葉たばこ化学成分に関する研究 (第2報)*

トルコ葉から 2-イソプロピルリンゴ酸の分離

福澄哲夫, 高原広康, 金子 肇, 大西 勲 (日本専売公社中央研究所)

昭和 40 年 1 月 18 日 受理

緒 言

前報⁽¹⁾においてトルコ葉中からフェノール酸類, D-β-フェニル乳酸およびアゼライン酸を分離確認したが, これらの成分は含量が比較的多く, たばこ香喫味にかなりの影響を及ぼしているものと考えられるが, 現在までに分離した成分を刻に添加して試喫してみても, トルコ葉特有の香喫味を呈するものは認められず, 酸性部についてさらに詳細な検討が必要であると考えられる。またトルコ葉中のフェノール酸類は組成も複雑で, そのためこれらフェノール酸以外の酸を純粹に分離するうえで, かなり障害となることが推測された。

そこで, フェノール酸類とその他の酸との分離について検討を加えたところ, 樹脂カラムを用いたクロマトグラフィーが有効であることがわかった。すなわち, Dowex-1-X8 のカラムに酸性部を注加し, 連続的に濃度を増しながら, いわゆる gradual elution system によって塩化アンモンの溶液で溶出すると, 香喫味に大きな影響を及ぼす成分は, フェノール酸より先に溶出していくことが認められた。

この研究では, 樹脂カラムによってフェノール酸を除いた酸性部について検索を行ない, 2-イソプロピルリンゴ酸を分離したので報告する。

実 験 の 部

1. 酸性部の分離

トルコ葉 (Izumir A, 1962 年産) 38 kg を 1.5 mm 幅に裁刻し, エーテルで 3 回抽出した。このエーテル抽出液から第 1 報と同様の方法⁽¹⁾で酸性部を分離し, 活性炭で処理して, 酸-I に相当する脱色酸 202 g を得た。

2. イオン交換樹脂によるフェノール酸の分離

Dowex-1-X8 (50~100 メッシュ) 300 ml を 2.5 cmφ × 80 cm のクロマト用ガラス管に填充し, 1 N HCl, 水および 1 N NaOH 溶液で順次洗浄し, さらに煮沸水で中性になるまで洗浄した。このカラムの下端に NaOH で中和した脱色酸 40 g を注加し, まず煮沸水でカラムを洗った。この操作により暗褐色色素が溶出した。色素が溶出し終ったとき, 0~2 M の塩化アンモン (pH 7.7) 溶液を連続的に濃度を高めながら流下させた。ときどき溶出液をとり, ジアゾ化した *p*-ニトロアニリンでフェノール性物質の検出を行なって, ジアゾ反応が陽性となる直前のものまで集めた。

塩化アンモン溶出液は硫酸酸性とし, 食塩飽和後, 酸をエーテル抽出した。同様の操作によって, 上記脱色酸 202 g から甘味臭のある黄褐色油状物 129 g を得た。

3. ケイ酸カラムによる分離

ケイ酸 39 g にアルカリ性メタノール 24 ml (1 N NaOH 7.5 ml をメタノール 1 l に溶解させたもの) を注ぎ, 冷却しながらよく混和したものをイソオクタンに懸濁し, 2.5 cmφ のクロマト用ガラス管に充填した。これと同一のカラム 30 本に上記フェノール酸を除いた酸を注加し, エーテル濃度を順次高めながら, イソオクタン・エーテル混液で展開した。40~60% エーテルを含むイソオクタンで溶出される物質を集め, カラムクロマトグラフィーを 2 回繰り返して, 甘味臭を有する油状物 4.5 g を得た。

4. メチルエステルとしての精製

ケイ酸カラムで精製した酸 4.5 g をジアゾメタンによりメチルエステルとし (収量 4.5 g), 減圧蒸留に付して b. p. 45~143°/5 mm で留出する留分 1.6 g を得た。この留分を, ケイ酸・セライト (2:1) を吸着剤とし, *n*-ヘキサン・エーテル混液を展開剤とするカラムクロマトグラフィーによって分離した。30~40% エーテルを含

* Studies on the Chemical Constituents of Tobacco Leaves. Part II. Isolation of 2-Isopropylmalic Acid from Turkish Tobacco. By Tetsuo FUKUZUMI, Hiroyasu TAKAHARA, Hajime KANEKO and Isao ONISHI (Central Research Institute, Japan Monopoly Corporation)

第1図 エステルのガスクロマトグラム

(— 分取前, 分取後)

カラム: 20% PEG-6000 (径 4mm, 長さ 3m), キャリアガス: He 50 ml/min, カラム温度: 170°

第2図 葉たばこ中より分離された試料 (a) および合成 2-イソプロピルリンゴ酸ジメチルエステル (b) の赤外線吸収スペクトル

むへキサンで溶出される部分を集めた。収量 700mg.

5. ガスクロマトグラフィーによる分離

カラムクロマトグラフィーによって分離したメチルエステルを、島津ガスクロマトグラフ GC-1B を用いて分析した結果を第1図に示す。このうち、斜線で示したピークに相当する成分を、内径 8mm, 長さ 1.5m のカラム (He, 200ml/min, その他の条件は第1図に同じ) を装置したガスクロマトグラフによって分取し、淡黄色油状物 82mg を得た。この物質の赤外線吸収スペクトル (日本分光-IRS) を第2図 (a) に示す。また、同物質の核磁気共鳴スペクトル (日本電子 JNM-3H 60) を第3図に示す。

元素分析値; $C_9H_{16}O_5$ としての

第3図 葉たばこ中より分離された試料のメチルエステルの核磁気共鳴スペクトル (溶剤: $CDCl_3$)

計算値: C 52.93, H 7.90%.

実験値: C 53.69, H 7.81%.

第 4 図 葉たばこ中より分離された試料 (a) および合成 2-イソプロピルリンゴ酸 (b) の赤外線吸収スペクトル (Nujol)

6. メチルエステルの加水分解

メチルエステルの一部を加水分解し, 得られた酸を冷却したところ固化した. これを酢酸エチルに溶解し, 石油エーテルを加えて放置すると m. p. 165.5~167.0° を示す無色板状結晶となった (文献値⁽³⁾ m. p. 166~167°). この結晶の赤外線吸収スペクトルを第 4 図 (a) に示す. また, この結晶の比旋光度をメタノール溶液中で測定したところ $[\alpha]_D^{20} -5.9^\circ$ ($c=3.66$) であった.

元素分析値; $C_7H_{12}O_5$ としての

計算値: C 47.72, H 6.88%.

実験値: C 48.09, H 6.72%.

7. 合成による 2-イソプロピルリンゴ酸の確認

トルコ葉中から分離された酸のメチルエステルには, 赤外線吸収スペクトルから OH 基の存在 (3600 cm^{-1}) が, また, 核磁気共鳴スペクトルからイソプロピル基 ($\tau=9.1$, 2つの doublet, 6H), メチレン基 ($\tau=7.2$ doublet, 2H) および 2 個のエステル結合をしたメチル基 ($\tau=6.2$, singlet, 3H および $\tau=6.33$, singlet, 3H) の存在が予想され, そのことからこのメチルエステルは 2-イソプロピルリンゴ酸ジメチルエステルであろうと推定された. メチルエステルをけん化して得られた酸の性質も, これと矛盾しなかった.

そこで, Yamashita の方法⁽²⁾によって, 2-イソプロピルリンゴ酸を合成した. m. p. 145.5~146.5° (文献値⁽³⁾ m. p. 146~147°). その一部はジアゾメタンで処理

してジメチルエステルとした. ジメチルエステルは室温では油状である. 両者の赤外線吸収スペクトルを, それぞれ第 4 図 (b) および第 2 図 (b) に示したが, いずれも葉たばこから分離された酸およびそのメチルエステルの同スペクトルとよく一致した.

ラセミ体の融点が光学活性のものより低い値を示すことは, すでに報告されている⁽³⁾が, この実験でも同様のことが認められた.

考 察

2-イソプロピルリンゴ酸は, 最近微生物を用いた研究によって, ロイシンの先駆物質であることが明らかにされている³⁻⁷⁾.

タバコ生葉中のアミノ酸については, 野口ら^(8,9)が黄色種を用いて詳細な研究を行なっているが, それによれば, ロイシンはアミノ酸のうち含量の著しく少ないものの一つで, 昼夜の変動も比較的少ないことが報告されている.

乾燥葉中にはロイシンの含まれている品種は少なく, 富田らの報告⁽¹⁰⁾によれば, 黄色種, パーレー種, オリエンツ葉など 8 品種のうち, 国内産パーレー種では比較的多いが, 他の 7 品種中には全く認められないか, 存在してもきわめて少ないことが明らかにされている.

このように, タバコ植物においては, ロイシンは他のアミノ酸に比較して含量が少ないものであるが, 微生物を用いた研究で, その先駆物質とみなされている 2-イ

ソプロビルリンゴ酸が, トルコ葉中から分離されたことは興味がある。

この酸を分離する過程で, メチルエステルとして精製する操作を行なっているのだから, 葉たばこ中においてこの酸のカルボキシル基が 2 つとも遊離の状態で存在していたか, あるいは一方のカルボキシル基がメチルエステルとして存在していたかについては, 今のところ論ずることができない。それについてはあらためて検討したい。

リンゴ酸の同族体は, たばこ香料として有効であるとされている⁽¹¹⁾が, 2-イソプロビルリンゴ酸はたばこに添加すると刺激を緩和し, 煙量感を増す作用を有していることが認められた。

要 約

(1) トルコ葉 (Izumir A) の酸性部について検討を加え, 2-イソプロビルリンゴ酸を分離確認した。

(2) この酸は, 微生物を用いた研究によって, ロイシンの先駆物質であることが明らかにされていることから, タバコ植物のロイシンとの関係について考察した。

終りにのぞみ, 終始御懇篤なる御指導を賜った北海道大学小幡弥太郎教授に深甚の謝意を表します。また, この研究の発表を許可された日本専売公社中央研究所長大

塚孝良氏, 元素分析をお願いした東大農化元素分析室, NMR を測定していただいた日本電子株式会社の方々, 実験に御協力を得ました中村絃子嬢に感謝いたします。

- (1) 福澄哲夫, 高原広康, 金子 肇, 大西 勲 : 本誌, **39**, 199 (1965).
- (2) M. Yamashita : *J. Org. Chem.*, **23**, 835 (1958).
- (3) C. Jungwirth, S. R. Gross, P. Margolin, H. E. Umbarger : *Biochem.*, **2**, 1 (1963).
- (4) M. Strassman, L. A. Locke, A. J. Thomas, S. Weinhouse : *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 1599 (1956).
- (5) J. Calvo, M. G. Kalyanpur, C. M. Stevens : *Biochem.*, **1**, 1157 (1962).
- (6) S. R. Gross, R. O. Burns, H. E. Umbarger : *ibid.*, **2**, 1046 (1963).
- (7) R. O. Burns, H. E. Umbarger, S. R. Gross : *ibid.*, **2**, 1053 (1963).
- (8) M. Noguchi, E. Tamaki : *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 197 (1962).
- (9) M. Noguchi, E. Tamaki : *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 689 (1962).
- (10) 富田英夫, 野口正雄, 玉置英之助 : 本誌, **38**, 314 (1964).
- (11) J. D. Fredrickson : US pat. 3,124,140(1964).