

水を媒体とした酢酸インドキシルからのインジルビンの選択的合成

中西勇義

【概要】

藍染に用いられる主たる色素はインジゴであるが、これ以外に色の複雑さなどに関わっているのが、インジルビンと呼ばれる物質である。このインジルビンは、藍の色素中に含まれるインジゴの異性体であり、様々な生理活性等が報告されている、大変興味深い物質である。しかし、インジゴが藍由来の染料の主要成分として様々な合成法が研究されてきたのに対し、インジルビンについてはあまり研究がなされていないのが現状であるといえる。そこで本研究では研究素材として、このインジルビンに着目した。

これらインジゴやインジルビンの実験室的な製法としては、酢酸インドキシルから作られる方法が一般的である。そして、酢酸インドキシルからインジルビンやインジゴが生成する際の条件などに関しては、既に詳細な報告が存在しており、酸や塩基が触媒として働くことや、イサチンをあらかじめ添加しておくことによりインジルビンが優先的に生成することなどが知られている。ここで、この反応において出発物質である酢酸インドキシルやイサチンは、水や高極性有機溶媒などに溶解する。しかしながら、従来の報告においてこの反応はメタノール等の高極性有機溶媒中で進行させられており、水を反応媒体とした報告は著者が調査した限り見当たらない。

そこで本研究では、酢酸インドキシルからのインジルビンの合成を水を媒体として行い、反応の条件や収率等における差異、反応機構等を明らかにすることを研究の目的とした。

その結果、水を媒体として反応を進行させた場合では、強酸性下で最も効率的に反応が進行することが判明した。また、インジルビン以外の生成物の量が従来と比較して大幅に減少することや、生成したインジルビンを濾過で容易に単離可能であることなど、インジルビンのみを選択的に高収率で合成できることも分かった。また、イサチン誘導体を原料に同様の手法でインジルビン誘導体を合成し、収率の変化などを測定した結果、置換基の電気的特性よりも立体障害の方が、反応に大きな影響を与えることが分かった。

The main chemical compound in indigo dye is indigo, but the other compound that is involved in color complexity is indirubin. This indirubin is isomer of indigo. In addition, it is a very interesting substance for which some physiological activities are reported. However, while indigo has been studied as the main compound of indigo-derived dyes in various synthesis methods, indirubin has not been studied much. Therefore, in this research, we focused on this indirubin as a research material. There are detailed previous studies on the conditions under which indirubin and indigo are produced from indoxyl acetate. Specifically, it is known that acids and bases act as catalysts, and that indirubin is preferentially produced by the addition of isatin.

Indoxyl acetate and isatin are soluble in water and highly polar organic solvents. However, in conventional studies, this reaction has been carried out in a highly polar organic solvent such as methanol, and no reports have been found using water as a medium. So, I researched about difference

from synthesizing indirubin from indoxyl acetate in water as a medium. As a results, we confirm four important points. First, indirubin can be synthesized with water as a medium. Second, if we use water synthesis indirubin, some by-products are little. Third, it is easy to collect created indirubin by filtering. Forth, the effect of substituents on the reaction is greater steric hindrance due to than electrical properties.

【研究動機・目的】

この研究を行うきっかけとして、前述のとおり、酢酸インドキシルからインジゴやインジルビンを合成する際には、これらの物質が水溶性を持つにも関わらず有機溶媒中での合成が主流であり、水を媒体としての合成に関する報告が行われていないことがある。そこで、酢酸インドキシルからのインジルビンの合成を水を媒体として行い、反応の条件や収率等における差異、反応機構等を明らかにすることで、インジルビンの合成法の研究に新しい知見がもたらされる可能性があると考えた。

【実験】

実験は5つの過程に分けて研究を行なった。

- 1 試験管スケールで定性実験を行い、反応の進行の有無や効率についておおよその検討を付ける。

仮説 インジルビンの合成は水を媒体としても進行し、また水を媒体としたことで生成したインジルビンの単離が非常に容易になると考えた。なぜなら、インジルビンは酢酸インドキシルなどの原料と違い、水に不溶性であるため、生成した後すぐに溶解しきれなくなり沈殿し、濾過によって回収が可能であると考えられるためである。これは使用した溶媒がインジルビンを溶解するために単離が難しかった従来の方法と比べて大きな利点と言える。

方法 酢酸インドキシル $50 \mu\text{mol}$ とイサチン $50 \mu\text{mol}$ を強酸から強塩基までの pH=1, 2, 5, 7, 9, 11, 12 の緩衝液 4.0mL に加え、 80°C で 30 分間湯浴し、クロロホルムで液-液抽出した後、無水

硫酸マグネシウムで脱水し、シリカゲル薄層クロマトグラフィー（以下 TLC と略記）で分析を行った。

結果 pH=1・2・12 の3種類で反応が良く進行し、インジルビンが生成した。pH=5・7・9 ではほとんど反応が進行しなかった。また pH=1・2・12 ではインジルビンと思われる沈殿の生成が確認できた。なお、pH=11 に関しては処理が十分でなかったため考察からは除外している。

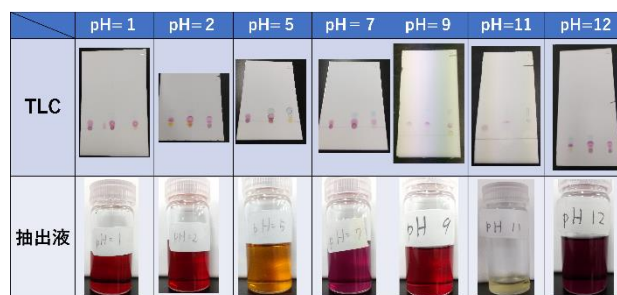


Fig. 2 各 pH での TLC と抽出液の写真考察

| | pH=1 | pH=2 | pH=5 | pH=7 | pH=9 | pH=12 |
|--------|----------|--------|------|--------|------|-------|
| インジルビン | 濃く出た | 濃く出た | 薄く出た | わずかに出た | 薄く出た | 濃た |
| 原料 | 薄く出た | わずかに出た | 濃く出た | 濃く出た | 濃く出た | 薄く出た |
| インジゴ? | 確認できなかった | わずかに出た | 濃く出た | 濃く出た | 濃く出た | 薄く出た |

Fig. 3 定性実験の結果

定性実験で得られた情報を Fig. 3 にまとめた。この結果から、強酸性、強塩基性下では反応が効率よく進行し、反対に弱酸性、中性、弱塩基性下では反応効率が悪く、副反応が進行しやすいと考えた。また、反応中にインジルビンと考えられる沈殿が確認できたことから、生成したインジルビンを濾過によって回収可能だと考えた。

2 展開溶媒を改良する。

定性実験の際に、TLC の展開溶媒にクロロホルムを用いると、スポットの間隔が狭く見づらいうことに気づき、展開溶媒の改良を行った。様々な組み合わせで試した結果、クロロホルムとアセトンを体積比 9 : 1 の割合で混合したもの（以下展開溶媒 2 と略記）が最も適当であったため、今後の実験ではこの展開溶媒を使用することにした (Fig. 4)。

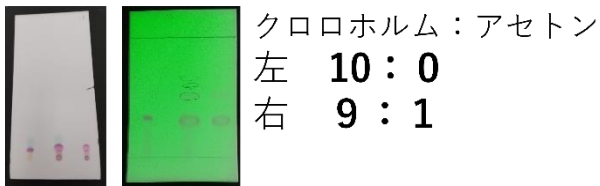


Fig. 4 展開溶媒の比較

3 定性実験の結果をもとに合成をスケールアップし、詳細な収率や選択性などを調べる。

方法 酢酸インドキシル 250 μ mol とイサチン 250 μ mol を、pH=1, 2, 11, 12 の緩衝液 8mL に加え、空気冷却管を取り付け 80°C で 60 分間湯浴した。その後高温のうちに吸引濾過をして沈殿物を回収し、沈殿の一部をアセトンに溶解させ展開溶媒 2 を用い TLC で分析した。

結果 各 pH での生成物の重量、収率、TLC の写真を Fig. 5 に示した。

| pH | pH=1 | pH=2 | pH=11 | pH=12 |
|--------|---------|---------|---------|---------|
| 生成物の重量 | 53.96mg | 20.11mg | 25.93mg | 31.44mg |
| 収率 | 82% | 31% | 40% | 48% |
| TLC | | | | |

Fig. 5 定量実験の結果

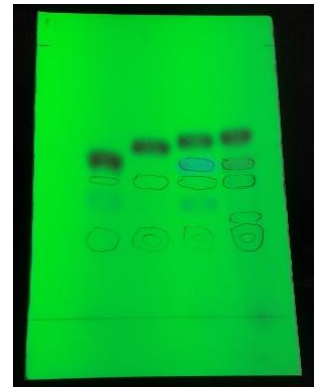
pH = 1 の強酸性条件下での反応が最も高収率であり、さらに不純物が見られなかった。pH=2 では pH=1 よりも低収率で、不純物が一種類見られた。また pH=11, 12 での反応ではさらに低収率であり、副生成物が数種類生成していた。

考察 酸性条件下で進行する反応の方が収率が高く、反応の選択性が高いと考えた。また塩基性条件下での反応は収率が比較的低く、副反応が進行しやすいと考えた。また、濾過によって沈殿したインジルビンを問題なく回収できることもわかった。

4 N 置換イサチンを用いて定性実験と同様の手法で N 置換インジルビンの合成を行い、置換基による収率の変化を測定した。使用したイサチン誘導体は、N-メチルイサチン・N-アリルイサチン・N-フェニルイサチン・N-ベンジルイサチンの 4 種類である。

方法 酢酸インドキシル 250 μ mol と各イサチン誘導体 250 μ mol を、pH=1 の緩衝液 8mL に加えジムロート冷却器を取り付け、80°C で 60 分間湯浴した。その後、高温のうちに吸引濾過をして沈殿物を回収し、沈殿の一部をアセトンに溶解させ展開溶媒 2 を用いて TLC で分析した。

結果 合成したサンプルに対する TLC の結果を Fig. 6 に示した。スポットは左から N-メチルイサチン・N-アリルイサチン・N-フェニルイサチン・N-ベンジルイサチンの順である。



これより、全体として Fig. 6 各誘導体の TLC 副生成物が無置換インジルビンと比較して多く生成していることや、その中でもフェニル基・ベンジル基が置換したものは副生成物が多く生成していることが分かった。また、生成物から求めた収率や置換基の性質などを Fig. 7 にまとめた。これより、N-メチルイサチン・N-アリルイサチンは収率が 60% 台と比較的低く、N-フェニルイサチン・N-ベンジルイサチンは収率が 90% 台と高いこ

とがわかった。

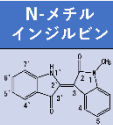
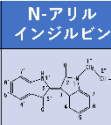
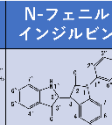
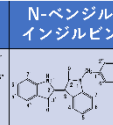
| | N-メチル インジルピン | N-アリル インジルピン | N-フェニル インジルピン | N-ベンジル インジルピン |
|--------|---|---|---|---|
| 構造 |  |  |  |  |
| 生成物の重量 | 43.8mg | 47.2mg | 80.0mg | 81.6mg |
| 収率 | 63.47% | 62.51% | 94.67% | 92.05% |
| 電気的性質 | 電子供与性 | 電子供与性 | 電子供与性 | 電子供与性 |
| 立体障害 | 小 | 中 | 大 | 大 |

Fig. 7 誘導体合成のまとめ

考察 今回実験した置換基はいずれも電子供与基であったにも関わらず置換基によって収率にはっきりと差が出たことから、置換基の電気的な特性が反応に及ぼす影響は小さく、立体障害が反応に大きく関わっていると考えた。

【結論】

以上より、以下の内容を結論として導いた。

- ・酢酸インドキシルから水を媒体としてインジルピンを合成することは可能であり、酸や塩基が触媒として働く。
- ・その中でも強酸性条件下での反応が最も高収率であり、インジルピンのみを選択的に合成することが可能である。
- ・生成したインジルピンを濾過によって容易に単離できる。
- ・置換基が付いた原料を用いてのインジルピン誘導体の合成も問題なく行える。
- ・置換基が反応に及ぼす影響は、電気的特性よりも立体障害による影響の方が大きい。

【今後の展望】

今後は、以下の内容について研究を続けていきたい。

- ・インジゴが生成する反応の反応機構の推定
文献によってラジカル反応であるとするものやイオン反応であるとするものなど違いがあり、詳細がいまだに判明していない。
- ・¹H-NMRによる生成物の同定
生成物がインジルピンであることを確定させる。
- ・原料の置換基が反応に与える詳細な影響
通常立体障害では、かさ高い置換基の方が反応の進行を阻害しやすいにも関わらず、今回の実験で

は、ともにかさ高いN-フェニルインジルピンとN-ベンジルインジルピンの方が他の置換基よりも高収率であったので、これについて原因を調査する。

【特別謝辞】

本研究を行うにあたって、実験にご協力していただいた鳴門教育大学の早藤幸隆教授に多大なるご協力を賜りましたことを、ここに感謝いたします。本当にありがとうございました。

【参考文献】

牛田智, 谷上由香, 太田真祈(1998). 「藍の生葉染めの過程におけるインジルピン生成の条件」『日本家政学会誌』 Vol. 49 No. 4 389~395