

その結果、5.80 ppm の水素原子は 95.4 ppm の炭素にそして、6.34 ppm の水素は 100.8 ppm の炭素に相関がみられた。続いて、 ^1H - ^{13}C HMBC の測定を行ったところ、5.80 ppm の水素からは 101.3 ppm, 165.2 ppm, および 169.2 ppm の炭素へ相関が観測された (Figure 34)。また 6.34 ppm の水素からは 96.0 ppm, 102.8 ppm, 161.0 ppm および 168.6 ppm への相関が観測された (Figure 34)。これらの結果から、もし 5.80 ppm および 6.34 ppm のピークが色素 5 に相当するピークだとしたら、2つの水素から同じ炭素への相関がないことを示している。これは左右対称で2つの水素シグナルから同じ炭素への相関が観測された cepaic acid のパターンと違い、xanthylum 環の左右それぞれの環に、環境の違う水素原子が1つずつ存在し、それぞれの環の炭素シグナルへ相関が観測されていることを示すものであった (Figure 35)。3は cepaic acid の類縁体であることが強く示唆されているが、もしそうであるとしたら、cepaic acid の左右の環にそれぞれ官能基が1つずつ置換していることが推定される。しかしながら、このように夾雑ピークがまだ多く観測され、また 800 MHz という高分解能を持つ NMR 機器を用いても満足な ^{13}C NMR スペクトルが観測されない状態では、完全な構造決定には至らない。そこで再度 NMR 測定を行うために、出来るだけ大量にかつ高純度な 3、もしくは 3 のメチルエステル体 (5) を調整することを目的に、タマネギ外皮からの色素の精製方法を検討したので次節で述べる。

第 4 節 色素成分 3 のメチルエステル体

(5) の単離方法の検討

第 1 節で述べた 3 の分取方法には数々の困難な点があった。まず、酸性条件下で *n*-ブタノールとの二層分配を行うと、色素の殆どをブタノール層へ抽出することが可能であるが、今回の目的のように色素ピーク 3 だけを精製したい場合、結果的に 3 以外の色素は夾雑物と同じである。前章でも述べたが、タマネギ外皮の色素は酸性化でプロトネーションされている状態では有機溶媒に可溶ではあるが、水溶液への溶解性は下がる。そのため、酸性化でブタノールに抽出された色素をメタノールに溶解させて TFA 入りの水・アセトニトリル系の溶媒での分取作業において、濃度の高いサンプルを HPLC の移動層に注入されると析出してしまうことが多く、大量分取する際の問題点となっていた。そのため、分取作業に非常に時間がかかってしまった。また色素の抽出に用いられた *n*-ブタノールは粘性の高い溶媒であるため減圧濃縮に時間を要し、大量のブタノールを使用する方法は非効率的であった。また高分子の色素と低分子の色素を分けるために行われた G-25 によるゲルろ過作業はゲルの膨潤および溶出等で時間がかかり、また大量の試料を負荷できない問題点もあった。さらに 3 は酸性条件下においてアルコールの存在とともに濃縮すると容易にエステル化することも判明し、また酸性水溶液中では cepaic acid へと分解してしまうことも示された。

これらの結果を反映させて、3 および将来的には他の色素成分をも効率よく分取する方法を検討した。

実験方法

タマネギ外皮 45g にミルサーを用いてパウダー状にし、水 2L を加えてアルミホイルで蓋をしたビーカー中で、マグネティックスターラーを用いて 16 時間攪拌した。タマネギ外皮はそのままブフナー漏斗を用いて吸引ろ過除去された。得られた抽出液を分液ロートに入れて、*n*-ブタノールを加えて二層分配を行った。これを二度繰り返した後、色素が存在する水相を回収した。この水相に 6N HCl (3 mL) を加えて酸性条件にした後、酢酸エチルを加えて分液ロートで二層分配を行った。赤色系の色素の集まった酢酸エチル相を回収した。酢酸エチル画分を減圧乾固後、塩酸メタノール 5mL に溶解して、50°C で 40 min 加熱した。色素 3 がメチルエステル体 (5) へとエステル化されたかを、逆相カラムを用いた LC/ESI-MS 分析を用いて確認した。LC/MS の分析条件は第一節に同じであった。確認された 5 について HPLC による分取を行った。分取条件として初めに a の条件で分取し、次にカラムを変えて b の条件で最終精製を行った。

HPLC 条件：

a)

カラム：Cosmosil 5C₁₈-MS-II (Ø20×250 mm、ナカライテスク社製)

移動層：A)0.05%TFA 入り水

B)0.1%TFA 入りアセトニトリル

流量：7.0mL/min

グラジエント条件：B 移動層を 10 分間で 40%から 60%まで上昇させた後に、60%から 70%まで、2 分間で上昇させた。

検出：PDA(500nm)

分取：手動

b)

カラム：Cosmosil Cholester (Ø10×250 mm、ナカライテスク社製)

移動層：A)0.05%TFA 入り水

B)0.05%TFA 入りアセトニトリル

流量：2.0mL/min

グラジエント条件：B 移動層を 10 分間で 60%から 80%まで上昇させた。

検出：PDA(500nm)

分取：手動

分取する際には「二層フラスコ法」を用いた。これは分取時に、あらかじめフラスコに有機層（酢酸エチル）と水層の二層を用意し、目標の色素画分をこのフラスコで受け、色素を迅速に酢酸エチル層へと抽出する方法である。分取完了後、色素を含んだ二層は分液ロートへ移され、酢酸エチル層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧乾固された。

結果および考察

これまでの実験で判明した問題点をふまえて出来るだけ効率のよい色素成分 3 もしくは 5 を単離する分離スキームを検討した。これまでは抽出液を酸性化し、プロトネーションされた色素全部をブタノールで抽出していたが、目標の 3 以外の色素は夾雑物に過ぎないと判断し、また色素ピーク 3 が比較的極性であることから、粗抽出液から酢酸エチルによって抽出されるであろうと判断した。まず、中性の夾雑物を取り除くために中性条件下でブタノールを用いて二層分配した後に、色素の存在する水層を塩酸で酸性条件にし、ブタノールではなく

酢酸エチルで抽出を行った。このときの酢酸エチル層はやや赤色を呈しており、水層は黄色を呈していた。酢酸エチル画分を濃縮後、LC/MS で分析した結果、2および3が含まれていることが確認された。また水層には *cepaic acid* を含めたより親水性の高い色素が存在していることも確認された。酢酸エチルの利用した二層分配はより効果的であると判断され本実験では色素ピーク3の精製のみが目的であったため、水層の色素はこの段階で放棄した。た。

酢酸エチル画分を濃縮した結果、3だけでなく3のブチルエステルと考えられるピーク4も観測された。これは夾雑物を取り除くためにブタノールと二層分配した際に水層へブタノールが溶け、その後酢酸エチルと二層分配した際にそのブタノールが酢酸エチル層へと移行し、濃縮過程で3がブチルエステル体(4)へとエステル化したものと考えられた。このようにブタノールによる抽出液の洗浄を行う限り、ブチルエステル体(4)の形成は避けられないと考えられたので、第2節と同様に塩酸メタノールを用いてのエステル交換反応を行い、3および4をメチルエステル体(5)へと変換した。

色素成分5を分取HPLCによって精製した。この際、移動層にはこれまでどおりTFAを含む水・アセトニトリル溶液を用いたが、分取した5の画分を酸性の移動層中に保持していると、メチルエステルが加水分解されてカルボン酸へと戻るだけでなく、さらに *cepaic acid* にまで分解されてしまうことが第2節において観察された。これを避けるために、水・酢酸エチルの二層に分かれたフラスコで分取する「二層フラスコ法」

を考案した。これは、あらかじめ三角フラスコに酢酸エチルと少量の水を加えて二層の状態を用意しておき、そのフラスコ内に色素画分を分取するというものである。分取された色素ピーク5は、酸性の水溶液中から迅速に酢酸エチル相へと移行するため、酸性水溶液中に放置され加水分解される危険性が減ることが予想された。分取には汎用性の高いC₁₈カラムが用いられたが(Figure 34)、色素成分5の近辺の夾雑ピークを取り除くことが困難だったため、上記のカラムで粗精製後に、Cosmosil cholester という疑似コレステロール基が胆体に結合した逆相カラムを用いて最終精製を行った(Figure 35)。

このように構築された5の単離スキームであったが、残念ながら本研究終了時までには十分な量の5を単離しNMR分析へ供することは時間の関係上達成することができなかった。しかしながら、本方法の確立によって、タマネギ外皮の抽出物から効率よく3および3のエステル体(5)を分取する道筋が示された。本方法は今後3の構造決定研究には欠かせない手法となるに違いない。

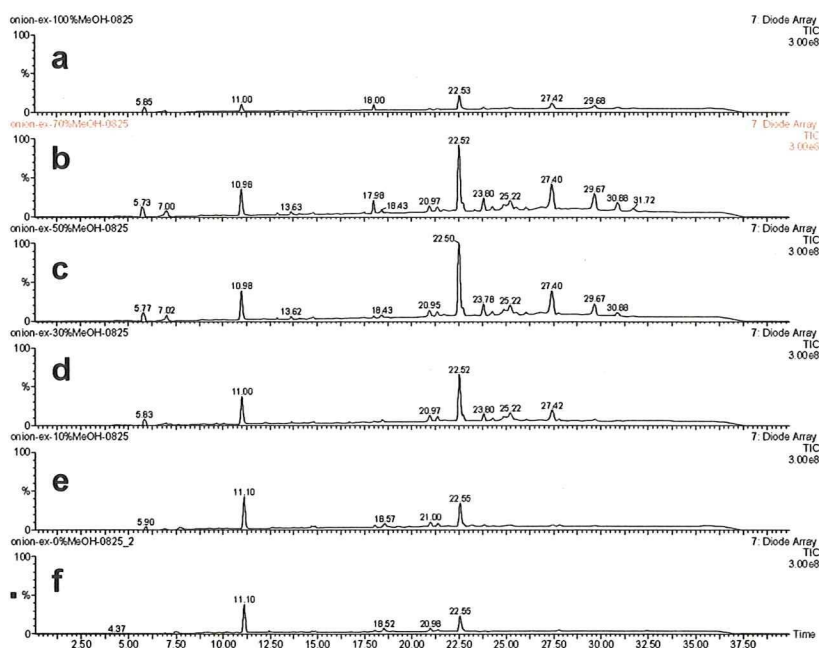


Figure 1 : 100% (a), 70% (b), 50% (c), 30% (d), 10% (e), 0% (f) メタノール水溶液によるタマネギ外皮抽出液の HPLC クロマトグラム (TIC)

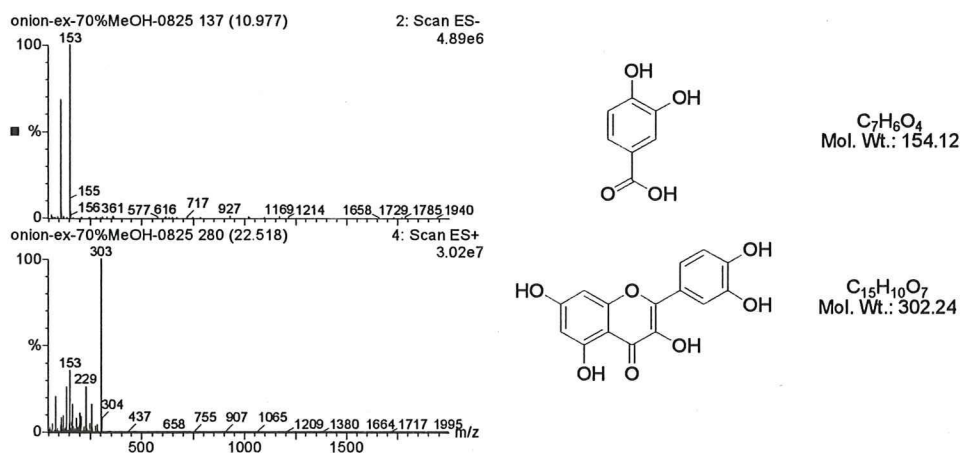


Figure 2 : Figure 1 で示された主要ピークの ESI-MS スペクトル。上段 (陰イオンモード) : 保持時間 11 分のピーク (DHBA)、下段 (陽イオンモード) : 保持時間 22.5 分のピーク (quercetin,)

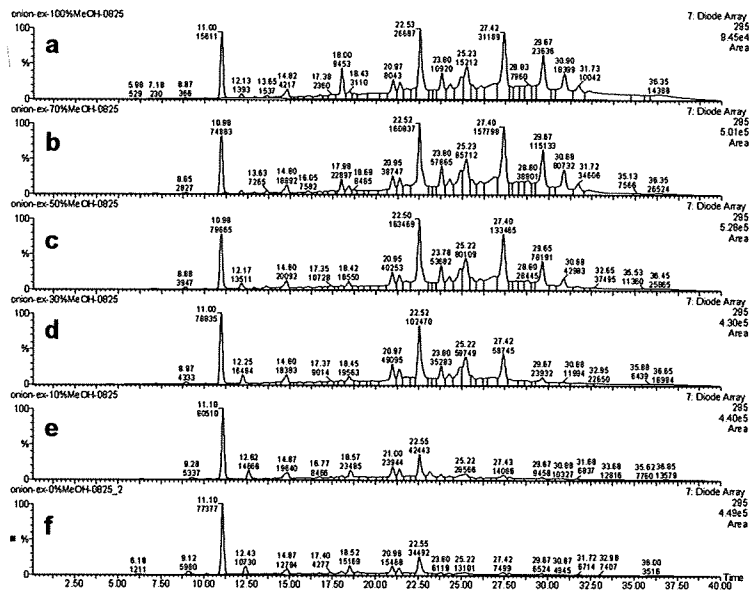


Figure 3 : 100% (a), 70% (b), 50% (c), 30% (d), 10% (e), 0% (f) メタノール水溶液によるタマネギ外皮抽出液中の DHBA (11.00 min) の検出 (295 nm)

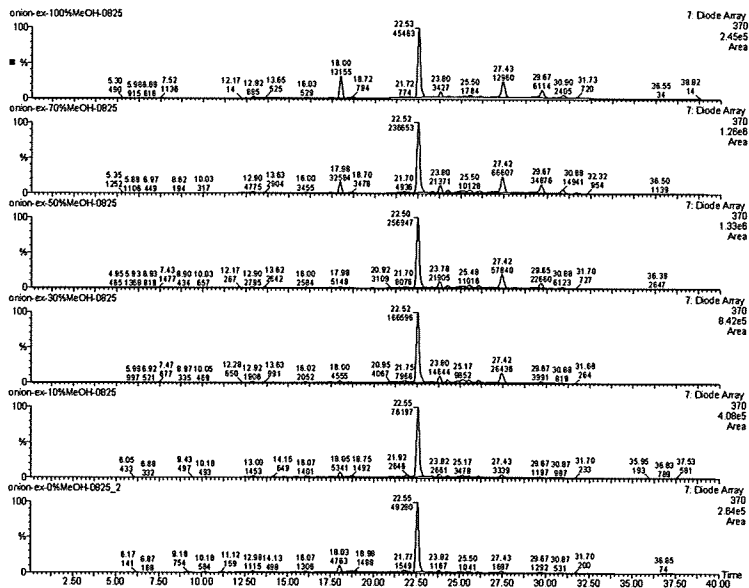


Figure 4 : 100% (a), 70% (b), 50% (c), 30% (d), 10% (e), 0% (f) メタノール水溶液によるタマネギ外皮抽出液中の quercetin (22.52 min) の検出 (370 nm)

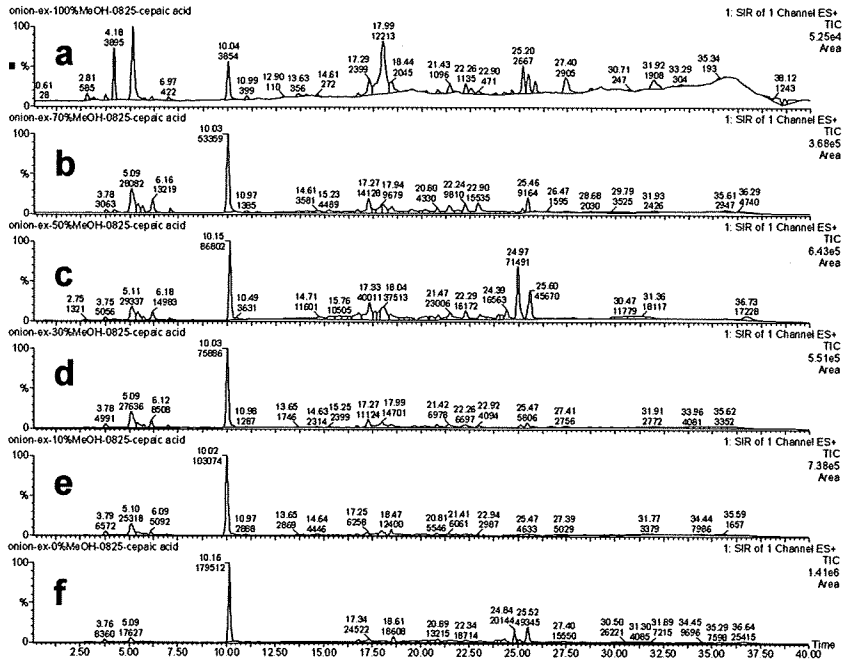


Figure 5: 100% (a), 70% (b), 50% (c), 30% (d), 10% (e), 0% (f) メタノール水溶液によるタマネギ外皮抽出液中の cepaic acid (10.04 min) の検出 (SIR 法、正イオンモード、標的イオン: m/z 289)

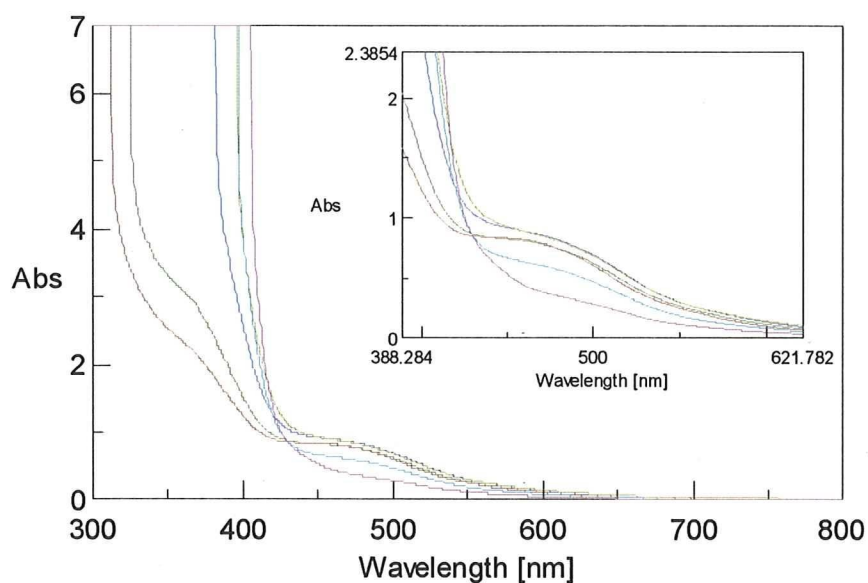


Figure 6: 各メタノール濃度によるタマネギ外皮抽出液の紫外可視光吸収スペクトル
(0% : 茶色、10% : 緑色、30% : 青色、50% : 黄色、70% : 青緑色、100% : 紫色)

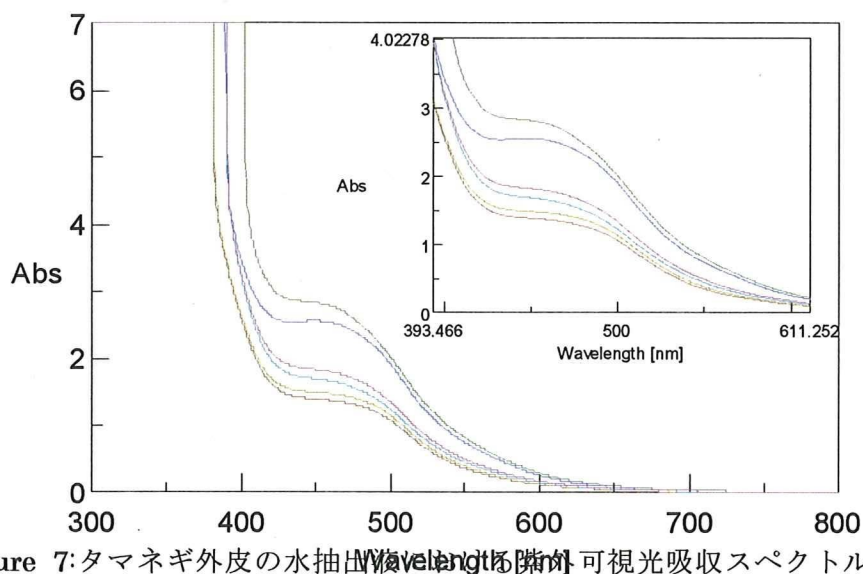


Figure 7: タマネギ外皮の水抽出液の紫外可視光吸収スペクトルの経時変化 (30 min : 茶色、1 h : 黄色、2 h : 青緑色、3 h : 紫色、12 h : 青色、16 h : 緑色)

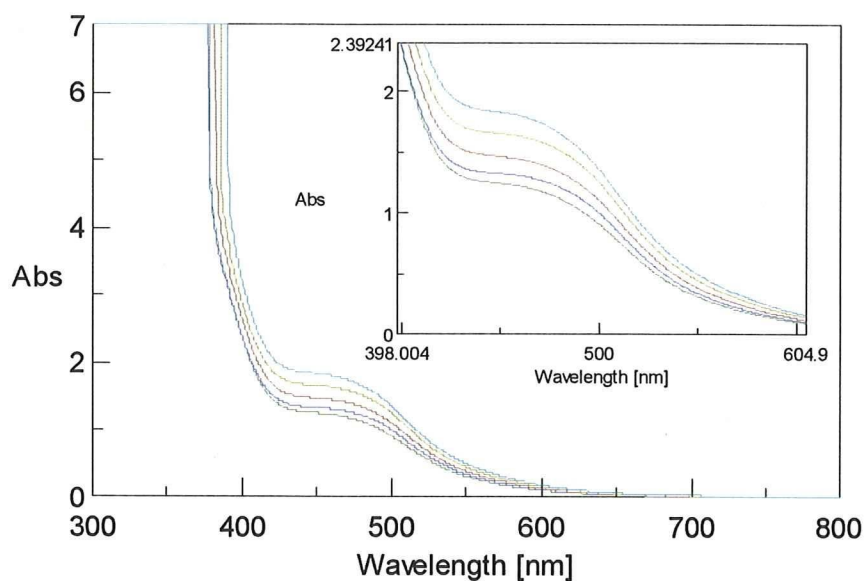


Figure 8 : タマネギ外皮の水抽出液における紫外可視光吸収スペクトルの経時変化 (15 min : 緑色、30 min : 青色、1 h : 茶色、2 h : 黄色、3 h : 青緑色)

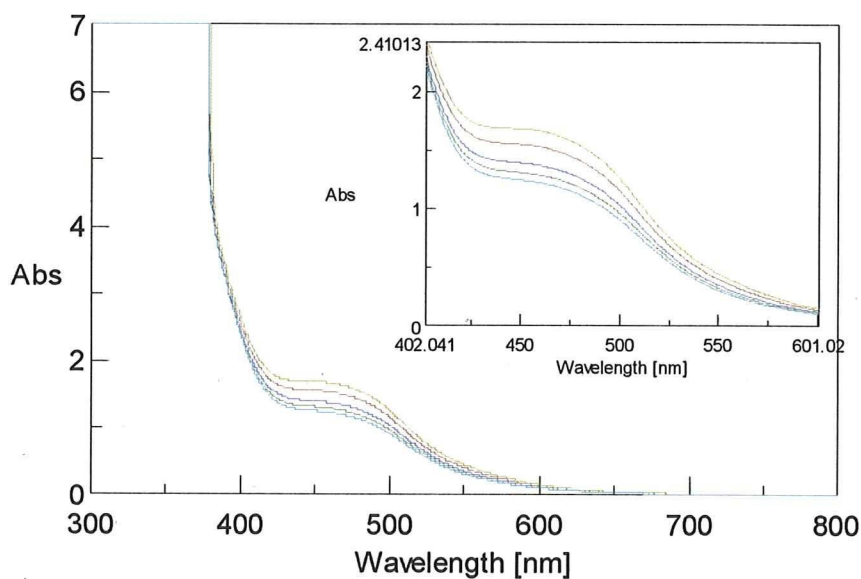


Figure 9 : 抽出開始から 15 min 後に回収したタマネギ外皮の水抽出液における紫外可視光吸収スペクトルの経時変化 (15 min : 青緑色、30 min : 緑色、1 h : 青色、2 h : 茶色、3 h : 黄色)

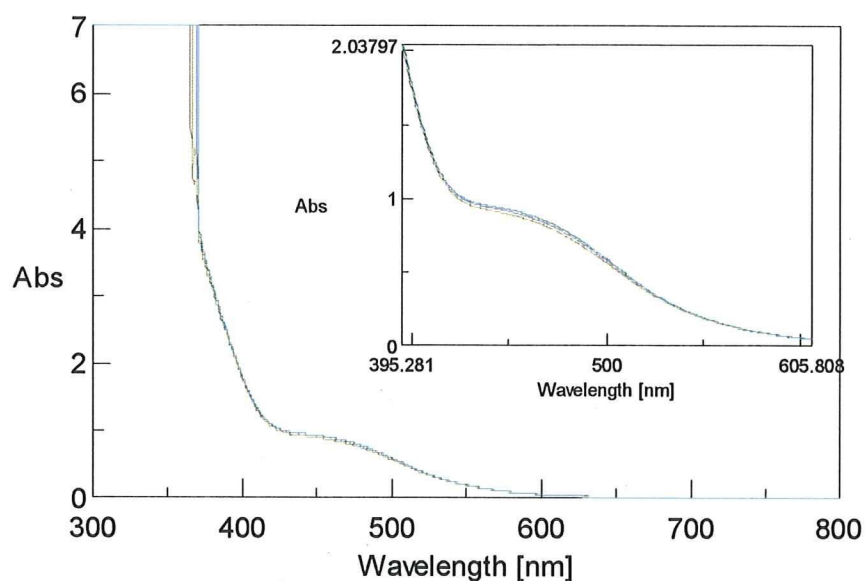


Figure 10 : 10 mM アスコルビン酸溶液による抽出実験において 15 min 後に回収した試料の紫外可視光吸収スペクトルの経時変化 (15 min : 青緑色、30 min : 緑色、1 h : 青色、2 h : 茶色、3 h : 黄色)

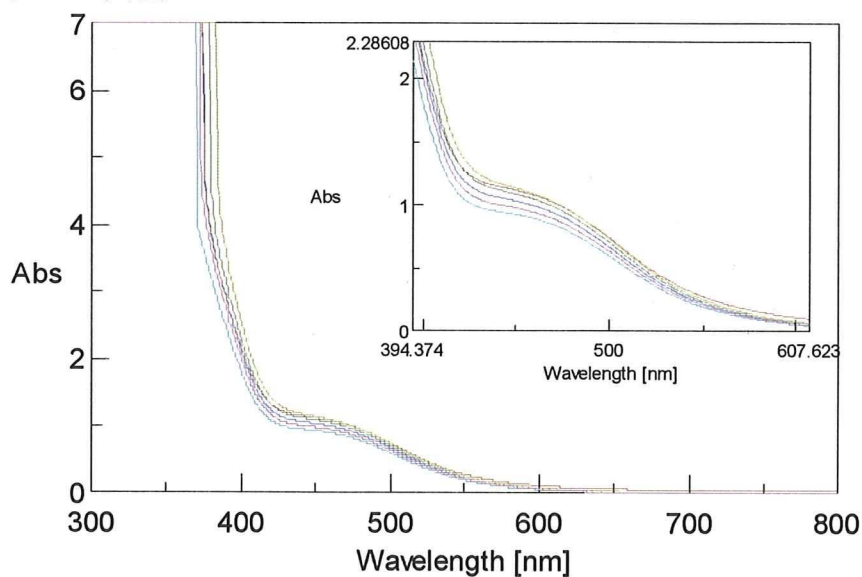


Figure 11 : 10 mM アスコルビン酸溶液による抽出実験における抽出液の紫外可視光吸収スペクトルの経時変化 (15 min : 青緑色、30 min : 緑色、1 h : 青色、2 h : 茶色、3 h : 黄色、4 h :)

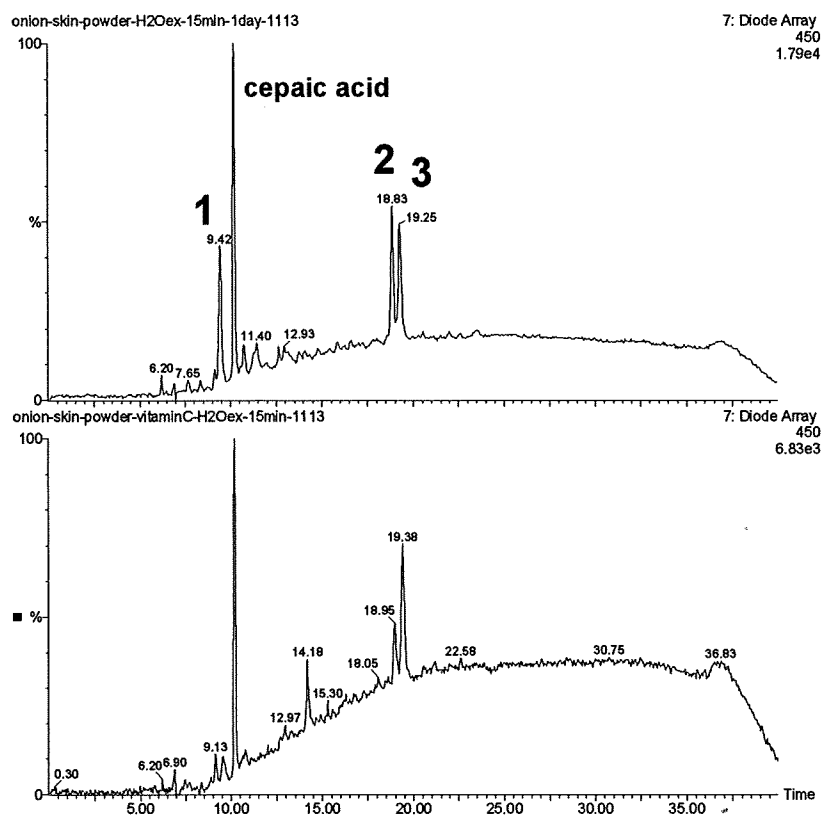


Figure 12 : 15 min 後に回収したタマネギ外皮抽出液の逆相 HPLC クロマトグラム、抽出液= (上) : 水、(下) : 10 mM アスコルビン酸溶液

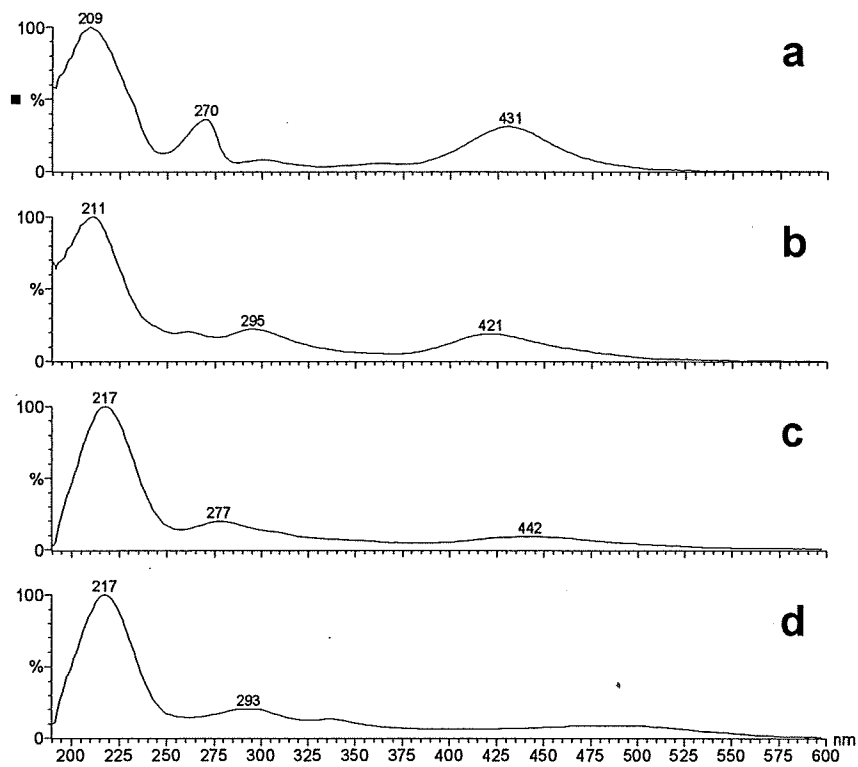


Figure 13 : タマネギ外皮抽出液中に観察された cepaic acid (a) および色素ピーク 1 (b), 2 (c), 3 (d)の紫外可視光吸収スペクトル(PDA で測定)

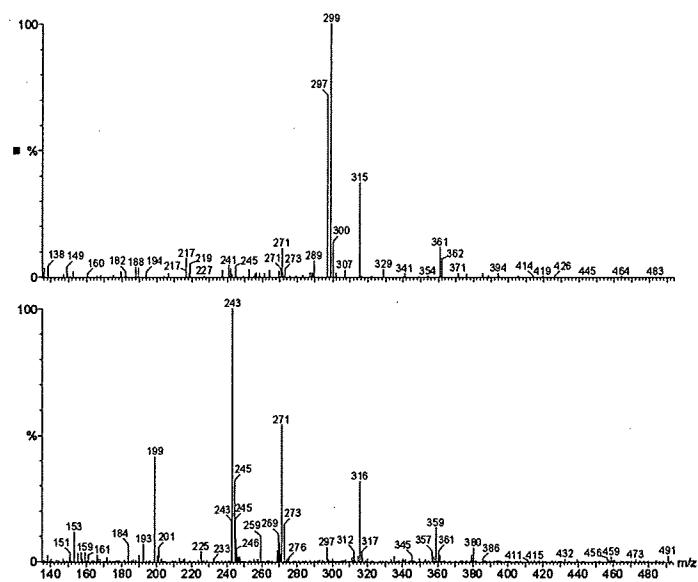


Figure 14 : ピーク 1 の ESI-MS スペクトル (上段 : 正イオンモード、下段 : 負イオンモード)

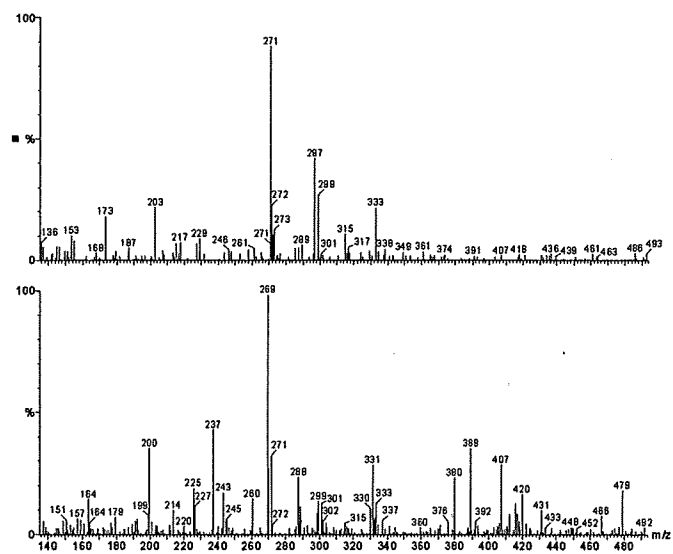


Figure 15 : ピーク 2 の ESI-MS スペクトル (上段 : 正イオンモード、下段 : 負イオンモード)

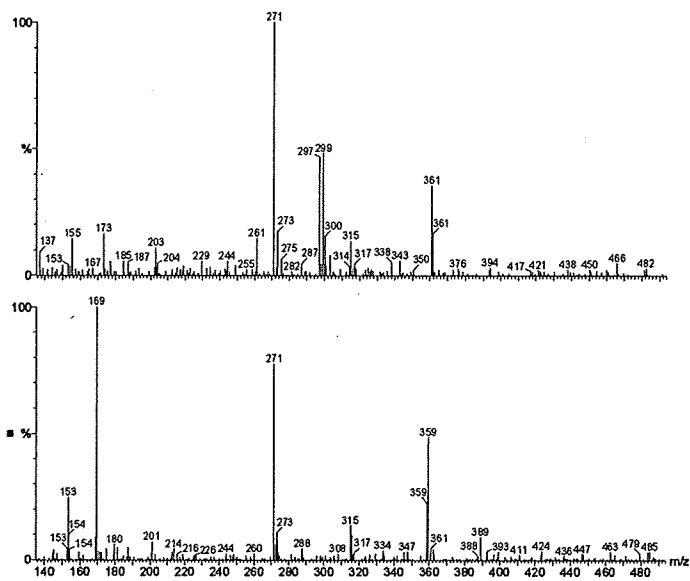


Figure 16: ピーク 3 の ESI-MS スペクトル (上段 : 正イオンモード、下段 : 負イオンモード)

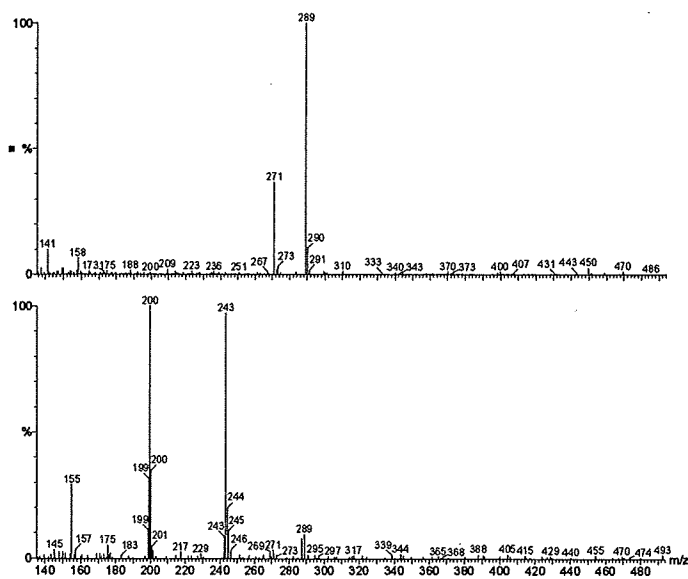


Figure 17 : cepaic acid の ESI-MS スペクトル (上段 : 正イオンモード、下段 : 負イオンモード)

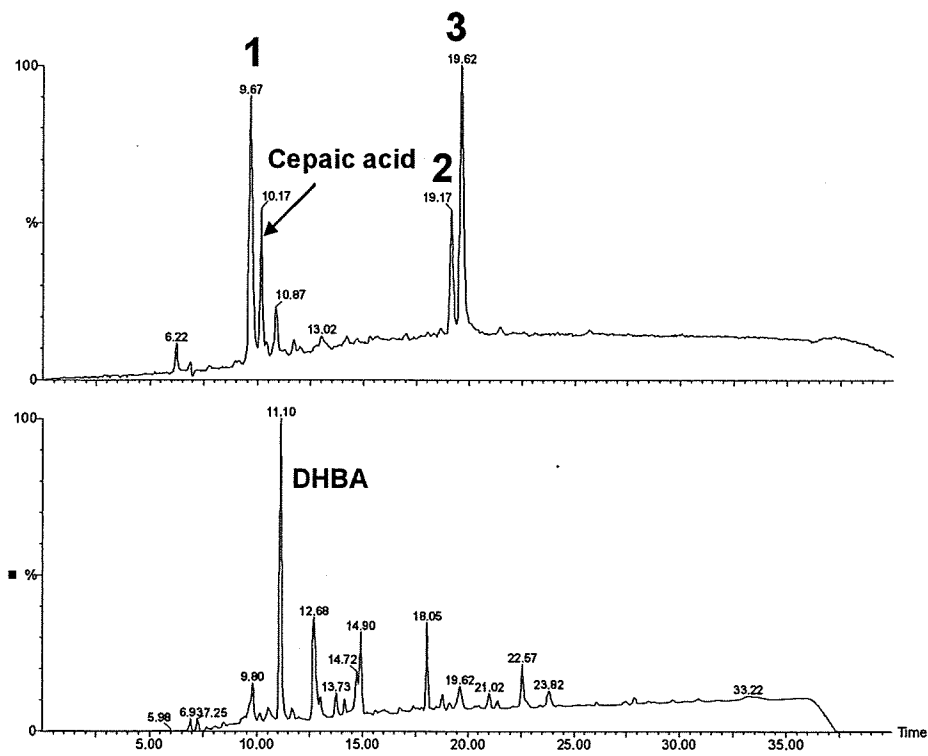


Figure 18: 研究室内で乾燥したタマネギ外皮抽出液の逆相 HPLC クロマトグラム (上段 : 450 nm、下段 : TIC)



Figure 19 : タマネギ外皮の抽出の様子。



Figure 20: : 酸性条件下でタマネギ外皮抽出液から色素を *n*-ブタノール層へ抽出した様子。

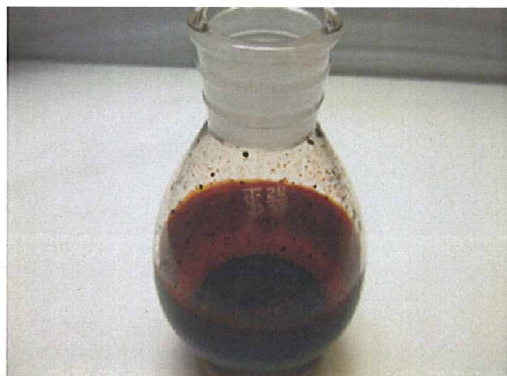


Figure 21 : 減圧乾固された Figure 19 のブタノール画分。

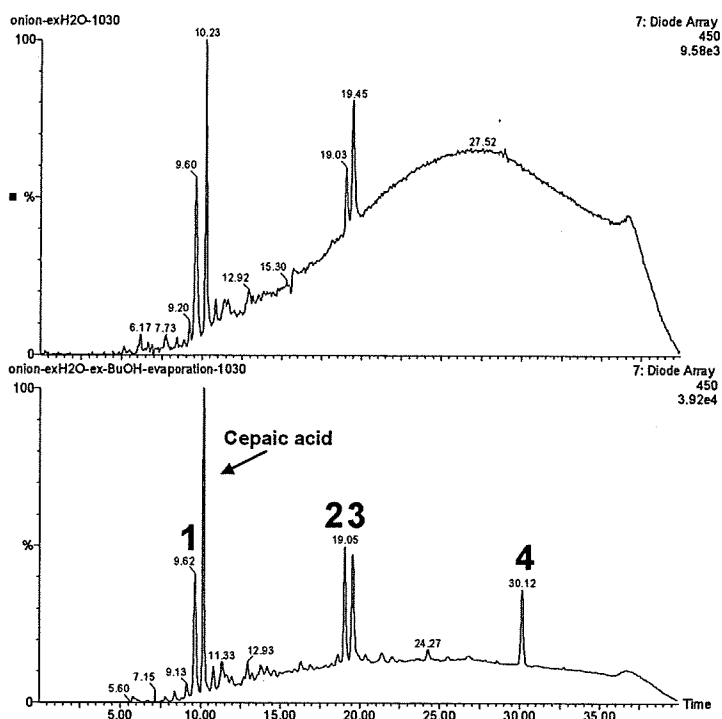


Figure 22 : (上) タマネギ外皮の粗抽出液のHPLCクロマトグラム、(下) Figure 21で示したブタノール画分のHPLCクロマトグラム (検出 450 nm)

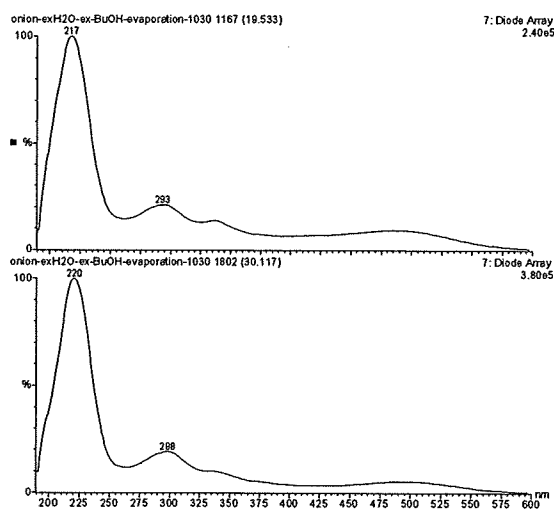


Figure 23 : ピーク 3 (上) および 4 (下) の紫外可視吸収スペクトル

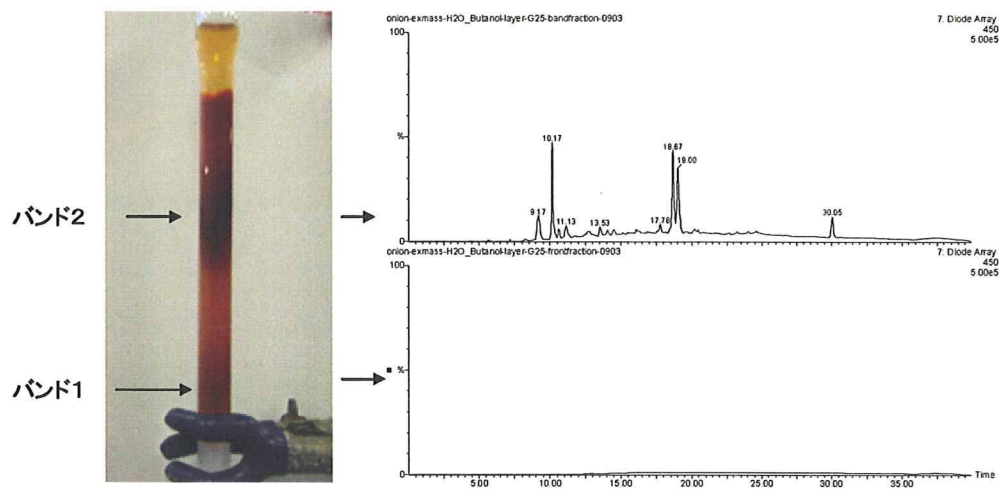


Figure 24 : Sephadex G-25 を用いたゲルろ過の様子 (左)。観察されたバンド 2 (上) およびバンド 1 (下) の HPLC クロマトグラム (検出 450 nm)

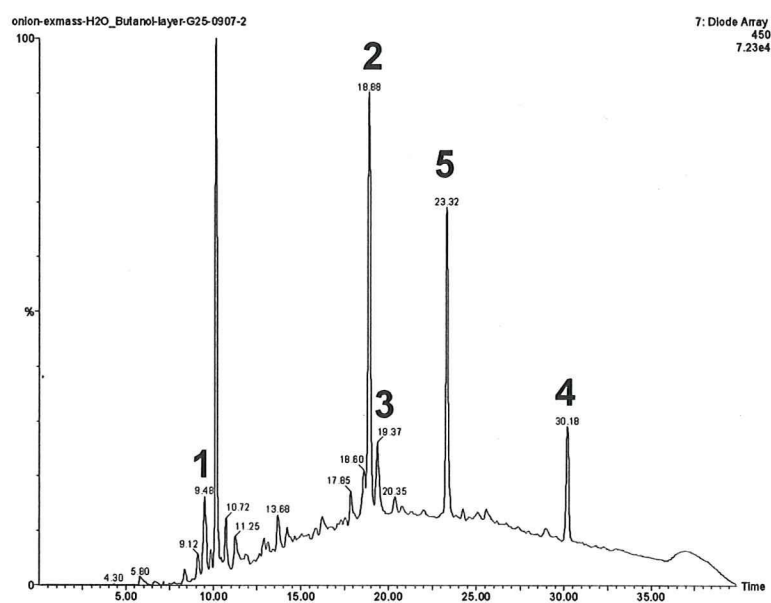


Figure 25 : Figure 24 のバンド 2 をブタノールで抽出し減圧乾固した画分の逆相 HPLC クロマトグラム (検出 450 nm)

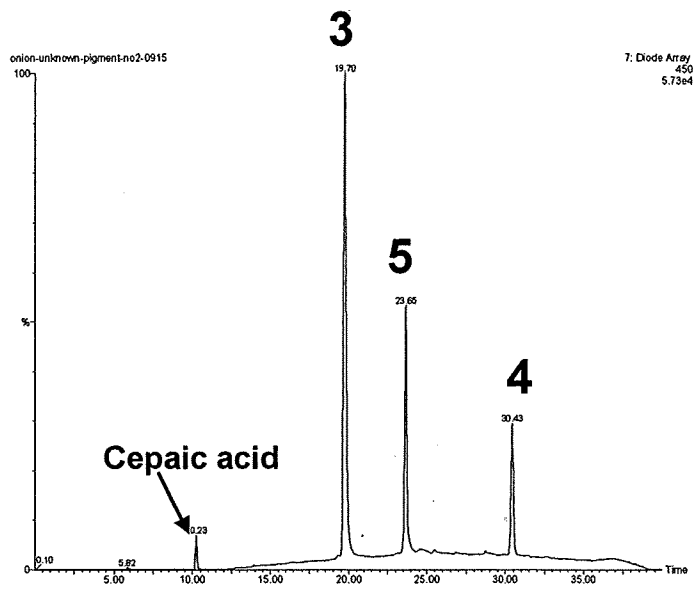


Figure 26: ピーク 5 精製後の純度確認のための HPLC クロマトグラム (検出 450 nm)

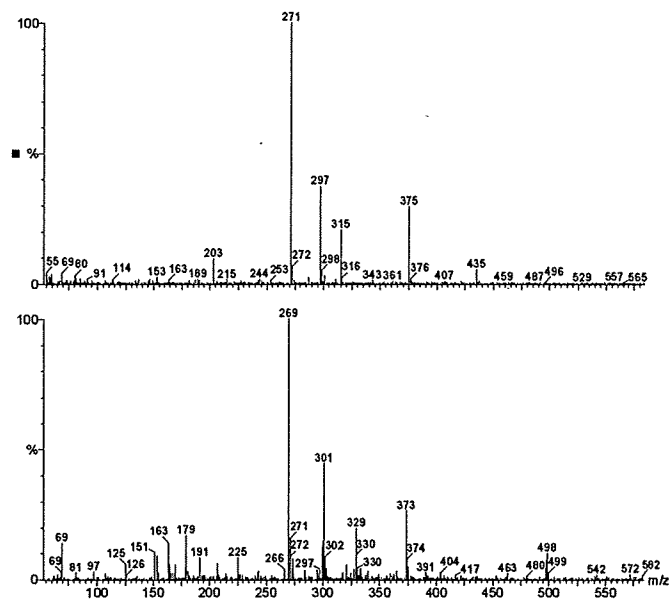


Figure 27: ピーク 5 の ESI-MS スペクトル (上段：正イオンモード、下段：負イオンモード)

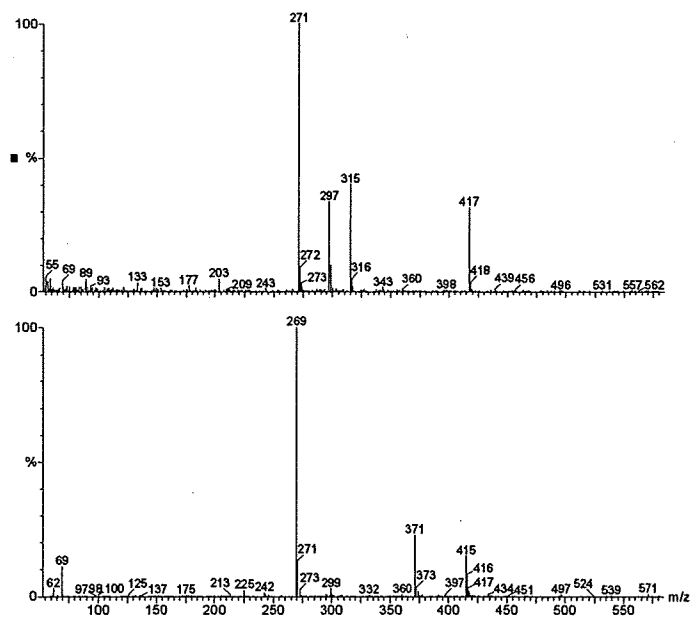


Figure 28: ピーク 4 の ESI-MS スペクトル (上段：正イオンモード、下段：負イオンモード)

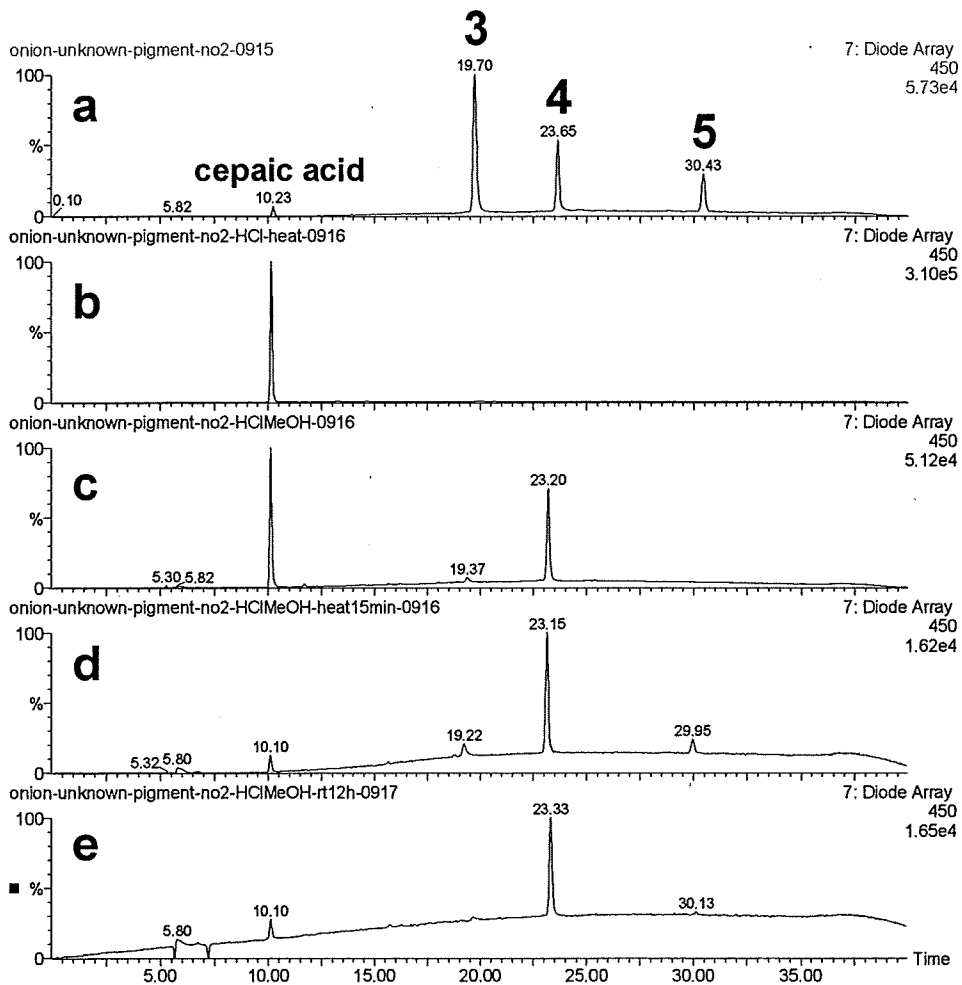


Figure 29 : 色素ピーク 3, 4, 5 の混合物の加水分解反応およびエステル交換反応 (逆相 HPLC クロマトグラム、検出 450 nm)、a) 反応前、b) 6N HCl、90°C、2 時間 (湯浴)、c) 塩酸メタノール、90°C、1 時間 (湯浴)、d) 塩酸メタノール、50°C、15 分 (湯浴)、e) 塩酸メタノール、常温、12 時間