

藍の葉を使用したインジルビンの選択的合成

浜松日体高等学校

科学研究部 2年 山田健人 他6名

1 動機・目的

タデアイ (*Persicaria tinctoria*) と言えば、インジゴと呼ばれる青い色素が取れることで知られている。しかし、ある一定の条件の下では、インジルビンと呼ばれる赤い色素 (インジゴレッドとも呼ばれている。) を合成できる。この物質は、天然赤色色素であり、インジルビンやその誘導体は抗腫瘍性薬効や抗癌作用を示すことが知られている。インジルビンは、タデアイに代表されるインジゴプラントの葉からごく僅かに副生する。この原因は、インジカン (インドキシル配糖体) の分解により生じるインジカンからインジゴへの変化がとても速いためである。そのため天然物からの収量はとても少ない。

先行研究では、酢酸インドキシルとイサチンの混合物を塩基性条件下で反応させインジルビンを得る方法⁽²⁾や、インジゴの過還元により分解しイサチンと反応させる方法⁽²⁾などが報告されている。しかし酢酸インドキシルがとても高価であったり、空气中または溶存している酸素によりインジゴが生じたりと、安価・簡便な方法とは言えない。

我々は、この有用性が期待できるインジルビンの簡便な合成方法と定量方法を確立することを目的とし、社会に貢献しようと考え研究活動を始めた。安価・簡便な合成方法を模索するにあたり、①特別な実験器具を必要としないこと、②高価な薬品は使用しないことを条件として設定した。

本年度は、先行研究を参考に、(1)インジカン分解酵素を失活させること、(2)インドキシルとイサチンを含む溶液を調整したのち加水分解することを考え、実験を行った。

2 実験

(1) タデアイの生葉からのインジルビン合成

ア 方法

朝摘んだタデアイの生葉 30.0 g をビーカーに入れた。湯浴または電子レンジで 80℃以上になるまで加熱し、葉中に含まれるインジカン分解酵素を失活させた。室温になるまで放冷したのち、ハサミで細かく切り刻んだ。50 mL の精製水を加え、80℃で 30 分間湯せんし、インジカン抽出した。吸引ろ過で葉の残渣を取り除き、ろ液は 100 mL メスシリンダーに移した。精製水を加えインジカン抽出液 100 mL を得た。

インジカン抽出液にイサチン 0.10 g を溶解した。イサチン溶解させた抽出液に 2.0 mol/L 塩酸 10 mL をすばやく加え、80℃で 24 時間反応させた。この反応容器にはビーカー、試験管をそれぞれ用いた。

反応終了後、生じた暗赤色沈殿を吸引ろ過し、精製水で洗浄し、乾燥した。ろ紙上の暗赤色沈殿を、エタノールを抽出溶媒としたソックスレー抽出により精製した。抽出物は、紫外可視分光光度計 (Shimadzu Sefi IUV-1240) を用いて分析した。

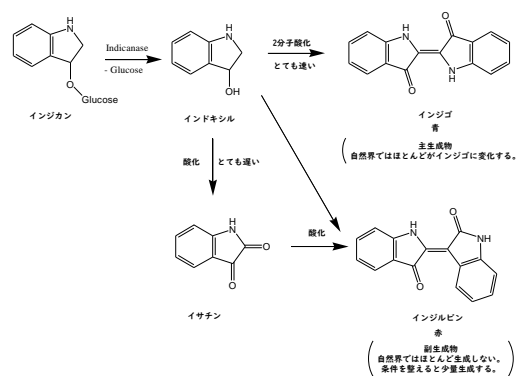


図. 1 自然界でのインジカンからインジゴおよびインジルビンへの合成経路

イ 結果

湯煎または電子レンジのどちらの加熱方法でも暗赤色沈殿の生成を確認した。ソックスレー抽出後の吸収スペクトルを示した。多少のノイズが生じているが、純度の高いインジルビンを得ることができた。加熱に電子レンジを用いた場合、660 nm 付近にピークが生じていた。測定に必要な量のインジルビンを得ることはできなかった。

ウ 考察

得られた暗赤色物質は純度の高いインジルビンであった。インジゴが生じなかったことから、酵素は完全に失活しインドキシルの生成が起こらなかったことが分かる。また、抽出液中のインジカン濃度が低く、イサチン濃度が高かったため、加水分解により生じたインドキシルからインジゴが生じる変化より、インドキシルとイサチンが反応しインジルビンが生じる変化が優先したと考えられる。

次に湯せん加熱と電子レンジ加熱で得られたインジルビン量に大きな差がある。酵素を失活させるための湯せん時に、インジカンが溶出した可能性が考えられる。より多くのインジルビンを生じさせるためには、電子レンジ加熱が有利であると考えられる。

その他の課題として、藍の生葉を用いているため定量や、長期間の保管が困難であることが分かった。これら共通の原因は、水分であると考えた。先行研究⁽³⁾では、インジカン分解酵素を失活させたのち、十分に乾燥させることで、葉中のインジカンが長期間保持できるとのことであったため、電子レンジで加熱後、80℃で十分に乾燥させる方法を試みることにした。

(2) 乾燥粉末化した藍の葉を用いたインジルビン合成および、加水分解時に加える酸または塩基の違いについて

ア 方法

電子レンジで加熱し酵素を失活させた藍の葉を 80℃で 6 時間加熱し、十分に乾燥させた。乾燥した藍の葉をフードプロセッサーで粉末化した (以下、粉末葉)。茶パックに詰めた粉末葉 5.0 g を精製水 50 mL に入れ、80℃以上で 30 分間加熱攪拌し、インドキシルを抽出した。吸引ろ過により、わずかに流出した葉の残渣を除去した。メスシリンダーを用いて、100 mL のインジカン抽出液を得た。インジカン抽出液にイサチン 0.10 g を溶かした。この溶液を 10 mL ずつ遠沈管に分注し、80℃の湯浴で予熱した。2.0 mol/L に調整した塩酸、硫酸、クエン酸水溶液、炭酸水素ナトリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液 1.0 mL を予熱した溶液にそれぞれ加え、ふたをした。80℃で 24 時間反応させた。

反応終了後、吸引ろ過、乾燥し、沈殿物を得た。暗赤色沈殿が得られた場合はソックスレー抽出を行った。ソックスレー抽出液をメスフラスコで 200 mL とした。この溶液の 10 倍希釈液の吸光スペクトルを測定した。

イ 結果

塩酸と硫酸、クエン酸水溶液を加えた遠沈管から暗赤色沈殿を得ることができた。一方で、炭酸水素ナトリウム水溶液と水酸化ナトリウム水溶液を加えた遠沈管からは何も得られなかった。

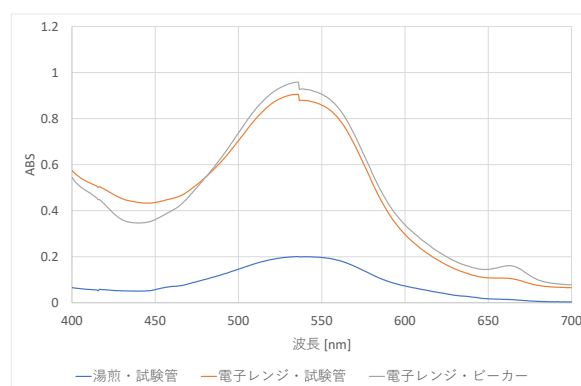


図. 2 各実験で得られた吸収スペクトル (溶媒 エタノール)

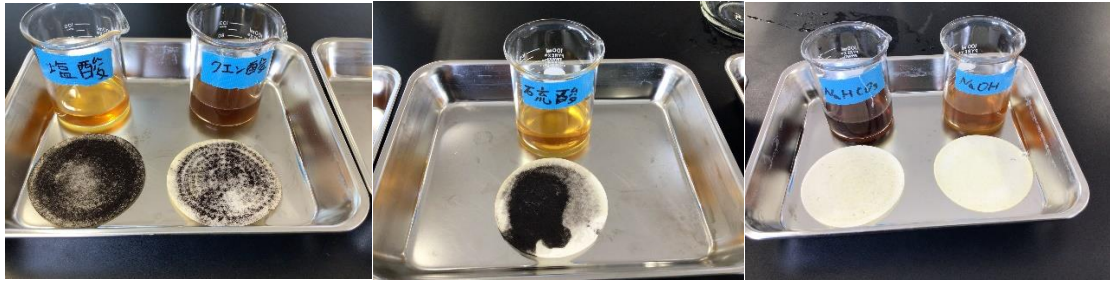


図. 3 吸引ろ過し得られた暗赤色沈殿

得られたインジルビン溶液の吸収スペクトルを図. 4 に示した。

ウ 考察

塩基性水溶液を用いて加水分解を試みたが、暗赤色沈殿は生じなかった。これらのろ液に対し、2.0 mol/L 塩酸を加え溶液を酸性にし、空气中で静置したところインジルビンと思われる暗赤色物質を生じた。この物質の一部を取り、吸収スペクトルを測定したところ、インジルビンであることが分かった (図. 5)。このことから配糖体内のグリコシド結合が塩基に対し強く、炭酸水素ナトリウム水溶液と水酸化ナトリウム水溶液では結合は切断されなかったことと考えられる。

酸性水溶液で加水分解した試料からはインジルビンが生じた。反応液中の酸の濃度は0.18 mol/L 程度であることから、 H^+ の存在によりグリコシド結合が切断されたことが考えられる。強酸である HCl と H_2SO_4 を用いた試料から得られたインジルビン量は同程度であった。これらに比べて弱酸であるクエン酸を用いた資料から得られたインジルビン量は少なかった。水溶液中の H^+ 濃度が加水分解速度に大きく寄与していることが分かった。

(3) インジルビンの定量 (検量線の作成)

ア 方法

これまでに合成したインジルビン 0.010 g をはかり取り、温かいエタノールに完全に溶解した。室温まで放冷したのち、メスフラスコを用いて0.10 g/L インジルビン溶液 (基準液) を調整した。調整した基準液をメスフラスコで段階的に 1.0×10^{-3} g/L まで希釈し、測定液を得た。測定液の吸収スペクトルを測定し、検量線を作成した。この実験は3回繰り返し、平均値をとった。

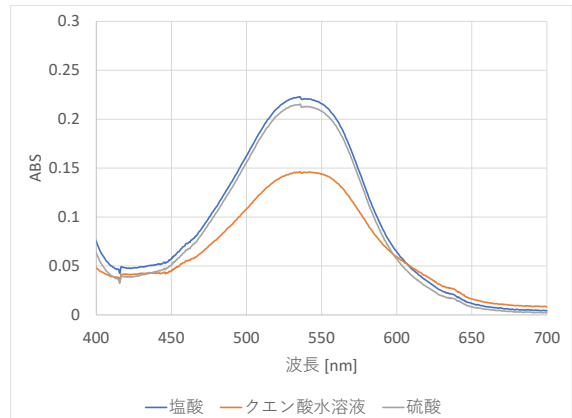


図. 4 ソックスレー抽出後のインジルビンの吸収スペクトル (溶媒 エタノール、10 倍希釈液)

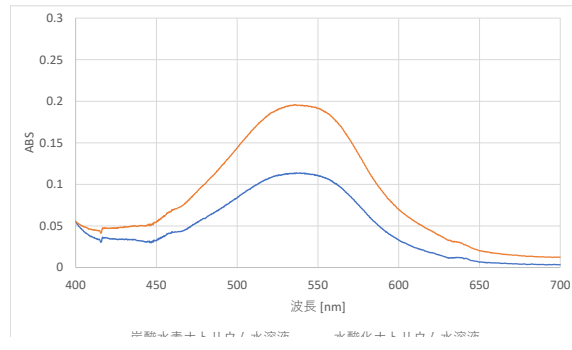


図. 5 塩基で加水分解を試みた場合の反応液から得られた暗赤色物質の吸収スペクトル (溶媒 エタノール)

イ 結果

測定した吸収スペクトル(3回の平均)を示した(図. 6)。極大吸収は533 nmであり、この波長での検量線を作成した。調整した測定液の濃度範囲では、濃度と吸光度は高い直線性を示した(表. 1、図. 7)。

ウ 考察

わずかにクロロフィル由来のピークが確認できるが、ほぼ純粋なインジルビンの吸収スペクトルを得ることができた。0.010 gを秤量するのがとても困難であったため、3回の平均をとり、検量線を作成することとした。その結果、インジルビンのエタノール溶液の検量線は、 $y = 20x$ と決定することができた。

作成した検量線から求めたインジルビンの生成量を表に示した。塩酸と硫酸で反応させた場合、得られたインジルビンはほぼ同量であり、クエン酸で反応させた場合は、塩酸と硫酸と比べて70%程度であった(表. 2)。

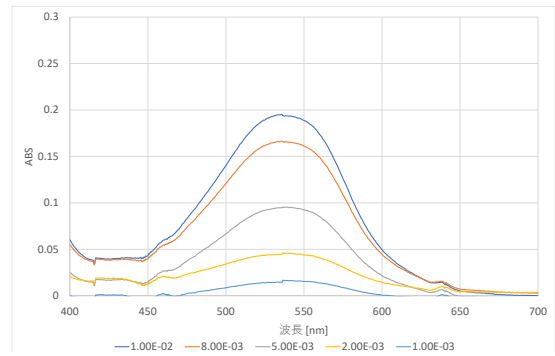


図. 6 基準液を段階的に希釈した溶液の吸収スペクトル(溶媒 エタノール)

表. 1 各濃度における533 nmの吸光度

	濃度 [g/L]				
	1.0.E-02	8.0.E-03	5.0.E-03	2.0.E-03	1.0.E-03
1回目	0.17	0.16	0.079	0.048	0.0067
2回目	0.16	0.13	0.075	0.023	0.0083
3日目	0.25	0.21	0.13	0.062	0.030
平均	0.19	0.17	0.095	0.045	0.015

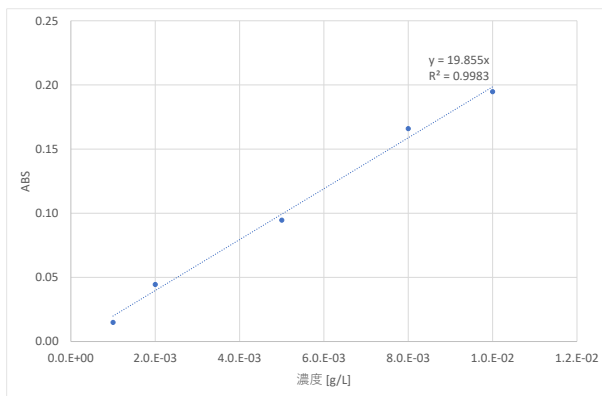


図. 7 平均吸光度から作成した検量線

表. 2 加水分解に使う酸の種類とインジルビン生成量

加えた酸	塩酸	クエン酸水溶液	硫酸
533nmの吸光度	0.4037	0.2823	0.3777
得られたインジルビン [mg/粉末葉g]	81	56	76

3 結論・今後の展望

本研究により特別な実験器具や、高価な薬品を用いることなくインジルビンを選択的に合成する方法を見出した。しかし、収量は粉末葉の質量に対し、最大8%程度にとどまっており、操作最適化による収量向上が今後の課題である。

4 謝辞

本研究は(公財)山崎自然科学教育振興会より研究助成を受け実施しています。この場をお借りして厚くお礼申し上げます。

5 参考文献

- (1) 牛田智, 谷上由香, 太田真祈; 日本家政学会誌 Vol. 49 No. 4, 389~395 (1998)
- (2) 曾根健夫; 葆光 13号 p. 13 (2002)
- (3) 牛田智, 川崎充代; 日本家政学会誌 Vol. 52 No. 1 75~79 (2001)