

サルビア・ウリギノーサ (*Salvia uliginosa*) の青色花卉に含まれる アピゲニン誘導体のポリアミドCを用いた新しい精製法

水永武光・斉藤ひとみ

A New Purification Method of Apigenin Derivatives from Blue Petals of *Salvia Uliginosa*

Takemitsu MIZUNAGA and Hitomi SAITO

Summary

A new purification method to obtain effectively large amount of apigenin derivatives from blue petals of *Salvia Uliginosa* was developed by polyamide C column chromatography. In the column chromatography by water-methanol gradient elution apigenin 7-O- β -D-glucopyranosyl-(1^{'''}→4^{''})- β -D-glucopyranoside-4'-O- β -glucopyranoside (Apigenin III) was eluted in about 50% methanol concentration and apigenin 7-O- β -D-glucopyranosyl-(1^{'''}→4^{''})- β -D-glucopyranoside (Apigenin I) was eluted in about 80–100% methanol concentration. The apigenin 7,4'-O,O-di- β -D-glucopyranoside (Apigenin II) which was reported to be present in blue petals of *Salvia uliginosa* by Veitch et al., (1998) was not detected in the column chromatography.

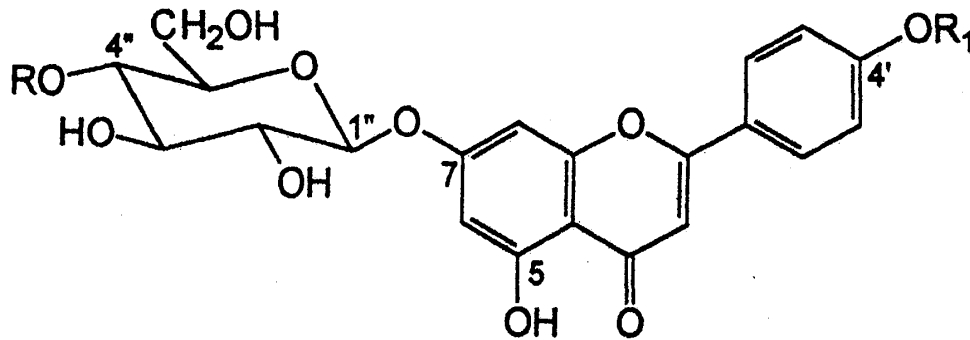
緒言

花は、私達に自然の美しさを感じさせ、楽しませたり、慰めたり、心を豊かにしてくれる。昔から、人々は季節毎に花を愛で、自然のうつろいを感じたり、また天地創造の神の御業をほめたたえたりもしてきた。そして私達が見つめる花は、その形や姿と共に色であろう。花の色の多彩な色調、特に赤や紫、そして青色などは、ほとんどアントシアニンによる。アントシアニン色素は、リトマスと同じようにpHによって、色調が変化し、酸性で赤色、アルカリ性で青色に変化する。しかし、中性からアルカリ性領域では、発色団のアントシアニン母核が容易に水和され速やかに退色するため、試験管内で青色を安定に再現することは、非常に難しい。にもかかわらず、自然界には多くの青色の花が存在し、その色は長期間にわたって安定に保たれる。この青い花色の発現と安定化機構は大きな謎として、古くから化学者・植物生理学者を引き付け、多数の説が提出されてきた。pH説 (Willstätter and Everest, 1913)、金属錯体 (メタロアントシアニン) モデル (Goto et al., 1986)、分子間コピグメンテーションモデル

(Robinson and Robinson, 1931)、分子内コピグメンテーション (アシル化アントシアニン) モデル (本多・斎藤, 1998) などの説やモデルが提出されている。しかし、私達の身近にある多くの青い花の色が、以上のモデルのどれに相当するのかとなると、必ずしも明らかではない。

私達は先の論文で園芸生活学科のキャンパスに植えられている、青色花であるサルビア・ウリギノーサに興味を持ち、その花の青色成分を精製し、その分析結果から、この青色色素が、デルフィニジン-3-O-[6-O-(パラクマロイル)- β -D-グルコピラノシド]-5-O-[4-O-アセチル-6-O-マロニル- β -D-グルコピラノシド]であり、フラボン部分はアピゲニン 7-O- β -D-グルコピラノシール-(1^{'''}→4^{''})- β -D-グルコピラノシド-4'- β -D-グルコピラノシド (以下、アピゲニンIIIと称する) であり、マグネシウムを含むメタロアントシアニンであることを示唆した。その結果、サルビア・ウリギノーサの青色色素が、ツユクサ、ヤグルマギク (Goto et al., 1986)、サルビア・パテンス (Takeda et al., 1994) に継ぐ第四の新しいメタロアントシアニンであることを明らかにした (水永ら, 2002)。

一方、サルビア・ウリギノーサには、更に二つのアピゲニン誘導体；アピゲニン7-O- β -D-グルコピラノシール-(1^{'''}→4^{''})- β -D-グルコピラノシド（以下アピゲニンIと称する）、とアピゲニン7,4'-O,O'-ジ- β -D-グルコピラノシド（以下アピゲニンIIと称する）が存在することが報告されており（図-1）



	R	R ₁
I	β -D-glc	H
II	H	β -D-glc
III	β -D-glc	β -D-glc

図-1 サルビア・ウリギノーサに含まれるフラボン；アピゲニン誘導体I, II, IIIの化学構造。文献 (Veitch et al, 1998) より引用。

(Veitch et al, 1998), それらのアピゲニン誘導体が、上記アントシアニンに対してどのような青色効果をもつかは大変興味ある問題である。そのことを研究する為には、上記アピゲニン誘導体を効率よく分離精製することが必要であるので、この論文ではその為に行った新たな精製法について述べる。

材料と方法

1. 青色花卉からのアピゲニンの抽出と精製

- (1) サルビア・ウリギノーサ青色花卉の採取とメタノール抽出；8～10月に採取したサルビア・ウリギノーサの青色花卉の凍結乾燥標品14gに、900mlの80%メタノールを加え、室温で24時間抽出する。更に抽出花卉に500mlの80%メタノールを加え、24時間抽出する。ろ液を併せ、濃縮する。不溶化した物質は13000rpm×15分の遠心分離で除く。
- (2) 抽出液からのマスペーパークロマトグラフィーによるアピゲニン誘導体の分離；抽出液をバンド法（林, 1988）によりADVANTEC 514Aのペーパーに展着し、15%酢酸で展開した。展開後、乾燥させ、暗室

のUVライトで、アピゲニンの色調の部分を取り取り、下降法（林, 1988）により、80%メタノールで溶出した。

- (3) ポリアミドC-100カラムクロマトグラフィー；2×30cmのガラスカラムに純水で膨潤させたポリアミド-C100（和光）（以下ポ

リアミドCとする）をつめ安定化させた後、上記アピゲニンを含む溶出液をカラムにアプライシ、純水（50ml）、次いで純水-メタノール（各300ml）のグラデーション溶出を行った。各画分は10mlずつ集めた。

- (4) アピゲニン画分のペーパークロマトグラフィーによる確認と精製；15%酢酸、BAW（ブタノール：酢酸：水=4：1：5）によるペーパークロマトグラフィーの展開によりアピゲニンの確認を行った。それぞれの画分のマスペーパークロマトグラフィーを行い、80%メタノールによりアピゲニン画分のみを溶出したものを精製標品とした。

2. 吸収スペクトル：日立分光光度計U-3200を用いた。

結果

1. ポリアミドCカラムクロマトグラフィー
サルビア・ウリギノーサの青色花卉を80%メタノールで抽出し、濃縮した液をペーパーに展着し、15%酢酸で展開したアピゲニン画分のポリアミドC

カラムクロマトグラフィーを行った。アピゲニンの検出として、吸光度としてフラボン骨格のA環に由来する吸収波長268.0nmを用いた。結果を図-2に記す。ピークが見られた画分の、No. 6-12, No.28-39, No.40-46, No.47-61, No.62-68について、BAWと15%酢酸によるペーパークロマトグラフィーを行い、UVランプによるアピゲニンの確認(暗室でのUVライト下では、アピゲニンは赤みがかかった茶色に見える)を行ったところ、No.28-39, No.47-61の画分にアピゲニンが観察された(図-3, A, B)。それぞれのRf値は、BAWによるペーパークロマトグラムでは、0.11, 0.24であり、また、15%酢酸によるペーパークロマトグラムでは、0.38と0.16であった。No. 6-12, No.40-46, にはアピゲニンの確認はできなかった。また、No.62-68には蛍光性の物質が見られたが、色調やRf値からアピゲニンではないと判断した。

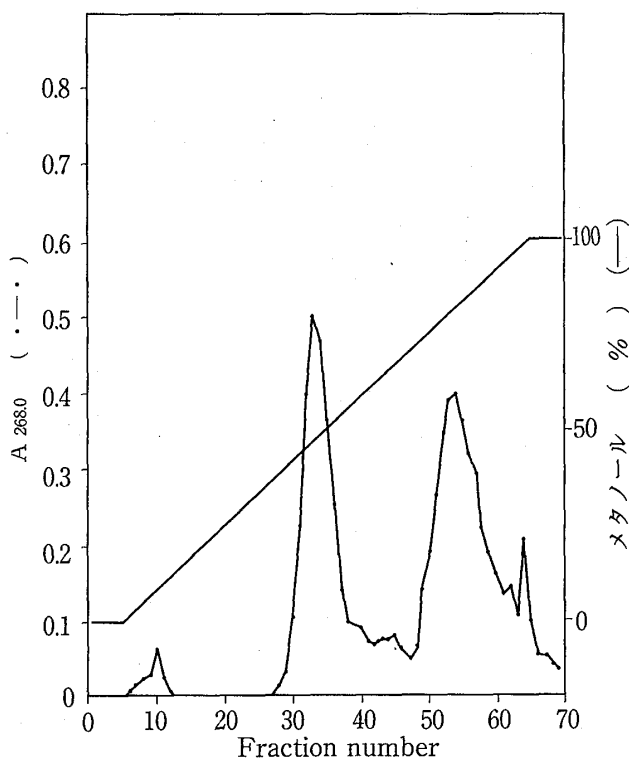


図-2 サルビア・ウリギノーサ青色花卉抽出液のポリアミドCカラムクロマトグラフィー。

サンプル;サルビア・ウリギノーサ青色花卉の80%メタノール抽出液を濃縮し、15%酢酸ペーパークロマトグラフィーを行い、アピゲニン画分の溶出液をカラムにアプライした。カラムサイズ: 2×30cm, 溶出;純水50ml, 次いで純水(300ml)-メタノール(300ml)のグラデエントで溶出した。フラクション;各10ml, 流速;7分/10ml, 吸光度は268nmで測定した。

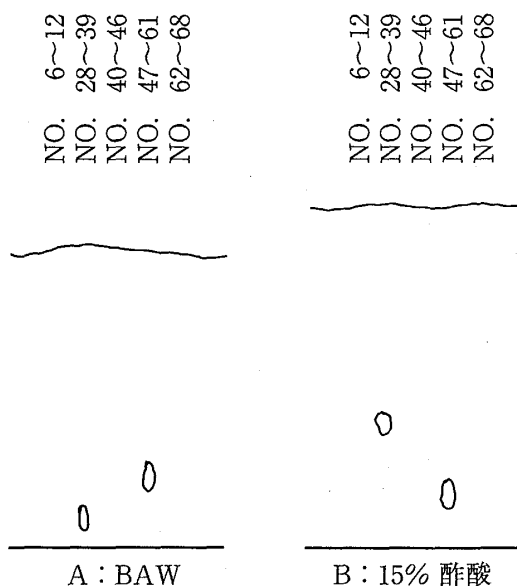


図-3 図-2のポリアミドCカラムクロマトグラフィーにより分画した溶出液のペーパークロマトグラフィー。

A:BAW (ブタノール:酢酸:水=4:1:5), B:15%酢酸で展開したもの。暗所のUVライトで赤みがかかった茶色の部分(アピゲニン)に印をつけた。

2. 吸収スペクトル

上記、No.28-39画分とNo.47-61画分に含まれるアピゲニンのBAWと15%酢酸のペーパークロマトグラフィーのRf値の結果から、前者にはアピゲニンⅢが、後者にはアピゲニンⅠで含まれていることが示唆された(Veitch et al, 1998)。このことを、更に確認する為、それぞれの画分のマスペーパークロマトグラフィーを行い、80%メタノールにより、アピゲニン画分のみを溶出して、不純物を除いたものの吸収スペクトルをとったものが、図-4, 図-5である。

図-4から、No.28-39画分由来のアピゲニンの吸収ピークは267.6nmと319.2nmであった。また、図-5からNo.47-61画分由来の吸収ピークは267.0nmと335.4nmであった。これらの結果はVeitch等によるアピゲニンⅢとアピゲニンⅠの吸収ピークに酷似していた(Veitch et al, 1998)。以上の結果からポリアミドカラムクロマトグラフィーによりアピゲニンⅢとアピゲニンⅠが分離できることが明らかとなった。

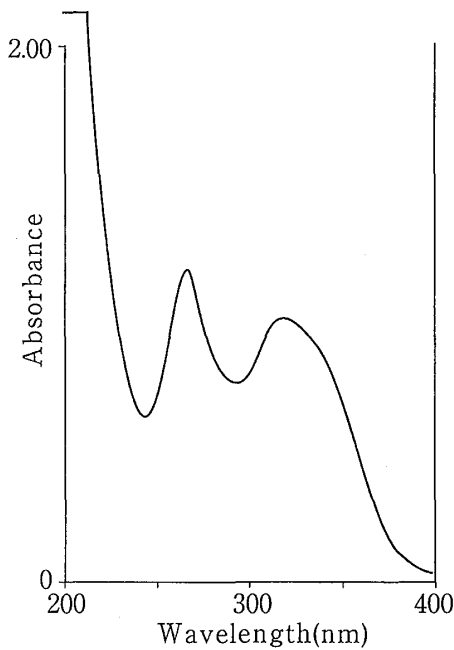


図-4 サルビア・ウリギノーサ青色花卉に含まれるフラボンの吸収スペクトル。

ポリアミドCカラムクロマトグラフィーにより得られたNo.28 - 39画分のペーパークロマトグラフィー (15%酢酸) を行い、アピゲニン部分のみを溶出したものの吸収スペクトル。図より267.6nmと319.2nmに吸収極大が見られる。

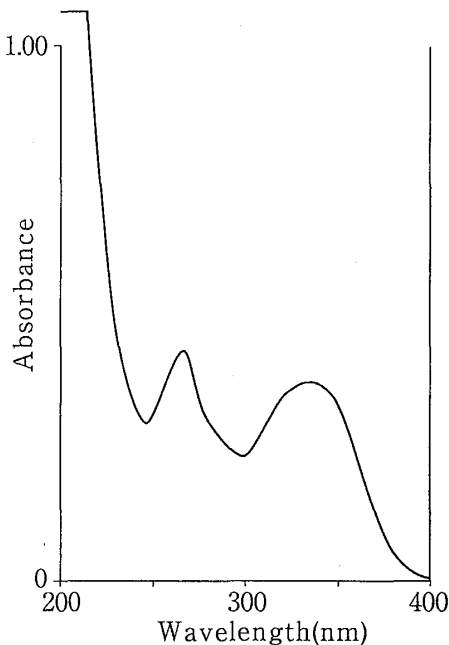


図-5 サルビア・ウリギノーサ青色花卉に含まれるフラボンの吸収スペクトル。

ポリアミドCカラムクロマトグラフィーにより得られたNo.47 - 61画分のペーパークロマトグラフィー (15%酢酸) を行いアピゲニン部分のみを溶出したものの吸収スペクトル。図から267.0nmと335.4nmに吸収極大が見られる。

考 察

本研究においては、サルビア・ウリギノーサの青色花卉から、アピゲニン誘導体を効率よく分離する目的でポリアミドCを用いたカラムクロマトグラフィーを試みた。ポリアミドCカラムクロマトグラフィーにおいては、水-メタノール系で青色花卉からの抽出液を溶出しているため、親水性の高いものほど、早く溶出することになる。アピゲニンI、とアピゲニンIIIを比較すると、アピゲニン骨格に前者はグルコースが2分子、後者は3分子結合しているため、アピゲニンIIIのほうが、より親水性に富むはずであり、このことは、アピゲニンIIIが、メタノール濃度が約50%のところ、つまり、より親水性に富む位置で、溶出され、アピゲニンIがより親水性の低いところで(約80-100%メタノールの画分)で溶出された結果に合致している。

アピゲニンIIがサルビア・ウリギノーサに含まれているという文献 (Veitch et al., 1998) からアピゲニンIIの存在についても検討した。アピゲニンIIはアピゲニン骨格に2分子のグルコース結合しているため、アピゲニンIの溶出画分、または、より疎水性の強い画分に見出されるのではないかと、100%メタノールやエタノールでの溶出を試みたが、アピゲニンIIを検出することはできなかった。ポリアミドCカラムにアプライする前に何らかの理由で除去された可能性もあるが、アピゲニンIIは、15%酢酸によるペーパークロマトグラフィーではアピゲニンIIIとほぼ同じRfと報告されているので、15%酢酸によるペーパークロマトグラフィーでの分取操作ミスは考え難い。従って、我々が採取した青色花卉にはアピゲニンIIは含まれていないと考えられる。前報において (水永ら, 2002) サルビア・ウリギノーサの青色花卉からの精製青色色素から、分離されたフラボンがアピゲニンIIIであったことを考えあわせると、このサルビア・ウリギノーサの独特の青色は存在するアシル化アントシアニンと、アピゲニンIIIと、マグネシウムによって複合体を形成して、青色を呈しているということが再確認されたと言えよう。一方、アピゲニンIIが、我々が採取した青色花卉には検出されなかったことに関しては、品種の違いも含めて今後更に検討してみる必要があるし、またアシル化アントシアニンに対する効果も興味ある問題である。

摘 要

サルビア・ウリギノーサの青色花卉より、アピゲニン誘導体を効率よく分離精製する方法として、ポリアミドCカラムクロマトグラフィーを行った。水-メタノール系によるグラディエント溶出により、約50%メタノール濃度で、アピゲニン7-O-β-D-グルコピラノシール-(1^{'''}→4^{''})-β-D-グルコピラノシド-4'-β-D-グルコピラノシド (アピゲニンⅢ) が溶出され、80-100%メタノール濃度でアピゲニン7-O-β-D-グルコピラノシール-(1^{'''}→4^{''})-β-D-グルコピラノシド (アピゲニンⅠ) が溶出されることが明らかとなった。他の研究者によりサルビア・ウリギノーサの青色花卉に存在が報告されていたアピゲニン7,4'-O-O-ジ-β-D-グルコピラノシド (アピゲニンⅡ) は我々が採取したサルビア・ウリギノーサの青色花卉には検出されなかった。

引用文献

Goto, T., H. Tamura, T. Kawai, T. Hoshino, G. Harada and T. Kondo. 1986. Chemistry of

metalloanthocyanins. 471:155-173

- 林孝三, 1988. 基礎実験技術, 植物色素. (養賢堂), 東京 108-111
- 本多利雄・斎藤規夫. 1998. 花の色の科学-多様な色をつくり出すアントシアニン. 現代化学. 25-32.
- 水永武光, 沢村めぐみ, 吉岡里美, 村上睦雄. 2002. サルビア・ウリギノーサ (*Salvia uliginosa*) の青色花卉由来の新しいメタロアントシアニン. 恵泉女学園園芸短大研究紀要. 33:1-6.
- Robinson, G. M. and R. Robinson. 1931. A survey of anthocyanins I. Biochem. J. 25:1687-1705.
- Takeda, K., M. Yanagisawa, T. Kifune, T. Kinoshita and C. F. Timberlake. 1994. A blue pigment complex in flowers of *Salvia patens*. Phytochemistry 35: 1167-1169.
- Veitch, N. C., R. J. Grayer, J. L. Irwin and K. Takeda. 1998. Flavonoid cellobiosides from *Salvia uliginosa*. Phytochemistry 98:389-393.
- Willstätter, R. and A. E. Everest. 1913. Über den Farbstoff der Kornblume. Liebigs Ann. der Chem. 401: 189-232.