

イオン液体を用いた植物葉からの天然有機化合物の新規獲得法

Extraction and isolation of natural products from plant leaves utilizing ionic liquids

上智大学理工学部物質生命理工学科 准教授 藤田 正博
Masahiro Yoshizawa-Fujita (Associate Professor)

准教授 臼杵 豊展
Toyonobu Usuki (Associate Professor)

Department of Materials and Life Sciences, Faculty of Science and Technology, Sophia University

1. はじめに

イオン液体は100℃以下に融点を有する塩であり、その名の通りイオンのみからなる液体である。水、有機溶媒とは異なる特徴を多数有する。例えば、蒸気圧が極めて低いこと、難燃性であること、数百℃にわたる液体範囲をもつことなどが特徴として挙げられる。さらに、イオン伝導性や電気化学的安定性、有機・無機化合物の溶解性にも優れる¹⁾。ただし、これらの特徴は全てのイオン液体が等しく有するものではなく、イオン液体を構成するイオンの性質に依存するため、目的に応じて適切なイオン構造を選択する必要がある。これを前向きにとらえれば、イオンの分子デザインを通じて、目的に合致するイオン液体を誰もが開発できることになる。実は、イオンの組み合わせは無数にあるという特徴が、多くの研究者を引きつける大きな魅力ではないだろうか。

現在のイオン液体研究の発端となった論文は、アメリカ空軍アカデミーのWilkesら²⁾とIBMのCooperら³⁾によって1992年に報告された(イオン液体に関する最初の論文は、1914年にドイツの化学者Waldenにより報告されたと言われており⁴⁾、今年は100周年の記念すべき年であるが、アラバマ大学のRogersらは、イオン液体の定義の観点から異議を唱えている⁵⁾)。その後、日本では電解質材料を中心にイオン液体の研究が活発化した。欧米ではイオン液体中での化学反応、触媒反応、分離・抽出など環境に優しいグリーン溶媒としての研究が盛んになった。今では、イオン液体の研究はバイオ関連分野にも展開してきており、応用分野は多岐にわたる⁶⁾。それらの中でも、イオン液体を用いたバイオ

マス処理技術が、ひととき大きな注目を集めている。

バイオマスとは、いずれ枯渇すると想定されている石油に代わるエネルギー源として、植物との共生を意識したエネルギー変換に使用される資源である。代表的なバイオマスは、地球上で最も豊富に存在するセルロースである。セルロースはグルコースなどの有用な物質を生産できるため、各種エネルギー源として注目を集めている。しかし、セルロースはグルコースが β -1,4結合で重合した多糖類であり、分子内および分子間で多数の水素結合を形成している。そのため、セルロースは水や汎用の有機溶媒には不溶である。バイオマスの有効利用が社会的要請としてあるものの、強酸とともに高温・高圧下で処理を行う既存の技術では、多大なエネルギーを投入する必要があるため、実質的なエネルギー獲得には至っていない。

2002年、前述のRogersらは、イオン液体にセルロースが溶解することを報告した⁷⁾。この発見がブレイクスルーとなり、イオン液体を用いたバイオマス処理技術の研究が活発化した。これまでの研究から、イオン液体のアニオン構造がセルロース溶解性の鍵であることがわかっていく。つまり、アニオンのルイス塩基性(電子供与性)が高いイオン液体ほど、セルロースの溶解性に優れる⁸⁾。種々のイオン液体を用いてセルロース溶解度を検討した結果、Rogersらは塩化物イオンがセルロースの溶解性に優れていることを明らかにした。その後、酢酸アニオン⁹⁾やギ酸アニオン¹⁰⁾からなるイオン液体が塩化物系イオン液体と同等のセルロース溶解性を示すことが報告された。さらに東京農工大学の大野らは、亜リン酸類が有力なアニオンの候補であることを見出した¹¹⁾。

セルロースを溶解するイオン液体の代表的な構造を図1に示す。

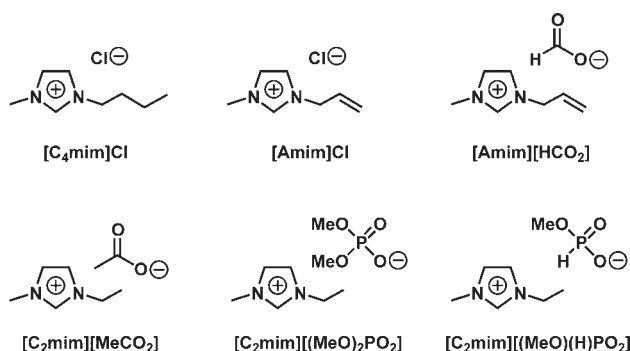


図1 セルロースを溶解する代表的なイオン液体の構造

イオン液体とセルロースをキーワードにした研究は、セルロースの活用および有用物質への変換のみに注力されているのが現状である。最近になって、イオン液体を用いて植物から天然有機化合物を抽出する研究が報告されるようになった¹²⁾。しかし実際に、天然物の単離まで至った報告はごく僅かである。イオン液体は難揮発性の液体であり、植物からイオン液体相に抽出した有機化合物を単離するのが困難であることが主な原因として考えられる。Rogersらは、イオン液体を用いてオレンジの皮からオレンジ精油の主成分であるリモネンを抽出した¹³⁾。オレンジの皮をイオン液体に溶解させ、所定の温度で攪拌後、ただちに減圧蒸留を行った結果、揮発成分であるリモネンだけを単離できた。イオン液体の難揮発性という特徴を活用した良い例である。

我々は、セルロースを溶解するイオン液体を用いて、植物葉から未だ誰も成し得ていない不揮発成分の天然有機化合物を効率的に抽出・単離する方法論を検討してきた。本稿ではその一例として、生命力が強く入手が容易なイチョウの葉から、インフルエンザの特効薬「タミフル®」の原料物質であるシキミ酸に着目し、その効率的獲得法について紹介する(図2)¹⁴⁾。

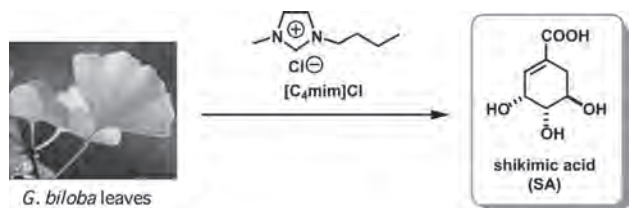


図2 イオン液体を用いることによりイチョウ葉からシキミ酸を効率的に獲得できるか?

2. シキミ酸

シキミ酸は、1885年にEijkmanによりシキミ(檳)の果実から初めて単離された天然有機化合物である¹⁵⁾。仏事などでよく用いられるシキミは主に日本に生息する植物で、その学名は*Illicium religiosum*であり、毒性を有することが知られている。シキミ酸は、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニンなどのアミノ酸^{16,17)}やアルカロイド、フラボノイド、リゲニンなど¹⁸⁾の生合成過程における重要な中間体であり、多くの植物に含有されている。173種の植物の特定部位におけるメタノール抽出物のうち、97種類の植物においてシキミ酸が検出されたという報告がある¹⁹⁾。例えば、*Illicium religiosum* (シキミ、モクレン科)、*Illicium verum* Hook f. (トウシキミ、モクレン科)、*Terminalia arjuna* (アルジュナ、シクンシ科)、*Pistacia lentiscus* (マルティクス、ウルシ科)、*Ribes aureum* (ゴールデンカラント、スグリ科)、*Symphytum officinalis* (ヒレハリソウ、ムラサキ科)、*Actaea pachypoda* (アクタエア・パキポダ、キンポウゲ科)、*Alangium salvifolium* (シログキウリノキ、ウリノキ科)、*Ginkgo biloba* (イチョウ、イチョウ科)、*Dipsacus laciniatus* (ディプサクス、マツムシソウ科)、*Agastache urticifolia* (アガスタキ、シソ科)、*Inula helenium* (オオグルマ、キク科)など、多種多様の植物にシキミ酸が含まれていることが知られている。

現在、製薬企業ロシュは、シキミ酸を出発原料として12段階でインフルエンザの治療薬 oseltamivir (オセルタミビル、通称タミフル(図3))を工業的に生産している。中国南西部の広西、四川、雲南、貴州省にある4つの山中に生息しているスターアニス(八角または唐檳とも言う、図4)からシキミ酸を抽出することで、全供給の70%を得ている²⁰⁾。栽培条件が最適なこれらの山で採取されたスターアニス30kgから、シキミ酸1kgを得ていることをロシュは報告している。一方、残りの30%は、大

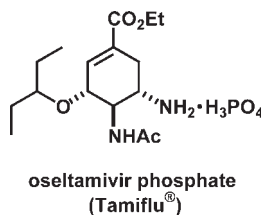


図3 タミフルの分子構造



図4 スターアニス(八角、または唐檳)

腸菌を用いた発酵法で得ている。ところが最近では、スターアニスの乱獲による資源の枯渇や昨今の生物資源問題を抱えている。また、潜在的なインフルエンザの世界的流行を鑑みると、シキミ酸の定常的な供給が必要である。さらに、多くの国々がタミフルを余分に貯蔵していることも問題視されている²¹⁾。少し古いデータになるが、2004年の第1四半期において、タミフルの全売り上げに占める日本の割合は、80%に達しているとの報告がある²²⁾。シキミ酸を出発原料としないタミフルの合成法は多数報告されてはいるが²³⁾、いずれも未だに工業化されていない。最近では、化粧品メーカーのコーセーがシキミ酸を有効成分とする美白剤の特許を公開している²⁴⁾。シキミ酸はタミフルの原料だけではなく、様々な用途への応用が期待されている。

スターアニス以外の天然資源からシキミ酸の供給源を確保することは、上記の問題解決につながる。そこで我々は、地域偏在性が低く、シキミ酸を豊富に含むイチョウに注目した。イチョウは、現存する植物の中でも最も原始的な種類に属し、約二億年前から生息するほど生命力の強い植物で、「生きている化石」とも言われている。また、世界的にみたイチョウの分布に関して、少なくとも年平均気温0℃がその限界温度となっている²⁵⁾。つまりイチョウは地球上の広い地域で生息でき、簡単に入手できる植物だといえる。当然、東京・千代田区の上智大学四谷キャンパスも例外ではなく、立派なイチョウ並木がある。イチョウは、本研究のターゲットとして極めて魅力的な存在である。

3. シキミ酸の抽出

イチョウ葉の採取は上智大学四谷キャンパス構内で行った。イチョウ葉の性別は葉の形で区別し、本研究においてはメスのみを用いた。イオン液体は1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([C₄mim]Cl)を用いた。イオン液体との比較のため、水、メタノール、およびN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)を用いてシキミ酸の抽出実験を行った。イチョウの葉からシキミ酸を抽出する手順を図5に示す。まず、イチョウ葉を液体窒素で凍結させた後、粉碎した。そのイチョウ葉を[C₄mim]Cl中で1時間加熱攪拌し、加熱温度は、100℃、130℃、150℃とした。加熱攪拌後、イオン液体の粘性を下げるためにメタノールを加え、室温で30分攪拌し、セライトにより濾過した。濾液を回収しメタノールを留去することで、イオン液体を含むイチョウ葉抽出物を得た。一方、水や有機溶媒を用いた抽出実験では、各溶媒の環流条件下で1時間加熱攪拌した。加熱攪拌後、セライトを用いて濾過を行い、除媒することでイチョウ葉抽出物を得た。各方法で得たイチョウ葉抽出物の分析は、逆相HPLCで行った。

イチョウ葉抽出物のHPLCチャートを図6に示す。比較のため、シキミ酸および[C₄mim]ClのHPLCチャートも示す。標品のシキミ酸の保持時間は約4分であった。[C₄mim]ClのHPLCチャートの場合、顕著なピークは観察されず、保持時間が3分前後においてベースラインが少し乱れた程度であった。シキミ酸と重なるピークが

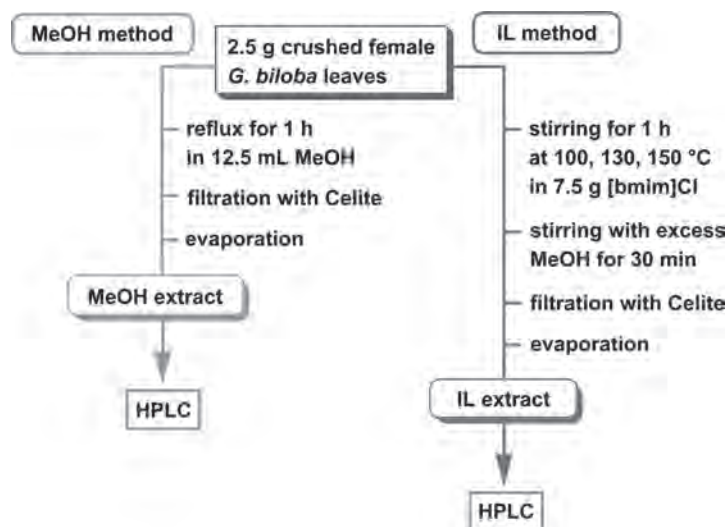


図5 シキミ酸の抽出手順

DMF、水を用いた抽出実験の場合、加熱温度以外の条件はメタノールと同様の手順で行った。

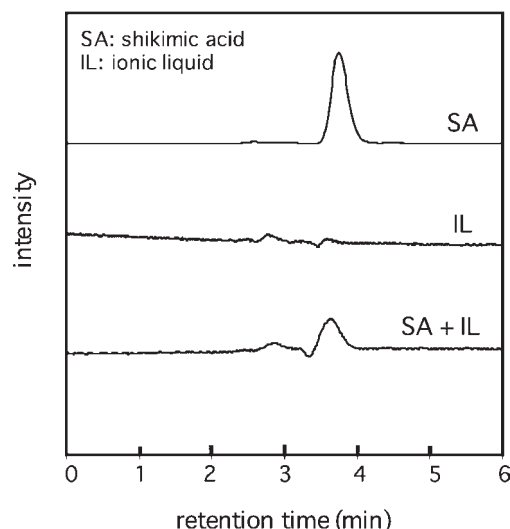


図6 シキミ酸の標品、イオン液体、およびイチョウ葉抽出物のHPLCチャート

ないことを確認した。イオン液体を含むイチヨウ葉抽出物のHPLCチャートでは、シキミ酸の保持時間と一致する位置にピークを特異的に観察することができた。

イチヨウ葉の重量に対するシキミ酸の抽出率と撹拌温度の関係を図7に示す。標品のHPLCチャートを用いて検量線を作成し、イチヨウ葉の重量に対するシキミ酸の抽出率を求めた。 $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ 中、 100°C で撹拌した場合、シキミ酸の抽出率は2.0%であった。加熱温度が同等のメタノールや水の場合、シキミ酸の抽出率は、それぞれ1.5%、1.7%であり、 $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ (100°C)と同等の抽出率であった。ところが $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ の場合、加熱温度を 130°C 、 150°C と上昇させたところ、シキミ酸の抽出率は3.4%、4.2%となり、温度の上昇とともに増大した。加熱温度の効果だけで抽出率が向上したのではないかと考え、DMF中、 150°C でイチヨウ葉を撹拌したが、シキミ酸の抽出率は1.2%であり、メタノール、水の抽出率と同等の結果であったことから、単純な加熱効果だけではないことがわかった。このように、イチヨウ葉を $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ 中で加熱撹拌することで、シキミ酸の抽出率が既存の溶媒よりも2倍以上向上することがわかった。

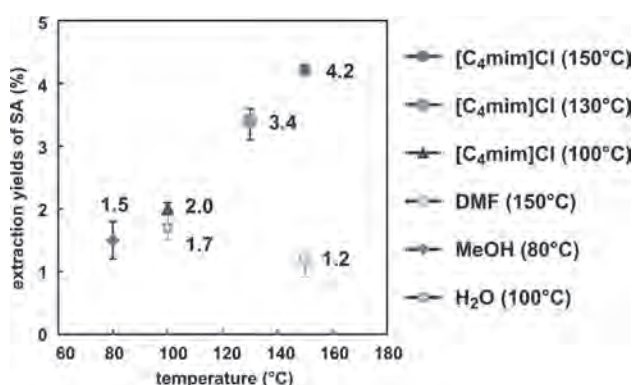


図7 イチヨウ葉の質量に対するシキミ酸の抽出率と撹拌温度の関係

4. シキミ酸の抽出機構

イオン液体中でイチヨウ葉を煮込むとシキミ酸の抽出率が向上するのはなぜか? $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ はセルロースを溶かすという事実が鍵を握っているのではないだろうか。つまり、 $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ が細胞壁の主要成分であるセルロースを溶解することで、細胞内の成分を抽出しやすくなったと考えられる。抽出実験後のイチヨウ葉を乾燥させ、それら葉の表面をSEMで観察した(図8)。比較のため、抽出実験前のイチヨウ葉表面も示す。未処理のイチヨウ葉表面には、粒状組織の塊が観察された。メタノール中で撹拌した後のイチヨウ葉表面にも、未処理のイチヨウ葉表面と同様の粒状組織の塊が観察された。一方、 $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ 中で撹拌した後のイチヨウ葉表面には粒状組織の大きな塊は観察されず、比較的平坦であった。 $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ がセルロースを溶かしたことで粒状組織が消失したものと考察した。

水はセルロースの貧溶媒であり、 $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ に水を加えるとセルロースの溶解性は顕著に低下することが知られている²⁶⁾。したがって、イチヨウ葉に含まれる水分は極力除くことが理想的であるが、採取したイチヨウ葉は全く乾燥せずに実験に用いた。そこで、イオン液体中にイチヨウ葉を加え、所定の温度で1時間撹拌した後、カールフィッシャー水分計で含水率を測定した。 100°C 、 130°C 、 150°C で撹拌した場合、含水率はそれぞれ5.9 wt.%、3.1 wt.%、1.3 wt.%であった。撹拌温度の上昇に伴い含水率が低下したことから、セルロースの溶解性が向上し、シキミ酸の抽出率が増加したと考えられる。そしてこの結果は、SEM観察によるイチヨウ葉表面の形状の傾向と一致した。しかしながら、シキミ酸の抽出機構の全容解明には至っておらず、今後より詳細な検討が必要である。

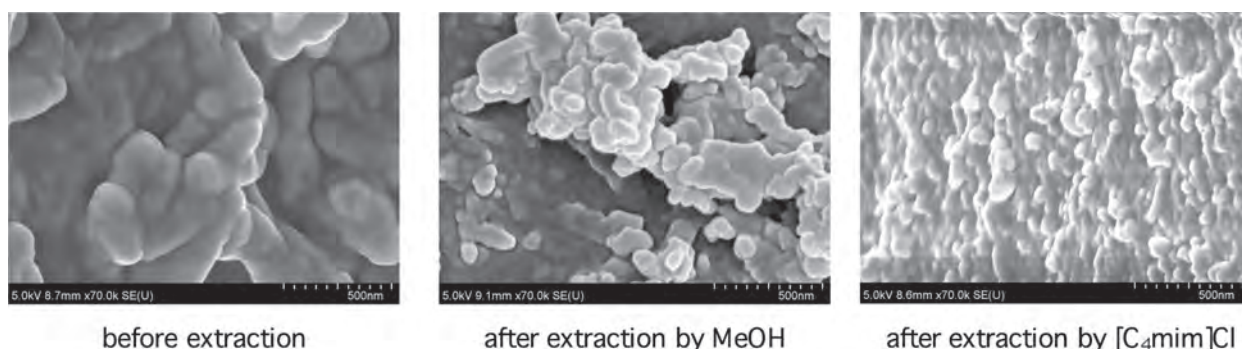


図8 イチヨウ葉表面のSEM写真

5. シキミ酸の単離

すでに述べたように、イオン液体を用いた植物葉からの天然有機化合物の獲得に関する報告は徐々に増えている。しかし、目的化合物を単離した報告は稀である。イオン液体の特徴である難揮発性が、単離を難しくしているためだろう。我々は、イオン交換樹脂を用いて、[C₄mim]Clからシキミ酸を単離する方法を検討した²⁷⁾。イオン交換樹脂には、アニオン交換樹脂であるAmberlite IRA 400を用いた。まず、[C₄mim]Clを含むイチョウ葉抽出物をイオン交換樹脂に担持し、シキミ酸を吸着させた。メタノール、次いでイオン交換水を通液し、[C₄mim]Clや不純物を洗い流した。その後、25%酢酸水溶液を通液し、シキミ酸を溶出させた。この溶液を濃縮し、抽出物の¹H NMR測定を行った(図9)。比較のため、標品のNMRスペクトルも示す。[C₄mim]Clが除去されたことは確認できたが、3~4ppmの範囲に不純物に基づくピークが観察された。そこで、イオン交換樹脂から回収したシキミ酸をHPLCにより精製した。その結果、不純物に基づくピークは消失し、シキミ酸の標品と同等のNMRスペクトルとなった。このように、イオン液体中に含まれるシキミ酸の単離に成功した。

6. おわりに

本稿では、セルロースを溶解する[C₄mim]Clを用いて、イチョウ葉からタミフル原料物質シキミ酸を効率的に抽出・単離する革新的な方法について紹介した。本成果は、イギリス王立化学協会のChemistry World誌にも特集された²⁸⁾。タミフルヘビーユーザーである日本で、シキミ酸の新規獲得法を開発することは意義深いと考えている。また最近になって我々は、シキミ酸のような水溶性天然有機化合物だけでなく、植物葉からイオン液体を用いた非水溶性天然有機化合物の効率的な抽出・単離にも成功している。続報を期待されたい。

東京のと真ん中に居ながら、よもや生物資源を得ようとは夢にも思わなかった。これまで、我が国は資源の少ない国だと教えられてきた。確かに、石油や鉱物資源に乏しいことは間違いない。しかし技術の進歩に伴い、メタンハイドレートやシェールガスなど、新しいエネルギー源の探索や獲得方法の開発が急ピッチで進められている。バイオマスの有効活用についても、セルロースを溶解するイオン液体の登場により、益々注目を集めるようになった。最近、我々は水存在下、非加熱でセルロースを溶解できるイオン液体を開発した²⁹⁾。イオン液体がバイオマス処理技術の発展と我が国に眠る天然

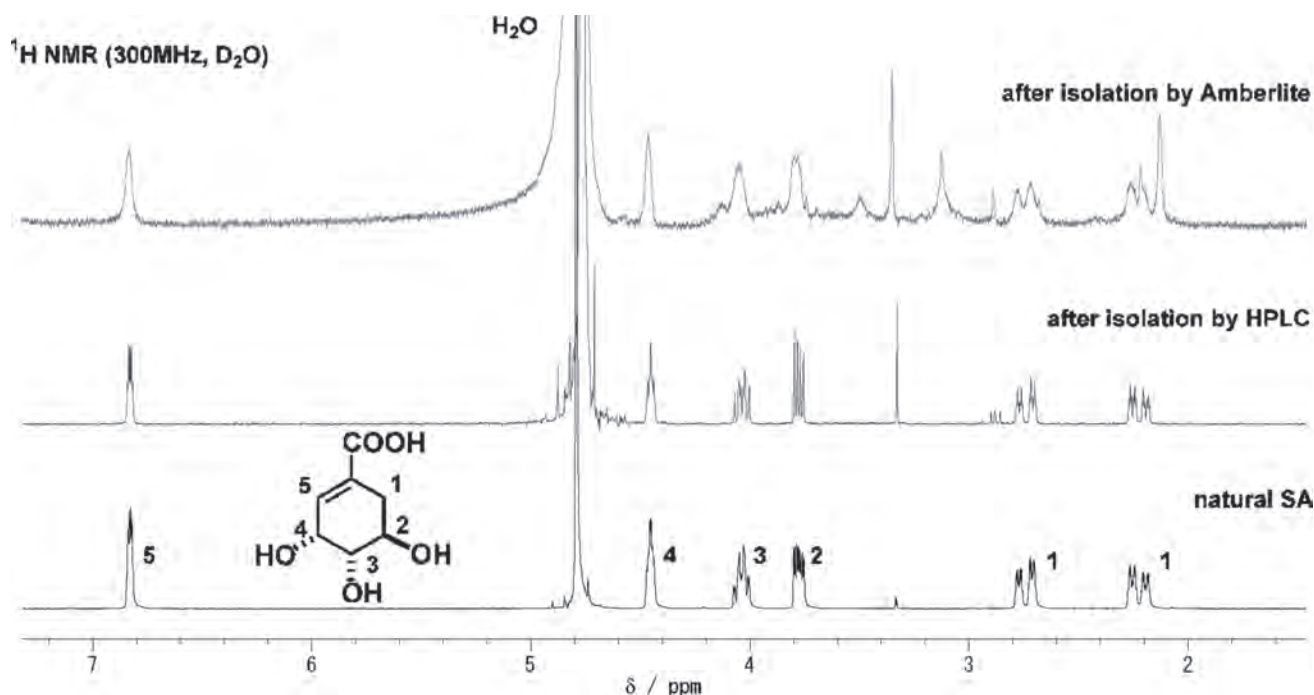


図9 標品および各精製段階におけるシキミ酸の¹H NMRスペクトル

資源獲得に大いに貢献できるものと期待している。

最後に、本研究にご助言くださいました陸川政弘教授(上智大学理工学部)に深謝いたします。また、本稿で紹介した研究を強力に推進してくれた保田菜々絵氏(上智大学大学院理工学専攻化学領域)に深く感謝いたします。彼女の情熱とアイデア無くして、これらの成果を挙げることはできませんでした。さらに、研究に関わってくれた佐藤麻希子氏(同化学領域)、岸えりな氏(同応用化学領域)、佐藤遼平氏(同応用化学領域)、小野祐太氏(同応用化学領域)に感謝いたします。

参考文献

- 1) Wasserscheid, P.; Welton, T. eds. *Ionic Liquids in Synthesis*. Wiley-VCH, 2003.
- 2) Wilkes, J. S.; Zaworotko, M. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1992, 965-967.
- 3) Cooper, E. I.; O'Sullivan, E. J. M. *Molten Salts VIII*. Gale, R. J.; Blomgren, G.; Kojima, H. eds. *The Electrochemical Society Proceeding Series*. PV 92-16, 1992, 386-396.
- 4) Walden, P. *Bull. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg*. 1914, 405-422.
- 5) Sun, N.; Rodriguez, H.; Rahman, M.; Rogers, R. D. *Chem. Commun.* 2011, 47, 1405-1421.
- 6) 大野弘幸 監修. *イオン液体III—ナノ・バイオサイエンスへの挑戦—*. シーエムシー出版, 2010, 243p.
- 7) Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Holbrey, J. D.; Rogers, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 4974-4975.
- 8) Ohno, H.; Fukaya, Y. *Chem. Lett.* 2009, 38, 2-7.
- 9) (a) Zhao, H.; Baker, G. A.; Song, Z.; Olubajo, O.; Crittle, T.; Peters, D. *Green Chem.* 2008, 10, 696-705. (b) Vitz, J.; Erdmenger, T.; Haensch, C.; Schubert, U. S. *Green Chem.* 2009, 11, 417-424.
- 10) Fukaya, Y.; Sugimoto, A.; Ohno, H. *Biomacromolecules*. 2006, 7, 3295-3297.
- 11) Fukaya, Y.; Hayashi, K.; Wada, M.; Ohno, H. *Green Chem.* 2008, 10, 44-46.
- 12) (a) Du, F. Y.; Xiao, X. H.; Li, G. K. *J. Chromatogr. A*. 2007, 1140, 56-62. (b) Du, F. Y.; Xiao, X. H.; Luo, X. J.; Li, G. K. *Talanta*. 2009, 78, 1177-1184. (c) Lu, Y.; Ma, W.; Hu, R.; Dai, X.; Pan, Y. *J. Chromatogr. A*. 2008, 1208, 42-46. (d) Ma, W.; Lu, Y.; Hu, R.; Chen, J.; Zhang, Z.; Pan, Y. *Talanta*. 2010, 80, 1292-1297. (e) Zeng, H.; Wang, Y.; Kong, J.; Nie, C.; Yuan, Y. *Talanta*. 2010, 83, 582-590. (f) Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. *J. Nat. Prod.* 2013, 76, 2162-2173.
- 13) Bica, K.; Gaertner, P.; Rogers, R. D. *Green Chem.* 2011, 13, 1997-1999.
- 14) (a) Usuki, T.; Yasuda, N.; Yoshizawa-Fujita, M.; Rikukawa, M. *Chem. Commun.* 2011, 47, 10560-10562. (b) 学校法人上智学院. 白杵豊展, 藤田正博, 保田菜々絵. シキミ酸取得方法及びシキミ酸製造方法. 特開2012-188374. 2012-10-04.
- 15) Eijkman, J. F. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*. 1885, 4, 32-54.
- 16) Davis, B. D. *J. Biol. Chem.* 1951, 191, 315-325.
- 17) Bohm, B. A. *Chem. Rev.* 1965, 65, 435-466.
- 18) Knaggs, A. R. *Nat. Prod. Rep.* 1999, 16, 525-560.
- 19) Avula, B.; Wang, Y.-H.; Smillie, T. J.; Khan, I. A. *Chromatographia*. 2009, 69, 307-314.
- 20) "Factsheet Tamiflu". F.Hoffmann-La Roche, Ltd. website. http://www.roche.com/med_mbtamiflu05e.pdf.
- 21) Farina, V.; Brown, J. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 7330-7334.
- 22) F.Hoffmann-La Roche, Ltd. website. <http://www.roche.com/pages/downloads/investor/pdf/presentations/irp1q04e.pdf>.
- 23) 代表的なものとして、(a) Yeung, Y. Y.; Hong, S.; Corey, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 6310-6311. (b) Fukuta, Y.; Mita, T.; Fukuda, N.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 6312-6313. (c) Cong, X.; Yao, Z. J. *J. Org. Chem.* 2006, 71, 5365-5368. (d) Satoh, N.; Akiba, T.; Yokoshima, S.; Fukuyama, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 5734-5736. (e) Ishikawa, H.; Suzuki, T.; Hayashi, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 1304-1307.
- 24) 株式会社コーセー. 間庭史雄, 板倉研. シキミ酸を有効成分とする美白剤. 特開2009-215266. 2009-09-24.
- 25) 十亀好雄. 世界におけるイチヨウの分布. 甲子園短期大学紀要. 1984, 4, 1-14.
- 26) Mazza, M.; Catana, D. A.; Vaca-Garcia, C.; Cecutti, C. *Cellulose*. 2009, 16, 207-215.
- 27) Enrich, L. B.; Scheuermann, M. L.; Mohadjer, A.; Matthias, K. R.; Eller, C. F.; Newman, M. S.; Fujinaka, M.; Poon, T. *Tetrahedron Lett.* 2008, 49, 2503-2505.
- 28) (a) "New source of Tamiflu". Royal Society of Chemistry. <http://www.rsc.org/chemistryworld/News/2011/August/25081101.asp>. (b) "New source of Tamiflu". *Chemistry World*, 2011, October, p.5.
- 29) Kishi, E.; Yoshizawa-Fujita, M.; Takeoka, Y.; Rikukawa, M. in preparation.