

TLCを用いた植物成分の分析 ～ 抗真菌活性試験を利用した生理活性成分の検索 ～

佐藤 里香

成田高等学校 自然科学部 天然物研究班

1. 背景と目的

近年、社会的な健康志向から食品に含まれる健康成分が注目されている。しかし、すべての食品成分は混合物として存在しており、相互作用も複雑である。ところで、私たちは高校の授業で、混合物から抽出やクロマトグラフィーなどの技術を用いて純物質を取り出せることを学んだ。特にクロマトグラフィーの原理は重要で、大学や企業の研究現場でも多用されている。私たちは、これまでに身近な食品や植物体に含まれる物質を、抽出とクロマトグラフィーを用いて純粋に分離・精製する実験に取り組み、その実験条件を確立した。そこで、この条件を用いて誰も調べたことのない新しい植物成分の分離・精製を行い、ここで得た成分を簡易的な抗真菌活性試験にかけることで、活性を示す物質の特定を試みた。これによって、植物に含まれる新しい生理活性成分の発見や、品種間の相互関係の解明につながると考えた。また、新しい植物成分の生理活性を発見することができれば、食品や嗜好品としての付加価値を高めることができると考えた。

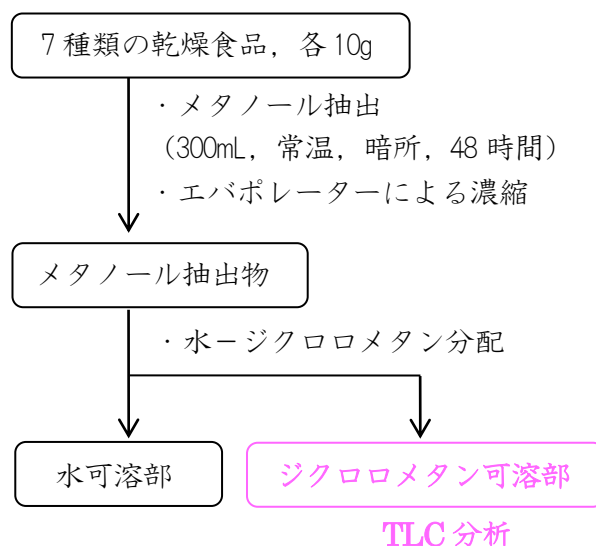
2. 方法

(1) 基礎研究

1) 乾燥食品のジクロロメタン可溶部の作成

市販の乾燥食品から日本茶・ほうれんそう・わかめ・のり・ひじき・こんぶ・しいたけの7種類を選んだ。乾燥食品を粉碎し、10gずつをビーカーに取ってメタノールを300mL加え、常温、暗所で48時間静置した。自然ろ過した抽出液を濃縮乾固して7種類のメタノール抽出物を得た。続いて、メタノール抽出物をイオン交換水とジクロロメタンを用いて完全に溶解し、分液ろうとを用いて分配操作を2回行い、溶部とジクロロメタン可溶部を得た(図1)。

図1 ジクロロメタン可溶部の作成



2) TLC分析に用いる展開溶媒の検討

ほうれんそうのジクロロメタン可溶部をTLCプレートに帯状に吸着させ、次の展開溶媒①～⑦を用いてそれぞれ分析した。分析は可視光下で行った。TLCプレートにはSilica gel 60 F₂₅₄ (MERCK)を用いた。

《展開溶媒①～⑦の組成》

- ① Acetone : Hx = 1 : 1 ② Acetone : Hx = 10 : 1 ③ Acetone : Hx = 5 : 1

- ④ Acetone : CH₂Cl₂ = 1 : 1 ⑤ Hx : CH₂Cl₂ = 1 : 1 ⑥ Hx : CH₂Cl₂ : Acetone = 1 : 1 : 0.1
 ⑦ Hx : CH₂Cl₂ : Acetone = 1 : 1 : 0.2

3) 溶媒⑦を用いたジクロロメタン可溶部の TLC 分析

7種類のジクロロメタン可溶部を、同一の TLC プレートにそれぞれ帯状に吸着させ、溶媒⑦を用いて分析した。分析は可視光下で行った。

4) ほうれんそうのジクロロメタン可溶部に含まれる物質の経時的変化の観察

ほうれんそうのジクロロメタン可溶部を TLC プレートに長く帯状に吸着させ、溶媒⑦を用いて展開した。C および D のスポットを別々にかき取って、それぞれサンプル瓶に移した。これにジクロロメタンを 1mL ずつ加えてかくはんし、C および D をそれぞれ単一に含むジクロロメタン溶液を得た。操作終了後 0 時間、および 24 時間について、それぞれ溶媒⑦で TLC 分析を行い、C と D のスポットの変化を観察した。分析は可視光下、および U.V.254nm, 366nm 照射下で行った。

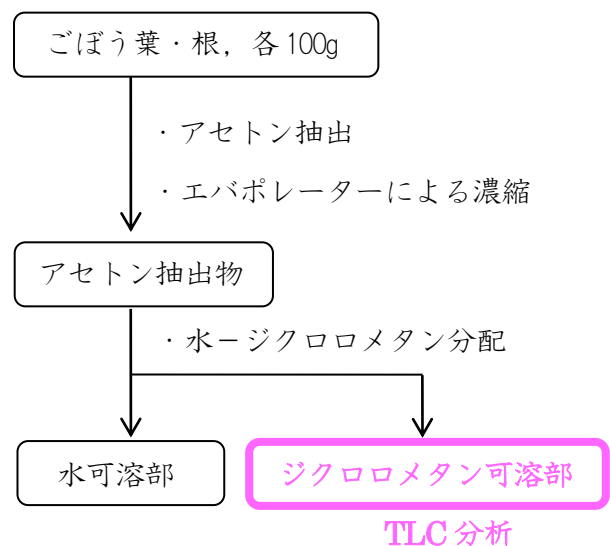
(2) 新規植物の成分検索

1) 大浦牛蒡の成分検索

大浦牛蒡（おおうらごぼう）は千葉県匝瑳地区大浦に限って栽培され、太さ 30 cm, 長さ 1m にもおよぶ特別品種の大ごぼうであり、「かつごぼう」「おぼけごぼう」の俗称もある。毎年 12 月に成田山新勝寺へ納めることでも知られ、新勝寺の精進料理の材料としてのみ利用され市場には流通していない^{※1}。大浦牛蒡保存組合の方々に直接連絡を取ったところ、大浦牛蒡の葉と茎、および可食部を手に入れることができた。そこで、各部位のアセトン抽出を行い、これらに含まれる物質の分析を行うことにした。

大浦牛蒡の地上部（葉、茎）と地下部（根、可食部）を分け、それぞれ細かく切って冷暗所で自然乾燥させた。また比較対照として、市販ごぼう地下部、乾燥ほうれんそうを用意した。それぞれをアセトン抽出し^{※2}、水・ジクロロメタン分配を行ってジクロロメタン可溶部を得た。（図 2）

図 2 ジクロロメタン可溶部の作製



2) セイヨウタンポポの成分検索

昨年度、第 10 回高校生バイオサミットにおいて、貴学先端生命科学研究所特任助教のガリポン・ジョゼフィーヌ氏に「ゴボウと近縁のタンポポの成分について検索すると面白いのではないかとアドバイスをいただいた。さっそく本校通学路で目にするセイヨウタンポポを採取し、地上部（葉、茎）と地下部（根）に分け、冷暗所で自然乾燥させた。それぞれアセトン抽出し、水・ジクロロメタン分配を行ってジクロロメタン可溶部を得た。

3) 大浦牛蒡・セイヨウタンポポのジクロロメタン可溶部の TLC 分析

溶媒⑦を用いて、大浦牛蒡およびセイヨウタンポポのジクロロメタン可溶部の TLC 分析を行った。

(3) 酵母菌を用いた簡易的な抗真菌活性試験

1) 大浦牛蒡およびタンポポのジクロロメタン可溶部の抗真菌活性試験

各抽出液に対して、酵母菌を用いた簡易的な抗真菌活性試験を行った。実験には帝京大学医真菌研究センターの石島早苗先生と安部茂先生が公表されている『安全で簡易な抗真菌活性の測定法マニュアル』^{*3}を参考にした。

電子レンジをで簡易滅菌水を作成し、グルコースとドライイーストを加えて一次発酵させた。この懸濁液を無菌条件下でクロラムフェニコール添加のポテトデキストロース培地に塗布した。これにジクロロメタン可溶部を浸みこませたペーパーディスクを乗せて、携帯かいろを入れて40~45°Cの条件で24時間培養し、阻止円ができるかどうか観察した。また、実験は、抽出物を溶かす溶媒の量を一定にすることで、可能な限り定量的に行った。

2) セイヨウタンポポ根のジクロロメタン可溶部に含まれる物質の精製

セイヨウタンポポのジクロロメタン可溶部をTLCプレートに带状に吸着させ、溶媒⑦を用いて展開した。A~Fのスポットを別々にかき取ってそれぞれサンプル瓶に移した。これにジクロロメタンを1mLずつ加えてかくはんし、遠心分離機にかけてシリカゲルを取り除いて、A~Eをそれぞれ単一に含むジクロロメタン溶液を得た。

3) セイヨウタンポポ根に含まれるA~Eの各成分の抗真菌活性試験

A~Eの各成分について、(3)の1)と同様の方法で抗真菌活性試験を行った。

3. 結果

(1) TLC分析に用いる展開溶媒の検討

展開溶媒⑦で同様に分析したところ分解能が向上し、新たに多くのスポットが確認できた。このため、これ以降のTLC分析には展開溶媒⑦を用いることにした(図3)。

(2) 溶媒⑦を用いたTLC分析

1) 7種類の乾燥食品ジクロロメタン可溶部の分析

ほうれんそうに多く含まれるCとDのスポットが日本茶に見られないのは、日本茶の製造工程で他の物質に変化したからと推測した。一方でAとBは日本茶、ほうれんそう共に強く現れていることからこれらのスポットに含まれる物質は、他の物質に比べて安定である」と推測した(図4)。そこで、ほうれんそうのジクロロメタン可溶部に含まれる各スポットをかき取りによって精製し、経時変化を観察して各スポットの相互関係を調べることで、上記の仮説を検証した。

実験の過程で、分取操作後にシリカゲルを除去し

図3 展開溶媒の検討(可視光下)

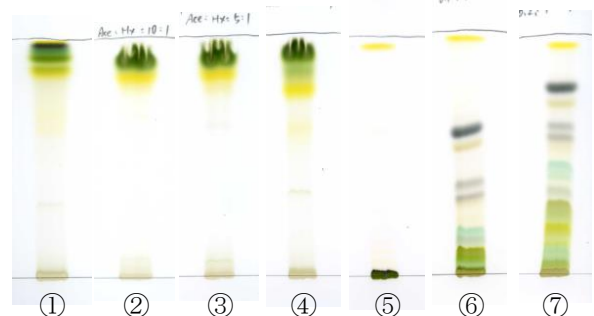
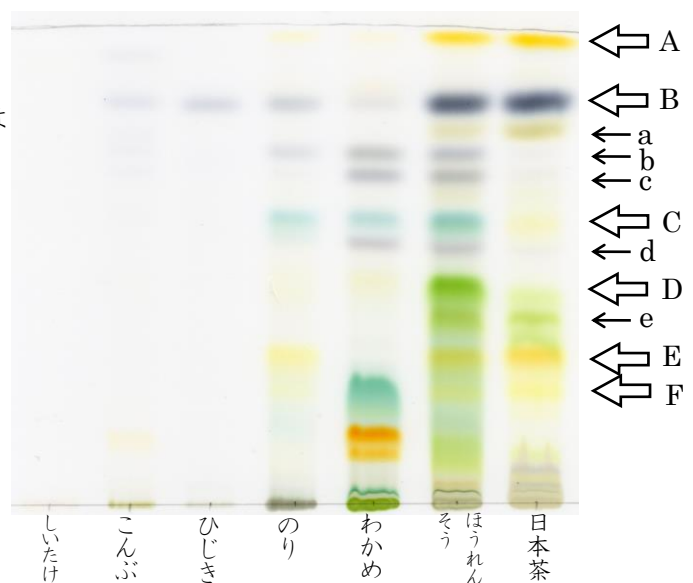
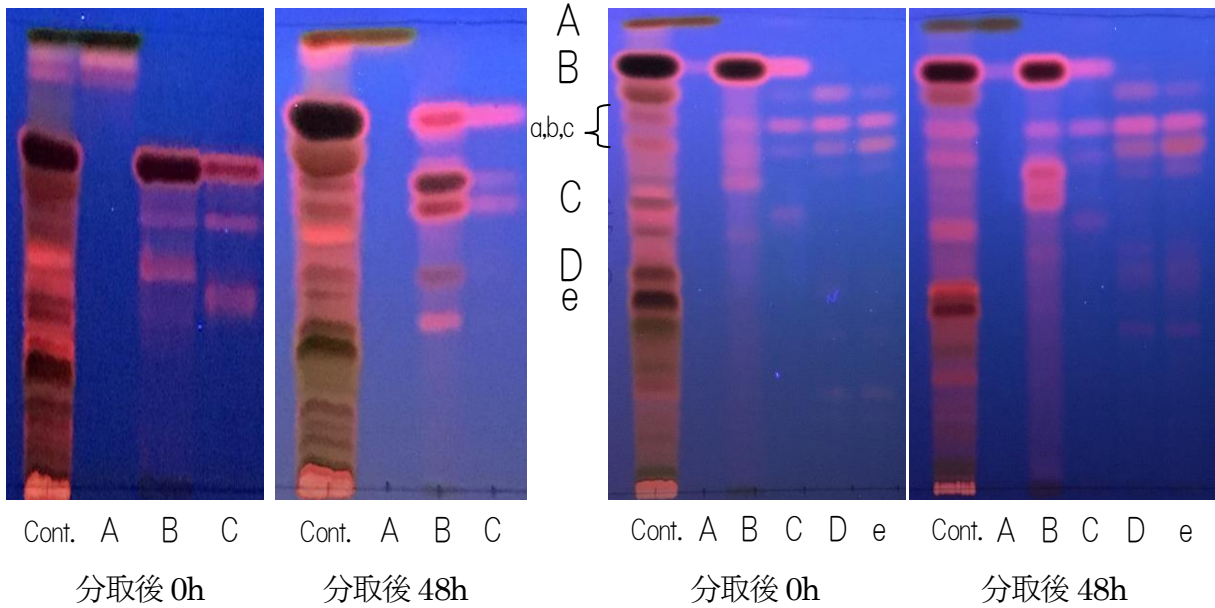


図4 ジクロロメタン可溶部のTLC分析(可視光下)



なかった場合、Bのスポットがうすくなり、他の位置に新たなスポットが確認できた。そこで分取操作後すぐに遠心分離機でシリカゲルを除去したものと比較したところ、Bの極性変化は抑えられ、そのぶんC、D、eのスポット変化が明確に表れた。C、D、eは分取後0時間で消失、もしくは非常にうすくなり、時間の経過とともにCはBの位置に、D、eはa、b、cの位置に、それぞれ新たなスポットとして現れた。これより、C、D、eは不安定な物質で、容易にBやa、b、cに変化することが示唆された。また、スポット変化の全体像として、CはまずBの位置に変化した後、再び他の位置に変化することが示唆された。一方でD、eからはBは生じず、直ちにa、b、cの位置に極性が変化することが示唆された（図5）。

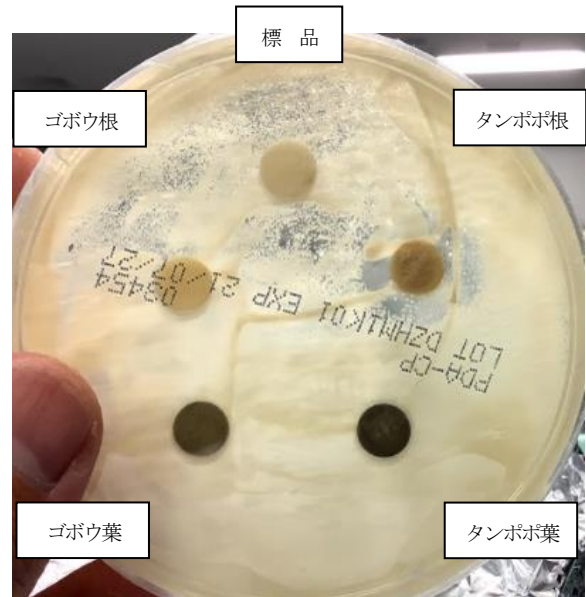
図5 ほうれんそうのジクロロメタン可溶部に含まれる物質の経時変化の観察（UV,366nm照射下）
シリカゲルを除去しなかった場合 遠心分離機でシリカゲルを除去した場合



2) 大浦牛蒡・セイヨウタンポポのジクロロメタン可溶部の抗真菌活性試験

大浦牛蒡およびセイヨウタンポポの地上部・根のジクロロメタン可溶部について、抗真菌活性試験を行った。また、標品としてドルマイシン軟膏（ゼリヤ新薬工業）0.1g をイオン交換水 5mL に溶かしたものをを用いた。ドルマイシンにはバシトラシンが含まれており、酵母菌などのグラム陽性細菌の繁殖を抑制すると考えた。抗真菌活性試験の結果、標品のドルマイシン希釈液に広く阻止円らしきものが観察できたのに加え、タンポポ根に明確な阻止円が観察された（図6）。

図6 ジクロロメタン可溶部の抗真菌活性試験

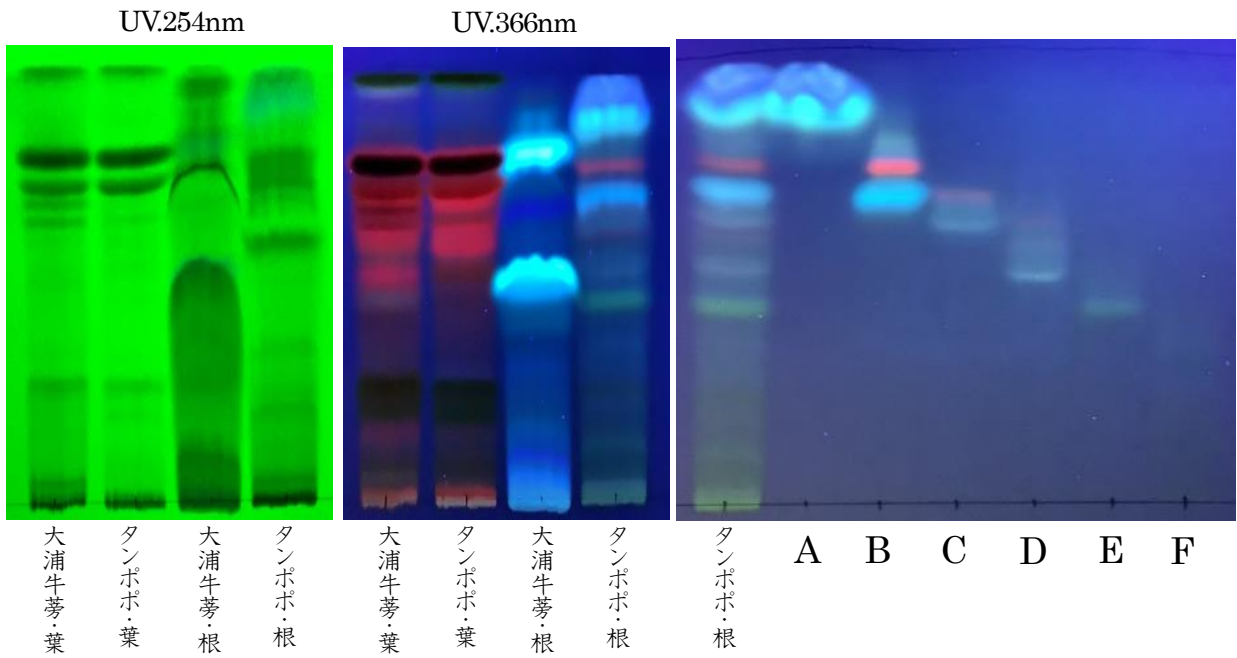


3) 大浦牛蒡・セイヨウタンポポのジクロロメタン可溶部の TLC 分析と、かきとりによる精製

大浦牛蒡およびセイヨウタンポポの地上部および根のジクロロメタン可溶部について、溶媒⑦による TLC 分

析を行った。また、セイヨウタンポポ根の成分のうち、どのスポットに抗真菌活性があるかを確認するため、物理的にかきとり可能な6か所(A~F)を適当に定め、かきとりによる精製を行った(図7)。

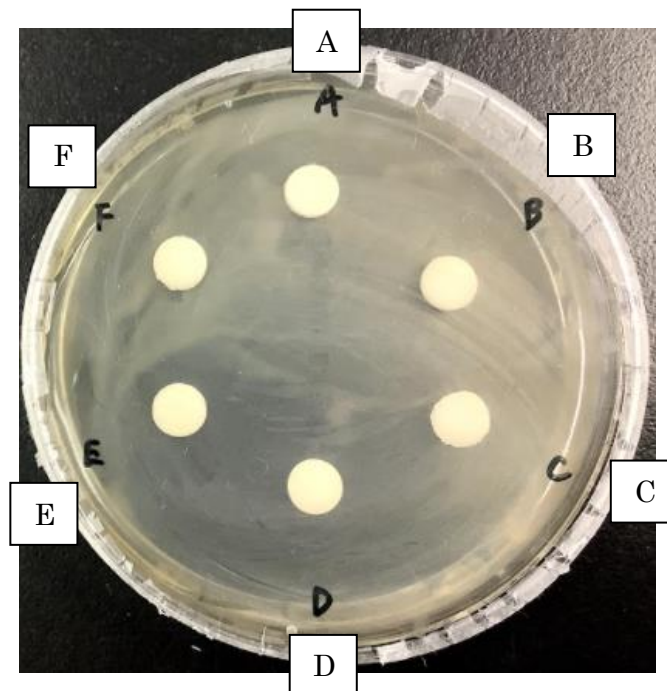
図7 TLC分析とかきとりによる精製



4) A~Fの抗真菌活性試験

セイヨウタンポポのジクロロメタン可溶部A~Fについて、抗真菌活性試験を行った。D~E付近で酵母菌の繁殖が抑制されているように見えたが、明確な阻止円は確認できなかった(図7)。

図7 A~Fの抗真菌活性試験



4. 考察

(2)の1)で、ほうれんそうに多く含まれるCとDのスポットが日本茶にほとんど見られないのは、お茶の製造工程でCやDが別の物質に変化したためではないか。これを踏まえて(2)の2)を行い、CはBに変化することが示唆された。また、Dについても新たなスポットが観察できたが、A~Fと同様のR_f値を示さないことから別の物質であることが示唆された。今後は、CとD以外のスポットについても、その相互関係について調べたい。

また、天然物には実験条件によっては容易に変化するものがあることがわかった。仮にCやDが健康増進に役立つ栄養成分ならば、これらが変化しないように工夫することで、より栄養価の高い食品が製造できるのではないか。シリカゲルには酸化作用があると聞いたことがあるので、TLC分析はできるだけ素早く行い、分析の回数もできるだけ少なくする必要があるのではないか。

また今回、タンポポ根のジクロロメタン可溶部に見られた抗真菌活性を示す成分を特定することができなかった。予備実験ではEに阻止円が観察できたが、今回は酵母菌の繁殖も弱く明確に確認できなかった。失敗の原因として、かきとり操作によってA~Fの濃度がうすくなってしまい活性の閾値に至らなかったことや、A~Fのうちいくつかの成分が協調して一定の活性を示している可能性を考えた。Eは多くのスポットが混在している部分であり、R_f値が小さいことから極性の大きな化合物の混合物ではないか。今後は一定量のサンプルを得るために、カラムクロマトグラフィーによる大量精製も行いたい。

5. 今後の実験計画

(1) タンポポ根の抗真菌活性を示す物質の特定

より高濃度のサンプルを用いて抗真菌活性試験を行いたい。一定量のサンプルを得るために、カラムクロマトグラフィーによる大量精製を行いたい。

(2) 抗菌活性の汎用性の検証

タンポポ根の抗真菌活性成分が、酵母菌以外の様々な菌に対しても効果を発揮するかどうか調べたい。

(3) 抗菌活性の新規性の確認

活性を示す成分が特定されたら、それがセイヨウタンポポだけに含まれる成分かどうかを調べたい。

6. 謝辞

抽出溶媒にアセトンが適当であることをご教示くださった東京農業大学の高市真一先生、タンポポ抽出物の検索をアドバイスくださった慶應義塾大学のガリポン・ジョゼフィーヌ先生、また今後の実験の方向性についてご指南くださった大阪市立大学の藤井律子先生、大浦牛蒡の研究を後押ししてくださった大阪市立大学の西川慶祐先生に感謝申し上げます。

7. 参考文献

- ※1 『大浦牛蒡』八日市場市史編さん委員会
- ※2 『光合成研究法』北海道大学低温科学研究所・日本光合成研究会 共編
- ※3 『安全で簡易な抗真菌活性の測定法マニュアル』石島早苗・安部茂（帝京大学医真菌研究センター）