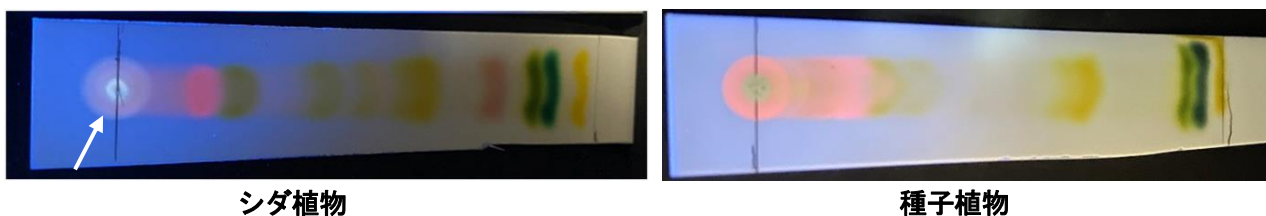


シダ植物に見られる蛍光成分の特定

静岡県立磐田南高等学校
生物部 2年 木野裕斗 1年 有藤葵

1. 動機

本年度(2021 年度)の始めに、新入部員の研究に対する興味・関心を引く為に様々な実験を行った。その一環として、TLC (薄層クロマトグラフィー) を使い、近くの公園や神社などの植物の葉の成分を展開した。成分を展開し、クロロフィルの蛍光を見るために紫外線ライトを当てたところ、スギナ等のシダ植物の TLC 原点に、他の種子植物にはみられない青い蛍光成分を確認することができた。資料 1 の矢印が、シダ植物の原点に現れた蛍光成分である。これらの結果からシダ植物にみられる蛍光成分について興味を持ち、今回はこの青い蛍光成分について最も蛍光が強かったスギナを中心に研究を始めた。



資料 1 TLC による成分展開の結果

2. 仮説

- (1) 種子植物にみられないため、青い蛍光成分はシダ植物から種子植物に進化する過程で失われた成分である
- (2) 青い蛍光成分は、蛍光が多くみられるフラボノイドの内、水溶性のアントシアニン系の物質である。

3. 材料・機器等 (資料 2)

〈材料〉スギナ *Equisetum arvense*、オシダ属のシダ *Dryopteris.sp.* 種子植物各種

〈器具〉展開槽、紫外線ライト(375nm)、紫外線灯 (254nm,365nm)、TLC プレート、ろ紙

〈機器〉ロータリーエバポレーター、核磁気共鳴装置 (NMR)、

フォトルミネッセンス分光分析装置 (励起光 325nm)、分光光度計 (UV-2550)

〈薬品〉ジエチルエーテル、石油エーテル、アセトン、メタノール、塩酸、酢酸エチル、酢酸ヘキサン、アセトニトリル



スギナ



オシダ属のシダ



ロータリーエバポレーター

資料 2

4. 研究 1 TLC：脂溶性(極性なし)成分の展開

(1) 方法

脂溶性の抽出溶媒と展開液の組み合わせを、資料3のように2種類作り、採集した植物の葉でTLC展開した。

【植物】スギナ・オシダ属シダ・ヨモギ・カシ・セイタカアワダチソウ・シロツメクサ

1	抽出溶媒	ジエチルエーテル
	展開溶媒	石油エーテル：アセトン=7：3
2	抽出溶媒	石油エーテル：アセトン=7：3
	展開溶媒	ジエチルエーテル

資料3 使用した抽出・展開溶媒の組み合わせ

(2) 結果・考察

脂溶性成分の展開において、スギナ、オシダ属のシダに加え、種子植物のシロツメクサにも青い蛍光成分がみられた。シダ植物は共通して青い蛍光成分を持っているが、種子植物にも蛍光成分があるため、青い蛍光成分は「シダ植物固有の色素ではない」ことがわかった。また、成分が原点に残り脂溶性溶媒で展開されなかったことから、青い蛍光成分は脂溶性ではないことが分かった。

5. 研究 2 ペーパークロマトグラフィー：水溶性(極性あり)成分の展開

(1) 方法

脂溶性溶媒では原点から展開しなかったため、青い蛍光成分が水溶性であるか調べるため「TLCプレート」ではなく「ろ紙」を用いて蛍光成分の展開を試みた。抽出溶媒と展開溶媒は、アントシアニン展開用の溶媒(資料4中5番)を含む、極性の大きい溶媒を使用した。

【植物】スギナ・オシダ属のシダ

3	抽出溶媒	水
	展開溶媒	水
4	抽出溶媒	エタノール
	展開溶媒	エタノール
5	抽出溶媒	塩酸:メタノール=1:1
	展開溶媒	酢酸エチル:酢酸:水=4:1:2

アントシアニン
展開用の溶媒

資料4 使用した抽出・展開溶媒の組み合わせ

(2) 結果・考察

青い蛍光成分は、資料4の溶媒3・溶媒4によって移動し、アントシアニン展開用の溶媒5によって展開されることがわかった(資料5)。そのため青い蛍光成分は、水酸基を多く持ち水に溶けやすいアントシアニンである可能性が高まった。



資料5 溶媒5によって展開された青い蛍光成分

6. 研究 ③ 成分分析

高校の所有する機材では、成分分析ができなかったため、静岡理工科大学に協力していただき、次の A,B,C 3 つの方法で成分分析を行った。

A TLC : 脂溶性(極性なし)成分の展開

(1) 方法 (資料 6)

- ① 分液漏斗を用いてオシダ属のシダの脂溶性成分を抽出する
- ② 抽出した脂溶性成分を、エバポレーターで濃縮していただく(静岡理工科大学が操作)
- ③ 資料 7 の 2 種類の脂溶性溶媒を用いて、ガラス TLC で濃縮した脂溶性成分を展開する。

【植物】オシダ属のシダ



分液漏斗



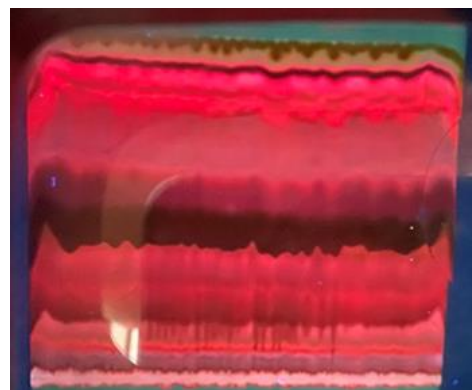
資料 6 ガラス TLC

6	展開溶媒	ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1
7	展開溶媒	ヘキサン : 酢酸エチル = 9 : 1

資料 7 使用した抽出・展開溶媒の組み合わせ

(2) 結果

TLC で展開された脂溶性成分は、紫外線灯を当てると、資料 8 のように赤の蛍光が強く現れたが、青い蛍光成分は発見できなかった。このことから青い蛍光成分は脂溶性ではないと改めて確認できた。



資料 8 脂溶性成分の展開

B TLC : 水溶性(極性あり)成分の展開

(1) 方法

- ① スギナの水溶性成分を抽出する
- ② 抽出した水溶性成分を、エバポレーターで濃縮していただく(静岡理工科大学が操作)
- ③ 資料 9 の 2 種類の水溶性溶媒を用いて、ガラス TLC で濃縮した水溶性成分を展開する。

【植物】スギナ

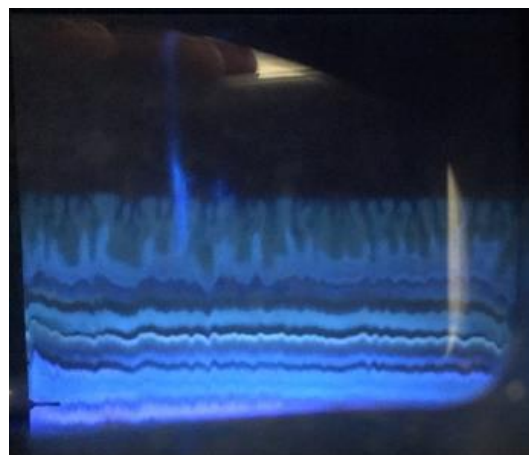
8	展開溶媒	メタノール : 水 = 1 : 1
9	展開溶媒	アセトニトリル : 水 = 1 : 1

資料 9 使用した抽出・展開溶媒の組み合わせ

(2) 結果

溶媒 8・9 の両方で青い蛍光成分が展開されたため、青い蛍光成分が水溶性であると改めて確認できた。資料 10 は、溶媒 8 でガラス TLC 上に展開された水溶性成分に 365nm の紫外線灯を当てて蛍光させた写真である。濃縮された成分 100mL から、鮮やかに蛍光する多数のバンドに分かれたことが確認できた。

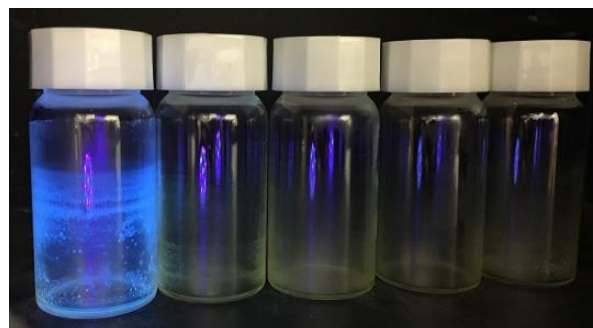
展開された順に、資料 11 のように、成分 F1~F5 とした。次に展開された成分をシリカゲルの層ごとに削り取り、シリカゲルからメタノールと水で抽出した後、濃縮した。濃縮した成分 F1~F5 を紫外線灯にあてると、資料 12 のように成分 F1 が最も強く蛍光を発していた。



資料 10 水溶性成分の展開



資料 11 展開した順に成分 F1~F5 とした



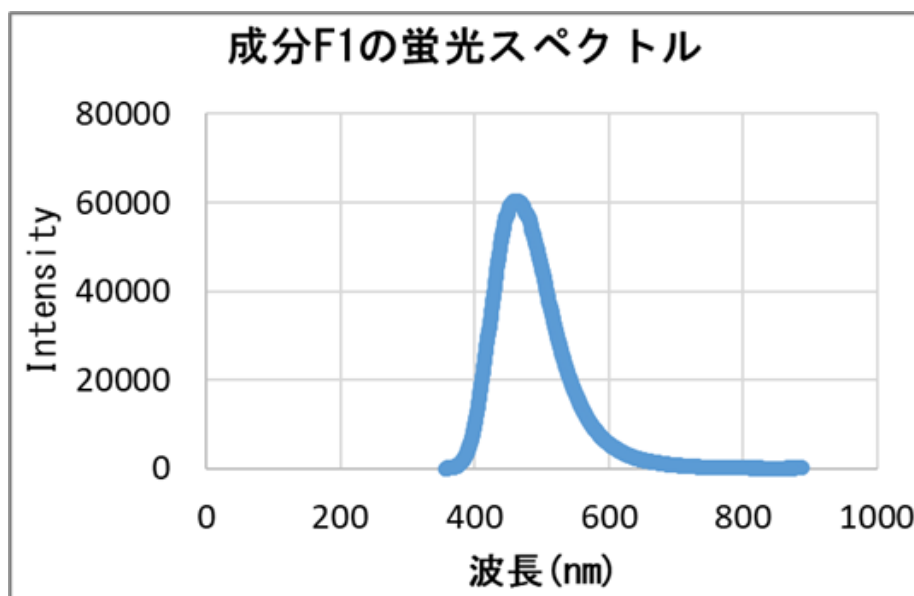
資料 12 左から成分 F1, F2, F3, F4, F5

C 蛍光・吸収スペクトル測定装置、NMRによる分析

大学の精密機器を使い、濃縮した青い蛍光成分の蛍光スペクトル、吸収スペクトルを測定していただいた。また、後にNMRでの分析結果をいただいた。

(1) 蛍光スペクトルの測定結果

資料13は、成分F1に紫外線を当てた時に発する蛍光の色や強さを表している。成分F1は成分F2～F5と比べて20～70倍も強く光り、蛍光波長のピークは460nmの青色であることがわかった。そのため我々が観察してきた青い蛍光成分はF1である可能性が高いと考えられる。また、成分F2～F5は500nmの緑色の辺りでピークを示した(資料14)。



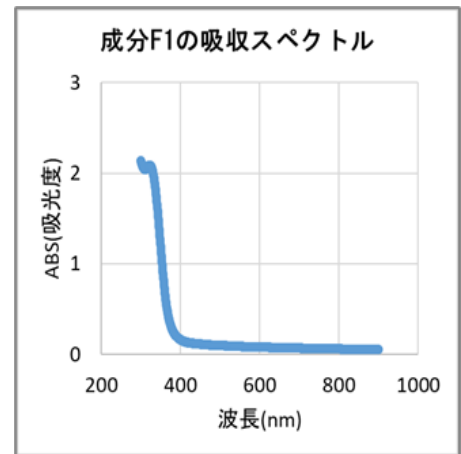
資料13 成分F1の蛍光スペクトル

成分	ピーク波長(nm)	最高光度	蛍光色
F1	460	60200	青
F2	515	3100	緑
F3	539	880	緑
F4	502	1420	緑
F5	539	755	緑

資料14 成分F1～F5の蛍光スペクトル

(2) 吸収スペクトルの測定 結果

資料 15 は成分 F1 の吸収波長である。成分 F1 が吸収する波長は 320nm の長波長の紫外線の辺りでピークを示した。このことから、成分 F1 は植物にとって有害な紫外線を吸収している可能性がある。

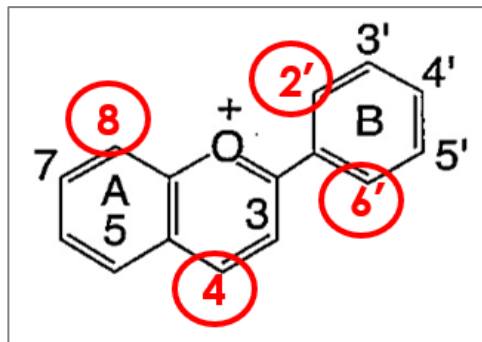


資料 15 成分 F1 の吸収スペクトル

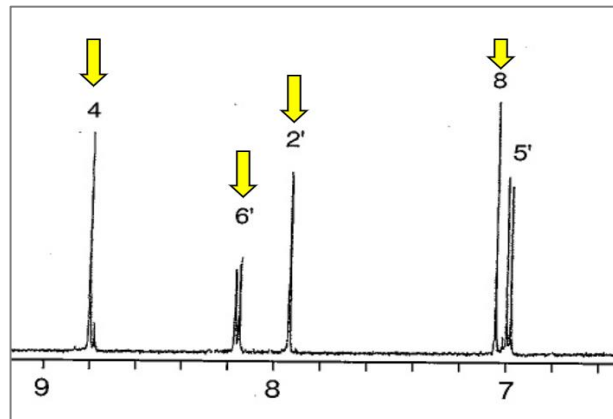
(3) NMR の測定 結果

資料 17 (植物色素フラボノイド より) の矢印部分は $^1\text{H-NMR}$ による分子構造の分析においてアントシアニンにみられる特徴的なピークを表している。8ppm の前後にピークが見られるのがアントシアニンの特徴である。資料 16 の番号に結合する水素の場所が資料 17 に示されている。

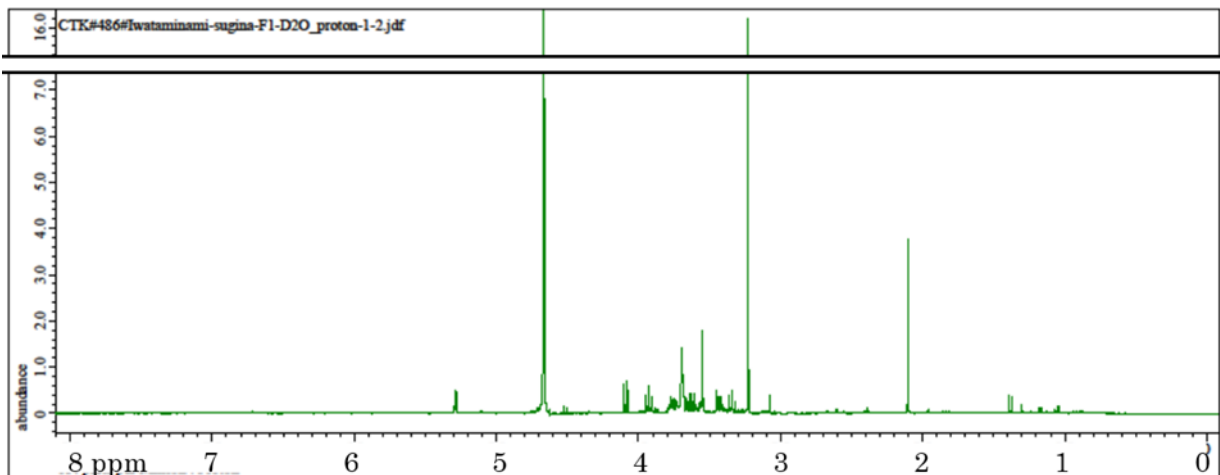
一方、成分 F1 の実際の $^1\text{H-NMR}$ の分析結果は資料 18 のとおりである。残念ながら成分 F1 には、アントシアニン特有のピークが見られなかった。そのことから、成分 F1 はアントシアニンではないことが判明した。また、横軸の 7.0ppm 辺りに芳香族化合物特有のピークがみられず、成分 F1 は芳香族化合物でもない事がわかった。



資料 16 アントシアニンの基本構造



資料 17 NMR におけるアントシアニン特有のピーク



資料 18 成分 F1 の $^1\text{H-NMR}$ 分析結果

7. まとめ

- (1) 青い蛍光成分は「シダから種子植物に進化する過程で失われた成分」ではない
- (2) 青い蛍光成分は水溶性である
- (3) 蛍光の強さと波長より、これまでの実験で確認された青い蛍光成分は最も光の強かった成分 F1 が主な成分である
- (4) 成分 F1 はアントシアニンではない。

8. 今後の課題

- (1) 青い蛍光成分を解明するために、多くの種類の抽出溶媒・展開溶媒で展開して特徴を絞り込む
- (2) 青い蛍光成分はどのような役割を持つのか調べるため、蛍光成分の増加する時期を特定する
- (3) B 水溶性(極性あり)成分の展開(研究³成分分析)において、青い蛍光成分には青い蛍光を発する成分や緑の蛍光を発する成分など様々な物質が含まれることが分かった。特定を進めるためにも、様々な溶媒で実験を行いこれらの成分をよりうまく展開できる溶媒を探したい。

9. 参考文献

- ・植物化学調節実験法 高橋 信孝(植物化学調節学会)
- ・植物色素フラボノイド 武田 幸作・齋藤 規夫・岩科 司(文一総合出版)
- ・日本の野生植物シダ 岩槻邦男(平凡社)

10. 謝辞

静岡理科大学 理工学部物質生命科学科 鎌田昂先生

同 先端機器分析センター 脇川祐介先生

同 鎌田研究室 佐藤光将様、川野仁様、加藤竜矢様、栗本隆世様

本研究にご協力いただいた静岡理科大学の皆さまに感謝申し上げます。ありがとうございました。