

# スギナに見られる蛍光成分Ⅳ

静岡県立磐田南高等学校 生物部

2年 長谷川帆風 村上陽菜 田中純平 1年 稲垣遼太郎 平野朱梨 柳田遼 山崎新

## 1 動機

2021 年度の新入生勧誘実験で葉のクロロフィル蛍光を観察するために、薄層クロマトグラフィー(TLC) のシリカゲルシートに紫外線を当てたところスギナの原点に青い蛍光成分を確認、その後の我々の研究で水溶性と判明した。一般に蛍光物質は、脂溶性は多い一方水溶性は少なく、同じ性質を持つ蛍光物質の文献も見つからない。化学構造が分かっている物質の研究に比べ、化学構造を調べる研究は難しく、これまでの研究で様々な特徴が分かってきたもののいまだ具体的な成分候補や構造が明らかになっていない。そこで、2024 年度こそは蛍光成分の化学構造を明らかにしたいと思い研究を進めた。

## 2 過年度研究

青い蛍光成分についてこれまでに判明したことは以下の通りである。①水溶性である。②高温乾燥に強く安定している。③細胞壁（特に二次細胞壁）に見られる。④二次細胞壁がよく蛍光することからリグニンやセルロースの前駆物質ではないか。⑤OH<sup>-</sup>の作用により蛍光が長波長側（緑色）にシフトし、また可逆性がある。

## 3 材料・機器等

{材料} スギナ *Equisetum arvense*

{薬品} 蒸留水（以下、水）、メタノール、酢酸エチル、酢酸、クロロホルム、メタノール、アセトン、トリメチルシリル化剤（TMSI-C）、スクロース（以下ショ糖）、重クロロホルム、重水、重ジクロロメタン、重アセトン、ヒドロキシメチルフルフラール

{器具} 紫外線ライト（375 nm）、紫外線灯（365 nm）、展開槽、濾紙、TLC（シリカゲル、アルミナ）

{機器} アスピレーター、ガスクロマトグラフィー質量分析装置（以下 GC-MS）、核磁気共鳴装置（以下 NMR）、恒温乾燥機、ロータリーエバポレーション、遠心分離機、吸引ろ過装置

## 4 仮説

青い蛍光成分はリグニンまたはセルロースの前駆物質かそれに関与する物質である。分子構造は、蛍光物質に多いベンゼン環もしくは六員環のピラノース形（ベンゼン環の炭素 1 つが酸素に置き換わったもの、糖に幅広くみられる）のような広範な共役系（ $\pi$ 電子系）を持ち、水酸基（-OH）があるために水溶性の性質を持つ。

## 5 試料作成

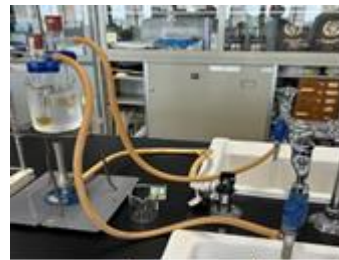
乾燥させたスギナを粉末化したもの 3 g に水 200ml 加え、1 日置いたものをスギナ抽出液とする。

## 6 試料濃縮

- (1) 半透膜のセロファンチューブに入れたスギナ抽出液を、飽和ショ糖溶液内に入れ、透析を使い濃縮した。この濃縮方法を「非加工非加圧」法と呼ぶこととする（資料 1）。
- (2) スギナ抽出液を、アスピレーターを用いて減圧しながら、湯煎による加熱で濃縮した。こ



資料 1



資料 2

の濃縮方法を「加熱減圧」法と呼ぶこととする（資料2）。

## 7 実験1

濃縮した試料を、TLC を用いて成分を分離。その後再抽出した成分を、GC-MS や NMR にかけて成分分析を行い、化学構造の特定を目的とした。

### 【実験1-1 ; GC-MS】

再抽出した成分のうち揮発性の成分を検出することを目的とした。

#### <方法>

加熱減圧法と非加工非加圧法によって得られた濃縮液を、それぞれ濾紙の二次元クロマトグラフィーにより分離して実験を行った。また、展開溶媒として、二次元クロマトグラフィーの一次展開と二次展開にて、様々な溶媒を試した結果最もはっきりとしたバンドが得られたため、どちらも水：メタノール=1：1の溶媒を用いている。展開した濾紙からの再抽出では、吸引ろ過装置（ポータブルアスピレーター）を用いた。吸引ろ過装置を用いて再抽出する際、初めにクロロホルム、次に水で再抽出した。これは予備実験で、二次元クロマトグラフィーでも不純物が混ざっていることが分かったため、極性分子と無極性分とで分けて再抽出することで混ざっている成分を少なくすることを目的とした。クロロホルムによる再抽出液、水による再抽出液をそれぞれ DB-WAX カラムを用いて GC-MS 分析を行った。

#### <GC-MS の設定>

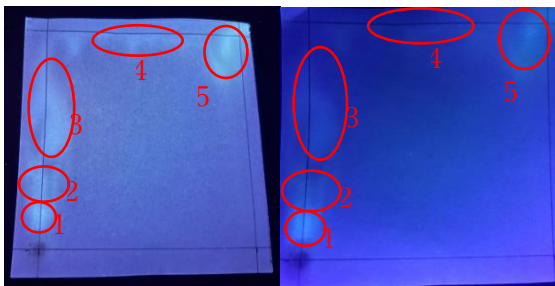
・カラムオープン温度 80.0℃。・気化室温度 300.0℃。・測定時間 32 分間。

#### <展開結果>

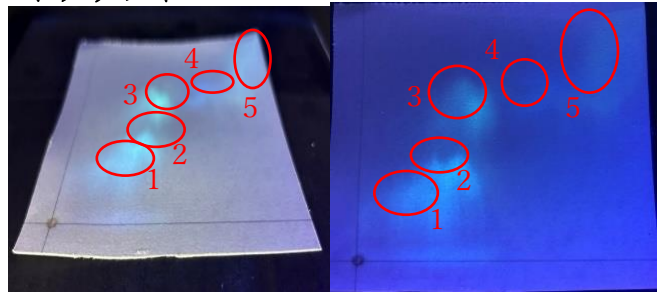
非加工非加圧の二次元クロマトグラフィー結果を以下に示す。蛍光部分を展開原点から近い順に F1～F5、とする。（資料3）

加熱減圧の二次元クロマトグラフィー結果を以下に示す。蛍光部分を展開原点から近い順に F1～F5、とする。（資料4）

二次元クロマトグラフィー



資料3



資料4

#### <結果>

各再抽出した試料を GC-MS にかけた結果を下に示す。ただし、仮説に基づく物質もしくは紫外線により蛍光する可能性のある物質のみ記載することとする。

		F1	F2	F3	F4	F5
非加工非加圧	クロホルム	×	×	×	×	×
	水	×	HMF	HMF マルトール	HMF マルトール	HMF
加熱減圧	クロホルム	×	×	×	×	パニコシ
	水	×	×	×	×	HMF

【HMF】 正式名称は 5-ヒドロキシメチルフルフラールである。水再抽出でのみ検出された

め極性の強い分子である。二次元クロマトグラフィーでは、成分が分離されているはずのセロファンによる非加工非加圧法において、ほとんどの試料から検出された。

【バニリン】 クロロホルム再抽出の加熱減圧法「F5」でのみ見られた。濾紙クロマトグラフィーでは最初に水で抽出しているため水溶性ではあるが、クロロホルムに再抽出されやすい物質であることがわかる。

【マルトール】 非加工非加圧法でのみ見られた。正確には、3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-2,3-ジヒドロ-4H-ピラン-4-オン (2,3-Dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) である。

### <考察>

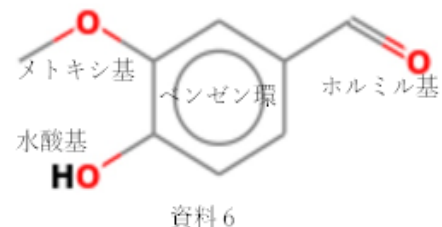
【HMF】 HMFはフラン環にヒドロキシメチル基がついた構造を持っており(資料5)、広い共役系を持つ。また、植物生体内で生成される物質であることが分かった<sup>1)</sup>平本(1997)。よって、ここで青い蛍光成分の候補としてHMFを挙げることにする。



一方、SDBS (日本国立先進産業科学技術研究所)、NIST chemistry WebBook (米国技術標準局) どちらのデータベースにもHMFの紫外線吸収スペクトルのデータがなかったため、今後、紫外線吸収スペクトルを測定し検証するつもりである。

アスピレーターによる加熱減圧法の試料と比べて、非加工非加圧法の試料に多く見られた。非加工非加圧法は、セロファンによる透析であり、その際ショ糖が使われている。透析の際に糖が混入し、GC-MSの気化室内で加熱分解されて検出されたといえる。ただし、糖が混入していない加熱減圧の試料の「F5」においてHMFが見られたことから、スギナにHMFは含まれていると考えられる。HMFが気化室内で加熱分解されたものでないと証明するため、HMF試料で同様に二次元クロマトグラフィーを行い「F5」と同じ位置に来ることを検証したい。

【バニリン】 バニリンは、ベンゼン環に水酸基、メトキシ基、ホルミル基が電子供与性の置換基としてついた構造を持っており(資料6)、共役系が広がっている。

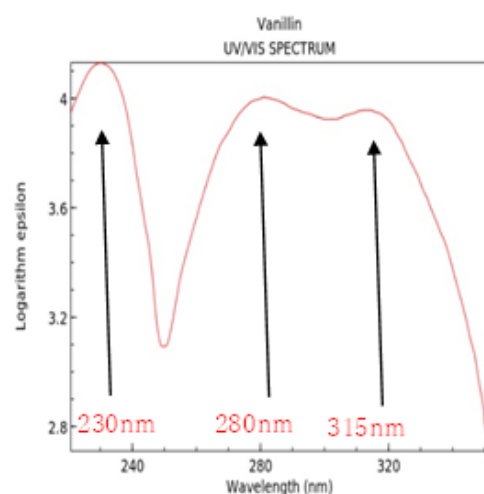


さらにNIST chemistry WebBook (米国技術標準局)の吸光度スペクトルデータ(資料7)によると230 nm、280 nm、315 nm付近の波長の光を吸光していることが分かった。ただ、バニリンがスギナの代謝物であるという報告は一切ない。一方、バニリンは木質のリグニンの分解過程で生成されるフェニルプロパノイド化合物としても知られている。今後、より厳格な単離方法や再抽出法を確立させ再度検査するなど、更なる考慮と評価をしていくつもりである。

アスピレーターによる加熱減圧法の試料でのみ見られるが、気化室の300°Cで成分が変化せず、アスピレーターによって変化したとは考えられないため、バニリンはスギナにみられる成分候補として挙げても良いと思われる。

【マルトール】 検出されたマルトール(3,5-ジヒドロキシ-6-メチル-2,3-ジヒドロ-4H-ピラン-4-オン)

は、ピラン環にカルボニル基がついた構造を持っており(資料8)、広くはないが共役系を持つ



NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry>)

資料7 (NIST chemistry WebBook より)

ている。

しかし、SDBS（日本国立先進産業科学技術研究所）、NIST chemistry WebBook（米国技術標準局）どちらのデータベースにも紫外線吸収スペクトルのデータがなかったため、今後試料を購入してスペクトルを測定し検証するつもりである。

### 【実験 1-2 ; NMR】

予備実験において、溶媒の重クロロホルムが試料のピークと重なってしまうという課題があったため、複数の重溶媒を試し NMR にて分析した。ただし、NMR 分析に用いる重溶媒は高価なため、異物混入が考えられる非加工非加圧法の試料は分析せず、加熱減圧法の試料のみを分析した。

#### <方法>

実験 1-1 で用いた加熱減圧法より得られた試料である F1, F2, F3, F4, F5 にて、クロロホルム再抽出と水再抽出を混ぜて乾燥させ、重クロロホルム、重アセトン、重水に溶解して NMR にかけた。結果は、Fn (F1~F5) の後ろに溶解した溶媒を次のように表記する。

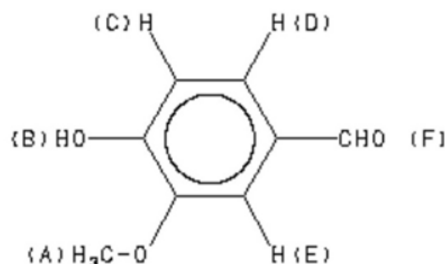
・重クロロホルム「Fn CDCl<sub>3</sub>」 ・重アセトン「Fn CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>」 ・重水「Fn D<sub>2</sub>O」

#### <NMR のグラフ・設定>

横軸は磁場の周波数で基準となる周波数 (Hz) からのずれを ppm で表す(400MHz を 0 ppm とする)。縦軸が信号強度 (共鳴強度)。コンピュータによる計算処理は積算数 128 回で行っている。グラフから物質の持つ H の位置を推測できる。

#### <結果>

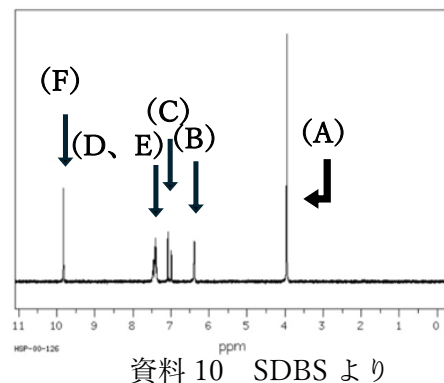
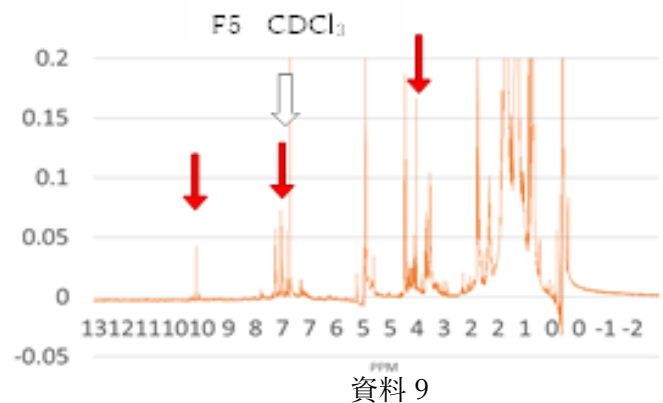
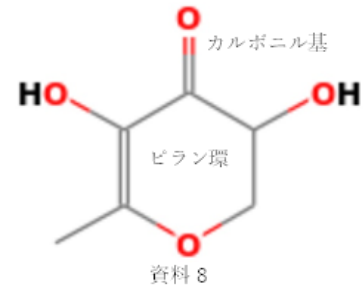
結果のうち代表的なものを資料 9 に示した。「F5 CDCl<sub>3</sub>」(重クロロホルム溶媒 F5) において(資料 9 の赤矢印部分)にバニリンのピーク(資料 10)と同じものが確認された。重クロロホルム溶媒「Fn CDCl<sub>3</sub>」の F4, F5 と重アセトン溶媒「Fn CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>」のすべてに芳香族化合物のプロトン(H) が引き起こしたと思われるピーク(資料 9 の白抜き矢印部分)が複数本重なってみられた。



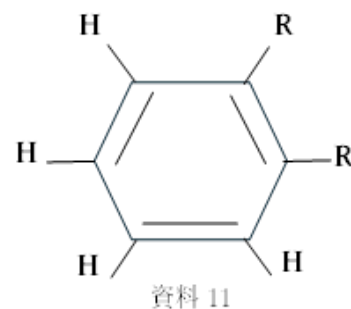
#### <考察>

実験 1-2 と同様にバニリンが F5 に含まれる成分であると言える。重アセトン溶媒の結果にはバニリンと思われるピークがみられなかったため、バニリンはアセトンには溶解しない物質と考えられる。

資料 12 の白抜き矢印部分に芳香族化合物のプロトン(H) が引き起こしたと思われるピークが複数本重なってみられたことから複数の芳香族化合物が含まれているか、異なった置換基を持



つ芳香族化合物が含まれている可能性が考えられる。また、ここでフラボノイドの構造が関与している可能性が生じた。その場合、2.0~6.0ppmのピーク（水酸基やメトキシ基など）が出るはずであるが、複数の別のピークや溶媒のピークが重なり詳しい観察はできない。さらにここにみられるピークの形から構造を考察すると資料11のような構造になるという（静岡理工科大学、小泉先生にご教授いただいた）。Rは置換基である。



複数のピークが混在していることから、やはり単離ができていないことが考察され蛍光成分の同定のためには、シリカゲルやアルミナ TLC による分離方法を確立させる必要がある。

## 8 実験 2

HMF が蛍光成分とは関与がないことやスギナに含まれる成分であること、加熱減圧法による濃縮についての正確性を検証する。また、実験 1-2 の分析で得られた構造の特徴から、芳香族化合物、特にフラボノイドの抽出や展開に適した方法を試し、高精度な単離方法の確立を目指す。

### 【実験 2-1 ; HMF の検証】

HMF 試料及び比較の水を展開し、HMF が検出された加熱減圧による試料の展開結果と比較する。

#### <方法>

HMF 試料を、濾紙を用いて二次元クロマトグラフィーを水：メタノール=1：1の展開溶媒で行い、HMF が検出された資料 4 と比較する。同様に比較の水も行う。

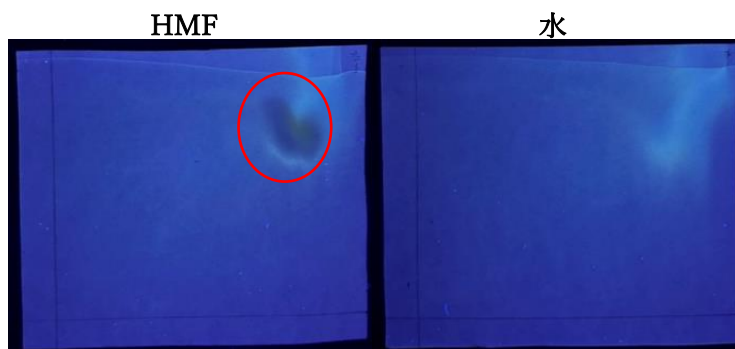
#### <結果>

展開結果は資料 12 のようになった。HMF と水の結果を比較すると、HMF は赤い丸の部分にあることがわかる。水の結果と資料 4 を比較すると水は精製水以外つけていないのにもかかわらず、F5 が同じように出ていることがわかる。

#### <考察>

(1) HMF について、資料 12 の赤い丸の部分つまり資料 4 の F5 の部分に見られたことから、スギナには HMF が含まれていることがわかった。ただし、資料 12 のとおり黒く見え、蛍光が確認されていないため、青い蛍光成分の候補から外すものとする。

(2) スギナ抽出液のない水のみでの展開で F5 の部分に蛍光がみられたことから、資料 5 の F5 は濾紙に元から配合されている成分が混ざっていた可能性が高い。ただしバニリンは濾紙に配合される成分ではないので未だスギナ由来のものであると考えられる。



資料 12

### 【実験 2-2 ; 抽出・展開方法の確立】

実験 2-1 の考察 (2) で濾紙に含まれる蛍光成分を抽出してしまう可能性が分かった。濾紙に含まれている成分を抽出してしまわないように、濾紙を使わず、シリカゲルやアルミナ TLC でスギナ抽出液を展開できないか考え、溶媒を探した。

芳香族化合物の抽出溶媒としてよく用いられる、メタノール、70%エタノール、アセトン、比較として水を試した。また、展開溶媒も同様に芳香族化合物によく用いられる、エチルアセテート：酢酸：水：ヘキサン=100：11：10：30、クロロホルム：メタノール：水=7：3：1、

を試した。

#### <方法>

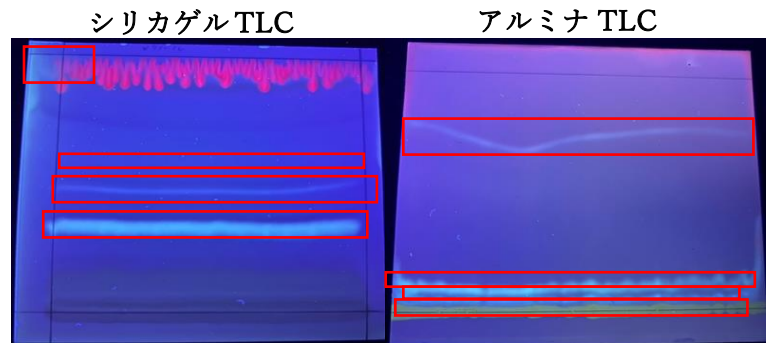
スギナ乾燥粉末 5.0g と各種抽出溶媒 200ml をビーカーに入れ、溶媒の蒸発を避けるためにラップをかけ、マグネットスターラーを用いて攪拌し抽出した。抽出液をろ過し、スギナ粉末を除去した試料をシリカゲル TLC、アルミナ TLC、濾紙にて、各種展開溶媒を用い展開をした。

#### <結果>

全ての組み合わせの展開の結果、抽出溶媒をメタノール。展開溶媒をクロロホルム：メタノール：水=7：3：1としたものが最も青い蛍光成分を多くのはっきりとしたバンドに分けることができた（資料 13）。

資料 13 のシリカゲル TLC では、4つのバンドが確認された。しかしうち一つはクロロフィルとバンドが重な

ってしまっている。アルミナ TLC でも同様に、4つのバンドが確認された。原点から近い3つのバンドは幅が狭く単離にはあまり適さない。一方、展開原点から離れて出ているバンドはシリカゲルではクロロフィルと重なっていたバンドであると考えられる。



資料 13

#### <考察>

- (1) 資料 13 の結果から、スギナの青い蛍光成分は抽出溶媒をメタノール。展開溶媒をクロロホルム：メタノール：水=7：3：1とした、シリカゲル TLC とアルミナ TLC の組み合わせによって単離が可能なのではないかと考えられる。
- (2) ただし、青い蛍光成分の単離方法確立のため、この方法によって「対象となる成分のすべての抽出が行われていたのか」を検証する必要がある。

#### 【実験 2-3 ; 方法の検証・評価】

実験 2-2 の考察 (2) による、検証方法は以下の通りである。これまでの実験通りメタノールで一度成分を抽出し、その残りのスギナ粉末をもう一度抽出した場合に青い蛍光が確認されなければ、これまでもすべての抽出が行われていたことになり抽出・展開方法が確立されたといえる。

#### <方法>

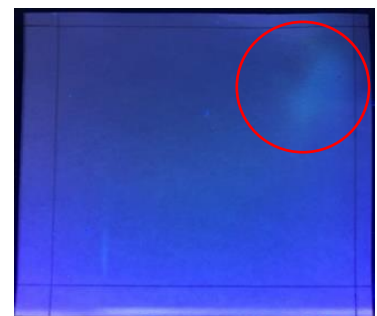
メタノールにて抽出した液を濾過し、濾過されたスギナ粉末を乾燥させ水にて再び抽出し、試料を作った。（ここで、スギナ粉末からメタノールに溶けるはずなのに溶け残るものが生まれないよう、スギナ粉末を 0.3 g の少量、メタノールを 200ml の過剰量とした。）試料を濾紙にて二次元クロマトグラフィー、水：メタノール=1：1の展開溶媒を用いて展開した。

#### <結果>

展開の結果、資料 14 のようになった。実験 2-1 より F5 の位置に出る蛍光は濾紙由来のものであるとわかっているため、本実験では青い蛍光成分が検出されなかったといえる。

#### <考察>

- (1) 一度抽出し終わった残りのスギナから青い蛍光が見られなかったことから、「対象となる成分のすべての抽出が行われていた」ことが分かり、抽出・展開方法が確立されたといえる。
- (2) これまでの抽出ですべて抽出されていたことから、実験 2-2 では 4つのバンド。資料 4 では 5つの物質が確認された。よ



資料 14

って資料 13 のバンドのうち 1 つはさらに分けることができるはずである。今後検証していきたい。

## 9 まとめ

### (1) 化学物質候補

2024 年度こそ、蛍光成分の化学構造を明らかにしたいという思いで研究し、現在の候補は 2 つである。中でも F5 で検出された、バニリンが有力候補である。

### (2) 二次元クロマトグラフィー

5 つの物質にはっきりと分けることができた。分離できたからには別の物質であるはずであるが、化学物質候補の判明の難しさを感じる。ただし F5 は濾紙に含まれる成分が混ざっていた可能性が高い。

### (3) TLC によるフラボノイド分離

NMR により構造の予想ができたために、フラボノイド用の溶媒により TLC 分離が成功した。鮮明な TLC から今後成分分析できることが楽しみである。

## 10 今後の課題

(1) 再抽出した蛍光成分が十分強く蛍光し、はっきりと 5 つに分離したにも関わらず、蛍光物質の有力候補がバニリンのみである。青い蛍光成分は大きな化合物であり揮発させるのが難しいため、様々な種類の TMS 化を検討して揮発性物質に変え GC-MS での検出を目指す。

(2) メタノール抽出によって得られた試料をシリカゲル TLC とアルミナ TLC を用いて展開することで、濾紙による分離よりも、鮮明に単離させることができた。そこから再抽出した試料を GC-MS や NMR 分析を行い、成分の構造特定を目指す。

(3) 青い蛍光成分はスギナ自ら生成した物質、もしくはその分解物あるいは前駆物質である。スギナ生体内でどのように生成され、何のためにつくられた物質なのか、探求する。

(4) 青い蛍光成分のうちいずれかにフラボノイドが含まれることが予想される。青い蛍光成分の塩基性で緑色に変わることや紫外線を吸収して蛍光するなどの特性を用いて、将来的には、一般的にフラボノイドを用いて応用される、細胞内の pH 変化観察のための染色液や、紫外線による劣化を防ぐための薬品などの開発・応用を行っていきたい。

## 11 参考文献

- 1) 生体内メイラード反応による活性酸素増産物質の生成 平本一幸(1997) 科研費
- 2) 水蒸気を用いたセルロースからのヒドロキシメチルフルフラール 吉田誠一郎(2020) 工業試験場報告 No319
- 3) Fulmer, Gregory R. et al. "NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist." *Organometallics* 29.9 (2010): 2176-2179.
- 4) NMR による正しい構造解析に必要な知識と心掛け 越野広雪(2023)
- 5) 核磁気共鳴法 佐藤一(2021) ブルカージャパン株式会社
- 6) フラボノイドの分析 北海道大学農学部 (<http://lab.agr.hokudai.ac.jp>)
- 7) 神戸の自然シリーズ神戸のシダ Siraiwa Takumi(1980) 神戸市教育委員会
- 8) 植物と人を支える細胞壁の化学 飛松 裕基 (2016) 京都大学生存圏研究所
- 9) 細胞壁のはなし 川田 健文(2009) 東邦大学生物学の新知識 2009 年 9 月号
- 10) 植物バイオマス化学研究室 松下 泰幸(2021) 東京農工大学
- 11) 植物生体内で単糖類はどのようにリサイクルされるか? 小竹敬久 円谷陽一(2010) 科学と生物 2010 年 48 巻 6 号
- 12) 発光する有機結晶 伊藤 傑(2020) 横浜国立大学

## 12 参考データベース

- ・SDBS (日本国立先進産業科学技術研究所)
- ・NIST chemistry WebBook (米国技術標準局)

## 13 謝辞

静岡理科大学先端機器分析センター 小泉武昭様、菅澤直裕様 本研究を進めるにあたり、検査機器の使用方法や分析・解析のためのご助言を多くいただきました。心より感謝申し上げます。