

2011 年度（平成 23 年度）修士学位論文

ハナショウブからの成分抽出と構造解析  
および機能性の探索

三重大学大学院 生物資源学研究科

博士前期課程

生物圏生命科学専攻 生命機能科学講座

生理活性化学教育研究分野

浅田 美穂

# 目次

## 第1章 緒論

- 第1節 ハナショウブについて・・・・・・・・・・・・・・・・・・1
- 第2節 抗酸化活性の有用性について・・・・・・・・・・・・・・2
- 第3節 抗菌活性の探索について・・・・・・・・・・・・・・3
- 第4節 本研究の背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5
- 第5節 これまでの研究と本研究の目的・・・・・・・・・・・・7

## 第2章 ハナショウブからの成分抽出

- 第1節 ハナショウブからの成分抽出・・・・・・・・・・・・10
- 第2節 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析・・・・11

## 第3章 ハナショウブ成分の分離・分取

- 第1節 カラムクロマトグラフィーによる分離・分取・・・・14
- 第2節 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分離・分取・・・・15

## 第4章 構造解析

- 第1節 質量分析による構造解析・・・・・・・・・・・・・・・・19
- 第2節 NMR による構造解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・26
- 第3節 結果および考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36

第5章	機能性の探索	
第1節	DPPH ラジカル消去活性測定	41
第2節	抗菌活性測定	43
第3節	結果および考察	47
第6章	総括	48
第7章	実験の部	50
	参考文献	62
	謝辞	63

## 第 1 章 緒論

### 第 1 節 ハナショウブについて

ハナショウブはアヤメ科アヤメ (*Iris*) 属の植物である。アヤメ科アヤメ属に含まれる植物は、世界で 200 余種にのぼる。その分布区域は北半球に限られ、北緯約 20 度から 60 度くらいにかけて広く自生している。ヨーロッパ、アフリカ、アジア、および北アメリカの各大陸にまたがり、各所にその地の風土に適した種類が生育している。とくにこのうちでハナショウブはシベリア、中国北部、日本などに多く産する。日本では北海道、東北関東および中部あたりから南は鹿児島にいたるまで野生しているが、どちらかといえば北方に多産し、関西以西には少ない。

日本に産する種類としては、ノハナショウブ、ハナショウブ、アヤメ、カキツバタ、ヒオウギアヤメとその変種キリガミネヒオウギアヤメ、ナスヒオウギアヤメ、さらにシャガ、ヒメシャガ、エヒメアヤメなどが挙げられる。そのほか、外国産の品種も数十種類存在している。その中でハナショウブはノハナショウブの園芸種で日本人の手によって改良されたまったくの国産種である。園芸種の中でも改良された地域により、江戸ハナショウブ、肥後ハナショウブ、伊勢ハナショウブと分かれており、それぞれ違った特性を持つ。また、ハナショウブは、葉がショウブに似て、美しい花を咲かせるのでハナショウブと呼ばれており、三重県の県花でもある<sup>1),2)</sup>。

## 第2節 抗酸化活性の有用性について

酸素が好気性生物において必要不可欠である一方で、有害な作用を持つことは、近年よく知られるようになった。フリーラジカルや活性酸素が生体物質に酸化的損傷を与え、それが様々な疾病や発癌、あるいは老化に関連していることが明らかになってきている<sup>3),4)</sup>。フリーラジカルとは、不対電子を持つ原子や分子のことで、不安定であるため、他の原子や分子から電子を奪おうとする。また、活性酸素は酸素から生じる、より活性の強い分子種であり、狭義の活性酸素はスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ )、ヒドロキシルラジカル ( $HO^{\cdot}$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、および一重項酸素 ( $^1O_2$ ) の4種であるが、このうちフリーラジカルは  $O_2^{\cdot-}$  と  $HO^{\cdot}$  のみであり、なかでも  $HO^{\cdot}$  はきわめて反応性が高い。生体において酸素および活性酸素はそれ自身がフリーラジカルであるか、もしくはフリーラジカルのおもな発生源であり、フリーラジカル反応によってその障害性が生じる。フリーラジカルや活性酸素は、脂質、蛋白質、糖、DNAなどを攻撃し、脂質や糖質の酸化、蛋白質の変性、酵素の不活性化、DNAの切断、塩基の修飾などを起こし、これにより生体膜や遺伝子の損傷が生じ、疾病、発癌、老化につながる。したがって、これらの予防や防止には抗酸化作用を持つ物質が非常に有効となり、抗酸化作用を持つ物質の探索は重要であるといえる。そして現在までに様々な抗酸化物質が発見されたり合成されたりしている<sup>3),5)</sup>。

### 第3節 抗菌活性の探索について

アヤメ科アヤメ属の中の *Iris pseudopumila* という品種の地下茎などから、抗菌活性を持つ成分が過去に得られている<sup>8)</sup>。このことから、今回研究を進めている *Iris ensata* から得られた成分の抗菌活性を検討することにした。

抗菌剤による微生物の制御は、殺菌と抑制に分類され、前者は物理的、化学的処理により、後者は除菌と抑制処理により評価される。抗菌剤がある微生物に効力をもつか否かについては、試験を行わなくてはならない。このような微生物に対する抗菌剤の効果を測定する方法を、一般に抗菌試験という。

今回抗菌試験に使用した菌体である大腸菌と黄色ブドウ球菌の特徴を以下に述べる。

大腸菌は  $1.1\sim 1.5\times 2.0\sim 6.0\ \mu\text{m}$  のグラム陰性桿菌で、ヒトや動物の腸管下部での常在菌であり、通常の大腸菌は大腸内の常在菌叢の一員であるが、腸管以外の部位に侵入すると感染症を起こすことが知られ、異所性感染と呼ばれている。また、大腸菌本来の生息場所である腸管内でも、特に小腸に定着し、特別な病原因子を産生する大腸菌（腸管病原大腸菌）は、下痢を主症状とした腸内感染症を起こす。

黄色ブドウ球菌は直径  $0.8\sim 1.0\ \mu\text{m}$  のグラム陽性球菌でヒトの化膿性疾患の原因菌であり、元来自然界に広く分布し、ヒトや動物の皮膚、消化管に常在しているブドウ球菌の1つである。しかし、す

べてのブドウ球菌が危篤な疾患を起こす訳ではない<sup>6)</sup>。

今回使用するのはどちらも病原性のないもので、日本薬局方の微生物試験法や JIS 抗菌性評価試験に使用されているものを独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の生物遺伝資源センター (NBRC) から分譲を受けた菌株を使用した。

## 第4節 本研究の背景

アヤメ属の中で、中央アジアや西アジアに分布する *Iris tenuifolia* からいくつかのフラボノイドやイソフラボノイドが以前に単離されており、それらに DPPH ラジカル消去活性があることが報告されている<sup>7)</sup>。

イソフラボノイドは、あらゆる植物から報告されているわけではなく、いくつかの植物に限って見出されている。その中で極端にイソフラボノイドの分布が集中しているのがマメ科であり、現在までに自然界で分離同定されたイソフラボノイドの9割以上がこの科の植物から報告されている。そして次に多く報告されているのがアヤメ科である。なかでもアヤメ属では数種類のイソフラボノイドが分離されている。それら化合物群は時に葉、心材、樹皮、花などからも見出されるが、ほとんどの場合は地下部、特に根や塊茎、種子で多く見出され、含有量も多い。アヤメ属でもほとんどが塊茎からの報告である。そして分離されたイソフラボノイドのほとんどはアヤメ属で初めて分離された成分であり、明らかにマメ科のものとは異なっている。現在までにアヤメ属植物から分離されたイソフラボノイドのうち、活性が証明されたものはわずか7種類のみであり、その他の物質については活性の調査は行われていないが、抗菌、抗酸化、抗腫瘍など重要な活性が認められているものもある。しかし、日本産のアヤメ属植物についてはハナショウブ、アヤメ、カキツバタ、ヒオウギアヤメ、ヒメシャガ、シャガなどいずれもイソフラボ

ノイドについての報告はなく、これらの植物にイソフラボノイドがあるのかは分かっていない<sup>8)</sup>。

## 第5節 これまでの研究と本研究の目的

これまでに著者は、日本のハナショウブである *Iris ensata* の成分と構造、機能性について研究を進めてきた<sup>9)</sup>。ハナショウブの成分の抽出を行い、DIAION HP-20 のカラムクロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離・分取し、化合物 3a、3b を得た (Fig.1-1)。それらについて DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) を用いてラジカル消去活性を測定し、抗酸化活性の検討を行った。その結果、化合物 3a、3b のどちらにも抗酸化活性が認められた (Fig.1-2)。しかし、強い抗酸化活性を持つフラボノイドの一種であるルチンと比較したところ、ルチンほどの強い活性は認められなかった (Fig.1-3)。また、質量分析や NMR による構造解析も試みたが、構造を決定するまでには至らなかった。

そこで本研究では、化合物 3a、3b の構造決定と、また、それ以外の成分が得られないか、またその成分にどのような活性があるのかを検討したいと考え、ハナショウブの成分を抽出して分離・分取し、構造解析を行うこと及び抗酸化活性の測定や他の機能性を探索することを目的とした。

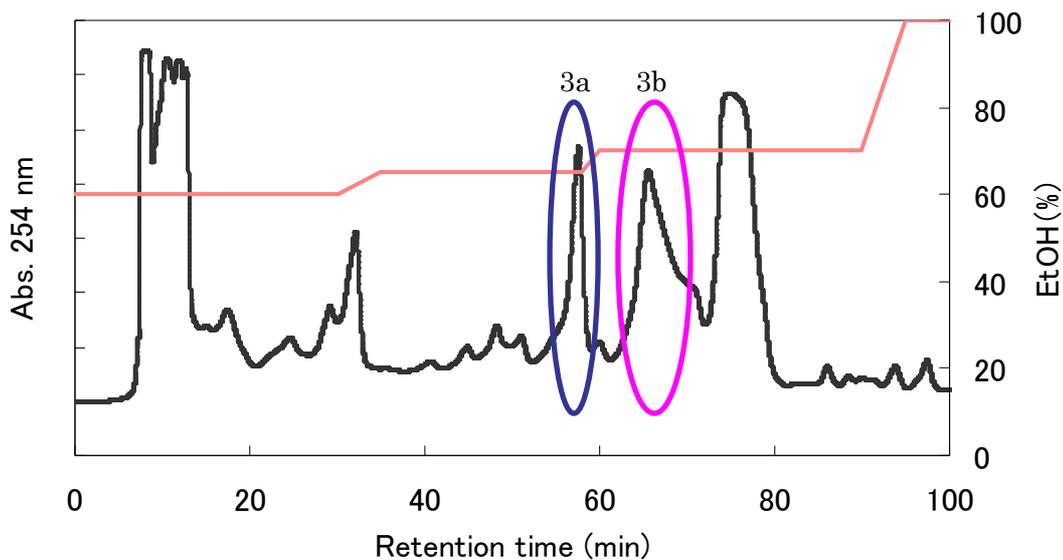


Fig.1-1 ハナショウブ根抽出物の DIAION HP-20 カラムの  
100%エタノール溶出画分のクロマトグラム

カラム : Develosil ODS-HG-5 (8.0 mm  $\phi$   $\times$  250 mmL)

移動相 : H<sub>2</sub>O /EtOH 流速 : 1.0 mL/min サンプル注入量 : 200  $\mu$ L

検出 : UV (254 nm)

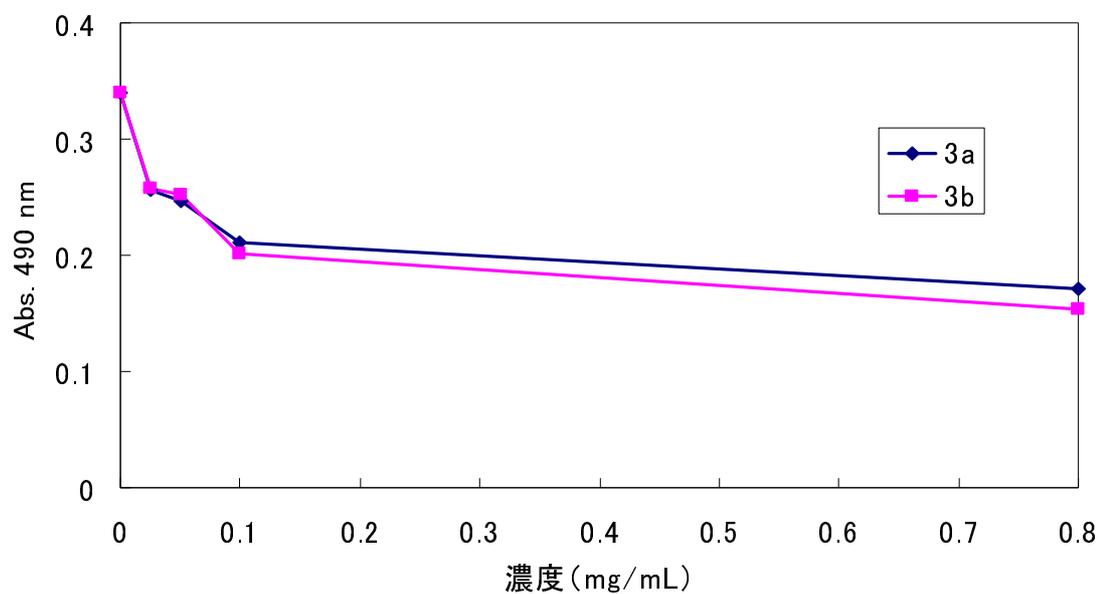


Fig.1-2 化合物 3a、3b の DPPH ラジカル消去活性

【測定条件】 試料 100  $\mu$ L、超純水 100  $\mu$ L、0.4 mM DPPH (エタノール溶液) 50  $\mu$ L 混合、20 min 室温で遮光反応、490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定

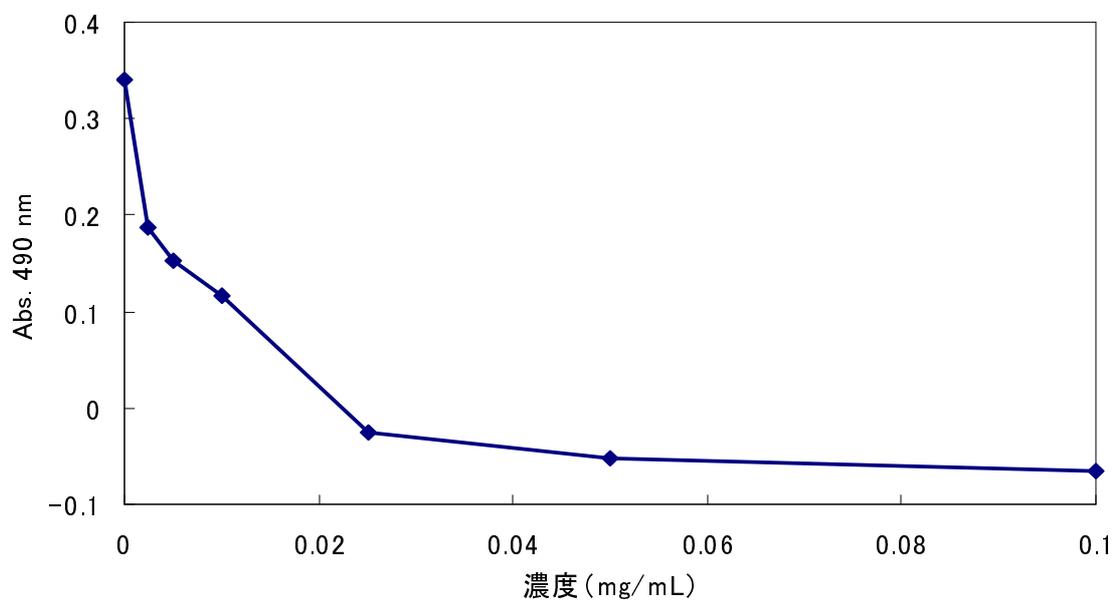


Fig.1-3 ルチンの DPPH ラジカル消去活性

【測定条件】 Fig. 1-2 に同じ

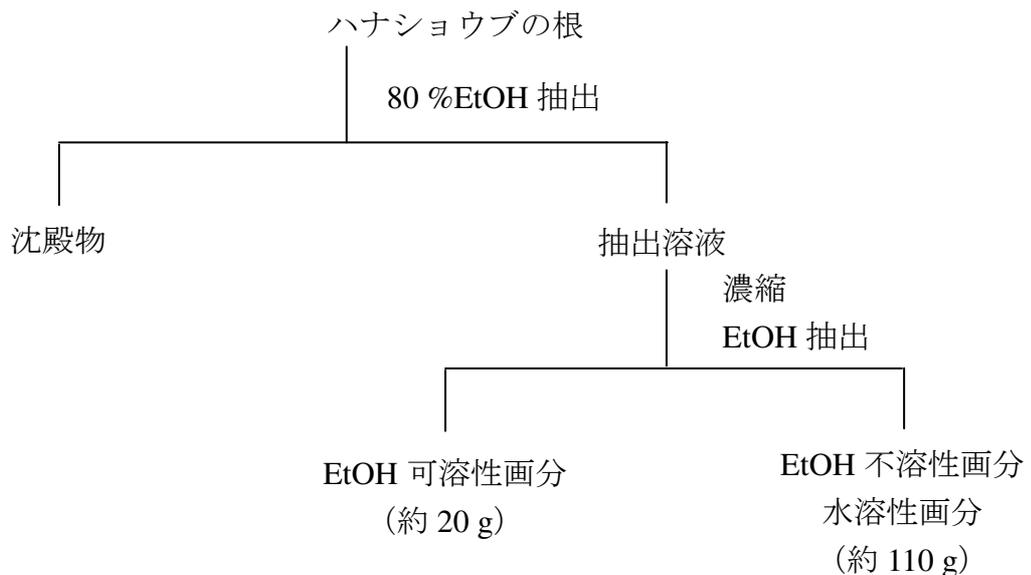
## 第2章 ハナショウブからの成分抽出

### 第1節 ハナショウブからの成分抽出

ハナショウブの根を水道水できれいに洗浄し、細かく刻んだ後、80 %エタノールと共に粉碎し、約2週間室温にて静置した。

デカンテーションによって根を除いた後、溶液を吸引濾過して細かい根を除去した。

根から抽出した溶液をナスフラスコに入れ、エバポレーターを用いて濃縮を行い、再度エタノールを加えて抽出した。その結果、エタノール可溶性画分（約20 g）とエタノール不溶性画分（水溶性画分）（約110 g）に分けた。



## 第2節 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析

根のエタノール可溶性画分と水溶性画分を逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって分析を行った（Fig.2-1、Fig.2-2）。

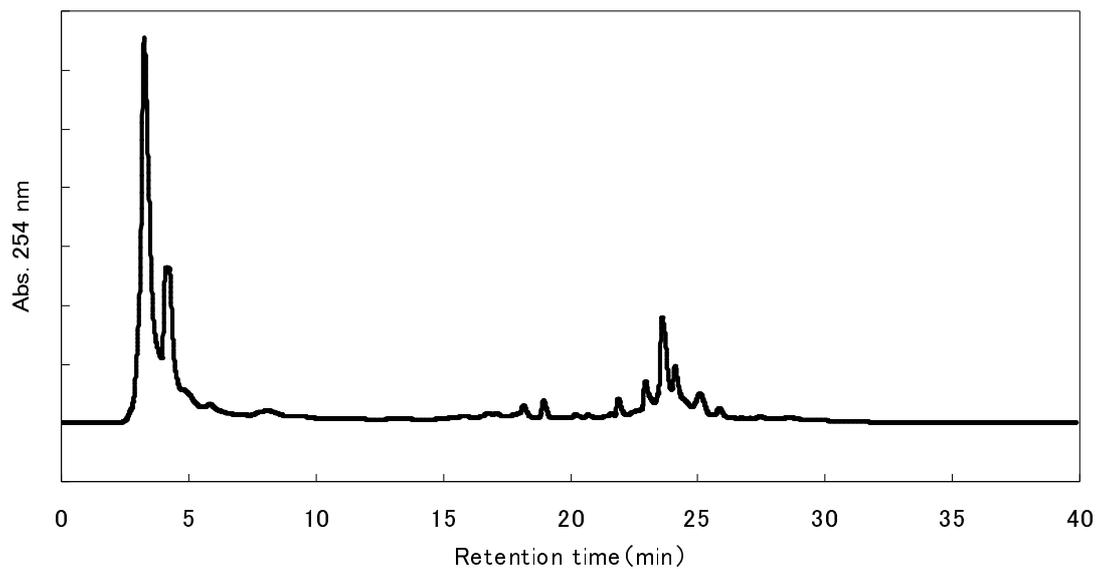


Fig. 2-1 根のエタノール可溶性画分のクロマトグラム

【HPLC 分析条件】

カラム：Develosil ODS-HG-5 (8.0 mm φ × 250 mmL)

移動相：H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN 流速：0.5 mL/min サンプル注入量：5.0 μL

検出：UV (254 nm)

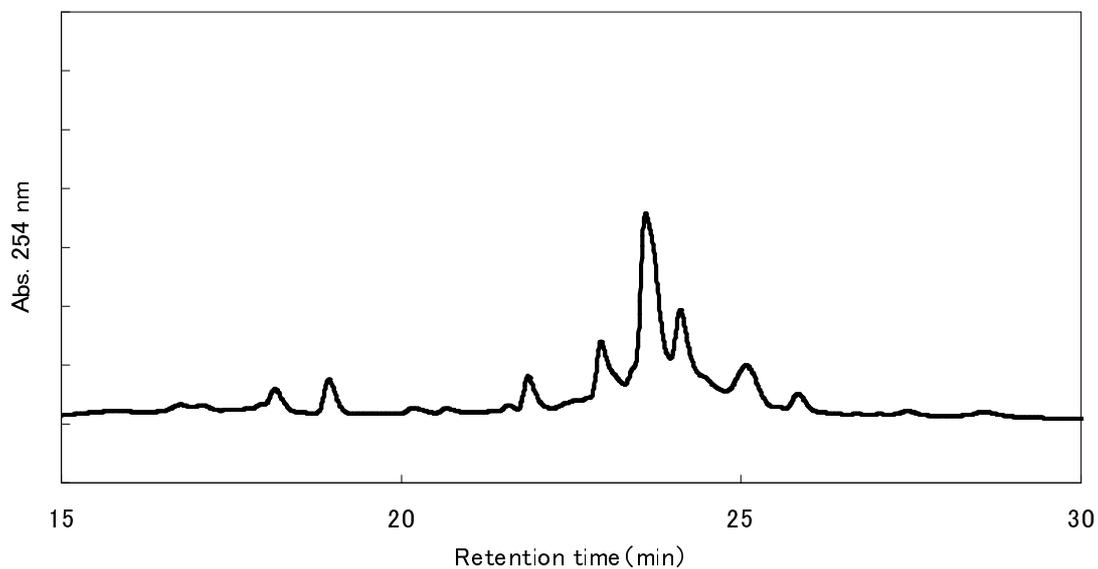


Fig. 2-1-1 根のエタノール可溶性画分のクロマトグラム  
(Fig. 2-1 の保持時間 15～30 分部分拡大)

【HPLC 分析条件】

Fig. 2-1 に同じ

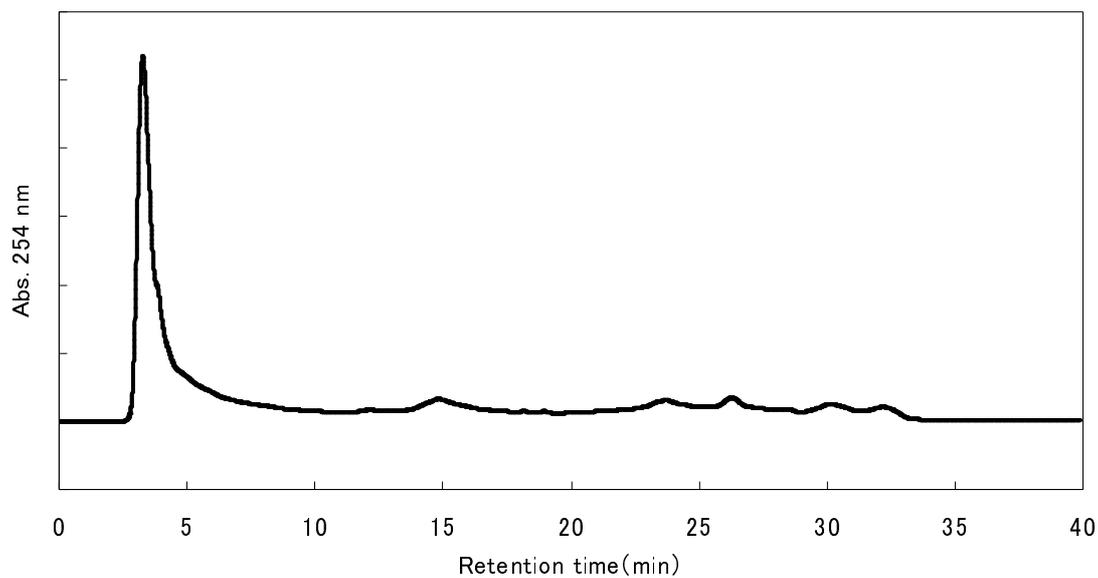


Fig. 2-2 根の水溶性画分のクロマトグラム

【HPLC 分析条件】

カラム：Develosil ODS-HG-5 (8.0 mm φ × 250 mmL)

移動相：H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN 流速：0.5 mL/min サンプル注入量：5.0 μL

検出：UV (254 nm)

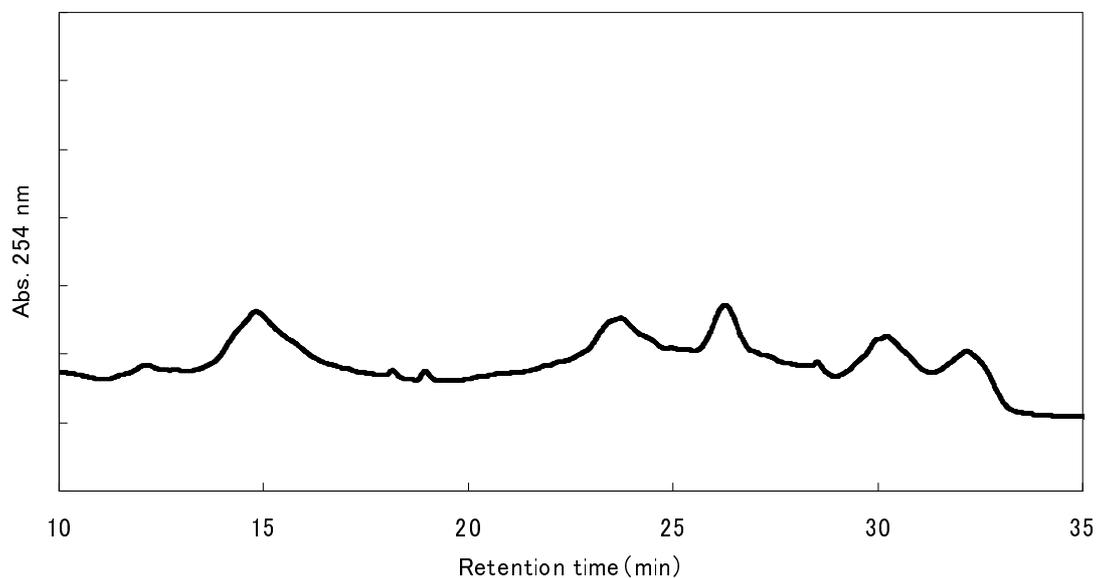


Fig. 2-2-1 根の水溶性画分のクロマトグラム  
(Fig. 2-2 の保持時間 10~35 分部分拡大)

【HPLC 分析条件】

Fig. 2-2 に同じ

### 第3章 ハナシヨウブ成分の分離・分取

#### 第1節 カラムクロマトグラフィーによる分離・分取

DIAION HP-20 を用いた疎水性カラムクロマトグラフィーによってエタノール可溶性画分の分離・分取を行った。

根のエタノール可溶性画分を少量のエタノールに溶解させてカラム（41.4 mm φ × 600 mmL）にのせ、60 %、80 %、100 %エタノールを順に流し込んで段階的に溶出させ、各溶出画分を分取した。その結果、60 %エタノール溶出画分を 0.38 g、80 %エタノール溶出画分を 0.43 g、100 %エタノール溶出画分を 2.82 g 得た。

## 第2節 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離・ 分取

DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーによる分取で得た 60 %、80 %、100 % 溶出画分を逆相カラムクロマトグラフィー (HPLC) によって分析をした (Fig.3-1、3-2、3-3)。

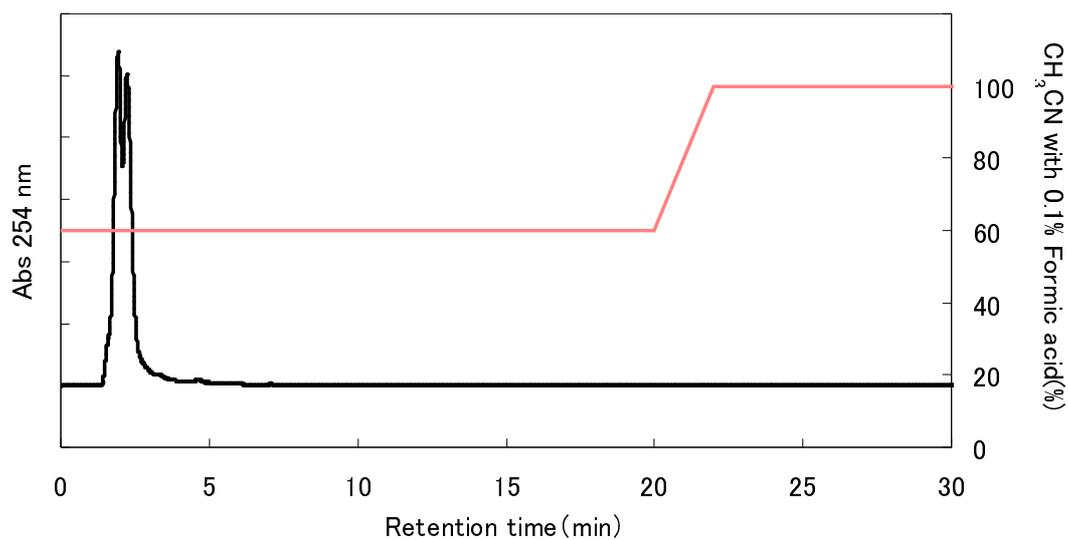


Fig.3-1 60 %エタノール溶出画分のクロマトグラム

### 【HPLC 分析条件】

カラム : YMC ProC18 (2.0 mm  $\phi$   $\times$  150 mmL)

移動相 : 0.1 % Formic acid in H<sub>2</sub>O/0.1 % Formic acid in CH<sub>3</sub>CN

流速 : 0.2 mL/min サンプル注入量 : 10  $\mu$ L 検出 : UV (254 nm)

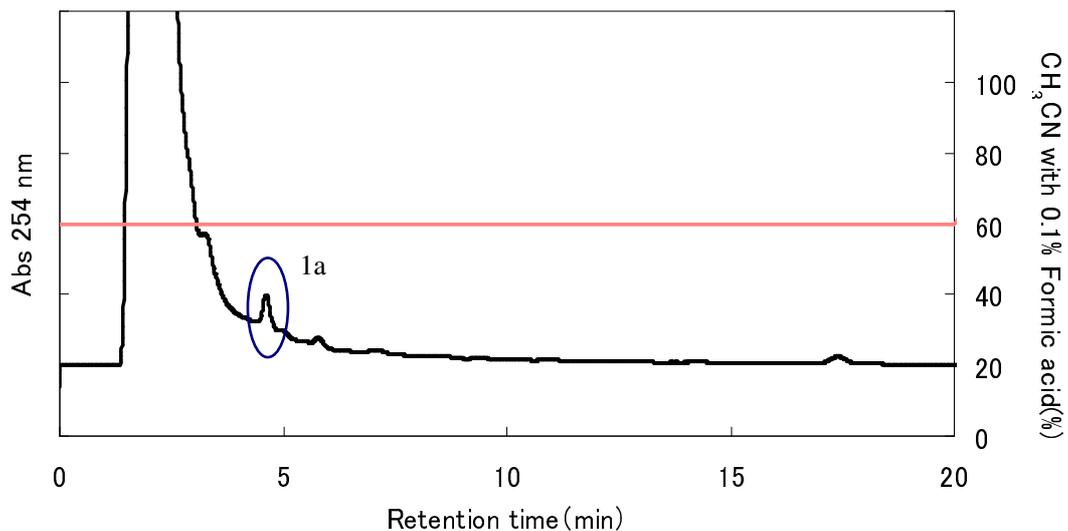


Fig.3-1-1 60 %エタノール溶出画分のクロマトグラム  
(Fig.3-1 の保持時間 0~20 分部分拡大)

【HPLC 分析条件】

Fig. 3-1 に同じ

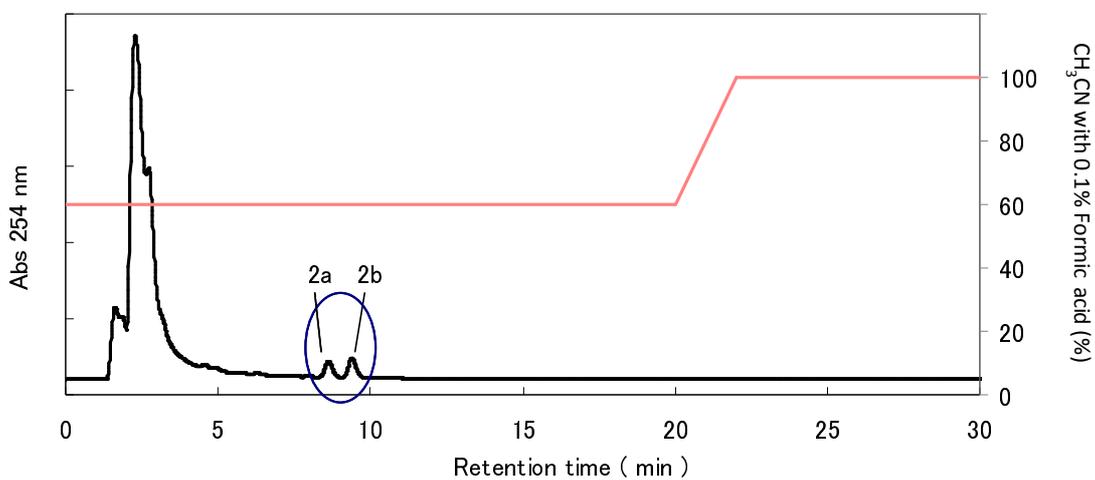


Fig.3-2 80 %エタノール溶出画分のクロマトグラム

【HPLC 分析条件】

カラム : YMC ProC18 (2.0 mm  $\phi$   $\times$  150 mmL)

移動相 : 0.1 % Formic acid in H<sub>2</sub>O/0.1 % Formic acid in CH<sub>3</sub>CN

流速 : 0.2 mL/min サンプル注入量 : 10  $\mu$ L 検出 : UV (254 nm)

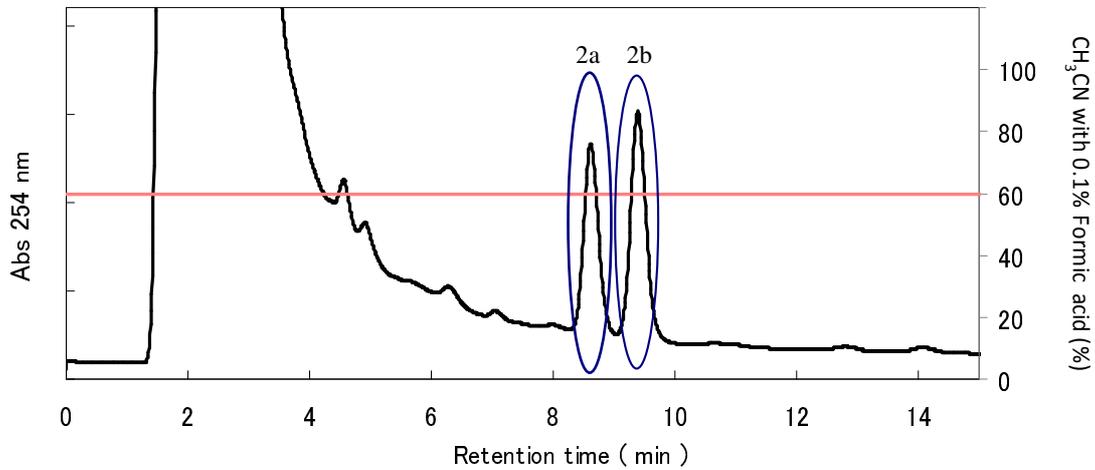


Fig.3-2-1 80 %エタノール溶出画分のクロマトグラム  
(Fig.3-2 の保持時間 0～15 分部分拡大)

【HPLC 分析条件】

Fig. 3-2 に同じ

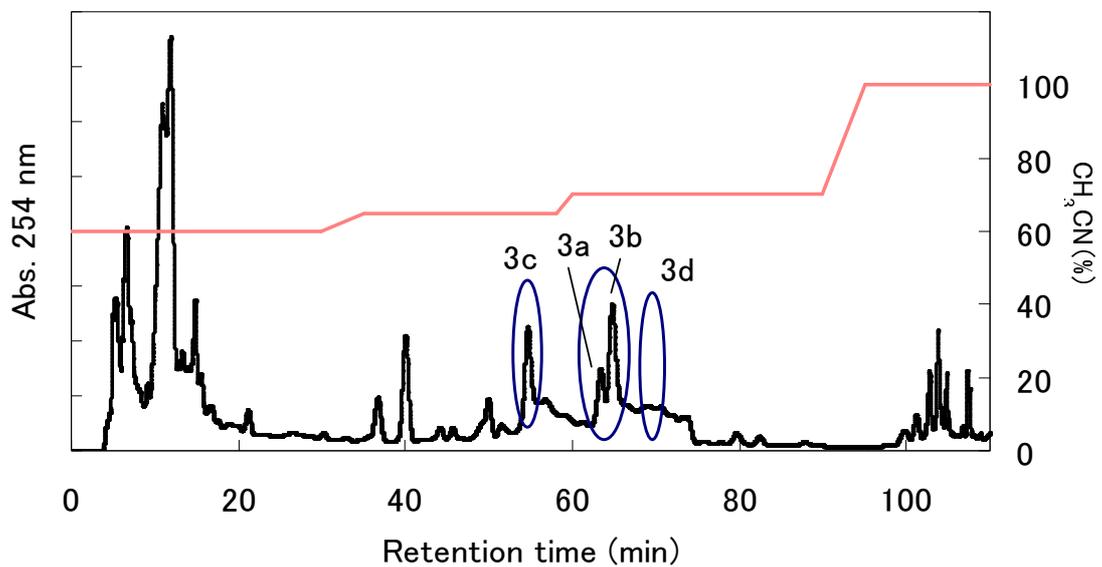


Fig.3-3 100 %エタノール溶出画分のクロマトグラム

【HPLC 分析条件】

カラム : Develosil ODS-HG-5 (8.0 mm  $\phi$   $\times$  250 mmL)

移動相 : H<sub>2</sub>O /CH<sub>3</sub>CN 流速 : 1.0 mL/min サンプル注入量 : 200  $\mu$ L

検出 : UV (254 nm)

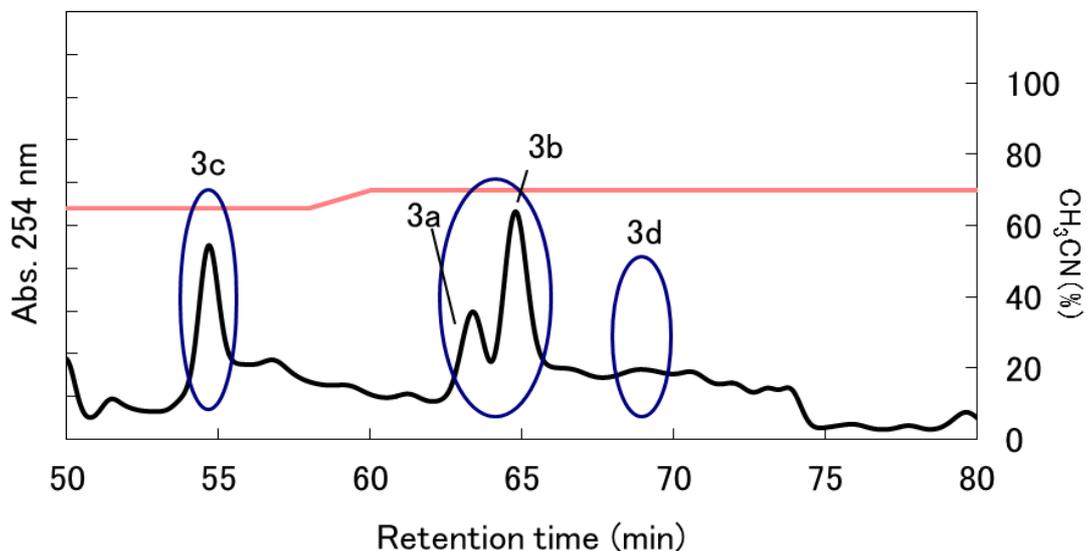


Fig.3-3-1 100 %エタノール溶出画分のクロマトグラム  
(Fig.3-3 の保持時間 50~80 分部分拡大)

【HPLC 分析条件】

Fig. 3-3 に同じ

その結果、60 %エタノール溶出画分で1つ (Fig. 3-1-1、1a)、80 %エタノール溶出画分で2つ (Fig. 3-2、2a、2b)、100 %エタノール溶出画分で複数 (Fig.3-3、3a、3b、3c、3d) のピークが確認できた。

そのうち、これまでの研究で分取を行ってきた100 %エタノール溶出画分をさらに分析することにした。そこで、得られた100 %溶出画分クロマトグラムより、化合物 3a、3b 及び 3c、3d の分取を行った (Fig.3-3)。その結果、3a を 12.8 mg、3b を 26.3 mg、3c を 20.8 mg、3d を 14.9 mg 得た。

## 第4章 構造解析

### 第1節 質量分析による構造解析

100%エタノール溶出画分の逆相 HPLC による分取によって得られた化合物 3a、3b、3c、3d について (Fig.4-2、4-3、4-4、4-5)、および 80%エタノール溶出画分 (2a、2b) (Fig.4-1) について、HPLC/ESI-MS を用いて質量分析を行った (Fig.4-6、4-7)。

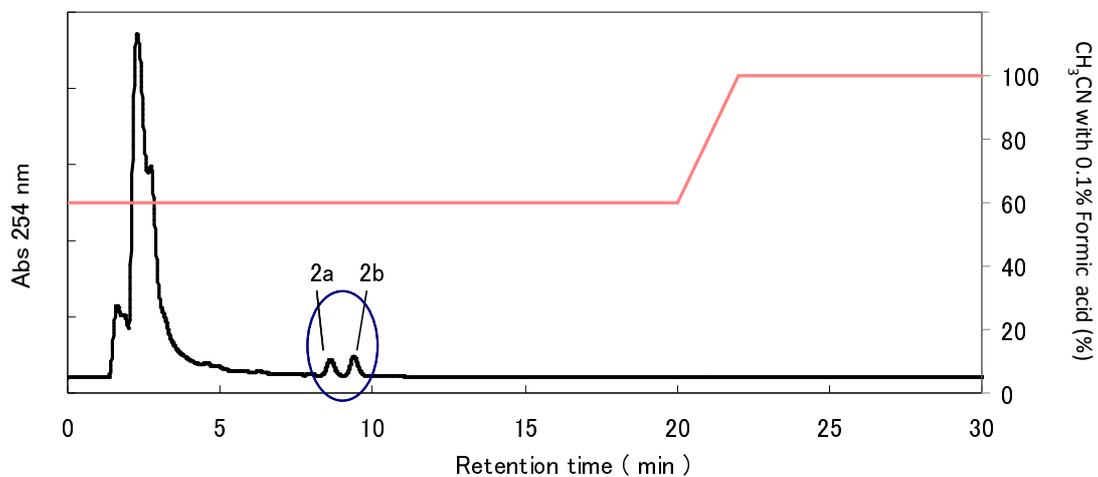


Fig.4-1 80%エタノール溶出画分のクロマトグラム

#### 【HPLC 分析条件】

カラム：YMC ProC18 (2.0 mm  $\phi$   $\times$  150 mmL)

移動相：0.1 % Formic acid in H<sub>2</sub>O/0.1 % Formic acid in CH<sub>3</sub>CN

流速：0.2 mL/min サンプル注入量：10  $\mu$ L 検出：UV (254 nm)

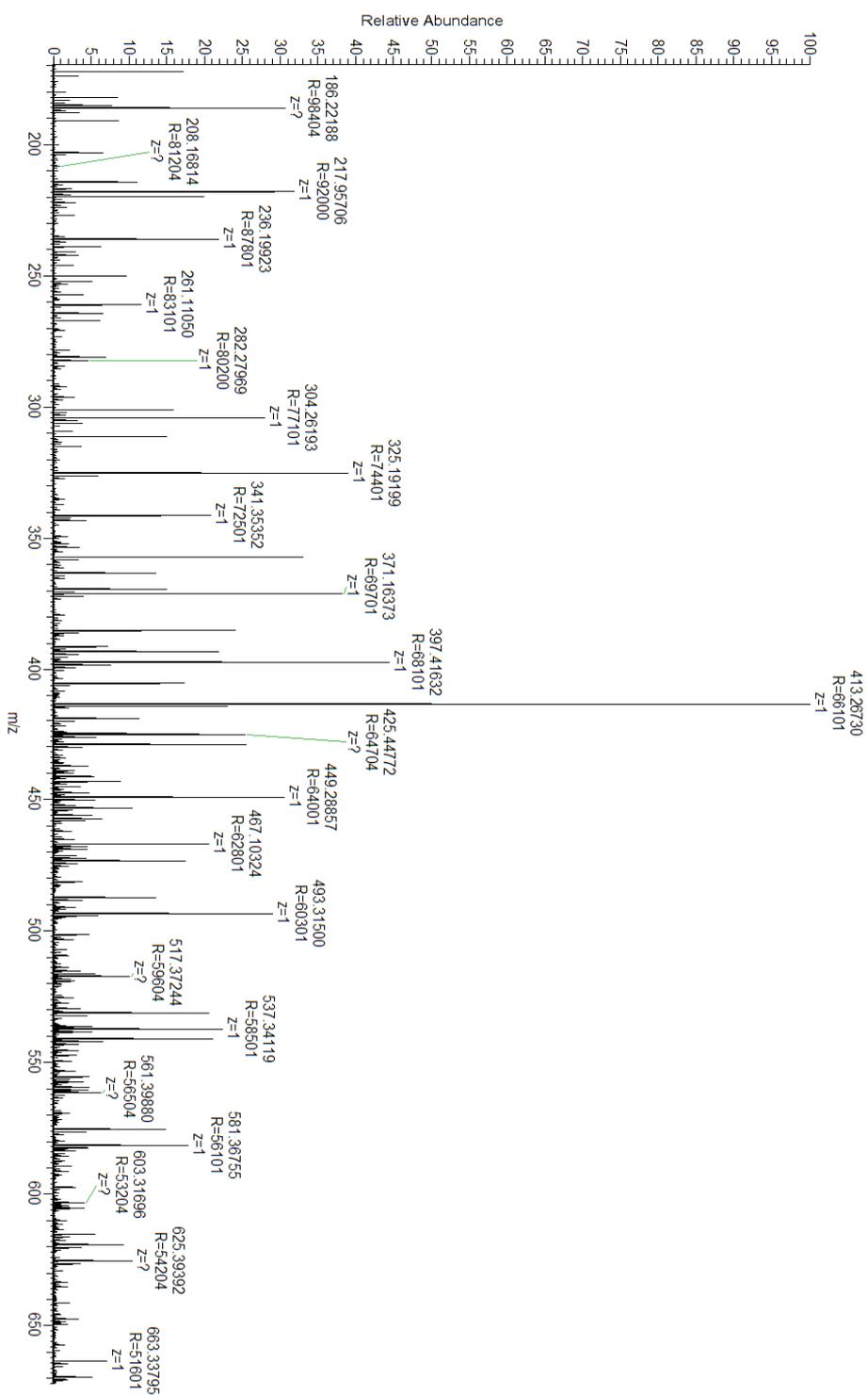


Fig.4-2 化合物 3c のマススペクトル

【ESI-MS 分析条件】

Positive モード

サンプルは MeOH に溶解し、流速 10  $\mu$ L/min で直接導入

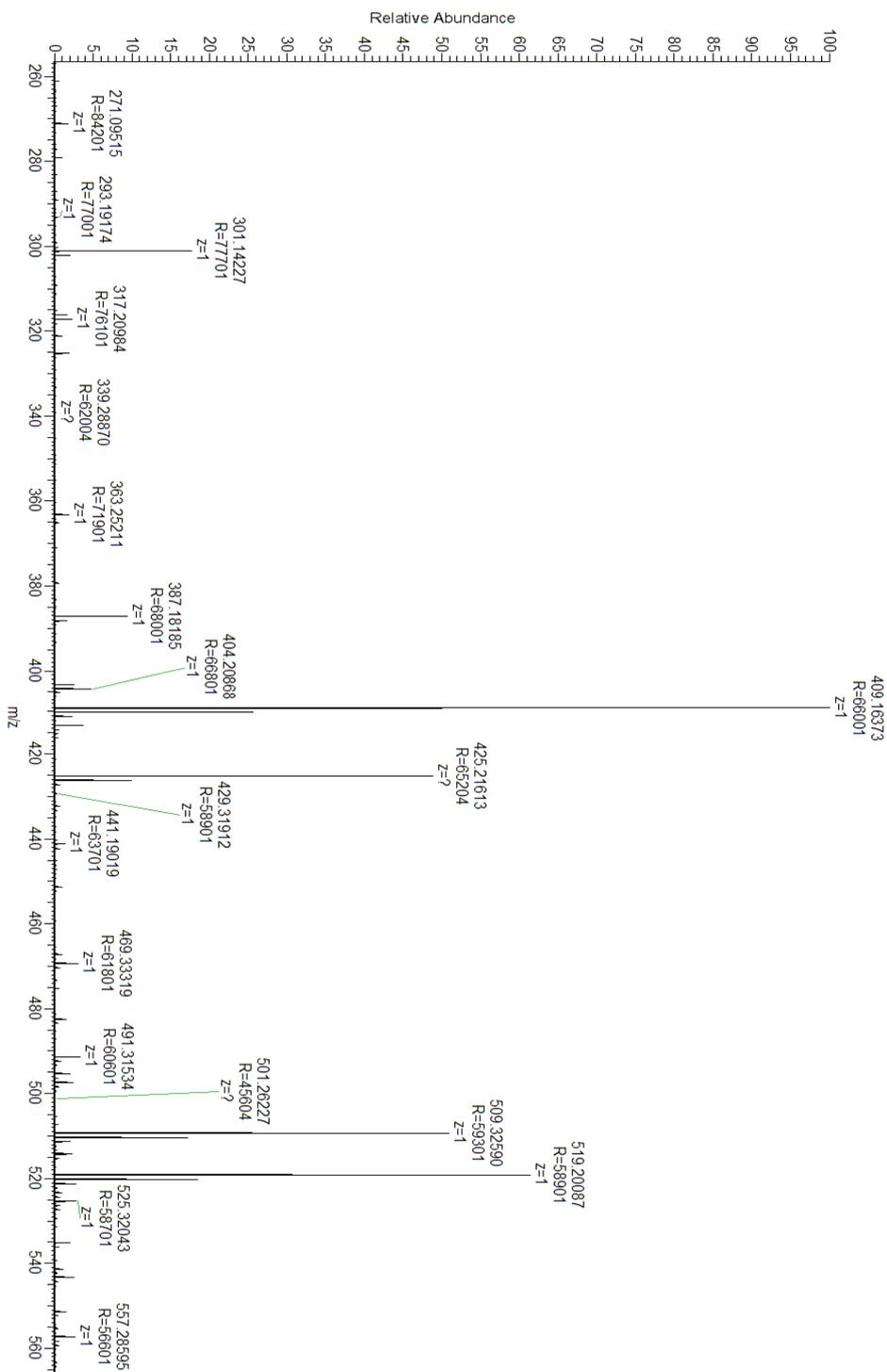


Fig.4-3 化合物 3a のマスペクトル

【ESI-MS 分析条件】

Positive モード

サンプルは MeOH に溶解し、流速 10  $\mu$ L/min で直接導入

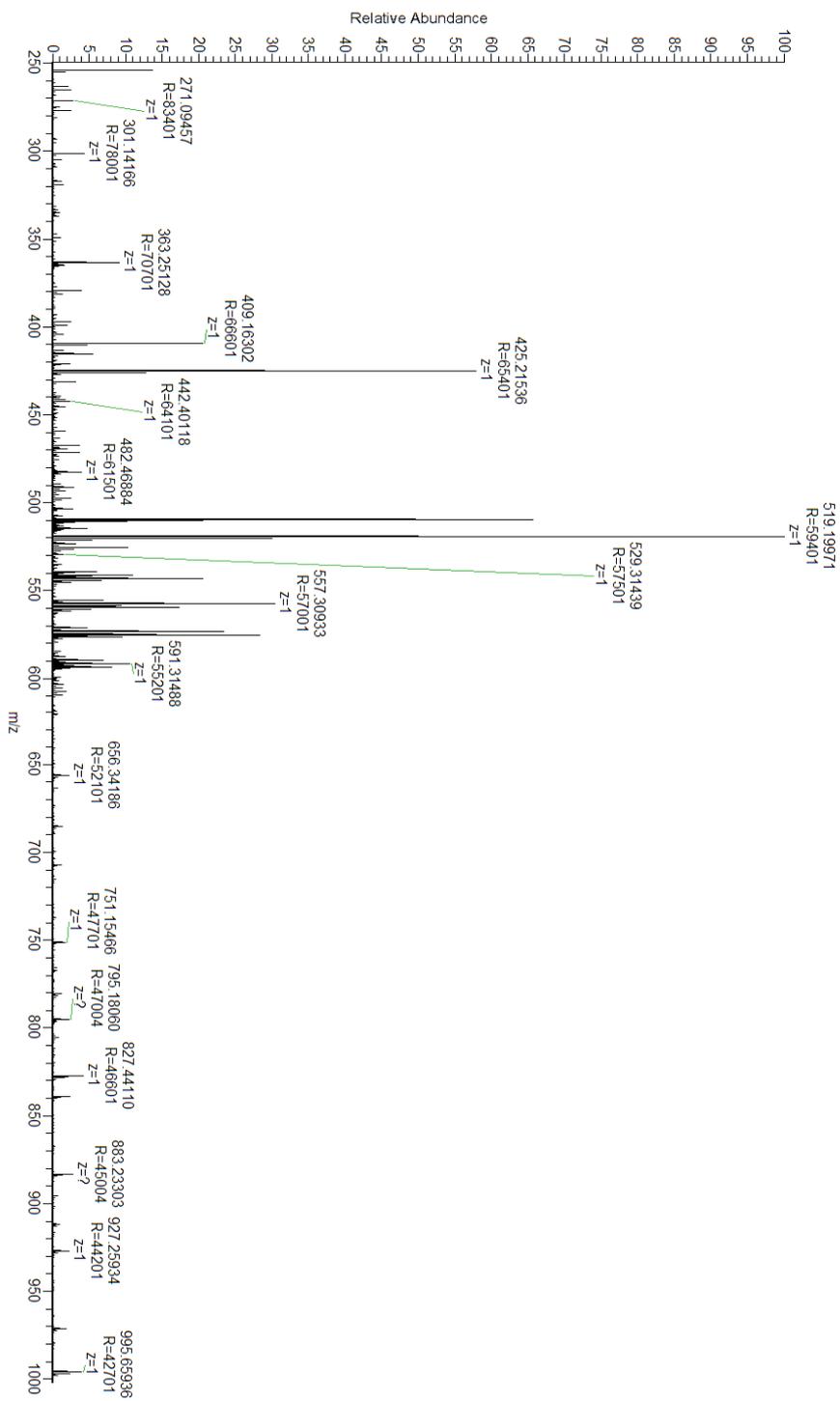


Fig.4-4 化合物 3b のマススペクトル

【ESI-MS 分析条件】

Positive モード

サンプルは MeOH に溶解し、流速 10  $\mu$ L/min で直接導入

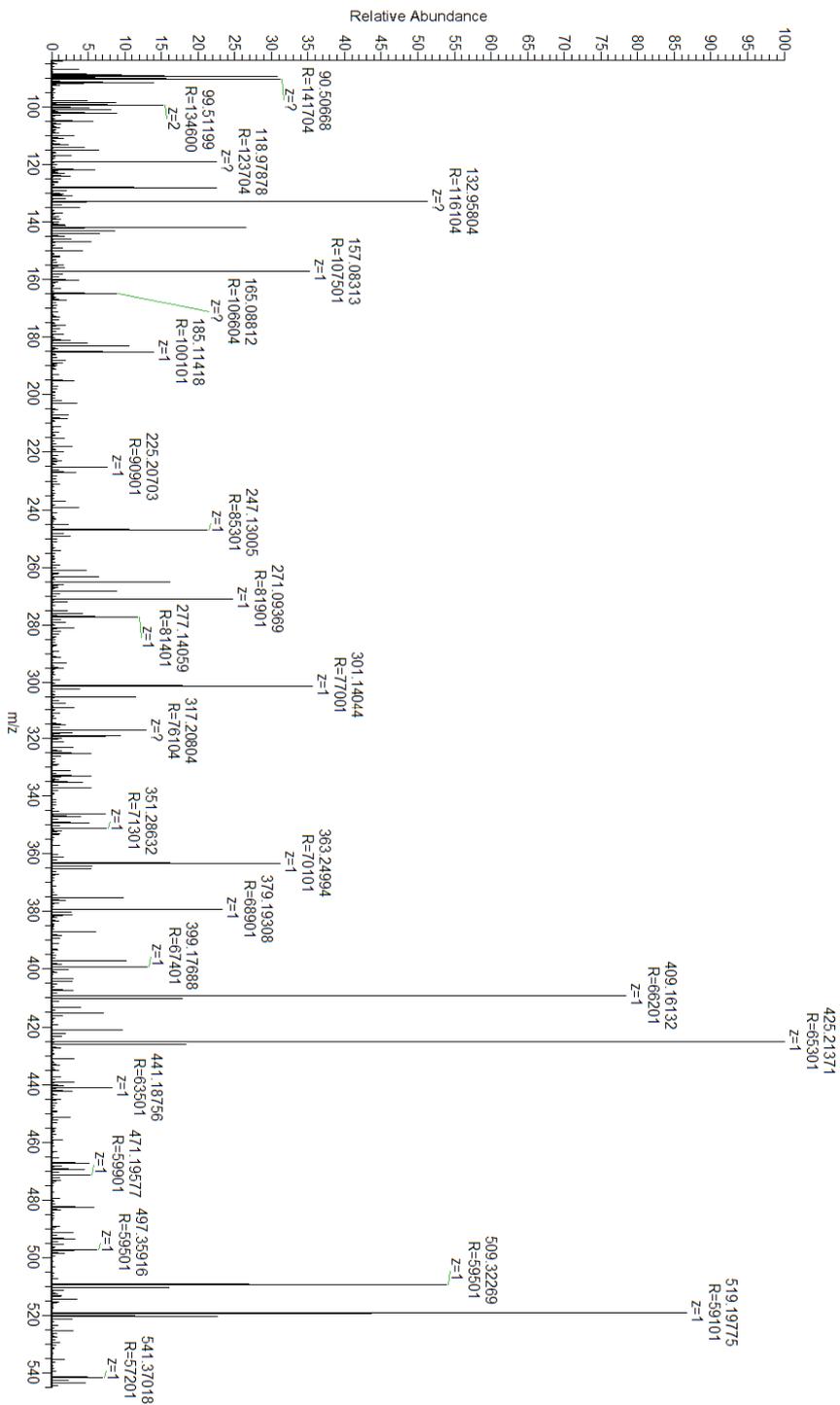


Fig.4-5 化合物 3d のマススペクトル

【ESI-MS 分析条件】

Positive モード

サンプルは MeOH に溶解し、流速 10  $\mu$ L/min で直接導入

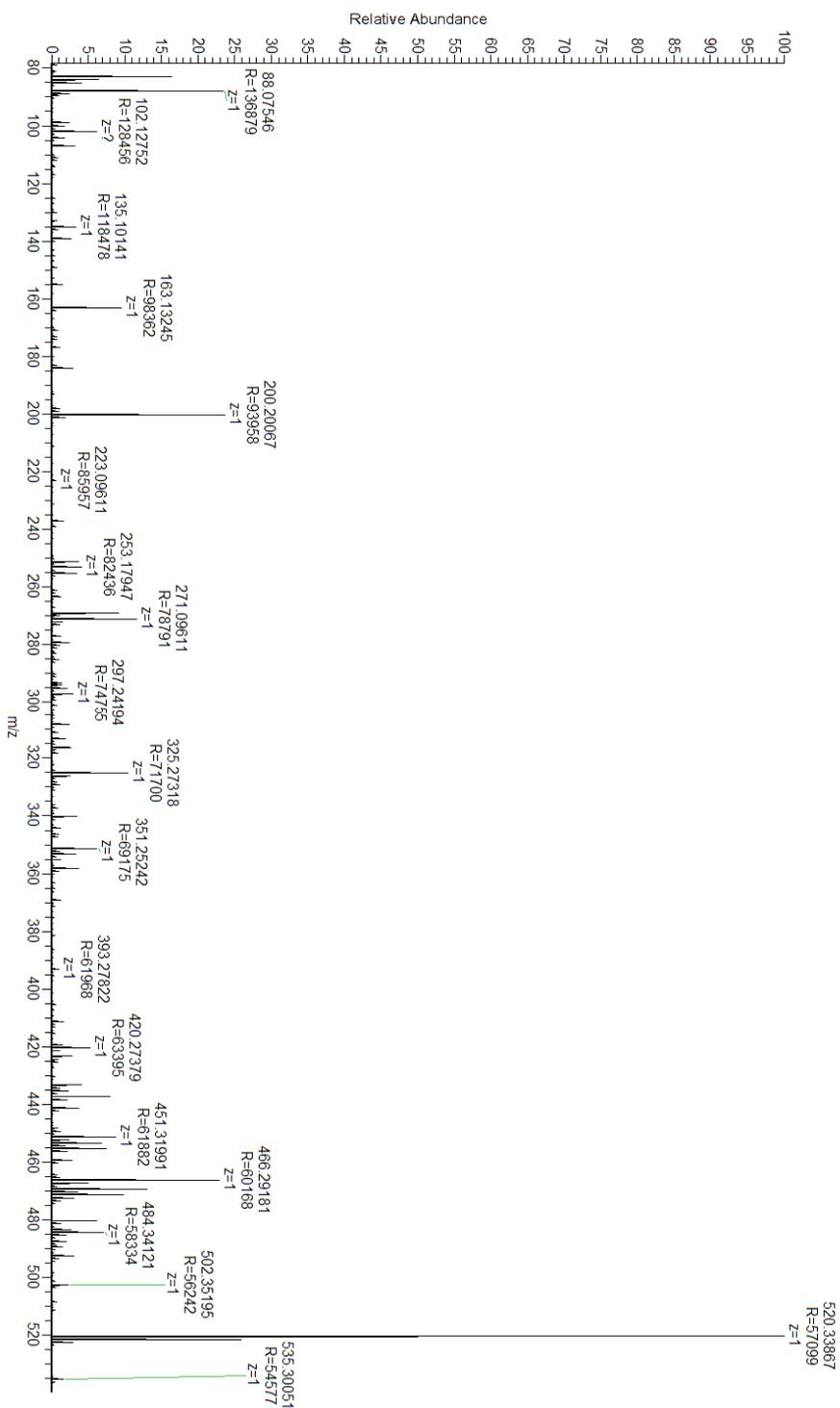


Fig.4-6 80 %エタノール溶出画分 (2a) のマススペクトル]

【HPLC/ESI-MS 分析条件】

Positive モード、注入量：10  $\mu$ L (10 mg/mL)

サンプルは MeOH に溶解し、流速 0.2 mL/min で HPLC/ESI-MS にて測定

LC 移動相：0.1 % Formic acid in H<sub>2</sub>O/0.1 % Formic acid in CH<sub>3</sub>CN、Rt=8 min

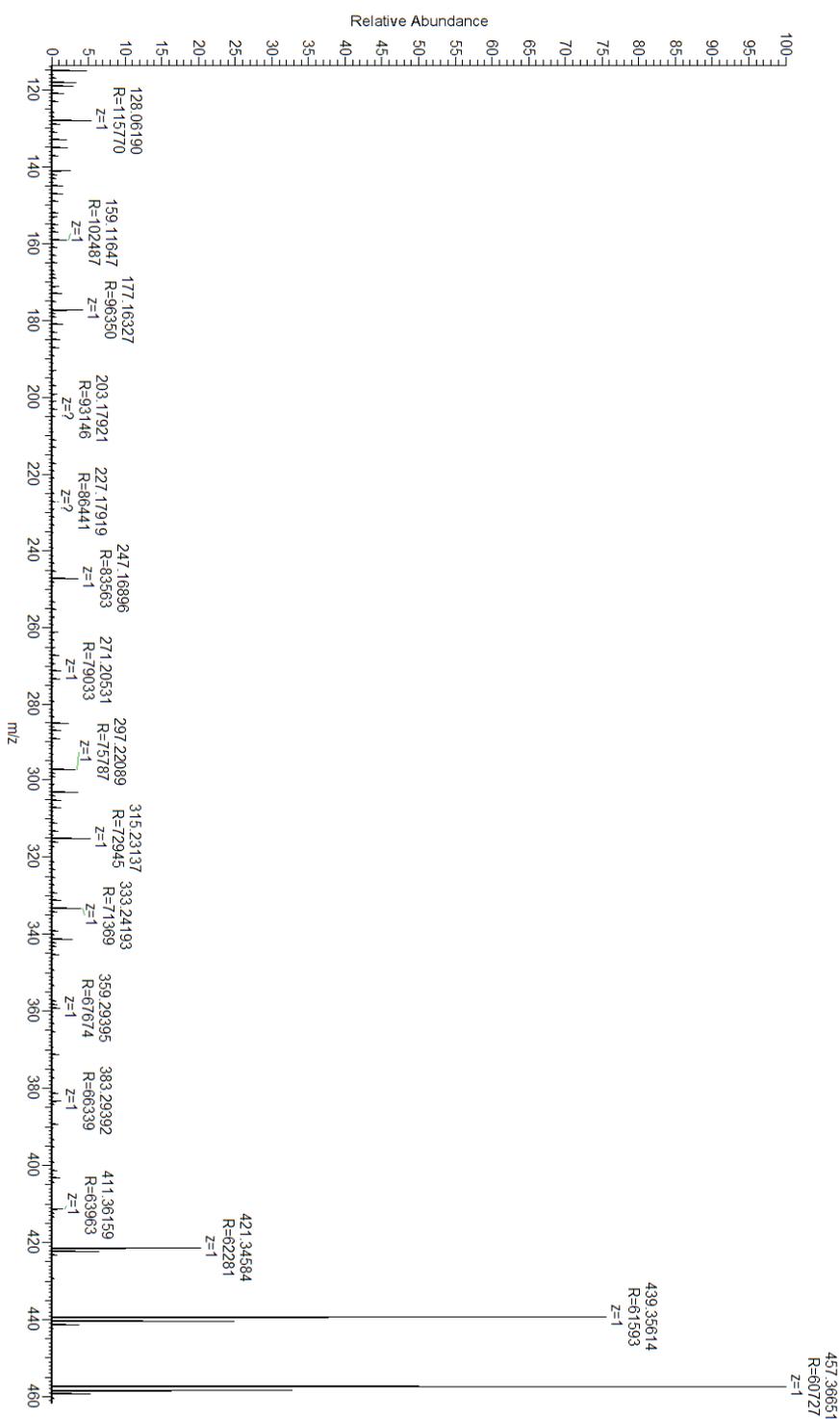


Fig.4-7 80 %エタノール溶出画分 (2b) のマスペクトル

【HPLC/ESI-MS condition】

Positive モード、注入量：10  $\mu$ L (10 mg/mL)

サンプルは MeOH に溶解し、流速 0.2 mL/min で HPLC/ESI-MS にて測定

LC 移動相：0.1 % Formic acid in H<sub>2</sub>O/0.1 % Formic acid in CH<sub>3</sub>CN、Rt=9 min

## 第 2 節 NMR による構造解析

100 %エタノール溶出画分の逆相 HPLC による分取によって得られた化合物 3a、3b、3c、3d について、溶媒  $\text{CDCl}_3$  中で  $^1\text{H}$  NMR を測定した (Fig.4-8、4-9、4-10、4-11)。

また、化合物 3b について、 $^{13}\text{C}$  NMR、H-H COSY、DEPT、HSQC、HMBC を測定した (Fig. 4-12、4-13、4-14、4-15、4-16)。

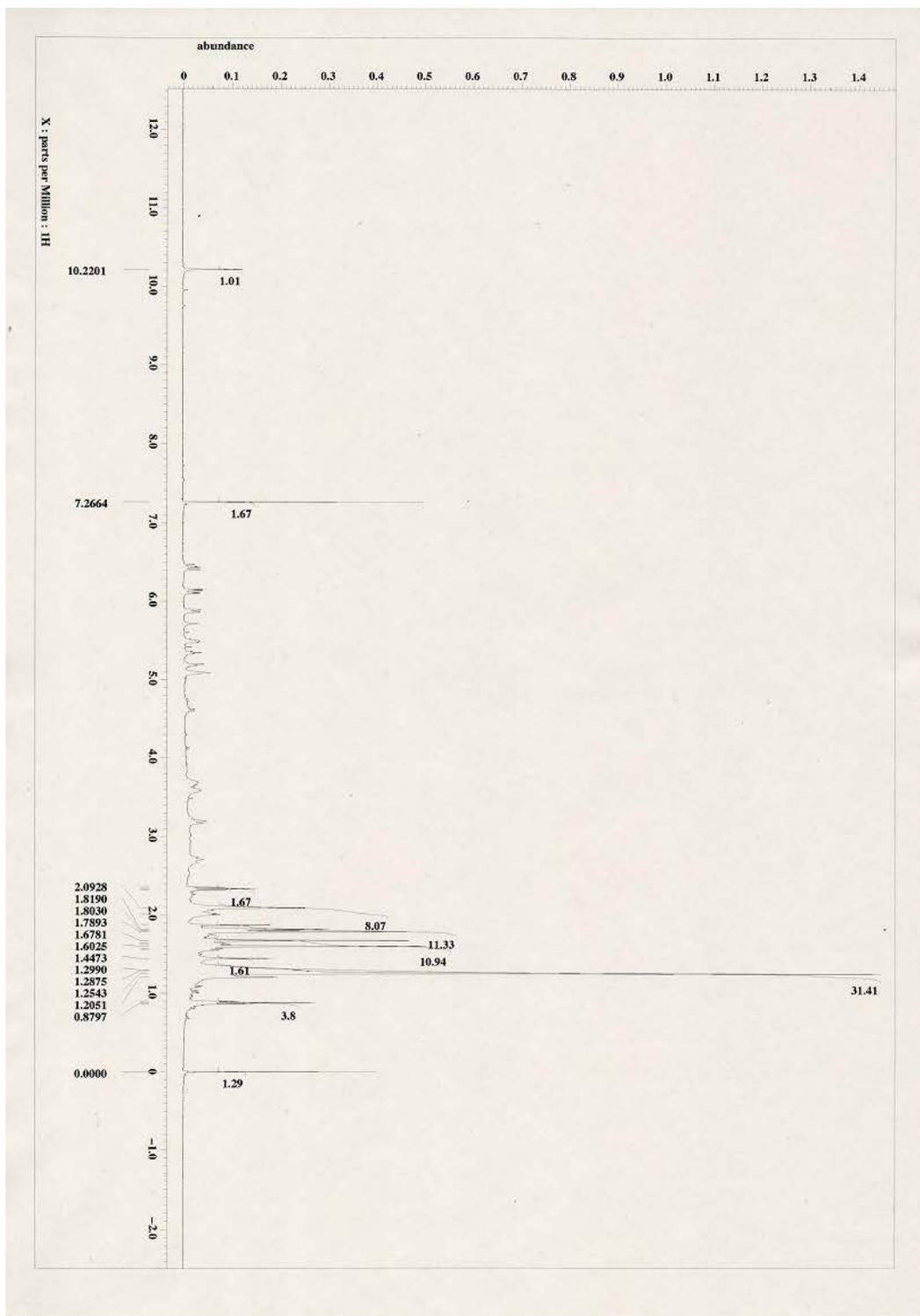


Fig.4-8 化合物 3c の  $^1\text{H}$ NMR スペクトル

【NMR condition】

溶媒： $\text{CDCl}_3$  化合物量：20.8 mg

積算回数：16

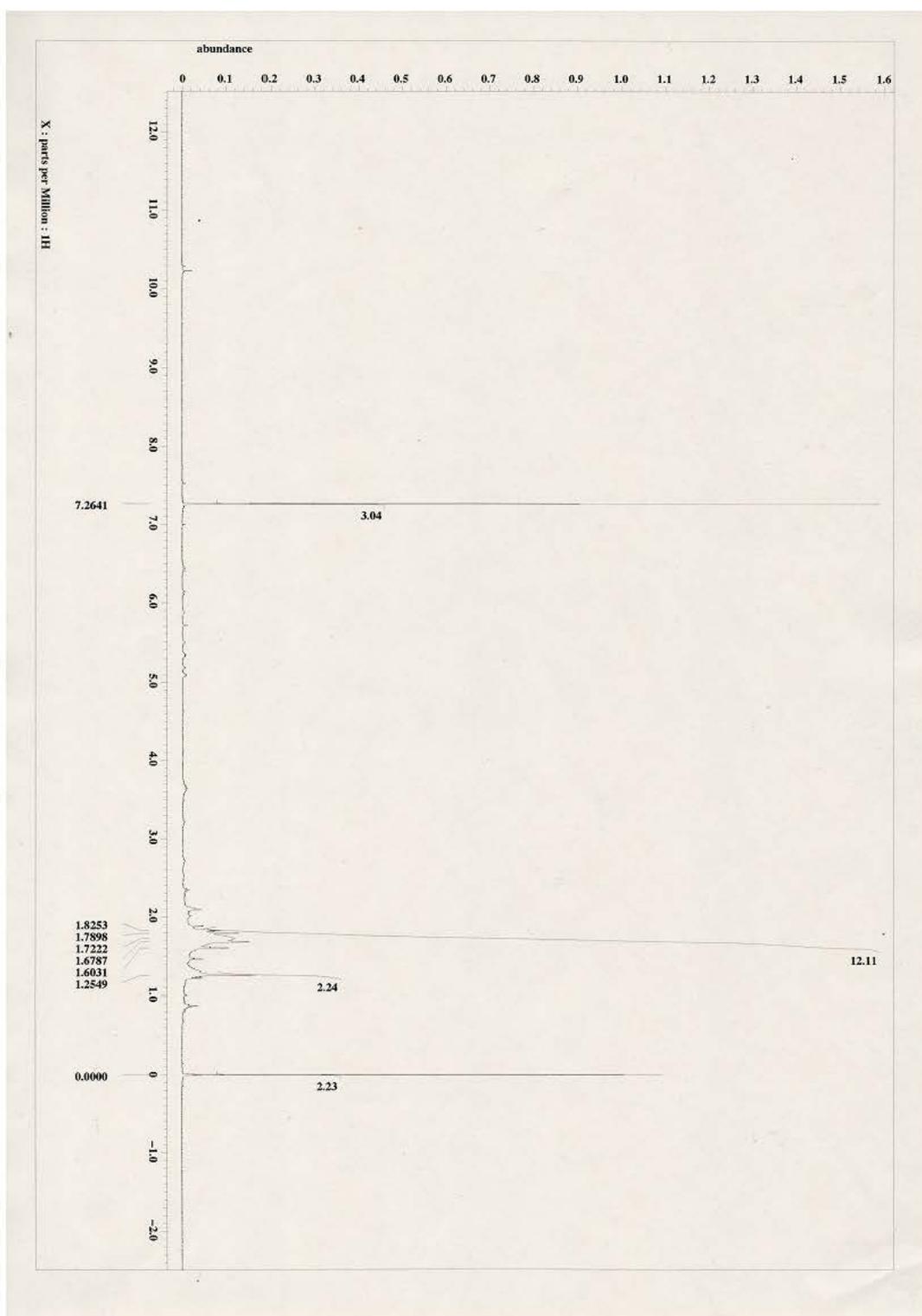


Fig.4-9 化合物 3a の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル

【NMR condition】

溶媒： $\text{CDCl}_3$  化合物量：12.8 mg

積算回数：16

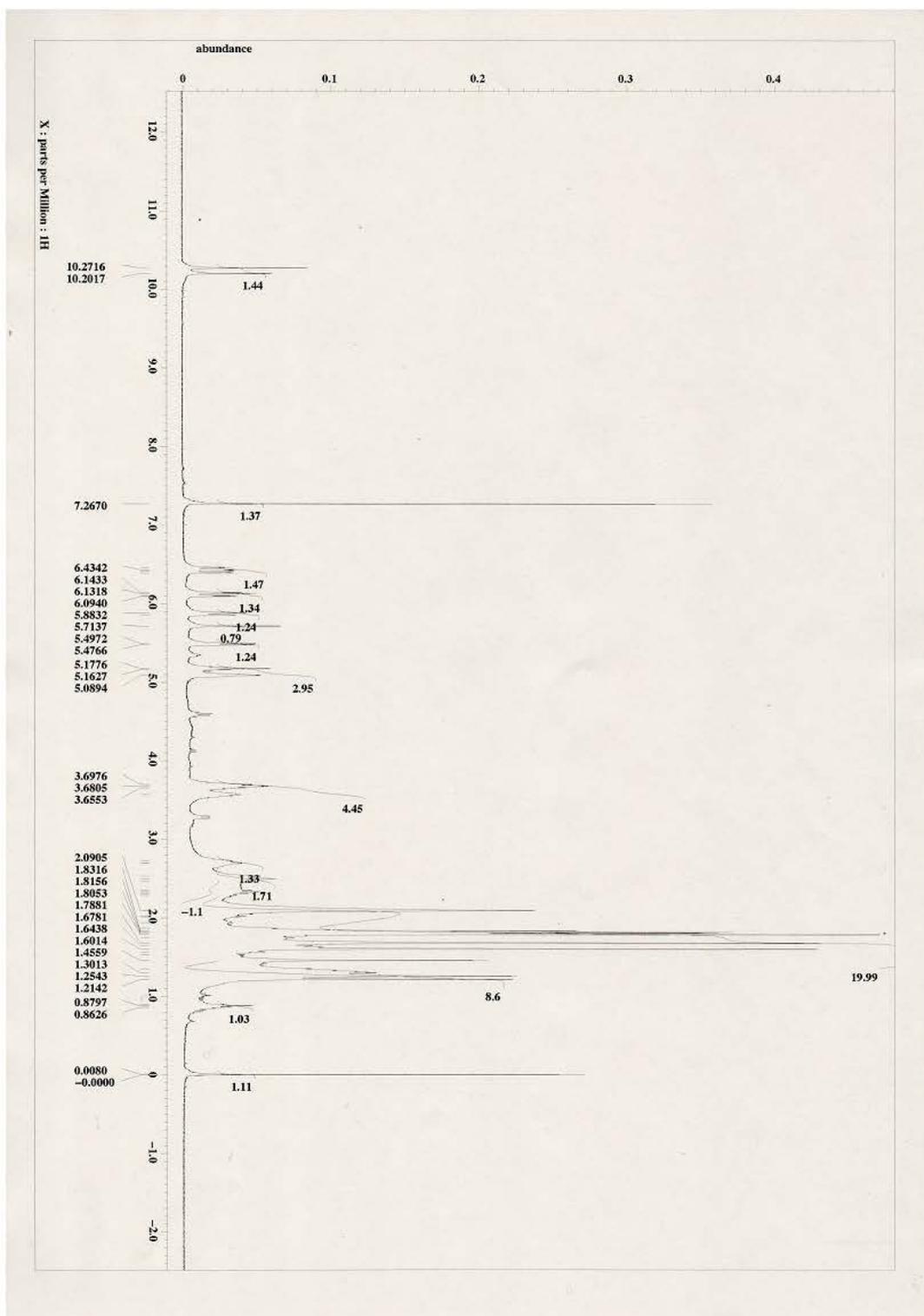


Fig.4-10 化合物 3b の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル

【NMR condition】

溶媒 :  $\text{CDCl}_3$  化合物量 : 26.3 mg

積算回数 : 16

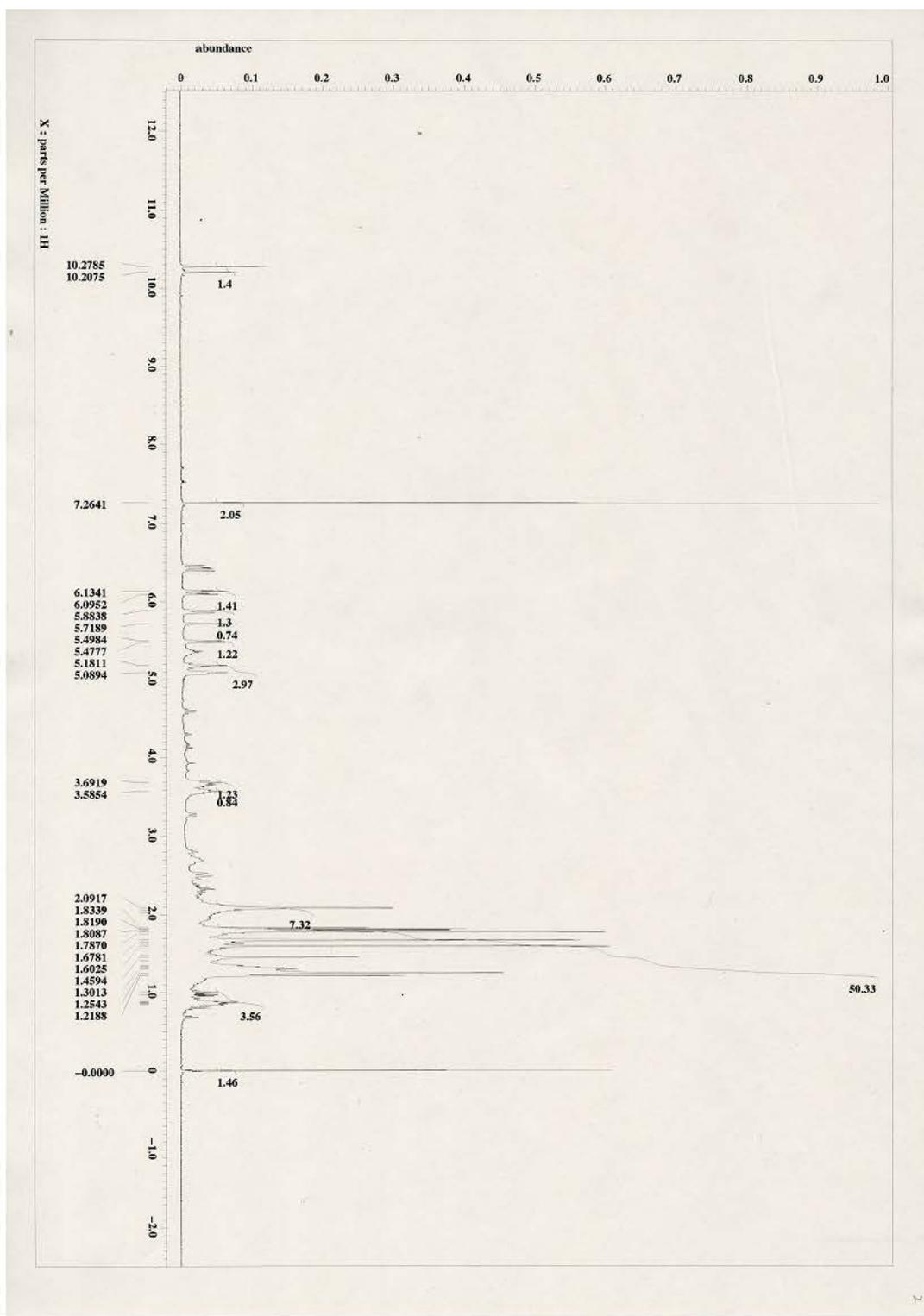


Fig.4-11 化合物 3d の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル

【NMR condition】

溶媒 :  $\text{CDCl}_3$  化合物量 : 14.9 mg

積算回数 : 16

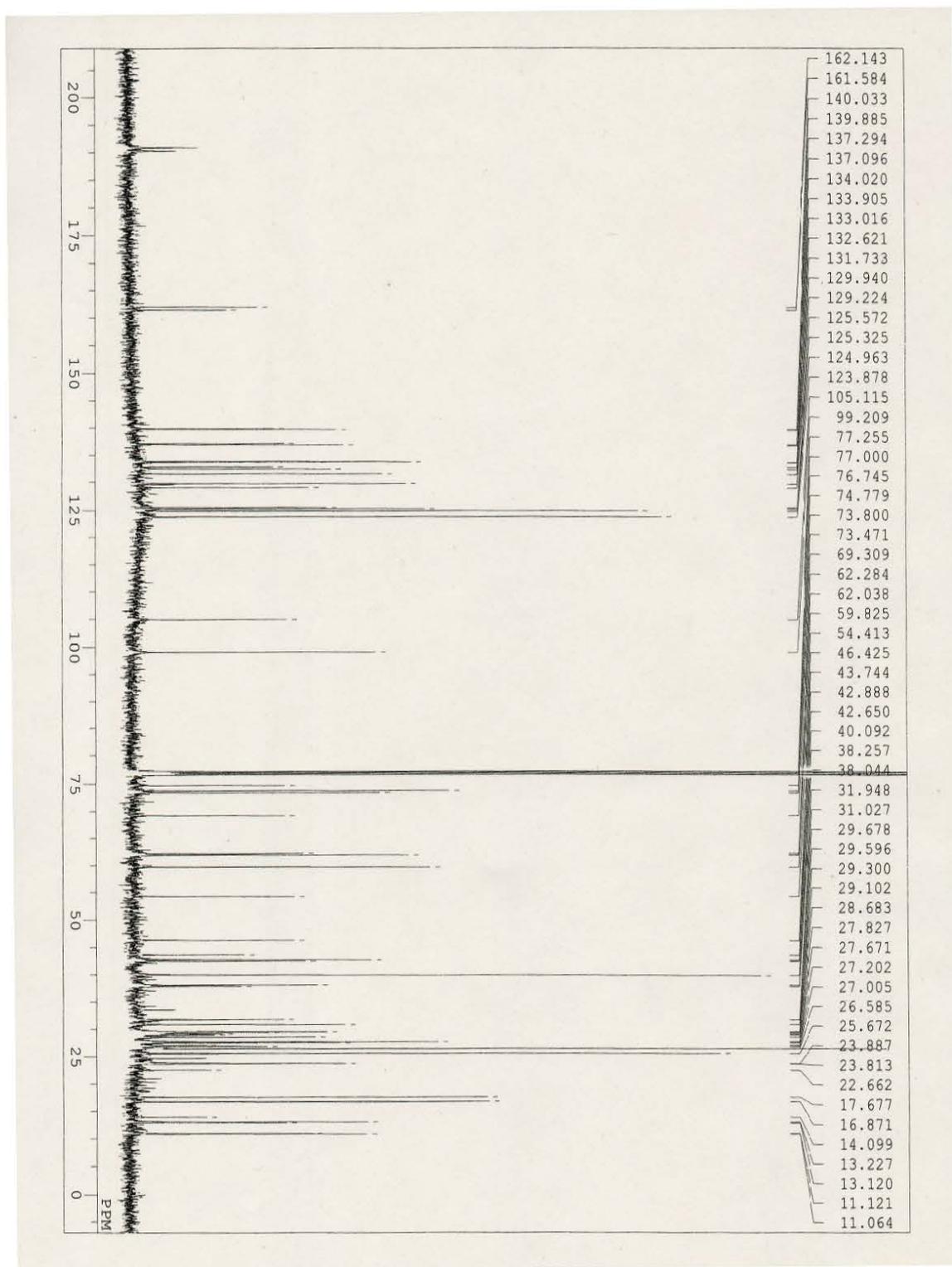


Fig. 4-12 化合物 3b の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル

【NMR condition】

溶媒 :  $\text{CDCl}_3$  化合物量 : 26.3 mg

積算回数 : 15000

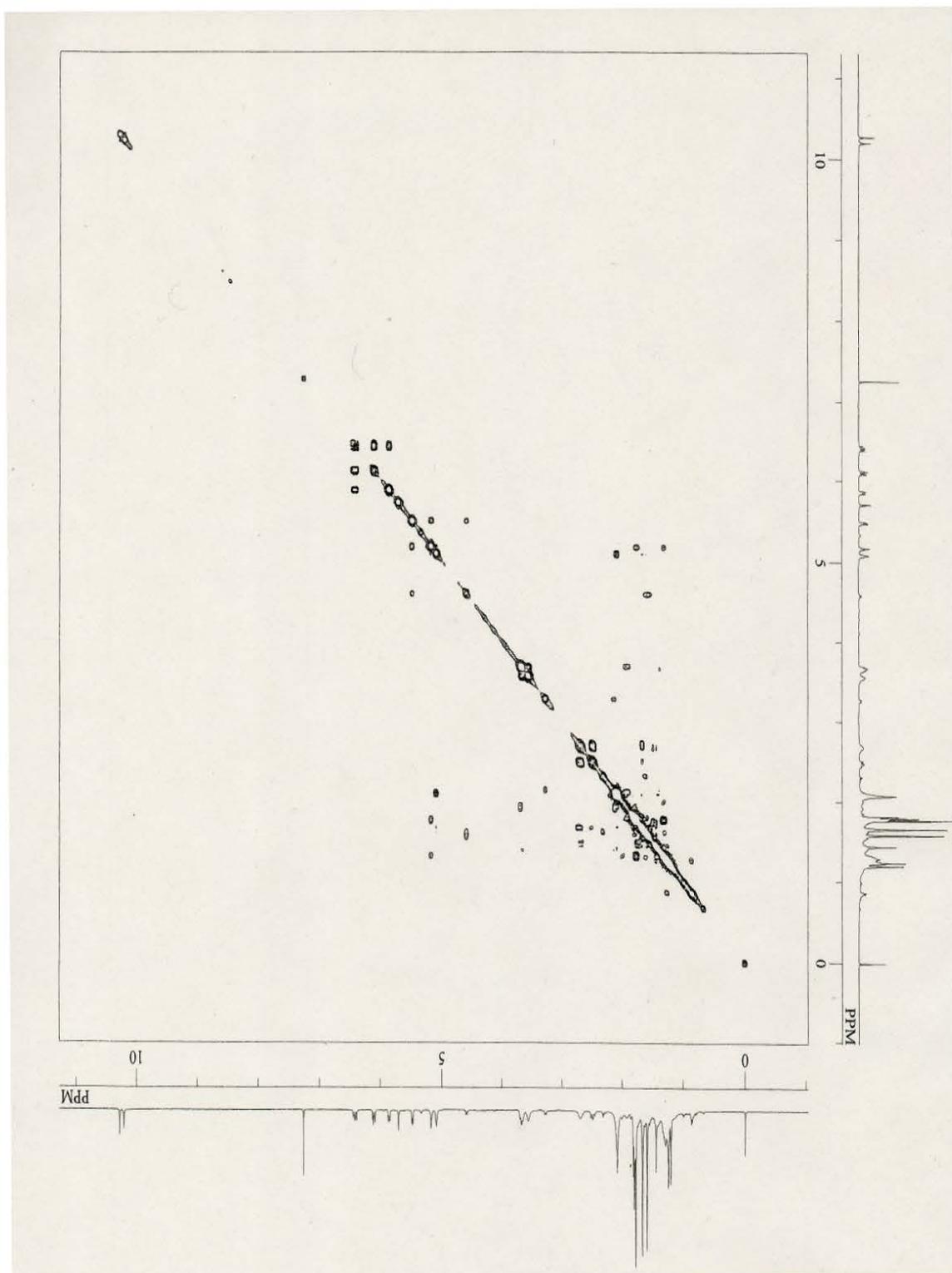


Fig. 4-13 化合物 3b の H-H COSY 結果

【NMR condition】

溶媒 :  $\text{CDCl}_3$  化合物量 : 26.3 mg

積算回数 : 4

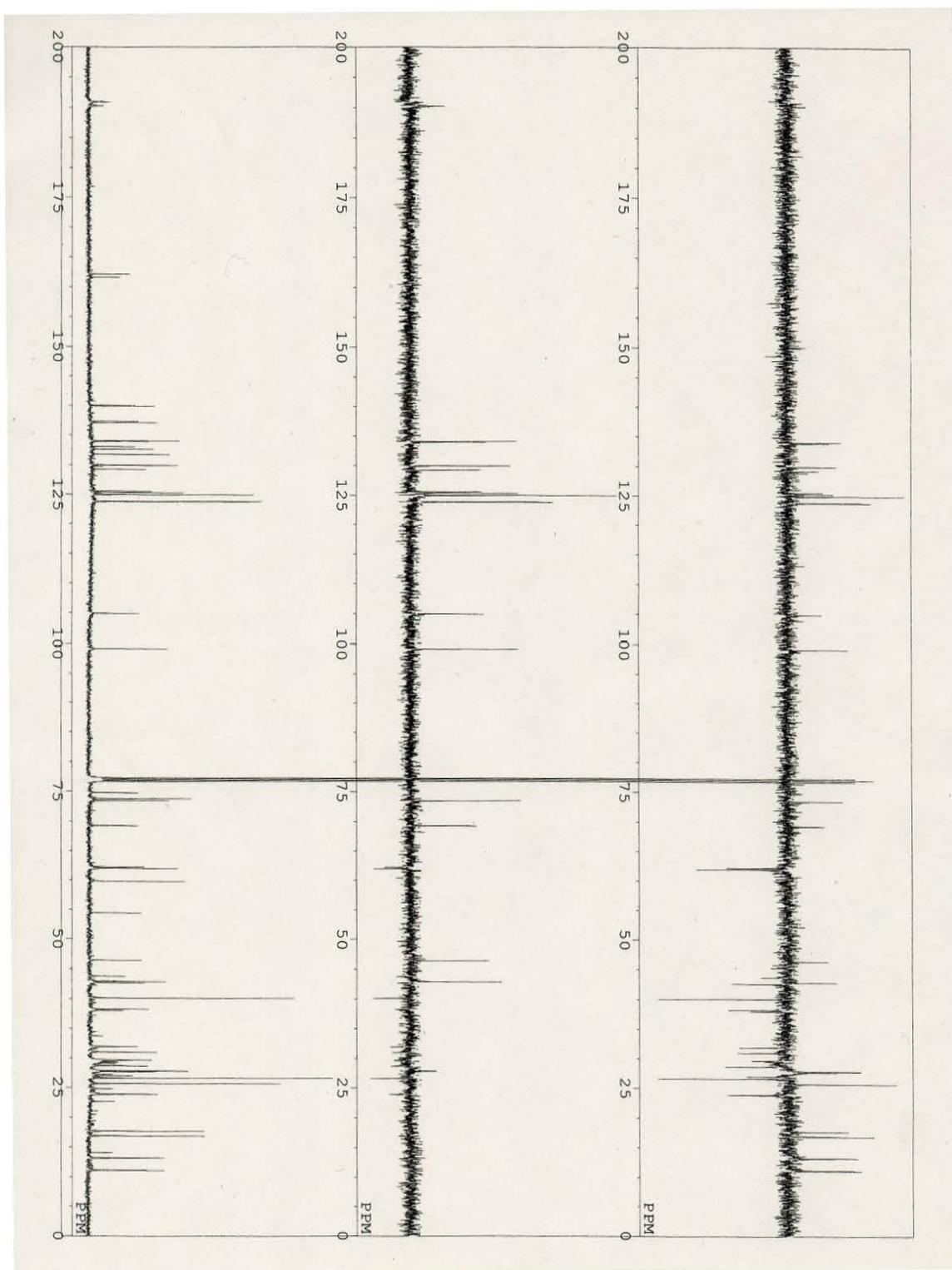


Fig. 4-14 化合物 3b の DEPT 結果

【NMR condition】

溶媒：CDCl<sub>3</sub> 化合物量：26.3 mg

積算回数：1024

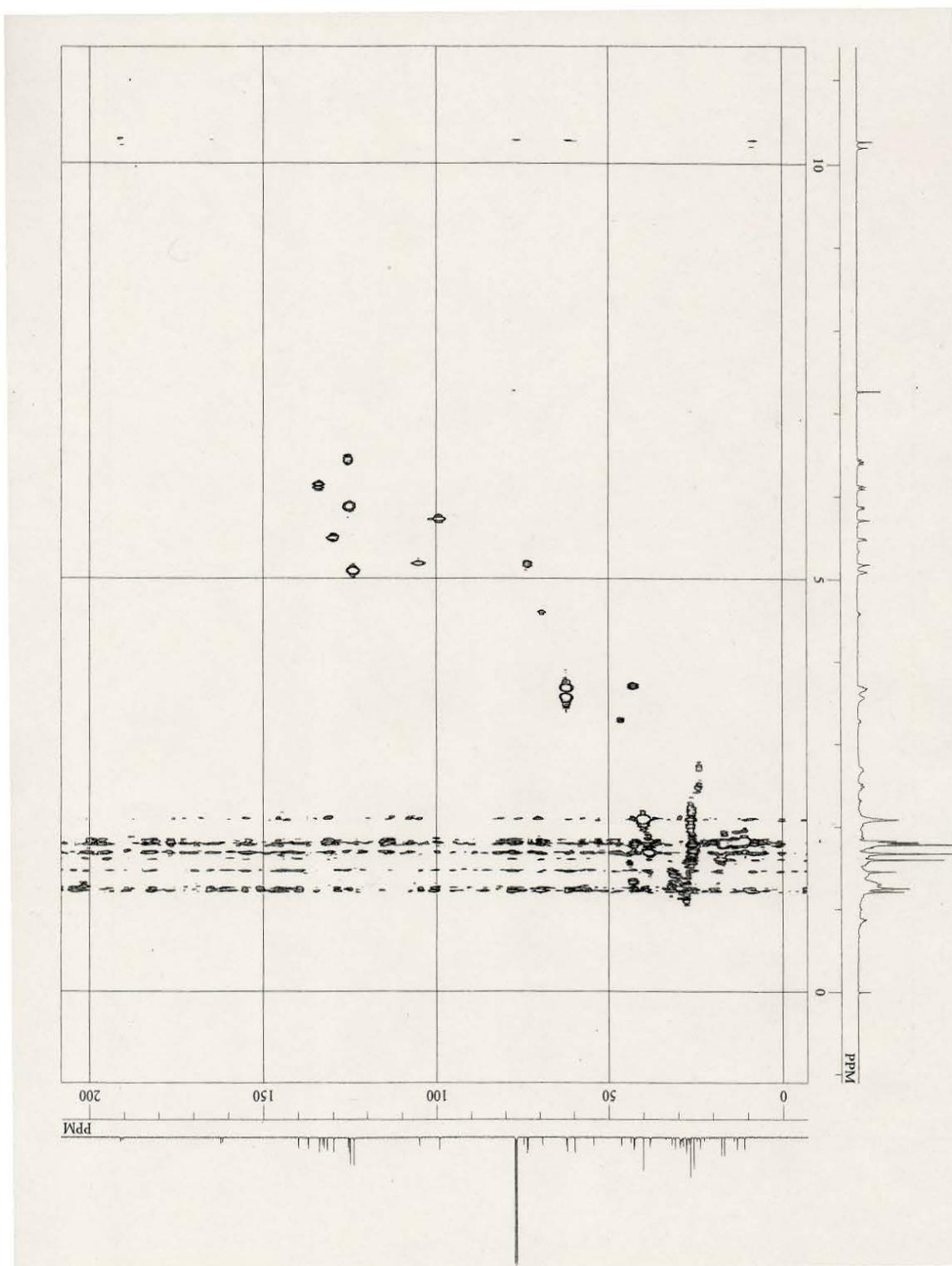


Fig. 4-15 化合物 3b の HSQC 結果

【NMR condition】

溶媒 :  $\text{CDCl}_3$  化合物量 : 26.3 mg

積算回数 : 16

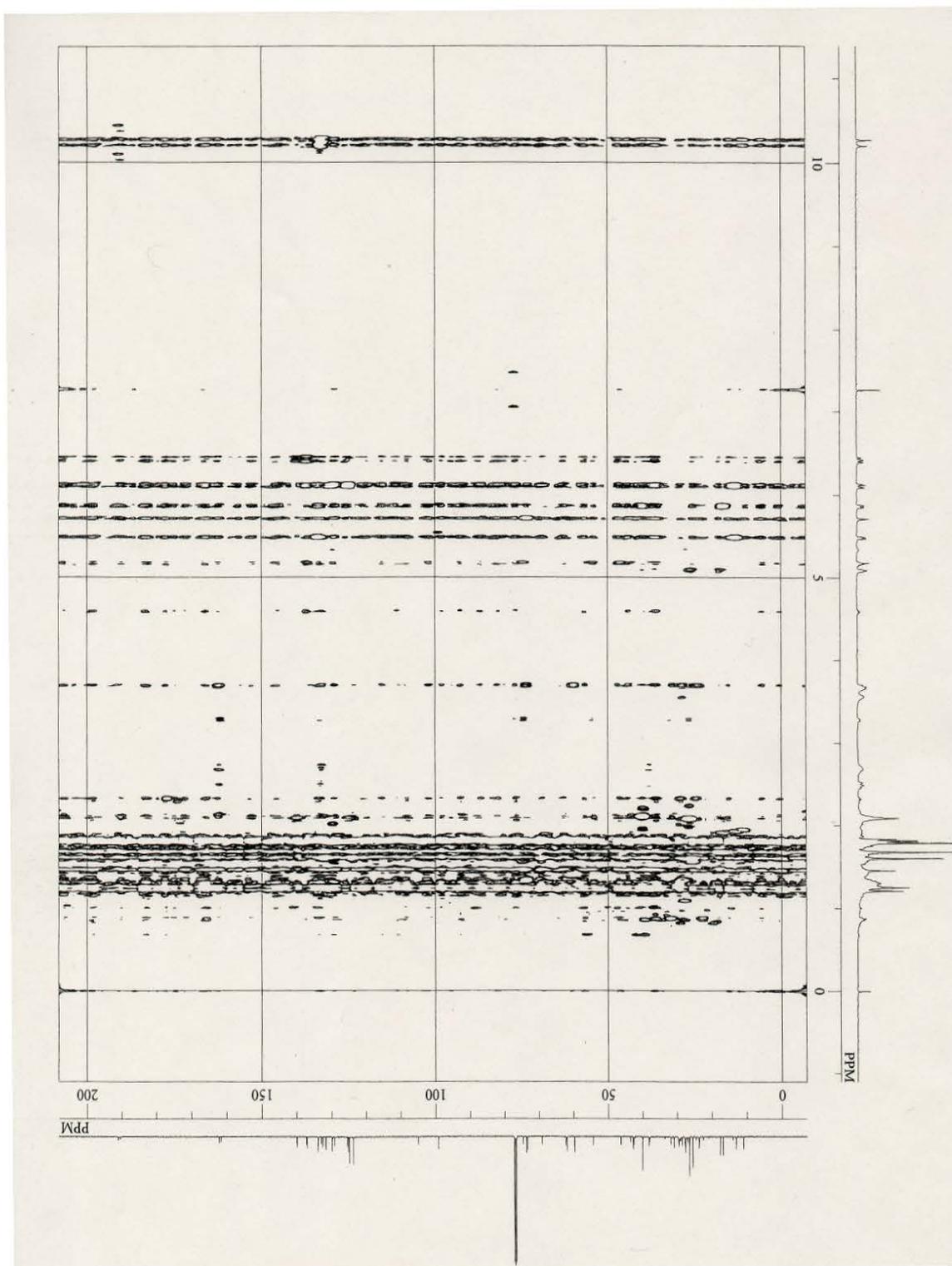


Fig. 4-16 化合物 3b の HMBC 結果

【NMR condition】

溶媒：CDCl<sub>3</sub> 化合物量：26.3 mg

積算回数：128

### 第 3 節 結果および考察

ESI-MS および HPLC/ESI-MS の結果より、化合物 3a、3b、3c、3d および 2a、2b の分子量を推定した (Table 1)。また、 $^1\text{H}$  NMR の結果より、3b は二重結合が連なる構造、アルデヒドが部分構造として含まれていると推定した。また、3a、3c、3d の  $^1\text{H}$  NMR のスペクトルが 3b のスペクトルと類似していることから、100 %エタノール溶出画分から分取した 4 つの化合物は似たような構造をしていると考えられる。

Table 1 分取した化合物の推定分子量

化合物	推定分子量
2a	519
2b	456
3a	408
3b	518
3c	412
3d	424

また、化合物 3b の  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、DEPT、HSQC の結果より、炭素と水素の相関を表にまとめた (Table 2)。

Table 2  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、DEPT の相関一覧

entry	C(ppm)	DEPT	H(ppm)	entry	C(ppm)	DEPT	H(ppm)
1	11.1	CH <sub>3</sub>	1.82	25	46.4	CH	3.28
2	13.2	CH <sub>3</sub>	1.82	26	54.4	C	
3	14.1	C		27	59.8	C	
4	16.9	CH <sub>3</sub>	1.78	28	62.2	CH <sub>2</sub>	3.56
5	17.7	CH <sub>3</sub>	1.58	29	69.3	CH	4.59
6	22.6	C		30	73.7	CH	5.17
7	23.8	CH <sub>2</sub>	2.68	31	74.8	C	
8	24.8	C		32	77	CH	7.26
9	25.7	CH <sub>3</sub>	1.75	33	99.2	CH	5.72
10	26.6	CH <sub>2</sub>	1.46	34	105.1	CH	5.18
11	27.1	CH <sub>2</sub>		35	123.9	CH	5.09
12	27.8	CH	1.31	36	124.9	CH	5.87
13	28.6	CH <sub>2</sub>		37	125.3	CH	6.43
14	29.1	CH <sub>2</sub>		38	125.6	CH	
15	29.4	CH <sub>2</sub>		39	129.2	CH	
16	29.7	CH <sub>2</sub>	1.25	40	129.9	CH	5.49
17	31	CH <sub>2</sub>		41	131.7	C	
18	31.9	CH <sub>2</sub>		42	132.6	C	
19	33.7	C		43	133	C	
20	38.2	CH <sub>2</sub>	1.67	44	134	CH	6.13
21	40.2	CH <sub>2</sub>	2.09	45	137.2	C	
22	42.8	CH <sub>2</sub>	1.33	46	140	C	
23	42.9	CH	3.66	47	160.4	C	
24	43.7	CH <sub>2</sub>		48	190.2	CH	10.2

その結果、多数の炭素、メチル基を 5 つ、アルデヒドを部分構造にもつ化合物であると推定した。また、HSQC の結果より、化合物を構成する炭素と水素の相関は分かったものの、全体の構造はまだ解明できていない。

しかし、化合物 3b の  $^{13}\text{C}$  NMR の結果 (Fig. 4-12) から考察すると、20~60 ppm と 120 ppm 付近 140 ppm 付近にピークが見られることから、コレステロールの  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルのピーク (Fig. 4-17) に似ているように思われる。このことから、化合物 3b はステロイド系の骨格を持つ物質ではないかと考えられる。さらに、*Iris florentina* という種から  $\beta$ -シトステロールが単離されているため、ステロイド系の物質である可能性は高いと考えられる。また、20~60 ppm、120~140 ppm に多数のピークが検出されていることから、 $\beta$ -カロテンの  $^{13}\text{C}$  NMR のスペクトルのピーク (Fig. 4-18) にも似ているように思われる。このことからカロテノイド系の骨格をもつ物質ではないかとも考えられる。今後、構造の解析を続ける必要があると思われる。

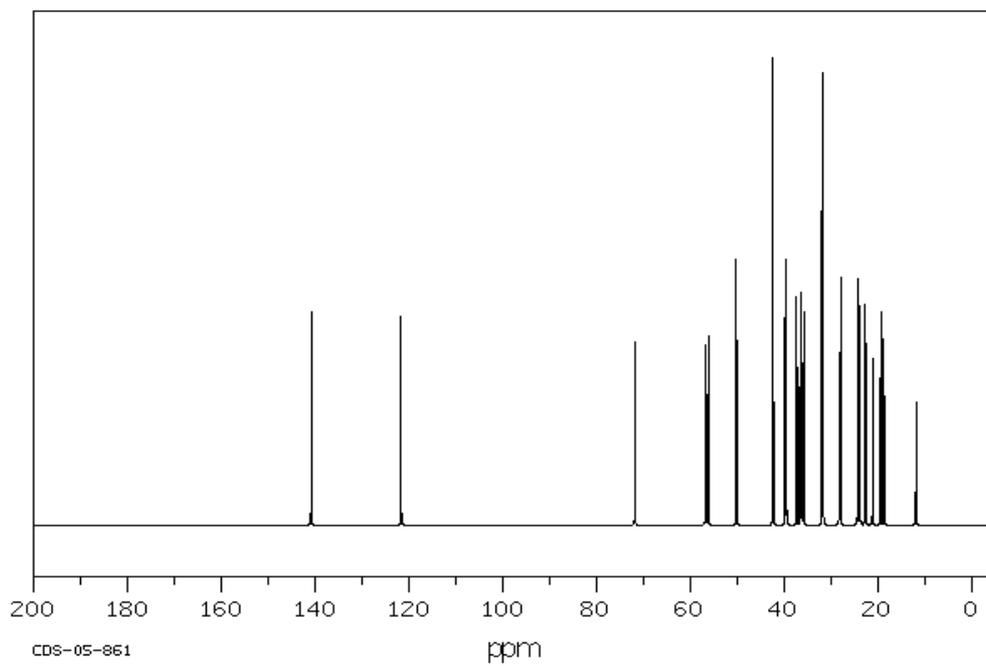


Fig. 4-17 コレステロールの  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル <sup>10)</sup>

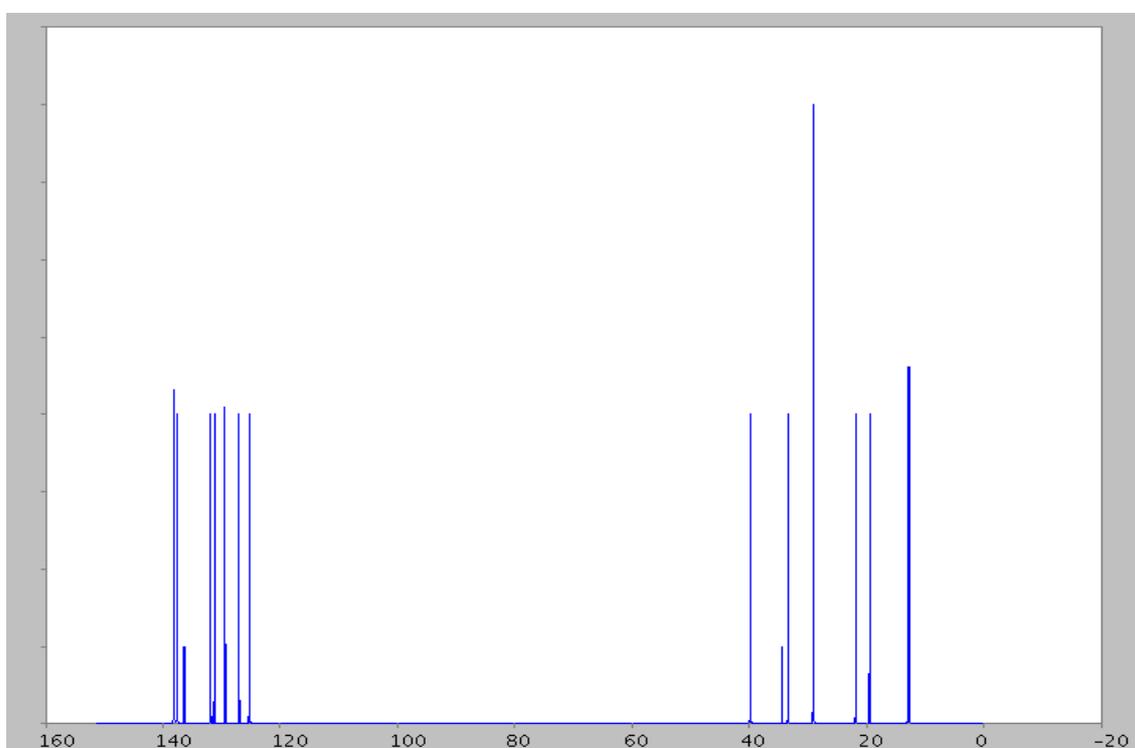


Fig. 4-18  $\beta$ -カロテンの  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル <sup>11)</sup>

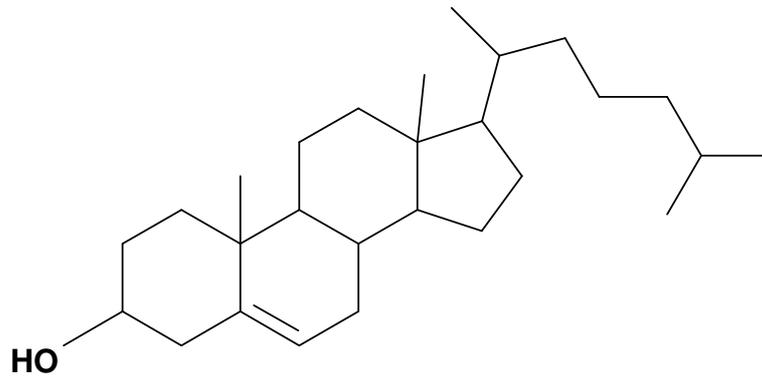


Fig. 4-19 コレステロール構造

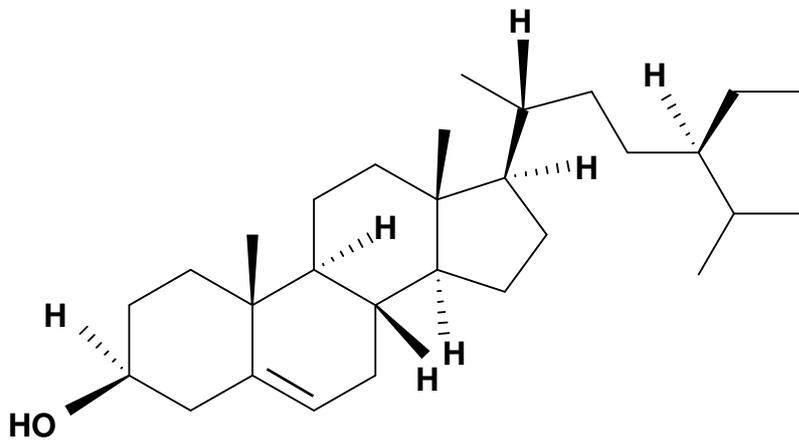


Fig. 4-20  $\beta$ -シトステロール構造

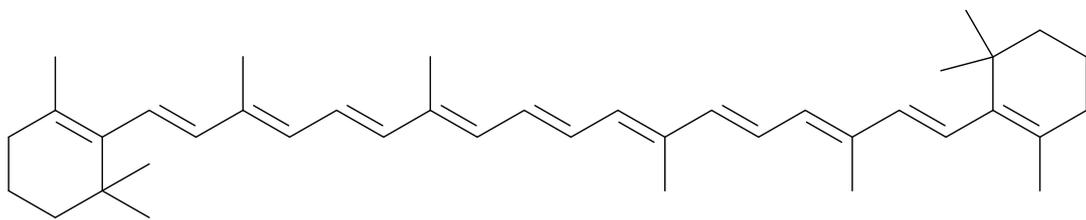


Fig. 4-21  $\beta$ -カロテン構造

## 第 5 章 機能性の探索

### 第 1 節 DPPH ラジカル消去活性測定

化合物 3a、3b、3c、3d について、DPPH ラジカル消去活性を測定した。

DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) は安定性のあるフリーラジカルで、エタノール中で 515 nm に強い吸収を示す。抗酸化化合物などが結合することによって DPPH が還元されて紫色が消え、吸収が消える。

各化合物を 0.5、0.4、0.3、0.2、0.15、0.1、0.075、0.05 mg/mL にエタノールで調製し、そこに超純水、0.4 mM DPPH (in EtOH) を加えて攪拌し、20 分間遮光静置して反応させた後、490 nm における吸光度を測定した (Fig.5-1)。

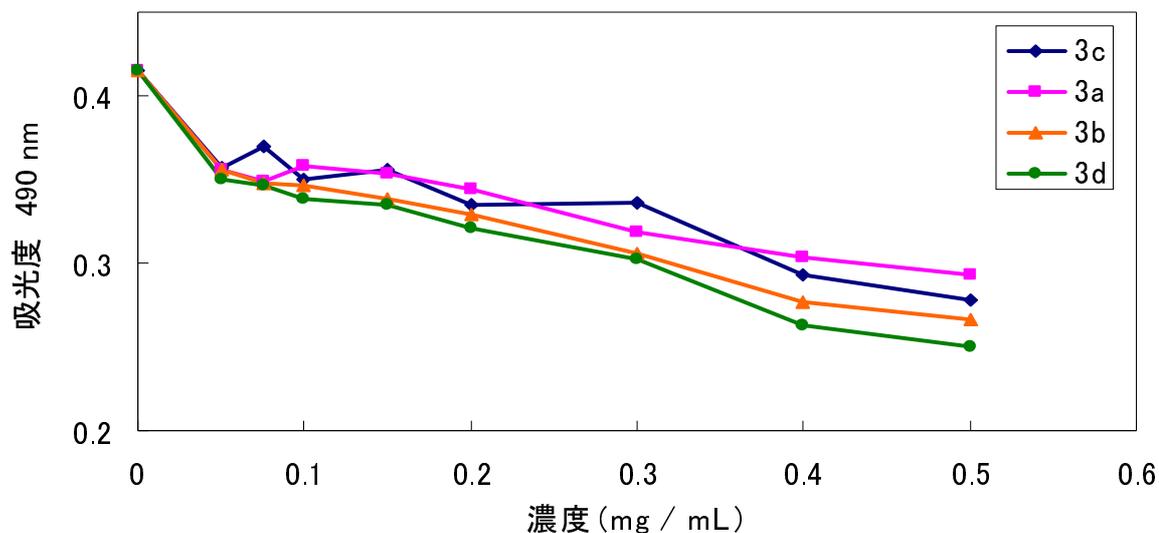


Fig.5-1 化合物 3a～3d の DPPH ラジカル消去活性測定

【測定条件】 試料 100  $\mu$ L、超純水 100  $\mu$ L、0.4 mM DPPH (エタノール溶液) 50  $\mu$ L 混合、20 min 室温で遮光反応、490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定

また、ルチンについても同様に DPPH ラジカル消去活性を測定した (Fig.5-2)。

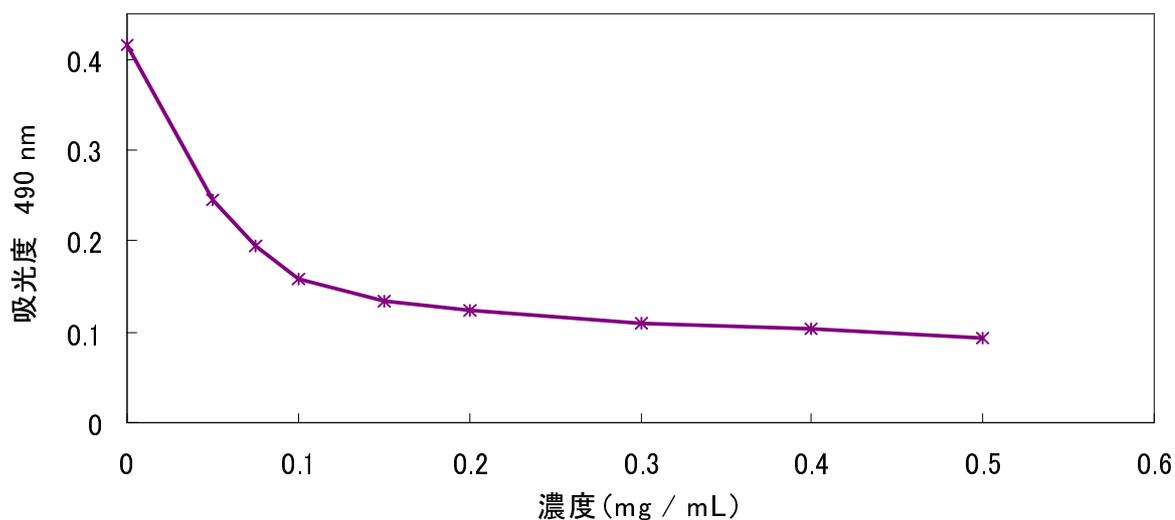


Fig.5-2 フラボノイド ルチンの DPPH ラジカル消去活性測定

【測定条件】 Fig. 5-1 に同じ

## 第 2 節 抗菌活性測定

化合物 3a、3b、3c、3d について、抗菌活性を検討した。

対象菌は病原性のない大腸菌 (NBRC 3972) と黄色ブドウ球菌 (NBRC 12732) であり、日本薬局方の微生物試験法や JIS 抗菌性評価試験に使用されていて、医薬品や化粧品、食品の微生物試験で用いられているものを使用し、測定はペーパーディスク法で行った。

各試料を 1.0、0.1、0.01 mg/mL にポリソルベート 80 を添加した 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で調整し、直径 8 mm の濾紙に 30  $\mu$ L 染み込ませ、LB 培地中で 37°C で一夜培養した各菌液を塗抹したミュラーヒントン寒天培地に 24 mm 間隔で配置して 37°C で 24 時間培養した (Fig. 5-3、Fig. 5-4、Fig. 5-5、Fig. 5-6、Fig. 5-7、Fig. 5-8、)。

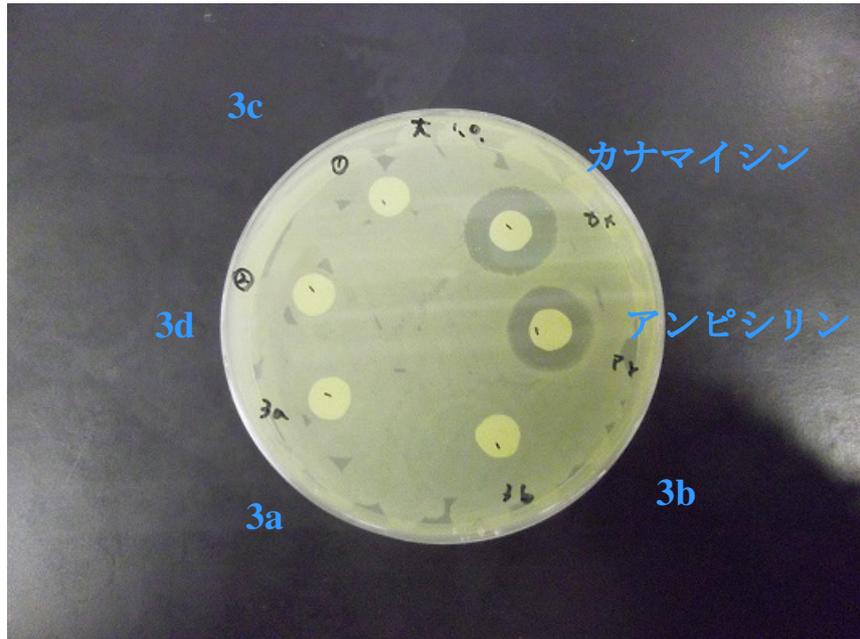


Fig. 5-3 抗菌活性実験結果（大腸菌）

【測定条件】

試料 1.0 mg/mL(アンピシリン 50  $\mu$ g/mL、カナマイシン 12.5  $\mu$ g/mL)、30  $\mu$ L を 8 mm  $\phi$  の濾紙に滴下し大腸菌を塗抹した寒天培地に置き、37 $^{\circ}$ C、24 h 培養

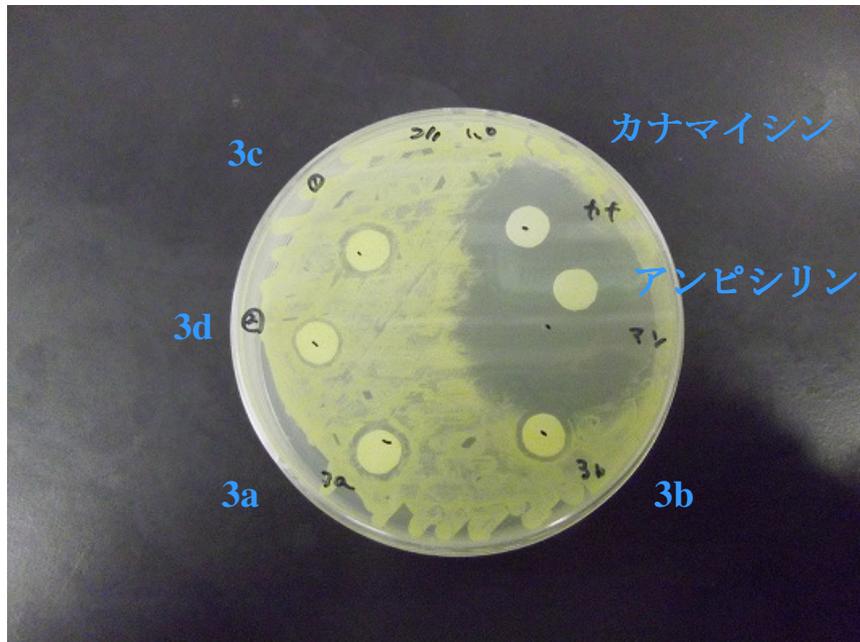


Fig. 5-4 抗菌活性実験結果（黄色ブドウ球菌）

【測定条件】

試料 1.0 mg/mL (アンピシリン、カナマイシンは上に同じ)、30  $\mu$ L を 8 mm  $\phi$  の濾紙に滴下し黄色ブドウ球菌を塗抹した寒天培地に置き、37 $^{\circ}$ C、24 h 培養

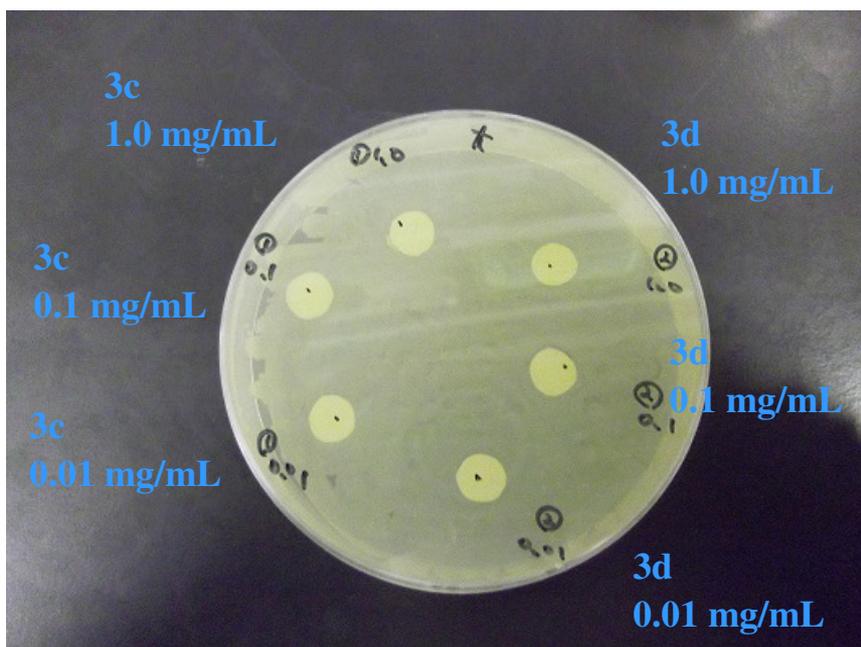


Fig. 5-5 抗菌活性実験結果（大腸菌、化合物 3c、3d）

【測定条件】

試料 1.0、0.1、0.01 mg/mLそれぞれ 30  $\mu$ L を 8 mm  $\phi$  の濾紙に滴下し大腸菌を塗抹した寒天培地に置き、37 $^{\circ}$ C、24 h 培養

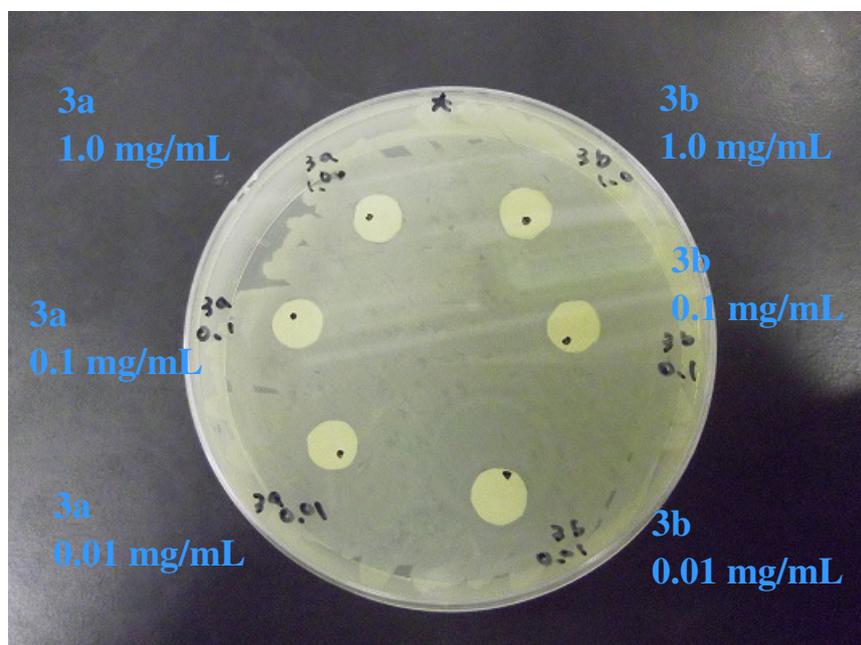


Fig. 5-6 抗菌活性実験結果（大腸菌、化合物 3a、3b）

【測定条件】

Fig. 5-5 に同じ

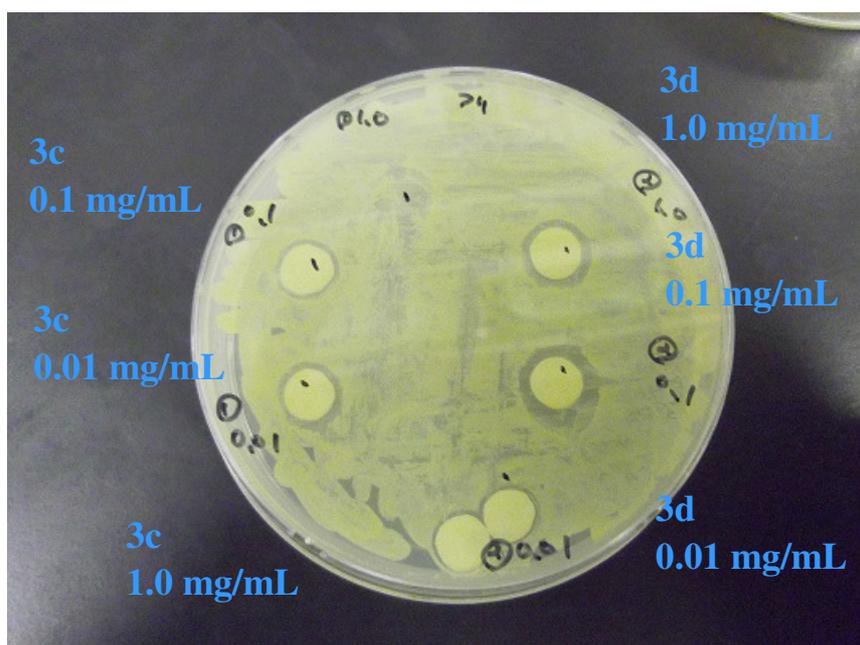


Fig. 5-7 抗菌活性実験結果（黄色ブドウ球菌、化合物 3c、3d）

【測定条件】

試料 1.0、0.1、0.01 それぞれ 30  $\mu$ L を 8 mm  $\phi$  の濾紙に滴下し黄色ブドウ球菌を塗抹した寒天培地に置き、37 $^{\circ}$ C、24 h 培養

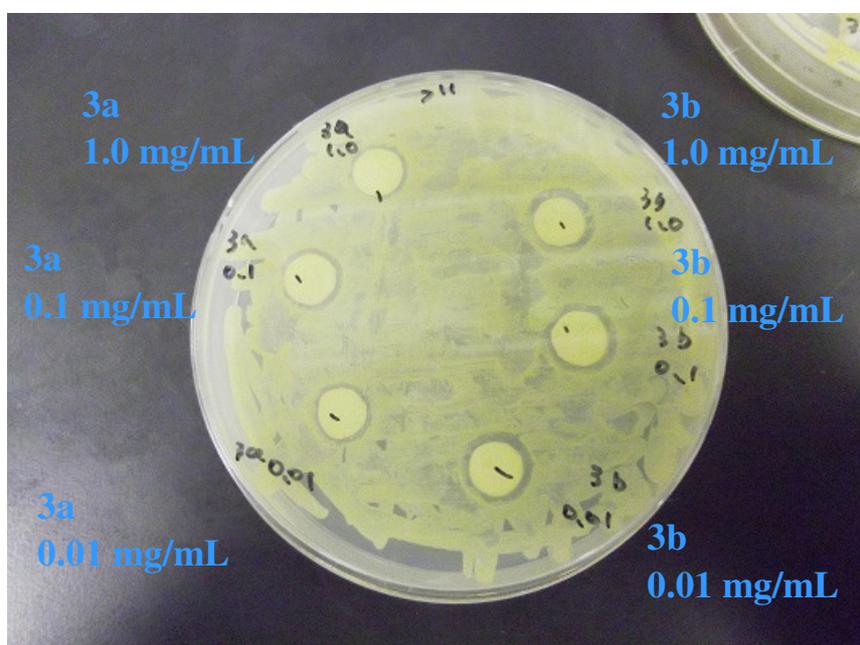


Fig. 5-8 抗菌活性実験結果（黄色ブドウ球菌、化合物 3a、3b）

【測定条件】

Fig. 5-7 に同じ

### 第 3 節 結果および考察

3a、3b、3c、3d について DPPH ラジカル消去活性を測定した結果、ブランクの吸光度が 0.415 であり、試料の濃度が大きくなるにつれて、吸光度の値が小さくなっている右下がりのグラフが描けたため、4 つの化合物にどれも抗酸化活性があると考えられた。しかし、強い抗酸化活性が確認されているルチンと比較すると、抗酸化活性は小さい結果になった。

また、抗菌活性については、大腸菌に対しては各画分とも制菌効果はみられなかったが、黄色ブドウ球菌に対しては、アンピシリンやカナマイシンほどではないものの、抗菌活性があることが分かった。試料を含まないポリソルベート 80 溶液のみを添加した実験では、阻止円が見られなかったので、ポリソルベート 80 の影響はないと思われる。しかし、濃度による依存性は今回の実験では確認することができなかった。今後、濃度依存的な抗菌効果の変化をもう少し詳しく調べるために、試料濃度の検討や微量液体培地希釈法などの検討を行う必要があると思われる。

## 第 6 章 総括

本研究では、ハナショウブからの成分抽出と構造解析を行った。また、機能性の探索として、抗酸化活性と抗菌活性を測定した。

成分抽出では、エタノールによる抽出、DIAION HP-20 を用いた疎水性カラムクロマトグラフィーによる分離・分取、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離・分取により、化合物 3a、3b、3c、3d を得た。

得られた 4 つの化合物の抗酸化活性測定を DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) を用いて、マイクロプレートリーダーによって行った。その結果、得られた 4 つの化合物に DPPH ラジカル消去活性があることが分かった。しかし、強い抗酸化活性を持つことが知られているルチンと比較してみたところ、残念ながらルチンほどの強い活性は認められなかった。

また、同じ 4 つの化合物の抗菌活性測定を大腸菌、黄色ブドウ球菌を用いて、ペーパーディスク法によって行った。その結果、4 つの化合物とも大腸菌に対しては制菌効果がみられなかったが、黄色ブドウ球菌に対して制菌効果が認められた。

構造解析を目的として、化合物 2a、2b、3a~3d について、HPLC/ESI-MS による質量分析と  $^1\text{H}$  NMR による解析を、また、化合物 3b については  $^{13}\text{C}$  NMR、DEPT、H-H COSY、HSQC、HMBC による解析も行った。質量分析の結果、化合物 3a、3b、3c、3d、2a、2b の分子量はそれぞれ 408、518、412、518、519、456 と推定することができた。また、 $^1\text{H}$  NMR の結果より、化合物 3b は二重結合が連な

る構造、アルデヒドが部分構造として含まれていると推定することができた。また、3a、3c、3dの $^1\text{H NMR}$ のスペクトルが3bのスペクトルと類似していることから、100%エタノール溶出画分から分取した4つの化合物は似たような構造をしていると考えられた。さらに、 $^{13}\text{C NMR}$ 、DEPT、H-H COSY、HSQCの結果より、化合物を構成する炭素と水素の相関が分かり、化合物3bは少なくとも炭素原子の信号が48個あり、メチル基の信号が5つ、アルデヒドに対応する信号が2つあり、それらを部分構造にもつ化合物であると推定することができた。また、化合物3bの $^{13}\text{C NMR}$ のスペクトルがコレステロール、 $\beta$ -カロテンのスペクトルに似ていることから、化合物3bはステロイド系、またはカロテノイド系の構造を持つ物質であることが推察された。しかし、全体の構造はまだ解明できていない。今回NMRの結果が非常に複雑であり、同じような物質が2つ混ざり合っている可能性、もしくは異性化している可能性が考えられたため、今後更なる化合物の精製が必要であると考えられた。また、化合物3a、3c、3d、2a、2bの分析や、今回分取していない成分の分析も今後発展していくことを期待している。

## 第 7 章 実験の部

### 第 1 節 ハナショウブからの成分抽出

ハナショウブの根 (7100 g) を水道水で洗って泥を落とし、包丁で細かく (厚さ 5 mm 程の輪切り) 刻んだ後、80 %エタノールと共に (ハナショウブの根 200 g に対して 80 %エタノールが 1 L の割合で) ミキサーに入れ粉碎した。それらを瓶に詰め、約 2 週間室温にて静置した。

デカンテーションによって根を除いた後、溶液を濾紙 (125 mm)、ブフナー漏斗 (11 cm  $\phi$ )、吸引フラスコ (1L) を用いて吸引濾過し、細かい根を除去した。

根から抽出した濾液を、ナスフラスコ (1 L) に入れてエバポレーターを用いて濃縮を行い、その残渣に再度 100 %エタノールを適量加え、エタノール可溶性画分 (約 20 g) とエタノール不溶性画分 (水溶性画分) (約 110 g) に分けた。

## 第 2 節 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析

根のエタノール可溶性画分と水溶性画分の分析を逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって行った。エタノール可溶性画分は 10 mg/mL にメタノールで調整し、水溶性画分は同濃度に超純水で調整した。

HPLC は SHIMADZU の LC-10AVP を使用し、付属のクロマトグラム解析ソフトウェアは CLASS-VP を使用した。

なお、HPLC の分析条件は以下に記述する。

【HPLC 分析条件】

Column : Develosil ODS-HG-5 (8.0 mm  $\phi$   $\times$  250 mm)

Mobile Phase : A : H<sub>2</sub>O

B : CH<sub>3</sub>CN

Programmed Gradient : Time	A : B
0 min	60 : 40
5 min	60 : 40
15 min	0 : 100
20 min	0 : 100
23 min	60 : 40
25 min	60 : 40

Flow rate : 0.5 mL/min

Column Temperature : 35 °C

Detection : UV at 254 nm

Injection Volume : 5  $\mu$ L

### 第3節 カラムクロマトグラフィーによる分離・分取

DIAION HP-20 (100 g) を 60 %エタノール (400 mL) に浸漬し、しばらく静置した後、カラム (41.4 mm  $\phi$   $\times$  600 mm) に綿を詰め、HP-20 を流し込んで逆相カラムを作成した。

根のエタノール可溶性画分 (1.0 g) を少量の 60 %エタノールに溶かしてカラムにのせ、60 %、80 %、100 %エタノールを 400 mL ずつ順に流し込み、各溶出画分を三角フラスコ (200 mL) に分取した。その後、抽出溶液をナスフラスコ (100 mL) に入れて、エバポレーターによって濃縮し、各溶出画分それぞれ 60 % 0.38 g、80 % 0.43 g、100 % 2.82 g を得た。

## 第 4 節 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離・ 分取

DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーによる分取で得た 60 %、80 %、100 %エタノール溶出画分を 10 mg/mL にメタノールで調整し、逆相液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分析を行った。その後、100 %エタノール溶出画分より、化合物 3a、3b 及び 3c、3d の分取を行った。

HPLC は SHIMADZU の LC-20AD を使用し、付属のクロマトグラム解析ソフトウェアは CLASS-VP を使用した。

なお、HPLC の分析条件は以下に記述する。

【HPLC 分析条件 (60 %、80 %エタノール溶出画分)】

Column : YMC ProC18 (2.0 mm  $\phi$   $\times$ 150 mm)

Mobile Phase : A :0.1 % Formic acid in H<sub>2</sub>O

B :0.1 % Formic acid in CH<sub>3</sub>CN

Programmed Gradient : Time	A : B
0 min	40 : 60
20 min	40 : 60
22 min	0 : 100
37 min	0 : 100
39 min	40 : 60
54 min	40 : 60

Flow rate : 0.2 mL/min

Column Temperature : 35 °C

Detection : UV at 254 nm

Injection Volume : 10  $\mu$ L

【HPLC 分取条件（100 %エタノール溶出画分）】

Column : Develosil ODS-HG-5 (8.0 mm  $\phi$   $\times$ 250 mm)

Mobile Phase : A : H<sub>2</sub>O B : CH<sub>3</sub>CN

Programmed Gradient : Time	A : B
0 min	40 : 60
30 min	40 : 60
35 min	35 : 65
58 min	35 : 65
60 min	30 : 70
90 min	30 : 70
95 min	0 : 100
100 min	0 : 100

Flow rate : 1.0 mL/min

Column Temperature : 35 °C

Detection : UV at 254 nm

Injection Volume : 200  $\mu$ L

## 第 5 節 質量分析による構造解析

逆相 HPLC による分取で得た化合物 3a、3b、3c、3d 及び、80 %エタノール溶出画分に含まれる成分 (2a、2b) を HPLC/ESI-MS によって解析を行った。各化合物は 10 mg/mL にメタノールで調整して使用した。

HPLC は DIONEX の UltiMate 3000 RS を、ESI-MS は Thermo Fisher SCIENTIFIC の LTQ Orbitrap Velos ETD を使用し、解析ソフトウェアは Thermo Xcalibur Qual Browser を使用した。

分析条件は以下に記述する。

### 【ESI-MS condition (化合物 3a、3b、3c、3d)】

Heater Temperature [°C] : 0

Sheath Gas Flow rate [arb] : 5

Aux Gas Flow rate [arb] : 0

Sweep Gas Flow rate [arb] : 0

I Splay Voltage [kV] : 3.0

Capillary Temperature [°C] : 275

**【HPLC condition】**

Column : YMC ProC18 (2.0 mm  $\phi$   $\times$ 150 mm)

Mobile Phase : A :0.1 % Formic acid in H<sub>2</sub>O

B :0.1 % Formic acid in CH<sub>3</sub>CN

Programmed Gradient : Time	A : B
0 min	40 : 60
20 min	40 : 60
22 min	0 : 100
37 min	0 : 100
39 min	40 : 60
54 min	40 : 60

Flow rate : 0.2 mL/min

Column Temperature : 35 °C

Detection : UV at 254 nm

Injection Volume : 10  $\mu$ L

**【ESI-MS condition (80 %エタノール溶出画分)】**

Heater Temperature 【°C】 : 0

Sheath Gas Flow rate 【arb】 : 50

Aux Gas Flow rate 【arb】 : 15

Sweep Gas Flow rate 【arb】 : 0

I Splay Voltage 【kV】 : 3.0

Capillary Temperature 【°C】 : 325

## 第 6 節 NMR による構造解析

逆相 HPLC による分取で得た化合物 3a、3b、3c、3d を  $^1\text{H}$  NMR にて解析を行った。

$^1\text{H}$  NMR は日本電子 JEOL JNM-ECX400P (400MHz) を使用し、溶媒は  $\text{CDCl}_3$  で測定した。

また、さらに化合物 3b を、 $^{13}\text{C}$  NMR、DEPT、H-H COSY、HSQC、HMBC にて解析を行った。

$^{13}\text{C}$  NMR、DEPT、H-H COSY、HSQC、HMBC は日本電子 JEOL JNM-A500 (500MHz) を使用し、溶媒は  $\text{CDCl}_3$  で測定した。

## 第 7 節 DPPH ラジカル消去活性測定

分取した化合物 3a、3b、3c、3d およびルチンについて DPPH ラジカル消去活性を測定した。各画分を 0.5、0.4、0.3、0.2、0.15、0.1、0.075、0.05 mg/mL にエタノールで調製し、96 穴マイクロプレートに 100  $\mu$ L ずつ分注し、そこに超純水 100  $\mu$ L、0.4 mM DPPH (in EtOH) 50  $\mu$ L を加えて攪拌し、20 分間遮光静置して反応させた後、マイクロプレートリーダーを用いて、490 nm の吸光度を測定した。

マイクロプレートリーダーはシステムインスツルメンツの Immuno Mini NJ-2300 を使用した。

## 第 8 節 抗菌活性測定

分取した化合物 3a、3b、3c、3d について抗菌活性をペーパーディスク法で測定した。

各試料を 1.0、0.1、0.01 mg/mL にポリソルベート 80 を 5 % (v/v) になるように添加した 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で調製し、直径 8 mm に切り取った濾紙に 30  $\mu$ L ずつ染み込ませた。また、ポジティブコントロールとしてアンピシリンとカナマイシンをそれぞれ 5  $\mu$ g/mL、12.5  $\mu$ g/mL に試料と同様の溶液で調整して使用した。

LB 液体培地 (蒸留水 20 mL、トリプトン 200 mg、乾燥酵母エキス 100 mg、塩化ナトリウム 200 mg) で 37°C、18 h 培養した大腸菌 (NBRC 3972) と黄色ブドウ球菌 (NBRC 12732) をミュラーヒントン寒天培地 (ミュラーヒントン寒天培地 7.6 g、蒸留水 200 mL) にオートクレーブした綿棒で全体的に均一になるように塗抹し、試料を染み込ませた濾紙を 24 mm 間隔で配置し、37°C、24 h 培養した。

## 参考文献

- 1) 富野耕治 花菖蒲～日本の花シリーズ～ 泰文館 (1967)
- 2) 富野耕治、堀中明 花と木の文化 花菖蒲 社団法人家の光協会 (1980)
- 3) 八木國夫、中野稔 活性酸素 医歯薬出版株式会社 (1987)
- 4) 大柳善彦 活性酸素と病気 株式会社化学同人 (1989)
- 5) 吉川敏一 抗酸化物質のすべて 先端医学社 (1998)
- 6) 西村民男 誰でもわかる抗菌の基礎知識 株式会社テクノシステム (1999)
- 7) Muhammad Iqbal Choudhary, Sumaira Hareem, Hina Siddiqui, Shazia Anjum, Shamsher Ari, Atta-ur-Rahman, Mudassir Israr Zaidi. A benzyl and isoflavone from *Iris tenuifolia*. *Phytochemistry* **69** 1880-1885 (2008)
- 8) 岩科司 アヤメ属植物に含まれるイソフラボノイド成分とその活性 日本花菖蒲協会会報 **28** (2000)  
<http://www.japan-iris.org/No28/iwasina.html>
- 9) 浅田美穂 2009年度三重大学生物資源学部学士論文
- 10) 有機化合物のスペクトルデータベース (SDBS) SDBS No.887, CDS-05-861, C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O, cholesterol <sup>13</sup>C NMR Spectrum
- 11) SciFinder CAS Registry Number : 7235-40-7, C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>, β,β-Carotene Carbon-13 NMR Spectrum

## 謝辞

本研究を行うにあたり、適切な助言とご指導をいただき、また、論文審査において主査をしていただいた、三重大学大学院生物資源学研究科稲垣穰教授に心より御礼申し上げます。そして、本論文を読んでいただき、また、審査していただきました三重大学大学院生物資源学研究科今井邦雄教授及び、審査に加え、NMR解析において大変お世話になりました、三重大学大学院生物資源学研究科勝崎裕隆准教授に深く感謝いたします。そして、試料であるハナショウブを提供してくださった花菖蒲園の前田義武社長、抗菌実験についてのご指導賜りました万協製薬株式会社松浦信男社長、木原紀子さん、本研究に様々な助言とご協力賜りましたATM株式会社高橋秀久社長に深く感謝いたします。

また、様々な助言をいただき、激励していただいた諸先輩方、並びに生理活性化学研究室の皆様に感謝の意を表すとともに、今後のご活躍を心よりお祈り申し上げます。

最後に、6年間の大学生活を温かく見守り、支えてくれた家族に深く感謝いたします。