

スギナにみられる蛍光成分V

静岡県立磐田南高校 生物部 TLC班

過年度研究

- ・複数種類の蛍光成分を含む。・高温乾燥に強く安定している。
- ・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の可能性がある。
- ・OH⁻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。
- ・配糖体の可能性が高い。・水溶性である(極性分子である)。

仮説

青い蛍光成分は配糖体化して水溶性となった

フラボノイドである。

候補：ケンペロール、アピゲニン、ルテオリン の配糖体

実験1

NMR分析では糖が分析の邪魔をするため、糖を加水分解して除き、アグリコンを分析した。

■アピゲニンの蛍光確認

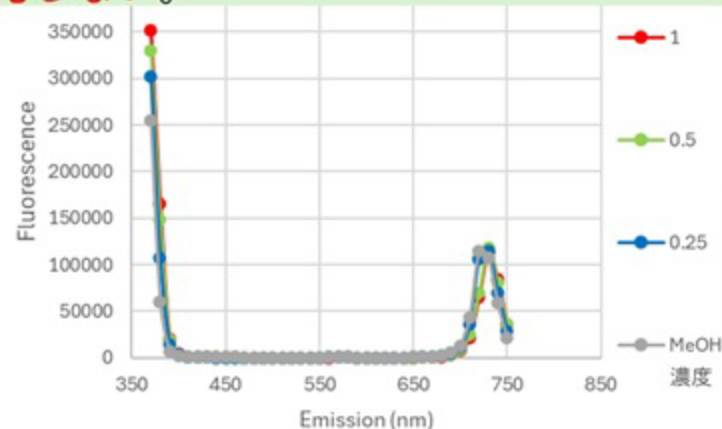
目的：加水分解後青く**蛍光した**成分をNMR分析したところ、アピゲニンのデータと一致した。アピゲニンの標品を用いて蛍光の有無、蛍光波長を確認する。

方法：アピゲニン標品をメタノールに溶解させ、分光蛍光光度計で分析する。

励起波長365nm、蛍光波長400～740nmを測定。

結果：アピゲニンは**蛍光しない**。

アピゲニンを候補から外す。



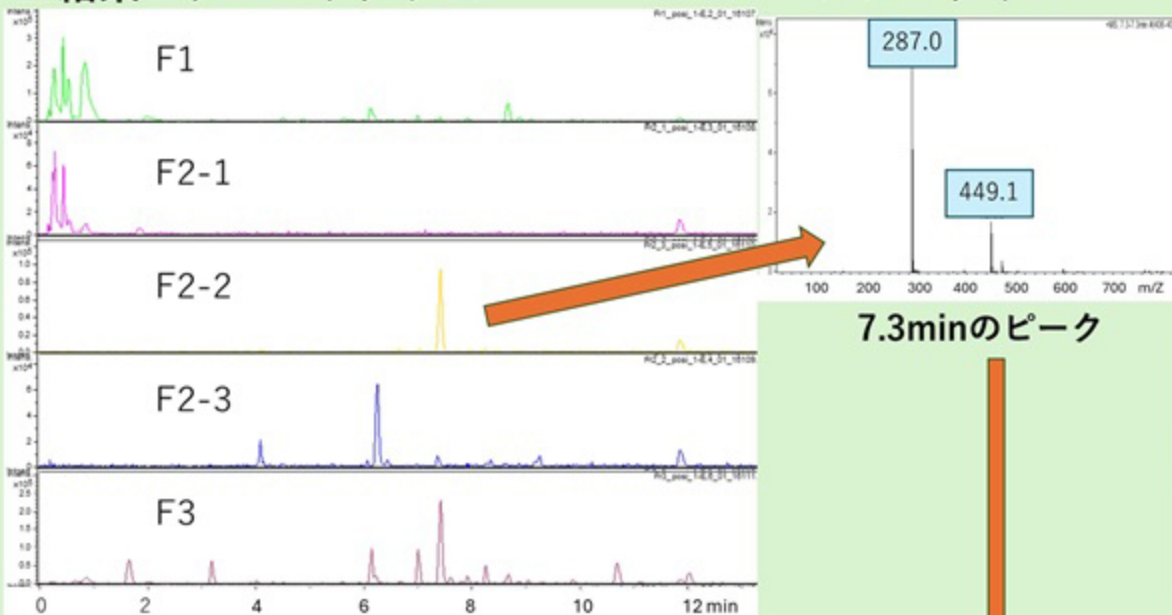
実験2

LC-MSは加水分解せずに成分同定ができる。

■LC-MS分析：A逆相のカラムクロマトグラフィーにより蛍光成分を3種（F1, F2, F3）に分離。その後、F2でB順相の分離を行ったところ3種（F2-1, F2-2, F2-3）に分離した。それぞれをC18 LC-MSで分析する。

■結果 クロマトグラム

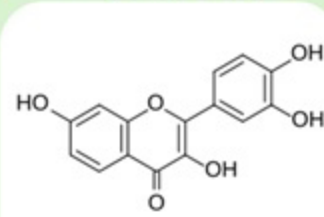
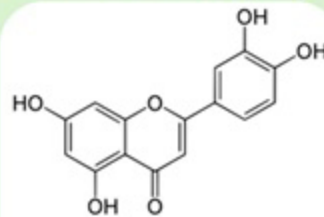
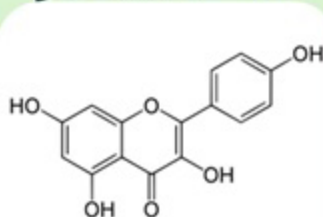
マスペクトル



■考察：F2-2は不純物が少ない

推定分子量：448（アグリコン：286）

候補：ケンペロール・ルテオリン・フィセチン等



考察

- ・蛍光成分の一つが、フラボノイドの一種「**ルテオリン**」の配糖体であることを同定することができた。これにより仮説が証明された。
- ・強い蛍光を持つ細胞壁にルテオリンが存在し、抗菌機能を持つ可能性あり。

今後の展望

- ・ルテオリンの配糖体は複数あり、そのどれかは判明していない。多量に精度の高い試料を作成する方法を確立し、**NMR**分析で構造同定を行う。
- ・ルテオリンが地下茎の細胞壁に集中する理由と、地下茎の細胞壁における役割を探る。

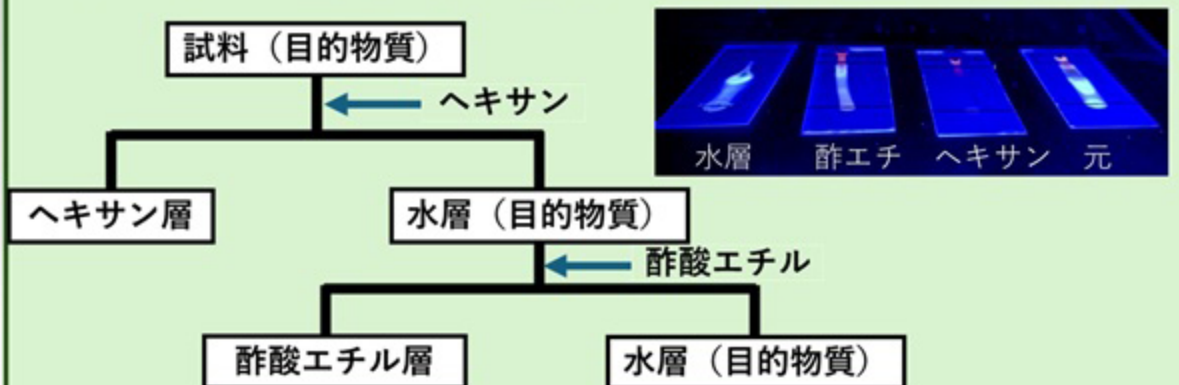
濃縮・精製基本操作

メタノール抽出を行う

■濃縮：乾燥させたスギナ約30gを粉末化し、300mLのメタノールを加え、攪拌しながら1時間置き、抽出する。その後、ろ過を行う。

■分画抽出：濃縮試料に 試料：水=1：1となるように水を加え、極性を上げる。

以下のように極性の違う溶液で分離する。脂溶性成分除去



■カラムクロマトグラフィー：青い蛍光成分の分離

〈A逆相〉充填剤：ワコーシル 40 C18 （極性の高い順）

溶媒：酢酸エチル、メタノール、水

〈B順相〉充填剤：Sephadex LH20 （極性の低い順）

溶媒：水、メタノール

カラムクロマトグラフィーで分離し、5分ごと計24回試験管に分取。分取した試料をそれぞれTLC展開することで同じ成分かどうかを判断し、同じ成分をまとめて試料とする。

実験3

F2-2の候補化合物は配糖体の種類が多いため、加水分解してアグリコンとし、アグリコンのLC-MSで標品との一致を確認する。標品は以下の2つを用いた。

■ケンペロール

保持時間が異なっている → **ケンペロールではない。**

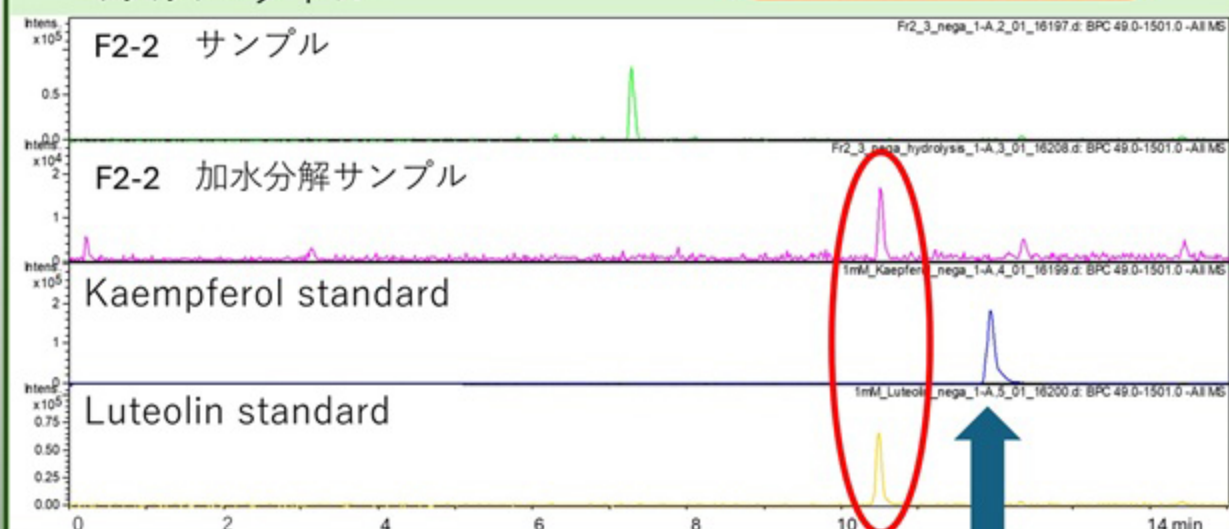
■ルテオリン

保持時間が一致した

励起波長（349nm）概ね一致

マスペクトル

蛍光成分の一つが**ルテオリンと同定。**



・加水分解、標品
m/z 285.0

ルテオリン保持時間同じ

ケンペロール保持時間違う

参考文献

- ・ Rie Mukai et al.(2008) Subcellular localization of flavonol aglycone in hepatocytes visualized by confocal laser scanning fluorescence microscope
- ・ Emrah Dikici(2025)A Comprehensive Investigation of Equisetum ra mosissimum: Phytochemical Composition, Antioxi dant Potential, and Enzyme Inhibition Activity
- ・ フラボノイドの分析 北海道大学農学部 (<http://lab.agr.hokudai.ac.jp>)