

エルダーフラワー培養物の抗酸化活性成分の特定

生物資源科学部 生物生産科学科
2年 阿部 愛笑 2年 阿部 杏樹
2年 加登 茜梨 2年 松渕 優子
指導教員 生物資源科学部 生物生産科学科
助教 川上 寛子

【背景および目的】

北アフリカ、ヨーロッパ、西アジアに分布するエルダーフラワー (*Sambucus nigra* L.) は各地で栽培されている落葉低木である。葉にはエムルシン、ショ糖、ウルソール酸、 β -シトステロールなどが含まれ、花にはカルシウム塩、粘液質、精油、コリン、吉草酸、ルチンなどが含まれる。また、葉と花に青酸配糖体のサンブニグリンが含まれる。薬理活性としては、出血箇所の消炎、止血あるいは活血の作用があり、利尿・鎮痛作用も強い。このため、筋骨の損傷や水腫、腎炎、関節リウマチ、通風などの諸痛、諸出血などに有効である。また、花には発汗・解熱作用がある。

このエルダーフラワーを組織培養することによって、有用成分を効率的に得ることができると考え、組織培養物由来の抽出物の抗酸化活性とその活性成分の化学構造を明らかにすることを目的とした。

【材料及び方法】

A) 組織培養

B) 抗酸化活性試験 (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC法)

H29年度自主研究「ハーブ培養物から美容成分を見つけよう II」の報告書と同様に培養した。

C) カルスに含まれる抗酸化活性成分の分析

成分分析には高速液体クロマトグラフィー(HPLC-PDA)、質量分析計付属高速液体クロマトグラフィー (LC-MS/MS) を用い、以下の条件で分析した。

- HPLC-PDA

Instrument : SHIMADZU Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Column : YMC-Pack ODS-A C18 column (column size, 4.6 × 150 mm; particle size, 5 μ m; YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)

Temperature : 40 °C

Solvent : A; Water B; Methanol

Gradient systems; 0-10 min 30-80 %, 10-15 min 80 %, 15-20 min 30%

Flow rate : 1.0 ml/min

Detection PDA : 254 nm

Injection : 10 μ l

- LC-MS/MS

Instrument : TSQ Quantum Ultra mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

Column : InertSustainSwift C18 column (column size, 2.1 × 100 mm; particle size, 3 μ m; GL Sciences, Tokyo, Japan)

Temperature : 40 °C

Solvent : A; Water B; Methanol

Gradient systems; 0-10 min 30-80 %, 10-15 min 80 %, 15-20 min 30%

Flow rate : 0.2 ml/min

Injection : 1 µl

Ionization: Negative

Collision energy of MS/MS: 25 eV.

【結果及び考察】

A) 組織培養

植物ホルモンの濃度の組み合わせがカルス形成率に与える影響について図3に示した。去年の結果とは異なり、葉・茎ともにカルスが形成され、 10^{-7} M 2,4-Dの試験区でも一部カルスがみられた。葉はKIN濃度が高くなるとカルス形成率が低下した。また、葉・茎ともに2,4-D濃度が高くなるとカルス形成率が低下した。

エルダーフラワーの組織培養では葉・茎ともにカルスを形成するが、茎の方がカルス形成率が高く

、効率的に抗酸化活性物質を生産できるため、材料には茎が適切であると考えられる。培養の際の植物ホルモンは、2,4-Dは 10^{-5} または 10^{-6} Mの条件が適切であると考えられる。KINは2,4-Dの濃度が同じ条件では濃度が低い方がカルス形成率が高いため、濃度が低い条件が適切であると考えられる。

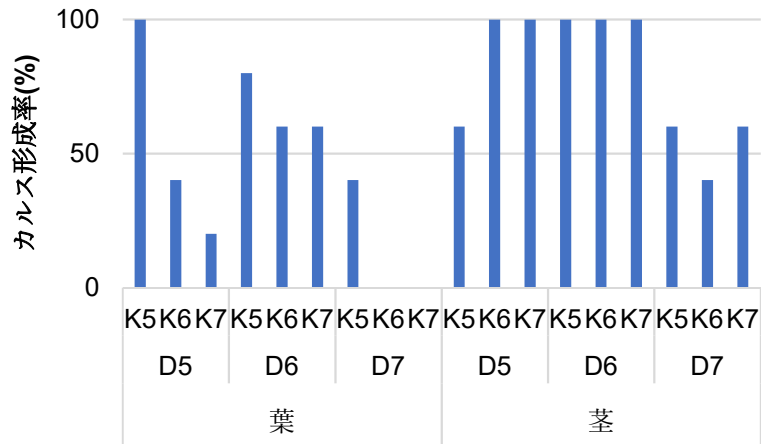


図 1 カルス誘導率

B) 抗酸化活性試験

葉と茎由来の2,4-DとKINを用いたカルス由来エキスをORAC法によって抗酸化活性測定した結果、植物ホルモン濃度と抗酸化活性の強さにおいて、一定の傾向は見られなかった。

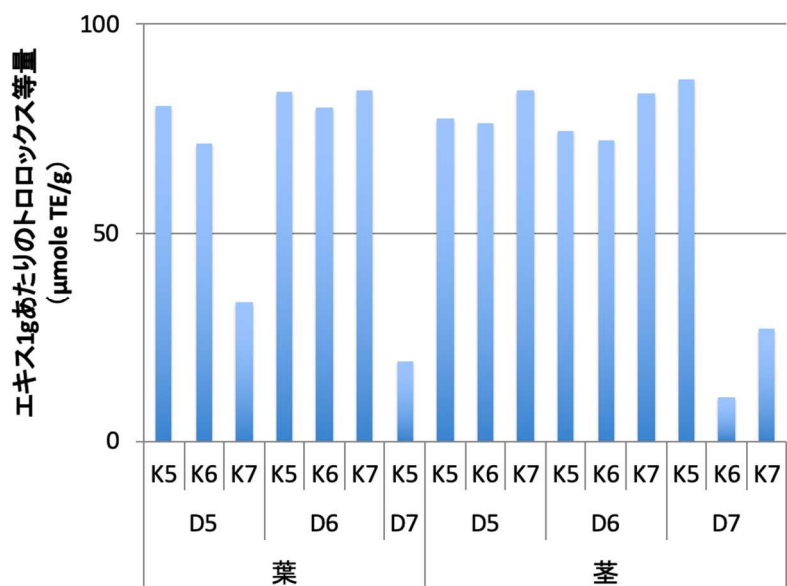


図 2 カルスが産生する成分の抗酸化活性に植物ホルモン条件が与える影響

C) カルスに含まれる抗酸化活性成分の分析

HPLC-PDAでカルスエキスを分析した結果、保持時間1.2分において莖D7K6以外の試験区で最大吸収波長が202 nmの化合物が検出され、化合物1とした(図3、4)。このことから、化合物1は共役する化学構造を複数持たない化合物であり、ベンゼン環等はないと推定した。

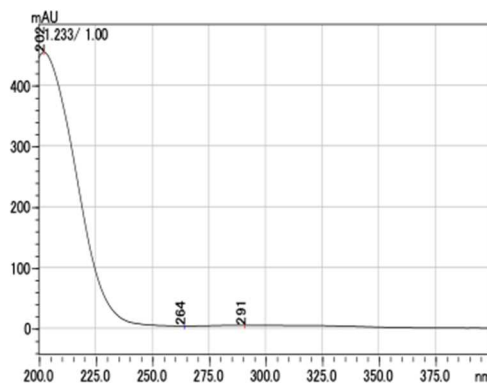


図3 化合物1の吸収スペクトル

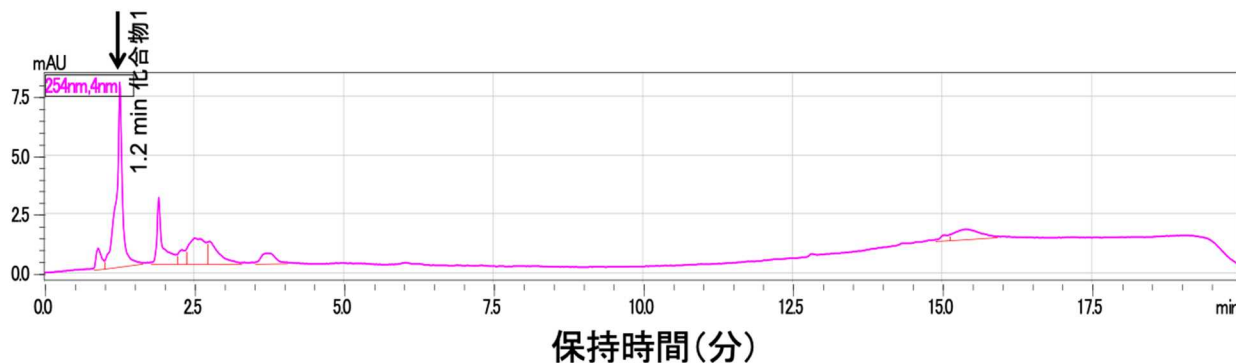


図4 莖D5K6のHPLCチャート

化合物1のピーク面積と抗酸化活性の強さを示すORAC値 ($\mu\text{mole TE/g}$) の相関を解析した結果、 R^2 値が0.6539であり、正の相関が見られたことから、化合物1が活性成分であると予想される(図5)。

さらに、化合物1をLC-MSで分析した結果、ネガティブイオンモードにおいて、保持時間1.8分に m/z 242を示す分子イオンピークが見られた。LC-MS/MSで m/z 242の分子イオンを親イオンとして分析し、エルダーフラワーに含まれる既知成分を参考に解析したところ、 m/z 242 [M-HCN]、 m/z 62 [M-HCN-Glc]にシグナルが得られ、シアノ基やグルコースを有する化合物と推定した(図6)。また、化合物1の分子量は269と予想された。エルダーフラワーには青酸配糖体のサンブニグリン(図7)が含まれており、化合物1はその類縁体であると考えられる。エルダーフラワーのカルスでサンブニグリン類縁体が含まれ、更にその化合物が抗酸化活性を有することを示唆した知見は本研究が初めてである。

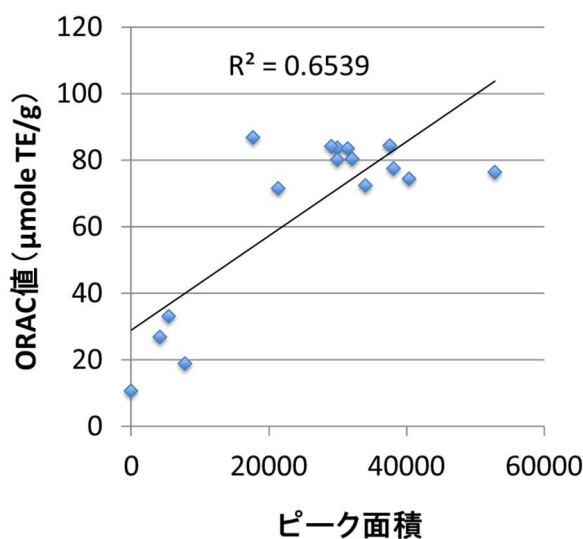


図5 ORAC値と化合物1のピーク面積の相関

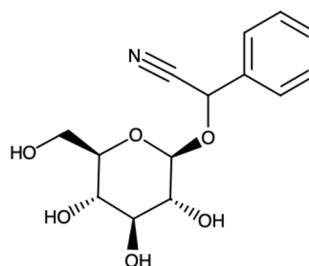


図7 サンブニグリンの化学構造

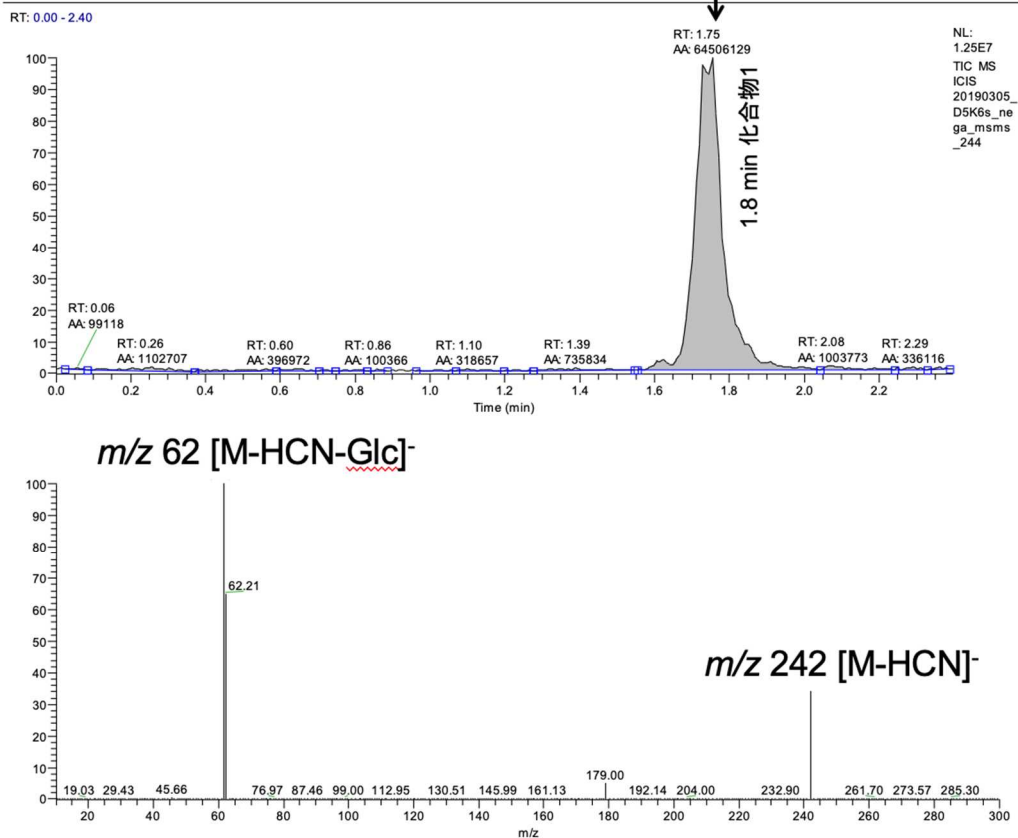


図 6 LC-MS/MS の TIC チャート (上) と MS/MS スペクトラム

【参考文献】

牧野和漢薬草大図録, 監修: 岡田 稔、発行: 福田 久子, 株式会社 北隆館, 東京都