ヒマワリの脂溶性画分に分布する抗菌活性物質について

(平成6年6月16日受理)

中野 益男* 福島道広* 東 浩司*

Isolation and Chemical Characterization of Antimicrobial Compounds from Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Masuo NAKANO, Michihiro FUKUSHIMA and Hiroshi AZUMA

(Department of Bioresource Chemistry, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine: Obihiro, Hokkaido 080, Japan)

Sunflower roots, stem, leaves and receptacles were extracted with ethanol, and the oily ethanol extracts were partitioned into chloroform-methanol-water (2:2:1.8, by final vol.) by the Bligh-Dyer method to obtain the lipidic fraction in the organic phase. The antimicrobial activity of lipidic fractions were examined by the paper disk method, using *E. coli* and *C. herbarum*. The results showed that the lipidic fraction of receptacles contained the strongest antimicrobial activities against these two microorganisms. Four antimicrobial compounds were isolated and purified by silicic acid column chromatography, thin layer chromatography and 15% AgNO₃-thin layer chromatography. The structures of the antimicrobial compounds were determined by spectroscopic analysis, IR, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The molecular weights and molecular formulas of the four compounds (1, 2, 3 and 4) were all 302 and C₂₀H₃₀O₂, respectively, on the basis of the EI-high resolution MS. Examination of the IR and NMR spectra and degree of unsaturation suggested that these compounds were diterpenoic acids. By using ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-¹H-NMR and ¹H-¹³C-NMR spectra, the chemical structure of **1** was determined to be trachyloban-19-oic acid. Similarly, the chemical structure of **2** was determined to be kaur-16-en-19-oic acid. The chemical structure of **4** was postulated to be beyer-15-en-19-oic acid on the basis of the NMR spectra.

(Received June 16, 1994)

Key words: ヒマワリ sunflower; 花托 receptacle; 抗菌活性 antimicrobial activity; 赤外吸光度法 infra-red absorption spectrometry (IR); 高分解能質量分析 high-resolution mass spectrometry (HRMS); 核磁気共鳴分析 nuclear magnetic resonance (NMR); ジテルペノイド diterpenoide; トラキロバンカルボン酸 trachyloban-19-oic acid; カウレン酸 kaur-16-en-19-oic acid

緒 言

ヒマワリ (*Helianthus annuus* L.) は北アメリカ西部を原産とする一年草で、数千年前からアメリカインディアンによる栽培と選抜が行われ、作物化されてきた。その後、17世紀にスペイン人によりヨーロッパに導入され、当時は観賞用もしくは種子を菓子やコーヒーの代用として用いるために栽培されていたが、しだいに油料作物としての価値が高まった¹⁾。しかし、食用、油脂原料に用いられるのは種子のみで、他の部位は特に利用価値がない

ために廃棄されてきた。

Pyrek はヒマワリの花から2種類のジテルペノイド、trachyloban-19-oic acid, (–)-kaur-16-en-19-oic acid を単離した²⁾。この二つの化合物はヒマワリの若芽及び根からも単離されている³⁾。Mitscher らはこれらの化合物をヒマワリの茎から単離し、その抗菌活性を明らかにしている⁴⁾。また、ヒマワリガ (*Homoecosoma electellum*) の幼虫に対する成長阻害効果も報告されている⁵⁾。これらのジテルペノイドの他に、ヒマワリの地上部若葉からは、ゲルマクラン骨格を有するセスキテルペンラクトンであるアヌイトリンヘリアンゴリドが単離され

* 帯広畜産大学生物資源化学科: 〒080 北海道帯広市稲田町

ており、これらの化合物は抗菌作用や動物腫瘍の DNA/RNA 合成に対する阻害作用を有するなど幅広い生理活性を示すことが確かめられている^{6)~8)}。

今回、著者らはヒマワリの種子を収穫した後の根、茎、葉及び花托（花床）の各部位に含まれる、抗菌活性を指標とした新規の生理活性物質の検索及び単離を試みた。

実験方法

1. 実験材料

ヒマワリ (*Helianthus annuus* L.) は北海道北竜町で栽培した IS-3001 を用い、種子を採取した後に根、茎、葉及び花托の各部位をそれぞれ採取した。

2. 供試菌株及び培地

供試菌株としては *Cladosporium herbarum* 9262, *Escherichia coli* ATCC11775 の 2 株を用いた。培地はそれぞれグルコース 50 g, ペプトン 10 g, 酵母エキス 1 g, 寒天 20 g/L 及び肉エキス 5 g, ペプトン 10 g, 塩化ナトリウム 2 g 及び寒天 20 g/L を使用した。

3. 抗菌活性物質の単離

ヒマワリ中の抗菌活性物質の単離・精製を Scheme 1 に示した。ヒマワリの根 (9.0 kg), 茎 (15.0), 葉 (14.2) 及び花托 (9.4) は適当な大きさに切断し、エタノールで抽出を行った。各エタノール抽出物は、更に Bligh-Dyer 法⁹⁾により脂溶性画分を得た。各脂溶性画分はカラムク

ロマトグラフィー（シリカゲル 30 g, 1.5×30 cm), 薄層クロマトグラフィー (TLC) 及び 5% AgNO₃-TLC により単離・精製した。最終的に抗菌活性物質として 4 種類 (Compound 1, 2, 3 及び 4) を単離した。

4. 抗菌活性の測定

ペーパーディスク法を用いて抗菌活性を測定した。抗菌活性試験は抗菌活性物質の単離・精製の各段階で行った。

5. 抗菌活性物質のメチル誘導体

試料のメチルエステル化は, Schlenk & Gellerman の方法を用いて, *N*-methyl-*N*-nitroso-*p*-toluenesulfonamide 2.14 g を 30 ml のエーテルに溶解後, 4% 水酸化カリウム-エタノール溶液を 10 ml 加え, 水浴 35~40° で蒸留し, ジアゾメタン/エーテル溶液を得た。この溶液を試料に数滴加え, 室温で 10 分間放置してメチル化反応を行った¹⁰⁾。

6. 分析方法

赤外吸光スペクトル (IR) は日本分光社製 A-100 を用いて, KBr 法により分析した。質量スペクトル (MS) はクレイトス社製 H-1 を用いて, 直接導入法により分析した。分析条件はイオンモード, EI; イオン化源, 70 eV; イオン化温度, 180°; 分解能, 10,000 で行った。¹H- 及び ¹³C- 核磁気共鳴スペクトル (¹H-NMR, ¹³C-NMR) は

Scheme 1. Isolation procedure of antimicrobial compounds from sunflower
(): extract volume

JEOL EX-270 (270 MHz) を用いて, ^1H , ^{13}C , $^1\text{H}-^1\text{H}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ - 二次元 NMR スペクトル, DEPT を測定した. 測定溶媒には CDCl_3 を用いた. その CDCl_3 のスペクトルを内部標準として用い, 化学シフトは δ ppm で表した.

1: Crystal, mp $164\sim 166^\circ$; IR (KBr), 3,425, 3,020, 2,995, 2,930, 2,860, 1,698 ($-\text{COOH}$), 1,470, 1,445, 1,408, 1,260 ($-\text{COOH}$) cm^{-1} ; MS, m/z 302 (76%), 287 (41), 257 (16), 246 (100), 231 (47), 220 (10), 201 (14); ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 0.57 (1 H, dd, $J=3$ and 3 Hz, H-12), 0.82 (1 H, m, H-13), 0.87 (3 H, s, H-20), 0.98 (1 H, dd, $J=11$ and 11 Hz, H-5), 1.12 (3 H, s, H-17), 1.18 (2 H, d, $J=1$ Hz, H-14), 1.21 (3 H, s, H-18), 1.25 (2 H, s, H-15), 1.75 (2 H, m, H-16).

1 メチルエステル: Crystal, mp $98\sim 100^\circ$; IR (KBr), 3,420, 3,005, 2,990 ($-\text{CH}_3$), 2,925 ($-\text{CH}_2-$), 2,900 ($-\text{C}-\text{H}$), 2,860 ($-\text{CH}_3$), 2,845 ($-\text{CH}_2-$), 1,722 ($-\text{C}=\text{O}$), 1,680 ($-\text{C}=\text{O}$), 1,465 ($-\text{COOCH}_3$, $-\text{CH}_2-$), 1,170, 1,160 ($-\text{C}-\text{O}-$), 1,145 ($-\text{C}-\text{O}-$), 1,090, 1,040, 982 (C_6H_{12}), 970 (C_6H_{12}) cm^{-1} ; MS, m/z 316 (M^+ 86%), 301 (41), 274 (13), 260 (100), 257 (56), 245 (20), 241 (36), 229 (8), 201 (20); EI-HRMS, MW316. 23731 ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$ calcd. 316. 24584).

2: Crystal, mp $169\sim 170^\circ$; IR (KBr), 3,420, 3,070 ($-\text{C}=\text{C}-$), 2,935, 2,855, 1,698 ($-\text{COOH}$), 1,660 ($-\text{C}=\text{C}-$), 1,470, 1,445, 1,410, 1,365, 1,320, 1,260 ($-\text{COOH}$) cm^{-1} ; MS, m/z 302 (71%), 287 (65), 269 (10), 259 (59), 243 (42), 231 (26), 219 (23), 205 (10), 131 (100), 119 (98); ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 0.81 (2 H, ddd, $J=14$, 13 and 4 Hz, H-1), 0.95 (3 H, s, H-20), 1.14 (2 H, dd, $J=12$ and 5 Hz, H-14), 1.24 (3 H, s, H-18), 1.46 (2 H, br. s, H-12), 1.50 (2 H, d, $J=12$ Hz, H-17), 1.84 (2 H, m, H-6), 2.05 (2 H, s, H-15), 2.64 (1 H, br. s, H-13), 4.76 (2 H, br. s, H-17).

2 メチルエステル: Crystal, mp $73\sim 74^\circ$; IR (KBr), 3,420, 3,060 ($=\text{CH}_2$), 2,990 ($-\text{CH}_3$), 2,945 ($-\text{CH}_3$), 2,930 ($-\text{CH}_2-$), 2,900 ($-\text{C}-\text{H}$), 2,875 ($-\text{CH}_3$), 2,850 ($-\text{CH}_2-$), 1,780 ($=\text{CH}_2$), 1,720 ($-\text{C}=\text{O}$), 1,360, 1,330, 1,270 ($-\text{C}-\text{O}$), 1,235 ($-\text{C}-\text{O}$), 1,200 ($-\text{C}-\text{O}$), 1,190 ($-\text{C}-\text{O}$), 1,165 ($-\text{C}-\text{O}$), 1,150 ($-\text{C}-\text{O}$), 1,125, 1,110, 1,090, 1,040, 1,020 (C_6H_{12}), 1,000, 985 ($=\text{CH}_2$), 965 (C_6H_{12}), 950, 915 ($=\text{CH}_2$), 890 ($=\text{CH}_2$) cm^{-1} ; MS, m/z 316 (M^+ 31%), 301 (22), 273 (56), 257 (72), 241 (63), 213 (28); EI-HRMS, MW 316. 23763 ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$ calcd. 316. 24584).

3: Oil; IR (KBr), 3,400, 2,920 ($-\text{CH}_2-$), 2,850 ($-\text{CH}_2-$), 1,610 ($-\text{C}=\text{O}$), 1,550 ($-\text{COO}^-$), 1,465 ($-\text{CH}_2-$), 1,445 ($-\text{CH}_2-$), 1,410 ($-\text{COOH}$), 1,380 ($-\text{CH}_3$), 1,050, 1,020 (C_6H_{12}), 940 ($-\text{COOH}$) cm^{-1} ; MS, m/z 302 (38%), 287 (33), 259 (16), 241 (12), 231 (5), 213 (10), 187 (35), 167 (40), 149 (100), 131 (14), 119 (31).

3 メチルエステル: Oil; MS, m/z 316 (M^+ 22%), 301

(10), 273 (10), 257 (10), 241 (19), 207 (14), 187 (34), 167 (28), 149 (100), 131 (12), 119 (21); EI-HRMS, MW316.23875 ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$ calcd. 316.24584).

4: Oil; IR (KBr), 3,420, 3,040 ($\text{C}=\text{C}$), 3,200, 2,950 ($-\text{CH}_3$), 2,930 ($-\text{CH}_2-$), 2,850 ($-\text{CH}_2-$), 1,698 ($-\text{COOH}$), 1,462 ($-\text{CH}_2-$), 1,450 ($-\text{CH}_2-$), 1,405 ($-\text{COOH}$), 1,363 ($-\text{CH}_3$), 1,320 ($=\text{CH}_2$), 1,270 ($-\text{COOH}$), 1,255 ($-\text{C}-\text{O}-$), 1,230, 1,210 ($-\text{COOH}$), 1,190, 1,160, 1,120, 1,090, 1,070, 1,035, 1,010, 970 (C_6H_{12}), 920 ($-\text{COOH}$), 845 ($\text{C}=\text{C}$), 790, 750, 740 ($-(\text{CH}_2)_n-$) cm^{-1} ; MS, m/z 302 (13%), 293 (19), 281 (13), 269 (10), 255 (13), 243 (23), 231 (21), 219 (23), 205 (10), 193 (16), 181 (77), 169 (55), 131 (97), 119 (100); ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 0.67 (3 H, s, H-20), 1.00 (3 H, s, H-18), 1.25 (3 H, s, H-17), 5.46 (1 H, d, $J=5.5$ Hz, H-15), 5.73 (1 H, d, $J=5.5$ Hz, H-16).

4 メチルエステル: Oil; MS, m/z 316 (M^+ 86%), 301 (9), 273 (5), 257 (21), 241 (11), 227 (4), 194 (23), 181 (24), 148 (40), 135 (100), 122 (69), 105 (61), 93 (60).

結果及び考察

1. 抗菌活性

ヒマワリの各部位から抽出した脂溶性画分の抗菌活性を Table 1 に示した. 茎の画分には抗菌活性物質がほとんど存在しなかった. その他の部位における活性は花托, 根, 葉の順であった. また, *E. coli* よりも *C. herbarum* に対して比較的強い活性を持つ傾向が見られた. そこで活性が最も高かった花托の脂溶性画分における抗菌活性物質の単離・精製を行った. 各単離・精製段階での抗菌活性試験の結果を Table 2 に示した. ヘキサン-エーテル (95:5, v/v) 画分に抗菌活性が見られ, この画分を 15% AgNO_3 -TLC (ヘキサン-エーテル-酢酸, 70:30:1, v/v/v) で分画した結果, R_f 値 0.60 (1), 0.48 (2), 0.31 (3), 0.22 (4) にそれぞれスポットが確認され, すべてに抗菌活性が見られた. 特に 2 に強い活性が見られた.

Table 1. Antimicrobial Activity of Sunflower Extracts

Extract	Inhibited zone (mm) ^a	
	<i>C. herbarum</i>	<i>E. coli</i>
Root	8.4	8.0
Stem	6.2	6.2
Leaf	7.8	7.4
Receptacle	9.0	8.0
Control ^b	— ^c	—

^a By paper disk method 1 mg/disk (6 mm thin)

^b Chloroform-methanol (2:1, v/v)

^c No inhibition

Table 2. Antimicrobial Activity of Each Fraction from the Receptacle

Fraction	Inhibition zone (mm)	
	<i>C. herbarum</i>	<i>E. coli</i>
Column chromatography ^a		
Hexane fr.	— ^b	—
H-Ether (98:2) fr.	—	—
H-E (95:5) fr.	7.0	7.4
H-E (85:15) fr.	—	—
H-E (70:30) fr.	—	—
15% AgNO ₃ thin-layer chromatography ^c		
1 (<i>Rf</i> 0.60)	9.0	7.2
2 (<i>Rf</i> 0.48)	9.8	8.2
3 (<i>Rf</i> 0.31)	8.4	6.8
4 (<i>Rf</i> 0.22)	9.2	7.0
Control ^d	—	—

^{a,c} By paper disk method 1 mg/disk, 0.1 mg/disk (6 mm thin) respectively

^b No inhibition

^d Chloroform-methanol (2:1, v/v)

2. 抗菌活性物質の構造解析

1 (*Rf* 0.60) 及び **1** メチルエステルの IR スペクトルはそれらが脂環式の物質であり、かつカルボキシル基が存在することを示している。3,000 及び 1,600 cm⁻¹ 付近の吸収から炭素鎖内に二重結合は存在しないと考えられる。**1** の IR スペクトルにおける 1,698 及び 1,260 cm⁻¹ の吸収はカルボン酸の存在を示している。**1** メチルエステルの MS スペクトルより分子量は 316、分子式は C₂₁H₃₂O₂ であることが確認された。¹³C-NMR スペクトルよりカルボキシル炭素が一つ存在することが明らかなので、**1** の分子量は 302、分子式は C₂₀H₃₀O₂ と推定された。分子式より **1** の不飽和数は 6 個であり、1 個はカルボキシル基の C=O であるため、また、IR 及び ¹H-NMR、¹³C-NMR スペクトルより、炭素鎖内二重結合は存在しないので残りの 5 個の不飽和数はすべて飽和した環に相当することが示唆された。¹H、¹³C、¹H-¹H、¹H-¹³C-二次元 NMR スペクトル、DEPT による測定の結果から、**1** は 3 個のメチル基 (δ_H 0.87 (H-20), 1.12 (H-17), 1.21 (H-18), δ_C 12.44, 20.54, 28.84) を持ち、それらはすべて 4 級炭素に結合することが示された。δ_C 183.52 のシグナルは 4 級炭素のカルボキシル基の炭素で、δ_H 10.96 の幅広い弱いシグナルはそれがカルボン酸であることを示唆している。δ_C 20.54 のシグナルはその強度から 2 個の炭素のシグナルが重なったものと思われる。そのうちの炭素の一つは先に述べた 3 個のメチル基のうちの一つに相当し、もう一つのシグナルは DEPT よりメチン基であることが示された。δ_H 0.57 (H-12) のシグナルは、このメチン基のプロトンのものであり、その化

Table 3. ¹³C-NMR Spectral Data of **1** (CDCl₃)

Carbon	1	DEPT	Ref. 12
C- 1	39.41	CH ₂	39.5
C- 2	18.67	CH ₂	18.7
C- 3	37.85	CH ₂	37.8
C- 4	43.60	C	43.7
C- 5	56.93	CH	57.0
C- 6	21.71	CH ₂	21.8
C- 7	39.19	CH ₂	39.2
C- 8	40.72	C	40.8
C- 9	52.72	CH	52.8
C-10	38.87	C	38.9
C-11	19.71	CH ₂	19.7
C-12	20.54	CH	20.6
C-13	24.24	CH	24.3
C-14	33.10	CH ₂	33.1
C-15	50.33	CH ₂	50.4
C-16	22.39	C	22.4
C-17	20.54	CH ₃	20.6
C-18	28.84	CH ₃	28.9
C-19	183.52	C	184.7
C-20	12.44	CH ₃	12.5

学シフト値からシクロプロピル基を形成していることが示唆された。δ_H 0.57 (H-12) のシグナルは δ_H 0.82 (H-13) のシグナルとカップリングしている。δ_H 0.82 (H-13) のシグナルは更に δ_H 1.18 (H-14) のシグナルとカップリングしている。また、δ_H 1.25 (H-15) のシグナルはどのシグナルともカップリングしていないので隣にプロトンが存在しないと思われる。δ_H 0.98 (H-5) のシグナルは δ_H 1.75 (H-6) のシグナルとカップリングしている。以上の IR, MS, NMR スペクトルと五環性ジテルペン酸関連化合物の文献値^{2), 4)} 及び ¹³C-NMR の値^{11), 12)} とほぼ一致していたことから、**1** は trachyloban-19-oic acid と同定された (Table 3, Fig. 1a)。

2 (*Rf* 0.48) 及び **2** メチルエステルの IR スペクトルは **1** のそれと類似しており、同様の物質であることを示唆している。しかし、**2** メチルエステルの IR スペクトルにおける 3,060 及び 1,780, 985 cm⁻¹ の吸収は末端二重結合の存在を示している。**1** メチルエステルと同様に **2** メチルエステルの MS スペクトルより分子量は 316、分子式は C₂₁H₃₂O₂ であることが確認された。¹³C-NMR スペクトルよりカルボキシル炭素が一つ存在していることが明らかなので、**2** の分子量は 302、分子式は C₂₀H₃₀O₂ であると決定された。分子式より不飽和数は 6 個であり、1 個はカルボキシル基の C=O であると推定される。また、¹³C-NMR スペクトルより二重結合が 1 個存在すると推定されるので、**2** は 4 個の飽和した環を持つと考えられる。¹H、¹³C、¹H-¹H、¹H-¹³C-二次元 NMR スペクトル、DEPT による測定の結果から、**2** は 2 個のメチル基

Fig. 1. Chemical structure of antimicrobial compounds

Fig. 2. Chemical structure of *ent*-kaurene and 16β, 17-dihydroxykauran-19-oic acid

(δ_{H} 0.95 (H-20), 1.24 (H-18), δ_{C} 15.58, 28.95)を持つことが示された。 δ_{C} 183.88 のシグナルは4級炭素のものであり、化学シフト値からカルボキシル基の炭素であると思われる。 δ_{H} 11.35 の幅広い弱いシグナルはそれがカルボン酸であることを示唆している。 δ_{C} 102.97, 155.92 のシグナルは二重結合を形成する炭素で、 δ_{C} 102.97 のシグナルは4級炭素であり、 δ_{C} 155.92 のシグナルはメチ

レン基であることから末端二重結合の存在が示された。 δ_{H} 4.76 (H-17) のシグナルは末端メチレン基のものであることは明らかで、 δ_{H} 2.05 (H-15) のシグナルとカップリングしている。 δ_{H} 2.64 (H-13) のシグナルは化学シフト値から末端二重結合を形成する炭素に隣接する炭素のプロトンであると思われる。 また、これは δ_{H} 1.14 (H-14) のシグナル及び δ_{H} 1.46 (H-12) のシグナルとカップリングしている。 δ_{H} 1.50 (H-7) のシグナルは δ_{H} 1.84 (H-6) のシグナルとカップリングしている。 IR, MS, NMR スペクトルと四環性ジテルペン酸の文献値^{2), 4), 13)}、及び類縁化合物である *ent*-kaurene ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$)¹⁴⁾、16β, 17-dihydroxykauran-19-oic acid ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$)¹⁵⁾ (Fig. 2) の ^{13}C -NMR と比較することにより、2 は kaur-16-en-19-oic acid であると同定された (Table 4, Fig. 1b)。

3 (*Rf* 0.31) は、IR, MS スペクトル及びメチルエステル化誘導体の分子量 316 から分子量 302 のカルボン酸であることが分かった。

4 (*Rf* 0.22) は、IR, MS スペクトルから分子量 302 のカルボン酸であると思われる。 ^{13}C -NMR スペクトルより炭素数は 20 個の $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ であると推測される。 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR スペクトル, DEPT, ^1H - ^1H -二次元 NMR スペクトルによる測定の結果から、3 個のメチル基 (δ_{H} 0.67 (H-20), 1.00 (H-18), 1.25 (H-17), δ_{C} 14.25, 25.34, 29.56) を持つことが示された。 また、カルボキシル基の炭素のシグナルが δ_{C} 183.18 にみられ、1~3 と同様にカルボン酸であると考えられる。 δ_{C} 135.24 及び 136.96 にみられるシグナルは化学シフト値から二重結合を形成する炭素のものであり、分子内に二重結合が一

Table 4. ^{13}C -NMR Spectral Data of **2** (CDCl_3)

Carbon	2	DEPT	Ref. 14	Ref. 15
C- 1	40.68	CH_2	40.5	41.3
C- 2	19.09	CH_2	18.9	18.9
C- 3	37.81	CH_2	42.2	38.0
C- 4	44.22	C	33.3	43.5
C- 5	57.02	CH	56.2	56.9
C- 6	21.82	CH_2	20.4	21.7
C- 7	41.26	CH_2	41.3	40.8
C- 8	43.69	C	44.3	43.4
C- 9	55.08	CH	56.1	56.3
C-10	39.64	C	39.5	39.4
C-11	18.42	CH_2	18.3	19.0
C-12	33.10	CH_2	33.5	26.8
C-13	43.83	CH	44.3	40.1
C-14	39.68	CH_2	40.0	37.5
C-15	48.95	CH_2	49.5	52.4
C-16	155.92	C	155.8	79.7
C-17	102.97	CH_2	103.4	69.5
C-18	28.95	CH_3	33.7	179.3
C-19	183.88	C	21.2	29.0
C-20	15.82	CH_3	17.7	15.1

Table 5. ^{13}C -NMR Spectral Data of **4** (CDCl_3)

Carbon	4	DEPT
C- 1	39.95	CH_2
C- 2	19.64	CH_2
C- 3	38.01	CH_2
C- 4	44.08 ^a	C
C- 5	57.41	CH
C- 6	22.00	CH_2
C- 7	38.40	CH_2
C- 8	49.54	C
C- 9	52.65	CH
C-10	38.37	C
C-11	20.86	CH_2
C-12	33.52	CH_2
C-13	44.13 ^a	C
C-14	61.44	CH_2
C-15	135.24 ^b	CH
C-16	136.96 ^b	CH
C-17	29.56 ^c	CH_3
C-18	25.34 ^c	CH_3
C-19	183.18	C
C-20	14.25	CH_3

a, b, c Interchangeable assignment

つ存在することになる。H-NMR, ^1H - ^1H -二次元 NMR スペクトルにおける δ_{H} 5.46 (H-15) 及び δ_{H} 5.73 (H-16) のシグナルは二重結合を形成する炭素のプロトンであると思われ、お互いにカップリングする以外は他のシグナルとカップリングしていないので二重結合は4級炭素に挟まれていると考えられる。その他、DEPTによるメチル基、メチレン基及びメチン基の個数、 ^{13}C -NMRの化学シフト値から**4**はbeyer-15-en-19-oic acidであると推測される (Table 5, Fig. 1c)。

以上の結果、ヒマワリの根、茎、葉及び花托の脂溶性成分に抗菌活性を見いだした。特に花托に最も高い活性がみられ、脂溶性成分についても最も多く抽出されていた (根, 3.35%; 茎, 0.92%; 葉, 3.73%; 花托, 4.53%)。抗菌活性物質であるジテルペノイドの量的関係は明らかにしていないが、その抽出量も花托で最も多いと推察される (Table 1)。このことは、以前の報告^{2)~4)}で、ヒマワリの若芽、根及び茎から単離されてきた抗菌活性物質の量と比べ、花托中に特異的に存在している可能性が考えられる。ヒマワリの未利用部位である花托を、天然抗菌物質として食品添加物等に有効利用することが可能になった。

要 約

ヒマワリ (*Helianthus annuus* L.) の根、茎、葉及び花托のエタノール抽出物から Bligh-Dyer 法により脂溶性画分を得た。得られた脂溶性画分の抗菌活性は *Escherichia coli* 及び *Cladosporium herbarum* を用いてペーパードиск法により測定された。花托の脂溶性画分に

比較的強い抗菌活性が示され、花托脂溶性画分の抗菌活性物質は、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー (TLC) 及び 15% AgNO_3 -TLC により4種類 (**1**, **2**, **3**, **4**) に単離・精製された。これらの化合物を赤外吸光光度計、高分解能質量分析計及び NMR を用いて構造解析を行った。その結果、4種類の化合物とも分子量 302、分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ を示し、一つ (**1**) は五環性ジテルペン酸である trachyloban-19-oic acid、もう一つ (**2**) は四環性ジテルペン酸である kaur-16-en-19-oic acid と同定された。**4** は beyer-15-en-19-oic acid と推定された。

文 献

- 1) 星川清親: “栽培植物の起源と伝播” p. 178~179 (1987) 二宮書店。
- 2) Pyrek, J. St.: Tetrahedron **26**, 5,029~5,032 (1970).
- 3) Kasprzyk, Z., Janiszowska, W., Papaj, M.: Bull. Acad. Pol. Sci. **22**, 1~4 (1973)
- 4) Mitscher, L. A., Rao, G. S. R., Veysoglu, T., Dralke, S., Haas, T.: J. Nat. Prod. **46**, 745~746 (1983).
- 5) Weiss, A. C. Jr., Chan, B. G., Elliger, C. A., Garrett, V. H.: Naturwissenschaften **64**, 341 (1977).
- 6) Spring, O., Albert, K., Gradman, W.: Phytochemistry **20**, 1,883~1,885 (1981).
- 7) Spring, O., Albert, K., Hager, A.: *ibid.* **21**, 2,551~2,553 (1982).
- 8) Spring, O., Kupka, J., Maier, B., Hager, A.: Z. Naturforsch. **37**, 1,087 (1982).
- 9) Bligh, E. G., Dyer, W. J.: Can. J. Biochem. Physiol. **37**,

- 991~917 (1959).
- 10) Schlenk, H., Gellerman, J. L.: Anal. Chem. **32**, 1,412~1,414 (1960).
- 11) Cory, R. M., Stothers, J. B.: Org. Magn. Reson. **11**, 252~256 (1978).
- 12) Arnone, A., Mondelli, R., Pyrek, J. St.: Org. Magn. Reson. **12**, 429~431 (1979).
- 13) Uto, S.: J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. A **43**, 97~106 (1979).
- 14) Fukuyama, Y., Toyota, M., Asakawa, Y.: Phytochemistry **27**, 1,425~1,427 (1988).
- 15) Tan, R. X., Hu, Y. H., Liu, Z. L., Pan, X.: J. Nat. Prod. **56**, 1,917~1,922 (1993).