

報 文

ヘッドスペース・マイクロ固相抽出ーGC・MS 法による

ニオイエビネ *Calanthe izu-insularis* (Orchidaceae) の揮発性成分の解析種田明子¹⁾, 安達雅代²⁾, 舩渡歎子²⁾, 大橋勝太郎²⁾, 根岸晴夫^{1, 2)}¹⁾ 中部大学植物バイオ研究センター, ²⁾ 中部大学応用生物学部

要 旨

ニオイエビネ *Calanthe izu-insularis* (Orchidaceae) の花が発散する揮発性成分を、ヘッドスペース(HS)・マイクロ固相抽出 (Solid Phase Microextraction: SPME) 法で濃縮し、GC-MS を用いて分析を行った。また、朝方と夕方の個々の揮発性成分の発散量の比較を行った。

C. izu-insularis が生きた状態で発散する揮発性成分を HS-SPME 法で測定した結果、テルペノイド類及び脂肪酸化合物の、12 物質を簡易同定することができた。その主要成分は、テルペノイド類の(E)- β -Ocimene, Linalool, (E,E)- α -Farnesene, (E)-Nerolidol であった。これらは“sweet”で“flower”のような香調を持ち、*C. izu-insularis* の芳香の主要成分となっていると考えられた。朝方と夕方の揮発性成分の発散量の比較では、実際に感覚的に感じられたものと一致し、検出されたすべての揮発性成分が、朝方には多く検出され、夕方には朝方より少なくなった。

キーワード: 揮発性成分, マイクロ固相抽出, 日内リズム, ニオイエビネ, ラン科植物

1. はじめに

ラン科エビネ属 *Calanthe* は、日本、中国、台湾などの東アジアを中心に、南アフリカやマダガスカル、インド、オーストラリア、ミクロネシアまで、広範囲に百数十種が分布し、日本各地には、約 20 種が自生している。エビネ属は、日本では地植えや鉢植えで手軽に栽培することができることに加え、交配が容易なため花色や花形などが株ごとに異なった多彩な変化を楽しむことができる園芸植物として人気がある。その花の香りは、花色や花形と同様に、強さ、質ともに多彩である。ニオイエビネ *C. izu-insularis* は、伊豆諸島に自生する原種で、その花や葉の美しさと、花が芳香を放つことで知られ、さまざまな交配に用いられている(石田,1994)。

植物の花の香りは花粉媒体動物を呼びよせ、種の保存の一助を担う重要な役割を果たしている。一方で、我々人類は、心地よい香りを得るために、花の香りを分析してそれを再構成することにより工業的に利用してき

た。このような、植物生理と、分析技術が相まって、花の香りの代謝研究が分子生物学の分野で進められるようになった。最近では、ペチュニア *Petunia* 花の香気成分であるベンゼノイドの代謝に関する遺伝子解析の報告がある(Boatright et al., 2004; Underwood et al., 2005)。

ラン科植物の花の香りについては、これまで多くの研究がなされてきた(Kaiser,1993;Awano et al.,1997.)。しかし、エビネ属の香りの組成を報告した例は僅かで、ヒトの知覚としての香りを目的として組成を調べた 1 報のみであった(Awano et al.,1997)。また、花の香りの発散には、花粉媒体動物を呼びよせる目的のためか昼夜リズムがあることが知られている。最近では、バラの昼夜リズム、サーカディアンリズムについて報告されている(Picone et al.,2004)。ラン科植物についても Altenburger(1990)などの報告があるが、エビネ属についての研究報告はない。

ヘッドスペースに発散した揮発性成分の分析法としては、先に報告 (Taneda et al.,2007;呂ら,2007) した、直接

気相を GC に注入して分析する方法が簡便であるが、微量な成分の検出には問題がある。そこで、生きている花が発散する揮発性成分の分析法については、花のヘッドスペースの揮発性成分を濃縮して GC へ導入して分析するという方法が、一般に採られている(Mookherjee et al., 1989). その濃縮法としては、Tenax や活性炭などの吸着剤をカラムに詰め、そこに花のヘッドスペース空気を通して吸着剤に捕集させる方法が、1980 年ごろから盛んに行われてきた。一方で、1990 年以降、細い棒状のヒューズドシリカコアに各種液相が固定相としてコーティングされたファイバーを花のヘッドスペース部に置いて捕集させる方法-マイクロ固相抽出 (SPME) 法が、一部で用いられるようになった(Bartak et al., 2003; Flamini et al., 2002; Custodio et al., 2006; Cuevas-Glory et al., 2007). Tenax 等の吸着剤を用いる方法では、吸着剤から GC へ導入を行うために溶媒脱着あるいは加熱脱着を行うが、いずれの場合も容量が大きくなるため何らかの濃縮の操作または装置が必要となってくる。それに対し SPME ファイバーを用いる場合は、捕集される成分は多くはないが、GC の注入口にファイバーを挿入することで、抽出された成分すべてを簡便に GC カラムに導入することができる。このように、SPME 法は、基本の GC 装置さえあれば、特別な装置や操作なしに迅速・簡便・高感度に生花の発散する揮発性成分を分析できる方法である。我々は、この HS-SPME 法を用いてフウラン *Neofinetia falcata* 及びコチョウラン *Phalaenopsis violacea*(いずれも Orchidaceae) の花の揮発性成分組成や揮発性成分の日内リズムを観察した(種田ら, 2008).

本研究では、ヘッドスペースに発散される揮発性成分を簡便に感度良く検出することができるマイクロ固相抽出法を用いて、ニオイエビネ *C. izu-insularis* の発散する揮発性成分の組成を調べ、その朝夕の違いを比較したので報告する。

2. 材料と方法

植物材料

菰野えびね園(三重県三重郡菰野町)から直径約 18cm の樹脂製鉢に植えられたニオイエビネ *Calanthe izu-insularis*(Orchidaceae)開花株を入手し、試験に供し

た。

C. izu-insularis 花が発散する揮発性成分の HS-SPME

C. izu-insularis の開花株の花序を袋で覆い、花から発散する揮発性成分を生きている状態で捕集する方法をとった。

揮発性成分の組成を調べるために、花 15 ヶ(内 5 ヶは未開花)が付いた花序を樹脂製の袋(ポリエチレン、外形:縦 273×横 268mm, 厚さ:0.068mm, ジッパー付き袋、旭化成ホームプロダクツ(株))を膨らませて覆い、この袋のヘッドスペース部に朝 9:30 から 1 時間 SPME ファイバーを挿入して抽出した。SPME ファイバーは、65 μ m Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene(PDMS/DVB)を固定相としたもの(Supelco)をオートサンプラー用ファイバーホルダー(Supelco)に装着して使用した。なお、抽出時の温度は、22°C~23°Cの範囲であった。

揮発性成分の朝夕比較をおこなうために、朝方 9:30 と夕方 17:30 に前述と同様に抽出を行った。このときは、花 14 ヶ(内 4 ヶは未開花)を、試験に供した。なお、抽出時の温度は、20°C~21°Cの範囲であった。

GC-MS 分析

抽出が終了した SPME ファイバーは、直ちに GC-MS 注入口に挿入して、分析を行った。

GC-MS 装置は、ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP5050A((株)島津製作所)を使用した。揮発性成分の分離カラムは、Stabilwax (60 m×0.32mm i.d., 膜厚 0.5 μ m, RESTEK)を用いた。キャリアガスは、ヘリウムを用い、カラム入口圧は、65kPaとした。試料気化室温度を 230°Cとし、スプリットレス(サンプリング時間 1.5 分)で GC-MS に導入した。カラム温度は、35°Cで 5 分保持後、3°C/分で 220°Cまで昇温した。

GC-MS インタフェースは、230°C, MS のイオン化は、EI モード(70eV), マスレンジ m/z 40—300 の条件で測定した。

Stabilwax カラムで検出した成分の確認を DB-5(30 m×0.25mm i.d., 膜厚 0.25 μ m, J&W)を用いて適宜行った。

GC-MS で検出された成分は、NIST/EPA/ NIH マススペ

クトルデータベース(2002)により類似のマススペクトルを検索するとともに、保持指標 RI (Van den Dool et al., 1963) を算出して、標準物質あるいは公表されているデータ (Acree et al., 2004) や文献値と比較して簡易同定を行った。

揮発性成分の朝夕比較では、GC - MS で得られたピークの出力強度(ピーク面積値)を測定した。

3. 結果及び考察

C. izu-insularis 花の発散する揮発性成分

朝9:30 から1時間抽出を行ったクロマトグラムを Figure 1 に、検出されたピークの簡易同定結果とピーク面積比を Table 1 に示した。

Table 1 The identification of volatiles detected from *Calanthe izu-insularis* (0930-1030)

No.	Compounds	RT ^a	RI ^b	Peak area %	methods of identification ^c	odor note ^d
1	2-Methyl-2-propenal	7.64	887	0.23	1,2,3	—
2	3-Buten-2-one	10.20	954	0.10	1,2	—
3	β -Myrcene	21.10	1174	0.05	1,2	—
4	(Z)- β -Ocimene	24.93	1247	0.55	1,3	citrus, herb, flower
5	(E)- β -Ocimene	25.91	1266	62.33	1,3	sweet, herb
6	unknown	27.37	1294	0.23	—	—
7	6-Methyl-5-hepten-2-one	30.30	1353	0.25	1,2,3	—
8	unknown	35.69	1465	0.20	—	—
9	Linalool	40.01	1560	25.93	1,2,3	flower, lavender
10	unknown	40.77	1577	0.23	—	—
11	(E)- β -Farnesene	45.16	1679	0.78	1,2,3	wood, citrus, sweet
12	unknown	47.29	1731	0.13	—	—
13	(Z,E)- α -Farnesene	47.63	1739	0.28	1,3	—
14	(E,E)- α -Farnesene	48.61	1764	5.55	1,3	wood, sweet
15	unknown	50.76	1818	0.12	—	—
16	Geraniol	52.41	1861	0.15	1,2,3	rose, geranium
17	unknown	55.92	1955	0.21	—	—
18	unknown	58.25	2019	0.07	—	—
19	(E)-Nerolidol	59.44	2051	1.43	1,2	wood, flower, wax
20	unknown	59.97	2066	0.07	—	—
21	unknown	62.42	2133	0.17	—	—

^aRetention time on Stabilwax column.

^bLinear retention index on Stabilwax column.

^c1, tentative identification using mass spectrometry and MS databases; 2, authentic standard injection; 3, coincidence between calculated retention index and known retention index of compounds.

^d <http://www.flavornet.org/flavornet.html>

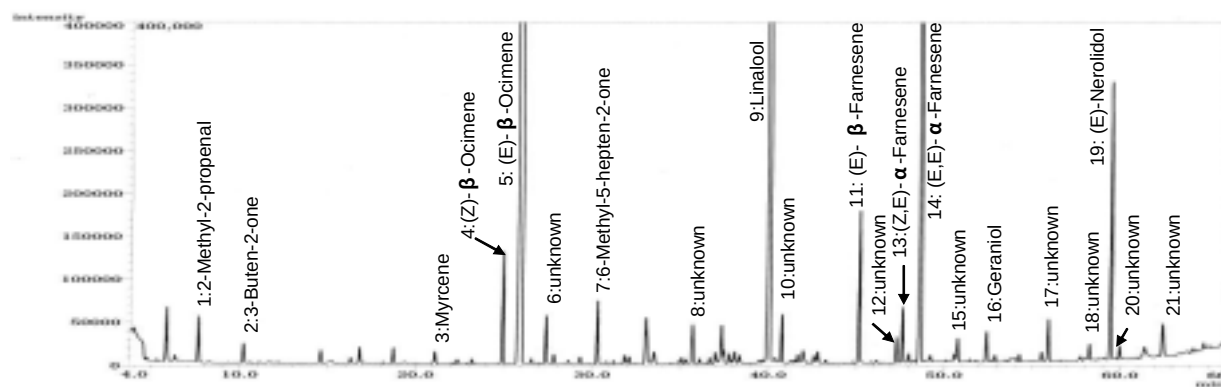


Figure 1 Volatile profile of *Calanthe izu-insularis* (flower) detected by HS-SPME-GC-MS.

The figure shows the total ion chromatogram obtained with Stabilwax column.

Table 2 Changes of volatile compounds of *Calanthe izu-insularis* in a day cycle
(peak area, unit; mV see by GC-MS analysis)

No.	Compounds	sampling periods	
		from 9:30 to 10:30	from 17:30 to 18:30
1	2-Methyl-2-propenal	131183	nd
2	3-Buten-2-one	66761	27237
3	β-Myrcene	43424	nd
4	(Z)-β-Ocimene	412380	222147
5	(E)-β-Ocimene	56118863	28801879
6	unknown	108937	nd
7	6-Methyl-5-hepten-2-one	39255	24091
8	unknown	97484	nd
9	Linalool	22119104	12660125
10	unknown	102224	nd
11	(E)-β-Farnesene	521578	485382
12	unknown	67173	nd
13	(Z,E)-α-Farnesene	148961	130433
14	(E,E)-α-Farnesene	3332985	2764824
15	unknown	55089	nd
16	Geraniol	73681	30630
17	unknown	100630	nd
18	unknown	14635	nd
19	(E)-Nerolidol	799950	609283
20	unknown	42967	nd
21	unknown	83474	nd
Total volatile compounds		84480738	45756031

nd; not detectable

21 成分が検出され, うち 12 物質が簡易同定され, (E)- β -Ocimene, Linalool, (E,E)- α -Farnesene, (E)-Nerolidol が主要成分として確認された. これらは, いずれもテルペノイド類であった. 簡易同定された 12 の揮発性物質のうち, 2-Methyl-2-propenal, 3-Buten-2-one 及び 6-Methyl-5-hepten-2-one 以外の 9 物質がテルペノイド類で, モノテルペン類の β -Myrcene, (E)-及び(Z)- β -Ocimene 並びに Linalool と, セスキテルペン類の(E,E)- α -Farnesene とその異性体, Geraniol 及び(E)-Nerolidol に分けられた. また, 芳香族化合物は確認されなかった. 未同定成分として, 9 成分が残されているが, *C. izu-insularis* の芳香は, (E)-及び(Z)- β -Ocimene, Linalool, (E,E)- α -Farnesene, (E)- β -Farnesene, (E)-Nerolidol の“sweet”で“flower”のような香りが主要成分となっていると考えられた. 本試験の結果は, Awano らの報告(1997)とほぼ同様であったが, *C. izu-insularis* の芳香を特徴づける寄与成分とされた Indoleが検出されず, 一方で, 低分子量の 2-Methyl-2-propenal 及び 3-Buten-2-one が検出され, さらにセスキテルペンの (E,E)- α -Farnesene の異性体が 2 成分検出されたという点が異なっていた. これらは, 抽出法の違い, あるいは, *C. izu-insularis* の個体差などが原因である可能性が考えられた. 未同定成分については, 今後解明を進め, *C. izu-insularis* 花の揮発性成分の全体像を明らかにする.

***C. izu-insularis* の揮発性成分の朝夕比較**

開花した花の揮発性物質の発散量を朝方 9:30-10:30, 夕方 17:30-18:30 の 2 点で比較した結果を Table 2 に示した. 検出されたすべての揮発性成分が, それぞれ大きさや変化の割合は違うが, 朝方は成分のピークが大きく, 夕方ピークが小さいという朝夕の差がみられ, 全成分としては, 夕方は朝方の半分程度の発散量であった. これは, *C. izu-insularis* が 10 時ごろよく香り, 夕方には香りが弱まると感じる感覚観察とも一致した.

本研究によって, *C. izu-insularis* の花から発散される揮発性物質を HS-SPME 法で抽出し, GC-MS で検出及び簡易同定することができた. 検出された揮発性成分は,

(E)- β -Ocimene, Linalool, (E,E)- α -Farnesene, (E)-Nerolidol などのテルペノイドを主要成分とし, 主にモノテルペン類とセスキテルペン類で構成されるという特徴を持っていた. また, 朝夕の発散を比較したところ, 検出された揮発性成分のすべてが, 朝方 10 時ごろ多く発散し, 夕方 18 時ごろ弱まることを捉えることができた.

今後, 花の揮発性成分の代謝経路の解明, その成果を応用した分子育種等につなげていきたい.

謝 辞

本研究の一部は文部科学省の学術フロンティア推進事業により支援された.

引用文献

- Acree T., Arn H. 2004,
<http://www.flavornet.org/flavornet.html>
- Altenburger R., Matile P., 1990, Further observations on rhythmic emission of fragrance in flowers. *Planta*, 180, 194-197.
- Awano K., Honda T., Ogawa T., Suzuki S., Matsunaga Y., 1997, Volatile Components of *Phalaenopsis schilleriana* Rehb.f. *Flavour and Fragrance Journal*, 12, 341-344.
- Awano K., Ichikawa Y., Tokuda K., Kuraoka M., 1997, Volatile Components of the Flowers of Two *Calanthe* Species. *Flavour and Fragrance Journal*, 12, 327-330.
- Bartak P., Bednar P., Cap L., Ondrakova L., Stransky Z., 2003, SPME - A valuable tool for investigation of flower scent. *J. Sep. Sci.* 26, 715-721.
- Boatright J., Negre F., Hen, X., Kish C.M., Wood B., Peel G., Orlova I., Gang D., Rhodes D., Dudareva N., 2004, Understanding in Vivo Benzenoid Metabolism in *Petunia* Petal Tissue. *Plant Physiology*, 135, 1993-2011.
- Cuevas-Glory L.F., Pino J.A., Santiago L.S., Sauri-Duch E., 2007, A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 103, 1032-1043.
- Custodio L., Serra H., Nogueira J. M. F., Goncalves S., Romano, A., 2006, Analysis of the Volatiles Emitted by

- Whole Flowers and Isolated Flower Organs of the Carob Tree Using HS-SPME-GC/MS. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 929-942.
- Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., 2002, Differences in the fragrances of pollen and different floral parts of male and female flowers of *Laurus nobilis*. *J. Agric. Food Chem.* 50,4647-4652.
- 石田源次郎 「日本のラン 原種・園芸種 280」1994,日本放送出版協会
- Kaiser R., 1993, *The Scent of Orchids*, Elsevier, Amsterdam.
- Mookherjee B.D., Trenkle R.W., Wilson R.A., 1900, The chemistry of flowers, fruits and spices: live vs. dead a new dimension in fragrance research. *Pure & Appl. Chem.*, 62, 1357-1364.
- Picone J.M., Clery R.A., Watanabe N., MacTavish H.S., Turnbull Colin.G.N., 2004, Rhythmic emission of floral volatiles from *Rosadamasena semperflorens* cv. 'Quatre Saisons'. *Planta*, 219, 468-478.
- 呂 鋒, 種田明子, 根岸晴夫, 2007, 愛知県春日井市の竹尾ハーブ園で栽培した芳香性ハーブ 4 種の香りと揮発性成分の比較. *応用生物学部紀要*, 中部大学, 6, 11-23.
- Taneda A., Kuroda E., Negishi H., 2007, Headspace gas chromatography-mass spectrometry to analyze volatiles from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Annual Report of Research Institute for Biological Function*, Chubu University, 7, 91-100.
- 種田明子, 森山寛子, 根岸晴夫, 2008, ラン (*Neofinetia falcata* 及び *Phalaenopsis violacea*) 花の放出する揮発性成分の朝夕変化の解析. *日本農芸化学会2008年度大会要旨集*, 60.
- Underwood B.A., Tieman D.M., Shibuya K., Dexter R.J., Loucas H.M., Simkin A.J., Sim C.A., Schmelz E.A., Klee H.J., Clark D.G., 2005, Ethylene-regulated floral volatile synthesis in *Petunia Corollas*1[w]. *Plant Physiology*, 138, 255-266.
- Van den Dool H., Kratz P.D., 1963, A generalisation of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. *J. Chromatography*, 11, 463-471.
- Title:** Changes in floral volatiles of *Calanthe izu-insularis* (Orchidaceae) in a day cycle by HS-SPME-GC-MS.
- Authors:** Akiko Taneda¹⁾, Masayo Adachi²⁾, Yoshiko Funato²⁾, Katsutaro Ohashi²⁾, Haruo Negishi^{1,2)}
- Addresses:** ¹⁾Plant Biology Research Center, Chubu University. ²⁾Department of Food & Nutritional Sciences, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.
- Keywords :** *Calanthe izu-insularis*, day-rhythm, Orchidaceae, solid phase microextraction, volatiles