

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
 分担研究報告書

既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究

「コメヌカ油抽出物」の成分探索

分担研究者 永津明人 名古屋市立大学 講師

研究要旨 「コメヌカ油抽出物」の探索の結果、主成分フェルラ酸以外の成分としてフェルラ酸のステロイドおよびトリテルペンのエステルが大量に含まれていることがわかった。

A. 研究目的

食品添加物「コメヌカ油抽出物」は抗酸化を目的に使用されている。その主成分はフェルラ酸であり、その他の微量成分は「フェノール性物質とオレイン酸など」とされている。しかしながら、規格品質を確認する上で主要成分以外の微量成分の解析が行われていないことから、その品質規格を作成する資料となりうるデータ収集を目的に「コメヌカ抽出物」微量成分の探索を行った。

B. 研究方法

Fig. 1 に示されるように、コメヌカ油を脂溶性画分とフェルラ酸画分の2画分に分離した。微量成分にあたるものが含まれるこの脂溶性画分については、さらに HPLC (カラム: 野村化学 RPAqueous 20 mm i.d. x 300 mm, 溶媒: acetone : H₂O = 97 : 3, 5 ml/min, 検出: UV 340 nm) を用いて9画分に分けた後、同条件で recycle HPLC による分離をおこない、最終的に化合物 1-9 を得ることができた。

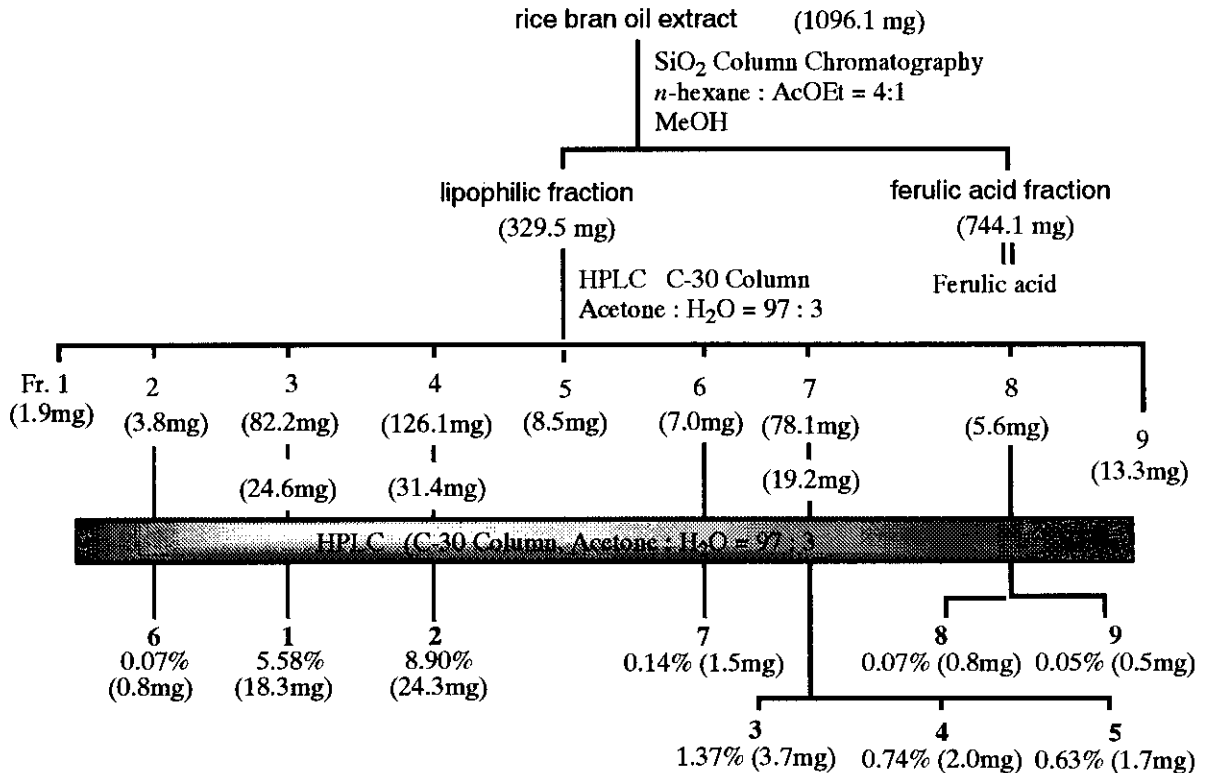


Fig. 1 「コメヌカ油抽出物」の分離

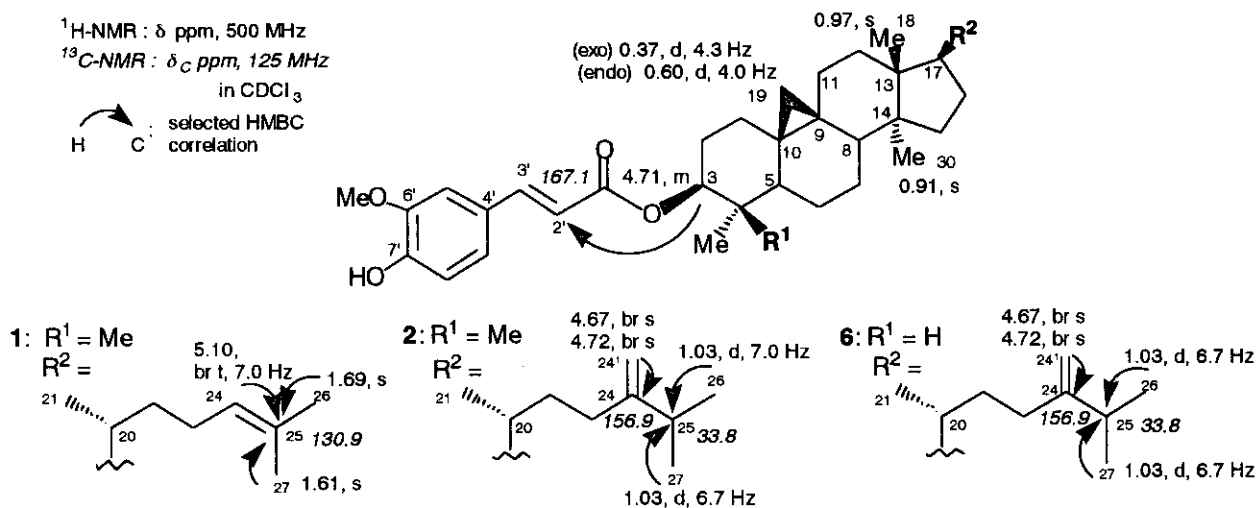


Fig. 2 「コメヌカ油抽出物」から単離されたTriterpene Farulates (1,2,6)

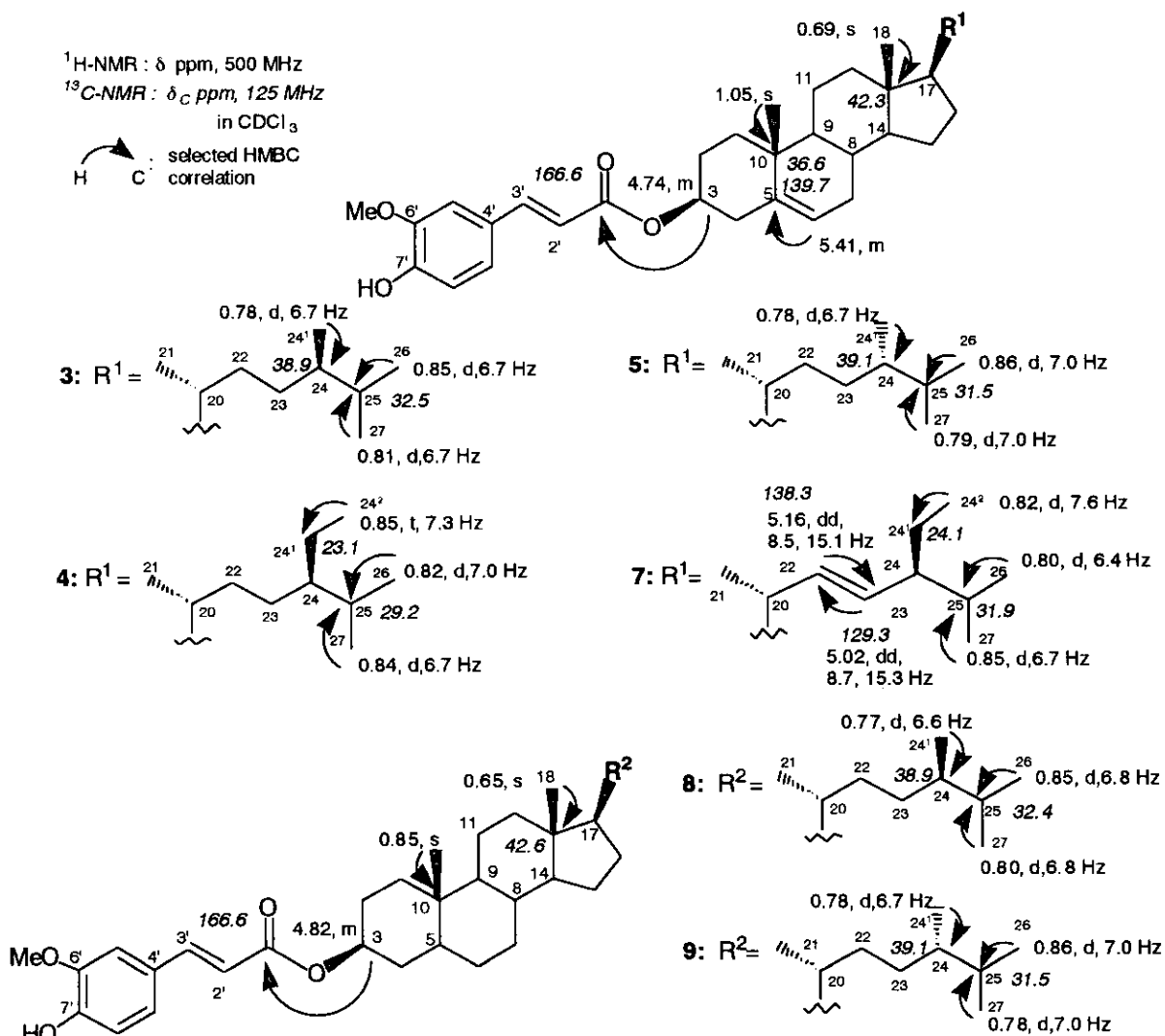


Fig. 3 「コメヌカ油抽出物」から単離されたSteroid Farulates (3-5, 7-9)

C. 研究結果

化合物 1, 2, 6 の構造を Fig. 2 に示した。まず、¹H-NMR 及び ¹³C-NMR データより、これらの化合物に共通してカルボニル基、フェノール性水酸基と三置換ベンゼン環の存在が推定され、このことから、これらの化合物がフェルラ酸エステルであると推定された。次に、¹³C-NMR データより、フェルラ酸を除いた残りの炭素が C30 ないし 31 の骨格を持つと推定されたことから、トリテルペンもしくはステロール骨格を持つのではないかと推測した。¹H-NMR データより、サイクロプロパン環を形成している 19 位のメチレンプロトン、18、30 位などのメチルプロトンが観測された。また、HMBC より、3 位のプロトンと、フェルラ酸のカルボニル炭素との相関が確認された。さらに、17 位の側鎖については、¹H-及び ¹³C-NMR データと HMBC により、それぞれこのような構造をとるものと推定された。以上より、化合物 1 と 2 がトリテルペンアルコールである cycloartenol *trans*-ferulate と 24-methylenecycloartanol *trans*-ferulate、6 が 4 α -メチルステロールである cycloeucalenol *trans*-ferulate と同定した。[1]

化合物 3, 4, 5, 7 は、それぞれの ¹H-NMR データより 1, 2 と同様にフェルラ酸の構造が確認され、6 位のオレフィンプロトンなどが確認されたことから、これらの化合物がステロールのフェルラ酸エステルであると推定された。¹H-及び ¹³C-NMR データと HMBC により、17 位の側鎖はそれぞれ Fig. 3 の構造式のように推定した。化合物 3 と 5 の 24 位の立体配置は、文献の ¹H-NMR データより決定した。以上より、化合物 3 と 5 がそれぞれ 24(R)- と 24(S)- の campesterol *trans*-ferulate、4 が sitosterol *trans*-ferulate、7 が stigmaterol *trans*-ferulate であると同定した。[1,2]

化合物 8 と 9 の ¹H-及び ¹³C-NMR データより、これらの化合物は、5 位に二重結合を持たないスタノールのフェルラ酸エステルであると推定された。また、この 2 化合物は 17 位の側鎖のメチルプロトンシグナルがそれぞれ化合物 3 と 5 に近似し、かつ、MS と HMBC データから、化合物 8、9 はそれぞれ 24(R)- と 24(S)- の campestanol *trans*-ferulate であると同定した。[3] (Fig. 3)

以上、9 化合物を単離したが、この他に HPLC 上多少のピークは検出されるものの、いずれも解

析に用いることのできる充分量を確保できなかった。一方、「コメヌカ油抽出物」の規格書には主成分であるフェルラ酸以外には「オレイン酸およびその水和物やフェノール性物質を含む」とされている。そこで、オレイン酸が含まれているか、1-9 の単離と同じ条件でオレイン酸の検出を試みた。しかし、標準のオレイン酸と同じ保持時間にピークは検出されず、オレイン酸の含有は確認できなかった。

さらに、化合物 1-9 の定量条件を検討した。「コメヌカ油抽出物」の直接分析すると、確実に定量可能なピークとして観察されるのは収率の比較的良好な化合物 1, 2, 4 と化合物 3 と 5 の混合物であった。カラム：ODS (Nucleosil 5C18, 4.6 mm i.d. x 250 mm)、溶媒：MeOH、流速：0.8 ml/min、検出：UV 210 nm という条件で検討した結果、内部標準に設定したコレステロールの保持時間(約 17.8 min)を 1.00 とした相対保持時間で 1: 1.43、2: 1.38、3+5: 1.51、4: 1.65 であった。

D. 考察

化合物 1, 2 は、単離収率でそれぞれ 5%以上、10%近く含まれることが明らかとなった。また、微量成分ととらえられるフェルラ酸以外の成分はほぼ cycloeucalenol、24-methylenecycloartanol といったトリテルペンアルコールおよび植物ステロール類のフェルラ酸エステルであった。規格書にある「フェノール性物質」は広い意味で解釈するとこれら化合物と理解できる。しかしながらあまり適当な表現ではないと思われる。一方、規格書にあるオレイン酸は現実には含まれていないに近い状態と考えられる。

「コメヌカ油抽出物」はコメヌカ油の不飽和物のエタノール抽出物ということであるが、鹸化され切れていないエステルも多いことになり、製造過程の鹸化の状況によって、フェルラ酸：微量成分の比率が大きく変わる可能性を示唆していた。

E. 結論

「コメヌカ油抽出物」の探索の結果、主成分フェルラ酸以外の成分として、フェルラ酸のステロイドおよびトリテルペンのエステルが大量に含まれていることがわかった。これらの化合物のうち含量の多いものに関しては定量法を確立した。規格書にあるようなオレイン酸は殆ど含まれてい

なかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

文献

[1] a) Yasukawa K. *et al.* *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1072 -1076 (1998). b) Yoshida K., *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1901-1912 (1989).

[2] Akihisa T. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 468 - 472 (2002).

[3] Akihisa T. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2313 - 2319 (2000).

分担研究報告書

既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究

「スフィンゴ脂質」の成分探索

分担研究者 永津明人 名古屋市立大学 講師

研究要旨 「スフィンゴ脂質」の探索の結果、主成分とされているセレブロシドがいまのところ 9 種単離されている。これらの骨格であるスフィンゴシン、フィトスフィンゴシンの長鎖アルキル鎖の鎖長、結合する脂肪酸種に特徴があるか否かを主に MS/MS を用いて探索している。

A. 研究目的

食品添加物「スフィンゴ脂質」は乳化剤として使用されている。その主成分はスフィンゴシン類およびセレブロシドとされている。しかしながら、規格品質を確認する上で主要成分以外の微量成分の解析が行われていない上、主成分であるスフィンゴシン類においても結合している脂肪酸とアルキル鎖との組み合わせなどで多様な化合物が存在するにもかかわらずそれぞれの確認はなされていない。以上のことから、その品質規格を作成する資料となりうるデータ収集を目的に「スフィンゴ脂質」の探索を行った。

B. 研究方法

市販のイネ種子由来（コメヌカ）又はコムギ胚芽由来（フスマ）の「スフィンゴ脂質」を原料に、Fig. 1 に示すように分離操作を行った。

まず、「スフィンゴ脂質」は TLC 上で非常に多数のスポットを与えることから、まずシリカゲルカラムクロマトグラフィーで大きく 10 画分に分画した。このうち、G,H の両画分で全体の 80%程を占めた。主成分のスフィンゴシン画分と考えられ、この画分の主成分の同定からとりかかった。

H 画分をさらに HPLC (カラム: YMC ODS-AQ 20 mm i.d. x 300 mm, 溶媒: i-PrOH : H₂O = 8 : 1, 5 ml/min, 検出: UV 210 nm) を用いて 11 画分に分離。さらに同条件で recycle HPLC を行って各画分を精製することで、9 化合物を単離した。

C. 研究結果

まず比較的大量に得られた、化合物 1 から NMR 測定などで構造を決定にかかった。¹H-NMR スペク

トルから、1 はトランスオレフィンの存在、直鎖のアルキル基、糖の存在を示唆する酸素官能基に隣接したメチンの存在の他、ヘテロ原子に隣接した 4 種のプロトンの存在などが推定された。2 次元 NMR の測定の結果、Fig. 2 に示すようなスフィンゴシン骨格を持つセレブロシドと同定された。しかしながら、スフィンゴシン骨格のアルキル鎖およびアミド結合する脂肪酸の長さ、水酸基 1 個、オレフィン 1 ヶ所とがそれぞれのアルキル鎖のどの部分に挿入されているかの同定は、NMR からは無理であった。

化合物 2,5,7 についても化合物 1 と全く同様の NMR スペクトルであることから、スフィンゴシン骨格および脂肪酸のアルキル鎖の異なる化合物であると推定できた。

一方、化合物 4,6 は 1 と比較するとトランスオレフィンのシグナルが消失し、酸素官能基に隣接スルメチンのシグナルが一つ増えていた。2 次元 NMR の測定の結果、スフィンゴシン骨格のトランスオレフィンが酸化され、水酸基になったフィトスフィンゴシン骨格を持つことがわかった。この 2 種についてもフィトスフィンゴシン骨格および脂肪酸のアルキル鎖の長さ、その途中の水酸基、オレフィンの位置はわからなかった。

化合物 3 はいまだ混合物なので精製中である。化合物 8,9 の NMR は解析中である。

さて、フィトスフィンゴシンまたはスフィンゴシン骨格および脂肪酸のアルキル鎖長と中間にある官能基の位置を MS/MS から決定することを考えた。現在、ESI-FT-ICR-MS/MS の技術の習得中である。この装置は標準で高分解能の MS 測定となるので、フラグメントが検出されればその分子式が特定できる。フラグメントの特定が容易で

あるので、データを集積しておけば、比較的普及している四重極 MS/MS での「スフィンゴ脂質」の分析の基礎データとなる。今後、これらの MS/MS による構造解析から分子の同定を行う。

これまでに、化合物 1 と 4-9 の分子式が特定できている。

- 1: $C_{44}H_{83}O_9N$ (m/z 792.59063, $[M+Na]^+$,
calcd. for $C_{44}H_{83}O_9NNa$, 792.59600)
- 4: $C_{46}H_{89}O_{10}N$ (m/z 838.63716, $[M+Na]^+$,
calcd. for $C_{46}H_{89}O_{10}NNa$, 838.63787)
- 5: $C_{46}H_{87}O_9N$ (m/z 820.62482, $[M+Na]^+$,
calcd. for $C_{46}H_{87}O_9NNa$, 820.62731)
- 6: $C_{48}H_{93}O_{10}N$ (m/z 866.66909, $[M+Na]^+$,
calcd. for $C_{48}H_{93}O_{10}NNa$, 866.66917)
- 7: $C_{48}H_{91}O_9N$ (m/z 848.65801, $[M+Na]^+$,
calcd. for $C_{48}H_{91}O_9NNa$, 848.65860)
- 8: $C_{30}H_{97}O_{10}N$ (m/z 894.70459, $[M+Na]^+$,
calcd. for $C_{30}H_{97}O_{10}NNa$, 894.70047)
- 9: $C_{30}H_{95}O_9N$ (m/z 876.69125, $[M+Na]^+$,
calcd. for $C_{30}H_{95}O_9NNa$, 876.68990)

溶出時間の順に炭素鎖が伸長したと考えられる化合物となり、同じ炭素数ではスフィンゴシン骨格→フィトスフィンゴシン骨格の順に溶出されることがわかる。また、化合物 8,9 はそれぞれフィトスフィンゴシン骨格、スフィンゴシン骨格であると推定できた。

D. 考察

MS の結果から、HPLC において一定の規則をもって溶出されることがわかった。MS/MS から構造が明らかとなれば、規格検定などのための分析法は比較的容易ではないかと考えられる。

E. 結論

「スフィンゴ脂質」の探索の結果、主成分はフィトスフィンゴシン骨格、スフィンゴシン骨格を持つセレブロシドであるとわかった。構造の詳細は現在検討中である。微量成分の探索も今後行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

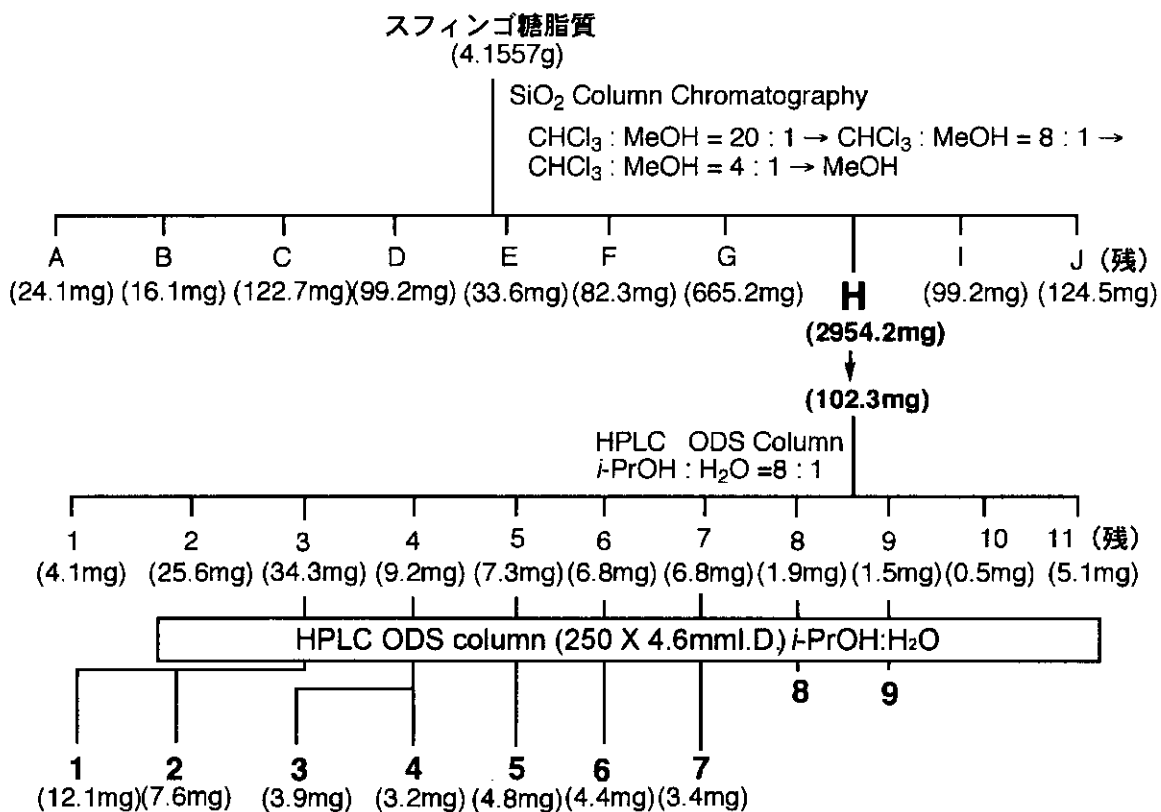


Fig. 1 「スフィンゴ糖脂質」の分画

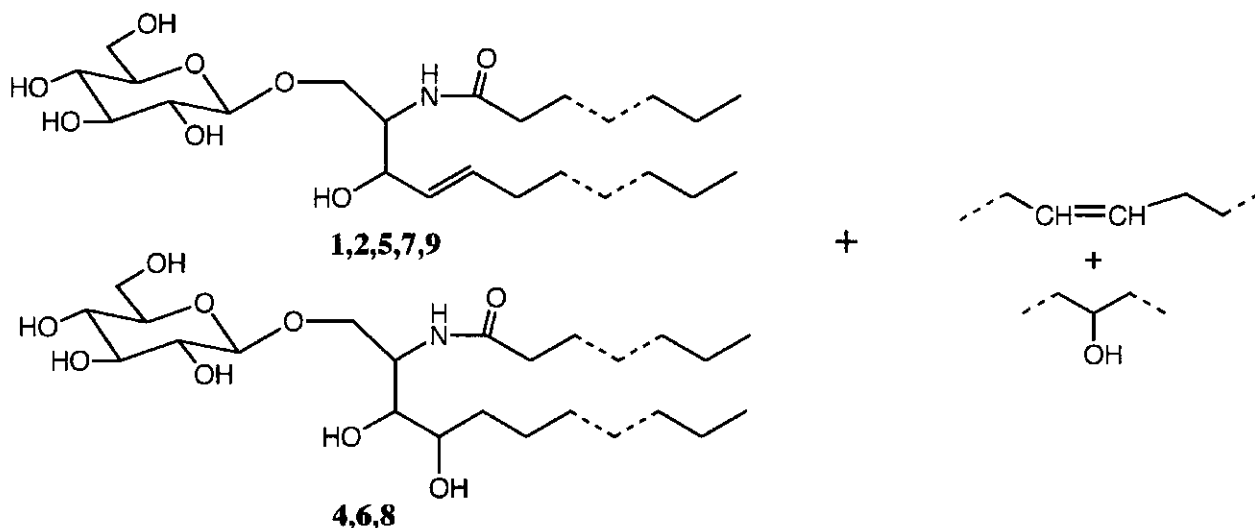


Fig. 2 「スフィンゴ糖脂質」のから得られたセレブロシド類

増粘安定剤マクロホモプシスガムの構成糖に関する研究

分担研究者 李 貞範 富山医科薬科大学薬学部 助手

研究要旨 増粘安定剤マクロホモプシスガムについて、糖組成分析やメチル化分析を行った。この結果、 β -1,3-グルカンとデキストランが含まれている可能性が考えられた。

A. 研究目的

増粘安定剤マクロホモプシスガム (Macrophomopsis gum) は、既存添加物収載品目リストにその基原・製法・本質として、「不完全菌類 (*Macrophomopsis*) 培養液より、分離して得られたものである。主成分は多糖類である。」と記載されている。本研究は、この構造的特徴を明らかにするため実施した。なお、マクロホモプシスガムについては、平成12年に変異原性試験が行われた。

B. 研究方法

分画方法

日本添加物協会を通じて入手したマクロホモプシスガム製品 (520 mg) に蒸留水を加え、加熱しながら攪拌した後、遠心分離により可溶部 (246 mg) と不溶部 (260 mg) に分画した。

糖組成分析

試料 (1 mg) を 2 N TFA (2 ml) に溶解後、100 °C、3 時間の条件で加水分解した。得られた加水分解物を窒素気流下で乾固後、少量の水に溶解し、NaBH₄ (3 mg) を加え還元した。少量の酢酸 (0.5 ml) を加えた後、MeOH を加え濃縮乾固する操作を 5 回行った。これを 1-メチルイミダゾール (0.2 ml) と無水酢酸 (2 ml) によりアセチル化した。得られたアルジトールアセテート誘導体は GC により分析した。GC 条件：カラム J&W DB-225 (30 m x 0.32 mm i.d.)、カラム温度：210 °C、キャリアーガス：窒素、検出器：FID。

メチル化分析

メチル化多糖は Anumula & Taylor 法 *Anal. Biochem.*, 203, 101, (1992) に従って調製した。すなわち、乾燥した試料を DMSO (0.5 ml) に溶解後、

NaOH-DMSO (0.5 ml) 試薬およびヨウ化メチル (0.3 ml) を加え超音波浴中 7 分間反応させることでメチル化多糖を得た。これを 2 N TFA で 121 °C、1 時間加水分解し、還元、アセチル化後、GC (GL Science GC-353) および GC-MS (島津製作所 GC/MS QP-5000) で分析した。GC 条件：カラム Supelco SP-2330 (30 m x 0.32 mm i.d.)、カラム温度：160・210 °C (2 °C/min) then 210-240 °C (5 °C/min)、キャリアーガス：窒素、検出器：FID。GC-MS 条件：カラム J&W DB-1 (30 m x 0.32 mm i.d.)、カラム温度：100-250 °C (2 °C/min)、検出：MS

各ピークの同定は 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl glucitol (Rt = 25.047 min) との相対保持時間および MS フラグメンテーションパターンと比較により行った。

C. 研究結果

マクロホモプシスガム製品 (520 mg) に蒸留水 (100 ml) を加え、加熱しながら攪拌し可溶部 (246 mg) と不溶部 (260 mg) に分画した。可溶部は常温まで冷却するとゲル状になり、カラムクロマトグラフィーでさらに分画するには至らなかった。

次にそれぞれの画分について糖組成を分析したところ、いずれもグルコースのみ検出された (Fig. 1)。それぞれについてメチル化分析を行った。Fig. 2 にトータルイオンクロマトグラム (TIC)、Fig. 3 にそれぞれのピークのマススペクトルを示す。組成分析の結果より、いずれの糖残基も Glc であり、マスフラグメンテーションパターンより、それぞれのピークを同定した。これらの結果より、いずれの画分も Glc-(1→、→3)-Glc-(1→、→4)-Glc-(1→、→

6)-Glc(1→、→4,6)-Glc(1→で構成されていることが判明した (Table 1)。

Table 1. Results of Methylation Analysis

Deduced Linkage	可溶部	不溶部
Glc(1→	10.0	19.2
→3)-Glc(1→	17.8	28.5
→4)-Glc(1→	47.3	31.8
→6)-Glc(1→	11.0	Trace
→4,6)-Glc(1→	13.0	20.5

D. 考察

今回、分析した試料の溶解性は極めて悪く、加熱下溶解した可溶部も常温まで冷却するとゲル状に変化し、カラムクロマトグラフィーによる分画は出来なかった。しかし、得られた可溶部と不溶部はそれぞれグルコースのみ構成糖として確認された。自主規格には本試料の主成分はβ-1,3-グルカンであり、デキストランを含むことがあると記載されている。メチル化分析の結果より、→4)-Glc(1→や→4,6)-Glc(1→が確認されたことより、本試料にはβ-1,3-グルカンにデキストランが混在している可能性が認められた。

E. 結論

市販マクロホモプシスガムは溶解性が極めて悪く、カラムクロマトグラフィーによる分画は出来なかった。今後の課題として、温度をかけながらゲル濾過を行うなど分画条件のさらなる検討が必要である。混合物での分析ではあるが、その成分中にはβ-1,3-グルカンとデキストランが混在していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

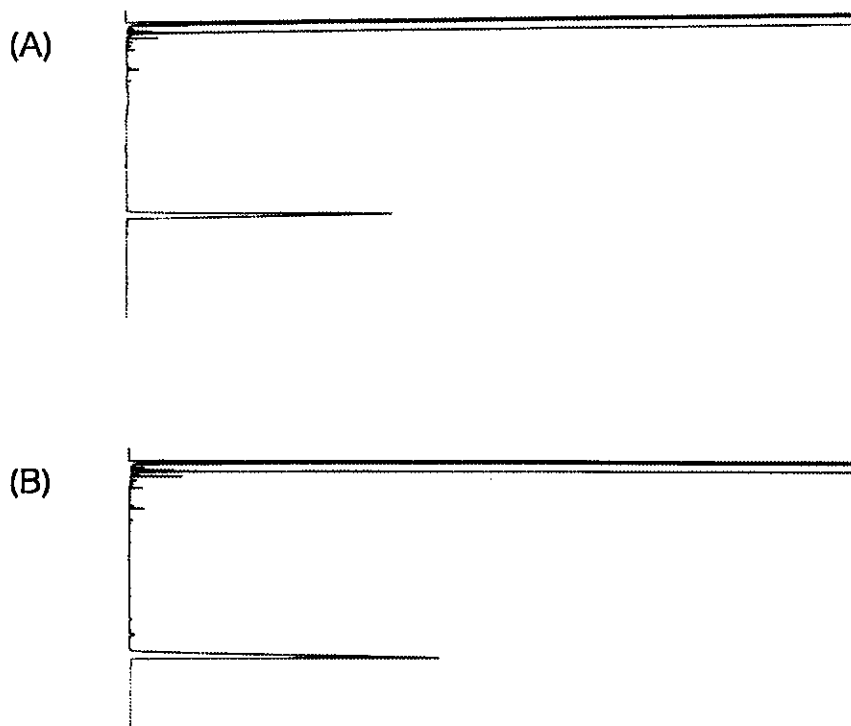


Fig. 1. Gas Chromatograms of Soluble Fraction (A) and Insoluble fraction (B) from *Macrophomopsis* Gum

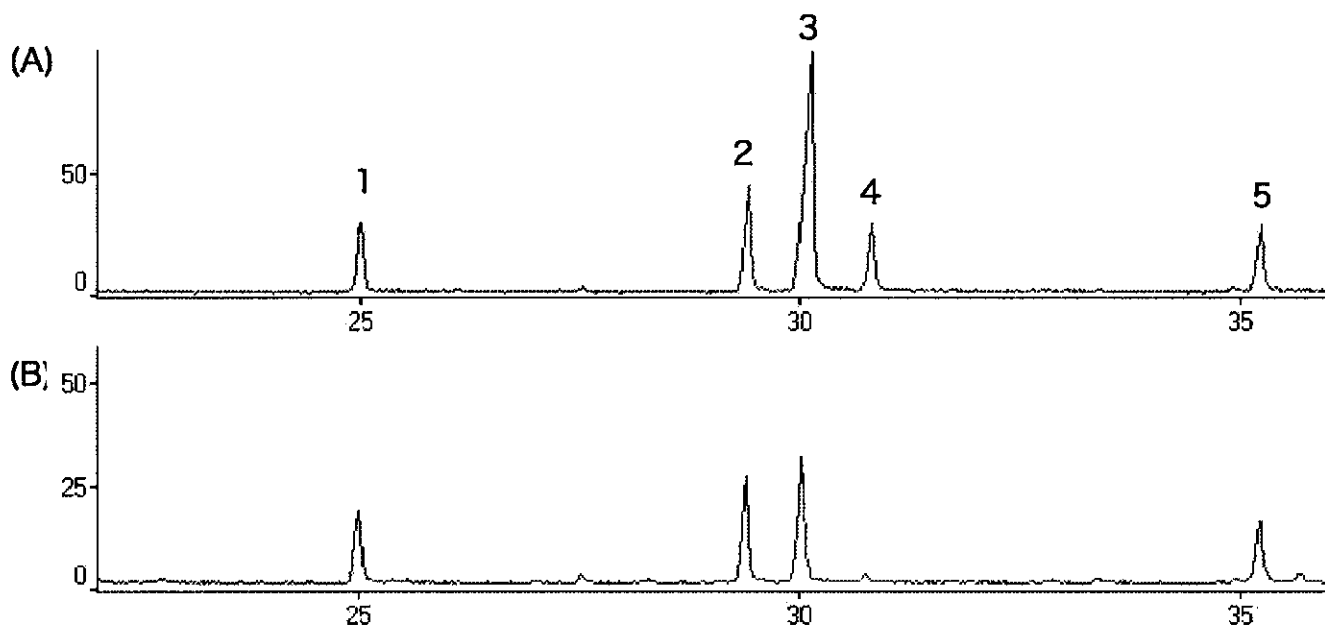


Fig. 2. TICs of Partially Methylated Alditol Acetates of Soluble Fraction (A) and Insoluble Fraction (B)

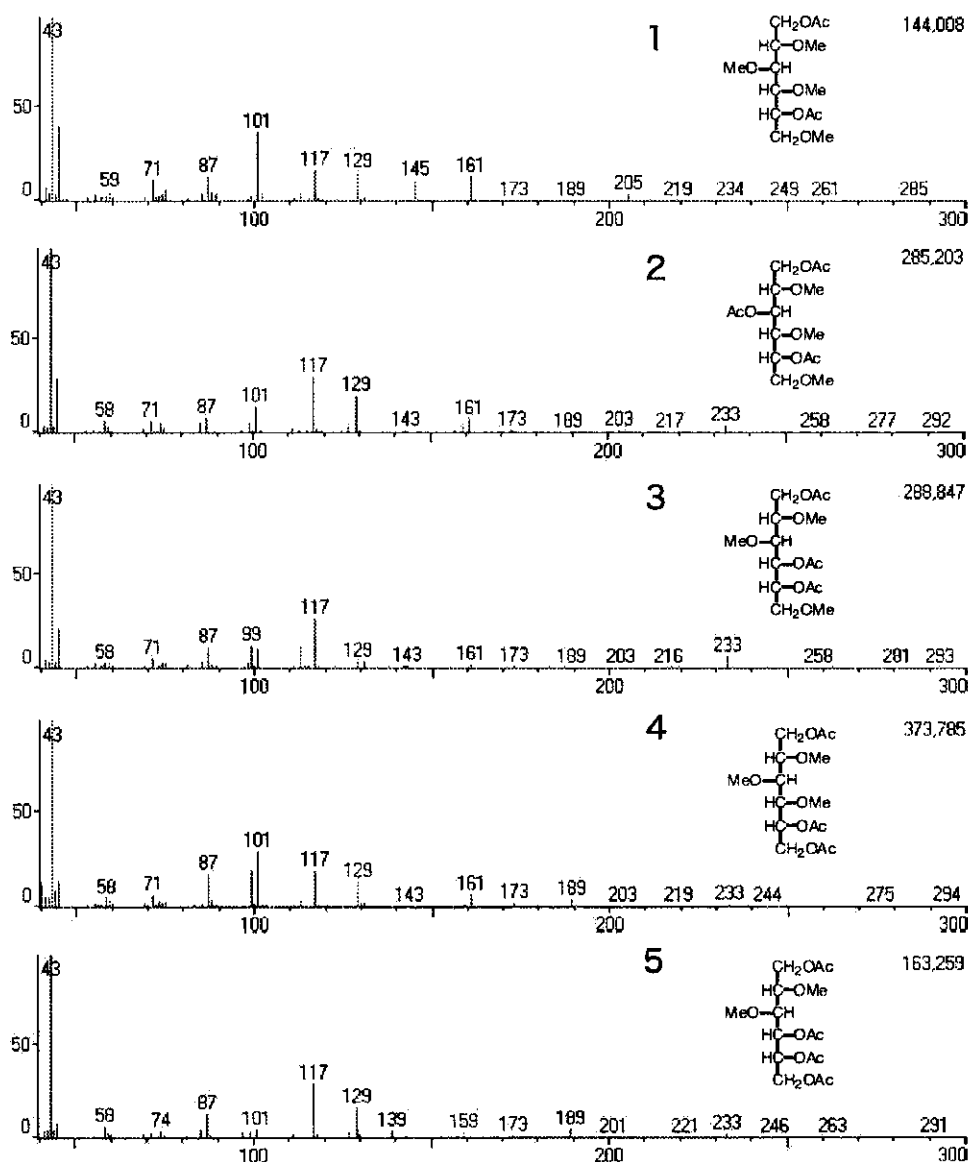


Fig. 3. Mass Fragmentation Patterns of Partially Methylated Glucitol Acetates

増粘安定剤アロエベラ抽出物の構成多糖に関する研究

分担研究者 李 貞範 富山医科薬科大学薬学部 助手

研究要旨 増粘安定剤アロエベラ抽出物製品中の多糖について検討を行った。機能性多糖として報告されているアセマンナンはほとんど含まれておらず、今回検討した試料中に含まれる多糖類のほとんどがマルトデキストリンであることが認められた。

A. 研究目的

増粘安定剤アロエベラ抽出物中に含まれる構成多糖（アセマンナン）の構造的特徴を明らかにする。

B. 研究方法

試料

日本添加物協会を通じて入手した増粘安定剤アロエベラ抽出物製品（平成11年に変異原性試験に供された試料と同様の製法で得られたもの、マルトデキストリン添加）を用いた。

アロエベラ抽出物製品の分画

アロエベラ抽出物製品（10 g）を水（50 ml）に溶解後、透析（和光純薬シームレスセルローズチューブ30）により高分子画分（透析内液）と低分子画分（透析外液）に分画した。得られた高分子画分をゲル濾過（Tosoh Toyopearl HW-65, 2.2 x 100 cm）に供した。溶出は0.2 M NaClで流速1 ml/minで行った。各フラクションの一部についてフェノール硫酸法に [Dubois M. *et al*, *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)] により糖の呈色を行い、溶出曲線を作成した。得られた画分はそれぞれ透析・凍結乾燥を行った。また、それぞれの画分は同一条件下でゲル濾過に供し、さらに精製した。

糖組成分析

試料（1 or 10 mg）を2 N TFA（1 or 5 ml）に溶解後、100 °C、3時間の条件下で加水分解した。得られた加水分解物を窒素気流下で乾固後、少量の水に溶解し、NaBH₄を加え還元した。少量の酢酸を加えることで、過剰なNaBH₄を分解後、生じたホウ酸を取り除くため、MeOHを加え濃縮乾固する操作を5回行った。内部標準としてmyo-イノシトール（90 µg）を加え、1-メチルイミダゾール（0.2 ml）と無

水酢酸（2 ml）によりアセチル化した。これをクロロホルムと水で分配後、クロロホルム層を水で洗浄した。クロロホルム層は濃縮することで得られたアルジトールアセテート誘導体はGCにより分析した。GC条件：カラムJ&W DB-225（30 m x 0.32 mm i.d.）、カラム温度：210 °C、キャリアーガス：窒素、検出器：FID。

メチル化分析

メチル化多糖はAnumula & Taylor法 *Anal. Biochem.*, **203**, 101, (1992)に従って調製した。すなわち、乾燥した試料をDMSO（0.5 ml）に溶解後、NaOH-DMSO（0.5 ml）試薬およびヨウ化メチル（0.3 ml）を加え超音波浴中7分間反応させることでメチル化多糖を得た。これを2 N TFAで121 °C、1時間加水分解し、還元、アセチル化後、GC（GL-Science GC-353）およびGC-MS（島津製作所GC/MS QP-5000）で分析した。GC条件：カラムSupelco SP-2330（30 m x 0.32 mm i.d.）、カラム温度：160-210 °C（2 °C/min）then 210-240 °C（5 °C/min）、キャリアーガス：窒素、検出器：FID。GC-MS条件：カラムJ&W DB-1（30 m x 0.32 mm i.d.）、カラム温度：100-250 °C（2 °C/min）、検出：MS

各ピークの同定は1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl glucitol (Rt = 25.047 min) との相対保持時間およびMSフラグメンテーションパターンの比較により行った。

見かけの分子量の測定

多糖類の見かけの分子量は島津LC-10 HPLCにて、TSK-Gel GMPW_{XL}（7.6 x 300 mm x 2）ゲル濾過カラムを用い、溶離液は0.2 M NaCl、流速0.5 ml/minを用いて、RIで検出を行った。検量線は分

子量既知のプルラン（昭和電工 Shodex）を用いて作成した。

C. 研究結果

透析により高分子画分（収量 6.3 g）および低分子画分（収量 3.4 g）を得た。高分子画分をゲル濾過に供し、3画分に分画した（Fig. 1）。

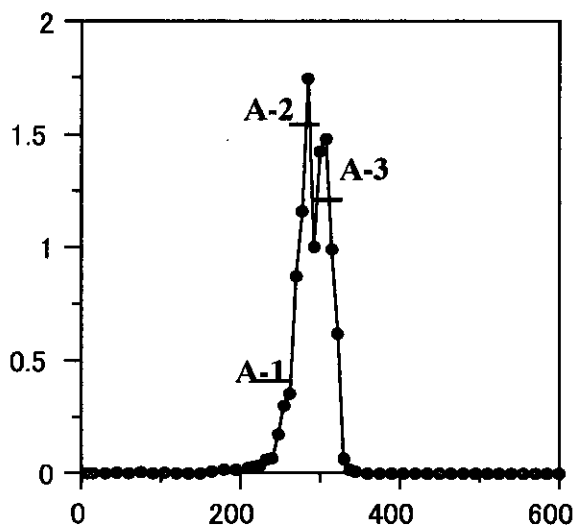


Fig. 1. Elution Profile of *Aloe vera* Extract (High molecular weight portion)

それぞれの画分を同一条件で再びゲル濾過に供し、精製した。見かけの分子量は A-1 が 59,000、A-2 が 19,000、A-3 が 10,000 と算出された（Fig. 2）。

酸加水分解後、アルジトールアセテート誘導体にしたのち、GC で分析したところ、いずれの画分もグルコースのみを構成糖としていた（Fig. 3）。次に多糖をメチル化分析に供した結果、Fig. 4 に示したトータルイオンクロマトグラム（TIC）のようにいずれの画分も構成糖残基は同一であった。それぞれのピークのマススペクトル（Fig. 5）より、Glc-(1→(1)、→4)-Glc-(1→(2)、→4,6)-Glc-(1→(3) と帰属できた（Table 1）。これらの結果から、いずれの画分もデキストリンであることが認められた（Table 1）。

Table 1. Results of Methylation Analysis

Deduced linkage	A-1	A-2	A-3
Glc-(1→	6.0	6.4	7.7
→4)-Glc-(1→	86.0	85.9	82.6
→4,6)-Glc-(1→	8.0	7.7	9.2

以上の結果から、単離した多糖類は添加物として加えられたマルトデキストリンであることが考えられた。そこで、アロエベラ抽出物製品の高分子画分を多量に用い、構成糖を再検討した（Fig. 6）。この結果、多量のグルコース（856.9 μg/mg）の他にごく少量のマンノース（4.2 μg/mg）が検出された。

D. 考察

Aloe vera にはアセマンナンが含まれており、これが生物活性など機能性を示す物質であるとされている。今回、検討したアロエベラ抽出物製品中にはアセマンナンがほとんど含まれていないことが考えられた。単離した多糖はメチル化分析の結果よりデキストリンであることが判明した。これは、本抽出物製品の製法（アロエベラ搾汁にマルトデキストリンを加え、粉末化）から考えて、添加されたデキストリンに含まれる高分子量デキストリンであったと思われる。詳細に糖組成を検討したところ、ごく少量のマンノースが検出できた。試料からの含有量は（2.6 μg/g）となる。以上の結果から、本試料中に含まれる多糖の多くはデキストリンであり、アセマンナンは含まれていても微量であると考えられた。

E. 結論

今回、検討したアロエベラ抽出物製品中には機能性多糖とされているアセマンナンはほとんど含まれておらず、多糖類の多くは添加物であるデキストリンであることが認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

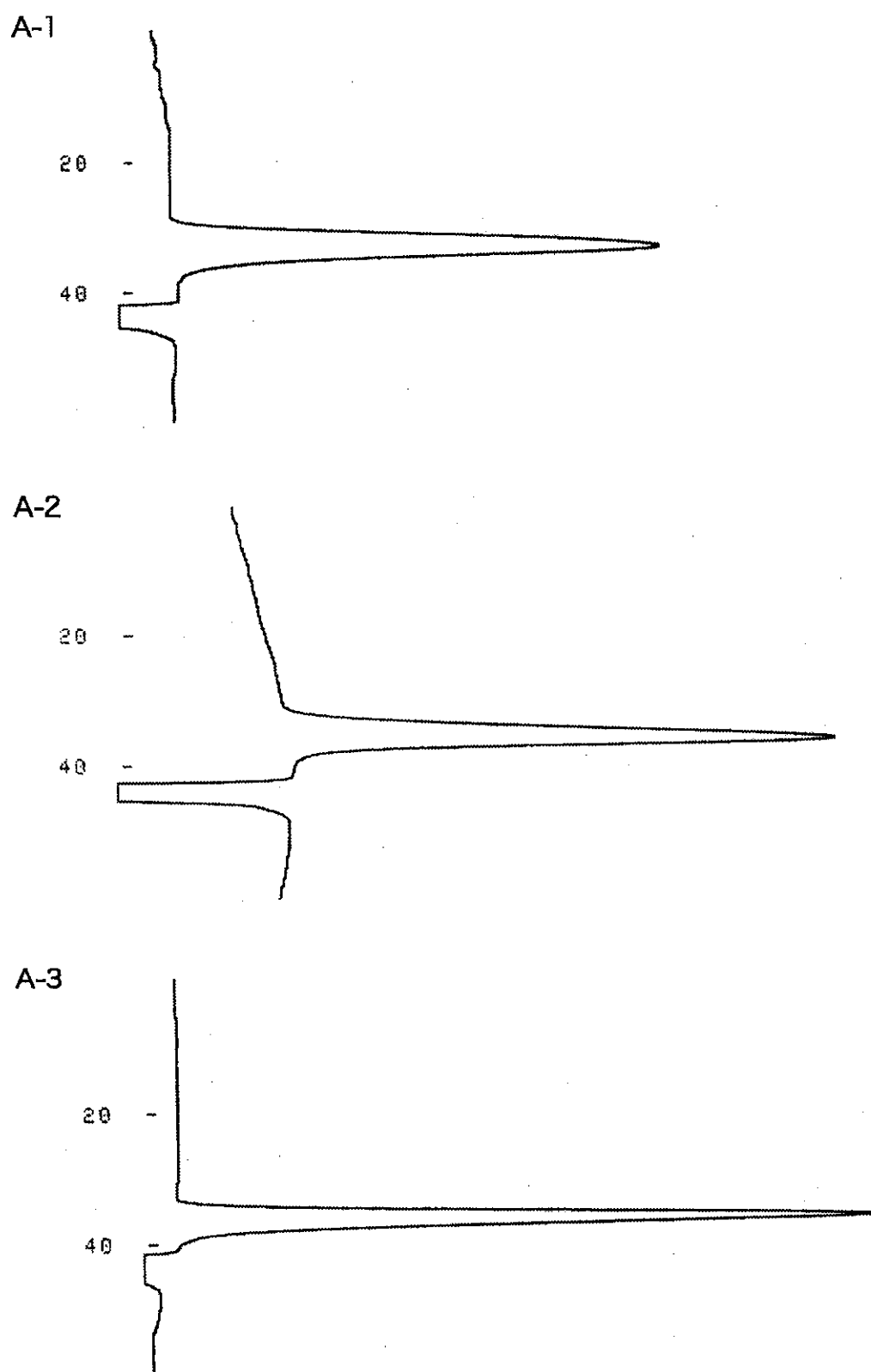


Fig. 2. HPLC Chromatograms of A-1, A-2 and A-3

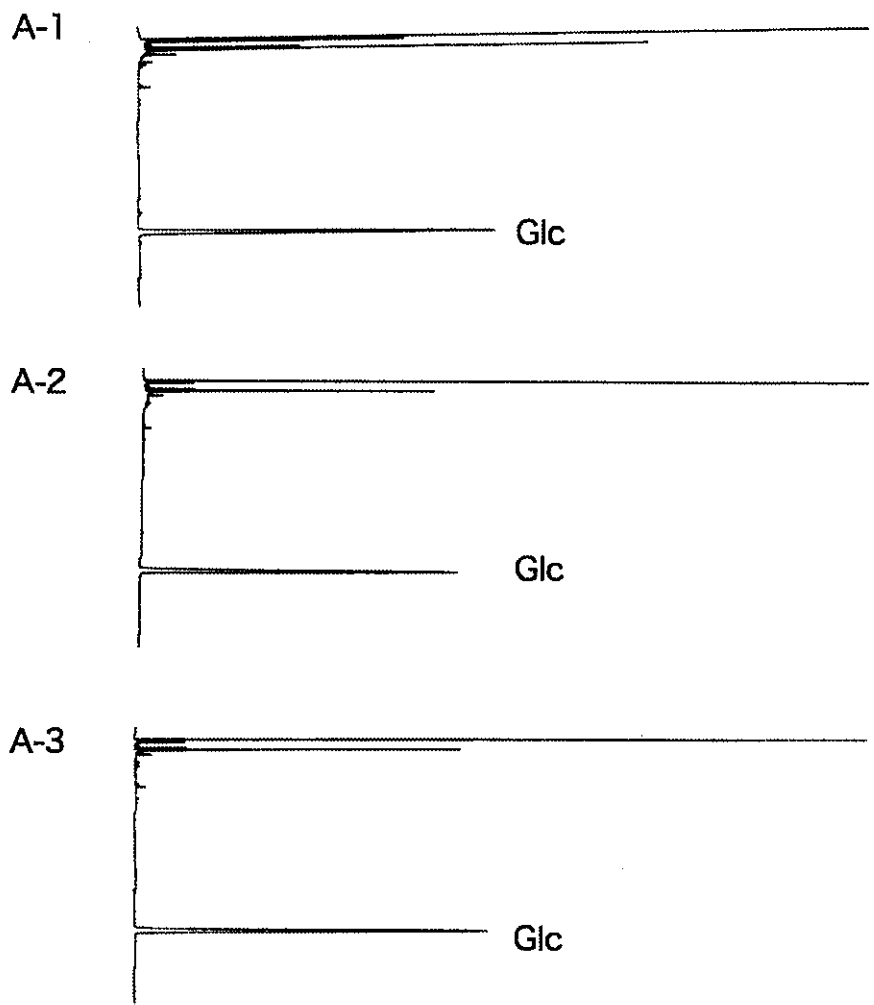


Fig. 3 Gas Chromatograms of Alditol Acetates from A-1, A-2, and A-3

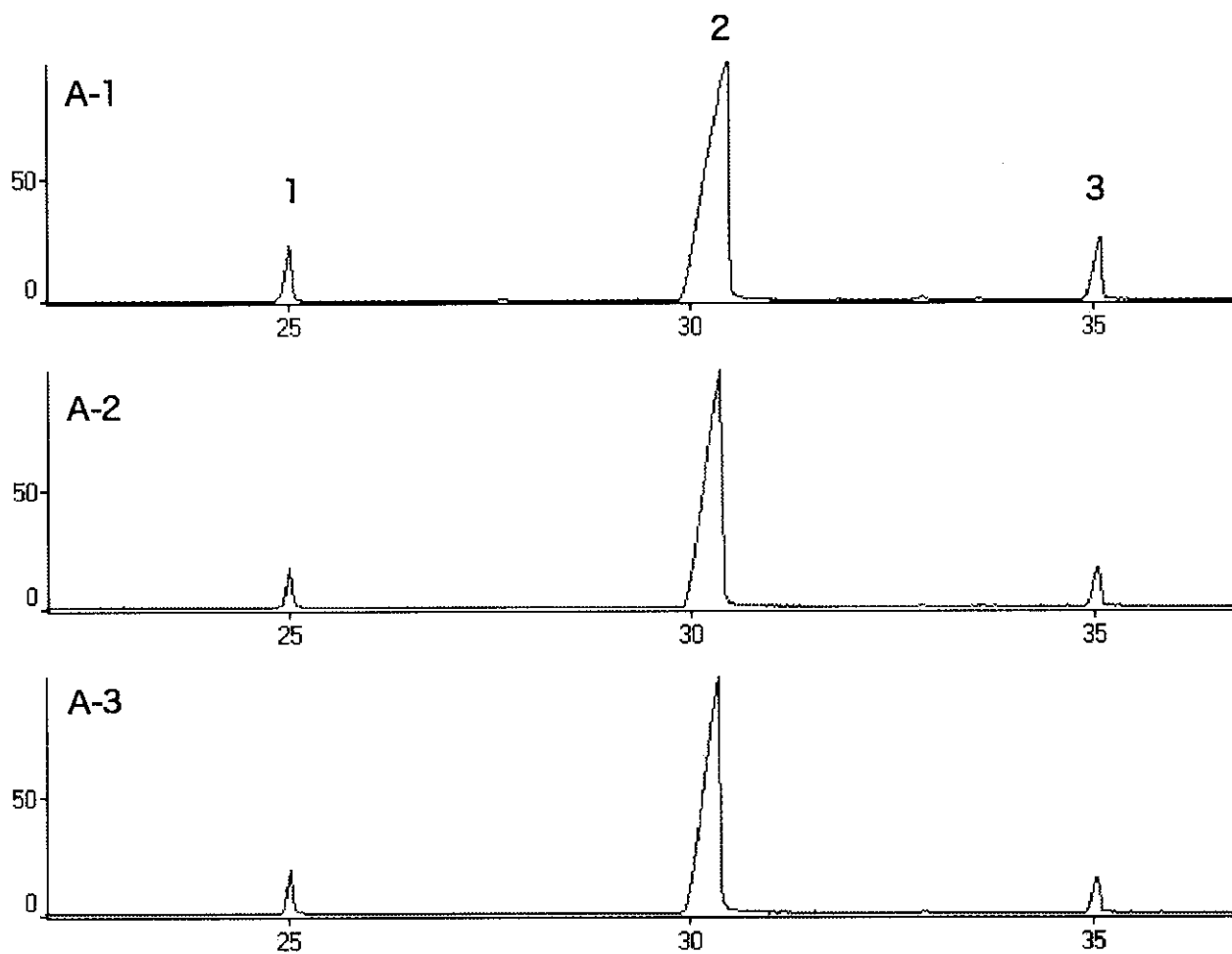


Fig. 4. TICs of Partially Methylated Glucitol Acetates from A-1, A-2, and A-3

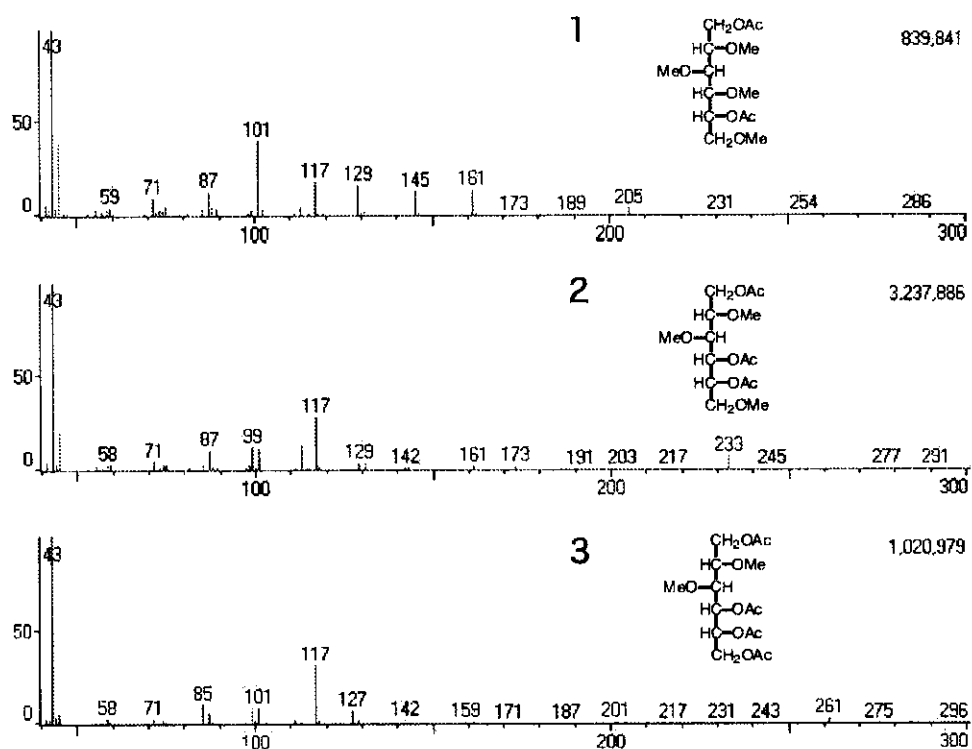


Fig. 5. Mass Fragmentation Patterns of Partially Methylated Glucitol Acetates

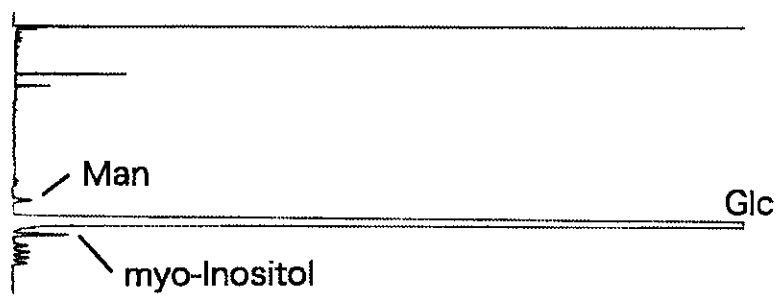


Fig. 6. Gas Chromatogram of High Molecular Fraction

増粘安定剤キダチアロエ抽出物の構成糖に関する研究

分担研究者 李 貞範 富山医科薬科大学薬学部 助手

研究要旨 前年度に単離したキダチアロエエキス由来多糖を還元後、メチル化分析に供した。この結果、主に1,4-結合したガラクトツロン酸で構成されるペクチン性多糖であることが示唆された。

A. 研究目的

増粘安定剤キダチアロエ抽出物中に含まれる多糖の構造を明らかにする。

B. 研究方法

多糖の単離

キダチアロエ抽出物製品からの多糖の単離は、前年度に報告した方法で実施した。抽出物2gを0.1M NaClに溶解し、2倍量のエタノールを攪拌しながら加え、エタノール沈殿画分を回収した。得られたエタノール不溶部(55mg)を0.1M NaClに溶解し、トヨパール HW-65(S)ゲル濾過カラムクロマトグラフィー(2.2 × 100 cm)に供した。カラムの溶出は0.1M NaClを溶離液に用い、流速0.5 ml/minで行った。各フラクション(7 ml)についてフェノール硫酸法を行い、480 nmにおける呈色を測定し、溶出曲線を作成した。

ウロン酸還元多糖の調製

ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで分離後、透析、凍結乾燥を行った多糖(10 mg)を水に溶解後、EDC(192 mg)を加え0.1N HClを加えながらpHを4.75にプロトンの消費が終了するまで維持した。その後NaBH₄(1.89 g)を4N HClを加えることでpH 7を維持しながら1時間かけて添加した。反応液を透析後、凍結乾燥し、カルボキシル基還元多糖を得た。

メチル化分析

メチル化多糖はAnumula & Taylor法 *Anal. Biochem.*, 203, 101, (1992)に従って調製した。すなわち、カルボキシル基還元多糖を乾燥後、DMSO(0.5 ml)に溶解し、NaOH・DMSO(0.5 ml)試薬およびヨウ化メチル(0.3 ml)を加え超音波浴中7

分間反応させることでメチル化多糖を得た。これを2N TFAで121 °C、1時間加水分解し、還元、アセチル化後、GC(GL-Science GC-353)およびGC-MS(島津製作所 GC/MS QP-5000)で分析した。GC条件:カラム Supelco SP-2330(30 m × 0.32 mm i.d.)、カラム温度:160・210 °C(2 °C/min) then 210-240 °C(5 °C/min)、キャリアーガス:窒素、検出器:FID。GC-MS条件:カラム J&W DB-1(30 m × 0.32 mm i.d.)、カラム温度:100-250 °C(2 °C/min)、検出:MS

各ピークの同定は1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl glucitol(Rt = 25.047 min)との相対保持時間およびMSフラグメンテーションパターンの比較により行った。

C. 研究結果

Fig. 1にメチル化分析時のトータルイオンクロマトグラム(TIC)、Fig. 2に主なピークのマススペクトルを示す。メチル化分析の結果、キダチアロエ抽出物に含まれる多糖中の糖残基の結合様式が判明した。それぞれの誘導体は、相対保持時間とマスフラグメンテーションパターンより同定した。なお、同じ結合様式の糖残基、たとえば→4)-Glc-(1→と→4)-Gal-(1→は同一のマスフラグメンテーションパターンを与える。これらの区別は相対保持時間の違いにより同定できる。以上の結果から、キダチアロエ抽出物に含まれる多糖は、Araf(1→(1.0%)(Fig.2A)、→5)-Araf(1→(0.4%)(Fig.2B)、→2)-Rha-(1→(1.0%)(Fig. 2C)、Glc-(1→(0.5%、→4)-Glc-(1→(20.3%)、→4,6)-Glc-(1→(0.8%)、Gal-(1→(1.0%)(Fig 2D)、→4)-Gal-(1→(73.7%)(Fig. 2E)、→4,6)-Gal-(1→(2.1%)で構成されることがわ

かった。

D. 考察

メチル化分析の結果で、ガラクトツロン酸残基はガラクトースとして検出されている。従って、 $\rightarrow 4$ -Gal-(1 \rightarrow)のほとんどはガラクトツロン酸残基由来と考えられる。一般に植物のペクチン性多糖類には様々なものが存在する。アラビノース残基はAraf(1 \rightarrow と $\rightarrow 5$)-Araf(1 \rightarrow)として存在することが認められたことから、タイプ1のアラビノガラクトン型糖鎖の存在が考えられた。また、ラムノースは $\rightarrow 2$ -Rha-(1 \rightarrow)のみが検出され、このことはラムノガラクトナンI型糖鎖の存在を示唆する。

以上の結果から、キダチアロエ抽出物中には主に1,4-ガラクトツロナンが存在するとともに、アラビノガラクトン(タイプ1)型糖鎖やラムノガラクトナンI型多糖鎖構造が結合していることが推測された。

E. 結論

メチル化分析の結果から、キダチアロエエキス中の多糖は主に1,4-結合したガラクトツロン酸で構成されることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

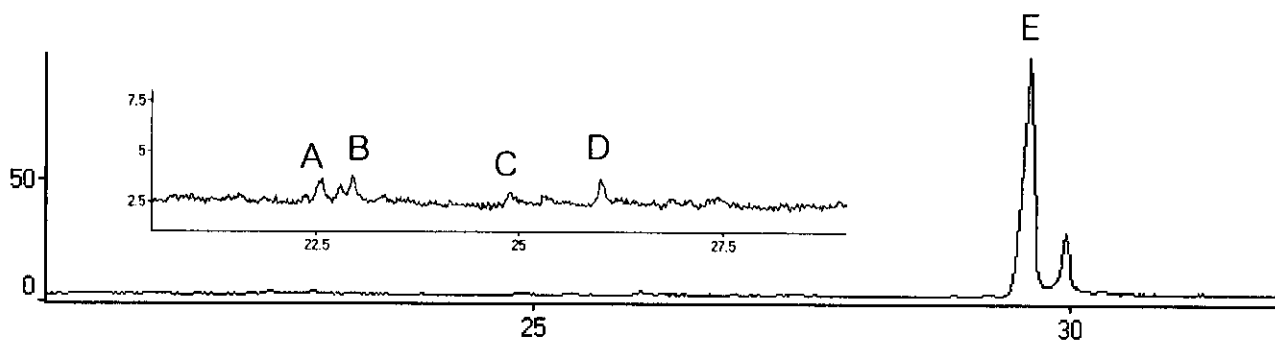


Fig. 1. Total Ion Chromatogram of Methylated Carboxyl-Reduced Polysaccharide

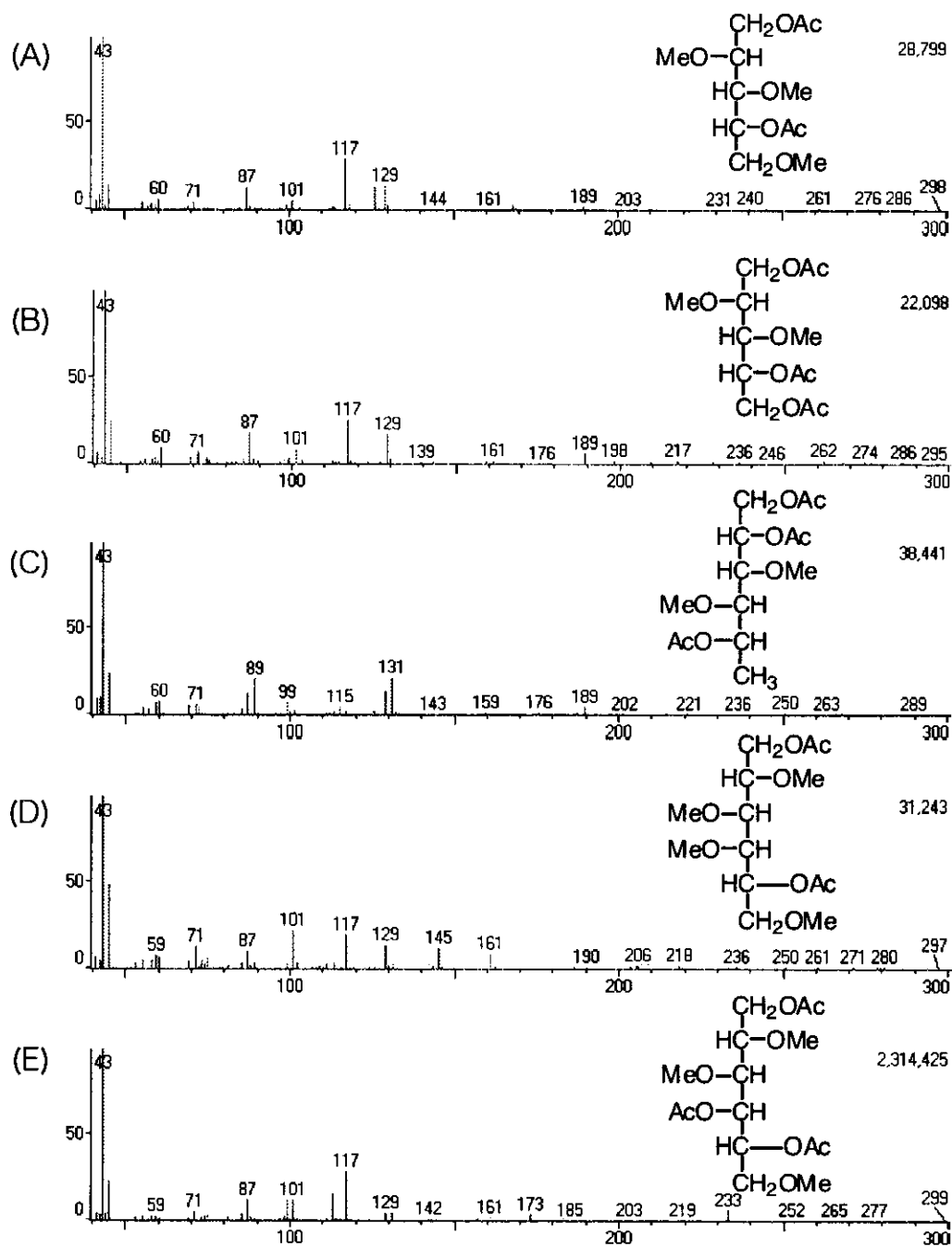


Fig. 2. Mass Fragment Patterns of Partially Methylated Alditol Acetates