

単離：カラム：RP-18 Mightysil column (関東化学株式会社、25 × 250 mm)、移動相 (20% CH₃CN、5 mL/min.)、検出器：紫外可視検出器 (島津、254 nm)

NMR 測定：¹H NMR and ¹³C NMR スペクトルは Bruker DPX-500 spectrometers を用い、Standard plus sequences and parameters は標準のものを使用した。また、¹H chemical shifts in DMSO-*d*₆ は 2.5 ppm、¹³C chemical shifts 39.5 ppm を内部標準とした。

C. 研究結果

ソバ葉乾燥粉末のメタノール抽出物から 2 つの化合物が単離された。化合物 1 は黄色粉末として得られ、エレクトロスプレーイオン化質量分析により (*m/z*) 611.1569 [M+H]⁺ のイオンピークを示し、HR-ESIMS より分子式を C₂₇H₃₀O₁₆ と決定した。また、¹H-NMR を測定した結果、6-8 ppm にケルセチン由来のシグナルが、5.35 (1H, d, *J*=7.4 Hz) および 4.38 ppm の糖由来のアノメリックシグナルが観測された。また、5.35 ppm における結合定数が 7.4 Hz であることから *b* 位のアノメリックプロトンであることが示唆された。一方、¹³C-NMR スペクトルにおいても、フラボノイド (93-178 ppm) 骨格を示唆するシグナルが、70 ppm 前後および 17.70 ppm にグルコースとラムノース由来のメチル基のカーボンシグナルが観測された。このことより化合物 1 はルチン (quercetin-3-*O*-rutinoside) である同定した。化合物 2 は黄色粉末として得られ、エレクトロスプレーイオン化質量分析により (*m/z*) 449.1049 [M+H]⁺ のイオンピークを

示し、HR-ESIMS より分子式を C₂₁H₂₀O₁₁ と決定した。1 次元の ¹H、¹³C-NMR スペクトルにおいて、化合物 1 と非常に類似しているが、グルコースのシグナルが観測されないこと、質量分析から一つの糖の分子量が少ないことから、ケルセチンにラムノースが結合した quercetin-3-*O*-L-rhamno-pyranoside であると同定した。(図 1)

さらに、ルチンの定量によりソバ葉乾燥粉末には約 3% が含有されていることが明らかになった。(図 2)

D. 考察

ルチンは生薬であるエンジュ (*Sophora japonica* L.) に約 10-28% 含まれていることが知られているが、今回ソバ葉乾燥粉末にも主成分として存在し、約 3% 含まれていることがわかった。なお、アグリコン部であるケルセチンのように *O*-dihydroxyl 基を有することで抗酸化作用を示すことが示唆された。

E. 結論

ソバ葉にはルチンが主成分として含有されている。このルチンの起源として、生薬ではなく、廃棄してしまうソバの葉を利用するということは資源の再利用の面からも望ましいことである。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

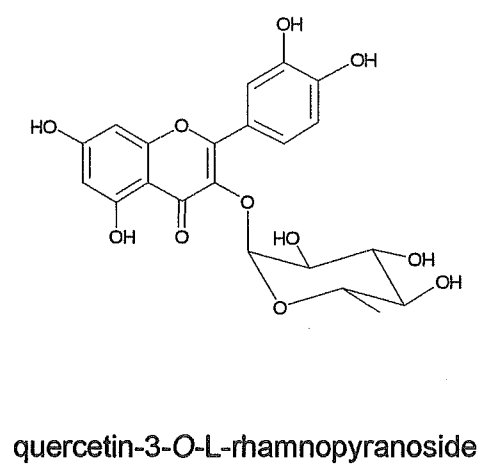
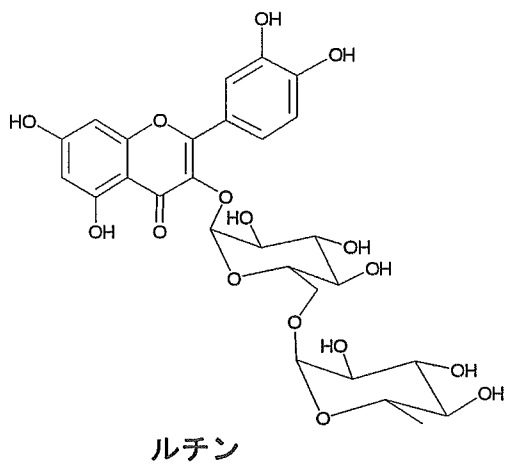


図 1 .

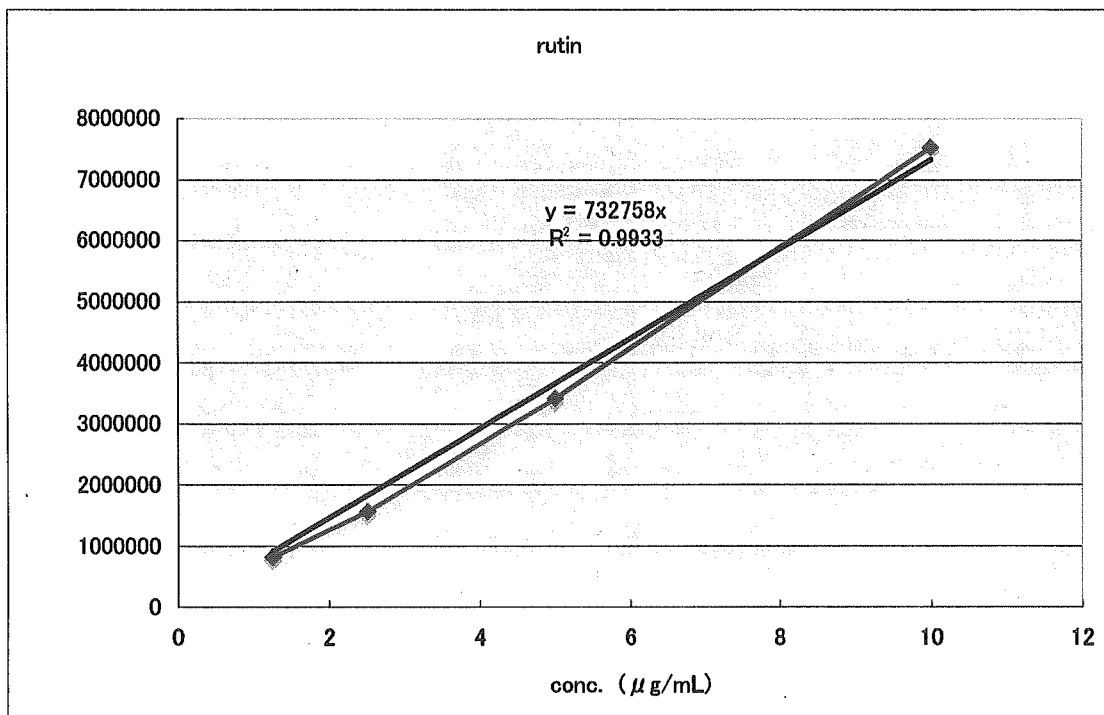


図2.ルチンの検量線

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
既存添加物の成分と品質評価に関する研究
分担研究報告書

分担研究課題: 既存添加物「ユーカリ葉抽出物」の成分に関する研究
協力研究者: 大槻 崇 千葉大学大学院薬学研究院 助手

研究要旨 「ユーカリ葉抽出物」規格作成に関する基礎的研究を行い、同製品中に含有される化合物の化学構造を NMR 及び FABMS を用いて解析し、低極性部にセスキテルペン類及びトリテルペンが含まれることを明らかにした。

A. 研究目的

「ユーカリ葉抽出物」は、既存添加物名簿収載品目リスト¹⁾に、「フトモモ科ユーカリ (*Eucalyptus globulus* LABILL)の葉より、水蒸気蒸留して得られたもの、又はエタノールで抽出して得られたものである。有効成分はβ-ジケトン類である。」と記載されている(既存添加物名簿番号, 456)。基原植物であるユーカリノキ (*Eucalyptus globulus* Labill., 英名: Tasmanian Blue Gum)はオーストラリア原産で、世界各地の温暖な地域で栽培される常緑高木である。薬効としては、葉の成分が抗菌作用、駆虫作用、去痰作用が示される他に、関節痛、陽炎、火傷、湿疹などに対する抗炎症作用も認められている²⁾。食品添加物としての用途は、油脂系食品への酸化防止剤と考えられる。主成分と考えられるエラグ酸は、「ユーカリ葉抽出物」と別途に食品添加物として登録され(既存添加物名簿番号, 56)、果実などの天然食品中に常在成分として含有されている。本研究では、公的な成分規格のない既存添加物「ユーカリ葉抽出物」の規格作成に関する基礎的検討を行うため、市販「ユーカリ葉抽出物」製品を入手し、昨年度の検討^{3, 4)}に引き続き、主成分に関する

研究、特に低極性部の成分に関する研究を行ったので報告する。

B. 研究方法

試料及び試薬 市販「ユーカリ葉抽出物」は日本食品添加物協会より入手した。オープンカラムの担体は、シリカゲル PSQ100(富士シリシア化学製)並びに Sephadex LH-20(アマシヤムバイオサイエンス製)を用いた。NMR 溶媒は MERCK 製 Chloroform-*d*1 99.8% 及び MERCK 製 Pyridin-*d*5 99.8%を用いた。TLCは MERCK 製 Silica gel 60 F254(20 cm×20 cm)を用いた。その他の試薬は、全て試薬特級品を用いた。本研究において、動物由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

装置及び測定条件 分取 HPLC は JASCO 製 HPLC system (ポンプ: PU-1580, 紫外可視検出器: UV-1575, 示差屈折検出器: RI-1530) に、レコーダーとして SEKONIC SS-250F を接続したのを用いた。

NMR スペクトルは、JEOL JNM-ECP600 を用いた。¹H 及び ¹³C NMR のケミカルシフト値は *d*

溶媒ピーク(Chloroform-*d*1: δ_{H} ; 7.26, δ_{C} ; 77.0, Pyridin-*d*5: δ_{H} ; 8.71 / 7.55 / 7.19, δ_{C} ; 149.9 / 135.5 / 123.5)に対する δ 値(ppm)で示した。

単離した化合物の質量分析(FABMS)は、JEOL JMS-AX500を用いた。FAB イオン化は、positive モード、マトリックスには *m*-Nitrobenzyl alcohol を用いた。

化合物の精製・単離 「ユーカリ葉抽出物」粉末 100 g をヘキサン、酢酸エチル、ブタノールで順次溶媒分画を行った。各画分を濃縮乾固しヘキサン可溶部(0.57 g), 酢酸エチル可溶部(2.5 g), ブタノール可溶部(2.1 g)及び水可溶部(76.3 g)をそれぞれ得た。得られたヘキサン可溶部のうち 284 mg を分取 HPLC[カラム:Inertsil Diol (6.0 mm x 250 mm), 移動相,96%ヘキサン 4% 2-プロパノール; 流速, 1.0 mL/min]に供し, 7 画分(Fr.1A-1G)を得た。Fr.1D は精製せず, 化合物 1(22.1 mg)とした。また, Fr.1G(12.6 mg)のうち 8.7 mg ついて Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー[(13 mm x 450 mm), 移動相, メタノール]による精製を行い, 化合物 2 (2.0 mg)及び 3 (3.8 mg)をそれぞれ単離した。さらに, Fr.1B についてシリカゲルクロマトグラフィー[(18 mm x 300 mm), 移動相 ヘキサン/酢酸エチル]による精製を行い化合物 4 (3.2 mg)を単離した。

C. 研究結果

化合物 1 は, FABMS スペクトルにおいて脱水イオンピーク m/z 223 ($M-H_2O+H$)⁺及び 205 ($M-2H_2O+H$)⁺が観察されたことから, 分子量が 240 と推定され, さらに分子内に 2 個のヒドロキシ基の存在が示唆された。¹H NMR スペクトルにおいて δ_{H} 1.20 (6H, s), 1.11 (3H, s)及び 0.86

(3H, s)より, 4 個のメチル基の存在が示唆された。また, ¹³C NMR より 15 本のシグナルが観察され, DEPT スペクトルより 4 個のメチル基, 6 個のメチレン基, 2 個のメチン基及び 3 個の 4 級炭素の存在が判明した。以上のスペクトルデータより, 1 は eudesman 骨格を有するセスキテルペンと推定され, 文献値⁵⁾との比較により cryptmeridiol と同定した。化合物 2 は, FABMS (m/z 223($M-H_2O+H$)⁺及び 205($M-2H_2O+H$)⁺), ¹H NMR, ¹³C NMR 及び DEPT スペクトルの結果より eudesman 型セスキテルペンと推定された。2 のスペクトルデータは 1 と非常に類似していたが, ¹³C NMR において, 化合物 2 の 14 位のケミカルシフト(δ_{C} 30.3)が化合物 1 (δ_{C} 22.6) と比較し低磁場側へ大きくシフトしていたことから, 2 は 1 の 4 位エピマー体であると示唆された。以上の結果及び文献値⁵⁾との比較により, 2 を 4-*epi*-cryptmeridiol と同定した。化合物 3 は, FABMS スペクトルより脱水イオンピーク m/z 455 ($M-H_2O+H$)⁺及び 437($M-2H_2O+H$)⁺が観察されたことから, 分子量が 472 と推定され, さらに分子内に 2 個のヒドロキシ基の存在が示唆された。¹H NMR スペクトルにおいて, δ_{H} 6.02 (1H, d, $J=10.0$), 5.66 (1H, dd, $J=10.0$, 2.4)にオレフィンプロトンに由来するシグナル, 5 個の 3 級メチル基のシグナル(δ_{H} 1.22 (3H, s), 1.20(3H, s), 1.18(3H, s), 1.01(3H, s)及び 0.90(3H, s)), 2 個の 2 級メチル基のシグナル(δ_{H} 0.98 (3H, d, $J=6.0$), 0.84 (3H, d, $J=6.0$))がそれぞれ観察されたことから, 分子内に 7 個のメチル基の存在が示唆された。また, ¹³C NMR においてオレフィン炭素 2 個(δ_{C} 133.6, 129.3), カルボニル炭素 1 個(δ_{C} 179.3), オキシメチン 1 個(δ_{C} 77.9)及びヒドロキシ基が結合した 4 級炭素 1 個(δ_{C} 89.3)を含む 30 本のシグナルが観察され, DEPT スペクトル

より7個のメチル基, 8個のメチレン基, 8個のメチン基及び7個の4級炭素の存在が判明した. 以上のスペクトルデータより, **3**は ursane 骨格を有するトリテルペンと推定され文献値⁶⁾との比較により,

3, 13β-dihydroxyurs-11-en-28-oic acid と同定した. 化合物 **4** は, FABMS (m/z 204 (M-H₂O+H)⁺), ¹³C NMR 及び DEPT スペクトルの結果より C₁₅H₂₆O の分子式を持つことが判明した. また, ¹H NMR スペクトルにおいて, δ_H 1.20 (3H, s), 1.20 (3H, s) 及び 0.70 (3H, s) より3個のメチル基, δ_H 4.72 (1H, d, $J=1.5$) 及び 4.45 (1H, d, $J=1.5$) よりエキソメチレンの存在が示唆された. 以上の結果及び文献値^{7, 8)}との比較により, **4** をβ-eudesmol と同定した.

化合物 **1**: cryptmeridiol. White needles; C₁₅H₂₈O₂, MW: 240. [α]_D²¹ = -27.3° (c 2.0, CHCl₃); FABMS m/z 223 (M-H₂O+H)⁺ and m/z 205 (M-2H₂O+H)⁺; ¹H NMR [measured at 600 MHz, Chloroform-*d*1]: δ 1.20 (6H, *s*, H-12 and H-13), 1.11 (3H, *s*, H-14), 0.86 (3H, *s*, H-15); ¹³C NMR [measured at 150 MHz, Chloroform-*d*1]: δ 41.0 (C-1), 20.1 (C-2), 43.4 (C-3), 72.3 (C-4), 54.8 (C-5), 21.5 (C-6), 49.9 (C-7), 22.5 (C-8), 44.6 (C-9), 34.5 (C-10), 73.0 (C-11), 27.0 (C-12), 27.3 (C-13), 22.6 (C-14), 18.7 (C-15).

化合物 **2**: 4-*epi*-cryptmeridiol. White needles; C₁₅H₂₈O₂, MW: 240.; [α]_D²¹ = +5.6° (c 1.0, CHCl₃); FABMS m/z 223 (M-H₂O+H)⁺ and m/z 205 (M-2H₂O+H)⁺; ¹H NMR [measured at 600 MHz, Chloroform-*d*1]: δ 1.20 (6H, *s*, H-12 and H-13), 1.17 (3H, *s*, H-14), 1.02 (3H, *s*, H-15); ¹³C NMR [measured at 150 MHz, Chloroform-*d*1]: δ 41.4 (C-1), 18.1 (C-2), 43.8

(C-3), 72.1 (C-4), 51.6 (C-5), 21.3 (C-6), 49.9 (C-7), 22.4 (C-8), 41.5 (C-9), 33.6 (C-10), 73.1 (C-11), 26.8 (C-12), 27.5 (C-13), 30.3 (C-14), 18.7 (C-15).

化合物 **3**: 3β,13β-dihydroxyurs-11-en-28-oic acid. White needles; C₃₀H₄₈O₄, MW: 472.; [α]_D²¹ = +22.0° (c 1.0, CHCl₃); FABMS m/z 455 (M-H₂O+H)⁺ and m/z 437 (M-2H₂O+H)⁺; ¹H NMR [measured at 600 MHz, Pyridin-*d*5]: δ 3.44 (1H, *m*, H-3), 5.66 (1H, *dd*, $J=10.0, 2.4$, H-11), 6.02 (3H, *s*, H-14), 0.90 (3H, *s*, H-23), 1.01 (3H, *s*, H-24), 1.18 (3H, *s*, H-25), 1.20 (3H, *s*, H-26), 1.22 (3H, *s*, H-27), 0.98 (3H, *d*, $J=6.0$, H-29), 0.84 (3H, *d*, $J=6.0$, H-30); ¹³C NMR [measured at 150 MHz, Pyridin-*d*5]: δ 38.2 (C-1), 23.1 (C-2), 77.9 (C-3), 39.4 (C-4), 55.0 (C-5), 17.8 (C-6), 30.9 (C-7), 41.9 (C-8), 53.3 (C-9), 36.5 (C-10), 133.6 (C-11), 129.3 (C-12), 89.3 (C-13), 42.1 (C-14), 27.8 (C-15), 25.8 (C-16), 45.1 (C-17), 60.4 (C-18), 38.1 (C-19), 40.2 (C-20), 31.4 (C-21), 31.9 (C-22), 28.3 (C-23), 15.7 (C-24), 16.1 (C-25), 19.0 (C-26), 18.1 (C-27), 179.3 (C-28), 18.0 (C-29), 19.2 (C-30).

化合物 **4**: β-eudesmol Colorless needles; C₁₅H₂₆O, MW: 240.; [α]_D²² = +31.8° (c 1.0, CHCl₃); FABMS m/z m/z 204, (M-H₂O+H)⁺; ¹H NMR [measured at 600 MHz, Chloroform-*d*1]: δ 1.20 (6H, *s*, H-12 and H-13), 0.70 (3H, *s*, H-14); ¹³C NMR [measured at 150 MHz, Chloroform-*d*1]: δ 41.1 (C-1), 23.5 (C-2), 36.9 (C-3), 151.2 (C-4), 49.8 (C-5), 25.0 (C-6), 49.4 (C-7), 22.3 (C-8), 41.8 (C-9), 35.9 (C-10), 72.9 (C-11), 27.1 (C-12), 27.2 (C-13), 16.3 (C-14), 105.3 (C-15).

D. 考察

「ユーカリ葉抽出物」は、既存添加物収載品目リストに酸化防止剤として、「フトモモ科ユーカリ(*Eucalyptus globulus* LABILL)の葉より、水蒸気蒸留して得られたもの、又はエタノールで抽出して得られたものである。有効成分はβ-ジケトン類である。」と記載されている。また、これまでの同植物中の二次代謝物の研究においては、Fig.5 に示す没食子酸、エラグ酸、macrocarpal 類の存在が報告されている⁹⁻¹³⁾。また、昨年度の報告^{3, 4)}では「ユーカリ葉抽出物」にはエラグ酸が含まれず、その主成分がフラボノール配糖体であることを明らかにしている (Fig.6)。本研究では「ユーカリ葉抽出物」の低極性画分の成分研究に着手しテルペン類 4 種を単離した。また、有効成分とされているβ-ジケトン類の含有の有無についても検討を行った。Osawa らは以前ユーカリ葉のリーフワックス中の低極性部に Fig.5 に示すβ-ジケトン類 (16-Hydroxy-18-tritriacontanone, 4-Hydroxy tritriacontane-16,18-dione) が含まれていることを明らかにしている¹³⁾。そこで、ケトン、アルデヒドを検出する *o*-Dianisidine 試薬及びβ-ジケトン類を deep yellow (山吹色) に発色する Fast Blue B 試薬¹⁴⁾を用いて、Fr.1 シリーズの TLC 分析を行った。その結果、Fr.1A 及び Fr.1B において両発色試薬に対する陽性スポットが観察された (Fig.4)。これらの画分のうち Fr.1A に含まれる陽性スポット群を単離したが、その総収量は 0.5 mg であり、これ以上の詳細な検討は行わなかった (data not shown)。また、Fr.1B の分画より化合物 4 を単離したが、この画分におけるβ-ジケトン類の有無については現時点では明らかにできていない。

本実験結果及び昨年度の結果^{3, 4)}を考慮す

ると、既存添加物収載品目リストの記載事項をより正確にするため、一部改訂する必要があると考えられた。植物体に含有される抗酸化活性を示す二次代謝物は多岐に渡る。酸化防止剤としての食品添加物の用途を踏まえると、本研究及び昨年度の研究で同定された化合物群の抗酸化能を測定し、同食品添加物中の活性本体を解明することも今後の検討課題であると考えられた。

E. 結論

既存添加物「ユーカリ葉抽出物」製品に含まれる化合物の検討を行い、低極性部にセスキテルペン類及びトリテルペンが含まれることを明らかにした。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局長通知書“別添 1 既存添加物名簿収載品目リスト”(平成 8 年 5 月 23 日). 衛化第 56 号(1996)

- 2) 和田浩志編集, “原色 牧野和漢薬草大図鑑”, 北陸館, 2002, p329
- 3) 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全性高度化推進事業 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 平成 16 年度総括・分担研究報告書, p104-112
- 4) 酒井信夫, 戸井田敏彦, 川原信夫, 合田幸広, 日本食品化学学会誌 2005, 12, 135-139
- 5) Ando M.; Arai K.; Kikuchi K.; Isogai K. *J. Nat. Prod.* 1994, 57, 1189-1199
- 6) Hao H.; Han-Dong S.; Shou-Xun Z. *Phytochemistry* 1996, 42, 1665-1666
- 7) Dieter R.K.; Kinnel R.; Meinwald J.; Eisner T. *Tetrahedron lett.* 1979, 19, 1645-1648
- 8) Adinarayana D.; Syamasundar K.V. *Phytochemistry* 1982, 21, 1083-1085
- 9) Amakura Y.; Umino, Y.; Tsuji S.; Ito H.; Hatano T.; Yoshida T.; Tonogai Y. *Food Chemistry* 2002, 77, 47-56
- 10) Kim J.P.; Lee I, K.; Yun B. S.; Chung, S.H.; Shim, G.S.; Koshino, H.; Yoo, I. D. *Phytochemistry* 2001, 57, 587-591
- 11) Murata M.; Yamakoshi Y.; Honma S.; Aida K.; Hori K.; Ohashi Y. *Agric. Biol. Chem.* 1990, 54, 3221-3226
- 12) Yamakoshi Y.; Murata M.; Shimizu A.; Honma S. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992, 56, 1570-1576
- 13) Osawa T.; Namiki M. *J. Agric. Food Chem.* 1985, 33, 777-780
- 14) Dierick P. J. *Phytochemistry* 1973, 12, 1498-1499

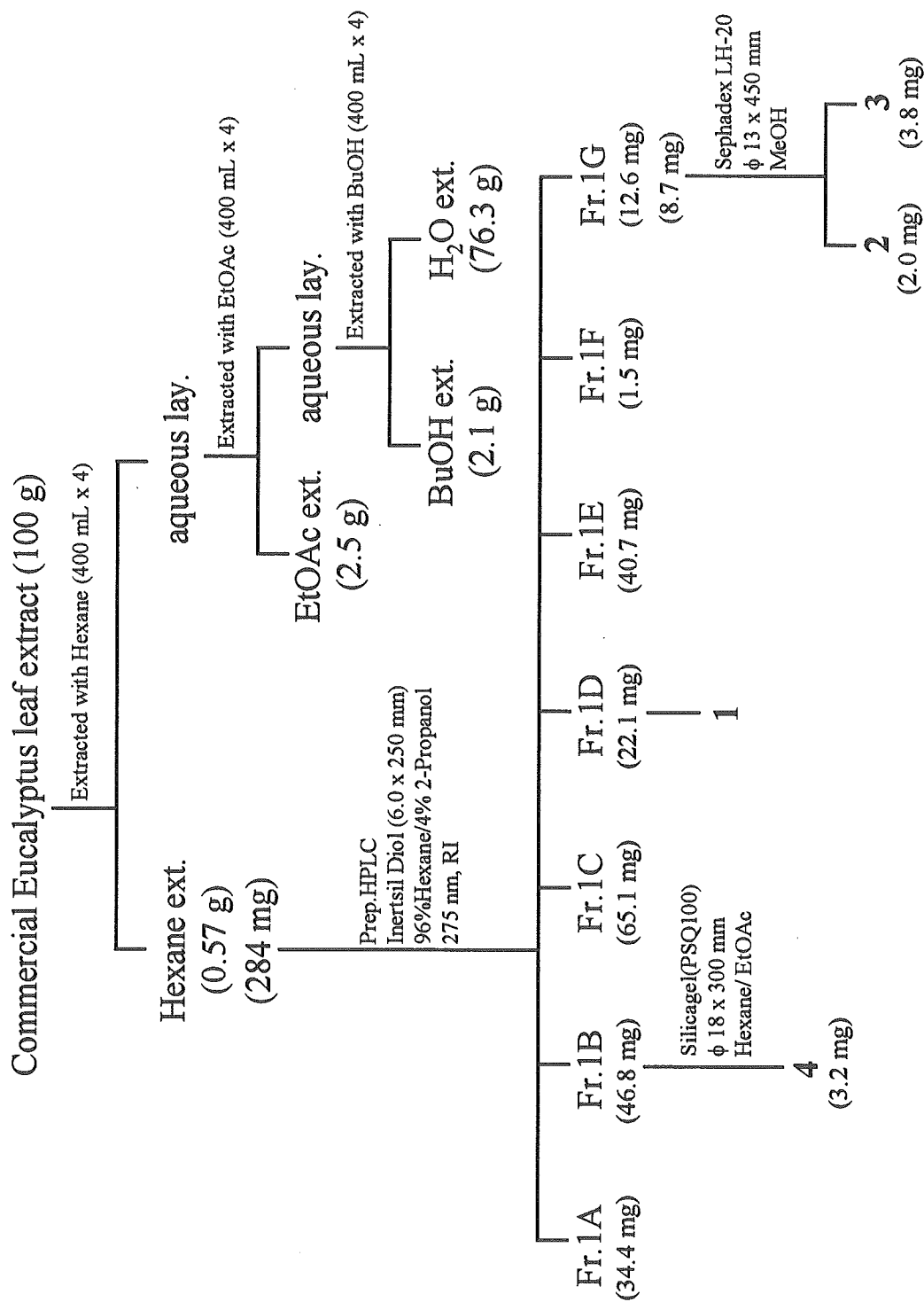
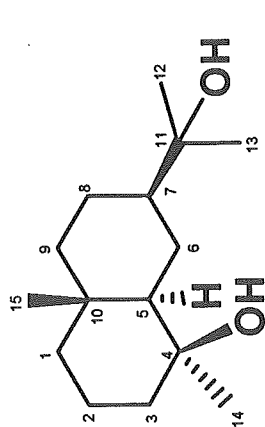
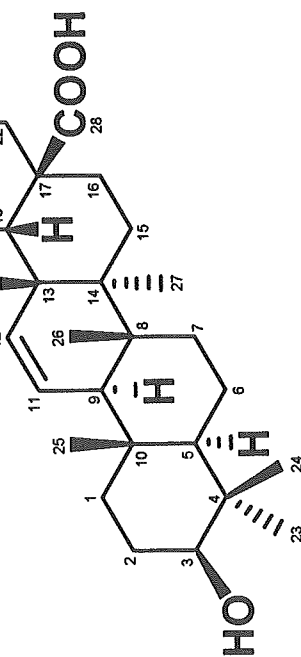


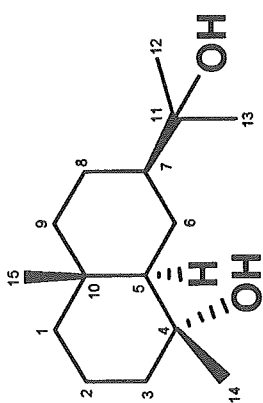
Fig. 1 Isolation of compounds from hexane extract of commercial Eucalyptus leaf extract



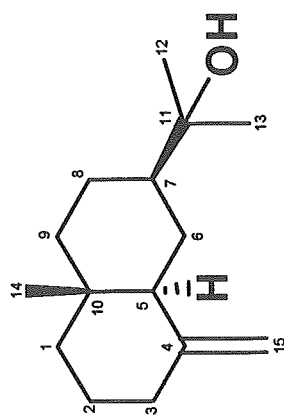
Compound 2
(4-*epi*-cryptmeridiol)



Compound 3
(3 β ,13 β -dihydroxyurs-11-en-28-oic acid)



Compound 1
(cryptmeridiol)



Compound 4
(β -eudesmol)

Fig.2 Chemical structures of compounds from hexane extract of commercial Eucalyptus leaf extract

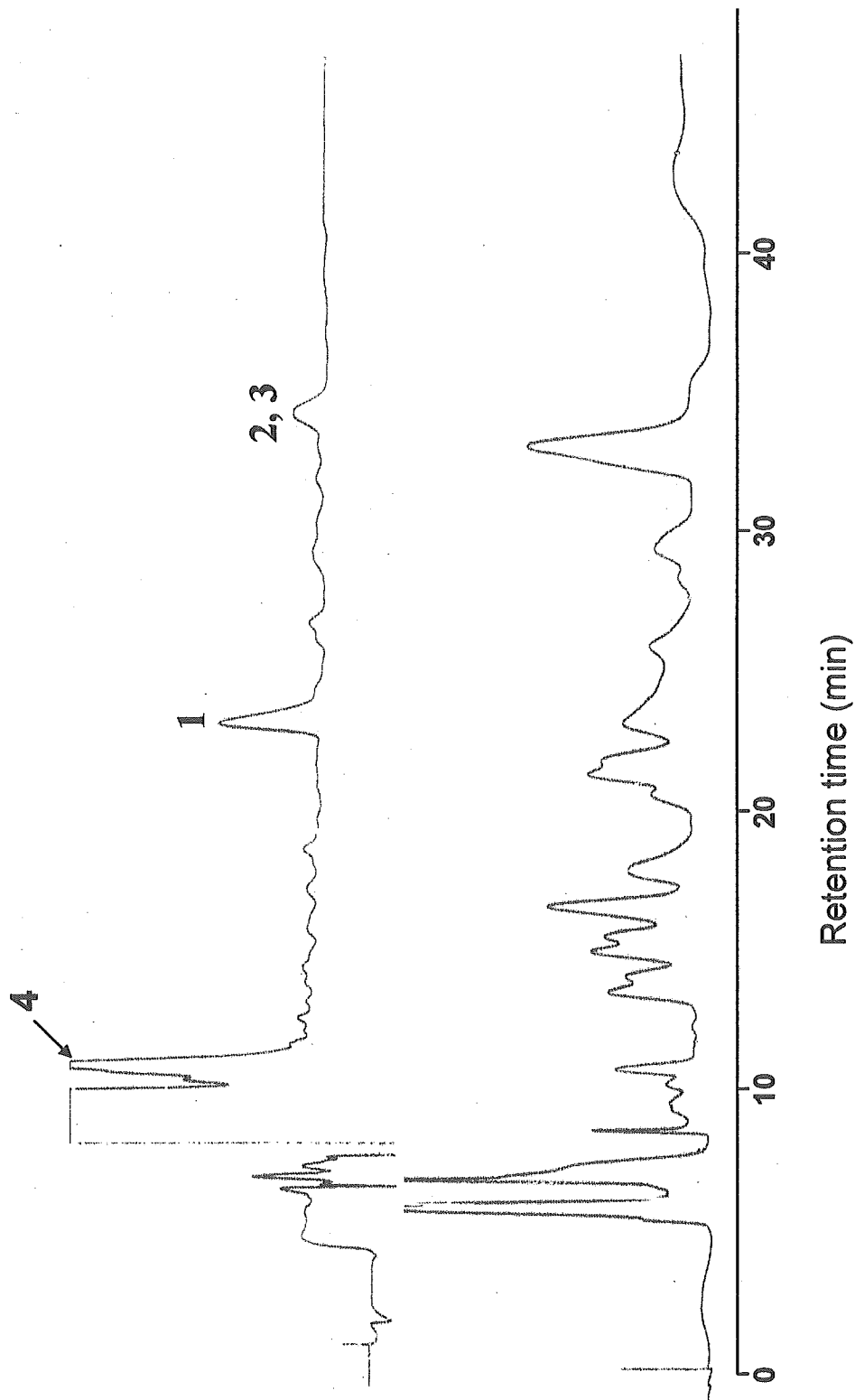


Fig.3 Chromatograms of hexane soluble fraction of commercial Eucalyptus leaf extract

RI detection (upper), UV detection (275 nm, lower)

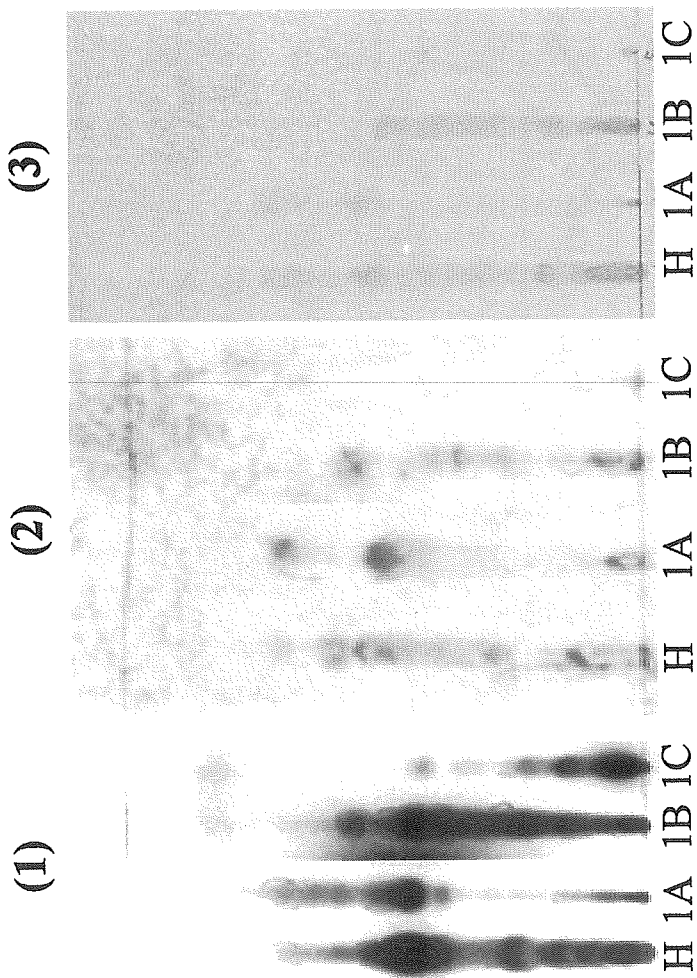


Fig.4 TLC analysis of Fr.1A-1C

Detection reagent (1) Molybdotophosphoric acid (2) Fast Blue B (3) *O*-Dianisidine
 Plate: Silica gel Mobile phase: Hexane/ EtOAc 2/1
 H: Hexane extract

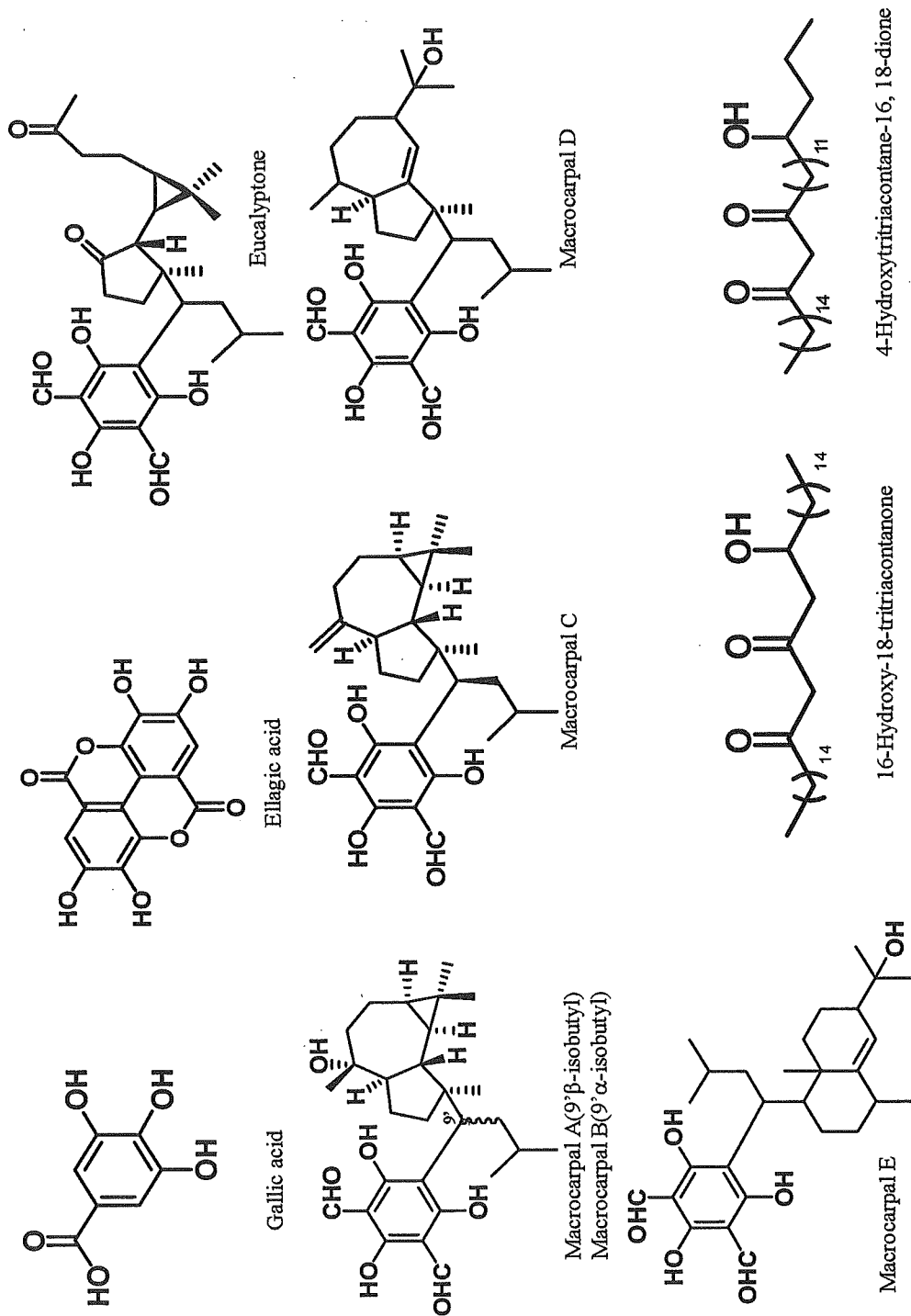


Fig. 5 Chemical structures of reported compound from Eucalyptus leaf extract and leaf waxes

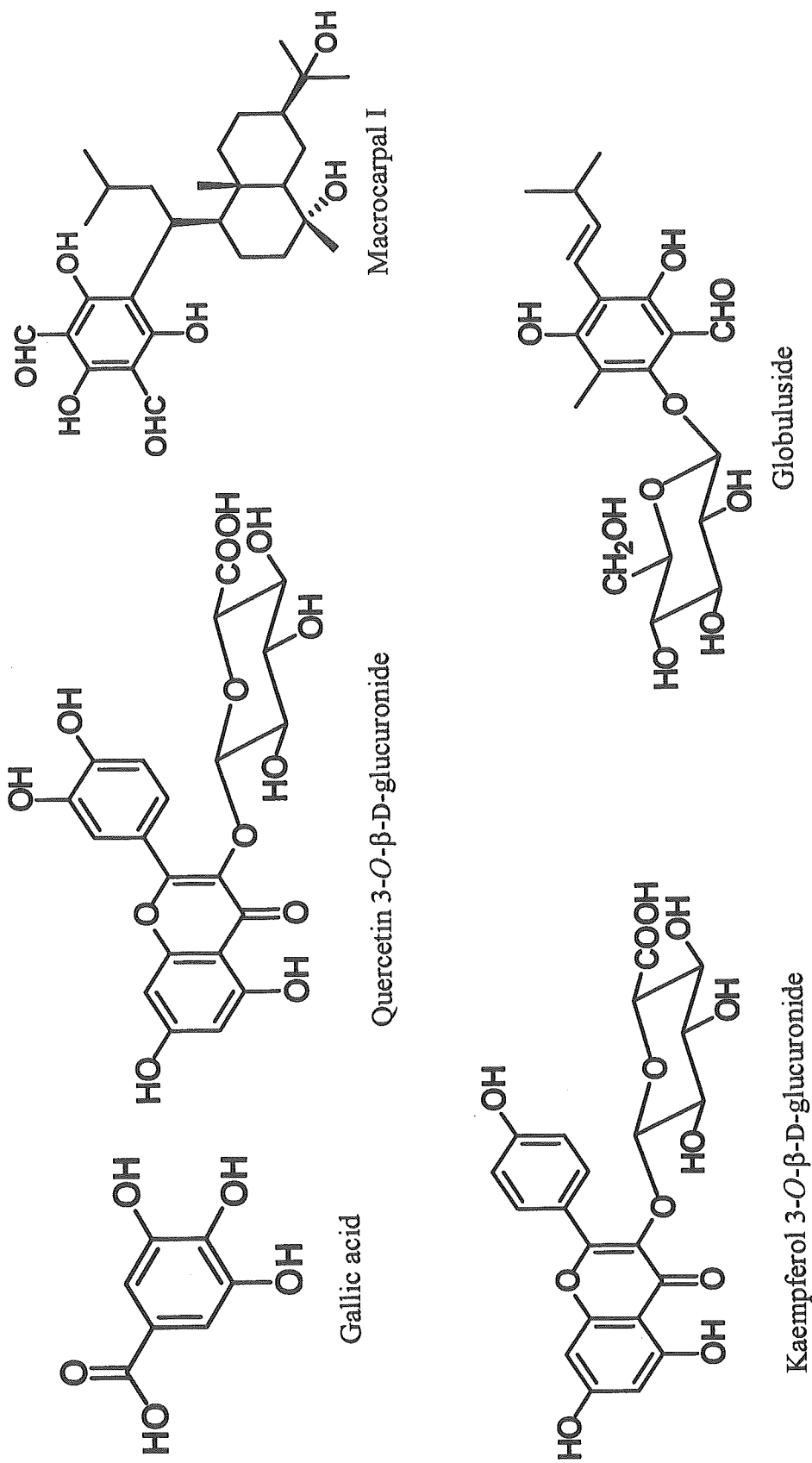


Fig. 6 Chemical structures of reported compound from commercial Eucalyptus leaf extract

5. 増粘多糖類等の成分と品質評価法に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

フクロノリ抽出物の成分に関する研究

分担研究者 李 貞範 富山大学薬学部助手

研究要旨

フクロノリ抽出物を透析および塩化セチルピリジンで分画し、GPC、セルロースアセテート膜電気泳動、および構成糖分析を実施したところ、主にガラクトースと3,6-アンハイドロガラクトースで構成される多糖が含まれていた。

A. 研究目的

フクロノリ抽出物は、「フノリ科フクロノリ (*Gloiopeltis furcata* POSTEL et RUPR) の全藻から得られた、多糖類を主成分とするものである。ショ糖、ブドウ糖、乳糖、デキストリン又はマルトースを含むことがある。」と現在定義されている。しかしながら、基原植物としてあげられてる *G. furcata* の和名はフクロフノリであり、実際に流通している試料も、フクロフノリ由来である。その主成分である多糖類を明らかにすることで、規格制定のための基礎資料を提供することを目的に、研究を行った。

B. 研究方法

試料：成分分析に供したフクロノリ抽出物は日本食品添加物協会を通じて入手した。
装置及び測定条件：HPLC は島津製作所製 Shimadzu Prominence システム（ポンプ：LC-20AD、カラムオープン：CTO-20A、システムコントローラー：CBM-20A）および LabSystem 製 RI 検出器を用い、データ処理は島津製作所製 LC ワークステーション（LCsolution）により解析した。GPC は下記条件で実施した。

カラム：TSKgel GMPW_{XL} (7.6 mm × 300 mm × 2, Tosoh 社製)、移動相：0.1 M NaNO₃、流速：0.6 mL/min、カラム温度：40℃、検出：RI

GC は GL サイエンス社製 GC-353 ガスクロマトグラフに、インテグレーターとして日立社製 D-7000 を接続したものをを用い、下記条件で測定した。

カラム：SP-2330 (3.2 mm × 30 m, Spelco 製)、キャリアーガス：N₂、検出器：FID、カラム温度 200-240℃ (4℃/min)

GC-MS は島津製作所製 QP-5000 システムを用いて、下記の条件で実施した。

カラム：DB-1MS (3.2 mm × 30 m, J&W 製)、キャリアーガス：He、検出器：MS、カラム温度

試料の分画：フクロノリ抽出物 (2 g) を蒸留水 (200 mL) に溶解後、透析チューブ (和光純薬、シームレスセルロースチューブ) を用いて蒸留水に対して透析した。透析内液および外液をそれぞれ濃縮後、凍結乾燥し、高分子量画分および低分子量画分 (163.7 mg) を得た。高分子量画分 (803.2 mg) を蒸留水 (50 mL) に溶解後、5%塩化セチルピリジン溶液 (100 mL) に攪拌しながら

ら滴下した。遠心分離により上清と沈殿を分画後、上清には3倍量のEtOHを加え、生じた沈殿を回収後、蒸留水に溶解し透析した。透析内液を凍結乾燥しCS画分とした。一方、沈殿部には2 M KCl (50 mL)を加え抽出し、遠心分離により可溶部を得た。これに3倍量のEtOHを加え、生じた沈殿を蒸留水に溶解後、透析、凍結乾燥しCP1画分を得た。2 M KCl 不溶画分には4 M KCl (50 mL)を加え、100°Cに加熱し、可溶化した。これを3倍量のEtOHに加え、生じた沈殿を回収した。蒸留水に溶解後、透析、凍結乾燥しCP2画分を得た。

セルロースアセテート膜電気泳動：試料溶液 (1 mg/mL) をセルロースアセテート膜に1 μ L、また両端にガイドマーカとしてインディゴトリスルフォネートを塗布し、0.1 M ピリジン/0.47 M.ギ酸緩衝液 (pH 3.0) を用い、1 mA/cm で泳動した。泳動終了後、0.5%トルイジンブルーで10分間染色し、7% AcOH で数回脱染色を行った。

単糖組成分析：試料 (X mg) に0.1 M トリフルオロ酢酸 (TFA, 0.5 mL) を加え、80°C で3時間加水分解した。TFA を留去後、NaBH₄ (10 mg/mL in 1 M アンモニア水、0.5 mL) を加え、室温で1時間還元し、数滴の酢酸を加え過剰のNaBH₄を分解後、10% AcOH/MeOH (2 mL) を加え濃縮乾固する操作を3回、次いでMeOH (2 mL) を加え濃縮乾固する操作を3回行った。次に2 M TFA (0.5 mL) を試料に加え、120°C で1時間加水分解を実施し、NaBH₄ で還元する操作を行った。得られたアルジトールは1-メチルイミダゾール (0.1 mL) と無水酢酸 (2 mL) によりアセチル化した。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、クロロホルム層を乾固した。得られたアルジトールアセテート誘導体はGCおよびGC-MSにて

分析した。

分子量の測定：試料溶液 (1 mg/mL) をGPCにて分析した。検量線は分子量既知のプルラン (Shodex) を用いて作成した。

C. 研究結果

フクロノリ抽出物より、透析により高分子量画分 (FH, 1.85 g) と低分子量画分 (FL, 163.7 mg) を得た。FH画分 (802 mg) について、塩化セチルピリジンをを用い、4級アンモニウム塩を形成させ、分画を進めた。4級アンモニウム塩を形成しない画分 (CS画分, 3.9 mg) と得られた沈殿について2 M KCl および4 M KCl で順次抽出し、それぞれに対する可溶性画分 (CP1, 122.1 mg およびCP2画分, 634.4 mg) を得た。それぞれの画分についてGPCを行ったところ、重量平均分子量 (Mw) は 1.62×10^6 , 2.75×10^6 , および 1.42×10^6 であった (Fig. 1)。

次にセルロースアセテート膜電気泳動で分析した結果、Fig. 2に示したように泳動された。CP2画分では濃いバンドが認められ、このバンドが主要な多糖であることが予想された。また、FH画分とCS画分においても同じ位置にバンドが検出された。

次にCP1及びCP2画分について構成糖分析を実施した (Fig. 3)。CP1画分はガラクトースと3,6-アンハイドロガラクトースを1:0.03の比で含むほか、まだ同定に至っていないがいくつかの部分メチル化糖と思われる糖を含んでいた。一方、CP2画分はガラクトースと3,6-アンハイドロガラクトースを1:0.26の比で含むほか、やはり少量の部分メチル化糖と思われる糖を含んでいた。

D. 考察

フクロノリ抽出物には、数種の多糖が含

まれていることが推察された。CS 画分は量も少なく、GPC および電気泳動のパターンが CP2 画分に類似していることから、微量に混入したものと考えられた。CPC は酸性多糖を沈殿させる試薬であり、中性多糖は沈殿しない。従って、本試料にはデンプンのような中性多糖の混入は認められなかった。CP1 および CP2 画分については、今後より詳細に解析を実施する。

E. 結論

フクロノリ抽出物にはガラクトースや 3,6-アンハイドログラクトースを含む多糖が含まれていた。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

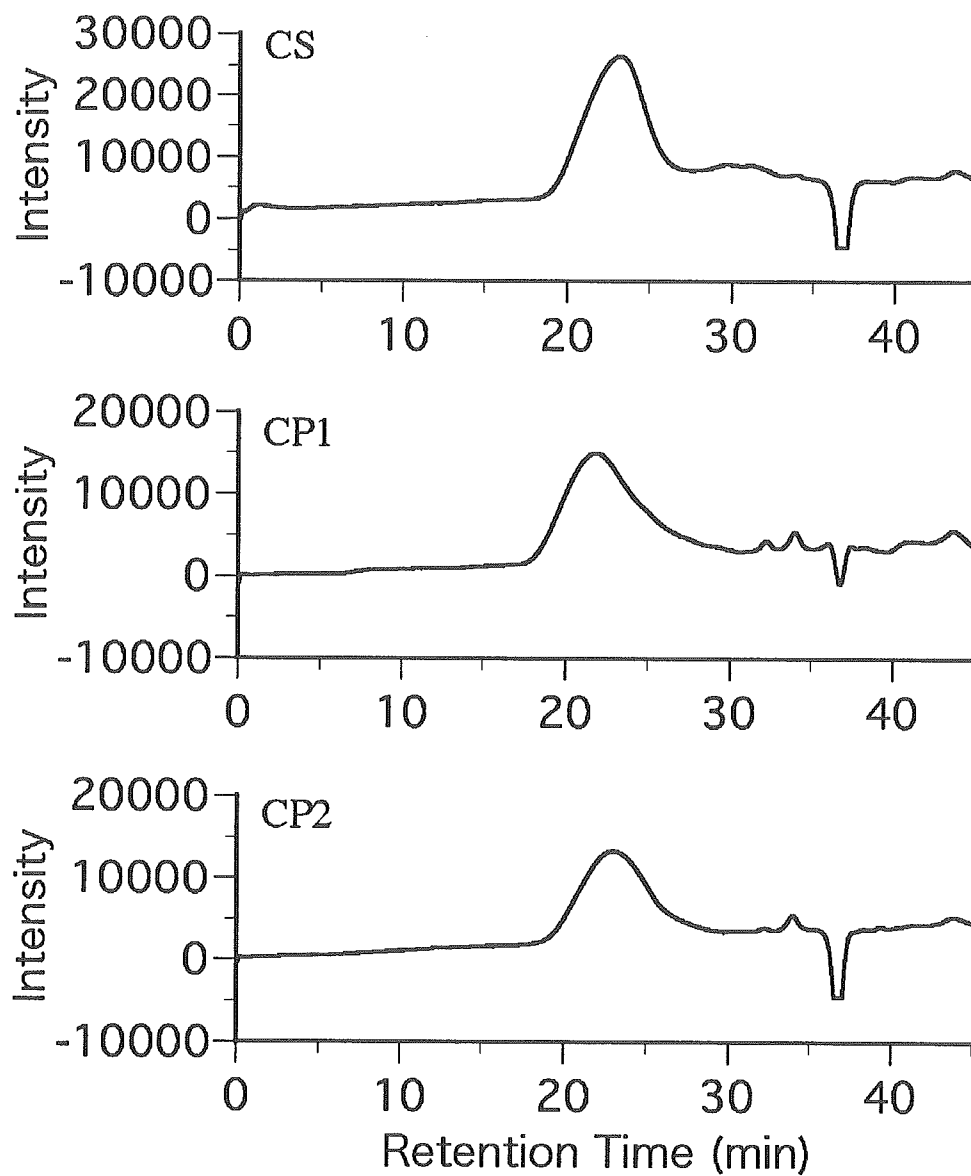


Fig. 1. GPC of CS, CP1, and CP2 Fractions.

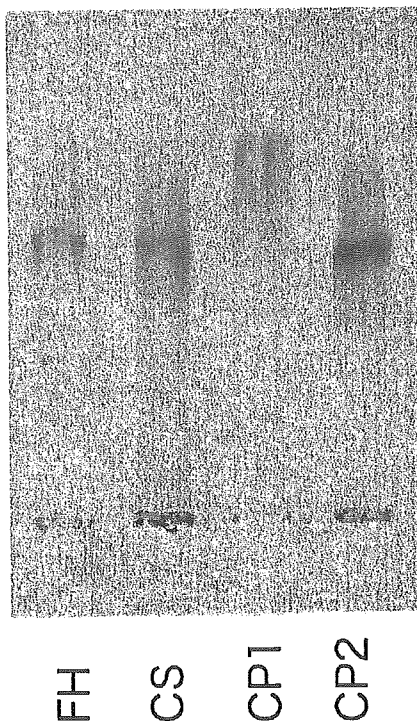


Fig. 2. Cellulose Acetate Membrane Electrophoresis.

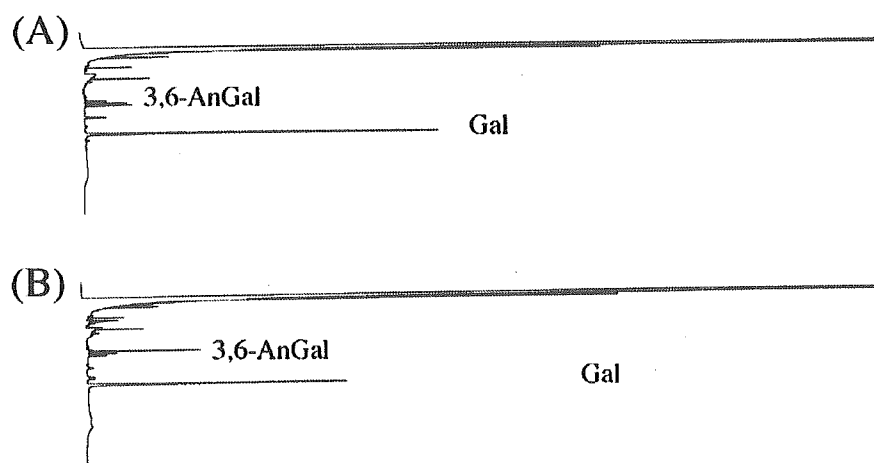


Fig. 3. GC chromatograms of (A) CP1 and (B) CP2 fraction.

AnGal: 3,6-anhydrogalactitol peracetate, Gal: galactitol peracetate.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

精製カラギナンの成分に関する研究

分担研究者 李 貞範 富山大学薬学部助手

研究要旨

精製カラギナン製品を分画し、それぞれの画分について GPC、セルロースアセテート膜電気泳動、構成糖分析を実施したところ、 κ -カラギナンなど数種の多糖の存在が推察された。

A. 研究目的

精製カラギナンは「イバラノリ科イバラノリ属の全藻より、熱時水酸化カリウムで処理し、中和し、乾燥粉碎して得られたものである。」と定義されている。本研究では、カラギナンの規格制定のための基礎資料を提供することを目的に、研究を行った。

B. 研究方法

試料：成分分析に供した精製カラギナン製品は日本食品添加物協会を通じて入手した。装置及び測定条件：HPLC は島津製作所製 Shimadzu Prominence システム（ポンプ：LC-20AD、カラムオーブン：CTO-20A、システムコントローラー：CBM-20A）および LabSystem 製 RI 検出器を用い、データ処理は島津製作所製 LC ワークステーション（LCsolution）により解析した。GPC は下記条件で実施した。

カラム：TSKgel GMPW_{XL}（7.6 mm × 300 mm × 2, Tosoh 社製）、移動相：0.1 M NaNO₃、流速：0.6 mL/min、カラム温度：40℃、検出：RI

GC は GL サイエンス社製 GC-353 ガスクロマ

トグラフに、インテグレーターとして日立社製 D-7000 を接続したものをを用い、下記条件で測定した。

カラム：SP-2330（3.2 mm × 30 m, Spelco 製）、キャリアーガス：N₂、検出器：FID、カラム温度 200-240℃（4℃/min）

GC-MS は島津製作所製 QP-5000 システムを用いて、下記の条件で実施した。

カラム：DB-1MS（3.2 mm × 30 m, J&W 製）、キャリアーガス：He、検出器：MS、カラム温度

試料の分画：カラギナン（2 g）を蒸留水（200 mL）に溶解後、透析チューブ（和光純薬、シームレスセルロースチューブ）を用いて蒸留水に対して透析した。透析内液および外液をそれぞれ濃縮後、凍結乾燥し、高分子量画分（1.1 g）および低分子量画分（0.9 g）を得た。次に、高分子量画分を蒸留水に溶解後、終濃度が 0.2 M になるように 2 M KCl を攪拌しながら加え、ゲルを形成させた。生じたゲルと可溶部を遠心分離により分離し、ゲルは蒸留水に再溶解後、透析し、凍結乾燥した。可溶部も透析後、凍結乾燥した。