

ずつ添加したサンプルを調製し、上述 2. と同様の方法で分析を行いピークの増強を確認することにより、Fig. 4 のようにピークを同定した。

この結果から、

- ① 紫芝に含まれるトリテルペノイドとして炭素数 27 の lucidenic acid が主要のものであること
- ② 本研究室の赤芝の分析方法では、紫芝においては、ピークの重複が複数見られるため、紫芝の分析には適していないこと
- ③ まだ同定できていない主要ピークが複数あることから、紫芝の成分の更なる分離・分析が必要なことが示唆された。

#### D. 考察

紫芝に含まれる成分の特徴として、赤芝 (*Ganoderma lucidum* Karst.) と同様に ganodermanontriol を多量に含んでいるが、lanostane 型トリテルペンの 24 位、25 位の結合が切断した lucidenic acid 誘導体が赤芝より顕著に多く含まれており、今回新規化合物 4 種を単離、構造決定した。これらは、20(21)-dehydro-lucidenic acid A, 20-hydroxylucidenic acid N, 20(21)-dehydro-lucidenic acid N, 20-hydroxylucidenic acid N と命名した。

中国では赤芝と紫芝を比べた場合、紫芝の方が生産量は少なく、高価で取引されている。赤芝の研究は多いが紫芝に関して殆ど報告は無い。霊芝の苦味成分に関するこれまでの研究から、luci-denic acid 型トリテルペンは ganoderic acid 型のトリテルペンより苦味は強いとされ、今回得られた化合物の苦味活性に興味を持たれる。

#### E. 結論

紫芝に含まれるトリテルペンの分析結果から、赤芝に含まれる成分と異なる化合物を含んでいる事が示唆され、分画を行い 4 種の新規化合物を単離、

構造決定した。

#### 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

1. 佐藤直人、高江静、馬 超美、服部征雄: 紫芝 *Ganoderma chinense* の新規トリテルペノイド成分、日本薬学会第 127 年会、2007. 3. 28-30、富山。

#### 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) EI-Mekkawy S., Meselhy M.R., Nakamura N., Tezuka Y., Hattori M., Kakiuchi N., Shimotohno K., Kawahata T., Otake T., *Phytochemistry*, **49**,1651–1657 (1998)
- 2) Komoda Y., Sekigawa Y., Sato Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**,531–533 (1989)
- 3) Koyama K., Imaizumi T., Akiba M., Kinoshita K., Takahashi K., Suzuki A., Yano S., Horie S., Watanabe K., Naoi Y., *Planta Med.*, **63**,224–227 (1997)
- 4) Kohoda H., Tukumoto W., Sakamoto K., Fuji M., Hirai Y., Yamasaki K., Komoda Y., Nakamura H., Ishihara S., Uchida M., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**,1367–1374 (1985)

- 5) Min B. S., Gao J. J., Hattori M., Lee H. K., Kim Y. H., *Planta Med.*, **67**, 811 – 814 (2001)
- 6) Min B. S., Nakamura N., Miyashiro H., Bae K. H., Hattori M., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1607 – 1612 (1998)
- 7) Min B. S., Gao J. J., Nakamura N., Hattori M., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1026 – 1033 (2000)
- 8) Gao J. J., Min B. S., Ahn E. S., Nakamura N., Lee H. K., Hattori M., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 837 – 840 (2002)
- 9) Gao J. J., Nakamura N., Min B. S., Hirasawa K., Zuo F., Hattori M., *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 688 – 695 (2004)

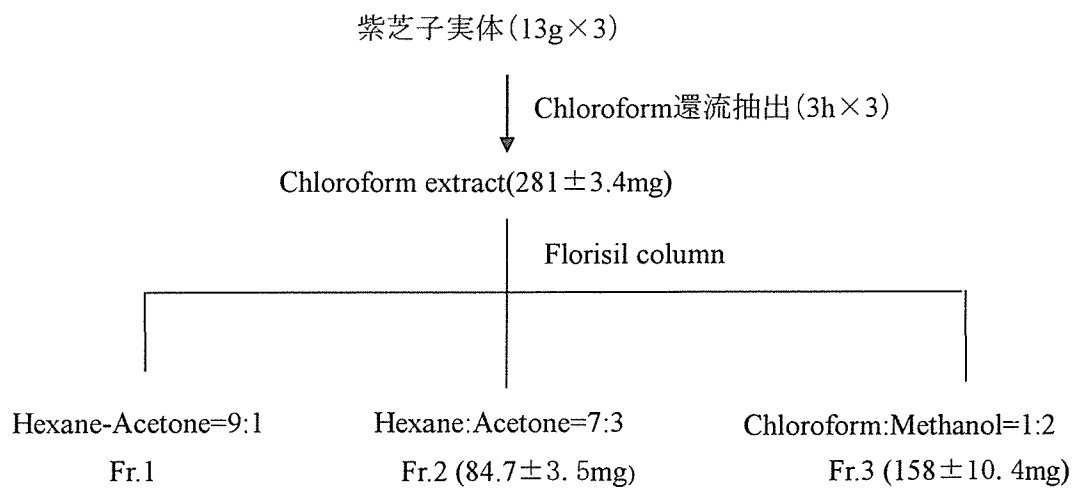
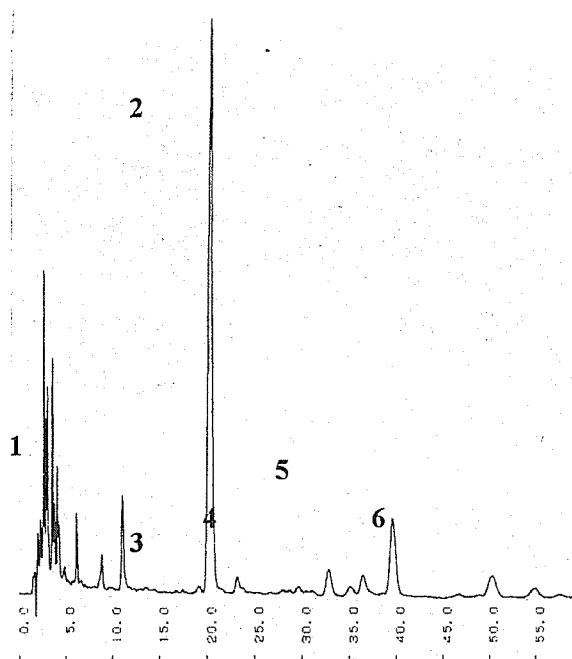
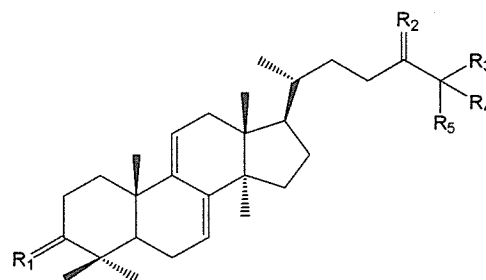
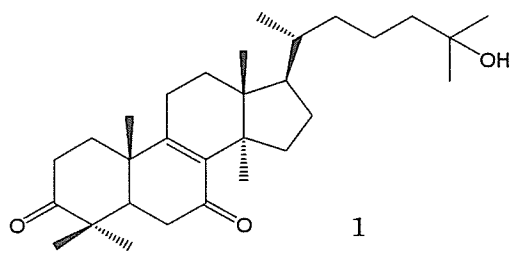


Chart 1 分析用紫芝エキスサンプルの調製

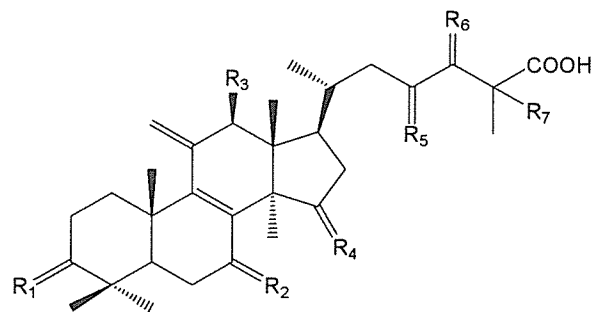
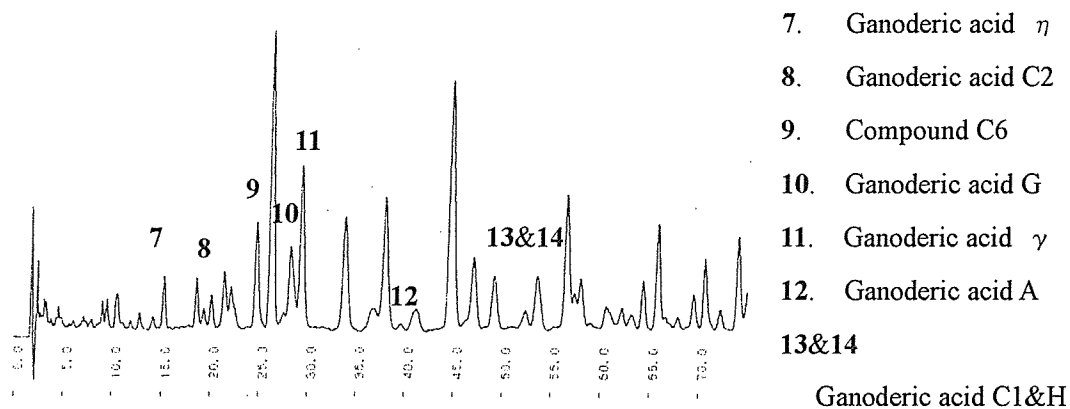


1. Lucidumol A
2. Ganodermanontriol
3. Ganoderatriol
4. Lucidumol B
5. Ganoderiol F
6. Ganodermanondiol



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
2	O	α-OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
3	β-OH	Δ <sup>24(25)</sup>		CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH
4	β-OH	α-OH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
5	O	Δ <sup>24(25)</sup>		CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH
6	O	α-OH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

Fig. 1 Ganoderma アルコール画分のクロマトグラムと成分の構造



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
7	β-OH	β-OH	β-OH	O	β-OH	Δ <sup>24(25)</sup>	
8	β-OH	β-OH	α-OH	H <sub>2</sub>	O	H <sub>2</sub>	H
9	β-OH	O	O	OH	O	H <sub>2</sub>	H
10	β-OH	β-OH	β-OH	O	O	H <sub>2</sub>	H
11	O	β-OH	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	β-OH	Δ <sup>24(25)</sup>	
12	O	β-OH	α-OH	H <sub>2</sub>	O	H <sub>2</sub>	H
13	O	β-OH	H <sub>2</sub>	O	O	H <sub>2</sub>	H
14	β-OH	O	β-OAc	O	O	H <sub>2</sub>	H

Fig. 2 Ganoderma 酸画分のクロマトグラムと成分の構造

Table.1 紫芝に含まれる各トリテルペン成分の量

Constituent	含有量[ $\mu$ g/g]
Lucidumol A (1)	100.6 $\pm$ 14.3
Ganodermanontriol (2)	507.1 $\pm$ 33.2
Ganodermatirol (3)	10.5 $\pm$ 5.6
Lucidumol B (4)	7.0 $\pm$ 5.4
Ganoderiol F (5)	125 $\pm$ 8.5
Ganodermanondirol (6)	65.3 $\pm$ 7.5
Total alcohols	815.6 $\pm$ 56.8

Constituent	含有量[ $\mu$ g/g]
Ganoderic acid $\eta$ (7)	46.7 $\pm$ 4.9
Ganoderic acid C2 (8)	63.2 $\pm$ 9.2
Compound C6 (9)	159.8 $\pm$ 24.1
Ganoderic acid G (10)	134.5 $\pm$ 25.4
Ganoderic acid $\gamma$ (11)	164.5 $\pm$ 24.9
Ganoderic acid A (12)	34.0 $\pm$ 5.7
Ganoderic acid C1&H (13&14)	10.7 $\pm$ 1.3
Total acids	613.2 $\pm$ 91.9

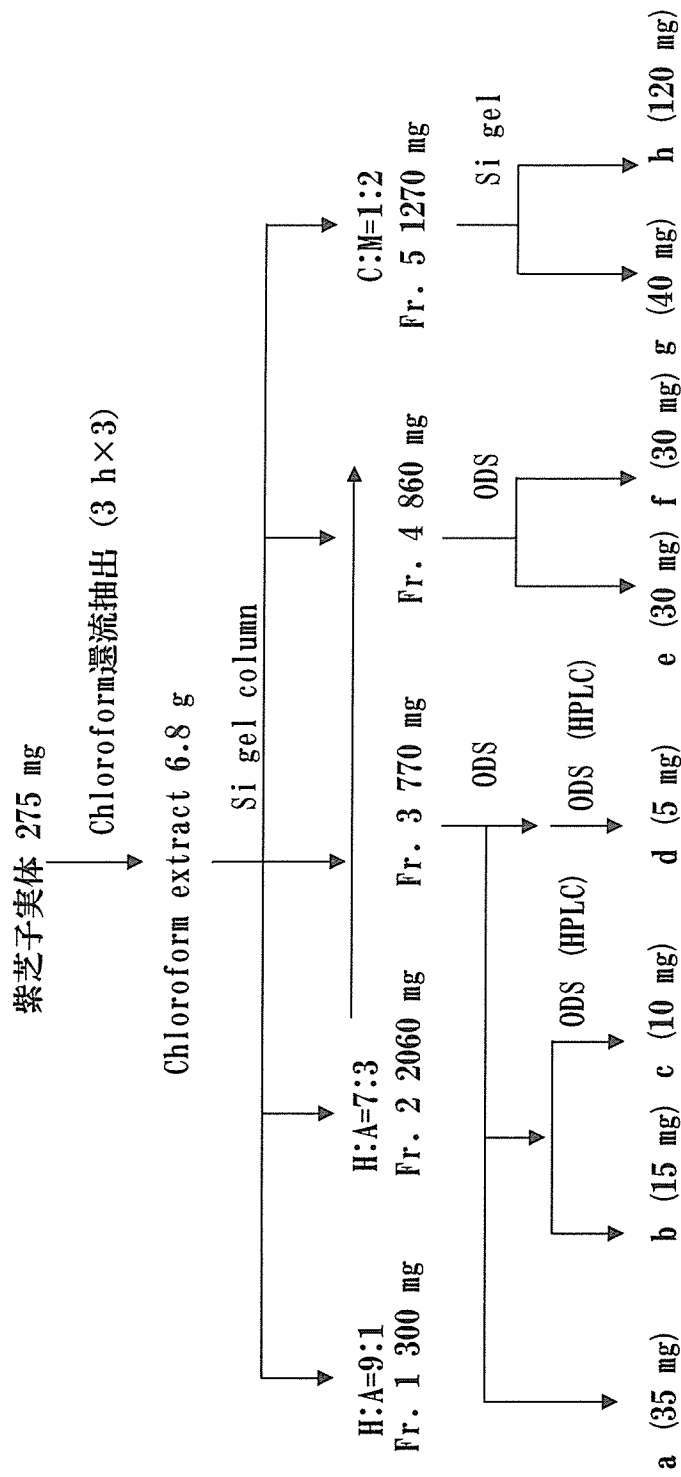
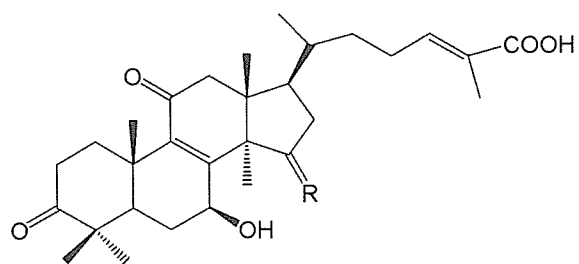
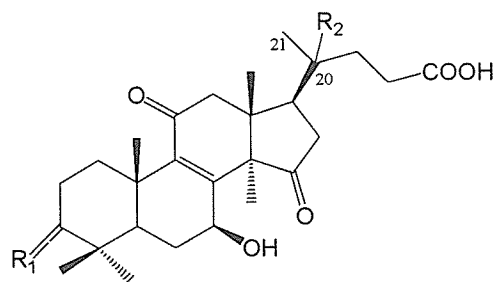


Chart 2 紫芝 Chloroform エキスからの化合物の分離

H: Hexane A: Acetone C: Chloroform M: Methanol



15: R1=O, R2=Δ 20(21)

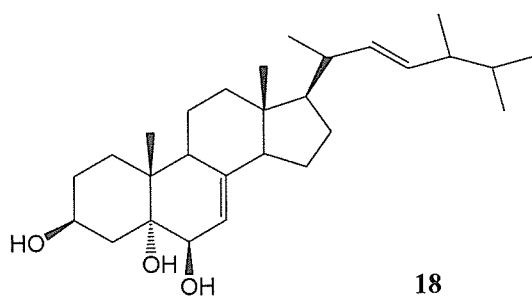
19: R1=O, R2=ξ -OH

20: R1=β -OH, R2=Δ 20(21)

21: R1=β -OH, R2=ξ -OH

16: R=O

17: R=α -OH



18

Fig. 3 紫芝から単離した化合物の構造式



Table 2 紫芝に含まれる新規化合物の  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift (ppm)

Carbon no.	b(16)	c(17)	e(19)	f(20)
1	35.6	35.7	35.8	34.7
2	34.4	34.5	34.1	27.5
3	216.8	218	216.6	78.3
4	46.2	47	46.7	38.6
5	48.8	49	48.8	49.1
6	27.6	29.2	27.6	26.5
7	66.3	69.2	66.2	66.9
8	157.8	159.2	157.4	156.8
9	141.2	140.6	141.1	142.6
10	38.2	38.2	38.2	38.8
11	197.7	200	196.9	197.8
12	50.1	52	49.9	49.1
13	44.9	46.9	45	46
14	59.3	54.1	59.2	58.8
15	218	72.9	215.8	217.7
16	41.2	36.7	35.6	49.1
17	46.7	48.7	49.5	46
18	17.7	17.4	19	18.4
19	18.2	19.6	18.1	18.5
20	35.5	36.2	85.9	143.9
21	18.2	18.5	25.9	112.2
22	34.5	34.8	27.4	31.3
23	25.6	25.9	34.2	32.3
24	144.1	145.3	175	177.3
25	127	127.2		
26	171	172		
27	12.1	12.3		
28	24.7	19.7	25	24.2
29	26.9	27.6	26.9	28.1
30	20.7	20.9	20.7	15.4

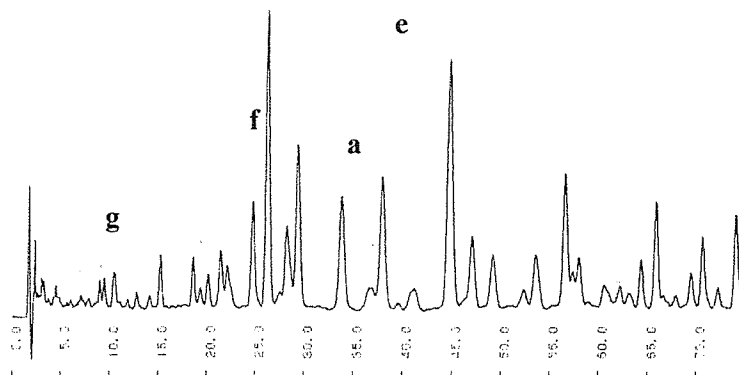


Fig.4 紫芝主要トリテルペノイドのピーク

a: 20(21)-dehydroglucidenic acid A (15)

e: 20-hydroxyglucidenic acid A (19)

f: 20(21)-dehydroglucidenic acid N (20)

g: 20-hydroxyglucidenic acid N (21)

## 5. 増粘多糖類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分画して得られた二種の多糖についてメチル化分析および各種スペクトル解析を行った結果、 $[\rightarrow 3)-6-SO_3-Gal-(1 \rightarrow 4)-3,6-AnGal-(1 \rightarrow)]$ と $[\rightarrow 3)-6-SO_3-Gal-(1 \rightarrow 4)-6-SO_3-Gal-(1 \rightarrow)]$ の繰り返し構造をそれぞれ有する多糖であることが明らかとなった。

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。前年度で本品より二種の多糖体を得て、それぞれがガラクトースと 3,6-アンハイドロガラクトースで構成されることを明らかにした。そこで、これらの構成糖の結合様式についてメチル化分析および各種スペクトル解析を行い、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。これを分画し、CP1 および CP2 の二種の多糖を前年度報告書記載の方法で分画した。  
装置及び測定条件：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：N<sub>2</sub>、検出器：FID、カラム温度  
160-210°C (2°C/min) , 210-240°C (5°C/min) ,  
240°C (9 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-5MS (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 100-200°C  
(2°C/min)、200-300°C (20°C/min)

NMR スペクトルは Varian Unity 500 plus を用い、測定した。試料を 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>O に溶解し、内部標準として DSS を用いた。

IR スペクトルは日本分光製 FT/IR-460 plus を用い、KBr 錠剤法で得た。

メチル化分析：試料を 0.1 M トリエチルアンモニウム塩酸塩水溶液および蒸留水に対して順次透析し、凍結乾燥することで、トリエチルアンモニウム塩を得た。これらの試料 (3 mg) を DMSO (1 mL) に溶解後、NaOH 粉末 (30 mg) を加え、室温で 5 分間攪拌した。ここにヨウ化メチル (0.1 mL) を加え、さらに室温で 10 分間攪拌した。窒素ガス

を当て過剰なヨウ化メチルを除去後、反応液を蒸留水、0.1 M トリエチルアンモニウム水溶液、蒸留水に順番で透析後、凍結乾燥した。この操作を3回繰り返し、メチル化多糖を得た。この試料に4-メチルモルホリン-ボラン (MMB, 80 mg/ml) 0.1 mL と 3 M TFA 0.4 mL を加え 80 °C で 5 分加熱した。放冷後、MMB 溶液 0.1 mL を加え、120 °C で 1 時間加熱した。これを放冷後、MMB 溶液を 0.2 mL 加え窒素気流下 50 °C で乾固した。さらにアセトニトリル 0.5 mL を加え窒素気流下で乾固する操作を行った。得られた部分メチル化アルジトールをアセチル化後、クロロホルム-水で分配し、クロロホルム相を乾燥後、GC および GC-MS で分析した。

#### C. 研究結果

CP-1 および-2 のそれぞれについてメチル化分析を行い、Table 1 に示した結果を得た。この結果、いずれの画分も  $\rightarrow 3, 6\text{-Gal-(1}\rightarrow$  を多量に含むが、 $\rightarrow 4\text{-3, 6-AnGal-(1}\rightarrow$  と  $\rightarrow 4, 6\text{-Gal-(1}\rightarrow$  の量比に大きな違いが認められた。

それぞれの画分について IR スペクトルを測定したところ (Fig. 1)、いずれの画分においても  $1250\text{ cm}^{-1}$  に S=O 伸縮振動に基づく吸収が観測され、硫酸基を含むことが示唆された。また、CP2 画分では  $935\text{ cm}^{-1}$  の吸収からアンハイドロガラクトースの存在が示唆された。

CP2 画分について、各種 NMR スペクトル ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, DQF-COSY, TOCSY, HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC) を測定し、構成糖残基の  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -化学シフト値を Table 2 のように決定した。この結果から、CP2 は  $\rightarrow 4\text{-3, 6-AnGal-(1}\rightarrow 3\text{-6-SO}_3\text{-Gal-(1}\rightarrow$  という繰り返し構造を持つ多糖、フノランであることが明らかとなった。

#### D. 考察

フクロノリ抽出物より主に2種の多糖体を分画した。CP2 画分は各種分析の結果、フノランであることが明らかとなった。一方、CP1 画分は溶解性が極めて悪く、NMR スペクトルの測定は出来なかったが、メチル化分析により Fig. 4 にしめした構造をとることが推測された。

#### E. 結論

フクロノリ抽出物には Fig. 4 に示したようなフノラン  $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-6-SO}_3\text{-Gal-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-3, 6-AnGal-(1}\rightarrow ]$  と  $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-6-SO}_3\text{-Gal-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-6-SO}_3\text{-Gal-(1}\rightarrow ]$  の繰り返し構造を有する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

Table 1. Results of Methylation Analysis of CP1 and CP2

	$\rightarrow 4)-3,6\text{-AnGal-(1}\rightarrow$	$\rightarrow 2,3\text{-Gal-(1}\rightarrow$	$\rightarrow 4,6\text{-Gal-(1}\rightarrow$	$\rightarrow 3,6\text{-Gal-(1}\rightarrow$
CP1	5.5	3.5	36.1	54.9
CP2	38.0	n. d.	2.3	59.7

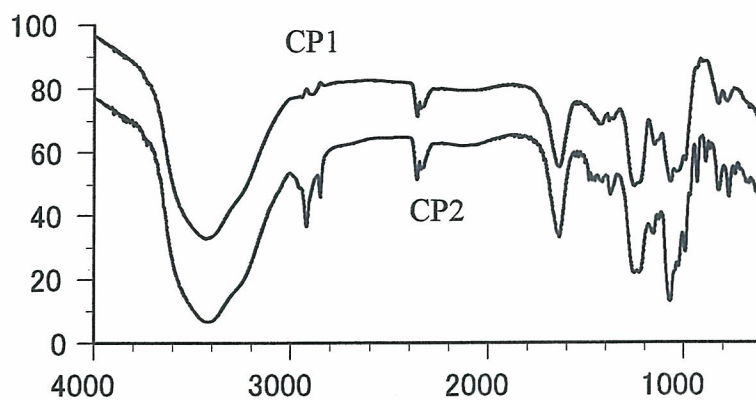


Fig. 1. IR spectrum of CP1 and CP2

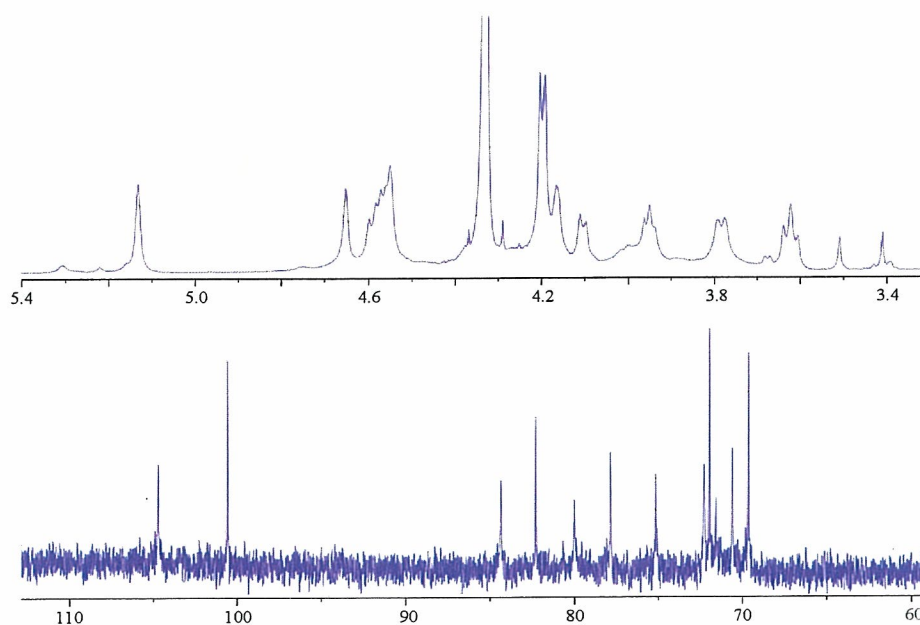


Fig. 2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of CP2

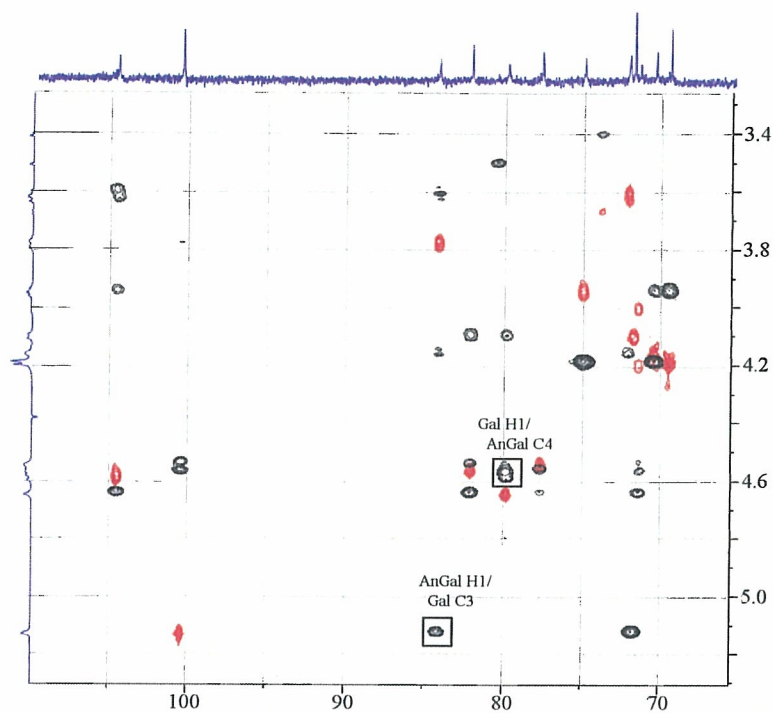


Fig. 3. Overlay of HSQC (Red) and HMBC (Black) spectrum of CP2

Table 2. Chemical shifts of CP2

	1	2	3	4	5	6	
$\rightarrow 3)-\beta\text{-D-6-SO}_3\text{-Gal-(1}\rightarrow$	104.36	72.09	84.04	70.35	74.93	69.51	
	4.592	3.615	3.782	4.160	3.950	4.193	
$\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-3,6-AnGal-(1}\rightarrow$	100.24	71.65	81.93	79.74	77.56	71.46	
	5.129	4.103	4.566	4.646	4.547	4.005	4.204

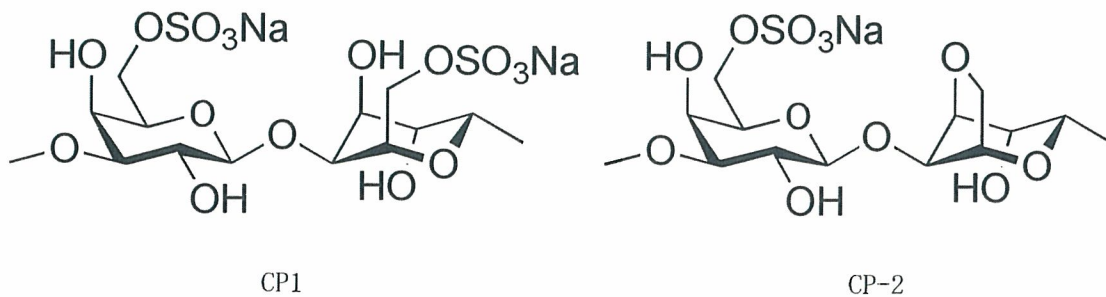


Fig. 4. Disaccharide structures of CP1 and 2

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

精製カラギナンを分画し、それぞれの画分についてメチル化分析および各種スペクトル解析を実施した結果、 $\kappa$ -カラゲナンと  $\kappa/\beta$ -ハイブリッド型カラゲナンが含まれていることが明らかとなった。

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。前年度 KCl 分画により二種の多糖を分画することが出来、それぞれについて構成糖の分析や分子量の測定を実施した。本年度はそれぞれについてメチル化分析や各種スペクトル解析を行い、カラゲ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は日本食品添加物協会を通じて入手した。これを前年度報告書記載の操作に従い、CKP および CKS 画分に分画した。

装置及び測定条件：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 を接続したのを用い、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：N<sub>2</sub>、検出器：FID、カラム温度 160-210°C (2°C/min) , 210-240°C (5°C/min) , 240°C (9 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-5MS (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 100-200°C (2°C/min)、200-300°C (20°C/min)

NMR スペクトルは Varian Unity 500 plus を用い、測定した。試料を 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>O に溶解し、内部標準として DSS を用いた。

IR スペクトルは日本分光製 FT/IR-460 plus を用い、KBr 錠剤法で得た。

単糖組成分析：多糖試料 (1 mg) に 4-メチルモルホリン-ボラン (MMB, 80 mg/ml) 0.1 mL と 3 M TFA 0.4 mL を加え 80 °C で 5 分加熱した。放冷後、MMB 溶液 0.1 mL を加え、120 °C で 1 時間加熱した。これを放冷後、MMB 溶液を 0.2 mL 加え窒素気流下 50 °C で乾固した。さらにアセトニトリル 0.5 mL を加え窒素気流下で乾固する操作を行った。ここに 1-メチルイミダゾール (0.2 mL) および無水酢酸 (2 mL) を加え、室温で 1 時間アセチル化を行った。

メチル化分析：試料を 0.1 M トリエチルアンモニウム塩酸塩水溶液および蒸留水に対して順次透析し、凍結乾燥することで、トリエチルアンモニウム塩を得た。これらの試料 (3 mg) を DMSO (1 mL)



に溶解後、NaOH 粉末 (30 mg) を加え、室温で 5 分間攪拌した。ここにヨウ化メチル (0.1 mL) を加え、さらに室温で 10 分間攪拌した。窒素ガスを当て過剰なヨウ化メチルを除去後、反応液を蒸留水、0.1 M トリエチルアンモニウム水溶液、蒸留水に順番で透析後、凍結乾燥した。この操作を 3 回繰り返して、メチル化多糖を得た。これを上述の単糖組成分析と同様の操作を行い、部分メチル化アルジトールアセテート誘導体を得て、GC および GC-MS で分析した。

### C. 研究結果

メチル化分析を行った結果、CKP および CKS はそれぞれ Table 1 に示した結合様式を有する糖残基で構成されることが判明した。すなわち、CKP は主に  $\rightarrow 4$ )-3, 6-AnGal-(1 $\rightarrow$ と  $\rightarrow 3$ , 6)-Gal-(1 $\rightarrow$ の 2 種の糖残基が、CKS は  $\rightarrow 4$ )-3, 6-AnGal-(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow 3$ )-Gal-(1 $\rightarrow$ と  $\rightarrow 3$ , 6)-Gal-(1 $\rightarrow$ の 3 種の糖残基が含まれていることが示唆された。

それぞれの画分について IR スペクトルを測定したところ、Fig. 1 に示すスペクトルが得られた。いずれの画分も  $1250\text{ cm}^{-1}$  に  $S=0$  伸縮振動に基づく吸収が認められ、硫酸基の存在が確認された。また、どちらの画分についても  $930\text{ cm}^{-1}$  および  $845\text{ cm}^{-1}$  に吸収が認められたことから、3, 6-アンハイドロガラクトースおよび 4 位が硫酸化された D-ガラクトースの存在が示唆された。

次にそれぞれの画分について  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを測定した (Fig. 2)。CKP 画分については、 $104.69$  および  $97.30\text{ ppm}$  に  $\rightarrow 3$ )-4-SO<sub>3</sub>Na-D-Gal-(1 $\rightarrow$ と  $\rightarrow 4$ )-D-3, 6-AnGal-(1 $\rightarrow$ のアノメリックカーボンのシグナルを観測できた。また、その他のシグナルに関しても  $\kappa$ -カラゲenanの文献値と一致したことから、本多糖体は  $\kappa$ -カラゲenanであることが判明した。一方、

CKS ではアノメリックカーボンのシグナルが計 4 本観測されたことから、少なくとも 4 種の結合様式を持つ糖鎖が含まれることが示唆された。これらの化学シフト値を文献値と比較したところ、 $\beta$ -および  $\kappa$ -カラゲenanのものと一致していた。

### D. 考察

メチル化分析および IR 並びに NMR スペクトルを測定した結果、CKP 画分は  $\kappa$ -カラゲenanであること、CKS 画分は  $\kappa$ -および  $\beta$ -カラゲenanタイプの多糖であることが示唆された。しかしながら、CKS 画分は 2 種の多糖が含まれているのか、あるいはそれぞれの結合様式が混在しているハイブリッドタイプなのかは不明であるが、これまでに  $\kappa/\beta$ -ハイブリッドカラゲenanは単離されていることから、本多糖体もハイブリッドタイプであることが予想される。

### E. 結論

本試料中には Fig. 3 に示した  $\kappa$ -カラゲenan及び  $\kappa/\beta$ -ハイブリッドカラゲenanが含まれていることが推察された。

### F. 研究発表

なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1. Results of Methylation Analysis of CKP and CKS

	$\rightarrow 4)-3,6\text{-AnGal-(1}\rightarrow$	$\rightarrow 3)\text{-Gal-(1}\rightarrow$	$\rightarrow 3)\text{-4-SO}_3\text{-Gal-(1}\rightarrow$
CKP	35.9	5.7	58.4
CKS	43.6	33.4	23.0

Each value was represented as mol%.

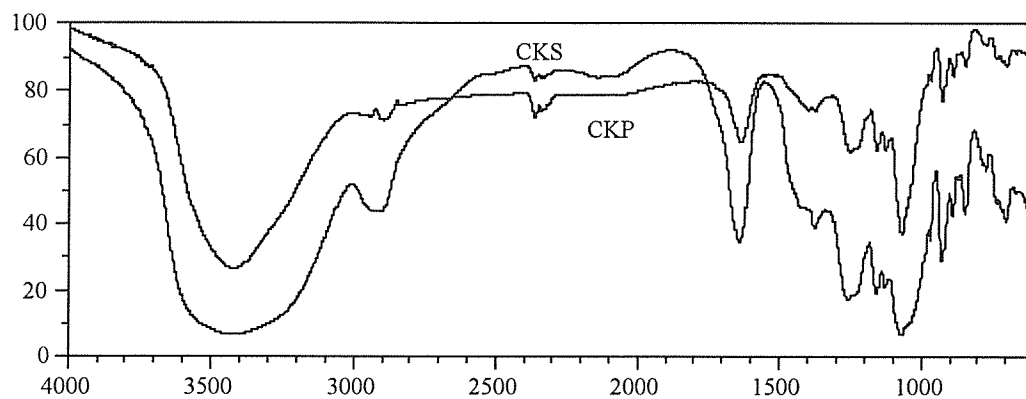


Fig. 1 IR spectrum of CKP and CKS.

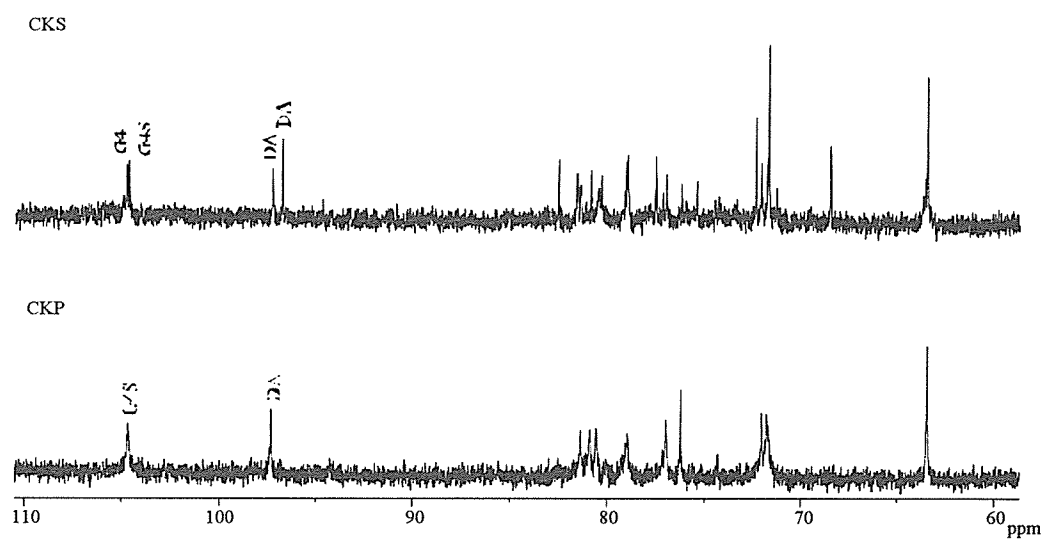


Fig. 2  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of CKP and CKS.

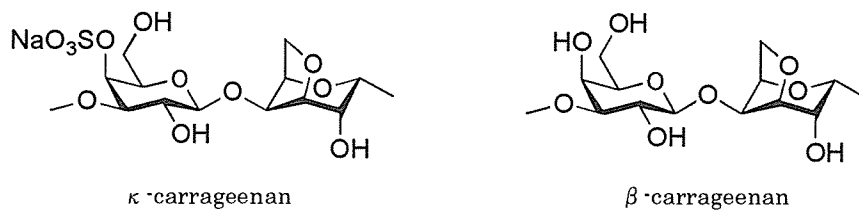


Fig. 3 Disaccharide structures

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

ファーセララ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

ファーセラランを KCl により分画し、2 画分を得た。それぞれについて、電気泳動、HPLC、IR スペクトル、NMR スペクトル、単糖組成分析、およびメチル化分析を実施した結果、KCl により沈殿した画分 FuKP は  $\kappa$ -カラゲナンであることが分かった。

A. 研究目的

ファーセラランはススカケベニ科フルセラリア (*Furcellaria fastigiata* HUD.) の全藻より、熱時水又はアルカリ性水溶液で抽出して得られた多糖類とされている。本研究では、ファーセララ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：成分分析に供したファーセララン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 (RI-2000) 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<sub>XL</sub> (7.6 mm × 300 mm × 2, Tosoh 社製)、移動相：0.1 M NaNO<sub>3</sub>、流速：0.6 mL/min、カラム温度：40°C、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：N<sub>2</sub>、検出器：FID、カラム温度 200-240°C (4°C/min), 240°C (15 min) または 160-210°C (2°C/min), 210-240°C (5°C/min), 240°C (9 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-5MS (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 100-200°C (2°C/min)、200-300°C (20°C/min)

NMR スペクトルは Varian Unity 500 plus を用い、測定した。試料を 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>O に溶解し、内部標準として DSS を用いた。

IR スペクトルは日本分光製 FT/IR-460 plus を用い、KBr 錠剤法で得た。

試料の分画：ファーセララン (500 mg) に蒸留水 (90 mL) を加え、40°C で攪拌した。ここに 2 M KCl (10 mL) を加え攪拌した後、遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) により上清と沈殿に分画した。沈殿部は 0.2 M KCl で洗浄後、遠心分離し、上清と沈殿部に分け、上清はさきに得られた上清と合わせた。沈殿部は 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> に溶解した。上清と沈殿画分のそれぞれを 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液と蒸留水に対して透析チューブ (和光純薬、シームレスセル

ロスチューブ)を用いて透析後、凍結乾燥し KCl 可溶画分 (FuKS, 93.3 mg) と KCl 不溶画分 (FuKP, 390.3 mg) 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  $\mu$ L、また両端にガイドマーカー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% トリジンブルーで 10 分間染色し、7% AcOH で数回脱染色を行った。

単糖組成分析: 試料に 4-メチルモルホリン-ボラン (MMB, 80 mg/ml) 0.1 mL と 3 M TFA 0.4 mL を加え 80  $^{\circ}$ C で 5 分加熱した。放冷後、MMB 溶液 0.1 mL を加え、120  $^{\circ}$ C で 1 時間加熱した。これを放冷後、MMB 溶液を 0.2 mL 加え窒素気流下 50 $^{\circ}$ C で乾固した。さらにアセトニトリル 0.5 mL を加え窒素気流下で乾固する操作を行った。これをアセチル化し、得られたアルジトールアセテート誘導体を GC および GC-MS で分析した。

メチル化分析: 試料を 0.1 M トリエチルアンモニウム塩酸塩水溶液および蒸留水に対して順次透析し、凍結乾燥することで、トリエチルアンモニウム塩を得た。これらの試料 (3 mg) を DMSO (1 mL) に溶解後、NaOH 粉末 (30 mg) を加え、室温で 5 分間攪拌した。ここにヨウ化メチル (0.1 mL) を加え、さらに室温で 10 分間攪拌した。窒素ガスを当て過剰なヨウ化メチルを除去後、反応液を蒸留水、0.1 M トリエチルアンモニウム水溶液、蒸留水に順番で透析後、凍結乾燥した。この操作を 3 回繰り返し、メチル化多糖を得た。この試料に 4-メチルモルホリン-ボラン (MMB, 80 mg/ml) 0.1 mL と 3 M TFA 0.4 mL を加え 80  $^{\circ}$ C で 5 分加熱した。放冷後、MMB 溶液 0.1 mL を加え、120  $^{\circ}$ C で 1 時間加熱した。これを放冷後、MMB 溶液を 0.2 mL 加え窒素気流下 50  $^{\circ}$ C で乾固した。さらにアセト

ニトリル 0.5 mL を加え窒素気流下で乾固する操作を行った。得られた部分メチル化アルジトールをアセチル化後、クロロホルム-水で分配し、クロロホルム相を乾燥後、GC および GC-MS で分析した

### C. 研究結果

ファーセラランを KCl に対する溶解度の差を用いて分画したところ、可溶画分 (FuKS, 93.3 mg) および不溶画分 (FuKP, 390.3 mg) をそれぞれ得た。それぞれを GPC で分析した結果 (Fig. 1)、FuKS では 2 個のピークが観測され、それぞれの重量平均分子量 (Mw) は  $2.48 \times 10^6$  と  $4.63 \times 10^4$  であった。また、FuKP ではシングルピークが観測され、その重量平均分子量は  $2.55 \times 10^6$  であった。また、セルロースアセテート膜電気泳動にて分析したところ、Fig. 2 のように泳動された。

次に単糖組成分析を行った結果、FuKS は 3,6-アンハイドロガラクトースとガラクトースが 0.27:1.00 の比で構成されるが、少量のグルコースとキシロースも検出された。一方、FuKP は 3,6-アンハイドロガラクトースとガラクトースが 0.74:1.00 の比で含まれていた。

以上の結果から、FuKS 画分中には多くの分子種が含まれていることが予想されたが、FuKP と共に含まれる糖残基の結合様式を明らかにするために、メチル化分析を行った (Table 1)。その結果、FuKS には多くの結合様式を持つ糖残基が含まれることが示された。一方、FuKP は  $\rightarrow 4$ -AnGal-(1 $\rightarrow$ ,  $\rightarrow 3$ )-Gal-(1 $\rightarrow$ 、および  $\rightarrow 3, 4$ -Gal-(1 $\rightarrow$ が主な糖残基であった。ここで、 $\rightarrow 3, 4$ -Gal-(1 $\rightarrow$ は  $\rightarrow 3$ )-4-SO<sub>3</sub>-Gal-(1 $\rightarrow$ または  $\rightarrow 4$ )-3-SO<sub>3</sub>-Gal-(1 $\rightarrow$ であることが予想された。

IR スペクトルにおいて、FuKS および FuKP いずれの画分も 1250  $\text{cm}^{-1}$  に S=O 伸縮振動に基づく吸収が認められ、硫酸基の存在が確認された。また、