

## のりの脂溶性成分について

### IV ステロール配糖体の同定

坂本 登・榎本 則行

(食糧管理化学教室)

昭和53年6月1日 受理

Studies on Fat-Soluble Substances of Laver (Susabinori, *Porphyra yezoensis*)

### IV Identification of steryl glycolipids

Noboru SAKAMOTO and Noriyuki ENOMOTO

(Laboratory of Food Hygienic Chemistry)

Received June 1, 1978

#### Summary

Steryl glycolipids were isolated from the chloroform-methanol extract of Susabinori (*Porphyra yezoensis*) by silica gel and Unisil column chromatography, and purified by preparative thin layer chromatography.

The steryl glycolipids were acyl steryl glycoside and steryl glycoside.

The molecular species of the acyl steryl glycoside were identified as palmitoyl cholesteryl mannoside and palmitoyl cholesteryl galactoside, and those of the steryl glycoside were as cholesteryl galactoside and cholesteryl mannoside.

のりの脂溶性成分に関する既報<sup>1,2,3,4)</sup>の研究に引き続いて、今回は生のりのステロール配糖体画分から得られた2つの成分について化学構造を調べたので、その結果を報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試料

有明海産の生のり (スサビノリ, *Porphyra yezoensis*) の冷凍物 (-15°C) を使用した。

##### 2. 抽出

1.5Kg の解凍生のり (水分含量 90.56%) に 5l のクロロホルム:メタノール (1:2) を加えてホモジナイズし、1昼夜放置して脂溶性成分を抽出した。

つぎにこれをろ別してその残渣を 5l のクロロホルム:メタノール (2:1) で再度抽出した。得られた抽出液をあわせ、これにクロロホルム:メタノール:水の比が 2:2:1.8 になるように水を加えて2層に分離させ、そのクロロホルム層を分取して減圧濃縮、乾固した。抽出された脂溶性成分の収量は、生のり 1.5Kg につき約 8.8g であった。

### 3. ステロール配糖体の分画

乾固物約 3.5g を少量のクロロホルムに溶かし、これをケイ酸カラム (4.5×60cm) に注入し、1.5l ずつのクロロホルムのみ、クロロホルム：アセトン (1:1)、アセトン：メタノール (9:1) およびメタノールで順次に溶出すると、使用溶媒の順に中性脂質、糖脂質 I、糖脂質 II およびリン脂質の各画分が溶出された。得られた糖脂質 I 画分を減圧濃縮後、少量のクロロホルムに溶かしてユニシルカラム (2.5×30cm) に注入し、クロロホルム・アセトン溶媒系で stepwise elution を行なった。クロロホルム：アセトン (9:1) を 200ml 流して得られた画分を A、つぎにクロロホルム：アセトン (7:3) を 200ml 流して得られた画分を B とした。

各溶出液 (10ml/tube) はアンスロン反応<sup>5)</sup> および Zak 反応<sup>6)</sup> によって糖およびステロールの定性を行ない、2つの画分 A, B に分けられた。これらをそれぞれ減圧濃縮、乾固して以後の実験に供した。

### 4. メタノリシス

#### 4-1. 脂肪酸メチルエステルの調製

A および B の乾固物約 5mg に 5ml の 5%メタノール性塩酸を加え、100°C、4時間還流加熱してメタノリシスした。冷却後、n-ヘキサン：ベンジン (1:1) で抽出し、抽出液を水洗、脱水後、減圧濃縮した。これを後述の条件で調製用簿層クロマトグラフィーに供して展開させ、脂肪酸メチルエステル担当部をかきとり、クロロホルム：メタノール (1:1) で溶出して、脂肪酸メチルエステル画分を得た。

#### 4-2. ステロールの調製

4-1. における調製用簿層クロマトグラフィーにおいて、ステロール相当部をかきとり、クロロホルム：メタノール (1:1) で溶出し、減圧乾固してステロール画分を得た。

#### 4-3. メチルグリコシドの調製

4-1. における n-ヘキサン：ベンジン (1:1) 抽出残渣をアンバーライト IR-4B (OH<sup>-</sup> 型) で脱イオンし、このものを減圧乾固してメチルグリコシド画分を得た。

### 5. ステロールのトリメチルシリル化

4-2. で得られたステロール画分約 1mg に 0.1ml のビストリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを加え 60°C、10分間加熱してステロールのトリメチルシリル化を行なった。このものをガスクロマトグラフィーの試料とした。

### 6. メチルグリコシドのトリメチルシリル化

4-3. のメチルグリコシド画分 2mg を活性化した五酸化リン上で1昼夜減圧乾固した後、0.2ml のピリジン：ヘキサメチルジシラザン：トリメチルクロルシラン (10:2:1) 混液を加え、75°C、5分間加熱してトリメチルシリル化した。生成したトリメチルシリル化メチルグリコシドをクロロホルムで抽出し、減圧濃縮してガスクロマトグラフィーの試料とした。

### 7. ガスクロマトグラフィー (GLC)

装置は、日本電子製 JGC-20K 型ガスクロマトグラフ (水素炎イオン化検出器付) を使用した。

#### 7-1. 脂肪酸メチルエステルの分析

ステンレスカラムは 3mm×200cm、充填剤は 10% DEGS を用い、カラム温度 180°C、キャリ

ヤーガス（窒素）は  $1.4\text{Kg}/\text{cm}^2$  の条件で行なった。

### 7-2. トリメチルシリル化ステロールの分析

ガラスカラムは  $3.5\text{mm}\times 200\text{cm}$ ，充填剤は 5% SE-30 を用い，カラム温度は  $215^\circ\text{C}$ ，キャリアーガス（窒素）は  $1.4\text{Kg}/\text{cm}^2$  の条件で行なった。

### 7-3. トリメチルシリル化メチルグリコシドの分析

ガラスカラムは  $3.5\text{mm}\times 200\text{cm}$ ，充填剤は 5% SE-30 を用い，カラム温度は  $180^\circ\text{C}$ ，キャリアーガス（窒素）は  $1.4\text{Kg}/\text{cm}^2$  の条件で行なった。

## 8. 簿層クロマトグラフィー (TLC)

常法によりシリカゲル G を用いてプレートを調製した。ステロール配糖体の展開には，クロロホルム：メタノール，(95：12)，脂肪酸メチルエステルおよびステロールの展開には，*n*-ヘキサン：エーテル：酢酸 (90：10：1) を用いた。発色剤としては，2% 2,7-ジクロロフルオレsein アルコール溶液を噴霧し，紫外線照射下で識別した。

調製用簿層クロマトグラフィーはクロロホルム：メタノール (95：12) を用いて展開した。

## 9. 可視吸収スペクトル

ベックスマン分光光度計 DB-GT 型で測定した。

## 実験結果

### 1. ステロール配糖体の単離

カラムクロマトグラフィーで分離されたステロール配糖体の A, B 2つの画分について，TLC を行なった。その結果を Fig. 1 に示した。

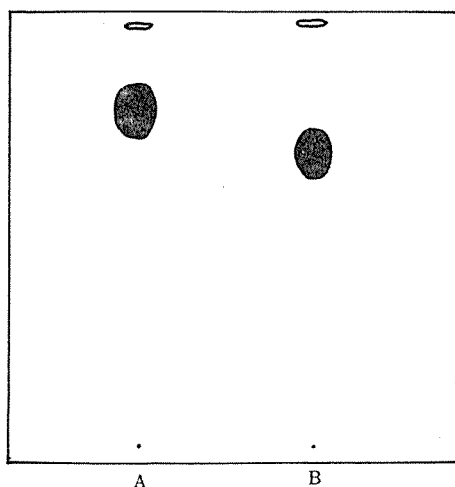


Fig. 1 Thin-layer chromatogram of two fractions of steryl glycolipid obtained by Unisil column chromatography.

A: Fraction eluted with chloroform: acetone (9: 1)

B: Fraction eluted with chloroform: acetone (7: 3)

Solvent: Chloroform: methanol: water (65: 25: 4)

Detection reagent: 2, 7-Dechlorofluorescein

Plate: Silica gel G

両画分には、展開先端部まで上昇する成分の他に、異なった Rf 値を示す成分が1つずつ含まれていた。後者の成分を単離するために、各画分ごとに調製用 TLC を行なって相当する Rf 値の部分をかきとり、クロロホルム：メタノール (1:1) でろ別して、それぞれの減圧濃縮物を得た。

これら2つのろ別乾固物は、2次元 TLC でただ1つのスポットのみを示した。以後 A 画分の精製物を ASG, B 画分の精製物を SG と仮称する。

## 2. ステロール配糖体に関するいくつかの試験

### 2-1. 中性糖の定性

ASG および SG をアンスロン反応<sup>5)</sup> によって発色させ、生成物の吸収スペクトルを測定した。その結果、ASG および SG はともに 620nm に吸収極大を示したので、中性糖の存在が認められた。

### 2-2. ステロールの定性

ASG および SG を Zak 法<sup>6)</sup> によって発色させ、生成物の吸収スペクトルを測定した。その結果、ASG および SG はともに 560nm に吸収極大を示したので、ステロールの存在が認められた。

## 3. 糖とステロールとのモル比

ASG および SG の、糖とステロールとのモル比を決定するために、糖はフェノール・硫酸法<sup>7)</sup>、ステロールは Zak 法<sup>6)</sup> により定量を行なった。その結果を Table 1 に示した。

ASG および SG は、ともに糖とステロールのモル比がほぼ 1:1 であることが明らかになった。

Table 1 Molar ratio of sugar to sterol in steryl glycolipids.

	Sugar	Sterol
ASG	1.2	1
SG	1.1	1

Table 2 Fatty acid composition of acyl steryl glycoside

Fatty acid	(%)
C 14:0	3.6
C 16:0	91.8
C 18:1	4.6

## 4. 構成脂肪酸組成

ASG の脂肪酸組成を Table 2 に示した。3種の脂肪酸が認められ、その主成分は C<sub>16:0</sub> であって全体の約90%を占めていた。

## 5. 構成ステロールの定性

ASG および SG を構成するステロールの GLC の結果を Fig. 2 および Fig. 3 に示した。

これらのクロマトグラムにおいて、ASG も SG もともにただ1つのピークしか認められなかった。それらの相対保持時間は、標品のコレステロールのそれと完全に一致したことから、両者とも構成ステロールはコレステロールであると同定された。

## 6. 構成糖の定性

ASG および SG の構成糖の、GLC と行なった。その結果を Fig. 4 および Fig. 5 に示した。

このクロマトグラムにおいて、ASG の構成糖はガラクトースおよびマンノースであり、その

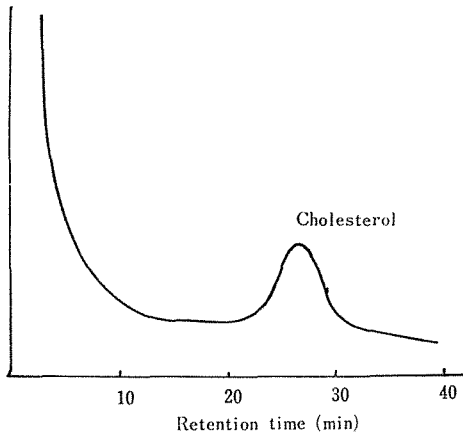


Fig. 2 Gas-liquid chromatogram of component sterol of acyl steryl glycoside.

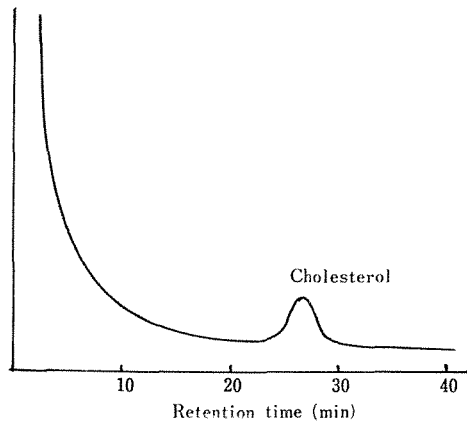


Fig. 3 Gas-liquid chromatogram of component sterol of steryl glycoside.

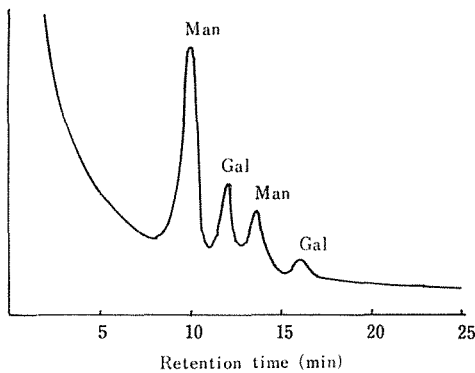


Fig. 4 Gas-liquid chromatogram of component sugar of acyl steryl glycoside.

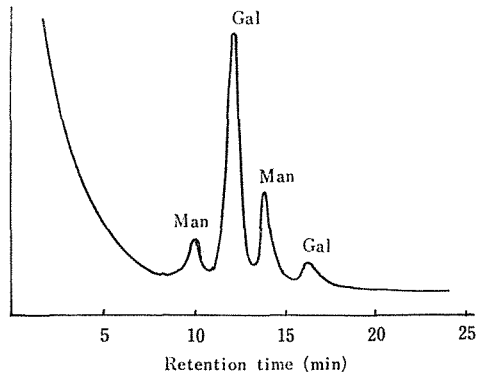


Fig. 5 Gas-liquid chromatogram of component sugar of steryl glycoside.

構成比は25:75であった。SGの構成糖も、ガラクトースおよびマンノースからなっており、その構成比は65:35であった。

以上の結果を総合して、ASGの主要な分子種は、パルミトイル・コレステリル・マンノシドおよびパルミトイル・コレステリル・ガラクトシドであると同定された。

またSGの分子種は、コレステリル・ガラクトシドおよびコレステリル・マンノシドであると同定された。

#### 考 察

植物体のステロールは遊離型で存在するものが多いが、一部は配糖体型となって存在している。大豆のステロール配糖体では、2種類あることが桐淵<sup>8)</sup>らによって明らかにされた。1つはステリルグリコシドであり、他の1つはアシルステリルグリコシドであった。その後、坂田ら<sup>9)</sup>は玄

米でこれら2種類のステロール配糖体の存在を、伊藤ら<sup>10)</sup>はアルフェルファからステリルグリコシドを同定したことを報告している。

スサビノリのステロール配糖体は、アシルステリルグリコシドおよびステリルグリコシドであって、それらの代表的分子種はそれぞれパルミトイル・コレステリル・マンノシドおよびコレステリル・ガラクトシドであると同定された。

従来の報告によると、植物体のステロール配糖体の構成糖は、グルコースであるものが大部分で、ごく一部にマンノースとの報告<sup>8,9)</sup>もあるが、スサビノリのステロール配糖体は、ガラクトースおよびマンノースを含有しており、他の植物体との相違がみとめられた。

植物体のステロール配糖体の構成ステロールとしては、 $\beta$ -シトステロール、スチグマステロールおよびカンペステロールが報告<sup>8,9)</sup>されているが、スサビノリの構成ステロールは、コレステロールと同定されたので、この点でも相違がみられた。

### 摘 要

生のりの脂溶性成分から2つのステロール配糖体画分を分離した。これらは、アシルステリルグリコシドおよびステリルグリコシドであって、その主要な分子種は、前者が、パルミトイル・コレステリル・マンノシドおよびパルミトイル・コレステリル・ガラクトシドであり、後者がコレステリル・ガラクトシドおよびコレステリル・マンノシドであると同定された。

試料の入手に便宜をはかって下さった株式会社サン海苔 加藤信治氏に感謝する。

### 文 献

- 1) 榎本則行, 坂本 登: 食品衛生学雑誌, **16**, 406 (1975).
- 2) 坂本 登, 榎本則行: 佐大農彙, No. 39, 75 (1975).
- 3) " " " " , No. 40, 11 (1976).
- 4) " " " " , No. 40, 23 (1976).
- 5) D. L. Morris: Science, **107**, 254 (1948).
- 6) 山川民夫他: 生化学研究法 I, p. 76 (1973) 朝倉書店.
- 7) 福井作蔵: 還元糖の定量法, p. 45 (1969) 東京大学出版.
- 8) T. Kiribucki, T. Mizunaga and S. Funahashi: Agr. Biol. Chem., **30**, 770 (1966).
- 9) 坂田澄雄, 伊藤精亮, 藤野安彦: 農化, **47**, 125 (1973).
- 10) 伊藤精亮, 藤野安彦: 農化, **47**, 229 (1973).