アサクサノリの脂質組成とその抗酸化性について

Component Lipids of Purple laver and their Antioxygenic Activity

(昭和 43 年 4 月 17 日 受理)

安 藤 英 彦* 金 田 尚 志*
(Hidehiko Ando) (Takashi Kaneda)

Dried Purple laver, *Porphyra tenera*, is the favorite seaweed among Japanese. This seaweed contains a small per cent of lipids, and it is known that the component fatty acids of lipids consist mainly of highly unsaturated fatty acids. However, a rancid odor is not detectable during storage.

In order to determine the antioxygenic activities of purple laver, the lipids were fractionated and the activity of each fraction was tested. The whole lipids were extracted with chloroform-methanol mixture, and the lipids thus obtained were fractionated by silicic acid column chromatography with increasing concentration of ethyl ether in n-hexane (Fig. 1). Phospholipids were separated in the same way but by the use of methanol-chloroform mixture (Fig. 2). Approximately 35 per cent of the whole lipids were phospholipids and 25 per cent were triglycerides. Upon analyzing fatty acids of each fraction by gas-liquid chromatography, it was clear that 40-55 per cent of fatty acids comprised $C_{22} : 3$ acid. In particular, phospholipids were characteristically rich in $C_{22} : 3$ acid (55%).

According to the results of the comparison of the antioxygenic activity of each fraction, the whole lipids and the phospholipids fraction showed similar effect with BHT used as control; moreover, both of them showed the effect as synergist (Fig. 3 and 4).

アサクサノリには1.5%~2.0%程度の脂質が含まれるが、本脂質の脂肪酸は高度不飽和酸に富むことが知られている¹⁾。アサクサノリは薄く干しあげられているにもかかわらず脂質が関与する酸敗臭を感じない。また過酸化物質を測定してみると、30前後であった。そこで筆者らはアサクサノリ中に、含有脂質の酸敗を防止するような成分があるのではないかと思い、その検索を行なった。またアサクサノリ脂質についての詳しい報告は出されていないので、抗酸化性を検討する際、脂質組成をみたので、これらの結果を報告する。

実験方法および結果

脂溶性区分に存在すると思われる抗酸化成分を分別するため以下のごとく脂質を抽出、分画した。

1. 試料

市販の乾海苔(上級品)を用いた。

2. 総脂質の抽出

Olcott²⁾らの方法に準じて総脂質を抽出した。すなわち一定量の試料にクロロホルム:メタノール(2:1)混液3倍量を加え、2分間ブレンダーにかけホモジナイ

ズし、さらに1倍量のクロロホルムおよび水を加えて1分間ホモジナイズをくりかえした。ホモジナイズしたものは口過し、組織の残渣を1倍量のクロロホルムで再び抽出口過を行ない、口液のクロロホルムは合わし、減圧濃縮し総脂質を得た。得られた総脂質は乾燥アサクサノリに対し1.7%であった。

3. ケイ酸カラムクロマトグラフィーによる脂質の分画

アサクサノリから抽出した総脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィー³⁾により分別を行なった。使用した溶剤はTable 1のとおりである。結果はTable 1およびFig 1に示した。各溶出物はT.L.C.およびP.C.⁴⁾による確認を行なった。

4. リン脂質の検索

前試験で得られたリン脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィーにより分画した。すなわちFig. 2に示すごとくクロロホルム・メタノール混合溶媒中のメタノールの割合を3, 12, 18, 25, 33, 50, 85, 100と順に増してゆきリン脂質を溶出分別した。溶出曲線はHARRIS⁵⁾法によりPを定量して画いた。各分画はT.L.C.により単一スポットを得た(Table 2)。クロロホルム・メタノール

*東北大学農学部

Table 1. Stepwise elution of lipids of dried purple laver with silicic acid column

Solvent	ml	Lipid class	Yield (%)
<i>n</i> -Hexane	100	Hydrocarbons	12.1
3%Et ₂ O in <i>n</i> -hexane	200	Sterolesters	2.4
15% Et ₂ O in <i>n</i> -hexane	250	Triglycerides	25.1
30% Et ₂ O in <i>n</i> -hexane	250	Sterols, Diglycerides, Chlorophyll	11.9
Et ₂ O	250	F. A., Monoglycerides, Xanthophylls	13.4
MeOH	200	Phospholipids	35.1

Fig. 1. Separation of dried purple laver-lipids by stepwise elution from silicic acid column with increasing concentrations of ethyl ether in *n*-hexane

Fig. 2. Separation of phospholipids by silicic acid chromatography

Table 2. Thin-layer chromatography of purple laver phospholipids

(CHCl₃ : MeOH : H₂O=80 : 25 : 3)

	Rf value	Indicator
I	0.92	Molybdc acid Reagent (+)
II	0.76	Ninhydrin Reagent (+)
"	0.64(tr.)	Dragendorff Reagent (+)
"	0.22(tr.)	Ninhydrin Reagent (+)
Cephalin (standard)	0.72 0.24	"
III	0.25	"
IV	0.43	Ammoniac silver nitrate Reagent (+)
V	0.40	Dragendorff Reagent(+)
Lecithin (standard)	0.42 0.13	"
VI	0.17	"
Sphingomyelin (standard)	0.18	"
VII	0.12	"
Lysolecithin (standard)	0.11	"

ル・水(80:25:3)および(65:25:4)の混合溶媒を用いて展開し、発色剤としてはニンヒドリン試薬、ドラージェンドルフ試薬、アンモニア性硝酸銀試薬、モリブデン

酸試薬、クロム硫酸試薬などを使用した。ピークIIには微量のコリン、セリンが混合溶出した。またこのピークにはクロム硫酸試薬のみで発色したスポットが認められ

た。リン脂質組成は Table 3 のごとくである。

Table 3. Composition of phospholipids

	compound	(%) [*]
I	Phosphatidic acid	9.2
II	Phosphatidyl ethanolamine	30.6
III	Phosphatidyl serine	14.1
IV	Phosphatidyl inositol	4.5
V	Lecithin	23.6
VI	Sphingomyelin	9.9
VII	Lysolecithin	13.2

^{*} determined by the amount of phosphorus

5. 脂質の脂肪酸組成

アサクサノリより得た総脂質，トリグリセライド，リン脂質の脂肪酸を，塩酸メタノール液でメチル化しガスクロマトグラフィーにより検索した。結果は Table 4 に示すごとくである。C_{20:5}酸が40—55%と特異的に大きい値を示した。ついで C_{16:0}酸が20—30%を占めた。リン脂質はトリグリセライドに比べ C_{20:5}酸が多く，C_{16:0}酸は少なかった。

Table 4. Fatty acid composition of dried purple laver-lipids

	total lipid	phospholipid	triglyceride
—	0.6	0.7	0.6
14:0	1.6	0.5	0.8
15:0	1.3	0.5	0.8
16:0	25.7	18.8	28.3
16:1	4.1	4.5	2.8
—	0.6	0.4	0.3
18:0	1.3	1.0	0.7
:1	4.3	3.3	3.8
:2	2.1	2.3	2.1
:3	0.5	0.4	0.3
20:1	4.4	4.2	4.4
:2	1.0	0.8	2.4
:3	2.9	2.1	0.7
:4	4.5	1.1	6.4
:5	40.8	54.9	41.1
—	4.5	4.3	4.5

YANAGIMOTO GCG-550F
15%DEGS (on CELITE 545)
Carrier gas: N₂
Column: 2.2m
Column temp. 175°C

6. アサクサノリ脂質の抗酸化性

Fig. 3 に示した各区分およびケン化物の抗酸化効力を検討した。抗酸化効力はOlcott³⁾らの行なったオーブ

ンテストによった。すなわち基質油にサンプルを一定量添加し 45°C オープンに入れ酸化誘導期の終末期にみられる重量増加までの日数を以て抗酸化性の程度を検討した。基質油は，サフラワー油をケン化し，メチル化後真空蒸留により得たメチルエステルを用いた。Fig. 3 は基質油に各試料を0.02%添加した際の結果である。II，

Fig. 3. Comparative antioxidant activity of dried purple laver-lipids on the antioxygenation of sufflower oil esters (at 45°C)

I Total lipids, II unsaponifiable matter, III *n*-hexane fraction, IV 3% Et₂O in *n*-hexane fraction, V 15% Et₂O in *n*-hexane fraction, VI 30% Et₂O in *n*-hexane fraction, VII Et₂O fraction, VIII MeOH fraction
Added % to substrate: I (0.05%), II-VIII (0.02%).

III, IV, V, VIには効果がみられない。VIIはやや効果がみられた。I およびVIIIは5日以上の誘導期延長を示し，とくにVIIIは対照として用いた BHT 0.02% 添加と同程度の効果を示した。

つぎに各区分のシネルギストとしての効果をみるため基質油に BHT 0.02%および各区分0.02%を添加し同様な試験を行なった。結果は Fig. 4 に示すごとくである。

Fig. 4. Comparative effect of dried purple laver-lipids as synergists for BHT in sufflower oil esters (at 45°C)

すなわち、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵには効果がみられない。しかしⅤにはやや効果がみられた。Ⅱは比較試験として行なった BHT 0.02 % + クエン酸 0.02 % と同程度、Ⅶ、Ⅰ、Ⅷはそれよりも大きい効果を示した。とくにⅧは前試験と比較してシネルギスとしての効果も大きいといえる。

7. 乾燥アサカサノリ中の脂質の存在状態

乾燥アサカサノリのタン白質、糖類、脂質を染色し各成分の組織中の存在状態を観察した。すなわち、ズダン染色、ペーカーアンドヘマチン法、アクロレインシッフ反応、PAS 染色により検索した。その結果 Fig. 5 に示す

Fig. 5. Tissue of dried purple laver

ごとくアサカサノリの細胞質、細胞膜にはいずれも損傷が認められず、一定の規則正しい配列を保っていることがわかった。また脂質は細胞質にのみ存在し、中性脂質は細胞質内に顆粒として存在し、リン脂質は細胞質内の周辺部にリング状または馬蹄形をなして存在していた。そしてこれらの脂質はタン白質および糖類からなる細胞膜、および糖類よりなる細胞膜外膜によりかこまれていることを認めた。このことからアサカサノリの脂質は組織中で安定な状態で存在していると考えられる。

考 察

以上の結果よりアサカサノリ 脂質は40%におよぶC₂₀:5 酸をふくみ、とくにリン脂質は50%以上のC₂₀:5 酸をふくむことを認めた。このように高度不飽和酸をふくむにかかわらず、抄製した乾燥アサカサノリが酸敗臭をおびないのは、組織学的に見ると脂質が細胞膜外膜、細胞膜によりとりかこまれており外気にさらされていないことが理由の1つと考えられる。また、アサカサノリ脂質中リン脂質がかなりの抗酸化効力およびシネルギスの効果を有することを見出した。リン脂質中には、わずかに抗酸化効力を有するものもあるとされているが、一般にリン脂質はシネルギスとしての効果は有しても、抗酸化性はないとされている。筆者らの用いたリン脂質区分がリン脂質のみか、あるいはリン脂質以外の成分がふくまれ、これが抗酸化効力を示したかについてはなお検討の

余地が残されているように思われる。

総 括

アサカサノリにふくまれる脂質の酸化しにくい理由を明らかにし、あわせてアサカサノリ脂質の組成を知るため、脂質を分離しその性状を調べたところ、つぎの結果を得た。

- (1) アサカサノリ脂質は C₂₀:5 酸に富み、とくにリン脂質は該酸を 50% 以上ふくんでいた。
- (2) アサカサノリ脂質中トリグリセライドは25%, リン脂質は 35% 程度であった。
- (3) リン脂質はホスファチジルエタノールアミン (30.6%) レシチン (23.6%) を主とし、リン脂質の脂肪酸中55%はエイコサペンタエン酸であった。
- (4) アサカサノリの組織を染色し、脂質の存在状態を調べたところ、脂質は細胞膜外膜および細胞膜にとりかこまれていた。
- (5) リン脂質は対照として用いたBHTと同程度の抗酸化性を有し、またシネルギスとしての効果も示した。

本研究を行なうにあたり、試料を提供された海苔増殖振興会および染色実験のご指導を賜った、東北大学農学部星野忠彦、谷内田秀昭の両氏に謝意を表する。

文 献

- 1) 新聞、田口：日本誌, 32, 1037—1042 (1966)
- 2) C. Yvonne Shuster, J. R. Froines and H. S. Olcott: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 41, 36—41 (1964)
- 3) H. H. Strain: *Biochim. et Biophys. Acta.*, 109, 1—15 (1965)
- 4) W. D. Harris: *ibid.*, 31, 124—127 (1954)
- 5) H. S. Olcott and E. Einset: *ibid.*, 35, 161—162 (1957)
- 6) 蛋白、核酸酵素「生物化学実験法Ⅶ」共立出版 (1967)
- 7) 薄層クロマトグラフィー 南山堂 (1960)