瀬戸内海産海藻類のヘキサン可溶部について

白根 福栄, 宮崎 一朗, 野崎 浩

(1989 年 1 月 12 日受理)

Composition of Hexane Soluble Fraction from Seaweeds in the Inland Sea

Fukue Shirane,^{*1} Ichiro Miyazaki,^{*2} and Hiroshi Nozaki^{*2}

Hexane extracts from five species of seaweeds in the Inland Sea were analysed, and their content and composition were compared with each other. *n*-Alkanes, fatty acids and sterols were isolated by silica gel column and thin layer chromatography, and identified by GC, GC-MS, IR and NMR measurements. Composition and amount of *n*-alkanes and fatty acids are little different between *Rhodophyta* and *Phaeophyta*. But, in sterols, cholesterol is dominant in *Rhodophyta* and fucosterol in *Phaeophyta*.

近年、機器分析技術のめざましい進歩に伴い、生体の微量成分の解析が可能になった。生体、特に植物成分の分析を基に種の類縁関係、すなわち、化学分類学が発達する^{1,2)}とともに、得られた成分から抗菌活性などの有用な生理活性を持つ化合物も多く発見されている。しかしながら、まだこのような研究に供されていない植物種も多く残されている。本研究は、瀬戸内海で比較的容易に採集できる紅藻類 2 種および褐藻類 2 種と市販の紅藻類 1 種のメタノール抽出成分の化学分析を行ない、種相互の構成成分の比較を行なうと同時に、それらの中で生理活性を持つ化合物の構造を検討することを目的とするものである。³⁾

実験方法

試料の紅藻類のムカデノリ *Grateloupia filicina* フクロフノリ *Gloiopeltis frucata*, 褐藻類のイロロ *Isige foliacea*, ウミトラノオ *Sargassum thunbergii* はこれら海藻類の成長最盛期である 3 月中旬、広島県御調郡向島町周辺の海域で採集した。採集した試料は淡水で水洗し、風乾して乾燥重量を測定した。乾燥試料は直ちにメタノールに浸漬し、約 1 ヶ月後メタノール抽出液を化学分析に供した。市販の紅藻類のマフノリ *Gloiopeltis tenax* も同様にメタノール抽出した。メタノール抽出液は全抽出液の 1/10 量になるまで湯浴温度 40°C のロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。濃縮液は Fig. 1 に示す手順に従ってヘキサン可溶画分、エチル

エーテル可溶画分および酢酸エチル可溶画分の各可溶部に分画をした。本研究では、ヘキサン可溶部の構成成分および含有量について検討した。ヘキサン可溶画分の精製はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで溶離液をヘキサン、ヘキサン: 酢酸エチル (9:1)、クロロホルム:

Fig. 1. Fractionation of methanol soluble layer in seaweeds.

^{*1} 広島大学学校教育学部 (Department of Chemistry, Faculty of School Education, Hiroshima University, Shinonome, Hiroshima 734, Japan).

^{*2} 岡山理科大学理学部生物化学科 (Department of Biological Chemistry, Faculty of Science, Okayama University of Science, Ridai, Okayama 700, Japan).

酢酸エチル (7:3) の順に変えて行なった。また, 必要に応じて分取薄層クロマトグラフィー (TLC) も行なった。分取および精製して得た各成分の組成および構造は, ガスクロマトグラフィー (GC), 赤外分光光度計 (IR), ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) および核磁気共鳴分光計 (NMR) 等で各種スペクトルの測定を行ない検討した。TLC は, KIESELGEL 60 F-254 Merck を使用した。GC 分析は, 水素炎イオン化検出器をそなえた島津 GC-4CM 昇温ガスクロマトグラフを使用し, 分離カラムは 2 m×2.6 mm のガラスカラムを用い, Silicon OV-1 (5%)-Unipor HP mesh 60/80 (Max. Temp. 350°C) を充填した。カラム温度は 100°C から 320°C まで毎分 3°C で昇温し, キャリヤガスの窒素圧は, 0.8 kg/cm² である。ピーク面積測定は島津 C-R1B クロマトバック処理装置 (百分率法) を使用した。EI-MS 分析は日本電子 JMS-D300 を使用し, イオン化電圧は 70 eV, イオン化電流は 300 μ A, イオン源温度は 200°C で測定した。また, CI-MS は試薬ガスにイソブタンを使用し, 200 eV, 300 mA で測定した。IR 分析は日立 EPI-G2 型を使用し KBr 錠剤法で行なった。NMR 分析は日立 R-600 形フーリエ変換高分解能核磁気共鳴装置 (核種: ¹H, 周波数は 60 MHz) 溶媒には CDCl₃, 内部標準試料として TMS を使用した。

Methyl 3-hydroxyhexadecanoate 無色針状結晶, m. p. 47.0~49.0°C, $[\alpha]_D^{20}$ -11.6° (c 0.28, CHCl₃), 分子式 C₁₇H₃₄O₃, EI-MS m/z: 268 (M-H₂O)⁺, 255 (M-

CH₃O)⁺, 194, 103 (base), 83, 81, 74, 71, 69, 61, 56, EI-HRMS m/z: 268.2386 [(M-H₂O)⁺, Calcd for C₁₇H₃₂O₂: 268.2388], 103.0398 (Calcd for C₁₇H₃₀O₂: 103.0398). CI-MS (イソブタン) m/z: 287 (M+H)⁺, 269. IR: ν 3400, 3300, 1720, 1180 cm⁻¹. ¹H-NMR: δ 2.45 (2H, d, J=3.6 Hz), 2.50 (1H, brs), 3.72 (3H, s), 4.00 (1H, m).

Methyl 3-acetoxy hexadecanoate β -オキシ酸メチルエステルを無水酢酸-ピリジン (1:1) 法により常温でアセチル化した。無色油状物, 分子式 C₁₉H₃₈O₄. EI-MS m/z: 297 (M-OCH₃)⁺, 285, 268, 237, 211, 194, 97, 96, 87, 83, 81, 74, 69, 58, 56 (base). CI-MS (イソブタン) m/z: 329 (M+H)⁺, 269. IR: ν 1740 cm⁻¹. ¹H-NMR: δ 1.97 (3H, s), 2.52 (2H, d, J=5.8 Hz), 3.62 (3H, s), 4.12 (1H, m).

Methyl 3-oxohexadecanoate β -オキシ酸メチルエステルを Jones 酸化してケト酸メチルエステルに誘導した。無色油状物, 分子式 C₁₇H₃₂O₃. EI-MS m/z: 284 (M)⁺, 211 (M-CH₂COOMe)⁺, 168, 166, 96, 85, 71, 59, 58 (base). IR: ν 1740, 1715 cm⁻¹. ¹H-NMR: δ 2.48 (2H, t, J=7.0 Hz) 3.38 (2H, s), 3.63 (3H, s).

結果および考察

ヘキサン可溶部 使用した試料の乾燥重量およびヘキサン可溶画分重量を Table 1 に示した。乾燥重量に対するヘキサン可溶画分重量比は今回採集した種の間ではほとんど差が認められず 1.9~2.8% であった。

Table 1. Dry and hexane extract weight in seaweeds

Class	No.	Species	Japanese name	Dry weight kg	Hexane extract weight g (%)
Rhodophyta	1	Grateloupia filicina	Mukadenori	10.7	220.0(2.1)
	2	Gloiopeltis frucata	Fukurofunori	10.6	230.0(2.2)
	3	Gloiopeltis tenax*	Mafunori	1.5	4.2(2.8)
Phaeophyta	4	Isiga foliacea	Iroro	10.8	270.0(2.5)
	5	Sargassum thunbergii	Umitoranoo	9.0	170.0(1.9)

* Commercial.

Table 2. Composition of hexane extract in seaweeds

Species No.	Japanese name	n-Alkanes	Fatty acid methyl esters	Sterols
		g (%)	g (%)	g (%)
1	Mukadenori	0.37(0.17)	138.37(62.9)	14.08(6.4)
2	Fukurofunori	0.22(0.10)	99.59(43.3)	14.79(6.3)
3	Mafunori*	0.76(18.0)	2.28(54.4)	0.37(8.8)
4	Iroro	6.21(2.30)	146.16(60.8)	16.53(6.1)
5	Umitoranoo	3.57(2.10)	99.23(58.4)	8.94(5.3)

* Commercial.

Fig. 2. Composition of *n*-alkanes in seaweeds.

各海藻から得られたヘキサン可溶部は、まずヘキサンを展開溶媒としたカラムクロマトグラフィーを行ない、ひき続き各種クロマトグラフィーを併用して、*n*-アルカン、脂肪酸メチルエステル*およびステロール類を得た。それぞれの成分における重量比を Table 2 に示した。

紅藻類の*n*-アルカン類の含有量は褐藻類よりも少なかった。脂肪酸メチルエステル*の場合はフクロフノリが他種に較べて若干低い値を示した。ステロールの場合は4

種の間で目立った差異は認められなかった。

***n*-アルカン類** *n*-アルカン類の GC 分析の結果を模式ガスクロマトグラムとして Fig. 2 に示した。*n*-アルカン類の同定は *n*-アルカン標品との GC および GC-MS 測定による比較、および *n*-アルカン同族間における GC の保持時間と炭素数との間に認められる直線関係⁹⁾ を利用した。GC-MS では m/z : M^+ , $(M-29)^+$, $(M-43)^+$, 85, 71, 57, 43 等のアルカン特有のシグナルを示し、IR においては 2980, 1460, 1380, 720 cm^{-1} に吸収を確認した。ムカデノリでは、 C_{17} を主成分 (全アルカンの 76.0%) とし、 C_{15} から C_{33} までの奇数炭素からなる *n*-アルカン類から構成され、偶数のアルカン類の存在比は少なかった。他の 4 種もムカデノリと同様 C_{17} を主成分 {フクロフノリ (84.0%), マフノリ (97.3%), イロロ (38.0%), ウミトラノオ (90.0%)} とし、 C_{15} から C_{33} までの広範囲におよぶ *n*-アルカン類の存在が認められた。しかし、奇数および偶数の間には優位の差は認められなかった。また、イロロを除く他の海藻類の *n*-アルカン類は 1% 前後の割合で幅広く分布するといった特徴あるパターンを示していた。しかし、イロロは C_{17} の存在が 38.0% と他の海藻類と比べると低い値を示したが C_{23} から C_{37} までの *n*-アルカン類の存在比 (3~10%) は他の 4 種に比べてかなり多かった。

脂肪酸のメチルエステル メタノール抽出した海藻類のヘキサン可溶画分から得た脂肪酸のメチルエステル部を GC および GC-MS により分析を行ない同族体を分離した。

脂肪酸メチルエステル類は Table 2 から明らかな

Table 3. GC-MS data for fatty acid methyl esters in *Grateloupia filicina*

Peak No.	Fatty acid	Rt* ¹ (min)	M ⁺ (m/z)	RI (%)	Base peak	Some major ions (m/z)
1	C _{14:0}	17.4	242	7.3	74	199 143 87 56
2	C _{15:0}	20.6	256	5.9	73	213 143 129
3	C _{16:1}	23.0	268	10.8	56	236 194 152 96
4	C _{16:0}	24.6	270	58.7	74	227 87
5	A* ²	26.2			103	255 237 226 194 71
6	C _{17:0}	27.1	284	1.4	73	256
7	C _{18:4}	28.0	290	1.7	79	194 161 105 93
8	C _{18:2}	28.1	294	6.3	67	264 149 108
9	C _{18:1}	29.3	296	7.0	56	264
10	C _{18:0}	30.1	298	5.2	74	255 87
11	C _{20:5}	33.9	316	3.3	78	285 175
12	C _{20:4}	34.5	318	1.0	79	281 180 105 91
13	C _{20:0}	35.8	326	8.0	74	352 282 143 87

*¹ Retention time, Column temp.: 100°C~320°C, 3°C up/min.

*² A is β -hydroxy palmitic acid methyl ester.

Molecular in peak was not detected in EI-MS.

* 海藻類は、メタノール抽出を行なっているの、遊離脂肪酸が、メチル化されている可能性もあるが、今回はそれらを含めた状態で比較検討した。

Table 4. Fatty acid methyl esters composition of seaweeds (%)

Peak No.	Fatty Acid	Sample No.*1				
		1	2	3	4	5
1	14:0	12.8	61.4	15.6	8.5	7.5
2	15:0	0.9	0.6	0.1	tr	0.6
3	16:1	tr*2	10.5	3.4	0.8	11.7
4	16:0	62.4	18.2	40.5	35.8	32.9
5	A*3	0.1	0.6	—	—	—
6	17:0	0.3	tr	0.1	tr	tr
7	18:4	—	—	—	0.4	—
8	18:2	—	0.9	10.5	32.2	18.7
9	18:1	21.9	5.3	—	—	—
10	18:0	0.6	1.6	5.8	0.6	2.3
11	20:5	0.1	0.1	18.0	—	—
12	20:4	0.8	0.5	—	21.7	25.8
13	20:0	0.1	0.4	—	tr	—

*1 Sample No. 1: Mukadenori, 2: Fukurofunori, 3: Mafunori, 4: Iroro, 5: Umitoranoo.

*2 tr: trace.

*3 A is β -hydroxy palmitic acid methyl ester.

様に3画分のうちで収量が一番多かった (43.3~62.9%)。

これらの試料は, 更にヘキサン: 酢酸エチル (9:1) で再クロマトグラフィーを行なって精製した後, IR, GC MS および $^1\text{H-NMR}$ を測定して成分の同定を行なった。炭素数の決定は標品脂肪酸メチルエステルの GC における保持時間の比較によって行ない, GC-MS によって分子量を確認した。ムカデノリの GC と GC-MS の測定結果をもとに 13 成分の化合物を同定し, Table 3 に示した。

他の4種の海藻における脂肪酸メチルエステル類もムカデノリと同じ手順で分析を行ない, その結果を Table 4 に示した。フクロフノリを除く他の4種は $\text{C}_{16:0}$ 酸のメチルエステルの含量が高く, 全脂肪酸中 32.9~62.4% を占めたが, フクロフノリは $\text{C}_{14:0}$ 酸のメチルエステルが 61.4% を占めていた。いずれの海藻類も $\text{C}_{18:0}$ 酸および $\text{C}_{14:0}$ 酸の飽和脂肪酸のメチルエステルの他は不飽和脂肪酸のメチルエステルの含有量が高く, 紅藻類では, ムカデノリ ($\text{C}_{18:2}$: 21.9%), フクロフノリ ($\text{C}_{16:1}$: 10.5%), マフノリ ($\text{C}_{18:2}$: 10.5%, $\text{C}_{22:5}$: 18.0%), 褐藻類ではイロロ ($\text{C}_{18:2}$: 32.2%, $\text{C}_{20:4}$: 21.7%), ウミトラノオ ($\text{C}_{20:4}$: 25.8%, $\text{C}_{18:2}$: 18.7%) という結果を示した。イロロからはわずかながら $\text{C}_{18:4}$ 酸のメチルエステル (0.4%) を検出した。また, 脂肪酸の炭素数は偶数のものが多く奇数の脂肪酸のメチルエステルはいずれの海藻類においても 1% 以下であった。褐藻類から検出した $\text{C}_{20:4}$ 酸は, 標品との GC および GC-MS 測定による比較によってアラキドン酸であることを確認した。

β -オキシ酸の同定 紅藻類のムカデノリ, フクロフノリ

の脂肪酸メチルエステル画分から未知の成分Aの存在を確認した。この成分を単離するためベンゼン: 酢酸エチル (6:1) を展開溶媒として TLC を行ない, R_f 0.4 の単一成分を得た。単離した化合物は融点 47.0~49.0°C の無色針状結晶で CI-MS (イソブタン) $[m/z$: 287 ($\text{M}+\text{H})^+$] および EI-HRMS $[m/z$: 268.2386, $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_3$, ($\text{M}-\text{H}_2\text{O})^+$] より分子式 $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_3$ と決定した。IR では 3400, 3300 cm^{-1} に水酸基の吸収が認められた。 $^1\text{H-NMR}$ では δ 4.00 (m) に水酸基のついたメチン水素, δ 2.45 にカルボキシル基に隣る活性メチレン水素がカップリング定数 3.6 Hz の doublet で認められた。このことは水酸基が β 位に存在していることを示唆している。更に, マスフラグメントにおいて m/z 103 (base peak) に β 位が開裂したと思われるピークが出現していた。これらの結果よりこの化合物を β -オキシ酸のメチルエステルと推定し, 化合物を無水酢酸: ピリジン (1:1) を用いて常温でアセチル化してモノアセテートを, また Jones 酸化を行なって酸化体を得た。モノアセチル体および酸化体の CI-MS (イソブタン) 測定結果はそれぞれ, m/z 329 $\{(\text{M}+\text{H})^+, \text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_4\}$ および m/z 285 $\{(\text{M}+\text{H})^+, \text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_3\}$ であった。IR, NMR における測定結果もこの構造をよく支持していた。本化合物のマススペクトルを文献記載⁹⁾ のものと比較した結果良い一致を示した。このことから化合物Aの構造を Methyl 3-hydroxyhexadecanoate と同定した。この β -オキシ酸のメチルエステルの存在比を Table 4 に示した。

本化合物は褐藻類および乾燥品マフノリからは検出されなかった。なお, β -オキシ酸はある種の細菌のグリセリン酸エステルとして単離が報告されているが,⁹⁾ 海藻からの単離は今回が初めてである。

ステロール類 海藻類のステロール類は IR, GC および GC-MS で分析を行なった。ムカデノリにおけるそれぞれの結果を Table 5 に示した。

ステロール類はクロロホルム: 酢酸エチル (7:3) を展開溶媒として TLC を行ないムカデノリからはコレステロールと 24-メチレンコレステロールを, マフノリ¹⁰⁾からはコレステロールと β -シトステロール, イロロからはフコステロールを単離し, 同定は IR, NMR スペクトルおよび GC の保持時間, GC-MS による MS スペクトル等を標準品のものと比較して行なった。その他のステロールは, 文献値⁷⁾ と比較した。これらの結果をもとに海藻から9種のステロールを同定し, 含有量比を測定した。その結果を Table 6 に示した。表からも明かなように紅藻類3種類ともコレステロールが目立って多く, フクロフノリ⁶⁾ では全ステロールの 98% 以上に達

Table 5. GC-MS data for sterols in *Grateloupia filicina*

Peak No.	Sterol* ¹ Name	Rt* ² (min)	M ⁺ (m/z)	RI (%)	Base peak	Some major ions (m/z)
1	desmosterol	47.0	384	38.5	55	300 255 175 161
2	cholesterol	48.4	386	100.0	386	368 353 301 275 213
3	brassicasterol	49.8	398	48.1	69	386 353 301 275 213
4	24-methylen cholesterol	51.3	398	15.0	314	398 383 281 271 213
5	campesterol	52.4	400	100.0	400	315 289 213 95
6	stigmasterol	53.6	412	46.4	56	382 351 300 255 81
7	β -sitosterol	53.9	414	100.0	414	396 381 303 255 81
8	fucosterol	54.4	412	9.5	314	299 281 229 55
9	saringosterol	56.3	428	7.6	44	410 395 296 253 229

*¹ The trivial names and abbreviations are as follows:

- 1 desmosterol (24-nor-5 α -cholest-22-en-3 β -ol).
- 2 cholesterol (cholest-5-en-3 β -ol).
- 3 brassicasterol (24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol).
- 4 24-methylen cholesterol (24-methylcholesta-5,24(28)-dien-3 β -ol).
- 5 campesterol (24-methylcholest-5-en-3 β -ol).
- 6 stigmasterol (24-ethylcholesta-5,22-dien-3 β -ol).
- 7 β -sitosterol (24-ethylcholest-5-en-3 β -ol).
- 8 fucosterol (24-ethylcholesta-5,24(28)-dien-3 β -ol).
- 9 saringosterol (24-ethylcholesta-5,28(29)-dien-3 β , 24 α -diol).

*² Retention time, Column temp.: 100°C~320°C, 3°C UP/min.

Table 6. The sterol composition of seaweeds (% of total sterol)

Peak No.* ¹	Sample No.				
	1	2	3	4	5
1	tr* ²	—	0.7	0.1	2.2
2	73.9	98.3	87.9	1.8	9.7
3	5.8	tr	tr	tr	6.6
4	2.7	0.2	1.5	11.2	2.2
5	1.6	0.9	2.6	—	—
6	2.0	—	tr	—	—
7	11.7	—	6.8	—	—
8	0.4	0.6	tr	73.7	79.3
9	1.9	—	0.6	12.2	—

*¹ Peak No. are the same as those in Table 5.

Sample No. 1: Mukadenori, 2: Fukurofunori, 3: Mafunori, 4: Iroro, 5: Umitoranoo.

*² tr: trace.

した。これに対して、褐藻類の2種類ではフコステロールが全ステロールの70%以上であった。紅藻類におけるステロール類の主成分がコレステロール、褐藻類ではフコステロールという結果は Ilias ら³⁾の報告とよく一致していた。しかし、紅藻類のステロール類ではコレステロールとデスモステロールの2種類、褐藻類では紅藻類の2種類に加えて24-メチレンコレステロール、サリノグステロールの5種以外のステロール類の存在の報告はされていないが、本研究では、Table 6に示したように9種のステロール類を同定することができた。

海藻類のヘキサン可溶部からは以上のような3種の化合物を得て、それぞれの同族体について機器分析を行な

い成分を確認した。含有成分において、紅藻類と褐藻類の間では成分量以外には差異は認められなかった。しかしヘキサン可溶部には哺乳類の必須脂肪酸であるリノール酸 (C_{18:2}) およびプロスタグランジンの前駆体物質であるアラキドン酸 (C_{20:4}) 等、動物にとっての有用成分を含有していることを確認した。現在、研究中の酢酸エチル可溶部からは抗菌活性を示す数種の化合物の存在を認めており、引き続き検討中である。

謝 辞

本研究において終始研究の御教示と御指導をいただきました大阪府立大学農学部農芸化学科中山充教授に深謝いたします。

文 献

- 1) G. Egliton, A. G. Gonzalez, R. J. Hamilton, and R. A. Raphael: *Phytochemistry*, **1**, 89-102 (1962).
- 2) G. A. Herbin and P. A. Robins: *Phytochemistry*, **7**, 239-255 (1968).
- 3) H. Nozaki, K. Minohara, I. Miyazaki, H. Kondo, F. Shirane, and M. Nakayama: *Agric. Biol. Chem.*, **62**, 3229 (1988).
- 4) S. Nishimoto, K. Tunewaki, M. Nakayama, and S. Hayashi: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 819 (1973).
- 5) W. R. Meyberry, P. F. Smith, T. A. Langworthy, and P. Plackett: *J. Bacteriol.*, **116**, 1091-1095 (1973).
- 6) 佐藤孜郎: 海藻の生化学と利用, 水産学シリーズ

- 45 (日本水産学会編) 恒星社厚生閣, 東京, 1983, pp. 56-57.
- 7) A. Matsuo, M. Nakayama, S. Hayashi, and Y. Yasuda: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2241-2242 (1971).
- 8) A. N. Ilias, W. E. Connor, D. S. Lin, and M. U. Ahmad: *FETTE SCIFEN ANSTRICHEN*, **87**, Jahrgang. Nr. 9, 345-346 (1985).