

ゲットウ葉に含まれるワックス成分の 分離・精製技術に関する研究[†]

化学室 池 間 洋一郎
比 嘉 三 利
照 屋 輝 一*

1. 緒 言

植物のワックスは、主に葉、種子、果実、花、茎などの表面に薄い保護膜をつくって植物体を虫害や病害から守り、同時に、体内の水分が蒸発し過ぎないように調節する働きをしている。植物由来のワックスはカルナバワックス、キャンデリラワックス、ライスワックス、木ろう、ホホバ油等が知られており、化粧品や医薬品、食品、つや出し剤、塗料、カーボン紙に利用されている。¹⁾

近年、サトウキビ中に含まれるワックスが白ネズミのコレステロール値を低下させる作用が認められ²⁾、また、植物系のワックスに含まれる成分がスタミナ源として清涼飲料水に添加されるなど、ワックス成分が生理活性物質として注目されている。

天然ワックスの成分は、一般に脂肪酸、アルコールおよびそれらのエステルと炭化水素などからなり、常温で固体の化合物である。¹⁾

ゲットウのワックスに関してはほとんど報告が見られないが、ゲットウは植物全体の表面や裏側が滑らかで光沢を帯びており、表面にワックスの存在が予想される。

これまでに、ゲットウの多目的総合利用の一環として、ゲットウ葉精油³⁾、根茎の抗カビ成分⁴⁾の研究を行ってきたが、本研究ではゲットウに含まれるワックス成分等の高沸点成分の分離精製条件を検討し、また有用成分としてワックス成分の1-オクタコサノールを同定したので報告する。

2. 試料と実験方法

2. 1 試料

沖縄本島産のゲットウ (*Alpinia. speciosa. k. schum*) の葉を採取し、中肋の直角方向に幅約1 cmに細断して、使用した。

2. 2 機器及び分析条件

① ガスクロマトグラフィー (GC) 分析

カラムはキャピラリーカラム CBP-1 (島津製)、内径0.53mm×25 m、膜厚3 μmを使用し、条件はワックス類等の高沸点成分を分析するためにカラム温度を300℃に設定し、インジェクション方式はスプリットレス、キャリアーガスはヘリウムガスを使用した。

② ガスクロ質量分析 (GC-MS)

GC条件は、カラムをCBP-1と同系のキャピラリーカラム、DB-1 (J&B製) 内径0.324mm×30 m、膜厚0.25 μmを使用し、温度条件は50℃、3分間保持後30℃/分の昇温後300℃、10分間保持

† ゲットウの多目的・高度利用に関する研究 (第7報)

* (株) トロピカルテクノセンター

した。質量分析装置は日本電子製 JMS-DX505H を使用し、測定条件はイオン化 EI、70 eV、イオン源温度 250°C で行った。

2. 3 成分の同定法

同定は、試料を GC-MS 分析して得られた成分のスペクトルと、GC-MS 付属の解析装置のライブラリーから検索した類似スペクトルとの一致性及び標準試薬の GC-MS 分析スペクトルの一致性で行った。また同時に、試料に標準試薬を添加して添加前と添加後に GC 分析を行い、成分のリテンションタイムの一致性も確認した。

2. 4 遠心液々分配クロマトグラフ (CPC) の使用条件

ゲットウ葉抽出液の分画は遠心液々分配クロマトグラフ CPC-LLN (三鬼エンジニアリング製) を使用した。

分画に使用する専用のカートリッジは 1000E 及び 250W の 2 種類を使用し、CPC 条件の検討及び最終的な濃縮には分離能の高い 250W を、比較的多い試料の分画には試料負荷量が大きい 1000E を使用した。

CPC の条件は、まず選定した混合溶媒の分配液を調製し、2 層に分かれた液を分液ロートで上層と下層を分け、CPC の回転しているローター中のカートリッジに下層を固定相として充填した。その後遠心機の回転数を上げて上層を移動相として送液し、試料を移動相に注入して分画した。

3. 結果及び考察

3. 1 ワックス抽出溶媒の組成比の検討

ゲットウ葉からのワックス類の予備抽出試験でヘキサソ、メタノール等よりもクロロホルム：メタノールの混合溶媒が抽出に良好なので、ゲットウ葉 15g にクロロホルムとメタノールの組成比を変えた混合溶媒 60ml を加えて 7 日間抽出試験を行った。

クロロホルム：メタノール混合溶媒の組成を 3 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3、クロロホルム単一溶媒の 6 条件で抽出を行い、固形物を濾過除去した液の有機溶媒部をそのまま GC 分析を行ってクロマトグラムピーク高とピーク数を比較した。その結果を表 1 に示す。

表 1 組成比を変えたクロロホルムとメタノール混合溶媒の抽出効果

組 成 比	GCクロマトグラム	
	ピークの最大高さ (mm)	ピーク数
クロロホルム：メタノール		
① 3 : 1	1 6	1 0
② 2 : 1	2 6	1 2
③ 1 : 1	1 0	7
④ 1 : 2	1 0	6
⑤ 1 : 3	1 0	5
⑥ クロロホルム	2 2	5

この結果から、組成比が異なると抽出効果が大きく変化した。組成比 2 : 1 のクロロホルム : メタノール（以後 CM 混液）で抽出した液が、他の抽出液よりも GC クロマトグラムのピーク数が多くピークの高さも高くなり、ゲットウ葉ワックス類の抽出には CM 混液が最も適していることが分かった。CM 混液抽出液の GC クロマトグラムの例を図. 1 に示す。

同組成のクロロホルムとメタノール混合溶媒はサトウキビワックスの抽出でも良好な結果を得ており⁵⁾、また食品中の脂質の分析法においても同混合溶媒が抽出液として使用されている⁶⁾。

3. 2 ゲットウ葉ワックス成分の抽出

ワックス成分を抽出するために、ゲットウ葉 1.75kg に CM 混液（2 : 1）7 ℓ を加えて 10 日間室温下で浸漬抽出を行った。

浸漬後、2 層に分かれた抽出液の上層部と下層部を GC で分析した結果、

ワックス成分は上層には認められず、下層部に存在していた。ワックス類が含まれていない上層の水相部を除去した下層部を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧乾燥して除去し、濃緑色を呈した粘性のある CM 混液のエキス 22.8g が得られた。これを初期処理ゲットウ葉の重量から収率を計算すると約 1.30% である。

3. 3 CPC 分離溶出条件の検討

ゲットウ葉からワックス成分を含む高沸点成分を濃縮、分離するために、遠心液々分配クロマトグラフ（CPC）の溶出溶媒の選定及び流速、遠心回転数の条件を検討した。

CPC の特徴は、お互いに混ざり合わない 2 相の溶媒系への分配係数の差を利用して、混合物中の成分を分離する向流分配法を利用した方法である⁷⁾。向流分配法は①条件が温和である。②担体を用いない液-液間の分配であるから、担体との接触による分解、吸着による損失がない。③極性が極端に異なる物質が共存しても分離が妨害されない等の長所があり、これらの長所に遠心力の場を組み合わせると分離時間を大幅に短縮した CPC は、容易に目的物質の分離が可能で分離法と思われる。これまでにビタミンや抗生物質、色素、生薬に含まれる生理活性物質等の分離、精製が行われている⁸⁾。

CPC の分離分配液を決定するために、ワックス成分等の無極性物質を分離する代表的な溶媒の組合せ⁹⁾の条件で検討した。すなわち、① n-ヘキサン / メタノール = 2 / 1、② n-ヘキサン / メ

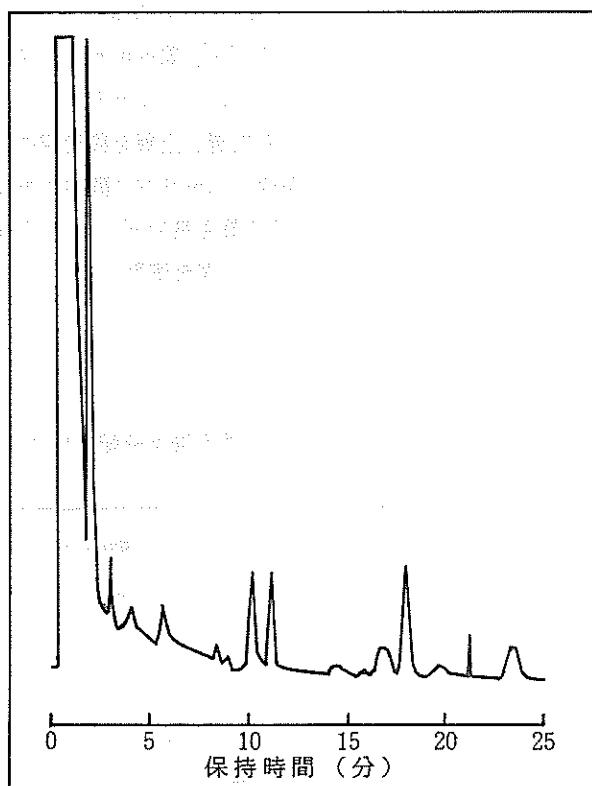


図. 1 ゲットウ葉抽出液の 300°C 恒温分析ガスクロマトグラム

タノール/水=100/90/10、③n-ヘキサン/アセトニトリル=1/1、④n-ヘキサン/酢酸エチル/アセトニトリル=7/2/3、⑤ヘキサン/メタノール/アセトニトリル=7/2/3、⑥ヘキサン/クロロホルム/アセトニトリル=5/1/4の6条件の混合溶媒を調整し、各々2層に分かれた液を分別し、下層を固定層、上層を移動相にした上昇法で、CM混液エキスの分画条件を検討した。その結果、④の条件のヘキサン/酢酸エチル/アセトニトリル=7/2/3の組成の溶媒を使用し、表. 2に示す条件で最も良いピークの分離性を示すクロマトグラムが得られたので、以後のCPC分画にはこの組成の溶媒を使用した。

CPCクロマトグラムの例を図. 2に示す。

表. 2 遠心液々分配クロマトグラフィー分画条件

二層分配相	： ヘキサン/酢酸エチル/アセトニトリル=7:2:3	
カートリッジ	： 250 W 6個	(1000 E 12個)
分離モード	： 上昇法	
流速	： 3 ml/分	(6 ml/分)
回転数	： 1,400 rpm	(1,800 rpm)
検出器	： 紫外可視分光光度計 254 nm	

注) カッコ内はカートリッジを1000Eに変えた場合の条件。

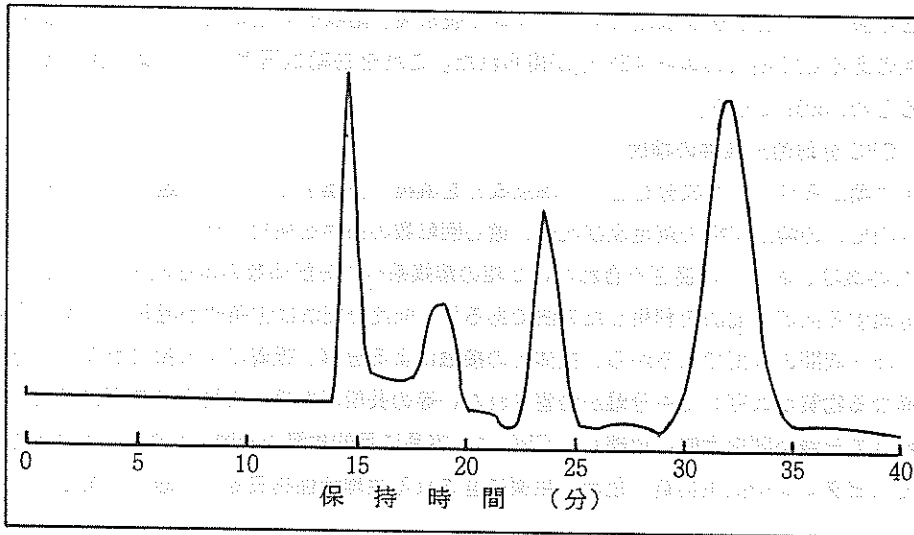


図. 2 ゲットウ葉抽出エキスのCPCクロマトグラム

3. 4 CM 混液抽出エキスの分画

CM 混液抽出エキスからワックス成分を分離、精製するために、CPC分画を行った。すなわち、総容量880mlの分取用のカートリッジ1000E、12個をCPC装置にセットし、グットウ葉から得られたCM抽出エキスを100mlのヘキサンに溶解した試料15mlを分画した。

このクロマト条件で1分間毎に分取を行い、得られた液を各々GC分析を行ってクロマトグラムに認められたピークの面積を合計して表示すると、図. 3に示すようにワックス含有量の最も多い区画No.58付近のピークとその両側のNo.30及びNo.86付近の低いピークの3つのピークが認められた。

認められた3つのピークに対応した区画を、図. 4のCPCクロマトグラムに示すように、フラクションコレクターで分取した。図. 3と図. 4を比較すると、ワックス含有量の推移とCPCクロマトグラムのピークの推移とは必ずしも対応してなく、若干異なっていた。このことはクロマトグラムのピークの成分とワックス成分が一致していないことを示す。なお、抽出エキスの大部分を占めるクロロフィルは図. 4には示していないが、リテンションタイム120分以降大量に出現する。

CM 混液エキスのヘキサン溶解液をCPCで分画を繰り返し行って3区画の部分に分取した後、溶媒を揮散して3区画の重量を測定した。

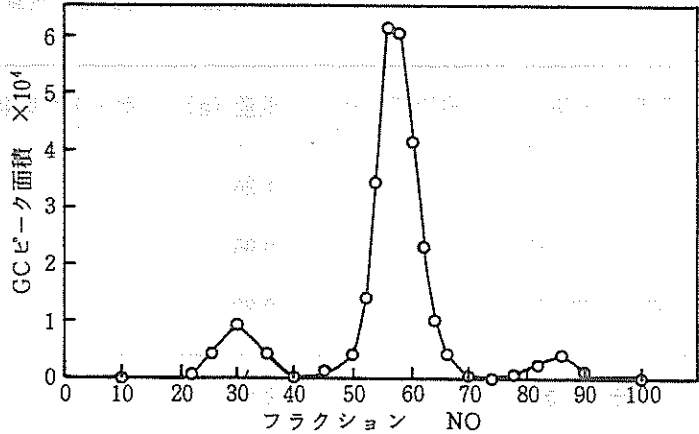


図. 3 CPCによる各フラクションのGCピーク面積

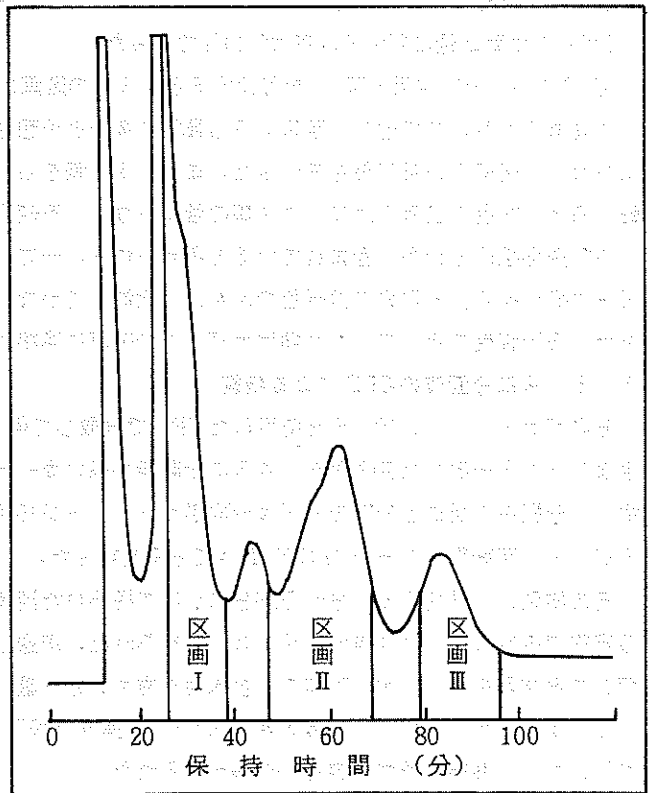


図. 4 CM 混液抽出エキスのCPCクロマトグラムと分取区画

表. 3 ゲットウ葉CPC 分画液の重量と収率

区画	分画No	分取時間 (分)	重量 (g)	ゲットウ葉重量に対する収率 (%)	性状
I	25—38	14	1.36	0.08	褐色
II	46—67	22	0.95	0.05	淡黄色
III	78—94	17	0.20	0.01	淡黄色
合 計			2.51	0.14	

その結果、表. 3 に示すように、褐色を呈する区画 I は 1.36g、淡黄色の区画 II は 0.95g、淡黄色の区画 III は 0.2g を示し、3 区画のうち、区画 I が最も大きい値を示した。分取した 3 区画の合計は 2.51g でゲットウ葉重量に対する収率は 0.14% であった。

図. 3 の GC 分析結果と図. 4 を対比すると、3 つの区画のうち区画 II が、分取する時間も長くワックス含有率も高いので他の 2 区画よりも量的に多いと予想されたが、表. 3 の結果では区画 II の量は少なく、区画 I の量が最も多かった。また、3 区画を GC 分析して得られたクロマトグラムを比較すると、褐色の区画 I はワックス類の量が少なく、不純物として GC では検出できない着色物質等の非揮発性成分が多く含まれていると考えられる。一方、II と III の GC 分析結果では、両者ともピーク高が高く、分取前の濃緑色のエキスを比較してかなり色が薄く淡黄色を示すことから、通常白色から淡黄色を示すワックス類は大部分この区画に濃縮されていると考えられる。

3. 5 分取分画液の CPC による精製

分取用カートリッジ 1000E を使用した CPC で分取して得られた 3 区画のうち、GC 分析で最も大きなピークを検出した II 区画を、さらに分離能の高いカートリッジ 250W 6 個 (総容量 125ml) に交換し、分配液の組成と分離モードは分取用カートリッジ 1000E で分画した場合と同条件にし、流速 3 ml/分、回転数 1,400rpm の CPC 条件で分画を行った。

その結果、試料注入後 27 分から 28 分にかけて得られた淡黄色の分画液を取り出し、溶媒を揮散する過程で透明なワックス様の針状結晶が認められた。濾過して得られた結晶を、温メタノールに溶解して再結晶を行い、水に不溶で、き水性を有する分子量 414 の結晶が得られた。

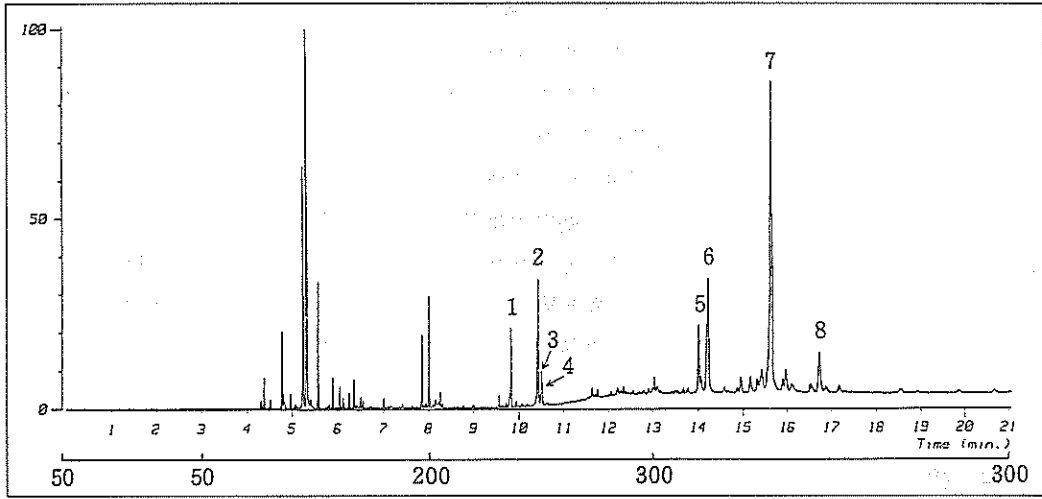
このようにゲットウ CM 混液エキスの CPC 分画を 2 段階に分けて行うだけで、目的成分が濃縮され、さらに再結晶操作で容易に結晶が得られた。

一般に微量成分の分離精製の方法は、イオン交換樹脂等の充填剤をカラムに詰めたカラムクロマトグラフィーで目的成分を濃縮した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等を利用して最終的な精製を行う。CPC を利用した本方法では、濃縮工程のカラムクロマトグラフィーの工程を省くことが可能なので、最終的に行う HPLC や再結晶による精製が短時間かつ容易になる可能性がある。したがって、CPC は大量の試料中の成分を濃縮する手段として、より有効な方法と考えられる。

3. 6 CPC 分画液に含まれるワックス成分のGC-MSによる同定

結晶化して得られた成分の同定を行うために、GC-MSによる測定を行い、スペクトルをGC-MS 付属のライブラリーから検索した。検索の結果、結晶成分のスペクトルはステロールに類似していたが、若干異なっており、また、マススペクトルを比較するための標準試薬が入手できなかったので、同定が困難であった。

この結晶成分以外にもワックス成分と考えられる成分が分画液に存在するので、これらの成分を分離するために、ゲットウ葉抽出エキスを250W カートリッジをセットしたCPCで分画した。



GC カラムの温度 (°C)

図. 5 ゲットウ葉CPC分画液のGC-MS トータルイオンクロマトグラフ

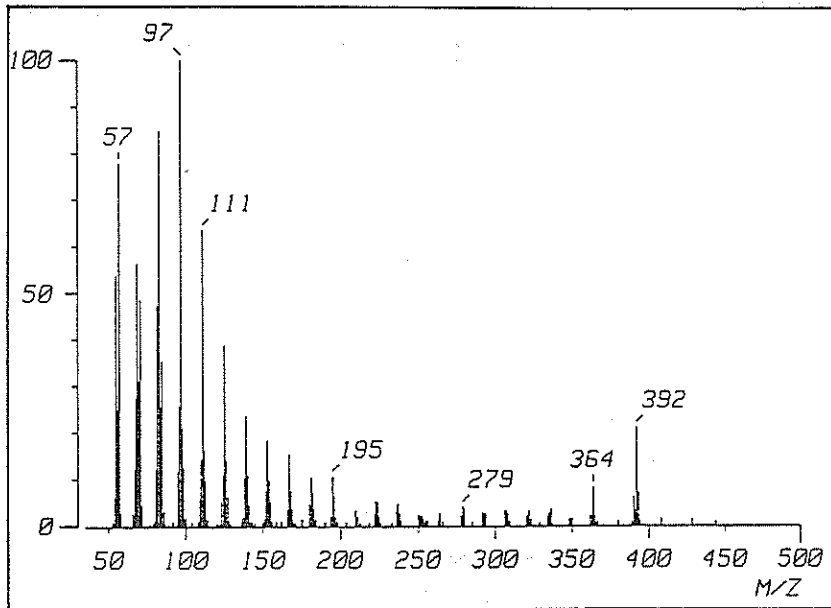


図. 6 ゲットウ葉に含まれる1-オクタコサノールのマススペクトル

ヘキサンに溶解したCM抽出エキスをCPCで分画すると、そのクロマトグラムの前半の30分以内にワックス類を含む低極性物質が出現し、ほとんどの色素類が除去される。分画前半の色素類を除去した褐色の透明なCPC分画液中の成分を、GC-MSで測定した。

その結果、図. 5に示すようなGC-MSのトータルイオンクロマトグラム(TIC)が得られ、主要成分12以上のピークが認められた。このうちワックス成分と考えられる250℃~300℃に出現する8つのピークについて同定を試みた。なお、分離して得られた結晶の成分は、図. 5の保持時間約15.6分に位置する大きなピークNo. 7に相当する。

図. 5の各ピークのスペクトルをライブラリーで検索し、標準試薬と比較した結果、No. 2はリノール酸メチル、No. 3はフィトール、No. 5は1-オクタコサノールと同定した。図6にゲットウ抽出分画液の1-オクタコサノールのマススペクトルを示す。その他、ピークNo. 1及びピークNo. 5の成分は高級脂肪酸エステルのスペクトルを示していた。

オクタコサノールは小麦胚芽油、米糠油、サトウキビ等に多く含まれており、耐久力、体力の増進、ストレスの影響に対する抵抗力の向上、基礎代謝率の向上に効果がある¹⁰⁾ことが知られており、生理活性物質として注目されている成分である。またフィトールはクロフィルの分解生成物でビタミンEやK₁の合成に用いられている。¹¹⁾含有量は少ないと思われるが、ゲットウ葉中に1-オクタコサノールの存在が認められたことは、今後ゲットウの利用を多方面への展開が可能になると考えられる。

4. 結 論

ゲットウ葉に含まれるワックス成分の同定及び抽出・分離技術を検討した結果、次の結果が得られた。

- (1) ゲットウ葉ワックス類を抽出する溶媒はクロロホルム：メタノール(2：1)が最適である。
- (2) 遠心液々分配クロマトグラフィーによるワックス成分の分離条件は、分配液にヘキサン：酢酸エチル：アセトニトリル(7：2：3)を使用し、分離モードは固定相に下層、移動相に上層を使用する上昇法を適用する。
- (3) ゲットウ葉に含まれるワックス類の収率は0.14%以下である。
- (4) ゲットウ葉を抽出したエキスをそのままCPC分画し単純な結晶化操作を行って、ステロール様の結晶を得た。
- (5) ワックス成分として1-オクタコサノールを同定した。
- (6) その他の成分としてリノール酸メチル、フィトールを同定した。

文 献

- (1) 府瀬川健蔵、ワックスの性質と応用、幸書房、1989
- (2) 尚 弘子、学位論文、1982
- (3) 池間洋一郎、照屋輝一、沖縄県工業試験場業務報告、16、143、1988
- (4) 池間洋一郎、照屋輝一、沖縄県工業試験場業務報告、18、43、1990
- (5) 財団法人 地域産業技術振興協会、地域基盤技術研究開発事業報告書、53、1991
- (6) 改訂 食品分析ハンドブック、122、建帛社、1984

- (7) 有機化学実験の手引 1、化学同人、1991
- (8) バイオ分離工学ハンドブック、214、(株)サイエンスフォーラム
- (9) CPC 技術資料2 遠心液々分配クロマトグラフ、三鬼エンジニアリング(株)
- (10) 食品と開発、26、vol. 27、No. 3、1992
- (11) 化学大辞典、1950、(株)東京化学同人、1989

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。