

バイオマス資源からの有用物質の分離・精製技術

— タイリングेटトウ葉精油の構成成分及び抗菌性について* —

化学室 池 間 洋一郎・比 嘉 三 利

1. はじめに

植物の精油は一般に香料として利用されているが、その作用は芳香作用に限らず殺虫剤、殺菌剤、消臭作用、皮膚刺激作用等の種々の効果を有しており¹⁾、その強弱は精油に含まれる個々の成分や組成に大きく影響される。

沖縄地域に生育するショウガ科植物ゲットウは、古くからその特徴ある香りが食品等に利用されており、現在沖縄県内では水蒸気蒸留によるタイリングेटトウ (*Alpinia uraiensis*) の精油が生産されている。

タイリングेटトウの精油は香料、殺ダニ剤、抗菌剤として利用されているが、カビ²⁾や細菌³⁾に対する作用が明らかにされただけで、その活性を示す主要成分はほとんど明らかにされていない。ゲットウ精油の利用度をさらに高めるためには精油中の活性を有する成分を同定し、その性質を把握する必要がある。

本報告はゲットウ精油に含まれる有用成分の同定を目的としており、今回タイリングेटトウ精油の新規成分の同定並びに精油の主成分に抗菌活性が認められたので報告する。

2. 実験方法

2. 1 試料

試料のゲットウ精油は、沖縄県の南大東島に生育しているタイリングेटトウ葉を100kgの規模で水蒸気蒸留して得られた精油を冷凍庫で-40℃に保存し、実験時に取り出して使用した。

2. 2 ゲットウ精油の化学処理による分別

図1のスキームに示すように、精油48.0gをジエチルエーテル(エーテル)480mlに溶解して1%炭酸水素ナトリウム可溶部、1%炭酸ナトリウム可溶部、1%水酸化ナトリウム可溶部、中性部の4つの区画に分別した。まず1%炭酸水素ナトリウム水溶液各160mlを加えて1ℓの分液ロートで3回振盪抽出し、有機相部と水相部に分けた。水相部は5%塩酸水溶液で中和し、エーテル160mlでさらに3回振盪抽出を行い、分けた有機相部を160mlの蒸留水で3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水、溶媒除去後これを1%炭酸水素ナトリウム可溶部(強酸性部)とした。一方水相部は1%炭酸水素ナトリウム可溶部と同様に5%塩酸水溶液で中和、エーテルで抽出して順次分別を行い、1%炭酸ナトリウム可溶部(弱酸性部)、1%水酸化ナトリウム(フェノール部)、中性部の3つの区画に分別した。

*) ゲットウの多目的・高度利用に関する研究(第8報)

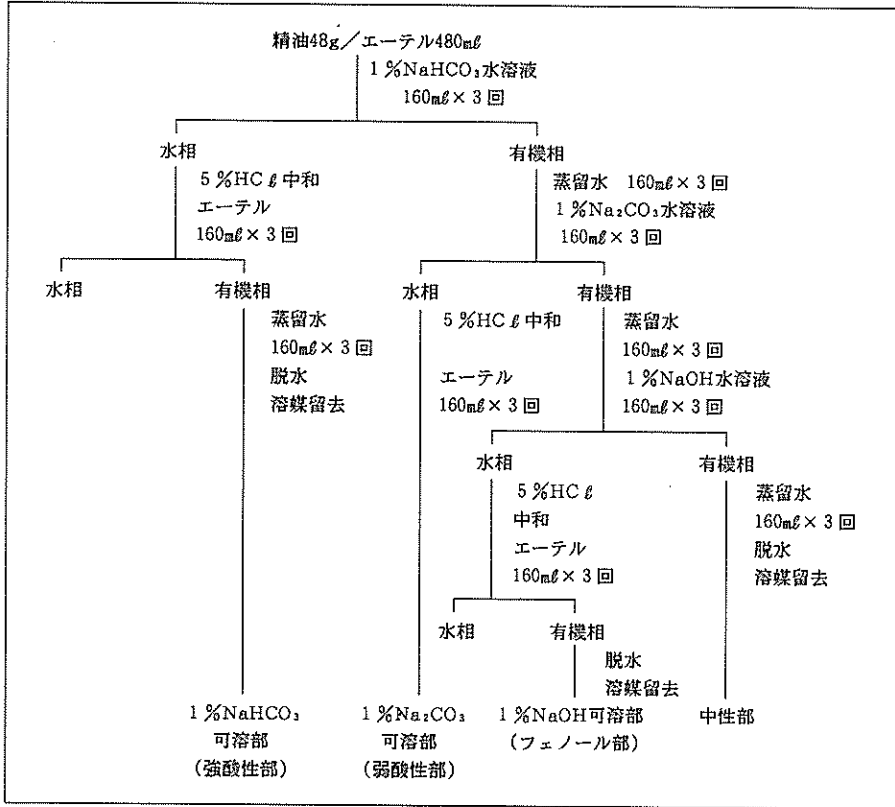


図1 ゲットウ精油の化学的処理分別

2. 3 カラムクロマトグラフィーによる精油中性部の分別

精油中性部を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精油成分の粗分別を行った。

内径25mm×200mmのカラムに吸着剤として80~230メッシュのシリカゲル (Merk製) 42gを充填し、少量のヘキサンに溶解した精油中性部1.0ml (0.99g) をカラム上端から注入した。そして、シリカゲルに対して溶出強度の異なる4種の有機溶媒ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、メチルアルコールの順に流速1.8ml/分、各々200mlで溶出した。溶出した各溶出区画を無水硫酸ナトリウムで脱水後ロータリーエバポレーターで減圧留去し、重量を測定した。

2. 4 機器分析法

2. 4. 1 ガスクロマトグラフィー (GC)

GCの分析条件は無極性のDB-1 (J&W製、内径0.32mm×60m、膜厚25μm) のキャピラリーカラムを使用した。温度条件は、50℃に5分間保持後210℃まで4℃/分の条件で昇温した。注入口温度は250℃、検出器はFID、キャリアーガスはヘリウムガスを使用した。試料の注入はスプリットレスで行った。含有量はGC分析のピーク面積値から求めた。

2. 4. 2 ガスクロ質量分析 (GC-MS)

GC-MSのGC部はカラム、温度条件ともGCと同条件で行い、MSの分析条件はイオン化電圧70 eV、イオン化源温度220℃、EIで行い、日本電子JMS-505H型GC-MSを使用した。

2. 5 成分の同定

GC-MS測定で得られた各々のピークのマスペクトルを、NISTデータを有するGC-MS付属のライブラリーのデータと比較し、類似度の高い成分のコンピューター検索を行った。

成分の同定は、検索した成分の標準物質を用いてGC-MS測定を行い、試料のマスペクトルと比較して一致することを確認し、さらに標準物質をGCで分析して試料のリテンションタイムとの一致で行った。標準物質を入手できなかった成分はマスペクトルをGC-MSライブラリーで検索したマスペクトルと比較し、類似度の高い成分を推定成分とした。

2. 6 抗菌力の測定

菌株は*Bacillus subtilis* (JCM 1465), *Escherichia coli* (JCM 1649), *Bacillus megaterium* (JCM 2506), *Bacillus cereus* (JCM 2152), *Pseudomonas fluorescens* (JCM 5963) の5菌株を使用した。

抗菌力の測定はペーパーディスク法で行った。すなわち菌株を試験管斜面培地に2日間30℃培養し、これを121℃、15分間高圧滅菌した2 mlの0.005%ラウリル硫酸ナトリウム溶液に1白金耳取り、振とう攪拌後、9 cmシャーレ平板培地表面に40 μ lを塗布した。この上に直径8 mmの濾紙を置き、ジメチルスルホキシド (DMSO) で20% (W/v) 濃度に希釈した各試料10 μ lを加えて30℃、24時間培養した。試験する試料の量は濾紙1枚あたり2 mgになる。試験は同一条件で3回を行い、培養終了後、平板培地上の濾紙の外側に認められる生育阻止円の直径を測定し、これを平均して抗菌力として表わした。対照はDMSOのみを使用して培養試験を行った。試験管斜面培地及び平板培地は市販の一般細菌測定用普通寒天培地 (栄研化学製) を使用した。

3. 結果及び考察

3. 1 ゲットウ精油の化学処理による分別

ゲットウ精油を中性部、1%NaHCO₃可溶部、1%Na₂CO₃可溶部、1%NaOH可溶部の4画分に分けた。その結果を表1に示す。中性部は精油48gのうち、91%を占める43.75gが得られ、ゲットウ精油のほとんどが中性部であることを確認した。1%NaHCO₃可溶部、1%Na₂CO₃可溶部、1%NaOH可溶部は中性部に比較していずれも約0.23%以下で少なく、1%NaHCO₃可溶部が最も少ない0.1%を示した。各分別した液を合計すると約43.986gとなり、これは分別前の未処理精油48gの約91.6%となる。残りの8.4%は、精油の分別時に洗浄水が微淡黄色になることから精油中の水溶性成分等が洗浄水に移行したものと考えられる。

表1 ゲットウ精油の化学分別

| 区 画 | 中性部 | 1%NaHCO ₃ 可溶部 | 1%Na ₂ CO ₃ 可溶部 | 1%NaOH可溶部 |
|---------|--------|--------------------------|---------------------------------------|-----------|
| 重 量 (g) | 43.751 | 0.049 | 0.076 | 0.110 |
| 組成比 (%) | 91.15 | 0.10 | 0.16 | 0.23 |

3. 2 カラムクロマトグラフィーによるゲットウ精油中性部の分画

精油を化学処理して得られた中性部0.99gをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画を行った。その結果を表2に示す。4区画のうち最も量が多い区画は酢酸エチル区画で約38%を占め、クロロホルム区画とメタノール区画は各々約15~16%の値を示した。最も多い酢酸エチル区画と次に多いヘキサン区画30.8%を合わせると全体の約70%を占めることが分かった。

表2 カラムクロマトグラフィーによる中性部の分画

| 溶媒の種類 | ヘキサン | クロロホルム | 酢酸エチル | メタノール | 合計 |
|--------|-------|--------|-------|-------|------|
| 重量 (g) | 0.252 | 0.131 | 0.313 | 0.124 | 0.82 |
| 割合 (%) | 30.8 | 15.9 | 38.1 | 15.1 | 99.9 |

3. 3 ゲットウ精油中性部分画液の成分同定

化学分別で得られたゲットウ中性部及びシリカゲルクロマトグラフィー分画後のヘキサン区画、クロロホルム区画、酢酸エチル区画の成分をGC及びGC-MSで測定し、各々の成分を同定した。メタノール区画及び1%NaOH可溶部の成分はGC-MSデータライブラリーのスペクトルと類似度の高い成分は認められなかったので成分の同定ができなかった。精油中性部の成分のピークを図2のガスクロマトグラムに示す。

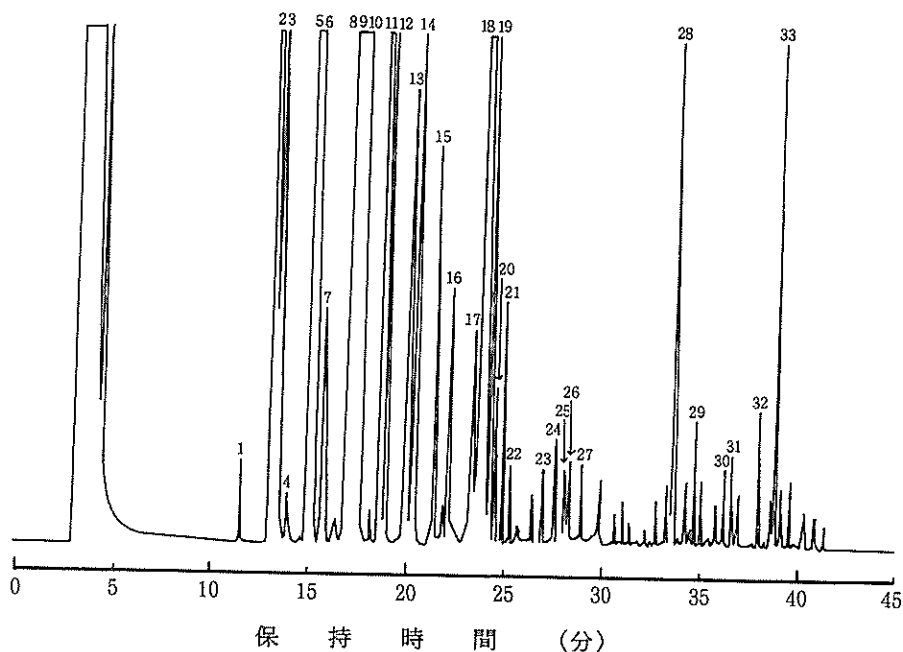


図2 ゲットウ葉精油中性部のガスクロマトグラム

各々の区画を分析すると、ヘキサン区画には α -ピネン（ピークNa3）、カンフェン（ピークNa4）、サビネン（ピークNa5）、 β -ピネン（ピークNa6）、ミルセン（ピークNa7）、p-シメン（ピークNa8）、リモネン（ピークNa10）、 γ -テルピネン（ピークNa11）、メチルアセトフェノン（ピークNa17）、キャリオフィレン（ピークNa28）の10成分が認められ、クロロホルム区画には1,8-シネオール（ピークNa9）、テルピネン-4-オール（ピークNa18）、ピペリトール（ピークNa20）、酢酸ボルニル（ピークNa25）、カルバクロール（ピークNa26）、ネロリドール（ピークNa32）の6成分が認められた。

酢酸エチル区画には1,8-シネオール（ピークNa9）、リナロール（ピークNa14）、シス-P-メンゼン-1-オール（ピークNa15）、1-テルピネン-4-オール（ピークNa18）、 α -テルピネオール（ピークNa19）の5成分が認められた。

同定あるいは推定したゲットウ精油の21成分をまとめて表3に示す。

表3 ゲットウ精油成分の同定及び推定

| Na | 成分名 | 成分の確認方法 | 検出区画 |
|----|-------------------|-----------|--------------|
| 1 | α -ピネン | GC-MS, GC | ヘキサン |
| 2 | カンフェン | GC-MS, GC | 〃 |
| 3 | サビネン | GC-MS | 〃 |
| 4 | β -ピネン | GC-MS, GC | 〃 |
| 5 | ミルセン | GC-MS, GC | 〃 |
| 6 | p-シメン | GC-MS, GC | 〃 |
| 7 | 1,8-シネオール | GC-MS, GC | クロロホルム、酢酸エチル |
| 8 | リモネン | GC-MS, GC | 〃 |
| 9 | γ -テルピネン | GC-MS | 〃 |
| 10 | リナロール | GC-MS, GC | 酢酸エチル |
| 11 | シス-2-メンゼン-1-オール | GC-MS | 〃 |
| 12 | メチルアセトフェノン | GC-MS, GC | ヘキサン |
| 13 | 1-テルピネン-4-オール | GC-MS, GC | クロロホルム、酢酸エチル |
| 14 | α -テルピネオール | GC-MS, GC | 酢酸エチル |
| 15 | ピペリトール | GC-MS | 〃 |
| 16 | 酢酸ボルニル | GC-MS, GC | クロロホルム |
| 17 | カルバクロール | GC-MS, GC | 〃 |
| 18 | β -キャリオフィレン | GC-MS, GC | ヘキサン |
| 19 | α -フムレン | GC-MS, GC | 〃 |
| 20 | γ -ムロレン | GC-MS | 〃 |
| 21 | ネロリドール | GC-MS, GC | クロロホルム |

タイリゲットウの精油成分はこれまでにシネオール、テルピネン-4-オール、p-シメンの主成分を含む18成分が同定あるいは推定されている²⁾。GC-MSを使用した本試験結果でも、 α -ピネン、カンフェン、 β -ピネン、p-シメン、1, 8-シネオール、リナロール、テルピネン-4-オール、 α -テルピネオール、カルバクロール、 α -フムレン等の11成分が認められ、また今回新たにサビネン、ミルセン、リモネン、 γ -テルピネン、シス-P-メンセン-1-オール、メチルアセトフェノン、ピペリトール、酢酸ボルニル、キャリオフィレン、 γ -ムロレン、ネロリドールの11成分を同定あるいは推定した。

同定したこれらの成分は各種の植物精油に存在が認められており、サビネン、p-メンセン-2-オール、ピペリトールは工業的にはほとんど利用されていない¹⁾が、リモネンはオレンジ油、レモン油に90%以上含まれ食品や化粧品に使用されている。テルピネン-4-オールはセッケン、香水、化粧品様香料として重要な α -テルピネオールの代用品として利用されている¹⁾。1, 8-シネオールはショウノウ様香気を有し、ユーカリ油に60~70%、ヨモギ油に50%以上含まれ、皮膚刺激作用を有し¹⁾、また去痰作用を示し、鼻炎や気管支炎などに吸入剤としても用いられる。⁵⁾

3. 4 細菌に対するゲットウ精油の抗菌性

精油を食品用防腐剤として利用できる可能性を検討するために、代表的な食品腐敗細菌⁶⁾に対する精油の抗菌性を比較した。

精油を20、10、5、2.5%の4段階に希釈し、この10 μ lを5種類の細菌に対する精油の抗菌性を比較した。その抗菌力の結果を表4に示す。この結果から精油の抗菌力は低温腐敗細菌*P.fluorescens*に対して最も強く、0.5mg/汚紙(濃度5%)でも生育阻止円が認められるが、他の4種の菌は1mg/汚紙(濃度10%)以下の濃度では抗菌性は認められず、2mg/汚紙(20%)濃度になると始めて生育阻止円が認められた。

精油2mg/汚紙(濃度20%)の条件での各菌の感受性を比較すると、各々生育阻止円の大きさに差が認められ、最も感受性の高い細菌は*P.fluorescens*、その次に高い菌は*B.subtilis*である。

ゲットウ精油の抗菌作用に関しては食中毒菌の黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオ菌、大腸菌に対して生育抑制作用があることが認められており³⁾、菌種は異なるが、本試験でも食品等の腐敗細菌といわれる*B.subtilis*(枯草菌)、*B.cereus*、*B.megaterium*、*P.fluorescens*と腸内細菌の*E.coli*(大腸菌)に対して、タイリゲットウ精油は、市販の抗菌剤と比較して抗菌力は弱い、明らかにこれら腐敗細菌や腸内細菌の生育を抑制する効果のあることが分かった。

表4 各種細菌に対するゲットウ精油の抗菌性

| 菌株名 | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | (試料mg/disk) |
|---|------|------|-----|------|-------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> (JCM 1465) | 11.5 | 8 | 8 | 8 | (mm) |
| <i>Escherichia coli</i> (JCM 1649) | 10.4 | 8 | 8 | 8 | |
| <i>Bacillus megaterium</i> (JCM 2506) | 10.9 | 8 | 8 | 8 | |
| <i>Bacillus cereus</i> (JCM 2152) | 9.8 | 8 | 8 | 8 | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (JCM 5963) | 13.8 | 11.4 | 9.5 | 8 | |

注) *Pseudomonas fluorescens* (JCM5963) の培養は26℃で行った。

注) 生育阻止円の直径は使用した汚紙(8mm)の長さも含む。

3. 5 精油中性部およびクロマトグラフィー分画液の抗菌性

抗菌活性を有する成分を検索する目的で、*B.subtilis*を用いて精油中性部、クロマトグラフィーによる4分画液の抗菌力を測定した。

その結果を表5に示す。それぞれの結果から生育阻止円の大きさは、酢酸エチル区画と中性部が最も大きく、ヘキサン区画はやや大きく、クロロホルム区画は小さかった。メタノール区画には抗菌力は認められなかった。分別した中性部が分画前の精油よりも抗菌力が強く、酢酸エチル区画の抗菌力が強くなることは、分別することにより、中性部に主要な抗菌成分が含まれ、またクロマト分画により酢酸エチル区画に濃縮されたことが推察される。

以上のことから精油の主要な抗菌成分は中性部に存在し、また中性部の酢酸エチル区画に存在することが分かった。

表5 精油中性部及びカラムクロマトグラフィー分画液の抗菌性

| 区 画 | 精 油 | 中 性 部 | ヘキサン | クロロホルム | 酢酸エチル | メタノール |
|--------------|------|-------|------|--------|-------|-------|
| 生育阻止円直径 (mm) | 11.5 | 22.1 | 15.6 | 11 | 23.1 | 8 |

注) 生育阻止円の直径は使用した濾紙(8mm)の長さも含む。

3. 6 酢酸エチル区画に含有される主要成分の抗菌性

抗菌性が最も強く認められた酢酸エチル区画の主成分の抗菌性を比較した。図3のGCクロマトグラムに示すように、ピークNo.9のテルピネン-4-オール(57.4%)が最もピーク面積が大きく、ピークNo.4のシネオール(18.6%)、ピークNo.6のリナロール(5.0%)の3成分で、81%になり、酢酸エチル区画はほとんどこの3成分で占める。これら3成分と標準試薬を入手できたピークNo.10の α -テルピネオール(0.9%)の標準試薬を使用して抗菌性を測定した。

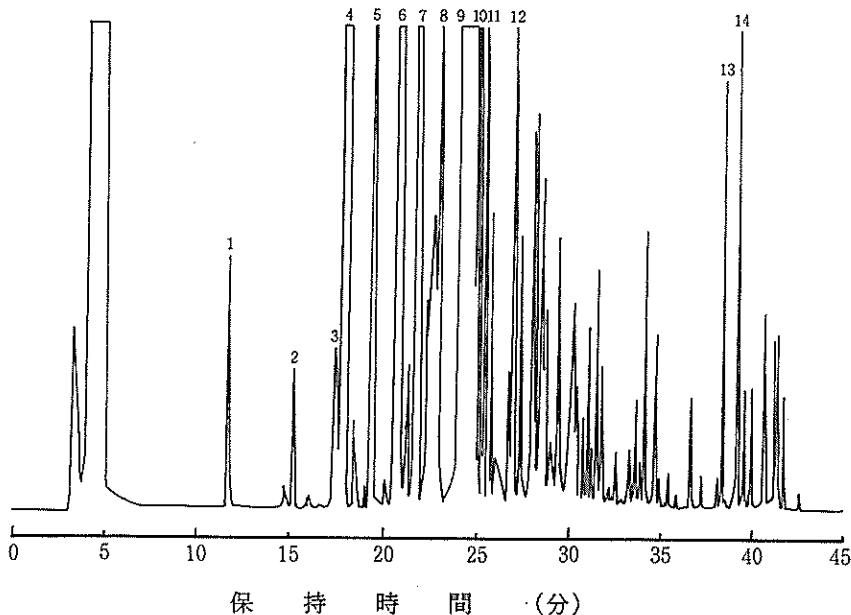


図3 酢酸エチル分画液のガスクロマトグラム

表6の結果に示すように、1, 8-シネオールには生育阻止円が認められなかったが、中性部とリナロール、テルピネン-4-オール、 α -テルピネオールの3成分に抗菌性が認められた。精油中性部と各成分を比較すると、テルピネン-4-オール、リナロール、 α -テルピネオールは中性部よりも弱い抗菌力をもつことがわかった。

リナロールは比較的殺菌作用が強いことが知られており¹⁾、またシネオールは防腐作用をもつことが知られ²⁾、抗カビ力を有しているが²⁾、本試験では細菌に対するシネオールの抗菌性は全く認められなかった。このような抗菌力の差は、抗菌性を測定する場合の試料濃度の差あるいはカビと細菌の感受性の差異または抗菌力測定法の違いによるものと考えられる。

これらの結果から酢酸エチル区画の抗菌性は、主成分のテルピネン-4-オール、リナロール、 α -テルピネオールが関与していることが推察される。

表6 酢酸エチル区画成分の抗菌性

| 成分名 | 中性部 | シネオール | テルピネン-4-オール | リナロール | α -テルピネオール |
|--------------|-----|-------|-------------|-------|-------------------|
| 生育阻止円直径 (mm) | 22 | 8 | 16 | 14.6 | 11.5 |

注) 生育阻止円の直径は使用した濾紙(8mm)の長さも含む。

4. まとめ

南大東島産のタイリングットウ精油の化学的処理による分別及びシリカゲルクロマトグラフィーによる分画を行い、精油成分の同定及び抗菌成分の検索を行った。

- (1) ゲットウ精油の中性部は91%を示し、1%炭酸水素ナトリウム可溶部、1%炭酸ナトリウム可溶部、1%水酸化ナトリウム可溶部はいずれも0.23%以下の組成を示した。
- (2) シリカゲルクロマトグラフィーでヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、メタノール区画に分画した結果、酢酸エチル区画が最も多く38.1%を示し、ヘキサン区画を合わせると約70%を占めた。
- (3) クロマト分画した各区画をGC及びGC-MSで同定した結果、表3に示す21成分を確認した。
- (4) 腐敗細菌を主とする5種類の細菌に対する精油の抗菌性を比較した結果、精油はいずれの菌に対しても2mg/濾紙の濃度で抗菌性を有し、また最も感受性の高い菌は低温腐敗細菌の*P. fluorescens*で、0.2mg/濾紙以上の濃度で感受性を示した。
- (5) 精油を化学的分別及びクロマトグラフィー分画した区画の抗菌性を比較した結果、中性部は抗菌力が強く、また中性部の酢酸エチル区画が最も強い抗菌力を示した。
- (6) 抗菌力の強い酢酸エチル区画の81%を占める3成分のうち、シネオールは抗菌性は認められなかったが、リナロール、テルピネン-4-オールの2成分は抗菌力を示した。

5. 参考文献

- 1) 奥田 治、香料化学総覧2、1980、廣川書店
- 2) 池間洋一郎、照屋輝一、沖縄県工業試験場業務報告、16、143、1988

- 3) (株) トロピカルテクノセンター、地域基盤技術研究開発事業報告書、222、1992
- 4) 亀岡 弘、エッセンシャルオイルの化学、1990、裳華房
- 5) 奥田拓男編、天然薬物辞典、195、1976、廣川書店
- 6) 食品科学便覧編集委員会編、食品科学便覧、共立出版、1979
- 7) 玉虫分一他、理化学辞典、岩波書店、589、1986

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。