

南大東島産ゲットウ葉精油成分の分離条件 及び抗カビ性

化学室 池 間 洋一郎

照 屋 輝 一

1. 緒言

ゲットウは、沖縄県全域に自生しているが、中でも南大東島には大量に賦存し、現在ゲットウの重要な供給源となっており、県内唯一の100kg/バッチの水蒸気蒸留装置が設置されゲットウ葉精油が生産されている。

南大東島に生育するゲットウ *Alpinia uraiensis*¹⁾ (タイリンゲットウ) と沖縄本島産ゲットウ *Alpinia speciosa*. k. Schum とは品種が異なり、香りの強さなどに差が認められる。

著者らは、これまでゲットウの高度利用の一環として沖縄本島産ゲットウからゲットウ葉精油を分離し、その構成成分について検討し^{2) 3)}、さらに南大東島において工業的生産供給体制が整備され生産されているゲットウ精油を用いて成分、抗カビ性について報告してきた⁴⁾。

本研究では前報⁴⁾と同様南大東島で工業的に生産されたゲットウ葉精油を使用し、精油に含有される各種成分を液体クロマトグラフィーを利用した分離条件の検討及びカラムクロマトグラフィーで分画した区画の抗カビ性を検討したので報告する。

2. 試料及び実験方法

2.1 試料

試料のゲットウ精油は、南大東島ゲットウ葉から100kg/バッチの工業用水蒸気蒸留装置で生産したものを使用した。

2.2 精油の化学処理

前報³⁾に準じて南大東島産ゲットウ葉精油20gを5%炭酸水素ナトリウム水溶液及び5%水酸化ナトリウム水溶液で化学処理を行い、カルボン酸部、フェノール部、中性部に分画した。精油の95%を占める中性部は、沖縄本島産のゲットウと同様ゲットウの特有香を有しており、本実験ではゲットウ精油の大部分を占める中性部を-40℃の冷凍庫に保存しておき、実験時に取り出して使用した。

2.3 ガスクロマトグラフィー

精油成分の同定及び分離した成分の純度確認のための分析は、ガスクロマトグラフィー (GC) で行った。

分析条件は前報³⁾と同様強極性のCBP-20 (0.33mm×50m)のキャピラリーカラムを使用した。温度条件は、50℃に4分間保持後200℃まで3℃/分昇温操作後200℃で6分間保持して行った。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。成分の同定には標準試薬の保持時間との一致で行った。

2.4 紫外線及び赤外線吸収スペクトルの測定

紫外線吸収スペクトルの測定は可視紫外分光光度計を使用した。赤外線吸収スペクトルの測定は、試料をシクロヘキサンに溶解して臭化カリ粉末に滴下し、デシケーター中で溶媒揮散後錠剤化して日本分光フーリエ変換型IR-8000型を使用して行った。

なお、同定のための標準物質には標準試薬を入手し使用した。

2.5 カラムクロマトグラフィーによる精油成分の分析

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分別を行った。

内径15mm×60cm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)40g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ヘキサン、塩化メチレン、クロロホルム、酢酸エチル、メチルアルコールの5種の有機溶媒各々160mlで溶出した。溶出した各溶出区画を窒素気流下でロータリーエバポレーターで減圧留去した後、香りの官能試験及び重量測定を行った。

2.6 抗カビ力の測定方法

抗カビ力測定のカビ菌株は、前報⁴⁾で精油に感受性の高かった*Penicillium citrinum*(青カビ)を使用し、試験管斜面培地で26℃、10日間培養して胞子の着生を十分に行った後、実験に使用した。

カラムクロマトグラフィー及び分取して得られた試料をシクロヘキサンに溶解した後、5μlを滅菌した直径8mmの円形ろ紙に均一に滴下した。これをクリーンベンチ内で10分間放置して溶媒を揮散し、直径9cmシャーレの平面培地上に置いた。

カビ胞子の接種は、滅菌した0.005%のラウリル硫酸ナトリウム水溶液2mlに斜面培地より胞子2白金耳とり、2分間振とう攪はんして胞子を十分に懸濁した後、これを平面培地上のろ紙に10μl滴下接種した。培養は恒温器で26℃、3日間行い、カビの生育状態を観察して抗カビ力を判定した。対照としてシクロヘキサンのみを加えたろ紙に胞子を接種した後、培養して抗カビ力を判定した。

試験管斜面培地及び抗カビ力測定用培地は、ポテトデキストロース寒天培地(榮研化学)を使用した。

3. 結果及び考察

3.1 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による精油成分分取条件の検討

精油に含まれる成分を分離・精製する手段として、分取HPLCを適用するため分離条件の検討を行った。

まず、精油中性部の成分をHPLCで検出する波長を決定するため、精油中性部の紫外線吸収スペクトルを分光光度計で測定した。精油中性部は図1に示すように波長200～470nmの範囲内で紫外部の吸収がみられ、これをヘキサンに溶解すると精油の高波長側の吸収が低波長側に移動し、吸収範囲は200～290nmになった。

移動相として精油をよく溶解し、かつ精油のも

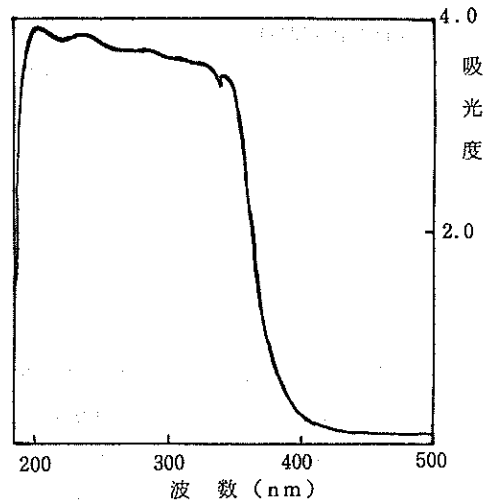


図1 南大東島産精油中性部の紫外線吸収スペクトル

つ紫外線吸収波長域が溶媒のもつ吸収波長域と重なりが少ない溶媒を決定するため、n-ヘキサン、ベンゼン、酢酸エチル、クロロホルム、メチルアルコール、石油エーテル、エチルアルコールの7種類の有機溶媒の紫外線吸収スペクトルを測定した。精油中性部の吸収スペクトルと有機溶媒の吸収スペクトルを比較すると、ベンゼンを除いた6溶媒が精油成分の吸収波長域と重複部分が少なく、精油成分のHPLC分取に適当と思われる。これら6種類の有機溶媒のスペクトルと精油中性部のスペクトルの差を求めると、精油の最大吸収波長は270 nm付近に存在していることがわかった。

以上の結果からHPLCの分取条件の検出波長を270nmに設定した。また、移動相は分取後の溶媒留去を考慮して、試験した有機溶媒の中から低沸点の溶媒を選び、流量、移動相組成を検討した。その結果、ヘキサンをベースに酢酸エチルの濃度を変えて精油中性部のHPLC分析を行うことにより、分離の良好なクロマトグラムが得られることがわかった。HPLC分析のクロマトグラムの1例を図2に、検討した分取HPLC条件の結果を表1に示す。

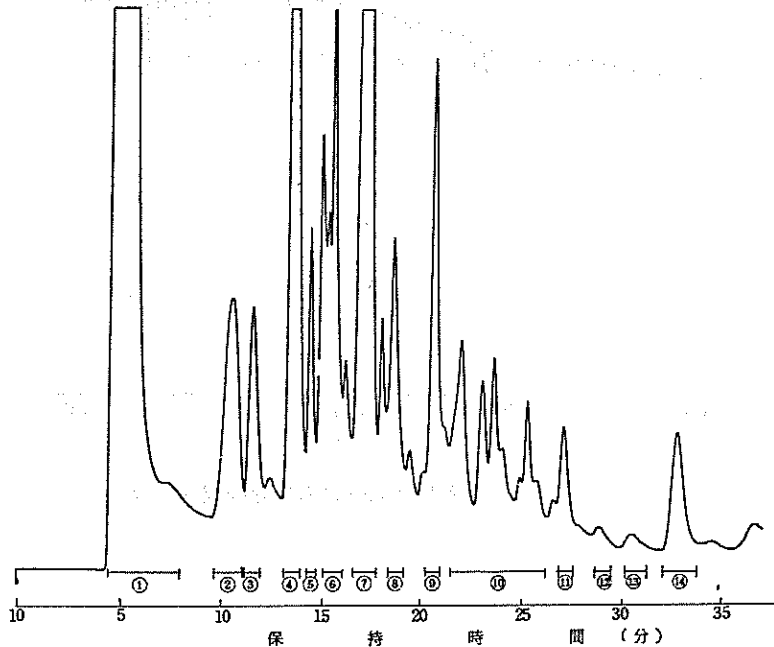


図2 分取液クロマトグラム
①~⑭は分取区分

表1 ゲットウ精油の高速液クロ分取条件

カラム：ラジアルパック マイクロポラシル (25 mm × 10 cm)
移動相：ヘキサン：酢酸エチル (2% → 30%)
流量：10 ml/分
検出器：紫外可視分光検出器
波長：270 nm
注入量：400 μl

このような分取条件で精油中性部を図2に示すように14の区画に分けて分取を試みた。得られた分取区画を窒素気流中で減圧下溶媒留去した後GC分析を行った結果、分取区画②、④、⑩は単一のピークとなりほぼ純粋な成分であることを確認した。このように精油成分の分離において、前処理なく1回のHPLC分取で3区画の成分が分離できたことは、HPLCが精油の成分分離方法として有効な方法と考えられる。

3.2 成分の同定

分取HPLCで得られた各分取区画のうちGC分析で確認した純度の高い区画の赤外線吸収スペクトルを測定した結果、分取区画②は図3の例に示すように標準試薬とほぼ同じ吸収スペクトルが

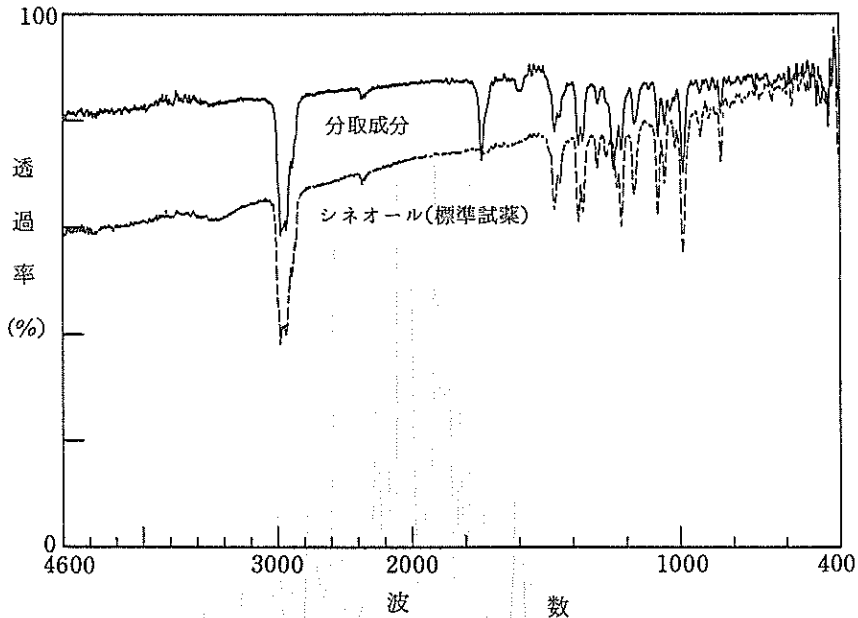


図3 分取した成分の赤外線吸収スペクトル

得られた。分取区画②の成分はGC分析及び赤外吸収スペクトルを比較してシネオールと同定した。

シネオールはGC分析で標準試薬との比較により、南大東島産ゲットウ葉精油にその存在を推定していた⁴⁾が、本実験でHPLC分取後の赤外吸収スペクトルを測定して南大東島産精油に含まれていることを確認した。

シネオールは南大東島産精油にGC分析の面積値で約16.6%含まれており、⁴⁾分析した成分の中では最も含有量が多い成分である。シネオールはショウガ根茎⁵⁾、ユーカリ油やジンジャーなど多くの精油に広く存在する成分でもあり、ショウノウやハッカに似た清涼な香気がある⁶⁾といわれていることから、ゲットウの特有香に重要な役割を果たしていると思われる。

またシネオールは鎮咳剤や化粧品等の用途があり⁶⁾工業原料としても利用されていることから、シネオールが多く含有されているゲットウ精油は、多くの用途に利用できる可能性がある。

HPLC分取して得られたその他の単一成分の分取区画の同定は、今後行う予定である。

3.3 分取HPLC区画の抗カビ性

分取した14区画を各々約3%になるようにシクロヘキサンを加えて、これを抗カビ性の試験に供試した。表2に示すように14区画のうち①、②、⑧、⑪、⑫、⑬、⑭の7区画は対照と同様にカビの生育が認められたが、区画⑦、⑩はカビの生育が認められず、区画③、④、⑤、⑥、⑨はやや生育阻害が認められた。

表2 分取区画における *Penicillium. citrinum* の發育

区分 No.	対照	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
生育度	+++	+++	+++	+	++	+	++	-	+++	+	-	+++	+++	+++	+++

生育度：-生育していない。+生育している。++よく生育している。+++非常によく生育している。

HPLC分取で得られたほぼ純粋な分取区画は、シネオールを含む区画のいずれにも生育阻害は認められなかった。標準試薬のシネオールは前報⁴⁾では濃度5%から弱い抗カビ性が認められたが、本実験では試験に使用した分取区分のシネオール濃度が3%と低いせいか抗カビ性は認められなかった。

3.4 カラムクロマトグラフィー分別液の組成

南大東島産ゲットウ葉精油が抗カビ活性を有することはすでに明らかにされているが、精油から抗カビ活性成分を分別する目的で、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精油の分別を行った。⁴⁾

分別した各溶出区画を溶媒留去した後の重量組成と香り強度を表3に示す。各溶出区画の組成を

表3 南大東島産ゲットウ葉精油中性部のシリカゲルによる分別

溶出区画	重量 (g)	組成 (%)	香り強度*
n-ヘキサン	0.31	35.2	++
塩化メチレン	0.02	2.2	++
クロロホルム	0.12	13.6	++
酢酸エチル	0.31	35.2	++
メチルアルコール	0.12	13.6	+
計	0.88	99.8	

*+++：香り強い +香り弱い

比較すると、n-ヘキサンと酢酸エチル溶出区画に同量ずつ含まれ、両者を合わせると全体の70.4%を示した。最も少ない区画は塩化メチレン溶出区画で2.2%の値を示した。クロロホルム、メチルアルコール区画は同量で各々13.6%を示した。

5 溶出区画の香りを比較すると、ヘキサン区画は柑橘様の香り、塩化メチレン区画はヘキサン区画にやや近いが異なった香りを有していた。クロロホルム、酢酸エチル区画は共通なバッカ様の香りを示したが、両者の香りの質は異なり酢酸エチル区画がやや酸を帯びた香りを有していた。メチルアルコール区画は他の4区画とは全く異なる重い特有の香りを有し、香りの強度は弱かった。他の4溶出区画の香り強度は、ほぼ同じ香り強度を示した。

3.5 カラムクロマトグラフィー分別液の抗カビ性

各溶出区画にシクロヘキサンを加えて40%になるように希釈して、抗カビ力を試験した。表4

表4 シリカゲルカラム溶出区画に対する *Penicillium citrinum* の生育

溶出区画	対 照	ヘキサン	塩化メチレン	クロロホルム	酢酸エチル	メチルアルコール
生 育	+++	+++	+++	—	—	+++

生育度：— 生育していない +++ 非常によく生育している

に示すようにヘキサン、塩化メチレン、メチルアルコール溶出区画には対照と同程度のカビの生育が認められたが、クロロホルムと酢酸エチル溶出区画は *Penicillium citrinum* の生育を完全に阻害する効果を示し、精油中性部の48.8%を示す両溶出区画に強力な抗カビ活性を有することが分かった。

南大東島産ゲットウ葉精油は20%以上の濃度でカビ類の生育を阻害することが認められているが、本試験の結果、精油の抗カビ活性はクロロホルム、酢酸エチル両溶出区画に存在することがわかった。

4. まとめ

南大東島産のゲットウ(タイリングゲットウ: *Alpinia uraiensis*) 葉精油の構成成分の高速液体クロマトグラフィーによる分離方法の検討及びカラムクロマトグラフィーによる分別成分の抗カビ性を検討し、次の結果を得た。

1. 精油中性部から精油成分を分離するためには、シリカゲル系のカラムを使用し、検出波長270nm、移動相にはヘキサン:酢酸エチル混合溶媒を使用する分取HPLC条件が得られた。
2. ゲットウ精油をHPLC分取して得られた分取区画14区画のうち、3区画が純度の高い区画で、これをGC分析及び赤外線吸収スペクトルを測定した結果、1区画をシネオールと同定した。
3. HPLCで分取した14区画の抗カビ性を試験を行った結果、7区画に抗カビ性が存在した。
4. シリカゲルカラムクロマトグラフィーでゲットウ精油中性部をn-ヘキサン、塩化メチレン、クロロホルム、酢酸エチル及びメチルアルコールにより溶出分別した結果、精油成分は全体の約70.4%の量をn-ヘキサン、酢酸エチル区画に占めていた。
5. 精油中性部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで溶出した各区画の抗カビ性試験を行っ

た結果、n-ヘキサン、メチルアルコール溶出区画はカビの生育阻害は全く認められなかったが、クロロホルム、酢酸エチルの合わせて48.8%を占める溶出区画がカビの生育を完全に阻害した。したがって、南大東島産ゲットウ葉精油中性部の抗カビ活性はクロロホルム、酢酸エチル溶出区画に存在する。

5. 文 献

- 1) 平良喜代志、：「沖縄の樹木」, 404, 新星図書(1987)
- 2) 池間洋一郎、島袋勇、照屋輝一 : 沖縄県工業試験場業務報告, 15, 69(1987)
- 3) 池間洋一郎、照屋輝一 : 沖縄県工業試験場業務報告, 15, 75(1987)
- 4) 池間洋一郎、照屋輝一 : 沖縄県工業試験場業務報告, 16, 143(1988)
- 5) 阪村倭貴子、林修一 : 日本農芸化学会雑誌, 52, 207(1978)
- 6) 奥田治 : 「香料化学総覧2」, 695、廣川書店 (1980)

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。