

# HPLC による海藻由来成分の分析 . I.

コモングサ属よりの抽出物質のクロマトグラム

## Analysis of The Extracts from Seaweeds on HPLC. I.

Chromatograms of The Extracts from *Spatoglossum*

東京水産大学

東京海洋大学

歯 学 部

長谷川 和 清

田 嶋 祥 乃 介

田 中 次 郎

柴 田 潔

Kazukiyo HASEGAWA

*Graduate school of Fisheries Science, Tokyo University of Fisheries,  
Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, JAPAN*

Jounosuke TAJIMA and Jiro TANAKA

*Graduate school of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology,  
Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, JAPAN*

Kiyoshi SHIBATA

*Department of Chemistry, The Nippon Dental University,  
Fujimi 1-9-20, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, JAPAN*

(2004 年 12 月 17 日 受理)

The chromatograms of extracts from *Spatoglossum* were majored on HPLC. Each seaweed showed different retention time pattern on the chromatogram. So the retention time patterns are one of the basis for the identification of the seaweed. As a silica gel C-18 was used on HPLC to detect retention times, the elucidation patterns can be used to identify seaweeds on silica gel TLC.

藻類に含まれる有機可溶成分には、色素類<sup>1)</sup>や種特異的な物質が含まれ、褐藻類だけを見ても有機可溶成分から多くの生理活性物質が報告されている。<sup>2)</sup>異なる種類の藻類であればその含有成分も異なることが予想される。

これとは別に、藻類は形態的特徴を基準に分類されているが、生育場所や環境により形態が大きく変化し、種同定が容易でない場合がある。そこで、種の同定の一助として藻類に含まれる有機可溶成分に着目し、含まれる成分を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い、比較検討する事により同一種か否か判別出来ないかを検討した。すなわち、HPLC を用いてクロマトグラムを作成し、それ

より含まれる有機可溶成分の保持時間(Retention Time)やピーク面積を計測してその差異を検討した。その結果、HPLCのクロマトグラムから有用な情報が得られたので、以下に報告する。

本研究の対象として、日本産のコモングサ属について行った。コモングサ属(*Spatoglossum*)は褐藻のアミジグサ目(Dictyotales)に分類され、叉状または裂けるように分岐する帯状の藻体を持ち、中肋がないことでヤハズグサ属(*Dictyopteris*)と区別される。本属の種は、低潮線から潮下帯に生育し、本州太平洋岸中・南部、九州、本州日本海岸中南部に見られ、アツバコモングサ、ヒロハコモ

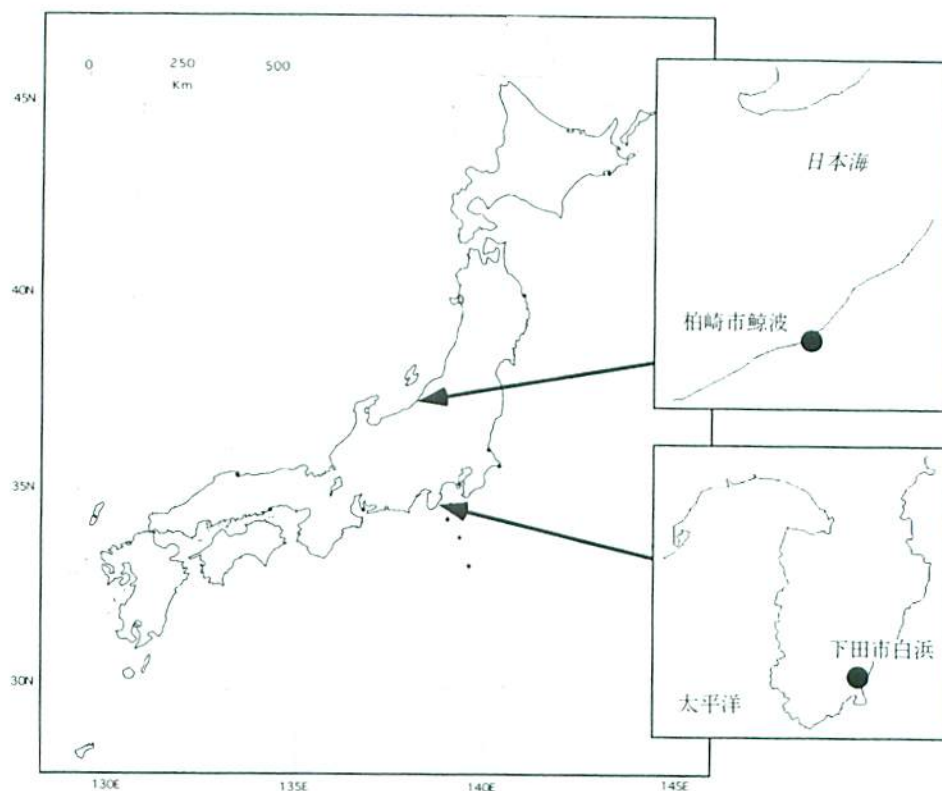


図1. 試料採取地

ングサ、コモングサが知られている。また、著者らは新潟県柏崎から新種ウスバコモングサ（仮称）を発見している。しかし、これらの藻類は共通する形態学的特徴からコモングサ属に分類されているが、アツバコモングサ、ヒロハコモングサ、ウスバコモングサは体内に強い酸性物質を持ち壊死すると細胞外に酸性物質を遊離して緑色に変色するが、コモングサではこの変化は見られない。さらに、コモングサ属に含まれる成分研究について見てみると、日本近海に生育するコモングサ属について含有成分を検討された例は見られないものの、近縁種である *Spatoglossum variabile* から Atta-ur-Rahman らが新規のステロイド骨格を有する化合物を見出し報告している。<sup>3)</sup>

## 材料と方法

### 1) 分析用海藻試料の調整

HPLC 測定に用いた海藻類のうち、アツバコモングサ、ヒロハコモングサ、コモングサは静岡県下田市白浜海岸（北緯：34度40分 東経：138度58分）の低潮線から潮下帯、ウスバコモングサは新潟県柏崎市鯨波（北緯：37度21分 東経：138度30分）の潮下帯よりそれぞれ採取、凍結保存して有機可溶成分抽出試料とした。

また、壊死後強い酸性物質を細胞外に遊離させる種において、可溶成分が酸性物質により変化する可能性の有

無を検討するため、ヒロハコモングサについて通常の凍結保存する方法に加え、採取後直ちにクロロホルムにて含まれる水分を置換し、抽出用試料とする方法も用い上記方法と区別した。

凍結した試料は、解凍後水洗し付着物や水分を除いた後、藻体の付着器以外の部分より得た葉片を 50g 秤量した。次いで、蒸留水（200 ml）を加え、ミキサーにて粉碎し、さらに 10 分間超音波破碎を行った。これにクロロホルムを等量加え 1 時間攪拌、抽出した。なお、前報においてクロロフィル類の抽出量を制限することを明らかにしていることから、抽出溶媒としてクロロホルムを用いている。<sup>4)</sup>

抽出液を減圧下濃縮乾固し、それぞれの粗抽出物質として保存した。次に、これをクロロホルムに溶解しスペースフィルタで濾過し HPLC 測定試料とした。

さらに、HPLC 測定によりそれぞれの粗抽出物質中のクロロフィル a 含量が高いため、他の有機可溶成分のピークが判別しにくいことが明らかになったことから、分離用 TLC（MERCK 社製 Silica gel プレート 20cm x 20cm）を用いて粗抽出物中のクロロフィル a 部分だけを除去して HPLC 測定試料とした。

一方、クロロホルム（1000ml）中に保存した試料（30g）は、クロロホルム 10ml を加えて乳鉢と乳棒にて組織を粉碎し、溶液が濃緑色になるまで続けた。抽出効率を上げる

ため同様の操作を2回繰り返した。これにより得られたクロロホルム層に等量の試料を保存していたクロロホルムを合わせ、スペースフィルタで濾過し測定試料とした。また、測定試料はいずれも -20℃ に保ち保存した。

## 2) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

HPLC は以下の条件にて、溶媒系 1) および 2) を用いて溶出を行い多波長分光高度計により試料中の物質の吸収波長と保持時間 (Rt) とを記録した。測定結果は各吸収波長でのピークを重ね合わせた平準化スペクトルとしてクロマトグラムに表わした。このことから含まれる化合物の極大吸収係数の違いによりピーク面積が必ずしも存在量を示してはいない。

ポンプ : 日本分光社製  
 検出器 : 日立社製 DAD-L7754  
 カラム : センシユパック Silica N-1151-N (φ 6 × 250mm)  
 流速 : 2ml/min  
 カラム温度 : 30℃  
 分析試料 : 3μl ~ 6μl  
 溶媒系 : 1) Hexane : 2-Butanol : 98.8 : 1.2  
           2) Hexane : 2-Butanol : 99 : 1  
           3) Hexane : 2-Butanol : 98.4 : 1.6

## 結果と考察

HPLC にて各海藻の成分を比較するにあたって、細胞が壊死した後に遊離する強酸性物質の含有物質に対する影響が、材料の処理方法により変化するかどうかをヒロハ

コモングサを用いて検討した。採取後すぐにクロロホルムに保存したものと、採取後凍結保存したものから、それぞれ常法に従い抽出し粗抽出物を得た。それらについて溶媒系 3) を用いて HPLC 測定を行い、テルペノイドやカロチノイドが検出される領域を中心にスペクトルグラムを比較した。

その結果、いずれの試料においてもクロマトグラム上に見られるピークに処理方法による差異は認められず、細胞壊死により放出される酸性物質による影響が無いことが明らかになった。このことから、以後の HPLC の測定には凍結保存した粗抽出物を用いることにした。

次に溶媒系は 1) を用いそれぞれの HPLC におけるクロマトグラムを測定し、含まれる物質の Rt を求め比較した。その結果を図 3 に示した。図 3 から明らかなように、粗抽出物には大量のクロロフィル a (Rt 4.08 ~ 4.73) が含まれており、それ以外の吸収面積が小さく明瞭にピークを求めることが出来ない。しかしながら、いずれもがクロロフィル a よりも Rt が短い部分に複雑な吸収パターンを示している。このことから、より極性の低い溶媒系 2) を用いて、クロロフィル a までのクロマトグラムを測定して比較検討した。得られたそれぞれの海藻のクロマトグラムは図 2 にまた、Rt はその値を表 1 として示し、また、使用した溶媒によると思われるピークは表 1 中では除いて示した。

溶媒系 2) において、ヒロハコモングサのクロマトグラムからは、Rt 3.21、3.37、3.60、3.88、5.99、6.25、9.10、13.39 および 16.18 に主なピークが見られた。同様の条件でウスバコモングサでは Rt 1.64、3.31、3.48、5.75、6.27、

表 1. 各海藻の示した保持時間 (Rt)

ヒロハコモングサ	ウスバコモングサ	アツバコモングサ	コモングサ
Rt(min)	1.64		
		2.40	2.48
		2.55	2.60
3.21			
3.37	3.31		
3.60	3.48		
3.88		3.87	3.88
		4.95	5.08
5.99	5.75		
6.25	6.27		
		8.00	8.25
9.10		9.65	9.37
		10.47	
	11.17		
13.39			13.80
	14.85		14.61
16.18			17.12
	18.25		
	19.08		19.55

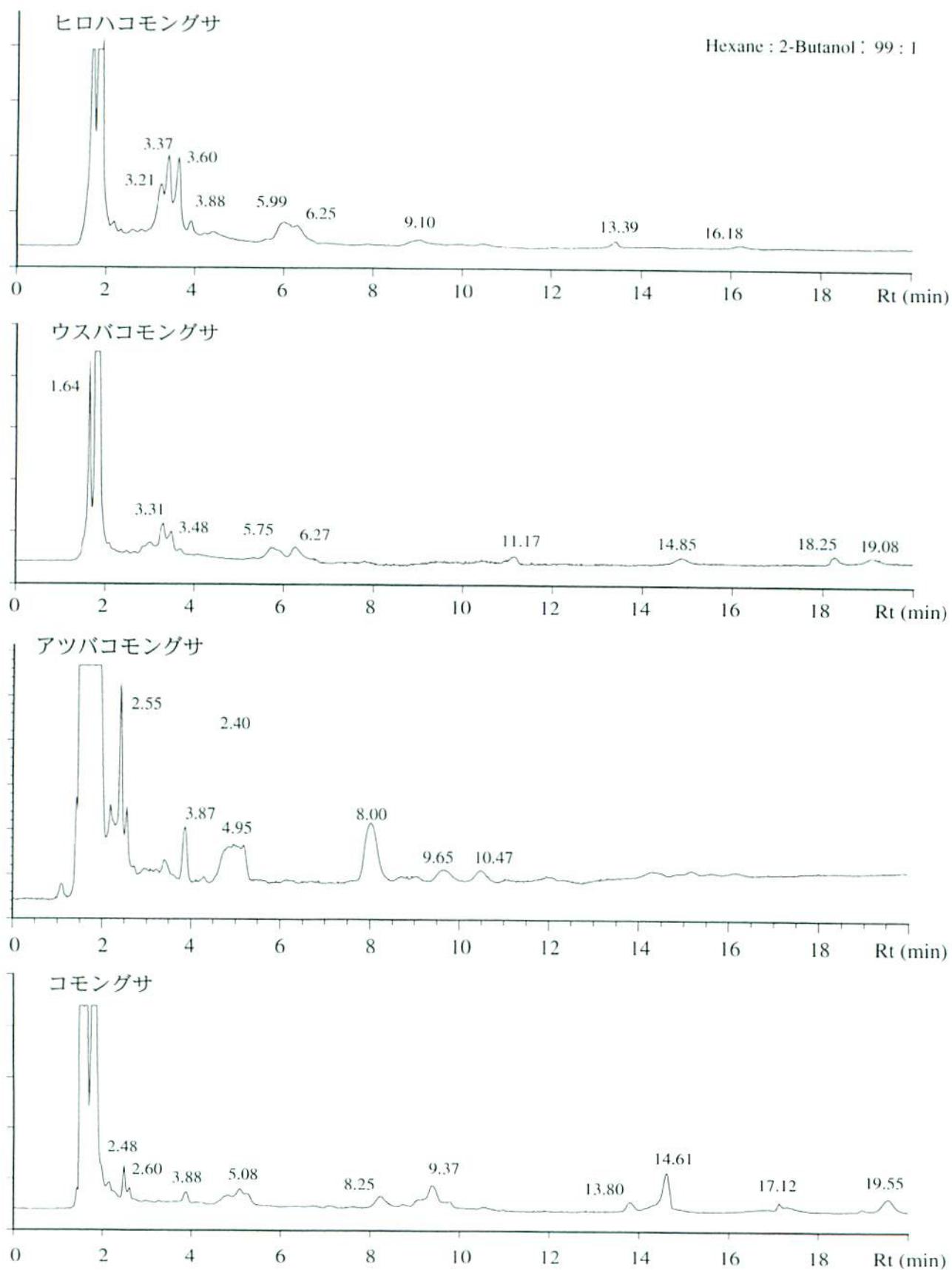


図2. コモングサ属の HPLC クロマトグラムと保持時間 (Rt)

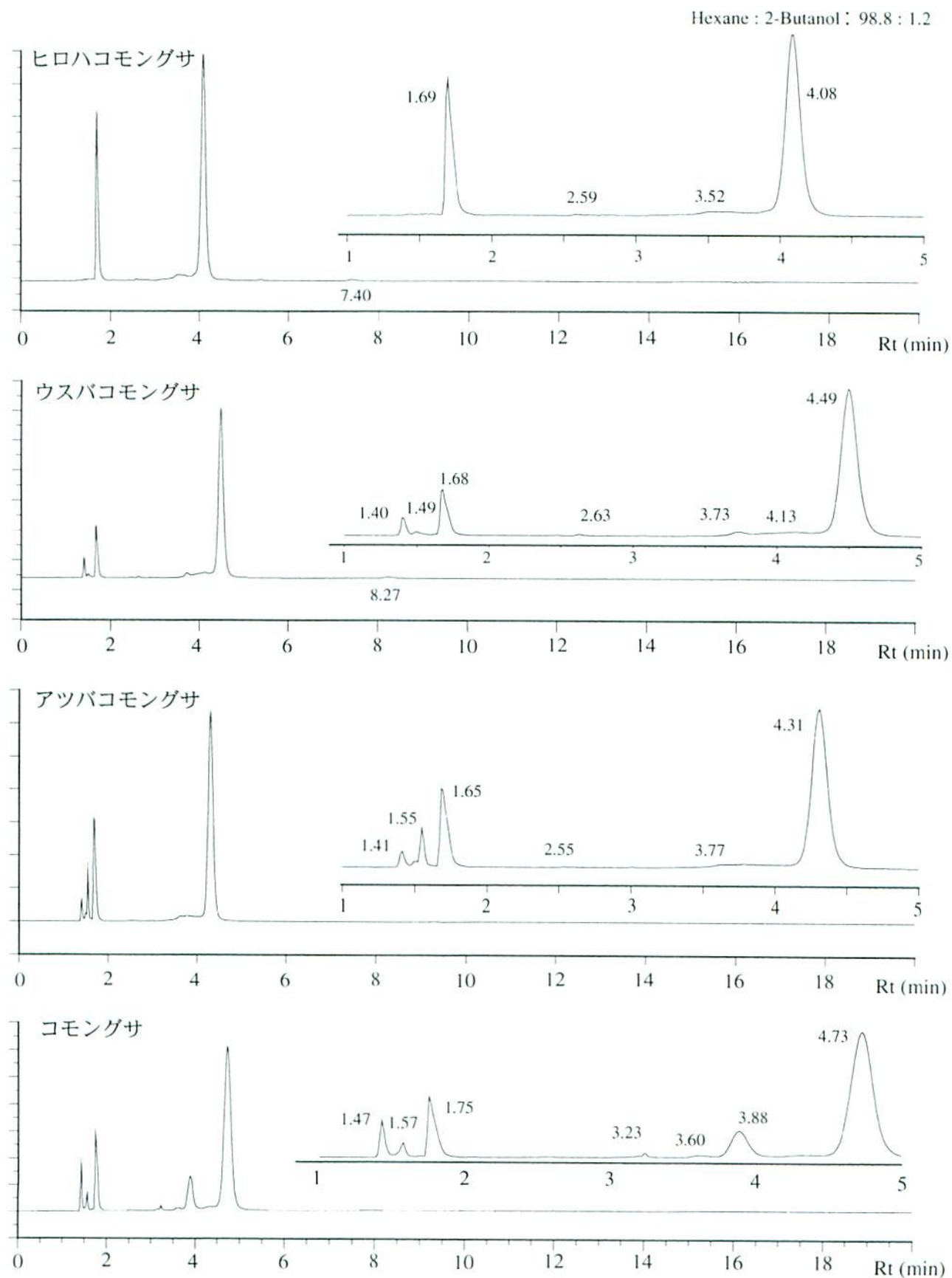


図3. コモングサ属の HPLC クロマトグラムと保持時間 (Rt)

11.17、14.85、18.25 および 19.08 に主なピークが見られ、クロマトグラムの外形がかなり類似している。特に、3.31～3.60の三段に重なり合ったピークや5.75～6.27に見られる二重に重なり合ったピークのピーク間の相対的な強度比も一致しているように思われる。

しかしながら、ヒロハコモングサに見られる Rt 9.10 および 13.39 などのピークは、ウスバコモングサからは検出されない。また、ウスバコモングサに見られる Rt 11.17、14.85、18.25 および 19.08 のピークも同様にヒロハコモングサでは見られない。このことから、これら2種はかなりの部分で類似するものの異なる成分を有することから、4種の中では近縁であるものの、別種である可能性が示唆される。

一方、アツバコモングサのクロマトグラムからは、Rt 2.40、2.55、3.87、4.95、8.00、9.65 および 10.47 におもなピークが得られた。また、コモングサのクロマトグラムからは、Rt 2.48、2.60、3.88、5.08、8.25、9.37、13.80、14.61 および 17.12 などのピークが観測された。ここでも、2.40～2.60の二つのピークと3.87～5.08の重なり合ったピーク、また8.00～8.25 また 9.37～9.65 に見られる各ピークが類似している。先と同様に、アツバコモングサとコモングサは、クロマトグラムから4種の中では近い関係にあることが推定される。

以上のことから、今回 HPLC 測定を行った4種の試料はいずれもコモングサ属に分類されるが、ヒロハコモングサとウスバコモングサ、またアツバコモングサとコモングサが成分的に近い関係にあることが判明した。また、それぞれが異なるピークを有することから識別することが可能であり、種判別の一助になり得ることも合わせて明らかになった。

さらに、今回、HPLC の測定用カラムとして順相系のシリカゲルを担体として用いている。これは、現在分離同定に頻用されている TLC の担体と同一であり、この HPLC 測定結果は TLC の Rf 値と相関することが明らかであり、簡易的に行う TLC の参考になるものと思われる。そのためこれらの海藻由来の抽出物の全体が明らかになるクロマトグラムを図3に示した。

今後、コモングサ属と近縁のヤハズグサ属の種をはじめ、各種の海藻類についても有機可溶成分の HPLC 測定および比較を行い、含まれる成分の差異を明らかにするとともに、クロマトグラムデータとしてライブラリー化を行う予定である。また、現在クロマトグラムのパターンについて比較しているが、粗抽出物の生理活性スクリーニングも行い、有用な成分を単離し、その構造を明らかにしていく予定である。

1) Jeffrey, S. W. and Wright, S. W., 1987. Chlorophyll c pigments and their distribution in the chromophyte algae. *Anal. Chem. Acta*, **894**, 180-188.

Green, J. C, B. S. C. Icadbeater and W. I. Diver, 1989. *The chromophyte algae. Systematics Association Special Volume No. 38*. Clarendon Press, Oxford.

2) Kurata, K., Suzuki M. Shiraishi K. and Taniguchi K. 1988. Spathane-type diterpens with biological activity from the brown alga *Dilophus okamurai*. *Phytochemistry*, **27**, 1321-1324

Minale, L., *Terpenoids from marine sponges*. 1978. *Marine natural products*. Vol 1. Academic Press. Noe York

Kigoshi, H., Shizura Y. Niwa H. and Yamada K. 1981. Laurecenyne, a plausible precursor of various nonterpenoid c-compounds, and nelaurecenyne from the red alga *Laurencia okamurai*. *Tetrahedron Lett.*, **22**, 4729-4732

3) Atta-ur-Rahman, Chudhary M. I. Hayat S. Khan A. M. Ahmad A. and Malik S. 1999. Spatozoate and varinasterol from the brown alga *Spatoglossum*. *Phytochemistry* **52**, 495- 499

4) 柴田潔、薩摩林貞義 2001. 海藻由来クロロフィル類検出用 HPLC 新溶媒系. *日本歯科大学紀要*, **30**, 111-121