

【論文】

## マイワシ及びアオサからの D-システノール酸の抽出に 関する基礎的研究

米田 真人<sup>1)</sup>、柴田 昌男<sup>2)</sup>、畑野 和弘<sup>3)</sup>、磯部 信一郎<sup>2)</sup>、境 正志<sup>2)</sup>、迎 勝也<sup>2)</sup>

### Basic research on extraction of D-Cysteinolic acid from Sardine and sea lettuce

Masato YONEDA, Masao SHIBATA, Kazuhiro THATANO, Shinichiro ISOBE, Masashi SAKAI,  
Katsuya MUKAE

D-cysteinolic acid is a useful candidate compound for medicine and food additives because of its bioactive and oxidization preventing properties. It was reported that D-cysteinolic acid contained in sea lettuce and sardine. Extraction of D-cysteionlic acid was carried out from sea lettuce grown in Hakata bay and sardine caught in the sea near Kyusyu. The fractions containing D-cystenolic acid were collected using HPLC following the extraction by hot water. The dried fractions ware analyzed by FT-IR and LC/MS. D-cysteionlic acid was contained in the extract form sea lettuce but not from sardine. The reason why D-cysteinolic acid was not obtained from sardine is supposed that D-cysteinolic acid is not contained in food of sardine. Especially, as large quantity growth of sea lettuce on seaside is a problem from the viewpoint of environmental pollution, this process is useful for the utilization of sea lettuce.

Keyword: D-cysteinolic acid, sardine sea lettuce, HPLC, FT-IR, LC/MS

#### 第1章 緒言

##### 1・1 背景・目的

近年、日本の沿岸各地で緑藻の一種であるアオサの大量繁殖が見られる。アオサの大量繁殖は、特に人工の砂浜や海岸、入江、河川からの生活排水の流入する富栄養海域で見られ、アオサ藻体が大量に発生・浮遊している。アオサは、水温が高くなる8月から11月にかけて異常発生し、海水浴シーズンには、衛生上の問題や砂浜の美観を損なうことが問題になっている。また、砂浜に打ち上げられた藻体が腐敗して異臭を漂わせるため、市民の生活環境に大きな影響をもたらしており、行政機関も対策に苦慮している。大量発生したアオサは、沿岸の魚介類を窒息させたり、海苔などの海藻の光合成を妨げたりと、人間だけに、とどま

- 1) 九州産業大学 大学院 工学研究科
- 2) 九州産業大学 工学部 物質生命化学科
- 3) 福岡市保健環境研究所 保健科学部門

らず海洋生物にも多大な影響を与えている。

博多湾でも、アナアオサやオオバアオサのグリーンタイドによる被害が見られる。この解決策として、海域へ流出する河川水の水質改善のほか、アオサの回収などが行われてきた。福岡市では、アオサの回収に3000万円もの税金をかけているが、その回収量も少なく適切な対策とは言えないのが現状である。また、回収後のアオサは人工島アイランドシティに埋め立て処理されていたが、アイランドシティの完成に伴い、廃棄場所が無くなってしまったため、これに代わる新たな処理法の検討が急務となっている<sup>1)</sup>。

##### 1・2 マイワシ

マイワシは、良質のたんぱく質を含んでいる。これは他の魚類と同様だが、マイワシには脂質である EPA (エイコサペンタエン酸) や DHA (ドコサヘキサエン酸) などの高度不飽和脂肪酸を多く含んでいる。また、カルシウム、必須ミネラル (亜鉛、銅、マグネシウム、マンガン) が豊富に含まれている。さらに、ビタミン E、セレン、タ

ウリン、D-システノール酸が含まれている<sup>2)</sup>。

### 1・3 アナアオサ

アナアオサの形体は、通常円形で約 30cm に成長し、葉体に孔が多くみられるのが特徴である。穏やかな内湾や河口域の岩に多くみられ、浮遊して成長することもある。この種は、各地に広く見られ、日本のアオサの主要種である。アナアオサに含まれている主な遊離アミノ酸は、D-システノール酸、システイン酸、グルタミン酸である。アミノ酸とは分子中に、アミノ基とカルボキシル基が含まれているものである。D-システノール酸は、カルボキシル基がスルホン基となっているがアミノ酸に分類されている。

### 1・5 D-システノール酸

D-システノール酸(D-Cysteinolic acid)は、分子式  $C_3H_9NO_4S$ 、分子量 155.16、融点  $279-281^{\circ}C$ 、水溶性で白色の針状結晶であり、多くの海洋生物に少量もしくは微量存在している。中でも緑藻や褐藻などの海藻に広く分布することが明らかにされている。D-システノール酸の効果は、血中コレステロール低下作用や抗疲労作用や血小板凝集抑制作用、胃液分泌抑制作用、活性酸素生産抑制作用などがあり、血小板の凝集による脳梗塞や心臓病への治療および予防薬として期待できる<sup>4)</sup>。Fig.1 に構造式を示す。

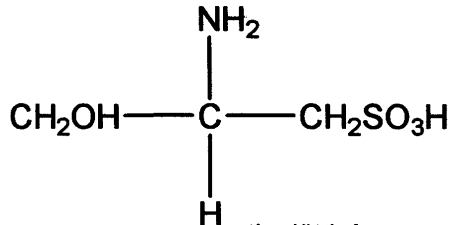


Fig.1 D-システノール酸の構造式

### 1・6 タウリン

タウリン (2-aminoethanesulfonic acid) は、分子式  $C_2H_7NO_3S$ 、分子量 125.15、融点  $328^{\circ}C$ 、水溶性で有機溶媒には不溶、常温で無色または白色の結晶性粉末である。タウリンには様々な生理活性作用がある。特に、高脂血症の改善に必要なコレステロール低下作用については、コレステロールを必要以上に下げないため、安全性が高いという特徴がある<sup>1)</sup>。Fig.2 に構造式を示す。

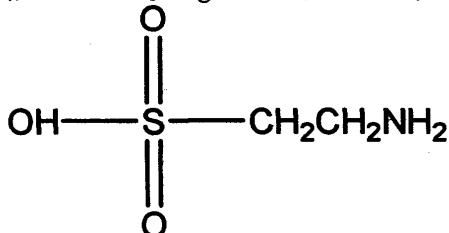


Fig.2 タウリンの構造式

## 第2章 マイワシからのD-システノール酸の抽出

### 2・1 マイワシからの成分抽出

博多湾近海で漁獲された生のマイワシ全個体をミキサーでミンチ状にした。そこに3倍量の超純水を加え、 $60^{\circ}C$ で60分熱水抽出した。その後遠心分離(6000rpm、20分)を行い、固形物を取り除いた。得られた抽出液から塩類を除去するため、抽出液を強酸性陽イオン交換樹脂、弱塩基性陰イオン交換樹脂の順に通し、通過した抽出液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。これを、HPLCで分取する抽出液とした。

#### 2・2・2 実験操作

HPLCの条件は温度： $60^{\circ}C$ 、流速： $1.5\text{ml}/\text{min}$ 、移動相： $0.05\%$ リン酸、カラム：イオン交換樹脂#2618、検出器：RI検出器(L-3300)、記録計(D-2200)で行った。まず、2・1の抽出液をマイクロシリンジで0.5ml打ち、記録計でHPLCクロマトグラムをモニターしながら、D-システノール酸(以下試料1)、タウリン(以下試料2)と思われる成分を採取した。HPLCクロマトグラムはFig.1に示す。その後、試料1、試料2を弱塩基性イオン交換樹脂にてリン酸除去後ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、凍結乾燥、真空乾燥(24h、 $40^{\circ}C$ )で乾燥させ、試料1、試料2を得た。

#### 2・2・3 HPLCの結果・考察

試料1、試料2のHPLCクロマトグラムをFig.3に示す。参考文献のD-システノール酸のHPLCのプロファイルがFig.3に示した試料1のHPLCのプロファイルが類似していることより、D-システノール酸が抽出できたと考えられる。また、Fig.3より、タウリンの保持時間が確認できたので、タウリンが抽出できたと考えられる。よって、今回はD-システノール酸と思われる7.16分付近のピークとタウリンと思われる8.00分付近のピークを分取した。

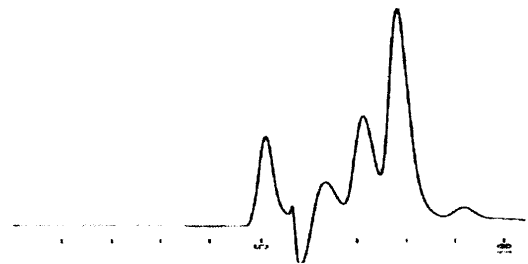


Fig.3 マイワシ抽出物のHPLCクロマトグラム

#### 2・3・2 FT-IRの実験操作

FT-IRを用い各抽出物の赤外吸収スペクトルをKBr法で測定した。臭化カリウム(KBr)と試料1と試料2のそれぞれについて、試料を真空乾燥機で乾燥させた後、所定量(KBr： $150\text{mg}$ ~ $200\text{mg}$ 、試料： $1\text{mg}$ )を計量しメノウ乳鉢で微粉砕混合し、錠剤成形器を用いディスクを形成

後、測定を行った。

### 2・3・3 結果・考察

Fig.4にFig.3のHPLCクロマトグラムを参考に分取した試料1の赤外吸収スペクトルを、Fig.5に試料2の赤外吸収スペクトルを示す。Fig.4より、 $3400\text{cm}^{-1}$ 付近にNH逆対称伸縮振動、 $3200\text{cm}^{-1}$ 付近にNH対称伸縮振動、 $3400\text{cm}^{-1}$ から $2500\text{cm}^{-1}$ に幅広いOH伸縮振動、 $2950\text{cm}^{-1}$ 付近に脂肪族のCH伸縮振動、 $1620\text{cm}^{-1}$ 付近にNH変角振動、 $1460\text{cm}^{-1}$ 付近に $\text{CH}_2$ はさみ振動、 $1300\text{cm}^{-1}$ 付近及び $1120\text{cm}^{-1}$ に $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ の吸収帯、 $1050\text{cm}^{-1}$ に $\text{S}=\text{O}$ の伸縮振動、 $700\text{cm}^{-1}$ から $600\text{cm}^{-1}$ にCSの伸縮振動が見られる。これは、D-システノール酸の構造から考えられる吸収帯と一致していることにより、試料1はD-システノール酸と考えられる。Fig.5より $3400\text{cm}^{-1}$ 付近にNH逆対称伸縮振動、 $3200\text{cm}^{-1}$ 付近にNH対称伸縮振動、 $3400\text{cm}^{-1}$ から $2500\text{cm}^{-1}$ に幅広いOH伸縮振動、 $2950\text{cm}^{-1}$ 付近に脂肪族CH伸縮振動、 $1620\text{cm}^{-1}$ 付近にNH変角振動、 $1460\text{cm}^{-1}$ 付近に $\text{CH}_2$ はさみ振動、 $1300\text{cm}^{-1}$ 付近及び $1120\text{cm}^{-1}$ に $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ の吸収帯、 $1050\text{cm}^{-1}$ に $\text{S}=\text{O}$ の伸縮振動、 $700\text{cm}^{-1}$ から $600\text{cm}^{-1}$ にCSの伸縮振動が見られる。これは、タウリンの構造から考えられる吸収帯と一致していることにより、試料2はタウリンと考えられる。

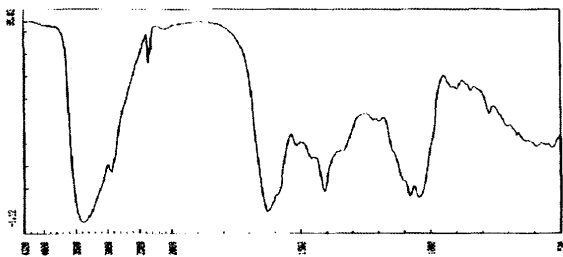


Fig.4 試料1の赤外吸収スペクトル

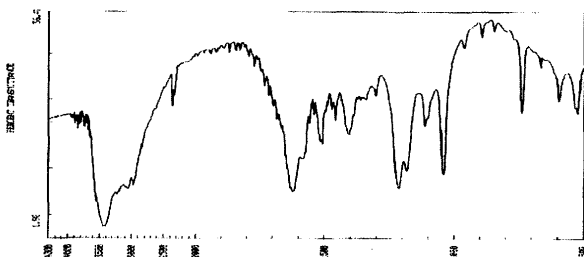


Fig.5 試料2の赤外吸収スペクトル

### 2・4・2 LC・MSの実験操作

今回は抽出段階でHPLCでの分取を行ったので液体クロマトグラフで分離せずに、酢酸アンモニウム溶液に試料を溶解し、インジェクションポンプを用いてイオン源に直接導入した。

### 2・4・3 結果・考察

試料1についてD-システノール酸（MW=155）由来の $[\text{M}-\text{H}^+; \text{m/z}=154]$ をスキャンモード（-）で測定した結果、

D-システノール酸の構造から想定されるマスペクトルは確認できなかった。マスペクトルをFig.6に示す。上記の結果は、D-システノール酸とタウリンの構造の類似性から、D-システノール酸から $[\text{M}+\text{H}^+; \text{m/z}=154]$ というイオンが検出できると仮定するとD-システノール酸は含有していなかった。しかし、 $[\text{M}+\text{H}^+; \text{m/z}=154]$ のイオンが生成しなければD-システノール酸が含有している可能性も考えられる。

試料2についてスキャンモード（-）で測定した結果、タウリン（MW=125）由来の $[\text{M}-\text{H}^+; \text{m/z}=124]$ のイオンが確認できた。マスペクトルをFig.7に示す。試料2を $100\text{mg/L}$ の濃度に溶解した、さらにタウリンも $100\text{mg/L}$ となるように添加し溶液についてそれぞれスキャンモード（-）で測定し、タウリンの含有量を求めた結果、試料2（ $100\text{mg/L}$ ）のイオン強度は $2.4 \times 10^7 \text{cps}$ である。また、Fig.9より、試料2（ $100\text{mg/L}$ ）とタウリン（ $100\text{mg/L}$ ）の混合液のイオン強度は $6.8 \times 10^7 \text{cps}$ であった。

これより、 $100\text{mg/L}$ のタウリンのイオン強度は $6.8 \times 10^7 \text{cps} - 2.4 \times 10^7 \text{cps} = 4.4 \times 10^7 \text{cps}$ となる。よって、試料2中のタウリンの含有率は $2.4 \times 10^7 \text{cps} / 4.4 \times 10^7 \text{cps} \times 100 = 55 \%$ となった。

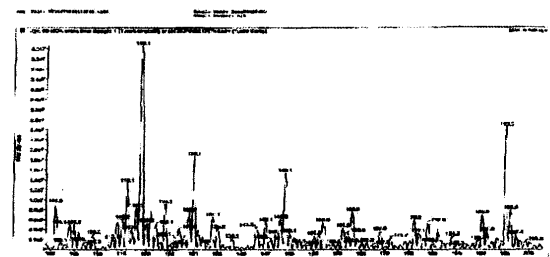


Fig.6 試料1のスキャンモード（-）の測定

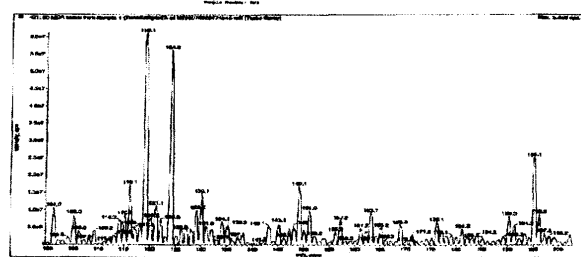


Fig.7 試料2のスキャンモード（-）の測定結果

## 第3章 アオサからのD-システノール酸の抽出

### 3・1 実験操作

試料は博多湾で採取したアナアオサを使用した。採取したアナアオサの砂やゴミなどを取り除くため洗浄を行った。その後、 $60^\circ\text{C}$ の通風乾燥機で乾燥し、粉砕器WB-1にて粉末状にした。乾燥アオサ25gに超純水1L加え、 $60^\circ\text{C}$ で1時間熱水抽出を行った。以下の操作は、第2章の実験操作にしたがい処理した。

### 3・2 HPLCの結果・考察

本研究で行ったアオサ抽出物のHPLCクロマトグラムをFig.8に示す。

アオサ抽出物のHPLCクロマトグラムのD-システノール酸と思われる7.48分のピークは、その前のマイナスの部分と重なって切れていると考えられ、実際は7.48分の保持時間より短くなると考えられる。これは、文献のD-システノール酸の保持時間とほぼ一致するので、今回はD-システノール酸と思われる7.48分付近のピークを分取した。

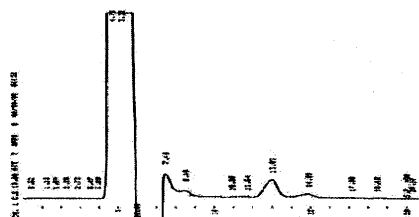


Fig.8 アオサ抽出物のHPLCクロマトグラム

### 3・3 FT-IRの結果及び考察

実験操作は2・3・2に従って行った。しかし、アオサ抽出物にはタウリンと思われるピークが確認できなかったため、D-システノール酸についてのみ検討した。

Fig.9にFig.8のアオサ抽出物のHPLCクロマトグラムを参照し分取した抽出物の赤外吸収スペクトルを示す。

Fig.9より、 $3400\text{cm}^{-1}$ 付近にNH 逆対称伸縮振動、 $3400\text{cm}^{-1}$ から $2500\text{cm}^{-1}$ に幅広いOH伸縮振動、 $2950\text{cm}^{-1}$ 付近に脂肪族のCH伸縮振動、 $1650\text{cm}^{-1}$ 付近にNH 変角振動、 $1460\text{cm}^{-1}$ 付近に $\text{CH}_2$ はさみ振動、 $1300\text{cm}^{-1}$ 付近及び $1120\text{cm}^{-1}$ に $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ の吸収帯、 $1050\text{cm}^{-1}$ に $\text{S}=\text{O}$ 伸縮振動、 $700\text{cm}^{-1}$ から $600\text{cm}^{-1}$ にCSの伸縮振動が見られる。

これは、D-システノール酸の構造から考えられる吸収帯と一致しているため、今回の抽出物はD-システノール酸と考えられる。

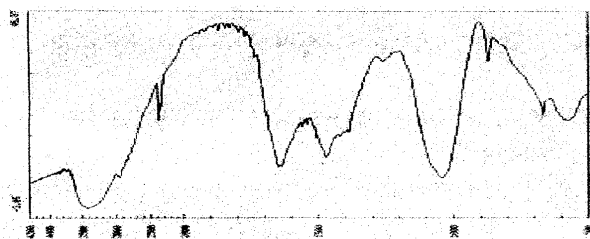


Fig.9 アオサ抽出物の赤外吸収スペクトル

### 3・4・2 分析結果

試料をスキャンモード(-)で測定した結果、それぞれD-システノール酸(MW=155)由来と思われる[M-H (m

$z=154$ )のイオンが確認された。マススペクトルをFig.10に示す。上記の結果は、D-システノール酸とタウリンのイオン強度が同等であり、試料中の共存物質により $m/z=154$ や $m/z=80$ のピークが発生しても無視できると仮定した場合の結果である。

D-システノール酸がタウリンと同じイオン強度が得られると仮定し、タウリンを標準品として試料について選択反応検出(SRM)モード(-)で測定し結果、タウリンの濃度を $1200\text{mg/L}$ 、D-システノール酸を含む抽出物の濃度を $1000\text{mg/L}$ の時、タウリンのイオン強度は $3 \times 10^6 \text{cps}$ 、D-システノール酸のイオン強度は $1.25 \times 10^5 \text{cps}$ になった。タウリンとD-システノール酸のイオン強度が同等と仮定すると $1200 (\text{mg/l}) / 3 \times 10^6 (\text{cps}) \times 1.25 \times 10^5 (\text{cps}) / 1000 \times 100 \approx 5 (\%)$ となる。

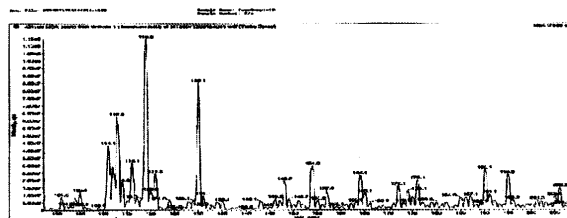


Fig.13 アオサ抽出物のスキャンモード(-)の測定結果

## 第4章 結言

第2章より、マイワシにはタウリンが含有していると考えられる。しかし、博多湾のマイワシにはD-システノール酸は含有してないと考えられる。この原因には、博多湾には、D-システノール酸を含むマイワシの餌が無いので、マイワシの体内にD-システノール酸が蓄積されず、抽出できなかった可能性がある。

第3章より、アオサにはD-システノール酸が含有していると考えられる。しかし、分取したにもかかわらず5%しか抽出できてなかったため、HPLCのピークはいくつかのピークが重なり、1つのピークになっていると考えられるので、純度を高める工程が必要と考えられる。また、一度に大量の試料を処理できないので、大量発生したアオサの処理には適していないなどの問題があるので、他の抽出法の検討が必要である。

### 参考文献

- 1) 能登谷正治 アオサの利用と環境修復 成山堂書店 pp.1-5 (2001)
- 2) 水産庁 資源評価 平成17年度資源評価表 (<http://www.fishexp.preh.hpkkaido.jp/>)
- 3) 佐竹幹夫 博士論文: 魚介類よりD-Cysteinolic Acidの単利とその関連化合物の薬理活性
- 4) 小田祐昭 横越英彦 日本農芸化学会誌 75 (9) 597 (2001)