

# ゲットウ根茎に含まれる抗カビ成分の性質及び分離条件の検討\*

化学室 池 間 洋一郎  
照 屋 輝 一

## 1. 緒言

沖縄地域に生育するゲットウ (*Alpinia speciosa*.k.Schum) はショウガ科の植物で全株に独特な香りを有し、成長速度が速く<sup>1)</sup>、虫害に強く、栽培が容易なことからバイオマス資源として注目されている。著者らはこれまでにゲットウの有効利用を目的に、ゲットウ葉を水蒸気蒸留して得られた精油の構成成分や抗カビ性について報告してきた。<sup>2)~4)</sup>さらに精油だけでなくゲットウ植物全体の総合利用を図ることを目的とするため、精油同様抗カビ成分の存在が予想されるゲットウ根茎の抽出、分離技術を検討した。

本報告ではゲットウ根茎中の抗カビ成分を抽出する溶媒の選定、カラムクロマトグラフィーによる分画、さらに高速液体クロマトグラフィーによる分画条件を検討したので報告する。

## 2. 試料及び実験方法

### (1) 試料

試料は、沖縄県本島南部及び那覇市内に生育しているゲットウの地下部の根茎を採取し、洗浄後ヒゲ根を除去して-40℃の冷凍庫に保存して実験時に使用した。

### (2) 抗カビ成分の分離

ゲットウ根茎中の抗カビ成分の分離試験には各種の有機溶媒を使用し、暗室温下で7日間または10日間抽出を行った。

### (3) 抗カビ力の測定

抽出液を所定濃度に希釈し、直径8mmの濾紙に20 $\mu$ l加え、クリーンベンチ内に30分間放置して溶媒を揮散し、濾紙を十分乾燥した。この濾紙を平面培地上に置き、孢子懸濁液20 $\mu$ lを加え、26℃で培養した。

孢子懸濁液は、試験管斜面培地で26℃、10日間培養した*Penicirium citrinum* (青かび) の孢子を滅菌した0.005%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液2mlに2白金耳取り、1分間振とう懸濁して調整した。

抗カビ力の評価は、平板培地上で26℃、3日間培養後の生育状態を観察して行った。

保存用斜面培地及び平面培地は市販のポテトデキストロース培地(栄研化学製)を使用した。

## 3. 結果及び考察

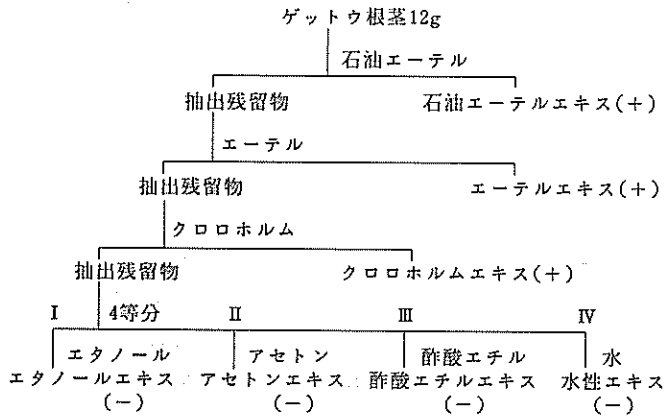
### (1) ゲットウ根茎に含まれる抗カビ成分の各種溶媒に対する挙動

植物成分の抽出分離に当たっては、先ず目的成分の溶媒に対する挙動、特に溶解性を知ることはたいせつなことである。そこで、ゲットウ根茎に含まれる抗カビ成分の分離を行う前に、抗カビ成分の各種溶媒に対する挙動を竹本<sup>5)</sup>の方法を参考にして調べた。

\*ゲットウの多目的・高度利用に関する研究(第6報)

ゲットウ根茎12gをソックスレー抽出器で表1に示すスキームに従って、石油エーテル、エーテル、クロロホルムで抽出を行い、残った抽出残留物を4等分してエタノール、アセトン、酢酸エチル、水の4種類の溶媒で各々4時間の抽出を行った。得られた各抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水、濃縮後、抗カビ性を試験した。

表1 ゲットウ根茎に含まれる抗カビ成分の溶媒に対する挙動



注) カッコ内のプラス、マイナスは抗カビ活性の有無を表す

その結果、ゲットウ根茎に含まれる抗カビ成分は比較的極性の低い石油エーテルやエーテル、クロロホルムに可溶で、水には不溶であることがわかった。

(2) 抽出溶媒の選定

ゲットウ根茎に含まれる抗カビ成分が有機溶媒に溶解することがわかったので、抗カビ成分を効率よく大量に抽出するための溶媒を選定するために、クロロホルム、アセトン及びメタノールの3溶媒を使用して、各々ゲットウ根茎粉碎物100gづつを1週間暗室温下で抗カビ成分の抽出試験を行った。

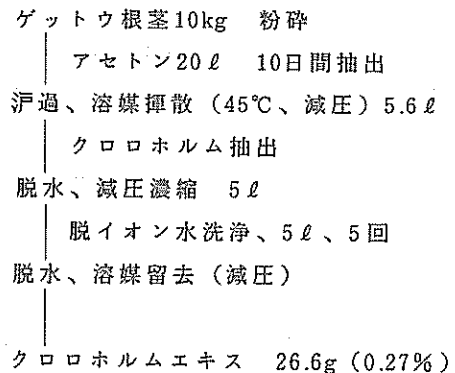
得られた抽出液はいずれも抗カビ性を示し、抽出液から溶媒を留去した後のエキスの量はほぼ同じくらいの量が得られた。その抗カビ強度を比較すると、各抽出液の抗カビ力に差が認められ、クロロホルム、メタノール、アセトンの順に抗カビ力が強く、アセトン抽出液が最も強い抗カビ力を有していた。

(3) ゲットウ根茎の抗カビ成分の抽出

ゲットウ根茎10kgを市販のミキサーで径2~3mmの大きさに粉碎し、表2に示すようにアセトン20リットルを加えて10日間暗室温下で抽出を行った。残渣を含む抽出液を濾紙(No.2)で濾過後、アセトンをロータリーエバポレーターで減圧留去し、水分を含む抽出液をさらにクロロホルムで抽出を行い、分別し下層のクロロホルム層が容量約5リットルになるまで減圧濃縮を行った。

このクロロホルム抽出液には多量の水溶性成分が含まれているため、これを除去する目的で等量の蒸留水を加え、スターラーで20分間攪はんして抽出液の洗浄を行った。

表2 ゲットウ根茎の抗カビ成分の抽出



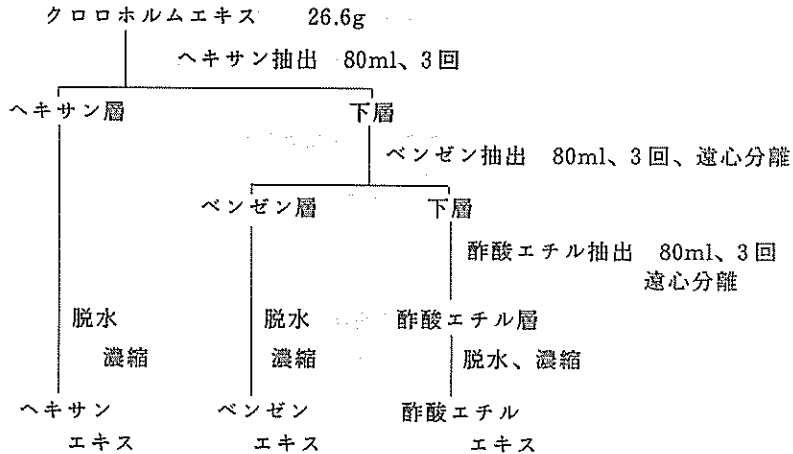
この洗浄操作を5回行って上層の褐色の洗浄水がほとんど呈色しない程度まで洗浄を行った。得られた洗浄クロロホルム抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、クロロホルムを減圧留去して褐色あめ様のクロロホルムエキス26.6gを得た。

また洗浄後、抗カビ成分の行方を確認するために、洗浄後のクロロホルムエキス及び初回洗浄した液を濃縮して濃度を高めた液の抗カビ性を試験した。その結果、クロロホルムエキスには抗カビ性が認められたが、濃縮洗浄水には全く認められなかった。このことは抗カビ成分以外の水溶性成分が洗浄により除去され、抗カビ成分がクロロホルムエキスに濃縮されることを示す。

(4) クロロホルムエキスの各種溶媒による抗カビ成分の粗分画

一般に多種類の成分が含まれる植物などの微量成分の抽出分離には、大量に含まれている目的成分以外の成分をいかに除去するかが分離の成否を決める。ゲットウ根茎から得られた抽出液にも多種類の成分が含まれると考えられたので、クロロホルムエキスから抗カビ成分以外の成分を除去する目的で、まず各種の溶媒に対する溶解度を利用した分別<sup>5)</sup>を行った。

表3 クロロホルムエキスの各種溶媒による抗カビ成分の分画



クロロホルムエキスを表3に示すようにヘキサン、ベンゼン、酢酸エチルの順に各々80mlの3回振とう抽出を行い、各々3,000rpm、5分間遠心分離後、得られた区画の溶媒を脱水、留去してそれぞれヘキサンエキス、ベンゼンエキス、酢酸エチルエキスを得た。

また、どのエキスに抗カビ成分が含まれているかを調べるために、各エキスを20%に調整し抗カビ性を試験した。その結果、3種の溶媒エキスのうち、ヘキサンエキス、ベンゼンエキスに抗カビ性が認められた。各溶媒エキスの組成と抗カビ性の結果を表4に示す。

表4 溶媒エキスの組成及び抗カビ性

溶 媒	ヘキサンエキス	ベンゼンエキス	酢酸エチルエキス	合 計
重量 (g)	12.2	12.0	2.2	26.4
組成 (%)	46.2	45.5	8.3	100
抗カビ性	+	++	-	

抗カビ性：++抗カビ力強い、+抗カビ力弱い、-抗カビ力無い

さらに抗カビ性が強いベンゼンエキスには、クロロホルムには溶解するがメタノールに溶解しにくい多量の白色状の沈澱が認められたため、ベンゼンエキスをメタノールに溶解し、メタノールに不溶の沈澱部とメタノール溶解部に分離した。メタノール溶解部と沈澱部のメタノールを減圧留去した後の重量は、メタノール溶解部が7.8g、沈澱部が4.6gを示した。

メタノール溶解部と不溶部のうち、メタノール不溶部の沈澱部には抗カビ性は認められなかったが、メタノール溶解部には認められた。このメタノールによる抗カビ成分を含まない沈澱の除去は、ベンゼンエキスの約37%を除去したことになり、抗カビ成分をさらに濃縮したことになる。

(5) シリカゲルクロマトグラフィーによる抗カビ成分の分画

初発ゲットウ根茎重量の0.078%を占めるベンゼンエキスメタノール溶解部をさらに細分画するために、抗カビ性を有するベンゼン分画液のシリカゲルクロマトグラフィーを行った。すなわちベンゼン分画液を少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲル（70～230メッシュ、merk製）を充填したカラム（内径10mm×50cm）に500 $\mu$ lを注入しクロロホルム、酢酸エチル、アセトン、メタノールの順に、流量1.5ml/分、各々60分間の条件で波長280nmの吸光度をモニタリングして溶出した。これらの操作を繰り返し行い、各々の分画液を得た。

得られた分画液の抗カビ試験を行ったところ、クロロホルム、アセトン区画の2区画に抗カビ成分が存在していることが分かった。分画した液の抗カビ性及び性状を表5に示す。

表5 シリカゲルクロマトグラフィーによる分画液の抗カビ性

分画液	クロロホルム	酢酸エチル	アセトン	メタノール
抗カビ性	—	++	+	—
性状	黄色沈澱	黄色油様	黄色沈澱	褐色油様

抗カビ性：++抗カビ力強い、+抗カビ力弱い、—抗カビ力無い

(6) 酢酸エチル区画液の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分取条件の検討及び分画

抗カビ成分が存在している酢酸エチル、アセトンの2区画のうち、抗カビ性が強かった酢酸エチル区画のHPLC分取条件を検討した。

その結果、HPLC分取にはシリカゲル系のカラムを使用し、波長280nm、移動相はヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒を使用することで分取が可能になった。HPLC分取条件を表6に示す。

表6 酢酸エチル区画のHPLC分画条件

カラム	WAKOSIL-5sil（直径10mm×30cm）
移動相	(A) ヘキサン、(B) 酢酸エチル
グラジェント分析	B液 20%（5分）→100%（5分）
流量	8ml/分
検出器	紫外可視分光光度計
サンプル量	500 $\mu$ l

図1のクロマトグラムに示すように、酢酸エチル区画はピーク数が35以上のピークが認められた。酢酸エチル区画をさらに細かく分画するため、ピークの数か8以下になるように図1のクロマトグラムを区画I～Vの5つの大まかな区画にHPLC分画を行った。

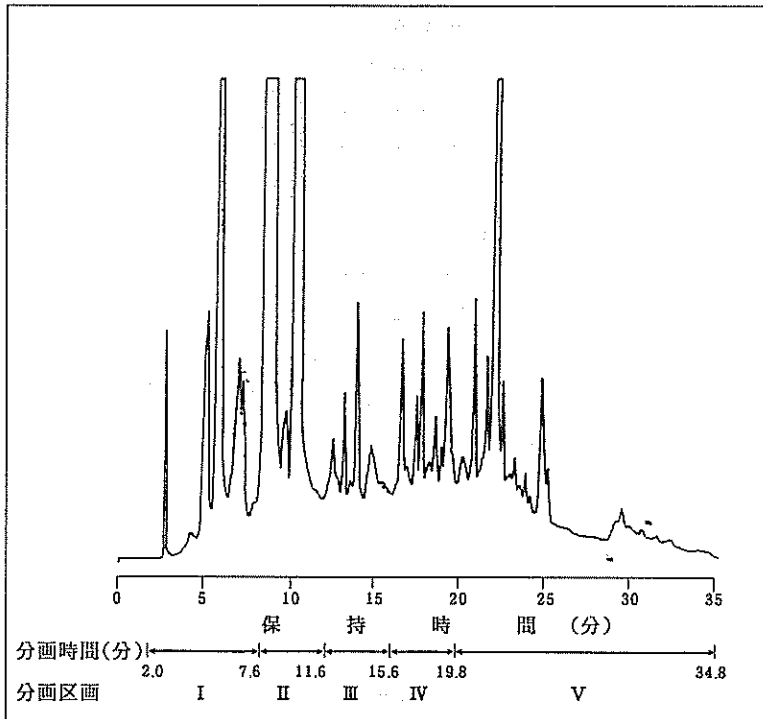


図1 酢酸エチル区画液のHPLCクロマトグラム及び分画時間

得られた分画液を溶媒留去した後、メタノールで30%に調製して抗カビ性を試験した結果、表7に示すようにII区画は抗カビ性をほとんど示さず、IとV区画は弱い抗カビ性を示し、保持時間11.6分～15.6分(4分間)までのIII区間と15.6分～19.8分(4分間)までのIV区間はカビの生育が全く認められないほど強い抗カビ性を示した。

表7 酢酸エチル区画をHPLC分画した液の抗カビ性

区 画	対照	I	II	III	IV	V
分画時間(分)	—	2.0～7.6	7.6～11.6	11.6～15.6	15.6～19.8	19.8～34.8
抗カビ性	—	+	—	++	++	+

抗カビ性：++抗カビ力強い、+抗カビ力弱い、—抗カビ力無い  
対 照：メタノール

#### 4. まとめ

ゲットウ (*Alpinia speciosa*.k.Schum) 根茎に含有される有用成分を検索するために、抗カビ性を指標としてその性質や抽出条件を検討し、以下の結果を得た。

- ① ゲットウ根茎には抗カビ成分が存在する。
- ② ゲットウ根茎に含まれている抗カビ成分の性質は、石油エーテル、エーテル、クロロホルム、アセトン、メタノールの有機溶媒には溶解するが、水には溶解しない。
- ③ ゲットウ根茎から抗カビ成分を抽出する溶媒には、メタノール、クロロホルムよりもアセトンが良好であった。
- ④ ゲットウ根茎 10 kg から抗カビ成分をアセトン抽出してクロロホルムエキスを得、各種溶媒による分画を経て、抗カビ成分が存在するヘキサン、ベンゼン区画を得た。さらにベンゼン区画をシリカゲルクロマトグラフィーで分画し、抗カビ試験を行った結果、酢酸エチル、アセトン区画に抗カビ成分が存在していることが分かった。
- ⑤ 酢酸エチル区画に含まれるいくつかの成分を分離するためのHPLC条件を検討した結果、シリカゲルカラム、測定波長280 nm、移動相としてヘキサン、酢酸エチルを使用する条件が得られた。
- ⑥ 酢酸エチル区画をHPLCにより5つの区分に分けてその抗カビ性を試験した結果、第Ⅲ区画、Ⅳ区画に強い抗カビ性が認められた。

#### 5. 文献

- (1) 平良喜代志、沖縄の樹木 404 新屋図書 (1987)
- (2) 池間洋一郎、照屋輝一、沖縄県工業試験場業務報告 15, 75 (1987)
- (3) 池間洋一郎、城間美香、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 17, 69 (1989)
- (5) 名取信策、池川信夫、鈴木真言、天然有機化合物実験法 177 講談社 (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。