HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	海藻の特殊成分の研究 II：紅藻特有成分の抽出及び分離
Author(s)	辻野, 勇
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 12(1), 59-65
Issue Date	1961-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23123
Type	departmental bulletin paper
File Information	12(1)_P59-65.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

海藻の特殊成分の研究 II

紅藻特有成分の抽出及び分離

辻　野　　勇
（北海道大学水産学部水産化学教室）

Studies on the compounds specific for each group of marine algae. II

Extraction and isolation of characteristic ultraviolet absorbing material in Rhodophyceae

Isami TSUJINO

Abstract

Four species of red algae (Neodilsea yendoana, Chondrus ocellatus, Chondria crassicaulis and Laurencia glandulifera) were homogenized and extracted with perchloric acid or ethanol followed by absorption with active carbon.

Ultraviolet-absorbing material was eluted from carbon with ethanol-ammonia mixture and fractionated by the use of Dowex 1 or Dowex 50 ion exchange resin. By the results of this column chromatography, ultraviolet absorbing material was separated into two fractions. One had an absorption maximum at 318 mμ and the other at 332 mμ. The maximum absorptions of the compouds were caused to disappear by bromination and caused to migrate to short wave length by sodium hydroxide.

前報[1]において各種海藻の過塩素酸抽出液の紫外吸収スペクトルを測定した結果，紅藻のみは共通して著るしく特異的な極大吸収を320～330mμに示すことを見出し，所謂紅藻色素と別種のものであることを報告した。可視吸収スペクトルの測定は一応海藻分類上の目安となることは従来よりよく知られているところであるが，紫外吸収スペクトルについての知見は現在までのところ殆んど知られていない。著者は紅藻にのみこのような特異的紫外吸収物質が存在することに興味をもち一連の研究を続けているが，本報告においては紅藻特異物質の抽出，イオン交換クロマトグラフィー，ペーパークロマトグラフィーによる分離，その他若干の性質について検討したので報告する。

実験方法

試料

函館市外七重浜及び茂辺地で採集した新鮮な下記4種の紅藻を使用した。

アカバ（Neodilsea yendana），　ツノマタ（Chondrus ocellatus），
ユ　ナ（Chondria crassicaulis），　オオソゾ（Laurencia glandulifera）．

抽出法

水洗した海藻（ツノマタ，ユナ，オオソゾ）を10%過塩素酸（1.5～3倍量）と共にホモゲナイザーでよくすりつぶし，最初はガーゼで粗く濾過し，次に2,000r.p.m.で30分遠心分離を行い微細な懸濁物のある着色した抽出液を得る。この抽出液をあらかじめ10%過塩素酸でよく洗つた濾紙パルプ及びセライト535（Johns-Manville 製）を併用して吸引濾過し，殆んど透明な抽出液を得る。

アカバは同量のエタノールを用いて過塩素酸の場合と同様な操作を行つて抽出し，減圧で濃縮後同量のエ

タノールを加えて不純物を沈澱させ上清は減圧でアルコール留去後酢酸鉛及び塩基性酢酸鉛で処理し，上清を硫化水素で脱鉛し更に濃縮後アルコール処理をくりかえして可溶部を集める。40°C 以下で濃縮しアルコールを留去後水に溶解し次の活性炭吸着に用いた。

活性炭吸着及び溶出

活性炭としては Norit S.X.30 (N.V. Norit-Vereeniging) 及び精製白サギ (武田薬品工業) を特別な前処理を行わずにそのまま使用したが，吸着力に殆んど差異が認められなかつた。

過塩素酸抽出液またはエタノール抽出液 (HCl で pH 2 とする) に活性炭を加え，30～60分室温ではげしくふりまぜ，吸引濾過後水洗を行つて酸性をなくする。

活性炭に吸着された物質の溶出はエタノール・アンモニア・水 (25：0.5：74.5 または 45：2：53) の混合液を使用した。320mμ または 330mμ 吸光度を測定して溶出状態を判定し，減圧 40°C 以下で濃縮乾固した。

イオン交換クロマトグラフィー

アニオン交換樹脂としては Dowex 1×10 (Dow Chemical Co.) 及び Amberlite IRA 401 (Rohm & Hass Co.) を，カチオン交換樹脂としては Dowex 50×10 (Dow Chemical Co.) を塩酸及び水酸化ナトリウムでよく洗い，洗液に紫外吸収を認められなくしてから使用した。活性炭よりの溶出液を樹脂に吸着させ水でよく洗い，次に溶離剤を流した。溶離剤としてはアニオン交換樹脂では稀塩酸を，カチオン交換樹脂で稀アンモニアを使用した。溶離状態の判定には 320mμ または 330mμ の吸光度を測定した。

ペーパークロマトグラフィー

東洋濾紙 No. 50 または No. 53 を使用した。展開溶剤としては (1) ブタノール・酢酸・水 (4：1：5)，(2) フエノール・水 (8：2)，(3) イソプロパノール・飽和硫安・水 (2：79：19) の3種を使用した。展開したクロマトグラムは各部位毎に切り取り，水で溶出し吸収スペクトルを測定した。

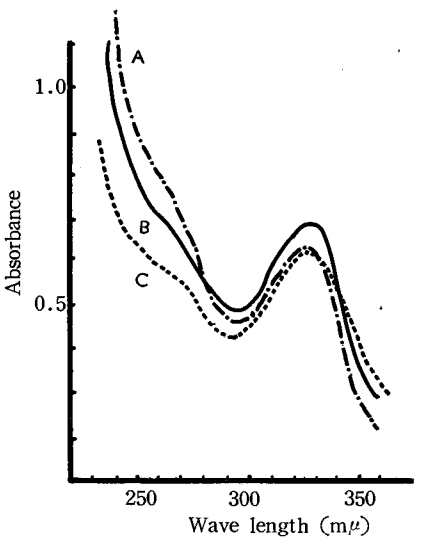

Fig. 1. Absorption spectra of Laurencia glandulifera
A: Extracted with perchloric acid
B: Extracted with water
C: Extracted with ethanol

実験結果及び考察

抽出剤について

抽出剤として水，10%過塩素酸，エタノールを使用してオオソゾについて行つた抽出結果を Fig. 1 に示した。吸収スペクトル的には抽出剤による差は殆んど認められないが，水及び過塩素酸の場合は微細な懸濁物があり，また粘性も著るしく大きいので濾過が非常に困難である。エタノールを用いると粘性が少なく濾過が非常に容易となるが，多量の色素が抽出されるので抽出液の着色度が大となる。

アカバ，アカハダのように粘性の非常に大きなものはアルコール抽出によつてもゲル状態となり濾過が困難であるが，抽出の際に酢酸鉛または塩基性酢酸鉛溶液を加えて操作すると，抽出液中の粘質は鉛塩を形成して凝縮し，また藻体自体も収縮するので濾過が非常に容易となる。この抽出法は粘度の高い試料を大量に扱う場合に適当な方法である。

活性炭処理について

活性炭吸着は一般に非常に良好で室温で30～60分ふりまぜるだけで吸着率は85～95%である。一例としてツノマタ1.5 kg を 10%過塩素酸2.8l で抽出し，Norit S.X. 30を30g及び60gを使用して吸着させた場合の濾液の吸収スペクトルを Fig. 2 に示した。

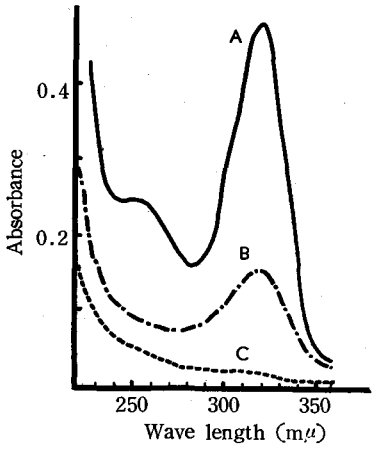

Fig. 2. Absorption spectra of carbon treated filtrate (Chodrus ocellatus)
A: Original
B: Treated with 30 g carbon
C: Treated with 60 g carbon

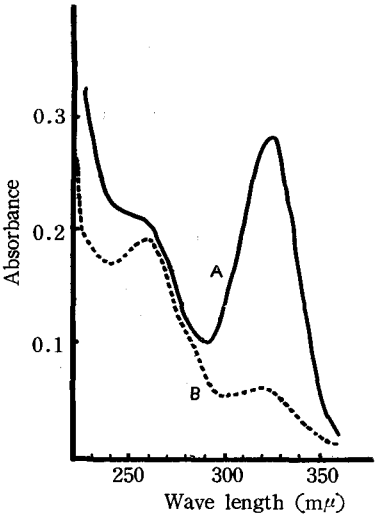

Fig. 3. Fractinal elution from carbon with ethanol-ammonia (Chondria crassicaulis)
A: Fomer fraction
B: Latter fraction

一般に粘性が大きく，懸濁物のある抽出液は吸着率が悪い傾向があるので，濾過に際し十分透明な濾液を得る必要がある。

活性炭よりエタノール・アンモニア・水混合液を用いて吸着された物質の溶出を行うと，320～330mμ に吸収を示す物質は比較的初期に溶出され，後半になるとむしろ 260mμ 附近に吸収を示す物質が主として溶出されて来る。一例としてユナの抽出液を吸着させた活性炭よりの溶出液を 450ml までと 450～2450ml までに2分し，濃縮後その吸収スペクトルを測定した結果を Fig. 3 に示した。

この結果より 320～330mμ に吸収を示す物質と 260mμ 附近に吸収を示す物質は異つたものであることが知られ，320～330 mμ の吸収物質を集める場合は比較的早く溶出を打切ることが出来る。一般に活性炭よりの溶出率は吸着液に対し45～60%の収量であつた。

イオン交換クロマトグラフィーについて

活性炭よりの溶出液は減圧 40°C で乾固し，再び水に溶解して不溶物を除き，Dowex 1 (Cl^-)（ユナ）及び Dowex 50 (H^+)（ツノマタ，アカバ，オオソゾ）を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行つた。溶離状態の判定には 320mμ または 330

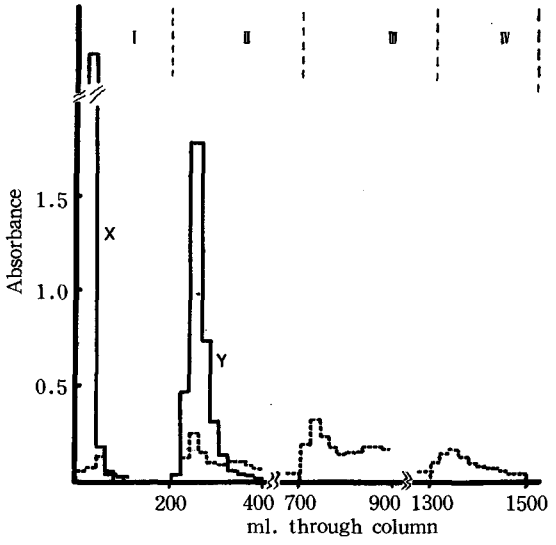

Fig. 4. Separation of ultraviolet absorbing material using anion exchanger (Chondria crassicaulis)
Exchanger: Dowex 1　Column: 10×180mm
Solvent: I, water. II, 0.003M-HCl
III, 0.02M-NaCl+0.01M-HCl
IV, 0.2M-NaCl+0.01M-HCl
Yield: X 55.7%　Y 27.0%
—— : Determined at 320 mμ
---- : Determined at 260 mμ

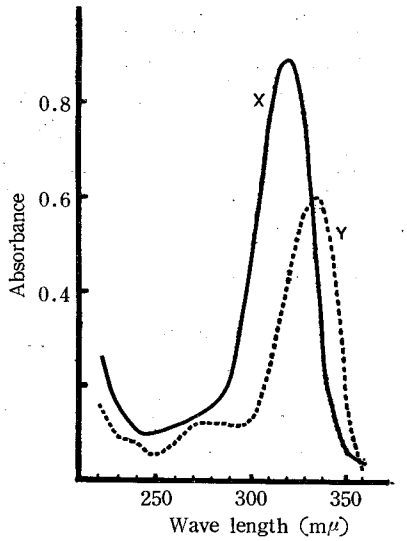

Fig. 5. Absorption spectra of X and Y isolated from Chondria crassicaulis

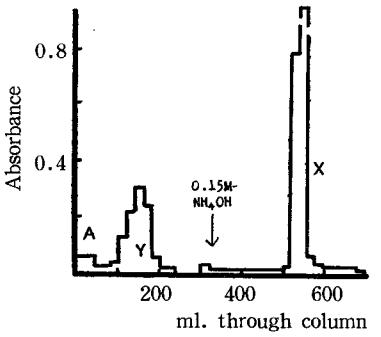

Fig. 6. Separation of ultraviolet absorbing material using cation exchanger (Chondrus ocellatus)
Exchanger: Dowex 50
Column: 11×180 mm
Yield: A 2.9%, Y 17.1%
X 80.1%
A and Y were determined at 330 mμ and X at 320 mμ.

mμ の吸光度の測定によつた。その結果は Fig. 4，6～8に示した。

ユナの場合にはアニオン交換樹脂を使用すると λmax 318mμ の物質(以下X物質と呼ぶ)は樹脂に吸着されないで通過する。次に 0.003M.HCl によつて λmax 332～333mμ の物質（以下Y物質と呼ぶ）が溶離されて来る。しかしさらに塩素イオンの濃度を高くしても 320～330mμ に吸収を示す物質は最早存在しないが，260mμに吸収を示す物質が溶離されて来るので，0.01 M.HCl + 0.02M.NaCl 以降ではおそらく主として酸可溶性ニュクレオチッドが溶出されるのであろう。さらに多量の試料を Amberlit IRA 401 (Cl') 16×330mm のカラムで処理してみると，0.003M.HCl によりY物質が溶出した後につづいてニュクレオチッド系物質が溶出されて来るのが認められる。

別なユナ試料2点について同様にアニオン交換樹脂を使用して定量を行つて見ると，X物質とY物質の比率はそれぞれ85%：10%，63%：24%であつた。

このようにして分離したX，Y両物質の吸収スペクトルを Fig. 5に示した。

さらにこのX，Y両物質を Dowex 50 (H') を使用するカチオン交換クロマトグラフィーを行つてみると，アニオン交換の場合とは逆にX物質は Dowex 50 に吸着されるがアンモニアで

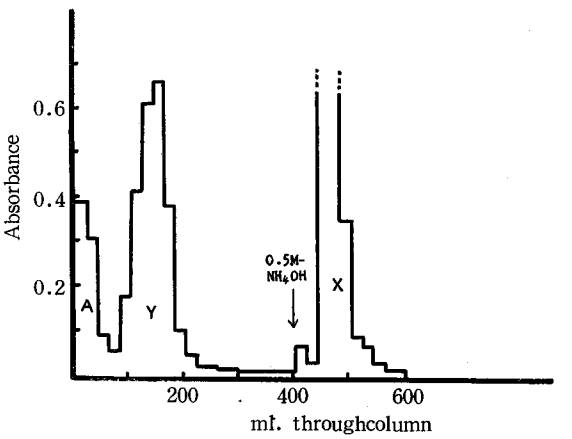

Fig. 7. Separation of ultraviolet absorbing material using cation exchanger (Neodilsea yendoana)
Exchanger: Dowex 50 Column: 14×70 mm
Yield: A 7.1% Y 21.8% X 59.8%
A and Y were determined at 330 mμ and X at 320 mμ.

溶離され，Y物質は水で溶離して来る。

ツノマタ，アカバ，オオソゾの場合も，Dowex 50 を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行つてみる

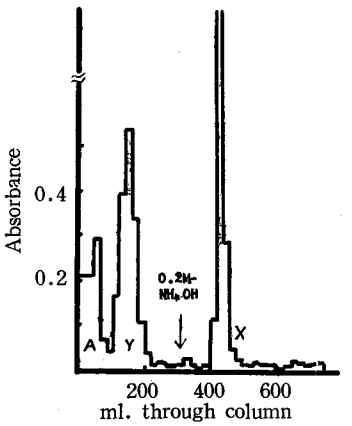

Fig. 8. Separation of ultraviolet absorbing material using cation exchanger. (Laurencia glandulifera)
Exchanger: Dowex 50,
Column: 10×150 mm
Yieled: A 9.5% Y 25.8%
X 51.3%
A and Y were determined at 330 mμ, and X at 320 mμ.

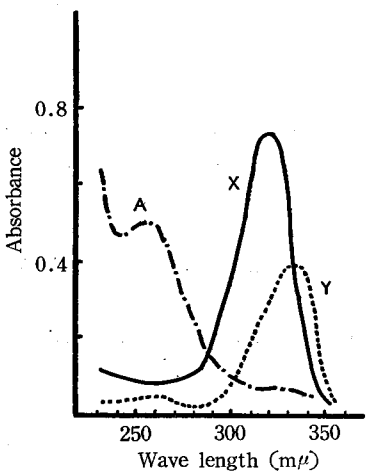

Fig. 9. Absorption spectra of X, Y and A isolated from Chondrus ocellatus

と，Fig. 6～8 に示したようにやはりX，Yの2成分が存在する。しかし水で溶離した際にY物質より先に出現するA物質は Fig. 9 に示したように 260mμ に吸収極大を示すので，おそらくニュクレオチッド系の物質であろう。

以上のイオン交換クロマトグラフィーの結果，紅藻に特有な 320～330mμ に吸収を示す物質中には吸収極大の波長を異にするX，Yの2成分が存在し，しかもX物質がY物質よりも量的に多く存在することが明かとなつた。

しかしながらY物質はいずれの海藻の場合でも殆んど極大吸収の位置に変化はないが，X物質の場合はアカバ及びオオソゾはユナ及びツノマタにくらべ若干極大位置が長波長にずれている。この点は精製が不充分なためか，または海藻の種類によりX物質に差があるのかについては今後の研究にまちたい。

ペーパークロマトグラフィーについて

イオン交換クロマトグラフィーにより分離したX，Y両成分は共にニンヒドリン反応陽性物質を含むので，本物質とニンヒドリン陽性物質との関係をペーパークロマトグラフィーにより検討した。

オオソゾのX，Y両成分を一応 Dowex 50 により分離した後両者を合一しクロマト試料として使用した。溶剤（1），（2）を使用して展開し，ガイドストリップによりニンヒドリン反応をしらべ，クロマトグラムはそれぞれ Fig. 10 に示した位置で切り取り，水 10m*l* で24時間抽出し 330mμ における吸光度を測定した。

この結果溶剤（1）においてはニンヒドリン呈色と紫外吸収の存在位置は一致するが，溶剤（2）を使用するとニンヒドリン陽性物質とX，Y両成分は全く異つたものであることが判明した。

さらに溶剤（2）によるクロマトグラムより溶出したフラクションA＋B及びCについて Dowex 50 によるイオン交換を行つてみると，A＋BはX物質を，Cは主としてY物質を含むことが認められた。一方溶剤（1）によるクロマトグラムのEはX，Y両成分を共に含む。

ユナの場合も同様なことが認められた。

この結果X，Y両物質はアミノ酸とは別個のものであることが確定し，80%フエノールはアミノ酸との分離及びX，Y相互の分離に適した溶剤と認められる。

X，Y物質の2，3の性質について

本物質はまだアミノ酸等の夾雑物を含んでいて，イオン交換により分離したX，Yフラクションは減圧で濃縮するも着色したシラップとなるのみである。

エーテル，酢酸エステル，ブタノールに不溶，含水エタノール，含水メタノールに可溶であるが，アルコールの濃度高いと沈澱する。この性質を利用し不純物をアルコールで沈澱させるとかなり純度を上げることが出来る。

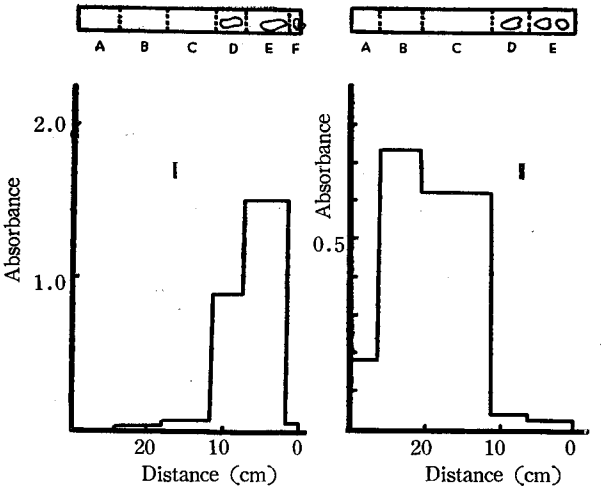

Fig. 10. Paper chromatographic separation of ultraviolet absorbing material
Upper column showed the spots colored with ninhydrin.
Downward column showed the ultraviolet absorbing area on chromatogram.
(I): Developed with solvent (1)
(II): Developed with solvent (2)

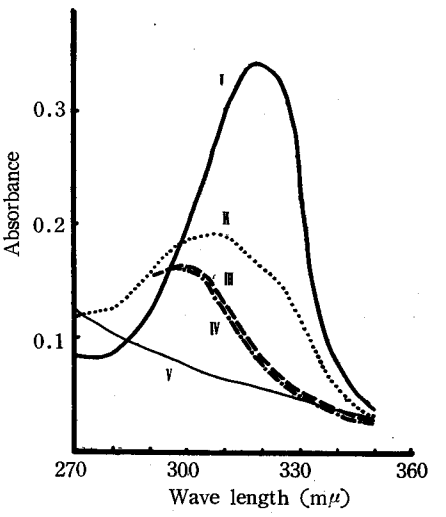

Fig. 11. Absorption spectra in sodium hydroxide solution
I: In water
II: In 0.1M-NaOH, after 1.5 hr
III: In 0.1M-NaOH, after 4 hr
IV: In 0.1M-NaOH, after 55 hr
V: In 0.1M-NaOH, after 1.5 hr, 100°C

室温においてブローム水と反応し特有な紫外吸収は完全に消失する。

また室温において水及び 0.5M・アンモニアに溶解するとX，Y共に極大吸収の位置のずれは見られないが，0.1M・塩酸では極大位置が若干短波長へ移動する傾向がある。しかし0.1M・水酸化ナトリウムに溶解すると，溶解後の時間の経過と共に吸光度の低下及び極大位置の短波長への移動が見られ，55時間後にはX物質は 297mμ 附近に，またY物質は 308mμ 附近に吸収極大を示すようになる。この変化の様子は Fig. 11 に示した。

この移動した吸収は塩酸の添加により pH をもどしても変らないことより，水酸化ナトリウムにより不可逆な変化をうけたものと考えられる。

さらに以上の溶液を封管中で 100°C，1.5時間加熱すると，水及び 0.1 M・塩酸の場合は若干の吸光度の低下がみられるのみで吸収スペクトルの型に変化は認められないが，0.5 M・アンモニア及び 0.1 M・水酸化ナトリウムの場合は特有な吸収が完全に消失する。

以上の結果より本物質の取扱いはアルカリ性で放置すること，特に水酸化ナトリウムとの接触は十分に注意を要する。

総　　括

ツノマタ，アカバ，ユナ，オオソゾの4種の紅藻につき特有な紫外吸収物質の検索を行つた。

本物質は海藻の過塩素酸抽出液またはアルコール抽出後酢酸鉛，アルコール処理を行つた抽出液より活性炭に吸着されエタノール・アンモニア混合液で溶出される。

イオン交換クロマトグラフィーにより λmax 318mμ のX物質と λmax 332 mμ のY物質に分別される。X物質はアニオン交換樹脂に吸着されないが，カチオン交換樹脂に吸着され，Y物質は逆にアニオン交換樹脂

に吸着されカチオン交換樹脂に吸着されない。量的にはX物質の方が常に多く存在する。

80%フエノールを使用したペーパークロマトグラフィーによりX，Y物質はアミノ酸と区別し得る。

ブローム水の作用により特有な紫外吸収は消失し，0.1 M・水酸化ナトリウム溶液中で吸収極大は短波長へ移動する。0.5 M・アンモニアまたは0.1 M・水酸化ナトリウム液と100°C，1.5時間の加熱により，X，Y両物質共に紫外吸収が消失する。

本研究に当り御指導，御鞭撻をいただいた斎藤恒行教授に深く感謝いたします。また実験に協力された佐々木健氏に謝意を表します。

文　　献

1) 辻野・斎藤 (1961). 北大水産彙報 12, 49-58.