The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ワラビのあく抜きの原理の解明と応用
Author(s)	
Citation	令和4（2022）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2023
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/90984
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式６

申請先学部　　薬学部　採択番号　No.4

令和４年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	みずまち　たくみ 水町　拓海	学部 学科	薬学部薬学科	学年	１年
ふりがな 共同 研究者氏名	うつのみや　こうすけ 宇都宮　浩介	学部 学科	薬学部薬学科	学年	１年
	こだま　ゆうと 小玉　悠登		薬学部薬学科		１年
	こやま　はるき 小山　陽生		薬学部薬学科		１年
	つだ　ももか 津田　桃佳		薬学部薬学科		１年
アドバイザー教員 氏名	あかい　しゅうじ 赤井　周司	所属	薬学研究科		
研究課題名	ワラビのあく抜きの原理の解明と応用				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。（先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。）				

目的：

食材に含まれる毒による人的被害は世界中でいまだに後を絶たない。そこで私たちは毒に興味を持ち、毒の研究をするにあたって文献調査を行った。その結果、ワラビのあく抜きにはえぐみの成分だけでなく、有害物質 ものぞく働きがあることが分かった。本研究では、身近な食材であるワラビのあく抜きにより、発がん性物質プタキロサイドを取り除く原理の解明、それを応用したあく抜き時間短縮等効率化の考察を行うことを目的として実施した。

①ワラビのあく抜きには一般的に二つの手法がある。一つは重曹を用いた手法で、もう一つは塩と小麦 粉を用いた手法である。この二つの手法は処理の時間が違う。その差の理由や、あく抜き処理に用いる材料がどのようにはたらいているのかを解明する。その化学反応の原理を解明することにより、あく抜きの効率化を図れるのではないかと考えた。

②他の食材でもあく抜きの原 理を考察し、あく抜き処理の効率化を図る。

③これらの食材を日常的に調理している人にとって、より安全に短時間であく抜きを行えることは有益である。ま た、食品中の有害物質を摂取するリスクを低減させることにもつながる。

計画：

ワラビからプタキロサイドを単離し、pH、温度、そして光によっておこる変化を見る。次に、現在行われているあく抜きの方法(前述の二つの方法)についての原理を解明し、あく抜きの効率化を図る。

研究方法・研究経過：

丹羽、山田らの報告（文献 1,2）に従い、ワラビからプタキロサイドの単離を行った。その全行程を図 1 に示す。

まず、ワラビを幾つかに分けて、各々を食品乾燥機を用いて 40℃、12 時間で乾燥した。この操作を２回繰り返し、総量 5. 78kg のワラビから 480g の乾燥ワラビを得た。

乾燥ワラビ 250g を約 2cm に細かく切り刻み、熱水抽出を三回行った。一回目はオイルバスの設定温

度を 80℃で行った。二回目からは三分割にして、一つを水浴で設定温度 90℃、もう二つをオイルバスで設定温度を 125℃で行った。一回抽出が終わるごとに、ワラビを吸引ろ過で除き、ろ液をエバポレーターで減圧濃縮した。次に、濃縮液を薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した。すなわち、抽出液の水分をエバポレーターで飛ばし、三つの抽出液を別々に TLC にスポットし、展開溶媒 CHCl3:CH3OH=5:1 で展開した。エバポレーターで TLC 上の水分を飛ばし、TLC に UV をあててスポットを検出した。その後、TLC をアニスアルデヒドおよびリンモリブデン酸で各々染色し、加熱後に呈色するスポットを観察した。

ワラビの熱水抽出液に含まれる疎水性の化合物をイオン交換樹脂 XAD-2 に吸着させ、それを分離した。すなわち、XAD-2 を 100ｇ秤り取り、MeOH200ml を加えて膨潤した。膨潤した樹脂をカラムに詰め、その体積の 5 倍の体積を目安に H2O を 1250ml 流し平衡化した。一回目の熱水抽出液を 3 回樹脂に通した。その後、樹脂吸着部を MeOH:H2O=3:7 の溶液 1250ml で溶出する操作を行った。次に、MeOH1250ml でも溶出を行った。溶出中に樹脂の一部が溶出液に入ってしまったので、溶出液をろ過して樹脂を取り除いた。ここで、XAD-2 非吸着部、MeOH:H2O=3:7 混合液溶出部、MeOH 溶出部の３つの試料を TLC で分析した。すなわち、三つの試料を別々に TLC にスポットし、展開溶媒 CHCl3:MeOH=5:1 で展開した。その後、アニスアルデヒドおよびリンモリブデン酸で各々染色し、加熱後に呈色するスポットを観察した。吸着操作を行う前の抽出液との比較のために上記の TLC で使用した 3 つの試料に加えて、2 回目の熱水抽出液を TLC で分析した。展開溶媒は上と同様で、染色液にはリンモリブデン酸を用いた。さらに、濃縮した一回目熱水抽出液由来の MeOH 抽出部を CD3OD に溶かし、核磁気共鳴(1HNMR) を測定した。

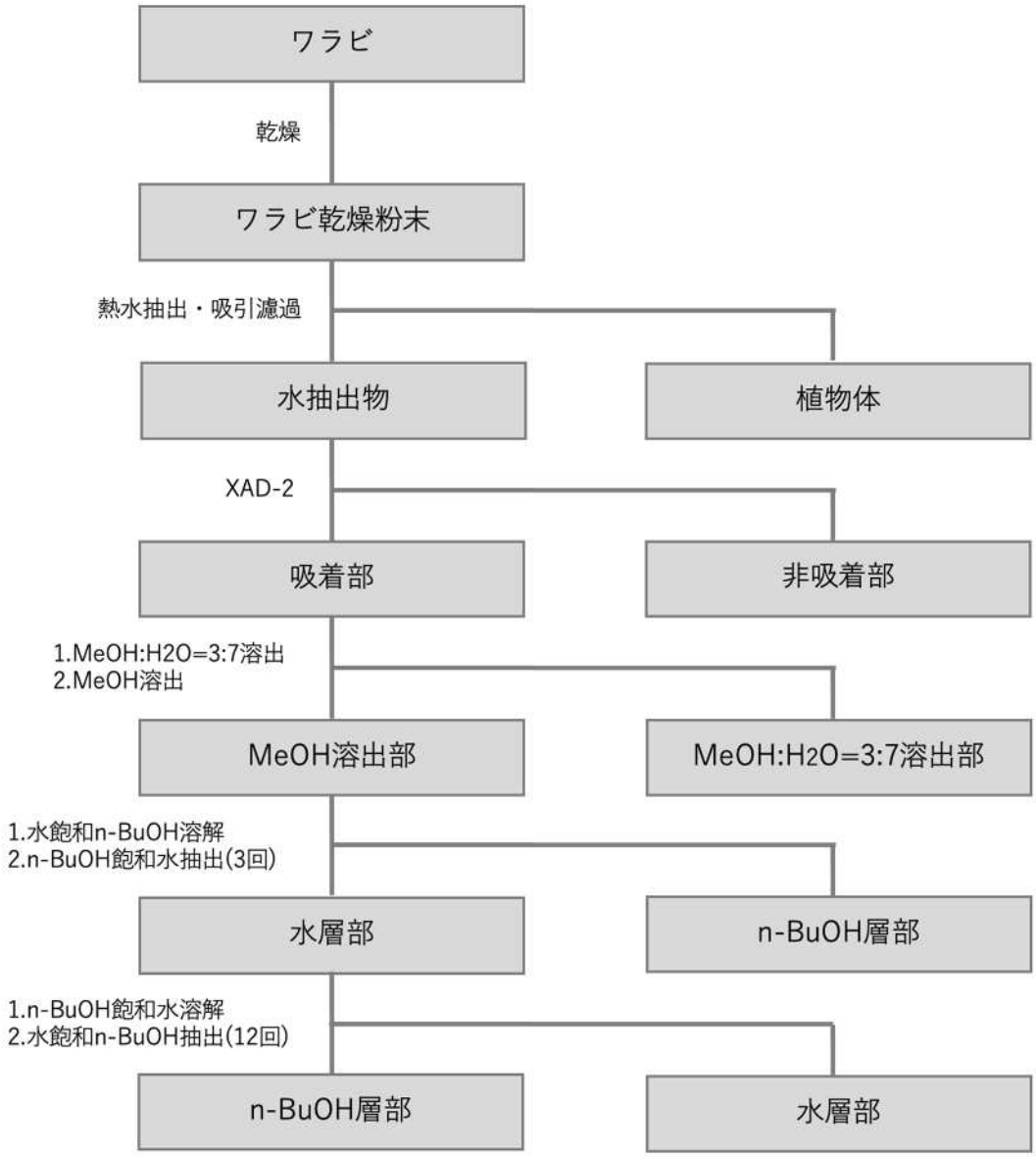

図１　ワラビからプタキロサイドの単離精製

分液漏斗(500ml)を使用し、水 150ml と n-BuOH150ml を混合し、水飽和 n-BuOH 約 150ml(上層)と n-BuOH 飽和水約 150ml(下層)の二層に分離した。NMR を測定した試料の CD3OD をエバポレーターでとばし、濃縮した抽出物を上記の操作で得た水飽和 n-BuOH30ml に溶解させた。さらに、溶け残った抽出物に n-BuOH 飽和水 30ml を加えて完全に溶解させ、これら 2 つの溶液を分液漏斗(300ml)に入れてよく混合した。しばらくすると、液が上層(水飽和 n-BuOH 層)と下層(n-BuOH 飽和水層)の二層に分離した。このうち下層の部分を液受け用フラスコに集めた。このとき、上層 30ml 分は分液ろうと中に残しておいた。その後、分液漏斗に n-BuOH 飽和水 30ml を加えて混合し、下層を同じ液受け用フラスコに集めた。この操作をもう一回行った。以上の分液操作によって、n-BuOH 飽和水抽出液 90ml が得られた。上記の分液漏斗での分離操作で得られた n-BuOH 飽和水層抽出部 90ml に H2O 飽和 n-BuOH45ml を分液漏斗で H2O 飽和 n-BuOH 層に目的の化合物を抽出した。この抽出操作を 12 回行った。1～3 回目の抽出操作での n-BuOH 層抽出部をエバポレーターにかけ、0.11g の抽出物が得られた。この一回目熱水抽出液のうち、分液漏斗 1～3 回目の n-BuOH 層抽出物を CD3OD に溶かし、NMR を測定した。さらに、分液漏斗 4～6 回目、7～9 回目の抽出を行い、分液

漏斗 10～12 回目の n-BuOH 層抽出物の NMR を測定して、目的化合物プタキロサイドがどの程度抽出されているのかを 1～3 回目抽出物と比較して調べた。分液漏斗 10～12 回目の抽出物にはプタキロサイドのピークが見られず、4～6 回目、7～9 回目の抽出物についても同様に NMR を測定した。その結果を見たところ、これらでも目的化合物のピークがほとんど見られなかったため、1～3 回目の H2O 飽和 n-BuOH 抽出で目的化合物が抽出されたと考えた。1～3 回目の n-BuOH 層抽出物の NMR 用サンプルを使用して TLC 分析を 4 回行った。1,2 回目の TLC では展開溶媒 CHCl3:MeOH=5:1 で展開した。その後、アニスアルデヒドおよびリンモリブデン酸で染色を行い、加熱後に呈色するスポットを観察した。その結果、リンモリブデン酸で染色したものはほとんど変化が観察されなかった。そこで、3 回目の TLC ではアニスアルデヒドのみを染色液に用いた。また、UV や呈色で観察できたスポットがこみあっていたため展開溶媒を CHCl3:MeOH=10:1 に変更して TLC で分析した。4 回目の TLC では操作の途中で試料が分解していないことを確認するために、3 回目の TLC と同じ条件で二次元 TLC によって分析した。その結果、観察していたスポットでは試料の分解が起こっていないと判断できた。さらに、 展開溶媒 CHCl3:MeOH=10:1 で展開し、小さなプレパラートを用いて再度 TLC で分析した。この TLC に使用したプレパラートの一部を、上記 1,3,4 回目の TLC の結果から求めた、アニスアルデヒドによって最も強く染色されたスポットの Rf 値を参考にして削り取った。削り取った粉末を、綿をつめたパスツールを使い、MeOH によって溶出した。この溶出液中の MeOH をエバポレーターでとばして濃縮すると、0.2mg の試料が得られた。この試料中にプタキロサイドが存在するかどうか確かめるために、試料全てを少量の MeOH に溶解させて高速液体クロマトグラフ-質量分析装置(LC-MS)で分析した。プタキロサイドの分子量(398.4)に相当するピークはみられなかったが、プタキロサイドの誘導体の一つであるプテロシン B の分子量(218.3)に相当するピークがみられた。上記の TLC による分離操作では、極めて少量の試料しか得られなかったため、NMR での検出は行えなかった。そこで、大きな薄層プレパラートに多くの試料を充填し、展開溶媒に CHCl3:MeOH=10:1 を用いて展開した。上記の LC-MS を用いた観察でプタキロサイドのピークが検出されなかったため、UV で観察された 6 つのスポットすべてを削り取った。削り取った粉末を、綿をつめたパスツールを使い、MeOH によって溶出した。これら 6 つの溶出液をエバポレーターで濃縮し、残った物質を CD3OD に溶かし NMR で分析した。今後、以下の実験を継続して行う。

・今後すること

1)TLC による分離操作では、プタキロサイドではなく、プタキロサイドの誘導体のピークのみが観測されたため、より短時間で実施できるカラムクロマトグラフィーで精製する。その後、中圧液体クロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィーによる精製を行い、プタキロサイドの単離を完了する。

2)LC-MS でプタキロサイドを検出する方法を検討する。

3)ワラビのあく抜きには一般的に二つの手法がある。一つは重曹を用いた手法で、もう一つは塩と小麦粉を用いた手法である。その二つの手法の時間差の原因や、用いる材料がどのようにはたらいているのかを明らかにする。そして、あく抜きの過程での反応を解明したのち、あく抜き処理の効率化を図る。

4)他の食材でもあく抜きの原理を考察し、効率化を図りたいと考える。

成果と考察：

LC-MS と NMR での分析によって、分液操作が終了した時点では抽出物中にプタキロサイドが存

在していると考えられる結果が得られた。しかし、その後の薄層プレパラートを利用した分離操作で得られた試料中にはプタキロサイドの存在は確認できなかった。一方、その試料中にプタキロサイドの誘導体の一つであるプテロシン B が存在していると考えられる結果が得られた。この分離操作によってプテロシン B が得られた原因の考察として、プタキロサイドは酸性条件下でプテロシン B に変化すること、酸性であるシリカゲルを用いたことが考えられる。丹羽らの報告（文献 1）では、シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーを行っていたが、本実験では TLC で分離操作を行ったため、試料が酸性条件にさらされる時間が長くなってしまい、プタキロサイドが化学変化を起こしてしまったと考えられる。今後の実験では、プテロシン B に変化させないために、カラムクロマトグラフィーを用いてより短時間でプタキロサイドを単離したい。

謝辞：
植物体からの天然化合物の抽出方法についてご指導いただいた荒井雅吉教授（大阪大学大学院薬学研究科）に感謝申し上げます。

参考文献：

1)丹羽治樹, 山田静之ら、わらびの新規ノルセスキテルペン配糖体, Ptaquiloside の単離と構造, 天然物有機化合物討論会講演要旨集, p9-15 (1983 年).
2) Niwa Haruki ら、PTAQUILOSIDE, A NOVEL NORSESQUITERPENE GLUCOSIDE FROM BRACKEN, PTERIDIUM AQUILINUM VAR. LATIUSCULUM, Tetrahedron Letters, 24, 4111-4120 (1983).
3) 木越英夫ら、わらび発癌物質プタキロサイドの合成研究, 天然物有機化合物討論会講演要旨集, p123-128 (1985 年).
4) N. V. Kovganko ら、 BIOACTIVE COMPOUNDS OF THE FLORA OF BELARUS, Chemistry of Natural Compounds, 40, 227-229 (2004).
5) MAKOTO Ojika ら、STUDIES ON PTERIDIUM VAR. LATIUSCULUM, IV. ISOLATION OF THREE p-HYDROXYSTYREN GLYCOSIDES AND AN EFEICIENT METHOD FOR THE ISOLATION OF PTAQUILOSIDE, AN UNSTABLE BRACKEN CARCINOGEN, Journal of Natural Products, 48, 634-637 (1985).
6) Mary T. Fletcher ら、Ptesculentoside, a novel norsesquiterpene glucoside from the Australian bracken fern Pteridium esculentum, Tetrahedron Letters, 51, 1997-1999 (2010).
7) 船山信次、毒の科学：毒と人間のかかわり（2016 年).