

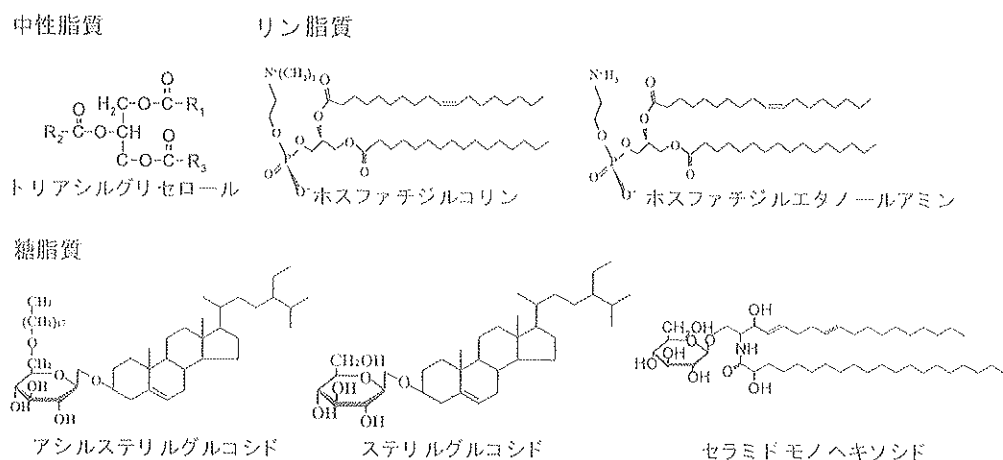
カカオ脂質の化学構造と生理作用

宮澤 陽夫 (東北大学大学院農学研究科教授)

近年、カカオ豆に含まれる成分の生理作用に関する研究が進み、カカオ豆由来ポリフェノールの抗酸化作用やリグニンのコレステロール低下作用などの生理作用が明らかにされている。一方、カカオ豆は脂質含量が高く、その主成分はパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸などからなるトリアシルグリセロールである。しかし、カカオ豆脂質の精密な分子化学構造に関する研究は少なく、その生理作用も明確ではない。カカオ豆の新しい機能性発掘と産業展開に向けて、これらの解明が待望されている。

こうした背景から、本研究では、カカオ豆脂質を精密分析し、その機能性を細胞実験で明らかにしようとした。そのために、カカオ豆を試料とし、これらの脂質含量と脂質組成を初めに明らかにしようとした。高い潜在的価値が期待されている糖脂質セラプロシド (セラミドモノヘキシシド) については、蒸発光散乱検出-高速液体クロマトグラフ (ELSD-HPLC)^{1,2)} と HPLC-大気圧化学イオン化質量分析装置 (HPLC-APCI/MS) によりその化学構造を詳細に明らかにしようとした。

図1 カカオ豆の主な脂質組成



実験 カカオ脂質の構造解析

【方法】

カカオ豆脂質の抽出 粉砕したカカオ豆 (10g) を正確に量り取り、30mLのクロロホルム/メタノール混液 (2:1, v/v) を加え、室温で1時間振とうした。これをろ過して残渣を取り除き、ろ液の一部 (20mL) に5mLの水を加えて混和した。これを遠心分離 (2500rpm, 10分) し、下層のクロロホルム層を採取した。上層の水/メタノール層に16mLのクロロホルムを加え、抽出操作をさらに2回繰り返した。得られた下層 (約45mL) を統合し、溶媒をロータリーエバポレータで除去して

総脂質を得た。

カカオ豆脂質の分画 総脂質の一部(約200mg)をクロロホルムに溶解し、カラムクロマトグラフィ(充填剤 COSMOSIL 75SL-II-PREP, ナカライテスク)に供した。クロロホルム、アセトン、メタノール(各150mL)の順で溶出し、中性脂質、糖脂質、リン脂質の画分を得た。

脂質含量と脂質組成 カカオ豆の脂質含量を重量法で測定した。脂質組成は薄層クロマトグラフ(TLC)法で調べた。すなわち、クロロホルムに溶解したカカオ豆の総脂質の一部をTLCプレート(Silica Gel 60, 厚さ0.25mm; Merck社製)にスポットし、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸(60:40:1)で展開した。また、糖脂質とリン脂質の画分については、クロロホルム/メタノール/水(80:25:4)で展開した。展開後、50%硫酸水溶液を噴霧し、160℃で加熱することにより全脂質のスポットを検出した。

セレブロシド定量と分子種分析 カカオ豆の総脂質を、100mg脂質/mLの濃度になるようにクロロホルム/メタノール(2:1)混液で溶解した。この溶液の一部(20 μ L)をELSD-HPLCに供し、セレブロシドを定量した^{1,2)}。

<HPLC-ELSD分析条件>

カラム: SILICA (SG120-5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm, 資生堂)

移動相: クロロホルムとメタノール/水(95:5)による2液グラジエント

流速: 1mL/min

検出: 蒸発光散乱検出器(ELSD, SEDEX 55, SEDERE社製)

検出条件: ドリフトチューブ温度60℃, ガス流量2.0Bar

標準物質: セレブロシド標品(小麦抽出物, 日本油脂)

次に、上記のHPLC-ELSD条件でカカオ豆のセレブロシドを分取し精製した。これをHPLC-APCI/MSに供し、セレブロシドの分子種ごとの化学構造を解析した。

<HPLC-APCI/MS分析条件>

カラム: CAPCELL PAK C₁₈ (SG120-5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm, 資生堂)

移動相: メタノール

流速: 1mL/min

検出: APCI/MS (LCMS-2010 Ver.1.01, 島津)、ポジティブイオンモード

【結果・考察】

カカオ豆の脂質含量は49.4% (w/w, n=4) であった。中性脂質・糖脂質・リン脂質の比は97:2:1であった。カカオ豆は中性脂質が大部分であり、糖脂質も比較的多かった。中性脂質はトリアシルグリセロールが主成分で、1,3-ジアシルグリセロール・遊離脂肪酸・ステロール・ステロールエステルなども存在した (図2)。リン脂質はホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンが主成分であった (図3)。糖脂質としてアシルステリルグルコシドやステリルグルコシドとともに、セラミドモノヘキソシドが検出された (図3)。近年、セラミドモノヘキソシドは抗腫や皮膚の保湿保護などの生理作用が報告され、産業応用がとくに期待されている。そこで、ELSD-HPLC法でセラミドモノヘキソシドを定量した結果、カカオ豆は $4.8 \pm 1.7 \text{ mg} / 100 \text{ g}$ のセラミドモノヘキソシドを含むことがわかった (図4)。カカオ豆の主要なセラミドモノヘキソシド分子種は、炭素数16と18のヒドロキシ脂肪酸がスフィンガジエニン骨格に酸アミド結合したものと、炭素数22と24のヒドロキシ脂肪酸がヒドロキシスフィンゲニン骨格に酸アミド結合したものであった (図5)。このようなカカオハスクのセレブロシド分子種は、大豆・米糠・とうもろこしなどにも含まれるものであった。しかし、炭素数18のヒドロキシ脂肪酸を持つセレブロシドは、これらの植物に少なく、カカオハスクに特徴的であった。この結果から、廃棄物であるカカオハスクは、新たなセレブロシド供給資源としての利用が考えられた。

図2 カカオ豆の中性脂質の薄層クロマトグラム

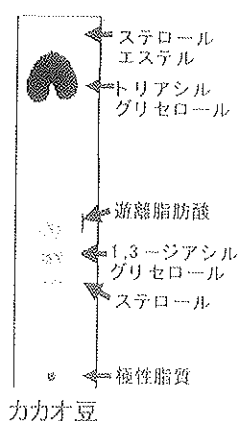


図3 カカオ豆脂質の薄層クロマトグラム

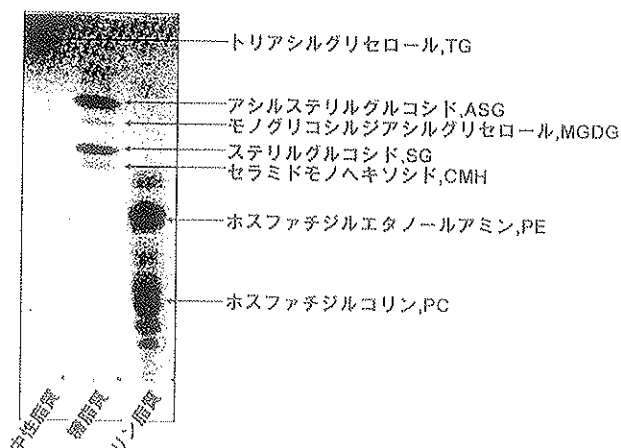
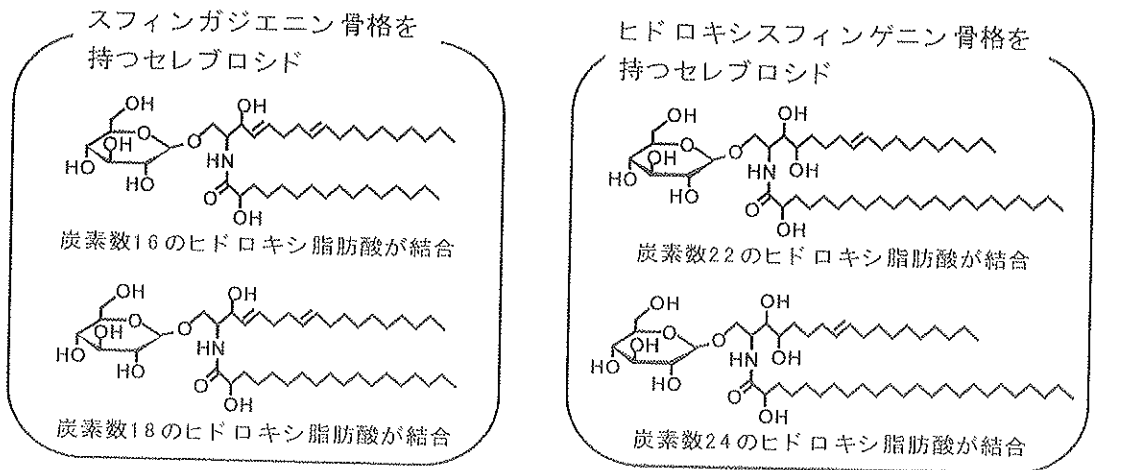


図4 光散乱検出-HPLCによるセラミドモノヘキソシドの検出

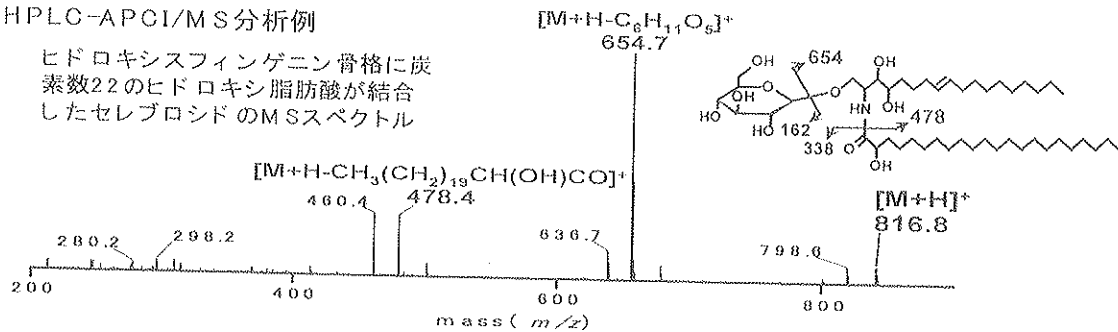


図5 カカオ豆脂質の主要なセラミドモノヘキソシド分子種



HPLC-APCI/MS分析例

ヒドロキシスフィンゲニン骨格に炭素数22のヒドロキシ脂肪酸が結合したセレブロシドのMSスペクトル



【結論】

カカオ豆の脂質は、中性脂質の大部分がトリアシルグリセロールであり、糖脂質はステロール配糖体が主要で、リン脂質はホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンが主であった。また、機能性の知られている糖脂質セレブロシド（セラミドモノヘキソシド）も検出された。

今後も、カカオ豆の新たな機能性を探るため、更なる研究が必要である。

参考文献

- 1) Sugawara, T. and Miyazawa, T. Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. *Lipids*, 1999, 34, 1231-1237.
- 2) Kashima, M., Nakagawa, K., Sugawara, T., Miyazawa, T., Murakami, C., Miyashita, R., Ono J., Deschamps, M. S. and Chaminade, P. Method for quantitative determination of cerebroside in "Plant Ceramide" foodstuffs by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Oleo Sci.*, 2002, 51, 347-354.