

氏 名 (本 国 籍)	包 玉 花 (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 6 0 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 5 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	米糠 γ - オリザノールの構成成分に関する研究
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授 上 野 義 仁 副査 岐阜大学 教 授 木 曾 真 副査 静岡大学 教 授 河 合 真 吾 副査 岐阜大学 准教授 柳 瀬 笑 子

論 文 の 内 容 の 要 旨

γ -オリザノールは米糠に特有の成分で、フェルラ酸がトリテルペンアルコールや植物ステロールと縮合したエステル類の総称である。抗酸化作用、脂質代謝作用などの多様な機能性が知られ、医薬品、食品の劣化防止、機能性食品、化粧品材料として広く用いられている。その主要成分はシクロアルタニルフェルレート(1)と 24-メチレンシクロアルタニルフェルレート(2)であるが、それら以外にも 10 種類以上の構成成分が知られており、これらは未だ完全に単離精製されていない。そのため、どの構成成分が主要な役割を果たしているかは未解明で、これらの生理活性の詳細を明らかにする為にはまず純度の高い主成分を大量に得る必要がある。そこで本研究では市販の γ -オリザノールから各構成成分の分離方法を開発することを目的に研究を行なった。

① 主成分 24-メチレンシクロアルタニルフェルレート(1)の効率的単離

γ -オリザノールを、遮光下で ODS と Cholesterol カラムを組み合わせ用いた逆相 HPLC 分取を検討したところ、少量ながら主成分の 1 及び 2 をほぼ純粋に単離精製することに成功し、MS 及び ^1H -NMR スペクトルより構造解析を行なった。次に、 γ -オリザノールの光異性化し易いフェルラ酸部を切断し、得られたトリテルペンアルコール類と、その α -トルオイル体の逆相 HPLC による分離を検討した。その結果、主成分の 2 種及びそれぞれの α -トルオイル体をほぼ純粋に単離精製することができた。しかしこれらは逆相系の溶媒に溶解し難く、その分離精製は困難であった。そのためアルコール部に各種置換基を導入し、逆相溶媒での溶解性を比較したが、誘導化によって溶解性の向上は確認されなかった。以上のことから、 γ -オリザノール関連化合物の逆相 HPLC による分離は困難を極めて、少量の場合のみ有効であることが判った。

主成分 1 の大量分離は再結晶法が報告されているが、2 の量産法は報告がなかった。本研究では γ -オリザノール中の 1 の側鎖に存在する三置換二重結合が、2 の二置換二重結合よりも電子密度が高く酸化され易いことに注目して、1 を *m*-クロロ過安息香酸により選択的に酸化除去

して2を効率的かつ純粋に単離する方法を開発した。その結果、純度 98.3%の2を 10.2g で大量精製することに成功した。

② γ -オリザノール微量成分の単離精製

γ -オリザノール中に含まれるカンペステリルフェルレート (3)及びエピカンペステリルフェルレート(4)は、微量成分であるが主成分 1、2 に次いで多く含まれる成分である。これらは互いに側鎖 24 位の立体異性体であり、その構造が近いために未だ純粋に単離されていなかった。そこで、 γ -オリザノールを結晶化して得た母液から ODS、C28 及び Cholesterol カラムの 3 種充填カラムを用いた逆相 HPLC 分取を組み合わせることで3、4をそれぞれ 99%以上に純粋に単離精製することに成功し、それらの MS 及び NMR スペクトルよりその構造を確認した。残りの微量成分についてもこれらの 3 種カラムを用いた逆相 HPLC 分取に誘導化反応を組み合わせることにより完全に単離精製することができ、これらの純度及びその構造については 3 種充填カラムを用いた HPLC 分析及び ^1H 、 ^{13}C -NMR スペクトル、MS スペクトル及び X 線結晶構造解析で証明した。

審 査 結 果 の 要 旨

本博士論文は、様々な機能性を持つことで知られる米糠 γ -オリザノールの構成成分の単離とその分離法の開発を目的として研究を行ったものである。

γ -オリザノールは米糠に特有の成分で、フェルラ酸がトリテルペンアルコールや植物ステロールと縮合したエステル類の総称である。抗酸化作用、脂質代謝作用などの多様な有益な機能性が知られ、医薬品、食品の劣化防止、機能性食品、化粧品材料として広く用いられている。その主要な成分はシクロアルテニルフェルレート(1)及び 24-メチレンシクロアルタニルフェルレート(2)であるが、それら以外にも 10 種類以上の構成成分が知られており、これらは未だ完全に単離精製されていない。そのため、どの構成成分が主要な役割を果たしているかは未解明で、これらの生理活性の詳細を明らかにする為にはまず純度の高い主成分を大量に得る必要がある。そこで本研究では市販の γ -オリザノールから各構成成分の分離方法を開発した。

① 主成分 24-メチレンシクロアルタニルフェルレート(1)の効率的単離

γ -オリザノールの主成分の単離精製について様々検討を行なった。 γ -オリザノールを、遮光下で ODS と Cholesterol カラムを組み合わせ用いた逆相 HPLC 分取を検討したところ、少量ながら主成分の 1 及び 2 をほぼ純粋に単離精製することに成功し、MS 及び ^1H -NMR スペクトルより構造解析を行なった。次に、 γ -オリザノールの光異性化し易いフェルラ酸部を切断し、得られたトリテルペンアルコール類と、その α -トリテルペンアルコール体の逆相 HPLC による分離を検討した。その結果、主成分のシクロアルテノール、24-メチレンシクロアルタノール及びそれぞれの α -トリテルペンアルコール体をほぼ純粋に単離精製することができた。しかしこれらは逆相系の溶媒に溶解し難く、その分離精製は困難であった。そのためアルコール部に各種置換基を導入し、逆相溶媒での溶解性を比較したが、誘導化によって溶解性の向上は確認されなかった。以上のことから、 γ -オリザノール関連化合物の逆相 HPLC による分離は困難を極めて、少量の場合のみ有効であることが判った。

主成分 1 の大量分離は再結晶法が報告されているが、2 の量産法は報告がなかった。本研究では γ -オリザノール中の 1 の側鎖に存在する三置換二重結合が、2 の二置換二重結合よりも電子密度が高く酸化され易いことに注目して、1 を *m*-クロロ過安息香酸(*m*-CPBA)により選択的に酸化除去して 2 を効率的かつ純粋に単離する方法を開発した。その結果、純度 98.3%の2を 10.2g で大量精製することに成功した。

② γ -オリザノール微量成分の単離精製

γ -オリザノール中に含まれるカンペステリルフェルレート (3) 及びエピ-カンペステリルフェルレート (4) は、微量成分であるが主成分 1, 2 に次いで多く含まれる成分である。これらは互いに側鎖 24 位の立体異性体であり、その構造が近いために未だ純粋に単離されていなかった。そこで、 γ -オリザノールを結晶化して得た母液から ODS、C28 及び Cholest カラムの 3 種充填カラムを用いた逆相 HPLC 分取を組み合わせることで 3, 4 をそれぞれ 99% 以上に純粋に単離精製することに成功し、それらの MS 及び ^1H -NMR スペクトルよりその構造を確認した。残りの微量成分についてもこれらの 3 種カラムを用いた逆相 HPLC 分取に誘導化反応を組み合わせることにより完全に単離精製することができ、これらの純度及びその構造については 3 種充填カラムを用いた HPLC 分析及び ^1H -, ^{13}C -NMR スペクトル、MS スペクトル及び X 線結晶構造解析で証明した。

以上の研究により、 γ -オリザノールの構成成分の分離精製法を新たに開発して、主成分 2 種と微量成分 7 種類を高純度に分離精製する事に成功し、これらの機器分析によりその構造を明快地証明できた。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値があるものとして認めた。

学位論文の基礎となる学術論文は以下のとおりである。

1. 包 玉花、柳瀬 笑子、中塚 進一：米糠 γ -オリザノールに含まれる主成分 24'-メチレンシクロアルタニルフェルートの効率的単離 日本食品化学学会誌 19(3): 209-214, 2012.
2. Bao, Y., Yanase, E. and Nakatsuka, S. : Isolation of Campesteryl ferulate and Epi-campesteryl ferulate, two components of γ -Oryzanol from Rice Bran. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, in press.