

## HPLCを用いたワラビのプタキロサイド含有量の測定

戸沢 一宏 (山梨森総研), 神田 和也 (峡北森組)

**要旨:** ワラビ (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) は有名な山菜であると同時に、ガン誘発性を持つプタキロサイドを含んでいる。このワラビのプタキロサイドを定量する方法を確立し、県内に自生するワラビ野生株のプタキロサイドの含有量について測定した。また、アクなしワラビ1系統と市販のワラビの醤油漬けについても定量分析を行い、野生株との比較を行った。その結果、アクなしワラビのプタキロサイドの含有量は野生株の7~10%程度であることが判明した。また、市販のわらびの醤油漬けからは、プタキロサイドが検出されなかった。

**キーワード:** ワラビ, プタキロサイド, HPLC, 定量分析

### I はじめに

ワラビに含まれるプタキロサイドは、癌を誘発する物質として知られ、単離に関する研究が行われた。

(1, 2)

プタキロサイドは、図-1に示されるような化学構造を持っており、加水分解するとジェノン体となりシクロプロパンが開裂して、DNAを損傷し、癌を引き起こすとされている。さらに、ジェノン体から図-2の構造をもったプテロシンBとなり、発がん性はなくなる。通常、ワラビを調理する際には、灰、重曹などを用いて灰汁を除去する操作を行うため、プタキロサイドはプテロシンBに変化し流出すると考えられ、人が食べても問題ないとされている。

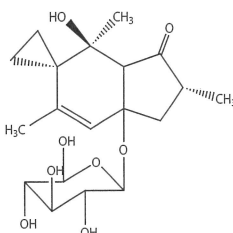


図-1. Ptaquiloside

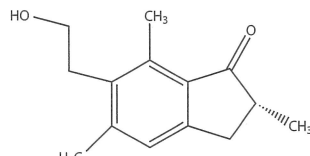


図-2. Pterosin B

そこで、本研究ではワラビに含まれるプタキロサイドの定量分析の方法を確立することを目的とし、ワラビの抽出条件およびHPLCの分析条件について検討を行った。

さらに、山梨県に自生するワラビ野生株3系統、栽培アクなしワラビ1系統、市販のわらびしょうゆ漬けの凍結乾燥粉末についてプタキロサイドの定量分析を行い、比較検討を行った。

### II 試験方法

#### II-1. 試料採取地

試験に使用したワラビ採取場所および重量を表-1に示す。

表-1. 採取地および試料重量

採取場所	生重量	乾燥重量
富士河口湖町	2.119	0.5287
増穂町	2.136	0.5081
南アルプス市	2.200	0.5107
アクなし	2.105	0.5008
醤油漬け	2.009	0.5012

#### II-2. 試料の調整・分析

採取したワラビは、凍結乾燥機 (東京理化製 FDU-1200) で乾燥を行い、粉碎器にて粉末状にしたものを用いた。試料はMeOHにて12時間抽出し、濾過後、40°Cの温浴上でロータリーエバポレータ (東京理化製 N-1100) により濃縮し、MeOHを加えて20mlにしたものをサンプルとした。

分析は、Agilent Technology社製HPLCシステム1200、検出器はUV検出器を用いた。分析条件は以下の通り。

カラム温度 25°C

溶媒: アセトニトリル: 水=20:80

流量 1.0ml/min

サンプル量 20 μl

カラム: 日本分光社製 Finepak 4.6 φ × 150mm

検出波長 206nm

### III 試験結果

#### III-1. 標準物質の分析

NMRにて構造が確認されたプタキロサイドおよびプテロシンBについて、分析を行った。

図-3に分析結果を示す。この結果より、プタキロサイドの保持時間は4.6min、プテロシンBは27.5minであった。

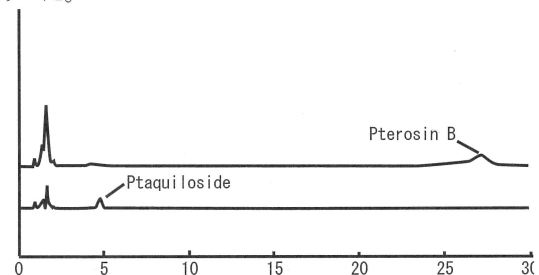


図-3. 標準品の分析

#### III-2. カラムの選定

効率的かつ精度の高い分析を行うため、分析を行うカラムについて検討を行った。HPLCの設定は標準品と同等に設定し、以下のカラムを用いて分析を行い、比較検討を行った。

(1) Merck社製 クロモリス

4.6 φ × 100mm

(2) 日本分光社製 Finepak SIL

4.6 φ × 150mm

(3) 日本分光社製 Finepak SIL

4.6 φ × 250mm

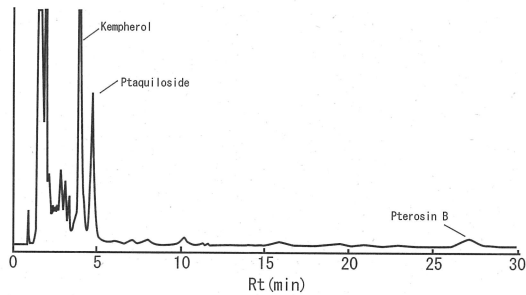


図-4. Finepakによるワラビの分析

図-4にワラビの凍結乾燥粉末をMeOHで抽出した試料をFinepak 4.6φ×150mmを用いた場合の分析結果を示す。クロモリスを用いた場合、分析時間が20分と短縮されるが、プタキロサイドとケンフェロールとのピークが重なり、分解能が低下することが確認された。また、Finepak SIL 4.6φ×250mmを用いた場合、全体の分析時間が60分となり、効率的ではないことが確認された。本研究においては、Finepak SIL4.6φ×150mmを用いて分析することとした。

### III-3. 抽出法の検討

ワラビ粉末から、プタキロサイドを抽出する溶媒について検討を行った。表-2にプタキロサイド分析結果

表-2 プタキロサイド分析に及ぼす抽出溶媒の影響

抽出液	分析結果 (PT Area)	分析結果 (PB Area)	濾過時間	濃縮時間
蒸留水	934,085	535,425	300 sec	37 min
50%MeOH	1,329,814	839,059	8 sec	33 min
80%MeOH	1,351,205	848,555	4 sec	27 min
MeOH	1,416,285	818,031	2 sec	15 min

果に及ぼす抽出液の影響を示した。この結果より、ワラビの抽出液にはMeOHが適していることが判明した。また溶媒量を検討するため、0.1gのワラビ粉末を20mlのMeOHで12時間抽出。遠心分離後、残渣にMeOHを加え、再び12時間抽出。この操作を2回繰り返す、それぞれの抽出液のプタキロサイドの分析を行った。この結果より、1回目の抽出において98.3%、2回目で99.3%の量を抽出していることから、0.5gの乾燥粉末に対し200mlのMeOHで抽出することとした。

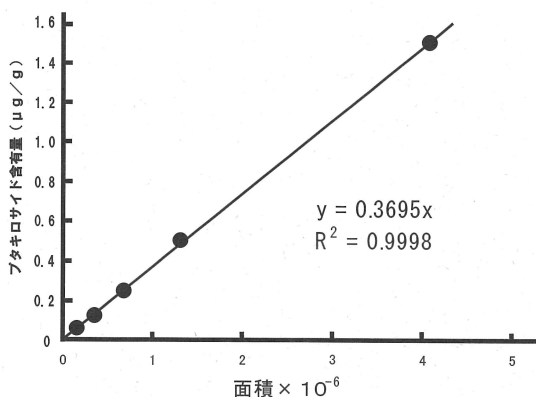


図-5. プタキロサイド検量線

### III-4. 検量線の作成

プタキロサイド標準品を用いて、検量線の作成を行った。図-5に検量線を示す。この検量線を用いて、定量分析を行った。

### III-5. ワラビのプタキロサイド含有量

県内に自生するワラビ、およびアクなしワラビ栽培品、わらび醤油漬けについて、分析結果を表-3に示す。野生ワラビについては10μg/g(dry)以上のプタキロサイドを含有していることが判明した。

表-3 ワラビのプタキロサイド含有量

採取場所	乾燥重量	PT含有量 (μg/g dry)	対アクなし
富士河口湖町	0.5287	15.19	11.57
増穂町	0.5081	12.48	9.51
南アルプス市	0.5107	20.48	15.61
アクなし	0.5008	1.31	—
醤油漬け	0.5012	N.D.	—

### III-6. 部位によるプタキロサイド含有量の差異

野生ワラビについて、小葉と葉柄について、それぞれの含有量について測定した。表-4に測定結果を示す。これから先端部の含有量が高くなっているが、ワラビ全体に対する先端部の重量が少ないため、際だって高いわけではない。

表-4. ワラビのプタキロサイド含有量

採取場所	部位	生重量	乾燥重量	含有量 (μg/g)
増穂町	先端部	2.0327	0.5071	0.926
	下部	5.1481	0.5570	0.205
富士河口湖町	先端部	2.2490	0.5221	0.792
	下部	4.9331	0.5299	0.147

### IV 考察

ワラビのプタキロサイド含有量の測定法について検討し、定量分析が可能となった。また、山梨県に自生するワラビについて分析したところ乾燥重量あたり12~20μgのプタキロサイドを含んでいることが判明した。また、アクなしワラビのプタキロサイド野生株の7~10%程度程度であることが明らかとなった。

### 引用文献

- (1) Niwa, H., Ojika, M., Wakamatsu, K., Yamada, K., Hirono, I. and Matsushita, K. (1983) "Ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*". *Tetrahedron Lett.* 24: 4117-4120.
- (2) 広野 巖, 大場 茂, 齊藤 喜彦, 丹羽 治樹, 小鹿 一, 若松 一雅, 山田 静之, 松下 和弘 (1983) 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. 天然有機化合物討論会講演要旨集 (26) pp. 9~15.