

グリセリン脂肪酸エステル（カプリル酸モノグリセリド）の 成分分析および微生物に対する抗菌効果について

高村 一知 星野 浩子 佐藤 正忠* 恵比根 豊*

Chemical Component of Glycerin Esters of Fatty Acid(Caprylic Acid Monoglyceride) and their Antibacterial Effect on Microorganisms

KAZUNORI TAKAMURA, HIROKO HOSHINO, MASATADA SATOH* and YUTAKA EBINE*

The caprylic acid monoglyceride(C8MG) on the commercial from 3 companies was analyzed of the purity and composition. According to the results, its antibacterial effect on microorganisms was also examined. The results were as follows:

- 1) According to the gas chromatography(GC) analysis, caprylic acid(octanoic acid, C8), synthetic base of C8MG was contained in about 0.1% of C8MG.
- 2) Fatty acid composition of C8MG was represented by C8(99.9%) and capric acid(C10)(0.01%); high purity product was in use for C8MG.
- 3) According to the GC analysis of the purities of 3 companies' C8MG, monoglyceride(MG) and diglyceride(DG) showed purities of 91~93% and 4.0~5.6%, respectively.
- 4) Monoglyceride composition was represented by α -monoglyceride(93.7%) and β -monoglyceride(6.9%).
- 5) In the antibacterial test using microorganisms, C8MG containing caprylic acid at a content of as low as 0.1% had no antibacterial effect.
- 6) High purity C8MG had high antibacterial effect no microorganisms.

脂肪酸の抗菌効果については1911年Lamar¹¹⁾がオレイン酸, リノール酸, リノレイン酸が抗菌性を示すことを報告して以来, 多くの研究が行なわれている。そのなかで, 芝崎ら¹²⁾はグラム陰性菌に対する抗菌性はカプリル酸(C8)以下の短鎖長の脂肪酸が有効であると報告している。しかし, 酢酸, プロピオン酸, ソルビン酸などの炭素数10までの脂肪酸

は, 臭気と特有な刺激のある味のためあまり食品への利用はなされていない。これらの問題点を解決したのは, 低級脂肪酸に多価アルコールを反応させそのエステルにすることにより, 臭い, 味がほとんど無くなり, また水への分散性も向上し, 抗菌効果も期待できるとして, 現在, 食品添加物の乳化剤グリセリン脂肪酸エステル(MG)として幅広く利用され

Key words: glycerin esters of fatty acid. caprylic acid monoglyceride. caprylic acid(octanoic acid). α -monoglyceride. β -monoglyceride. gas chromatography. thermospray liquid chromatography mass spectrometry.

*第一製薬㈱ 中央研究所

〒134 東京都江戸川区北葛西1-16-13

ている。

抗菌効果を期待して実用化されているのは、低級脂肪酸のモノグリセリドとシュガーエステルである。このうちカプリル酸モノグリセリド (C8MG) とカプロン酸モノグリセリド (C10MG) がしょう油などを中心に使用され、また多くの研究報告もある^{3,5,7,8,9,13,15)}。これらの微生物研究についての報告をみると、試料として使用しているMGの成分および組成に関する分析はほとんどなされていない。

そこで著者らは微生物研究の基礎実験の一環として、C8MGの成分、組成について薄層クロマトグラフィー (TLC)、ガスクロマトグラフィー (GC) およびLC-MSを用いて分析し、この分析結果をもとに微生物の抗菌性について検討したところ、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 供試薬

グリセリン脂肪酸エステルはグリセリンに低級脂肪酸のカプリル酸が結合した、市販のカプリル酸モノグリセリド (C8MG) を用いた。

トリメチルシリル化剤 (トリメチルシリルアセトアシド)、メチル・ブチル化剤 (ジメチルホルムアシド・ブチルアセタール)、カプリル酸、Tween 20などのすべての試薬は和光純薬工業社製特級試薬を用いた。

2. 装置

ガスクロマトグラフ装置は島津製作所社製GC-6A型を用いた。また、キャピラリガスクロマトグラフ装置はヒューレットパッカード社製HP-5890A型を用いた。

液体クロマトグラフーマススペクトル装置 (LC-MS) はVG社製ZAB-2SEQ型を用いた。

3. 供試菌株

東京農業大学総合研究所より分与された *Bacillus subtilis* NRIC 1521 (ATCC 6633) を用いた。また、醸造協会より分与された *Saccharomyces cerevisiae* RIB 6006 (Jozo-

Kyokai No.701) を用いた。

4. 培地

増菌培地：ブドウ糖20 g, 酵母エキス2 g, 硫酸マグネシウム0.5 g, カゼイン5 g, リン酸二水素カリウム1 g, 28.5 g / 1 (pH5.7)

1%ペプトン水 (栄研化学株) : ペプトン10 g, 塩化ナトリウム5 g, 15 g / 1 (pH7.1)

生菌数測定用培地 (日本製薬株) : 標準寒天培地, ポテトデキストロース寒天培地

5. 操作

(1) 成分分析

C8MGの成分分析 (水分, 油脂分, 酸価, ケン化価, ヨウ素価) は衛生試験法注解¹⁰⁾に基づいて分析した。

(2) TLC

シリカゲルプレートFM₂₅₄ (和光純薬工業社製) 20×20cmを用いて、C8MGをヘキサノール：酢酸 (60：40：1) の展開溶媒を用いて展開し、紫外線下でMG, DGを検出した。また α -MG, β -MGの分析はMG部分を削り取りエーテルで抽出して用いた。

LC-MS用のMGはホウ酸含浸TLCプレート¹⁴⁾ (ホウ酸3 gを蒸留水に溶解し、この溶液をシリカゲル60 G, Merck30 gに加えてプレートを作成し、110℃, 2時間活性化する。) で展開溶媒クロロホルム：メタノール (98：2) でC8MGを展開し、 α , β -MG部分を前記方法と同様に操作して用いた。

(3) GC

本実験では型式の異なった機器およびカラムを多数用いたので、カラムの種類、測定条件などは実験結果の表の下に脚注として記載した。

C8MG中のカプリル酸の分析は、C8MG 1 gを20mlの蒸留水に溶解し、3% H₂SO₄で約pH 4程度の酸性にする。(強酸性にするとグリセリンに結合しているC8を遊離させてしまう。) 40ml ジエチルエーテルで脂肪酸を抽出し、エーテル層を得る。このエーテル層に5%炭酸水素ナトリウム10mlを加えて脂肪酸を抽出し、この水層を酸性にしエーテル抽出した。このエーテルをエバポレートし、残渣

Table. 1 Component analysis of C8MG

Sample	Water content (%)	Fats and oils content (%)	Acid value	Saponification value	Iodine value
A	0.62	95.8	0.32	246.9	0

にジクロロメタン1mlを加えて溶解し、カプリル酸のGC定量および脂肪酸組成のキャピラリGC用試験溶液とした。

その他C8MGの純度および α 、 β -MGのGC分析の各種誘導体は常法に従って行った。

(4) LC-MS

C8MG中の α -MG, β -MGの試料の調製は(2)TLCに記載した。また測定条件はFig. 3に記載した。

実験結果および考察

1. C8MGの一般成分分析

表. 1は市販A社のC8MGの成分を分析した結果である。酸価は0.32で、これを脂肪酸量に表わすと約0.1%になる。この結果はGC法にてカプリル酸を分析した表. 2の値とはほぼ一致したことから、C8MG中に微生物に対して抗菌力のある¹²⁾カプリル酸が0.1%程度含まれていることがわかった。また、ケン化価246.9はケン化価の理論値257.03よりも低い値である。このことは、C8MG以外の他の成分が含まれていることを示している。

表. 3はA社のC8MG中に含有されていた脂肪酸をメチルエステル、ブチルエステル誘導体にして、キャピラリGCを行なった結果、カプリル酸(C8)が99.89%、カプリン酸(C-10)が0.1%と高純度の合成基剤が使用されていた。

2. C8MGのカプリル酸量の定量および脂肪酸組成

表. 2は市販3社(A, B, C)のC8MGのカプリル酸量である。各社製造のC8MG中には合成基剤のカプリル酸が約0.1g/100g含まれていた。

3. C8MGの純度(TLCおよびGC)

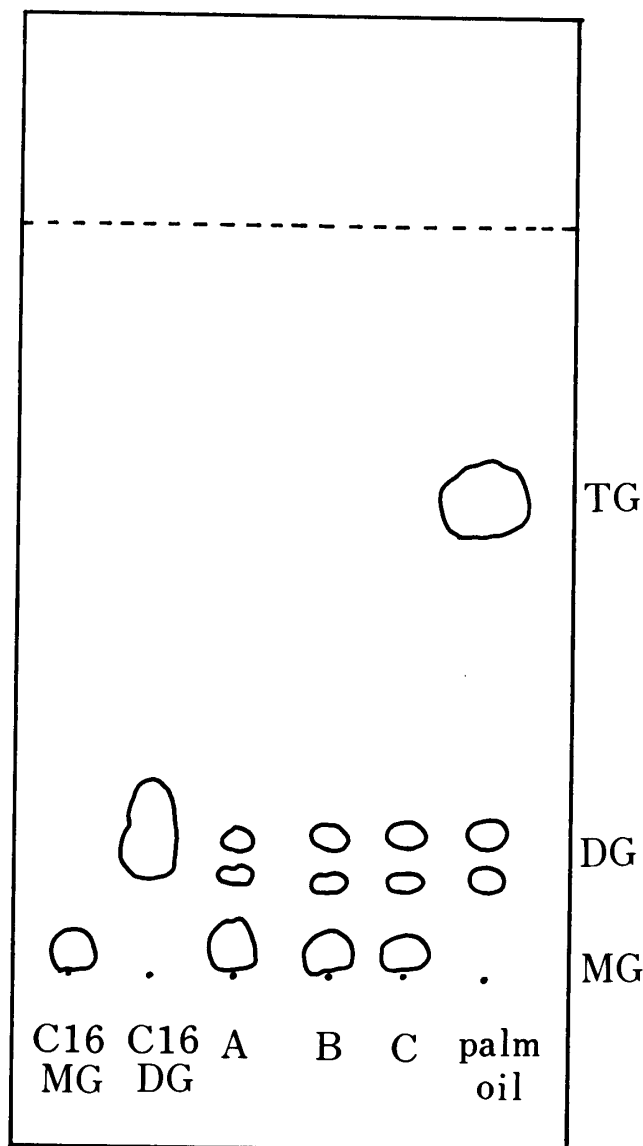


Fig. 1 TLC of C8MG

developing solvent; hexane : ether : acetic acid
(60 : 40 : 1)
silica gel FM₂₅₄ plate

図. 1はC8MGのTLCである。モノグリセリド(MG), ジグリセリド(DG), およびトリグリセリド(TG)の標準品として、パーム油, C16MG, C16DGを展開した。その結果, C8MG中にはモノグリセリドの他に, 2個に分離したジグリセリドが検出された。

Table. 2 Determination of caprylic acid in C8MG

Samples	Caprylic acid (g/100g)
A	0.083
B	0.065
C	0.078

GC condition

Packed column : 20% DEGS+1% H₃PO₄ 2m

Column temp. : 150℃

C8 : Acetylate derivative

Table. 3 Fatty acid component in C8MG

Sample	C8 (%)	C10 (%)
C8MG	99.89	0.10

GC condition

Capillary column : SPB-1 (φ0.25mm×30m)

Column temp. : 100~180℃ (5℃/min)

Methyl esters-butyl esters derivative

表. 4はGC法によりMGとDGを定量した結果である。MGは91~93%, DGは4.0~5.6%であった。各社の製品は分子蒸留により製造されているので, DGがわずかに存在するだけでTGなどは含まない高純度製品であった。

C8MG中に含まれているDGは, J.J.Kabara⁴⁾らの研究では, MGは抗菌性を有するがDGはほとんど抗菌性を持たないと報告している。

4. C8MG中のMG組成

図. 2, 3と表. 5はA社製品のC8MGをTLCで分離して得られたMGを, キャピラリGCおよびLC-MSを行なった結果である。TLC (図. 1) にて単一に分離したMGは, キャピラリGCでは6.50分と7.02分に2ピークとして現われた。

A.Hofmann¹⁾はTLCのシリカはβ-MGをα-MGに異性化すると報告している。そこで高木¹⁴⁾らはホウ酸含浸TLCプレートを用いると, α-MGとβ-MGを分離することができると報告している。β-MGは極めて異性化しやすく酸性, 塩基性, 高温でα-MG90%, β-MG10%の平衡値に向って速やかに異性化する⁶⁾ことが知られている。

そこでA社製のC8MGをホウ酸含浸TLCプ

Table. 4 Purity measurement by GC

Samples	MG (%)	DG (%)
A	90.89	5.57
B	90.86	4.96
C	93.19	4.15

GC condition

Packed column : 1.6% OV-1

Column temp. : 90℃~340℃ (10℃/min)

C8MG : Trimethylsilyl derivative

Table. 5 MG component in C8MG

Sample	α-MG (%)	β-MG (%)
MG	93.7	6.9

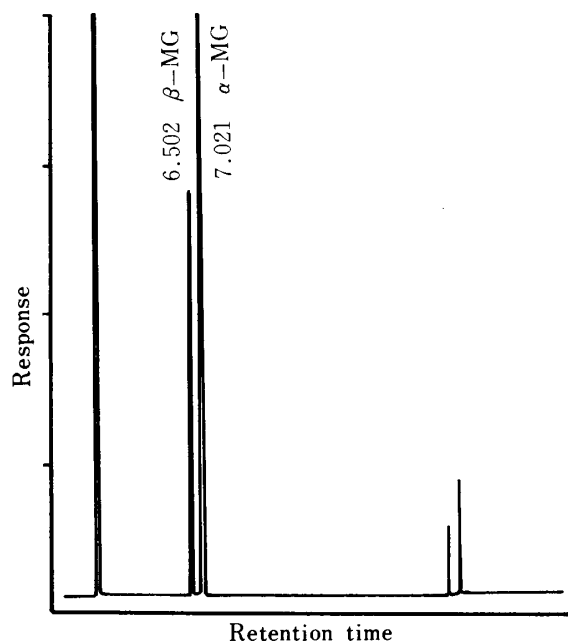


Fig. 2 MG component analysis by GC

capillary column : SPB-1 (φ0.25mm×30m)

column temp. : 180℃~260℃ (25℃/min)

injection temp. : 280℃

C8MG : Trimethylsilyl derivative

レートを用いて分離し, αおよびβ-MGの混合物を図. 3に示すようにLC-MSを行なった結果, [M+H]⁺219は分子量218と一致した。LC-MSのスペクトル中の親イオン以外のフラグメントイオンに, MGの分子量に近接しているイオンもないので, 図. 2の6.50

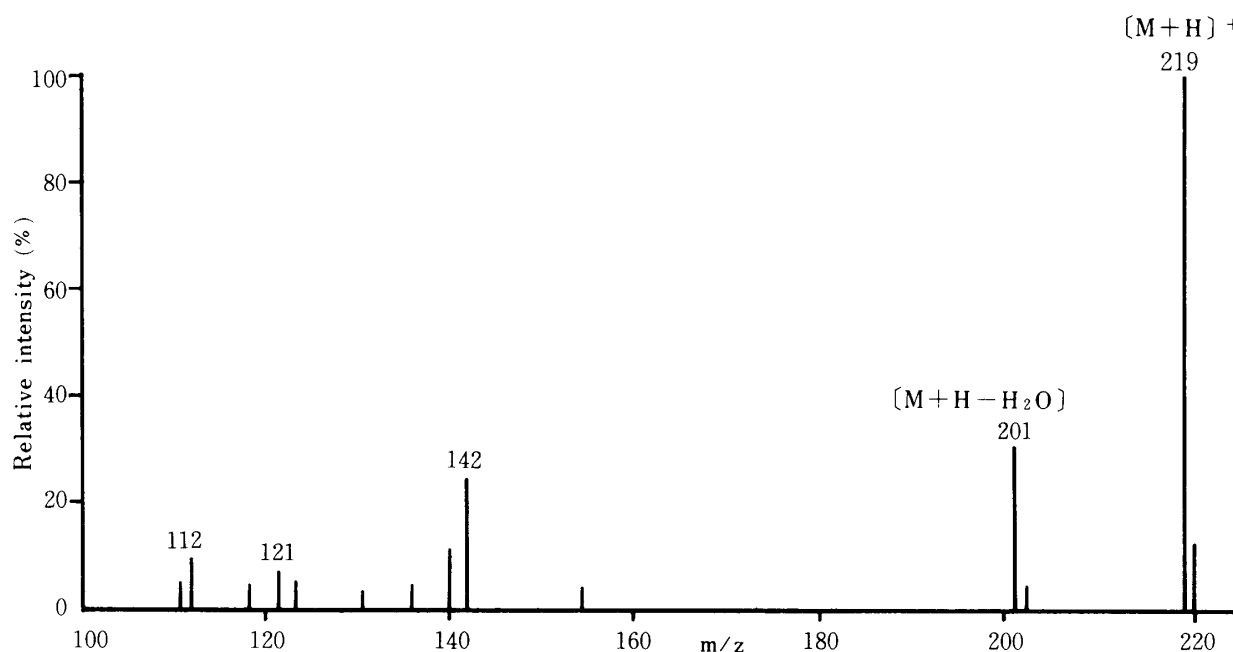


Fig. 3 Liquid chromatography mass spectrum of C8MG

ionization system; thermospray, electron energy; 6.0kv
source temp. ; 230°C, probe temp. ; 280°C
LC-column ; ODS-2, 4.6mm i.d. × 15cm
mobile phase ; CH₃CN : H₂O (1 : 1)

分はβ-MG, 7.02分はα-MGと確認した。今後の課題としてGC-MSを行ない確認したい。

表. 5はキャピラリGCにてC8MG中のMGを定量した結果である。α-MG93.7%, β-MG6.7%であった。

ホウ酸含浸TLC, GCおよびLC-MSでC8MG中のMGには, α-MG以外にβ-MGが存在していた。

5. *B. subtilis*および*S. cerevisiae*に対する抗菌効果

表. 6は表. 2の結果からC8MG中に合成基剤としてカプリル酸が約0.1%含有されて

いたので, その抗菌作用について実験を行った結果である。*B. subtilis*, *S. cerevisiae*に対してC8が0.1%程度の濃度ではほとんど抗菌効果は無かった。しかし, C8とTween 20の組み合わせでは, 弱い抗菌効果を示した。一般的に低級脂肪酸は微生物に抗菌効果が有る³⁾ことが知られており, 芝崎ら¹²⁾や, 加藤ら⁵⁾はグラム陽性細菌, かび, 酵母に対して脂肪酸のC8~C12は抗菌性があると報告している。著者らの抗菌力試験に用いたC8の濃度が0.1%と低いので抗菌効果を示さなかったと考える。C8とTween 20で弱い抗菌効果を示したのはTween 20の影響が考えられる。芝崎ら¹²⁾は

Table. 6 Antibacterial effect of C8MG on *B. subtilis* and *S. cerevisiae*

Samples	Concentration (%)	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Caprylic acid	0.1	+++	+++
Tween 20	0.1	+++	+++
Caprylic acid + Tween 20	0.1+0.1	++	++
Purity 60% C8MG	0.1	++	+++
Purity 85% C8MG	0.1	+	++
Purity 95% C8MG	0.1	±	+

—; no growth ±; slight growth +; definite growth
++; growth more than 1/4 +++; growth more than 1/2

菌の表面に界面活性剤がまず吸着して、細胞壁の正常な作用を妨害し、さらに細胞内に浸透して酵素の不活性化や核酸、タンパク質の合成を阻害する³⁾と報告している。また、江口²⁾はしょう油の産膜酵母にエタノール単独とC8MG+エタノールの抗菌力を比較すると、前者の5%と後者の0.05%が同等の抗菌力を持っていると報告している。

C8MGの純度60%, 85%, 95%の各製品について、微生物に対する抗菌力試験を行なった。その結果、純度が60%より85%, 85%よりも95%の方が抗菌力は高かった。C8MGの純度60%製品は食品用ではなく化粧品などの用途に使用されている。一般に食品用として市販されているC8MG製品の純度は、表. 4に示したように85%以上の純度を持つ製品で、これまでに著者らが分析してきたように、合成基剤のカプリル酸約0.1%, 合成時の不純物質としてジグリセリド4.0~5.6%, β -モノグリセリド6.9%である。このなかで微生物に対して抗菌性を持つ物質はカプリル酸であるが、表. 6の結果から、あまり抗菌効果は期待できない。ジグリセリドはJ.Kabara⁴⁾の研究から抗菌効果が無いことが知られている。 β -モノグリセリドはC8MGの高純度製品を合成する場合、最終段階で分子蒸留を繰り返し行なう。この過程で β -モノグリセリドの生成率が高純度製品ほど高くなることが予想できる。油脂中の β -モノグリセリドは微量で、その研究は高木ら¹⁴⁾による定量法の検討などで、微生物に対しての抗菌性などはほとんど研究されていないので、今後これらについて検討して行きたい。

要 約

食品添加物の乳化剤として許可されているグリセリン脂肪酸エステルのカプリル酸モノグリセリド(C8MG)について、その純度および組成について分析を行なった。また、これらの分析結果をもとにC8MGの微生物(*B.s-ubtilis*, *S.cerevisiae*)に対する抗菌効果についても検討した。

その結果は、

1) C8MGの合成基剤であるカプリル酸(C8)量をガスクロマトグラフィー(GC)で分析したところ、C8はC8MGに対して約0.1%含まれていた。

2) その脂肪酸組成はC8(99.9%), C10(0.1%)と高純度製品が用いられていた。

3) 3社のC8MGの純度をGC法で分析したところモノグリセリド(91~93%), ジグリセリド(4.0~5.6%)であった。

4) モノグリセリドの組成は α -モノグリセリド(93.7%), β -モノグリセリド(6.9%)であった。

5) 微生物を用いた抗菌力試験ではC8MG中に含まれる0.1%程度のカプリル酸量では抗菌効果を示さなかった。

6) 高純度のC8MGは微生物に対する抗菌力が高かった。

本研究の液体クロマトグラフマスペクトルは国立衛生試験所 叶多謙蔵博士に分析していただきました。ここに御礼申し上げます。またグリセリン脂肪酸エステルに関して終始ご指導下さいました日本油脂株式会社 島村馬次郎博士に深く感謝の意を表します。

本研究の一部は日本食品衛生学会第60回學術講演会に発表した。

文 献

- 1) A.F.HOFMANN: J.Liquid Res., 3, 391 (1962).
- 2) 江口卯三夫他: 調味科学., 19, 11, 43 (1972).
- 3) 日高徹: 油脂., 39, 1(1986).
- 4) J.J.KABARA: Antimicrob. Ag. Chromother., 2, 23(1972).
- 5) 加藤信行, 芝崎勲: 醸酵工学会誌., 53, 11, 793(1975).
- 6) 鹿山光編: 総合脂質科学., 50.
- 7) 古賀友英, 渡辺忠雄: 日本食品工業学会誌., 15, 7, 297(1968).
- 8) 古賀友英, 渡辺忠雄: 日本食品工業学会誌., 15, 7, 310(1968).

- 9) 鍋谷修, 加藤芳男, 浅田拓司, 澤田玄道:
日本食品工業学会誌., 35, 5, 293(1988).
- 10) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解., 328-
(1990).
- 11) R.W.LAMAR: J.Exptl. Med., 14, 256
(1911).
- 12) 芝崎勲: 醸酵工学会誌., 57, 3, 164(1979).
- 13) 諏訪信行, 代田徳子, 町田肇: 日本食品
工業学会誌., 35, 10, 706(1988).
- 14) 高木徹, 板橋豊: 油化学., 35, 9, 74
(1986).
- 15) 戸田義郎: フードケミカル., 4, 69(1988).
-