

海苔の脂溶性成分について

III. ホスホリピドの同定

坂本 登・榎本 則行

(食糧管理化学教室)

昭和50年9月16日 受理

Studies on Fat-Soluble Substances of Laver (Susabinori, *Porphyra yezoensis*)

III. Identification of phospholipids

Noboru SAKAMOTO and Noriyuki ENOMOTO

(Laboratory of Food Hygienic Chemistry)

Received September 16, 1975

Summary

Three kinds of phospholipids were isolated from Susabinori, *Porphyra yezoensis* and identified as phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol.

The major fatty acids of the phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine were $C_{18:3}$, $C_{20:3}$ and $C_{22:6}$ and those of the phosphatidylglycerol were $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:2}$, $C_{20:3}$ and $C_{22:6}$.

In both phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, the fatty acids associated with the β -carbon contained, in terms of percentage composition, more than 95% of unsaturated fatty acids, while the fatty acids associated with the α -carbon contained only 30% of saturated fatty acids.

著者らは海苔の脂溶性成分についての研究を行ない、これまでにパラフィン¹⁾、スルホリピド²⁾およびグリセログリコリピド³⁾について報告した。今回は乾海苔のホスホリピドについて調べた結果について報告する。

実験方法

1) 試料

有明海産の乾海苔 (スサビノリ *Porphyra yezoensis*) を用いた。

2) ホスホリピドの抽出

乾海苔に5倍容のクロロホルム：メタノール (2:1) を加え、30°C、3時間振盪させて脂溶性成分を抽出し、ろ過後の残渣について同様の抽出を2回行なった。抽出液をあわせ、Folch の分配法⁴⁾により非脂質成分を除き、得られたクロロホルム層の溶媒を留去した。これに3倍容のアセトンを加え十分にかき混ぜたのち一夜冷蔵庫に放置し、生じた沈澱を遠心分離して集め15倍容のアセトンで洗浄した。つぎにアセトンを留去し、15倍容のクロロホルム：メタノール (2:1) にとかして一夜室温に放置した。このときわずかに残存する不溶物をろ過して除去した後、ろ液を減圧濃縮乾固し、クロロホルムにとかして試験溶液とした。

3) ホスホリピドの分画⁵⁾

上記試験溶液を DEAE セルロースカラム (4.5×50cm) に注入し、最初にクロロホルムを流した。つぎにクロロホルム：メタノール (98：2) を流すとホスファチジルコリン (PC) 画分が溶出され、クロロホルム：メタノール (90：10) を流すとホスファチジルエタノールアミン (PE) 画分が溶出された。またホスファチジルグリセロール (PG) 画分は、クロロホルム：メタノール：アンモニア水：酢酸アンモニウム (800：200：20：0.05M) で溶出された。各画分の溶出液をそれぞれ減圧濃縮して以後の実験に供した。

4) 薄層クロマトグラフィー (TLC)

常法によりシリカゲル G を用いてプレートを調製し、一次元展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水 (65：25：4)、二次元展開溶媒は、クロロホルム：アセトン：メタノール：酢酸：水 (10：4：2：2：1) を用いた。発色剤は Dittmer 試薬⁶⁾、ニンヒドリン試薬⁷⁾ およびヨウ素蒸気をそれぞれの目的に応じて使いわけた。

調製用 TLC は、一次元展開溶媒を用いて行なった。

5) ホスホリピドの酵素分解⁸⁾

PC および PE 画分をエーテルに溶解し、ホスホリパーゼ A を加えて室温で2時間インキュベートした後、沸騰水浴中で5分間加熱して反応を中止させ、ただちに水冷した。反応液を40°C以下で減圧濃縮した後、これを調製用 TLC に供した。展開後のプレートから遊離脂肪酸とリゾホスホリピドに相当する部分をかきとり、クロロホルム：メタノール (1：1) で溶出して、各反応生成物を得た。

6) 構成脂肪酸のメチル化⁹⁾

PC, PE および PG 画分の乾固物にメタノール性5%塩酸を加え、封管で100°C、4時間メタノリシスを行なった。冷後反応液に2倍容のメタノールを加えて容積を増やし、メタノールと同量のn-ヘキサンで脂肪酸メチルエステルを抽出し、減圧濃縮してガスクロマトグラフィーの試料とした。

なお PC および PE 画分の α 位および β 位の構成脂肪酸組成は、酵素分解で生じたりゾホスホリピドの脂肪酸 (α 位) と遊離脂肪酸 (β 位) とを分析することによって求められた。

7) ガスクロマトグラフィー (GLC)

日本電子製750型ガスクロマトグラフ (水素炎イオン化検出器付) を使用した。ステンレスカラムは3mm×200cm、10%ジエチレングリコールサクシネートポリエステルを用い、カラム温度180°C、キャリアーガス (窒素) は1.4kg/cm² の条件で行なった。

8) 可視吸収スペクトル

装置はベックマン分光光度計 DB-GT 型を使用した。

9) 赤外 (IR) 吸収スペクトル

装置は島津 IR-27 型赤外分光光度計を使用し、ペースト法によって測定した。

10) 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル

日本電子 MH-100 型核磁気共鳴装置を使用し、四塩化炭素に溶解して測定した。標準物質としては、テトラメチルシランを用いた。

実験結果および考察

1) ホスホリピドの単離

カラムクロマトグラフィーによって分離されたホスホリピドの PC, PE および PG 画分につい

て、一次元 TLC を行なった。結果を Fig. 1 に示した。

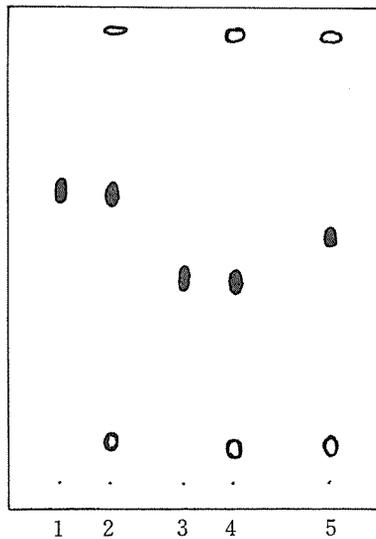


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of phospholipids obtained from laver.
 1: authentic PE 2: PE fraction of laver 3: authentic PC
 4: PC fraction of laver 5: PG fraction of laver
 Solvent: chloroform-methanol-water (65:25:4)
 Detection reagent: Dittmer reagent
 Plate: silica gel G
 black spots: blue color was developed
 white spots: no blue color was developed

各画分には、それぞれ Rf 値が異なって、Dittmer 試薬で青色に発色する成分と、青色に発色しない成分とが含まれていた。前者の成分を単離するため、それぞれの画ごとに調製用 TLC を行なって相当する Rf 値の部分をかきとり、クロロホルム：メタノール (1:1) で溶出して、各画分の精製物を得た。これら精製物は、二次元 TLC で1つのスポットのみを示した。

なお、実験方法2)で得られた試験溶液について二次元 TLC を行なった結果では、Dittmer 試薬で青色に発色する明瞭な3つのスポットの他に2~3コの不明瞭な青色スポットが検出されたが、後者についての検討は行なわなかった。

2) ホスホリピドの TLC

PC, PE および PG の TLC を行ないプレート上のスポットについてのリン酸基およびアミノ基の定性を行なった。

PC および PE は、ニンヒドリン試薬と Dittmer 試薬でそれぞれ発色し、PG はニンヒドリン反応が陰性で、Dittmer 試薬によってのみ発色した。

また、PC および PE のスポットの位置は、それぞれの標品のそれとよく一致した。なお PG のスポットは文献値の Rf 値⁹⁾ とほぼ一致した。

3) PG の過ヨウ素酸酸化-クロモトローブ酸反応¹⁰⁾

PG の乾固物をクロロホルムに溶かし、2%過ヨウ素酸エタノール溶液を加えて密栓し、室温に一夜放置した。10%の亜硫酸水素ナトリウムを加えて反応をとめ、これにクロモトローブ酸試

葉¹⁰を加えて 100°C で30分間加熱した。冷後、1/2 飽和チオ尿素を加えて発色させ反応生成物の吸収スペクトルを測定した。

570nm の吸収を示すことからこのものは PG の特性を有していることがわかった。

4) IR 吸収スペクトル

PC, PE および PG の IR 吸収スペクトルを Fig. 2 に示した。

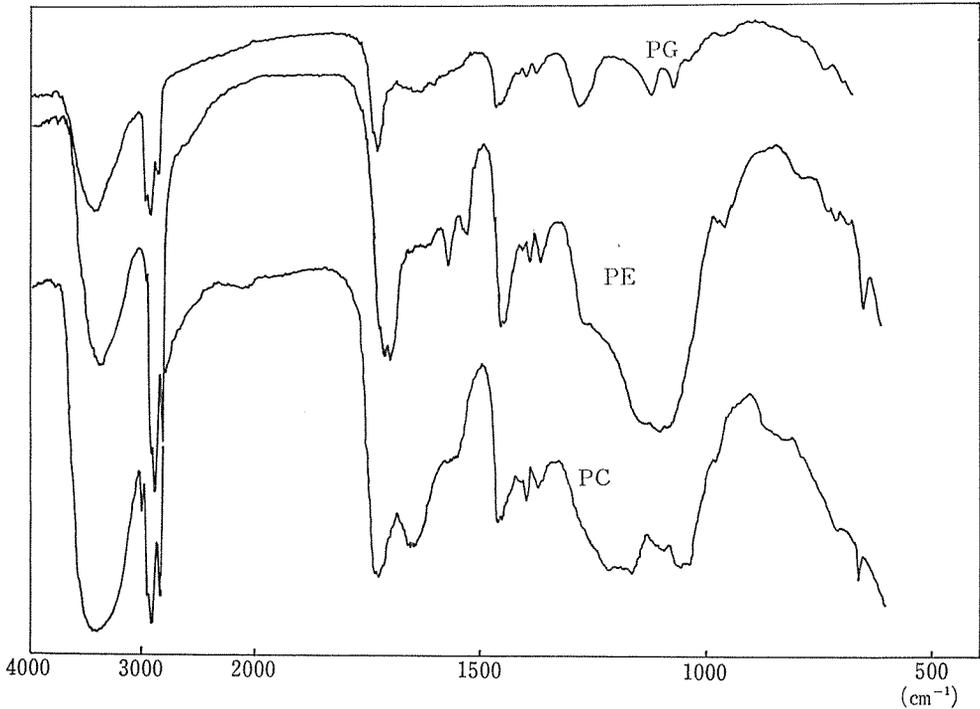


Fig. 2. Infrared spectra of purified PC, PE and PG of laver.

PC のスペクトルでは、P-O 結合のジエステルによる吸収が $1220\text{cm}^{-1}[\nu_{as}(\text{PO}_2)]$ および $1100\text{cm}^{-1}[\nu_s(\text{PO}_2)]$ に認められ、P-O-C 結合による吸収が $1070\text{cm}^{-1}[\nu(\text{P-O-C})]$ および $980\text{cm}^{-1}[\nu(\text{P-O-C})]$ に認められた。なお第四級アンモニウム塩基は IR 吸収を示さないことからその影響はこのスペクトル上には認められなかった。

PE のスペクトルでは P-O 結合のジエステルによる吸収が $1220\text{cm}^{-1}[\nu_{as}(\text{PO}_2)]$ および $1100\text{cm}^{-1}[\nu_s(\text{PO}_2)]$ に認められ、P-O-C 結合による吸収も $1070\text{cm}^{-1}[\nu(\text{P-O-C})]$ および $980\text{cm}^{-1}[\nu(\text{P-O-C})]$ に認められた。また第一級アミンによる吸収が $1575\text{cm}^{-1}[\nu_{as}(\text{NH}_3)]$ および $1530\text{cm}^{-1}[\nu_s(\text{NH}_3)]$ に認められた。

PG のスペクトルでは P-O 結合のジエステルによる吸収が $1280\text{cm}^{-1}[\nu_{as}(\text{PO}_2)]$ および $1100\text{cm}^{-1}[\nu_s(\text{PO}_2)]$ に、P-O-C 結合による吸収が $1080\text{cm}^{-1}[\nu(\text{P-O-C})]$ にそれぞれ認められた。

これらの特性は伊藤ら⁹⁾ がアルファルファから精製したホスホリピドについて報告しているものとよく一致した。

5) NMR スペクトル

PC, PE および PG の NMR スペクトルを Fig. 3, 4, 5 に示した。

各スペクトルのシグナル値とその名称を Table 1 に示した。

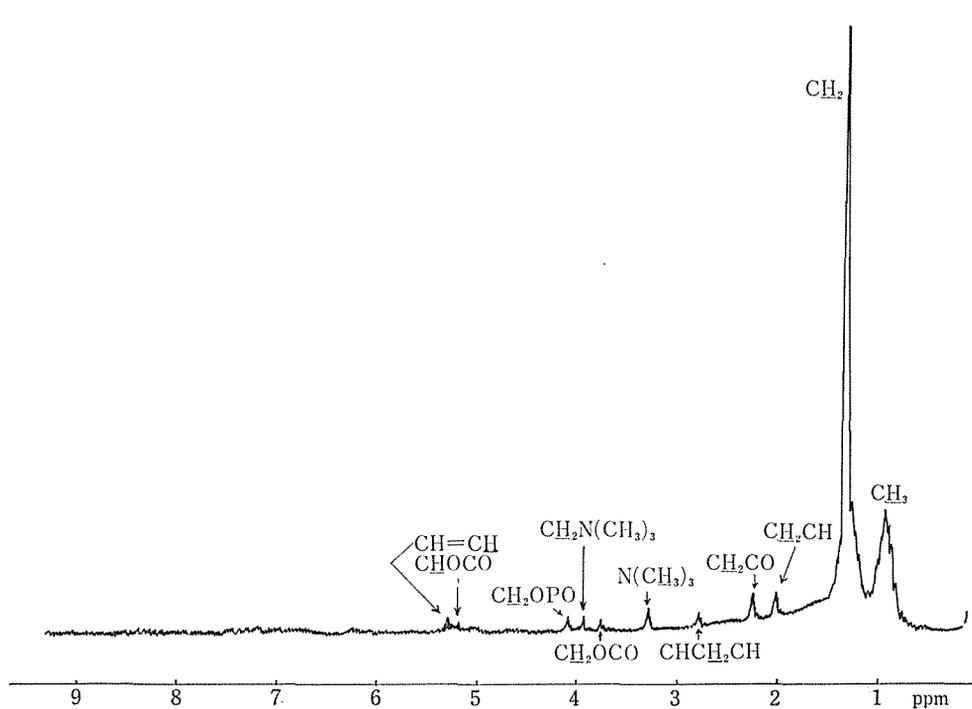


Fig. 3. NMR spectrum of purified PC of laver.

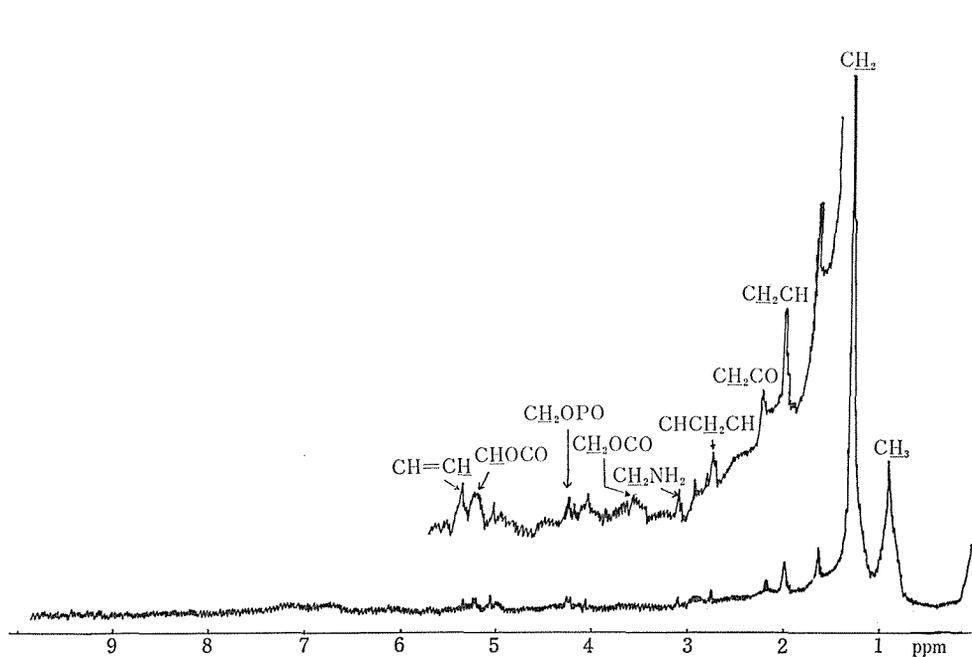


Fig. 4. NMR spectra of purified PE of laver.

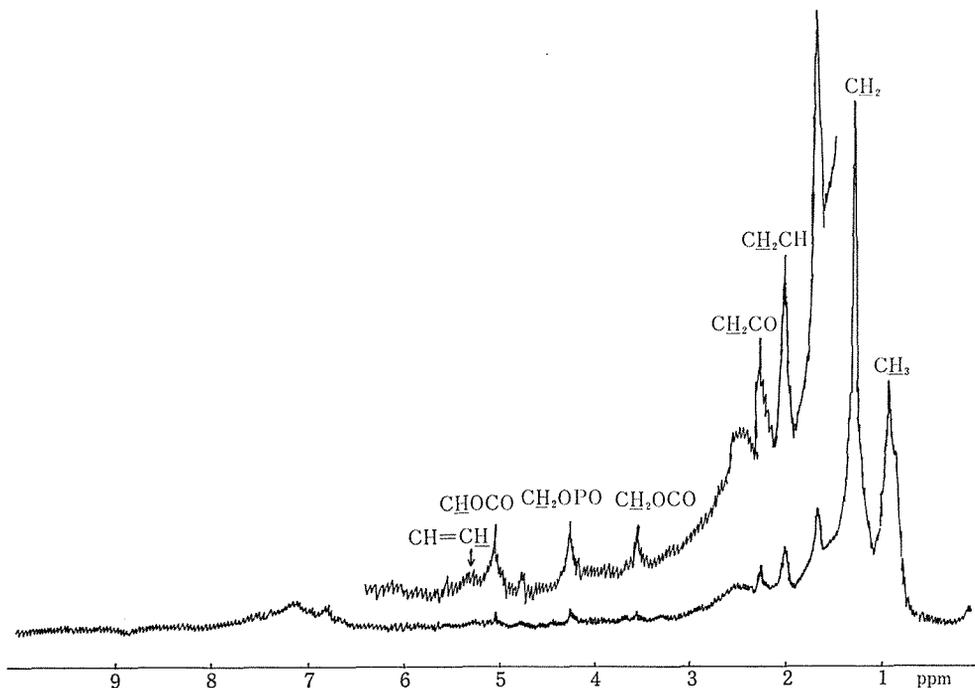


Fig. 5. NMR spectra of purified PG of laver.

Table 1. Assignment of NMR signals to proton of PC, PE and PG. (δ ppm).

Proton	PE	PC	PG
CH ₃	0.89	0.88	0.88
CH ₂	1.24	1.24	1.24
CH ₂ CH	1.96	1.96	1.96
CH ₂ CO	2.20	2.20	2.24
=CH-CH ₂ -CH=	2.74	2.74	—
CH=CH	5.34	5.34	5.24
CH ₂ NH ₂	3.54	—	—
CH ₂ N(CH ₃) ₃	—	3.92	—
N(CH ₃) ₃	—	3.38	—
CH ₂ OCO	4.00	3.72	3.52
CH ₂ OPO	4.20	4.36	4.15
CHOCO	5.20	5.20	4.98

各 NMR スペクトルのパターンは伊藤ら⁹⁾のそれとほぼ一致した。

6) ホスホリパーゼ A による酵素分解

PC および PE のホスホリパーゼ A による酵素分解生成物の TLC を Fig. 6 に示した。

この酵素分解で PE は遊離脂肪酸とリゾホスファチジルエタノールアミンを生じ、PC は遊離

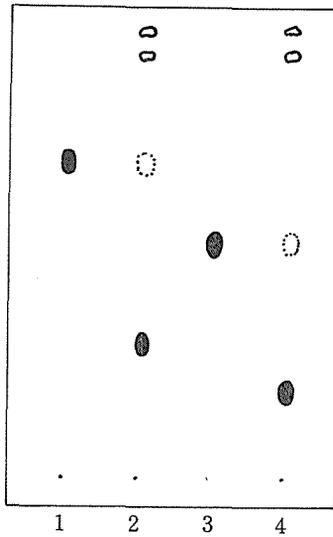


Fig. 6. Thin-layer chromatogram of hydrolysates of PC and PE with phospholipase A.

1: PE of laver 2: hydrolysate of PE of laver

3: PC of laver 4: hydrolysate of PC of laver

Solvent: chloroform-methanol-water (65: 25: 4)

Detection reagent: iodine vapor

Plate: silica gel G

Table 2. Fatty acid composition of three kinds of phospholipids of laver. (%)

F.A.	PC	PE	PG
C _{16:0}	4.6	6.5	12.2
C _{16:1}	3.2	2.9	4.6
C _{18:0}	9.7	9.6	21.2
C _{18:2}	9.8	9.2	21.4
C _{18:3}	11.3	13.3	7.4
C _{20:1}	9.5	7.9	5.2
C _{20:3}	15.8	15.0	11.2
C _{20:4}	7.0	4.7	1.1
C _{22:4}	3.7	2.2	—
C _{22:6}	20.7	22.3	10.8

Table 3. Distribution of fatty acids at α - and β -carbon of glycerol in PC and PE.

F.A.	PC (%)		PE (%)	
	α	β	α	β
C _{16:0}	9.8	0.4	10.6	3.4
C _{16:1}	7.1	—	6.3	trace
C _{18:0}	21.5	—	20.0	1.2
C _{18:2}	20.6	1.1	19.1	1.3
C _{18:3}	16.1	8.1	19.1	9.2
C _{20:1}	7.2	12.4	5.1	11.1
C _{20:3}	8.7	23.8	9.7	21.2
C _{20:4}	3.2	11.1	trace	9.3
C _{22:4}	—	7.4	—	4.3
C _{22:6}	6.4	35.6	7.6	37.8
Satu. F.A.	31.3	0.4	30.6	4.6
Unsat. F.A.	68.7	99.6	69.4	95.4

脂肪酸トリゾホスファチジルコリンを生じた。リゾホスホリピドの同定は文献値⁹⁾を用いた。

以上の結果を総合して、PCは phosphatidylcholine, PEは phosphatidylethanolamine, PGは phosphatidylglycerol と同定された。

7) ホスホリピドの構成脂肪酸

PC, PE および PG の脂肪酸組成は GLC によって測定された。結果を Table 2 に示した。

3種のホスホリピドの脂肪酸組成において、PC および PE はほぼ類似した組成比を示し、 $C_{18:3}$, $C_{20:3}$ および $C_{22:6}$ が多かった。これに対して PG は PC および PE とやや異なった組成比を示し $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:2}$, $C_{20:3}$ および $C_{22:6}$ が多かった。

また PC と PE の α 位と β 位の脂肪酸組成を Table 3 に示した。

α 位炭素の脂肪酸組成は、飽和脂肪酸が約30%を占めていた。これに対して β 位炭素のそれは不飽和脂肪酸が95%以上をしめていた。

摘 要

スサビノリから3種のホスホリピドが分離され、それらはホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルグリセロールと同定された。

ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンの主要な構成脂肪酸は、 $C_{18:3}$, $C_{20:3}$ および $C_{22:6}$ であり、一方ホスファチジルグリセロールのそれは、 $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:2}$, $C_{20:3}$ および $C_{22:6}$ であった。

ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンにおいて、 β 位炭素の脂肪酸組成は不飽和脂肪酸が95%以上を占めていた。一方、 α 位炭素のそれは、飽和脂肪酸がわずかに30%にすぎなかった。

文 献

- 1) 榎本則行, 坂本 登: 食品衛生学雑誌, **16**, 406 (1975).
- 2) 坂本 登, 榎本則行: 佐大農彙, No. 39, 75 (1975).
- 3) 坂本 登, 榎本則行: 佐大農彙, No. 40, 11 (1976).
- 4) 野田万次郎: 別冊蛋白質・核酸・酵素, p. 86 (1967) 共立出版.
- 5) 野田万次郎: 同 上 p. 97 (1967) 共立出版.
- 6) 渋谷 勲, 赤松 稔, 土井 脩, 鬼頭 誠: 化学と生物, **10**, 677 (1972).
- 7) 野田万次郎: 別冊蛋白質・核酸・酵素, p. 24 (1967) 共立出版.
- 8) 土井 脩, 野島庄七: 化学と生物, **11**, 178 (1973).
- 9) 伊藤精亮, 藤野安彦: 農化, **48**, 319 (1974).
- 10) 舟橋三郎, 原 一郎, 山川民夫: 脂質 1, p. 182 (1970) 共立出版.