

## 海苔の脂溶性成分について

### I. スルホリピドの同定

坂本 登・榎本 則行

(食糧管理化学教室)

昭和50年5月31日 受理

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

### I. Identification of sulfolipid

Noboru SAKAMOTO and Noriyuki ENOMOTO

(Laboratory of Food Hygienic Chemistry)

Received May 31, 1975

#### Summary

A sulfolipid fraction was isolated from chloroform-methanol extract of *Susabinori*, *Porphyra yezoensis* by Florisil, DEAE-cellulose and silica gel column chromatography, and by preparative thin-layer chromatography.

The sulfolipid was identified as 6-sulfo- $\alpha$ -quinovopyranosyl-2', 3'-di-O-acyl-glycerol from the results of molecular weight determination, degradation with periodic acid and infrared absorption analysis.

Main fatty acids of the sulfolipid were  $C_{14:0}$ ,  $C_{16:0}$ ,  $C_{20:3}$  and  $C_{22:6}$ , among which the last was found to be remarkably abundant.

海苔の脂質に関する研究は、系統的に行なわれたものはほとんどなく、品質管理上の観点からの研究をふくめてわずかに散見される程度である<sup>1,2)</sup>。われわれは海苔の脂溶性成分を明らかにしたいと考え、まずスルホリピドをとりあげた。Sato<sup>3)</sup>は、アサクサノリ *Porphyra tenera* にスルホリピドが約10%含まれていると報告しているが、その詳細についてはふれていない。本報は、有明海産スサビノリのスルホリピドの単離および同定の結果について記載したものである。

#### 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) 脂溶性成分の抽出

乾海苔を細切し、これにクロロホルム：メタノール (1:1) の混合溶媒を約4倍容加え、40°Cで24時間ときどき振盪させて脂溶性成分を抽出した。同様な操作を3回繰り返し、得られた抽出液を合わせて溶媒を減圧溜去したのち、クロロホルム：メタノール (9:1) にとかして試験溶液とした。抽出された脂溶性成分の収量は、乾海苔 1kg に対して約 6.7g であった。

##### 3) スルホリピドの分画

試験溶液 (約 4g の脂溶性物質を含む) をフロリジルカラム (4.5×50 cm) に注入し、クロロホ

ルム：メタノール (9:1) を約 1l 流すと、ほとんどの色素や中性脂質が溶出された。つぎにクロロホルム：メタノール (2:1) を約 2l 流すと、カラムに残っていた複合脂質が溶出された。この溶出画分を減圧濃縮し、少量のクロロホルム：メタノール (2:1) 混合溶媒にとおして DEAE セルロースカラム (4.5×50cm) に注入し、クロロホルム：メタノール (2:1) を約 2l 流すと中性糖脂質が溶出されて、それ以外の複合脂質と分離された。さらにこの DEAEセルロースカラムを 1l の水酢酸, 1l のメタノールで順次洗ったのち、クロロホルム：メタノール：アンモニア水 (4:1:0.2) 2l を流すと、スルホリピド画分が溶出された。さらに精製するために、このスルホリピド画分を流水に対して透析 (セルロースチューブ, Visking Company 製を使用) したのち減圧濃縮し、少量の溶媒クロロホルム：メタノール：水 (65:25:3) にとおしてシリカゲルカラム (2.5×30cm) に注入し、クロロホルム：メタノール：水 (65:25:3) 500ml を流した。この溶出液を、減圧濃縮して以後の実験に供した。

#### 4) 脱アシル化物の調製

試料に 0.1N メタノール性カセイカリを加えて、100°C で10分間処理した。これを酸性 (pH 2.0) にしたのち遊離した脂肪酸を n-ヘキサンで抽出した。残りのメタノール層を、Dewex 1 および Dowex 50 で脱イオンし、スルホリピドの脱アシル化物を調製した。

#### 5) 脂肪酸のメチル化

n-ヘキサンで抽出した遊離脂肪酸に12%三フッ化ホウ素メタノール溶液を加え、75°C で3分間加熱してメチル化し、生成した脂肪酸メチルエステルを n-ヘキサンで抽出してガスクロマトグラフィーの試料とした。

#### 6) 過ヨウ素酸分解<sup>3)</sup>

脱アシル化物を2つにわけ、1つは 0.025N 過ヨウ素酸液 0.5ml を加え 5°C、75時間酸化した。つぎに 2%酸性亜硫酸ソーダ溶液 1ml で還元し、さらに 1N 塩酸で 100°C、10分間加水分解を行なった。他の1つは 1N 塩酸で 100°C、10分間加水分解したのち、上記と同様に過ヨウ素酸液によって酸化分解し、亜硫酸ソーダ溶液で還元した。これら2つの処理によって得られたそれぞれの生成物は、Dowex 1 および Dowex 50 によって脱イオンして精製した。

#### 7) 薄層クロマトグラフィー (TLC)<sup>2)</sup>

常法によりシリカゲルGを用いて薄層を調製し、クロロホルム：メタノール：水 (65:25:3)、クロロホルム：メタノール：酢酸：水 (170:25:25:6)、ジイソブチルケトン：酢酸：水 (80:50:10) の3種の溶媒を用いて展開した。発色剤としては 2% 4,5ジクロロフルオレセインアルコール溶液を噴霧し、紫外線照射下で識別した。

調製用 TLC はクロロホルム：メタノール：水 (65:25:3) で展開した。

#### 8) 分子量の測定 (ゲルろ過法)<sup>4)</sup>

Sephadex G-25 カラム (1.5×20cm) を用いた。溶出は水を 1ml/min の割合で流して展開し、5ml ずつ分取した。

#### 9) ペーパークロマトグラフィー (PC)<sup>3)</sup>

東洋ろ紙 No. 51 を使用し、上昇法により室温で展開した。展開溶媒は、n-ブタノール：ピリジン：水 (6:4:3) を使用した。

#### 10) 赤外線 (IR) 吸収スペクトル<sup>3,5)</sup>

臭化カリウム錠剤法により、島津製 IR-27 型および日立製 G-24 型赤外分光光度計を用いて測定した。

#### 11) ガスクロマトグラフィー (GLC)

装置は日本電子製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。カラムは

内径 3mm, 長さ 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, キャリヤース (窒素) 1.4kg/cm<sup>2</sup> の条件で行なった.

### 結果および考察

#### 1) スルホリピドの単離

カラムクロマトグラフィーで分離されたスルホリピド画分の, TLC の結果を Fig. 1 に示した.

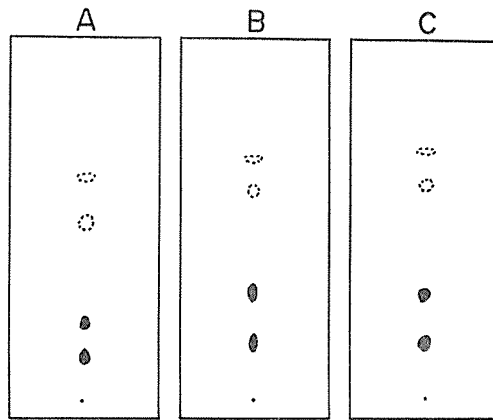


Fig. 1. Thin-layer chromatograms of sulfolipid fraction.

A: chloroform-methanol-water (65: 25: 3)

Solvent B: chloroform-methanol-acetic acid-water (170: 25: 25: 6)

C: diisobutylketone-acetic acid-water (80: 50: 10)

Detection reagent: 4, 5-dichlorofluorescein

Plate: silica gel G

3種の展開溶媒によるクロマトグラムにより, 本画分は2つの主成分を含むことが明らかになったので, これらを分離するため, 調製用 TLC を行なった. Rf 値 0.45 および 0.30 付近のものをかきとり, クロロホルム:メタノール (1:1) 混合溶媒を用いて別した. 前者を SQ-1, 後者を SQ-2 と仮称することにする.

#### 2) スルホリピドの同定

SQ-1 と SQ-2 とがスルホリピドであるかどうかを確かめるために, アンスロン法<sup>6)</sup> によって発色させてその反応生成物の吸収曲線を求めた. 結果を Fig. 2 に示した.

両者に共通の 500nm の吸収はグリセリンによるものである. スルホキノボースは 592 nm に特有のピークを示すので SQ-2 はスルホキノボースを含むスルホリピドである. これに対し SQ-1 は, 中性糖の吸収である 625 nm にピークを示しスルホリピドではないことが明らかになったので, 以後の実験の対象から除外した.

SQ-2 がリン酸基やアミノ基を有しているかどうかを確かめるため, TLC 上で発色剤による定性反応を行なった. Zinzadze 試薬反応<sup>7)</sup> とニンヒドリン反応<sup>8)</sup> とがともに陰性であったので, リン酸基とアミノ基はともに存在しないことが確認された. したがって SQ-2 はリン酸基およびアミノ基を有しないスルホリピドである.

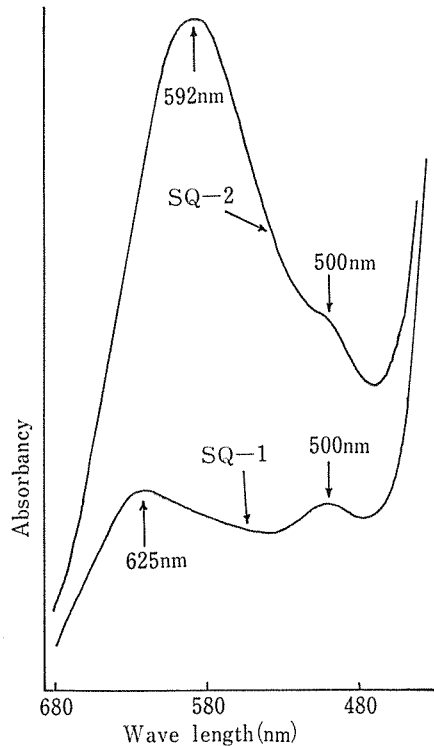


Fig. 2. Absorption spectra of reaction products of SQ-1 and SQ-2 with anthrone reagent.

SQ-1 is a compound corresponding to upper black spot and SQ-2 corresponds to lower black spot in Fig. 1.

Both SQ-1 and SQ-2 were collected by preparative thin layer chromatography.

### 3) 分子量の定量

脱アシル化 SQ-2 の分子量の定量は、Sephadex G-25 によるゲルろ過法によった。標準糖としては、グルコース、サッカロースおよびラフィノースを用いた。糖の定量はアンスロン法によった。

横軸に分子量の対数値、縦軸に溶出量をとってプロットした結果を Fig. 3 に示した。

この結果より脱アシル化 SQ-2 の分子量は306となり、これまでに得られた結果と総合して Fig. 4 のような構造式が推定された。

### 4) スルホン酸基の結合位置の決定

アンスロン反応で 592nm に吸収が見られたので、スルホン酸基は C<sub>6</sub> 位に結合していると推測されるが、さらにこれを確認するために、脱アシル化 SQ-2 について、過ヨウ素酸分解後酸水解を行なったものと、酸水解後過ヨウ素酸分解を行なったものについて、PC を行なった。結果を Fig. 5 に示した。

検出されたスポットの同定は、いずれも標品が人手できなかつたので、文献値<sup>3)</sup>との比較によって行なったが、その Rf 値はいずれの場合も文献値とほぼ一致した。同定された分解生成物は、前者からはスルホラクトアルデヒドとグリコールアルデヒド、後者からはスルホアセトアルデヒドであった。過ヨウ素酸による分解過程 Fig. 6 と考えあわせると、スルホン酸基は C<sub>6</sub> 位に結合していることが明らかである。

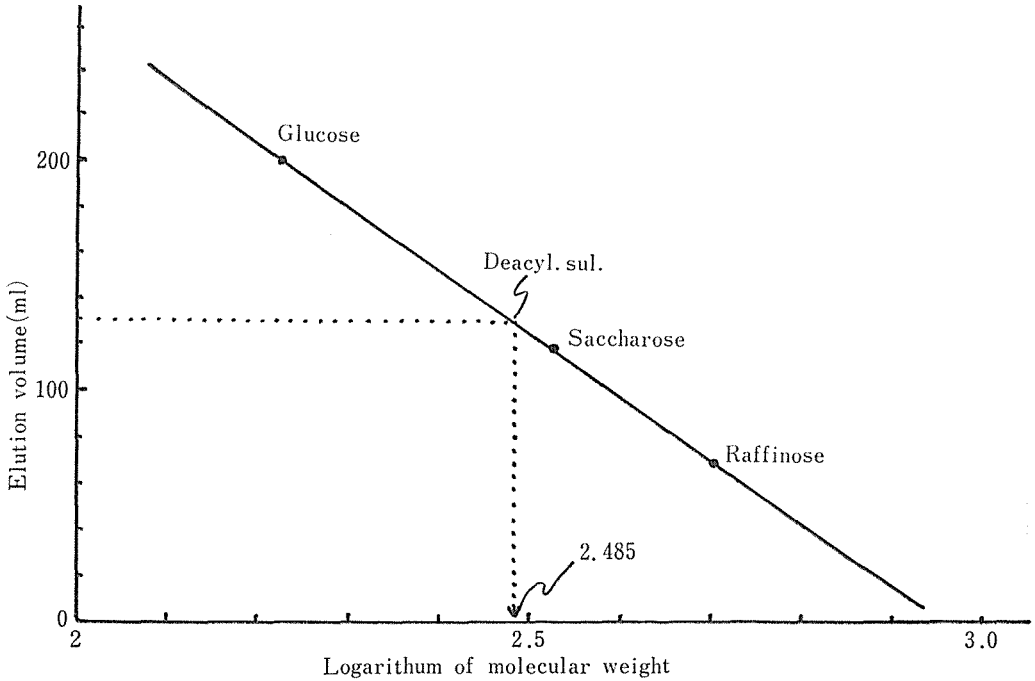


Fig. 3. Determination of molecular weight of deacylated sulfolipid by gel filtration on Sephadex G-25.

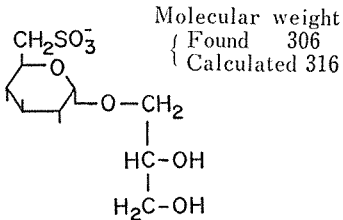


Fig. 4. Proposed structural formula of deacylated sulfolipid.

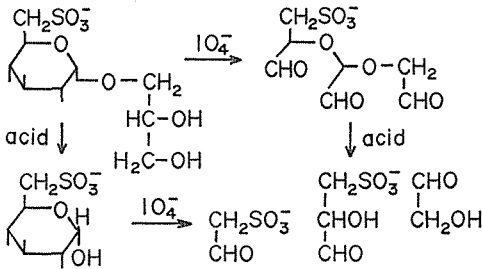


Fig. 6. Periodic acid oxidation of deacylated sulfolipid.

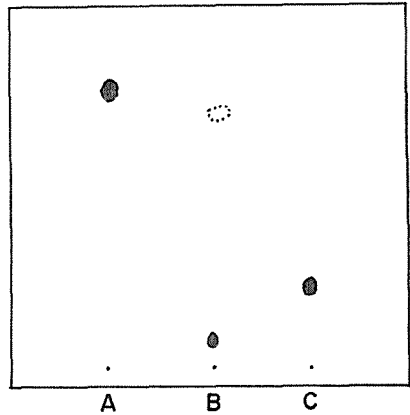


Fig. 5. Paper chromatogram of oxidation products with periodic acid.

A: Sulfolipid  
 B:  $HIO_4 \rightarrow$  Acid hydrolysis  
 C: Acid hydrolysis  $\rightarrow HIO_4$   
 Solvent: Phenol-water (100:20)  
 Detection reagent: Ammoniacal silver nitrate solution  
 Paper: Toyo filter paper No. 51

5) IR 吸収スペクトル

SQ-2 についての結果を Fig. 7 に示した.  $1740cm^{-1}$  の吸収はグリセロール型脂質のエステル結合の  $C=O$  の伸縮振動,  $1170cm^{-1}$  および  $1035cm^{-1}$  の吸収はスルホン酸基の  $S-O$  の伸縮振動によるものである.<sup>5)</sup>

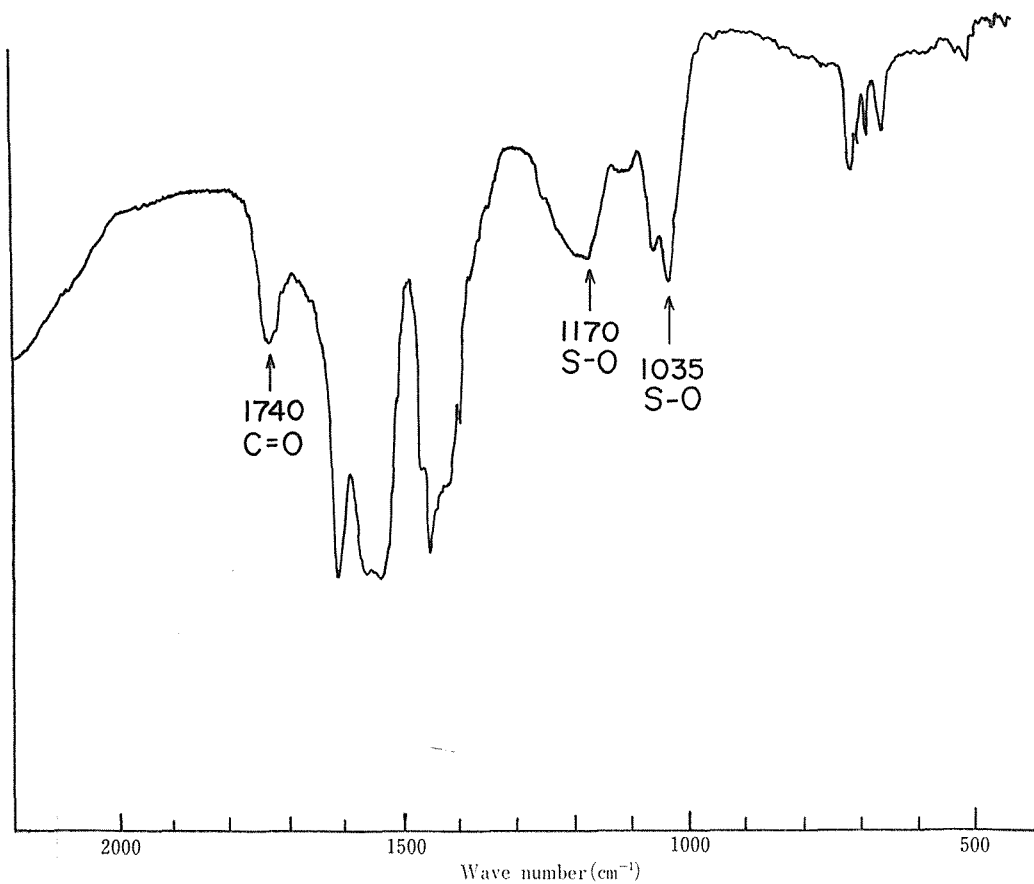


Fig. 7. IR spectrum of sulfolipid.

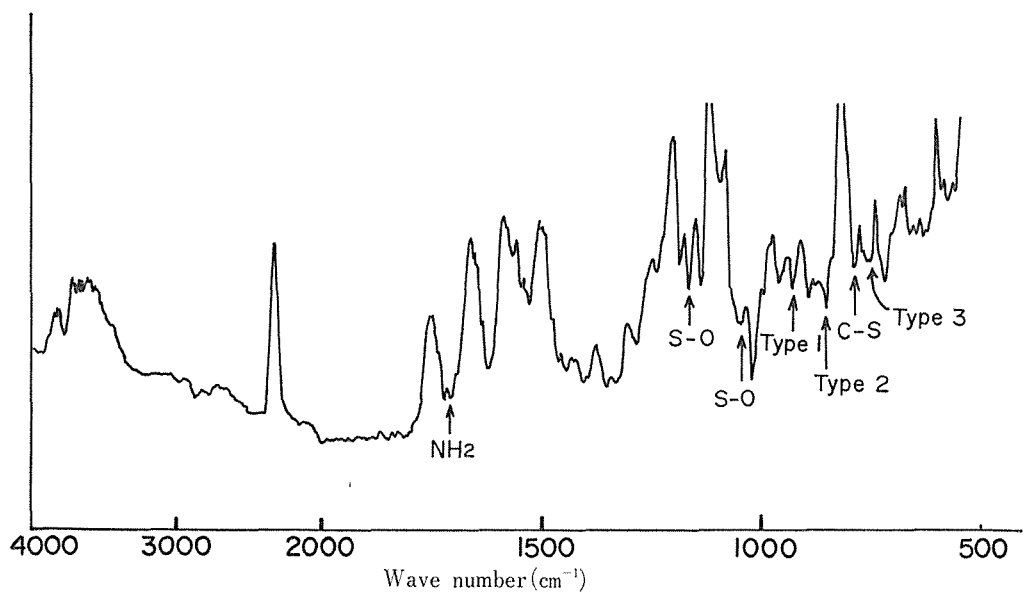
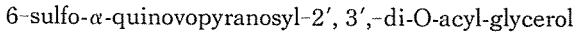


Fig. 8. IR spectrum of cyclohexylamine salt of deacylated sulfolipid.

脱アシル化 SQ-2 のシクロヘキシルアミン塩の IR スペクトルを Fig. 8 に示した。

グリコピラノシド環に特有な  $925\text{cm}^{-1}$  の吸収 (Type 1),  $845\text{cm}^{-1}$  の吸収 (Type 2a) および  $760\text{cm}^{-1}$  の吸収 (Type 3), スルホン酸基の  $1160\text{cm}^{-1}$  および  $1050\text{cm}^{-1}$  の吸収, C-S 結合の  $785\text{cm}^{-1}$  の吸収などが認められた。とくに Type 2a は  $\alpha$ -グリコシド構造に特徴的な吸収である<sup>5)</sup>。

以上の結果より, SQ-2 は



であると同定された。

このものの存在は, 光合成をする植物体や菌体内に見い出されており, これらと同種のものであった。

#### 6) スルホリピドの構成脂肪酸

ガスクロマトグラフィーによって得られた SQ-2 の脂肪酸組成を Table 1 に示した。

$\text{C}_{14:0}$ ,  $\text{C}_{16:0}$ ,  $\text{C}_{20:3}$  および  $\text{C}_{22:6}$  がスルホリピドの主要構成脂肪酸であって,  $\text{C}_{22:6}$  が大半を占めていることは特異的であると考えられる。

Table 1. Fatty acid composition of sulfolipid.

Fatty Acid	(%)
C14:0	10.3
C16:0	15.4
C18:0	—
C18:1	2.3
C18:2	4.8
C20:1	6.2
C20:3	15.6
C22:6	41.8

### 摘 要

乾海苔の脂溶性成分からフロリジル, DEAE セルロースおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分離し, 調製用薄層クロマトグラフィーによって精製したスルホリピドについて調べた。

このスルホリピドは, 脱アシル化物の分子量測定, 過ヨウ素酸分解, IR 吸収スペクトルなどにより, 6-スルホ- $\alpha$ -キノピラノシル-2', 3'-ジ-O-アシルグリセロールと同定された。

主要構成脂肪酸は  $\text{C}_{14:0}$ ,  $\text{C}_{16:0}$ ,  $\text{C}_{20:3}$  および  $\text{C}_{22:6}$  であって,  $\text{C}_{22:6}$  が特に多かった。

赤外分光光度計を使用させて下さった本学理工学部永野研究室, および試料の入手に便宣をはかって下さった株式会社サン海苔加藤信治氏に感謝します。

### 文 献

- 1) 野中順作: 日本水産学会誌 **39**, 1163 (1973).
- 2) S. Sato: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **37**, 326 (1971).
- 3) 涉谷 勲: 蛋白質・核酸・酵素, **11**, 95 (1966).
- 4) 河原一男: 蛋白質・核酸・酵素, **18**, 357 (1973).
- 5) 中西香爾: 赤外線吸収スペクトル, (1971) 南江堂.
- 6) D.L. Morris: *Science*, **107**, 254 (1948).
- 7) R.L.J. Allen: *Biochem. J.*, **34**, 858 (1940).
- 8) J. Axelrod, J. Reichenthal, B.B. Brodie: *J. Biol. Chem.*, **204**, 903 (1953).