

野菜類の脂質成分に関する研究 (第16報)

—レタスの脂質について—

北村光雄

はじめに

レタスの脂質について、いくつかの研究報告がある。Ichiba⁽¹⁾はレタスオイルの不ケン化物からセリルアルコールを検出している。Nichols⁽²⁾は薄層クロマトグラフィーによって、レタス中に、19種の脂質が含まれ、ステロール、ステロールエステル、ステロールグルコシドを認めている。Crosby⁽³⁾は凍結レタスを材料として分析している。Knappら⁽⁴⁾は乾燥したレタスの非ケン化物質からセリルアルコール、 β -シトステロール、スチグマステロール、カンペステロールおよび3種のステロールのグルコシドを薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーおよび化学分析法によって検出している。また、トリテルペンの混合物からは β -アミリン、 α -アミリン、 ψ -タラキサンステロールなどを見出ししている。

著者はわが国で栽培されている玉レタスについて、その脂質成分の全体を調べたので報告する。

実験方法

1. 脂質の抽出

試料は長野県産の玉レタスで、4個 1,300g のものを用いた。抽出の前処理として、ブランチングをおこなった。80℃の湯に1分間漬け、ただちに冷水中に投入冷却したのち、水を切る。脂質の抽出方法は既報⁽⁵⁾と同様、クロロホルム・メタノール混液 (2:1) を用いて抽出した。

2. 脂質の分画

総脂質はケイ酸のカラムクロマトグラフィー (CMC) により、中性脂質と極性脂質に分けた。カラムはシリカゲル (Kieselgel 60, 200~400 mesh, 130℃ 5時間乾燥) 100g をクロロホルムに懸濁し、これをフィルターに付いたガラス円筒に注入して26×400mm のものをつくった。つぎに総脂質 1.98g を30ml のクロロホルムに溶

解し、これをカラムに加えて吸着させ、ついで 1,000ml のクロロホルム、続いて2,000ml のアセトン、さらに1,000ml のメタノールで順次溶出する。溶出順に中性脂質、糖脂質、リン脂質に分けた。

3. 脂質の同定および定量

脂質の同定および定量は既報⁽⁶⁾に準じて実施した。

実験結果と考察

1. 脂質の含量

レタス 1,300g からクロロホルム・メタノール混液 (2:1) で脂質を抽出し、2.1g (0.2%) の総脂質を得た。

2. 総脂質 CMC により分画

総脂質をケイ酸の CMC により分画した結果は表のとおりである。中性脂質区分の収量は53%で、アブラナ科のキャベツ、コマツナ、ハクサイなどに比較して10~20%多いが、トリグリセリドそのものは図1の薄層クロマトグラムからみて余り多くないようである。

表1 ケイ酸のCMCによる総脂質の分画

区分	収量(%)	状態
中性脂質	53.0	黒緑色半固体
糖脂質	22.0	黒色半固体
リン脂質	7.2	淡褐色半固体

3. 中性脂質区分の検索

(1) 中性脂質区分の薄層クロマトグラフィー (TLC)
中性脂質区分の薄層クロマトグラムは図1のとおりである。標準物質として炭化水素 (ヌジオール), トリグリセリド (精製大豆油), 遊離脂肪酸 (オレイン酸), ステロール (β -シトステロール) を用い、TLCで、それぞれ同定した。このほか2, 3のスポットが検出された。

(2) 不ケン化物および脂肪酸の分離

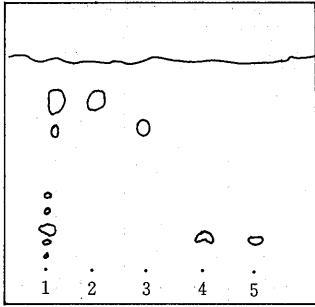


図1 薄層クロマトグラム

展開溶媒：石油エーテル／エーテル
／酢酸 (70:30:1)

発色：50%硫酸

- 試料：1. 中性脂質区分
2. 炭化水素
3. トリグリセリド
4. 脂肪酸
5. ステロール

中性脂質区分1.2gにメタノール性N-水酸化カリウム溶液10mlを加え、還流冷却器をつけて湯浴上で2時間加熱ケン化した。ケン化したのち、常法により不ケン化物と脂肪酸に分離した。その収量は表2のとおりである。

表2 不ケン化物および脂肪酸の収量

区 分	収量(%)	状 態
不ケン化物	49.9	黄赤色固体
脂 肪 酸	35.4	黒色固体

(3) 不ケン化物

不ケン化物にはTLCにより、炭化水素、高級アルコール、ステロールなどを含むことが推定される。そこで個々の成分の分離を目的として、アルミナのCMCをおこない、不ケン化物を表3に示すように9つのフラクションに分けた。これらのフラクションの薄層クロマトグラムは図2に示すとおりである。

(i) フラクション1：この区分はTLCにより炭化水素であることを認めた。ガスクロマトグラフィー (GLC) により、その炭化水素のクロマトグラムは図3のようにC₂₆を中心とした炭化水素である。このクロマトグラムから炭化水素の組成を求めると表4のとおりである。なおC₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀の標準物質として市販(東京化成)の標品を用い、C₂₇, C₂₉, C₃₁の標準物質として、リンゴの果皮、ヒエのロウ物質から分離精製したものをを用いた。

表3 不ケン化物のアルミナCMC

No.	溶出溶媒	溶出量(ml)	収量(%)
1	石油エーテル	50	17.3
2	〃	150	34.6
3	P+A (0.5%)	100	1.0
4	〃 (2%)	〃	26.1
5	〃 (5%)	〃	16.9
6	〃 (10%)	〃	2.3
7	〃 (20%)	〃	0.9
8	〃 (40%)	〃	0.5
9	アセトン	〃	0.3

アルミナ25g, P:石油エーテル A:アセトン

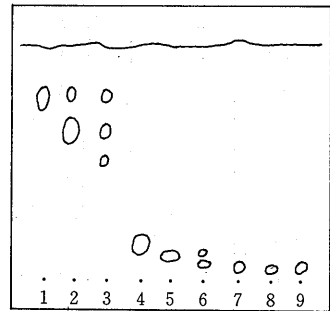


図2 不ケン化物各フラクションの薄層クロマトグラム

展開溶媒：石油エーテル／エーテル
／酢酸 (70:30:1)

発色：50%硫酸

1~9:各フラクションNo.

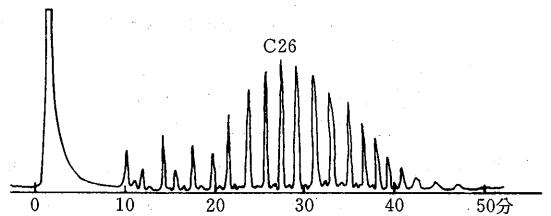


図3 フラクション1のガスクロマトグラム

SE-30, 3%, 100→260°/5°C

(ii) フラクション2：この区分は図2の薄層クロマトグラムより、2成分以上の混合物と考えられる。GLC分析から炭化水素約53%、その他成分47%と算出される。この区分を再ケン化したのち、アルミナのCMCをおこない、炭化水素とその他の区分に分けた。炭化水素区分はGLC分析、赤外吸収スペクトルから炭化水素であることを確認した。その他区分はステロールの呈色反応を

表4 フラクシオン1の炭化水素組成

炭素数	Rt	%
16	10.3	1.6
17	12.3	1.3
18	14.3	4.2
19	16.2	1.8
20	18.2	3.4
21	20.0	1.6
22	21.8	3.9
23	23.8	4.7
24	25.1	8.8
25	27.7	11.2
26	28.1	11.4
27	29.6	11.6
28	31.0	8.5
29	32.3	7.9
30	33.7	5.5
31	35.0	4.7
32	36.6	3.0
33	38.6	2.3
34	41.0	1.6
35	44.2	0.9
36	48.1	0.1

SE-30 3%, 100→260° / 5°C

Rt: retention time

示し、そのアセチル誘導体のGLC分析からβ-シトステロール、その他のステロールが見い出された。また再ケン化物からパルミチン酸、リノール酸を検出した。以上の結果から、その他区分は脂肪酸のステロールエステルである。

(iii) フラクシオン3: この区分は図2の薄層クロマトグラムから3成分以上の混合物と考えられる。GLC分析から炭化水素、高級アルコールに相当するピークは検出されなかった。試料少量のためこれ以上調べなかった。

(iv) フラクシオン4: この区分の薄層クロマトグラムは単一のスポットを与え、フリーおよびアセチル誘導体のRf値も標品の高級アルコールと一致する。この区分のアセチル誘導体のGLCから、その組成を求めると表5のとおりである。おもにC₂₆、C₂₄、C₂₂の高級アルコールで、C₂₆はセリルアルコールであり、Ichiba⁽¹⁾やKnapp⁽⁴⁾が見つけたものと同一である。なお、C₂₄~C₂₈の高級アルコールの標準物質として、ヒエ・米糠のロウ成分から分離精製したものをを用いた。

表5 フラクシオン4の高級アルコール組成

炭素数	Rt	%
22	1.8	25.0
23	2.2	0.2
24	2.8	24.1
25	3.5	0.9
26	4.2	40.4
27	5.5	0.2
28	6.7	6.2
29	—	—
30	10.5	1.6
?	11.3	1.5

SE-30, 3%, 260°C

(v) フラクシオン5: この区分で、薄層クロマトグラム上で大きなスポットを与える物質は、そのRf値および呈色反応からステロールと予想された。このスポットをかきとり、アセチル化してGLCにかけ、その組成を求めると表6のとおりである。

表6 フラクシオン5のステロール組成

sterol	Rt	%
Campesterol	19.2	7.9
stigmasterol	20.6	34.7
β-sitosterol	23.5	57.4

SE-30, 3%, 240°C

(vi) フラクシオン6: この区分をフラクシオン5と同様に処理し、GLC分析よりカンベステロール、スチグマステロール、β-シトステロールを確認した。このほかに2種の未知ステロール物質を検出した。この未知物質は試料少量のため、これ以上検索しなかった。

(vii) フラクシオン7・8・9: これらの区分からGLCによりステロール類が検出されたが、いずれも試料少量のためこれ以上検索しなかった。

(4) 脂肪酸

中性脂質区分の混合脂肪酸は常法によりメチル化し、GLCによる分析をおこなった。そのクロマトグラムから半値幅法により脂肪酸の組成を求めると表7のようになる。リノレン酸の含量はアブラナ科の野菜類の50~60%に比べて低い値である。

表7 中性脂質区分の脂肪酸組成

炭素数	Rt	%
12:0	1.2	+
14:0	2.2	0.7
16:0	3.7	18.9
16:1	4.5	0.4
17:0	6.0	+
18:0	6.3	1.5
18:1	7.3	2.9
18:2	9.0	38.0
18:3	11.7	37.7

DEGS 15%, 190°C

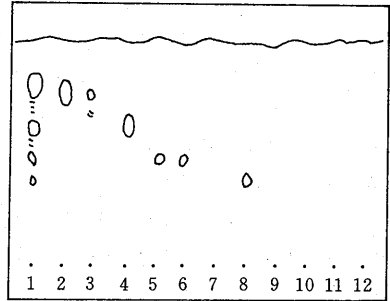


図4 糖脂質区分の薄層クロマトグラム

展開溶媒：クロロホルム/メタノール/水 (65:25:4)

発色： α -ナフトール試薬

1：糖脂質区分

2~12：各フラクション

4. 糖脂質区分の検索

(1) 再ケイ酸CMC

表8 糖脂質区分の再CMC

No.	溶出溶媒	溶出量(ml)	収量(%)
1	クロロホルム	150	9.9
2	C+A (99:1)	100	2.5
3	〃 (98:2)	100	2.1
4	〃 (95:5)	200	12.7
5	〃 (90:10)	200	10.5
6	〃 (80:20)	200	7.3
7	〃 (70:30)	200	20.1
8	〃 (60:40)	200	6.8
9	〃 (40:60)	200	4.9
10	〃 (20:80)	200	2.7
11	メタノール	200	13.6

Sample 0.55g, Kieselgel 60, 18g, 18×155mm

C:クロロホルム, A:アセトン

この区分には図4の薄層クロマトグラムのように多数の成分が含まれるので、精製の目的でさらにケイ酸のCMCを表8のようにおこなった。各フラクションの薄層クロマトグラムは図4のとおりである。同様に展開したプレートを、硫酸を噴霧して高温で加熱炭化すると多数のスポットがあらわれる。

(2) フラクション1・4

フラクション1および4のスポットは α -ナフトール試薬で赤紫色を呈し、これらの区分にもまだ糖脂質以外の成分が含まれるので、つぎのようにさらに精製した。すなわち、これらの区分をそれぞれ少量のクロロホルム

に溶かし、シリカゲルの薄層プレートに直線状に塗布し、乾燥後、クロロホルム/メタノール/水 (65:25:4) の溶媒で15cm展開する。分離した糖脂質のバンドをかきとり、クロロホルム・メタノール混液 (2:1) で抽出した、TLCで単一のスポットを与えるまでくりかえす。つぎに精製した糖脂質に5%塩酸を含むメタノールを加えて煮沸分解し、脂肪酸メチルエステルと水溶性部分に分ける。水溶性部分はさらにTMS化して、それぞれGLC分析をおこなった。脂肪酸の組成は表9のとおりで

表9 糖脂質の脂肪酸組成

炭素数	Rt	フラクション1 (%)	フラクション4 (%)
14:0	2.3	+	+
14:1	2.6	+	+
16:0	3.7	31.4	24.6
16:1	4.3	+	2.1
17:0	4.6	—	+
18:0	6.4	3.7	1.1
18:1	7.4	3.7	2.1
18:2	9.0	30.5	47.8
18:3	11.8	31.1	22.2

DEGS 15%, 190°C

ある。また水溶性部分のTMS化物はそれぞれグルコースを検出した。以上の結果からフラクション1および4のスポットはグルコースを含む糖脂質である。

(3) フラクション5・6

フラクション5および6のスポットは α -ナフトール

試薬できれいな紫色を呈するが、まだ不純物が含まれるので、製造的TLCによって精製した。この物質の赤外吸収スペクトルは図5のとおりで、 $1,745\text{cm}^{-1}$ にステロールグルコシド結合、 $1,460\text{cm}^{-1}$ にステロールのメチレン基、 $1,380\text{cm}^{-1}$ にステロールのメチル基、 $1,090\sim 1,010\text{cm}^{-1}$ に糖の水酸基の吸収を示す。この物質に5%塩酸を含むメタノール溶液を加え、2時間煮沸して水解した。水解物の脂溶性区分をアセチル化してGLC分析し、 β -シトステロール、スチグマステロール、ブラシカステロールを検出した。また水解物の水溶性区分を常法によりTMS化し、GLC分析によりグルコースを検出した。

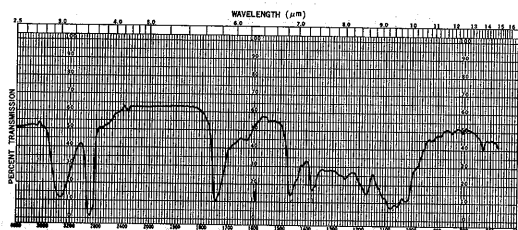


図5 赤外吸収スペクトル

以上の結果からフラクション5, 6に含まれる紫色のスポットの物質はステロールグルコシドである。

(4) フラクション 8

この区分の薄層クロマトグラムは α -ナフトール試薬できれいな紫色のスポットを与える。この区分を前記同様にTLCで精製し、塩酸で水解、GLCで分析したところ、ステロールおよびグルコースを検出した。したがってこのスポットの物質もステロールグルコシドである。

5. リン脂質区分の検索

(1) リン脂質区分のTLC

この区分のTLCは図6のように2つのスポットを与える。スポットの呈色反応は表10のとおりである。以上

表10 リン脂質の薄層クロマトグラムの呈色

試薬	スポット	
	1	2
硫酸	B	B
モリブデンブルー	+	+
ドラーゲンドルフ	-	+
ニンヒドリン	+	-
α -ナフトール	-	-

B：褐色

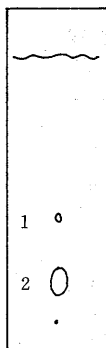


図6 リン脂質の薄層クロマトグラム

展開溶媒：クロロホルム/メタノール/水 (65:25:4)
発色：モリブデンブルー試薬

の結果からスポット1はホスファチジルエタノールアミン (PE), 2はホスファチジルコリン (PC) である。

(2) リン脂質の脂肪酸組成

それぞれのリン脂質の脂肪酸組成を求めるのに、つぎの方法をとった。まず、薄層プレートの原点に試料を線状に付着させ、乾燥後これを展開する。展開後プレートを風乾し、プレートの両側の端を約1.5cm露出させて中央部をビニールフィルムで覆い、ついでモリブデンブルー試薬で両側を発色させ、中央部分のバンドをかきとり、クロロホルム・メタノール混液で脂質を抽出する。抽出液は低温で溶媒を蒸発乾固し、新しいクロロホルムを加えて脂質を再び溶解し、メタノール性の0.4N-水酸化ナトリウム溶液を加えて混合し、室温で2時間放置してメチル化した。これをGLCの試料とした。GLC分析の結果は表11のとおりである。

表11 リン脂質の脂肪酸組成 (%)

炭素数	Rt	PE	PC
14:0	2.3	+	+
15:0	3.0	+	+
16:0	3.8	39.5	38.7
16:1	4.5	+	+
18:0	6.2	2.8	2.5
18:1	7.3	10.1	9.6
18:2	9.0	31.4	32.3
18:3	12.0	16.1	16.8

DEGS 15%, 190°C

要約

1. 玉レタスをブランチングしたのち、クロロホルム・メタノール混液 (2:1) を加えてミキシングし、脂質を抽出した。0.2%の総脂質を得た。

参考文献

2. 総脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィーにより中性脂質, 糖脂質, リン脂質区分に分けた。その収量はそれぞれ53.0%, 22.0%, 7.2%であった。

3. 中性脂質区分を検索し, 不ケン化物は49.9%含まれ, 炭化水素, 高級アルコール, ステロールなどからなる。脂肪酸は35.4%含まれ, 主としてリノール酸, リノレン酸, パルミチン酸よりなる。

4. 糖脂質区分を検索し, グルコースを含むグリセリドおよびステロールグルコシドを見出した。

5. リン脂質区分を検索し, 主としてホスファチジルコリよりなり, わずかのホスファチジルエタノールアミンが含まれる。

- 1) Ichiba, A; Sci. papers Inst. Phym. Chem. Res. Tokyo **34**, 132 (1937)
- 2) Nichols, B.W. : Biochem. Biophys. Acta **70**, 417 (1963)
- 3) Crosby, D.G.; J. Food science **28**, 347 (1963)
- 4) Knapp, F. et. al; J. Food science **33**, 159 (1968)
- 5) 北村光雄; 本誌, 第18集 (1974)
- 6) 北村光雄; 本誌, 第22集 (1978)