

野菜類の脂質に関する研究 (第4報)

— タマネギ脂質のアセトン不溶部について —

Studies on the Lipid of Vegetable (Part 4)

On Acetone insoluble fraction of Onion Lipid

北 村 光 雄

Mitsuo Kitamura

は し が き

著者は先に、タマネギ油脂の脂肪酸および不けん化物について報告^{1), 2)}したが、タマネギ脂質の構成成分を明らかにする一環として、つづいてアセトン不溶脂質について検討した。このアセトン不溶脂質には、複合脂質のほかに多量の炭化水素、高級アルコールなどが含まれている。複合脂質には糖脂質、**リン脂質が含まれ、その**性状を明らかにしたので報告する。

実験材料および実験方法

1. 実験材料の調製

前報タマネギ油脂20.4gに約10倍量のアセトンを加え、冷暗所に放置すると多量の粘りや濁りなかつ色沈殿物を生じた。この物質をろ別し、少量のエーテルに溶解し、さらにアセトンを加えて再沈殿を行なった。このようにしてアセトン不溶脂質3.0g(試料油の14.7%)を得た。

2. 実験方法

1) ケイ酸カラムクロマトグラフィーによるアセトン不溶脂質の分画

120°Cで15時間活性化したケイ酸(Wakogel Q 50, 60~200メッシュ) 12gを50mlのクロロホルムに懸濁させてから、カラム(1.8×20cm)に注入した。50mlのクロロホルムでカラムを洗浄したのち、上記のアセトン不溶脂質117mgを

10mlのクロロホルムにとかして注加した。溶出溶媒をクロロホルム100ml, クロロホルムとメタールの混液(以下C—Mで略記)(9:1) 200ml, C—M(3:2) 200ml, C—M(2:3) 200ml, C—M(9:1) 200ml, メタノール150mlの順に加え、1ml/minで10mlずつ集めた。リンの定量はAllenの中村変法³⁾、アミノ脂質はニンヒドリンによる方法で⁴⁾、それぞれ定量し、溶出パターンを描いた。

2) 薄層クロマトグラフィー

アセトン不溶脂質の分析には、Wakogel B-5の厚さ0.25mmのプレートを用いた。展開溶媒はクロロホルム:メタノール:水(65:25:4)を用い、展開後の顕色試薬として50%硫酸、ニンヒドリン試薬、ドラーゲンドルフ試薬、モリブデン酸アンモニウム-過塩素酸試薬などを用いた。

糖類の薄層クロマトグラフィー分析には、プレートをつくる時、水のかわりに0.1Nホウ酸溶液を用いた。また展開溶媒にはメチルエチルケトン:酢酸:水(3:1:1)またはN-ブタノール:アセトン:水(4:5:1)を用い、発色にはアニスルアルデヒド-硫酸試薬またはナフトゾルシン-硫酸試薬を用いた。

3) 赤外線吸収スペクトル

ヌジヨール法または溶媒法(二硫化炭素)により、日本分光IR-E型の赤外分光光度計を用いた。

4) 脂肪酸のガスクロマトグラフィー

試料 5 mg を 2 N メタノール性塩酸 2 ml を加え、封管、湯浴中で 3 時間メタノリシスした。生成した脂肪酸メチルを石油エーテル 10 ml で 3 回抽出し、抽出液を水洗して無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮してガスクロマトにかけた。柳本 GCG-220 型を用い、カラムは銅、4mm × 2m、担体は Neosrb NC 固定相は、15% Polyethylene glycol succinate ester または 5% Silicone DC H. V.、キャリアーガスはヘリウム、流速毎分 35ml、入口圧 1.5Kg/cm²、ブリッジ電流 150mA、カラム温度は 180° または 240°C、記録紙速度は毎分 5 mm である。なお各ピークの同定あるいは推定には、標準脂肪酸メチルとの比較、各ピークの保持時間の対数と炭素数との直線関係を用いた。

5) 炭化水素のガスクロマトグラフィー

カラムは銅、4mm × 2m、担体はセライト 545、固定相は 5% アスファルテン、温度は 310°C である。その他の条件は脂肪酸メチルエステルの場合と同様である。各ピークの同定または推定は標準炭化水素によった。

6) 糖類のガスクロマトグラフィー

4) で脂肪酸メチルを除いたもの (メタノール溶液) を Amberlite IR-4B で脱塩酸したのち濃縮する。残渣を 0.5 ml のピリジンにとかし、ヘキサメチルジシラザン 0.2ml とトリメチルクロロシラン 0.1 ml を加え、振とう混合して TMS 化⁵⁾を行ない、ガスクロマトにかけた。ガスクロマトの条件としては、担体に Chamelite CS、固定相に 5% Silicone DC Q F-1、カラムは 4 mm × 2 m のステンレススチール、温度は 238°C である。

実験結果および考察

1. アセトン不溶脂質の薄層クロマトグラフ

イー

アセトン不溶脂質の薄層クロマトグラムは図-1に示すとおりで、各スポットの呈色は表-1のとおりである。

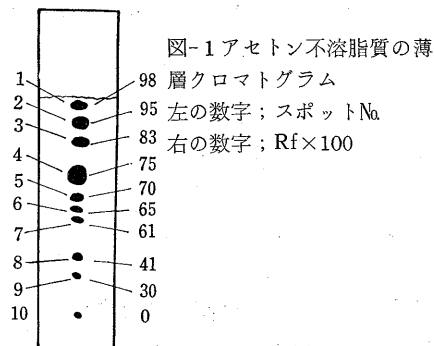


表-1 薄層クロマトグラムの呈色

試薬	スポット番号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
硫酸	B	V	B	B	V	B	B	B	B	B
ヨウ素蒸気	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
ニンヒドリン	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
ドラーゲンドルフ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
モリブデン酸アンモニウム過塩素酸	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+

B : かつ色 V : 紫色

スポット 3, 9, 10 はモリデン酸アンモニウム過塩素酸試薬に対し陽性で、リン脂質である。スポット 2, 6, 9, 10 はニンヒドリン試薬に対し陽性でアミノ脂質であるが、アミノリン脂質である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セリンに相当するものはみつからなかった。ドラーゲンドルフ試薬で陽性のスポットは 9, 10 であるが、明確な呈色を示さなかった。

2. ケイ酸カラムクロマトグラフィー

アセトン不溶脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィーにより細分画して図-2に示すようなパターンを得た。このパターンから薄層クロマトグラフィーと同様多数個の成分が推定されたので、つぎの溶媒による分別を試みた。

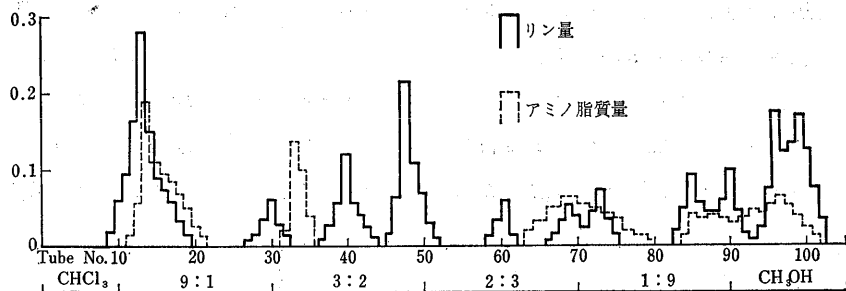


図-2 ケイ酸カラムクロマトグラフィーによるリンおよびアミノ脂質量

3. アセトン不溶脂質の溶媒による分別が推定されたので、これを図-3に示すような薄層クロマトグラフィーおよびケイ酸カラム溶媒によってA~D区分に大きく分けた。クロマトグラフィーによって、おおよその成分

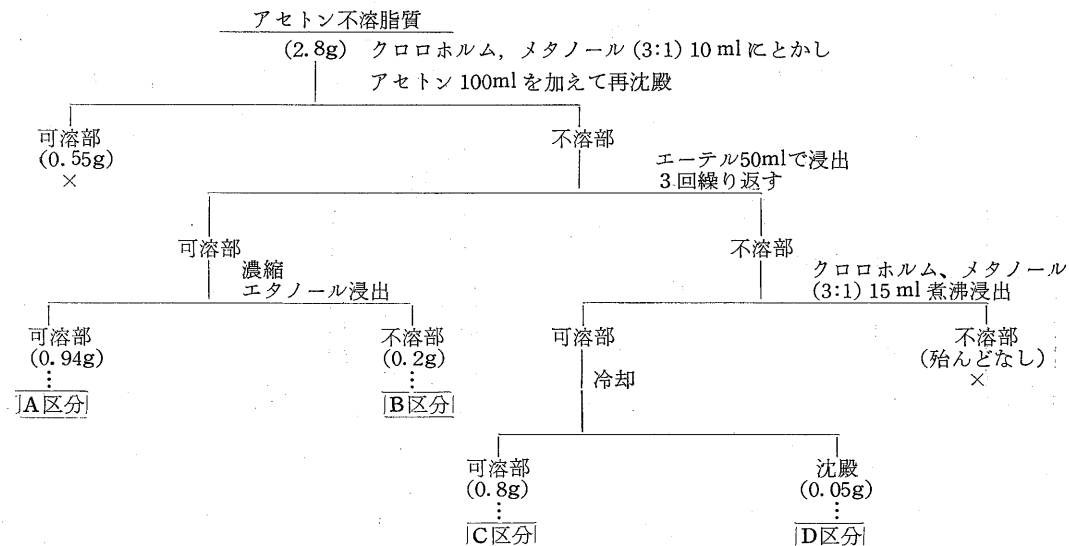


図-3 アセトン不溶脂質の溶媒による分別

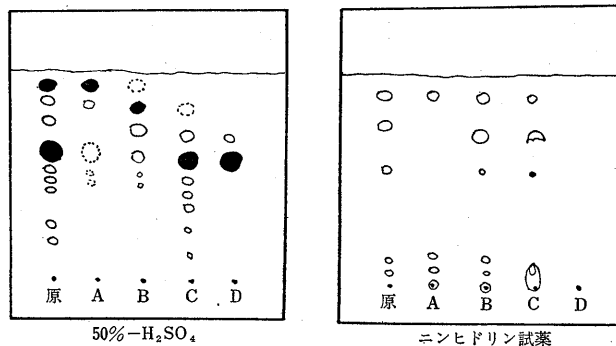


図-4 溶媒分画した各区分の薄層クロマトグラム

溶媒分画した各区分の薄層クロマトグラムは、図-4に示すとおりである。D区分は比較的小く分離したが、A~C区分は分離が悪い。ニンヒドリン試薬での発色はA~C区分に分布し、

溶媒による分離性は見られなかった。なおドラージェンドルフ試薬で発色するものはなかった。

4. 溶媒区分のカラムクロマトグラフィー

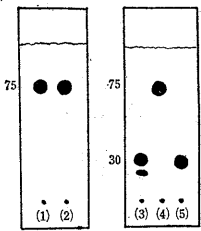
図-3のA~D区分は、図-4に示す薄層クロマトグラムで明白なように、かなり混合物が

表-2 A区分のカラムクロマトグラフィー

No.	溶媒	溶出量 (ml)	収量 (%)
a	CHCl ₃	150	39.7
b	C-M(9:1)	100	19.0
c	C-M(3:2)	100	12.1
d	C-M(2:3)	100	6.9
e	C-M(1:9)	100	13.8
			91.5

Wakogel Q-22, 25g, 試料 0.58g

図-6 薄層クロマトグラム



- (1) mp68~69°Cの炭化水素
 - (2) ノナコサン
 - (3) mp78~79°Cのアルコール
 - (4) 同上のアセチル化物
 - (5) メリシルアルコール
- 数字: Rf × 100

各区分の薄層クロマトグラムは図-5に示すとおりである。

a 区分について、アルミナで再カラムクロマトグラフィーを行ない、アルコール、アセトンより再結晶を繰り返して、mp68~69°Cの炭化水素と、mp78~79°Cの高級アルコールと考えられる結晶を得た。薄層クロマトグラフィーによる分析は図-6のとおりである。またこの炭化水素を、固定相に5%のアスファルテン、カラム温度310°Cで、ガスクロマトグラフィーを行なったが、20分後に丘のようなピークしか得られなかった。おそらく沸点の高い炭化水素と考えられる。なおa区分をそのまま上記と同条件でガスクロマトにかけると図-7に示すような

あるので、純粋にするためそれぞれにつきカラムクロマトグラフィーを行なった。

1) A区分のケイ酸カラムクロマトグラフィー

この区分をケイ酸カラムクロマトグラフィーにより分画したところ表-2の結果を得た。

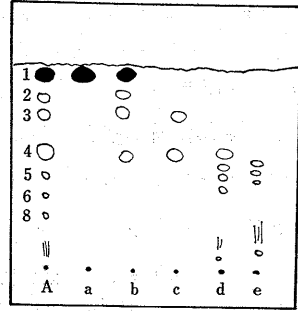


図-5 A区分の薄層クロマトグラム
数字: スポットNo.

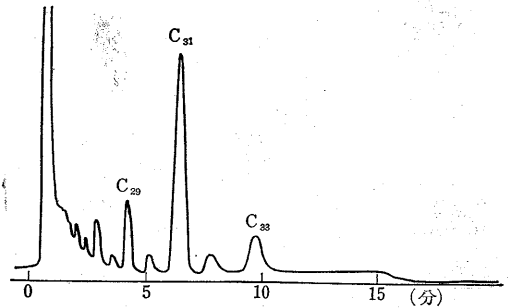


図-7 a区分のガスクロマトグラム

ガスクロマトグラムが得られた。相当多数個の炭化水素よりなることを認めた。

b 区分の大部分はa区分と同様炭化水素と高級アルコールである。c, d, e, 区分は少量で

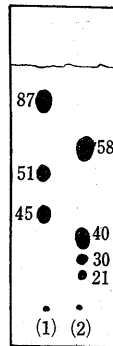


図-8 リン脂質の薄層クロマトグラム

- (1) 試料
 - (2) 卵黄のリン脂質
- 数字: Rf × 100

あるので薄層クロマトグラフィーによる定性を試みた。その結果、ニンヒドリン試薬、ドラージェ

ンドルフ試薬に対し陰性、モリブデン酸アンモニウム-過塩素酸試薬に対しては陽性のリン脂質、図-8に示すような薄層クロマトグラムを得た。このことからこの区分には、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のようなリン脂質は含まれていないことがわかった。

2) B区分のケイ酸カラムクロマトグラフィー

表-3 B区分のカラムクロマトグラフィー

No.	溶媒	溶出量 (ml)	収量 (%)
a	CHCl ₃	80	38.1
b	C-M(9:1)	50	26.3
c	C-M(3:2)	50	10.9
d	C-M(2:3)	50	7.3
e	C-M(1:9)	50	11.0
			93.3

Wakogel Q-22, 20g, 試料 0.2g

この区分もA区分と同様ケイ酸カラムクロマトグラフィーにより分画したところ表-3に示

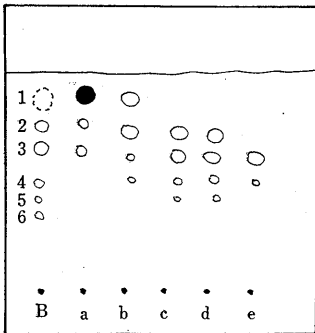


図-9 B分画区分の薄層クロマトグラム
数字：スポットNo.

すような結果を得た。各区分の薄層クロマトグラムは図-9に示すとおりである。

a 区分は薄層およびガスクロマトグラフィーによって検索したところ、A-a区分と同一のものが得られた。c, d, e 区分は少量であるので、発色試薬による定性を試みた。スポット2はニンヒドリン試薬に対して陽性、モリブデン酸アンモニウム-過塩素酸試薬に対して陰性で、

アミノ脂質と考えられる。スポット3はニンヒドリン試薬に対し陰性、モリブデン酸アンモニウム-過塩素酸試薬に対し陽性で、リン脂質である。またスポット3, 4, 5はα-ナフトール、過ヨウ素酸ベンジジン、ジフェニルアミンなどの試薬に対しても陽性であることから、リン脂質および糖脂質の混合物であると考えられる。またステリン反応も陽性であることからスポット4はステリンの混在が知られる。

3) C区分のケイ酸カラムクロマトグラフィー

A, B区分と同様ケイ酸カラムクロマトグラフィーを行ない、表-4の結果を得た。各区分

表-4 C区分のカラムクロマトグラフィー

No.	溶媒	溶出量 (ml)	収量 (%)
a	CHCl ₃	100	9.6
b	C-M(9:1)	100	46.1
c	C-M(3:2)	100	23.2
d	C-M(2:3)	100	7.4
e	C-M(1:9)	100	5.8
			92.1

Wakogel Q-22, 25g, 試料 0.75g

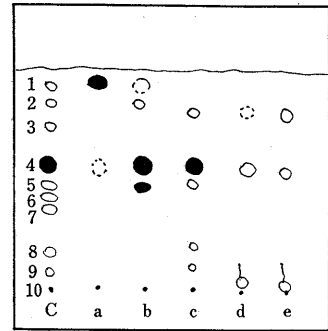


図-10 C分画区分の薄層クロマトグラム
数字：スポットNo.

の薄層クロマトグラムは図-10のとおりである。

スポット3, 4はジフェニルアミン、過ヨウ素酸ベンジジン、α-ナフトールなどの試薬に対し陽性で、糖脂質であることを認めた。スポット4, 5, 6, 7を純粋にするために、c, d区分をナトリウムフルオレッセンスを含む薄層

上で展開し、得られた各分離帯をかきとり、クロロホルム・メタノール混液(1:1)で溶出した。それぞれについて水酸化カリウムによる加水分解を行ない、得られた酸性部、中性部、水溶液部についてその性状を調べた。酸性部はジブメタンにより脂肪酸をメチルエステルと

し、ガスクロマトグラフィーにより測定した。中性部は薄層クロマトグラフィーを行ない。水溶液部は薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーを行なった。その結果は表-5のとおりである。

表-5 加水分解物の薄層およびガスクロマトグラフィー

スポット No.	酸性部 脂肪酸の種類	中性部 薄層クロマトグラフィー Rf	水溶液部	
			薄層クロマトグラフィー Rf	ガスクロマトグラフィー Rf
4	C ₁₆ C ₁₈ C ₂₂ C ₂₄	0.38, 0.72	0.32	3.1
5	C ₁₈ C ₂₂	0.37, 0.72	0.30	3.2
6	C ₁₆ C ₁₈ C ₂₂	0.38, 0.72	0.31	3.2
7	C ₁₆ C ₂₂	0.37, 0.72	—	—

※ 展開溶媒 ヘキサン : エーテル : 酢酸 (70:30:1)

※※ 0.1Nホウ酸を使用したプレート、展開溶媒 メチルエチルケトン : 酢酸 : 水 (3:1:1)

※※※ 保持時間(分)

また2N塩酸による加水分解物からも上記と同様な結果を得たので、スポット4, 5, 6は糖脂質である。

スポット8, 9, 10は少量で精査するに至らなかったが、薄層クロマトグラフィーの発色試薬の呈色によりスポット9, 10はリン脂質であるが、ホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリンなどと異なるRf値を与えるので、これら物質の分解物またはリン脂質の誘導体と推定される。

4) D区分の成分

この区分はクロロホルム・メタノール混液(1:3)で再結し、mp 225~227°Cの結晶を得た。この結晶は薄層クロマトグラフィーで展開しても単一のスポットを与えるので純粋物質と考えられる。この結晶の赤外吸収スペクトルは図-11のとおりである。この結晶に2N塩酸メタノール溶液50倍量を加えて24時間煮沸し、加水分解を行なった。加水分解後放冷すると多量の結晶を生じた。これを70%アルコールより再結し、mp 143°Cの光沢ある板状結晶を得た。薄

層クロマトグラフィー、赤外吸収スペクトルなどの測定より高級アルコールと推定される。

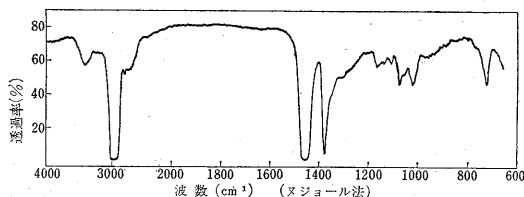


図-11 D区分から得られた結晶(mp225~227°C)の赤外吸収スペクトル

加水分解物から高級アルコールを除いたものに石油エーテルを加え、3回、脂肪酸メチルエステルを抽出し、水洗、脱水、濃縮してからガスクロマト分析を行なった。その結果パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘニンを含むことを認めた。

脂肪酸メチルエステルを除いた希メタノール性水層を濃縮し、薄層クロマトグラフィーによりグルコースであることを認めた。

以上D区分の主成分はmp 225~227°Cの結晶として得られる高級アルコール、糖および脂肪酸からなる複合脂質である。

要 約

タマネギ油脂のアセトン不溶部の脂質成分を調べた。

(1) アセトン不溶脂質は試料油の14.7%である。

(2) この脂質中には高級炭化水素、高級アルコールが多量に含まれ、このほか糖脂質、リン脂質、ステリンなどが含まれている。

(3) 糖脂質は高級脂肪酸、アルコール、グルコースまたはガラクトースからなる複合脂質である。

(4) リン脂質はホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリンが含まれず、その分解物または誘導体と考えられる。

参 考 文 献

- 1) 北村ら；食, 12, 26 (1964)
- 2) 北村；本誌第10集 (1966)
- 3) 中村；農化, 24, 1 (1950)
- 4) 波多野ら；光電比色法 56 (1948) 南江堂
- 5) C. C. Sweeley et al; J. Am. Chem. Soc., 85, 2497 (1963)