報 文

ア サ リ の 脂 質 (第1報)

アセトン可溶部の組成について

保 田 茂 次 郎

広島大学教養部 (広島市東千田町)

Studies on the Lipids of Japanese Littleneck, *Tapes japonica* (Deshayes). I.
Composition of Acetone-soluble Lipids

Shigejirō YASUDA

Department of General Education, Hiroshima University (Higashisenda-machi, Hiroshima-shi)

The composition of the acetone-soluble lipids contained in Japanese Littleneck (*Tapes japonica* (Deshayes)) was studied from the view point of its seasonal variation.

The lipids were extracted with ethanol-ether or methanol-chloroform, and acetone-soluble lipids were obtained by means of acetone-precipitation and Folch-washing method. The acetone-soluble lipids were analyzed with counter-current distribution method (95% methanol-petroleum ether, 100-transfer). Sterols and phospholipids were separated, but glyceride and fatty ester of sterols were not separated. Fraction of the mixtures of glycerides and sterols esters were determined for the unsaponifiables, to calculate the per cent of glyceride, sterol ester, free sterol and phospholipid. The separation of these fractions were identified with thin-layer chromatography on silicic acid. The seasonal variation of the composition of acetone-soluble lipids was not prominent.

The sterol was mainly 7-dehydrostigmasterol, but the presence of another sterol was indicated by the infrared absorption spectrum and by the thin-layer chromatography.

1 緒 言

アサリ *Tapes japonica* (Deshayes) の脂質については、すでに辻本、小柳¹⁾によって、脂質の抽出とその定数の測定が行なわれている。またそのステリンについては、松本、田村²⁾によって研究され、7-デヒドロスチグマステリン (コルピステリン) が確認されている。しかしその脂質の組成についての研究は行なわれていないようである。アサリは食用に供せられる貝類として、わが国では最も広く知られているものであるところから、その脂質について研究を行なった。

アサリの脂質が著量のリン脂質 (62%) を含むことは、すでに辻本らによって報告されているが、今回はリン脂質を除いたアセトン可溶性脂質の組成を、季節的に調べた結果について報告する。

2 実験および結果

2・1 試 料

アサリは4月、8月、12月にそれぞれ同一の商店で、ムキミとして市販するものを入手して試料とした。これは山口県福川にて養殖されたものである。そのうち 20

個体をとって1個体当りの平均重量を測定したが、4月における2回の実験で見られるように、同じ季節でもその大きさにかなりの変動があった。

アサリは軽く水洗して夾雑物を除き、水を加えて5 min 煮沸したのち、モメン布に包んでできるだけ水を除いて重量をはかった。

2・2 脂質の抽出

試料からの総脂質の抽出は、エチルアルコール-エーテル、またはメチルアルコール-クロロホルムによって行なった。

試料を試料と同量のエチルアルコールと2 min ミキサーでホモジナイズし、半量のエチルアルコールを加えて吸引口過した。残分をそれと同量のエチルエーテルに室温で一夜浸せきして吸引口過した。残分は同量のエーテルにさらに一夜浸せきしそれぞれ脱水乾燥ののち炭酸ガス気流中で減圧下に溶媒を除き、それを合して総脂質を得た。エーテルで2回浸出した残分を、さらにクロロホルム-メタノール (1:1) と2 min ミキサーで処理し、同様にして抽出物を求めたが、抽出物はわずかであったため、エーテルによる2回の浸出で脂質は抽出されたものとみなした。

またメタノール-クロロホルムによる抽出は4月の試料について行なった。試料に同量のクロロホルムおよび倍量のメタノールを加えて2 min ミキサーで処理し、さらに半量のクロロホルムを加えて30 sec ホモジナイズして吸引口過した。残分を同量のクロロホルムと再びホモジナイズし、半量のクロロホルムを加えて吸引口過した。ロ液はエーテル抽出の場合と同様に処理した。

このようにして得られた総抽出物を、倍量のエーテルに溶かし、5倍量のアセトンに注入して冷蔵庫内に一夜静置して不溶部を傾斜分離した。アセトン溶液は減圧下にアセトンを除き、その残留物について Folch's washing³⁾を行なってアセトン可溶性脂質とした。すなわち、アセトン溶液から得た脂質を約5倍容のクロロホルム-メタノール(2:1)に溶かし、蒸留水を満たした1 l 容ビーカー内に沈めた200 ml 容ビーカーに、分液漏斗を用いて静かに注入した。冷蔵庫内に一夜静置したのち、ピペットでクロロホルム層を取り出した。これを脱水乾燥してクロロホルムを除きアセトン可溶性脂質を得た。

Folch's washing は向流分配を行なうときのエマルジョンの生成を、できるだけおさえるために行なった。

このようにして得たアセトン可溶性脂質は、黒カッ色で海草様の臭気を持ち、夏季においても一部結晶を析出する粘ちょうな油状物であった。

抽出の結果および脂質の定数を Table-1 に示す。

Table-1 Extraction of lipids and its chemical properties.

	April I	April II	August	December
Mean weight of one sample (g)	2.4	3.2	3.9	2.9
Sample weight, total (g)	570.0	620.0	590.0	830.0
Lipids (g)	10.24	13.02	10.81	25.73
(%)	1.8	2.1	1.8	3.1
Acetone-soluble lipids (%)	43.0	36.2	38.3	29.5
A.V.	9.0	8.8	9.7	8.6
S.V.	147.0	140.5	133.2	164.0
Unsaponifiables (%)	27.3	31.3	32.0	36.6
Fatty acids N.V.	191.9	203.5	193.1	209.9
I.V. (Wijjs)	184.2	176.0	172.5	162.6

また後述の方法で行なった薄層クロマトグラム(2.4, Fig.-2)に見られるように、このアセトン可溶性脂質にはなおリン脂質が含まれており、アセトン分別処理は一回では不十分であったが、これをそのままアセトン可溶性脂質として用いた。

2.3 向流分配

脂質の向流分配についてはすでに多くの報告がある⁴⁾。ここでは石油エーテル(bp 40~60°C)と95%メタノールよりなる溶媒系で、100回の移行によってアセトン可溶性脂質の分離を行なった。向流分配装置はCDA-100型(柴田科学製)を使用した。100回の移行を行なった

のち、上相および下相を別々に取り出し、減圧下に溶媒を除いて得た残留物の重量によって向流分配曲線を作成した。その一例を、Fig.-1 に示した。

Fig.-1 Countercurrent distribution of acetone-soluble lipids of Japanese Littleneck.

図における各ピークの同定は、赤外線吸収スペクトルと薄層クロマトグラフィーによって行なった。これでおかるように遊離ステリンは上相に、またリン脂質は下相において分離できるが、ステリンエステルとグリセリドの分離はできなかった。

したがって、ステリンエステルとグリセリドの混合物の部分を集め、不ケン化物量を測定してステリンエステルとグリセリドの比を算出した。ただし脂肪酸の分子量は混合脂肪酸の中和価から算出した平均分子量を用い、ステリンは後述する7-デヒドロスチグマステリン $C_{29}H_{46}O$ (分子量410.7)として計算した。また遊離ステリンの量は向流分配において分離された重量を用い、ステリンエステルおよびグリセリドの重量と遊離ステリン重量の合計と、向流分配に用いた試料重量との差をリン脂質の量として、アセトン可溶性脂質の組成を求めた。

その結果を Table-2 に示す。

Table-2 Composition of acetone-soluble lipids of Japanese Littleneck.

Sample Composition (%)	April I	April II	August	December
Glycerides	52.3	53.3	51.6	54.2
Sterol, ester	8.5	8.8	8.1	7.8
Sterol, free	14.2	16.1	16.9	19.8
Phospholipids	25.0	21.8	23.4	18.2

2.4 薄層クロマトグラフィー

各成分の分離を調べるために薄層クロマトグラフィーを行なった。薄層クロマトグラフィー用シリカゲル、ワコーゲル B-5(和光純薬製)を用いてプレートをつくり

(シリカゲル層の厚さ 0.2 mm), 110°C で 30 min 活性化して使用した。展開溶媒は Malins, Mangold⁵⁾ による石油エーテル (bp 60~70°C)-エチルエーテル-氷酢酸 (90:10:1 vol/vol), および金子, 川西⁶⁾ によるジイソプチルケトン-氷酢酸-水 (40:25:3 vol/vol) を用いた。室温で 10 cm 展開し, 110°C で乾燥してスポットの検出を行なった。そのためには 50% 硫酸をスプレーして

Fig.-2 Thin-layer chromatograms of acetone-soluble lipids.

110°C に加熱するか, または 15% 三塩化アンチモン-クロロホルム 溶液を スプレーして 90°C に加熱した。

二種の展開溶媒によるアセトン可溶性脂質の薄層クロマトグラムを Fig.-2 に示した。スポット a, b, d は硫酸, 三塩化アンチモン溶液のいずれによっても茶カッ色であったが, スポット c は硫酸によって赤紫色, 三塩化アンチモン溶液で桃赤色を示し, また c' は硫酸, 三塩化アンチモン溶液のいずれによっても青灰色となった。それぞれのスポットは, 標準物質と同時に展開して同定を行なった。すなわちステリンとしては不ケン化物から分離した 7-デヒドロスチグマステリンを用い, グリセリドとしてはオリブ油を用いた。またコレステリンとパルミチン酸を反応させ, アルミナによるカラムクロマトグラフィーで分離したコレステリンパルミテートをステリンエステルの標準物質とした。またリン脂質としては, さきに分離したアセトン不溶部を用いた。

その結果, スポット a はステリンエステル, b はグリセリド, c は 7-デヒドロスチグマステリ

ン, d はリン脂質のスポットと一致した。また c' はその呈色および R_f 値から, c と異なるステリンと考えられる。

向流分配法で分離したそれぞれについて薄層クロマトグラフィーを行ない, その成分を決定した。

2.5 不ケン化物

常法によって分離した不ケン化物は橙色の結晶である。その 0.1208 g は 1% ジギトニン-エチルアルコール (90%) 溶液によって, 不溶性 ジギトニド 0.2475 g を生じ, ステリン含量 51.2% を示した。

この不ケン化物のケイ酸 (Mallinckrodt 製 100 mesh) カラムクロマトグラフィーによって, 石油エーテル (bp 40~60°C)-エーテル (70:30 vol/vol) で溶出する結晶を, アセトンおよびメタノールで再結晶し mp 138~140°C, $[\alpha]_D^{25} -39^\circ$ (クロロホルム) の結晶を得た。これをピリジン-無水酢酸でアセチル化し, メタノールで再結晶して mp 127~128°C の結晶を得た。それぞれの赤外線吸収スペクトル (KBr 錠剤法) を Fig.-3, 4 に示した。

またこのステリンの紫外線吸収スペクトルは Fig.-5 に示すように, その吸収極大の波長は松本, 田村²⁾ によってアサリから, また高木ら⁷⁾ によってマボヤから分離されたステリンの値と一致する (Table-3)。

またアセタートの赤外線吸収スペクトルも高木らの結果とまったく一致した。したがってこのステリンは 7-デヒドロスチグマステリンとされるが, 精製不十分で融点, 旋光度は低い値を示した。

不ケン化物を含水メタノールで 2 回結晶を分離した橙

Fig.-3 Infrared absorption spectrum of sterol obtained from unsaponifiables (KBr).

Fig.-4 Infrared absorption spectrum of sterol acetate (KBr).

Fig-5 Ultraviolet absorption spectrum of sterol obtained from unsaponifiables (EtOH).

Table-3 Ultraviolet absorption of 7-dehydrostigmasterol.

Author	$\lambda_{\max}$ (m μ)		
Matsumoto, Tamura ²⁾	271.5	282	293
Takaki <i>et al.</i> ⁷⁾	271	282	294
Observed	272	282	292

色の溶液からメタノールを除き、石油エーテルで抽出して結晶を交えた赤カッ色の樹脂状物を得た。このものは $[\alpha]_D^{25} = -8^\circ$ (クロロホルム) で、ジギトニン法によるステリン含量 23.7% であった。その 0.18 g についてケイ酸カラムクロマトグラフィーを行ない、エーテル-石油エーテル (50:50) で溶出した 0.09 g は、その赤外線吸収スペクトルおよび薄層クロマトグラフィーによって 7-デヒドロスチグマステリンと見なされるが、さらにエーテル-メタノール (75:25) で溶出したもの 0.04 g はこれと異なるステリンを含むと考えられたので、再びケイ酸カラムクロマトグラフィーを行なった。そしてエーテル-石油エーテル (50:50) で溶出するわずかに黄色を帯びた結晶 0.01 g をとった。このものは赤外線吸収スペクトル (Fig.-6) から、7-デヒドロスチグマステリンとは異なるステリンと思われる。

Fig-6 Infrared absorption spectrum of unidentified sterol (KBr).

このものについて Liebermann-Burchard 反応を行なうと黒青色から暗緑色となったが、一方 7-デヒドロスチグマステリンは桃赤色を示し、しだいに赤紫色から暗緑色となった。また紫外部に吸収極大を示さなかった。薄層クロマトグラフィーによっては、ジイソブチルケトン-氷酢酸-水で展開して R_f 0.67 に灰青色のスポットを与えたが、7-デヒドロスチグマステリンは R_f 0.78 に赤紫色のスポットを示した。したがって Fig.-2 の薄層クロマトグラムに示した c' のスポットに相当するものである。

これらの結果から、アサリ脂質の不ケン化物にはすでに報告された 7-デヒドロスチグマステリンのほか、微量のこれと異なるステリンの存在が示されるが、それを決定するには至らなかった。

3 考 察

辻本、小柳 (昭和 8 年 6 月実験) は、アサリよりアルコール-エーテルで抽出して 2.0% の抽出物を得、そのアセトン可溶部は 35.9% であると報告した。Table-1 のように、本実験でもほぼ一致する結果を得たが、12 月採取の試料では総脂質がやや多いようである。貝類の脂質の季節的変化については、増本⁸⁾によってマガキ *Ostrea gigas* Thunberg が 12 月から脂肪量を増し、4 月が最も多く、8 月に産卵を終わって急激に減少することが認められている。アサリの産卵期については、春から秋にわたり、その生棲環境によって一定しないようである^{注 1)}。Table-1 の結果からみると 4 月はすでに脂質量が低下している。しかしほぼ同時期に別に入手した試料についての結果と比較すれば、季節のみによって結論づけることはできぬようである。

注 1) 広島大学教養部生物学教室小林教授による。記して厚く感謝する。

アセトン可溶性脂質の定数については辻本、小柳によれば、酸価 17.2、ケン化価 103.2、ヨウ素価 188.7、不ケン化物 45.7% とされている。Table-1 の結果をこれと比較すると多少の差異が認められる。またその組成 (Table-2) については、季節的に多少の変動があるが、さして大きなものとはいえない。

終わりに種々御指導をいただいた広島大学理学部松浦教授に厚く御礼申し上げる。

昭和 40 年 10 月 油化学研究発表会において発表。
(昭和 40 年 8 月 21 日受理)

文 献

- 1) 辻本、小柳、工化、**37**, 175 (1934)
- 2) 松本、田村、日化、**77**, 1596 (1956)
- 3) J. Folch *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **191**, 833 (1951)
- 4) たとえば、D.G. Therriault, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **40**, 395 (1963)
- 5) D.C. Malins, H.K. Mangold, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37**, 576 (1960)
- 6) 金子、川西、油化学、**12**, 597 (1963)
- 7) 高木、前田、外山、日化、**78**, 88 (1957)
- 8) 増本、日化、**62**, 547 (1941)