Fig.-6 Relation between polymorphism of the binary system tristearin-tripalmitin.

と融点付近の温度とで測定してみると 3.85 Å の回折線のいくつかの角度移動を認める点を除きその回折図形はほとんど変化していない。この事実は室温においても β 形を完全には示さない deformed β が存在することを示していると考ええる。

このようにして固溶体は X 線回折図形からみると $\alpha \rightarrow \beta'^* \rightarrow \text{intermediate} \rightarrow \beta^* \rightarrow \text{deformed } \beta^* \rightarrow \beta$ と進行するように観察されるが変態の変化としては $\alpha \rightarrow \beta'^* \rightarrow \text{deformed } \beta^* \rightarrow \beta$ と進行すると考えられる。

以上の結果をまとめて トリステアリン-トリパルミチン二成分系の多形間の転移とその X 線回折図形との関連を Fig.-6 にまとめて示した。

付記 本実験において トリステアリンの一部(トリステアリン A)を恵与されかつ貴重なご助言をいただいた東京工業試験所 5 部加藤秋男技官, ガスクロマトグラフィーによる分析をしていただいた中里 敏, 樋口勝彦技官に厚く感謝の意を表します。(昭和 42 年 4 月 12 日受理)

文 献

- 1) M.G.R. Carter, T. Malkin, *J. Chem. Soc.*, **1947**, 554
- 2) E.S. Lutton, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **27**, 276 (1950)
- 3) C.W. Hoerr, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37**, 539 (1960)
- 4) K.S. Markley "Fatty Acids", Vol. 1, p. 285 (1960) Interscience, New York
- 5) C.W. Hoerr, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **41** (July), 32 (1964)
- 6) V. Vand, *Acta Cryst.*, **4**, 465 (1951)
- 7) 後藤, 浅田, 化学の領域増刊, X 線工業分析第 3 集, p. 87 (1966), 南江堂
- 8) F.L. Jackson, E.S. Lutton, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4519 (1950)
- 9) L.H. Jensen, A.J. Mabis, *Acta Cryst.*, **21**, 770 (1966)

リン脂質およびその加水分解生成物の抗酸化作用 (第 6 報)

アミングループを有するリン酸エステルの抗酸化作用機構と レシチンの抗酸化作用に関係する分子の配座構造

浦上 智子・梅谷 恵子・森川 尚子

大阪市立大学家政学部 (大阪市西区北堀江御池通)

Antioxidant Activity of Glycerolphosphatides and their Hydrolysis Products. VI. A Mechanism for the Phosphate Esters Containing the Amino Group and the Molecular Conformations of Lecithin in Relation to its Antioxidant Activity

Chieko URAKAMI, Keiko UMETANI and Naoko MORIKAWA

Food and Nutrition, Faculty of the Science of Living

(Miike-dōri, Kitahoriye, Nishi-ku, Osaka)

Phosphorylcholine (PC), phosphorylethanolamine (PE), glycerylphosphorylethanolamine (GPE) and glycerylphosphorylcholine (GPC) exhibited antioxidant activities in a concentration range from 0.01 to 0.04% in unsaturated fatty acid esters, and these compounds as well as β-glycerolphosphoric acid (β-GP) and tributyl phosphate (TBP) showed synergistic activities with hydroquinone. The infrared spectrum of methyl linoleate (MeL) containing 0.03 % of GPC showed the same characteristic absorption bands as those observed in the case of β-GP and TBP added to the same substrate. These results suggest that a mechanism for the antioxidant activity of GPC also involves an interaction of the PO group possibly with the α-methylene group of the MeL molecule. Accordingly, a mechanism for the synergism shown by GPC, β-GP and TBP with hydroquinone and that reported by Olcott³⁾ for lecithins and inositol phosphatides with ethoxyquin may not conform with the general concept that phosphate esters act as hydroperoxide decomposer.

Since the results of alcoholysis of lecithins indicated that the glyceryl moiety of lecithin molecule in organic solvents is chiefly in the trans-trans conformation⁷⁾, the phosphorylcholine group is presumably sterically hindered by the α -acyl group in such a way that the PO group cannot interact with the substrate molecule; this may explain the ineffectiveness of lecithins as an antioxidant in liquid substrates. On the other hand, lecithins comprising a large proportion of the gauche-trans conformation with the least steric hindrance on the PO group (under a certain condition), and lecithins in the solid form with the conformation suggested by Sundarlingam and Jensen¹⁷⁾, would show an antioxidant activity; and this may be considered as reasonable for the antioxidant activity exhibited by phospholipids in solid substrates containing protein^{18), 19)}.

1 緒 言

さき到高純度の卵黄ケファリンおよびジパルミトイルケファリン (合成品) をオレイン酸メチルに 0.12% 添加し 50°C で抗酸化作用を調べた結果, いずれも作用を示さなかった¹⁾. さらに同条件下でこれらのリン脂質および牛肝より得たセリンリン脂質を 0.4% 添加して調べたところ, むしろ酸化促進作用を示し, その順序はセリンリン脂質 > 卵黄ケファリン > 合成ケファリンであった²⁾. Olcott ら³⁾ も分子蒸留したメンヘーデン油に 3.5~4.2% のジパルミトイルケファリンおよびレシチンを添加した場合抗酸化作用がないことを示し, これらは ethoxyquin のシネルジストであると報告し, また Ghahine ら⁴⁾ も同様な結果を得ている. レシチンに抗酸化作用がないことはよく報告されており, 両性イオンであるため作用がないと考えられてきた^{5), 6)} が証明はなされていない. 他方リン脂質から脂肪酸を除去したグリセリルホスホリルエタノールアミン (GPE) およびグリセリルホスホリルセリンはオレイン酸メチル基質中でかなり強い作用を示した²⁾.

そこで今回はリン脂質加水分解物で窒素を有するリン酸エステルを中心にその抗酸化作用およびヒドロキノンとの相乗作用を不飽和脂肪酸エステル中で検圧法を用いて調べた. また液状基質中で抗酸化作用を示さないといわれているレシチンについて, その加水分解物であるグリセリルホスホリルコリン (GPC) がトリアルキルリン酸エステルおよび β -グリセロリン酸 (β -GP) と同様⁷⁾ に基質分子と相互作用するかどうかについて検討し, さらにレシチン分子の配座構造と抗酸化作用の有無について説明を試みた.

2 実 験

2.1 試料および方法

オレイン酸メチル (MeO) およびリノール酸メチル (MeL) は Nutritional Biochemical 社製の高純度のものを用いた. ガスクロマト分析の結果, MeO は飽和酸エステルを含有し 86% 純度のものではあったが MeL は単一物であった. 混合基質の場合は wt % を用いた.

ホスホリルエタノールアミン (PE) は L. Light & Co., Ltd. より購入したものである. ホスホリルコリン (PC) 塩化バリウム塩を Baer の方法⁸⁾ により合成し, 浦上らの方法⁹⁾ に従って遊離の PC を得た. GPE および GPC はカラムクロマト法で精製した卵黄ケファリンおよびレシチンを Hübscher らの方法¹⁰⁾ に従って加水分解して得たもので, ペーパークロマト法で単一物であることを確認した. β -GP およびトリブチルリン酸エステル (TBP) は前報⁷⁾ と同様のものを用いた. PE と TBP 以外の試料の濃度はリン定量⁷⁾ で決定した. ヒドロキノン¹¹⁾ は和光純薬のものを使用した.

自動酸化は前報⁷⁾ と同じ方法で誘導期を求めた. Table-1 に示した実験を除いて 40 mg の基質を使用した. 赤外線吸収スペクトルは前報⁷⁾ と同様な方法で測定した.

3 結果と考察

3.1 リン酸エステルの抗酸化作用

さきに A.O.M. 法で MeO を基質としてリン酸エステルの抗酸化作用を検討したが^{2), 6)}, 検圧法で同様な結果が得られるかどうか, ほかの基質の場合とあわせて実験を行なった. MeO を用いた予備実験で PC 0.028% が最適濃度であったので, これを基準にし, リン酸エステルのリン酸残基の濃度を同一に保ち各リン酸エステルの

Table-1 Antioxidant properties of the phosphate esters at a concentration of 8×10^{-3} m mol/50 mg of unsaturated fatty acid esters at 50°C.

Compd.	Concn., (%)	Induction period	
		MeO (day)	MeO+20% MeL (hr)
Substrate alone		4.6	14.0
PC	0.028	1.8	21.5
GPC	0.044	1.3	16.5
PE	0.023	5.8	14.5
GPE	0.034	8.5	7.0

MeO stands for methyl oleate, MeL methyl linoleate, PC phosphorylcholine, GPC glycerylphosphorylcholine, PE phosphorylethanolamine and GPE glycerylphosphorylethanolamine.

抗酸化力を比較した。結果は **Table-1** に示す。MeO 中では GPE が最も強い作用を示し、GPC は作用を示さない。これはさきに A.O.M. 法で得た結果^{3), 6)} と同じであった。20% MeL を添加した基質中では PC および GPC は明らかに作用を示したが GPE は作用を示さなかった。また表示は省略するが MeO に 40% のリノレン酸メチルを添加した基質中で検討した結果 GPE が最も強く、ついで GPC、PC の順であり、PE は作用を示さなかった。基質の相違により作用が異なるので、リン酸エステルの抗酸化力の相対的な比較は困難であり、この点については今後さらに検討する必要がある。**Table-1** に示した実験では GPC の濃度がほかのものに比べて高く、さらにこの分子は極性が強いので^{10), 11)} このような濃度では同一分子間の相互作用の方が GPC と基質分子との間の相互作用⁷⁾ に比べてより強いため、作用を充分示さないのではないかと考え、以後 0.01~0.04% 濃度範囲について検討した。

MeL を基質とした場合を **Table-2** に示す。 β -GP の 0.02% および 0.04% を除いてすべての化合物が作用を示し、GPE は GPC に比べてかなり強い。表示は省

Table-2 Antioxidant properties of the phosphate esters at various concentrations in 40 mg of methyl linoleate at 50°C.*

Substrate alone	Induction period (hr)			
	5.0	13.7	12.4	19.9
Concn. of phosphate ester (%)	0.01	0.02	0.03	0.04
PE	22.8	26.3	30.7	34.6
PC	16.2	29.1	32.2	29.5
GPE	46.8	47.1	47.2	49.5
GPC	14.6	24.1	29.5	29.5
β -GP	20.5	7.1	20.1	18.7

* The phosphate esters were compared at the respective concentration.

略するがこれらの化合物を MeO に 40% のリノレン酸メチルを添加した基質中で同一条件下で調べたところ、GPE および GPC は 0.03% 濃度で強い抗酸化作用を示した。

GPC 0.03% を添加した MeL の赤外線吸収スペクトルは **Fig.-1** に示すごとく、前報⁷⁾ で示した TBP および β -GP の場合と同じ傾向を示す（ただし 880 cm^{-1} の吸収はやや弱い）。したがって PO 酸素と MeL の α -メチレン基との間に水素結合の存在が推定される。

3.2 レシチン分子の配座構造と抗酸化作用

以上の結果から GPC および GPE は MeL 基質中で抗酸化作用を示すことは明らかである。したがってこれらのグループを有するレシチンおよびケファリンは抗酸化作用を示すべきであると考えられるが、前にも述べたごとく、液状基質中ではまったく作用を示さない。天然

Fig.-1 IR spectrum of methyl linoleate containing 0.03% of glycerylphosphorylcholine.

レシチンは高度不飽和脂肪酸を有している場合が多いのでこれが自動酸化開始にあずかり、油脂の酸化を促進する場合がある¹⁾。しかし飽和脂肪酸を有する合成レシチンおよびケファリンにはこのような促進作用はないがやはり抗酸化作用を示さない^{1), 3), 4)}。そこでレシチン分子およびケファリン分子では抗酸化作用に最も重要な役割を果たしている PO グループの部分が立体障害を受けているのではないかと考えられる。

これに関連して、著者のひとり最近レシチンのアルコールシスを行ない α および β -エステル結合の分解率を調べた結果、レシチン分子のグリセリン部分は有機溶媒中では主として *trans-trans* (I) の配座をしていると提案した¹²⁾。このほか、 β -位脂肪酸部分を PC 部分に対して *trans* に置いた場合、二つの *gauche-trans* (II, III) が考えられる。ここで R_α と R_β はそれぞれ α と β -位

の脂肪酸グループを示し、PC はホスホリルコリングループを示す。I の配座構造では PC が R_α により最も大きな立体障害を受け、このグループ間の障害は PC 部分が有機溶媒中で環状構造をしている¹⁰⁾ことが示されているのでさらに大きい。したがって抗酸化作用を示すために必要と考えられる PO グループが立体障害を受けるため抗酸化作用を示さないと考えられる。 R_α の PC に及ぼす障害は II の配座構造ではやや緩和され、III ではまったくなくなるので、III の配座構造が多い条件下ではレシチンは抗酸化作用を示すと考えられる。したがってレシチンおよびケファリンの抗酸化性の不一致（たとえば文献 1, 3, 4 に対して 13, 14, 15）は各立体配座の相対的な割合によるものと考えられる。最近 Sundarlingam-Jensen¹⁶⁾ は固体のレシチン分子のグリセリン部分は *gauche-gauche* で、リン原子の位置で直角に曲がり、PC の部分は環状ではなく開いた構造をしていると推定している。この構造では R_α および R_β は PC に

障害を与えないから抗酸化作用を示すと考えられる。したがって、基質が固体である場合 III の構造とあわせて重要な役割を果たすと考えられる。

Table-3 Effect of the phosphate esters on hydroquinone in 40 mg of methyl linoleate at 50°C.

Compd.	Concn.(%)	Induction period (hr)	
		Hq 10 μ g	Hq 20 μ g
Substrate alone		2.6	9.3
Substrate and Hq		250.6	299.7
PE	0.02	302.3	1,249.7
PC	"	402.2	705.1
GPE	"	612.0	961.4
GFC	0.04	211.8	727.4
β -GP	0.02	80.9	804.0
TBP	"	367.4	79.9

Hq stands for hydroquinone and TBP for tributyl phosphate.

固体基質に関連して、Bishov ら¹⁷⁾ および Togashi ら¹⁸⁾ はそれぞれ大豆タンパク質の乳化乾燥試料あるいはゼラチンフィルム上にリン脂質の層を作りその上に油脂の層を置いた場合の方がフィルム上に油脂ついでリン脂質を置いた場合より抗酸化効果が大きいことを報告している。この場合タンパク質の表面に分散したリン脂質の配座構造が前述のように関係しているのではないかと考えられ、今後さらに詳しく検討する余地がある。

3-4 リン酸エステルとヒドロキノンとの相乗作用

ヒドロキノン 10 μ g (0.099 μ mol) を用いた場合 GPC (0.056 mol) および β -GP (0.046 μ mol) は酸化促進作用を示したが、ヒドロキノン 20 μ g の場合には非常に強い抗酸化作用を示した。これに反して TBP (0.03 μ mol) は後者で酸化促進を、そして前者で相乗作用を示した。このことは PO グループも相乗作用に関与することを意味し、前報⁷⁾ およびさきに述べたごとく、これら三つの化合物すなわち GPC、 β -GP および TBP は基質分子と同じ傾向の相互作用をすると考えられるので、相乗作用の場合も同じ型の機構が部分的に関与しているのではないかと考えられる。通常リン酸エステル類およびリン脂質の相乗作用は過酸化化物分解作用によるといわれているが¹⁹⁾、GPC β -GP、TBP、レシチンおよびイノシットリン脂質³⁾ の場合は異なる機構による場合も考えられる。ただしケファリンおよびセリンリン脂質では第一アミンの過酸化化物分解作用が明らかにされているので^{19), 20)}、相乗作用の一部はこの分解作用によるものと思われる。このことは **Table-2** および **Table-3** に示すごとく、GPE の抗酸化剤および相乗作用剤として

の作用が常に GPC より強いという結果に反映されているのではないかと考えられる。PE と PC はリン酸残基の部分に 2 個の OH 基を有した酸性度は GPE、GPC より強いことが知られているので過酸化化物分解作用を示すと考えられないでもないが、もしこの作用のみにより抗酸化作用が現われるのであれば、前者は後者より強い作用を示すべきである。しかし **Table-2** に示す抗酸化作用では必ずしもそうではなく、GPE は PE より強い作用を、また PC と GPC との間にはあまり差はない。また相乗作用の場合 (**Table-3**)、20 μ g のヒドロキノンを添加した例でみると PE はたしかに GPE より強い相乗作用を示しているが、PC は GPC より弱い作用を示している。後者では添加濃度の差が影響していることが考えられるが、**Table-2** で示したごとく、0.02% の PC の誘導期は 0.04% の GPC のそれと同じであるから比較してもさしつかえない。したがってこれらの化合物の相乗作用をすべて過酸化化物分解作用に帰することは困難のように考えられ、今後リン酸化化合物と基質分子との相互作用を考慮に入れて検討する必要がある。

(昭和 41 年 11 月 15 日受理)

文 献

- 1) 浦上, 田中, 安原, 亀山, 栄食, **13**, 87 (1960)
- 2) 浦上, 山口, 藤原, 高橋, 阪市家記, **10**, 1 (1962)
- 3) H.S. Olcott, J. van der Veen, *J. Food Sci.*, **28**, 313 (1963)
- 4) M.H. Ghahine A.F. El-Shobaki, *Grassa Aceites*, **14**, 116 (1963); *C.A.*, **60**, 3417 e
- 5) V.P. Calkins, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 384 (1947)
- 6) C. Urakami, H. Kameyama, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **33**, 29 (1960)
- 7) 浦上, 亀山, 森川, 梶本, *油化学*, **16**, 123 (1967)
- 8) E. Baer, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1253 (1947)
- 9) G. Hübscher *et al.*, *J. Lipid Res.*, **1**, 433 (1960)
- 10) M.B. Abramson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **204**, 2389 (1965)
- 11) J.E. Garvin, M.L. Karnovsky, *J. Biol. Chem.*, **221**, 211 (1956)
- 12) Y. Fujiwara, M. Masuoka, C. Urakami, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **40** (1), 230 (1967)
- 13) P. Desneulle *et al.*, *Bull. soc. chim. France*, **1953**, 595
- 14) A.C. Candela, G. Jacini, *Olii Minerali Grassie Saponi Colori e Vernici*, **N 4**, 110 (1959)
- 15) W. Haab, *Milchwiss.*, **14**, 16 (1959)
- 16) M. Sundarlingam, L.H. Jensen, *Science*, **150**, 1035 (1965)
- 17) S.J. Bishov *et al.*, *Food Res.*, **25**, 174 (1960)
- 18) H.J. Togashi *et al.*, *Food Res.*, **26**, 186 (1961)
- 19) K.U. Ingold, *Chem. Revs.*, **61**, 584 (1961)
- 20) H.S. Olcott, E. J. Kuta, *Nature*, **183**, 1812 (1959)