牛乳および人乳のリン脂質に関する研究 (第 2 報)

Studies on the Phospholipids in Cow's and Human Milk (Part 2)

薄層クロマトグラフィーによるリン脂質の定量

Quantitative analysis of phospholipids by thin layer chromatography

(昭和 40 年 8 月 20 日 受理)

長 沢 太 郎 岡 木 岱 造 工 藤 力
(Taroh Nagasawa) (Taizoh Ryohki) (Tsutomu Kudoh)

The phospholipids from cow's and human milk were extracted by the modified Rse-Gottlieb method and separated to their components by thin layer chromatography. These components were identified by infrared spectrophotometry and R_f value and visualization of thin layer chromatogram, and then analyzed by colorimetric method. Analysis of phospholipids from cow's and human milk gave the following results (in moles %): lysophosphatidylcholine, 5.51, 2.52; sphingomyelin, 17.94, 25.08; phosphatidylcholine, 27.77, 46.96; and cephalin, 48.77, 25.44, respectively.

リン脂質の生体への作用はあまり深く究明されていないが、血液の凝固活性³⁴⁾、血清抗体価の増加³⁵⁾などが報告されている。リン脂質を経口的に摂取した場合の生理作用について Piirsalu³⁶⁾ が脱脂乳で育てた動物は全乳を与えたものより血中のリン脂質量が多くなることを報告している。またリン脂質の酸化におよぼす影響^{37)~39)}、乳腺における合成⁴⁰⁾に関する報告もある。

牛乳および乳製品のリン脂質に関する研究は Rhodes¹⁷⁾, Sprecher³³⁾ などがカラムクロマトグラフィーによりまた McDowell¹⁸⁾ は溶媒分画法によりそれぞれ分離している。薄層クロマトグラフィーによる報告は Badings¹²⁾ が 1962 年に行ない、最近 Patton³¹⁾ はクリーム、脱脂乳、バターミルク中のリン脂質について行なっている。

本報では Stahl¹⁵⁾ によって開発されて以来脂質の分析に数多く応用されている薄層クロマトグラフィーを用い^{1)~(4), 16)}、前報¹⁰⁾と同様にして牛乳および人乳から分離したリン脂質中の各成分を定量した。

なお本報では次のような略語を用いた。

TLC : 薄層クロマトグラフィー。

LPC : Lysophosphatidylcholine.

PC : Phosphatidylcholine. Cep : Cephalin

Sph : Sphingomyelin. Cer : Cerebroside

実 験 方 法

(1) 試 料

供試試料は前報¹⁰⁾と同様である。

(2) 薄層の製作

薄層は Wagner¹⁰⁾ の方法を改良して行なった。すなわち水 20ml に 0.5g の特級アンモニウムミョウバンを溶解し、これに Silica Rider (第一化学薬品製) 10g を懸濁させ、Applicator (東洋科学産業製) により 0.3mm の層厚で 5×20cm のガラス板 5 枚に塗布した。このガラス板を水平な台におき風乾し、使用前に 120°C で 1 時間加熱した。

(3) 試料のスポットおよび展開

試料 50mg を 1ml のクロロホルムに溶解し、Micro Jector (三陽理化学製) により 5μl をスポットし、展開溶媒で飽和した槽内で上昇法により 12cm (約 40 分間) 展開した。展開溶媒は Wagner¹⁰⁾ と同様クロロホルム 65 : メタノール 25 : 水 4 (容量) を用いた。

(4) スポットの発色

スポットの発色は次の 4 種の試薬を用い、各試薬に対する発色を検討した。リン脂質全般の発色にはローダミン B¹¹⁾、モリブデン酸アンモン、過塩素酸²⁰⁾、choline 含有リン脂質の発色には Dragendorff 試薬¹⁴⁾、アミノ基含有リン脂質の発色には ninhydrin 試薬を用いた¹⁴⁾。

(5) スポットの赤外線吸収スペクトル

前記の方法で作成した 20×20cm ガラス板に試料を帯状に吸着させて展開し、展開後ガラス板の両端をローダミン B 試薬により発色させ、相当する部分の薄層を削り取って Skipski⁹⁾ の方法によりリン脂質を抽出し、溶媒を減圧留去し各分画から得た 0.5~2mg の試料を KB₂ 錠

剤とし、日立赤外分光光度計 EPI-S2型により吸収スペクトルを測定した。

(6) リン脂質の定量法

Wagner¹³⁾の方法によった。

実 験 結 果

(1) リン脂質のTLC

牛乳および人乳のリン脂質からはそれぞれ5, 4個のスポットが得られた。各試薬に対するスポットの発色は第1表の通りであり、クロマトグラムは第1図の通りである。各スポットはよく分離し Rf 値は ± 0.05 以内に一定していた。各試薬に対する発色は良好であったが、

Table 1. Identification and Rf value of each phospholipid spot from cow's and human milk

Spot No.	(1)		(2)		(3)		(4)		Rf value	
	C	H	C	H	C	H	C	H	C	H
2	+	+	+	+	+	+	-	-	0.09±0.04	0.09±0.04
3	+	+	+	+	+	+	-	-	0.21±0.03	0.20±0.02
4	+	+	+	+	+	+	-	-	0.33±0.04	0.35±0.03
5	+	-	+	-	-	-	+	-	0.57±0.03	—
6	+	+	+	+	-	-	+	+	0.65±0.03	0.65±0.03

(1): Rhodamin B, (2): Ammonium molybdate-HCl O₄, (3): Dragendorff's and (4): Ninhydrin reagent. C: cow's milk, H: human milk.

ninhydrin に対する発色はやや不鮮明なものもあった。試薬中の糖脂質の混入を Wagner¹⁰⁾ の diphenylamine 試薬により検討したが検出されなかった。

牛乳のリン脂質には Rf 値が 0.60 と 0.67 の2つが検出されたが、人乳では0.67のスポットのみ検出された。

(2) スポットの赤外線吸収スペクトル

各スポットの赤外線吸収スペクトルは第2図に示す通りであり Smith²¹⁾ の報告, Rf 値および各試薬に対する発色から (b)は LPC, (c)は Sph, (d)は PC, (e)は Cep である。

(3) リン脂質の定量

Fig. 1 Thin layer chromatogram of phospholipids from cow's (left) and human (right) milk

These chromatograms were visualized by ammonium molybdate-perchloric acid reagent.

1. Origin.
2. Lysophosphatidylcholine.
3. Sphingomyelin.
4. Phosphatidylcholine.
- 5 & 6. Cephalin.
7. Front of solvent.

Fig. 2 Infrared spectrum of total cow's milk phospholipid and its components which were separated by TLC

- (a): Total phospholipid.
- (b): Spot 2.
- (c): Spot 3.
- (d): Spot 4.
- (e): Spot 5+6.

牛乳および人乳リン脂質の定量結果は第 2 表の通りである。牛乳では全リン脂質中の約 50% が Cep よりなり残りの 50% が choline を含むリン脂質からなる。一方人乳では choline を含むリン脂質が 73% を占めている。

考 察

薄層の製作には Phillips¹⁾, Robinson⁴⁾, Vogel¹¹⁾ は

純水を用いているが, Mangold¹⁰⁾ は硫酸の 10% 溶液に吸着剤を懸濁させたものを用い, その他 0.01M 炭酸ソーダ⁹⁾, 5% のリン酸アンモニウム¹⁰⁾ なども用いられている。これらの場合いずれもリン脂質のシリカゲルへの吸着を無機イオンが特異的に妨害し, 特定成分の分離能の向上を目的としている。本報では分離能の比較から, 5% アンモニウムミョウバン溶液が最良の結果を得た。

Table 2. Quantitative analysis and recovery of cow's and human milk phospholipids

	Mean value of P from each spot (γ)		Ratio of each component (%)	
	Cow's	Human	Cow's	Human
Lysophosphatidylcholine	0.58 (0.06)*	0.29 (0.07)*	7.38** (5.51)***	3.47** (2.52)***
Sphingomyelin	1.31 (0.08)	2.00 (0.09)	16.68 (17.94)	23.92 (25.08)
Phosphatidylcholine	2.09 (0.30)	3.86 (0.10)	26.59 (27.77)	46.17 (46.96)
Cephalin	3.88 (0.29)	2.21 (0.07)	49.37 (48.77)	26.44 (25.44)
Total (γ)	7.86 (0.08)	8.36 (0.16)		
Applied (γ)	8.58	9.10		
Recovery (%)	91.57 (0.92)	91.90 (1.85)		

*: Standard deviation. **: Lipid-P %. ***: Mole %. Assuming following average molecular weights: Lysophosphatidylcholines 578, Sphingomyelins 831, Phosphatidylcholines 806, Cephalins 744.

展開溶媒も各種有機溶媒の種々の割合の混合物が用いられている。本報ではリン脂質の分離に広く用いられているクロロホルム, メタノール, 水, 酢酸を各種の割合で混合した溶媒について, 牛乳リン脂質を用いてその分離能を検討した。その中でクロロホルム, メタノール, 水の比が容量で 65:30:5 と, 65:25:4 がほぼ同じような結果を示した。しかし前者では展開剤に浸した部分の薄層が脱落する場合が多く定量分析には後者を用いた。

リン脂質の TLC に関して, 本報で用いた方法が各成分をよく分離することができたが phosphatidylserine と phosphatidylethanolamine は分離できなかった。Skipski²⁰⁾ は炭酸ソーダまたは酢酸ソーダを含む薄層によりリンの両成分を分離できると報告しているが, 本報ではこれらの成分を一括して定量した。

各成分の分離能は薄層の加熱温度, 時間により影響を受けるので使用前に正確に行なわなければならない。

ガラス板に塗布する試料の量はリンの定量を行なうためにできるだけ多い方が望ましいが, 各成分の分離を考慮すれば 250 γ が限度である。

リン脂質の赤外線分析はあまりよく研究されていないが, 合成 Cep²¹⁾, PC²³⁾ のスペクトルが測定され, Sph²⁴⁾ についても検討されている。最近 Smith²¹⁾, Schwarz²⁵⁾, Wagner¹²⁾ らが詳細に検討している。リン脂質各成分の主な吸収帯は Sph に -CONH- による強い吸収が 1639 cm^{-1} と 1538 cm^{-1} に表われること, PC と Cep には

1724 cm^{-1} にカルボニルエステルによる強い吸収がありこれは Sph がないことおよび PC は 970 cm^{-1} に P=O による吸収を示すが Cep にはない。しかし PC と LPC の区別は明らかではなく Wagner¹³⁾ によれば 3333 cm^{-1} における -OH の吸収により判定されると報告しているが本報では確認できなかった。

TLC によるリン脂質の定量法には本報で用いた Wagner¹³⁾ の方法, Skipski⁹⁾ の方法, 面積法および Densitometry などがあるが, 精度, 操作の点から Wagner の方法が良い。

リン脂質の定量分析では回収率も良く, 第 2 表に示すように再現性もすぐれていた。この結果を Baliga²⁶⁾, McDowell²⁷⁾, Smith²¹⁾ (以上の報告ではリン脂質中の各成分のリンの比率で示している), Deutsch²⁸⁾, Koops³⁰⁾, Rhodes¹⁷⁾ (以上の報告ではリン脂質中の各成分のモル比で示している) らの値と比較したのが第 3 表である。

本報の値は Sph, PC が他の研究者の値よりやや低く Cep は Baliga, Koops の値に近い。これらの報告と比較して最も大きな相違は LPC が検出されたことおよび Sph が少ないことである。リン脂質中の各成分の分析値は研究者により異なった値を示しているが, その大きな原因は試料の調製法にある。この点に関して McDowell¹⁸⁾ は種々の抽出法による PC, Sph, Cep の変動を詳しく検討し, エーテル, 石油エーテルを用いた Rösse-Gottlieb 変法が良いことを示し, 同一の牛乳から得た脱脂乳, バ

Table 3. Composition of major phospholipid classes found in cow's milk by various investigators

	Lipid-P %				Mole %			
	Present study	Baliga ²⁶⁾	McDowell ²⁷⁾	Smith ²¹⁾	Present study	Rhodes ¹⁷⁾	Deutsch ²⁹⁾	Koops ³⁰⁾
Lysophosphatidylcholine	7.38				5.51			
Sphingomyelin	16.67	25	30.2	24	17.94	19	23	25
Phosphatidylcholine	26.59	30	29.3	32	27.77	33	33	30
Cephalin	49.37	45	40.5	35	48.77	48	38	45

ターのリン脂質中の各成分の間には大きな差異はないと報告している。Rhodes¹⁷⁾ は第3表に示した他に plasmalogen 3.3%および inositol を含むリン脂質 5%の存在を明らかにしている。

人乳のリン脂質は牛乳と異なって PC が最も多く含まれている。この組成の相違が何を意味するか現在の段階では明らかにできないが、生理学的な作用および乳汁中の脂肪の安定性に関係があるものと推定される。

牛乳中の脂肪は飼料、季節などにより含量、脂肪酸組成が変動することはすでに知られている。リン脂質についても McDowell²⁷⁾, Baliga⁴¹⁾ が秋期には含量が高く、冬期には低くなることを報告している。人乳についてもリン脂質が泌乳期、季節などにより変動することが考えられるが、この点に関しては後日検討する。

要 約

牛乳および人乳から Röse-Gottlieb 変法によりリン脂質を抽出し、TLC により各成分を分離した。各々の成分を試薬に対する発色、Rf 値および赤外線吸収スペクトルから同定し、比色法により定量した。リン脂質中の各成分の組成は人乳では LPC: 2.52, Sph: 25.08, PC: 46.96 および Cep: 25.44, 牛乳では LPC: 5.51, Sph: 17.94, PC: 27.77 および Cep: 48.77 (いずれもモル%) であった。

文 献

- 1) B. M. Phillips : *Clin. Chim. Acta*, 8 : 832(1963)
- 2) M. William : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 113: 91 (1963)
- 3) O. Renkonen : *Acta Chem. Scand.*, 17 : 1925 (1963)
- 4) N. Robinson : *Clin. Chim. Acta*, 8 : 385 (1963)
- 5) H. Wagner : *Biochem. Z.*, 336 : 380(1962)
- 6) M. Lepage : *J. Chromatog.*, 13 : 99 (1964)
- 7) D. E. Bowyer : *Biochem. J.*, 89 : 24 (1963)

- 8) A. N. Davis : *ibid.*, 87 : 31 (1963)
- 9) V. P. Skipski : *ibid.*, 90 : 374 (1964)
- 10) H. Wagner : *Biochem. Z.*, 334 : 175 (1961)
- 11) W. C. Vogel : *J. Lipid Res.*, 3 : 138 (1963)
- 12) H. Wagner : *Fette, Seifen, Anstr.*, 62 : 1115 (1960)
- 13) H. Wagner : *ibid.*, 63 : 1119 (1961)
- 14) W. Schlemmer : *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 37: 134 (1961)
- 15) E. Stahl : *Chemiker Ztg.*, 82 : 323 (1958)
- 16) H. K. Mangold : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 38 : 708 (1961)
- 17) D. N. Rhodes : *J. Dairy Res.*, 25 : 60 (1958)
- 18) A. K. R. McDowell : *J. Dairy Res.*, 25 : 192(1958)
- 19) 長沢 : 本誌, 17 : 68 (1964)
- 20) V. P. Skipski : *J. Lipid Res.*, 3 : 467 (1962)
- 21) L. M. Smith : *J. Dairy Sci.*, 42 : 1450 (1959)
- 22) E. Bear : *J. Am. Chem. Soc.*, 74 : 152 (1952)
- 23) E. Bear : *ibid.*, 75 : 621 (1953)
- 24) G. Marinetti : *J. Am. Chem. Soc.*, 76 : 1347 (1954)
- 25) H. P. Schwarz : *Ann. N.Y. Sci.*, 69 : 116(1957) [*Chem. Abstr.*, 52 : 4780d (1958)]
- 26) B. S. Baliga : *Indian J. Dairy Sci.*, 8 : 119(1955) [*Chem. Abstr.*, 50 : 5184a (1956)]
- 27) A. K. R. McDowell : *J. Dairy Res.*, 25 : 202 (1958)
- 28) C. G. Honegger : *Helv. Chim. Acta.*, 45 : 281 (1962) [*Chem. Abstr.*, 58 : 812b (1963)]
- 29) A. Deutsch : *Alnarp Dairy Res.*, 54 : 1 (1958)
- 30) J. Koops : *Neth. Milk. Dairy J.*, 12 : 226(1958) [*Chem. Abstr.*, 53 : 5532h (1959)]
- 31) S. Patton : *J. Dairy Sci.*, 47 : 489 (1964)
- 32) H. T. Badings : *Neth. Milk Dairy J.*, 16 : 217 (1962)
- 33) H. W. Sprecher : *J. Agr. Food Chem.*, 13 : 17 (1965)
- 34) J. D. Billimoria : *Biochem. J.*, 78 : 185 (1961)
- 35) A. W. Pound : *J. Pathol. Bacteriol.*, 75 : 55(1958)
- 36) H. Piirsalu : *Izvest. Akad. Nauk. Eston., S.S.R.*, 6 : 272(1957) [*Chem. Abstr.*, 54 : 18720d(1960)]
- 37) W. Haab : *Intern. Dairy Congr.*, Proc. 15th Congr., London, 3 : 1743(1959)
- 38) W. Haab : *Milchwiss.*, 14 : 16 (1959)
- 39) T. A. J. Payens : *Neth. Milk Dairy J.*, 13 : 237 (1959)
- 40) S. Patton : *J. Dairy Sci.*, 46 : 396 (1963)
- 41) B. S. Baliga : *Indian J. Dairy Sci.*, 9 : 24 (1956) [*Chem. Abstr.*, 50 : 13318h (1956)]

(森永乳業株式会社中央研究所)