牛乳のスフィンゴミエリン*

藤野安彦, 山吹佐和子**, 伊藤精亮, 根岸 孝

(帯広畜産大学農産化学科)

昭和 44 年 4 月 19 日 受理

Sphingomyelin in Cow's Milk

By Yasuhiko FUJINO, Sawako YAMABUKI, Seisuke ITO and Takashi NEGISHI

Department of Agricultural Chemistry, Obihiro Zootechnical University

Bovine milkfats contain about 1% phospholipids, of which sphingomyelin, N-acyl-sphingosylphosphorylcholine, is one of the representatives in quantity together with lecithin and cephalin. The present paper describes composition of the constituents of the long chain acid as well as the long chain base in sphingomyelin purely isolated from cow's milk. As the component fatty acids, nineteen ones were found between the range of C_{12} and C_{24} . The greater part of them belonged to the long chain saturated acids, among which $C_{23:0}$, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$ and $C_{16:6}$ were predominant in decreasing order. As the component long chain bases, seven kinds, namely, C_{18} -sphingosine, C_{16} -sphingosine, 16-methyl- C_{17} -sphingosine, C_{16} -dihydrosphingosine, C_{17} -sphingosine, C_{18} -dihydrosphingosine and probably 17-methyl- C_{18} -sphingosine were detected in decreasing sequence. The dominating bases were C_{18} -sphingosine and C_{16} -sphingosine.

(Received April 19, 1969)

緒 言

牛乳は約 3.3% の脂質を含むが, この中のほぼ 1% を占める複合脂質は, 乳脂肪球の構成成分として重要な役割をはたし, また乳および乳製品のフレーバーの生成に関連があるとされている. 複合脂質には, リン脂質と糖脂質があるが, 牛乳中に糖脂質は少なく, 複合脂質の大部分はレシチン, ケファリン, スフィンゴミエリンを主成分とするリン脂質である⁽²⁾. このうち, レシチンとケファリンについては昔から知られていたが, スフィンゴミエリンについては近年までその存在さえ明らかでなく⁽³⁾, 実験技術の進歩によってこのごろようやく分離, 定量, 分析に関する研究が行なわれるようになってきたのが実状である. スフィンゴミエリンは, 脂肪酸, スフィンゴシン塩基, リン酸およびコリンを成分とし, N-アシルスフィンゴシルホスホリルコリンの構造を有する一種のリン脂質であるが, 従来, 牛乳スフィンゴミエリンの研

究の多くはその定量ないし脂肪酸組成に向けられていて, その長鎖塩基の組成については全く調べられていなかった. われわれは牛乳からスフィンゴミエリンを純粋に分離し, その脂肪酸組成を従来の文献と対比して調べるとともに, これまで未知であったスフィンゴシン塩基の組成を明らかにしたので報告する.

実 験 方 法

1. スフィンゴミエリンの分離 ホルスタイン種の牛乳 12 l に 4% トリクロル酢酸を加えて脂質を乳タンパクとともに沈殿させた後, 沈殿部分を水洗し凍結乾燥した. 約 700 g の乾燥粉末に 3 倍量のクロロホルム-メタノール (2:1) を加えて全脂質を抽出し, 抽出液を減圧濃縮した後アセトン処理して約 10 g の白色粉末の複合脂質画分を得た. これを次のようなケイ酸カラムクロマトグラフィーに供して精製した. すなわち, ケイ酸 (Mallinckrodt, 100 mesh)-セライト (2:1) 75 g を直径 2 cm, 長さ 70 cm のカラムに充填し, 試料をクロロホルム 1000 ml, アセトン 500 ml, クロロホルム-メタノール (4:1) 500 ml, 同 (3:2) 500 ml, 同 (1:1) 750 ml, 同 (1:4) 500 ml, メタノール 500 ml で順次

* 本研究の要旨は日本畜産学会第 55 回大会 (昭和 43 年 8 月 31 日~9 月 1 日, 帯広) で講演した. また, その一部は日本畜産学会報⁽¹⁾に発表した.

** 現在, 文化女子大学室蘭短期大学

Fig. 1. Silicic Acid Column Chromatogram of the Complex Lipids from Milk.

- a : cephalin
b : phosphatidyl choline
c : sphingomyelin
d : lysophosphatidyl choline

に溶出させた。溶出液を 50 ml ずつ分取し、それぞれのリンを測定⁽⁵⁾して得た曲線を Fig. 1 に示す。薄層クロマトグラフィーにより、Fig. 1 の主ピーク、a, b, c, d はそれぞれセファリン、レシチン、スフィンゴミエリン、リゾレシチンに該当することが認められた。このうちスフィンゴミエリンのフラクションを集め、Dawson 法⁽⁶⁾によりアルカリ加水分解を行なって混在する少量のグリセロリン脂質を除去した後、再びクロロホルム-メタノールを溶出溶媒とする上述のケイ酸カラムクロマトグラフィーに供し、溶出物をエーテルから再結して純スフィンゴミエリンの白色結晶状粉末 300 mg を得た。

2. スフィンゴミエリンの加水分解

a) 脂肪酸画分の調製 : スフィンゴミエリン 10 mg に 5% メタノール性硫酸 5 ml を加え、100°C で 6 時間、水浴上で還流加熱、冷却後 5 ml ずつの石油エーテルで 3 回抽出し、抽出液を 5 ml ずつの水で 3 回水洗後、無水硫酸ソーダで脱水して石油エーテルを減圧濃縮、脂肪酸のメチルエステル 3.7 mg を得た。

b) スフィンゴシン塩基画分の調製 : Gaver, Sweely の方法⁽⁷⁾により行なった。スフィンゴミエリン 10 mg に 1 N 含水メタノール性塩酸 5 ml を加え、70°C で 18 時間水浴上で還流加熱、冷却後 5 ml ずつの石油エーテルで 3 回抽出して脂肪酸メチルエステルを除去。残液を濃カセイカリ溶液で pH 9.5 に調整、5 ml ずつのエーテルで 3 回抽出、エーテル層を水洗、無水硫酸ソーダで

脱水した後エーテルを減圧濃縮して粗スフィンゴシン画分を得た。これをケイ酸 1 g のカラムに供し、15 ml のクロロホルムで溶出させて少量の脂肪酸メチルエステルを除去、ついで 15 ml のメタノールで溶出させ、メタノール溶液を減圧濃縮、スフィンゴシン塩基 3 mg を得た。

3. スフィンゴシン塩基誘導体の調製

a) ジニトロフェニル (DNP) 化 : Karlsson の方法⁽⁸⁾により次のようにしてスフィンゴシン塩基の DNP-誘導体を調製した。スフィンゴシン塩基 3 mg に 2 µl のフロロニトロベンゼン含有のエチルアルコール 1 ml と、ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 10) 4 ml を加え、30 分間 60°C に保つ。冷却後 5 ml ずつのエーテルで 3 回抽出、エーテル層を減圧濃縮してスフィンゴシン塩基の DNP-誘導体を得た。

b) トリメチルシリル (TMS) 化 : Carter, Gaver の方法⁽⁹⁾に従いスフィンゴシン塩基 1 mg にシラン試薬 (ピリジン-ヘキサメチルジシラザン-トリメチルクロルシラン (10:13:8)) をスフィンゴシン塩基が 1% 含まれるように加えて長鎖塩基のトリメチルシリル誘導体を調製した。

c) 過ヨウ素酸酸化 : Gatt, Rapport の方法⁽¹⁰⁾に準じ、まずスフィンゴシン塩基を還元して飽和のスフィンゴシン塩基を調製し、ついで Sweely, Moscatelli の方法⁽¹¹⁾に従いこの過ヨウ素酸酸化を行なった。スフィンゴミエリン 4 mg より調製した飽和のスフィンゴシン約 1.5 mg を 0.3 ml のメタノールに溶解、1/5 倍量の 0.2 M メタ過ヨウ素酸ソーダを加え、暗所で 60 分間室温に放置する。ついで 2 倍量の塩化メチレンと半量の水を混和して遠心分離した。上層はさらに 2 倍量の塩化メチレンで抽出し、下層の塩化メチレン層を合一して濾過後、真空乾燥した。生成した脂肪性粗アルデヒドはケイ酸 2 g を充填したカラムに供し、15 ml のクロロホルムで溶出させ、窒素気流下にクロロホルムを除いて試料とした。

d) 脂肪性アルデヒドの還元 (アルコール化) : 過ヨウ素酸酸化で得られた脂肪性アルデヒドを Carter, Hirschberg の方法⁽¹²⁾に従い脂肪性アルコールに還元した。スフィンゴミエリン 4 mg より調製した脂肪性アルデヒドを 0.5 ml のメタノールに溶解させ、0.5 ml の水素化ホウ素ナトリウム溶液を加え 30 分間室温に放置する。ついで 0.03 ml の 1 N 塩酸、0.5 ml の水、0.3 ml

のメタノール, 1.6 ml のクロロホルムを混和し遠心分離する。下層を濃縮乾燥後 0.5 ml の水を加え 2 ml ずつのエーテルで 3 回抽出, エーテルを除去して脂肪性アルコールを得た。これにシラン試薬⁽⁹⁾を加え, 脂肪性アルコールのトリメチルシリル誘導体を調製した。

4. ガスクロマトグラフィー 柳本 GCG-5 DH 型(水素イオン化検出器)ガスクロマトグラフを用いて各成分の分析を行なった。脂肪酸メチルエステルに対する運転条件は Table II に, TMS-スフィンゴシン塩基に対する運転条件は Fig. 5 に, 過ヨウ素酸化物に対する運転条件は Fig. 6 に, また脂肪性アルコールの TMS-誘導体に対する運転条件は Fig. 7 にそれぞれ示した。

5. 標準品 スフィンゴミエリンは Fujino, Negishi⁽¹³⁾ が馬脊髄から調製したもの, 脂肪酸は市販の結晶ラウリン酸, ミリスチン酸, パルミチン酸およびステアリン酸, C_{18} -スフィンゴシンは牛脾臓のセラミドから調製したもの⁽¹⁴⁾, C_{18} -ジヒドロスフィンゴシンは藤野⁽¹⁵⁾の調製したジヒドロプレノシンをアルカリ加水分解したもの, テトラデカノールとヘキサデカノールは札幌医科大学の大野教授から恵与されたもの, テトラデカノールとヘキサデカノールは該当のアルデヒドを還元して調製したものをそれぞれ標準品として用いた。

結 果

1. スフィンゴミエリンの純度

a) 薄層クロマトグラフィー 牛乳より分離精製し

Fig. 2. Thin-layer Chromatogram of Sphingomyelin from Cow's Milk.

Coating material : silica gel G

Solvent system : chloroform-methanol-water
(65 : 25 : 4)

Detection : iodine vapor, Dragendorff reagent

1. sphingomyelin from cow's milk

2. standard sphingomyelin⁽¹³⁾

たスフィンゴミエリンの薄層クロマトグラムを Fig. 2 に示した。スフィンゴミエリンはプレート上でただ一つのスポットを与え, R_f 値は標準スフィンゴミエリン⁽¹³⁾のそれに完全に一致した。

b) スフィンゴミエリンの分析 スフィンゴミエリンの分析結果を Table I に示す。リンは King 法⁽⁶⁾, 窒素はマイクロケルダール法, スフィンゴシンは Lauter, Trams 法⁽¹⁶⁾, 遊離コリンは Glick 法⁽¹⁷⁾でそれぞれ測定した。各測定値は計算値とほぼ一致し, リン : 窒素 : スフィンゴシン : 遊離コリンの比はほとんど 1 : 2 : 1 : 1 に等しかった。

Table I. Analytical Data of Sphingomyelin from Cow's Milk

	Found	Calcd. for N-arachidyl-sphingosyl-phosphorylcholine $C_{43}H_{89}O_7N_2P$
P	3.47%	3.99%
N	3.14%	3.61%
Sphingosine	38.40%	38.53%
Free choline	14.00%	15.59%
P : N :		
Sphingosine :	1 : 2.01 :	1 : 2.0 : 1.0 : 1.0
Choline :	1.15 : 1.03	
Melting point	199°C	197~198°C ⁽¹³⁾

c) スフィンゴミエリンの赤外線吸収スペクトル

スフィンゴミエリン 3 mg を臭化カリウムと混合して錠剤とし, 日本分光工業 IR-S 型を用いて測定した赤外線吸収スペクトルを Fig. 3 に示す。1650 cm^{-1} と 1540 cm^{-1} 付近に酸アミドの, 1087~1064 cm^{-1} のところにリン酸の, および 970 cm^{-1} にトランス二重結合の深い吸収がスフィンゴミエリンに特徴的なピークとして認められ, グリセロリン脂質の夾雑にもとづくエステル結合の吸収 (1739 cm^{-1}) は認められなかった。このスペクトルのデータは, 標準スフィンゴミエリン⁽¹³⁾のそれに完全に一致した。

2. 構成脂肪酸

スフィンゴミエリンの加水分解で得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーに供し, そのチャートから同定した脂肪酸とその組成を Table II に示す。表のように C_{12} から C_{24} までの 19 種類の脂肪酸が検出された。その主成分は多い方から $C_{23:0}$, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$, $C_{16:0}$ で, この 4 つで全脂肪酸の 75% 以上に達した。飽和脂肪酸が 90% 以上を占め, 不飽和脂肪酸は少量, 低級脂肪酸は全く認められなかった。

Fig. 3. Infrared Spectrum of Sphingomyelin from Cow's Milk.
(3 mg of sample was packed in KBr.)

Table II. Fatty Acid Composition of Sphingomyelin from Cow's Milk

Operative conditions of gas chromatogram :
Column 0.3×150 cm with 15%-succinate polyester (60~80 mesh), column temp. 180°C, injection temp. 255°C, N₂ 45 ml/min, H₂ 30 ml/min, air 800 ml/min, sensitivity 10⁹, attenuator 1/1 and chart drive 2 cm/min.

Fatty acid	Authors	Morrison, Jack & Smith ⁽¹⁹⁾	Badings ⁽²⁰⁾	森, 土肥, 三野 ⁽²²⁾
12:0	3.0	0.3	0.9	0.5
13:0	2.6	tr.	—	—
14:0	7.1	2.5	9.5	1.4
15:0	2.9	0.4	—	—
15:1	1.3	—	—	—
16:0	11.8	22.1	30.5	20.7
16:1	0.4	0.8	0.7	1.1
17:0	0.6	0.6	—	—
17:1	0.1	tr.	—	—
18:0	1.6	4.5	6.3	2.3
18:1	0.3	5.0	9.6	0.8
18:2	0.3	0.9	1.2	0.5
20:0	1.1	0.6	0.6	2.4
21:0	1.1	0.8	—	—
22:0	19.6	14.7	8.5	13.1
23:0	27.0	27.0	13.1	25.2
24:0	18.4	14.8	8.2	19.8
24:1	0.5	1.9	2.2	12.0

3. 構成スフィンゴシン塩基

a) DNP-誘導体の薄層クロマトグラフィー スフィンゴミエリンの水解と DNP-化で得られた DNP-スフィンゴシン塩基を Michalec の方法⁽¹⁸⁾に準じて二次元薄

Fig. 4. Two-dimensional Thin-layer Chromatogram of DNP-sphingosine Bases obtained from Cow's Milk Sphingomyelin.

Coating material : aluminium oxide G

Solvent system : 1st development, chloroform-methanol (98:2) ; 2nd development, methanol-trimethylamine-water (85:5:10) saturated with tetralin ; between 1st and 2nd development plate was impregnated by 5% tetralin in ether.

1. C₁₈-sphingosine (?)
2. 3-O-methyl C₁₈-sphingosine (?)
3. C₁₆-sphingosine (?)
4. 3-O-methyl C₁₆-sphingosine (?)

層クロマトグラフィーに供した。試料をアルミニウム・オキサイドGのプレートに着点した後、まずクロロホルム-メタノール (98:2) で一次展開, ついでエーテル性 5% テトラリン溶液に含浸し, エーテルを蒸発させた

後, テトラリン飽和のメタノール-トリメチルアミン-水 (85:5:10) で二次展開を行なった。紫外光下で検出されたスフィンゴシンの DNP-誘導体の二次元薄層クロマトグラムを Fig. 4 に示す。4 つのスポットのうち 2 つはそれぞれ標準の C_{18} , C_{16} -スフィンゴシンとほぼ一致したが, 各スポット内に濃淡があり, それぞれ複数のスフィンゴシン塩基から成ることが予測された。あとの 2 つのスポットはスフィンゴミエリンを酸で分解したとき生じた 3-O-メチル- C_{18} -スフィンゴシン, 3-O-メチル- C_{16} -スフィンゴシンと推定されたが確認できなかった。

b) TMS-誘導体のガスクロマトグラフィー スフィンゴシン塩基の種類をもっと詳しく分析するために, 牛乳スフィンゴミエリンの水解と TMS 化で得られた TMS-スフィンゴシン塩基をガスクロマトグラフィーに供した成績を Fig. 5 に示す。スフィンゴシン塩基の同定は, C_{18} -スフィンゴシンと C_{18} -ジヒドロスフィンゴシンについては, それぞれ標準品^(14,15)と比較して行ない, その他の長鎖塩基については, それぞれの保持時間を片対数表にプロットして, それらが直線関係になること

Fig. 5. Gas-Liquid Chromatogram of TMS-sphingosine Bases obtained from Cow's Milk Sphingomyelin.

Operative conditions: column 0.3×180 cm with 5% SE-30 (60~80 mesh), column temp. 210°C, injection temp. 280°C, N_2 40 ml/min, H_2 30 ml/min, air 800 ml/min, Sensitivity 10^9 , attenuator 1/1 and chart drive 2 cm/min.

1. 3-O-methyl- C_{16} -sphingosine
2. C_{16} -sphingosine
3. C_{16} -dihydrosphingosine
4. C_{17} -sphingosine
5. 3-O-methyl- C_{18} -sphingosine and/or 16-methyl- C_{17} -sphingosine
6. C_{18} -sphingosine
7. C_{18} -dihydrosphingosine
8. 17-methyl- C_{18} -sphingosine (?)

を確認した上で Carter, Hirschberg⁽¹²⁾ の Equivalent Chain Length (以下 ECL と略称) と比較した。その結果, 見出された 8 つのピークは, 保持時間の低い方から, 3-O-メチル- C_{16} -スフィンゴシン (2.6%), C_{16} -スフィンゴシン (23.5%), C_{16} -ジヒドロスフィンゴシン (9.8%), C_{17} -スフィンゴシン (7.9%), 3-O-メチル- C_{18} -スフィンゴシンおよび / または 16-メチル- C_{17} -スフィンゴシン (14.3%), C_{18} -スフィンゴシン (35.4%), C_{18} -ジヒドロスフィンゴシン (3.8%), 17-メチル- C_{18} -スフィンゴシン (2.7%) (?) と同定された。このうち, 3-O-メチル-スフィンゴシンは酸水解による人工産物である。3-O-メチル- C_{18} -スフィンゴシン (ECL 17.10) と 16-メチル- C_{17} -スフィンゴシン (ECL 17.28) はほぼ同じ保持時間を有するので, ガスクロマトグラム上では, 一つのピークとしてあらわれている。Fig. 5 の 5 のピーク中に 3-O-メチル- C_{18} -スフィンゴシンが含まれるとすると, その割合は, C_{16} -スフィンゴシンと 3-O-メチル- C_{16} -スフィンゴシンとの比率から類推して約 3.6%, したがって, 16-メチル- C_{17} -スフィンゴシンは, 10.7% と計算される。また, 8 のピークは ECL が 18.30 で, この値は, Carter ら⁽²³⁾が見出した 17-メチル- C_{18} -スフィンゴシンの ECL (18.28) とほぼ一致した。全体を通じ, 主ピークは, C_{18} -スフィンゴシンと C_{16} -スフィンゴシンで両方合わせて全塩基の 60% 近くを占めた。

c) 脂肪性アルデヒドのガスクロマトグラフィー

16-メチル- C_{17} -スフィンゴシンの存在の有無を検討することを主眼として, 牛乳スフィンゴミエリンの水解と水添後の過ヨウ素酸酸化で得られた脂肪性アルデヒドをガスクロマトグラフィーに供した成績を Fig. 6 に示す。アルデヒドの同定は, テトラデカナールとヘキサデカナールについてはそれぞれの標準品と比較して行ない, ペンタデカナールは標準アルデヒドのそれぞれの保持時間をプロットした片対数グラフ上より求めた。その結果, ガスクロマトグラムに表われた 4 つの明らかなピークは保持時間の短い方からテトラデカナール (33.4%; C_{16} -スフィンゴシンおよび C_{16} -ジヒドロスフィンゴシンに由来), ペンタデカナール (10.4%; C_{17} -スフィンゴシンに由来), 14-メチル-ペンタデカナール (11.3%; 16-メチル- C_{17} -スフィンゴシンに由来) (?), ヘキサデカナール (41.8%; C_{18} -スフィンゴシンおよび C_{18} -ジヒドロスフィンゴシンに由来) と同定された。このうち, 14-メチル-ペンタデカナールの同定はやや不確実, またペンタ

Fig. 6. Gas-Liquid Chromatogram of Fatty Aldehydes derived from Cow's Milk Sphingomyelin.

Operative conditions : column 0.3×150 cm with 15 % succinate polyester (60~80 mesh), column temp. 150°C , injection temp. 265°C , N_2 45 ml/min, H_2 30 ml/min, air 800 ml/min, sensitivity 10^9 , attenuator 1/1 and chart drive 2 cm/min.

1. tetradecanal (derived from C_{16} -sphingosine and C_{16} -dihydrosphingosine)
2. pentadecanal (derived from C_{17} -sphingosine)
3. 14-methyl-pentadecanal (derived from 16-methyl- C_{17} -sphingosine)
4. hexadecanal (derived from C_{18} -sphingosine and C_{18} -dihydrosphingosine)
5. 15-methyl-hexadecanal (derived from 17-methyl- C_{18} -sphingosine) (?)

デカノールの前の小さなピークは同定できなかった。5のピークは、その ECL (16.75) が Carter ら⁽²³⁾ の ECL (16.65) にほぼ一致するので、17-メチル- C_{18} -スフィンゴシンに由来する 15-メチル-ヘキサデカノールと推定された。

d) 脂肪性アルコールのガスクロマトグラフィー

16-メチル- C_{17} -スフィンゴシンの存在を確かめるために、牛乳スフィンゴミエリンからのスフィンゴシン塩基の過ヨウ素酸酸化物を脂肪性アルコールに導き、これを TMS 化してガスクロマトグラフィーに供した成績を、Fig. 7 に示す。アルコールの同定は、テトラデカノールとヘキサデカノールについてはそれぞれ標準品と比較して行ない、ペンタデカノールと 14-メチル-ペンタデカノールは標準アルコールのそれぞれの保持時間をプロットした片対数表より求め、さらに Carter, Hirschberg⁽¹²⁾ の ECL と比較した。その結果、アルコールのガスクロマトグラムは対応するアルデヒドのそれと全く同じパターン

Fig. 7. Gas-Liquid Chromatogram of TMS-alcohol Derived from Cow's Milk Sphingomyelin.

Operative conditions : column 0.3×180 cm with 5% SE-30 (60~80 mesh), column temp. 180°C , injection temp. 220°C , N_2 40 ml/min, H_2 30 ml/min, air 800 ml/min, sensitivity 10^9 , attenuator 1/1 and chart drive 2 cm/min.

1. tetradecanol (derived from C_{16} -sphingosine and C_{16} -dihydrosphingosine)
2. pentadecanol (derived from C_{17} -sphingosine)
3. 14-methyl-pentadecanol (derived from 16-methyl- C_{17} -sphingosine)
4. hexadecanol (derived from C_{18} -sphingosine and C_{18} -dihydrosphingosine)
5. 15-methyl-hexadecanol (derived from 17-methyl- C_{18} -sphingosine) (?)

を示し、それぞれ、テトラデカノール (C_{16} -スフィンゴシンおよび C_{16} -ジヒドロスフィンゴシンに由来)、ペンタデカノール (C_{17} -スフィンゴシンに由来)、14-メチル-ペンタデカノール (16-メチル- C_{17} -スフィンゴシンに由来)、ヘキサデカノール (C_{18} -スフィンゴシンおよび C_{18} -ジヒドロスフィンゴシンに由来) および 15-メチル-ヘキサデカノール (17-メチル- C_{18} -スフィンゴシンに由来) (?) とそれぞれ同定された。

考 察

牛乳は 0.03% の複合脂質を含み、そのうちスフィンゴミエリンは 19% を占めることが報告されている⁽¹⁹⁾。これによれば牛乳 12 l 中には約 700 mg のスフィンゴミエリンが含まれることになるが、われわれが分離したのはその半量以下の 300 mg であった。これは主として溶媒分画とケイ酸カラムクロマトグラフィーによる精製操作の途中で損失したものと思われる。得られたスフィンゴミエリンは薄層クロマトグラム上の R_f 値、分析値

および赤外線吸収スペクトルから判断して, 全く純品であるとみなされる。

牛乳スフィンゴミエリンの構成脂肪酸についての分析結果は, Badings⁽²⁰⁾, Smith, Lowry⁽²¹⁾, Morrison ら⁽¹⁹⁾, 森ら⁽²²⁾の報告とはほぼ一致しており, $C_{23:0}$, $C_{24:0}$, $C_{16:0}$, $C_{22:0}$, $C_{20:0}$ などの高級脂肪酸が多いこと, とくに C_{23} 酸の存在することが特徴的であった。この傾向は牛乳のみならず, ヒト, ブタ, ラクダ, ロバ, ヒツジ, スイギュウなどの種々の哺乳動物の乳スフィンゴミエリンにおいても同様であるという^(24, 25)。

牛乳スフィンゴミエリンの構成スフィンゴシン塩基の種類は, DNP-誘導体, TMS-誘導体, 脂肪性アルデヒドおよび脂肪性アルコールの 4 つの分析結果を総合すると, 含量の多い方から順に C_{18} -スフィンゴシン, C_{16} -スフィンゴシン, 16-メチル- C_{17} -スフィンゴシン, C_{16} -ジヒドロスフィンゴシン, C_{17} -スフィンゴシン, C_{18} -ジヒドロスフィンゴシンおよび多分 17-メチル- C_{18} -スフィンゴシンの 7 つで, このうち C_{18} -スフィンゴシンと C_{16} -スフィンゴシンは合わせて全スフィンゴシンの約 60% に達した。前回⁽¹⁾われわれは TMS-誘導体のガスクロマトグラフィーで, C_{18} -スフィンゴシン, C_{16} -スフィンゴシンのほかに, 不確実ながら C_{18} -ジヒドロスフィンゴシン, C_{17} -スフィンゴシン, C_{14} -スフィンゴシンに相当するピークの存在を報じたが, このうちで C_{14} に相当するスフィンゴシンは今回確認されなかった。これはおそらく TMS-化の途中で混入した不純物にもとづくものと思われる。

今までに, 牛乳スフィンゴミエリンのスフィンゴシン塩基部分についての報告は全くなかったが, 本研究により, 一般の動物組織に多く見出される C_{18} 塩基 (C_{18} -スフィンゴシンと C_{18} -ジヒドロスフィンゴシン) のほかに, C_{16} -塩基 (C_{16} -スフィンゴシンと C_{16} -ジヒドロスフィンゴシン) および C_{17} -塩基 (C_{17} -スフィンゴシンと 16-メチル- C_{17} スフィンゴシン) の存在することが明らかにされたわけである。動物の臓器リピド中に C_{16} -, C_{17} -塩基が少量ながら含まれることは近年 Michalec⁽²⁶⁾, Karlsson⁽²⁷⁾ および Carter, Hirschberg⁽¹²⁾ によって報告されている。とくに, Carter, Hirschberg⁽¹²⁾ は, ウシ腎臓のスフィンゴミエリン中に 16-メチル- C_{17} -スフィンゴシンを見出し, これがルーメン微生物の菌体脂質に由来するものかもしれないことを示唆しているが, これと同じ分枝スフィンゴシン塩基がわれわれの牛乳スフィンゴ

ミエリン中にも認められたことはきわめて興味深い。また, Carter, Gaver⁽²⁸⁾ は *Tetrahymena Pyriformis* に 17-メチル- C_{18} -スフィンゴシンの存在を認めているが, われわれもやや不確実ながらこのものを牛乳のスフィンゴミエリン中に見出した。これら各種のスフィンゴシン塩基の生成起源ないし由来の探求は, 今後委ねられた課題の一つであろう。

要 約

(1) 牛乳から純粋なスフィンゴミエリンを単離し, その脂肪酸と長鎖塩基の組成を調べた。

(2) 牛乳スフィンゴミエリンの構成脂肪酸として, C_{12} から C_{24} までの 19 種が検出された。その大部分は長鎖の飽和脂肪酸で, そのうちで主なものは多い方から順に, $C_{23:0}$, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$, $C_{16:0}$ であった。

(3) 牛乳スフィンゴミエリンを構成する長鎖塩基として, 多い方から順に, C_{18} -スフィンゴシン, C_{16} -スフィンゴシン, 16-メチル- C_{17} -スフィンゴシン, C_{16} -ジヒドロスフィンゴシン, C_{17} -スフィンゴシン, C_{18} -ジヒドロスフィンゴシン, および多分 17-メチル- C_{18} -スフィンゴシンの 7 種が検出された。そのうち, C_{18} -スフィンゴシンと C_{16} -スフィンゴシンが全塩基の過半を占めていた。

- (1) Y. Fujino, S. Yamabuki, T. Negishi and S. Ito: *Jap. J. Zootech. Sci.*, **39**, 481 (1968).
- (2) F. E. Kurtz: "Fundamentals of Dairy Chemistry", ed. by B. H. Webb and A. H. Johnson, The Avi Publishing Company Inc., Westport, Connecticut, 1965, pp. 91~169.
- (3) 佐々木林治郎, 津郷友吉: 乳の化学, 地球出版, 1962, p. 35~38.
- (4) J. Folch, M. Lees and G. H. Sloane Stanley: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- (5) E. J. King: *Biochem. J.*, **26**, 292 (1932).
- (6) R. M. C. Dawson: *Biochem. J.*, **75**, 45 (1960).
- (7) R. C. Gaver and C. C. Sweeley: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **42**, 294 (1965).
- (8) K. Karlsson: *Nature*, **188**, 312 (1960).
- (9) H. E. Carter and R. C. Gaver: *J. Lipid Res.*, **8**, 391 (1967).
- (10) S. Gatt and M. M. Rapport: *Biochem. J.*, **101**, 680 (1966).
- (11) C. C. Sweeley and E. A. Moscatelli: *J. Lipid Res.*, **1**, 40 (1959).
- (12) H. E. Carter and C. B. Hirschberg: *Biochemistry*, **7**, 2296 (1968).
- (13) Y. Fujino and T. Negishi: *Nature*, **184**, 817 (1959).

- (14) 伊藤精亮, 藤野安彦, 根岸 孝: 帯広畜産大学
学術研究報告, **5**, 89 (1967).
- (15) 藤野安彦: 農化, **12**, 767 (1956).
- (16) C. J. Lauter and E. G. Trams: *J. Lipid Res.*,
3, 136 (1962).
- (17) D. Glick: *J. Biol. Chem.*, **156**, 643 (1944).
- (18) C. Michalec: *J. Chromatog.*, **20**, 594 (1965).
- (19) W. R. Morrison, E. L. Jack and L. M. Smith:
J. Am. Oil Chemists' Soc., **42**, 1142 (1965).
- (20) H. T. Badings: *Neth. Milk and Dairy J.*, **16**,
217 (1962).
- (21) L. M. Smith and R. R. Lowry: *J. Dairy Sci.*,
45, 581 (1962).
- (22) 森 茂, 土肥 達, 三野和雄: 日畜会報, **38**,
277 (1967).
- (23) H. E. Carter and R. C. Gaver: *Biochem. Bio-*
phys. Res. Commun., **29**, 886 (1967).
- (24) W. R. Morrison and L. M. Smith: *Lipids*, **2**,
178 (1967).
- (25) W. R. Morrison: *Lipids*, **3**, 107 (1968).
- (26) C. Michalec: *Naturwiss.*, **53**, 254 (1966).
- (27) K. Karlsson: *Acta Chim. Scand.*, **18**, 2395
(1964).
-