大豆リン脂質の食品化学的研究*

第9報 3-*sn*-phosphatidylethanolamine の Molecular Species

木村繁昭**・佐野芳樹**・柴崎一雄**

Food Chemical Studies on Soybean Phospholipids

Part IX. Molecular Species of 3-*sn*-Phosphatidylethanolamine

SHIGEAKI KIMURA, YOSHIKI SANO and KAZUO SHIBASAKI

The molecular species of 3-*sn*-phosphatidylethanolamine from soybean were determined after conversion into diglyceride acetates by means of hydrolysis with phospholipase C and acetylation with acetic anhydride and pyridine. Employing column chromatography on silica impregnated with silver nitrate, the resultant diglyceride acetates were separated into 15 (EDGA-1~9) differing with respect to their degree of unsaturation. Furthermore, the diglyceride acetates were separated by gas liquid chromatography on 3%-JXR on the basis of total carbon number of the fatty acids.

As the results, the amount of the 3-*sn*-phosphatidylethanolamine composed of total carbon number 28 (14+14, 12+16), 36 (18+18, 16+20) and 38 (18+20) was abundant, and it was assumed that the original 3-*sn*-phosphatidylethanolamine contained linoleic acid (49.8%), palmitic acid (28.2%) and stearic acid (1.5%) in large quantities. Notwithstanding the original 3-*sn*-phosphatidylethanolamine contained arachidonic, eicosatrienoic and eicosadienoic acid in comparatively large quantities, the amount of the 3-*sn*-phosphatidylethanolamine composed of total carbon number 40 was scarcely, and it was assumed that the fatty acids of the 3-*sn*-phosphatidylethanolamine among both ester position were not only unsaturated ones composed of carbon number 20, but also ones composed of except carbon number 20, for example (18+20), (16+20) and (14+20). (Received Nov. 11, 1969)

大豆リン脂質の主成分である 3-*sn*-phosphatidylcholine からガスクロマトグラフィーで少なくとも 10 種類の脂肪酸が検出され構成脂肪酸を異にする混合物と考えられる。

そこでこれに phospholipase C を作用させ、さらにアセチル化し diglyceride acetates とし、これを硝酸銀カラムクロマトグラフィーで分画し、さらに分画された各フラクションの diglyceride acetates をガスクロマトグラフィーで検討し 1 位および 2 位の構成脂肪酸の総炭素数により分離し、構成脂肪酸よりみて単一の 3-*sn*-phosphatidylcholine を得たことを報告した。この結果 3-*sn*-phosphatidylcholine の molecular species は 1 位および 2 位の構成脂肪酸の総炭素数 28, 36, 38 が圧倒的に多く、また 40 のものがごく少量であることより 1

位、2 位の両者に炭素数 20 の脂肪酸がほとんどはいらないことが明らかになった。

今回は大豆リン脂質成分で次に多い 3-*sn*-phosphatidylethanolamine について構成脂肪酸よりみて単一のものを得るため、また molecular species を明らかにするため同様に検討したので報告する。

実験の部

3-*sn*-phosphatidylethanolamine の調製および同定、脂肪酸の分析、アセチル化、硝酸銀カラムクロマトグラフィー、diglyceride acetates のガスクロマトグラフィーなどは既報に従って行なった¹⁻³⁾。

phospholipase C を次のようにして作用させた。すなわち phosphatidylethanolamine のみでは phospholipase

* 大豆の食品化学的研究 (第 18 報)

** 東北大学農学部食糧化学科 (仙台市堤通雨宮 1)

Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai.

C で分解しないので、さらに等量の lysophosphatidylcholine (NUTRITIONAL BIOCHEMICAL Co. 製) を加えたのち、RICHARD⁴⁾の方法にもとづいて調製した phospholipase C 酵素液 (GENERAL BIOCHEMICAL 製, ペロナール Buffer+0.02 M-CaCl₂ 溶液数滴 pH 7.6) を加え激しく攪拌し室温で一晩作用させた。この結果分解生成した 1, 2-diacylglycerol acetates と 1-acylglycerol acetates とを分離するため作用後にヘキサンを加えて抽出しこれを減圧濃縮し、展開剤ヘキサン: エーテル (85: 15 v/v) で3回多重展開し目的とする 1, 2-diacyl acetates を分離して得た。

結果および考察

1. DIGLYCERIDE ACETATES の検討

3-sn-phosphatidylethanolamine phospholipase C を作用させ diglyceride にし、これをアセチル化し diglyceride acetates を得たがこれは脂肪酸を異にする混合物であるので、構成脂肪酸よりみて単一の 3-sn-phosphatidylethanolamine を得る手段として、エーテル、石油エーテルの混合比 (v/v) 5: 95, 10: 90, 15: 85, 20: 80, 25: 75, 30: 70, 40: 60, 50: 50, 60: 40, 70: 30, 80: 20, 90: 10, エーテル、クロロホルム、メタノールの計 15 種類の展開剤を用いて硝酸銀 カラムク

ロマトグラフィーを行なった。溶出液を減圧濃縮後、ケン化、メチル化しガスクロマトグラフィーを行ないそれらの構成脂肪酸を検討した。この結果を第1表に示した。

すなわち展開剤エーテル: 石油エーテル (5: 95 v/v) のフラクシヨンのものでは構成不飽和脂肪酸としてリノール酸 27.5%, アラキドン酸が痕跡含まれ、飽和脂肪酸としてラウリン酸が 72.5% と圧倒的に多く、他にミリスチン酸, パルミチン酸, ステアリン酸が痕跡含まれフラクシヨ EDGA-1 とした。展開剤 10: 90 のフラクシヨンでは、不飽和脂肪酸としてリノレン酸 21.0%, アラキドン酸 36.6% が含まれていた。いっぽう飽和脂肪酸としてはフラクシヨ EDGA-1 にきわめて多く含まれていたラウリン酸が含まれず、ミリスチン酸, ステアリン酸が各々 31.6, 15.8% と比較的多く含まれフラクシヨ EDGA-2 とした。

展開剤 15: 85 のフラクシヨンでは、不飽和脂肪酸としてフラクシヨ EDGA-1, 2 に含まれていた炭素数 18 のものは含まれず、炭素数 20 のエイコサトリエン酸が 9.5% 含まれていた。一方飽和脂肪酸としてフラクシヨ EDGA-2 と同様にパルミチン酸, ステアリン酸が各々と比較的多く含まれていたが、フラクシヨ EDGA-1, 2 では痕跡より含まれていなかったミリスチン酸が 15.8% も含まれておりフラクシヨ EDGA-3 とした。

Table 1. Fatty acid composition of the fractionated diglycerides (DGAE-I 9) derived from soybean 3-sn-phosphatidylethanolamine

Fatty Acid Solvent System	12:0	14:0	14:1	16:0	16:1	17:0	17:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:2	20:3	20:4	Fraction
PE	72.5	T		T				T	T	27.5				T	DGAE-1
10:90(E:PE)		T		31.6				15.8			21.0			31.6	2
15:85		15.8		46.0				28.6					9.5	T	3
20:80		21.9	T	19.9		5.2		4.0	13.2	5.5			29.8		4
25:75	4.2			60.2		7.9	T			T		25.0		10.5	5
30:70	7.9	24.0	T	12.0		T		9.9	4.0	21.1		T	5.9		4'
40:60		25.5	T	3.8	3.8	T		7.6	2.5	12.7		30.6		12.4	6
50:50		9.5	T	30.8	T	6.5		11.8	7.1	9.5	T	2.8	28.4		4''
60:40		41.9	T	19.4				10.8	4.3	6.5	T		10.8		4'''
70:30	44.8	3.7		4.5				T	2.2	44.8		T		T	6'
80:20	12.5	25.0	T	T				T	T	T				62.5	7
90:10	17.5	28.0	T	T	T			T	T	T				54.5	7'
E	50.5	12.5		T						37.5					1'
CHCl	48.5	9.7		47	T			2.4	9.5	25.2					8
CHOH	98.0	T		T				T							9

T=Trace PE=Petroleum Ether E=Ether

展開剤 20:80 のフラクシオンでは不飽和脂肪酸としてオレイン酸、リノール酸、エイコサトリエン酸が 13.2, 5.5, 29.8% 含まれており他のフラクシオンと異なっていたのでフラクシオン EDGA-4 とした。

展開剤 25:75 のフラクシオンでは不飽和脂肪酸として、炭素数 18 のものはフラクシオン EDGA-3 と同様に含まれていないが、炭素数 20 のものは新たにエイコサジエン酸が 25.0% も含まれていた。いっぽう飽和脂肪酸としてパルミチン酸がどのフラクシオンよりも多く 60.2% 含まれ、ミリスチン酸、ステアリン酸は全く含まれずフラクシオン EDEA-5 とした。

展開剤 30:70 のフラクシオンでは不飽和脂肪酸としてフラクシオン EDGA-4 と似ているが、エイコサジエン酸が痕跡含まれており、飽和脂肪酸としてはこのフラクシオンに含まれていなかったラウリン酸が 7.9% も含まれておりフラクシオン EDGA-4' とした。

展開剤 40:60 のフラクシオンでは不飽和脂肪酸として炭素数 18 のものとしてはオレイン酸、リノール酸が各々 2.5, 12.7% 含まれフラクシオン EDGA-4 と似ているが、炭素数 20 のものはエイコサジエン酸、アラキドン酸が各々 30.6, 12.4% 含まれフラクシオン DGAE-4 と異なるので EDGA-6 とした。

展開剤 50:50 のフラクシオンでは、不飽和脂肪酸としてオレイン酸、リノール酸、エイコサトリエン酸が各々 7.1, 9.5, 28.4% 含まれフラクシオン EDGA-4 と似ているが、新たにエイコサジエン酸、リノレン酸が各々 2.8%, 痕跡含まれているのでフラクシオン EDGA-4'' とした。

展開剤 60:40 のフラクシオンでは不飽和脂肪酸としてオレイン酸、リノール酸、エイコサトリエン酸が各々 4.3, 6.5, 10.8% 含まれフラクシオン EDGA-4 と似ているが新たにリノレン酸が痕跡含まれているのでフラクシオン EDGA-4''' とした。

展開剤 70:30 のフラクシオンでは不飽和脂肪酸としてオレイン酸、リノール酸が各々 2.2, 44.8% 含まれてフラクシオン EDGA-6 と似ているが、フラクシオン EDGA-6' とした。

展開剤 80:20 のフラクシオンでは不飽和脂肪酸としてほとんどアラキドン酸のみで 62.5% と非常に多く含まれ他のフラクシオンと特異的なのでフラクシオン EDGA-7 とした。

展開剤 90:10 のフラクシオンでは不飽和脂肪酸としてアラキドン酸が 54.5% 含まれ、フラクシオン EDGA-7 と似ているが他に 16:1 が痕跡含まれていることよ

りフラクシオン EDGA-7' とした。

展開剤エーテルのフラクシオンでは不飽和脂肪酸としてリノール酸が 37.5% 含まれフラクシオン EDGA-1 と似ているが、オレイン酸、アラキドン酸が全く含まれておらず、またフラクシオン EDGA-1 ではほとんど含まれていなかったミリスチン酸 9.7% も含まれておりフラクシオン EDGA-1' とした。

展開剤クロロホルムのフラクシオンでは不飽和脂肪酸としてオレイン酸、リノール酸が各々 9.5, 25.2% 含まれ、炭素数 20 のものは全く含まれず、他のフラクシオンと異なるのでフラクシオン EDGA-8 とした。

展開剤メタノールのフラクシオンの脂肪酸はラウリン酸が他のフラクシオンよりも多く 98.0% と非常に多く含まれ、不飽和脂肪酸は全く含まれずフラクシオン EDGA-9 とした。

以上の結果より 3-*sn*-phosphatidylethanolamine に phospholipase C を作用させ diglyceride にし、さらにアセチル化して diglyceride acetates にしたのち、硝酸銀カラムクロマトグラフィーを行うと構成脂肪酸を異にする 3-*sn*-phosphatidylethanolamine のフラクシオンが少なくとも 15 種類得ることができた。既報²⁾で 3-*sn*-phosphatidylethanolamine そのものの硝酸銀カラムクロマトグラフィーでは 9 種類のフラクシオンより得られなかったことより、diglyceride acetates にしたのち 1 位および 2 位の構成脂肪酸の総炭素数によりガスクロマトグラフィーを行なったほうが構成脂肪酸よりみて単一の 3-*sn*-phosphatidylethanolamine を得る中間手段としてすぐれていることが明らかになった。これは phospholipase C を作用させた結果リン、エタノールアミンの極性が取り除かれ、またアセチル化によって水酸基の影響も取去され、不飽和度のみによって分画された結果と考えられる。

2. DIGLYCLERIDE ACETATES 各フラクシオンの

1 位, 2 位の構成脂肪酸の総炭素数による分離

3-*sn*-phosphatidylethanolamine より調製した diglyceride acetates は硝酸銀カラムクロマトグラフィーで少なくとも構成脂肪酸を異にする 15 種類のフラクシオンに分画されたが、これらの各フラクシオンの構成脂肪酸は数種類が検出されいぜん脂肪酸を異にする混合物であると考えられる。そこでさらに diglyceride acetates の 1 位および 2 位の構成脂肪酸の総炭素数により硝酸銀カラムクロマトグラフィーで分画された各フラクシオンをガスクロマトグラフィーで分離し molecular species を検討した。大豆 3-*sn*-phosphatidylethanolamine の構

成脂肪酸は炭素数が12(ラウリン酸), 14(ミリスチン酸), 16(パルミチン酸), 18(ステアリン酸, オレイン酸, リノール酸, リノレン酸), 20(アラキドン酸など)のものが含まれているので, 1位と2位の構成脂肪酸を加えた総炭素数は3-*sn*-phosphatidylcholineと同様24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40の計9種類になる。3-*sn*-phosphatidylcholineの場合と同条件でガスクロマトグラフィーを行ないその代表的なクロマトグラムを第1~4図に, 定量値を第2表に示した。

すなわちフラクシオン EDGA-1 では総炭素数24, 26が多く各々23.8%と含まれ, これは1位, 2位の構成脂肪酸の炭素数が(12+12), (12+14)に由来する。

フラクシオン EDGA-2 ではフラクシオン EDGA-1に含まれなかった総炭素数34, 36が各々8.2, 4.5%ずつ含まれ, またフラクシオン EDGA-3 では36, 38が

各々4.2, 2.6%ずつ含まれており, これは1位, 2位の構成脂肪酸の炭素数が(18+16), (18+18), (20+14), (20+16), (20+18)に由来する。

フラクシオン EDGA-6 では総炭素数24が54.1%含まれまた28が21.6%でこれは(14+14)に由来する。

フラクシオン EDGA-5 では総炭素数36, 38が各々78.3, 21.7%と圧倒的に多く含まれており, このフラクシオンの molecular species は2種類のみで特異的である。

フラクシオン EDGA-4' では総炭素数36が圧倒的に多く80.8%含まれ24, 38が各々9.4, 3.8%含まれており, またあらたに40が含まれていたがわずかに2.7%だけであった。

Fig. 1. Gas chromatogram of fraction DGAE-1

Fig. 3. Gas chromatogram of fraction DGAE-5

Fig. 2. Gas chromatogram of fraction DGAE-4'

Fig. 4. Gas chromatogram of fraction DGAE-6'

Table. 2. Molecular species of soybean 3-*sn*-phosphatidylethanolamine

R ₁ +R ₂ Fraction	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
DGAE-											
1	20.8	16.4	23.8	23.8	8.3	3.9	3.0	T			
2	65.5	T	6.8	9.1	3.6	11	1.1	8.2	4.5		
3	93.2								4.2	2.6	
4	T	6.8	54.1		21.6				6.8	10.8	
5									78.3	21.7	
4'	T	T	9.4	T	T	2.2	T		80.8	8.3	2.7
6		26.1	18.6	18.6	17.1	5.6	5.4		11.2	9.3	T
4''	T	38.7	T	T	12.9	T	T	T	19.4	29.0	
4'''	T	T	T	T	17.8	T			26.7	37.0	2.1
6'	T				over 99	T				T	T
7					over 99						
7'					over 99						
1'	35.7	6.2	3.7	1.8	T				18.5	33.2	T
8	64.3	21.4	T	T	T				3.6	5.5	

T=Trace

フラクシオン EDGA-6 では総炭素数 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38 と種々の molecular species を含んでいたが、そのなかで 28, 36, 38 が比較的多いことがわかる。

フラクシオン EDGA-4' でも総炭素数 28, 36, 38 の molecular species が多く各々 12.9, 19.4, 29.0% 含まれていた。このフラクシオンでは炭素数 20 の不飽和脂肪酸（エイコサジエン酸，エイコサトリエン酸）が各々 2.8, 28.4% と多く含まれているにもかかわらず、総炭素数 40 の molecular species が全く含まれず、1 位，2 位の両者に炭素数 20 の不飽和脂肪酸が入ることなく (20+18), (20+16), (20+14) の組みあわせに由来する。

フラクシオン EDGA-4''' ではフラクシオン 4' と同様 28, 36, 38 の molecular species が多く 17.8, 26.7, 37.0% 含まれ新たに総炭素数 40 の molecular species がわずかに 2.1% 含まれていた。

フラクシオン EDGA-6' では他と全く特異的で molecular species 28 が 99% 以上で、ほかに 30, 38, 40 が痕跡含まれていた。これは構成脂肪酸として炭素数 12 (ラウリン酸)，14 (ミリスチン酸)，16 (パルミチン酸) のものが各々 44.8, 3.7, 4.5% と比較的多く含むためと考えられる。

フラクシオン EDGA-7, 7' の molecular species は 28 が 99% 以上でほとんど 1 種類であった。

以上の結果より大豆 3-*sn*-phosphatidylethanolamine は 3-*sn*-phosphatidylcholins と同様¹⁾ に 28(14+14), (12+16), 36 (18+18), (20+16), 38 (20+18) が大部分を占めていたが、このことは 3-*sn*-phosphatidylethanolamine そのものの構成脂肪酸の 49.8% がリノール酸，28.2% がパルミチン酸，1.5% がミリスチン酸で占められることに由来すると考えられる。またアラキドン酸，エイコサトリエン酸，エイコサジエン酸が含まれているにもかかわらず総炭素数 40 がごく少量より含まれていなかったことは、炭素数 20 の不飽和脂肪酸がたとえば (14+20), (16+20), (18+20), (12+20) と炭素数 20 以外の脂肪酸が 1 位か 2 位に入り炭素数 20 のものは 1 位および 2 位の両者に入らないためと考えられる。それゆえ 3-*sn*-phosphatidylethanolamine も 3-*sn*-phosphatidylcholine と同様 1 位および 2 位に炭素数 20 の不飽和脂肪酸がともに入ることなく、大豆リン脂質には共通のこのように思われる。

要 約

構成脂肪酸よりみて単一の大豆 3-*sn*-phosphatidylethanolamine を得、molecular species を検討するため phospholipase C を作用させ diglyceride にし、これをアセチル化 diglyceride acetates にし、次に硝酸銀カラムクロマトグラフィーで分画した。さらに分画された各

フラクシヨンの1位および2位の構成脂肪酸の総炭素数による検討を行なった。その結果硝酸銀カラムクロマトグラフィーで構成脂肪酸を異にする15フラクシヨン(E DGA-1~9)に分画され、各フラクシヨンのガスクロマトグラフィーの結果1位および2位の構成脂肪酸の総炭素数を異にする 3-*sn*-phosphatidylethanolamine は28 (14+14, 16+12), 36 (18+18, 20+16), 38 (20+18)が多く、これはもとの 3-*sn*-phosphatidylethanolamine の脂肪酸がリノール酸(49.8%), パルミチン酸(28.2%), ステアリン酸(1.5%)が多いためと考えられる。また炭素数20の不飽和脂肪酸(アラキドン酸)が比較的多く含まれているにもかかわらず総炭素数40のものはごく

少量より含まれておらず、このことは1位および2位の両者ともに炭素数20の不飽和脂肪酸がはいることなく、たとえば(12+20), (14+20), (16+20), (18+20)の組み合わせが多いためと考えられる。

文 献

- 1) 木村繁昭・柴崎一雄: 食品工誌, **17**, (1970).
- 2) 木村繁昭・柴崎一雄: 食品工誌, **16**, (1969).
- 3) 柴崎一雄・木村繁昭: 食品工誌, **16**, 272, 277 (1969).
- 4) RICHARD, D.C.: *J. Bacteriol.*, **76**, 317 (1958).
(1969年11月10日受理)