クジラ臓油中の脂肪酸アミドの分離および同定

中村 孝・細川忠昭・豊水正道*

(1968 年 1 月 8 日受理)

Separation and Characterization of Fatty Acid Amides from Visceral Lipid of Fin Whale.

Takashi NAKAMURA, Tadaaki HOSOKAWA,
and Masamichi TOYOMIZU*

It was previously shown in our laboratory that certain lipids in visceral lipid of fin whale (*Balaenoptera physalus*), which were eluted chromatographically with methanol-chloroform after being eluted most of neutral lipid with ethyl ether, have infrared absorption at 5.96 and 6.28 μ due to amide linkage. Judging from chemical tests, thin layer chromatography and infrared absorption spectroscopy, they seem not to be phospholipids, glycolipids nor sphingolipids.

The amide lipids were separated by the procedure as shown in Fig. 1, and their components were analyzed after 2N-HCl hydrolysis in 80% methanol (8 hrs, 110°C). Ether soluble moiety of the lipids consisted of fatty acid methyl esters and small amounts of unmethylated fatty acids (Fig. 3). After remethylation with BF_3 -methanol, fatty acid methyl esters were analyzed by gas liquid chromatography. Twelve kinds (C_{12} ~ C_{20}) of fatty acids were detected and the composition was generally similar to that of original visceral lipid of fin whale (Table 1). On the other hand, water soluble moiety of the lipids was analyzed by paper chromatography and amino acid autoanalyzer, and ammonia and trace amounts of amino acids (0.07% weight of the amide lipid) were detected. From a comparison between the amide lipids in visceral lipid and synthesized palmitoyl amide in infrared spectra and thin layer chromatogram (Fig. 2), it was concluded that the former are fatty acid amides.

著者ら¹⁾はナガスクジラ臓油の硅酸カラムクロマトグラフィー分析で、クロロホルム・メタノールにより溶出される極性脂質中に 5.96, 6.28 μ に特徴的な赤外線吸収を示す脂質の存在をすでに報告した。この脂質は従来報告されている複合脂質^{2~4)}とは異なり、リン、糖が検出されず、エステル結合が存在せず、またアミド結合の存在が推定されるが、スフィンゴ脂質とは赤外線吸収スペクトル (IR スペクトル) が異なるなど注目に値する脂質である。この脂質を硅酸カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて分離、同定したので報告する。

実験方法

供試クジラ臓油

南水洋産ナガスクジラ *Balaenoptera physalus* の肝臓、脾臓以外の臓器から採油したもので、ヨウ素価 133.6, リン含量 $6 \times 10^{-3}\%$ であった。

脂肪酸アミドの分離法

(1) 硅酸カラムクロマトグラフィー 活性化した 100 g の硅酸 (Mallinckrodt 社製, 100 メッシュ, カラムクロマト用) でカラム (径 3.2 cm) を作成した。これに 500 ml の 80% エチルエーテル/*n*-ヘキサン溶

* 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Tech., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan)

Fig. 1. Procedure for the separation of fatty acid amides from visceral lipid of fin whale.

液としたクジラ臓油 60 g を注入後、400 ml の 80% エチルエーテル/*n*-ヘキサンで中性脂質の大部分を溶出した。引き続き 500 ml の 10% メタノール/クロロホルムで溶出し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下に溶媒を除去した (10% MeOH 区)。(2) 稀アルカリ加水分解 10% MeOH 区を 0.2 N-80% メタノール性 NaOH 中で 50°C, 1 時間ゆるく攪拌しながら加水分解後、不ケン化脂質をエチルエーテルで抽出し減圧下に溶媒を除去した。(3) 調製用 TLC 不ケン化脂質をクロロホルムに溶かし、活性化した珪酸薄層 (WAKOGEL B-O, 1 mm) 上に帯状に塗布し、クロロホルム/メタノール (93/7) で 10 cm 展開した。プレートに水を噴霧することにより顕われた Rf 0.5 域のバンドから薄層珪酸を掻き取り、50% メタノール/クロロホルムで抽出後、減圧下に溶媒を除去して脂肪酸アミドを得た。C-H 伸縮以外の 3 μ 域の数本の吸収および 5.96, 6.28 μ の吸収を示すことを確認し、もし TLC で単一なスポットが得られない場合は調製用 TLC で再度精製した。上述の脂肪酸アミド分離法の概略を Fig. 1 に示した。

脂肪酸アミドの分析法

(1) 一般性状分析法 IR スペクトル法: クロロホルム溶剤法で測定した。TLC: WAKOGEL B-O, Alumina B-O の 250 μ の薄層を 110°C, 1 時間活性化して用いた。紫外線吸収スペクトル法: エタノール溶液として測定した。

リン⁵⁾, グリセロール⁶⁾, 糖⁷⁾, アミノ糖⁸⁾を比色法により測定した。(2) 構成分析法 塩酸加水分解: 脂肪酸アミドを 2N-メタノール性 HCl (conc. HCl/メタノール 1/5) の 20 倍量で 110°C, 8 時間加水分解後、エーテル可溶部と水可溶部とに分け、減圧下に溶媒を除去した。エーテル可溶部の分析法: BF₃・メタノールを用いる METCALFE らの方法⁹⁾で再メチル化後, diethylene glycol succinate polyester を固定相としたガスクロマトグラフィーで分析した。水可溶部の分析法: 2N-HCl 中で 110°C, 2 時間再加水分解後、減圧下に溶媒を除去し分析した。すなわちペーパークロマトグラフィーは東洋濾紙 No. 51 A を用い、*n*-ブタノール/氷酢酸/水 (120/30/50) で展開後、ニンヒドリン試薬, Nessler 過ヨウ素酸試薬, オルトフタルアルデヒド試薬¹⁰⁾を噴霧した。またイオン交換クロマトグラフィーは日立アミノ酸分析計 KLA-2 型, Amberlite IRC-120 カラム, クエン酸緩衝液を用いた。

パルミチン酸アミドの合成

パルミチン酸に三塩化リンを加えてパルミチン酸クロリドとなし、これに冷アンモニア水を反応させて合成した¹¹⁾。このものは融点 105.6°C であった。

溶剤はいずれも一級試薬を用い、*n*-ヘキサン、エチルエーテルは金属ナトリウムで脱水蒸溜し、エタノールは脱アルデヒド後蒸溜し、クロロホルム、ベンゼン、メタノールは蒸溜して用いた。

実験結果

一般性状 Fig. 1 の操作によつて分離された脂質はクロロホルム・メタノール系あるいはベンゼン・メタノール系の展開剤を用いた TLC でも、薄層に硅酸あるいはアルミナを用いた TLC でも、いずれも単一なスポットとして検出された。エタノール溶液での紫外線吸収スペクトルは $230\text{ m}\mu$ に単一な極大吸収を示した。またリン、グリセロール、糖、アミノ糖はいずれも検出されなかつた。収量は 60 g のクジラ臓油から約 50 mg であつた。この脂質の IR スペクトルを Fig. 2(A) に示した。 $3.4\text{ }\mu$ 域の C-H 伸縮、 $6.85, 7.20\text{ }\mu$ の C-H 変角によるエチレン鎖を有する物質に共通な吸収^{12,13}の他に、 $3\text{ }\mu$ 域の数本の吸収、 $5.96, 6.28\text{ }\mu$ の吸収が特徴的である。 $3\text{ }\mu$ 域の吸収は N-H 伸縮、 $5.96\text{ }\mu$ はアミド結合した C=O 伸縮(アミド I) $6.28\text{ }\mu$ は N-H 変角(アミド II) と推定される。しかしアミド I, アミド II の吸収が従来報告されたスフィンゴ脂質^{4,14}に比べ $0.1\sim 0.2\text{ }\mu$ 短波長に移行している。次にこの脂質の構成成分を明らかにする目的で 2N-メタノール性 HCl で加水分解後エーテル層物質、水層物質に分けて各々を分析した。

塩酸加水分解エーテル層物質 エーテル層物質

質の IR スペクトル, TLC 図を Fig. 3 に示した。加水分解により, Fig. 2(A) に見られた C-H 伸縮によらない $3\text{ }\mu$ 域の吸収および $5.96, 6.28\text{ }\mu$ の吸収が消失し, $5.76\text{ }\mu$ にエステル結合の C=O 伸縮および $8.5\text{ }\mu$ 域にエステル結合 C-O 伸縮の吸収が出現した(A)。これはオレイン酸メチルエステル(B)に一致し, メタノール性塩酸加水分解中に, 脂肪酸メチルエステルが形成されたことを示している。また TLC 図もエーテル層物質が脂肪酸メチルエステルおよび僅かのエステル化されなかつた脂肪酸から成っていることを示している。BF₃・メタノールでの再メチル化後のガスクロマトグラフィーによる脂肪酸分析の結果を Table 1 に示した。オレイン酸, パルミチン酸を主成分とする C₁₂~C₂₀ の 12 種類の脂肪酸が検出され, その組成は原クジラ臓油と大差ないが, 高度不飽和酸は検出されなかつた。

塩酸加水分解水層物質

ペーパークロマトグラフィーにおいて, 過ヨウ素酸ネスラー試薬で茶色の, オルトフタルアルデヒド試薬で灰~黒色の R_f 0.3 のスポットが検出された。これは標品塩化アンモニウムに呈色, R_f が一致しアンモニヤの存在が推定された。さらにニンヒドリン試験で痕跡のアミノ酸が検出されたので, アミノ酸自動分析計で分析した。アミノ酸は Lys, Leu, Gly その他数種が検出されたが, アミノ酸の総量は分離脂質重量の約 0.07% にすぎずアンモニヤが主成分であることを確かめた。

Fig. 2. Infrared absorption spectra and thin layer chromatogram of fatty acid amides separated from visceral lipid of fin whale (A), synthesized palmitoyl amide (B) and palmitic acid (C).

Spectra were measured in chloroform solution. Apparatus: HITACHI EPI-S. Chromatogram was obtained by following method. Thin layer: WAKOGEL B-O ($250\text{ }\mu$), Developing solvent: chloroform/methanol (93/7), Indicator: 70% sulfuric acid

Fig. 3. Infrared absorption spectra and thin layer chromatogram of ether soluble moiety (A), methyl oleate (B) and oleic acid (C).

Spectra were measured in chloroform solution. Apparatus: HITACHI EPI-S. Chromatogram was obtained by following method. Thin layer: WAKOGEL B-O (250 μ), Developing solvent: *n*-hexane/ethyl ether/acetic acid (50/50/1), Indicator: 70% sulfuric acid

い出した。カラムクロマトグラフィーで 80% エチルエーテル/*n*-ヘキサンで溶出する脂質の大部分は中性グリセライドで、IR スペクトル、TLC 分析の結果脂肪酸アミドの混入は認められなかつた。しかし、このためには多量の溶出剤の使用は避けるべきである。10% MeOH 区に大部分の脂肪酸アミドを溶出させることができた。ところが IR 分析の結果、この区分はエステル結合に由来すると考えられる 5.76 μ の C=O 伸縮、8.5 μ 域の C-O 伸縮の吸収¹⁵⁾が観察され、TLC の結果からもグリセライドとくに酸化グリセライド

合成パルミチン酸アミドとの比較 著者がクジラ臓油から分離した脂質と合成パルミチン酸アミドおよびパルミチン酸の IR スペクトル、TLC 図を検討した (Fig. 2)。パルミチン酸 (C) の 5.85 μ の C=O 伸縮の吸収が、合成パルミチン酸アミド (B) においてはアミド結合の出現によって 5.96 μ に移行している。合成パルミチン酸アミドではこれらの他に 3 μ 域の N-H 伸縮、6.28 μ に N-H 変角の吸収が出現して、クジラ臓油から分離された脂質の IR スペクトル (A) と一致した。また TLC 図においても両者の R_f 値は一致し、クジラ臓油から分離された脂質が脂肪酸アミドであることが確認された。

考 察

3 μ 域に N-H 伸縮、5.96 μ にアミド結合の C=O 伸縮 6.28 μ に N-H 変角の赤外線吸収を示し、TLC で単一なスポットを与える脂肪酸アミドを精製分離する目的で種々検討して、Fig. 1 に示す方法を見

Table 1. Fatty acid composition of fatty acid amides and original visceral lipid of fin whale (%).

Fatty acid	Fatty acid amides	Original visceral lipid	Fatty acid	Fatty acid amides	Original visceral lipid
C _{12:0}	0.3	0.5	C _{18:1}	38.6	32.5
C _{14:0}	12.4	9.4	C _{18:2}	2.4	3.4
C _{14:1}	0.3	1.0	C _{18:3}		2.9
C _{15:0}	1.6	0.9	C _{19:0}	1.8	1.2
C _{16:0}	22.3	16.3	C _{20:0}	2.8	3.2
C _{16:1}	12.9	9.5	C _{20:5}		6.1
C _{16:2}		1.3	C _{22:4}		1.8
C _{17:0}	1.5	2.5	C _{22:6}		4.5
C _{18:0}	3.1	3.0			

Chromatography was carried out as follows.

Apparatus: HITACHI KGL-2, Column: diethylene glycol succinate polyester (4 mm $\times$ 5 m), Carrier gas: He (60 cc/min), Column temperature: 210°C

の混入が推定された。カラムクロマトグラフィーで 100% MeOH により溶出する脂質は IR スペクトル分析の結果、アミド結合の吸収が僅かに観察されたが、少量のため以後の分離操作には加えなかつた。アミド結合がアルカリに安定なことはよく知られている^{16,17)}。よつて稀アルカリにより、10% MeOH 区からエステル結合脂質を加水分解して除去し、TLC で単一なスポットを与える脂肪酸アミドを分離できた。著者らは初期の実験において、稀アルカリ加水分解を行わずに、10% MeOH 区を直接調製用 TLC でクロマトグラフィーを繰り返すことにより、TLC 的に純粋な脂肪酸アミドを得ることができた。これは Fig. 1 の操作によつて分離された脂肪酸アミドに IR スペクトル、TLC の結果が一致したが、収量が著しく低いため以後の分離には Fig. 1 の操作を用いた。

脂肪酸アミドの塩酸加水分解で得られたエーテル層脂質の脂肪酸組成は、Table 1 に示したように、原クジラ臓油の脂肪酸組成と大差なかつたが高度不飽和酸が検出されなかつた。これは分離操作中に酸化されたためとも考えられる。塩酸加水分解水層物質はアミノ酸のメチル化物の形成を避けるため水性塩酸で再加水分解して分析した。この区分のほとんどがアンモニヤであることはアミノ酸自動分析計分析により明らかにされた。さらにクジラ臓油から分離された脂質が脂肪酸とアンモニヤが結合した脂肪酸アミドであることは、合成パルミチン酸アミドとの IR スペクトルの一致 (Fig. 2) からも確認された。脂肪酸アミドがこのように脂質から分離された例はないようで、存在の普遍性、意義については今後の研究に待たねばならない。なお塩酸加水分解後に検出されたアミノ酸については僅少量のため、本実験では詳しく検討しなかつた。

アミノ酸自動分析計分析をしていただいた九州大学農学部生物化学教室に感謝する。

要 約

1. 硅酸カラムクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて、ナガスクジラ臓油から TLC 的に純粋なアミド結合を有する脂質を分離した。
2. 塩酸加水分解後その構成成分を明らかにした。脂溶部は脂肪酸から成り、ガスクロマトグラフィーにより、オレイン酸、パルミチン酸を主成分とする C_{12} ~ C_{20} の 12 種の脂肪酸が検出された。脂肪酸組成は原クジラ臓油と大差がなかつた。水溶部はペーパークロマトグラフィーおよびアミノ酸自動分析計によりアンモニヤと僅少量 (約 0.07%/脂質重量) のアミノ酸が検出された。
3. 合成パルミチン酸アミドの赤外線吸収スペクトルおよび TLC 図との比較により、クジラ臓油から分離されたアミド結合を有する脂質が、脂肪酸とアンモニヤが結合した脂肪酸アミドであることが確認された。

文 献

- 1) 中村 孝・豊水正道: 本誌 **23**, 204~209 (1967).
- 2) G. ROUSER, G. KRICHEVSKY, C. CALL, and D. HELLER: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **42**, 215~227 (1965).
- 3) R. LEDEEN, R. O. BRADY, and P. J. STOFFYN: *ibid.*, **43**, 57~74 (1966).
- 4) G. ROUSER, G. KRICHEVSKY, D. HELLER, and E. LIEBER: *ibid.*, **40**, 425~454 (1963).
- 5) W. D. HARRIS and P. POPAT: *ibid.*, **31**, 124~127 (1954).
- 6) O. RENKONEN: *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 367~369 (1962).
- 7) N. S. RADIN: *Methods of Biochemical Analysis*, **6**, 169~171 (1959).
- 8) 泉 邦彦: 蛋白質 核酸 酵素, **5**, 555~558 (1960).
- 9) L. D. METCALFE and A. A. SCHMITZ: *Anal. Chem.*, **33**, 363~364 (1961).
- 10) 成田耕造・村上孝夫編: クロマトグラフィーの実際, **Vol. 1**, 37~104 広川書店 (1964).
- 11) 日本化学会編: 実験化学講座, **19**, 484~485 丸善 (1957).
- 12) D. CHAPMAN: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **37**, 73~77 (1960).
- 13) D. CHAPMAN: *ibid.*, **42**, 354~371 (1965).
- 14) C. Y. SCHUSTER, J. R. FROINESAND, H. S. OLCOTT: *ibid.*, **41**, 31~41 (1964).
- 15) R. T. ÓCONNER, E. F. DUPRE, and R. O. FEUGE: *ibid.*, **32**, 88~93 (1955).
- 16) G. SCHMIDT, J. BENOTTI, B. HERSHMAN, and S. J. THANHAUSER: *J. Biol. Chem.*, **166**, 505~511 (1946).
- 17) G. B. ANSELL and J. N. HAWTHORNE: *Phospholipid*, B. B. A. library **Vol. 3**, 32~33, Elsevier Pub. Co. (1964).