UDC 547.953.2:613.286

278. 涌井袈裟参, 河内佐十: 卵黄レシチンならびにリゾレシチンの分離法の研究

Kesami Wakui and Saju Kawachi: Studies on the Isolation
of Egg Lecithin and Lysolecithin

(Hoshi College of Pharmacy*1)

During the purification of lecithin from the ethanolic extract of egg yolk phospholipid as cadmium chloride double salt, the cadmium chloride solution was added while examining Ninhydrin-coloration of the precipitate and the product was separated into lecithin and cephalin. The egg-yolk lecithin so obtained was purified by column chromatography through alumina and a product of high purity was obtained in a good yield.

Application of egg-yolk solution to snake venom in Veronal buffer afforded lysolecithin in a better yield than by the use of a phosphate buffer.

(Received January 31, 1961)

レシチンの分離に関する研究には従来主として卵黄, 大豆あるいは脳組織などが用いられてきたが, そのうち特に卵黄は磷脂質の主成分としてレシチンを含み, 僅かの量のセファリンおよびリゾレシチンを含むにすぎない。したがって脳などの磷脂質に比べて単純な点で取扱い易く, また入手し易いので実験室的なレシチンの分離には, 卵黄レシチンが最も多く用いられている。著者等は蛇毒のレシチナーゼ A の活性測定法¹⁾を研究するのにレシチン並びにリゾレシチンを必要としたが, 卵黄からレシチンを分離する際, 粗レシチン抽出液に混在するレシチンとセファリンのうちレシチンのみを塩化カドミウム複塩として沈殿させる方法を案出した。この方法によれば従来の再沈殿操作を何回も繰返す方法よりも簡易にレシチンを分別しうる。また卵黄にレシチナーゼ A を作用させてリゾレシチンを好収量にうる条件をも見出したので報告する。

卵黄からレシチンの調製 卵黄レシチンの調製に際しては卵黄を予めアセトンで処理して脂肪, 遊離脂肪酸, ステロイド等を溶離した後, 卵黄末をアルコールで抽出する方法が最も好ましい。卵黄からのレシチン調製には McKibbin²⁾, Levene および Rolf³⁾, Pangborn 等⁴⁾の種々の方法があるが, 著者等は Pangborn 法をさらに簡易化し, しかも夾雑するセファリンやリゾレシチンを分離する方法を考案した。その要点とするところは卵黄末のアルコール抽出液に塩化カドミウムのアルコール液を加えてレシチンの塩化カドミウム塩を沈殿させる際, 沈殿部にニンヒドリン呈色が僅かに現われるまで沈殿剤を加える点にある。この沈殿を少量のクロロホルムに溶かし, Pangborn 法の塩化カドミウム含有アルコール液に注いでレシチンを再沈殿させる操作に入れば, 再沈殿の回数を少くして Levene, Rolf および Pangborn のものと同純度の卵黄レシチンをうることができる。

卵黄のアルコール抽出液にはレシチン, セファリンおよびリゾレシチン等を含み, これらはいずれも塩化カドミウムと複塩を形成してアルコール溶液から沈殿する性質を有する。その複塩形成の順位はこれらの化学構造からみて異なるものと考えられ, したがって塩化カドミウムの添加量を段階的に変えれば 3 者を分別沈殿させうると考えた。すなわち上記アルコール抽出液の一定量に塩化カドミウムのアルコール溶液を段階的に量を変えて加え, 生成した沈殿を遠心分離し, この沈殿部のセファリンに由来するアミノ基をニンヒドリン反応で調べた。それによると添加した塩化カドミウムが一定量になるまではニンヒドリン呈色はほとんど現われませんが, それ以上の濃度に加えると急速に強まる。また最初のアルコール抽出液を同量のアルコールで希釈し, この希釈液の半量を用いて上記と同じように塩化カドミウム液を加え, 生成した沈殿部のニンヒドリン反応を調べてみた結果, 呈色を明らかに認めるまでの塩化カドミウム量は上記の場合の約 1/2 量であつた。この実験を参考にして別のアルコール抽出液にニンヒドリン呈色が明らかに認められるまで塩化カドミウム液を加え, 生じた沈殿を 0° で遠心

*1 Ebara Shinagawa-ku, Tokyo.

1) 涌井, 河内: 本誌 79, 1177(1959).

2) J. M. McKibbin, W. E. Taylor: J. Biol. Chem. 178, 29(1952).

3) P. A. Levene, I. P. Rolf: *Ibid.* 55, 743(1923).4) M. C. Pangborn: *Ibid* 188, 471(1951).

分離し、この上清にさらに塩化カドミウム液を沈殿が生じなくなるまで加えて沈殿を遠心分離した。この両沈殿分画をそれぞれアンモニア・アルコール液と混和して複塩を分解したが、最初の沈殿部からはレンチンを、第2の沈殿部からはセファリンをえた。

吸着クロマトグラフィーによる卵黄レンチンの精製 著者等は上記の方法でえた卵黄レンチンからリゾレンチンおよび混在する微量のセファリンを除く目的で、これらの標品をアルミナによるカラムクロマトグラフィーにかけた。すなわち Fig. 1 に示したクロマトグラムの実験条件にしたがい、95% のエタノールで溶出し、各分画液のヨウ素消費量、ニンヒドリン呈色、溶血作用などを調べてレンチン、セファリン、リゾレンチンの分離状況を観察した。結果は Fig. 1 からわかるように分画 (II) の部分にレンチンが試料の約 62% 分離された。また分画 (I) および (III) の部分にはニンヒドリン呈色性物質が認められ、分画 (IV) には溶血作用が示された。Fig. 1 のカラムクロマトグラフィーの分画 (I)~(IV) の各液のヨウ素消費量から、各分画部の磷脂質の回収量を求めた結果を Table I に示した。この結果は再度実施しても再現性がある。

Conditions: 5 g. of crude egg lecithin dissolved in 200 cc. of 95% EtOH was applied on a column (1.8×80 cm.) of Al_2O_3 (Merck "suitable for chromatographic analysis"). The flow rate was about 50 cc./hr. and fractions of 100 cc. were collected. All experiments were carried out at about 25°.

Fig. 1. Column Chromatography on Al_2O_3 of Crude Egg Lecithin prepared from Cd Salt

Table I. Recovery of Phospholipids with Al_2O_3 Column Chromatography

	Crude lecithin (5 g.)	Frac. I	Frac. II	Frac. III	Frac. IV
Consumption of 0.1N I_2 soln. (cc.)	5170	390 (7.5%)	3250 (62.5%)	185 (3.5%)	270 (5.4%)
Total recovery=78.9%					

卵黄レンチンから精製リゾレンチンの調製 著者は前報⁵⁾で蛇毒のレンチナーゼ A 活性を溶血法で測定する方法を述べたが、洗浄血球の溶血の程度とリゾレンチン量との関係を考察するのに純リゾレンチンを必要とした。

卵黄レンチンからのリゾレンチンの調製法には卵黄液に蛇毒を作用させる Leven 等³⁾の方法と、卵黄から分離したレンチンのエーテル溶液に蛇毒溶液を作用させる Hanahan 等⁶⁾や Saunder⁷⁾の方法がある。著者は最初 Levene の方法で卵黄のホモジネートに pH 7.0 の磷酸緩衝液を加えて希釈した液に台湾コブラ毒溶液を加え、40° で 14 時間反応させる方法をとつたが、前報のレンチナーゼ A 活性の測定法の条件を検討中、蛇毒レンチナーゼ A の活性は磷酸緩衝液中では著しく阻害されるのを観察したので、阻害作用を示さないペロナル緩衝液による実験も並行して行なつた。ペロナル緩衝液を用いた反応液では約 1 時間経過すると卵黄液の外観上の粘性は全く消失したが、磷酸緩衝液を用いたものは約 6 時間後にこの状態になる。ついで上記の反応液に同

5) 涌井, 河内: 本誌 79, 867(1959).

6) D. J. Hanahan: J. Biol. Chem. 185, 199(1952).

7) L. Saunder: J. Pharm. and Pharmacol. 9, 834(1957).

量の 95% エタノールを加え, 沈殿する蛋白部分を濾別し, 濾液は減圧下で約 $\frac{1}{2}$ 量になるまで濃縮した. この液に塩化カドミウム液を加えると混合リゾ磷脂質および未反応の磷脂質の複塩が沈殿する. この混合物から結晶リゾレシチンを分離した過程を Table II に示した.

Table II の混合磷脂質-塩化カドミウム複塩 (I) の部分には, レシチナーゼ A の作用で分解されたリゾレシチン, リゾセファリンのほかに未反応のレシチン, セファリンなどが含まれる. この (I) を 40° のクロロホルムに溶解し, 10% のアンモニア・エタノール液と振盪すると複塩は分解して遊離の磷脂質と水酸化カドミウムとなる. 水酸化カドミウムを濾別した液は減圧で濃縮し, 濃縮液を室温で放置するとリゾ磷脂質のみが析出してくる. この部分は予め濾過してとり, さらにこの濾液に 2 倍量のエーテルを加えるとかなり純度の高いリゾ磷脂質が結晶状に析出 (II) する. この混合リゾ磷脂質 (II) にはリゾレシチンとリゾセファリンが共存する. 両者の分画は上記のレシチンとセファリンの場合のように, リゾレシチンがリゾセファリンよりも先に塩化カドミウム複塩を形成する性質を利用する分別沈殿によった. すなわち著者は上記 (II) の粗結晶をクロロホルムにとかし, 塩化カドミウムのエタノール溶液一定量を加え, 析出する沈殿を遠心分離し, 沈殿部のニンヒドリン呈色が顕著に現われるまでの分画を集めて, この部分からリゾレシチンをえた. この上清部にはリゾセファリンが残存する.

Table II. Isolation of Lysolecithin from Egg-yolk Lecithin

(I) Mixed-phospholipids separated from the reaction mixture of egg-yolk lecithin with snake venom (CdCl_2 -double salt)

上にのべたニンヒドリン反応を応用するリゾレシチンとリゾセファリンの分別沈殿法は Levene, Rolf 等³⁾ の溶解度の差を利用する再結晶法よりも操作が簡単で, かつ確実にリゾレシチンのみを得ることができる利点をもつ.

以上の主な点を要約すると卵黄磷脂質のエタノール抽出液からレシチンを塩化カドミウム複塩として精製する際, 沈殿部のニンヒドリン呈色をしらべつつ塩化カドミウム液を加えてレシチンとセファリンを分別した. またここにえた卵黄レシチンをさらにアルミナカラムクロマト法で精製し, 高純度の標品を好収量にえた.

卵黄液をペロナール緩衝液中で蛇毒と作用させると磷酸緩衝液を用いたときよりも好収量にリゾレシチンをえることができる.

実 験 の 部

卵黄からレシチンの調製 新鮮な 12 個の鶏卵から卵黄を分け、ホモジナイザーで数 min 攪拌し、これに Me_2CO 600 cc を 3 回に分けて加えよく攪拌する。つぎに吸引濾過し、 Me_2CO で 3 回洗うと卵黄末 55 g がえられる。この卵黄末に 95% EtOH 800 cc を加え、30 min 振盪した後、吸引濾過、濾液に 50% の CdCl_2 20 cc を加えてレシチンの Cd 塩を沈殿させる。この沈殿部は遠心分離して分ける。沈殿の少量をとり、数滴の CHCl_3 にとかし、0.1% ニンヒドリンエタノール溶液 2 cc を加えて沸騰水浴中で加熱し、呈色の有無をしらべて微かに紫色を呈する沈殿が生じはじめるまで上記の上清に CdCl_2 液を加え、生成した沈殿を集める。沈殿を Me_2CO で洗ったのち、60 cc の CHCl_3 に溶かす。この CHCl_3 溶液を 1% の CdCl_2 を含有する EtOH 500 cc 中に注ぎ、レシチンのカドミウム塩を再沈殿させる。この操作を 3 回繰返した後、えた沈殿を 100 cc の石油エーテルに浮遊させ、80% EtOH に石油エーテルを飽和した混液 100 cc ずつで 3 回抽出する。抽出液を集めて約 1/2 容量になるまで減圧濃縮、氷室に一晩放置する。生成した沈殿を遠心分離し、つぎにこの沈殿を 100 cc の CHCl_3 に溶かし、30% の EtOH 100 cc と強く振盪し、 CdCl_2 を 30% EtOH に移行させる。この操作を 5 回繰返し、 CdCl_2 を除いた CHCl_3 層を減圧乾燥、残留物を無水 Et_2O 100 cc に溶かし、これに冷 Me_2CO 200 cc を加えてレシチンを沈殿させる。氷室に 2 hr 放冷後、沈殿を 0° で遠心分離し、再びこの沈殿を同量の無水 Et_2O にとかし、 Me_2CO で沈殿させ、遠心分離してえたレシチンを真空中で乾燥した。収量 3 g (レシチン) Pangborn の標品。P 4.03, N 1.98, N : P = 1.06 : 1.00. Found P 4.14, N 2.14, N : P = 1.22 : 1.00.

吸着クロマトグラフィーによる卵黄レシチンの精製 吸着クロマト用アルミナ ("Merck") 250 g を 95% EtOH 1 L に浮遊し、内径 1.8 cm のガラス製カラムに 80 cm 層積して、EtOH の流出速度を毎時約 50 cc になるように調節した。前項でえた卵黄レシチン 5 g を 95% EtOH 200 cc に溶解し、上記の吸着カラム上端に装置した溶媒槽から流下してアルミナ層に吸着させ、ついで 95% EtOH 約 3 L を用いて溶出した。流出液 100 cc ずつを分画し、その分画液の 1 cc につき、Yasuda¹⁰⁾ の方法で I_2 消費量を測定し、レシチンの分離状況を調べた。アミノ基含有磷脂質の溶出部は各分画液の 1 cc に 0.1% ニンヒドリン溶液 2 cc を加え、沸騰水浴中で加熱したときの呈色でみた。リゾレシチンの溶出部は各分画液 0.1 cc を前報⁹⁾ に記した血球浮遊液に作用させたときの溶血の有無から調べた。これらの測定結果は Fig. 1 のようになる。(I) から (IV) までの 4 部分を N_2 気流中で減圧下に EtOH を留去した。分画 (II) の部分から純卵黄レシチン 4.1 g をえた。 $\text{C}_{44}\text{H}_{86}\text{O}_7\text{NP}$ (卵黄レシチン) Hanahan の標品 P 3.86, N 1.74, N : P = 1.00 : 1.00. Found P 3.74, N 1.72, N : P = 1.02 : 1.00, 分子量 804.

卵黄からリゾレシチンの調製 新鮮な 10 個の卵黄をホモジナイザーにかけ、これに 0.05M のペロナル緩衝液 (pH 7.0) 250 cc とよく混和する。この液に台湾コブラ (*Naja naja*) 毒 5 mg を水 2 cc にとかした液を加え、 35° で 16 hr 反応させた。反応の進行にともなつて pH が酸性側に移行するから、時々 0.2N NaOH 液を加え、pH 7.0 の附近に保ちつつ実験した。反応終了後この液に 95% EtOH 1 L を加え、よく振盪してから吸引濾過する。残渣にはさらに 1 L の EtOH を加えて再抽出し、上記の濾液と合わせる。このリゾレシチン抽出液は減圧下に全量が約 300 cc になるまで濃縮する。この液に 50% CdCl_2 の EtOH 溶液 30 cc と Me_2CO 50 cc を加え、約 3° で一夜放置するとリゾ磷脂質の CdCl_2 塩が沈殿するから、吸引濾過する。収量 12 g.

つぎに上記の CdCl_2 複塩を 100 cc の CHCl_3 にとかし、10% NH_3 含有 EtOH 液を 10 cc 加えよく振盪する。ここに生成した $\text{Cd}(\text{OH})_2$ は浮別し、濾液に再び 10% NH_3 含有 EtOH 液を少量加え、生ずる沈殿を濾過する。濾液を減圧下で油状物が生ずるまで濃縮し放冷すると混合リゾ磷脂質の粗結晶がえられる。この母液に Et_2O 約 10 cc を加え、大部分の混合磷脂質を結晶として回収した。上記の粗結晶 5 g を CHCl_3 30 cc に溶かし、1.2 g の CdCl_2 を含む EtOH 液 100 cc に加えるとリゾレシチンのみが CdCl_2 複塩として沈殿する。この沈殿部にはニンヒドリン呈色性物質は含まれない。上記の条件で粗結晶中のリゾレシチンのみを分別沈殿しうる。この沈殿を吸引濾過し、 CHCl_3 20 cc に浮遊させ、10% の NH_3 含有 EtOH 液 2 cc と振盪し、生じた $\text{Cd}(\text{OH})_2$ を浮別し、濾液を減圧下で濃縮した。この液を約 3° に放冷すると結晶が析出する。収量 2.1 g. $\text{C}_{24}\text{H}_{52}\text{O}_8\text{NP}$ (リゾレシチン) Anal. Calcd. C 56.1, H 10.1, N 2.72, P 6.04, N : P = 1.00 : 1.00. Found C 55.8, H 10.2, N 2.67, P 6.09, N : P = 0.98 : 1.00, 分子量 516.

卵黄レシチンからリゾレシチンの調製 卵黄レシチン 2 g を Et_2O 200 cc に溶かし、これに 0.1% 台湾コブラ毒溶液 2 cc を加え、静かに混和する。室温 (約 25°) で時々揺動させながら約 30 min 反応させると、リゾレシチンが器底に沈殿する。上清は傾斜して除き、沈殿は Me_2CO 30 cc を用いて洗浄する。この沈殿を 20 cc の CHCl_3 に溶かし、 Et_2O 120 cc を加えて再沈殿させる。この操作を 5 回繰返し、最後の沈殿は Me_2CO 少量で洗浄したのち減圧乾燥する。ついでこの沈殿をできるだけ少量の 95% EtOH に浮遊させ、 50° の水浴中で溶解し、室温に放冷すれば結晶が析出する。同じ操作でさらに 2 回再結晶する。収量 0.7 g. $\text{C}_{24}\text{H}_{52}\text{O}_8\text{NP}$ (リゾレシチン) Anal. Calcd. P 6.04, N 2.72, N : P = 1.00 : 1.00. Hanahan の標品 P 5.51, N 2.80, N : P = 1.12 : 1.00. Found P 5.92, N 2.89, N : P = 1.08 : 1.00, 分子量 516.

本研究に当り終始御懇篤なる御指導を賜つた京都大学教授 鈴木友二博士に謹謝します。

星薬科大学