



Title	サケ・マス類の脂質：第7報 マス肝臓ケファリン
Author(s)	座間, 宏一; ZAMA, Kōichi; 羽田野, 六男 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 14(4), 236-242
Issue Date	1964-02
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/23195">https://hdl.handle.net/2115/23195</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	14(4)_P236-242.pdf



# サケ・マス類の脂質

## 第7報 マス肝臓ケファリン

座間 宏一・羽田野 六男・五十嵐 久尚

(北海道大学水産学部水産化学教室)

### Lipids of Salmonoid Fishes

#### VII. Cephalin from liver of salmon, *Oncorhynchus masou*\*

Kōichi ZAMA, Mutsuo HATANO and Hisanao IGARASHI

#### Abstract

The cephalin fraction obtained from liver of salmon, *Oncorhynchus masou*, mainly consisted of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and inositol-phospholipids. In addition to those constituents, small amounts of contaminants, such as phosphatidylcholine, sphingolipids and acetal lipids were detected.

This cephalin fraction was fractionated into eight fractions by means of silicic acid-celite (2:1, w/w) column chromatography, and the analytical results obtained are shown in Table 3.

Furthermore, the purification of the aminophospholipid fraction, obtained by means of silicic acid-celite column chromatography, was dinitrophenylated and then rechromatographed on silicic acid-celite column.

The results obtained are shown in Table 5.

#### 緒 言

陸上動物肝臓ケファリンに関しては多くの報告があるが、魚類肝臓ケファリンについての報告は少く、露木ら<sup>1)</sup>がブリ肝臓ケファリンの性状とそれの Folch 分画を行なった結果について報告しているにすぎない。著者らはさきにマス肝臓アセトン可溶性脂質<sup>2)</sup>およびレシチンの性状<sup>3)</sup>について報告したが本報ではケファリン画分の性状とそれのケイ酸—セライトカラムクロマトグラフィーを行なった結果について報告する。

#### 実験および結果

分析法：P は Fiske—Subbarow 法、N は Micro Kjeldahl 法、アミノ酸（セリンとして）、エタノールアミンは Nojima—Utsugi 法<sup>4)</sup>、コリンは Beattie 法<sup>5)</sup>、糖（ガラクトースとして）は Anthrone 法<sup>6)</sup>、スフィンゴシン-N は McKibbin—Taylor 法<sup>7)</sup>、グリセロールは Blix 法<sup>8)</sup>、アルデヒド（ステアラルールとして）は Wittenberg らの方法<sup>9)</sup>、沃素価は Wijs 法により測定、イノシットは Scherer 反応および加水分解物を Hough の方法<sup>10)</sup>に従いペーパークロマトグラフィーによって確認した。

\* Studies on the Phosphatide of Aquatic Animals XXXI.

水産動物磷脂質に関する研究 第31報

昭和36年 日本水産学会秋季大会（鹿児島）にて一部講演

**ケファリンの調製:** ケファリンの調製に当り抽出液の濃縮, 溶剤溜去等の操作はすべて CO<sub>2</sub> 気流中で行なった。試料処理は大約 Fig. 1 のごとくし, かくしてマス肝臓 18.19 kg より 50.2g のケファリンを得た。

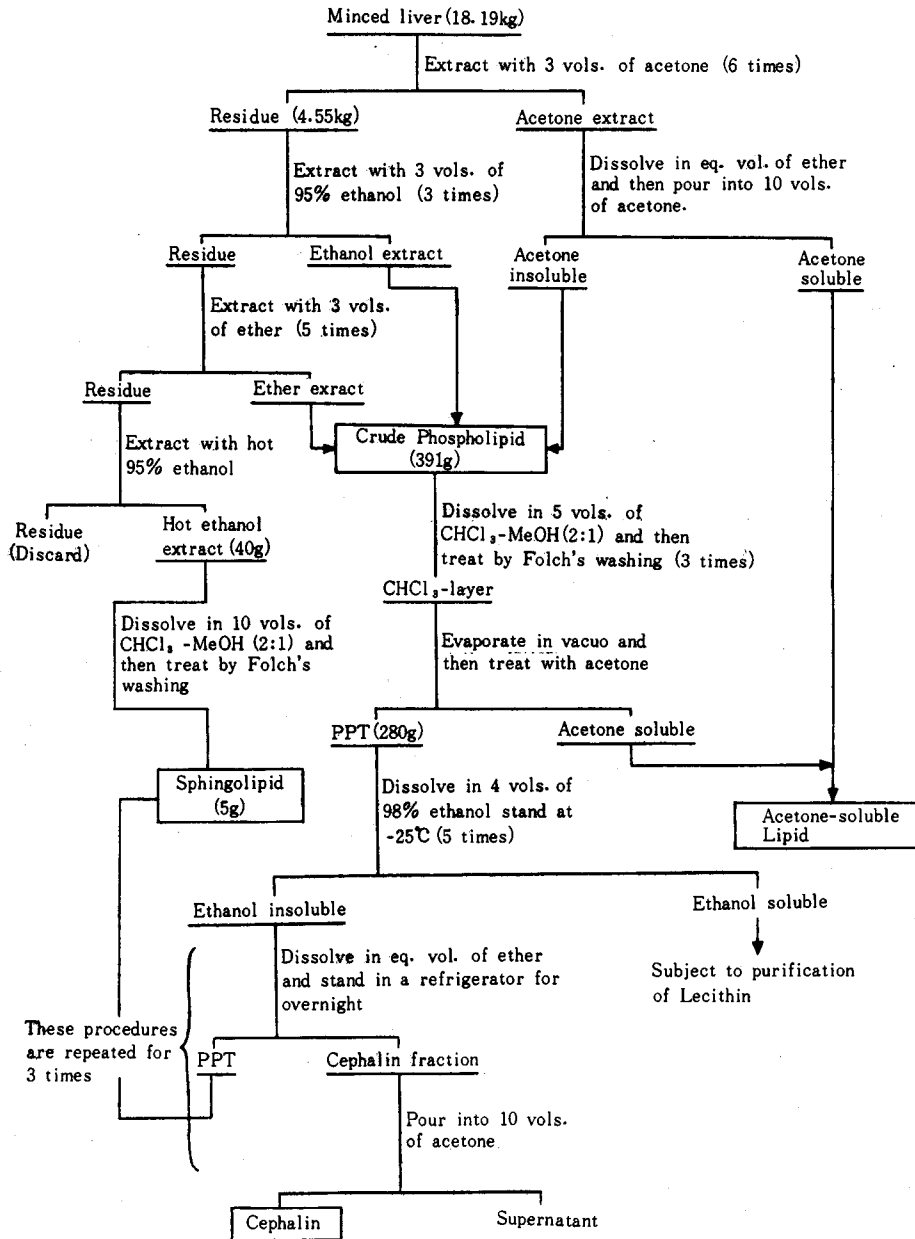


Fig. 1. Preparation of cephalin from salmon liver

Table 1. Properties of liver cephalin

P	3.19%	Sphingosine-N	0.22%	Iod. no.	98.2
N	1.65%	Aldehyde	0.32%	N/P	1.14
Serine	3.24%	Sugar	0.84%	Glycerol/P	1.02
Ethanolamine	4.69%	Glycerol	9.63%		
Choline	1.90%	Inositol	+		

ケファリンの脂肪酸：ケファリン 5g を常法通り 2N-KOH-エタノール溶液と 2 時間還流，中和価 208.3，沃素価 127.7 の混合脂肪酸 3.2g を得た。その一部をとり Herb-Riemenschneider 法<sup>11)</sup> によって 21% KOH-エチレングリコール中で 180°C，15 分間共役化し，そのメタノール溶液の 374, 346, 315, 268 および 233m $\mu$  における比吸光係数を測定，Hammond-Lundberg の式<sup>12)</sup> によって計算した結果，ケファリン構成脂肪酸組成は飽和脂肪酸 29.2%，モノエチレン酸 48.4%，ジェン酸 2.1%，トリエン酸 0.7%，テトラエン酸 6.0%，ペンタエン酸 9.5%，ヘキサエン酸 4.1% よりなること，また混合脂肪酸の一部をとり Marinetti ら<sup>13)</sup> の方法に従い構成脂肪酸を定性的に検討した結果 Table 2 に示すごとく，ラウリン酸，ミリスチン酸，パルミチン酸，ステアリン酸，アラキジン酸および C<sub>18</sub>，C<sub>19</sub>，C<sub>20</sub> の各不飽和酸の存在することを認め，また C<sub>22</sub>，C<sub>24</sub> の不飽和酸の存在を推定した。

ケファリンのケイ酸—セライトカラムクロマトグラフィー：ケイ酸 (Mallinckrodt, 100 mesh クロマトグラフィー用) 200g，セライト-545 (Johns-Manville) 100g をよく混合し N<sub>2</sub> 気流下 110°C，24 時間活性化し，カラム (30×830mm) に充填，アセトン 650ml，次いでクロロホルム 400 ml で洗滌後，100ml クロロホルムに溶解した 5g のケファリンを注入，更にクロロホルム，クロロホルム-メタノール混液，最後にメタノール-エーテル混液で溶出を行ない，溶出液は各 20ml 宛集めた。溶出溶剤の組成，溶出量および P 含量は Fig. 2 に示す通りである。

Fig. 2 の結果より全溶出画分は Fract. A (No. 1~No. 38)，Fract. B (No. 39~No. 53)，Fract.

Table 2. Paper chromatography of the component fatty acid of liver cephalin (R<sub>F</sub> values)

Fatty acid	Standard	Cephalin	Fatty acid	Standard	Cephalin
Lauric	0.47	—	C <sub>14</sub> unsatd.	0.54	0.54
Myristic	0.36	0.36	C <sub>16</sub> unsatd.	0.46	0.46
Palmitic	0.26	0.28	C <sub>18</sub> unsatd.	0.37	0.36
Stearic	0.17	0.16	C <sub>20</sub> unsatd.	0.28	0.28
Arachidic	0.08	0.07	C <sub>22</sub> unsatd.	0.16	0.16
C <sub>22</sub> or C <sub>24</sub>	0.00	±	C <sub>24</sub> unsatd.	0.00	±

Paper chromatography was carried out as follows: Tōyō No. 51 paper which saturated with 10% of paraffin in benzene solution, was used with the solvent system AcOH-H<sub>2</sub>O (9:1, v/v) which saturated with paraffin with ascending front chromatography. (at 23°C, 20 hrs.)

Reagent A. 0.01% Rhodamine 6 G aq. solution

Reagent B. 1% KMnO<sub>4</sub> aq. solution.

C (No. 54~No. 88), Fract. D (No. 89~No. 136), Fract. E (No. 137~No. 156), Fract. F (No. 157~No. 174), Fract. G (No. 175~No. 199) および Fract. H (No. 200~285) の 8 画分

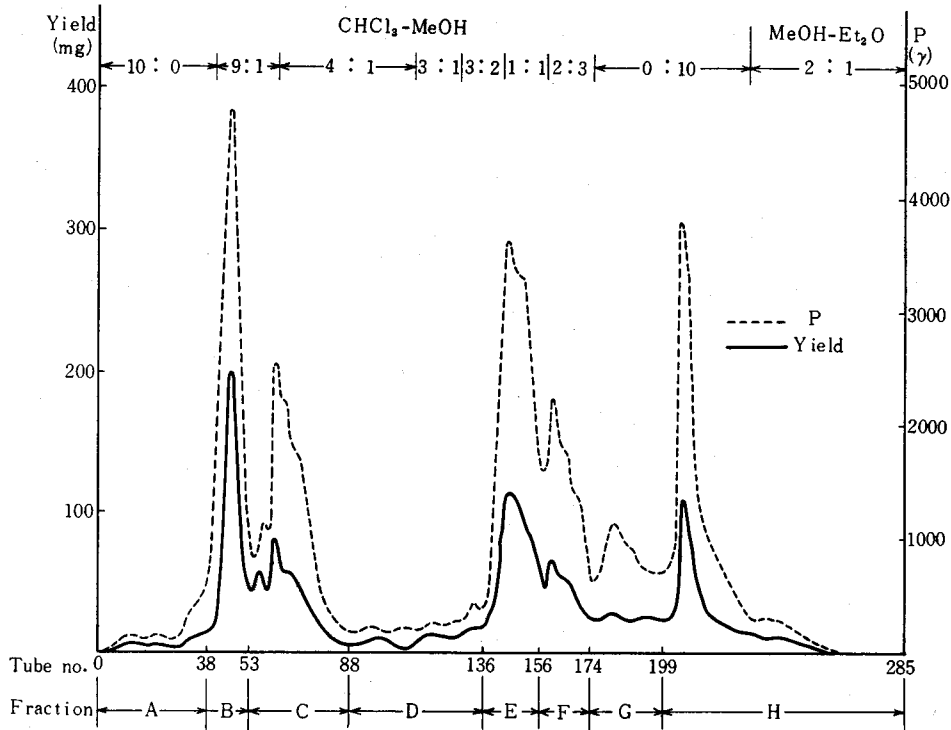


Fig. 2. Fractionation of salmon liver cephalin by silicic acid-celite  
Five grams of cephalin was chromatographed over 300 g of  
silicic acid-celite (2:1, w/w) column.  
The eluate was collected in 20ml fractions.

Table 3. Properties of fractions separated from liver cephalin by  
silicic acid-celite column chromatography

Fract.	Yield (mg)	P (%)	N (%)	Glycerol (%)	Ethanolamine (%)	Amino acid (as serine) (%)	Choline (%)	Sugar (%)	Sphingosine-N (%)	Aldehyde (%)	Iod. no.
A	147.9	3.20	1.00	10.11	0.59	0.06	0.55	1.53	—	0.17	78.8
B	751.3	3.24	1.29	10.17	2.48	2.50	0.99	0.65	0.15	0.34	54.9
C	855.0	3.20	1.89	9.94	5.86	2.38	1.73	0.29	—	0.32	44.2
D	273.5	3.18	1.96	9.95	5.91	2.76	1.57	0.46	—	0.28	105.7
E	1132.6	3.47	1.75	10.36	5.44	1.27	1.86	0.38	0.08	0.26	112.6
F	572.3	3.76	1.45	9.91	3.48	0.92	3.00	0.60	0.12	0.31	114.8
G	524.9	3.82	1.57	9.32	1.11	3.25	4.92	0.92	0.31	0.46	102.1
H	742.0	3.83	2.19	8.79	0.88	3.58	5.84	1.20	0.72	0.21	56.4

に大別した。各画分の分析結果は Table 3 に示す通りである。また各画分を 20 倍量の 6N-HCl と封管中, 100°C, 12 時間加水分解し加水分解物について糖およびアミノ塩基をそれぞれペーパークロマトグラフィーにより検索し Table 4 に示す結果を得た。

DNP-アミノ磷脂質: Fract. B 374.4mg をクロロホルム 10ml に溶解, 7% DNFB-95% エタ

Table 4. Paper chromatography of hydrolyse product of cephalin

Fract.	Aminobase*						Galactose or Inositol**	
	Ethanol-amine (R <sub>F</sub> 0.33)	Serine (R <sub>F</sub> 0.17)	Threonine (R <sub>F</sub> 0.21)	un-identified (R <sub>F</sub> 0.61)	un-identified (R <sub>F</sub> 0.48)	un-identified (R <sub>F</sub> 0.11)	Galactose (R <sub>F</sub> 0.31)	Inositol (R <sub>F</sub> 0.10)
A	Ethanol-amine	Ser.					Gal.	
B	Ethanol-amine	Ser.					Gal.	
C	Ethanol-amine	Ser.						Inosit.
D	Ethanol-amine	Ser.						Inosit.
E	Ethanol-amine		Thr.				Gal.	
F	Ethanol-amine		Thr.			un-identified	Gal.	
G	Ethanol-amine		Thr.	un-identified			Gal.	
H	Ethanol-amine		Thr.		un-identified		Gal.	

Paper chromatography was carried out as follows:

\* Tōyō No. 50 paper was used with the solvent system n-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1:5) with ascending front chromatography (at 25°C, 20 hrs.).

Reagent 0.1% Ninhydrin in acetone solution.

\*\* Tōyō No. 50 paper was used with the solvent system n-BuOH-EtOH-H<sub>2</sub>O (4.0:1.1:1.9) with ascending front chromatography

Reagent A. AgNO<sub>3</sub>-acetone solution; Reagent B. Ethanolic NaOH solution

Table 5. DNP-aminophospholipids separated by silicic acid-celite chromatography

Eluent CHCl <sub>3</sub> :MeOH, ml			Eluting fract. (Yield, mg)	DNP-aminobase	Fatty acid
10	0	100	Fract. B <sub>1</sub> (104.4)	DNP-Ethanolamine	Pal., Ste., Arach., Beh (?), C <sub>18</sub> unsatd., C <sub>18</sub> unsatd.
9	1	100			
4	1	100			
7	3	100			
3	2	100	Fract. B <sub>2</sub> (133.3)	DNP-Ethanolamine, DNP-Serine	Pal., Ste., Arach., C <sub>18</sub> unsatd.
1	1	100			
2	3	100			
3	7	100			

ノール溶液 (1.5mMol.), 5%  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 8ml を加え, 室温 24 時間振盪し反応させた後, 稀 HCl で酸性としクロロホルム層をとり, 水層をさらにクロロホルムで抽出, 全クロロホルム層を合し 95% エタノール, 水で順次洗滌, 乾燥後溶剤を溜去, 410.8mg の DNP-アミノ磷脂質を得た。

**DNP-アミノ磷脂質のケイ酸-セライトカラムクロマトグラフィー**：前記の如くして活性化したケイ酸-セライト 24g をカラム (20×190mm) に充填, アセトン 100ml, クロロホルム 60ml で洗滌した後, クロロホルム 7ml に溶解した 350mg の DNP-アミノ磷脂質を注入, クロロホルム, クロロホルム-メタノール混液で順次溶出を行ない, Fract. B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> の画分を得た。各画分を 10 倍の 6N-HCl と封管中 100°C, 8 時間加水分解し得られた DNP-アミノ酸と脂肪酸を Marinetti ら<sup>13)</sup> の報告に従ってペーパークロマトグラフィーによって検索し, Table 5 に示す結果を得た。

### 考 察

溶剤分画によって得られたケファリン画分は Table 1 に示すごとく, コリン, スフィンゴシンおよび糖を含み, これらの結果よりこのケファリン画分には Phosphatidylcholine, Sphingomyelin, 磷脂質が混在していることが推定されるが, これらの物質を単に溶剤分画のみによって完全に除去することは困難と考えられる。構成脂肪酸の分布は C<sub>14</sub> から C<sub>24</sub> 酸におよんではいるが, C<sub>24</sub> 酸は恐らく Sphingomyelin および糖脂質などのスフィンゴ脂質に由来するものと考えられる。

ケイ酸-セライトカラムクロマトグラフィーにより分画した画分の分析結果は Table 3 に示したがこの結果よりみると Fract. A は溶出量が少く, N/P 値が比較的小である。またスフィンゴシン-N, 糖の量よりみて糖脂質および磷脂質などが Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylcholine に混入して溶出されたものと考えられる。Fract. B は N/P 値は多少大ではあるが Phosphatidylethanolamine および Phosphatidylserine が主でその成分比は約 2:1 でさらに少量のコリン脂質および糖脂質が混在している。Fract. C は Phosphatidylethanolamine および Phosphatidylserine を主としその成分比は約 4:1 であるが加水分解物にイノシットが検出されたことよりイノシトール脂質, 分析値よりコリン脂質の混入されていること, また Fract. D はその溶出曲線, 分析結果より Fract. C の tailing したものと考えられる。Fract. F より H はその分析値および加水分解物より推定すると何れも Phosphatidylethanolamine および Phosphatidylthreonine, コリン脂質と糖脂質の混合物であるがその成分比は各画分により多少差が認められる。

アセタール脂質は全般にわたって分布している。この様にして予めケファリン画分を分別し, さらにケイ酸-セライトカラムクロマトグラフィーを行なっても個々の脂質を単離することは困難なように考えられる。

さらに Fract. B を DNP 化し DNP-アミノ磷脂質をケイ酸-セライトカラムクロマトグラフィーにより分画し, その加水分解生産物として DNP-エタノールアミンのみを含む画分と DNP-エタノールアミンおよび DNP-セリンを含む画分に分画した。前者を構成する脂肪酸はパルミチン酸, ステアリン酸, アラキジン酸および C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub> 不飽和酸, 後者はパルミチン酸, ステアリン酸, アラキジン酸および C<sub>18</sub> 不飽和酸よりなることを認めた。

### 総 括

マス肝臓から溶剤分画法によりケファリン画分を得, さらにケイ酸-セライトカラムクロマトグラフィーによりケファリンの再分画を試みた。この方法により得られたエタノールアミン, セリンに富む画分をさらに DNP 化しケイ酸-セライトカラムクロマトグラフィーにより DNP-phosphatidylethanolamine を分別した。

## 文 献

- 1) 露木英男・成瀬宇平 (1961). 油化学 **10**, 474-479.
- 2) 羽田野六男・座間宏一・五十嵐久尚 (1961). 日水誌 **27**, 1001-1004.
- 3) 座間宏一・羽田野六男・五十嵐久尚 (1961). 同誌 **27**, 1005-1008.
- 4) Nojima, S. & Utsugi, N (1957). *J. Biochem. (Tokyo)* **44**, 565-573.
- 5) Jane, F. & Beattie, R (1936). *Biochem. J.* **30**, 1554-1559.
- 6) Radin, N.S., Lavin, F.B. & Brown, J.R. (1955). *J. Biol. Chem.* **217**, 789-796.
- 7) McKibbin, J.M. & Taylor, W.E. (1949). *ibid.* **178**, 29-35.
- 8) Blix, G. (1937). *Mikrochim. Acta* **1**, 75-77.
- 9) Wittenberg, J.B., Korey, S.R. & Swenson, F.H. (1956). *J. Biol. Chem.* **219**, 39-47.
- 10) Hough, L. (1950). *Nature* **165**, 400.
- 11) Herb, S.F. & Riemenschneider, R.W. (1953). *Anal. Chem.* **25**, 953-955.
- 12) Hammond, E.G. & Lundberg, W.O. (1953). *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **30**, 432-438.
- 13) Marinetti, G.V., Erbland, J. & Stotz, E. (1960). *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 534-538.