



Title	クロマトグラフィーにおけるホスファチジルコリン分子種の溶出順位性について
Author(s)	高橋, 是太郎; 平野, 次彦; 座間, 宏一
Citation	脂質生化学研究, 25, 352-355
Issue Date	1983
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/48571
Type	journal article
File Information	lipids25_352-355.pdf



クロマトグラフィーにおけるホスファチジルコリン分子種の
溶出順位性について

北大・水産・食品化学 高橋是太郎, 産間宏一
日立北海セミコンダクタ 平野次彦

大豆, 卵黄ならびに4種の魚の筋肉より得たホスファチジルコリンをジグリセリドのアセテートとしたのち, 高速液体クロマトグラフィーによって各ピークの分子種と相対保持時間との関係を求めた。その結果, 各分子種の相対保持時間の対数とアシル基の総炭素数ならびに二重結合数との間にそれぞれ一次関数的関係があった。この一次関数は, ホスファチジルコリンの各アシル基の炭素数, 二重結合数をそれぞれ2行2列の行列の要素と考えた場合, この行列によって規定されることが明らかになった。

脂質の分子種レベルでの研究が強く望まれているにもかかわらず, 多くの天然脂質は複雑な分子種組成を有しており, 分析を困難にしている。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は, 脂質の分子種の研究に極めて有力な分析手段のひとつであると考えられているが, 今だにHPLCにおける脂質分子種の溶出順位を個々の分子種のレベルにまで明確にした報告は見当らない。したがって, この点を明らかにすることが分子種の同定と定量を迅速且つ正確に行なうことになると考え, 組織脂質の主成分であるホスファチジルコリン(PC)を対象にして実験を行なった。

＜ 実験方法 ＞

シロザケ, メバチマグロ, スケトウダラ, コイの各魚肉から Bligh & Dyer 法により全脂質を抽出したのち, Lands¹⁾のシリカゲルクロマト法に準じて精製PCを得た。また, 大豆レシチン(和光純薬製), 卵黄レシチン(旭化成製)からも同様にして精製PCを得た。各精製PCを Renkonen²⁾の方法に準じて phospholipase Cで加水分解した。加水分解物を調製TLC(*n*-ヘキサン:エチルエーテル=1:1)に供し, これにより精製した1,2-ジグリセリドをピリジンに溶解し, 無水酢酸を加えて20°Cで一晩アセチル化を行なった³⁾。反応物を調製TLC(*n*-ヘキサン:エチルエーテル=3:1)に供し, PC由来の1,2-ジグリセリドのアセテートを得た。この最終産物をLi Chrosorb RP-18 (Merck社製)のHPLC(イソプロパノール:アセトン:メタノール:アセトニトリル=1:1:3:4)に付し, 得られた各画分を必要に応じて8% AgNO₃含浸TLC(ベンゼン:エチルエーテル=4:1)に供したのち得られた再画分の脂肪酸組成(Unisole 3000, 2mm I.D. x 2m, ガラスカラムによる)および総炭素数組成(OV-101, 3mm I.D. x 0.5m, スチールカラムによる)をGLCにより分析し, 相方の分析結果からアシル基の組み合わせを考えて分子種組成を決定した。なお, AgNO₃含浸TLCの各バンドの量比は, ドトリアコンタンを内部標準とする内部標準法によって決定した。1位, 2位の位置異性体の決定は, HPLCで分取した脂質を酢リパーゼで加水分解することによって行なった。すなわち, 脂質3~5mgを2.2% CaCl₂溶液

0.1 mlと0.05% タウロコール酸ナトリウム塩0.25 mlを含むpH 8の1 M トリス塩酸緩衝液1 mlに40°Cで1分間激しく振ることによって懸濁し、この液に腭リパーゼ(Calbiochem社製)を40 mg加え、40°Cで4分間反応後、エタノール1 mlと6 N 塩酸1 mlで反応を停止させ、反応液からエチルエーテルで脂質を抽出し、調製TLC(n-ヘキサン:エチルエーテル:ギ酸=40:10:1)により加水分解物を精製後GLC分析に供して決定した。

< 結果 >

Fig. 1~3は、各PC由来の1,2-ジグリセリドのアセテートのHPLCクロマトグラムである。主要ピークの分子種の同定例をTable 1に示した。この表は、メバチマグロ(Fig. 3-E)の例であるが、ピーク7は明らかに $\begin{matrix} 16:0 \\ 22:6 \end{matrix}$ なるアシル基をもつ分子種である。高度不飽和酸は通常2位に結合していることが多いといわれていることから、最も大きいこのピークは、1位に16:0、2位に22:6を結合しているものであり、ピーク6は $\begin{matrix} 22:6 \\ 16:0 \end{matrix}$ すなわち、1位に22:6、2位に16:0を結合しているものであると考えられた。さらに、ピーク7に対して腭リパーゼによる加水分解を行なった結果、70%以上が加水分解されたにもかかわらず、1位の

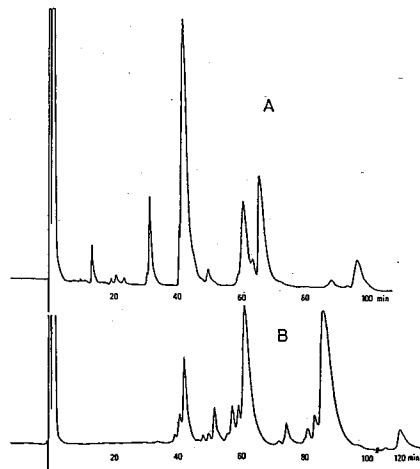


Fig. 1. HPLC chromatograms of soybean and egg yolk lecithin. A: Soybean. B: Egg yolk.

のアシル基に基づき遊離脂肪酸の画分にほとんど22:6が認められなかったことからこのことが裏づけられた。ピーク6中の18:1と20:5は前溶出ピーク5の夾雑物と考えられた。

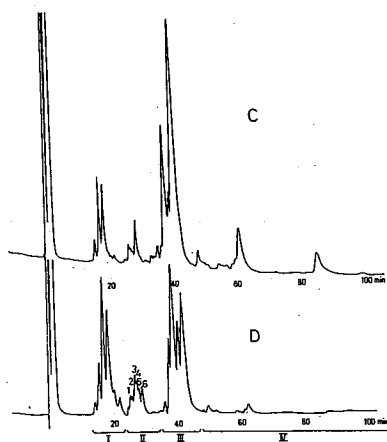


Fig. 2. HPLC chromatograms of chum salmon muscle lecithin. C: Captured in summer. D: Captured in fall.

た。ピーク5は、16:0、18:1、20:5そして22:6をほぼ等量ずつ含むが、ピーク5がピーク6よりも大巾に小さいことから、16:0および22:6はピーク6の夾雑物と

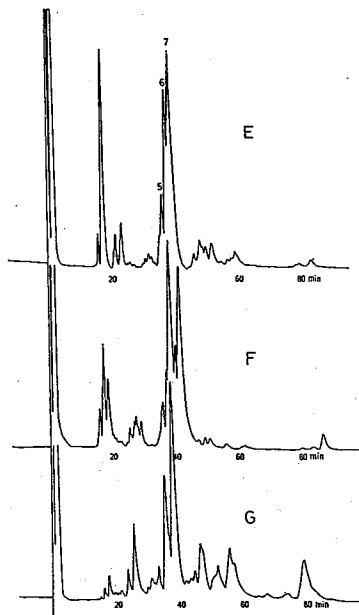


Fig. 3. HPLC chromatograms of big-eyed tuna, Alaska pollack and carp muscle lecithin. E: Big-eyed tuna. F: Alaska pollack. G: Carp.

考えられ、このピーク5は $|^{18:1}|_{20:5}|$ と結論づけられた。

Table 2. Determination of lecithin molecular species of minor component*

Fatty acid	Peak number					
	1	2	3	4	5	6
14:0						
16:1	53.0	47.7	21.3	30.6	34.6	44.6
20:5	47.0	52.3	50.4	28.3	19.0	9.7
22:6				36.2	15.6	8.3
Carbon number**				14.2	30.2	37.9
34			42.6	63.3	32.2	10.8
36	95.0<	90.0	57.4	5.7	41.7	89.2
38		10.0		31.0	26.1	
Carbon number**						
34			$ ^{20:5} _{14:0} $ 42.6	$ ^{14:0} _{20:5} $ 63.3	$ ^{14:0} _{20:5} $ 32.2	$ ^{14:0} _{20:5} $ 10.8
36	$ ^{20:5} _{16:1} $ 95.0<	$ ^{16:1} _{20:5} $ 90.0	$ ^{16:1} _{20:5} $ 57.4	$ ^{16:1} _{20:5} $ 5.7	$ ^{22:6} _{14:0} $ 41.7	$ ^{14:0} _{22:6} $ 89.2
38				$ ^{22:6} _{16:1} $ 31.0	$ ^{16:1} _{22:6} $ 26.1	

* % to each peak
** Example of chum salmon (Fall). ** Total acyl carbon number.

Table 1. Determination of lecithin molecular species of major component*

Fatty acid	Peak number		
	5	6	7
15:0			trace
16:0	25.6	48.4	53.8
17:0			trace
18:1	25.9	4.1	trace
20:4			trace
20:5	23.3	3.7	trace
22:4			trace
22:6	25.1	43.8	46.2
Molecular species	$ ^{18:1} _{20:5} $	$ ^{22:6} _{16:0} $	$ ^{16:0} _{22:6} $

* Example of big-eyed tuna.

Table 4. Relation between relative retention time of HPLC and molecular species of egg yolk lecithin

PN	MS	RT	RRT
26	$ ^{16:0} _{22:6} $	*	100.0
28	$ ^{16:0} _{18:3} $	47.0	114.1
"	$ ^{18:1} _{20:4} $	*	*
"	$ ^{16:0} _{20:4} $	50.4	122.2
30	$ ^{16:0} _{22:4} $	54.4	132.0
"	$ ^{16:1} _{18:1} $	55.6	134.9
"	$ ^{18:1} _{18:2} $	*	*
"	$ ^{16:0} _{18:2} $	59.2	143.7
28	$ ^{18:0} _{22:6} $	*	*
31	$ ^{15:0} _{18:1} $	72.4	175.7
"	$ ^{16:0} _{17:1} $	*	*
"	$ ^{17:0} _{18:2} $	*	*
30	$ ^{18:0} _{20:4} $	*	*
32	$ ^{18:1} _{18:1} $	79.0	191.7
"	$ ^{18:0} _{22:4} $	*	*
"	$ ^{16:0} _{18:1} $	83.6	202.9
"	$ ^{18:0} _{13:2} $	*	*
34	$ ^{18:0} _{18:1} $	121.8	295.1

Abbreviations:
PN: Partition number, MS: Molecular species, RRT: Relative retention time.

Table 3. Relation between relative retention time of HPLC and molecular species of soybean lecithin

PN	MS	RT	RRT*
26	$ ^{18:2} _{18:3} $	27.6	70.4
28	$ ^{18:2} _{18:2} $	37.6	95.8
"	$ ^{18:1} _{18:3} $	39.2	99.9
"	$ ^{16:0} _{18:3} $	42.0	107.1
30	$ ^{18:1} _{18:2} $	51.4	131.0
"	$ ^{16:0} _{18:2} $	55.2	140.7
"	$ ^{18:0} _{18:3} $	60.0	152.9
31	$ ^{17:0} _{18:2} $	62.8	160.1
32	$ ^{18:1} _{18:1} $	73.8	188.1
"	$ ^{20:1} _{18:2} $	*	*
"	$ ^{16:0} _{18:1} $	79.6	202.9
"	$ ^{18:0} _{18:2} $	*	*
"	$ ^{16:0} _{18:2} $	83.6	213.0
34	$ ^{18:0} _{18:1} $	113.2	288.6
"	$ ^{18:2} _{20:4} $	*	*

Abbreviations:
PN: Partition number, MS: Molecular species, RRT: Relative retention time.
* $|^{16:0}|_{22:6}|$ is used as the reference peak.

Table 5. Relation between relative retention time of HPLC and main molecular species of fish muscle lecithin

Chum salmon (Summer)			Chum salmon (Fall)			Big-eyed tuna			Alaska pollock			Carp		
MS	PN/RRT		MS	PN/RRT		MS	PN/RRT		MS	PN/RRT		MS	PN/RRT	
$ ^{20:5} _{20:5} $	20	37.3	$ ^{20:5} _{20:5} $	20	37.5	$ ^{20:5} _{22:6} $	20	41.2	$ ^{20:5} _{20:5} $	20	37.2	$ ^{20:5} _{22:6} $	20	42.5
$ ^{20:5} _{22:6} $	20	40.7	$ ^{20:5} _{22:6} $	20	40.4	$ ^{22:6} _{22:6} $	20	44.6	$ ^{20:5} _{22:6} $	20	40.4	$ ^{22:6} _{22:6} $	20	46.2
$ ^{22:6} _{22:6} $	20	44.2	$ ^{22:6} _{22:6} $	20	44.1	$ ^{20:4} _{22:6} $	22	55.2	$ ^{22:6} _{20:5} $	20	44.3	$ ^{20:5} _{20:5} $	20	62.5
$ ^{14:0} _{24:2} $	24	69.7	$ ^{18:1} _{20:5} $	26	87.0	$ ^{22:5} _{20:5} $	22	55.2	$ ^{18:1} _{26} $	26	86.7	$ ^{18:2} _{20:5} $	24	62.5
$ ^{22:6} _{22:6} $	26	92.2	$ ^{20:5} _{16:0} $	26	89.5	$ ^{22:5} _{22:6} $	22	60.0	$ ^{20:5} _{16:0} $	26	89.8	$ ^{16:1} _{22:6} $	24	67.7
$ ^{18:1} _{20:5} $	26	92.2	$ ^{16:0} _{20:5} $	26	91.9	$ ^{18:1} _{22:6} $	26	93.5	$ ^{22:6} _{26} $	26	89.8	$ ^{18:2} _{22:6} $	24	67.7
$ ^{22:6} _{22:6} $	26	97.1	$ ^{18:1} _{22:6} $	26	91.9	$ ^{16:0} _{20:5} $	26	93.5	$ ^{16:0} _{26} $	26	92.0	$ ^{14:0} _{24:2} $	24	67.7
$ ^{16:0} _{22:6} $	26	100.0	$ ^{22:6} _{16:0} $	26	96.7	$ ^{22:6} _{16:0} $	26	96.8	$ ^{22:6} _{26} $	26	92.0	$ ^{18:1} _{20:5} $	26	67.7
			$ ^{16:0} _{22:6} $	26	100.0	$ ^{16:0} _{22:6} $	26	100.0	$ ^{16:0} _{26} $	26	97.1	$ ^{16:0} _{20:5} $	26	93.7
						$ ^{16:0} _{22:5} $	26	134.9	$ ^{16:0} _{22:6} $	26	100.0	$ ^{18:1} _{22:6} $	26	93.7
									$ ^{16:0} _{26} $	26	100.0	$ ^{16:0} _{22:6} $	26	93.7
									$ ^{18:1} _{216.6} $	26	100.0	$ ^{16:0} _{22:6} $	26	100.0
									$ ^{14:0} _{32} $	26	100.0	$ ^{16:0} _{20:4} $	28	124.0
									$ ^{20:1} _{216.6} $	26	100.0			

Abbreviations:
PN: Partition number, MS: Molecular species, RRT: Relative retention time.

他のピークについても全く同様にして分子種を決定していった。なお、小さなピークは重なり合いが激しいことから、先づ、分取画分をAgNO₃含浸TLCに供したのち、得られた各バンドの脂肪酸組成と総炭素数を分析しその結果から可能なアシル基の組み合わせを考え、Table 2に示す如く夾雑物量の推移から各ピークの分子種を決定していった。以上の結果を基に $|^{16:0}|_{22:6}|$ の保持時間を100としたときの各分子種の相対保持時間(RRT)を求め、Table 3~6に示す結果を得た。なお、大豆PCの場合は、先づ $|^{16:0}|_{18:2}|$ を基準にしてRRTを求め、卵黄PCの分子種のRRTの表から、 $|^{16:0}|_{22:6}|$ を基準にしたときのRRTに換算して求めた。

< 考 察 >

PCの各アシル基の炭素数および二重結合数を2行2列の行列の要素と考え、そのうち1つを変数、残りを定数とみなし、縦軸にRRT、横軸にアシル基の総炭素数あるいは総二重結合数をとった片対数座標上にTable 3~6の結果をプロットした結

Table 6. Relation between relative retention time of HPLC and molecular species of fish muscle lecithin

Chum salmon (Summer)		Chum salmon (Fall)		Big-eyed tuna		Alaska pollack		Carp	
MS	PN/RRT	MS	PN/RRT	MS	PN/RRT	MS	PN/RRT	MS	PN/RRT
20:4	22	18:3	22	22:6	24	16:1	24	18:3	22
22:6	50.6	22:6	48.7	16:1	65.0	20:5	61.0	22:6	30.7
22:5	22	20:4	22	18:2	24	18:2	24	20:4	22
20:5	50.6	22:6	48.7	22:6	66.9	20:5	61.0	20:5	32.3
22:5	22	22:5	22	14:0	24	14:0	24	22:5	22
22:6	52.8	20:5	48.7	22:6	71.1	20:5	64.2	22:6	54.5
16:1	24	20:5	24	22:4	24	16:1	24	20:4	22
20:5	60.8	16:1	39.1	22:6	71.1	22:6	65.9	22:6	56.4
14:0	24	20:5	24	16:1	26	18:2	24	16:1	26
20:5	64.8	18:2	39.1	20:4	71.1	22:6	65.9	22:5	79.4
16:1	24	16:1	24	20:4	24	14:0	24	18:3	26
22:6	65.8	20:5	60.8	22:5	74.0	22:6	69.9	22:5	79.4
22:6	24	18:2	24	22:6	25	22:5	28	15:0	25
14:0	67.4	20:5	60.8	17:1	78.4	16:0	115.7	22:6	79.4
15:0	25	20:5	24	22:5	24	16:0	28	17:1	25
20:5	77.8	14:0	62.2	22:5	78.4	20:4	115.7	22:6	79.4
17:1	25	14:0	24	17:2	25	16:0	28	16:1	26
22:6	82.3	20:5	64.2	22:5	78.4	22:5	130.3	20:4	82.7
14:0	26	22:6	24	17:2	25	20:1	28	18:2	26
22:5	82.3	16:1	64.2	22:5	78.5	20:5	125.0	20:4	82.7
15:0	25	16:1	24	17:1	25	18:0	28	18:1	28
22:6	84.4	22:6	67.1	22:6	82.7	20:5	137.5	22:5	111.7
20:5	26	22:6	24	15:0	25	20:1	28	16:0	28
18:1	87.2	14:0	67.1	22:6	84.7	22:6	137.5	16:2	111.7
18:1	26	14:0	24	20:5	26	18:1	30	18:1	28
20:5	90.2	22:6	69.5	18:1	84.7	16:1	137.5	20:4	115.8
20:5	26	16:1	26	18:1	26	18:1	30	15:0	28
16:0	90.2	22:5	77.8	20:5	88.2	18:2	137.5	22:5	119.3
22:6	26	15:0	25	22:6	26	14:0	30	16:0	30
18:1	90.2	20:5	77.8	18:1	91.3	18:1	150.0	22:4	133.8
16:0	28	17:1	25	20:5	26	16:0	30	20:1	28
22:5	121.9	22:6	77.8	16:0	91.3	16:1	150.0	22:6	133.8
16:0	28	20:5	26	20:4	28	16:0	30	18:1	30
20:4	126.6	18:1	82.2	16:0	116.7	18:2	150.0	16:1	138.4
17:0	27	22:5	28	17:0	27	18:0	28	18:1	30
22:6	126.6	16:0	116.6	22:6	116.7	22:6	150.0	15:2	138.4
20:1	28	16:0	28	18:1	28	18:1	32	16:0	30
20:5	126.6	22:5	119.9	22:5	116.7	16:0	207.4	18:2	148.4
20:1	28	16:0	28	16:0	28	20:1	32	16:0	30
22:6	140.6	20:4	124.6	20:4	124.6	14:0	207.4	16:1	148.4
18:0	28	20:1	28	22:5	28	16:0	34	18:0	28
20:5	140.6	20:5	124.6	16:0	130.0	20:1	301.9	22:6	148.4
18:1	30	18:0	28	22:6	28	18:0	34	18:0	30
16:1	143.6	20:5	133.3	18:0	143.2	18:0	34	20:4	179.4
18:0	28	18:1	30	18:0	30	18:0	32	18:1	32
22:6	152.5	16:1	137.2	22:6	148.1	18:1	301.9	18:1	195.3
14:0	30	14:0	30	18:1	32	16:0	32	16:0	32
18:1	152.5	18:1	142.9	18:1	189.6	18:1	32	18:1	210.1
16:0	30	16:0	30	18:1	32	16:0	32		
16:1	152.5	16:1	142.9	16:0	206.1	16:0	32		
22:4	32			18:1	215.5				
20:5	265.7								

Abbreviations:
PN: Partition number, MS: Molecular species, RRT: Relative retention time.

果, Fig. 4 に示す如く2種類の平行線群を得ることができた。

この結果を基にして実験式をたてた結果, 次の如く表わすことができた。すなわち,

$$C = P_1 \cdot \log(RRT) + \beta_1 \quad C = \begin{vmatrix} x & d_1 \\ c_2 & d_2 \end{vmatrix} \quad (1)$$

$$D = P_2 \cdot \log(RRT) + \beta_2 \quad D = \begin{vmatrix} c_1 & d_1 \\ c_2 & d_2 \end{vmatrix} \quad (2)$$

但し, P_1, P_2 は直線の傾き, β_1, β_2 は直線の切片を表わす。

C_1, C_2 は各アシル基の炭素数を表わし定数, d_1, d_2 は各アシル基二重結合数を表わす定数である。

x は, アシル基の炭素数を表わし変数, y は, アシル基の二重結合数を表わす変数である。

PC由来の1,2-ジグリセリドのアセテートは, (1), (2)式に従って溶出されてくることから, 実験条件を同一にすることによ

り, 未知ピークの分子種をRRTから推定できることが明らかになった。

＜文献＞

- 1) W. E. M. LANDS and P. HART: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 43, 290-295 (1966).
- 2) O. RENKONEN: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42, 298-304 (1965).
- 3) A. KUKSIS and L. MARAI: *Lipids*, 2, 217-224 (1967).
- 4) K. ZAMA, T. MARUYAMA, and K. TAKAHASHI: *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 27, 181-190 (1976).
- 5) K. TAKAHASHI, K. ZAMA, and T. MATSUOKA: *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 29, 378-385 (1978).
- 6) K. TAKAHASHI, F. CABLING, and K. ZAMA: *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 29, 386-391 (1978).
- 7) A. KUKSIS: in "Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids" (ed. by R. T. HOLMAN), Vol. 12, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, 1972, pp. 105-111.
- 8) R. WOOD and F. SNYDER: *Arch. Biochem. Biophys.*, 131, 478-494 (1969).

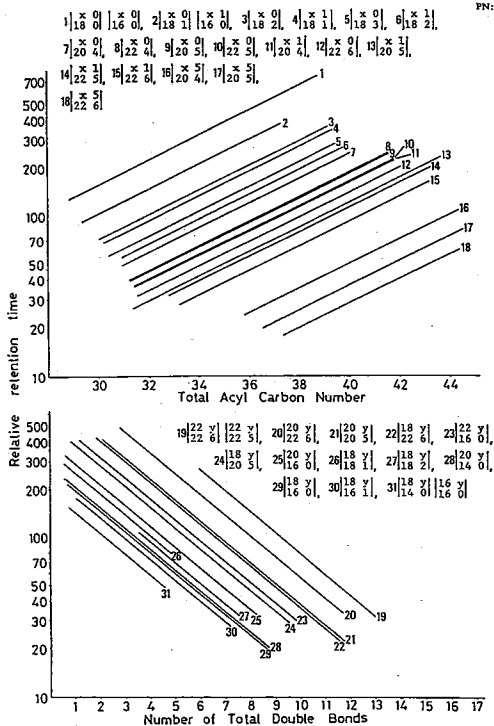


Fig. 4. Relation between relative retention time and total acyl carbon number and relation between relative retention time and total double bonds on HPLC of lecithin.