

総合論文

過酸化脂質分析用ホスフィン試薬の開発とその応用

赤坂 和昭*

(1995 年 5 月 18 日受付)

脂質の酸化により生成する過酸化脂質の高感度、高選択的な蛍光分析試薬として、ホスフィン試薬の設計・開発を行った。トリフェニルホスフィンによる脂質ヒドロペルオキシドの還元反応に着目し、過酸化脂質分析試薬としてトリフェニルホスフィンのフェニル基を蛍光発色基で置換した化合物を設計・合成した。この化合物は、それ自体には蛍光性がなく、過氧化物等によりホスフィンオキシドに酸化されることにより初めて強い蛍光性を示した。反応は、脂質過酸化反応の第一次生成物であるヒドロペルオキシドに高い選択性を示し、反応の前後の蛍光強度の変化より脂質ヒドロペルオキシドを定量することが可能であった。合成したホスフィン試薬の中で蛍光分析に最適な性質を示したジフェニル-1-ピレニルホスフィン (DPPP) は液相法、及び HPLC ポストカラム法への適応が可能で、これらの方法によりそれぞれ sub-nmol、及び数 pmol レベルでの脂質ヒドロペルオキシドの検出・定量が可能であった。特に、HPLC ポストカラム法ではリン脂質やトリアシルグリセロール、コレステロールエステル等の脂質クラス、あるいは分子種レベルでの分析が可能となった。本稿では、過酸化脂質分析試薬の開発の経緯を含めたホスフィン試薬の設計・合成、特性、及び食品試料や血しょう等の生体試料中の脂質ヒドロペルオキシドの分析への応用について紹介する。

1 緒 論

脂質は酵素的、あるいは非酵素的に酸化を受け、その一次生成物としてヒドロペルオキシドを与える。更に、ヒドロペルオキシドは分解や重合によりアルデヒド、ケトン、カルボン酸、炭化水素などの様々な二次生成物を与える。過酸化脂質はこれら脂質の酸化により生じた化合物の総称で、非常に多様性に富んでいる。

食品中の過酸化脂質は、その風味や栄養価を低下させることから食品化学上非常に重要な問題であり¹⁾²⁾、酸化メカニズムの解明やその防止法について様々な検討がなされてきた。

一方、脂質は生体の主要な構成成分の一つでもある。近年、その酸化的変性が生体に与える影響、特に各種疾患や老化との関連が非常に注目されるようになってきている。例えば、細胞膜の主要な構成成分であるリン脂質の酸化は、膜の流動性や透過性を変化させ、膜機能を低下させるものと考えられている。また、最近では、血しょう中の低比重リポタンパク質が、酸化的損傷を受け、マクロファージに無制限に取り込まれ、これが血管の内皮下の空間に停滞し、泡まつ細胞を形成、更に内皮細胞

を障害し、血小板などの細胞が集まり凝固系が活性化され、血栓形成が始まり、動脈硬化が進展することが明らかとなってきている^{3)~5)}。このほかにも、病的老化であるアルツハイマー症やパーキンソン病⁶⁾、虚血-再灌流における障害⁷⁾、ストレス性かいよう⁸⁾、四塩化炭素やハロセン等による肝障害等⁹⁾、酸化的障害とかかわり合いの指摘されている疾患は枚挙に暇がない。

このような脂質過酸化が及ぼす生体への影響を解明する上で、酸化障害を受けた部位、程度、及び脂質の種類に関する情報を得ることが必要不可欠である。そのため、それぞれの目的に応じた分析法の提案がなされてきた。ヨウ素法¹⁰⁾は、試料にヨウ化カリウムを加えた場合に遊離されるヨウ素をチオ硫酸ナトリウムで滴定して求める方法で食用油脂中に含まれる過酸化脂質の分析には最も一般的に用いられている方法であるが、感度が低く数 g 程度の試料量を必要とするため、その微量化の試みがなされている。例えば、ヨウ素を塩化カドミウム複合体とする比色法¹¹⁾や塩化アルミニウムを用いた比色法¹²⁾、ヨウ素滴定へ電位差滴定を用いた方法¹³⁾や、遊離三ヨウ素化物の HPLC による分離なども試みられている¹⁴⁾。これらの方法は、いずれも過酸化脂質を還元剤で還元し、生成した酸化物量を求めることにより間接的に総過酸化物を定量するものである。これに対し、

* 東北大学農学部応用生物化学科生体分子分析学講座:
981 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

生体試料中の過氧化物分析法として繁用されているチオバルビツール酸 (TBA) 法は、過酸化脂質が分解して生じるマロンジアルデヒド (MDA) が TBA と反応してできる赤色色素を比色あるいは蛍光定量するもので¹⁵⁾¹⁶⁾、簡便かつ高感度な分析が可能であるが、MDA 以外にも反応陽性物質が存在することや、脂質の分子種により生成する MDA 量が異なるなど、得られる情報の質がヨウ素法などと異なり、測定値の比較や評価に注意が必要である¹⁷⁾。このほか、脂質ヒドロペルオキシドの定量法として酵素を用いた分析法^{18)~20)}が報告されているが、これらの方法では酵素が基質特異性を有することから、脂質クラスレベルでの反応の選択性がより高い。従って、液相法による分析においては、過酸化脂質の中の何を測定しているのか考慮した上で用いる必要があり、選択性が明らかで、高感度、簡便な分析法の開発が望まれていた。

生体内過酸化脂質の量的評価と同時に質的評価を行うためには酸化を受けている脂質の種類を特定する必要がある。そのためには、対象とする脂質に対し特異性の高い分析法を用いるか、脂質をあらかじめ何らかの方法で分離した後に検出する必要がある。前者の例としては、基質特異性を利用した酵素法が挙げられる。Kamata らは、*N*-(9-アクリジニル)マレイミドとグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) との組み合わせによる脂肪酸ヒドロペルオキシド分析法²¹⁾とリパーゼやホスホリパーゼとの組み合わせによるトリアシルグリセロール²²⁾やリン脂質²³⁾のヒドロペルオキシドの選択的分析法を報告している。一方、後者の例としては、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた方法が幾つか提案されている。HPLC 法は、穏和な条件下で難揮発性の微量成分を分離する方法として非常に優れた方法で、過酸化脂質の分離には非常に適した方法といえるが、この方法では過酸化脂質を選択的、かつ高感度に検出するための工夫が必要となる。過酸化脂質の検出法としては標的化合物自体の持つ官能基を直接検出する方法、及び HPLC により分離後、検出反応を行い検出する方法 (ポストカラム法) が用いられている。直接検出する方法としては紫外吸収検出²⁴⁾や電気化学的検出²⁵⁾が挙げられる。紫外吸収検出法は 1,4 ジエン構造を持つ不飽和脂肪酸が酸化を受けると主に共役ジエン構造を有する酸化物が生成することから、235 nm 付近の吸収をモニターすることにより過酸化物を検出する方法であり、非常に簡便かつ特殊な装置を必要としないことから、酸化生成物の追跡やメカニズム解明などに広く用いられてきているが、必ずしも過酸化物自体を検出しているとは限らず、選択性

の面で問題があった。これに対し、電気化学的検出法ではヒドロペルオキシドの酸化電位を直接検出するもので、特異的にナノモルレベルのヒドロペルオキシドを検出することができる。しかし、生体内過酸化脂質の分析にはなお感度が不十分であり、高感度な検出法の開発が切望されていた。このような状況から、更に高感度なヒドロペルオキシドの検出法として化学発光法や蛍光法を用いたポストカラム法が開発された。化学発光法は、ルミノールやイソルミノールがヘムタンパクの存在下、過酸化物により酸化的に分解する際に発する光を検出する方法で過酸化水素の高感度分析法として広く用いられていたが、過酸化物として脂質ヒドロペルオキシドを用いても同様の発光現象が観察されたことから、この方法を検出反応に組み入れた HPLC 法が開発された²⁶⁾²⁷⁾。この検出法は、従来の検出法に比べ非常に高感度で、選択性も高く生体内過酸化脂質の分析法に適した方法の一つである。一方、著者らは過酸化脂質の新しい蛍光分析試薬としてホスフィン型試薬を開発し、液相法、及び HPLC-ポストカラム法による高感度、高選択的な過酸化脂質の分析を可能とした。この方法は、化学発光-HPLC 法と測定原理を異にし、化学発光-HPLC 法での障害となる溶媒選択の制限やラジカル捕そく剤の影響等を受けずに測定することを可能とした。本稿では、この蛍光法について、試薬開発の経緯と食品や生体試料中の過酸化脂質分析への応用について紹介する。

2 ホスフィン型試薬の開発²⁸⁾²⁹⁾

蛍光分析法は、高感度性と高選択性を兼ね備えた方法の一つとして、食品や生体試料などの複雑なマトリックス中の微量成分の分析に広く用いられてきている。著者らは、この蛍光法を用いた新しい過酸化脂質の分析法の開発を目指し、試薬の設計と合成を行った。

前述のとおり、脂質過酸化物には第一次生成物であるヒドロペルオキシドとその分解あるいは重合した二次生成物が存在する。二次生成物は複雑な化合物群で、しかも脂質の酸化に由来しない経路で生成する場合もあり、脂質過酸化の指標としては問題があると考えられる。一方、ヒドロペルオキシドは脂質の酸化反応によってのみ生成し、-OOH 基を共通して有することから、この官能基を標的とした分析法の開発を試みた。

まず、ヒドロペルオキシドに選択的な化学反応の検索を行い、その中でトリフェニルホスフィンとの反応に注目した。トリフェニルホスフィンは、Wittig 反応など有機合成において広く用いられている試薬であるが、過酸化物の還元剤としても利用され、特に、脂質過酸化反

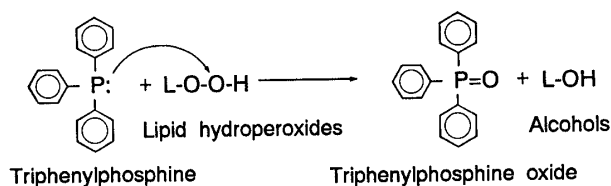
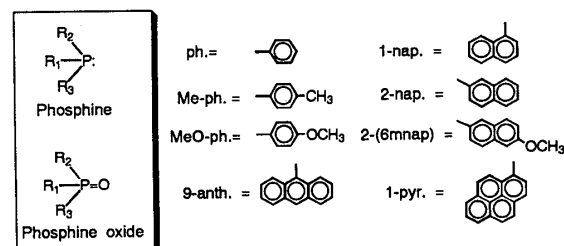


Fig. 1 Reaction of triphenylphosphine with lipid hydroperoxides

応における第一次生成物であるヒドロペルオキシドを穏和な条件下で、定量的にアルコールに還元する試薬として繁用されている (Fig. 1). これをトリフェニルホスフィンの側からみると、ホスフィンの三価のリン原子が n 供与体としてヒドロペルオキシドの酸素原子に求核反応を行うと同時にその 3d 空軌道が π 受容体となり $d\pi-p\pi$ 相互作用が可能となり、五価のホスフィンオキシドが生成する. このリン原子の電子軌道の変化は、分子全体の電子密度分布に変化をもたらし、その結果、電子軌道と密接にかかわり合いのある紫外外部吸収に変化が生じることが予想された. 実際、トリフェニルホスフィンには、260 nm 付近でごくわずかな吸収を示したに過ぎなかったのに対し、そのオキシドでは約 10 倍以上の強い吸収を示した. このホスフィンとヒドロペルオキシドの反応の前後における吸光度の変化量はヒドロペルオキシド量と非常によく比例したことから、この反応を用いることにより脂質ヒドロペルオキシドを定量することが可能であることが示唆された. しかし、紫外外部吸収を検出する方法は、共存物質の影響を大きく受け、又感度的にも不十分であったが、もし、この変化量を蛍光の信号として取り出すことができれば、より高感度、高選択的分析が可能となるものと期待できた.

そこで、蛍光性は、紫外外部吸収と同様、分子の電子密度分布により大きく影響を受けることから、反応の前後における蛍光スペクトル特性の変化を期待し、トリフェニルホスフィンのフェニル基を蛍光性の発色団で置換したホスフィン化合物 (1~10)、及びそれらのオキシド (1'~10') を設計・合成した (Fig. 2).

試薬は、当初トリフェニルホスフィンと金属リチウムを反応させた後、導入する発色団の臭素化物を加えフェニル基と置換させることにより合成した. この方法は、低収率で、導入できる発色団の数も 1 個のみであったが、フェニルホスホリルクロリドと導入する発色団の Grignard 試薬とのカップリング反応により収率を向上させるとともに、複数の発色団の導入も可能となった (Fig. 3). 例えば、後述するジフェニル-1-ピレニルホス



Phosphine	Phosphine oxide	R ₁	R ₂	R ₃
1	1'	1-nap.	ph.	ph.
2	2'	1-nap.	1-nap.	ph.
3	3'	2-nap.	ph.	ph.
4	4'	2-nap.	2-nap.	ph.
5	5'	2-nap.	2-nap.	2-nap.
6	6'	2-(6-mnaph)	ph.	ph.
7	7'	9-anth.	ph.	ph.
8	8'	1-pyr.	ph.	ph.
9	9'	1-pyr.	Me-ph.	ph.
10	10'	1-pyr.	MeO-ph.	ph.

Fig. 2 Structure of aryl phosphines and their oxides

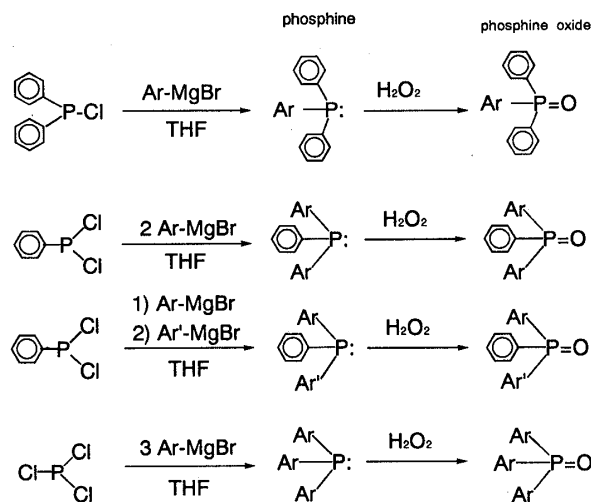


Fig. 3 Synthesis of phosphines and their oxides

フィン (DPPP; 8) は、市販の試薬を原料とし、Grignard 試薬の調製とそれに続くカップリング反応の短工程の反応で、40% 以上の収率で得ることが可能であった. 各ホスフィンオキシドはホスフィンを経過酸化水素で酸化して調製した.

合成したホスフィン及びオキシドの蛍光スペクトルを測定した結果、いずれのホスフィンも蛍光性を示さな

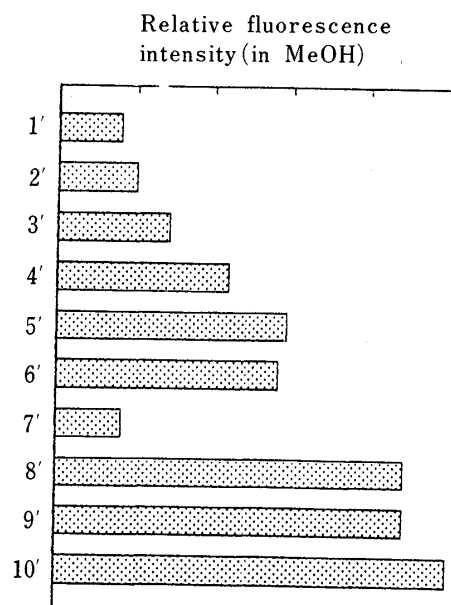


Fig. 4 Relative fluorescence intensities of phosphine oxides in methanol

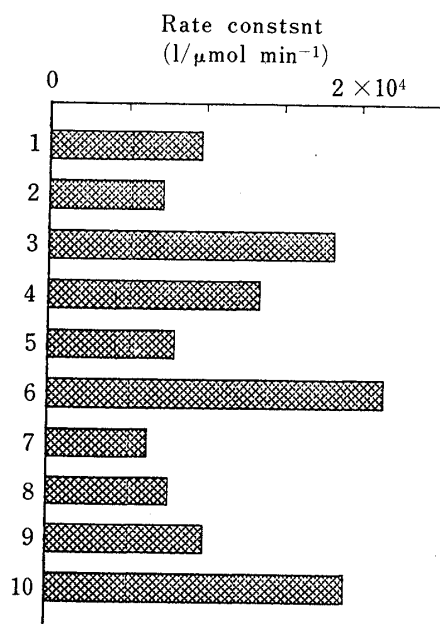


Fig. 5 Rate constants of the reaction of phosphine reagents with *t*-butyl hydroperoxide at 60°C

ったのに対し、オキシドは強い蛍光性を示した。これは、ホスフィン化合物では、リン原子上の孤立電子雲の存在により蛍光発色基に電子が流れ込み、本来持っていた蛍光性を失っていたものが、オキシドに酸化されることにより電子の流れに変化が生じ、その蛍光性を回復し

たものと考えられた。このことは、ホスフィン試薬が蛍光分析試薬として理想的な特性の一つを有することを示したもので、幸運にも当初の著者らの期待した以上の結果を得ることができた。

Fig. 4, 及び Fig. 5 に各オキシドのメタノール中での相対蛍光強度、及びホスフィンの *t*-ブチルヒドロペルオキシドとの反応速度定数を示した。ピレン誘導体で最も強い蛍光強度が得られた。これらホスフィンオキシドの蛍光強度は溶媒の極性により影響を受け、ピレン系やナフタレン系の化合物ではアルコール系溶媒で強く、低極性溶媒で若干弱くなり、逆にアントラセン誘導体では低極性溶媒で強い傾向を示した。ヒドロペルオキシドとホスフィンの反応性は、本反応が SN_2 反応により進行することから予想されたとおり、リン原子の周りの立体障害の小さいものほど、又リン原子の電子密度の高いものほど高い傾向を示した。

ホスフィン試薬は結晶状態では非常に安定であったが、溶液中では、特に光照射により不安定となりオキシドを与える。このため試薬溶液は褐色瓶等を用い冷暗所に保存する必要があった (-20°C で遮光することにより 1 週間は保存可能)。この光照射下での不安定性は、試薬合成においても収率低下の一因となることから、特にシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製中の光照射に注意する必要があった。

試薬の安定性、反応性、蛍光特性、調製の容易さ等を考慮し、分析試薬として DPPP が最も優れた特性を持っていると判断されたため、この試薬を用いた分析への応用について検討し、高感度、高選択的な過酸化脂質分析法を確立することができた。

3 液相法による過酸化脂質分析³⁰⁾³¹⁾

DPPP は、それ自体は蛍光性でなく、オキシドに酸化されて初めて蛍光を発する。このため、試薬と試料を混合し反応させた後、蛍光強度を測定することにより過酸化物の定量が可能であった。実際の反応は、メタノールとクロロホルムの混合溶液を溶媒として、試料と試薬を混合し、密栓した後、 60°C 、暗所で 60 分間反応させた。反応後、氷冷し一定量の 2-プロパノールを加えてから蛍光強度の測定を行い、既知濃度の DPPP オキシドの蛍光強度と比較し、過酸化物濃度を求めた。DPPP と各種ペルオキシドとの反応は、ペルオキシド基の周りの立体的障害と求核攻撃を受ける酸素原子の電子密度により影響を受け、ヒドロペルオキシドで高く、過酸エステルやジアルキルペルオキシドで低い。このため、この試薬を用いることにより高選択的にヒドロペルオキシド

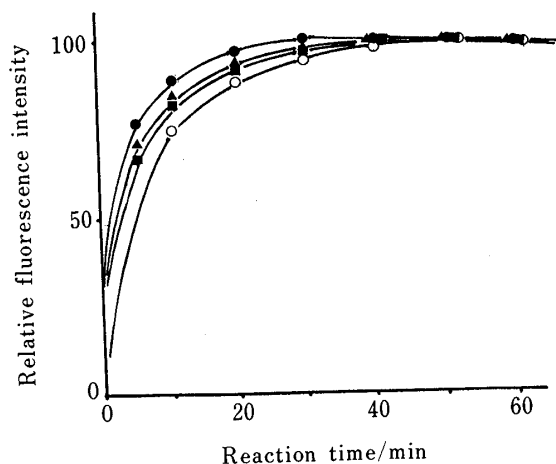


Fig. 6 Reaction time courses of lipid hydroperoxides with DPPH at 60°C

Samples were hydroperoxides of trilineolein (▼), triolein (●), cottonseed oil (▲), linseed oil (△), and soybean oil (○).

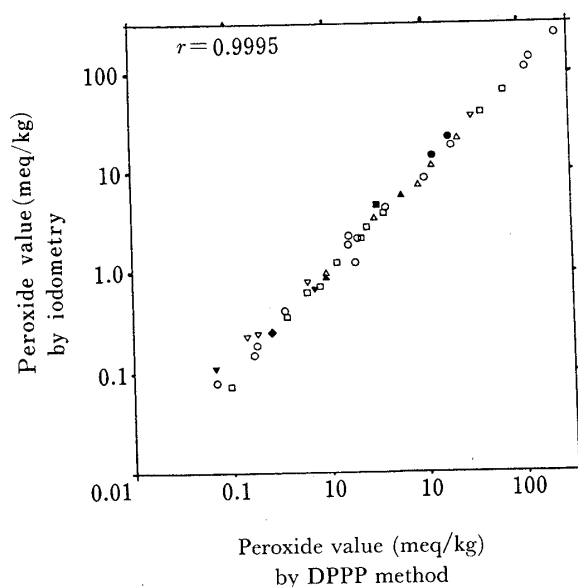


Fig. 7 Relationship between peroxide values determined by the DPPH method and iodometry

○: vegetable oils; ●: fatty acids; ■: wheal oil; □: salad oils; ▲: butters (suspension); ▼: butters (extract); △: margarines (suspension); ▽: margarine (extract); ◆: mayonnaise (extract)

の定量が可能で、各種脂質ヒドロペルオキシドとの反応は 60°C で 50 分以内に完了した (Fig. 6). この反応条件下での脂質ヒドロペルオキシドの分解は認められず、又抗酸化剤として BHT を添加することにより測定に影

響を与えることなく、新たなヒドロペルオキシドの生成を効果的に抑制することができた. この方法を用い、0.1~7 nmol の範囲で再現性良く脂質ヒドロペルオキシドを定量することが可能であった. 本法を用い、数 mg 以下の試料を用い食用油、バター、マーガリン等の食品中の脂質過酸化物を測定した結果は、ヨウ素法による値と非常によく一致した (Fig. 7). ヨウ素法と DPPH 法では、還元剤と過酸化脂質の反応により生成した酸化物を定量することにより間接的に過酸化物を分析する点で類似した方法であり、用いる還元剤の酸化還元電位の違いにより過酸化物に対する選択性が若干異なる可能性があるものの、主要な標的となる官能基はいずれもヒドロペルオキシド基であることから同じ質の情報が得られるものと考えられる.

4 HPLC による過酸化脂質分析

4.1 HPLC ポストカラムシステムの構築³²⁾

HPLC の検出法としては、① 標的化合物自体の持つ官能基の直接検出、② HPLC に導入する前に誘導体化し分離後に検出 (プレカラム法)、及び ③ HPLC により分離後、検出反応を行い検出 (ポストカラム法) する方法が挙げられる. ポストカラム法の場合、分離のためのポンプ以外に試薬溶液を送液するためのポンプ、及び反応槽、反応コイル等の装置とともに、検出反応には高選択かつ迅速に進行すると同時に、反応生成物のみを選択的に高感度で検出できることが要求されるなどの制約がある. しかし、必要最小限の前処理で高感度な分析が可能となることから、過酸化脂質のような不安定な化合物を分析する場合、適当な検出反応さえあれば非常に有効な方法となる. そこで、DPPH を検出系に組み入れたポストカラムシステムの開発を行った (Fig. 8). カラムからの溶出液に試薬溶液を混合し、反応コイル中で反応後、冷却し蛍光強度をモニターした. 反応コイルはテフロン製よりもステンレス鋼製のものでより高いピークが得られたため、ステンレス鋼製コイル (0.5 mm i.d. × 20~30 m) を用いた. 反応温度について室温から 80°C まで検討した結果、ベースラインのノイズはほとんど変化せず、反応温度が高いほどピーク高は増加し、S/N の向上が認められたため 80°C に設定した. 本検出法により、1~2 ピコモルレベルの脂質ヒドロペルオキシドを検出することが可能で、濃度とはピーク高 (あるいはピーク面積) の間には良好な直線関係が認められた.

Fig. 9 にトリリノレイン、そのヒドロキシド体、及びヒドロペルオキシド体のクロマトグラムを示した. 蛍光検出では、ヒドロペルオキシドだけがピークを与え、未

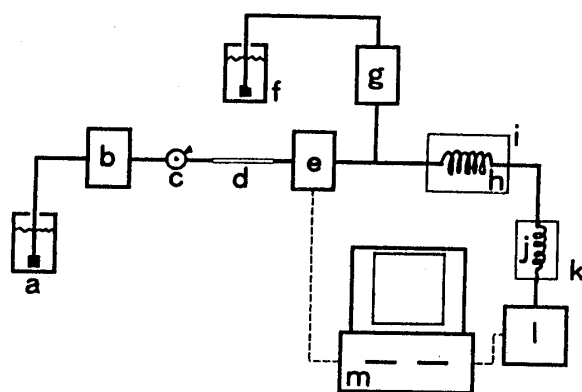


Fig. 8 HPLC system diagram

a) mobile phase solvent, b) pump, c) injector, d) analytical column, e) UV detector, f) DPPP solution, g) pump, h) reaction coil, i) reaction oven, j) cooling coil, k) water jacket, l) fluorometer, m) data processor.

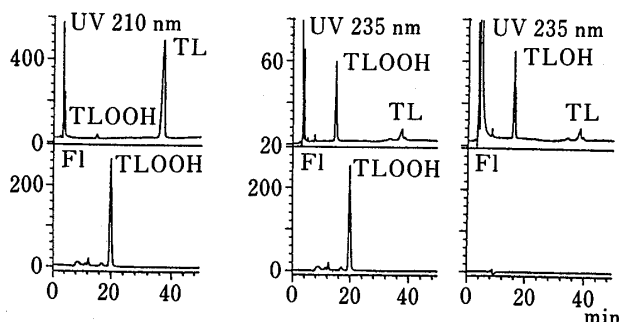


Fig. 9 Chromatograms of trilinolein (TL, 50 nmol), TL hydroperoxides (TLOOH, 214 pmol), and TL hydroxides (TLOH, 214 pmol)

Detections were performed by UV at 205 nm or 235 nm (UV) and fluorometry with DPPP (FI).

酸化、及びヒドロキシ体は検出に影響を与えなかった。ヒドロペルオキシドのピークの中には、蛍光法のみで検出され、紫外吸収では検出されなかったものもあった。このように DPPP 法は共役ジエン構造を有さないヒドロペルオキシドでも検出することが可能であった。

Fig. 10 に構成脂肪酸種の異なる脂質ヒドロペルオキシドの単位濃度あたりの相対ピーク面積を示した。オレイン酸が酸化されたものではわずかに低い値が得られているが、リノール酸やリノレン酸などのポリエン酸のヒドロペルオキシドはほぼ同じ値を与えた。不飽和脂質の酸化速度は、二重結合に隣接するメチレン基、特に二重結合に挟まれたメチレン基の数により異なり、相対的酸化速度はモノエン酸 0.025 に対し、二重結合に挟まれた

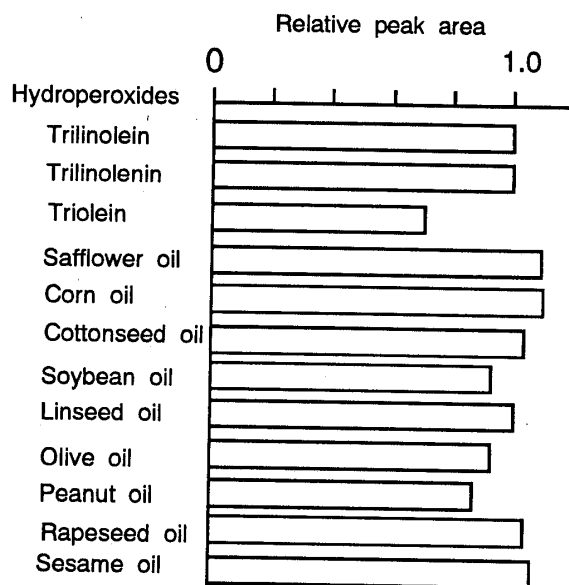


Fig. 10 Relative peak area of lipid hydroperoxides

メチレン基の数が 1, 2, 3, 4, 及び 5 個の脂質は、それぞれ 1, 2, 4, 6, 及び 8 と 40~320 倍酸化を受けやすい³³⁾。このことから、生体や食品中の脂質過酸化物のほとんどがリノール酸やリノレン酸などのポリエン酸に由来するものと考えられ、構成脂肪酸の影響をほとんど考慮せずに、共通の検量線を用いて分析することが可能であった。

DPPP とヒドロペルオキシドの反応は極性溶媒である含水メタノールから低極性溶媒のヘキサンに至るまで各種有機溶媒中で進行することから、HPLC の移動相は幅広い溶媒系の中から選択することができ、これにより順相、逆相、グラジエント溶出等の分離モードの選択の自由度を大きくとることが可能であった。

4・2 リン脂質ヒドロペルオキシドの分析^{34)~36)}

ホスファチジルコリン (PC) ヒドロペルオキシドの分析は、比較的高極性の溶媒を用い、順相系のカラムで分離した。この方法では、当初、内在性のリン脂質のピークを紫外吸収検出によりモニターし、これを内標準とし、卵黄 PC より調製した標準 PC ヒドロペルオキシドを用いた標準添加法により定量を行った。しかし、測定に時間がかかることなどから、NBD で蛍光標識化された PC を内標準として試料に添加し、これを紫外吸収検出する改良法を確立した。これにより再現性の良い結果を短時間で得ることができるようになり、この方法を用いヒト血しょう、及びウシ血清を分析した結果、

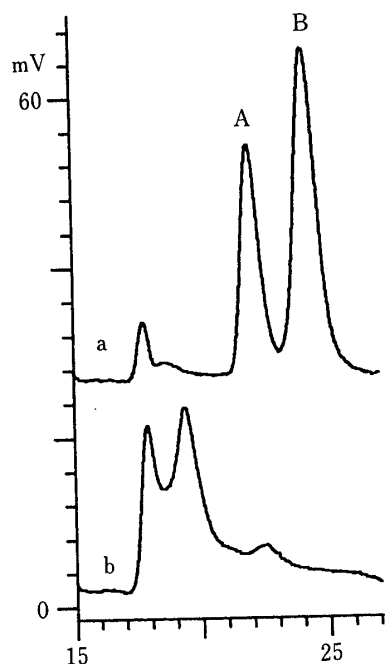


Fig. 11 Typical chromatograms of standard hydroperoxides of PC and PE (a) and deproteinized human plasma (b)

Peaks A and B were PC hydroperoxides (111 pmol) and PE hydroperoxides (117 pmol), respectively.

10~50 nM の PC ヒドロペルオキシドが検出され、このレベルは季節的に変動することも明らかとした。血しょう中の PC ヒドロペルオキシドレベルについて、二木らはイソルミノールを用いた化学発光-HPLC 法により分析し、検出されなかったと報告している³⁷⁾。一方、Miyazawa らはルミノールを用いた同様の化学発光-HPLC 法により数十~数百 nM レベルの PC ヒドロペルオキシドが存在すると報告している³⁸⁾。これらの方法では、標準試料ではいずれもピコモルレベルでの検出が可能であることから、前処理操作の違いにより異なった結果が得られたものと考えられた。そこで、人手による前処理操作の影響を最小限とするため、メタノールで除タンパクした血しょうを直接導入し、逆相系カラムで濃縮、洗浄後、溶媒を切り替え溶出させ、必要な部分のみをバルブ切り替えにより分離カラムに導入するシステムを構築した³⁹⁾。この方法により、PC 及びホスファチジルエタノールアミンのヒドロペルオキシドを同時かつ簡便に分析することが可能であった (Fig. 11)。この方法によっても、ヒト血しょうからは 5~30 nM 程度の PC ヒドロペルオキシドが検出され、ヒト血しょう中には PC ヒドロペルオキシドが存在していることを明らか

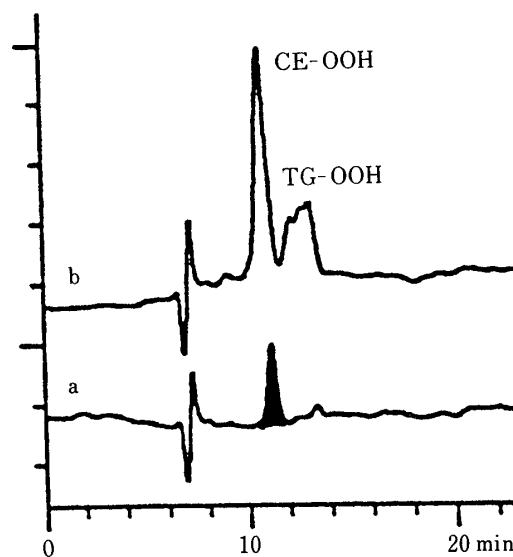


Fig. 12 Typical chromatograms of a human plasma extract (a) and standard hydroperoxides (b)

とすることができた。

4.3 中性脂質ヒドロペルオキシドの分析

トリアシルグリセロール (TG) は、ODS カラムを用いた場合、構成脂肪酸の総炭素数及び不飽和結合数により保持時間が異なるため、分子種に関する情報を得ることができる。一方、同じ逆相系カラムでもフェニル基をシリカゲルに化学結合させたカラムでは、構成脂肪酸に関係なくほぼ同じ位置に溶出するため、クラスレベルでの分析が可能であった³²⁾。

TG とコレステロールエステル (CE) は、シリカゲルカラムを用い、低極性溶媒でグラジエント溶出を行うことによりそれぞれのクラスレベルでヒドロペルオキシドを分析することが可能で⁴⁰⁾、ヒト血しょうを分析した結果、5~30 nM レベルの CE ヒドロペルオキシドが検出されたが、TG ヒドロペルオキシドは検出されなかった (Fig. 12)⁴¹⁾。この方法を用い、ヒト血しょう中に添加した PC ヒドロペルオキシドからレシチンコレステロールアシル基転移酵素によりコレステロールにヒドロペルオキシ脂肪酸が転移し CE ヒドロペルオキシドが生成することを証明することができた⁴¹⁾。又、沈殿法による血しょうリポタンパク質の簡易分画法と組み合わせ、HDL と LDL+VLDL 中の CE ヒドロペルオキシドを分析することも可能であった⁴²⁾。一方、Yamamoto らは、化学発光-HPLC 法により逆相カラムを用い CE ヒドロペルオキシドが数 nM レベルで存在すると報告

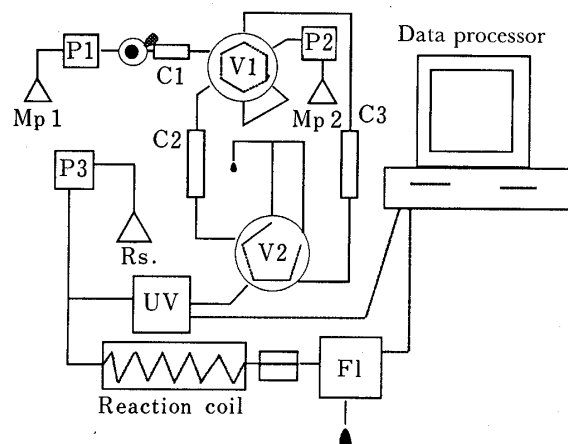


Fig. 13 HPLC system diagram for simultaneous determination of hydroperoxides of PC, CE and TG

している⁴³⁾。彼らの方法では、構成脂肪酸の種類により CE が分離するため分子種レベルの分析となる。又、ヒドロペルオキシド以外にユビキノール類もピークを与え、CE ヒドロペルオキシドの近くに溶出することからこれらとの分離に注意する必要がある。

4・4 リン脂質と中性脂質の一斉分析⁴⁴⁾

リン脂質と中性脂質は極性が大きく異なるためこれらを単一のカラムで同時に分析するのは困難であり、総脂質を抽出した後試料を分割、あるいは抽出段階でリン脂質画分と中性脂質画分を分割し、それぞれ異なったシステムで分析する必要があった。そこで、リン脂質と中性脂質を分析装置に導入後、オンラインで分画し、カラムスイッチングによりそれぞれを別々の分離カラムに導き分離し、検出するシステムを開発した (Fig. 13)。この方法により、PC ヒドロペルオキシドをクラスレベルで、又 TG と CE のヒドロペルオキシドは分子種レベルで同時に定量することが可能で、実際のヒト血しょう中の過酸化脂質の検索にも有効であった (Fig. 14)。

5 おわりに

ホスフィン試薬を用いた蛍光分析法は、化学発光-HPLC 法とともに、生体や食品試料中の過酸化脂質を分析するために十分な感度と選択性を有した分析法である。化学発光-HPLC 法は試薬混合後検出器まで導く時間が短く、比較的迅速な分析が可能で、検出器の発達によっては更なる高感度化も期待できるが、試薬溶液に水溶液を用いるため分離溶媒の選択に制限があり、又、脂質の構成脂肪酸により検量線の傾きが異なるため、個々

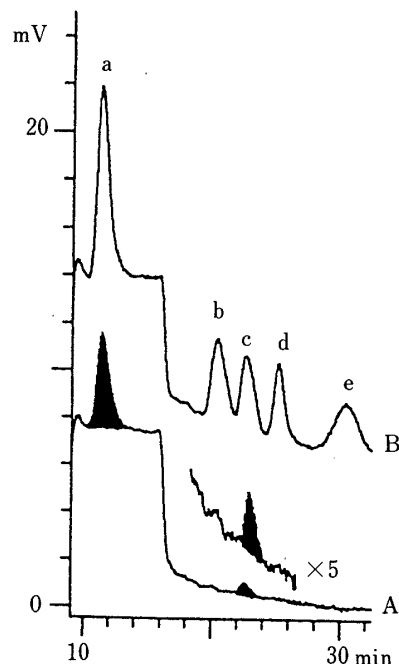


Fig. 14 Typical chromatograms of a human plasma extract (A) and standard hydroperoxides (B)

Peaks a~e were hydroperoxides of PC (a), trilinolein (b), cholesteryl linolate (c), cholesteryl oleate (d), and triolein (e)

の脂質に対し検量線を作成する必要がある。一方、DPPP を用いたポストカラム法は、移動相溶媒の選択の自由度が大きいため、様々な分離モードの利用が可能であり、又、化学発光-HPLC 法で問題となるラジカル捕そく剤の影響も受けずに選択的にヒドロペルオキシドを分析することが可能で、試料調製の際の酸化を防止する目的で BHT 等の抗酸化剤を比較的大量に添加することも可能である。

過酸化脂質の分析法は、分析の原理、対象が異なる方法が数多くあり、これらの結果を単純に比較することはできない。このため、実際の測定にあたっては、用いる測定法の特質を十分考慮する必要がある。著者らが開発した DPPP を用いた蛍光分析法は、脂質の酸化第一次生成物であるヒドロペルオキシドに高い選択性と感度を有し、食品や生体内の脂質過酸化のメカニズムやその影響の解明に有効な方法であると期待できる。

本研究は、東北大学農学部生体分子分析学教室において 目黒 熙教授のご指導の下で行われたものであり、ここに深く感謝申し上げます。又、終始適切なご指導、ご助言を賜りました東北大学農学部大類 洋助教授、農林水産省食品総合研究所鈴木建夫博士に深く感謝申し上げます。更に、本研究の共同研究者の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) T. Kaneda, S. Ishii: *J. Biochem.*, **41**, 327 (1954).
- 2) J. J. Rackis, D. J. Sessa, D. H. Honig: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 262 (1979).
- 3) 長野 豊: *The Lipid*, **2**, 494 (1991).
- 4) D. Steinberg, S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Choo, J. L. Witztum: *New Engl. J. Med.*, **15**, 212 (1989).
- 5) 内藤周幸: 医学のあゆみ, **157**, 842 (1991).
- 6) 松尾光芳: *The Lipid*, **3**, 294 (1992).
- 7) K. Kogure, B. D. Watoson, R. Busto, K. Abe: *Neurochem. Res.*, **7**, 437 (1982).
- 8) T. Yoshikawa, H. Miyagawa, N. Yoshida, S. Sugino, M. Kondo: *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **1**, 271 (1986).
- 9) 松浦達也, 川崎 尚: *The Lipid*, **3**, 244 (1992).
- 10) Official and Tentative Methods of the American Oil Chemist's Soc.: Cd8-53.
- 11) J. A. Berg, S. D. Aust: *Meth. Enzymol.*, **52**, 302 (1978).
- 12) T. Asakawa, S. Matsushita: *Lipids*, **15**, 965 (1980).
- 13) 原 節子, 鷺巣 治, 戸谷洋一郎: 油化学, **12**, 1004 (1982).
- 14) J. M. Gebicki, J. Guille: *Anal. Biochem.*, **176**, 360 (1989).
- 15) K. Yagi: *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976).
- 16) M. Uchiyama, M. Mihara: *Anal. Biochem.*, **86**, 271 (1978).
- 17) 寺尾純二: *The Lipid*, **3**, 236 (1992).
- 18) R. L. Heath, L. Tappel: *Anal. Biochem.*, **76**, 184 (1976).
- 19) K. Kohda, K. Arisue, A. Maki, C. Hayashi: *Jpn. J. Clin. Chem.*, **11**, 306 (1982).
- 20) P. J. Marshall, M. A. Warso, W. E. Lands: *Anal. Biochem.*, **145**, 192 (1985).
- 21) T. Kamata, H. Tanno, H. Ohruai, H. Meguro: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1985 (1991).
- 22) T. Kamata, H. Tanno, H. Ohruai, H. Meguro: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1989 (1991).
- 23) T. Kamata, K. Akasaka, H. Ohruai, H. Meguro: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 878 (1994).
- 24) C. G. Crawford, R. D. Platner, D. J. Sessa, J. J. Rackis: *Lipids*, **19**, 325 (1984).
- 25) Y. Yamada, J. Terao, S. Matsushita: *Lipids*, **22**, 125 (1987).
- 26) Y. Yamamoto, M. Brodsky, J. C. Baker, B. N. Ames: *Anal. Biochem.*, **160**, 7 (1987).
- 27) T. Miyazawa, K. Yasuda, K. Fujimoto: *Anal. Lett.*, **20**, 915 (1987).
- 28) K. Akasaka, T. Suzuki, H. Ohruai, H. Meguro: *Anal. Lett.*, **20**, 731 (1987).
- 29) K. Akasaka: *Tohoku J. Agric. Res.*, **45**, 111 (1995).
- 30) K. Akasaka, T. Suzuki, H. Ohruai, H. Meguro: *Anal. Lett.*, **20**, 797 (1987).
- 31) K. Akasaka, I. Sasaki, H. Ohruai, H. Meguro: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 605 (1992).
- 32) K. Akasaka, S. Ijichi, K. Watanabe, H. Ohruai, H. Meguro: *J. Chromatogr.*, **596**, 197 (1992).
- 33) L. A. Wittig, M. K. Horwitt: *J. Nutr.*, **82**, 19 (1964).
- 34) K. Akasaka, H. Ohruai, H. Meguro: *Anal. Lett.*, **21**, 965 (1988).
- 35) H. Meguro, K. Akasaka, H. Ohruai: *Meth. Enzymol.*, **186**, 157 (1990).
- 36) 赤坂和昭, 森宗孝介, 大類 洋, 目黒 熙, 大田 実: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 27 (1993).
- 37) 二木鋭雄, 島崎弘幸, 山本順寛: “活性酸素測定マニュアル”, 浅田浩二, 中野 稔, 柿沼カツ子編, p. 152 (1992), (講談社).
- 38) T. Miyazawa, K. Yasuda, K. Fujimoto, T. Kaneda: *J. Biochem.*, **103**, 744 (1988).
- 39) K. Akasaka, A. Ohata, H. Ohruai, H. Meguro: *J. Chromatogr. B.*, **665**, 37 (1995).
- 40) K. Akasaka, H. Ohruai, H. Meguro: *J. Chromatogr.*, **628**, 31 (1993).
- 41) K. Akasaka, H. Ohruai, H. Meguro: *J. Chromatogr.*, **617**, 205 (1993).
- 42) K. Akasaka, H. Ohruai, H. Meguro: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 396 (1994).
- 43) Y. Yamamoto, E. Niki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 988 (1989).
- 44) K. Akasaka, H. Ohruai, H. Meguro: *J. Chromatogr.*, **622**, 153 (1993).



Development of phosphine reagents for the determination of lipid hydroperoxides (Accounts). Kazuaki AKASAKA (Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, 1-1, Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 981)

Phosphine reagents were designed and synthesized as new highly sensitive and selective fluorescent reagents for the determination of lipid hydroperoxides. The reagents had one or two fluorophores in their structures. None were fluorescent but their oxidized products (phosphine oxides) had strong fluorescence. They showed high selectivity for lipid hydroperoxides which were primary oxidized products during the lipid peroxidation reaction.

It was possible to determine lipid hydroperoxides from the fluorescence intensity difference before and after the reaction. Diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) had the most suitable properties as a fluorescence reagent for lipid hydroperoxides. This reagent could be applied to both the batch method and the HPLC postcolumn method, by which lipid hydroperoxides were determined at sub-nmol and pmol levels, respectively. Especially, the HPLC postcolumn method made it possible to determine lipid hydroperoxides by their lipid class levels or molecular species level. Here, I review the design, synthesis and properties of phosphine reagents, and their applications to foodstuffs and biological materials.

(Received May 18, 1995)

Keywords

fluorometry; lipid hydroperoxide; diphenyl-1-pyrenylphosphine; HPLC.
