

ノ ー ト

間接紫外検出キャピラリー電気泳動法による脂肪酸の組成分析

忠海 聡子¹, 遠藤 忍¹, 赤川 博人¹, 板橋 豊^{®1}

Analysis of fatty acids by capillary electrophoresis with indirect UV detection

Satoko TADAUMI¹, Shinobu ENDO¹, Hiroto AKAGAWA¹ and Yutaka ITABASHI¹¹ Laboratory of Bioresources Chemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1, Minato-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611

(Received 19 May 2003, Accepted 16 July 2003)

An analysis of the long-chain fatty acids in some saponified vegetable oils (olive, rice bran and linseed oils) and salmon roe phospholipids was carried out using capillary zone electrophoresis (CE) with indirect UV detection at 254 nm. Adenosine monophosphate (AMP) was used as an indirect UV detection reagent. The electrolyte consisted of 40 mM Tris buffer and 2.5 mM AMP in *N*-methylformamide/dioxane/water (5 : 4 : 1, v/v/v, for vegetable oil fatty acids; 4 : 6 : 1 for fish oil fatty acids). A satisfactory separation of an approximately 20 fmol mixture of palmitic (16 : 0), stearic (18 : 0), oleic (18 : 1n-9), linoleic (18 : 2n-6) and linolenic (18 : 3n-3) acids from vegetable oils was achieved within 25 min. Icosapentaenoic acid (20 : 5n-3) and docosahexaenoic acid (22 : 6n-3) were also completely resolved within 50 min, although some peak overlappings were observed in the fish sample. The fatty acid compositions (mol%) obtained by CE were in good agreement with those determined by HPLC. Thus, the CE method employed in this study would be useful for determining the composition of saturated and unsaturated fatty acids from biological samples.

Keywords : capillary electrophoresis; vegetable oil; icosapentaenoic acid; docosahexaenoic acid; fatty acid composition.

1 緒 言

脂肪酸は動植物油の主な構成成分であり、中でも魚油はドコサヘキサエン酸 (DHA, 22 : 6n-3) やイコサペンタエン酸 (EPA, 20 : 5n-3) などの高度不飽和脂肪酸を多く含むために複雑な組成を示す¹⁾。

脂肪酸組成を気液クロマトグラフィー (GLC) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分析する方法は、これまで数多く報告されている^{1)~5)}。しかし、GLCでは揮発性を高めるために、また HPLCでは検出を容易にするために、サンプルの前処理や誘導体化を必要とし、分析時間は魚油の脂肪酸の場合、通常1時間を超える。

キャピラリー電気泳動 (CE) 法は電場中における溶質の移動度の差を利用した分析技術であり、分離に関するメカニズムがクロマトグラフィーと異なるため、クロマトグ

ラフィーの相補的な役割を果たすことが期待できる。CEは分離性能が高く、通常サンプルの誘導体化の必要がなく、また試薬の消費量や廃液量が極めて少ないなど多くの特長を有することから、近年様々な分野への応用が広がりつつある^{6)~10)}。脂肪酸分析への適用も種々検討されているが、標準品を使用している研究例が多く、今日 GLC や HPLC で日常的に行われている動植物油脂肪酸の組成分析 (定量分析) は、CE ではほとんど実施されておらず、これまでヤシ油の飽和脂肪酸¹¹⁾や水素添加魚油脂肪酸¹²⁾などの分析に限られている。また、高度不飽和脂肪酸を多く含む魚油の脂肪酸分析も報告されていない。このため、本研究では CE を用いて植物油と魚油の脂肪酸の組成分析を行い、HPLC で得られた結果と比較することで、CE の有効性を明らかにすることを試みた。

¹ 北海道大学大学院水産科学研究科生物資源化学講座: 041-8611
北海道函館市港町 3-1-1

2 実 験

2.1 泳動液

植物油脂肪酸の分析には、*N*-メチルホルムアミド (NMF) (東京化成製)/ジオキサン (Merck)/水 (関東化学) (5:4:1, v/v/v) に 40 mM トリスアミノメタン (関東化学製) と 2.5 mM アデノシン-1-リン酸 (AMP) (Sigma 製) を溶解したもの¹³⁾、及び 50 mM AMP-1 M ホウ酸 (関東化学製) 水溶液をメタノールで 10 倍に希釈して得られた 5 mM AMP-100 mM ホウ酸溶液¹⁴⁾の 2 種類の泳動液を用いた。また、高度不飽和脂肪酸を含む魚油の脂肪酸分析には、NMF/ジオキサン/水 (4:6:1, v/v/v) に 40 mM トリスアミノメタンと 2.5 mM AMP を溶解した泳動液を用いた。使用前に、これらの泳動液を孔径 0.45 μm の PTFE フィルターに通して脱気した。

2.2 試 料

アマニ油、米ぬか油、オリブ油及びサケ卵リン脂質¹⁵⁾を常法によりけん化して脂肪酸を得た。脂肪酸標準品として Sigma 製のバルミチン酸 (16:0)、ステアリン酸 (18:0)、オレイン酸 (18:1n-9)、リノール酸 (18:2n-6)、リノレン酸 (18:3n-3) (以上、純度 99%) と日本化学飼料製の 20:5n-3 (純度 90%) 及び 22:6n-3 (純度 98%) を用いた。これらの脂肪酸を、NMF/ジオキサン/水の泳動液を用いるときは NMF/ジオキサン (4:1, v/v) に溶解し、メタノール/水の泳動液を用いるときはメタノール/水 (9:1, v/v) に溶解して試料溶液とした。また、2.5 μg の脂肪酸に 0.01% 9-アンスリルジアゾメタン (ADAM, フナコシ製)/メタノール溶液を 100 μl 加え、室温、暗所にて 60 分間反応させて 9-アンスリルメチルエステル (ADAM) 誘導体を調製し、これを逆相 HPLC で分析して脂肪酸組成を求めた¹⁶⁾。

2.3 分析条件

キャピラリー電気泳動装置には Waters 製 Quanta 4000E を使用した。キャピラリーは、ジーエルサイエンス社から購入した内面未処理の溶融シリカ管 (内径 50 μm と 75 μm 、長さ 60 cm と 80 cm) で、分析前に 1 M NaOH、次いで 0.1 M NaOH、そして蒸留水で内壁を洗浄してから使用した。検出波長を 254 nm、印可電圧を 22.5~30 kV に設定し、重力法で 1~10 秒間、試料溶液を注入した。

3 結果と考察

3.1 脂肪酸標準品の分析

脂肪酸は 200 nm 付近に弱い吸収をもつが、低紫外 (UV) 波長領域を利用する直接検出法では感度が限られる。このため本研究では、間接 UV 検出法^{11)~13)17)}を適用

した。間接 UV 検出試薬として AMP を用いて、254 nm で脂肪酸を検出した。キャピラリーサイズと印加電圧を変えて飽和及び不飽和脂肪酸標準品 (16:0, 18:0, 18:1, 18:2 及び 18:3) を分析した結果、高電圧 (30 kV) を印加した場合は泳動液の流れが速くなり、18:3 と 16:0 は移動度に差が生ずる前に溶出し、良い分離は得られなかった。印加電圧が低い (22.5 kV) 場合、又はキャピラリーが長い場合 (80 cm) も良い分離は得られなかったが、これは溶質がキャピラリー内に長くとどまるためにジュール熱の影響を受けたり、キャピラリー内に吸着してしまうことが原因⁷⁾⁸⁾と考えられた。結局、本研究では、内径 50 μm 、長さ 60 cm のキャピラリーに 25 kV を印加することにより、脂肪酸標準品の混合物は最もよく分離された (Fig. 1A)。この条件で、高度不飽和酸 (20:5 及び 22:6) を含む 4 種の脂肪酸標準品の混合物を NMF/ジオキサン/水 (5:4:1, v/v/v) を用いて分析したところ、20:5 と 22:6 は完全に分離されたが、18:1 と 22:6 及び 20:5 と 16:0 のピークは重なって、それぞれ 1 つのピークとして検出された (エレクトロフェログラムは示さない)。このため、泳動液の組成を NMF/ジオキサン/水 (4:6:1, v/v/v) に変えて分離を検討した。その結果、4 成分を相互に明りょうに分離することはできなかったが、18:1 と 22:6 の分離は大きく改善された (Fig. 1B)。

適用した条件下で、脂肪酸は炭素数と不飽和度に従って移動した。すなわち、炭素数の大きい脂肪酸ほど、また不飽和度の低い脂肪酸ほど早く移動した。これは、脂肪酸の炭素数が大きく、二重結合の少ない脂肪酸ほど電気泳動移動度が小さく、結局、電気浸透流によって急速に陰極 (検出器) 側に流されてしまうためと考えられる。同様の現象は他の研究者らによっても観察されている^{11)~13)17)}。

3.2 植物油脂肪酸の分析

脂肪酸標準品の分析で得られた最適条件で、アマニ油、米ぬか油及びオリブ油の構成脂肪酸を分析した結果、各脂肪酸は泳動開始後 25 分以内に明りょうに分離された。Fig. 2 にアマニ油脂肪酸の分析例を示す。検出された脂肪酸量は約 20 fmol であった。米ぬか油やオリブ油のように 18:3 を含まない試料については、ホウ酸泳動液を用いて約 15 分で良好な分離が得られた。HPLC では、これらの脂肪酸を明りょうに分離するために 40 分以上を要したことから、CE は脂肪酸の迅速微量分析法として有効であることが認められた。

Table 1 に、CE と HPLC (ADAM 誘導体) で得られたアマニ油、米ぬか油及びオリブ油の脂肪酸組成を比較して示す。これら 3 種の植物油は、それぞれ 18:3, 18:2 及び 18:1 を多く含み、脂肪酸組成は大きく異なるが、いずれの試料についても CE で求めた組成は HPLC で得た値

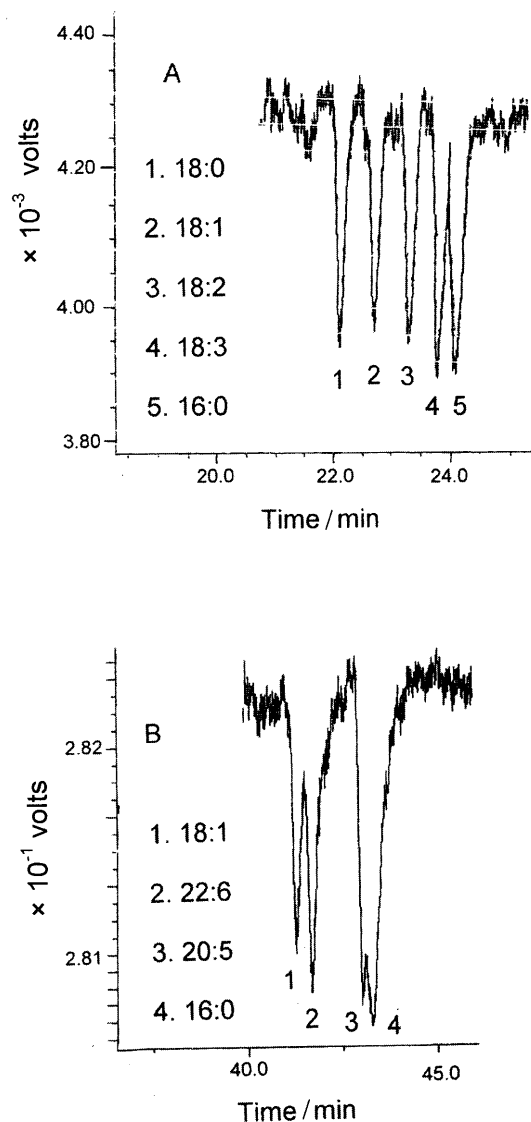


Fig. 1 Electropherograms of (A) a mixture of 18 : 0, 18 : 1, 18 : 2, 18 : 3 and 16 : 0 fatty acid standards and (B) a mixture of 16 : 0, 18 : 1, 20 : 5 and 22 : 6 fatty acid standards

Fused silica capillary: 50 μ m i.d. $\times$ 60 cm. Buffer: (A) NMF/dioxane/ H_2O = 5 : 4 : 1 (v/v/v), 2.5 mM AMP and 40 mM Tris; (B) NMF/dioxane/ H_2O = 4 : 6 : 1 (v/v/v), 2.5 mM AMP and 40 mM Tris. Applied voltage: 25 kV; temperature: 25°C; wavelength: 254 nm; injection: hydrostatics, 1 s. Fatty acids (A, 30 μ g; B, 20 μ g) dissolved in 0.5 ml NMF/dioxane (4 : 1, v/v) were analyzed.

とよく一致し, HPLC と比べて幾分大きい標準偏差を示したものの再現性も良好であった. R-Assad and Gareil¹¹⁾ は, ヤシ油を構成する飽和脂肪酸 (8 : 0 ~ 18 : 0) を CE で分析した結果, 各成分は互いに完全に分離され, その組成は GLC で得られた値とよく一致することを報告している. 本研究で適用した CE 法は, 定量性も良好であり, 飽和脂肪酸ばかりでなく, 不飽和脂肪酸を含む種々の植物油の脂

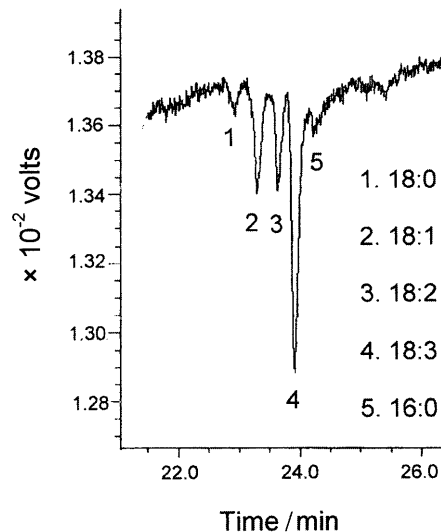


Fig. 2 Electropherogram of linseed oil fatty acids

Buffer: NMF/dioxane/ H_2O = 5 : 4 : 1 (v/v/v), 2.5 mM AMP and 40 mM Tris. Fatty acids (100 μ g) dissolved in 0.5 ml NMF/dioxane (4 : 1, v/v) were analyzed. Other CE conditions as given in Fig. 1.

肪酸組成分析法として日常的に十分使用できると考えられる.

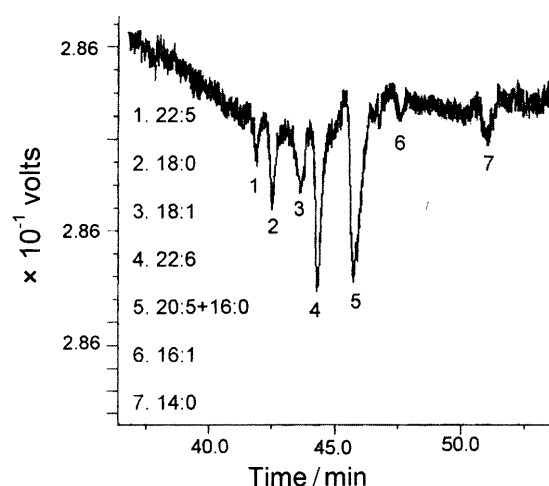
3.3 魚油脂肪酸の分析

サケ卵リン脂質の脂肪酸を Fig. 1B と同じ条件で分析して得た結果を Fig. 3 に示す. キャピラリー GLC 分析では, 微量成分や二重結合位置異性体を含めて 15 種の脂肪酸が同定されている¹⁵⁾. HPLC では, キャピラリー GLC ほどの良い分離は得られないが, 約 10 ピークが検出された (クロマトグラムは省略). 本研究で検討した CE 法では, 少量成分や異性体の分離は困難で, 7 ピークのみが標準品との移動時間の比較により同定された. GLC や HPLC と同様に, 魚油の特徴的成分である 22 : 6 と 20 : 5 は, 標準試料の分析でも見られるように (Fig. 1B), 完全に分離された. しかしながら, 20 : 5 は 16 : 0 と重なったために, それぞれのピーク面積を CE で測定することはできなかった. Table 2 に, CE と HPLC で求めた脂肪酸組成 (mol%) を比較して示す. サケ卵リン脂質の主な脂肪酸は, 16 : 0, 18 : 0, 18 : 1, 20 : 5, 22 : 5 及び 22 : 6 であり, これら脂肪酸の総量は総脂肪酸の 80% を超えることが知られている¹⁵⁾. 本研究でも同様の結果が得られた. 植物油脂肪酸 (Table 1) と同様に, CE で得られた組成は HPLC で求めた結果と比較的によく一致し, 再現性も良好であった. したがって, CE は魚油の脂肪酸組成分析にも十分使用できる可能性を有すると考えられる. 今後, CE での分離が改善されて, キャピラリー GLC に匹敵するほどの分離が得られるようになれば, CE は簡便な脂肪酸組成分析法として

Table 1 Comparison of fatty acid compositions of some vegetable oils by CE and HPLC (mol%)^{a)}

Fatty acid	Linseed oil		Rice bran oil		Olive oil	
	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC
18 : 0	3.23 ± 1.32	2.80 ± 0.09	1.65 ± 0.28	2.28 ± 0.40	4.42 ± 0.96	3.83 ± 0.16
18 : 1n-9	18.19 ± 1.52	18.46 ± 0.71	46.44 ± 1.93	44.13 ± 0.14	73.50 ± 1.65	75.01 ± 0.42
18 : 2n-6	17.19 ± 1.32	17.24 ± 0.18	32.80 ± 1.62	33.49 ± 0.23	8.23 ± 1.17	7.02 ± 0.23
18 : 3n-3	58.07 ± 2.15	57.20 ± 0.39	—	—	—	—
16 : 0	4.07 ± 0.81	4.30 ± 0.11	18.52 ± 0.71	20.10 ± 0.24	13.86 ± 1.86	14.14 ± 0.20

a) Mean ± S.D. (n = 4)

**Fig. 3** Electropherogram of the fatty acids of salmon roe phospholipids

Buffer: NMF/dioxane/H₂O = 4 : 6 : 1 (v/v/v), 2.5 mM AMP and 40 mM Tris. Injection; hydrostatics, 8 s. Fatty acids (50 µg) dissolved in 0.5 ml NMF/dioxane (4 : 1, v/v) were analyzed. Other CE conditions as given in Fig. 1.

広く利用されると思われる。

EPA と DHA を提供していただいた日本化学飼料(株)穂刈勝利氏に感謝します。

文 献

- 1) R. G. Ackman: "Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils", Edited by R. G. Ackman, p. 103 (1989), (CRC Press, Boca Raton, Florida).
- 2) W. W. Christie: "Gas Chromatography and Lipids", Edited by W. W. Christie, p. 64 (1989), (The Oily Press, Ayr, Scotland).
- 3) W. W. Christie: "High-performance Liquid Chromatography and Lipids", Edited by W. W. Christie, p. 133

Table 2 Comparison of fatty acid compositions of salmon roe phospholipids by CE and HPLC (mol%)^{a)}

Fatty acid	CE	HPLC
22 : 5	6.37 ± 1.04	6.34 ± 0.11
18 : 0	8.82 ± 1.00	9.73 ± 0.08
18 : 1	12.53 ± 0.72	13.80 ± 0.18
22 : 6	28.56 ± 1.25	30.60 ± 0.37
16 : 0 + 20 : 5	37.28 ± 2.38	33.28 ± 0.20 ^{b)}
16 : 1	2.70 ± 0.42	2.46 ± 0.03
14 : 0	3.75 ± 0.64	3.83 ± 0.64

a) Mean ± S.D. (n = 4); b) 20 : 5, 13.97%; 16 : 0, 19.31%

(1987), (Pergamon Press, Tokyo).

- 4) 和田 俊, 白井展也: 日本油化学会誌, **47**, 937 (1998).
- 5) 板橋 豊, 高木 徹: 油化学, **29**, 855 (1980).
- 6) 酒井恒行: 化学と生物, **32**, 456 (1994).
- 7) 志村清仁: 蛋白質核酸酵素, **39**, 1625 (1994).
- 8) 本田 進, 寺部 茂編: "キャピラリー電気泳動—基礎と実際—", (1995), (講談社).
- 9) 寺部 茂: 科学と工業, **72**, 462 (1998).
- 10) 北岸恵子, 山田浩美: 蛋白質核酸酵素, **44**, 194 (1999).
- 11) R. Roldan-Assad, P. Gareil: *J. Chromatogr. A*, **708**, 339 (1995).
- 12) E. Drange, E. Lundanes: *J. Chromatogr. A*, **771**, 301 (1997).
- 13) F. Haddadian, S. A. Shamsi, I. M. Warner: *J. Chromatogr. Sci.*, **37**, 103 (1999).
- 14) F. Haddadian, S. A. Shamsi, J. P. Schaeper, N. D. Danielson: *J. Chromatogr. Sci.*, **36**, 395 (1998).
- 15) H. Okabe, Y. Itabashi, T. Ota: *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **48**, 559 (1999).
- 16) M. Terasaki, Y. Itabashi, T. Suzuki, K. Nishimura: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 1181 (2002).
- 17) M. A. L. de Oliveira, G. A. Micke, R. E. Bruns, M. F. M. Tavares: *J. Chromatogr. A*, **924**, 533 (2001).