

受賞者総説

魚油の精密分析法の開発とその応用

(平成 12 年度日本水産学会賞進歩賞受賞)

板 橋 豊*

北海道大学大学院水産科学研究科

Development and Application of Precision Methods for Analysis of Fish Oils

Yutaka Itabashi*

Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, Japan

1. はじめに

魚油は炭素数、二重結合数、二重結合位置、アシル基位置などの異なる多数の異性体と同族体の混合物であり、極めて複雑な組成を有している。このため、分析機器や分析法の発達した今日であっても、分析が困難なために生理作用も機能も不明な成分が多数存在する。一般に構造や組成のわずかな相違でも代謝や生理作用が大きく異なると考えられることから、類似した成分を分離し、構造と組成の詳細を明らかにすることは魚油やその他の脂質を採取するすべての分野において必要不可欠であり、古くから重要な研究課題になっている。著者はクロマトグラフィーと質量分析法 (MS) がこの課題に応え得る主な手段であると考え、これまでガスクロマトグラフィー (GLC) と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分離の困難な成分の分離を可能にし、MS を併用して水産動物、藻類および微生物脂質の構造解析と組成分析、油脂食品の成分分析などの研究を行ってきた。本稿では、その主な成果の概略を述べたい。

2. GLC による海産油脂成分の精密分析

従来 GLC では不飽和度別の分離分析が困難であったワックスエステル (WE) などの高沸点脂質成分を強極性を有するシアノプロピルシロキサン液相を使用することにより、炭素数別・不飽和度別に分離することに成功した。¹⁻⁵⁾ この分析法を鯨油の特徴的成分である WE に適用し、構成成分である脂肪酸と脂肪アルコールがランダムな組合わせで結合していることを炭素数と不飽和度の両面から明らかにした。³⁾ 一方、魚類の脂質を構成する約 80 種類の脂肪酸を一斉分析するためにキャピラリー GLC 法を検討し、その基礎的技術を確立した。⁶⁾

これにより、従来分離の困難であった脂肪酸の二重結合位置異性体の精密な分析が可能となった。この方法に MS と NMR を併用して、水産動物や植物に存在する特異な脂肪酸 (5-オレフィン酸, トランス酸, 共役酸, 超長鎖脂肪酸) の構造, 分布および組成の詳細を明らかにし、その生合成経路を示した。⁷⁻¹⁶⁾ 図 1 にウニ脂質を構成する脂肪酸の分析例を示す。ウニは海藻を主食とするため、アラキドン酸 (20:4n-6) と EPA (20:5n-3) を多く含むが、DHA (22:6n-3) は少ない。^{9,11)} また、魚類や海藻にはまれな 5 位や 7 位に二重結合を有する特異な脂肪酸 (5-20:1, 5, 11-20:2, 5, 13-20:2, 7, 15-22:2 など) を含有するため、脂肪酸組成は魚油よりも複雑であり、その分析には高分解能キャピラリーカラムの使用が不可欠である。図 1 は分析法を確立した当時 (1980 年) のクロマトグラムであるが、充填カラムでは分離の不可能なモノエン脂肪酸の二重結合位置異性体が良好に分離されている。現在ではカラム性能が格段に向上し、分析条件も見直されて更に良い異性体分離が達成されている。キャピラリー GLC は、今日では脂質の分析に広く利用されているが、当時はカラム作製の技術的な難しさや GLC 装置の操作性の問題などからごく限られた研究室で行われていたにすぎなかった。著者らの研究は国内では最初の試みであり、⁶⁾ キャピラリー GLC の普及に貢献できたと思っている。

3. HPLC による魚油成分の光学分割

EPA や DHA など通常の脂肪酸は光学不活性であるが、これらがグリセリンと結合したアシルグリセロールやリン脂質には光学異性体が存在する。著者らは HPLC による光学異性体の分析技術を脂質化学の分野

* Tel : +81-138-40-8802, Fax : +81-138-40-8802, E-mail : yutaka@fish.hokudai.ac.jp

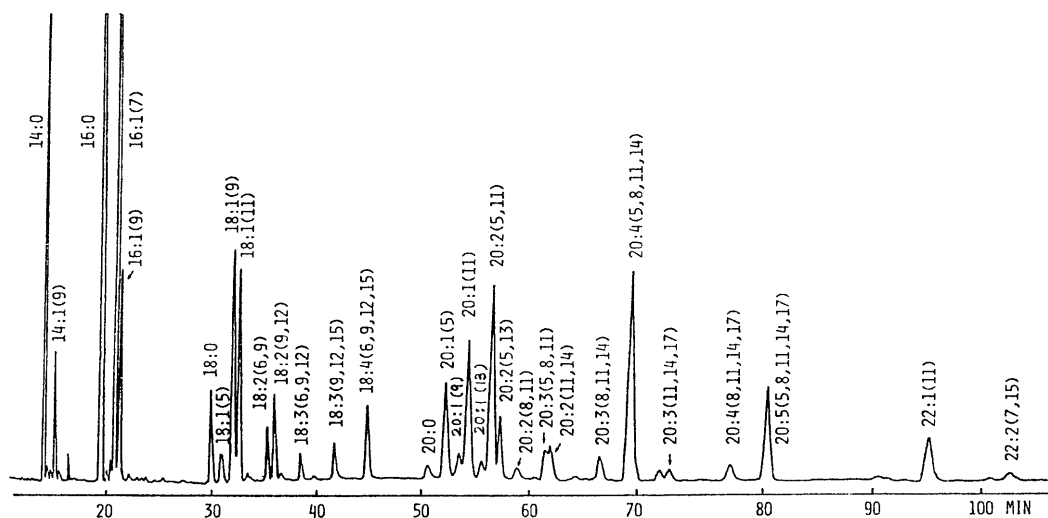


図1 キャピラリー GLC によるウニ脂肪酸の分析⁶⁾

カラム, Silar 5CP 塗布ガラスキャピラリー (67 m×0.25 mm I.D.); カラム温度, 200°C; キャリヤーガス, 窒素 1 ml/min; スプリット注入

に初めて導入し, 従来分離の不可能であった脂質成分の光学異性体を短時間で完全に分離できる高感度精密分析法を確立した。¹⁸⁻²⁵⁾ この方法は脂質成分のヒドロキシ基を 3,5-ジニトロフェニルウレタン (3,5-DNPU) や 2-アンスリルウレタン誘導体に変換し, (R)-1-(1-ナフチル) エチルアミンなどを不斉部位とするキラル固定相を用いて光学異性体を分離するものである。図 2 に, マグロ眼窩油トリアシルグリセロール (TAG) から Grignard 分解によって調製した *sn*-1,2-および *sn*-2,3-ジアシルグリセロール (DAG) の分離を示す。クロマトグラムは単純であるが, 分離された両光学異性体はそれぞれ種々の分子種から構成されている。光学異性体は分子中の 3,5-DNPU 基とキラル固定相間で形成されるジアステレオメリックな π - π 相互作用, 水素結合および双極子-双極子相互作用により分離されと考えられる。従って, 3,5-DNPU 誘導体は単に検出を容易 ($\lambda_{\max}$ 226 nm, $\epsilon=33,000$) にするだけでなく, キラル分離を可能にするために調製される。このキラル HPLC 法に MS やキャピラリー GLC を併用することにより, TAG やリン脂質を構成する DAG 光学異性体の分子種の精密分析が可能となり,²¹⁻²⁴⁾ また, グリセロ脂質の代謝に関する酵素 (リパーゼ, アシルトランスフェラーゼ) の位置および立体特異性の決定,²⁶⁻²⁹⁾ 糖脂質のグリセロール部の絶対配置の決定,³⁰⁾ サメ類に存在するアルキルグリセロールの分子中におけるエーテル結合の位置決定,³¹⁾ TAG の立体特異分析^{32,33)} および酸性リン脂質の立体異性体分析²⁴⁾ がクロマトグラフィーを使用しない従来法よりも格段に高い感度で正確に, かつ簡単にできるようになり, 脂質の構造分析に新しい道を開くことができ

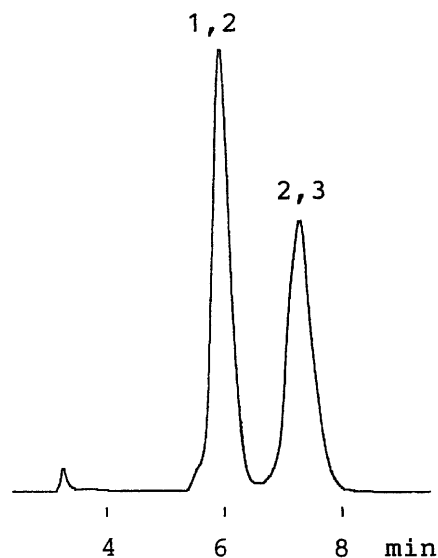


図2 キラル HPLC によるマグロ眼窩油由来 1,2(2,3)-ジアシルグリセロール (3,5-DNPU 誘導体) の光学異性体分離²⁰⁾

カラム, YMC A-K03 (25 cm×4.6 mm I.D.); 移動相, *n*-ヘキサン/1,2-ジクロロエタン/エタノール (40:30:1, 1 ml/min); 検出, 254 nm

た。なお, キラル HPLC とその脂質分析への応用については解説および総説として報告した。³⁴⁻³⁶⁾

4. グリセロ脂質の reverse isomer の分離

光学異性体の分離と並び長年の未解決課題であったグリセロ脂質の reverse isomer (アシル基の結合位置が逆転した異性体) の分離をキラル, 逆相および銀イオン

HPLC を用いて詳細に検討した。³⁷⁾ その結果、魚油のリン脂質や藻類の糖脂質をはじめ、種々の動植物脂質中に存在すると推測されている高度不飽和酸を含む reverse isomer の分析が可能になった。³⁷⁾ 図3にグリセロ脂質を構成する 1,2-DAG の 3,5-DNPU 誘導体の reverse isomer の分離例を示す。使用した何れの HPLC でも、2つの構成脂肪酸が不飽和度または鎖長において大きく異なる場合、異性体は完全に分離された。しかし、この差が小さくなるにつれて分離は徐々に低下し、16:0-18:2, 18:1-18:2, 18:1-18:3 などの 1,2-DAG では異性体ピークは完全に重なった。逆相 HPLC での分離の限界は鎖長差 6, 不飽和度の差は 3 であった。Reverse isomer の分離には高理論段数を有するカラムが必要であり、充填剤の粒径が 4 μm のカラムは 5 μm カラムに比べて明らかに良い分離を示した。銀イオン含浸シリカカラムを用いる HPLC では移動相の選択が特に重要であり、キラル HPLC で用いた移動相 (図2参照) では良好な分離は得られず、明瞭な分離を得るためにはアセトニトリルの使用が不可欠であった。興味深いことに、何れの HPLC においても、sn-2 位に高度不飽和脂肪酸または短鎖脂肪酸を有する極性のより小さな異性体が強く保持された。この観察は、分離のメカニズムを明らかにし、短時間で更に良い分離を得るための分析法の改良において役立つと考えられる。また、LC/MS での分析法も検討し、DAG のニコチネート誘導体が reverse isomer を区別し得るフラグメントイオンを与えることを見出した。³⁸⁾ これらの結果は、複雑な組成を有する reverse isomer 混合物の精密な分析も可能である

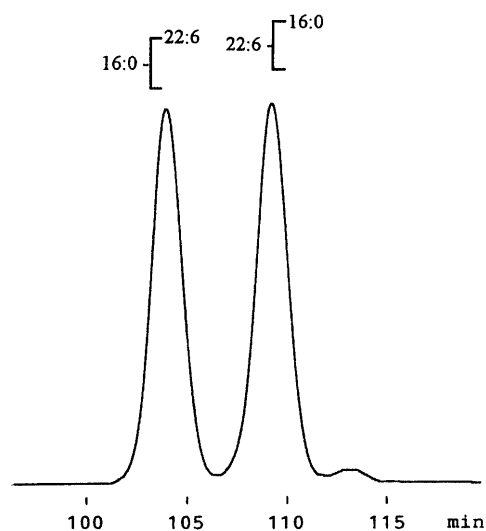


図3 逆相 HPLC による 1,2(2,3)-ジアシルグリセロール (3,5-DNPU 誘導体) の reverse isomer の分離³⁷⁾
カラム, ODS (25 cm $\times$ 4.6 mm I.D.); 移動相, アセトニトリル (0.5 ml/min); 検出, 254 nm

ことを示す。生体膜脂質における reverse isomer の分布、機能、代謝についてはほとんど何も分っていない。本研究により、魚類や藻類に存在すると推測される reverse isomer の分析が可能となったことから、今後この異性体に関する研究が進展するものと期待される。

5. 分析法の高感度化、ダウンサイズ化

魚油の分析に限らず、生体成分の分析法の高感度化とマイクロ化は微量成分分析のためだけでなく、実験に使用する試薬や有害物質を最小限に抑えて実験者の健康と環境を守り、また実験コストを削減するためにも必要である。このような観点から、著者らは蛍光検出 HPLC による魚油リン脂質分子種の高感度精密分析法の確立とキャピラリー HPLC による脂質光学異性体分離法のマイクロ化に取り組んだ。前者の目的のために新規蛍光ラベル化試薬 (1-および 2-アンスリルイソシアネート) を開発した。^{25,39)} 図4に、魚油リン脂質分子種の逆相 HPLC および LC/ESI (エレクトロスプレーイオン化)/MS による分析例を示す。多数の分子種を微量成分を含めて明瞭に分離するために、ホスファチジルコリンをホスホリパーゼ C で加水分解して得られた sn-1,2-DAG を 2-アンスリルイソシアネートと反応させて対応するウレタン誘導体に変換し、蛍光検出 HPLC で分析した。微量成分を同定するためには LC/MS の使用が不可欠であった。本誘導体の蛍光 HPLC での検出限界は 1 成分について約 1 fmol (S/N 比 3 : 1) であり、極めて高い感度での分析が可能となった。また、本誘導体は脂質光学異性体の高感度キラル分析にも有用であることを示した。²⁵⁾

内径 1 mm 以下のカラムを用いるキャピラリー HPLC は従来の HPLC に比べて移動相と固定相の必要量が少ないこと、質量感度が増大するため微量分析に有効であること、温度勾配分離が容易であること、移動相流量が少ないため質量分析計や赤外検出器への直結が容易である、などの利点を有する。著者らは、キラル固定相を含む担体をスラリー充填したキャピラリーカラム (内径 0.32 mm, 長さ 40 cm) と容量 0.05 μl の検出器セルを自作し、これらを用いて 1,2-ジオール脂質や 2-ヒドロキシ脂肪酸の光学分割を検討した。その結果、移動相使用量は従来の 1/250, 固定相使用量は 1/100 となり、さらに、感度は約 10 倍向上して、従来の HPLC にはば匹敵する光学異性体分離が得られ、分析法のダウンサイズ化が達成された。^{40,41)} 脂質の研究では、脂質抽出から目的成分の分離・精製、誘導体の調製、そして HPLC 分析に至る過程で多量の有機溶剤を使用する。有機溶剤の健康への悪影響や廃液の環境汚染を考えると、その使用をできる限り少なくすることが望まれる。今後、クロマトグラフィーのマイクロ化が加速すると予測

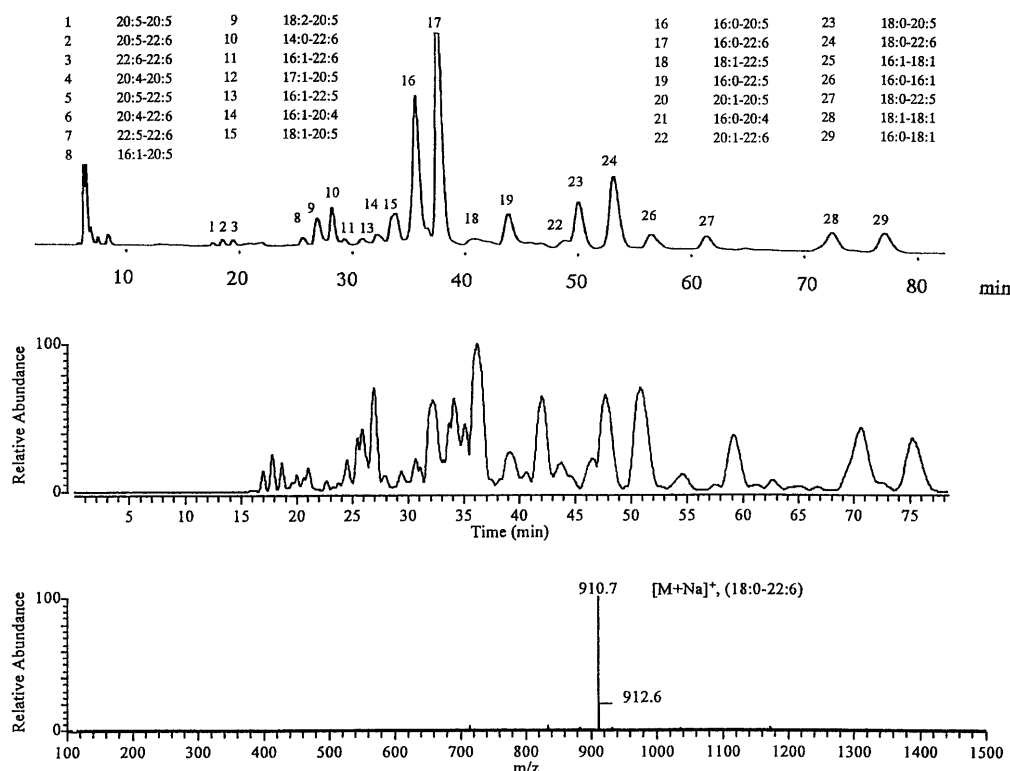


図4 逆相 HPLC 及び LC/ESI/MS によるサケ卵ホスファチジルコリン (2-アンスリルウレタン誘導体) の分子種分析³⁹⁾
 (上) 蛍光検出, 265(ex)/426(em)nm; (中) $[M+Na]^+$ イオンクロマトグラム; (下) マススペクトル。カラム, ODS
 (25 cm $\times$ 4.6 mm I.D.); 移動相, アセトニトリル/2-プロパノール (75 : 25, 0.5 ml/min)

されることから, 本研究で得られた結果は魚油を含む種々の脂質の研究に役立つと考えられる。

6. おわりに

魚油を含む脂質の化学の進展はクロマトグラフィーや分析機器の発展と軌を一にするといっても過言ではない。TLC, GLC, GC/MS, HPLC, そして LC/MS へと新しい技術が開発され, それを使用して新しい分析法を確立することによって, 従来よりも少量の試料で, 迅速に, そして正確に脂質の構造を決定し, 組成を明らかにすることが可能となった。今後はキャピラリー電気泳動 (CE) や MS^n , GC^n などの新しい手法が取り入れられて, 更に高感度化, ダウンサイズ化, 精密化が進み, 脂質研究が発展するものと思われる。こうした流れの中で, 水産脂質成分の新しい分析法の開発とその応用に関する研究に取り組んでいきたいと考えている。

本研究を行うにあたり, ご指導頂いた高木 徹北海道大学名誉教授, Arnis Kuksis トロント大学教授, ならびに共同研究者の皆様に厚くお礼申し上げる。

文 献

- 1) Takagi T, Itabashi Y. Gas chromatographic resolution of polyunsaturated wax esters based on their degree of unsaturation. *J. Chromatogr. Sci.* 1977; **15**: 121-124.
- 2) Itabashi Y, Takagi T. Gas chromatographic resolution on polar open-tubular columns of saturated and unsaturated wax ester isomers differing in combinations of acyl and alcoholic groups. *J. Chromatogr.* 1984; **299**: 351-363.
- 3) Takagi T, Itabashi Y. Random combinations of acyl and alcoholic groups through overall wax esters of sperm whale head oils. *Comp. Biochem. Physiol.* 1977; **57B**: 37-39.
- 4) Takagi T, Itabashi Y. Gas chromatographic separation of triglycerides based on their degree of unsaturation. *Lipids* 1977; **12**: 1062-1068.
- 5) Itabashi Y, Takagi T. Gas chromatographic separations of di- and monoacylglycerols based on the degree of Unsaturation and positional placement of acyl groups. *Lipids* 1980; **15**: 205-215.
- 6) 板橋 豊, 高木 徹. 海産動植物油脂肪酸のガラスキャピラリーガスクロマトグラフィー. *油化学* 1980; **29**: 855-865.
- 7) Itabashi Y, Takagi T. *Cis*-5-olefinic nonmethylene-interrupted fatty acids in lipids of seeds, arils and leaves of Japanese yew. *Yukagaku* 1982; **31**: 574-579.
- 8) Takagi T, Itabashi Y. *Cis*-5-olefinic unusual fatty acids in seed lipids of gymnospermae and their distribution in triacylglycerols. *Lipids* 1982; **17**: 716-723.

- 9) Takagi T, Kaneniwa M, Itabashi Y, Ackman RG. Fatty acids in Echinoidea: Unusual *cis*-5-olefinic acids as distinctive lipid components in sea urchins. *Lipids* 1986; **21**: 558-565.
- 10) Kaneniwa M, Itabashi Y, Takagi T. Unusual 5-olefinic acids in the lipids of algae from Japanese waters. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987; **53**: 861-866.
- 11) 板橋 豊, 熊谷光洋, 太田 亨, 中尾博己. 魚肉を投与したキタムラサキウニ生殖巣の脂肪酸組成. 日本油化学会誌 1998; **40**: 43-47.
- 12) Takagi T, Kaneniwa M, Itabashi Y. Fatty acids in Crinoidea and Ophiuroidea: Occurrence of all-*cis*-6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoic acid. *Lipids* 1986; **21**: 430-433.
- 13) Ota T, Chihara Y, Itabashi Y, Takagi T. Occurrence of all-*cis*-6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoic acid in flatfish lipids. *Fisheries Sci.* 1994; **60**: 171-175.
- 14) Kaneniwa M, Itabashi Y, Endo S, Takagi T. Fatty acids in Holothuroidea: Occurrence of *cis*-14-tricosenoic acid. *Comp. Biochem. Physiol.* 1986; **84B**: 451-455.
- 15) Takagi T, Hayashi K, Itabashi Y. Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Bull. Japan. Soc. Fish.* 1984; **50**: 1413-1418.
- 16) Takagi T, Itabashi Y. Occurrence of mixtures of geometrical isomers of conjugated octadecatrienoic acids in some seed oils: Analysis by open-tubular gas liquid chromatography and high performance liquid chromatography. *Lipids* 1981; **16**: 546-551.
- 17) Itabashi Y, Takagi T. High performance liquid chromatographic separation of monoacylglycerol enantiomers on a chiral stationary phase. *Lipids* 1986; **21**: 413-416.
- 18) Itabashi Y, Takagi T. High-performance liquid chromatographic separation of diacylglycerol enantiomers on a chiral stationary phase. *J. Chromatogr.* 1987; **402**: 257-264.
- 19) Itabashi Y, Kuksis A, Marai L, Takagi T. HPLC resolution of diacylglycerol moieties of natural triacylglycerols on a chiral phase consisting of bonded (*R*)-(+) -1-(1-naphthyl)ethylamine. *J. Lipid Res.* 1990; **31**: 1711-1717.
- 20) 板橋 豊. 高速液体クロマトグラフィーによる魚油構成ジアシルグリセロールの光学異性体分離. 分析化学 1999; **48**: 1145-1148.
- 21) Itabashi Y, Kuksis A, Myher JJ. Determination of molecular species of enantiomeric diacylglycerols by chiral phase high performance liquid chromatography and polar capillary gas liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 1990; **31**: 2119-2126.
- 22) Itabashi Y, Marai L, Kuksis A. Identification of natural diacylglycerols as the 3,5-dinitrophenylurethanes by chiral phase liquid chromatography with mass spectrometry. *Lipids* 1991; **26**: 951-956.
- 23) Marai L, Kuksis A, Myher JJ, Itabashi Y. Liquid chromatography chloride attachment negative chemical ionization mass spectrometry of diacylglycerol dinitrophenylurethanes. *Biol. Mass. Spectrom.* 1992; **21**: 541-547.
- 24) Itabashi Y, Kuksis A. Reassessment of stereochemical configuration of natural phosphatidylglycerols by chiral-phase high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1997; **254**: 49-56.
- 25) Okabe H, Itabashi Y, Ota T, Kuksis A. Highly sensitive method for the separation of enantiomeric and regioisomeric diacylglycerols as 2-anthrylurethanes by chiral phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1998; **829**: 81-89.
- 26) Itabashi Y, Ota T. Lipase activity in scallop hepatopancreas. *Fisheries Sci.* 1994; **60**: 347.
- 27) Itabashi Y, Nishihara S, Ota T. Chiral phase HPLC determination of lipase regio- and stereoselectivities. In Hatano H, Hanai T (eds) *International Symposium on Chromatography*. World Scientific, Singapore, 1995; 337-344.
- 28) Ota Y, Itabashi Y, Hasuo M. Determination of positional specificity index of microbial lipases by chiral phase high-performance liquid chromatography. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996; **60**: 145-146.
- 29) Lehner R, Kuksis A, and Itabashi Y. Stereospecificity of monoacylglycerol and diacylglycerol acyltransferases from rat intestine as determined by chiral phase high-performance liquid chromatography. *Lipids* 1993; **28**: 29-34.
- 30) Takahashi Y, Itabashi Y, Suzuki M, Kuksis A. Determination of stereochemical configuration of the glycerol moieties of glycolipids by chiral-phase high-performance liquid chromatography. *Lipids* in press.
- 31) Itabashi Y, Yamaguchi A, Nakaya K. Lipid composition of the megamouth shark, *Megachasma pelagios*. In: Yano K, Morrissey JF, Yabumoto Y, Nakaya K (eds) *Biology of the Megamouth Shark*. Tokai University Press, Tokyo, 1997; 151-159.
- 32) Itabashi Y, Myher JJ, Kuksis A. Determination of positional distribution of short chain fatty acids in bovine milk fat on chiral columns. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1993; **70**: 1177-1181.
- 33) 板橋 豊, 河野真子, 青山倫也, 中島寿昭. 高速液体クロマトグラフィーによるγ-リノレン酸含有油脂の立体特異分析. 分析化学 2000; **49**: 375-380.
- 34) 板橋 豊. キラルクロマトグラフィー. 化学と生物 1995; **33**: 381-388.
- 35) 板橋 豊. キラル HPLC によるキラルグリセロ脂質の分析. 日本油化学会誌 1998; **47**: 971-981.
- 36) Kuksis A, Marai L, Myher JJ, Itabashi Y, Pind S. Applications of GC/MS, LC/MS and FAB/MS to determination of molecular species of glycerolipids. In: Perkins EG (ed) *Analysis of Fats, oils and lipoproteins*. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL., 1991; 464-495.
- 37) Itabashi Y, Myher JJ, Kuksis A. High-performance liquid chromatographic resolution of reverse isomers of 1,2-diacyl-*rac*-glycerols as 3,5-dinitrophenylurethanes. *J. Chromatogr. A* 2000; **893**: 261-279.
- 38) Dobson G, Itabashi Y, Christie WW, Robertson W. Liquid chromatography with particle-beam electron-impact mass spectrometry of diacylglycerol nicotinates. *Chem. Phys. Lipids* 1998; **97**: 27-39.
- 39) Okabe H, Itabashi Y, Ota T. Determination of molecular species of phosphatidylcholines as 2-anthrylurethanes by reversed-phase HPLC with fluorescence detection and on-line electrospray ionization mass spectrometry. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 1999; **48**: 559-567.
- 40) Itabashi Y, Takagi T, Tsuda T. High-performance liquid chromatographic separation of alkane-1,2-diol enantiomers on a chiral slurry-packed capillary column. *J. Chromatogr.* 1989; **472**: 271-276.
- 41) Takagi T, Itabashi Y, Tsuda T. High-performance liquid chromatographic separation of 2-hydroxy fatty acid enantiomers on a chiral slurry-packed capillary column. *J. Chromatogr. Sci.* 1989; **27**: 574-577.