ノ ー ト

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

板 橋 豊*

Chiral-phase HPLC resolution of enantiomeric diacylglycerol
moieties of fish-oil triacylglycerols

Yutaka ITABASHI*

*Department of Marine Bioresources Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611

(Received 19 July 1999, Accepted 1 October 1999)

The HPLC resolution of the enantiomeric *sn*-1,2- and *sn*-2,3-diacylglycerol (DG) moieties of fish-oil triacylglycerols (TGs) having different fatty acid compositions was carried out on a chiral stationary phase, (*R*)-1-(1-naphthyl)ethylamine. The DGs were generated from TGs of tuna orbital, pomfret flesh and pacific saury flesh by partial Grignard degradation; they were chromatographed as 3,5-dinitrophenylurethanes. By an isocratic elution with *n*-hexane-1,2-dichloroethane-ethanol 40 : 30 : 1 (v/v/v) as the mobile phase, the *sn*-1,2(2,3)-DGs from tuna orbital and pomfret flesh were resolved into two clearly distinguishable enantiomer groups, although some peak overlappings between the enantiomers were observed in the latter sample. On the other hand, no clear enantiomer resolution was obtained for the saury flesh DGs. The poorer resolution was mainly caused by the existence of large amounts of long-chain monounsaturated fatty acids (20 : 1 and 22 : 1) in the molecules.

Keywords : chiral phase HPLC; diacylglycerol; enantiomer; 3,5-dinitrophenylurethane; fish oil.

1 緒 言

近年、エイコサペンタエン酸 (20 : 5) やドコサヘキサエン酸 (22 : 6) など魚油に多量に含まれる高度不飽和脂肪酸の生体での重要性が認識されるにつれ、その薬効・薬理や作用メカニズムに強い関心が持たれている¹⁾。これら高度不飽和脂肪酸は、生体内や食品中では通常グリセロールエステル形態で存在するので、その機能や生理作用を明らかにするには、光学異性体を区別

して分子種レベルで研究することが重要であると考えられる。

ジアシルグリセロール (DG) はトリアシルグリセロール (TG) やリン脂質の代謝中間体として、またプロテインキナーゼ C を活性化するセカンドメッセンジャー分子として生体において重要な役割を演じている²⁾。DG のエナンチオマー (Fig. 1) を分離するには、幾つかの手法が報告されているが、その中で、3,5-ジニトロフェニルウレタン (DNPU) 誘導体を (*R*)-1-(1-ナフチル)エチルアミンを固定相とするキラル高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析する方法が最も良い分離

* 北海道大学水産学部海洋生物資源化学科: 041-8611
北海道函館市港町 3-1-1

を示している³⁾。このキラル HPLC 法は、脂肪酸組成の異なる種々の陸上動植物油 DG のエナンチオマー分離に適用されているが³⁾⁴⁾、魚油ではメンハーデン油⁴⁾やイワシ油⁵⁾の DG について比較的良好な分離が報告されているにすぎず、分離に及ぼす脂肪酸組成の影響は検討されていない。

本研究では、キラル HPLC 法を用いて脂肪酸組成の異なる 3 種の魚油 TG を構成する *sn*-1,2-DG と *sn*-2,3-DG のエナンチオマーグループ間の分離を比較検討した。その結果、魚種（脂肪酸組成の違い）により二つのグループ間の分離が大きく異なることが認められたので

Fig. 1 Structures of *sn*-1,2- and *sn*-2,3-diacylglycerol enantiomers

報告する。

2 実 験

マグロ眼か(窩)油、シマガツオ筋肉脂質及びサンマ筋肉脂質から薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて TG を分離し、これをグリニャール (Grignard) 分解して DG を含む反応混合物を得た⁴⁾。このグリニャール分解物 (約 10 mg) を脱水トルエン (1 ml) に溶解し、これに 3,5-ジニトロフェニルイソシアネート (住化分析センター製, 7~10 mg) を加えてピリジン (20 μ l) の存在下で 1 時間室温で反応させた。反応混合物から、TLC (Analtech 製シリカゲル GF プレート, 20 cm $\times$ 20 cm, *n*-ヘキサン/ジクロロメタン/エタノール, 40 : 10 : 1) により DG の DNPU 誘導体 [*sn*-1,2(2,3)-DG (R_f = 0.53) と *sn*-1,3-DG (R_f = 0.57) の混合物] を分離し、エーテルを用いて回収した。この DG 異性体混合物を再度 TLC (クロロホルム/アセトン, 99 : 1) で精製し、*sn*-1,3-DG (R_f = 0.40) を含まない *sn*-1,2(2,3)-DG (R_f = 0.25) のエナンチオマー混合物を得た。

HPLC による *sn*-1,2-DG と *sn*-2,3-DG の分離には、(*R*)-1-(1-ナフチル)エチルアミンをキラル固定相とするワイエムシイ製 A-K03 カラム (25 cm $\times$ 4.6 mm i.d.) を

Fig. 2 Chiral phase HPLC resolution of 3,5-dinitrophenylurethanes of the *sn*-1,2(2,3)-diacylglycerol moieties of triacylglycerols of tuna fish orbital (A), pomfret (*Brama japonica*) flesh (B), and saury flesh (C)

HPLC conditions: column, YMC A-K03 (5 μ m particles, 25 cm $\times$ 4.6 mm i.d.); column temp., ambient; mobile phase, *n*-hexane/1,2-dichloroethane/ethanol (40 : 30 : 1, by vol.); flow-rate, 1 ml/min; detection, 254 nm UV; sample size, 4~8 μ g

使用した⁴⁾。分析条件は以下のとおりである。ポンプ：島津 LC-6A, 移動相 (和光純薬製 HPLC 用溶媒)：*n*-ヘキサン/二塩化エチレン/エタノール (40 : 30 : 1, v/v/v), 流量：1 ml/min (室温), 検出器：島津 SPD-6A, 検出波長：254 nm UV, データ処理装置：島津 C-R6A, 試料注入量：4~8 µg (二塩化エチレン溶液)

TG の脂肪酸組成は、水素炎イオン化検出器 (FID) を装備した島津製 GC-9A ガスクロマトグラフを用いて、気液クロマトグラフィー (GLC) で求めた。カラムは日本クロマト工業製 Rascot Silar 5CP (50 m × 0.25 mm i.d.) を使用し、キャリアーガス (水素) 流量 0.8 ml/min, スプリット比 1/50, カラム温度 180~220°C (0.4°C/min) の条件で脂肪酸メチルエステルを分析した⁶⁾。

3 結果と考察

Fig. 2 にマグロ眼窩, シマガツオ筋肉及びサンマ筋肉 TG のグリニャール分解によって得られた *sn*-1,2(2,3)-DG のキラル HPLC による分離を示す。マグロ眼窩油 DG は (Fig. 2, A), *sn*-1,2-DG と *sn*-2,3-DG の二つのエナンチオマーのグループにはほぼ完全に分離されたが (ピーク分離⁷⁾ 98%), シマガツオでは 81% (Fig. 2, B), サンマでは 48% (Fig. 2, C) であり, 魚種により分離の程度は大きく異なった。この結果は, エナンチオマーグループ間の分離が構成脂肪酸の組成に大きく依存していることを示唆する。Table 1 に, 各魚油の TG の脂肪酸組成を示す。いずれの試料も構成脂肪酸の種類はほとんど同じであるが, その含量において大きく異なる。マグロ眼窩油は, 主要成分として 16 : 0, 16 : 1, 18 : 1, 20 : 5 及び 22 : 6 を含有する。サンマ筋肉 TG は, これらの脂肪酸に加えて 20 : 1 と 22 : 1 の長鎖モノエン酸を著量含む点でマグロ眼窩油とは大きく異なる。シマガツオは両者の中間的な値を示した。これら魚油の脂肪酸組成の結果は文献値⁹⁾と類似する。適用した分析条件下で, 20 : 5 や 22 : 6 などの高度不飽和酸を含む単一の DG のエナンチオマー分離 (分離係数 $\alpha = 1.40$) は, これを含まないものとほとんど同じである (板橋, 未発表)。したがって, エナンチオマーグループ間の不完全な分離 (Fig. 2, B, C) は個々の DG 分子のエナンチオマー分離が異なるためではなく, DG 分子中のアシル基の鎖長と不飽和度の違いにより保持容量が異なり, 結果として *sn*-1,2-DG と *sn*-2,3-DG の二つのエナンチオマーグループ間でピークの重なりが起こるためと考えられる。著者らは飽和脂肪酸 (C12~C18) 及び不飽和脂肪酸 (C18) を含む DG の DNPU 誘導体は equivalent car-

Table 1 Fatty acid compositions of the fish oil triacylglycerols (wt%)

Fatty acid	Tuna fish orbital	Pomfret flesh	Saury flesh
12 : 0	0.02	5.90	0.04
14 : 0	3.36	9.72	9.91
<i>iso</i> -15 : 0	0.24	0.58	0.39
15 : 0	0.83	0.55	0.73
16 : 0	19.09	19.72	16.90
16 : 1 <i>n</i> -7	7.38	5.27	6.03
16 : 2 <i>n</i> -4	0.52	0.38	0.26
17 : 0	0.75	0.47	0.94
16 : 3 <i>n</i> -4	1.07	0.36	0.50
18 : 0	2.80	3.59	2.61
18 : 1 <i>n</i> -9	23.16	16.79	5.48
18 : 1 <i>n</i> -7	2.67	1.63	1.10
18 : 2 <i>n</i> -6	1.02	0.99	1.54
18 : 3 <i>n</i> -3	0.38	0.99	1.59
18 : 4 <i>n</i> -3	0.30	1.28	5.46
20 : 0	0.25	0.09	0.18
20 : 1 <i>n</i> -11	0.29	2.72	7.54
20 : 1 <i>n</i> -9	1.65	2.08	2.74
20 : 1 <i>n</i> -7	0.16	0.14	0.16
20 : 4 <i>n</i> -6	1.99	0.40	0.31
20 : 4 <i>n</i> -3	0.49	1.42	1.02
20 : 5 <i>n</i> -3	5.48	6.43	8.48
22 : 1 <i>n</i> -11, <i>n</i> -13	0.31	2.86	13.56
22 : 1 <i>n</i> -9	0.32	0.36	0.81
21 : 5 <i>n</i> -3	0.14	0.25	0.37
22 : 5 <i>n</i> -6	1.03	0.19	0.16
22 : 5 <i>n</i> -3	1.61	0.96	1.23
22 : 6 <i>n</i> -3	22.69	13.87	9.96

bon number (ECN = アシル基の総炭素数 - 2 × アシル基の総二重結合数) に従ってキラルカラムから溶出することを明らかにした¹⁰⁾。この規則は 20 : 5 や 22 : 6 のポリエン酸や, 20 : 1 と 22 : 1 の長鎖モノエン酸を含有する DG についても適用できると考えられる。分析した各試料は, ECN 値の大きな長鎖モノエン酸 (20 : 1 と 22 : 1) と, ECN 値の小さなポリエン酸 (18 : 4) 含量に大きな違いが認められた。すなわち, マグロ眼窩 TG では 20 : 1 と 22 : 1 酸の含量は合わせて 2.7% に過ぎなかったが, サンマ筋肉 TG では 24.8% と高く, また 18 : 4 含量もマグロでは 0.3% であったが, サンマでは 5.5% と高い値を示した。12 : 0 はシマガツオだけに多く存在した。18 : 4 の ECN 値は 10 であり, これは 20 : 5 及び 22 : 6 (ECN = 10) と同じであることから, サンマ筋肉 DG (Fig. 2, C) において明りょうなエナンチオマー分離が得られないのは, 高度不飽和酸を含む ECN 値の小さな *sn*-1,2-DG と, 長鎖モノエン酸を含む

ECN 値の大きな *sn*-2,3-DG が重なるためであると考えられる。シマガツオの不完全な分離には 5.9% 存在する 12:0 (ECN = 12) も影響していると思われる。

光学異性体を区別して生物由来 DG の詳細な分子種組成を求めるためには、逆相 HPLC や GLC の使用が不可欠であり、その前提としてキラル HPLC による *sn*-1,2-DG と *sn*-2,3-DG の完全な分離が要求される³⁾⁴⁾¹¹⁾。本研究で用いた方法は、種々の動植物油 DG の分離に有効であるが、長鎖モノエン酸を多く含む魚油 DG に適用するには改良が必要である。

キラル HPLC による光学異性体分離についてご教示いただいたワイエムシの大井尚文博士に感謝致します。本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (課題番号 04660217) を得て行われた。

文 献

- 1) 鹿山 光編: “AA, EPA, DHA—高度不飽和脂肪

- 酸”, (1995), (恒星社恒生閣).
- 2) F. M. Goni, A. Alonso: *Prog. Lipid Res.*, **38**, 1 (1999).
- 3) 板橋 豊: 日本油化学会誌, **47**, 971 (1998).
- 4) Y. Itabashi, A. Kuksis, J. J. Myher: *J. Lipid Res.*, **31**, 2119 (1990).
- 5) T. Suzuki, T. Ota, T. Takagi: *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 461 (1993).
- 6) 板橋 豊, 原田直和, 太田 亨, 松永勝彦: 日本油化学会誌, **45**, 271 (1996).
- 7) L. S. Ettre: *J. Gas Chromatogr.*, **1**, 36 (1963).
- 8) 日本水産油脂協会編: “魚貝類の脂肪酸組成表”, (1989), (光琳).
- 9) Y. Ando, T. Ota, Y. Matsuhira, K. Yazawa: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 483 (1996).
- 10) Y. Itabashi, A. Kuksis, L. Marai, T. Takagi: *J. Lipid Res.*, **31**, 1711 (1990).
- 11) J. J. Myher, A. Kuksis, P. W. Park: “*New Techniques and Applications in Lipid Analysis*”, Edited by R. E. McDonald and M. M. Mossoba, p. 100 (1997), (AOCS Press, Champaign).