報 文

重水素標識脂肪酸メチルエステルのプロトン
核磁気共鳴スペクトル

野田 万次郎・善 積 み ち る

京都府立大学農学部農芸化学科 (京都市左京区下鴨半木町)

 ^1H NMR Analysis of Deuterated Fatty Acid Methyl Esters

Manjiro NODA and Michiru YOSHIKUMI

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
Kyoto Prefectural University (Shimogamo, Sakyo-ku, Kyoto)

Stearic-9, 10- d_2 , stearic-9, 9, 10, 10- d_4 , oleic-9, 10- d_2 , decanoic-3, 3- d_2 , lauric-3, 3- d_2 , myristic-3, 3- d_2 , palmitic-3, 3- d_2 , and stearic-3, 3- d_2 acids were synthesized, and ^1H NMR spectra of the methyl esters of these deuterated acids were measured. The signals due to the protons which were substituted by deuterons disappeared on the ^1H NMR spectra of the deuterated acid methyl esters. Estimation of the deuterium-labeled acid content in unlabeled acids was possible by measuring the relative decrease in the integrated areas of the signals for the corresponding methylene or olefinic protons which were replaced with deuterons in the deuterated acids. The shift reagents, $\text{Eu}(\text{fod})_3$ and $\text{Pr}(\text{fod})_3$, were effective for the NMR determination of deuterium-labeled fatty acids. Oleic-9, 10- d_2 acid and saturated 3, 3-dideuterio acids seem to be useful as nonradioactive tracers in the NMR analysis.

1 結 言

重水素化脂肪酸及びそれらを構成成分とする脂質は、近年 NMR を利用する脂質の種々の研究に用いられるようになってきた。現在までに脂肪酸の ^{13}C NMR の研究に重水素標識脂肪酸を用いた例^{1)~6)}、重水素化脂肪酸を含む脂質の ^1H NMR を生体膜研究に応用した例^{7)~11)}、また過重水素化リン脂質の ^1H NMR に関する研究^{12), 13)}などが報告されている。

この報告では、以上のような重水素化脂肪酸の NMR への利用方法とは異なり、分子内の特定位置に重水素を標識した脂肪酸及びその誘導体を、代謝や一般の化学反応のトレーサーとして利用する目的から、その ^1H NMR における重水素標識部の ^1H シグナルの欠如に着目し、これを利用して非標識脂肪酸中に混在する重水素標識脂肪酸の検出、定量を試みた結果をまとめて報告する。

この方法は、先に報告したシフト試薬を使う脂肪酸メチルエステルの NMR¹⁴⁾を応用することによって、一層効果を発揮するものであって、放射性同位元素を用いるトレーサー実験に比して、安全で試料の取り扱いが容易であり、かつ NMR の高級機種を特に必要としない等の利点を持つので、利用価値の高い方法と考えられる。

2 実 験

2.1 重水素標識脂肪酸

個々の重水素標識脂肪酸の合成法の概要は以下のようである。

2.1.1 ステアリン-9, 10- d_2 酸

オレイン酸を常法のとおり白金黒を触媒とし、ヘキサン中で常温において所定量重水素 (フランス原子力庁製品) 添加した。生成脂肪酸をヘキサンに溶解して再結晶させ、ステアリン-9, 10- d_2 酸を主成分とする重水素標識ステアリン酸混合物¹⁵⁾の結晶 (収率、ステアリン-9, 10- d_2 酸としての理論収量の 68~84%。mp 69.5°C) を得た。

2.1.2 ステアリン-9, 9, 10, 10- d_4 酸

オレイン酸の二臭化物を水酸化カリウムとともに加熱して得たステアロール酸¹⁶⁾を、上記同様に完全重水素添加後、ヘキサンに溶解して再結晶し、ステアリン-9, 9, 10, 10- d_4 酸を主成分とする重水素標識ステアリン酸混合物¹⁵⁾ (収率、ステアリン-9, 9, 10, 10- d_4 酸としての理論収量の 85%。mp 69°C) を調製した。

2.1.3 オレイン-9, 10- d_2 酸

ステアロール酸 1.5 g を、キノリン 0.1 ml を含むヘキサン 50 ml に溶解し、Lindlar 触媒¹⁷⁾ 0.5 g を加え、水素価測定の方法¹⁸⁾に準じて、溶液を強くかきまぜつつ密閉容器の中で重水素の圧力を加えながら、計算容量の重水素が吸収されるまで、30°C において半重水素添加した。ステアロール酸が完全にオレイン-9, 10- d_2 酸に変化したことを GLC で確認した後、反応液を濾過し、ろ

液を希塩酸で洗浄後、数回水洗し、次に硫酸ナトリウム（無水物）で脱水した後、溶液からヘキサンを留去した。得られたオレイン-9,10- d_2 酸の収量は 1.5 g（理論収量の 99.3%）。さらにこれを尿素付加精製したものは mp 13°C であった。

2.1.4 $C_{10}\sim C_{18}$ 飽和-3,3- d_2 酸

オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸の各メチルエステルから、それぞれ、炭素数 2 個多い $C_{10}\sim C_{18}$ 飽和-3,3- d_2 酸を合成した。その合成法の概要を示す。

重水素化アルミニウムリチウム 0.33 g をエーテル 50 ml に溶解した溶液に、 $C_8\sim C_{16}$ 飽和脂肪酸メチルエステル (0.017 mol)（固体のメチルエステルの場合はそのエーテル溶液）をかきまぜながら少量ずつ加え、窒素下、室温で 1 夜放置した。反応後希硫酸を加えて過剰の還元剤を除き、エーテル抽出し、エーテル抽出液から粗重水素化アルコールを得た。これをアルカリ加水分解して未反応の脂肪酸エステルを除き、相当する $C_8\sim C_{16}$ -1,1- d_2 アルコール、 $CH_3(CH_2)_nCD_2OH$ ($n=6,8,10,12$, または 14), の純粋物を得た。収率, 理論収量の 59~95%。同位体純度 (NMR 法), 97% 以上。

この $C_8\sim C_{16}$ -1,1- d_2 アルコールを、それぞれ赤リンとヨウ素とともに 150°C で 5 h 加熱し、常法¹⁹⁾により相当する 1-ヨードアルカン-1,1- d_2 , $CH_3(CH_2)_nCD_2I$ ($n=6,8,10,12$ または 14), とした。収率, 理論収量の 53~65%。

次にこれらの $C_8\sim C_{16}$ -1-ヨードアルカン-1,1- d_2 のそれぞれを、常法²⁰⁾によりマロン酸ジエチルと反応させ、炭素数 2 個の増炭合成を行った。生成物をけん化後、加熱脱炭酸して得られた粗脂肪酸は、不純物を含んでいたため、これを TLC [シリカゲル G プレート; 展開溶媒, ヘキサン-エーテル-酢酸 (80:20:1)] で分離精製し、さらにメチルエステル化後、分取ガスクロマトグラフィー（充てん剤, 3% OV-17/Chromosorb W; 温度, 100~180°C）を行って精製し、純粋物を得た。精製物としての収率は理論収量の 18~45%。同位体純度 (NMR 法) 97% 以上。このようにして各 $C_8\sim C_{16}$ 1-ヨードアルカン-1,1- d_2 から調製された飽和-3,3- d_2 酸メチル, $CH_3(CH_2)_nCD_2CH_2COOCH_3$ ($n=6,8,10,12$ または 14), は次の各種である。

デカン-3,3- d_2 酸メチル	bp 225°C
ラウリン-3,3- d_2 酸メチル	bp 136~139°C/14 mmHg
ミリスチン-3,3- d_2 酸メチル	mp 18°C
パルミチン-3,3- d_2 酸メチル	mp 30.5°C
ステアリン-3,3- d_2 酸メチル	mp 39°C

2.1.5 重水素標識脂肪酸メチルとその純度

上記の合成重水素標識脂肪酸はすべて常法により三

ッ化ホウ素-メタノールを用いてメチルエステルとした後、分析に供した。これらのメチルエステルは、いずれも GLC で単一のピークを与えたが、DEGS や OV-17 を固定相とする充てんカラム (3 mm×3 m) では、相当する非標識脂肪酸メチルとの間に保持時間の差異はほとんど認められなかった。

しかし後記のような NMR を利用する測定法によると、重水素で置換された特定プロトンのシグナルは消失し、その積分値から計算してみても、いずれも少なくとも 97% 以上の純度の重水素標識脂肪酸メチルであることがわかった。

ただしステアリン-9,10- d_2 酸及びステアリン-9,9,10,10- d_4 酸の場合は、その合成法の特徴として、もとの不飽和結合を中心に重水素が 1 ないし数個入った同族体も若干同時に生成するが¹⁹⁾、これらの混入は本実験における NMR の条件では、そのスペクトルに影響が出てこない。またオレイン-9,10- d_2 酸及び飽和-3,3- d_2 酸の場合は、このような同族体の混入のおそれはなく、重水素の置換位置は所定位置に限定されており、純粋物が得られる²¹⁾。

2.2 NMR の装置と測定条件

前報¹⁴⁾と同様、使用装置は日立高分解能核磁気共鳴装置 R-24 型 (60 MHz) で、室温 (16~30°C) で測定した。

試料メチルエステル 7~30 mg またはこれにシフト試薬を添加したものを、テトラメチルシラン (TMS) 含有四塩化炭素 0.3~0.4 ml に溶解し、外径 4 mm の試料管に入れて測定した。シフト試薬としては、乾燥したトリス (1,1,1,2,2,3,3-ヘプタフルオロ-7,7-ジメチル-4,6-オクタジオナト) ユロピウム (Ⅲ) ($Eu(fod)_3$) 及び同プラセオジウム (Ⅲ) ($Pr(fod)_3$) の両者を用い¹⁴⁾、試料メチルエステルに対する混合モル比は主として 0.4~1.0 の範囲内であった。

なお化学シフトは、TMS を内部標準としたときの δ (ppm) 値で表し、TMS より高磁場側を負の値とした。

定量のための各ピークの積分値は、同一条件で 5~10 回繰り返して積分曲線を書かせ、該当ピークの測定値の平均値をとった。

3 結 果

3.1 ステアリン-9,10- d_2 酸及びステアリン-9,9,10,10- d_4 酸メチルの NMR

Fig-1 のように、ステアリン-9,10- d_2 酸メチルでは、重水素添加前のオレイン酸のオレフィンプロトン (δ 5.26) 及びその α 位のメチレンプロトン (δ 1.95) のシグナルは、もとの位置から消失し、ステアリン酸メチルのスペクトルと区別がつかなくなった。またステアリン-9,9,10,10- d_4 酸メチルの場合も、同様に原料ステアロ

Fig.-1 NMR spectra (60 MHz) of methyl stearate (A), methyl stearate-9,10- d_2 (B), and methyl stearate-9,9,10,10- d_4 (C).

Fig.-2 NMR spectra (60 MHz) of methyl oleate (18:1) and methyl oleate-9,10- d_2 (18:1 d_2) without shift reagents (A, B), with $\text{Eu}(\text{fod})_3$ (C), and with $\text{Pr}(\text{fod})_3$ (D). Molar ratio: $\text{Eu}(\text{fod})_3/\text{ester}=0.52$, $\text{Pr}(\text{fod})_3/\text{ester}=0.71$.

ル酸メチルの三重結合の α 位に当たるメチレンプロトン ($\delta 2.06$) のシグナルは移動して他のメチレンプロトンのシグナルと重なる結果、消失した。いずれもこの NMR 条件下、またはシフト試薬を加えた場合でも、これらの重水素置換酸メチルとステアリン酸メチルの NMR スペクトルの差は現れてこない。

3.2 オレイン-9,10- d_2 酸メチルの NMR

オレイン-9,10- d_2 酸メチルでは、オレフィンプロトンのシグナルは消失する。**Fig.-2** にシフト試薬を加えた場合の結果とともに図示する。

3.3 $\text{C}_{10}\sim\text{C}_{18}$ 飽和-3,3- d_2 酸メチルの NMR

$\text{C}_{10}\sim\text{C}_{18}$ 飽和-3,3- d_2 酸メチルの場合は、いずれも C-3 のプロトンのシグナルが消失し、C-2 のプロトンのシグナルが一重線となり、C-4 のそれは三重線となる。これはシフト試薬を加えたときに特に明りょうとなる。

Fig.-3 にその二、三の例を示す。

Fig.-3 NMR spectra (60 MHz) of methyl esters of unlabeled saturated acids (12:0 ~ 16:0) and saturated 3,3-dideutero acids (12:0 d_2 ~ 16:0 d_2) without shift reagents (A, B), with $\text{Pr}(\text{fod})_3$ (C), and with $\text{Eu}(\text{fod})_3$ (D). Molar ratio: $\text{Pr}(\text{fod})_3/\text{ester}=0.78$, $\text{Eu}(\text{fod})_3/\text{ester}=0.47$.

3.4 NMR による重水素標識脂肪酸の定量

3.4.1 オレイン-9,10- d_2 酸メチルの定量

非標識オレイン酸メチル中に混在するオレイン-9,10- d_2 酸メチルの含有率は、**Fig.-4** に示すように、オレフ

インプロトン (2H, 積分値 b) の積分値の正規値よりの減少に比例するから, この値 (b) と, エステルメチルプロトン (3H, 積分値 a) またはこれと C-3 のメチレンプロトンの合計 (5H, 積分値 d), あるいは C-2, C-4 の各メチレンプロトン (2H, 積分値 c) などの積分値との比から, 含有重水素標識オレイン酸のモル百分率を式 (1)~(3) で算出することができる。

$$\text{オレイン-9,10-}d_2 \text{ 酸 \%} = 100 - \frac{150b}{a} \quad (1)$$

$$= 100 - \frac{100b}{c} \quad (2)$$

$$= 100 - \frac{250b}{d} \quad (3)$$

Fig.-4 NMR spectra (60 MHz) of a mixture of methyl oleate and methyl oleate-9,10- d_2 without $\text{Pr}(\text{fod})_3$ (A), and with $\text{Pr}(\text{fod})_3$ (B). $\text{Pr}(\text{fod})_3/\text{ester} = 0.65$. Peak numbers are the same as those in **Fig.-2**.

この場合は **Fig.-4** (A) のように, シフト試薬の添加なしでも十分に定量可能であった。

なおまた **Fig.-4** (B) のように, 両脂肪酸メチルの混合物の場合には, $\text{Pr}(\text{fod})_3$ 添加の場合, エステルメチルプロトン (m) のシフト値に両者で差が出るため, そのピークが分離することがある。

以上の定量法を用いて, オレイン酸中に混在する重水素標識オレイン酸の比率を実際に算出した二, 三の結果を **Table-1** に例示する。このように少なくとも, 含有率 10~95% の範囲では, どの計算式を使っても実用できることを知った。

3・4・2 $\text{C}_{10} \sim \text{C}_{18}$ 飽和-3,3- d_2 酸メチルの定量

非標識 $\text{C}_{10} \sim \text{C}_{18}$ 飽和酸メチル中に混在する 同飽和-3,3- d_2 酸メチルの含有率は, **Fig.-5** に示すように, C-3 のメチレンプロトン (2H, 積分値 b) の積分値の

Table-1 Estimation of methyl oleate-9,10- d_2 in methyl oleate by NMR.

Methyl esters	Method*	Methyl oleate-9,10- d_2 (mol %)
Mixture I	Weighed	12
	NMR (1)	10
	NMR (3)	11
Mixture II	Weighed	28
	NMR (3)	29
Mixture III	Weighed	53
	NMR (1)	55
	NMR (2)	54
	NMR (3)	54
Mixture IV	Weighed	90
	NMR (2)	91
	NMR (3)	90
Mixture V	Weighed	95
	NMR (1)	93
Methyl esters from 1,3-dioleoyl-2-(oleoyl-9,10- d_2)-glycerol	Theor.	67
	NMR (1)	67
	NMR (3)	66

* Numbers in parentheses indicate the numbers of equations employed, respectively (see text).

正規値よりの減少に比例するから, この値 (b) と, エステルメチルプロトンと C-2 のメチレンプロトンの積分値の和 (5H, 積分値 a) との比から, 含有重水素標識-3,3- d_2 酸のモル百分率を式 (4) で算出することができる。

$$\text{飽和-3,3-}d_2 \text{ 酸 \%} = 100 - \frac{250b}{a} \quad (4)$$

Fig.-5 NMR spectra (60 MHz) of a mixture of methyl palmitate and methyl palmitate-3,3- d_2 with $\text{Eu}(\text{fod})_3$. $\text{Eu}(\text{fod})_3/\text{ester} = 0.65$. Peak numbers are the same as those in **Fig.-3**.

なお, この定量の場合は, **Fig.-5** のように適量の $\text{Eu}(\text{fod})_3$ を添加して測定する。 $\text{Pr}(\text{fod})_3$ 添加の場合も, 同様の原理で定量できるが, $\text{Eu}(\text{fod})_3$ 添加の場合に比べて精度がはるかに落ちる。

この方法を使って, 既知混合比のメチルエステル混合物について定量した二, 三の例を **Table-2** に示す。結

Table-2 Estimation of saturated 3,3-dideutero acids in the corresponding unlabeled acids as their methyl esters by NMR.

Mixture of acids*	3,3-Dideutero acid (mol %)	
	Weighed	Calcd. from NMR
10:0+10:0 d_2	82	85
12:0+12:0 d_2	27	26
14:0+14:0 d_2	10	10
16:0+16:0 d_2	41	42
18:0+18:0 d_2	91	93

* 10:0 d_2 ~18:0 d_2 , C_{10} ~ C_{18} saturated 3,3-dideutero acids.

果は、いずれも少なくとも 10~90% の範囲では大体信頼できる値を示すことがわかった。

4 考 察

前記のように、この研究の目的の一つは重水素標識脂肪酸を安定トレーサーとして用い、これを脂肪酸の関与する化学反応や生体における代謝の追跡に使おうというものであるから、その意味ではオレイン-9,10- d_2 酸メチルの NMR による定量法が最も有用な方法となりうるものと期待できる。

飽和-3,3- d_2 酸の NMR 自体も、定量的にはほぼ満足できる結果が得られたが、これらの飽和-3,3- d_2 酸の合成法がやや煩雑で、この点に難点があり、目下これに代わって、より簡単にかつ収量よく調製できる別の重水素標識脂肪酸を開発中である。

ステアリン-9,10- d_2 酸及びステアリン-9,9,10,10- d_4 酸は、重水素の置換位置が限定されにくい合成上の難点¹⁵⁾とも相まって、上記のトレーサーとしての価値は低い。

この実験結果の示すように、重水素標識脂肪酸を NMR で定量する場合、シフト試薬の添加が極めて効果的であった。本 NMR 定量法の難点としては、試料が比較的多量 (7 mg 以上) 必要とする点があげられ、この点は GC-MS による重水素標識酸の分析に劣るが、反面試料が全量回収できる利点がある。また、より高級な

高分解能 NMR 装置の使用によって、試料量に関する難点は、かなり改善されるであろう。従って本法は重水素標識脂肪酸の検出、定量法として、充分実用できる方法であると考ええる。

現在諸種の酵素反応の追跡にこの方法を適用して、その応用面の可能性を検討中である。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金によった。記して謝意を表する。

(昭和 55 年 9 月 5 日受理)

文 献

- 1) A.P. Tulloch, M. Mazurek, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1973**, 692
- 2) A.P. Tulloch, M. Mazurek, *Lipids*, **11**, 228 (1976)
- 3) A.P. Tulloch, *Lipids*, **12**, 92 (1977)
- 4) A.P. Tulloch, *Chem. Phys. Lipids*, **18**, 1 (1977)
- 5) A.P. Tulloch, *Chem. Phys. Lipids*, **23**, 69 (1979)
- 6) A.P. Tulloch, *Chem. Phys. Lipids*, **25**, 225 (1979)
- 7) G.W. Stockton, C.F. Polnaszek, L.C. Leitch, A.P. Tulloch, I.C.P. Smith, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 844 (1974)
- 8) G.W. Stockton, C.F. Polnaszek, A.P. Tulloch, E. Hasan, I.C.P. Smith, *Biochemistry*, **15**, 954 (1976)
- 9) A. Seelig, J. Seelig, *Biochemistry*, **13**, 4839 (1976)
- 10) G.W. Stockton, K.G. Johnson, K.W. Butler, A.P. Tulloch, Y. Boulanger, I.C.P. Smith, J.H. Davis, M. Bloom, *Nature*, **269**, 267 (1977)
- 11) B.J. Forrest, L.W. Reeves, *Chem. Phys. Lipids*, **24**, 183 (1979)
- 12) P.B. Kingsley, G.W. Feigenson, *Chem. Phys. Lipids*, **24**, 135 (1979)
- 13) J. Browning, J. Seelig, *Chem. Phys. Lipids*, **24**, 103 (1979)
- 14) 野田万次郎, 高橋朋弘, 油化学, **28**, 411 (1979)
- 15) W.K. Rohwedder, E.D. Bitner, H.M. Peters, H.J. Dutton, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 33 (1964)
- 16) 土屋知太郎編, “実用油脂便覧 (改訂版)”, 産業図書 (1956) p. 204
- 17) H. Lindlar, *Helv. Chim. Acta*, **35**, 446 (1952)
- 18) 土屋知太郎編, “実用油脂便覧 (改訂版)”, 産業図書 (1956) p. 110
- 19) W.W. Hartman, J.R. Byers, J.B. Dickey, “Organic Syntheses”, Coll. Vol. II, p. 322 (1943)
- 20) E.E. Reid, J.R. Ruhoff, “Organic Syntheses”, Coll. Vol. II, p. 474 (1943)
- 21) A.P. Tulloch, *Chem. Phys. Lipids*, **24**, 391 (1979)