報 文

過酸化脂質の HPLC 分析 (第 1 報)

自動酸化脂肪酸エステルの過酸化物価測定

原 節 子・山 脇 英 樹・戸 谷 洋 一 郎

成蹊大学工学部 (東京都武蔵野市吉祥寺北町 3-3-1)

HPLC Analysis of Lipid Peroxides. I.

POV Determination of Autoxidized Fatty Acid Esters

Setsuko HARA, Hideki YAMAWAKI, and Yoichiro TOTANI

Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Seikei University
(3-1 Kichijoji-Kitamachi 3, Musashino-shi, Tokyo)

Reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC) with an RI detector was used to separate and determine hydroperoxides of autoxidized ethyl oleate, linoleate and linolenate.

Ethyl oleate hydroperoxide appeared as a single peak apart from unoxidized ethyl oleate on the chromatogram. The hydroperoxide isomers formed by autoxidation of ethyl linoleate were resolved into two components which were geometrical isomers having *cis-trans* and *trans-trans* conjugated diene structures. Autoxidized ethyl linolenate gave two peaks of conjugated diene monohydroperoxides and conjugated triene dihydroperoxides, respectively. Under the HPLC conditions used here, the hydroperoxides could be separated according to the number of their double bonds and hydroperoxy groups, and the configuration of the conjugated double bonds (*cis-trans* and *trans-trans*), but not on the basis of the difference in the location of hydroperoxy groups.

When autoxidized esters were subjected to HPLC analysis directly, a good linear relationship was observed between the ratio of the peak area of hydroperoxides to that of all peaks on the chromatogram and POV of the sample ester in the range of 30~3,000 meq/kg. POV determined by this procedure agreed quite well with those measured by the official titration method.

1 結 言

過酸化脂質は種々の疾病や老化現象との関連が示唆されて以来、広く注目を集め、特に生体内における様々な作用の解明のために多くの研究が行われている^{1),2)}。過酸化脂質の分析法として過酸化物価 (POV) 法、チオバルビツール酸 (TBA) 法をはじめとして種々の方法が用いられているが、測定対象物質の相違などからのおのの測定値の比較やその評価についてしばしば困難を伴い、適切な分析法の確立が望まれている。本研究では近年、脂質分野への進出が著しい高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて簡便かつ迅速な過酸化脂質の分離及び定量を行うことを目的とした。これまで HPLC による過酸化脂質の分析例として Chan らにより順相カラムにエタノール-ヘキサン系溶媒と UV 検出器を用いてリノール酸エチルヒドロペルオキシドが検出でき

ることが報告され^{3),4)}、その後リノール酸エチルの4種のヒドロペルオキシド⁵⁾及びリノレン酸エチルヒドロペルオキシドを還元することにより8種のヒドロキシリノレン酸エチル⁶⁾が分離できることが明らかにされている。さらに逆相カラムを用いて Neff らは自動酸化オレイン酸エチル、リノール酸エチルを還元して得られたヒドロキシ脂肪酸エチルが分離されること⁷⁾、また金田らによりリノール酸ヒドロペルオキシドが検出できることが報告されている⁸⁾。しかしこれらの研究のほとんどにおいて過酸化脂質の分離のみがなされており、また検出器として共役ジエン、トリエンの特性吸収に基づく UV 検出器を使用しているためオレイン酸エチルヒドロペルオキシドの様に特性吸収を持たない物質は検出されていない。それゆえ、本研究においてはすべての物質を非選択的に検出することができる RI 検出器を用い、過酸化脂質の分離条件及びその定量性について検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

試料として日本油脂(株)製高純度オレイン酸, リノール酸の各標準試料及び市販のオリブ油, サフラワー油, あまに油, ひまし油から常法により調製した各エチルエステルを用いた。各試料の GLC 分析による脂肪酸組成を **Table-1** に示した。試料は室温 (20~25°C) で自動酸化し, 種々の POV を有する自動酸化試料を調製した。

Table-1 Fatty acid composition of sample esters by GLC (%).

Ethyl ester	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{18:1} -OH
Oleic acid			100.0			
Linoleic acid				100.0		
Ricinoleic acid	1.7	1.0	5.5	7.1		82.6
Olive oil fatty acid	10.3	0.8	86.1	2.3	0.5	
Safflower oil fatty acid	10.8		21.3	61.5	6.4	
Linseed oil fatty acid	5.9	3.7	19.7	15.8	54.9	

2.2 HPLC 分析

装置として日本分光工業(株)製 TWINCLE 型ポンプに昭和電工(株)製示差屈折計 Shodex RI SE 31 型を接続して用いた。カラムは日本分光工業(株)製逆相系充てん剤 Fine SIL C₁₈ を 4×250 mm のステンレスカラムに充てんしたものを使用した。溶離液としては水-アセトニトリル系溶媒の種々の組成について検討し, アセトニトリル/水/テトラヒドロフラン (5:2:1) を用いた。なお HPLC 条件の詳細を **Table-2** に示した。

Table-2 Conditions of HPLC.

Column	Fine SIL C ₁₈ (4×250 mm)
Eluent	Acetonitrile : Water : Tetrahydrofuran (5 : 2 : 1)
Flow rate	1.0 ml/min
Detector	Refractive Index (RI) detector

2.3 POV の測定

自動酸化試料の POV 測定に際しては基準油脂分析試験法記載の方法⁹⁾及び試料が微量の場合には電位差滴定法¹⁰⁾を用いた。

2.4 ヒドロペルオキシドの濃縮及び還元

自動酸化試料からヒドロペルオキシドを濃縮するため Frankel らの方法¹¹⁾に従ってシリカゲルを充てん剤としたカラムクロマトグラフィーを行った。

またヒドロペルオキシドの還元に際

しては水素化ホウ素ナトリウムを用いる Chan らの方法^{1),12)}を使用した。

3 結 果

3.1 ヒドロペルオキシドの分離

3.1.1 オレイン酸エチルモノ (ヒドロペルオキシド) の分離

まずオレイン酸エチルモノ (ヒドロペルオキシド) が **2.2** の HPLC 条件により分離されることを確認するため標準試料であるオレイン酸及びひまし油から得たリシノール酸の各エチルエステルを HPLC 分析に供した。その結果, **Fig.-1** に示した様に ヒドロキシル基を有するリシノール酸エチルはオレイン酸エチルに比較して保持時間がかなり短く, この条件によりヒドロペルオキシドも同様にオレイン酸エチルから分離できることが推測された。

未酸化及び POV 1,620 meq/kg のオリブ油脂脂肪酸エチルの HPLC を **Fig.-2** に示した。これから保持時間 60 min のピークが標準物質との比較からオレイン酸エチルであることが判明した。また自動酸化に伴い保持時間 14 min 付近に新たなピークが出現し, POV の上昇とともにこのピークの増大が認められたのでこれがオレイン酸エチルモノ (ヒドロペルオキシド) であると推定された。

そこで POV 1,620 meq/kg のオリブ油脂脂肪酸エチルから **2.4** に示したカラムクロマトグラフィーにより POV 5,494 meq/kg のオレイン酸エチルモノ (ヒドロペルオキシド) を調製し HPLC 分析を行ったところ **Fig.-2** に示した様にオレイン酸エチルのピークがほとんど消失したのに対し, 保持時間 14 min 付近のピークが著しく増大した。またこの試料を **2.4** の方法により水素化ホウ素ナトリウムにより還元し HPLC 分析を行ったところ **Fig.-1** に示したリシノール酸エチルと同じ保持時

Fig.-1 HPLC of ethyl oleate and ricinoleate.

Fig.-2 HPLC of olive oil fatty acid ethyl ester.

Fig.-3 HPLC of ethyl linoleate.

Fig.-4 HPLC of safflower oil fatty acid ethyl ester.

Fig.-5 HPLC of hydroperoxides of safflower oil fatty acid ethyl ester.

間を有するピークが出現したことから保持時間 14 min 付近のピークがオレイン酸エチルモノ（ヒドロペルオキシド）であることが同定された。

3.1.2 リノール酸エチルモノ（ヒドロペルオキシド）の分離

未酸化及び POV 230 meq/kg のリノール酸エチルの標準試料を同条件で HPLC 分析した結果、Fig.-3 に示したように保持時間 38 min にリノール酸エチルのピークが現れ、自動酸化に伴い保持時間 12 min 付近に新たな 2 ピークの出現が認められた。

同様にサフラワー油脂脂肪酸エチルを HPLC 分析しその結果を Fig.-4 に示した。保持時間 38 min にリノール酸エチルのピーク及び保持時間 60 min にオレイン酸エチルのピークが認められ、また保持時間 21 min のピークは Warthen¹⁾ らの報告により共存するリノレン酸エチルと考えられた。なお試料中に含まれているパルミチン酸メチルは標準試料を用いて検討した結果、本条件では溶出しなかった。カラムクロマトグラフィーによりヒドロペルオキシドを濃縮して得られた POV 2,898 meq/kg の試料では保持時間 12 min 付近の 2 ピークが顕著に増大し、これらがリノール酸エチルモノ（ヒドロペルオキシド）であることが判明した。なおこれらのピークの前後に見られるピークは試料中に含まれているオレイン酸エチル、リノレン酸エチルから生じたヒドロペルオキシドと考えられた。

次に Fig.-4 の POV 987 meq/kg のサフラワー油脂脂肪酸エチルについてカラム及び溶離液はそのまま RI 検出器を UV 検出器に変え 235 nm で検出した結果を Fig.-5 に示した。

Fig.-5 からこれらの 2 ピークは共役ジエン型であり Chan らの結果³⁾よりシリカ ODS カラムにおいては二重結合の幾何異性に基づいてヒドロペルオキシドが分離

されると考えられるので前のピークがシス-トランス型、後のピークがトランス-トランス型であると考えられた。

3.1.3 リノレン酸エチルヒドロペルオキシドの分離

あまに油脂脂肪酸エチルを試料としてリノレン酸エチルヒドロペルオキシドの分離について検討した。すなわち Fig.-6 に示した様に未酸化の時には 3 ピークが認められ Fig.-1, 3 の結果及び尿素付加によって得られたリノレン酸エチル（純度 85%）の HPLC 分析結果からこれらはリノレン酸、リノール酸、オレイン酸の各エチルエステルと考えられた。また POV 2,065 meq/kg の自動酸化試料においては保持時間の短いところに 7 ピークが新たに出現した。これらのうち Fig.-6 に示した ⑤、⑥ のピークは Fig.-4 に示したようにリノール酸エチルモノ（ヒドロペルオキシド）であり、⑦ のピークはオレイン酸エチルモノ（ヒドロペルオキシド）であるので、①～④ の 4 ピークがリノレン酸エチルから生じたヒドロペルオキシドと考えられた。そこでこの試料から同様にカラムクロマトグラフィーによりヒドロペルオキシドを濃縮して得られた POV 7,610 meq/kg の試料を HPLC 分析し、Fig.-7 の結果を得た。これから ①～④ の 4 ピークがリノレン酸エチルヒドロペルオキシドであることが確認され、更に Fig.-8 に示した様に UV 検出器による検出結果から ①、② のピークは 270 nm に特性吸収を有する共役トリエン構造を含み、また ③、④ のピークは共役ジエン構造であることが判明した。

3.2 ヒドロペルオキシドの定量

3.1 においてオレイン酸、リノール酸、リノレン酸の各エチルエステル及びそれらのヒドロペルオキシドが HPLC により良好に分離されることが明らかとなったので次に HPLC によるヒドロペルオキシドの定量について検討した。すなわち各試料を用いて得られたクロマ

Fig.-6 HPLC of linseed oil fatty acid ethyl ester.

Fig.-9 Relationship between ratio of peak area and POV.

トグラム上に現れたすべてのピーク面積の合計を1としたヒドロペルオキシドのピーク面積の比、すなわち面積分率で表し、滴定によって求めた POV との関係を図-9 に示した。なおヒドロペルオキシドのピークが複数存在する場合にはそれらのピーク面積を合計して面積分率を求め POV との関係を得た。

その結果、オレイン酸エチル、リノール酸エチルについては同一直線上にプロットされたのに対し、リノレン酸エチルを主成分とする試料においてはこう配が幾分か小さい直線が得られた。これは Frankel ら¹²⁾ によりリノレン酸エチルヒドロペルオキシドの中にジ(ヒドロペルオキシド)が存在することが報告されていることから Fig.-6 の ①, ② のピークについてジ(ヒドロペルオキシド)であると仮定してそのピーク面積を補正した。すなわちジ(ヒドロペルオキシド)と考えられる2つのピーク面積を2倍しその他のモノ(ヒドロペルオキシド)のピーク面積と合計してヒドロペルオキシドとしてのピーク面積分率を求め POV との関係を図-10 に示した。

Fig.-7 HPLC of hydroperoxides of linseed oil fatty acid ethyl ester (1).

Fig.-8 HPLC of hydroperoxides of linseed oil fatty acid ethyl ester (2).

Fig.-10 Calibration curve for determination of POV (1).

Fig.-10 からリノレン酸エチルもオレイン酸エチル、リノール酸エチルと同一の直線上にプロットされることが明らかとなったことからリノレン酸エチルヒドロペルオキシドについて Fig.-6 の ①, ② のピークをジ(ヒドロペルオキシド)として補正することによりオレイン酸、リノール酸、リノレン酸の各ヒドロペルオキシドについて試料の POV を算出することが妥当と考えられた。そこでこの検量線を用いて種々の試料の HPLC 分析結果から POV を求めると同時に電位差滴定法¹⁰⁾により POV を測定し両者の相関性について検討した。その結

果、オレイン酸エチル、リノール酸エチルを試料とした場合には両者の値が良く一致したのに対し、オリーブ油、サフラワー油、あまに油の各脂肪酸エチルエステルでは POV の測定値に比較して HPLC による定量値の方が高い値を示した。これはこれらの試料が Table-1 に示したように飽和酸を 10% 程度含有しているが本実験において用いた溶離液ではこれらの飽和酸がカラムに吸着

Table-3 POV determination by HPLC and potentiometric titration.

Ethyl ester	POV (meq/kg)	
	HPLC	Potentiometric titration
Oleic acid	50	42.3
Linoleic acid	250	227.0
Olive oil fatty acid	1,572	1,535.9
Safflower oil fatty acid-A	28	30.9
Safflower oil fatty acid-B	1,787	1,770.9
Linseed oil fatty acid	2,080	2,046.2

Fig.-11 Calibration curve for determination of POV (2).

されクロマトグラム上にあらわれないことから見かけのヒドロペルオキシドのピーク面積分率が大きくなるためと考えられた。そこで検量線の作製に用いるピーク面積分率を計算する際に飽和酸を含めたピーク面積の合計から求めた全ヒドロペルオキシドのピーク面積分率とPOVの関係を図Fig.-11に示した。

Fig.-11においてはFig.-10と比較して各プロットのばらつきも小さく更に良好な直線関係が認められた。これを検量線として種々の試料のPOVを求めるとともに電位差滴定法¹⁰⁾によりPOVを算出し結果をTable-3に示した。なおサフラワー油については自動酸化程度の異なる2種を用いた。

これから明らかな様に両測定値は良く一致しており、この検量線を用いることによりHPLCからPOVを求められることが判明した。なおHPLC分析に際しては試料2~6 μ lを用い、数回の繰り返しの実験の結果、再現性も良好であった。

4 考 察

逆相カラム Fine SIL C₁₈とShodex RI SE 31型RI検出器を組み合わせ、過酸化脂質のHPLC分析を行った結果、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の各エチルエステル及び自動酸化によって生じたそれらのヒドロペルオキシドが良好に分離・検出できることが判明した。これまでの報告においては主に順相カラムが使用されており、過酸化脂質は順相カラムによりヒドロペルオキシドの位置・数及び二重結合の幾何異性の違いで細かく分離されることが明らかにされている^{3), 6), 14)}。従って過酸化脂質の構造を解析するためには順相カラムとUV検出器を組み合わせることが非常に有効と考えられるが、自動酸化リノレン酸エチルではモノ(ヒドロペ

ルオキシド)として8ピークが検出され複雑なクロマトグラムを呈する⁶⁾。本研究では過酸化脂質の迅速なる定量法の確立を主目的としているため、過酸化脂質がヒドロペルオキシド基の数のみにより未酸化脂質から分離されることが望ましい。従ってヒドロペルオキシド基の数及び二重結合の幾何異性によって分離する逆相カラムを使用することが有効と思われた。また検出器としてすべての物質を非選択的に検出するRI検出器を用いることにより従来、主に使用されているUV検出器では特性吸収を持たないために検出不可能であったオレイン酸エチルモノ(ヒドロペルオキシド)及び未酸化脂肪酸エチルがすべて良好に検出できることが判明した。その結果、オレイン酸エチルモノ(ヒドロペルオキシド)としては1ピークが得られ、リノール酸エチルモノ(ヒドロペルオキシド)としてはシス-トランス型及びトランス-トランス型と考えられる共役ジエン型の2ピークが検出された。またリノレン酸エチルについてはヒドロペルオキシドとして4ピークが認められ、前の2ピークが共役トリエン型を含むジ(ヒドロペルオキシド)、後の2ピークが共役ジエン型のモノ(ヒドロペルオキシド)であると考えられた。

また更にHPLCによるPOVの測定について検討した結果、オレイン酸エチル、リノール酸エチルのモノ(ヒドロペルオキシド)のピーク面積分率とPOVの間には同じ割合を持つ直線関係の成立することが判明した。しかしリノレン酸を含む試料においてはヒドロペルオキシドのピーク面積分率とPOVの間に直線関係は認められたものの、その割合はオレイン酸エチル、リノール酸エチルと比較して小さく、これはリノレン酸エチルヒドロペルオキシドの中にジ(ヒドロペルオキシド)が共存していることによると思われた。従ってジ(ヒドロペルオキシド)と考えられるピークについてそのピーク面積を2倍にしてヒドロペルオキシドのピーク面積分率とすることによってオレイン酸エチル、リノール酸エチルと同一の割合を持つ直線が得られた。また飽和酸を含む試料についてはGLCから求めた飽和酸含量による補正を行い、本実験で用いたすべての試料においてヒドロペルオキシドのピーク面積分率とPOVの間に同一の直線関係が成立し、試料のPOVを求めるための検量線として使用できることが判明した。HPLCによるPOVの測定結果は電位差滴定法による測定値と良く一致し、過酸化物の検出限界は約0.1 μ eqであった。それゆえ、HPLCを用いた本法は過酸化脂質の迅速かつ簡便な定量を可能にし、過酸化脂質の生体に対する種々の作用を解明する上で有効な方法であると考えられる。

(昭和59年6月7日受理)

文 献

- 1) 島崎弘幸, 油化学, **29**, 301 (1980)
 - 2) 金田尚志, 油化学, **31**, 712 (1982)
 - 3) H.W.S. Chan, F.A.A. Prescott, *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 141 (1975)
 - 4) H.W.S. Chan, F.A.A. Prescott, P.A.T. Swoboda, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**, 572 (1976)
 - 5) H.W.S. Chan, G. Levett, *Lipids*, **12**, 99 (1977)
 - 6) H.W.S. Chan, G. Levett, *Lipids*, **12**, 837 (1977)
 - 7) W.E. Neff, E.N. Frankel, C.R. Scholfield, D. Weisleder, *Lipids*, **13**, 415 (1978)
 - 8) K. Nakatsugawa, T. Kaneda, 油化学, **32**, 361 (1983)
 - 9) 日本油化学協会編, “基準油脂分析試験法” 2.4.12-71
 - 10) 原 節子, 鷺巢 治, 戸谷洋一郎, 油化学, **31**, 1004 (1982)
 - 11) J.D. Warthen, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 151 (1975)
 - 12) E.N. Frankel, C.O. Evans, H.A. Moser, D.G. McConnell, J.C. Cowans, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 130 (1961)
 - 13) 藤野安彦著 “脂質分析法入門” 学会出版センター, (1978) p. 173
 - 14) W.E. Neff, E.N. Frankel, D. Weisleden, *Lipids*, **16**, 439 (1981)
-