ノート

高速液体クロマトグラフィーによるサケ精巢の フラン酸の分析

板橋 豊・加藤 智子・太田 亨

北海道大学水産学部水産化学科 (〒041 函館市港町3丁目1-1)

Analysis of Furan Fatty Acids in Chum Salmon Testis by High Performance Liquid Chromatography

Yutaka ITABASHI, Tomoko KATO, and Toru OTA

Department of Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University

(3-1-1, Minato-cho, Hakodate-shi, 〒041)

The compositions of furan fatty acids (F acids) in chum salmon *Oncorhynchus keta* testis were easily determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography. For this determination fatty acid methyl esters from triacylglycerols of mature chum salmon testis, containing 14.1% F acid of all the fatty acids, were separated on a reversed-phase column (25 cm × 4.6 mm i. d., 5 μm particles), Supelcosil LC-18. Several μg methyl esters dissolved in acetonitrile were admitted to the column and eluted using acetonitrile. The effluents were monitored at 227 nm UV to detect F acids. Satisfactory separation of F₂, F₄, F₅, F₆ and F₈ acids was achieved within 20 min. F acid compositions (mol %) were as follows : F₆, 58.6, F₄ 20.1, F₅ 14.4, F₂ 5.2 and F₈ 1.7%. These values were in good agreement with those obtained by gas liquid chromatography.

1 緒 言

魚類の生殖巣や肝臓の脂質中にはフラン環を有する一連の特異な脂肪酸 (Fig.-1) が存在する¹⁾。これらフラン酸の生物学的機能は明らかではないが、生殖生理にかかわる何らかの役割や酸化防止剤としての役割を果たしている可能性が推測され、興味が持たれている^{2)~5)}。

従来、フラン酸の組成分析にはガスクロマトグラフィー (GLC) が使用されている¹⁾。キャピラリーカラムを用いると、フラン酸は互いに良好に分離され、他の非環状脂肪酸ともピーク成分は重ならないことから、フラン酸組成を精度良く求めることが可能である。しかしながら、フラン酸を含む魚油脂肪酸のクロマトグラムは複雑であり、フラン酸成分の同定には特別の注意が必要である。また、キャピラリーカラムを用いてフラン酸 (F₂~F₈) を他の脂肪酸から良好に分離するには長い分析時間を要するなどの問題点が挙げられる。

著者らは、フラン酸が 230 nm 付近に強い UV 吸収を示すことに着目し、魚類脂質中のフラン酸組成を高速

	m	n	R ₁	R ₂
F ₂	4	8	H	CH ₃
F ₄	2	10	CH ₃	CH ₃
F ₅	4	10	H	CH ₃
F ₆	4	10	CH ₃	CH ₃
F ₈	4	12	CH ₃	CH ₃

Fig.-1 Structures of main furan fatty acids in triacylglycerols of the chum salmon *Oncorhynchus keta* testis.

液体クロマトグラフィー (HPLC) で求める方法を検討した。その結果、サケ精巢の脂質に含まれるフラン酸を特異的に検出し、短時間でその組成を求める簡単な条件を見いだしたので報告する。

連絡者：板橋 豊

2 実 験

産卵期に宮城県の河川で捕獲されたサケ *Oncorhynchus keta* の精巢から、Bligh-Dyer 法⁶⁾に従って脂質を抽出した (脂質含量 2.8%)。フラン酸はリン脂質にはほとんど存在せず、トリアシルグリセリン (全脂質中 6.6%) に局在した。このフラン酸含有トリアシルグリセリンを 7% BF_3 -メタノール試薬を用いてメチルエステル化したのち、*n*-ヘキサン/ジエチルエーテル (80 : 20, vol/vol) を移動相とするシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) で精製して分析試料とした。また、サケ精巢の混合脂肪酸から AgNO_3 含浸 TLC により分離した構造既知のフラン酸メチルエステル混合物 ($\text{F}_2 \sim \text{F}_8$)⁴⁾を標準品として使用した。HPLC 分析には Supelcosil LC-18 カラム (長さ 25 cm, 内径 4.6 mm, 粒径 $5 \mu\text{m}$) を使用し、これを島津 LC-6 A 送液装置に取り付け、アセトニトリルを移動相に用いて 1 mL/min の流速で室温で分析した。アセトニトリルに溶解した約 $5 \mu\text{g}$ の脂肪酸メチルエステルをカラムに導入し、溶出したフラン酸成分を波長可変 UV 検出器 (島津 SPD-6 A) を使用して 227 nm でモニターした。メチルエステルの GLC 分析は、Silar 5 CP キャピラリーカラムを用いて前報⁷⁾に従って行った。

3 結果及び考察

フラン酸メチルエステル標品は 227 nm 付近に極大吸収を示した。254 nm の長波長では感度は約 1/6 に低下したが、HPLC 分析に十分な検出感度を有することが認められた。通常の非環状脂肪酸はこれらの波長領域では強い UV 吸収を示さないの、フラン酸を特異的に検出できる。Fig.-2 に、サケ精巢トリアシルグリセリンを構成する脂肪酸メチルエステルを逆相カラムを用いて分析し、溶出成分を 227 nm でモニターして得たクロマトグラムを示す。移動相にアセトニトリルのみを使用しているため、移動相組成の変動に基づく保持容量のばらつきがなく、室温で再現性のあるクロマトグラムが得られた。主なフラン酸 ($\text{F}_2 \sim \text{F}_8$) が特異的に検出され、20 min 以内に互いに良好に分離された。ピーク成分の同定は、標品との保持容量の比較及び HPLC で分取した各成分を GLC 分析して、その保持時間を既知データ⁷⁾と比較して行った。逆相 HPLC でのフラン酸の溶出順番は極性カラムを使用した GLC の場合と同様であった。すなわち、 F_2 が最初に溶出し、次いで F_4 , F_5 , F_6 , F_8 の順に分子量別に溶出した。GLC で得られたフラン酸の組成 (mol%) は、 F_6 が 60.2% と最も多く、次いで F_4 19.4%, F_5 13.5%, F_2 5.3%, F_8 1.6% であった。一方、HPLC (227 nm) で得られた組成は、 F_6 58.6%, F_4 20.1%, F_5 14.4%, F_2 5.2%, F_8 1.7%

Colum : Supelcosil LC-18 (25 cm $\times$ 4.6 mm i. d., $5 \mu\text{m}$ particles).
Mobile phase : acetonitrile (1 mL/min).
Column temperature : 25°C
Detection : 227 nm UV.

Fig.-2 HPLC chromatogram of the methyl esters derived from triacylglycerols of the chum salmon *Oncorhynchus keta* testis.

であり、GLC で得られた結果と良く一致し、HPLC での定量性も良好であることが認められた。HPLC で得られた組成の標準偏差 ($n=5$) は各成分について 0.3 以下であった。全脂肪酸中のフラン酸の総含量は GLC 分析により 14.1% と算出されたが、この値を HPLC で求めるには適当な内部標準の使用が必要であり、現在検討している。

最近、Guth と Grosch⁸⁾ は大豆油などの食用油から微量のフラン酸を検出し、その光酸化によって強い臭気成分の生成することを報告している。この研究では、試料油よりあらかじめ分離されたフラン酸混合物から各フラン酸を単離するために逆相 HPLC 法が使用され、溶出成分が低波長 UV (206 nm) 下で検出されている。Ishii ら⁹⁾は、フラン酸の自動酸化物を逆相 HPLC で分析し、234 nm で成分を検出している。また、Puchta ら¹⁰⁾はヒトとウシの血液からフラン酸を見だし、その濃縮分離に順相 HPLC を使用している。これらの研究では、HPLC はフラン酸研究の有効な手段として利用されているが、試料からフラン酸を特異的に検出し、その組成を明らかにするための分析方法としては使用されていない。

フラン酸は植物プランクトンからも最近見いだされて

おり¹¹⁾, 食物連鎖の観点からも興味をもたれる。本研究で検討した HPLC 法は, 操作が極めて簡単であることから, 動植物脂質中のフラン酸の分布, 組成, 代謝, 未知成分の検出等の研究に役立つと考えられる。

[平成6年(1994年)8月22日受理]

文 献

- 1) M. E. Stansby, H. Schlenk, E. H. Gruger, Jr., "Fish Oils in Nutrition", Van Nostrand Reinhold, New York (1990) p. 6
- 2) R. L. Glass, T. P. Krick, D. L. Olson, R. L. Thorson, *Lipids*, 12, 828 (1977)
- 3) G. Jacini, *Fette Seifen Anstrichm.*, 88, 290 (1986)
- 4) T. Ota, T. Takagi, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 1565 (1992)
- 5) Y. Okada, H. Okajima, H. Konishi, M. Terauchi, K. Ishii, I. Lui, H. Watanabe, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67, 858 (1990)
- 6) E. G. Bligh, W. J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911 (1959)
- 7) T. Ota, T. Takagi, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 721 (1992)
- 8) H. Guth, W. Grosch, *Fat Sci. Technol.*, 93, 249 (1991)
- 9) K. Ishii, H. Okajima, T. Koyamatsu, Y. Okada, H. Watanabe, *Lipids*, 23, 694 (1988)
- 10) V. Puchta, G. Spiteller, H. Weidinger, *Liebigs Ann. Chem.*, 25, (1988)
- 11) A. Batna, J. Scheinkoning, G. Spiteller, *Biochim. Biophys. Acta*, 1166, 171 (1993)