報 文

キャピラリーガスクロマトグラフィーによる 精製魚油中の IPA 及び DHA の定量 —合同実験及び標準化—

梶島 俊樹^{*1}・青木 滋^{*2}・西本ゆかり^{*3}
長谷川栄治^{*4}・森好 栄子^{*5}・永山 裕美^{*6}

- *1 日本油脂株式会社王子工場食品研究所 (〒114 東京都北区豊島 4-18-11)
- *2 日本水産株式会社中央研究所 (〒192 東京都八王子市北野町 559-6)
- *3 日本合成化学工業株式会社中央研究所 (〒567 大阪府茨木市室山 2-13-1)
- *4 日本化学飼料株式会社中央研究所 (〒040 北海道函館市浅野町 3-6)
- *5 池田糖化工業株式会社研究室 (〒721 広島県福山市箕沖町 95-7)
- *6 マルハ株式会社中央研究所 (〒300-42 茨城県つくば市和台 16-2)

Quantitative Determination of IPA and DHA in the Refined Fish Oil by Capillary Gas Chromatography —Collaborative Study and Standardization—

Toshiki KAJISHIMA^{*1}, Shigeru AOKI^{*2}, Yukari NISHIMOTO^{*3}
Eiji HASEGAWA^{*4}, Eiko MORIYOSHI^{*5}, and Hiromi NAGAYAMA^{*6}

- *1 Food Research Laboratory, Oji Plant, NOF CORPORATION
(4-18-11, Toshima, Kita-ku, Tokyo, 〒114)
- *2 Central Research Laboratory, Nippon Suisan Kaisha, LTD
(559-6, Kitano-cho, Hattouji-shi, Tokyo, 〒192)
- *3 Central Research Laboratory, The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., LTD
(2-13-1, Muroyama, Ibaraki-shi, Osaka, 〒567)
- *4 Central Research Laboratory, Nippon Kagaku Siryou Co., LTD
(3-6, Asano-cho, Hakodate-shi, Hokkaido, 〒040)
- *5 Research Laboratory, Ikeda Tohka Industries Co., LTD
(95-7, Minooki-cho, Fukuyama-shi, Hiroshima-ken, 〒721)
- *6 Central Research Institute, Maruha Corporation
(16-2, Wadai, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 〒300-42)

Abstract : The authors developed a method for the quantitative determination of icosapentaenoic acid (IPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in refined fish oil containing polyunsaturated fatty acids based on data obtained from a laboratory collaborative study. Three kinds of oils were (a) refined fish oil (labels specifying IPA content was 18%), (b) refined fish oil (labels specifying IPA content was 28%) and (c) mixture of (a) and (b) [50 : 50 (wt/wt)]. Methylation of triacylglyceride was carried out in a methanol solution of 2M potassium hydroxide. The tri-cosanoic acid methyl ester served as the internal standard for determining polyunsaturated fatty acid methyl esters by capillary gas chromatography.

All data were analyzed statistically for determination of intra- and inter-laboratory variation. IPA and DHA values were consistent with intra- and inter-laboratory coefficients of variation.

tion less than 3%. The present method is thus shown suitable for determining IPA and DHA in refined fish oil containing polyunsaturated fatty acids in excess.

Key words : icosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, fish oil esterification method, capillary GC analysis

1 緒 言

Dyerberg らによるグリーンランドに住むイヌイットの疫学調査の報告¹⁾から、抗血栓作用、抗動脈硬化抑制作用に注目を発したイコサペンタエン酸 (IPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) は、現在では、学習機能向上作用、抗アレルギー作用等の効果²⁾等が認知されつつある。

従来、IPA 及び DHA は、魚油を原料としたものが大部分³⁾であり、特殊な場合を除いては魚油として摂取されてきた。その製品の形態は、魚油臭が強く、酸化安定性が悪いためカプセルの形状で健康食品関連分野で主に使用されてきていた。しかし最近の技術の発展から、一般食品に魚油を添加できるまでに至っている。これらの製品の開発に伴い、品質評価の面でも、従来の油分、脂肪酸組成の表示³⁾から対製品単位重量中の IPA 及び DHA の含有量の表示が求められてきている。そこで今回、定量法の確立及びその標準化を目的として 6 機関による検討を行った。

現在、基準油脂分析試験法⁴⁾では、油脂中の脂肪酸含量測定法について定められていない。また魚油は、それを構成する脂肪酸の多さによるピークの重複、及び構成脂肪酸である高度不飽和脂肪酸の熱安定性が悪いことから、脂肪酸組成測定法において従来の GC 法による脂肪酸メチルエステルの定量法の適用範囲外となっている。

そこで本検討においては、精製魚油 (トリアシルグリセリン) 中の IPA 及び DHA 含量測定法^{5), 6)}として内部標準法を採用し、脂肪酸メチルエステルの調製には操作が簡便でまた加熱を必要としない水酸化カリウム-メタノール法⁷⁾を、また GC 分析についてはカラム分離能に優れたキャピラリー GC 法⁸⁾を用いた。本方法により精製魚油中の IPA 及び DHA を定量し、機関内及び機関間のばらつきの程度を検討した。

今回、機関内及び機関間の定量値の再現性において、満足のいく結果が得られたので、その結果を報告する。

2 実 験

2.1 分析機関

合同実験に参加した機関は、次の 6 機関である。池田糖化工業株式会社研究室、日本化学飼料株式会社中央研究所、日本合成化学工業株式会社中央研究所、日本水産株式会社中央研究所、日本油脂株式会社王子工場食品研究所、マルハ株式会社中央研究所。

2.2 装置と試料油

測定に使用した各機関の GC 装置及び、インテグレーターを Table-1 に示した。

試料油は、内容表示に IPA 18% 及び 28% とある精製魚油と、それらを等量混合したものの 3 種類を使用した。試料油の性状を、Table-2 に示した。

2.3 試 薬

n-ヘプタン、メタノール及び水酸化カリウムは、特級グレードを使用した。2M 水酸化カリウム-メタノール溶液は、水は加えずに調製した。

内部標準物質は、トリコサン酸メチルエステル (GC 99% グレード, SIGMA 社製) を使用した。また、補正係数測定に使用した IPA メチルエステル及び DHA メチルエステルは、いずれも GC 99% グレード (SIGMA 社製) であった。

2.4 GC カラム⁶⁾

カラムは、ポリグリコール系キャピラリーカラム

Table 1 GC Instrumentation Used by Collaborative Study Participants.

Laboratory	GC	Integrator
A	HP*5890 series II	Shimadzu C-R 6 A
B	HP 5890 A	HP 3396 A
C	HP 5890	Shimadzu C-R 4 A
D	HP 5890 series II	HP 3396 series II
E	HP 5890 A	HP 3396 A
F	HP 5890 series II	HP Vectra QS/20
	Shimadzu GC-14 A	Shimadzu C-R 4 AX

HP : HEWLETT PACKARD

Table 2 The Characteristics Data of the Refined Fish Oils Used by Collaborative Study Participants.

Characteristics	Sample 1*1	Sample 2*2	Sample 3*3
Peroxide value (meq/kg)	0	2.9	2.2
Acid value	0.1	0.1	0.1
Iodine value	198.9	247.1	220.7
Unsaponifiable matter (%)	1.23	0.81	1.04

*1 fish oil (IPA 18%)

*2 fish oil (IPA 28%)

*3 fish oil blended IPA 18% and IPA 28% [50 : 50 (wt/wt)]

DB-WAX (内径 0.25 mm×30 m, 膜厚 0.25 μ m, J & W 社製) を使用した。

エージング条件は、特に定めなかった。

2・5 GC の実験条件

今回の合同実験では、Table-3 に示した統一条件で GC 分析を行った。

2・6 脂肪酸メチルエステルの調製法⁶⁾

試料油 50 mg 及びトリコサン酸メチルエステル 10 mg を 10 mL 容共栓付試験管に精ひょうし、*n*-ヘプタン 5 mL で溶解した。溶解後、2 M 水酸化カリウム-メタノール溶液 0.25 mL を加え、激しく 20 s 振とうした。室温で 5 min 静置した後、上層を採取し直ちに GC に導入した。

Table 3 Capillary GC Condition Used by Collaborative Study Participants.

GC column	DB-WAX (ϕ 0.25 mm×30 m, coating 0.25 μ m)
Column temp.	170~210°C (30 min)
Program	1.5°C/min
Inj. port temp.	250°C
Detector temp.	250°C
Carrier gas flow rate	1 mL/min
Carrier gas	He
Detector	FID
Split ratio	100 : 1

なお本方法でトリアシルグリセリンから脂肪酸メチルエステルを調製した場合、TLC 分析において脂肪酸メチルエステル以外のスポットは確認されなかった。また本方法により定量された IPA 及び DHA の定量結果は、Ackman らにより報告された方法^{8),9)}による定量結果と比較して、IPA について約 15%, DHA について約 5% それぞれ高い定量値を得たことが著者らにより報告されている⁶⁾。

3 結果及び考察

3・1 GC クロマトグラム

Sample 1 のクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

IPA, DHA 及びトリコサン酸について、他のピークとの重複は確認されなかった。またピーク形状が、充填カラムと比べシャープであった。GC 分析時間は、55 min を要した (DHA 検出時間は、約 50 min であった)。

3・2 補正係数

補正係数の測定用試料である IPA, DHA 及びトリコサン酸のメチルエステルの純度を GC 分析によりあらかじめ確認した。それぞれ等量になるように試料を調製し、Table 3 に示した GC 条件で補正係数を測定した。なお、算出式は下記のとおりである。

$$CF_x = \frac{(W_R)(A_{Is})(P_R)}{(W_{Is})(A_R)(P_{Is})}$$

ただし、

CF_x : Correction factor for IPA or DHA

W_{Is} : Weight of internal standard [TCA-Me*¹]

Fig. 1 Gas Chromatogram of Fatty Acid Methyl Esters in the Refined Fish Oil (Sample 1) Used by DB-WAX.

Table 4 Correction Coefficient by Consequence Measurement .

Acid	Lab. Ana. value	A	B	C	D	E	F	Average
IPA	M.V	1.21*	1.03	0.97	1.00	1.02	1.03	1.01
	S.D.	0.06	0.01	0.02	0.00	0.01	0.03	0.03
	C.V. (%)	4.96	0.97	2.06	0.00	0.98	2.91	2.97
DHA	M.V	1.07	1.06	1.07	1.05	1.05	1.07	1.06
	S.D.	0.02	0.01	0.03	0.00	0.00	0.03	0.01
	C.V. (%)	1.87	0.94	2.80	0.00	0.00	2.80	0.94

* Outlier value, determined by Dixon tests ($\alpha=0.05$), not used in statistical calculations.

Ana. value : Analysis value M.V : Mean value S.D. : Standard deviation

C.V. : Coefficient of variation

Table 5 IPA and DHA Content in the Refined Fish Oil.

Sample	Acid	Lab. Ana. value	A	B	C	D	E	F	Average
1	IPA	M.V(mg/g)	159.78*	170.32	172.66	173.97	173.68	172.58	172.64
		S.D.	2.35	2.78	5.00	1.41	3.18	2.92	1.44
		C.V. (%)	1.47	1.63	2.90	0.81	1.83	1.69	0.83
	DHA	M.V (mg/g)	114.59	117.35	114.96	116.40	116.70	116.55	116.09
		S.D.	0.63	3.06	0.99	1.84	2.61	1.12	1.08
		C.V. (%)	0.55	2.61	0.86	1.58	2.24	0.95	0.93
2	IPA	M.V (mg/g)	265.33	273.21	291.40*	267.75	274.28	267.84	269.68
		S.D.	1.81	4.54	1.68	4.38	2.71	6.38	3.86
		C.V. (%)	0.68	1.66	0.58	1.64	0.99	2.38	1.43
	DHA	M.V (mg/g)	119.57	116.86	118.30	114.10	115.76	110.34	115.82
		S.D.	0.81	2.25	1.66	0.66	0.51	2.42	3.30
		C.V. (%)	0.68	1.92	1.40	0.58	0.45	2.19	2.85
3	IPA	M.V (mg/g)	218.06	217.89	229.85	230.13	219.82	224.14	223.32
		S.D.	5.27	3.88	6.71	2.71	3.70	6.44	5.64
		C.V. (%)	2.42	1.78	2.92	1.18	1.68	2.87	2.53
	DHA	M.V (mg/g)	120.73	115.14	116.14	117.39	115.39	112.99	116.30
		S.D.	1.70	0.84	1.46	0.90	0.66	2.55	2.61
		C.V. (%)	1.40	0.73	1.25	0.75	0.58	2.26	2.24

* Outlier value, determined by Dixon tests ($\alpha=0.05$), not used in statistical calculation.

Ana. value : Analysis value M.V : Mean value S.D. : Standard deviation C.V. : Coefficient of variation

W_R : Weight of standard of IPA or DHA methyl ester

A_{Is} : Area counts for internal standard [TCA*2]

A_R : Area counts for IPA for DHA

P_{Is} : Purity of internal standard [TCA-Me]

P_R : Purity of standard of IPA or DHA methyl ester

*1 TCA-Me: Tricosanoic acid methyl ester

*2 TCA: Tricosanoic acid

この操作に従い3~7回、各機関において補正係数の測定を行ったので、その結果をTable 4に示した。なお、測定は連続的に行った。

Table 4に示した各機関のトリコサン酸メチルエステルに対するIPAメチルエステル及びDHAメチルエステルの補正係数は、IPAが1.01(変動係数2.97)、DHAが1.06(変動係数0.94)であった。そこで今回の合同実験では、各機関共通に補正係数としてIPAは1.01、DHAは1.06を用い精製魚油単位重量中のIPA及びDHA含量を測定した。

3.3 精製魚油中のIPA, DHA含有量の測定

各機関において、3種類の試料について各5回の測定を行った。試料中のIPA及びDHA含量は、下記に示した算出式によってもとめた。

$$\text{IPA or DHA (mg/g)} = \frac{(A_x)(W_{Is})(CF_x)(P_{Is})}{(A_{Is})(W_x)(1.04)^*} \times 1000$$

ただし、

A_x : Area counts of IPA or DHA

A_{Is} : Area counts of internal standard [TCA]**

CF_x : Correction factor for IPA or DHA

P_{Is} : Purity of internal standard [TCA-Me]***

W_{Is} : Weight of internal standard [TCA-Me] added to the sample (mg)

W_x : Sample weight (mg)

* (1.04) : TCA-Me/TCA

** TCA : Tricosanoic acid

*** TCA-Me: Tricosanoic acid methyl ester

各機関の試料油中のIPA及びDHA含量の測定結果をTable 5に示した。

すべての試料油において、各機関内でのIPA及びDHAの定量値のばらつきは、変動係数3%以内であり、有意な差は認められなかった。また、機関間の定量値の測定結果は、平均でSample 1がIPA 172.64 mg/g(変動係数0.83)、DHA 116.09 mg/g(変動係数0.93)、Sample 2がIPA 269.68 mg/g(変動係数1.43)、DHA

115.82 mg/g(変動係数2.85)、Sample 3がIPA 223.32 mg/g(変動係数2.53)、DHA 116.30 mg/g(変動係数2.24)であり、機関間での定量値のばらつきは、IPA及びDHAともに有意な差は認められなかった。

4 総 括

今回の合同実験では、精製魚油(トリアシルグリセリン)中のIPA及びDHA含量測定法について検討を行った。

精製魚油からの脂肪酸メチルエステルの調製には、水酸化カリウム-メタノール法を用いた。本メチルエステル化法は、熱に不安定である高度不飽和脂肪酸を加熱せずに短時間にメチルエステル化することができ、また抽出操作を必要としないことから、定量値にばらつきが小さく、IPA及びDHA含量を測定するのに有効であった。なお水酸化カリウム-メタノール法では、遊離脂肪酸のメチルエステル化は不可能である⁶⁾が、現在流通しているIPA及びDHAを含有している健康食品、加工食品は、酸価の低い精製魚油が使用されていることが多いため、測定には問題ないものと考えられる。

また、魚油中の多種の構成脂肪酸を分離するには、分離能の高いキャピラリーGC法が適していた。

本方法により分析した精製魚油中のIPA及びDHA含量の測定値は、機関内及び機関間でいずれも変動係数3%以内であり、分析誤差の小さい方法であることが確認された。

謝 辞

本実験に際し、終始ご協力いただきました特定保健用食品多価不飽和脂肪酸部会(EPA分科会)に深謝いたします。

(受付: 1995年5月8日; 受理 1995年11月15日)

文 献

- 1) J. Dyerberg, H.O. Bang, N. HJøne, *Am. J. Clin. Nut.*, 28, 958 (1975).
- 2) 矢沢一良, 脂質栄養学, 3, 45 (1994).
- 3) 日比野美彦, 牧野孝夫, 前野 達, 小沢昭夫, 油化学, 34, 371 (1985).
- 4) 日本油化学協会編, 基準油脂分析試験法 2. 4. 20. 2-91 (1991).
- 5) 川添俊樹, 加藤博史, 端本謙一, 和田 俊, 第33回油化学討論会・油化学研究発表会講演要旨集, 210 (1994).
- 6) 梶島俊樹, 加藤博史, 端本謙一, 和田 俊, (現在油化学投稿中).
- 7) *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives* 2. 301-5 (Sixth Edition).
- 8) Joseph & Ackman., *Journal of AOAC International*, 75, 488 (1992).
- 9) American Oil Chemistry Society Ce 1 b-89, 75, 3 (1992).

日本油化学会誌本号掲載 論文要旨

[総説] シクロデキストリンおよびイオン性ミセルを用いるキャピラリー電気泳動による光学分割

田 中 稔

大阪大学保全科学研究センター (〒565 吹田市山田丘2-4)

本総説では、キャピラリー電気泳動を用いる光学分割について概説する。とくに、キャピラリーゾーン電気泳動とミセル動電クロマトグラフィーの簡単な原理と光学分割への応用について紹介する。泳動電解質溶液中に未修飾および化学修飾シクロデキストリンをキラルセクターとして添加し、イオン性エナンチオマーを分離するキャピラリーゾーン電気泳動について述べる。この方法のキラル分離は、エナンチオマーの包接錯体形成能の差に基づいている。化学修飾したシクロデキストリンの置換基の位置と置換度、および電解質溶液への添加剤の光学分割に及ぼす影響を述べる。キラルミセル相へのエナンチオマーの分配の差に基づいてキラル分離が達成される、キラルな界面活性剤を用いるミセル動電クロマトグラフィーについて述べる。多用されているイオン性界面活性剤である硫酸ドデシルナトリウムのミセルとシクロデキストリンを一緒に用いる方法についても簡単に紹介する。

(連絡者: 田中 稔) Vol. 45, No. 4, 319 (1996).

[報文] *Sulfolobus acidocaldarius* N-8 に於ける 微量イノシトールリン脂質の構造解析

須 貝 昭 彦 *1 ・ 宇 田 郁 子 *1 ・ 近 一 夫 *2 ・
安 藤 進 *2 ・ 伊 藤 佑 子 *3 ・ 伊 藤 俊 洋 *1

*1 北里大学・一般教育総合センター (〒228 神奈川県相模原市北里1-15-1)

*2 東京都老人総合研究所・生体膜部門 (〒173 東京都板橋区栄町35-2)

*3 創価大学・工学部・生物工学科 (〒192 東京都八王子市丹木町1-236)

Sulfolobus acidocaldarius N-8 の微量脂質成分であるジエーテル型脂質とトリアルキルタイプのテトラエーテル型脂質の構造について調べ、ジエーテル型脂質のPL-X, トリアルキル型脂質のPL-YとPL-Zの3種類のリン脂質の構造を明らかにした。PL-Xの構造は、ホスファチジルイノシトールの類似体で、PL-YとPL-Zの両者もイノシトールリン脂質であり、前者は脂質骨格の片側のグリセリンにイノシトールリン酸が結合したもので、後者は脂質骨格の両側のグリセリンにイノシトールリン酸が各々リン酸エステル結合したものであることがわかった。また、2分子のPL-XからPL-Zが生成し、PL-Yからテトラエーテル型脂質が生成される経路の存在が推測された。*Sulfolobus acidocaldarius* N-8 に於けるPL-Xの含有量は全脂質の約5%であるが、PL-YとPL-Zは1%以下であった。

(連絡者: 須貝昭彦) Vol. 45, No. 4, 327 (1996).

[報文] キャピラリーガスクロマトグラフィーによる 精製魚油中のIPA及びDHAの定量 - 合同実験及び標準化 -

梶 島 俊 樹 *1 ・ 青 木 滋 *2 ・ 西 本 ゆかり *3 ・
長谷川 栄 治 *4 ・ 森 好 栄 子 *5 ・ 永 山 裕 美 *6

*1 日本油脂株式会社 王子工場食品研究所 (〒114 東京都北区豊島4-18-11)

*2 日本水産株式会社 中央研究所 (〒192 東京都八王子市北野町559-6)

*3 日本合成化学工業株式会社 中央研究所 (〒567 大阪府茨木市室山2-13-1)

*4 日本化学飼料株式会社 中央研究所 (〒040 北海道函館市浅野町3-6)

*5 池田糖化工業株式会社 研究室

(〒721 広島県福山市箕冲町95-7)

*6 マルハ株式会社 中央研究所

(〒300-42 茨城県つくば市和台16-2)

高度不飽和脂肪酸を含有する精製魚油中のイコサペンタエン酸(IPA)とドコサヘキサエン酸(DHA)定量法について6機関による合同実験を行った。試料は、IPA18%, 28%表示のある精製魚油2種類とこれらを等量混合したものを使用した。脂肪酸メチルエステルは、2N水酸化カリウム-メタノール溶液を使用し誘導体化した。内部標準物質としてトリコサン酸メチルエステルを用い、キャピラリーガスクロマトグラフィーによって、これら高度不飽和脂肪酸を定量した。

実験データは、機関内及び機関間で検討し、統計的に分析した。この方法によるIPA及びDHA定量結果の全ては、機関内、機関間で変動係数3%以内であり、満足できるものであり、この方法は、高度不飽和脂肪酸を高含有する精製魚油中のIPA及びDHAを定量する適切な方法であることがわかった。

(連絡者: 梶島俊樹) Vol. 45, No. 4, 335 (1996).

[報文] *Bacillus* sp. 由来のホスホリパーゼCによる ホスファチジルコリンの加水分解の最適条件

鎌田 正純・原 節子・戸谷 洋一郎

成蹊大学工学部 (〒180 東京都武蔵野市吉祥寺北町3-3-1)

本実験では、まだ特性が明らかにされていない*Bacillus* sp. 由来のホスホリパーゼCを用いて、ホスファチジルコリン(PC)を1,2-ジアシルグリセリンに完全に加水分解するための最適反応条件を検討した。加水分解率は水系の反応よりも溶媒を用いた2層系の反応の方が高くなった。PCの加水分解はpH7.0のリン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液とジエチルエーテル存在下に促進された。ホスホリパーゼCによるPC-90の加水分解最適条件はPC-90:50mg, ジエチルエーテル:1mL, リン酸二水素カリウム-リン酸水素ナトリウム緩衝液(pH7.0):6mL, ホスホリパーゼCを0.02Uと決定した。この最適反応条件のもとでPCは80min. で完全に加水分解された。

(連絡者: 鎌田正純) Vol. 45, No. 4, 341 (1996).

[ノート] α -グルコシダーゼ反応に対するスルホ キノボシルモノアシルグリセリンの阻害

栗原 秀幸*1・安藤 淳一*1・川端 潤*2・羽田野 六男*1

*1 北海道大学 水産学部 (〒041 函館市港町3-1-1)

*2 北海道大学 農学部 (〒060 札幌市北区北9条西9丁目)

市販ヒジキから酵母 α -グルコシダーゼに対して阻害性を示す少量成分を精製した。各種機器分析の結果から阻害物質の構造をスルホキノボシルモノアシルグリセリン(SQMG)と同定した。SQMGは既知阻害物質であるスルホキノボシルジアシルグリセリン(SQDG)のリゾ体である。阻害率を比較したところ、SQMGはSQDGより強い阻害性を示した。

(連絡者: 栗原秀幸) Vol. 45, No. 4, 347 (1996).

[ノート] キャピラリーガスクロマトグラフィーによる 精製魚油中のIPA及びDHAの定量 - 基礎的検討 -

梶島 俊樹*1・加藤 博史*1・端本 謙一*1・和田 俊*2

*1 日本油脂株式会社 王子工場食品研究所 (〒114 東京都北区豊島4-18-11)