エイコサペンタエン酸のメチルエステル及び トリグリセリドの自動酸化で生成する モノヒドロペルオキシド位置異性体

河津 智絵・遠藤 泰志・藤本健四郎

東北大学農学部応用生物化学科 (〒981-8555 仙台市青葉区堤通兩宮町 1-1)

Positional Isomers of Monohydroperoxides Produced during the Autoxidation of Methyl Ester and Triglycerides of Eicosapentaenoic Acid

Tomoe KAWATSU, Yasushi ENDO, and Kenshiro FUJIMOTO

Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University
(1-1, Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai-shi 981-8555)

Abstract : The methyl ester of eicosapentaenoic acid (EPA) and three triglycerides containing EPA (EEE, trieicosapentaenoylglycerol ; EEP, 1,2(or 2,3)-dieicosapentaenoyl-3(or 1)-palmitoylglycerol ; EPP, 1,2 (or 2,3)-dipalmitoyl-3 (or 1)-eicosapentaenoylglycerol) were autoxidized and their monohydroperoxide (MHP) isomers were analyzed by normal phase high-performance liquid chromatography (HPLC). Eight MHP isomers (18-,15-,14-,12-,11-,9-,8-,5-position) were found in the autoxidized methyl ester of EPA and the major component was 18-MHP. Although eight MHP isomers were detected during the autoxidation of EEE, EEP and EPP, 5-MHP was produced in only slight amount. The lipid structure is thus shown to be a determining factor of the composition of the MHP isomers of EPA.

Key words : autoxidation, eicosapentaenoic acid, HPLC, hydroperoxide, triglyceride

1 緒 言

高度不飽和脂肪酸の一つである(エ)イコサペンタエン酸 (EPA ; 20:5) は、特異的な生理活性を有することから既にエチルエステルの形で医薬品に利用されている。機能的食品への応用も期待されるが、極めて酸化されやすくオフフレーバーを生じやすいことが問題となっている。筆者らのグループ^{1)~3)}は、先に構造の明らかなEPA含有トリグリセリド(TG)を合成した後、自動酸化における酸化速度を測定した結果、TGの種類によって酸化速度が異なることを見いだした。また酸化物を分析した結果、主成分がモノヒドロペルオキシド(MHP)であることを認めた。これより、第一次酸化生成物であるモノヒドロペルオキシドの組成もトリグリセリドの種類によって異なることが示唆された。そこで本研究では、各種EPA含有TGの自動酸化により生ずるMHP位置異性体組成を分析して、酸化反応機構に及ぼす脂質構造の影響を明らかにすることを目的とした。

連絡者：河津智絵

2 実 験

2・1 試 料

EPAメチルエステルは日本水産(株)から提供を受けたEPAエチルエステル(純度95%以上)をナトリウムメチラート法でエステル交換して得た。

EPA含有TGとしては以下の3種類を前報¹⁾に従って合成した。

EEE : trieicosapentaenoylglycerol

EEP : 1,2 (or 2,3)-dieicosapentaenoyl-3 (or 1)-palmitoylglycerol

EPP : 1,2 (or 2,3)-dipalmitoyl-3 (or 1)-eicosapentaenoylglycerol

2・2 EPA含有脂質の自動酸化試験

試料はケイ酸カラムに通して過酸化物質等の不純物を除いてから、酸化試験に供した。

10 mL容のビーカーにそれぞれ、EPAメチルエステル、またはTGを1g採取した後、これを遮光下、25℃のインキュベーター中で自動酸化を行った。経時的に過

酸化物価を測定し、自動酸化の初期段階として過酸化物価が数十、中期段階として数百、終期段階として千以上でサンプリングを行い、EPA 含有脂質を水素化ホウ素ナトリウムで還元して、MHP 還元型誘導体を調製した。更に、TG の場合はこれをナトリウムメチラート法でメチル化を行った。これら還元物から未酸化 EPA メチルエステルをケイ酸カラムで取り除いた後、HPLC 分析に供した。

2.3 HPLC によるモノヒドロペルオキシド位置異性体分析

EPA の MHP 位置異性体の HPLC 分析は VanRollins と Murphy⁴⁾の方法を改良して行った。HPLC 分析の条件は以下に示す通りである。なお、検出された各ピークは分取後、水素添加、トリメチルシリル化した後 GC-MS 分析に供し、フラグメントの開裂パターンから同定した。

カラム : Shodex silicapak E-411 (4.6 mm×150 mm)

移動相 : n-ヘキサン/イソプロピルアルコール (997 : 3, v/v)

流速 : 0.8 mL/min

検出 : UV 235 nm

カラム温度 : 35°C

3 結果および考察

3.1 EPA メチルエステルのモノヒドロペルオキシド位置異性体

過酸化物価が千以上の EPA メチルエステルの MHP 還元型誘導体の HPLC 分析により得られたクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

8 種類の位置異性体が検出され、GC-MS 分析に基づいて溶出順に、15-, 12-, 14-, 11-, 18-, 8-, 9-, 5-MHP と同定した。山内ら⁵⁾は、GC-MS により EPA メチルエステルの自動酸化物中に MHP として 8 種類の位置異性体の存在を認めているが、我々の結果もそれを追認した。

この結果を基に、過酸化物価の異なる EPA メチルエステルの MHP 異性体組成を分析した。その結果を Fig. 2 に示す。

どの酸化段階でも 18-MHP が 19%~33% と主成分であり、酸化が進むにつれて組成比も増える傾向にあった。一方、15-MHP は酸化が進むにつれて減少する傾向

Fig. 1 HPLC chromatogram of monohydroperoxide isomers produced during autoxidation of EPA methyl ester.

Fig. 2 The composition of monohydroperoxide isomers produced during autoxidation of EPA methyl ester.

Fig. 3 HPLC chromatogram of monohydroperoxide isomers produced during autoxidation of EEE.

があった。他の異性体については酸化段階による組成比の差は見られなかった。

3・2 EPA 含有トリグリセリドのモノヒドロペルオキシド位置異性体

TG の自動酸化で生じた MHP の還元型誘導体の HPLC クロマトグラムの代表として、過酸化価が千以上の EEE の場合を Fig. 3 に示す。EEE だけでなく、3 種類全ての EPA 含有 TG でも EPA メチルエステルと同様、8 種類の MHP 異性体が検出された。

次に過酸化価の異なる EEE, EEP, EPP の MHP 異性体組成を分析した。その結果を Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6 に示す。EPA 含有 TG では EPA メチルエステルと同様、18-MHP が主成分 (27%~56%) であり酸化が進行するにつれて増加する傾向にあった。一方、5-MHP は 1.5% 以下とほとんど生成されない結果となり、EPA メチルエステルの場合と著しく異なった。しかし、TG 構造の違いによる組成比の違いは見られなかった。

EPA メチルエステル及び TG とも自動酸化によって生じた MHP の主成分は 18-MHP であった。これは EPA の 16 位の水素が引き抜かれる際に 18 位と 14 位にラジカルを持つ脂質ペルオキシラジカルが生成し、18 位は 18-MHP として安定していると考えられるが、14 位では、14-MHP が生成すると同時に分子内で環化が進み、モノヒドロペルオキシエピジオキソド等の酸化二次生成物が生成すると思われる。実際に先の報告¹⁾で、著者らは自動酸化 EPA 含有トリグリセリド中にモノヒドロペルオキシエピジオキソドの存在を認めている。今回は MHP しか検出していないので、18-MHP の組成比が高い結果になったと思われる。

又、TG において 5-MHP が生成されにくい原因としては、今回実験に使用した以外の EPA 含有 TG (EAcAc, 1,2(or 2,3)-diacetyl-3(or 1)-eicosapentaenoylglycerol) でも、自動酸化において 5-MHP が生成しにくかったことから、5-MHP の生成に対してグリセロール構造が立体障害を引き起こしたのではないかと考えられた。

以上のように、EPA のメチルエステルと TG の自動酸化で生じる MHP の位置

Fig. 4 The composition of monohydroperoxide isomers produced during autoxidation of EEE.

Fig. 5 The composition of monohydroperoxide isomers produced during autoxidation of EEP.

Fig. 6 The composition of monohydroperoxide isomers produced during autoxidation of EPP.

異性体の組成が異なることから、脂質構造が MHP の生成に影響を与えることが明らかとなった。

(受付:1998 年 3 月 16 日, 受理: 1998 年 4 月 30 日)

文 献

- 1) Y. Endo, S. Hoshizaki, K. Fujimoto, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 543 (1997).
 - 2) Y. Endo, S. Hoshizaki, K. Fujimoto, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1036 (1997).
 - 3) Y. Endo, S. Hoshizaki, K. Fujimoto, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 1041 (1997).
 - 4) M. VanRollins, R.C. Murphy, *J. Lipid. Res.*, **25**, 507 (1984).
 - 5) R. Yamauchi, T. Yamada, K. Kato, Y. Ueno, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2897 (1983).
-

[ノート] エイコサペンタエン酸のメチルエステル及び トリグリセリドの自動酸化で生成する モノヒドロペルオキシド位置異性体

河津 智絵・遠藤 泰志・藤本健四郎

東北大学農学部応用生物化学科 (〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1)

エイコサペンタエン酸 (EPA) メチルエステルと 3 種類の EPA 含有トリグリセリド (EEE, triecosapentaenoylglycerol ; EEP, 1,2(or 2,3)-dieicosapentaenoyl-3 (or 1)-palmitoylglycerol ; EPP, 1,2 (or 2,3)-di-palmitoyl-3 (or 1)-eicosapentaenoylglycerol) を自動酸化し, それらのモノヒドロペルオキシド (MHP) 異性体を順相系高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。EPA メチルエステルの自動酸化において, 8 種類の MHP 異性体 (18-, 15-, 14-, 12-, 11-, 9-, 8-, 5-,) が検出され, 主成分は 18-MHP であった。EEE, EEP, EPP の自動酸化においても同様に 8 種類の MHP 異性体の存在が確認できたが, 5-MHP は生成されにくい傾向にあった。これらの結果から, 脂質の構造が EPA の MHP 異性体組成に影響を与えていることが明らかとなった。

(連絡者: 河津 智絵) Vol. 47, No. 7, 709 (1998)

[速報] 補酵素 PQQ によるオクチルアミンの酸化的 脱アミノ化反応におよぼすレシチンの影響

菊田 博茂・名窪 芳晃・中川 正俊・大城 芳樹

近畿大学理工学総合研究所 (〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1)

補酵素 PQQ による好気性条件下でのオクチルアミンの酸化的脱アミノ化反応において, レシチンは CTAB ミセルに比べてより効率的な反応場を形成することを明らかにした。レシチンによって形成される二分子膜では, CTAB ミセルの場合のようなミセルの疎水場内部への基質の取り込みが避けられたためと推察される。

(連絡者: 菊田 博茂) Vol. 47, No. 7, 713 (1998)