短 報

改良 HPLC 法による抽出魚油中の
EPA および DHA の定量

中島 滋, 松下 至, 土屋隆英

Determination of EPA and DHA Content in
Extracted Fish Oil by Modified HPLCShigeru Nakajima,* Itaru Matsushita,*
and Takahide Tsuchiya*³

(1992 年 10 月 15 日受付)

魚油中のエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) の定量法としては、ガスクロマトグラフィー (GC) 法^{1,2)}が常法であるが、定量だけでなく調製にも有効なものとして高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法^{3,4)}がある。蛍光試薬を用いた HPLC 法⁵⁾は、GC 法と比べ高感度で脂肪酸を定量できるので、EPA や DHA の定量にも適している。しかしこの方法は、血液中遊離脂肪酸等の定量にのみ用いられており、加水分解して生じた魚油中の脂肪酸の定量には、蛍光試薬と脂肪酸試料との反応性が低いために使われていない。その原因としてヘキサン等の溶媒が影響していることが考えられた。そこで本研究は、溶媒を除去して蛍光試薬と脂肪酸の反応性を高めることにより、加水分解して生じた EPA や DHA を定量できる HPLC 法を開発することを目的とした。

試料魚として体長 5 cm のマイワシを用い、Bligh-Dyer 法⁶⁾を用いてマイワシ抽出油を得た。この抽出油中の EPA と DHA を本 HPLC 法と既存の GC 法¹⁾で測定し、本法の有用性を検討した。抽出油の一部を

Fig. 1. Typical gas chromatograms of standard and extracted sardine oil.

Concentrations of standard EPA and DHA were 100 and 125 mg/dl, respectively. The sample of sardine oil was diluted with solvent to 220 times. Numbers in the diagram specify the peaks of fatty acids as follows: 1, EPA; 2, DHA. Conditions: column, Unisole 3000 (3 m × 3 mm I.D.); temperature, col. 230°C, inj. and det. 250°C; carrier gas, N₂ 30 ml/min.; gas chromatograph, Shimadzu GC-9A; integrator, Shimadzu C-R3A.

Fig. 2. Typical HPLC chromatograms of standard and extracted sardine oil.

Concentrations of both standard EPA and DHA were 20 mg/dl. The sample of sardine oil was diluted with solvent to 1450 times. Numbers in the diagram specify the peaks of fatty acids as follows: 1, EPA; 2, DHA. Conditions: column, Nacalai Cosmosil 5C18-AR (15 cm × 6 mm I.D.); mobile phase, CH₃CN: water = 90:10; flow rate, 0.9 ml/min.; pump, Hitachi L-6000; detector, Hitachi F-1050 (EX₃₆₅, EM₄₁₂).

ケン化後メチルエステル化して GC 用の試料とした。HPLC 用の試料はケン化後、N₂ ガスを注入して脂肪酸の酸化を防ぎながら溶媒を除去し、蛍光試薬であるアダム試薬 (9-Anthryldiazomethane reagent) を加えて調製した。その後、酢酸エチル (99.5 v/v%) を溶剤とし、脂肪酸濃度が GC 用の試料と同じになるように一定量に希釈した。

標準試料とした市販 EPA と DHA およびマイワシ抽出油試料の GC 溶出図を、Fig. 1 に、HPLC 溶出図を、Fig. 2 に示した。マイワシ抽出油中の EPA と DHA は、両方法とも鮮明な単一ピークとして検出できた。また、Fig. 1 および Fig. 2 に示したように、HPLC 法と GC 法のマイワシ抽出油試料の希釈倍率は、それぞれの 1450 倍と 220 倍であった。したがって、HPLC 法の方が GC 法より高感度で EPA と DHA を検出することができた。なお、Fig. 2 に示したように、本 HPLC 法の測定条件では、溶出時間 60 分以後にオレイン酸をはじめとする不飽和脂肪酸のものと思われるピークが 5 本観察された。標準試料のピーク面積と濃度を基準にして、溶出図のピーク面積より算出したマイワシ抽出油中の EPA と DHA の百分率は、GC 法の場合がそれぞれ 15 と 17%、HPLC 法の場合がそれぞれ 16 と 15% であった。したがって、本 HPLC 法は、加水分解したマイワシ抽出油中の EPA と DHA を GC 法とほぼ同じ精度でかつ高感度で測定することができた。以上の結果より、本 HPLC 法は、高感度の魚油中 EPA および DHA の定量法として有用であると思われる。また、本 HPLC 法は、分析後に試料を回収できる利点もある。

文 献

- 1) 前田有美恵, 石川雅章, 山本正利, 寺田志保子, 増井俊夫, 渡辺佳一郎: 日本栄養・食糧学会誌, 38, 447-450 (1985).
- 2) R. Tocher, A. Webster, and J. R. Sargent: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 8, 83-95 (1986).
- 3) S. Tokiwa, A. Kanazawa, and S. Teshima: *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47, 675 (1981).
- 4) 水上 裕: 月間フードケミカル, 10 月号, 48-52, (1992).
- 5) 下村吉治, 谷口清昭: 臨床検査, 27, 561-564 (1983).
- 6) E. G. Bligh and W. J. Dyer: *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 37, 912-917 (1959).

*1 聖カタリナ女子大学 (St. Catherine Women's College, Hojo, Ehime 799-24, Japan).

*2 ヤマキ株式会社研究開発室 (Research Laboratory, Yamaki Co. Ltd., Iyo, Ehime 799-31, Japan).

*3 上智大学理工学部化学科 (Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Sophia University, Kioi, Chiyoda, Tokyo 102, Japan).