脂質過酸化物による蛍光物質の形成 (第 3 報¹⁾)

余田和明,* 松崎怜子, 飯尾利弘, 太幡利一

昭和薬科大学

The Formation of Fluorescent Substance by Lipidperoxides. III¹⁾

KAZUAKI YODEN,* REIKO MATSUZAKI, TOSHIHIRO IIO and TOSHIKAZU TABATA

Showa College of Pharmaceutical Science 1-8, Tsurumaki 5-chome, Setagaya-ku, Tokyo

(Received January 5, 1982)

Lipofuscin-like fluorescent substance was obtained from the reaction of β -phenylethylamine and *n*-hexanal, which is one of the secondary products of autoxidized methyl linoleate and it was separated by high performance liquid chromatography and thin layer chromatography.

This fluorescent substance showed excitation maxima 366 nm and emission maxima 428 nm.

The addition of unsaturated aldehyde, that is, 2-hexenal, crotonaldehyde or 2-*n*-butyl-2-octenal derived from aldol condensation of *n*-hexanal in the reaction system increased significantly the formation of fluorescent substance.

However, the main product in this reaction system was a Schiff base compound from β -phenylethylamine and 2-*n*-butyl-2-octenal, but was not fluorescent substance.

On the other hand, the fluorescent substance obtained from the reaction of malondialdehyde and β -phenylethylamine was 1,4-dihydropyridine derivative, three molar malondialdehyde condensed with one molar β -phenylethylamine.

These results suggested that lipofuscin-like fluorescent substance would be formed from the reaction of various amino compounds and dialdehyde compounds derived from "Michael reaction" of saturated aldehyde compounds and unsaturated aldehyde compounds.

Keywords—lipofuscin; aging; secondary products; *n*-hexanal; fluorescent substances; malondialdehyde

緒 言

生体の老化に伴って蓄積する老化色素は lipofuscin と呼ばれる蛍光物質であり, 脂質過酸化物とアミノ化合物から形成されるものと考えられており,²⁾ Tappel らは脂質過酸化反応の最終産物である malondialdehyde とアミノ化合物がシッフの塩基を形成したものであると報告している.³⁾ 生体組織に存在する不飽和脂肪酸は conjugated diene hydroperoxide を経て飽和および不飽和アルデヒド化合物を含む secondary products を形成し, これらはさらに malondialdehyde へ分解されて行くと言われているがその詳細は明らかでない.⁴⁾ 不飽和脂肪酸のこうした酸化分解過程を明らかにすべく, conjugated diene hydroperoxide や secondary products の分離, 同定が高速液体クロマトグラフィーや gas chromatography-mass spectrum (GC-MS) などで行われている.⁵⁾

我々は先に自動酸化した methyl linolenate から得た secondary products 画分からアルデヒド化合物を分離し, これにアミノ化合物を反応させることによって励起波長 350—360 nm, 蛍光波長 420—430 nm を示す蛍光物質の生成ならびに分離条件について検討し, 生体での lipofuscin 様蛍光物質の形成には secondary products に含まれるアルデヒド化合物が関与している可能性を示唆する結果を得た.¹⁾

今回, この可能性をさらに明らかにするため, 既知の飽和ならびに不飽和アルデヒド化合物とアミノ化合物による蛍光物質の形成を試み, secondary products からのものと類似した蛍光物質を得ると共にこの蛍光物質の形成機序に関する知見を得たので報告する.

実 験 方 法

蛍光物質の形成 1,1,3,3-Tetramethoxypropane を塩酸で加水分解して得た malondialdehyde および市販

の各種アルデヒド化合物の ethanol 溶液にアミノ化合物として β -phenylethylamine 等を加え 30°C で数日間保温した。

蛍光物質の測定と分離 生成した蛍光物質は前報¹⁾に従って測定した。薄層クロマトグラフィーは Kiesel-gel 60 (Merck) を用い、クロロホルム：メタノール/100：5 混液で展開し紫外線ランプ下で蛍光スポットを確認すると共にヨード蒸気中에서도スポットの確認を行った。高速液体クロマトグラフィーによる蛍光物質の分析はカラムに varian MCH-10 (逆相) を用いて行った。また 2-hexenal などの不飽和アルデヒド化合物から生成する蛍光物質の分析は、分離能の点から waters FAA (逆相) カラムを用いた。検出は蛍光 (日立 650-10 LC) および 254 nm の紫外線 (UV) 吸収 (waters 440) を用いて行った。

反応生成物の分離・精製 *n*-Hexanal と β -phenylethylamine の反応溶液を高速液体クロマトグラフィーで分析し、蛍光 peak および UV 吸収 peak をそれぞれ分取した。ガスクロマトグラフィー (日立 163) による反応主生成物の分析は、充てん剤に silicon SE 30 (国産化学) を用い、カラム温度 100°C から 1 分当り 5°C の昇温による方法で行った。¹⁴C- β -phenylethylamine を用いた生成量の比較は、高速液体クロマトグラフィーで分取した後各画分の放射活性を測定した。不飽和アルデヒドとして用いた 2-*n*-butyl-2-octenal は減圧蒸留をくり返して分離精製した。

実験結果

Malondialdehyde とアミノ化合物による蛍光物質

Malondialdehyde に lysine, 1-aminopentane あるいは β -phenylethylamine などのアミノ化合物を加え 30°C で保温すると、励起波長 390 nm 付近、蛍光波長 450 nm 付近の蛍光スペクトルを示す物質が形成された。⁶⁾ これらの蛍光物質の分離精製を薄層クロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーで試みた。Malondialdehyde とアミノ化合物として用いた β -phenylethylamine から得られた蛍光物質は高速液体クロマトグラフィーで 2 分 25 秒の位置に強い蛍光 peak として溶出された (Fig. 1)。またこの蛍光物質は薄層クロマトグラフィーでは *R*_f 0.51 の位置に強い蛍光スポットとして確認された。この蛍光物質を分離精製すると、266 nm および 385 nm に特徴ある UV 吸収スペクトルを示し、また励起波長 392 nm、蛍光波長 446 nm の蛍光スペクトルを示した。

次にこの蛍光物質の mass スペクトルを測定したところ分子量 255 を示し、さらに *m/e* 240 (*M*⁺-15) や *m/e*

Fig. 1. High Performance Liquid Chromatography and Thin Layer Chromatography of Fluorescent Substance obtained by the Reaction of β -Phenylethylamine with Malondialdehyde

HPLC: column; varian MCH-10.
detector; fluorescence: Ex. 390 nm, Em. 450 nm.
solvent system; 5 mM(NH₄)₂HPO₄/AcCN: MeOH:
H₂O (40: 30: 40) (pH 3.5).
TLC : solvent system; CHCl₃: CH₃OH (100:5).
(I): reaction mixture, (II): purified fluorescent
substance.

Fig. 2. NMR Spectrum of Fluorescent Substance obtained by the Reaction of β -Phenylethylamine with Malondialdehyde

105 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH}_2^+$) が強く認められた。また $^1\text{H-NMR}$ の測定では Fig. 2 の結果を得、アルデヒドの存在を示す δ : 9.130 の singlet のシグナルをはじめ, δ : 6.543 (2H, s), 3.804 (1H, q), 3.706 (2H, t), 2.980 (2H, t), 1.057 (3H, d) などのシグナルを得た。

以上の結果からこの蛍光物質は 3 分子の malondialdehyde と 1 分子の β -phenylethylamine が縮合した 1,4-dihydropyridine 型の化合物であり, 1-aminopentane を用いた時も同様の蛍光物質が得られた (Fig. 2)。

菊川ら⁷⁾は malondialdehyde と glycine や methylamine を種々の pH 条件で反応させ, 1,4-dihydropyridine 型蛍光物質が形成されることを報告しており, 今回の結果とも合わせてアミノ化合物と malondialdehyde から生成する主蛍光物質は 1,4-dihydropyridine 型の化合物であり malondialdehyde に対するアミノ化合物の共通した性質であるものと思われた。

n -Hexanal と β -Phenylethylamine による蛍光物質

不飽和脂肪酸の secondary products 画分に含まれるアルデヒド化合物とアミノ化合物から蛍光物質が形成された¹⁾ことから, secondary products のひとつである n -hexanal を用いて蛍光物質の形成機序を検討した。 n -Hexanal の ethanol 溶液に β -phenylethylamine を加えて 30°C で保温すると励起波長 360 nm 付近, 蛍光波長 430 nm 付近の蛍光スペクトルを示す物質を得た。この反応溶液を高速液体クロマトグラフィーで分析すると Fig. 3 に示す強い蛍光 peak を認め, 7 分 20 秒に溶出したこの蛍光物質は薄層クロマトグラフィーで R_f 0.46 の位置に強い蛍光スポットとして認められた。この蛍光物質は 364 nm に強い UV 吸収を示し, また励起波長 366 nm, 蛍光波長 428 nm の蛍光スペクトルを示した (Fig. 4)。一方 254 nm の UV 吸収による検出ではこの蛍光物質とは別の溶出位置に強い peak が検出された。しかしこの UV 吸収 peak は蛍光 peak としては検出されなかった (Fig. 3)。そこで ^{14}C - β -phenylethylamine を用いて各 peak の生成量を比較したところ, 強い UV 吸収を示した 2 つの peak にはそれぞれ 27% および 51% と非常に多くの放射活性が検出されたのに対し, 7 分 20 秒に溶出する蛍光 peak にはわずか 1% 程の放射活性しか検出されなかった (Fig. 3)。この生成量の比較から, n -hexanal と β -phenylethylamine の反応における主生成物は強い UV 吸収 peak として検出される物質であり, 蛍光物質の生成量はごくわずかであった。

ガスクロマトグラフィーによる生成物の分析

n -Hexanal と β -phenylethylamine の反応生成物をガスクロマトグラフィーで分析すると 3 本の大きな peak を認めた (Fig. 5)。そこでこれらを単離して単一化合物として $^1\text{H-NMR}$ および mass スペクトルを測定した結果, peak 3 の化合物は分子量 285 であり, 2 分子の n -hexanal が aldol 縮合した 2- n -butyl-2-octenal (peak 1) に β -phenylethylamine がシッフの塩基を形成した化合物であった。また peak 2 は n -hexanal と β -phenylethylamine が単にシッフの塩基を形成した化合物であり, 分子量 203 を示した (Fig. 5)。

これらの化合物は UV 吸収こそ示すものの蛍光物質ではなく, 先の高速液体クロマトグラフィーでは 20 分付近に溶出される UV 吸収 peak に重なって検出された。このような結果は n -hexanal と β -phenylethylamine から形成される 2 種類のシッフの塩基を持つ化合物はこの反応系の主生成物であるが Tappel ら⁸⁾の報告している蛍光物質ではなく, アルデヒド化合物とアミノ化合物による蛍光物質の形成機構としては何か他の機構をも考える必要があると思われる。

不飽和アルデヒド化合物による蛍光物質の形成

不飽和脂肪酸の secondary products には不飽和アルデヒド化合物も存在しており, 我々はこの不飽和アルデヒド化合物も蛍光物質の形成に関与しているものと考えている。そこで既知の不飽和アルデヒド化合物である 2-hexenal, crotonaldehyde および 2- n -butyl-2-octenal を用いて蛍光物質の形成におよぼす影響を比較検討した。2-Hexenal や crotonaldehyde を n -hexanal と共存させた時, 蛍光物質の形成は著しく増加し, n -hexanal 単独にくらべて 2—3 倍に増加した (Table I)。さらに n -hexanal と 2-hexenal 共存下で形成された蛍光物質を, ウォーターズ FAA カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析したところ, n -hexanal から形成される蛍光物質とは別の溶出位置に新たな蛍光 peak が出現した (Fig. 6)。この蛍光 peak は n -hexanal と 2-hexenal が共存する時のみ強く出現することから, 不飽和アルデヒド化合物である 2-hexenal と n -hexanal の両化合物が反応することによって形成された蛍光物質であると思われた。

次に 2 分子の n -hexanal が aldol 縮合した 2- n -butyl-2-octenal を単離して n -hexanal と共存し, 蛍光物質の

形成を比較したところ、高速液体クロマトグラフィーにおいて *n*-hexanal から得られる主蛍光 peak のみが著しく増加したが他に新たな蛍光 peak の出現は認められなかった (Fig. 6)。またこの時の蛍光物質の形成は塩基触媒として C_2H_5ONa を用いた時さらに促進された。この結果から、*n*-hexanal と 2-*n*-butyl-2-octenal 共存下で

Fig. 3. High Performance Liquid Chromatography of Fluorescent Substance obtained by the Reaction of β -Phenylethylamine with *n*-Hexanal

HPLC: column; varian MCH-10.
detector; fluorescence; Ex. 350 nm, Em. 430 nm.
UV; 254 nm.

a) Radioactivity (%) in the compounds formed from ^{14}C - β -phenylethylamine with *n*-hexanal.

Fig. 4. Ultraviolet and Fluorescent Spectrum of Fluorescent Substance obtained by the Reaction of β -Phenylethylamine with *n*-Hexanal

Fig. 5. Gas Liquid Chromatography of Products obtained by the Reaction of β -Phenylethylamine with *n*-Hexanal

GLC: Hitachi 163
C.T.; 100→200°C (5°C/min)
I.T.; 150°C

N_2 ; 2.0 kg/cm²,
 H_2 ; 1.0 kg/cm²,
Air; 2.0 kg/cm².

Fig. 6. High Performance Liquid Chromatography of Fluorescent Substance obtained by the Reaction of β -Phenylethylamine with *n*-Hexanal and Various Unsaturated Aldehyde Compounds

HPLC: column; waters FAA,
detector; fluorescence; Ex. 350 nm, Em. 430 nm,
solvent system; THF: AcCN: H_2O (15: 40: 55).

—: *n*-hexanal + β -phenylethylamine,
---: *n*-hexanal + 2-hexenal + β -phenylethylamine,
- - - : *n*-hexanal + 2-*n*-butyl-2-octenal + β -phenylethylamine.

TABLE I. Effect of Unsaturated Aldehyde Compounds on the Formation of Fluorescent Substance

Aldehyde compound	Fluorescence (%)
(0.15 mmol) (0.15 mmol)	a)
<i>n</i> -Hexanal + <i>n</i> -hexanal	346—413 nm 4380.0 (100.0%)
<i>n</i> -Hexanal + 2-hexenal	347—410 nm 11360.0 (259.4%)
<i>n</i> -Hexanal + croton aldehyde	348—410 nm 9760.0 (222.8%)
2-Hexenal + 2-hexenal	340—409 nm 3900.0 (89.0%)
Croton aldehyde + croton aldehyde	340—408 nm 2030.0 (46.4%)

a) Excitation wavelength—emission wavelength.
Reaction mixture was incubated for 24 h at 35°C.

形成される蛍光物質は *n*-hexanal から形成される蛍光物質と同一化合物であり、しかもこの蛍光物質の形成には不飽和アルデヒド化合物である 2-*n*-butyl-2-octenal が強く関与していることが示唆された。

考 察

生体組織に蓄積する脂質過酸化物とアミノ化合物から老化色素と呼ばれる lipofuscin 様蛍光物質が形成されるが、我々は脂質過酸化反応において形成される secondary products がこの蛍光物質の形成に関与するものと考え、アルデヒド化合物による蛍光物質の形成機序を検討した。Malondialdehyde とアミノ化合物から得られる蛍光物質は励起波長 390 nm 付近、蛍光波長 450 nm 付近の蛍光スペクトルを示した。この蛍光物質は 3 分子の malondialdehyde と 1 分子のアミノ化合物が縮合した 1,4-dihydropyridine 型化合物 (Fig. 2) であり、菊川らの報告⁷⁾と一致したことは、malondialdehyde と種々のアミノ化合物から形成される蛍光物質は Tappel らの報告⁸⁾しているシッフの塩基化合物ではなく、3:1 のモル比で縮合した 1,4-dihydropyridine 型化合物であり、しかもこの蛍光物質はアミノ化合物の種類によらず両者が共存する時に形成される一般的な蛍光物質であると言える。

さらに不飽和脂肪酸の secondary products に含まれるアルデヒド化合物のひとつと考えられている *n*-hex-

Chart 1. Reaction Mechanism of the Formation of Fluorescent Substances of Phenylethylamine with *n*-Hexanal

(1)^{a)}; Aldol condensation.

(2)^{a)}; Michael reaction.

anal とアミノ化合物からも類似した蛍光物質が形成され、高速液体クロマトグラフィーなどで分離することが出来たがその生成量はわずかであった (Fig. 3).

この反応においては、*n*-hexanal が aldol 縮合した 2-*n*-butyl-2-octenal とアミノ化合物が Schiff の塩基を形成する反応および *n*-hexanal とアミノ化合物が直接 Schiff の塩基を形成する反応が主系路であるが、ここで得られた 2 種類の Schiff の塩基を持つ化合物は高速液体クロマトグラフィーからも明らかなように UV 吸収こそ持つもののいずれも蛍光物質でなかった。

しかし *n*-hexanal と β -phenylethylamine による蛍光物質の形成が 2-hexenal や 2-*n*-butyl-2-octenal などの不飽和アルデヒド化合物の共存によって増加した事 (Table I), そして *n*-hexanal と 2-hexenal の共存で新しい蛍光物質の形成が認められた事 (Fig. 6) などから、この蛍光物質の形成には飽和および不飽和アルデヒド化合物の両者が関与しているものと考え、次のような反応機構を推定した (Chart 1).

2 分子の *n*-hexanal が aldol 縮合すると 2-*n*-butyl-2-octenal を生ずるが、この 2-*n*-butyl-2-octenal あるいは *n*-hexanal にアミノ化合物が Schiff の塩基を形成した化合物はこの反応系の主生成物であるがいずれも蛍光を示さない。

一方 *n*-hexanal と 2-*n*-butyl-2-octenal が Michael 反応を起こすと dialdehyde 化合物が形成されるが、この dialdehyde 化合物にアミノ化合物が結合すると malondialdehyde から得られたと同じ 1,4-dihydropyridine 型化合物が形成されることが考えられる。

事実 *n*-hexanal と 2-hexenal の共存によって新しい蛍光物質が形成され、また 2-*n*-butyl-2-octenal の共存によって蛍光物質の形成が促進された (Fig. 6). また得られた蛍光物質の mass スペクトルから 367 の分子量を得、さらにこの蛍光物質の UV 吸収スペクトルが古くから報告⁸⁾のある 1,4-dihydropyridine 型化合物のスペクトルと類似していることなどからもこの蛍光物質が 1,4-dihydropyridine 型化合物である可能性を強く示唆するものである。

現在のところ 1,4-dihydropyridine 型蛍光物質の形成機構は明らかでなく、また dialdehyde 化合物の生成も推定の域を出ないが、食品中などにも脂肪族アルデヒド化合物とアミノ化合物から dihydropyridine 化合物の形成が報告⁹⁾されている。

このように不飽和脂肪酸の酸化過程において生ずる数種の不安定なアルデヒド類が、Chart 1 に示す反応過程のもとに dialdehyde 化合物となり生体の各種アミノ化合物と反応して 1,4-dihydropyridine 型蛍光物質を生ずる可能性は十分に考えられ、その詳細な機構について検討中である。

引用文献および注

- 1) 余田和明, 飯尾利弘, 太幡利一, 薬誌, **101**, 437 (1981).
本論文の一部は薬学会第 102 年会 (大阪) にて発表した。
- 2) 平井俊策, 代謝, **15**, 1329 (1978).
- 3) K.S. Chio, A.L. Tappel, *Biochemistry*, **8**, 2821 (1969); R. Trombly, A.L. Tappel, *Lipids*, **10**, 441 (1975).
- 4) 太田静行, “油脂食品の劣化とその防止,” 幸書房, 東京, 1977, p. 18.
- 5) E.N. Frankel, W.E. Neff, E. Selke, *Lipids*, **16**, 279 (1981); W.E. Neff, E.N. Frankel, D. Weisleder, *ibid.*, **16**, 439 (1981).
- 6) 太幡利一, 余田和明, 武井 泰, 飯尾利弘, 薬誌, **99**, 711 (1979).
- 7) K. Kikugawa, T. Maruyama, Y. Machida, T. Kurechi, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1423 (1981); K. Kikugawa, Y. Machida, M. Kida, T. Kurechi, *ibid.*, **29**, 3003 (1981).
- 8) O. Craig, L. Schaefgen, W.P. Tyler, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1624 (1948).
- 9) 須山享三, 農化, **55**, 1131 (1981).