HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A Novel of Approach for the Identification of Lipid Molecular Species : Application of High Performance Liquid Chromatography on Fish Muscle Lecithin Molecular Species Analysis
Author(s)	Koretaro, Takahashi
Citation	北海道大学. 博士(水産学) 乙第2740号
Issue Date	1984-12-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/42778
Type	theses (doctoral)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	takahashi_thssis_abst.pdf (Abstract)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

学位の種類	水産学博士	氏名	高橋是太郎

学位論文題名

高速液体クロマトグラフィーによる脂質分子種の同定理論の確立と魚類筋肉レシチン分子種分析への応用

近年急速に進歩した高速液体クロマトグラフィー（HPLCと略記）は，比較的分子量の大きい物質まで損傷なく且つ迅速に分離できることから，脂質分子種の分析にも応用が試みられてきた。しかしながら，その同定方法はパーティションナンバー（PNと略記）と呼ばれる大まかな溶出規定式に基づいてなされているに過ぎなかった。PNとはPN＝CN－2・DBなる関係式（CNはアシル基の総炭素数，DBは総二重結合数）で表わされる。しかしながら，この同定法に従えば16:0（炭素数が16個で二重結合数が0個）と18:1（炭素数が18個で二重結合数が1個）のアシル基をそれぞれ持つ2種類の分子種を比較する場合，両者とも残りのアシル基が同一であるとすると，上記の式より，これらは同じPNを持つことになり，この2種類の分子種はPNを用いては区別できないことになる。このほか20:5と22:6，14:0

と16:1と18:2，18:3と20:4と22:5等，同一のPNを持つアシル基は数多くあり，したがって，このことが個々の分子種の同定を一層困難にさせてきた。

本研究では，先ず精製大豆レシチンとその誘導体を種々の条件下でHPLCに供した結果，レシチンを1,2-ジグリセリドのアセチル化物に誘導して分子全体を非極性化することがレシチン分子種同士の分離に有効であることを見い出した。

この知見を基に，卵黄レシチン，数種魚類の筋肉レシチンについてもレシチン由来の1,2-ジグリセリドのアセチル化物を調製してHPLCに供し，得られた画分を可能な限り詳細に検討した。その結果，各分子種の相対保持時間（RRTと略記）の対数とCNならびにDBとの間には1次関数的関係があることを見い出した。また，レシチンの溶出順位を考えた場合，分子種をPNで定義するよりもそれぞれのアシル基の炭素数，二重結合数を独立変数として行列表示することが有効であることを明らかにした。すなわち，

$$CN = P_1 \cdot \log(RRT) + g_1 \qquad CN = \begin{vmatrix} x & d_1 \\ c_2 & d_2 \end{vmatrix} \quad (1)$$

$$DB = P_2 \cdot \log(RRT) + g_2 \qquad DB = \begin{vmatrix} c_1 & y \\ c_2 & d_2 \end{vmatrix} \quad (2)$$

但し，P_1, P_2は1次関数の直線の傾きであり，g_1, g_2は直線のy切片を表わしている。また，C_1, C_2は各アシル基の炭素数を表わす定数，d_1, d_2は各アシル基の二重結合数を表わす定数である。

xおよびyは，それぞれアシル基の炭素数および二重結合数を表わす変数であると定義した。

次に，(1),(2)式の解釈の拡張を試みた。つまり，レシチン由来のジグリセリドのアセチル化物は，分子の形状から見た場合，そのアセチル基がアシル基の最も短鎖の脂肪酸残基であると考えることによりゆえに，(1),(2)式はトリグリセリドの一つと解釈できる。トリグリセリドの分子種の分配クロマトグラフィーにおける溶出順位を規定すると予想される次の仮説式：

$$CN = P_1 \cdot \log(RRT) + g_1 \qquad CN = \begin{vmatrix} x & d_1 \\ C_2 & d_2 \\ C_3 & d_3 \end{vmatrix} \quad (3)$$

$$DB = P_2 \cdot \log(RRT) + g_2 \qquad DB = \begin{vmatrix} C_1 & y \\ C_2 & d_2 \\ C_3 & d_3 \end{vmatrix} \quad (4)$$

のC_3とd_3がアセチル基の2と0になったものであると考えられる。このことから，(3),(4)式はアシル型の脂質の分子種すべてに対して成り立つと推察した。そこで，実際に数種のトリグリセリドを精製し，

これをHPLCに供して分取，同定し，仮説式の確認を行なうと共に，他の研究者の論文中のHPLCクロマトグラムを用いて各既知分子種のRRTをアシル基の総炭素数と総二重結合数に対して半対数座標上にプロットし，(3),(4)式が分析条件にかかわりなく普遍的な法則であることを確認した。

一方，得られた仮説の論理的背景については，Martinの分配クロマトグラフィー理論を導入することによって明らかにすることができた。すなわち，Martinの理論は：

$$\log \alpha_A = \frac{\Delta \mu_A}{R \cdot T}, \qquad \log \alpha_B = \frac{\Delta \mu_A}{R \cdot T} + \frac{\Delta \mu_X}{R \cdot T}$$

αは分配係数，Rは気体定数，Tは絶対温度，μはケミカルポテンシャル，AとBは同族体同士の溶質，XはAとBの分子構造上の差であるが，この式における Aを $\begin{vmatrix} c_1 & d_1 \\ c_2 & d_2 \\ c_3 & d_3 \end{vmatrix}$ なる分子種，BをAにXなる炭素鎖が加わった $\begin{vmatrix} c_1+X & d_1 \\ c_2 & d_2 \\ c_3 & d_3 \end{vmatrix}$ なる分子種として置き換えて考えることにより，BはAよりもXに相当する分だけ高いケミカルポテンシャルを持つことになる。したがって，その分だけHPLCクロマトグラム上では，BがAよりも後から溶出され

る結果となり，このXはアシル基の$(-CH_2)_n$に相当し，nの増大と共に脂質分子のケミカルポテンシャルが対数的に増加してゆくこととして(3)式を説明することができた。

以上，このようにして説明された脂質分子種のHPLCにおける溶出理論は，換言すれば$\begin{vmatrix} c_1 & d_1 \\ c_2 & d_2 \\ c_3 & d_3 \end{vmatrix}$の$c_1, c_2, c_3, d_1, d_2, d_3$のそれぞれすべてについてRRTとの間に直線関係が成り立つということでもある。すなわち，分子種$\begin{vmatrix} c_1 & d_1 \\ c_2 & d_2 \\ c_3 & d_3 \end{vmatrix}$の各要素をそれぞれ独立変数としたときに与えられる従属変数がRRTとなっているものとしてとらえることができる。

一方，PNの定義ではCN（アシル基の総炭素数）とDB（アシル基の総二重結合数）をそれぞれ独立変数とし，RRTを従属変数としている。すなわち，PNの定義ではCNおよびDBという2個の独立変数で従属変数RRTを与えている。

今，$CN = c_1 + c_2 + c_3$，$DB = d_1 + d_2 + d_3$なる関係があるから，ゆえに，両者（PNと本溶出理論）は，PNの定義で与えられている独立変数（CNとDBの計2個）を拡張して，アシル基中の炭素数および二重結合数（計6個）をそれぞれ独立変数と

しているものとしてとらえることができる。すなわち，本溶出規定式はPNの独立変数の次元を2次元から6次元に拡張したものとして結論づけられた。

本研究ではさらに，全貌が明らかになった分子種の溶出理論を基にレシチン分子種の同定用プログラムを作成した。

以上までに確立した脂質分子種分析法を用い，これまで脂肪酸組成レベルでしか知見が出されていない魚類筋肉のレシチン分子種分析を行なった。供試魚としては，マイワシ，サバ，メバチマグロ，マガレイ，スナガレイ，クロソイ，スケトウタラ，シロサケ，ヨシキリザメ，ネズミザメ，ニジマスおよびコイを用いた。その結果，20:5や22:6などの高度不飽和脂肪酸同士の組み合わせから成る分子種と，16:0と20:5あるいは16:0と22:6の組み合わせから成る分子種が，これら構成上位をはる魚類筋肉レシチン分子種全体の60%以上を占める魚類筋肉レシチン分子種の特徴であると考えられた。

一方，各魚類の特色については，個々のレシチン分子種の量的な比に注目することによって見いだされた。すなわち，マガレイ，スナガレイ等の底棲魚では，(16:0)(20:5)を最も多く含み，他の供試魚は(16:0)(

22:6）を最も多く含んでいて，底棲魚とその他のものとの間の最も特徴的差異として認められた。また，マイワシは高度不飽和脂肪酸同士の組み合わせである（20:5）（22:6），（22:6）（22:6）が他の魚種よりも多いのに対し，コイ，ニジマス等の淡水魚では，これらの分子種を少量しか含有しなかった。また，同一魚種であっても捕獲された時期によって分子種に量的差のあることが認められた。特に，遡上を行なうシロサケでは魚肉レシチン分子種の組成に大きな時期変動の起ることが認められた。

最後に，各主要分子種の量的変化の全体像を把握するために多変量解析（主成分分析）を行なった。これにより，供試魚のほとんどの魚種において（20:5）（20:5）の分子種の増減が季節変化に対応する傾向のあることが示唆された。