

平成 27 年度「杉山産業化学研究所研究助成」  
報告書

食品および生体に含まれる脂質の網羅的分析システムの開発  
(Choline glycerophospholipid の分子種分析)

大阪府立大学

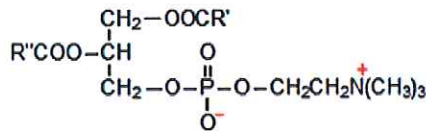
北村 進一

平成 28 年 12 月

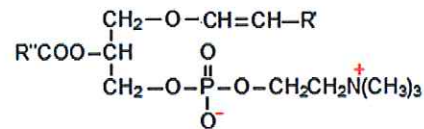
## はじめに

脂質は、タンパク質、糖質とならんで、主要生体成分であり、代謝や分化、病態、食品分析の点から重要であることが明らかにされつつある。しかしながら、脂質は幅広い極性を持つ各種クラスに分類され、かつ脂肪酸組成の違いにより物理化学的挙動が多様であるため、その分析は極めて労力と時間を要するものとなっている。

前年度では、脂質の主成分であるトリアシルグリセロール(TAG)について、抽出した脂質サンプルをセットするだけで分子種まで同定可能なオンライン二次元 HPLC(2D) システムを完成した。本年度は、システムを Choline glycerophospholipids の分子種分析用に変更し、さらに至適化を行った。Choline glycerophospholipids には、脂肪酸がエステル結合したもの(以下 PC)と、*sn*-1 にビニルエーテル結合を有する plasmalogen phosphatidylcholine、いわゆる plasmalogen (以下 pl PC) が存在するが、その同定にも成功した。



Phosphatidylcholine



Plasmalogen phosphatidylcholine (plasmalogen phosphatidylcholine)

## 自動オンライン 2D システム

使用システムの概要は、前回報告した TAG システムと同様であるが、今回は、PC 及び pl PC が比較的高極性の化合物であることから、Make-up 溶媒を変更し、トラップカラムのサイズを小さくして、流路は Back flush 方式とした。

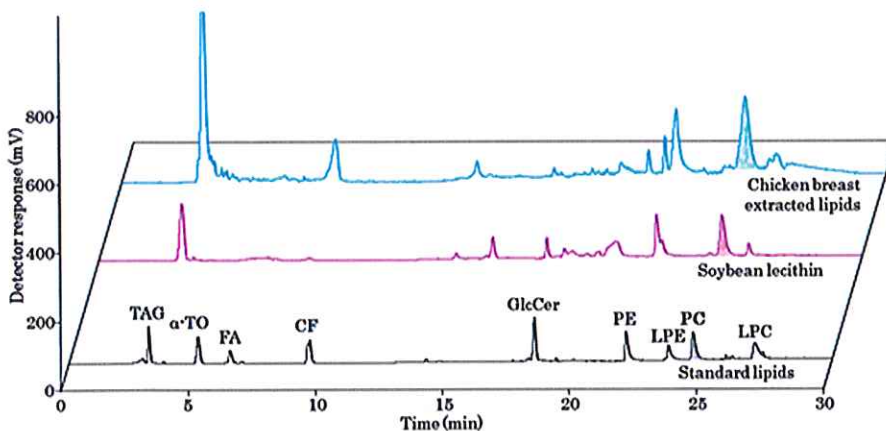
### 1. トラップカラム

トラップカラムには、TAG の際と同様、カーボンコンテンツが高く保持力の強い C18 カラムを選択した。二次元目の逆相 (RPC) カラムには 4.6x250 mmL を使用するため、トラップカラムには 4.6x30mmL のサイズを採用することとした。カラム温度は、RPC カラム温度 40°C に対し、27°C とした。

### 2. Make-up 溶媒

Make-up 溶媒は、脂質クラス分離の移動相と混和し、かつ親水性の高い溶媒を検討し、Acetonitrile/Water の混合液を採用した。Make-up の条件検討は標準 PC dipalmitoylphosphatidylcholine、粗精製レシチンを用いて行い、Trap 回収率が各ピークにおいて問題がないことを確認した。

## Lipid Class 分離 (1<sup>st</sup> dimension)



TAG:Triacylglycerol α-TO:a-tocopherol FA:Free Fatty Acid CF:g-Cycloartenylferulate  
GlcCer:Glucosylceramide PE:Phosphatidylethanolamine LPC:Lysophosphatidylcholine  
LPE:Lysophosphatidylethanolamine

サンプルには、粗精製レシチン (J-オイルミルズ様から頂いたサンプル)、鳥胸肉から Folch 法に準じて抽出した脂質を使用した。

Fig. 1 粗精製レシチン、鳥胸肉脂質抽出物の Lipid Class 分離(1st dimension)

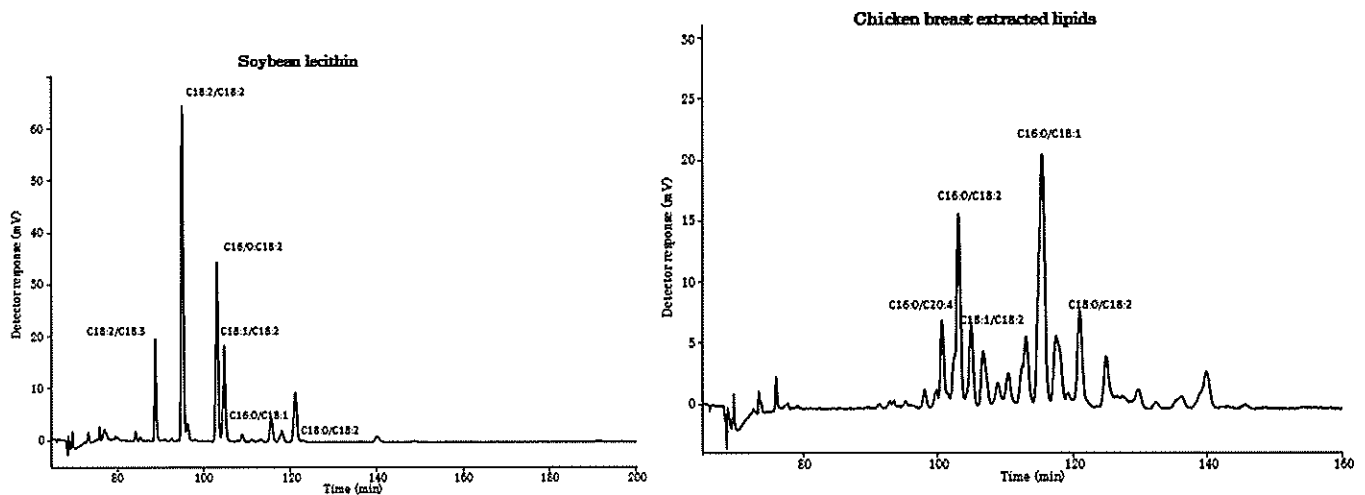


Fig. 1 粗レシチン、鳥胸肉脂質抽出物の分子種分離(2st dimension)

各サンプルは、複数の脂質クラス化合物を含んでいたが (Fig. 1)、本システムを使用することによりオンラインで PC 及び pl PC の各種分子種を同定定量することができた (Fig. 2)。

粗精製レシチンには、C18:2/C18:2-PC、C16:0/C18:2-PC、C18:1/C18:2-PC、C18:2/C18:3-PC の分子種が多く、他に 20 ピーク余りを同定することができた。

鳥胸肉では、30 程度のピークを同定することができ、C16:0/C18:1-PC、C16:0/C18:2-PC、C18:0/C18:2-PC の分子種が多く含まれていることがわかった。また、鳥胸肉には、約 10% の pl PC が含まれており、その分子種は、C16:0/C18:1-pl PC、C16:0/20:4-pl PC、C18:1/C20:4-pl PC、C18:0/C18:2-pl PC と同定された。

近年、PC の特定の分子種は病態マーカーとして注目されている。たとえば、アルツハイマー病患者の血しょうにおいて減少が認められる C16:0/20:5-PC や C16:0/C22:6-PC<sup>(1)</sup>が鳥胸肉脂質抽出物の PC の中に微量ではあるが含まれていることが今回の分析でわかった。

また、冠動脈疾患や急性心筋梗塞患者の血しょうでは特定の分子種のプラズマローゲン PC が減少することが報告されている<sup>(2)</sup>。鳥胸肉から検出されたプラズマローゲン C16:0/C18:1-pl PC、C18:0/C18:2-pl PC は、報告された分子種に相当するものである。

このように、Choline glycerophospholipid の分子種の同定定量が容易に実行可能であることは、食品分野だけでなく臨床分野でも非常に有用であるといえ、このシステムを用いた病態マーカーの発見、解析などが期待される。

今後は、システムの応用性を拡張すべく、他の脂質クラスの分析について検討し、さらには脂質の抽出方法として SFE の可能性を追求したい。

Ref.

Neurobiol. Aging 35(1) (2014) 271-278

Atherosclerosis 246 (2016) 130-140