

海藻由来脂質における抗炎症作用の解明とその活用（第 3 報）

-蒸発光散乱検出-HPLC によるスサビノリ由来リン脂質の定量-

食品工業部

柘植圭介 鶴田裕美 吉村臣史

蒸発光散乱検出-HPLC 法を用いて、抗炎症作用が期待されるスサビノリ由来リン脂質（NPL）の分別定量を試みた。Diol カラムを用いた順相分配クロマトグラフィーを適用して分析系を確立し、*sn*-1 位に palmitic acid が、*sn*-2 位に oleic acid が結合する標準リン脂質クラス 6 種類（phosphatidylglycerol; PG, phosphatidylethanolamine; PE, phosphatidylcholine; PC, phosphatidylserine; PS, phosphatidic acid; PA 及び lysophosphatidylcholine; LPC）を用いたバリデーションを実施した。これらの標準リン脂質においては、10 mg/mL 以上の濃度で検量線の直線性が得られ、分析の再現性も良好であった。次に、本分析法における NPL と標準リン脂質のクロマトグラムを比較したところ、NPL において標準リン脂質の PG、PC 及び LPC に相当するピークと同じ保持時間にピークが溶出せず、これらのリン脂質クラスの同定が困難であった。この保持時間のずれは、NPL、標準リン脂質それぞれに結合する脂肪酸の種類が異なるためカラム内での分配挙動が異なることに起因すると考えられた。したがって、NPL に含まれるリン脂質クラスの分別定量に対して本分析法を適用するためには、NPL のリン脂質と極性が類似したものを標準物質とし、保持時間のずれを極力なくす工夫が必要と判断された。

1. はじめに

我々は、これまでにスサビノリ由来複合脂質において LPS 刺激によるマクロファージの活性化を抑える作用（抗炎症作用）があることを明らかにしており^{1),2)}、機能性食品素材としてのスサビノリの活用が期待されている。この複合脂質は、スサビノリに乾燥重量あたり 5%程度含まれ¹⁾、主としてリン脂質と糖脂質から成っており、そのうちリン脂質画分は phosphatidylglycerol (PG), phosphatidyl- ethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC) 等の複数のリン脂質クラスで構成されている^{2),3)}。スサビノリ由来リン脂質 (NPL) はマウス由来 RAW264.7 細胞における LPS 誘導型の活性化を抑え、iNOS, COX-2, TNF- α などの炎症性物質の発現誘導を抑制する²⁾。また、リン脂質に結合する脂肪酸の約半数が多価不飽和脂肪酸である eicosapentaenoic acid (EPA) で占められ、陸上植物由来のリン脂質には見られないユニークな構造を有している³⁾。

我々はまた、抗炎症作用の強さがリン脂質クラスによって異なり、NPL を構成するリン脂質クラスの中では PG が特に強いマクロファージ活性化抑制作用を有することを明らかにしている²⁾。同様に、PG が、*Mycoplasma pneumoniae* の刺激による TLR-2 を介した RAW264.7 細胞のエイコサノイド産生を抑えることが、Kuronuma ら⁴⁾や Kandasamy ら⁵⁾によって

も報告されている。

このような背景から、ノリの抗炎症作用を活かした機能性食品素材を開発するうえで、スサビノリ原料に含まれる NPL の含量やリン脂質クラスの組成比を定量的に把握することはきわめて重要である。しかしながら、従来からリン脂質クラスの分析に用いられている薄層クロマトグラフィーによる手法は、安価で簡便ではあるものの、定量精度が低く、また、分析の自動化や連続的な分析に向かないという短所があった。他方、生体成分の連続分析や自動分析に汎用される高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、脂質の紫外波長領域における吸収が弱いため、これまで吸光度検出器では高感度検出ができなかった。

近年、蒸発光散乱検出法 (Evaporative Light Scattering Detection; ELSD) が紫外領域での吸収が弱い物質の HPLC に応用されている⁶⁾。ELSD は、カラムから溶出した移動相を蒸発させることにより目的化合物を微粒化し、その散乱光を測定する検出法である。移動相とともに蒸発してしまう低沸点化合物を除き、原理的にほとんど全ての化合物を検出することができ、吸光度検出器で検出できない化合物（炭水化物、アルコール、脂質、界面活性剤、テルペノイドなど）の分析で威力を発揮する。また、従来の示差屈折率検出よりも感度が高く、揮発性の

移動相であれば、グラジエント分析にも対応できる長所を有する。

以上から、本研究では、ELSD-HPLC による NPL 中のリン脂質クラスの分別定量法の確立を試みた。定量法の確立にあたっては順相クロマトグラフィーの原理を適用し、*sn*-1 位に palmitic acid が、*sn*-2 位に oleic acid が結合する標準リン脂質クラス 6 種類を用いてバリデーションを実施した。さらに、本手法を NPL 中のリン脂質クラスの分析に応用したのでその結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 材料及び試薬

スサビノリとして 2011 年度有明海産板海苔を用いた。試料を超遠心粉碎機 (ZM-1; Retsch 製) で粉碎し、粒子径 125 μm 以下の微粉末を得た。品質の劣化を防ぐため、微粉末は密封下-18°C で保管した。

本研究における試薬は以下のものを用いた：1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol (PG), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine (PE), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidic acid (PA), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylserine (PS), 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (PC), 1-palmitoyl-2-hydroxy-phosphatidylcholine (LPC) (以上 6 点総て Avanti Polar Lipid), chloroform, *n*-hexane, 2-propanol, acetic acid, 1 mol/L ammonium acetate 水溶液 (以上 5 点総て HPLC grade, 和光純薬工業)。

2.2 標準物質及び検体の調製

各種リン脂質は 10 mg/mL chloroform 溶液として密封下-40°C にて保管し、分析直前に移動相で所定の濃度に希釈して使用した。

また、既報に準じ²⁾、スサビノリ微粉末より chloroform/methanol (1/1, v/v) で脂溶性画分を抽出後、固相抽出法によりリン脂質画分を分離した。これらの画分は chloroform/methanol (2/1, v/v) に溶解させて密封下-40°C で保管し、分析直前に移動相で所定の濃度に希釈して使用した。

2.3 HPLC 条件

HPLC の条件検討にあたり、以下を基本条件とした：装置, Waters 製 UPLC; カラム, Develosil 100 Diol-5 ($\phi 2 \times 250$ mm, 野村化学); 流速, 0.22 mL/min; カラム温度, 40°C; 注入量, 5 μL ; ELSD ガス圧, 25 psi, ELSD ネブライザー温度, 40°C; ELSD ドリフトチューブ温度, 50°C。

移動相については、装置の配管に対するダメージや環境に与える悪影響を考慮して毒性の強い

chloroform は用いず、*n*-hexane, 2-propanol 及び water の混合溶媒とした。また、移動相への添加剤として acetic acid 及び ammonium acetate (1 mol/L 水溶液) を使用した。これらの混合溶媒の比率や添加剤の濃度を変えて分析を試行し、分離条件の最適化を試みた。

3. 結果及び考察

3.1 移動相における *n*-hexane/2-propanol/water/acetic acid の比率

リン脂質混合標準液 (PG, PE, PA, PS, PC, LPC; 各 100 $\mu\text{g/mL}$) を用いて、移動相における *n*-hexane, 2-propanol 及び water の比率がリン脂質クラスの分離度に及ぼす影響を検討した。その結果、図 1 に示すように、混合溶媒の比率はリン脂質クラスの分離度に大きく影響し、*n*-hexane の比率が高すぎると各々のリン脂質クラスが十分分離せず、逆に低すぎるとカラムに保持されすぎて分析時間の過大を招く結果となった。条件検討の結果、最適な分離条件として、*n*-hexane/2-propanol/water/acetic acid = 63/34/3/0.07 (v/v) を選択した。

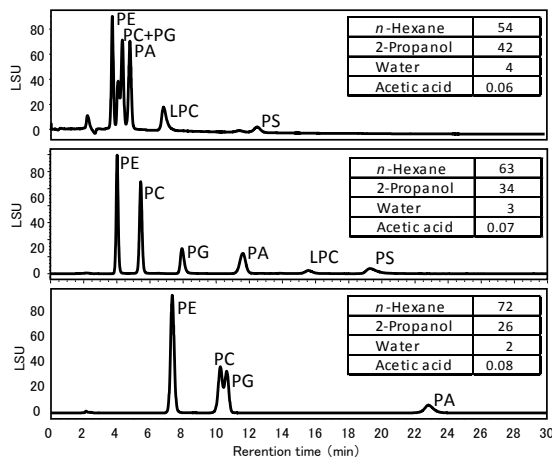


図 1 HPLC における移動相の混合溶媒の比率がリン脂質クラスの分離度に及ぼす影響
PE; phosphatidylethanolamine, PC; phosphatidylcholine, PG; phosphatidylglycerol, PA; phosphatidic acid, LPC; lysophosphatidylcholine, PS; phosphatidylserine

3.2 アンモニウムイオン添加の影響

3.1 で決定した分離条件にて分析を試行する中で、PG, PA, PS の保持時間が、PE, PC, LPC と比べて安定せず、注入再現性が低くなる現象が認められた (図 2)。これらのリン脂質クラスは注入回数を重ねると

つれて保持時間が遅くなり、最終的には溶出しなくなりました。保持時間の再現性が低かったリン脂質クラスは総て酸性リン脂質であることから、移動相内におけるリン脂質の酸性官能基の解離状態と保持時間の安定性には関連性があると推察された。

そこで、移動相にカチオン性のアンモニウムイオン (ammonium acetate として) を添加し、リン脂質の保持時間に及ぼす移動相中アンモニウムイオン濃度の影響を検討した。その結果、図 3 に示すように、リン脂質クラスの中でも酸性リン脂質の保持時間は、アンモニウムイオンの濃度に依存して大きく変わることが明らかとなった。おそらく、酸性リン脂質の保持時間が遅くなっていったのは、本研究以前の分析で Diol カラムを使用した際、移動相に含まれていたアンモニウムイオンなどのイオンがカラム内に残存し、それが分析回数を重ねるにつれて、少しずつ

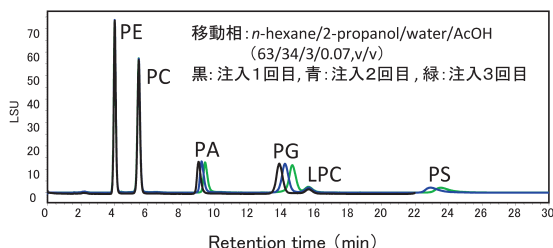


図 2 HPLC における繰り返し注入再現性

PA, PG, PS における繰り返し注入再現性が低くなっている。これらはすべて酸性リン脂質である。

減少していったためであろうと思われる。

この結果を受け、リン脂質クラスの適切な分離ならびに保持時間の安定性向上のため、移動相に ammonium acetate を濃度 0.03 mmol/L で添加した。即ち、移動相の組成を *n*-hexane/2-propanol/ acetic acid/1 mmol/L ammonium acetate = 63/34/0.07/3 (v/v) とした。

3.3 分析のバリデーション

3.2 で最適化した移動相の組成により各リン脂質クラス標準液 (6.25~100 $\mu\text{g/mL}$) で検量線を作成し、検量線の直線性 (R^2)、濃度変動係数 (CV%) 及び定量下限値 (LOQ) を求めた。このとき、ノリリン脂質の分析に応用することを想定し、ノリに含まれていないことが明らかかな PA を内部標準に用いた。また、ELSD のレスポンスは注入した物質質量に対して指数関数応答であるため、検量線は両常用対数でプロットした。

その結果、表 1 に示すように、PE, PA, PC, PG, LPC においては濃度 6.25~100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で相関係数以上の良好な直線性が得られた。他方、PS においては他のリン脂質クラスに比べてやや検出感が低く、検出限界及び LOQ が高くなる結果となった。

3.4 NPL 分析への応用

本分析法を NPL 分析に応用した。標準リン脂質およびノリリン脂質のクロマトグラムを比較した結果を図 4 に示す。NPL においては、PE が、標準 PE とほぼ同じ保持時間で溶出したものの、標準 PC, PG

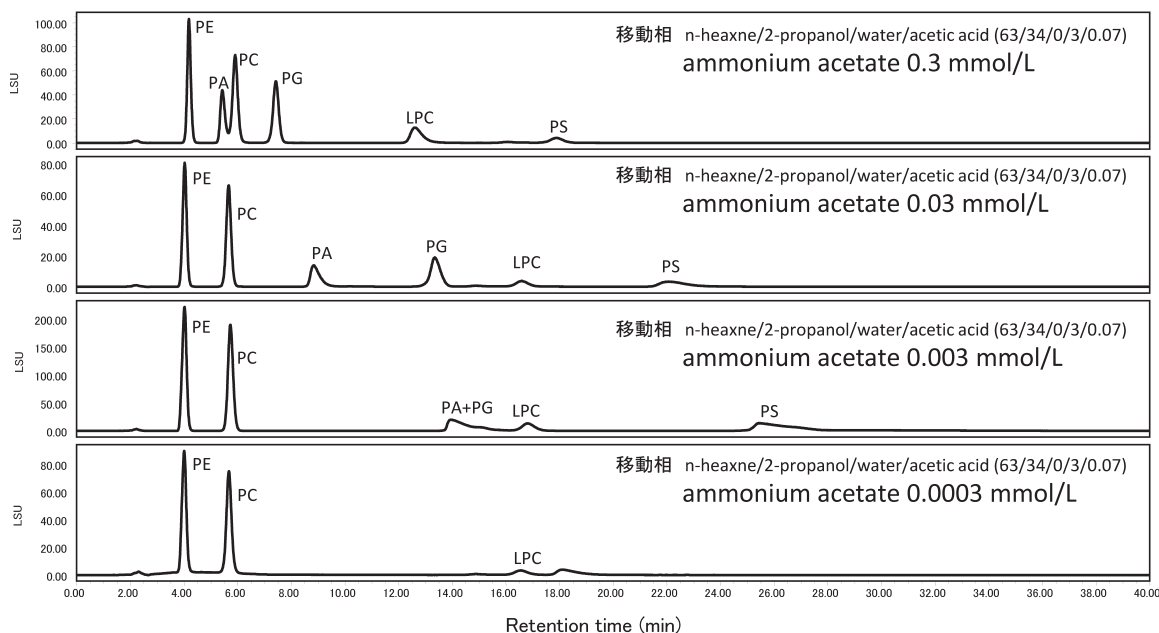


図 3 HPLC におけるリン脂質の保持時間に及ぼす酢酸アンモニウム添加の影響

及び LPC と保持時間が重なるピークは認められなかった。標準 PC のピークに 0.5 分遅れて NPL のピークが溶出し (ピーク 1)、また、標準 PG のピークに 0.6 分早くピーク 2 が、1.5 分遅れてピーク 3 が、さらに、標準 LPC に 2 分遅れてピーク 4 が溶出した。ピーク同定の許容範囲を超えて保持時間がずれることから、これらのピークについてはリン脂質クラスの帰属が難しく、結果として NPL に含まれる PC, PG 並びに LPC のピーク同定ができなかった。

NPL の多くのリン脂質クラスでピークの帰属が出来なかった理由として、構成脂肪酸の標準リン脂

質との違いが考えられた。NPL は、結合する脂肪酸の半数が eicosapentaenoic acid であるため、palmitic acid 及び oleic acid で構成される標準リン脂質とは、極性の点でかなり異なっていることが推察される。したがって、NPL の正確な定量にあたっては、eicosapentaenoic acid を含み、NPL のリン脂質と極性が類似したものを標準に用いて保持時間のずれを極力なくす工夫が必要と考えられた。

4. おわりに

本研究では、NPL のクラスごとの分別定量を行う

表 1 HPLC によるリン脂質分析のバリデーション結果

	PE	PC	PG	LPC	PS
検量線 $\text{LOG}(y) = A \times \text{LOG}(x) + B$					
A	1.2355	0.9914	1.1641	0.7815	1.4366
B	-2.1988	-1.9135	-2.3595	-1.6135	-3.0102
R²	0.9996	0.9919	0.9994	0.9915	0.9998
CV%					
6.25 µg/mL	12.7	3.7	13.4	4.3	N.D.
12.5 µg/mL	4.7	1.3	6.2	10.2	21.0
25 µg/mL	5.8	1.9	8.9	5.7	7.4
50 µg/mL	6.4	0.6	7.9	4.6	3.6
100 µg/mL	4.0	1.6	8.4	1.9	3.7
Mean	6.7	1.8	9.0	5.3	4.9
LOQ (µg/mL)	10.5	1.7	12.8	4.9	17.4

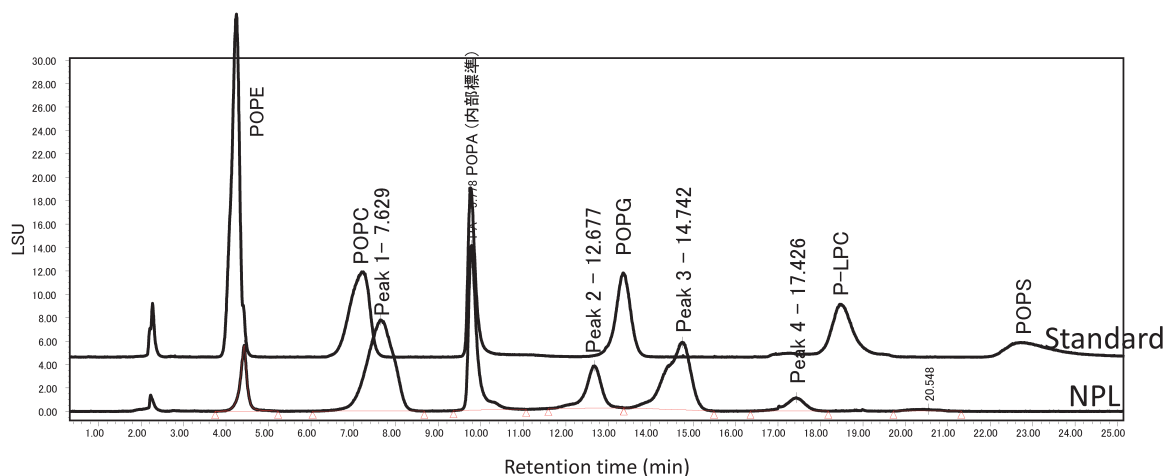


図 4 標準リン脂質混合試料と NPL のクロマトグラムの比較

ことを目的として、ELSD を用いた HPLC による分析手法の確立を試みた。その結果、

- 1) Diol カラムを用いた順相クロマトグラフィーの原理を適用し、6 種類の標準リン脂質クラスを良好に分離する分析系を確立した。
- 2) 本分析法においては、おおむね 10~100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で標準リン脂質の検量線の直線性が得られ、再現性も良好であった。
- 3) 本分析法を NPL のリン脂質クラスごとの分別定量に応用したが、PC, PG 及び LPC については、保持時間のずれからピーク同定ができず、NPL の分析系としては不十分であった。

以上の結果から、今後、本分析法を NPL の定量分析に適用するために、標準リン脂質の選択などの改良の余地があると判断された。

なお、本研究に使用した高速液体クロマトグラフは電源立地地域対策交付金の補助によるものである。

参考文献

- 1) 柘植圭介, 鶴田裕美, 佐藤真佐恵, 吉村臣史, 海藻由来脂質における抗炎症作用の解明とその活用 (1) -スサビノリにおける抗炎症作用の探索-. 平成 24 年度佐賀県工業技術センター報告, 1-9 (2013).
- 2) 柘植圭介, 鶴田裕美, 佐藤真佐恵, 吉村臣史, 海

藻由来脂質における抗炎症作用の解明とその活用 (2) -スサビノリにおける抗炎症性脂質の特定-. 平成 25 年度佐賀県工業技術センター報告, 19-28 (2014).

- 3) Araki S, Sakurai T, Omata T, Kawaguchi A and Murata N, Lipid and fatty acid composition in the red alga *Porphyra yezoensis*. *Jpn. J. Phycol.*, 34, 94-100 (1986).
- 4) Kuronuma K, Mitsuzawa H, Takeda K, Nishitani C, Chan ED, Kuroki Y, Nakamura M and Voelker DR, Anionic Pulmonary Surfactant Phospholipids Inhibit Inflammatory Responses from Alveolar Macrophages and U937 Cells by Binding the Lipopolysaccharide-interacting Proteins CD14 and MD-2. *J. Biol. Chem.*, 284, 25488-25500 (2009).
- 5) Kandasamy P, Zarini S, Chan ED, Leslie CC, Murphy RC and Voelker DR, Pulmonary Surfactant Phosphatidylglycerol Inhibits Mycoplasma pneumoniae-stimulated Eicosanoid Production from Human and Mouse Macrophages. *J. Biol. Chem.*, 286, 7841-7853 (2011).
- 6) 寺田英敏, 早川禎宏, 三上博久, 蒸発光散乱検出器の有効的な使い方, *Chromatography*, 32(3), 141-152 (2011).