報 文

1,2-ジアシルグリセロール位置異性体のエレクトロスプレー イオン化質量分析

橋 立 毅¹, 板 橋 豊^{®1}

Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Regioisomeric 1,2-Diacylglycerols

Tsuyoshi HASHIDATE¹ and Yutaka ITABASHI¹

¹ Laboratory of Bioresources Chemistry, Graduate school of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1, Minato-machi, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611

(Received 19 April 2005, Accepted 4 July 2005)

We investigated the identification of regioisomers (reverse isomers) of 1,2-diacylglycerols by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The reverse isomers of diacylglycerols with various pairs of saturated and unsaturated acyl groups, which were prepared by partial Grignard degradation of the corresponding triacylglycerols, were derivatized into 3,5-dinitrophenylurethanes (DNPU), 3,5-dinitrobenzoates, nicotines, 1-anthrylurethanes and 2-anthrylurethanes. They were then subjected to positive and negative ESI-MS using an ion-trap mass spectrometer. All of the derivatives employed gave prominent molecular related ions, $[M-H]^-$ and $[M+Na]^+$, in negative and positive ion modes, respectively, but no product ions related to the constituent fatty acids. In the ESI-MS/MS of the $[M-H]^-$ molecules, only the DNPU derivatives gave carboxylate $[RCOO]^-$ ions. The $[R^2COO]^-$ ions derived from the *sn*-2 position of pairs of the reverse isomers of saturate/monoenoate (or dienoate) were more abundant than those from the *sn*-1 position, showing possible discrimination between the reverse isomers, while pairs of the reverse isomers containing polyunsaturated fatty acids, such as arachidonic and docosahexaenoic acids, were not discriminated on MS/MS. The mechanism leading to the formation of the carboxylate ions is discussed. The present study demonstrates that negative ESI-MS/MS would be useful for assigning diacylglycerol reverse isomers as DUPU derivatives.

Keywords : 1,2-diacylglycerol; regioisomer; reverse isomer; electrospray ionization mass spectrometry; 3,5-dinitrophenylurethane.

1 緒 言

1,2-ジアシル-*sn*-グリセロール (1,2-DAG) はトリアシルグリセロール (TAG) やリン脂質などグリセロ脂質の代謝中間体として、また、プロテインキナーゼ C を活性化させるセカンドメッセンジャー分子として生体において重要な役割を果たしている^{1)~3)}。

生物由来 1,2-DAG は脂肪酸の組み合わせの異なる種々

の分子種から構成されているため、組成は極めて複雑である。多数の分子種の中で、*sn*-1 位 (又は *sn*-3 位) と *sn*-2 位の脂肪酸が入り替わった位置異性体は reverse isomers といわれるが (Fig. 1), この位置異性体の分離分析はクロマトグラフィーの発展した今日であっても難しく、これまで異性体の生体での分布や異性体間の生理機能の差異はほとんど明らかにされていない。このため、古くから両異性体を区別して分析する簡便な方法の開発が望まれてきた。著者らはこの問題を解決するために、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とガスクロマトグラフィー (GC)

¹ 北海道大学大学院水産科学研究院海洋応用生命科学部門: 041-8611 北海道函館市港町 3-1-1

Fig. 1 Structures of 1,2-diacylglycerol regioisomers (reverse isomers, $\text{R}_1 \neq \text{R}_2$) and their derivatives

の種々の手法を検討し、分析条件の最適化を試みた⁴⁾。その結果、2つの構成脂肪酸の炭素数と不飽和度が大きく異なる場合、例えば、パルミチン酸 (16:0) (*sn*-1 位)/ドコサヘキサエン酸 (22:6) (*sn*-2 位) と 22:6 (*sn*-1 位)/16:0 (*sn*-2 位) 及び酢酸 (2:0)/16:0 と 16:0/2:0 などの位置異性体は逆相 HPLC で完全に分離されるが、その差が小さくなるにつれて分離は徐々に低下し、16:0/18:0 (ステアリン酸) と 18:0/16:0 及び 18:1 (オレイン酸)/18:2 (リノール酸) と 18:2/18:1 などは分離困難であることが明らかになった。分離の限界は2つの脂肪酸の鎖長差が6又は不飽和度の差が3であった。このことは、16:0 や 18:2 を多く含む陸上動植物由来の 1,2-DAG 中に両異性体が混在した場合、その同定は困難であることを示唆する。

近年、グリセロ脂質の分子種分析に質量分析法 (MS) が広く利用されているが、1,2-DAG の位置異性体の MS についてはほとんど何も検討されていない。このため、本研究では飽和及び不飽和脂肪酸を含む 1,2-DAG の位置異性体識別のためのエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) を検討し、その特徴を明らかにした。

2 実験

2.1 試薬

以下の試薬を用いた。1,2-ジパルミトイル-*rac*-グリセロール、1-モノパルミトイル-*rac*-グリセロール、18:1、18:2 (Sigma 製); 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP), 3,5-ジニトロ塩化ベンゾイル、無水硫酸ナトリウム、 N,N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (ナカライテスク製); 3 M 臭化エチルマグネシウム、乾燥トリエチルアミン (東京化成製); ニコチン酸、乾燥クロロホルム、乾

燥エーテル、乾燥トルエン、乾燥ピリジン、酢酸 (関東化学製); アラキドン酸 (20:4), 22:6 (日本化学飼料製)。3,5-ジニトロフェニルイソシアネート (DNPI) と 1(2)-アンスリルイソシアネートは、対応するアミンとトリホスゲン をアセトニトリル中で反応させて合成したものを使用した⁵⁾。

2.2 TAG の合成

乾燥クロロホルム (3 ml) に溶解した 1,2-ジパルミトイル-*rac*-グリセロール又は 1-モノパルミトイル-*rac*-グリセロール (0.045 mol) に、脂肪酸 (0.1 mol), DMAP (0.02 mol) 及び DCC (0.12 mol) を加え、かくはんしながら 20°C で約 20 時間反応させた⁴⁾。反応終了後、窒素気流下で溶媒を除去し、少量のヘキサンを加えた。この反応混合物からシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) {シリカゲル GF (Merck 製), 20 × 20 cm, 厚さ 0.5 mm} を用いて TAG を単離した。展開溶媒にはヘキサン: ジエチルエーテル (70:30, v/v) を使用した。展開後、0.2% 2',7'-ジクロロフルオレセイン-エタノール試薬を噴霧して紫外 (UV) 照射下で分離成分を検出し、ジエチルエーテルを用いて TAG を抽出した。

2.3 Grignard 分解

1,2-DAG は TAG を部分的に Grignard 分解して得た⁶⁾。すなわち、乾燥エーテル (1 ml) に溶解した TAG (10 mg) に、1 M の臭化エチルマグネシウム (0.25 ml) を加えて 25 秒間かくはんしながら反応させた。その後、乾燥エーテル: 酢酸 (9:1, v/v) (1 ml) を加えて 30 秒間かくはんすることにより反応を停止させた。反応混合物に乾燥エーテル (2.5 ml) と水 (0.5 ml) を加えて 2 分間かくはんし

Table 1 Positive ESI-MS conditions of 1,2-diacylglycerols and their derivatives

Parameter	DAG	Derivative ^{a)}			
		DNB	Nicotinate	1- and 2-AU	DNPU
Capillary temp. /°C	250	200	250	200	200
Spray voltage/kV	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
Sheath gas flow rate/arb.	30	30	30	30	30
Aux gas flow rate/arb.	0	0	0	0	0
Capillary voltage/V	46	9	25	3	28
Tube lens offset/V	45	55	5	55	60
Relative collision energy, %	37	36	40	42	38

a) DAG: 1,2-diacylglycerols; DNB: 3,5-dinitrophenyl benzoates; AU: anthrylurethanes; DNPU: 3,5-dinitrophenylurethanes

た後、水層を除去し、エーテル層を2% 炭酸水素ナトリウム (0.25 ml) で1回、水 (0.25 ml) で2回洗浄した。その後、適量の無水硫酸ナトリウム加えて脱水し、窒素気流下で溶媒を除去して1,2-DAGを含む反応混合物を得た。

2・4 誘導体の調製

2・4・1 3,5-ジニトロベンゾエート (DNB) TAG (10 mg) の Grignard 分解物を3,5-ジニトロ塩化ベンゾイルの乾燥ピリジン溶液 (20 mg/5 ml) に溶解し、室温で約16時間反応させた。その後、0.1 M の塩酸 (2 ml) を加え、ヘキサン (2 ml) で3回抽出した。得られた生成物を0.1 M 塩酸 (2 ml) で3回、続いて0.1 M 炭酸水素ナトリウム (2 ml), そして1 M 塩化ナトリウム (2 ml) を用いて洗浄した⁷⁾。洗浄後、窒素気流下で溶媒を除去し、2・2に記載したTLCを用いて1,2-DAGのDNB誘導体を精製した。展開溶媒にはヘキサン:ジクロロメタン:エタノール (40:10:3, v/v/v) を使用した。展開後、UV照射下で誘導体を検出し (R_f 値: 0.45), ジエチルエーテルを用いて抽出した。

2・4・2 ニコチネート TAG (10 mg) の Grignard 分解物、ニコチン酸 (10 mg) 及び DMAP (2 mg) をジクロロメタン (3 ml) に溶解した後、DCC (20 mg) を加え、0°C で5分間保った。その後、室温 (20°C) で16時間反応させた⁸⁾。反応後、窒素気流下で溶媒を除去し、ヘキサンで抽出した。生成したニコチネート誘導体を2・4・1と同様にTLCを用いて精製した (R_f 値: 0.37)。

2・4・3 1(2)-アンスリルウレタン (AU) TAG (10 mg) の Grignard 分解物を乾燥トルエン (1 ml) に溶解した後、1(2)-アンスリルイソシアネート (5 mg) と乾燥トリエチルアミン (50 μ l) を加え、暗所で3時間室温反応させた⁹⁾。反応終了後、窒素気流下で溶媒を除去した。生成した1-及び2-AU誘導体を2・4・1と同様にTLCを用いて精製した (R_f 値: 1-AU, 0.23; 2-AU, 0.27)。

2・4・4 3,5-ジニトロフェニルウレタン (DNPU) TAG (10 mg) の Grignard 分解物に、乾燥トルエン (0.5 ml) に溶かした DNPI (5 mg) と乾燥ピリジン (20 μ l)

を加え暗所で1時間反応させた¹⁰⁾。反応終了後、窒素気流下で溶媒を除去した。その後、少量のジクロロメタンに反応混合物を溶かし、2・4・1に記したTLCを用いて生成したDNPU誘導体を精製した (R_f 値: 0.26)。

2・4・5 位置異性体の単離 2・4・1から2・4・4で得られた1,2-DAGの各誘導体は、目的の異性体以外の1,2-DAGを含む。このため、逆相HPLCを用いて目的成分を単離精製した。すなわち、上で得られた誘導体約50 μ gをODSカラム (J'sphere ODS-H80, 150 $\times$ 4.6 mm i.d., 4 μ m, YMC製) に数回注入し、分取HPLCを行った。移動相組成 (アセトニトリル:2-プロパノール) は、DNPU (90:10, v/v), DNB (70:30, v/v), 1-及び2-AU (60:40, v/v), ニコチネート (60:40, v/v) であった。移動相流量はニコチネートが0.4 ml/min, その他の誘導体は0.5 ml/minであった。ピーク成分の検出にはUV検出器を使用し、ニコチネートは263 nmで、その他の誘導体は254 nmで検出した。

2・5 ESI-MS

ESI-MS分析には、Finnigan製のイオントラップ型質量分析計LCQを用いた。2-プロパノールに溶解した試料をインフュージョン法によりESIイオン源に導入し (3 μ l/min), 正及び負の両イオンモードでスペクトルを測定した。Table 1に、正イオンモードの測定条件を示す。負イオンスペクトルはキャピラリー電圧とチューブレンズオフセット電圧の符号を負に切り替えて測定した。

3 結 果

3・1 1,2-DAGのMS分析

はじめに、誘導体に変換しない1,2-DAG異性体のMSを測定した。Fig. 2に、1-パルミトイル-2-オレオイル-*rac*-グリセロール (16:0/18:1) とその位置異性体 (18:1/16:0) の正イオンESI-MSスペクトルを示す。両異性体について同一の $[M + Na]^+$ (m/z 618) イオンが得られたが、いずれからも構成脂肪酸由来のフラグメントイオンは得られなかった。そこで、 $[M + Na]^+$ をプリカーサーイオンと

Fig. 2 Positive ESI-MS and MS/MS spectra of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*rac*-glycerol (16 : 0/18 : 1) (left panels) and its reverse isomer (18 : 1/16 : 0) (right panels)

The isomers were prepared by hydrolysis of the corresponding phosphatidylcholines using phospholipase C⁸⁾.

して MS/MS 分析したところ、両異性体から $[M-R^1COO]^+$ (m/z 339), $[M-R^2COO]^+$ (m/z 313), $[M-H+Na-R^1COO]^+$ (m/z 361) 及び $[M-H+Na-R^2COO]^+$ (m/z 335) の脂肪酸関連のプロダクトイオンが得られた。両異性体から得られた $[M-R^1COO]^+$ イオンの強度を 100% としたとき、 $[M-R^2COO]^+$ の強度は 16 : 0/18 : 1 については 50%, 18 : 1/16 : 0 では 20% であった。また、 $[M-H+Na-R^1COO]^+$ の強度は、16 : 0/18 : 1 については 76%, 18 : 1/16 : 0 では 25% であった。 $[M-H+Na-R^2COO]^+$ の強度は、16 : 0/18 : 1 については 21%, 18 : 1/16 : 0 では 20% であった (Fig. 2)。これらの結果から、*sn*-1(3) 位のアシル基が *sn*-2 位のそれよりも脱離しやすいことが明らかとなった。なお、負イオン MS 分析では試料に由来するイオンは得られなかった。

3・2 DNB 誘導体の MS 分析

Fig. 3 に、16 : 0/18 : 1 とその位置異性体 (18 : 1/16 : 0) の DNB 誘導体の正イオン ESI-MS スペクトルを示す。両異性体について同一の $[M+Na]^+$ イオン (m/z 811) が得られたが、構成脂肪酸由来のフラグメントイオンは観察されなかった。そこで、 $[M+Na]^+$ をプリカーサーイオンとして MS/MS 分析したところ、誘導体部位の脱離した $[M-DNB]^+$ (m/z 577) イオンが得られたが、ここでも構成脂肪酸由来のイオンは生成しなかった。そこで、更に $[M-$

DNB]⁺ をプリカーサーイオンとして MS/MS/MS 分析したところ、両異性体から $[R^1CO]^+$ (m/z 239) と $[R^2CO]^+$ (m/z 265) の 2 つの構成脂肪酸由来のプロダクトイオンが得られた (Table 2)。しかし、結合位置による強度比に差は見られず、異性体間の区別は困難であった。なお、負イオン MS 分析では、試料に由来するイオンは得られなかった。

3・3 ニコチネート誘導体の MS 分析

Fig. 4 に、16 : 0/18 : 1 とその位置異性体 (18 : 1/16 : 0) のニコチネート誘導体の正イオン ESI-MS スペクトルを示す。両異性体について同一の $[M+Na]^+$ イオン (m/z 723) が得られたが、構成脂肪酸由来のフラグメントイオンは観察されなかった。そこで、 $[M+Na]^+$ をプリカーサーイオンとして MS/MS 分析したところ、誘導体部位の脱離した $[M-nicotinate]^+$ (m/z 577) のフラグメントイオンが得られた。しかし、構成脂肪酸由来のフラグメントイオンは生成しなかった。負イオン MS 分析では、試料に由来するイオンは観察されなかった。

3・4 1-AU 及び 2-AU 誘導体の MS 分析

Fig. 5 に、16 : 0/18 : 1 とその位置異性体 (18 : 1/16 : 0) の 2-AU 誘導体の正イオン ESI-MS スペクトルを示す。両異性体について同一の $[M+Na]^+$ イオン (m/z 837) が得

Fig. 3 Positive ESI-MS, MS/MS and MS/MS/MS spectra of the 3,5-dinitrobenzoates (DNB) of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*rac*-glycerol (16 : 0/18 : 1) (left panels) and its reverse isomer (18 : 1/16 : 0) (right panels)

られたが, 構成脂肪酸由来のフラグメントイオンは得られなかった. そこで, $[M+Na]^+$ をプリカーサーイオンとして MS/MS 分析したところ, 誘導体部位の脱離した $[M-AU]^+$ (m/z 577) とこれにナトリウムが付加した $[M-AU-2H+Na]^+$ (m/z 599) のプロダクトイオンが得られた. しかし, ここでも構成脂肪酸由来のイオンは観察されなかった. 1-AU についても 2-AU と同様の結果が得られた. なお, 負イオン MS 分析では, 試料に由来するイオンは得られなかった.

3.5 DNPU 誘導体の MS 分析

Fig. 6 に, 16:0/18:1 とその位置異性体 (18:1/16:0) の DNPU 誘導体の負イオン ESI-MS スペクトルを示す. 両異性体について同一の $[M-H]^-$ イオン (m/z 803) が得られたが, 構成脂肪酸由来のフラグメントイオンは得られなかった. そこで, 16:0/18:1 の $[M-H]^-$ をプリカーサーイオンとして MS/MS 分析したところ, *sn*-2 位の脂肪酸が脱離した m/z 281 ($[R^2COO]^-$) と *sn*-1(3) 位の脂肪酸が脱離した m/z 255 ($[R^1COO]^-$) のプロダクトイオンが 100:65 の強度比で得られた. 同様に 18:1/16:0 の $[M-H]^-$ を MS/MS 分析したところ, *sn*-2 位の脂肪酸が脱離した m/z 255 ($[R^2COO]^-$) と *sn*-1(3) 位の脂肪酸が脱離した m/z 281 ($[R^1COO]^-$) のプロダクトイオンが 100:26 の強度比で得られた. すなわち, 両異性体ともに *sn*-1(3) 位よりも *sn*-2 位のアシル基のほうが脱離しやすいことが明

らかとなった (Table 2). これらの結果は, 分子量関連イオンと構成脂肪酸由来のプロダクトイオンの強度差から, 16:0/18:1 と 18:1/16:0 を区別して同定できることを示す. MS/MS での $[R^1COO]^-$ と $[R^2COO]^-$ のイオン強度は共に 20% 以下であったが (Fig. 6), 繰り返し分析によっても常に同様のスペクトルが観察され, 強度比の再現性は良好であった.

次に, 脂肪酸を 18:1 から 18:2 に変換し, 上と同様の実験を行った (スペクトルは省略する). *sn*-1(3) 位から脱離した $[R^1COO]^-$ (m/z 255) イオンと *sn*-2 位から脱離した $[R^2COO]^-$ (m/z 279) イオンの強度 (%) を比較した結果, 16:0/18:2 については *sn*-1(3) : *sn*-2 = 19 : 100 であり, 18:2/16:0 については *sn*-1(3) : *sn*-2 = 20 : 100 であり (Table 2), 18:1 を含む場合と同様に *sn*-2 位のアシル基が *sn*-1(3) 位のそれよりも脱離しやすいことが認められた. しかしながら, 20:4 や 22:6 のような高度不飽和脂肪酸を含む異性体の場合, これら脂肪酸に由来する $[RCOO]^-$ イオンの強度は常に 100% となり (Table 2), その結合位置にかかわらず脱離しやすい傾向が認められた (Fig. 7). このため高度不飽和を含む位置異性体を MS によって区別することは困難であった.

一方, 16:0/18:1 とその位置異性体 (18:1/16:0) の DNPU 誘導体の正イオン MS 分析では, 強い分子量関連イオン ($[M+Na]^+$) が得られたが, 構成脂肪酸由来のフラグメントイオンは得られなかった. $[M+Na]^+$ イオンの

Table 2 Molecular related and product ions of the 1,2-diacylglycerol derivatives obtained by negative and positive ESI-MS

Derivative	MS		MS/MS		MS/MS/MS		Relative intensity, %	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive		[R ¹ COO] ^{−a)}	[R ² COO] ^{−b)}
3,5-Dinitrobenzoate (DNB)	[M + Na] ⁺	— ^{c)}	[M-DNB] ⁺	—	[R ¹ CO] ^{+,a)} , [R ² CO] ^{+,b)}		—	—
Nicotinate	[M + Na] ⁺	—	[M-Nicotinate] ⁺	—			—	—
1-Anthrylurethane (AU)	[M + Na] ⁺	—	[M-AU-2H + Na] ⁺	—			—	—
			[M-AU] ⁺					
2-Anthrylurethane (AU)	[M + Na] ⁺	—	[M-AU-2H + Na] ⁺	—			—	—
			[M-AU] ⁺					
3,5-Dinitrophenylurethane (DNPU)								
<i>sn</i> -1(3)/ <i>sn</i> -2								
16: 0/18: 1	[M + Na] ⁺	[M-H] [−]	[M-DNPU] ⁺	[R ¹ COO] [−] , [R ² COO] [−]	[R ¹ CO] ⁺ , [R ² CO] ⁺	65	100	
18: 1/16: 0	[M + Na] ⁺	[M-H] [−]	[M-DNPU] ⁺	[R ¹ COO] [−] , [R ² COO] [−]	[R ¹ CO] ⁺ , [R ² CO] ⁺	26	100	
16: 0/18: 2	[M + Na] ⁺	[M-H] [−]	[M-DNPU] ⁺	[R ¹ COO] [−] , [R ² COO] [−]	[R ¹ CO] ⁺ , [R ² CO] ⁺	19	100	
18: 2/16: 0	[M + Na] ⁺	[M-H] [−]	[M-DNPU] ⁺	[R ¹ COO] [−] , [R ² COO] [−]	[R ¹ CO] ⁺ , [R ² CO] ⁺	20	100	
16: 0/22: 6	[M + Na] ⁺	[M-H] [−]	[M-DNPU] ⁺	[R ² COO] [−]	—	—	100	
22: 6/16: 0	[M + Na] ⁺	[M-H] [−]	[M-DNPU] ⁺	[R ¹ COO] [−] , [R ² COO] [−]	—	100	15	
16: 0/20: 4	[M + Na] ⁺	[M-H] [−]	[M-DNPU] ⁺	[R ² COO] [−]	—	—	100	
20: 4/16: 0	[M + Na] ⁺	[M-H] [−]	[M-DNPU] ⁺	[R ¹ COO] [−] , [R ² COO] [−]	—	100	4	

a) Derived from the *sn*-1(3) position; b) Derived from the *sn*-2 position; c) —, Not observed

MS/MS 分析では、誘導体部の脱離した $[M-DNPU]^+$ イオンが生成したが、構成脂肪酸由来のプロダクトイオンは観察されなかった。そこで、 $[M-DNPU]^+$ をプリカーサーイオンとして MS/MS/MS 分析したところ、それぞれから $[R^1CO]^+$ と $[R^2CO]^+$ の 2 つの構成脂肪酸由来のプロダクトイオンが得られた。しかし、結合位置による強度比に差は見られず、正イオン MS 分析では、結合位置による位置異性体の区別は困難であった。

本研究では、低極性化合物の構造解析に有効とされる大気圧化学イオン化 (APCI) 法についても検討した (実験条件の詳細は省略する)。DNPU 誘導体を APCI-MS 法で測定した結果、負イオンモードでは ESI-MS と同様に強い $[M-H]^-$ イオンが得られたが、脂肪酸由来のフラグメントイオンは検出されなかった。 $[M-H]^-$ をプリカーサーイオンとする APCI-MS/MS では、ESI-MS/MS と同様に弱いプロダクトイオン ($[R^1COO]^-$ と $[R^2COO]^-$) が得られ、その結合位置の違いによる強度差は ESI-MS/MS と同じ傾向を示した。一方、正イオン APCI-MS では強い $[M+H]^+$ が得られ、その MS/MS では $[RCO]^+$ と $[M-RCO]^+$ のプロダクトイオンが検出されたが、ESI と同様にアシル基の結合位置による強度差は認められなかった。これらの結果から、負イオン APCI-MS/MS は負イオン ESI-MS/MS と同様に 1,2-DAG の位置異性体の同定に有用であることが認められた。しかし、インフュージョン法で試料を APCI イオン源に導入し、安定したイオンを検出するためには、ESI-MS の 7~8 倍量 (20~25 μ l/min) の試料量を必要としたため、本研究では ESI-MS 法を使用した。

4 考 察

1,2-DAG (遊離型) の ESI-MS/MS 分析では構成脂肪酸由来の $[M-RCOO]^+$ と $[M+Na-RCOO]^+$ が得られ、その強度は $[M-R^1COO]^+ > [M-R^2COO]^+$ 及び $[M+Na-R^1COO]^+ > [M+Na-R^2COO]^+$ であり、*sn*-1(3) 位のアシル基が *sn*-2 位のそれよりも脱離しやすいことが認められた (Fig. 2)。この結果は、誘導体に変換した場合も両異性体の識別が可能であることを示唆した。1,2-DAG は UV 検出や蛍光検出に有効な官能基をもたず、また、熱力学的により安定な 1,3-DAG に異性化しやすいために、クロマトグラフィーでは通常誘導体に変換して分析される¹¹⁾。本研究で調製した誘導体は、いずれも 1,2-DAG の HPLC 分析に使用されているものである^{9)~12)}。

DNB 誘導体では、結合位置による構成脂肪酸由来のプロダクトイオンの強度に違いは見られず、また、1(2)-AU とニコチネート誘導体からは脂肪酸由来のイオンは検出されなかった。DNPU 誘導体の負イオン ESI-MS/MS において、構成脂肪酸が 16:0 と 18:1 (又は 18:2) の時は $[RCOO]^-$ の強度に違いが見られ、*sn*-2 位の脂肪酸が脱離

Fig. 4 Positive ESI-MS and MS/MS spectra of the nicotinates of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*rac*-glycerol (16 : 0/18 : 1) (left panels) and its reverse isomer (18 : 1/16 : 0) (right panels)

Fig. 5 Positive ESI-MS and MS/MS spectra of the 2-anthrylurethanes (AU) of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*rac*-glycerol (16 : 0/18 : 1) (left panels) and its reverse isomer (18 : 1/16 : 0) (right panels)

しやすことが明らかになった。しかし、20 : 4 や 22 : 6 のような高度不飽和脂肪酸を含む位置異性体では、これら脂肪酸は結合位置にかかわらず脱離しやすい傾向が認められた (Table 2)。Murphy¹³⁾ 及び Vernooij ら¹⁴⁾ は、リン脂

質からカルボキシレートアニオン ($[\text{RCOO}]^-$) が生成する MS の機構について考察し、リン酸基のアニオン部位の C-1 (*sn*-1 位) 又は C-2 (*sn*-2 位) への攻撃が開裂の最初の段階であることを推測している。本研究で検討した

Fig. 6 Negative ESI-MS and MS/MS spectra of the 3,5-dinitrophenylurethanes (DNPU) of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*rac*-glycerol (16 : 0/18 : 1) (left panels) and its reverse isomer (18 : 1/16 : 0) (right panels)

Fig. 7 Negative ESI-MS and MS/MS spectra of the 3,5-dinitrophenylurethanes (DNPU) of 1-palmitoyl-2-docosa-hexaenoyl-*rac*-glycerol (16 : 0/22 : 6) (left panels) and its reverse isomer (22 : 6/16 : 0) (right panels)

DNPU 誘導体の場合、 $[RCOO]^-$ の生成する過程は次のように推定される (Fig. 8). 初めに、誘導体部分のアミド結合のNHからプロトンが脱離して $[M-H]^-$ が生成する。次に電子の移動によって生成したカルボキシル基の負電荷

の攻撃によって、6員環 (a) 又は5員環 (b) の遷移状態を経て $[RCOO]^-$ イオンが生成すると考えられる。本実験の結果から、アシル基の不飽和度が小さい場合は (b) が起こりやすいのは明らかであるが、アシル基の不飽和度が

Fig. 8 Mechanism leading to the formation of the *sn*-1(3) and *sn*-2-carboxylate ions derived from the 3,5-dinitrophenylurethanes of 1,2-diacylglycerols by negative ESI-MS

高くなるにつれて, (a) と (b) の差はなくなり, 両方のコースから $[\text{RCOO}]^-$ イオンが生成すると考えられる。

16:0/18:1 と 18:1/16:0 など, 2つの類似した脂肪酸を含む (炭素数と二重結合数の差の小さい) 異性体は逆相 HPLC では分離されないが, 銀イオン HPLC では再現性に問題があるものの, ある程度の分離は得られる⁴⁾。したがって, 試料がこのような異性体の混合物の場合, 逆相 HPLC/MS で両者を区別することは難しいが, 銀イオン HPLC/MS では可能であると思われる。一方, 16:0/22:6 と 22:6/16:0 のように2つの脂肪酸が大きく異なる異性体は MS では識別されないが, 逆相 HPLC では良好に分離される⁴⁾。したがって, この場合は逆相 HPLC/MS が両異性体の識別に役立つと考えられる¹⁵⁾。

以上, 本研究では 1,2-DAG の位置異性体 (reverse isomers) の ESI-MS によるフラグメンテーションを精査し, DNPU 誘導体の負イオン ESI-MS/MS が異性体の同定に有用であることを明らかにした。

文 献

- 1) Y. Nishizuka: *Nature*, **308**, 693 (1984).
- 2) R. Lehner, A. Kuksis: *Prog. Lipid Res.*, **35**, 169 (1996).

- 3) G. M. Felix, A. Alicia: *Prog. Lipid Res.*, **38**, 1 (1999).
- 4) Y. Itabashi, J. J. Myher, A. Kuksis: *J. Chromatogr. A*, **893**, 261 (2000).
- 5) H. Okabe, Y. Itabashi, T. Ota, A. Kuksis: *J. Chromatogr. A*, **829**, 87 (1998).
- 6) J. J. Myher, A. Kuksis: *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **62**, 352 (1984).
- 7) H. Takamura, H. Narita, R. Urade, M. Kito: *Lipids*, **21**, 356 (1986).
- 8) G. Dobson, Y. Itabashi, W. W. Christie, W. Robertson: *Chem. Phys. Lipids*, **97**, 27 (1998).
- 9) H. Okabe, Y. Itabashi, T. Ota: *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **48**, 559 (1999).
- 10) Y. Itabashi, A. Kuksis, J. J. Myher: *J. Lipid Res.*, **31**, 2119 (1990).
- 11) 板橋 豊: “油脂・脂質の基礎と応用”, p. 144, (2005), (日本油化学会).
- 12) Y. Itabashi: “*HPLC of Acyl Lipids*”, Edited by J.-T. Lin, T. A. McKeon, Chapter 7, p. 167 (2005), (HNB Publishing, New York).
- 13) R. C. Murphy: “*Handbook of Lipid Research Volume 7*”, Edited by F. Snyder, p. 213 (1993), (Plenum Press, New York).
- 14) E. A. A. M. Vernooij, J. F. H. M. Brouwers, J. J. K.-van den Bosch, D. J. A. Crommelin: *J. Sep. Sci.*, **25**, 285 (2002).
- 15) 板橋 豊: 化学と生物, **43**, 338 (2005).

要 旨

1,2-ジアシルグリセロール (1,2-DAG) の位置異性体 (reverse isomers) を同定するためのエレクトロスプレーイオン化質量分析法を検討し、その特徴を明らかにした。不飽和度の異なる種々の異性体をジニトロフェニルウレタン (DNPU)、ジニトロベンゾエート、ニコチネート及びアンスリルウレタンへ変換してスペクトルを測定した。その結果、MS では、いずれの誘導体からも強い分子量関連イオン ($[M-H]^-$ 又は $[M+Na]^+$) が得られたが、構成脂肪酸由来のイオンは検出されなかった。一方、MS/MS では、DNPU から $[RCOO]^-$ イオンが検出された。16:0 や 18:1 など不飽和度の小さな脂肪酸を含む位置異性体の *sn*-2 位由来の $[R^2COO]^-$ の強度は *sn*-1 (3) 位由来の $[R^1COO]^-$ よりも大きく、両異性体の識別が可能であった。一方、高度不飽和脂肪酸を含む異性体では、この差は小さく、20:4 や 22:6 は結合位置にかかわらず脱離しやすいことが認められた。 $[RCOO]^-$ イオンの生成機構について考察した。