MS/MS, HPLC-MS/MS, キラル HPLC-MS/MS を活用した 脂質過酸化機構の評価

Evaluation of Lipid Peroxidation Process Using MS/MS, HPLC-MS/MS, and Chiral Stationary Phase-HPLC-MS/MS

伊藤 隼哉

東北大学大学院農学研究科
機能分子解析学分野
〒 981-8555
仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

Junya ITO
Food and Biodynamic Chemistry
Laboratory Graduate School of
Agricultural Science, Tohoku University
1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi,
Aoba-ku, SENDAI, 981-8555, Japan

加藤 俊治

東北大学大学院農学研究科
機能分子解析学分野
〒 981-8555
仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

Shunji KATO
Food and Biodynamic Chemistry
Laboratory Graduate School of
Agricultural Science, Tohoku University
1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi,
Aoba-ku, SENDAI, 981-8555, Japan

仲川 清隆

東北大学大学院農学研究科
機能分子解析学分野
〒 981-8555
仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

Kiyotaka NAKAGAWA
Food and Biodynamic Chemistry
Laboratory Graduate School of
Agricultural Science, Tohoku University
1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi,
Aoba-ku, SENDAI, 981-8555, Japan

宮澤 陽夫

東北大学大学院農学研究科
機能分子解析学分野
〒 981-8555
仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

Teruo MIYAZAWA
Food and Biodynamic Chemistry
Laboratory Graduate School of
Agricultural Science, Tohoku University
1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi,
Aoba-ku, SENDAI, 981-8555, Japan

論文要旨: 脂質は生体や食品で重要な役割を担う一方で、様々な酸化機構（酵素酸化、自動酸化、光酸化）を経て過酸化脂質となる。脂質の過酸化は、生体老化や疾患、食品劣化に密接に関与していると考えられているが、生体や食品における実際の酸化機構を明らかにできる分析法は確立されておらず、未だ不明な点が多いのが現状である。この問題を解決するために、近年注目されているのが過酸化脂質の異性体解析である。過酸化脂質は酸化機構ごとに特徴的な異性体となることから、詳細な異性体解析により、生体や食品における脂質過酸化機構の推定ができると期待される。本稿では、著者らが開発した、脂肪酸ヒドロペルオキシドとリン脂質ヒドロペルオキシドの解析方法を中心に、MS/MS や HPLC-MS/MS, キラル HPLC-MS/MS を用いた過酸化脂質の異性体解析に関して紹介する。

Abstract: Lipid is one of the important molecules in vivo and in foods, whereas the molecule is easily converted to lipid hydroperoxide by several oxidation processes (i.e., enzymatic oxidation, auto-oxidation and photo-oxidation). The resultant lipid hydroperoxide is believed to be closely involved in aging, diseases and food deterioration. However, there is still little information on the lipid peroxidation mechanism in vivo and in foods, mainly due to analytical limitation. To clear the issue, analysis of lipid hydroperoxide isomers has recently received a lot of attention, because specific lipid hydroperoxide isomers are generated by each oxidation process (enzymatic oxidation, auto-oxidation and photo-oxidation). Here we review the recent literature on the MS/MS, HPLC-MS/MS, and chiral stationary phase-MS/MS analysis of isomers of lipid hydroperoxide such as fatty acid hydroperoxide and phospholipid hydroperoxide.

Key words: lipid hydroperoxide, MS/MS, HPLC-MS/MS, chiral stationary phase-HPLC-MS/MS

1 はじめに

脂質は生体や食品に様々な形で存在し、生体膜の構成、生理機能に関わるシグナルの伝達、エネルギーの貯蔵など様々な役割を担っている^{1, 2)}。例えば、リン脂質 (PC) は生体内における細胞や赤血球、リポタンパク質などの生体膜の主要成分であり、リポタンパク質にはトリアシルグリセロール (TG) やコレステロールエステル (CE) などが内包されている^{3, 4)}。血中の遊離脂肪酸 (FA) はエネルギー源として利用され、余剰なエネルギーは TG の形で貯蔵される⁵⁾。また、食品中では食用油脂をはじめ、生鮮食品や加工食品を含めたそれぞれの食品に特徴的な脂質分子が存在し、食品の味や栄養素、香りに大きな影響を与えている⁶⁾。このように、脂質は生体や食品で重要な働きを担う一方で、脂質分子が有する不飽和脂肪酸が酸化されると過酸化脂質へと変換される (Fig. 1)。

過酸化脂質は、生体では老化や疾患の発症や進行⁷⁾、食品では食味の低下や栄養素の減衰、不快臭の原因になると考えられてきた⁸⁾。しかし、従来、生体や食品に含

まれる微量な過酸化脂質を測定することは困難であった。多くの研究者が過酸化脂質 (脂質ヒドロペルオキシド) の分析に取り組み^{3, 4, 9, 10)}、著者らは化学発光 HPLC 法 (CL-HPLC 法) の開発により、生体や食品における過酸化脂質の測定を可能とし¹¹⁾、過酸化脂質が生体や食品に与える影響を検討してきた¹²⁻¹⁴⁾。例えば、脂質代謝異常者の血中では膜リン脂質ヒドロペルオキシド (PCOOH) が健常者と比較して高値となること¹³⁾、食用油脂 (植物油) の酸化によりトリアシルグリセロールヒドロペルオキシド (TGOOH) が生じることを報告した¹⁴⁾。他の研究者からも CL-HPLC あるいは他の測定法を用いて多くの報告がなされ、例えば、Zhang らは、げっ歯類を用いた研究で、加齢に伴い脳線条体における過酸化リン脂質量が増加することを報告している¹⁵⁾。また、Takayama らは虚血再灌流したラットの肝臓で、虚血時間の延長に伴って PCOOH が増加することを示している¹⁶⁾。Karsten らは蛍光-サイズ排除 HPLC を用いて、マヨネーズの TGOOH やコレステロールエステルヒドロペルオキシド (CEOOH) を測定し、EDTA や

Fig. 1 種々の脂質ヒドロペルオキシド

没食子酸といった抗酸化物質の添加によりこれらの濃度が低下することを報告している⁶⁾。このように、生体老化や食品劣化に脂質過酸化が密接に関わることが古くから示唆されているが、Fig. 1に示すような種々の過酸化脂質分子の中で、いずれの過酸化脂質分子が生体老化や食品劣化に深く関与するのか、そもそも生体や食品における酸化機構(過酸化脂質がどのように生成・増加するのか)には未だ不明な点が多い。

この解明に向けて、著者や他の幾つかの研究グループが最近注目しているのが、過酸化脂質の異性体解析である¹⁷⁻²¹⁾。脂質は、(1) リポキシゲナーゼをはじめとする酵素によって脂質が過酸化修飾を受ける酵素酸化、(2) 熱や金属イオンなどによる自動酸化(ラジカル酸化)、(3) 光暴露などが原因となる光酸化(一重項酸素酸化)、これらの酸化機構により過酸化脂質へと変換される¹⁷⁻²⁰⁾。そして、それぞれの酸化機構からは特徴的な構造を有する異性体(ヒドロペルオキシ基の結合する炭素原子の位置が異なる「位置異性体」、位置異性体の中で二重結合の形が異なる「*cis-trans* 異性体」)が生成する。リノール酸型PCを例にすると、ラジカル酸化: 9-hydroperoxy-10*E*,12*Z*-octadecadienoyl PC (9-10*E*,12*Z*-HPODE PC), 9-10*E*,12*E*-HPODE PC, 13-9*Z*,11*E*-HPODE PC, 13-9*E*,11*E*-HPODE PC, 光酸化: 9-10*E*,12*Z*-HPODE PC, 10-8*E*,12*Z*-HPODE PC, 12-9*Z*,13*E*-HPODE PC, 13-9*Z*,11*E*-HPODE PC, 酵素酸化: 9-10*E*,12*Z*-HPODE PC (5-リポキシゲナーゼ (5-LOX) から), 13-9*Z*,11*E*-HPODE PC (15-リポキシゲナーゼ (15-LOX) から)、これらがそれぞれの酸化機構から特異的に生じる (Fig. 2)¹⁷⁻²⁰⁾。

したがって、これらの過酸化脂質の異性体を精密に解析できれば、生体内や食品中における脂質過酸化機構の解明に結びつくと期待される¹⁷⁻²⁰⁾。

但し、酵素酸化により生じる 13-9*Z*,11*E*-HPODE PC や 9-10*E*,12*Z*-HPODE PC は自動酸化と光酸化のいずれからも生じ得る (Fig. 2, 3)¹⁷⁻¹⁹⁾。そのため、過酸化脂質の位置異性体や *cis-trans* 異性体解析のみで酵素酸化の関与を正確に評価することは難しい。この酵素酸化の評価には、過酸化脂質分子の立体異性体解析が有効と考えられる。過酸化脂質はヒドロペルオキシ基が結合する炭素原子が不斉中心となるため、*R* 体と *S* 体の立体異性体 (*RS* 異性体) となる (Fig. 3)¹⁷⁻²⁰⁾。酸化機構ごとに立体異性体の比率に着目すると、リポキシゲナーゼによる酵素酸化では *S* 体のみが生じる一方で^{22, 23)}、自動酸化や光酸化では *R* 体と *S* 体が等量に生じる²⁴⁾ (Fig. 3)。このように、酵素酸化に対して自動酸化や光酸化で生じる過酸化脂質の立体異性体の比率は異なり、立体異性体の比率を解析することで、脂質過酸化における酵素酸化の関与が評価できると考えられる。

以上述べてきたように、過酸化脂質分子において、位置異性体、*cis-trans* 異性体、立体異性体 (*RS* 異性体)、これらを精密に解析できれば、生体や食品における過酸化脂質の生成機構の推定に繋がると考えられる。本総説では、著者らの最近の知見を例にしながら、はじめに、種々の脂質ヒドロペルオキシドの構成因子となり、最も基本的な構造を有する脂肪酸ヒドロペルオキシド (FAOOH; Fig. 1) 異性体の MS/MS 解析について述べる。次いで、特に生体老化や疾患と深く関連することが

Fig. 2 酸化機構と異性体
酸化機構ごとに特徴的な異性体が生じる。

Fig. 3 酸化機構と立体異性体の比率

15- リポキシゲナーゼによる酵素酸化では *S* 体が生じ、自動酸化や光酸化からは *R* 体と *S* 体が等量に生じる。

示唆されている PCOOH 異性体の HPLC-MS/MS やキラル HPLC-MS/MS 分析を概説し、生体や食品における脂質過酸化メカニズムの解明に向けた取り組みを紹介する。

2 MS/MSによる脂肪酸ヒドロペルオキシド(FAOOH)の異性体解析

過酸化脂質は、脂質分子(例: PC, TG, CE, 等)を構成する不飽和脂肪酸が酸化修飾を受けることで生成する(Fig. 1)。そのため、FAOOHの異性体解析は脂肪酸のみならず、PCやTG, CEといった不飽和脂肪酸を有し得る脂質分子のヒドロペルオキシド(例: PCOOH, TGOOH, CEOOH, 等)の解析にも有用と考えられる。一方、過酸化脂質に限らず、類似した構造を有する異性体の解析にはMS/MS分析が広く使用されている²⁵⁻²⁸⁾。通常、FAOOHのMS/MS分析にはnegative modeが用いられ、親イオンとして検出される脱プロトン体[M-H]⁻と、各異性体の特徴的な構造情報を反映するようなフラグメントイオンを組み合わせたselective reaction monitoring (SRM)により解析が行われる²⁹⁾。したがって、親イオンの異なるFAOOH(例えば、リノール酸ヒドロペルオキシド(HPODE, hydroperoxyoctadecadienoic acid)やアラキドン酸ヒドロペルオキシド(HPETE, hydroperoxyeicosatetraenoic acid))の区別に加え、ヒドロペルオキシ基が結合する炭素原子の位置が異なる異性体(位置異性体)の解析も一部達成されて

いるが、フラグメントイオンの特異性や感度に関して課題を残しており、さらなる高感度・高選択的な解析法が望まれていた。その中で著者らは、アルカリ金属イオンを用いたpositive modeのMS/MS分析により、PCOOHの位置異性体を高感度・高選択的に分析できることを見出した¹⁹⁾。すなわち、冒頭で述べたような、脂質過酸化メカニズムの解明に向けた過酸化脂質の異性体解析には、アルカリ金属イオンを用いたMS/MS分析の有用性が明らかになりつつある。ここでは、過酸化脂質分子種の中で最も基本的な骨格であるFAOOH(とくにHPODEとHPETE)位置異性体の解析例を紹介する。

はじめに、解析に用いる標品の作製に取り組んだ。リノール酸とアラキドン酸を光増感剤(ローズベンガル)存在下で光酸化させた(光照下, 4℃, 24 h)。UV-HPLCで酸化物を分析したところ、リノール酸光酸化物からは6種のHPODE、アラキドン酸光酸化物からは8種のHPETEがそれぞれ確認できた。それらの異性体を分取HPLCにより単離し、アルカリ金属イオンを含まないメタノール溶液(5 mM 酢酸アンモニウム)、あるいはアルカリ金属イオンを含むメタノール溶液(0.1 mM 酢酸ナトリウム, 0.1 mM 酢酸リチウム, 0.1 mM 酢酸カリウム)に溶解させて標品とした。これらの標品と飛行時間型質量分析計(microTOF-Q II mass spectrometer, Bruker Daltonik)を用い、ダイレクトインフュージョン法にてMS/MS分析し、HPODEとHPETEの位置異性体の解析が可能な条件を検討した。その結果、

Fig. 4 脂肪酸ヒドロペルオキシドのMS/MS分析
MS/MS分析においてアルカリ金属イオン（ナトリウムイオン）が存在すると、構造情報を反映する特徴的なフラグメントイオンが生成する。

Fig. 5 フラグメンテーションの推定メカニズム
アルカリ金属イオン（ナトリウムイオン）の存在により α -cleavage や Hock cleavage が生じ、特徴的なフラグメントイオンが生成すると考えられる。

5 mM 酢酸アンモニウムを含むメタノールで調製した標品では、positive mode でプロトン付加体 $[M+H]^+$ 、negative mode で脱プロトン体 $[M-H]^-$ のプリカーサーイオンが検出された。しかし、これらをプリカーサーイオンとしたプロダクトイオンマススペクトルには、構造解析に有用な特徴的なフラグメントイオンはほとんど検出されなかった (Fig. 4)。一方で、アルカリ金属イオンを含むメタノール溶液で調製した標品を positive mode で測定すると、アルカリ金属イオン付加体 $[M+Na]^+$ 、

$[M+Li]^+$ 、 $[M+K]^+$ がプリカーサーイオンとして検出され、これらをもとにしたプロダクトイオンマススペクトルには、異性体ごとに様々なフラグメントイオンが検出された。そして、それぞれのフラグメントイオンをもとに構造解析を進め、異性体ごとに特徴的なフラグメントイオンを同定した (Fig. 4)。フラグメントイオンの強度を比較すると、ナトリウムイオンが付加した場合に、最も高感度な分析が可能であることを確認した。以上より、HPODE と HPETE のプリカーサーイオンとフラグ

メントイオンをもとに新規 SRM を構築した²¹⁾。

このように、従来の MS/MS 分析に比べて高感度・高選択的な分析が可能となった理由として、 α -cleavage と Hock cleavage におけるアルカリ金属イオンの寄与が示唆された (Fig. 5)。 α -cleavage は MS/MS 分析で見られるフラグメンテーション機構の1つであり³⁰⁾、Hock cleavage はルイス酸やプロトンの存在下でヒドロペルオキシ基を中心にしてアルデヒドを形成される分解反応である³¹⁾。本研究で推定されたフラグメントイオンは、 α -cleavage や Hock cleavage で生成すると考えられる分解物に一致している。この仮説を後押しする研究例として、Porter らによる Coordination (Ag^+) ion spray-mass spectrometry (Ag^+ CIS-MS) による CEOOH の異性体解析が挙げられ、MS/MS 分析に銀イオン (Ag^+) を使用することで Hock cleavage を介した異性体解析の可能性を報告している³²⁻³⁴⁾。これらから、脂肪酸ヒドロペルオキシドの MS/MS 分析では、collision において、 α -cleavage や Hock cleavage、またはこれらに類似した反応が生じており、銀イオンやアルカリ金属イオンがこれら反応の触媒や、反応性生成物 (フラグメントイオン) の安定化に寄与することが示唆される。Porter らは銀イオンを使用しているため、質量分析計への負荷が大きいと考えられる一方で、著者らの手法では低濃度のアルカリ金属の使用であることから、質量分析計への負荷を小さくしていると考えられる。

本研究で構築した SRM を用いた HPODE と HPETE 位置異性体の MS/MS 分析法は、非常に高選択的かつ高感度で簡便な分析手法であり、本法により、従来、NMR や質量分析といった複雑な解析を必要とした HPODE や HPETE などの FAOOH の位置異性体構造を、より簡便に決定することが可能となった。

3 HPLC-MS/MS やキラル HPLC-MS/MS によるリン脂質ヒドロペルオキシド (PCOOH) の異性体解析

冒頭で述べたように、動脈硬化症をはじめとした様々な疾患の発症や進行、食品劣化において、PCOOH が重要な役割を担うことが示唆されている¹¹⁻¹⁴⁾。とくに、疾患の発症や進行を予防・遅延するにあたり、PCOOH の発生機序を理解することは非常に重要である。上述したように、著者らはすでに HPLC-MS/MS 分析により PCOOH の位置異性体と *cis-trans* 異性体の分析を可能としている¹⁹⁾。すなわち、リノール酸型 PCOOH を例にすると、自動酸化や光酸化により生じる特異的な位置・*cis-trans* 異性体 (自動酸化: 13-9E, 11E-HPODE PC, 9-10E, 12E-HPODE PC, 光酸化: 10-8E, 12Z-HPODE PC, 12-9Z, 13E-HPODE PC) (Fig. 2) を測定することで、それぞ

れの酸化機構の関与を評価できる。

他方、脂質過酸化が関与する幾つかの疾患に関しては、古くから酵素酸化が関与することが示唆されている³⁵⁻³⁷⁾。例えば、動物試験により、リポキシゲナーゼの発現を抑制することで動脈硬化症の発症リスクが減少すること^{35, 36)}、反対に、リポキシゲナーゼの発現を増加させることで血管障害が進行することが報告されている³⁷⁾。このように、生体の脂質過酸化に関しては酵素酸化が大きな影響を与えることが示唆されているが、実際の酵素酸化物 (例えば酵素酸化で生じた PCOOH) を測定し証明した研究例は、著者らが知る限り報告されていない。加えて、過酸化脂質の異性体解析により酵素酸化を評価するには立体異性体解析が有効であるが、PCOOH の立体異性体 (*RS* 異性体) 解析は、世界的にみても未だ達成されていなかった。

通常、HPLC を用いた化合物の立体異性体解析には、キラルカラムの使用が有効である³⁸⁻⁴⁰⁾。脂質に関しては、グリセロールや脂肪酸は不斉中心を持たないアキラルな化合物であるが、グリセロ脂質は *sn*-1 位と *sn*-3 位に異なる脂肪酸を有する場合はじめ、*sn*-2 位が不斉中心となる場合にキラル化合物となり得る⁴¹⁾。そのため、自然界のグリセロ脂質分子には立体異性体 (エナンチオマーやジアステレオマー) が存在し得るため、立体異性体の解析法が検討されてきた。例えば、Itabashi らによって 3,5-dinitrophenylurethanes のような合成モノアシルグリセロールやジアシルグリセロールのエナンチマー分離がキラル HPLC によって 1980 年代に達成されている^{42, 43)}。最近では、Nagai らにより、リサイクルモードとキラル HPLC を組み合わせることでトリアシルグリセロールのキラル分割が達成されている⁴⁴⁾。PC やホスファチジルエタノールアミン (PE) のようなリン脂質のエナンチオマーに関しては、Itabashi らによって CHIRALPAK ID とアセトニトリル: メタノール: ジエチルアミン (85: 15: 0.1, v/v/v) を用いることで、エナンチオマー分離が部分的に達成されている⁴¹⁾。他方、脂質ヒドロペルオキシドに関しては、2007 年に Schneider らがアラキドン酸メチルエステルの過酸化物を CHIRALPAK AD により分割し⁴⁵⁾、後に、Garscha らは CHIRALCEL OB-H, OC を用いて HPODE や HPETE のエナンチオマー分離を達成している⁴⁶⁾。このように脂質や脂質ヒドロペルオキシドの立体異性体解析にはキラルカラムの使用が非常に有効であると考えられる。そこで著者らは PCOOH の立体異性体解析による酵素酸化の評価を目的とし、未だ例のなかったキラル HPLC を用いたグリセロリン脂質ヒドロペルオキシド (PCOOH) の立体異性体分離に取り組んだ。

立体異性体解析に用いる PCOOH の標品は、リポキシゲナーゼとリノール酸を用いて 13(*S*)-9*Z*,11*E*-HPODE を調製し、リゾ PC (LPC) と合成することで酵素酸化由来の 16:0/13(*S*)-9*Z*,11*E*-HPODE PC を合成した。また、リノール酸を自動酸化 (40°C, 48 h) させて 13(*RS*)-9*Z*,11*E*-HPODE を得て、同様にして自動酸化由来の 16:0/13(*RS*)-9*Z*,11*E*-HPODE PC を調製した⁴⁷⁾。これらの標品を用いて、立体異性体の解析に有用であるキラル HPLC-MS/MS による分析条件を検討した。

立体異性体の分離にあたり、検討を行ったキラルカラムは、様々な移動相に対応できる多糖誘導体耐溶剤型キラルカラム (CHIRALPAK IA, IB, IC, ID, IE, IF)、順相系の移動相に対応している順相用多糖誘導体コーティング型キラルカラム (CHIRALPAK AD-H, AY-H, CHIRALCEL OD-H, OJ-H, OZ-H)、逆相系の移動相に対応している逆相用多糖誘導体コーティング型キラルカラム (CHIRALPAK AD-RH, AS-RH, AY-RH, CHIRALCEL OD-RH, OJ-RH, OZ-RH)、ポリメタクリレート型キラルカラム (CHIRALPAK OP (+)), 以上 18 種類である。また、これらのカラムに対して逆相系・順相系の移動相 9 種類を組み合わせで分離条件をスクリーニングした。その結果、CHIRALPAK OP (+) (poly (*o*-pyridyl diphenylmethacrylate) coated on silica, 4.6 mm i.d.×250 mm, 10 μm, Daicel) カラムと 20 mM 酢酸アンモニウム水溶液: メタノール (20:80, v/v) を移動相に使用することで、明瞭にピーク分割できる分析条件を見出した (Fig. 6)²⁰⁾。すなわち、PCOOH の立

体異性体を直接的に分離することが可能となったことから、生体内の脂質過酸化における自動酸化、酵素酸化、光酸化の割合を評価でき、ひいては様々な疾患の発症や進行における PCOOH の役割の解明や脂質過酸化の予防法構築に繋がると期待される。

近年、キラル分離にはアミロースやセルロースといった多糖誘導体のキラルセクターを有するキラルカラムが広く使用されている³⁸⁻⁴⁰⁾。脂肪酸ヒドロペルオキシドの立体異性体解析にも多糖誘導体のキラルセクターを有するキラルカラムが用いられており、これらのカラムが PCOOH の立体異性体分離にも有用であると考えられた。しかしながら、予想に反してこれらのカラムでは PCOOH の立体異性体分離を達成できなかった。一方で、CHIRALPAK OP (+) は他のキラルカラム異なるポリメタクリレート型キラルカラムであり、キラルセクターに poly (*o*-pyridyl diphenylmethacrylate) が使用されている³⁹⁾。そのため、本研究で達成された PCOOH の立体異性体分離には、キラルセクターの種類の違いが大きな影響を与えていることが示唆された。

最後に、応用例の一つとして、健常者のヒト血漿 PCOOH の立体異性体解析を紹介する。PCOOH は脂質代謝異常症患者の血中で増加すると報告されているが¹³⁾、健常者の血中においても少なからず PCOOH が検出される^{13, 19)}。すなわち、何らかの疾患状態に陥っていかなくとも、生体には PCOOH が存在しており、健常者における PCOOH の役割や生成機構は未だ明らかでない。そこで著者らが開発したキラル HPLC-MS/MS 分析を用

Fig. 6 リン脂質ヒドロペルオキシドの立体異性体分離

明瞭なピーク分割 (13(*R*)-9*Z*,11*E*-HPODE PC と 13(*S*)-9*Z*,11*E*-HPODE PC) が確認できた。

分析条件

カラム: CHIRALPAK OP (+)、移動相: メタノール-水 (20 mM 酢酸アンモニウム) (80:20, v/v)、流速: 0.5 mL/min、カラムオープン: 25°C

Fig. 7 健康者ヒト血漿 LDL におけるリン脂質ヒドロペルオキシドの立体異性体分離

いて、健康者のヒト血漿由来の LDL に含まれる PCOOH を解析し、PCOOH の生成機構の推定を試みた。健康者ヒト血漿 LDL から Folch 法にて総脂質を抽出し⁴⁸⁾、固相抽出法により PCOOH を含むリン脂質画分を調製し¹⁹⁾、立体異性体解析した。その結果、13(R)-9Z,11E-HPODE PC の単一ピークと、13(S)-9Z,11E-HPODE PC と 13(RS)-9E,11E-HPODE PC の2つの異性体を含むピークが検出された (Fig. 7)。13(R)-9Z,11E-HPODE PC は自動酸化、あるいは光酸化によって生じる異性体である。すなわち、健康者の血中において自動酸化あるいは光酸化が起きていることが示唆された。一方で、同じく光酸化によって生じる 10-8E,12Z-HPODE PC や 12-9Z,13E-HPODE PC は検出されなかった。このことから、検出された 13(R)-9Z,11E-HPODE PC は自動酸化由来であることが示唆された。また、2つ目のピークには酵素酸化によって生成した 13(S)-9Z,11E-HPODE PC が含まれる可能性も考えられる。しかしながら、酵素酸化によって生成した分を考慮しても大部分は自動酸化由来であると考えられた。今後はこのような PCOOH の異性体解析を通して、種々の疾患における酸化機構の解明を進め、発症や進行の抑制に貢献することが期待される。

4 おわりに

本総説では著者らの最近の知見を中心に、生体や食品における脂質過酸化機構の解明に向けて、MS/MS、HPLC-MS/MS、キラル HPLC-MS/MS を活用した過酸化脂質分子の、位置異性体、*cis-trans* 異性体、立体異性体 (RS 異性体)、これらを精密に解析できる分析法を

紹介した。これらの手法によって、生体や食品の過酸化脂質の異性体解析が可能となり、自動酸化、酵素酸化、光酸化が生じる割合や、生体老化や疾患の発症や進行、食品劣化に関与する過酸化脂質異性体や生成機構の解明に結びつくと考えられる。さらには、生体や食品における脂質過酸化の予防法構築にも貢献できると期待される。

文 献

- 1) M. Murakami, Lipid mediators in life science, *Exp. Anim.*, **60**, 7-20 (2011).
- 2) A. Dichlberge, P. T. Kovanen, W. J. Schneider, Mast cells: from lipid droplets to lipid mediators. *Clin. Sci. (Lond)*, **125**, 121-130 (2013).
- 3) S. P. Hui, T. Sakurai, S. Takeda, S. Jin, H. Fuda, T. Kurosawa, H. Chiba, Analysis of triacylglycerol hydroperoxides in human lipoproteins by Orbitrap mass spectrometer, *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 4981-4987 (2013).
- 4) S. P. Hui, T. Sakurai, F. Ohkawa, H. Furumaki, S. Jin, H. Fuda, S. Takeda, T. Kurosawa, H. Chiba, Detection and characterization of cholesteryl ester hydroperoxides in oxidized LDL and oxidized HDL by use of an Orbitrap mass spectrometer. *Anal. Bioanal. Chem.*, **404**, 101-112 (2012).
- 5) H. Mu, C. E. Høy, The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog. Lipid Res.*, **43**, 105-133 (2014).
- 6) K. Hartvigsen, L. F. Hansen, P. Lund, K. Bukhave, G. Hølmer, Determination of neutral lipid hydroperoxides by size exclusion HPLC with fluorometric detection. Application to fish oil enriched mayonnaises during storage. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5842-5849 (2000).
- 7) G. Spiteller, Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mech. Age-*

- ing Dev.*, **122**, 617-657 (2001).
- 8) C. Karahadian, R. C. Lindsay, Evaluation of compounds contributing characterizing fishy flavors in fish oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 953-960 (1989).
 - 9) B. Frei, Y. Yamamoto, D. Niclas, B. N. Ames, Evaluation of an isoluminol chemiluminescence assay for the detection of hydroperoxides in human blood plasma. *Anal. Biochem.*, **175**, 120-130 (1988).
 - 10) J. Terao, Stabilization of phosphatidylethanolamine hydroperoxides in human plasma. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1003**, 221-224 (1989).
 - 11) T. Miyazawa, K. Yasuda, K. Fujimoto, T. Kaneda, Presence of phosphatidylcholine hydroperoxide in human plasma. *J. Biochem.*, **103**, 744-746 (1988).
 - 12) T. Miyazawa, T. Suzuki, K. Fujimoto, Age-dependent accumulation of phosphatidylcholine hydroperoxide in the brain and liver of the rat. *Lipids*, **28**, 789-793 (1993).
 - 13) M. Kinoshita, S. Oikawa, K. Hayasaka, A. Sekikawa, T. Nagashima, T. Toyota, T. Miyazawa, Age-related increases in plasma phosphatidylcholine hydroperoxide concentrations in control subjects and patients with hyperlipidemia. *Clin. Chem.*, **46**, 822-828 (2000).
 - 14) T. Miyazawa, H. Kunika, K. Fujimoto, Y. Endo, T. Kaneda, Chemiluminescence detection of mono-, bis-, and tris-hydroperoxy triacylglycerols present in vegetable oils. *Lipids*, **30**, 1001-1006 (1995).
 - 15) J. R. Zhang, P. K. Andrus, E. D. Hall, Age-related phospholipid hydroperoxide levels in gerbil brain measured by HPLC-chemiluminescence and their relation to hydroxyl radical stress. *Brain Res.*, **639**, 275-282 (1994).
 - 16) F. Takayama, T. Egashira, Y. Kudo, Y. Yamanaka, Chemiluminescence-HPLC assay of phosphatidylcholine hydroperoxide generated by ischemia-reperfusion in the liver of rats. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 2412-2414 (1992).
 - 17) Y. Yoshida, E. Niki, Bio-markers of lipid peroxidation in vivo: hydroxyoctadecadienoic acid and hydroxycholesterol. *Biofactors.*, **27**, 195-202 (2006).
 - 18) Y. Akazawa-Ogawa, M. Shichiri, K. Nishio, Y. Yoshida, E. Niki, Y. Hagihara, Singlet-oxygen-derived products from linoleate activate Nrf2 signaling in skin cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **79**, 164-175 (2015).
 - 19) S. Kato, K. Nakagawa, Y. Suzuki, A. Asai, M. Nagao, K. Nagashima, S. Oikawa, T. Miyazawa, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of human plasma 1-palmitoyl-2-hydroperoxyoctadecadienoyl-phosphatidylcholine isomers via promotion of sodium adduct formation. *Anal. Biochem.*, **471**, 51-60. (2015).
 - 20) J. Ito, K. Nakagawa, S. Kato, T. Hirokawa, S. Kuwahara, T. Nagai, T. Miyazawa, Direct separation of the diastereomers of phosphatidylcholine hydroperoxide bearing 13-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid using chiral stationary phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1386**, 53-61 (2015).
 - 21) J. Ito, S. Mizuochi, K. Nakagawa, S. Kato, T. Miyazawa, Tandem mass spectrometry analysis of linoleic and arachidonic acid hydroperoxides via promotion of alkali metal adduct formation. *Anal. Chem.*, **87**, 4980-4987 (2015).
 - 22) C. P. van Os, M. Vente, J. F. Vliegthart, A NMR shift method for determination of the enantiomeric composition of hydroperoxides formed by lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **574**, 103-111 (1979).
 - 23) H. Kühn, R. Wiesner, V. Z. Lankin, A. Nekrasov, L. Alder, T. Schewe, Analysis of the stereochemistry of lipoxygenase-derived hydroxypolyenoic fatty acids by means of chiral phase high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **160**, 24-34 (1987).
 - 24) E. N. Frankel, Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog. Lipid Res.*, **123**, 197-221 (1984).
 - 25) M. J. Motilva, A. Serra, A. Macià, Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. *J. Chromatogr. A*, **1292**, 66-82 (2013).
 - 26) Y. Cao, R. X. Xu, Z. Liu, A high-throughput quantification method of curcuminoids and curcumin metabolites in human plasma via high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **15**, 949-950 (2014).
 - 27) R. Taguchi, M. Nishijima, T. Shimizu, Basic analytical systems for lipidomics by mass spectrometry in Japan. *Methods Enzymol.*, **432**, 185-211 (2007).
 - 28) X. Han, R. W. Gross, Quantitative analysis and molecular species fingerprinting of triacylglyceride molecular species directly from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **295**, 88-100 (2001).
 - 29) P. B. Derogis, F. P. Freitas, A. S. Marques, D. Cunha, P. P. Appolinário, F. de Paula, T.C. Lourenço, M. Murgu, P. Di Mascio, M. H. Medeiros, S. Miyamoto, The development of a specific and sensitive LC-MS-based method for the detection and quantification of hydroperoxy- and hydroxydocosahexaenoic acids as a tool for lipidomic analysis. *PLoS One*, e77561 (2013).
 - 30) S. Hong, Y. Lu, R. Yang, K. H. Gotlinger, N. A. Petasis, C. N. Serhan, Resolvin D1 protectin D1, and related docosahexaenoic acid-derived products: Analysis via electrospray/low energy tandem mass spectrometry based on spectra and fragmentation mechanisms. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 128-144 (2007).
 - 31) J. Brinkhorst, S. J. Nara, D. A. Pratt, Hock cleavage of cholesterol 5 α -hydroperoxide: an ozone-free pathway to the cholesterol ozonolysis products identified in arterial plaque and brain tissue. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 12224-12225 (2008).
 - 32) C. M. Havrilla, D. L. Hachey, N. A. Porter, Coordination (Ag⁺) Ion Spray-Mass Spectrometry of Peroxidation Products of Cholesterol Linoleate and Cholesterol

- Arachidonate: High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Peroxide Products from Polyunsaturated Lipid Autoxidation. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 8042-8055 (2000).
- 33) J. R. Seal, C. M. Havrilla, N. A. Porter, D. L. Hachey, Analysis of unsaturated compounds by Ag^+ coordination ion-spray mass spectrometry: studies of the formation of the Ag^+ /lipid complex. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**, 872-880 (2003).
 - 34) J. R. Seal, N. A. Porter, Liquid chromatography coordination ion-spray mass spectrometry (LC-CIS-MS) of docosahexaenoate ester hydroperoxides. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1007-1013 (2004).
 - 35) J. George, A. Afek, A. Shaish, H. Levkovitz, N. Bloom, T. Cyrus, L. Zhao, C. D. Funk, E. Sigal, D. Harats, 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*, **104**, 1646-1650 (2001).
 - 36) S. Rong, Q. Cao, M. Liu, J. Seo, L. Jia, E. Boudyguina, A. K. Gebre, P. L. Colvin, T. L. Smith, R. Murphy, N. Mishra, J. S. Parks, Macrophage 12/15 lipoxygenase expression increases plasma and hepatic lipid levels and exacerbates atherosclerosis. *J. Lipid Res.*, **53**, 686-695 (2012).
 - 37) U. Mabalirajan, R. Rehman, T. Ahmad, S. Kumar, G. D. Leishangthem, S. Singh, A. K. Dinda, S. Biswal, A. Agrawal, B. Ghosh, 12/15-lipoxygenase expressed in non-epithelial cells causes airway epithelial injury in asthma. *Sci. Rep.*, **3**, 1540 (2013).
 - 38) J. Shen, T. Lkai, Y. Okamoto, Synthesis and application of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparation by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1363**, 51-61 (2014).
 - 39) R. Geryk, K. Kalíková, J. Vozka, D. Plecítá, M. G. Schmid, E. Tesařová, Enantioselective potential of chiral stationary phases based on immobilized polysaccharides in reversed phase mode. *J. Chromatogr. A*, **1363**, 155-161 (2014).
 - 40) J. Shen, Y. Okamoto, Efficient Separation of Enantiomers Using Stereoregular Chiral Polymers. *Chem. Rev.*, **116**, 1094-1138 (2016).
 - 41) Y. Itabashi, Chiral separation of glycerolipids by high-performance liquid chromatography. *J. Lipid Nutr.*, **21**, 27-34 (2012).
 - 42) Y. Itabashi, T. Takagi, High performance liquid chromatography separation of monoacylglycerol enantiomers on a chiral stationary phase. *Lipids*, **21**, 413-416 (1986).
 - 43) Y. Itabashi, T. Takagi, High-performance liquid chromatographic separation of diacylglycerol enantiomers on a chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A*, **402**, 257-264 (1987).
 - 44) T. Nagai, H. Mizobe, I. Otake, K. Ichioka, K. Kojima, Y. Matsumoto, N. Gotoh, I. Kuroda, S. Wada, Enantiomeric separation of asymmetric triacylglycerol by recycle high-performance liquid chromatography with chiral column. *J. Chromatogr. A*, **1218**, 2880-2886 (2011).
 - 45) C. Schneider, Z. Yu, W. E. Boeglin, Y. Zheng, A. R. Brash, Enantiomeric separation of hydroxy and hydroperoxy eicosanoids by chiral column chromatography. *Methods Enzymol.*, **433**, 145-157 (2007).
 - 46) U. Garscha, T. Nilsson, E. H. Oliw, Enantiomeric separation and analysis of unsaturated hydroperoxy fatty acids by chiral column chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **872**, 90-98 (2008).
 - 47) S. Kato, K. Nakagawa, Y. Suzuki, K. Suzuki, S. Mizuochi, T. Miyazawa, Preparation of 13 or 9-hydroperoxy-9Z,11E (9E,11E) or 10E,12Z (10E,12E)-octadecadienoic phosphatidylcholine hydroperoxide. *J. Oleo Sci.*, **63**, 431-437 (2014).
 - 48) J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane-Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1956).