〔ワークショップ〕

ガスクロマト-質量分析 (GC-MS) 法による脂質の分析*

矢野 郁也** ・大野 佳美**
 松本 勇*** ・久原とみ子***
 丸山 悠司**** ・細谷 英吉****

はじめに

枝鎖脂肪酸やヒドロキシ脂肪酸が最近にわかに注目されるようになったのは、これらの脂肪酸が細菌の細胞膜などに特異な分布をしており、それが膜の極めて複雑な機能との関連性が予想されるからである。一方、近年ヒトで Refsum 病とか、メチルマロン酸尿症などのある種の神経疾患の患者の脳などに、奇数個の炭素原子をもつ長鎖脂肪酸と共に、これらの分枝状脂肪酸の存在することが次々に発見されて、一層関心が昂まってきた。

通常、天然の脂肪酸は、直鎖、分枝、ヒドロキシ、飽和、不飽和脂肪酸など、その種類は極めて多様であり、したがってその分析にはガスクロマトグラフィー (GLC) が最も多く用いられ、威力を発揮してきた。しかし、GLC による未知成分の同定には、既知の標準物質が必要とされ、もし入手困難な場合は、未知試料の同定を著しく困難にする。

本来、GLC は液体クロマトや薄層クロマトなど、他の分離方法に較べて分離能が非常に高い反面、物質の構造解析の手段としては余り有効ではない。一方、質量分析計 (MS) は、それ自身分離、精製の能力は殆んどもち合わせていないが、非常に優れた構造解析能を有する。大変幸いなことに、両者とも $\mu\text{g}\sim\text{ng}$ 量の極く微量の試料で分析が可能であるため、GLC と MS を直結して、混合成分中の物質の分離と構造解析とを一挙に行なうという方法が Ryhage ら¹⁾ によって開発された。すなわち、GLC の高い分離能と、質量分析計の優れた構造解析能とを組み合わせたもので、ガスクロマト-質量分析

計 (GC-MS) と呼ばれ、極く微量の物質の分析が可能となるため、極めて多様性に富み、且つその含量が非常に微量な天然の脂肪酸の混合物などの分析には、最適の分析機器として登場してきた²⁻⁴⁾。Fig. 1 に GC-MS の概略を示した。GC-MS 複合分析では、GLC で分離し溶出された各成分を、溶出と同時に次々と質量分析すること

Fig. 1. Outline of GC-MS.

* Ananalysis of lipids by GS-MS. 昭和49年10月26日の第25回電気泳動学会総会におけるワークショップ, 1. GC-MS による脂肪酸 (分枝およびヒドロキシ) 及び脂質分子種の分離と固定 (矢野・大野), 2. 高分解能 GC-MS による枝鎖脂肪酸の分離と固定 (松本・久原), 3. MF による微量物質の測定法とその応用 (丸山・細谷) の講演をまとめたもの。

** Ikuya Yano, Yoshimi Ohno, 大阪市立大学医学部細菌学教室。

*** Isamu Matsumoto, Tomiko Kuhara, 久留米大学医学部医化学教室。

**** Yuhshi Maruyama, Eikichi Hosoya, 慶応義塾大学医学部薬理学教室。

より、容易に各成分の構造を知ることができ、今日ではこの方法をさらに発展させて、従来のように脂質を水解して、グリセリンとそれぞれの構成脂肪酸とに分解することなく、*intact* な分子種のままジグリセリドやセラミドとして分離、同定することも可能になった。そこで、まず最初に、動物および微生物の脂質成分中の脂肪酸とリン脂質分子種の*通常の GC-MS による分析について述べてみたい。

I. GC-MS による脂肪酸及び脂質分子種の分離と同定

1. 動物および微生物の脂質成分中の脂肪酸とリン脂質の分子種の分析

分析に供する脂質の抽出と各成分の純化は既知の方法^{5,6)}に準じて行ない、脂肪酸メチルエステルの調製は、5%無水 HCl メタノール、又は3%-H₂SO₄-ベンゼン-メタノール中で還流しながら行なった。ヒドロキシおよび非極性脂肪酸メチルエステルの分離には Silica gel H (又はG) の薄層クロマトプレートを用い、ヘキサン-エーテル (8/2, V/V) を展開溶媒として行なった。非極性、2-ヒドロキシおよび3-ヒドロキシ脂肪酸メチルエステルは、別々に薄層プレートから回収し、クロロフォルムで溶出後、GLC 又は GC-MS により分析した。ミコール酸メチルエステルはそのまま分析しないで、*bis-trime-*

thylsilylacetamide を用いて、さらにトリメチルシリル化 (TMS 化) して GLC 分析を行なった。リン脂質分子種の分析は、それぞれのリン脂質をフォスホリパーゼ C で処理して得られるジグリセリドを TMS 化し、又は直接リン脂質をアセトリシスして得られるアセチルジグリセリド⁷⁾について GLC 又は GC-MS による分析を行なったが、それぞれの誘導体の生成は薄層クロマトグラフィー (TLC) により確認した。GLC および GC-MS は島津 5 AF ガスクロマトグラフおよび Shimadzu-LKB 9,000 型単収束質量分析計を用い、1% OV-1 を固定相とするガラスカラムを使用した、注入口温度は230~330°C。カラム温度は170~290°C で GLC 条件は GLC も GC-MS も全く同じである。GC-MS のセパレータ温度は300°C、イオン化電流は60μA、イオン化電圧22.5 eV 又は70 eV、加速電圧3kV で分析した。

以上のようにして得た脂肪酸の GC-MS による解析結果を直鎖飽和、分枝、ヒドロキシおよびミコール酸に分けて述べてみよう。

1. 直鎖飽和および分枝脂肪酸：

一般に飽和脂肪酸メチルエステルの質量スペクトルでは、分子イオン (M⁺) の他に、α-開裂**によって生ずるフラグメントイオン (R. CO, CO-OCH₃, O-CH₃ など) と β-開裂***による特徴的なイオン (m/e 74) が検出さ

* 大抵の GC-MS では質量スペクトル中の各イオンは、イオンコレクターを用いた電気検出法で行なっており、低分解能質量スペクトルが得られる。

** α-開裂は α-炭素と隣り合った原子と α-炭素との結合の開裂をいう。直鎖脂肪酸の α-開裂では Fig. 2 のように、2 個所の α-開裂が起り、3 個のフラグメントイオンを生成する。

Fig. 2. α-Cleavage of single chain fatty acids.

*** β-開裂は β-炭素と隣り合った原子と、β-炭素との結合の開裂をいう。直鎖脂肪酸の β-開裂によってフラグメントイオンが生成する開裂機構は Fig. 3 のようである。

Fig. 3. β-Cleavage of fatty acids.

れる。

直鎖脂肪酸の質量スペクトルに較べて、分枝脂肪酸の質量スペクトルは極めて特徴的なパターンを示す。一般に枝分れがあると、枝分れの位置の炭素原子と、それに隣り合った原子との間の結合が切れ易い。特に C_2 および C_3 位にメチル分枝をもつものでは、このような開裂によって特徴的なピークが認められる⁸⁾。例えば、 C_2 にメチル置換があると、McLafferty 転位* を起こして m/e^{**} 88 に強いピークが現われ、基準ピーク*** となる¹⁷⁾。

モノメチル分枝脂肪酸メチルエステルの枝分れの位置と、それぞれの特徴的なピークを Table 1 に示したので、参照して頂きたい。

Table 1. m/e of mass fragment ions of monomethyl ester of branched fatty acids.

	β -cleavage	γ -cleavage	hydrocarbon ion	
Single chain	74	87	M-43	M-29
2-methyl	88	101	M-57	M-43
3-methyl	74	101	M-57	M-43
4-methyl	74	87	M-57	M-29

2. ヒドロキシ脂肪酸：

2-ヒドロキシ脂肪酸は、スフィンゴ脂質の構成々分として高等動物の種々の組織に広く分布しているが、微生物や植物にもいろいろな脂質成分として含まれている。一方この 2-ヒドロキシ脂肪酸は、脂肪酸の α -酸化経路における中間体として形成されるものであり、極めて重要な意義をもっている⁹⁻¹¹⁾。

3-ヒドロキシ酸は、2-ヒドロキシ酸と異なり、グラム陰性細菌のリポ多糖体（エンドトキシン）やリポアミノ酸の主要な構成々分である^{12,13)}。細菌の菌体に存在する 2-又は 3-ヒドロキシ脂肪酸の構造を GC-MS で解析してみると、菌種によってそれぞれ特徴のある多数のヒドロキシ脂肪酸が分布している¹⁴⁻¹⁷⁾。一般にヒドロキシ脂肪酸の質量スペクトルでは、分子イオンは検出されにくく、脱水ピーク：M-H₂O、メトキシル基の脱離したもの：M-OCH₃、水とメトキシル基の両方が脱離したイオン：M-(H₂O+OCH₃) が検出される。又 OH 基に対

して α -位開裂による $\left[\begin{array}{c} \text{CH}-(\text{CH}_2)_m \cdot \text{COOCH}_3 \\ | \\ \text{OH} \end{array} \right]^+$ や

$[(\text{CH}_2)_m \cdot \text{COOCH}_3]^+$ イオンが検出されるので、これらのイオンから OH 基の位置を容易に推定することができる (Fig. 4 および Table 2)。

Fig. 4. Mass spectrum of methyl ester of 2-hydroxyheptadecanoic acid (top) and 3-hydroxypalmitic acid (bottom).

Table 2. Fragment ions of methyl ester of 2-, 3- or 10-hydroxy fatty acids.

Cleavage position	Normal	2-hydroxy	3-hydroxy	10-hydroxy
$C_1 - C_2$	59	M-59(##)	—	—
$C_2 - C_3$	74(##)	90(##)	74(+)	74(##)
$C_3 - C_4$	87(###)	103(+)	103(###)	87(##)
$C_{10} - C_{11}$	—	—	—	201(##)

3. ミコール酸：

ミコール酸は、Mycobacteria とその類縁の細菌に分布する脂肪酸で、又細菌に分布する天然の脂肪酸として最も長鎖(〜C₉₀)で、C2-位に長鎖アルキル側鎖をもつ 3-ヒドロキシ脂肪酸である、これらのミコール酸の化学構造については既に数多くの報告があり、種々のミコール酸 (α , β , α' , pre- α など) の存在が知られている¹⁸⁻²¹⁾。不都合なことに、この脂肪酸は $C_2 \sim C_3$ の間で熱分解を受け易く、そのため従来 GLC による分析は不可能であるとされていた。ところが、Nocardia, Corynebacteria

* McLafferty 転位：Fig.3 の β -開裂の際に示されているように、ケトン、エステルなどの開裂の際に γ -水素 1 個が転位する。この場合 6 員環遷移中間体の形で水素ラジカルが転移する。

** m/e ：mass/electronic charge つまり質量対荷電の比を表わすもので、それぞれのイオンの大きさを表わす。

*** 基準ピーク：ある物質の質量スペクトルの中で最も強度の高いものを基準ピークと呼び、通常これを 100 とした時の相対強度で各フラグメントイオンの強さを表わす。

Fig. 5. Mass spectrum of TMS-methyl ester of C_{32} -mycolic acid (saturated, mono-ene and di-ene) from *Corynebacterium ulcelans*²²⁾.

などの菌体から得られるミコール酸メチルエステルの TMS 誘導体は、熱に安定なので、これらの超高級脂肪酸も GC-MS で多数の分子種に分離し、それぞれの成分の構造を容易に同定できることを明らかにした²²⁻²⁴⁾。即ち、これらミコール酸メチルエステルの TMS 誘導体の質量スペクトルには、分子イオン(M^+)のほか、M-15、M-90 などのイオンが特徴的に検出され、 $C_2 \sim C_8$ 開裂により直鎖部分の構造が、又 $C_3 \sim C_4$ 開裂によって側鎖部分がどのような構造であるか同定することができた (Fig. 5)。

4. リン脂質ジグリセリド分子種の分離と同定：

グリセロリン脂質の脂溶性成分、即ちジグリセリド (DG) 部分の構造決定には、従来グリセロールの 1 位および 2 位の脂肪酸を酵素的に分解して、各々の脂肪酸を GLC で分析する方法が専ら行なわれている²⁵⁾。最近種々の方法を用いて DG 誘導体 (アセチル DG、トリメチルシリル-DG など) の GLC による分析が可能であることが示され、したがって intact な DG 分子種を、そのまま GC-MS によって同定することも可能になってきた。そこでこの方法を動物レシチンに応用してみた。すなわち、動物レシチンをまずフォスホリパーゼ C で処理して得られた DG を TMS 化し、硝酸銀硅胶クロマトグラフィーと、GC-MS とを併用して、マウス臓器のレシチンが約 20 種の分子種に分離することを見いだした^{26, 27)}。

これらの質量スペクトルでは、分子イオン(M^+)の他、M-15、M-90 のフラグメントイオンなどから計算して脂肪酸の総炭素数、および 2 重結合が求められるが、さらに RCO, RCO+74, RCOO+74 および M-RCOO な

どのフラグメントイオンから各脂肪酸の組み合わせ ($16:0 \sim 18:1$, $16:0 \sim 18:2$, $16:0 \sim 20:4$, $16:0 \sim 22:6$ ……など) を容易に知ることができる。この方法は、フォスホリパーゼの基質特異性によって制約をうけるが、細菌の膜リン脂質 (CL, PG, PE など) については、モノアセチルジグリセリドの GC-MS 分析により、各分子種を同定することができた²⁸⁾ (Fig. 6, 7.)。

II. 高分解能 GC-MS による枝鎖脂肪酸の同定

1. 医学分野の GC-MS における高分解能の重要性：

通常の低分解能 GC-MS によって、直鎖、枝鎖、ヒドロキシン、高級、超高級脂肪酸の構造解析が可能であること、あるいはリン脂質ジグリセリドの分子種の同定も可能であることを示したが、このように予め目的とする試料が、脂肪酸とか、生体アミンなどと分っていないような場合には、GC-MS による解析は極度に難しくなる。例えば、薬草中の有効成分の検索を行なう場合、有効成分の目じるしになるのは薬効以外に何の情報も得られないことがある。その最も極端な例は、先天性代謝異常症など、臨床診断における GC-MS 分析であろう。提供されるのは、時に患者の尿とか血液、それに患者の主訴だけであるというケースにも往々にして遭遇する。

一般に医学領域における未知成分の分離と、その化学構造の解析には、1) 目的とする成分が極めて微量しか含まれず、2) 治療中の患者を対象とする場合などに容易に想像されるように、繰り返し試料を採取することが難しい。3) 分析試料には、目的とする成分以外の非常に沢山の化学物質が含まれていて、それら混合成分から

Fig. 6. TLC chromatogram of TMS-diglycerides from mouse lecithine.

Fig. 7. Mass spectrum of TMS-diglyceride of mouse lecithine ($C_{32:0}$ and $C_{36:4}$)^{25, 26)} and acetyl-diglyceride of cardiolipin ($C_{16:19CPA}$, $C_{19CPA-19CPA}$) from gram-negative bacterium²⁷⁾.

目的とする成分を単離，検出することが非常に困難である．4) 構造解析のために必要な情報，たとえばアミノ基や水酸基があるとか，炭素，水素以外に硫黄の原子が含まれているとか，あるいは脂質か糖類かとか，などの情報が殆んど得られない．5) 加えて医学領域の研究者には物質の分離や精製などが不得手な人が多い．6) それにも拘らず，病気の診断などのため，緊急を要することが多い……など，他の研究分野とは多分に異なった性格を有する．そして以上のような性格から，医学領域の質量分析では「はじめに」に述べたように，分離と精製

を同時に行なうことのできる GC-MS が必要とされてくるのは，当然の成り行きである．さらに，もし元素組成が分るとか，2重結合の数が何個あるか，などの情報が付け加えられると，分析試料の情報不足を大いに補ってくれるので，構造解析が極めて容易になる．そのような GC-MS として高分解能 GC-MS がある．

2. 低分解能 GC-MS と高分解能 GC-MS の違い：

通常の GC-MS の多くは，方向収束を行なうだけの単収束の質量分析計で，磁場で分散された各イオンは，磁場を走査することによって順次イオンコレクターに集め

Fig. 8. Outline of mass spectrometer with ordinary resolving power.

て記録するという電気検出方式を用いている (Fig. 8). この方式では一般に高い分解能を得ることはできず、整数位の質量スペクトルしか得られない。

高分解能質量分析計では、磁場の前に速度収束を行なうための電場を置いて、収差を除き、一定の速度をもったイオンのみを磁場に入れて方向分散を行わせる 2 重収束を行なう結果、少数下 3 桁又は 4 桁迄の精密測定ができる。たとえば 44.010 と 44.094 の 2 個のイオンがあったとして、低分解能質量スペクトルでは、両者は互いに重なり合って分離せず、1 本のピークとして得られるが、高分解能 GC-MS では、両者は極めて明瞭に分離される。さらに、このような精密質量が得られると、先にも述べたようにそのイオンの元素組成と、不飽和結合数が求められるので、その化合物の構造解析が非常に容易になる。

高分解能質量分析計には、大別して Nier-Johnson 型と Mattauch-Herzog 型とがあり、後者の模式図を Fig. 9 に示したが、その特徴や相違する点などについては多くの成書や解説書など²⁹⁻³¹⁾があるので参照して頂きたい。この中 Mattauch-Herzog 型質量分析器は、分散されたすべてのイオンを、質量のいかに拘らず同一平面上に収束させている。そこでこの焦点の平面上に写真乾板をおくと、各 m/e のイオンを直接、同時に写真記録することができる。現象した写真乾板上の各イオンの質量は、各スペクトル線の位置を、既知のスペクトル線の位置と比較して精密に算出することができる。GC-MS で得られるそれぞれの成分の出現時間は短かいので、通常 20 秒以内の短時間で質量スペクトルの測定を行なうことになる。したがって磁場走査を行なう時には、各々のイオンの測定に費される時間が非常に短かいため、精密測定は困難であるが、写真乾板法を用いると電場と磁場を固定した儘で、且つ全てのイオンを同時に、同一時間測定するので、全部のイオンについて精密測定が可能になる³²⁾。

Fig. 9. Outline of Mattauch-Herzog type high resolution mass spectrograph.

A, ion source; B, electric field; C, magnetic field; a, ionizing chamber; b, accelerating slit; c, main slit; d, α -slit; e, β -slit and monitor slit; f, photographic plate.

Achromobacter xylosoxidans の脂質中の脂肪酸メチルエステルを日本電子 JGC-20K 型ガスクロマトグラフと日本電子 JMS-OISG-2 型質量分析計を繋いだ高分解能 GC-MS で解析した例について以下述べてみよう。

3. *Achromobacter xylosoxidans* のメチルエステルの高分解能 GC-MS :

分析に供した *Achromobacter xylosoxidans* の細胞膜のリン脂質は、I. で述べたような方法で調製した GLC

Fig. 10. Gas-liquid chromatogram of the methyl esters of fatty acids from *Chromobacter xylosoxidans*.

のカラムや分析条件も島津 LKB-9,000 型 GC-MS の場合と同様 3% OV-1, 2 m のガラスカラムを用い、イオン源温度 280°C, セパレータ温度 260°C, イオン化電圧 30 eV, イオン電流 200 μ A, 加速電圧 8 kV で測定した。

Fig. 11a. Mass spectrum of the compounds corresponding to peak 2 (top) and peak 3 (bottom) in the gas chromatogram (Fig. 10).

Fig. 11b. Mass spectrum of the compounds corresponding to peak 5 (top), peak 6 (middle) and peak 7 (bottom) in the gas chromatogram (Fig. 10).

Achromobacter xylooxidans からの脂肪酸メチルエステルの混合物のガスクロマトグラムあるいは Total Ion Monitor (TIM) で測定したクロマトグラム (GC-MS の GLC カラムで分離した各ピークは、イオン源でイオン化された後分析管に入り、磁場で分散されるが、磁場に入る前のところにスリットを置き、1 部のイオンを捉えて増加し記録する装置で、そのクロマトグラムは GLC のクロマトグラムと同じであると考えてよい。つまり TIM は GLC の検出器に相当するものである) を Fig. 10 に示した。3 番目のピークと 7 番目の大きなピークの裾の肩の部分を含めて、合計 10 個の成分が検出されるが、その中ピーク 2, 3, 5, 6, 7 の低分解能質量スペクトルを Fig. 11 に示す。

以上の各ピークの中、ピーク 2 の分子イオン (M^+)、214 について高分解能解析を行なって精密質量を求め、それから 2 重結合の数と、元素組成とをコンピュータ解析によって求めたのが Table 3 である。最下段の数字が示すように、2 重結合数が 1 で、元素組成は、 $C_{18}H_{26}O_2$ である。2 重結合の数が 1 個で、O が 2 個含まれる

ことから、 $\begin{array}{c} O \\ || \\ -C-OH \end{array}$ の存在が容易に推定できる。各

脂肪酸はいずれもメチル化されているので、 $214-59$ ($COOCH_3$) = 155 から炭素数 12 個の飽和脂肪酸であることが、直ちに計算によって求められる。

分子イオンだけでなく、主なフラグメントイオンの元素組成も同時に求めることができると、フラグメントイオンの推定構造が正しいかどうかははっきりする。ピーク 3, 5, 7, 8 について、ピーク 2 と違ったプログラ

Table 3. Elemental compositions of fragment ions observed in the high resolution mass spectrum of P-2.

JOB=5				
ERROR=0.005				
NO. OF UNSATURATION=3				
JOB=7				
NO. ELEMENT VALENCE MAX				
1	C	12.0000	4	100
2	H	1.0078	1	200
3	O	15.9949	2	4
4	N	14.0030	3	0

JOB=1

L PFK 205 22.2632

H PFK 219 21.4930

SAMPLE=21.7538

214.1943 1.0 1.0 C13 H26 O2

Table 4. Elemental composition of fragment ions observed in the high resolution mass spectrum of P-3.

m/e	Composition	Observed	Calculated	Error
171	C ₁₁ H ₂₃ O	171.1734	.1748	-1.4
198	C ₁₂ H ₂₅ O ₂	198.1677	.1620	+5.7
231	C ₁₃ H ₂₇ O ₃	231.1964	.1961	+0.3*
230	C ₁₃ H ₂₆ O ₃	230.1873	.1882	-0.9

* M+1

Table 5. Elemental composition of fragment ions observed in the high resolution mass spectrum of P-5.

m/e	Composition	Observed	Calculated	Error	
171	C ₁₁ H ₂₃ O	171.1711	.1748	-3.7	M-C ₃ H ₇ -CO
199	C ₁₂ H ₂₅ O ₂	199.1684	.1698	-1.3	M-C ₃ H ₇
211	C ₁₄ H ₂₇ O	211.2055	.2061	-0.6	M-OCH ₃
242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242.2247	.2245	+0.1	M ⁺

ムを用いて主なイオンの精密質量数と元素組成を同時に打ち出したのが、Table 4 と Table 5 である。

例えば、2-ヒドロキシ-ドデカン酸 (2-OH, n: 12) の分子イオン(M⁺)は、C₁₃H₂₆O₃ で、m/e 198 は C₁₂H₂₅O₂ で、分子イオンから CH₃OH の脱離したイオンであり、m/e 171 は C₁₁H₂₃ の元素組成で、C₂H₅O₂、即ち COOCH₃ が分子イオンから脱離したイオンであることが容易に分る。M-COOCH₃ は 2-ヒドロキシ酸に特徴的なピークであることは I で述べたので想い起して頂きたい。2-ヒドロキシ酸としては、この他ピーク 6 の 2-ヒドロキシ-テトラデカン酸が、脂質成分中に可成り含まれることが分る。

TIM クロマトグラム中の最も大きなピーク 7 の分子イオン(M⁺)、258 は C₁₅H₃₀O₃ で、m/e 240 は C₁₅H₂₈O₂ で脱水ピーク、m/e 227 の元素組成は C₁₄H₂₇O₂ で M-OCH₃、m/e 199 は C₁₃H₂₇O₁ で M-59 (COOCH₃) であることが極めて容易に判定できる (Table 6, Table 7)。

高分解能解析が如何に有用であるかは、次の例をみて頂くと明瞭であろう。Fig. 12 に示した化合物のマススペクトルから、当初フラグメントイオン m/e 120 と m/e 121 について 2 つの開裂の経路によって別々に生成するのではなかろうかと推定されていた³³⁾。そこで高分解能 MS で改めて高分解能解析をおこなってみると、Table 8 のように m/e 120 に 2 種、m/e 121 にも 2 種の、精密質量数異なるイオンが存在していることが分った。m/e 121 のイオンについて得られた精密測定値と、元

Table 6. Elemental composition of fragment ions observed in the high resolution mass spectrum of P-7.

m/e	Composition	Observed	Calculated	Error
103	C ₄ H ₇ O ₃	103.0412	.0395	+1.7
199	C ₁₃ H ₂₇ O ₁	199.2061	.2061	-0.0
208	C ₁₄ H ₂₄ O ₁	208.1863	.1827	+3.6
227	C ₁₄ H ₂₇ O ₂	227.2037	.2011	+2.5
240	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	240.2123	.2089	+3.3
258	C ₁₅ H ₃₀ O ₃	258.2223	.2195	+2.8

Table 7. Elemental composition of fragment ions observed in the high resolution mass spectrum of P-8.

m/e	Composition	Observed	Calculated	Error
171	C ₁₀ H ₁₉ O ₂	171.1395	.1385	+1.0
185	C ₁₁ H ₂₁ O ₂	185.1532	.1541	-0.9
199	C ₁₂ H ₂₃ O ₂	199.1697	.1698	-0.0
227	C ₁₄ H ₂₇ O ₂	227.2004	.2011	-0.6
270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.2533	.2558	-2.5

Fig. 12. A compound subjected to high-resolution mass spectrographic analysis.

素組成から、このイオンは m/e 120 のフラグメントイオンより水素が 1 個多いイオンであり、¹³C の安定同位元素を含む同位体ピークでないことが容易に解析できた。

枝鎖脂肪酸やヒドロキシ脂肪酸ばかりでなく、生体試料に含まれるいろいろな物質でみられるように、情報が皆無に等しいような物質の GC-MS には、高分解能が如何に有利であるかは、以上で大体ご理解頂けると思うが、GC-MS の今後の発展のひとつの方向となっていることを付け加えたい。

Table 8. Elemental composition of fragment ions observed in the high resolution mass spectrum of the compound shown in Fig.12.

Obsd.	Calcd.	Error	C12	C13	H	N	O	X	S	P	INT
120.0327	.0323	+0.3	6	0	4	2	1	0	0	0	47
	.0278	+4.9	5	1	3	2	1	0	0	0	47
120.0564	.0575	-1.1	8	0	8	0	1	0	0	0	37
	.0561	+0.2	6	0	6	3	0	0	0	0	37
	.0530	+3.3	7	1	7	0	1	0	0	0	37
	.0516	+4.7	5	1	5	3	0	0	0	0	37
121.0403	.0401	+0.1	6	0	5	2	1	0	0	0	45
	.0357	+4.6	5	1	4	2	1	0	0	0	45
121.0632	.0653	-2.0	8	0	9	0	1	0	0	0	32
	.0639	-0.7	6	0	7	3	0	0	0	0	32
	.0608	+2.4	7	1	8	0	1	0	0	0	32
	.0595	+3.7	5	1	6	3	0	0	0	0	32

III. Mass Fragmentography (MF) による微量物質の測定法とその応用

現在使用されている機器分析の中で、微量成分の分離分析に最も適した特性を備えていて、同時にこの微量の目的成分の化学構造の解析も併せ行えるのは GC-MS が唯一の方法であることは、以上の説明で大体ご理解頂けたことと思う。さらにこの GC-MS が医学あるいは生化学領域の研究に必須のものとなったのは、Sweely ら³⁴⁾によって開発され、Hammer ら³⁵⁾ および Strong ら³⁶⁾によって改良された mass fragmentography (MF) と Hiter ら³⁷⁾によって開発された mass chromatography (MC) の新しい分析方法の登場によるものであろう。わが国では未だしもの感はあるが、最近の1, 2年間の間にこの新しい分析法に関する優れた応用例が欧米諸国で相次いで発表され、改良が相次いで、まさに分析法の寵児といった感じがある。

さてこの MF は、GC-MS の特殊な利用法のひとつであるが、機器上の理屈はともかく、質量スペクトルの全域からその物質に特徴的なイオンだけを選択して、そのイオンが落ち込むように穴をあけたフィルター（実際にはそれぞれの m/e に対応する加速電圧の指定）を挿入して、抜け出たイオンを再び高感度（多重イオン検出器、MID）で測定したと思えばよい。但し機構上選択するイオンは、コンピュータを使用する場合以外は、指定したイオンの20% 以内で選ばなければならない。

この方法は、1) 選定したイオン(m/e) 以外は検知しないので、検体のバックグラウンドにそのイオンピークが現われない限り、高度の特異性をもった測定法である。

2) MID の操作によっては $ng \sim pg$ 量の超高感度で測定できる。3) 1) および 2) のような特性をもっているので、安定同位体標識化合物および内部標準物質の選択イオンを基本として、極めて特異性のある正確な測定が可能となる……などの特徴がある。

したがって、従来 GLC では分離できなかったもの、あるいは極く微量にしか存在しない生体内物質の定量が可能となり、嘗ては、とても望めなかった疾病の診断やヒトにおける代謝研究、脳の生化学的研究などがむかひに活発となり、その応用は急速に展開しつつある。

以下に不飽和脂肪酸と分枝およびヒドロキシ脂肪酸への MF の応用例を紹介する。

装置および条件：

MF に用いた GC-MS は、島津 5APF 型ガスクロマトグラフと直結した日本電子 JMS-D 100 型 GC-MS で、Gas Chrom Q を担体とした 5% DEGS を充填したガラスカラム (1 m)、カラム温度は 160°C、注入口 210°C で TIM の感度は $1 \times 10^{-10}A$ 、又は日本電子 JGC-20K 型ガスクロマトグラフと直結した日本電子 JMS-OISG-2 型高分解能 GC-MS で 3% OV-1, 2m のガラスカラムで、カラム温度 155°C、注入口 190°C で TIM の感度 $1 \times 10^{-10}A$ のいずれかを用いた。

1. 不飽和脂肪酸の分離測定

肝細胞から常法に従って抽出した脂肪酸混合物には、 $C_{20:3}$ 、 $C_{20:4}$ が混合して存在しているが、通常ガスクロマトグラフィーあるいは TIM (Total Ion Monitor) で測定すると、Fig. 13 に示すように両者が互に交わり合ってひとつのピークとして現われる。そこで、各々の脂肪酸に特有なイオン、すなわち $C_{20:3}$ に対しては m/e

Fig. 13. Gas chromatogram of fatty acid mixture extracted from liver as detected by total ion monitor.

Fig. 14. Determination of a mixture of unsaturated fatty acids by mass fragmentography.

320を、 $C_{20:4}$ に対しては m/e 318 をそれぞれ選んでMFを行なってみると、Fig. 14のようにそれぞれ非常に綺麗に分離した選択イオンによるピークが現われる³⁸⁾。

2. 分枝およびヒドロキシ脂肪酸の分離推定

天然脂肪酸には、直鎖飽和、不飽和、分枝、ヒドロキシ脂肪酸など多種多様なものが含まれるが、それぞれの種類の脂肪酸には、共通した特有の開裂イオンが存在することを先に示した。今、この天然の脂肪酸の混合物をGLCで分析すると、非常に沢山のピークが得られるが、それぞれのピークの同定には、各々の標準の脂肪酸とガスクロマトグラムの保持時間 (R_t) を比較して推定する以外に方法はない。しかし、いろいろな脂肪酸の種類に共通したイオンを選んでMFを行なうと、GLC上、またはTIMで得られる各ピークは、どのような種類、どのような性質の脂肪酸であるかを、容易に推定することができる¹⁷⁾。Fig. 15にその例を示した。

図の上段にはIIで示した *Achromobacter xylosoxidans* の細胞膜の脂肪酸の混合成分のTIMクロマトグラムを示した。上から2段目のクロマトグラムは、直鎖飽和脂肪酸に特徴的なフラグメントイオン、 m/e 87で繰り返し測定したMF、第3段目には、 α -ヒドロキシ脂肪酸の C_2C_3 開裂によるフラグメントイオン、 m/e 90、最下段には β -ヒドロキシ脂肪酸の C_3C_4 開裂によって生ずる特徴的なイオン、 m/e 103を選択して同時に3種のイオンについてMFを行なったものである。図のように、TIMクロマトグラム (GLCのクロマトグラムと同じと考えてよい) の各ピークは、それぞれ直鎖飽和脂肪酸であるか、 α -ヒドロキシ脂肪酸であるか、あるいは β -ヒドロキシ脂肪酸であるかが一目瞭然である。さらに、TIMのピークは、必ずしも単一の種類の脂肪酸から構成されているものばかりではなくて、幾種類かの脂肪酸が混り合っているものもあることが分る。図に示したマスフラグメントグラムは、この儘でさらに1,000倍位に感度を高めることができるので、TIM上で認めることができないような、微量の成分でも充分にその存否を知ることもし、又、安定同位体標識化合物を用いることによって、極めて正確な定量が可能であることも理解して頂けるであろう。

この他、カテコールアミン、アセチルアミンなどの生体アミンにもMFは広く応用され^{28,29)}、測定に供する物質によっては、10pg~200ngといった極微量の範囲で正確に測定できる。今後MFは益々広く利用されてゆくことであろう。

おわりに

ある化合物の化学構造を知る上での定性の根拠は、NMRに比して遙かに劣り、他方、目的とする物質のみを特異的に検出する選択性からは、放射能分析に遠く及

Fig. 15. Mass fragmentogram of the methyl esters of fatty acids from *Achromobacter xylosoxidans* cell wall.

ばない。それにも拘らず、微量の物質を、大量に共存する目的物以外の生体成分から分離して、その化学構造を推定し、定量が行なえる分析法としてGC-MSに優るものは現在他には見当たらない。この素晴らしい分析法は忽ちにして全ての科学領域で採り入れられ、その有用性が

認められてきた。Ryhageによって開発されたこのGC-MSは、その後種々の改良が加えられ、又利用法が開発されてきたが、就中、Sweelyらによって開発されたMFやHitesらの開発したMCによって、従来の定性用分析機器から、定量用分析機器へと大きく変貌し、分析機器の王座を揺ぎないものにしたようである。

周知の如く、最近の医学、生化学研究の発展は目を眩るものがあるが、世界の学問に駆けてわが国の研究を押し進めるためには、この新しい分析技術を一刻も早く取り入れて役立たせるべきであろう。この小論文がその意味で、多少とも参考になれば望外の歓びである。

文 献

- 1) Ryhage, R.: *Anal. Chem.* **36**, 759 (1964); *Acta Chem. Scand.* **17**, 2025, 2504 (1963).
- 2) Weller, G. R.: "Biochemical Applications of Mass Spectrometry", Wiley-Interscience, New York (1972).
- 3) 土屋利一編: "GC-MS とその応用" 講談社サイエンティフィク (1974).
- 4) 日本生化学会(山川民夫, 野島庄七)編: "生化学実験講座, 第3巻「脂質の化学」" (1974).
- 5) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H.: *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1957).
- 6) Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911 (1959).
- 7) Hasegawa, K. and Suzuki, T.: *Lipids* **8**, 631 (1973).
- 8) Gunstone, F. D.: "Topics in Lipid Chemistry, Vol. 1" Logos Press Ltd., London (1970).
- 9) Fulco, A. J. and Mead, J. F.: *J. Biol. Chem.* **236**, 2416 (1961).
- 10) Hitchcock, C. and James, A. T.: *J. Lipid Res.* **5**, 593 (1964).
- 11) Yano, I., Furukawa, Y. and Kusunose, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 166 (1969).
- 12) Ikawa, M., Koepfli, J. B., S. G. Mudd and Niemann, C.: *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5219 (1952).
- 13) Burton, A. J. and Carter, H. E.: *Biochemistry*, **3**, 411 (1964).
- 14) Yano, I., Furukawa, Y. and Kusunose, M.: *FEBS Letters* **4**, 96 (1969).
- 15) Yano, I., Furukawa, Y. and Kusunose, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 189 (1970).
- 16) Yano, I., Furukawa, Y. and Kusunose, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **210**, 105 (1970).
- 17) 矢野郁也: 大阪大学医学雑誌 **23**, 153(1971).
- 18) Asselineau, J.: "The Bacterial Lipids", Hermann, Paris (1966).
- 19) Lederer, E., *Chem. Phys. Lipid* **1**, 294(1967).
- 20) Etemadi, A. H., Gasche, J. and Sifferlen, J.:

(336) 生物物理化学

- Bull. Soc. Chim. Biol. **47**, 631 (1965).
- 21) Bordet, C., Etemadi, A. H., Michel, G. and Lederer, E. : Bull. Soc. Chim. France **234** (1965).
- 22) Yano, I., Saito, K., Furukawa, Y. and Kusunose, M. : FEBS Letters **21**, 215 (1972).
- 23) Yano, I. and Saito, K. : FEBS Letters **23** (3) 352 (1972).
- 24) 矢野郁也, 弓岡恵子, 斎藤国彦 : 脂質生化学研究 **15**, 203 (1973).
- 24) Van Golde, L. M. G. and Van Deenen, L. L. M. : Biochim. Biophys. Acta **125** 496 (1966).
- 25) 矢野郁也, 弓岡恵子, 斎藤国彦 : 生化学 **45**, 657 (1973).
- 27) 矢野郁也, 弓岡恵子, 斎藤国彦 : 第8回有機マスペクトロメトリー討論会予講集 p. 41 (1973).
- 28) Ohno, Y., Yano, I. and Masui, M. : FEBS Letter (accepted).
- 29) 土屋利一 : 質量分析 共立出版, (昭和44年)
- 30) 日本化学会編 : 実験化学講座 続**14**, 丸善, (昭和44年)
- 31) 久原とみ子, 芳野 信, 哲翁正博, 松本 勇 : 久留米医会誌, **37** (12), 1 (1974).
- 33) Frigerio, A. : Personal communication.
- 33) Sweely, C. C. : Anal. Chem. **38**, 1549 (1966).
- 34) Hammer, C. G. et al. : Anal. Chem. **43**, 298 (1971).
- 35) Strong, J. M. : Anal. Chem. **44**, 14 (1972).
- 36) Hites, R. A. et al. : Anal. Chem. **42**, 855 (1970).
- 37) 松浦健二, 板垣又丕 : 分析機器 **12**, 43 (1974).
- 38) 橋本 豊, 不元絹子, 宮崎 浩 : 生体成分の分析化学シンポジウム講演要旨集51 (1973).
- 39) 丸山悠司, 飯田直子, 細谷英吉 : 日本薬理学会第51回関東部会 No. 8 (1974).