

報 文

高速液体クロマトグラフィー/質量分析法によるホスファチジル
グリセロールの分子種分析石岡 沙織¹, 田岡裕佳子¹, 板橋 豊^{®1}

Molecular species analysis of phosphatidylglycerols by reversed-phase HPLC/ESI-MS

Saori ISHIOKA¹, Yukako TAOKA¹ and Yutaka ITABASHI¹¹ Laboratory of Bioresources Chemistry, Graduate school of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1, Minato-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611

(Received 19 May 2003, Accepted 18 July 2003)

A facile method for the determination of molecular species of phosphatidylglycerols (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol, PG) is described. Intact PG isolated from spinach leaves and *Escherichia coli* IAM12119 was converted into *bis*(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives, followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) on an ODS column (25 cm × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) using methanol/water/aqueous ammonium hydroxide (95 : 5 : 0.1 or 93 : 7 : 0.1, v/v/v) as the mobile phase, which gave clear resolution of individual molecular species containing saturated and unsaturated fatty acids. Peaks were detected at 254 nm UV. Reversed-phase HPLC in conjunction with negative electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) gave a weak $[M + 2H - bis-DNPU - RCO]^-$ ion in addition to a prominent pseudomolecular $[M - H]^-$ ion, by which individual molecular species could be identified.

Keywords : phosphatidylglycerol; molecular species; 3,5-dinitrophenylurethane; spinach leaves; *Escherichia coli*; reversed-phase HPLC; electrospray ionization mass spectrometry.

1 緒 言

ホスファチジルグリセロール (PG) は生体膜を構成する酸性リン脂質の一つであり, 種々の生物組織中に少量又は主要成分として広く分布する¹⁾. 例えば, 植物では葉緑体包膜とチラコイド膜に含まれる総脂質の 10~15% を占め, その分子種組成は低温適応に影響を及ぼし²⁾³⁾, 微生物ではホスファチジルエタノールアミンやカルジオリピンとともに菌体膜を構成する主要成分として, 細胞の生育に重要な役割を果たしていると考えられている⁴⁾.

生物由来 PG は, 組み合わせの異なる 2 つのアシル基を含むため, 多数の分子種から構成されている (PG の構造については, Fig. 1 参照). 一般に, 分子種の違いは代謝や生理作用に大きな影響を及ぼすと考えられることから⁵⁾, PG の分子種の詳細を明らかにすることは生化学的

な面ばかりでなく, PG を界面活性剤やドラッグデリバリーシステム等に利用する応用面においても重要である⁶⁾.

PG 分子種は大別して 2 つの方法で分析されている. 一つは, PG の極性 (リン酸) 基をホスホリパーゼ C を用いて加水分解して得られる 1,2-ジアシルグリセロール (1,2-DAG) を *p*-メトキシベンゾエート⁷⁾やジニトロベンゾエート⁸⁾などの紫外 (UV) 吸収誘導体, 又は揮発性誘導体²⁾に変換して, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や気液分配クロマトグラフィー (GLC) によって分析する方法である. この間接的な方法は, 種々の誘導体を調製できるために, 高感度分析が可能であり, 分離も良好で定量性にも優れているなどの利点を有しているが, 加水分解と誘導体調製の 2 つの反応を必要とするために, 多くの時間を要する. また, 加水分解によって生成する 1,2-DAG は, より安定な 1,3-DAG に異性化しやすいために, 実験には迅速さと細心の注意が必要とされる. もう一つは, PG を誘導体に変換することなく直接 HPLC で分析する方法で

¹ 北海道大学大学院水産科学研究科生物資源化学講座: 041-8611
北海道函館市港町 3-1-1

ある。直接法では、試料調製が容易で異性化は起こらないが、PGは極性が大きい上に酸性を示すために固定相との相互作用が強く、間接法（逆相HPLC）で使用される移動相系では良い分離は得られない。このため、PGとイオン対を形成する第四級リン酸アンモニウムを移動相に添加して分離する逆相イオン対HPLCが検討されている⁹⁾。また、PGは検出に有利な官能基をもたないために、UV検出では高感度分析や正確な組成分析は困難である。

著者らは先に、PG分子中の2つのヒドロキシル基を3,5-ジニトロフェニルウレタン (*bis*-DNPU) に変換し、キラルHPLCで分析することにより、PGの4種の立体異性体を良好に分離できることを報告した¹⁰⁾¹¹⁾。キラルHPLCでは生物由来PGを構成する種々の分子種は分離されないため、本研究では、PG *bis*-DNPU誘導体を逆相HPLCで分析して分子種組成を求める方法を検討した。その結果、移動相にメタノール-水-アンモニア水の単純な混液を使用することにより、複雑な組成を有する微生物由来PGの分子種が互いに明りょうに分離され、UV検出では、高い感度で正確に分子種組成を求めることが可能であることが認められた。近年、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) 法によるリン脂質の分子種分析が活発に研究されている¹²⁾。本研究において、逆相HPLCで分離された個々のPG (*bis*-DNPU誘導体) 分子種はオンラインESI-MSにより、容易に同定できることも明らかになったので報告する。

2 実 験

2.1 試 料

試料には、比較的単純なPG組成をもつハウレンソウの葉（函館市内の食料品店にて購入）と複雑な組成の大腸菌 *Escherichia coli* IAM12119を用いた。*E. coli*は、蒸留水1.0 lにポリペプトン5.0 g、肉エキス3.0 g及び塩化ナトリウム3.0 gを溶解した液体培地を用いて37℃で24時間培養した後、遠心分離（8000 rpm, 20 min）によって集菌した。得られた菌体からBligh and Dyer法¹³⁾を用いて総脂質を抽出し、その一部を薄層板（シリカゲル 60 F₂₅₄ TLC板, 20×20 cm, 厚さ0.25 mm, Merck製）にバンド状にスポットしてクロロホルム-メタノール-水（65:25:4, v/v/v）を用いて展開した。風乾後、2',7'-ジクロロフルオレセイン-エタノール溶液（0.2%）を噴霧して紫外線下で成分を検出し、クロロホルム-メタノール-酢酸（20:10:1, v/v/v）を用いてPG (*R_f* 0.24) を吸着剤から抽出した。得られたPGをTLCで分析し、単一スポットであることを確認した。複数のスポットが観察された場合は、再度TLCを行ってPGを精製した。

2.2 脂肪酸分析

総脂質から分離したPGの一部を0.5 N ナトリウムメトキシド-メタノール試薬と反応させて脂肪酸メチルエステルを調製し、これをGLCで分析して脂肪酸組成を求めた。分析カラムにはOmegawax 320（30 m×0.32 mm i.d.）を使用し、キャリアーガス（窒素）流量を1.2 ml/min, カラム温度を170℃, 検出器と注入口温度を230℃に設定して、スプリット法で*n*-ヘキサンに溶解した試料を注入した¹⁴⁾。

2.3 誘導体の調製

PG（約0.5 mg）に、数倍量の3,5-ジニトロフェニルイソシアネートを含む脱水トルエン（関東化学製, 0.5 ml）溶液と脱水ピリジン（関東化学製, 30 μl）を加え、30℃で3時間反応させて*bis*-DNPU誘導体を調製した（Fig. 1）¹⁰⁾。反応混合物からTLC（シリカゲル 60 F₂₅₄ TLC板, 20×20 cm, 厚さ0.25 mm; 移動相, クロロホルム-メタノール-水（80:20:2, v/v/v））を用いて*bis*-DNPU誘導体を分離した。紫外線下で誘導体を示すバンド (*R_f* 0.26) を確認した後、クロロホルム-メタノール-酢酸（20:10:1, v/v/v）を用いてシリカゲルから抽出した。

2.4 HPLC/UV

UV検出逆相HPLC（HPLC/UV）により、PG *bis*-DNPU誘導体の分子種分析を行った。ODSカラム（Mightysil RP-18, 250×4.6 mm i.d., 5 μm, 関東化学製）をL-6000ポンプ（日立製）に接続し、カラム温度をCTO-10AS恒温槽（島津製）を用いて20℃に設定した。移動相にはメタノール-水-29%アンモニア水の混液を使用し、ハウレンソウPGの場合は、その組成を95:5:0.1（v/v/v）に、*E. coli* PGでは93:7:0.1（v/v/v）とした。いずれの場合も、流量は0.5 ml/minとし、イソクラティック溶離法で分析した。移動相のメタノールと水はHPLC用溶媒（和光純薬製）を用い、29%アンモニア水は特級試薬（関東化学製）を用いた。移動相混液は、使用前に0.45 μmのPTFEフィルター（Millipore製）を用いて濾過した。試料を1 mg/mlの濃度になるようにメタノールに溶解し、その5 μlを7125型インジェクター（Rheodyne製）を用いてカラムに注入した。検出器にはL-4000（日立製）を使用し、溶出成分を254 nmでモニターした。クロマトグラムの記録にはクロマトパック C-R6A（島津製）を使用した。分析終了後は、アンモニア水を添加しない移動相を用いてカラムを十分洗浄した。

2.5 HPLC/ESI-MS

PGの分子種 (*bis*-DNPU誘導体) をHPLC/ESI-MSを用いて同定した。HPLCポンプにはP4000（Finnigan製）

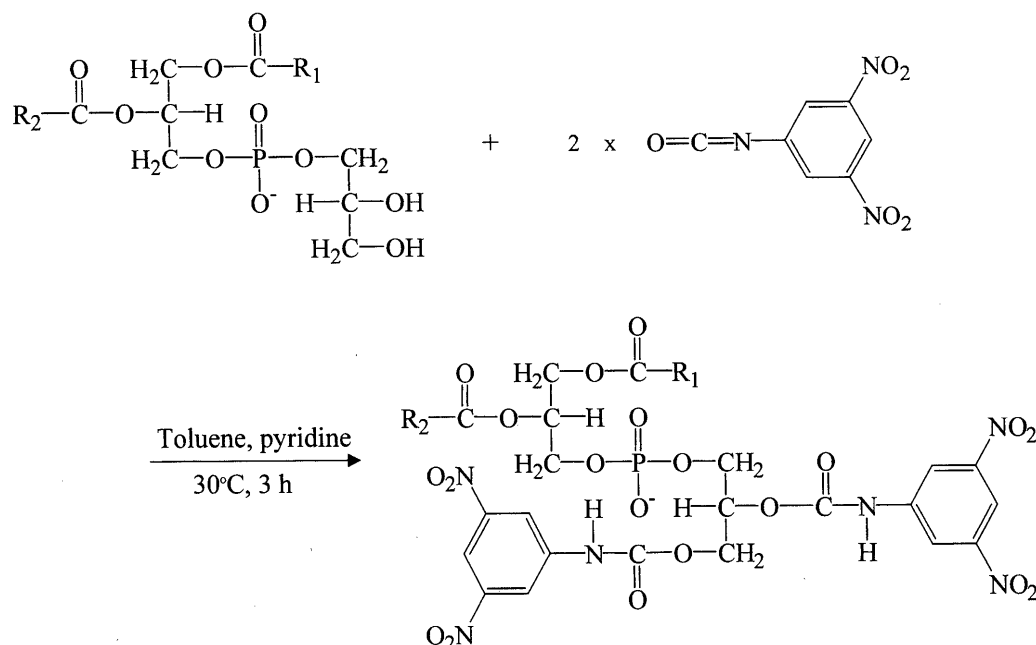


Fig. 1 Preparation of the bis(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols

を使用した。試料を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるようにメタノールに溶解し、オートインジェクター (AS3000, Finnigan 製) を用いて、その 3~5 μl をカラムに注入した。他の HPLC 条件は 2・4 に記載したとおりである。MS 分析には、イオントラップ型質量分析計 LCQ (Finnigan 製) を使用し、加熱キャピラリー温度 260 $^{\circ}\text{C}$ 、スプレー電圧 4.2 kV、シースガス (窒素) 流量 80 arb (arbitrary units), 補助ガス (ヘリウム) 流量 30 arb, キャピラリー電圧 -38 V 及びチューブレンズオフセットを -100 V に設定し、ESI 法により負イオンスペクトルを測定した (質量範囲 150~1500 amu)。この MS 条件では主に $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ の分子量関連イオンが得られた。構成脂肪酸由来のフラグメントイオンを得るために、キャピラリー電圧を -24 V に変更し、衝突誘起解離エネルギー (source CID energy) を 40% に設定して分析した。

3 結果と考察

3・1 脂肪酸組成

以下 (3・3) に述べるように、HPLC/ESI-MS によって、個々の PG 分子種の構成脂肪酸を特定できるが、あらかじめ GLC で総 PG の脂肪酸組成を求めておくことは、分子種の同定を確認する上で有効であった。本研究で分析したホウレンソウ PG と *E. coli* (IAM12119 株) PG の脂肪酸組成を Table 1 に示す。ホウレンソウ PG の主な脂肪酸はリノレン酸 (18:3n-3), パルミチン酸 (16:0) 及びトランス-3-ヘキサデセン酸 (16:1n-13) であり、それぞれ全脂肪酸中 40.8, 22.3, 29.9% を占めた。*E. coli* PG の主な脂肪酸は 16:0, パルミトオレイン酸 (16:1n-7) 及びシ

Table 1 Fatty acid compositions of phosphatidylglycerols from spinach leaves and *Escherichia coli* IAM12119 (wt%)^{a)}

Fatty acid ^{b)}	Spinach leaf	<i>E. coli</i>
14:0	0.3	4.1
14:1	—	0.2
15:0	0.3	4.6
16:0	22.3	34.4
16:1n-9	—	0.2
16:1n-7	—	16.2
16:1n-13	29.9	—
17:0	—	2.0
17:1	—	0.4
cy17:0	—	11.9
18:0	0.9	0.8
18:1n-9	1.1	0.4
18:1n-7	0.6	21.8
18:2n-6	3.8	—
18:3n-3	40.8	—
cy19:0	—	3.0

a) GLC conditions: column, Omegawax 320 (30 m \times 0.32 mm i.d.), carrier gas (He) 1.2 ml/min, column temperature 170 $^{\circ}\text{C}$; b) t: trans, cy: cyclopropane

ス-バクセン酸 (18:1n-7) であり、それぞれ 34.4, 16.2, 21.8% 含まれていた。また *E. coli* には、分子中にシクロプロパン環を持つシス-9,10-メチレンヘキサデカン酸 (cy17:0) が 11.9%, シス-11,12-メチレンオクタデカン酸 (cy19:0) が 3.0% 存在した。これら試料の脂肪酸組成は文献値^{7)15)~17)}と類似した。

3・2 分子種分離

ホウレンソウ PG と *E. coli* PG の bis-DNPU 誘導体の

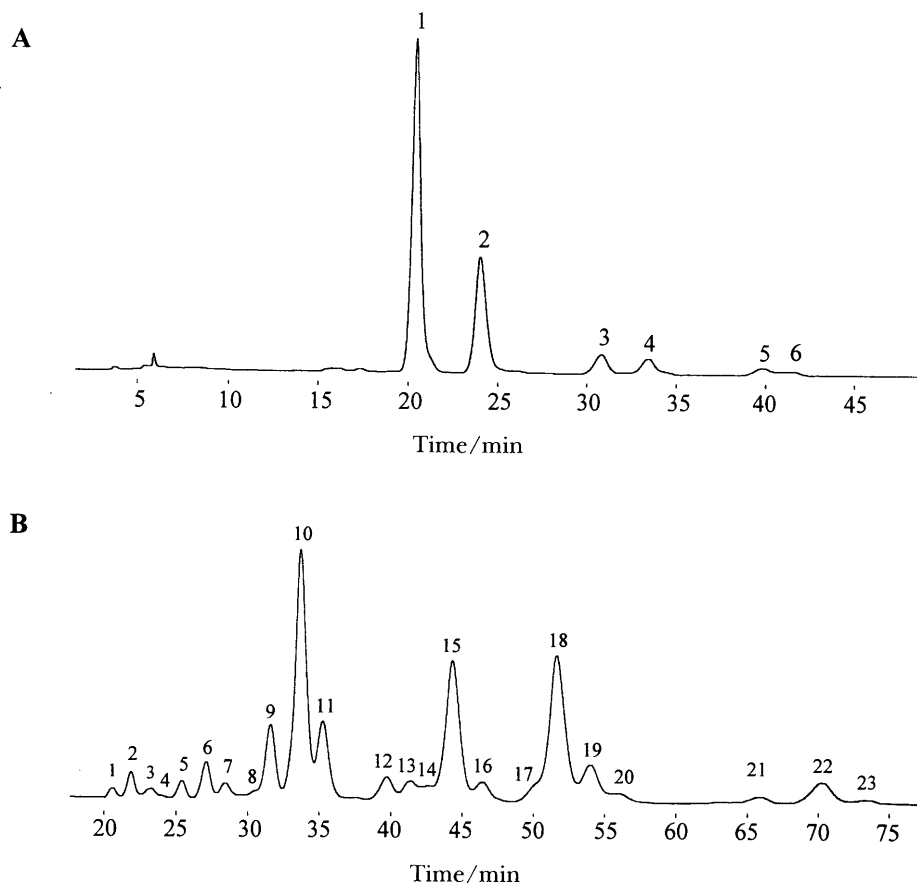


Fig. 2 Reversed-phase HPLC chromatograms of the *bis*(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols from spinach leaves (A) and *Escherichia coli* IMA12119 (B)

HPLC conditions as given in text

Table 2 Molecular species composition of phosphatidylglycerols from spinach leaves obtained by HPLC/ESI-MS and HPLC/UV

Peak no. ^{a)}	ECN ^{b)}	RRT ^{c)}	Molecular species ^{d)}	Peak area, %	
				HPLC/ESI-MS ^{e)}	HPLC/UV ^{f)}
1	26	1.00	18 : 3-16 : 1	57.3	58.9
2	28	1.17	18 : 3-16 : 0	30.8	26.4
3	30	1.48	18 : 2-16 : 0	5.0	5.4
4	30	1.61	16 : 0-16 : 1	4.7	5.2
5	32	1.91	16 : 0-16 : 0	1.4	2.5
6	32	1.98	18 : 1-16 : 0	0.8	1.6

a) Peak numbers correspond to those in Figs. 2A and 3A; b) Equivalent carbon number = total acyl carbon number - 2 × number of double bonds; c) Retention times relative to 18 : 3-16 : 1; d) No distinction is made between the *sn*-1 and *sn*-2 positions; e) [M-H]⁻ ions of the *bis*(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols; f) UV detection of the *bis*(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols

HPLC/UV クロマトグラムを Fig. 2 に示す. 少量のアンモニア水を添加した移動相を用いることにより, 各分子種が形状のよいピークで検出された. ホウレンソウ PG では, メタノール-水-29% アンモニア水 (95 : 5 : 0.1, v/v/v) を用いるイソクラティック溶離法で 45 分程度の分析時間で 6 成分が明りょうに分離された (Fig. 2A). 一方, 成分数の多い *E. coli* PG の場合は, 同 93 : 7 : 0.1 (v/v/v)

を適用して溶出を少し遅らせてピーク間の重なりを避けることにより, 23 成分が検出された. 各成分は, ECN (equivalent carbon number) 値に従ってカラムから溶出した (Table 2 及び Table 3). cy17 : 0 と cy19 : 0 のシクロプロパン酸の ECN 値は, 対応する (分子量の等しい) 17 : 1 及び 19 : 1 と同一と見なして算出した. 同じ ECN 値の分子種の中では, 二重結合をもたない成分が最も早く

Table 3 Molecular species composition of phosphatidylglycerols from *Escherichia coli* IAM12119 obtained by HPLC/ESI-MS and HPLC/UV

Peak no. ^{a)}	ECN ^{b)}	RRT ^{c)}	Molecular species ^{d)}	Peak area, %	
				HPLC/ESI-MS ^{e)}	HPLC/UV ^{f)}
1	28	0.60	14 : 0-14 : 0	0.3	0.6
2	28	0.65	14 : 0-16 : 1	0.9	1.6
3	28	0.68	—	0.1	0.9
4	29	0.69	14 : 1-17 : 0	0.2	n.d. ^{g)}
5	29	0.74	14 : 0-15 : 0	0.6	1.2
6	29	0.80	15 : 0-16 : 1	1.9	2.6
7	29	0.84	14 : 0-cy17 : 0 ^{h)}	0.4	1.4
8	29	0.91	17 : 1-16 : 1	0.3	n.d.
9	30	0.93	16 : 0-14 : 0	6.3	6.8
10	30	1.00	16 : 0-16 : 1	28.9	22.1
11	30	1.05	18 : 1-16 : 1	4.6	7.0
12	31	1.17	16 : 0-15 : 0	0.9	2.4
13	31	1.22	15 : 0-18 : 1	1.0	2.1
14	31	1.26	17 : 0-16 : 1	0.7	1.2
15	31	1.32	16 : 0-cy17 : 0	20.2	15.8
16	31	1.38	18 : 1-cy17 : 0	1.3	2.2
17	32	1.46	16 : 0-16 : 0	0.7	n.d.
18	32	1.54	16 : 0-18 : 1	24.5	20.0
19	32	1.61	18 : 1-18 : 1	3.1	5.0
20	32	1.66	17 : 0-cy17 : 0	0.6	1.3
21	33	1.94	17 : 0-18 : 1	0.5	1.2
22	33	2.08	16 : 0-cy19 : 0	1.7	3.8
23	33	2.19	cy19 : 0-18 : 1	0.3	0.8

a) Peak numbers correspond to those in Figs. 2B and 5A; b) Equivalent carbon number = total acyl carbon number - 2 × number of double bonds. ECN values of cy17 : 0 and cy19 : 0 are taken as equivalent to those of 17 : 1 and 19 : 1, respectively; c) Retention times relative to 16 : 0-16 : 1; d) No distinction is made between the *sn*-1 and *sn*-2 positions; e) [M-H]⁻ ions of the *bis*(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols; f) UV detection of the *bis*(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols; g) n.d., not detected; h) cy, cyclopropane

カラムから溶出した。逆相 HPLC において、移動相に塩基を加えることによって良好な分離が得られるのは、塩基が PG の極性部位と固定相との相互作用を抑制するためであり、塩化コリンやトリエチルアミンなども有効であると言われている¹⁸⁾。移動相に塩基を添加することによって分子種がよく分離されることは、ホスファチジルコリン (PC) についても観察されている^{19)~21)}。一方, Abidi and Mounts は, カウンターイオンとして第 4 級リン酸アンモニウムを用いる逆相イオン対クロマトグラフィーにより, 大豆種子油中に少量存在する PG の分子種を分離し, 低波長 UV (205 nm) 下で溶出成分を検出する方法を報告している⁹⁾。少量のアンモニア水を移動相に添加して分子種を分析する本法は, 移動相の調製が容易であることと *bis*-DNPU 誘導体が強い UV 吸収を示すことから (λ_{\max} 226 nm, ϵ 59600)¹⁰⁾ 高感度である特徴を有している。一方で, 使用した ODS カラムはシリカゲルを基材とするため, アンモニア水を添加した移動相 (pH 9.7~9.8) を使用した場合, カラム性能が低下するおそれがある。しかしながら, 本研究で適用した 0.1% 程度の添加量では保持時間や分離の再現性にほとんど影響は認められなかった。

3.3 分子種の同定

逆相 HPLC で分離された各分子種をオンライン ESI-MS により同定した。ハウレンソウ PG *bis*-DNPU 誘導体の HPLC/ESI-MS によって得られた総イオンカレントクロマトグラム (TIC) を Fig. 3A に示す。HPLC/UV クロマトグラム (Fig. 2A) と同様に 6 成分が検出された。各ピークの負イオンスペクトル中には, [M-H]⁻ の強い脱プロトン化分子が観察されたので (Fig. 3B), このイオンと脂肪酸分析の結果 (Table 1) を利用して各分子種を推測した。例えば, TIC 上で 25~26 分に溶出したピーク 3 (Fig. 3A) の m/z 1163 は, 脂肪酸組成 (Table 1) から 18 : 2-16 : 0 と 18 : 1-16 : 1 の 2 つが考えられる。しかし, 18 : 1 は微量成分であり, マスクロマトグラフィーによっても後者の分子種は検出されなかったことから (Fig. 4), ピーク 3 は 18 : 2-16 : 0 と同定された。

Fig. 5 に, *E. coli* PG 誘導体の HPLC/ESI-MS 分析の結果を示す。HPLC/UV で得られたクロマトグラム (Fig. 2B) と同様に, 明りょうな TIC が得られた (Fig. 5A)。各ピークの質量スペクトルからは, いずれも [M-H]⁻ の強い脱プロトン化分子が検出されたので, このイオンを利用して, ハウレンソウ PG の場合と同様の方法で各分子種の同定を試みた。例えば, TIC 上で 50.2~51.5 分に溶出

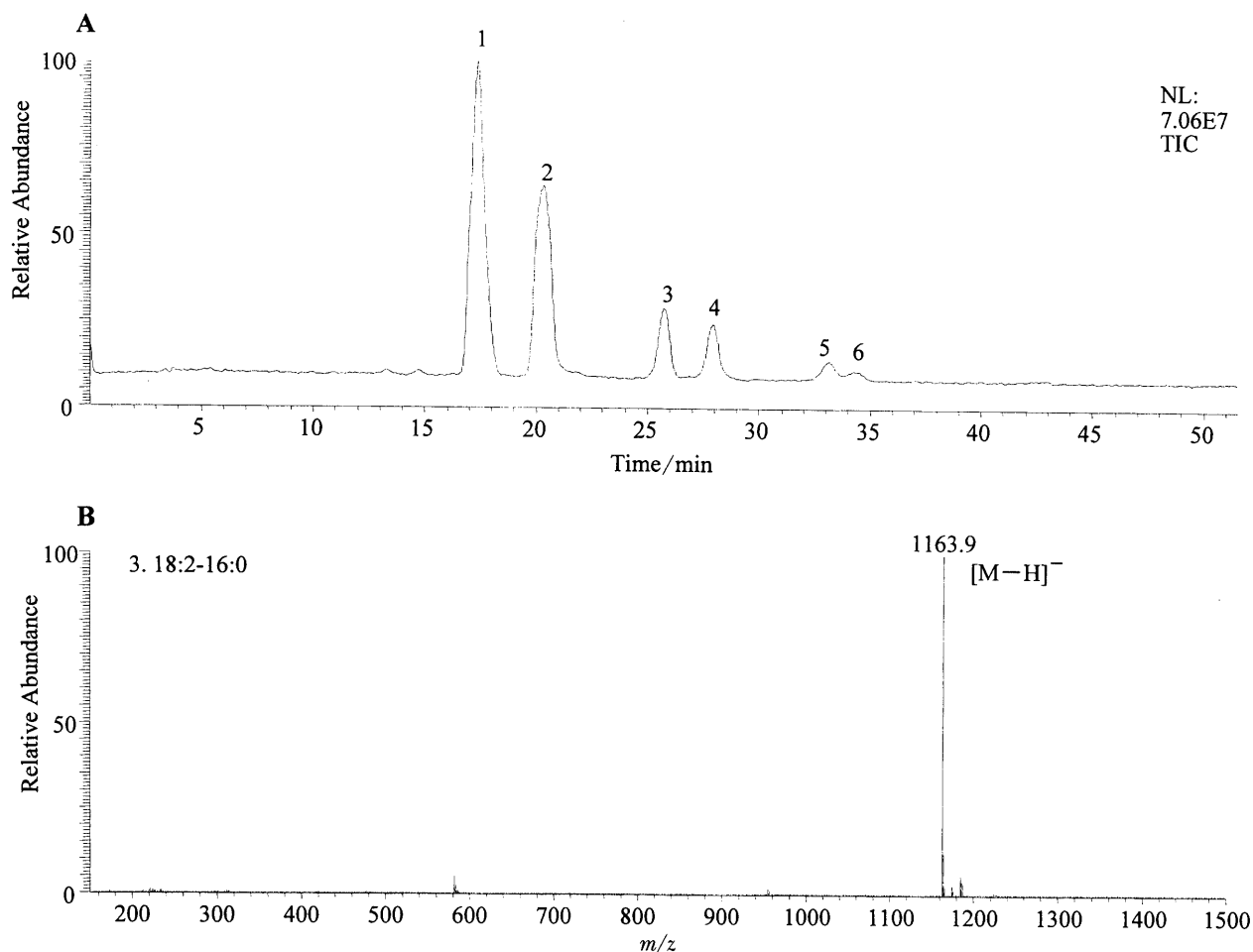


Fig. 3 Reversed-phased HPLC/ESI-MS profiles of the *bis*(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols from spinach leaves

A: total ion chromatogram (TIC); B: mass spectrum averaged over the peak 3 between 25.3 and 26.1 min on TIC. LC/ESI-MS conditions as given in text

するピーク 15 (Fig. 5A) の質量スペクトル中の m/z 1151 は、脂肪酸分析の結果 (Table 1) から 16:0-cy17:0 であると推定される。同様にして他の主要ピークも同定されたが、分子量の等しい成分 (例えば、ピーク 13, 14 及び 15) を正しく同定するためには、各成分の構成脂肪酸に関する情報が必要であった。そこで、イオン源に高電圧 (source CID energy, 40%) を印加してフラグメンテーションを行った結果、DNPU 部が 2 つ脱離した $[M+H-bis-DNPU]^-$ (ベースピーク) と 1 つ脱離した $[M-DNPU]^-$ のフラグメントイオンのほかに、誘導体分子中の 2 つの DNPU 部とアシル基の 1 つが脱離した弱い $[M+2H-bis-DNPU-RCO]^-$ イオンが得られた。したがって、この脂肪酸関連イオンを利用して、HPLC で分離されたほとんどすべての分子種を少量成分を含めて正確に同定することが可能であった。例えば、ピーク 15 (Fig. 5A) の分子種は、脱プロトン化分子 m/z 1151 (Fig. 5B) とアシル基 (cy17:0) 関連の m/z 484 イオン ($[M+2H-bis-DNPU-$

$RCO]^-$) (Fig. 5C) から 16:0-cy17:0 と同定された。他のピークについても同様の方法で解析し、マスキングマトグラフィーによって確認した (Fig. 6)。例えば、 m/z 1151.5 ± 0.5 ($[M-H]^-$) の質量数を検索することにより、分子量の等しい 3 成分 (ピーク 13, 14, 15) が得られた。

3.4 分子種組成

HPLC/UV と HPLC/ESI-MS (SIM) で求めたホウレンソウ PG 及び *E. coli* PG の分子種組成 (ピーク面積%) を Table 2 及び 3 に示す。ホウレンソウ PG の主要分子種は 18:3-16:1 と 18:3-16:0 であることが知られている²⁾⁸⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。本研究で分析した試料でも 18:3-16:1 と 18:3-16:0 で全 PG 中約 90% を占めた。その他少量成分として、18:2-16:0, 16:0-16:1, 16:0-16:0 及び 18:1-16:0 の 4 分子種が検出された。*E. coli* PG からは、これまで未同定だった 1% 以下の少量成分を含めて 23 成分が検出された。主な分子種は 16:0-16:1, 16:0-18:1

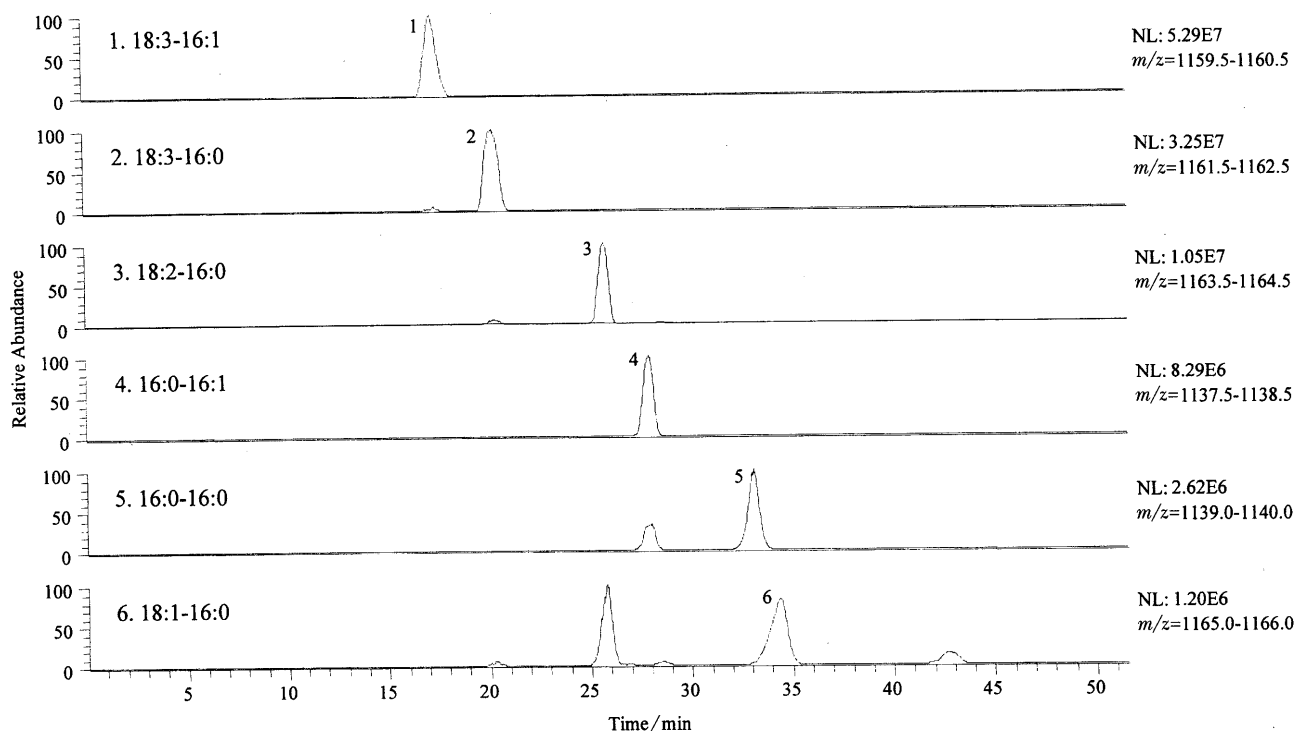


Fig. 4 Mass chromatograms representing $[M-H]^-$ ions of major molecular species of phosphatidylglycerols from spinach leaves

$m/z = [M-H]^- \pm 0.5$

及び 16:0-cy17:0 であった。 *E. coli* K12 由来 PG でも、これら 3 成分が主要分子種であることが報告されている⁷⁾²²⁾。

E. coli 脂質の特徴的成分であるシクロプロパン酸 (cy17:0 及び cy19:0) は PG 分子中の *sn*-2 位に局在することが知られている⁷⁾²²⁾。ピーク 15 (16:0-cy17:0) の質量スペクトルに見られる $[M+2H-bis-DNPU-RCO]^-$ では、cy17:0 のアシル基が脱離したイオンのみが得られ、16:0 関連のイオンは観察されなかった (Fig. 5C)。このことは、本研究で適用した条件では、*sn*-1 位のアシル基よりも *sn*-2 位のアシル基のほうが脱離しやすいことを示唆している。この現象が、アシル基の異なるすべての分子種について共通かどうかは明らかではないが、Vernooij ら¹⁹⁾ も数種の合成リン脂質の ESI-MS を測定し、*sn*-1 位と *sn*-2 位から脱離する脂肪酸由来イオンの強度の違いを報告していることから、今後フラグメンテーションの詳細な解析が必要であると考えられる。

HPLC/UV で得られた分子種組成は HPLC/ESI-MS で得られた値 (面積%) と比較的良好に一致したことから (Table 2 及び 3), HPLC/ESI-MS は分子種の同定ばかりでなく、PG 組成を求める方法としても十分な実用性を有すると思われる。しかし、含有率の高い成分 (ホウレンソウ PG では 18:3-16:0, *E. coli* PG では 16:0-16:1, 16:0-cy17:0 及び 16:0-18:1) では、MS のほうが UV

検出よりも幾分高い値 (4~7%) を示したので、HPLC/ESI-MS で組成を求める場合、成分濃度とピーク面積の相関について、更に詳細に検討する必要があると考えられる。

本研究で確立した方法は、PG を *bis*-DNPU 誘導体に変換して逆相 HPLC/UV と HPLC/ESI-MS で分子種組成を求めるもので、PG を加水分解して組成を求める従来の方法よりも簡便である。HPLC/ESI-MS では、少量 (0.5 pmol 程度) の試料で、少量成分 (総分子種中 1% 程度) を含めて分子種の同定が可能であったことから、本法は天然物由来 PG の分子種分析に広く適用できると考えられる。

本研究の一部は科学研究費補助金 (基盤研究 B 13460088) によって行われた。

文 献

- 1) K. Y. Hostetler: "Phospholipids", Edited by J. N. Hawthorne and G. B. Ansell, p. 215, (1982), (Elsevier, Amsterdam).
- 2) N. Murata: *Plant & Cell Physiol.*, **24**, 81 (1983).
- 3) 大西正男: 化学と生物, **30**, 211 (1992).
- 4) I. Shibuya: *Prog. Lipid Res.*, **31**, 245 (1992).
- 5) D. V. Lynch, R. E. Gundersen, Jr. G. A. Thompson: *Plant Physiol.*, **72**, 903 (1983).
- 6) 原 節子, 戸谷洋一郎: オレオサイエンス, **2**, 13 (2002).
- 7) M. Batley, N. H. Packer, J. W. Redmond: *Biochim.*

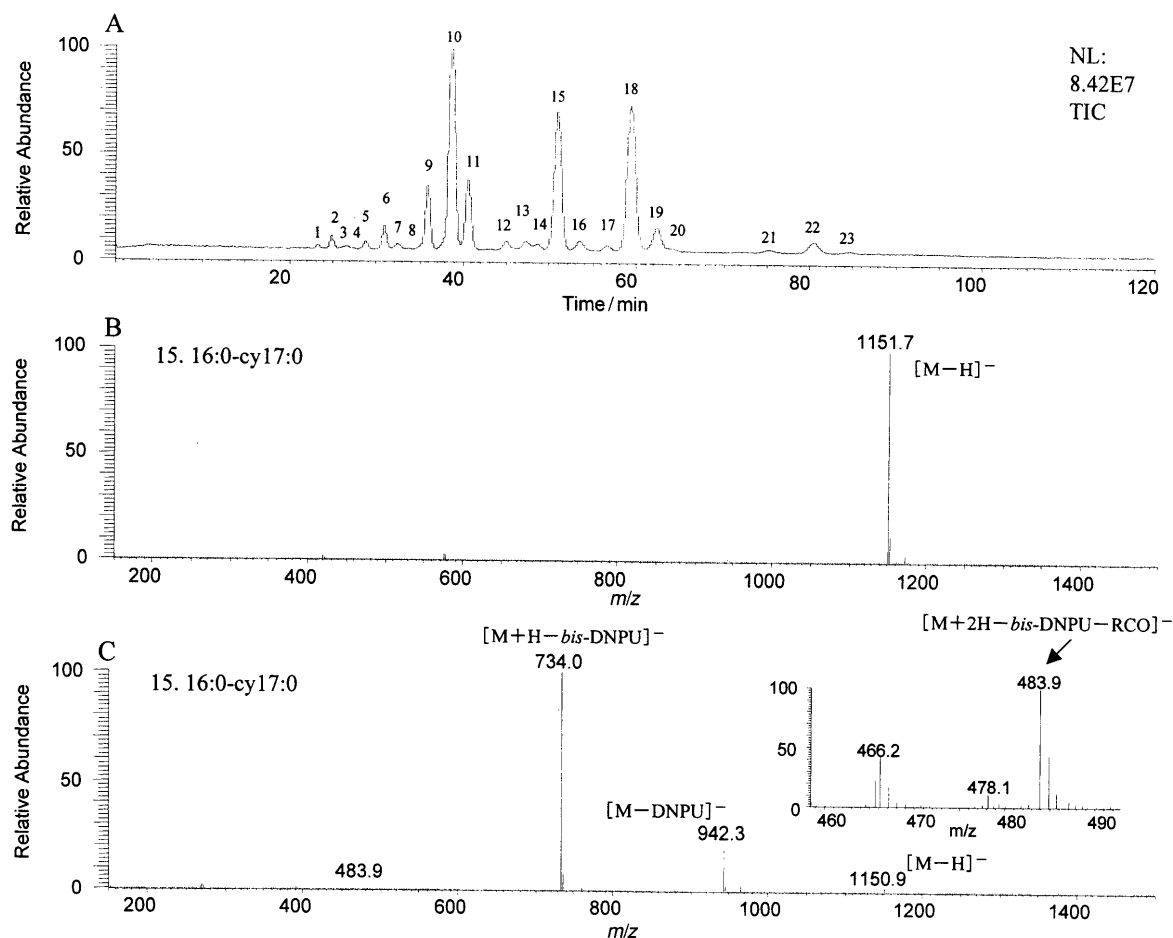


Fig. 5 Reversed-phased HPLC/ESI-MS profiles of the *bis*(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols from *Escherichia coli* IMA12119

A: total ion chromatogram (TIC); B and C: mass spectra averaged over the peak 15 between 50.2 and 51.5 min on TIC. Source CID energy: (A) and (B), 0%; (C) 40%. Other MS conditions as given in text

- Biophys. Acta*, **710**, 400 (1982).
- 8) Y. Xu, P. A. Siegenthaler: *Lipids*, **31**, 223 (1996).
 - 9) S. L. Abidi, T. L. Mounts: *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 231 (1993).
 - 10) Y. Itabashi, A. Kuksis: *Anal. Biochem.*, **254**, 49 (1997).
 - 11) 板橋 豊, 佐藤理奈, 藤島裕典, A. Kuksis: *Chromatography*, **20**, 368 (1999).
 - 12) 田口 良, 北條俊章: *ぶんせき (Bunseki)*, **2003**, 130.
 - 13) E. G. Bligh, W. J. Dyer: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911 (1959).
 - 14) M. Terasaki, Y. Itabashi, T. Suzuki, K. Nishimura: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 1181 (2002).
 - 15) J. L. Brown, T. Ross, T. A. McMeekin, P. D. Nichols: *Int. J. Food Microbiol.*, **37**, 163 (1997).
 - 16) F. Haverkate, L. L. M. Van Deenen: *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 78 (1965).
 - 17) S. Duchene, P.-A. Siegenthaler: *Lipids*, **35**, 739 (2000).
 - 18) J. T. Lin, T. A. McKeon: *J. liquid Chrom. & Rel. Technol.*, **23**, 813 (2000).
 - 19) J. F. H. M. Brouwers, B. M. Gadella, L. M. G. van Golde, A. G. M. Tielens: *J. Lipid Res.*, **39**, 344 (1998).
 - 20) 田尻智計, 板橋 豊: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **51**, 667 (2002).
 - 21) E. A. A. M. Vernooij, J. F. H. M. Brouwers, J. J. Kettenes-van den Bosch, D. J. A. Crommelin: *J. Sep. Sci.*, **25**, 285 (2002).
 - 22) M. Ishioka, R. Kanamoto, M. Kito: *J. Biochem.*, **86**, 161 (1979).

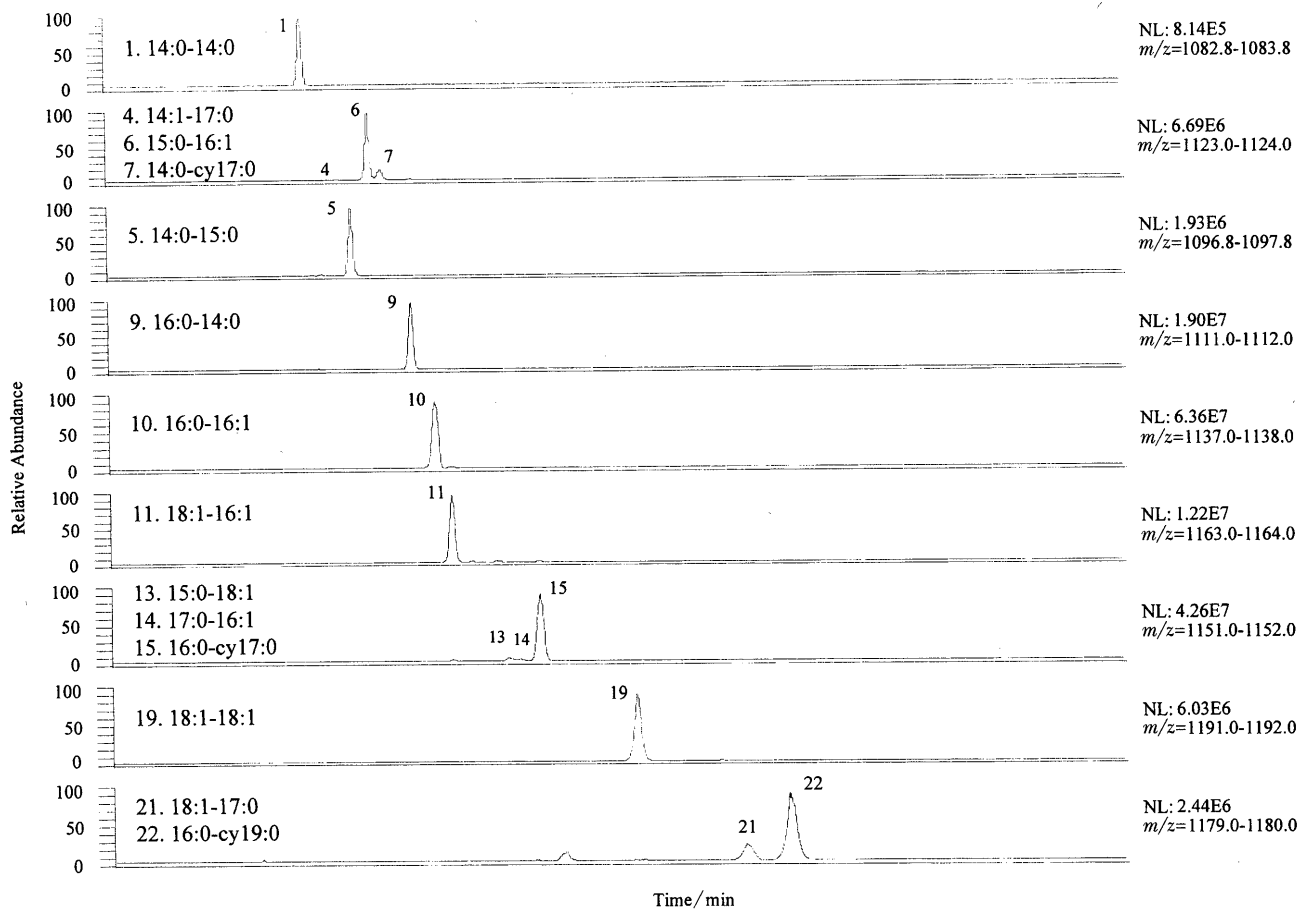


Fig. 6 Mass chromatograms representing $[M-H]^-$ ions of major molecular species of phosphatidylglycerols from *Escherichia coli* IMA12119

$$m/z = [M-H]^- \pm 0.5$$

要 旨

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と質量分析法 (MS) を用いて, 植物チラコイド膜や微生物細胞膜の特徴的成分である酸性リン脂質-ホスファチジルグリセロール (PG)- の分子種の詳細を明らかにする簡便な方法を確立した. ホウレンソウ葉及び大腸菌から分離した PG をビス-3,5-ジニトロフェニルウレタン誘導体 (*bis*-DNPU) に変換して, UV 検出 HPLC (HPLC/UV) とエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (HPLC/ESI-MS) により分析した. HPLC/UV 分析では, ODS 充填剤を含むカラム (25 cm × 4.6 mm i.d.) と少量のアンモニア水を添加した移動相 {(メタノール-水-29% アンモニア水 (93:7:0.1 又は 95:5:0.1, v/v/v)} を用いることによって PG の種々の分子種が明りょうに分離され, 分子種組成を正確に求めることが可能であった. HPLC/ESI-MS では, $[M-H]^-$ の強い分子量関連イオンと構成脂肪酸由来の $[M+2H-bis-DNPU-RCO]^-$ イオンが得られたので, これらを利用して各分子種を同定した. HPLC/UV と HPLC/MS で求めた各分子種のピーク面積比はおおむね一致したことから, PG 誘導体の HPLC/ESI-MS は分子種の同定ばかりでなく, 組成分析法としても有用であることが認められた.