

ノート*

逆相高速液体クロマトグラフィーにおける 1,2-ジアシル
グリセロール位置異性体の分離挙動相澤 知里¹, 塩崎梨絵子¹, 板橋 豊^②

1 緒 言

1,2-ジアシル-*sn*-グリセロール (1,2-DAG) は, グリセロ脂質 (リン脂質やトリアシルグリセロール) の骨格を形成する代謝中間体として, また, プロテインキナーゼ C を活性化するセカンドメッセンジャー分子の一つ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 2 つのアシル基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. 多くの分子種の中で, 特に *sn*-1 位と *sn*-2 位のアシル基が入れ替わった位置異性体は reverse isomers (Fig. 1) といわれるが, クロマトグラフィーによるその分離は大変困難であり, この異性体の生体内での分布や異性体間の生理機能の差異はこれまでほとんど明らかにされていない. このため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. 著者らは先に, 高度にエンドキャップ処理したオクタデシルシリカ (ODS) カラムを装備した逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて 1,2-DAG の reverse isomers の分離を詳細に検討し, 2 つのアシル基の鎖長や不飽和度が大きく異なる場合 (4:0/16:0, 16:0/22:6 など), 両異性体は明瞭に分離されるが, 2 つのアシル基が類似した場合 (16:0/18:0, 18:1/18:2 など), その分離は困難であることを報告した⁴⁾⁵⁾.

ODS カラムの固定相はオクタデシル基 (C₁₈H₃₇) で修飾されており, その疎水性が試料との基本的な相互作用になっている. ODS 固定相の残存シラノールが塩基性化合物などのピーク形状や保持挙動に影響を与えるため, その影響を取り除く処理として現在のカラムの大半は ODS 充填剤の合成工程においてエンドキャップ処理を施している. しかしながら, シラノールが静電的相互作用によって溶質の保持・分離に影響を及ぼす可能性のあることから, 本研究では, シラノール含量の異なる ODS カラムを用い

て種々の reverse isomers を分析し, 残存シラノールの分離に及ぼす影響を調べた. その結果, 残存シラノールは分離に大きな影響を及ぼさないが, 溶出時間を著しく短縮することが認められ, 非エンドキャップ ODS カラムのほうがエンドキャップ ODS カラムよりも reverse isomer 分析に適していることが明らかとなったので報告する.

2 実 験

2.1 試 薬

以下の試薬を用いた. カプリル酸 (8:0), リノール酸 (18:2), リノレン酸 (18:3), 1-オレオイル-*rac*-グリセロール, 1-リノレオイル-*rac*-グリセロール, 1-リノレノイル-*rac*-グリセロール, 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 (Sigma 製); 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP), 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 (東京化成製); 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), エイコサペンタエン酸 (20:5) (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) は, アセトニトリル中で, 3,5-ジニトロアニリンにトリホスゲンを 60℃ で 30 分間反応させて合成した⁶⁾.

2.2 トリアシルグリセロール (TAG) の合成

乾燥クロロホルム (3 mL) に溶解したモノ-及びジアシルグリセロール (0.045 mol) に, 脂肪酸 (0.1 mol),

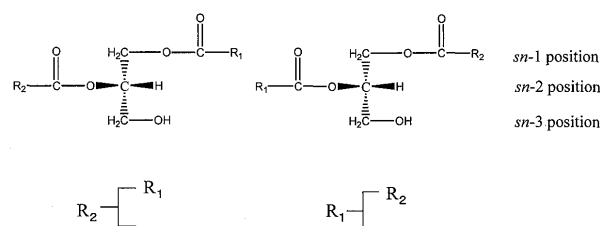


Fig. 1 Structures of 1,2-diacyl-*sn*-glycerol reverse isomers ($R_1 \neq R_2$)

* 若手研究者の初論文特集

¹ 北海道大学大学院水産科学院海洋応用生命科学専攻: 041-8611
北海道函館市港町 3-1-1² 北海道大学大学院水産科学院海洋応用生命科学部門: 041-8611
北海道函館市港町 3-1-1

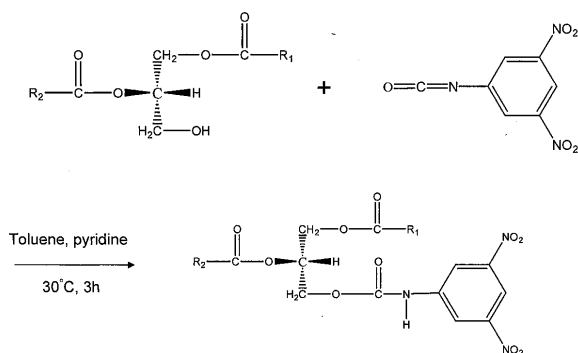


Fig. 2 Preparation of the 3,5-dinitrophenylurethane derivatives of 1,2-diacyl-*sn*-glycerols

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。反応終了後、窒素気流下で溶媒を除去し、残渣に少量のヘキサンを加えて激しくかくはんした。このヘキサン可溶物からシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) [Merck 製シリカゲル 60 F₂₅₄ (厚さ 0.5 mm, 20 cm × 20 cm)] 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線 (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⁷⁾。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 秒間かくはんして反応を停止させた。反応混合物にエーテル (2.5 mL) と蒸留水 (0.5 mL) を加えて 2 分間かくはんした後、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を加えて脱水し、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

3,5-ジニトロフェニルウレタン (DNPU) 誘導体の調製は Itabashi and Kuksis の方法⁸⁾に従って行った (Fig. 2)。1,2-DAG (約 0.5 mg) を含む試料に、乾燥トルエン (500 μL) に溶解した DNPI (5 mg) と乾燥ピリジン (30 μL) を加え、かくはんしながら 30°C で 3 時間反応させた。反応終了後、窒素気流下で溶媒を除去して得られた残渣を少量のクロロホルムに溶解し、TLC [Merck 製シリカゲル

60 F₂₅₄ プレート (厚さ 0.25 mm, 20 cm × 20 cm), 移動相:ヘキサン-ジクロロメタン-エタノール (40:10:3, v/v/v)} を用いて 1,2-DAG の DNPU 誘導体画分を分離した。UV 照射下で誘導体に相当するバンド ($R_f = 0.45$) を確認し、エーテルを用いて回収した。この画分を再度 TLC {移動相:クロロホルム-アセトン (99:1, v/v)} で精製し ($R_f = 0.26$), ほぼ純粋な DNPU 誘導体を得た。

2.5 逆相 HPLC 分析

逆相 HPLC 分析には、Imtakt 製の内径 4.6 mm, 長さ 25 cm, 粒径 3 μm, 細孔径 12 nm のエンドキャップ処理 ODS (Cadenza CD-C18) とシラノール制御型 ODS (Cadenza CL-C18) 及び Merck 製の内径 4.0 mm, 長さ 25 cm, 粒径 4 μm, 細孔径 10 nm のエンドキャップ処理 ODS (Superspher 100 RP-18 e, 炭素量 21.6%, 表面被度 4.09 μmol/m²) と非エンドキャップ処理 ODS (Superspher 100 RP-18, 炭素量 21%, 表面被度 3.61 μmol/m²) の 4 種類のカラムを用いた。Cadenza カラムを装備した HPLC 分析には、LC-20AD ポンプ (島津製), カラム恒温槽 Cool Pocket (Thermo Fisher Scientific 製), SPD-10A UV 検出器 (島津製) 及びクロマトパック C-R8A (島津製) を使用した。Superspher カラムを装備した HPLC 分析には、D-7000 ポンプ (日立製), カラム恒温槽 CTO-10Asvp (島津製) 及び L-7455 Diode Array 検出器 (日立製) を使用した。試料 (DNPU 誘導体) は 2-プロパノールに 1 mg/mL の濃度になるように溶解し、その 5 μL を Rheodyne 製インジェクター (Model 7725) を用いてカラムに注入した。カラム死容量 (void volume) の測定には、試料溶剤を注入して現れたピークの保持容量を用いた。移動相にはアセトニトリル (和光純薬工業製 HPLC 用) のみを用いて 0.5 mL/min の流量で送液し、溶出した成分を 254 nm で検出した。

3 結果と考察

本研究で使用した ODS カラムの残存シラノール含量は、Cadenza CD-C18 < Superspher 100 RP-18e < Cadenza CL-C18 < Superspher 100 RP-18 の順に高いと推定される⁹⁾¹⁰⁾。CD-C18 と RP-18e は今日広く使用されている他の ODS カラムと同様に高度にエンドキャップ処理したカラムである。一方、CL-C18 はエンドキャップ工程をコントロールすることにより意図的に少量のシラノールを残存させたシラノール制御型カラムであり、CD-C18 とは残存シラノール量のみが異なることから、両カラムは残存シラノール量の分離に及ぼす影響を比較するのに適している⁹⁾。Superspher 100 RP-18 はエンドキャップ処理を施さないカラムであり、Superspher 100 RP-18e とは炭素量や表面被度など仕様が幾分異なっている (2.5 参照)。

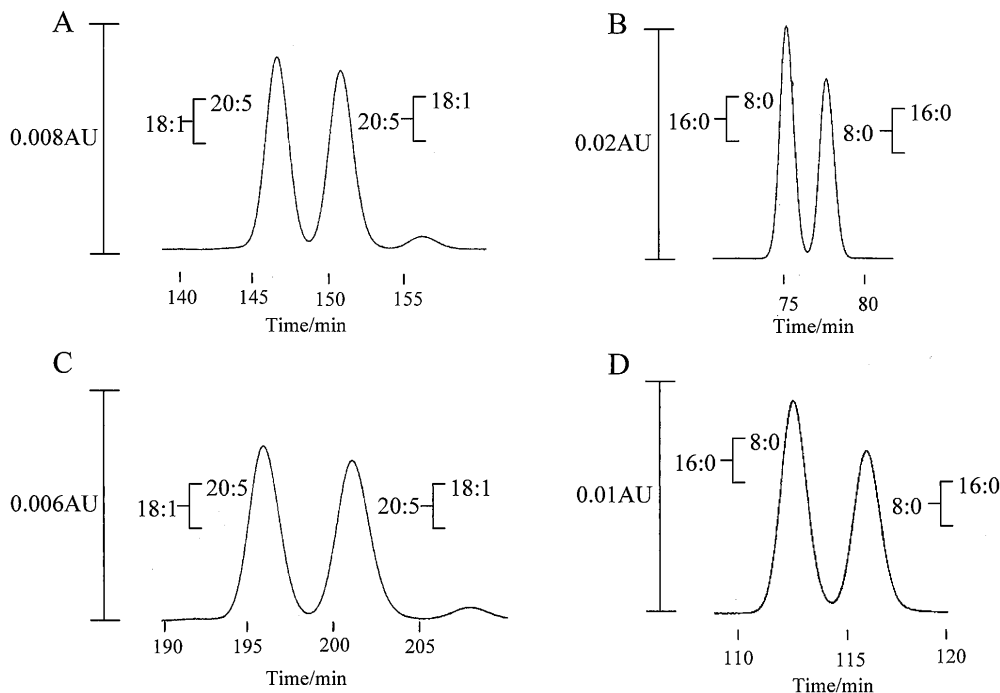


Fig. 3 Reversed-phase HPLC resolution of the reverse isomers of 1,2-diacyl-*rac*-glycerols as 3,5-dinitrophenylurethanes on fully endcapped and controlled endcapped ODS phases

Peak identification (from left to right): 1-icosapentaenoyl-2-oleoyl-*rac*-glycerol (20 : 5/18 : 1), 1-oleoyl-2-eicosapentaenoyl-*rac*-glycerol (18 : 1/20 : 5), 1-capryloyl-2-palmitoyl-*rac*-glycerol (8 : 0/16 : 0) and 1-palmitoyl-2-capryloyl-*rac*-glycerol (16 : 0/8 : 0). (A) and (B), controlled endcapped ODS column (Cadenza CL-C18, 250 × 4.6 mm i.d.); (C) and (D), fully endcapped ODS column (Cadenza CD-C18, 250 × 4.6 mm i.d.). Column temperature, 10°C. Mobile phase, acetonitrile 100%. Flow rate, 0.5 mL/min.

3・1 シラノール制御型 ODS カラムによる位置異性体 (reverse isomers) の分離

ODS カラムに残存するシラノールの分離へ及ぼす影響を検討するために, 高度にエンドキャップ処理した ODS (Cadenza CD-C18) とシラノールを少量残存させたシラノール制御型エンドキャップ ODS カラム (Cadenza CL-C18) を用いて, 飽和及び不飽和脂肪酸から構成された 1,2-DAG の reverse isomers (DNPU 誘導体) の分離を検討した. 1-エイコサペンタエノイル-2-オレオイル-*rac*-グリセロール (20 : 5/18 : 1) とその reverse isomer (18 : 1/20 : 5) 及び 1-カプリロイル-2-パルミトイル-*rac*-グリセロール (8 : 0/16 : 0) とその reverse isomer (16 : 0/8 : 0) のクロマトグラムを Fig. 3 に示す. 高度にエンドキャップ処理した CD-C18 カラムで完全な分離を得るためには, 20 : 5/18 : 1 と 18 : 1/20 : 5 の不飽和 reverse isomers については約 205 分, 8 : 0/16 : 0 と 16 : 0/8 : 0 の飽和 reverse isomers については約 120 分の分析時間を要したが (Fig. 3, C & D), 適度にシラノールを残した CL-C18 カラムでは分析時間が大幅に短縮され, それぞれ 155 分と 80 分ほどでほぼ完全な分離が得られた (Fig. 3, A & B). 一般に, 残存シラノールが溶質とイオンの, 水素結合的相互作用をした場合, シラノールを残したカラムは十分にエンドキャ

ップ処理したカラムに比べて溶質を強く保持する. しかしながら, 本研究では逆に, 十分にエンドキャップ処理したカラムの方が溶質 (DNPU 誘導体) を強く保持した. このことは, 極性の小さい溶質と残存シラノール間の相互作用は弱く, 逆にシラノールを封じたカラムのアルキル基と溶質間でより強い疎水性相互作用の起こることを示唆する.

2 種のカラムを用いて得られた標準品の保持容量 (V_r), 保持係数 (k), 分離係数 (α), 分離度 (R_s) 及び理論段数 (N) を Table 1 に示す. 保持係数は CD-C18 が CL-C18 よりも大きい値を示したが, 分離係数は両カラムで同一 (1.03) であった. このことは, 溶質の保持に影響を与える相互作用のサイトがエンドキャップ処理カラム (CD-C18) よりもシラノールを残したカラム (CL-C18) に多いことを示唆する. エンドキャップ処理することで導入されるトリメチルシリル (TMS) 等の置換基はシラノール基よりもかさ高いため, ODS のアルキル鎖は絡まりあわずに均一に伸びているが, 非エンドキャップカラムのアルキル鎖は動きやすく, シリカ表面は不均一であるといわれている¹¹⁾. また, 水系の移動相中では ODS のアルキル鎖は互いに絡まりあった構造をとるが, 有機溶剂量 (メタノール) の増加でより伸びた状態になると考えられている¹²⁾.

Table 1 Chromatographic parameters of the reverse isomers of saturated and unsaturated 1,2-diacylglycerols as their 3,5-dinitrophenylurethanes on Cadenza CD-C18 and CL-C18 columns^{a)}

Diacylglycerol		Cadenza CD-C18					Cadenza CL-C18				
<i>sn</i> -1(3)	<i>sn</i> -2	V_r ^{b)}	k ^{c)}	α ^{d)}	R_s ^{e)}	N ^{f)}	V_r	k	α	R_s	N
20:5	18:1	94.86	30.56	1.03	1.47	42700	69.84	21.29	1.03	1.41	39900
18:1	20:5	97.87	31.53								
8:0	16:0	52.96	13.22	1.03	1.31	33100	34.44	10.87	1.03	1.36	32500
16:0	8:0	54.62	13.64								

a) Column temperature, 10°C. Other HPLC conditions as given in text. b) V_r = retention volume (mL) corrected by subtracting the column void volume (CD-C18, 3.10 mL; CL-C18, 3.28 mL). c) k = retention factor. d) α = separation factor. e) R_s = peak resolution. $R_s = 1.18 (tr_2 - tr_1) / (w_1 + w_2)$, where w = peak half width (min). f) N = theoretical plate. $N = 5.54 \{tr (min) / w (min)\}^2$.

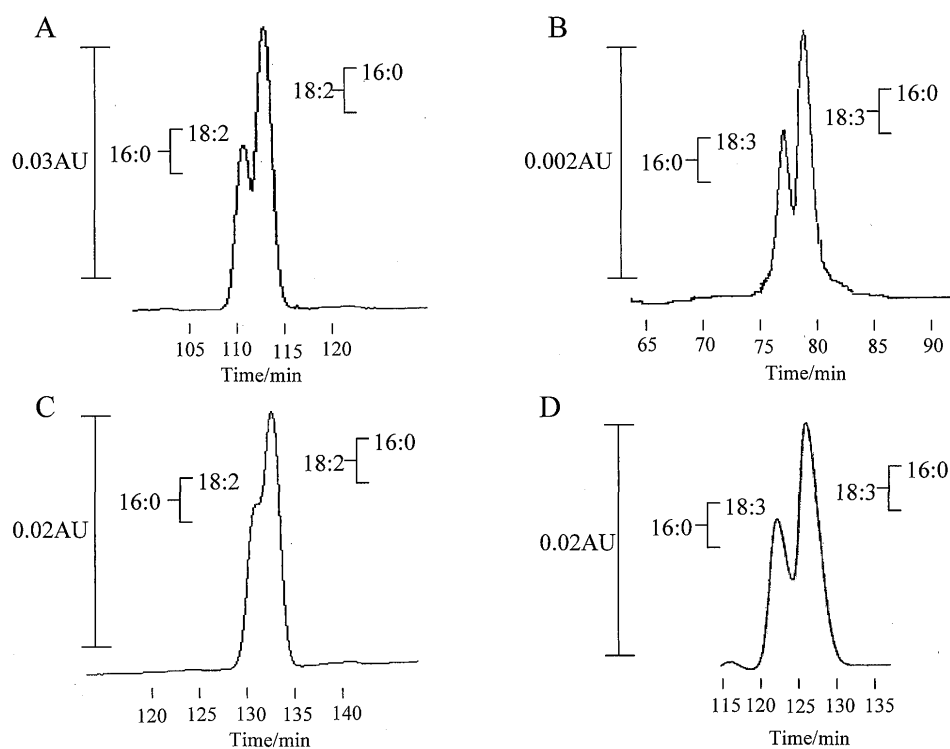


Fig. 4 Reversed-phase HPLC resolution of the reverse isomers of 1,2-diacyl-*rac*-glycerols as 3,5-dinitrophenylurethanes on fully encapped and non-encapped ODS phases

Peak identification (from left to right): 1-linoleoyl-2-palmitoyl-*rac*-glycerol (18:2/16:0), 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*rac*-glycerol (18:2/16:0), 1-linolenoyl-2-palmitoyl-*rac*-glycerol (18:2/16:0) and 1-palmitoyl-2-linolenoyl-*rac*-glycerol (16:0/18:2). (A) and (B), non-encapped ODS column (Superspher 100 RP-18, 250 × 4.0 mm i.d.); (C) and (D), fully encapped ODS column (Superspher 100 RP-18e, 250 × 4.0 mm i.d.). Column temperature, 18°C. Mobile phase, acetonitrile 100%. Flow rate, 0.5 mL/min.

本研究では移動相にアセトニトリルのみを用いたが、メタノールを使用した場合でも、異性体の分離は低下するものの、シラノールを残した CL-C18 カラムのほうが誘導体を早く溶出した。したがって、ODS のアルキル基はアセトニトリル中でも十分伸び出しているものと推測される。これらのことから、シラノールを封じたカラム (CD-C18)

のアルキル鎖の方がアセトニトリル中でより均一に立ち上がっていて疎水性相互作用を受けやすく、このことが溶質 (DNPU 誘導体) をより強く保持する要因であると考えられる。

以上の検討により、エンドキャップ処理の有無は異性体の分離に影響を及ぼさず、溶出時間に大きな影響を与える

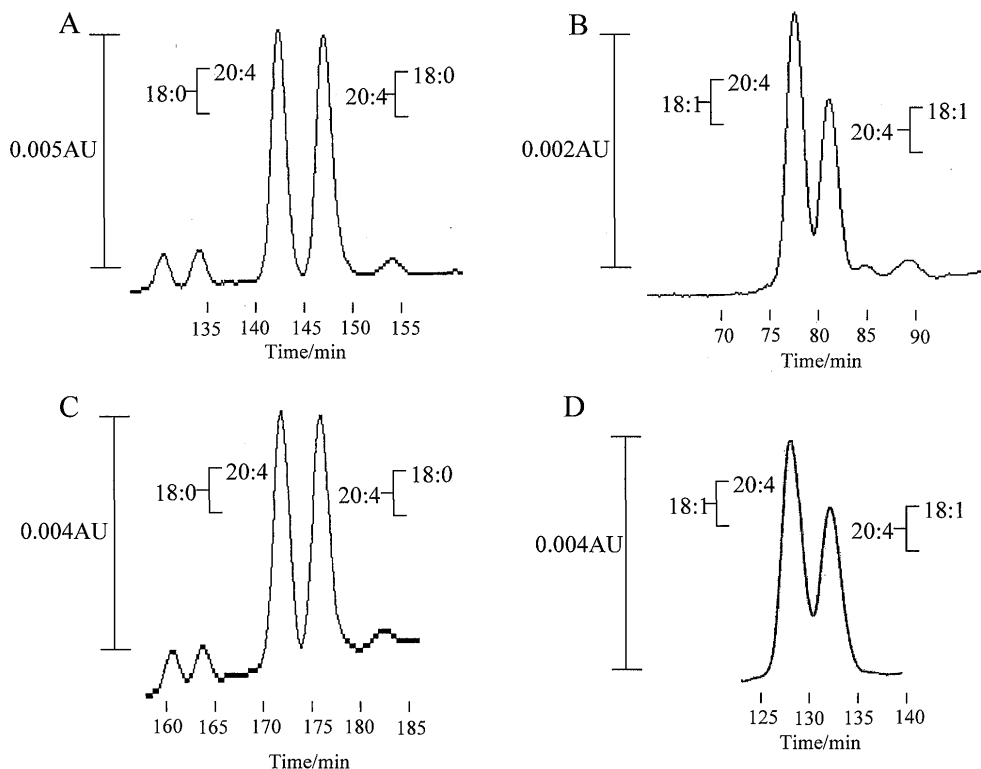


Fig. 5 Reversed-phase HPLC resolution of the reverse isomers of 1,2-diacyl-*rac*-glycerols as 3,5-dinitrophenylurethanes on fully encapped and non-encapped ODS phases

Peak identification (from left to right): 1-arachidonoyl-2-stearoyl-*rac*-glycerol (20 : 4/18 : 0), 1-stearoyl-2-arachidonoyl-*rac*-glycerol (18 : 0/20 : 4), 1-arachidonoyl-2-oleoyl-*rac*-glycerol (20 : 4/18 : 1) and 1-oleoyl-2-arachidonoyl-*rac*-glycerol (18 : 1/20 : 4). (A) and (B), non-encapped ODS column (Superspher 100 RP-18, 250 × 4.0 mm i.d.); (C) and (D), fully encapped ODS column (Superspher 100 RP-18e, 250 × 4.0 mm i.d.). Column temperature, 18°C. Mobile phase, acetonitrile 100%. Flow rate, 0.5 mL/min

ことが明瞭になった。すなわち、高度にエンドキャップ処理した ODS カラムよりも適度にシラノールを残存させた ODS カラムのほうが分析時間が短く、reverse isomer 分析に適することが認められた。

3.2 非エンドキャップ処理 ODS カラムによる位置異性体 (reverse isomers) の分離

1,2-DAG の reverse isomers (DNPU 誘導体) を残存シラノール含量の高い非エンドキャップ処理 ODS カラム (Superspher 100 RP-18) を用いて分析し、その溶出挙動を高度にエンドキャップ処理したカラム (Superspher 100 RP-18e) と比較した。1-リノレオイル-2-パルミトイル-*rac*-グリセロール (18 : 2/16 : 0) とその reverse isomer (16 : 0/18 : 2) 及び 1-リノレイル-2-パルミトイル-*rac*-グリセロール (18 : 3/16 : 0) とその reverse isomer (16 : 0/18 : 3) のクロマトグラムを Fig. 4 に示す。Cadenza ODS カラムと同様に、残存シラノールをそのまま残した RP-18 カラムのほうが、より短い時間で成分を溶出した。RP-18 カラムは 2 つのアシル基の類似した (炭素数の差及び不飽和度の差の小さい) 18 : 2/16 : 0 と

16 : 0/18 : 2 について、RP-18e カラムよりも幾分良い分離を示した (Fig. 4, A & C)。2 つのアシル基が大きく異なる 1-アラキドノイル-2-ステアロイル-*rac*-グリセロール (20 : 4/18 : 0) とその reverse isomer (18 : 0/20 : 4) 及び 1-アラキドノイル-2-オレオイル-*rac*-グリセロール (20 : 4/18 : 1) とその reverse isomer (18 : 1/20 : 4) のクロマトグラムを Fig. 5 に示す。Fig. 4 のクロマトグラムと同様に、エンドキャップ未処理カラムはエンドキャップ処理カラムよりも短い溶出時間で良好な reverse isomer 分離を示した。

2 種のカラムを用いて得られた分離パラメータ (V_r , k , α , R_s , N) を Table 2 に示す。RP-18 カラムでは、16 : 0/18 : 2 と 18 : 2/16 : 0 の α は 1.02 ($R_s = 0.72$) であり、部分的な分離が得られたが、RP-18e カラムではショルダーピークとして保持時間のシフトが認められたに過ぎなかった。16 : 0/18 : 3 と 18 : 3/16 : 0 の α は両カラムとも 1.02 であったが、RP-18e カラムでの R_s は 0.85 であり、RP-18 カラムでの $R_s = 0.97$ に比べて幾分小さい値が得られ、非エンドキャップ ODS カラムのほうがより良い分離を示した。20 : 4/18 : 0 と 18 : 0/20 : 4 の reverse isomers

Table 2 Chromatographic parameters of the reverse isomers of 1,2-diacylglycerols containing polyunsaturated acyl chains as their 3,5-dinitrophenylurethanes on Superspher 100 RP-18e and 100 RP-18^{a)}

Diacylglycerol		Superspher 100 RP-18e					Superspher 100 RP-18				
<i>sn</i> -1(3)	<i>sn</i> -2	$V_r^{b)}$	$k^{c)}$	$\alpha^{d)}$	$R_s^{e)}$	$N^f)$	V_r	k	α	R_s	N
18:2	16:0	—	—	—	—	—	54.79	21.45	—	—	—
16:0	18:2	66.92	27.84	—	—	—	55.78	21.86	1.02	0.72	26800
18:3	16:0	57.01	23.94	—	—	—	37.55	14.14	—	—	30200
16:0	18:3	58.26	24.49	1.02	0.85	—	38.39	14.48	1.02	0.97	30900
20:4	18:0	85.08	35.67	—	—	25600	72.06	28.53	—	—	30800
18:0	20:4	88.12	36.98	1.04	1.39	25000	74.86	29.68	1.04	1.68	31500
20:4	18:1	58.89	25.76	—	—	22500	39.75	16.24	—	—	28500
18:1	20:4	60.46	26.45	1.02	0.94	21800	40.74	16.67	1.03	1.06	28500

a) Column temperature, 18°C. Other HPLC conditions as given in text. b) V_r = retention volume (mL) corrected by subtracting the column void volume (RP-18e, 2.29 mL; RP-18, 2.22 mL). c) k = retention factor. d) α = separation factor. e) R_s = peak resolution. $R_s = 1.18 (tr_2 - tr_1) / (w_1 + w_2)$, where w = peak half width (min). f) N = theoretical plate. $N = 5.54 \{ tr (min) / w (min) \}^2$.

についても同様に α はそれぞれ 1.04 であったが, R_s は 1.68 と 1.39 であり, 分離に大きな違いが認められた. 20:4/18:1 と 18:1/20:4 の reverse isomers についても同様の傾向が認められた. いずれのカラムにおいても, Cadenza カラムと同様に, *sn*-1 位に不飽和度の高いアシル基をもつ極性の大きな reverse isomer が, *sn*-2 位に不飽和度の高いアシル基をもつ極性のより小さい reverse isomer よりも先に溶出した.

上述したように, Cadenza CD-C18 と CL-C18 カラムは残存シラノール量が異なるだけでシリカゲル基材や ODS 導入量は全く同じであるのに対して, Superspher RP-18e と RP-18 カラムは ODS のエンドキャップ処理の有無の他に炭素量や表面被度も幾分異なっている. 両カラムの理論段数を比較すると, CD-C18 と CL-C18 は測定したすべての reverse isomers についておおむね等しい値を示したが, RP-18 で得られた値は RP-18e のそれよりも明らかに大きく, カラム効率の高いことが認められた. したがって, RP-18 カラムで得られたより良い分離には, 残存シラノールよりもカラム効率が大きく関与していると考えられる. なお, 2つのアシル基が類似した reverse isomers (16:0/18:0, 18:1/18:2 など) の分離は今回使用したいずれのカラムを用いても困難であった.

最近の HPLC 用 ODS 充填剤は, 残存シラノールの影響を減らすためにエンドキャップ処理を施したものがほとんどであるが, 本研究においてエンドキャップ有無の分離に及ぼす影響を検討した結果, 残存シラノールをそのまま残

した ODS カラムの方がエンドキャップ処理したカラムで得られる分離を維持しながら reverse isomers の溶出時間を大幅に短縮することが明らかになった. 以上の結果から, 1,2-DAG の reverse isomers の分析には高度にエンドキャップ処理した ODS カラムよりもエンドキャップ未処理 ODS カラムのほうが適していると結論された.

Reverse isomer 分析についてコメントを頂いた高橋是太郎教授 (北海道大学) に感謝いたします.

文 献

- 1) Y. Nishizawa: *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) Y. Itabashi, A. Kuksis: *Chromatography*, **21**, 85 (2000).
- 6) Y. Itabashi: "HPLC of Acyl Lipids", Edited by J.-T. Lin, T. A. McKeon, Chapter 7, p. 167, (2005), (HNB Publishing, New York).
- 7) J. J. Myher, A. Kuksis: *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **62**, 352 (1984).
- 8) Y. Itabashi, A. Kuksis, J. J. Myher: *J. Lipid Res.*, **31**, 2119 (1990).
- 9) Imtakt Technical Report TR001 (Imtakt Co., Kyoto).
- 10) S. Momchilova, Y. Itabashi, B. Nikolova-Damyanova, A. Kuksis: *J. Sep. Sci.*, **29**, 2578 (2006).
- 11) F. Gritti, G. Guiochon: *J. Chromatogr. A*, **1098**, 82 (2005).
- 12) 原 昭二, 森 定雄, 花井俊彦: "クロマトグラフィー分離システム", p. 244-259, (1981), (丸善).

Reversed-Phase HPLC Separation of 1,2-Diacylglycerol Regioisomers

Chisato AIZAWA¹, Rieko SHIOZAKI¹ and Yutaka ITABASHI²

¹ Division of Marine Life Science, Chair of Marine Bioresources Chemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1, Minato-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611

² Division of Marine Life Science, Laboratory of Marine Bioresources Chemistry, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1, Minato-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611

(Received 18 April 2007, Accepted 21 August 2007)

We investigated the separation of the regioisomers (reverse isomers) of 1,2-diacyl-*rac*-glycerols by reversed-phase HPLC on columns containing endcapped and non-endcapped ODS phases. The reverse isomers of 1,2-diacylglycerols, having various pairs of acyl groups including saturated and unsaturated chains, were chromatographed as 3,5-dinitrophenylurethanes (DNPU) using acetonitrile as the mobile phase. Baseline separations were achieved for the reverse isomers of very different pairs of acyl groups, such as caprylate/palmitate and stearate/arachidonate, on both endcapped and non-endcapped ODS columns, which retained longer less-polar isomers with a lower degree of unsaturation or shorter chain at the *sn*-1(3) position. The latter columns, however, markedly shortened the elution times of the derivatives compared to the former columns. Most commercially available ODS columns are fully endcapped so as to decrease any undesirable influence of residual silanol. The present study, however, demonstrates that non-endcapped ODS phases are more suitable for reverse isomer separation than fully endcapped ones.

Keywords : 1,2-diacylglycerols; reverse isomers; 3,5-dinitrophenylurethanes; reversed-phase HPLC; non-endcapped ODS.