

海藻中の不飽和脂肪酸の GC/MS による解析： 不飽和度別分画と不飽和位置の同定*

力石嘉人**・奈良岡浩***

(2005年6月20日受付, 2005年8月23日受理)

1. はじめに

脂肪酸は、生物の細胞膜を構成する主要な脂質分子であり、また土壌や堆積物などの環境試料中にも普遍のかつ多量に見いだされるため、最も有用なバイオマーカーの1つとして多くの研究で用いられている。不飽和脂肪酸は、同じ炭素数の飽和脂肪酸に比べて低い融点を示し、この傾向は一般に不飽和度が大きくなるにつれ顕著になる。そのため不飽和脂肪酸は、生物が生育環境（温度）に適応した細胞膜を作るために非常に重要であり、様々な生物は多種多様な不飽和脂肪酸を持っている (Harwood, 1994 など)。さらに、不飽和脂肪酸の不飽和度や不飽和位置には生物特異性があり、この特徴は生物の化学分類法などに利用されている。有機地球化学においても、不飽和脂肪酸の分布や同位体比情報の有用性は古くから指摘され、これまでも多くの研究が活発に行われてきた (Meier-Augenstein, 2002 など)。

筆者らは、Chikaraishi *et al.* (2004a) で、海藻に含まれる飽和・不飽和脂肪酸を不飽和度別に分画し、分子レベル安定水素・炭素同位体比を報告した。本報では、この論文で用いた不飽和脂肪酸の不飽和度別分画法と不飽和位の同定法を詳しく報告する。

2. 不飽和脂肪酸の表記

脂肪酸の名称と簡略式をリノール酸を例として Fig. 1 に示す。脂肪酸は慣用名で呼ばれることが多く、また様々な簡略式で表記される。本報では、一般的な表記に習い、1 不飽和及び1,4-ジエン型の脂肪酸は簡略式 a で、それ以外は簡略式 b で表記した。

3. 試料

神奈川県湯河原町の相模湾沿岸で採取した紅藻 (カエルデグサ, *Binghamia californica*, 2001年2月採取) から抽出した飽和・不飽和脂肪酸 (メチルエステル誘導体化物, 以下 FAMES と記述) を用いた (詳しい抽出法・メチルエステル誘導体化法については, Chikaraishi *et al.* (2004b) を参照)。

4. 分析方法

4.1. 硝酸銀シリカゲルの調製

シリカゲル (100メッシュ粉末) を 450°C で 3 時間加熱し、含有する有機物・水分を完全に除去した。乾燥シリカゲルに対して 10 wt% の硝酸銀を等量の蒸留水 (予め有機溶媒で十分に洗浄しておく) に溶解し、シリカゲルに分散して加えた。1 時間ほど激しく振り十分に混合した後、110°C

* GC/MS analysis of mono and polyunsaturated fatty acids in a marine macroalga: separation and double-bond identification

** 独立行政法人海洋研究開発機構・地球内部変動研究センター, 〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2-15
Institute for research on Earth Evolution, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
2-15 Natsushima-cho, Yokosuka 237-0061, Japan
E-mail: ychikaraishi@jamstec.go.jp Tel: 046-867-9778 Fax: 046-867-9775

*** 岡山大学理学部地球科学科, 〒700-8530 岡山県岡山市津島中3-1-1
Department of Earth Sciences, Okayama University, Tsushima-Naka 3-1-1, Okayama 700-8530, Japan

で2時間加熱乾燥した。乾燥後、シリカゲルは *n*-ヘキサン（予め超音波で十分に脱気しておく）中で遮光保存した。

4.2. 飽和・不飽和 FAMES の不飽和度別分画法

FAMES は、直径 6 mm のパスツールピペットを用いた硝酸銀シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより不飽和度ごとに分画した (Fig. 2)。

まず、長さ 4 cm のカラムで、飽和 FAMES (9 ml, *n*-ヘキサン/ジクロロメタン, 4/1, v/v) と不飽和 FAMES (4 ml, ジクロロメタン/酢酸エチル, 4/1, v/v) に分画した。次に不飽和 FAMES を長さ 6 cm のカラムを用いて、1 不飽和 FAMES (4 ml, ジクロロメタン/酢酸エチル, 49/1, v/v), 2 不飽和 FAMES (4 ml, ジクロロメタン/酢酸エチル, 49/1, v/v), 3 不飽和 FAMES (4 ml, *n*-ヘキサン/酢酸エチル, 4/1, v/v), 4 不飽和 FAMES (5 ml, *n*-ヘキサン/酢酸エチル, 4/1, v/v), 5 不飽和 FAMES (2 ml, ジクロロメタン/酢酸エチル, 3/1, v/v + 5 ml, *n*-ヘキサン/酢酸エチル, 4/1, v/v) に分画した。

4.3. 不飽和位置の同定のための誘導体化：1 不飽和 FAMES

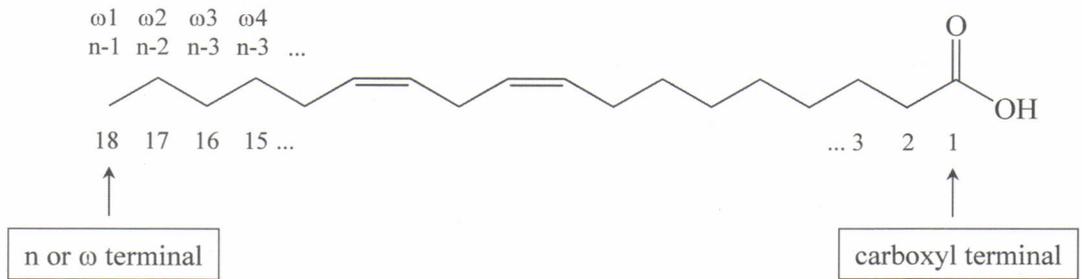
1 不飽和 FAMES の不飽和位置の同定には、ジ

メチルジスルフィド (dimethyl disulphide, 以下 DMDS と記述) 誘導体化法を用いた。これは、FAMES の不飽和位 (C=C 二重結合) に 2 つのメチルスルフィド基 (-SCH₃) を導入する誘導体化法であり (Fig. 3), 1 不飽和 FAMES の不飽和位置の同定のみに用いることができる。これまで、Leonhardt and DeVilbiss (1985), Nichols *et al.* (1986), Scribe *et al.* (1988) などの報告例がある (Table 1)。

1 ml アンプルに 50 μl の 1 不飽和 FAMES/*n*-ヘキサン溶液, 100 μl の DMDS, 1-2 滴の 6 wt% ヨウ素/ジエチルエーテル加え, アンプル内の空気を窒素ガスに置換したのち封管し, 50°C にて 48 時間反応させた。室温まで自然に冷却した後, 反応液を 10 ml 遠沈管に移し, 1 ml の 5 wt% チオ硫酸水溶液を添加した。1-2 ml の *n*-ヘキサン/クロロホルム (4/1, v/v) で 4-5 回抽出し, FAMES-DMDS 誘導体化物を得た。

4.4. 不飽和位置の同定のための誘導体化：多不飽和 FAMES

多不飽和 FAMES の不飽和位置の同定には、ジメチルオキサゾリン (dimethylloxazoline, 以下 DMOX と記述) 誘導体化法を用いた。これは、FAMES に 2-アミノ-2-メチルプロパノール (2-



Systematic name: 9, 12-Hexadecadienoic acid
 Trivial name: Linoleic acid
 Shorthand designation a: 18:2(n-6)
 b: 18:2(Δ^{9,12})
 c: 18:3ω6
 d: 18:2(9,12)

Fig. 1. Systematic name and shorthand designations of Linoleic acid.

amino-2-methylpropanol) を反応させ、不飽和位に対応した特徴的なイオンフラグメントを持つ DMOX を生成させる誘導体化法である (Fig. 4)。これまで、Fay and Richli (1991), Luthria and Sprecher (1993), Christie (1998) などの報告例がある (Table 1)。

1 ml アンプルに、多不飽和 FAMES を入れ、窒素ガス気流化で濃縮・乾固し、75°C に温めて

おいた 2-アミノ-2-メチルプロパノールを約 200-500 μ l 添加した。アンプル内の空気を窒素ガスに置換したのち封管し、180°C にて 24 時間反応させた。75°C まで自然に冷却した後、500 μ l の 75°C の蒸留水を加えた。反応液を 10 ml 遠沈管に移し、1-2 ml の *n*-ヘキサン/ジクロロメタン (2/3, v/v) で 4-5 回抽出し、FAMES-DMOX 誘導体化物を得た。

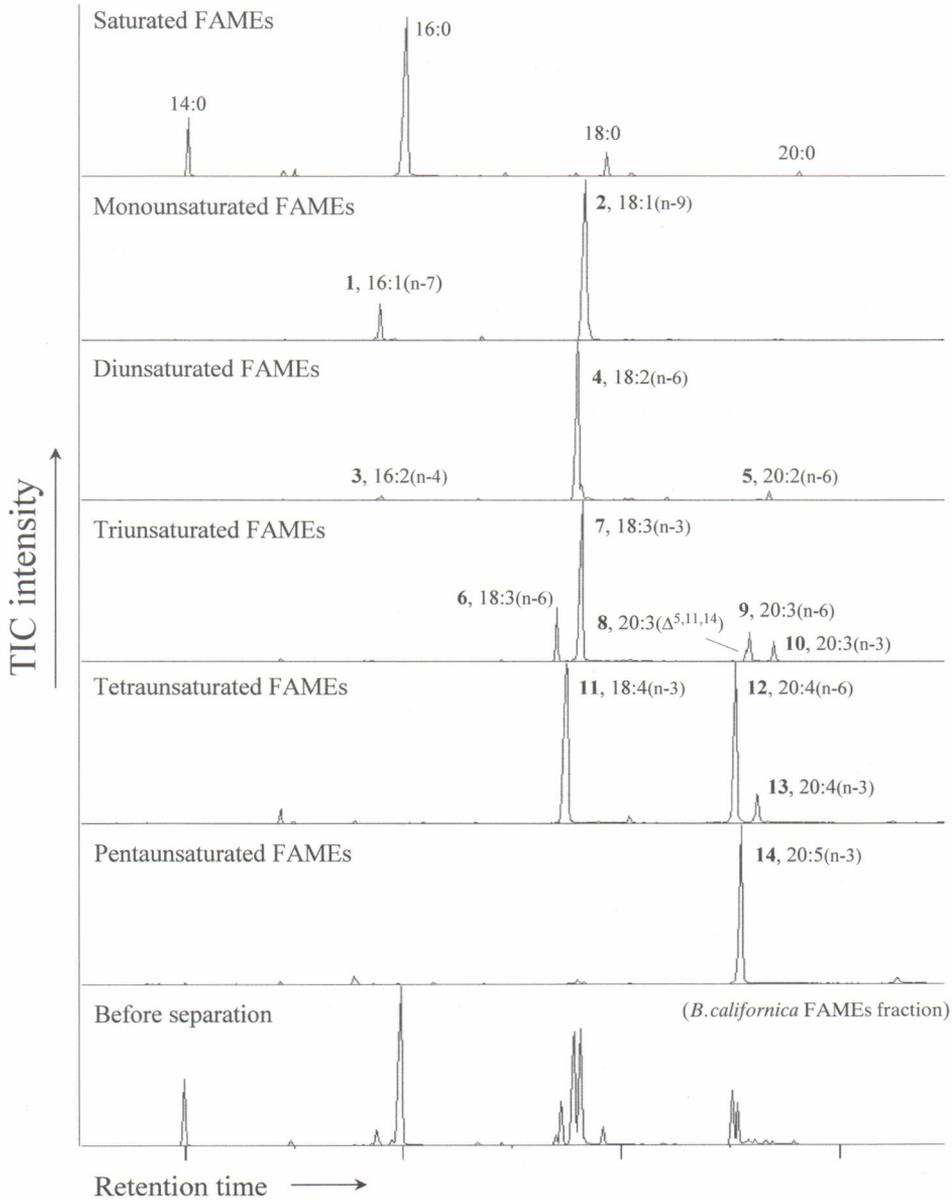


Fig. 2. Gas chromatograms (total ion chromatogram, TIC, on GC/MS analysis) of FAMES in *B. californica*.

4.5. ガスクロマトグラフィー／質量分析：
GC/MS

マススペクトルの測定は、Hewlett-Packard 社 (現・Agilent 社) 製、HP 6890 ガスクロマトグラフ／HP MSD 5972A 質量分析計を用いた。分

析カラムは、J & W DB-5MS (30 m 長, 0.25 mm 内径, 0.25 μm 膜厚) を使用し、オープン温度は、50°C で 2 分保持し、120°C まで 30°C / 分で昇温し、120°C から 310°C まで 5°C / 分で昇温した後、310°C で 8 分間保持した。

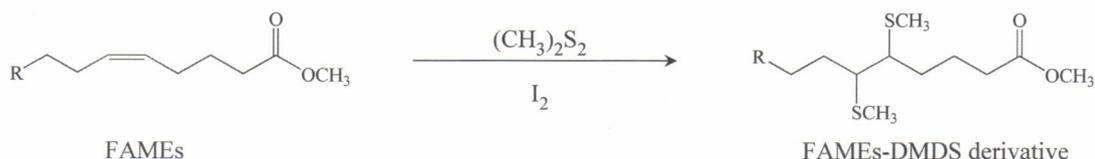


Fig. 3. DMDS derivatization of FAMES

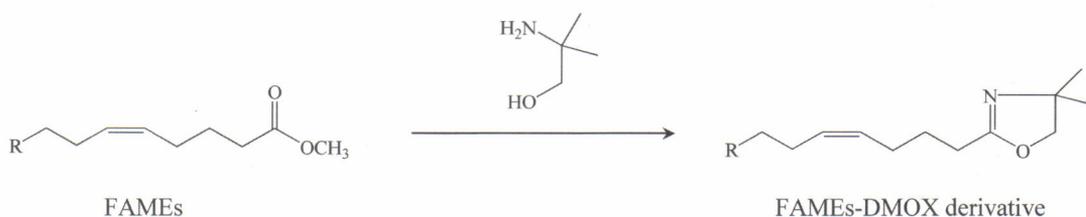


Fig. 4. DMOX derivatization of FAMES

Table 1. Identification level of unsaturated fatty acids.

Peak No.*	Systematic name	Trivial name	Shorthand designation	Identification level**		
				This study	Reference	Reference paper
<i>Monounsaturated</i>						
1	9-Hexadecenoic acid	Palmitoleic acid	16 : 1 (n-7)	2	1	Nichols <i>et al.</i> (1986)
2	9-Octadecenoic acid	Oleic acid	18 : 1 (n-9)	4	4	Scribe <i>et al.</i> (1988)
<i>Diunsaturated</i>						
3	9,12-Hexadecadienoic acid		16 : 2 (n-4)	1		
4	9,12-Octadecadienoic acid	Linoleic acid	18 : 2 (n-6)	4	4	Fay and Richli (1991)
5	11,14-Eicosadienoic acid		20 : 2 (n-6)	2	4	Fay and Richli (1991)
<i>Triunsaturated</i>						
6	6,9,12-Octadecatrienoic acid	γ -Linoleic acid	18 : 3 (n-6)	4	4	Fay and Richli (1991)
7	9,12,15-Octadecatrienoic acid	α -Linoleic acid	18 : 3 (n-3)	4	4	Fay and Richli (1991)
8	5,11,14-Eicosatrienoic acid		20 : 3 ($\Delta^{5,11,14}$)			
9	8,11,14-Eicosatrienoic acid	Dihomo- γ -linoleic acid	20 : 3 (n-6)	2	4	Fay and Richli (1991)
10	11,14,17-Eicosatrienoic acid	Dihomo- α -linoleic acid	20 : 3 (n-3)	2	4	Fay and Richli (1991)
<i>Tetraunsaturated</i>						
11	6,9,12,15-Octadecatetraenoic acid		18 : 4 (n-3)	2	4	Fay and Richli (1991)
12	5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid	Arachidonic acid	20 : 4 (n-6)	2	4	Fay and Richli (1991)
13	8,11,14,17-Eicosatetraenoic acid		20 : 4 (n-3)	1		
<i>Pentaunsaturated</i>						
14	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	Eicosapentaenoic acid (EPA)	20 : 5 (n-3)	2	4	Fay and Richli (1991)

* Peak numbers refer to chromatogram in Fig. 2, and mass spectra in Fig. 5.

** 1. Interpretation of mass spectral data.

2. Coincidence in mass spectral data in a reference.

3. Coincidence in mass spectral and retention time data in a reference.

4. Coincidence in mass spectrum and GC retention time with that of authentic standard.

5. マススペクトル

5.1. 1 不飽和 FAMES-DMDS 誘導体

1 不飽和 FAMES-DMDS 誘導体は、メチルス

ルフィドが付加した位置（すなわち、もとの FAMES の不飽和位）で、非常に特徴的な強いイオンフラグメントを示す。これにより 1 不飽和 FAMES の不飽和位置は、ほぼ100%正確に同定

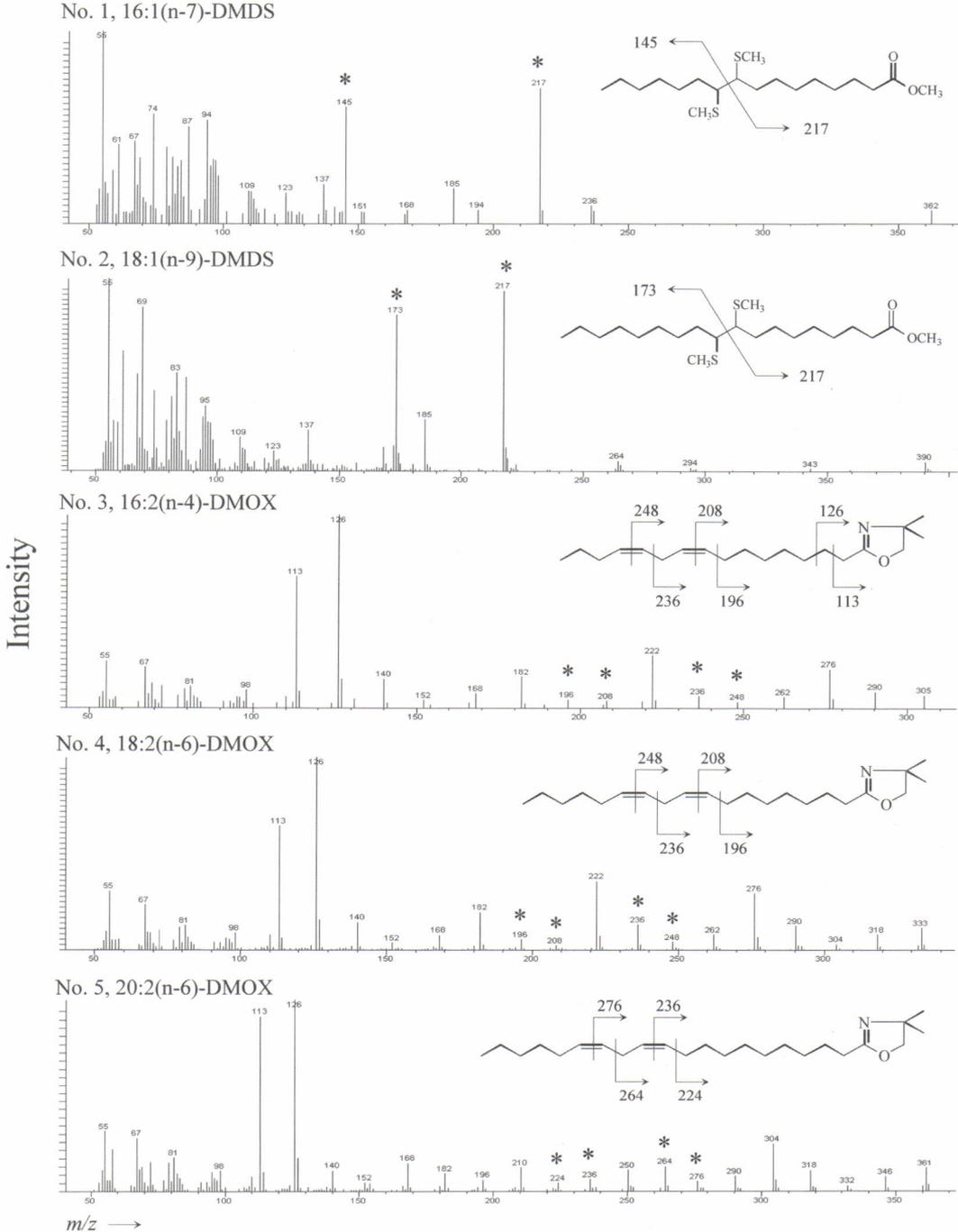


Fig. 5. Mass spectra of FAMES-DMDS and -DMOX derivatives. (No.1-No.5)

される (Fig. 5, No.1-2)。例えば, 16:1(n-7) のマススペクトルは, DMDS 誘導体の親イオンが m/z 362 であり, n-7 位に帰属される 2 つの主要なイオンフラグメント m/z 145 と m/z 217 を

持つ。また, 18:1(n-9) のマススペクトルも同様に, DMDS 誘導体の親イオンが m/z 390 であり, n-9 位に帰属される 2 つの主要なイオンフラグメント m/z 173 と m/z 217 を持つ。

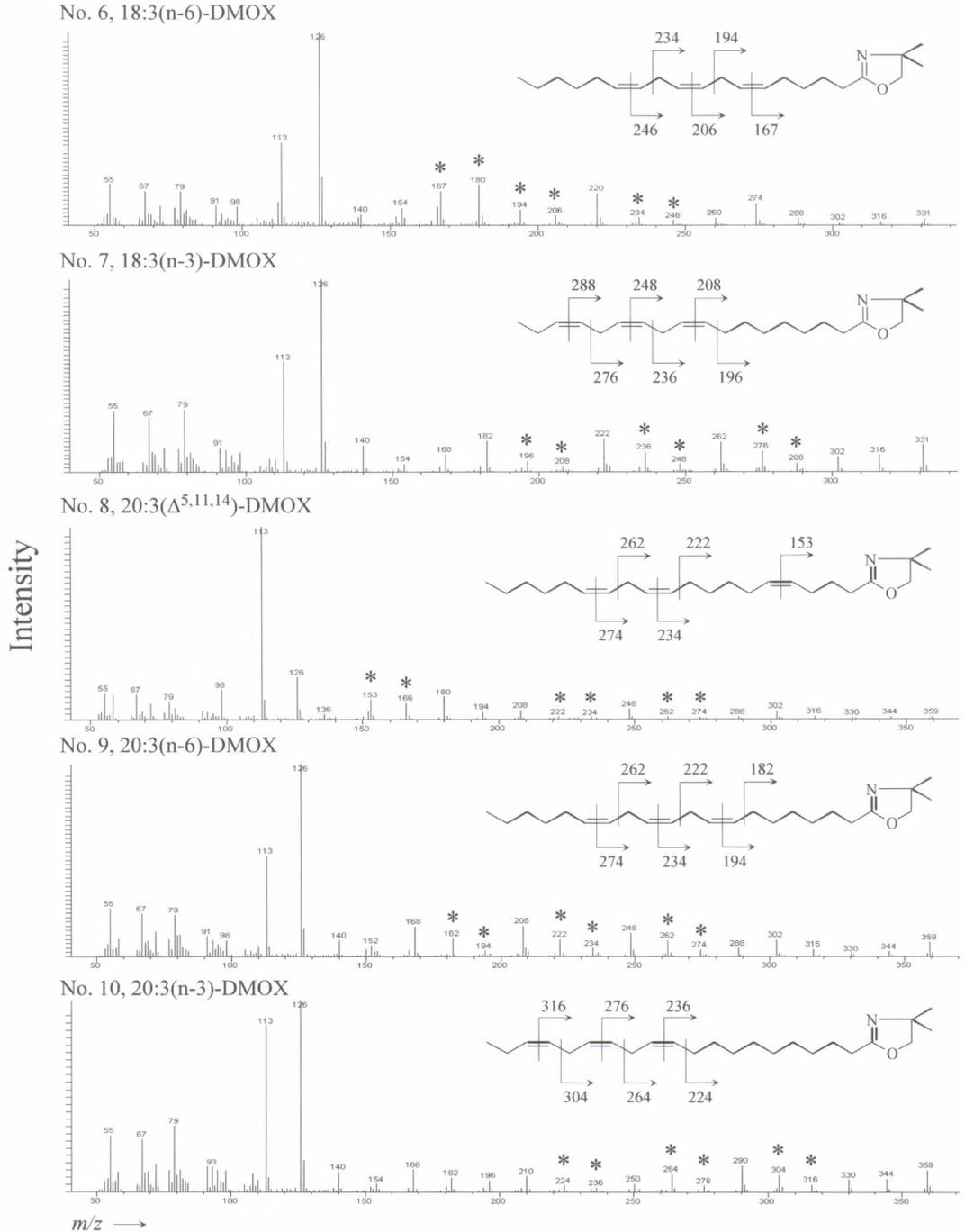


Fig. 5. (continued) Mass spectra of FAMES-DMDS and -DMOX derivatives. (No.6-No.10)

5.2. 多不飽和 FAMES-DMOX 誘導体

多不飽和 FAMES-DMOX 誘導体のマススペクトルもまた不飽和位に対応した特徴的なイオンフラグメントを示す (Fig. 5, No.3-14)。しかし、不飽和位が、カルボキシル基末端に近くなると正確な不飽和位置の同定が困難になる場合もある。多不飽和 FAMES-DMOX 誘導体の一般的なマススペクトルは、親イオン (M) に対して、まず15ダルトン小さいイオンフラグメント (M-15) が得られ、その後不飽和位まで14ダルトン間隔でイオンフラグメントが得られる。そして不飽和位で

は、12ダルトンの間隔でイオンフラグメントが得られる。また、不飽和位がカルボキシル基末端に近くなると13ダルトンの間隔が、2重結合の位置を示す場合もある。

例えば、18:2(n-6) (Fig. 5, No.4) では、DMOX 誘導体の親イオンが m/z 333 であり、14ダルトンの間隔で、 m/z 318 \rightarrow 304 (n-1 位)、304 \rightarrow 290 (n-2 位)、290 \rightarrow 276 (n-3 位)、276 \rightarrow 262 (n-4 位)、262 \rightarrow 248 (n-5 位) のイオンフラグメントを持つ。そして、n-6 位 (Δ^{12} 位) で m/z 248 \rightarrow 236 と12ダルトンの間隔を持ち、1

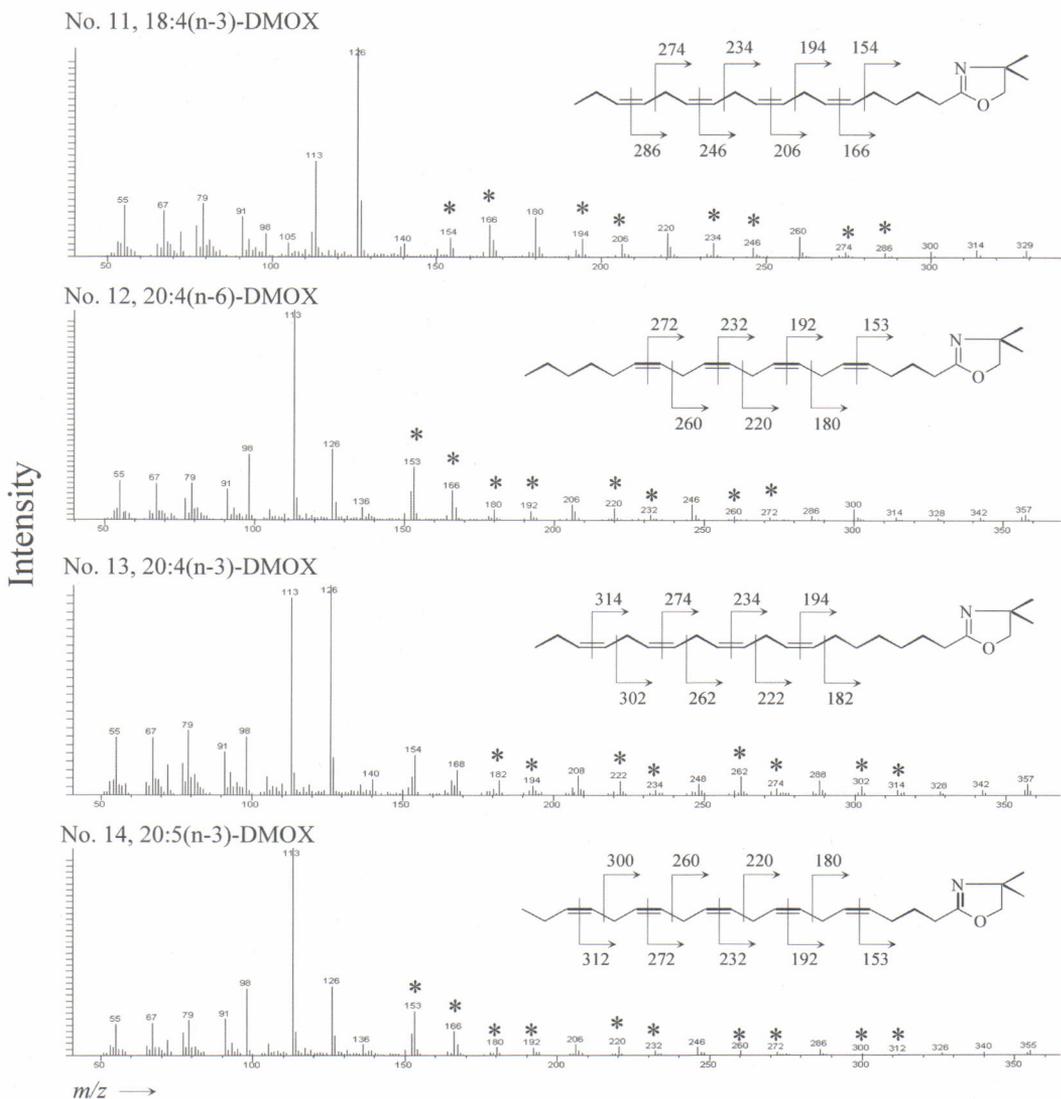


Fig. 5. (continued) Mass spectra of FAMES-DMDS and -DMOX derivatives. (No.11-No.14)

つ目の不飽和位が n-6 位であることを示す。m/z 236 → 222 (n-7 位), 222 → 208 (n-8 位) と 14 ダルトンの間隔のあと, n-9 位 (Δ^9 位) で m/z 208 → 196 と 12 ダルトンの間隔を持ち, 2 つ目の不飽和位が n-9 位であることを示す。その後は, m/z 196 → 182 (n-10 位), 182 → 168 (n-11 位) と再び 14 ダルトンの間隔を持つ。

また, 20 : 3 ($\Delta^{5,11,14}$) (Fig. 5, No.8) では, DMOX 誘導体の親イオンが m/z 359 であり, 14 ダルトンの間隔で, m/z 344 → 330 (n-1 位), 330 → 316 (n-2 位), 316 → 302 (n-3 位), 302 → 288 (n-4 位), 288 → 274 (n-5 位) のイオンフラグメントを持つ。そして, n-6 位 (Δ^{14} 位) で m/z 274 → 262 と 12 ダルトンの間隔を持ち, 1 つ目の不飽和位が n-6 位であることを示す。m/z 262 → 248 (n-7 位), 248 → 234 (n-8 位) と 14 ダルトンの間隔のあと, n-9 位 (Δ^{11} 位) で m/z 234 → 222 と再び 12 ダルトンの間隔を持ち, 2 つ目の不飽和位が n-9 位であることを示す。m/z 222 → 208 (n-10 位), 208 → 194 (n-11 位), 194 → 180 (n-12 位), 180 → 166 (n-13 位) は 14 ダルトンの間隔であり, 最後に n-14 位で m/z 166 → 153 と 13 ダルトンの間隔を持つ。これは, 3 つ目の不飽和位が n-15 位 (Δ^5 位) であることを示す。

謝 辞

石渡良志名誉教授 (東京都立大学), 山本正伸助教授 (北海道大学大学院) には本稿の査読を通し, 貴重なご助言を頂きました。記して厚く感謝致します。

引用文献

- Chikaraishi, Y., Suzuki, Y. and Naraoka, H. (2004a). Hydrogen isotopic fractionations during desaturation and elongation associated with polyunsaturated fatty acid biosynthesis in marine macroalgae. *Phytochemistry*, **65**, 2293-2300.
- Chikaraishi, Y., Naraoka, H. and Poulson, S. R. (2004b) Hydrogen and carbon isotopic fractionations of lipid biosynthesis among terrestrial (C3, C4 and CAM) and aquatic plants. *Phytochemistry*, **65**, 1369-1381.
- Christie, W. W. (1998) Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids*, **33**, 343-353.
- Fay, L. and Richli, U. (1991) Location of double bonds in polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry after 4,4-dimethylloxazoline derivatization. *J. Chromatogr.*, **541**, 89-98.
- Harwood, J. L., 1994. Lipid metabolism. In : Gunstone, F. D., Harwood, J. L., Padley, F. B. (eds), *The Lipid Handbook*, Chapman and Boundary, London, p.605-664.
- Leonhardt, B. A. and DeVilbiss, E. D. (1985) Separation and double-bond determination on nanogram quantities of aliphatic monounsaturated alcohols, aldehydes and carboxylic acid methyl esters. *J. Chromatogr.*, **322**, 484-490.
- Luthria, D. L. and Sprecher, H. (1993) 2-Alkenyl-4,4-dimethylloxazolines as derivatives for the structural elucidation of isomeric unsaturated fatty acids. *Lipids*, **28**, 561-564.
- Meier-Augenstein, W. (2002) Stable isotope analysis of fatty acids by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **465**, 63-79.
- Nichols, P. D., Guckert, J. B. and White, D. C. (1986) Determination of monounsaturated fatty acid double-bond position and geometry for microbial monocultures and complex consortia by capillary GC-MS of their dimethyl disulphide adducts. *J. Microbiol. Meth.*, **5**, 49-55.
- Scribe, P., Guezennec, J., Dagaut, J., Pepe, C. and Saliot, A. (1988) Identification of the position and the Stereochemistry of the double bond in monounsaturated fatty acid methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. *Anal. Chem.*, **60**, 928-931.