不飽和脂肪酸の極性カラムを用いた GC/MS 解析*

内藤裕一******・山口保彦******・力石嘉人****.a ·大河内直彦**** (2010年4月23日受付,2010年7月30日受理)

1. はじめに

飽和脂肪酸は 細胞膜の主要な構成成分であ り、またエネルギー源として蓄積および代謝され る(松久ら, 2002)。不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸に 比べて融点が低いため, 生物が生育環境(温度) に適応した細胞膜を作るうえで重要であり、不飽 和の数(不飽和度)や位置(不飽和位)の生物特異 性は、生物の化学分類法などにも利用される。従 属栄養生物 (動物) においては、自ら生合成でき る非必須脂肪酸(例えば、パルミチン酸)と、合 成できない必須脂肪酸(例えば、リノール酸、リ ノレン酸)が存在し、栄養状態や病理疾患などと 密接な関係がある(松久ら, 2002)。有機地球化学 においても、生物試料や土壌、堆積物などといっ た環境試料中の飽和・不飽和脂肪酸の分布や同位 体比情報は古くから注目され、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きた (例えば, Evershed et al., 2007;新村·沢田, 2010)。 飽和・不飽和脂肪酸の一般的な分析法は、 試 料から脂質成分を有機溶媒で抽出し、シリカゲル クロマトグラフィー等を用いた脂肪酸成分の分画

と誘導体化 (メチルエステル化) の後. GC/MS や GC/FID による同定・定量や、GC/IRMS による安 定同位体比の測定を行うというものである (例え للل Fang et al., 1993; Meier-Augenstein, 2002; Fang et al., 2006)。しかし、一般的に GC の分離カラムを して用いられている無極性(例えば, Agilent 社製 の HP-1) あるいは微極性 (例えば, Agilent 社製の HP-5)のGCカラムでは、クロマトグラム上で個々 の飽和・不飽和脂肪酸の分離がよくない。これは 無極性カラムでは、主に各化合物の蒸気圧の差を 利用して分離するので、似たような構造を持つ不 飽和脂肪酸では、分離能を稼ぎにくいという本質 的な欠点があるためである。実際、力石・奈良岡 (2005) が報告しているように、海藻に含まれる脂 肪酸では、とくに炭素数18の不飽和脂肪酸につい て,不飽和度や不飽和位の異なるものが非常に近 い時間で溶出する。そのため、このようなクロマト グラムから個々の脂肪酸を正確に同定, 定量する ことは難しい場合が多く、また、個々の脂肪酸の安 定同位体比を得ることはほとんど不可能である。

力石・奈良岡 (2005) は,海藻に含まれる飽和・ 不飽和脂肪酸を硝酸銀シリカゲルカラムクロマト

*GC/MS analysis of polyunsaturated fatty acids: Rapid separation and structural assignment with polar GC column **東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻, 〒 277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5 生命棟 502 Yuichi I. Naito: Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Kashiwanoha 5-1-5, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

***東京大学大気海洋研究所, 〒 277-8564 千葉県柏市柏の葉 5-1-5 Yasuhiko T. Yamaguchi: Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8564, Japan

****独立行政法人海洋研究開発機構海洋・極限環境生物圏領域, 〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15 Yoshito Chikaraishi and Naohiko Ohkouchi: Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka, 237-0061, Japan

^aCorresponding author. Yoshito Chikaraishi

e-mail: ychikaraishi@jamstec.go.jp Tel: +81-46-867-9778; Fax: +81-46-867-9775

グラフィーにより不飽和度別に分画し、ジメチル ジスルフィド(dimethyl disulphide:DMDS)誘導体 化法とジメチルオキサゾリン(dimethyloxazoline: DMOX)誘導体化法を用いて、不飽和度・不飽和 位を決める分析法を報告した。この方法は、従来 の研究では同定することが難しかった不飽和度と 不飽和位を正確に決めることができる。また、分 画後の試料を用いて分子レベルの水素・炭素安定 同位体比分析が行える点で画期的であった(Chikaraishi et al., 2004)。しかし、硝酸銀シリカゲルカ ラムクロマトグラフィーによる不飽和度ごとの分 画は、熟練した技術(再現性良く、常に高い回収 率でクロマトグラフィーを行う技術)を必要とす るうえ、硝酸銀シリカゲルを均一に再現性良く作 製することが難しいという問題点があった。

この問題の解決策として,硝酸銀シリカゲルカ ラムクロマトグラフィーによる分画を行う代わり に,GCの分離カラムに極性カラム(例えば,Agilent 社 製 の DB-23, HP-88, HP-INNOWAX, HP-FFAP など)を用いる方法がある。極性カラムで の分離は,各化合物の蒸気圧に加え,カラム固定 相への親和性の差を用いて行われる。例えば,同 炭素数の脂肪酸は,飽和,1不飽和,2不飽和,3 不飽和,4不飽和と不飽和度が小さいものから溶 出し,これらの分離・同定が容易になる。本稿で は,無極性カラムと極性カラムによる分析結果を 比較しながら,極性カラムによる迅速かつ簡易な 飽和・不飽和脂肪酸の同定法を紹介する。

2. 不飽和脂肪酸の表記

リノール酸を例として,脂肪酸の名称と簡略式 を 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。本稿で は,一般的な表記に習い,簡略式 a で表記した。

3. 試料と分析法

試料と脂肪酸の抽出

試料として,茨城県沖(北緯36度35.1分,東経 142度3.7分)で捕獲されたキタオットセイ(*Callorhinus ursinus*, 2008年2月7日捕獲)の筋肉組 織を用いた。クロロホルム:メタノール(2:1, v/v) による超音波抽出で脂質成分を抽出し(15 分×4 回),アルカリ加水分解(0.5 M KOH/MeOH/5wt% H₂Oで,80℃,2時間)を行った後,液-液抽出 で酸性画分を分離した。酸性画分はメチルエステ ル化を行った後,シリカゲルクロマトグラフィー によってA-1 画分(ヘキサン溶出成分:モノカル ボン酸)とA-2 画分(メタノール溶出成分:ジカ ルボン酸およびヒドロキシカルボン酸)に分画し た。本稿では,このA-1 画分を脂肪酸メチルエス テル(FAMEs)として扱う。

不飽和位置の同定のための誘導体化(DMOX誘導体化)

本稿では、不飽和位置の同定のための誘導体化 法として、DMOX 化を用いた。1 ml アンプルに FAMEs の溶液を入れ、窒素ガス気流化で濃縮・ 乾固し、75℃に温めておいた 2-アミノ-2-メチル プロパノールを適量(約 200-500 µl)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℃で 24 時間反応させた。75℃まで自然に 冷却した後、約 75℃の蒸留水を 2 ml 加えた。反 応液を 10ml 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 回抽出した。得 られた抽出溶媒に硫酸マグネシウムを加えて脱水 し、ガラスウールを詰めたパスツールピペットで 濾過した。窒素ガス気流下で乾固させた後、適量 (約 200-500 µl)のジクロロメタンに再度溶かして DMOX 誘導体溶液を得た。

なお、DMOX 誘導体化の方法やマススペクト ルは、すでに、Fay and Richli (1991), Luthria and Sprecher (1993), Christie (1998), 力石・奈良岡 (2005) などに詳細に記載されているので、それらを



Fig. 1. Systematic name and shorthand designation of linoleic acid.

参照して頂きたい。また,不飽和位の同定のための 誘導体化には,DMDS 誘導体化 (1 不飽和脂肪酸の みに利用可能), ピロリジン (Pyrrolidine) 誘導体化, ピコリニルエステル (Picolinyl esters) 誘導体化など もある。詳しくは,Andersson and Holman (1974), Kawaguchi et al. (1983), Leonhardt and DeVilbiss (1985), Nichols et al. (1986), Christie et al. (1987), Scribe et al. (1988) などを参照して頂きたい。

GC/MS分析

GC/MS分析は, Agilent 社製, HP 6890N GC/5973A MSD を用いた。導入法は PTV 法を用い, 50℃で 0.2 分間保持し, 350℃まで 600℃ / 分で昇温した 後, 350℃で 10 分間保持した。分析カラムは, 従 来法で使われている無極性(微極性) カラムの代 表として, HP-5MS (30m 長さ, 0.25 mm 内径, 0.25 µm 膜厚)を, 極性カラムの代表として DB-23 (30m 長さ, 0.25 mm 内径, 0.25 µm 膜厚)使用し た。オーブンの昇温条件は,HP-5MS については, 40℃で2分保持し,120℃まで30℃/分で昇温し, 120℃から320℃まで6℃/分で昇温した後,320℃ で20分間保持した。また,DB-23 については, 40℃で2分保持し,120℃まで30℃/分で昇温し, 120℃から250℃まで3℃/分で昇温した後,250℃ で12分間保持した。

4. 不飽和度と不飽和位の同定

Fig. 2 にオットセイの脂肪酸の TIC (total ion chromatogram) を, Table 1 にその同定レベルを示す。オッ トセイには、主な飽和脂肪酸として、14:0, 16:0, 18:0 が含まれており、主な不飽和脂肪酸として、16:1 (n-7), 18:1 (n-7), 18:1 (n-9), 18:1 (n-13), 18:2 (n-6), 20:1 (n-9), 20:1 (n-11), 20:4 (n-6), 22:1 (n-11), 22:1 (n-13) などが含まれていた。

脂肪酸の質量数と不飽和度は FAMEs の保持時



Fig. 2. TIC of FAMEs and DMOX derivatives of northern fur seal (*C. ursinus*) on HP-5MS and DB-23 columns. Numbers correspond to fatty acids listed in Table 1.

Peak No.*	Systematic name	Trivial name	Shorthand designation	Retention time (min)				Identification level**	
				FAMEs (DB-23)	DMOX (DB-23)	FAMEs (HP-5MS)	DMOX (HP-5MS)	This study	Reference paper
1	Tetradecanoic acid	Myristic acid	14:0	12.07	15.17	11.02	13.94	4	Chikaraishi and Naraoka (2005)
2	Hexadecanoic acid	Palmitic acid	16:0	16.32	19.59	14.09	16.94	4	Chikaraishi and Naraoka (2005)
3	9-Hexadecenoic acid	Palmitoleic acid	16:1 (n-7)	16.86	20.08	13.71	16.57	2	Chikaraishi and Naraoka (2005)
4	Octadecanoic acid	Stearic acid	18:0	20.81	23.98	17.05	19.75	4	Chikaraishi and Naraoka (2005)
5	5-Octadecenoic acid		18:1 (n-13)	21.11	24.10	-	-	1	
6	9-Octadecenoic acid	Oleic acid	18:1 (n-9)	21.26	24.32	16.65	19.35	4	Chikaraishi and Naraoka (2005)
7	11-Octadecenoic acid		18:1 (n-7)	21.42	24.53	16.72	19.44	4	Chikaraishi and Naraoka (2005)
8	9,12-Octadecadienoic acid	Linoleic acid	18:2 (n-6)	22.27	25.29	16.52	-	4	Chikaraishi and Naraoka (2005)
9	9-Eicosenoic acid		20:1 (n-11)	25.56	28.38	19.42	21.94	1	
10	11-Eicosenoic acid	Gondoic acid	20:1 (n-9)	25.67	28.53	19.54	22.00	2	Fay and Richli (1991)
11	5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid	Arachidonic acid	20:4 (n-6)	27.59	30.20	18.81	21.36	2	Fay and Richli (1991)
12	9-Docosenoic acid		22:1 (n-13)	-	32.24	22.10	-	1	
13	11-Docosenoic acid		22:1 (n-11)	-	32.35	22.04	24.42	1	

Table 1. Identification level of saturated and unsaturated fatty acids extracted from northern fur seal (C. ursinus).

*Peak numbers refer to chromatograms in Fig. 2 and Fig. 3.

**1. Interpretation of mass spectral data.

2. Coincedence in mass spectral data in a reference.

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

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

間とマススペクトルの親イオンから容易に求めら れるが、それらの情報 (FAMEs の保持時間とマ ススペクトル)から不飽和位の情報を得ることは 困難である (Figs. 3a, 3c, 3e)。一方. DMOX 誘導 体のマススペクトルは、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ことから、不飽和 位の決定が容易である (Figs. 3b, 3d, 3f)。一般的 に、DMOX 誘導体のマススペクトルは、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。 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。ただし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1つ 先の炭素位での2 重結合の位置を示す場合もある (力石・奈良岡. 2005)。

例えば、18:1 (n-7) の場合 (Fig. 3b)、親イオン が m/z 335 であり、14 ダルトンの間隔で、m/z 320 → 306 (n-1 位)、306 → 292 (n-2 位)、292 → 278 (n-3 位)、278 → 264 (n-4 位)、264 → 250 (n-5 位)、 250 → 236 (n-6 位) のイオンフラグメントを持つ。 そして n-7 位 (Δ^{11} 位) で m/z 236 → 224 と 12 ダル トンの間隔を示し、不飽和位が n-7 位である。そ の後は, *m/z* 224 → 210 (n-8 位), 210 → 196 (n-9 位) と再び 14 ダルトンの間隔を示す。

また、20:4 (n-6) の場合 (Fig. 3f)、親イオンが m/z 357 であり、14 ダルトンの間隔で、*m/z* 342 → 328 (n-1 位), 328 → 314 (n-2 位), 314 → 300 (n-3 位), 300 → 286 (n-4 位). 286 → 272 (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/z272→260と12ダルトンの間隔を示し、1つ目の不 飽和位がn-6位である。そして, m/z 260 → 246 (n-7 位), 246→232 (n-8 位) と 14 ダルトンの間隔のあ と、再び n-9 位 (Δ^{11} 位) で *m/z* 232 → 220 と 12 ダ ルトンの間隔を示し、2つ目の不飽和位がn-9位で ある。さらに、m/z 220 → 206 (n-10 位), 206 → 192 (n-11 位) と 14 ダルトンの間隔のあと, n-12 位 (Δ⁸ 位) で m/z 192 → 180 と 12 ダルトンの間隔を示し. 3つ目の不飽和位が n-12 位である。最後に. m/z 180 → 166 (n-13 位) と 14 ダルトンの間隔のあと. n-14 位で m/z 166 → 153 と 13 ダルトンの間隔が示 され, 4つ目の不飽和位が n-15 (Δ⁵ 位) 位である。

Fig.2に示すように, FAMEs と DMOX 誘導体は, 保持時間は異なるが,基本的にほとんど同じ順序で 溶出するため,両者のクロマトグラムを比較するこ とで, FAMEs の個々の脂肪酸の同定も可能になる。



Fig. 3. Mass spectra of a) 18:1(n-7)-FAME, b) 18:1(n-7)-DMOX, c) 18:1(n-9)-FAME, d) 18:1(n-9)-DMOX, e) 20:4(n-6)-FAME, and f) 20:4(n-6)-DMOX derivatives.

5.GC カラムの比較

従来の研究で用いられてきた無極性や微極性の GC カラムでは、個々の飽和・不飽和脂肪酸をきれ いに (ベースラインで)分離することが難しい。そ のため、無極性や微極性の GC カラムを用いて飽 和・不飽和脂肪酸の正確な同定を行うためには、力 石・奈良岡 (2005) で報告されているように、GC/MS での測定前に硝酸銀シリカゲルカラムクロマトグラ フィーを用いて、飽和・不飽和脂肪酸をあらかじめ 不飽和度別に分画するなどの必要がある。

一方, DB-23 などの極性カラムを用いると, 飽和・ 不飽和脂肪酸の混合溶液をそのまま測定しても, ク ロマトグラム上で個々の脂肪酸をある程度きれいに

a) DB-23 standard



Fig. 4. TIC of C₁₈ fatty acids: a) standards on DB-23,
b) northern fur seal (*C. ursinus*) on DB 23, c) standards on HP-5MS, and d) northern fur seal (*C. ursinus*) on HP-5MS columns.

(少なくとも GC/MS で同定ができるレベルで)分離 することができる。実際に,HP-5 では,炭素数18の 不飽和脂肪酸のうち,18:1 (n-9)と18:3 (n-3),18:1 (n-9)と18:1 (n-13)はほとんど同じ時間で溶出し, 両者のピークは完全に重なってしまうが (Figs.4c, 4d),DB-23 では,これらの不飽和脂肪酸のピークを 全て完全に分離することができる (Figs.4a,4b)。こ のように,極性カラムを用いることで,従来の硝酸 銀シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いた分 析法に比べて,非常に迅速かつ簡単に飽和・不飽和 脂肪酸を同定することが可能である。

6. 今後の課題

一般的に、極性カラムの使用温度限界は無極性 または微極性カラムに比べて著しく低い(例えば、 本稿で用いた DB-23 は 250℃であり HP-5MS は 325℃である)。これは、極性カラムでは高分子の 脂肪酸(炭素数26以上)の分析ができないことを 意味する。すなわち、炭素数26以上の脂肪酸をほ とんど含まない植物プランクトンやバクテリア. 一般的な捕食動物を試料とする場合には問題にな らないが、炭素数26以上の脂肪酸が含まれている 陸上植物や土壌、堆積物などの環境試料を分析す る場合には注意が必要である(例えば, GCの導入 口の温度条件を使用する GC カラムの限界温度と 同じにして, 高分子化合物が GC カラム内に導入 されないようにする。あるいは、高温でも使用す ることのできる中・極性カラムを検討する、など)。 また、このような極性カラムを使って GC/IRMS で 安定同位体比を測定する場合には、その再現性や 安定性を確かめる必要がある。特に、DOMX 誘導 体で同位体比を測定する場合には、誘導体化時の 同位体分別の有無も調べる必要がある。

謝 辞

キタオットセイ現生標本は,清田雅史博士・ 米崎史郎博士(水産総合研究センター)からご提 供頂きました。越智大介氏(水産総合研究セン ター)・香山薫氏(伊豆・三津シーパラダイス)に は,標本の採取において大変お世話になりまし た。海洋研究開発機構の大河内グループ,米田穣 准教授・横山祐典准教授(東京大学)には,脂肪酸 の分析に関して助言・アドバイスをいただきまし た。奈良岡浩教授(九州大学)・沢田健講師(北海 道大学)には,本稿の査読を通して貴重なご助言 を頂きました。記して厚く感謝申し上げます。本 稿の内容は,日本学術振興会特別研究員研究奨励 費(内藤・山口)により実施した研究成果の一部を 取り纏めたものである。

引用文献

- Andersson B. A. and Holman R. T. (1974) Pyrrolidides for the mass spectrometric determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids. *Lipids* 9, 185-190.
- Chikaraishi Y., Suzuki Y. and Naraoka H. (2004) Hydrogen isotopic fractionations during desaturation and elongation associated with polyunsaturated fatty acid biosynthesis in marine macroalge. *Phytochemistry* **65**, 2293-2300.
- 力石嘉人·奈良岡 浩(2005)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. Res. Org. Geochem. 20, 23-30.
- Christie W. W., Brechany E. Y. and Holman R. T. (1987) Mass spectra of the picolinyl esters of isomeric mono- and dienoic fatty acids. *Lipids* 22, 224-228.
- Christie W. W. (1998) Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids* **33**, 343-353.
- Evershed R. P., Bull I. D., Corr L. T., Crossman Z. M., van Dongen B. E., Evans C. J., Jim S., Mottram H. R., Mukherjee A. J. and Pancost R. D. (2007) Compound-specific stable isotope analysis in ecology and paleoecology, In: Michener R. and Lajtha K. (Eds.), *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*, Blackwell Publishing, pp. 480-540.
- Fang J., Abrajano T. A., Comet P. A., Brooks J. M., Sassem R. and MacDonald I. R. (1993) Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities XI. Carbon isotopic fractionation during fatty acid biosynthesis of seep organisms and its implication for chemosynthetic processes. *Chem. Geol.* **109**, 271-279.
- Fang J., Uhle M., Billmark K., Bartlett D. H. and Kato

C. (2006) Fractionation of carbon isotopes in biosynthesis of fatty acids by a piezophilic bacterium Moritella japonica strain DSK1. *Geochim. Cosmochim. Acta* **70**, 1753-1760.

- Fay L. and Richli U. (1991) Location of double bonds in polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry after 4,4-dimethyloxazoline derivatization. *J. Chromatogr.* 541, 89-98.
- Kawaguchi A., Kobayashi Y. Ogawa Y. and Okuda S. (1983) Determination of double bond positions in polyunsaturated fatty acids by mass spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 3228-3232.
- 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-4,4dimethyloxazolines as derivatives for the structural elucidation of isomeric unsaturated fatty acids. *Lipids* **28**, 561-564.
- 松久俊博・小池一男・木島孝夫・羽野芳生・掘田 清・増田和夫・宮澤三雄・安川 憲(2002)脂 質. 資源天然物化学,共立出版, 69-84.
- 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.
- 新村龍也・沢田 健(2010)海生哺乳類の骨化石の 脂肪酸・ステロイドの組成分布と炭素同位体比 ~古食性・続成変化の評価への応用.地球化学 44,17-29.