

# LC-MS/MS はホスファチジルコリンのアシル基 *sn* 結合位置分析に有用となり得るか

Can LC-MS/MS Be Useful for Analysis of Regiospecific Isomers of Phosphatidylcholine?

西村 一彦 加賀 岳朗 藤井 良昭 板橋 豊\*<sup>1</sup>

Kazuhiko NISHIMURA, Takero KAGA, Yoshiaki FUJII and Yutaka ITABASHI\*<sup>1</sup>

**Key words** : Phosphatidylcholine (ホスファチジルコリン) ; stereospecific numbering (*sn*) ; Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

## 緒 言

グリセロール誘導体であるリン脂質は stereospecific numbering (以下 *sn*) で示されるグリセロール骨格の *sn*-3 位にリン酸エステルを持つ (図 1)。そのリン酸基の違いによりホスファチジルグリセロール、ホスファチジエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン (以下 PC) など様々な種類が存在する。これらリン脂質は、*sn*-1 位、*sn*-2 位に脂肪酸 (アシル基、以下 RCO) が結合しており、結合する RCO の種類、組み合わせが異なる混合物として天然には存在している<sup>1)</sup>。リン脂質のうち PC はレシチンとも呼ばれ、食品加工や化粧品に利用さ

れる卵黄レシチンや大豆レシチンは、えさや環境などの影響で RCO 組成が変化することが報告されている<sup>2-5)</sup>。また PC は生体膜の主要構成成分であり、RCO の種類、組み合わせ、*sn* 結合位置の違い等により、酸化安定性や性状、機能が異なることから、*sn* 結合位置を含めた PC の分析は重要である<sup>6-11)</sup>。PC を構成する RCO の分析には、酵素であるホスホリパーゼ A<sub>2</sub> を用い PC から *sn* 結合位置特異的に RCO を切断後、メチル誘導体化し、GC 分析する方法が一般的に用いられてきた。この方法で PC 混合物を分析する場合、*sn*-1 位全体、*sn*-2 位全体としての RCO 組成は明らかにできるが、PC 個別の RCO 組み合わせを知ることは困難である<sup>12-14)</sup>。近年、脂質メタボロミクスの観点から、様々なリン脂質分析に高感度の LC-MS/MS を用いた分析例が報告されている<sup>15-22)</sup>。このうちホスファチジルグリセロールの分析では、LC-MS/MS で得られる開裂イオンから、結合している RCO の組み合わせに加え、*sn* 結合位置に関する情報も得られている<sup>15,17,21,22)</sup>。PC も LC-MS/MS 分析により結合している RCO の組み合わせは明らかにされているが、*sn* 結合位置に関する情報は得られていない<sup>16,18,20,23,24)</sup>。

今回我々は、LC-MS/MS に用いるコリジョンエネルギー (CE) により *sn*-1 位、*sn*-2 位に結合した RCO が脱離したプロダクトイオンの強度比が異なることを利用した RCO の *sn* 結合位置分析に有用な知見を得ることができたので、以下に報告する。

## 方 法

### 1. 試薬・試液

リン脂質標準品：1, 2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0 (*sn*-1)/16:0 (*sn*-2)-PC)、1, 2-Dioleoyl-*sn*-

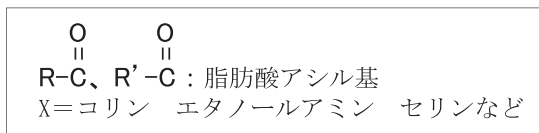
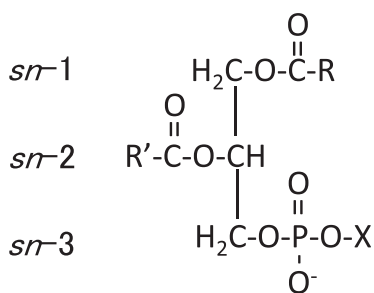


図 1 リン脂質の構造  
*sn* : Stereospecific number

\*1 北海道大学大学院水産科学研究院 (現所属 : 公益財団法人日本食品油脂検査協会)

glycero-3-phosphocholine (18:1 (*sn*-1)/18:1 (*sn*-2)-PC)、2-Oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0 (*sn*-1)/18:1 (*sn*-2)-PC) (>99% (TLC)、シグマアルドリッチジャパン)、1-Oleoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (18:1 (*sn*-1)/16:0 (*sn*-2)-PC) (北海道大学大学院水産科学研究院、細川雅史教授から分与)を用いた。

標準溶液：標準品 10 mg を正確に量り、クロロホルム 5 mL に溶解して標準原液 (2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) とした。標準原液を分取し、窒素ガスでクロロホルムを揮発させたのちメタノールに溶解し 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製した。

試薬：クロロホルム (特級、富士フィルム和光純薬(株))、メタノール、アセトニトリル、超純水、ギ酸 (いずれも LC/MS 用、富士フィルム和光純薬(株)) を用いた。

## 2. 装置・条件

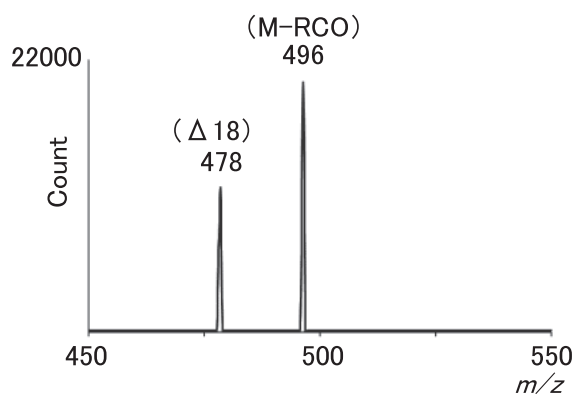
LC は Agilent Technologies 社製 1260 Infinity LC、MS/MS は Agilent Technologies 社製 6490 Triple Quad LC/MS を用いた。分析カラムは SHISEIDO 社製 CAPCELL PAK ADME (3  $\mu\text{m}$ 、2.1 $\times$ 100 mm) を用いた。カラム温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ 、移動相は A 液 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液と B 液 10 mM ギ酸アンモニウムアセトニトリルのグラジエント溶出とし、その条件は 70% B 液 (0–10 min)–95% B 液 (10–20 min)–70% B 液 (22–32 min) とした。流量は 0.2 mL/min で、試料注入量は 5  $\mu\text{L}$ 、イオン化モードは ESI (+) とした。

## 結果と考察

### 1. PC に結合している RCO の分析

近年、LC-MS/MS の高感度化に伴い、PC 分析も従来の親イオン  $[\text{M}+\text{H}]^+$  や PC 共通のホスホコリン由来のプロダクトイオン  $m/z=184$  に加え、RCO の脱離で生成される微少なプロダクトイオンの測定も可能となった。これにより、PC 親イオンとプロダクトイオンの  $m/z$  差から PC に結合している RCO の種類について分析した例が報告されている<sup>16, 18, 20, 23, 24</sup>。そこで RCO の種類を当所 LC-MS/MS で分析するため、はじめに RCO が脱離したイオン (以下 (M-RCO)) がプロダクトイオン分析により測定可能か検討を行ったところ、(M-RCO) に加え (M-RCO) より  $m/z$  が 18 減少したイオン (以下 ( $\Delta 18$ )) が測定された。すなわち 16:0 (*sn*-1)/16:0 (*sn*-2)-PC ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  :  $m/z=735$ ) からはパルミトイル基 ( $m/z=239$ ) が脱離した (M-RCO) の  $m/z=735-239=496$  に加え ( $\Delta 18$ ) の  $m/z=478$  が (図 2 (A))、18:1 (*sn*-1)/18:1 (*sn*-2)-PC ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  :  $m/z=787$ ) からはオレオイル基 ( $m/z=265$ ) が脱離した (M-RCO) の  $m/z=787-265=522$  と ( $\Delta 18$ ) の  $m/z=504$  が測定された (図 2 (B))。( $\Delta 18$ ) の開裂様式として脂肪酸としてのニュートラルロスや RCO が脱離後の脱水といった可能性も考えられるが<sup>23–27</sup>、今回の検討結果だけで開裂様式を推察することは困難であった。しかし 18:0 (*sn*-1)/18:0 (*sn*-2)-PC や 18:3 (*sn*-1)/18:3

(A) 16:0(*sn*-1)/16:0(*sn*-2)-PC



(B) 18:1(*sn*-1)/18:1(*sn*-2)-PC

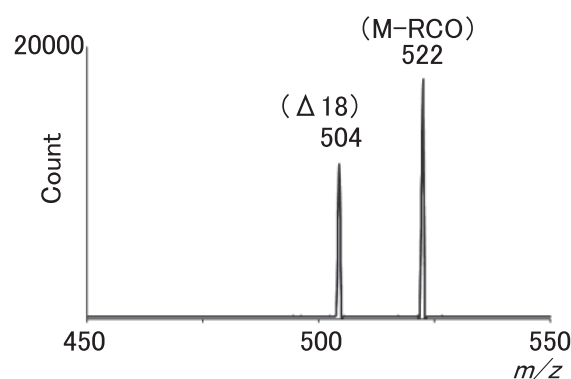


図 2 プロダクトイオン分析で観察された PC 標準品のプロダクトイオン (ESI(+), CE=30 eV)

(A) 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0(*sn*-1)/16:0(*sn*-2)-PC)

(B) 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (18:1(*sn*-1)/18:1(*sn*-2)-PC)

(M-RCO) : 脂肪酸アシル基が脱離したもの

( $\Delta 18$ ) : (M-RCO) より  $m/z=18$  減少したイオン

(*sn*-2)-PC から共通して (M-RCO) > ( $\Delta 18$ ) の強度比でこれらのイオンが測定 (データ未掲載) できたことから、( $\Delta 18$ ) は (M-RCO) 由来の特徴的なイオンとして利用可能と考えられた。以上の結果から (M-RCO) と PC 親イオンの  $m/z$  差から PC に結合している RCO を推定することが可能であった。

### 2. PC に結合している RCO の *sn* 結合位置分析

*sn*-1 位、*sn*-2 位に結合している RCO が異なる 16:0 (*sn*-1)/18:1 (*sn*-2)-PC ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  :  $m/z=761$ ) を用い、プロダクトイオン分析を行い *sn* 結合位置分析が可能かの検討を行った。上記 1 より *sn*-1 位に結合したパルミトイル基が脱離した (M-RCO) のイオン  $m/z=522$  と ( $\Delta 18$ ) の  $m/z=504$ 、*sn*-2 位のオレオイル基が脱離した (M-RCO) のイオン  $m/z=496$  と ( $\Delta 18$ ) の  $m/z=478$  といった 4 つのイオンが測定されると予想され、実際に分析を行った結果、これらがすべて測定された (図 3 (A))。このとき、(M-RCO) と ( $\Delta 18$ ) のイオン強度比が *sn*-1 位と *sn*-2 位で異なっていたため、この違いが RCO の *sn* 結合位置の推

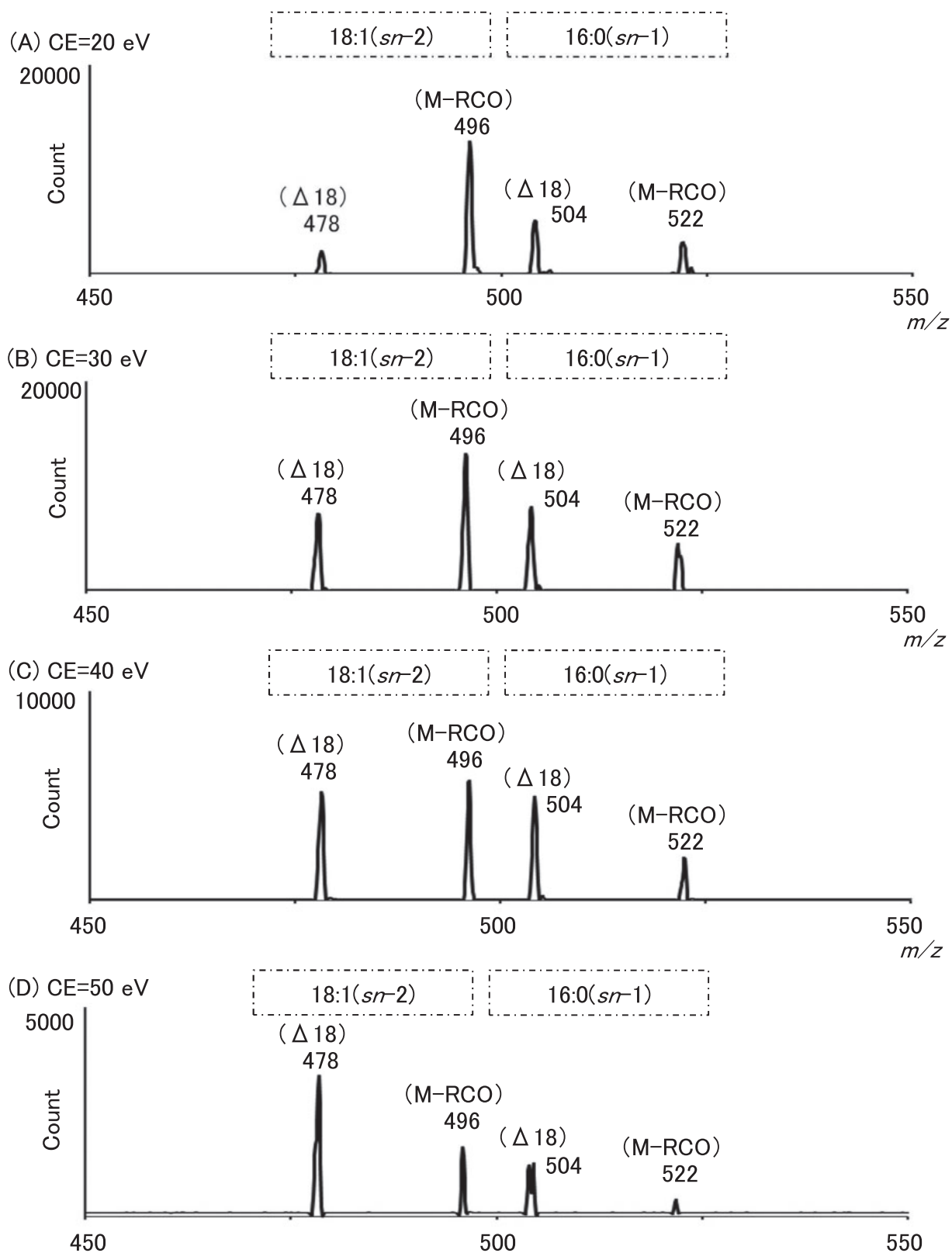


図3 異なるCEによるプロダクトイオン分析で観察された2-Oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0(*sn*-1)/18:1(*sn*-2)-PC)のプロダクトイオン(ESI(+))

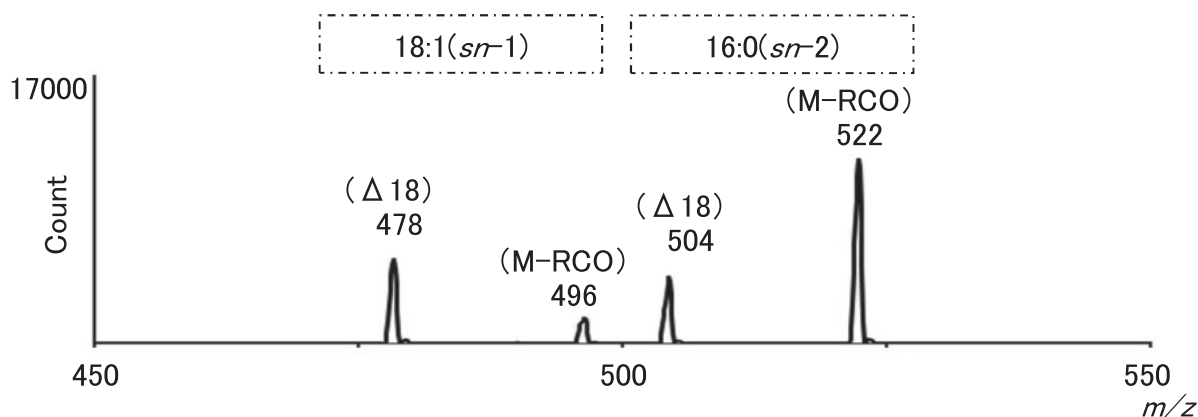
(A) CE=20 eV、(B) CE=30 eV、(C) CE=40 eV、(D) CE=50 eV

(M-RCO)：脂肪酸シル基が脱離したもの

(Δ 18)：(M-RCO)より  $m/z = 18$  減少したイオン

*sn*：Stereospecific number

(A) 18:1(*sn*-1)/16:0(*sn*-2)-PC



(B) 16:0(*sn*-1)/18:1(*sn*-2)-PC

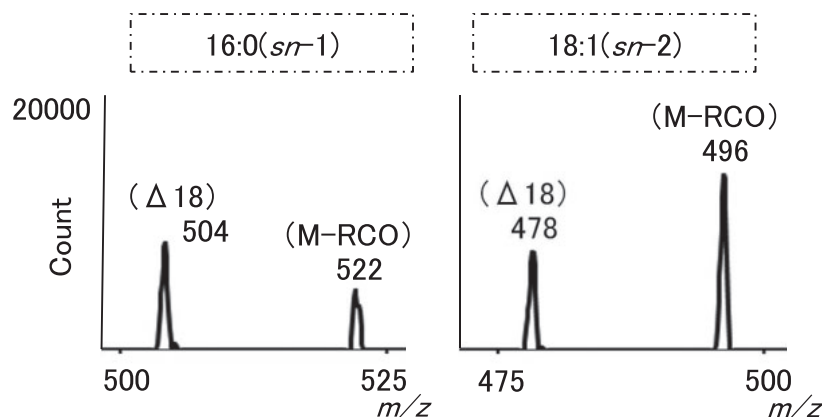


図4 1-Oleoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(18:1(*sn*-1)/16:0(*sn*-2)-PC)と2-Oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(16:0(*sn*-1)/18:1(*sn*-2)-PC)のプロダクトイオン比較(ESI(+), CE=30 eV)

(M-RCO)：脂肪酸アシル基が脱離したもの  
( $\Delta 18$ )：(M-RCO)より  $m/z = 18$  減少したイオン  
*sn*：Stereospecific number

定に利用することが可能か検討を行った。はじめにこのイオン強度の違いを顕著に測定できるCEの検討を行った。CEを20、30、40、50 eVと変化させて、得られたプロダクトイオンを図3に示す。*sn*-1位由来の(M-RCO)の $m/z = 522$ と( $\Delta 18$ )の $m/z = 504$ の強度比はすべてのCEで(M-RCO) < ( $\Delta 18$ )であり、CE上昇に従い、(M-RCO)に対する( $\Delta 18$ )の強度が増加した。*sn*-2位由来の(M-RCO)の $m/z = 496$ と( $\Delta 18$ )の $m/z = 478$ は、CE=20、30 eVではいずれも(M-RCO) > ( $\Delta 18$ )であったが、CE=30 eVの方が4本すべてのイオン強度が高かった(図3(A)、(B))。CE=40 eVでは、ほぼ同程度(図3(C))、CE=50 eVでは*sn*-1位同様に(M-RCO) < ( $\Delta 18$ )と変化し、そのイオン強度も低下した(図3(D))。以上の結果から、CE=30 eVでプロダクトイオン分析を行った場合、イオン強度が高く、*sn*-1位由来のイオンで(M-RCO) < ( $\Delta 18$ )、*sn*-2位由来のイオンで(M-RCO) > ( $\Delta 18$ )の特徴的な強度比が認められた。次にこの強度比の違いがRCOの種類ではなく*sn*結合位置に起因していることを確認するため

にRCOの*sn*結合位置が逆転した18:1(*sn*-1)/16:0(*sn*-2)-PCをCE=30 eVで分析し比較を行った(図4(A))。その結果、*sn*-1位のオレオイル基が脱離したイオン( $m/z = 496, 478$ )の強度比は(M-RCO) < ( $\Delta 18$ )、*sn*-2位のパルミトイル基が脱離したイオン( $m/z = 522, 504$ )の強度比は(M-RCO) > ( $\Delta 18$ )と16:0(*sn*-1)/18:1(*sn*-2)-PCと同様の*sn*結合位置に依存した傾向(図4(B))が認められた。以上の結果からイオン強度比の違いは、RCOの種類よりも*sn*結合位置の影響を受けており、これらイオン強度比の違いを利用することでRCOの*sn*結合位置の推定が可能と考えられた。

今回得られた知見はPCに結合しているRCOの種類に加え、*sn*結合位置の分析に活用できることを示唆している。今後、RCOの種類、*sn*結合位置が既知であるPC標準品の分析事例を蓄積するとともに天然物由来のPC分析への応用、量的比較の可能性についても検討を行う予定である。

最後に、貴重なPCである18:1(*sn*-1)/16:0(*sn*-2)-PC

を分与いただいた、北海道大学大学院水産科学研究院海洋応用生命科学部門生物資源化学分野の細川雅史教授にこの場をかりて深謝いたします。

本研究の一部は、化学系学協会 2017 年冬季研究発表会(札幌) で発表を行った。

## 文 献

- 1) 板橋 豊：細胞膜を構成するグリセロ脂質の特異な異性体。化学と生物, 43(5), 338-346 (2005)
- 2) Privertt OS, Blank ML, Schmit JA: Studies on the Composition of Egg Lipid. J. Food Sci., 27(5), 463-468 (1962)
- 3) Weber EJ: Compositions of Commercial Corn and Soybean Lecithins. J. Am. Oil chem. Soc., 58(10), 898-901 (1981)
- 4) Dornbos DL, Mullen RE, Hammond EG: Phospholipids of Environmentally Stressed Soybean Seeds. J. Am. Oil chem. Soc., 66(9), 1371-1373 (1989)
- 5) 奈良部均：リン脂質－工業的生産の現状と将来－。油化学, 41(9), 897-902 (1992)
- 6) 井上圭三, 野島庄七：リン脂質の生物活性。ファルマシア, 20(9), 869-876 (1984)
- 7) 細川雅史, 大島宏哲, 甲野裕之, 高橋是太郎, 羽田野六男, 小田島肅夫：ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> による高度不飽和脂肪酸含有ホスファチジルコリンの合成と細胞分化誘導作用に及ぼす影響。日本水産学会誌, 59(2), 309-314 (1993)
- 8) Miyashita K, Nara E, Ota T: Comparative Study on the Oxidative Stability of Phosphatidylcholines from Salmon Egg and Soybean in an Aqueous Solution. Biosci. Biotech. Biochem., 58(10), 1772-1775 (1994)
- 9) Nara E, Miyashita K, Ota T: Oxidative Stability of Liposomes Prepared from PC, Chicken Egg PC and Salmon Egg PC. Biosci. Biotech. Biochem., 61(10), 1736-1738 (1997)
- 10) 細川雅史, 高橋是太郎：高度不飽和リン脂質の酵素的改変と機能特性。オレオサイエンス, 2(1), 19-25 (2002)
- 11) 原 節子, 戸谷洋一郎：構造リン脂質の調製。オレオサイエンス, 2(1), 13-17 (2002)
- 12) 伊藤精亮, 朴 和鎮, 藤野安彦：小麦種子の油脂とリン脂質の分子種的研究。日本農芸化学会誌, 58(9), 881-885 (1984)
- 13) Igarashi D, Hayashi K, Kishimura H: Positional Distribution of DHA and EPA in Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine from Different Tissues of Squids. J. Oleo Sci., 50(9), 729-734 (2001)
- 14) 杉森大助：バクテリア由来新規ホスホリパーゼ。オレオサイエンス, 13(10), 477-484 (2013)
- 15) Hsu FF, Turk J: Studies on Phosphatidylglycerol with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry with Electrospray Ionization: Fragmentation Processes and Structural Characterization. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 12(9), 1036-1043 (2001)
- 16) 田尻智計, 板橋 豊：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コリンの分子種分析。分析化学, 51(9), 667-674 (2002)
- 17) 石岡沙織, 田岡裕佳子, 板橋 豊：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。分析化学, 52(9), 795-803 (2003)
- 18) 東城博雅：質量分析を利用した脂質メタボロミックスの現状。オレオサイエンス, 4(4), 147-156 (2004)
- 19) 中西広樹：リポミックスの分析技術と将来展望。オレオサイエンス, 14(8), 321-327 (2014)
- 20) 山田真希：高速 SRM によるジアシルリン脂質の分析手法の開発と異性体分析について。J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 66(5), 183-189 (2018)
- 21) Mazzella N, Molinet J, Syakti AD, Dodi A, Doumenq P, Artaud J, Bertrand JC: Bacterial Phospholipid Molecular Species Analysis by Ion-Pair Reversed-Phase HPLC/ESI/MS. J. Lipid Res., 45, 1355-1363 (2004)
- 22) 田岡裕佳子, 石岡沙織, 板橋 豊：高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による大腸菌ホスファチジルグリセロールの分子種分析。分析化学, 54(2), 155-160 (2005)
- 23) Berdeaux O, Juaneda P, Martine L, Cabaret S, Bretillon L, Acar N: Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very-long-chain polyunsaturated fatty acid in bovine and human retina using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1217(49), 7738-7748 (2010)
- 24) Reis A, Domingues MRM, Amado FML, Ferrer-Correia AJ, Domingues P: Radical peroxidation of palmitoyl-linoleoyl-glycerophosphocholine liposomes: Identification of long-chain oxidised products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B, 855, 186-199 (2007)
- 25) Kuwabara H, Viden I, Tsuchiya M, Sugatani J, Saito K: Liquid Ionization Mass Spectrometry of Phospholipids. J. Biochem., 100, 477-484 (1986)
- 26) LIPID MAPS MASS SPECTROMETRY METHODS CHAPTER, [http://www.lipidmaps.org/resources/downloads/2007\\_methods\\_chapters.pdf](http://www.lipidmaps.org/resources/downloads/2007_methods_chapters.pdf) (確認：2020 年 5 月 28 日)
- 27) Moon MH: Phospholipid Analysis by Nanoflow Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Mass Spectrom. Lett., 5(1), 1-11 (2014)