

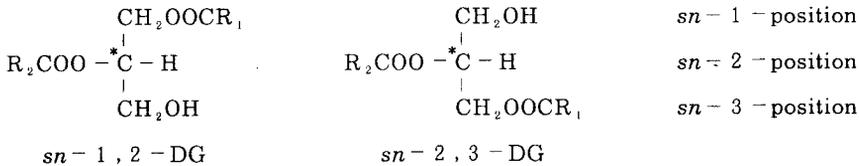
学位論文題名

ENANTIOMER SEPARATION OF 1, 2 - DIACYLGLYCEROL DERIVATIVES BY HIGH - PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ON CHIRAL STATIONARY PHASES WITH APPLICATIONS TO THE MARINE LIPID ANALYSIS

（高速液体クロマトグラフィーによる 1, 2 - ジアシルグリセロール誘導体のエナンチオマーの分離とその海洋脂質分析への応用）

学位論文内容の要旨

1, 2 - ジアシルグリセロール (1, 2-DG) には, 1, 2 - ジアシル-*sn*-グリセロール (*sn*-1, 2-DG) と, そのエナンチオマーである, 2, 3 - ジアシル-*sn*-グリセロール (*sn*-2, 3-DG) の 2 種類の光学異性体が存在する。



高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による, 1, 2-DG エナンチオマーの分離分析技術の開発は, 生体中における脂質の代謝経路の研究などに極めて有用であり, 近年の脂質生化学分野における重要な課題の一つであった。一般に, HPLC によるエナンチオマーの分離方法として, エナンチオマーにキラル中心を有する試薬を反応させジアステレオマーを調製し, ジアステレオマーの物理化学的な性質の違いを利用して分離する方法と, キラル中心を有するカラム (キラルカラム) のエナンチオ選択性によって直接エナンチオマーを分離する 2 通りの方法が考案されている。近年, 高木, 板橋らは, 後者の方法に注目し, キラル固定相を備えた HPLC による, 1, 2-DG 3, 5-ジニトロフェニルウレタン誘導体 (3, 5-DNPU) の光学分割に関するいくつかの分析例を報告してきた。これまでに報告されたキラル HPLC による 1, 2-DG の分離は, 単一のアシル基のみを有する 1, 2-DG (単酸-1, 2-DG) の分離に限られており, これらの分析技術を生産動物の脂質の分析に応用するためには, 次のような改良すべき課題が残されている。生産動物

物に由来する1,2-DGの分子種組成は、生体の脂肪酸組成の複雑さを反映してかなり複雑な組成である。従来、1,2-DGの光学分割に使用されてきたいくつかのキラルカラムは、エナンチオマーの分離に加えて、炭素数及び二重結合数の違いに基づく分離能も有しており、このことが水産動植物の1,2-DGエナンチオマー間の完全分離を極めて困難にしている。従って、複雑な分子種組成からなる1,2-DGのエナンチオマー間を完全分離するためには、エナンチオ選択性を保ちつつ、キラルカラムの分子種別の分離を低くするか、エナンチオ選択性を高くし、かつ分子種別の分離と同時にエナンチオマーの分離を行うかのいずれかの方法を検討しなければならないが、後者の方が詳細な分析を行うときにより有用であり、かつ発展性のある改良法である。本研究では後者の観点から、キラルHPLCの海洋脂質分析への応用を目的として、(1)高度不飽和酸などを含む二酸-1,2-DGエナンチオマーの完全分離、(2)分離に及ぼす温度の影響、(3)いくつかのキラルカラムのエナンチオ選択性の比較、(4)キラルHPLCの海洋生物に由来する1,2-DGの分析への応用、の4点について研究し、以下の知見を得た。

## 1. 二酸-1,2-DGエナンチオマーの分離

二酸-1,2-DGは、2つの異なったアシル基を持つ1,2-DGである。天然物に由来する1,2-DGは、二酸-1,2-DGであることが多く、このため本分析法を海洋脂質の分析に適用する場合、二酸-1,2-DG混合物のエナンチオマーの分離が必要になる。本研究ではこのことを考慮して、HPLCの移動相組成、流速を詳細に検討し、リサイクル法を導入することによって、分離の改良を試みた。検討したHPLC分析条件の中では、移動相中の1,2-ジクロロエタン含量が分離に最も大きな影響を及ぼした。またリサイクル法の導入によって、ピーク分解能( $R_s$ )が改良された。これらの改良措置によって、アシル基炭素数が2ずつ異なる二酸-1,2-DG同族体の10本のエナンチオマー、及びエイコサペンタエン酸(EPA)などを含む飽和-不飽和二酸-1,2-DGの6本のエナンチオマーの完全分離が可能になった。

## 2. 分離に及ぼす温度の影響

一般にクロマトグラフィーの選択性を示すパラメーターとして広く用いられている分離係数( $\alpha$ )は、熱力学的に定義されている係数であり、絶対温度( $T$ )に依存していることが知られている。 $\alpha$ の温度依存性は以下の式によって表されている。

$$\ln \alpha = -\Delta \Delta G^\circ / RT \quad (1)$$

ここで、 $R$ は気体定数、 $\Delta \Delta G^\circ$ は標準状態において基質がカラムに保持されるとき自由エネルギー変化( $\Delta G^\circ$ )の基質間の相対的な差である。1,2-DGのエナンチオマーの分離における

温度依存性を調べるために、マイナス数十度までの低温分析を試みた。その結果、 $\ln \alpha$ と $1/T$ との間に直線関係が成立し、キラルカラムによる1,2-DGのエナンチオマーの分離においても(1)式が成立することが確認された。このことは、低温で分析することによって、カラムのエナンチオ選択性が著しく増大されることを示しており、低温分析が水産動植物に由来する試料を分析するときに有効であることを定量的に示している。またキラルカラムの分子種別の分離係数の温度依存性を、熱力学的なパラメーターを比較することによって検討した結果、炭素数別の分離はエントロピー支配の分離であるのに対して、二重結合数別の分離はエンタルピー支配の分離であることが明らかにされた。この結果は、水産動植物に多く含まれる高度不飽和脂肪酸を含む1,2-DGのキラルカラム中における挙動が、温度にかなり影響されることを示唆している。

### 3. いくつかのキラルカラムのエナンチオ選択性の比較

3本の市販キラルカラム(OA-4100, Supelcosil, YMC A-K03)の1,2-DGエナンチオマーに対するエナンチオ選択性を比較した結果、YMC A-K03キラルカラムが最も高いエナンチオ選択性を示すことが明らかになった。またエナンチオマーの分離における各カラムの熱力学的なパラメーターを比較した結果、これらのパラメーターはカラムにより異なっており、市販キラルカラムの物理化学的な性質が、かなり異なっていることが明らかになった。

### 4. キラルHPLCの海洋脂質分析への応用

魚油(マイワシ, メンハーデン)のトリアシルグリセロールをグリニャール分解することによって得られた1,2-DGのエナンチオマーを、YMC A-K03キラルカラムにより低温下で分離した。分離された1,2-DGから得られた脂肪酸をガスクロマトグラフィーによって分析した結果、エナンチオマー間の完全分離が確認された。また逆相カラムによって1,2-DG 3,5-DNPUを分離し、分離されたそれぞれの画分をキラルカラムに供することによって、魚油由来の1,2-DGエナンチオマー間の完全分離が可能になった。本分析技術は、水産動植物由来の1,2-DGの光学分割にも十分に適用できることから、水産動物のグリセロ脂質の消化経路、生合成経路を解明する上で有効な手段となり得ると考えられる。また、近年、リン脂質が脂質二重層の膜構造を単に保持するだけでなく、細胞の活動にとって必要な機能、及び生理活性を備えていることが明らかにされつつある。本分析技術は、こうした分野の研究にも有効であると考えられる。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 太 田 亨  
副 査 教 授 羽 田 野 六 男  
副 査 助 教 授 板 橋 豊  
副 査 助 教 授 高 橋 是 太 郎

1,2-ジアシルグリセロール (1,2-DG) には, 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロール (*sn*-1,2-DG) と, そのエナンチオマーである2,3-ジアシル-*sn*-グリセロール (*sn*-2,3-DG) の2種類の光学異性体が存在する。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による1,2-DG エナンチオマーの分離定量分析技術の開発は, 生体内における脂質の代謝経路の解明に関する研究などに極めて有用であり, 脂質生化学分野における重要な課題の一つであった。これまでに報告されたキラル HPLC による1,2-DG の分離は, 単一のアシル基のみを有する1,2-DG (単酸-1,2-DG) の分離に限られており, 広範囲な炭素数および二重結合数の脂肪酸によって構成されている水産動物脂質由来の1,2-DG エナンチオマーの分析に応用するためには, キラルカラムの特性を考慮し, 移動相, 流速, その他の条件について, さらに改良する必要がある。

本研究は, キラル HPLC の海洋脂質, とくに1,2-DG 分析への応用を目的としたものである。本研究の評価すべき成果は以下の通りである。

1) 天然物に由来する1,2-DG は, 二つの異なったアシル基を持つ1,2-DG (二酸-1,2-DG) であることが多く, キラル HPLC を海洋脂質由来の二酸-1,2-DG 分析に適用する場合, 二酸-1,2-DG 混合物のエナンチオマーの分離が必要であるが, 本研究では, まず HPLC の移動相組成, 流速に関して詳細に検討した。その結果, 移動相中の1,2-ジクロロエタン含量が分離に最も大きく影響すること, またリサイクル法を導入することによって, ピーク分解能が高くなることを明らかにした。これらの分析条件の改良によって, アシル基炭素数が二つずつ異なる二酸-1,2-DG 同族体のエナンチオマーおよびエイコサペンタエン酸などを含む飽和-不飽和二酸-1,2-DG のエナンチオマーの完全分離を可能にした。

2) クロマトグラフィーの選択性を示すパラメーターとして広く用いられている分離係数 ( $\alpha$ ) は, 熱力学的に定義されている係数であり, 絶対温度 (T) に依存する。 $\alpha$  の温度依存性は下式によって示される。

$$\ln \alpha = -\Delta \Delta G^\circ / RT$$

( $R$  : 気体定数,  $\Delta \Delta G^\circ$  : 標準状態において基質がカラムに保持されるとき自由エネルギー変化 ( $\Delta G^\circ$ ) の基質間の相対的な差)

-40度までの低温分析を行い, 1,2-DG エナンチオマーの分離における温度依存性を検討した結果,  $\ln \alpha$  と  $1/T$  との間に直線関係が成立し, キラルカラム HPLC による1,2-DG エナンチオマーの分離の場合でも, 上式が成立することを明らかにし, 低温条件がカラムのエナンチオ選択性を著しく増大することを証明した。これは低温条件が海洋脂質に由来する試料を分析するときに, 極めて有効であることを示すものである。また, キラルカラムの分子種別の分離係数の温度依存性について検討し, 炭素数別の分離は, エントロピー支配の分離であるのに対し二重結合数別の分離はエンタルピー支配の分離であることを明らかにした。このことは高度不飽和脂肪酸を含む1,2-DG のキラルカラム中の挙動が, 温度によって影響されることを示唆する。

3) 三種のキラルカラム (OA-4100, Supelcosil および YMC A-K03) の1,2-DG エナンチオマー分離における熱力学的なパラメーターを比較し, カラムによって温度依存性などの物理化学的な性質が大きく異なることを明らかにした。さらに, 1,2-DG エナンチオマーに対するエナンチオ選択性に関して検討した結果, YMC A-K03カラムの室温における  $\alpha$  が1.43~1.46と OA-4100 (1.12~1.13), Supelcosil (1.12~1.13) に比べて極めて高い選択性を持つことが確認された。

4) 以上の研究によって得られた最適のキラルカラム HPLC による1,2-DG エナンチオマーの分析条件を適用して, 脂肪酸組成が複雑なメンハーデンおよびマイワシ油のトリアシルグリセロールをグリニャール分解して得られた1,2-DG のエナンチオマーを分析した。分解された1,2-DG から調製された脂肪酸メチルエステルを高分解能ガスクロマトグラフィーによって分析した結果, ECN (Equivalent carbon number) 値の高い脂肪酸グループ (19~22) が *sn*-1,2-DG エナンチオマーグループの後半ピークから検出されなかったことから, エナンチオマー間の完全分離が確認された。また, 逆相カラムを用い, 1,2-DG 3,5-ジニトロフェニルウレタン誘導体を分離し, それぞれの画分をキラルカラムを使用して分析することにより, 魚油由来の1,2-DG のエナンチオマー間の完全分離を可能にした。

本研究によって得られた基礎的新知見は海洋生物のグリセロ脂質の生合成経路や消化経路の解明に, また生物作用物質の研究に今後大きく貢献するものであり, 高く評価される。本論文の提出者は博士 (水産学) の学位授与に十分な資格を有するものと, 審査員一同は判定した。