



Title	脂質分析におけるキラルHPLCの最近の進歩
Author(s)	Itabashi, Yutaka
Citation	オレオサイエンス, 16(5), 213-224
Issue Date	2016
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64897
Type	journal article
File Information	oleo_science_2016_1.pdf



脂質分析におけるキラル HPLC の最近の進歩

Recent Advances in Chiral-Phase HPLC for Lipid Analysis



板橋 豊

北海道大学名誉教授

Yutaka ITABASHI

Emeritus Professor, Hokkaido University

論文要旨：近年、種々の脂質成分について分析法の著しい進歩がみられるが、本稿では脂質の立体異性体（エナンチオマー、ジアステレオマー）分析に大きな役割を果たしているキラル高速液体クロマトグラフィー（キラル固定相を用いる HPLC）の最近の進歩と分析の実際を概説する。

Abstract: Chiral-phase HPLC has been widely used as an essential means of separating and quantifying enantiomers in biological and synthetic samples. The methodology has been extended to the direct resolution of various synthetic and naturally occurring chiral glycerolipids, such as triacylglycerols and phospholipids, since the enantiomer resolution of synthetic mono- and diacylglycerols as 3,5-dinitrophenylurethane derivatives was achieved by chiral-phase HPLC in the 1980s. This review describes recent advances and applications of chiral-phase HPLC in lipid research. In particular it is focused on the analysis of enantiomeric glycerolipids including triacylglycerols and phospholipids.

Key words: chiral-phase HPLC, glycerolipid, enantiomer, diastereomer, derivatization, direct separation, chiral stationary phase

1 はじめに

キラル HPLC によるグリセロ脂質の鏡像異性体（エナンチオマー）分析は 1985 年から 86 年にかけて行われたモノアシルグリセロール（MAG）のラセミ体分離に始まる^{1, 2)}。そこでは MAG の 2 つのヒドロキシル基を UV 吸収誘導体（ビス-3,5-ジニトロフェニルウレタン：ビス-3,5-DNPU）に変換し、誘導体部と相互作用が期待できる固定相（D-フェニルグリシンを含む低分子系キラル固定相）を使用して分離が達成された。その後、この方法はジアシルグリセロール（DAG）、アルキルグリセロール、ホスファチジルグリセロール（PG）、ホスファチジルセリン（PS）、リゾホスファチジルコリン（lyso-PC）等のヒドロキシル基やアミノ基を有する脂質成分に応用されて、いずれも完全な鏡像異性体分離が達成された^{3, 4)}。これにより、これら脂質成分の立体異性体を構成する分子種の詳細な分析が可能となり、また、グリ

セロ脂質の代謝に関する酵素（リパーゼ、ホスホリパーゼ、アシルトランスフェラーゼ）の立体特異性の決定、糖脂質やエーテル脂質のグリセロール部の絶対配置の決定及びトリアシルグリセロール（TAG）の立体特異分析（*sn*-1,2,3 位に結合するアシル基の位置分布の決定）等が正確かつ容易に行えるようになった^{3, 5)}。一方、TAG やホスファチジルコリン（PC）など誘導体化の困難な脂質成分の鏡像異性体分離は未解決の課題として残されたが、近年開発された多糖系のキラル固定相（セルロース及びアミロースの誘導体）の使用によって、この問題も解決されつつある。今日では、後述するように CCD（C=8:0, D=22:6）のようにアシル基が大きく異なる合成 TAG だけでなく、PPO, SOP, PLO, POL（P=16:0, S=18:0, O=18:1, L=18:2）などアシル基の類似する天然型 TAG や PC の鏡像異性体についても驚異的な分離が得られている。これらの結果はこれまで間接的に分析され推測されてきた TAG や PC の鏡像異性体の生物組織における存在を直接知ることが可能であることを意味し、鏡像異性体の生体での分布、役割につ

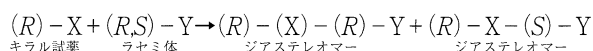
連絡者：板橋 豊
E-mail : yutaka@fish.hokudai.ac.jp

いて新たな知見の得られることが期待される。本稿では主に2000年以降の脂質分析におけるキラル HPLC の進歩について概説する。脂質のキラル分析については既に幾つかの成書³⁻¹⁰⁾、総説¹¹⁻¹⁷⁾、解説¹⁸⁻²¹⁾があるので参考にされたい。

2 キラルクロマトグラフィー

2・1 原理

同じ分子式をもつが構造の異なる化合物を異性体という。異性体には原子の結合順序が異なる構造異性体と原子の結合順序は同じであるが配置が異なる立体異性体の2つがある。構造異性体には、脂肪酸分子中での二重結合の位置やヒドロキシル基の位置、脂質分子中のアシル基の結合位置の異なる位置異性体が含まれる。立体異性体は、鏡像異性体（エナンチオマー, enantiomer）、ジアステレオマー（diastereomer）及びシス・トランス（*cis-trans*）異性体に分類される。鏡像と異なる分子は鏡像異性体であり、互いに鏡像でない立体異性体がジアステレオマーである。ジアステレオマーは沸点、融点、溶解度等の物理的性質が異なるので、通常のシリカカラムや ODS (C18) カラム使用して分離される。一方、鏡像異性体の物理的性質は偏向面の回転方向を除けば同じであるため、これを分離するためにはキラル（chiral, chirality = 鏡像と重ね合わせることのできない化合物、性質）な環境が必要である。すなわち、以下に示すように、鏡像異性体混合物（あるいはラセミ体）をキラル試薬と反応させてジアステレオマーに導いたのち、シリカや ODS (C18) などのアキラル（achiral = キラルでない）な固定相を含むカラムを用いて分離するか、あるいはキラル固定相と鏡像異性体間で可逆的なジアステレオマー形成させて分離する。前者が鏡像異性体の間接的な分離法であり、後者がキラルクロマトグラフィーとよばれる直接的な分離法である。



間接法はシリカや ODS などの安価な汎用カラムが使用できること、種々のジアステレオマー誘導体の調製が可能であるなどの長を有するが、鏡像異性体分離の正確さはキラル試薬の光学純度に依存するため高純度の試薬が必要である。一方、キラルカラムを用いる直接法では、分離の程度はキラル固定相の有する不斉識別能に依存するため、良好な分離を得るには多種類のキラルカラムの中から最適なものを選択しなければならない煩わしさがあるが、間接法に比べて良い分離が得られやすいことやジアステレオマーに変換する必要がないことから今

日では直接法が主流となっている。キラルクロマトグラフィーは鏡像異性体分離のために開発された手法であるが、通常のアキラルカラムでは分離できないジアステレオマーの分離にも有効である（3・5 参照）。

2・2 キラル固定相（CSP）

キラル HPLC に使用される CSP には不斉識別のある種々の化合物が用いられるが、合成らせん低分子化合物（尿素誘導体、アミド誘導体）と合成高分子化合物（ポリメタクリル酸エステル、ポリメタクリルアミドなど）または天然高分子化合物（セルロース誘導体、アミロース誘導体）に大別される²²⁾。これら CSP をシリカゲルのような担体に化学結合させてカラム充填剤として使用する（Fig. 1）。鏡像異性体が CSP に識別されるためには可逆的な相互作用が必要であり、その結果形成されるジアステレオメリックな会合体の安定性が両鏡像異性体間で異なり、CSP と移動相に対する分配係数に差が生じて分離が達成される。低分子系 CSP ではキラル炭素が2個程度であることが多く、相互作用は考えやすいが、高分子系 CSP は多くのキラル炭素を有し、その不斉識別能は高分子の高次構造にも依存するため分離メカニズムは複雑である。相互作用には水素結合、双極子-双極子相互作用（dipole-dipole interaction）、電荷移動錯体（charge transfer complex）、イオン結合、金属への配位結合、疎水的相互作用等があるが、これらが単独または複合して分離が達成されると考えられている²²⁾。電荷移動錯体の形成を考慮したカラムでは CSP と試料間の π - π 相互作用が鏡像異性体分離に大きく寄与する。一般にナフチル基やアンスリル基をもつ多環式芳香族化合物は π 電子供与体としてニトロ基やシアノ基のような電子吸引基を形成するが、ナフチル基とアンスリル基間でも電荷移動は起こりうる³⁾。この時、水素結合や双極子-双極子相互作用が加わると良好な鏡像異性体分離が得られる。従って、このような相互作用が期待できない試料の場合は試料にアキラルな試薬を反応させて相互作用しうる誘導体に変換して分離する（2・1 で述べた間接的なジアステレオマー法とは異なることに注意されたい）。この手法はヒドロキシル基やアミノ基のような誘導体を作りやすい官能基を有するグリセロ脂質やヒドロキシ脂肪酸のキラル分析に極めて有効であり、グリセロ脂質のキラル分離が初めて可能になった当初から使用されている^{1-7, 9, 10-15, 18-21)}。

一方、セルロースやアミロースをベースにした CSP では、試料を誘導体にしなくても、あるいはアセートやメチルエステルのようなごく簡単な誘導体に変換するだけで鏡像異性体分離の得られることが大きな長で、TAG や PC など低分子系カラムでは分離が難しい脂質

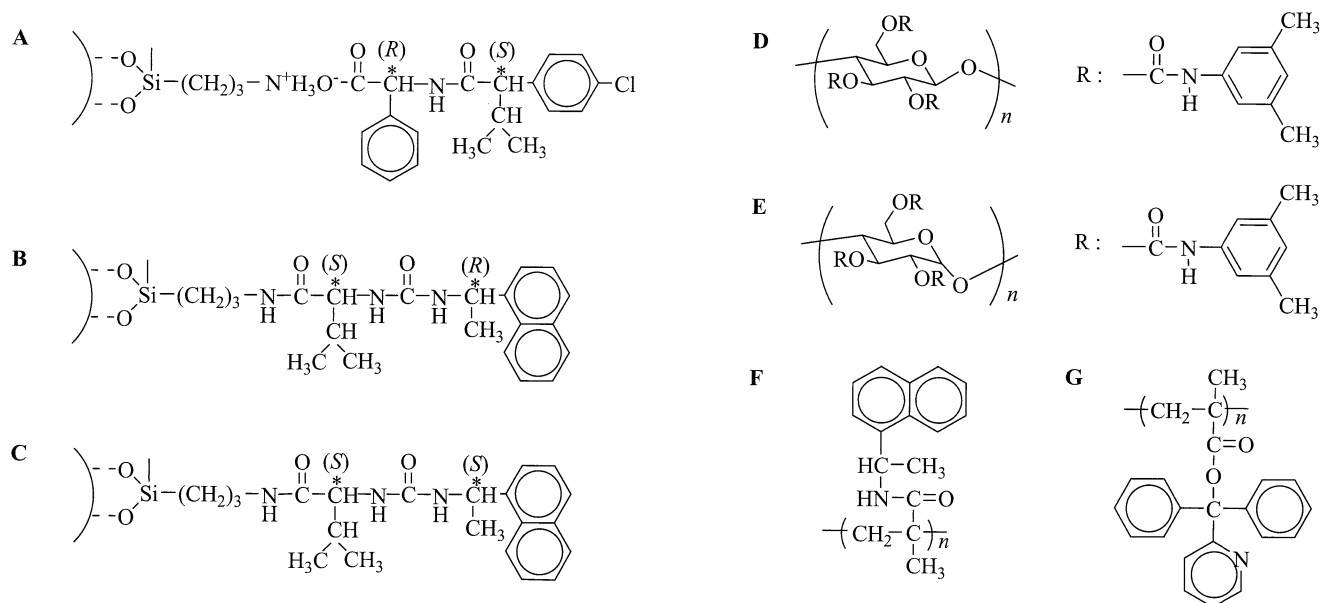
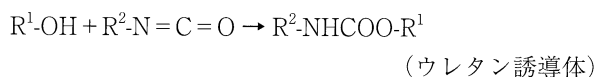


Fig. 1 Chiral stationary phases for HPLC separation of stereoisomeric glycerolipids.
 A. *N*-[(*S*)-2-(4-chlorophenyl)-isovaleroyl]-D-phenylglycine (Sumichiral OA-2100)
 B. *N*-[(*R*)-1-(α-naphthyl)ethylaminocarbonyl]-L-valine (Sumichiral OA-4100)
 C. *N*-[(*S*)-1-(α-naphthyl)ethylaminocarbonyl]-L-*tert*-leucine (Sumichiral OA-4600)
 D. Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) (Chiralcel OD, Chiralcel OD-RH, Chiralpak IB, Lux Cellulose-1)
 E. Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) (Chiralpak AD, Chiralpak IA)
 F. Poly (*R*)-1-(α-naphthyl)ethylmethacrylamide (YMC A-K03)
 G. Poly (diphenyl-2-pyridylmethyl methacrylate) (Chiralpak OP(+)). (Redrawn from Ref. 3)

成分もこの方法で分離されるようになり、近年著しい発展をみせている¹⁵⁻¹⁷⁾。誘導体化は面倒であるが、定量性と検出感度に優れている。一方、高分子系カラムを用いる直接分離は簡便であるが、検出に有利な官能基を分子がもたない場合、使用できる検出器に限られ、定量が煩雑になる場合がある。どちらの手法を選ぶかは、両者の特徴を把握した上で、何をどの程度分離するか目的に合わせて決めることが大切である。

2・3 誘導体の調製と分析条件

ヒドロキシル基とアミノ基は以下に示すようにイソシアネートと容易に反応して、それぞれ対応するウレタン誘導体と尿素誘導体を生成する。



3,5-ジニトロフェニルイソシアネートや2-アンスリルイソシアネートはヒドロキシル基やアミノ基を有するグリセロ脂質、たとえば lyso-PC や PS と塩基性触媒下室温で定量的に反応し、高感度検出が可能な誘導体が容易に得られる^{3, 13)}。一般に鏡像異性体は室温以下の温度で良い分離が得られるので、5~10℃の温度がコント

ロールできるカラム恒温槽の使用が望ましい³⁾。キラル HPLC の初期の頃は専らヘキサンをベースにした順相モードで分析されていたが、最近の高分子系カラムではアセトニトリルやメタノールなどの極性溶剤が使用できることから逆相モードも広く利用されるようになった。特に逆相モードは質量分析法 (MS) での溶出成分のイオン化を容易にし、キラル脂質の分子種分析に威力を発揮する。キラルカラムから溶出した成分は、誘導体の場合は UV または蛍光検出器が用いられ、ピーク面積比が各異性体の存在比率とみなせるが、UV 吸収を示さない試料や蛍光を発しない試料の場合は、示差屈折率検出器 (RI)、蒸発光散乱検出器 (ELSD) や荷電化粒子検出器 (CAD) 等の万能型検出器を用いて検出される。ELSD は CAD ほどこ感度ではないが、脂質の検出に広く使用されている。ラセミ体の場合、どの検出器を用いても分離された両鏡像異性体のピーク面積比は 50 : 50 になると思いがちだが、ELSD では両ピークのピーク幅が大きく異なる場合、面積比はかなり異なることが知られているので定量分析には注意が必要である²³⁾。鏡像異性体の分析に特異的な検出器として旋光度計と円二色性分散計 (CD) が利用できる。前者では旋光度に応じてプラスまたはマイナス側にピークが現れるので、一見して鏡像異性体の識別が可能であるが、一般にグリセロ脂質は

旋光度が小さく、汎用型モデルでは感度が不十分で明瞭なピークを得るのは容易ではない。一方、CD 検出器は絶対配置が決定できる利点を有しており、DAG から調製したジベンゾイルグリセロールの *tert*-ブチルジメチルシリルエーテル誘導体（ベンゾエート誘導体）の分析に使用されている²⁴⁾。しかし、脂質成分の検出器としての利用は限られている。最近、赤外吸収における円二色性を利用する赤外円二色性スペクトル（Vibrational CD: VCD）を用いてリン脂質の絶対配置を決定する方法が報告された²⁵⁾。*R,S*を決定する場合、クロマトグラフィーでは標準品が不可欠であるが、CD や VCD はこれを必要としないことから今後の普及が期待される。HPLC の万能型検出器として近年は MS が普及している。MS で両異性体を区別することはできないが、微量の鏡像異性体の検出や分子種の同定には不可欠である⁴⁾。

3 分析の実際

3・1 グリセロ脂質の構造とその表記法

グリセロールと通常の脂肪酸はキラル中心(不斉炭素)をもたないアキラルな化合物であるが、これらを構成成分とするグリセロ脂質（リン脂質、糖脂質、アシルグリセロール等）にはグリセロール骨格の C-2 に由来する鏡像異性体が存在する。すなわち、グリセロールはプロキラル (prochiral) な化合物である。主なグリセロ脂質の構造を Fig. 2 に示す。グリセロ脂質分子種の多様性にはグリセロールのプロキラル性が大きく関わっている。一般に n 個のキラル中心をもつ化合物は最大で 2^n 個の立体異性体 (2^{n-1} 組の鏡像異性体) が存在する。たとえば、グリセロール骨格の C-2 のみが不斉炭素である 1,2-DAG や PC (1,2-ジアシルホスホコリン) には 1 組の鏡像異性体が、グリセロール骨格を 2 個有する PG や PS には 4 個の立体異性体が存在する。

通常キラル化合物の立体配置は Cahn-Ingold-Prelog 則に従って *R* 配置, *S* 配置で表示されるが、グリセロ脂

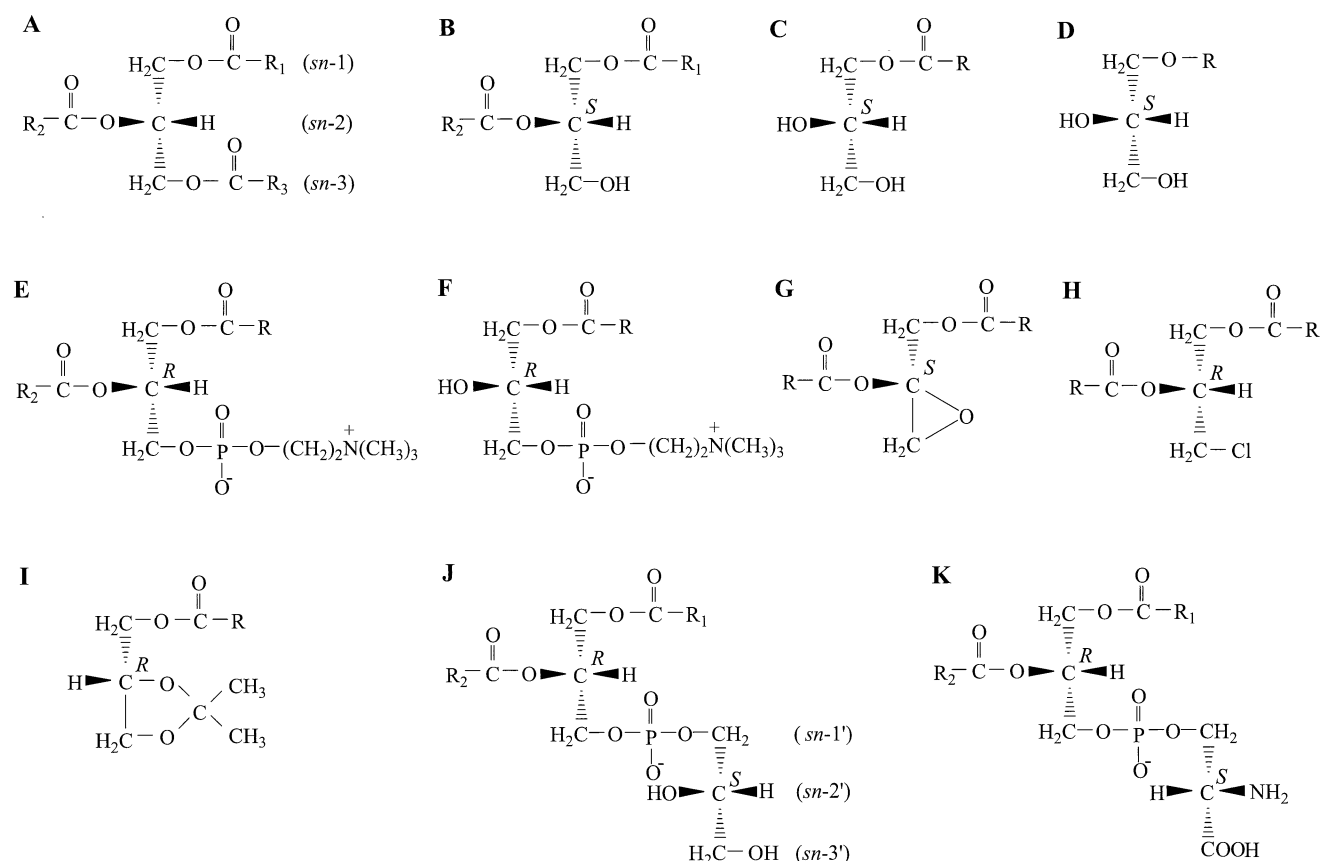


Fig. 2 Structures of some chiral glycerolipids. (A) 1,2,3-triacyl-*sn*-glycerol; (B) 1,2-diacyl-*sn*-glycerol; (C) 1-acyl-*sn*-glycerol; (D) 1-alkyl-*sn*-glycerol (glyceryl ether); (E) 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; (F) 1-acyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (lysophosphatidylcholine); (G) (*S*)-1-acyl-2,3-epoxypropane (glycidol fatty acid ester); (H) (*R*)-1,2-diacyl-3-chloropropane; (I) 2,3-*O*-isopropylidene-*sn*-glycerol; (J) 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol (phosphatidylglycerol); (K) 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (phosphatidylserine). (Redrawn from Ref. 15)

質では *sn* (stereospecific numbering) 表示法がよく使われる。これは、(S)-グリセロール誘導体を Fisher 投影式で表わして、第2級ヒドロキシル基を C-2 の左側に置いたとき、その上の炭素を C-1、下の炭素を C-3 とし、グリセロールの前に *sn* を付けて命名するものである。PG や PS のようにグリセロール骨格を2個もつ場合は、第2のグリセロール骨格を上と同じように配置して C-1', C-3' とする。この表記法に従えば、1,2-ジアシル-*sn*-グリセロールは *S* に、その鏡像異性体である 2,3-ジアシル-*sn*-グリセロールは *R* に対応する。同様に、1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-1'-*sn*-グリセロールは *R,S* に、そのジアステレオマーの1つである 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-3'-*sn*-グリセロールは *R,R* に対応する。1,2-DAG (Fig. 2B) と PG (Fig. 2J) では、C-2 の立体配置は同じであるが (*sn*-1,2-ジアシル), *R/S* 表記では逆になる。1,2-DAG や 1-MAG を 3,5-DNPU や 2-アンスリルウレタン等の誘導体に変えた場合も *R/S* は元の化合物と異なるので注意が必要である。

3・2 モノアシルグリセロール (MAG)

1-MAG はキラル HPLC により鏡像異性体が最初に分離されたグリセロ脂質である^{1, 2)}。ラセミ体の 1-MAG がビス-3,5-DNPU 誘導体に変換され、低分子系のキラルカラム (OA-2100, Fig. 1A) を順相モードで使用し、溶出成分は UV (254 nm) で検出された。2-MAG の位置異性体も同時に鏡像異性体から分離された。現在では多糖系キラルカラムを用いて直接分離が達成されている^{26, 27)}。Chiralpak IA カラム (Fig. 1E) を逆相モード

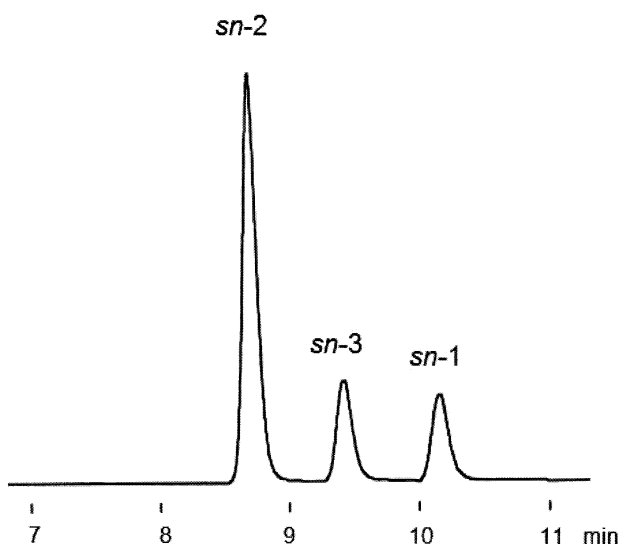


Fig. 3 Direct resolution of isomeric monoarachidonoylglycerols by chiral-phase HPLC on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate). Column: Chiralpak IA (250 × 4.6 mm i.d.). Mobile phase: MeCN/MeOH (90 : 10, v/v). Detection: ELSD. (Redrawn from ref. 14)

で使用して、モノアラキドノイルグリセロールを分離した結果を Fig. 3 に示す¹⁴⁾。2-アラキドノイルグリセロールはラットの脳やイヌの腸から取り出され、カンナビノイド受容体の内在性のリガンドであることが明らかにされた物質 (脳内マリファナ様物質) である²⁸⁾。2-MAG は容易に 1(3)-MAG に異性化するので⁵⁾、加熱を避け分析に至る操作をできるだけ短時間で行うなど取り扱いには細心の注意が必要である。2-MAG は試薬として市販されているが、異性化で生ずる少量のラセミ体が含まれている。一旦誘導体に変換されると異性化は起こらないので長期保存が可能である。キラル HPLC は 2-MAG の純度チェックに役立つ。

3・3 ジアシルグリセロール (DAG)

1,2-ジアシル-*sn*-グリセロール (1,2-DAG) は TAG やリン脂質などグリセロ脂質の代謝中間体として、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として生体において重要な役割を果たしている²⁹⁾。DAG には血清 TAG 濃度を顕著に低下させる作用や抗肥満効果のあることが明らかにされて、栄養生理の面からも興味をもたれている³⁰⁾。TAG をグリニャール分解すると、反応の初期には *sn*-1-, *sn*-2-, *sn*-3-MAG の他に、*sn*-1,2-, *sn*-2,3-, *sn*-1,3-DAG の混合物が得られる。これらを 3,5-DNPU 誘導体に変換したのち、*sn*-1,2-DAG と *sn*-2,3-DAG の鏡像異性体をキラル HPLC で単離して、それぞれを極性キャピラリー GLC や逆相 HPLC で分析することにより、TAG を構成する DAG 部の分子種や TAG の脂肪酸位置分布を知ることができる^{3, 31, 32)}。Takahashi らは、この誘導体化法を海藻と植物の葉に含まれるグリセロ糖脂質 (MGDG, DGDG, SQDG) のグリセロール部の絶対配置の決定に適用した³³⁾。すなわち、グリセロ糖脂質とそのリゾ体を過ヨウ素酸酸化/ヒドラジン分解して得られる DAG を 3,5-DNPU 誘導体に変換して A-K03 (Fig. 1F) 及び逆の立体配置をもつ A-L03 キラルカラムで分析した結果、いずれも *S*-配置 (*sn*-1,2-DAG) であり、*R* 配置 (*sn*-2,3-DAG) は混在しないことを明瞭に示した。この誘導体化法はリパーゼやアシルトランスフェラーゼの立体特異性の決定にも利用されている^{5, 34-37)}。一方、多糖系キラルカラム (Chiralpak IA, Chiralcel OD) を用いると 1,2-DAG 鏡像異性体の直接分離が可能である^{14, 15, 38)}。Fig. 4 に DAG の誘導体と遊離型の分析結果を比較して示す。いずれの方法でも良好な異性体分離が得られる。多糖系キラルカラムは順相モードでも逆相モードでも使用可能であり、ともに良好な分離が得られるが、鏡像異性体は逆相モードで (Fig. 4B)、位置異性体と鏡像異性体間の分離は順相モードでそれぞれより良い分離が得られる。逆相モー

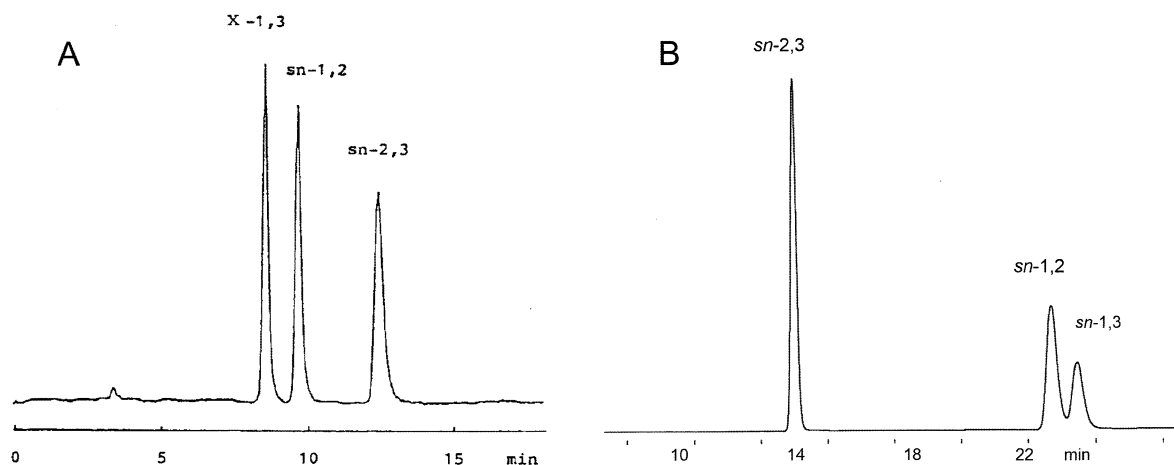


Fig. 4 Chiral-phase HPLC separation of enantiomeric and regioisomeric diacylglycerols as 3,5-DNPU derivatives (A) and free forms (B). Sample: (A) dipalmitoylglycerols, (B) dilinoleoylglycerols. Column: (A) poly (*R*)-1-(α -naphthyl)ethyl-methacrylamide (YMC A-K03, 250 $\times$ 4.6 mm i.d.); (B) tris-3,5-dimethylphenylcarbamate (Chiralpak IA, 250 $\times$ 4.6 mm i.d.). Mobile phase: (A) hexane-1,2-dichloroethane-ethanol (40:10:1, v/v/v), 1 mL/min; (B) CH₃CN/CH₃OH (90:10, v/v), 0.5 mL/min. Detection: (A) 254 nm UV; (B) ELSD. (Redrawn from Refs. 14 and 31)

ドはMSで検出した場合、試料のイオン化が容易に起こるため、HPLC-MSが実施しやすい。一方、誘導体のキラル分離に使用するカラムは通常順相モード（ヘキサンベース）で使われるため、MSではイオン化が起きにくい。ポストアラム法で少量のアルコールやアンモニア水をMS装置に導入することでイオン化が促進される^{3, 9)}。直接法は簡便であり、リバーゼの立体特異性の決定に利用されているが³⁸⁾、ELSDやMSの応答感度はアシル基の不飽和度と鎖長の影響を受けることから定量分析には注意が必要である。誘導体化法では、キラルHPLCに逆相HPLCやキャピラリーGLCを併用して生物試料由来鏡像異性体の詳細な分子種分析が行われているが^{3, 9)}、多糖系カラムを用いる直接法ではこうした試みはなく、今後の課題である。

3・4 トリアシルグリセロール (TAG)

TAGは誘導体を作る適当な官能基をもたないためにキラル分離が難しい化合物の1つであるが、近年の多糖系キラルカラムの高いキラル認識能はこの問題を解決しつつある。Iwasakiらはアシル基の大きく異なる合成TAGの鏡像異性体（例えば、1-ドコサヘキサノイル-2,3-ジカプリロイル-*sn*-グリセロール, 22:6-8:0-8:0と1,2-ジカプリロイル-3-ドコサヘキサノイル-*sn*-グリセロール, 8:0-8:0-22:6)をChiracel ODカラム (Fig. 1D) とヘキサン/2-プロパノール (200:1, v/v) の移動相を用いて優れた分離を達成した (Fig. 5)³⁹⁾。

NagaiらはリサイクルHPLC法を用いて天然に存在する似通ったアシル基をもつTAGの鏡像異性体の幾つかを分離することに初めて成功した。Chiralcel OD-RHカラムと移動相にメタノールを用いてリサイクル分析した

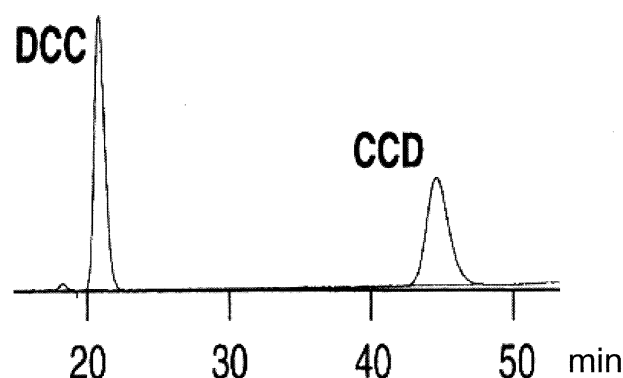


Fig. 5 Chiral-phase HPLC resolution of enantiomeric 1-docosaheptaenoyl-2,3-dicapryloyl-*sn*-glycerol (22:6-8:0-8:0, DCC) and 1,2-dicapryloyl-3-docosaheptaenoyl-*sn*-glycerol (8:0-8:0-22:6, CCD) on cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate). Column: Chiralcel OD (250 $\times$ 4.6 mm i.d.). Mobile phase: hexane/2-propanol=200:1 (v/v). Detection: 210 nm UV. (Redrawn from Ref. 39)

結果、16:0-16:0-18:1/18:1-16:0-16:0 (PPO/OPP), 18:1-18:1-16:0/16:0-18:1-18:1 (OOP/POO) 及び 16:0-16:0-18:2/18:2-16:0-16:0 (PPL/LPP) の鏡像異性体のペアが150分程度で良好に分離された (Fig. 6A)。しかしながら、不飽和脂肪酸のみからなる 18:1-18:1-18:2/18:2-18:1-18:1 (OOL/LOO) 及び飽和脂肪酸のみからなる 16:0-16:0-18:0/18:0-16:0-16:0 (PPS/SPP) の分離は困難であった。これらの結果は、*sn*-1位または*sn*-3位に16:0と18:1（または18:2）の両方を含むTAGがCSPに識別されたことを示す⁴⁰⁾。Nagaiらはこの方法を用いて、魚類や海洋哺乳動物における飽和脂肪酸と

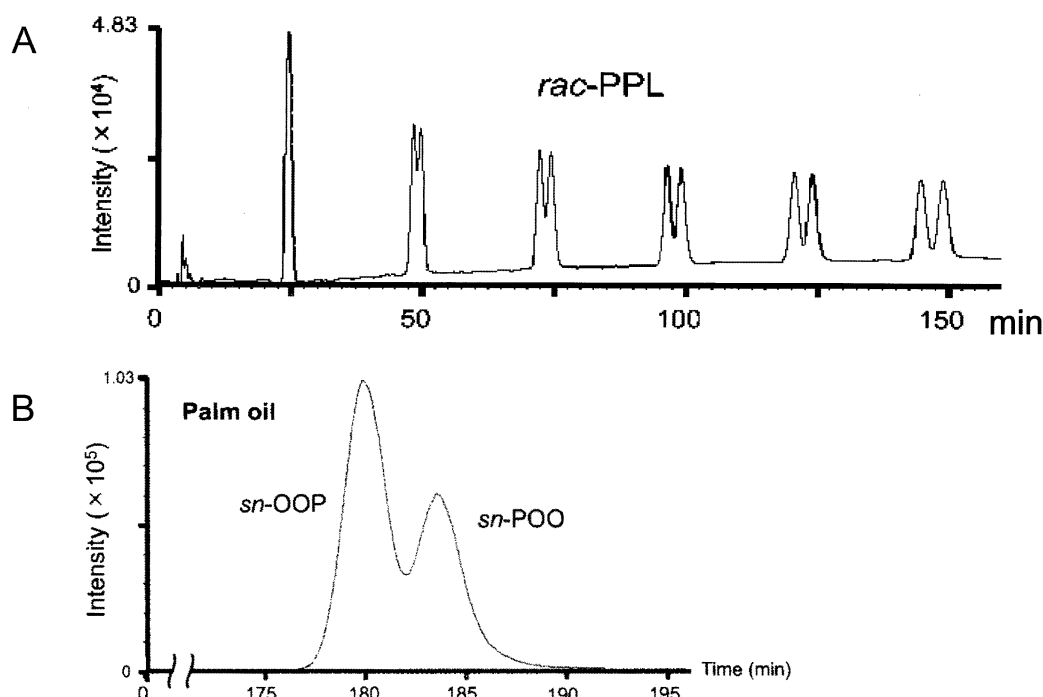


Fig. 6 Recycling chiral-phase HPLC resolution of synthetic and natural triacylglycerol enantiomers on cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate). A : 1,2-dipalmitoyl-3-linoleoyl-*rac*-glycerol (*rac*-PPL), B : a dioleoylpalmitoylglycerol fraction from palm oil triacylglycerol. Column : Chiralcel OD-RH column (150×4.6 mm i.d., 5 μm) with methanol (0.5 mL/min). Column temperature : 25°C. Detection : 205 nm UV. (Redrawn from Ref. 40)

高度不飽和脂肪酸からなる TAG と乳脂 TAG の位置異性体と鏡像異性体を分析し、それぞれの異性体の比を明らかにした⁴⁰⁻⁴²⁾。Kalpio らも2つの同一カラム (Chiralcel OD-RH, 150×4.6 mm i.d.) を装備したリサイクル HPLC 法によって、15 種のラセミ体 TAG をメタノールを移動相に用いて分析した。その結果、18:1-18:0-18:0 (*rac*-OSS), 18:1-16:0-16:0 (*rac*-OPP) のラセミ体については 250 h の長い保持時間を要したもののほぼ完全な分離が得られた⁴³⁾。

Lisa と Holcápek は同種のキラルカラム (Lux Cellulose-1, Fig. 1D) を 2 本接続して順相モード (ヘキサン/2-プロパノールのグラジエント溶出) の HPLC/APCI-MS により、1~8 の二重結合をもつ鎖長の異なる TAG の鏡像異性体と位置異性体を分析した⁴⁴⁾。その結果、1 位と 3 位に飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸 (ジエン酸またはトリエン酸) を含むラセミ体を除いて良好な鏡像異性体分離を得ている。この方法はヘーゼルナッツ油とヒトの血漿 TAG のキラル分析に適用された。Řezanka らは同一のキラルカラム (Cyclobond I 2000 DMP, β-cyclodextrin 修飾 3,5-dimethylphenyl carbamate) を 2 本接続した順相モードのキラル HPLC/MS に逆相 HPLC/APCI-MS を併用して種々の生物試料 (酵母, コケ, 原虫) の TAG の位置異性体と鏡像異性体を分析した⁴⁵⁻⁴⁷⁾。その結果、酵母からは鏡像異性体のペアを含む 94 の

TAG 分子種が同定された⁴⁵⁾。

これらの挑戦的な研究は TAG の鏡像異性体分析にインパクトを与えているが、分析時間が長いことやタンデムカラムを必要とすることから改善が望まれる。最近、著者らは分析条件 (カラム温度, 固定相, 移動相) の最適化によって、分析時間を大幅に短縮しながらより良い分離の得られることを見出している (Fig. 7) (板橋 豊, 永井利治, 後藤直弘ら, 未発表データ)。今後、さらに分析法が改善されて、現在分離の困難な 18:1-18:1-18:2 (*rac*-OOL) や 18:2-18:2-18:3 (*rac*-LLLn) 等も分離可能になることが期待される。

3・5 グリセロリン脂質

ヒドロキシル基やアミノ基をもつリン脂質、例えば lyso-PC, PE, PG, PS は 2・3 で述べたように 3,5-ジニトロフェニルイソシアネートや 2-アンスリルイソシアネートと容易に反応して、ヒドロキシル基はウレタンに、アミノ基は尿素誘導体に変換される。この誘導体化法によって、1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-D-セリン (D-PS) と 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン (L-PS) が A-K03 カラム (Fig. 1F) とヘキサン/ジクロロメタン/メタノール/トリフロロ酢酸 (70:20:10:0.2, by vol) の移動相を用いて完全に分離された。両異性体はジアステレオマーであるが、ODS やシリカなどのアキラルカラムでは分離は困難である。この方法

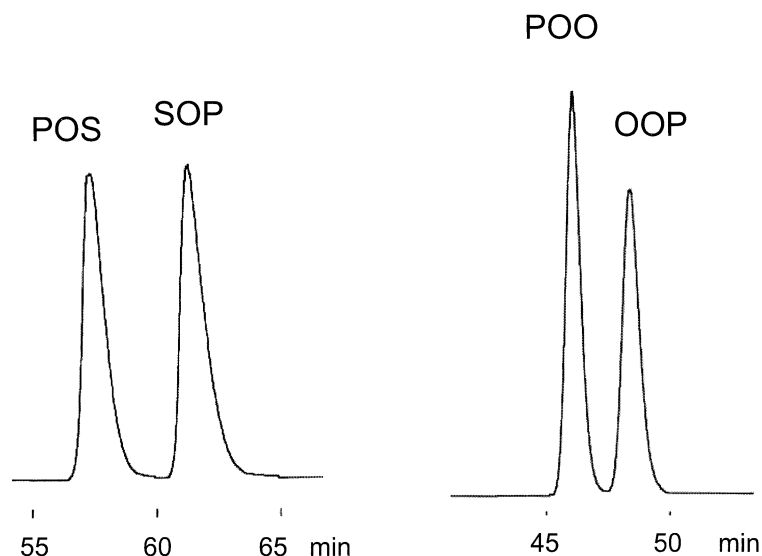


Fig. 7 Chiral-phase HPLC resolution of synthetic triacylglycerol enantiomers on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate). POS = 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-*sn*-glycerol. SOP = 1-stearoyl-2-oleoyl-3-palmitoyl-*sn*-glycerol. POO = 1-palmitoyl-2,3-dioleoyl-*sn*-glycerol. OOP = 1,2-dioleoyl-3-palmitoyl-*sn*-glycerol. Column: Chiralpak IA-3 (250×3 mm i.d.); Column temp.: 5–10°C; Mobile phase: CH₃OH/2-propanol/CH₃CN = 70 : 20 : 10, by vol. (0.3 mL/min).

を用いて筆者らはラットの脳と肝臓、サバの目と肝臓からのPSを分析した結果、いずれもL-PSのみを含むことが明らかになった^{4, 48)}。これらの生物組織には遊離型D-セリンが多く含まれることが知られているが、D-セリンを含むPSの存在は確認されなかった。一方、Omoriらはラットの大脳からのPSを加水分解して得たセリンを蛍光誘導体に変換して逆相HPLCで分析した結果、総PS中約1%のD-セリンの存在することを報告している⁴⁹⁾。

PGは分子中に2つのキラル中心をもつため4つの立体異性体が存在する。天然型はRS配置(1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-1'-*sn*-グリセロール)であるといわれているが(Fig. 2J)⁵⁰⁾、バクテリアにはRR配置(1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-3'-*sn*-グリセロール)が少量含まれることがキラルHPLCにより明らかにされた。これら2つの異性体はPSの場合と同様にジアステレオマーの関係にあるが、2つのキラル中心が離れているため通常のシリカカラムや逆相カラムでは分離されない。市販の合成PGをビス-3,5-DNPU誘導体に変換し、A-K03カラム(250×4.6 mm i.d.)とヘキサン/ジクロロメタン/メタノール/トリフロロ酢酸(60:20:20:0.2, by vol)の移動相を用いて10°Cのカラム温度で分析すると20分程度でRSとRRは完全に分離して溶出する。この方法で数十種のバクテリアのPGを分析した結果、RR体が腸菌や海洋細菌から総PG中数%~15%検出された^{51–53)}。また、ホスホリパーゼD(PLD)のホスファチジル基変換反応で天然型PC(R体, *sn*-1,2-ジアシル型)から生成するPGはRSとRRの等量混合物であるとい

われているが⁵⁰⁾、キラルHPLC分析の結果、必ずしもラセミ体ではないことが明らかになった。このことはPLDの起源(放線菌、植物)や反応条件(温度)により立体選択性が異なることを示す^{54, 55)}。

2-lyso-PCの鏡像異性体(1-acyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholineと3-acyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-1-phosphocholine)も、ヒドロキシル基を3,5-DNPUに変換し、多糖系キラルカラム(Chiralcel OD-RH, 150×4.6 mm i.d.)を2本連結して低温下(5°C)で分析することにより、ほぼ完全な分離が得られる^{3, 14)}。この場合、極性の大きなlyso-PCを溶出するために、移動相にはメタノール/水(90:10 v/v, 0.25 mL/min)が使用された。同一条件で、1-lyso-PCの鏡像異性体(1-hydroxy-2-acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholineと3-hydroxy-2-acyl-*sn*-glycero-1-phosphocholine)は部分的に分離される。すなわち、MAGと同様に不斉炭素(C-2)に直結したOH基が誘導体化された場合、より良い分離が得られる。

Itoらは最近、Chiralpak OP(+)カラム(Fig. 1G)を用いて、PCのアシル鎖が酸化されたヒドロペルキッド(PC-OOH)のジアステレオマーを直接分離することに成功している(Fig. 8)⁵⁶⁾。リン脂質の酵素酸化を考える上で有益な方法であると思われる。筆者らは飽和及び不飽和PCの鏡像異性体をChiralpak IEを用いて完全に分離することを可能にした(Fig. 9)⁵⁷⁾。生物由来のPCやPEの構造はR配置(*sn*-1,2-ジアシル型)であるが、古細菌のエーテル型リン脂質⁵⁸⁾や哺乳動物由来のビス(モノアシルグリセロール)リン酸(BMP)⁵⁹⁾では逆配置であるといわれている。本法はこのような細胞膜リン

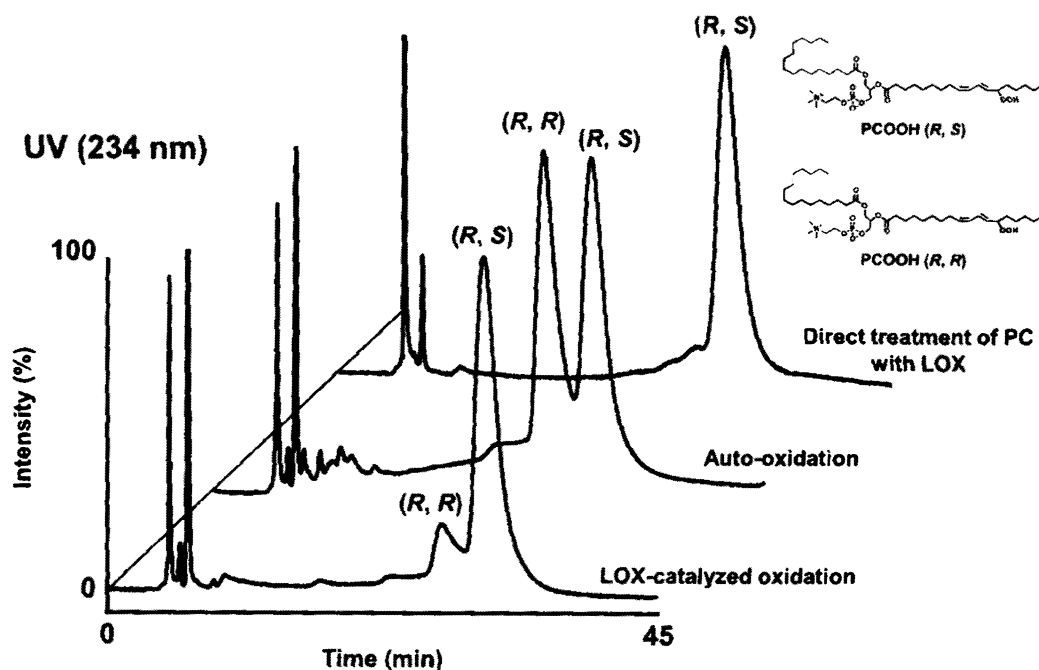


Fig. 8 Diastereomer separation of PC hydroperoxide bearing 13-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid on Chiralpak OP(+) (250×4.6 mm i.d., 10 μm) using methanol-water containing 5 mM ammonium acetate (80 : 20, v/v) as the mobile phase. (Redrawn from Ref. 56)

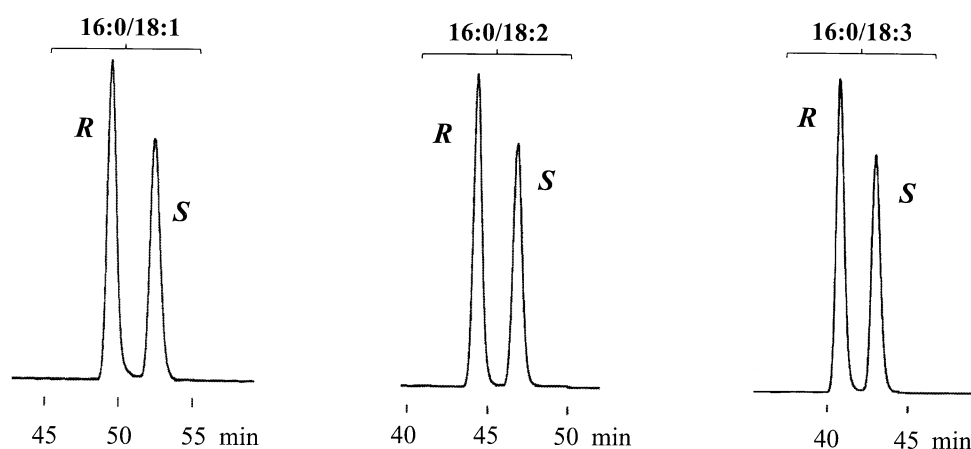


Fig. 9 Separation of a mixture of enantiomeric 1,2-diacyl-*rac*-glycero-3-phosphocholines by chiral-phase HPLC on amylose tris (3,5-dichlorophenylcarbamate). *R* and *S* correspond to *sn*-1,2-diacyl and *sn*-2,3-diacyl, respectively. Mobile phase : acetonitrile/methanol (70/30, by vol) with 0.1% (w/v) ammonium formate. Column : Chiralpak IE (250×4.6 mm i.d.); Column temperature : 25°C; Flow rate : 0.3 mL/min. Detection : ELSD.

脂質の生合成に関する研究に役立つと考えられる。なお、BMPの立体異性体の分離分析は、低分子系のキラルカラム (OA-4600, Fig. 1C) を用いて試みられている^{4, 60)}。

3・6 その他の脂質成分

深海魚等に存在するエーテル脂質 (グリセリルエーテル)⁶¹⁾、TAGやリン脂質などの化学合成の原料として汎用されるイソプロピリデングリセロール⁶²⁾、精製油脂中に微量含まれる有害成分 (グリシドール脂肪酸エステル、モノクロプロパンジオール脂肪酸エステル)^{14, 15, 63)}、アラキドン酸やEPAの代謝物であるオキシリピン^{4, 64)}には鏡像異性体が存在する (Fig. 2)。これらは誘導体化

法または直接法を用いて分離が達成されており、その方法は生物試料やキラルグリセロ脂質の合成へ利用されている。

4 キラル HPLC-MS による分子種分析

MSは鏡像異性体を識別できないが、*R*, *S*の確認 (同一スペクトルを与える) と鏡像異性体を構成する種々の分子種の同定に役立つ。すなわち、キラル HPLC/ESI-MSでは、DAG³⁾やリン脂質のキラル分析と分子種分析が同時に達成される。Fig. 10に大豆PC (水素添加物)のキラル HPLC/ESI-MSの分析例を示す⁶⁵⁾。大豆PCか

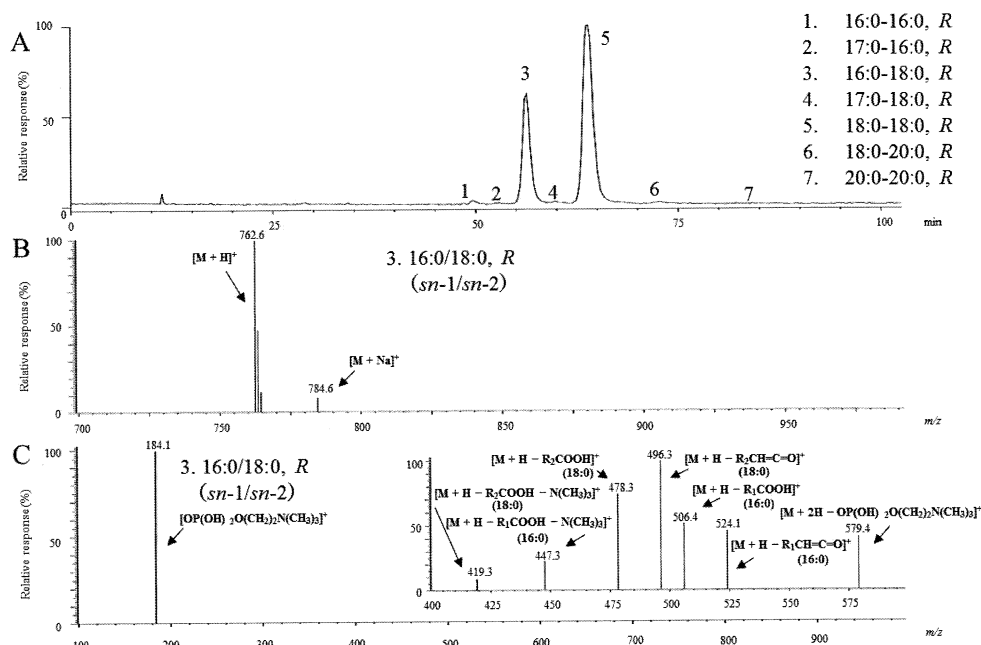


Fig. 10 Molecular species analysis of hydrogenated soybean phosphatidylcholines by chiral-phase HPLC/ESI-MS. A : total ion chromatogram; B : mass spectrum of Peak 3; C : MS/MS spectrum of $[M+H]^+$ (m/z 762.5). HPLC conditions as given in Fig. 9. MS conditions : triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu LCMS 8040); nebulizer gas, 2.0 L/min; drying gas, 15.0 L/min; DL temp. 250°C; heat block temp. 400°C; CID gas, argon (17 kPa).

らは *S* 配置 (*sn*-2,3-ジアシル) の鏡像異性体は検出されず, *R* 配置の鏡像異性体の分子種が通常の逆相 HPLC と同じように分離される。移動相に少量のギ酸アンモニウムを添加した場合, MS では顕著なプロトン化分子 $[M+H]^+$ と弱い $[M+Na]^+$ が検出される (Fig. 10B)。プリカーサーイオンを $[M+H]^+$ に指定する MS/MS では脂肪酸由来プロダクトイオンとして, $[M+H-RCH=C=O]^+$, $[M+H-RCOOH]^+$, $[M+H-RCOOH-N(CH_3)_3]^+$ が検出される (Fig. 10C)。イオン強度が $[M+H-R_2CH=C=O]^+ > [M+H-R_1CH=C=O]^+$ であることは, *sn*-2 位のアシル基と *sn*-1 位のアシル基を識別できることを示している。すなわち, ピーク 3 は 16:0 (*sn*-1)-18:0 (*sn*-2) と同定される。他のピークも同様に同定される。

5 おわりに

キラル HPLC が脂質化学の分野に取り入れられてから 30 年が経過した。この間, この手法により, あるいは他の手法 (キラルカラムを使わないジアステレオマー法) が導入されて種々のグリセロ脂質成分の鏡像異性体分離が可能になり, 脂質の構造, 組成, 関連酵素の立体特異性に関する研究が進展した。近年の多糖系キラルカラムの開発により, 当初分離が困難であった TAG やリン脂質 (PC, PE), リン脂質酸化物 (PC-OOH) の直接分析が可能になり, これまで間接的に分析され推測され

てきた脂質の立体異性体 (エナンチオマー, ジアステレオマー) の生物組織における存在を直接知ることが可能になった。立体異性体の生体での分布, 役割について新たな知見の得られることが期待される。最近, ミセル動電クロマトグラフィーと超臨界流体クロマトグラフィーによる脂質鏡像異性体の分析が試みられている。これらの新しい方法については本稿では言及しなかったが, その高いキラル分離能から脂質分野での積極的な利用が期待される。細胞膜を構成する脂質は種々の異性体を含む多数の分子の集合体であり (10^3 オーダーと見積られている), それぞれが多様な役割を担って膜機能を維持している。リン脂質は単に細胞膜の構成材料ではなく, 細胞の外からのシグナルを伝達するメディエーターでもある。このような脂質分子の集合体・総体 (lipidome) を網羅的かつ包括的に解析するリピドミクス (lipidomics) は, プロテオーム解析を補完するものとして, 近年注目されている。今日, プロテオミクス研究に MS が不可欠であるように, リピドミクス研究においても MS は主導的な役割を果たしている。しかしながら, MS で鏡像異性体を識別することは不可能であり, また位置異性体や幾何異性体を区別することも多くの場合困難である。クロマトグラフィーはこうした問題の解決に役立つ。MS によるリン脂質の定量分析には解決すべき課題が残されているが, キラル HPLC と MS を併用することによって, 細胞膜リン脂質の精密な分析が可能になることが期待さ

れる。リン脂質や TAG に特有の立体異性体や位置異性体を正確に分析することは細胞や組織で起こる生理的变化(病態等)を解析する上で、また油脂の代謝と栄養生理を考える上で不可欠であり、その手段としてクロマトグラフィーと MS は重要な役割を担っている。誘導体化とそれを必要としない2つのキラル HPLC 法はともに脂質分析に有用であり、今後は相補いながら利用されていくものと思われる。

謝辞

脂質のキラル分析についてご教示いただいた Arnis Kuksis トロント大学名誉教授に感謝します。

文 献

- 1) T. Takagi & Y. Itabashi, *Yukagaku*, **34**, 962 (1985).
- 2) Y. Itabashi & T. Takagi, *Lipids*, **21**, 413 (1986).
- 3) Y. Itabashi, *HPLC of Acyl Lipids*, (J. T. Lin & T. A. McKeon, eds.), HNB Publishing, New York, p.168 (2005).
- 4) A. Kuksis & Y. Itabashi, *Lipid Analysis and Lipidomics*, (M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, J. T. Brenna & R. E. McDonald, eds.), AOCS Press, Champaign, p. 73 (2006).
- 5) A. Kuksis, *Advances in Lipid Methodology-Three*, (W. W. Christie, ed.), The Oily Press, Dundee, p. 1 (1996).
- 6) A. Kuksis, L. Marai, J. J. Myher, Y. Itabashi & S. Pind, *Analysis of Fats, Oils and Lipoproteins*, (E. G. Perkins, ed.), AOCS Press, Champaign, p. 214 (1991).
- 7) A. Kuksis, L. Marai, J. J. Myher, Y. Itabashi & S. Pind, *Analysis of Fats, Oils and Lipoproteins*, (E. G. Perkins, ed.), AOCS Press, Champaign, p. 464 (1991).
- 8) W. W. Christie (ed.), *Advances in Lipid Methodology-One*, The Oily Press, Ayr, p. 121 (1992).
- 9) J. J. Myher, A. Kuksis & P. W. Park, *New Techniques and Application in Lipids Analysis*, (E. MacDonald & M. M. Mossoba, eds.), AOCS Press, Champaign, p. 100 (1997).
- 10) 板橋 豊, 「水産機能性脂質－給源・機能・利用－, 水産学シリーズ 142 (高橋是太郎 編)」, 恒星社厚生閣, 東京, p.60 (2004).
- 11) T. Takagi, *Prog. Lipid Res.*, **29**, 277 (1990).
- 12) 板橋 豊, 日本油化学会誌, **47**, 971 (1998).
- 13) A. Kuksis & Y. Itabashi, *Methods*, **36**, 172 (2005).
- 14) Y. Itabashi, *Chromatography*, **32**, 59 (2011).
- 15) Y. Itabashi, *J. Lipid Nutr.*, **21**, 27 (2012).
- 16) 永井利治, 後藤直弘, オレオサイエンス, **13**, 355 (2013).
- 17) 永井利治, 後藤直弘, ミルクサイエンス, **64**, 139 (2015).
- 18) 板橋 豊, 化学と生物, **33**, 381 (1995).
- 19) 板橋 豊, 鈴木敏之, 化学と生物, **33**, 471 (1995).
- 20) 安藤靖浩, 板橋 豊, 化学と生物, **33**, 545 (1995).
- 21) 板橋 豊, 化学と生物, **43**, 338 (2005).
- 22) G. Gübitz, M. G. Schmid (eds.), *Chiral Separations (Methods in Molecular Biology, vol. 243)*, Humana Press, New Jersey, P.1 (2004).
- 23) T. Zhang, D. Nguyen & P. Franco, *J. Sep. Sci.*, **29**, 1517 (2006).
- 24) H. Uzawa, H. Ohru, H. Meguro, T. Mase & A. Ichida, *Biochim. Biophys. Acta*, **1169**, 165 (1993).
- 25) T. Taniguchi, D. Manai, M. Shibata, Y. Itabashi & K. Monde, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 12191 (2015).
- 26) L. Deng, H. Nakano & Y. Iwasaki, *J. Chromatogr. A*, **1165**, 93 (2007).
- 27) L. Deng, H. Nakano & Y. Iwasaki, *J. Chromatogr. A*, **1198**, 67 (2008).
- 28) 杉浦隆之, 日本油化学会誌, **49**, 777 (2000).
- 29) Y. Nishizawa, *Science*, **258**, 607 (1992).
- 30) Y. Katsuragi, T. Yasukawa, N. Matsuo, B. D. Flickinger, I. Tokimitsu & M. G. Matlock (eds.), *Diacylglycerol Oil*, AOCS Press, Urbana (2008).
- 31) Y. Itabashi, A. Kuksis, L. Marai & T. Takagi, *J. Lipid Res.*, **31**, 1711 (1990).
- 32) Y. Itabashi, A. Kuksis & J. J. Myher, *J. Lipid Res.*, **31**, 2119 (1990).
- 33) Y. Takahashi, Y. Itabashi, M. Suzuki & A. Kuksis, *Lipids*, **36**, 741 (2001).
- 34) R. Lehner, A. Kuksis & Y. Itabashi, *Lipids*, **28**, 29 (1993).
- 35) Y. Itabashi, S. Nishihara & T. Ota, *International Symposium on Chromatography* (H. Ho and T. Hanai eds.), World Scientific, Singapore, p. 337 (1995).
- 36) T. O. Eichmann, M. Kumari, J. T. Hass, R. V. Farese Jr, R. Zimmermann, A. Lass & R. Zechner, *J. Biol. Chem.*, **287**, 41446 (2012).
- 37) J. A. Rodriguez, L. D. Mendoza, F. Pezzotti, N. Vanthuyne, J. Leclaire, R. Verger, G. Buono, F. Carriere & F. Fotiadu, *Anal. Biochem.*, **375**, 196 (2008).
- 38) W. Piyatheerawong, Y. Iwasaki & T. Yamane, *J. Chromatogr. A*, **1068**, 243 (2005).
- 39) Y. Iwasaki, M. Yasui, T. Ishikawa, R. Irimescu, K. Hata & T. Yamane, *J. Chromatogr. A*, **905**, 111 (2001).
- 40) T. Nagai, H. Mizobe, I. Otake, K. Ichioka, K. Kojima, Y. Matsumoto, N. Gotoh, I. Kuroda & S. Wada, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 2880 (2011).
- 41) T. Nagai, Y. Matsumoto, Y. Y. Jiang, K. Ishikawa, T. Wakatabe, H. Mizobe, K. Yoshinaga, K. Kojima, I. Kuroda, T. Saito, F. Beppu & N. Gotoh, *J. Oleo Sci.*, **62**, 1009 (2013).
- 42) T. Nagai, N. Watanabe, K. Yoshinaga, H. Mizobe, K. Kojima, I. Kuroda, Y. Odanaka, T. Sato, F. Beppu & N. Gotoh, *J. Oleo Sci.*, **64**, 943 (2015).
- 43) M. Kalpio, M. Nylund, K. M. Linderborg, B. Yang, B. Kristinsson, G. G. Haraldsson & H. Kallio, *Food Chem.*, **172**, 718 (2015).
- 44) M. Lisa, H. Velinska & M. Holčápek, *Anal. Chem.*, **87**, 3903 (2009).
- 45) T. Řezanká, I. Kolouchová, A. Čejková, T. Cajthami & K. Sigler, *J. Sep. Sci.*, **36**, 3310 (2013).
- 46) T. Řezanká, K. Siegler, *Lipids*, **49**, 1251 (2014).
- 47) T. Řezanká, M. Vitová, A. Nováková & K. Sigler, *Lip-*

- ids*, **50**, 811 (2015).
- 48) Y. Itabashi, T. Ebata, A. Hatanaka & A. Kuksis, 95th AOCS Annual Meeting & Expo, Cincinnati, Abstract, p. 3 (2004).
 - 49) T. Omori, H. Mihara, T. Kurihara & N. Esaki, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **382**, 415 (2009).
 - 50) K. Y. Hostetler, *New Comprehensive Biochemistry, vol.4 (Phospholipids)*, Elsevier, New York, p. 215 (1982).
 - 51) Y. Itabashi & A. Kuksis, *Anal. Biochem.*, **254**, 49 (1997).
 - 52) 藤島裕典, 蒲野淑子, 田岡裕佳子, 澤辺智雄, 板橋 豊, 日本水産学会誌, **70**, 200 (2004).
 - 53) 蒲野淑子, 藤島裕典, 澤辺智雄, 板橋 豊, 北大水産彙報, **55**, 17 (2004).
 - 54) R. Sato, Y. Itabashi, T. Hatanaka & A. Kuksis, *Lipids*, **39**, 1013 (2004).
 - 55) R. Sato, Y. Itabashi, A. Suzuki, T. Hatanaka & A. Kuksis, *Lipids*, **39**, 1019 (2004).
 - 56) J. Ito, K. Nakagawa, S. Kato, T. Hirokawa, S. Kuwahara, T. Nagai & T. Miyazawa, *J. Chromatogr. A*, **1386**, 53 (2015).
 - 57) 板橋 豊, 中米洋介, 木村 錬, *Chromatography*, **33** (Supple. 2), 83 (2012).
 - 58) 古賀洋介, 蛋白質・核酸・酵素, **38**, 1566 (1993).
 - 59) 小林俊秀, J. Gruenberg, 蛋白質・核酸・酵素, **44**, 1181 (1999).
 - 60) Y. Itabashi & A. Kuksis, *International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC Kyoto)*, Kyoto, Abstract, p. 72 (2001).
 - 61) Y. Itabashi, A. Yamaguchi & K. Nakaya, *Biology of the Megamouth Shark*, (K. Yano, J. F. Morrissey, Y. Yabu-moto & K. Nakaya, eds.), Tokai University Press, Tokyo, p. 151 (1997).
 - 62) Y. Itabashi, H. Fujishima & R. Sato, *J. Oleo Sci.*, **53**, 405 (2004).
 - 63) Y. Itabashi, S. Yoshioka, M. Suzui, H. Tsuda & A. Kuksis, 104th AOCS Annual Meeting and Expo, Montreal, Abstract on-line, <http://www.aocs.org/archives/am2013/> (2013).
 - 64) C. Schneider, Z. Yu, W. E. Boeglin, Y. Zheng & A. Brash, *Methods in Enzymology vol. 433*, (H. A. Brown ed.), Elsevier, Amsterdam, p. 145 (2007).
 - 65) 木村 錬, 西村和彦, 板橋 豊, 日本油化学会第53回年会, 札幌, 講演要旨集, p.198 (2014).