graphy on precoated adsorbents fixed with fused glass. VIII.) Tamotsu OKUMURA and Tetsuro KADONO (Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd., 2-47, Sagisukami, Fukushima-ku, Osaka-shi, Osaka)

In a previous paper⁹⁾ we reported the preparation of the silica gel and alumina sintered plates. They consisted of a layer of silica gel or alumina on various kinds of glass or metal base plate fixed with several kinds of sintered glass powder.

In the present paper we reported that the previously reported welding procedure was successfully applied to the preparation of silica gel or alumina sintered sticks. As reported previously, several kinds of glass or metal sticks were used as support and several kinds of glass powder were tested as binders. While these three materials are very much different from each other in their expansion coefficient (α) as shown in Table I, the welding among these materials does occur.

Thin-layer chromatographic separation of the following test mixtures was performed by using these silica gel and alumina sintered sticks: azodyes (indophenol, Sudan red G and *p*-dimethylaminoazobenzene, and *p*-aminoazobenzene, Sudan yellow and azobenzene), estrogens (estriol, estradiol and estrone), alkaloids (quinine, codeine, brucine and thebaine)

and lipids (cholesterol, cholesteryl stearate, mono-stearin, distearin, tristearin, stearic acid and methyl oleate). All these sticks are thermo-stable, and those with glass stick supports are acid-resistant and, moreover, can be repeatedly used without reactivation after being in the hydrogen flame ionization detector. As shown in Table IV and IX, these sintered sticks have very superior reproducibility of separation.

By using the silica gel quartz sintered sticks, a quantitative determination of lipids was attempted. Among the five kinds tested, two kinds of stick with glass ceramic or borosilicate as binder were proved to be useful owing to their small baseline noise in response (Fig. 3 and 4). The response reproducibility of lipids was very good when scanning was performed with TLC-flame ionization detector (FID). The coefficient of variation was less than 5% in three weight ratios (Table VIII).

The silica gel sintered sticks and the silica gel Laboratory-made sticks when used together with TLC-FID apparatus will facilitate the qualitative and quantitative analysis of lipids in biological fluids, heavy oil fractions in petroleum industry and plant components in phytochemistry¹⁰⁾.

(Received Dec. 15, 1972)

反応ガスクロマトグラフィーを用いる血清コレステロールの迅速分析

松居 正己*, 水沼 寛**, 池川 信夫***

(1972 年 12 月 27 日受理)

血清中の遊離形コレステロールと総コレステロールの分析をガスクロマトグラフィーで検討した。コレステランを溶解したテトラヒドロフラン液を血清に加えて混合し、上澄み液を試料とし、OV-1 のカラムで遊離形コレステロールを分析した。総コレステロールは反応カラムを OV-1 のカラムの先端部に取り付けて行なった。

反応カラムは水晶粉末に 15% の水酸化カリウムをコーティングしたものを使用した。反応カラムの温度は 300°C でエステル形を遊離形コレステロールに加水分解する条件として適していた。

定量分析はコレステランを内部標準物質として内部標準法で行なった。血清中の総コレステロール量を ZaK-Hennry 法の変法と比較し、大差ない結果が得られたので、各種疾患の血清中の遊離形および総コレステロールの分析に応用した。

* 島津製作所東京研究所: 東京都調布市柴崎 1-63-1

** 専売公社東京病院: 東京都港区三田

*** 東京工業大学天然物化学研究施設: 東京都目黒区大岡山 2-12-1

1 緒 言

血清中には遊離形とエステル形 コレステロールが存在している。現在、臨床分析の分野では Liebermann-Burchard 反応¹⁾あるいは Kiliani 反応²⁾を利用して比色法で総コレステロールを分析している。しかし、反応試薬の変化、血清中の妨害成分などの影響で満足すべき結果が得られないこともある。

一方、ガスクロマトグラフィーでは血清を加水分解し、石油エーテル、*n*-ヘキサンなどの有機溶媒で抽出して総コレステロールを分析する方法がルーチン化されつつある³⁾。また、著者らは遊離形とエステル形のコレステロールの分別定量法についてはすでに報告したが⁴⁾⁵⁾、今回、血清中の遊離形と総コレステロールの迅速分析をガスクロマトグラフィーで行なうために、水酸化カリウムを含む反応カラムでエステル形を遊離形コレステロールとして総コレステロールを分析する方法を検討した。検討事項は反応カラム中の水酸化カリウムの濃度、反応カラムの温度、比色法との比較などである。得られた最適な分析条件より各種疾患の血清中の遊離形と総コレステロールの迅速分析に応用し、良好な結果が得られたので報告する。

2 実験方法および装置

2.1 装 置

島津製作所製ガスクロマトグラフ GC-5APF を使用した。遊離形コレステロールの分析用カラムは Dimethyl-dichlorosilane 処理をした Shimalite W, 80~100 mesh に固定相液体 OV-1 を 2% コーティングした充てん剤を長さ 0.5m, 内径 3mm のガラス管に充てんしたものを用いた。また、比色法での総コレステロールの分析は島津ボッシュロム回折格子形光電比色計スペクトロニク 20 を使用した。

2.2 反応カラム

反応カラムの充てん剤の作製は水酸化カリウムをエチルアルコールに溶解し、その溶液中に水晶粉末を入れ、ロータリーエバポレーターでエチルアルコールを留去後、80°C で乾燥した。

反応カラムは水酸化カリウム-水晶粉末 80~200 メッシュ 4g を遊離形コレステロールの分析用カラムの先端部に 7cm になるように充てんしたものを使用した。

2.3 試 薬

コレスタン、コレステロール、コレステリルオレエートは Applied Science Laboratory 社製のものを使用した。水酸化カリウム、テトラヒドロフラン、エチルアルコールは和光純薬製の特級品を使用した。テトラヒドロ

フランは蒸留したものに金属ナトリウムを加えて使用した。また、比色法で用いた塩化第二鉄、水酢酸、濃硫酸は和光純薬製コレステロール定量用のものを用いた。

2.4 実験方法

反応カラムでの加水分解条件の検討にはコレスタン 5mg とコレステリルオレエート 10mg を 50ml のテトラヒドロフランに溶解し、その 2 μ l を用いた。

ガスクロマトグラフィーの血清試料の調製は 30 μ l の血清とコレスタン 5mg を 10ml のテトラヒドロフランに溶解した溶液 60 μ l を Fig. 1 に示したマイクロ試験管に入れ、30 秒間激しく振り混ぜたのち、2 分間静置し、上澄み液を分析用試料とした。調製した血清試料は総コレステロールの分析に 3 μ l 用い、遊離形コレステロールに 5 μ l を使用した。反応カラム中の加水分解の条件はコレスタンとコレステリルオレエートの試料の分析で 150~300°C の昇温分析を行ない検討した。調製した血清試料のコレスタンとコレステロールの分析は 230°C で行なった。

Fig. 1 Dimensions of test tube for analysis

また、ガスクロマトグラフの測定条件は Table I に示す。ピーク面積の測定は半値幅法で行なった。

Table I Operating conditions of gas chromatography

Apparatus	Shimadzu gas chromatograph GC-5APF	
Column	Glass tube	0.5 m × 3 mmφ
	Packing	2% OV-1 on Shimadzu W, 80~100 mesh
Reaction column	Packing	Potassium hydroxide on quartz powder
Detector	Hydrogen flame ionization detector	
Carrier gas	Nitrogen	
Flow rate	Nitrogen	50 ml/min
	Hydrogen	40 ml/min
	Air	0.91 l/min
Detector temperature	300°C	
Injection port temperature	300°C	
Column temperature	Isothermal	230°C
	Programm	150~300°C rate 5°C/min

比色法で血清中の総コレステロールの分析は Zak-Henly 法⁹⁾の変法で行なった。血清 0.1 ml を試験管に採取し、0.08% の塩化第二鉄-酢酸液 8.0 ml を加えて、じゅうぶん混合し、15 分間放置後、汙過し、6.0 ml の汙液を共せん付き試験管に入れ、濃硫酸 4.0 ml を加えて、激しく振って室温で放置し、冷却後、蒸留水を対照として 560 mμ で吸光度を測定した。

3 実験結果および考察

3.1 反応カラムの水酸化カリウムの濃度による影響

著者らは血清に水酸化カリウムとエチルアルコールを加えて還流し、濃縮した反応液をガスクロマトグラフで分析する方法を検討している際、数十回分析後、ただちにエステル形コレステロールをガスクロマトグラフに注入すると一部のエステル形コレステロールが遊離形コレステロールに加水分解されることを見いだした。

これは反応液の水酸化カリウムがカラムの先端部に残り、下式の加水分解反応が起こるものと考えられたので、カラムの先端部に反応カラムを取り付けることを検討した。しかし、特別の反応カラムを用いる必要はなく通常の分析用カラムの試料室に水酸化カリウムの充てん剤を充てんすることでじゅうぶん目的を達することが明らかになった。すなわち Fig. 2 のようなデュアルカラム方式を用い、一方は遊離コレステロール分析用の OV-1 のカラムをセットし、一方は試料室部分の長さ 7 cm に水酸化カリウム充てん剤を充てんして反応カラムとし総コレステロール測定用とすることができる。試料室温度がすなわち反応カラムの温度となる。

反応カラムの担体としてグラスウールなどを検討したが、水晶粉末が最もすぐれていた。エステル形が完全に加水分解されるか否かはコーティングする水酸化カリ

Fig. 2 Flow diagram of gas chromatographic system

(1) Nitrogen gas; (2) Septum; (3) Reaction column potassium hydroxide 7 cm; (4) Heater; (5) Column OV-1 0.5 m; (6) Flame ionization detector; (7) Air compressor; (8) Electrometer; (9) Hydrogen gas; (10) Recorder

ウムの量によっているのでまずその検討を行なった。

水晶粉末の重量に対して水酸化カリウムをそれぞれ 5, 10, 12, 15, 18, 20% をコーティングしたものを反応カラムとして用い、コレスタンとコレステリルオレエートをテトラヒドロフランに溶解した試料を分析した。得られたクロマトグラムよりコレスタンとコレステロールのピーク面積比を求め、反応カラムの水酸化カリウムの濃度との関係を検討した結果を Table II に示す。反応カラムの水酸化カリウムの濃度は 10, 12, 15, 18% でコレステロールの生成が起こるが、最も効率のよい反応カラムは水酸化カリウムの濃度が 15% のものであった。10% 以下の濃度ではコレステリルオレエートが検出されたことから分解反応がじゅうぶんで、コレステロールの生成が少なかったものと思われる。20% 以上では反応条件が強すぎてコレステロールが分解されたものと考えられる。また、Table II では反応カラムの温度を 300°C に設定して行なったが、この温度では水酸

Table II Effect of concentration of potassium hydroxide on peak area ratio of cholesterol/cholestane

Concentration of potassium hydroxide in reaction column (%)	Peak area ratio (cholesterol/cholestane)	Cholesteryl oleate
5.0	0.00	Detected
10.0	0.05	Detected
12.0	0.17	Detected
15.0	0.25	Not detected
18.0	0.12	Not detected
20.0	0.00	Not detected

化カリウムの濃度を 20% 以上にすると、反応カラム中の水酸化カリウムが液状となり分析用カラムに流れ出し、実用上使用できない。

3.2 反応カラムの温度による影響

水酸化カリウム濃度 15% の反応カラムで温度を 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330°C に設定し、コレスタンとコレステリルオレエートの試料を分析した。

Table III にコレスタンとコレステロールのピーク面積比と反応カラムの温度の関係を示したが、反応カラムの温度を 290°C 以下に設定するとコレステロールの生成は少なく、310°C 以上ではコレステロール以外の生成物が検出され、コレステロールの生成量は少ない。したがって、反応カラムの温度が 300°C の場合にコレステロールの生成は最もよい結果を示した。また、この温度での遊離形コレステロールの分析はまったく影響がなかった。遊離形とエステル形コレステロールの両者が存在している血清に反応カラムを用いることによって、総コレステロールの分析が可能である。

Table III Relationship between temperature of reaction column and peak area ratio of cholesterol/cholestane

Reaction column temperature (°C)	Peak area ratio (cholesterol/cholestane)	Cholesteryl oleate
260	0.00	Detected
270	0.03	Detected
280	0.05	Detected
290	0.13	Detected
300	0.25	Not detected
310	0.24	Not detected
320	0.22	Not detected
330	0.20	Not detected

3.3 血清中のコレステロールの分析

血清には遊離形とエステル形コレステロール以外の成分が存在しているので、直接血清をガスクロマトグラフ

に注入するとマイクロシリンジの針先にたん白質などの成分が凝固したり、カラム内に不揮発性物質が残るなどの欠点がある。そこで、コレステロールを溶解し、かつ内部標準物質のコレスタンも溶解させるテトラヒドロフランを抽出溶媒として使用した。

血清にテトラヒドロフランを加えた試料中の遊離形コレステロールは OV-1 のカラムで分析し、総コレステロールは反応カラムと OV-1 のカラムで分析した。

3.4 比色法との比較

同一血清を用いて総コレステロールの測定値を比色法と比較した。Table IV は 10 試料の両者の測定値を示したものであるが、比色法は血清中のコレステロール濃度の高い場合、反応ガスクロマトグラフィーに比べ測定値が高く、コレステロール濃度が低い場合、両者の値はほぼ一致する。

Table IV Determination of total cholesterol in serum (mg/100 ml)

No.	Gas chromatography (reaction column)	Colorimetry (Zak-Henly method) ⁶⁾
1	277.5	316.0
2	277.5	318.0
3	192.0	187.0
4	373.5	389.0
5	264.0	298.0
6	354.0	351.0
7	330.0	370.0
8	159.0	167.0
9	247.5	233.0
10	160.0	165.0

また、ガスクロマトグラフィーでの遊離形と総コレステロールのピーク面積の再現性は血清にコレスタンを溶解したテトラヒドロフランを加えた試料で行なった。

Table V に同一血清試料について 5 回くりかえして測定したコレスタンとコレステロールのピーク面積を示したが、コレステロール/コレスタンのピーク面積比は遊離形と総コレステロールでいずれも変動係数は 2.18% 以下であった。

3.5 検量線

定量分析は内部標準法で行なった。内部標準物質に octacosane を使用した報告もあるが³⁾、ここではコレステロールの同族体であるコレスタンを使用した。

検量線は横軸にコレステロールとコレスタンの重量比を求め、縦軸にピーク面積比をプロットしたが、両者の関係は直線性があり、検量線としてじゅうぶんに用いら

Table V Reproducibility of peak area of free cholesterol and total cholesterol in serum

No.	Free cholesterol			Total cholesterol		
	Cholestane	Cholesterol	Cholesterol/ cholestane	Cholestane	Cholesterol	Cholesterol/ cholestane
1	2.60	3.15	1.21	3.20	6.56	2.05
2	2.65	2.95	1.11	3.15	6.30	2.00
3	2.70	3.30	1.22	3.05	6.41	2.10
4	2.65	3.06	1.15	3.05	6.35	2.08
5	2.65	2.97	1.12	3.10	6.36	2.05
Mean value	2.65 (cm ²)	3.09 (cm ²)	1.16	3.11 (cm ²)	6.40 (cm ²)	2.06
C. V.	0.66	2.18	2.16	1.04	0.77	0.91

Column : OV-1 for free cholesterol determination; Reaction column of potassium hydroxide and OV-1 for total cholesterol determination

れる。

3・6 血清の分析

Fig. 3 は正常男子の血清中の総コレステロールを反応カラムと OV-1 のカラムで分析したクロマトグラムである。コレスタンとコレステロールの保持比は OV-1 のような無極性のカラムで約 2 となり, QF-1, OV-17, XE-60 のカラムでは保持比が 5~10 となった。

Fig. 3 Analysis of cholesterol in serum

(1) Cholestane; (2) Cholesterol; Column : Potassium hydroxide and OV-1

また, 血清試料に応用した場合のカラムの寿命は総コレステロール測定の場合 70~80 検体であった。総コレステロール分析用カラムの寿命は反応カラムにあり, そのチェックはコレスタンとコレステリルオレエートの試料を分析し, コレスタンとコレステロールのピーク面積比を求めて行なった。反応カラムの性能が低下したと

き, 水酸化カリウムの充てん物を交換することによって再生できた。

一方, 遊離形コレステロール用カラムの耐久性は血清試料約 400 検体の分析が可能であった。

このような方法で各種疾患者の血清中のコレステロールを分析した結果を Table VI に示す。血清コレステロール量は甲状腺機能低下 (Table VI, patient No. 9 良性甲状腺せんしゅ), ネフローゼ (No. 11), 糖尿病 (No. 15) などが増加し, 悪性貧血 (No. 2) が減少する傾向にあった。

Table VI Determination of free cholesterol and total cholesterol in serum

Patient No.	Free cholesterol (mg/100 ml)	Total cholesterol (mg/100 ml)
1 (M 45)	16	33
2 (M 66)	53	147
3 (F 64)	95	155
4 (F 24)	86	165
5 (M 35)	60	167
6 (M 11)	70	183
7 (M 21)	74	191
8 (F 66)	87	216
9 (F 40)	42	227
10 (F 45)	90	243
11 (F 49)	88	251
12 (M 62)	120	280
13 (F 57)	72	309
14 (F 48)	80	334
15 (M 58)	131	347

4 結 語

血清中の遊離形, 総コレステロールの迅速分析をガスクロマトグラフィーで検討した。試料の調製は血清にテトラヒドロフランを加えてたん白質などの不揮発性成分を沈殿させ, その上澄み液を分析用試料とした。遊離形コレステロールは OV-1 のカラムで分析し, 総コレステロールは水晶粉末に 15% の水酸化カリウムをコーテ

ィングした充てん剤を OV-1 のカラムの先端部に充てんしたカラムを用いて分析した。

血清中のエステル形を遊離形コレステロールに分解させる反応カラムの温度は 300°C が適していた。コレステロールの定量分析はコレスタンを用いた標準物質として行ない、Zak-Henly 法の変法⁶⁾と比較したが、両者の測定値は大差ない結果が得られた。

また、各種疾患者の血清中のコレステロールの分析に応用し、良好な結果が得られた。微量の血清試料でじゅうぶんであり、デュアルカラム方式を用いることによって短時間で遊離形および総コレステロールが分析できることから臨床分析に大いに役だつと思われる。

終わりに、本実験に協力された東京工業大学理学部緒方泰子、奥村真理両氏に感謝します。

(1972 年 9 月 14 日、本会第 21 年会において発表)

文 献

- 1) D. R. Ider, C. A. Baumann : *J. Biological Chemistry*, **203**, 389 (1953).
- 2) B. Zak : *Am. J. Clinical Path.*, **27**, 583 (1957).
- 3) J. L. Driscoll, D. Aubuchon, M. Descoteaux, H. F. Martin : *Anal. Chem.*, **43**, 1196 (1971).
- 4) 松居正己, 佐藤克哉, 遠藤文雄, 池川信夫 : 医学のあゆみ, **66**, 3 (1968).
- 5) N. Ikekawa, M. Matsui, K. Sato : *Japan J. Exp. Med.*, **41**, 3 (1971).
- 6) 北村元仕 : 医学のあゆみ, **33**, 7 (1960).

☆

Rapid analysis of serum cholesterol using reaction gas chromatography. Masami MATSURI*, Hiroshi MIZUNUMA** and Nobuo IKEKAWA*** (*Tokyo Research Laboratory, Shimadzu Seisakusho Co., Ltd., 1-63-1, Shibasaki, Chofu-shi, Tokyo; **Tokyo Hospital of Japan Monopoly Corporation, Mita, Minato-ku, Tokyo; ***Laboratory of Chemistry for Natural Products, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1, Ohokayama, Meguro-ku, Tokyo)

The amount of cholesterol in serum has a close relationship with the functions of liver, pancreas,

thyroid gland and other organs. Thus its determination is very important in clinical examinations. The Zak, Pearson, and other methods have been used as routine analysis of total cholesterol in serum, but hitherto no method allows rapid analysis of total and free cholesterol in serum. Recently, cholesterol analysis in serum by gas chromatography has been done by hydrolysis of its ester, but since this method requires complicated procedure, it is not suitable for routine work.

We have studies on rapid analysis of cholesterol in serum by reaction gas chromatography. Serum sample was injected into a gas chromatograph and the hydrolysis of cholesterol ester was carried out in a KOH reaction column. The first 7 cm of the column was packed with KOH on quartz powder, and the rest packed with 2% OV-1. Thus the total cholesterol was detected as a single peak.

Apparatus used was Shimadzu Seisakusho model GC-5AP, dual column system, with flame ionization detector. A glass column, 0.5 cm × 3 mm i.d., packed with 2% OV-1 on Shimalite W was used for determination of free cholesterol and the other column (same size) packed with KOH on quartz powder and 2% OV-1 on Shimalite W was used for total cholesterol as shown in Fig. 2. The conditions for the analysis were: column temperature 230°C, detector and sample injection port temperature 300°C, nitrogen flow rate 60 ml/min, and electrometer sensitivity setting 0.32×10^{-10} A per millivolt.

From the tested concentration of KOH in the reaction column, 15% on quartz powder was found to yield best cholesterol ester hydrolysis. Optimum column temperature (injection port temperature) was 300 °C. Cholestane was used as an internal standard.

Five μ l of serum and 10 μ l of 0.02% cholestane in tetrahydrofuran were put into microtest tube, and after shaking up, it was left on for 2 min., and the upper phase was used as a sample for analysis. Value of total cholesterol in serum obtained by gas chromatographic analysis was compared with that obtained by colorimetric determination, and no significant difference was observed. This most rapid method for the determination of free and ester forms of cholesterol in serum was applied to the analysis of serum cholesterol of patients.

(Received Dec. 27, 1972)