シンクログラフィーによる中性脂質の 定量に関する研究

田中正康・伊藤俊洋・金子 弘

北里大学教養部化学研究室（相模原市麻溝台 1）

Quantitative Determination of Neutral Lipids on Thin Layer-FID Chromatography

Masamichi TANAKA, Toshihiro ITOH and Hiroshi KANEKO

Division of Chemistry, School of General Studies, Kitasato University
(1, Asamizodai, Sagamihara, Kanagawa)

Responses of sterol, fatty acid, sterol ester and triglyceride on a quantitative thin layer chromatographic apparatus which was equipped with a flame ionization detector were determined using with six kinds of neutral lipid mixtures. These responses were represented as relative responses against to triglyceride response and converged within maximum error of 5~10% (S.D.) over a range of loads (2~10 μ g lipid). All of the relative responses were in proportion to the weight ratio. It was found that the method is very superior and convenient means for the quantitative estimation of neutral lipid compositions.

1 結 言

複雑な脂質混合物中の各成分を定量するためには、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラム上に分離した各スポット部位をデンシトメーターで測定する方法、または薄層からかき取り比色定量する方法、あるいは最近では高速液体クロマトグラフィーなど種々試みられている^{1),2)}。しかしこれらの方法は、簡便さ、正確さ、感度などのうち、いずれかの点で何らかの難点があり、それぞれ一長一短がある。

薄層クロマトグラフィー (TLC) と水素炎イオン化検出器 (FID) とを組み合わせたシンクログラフィーは、TLC により分離した有機化合物を水素炎中で燃焼させ、FID で検出定量するものである^{3),4)}。この方法は、その簡便性と高い感応性、および有機化合物であればすべて検出が可能であることなど、脂質の定量分析への応用にも大いに期待すべきものがあると考えられる。特に、特異的な検出反応がなく不飽和度により呈色性の差の大きい中性脂質類の分析に有利と考えられる。しかし、これまでこの方法による脂質の定量分析については、一、二の試みはなされているが^{5),6)}、定量的応用について、詳細な検討は行われていない。また、最近シンクログラフィーに用いる TLC 用ロッドとして、ケイ酸、アルミナなどを石英棒に焼結したものが開発された。このものは、反復使用が可能であり、また、層がはげ落ちるこ

とがないので、炭酸水素ナトリウム、ホウ酸などの溶液に浸すことにより、いろいろな試薬で処理したロッドを作ることも容易であり、従来使われていたケイ酸塗布ロッドに比べて、その有用性は更に飛躍的に向上するものと思われる。

今回、中性脂質の定量分析にシンクログラフィーがどの程度の信頼性をもって応用できるかを詳細に調べた。

2 実 験

2.1 装 置

THINCHROGRAPH (TFG-10型, ヤترون製) に 2 ペン記録計 (日立 056型) を組み合わせたもので、クロマトグラムおよびそれぞれのピーク面積が同時に記録されるものを使用した。

2.2 ロッド

外径 0.9 mm, 長さ 15 cm の石英棒にケイ酸を融着させたケイ酸融着ロッド (商品名シンクロッド, ヤترون製) を使用した。

2.3 試 料

ステアリン酸およびパルミチン酸 (ガスクロマトグラフィーで純度 99.9% 以上を確認) は日本油脂から提供された。コレステロールは関東化学製 (一級試薬), またトリパルミチンは日本グリセライド工業製を用いた。コレステロールパルミテートは上記コレステロールとパルミチン酸から合成したものをを使用した。上記のそれぞ

Table-1 Composition of standard mixtures.

Sample	Composition of wt %			
	Cholesterol	Stearic acid	Tripalmitin	Cholesteryl palmitate
A	23.56 (0.79)	22.66 (0.76)	29.69 (1.00)	24.08 (0.81)
B	31.27 (1.54)	26.19 (1.29)	20.33 (1.00)	22.18 (1.09)
C	16.71 (0.36)	22.21 (0.57)	46.31 (1.00)	14.78 (0.32)
D	20.00 (1.35)	37.10 (2.51)	14.81 (1.00)	28.09 (1.90)
E	13.06 (0.21)	12.15 (0.19)	62.85 (1.00)	11.94 (0.19)
F	24.57 (0.85)	20.96 (0.73)	28.83 (1.00)	25.63 (0.89)

(): Weight ratio to tripalmitin

れの試料を Table-1 に示した組成に混合したものを標準脂質混合物として使用した。

2.4 試 薬

実験に用いた溶媒（石油エーテル、ジエチルエーテル、酢酸、クロロホルム、メタノール）は、それぞれ市販一級試薬を全共通すり合わせガラス器具で蒸留したものを使用した。

2.5 分析法

約 $1\mu\text{l}$ の標準脂質混合物（ $20\sim 30\mu\text{g}$ ）のクロロホルム溶液を、マイクロシリンジを用いてケイ酸融着ロッド上にスポットし、溶媒系；石油エーテル：エーテル：酢酸（90：10：1, vol/vol）で展開後、ロッドは温風で 1 min 風乾し、さらに五酸化リン上、真空デシケーター中で 10 min 乾燥したのち、シンクログラフにかけた。シンクログラフの条件は、水素流速；125 ml/min, 空気流速；2000 ml/min, スキャンニング速度；200 mm/min, チャート速度；240 mm/min, 検出器の電圧；50 mV, 記録計の電圧；100 mV で行った。クロマトグラフィー用融着ロッドは、FID による検出と同時に再活性化が行われており、そのまま直ちに再使用することができた。なお、この装置では、融着ロッドを 10 本連続的に測定できるので、原則として一度に 10 本のロッドを同時に分析した。ロッドは特に分離の悪いもの（100 本中 2~3 本）を除き、ランダムに使用した。クロマトグラムの面積は積分曲線から読みとり、その際、積分曲線がフルスケールになる場合の面積を 25.0 とした。

3 結果と考察

ケイ酸融着ロッドを用いて、標準脂質混合物をシンクログラフで分析した場合に得られたクロマトグラムの一例を Fig.-1 に示した。この場合の脂質成分の相互分離は、石油エーテル：エーテル：酢酸（90：10：1, vol/vol）の系で充分効果的であることがわかり、主としてこの系を用いて以下の実験を行った。また、シンクログラフの操作条件は、2.5 分析法の中で示した条件が分離、感度ともに良いことがわかったので、本実験はこの条件に従った。なお、特定のロッドを選び出し、これを繰り返し使ってゆくことで、より一層再現性の良い結果を得ること

1 : Cholesterol 2 : Stearic acid
3 : Tripalmitin 4 : Cholesteryl palmitate

Sample A was spotted on a silicic acid rot, Mobile phase; petroleum ether-ethyl ether-acetic acid (90:10:1)

Fig.-1 Thin chromatogram of the standard mixture A.

Fig.-2 The influence of sample size on the ratio of peak area of cholesterol, stearic acid, cholesteryl palmitate to that of tripalmitin. Sample D.

とができると考えられるが、実際の分析では、このような分析法をとることはむしろ困難なため、本実験では、不特定ロッドをランダムに使用して分析を行った。

まず、スポット量を変えた場合、各脂質のトリパルミチンに対する面積比がどのように変わるかを調べた。試料として混合物 D を用い、各脂質成分の量を $2\sim 10\mu\text{g}$ の範囲でスポット量を変えて測定した結果を Fig.-2 にまとめた。各脂質の面積とトリパルミチンの面積の間には、いずれの脂質においてもよい直線関係があることがわかった。したがって、少なくとも $2\sim 10\mu\text{g}$ の範囲

Table-2 Reproducibility of peak area ratio^{a)}.

Lipids	Tripalmitin	Cholesterol	Stearic acid	Cholesteryl palmitate
Average peak area ratio	1.00	1.13	0.69	1.17
Standard deviation		±0.11	±0.04	±0.07
Weight ratio ^{b)}	1.00	0.79	0.76	0.81

Means of seventy experiments

Sample : sample A

a) Ratio of peak area of each component to that of tripalmitin.

b) Ratio of weight of each component to that of tripalmitin.

Fig.-3 The relationships between the ratio of peak area and that of weight for cholesterol, stearic acid and cholesteryl palmitate to tripalmitin.

であれば、スポット量を一定にしないで各脂質のトリパルミチンに対する面積比は常に一定であることがわかった。

そこで次に、試料 A~F (**Table-1**) をシンクログラフにかけ、各脂質のトリパルミチンに対する面積比と重量比との関係を調べ、得られた結果をまとめて **Fig.-3** に示した。**Fig.-3** のグラフに見られる通り、トリパルミチンに対するステアリン酸の面積比と重量比との間には、ほぼ 1:1 の直線関係があることがわかった。しかし、遊離コレステロール、コレステロールパルミテートの場合は、面積比が必ずしも重量比を反映せず、面積比が重量比より大きくなる傾向が見られた。したがってステロール誘導体に対しては、面積比を **Fig.-3** のグラフを用いて重量比に換算する必要があることがわかった。実際に天然物の中性脂質組成を分析する場合には、脂肪酸は炭素鎖長および不飽和度の異なるものの混合物であるし、ステロール類もいくつかの同族体の混合物である

ので、シンクログラフィーを用いて各成分の厳密な組成比を得ることは困難であるが、**Fig.-3** のグラフを用いることにより、遊離脂肪酸類、ステロールエステル類、遊離ステロール類の各グループの含有量をそれぞれステアリン酸、コレステロールパルミテート、コレステロールに換算した分析値として算出できることがわかった。

なお、各中性脂質混合物 (A~F) を分析し、20~70 例のシンクログラムから得られた各中性脂質組成の分析値は、それぞれ標準偏差 $\pm 5 \sim 10\%$ の範囲で再現性のあることがわかった。このうち混合物 A についての結果を、**Table-2** にまとめて示した。

以上述べた実験から、この方法は、簡便さ、正確さ、感度、経済性などにすぐれており、特に中性脂質など特異的検出反応の少ないもの、あるいはあってもはんな雑なもの、あるいは均一な反応を示さないものなどの定量法として非常に有用な分析法の一つであることがわかった。

さらに極性脂質の定量分析にシンクログラフィーを用いる分析法について検討を進めている。

本研究の一部は昭和 49 年度油化学研究発表会 (昭和 49 年 11 月 2 日、大阪) で発表したものである。

(昭和 50 年 10 月 16 日受理)

文 献

- 1) M. Kates, "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Techniques of Lipidology", North-Holland, London (1972) p. 393
- 2) 金子 弘, 油化学, **22**, 499 (1973)
- 3) J.J. Szakasits, P.V. Peurifoy, L.A. Woods, *Anal. Chem.*, **45**, 351 (1970)
- 4) K.D. Mukherjee, H. Spaans, E. Haahti, *J. Chromatogr.*, **61**, 317 (1971)
- 5) 奥村 保, 上遠野哲郎, 分析化学, **22**, 980 (1973)
- 6) 日本生化学会編, "生化学実験講座 3 脂質の化学", 東京化学同人, (1974) p. 58