総 説

TLC-FID 法の油脂及び脂質
分析への応用

金 子 弘

北里大学教養部化学研究室 (相模原市北里 1-15-1)

Quantitative Determination of Lipids and Lipid Related
Compounds by TLC-FID System

Hiroshi KANEKO

Division of Chemistry, School of General Studies, Kitasato
University (1-15-1 Kitasato, Sagami-hara, Kanagawa)

ま え が き

戦後新たに開発された分離分析技術の中で最も有用なものの一つとして薄層クロマトグラフィー (TLC) を挙げることができよう。有機化合物はもちろんとして無機化合物を含め、すべての化合物の分離分析に絶大な威力を発揮しつつあり、特に油化学に関係する領域での有用性については事新しく申し立てるまでもないところである。簡単な器具、装置と単純な操作で、短時間に優れた分離能を示す TLC にレディメイドの優秀な薄層プレートが市販されるようになり、その有用性はますます増大しつつあるところである。TLC の持つこのような優れた特性をいかし、なんらかの手段で定量分析に応用しようという試みも沢山ある。

そのうち、最も単純で直接的な方法として、得られたクロマトグラムを直接あるいは間接的にデンストメーターで測定する方法がある。ただし、このためにはクロマトグラム上に分離された物質がすべて均等に検出できるような試薬が必要となる。油脂、界面活性剤などを含め脂質にはこのような試薬はむしろまれで、一般的には硫酸あるいは重クロム酸-硫酸混液での有機化合物の炭化がほとんど唯一のものといえよう。この場合も、プレート全面への試薬の均一な噴霧と、それに続く均一な加熱 (反応) が必ずで、このための特別な装置と特別な配慮 (常に同一プレート内で基準物質を並行して分析できるようにするなど) が不可欠である。また、そ

の様な万全の配慮を払ったとしても飽和酸と不飽和酸とでは炭化状態が大きく異なることが知られており、それぞれの脂質を構成している脂肪酸の組成によって、同じ脂質 (例えば同じトリグリセリド) でも炭化度に大きな違いが生じる可能性を否定できない。

ガスクロマトグラフィーの検出装置の一つとして使われている水素炎イオン化検出器 (H_2 -FID) はほぼ炭素数に比例したレスポンスを示すことが確立されており、この検出器を薄層上に分離したスポットの検出に使用とする試みがいくつか提案されている^{1)~5)}。

図-1 に Mukherjee らのシステム⁶⁾の概略を示した。薄層上に分離した有機化合物を電気炉で加熱気化させ、そこに存在する炭素をすべて二酸化炭素にかえ、更に、この二酸化炭素を還元してメタンとし、 H_2 -FID で検出定量しようという装置である (A)。複雑な反応過程と、それに伴う複雑な機構が必要であるのみならず、このシステムに使われる薄層がガラス管の内壁にシリカゲルなどの吸着剤を各自が塗布したものであり、薄層調製の手間と労力に加えて、薄層の均一性と固着性にも問題があ

図-1 Mukherjee らのシステムの概略図⁶⁾

り、一般に受け入れられるには至っていない。ただし、放射性同位元素 (^{14}C , ^3H など) で標識された試料の場合、放射性二酸化炭素、放射性水蒸気などを回収し、液体シンチレーターで、その放射能を測定することで放射性同位体で標識した物質への応用の可能性がある (B)。

これとは別に、薄層上に分離されたスポットを順次、直接水素炎で気化焼却してゆき、生成したイオンをコレクター電極で検出しようという単純な装置が純国産技術で開発された (図-2)。この装置は当初 シンクログラフの名で市販され (そのため、この装置を使った薄層定量法をシンクログラフィと呼んだ⁷⁾)、その後イアトロスキャンと改称された。このシステムの場合も、当初はステンレスプレートあるいはガラス管に各自が吸着剤を塗布したものを薄層としていたのであるが、その後、これも純国産技術でシリカゲルなどの吸着剤を石英棒による (熔) 融固着 (ガラス粉末で) させた薄層棒 (商品名クロマロッド) がつくられ^{8), 9)}、イアトロスキャンの有用性が飛躍的に拡大することになった。すなわち、クロマロッドは有機バインダーなしに吸着剤を石英棒による着したもので、特別な力を加えない限り吸着剤がはく離せず、一度、 H_2 -FID での検出反応が済めばロッドは使用前の状態に戻ることになり、理論的には何回でも繰り返し使うことができる。更に、液体溶液中に自由に浸漬できるので硝酸銀処理ロッドなどの試薬処理ロッドが簡単につくれるという特徴も備えている。

図-2 クロマロッド-イアトロスキャンでの薄層自動検出装置 (TLC-FID 法)

我々は酵母あるいはアルケバクテリアを使い脂質生化学的研究を進めつつあり、その過程で特に単純脂質組成の分析法を模索しつつあり、クロマロッド-イアトロスキャンでの TLC-FID 法 (以下 TLC-FID 法と略す) の可能性を詳細に検討し、引き続き、いくつかの新しい利用法を開発し、提案してきた^{7), 10)~15)}。

その後、このシステムはヨーロッパを経てカナダへ輸出され、JOCS-AOCS 第2回ジョイントミーティングを機に、ようやくアメリカ合衆国への輸出が始まったところであり、その直後の 1981 年度 IR 100 賞 (米国 IRD 社が優秀技術開発製品に贈っている) を受賞。更に、1984 年度 AOCS 年次大会では Methods in Enzymology に TLC-FID 法の総説をまとめている Ackman¹⁷⁾ の主

宰になる本法での脂質分析に関する第1回の国際シンポジウムが企画されているとの事である。

この様な状況を背景として、TLC-FID 法による油脂及び脂質関連化合物の分析に関する研究の現状を、まず、単純脂質分析への応用、次いで複合脂質分析への応用、試薬処理ロッドによる脂質分析、及び、その他としてシリカゲル以外の吸着剤をよう着したロッドによる応用の順にまとめ、今後の展開について論じた。

単純 (中性) 脂質分析への応用

いわゆる、単純脂質あるいは中性脂質と呼ばれている化合物としては長鎖炭化水素誘導体、ワックスエステル類、エステル型ステロール類、グリセリド類、脂肪酸、脂肪酸アルコール、遊離型ステロール類などがその主なもので、これらの化合物のいずれにも共通するような特異的な検出反応はほとんど知られていない。従って、これらの組成を分析するには、ステロール類はステロールに特異的な呈色反応での比色法で定量するとか、脂肪酸は滴定あるいはガスクロマトグラフィーで、エステル誘導体はヒドロキサム酸法で、といった具合に、それぞれ別個に分析し、それらの分析値を総合するといった煩雑で手間のかかる操作が必要であった。

しかるに、TLC-FID 法では、これらの脂質をクロマトロッド上でそれぞれの成分に分離することさえできれば、あとは、そのロッドをスキャナー (イアトロスキャン) にかけてさえすればよいということになり、大変簡便で有用な分析法となりうる可能性が予想された。

当然、まず単純脂質を中心として多くの研究者により TLC-FID 法での分析データが続々と報告されるようになった^{7), 8), 16)~20)}。

実用上からの分析例も多く、例えば、ピロホスファチジン酸を構成員とする酵母 *Cr. neoformans* の増殖過程における単純脂質組成の変動の追跡に利用した研究²¹⁾ (表-1) を始めとして、高脂血症との関係から血清^{22), 23)} 血しょう^{18), 24)~26)}、リンパ球²⁷⁾、好中球²⁸⁾、血清リポタンパク質²⁹⁾などの単純脂質組成分析法として使われている。

表-1 酵母 *Cr. neoformans* の増殖時期と単純脂質組成²¹⁾

	5 h	23 h	47 h	71 h
Sterol ester	5.5±0.9	5.8±0.5	3.1±0.1	3.2±0.8
Triglyceride	44.2±1.8	78.8±2.4	90.7±0.3	91.4±0.9
Free fatty acid	3.8±0.2	2.6±0.2	1.2±0.2	1.0±0.4
Free sterol	37.9±3.0	7.7±0.8	3.6±0.1	2.4±0.5
Diglyceride	5.5±0.3	3.1±1.3	1.2±0.2	1.4±0.2
Unidentified component	1.5±0.2	2.1±0.2	0.7±0.4	2.0±0.2

5 h : early logarithmic phase 47 h : early stationary phase
23 h : late logarithmic phase 71 h : late stationary phase

表-2 酵母の単純脂質組成^{a),36)}

Species	S (%)	FFA (%)	TG (%)	SE (%)	Unidentified NL ^{b)}
Ascosporogenous yeast					
<i>Schiz. pombe</i>	4.2±0.6	4.0±0.9	54.4±5.0	28.9±1.7	2
<i>Sacch. cerevisiae</i>	3.5±0.6	2.5±1.6	29.9±6.3	52.9±5.2	2
<i>Sacch. rosei</i>	6.6±0.9	Tr. ^{c)}	14.4±1.4	76.4±2.0	5
<i>Sacch. carlsbergensis</i>	11.1±1.6	10.7±0.4	19.2±0.7	57.1±1.7	5
<i>Sacch. rouxii</i>	8.9±1.5	3.0±1.2	47.0±2.5	38.1±3.6	5
<i>K. polysporus</i>	6.7±0.3	2.8±1.0	26.0±1.7	54.8±5.2	6
<i>Schw. occidentalis</i>	3.0±1.5	7.2±0.1	76.0±5.5	4.9±2.7	3
<i>Deb. hansenii</i>	13.8±1.7	10.0±1.8	65.8±5.2	1.8±0.8	4
<i>Deb. nilssonii</i>	21.2±2.0	2.1±0.5	41.2±1.0	34.4±3.0	5
<i>P. membranaefaciens</i>	3.8±0.9	4.4±1.3	70.4±6.7	6.5±0.6	4
<i>P. farinosa</i>	25.9±2.5	3.5±1.3	59.6±4.3	4.5±1.0	4
<i>H. anomala</i>	11.9±4.0	Tr.	74.0±1.1	7.6±4.0	5
<i>L. starkeyi</i>	2.4±0.7	3.2±0.8	93.4±1.8	Tr.	5
<i>L. lipoferus</i>	1.8±0.2	7.6±0.6	85.4±0.6	Tr.	4
<i>S'codes, ludwigii</i>	3.9±1.9	3.8±1.0	36.1±5.7	46.1±4.7	5
Ballistospologenous yeast					
<i>Sp. salmonicolor</i>	7.2±1.9	15.9±1.3	66.0±6.2	5.0±1.0	2
Asporogenous yeast					
<i>Cr. neoformans</i> ^{d)}	3.6±0.1	1.2±0.2	90.7±0.3	3.1±0.1	4
<i>Cr. laurentii</i>	6.3±1.5	67.2±1.3	21.3±1.5	2.5±0.8	3
<i>T. colliculosa</i>	6.7±1.5	1.7±0.9	39.0±1.6	46.6±2.8	8
<i>T. candida</i>	3.1±0.9	1.1±0.4	92.4±2.3	1.0±0.2	5
<i>C. utilis</i>	3.1±1.4	2.2±0.6	87.6±3.4	2.3±3.0	3
<i>C. krusei</i>	19.4±2.0	4.5±1.0	71.1±1.1	4.9±2.3	5
<i>C. tropicalis</i>	18.4±0.8	4.8±0.8	69.7±1.7	7.0±0.8	5
<i>C. mycoderma</i>	6.5±1.1	1.6±0.2	70.9±2.5	1.3±0.2	4
<i>C. pulcherrima</i>	30.3±2.5	Tr.	62.5±2.9	2.0±0.7	4
<i>Kl. apiculata</i>	7.1±1.7	29.3±3.4	51.2±3.8	4.8±1.4	3
<i>Trig. variabilis</i>	27.7±1.6	14.3±1.2	32.0±2.8	6.9±0.6	4
<i>Tr. cutaneum</i>	1.8±0.6	Tr.	93.4±2.1	2.5±1.4	4
<i>Rh. glutinis</i>	6.7±1.2	7.0±1.4	79.7±3.7	4.5±1.0	3
<i>Rh. rubra</i> AY-2	3.6±0.3	8.0±0.8	84.8±1.7	1.7±0.3	3
<i>Rh. rubra</i> Np. 2-17-4 B	1.3±0.1	6.6±0.3	90.9±0.3	0.8±0.1	3

a) The figures are obtained from the same experiments as in Table-1. Abbreviations : S, sterol; FFA, free fatty acid; TG, triglyceride; SE, sterol ester; NL, neutral lipid.

b) The number of unidentified lipids detected on the area between the origin and sterol ester on the silica gel thin layer chromatograms.

c) Tr.<1%.

d) That was obtained from liquid cultured cells.

また、妊娠及び出産時^{30),31)}、あるいは糖尿病³²⁾における赤血球膜脂質の変動を調べる手段としての利用なども報告されている。その他、歯肉³³⁾、胆汁³⁴⁾、皮膚^{19),35)}酵母³⁶⁾(表-2)、皮革³⁷⁾での脂質組成分析法としても使用されており、特に臨床検査、品質管理、工程管理などの分野で今後益々重用されてゆくものと思われる。

なお、胆汁酸誘導体^{38)~40)}、石炭液化油成分⁴¹⁾の分析に利用した報告も出されている。

単純脂質分析における TLC-FID 法でのデータの再現性や、それぞれの脂質のレスポンスなどを詳細に検討するため、コレステロール=パルミタート、トリパルミ

チン、ステアリン酸、コレステロールを異なる割合で混合した 6 種の標準単純脂質混合試料での実験が行われた⁷⁾。図-3 にそのクロマトグラムの一例を示した。1~10 µg の範囲ではロッドにアプライする量の違いによるトリパルミチンに対する、その他の脂質のレスポンスに変化がなく、同一試料を 70 回任意のロッドで分析した結果、分析値は SD で 5~10% に入ることがわかった。6 種の標準試料でのデータをまとめたものが 図-4 で、トリパルミチンに対するそれぞれの脂質の重量比と面積比との間に一定の関係が認められ、単純脂質組成の迅速簡易定量法として大変優れた方法であることが確立され

図-3 標準純脂質混合物のクロマトグラム⁷⁾ 図-4 トリパルミチンに対するその他の脂質の重量比と面積比との関係⁷⁾

た。最近 Kaitaranta ら¹⁹⁾によっても同様な実験が行われ、ほぼ同じ結論が得られており、トリパルミチンに対するその他の脂質のレスポンスが数字として示されている。

試料の絶対量が少なく、構成員の組成比のみならず、絶対量を知るためには、構成員とクロマロッド上で重ならないような内部標準物質を使えばよい。これまで TLC-FID 法での単純脂質分析に使われている内部標準物質としてはコレステロール=アセタート^{22), 27), 28), 30), 31)}、1-オクタデカノール^{25), 42)}、ウンベリフェリル-パルミタート²⁶⁾、チモールとアニスアルコール³⁵⁾、あるいは脂肪酸メチルエステル²⁰⁾などが報告されている。それぞれの試料、あるいは展開溶媒系の違いで何を使うかが決まってくると思われる。

なお、クロマロッドに 2, 4, 6, 8 μg といった一定量の試料をアプライし、 H_2 -FID でスキャンすると、ロッドのロットによってレスポンスに大きな差が²⁰⁾でて使えないという報告がある⁴³⁾。ロッドに μg オーダーの一定

量の試料を正確にアプライしたという保証はどこにもないにもかかわらず、そのアプライ量の絶対値を基にレスポンスを出し、その差を論じているのである。ただし、その主張者の 1 人である Kramer ら²⁰⁾は脂肪酸メチルエステルを内部標準物質として使うことにより組成比は、ほぼ理論値に近付き、充分単純脂質分析法として有用であると結論しているのはあるが…、いずれにしてもクロマロッドに幾らかの差があるのは確かで、あらかじめ、一本一本のロッドにつき、標準試料などで念入りにその特性を調べておき、可能な限り同一特性をもつロッドを一つのロットとしてまとめて使ってゆくなどの工夫をすれば、分析精度は一段と向上するものと思われる。

その後、粒度を 5 μm (直径) にそろえたシリカゲルをよう着させたクロマロッド SII が開発され、

図-5 非イオン界面活性剤重合物の S 及び SII での分離

分離能、再現性とも改善されている(図-5)。このロッドで実験条件を厳密に規定する(例えば、ロッドは使用直前に完全に H_2 -FID で空焼きをしておき、その直後に使用するか、分析室の空気を清浄に保つとか、ロッドの特性をそろえとか)ことにより 1 スポット当たり 0.05 ~ 0.1 μg のオーダーでの分析が可能なることもわかった⁴²⁾。

1 本のクロマロッド上で可能な限り多数の物質を分離定量しようというための工夫が二、三^{35), 44) ~ 46)}出されている。

Ackman らのアイデア⁴⁴⁾をもとに吉塚ら³⁵⁾はひと表皮脂質抽出液にアニスアルコールとチモールを内部標準物質として加え、まずヘキサン:ベンゼン (1:1) で 10 ~ 12 cm 展開し、溶媒先端より 8 cm (原点から 2 cm までが残る) スキャンする。更に、ヘキサン:エーテル:ギ酸 (70:30:1) で 10 ~ 12 cm 展開後、再び全面をスキャンする方法である。まず、チモールを内部標準としてスクワレンとワックスエステルを定量し、第二段の展開でアニスアルコールを内部標準としてトリグリセリド、遊離脂肪酸、コレステロール、モノグリセリド、リ

ン脂質を定量することに成功している。

クロマロッド S,あるいは SII で単純脂質の相互分離に使われている溶媒系については、既に、そのいくつかは例示してきたが、スポットのテーリングを防ぐ目的で少量の酸を加えているケースが多い。この酸としてギ酸を使っている例も多いが、ギ酸は重合しやすく、精製も難しいこともあり、我々は専ら酢酸を使っている。また、Christie ら⁴⁷⁾は 1,2-ジクロロエタン：クロロホルム：酢酸(92：8：0.1)での二重展開法で、ステロールエステル、トリグリセリド、遊離酸、ステロール、1,3-ジグリセリド、1,2-ジグリセリド、リン脂質を 1本のロッド上で分離定量できることを報告している。

複合脂質分析への応用

TLC-FID 法が複合(極性)脂質の分離定量法として、どの程度使えるのか、まず、約 9 種の混合比の異なる標準リン脂質混合物(レシチン：PC, ホスファチジルエタノールアミン：PE, スフィンゴミエリン：SPM, カルジオリピン：CL, ホスファチジルセリン：PS, ホスファチジルイノシトール：PI, リゾレシチン：LPC)を使って検討された¹¹⁾。

クロマロッド S では PI, PS が SPM, LPC などと重なりやすく、特別の工夫を要するが、LPC, PC, PE, CL の標準混合試料では 図-6 に示したように充分分離定量できることがわかった。

図-6 標準リン脂質混合物のクロマトグラム¹¹⁾

また、20~30 μg の範囲では試料のアプライ量の変動によって PC に対するその他の脂質の相対比に変動が見られず、分析値は S.D. 10~15% で再現性があることがわかった。標準リン脂質混合物での実験の結果を 図-7 にまとめて示したが、PC に対する重量比と面積比の関係は、いずれも直線関係にあり、PC に対する面積比がほぼ PC に対する、その他の脂質の重量比を反映していることがわかった。なお Kaitaranta ら¹⁹⁾も、その後 C₁₈ で統一した標準複合脂質混合物で PC に対するレスポンスを数字で出しており、いずれも 0.86 (LPC)~

図-7 PC に対するその他の脂質の重量比と面積比との関係¹¹⁾

1.14 (セラミド) の範囲であると報告している。

ただし、複合脂質にはリン脂質だけに限っても、まだまだ沢山の種類があり、その外に糖脂質、含硫脂質など多種多様である。この様に複雑な複合脂質を 1本のクロマロッド上で完全に分離することは困難なことが多く、今のところ、あらかじめリン脂質、糖脂質あるいは中性糖脂質、酸性糖脂質といったサブグループに分けたもの、あるいは比較的単純な複合脂質組成をもつもの(例えば血清、血しょう、赤血球膜などでは PE, PC, SPM が主で少量の PS, PI が存在するとか、*E. coli* 菌体では PE, ホスファチジルグリセリン：PG が主であるなど)に限られる。すなわち、赤血球膜リン脂質の組成分析⁴⁸⁾あるいは、その加齢と糖尿病との関係の解析³²⁾、血しょう²⁴⁾、リンパ球²⁷⁾、好中球²⁸⁾、血小板⁴⁹⁾などのリン脂質組成の分析といった臨床への応用例が多い。また、羊水のリン脂質組成と胎児の正常な発育との相関性が推定されており、羊水中の PC, SPM, PG の定量法⁵⁰⁾に用いられている。

脂質試料をアプライしたロッドを、いわゆる、単純脂質の移動する溶媒系で展開すると、極性脂質は原点に留

表-3 酵母の全脂質に占める PL の割合¹¹⁾

Yeast strains	PL/TL (%)	
	TLC-FID 法	P-analysis ^{a)}
<i>Debaryomyces hansenii</i> MY-45	64.1	56.3
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> BH 1-3	63.6	61.0
<i>Saccharomyces rouxii</i> MS-1-3	56.9	48.8
<i>Candida krusei</i> WF-16	63.2	55.8
<i>Candida toropicalis</i> Shin 1-3	67.2	53.3

Abbreviations: PL; polar lipid, TL; total lipid

a) P-analysis refers to the content of phospholipid determined by a modification of the method of Bartlett

まることになり、原点のレスポンスとそれ以外の部分のレスポンスから極性脂質の割合を知ることができる。表-3 に酵母の脂質について¹¹⁾ この方法で求めた値と、脂質リンの測定から算出したリン脂質量を示した。差の大きなものは、リン脂質以外の極性脂質(糖脂質)が多いことがわかっている³⁶⁾。また 80°C, pH 2 といた極限状態で増殖するアルケバクテリア TA-1 の脂質のクロマトグラムの一例を 図-8 に示したが、単純脂質、中性極性脂質、酸性極性脂質が1本のロッド上で、それぞれうまく分画され、これらの相対比の簡易測定法として

図-8 TA-1 菌脂質のクロマトグラム¹¹⁾

A, B and experimental details as in text.
Rod: Chromarod S, SM: sphingomyelin,
PLA: Ethanolamine plasmalogen,
LCA: Long chain aldehydes

図-9 脳シナプトソーム膜リン脂質のクロマトグラム⁵²⁾

有効に使われている^{11), 51)}。

ごく最近 Foot ら⁵²⁾によりプラスマロゲン型 PE の分別定量法への応用が工夫されている。すなわち、ラット脳シナプトソーム膜の全脂質抽出液に内部標準物質としてノナデカンを加え、まず、石油エーテル: エーテル (85:15) で展開、溶媒先端より原点直前までスキャンし、コレステロールを定量する。引き続き、このロッドを半数に分け、一方 (B) は原点部分を濃塩酸の蒸気に 5 min さらしたのち、もう一方 (A) はそのまま、クロロホルム: メタノール: 水 (80:35:3) で展開することによって 図-9A, B のクロマトグラムを得、両者の差からプラスマロゲン型 PE の定量を含め、コレステロール, PC, PE, SPM, PS の組成分析を行う方法である。

試薬処理ロッドによる脂質分析への応用

クロマロッドは液体溶液中に浸漬し、乾燥、活性化することで簡単に均一な試薬処理ロッドを調製することができる。

硝酸銀溶液で処理したクロマロッドの調製法と再生法を 図-10 に示した¹²⁾。このロッドは炭化水素鎖の不飽和度の違いによる分別に有効で、その一例として、トリ

図-10 硝酸銀処理ロッド調製法¹²⁾

パルミチン、トリオレイン、トリリノレン混合物のクロマトグラムを 図-11 に示した。硝酸銀濃度 5, 12.5, 25%, 活性化 120°C, 2 h, 180°C, 5 h の各条件で検討し、5%, 120°C, 2 h, 12.5%, 120°C, 2 h がほぼ同じで、最もよい結果であった。約 10 種類の油脂で試みた結果を 図-12 に示したが、油脂の簡易鑑別法としての可能性が充分示唆されるものであった。また、PC, PE などの分子種組成の分析法としての可能性も示された¹²⁾。

その後、Sebedio ら^{53), 54)}も、2.5% 硝酸銀アセトリル溶液処理、120°C, 3 h 活性化ロッドで不飽和脂肪酸の分離定量を報告している。また、Petersson⁵⁵⁾は酢酸水銀 (II) で不飽和グリセリドとの間でアダクトをつ

Argentation rod was prepared by immersing the silica gel-sintered rod in 12.5% silver nitrate solution and activating at 120°C for 2 h
 Sample : standard mixture (tripalmitin (P₃) : triolein (O₃) : trilinolein (L₃) = 30 : 30 : 40, wt%)
 Mobile phase : benzene-ether (98 : 2, vol/ vol)
 Rod : Chromarod S

図-11 銀ロッドによるトリグリセリド混合物の分離¹²⁾

Mobile phase : Benzene-Ethyl ether (98 : 2) Mobile phase : Benzene-Chloroform-Acetic Acid (90 : 10 : 1)
 O : origin, S.F. : solvent front, Asterisks indicate the number of double bonds in the molecular species, **Argentation rod was activated at 180°C 3 h.

図-12 硝酸銀処理ロッドによる油脂の鑑別¹²⁾

図-13 ホウ酸処理ロッド調製法¹⁵⁾

Mobile phase : Chloroform-Acetone (96 : 4)
 Rod : 3% Boric acid Impregnated chromarod SII
 TP : Tripalmitin, DS : Distearin, SA : Stearic acid
 MP : Monopalmitin, MS : Monostearin

図-14 ホウ酸処理ロッドによるグリセリド混合物の分離¹⁵⁾

くり, これをクロマロッドSで分析する方法での油脂の簡易鑑別法を開発し, この結果が別法での分析結果と一致することを報告している。

ホウ酸処理ロッドの調製法を図-13に示したが, このロッドはグリセリドの位置異性体の相互分離に効果的で, トリグリセリド, 1,2-ジグリセリド, 1,3-ジグリセリド, 遊離脂肪酸, 2-モノグリセリド, 1-モノグリセリドの組成が1本のロッド上で一挙に分析可能となった(図-14)。更に, このロッドは, そのままで最低5回は繰り返し使え, 糖脂質などの分析にも有効だと思われる¹⁵⁾。

なお, ホウ酸の濃度を高めるにはメタノール溶液にすればよく, その他の塩で

図-15 アルミナロッドによるリン脂質の分離^{13), 14)}

の処理ロッドなども種々検討されているところである。

そ の 他

今のところシリカゲル以外の吸着剤をよう着させたロッドで実際に市販されているものとしてはアルミナ粉末をよう着させたクロマロッドAがあるだけである。このロッドはコリン含有脂質に対する親和性が、それ以外の極性脂質に対するものより小さいというアルミナに見られる特徴がそのまま保持されている(図-15)。

PI, PS の分離に有効であるとの報告をもとにフロリジル:シリカゲル (1:9), (1:1), (1:0) ロッドでの実験も行われているが、いまだ決定的な特徴が出るまでには至っていない。

その他ヒドロキシアパタイトなどの新しい吸着をよう着したロッドの開発が期待されるところである。

ま と め

TLC-FID 法は、分析法の根本原理である特別な熟練なしにだれにでも取り扱える操作の簡便性と、分析時間が非常に短いという特徴も備えており、TLC の定量化に一つの大きな可能性を開いたものである。

マイコン付きデジタルインテグレーターによるデータの記録保存、整理、解析なども実際に試みられており、その面からも今後の一層の簡便化が予想されるところである。

有機化合物の反応で、出発物質と反応生成物とが1本のロッド上で分離さえされれば、あとはイアトロスキャンでスキャンすることで、その量的変動を追跡できるはずである。合成、分解反応での経時的変化の追跡、物質精製の純度検定などに大きな威力を発揮することが期待され、磯辺ら⁵⁶⁾はひまし油から溶媒分別法でトリリシノレインを精製してゆく過程の各精製段階での純度検定に利用しており、Kaitaranta ら⁵⁷⁾は魚油の酸化過程の追跡に用いている。

また、安藤ら⁴⁶⁾は衣料の洗浄力評価法としての利用を、田中ら⁵⁸⁾は複合脂質構成成分の量比関係を分析する方法としての応用を報告しており、今後もまだまだ新しい応用法が考案されてゆくものと思われる。

この様な TLC-FID 法にとって、スキャナーの改善改良(例えば、より高感度な検出器あるいは EC 検出器の開発など)はもちろんとし、本法の将来は専らロッドの性能向上と新しいロッドの開発にかかっているものともいえよう。すなわち、1本のロッド上でいかにして可能な限り多数の物質を分離させられるのか、また、いかにして均一なロッドが供給できるのかである。少なくとも HPTLC に匹敵する性能をもつロッド(よう着ロッドでなくとも塗布ロッドでもよい)の開発、セラミックス、炭素繊維を素材としたロッドの開発などにその手

掛かりがあるように思われる。

(昭和 58 年 5 月 23 日受理)

文 献

- 1) F.B. Padley, *J. Chromatogr.*, **39**, 37 (1969)
- 2) J.J. Szakasits, P.V. Dearifoy, L.A. Woods, *Anal. Chem.*, **42**, 351 (1970)
- 3) 奥村 保, 上遠野哲郎, 分析化学, **22**, 980 (1973)
- 4) K.D. Mukherjee, *J. Chromatogr.*, **82**, 121 (1973)
- 5) 金子 弘, 油化学, **22**, 499 (1973)
- 6) K.D. Mukherjee, *Lipids*, **2**, 361 (1976); R. Paoletti, G. Jacini, R. Porcellati ed., Ravan Press (New York)
- 7) 田中正康, 伊藤俊洋, 金子 弘, 油化学, **25**, 263 (1976)
- 8) T. Okumura, T. Kadono, A. Iso'o, *J. Chromatogr.*, **108**, 329 (1975)
- 9) T. Okumura, *J. Chromatogr.*, **184**, 37 (1980)
- 10) 金子 弘, 化学と生物, **14**, 640 (1976)
- 11) 田中正康, 伊藤俊洋, 金子 弘, 油化学, **26**, 454 (1977)
- 12) 田中正康, 伊藤俊洋, 金子 弘, 油化学, **28**, 96 (1979)
- 13) 金子 弘, 伊藤俊洋, 田中正康, 油化学夏期ゼミナール・テキスト, p. 11 (1979)
- 14) T. Itoh, M. Tanaka, H. Kaneko, "Thin Layer Chromatography," J.C. Touchstone, D. Rogers ed., J. Wiley & Sons, New York (1980), p. 536
- 15) M. Tanaka, T. Itoh, H. Kaneko, *Lipids*, **15**, 872 (1980)
- 16) J.C. Sipcs, R.G. Ackman, *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 443 (1978)
- 17) R.G. Ackman, *Methods in Enzymology*, **72**, 205 (1981); J.M. Lowenstein ed., Academic Press (New York)
- 18) D. Vandamme et al., *Clin. Chim. Acta*, **89**, 231 (1978)
- 19) J.K. Kaitaranta, N. Nicolaides, *J. Chromatogr.*, **205**, 339 (1981)
- 20) E.R. Farnworth, B.K. Thompson, J.K.G. Kramer, *J. Chromatogr.*, **240**, 463 (1982)
- 21) T. Itoh, H. Waki, H. Kaneko, *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 2365 (1975)
- 22) 植田 寛ら, 臨床検査, **19**, 65 (1975)
- 23) 伊藤機一ら, 最新医学, **30**, 1660 (1975)
- 24) D. Vandamme, V. Bleton, H. Peeters, *J. Chromatogr.*, **145**, 151 (1978)
- 25) P. van Tornout et al., *J. Chromatogr.*, **164**, 222 (1979)
- 26) D.M. Bradley, C.R. Richards, N.S.T. Thomas, *Clin. Chim. Acta*, **92**, 292 (1979)
- 27) K. Hiramatsu, S. Arimori, *J. Chromatogr.*, **227**, 423 (1982)
- 28) K. Hiramatsu, S. Arimori, *J. Chromatogr.*, **229**, 455 (1981)
- 29) G.L. Mills, C.E. Taylaur, A.L. Miller, *Clin. Chim. Acta*, **93**, 173 (1979)
- 30) 勝美代子ら, 女子栄養大学紀要, **10**, 9 (1979)
- 31) 井上太郎, 佐藤郁雄, 我妻 亮, 田部井徹, 医学のあゆみ, **112**, 49 (1980)
- 32) 鎌田哲郎, 馬場泰忠, 尾辻省悟, 臨床病理, **28**, 175 (1980)
- 33) 村井正大ら, 日歯同誌, **18**, 340 (1976)
- 34) 増井孝子, 藤島見依子, 肝臓, **21**, 233 (1980)

- 35) 吉塚直伸, 岡本暉公彦, 高瀬吉雄, 香粧会誌, **5**, 33 (1981)
- 36) H. Kaneko, M. Hosohara, M. Tanaka, T. Itoh, *Lipids*, **11**, 837 (1976)
- 37) J. Poré, *J. Soc. Leather Tech. Chemists*, **66**, 41 (1982)
- 38) 宇治 昭, 薬学雑誌, **95**, 214 (1975)
- 39) 増井孝子, 藤島見依子, 肝臓, **20**, 976 (1979)
- 40) 増井孝子, 藤島見依子, 肝臓, **20**, 1299 (1979)
- 41) M.L. Selucky, *Anal. Chem.*, **55**, 141 (1983)
- 42) 田中正康ら, 第 20 回油化学討論会研究発表会講演要旨集, p. 21 (1981)
- 43) R.T. Crane, S.C. Goheen, E.C. Larkin, G.A. Rao, *Lipids*, **18**, 74 (1983)
- 44) R.G. Ackman, A.D. Woyewoda, *J. Chromatogr., Sci.*, **17**, 514 (1979)
- 45) S.M. Innis, M.T. Clandinin, *J. Chromatogr.*, **205**, 490 (1981)
- 46) 安藤洋子, 林 雅子, 油化学, **31**, 372 (1982)
- 47) W.W. Christie, M.L. Hunter, *J. Chromatogr.*, **171**, 517 (1979)
- 48) 柴田 進, 武元良整, 柴田和子, *Clin. Lab.*, **21**, 837 (1980)
- 49) K. Hiramatsu, H. Nozaki, S. Arimori, *J. Chromatogr.*, **182**, 301 (1980)
- 50) A.M. Ponthieu *et al.*, *Clin. Chem.*, **25**, 31 (1979)
- 51) T. Furuya, T. Nagumo, T. Itoh, H. Kaneko, *Agr. Biol. Chem.*, **44**, 517 (1980)
- 52) M. Foot, M.T. Clandinin, *J. Chromatogr.*, **241**, 428 (1982)
- 53) J.L. Sebedio, R.G. Ackman, *J. Chromatogr. Sci.*, **19**, 552 (1981)
- 54) J.L. Sobedio, T.E. Farquharson, R.G. Ackman, *Lipids*, **17**, 469 (1982)
- 55) B. Petersson, *J. Chromatogr.*, **242**, 313 (1982)
- 56) 磯辺次男, 清野 肇, 渡辺 昭一郎, 油化学, **29**, 760 (1980)
- 57) J.K. Kaitaranta, P.J. Ke, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **58**, 710 (1981)
- 58) 田中正康ら, 油化学討論会, 研究発表会講演要旨集, p. 89 (1982)