薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (8) 749-752 (1981)

市販リン脂質中のグリセロリン酸の分析

半田八十三,^{*,a} 東元 稔,^a 俣野景典,^a 徳村 彰,^b 塚谷博昭^b

徳島文理大学薬学部,^a 徳島大学薬学部^b

Analysis on Glycerophosphate in Commercial Phospholipids

YASOMI HANDA,^{*,a} MINORU HIGASHIMOTO,^a KAGENORI MATANO,^a

AKIRA TOKUMURA,^b and HIROAKI TSUKATANI^b

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University,^a Yamashiro-cho,

Tokushima and Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of

Tokushima,^b Shomachi, Tokushima

(Received February 16, 1981)

A sensitive and selective gas chromatographic method for the determination of glycerophosphate was carried out and good results were obtained, in which a flame photometric detector (FPD) was used as a detector and the emission was measured with a photomultiplier tube through an interference filter with a transmission maximum at 526 nm. Glycerophosphate was trimethylsilylated with bis (trimethylsilyl) fluoroacetamide containing 1% trimethylchlorosilane in pyridine. Tetrakis(trimethylsilyl)-glycerophosphate was subjected to a gas chromatograph equipped with an FPD and a glass column (3 mm i.d. × 1 m) packed with 2% OV-17 on Chromosorb W, AW-DMCS. The column temperature was 160°C, the carrier gas was nitrogen at a flow-rate of 40 ml/min, the fuel gas was hydrogen (100 ml/min) and oxygen (20 ml/min), and detector gas was nitrogen (40 ml/min). The photomultiplier voltage was 700 V. Response to glycerophosphate was found to be linear from 1 ng to 1 µg. The retention times of glycerophosphates of GC-FPD were as follows: β-glycerophosphate (3.2 min), α-glycerophosphate (3.8 min).

This method was found to be much more rapid and simple than a paper chromatography and a thin-layer chromatography. Thus the method is convenient for the measurement of glycerophosphates in commercial phospholipids.

Keywords—glycerophosphate; phospholipid; silylating reagent; flame photometric detector; gas chromatography

天然に見いだされる複合脂質の中で最も広く存在しているのはグリセロリン脂質である。ホスファチジルコリンの加水分解で生じるグリセロリン酸の分離については PPC,¹⁾ TLC,²⁾ GC³⁾ などの方法が報告されている。著者らはグリセロリン酸 (I) をトリメチルシリル (TMS) 誘導体 (II) として蛍光光度検出器付ガスクロマトグラフ (GC-FPD) による高感度、迅速微量定量法を検討し市販のリン脂質中に存在するグリセロリン酸の定量に適用した。

実験の部

装置および器具 ガスクロマトグラフ—日立 GC 163 型 (FPD), リアクティサーモシステム—Reacti-Therm Heating/Stirring Module (ピアス), リアクティブバイアル—1 ml Reacti-Vials (ピアス), イオン交換樹脂用クロマトグラフ管—内径 6 mm, 長さ 150 mm.

ガスクロマトグラフィーの条件 操作条件は Table I に示した。

試料と試薬 リン脂質は市販品を用いた。L-α-グリセロリン酸, β-グリセロリン酸—L-α-グリセロホスフ

TABLE I. Gas Chromatographic Conditions

Instrument	Hitachi GC Model 163 equipped with FPD
Column	2 % OV-17 Chromosorb W, AW-DMCS, 80—100 mesh, 3 mm i.d. × 1 m glass
Column temp.	160 °C
Injector temp.	250 °C
FPD temp.	Notch 9
Carrier gas	N ₂ 40 ml/min
Fuel gas	H ₂ 100 ml/min O ₂ 20 ml/min
Detector gas	N ₂ 40 ml/min
Photomul. voltage	700 V
Optical filter	526 nm
Time constant	1 s

エイト (ジモノシクロヘキシルアンモニウム塩, シグマ) および β -グリセロホスフェイト (ジナトリウム塩, シグマ) を Dowex 50 W (H⁺) でそれぞれの遊離型にして用いた. HMDS, BSA (東京化成工業), TSIM (半井化学薬品) BSTFA, 1% TMCS 含有 BSTFA, ピリジン (ピラス). イオン交換樹脂, Dowex 50 W-×4 (100—200 mesh) H⁺-型 (ダウケミカル)——イオン交換樹脂の前処理は常法により調製して用いた. その他の試薬は市販品を蒸留して用いた.

TMS 化 グリセロリン酸の一定量にピリジン 25 μ l, TMS 化剤 25 μ l を加え各種条件下 (Fig. 1, 2) で反応させたものをガスクロマトグラフに約 1 μ l 注入した.

リン脂質中のグリセロリン酸の定量 試料 (グリセロリン酸として 5—15 μ g を含む) を少量の MeOH-H₂O (1:1, v/v) に溶解後 Dowex 50 W-×4 カラム (6 i.d. × 30 mm) に注ぎ入れ MeOH-H₂O (8:2, v/v) で溶出し分画液 5 ml を得る. その一定量をリアクティブアル中で減圧乾固後, ピリジン 25 μ l および 1% TMCS 含有 BSTFA 25 μ l を添加, 60°C で 60分間時々震盪しながら反応させたものを約 1 μ l ガスクロマトグラフに注入した. 得られたクロマトグラムのピーク面積を半値幅法で測定し検量線からグリセロリン酸の含量を求めた.

結果および考察

TMS 化剤の検討

TMS 化剤は従来, 活性水素を有する化合物の GC 分析⁴⁾ に広く使用されている.

検討した TMS 化剤は, ヘキサメチルジシラゼン (HMDS), N,O-ビストリメチルシリルアセトアミド (BSA), N-トリメチルシリルイミダゾール (TSIM), N,O-ビストリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (BSTFA), 1% トリメチルクロロシラン (TMCS) 含有 BSTFA の 5 種である. 溶媒はいずれもピリジンを用いた.

Fig. 1 の結果から明らかなように 1% TMCS 含有 BSTFA を TMS 化剤として用いたとき最も高い値を示した.

この結果からグリセロリン酸の分析を行なう場合シリル化剤は 1% TMCS 含有 BSTFA が適当であることがわかった.

TMS 化の反応温度および時間の検討

TMS 化の反応時間は 5—15 分ではほぼ 90% 以上 TMS 化されるが, さらに徐々に反応の進行がみられるので 60 分間反応させることとした.

Fig. 2 に 1% TMCS 含有 BSTFA の反応温度とグリセロリン酸 TMS 誘導体の生成量との関係を示したが, 60°C のとき最も高い値が観測され, 80°C, 100°C と高温で反応を行なった場合, ピークの高さは 60°C に比較してむしろ低下した. 以後, グリセロリン酸分析の TMS 化の反応条件を 60°C, 60 分とし反応中ときどき震盪して行なった.

保持時間および検量線

Table I に示す操作条件での α - および β -グリセロリン酸の保持時間はそれぞれ 3.8 min, 3.2 min であった.

Fig. 1. Time Course of Formation of TMS Derivative of Glycerophosphate with Some Silylating Reagents

○, BSTFA: N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide,
 ●, 1% TMCS in BSTFA: Trimethylchlorosilane in BSTFA,
 △, BSA: N,O-bis(trimethylsilyl) acetamide,
 ▲, HMDS: Hexamethyldisilazane,
 □, TSIM: N-(trimethylsilyl)imidazole,
 Reaction temperature: 60°C.

Fig. 2. Temperature Effect of Reaction of Glycerophosphate with BSTFA Containing 1% TMCS

Reaction time: 60 min.

TABLE II. Determination of Glycerophosphate in Commercial Phospholipids

Phospholipids	α -Glycerophosphate (ppm)	β -Glycerophosphate (ppm)
Phosphatidyl choline (didecanoyl)	1938	1270
Phosphatidyl choline (dipalmitoyl, synthetic)	6	trace
Phosphatidyl choline (dioleoyl, synthetic)	418	385
Lecithin (from eggs)	32	25
Phosphatidyl ethanolamine (from egg yolk)	149	N.D.
Phosphatidyl serine (from bovine brain)	559	183
Phosphatidyl glycerol (dipalmitoyl)	2587	749
Phosphatidyl glycerol (from egg lecithin)	16243	867
Cardiolipin (from beef heart)	1335	534
Phosphatidyl inositol (from pig liver)	144	25
Sphingomyelin (from bovine brain)	trace	N.D.

N.D. : not determined.

得られた α -および β -グリセロリン酸の確認はそれぞれマススペクトルを測定して分子イオンおよびフラグメントイオンにより行なった。^{2b, 5)}

526 nm のリン化合物用光学フィルターを用いたときのグリセロリン酸濃度とそのピークの大きさとの関係は 1 ng—1 μ g の範囲に亘って直線関係が成立した。

市販リン脂質中のグリセロリン酸の分析

Table I に示した GC の操作条件を用い TMS 化の反応条件は 60°C, 60 分でグリセロリン酸の TMS 化が完全に行なわれることが分った。かつ、 α -および β -グリセロリン酸は良好に分離した。

この方法による市販リン脂質中の α -および β -グリセロリン酸の分析結果を Table II に示した。

結 論

本分析法は従来の PPC, TLC にくらべ正確さにおいて優り、さらに簡便、迅速である。また FPD の有する

高感度、高選択性はグリセロリン酸の微量定量法に有力な手段であり、加うるにリン脂質の純度の評価に有用であると考ええる。

謝辞 本研究に際し、有益な御助言を賜った京都大学 宇野豊三教授に深く感謝いたします。なお本研究の一部は文部省科研費によりなされた。

引用文献および注

- 1) B. Maruo, A.A. Benson, *J. Biol. Chem.*, **234**, 254 (1959); R.M.C. Dawson, *Biochem. J.*, **75**, 45 (1960).
- 2) a) W.D. Skidmore, C. Entenman, *J. Lipid Res.*, **3**, 471 (1962); b) A. Tokumura, K. Fukuzawa, Y. Akamatsu, S. Yamada, T. Suzuki, H. Tsukatani, *Lipids*, **13**, 468 (1978).
- 3) Y. Handa, K. Matano, K. Takauchi, H. Tsukatani, *J. Chromatogr.*, **206**, 387 (1981).
- 4) E.M. Chambaz, E.C. Horning, *Anal. Biochem.*, **30**, 7 (1969); M.G. Horning, K. Lertratanangkoon, J. Nowlin, W.G. Stillwell, R.N. Stillwell, T.E. Zion, P. Kellaway, R.M. Hill, *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 630 (1974); H. Ogino, T. Mastumura, K. Satouchi, K. Saito, *Biochim. Biophys. Acta*, **574**, 57 (1979).
- 5) J.H. Duncan, W.J. Lennarz, Catherine C. Fenselau, *Biochemistry*, **10**, 927 (1971).