

蛍光ラベル化試薬9-anthryldiazomethaneを用いた血清中の遊離脂肪酸の高速クロマトグラフィーによる分析

高山美佐子・前田隆子*・古徳 進**

Misako TAKAYAMA, Takako MAETA and Susumu KOTOKU

Fluorometric determination of free fatty acids in human sera with 9-anthryldiazomethane by high performance liquid chromatography

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による脂肪酸分析において、脂肪酸分子の carboxyl 基に対する蛍光化による検出法がよく応用されており、蛍光ラベル化試薬として 4-bromomethyl-7-methylcoumarin¹⁾, 9-aminophenanthrene²⁾, diazomethylanthracene³⁾, 9-anthryldiazomethane^{4,5)} (ADAM) などが広く採用されてきている。この中で ADAM は、室温でも容易に結合し、分析感度も高いために、夾雑物の多い生物試料中の脂肪酸検出法には特に適していると思われる。

著者らは今回、血清中遊離脂肪酸のうち代表的な 8 種類について、ADAM 法にもとずく HPLC 測定を行い、それらの検出感度を高めるための基礎的条件を検討した。

材料と方法

各種標準脂肪酸の myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), linolenic acid (C18:3), arachidonic acid (C20:4), 内部標準 (IS) としての octadecanoic acid (C17:0), および ADAM はフナコン薬品から、HPLC 用溶媒, chloroform, および酢酸 ethyl (特級) は関東化学から、遊離脂肪酸測定用キット (NEFA C テスト) は和光純薬から入手した。各種の脂肪酸は methanol で溶解し既定の濃度に調製した。

装置本体：日立液体クロマトグラフ L-6000 Pump, グラジエント装置：日立 L-5000 LC Controller, 検出器：日立 F 1100 Fluorescence Spectrophotometer, データ処理装置：日立 D-2500 Chromato-Integrator,

測定波長：Ex = 350 nm, Em = 412 nm, 逆相系カラム：CAPCEL, 4.6 mmφ×150 mm (資生堂), 流速：1.0 ml/min, 分析温度：室温

測定方法：血清 0.3 ml を共栓付試験管にとり、IS (20 μg/ml methanol) 0.5 ml および chloroform 2.0 ml を加え、試験管シェーカーで 5 min 振盪後、卓上遠心機で 3,000 rpm, 10 min 遠心分離して液層を分離した。この chloroform 層の 1.5 ml を別の共栓付試験管に移し、N₂ 気流下で 37°C で蒸発乾固した。これに ADAM 試薬 (0.5 mg/ml 酢酸 ethyl) を 300 μl 加え、室温で 1 hr 反応させ、その 5 μl をクロマトグラフの試料孔に注入して作動させた。

結果および考察

各脂肪酸分離条件の検討：HPLC に日立 ODS カラムを用いて溶出すると、acetonitrile/H₂O 又は methanol/H₂O の溶出溶媒系によっても、保持時間が比較的早い miristin 酸と palmitolein 酸のピークが分離出来ないことが分かった。次に資生堂の逆相系カラム (CAPCEL) について検討した。methanol/H₂O の溶出溶媒系においてこれらの脂肪酸は分離可能であった。この手法は我々の報告が最初のものであると思われる。この場合、HPLC では保持時間が近似しているため分離し難い miristin 酸と palmitolein 酸および palmitin 酸と olein 酸が充分分離できること、および使用した標準脂肪酸の中では最も遅く溶出する stearin 酸の保持時間を出来るだけ短くできることの二つの条件を満足しうるための溶媒の methanol 濃度を検討した。その結果、olein 酸が溶出

するまでの試料注入後 50 min までは methanol 92% とし, 50-60 min は 92-98% のグラジェントとし, 60 min 以降は 98% とすることによって, 上記の条件を満足しうるプログラムが得られることが分かった。

逆相カラムを用いたクロマトグラム: 図 1 に 8 種類の標準脂肪酸を添加したヒト血清標品 (各 12.5 μg , (A)), およびヒト血清標品のみ (B) のクロマトグラムを示した。

逆相カラムを用いて, 前項の送液プログラムに従って作動することによって血清中に比較的多い palmitin 酸 (ピーク 6) および olein 酸 (ピーク 7) の定量可能な分離が出来ることは明らかであった。一般に飽和脂肪酸についてみれば炭素数が増加するにしたがって保持時間が長くなり, 同種類の脂肪酸の不飽和結合数についてみ

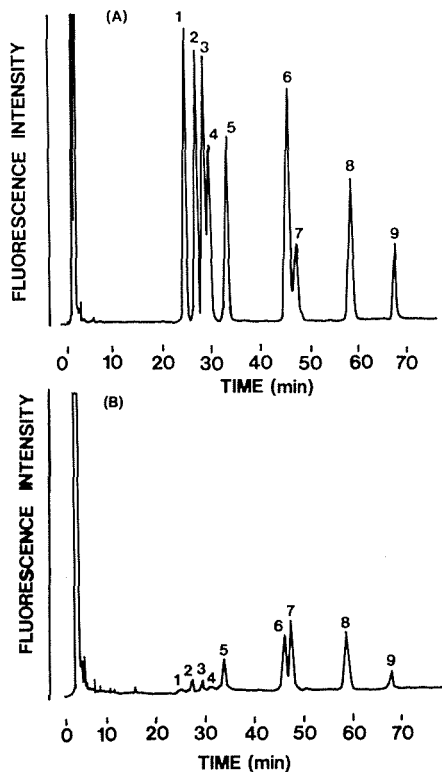


Fig. 1. Chromatogram of ADAM derivatives from long chain fatty acids in human serum. Peaks 1, C18:3; 2, C14:0; 3, C16:1; 4, C20:4; 5, C18:2; 6, C16:0; 7, C18:1; 8, C17:0; 9, C18:0 (A): A serum sample supplemented by 8 kinds of standard fatty acids of 12.5 μg . (B): A sole serum sample. Peaks were separated well by the operation of HPLC equipped with a reverse phase column (CAPCEL, Shiseido) under an elution programme, supplied with a methanol gradient from 92% till 50 min, 92-98% ascending till 60 min and 98% to the end.

ればそれらの増加に伴って, 溶出時間が早くなる原則のあるのが認められた。

クロマトグラムからの脂肪酸の定量: 本法を用いて, 血清中脂肪酸を定量するために, あらかじめ既存する脂肪酸の IS に対する面積比を測定した。次いでこの血清 0.3 ml に対して各種標準脂肪酸 12.5 μg 又は 25.0 μg ずつ添加してから本法をおこない, 得られたクロマトグラムから IS に対するそれぞれの添加脂肪酸の面積比を求め, 検量線を作製した。その結果, すべての脂肪酸についてほぼ原点を通る直線性のあることが確かめられた。

試料中の各脂肪酸含量はそれぞれが約 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲において定量可能であった。血清中の総遊離脂肪酸の正常値は 172-586 $\mu\text{Eq}/\text{l}$ であると報告されている⁹⁾ことを参照すると, 上記の定量範囲を持つ本法は十分実用性があると思われる。

同時再現性: 健康ヒト血清を用いて本法により 5 回反復測定することによって, 再現性の検討をした。 $\bar{x} \pm 2$ SD および CV% については, 溶出順に C18:3; 3.0 \pm 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8.2%, C14:0; 6.5 \pm 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12.1%, C16:1; 4.6 \pm 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8.0%, C20:4; 4.5 \pm 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12.3%, C18:2; 19.0 \pm 3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8.1%, C16:0; 35.2 \pm 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.3%, C18:1; 45.8 \pm 5.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 6.2% そして C18:0; 23.3 \pm 1.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4.0% であり, 十分再現性のある定量法と考えられた。

添加脂肪酸の回収率: 表 1 に本法によるヒト血清中に添加した一定量の各種脂肪酸の回収率を示した。myristin 酸 (C14:0), palmitin 酸 (C16:0), および stearin 酸 (C18:0) の回収率は 81-88% であったが, それら以外の脂肪酸では 97.6-106.4% の値が得られ, 全体的に満足出来る結果が得られた。

ADAM による誘導体の安定性: 各種標準脂肪酸 12.5 μg を添加したヒト血清を用い, ADAM 試薬を加えて, 1 時間反応させた後, 各種の条件下で保存し, 試料中の各種脂肪酸の誘導体の安定性を検討した。保存後本法により検出した蛍光強度は試料の保存日数の増加と共に増加し, 保存温度に関しては室温で最も大きく, -20 $^{\circ}\text{C}$ で最も小さかった。また C18:1 の場合 IS との面積比の変化をみると, 室温では保存 0 日目には 0.905, 1 日目には 0.896, 2 日目には 0.905, 7 日目には 0.911 であり, 4 $^{\circ}\text{C}$ ではそれぞれ 0.905, 0.926, 0.933, 0.945, -20 $^{\circ}\text{C}$ ではそれぞれ 0.905, 0.898, 0.919, 0.928 であった。従って, いずれの保存状態においても面積比は極めて僅かずつ増加しており, 保存 2 日後についてのみ言及すれば, 保存温度の如何に関わらず 3.09% 以下の増加にとどまった。さらに実験範囲内のその他の脂肪酸について

Table 1. Analytical recovery of the free fatty acids (FFA) determined in human serum with a 9-anthryldiazomethane reagent*

Compound	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
C 14 : 0	12.5	11.0	88.0
C 16 : 0	12.5	10.7	85.6
C 16 : 1	12.5	12.2	97.6
C 18 : 0	12.5	11.0	88.0
C 18 : 1	12.5	13.8	110.4
C 18 : 2	12.5	12.5	100.0
C 18 : 3	12.5	12.8	102.4
C 20 : 4	12.5	13.3	106.4
C 14 : 0	25.0	20.2	81.0
C 16 : 0	25.0	20.8	83.2
C 16 : 1	25.0	24.6	98.4
C 18 : 0	25.0	21.0	84.0
C 18 : 1	25.0	24.8	99.2
C 18 : 2	25.0	25.6	102.4
C 18 : 3	25.0	24.6	98.4
C 20 : 4	25.0	26.4	105.6

* Analysed by high performance liquid chromatography equipped with a reverse phase column (CAPCEL, Shiseido).

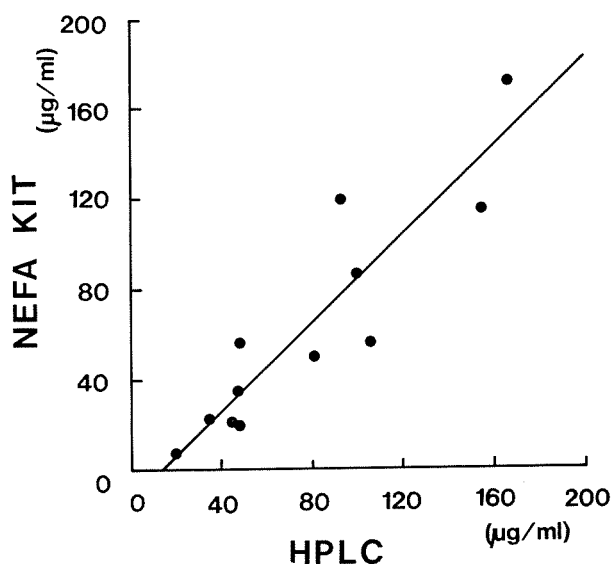


Fig. 2 Correlation between both values of total quantity of long chain fatty acids in each of 12 samples of human sera, measured by HPLC equipped with a reverse phase column and a NEFA kit (Wako)

得られた蛍光強度の変化範囲を勘案しても本報による測定精度にほとんど影響をせず、ADAM 誘導体は極めて安定であると考えられた。

本法の信頼性：12種類の血清サンプルについて本法および遊離脂肪酸測定用キットによる定量を併行し、本法によって得られた個々の遊離脂肪酸量の総和と、NEFAキットによる総遊離脂肪酸量を求め、この二法間で相関を調べ、図2に示した。グラフのX軸を本法による測定値、Y軸をNEFAキット法による測定値で表した。この直線式は $Y = -13.08 + 0.97X$ となり、 $r = 0.906$ という良好な相関係数が得られた。

要 約

生物試料中に存在する脂肪酸を9-anthryldiazomethaneによる蛍光誘導体化法で、HPLC分析する条件について検討した。難分離性脂肪酸は逆相カラムにより送液することにより分離できた。検討した8種類の血清中遊離長鎖脂肪酸はmethanolのグラジエント送液プログラムによって良好に分離し、本法が迅速性、簡便性、経済性、良好な再現性、高い特異性、高い分析感度、安定性および信頼性を持つ分析法であることを実証した。

文 献

- 1) Stanley, L. and Grushka, E., *J. Chromatogr.*, **158**, 207-214, 1978.
- 2) Ikeda, M., Shimada, K., Sakaguchi, T. and Matsumoto, U., *J. Chromatogr.* **305**, 261-270, 1984.
- 3) Barker, S. A., Monti, J. A., Christian, S. T. and Benington, F., *Anal. Biochem.*, **107**, 116-123, 1980.
- 4) Nimura, N. and Kinosita, T., *Anal. Lett.*, **13**, 191-202, 1980.
- 5) Nakagawa, Y. and Waku, K., *Lipids*, **20**, 482-487, 1985.
- 6) 久城英人, 高野圭似, 會山浩吉, 福井敏, *臨床病理*, **18**, 833 ~ 837, 1970.

Summary

The successful fluorometric determination of free fatty acids (FFA) was described in human sera by high performance liquid chromatography equipped with a reverse phase column (CAPCEL, Shiseido). Fluorescent derivatives from both palmitic and oleic acids with 9-anthryldiazomethane (ADAM) were separately carried out from the reverse phase column but not from a conventional one. The derivatives from the two acids and six more additives were thus successively driven out under an elution programme of ascending methanol concentrations. Each of the FFA in human serum was able to sharply quantify from the corresponding peak of the chromatogram in a range of 0.05-250 $\mu\text{g/ml}$. All of the within-day precision for each of the FFA lay between 2.3 and 12.3% of relative standard deviations. Specific recoveries of myristic, palmitic and stearic acids were calculated to be 81-88% and of the other FFA 97.6-106.4%. Total FFA contents determined in each of 12 samples of human sera both by the proposed HPLC with the reverse phase column and by a NEFA kit (Wako) were explained to coincide each other, because of the relative coefficient of 0.906. The fluorescent esters of the FFA and ADAM were watched to be stable after the prolonged operation.

These findings suggest that this procedure will be fully acceptable to determine FFA in biological materials.

(受付 1991. 2. 28.)