

## 分析キットを用いる脂肪酸の簡便かつ迅速なHPLC分析

### ●もくじ

1. はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・2
2. ラベル化の原理と手順・・・・・・・・・・2
3. 2-NPH誘導体の分析・・・・・・・・・・4
4. アプリケーション・・・・・・・・・・5
5. まとめ・・・・・・・・・・・・・・・・・・7

# 1. はじめに

食品や生体に含まれる脂肪酸の量や種類を測定することは、生活習慣病や代謝異常などとの関連において重要です。従来、脂肪酸の測定には主にガスクロマトグラフィが用いられていますが、揮発性の誘導体として測定するため前処理の過程でサンプルロスがある、ゴーストピークが出現するなどの欠点があります。また、HPLC法ではフェナシルプロミドや4-ブロモメチル-7-メトキシマリンなどによるプレカラムラベル化も知られていますが、ラベル化の操作が煩雑、分析に長時間を要するなどの問題があります。そこで、本紙ではこれらの問題点を解消した「YMC脂肪酸分析キット」を用いた逆相HPLCによる脂肪酸の簡便かつ迅速な分析法を紹介します。

「YMC脂肪酸分析キット」は2-ニトロフェニルヒドラジン(2-NPH)によるプレカラムラベル化法で脂肪酸を分析します。2-NPHラベル化法は、ラベル化前の脂肪酸の抽出操作が不要で、ラベル化の操作も簡単であり、食品や生体液中の脂肪酸の分析を簡便に行うことができます。ラベル化前にけん化することでエステル型の脂肪酸の分析も容易にできます。また、2-NPH誘導体は専用カラムを用いて短時間で分析することができ、可視部の400nmに最大吸収を有することから、高感度で選択性の高い検出ができます。この分析キットは、短鎖、長鎖脂肪酸のほかヒドロキシカルボン酸やジカルボン酸の分析にも応用できます。以下、この分析キットを用いた脂肪酸の分離の詳細について述べます。

# 2. ラベル化の原理と手順

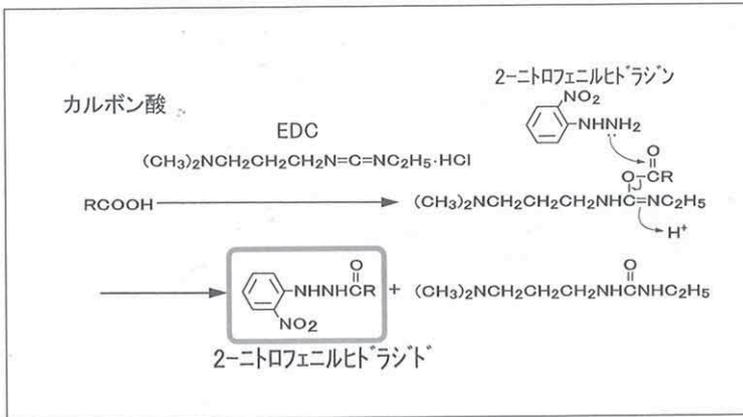


図1 2-NPH 誘導体化の原理

脂肪酸は縮合剤1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)の存在下、2-NPHと反応して2-ニトロフェニルヒドラジドとなります(図1)。生成した2-ニトロフェニルヒドラジドの吸収スペクトルはpH値に影響され、pH4.5から8.5では350nm以上の波長領域において400nmで最大吸収を有します。したがって、HPLC分析時は検出波長400nmで2-ニトロフェニルヒドラジドを高感度かつ選択的に検出することができます。また、2-ニトロフェニルヒドラジドは水に不溶で、有機溶媒への溶解性はヒドラジドの種類によって異なります(表1)。

	脂肪酸2-ニトロフェニルヒドラジド	ヒドロキシカルボン酸2-ニトロフェニルヒドラジド	ジカルボン酸ノ2-ニトロフェニルヒドラジド
外 観	黄色結晶	黄色結晶	黄色結晶
溶解性	ジクロロメタン、クロロホルム、エーテルに易溶 酢酸エチル、MeOH、EtOHには可溶 n-ヘキサンにはRの種類による 水には不溶	ジクロロメタン、クロロホルム、エーテルに易溶 酢酸エチル、MeOH、EtOHには可溶 n-ヘキサンには不溶 水には不溶	ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチルに易溶 エーテル、MeOH、EtOHには可溶 水に対しては、pH6以上で可溶、pH2以下では不溶

表1 2-NPH 誘導体の性質

ラベル化試薬

- ◆ 試薬A : ラベル化剤(2-NPH溶液)
- ◆ 試薬B : 縮合剤(EDC溶液)
- ◆ 試薬C : 反応停止剤(アルカリ溶液)
- ◆ 試薬D : 酸性緩衝液
- ◆ 試薬E<sup>1)</sup> : 酸性緩衝液
- ◆ 試薬S<sup>2)</sup> : ケン化用試薬

分析用カラム

- ◆ YMC-Pack FA 250 × 6.0mmI.D.
- ◆ YMC-Pack CA 250 × 4.6mmI.D.<sup>3)</sup>

- 1) ヒドロキシカルボン酸・ジカルボン酸用のみ
- 2) エステル型長鎖・短鎖脂肪酸用のみ
- 3) ジカルボン酸用

表2 脂肪酸分析キットの内容

そのため、適切な有機溶媒を選択することで目的のヒドラジドのみを選択的に抽出することもでき、HPLC分析では夾雑物の少ないクロマトグラムが得られます。「YMC脂肪酸分析キット」は脂肪酸のラベル化、生成したラベル化体の抽出、分析が簡単にできるようにラベル化に必要な試薬とラベル化体の分離に最適なカラムをパッケージ化したものです(表2)。一般にラベル化試薬は反応性が高いために、安定性に問題がある場合がありますが、本キットの試薬は安定性に優れ約3ヶ月の保存が可能です。ラベル化反応に必要な器具は恒温槽、試験管ミキサー、小型遠心機などで、図2に示したように脂肪酸とこれらの試薬を混合するのみでラベル化できます。一連の反応は1本の試験管内で行うことができ、

反応時間も約40分と短時間で完了します。ラベル化に際して従来法で必要とされていた脂肪酸の抽出や除タンパクの操作も不要です。ラベル化後、試料中の夾雑物が少ない場合は反応液をそのままHPLCで分析することができます。生体試料など試料中の夾雑物が多い場合は、図に示した手順で目的のラベル化体を抽出して分析します。

なお、エステル型の脂肪酸を分析する場合はケン化後ラベル化します。したがって、ケン化の有無で試料中の総脂肪酸と遊離脂肪酸を分別定量することができます。

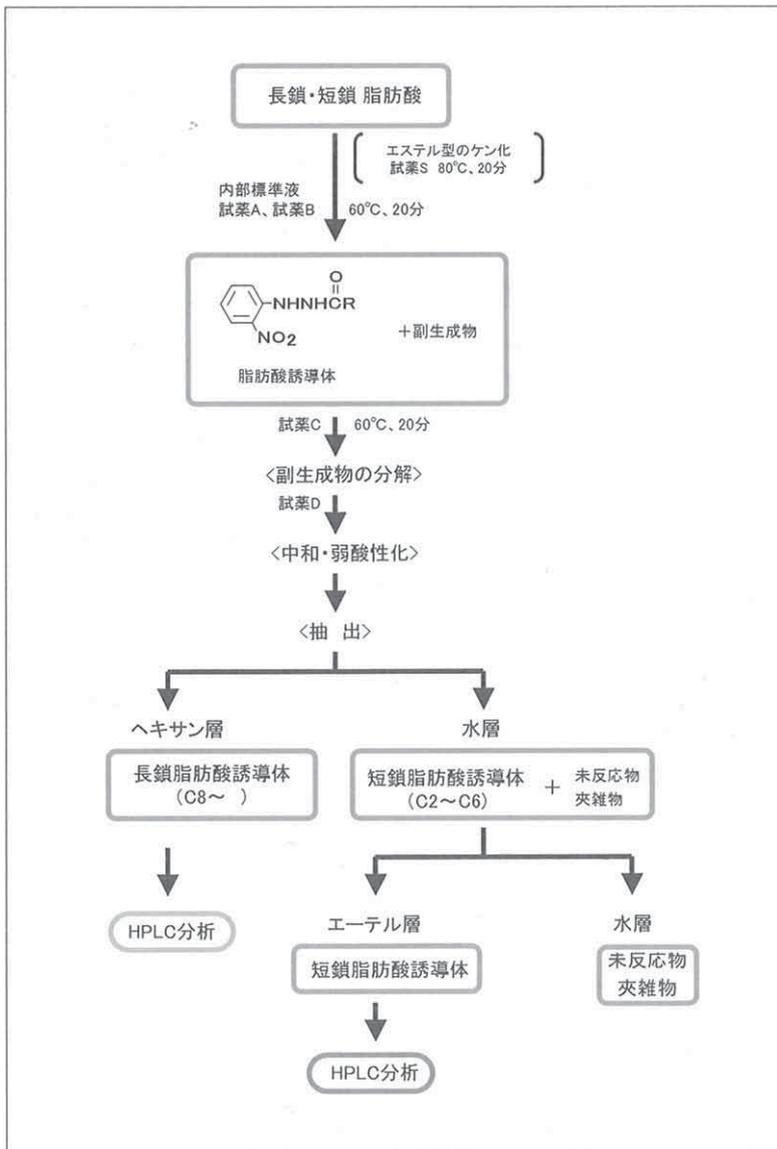


図2 長鎖・短鎖脂肪酸の誘導化手順

### 3. 2-NPH誘導体の分析

2-NPH誘導体は350nm以上の波長領域において400nmで最大吸収を有します。図3に分析時の検出波長の比較クロマトグラムを示します。波長230nmでは、400nmと比較して約4倍の感度がありますが、多数の夾雑物ピークも検出されています。逆に400nmでは感度は230nmにおよばないものの夾雑物ピークはほとんどなく2-NPH誘導体を選択的に検出しています。検出波長は試料の種類や目的に応じて選択することになりますが、以下の分析例では選択性の高い400nmを検出波長としています。

図4に10種類の長鎖脂肪酸の分析例を示します。脂肪酸分析専用カラムYMC-Pack

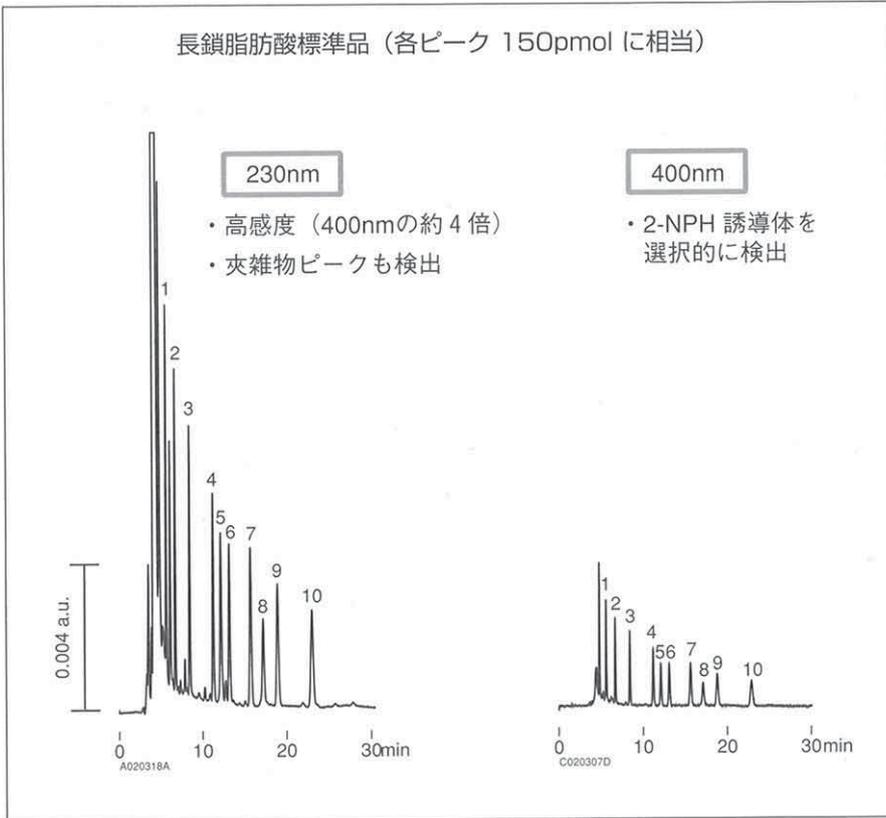


図3 検出波長の比較

FAを使用することによりアイソクラティック条件下で多成分の一斉分析を30分以内に行うことができます。図4の(b)に血清中の遊離脂肪酸の分析例を示します。一回の分析で用いる血清はわずか50 $\mu$ Lです。ラベル化に際して除タンパクや脂肪酸の抽出操作は不要で、血清を直接ラベル化することができます。このように本分析キットを用いることにより、低濃度の脂肪酸も簡便かつ高感度に分析することができます。

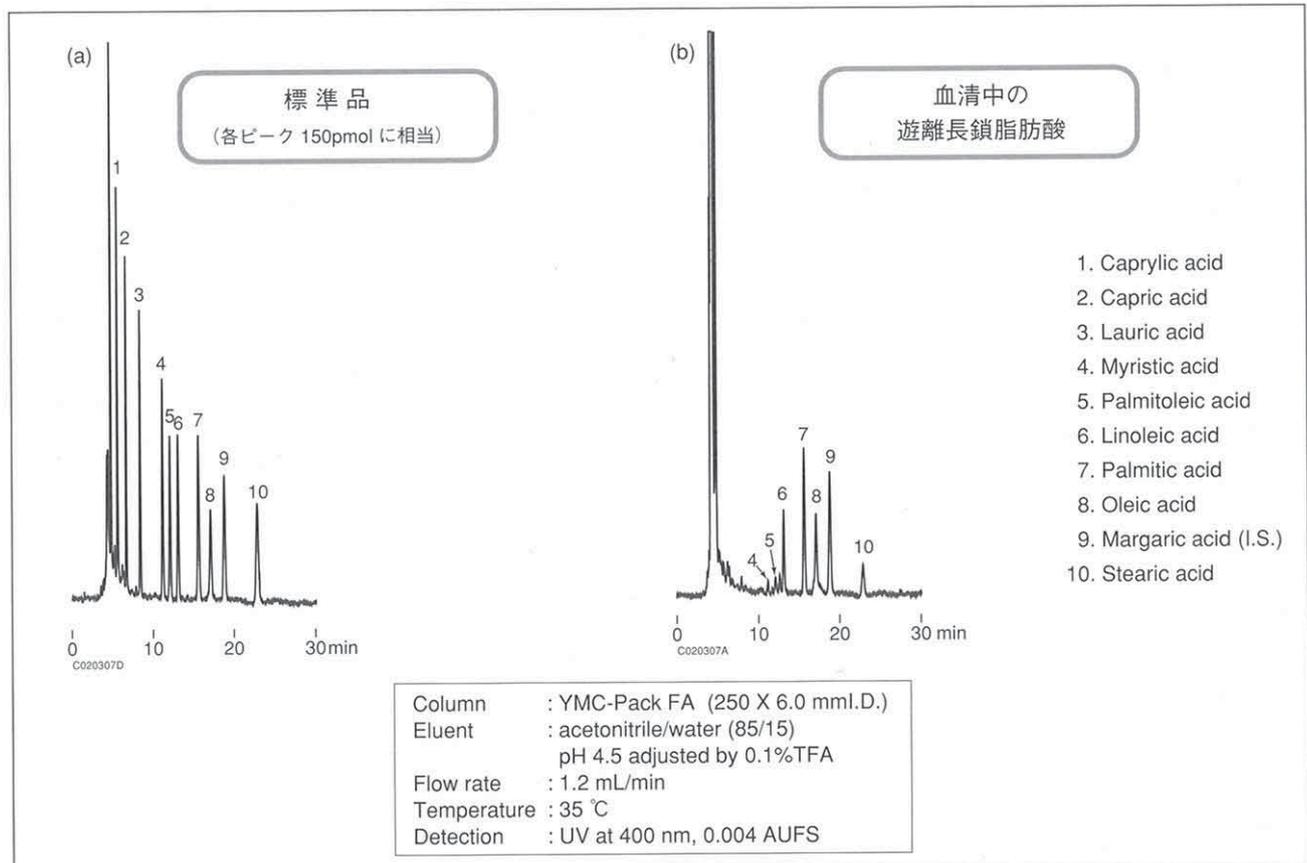


図4 長鎖脂肪酸の分析

## 4. アプリケーション

本分析キットでは遊離型脂肪酸だけでなく、エステル型の脂肪酸も手順に従って簡単に分析することができます。エステル型脂肪酸は試料をケン化後、遊離型脂肪酸と同様にラベル化します。分析例を図5に示します。

さらに、長鎖脂肪酸のほか短鎖脂肪酸、ヒドロキシ脂肪酸やジカルボン酸の分析も同様にできます。また、ヘキサコサン酸(C26)などのC24以上の長鎖脂肪酸についてもラベル化の条件や分析条件を最適化することで分析可能です。これらの分析例を図6から8に示します。

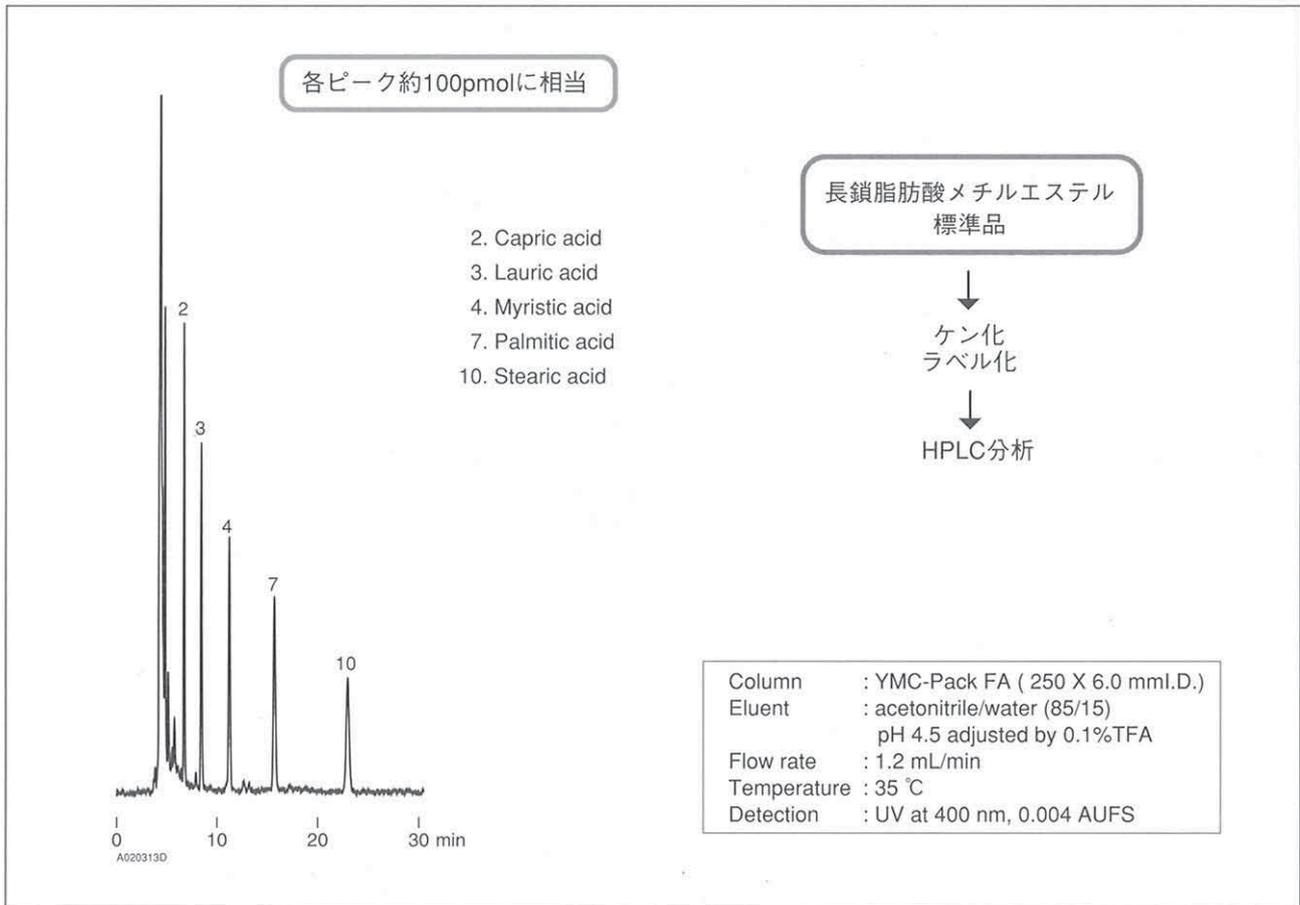


図5 エステル型長鎖脂肪酸の分析

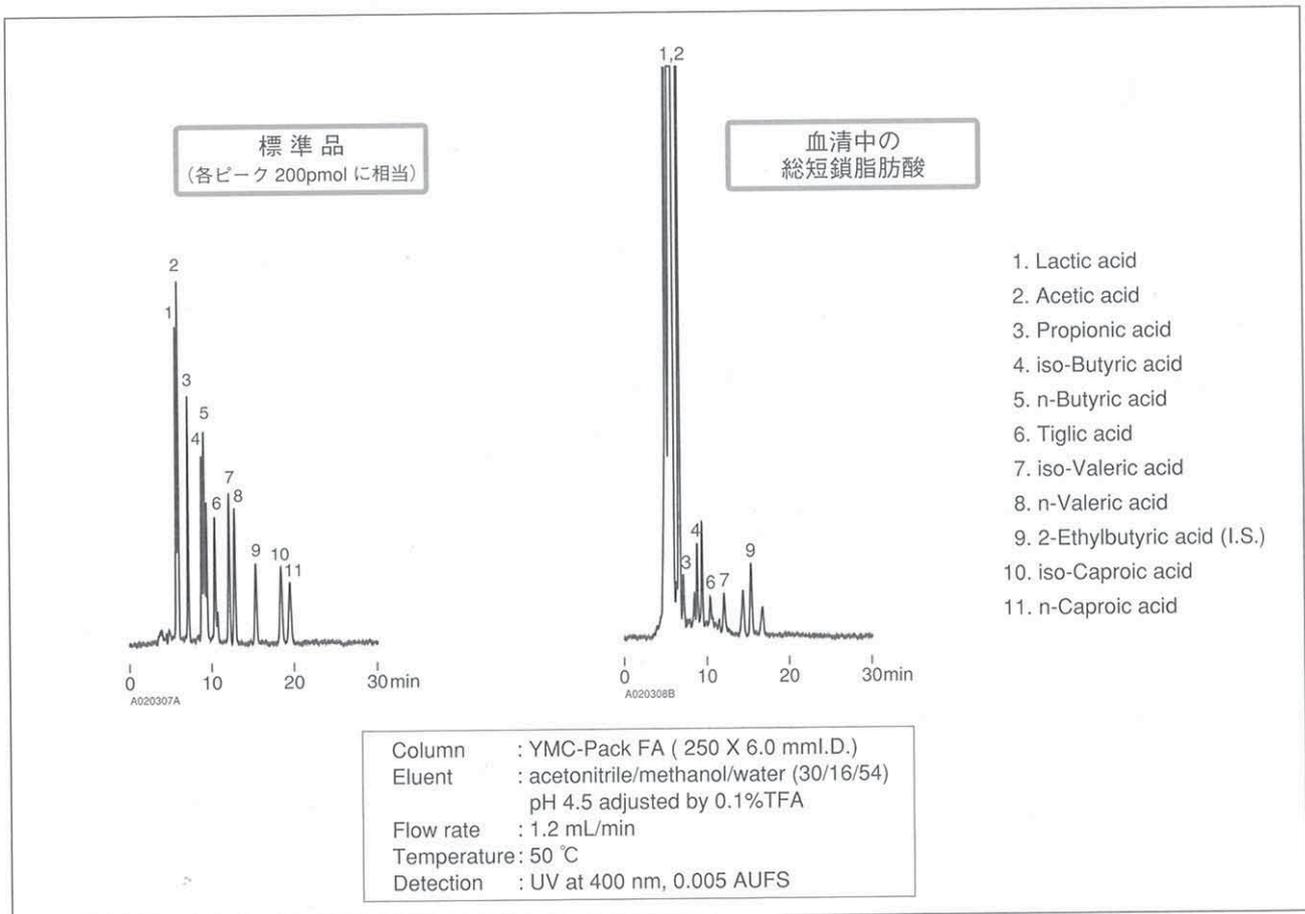


図6 短鎖脂肪酸の分析

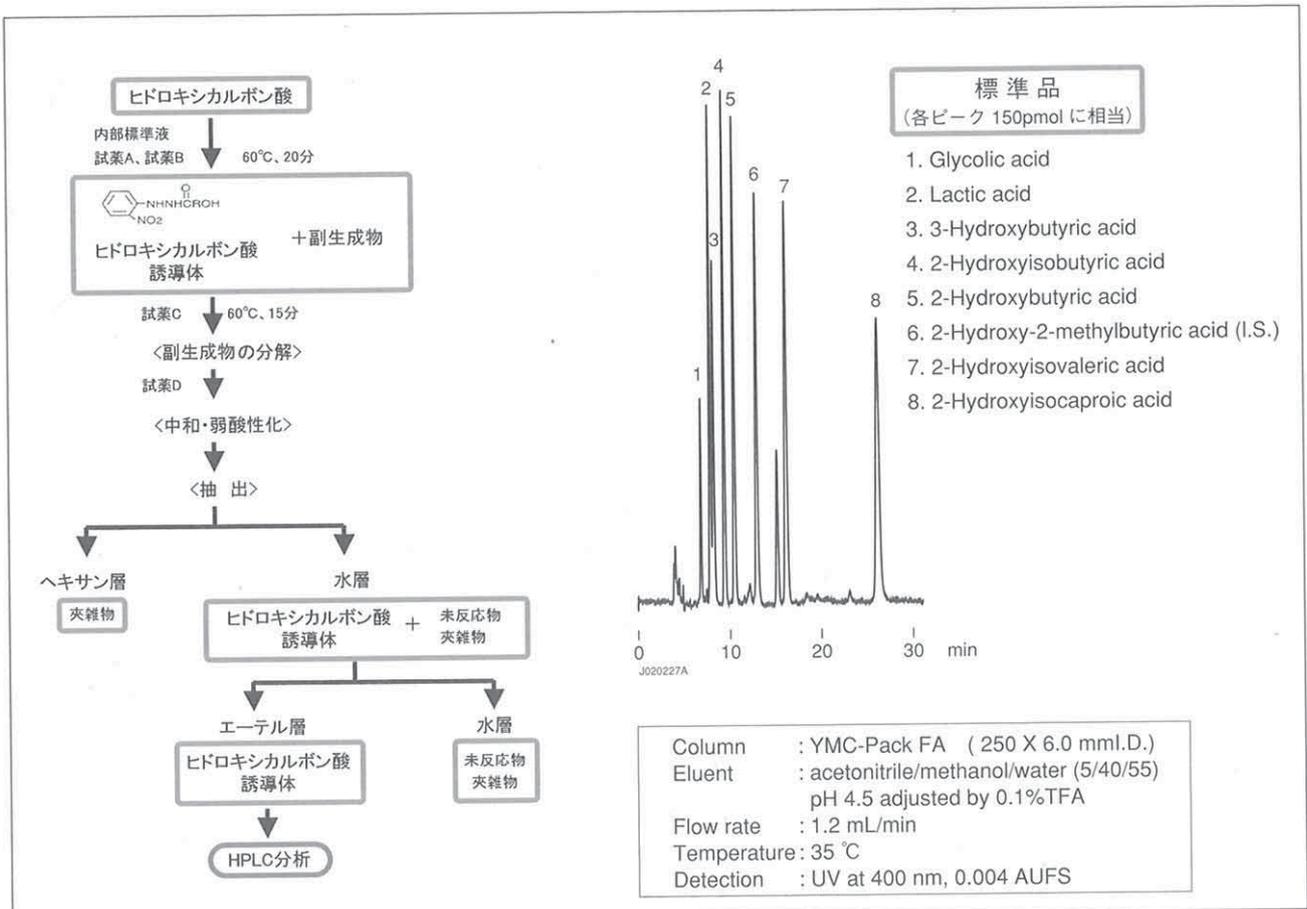


図7 ヒドロキシカルボン酸の分析

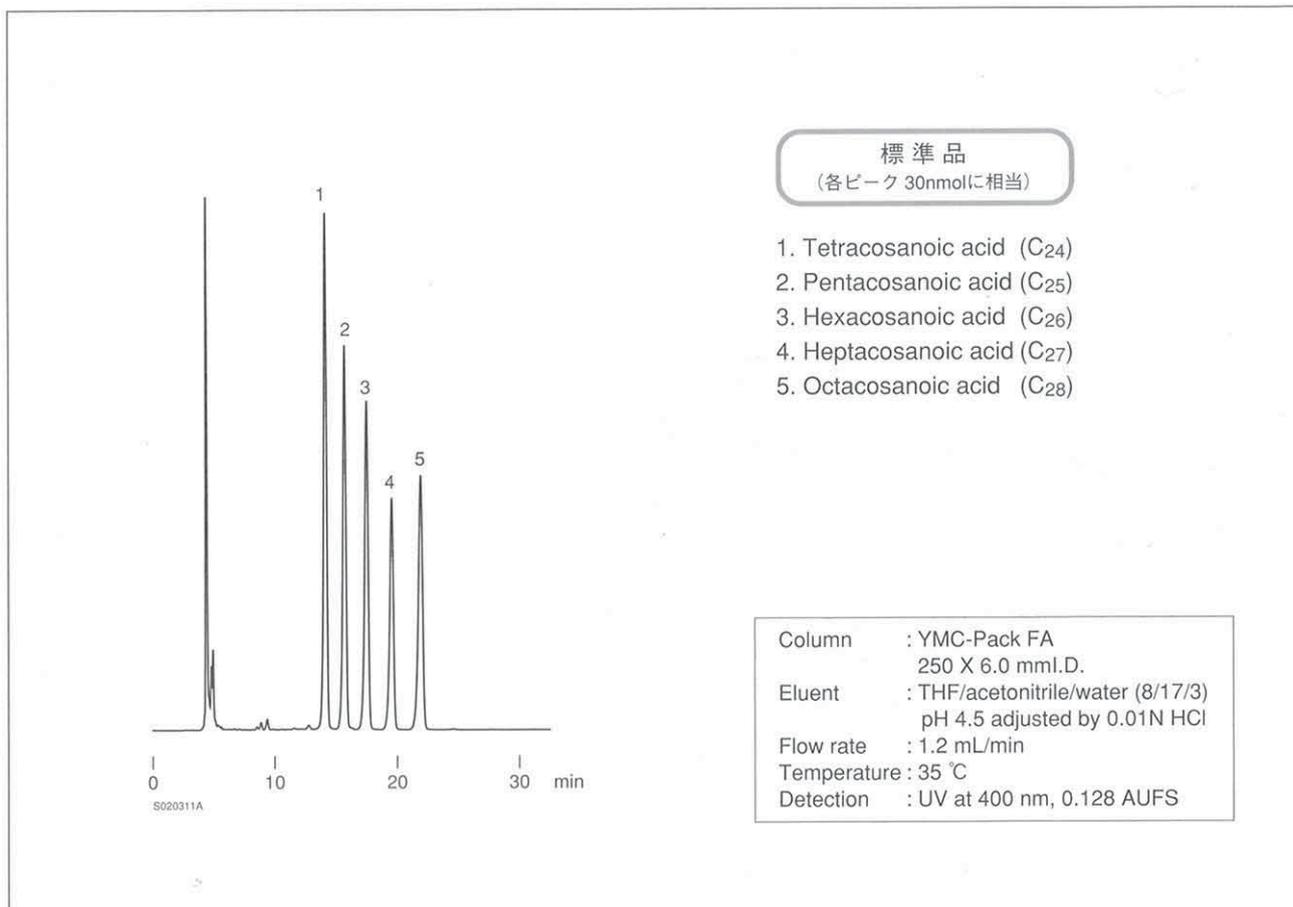


図8 長鎖脂肪酸(C<sub>24</sub>以上)の分析

## 5.まとめ

YMC脂肪酸分析キットは既存法の問題点を解消した2-NPHラベル化用のキットで、ラベル化試薬と専用カラムをパッケージ化しています。簡単な反応操作、高い定量性および高い検出感度が特長です。生体試料や食品試料に含まれる種々の脂肪酸の直接ラベル化が可能で、ラベル化前の除タンパクや脂肪酸の抽出操作は不要です。ラベル化体の分析もアイソクラティックで多成分の一斉分析が可能で、ラベル化からHPLC分析まで短時間で完了することができます。本キットにより各種脂肪酸の分析を簡便かつ迅速に行うことができ、食品、医学、生化学などあらゆる分野の脂肪酸分析に有用です。