

脂肪酸分析は意外と簡単

市原 謙一

生命科学の領域で仕事をしている人であれば、タンパク質や核酸の分析はなじみ深いものであり、身近に感じられることであろう。そのような水溶性の生体物質を研究対象にしている人が仕事のなり行きから脂質や脂肪酸の分析が必要になった時、ややもすると取りかかることに躊躇されるのではないだろうか。実際、生体の主要構成成分といっても脂質や脂肪酸は扱ったことがないという人がほとんどであろう。しかし、脂質や脂肪酸の分析は水溶性物質を扱っている研究者・技術者が敬遠するほど扱いにくいものではないし、対象によってはきわめて単純な操作ですませることができる。たとえば、サラダ油の脂肪酸組成を分析する場合であれば、油を試薬と混合するだけでグリセリド脂肪酸を脂肪酸メチルに誘導し、ガスクロマトグラフ (GC) にかけて組成を調べることができる。このように脂肪酸分析には設備として GC を必要とするが、分析のポイントは GC 分析の前処理として脂肪酸メチルを調製する段階である。GC を装備しない研究室でも、脂肪酸メチルが調製できれば、GC を持つほかの研究室や研究機関に分析を依頼したり GC を使わせてもらうことはできるだろうが、脂肪酸メチルの調製まで頼めることはまれであろう。

本稿では、脂質を専門分野としない方々が、脂肪酸分析の必要に迫られたときに強い抵抗感なしに取りかかれるきっかけを提供したい。分析法の詳細は実験書^{1,2)}、インターネットホームページ^{3,4)}を参照されたい。

脂肪酸分析の操作手順

脂質を大別すると、脂肪酸を含む脂質と含まない脂質 (カロチノイドなど) に分類される。脂肪酸を含む脂質の存在形態としては、(a) 共有結合していない遊離の脂肪酸、(b) グリセロールとのエステル (トリアシルグリセロールやグリセロリン脂質)、(c) グリセロール以外のアルコールとのエステル (ステロールエステル、ワックス)、(d) アミド結合した脂肪酸をもつスフィンゴ脂質に分類できる。ここでは、脂質 (a)~(c) を構成している脂肪酸の分析法について解説する。

オーソドックスな脂肪酸分析の流れは、(1) 試料から脂質を有機溶媒で抽出する、(2) 溶媒を留去して総脂

表1. 脂肪酸分析の操作手順

手順A	手順B	手順C
試料	試料	試料
↓抽出	↓抽出	↓誘導体化
総脂質	総脂質	脂肪酸メチル
↓分画	↓誘導体化	↓
各脂質	脂肪酸メチル	GC 分析
↓誘導体化	↓	
脂肪酸メチル	GC 分析	
↓		
GC 分析		

質を得る、(3) 総脂質から薄層クロマトグラフィ (TLC) などで目的の脂質を分画・単離する、(4) 得られた脂質から脂肪酸メチルを調製する、(5) 脂肪酸メチルを GC で分析する、となる (表1, 手順A)。しかし、常にすべての操作が必要というわけではなく、総脂質の脂肪酸組成を求める時は操作 (3) は不要となり、総脂質に対して誘導体化反応を施せばよい (表1, 手順B)。また、試料がポテトチップスやきな粉のように乾燥していれば抽出操作は必要でないし、最近では血液や菌体ペレットのように水が主成分であるような試料でも、抽出操作を省いて直接誘導体化して総脂質や膜リン脂質の脂肪酸組成を求めることができるようになってきた (表1, 手順C)。要するに、試料や目的によっては、誘導体化試薬を加えて穏やかな温度条件で攪拌するか放置しておくだけで脂肪酸メチルを調製し、GC に供することができる。

抽出 工場レベルでダイズなどの油糧種子からトリアシルグリセロールを主成分とする食用油脂を抽出するときにはヘキサンが用いられるが、研究室で脂質を分析する場合には、優れた抽出効率を示すクロロホルム-メタノール混合溶液が用いられる。しかし最近では、毒性や環境汚染の観点から同等の抽出効率をもつ *tert*-ブチルメチルエーテル-メタノール系が提案されている⁵⁾。*tert*-ブチルメチルエーテルは、ソックスレー抽出などで使われるジエチルエーテルに比べて沸点が高い (55°C) ので引火の危険性が緩和されることに加えて、過酸化物を生成しにくいという安全性の利点がある。また、分層操作の時に有機層が上層となるので、水層の下に来るクロロ

著者紹介 京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 (特任教授) / 財団法人 京都高度技術研究所 (招聘研究員)
 E-mail: ichihara@kpu.ac.jp, ken-ichi@astem.or.jp

2012年 第2号

ホルムの場合より回収操作が容易である。抽出溶媒には、試料に含まれる多価不飽和脂肪酸の自動酸化を防ぐため、あらかじめ0.001%程度の抗酸化剤BHT (2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol)を加えておくのが望ましいが、GC分析で中鎖脂肪酸メチルの近傍に溶出するので注意が必要である。

広く使われているBligh-Dyer抽出法の概略は以下のとおりである。「試料に含まれる水分を考慮して、クロロホルム/メタノール/水の体積比が1:2:0.8となるように溶媒を試料に加えて混合する。液相は、メタノールが多いのでクロロホルムと水が分離することなく1層となる。次いで上記体積比が2:2:1.8となるようにクロロホルムと水を加えて攪拌し濾過する。2層に分離した溶液の上層(水-メタノール層)を取り除き、脂質を含むクロロホルム層を回収する」

溶媒の留去 抽出溶液はロータリーエバポレーターを用いるか、窒素ガスを吹きつけて濃縮・乾固する。完全に乾固するためには、減圧デシケータ(2 kPa)でさらに20分以上乾燥させる。得られた総脂質を少量のクロロホルムなどに溶かして-20℃で保存する。ここに含まれる脂肪酸の組成は総脂質の脂肪酸組成となる。

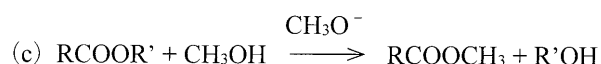
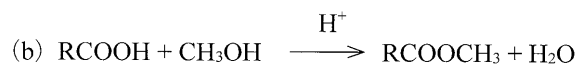
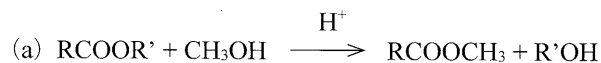
分画・単離 抽出した総脂質から大きく、中性脂質、リン脂質などに分画する場合と、より細かく中性脂質のステロールエステル、トリアシルグリセロール、遊離脂肪酸、ステロール、リン脂質のホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンなど各脂質を単離する場合とがある。シリカゲルを充填した固相抽出カラムは微妙な単離操作には向かないが、カラムに溶液を流すだけであるので簡単に分画が行える⁵⁾。つぎに具体例を示したシリカゲルTLCはどちらにも使える。

TLCガラスプレート(横5 cm, 縦10 cm, シリカゲル厚0.25 mm)に、総脂質のクロロホルム溶液を帯状に着点する。試料スポットの横に混ざらないように標準品をスポットしておいてもよいが、あらかじめ単離したい脂質の移動度を確認しておけば、単離時に標準脂質を用いる必要がなく、混入の危険は防げる。このとき空気中や呼気の水分がシリカゲルに吸着すると本来の吸着力が落ちてリン脂質など極性脂質では展開が乱れるので、着点后10分程度減圧デシケータに入れて乾燥する。中性脂質の展開にはこの乾燥操作は必要ない。展開槽としてインスタントコーヒーの空ビンなど密栓できる広口ビン(無色透明のビンが展開を観察しやすい)にプレートが5 mm程度浸るように展開溶媒を入れる。中性脂質をステロールエステル、トリアシルグリセロール、遊離脂

肪酸などに分離するときは、ヘキサン/*tert*-ブチルメチルエーテル/酢酸(85:15:0.5, 体積比)など、リン脂質をホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルコリンなどに分けるときは、クロロホルム/メタノール/アンモニア水(65:35:5, 体積比)などを用いる。展開は10~15分で終了する。数分間ドラフトあるいは減圧デシケータで溶媒を蒸発させてから、0.001%プリムリンのメタノールまたはエタノール溶液を軽く噴霧する。暗所、365 nmの紫外線ランプ下で蛍光を検出して鉛筆で印をつけておき、目的とするシリカゲルのバンドを削り取る。このとき刃先の鋭敏な専用のプレートスクレーパーか安全カミソリ刃などを用いないとシリカゲルが飛び散ることになる。シリカゲルに吸着した脂質はそのまま脂肪酸メチルに誘導することができる⁵⁾。

脂肪酸メチルの調製 脂肪酸メチルは、脂質試料を酸または塩基触媒を含むメタノールに溶解させて合成する。酸としてはHCl, 硫酸, BF₃, 塩基としてはナトリウムメトキシド, KOHなどが用いられる。KOHのメタノール溶液では、生成するカリウムメトキシドが触媒作用を担っていると考えられる。

酸触媒は、(a) エステル脂質とメタノールとのエステル交換反応(メタノリシス), ならびに(b) 遊離脂肪酸のメチル化の両反応を触媒する。一方、塩基触媒存在下では(c) エステル脂質のメタノールとのエステル交換反応のみが進行する。遊離脂肪酸のメチル化はできない。



酸触媒による遊離脂肪酸のメチル化反応はエステル交換反応よりも速いので、外見上エステル交換反応とみられる脂肪酸メチル合成反応(a)は、実際には微量混在する水によってエステルがその酸触媒の存在下に加水分解されたあと[RCOOR' + H₂O → RCOOH + R'OH], 遊離脂肪酸のメチル化反応(b)が起こった結果であるという可能性もある。

酸触媒として作用するH⁺に対して、メチルエステル合成に機能する塩基触媒は実質的にはメトキシドイオンCH₃O⁻である。そのため、金属ナトリウムを無水メタノールに溶解することによって無水状態で調製できるナトリウムメトキシドのメタノール溶液が、メタノリシスの反応溶液として用いられてきた。一方、KOHや

NaOHを用いた場合では、解離により生成する水酸化物イオン OH^- がエステルに作用し、ケン化反応により遊離脂肪酸（セッケン）を生じると考えられる。しかし、これらアルカリ金属の水酸化物をメタノールに溶解すると、平衡 $[\text{CH}_3\text{OH} + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{O}^- + \text{H}_2\text{O}]$ はメトキシドイオンの生成に偏るため、この溶液にエステルが存在するとメトキシドイオンとの反応（メタノリシス）が水酸化物イオンとの反応（ケン化）よりも1000倍以上早く進行する。したがって、反応時間などの条件設定を誤らなければKOHやNaOHのメタノール溶液をメチルエステル合成に用いても実用上は問題ない。市販のKOHやNaOHには水が含まれており、さらにメタノールに溶解させるとメトキシドイオンとともに水が生成することになって水酸化物イオンが増加するが、手軽に試薬調製できることもあって最近では広く使われるようになってきた^{6,7)}。それでも微量副生する遊離脂肪酸も含めて分析したい場合や、もとの試料に無視できない量の遊離脂肪酸が含まれている場合には、それらをメチルエステルに変換する必要がある。遊離脂肪酸のメチル化は酸触媒を必要とするので、塩基条件で反応させた後に中和量以上の酸触媒を加えて遊離脂肪酸を反応させる。この操作は条件設定が面倒であり、場合によっては危険でもあるが、エステル交換反応を含めてこの一連の操作を簡便かつ効率的に行うことができる試薬キットも市販されている。市販キットも原理的には同じであるが、凍結乾燥した大腸菌や酵母、ラット肝臓などからそのまま脂質抽出操作をすることなく脂肪酸メチルエステルが調製できるなど、さまざまな試料に適用できるように最適化されている⁸⁾。表2に酸触媒と塩基触媒の特徴を比較した。

GC分析 脂肪酸メチルをGCで炭素数、二重結合の数と位置などの違いによって分離するため、30～50 mの高極性キャピラリーカラム、たとえば(50%シアノプロピル)-メチルポリシロキサン（商品名DB-23）などが用いられる。このような高極性カラムを用いると、脂

肪酸メチルは炭素数（気化しやすさ）の順番に、同じ炭素数であれば二重結合数の少ないもの（極性の低いもの）から順に溶出する。脂肪酸種の多い試料で30分程度の分析時間である。定量には、脂肪酸メチル1ピークあたり0.1 μg くらいが適量である。定量分析に広く使われている水素炎イオン化検出器で得られた各脂肪酸メチルのピーク面積の割合は、ほぼ重量百分率を表している。

脂肪酸メチル調製の実験例

脂肪酸メチルの調製が対象試料によってはどれくらい単純かということ、天ぷら油と血液脂質の脂肪酸組成を求める手順を具体例として示してみよう。

塩基触媒を用いた脂肪酸メチルの調製^{6,7)} 小試験管に天ぷら油1滴を取り、ヘキサン2 mlと2 M KOHのメタノール溶液0.2 mlを加えて、試験管攪拌機で2分間攪拌する。これでグリセリド脂肪酸はメチルエステルに変換される。上層のヘキサン層を10倍くらい希釈して1 μl をGCに注入する。

この反応系では、上層にヘキサン、下層にKOH-メタノール溶液の2層が形成される。試料の天ぷら油トリアシルグリセロールは疎水性であるため大部分は上層のヘキサン層に分配するが、触媒が存在していて反応のあるメタノール層に溶解した一部のトリアシルグリセロールは室温で速やかに反応して脂肪酸メチルとなる。ヘキサン層のトリアシルグリセロールは攪拌によって次々とメタノール層に移行してメタノリシスを受ける。生成した脂肪酸メチルはトリアシルグリセロールよりもさらに疎水性が強いので、すぐにヘキサン層に分配する。そのため、微量の水がメタノール層に混入していても、基質トリアシルグリセロールや反応産物である脂肪酸メチルはケン化反応を受けにくいと考えられる。極性脂質であるグリセロリン脂質はメタノールに溶けやすいので反応はさらに速く、15秒で完了する。

このように塩基触媒によるエステル交換反応は速いので、水が混入する条件でも膜の極性脂質であるグリセロリン脂質から脂肪酸メチルを合成することができる。筆者の研究室では、大腸菌の培養液から遠心分離で得た菌体ペレットを湿ったまま、塩基触媒溶液と混合するだけで膜リン脂質脂肪酸をメチルエステルに変換する方法も開発している（未発表）。酵母にも類似の手法が適用できるが、細胞壁を持っているためもう1段階処理が必要である。それでも試験管で混合、インキュベート、遠心分離するというごく単純な操作であり、熟練を要するような技術は必要ない。

大腸菌はシクロプロパン環構造を有する脂肪酸を持つ

表2. 酸触媒と塩基触媒の特徴

比較項目	酸触媒	塩基触媒
エステル交換反応	遅い	速い ^{a)}
遊離脂肪酸のメチル化	進行する	進行しない
処理できる試料量	少ない	多い ^{b)}
遊離脂肪酸の副生	起こりにくい	起こりやすい

^{a)} トリアシルグリセロールから脂肪酸メチルを合成するには、酸触媒では100°C、1時間の条件が必要であり、塩基触媒では室温、2分で完了する。

^{b)} 塩基触媒を含むメタノール溶液は、酸触媒の溶液より少なくとも10倍のエステル処理能力がある。

ているが、この環構造は加熱酸性条件下では分解する。また、制がん作用が注目されている共役二重結合を持った脂肪酸も酸性条件で異性化する。このような酸に不安定なグリセリド脂肪酸をメチルエステルに変換するには塩基触媒が適している。

酸触媒を用いた脂肪酸メチルの調製⁹⁾ 抗酸化剤を含ませた濾紙の小片に血液1滴を着点し、乾燥させてネジ口試験管に入れる。トルエン0.2 ml, メタノール1.5 ml, 8% HClを含む85% メタノール0.3 mlを加え、45°Cで一晩放置する。ヘキサン1 mlと水0.2 mlを加えて脂肪酸メチルをヘキサン層に転溶する。血液に含まれるコレステロールエステル、トリアシルグリセロール、遊離脂肪酸、グリセリン脂質の脂肪酸成分がメチルエステルとしてほぼ定量的に回収できる。

この血液脂肪酸の分析例では、脂質抽出の操作を省いて直接脂肪酸メチルの合成反応を行っている。また、この反応系では触媒として市販の濃塩酸をメタノールに溶解したものをを用いており、一晩45°Cに放置するだけで特別な器具や手間が不要であり、事故の起こる危険性も少ない。なお、スフィンゴ脂質のアミド結合した脂肪酸をメチル化するには100°Cの加熱が必要となる。

メタノールへの脂質の溶解性と塩酸 反応はメタノール溶液中で起こるので、当然脂質はメタノールに溶解していなければならない。ステロールエステルは対象とする脂肪酸エステルの中でも最も疎水性が強く、メタノールには溶けにくい。そのことがステロールエステルの反応が遅い原因でもある。そこで上記血液脂質の反応系ではトルエンを加えて溶解度を上げている。これまで酸触媒を用いる場合はその無水溶液調製法として、(a) メタノールにHClガスを吸収させる、(b) メタノールに塩化アセチルを加える(HClと酢酸メチルが生成する)、(c) メタノールに硫酸を溶解する、という方法がある。また、HCl-メタノール溶液やBF₃-メタノール溶液は市販されている。しかしいずれも一長一短である。たとえば、HClとメタノールは保存中に求核置換反応を起こしてクロロメタンと水を生成するので、市販のHCl-メタノール溶液は購入時点でHCl濃度がかなり下がっていることが多い。当然水も生成している。また、1回分1 mlのアンプル1本700円以上と、単純な試薬であるのに案外高価である。一方、市販濃塩酸は65%が水であるので、触媒としては用いられてこなかった。われわれの研究室で、その濃塩酸を用いて脂肪酸メチルの調製を研究していた大学院生が、トルエン、メタノール、濃塩酸を脂質試料に加えると、温和な温度条件でも遊離脂肪酸とすべてのエステル脂質をほぼ完全にメチルエステル化できる

ことを見いだした。ところが、その大学院生が卒業したのち論文投稿のために追試をしたところ、かなりのステロールエステルとトリアシルグリセロールが未反応のままで残ってしまった。修士論文を見ると完全に反応が進行しているのが確認できる。何度繰り返しても結果は同じであったので、自分も混ぜるだけの操作すら満足にできなくなったかと思ったが、幸いそうではなかった。白煙がたつ濃塩酸を試料試験管1本ずつに入れる作業は、たとえドラフトを使っても気持ちのいいものではないので、濃塩酸をトルエン-メタノール溶液に混合して試料に加えたことが原因であった。遊離脂肪酸やリン脂質は直接この酸触媒溶液を加えても溶解・反応するが、疎水性の強い脂質は濃塩酸に含まれている水のために一部が溶解せず反応がスムーズに進行しないということが判明した。院生はトルエン、メタノール、濃塩酸をその順番で加えていたので、後から濃塩酸を加えてもトルエン-メタノールに溶解した状態がそのまま保たれていたものと思われる。それでも濃塩酸原液をそのまま試薬として使うのは、分析方法の論文としては情けないので、それを改善してようやく投稿論文を書くことができた⁹⁾。脂質の溶解性を見落としていたわけではないが、甘く見ていたことは確かで専門家としては失格であった。

おわりに

脂質研究者は、核酸やタンパク質など他分野の研究者から脂肪酸のGC分析を依頼されたりGC装置の借用を頼まれれば、脂質の重要性が認知されたと感じて自身の存在感をアピールするためにも、たぶん二つ返事でOKするはずである。本稿では脂肪酸分析に関わる反応とその原理の一部を解説したが、GC分析の試料前処理は上記のように混ぜればできあがりという簡単な操作ですむことも多いので、機会があれば気楽に試していただきたい。

文 献

- 1) 日本生化学会編：新生物化学実験講座4 脂質II リン脂質、東京化学同人(1991).
- 2) 日本生化学会編：基礎生化学実験法 第5巻 脂質・糖質・複合糖質、東京化学同人(2000).
- 3) <http://www.cyberlipid.org/>
- 4) <http://lipidlibrary.aocs.org/>
- 5) Ichihara, K. *et al.*: *Lipids*, **46**, 297 (2011).
- 6) Ichihara, K. *et al.*: *Lipids*, **31**, 535 (1996).
- 7) Ichihara, K. *et al.*: *Lipids*, **31**, 889 (1996).
- 8) http://www.nacalai.co.jp/products/recommend/fatty_acid_methylation_kit.html
- 9) Ichihara, K. and Fukubayashi, Y.: *J. Lipid Res.*, **51**, 635 (2010).