

薄層クロマトグラフィーを中心とした動物組織グリセロ脂質分析法の実際

和田, 正太
九州大学農学部栄養化学教室

菅野, 道廣
九州大学農学部栄養化学教室

<https://doi.org/10.15017/23108>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 26 (1/4), pp.505-516, 1972-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

薄層クロマトグラフィーを中心とした 動物組織グリセロ脂質分析法の実際

和田 正太・菅野 道廣

The practical methods for utilization of thin-layer
chromatography to the analysis of glycerolipids
from animal tissues

Masafuto Wada and Michihiro Sugano

I. 緒 言

脂質に関する諸研究は、この成分の水不溶性、不安定性、分析法の特殊性あるいは純粋な成分としての分離の困難さなどのため、他の生体成分の研究に比してかなりの遅れがあつた。しかし、近年ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーなどを主体とする分析法が開発され、さらにそれらを応用した純粋な脂質成分の調製が可能となり、飛躍的な進展を見るに至つた。

脂質成分の分離・分析法に関しては多くの成書があり、^{1)~8)} それらを熟読すれば一応の成績は得られるものの、なお細部については十分とは言ひ切れないのが現状である。他の生体成分と脂質との関連性が深まるにつれ脂質を取り扱う研究分野は増大の一途をたどりつつあり、詳細な指導書の出版は強く望まれているところである。当栄養化学講座では脂質の代謝・栄養を手がけてきて、実験実施上の諸問題についてかなりの知見を得てきた。本編ではこの経験を基にして、動物肝臓および血清(漿)の脂質成分の取り扱い法、分析法などの実際を、実例を示しつつ、特に薄層クロマトグラフィーの実際を中心にして詳細に記載しようと思う。

II. 脂質の抽出法

1. 肝臓脂質の抽出法

肝臓などの組織からの総脂質の抽出法としては Folch らの方法⁹⁾が推奨される。動物を屠殺後、直ちに肝臓を摘出する。通常の実験では肝臓中に残存する血液は脂質分析上問題とならないが、放射性同位元素

を投与した場合などには肝臓摘出前に肝静脈を切断し、注射器を用いて門脈から水冷した生理食塩水を注入し、血液を十分に放出させることが必要である。血液の放出によつて肝臓は黄褐色となる。ラットの場合通常 20~30 ml の食塩水を用いれば十分である。

肝臓を水冷した生理食塩水中で洗い、濾紙を用い水分をふきとつた後ハサミで小片とする。この場合、肝臓を直ちに凍結させ、メスを用いて薄片(約 1 mm 厚さ)に切る方法は極めて有用である。生の場合にはハサミ、秤量紙(パラフィン紙)などにくつついて不便なことが多い。なお、屠殺後直ちに脂質抽出ができない時には、凍結させた状態で N_2 gas を充滿させた容器中 $-20^{\circ}C$ 以下に保存するとよい。

肝臓 5 g を容量約 70 ml のガラス製ホモゲナイザーにとり、20~25 ml のメタノールを加えホモゲナイズする。最終的にはクロロホルム:メタノールの比(v/v)がほぼ 2:1 になるようにメタノールを用いる。5 g の組織を用いた場合 33 ml 使用する。最初からクロロホルム:メタノール(2:1)を用いホモゲナイズすることは比較的困難である(特に筋肉など)。また一定容(組織の 20 倍容)のクロロホルム:メタノール中でホモゲナイズする方法は操作中の溶媒の蒸発損失が大きく定量的な操作が難しい。ホモゲナイズが終つたら回転子部分を液面より上にあげ緩やかに回転しつつメタノールで洗い、ついで 100 ml のメスフラスコへメタノールを用いて洗い移す。この際メタノールは急速に蒸発し、容器にホモゲナイズされた肝臓が強く付着してとれ難くなるので、ホモゲネートが乾燥する前に速やかにメタノールで洗い落してやる。必要量のメタノールでホモゲナイザーから完全に

内容物を洗い移すことは困難であるから必ずしも全部を移す必要はない。ついでクロロホルム約 10 ml をホモゲナイザーに加え再びホモゲナイズし内容をメスフラスコへ移す。このクロロホルムでのホモゲナイズ操作を少なくとも 3 回くり返せば定量的にメスフラスコへ移る。

クロロホルムをメスフラスコの首部の立ち上り部分のすぐ下まで加え、内容が首部へ余り上らないよう注意して混和する。さらにクロロホルムを首部の立ち上がり部分まで追加する。ついで 37~40°C で 30 分加温する。室温まで冷却した後、クロロホルムを標線まで加える。十分に混和し、東洋濾紙 No. 2 を用い 100 ml 容の有栓シリンダーへ濾液を集める。濾過速度は極めて速いが、夏期には溶媒の蒸発を可及的に避けることが必要である(濾液は通常 86~88 ml)。濾液に 20% 容の水を加え水で濡らした栓をしてしばらく置く。ついで栓を強く抑えて 3 回ゆつくりと「てんとう」させて混和する。水を加えた後、直ちに混和すると発熱してしばしば内容物が吹き出すことがある。急ぐ時には急冷させるか、あるいは水を加えた後栓をしないで *swirling* して混和させてから「てんとう」し振とうするとよい。低温室に一夜放置すれば二層に分れる(上層と下層の割合はほぼ 4:6 である)。なお、抽出濾液の一定容を共栓の遠沈管にとり、その 20% 容の水を加え同様の操作後、3000 r. p. m., 10 分遠心分離してやれば二層に分離するので、急ぐ場合にはこの方法がよい。しかし、遠心分離後放置しておくと比較的短時間で下層が濁ってくるがあるので早急に以下の操作に付すことが必要である。

5~10 ml 容の駒込ピペットを用い上層の大部分を除き、ついで先端を内径約 1 mm 位に細くした駒込ピペットを用い上層をできるだけ取り除く。容器の大きさ、「てんとう」混和の程度などによつて二層間に白い *fluff* が生ずることがある。この場合には *fluff* は下層と共に残す。なお、下層のガラス壁部分に水滴が付着して残ることがあるが、これは上層を取り除く前にゆるやかに *swirling* してやると浮上してくる。上層を取り除いた後、さらに Folch らの *pure upper phase solvent* (クロロホルム:メタノール:水, 3:48:47) を用いて下層に乱れが生じないように注意して栓および容器壁を洗い落とし、上述の方法で取り除く操作を 2 回くり返すことが望ましいが、通常の分析実験ではこの操作は省略しても影響はない。

上層を取り除いた後、栓および器壁を少量のメタノールで洗い、*swirling* して混和した後、メタノール

を用いて内容物を Fig. 1 に示すような減圧濃縮装置へ移す。有機溶媒を用いてのこのような洗い移し操作時には容器の口部へ溶媒が *creeping* することは避けられないので、この部分も十分に洗うことが必要である。

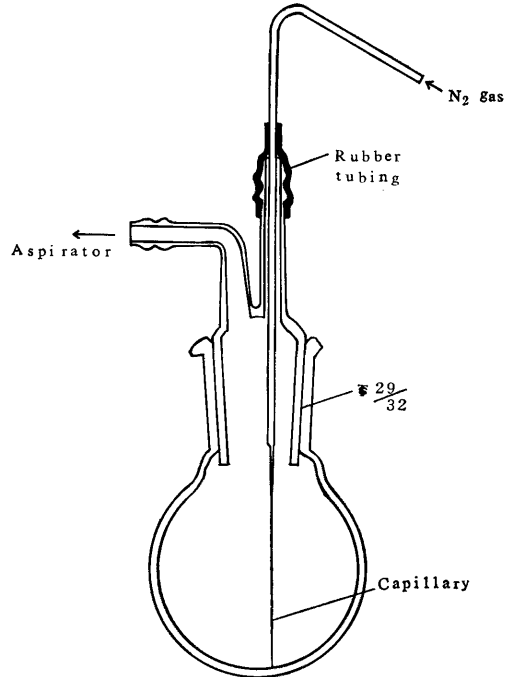


Fig. 1. An example of glass joint evaporator used in our laboratory. The rubber tubing-joint part may be replaced by the glass-joint.

35~40°C の温浴中で N₂ gas を通じながらアスピレーターを用い減圧で溶媒を蒸発させる。クロロホルムが蒸発すると少量の水が残るが、これは少量のメタノールを加えてさらに濃縮を続ければ完全に乾固する。このメタノール添加は 1~2 回必要である。なお、メタノールを加えないでも水は蒸発するが、時間がかかるのでこの操作を勧める。完全に乾固したら駒込ピペットを用い、石油エーテルをアスピレーター接続部から吹き込み、同時に摺り合わせ部分と毛细管部分も十分に洗つて付着する脂質を濃縮フラスコへ洗い落とす。乾固が完全であれば石油エーテル不溶の蛋白質は沈でんし(あるいは器壁に付着したまま)、黄色透明の液が得られるが、しばしば蛋白質が微細になり浮遊することもある。この場合、水分の除去が完全でないと石油エーテルで脂質を定量的に溶解することはできない。

ついで G 4 ガラスフィルターを用いて 25 ml のメスフラスコに濾液を集める。この際、メタノールでの洗い移しの場合よりさらに石油エーテルの creeping に注意し十分に洗つてやる必要がある。また駒込ピペットを用いて移すことも勧められる。濾過が終れば石油エーテルを標線まで加える。この液 1 ml は肝臓 ag に相当する。

$$a(g) = 5 \times b / 100 \times 1/25 = \frac{b}{500}$$

b: クロロホルム-メタノール抽出液の ml 数

次項に記すように、石油エーテル中では脂質は余り安定でないで、溶液が得られたら直ちに分析に供すべきである。石油エーテルを用いる理由の一つはこの溶媒が極めて容易に蒸発するため、サンプリング後の諸操作に有利であるためである。反面、この抽出液から一定量を取つて分析に供する場合には、標線まで加えたら直ちにサンプリングしなければならない。なお、この溶液を -20°C 位で保存しておくとしばしば不溶物が生じることがある。

肝臓以外の組織からも同様の手法で脂質を抽出することができる。特に、試料が少量しか得られない場合には、遠心分離の方法(前出)に従うとよい。濾過に際して濾紙上の残渣およびメスフラスコ内容をクロロホルム-メタノール(2:1)で十分に洗つてやれば脂質の全量を定量的に抽出することも可能である。

2. 血清(血漿)脂質の抽出法

Sperry, Brand 法¹⁰⁾が推奨される。100 ml のメスフラスコ中にメタノール 33 ml を入れ、振りながら血清 5 ml を滴下すると血清は微細な粒子を形成する。急速に血清を加えるとフラスコ底部で蛋白質が附着することがある。クロロホルムを加え、以下肝臓脂質の抽出法に従い操作する。

3. 脂質抽出液の保存法

上述の石油エーテルを脂質の溶解溶媒として用いるのは、その沸点が低く蒸発し易いため、一定容をとつて分析する際に時間の節約ができるためであるが、十分に精製した石油エーテルを用いても、 -20°C で1週間以上保存すると脂質抽出液の色調の変化が著しく、また脂質の酸化も大きい。脂質の溶解性を考えるとき、最も推奨できる溶媒はクロロホルム(特級品に N_2 gas を bubbling したもの)である。この場合、遮光して空気との接触をさけ、 -20°C 以下で保存することが必要である。種々の脂質成分が同時に存在する場合は、脂質は比較的安定であるが、単離すると極めて不安定となる。たとえば、肝臓セファリンは十分

注意して保存しても1週間後には脂肪酸組成にかなりの変化が認められる。 N_2 gas を充滿させたアンプル中での保存法もあるが、いずれにせよ早急に分析することが望ましい。

III. 薄層クロマトグラフィーによる脂質成分の分別法

薄層クロマトグラフィーの開発は脂質の分別法に画期的な進歩をもたらしたと言える。カラムクロマトグラフィーと比較して、多量の脂質を分別する際の不利を除けば、分別法として殆んどすべての点で明らかに優れた方法である。現在では、生体脂質成分の分別、単離はこの薄層クロマトグラフィーによつてすべてが可能であるといつても過言ではない。

1. プレートの調製法

通常用いられるガラス板は厚さ 3 mm の 20×20 cm のものであるが、その他 5×20 cm のものも有用である。 20×20 cm のプレートを用いる場合のシリカゲル(Merck 製シリカゲル G および H) および水の必要量は Table 1 のとおりである。

Table 1. Relationship between the amount of silica gel and water suitable for preparation of thin-layer plates (20×20 cm).

| Thickness of gel layer (mm) | Amounts of gel (g) | Amounts of water (ml) | Plates available (sheets) |
|-----------------------------|--------------------|-----------------------|---------------------------|
| 0.25 | Silica gel G 30 | 60-63 | 5 |
| 0.5 | " 45 | 95 | 5 |
| 1.0 | " 55 | 115 | 3 |
| 0.5 | Silica gel H 45 | 100-105 | 5 |

スプレッターは Desaga type のものを用いるのが一番容易である。必要量のゲルを三角フラスコ(300~500 ml 容)にとり、必要量の水を加え、栓(ゴム栓にパラフィルムあるいはアルミホイルをかぶせたもの)をし、激しく振る(約 20~30 秒)。ゲルと水の混和には種々の方法があるが、この方法が最も簡単で、確実に均一なゲルサスペンションを得ることができる。直ちにスプレッターに移し、一定速度でスライドして薄層を調製する。プレート乾燥用棚に入れ、一夜放置後、所定の温度で加熱活性化する。急ぐ時には扇風機で弱い風を送つてやるとよい。水分の残りが多く、加熱乾燥中に生じた水滴が棚の上段のプレートの裏面につき、下段のプレートの膜面に落ちてくることがある。特に、1 mm 厚さのプレートの場合に起こるので、そのような時には棚に少々傾斜をつけて加熱乾燥

すればよい。加熱乾燥がすんだら直ちに乾燥容器に入れる。市販の乾燥容器は比較的熱に弱く、気密性に乏しいので、大型デシケーターを用いると便利である。乾燥剤は特別な場合を除き、シリカゲル（乾燥用）を用いる。

硝酸銀含有プレートを調製する際も、ゲル量と水量（硝酸銀溶液）は前記と同様であるが、下記の点に注意を要する。硝酸銀溶液を用いると、通常のクロムメッキしたスプレッダーは比較的短期間の使用でメッキがはげ、エッジ部分が侵される。スプレッダーの痛みがひどくなると金属が薄層上に浮遊してくる。このため特殊のスプレッダーが必要となる。外国で市販されているプラスチック製のスプレッダーは重量が軽いので均一な薄層をつくるのにかなりの技術を要する。銀メッキしたスプレッダーの使用も推奨されるが、次のような方法で十分、長期間使用できる。即ち、スプレッダーのゲル充てん部分に固体パラフィンを溶融して均一に薄くコートする。この際、エッジ部分にはパラフィンが付かないように注意する。硝酸銀プレートを調製したら直ちに十分水洗することが必要である。

Solvent front では成分が横に広がる傾向があるので、スポットは 18 cm 展開する場合にはプレートの両横端から少なくとも 1.5 cm はなして打つことが必要である。また各スポットの間も少なくとも 1.5 cm はあけないと隣同志の overlap が起こる。

2. 中性脂質の分離¹¹⁾

110~115°C で 1 時間加熱活性化したシリカゲル G のプレートを用いる。温度、時間は厳密でなくてもよい。厚さ 1 mm のプレートを用いる時には 1.5~2 時間加熱する。十分に加熱することが肝要である。加熱が不十分であると、デシケーターに入れた際水滴が生ずる。一旦活性化したプレートはデシケーター中に保存すれば長期使用に耐える。0.5 mm 厚さのプレートを用いる場合には、プレートを机上水平におき 1 cm 幅あたり脂質量 1~1.5 mg を連続スポットする。点でスポットするより、線としてスポットする方が分離は一般に優れる。スポット量はプレートの厚さに応じて調節する。スポットには手製のガラス製毛細管が最も便利で肉薄のガラス管を用いて作るとよい。毛細管を切るには折りまげた紙ヤスリで軽くこすつてやれば容易に切れる。金属性のヤスリで切るとは難しい。切り口は軸に対して直角にすること。

毛細管の大きさはプレートの厚さのみならず、脂質を溶解した溶媒の種類によつて選ぶべきである。たとえば、0.5 mm 厚さのプレートの場合、直径 2 mm 位

のスポットが得られるような毛細管（外径約 0.8 mm）を選ぶ。石油エーテルの場合に比べクロロホルムを用いる場合にはやや大き目の毛細管が上記のスポットを打つのによいようである。1 mm 厚さのプレートの場合には、スポットの径が 5 mm 位まで大きくするのがよく、多量にスポットするときには 0.5 ml のホールピペットを用いるとよい（厚いプレートほど分離能は劣るようであるが、1 mm のプレートの場合には、スポットを大きく打たないと調製用としてのこのプレートの意味がない。事実、2 mm 径位のスポットを打てば、脂質は極めて少量しか負荷できない）。なお、スポットする脂質の濃度は薄いほどよいが、余り低濃度過ぎるとスポット回数が多く時間を要する。

線としてスポットする場合には、隣り合うスポットの外縁がほぼ接するか、少々重なる位の間隔で連続スポットし、2 回目には第 1 回目のスポットとスポットの間に打ち、3~4 回くり返しスポットするとよい。濃厚な溶液を用いた場合あるいは打ち過ぎの場合には 2 回目以後のスポット時に溶媒の拡がりにムラを生ずる。定量的にスポットする場合には少量の溶媒に溶かした脂質を全量スポットしたのち少量の溶媒で残存する脂質を溶かし再スポットする。この操作を少なくとも 3 回くり返せば定量的にスポットすることができる。

スポットが終り、外見的に溶媒が蒸発したら展開を行なう（溶媒は必ずしも完全にとばす必要はなく、むしろ脂質の酸化を抑える上からも完全に溶媒を追い出すことは望ましくない）。石油エーテル：エーテル：酢酸（82：18：1）で展開を行なう。夏期 25°C 以上の場合には石油エーテル：エーテル：酢酸の比を 85：15：1 位にすると分離がよい。エーテルの割合を減らせば R_f 値が低くなる。展開（上端より 1 cm 下まで。スポットする位置は下端から 1 cm 上であるので、約 18 cm 展開したことになる）が終了したらプレートに風を送つて溶媒をとばす（完全にとばさなくてもよい）。スポットを打つ時および溶媒を追い出すときには N₂ gas 下で行なうことが望ましいが、ラットなど通常の実験動物の組織脂質では迅速に処理すればそれ程の注意はいらないようである。酢酸は風を送つても十分にはとばさないが、それでも差支えはない。溶媒除去後、直ちに 2', 7'-dichlorofluorescein 溶液（0.2% 2', 7'-dichlorofluorescein 95% エタノール溶液。最初に必要な量の水に溶解し所定の濃度にする。種々の発色剤（検出液）のうちでこれが最も使い易い）をスプレーする。風を送つて発色剤の溶

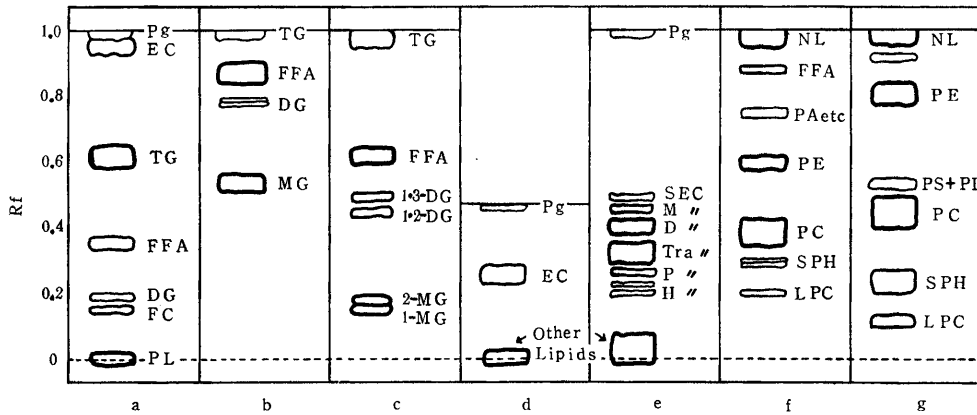


Fig. 2. Thin-layer chromatograms-(1)

Solvents and lipids applied were:

- a; Petroleum ether-diethyl ether-acetic acid (82:18:1). Liver total lipids.
 b; Petroleum ether-diethyl ether-acetic acid (30:70:1). Hydrolysis products by steapsin of liver triglyceride.
 c; Chloroform-acetone (96:4). Samples similar to b.
 d; Cyclohexane-benzene (5:1). Plasma total lipids.
 e; Cyclohexane-benzene (4:1). Plasma total lipids.
 f; Chloroform-methanol-water (65:25:4). Liver total lipids.
 g; Chloroform-methanol-acetic acid-water (25:15:4:2). Liver total lipids.

Abbreviations used were: EC; esterified cholesterol, TG; triglyceride, FFA; free fatty acid, DG; diglyceride, FC; free cholesterol, PL; phospholipid, MG; monoglyceride, PA; phosphatidic acid, PE; phosphatidylethanolamine, PC; phosphatidylcholine, SPH; sphingomyelin, LPC; lysophosphatidyl choline, PS; phosphatidylserine PI; phosphatidylinositol, NL; neutral lipids, Pg; pigments.

S, M, D, Tra, P and H represent saturated, monounsaturated, diunsaturated, tetraunsaturated, pentaunsaturated and hexaunsaturated fatty acids, respectively.

媒を大部分とせば肉眼でも分離された脂質のバンドが見える。U. V. (紫外線) 下ではよりはつきりと見える。下部約 1/3 (遊離脂肪酸画分の下) まで酢酸が上昇しており、この部分はフルオレッセインでの発色は極めて低い、U. V. 下では独特の蛍光を発し容易に確認できる。なおトリグリセリドの位置は量が多ければプレートを光にすかしてみるだけでも確認できるし、また発色させなくても U. V. 下で十分に検出できる。なお、分離の状態は Fig. 2-a に示す通りである。この方法での分離効率(コレステロールエステル(この画分と色素類との分離はよくない)を除いて各脂質について 98% 以上である。

色素をスプレーすることが望ましくない場合(分離された脂質中の放射能活性をゲルの存在下で計測する場合など)には、プレートを I_2 を含む chamber に入れば明瞭な着色が見られる。この場合、酢酸の残存は着色に影響しない。但し、余り強く I_2 を吸収させると I_2 がなかなかとび難いので、各脂質成分の存在位置が可能な程度のできるだけ弱い着色を行なうと

よい。しばらく風乾すれば殆んど I_2 はとぶがリン脂質など不飽和度の高い脂質から I_2 をとばすには風乾後 40~50°C に加温してやるとよい。

3. トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドおよび遊離脂肪酸の分離¹²⁾¹³⁾

この方法はトリグリセリドをリパーゼで加水分解した際の生成物の分離に適用できる。プレートおよびスポットの方法は III-2 と同じである。溶媒は石油エーテル:エーテル:酢酸 (80:30:1 あるいは 30:70:1) を用いる。Fig. 2-b に示すような分離が得られる。80:30:1 の場合、酢酸は 1-3-ジグリセリドと 1-2-ジグリセリドの間まで上昇する。フルオレッセインで検出する。

なお、シリカゲル G を 2% の硼酸を含む水でスプレッドし、110°C、2 時間活性化させたプレートを用いクロロホルム:アセトン (96:4) で展開すると、Fig. 2-c に示すように、1- および 2-モノグリセリドの分離能が優れている。¹⁴⁾

4. コレステロールエステルの分離

a) 総コレステロールエステルの分離¹⁵⁾

プレートおよびスポットの方法は III-2 と同じである。溶媒にはシクロヘキサン：ベンゼン(5 : 1)を用い、約 10 cm 展開させると、Fig. 2-d のような分離が得られる。この方法では色素類は solvent front まで上昇する。なお、冬期特に低温の場合に Rf 値が低過ぎるときにはそのまま風乾し、再度展開すればよい分離が得られる。逆に溶媒の割合を 4 : 1 としてもよい。

b) 各コレステロールエステルの分離¹⁶⁾¹⁷⁾

プレートは III-2 の方法と同じものでよいが、0.5 mm 以上厚いものでは分離がよくない。厚さ 0.25 mm のプレートがよい。スポットはできるだけ小さく打つことが必要である(径 1.5 mm 以下)。シクロヘキサン：ベンゼン(4 : 1)を用い 18 cm 展開する。展開溶媒の極性によつて Rf 値のみならず分離の程度は著しく変動するので注意を要する。シクロヘキサン：ベンゼン(4 : 1)の割合は 15~17°C で用いる比率であつて、夏期には 5 : 1 位まで、冬期には 3.5 : 1 位まで変える必要がある。いずれにしても、テトラエンエステルの Rf 値が約 0.35 になるようにすれば分離は極めて良好である。なお、各コレステロールエステルの分別には出来るだけムラやスジのない均一なプレートを使うよう留意が必要である。分離効率は各エステルについて 95% 以上である。

展開後、プレートを展開槽から取り出し、溶媒臭がなくなるまで風乾し、更にもう 1 回展開する。この際、室温 17°C 以下の場合には展開溶媒 120 ml に対しベンゼン約 4 ml を追加混和して第 2 回目の展開を行なうとよい。分離は Fig. 2-e に示すとうりである。なお、肝臓などの脂質中でコレステロールエステルの濃度が比較的低い組織の場合には、分別に先だつて予じめシリカゲルのカラムクロマトグラフィーあるいは III-4-a の方法で総エステルを集める必要がある。血清の場合、0.5 mm プレートでは、ラットの場合 0.5 ml に相当する脂質を、ヒトでは 0.3 ml に相当する脂質を 3 cm 幅にスポットすればよい。I₂ による検出ではこの量で十分であるが、フルオレッセインを用いる場合には、飽和およびモノ不飽和エステルの分離が明瞭に検出し難いので、これより多目にスポットする必要がある。

なお、硝酸銀含有プレートで各エステルを分別する方法¹⁸⁾は分離能は優れているが、すべてのエステルを 1 回の展開で分別することは難しい。

5. リン脂質の分離

a) シリカゲル G プレートによる方法¹⁹⁾

プレートおよびスポットの方法は III-2 と同じ。展開槽の両面に濾紙を貼つて、予じめ展開溶媒(クロロホルム：メタノール：水、65 : 25 : 4)でしめらし、槽内を溶媒蒸気で飽和しておくことが必要である。展開溶媒は夏期には 100 : 35 : 5.5 がよい。フルオレッセインで検出される。分離は Fig. 2-f に示すとうりである。

b) シリカゲル H プレートによる方法²⁰⁾

2 mM-Na₂CO₃ 溶液でスプレッドしたプレート(シリカゲル H)を用いる。この場合、加熱活性化は 110°C、60 分を厳守しなければならない。一度活性化したプレートはデシケーター中に保存すれば長期使用に耐える。スポットの打ち方は III-2 と同じである。展開溶媒はクロロホルム：メタノール：酢酸：水(25 : 15 : 4 : 2)を用いる。展開槽は予じめ濾紙を貼つて溶媒蒸気で飽和しておく。クロロホルム：メタノール：水系での展開時、濾紙を貼らないとプレート中央部での Rf 値はかなり低くなるので、このような場合には中央部約 3 cm 幅はスポットしない方がよい。フルオレッセインで検出する。Fig. 2-g に分離の状態を示す。この方法によるラット肝臓マイクロゾームでの結果を Table 2 に示す。

Table 2. Concentration of phospholipid components of rat liver microsomes.

| Phospholipids | Percent of total phospholipid phosphorus |
|---|--|
| Phosphatidylethanolamine | 20.9-24.6 |
| Phosphatidylinositol + Phosphatidylserine | 15.2-17.9 |
| Phosphatidylcholine | 48.0-48.7 |
| Sphingomyelin | 7.6-7.8 |
| Lysophosphatidylcholine | 3.9-5.4 |

Male Wistar rats weighing 260-280 g and fed on a commercial pellet (Oriental Rat Chow NMF) were used. Phospholipids were separated into their components by the method of Skipski *et al.*²⁰⁾

c) レシチンおよびリゾレシチンの分離²¹⁾

5-a) と同じ方法で、クロロホルム：メタノール：水(60 : 40 : 5)で展開すればリゾレシチンの Rf 値は高く、またレシチンとの分離状態もよい。レシチンをホスホリパーゼ A で分解した際の生成物の分離に適用する。

6. 脂肪酸メチルエステルの不飽和度による分離²²⁾

シリカゲル G 40 g を 10 g の AgNO_3 を含む 85 ml の水でサスペンドしてプレート調製する (厚さ 0.5 mm 以下). 110°C で 2 時間活性化する. AgNO_3 はシリカゲルと共存するときには光に対する安定性が増すようであるが, できる限り遮光することが必要である. 特に, 加熱活性化時に注意を要する. Ag^+ を含むプレートを用いる場合には, スポットを打つときにも可及的に光に当たらぬようにする. ベニヤ板製のカバーなどを用いると便利である. 展開槽は黒布で包み遮光する. 以下, Ag^+ プレートの場合, この点に十分注意すること.

試料はクロロホルム溶液として出来るだけ小さくスポットする. 展開溶媒は石油エーテル: エーテル (80:20) を用いるが, 温度により Rf 値および分離の程度が変わるので, エーテルの割合を増減する必要がある. 分離は Fig. 3-a に示す.

7. トリグリセリド分子種の分離²³⁾

16% (w/v) の AgNO_3 を含む水とシリカゲル G でプレートを調製し (厚さ 0.5 mm 以下), 遮光した状態で風乾後 120°C で 2 時間加熱活性化する. 0.8% メタノール (特級品) を含むクロロホルム (特級品) を展開溶媒として用いる. プレート中央部にはスポッ

トしないこと. 試料のトリグリセリドはクロロホルム溶液としてできるだけ小さくスポットする. 分離は Fig. 3-b, c に示す. この条件でパルミトイルジリノレオイル型 (SD_2 型) のトリグリセリドまでは明瞭に分別される. SD_2 型トリグリセリドの他 MD_2 , SMTri まではこの条件でかなりよく分画できる (S; 飽和脂肪酸, M; モノ不飽和, D; ジ不飽和, Tri; トリ不飽和). これより総不飽和数の多いトリグリセリドの分別には 3~10% メタノールを含むクロロホルムを用いるとよいが, アラキドン酸あるいはそれ以上の不飽和酸を含むトリグリセリドを各分子種に分離することは極めて困難である.²⁴⁾²⁵⁾ この方法では分別後抽出に際して標準物質 (たとえば pentadecanoic acid, $\text{C}_{15:0}$) を一定量 (トリグリセリド 10~15 mg から分別された各分子種に対し約 250 μg) 加えてやれば分離の程度は完全でなくても各分子種の濃度を計算により求めることができる.²³⁾ ラット肝臓トリグリセリドでの分析値の一例を Table 3 に記す.

8. ジグリセリド分子種の分離²⁶⁾

シリカゲル G を 6% (w/v) の AgNO_3 を含む水でスプレッドしたプレートを用いる (厚さ 0.5 mm 以下). 130°C で 2 時間加熱活性化する. 展開溶媒はクロロホルム: エタノール (94:6). 温度の高低により

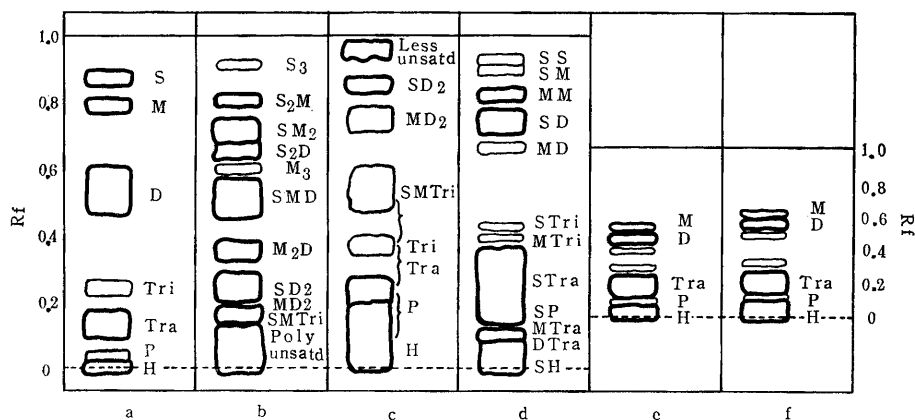


Fig. 3. Thin-layer chromatograms-(2).

Solvents and lipids applied were:

a; Petroleum ether-diethyl ether (80:20). Fatty acid methyl esters from liver triglyceride.

b and c; 0.8% and 3.0% methanol in chloroform, respectively. Liver triglyceride.

d; Chloroform-ethanol (94:6). Diglyceride prepared from liver lecithin by means of phospholipase C.

e; Chloroform-methanol-water (60:30:5). Liver lecithin.

f; Chloroform-methanol-water (55:35:7). Liver cephalin.

For abbreviations see Fig. 2. Lecithin and cephalin (e and f) were separated according to the degree of unsaturation of the fatty acids combined at the 2-position on the molecules.

Table 3. Fatty acid composition of triglyceride species of rat liver.*

| Species | Relative concentration (%)† | Fatty acids (%) | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------|-----------------|------|------|------|------|------|-----------------------|------|------|------|------|------|
| | | 14:0 | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 20:3 | 20:4 | 20:5 | 22:5 | 22:6 |
| S ₃ (0) | 0.7 | 4.6 | 68.4 | 2.5 | 18.2 | 4.2 | 4.0 | | | | | | |
| S ₂ M (1) | 3.0 | 2.7 | 54.8 | 4.5 | 9.7 | 26.9 | 1.4 | | | | | | |
| SM ₂ (2) | 6.2 | tr | 31.1 | 1.7 | 3.9 | 59.4 | 2.3 | (20:1, 1.6) | | | | | |
| S ₂ D (2) | 3.5 | tr | 52.6 | 4.6 | 5.9 | 11.5 | 25.4 | | | | | | |
| M ₃ (3) | 0.1 | tr | 56.3 | 3.7 | 8.1 | 5.6 | 26.2 | | | | | | |
| SMD (3) | 17.3 | tr | 26.6 | 1.8 | 2.0 | 35.4 | 33.1 | (20:1, 1.0) | | | | | |
| M ₂ D (4) | 6.1 | tr | 5.9 | 3.8 | 1.3 | 52.8 | 33.1 | (20:1, 3.0) | | | | | |
| SD ₂ (4) | 13.3 | tr | 29.9 | 1.2 | 2.2 | 2.6 | 64.2 | | | | | | |
| SMTri (4) | 0.8 | | | | | | | | | | | | |
| Polyunsatd. (≥5) | 47.8 | tr | 19.4 | 1.6 | 1.6 | 15.1 | 37.3 | 4.9 | 0.4 | 2.7 | 2.1 | 4.2 | 9.4 |
| | | | | | | | | (20:1, 0.6; Unk, 0.8) | | | | | |

Male Wistar rats weighing 250–260 g and fed on a commercial pellet (Oriental Rat Chow NMF) were used. Hepatic triglyceride was separated into the molecular species by using a 0.8% methanol in chloroform mixture as developing solvent.

* Abbreviations used were: S; saturated fatty acids, M; monounsaturated, D; diunsaturated, Tri; triunsaturated. tr; trace. unk; unknown. Figures in parentheses represent number of unsaturation.

† Relative concentration of each species was determined using pentadecanoic acid as a calibration standard and applying the equation described by Privett *et al.*²²⁾

Table 4. Fatty acid composition of molecular species of diglyceride prepared from hepatic lecithin of male rat.*

| Species | Relative concentration (%)† | Fatty acids (%) | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------------------------|-----------------|------|------|------|------|-----|------|------|-----|------|------|------|
| | | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | Unk | 20:3 | 20:4 | Unk | 20:5 | 22:5 | 22:6 |
| SS | 0.9 | 56.4 | 16.7 | 15.5 | 11.5 | | | | | | | | |
| SM | } 6.0 | 73.4 | 1.0 | 14.6 | 11.0 | | | | | | | | |
| MM | | 34.4 | 2.1 | 11.9 | 40.1 | 11.4 | | | | | | | |
| SD | 33.5 | 27.3 | 0.4 | 21.0 | 1.6 | 49.7 | | | | | | | |
| MD | 4.4 | 2.9 | 3.3 | 1.1 | 35.8 | 54.1 | 2.8 | | | | | | |
| STri | } 1.8 | 7.4 | 0.4 | 10.1 | 0.9 | 69.0 | — | 12.2 | | | | | |
| MTri | | 23.6 | 1.4 | 20.1 | 4.2 | 8.5 | — | 36.0 | 6.1 | | | | |
| STra | 36.0 | 19.7 | 0.8 | 23.7 | 4.7 | 1.1 | — | — | 50.0 | | | | |
| MTra | } 5.7 | | | | | | | | | | | | |
| DTra | | | | | | | | | | | | | |
| SP | 2.7 | 17.7 | 0.9 | 12.5 | 2.6 | 13.9 | 3.8 | — | 20.5 | 1.9 | 13.4 | 13.0 | |
| SH | 8.6 | 32.1 | tr | 16.0 | 3.6 | 2.7 | — | — | 2.5 | — | — | — | 43.0 |

Wistar rats weighing 250–260 g and fed on the commercial pellet were used. Diglyceride was obtained after treatment of lecithin with phospholipase C (*Cl. welchii*). Developing solvent; CHCl₃: C₂H₅OH=94:6, v/v.

* Abbreviations used were: Tra; tetraunsaturated fatty acid, P; pentaunsaturated, H; hexaunsaturated. For other abbreviations see footnote of Table 3.

† See Table 3.

エタノールの割合を増減する。スポットは III-6, 7 と同様に打つ。分離の状態は Fig. 3-d に示す。この方法はレシチンをホスホリパーゼ C で分解して得られた 1, 2-ジグリセリドの分子種への分別に適用する。ラット肝臓レシチンでの結果の 1 例を Table 4 に示す。

9. リン脂質 (レシチンおよびセファリン) の分子種の分離²⁷⁾

15 g の AgNO₃ を含む水でサスペンドしたシリカゲル H (45 g) を用いプレート調製する。活性化は

190~195°C で 2.5~4 時間行ない、P₂O₅ を含む褐色デシケーター中で 90~120 分放冷する。放冷時間は厳守しなければならない。放冷後プレートはなお温かいが、そのまま使用する。リン脂質として最大 10 mg を 12~15 cm 幅にスポットする。但し、プレート中央部は Rf 値が極端に低くなるので、できるだけ中央部をさけて小さくスポットする。スポットの位置は下端から 2.5~4 cm (特にセファリンの場合高くする必要があるので)。この方法は温度、湿度の影響を受けること

Table 5. Fatty acid composition of molecular species of liver lecithin and cephalin from rats fasted for 35 hours.*

| Molecular species | Percentage concentration | Fatty acids (%) | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|
| | | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 20:4 | 22:6 |
| Lecithin | | | | | | | | |
| Monoenoic | 6.4 | 39.0 | 2.2 | 20.4 | 33.2 | 4.0 | | |
| Dienoic | 20.2 | 21.7 | 0.5 | 26.4 | 2.6 | 48.2 | | |
| Tetraenoic | 48.7 | 11.0 | 0.2 | 37.4 | 1.0 | 0.2 | 49.7 | |
| Hexaenoic | 24.6 | 15.9 | 0.7 | 27.3 | 1.4 | 1.6 | 2.1 | 47.3 |
| Unfractionated lecithin | | 15.0 | 0.3 | 31.4 | 3.2 | 11.0 | 26.4 | 11.0 |
| Cephalin | | | | | | | | |
| Monoenoic | 2.2 | 24.7 | 6.3 | 25.3 | 26.5 | 10.2 | 0.7 | |
| Dienoic | 10.7 | 18.3 | 1.7 | 29.4 | 4.5 | 44.3 | 0.6 | |
| Tetraenoic | 34.0 | 8.9 | 0.5 | 37.9 | 1.4 | — | 49.4 | 0.5 |
| Hexaenoic | 53.1 | 17.4 | 0.6 | 24.5 | 0.9 | — | 3.9 | 49.0 |
| Unfractionated cephalin | | 13.1 | 0.1 | 29.0 | 1.5 | 5.9 | 20.9 | 26.5 |

Female Wistar rats weighing 190-230g and fed on the commercial pellet ration were used.

*The percentage concentration of each molecular species which was separated according to the degree of unsaturation of fatty acids at the 2-position was determined by the internal standard (pentadecanoic acid) method (see Table 3).

が極めて大きいので、展開は 20~25°C で行ない、スポットはできる限り手早く行なう。展開溶媒はレシチンの場合、クロロホルム：メタノール：水（60：30：5）セファリンの場合、55：35：7 を用いる。溶媒の上昇速度は比較的遅く、展開が進むとプレートの濡れに独特の様相が見られる。Solvent front よりかなり遅れて、恐らくは水分によるプレートの変化と思われる部分が生ずる。つまり、プレートの濡れ方が front 部分と全く異なり白っぽく見えるのがわかる。特にセファリンの場合に著しい。スポットの位置が高いのはこの部分の上昇の影響を避けるためであつて、この部分がスポット位置のすぐ下まできたら展開を終らせる。レシチンの場合、展開は通常 solvent front がプレートの約 70% の高さまで上昇したときに終了する。風乾後フルオレッセインをスプレーするとレシチン（セファリン）の 2 位の脂肪酸の不飽和度によつて、Fig. 3-e, f のような分離がえられる。プレートの活性化が不十分な場合や放冷時間が長過ぎる場合には、モノエン型とジエン型の分離が悪い。なお、放冷後プレートを取り出しスポットを打ち、直ちに次のプレートを取り出しスポットしても、2 回目のプレートでの分離は 1 回目のそれよりかなり劣るので必要量以上のプレートは作らないこと。ラット肝臓での結果の 1 例を Table 5 に示す。

10. 薄層プレートからの脂質抽出法

発色させた各脂質成分は注射針でマークし、厚手のカミソリ（片刃）ではぎとり、ガラスフィルター（G 3 または G 4）、あるいは市販の脱脂綿をエーテルで再

脱脂した綿をつめた小型カラムへ移す。これに下記の溶媒を加え、ゲルから脂質を抽出する。しばしばゲルがかたまることがあるのでよく混和して均一のサスペンションになるよう注意する。ゲルの面積 10~20 cm² 当り（0.5~1.0 mm プレートの場合）15~20 ml の溶媒を用いれば抽出は定量的である。なお抽出時、濾過器の洗浄、特に足部へのクリーピングに注意を要する。

a) 中性脂質の抽出法²⁸⁾

Ag⁺ を含まないプレートで分別したトリグリセリド、ジおよびモノグリセリド、遊離脂肪酸、コレステロール（遊離およびエステル型）などはクロロホルム：メタノール（2：1）抽出が簡単でよい。小型共栓試験管に集めた抽出液をその 20% 容の水とゆるやかに混和し（II の抽出法参照）、遠心分離あるいは低温室に放置すれば二層に分かれる。上層の水-メタノール層を駒込ピペットでできるだけ完全に取り除いた後、少量のメタノールで栓および器壁を洗い、35~40°C に加温しつつ N₂ gas を吹き込んで蒸発乾固させる。しばしば水滴が残ることがあるが、少量のメタノールを加えてやれば容易に完全に乾固する。フルオレッセインでプレート上の各脂質を検出した場合、少量の色素が脂質と共存するが、石油エーテルに溶かしてやれば色素は不溶でほとんどが除かれる。回収率は定量的（97% 以上）である。なおトリグリセリドはエーテルでも抽出できる。

中性脂質から色素を完全に除去する必要がある場合には、²⁹⁾ 乾固させた脂質をエーテル：ヘキサン（1：

1) に溶解し、等容の水：メタノール：トリエチルアミン混液（5：5：1）を加えよく振り静置する。色素は下層に移行するので、上層のエーテルヘキサン層を集め再びトリエチルアミン混液を加え同様にして上層を回収する。この操作を3回くり返せば色素は完全に除きうる。なお、遊離脂肪酸はこの方法では少量の損失をとまうようである。なお、トリ、ジ、モノグリセリドの抽出は次項b)の方法に準じてよい。 Ag^+ が存在しない場合には食塩水を加える必要はない。

b) トリグリセリド、ジグリセリド分子種の抽出法³⁰⁾

Ag^+ を含むプレートからのこれら脂質成分の抽出には、10%のメタノールを含むエーテルを用いるとよい。極めて少量の Ag^+ が抽出液に入ってくる。 Ag^+ の存在が以後の分析に支障をきたす場合には抽出に先立つてゲルを1%の食塩を含む90%メタノール溶液でしめらし、よく混和後上記の溶媒で抽出する。食塩を含むメタノールを加えると、ゲルの色が黄褐色に変るのでこの液の必要量がわかる。

c) リン脂質の抽出法³¹⁾

レシチン、セファリン、リゾレシチンなどの抽出にはクロロホルム：メタノール：酢酸：水（50：39：1：10）がよい。抽出後この溶液の1/3容の4M- NH_4OH 溶液を加えよく振る。遠心分離あるいは静置すれば色素は上層へ移行するので駒込ピペットでこれを除く。栓および器壁をアンモニアと同容の1：1-メタノール：水で下層のクロロホルム層に乱れが生じないように洗う。この洗液を除去後、同容の水-メタノール混液を加えよく振り遠心分離し上層をすてる。この操作を合計3回くり返すと色素は完全に除かれる。回収率は97%以上である。なお、いずれの操作の場合にも、洗滌液を加えて直ちに振ると内容がふき出すので、しばらく放置するか冷却してやるとよい。夏期には特にこの点注意を要する。

この方法は Ag^+ を含むプレートからの抽出にも適用できるが、 Ag^+ を完全に除去するにはアンモニア洗滌後、0.5%の食塩を含む水-メタノール混液（1：1）で1回洗い、ついで上述と同様の操作に付せば目的にかなう。なお、食塩含有の水-メタノール混液で洗っても AgCl が沈澱してくることは殆んど起こらないので、特別の場合を除きこの操作は省略してもさしつかえない。

IV. 溶媒の精製法

1. 石油エーテル（沸点 30~60°C）

総ガラス製蒸留装置を用い、試薬一級品を蒸留し、所定の沸点の留液を集める。特級品を用いる場合にも再蒸留するがよい。なお、蒸留前に1/2~1/3容の濃硫酸と振つて硫酸層の着色の有無を確かめておくこと。通常は殆んど認められないが、着色があれば洗液が中性になるまで水洗し無水芒硝で脱水して蒸留する。

2. リグロイン（沸点 90~120°C）

石油エーテルと同様処理して用いる。石油エーテルに比べ沸点が高いこと、クリーピングする程度が少ないことなどから利用度は高い。

3. メタノール

試薬一級品を再蒸留して用いる。混在するアルデヒド類を除くため、過マンガン酸カリ存在下で還流することが望ましいが、通常は再留だけで十分である。なお、特級品はそのまま十分使用に耐える。

4. エタノール

メタノールと同様処理して用いる。

5. クロロホルム

脂質の抽出、薄層クロマトグラフィーなどには、試薬一級品をそのまま用いてよい。脂質の保存溶媒としては特級品がよい。また、 Ag^+ シリカゲルプレートを用いるトリグリセリド、ジグリセリド、リン脂質などの分子種の分別には特級品を用いるがよい。クロロホルムには安定剤として数パーセント以下のエタノールが添加されているが、これは問題にならない。

6. ジエチルエーテル

試薬一級品から予じめ過酸化物を除く必要がある。特級品についても同様である。試薬の標示には過酸化物はマイナスとなっているが、必ずこの操作に付すこと。特に夏期には必要である。

エーテルを大型の分液漏斗にとり、その1/3容の5% FeSO_4 溶液と激しく振り下層は捨てる。上層のエーテルを少なくとも合計4回同様に FeSO_4 溶液で洗った後、3~4回水洗し、 CaCl_2 を用い低温室内で一晩脱水する。なお、市販の FeSO_4 はしばしば酸化されていることがあるので注意を要する。 CaCl_2 で脱水後、蒸留して用いる。精製したエーテルは褐色ビンに入れ、冷蔵庫中で保存すれば比較的長期（数カ月）は安定である。保存する際には、容器一杯につめ、できるだけ空間部を少なくすることが安定性および保存庫内の温度変化に対する危険性を少なくする面から必要である。

7. その他の溶媒

ヘキサン, ベンゼン, アセトン, シクロヘキサンなどは特級品を使えば問題はない. 通常の薄層クロマトグラフィーには一級品で十分である.

V. 結 論

本論文は動物体組織の脂質分析法に関し, 特に薄層クロマトグラフィーの応用の実例を中心に記載したものである.

脂質の栄養ないしは生理的役割は, 究極的には生体内における脂質の存在状態に関連する. 膜の構成成分, 酵素の Co-factor としてなどであり, 蛋白質・糖質との結合様式のみならず, 脂質そのものの構造・分子組成などが密接な関係をもつことになる. このような趨勢の中で, 脂質以外の生体成分を専攻する研究にとつても脂質分析はかなりの比重を占めるようになってきているが, 脂質の水不溶性, 不安定性, 純粋物を得ることの困難性などのため取り扱いにかなりの難点があつた. 近年ガスクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーの開発により上述の諸問題は分子レベルで取り扱い得るようになった. これに伴い脂質分析法に関する多くの成書が刊行されてきたが, いずれも実施上の諸問題点を具体的に示されておらず, 他分野ないしは初心者にとつてはなお十分なものとはい切れない現状にある. 本編では, 極めて具体的にこれらの要望を満すべく書かれた. また実例として, ラット肝臓および血清(漿)での分析結果を併記し, 一層の普及性を高めている.

本研究の結果は長年に亘る栄養化学講座での結晶の一部であり, 実際に経験を重ねた多くの教員, 大学院生, 卒論学生の諸氏に深甚の謝意を表す.

文 献

- 1) M. G. Horning: *Lipid Pharmacology* (ed. R. Paoletti), p.2, Academic Press (1964).
- 2) 丹羽正治, 北村元仕, 齊藤正行(編): *臨床化学分析 III*, 東京化学同人(1966).
- 3) *生物化学実験法 VII*, 脂質実験法, 共立出版(1967).
- 4) *生物化学実験法 VIII*, 脂質代謝実験法, 共立出版(1967).
- 5) 安藤鋭郎, 寺山宏, 西沢一俊, 山川民夫(編): *生化学研究法 1*. 朝倉書店(1967).
- 6) G. V. Marinetti (ed.): *Lipid Chromatographic Analysis*, Vol. 1, Mergel Dekker (1967).
- 7) J. M. Lowenstein (ed.): *Methods in Enzymology*, Vol. 14, Academic Press (1969).
- 8) 舟橋三郎, 原一郎, 山川民夫(編): *脂質 1*. 共立出版(1970).
- 9) J. Folch, M. Lees and G. H. Sloane-Stanley: *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1957).
- 10) W. M. Sperry and F. C. Brand: *J. Biol. Chem.* **187**, 97 (1950).
- 11) G. Schlierf and P. Wood: *J. Lipid Res.* **6**, 317 (1965).
- 12) M. Noda and R. Ikegami: *Agr. Biol. Chem.* **30**, 330 (1966).
- 13) V. M. Sardesai and J. A. Manning: *Clin. Chem.* **14**, 156 (1968).
- 14) A. E. Thomas, III, J. E. Scharoun and H. Ralston: *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **42**, 789 (1965).
- 15) O. W. Portman and M. Sugano: *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 532 (1964).
- 16) 菅野道廣, O. W. Portman: *九大農学芸誌*, **22**, 157, 173 (1966).
- 17) M. Sugano: *Biochem. J.* **122**, 469 (1971).
- 18) L. J. Morris: *J. Lipid Res.* **4**, 357 (1963).
- 19) H. K. Mangold: *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **38**, 708 (1961), **41**, 762 (1964).
- 20) V. P. Skipski, R. F. Peterson and M. Barclay: *Biochem. J.* **90**, 374 (1964).
- 21) M. Sugano, S. Cho, K. Imaizumi and M. Wada: *Biochem. Pharmacol.* **19**, 2325 (1970).
- 22) O. S. Privett, M. L. Blank, D. W. Coddington and E. C. Nickell: *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **42**, 381 (1965).
- 23) M. L. Blank, B. Verdino and O. S. Privett: *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **42**, 87 (1965).
- 24) J. N. Roehm and O. S. Privett: *Lipids* **5**, 353 (1970).
- 25) M. Sugano, K. Imaizumi, S. Cho and M. Wada: *Lipids* **6**, 141 (1971).
- 26) L. M. G. van Golde, W. A. Pieterse and L. L. M. van Deenen: *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 84 (1968).
- 27) G. A. E. Arvidson: *J. Lipid Res.* **6**, 574 (1965).
- 28) M. Sugano, K. Imaizumi, S. Cho, K. Hori and M. Wada: *Biochem. Pharmacol.* **18**, 1961 (1969).
- 29) H. Brockerhof: *Can. J. Biochem.* **44**, 1519 (1966).
- 30) S. P. M. Slakey and W. E. M. Lands: *Lipids* **3**, 30 (1968).
- 31) G. A. E. Arvidson: *Eur. J. Biochem.* **4**, 478 (1968).

Summary

This paper was described as plainly as possible the practical methods for analyzing lipid components of animal sources. The particular interests were paid to the introduction of the thin-layer chromatographic procedure for the lipid analysis. The data obtained in our laboratory with the rat liver and plasma were also presented for the convenience.