



Title	脂質の分析II
Author(s)	Itabashi, Yutaka
Citation	オレオサイエンス, 15(9), 431-436
Issue Date	2015
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/64898">http://hdl.handle.net/2115/64898</a>
Type	article
File Information	oleo_science_2015.pdf



[Instructions for use](#)

基礎講座 第13回

脂質 (第6回)

脂質の分析Ⅱ  
Analysis of Lipids (Ⅱ)

北海道大学名誉教授 板橋 豊

Yutaka Itabashi

Emeritus Professor, Hokkaido University

1. はじめに

油脂・脂質の研究では、目的に応じて種々の機器や方法が使用されるが、その中で誰もが一度は経験し、今日広く用いられている便利なものは以下の3つであろう。薄層クロマトグラフィー (TLC)、ガスクロマトグラフィー (GC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)。何は無くとも TLC プレートさえあれば、抽出物にどんな脂質が含まれているか推測できるし、ましてや GC と HPLC が使えたら鬼に金棒、脂肪酸や脂質の精密な分析が可能になる。機器の原理や分析法の詳細は成書・その他<sup>1-3)</sup>に譲るとして、ここでは GC と HPLC について、知っていたら脂質の分析に役立つと思われることの幾つかを (基礎的知見, トラブル対策, ノウハウ等) 筆者の経験を交えて紹介する。

2. 分離度と理論段数

GC と HPLC で、ピーク間の分離の程度を議論するとき、クロマトグラムの見かけで分離のよし悪しを判断するだけでなく、分離度、分離係数、理論段数等を計算して数値で示すことが要求される。このことは、より良い分離を得るためにカラムの状態を的確に把握すること、すなわち、カラムの劣化の程度を知ることに役立つ。最近の化学結合型固定相のカラムは耐久性に優れており (寿命が長い)、GC の場合はベースラインが不安定になったり、ピーク分離が悪くなる前に、保持時間が徐々に短くなる。そのまま使い続けても問題ない場合 (実際、カラム温度を少し下げることでそれまでとほぼ同様の分離を得ることができる)、報告書にその時の分析条件を記しても他の分析機関では再現できない恐れがある。時々以下の式を使ってクロマトグラム (Fig. 1) から分離度や理論段数を計算し、バリデーション実施時 (新品使用開始時) と比較するとカラムの劣化の程度が分かる。数値が大きく変化した場合は、たとえまだ使えるカラムで

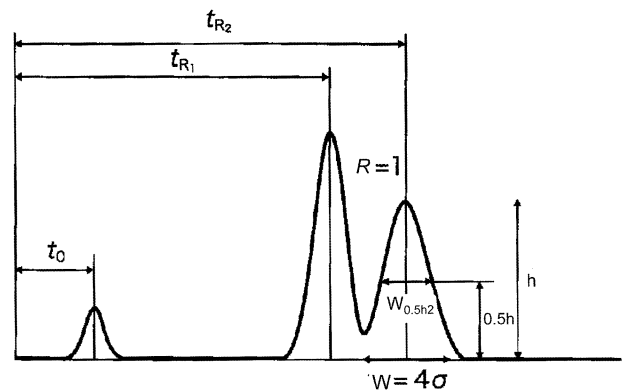


Fig. 1 クロマトグラムとパラメータ<sup>4)</sup>

あっても発表用には控えるか使用履歴を明記して報告する。

$$R = 1.18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{0.5h1} + W_{0.5h2})$$

$$k = (t_R - t_0) / t_0$$

$$\alpha = k_2 / k_1 = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0)$$

$$N = 5.54 \times (t_R / W_{0.5h})^2$$

各パラメータの内容を以下に簡単に記す。 $R$  (resolution): 分離度 (2つのピークの間隔を示す。 $R=1.5$  のとき2つのピークはほぼ完全に分離され、数値が小さいほどピーク間の重なりが大きい),  $t_R$ : 保持時間 (試料注入時からピーク頂点が現われるまでの時間),  $W_{0.5h}$ : ピークの半値幅 (ピーク高さ  $h$  の半分でのピーク幅),  $k$  (retention factor): 保持係数 (値が大きいほど、充填剤に含まれる固定相の量が多い),  $t_0$ : ホールドアップタイム (移動相のカラム通過時間 = 固定相に全く保持されない物質の溶離時間。 $t_0$  を求めるには幾つかの方法があるが、GC の場合はヘキサン等の溶剤ピークの立ち上がり、HPLC では注入後最初に現われるベースラインの乱れを利用するのが簡単である),  $\alpha$  (separation fac-

tor) : 分離係数 (分離度と同様2つのピークの間隔を示す指標である)。 $N$  (theoretical plate) : 理論段数 (カラムが多数の段から構成されていて、各段で分離が起こっていると考えたときの段の数。この値が大きいほどカラム性能が高い)。これらの値の幾つかはカラム購入の際、テストサンプルのクロマトグラムに添付されているが、目的の脂質サンプルを分析してデータを残しておく。

### 3. GC

#### 3.1 装置

2次元GCやバックフラッシュGCなど最近のGC技術の進歩には目覚ましいものがある。これらの機能を有する装置を用いれば、通常のGCでは得られない精密な分離と分析時間の短縮など分析の高効率化が達成されるので (特に資金に) 余裕のある読者は試されたい。GC-MS (質量分析法) 装置を購入する機会があれば、水素炎イオン化検出器 (FID) をオプションとして付け加えたい。カラムから流出するキャリアガスをスプリットして、一部をMSへ、残りをFIDへ送り込むもので、MSによる成分の構造解析とFIDによる定量分析が1台のGC装置で同時にできるので便利である (Fig. 2)。また、1台のGC装置に2つのFIDがあると (オープン1つ)、同一種類のカラムや異種カラムを2本装着できるので、分析検体が多い場合や異なった分離パターンを得るのに便利である。両クロマトグラムを比較することによって未知成分の検出や成分の同定に役立つ情報が容易に得られる。

#### 3.2 カラム

HPLCが普及した今日、脂質の分析にGCを使う機会は少なくなったが、脂肪酸の組成分析はGCの独壇場である。理由は数十成分を含む生物由来の脂肪酸を分析した場合、HPLCに比べて圧倒的によい成分間の相互分離が得られるからである。通常、スプリット方式で試料は注入されるので、1/20~1/50の試料がカラム内に導入

されるが、ピークが小さすぎる場合はスプリットレス方式で注入するとほぼ全量の試料がカラム内に入るので感度は飛躍的に上がる。感度 (試料) 不足でGCでの分析を諦める前にこの方法を試してみたい。それでも不十分な場合やごく微量の遊離脂肪酸を検出したいときは、脂肪酸を蛍光誘導体 (ADAM) に変えて蛍光検出HPLCで分析する。この場合はフェムトモルレベルでの検出が可能となる<sup>2, 3)</sup>。

どんな種類のどの程度の長さのカラムを使用するかは、試料と目的によって異なるが、通常の植物油や魚油の脂肪酸分析には迷わずにワックス系のカラム (たとえば、中極性の poly-ethylene glycol 液相) を使うと満足できる結果が得られる。長さは30 m、膜厚は0.2  $\mu\text{m}$ 、内径は0.25 mmでも0.32 mmでも分離はほとんど変わらない。Non-methylene interrupted (NMI) 脂肪酸を含むために複雑な組成を示す魚介類の脂肪酸の分析には、より長いカラム (50~60 m) を使用する<sup>6)</sup>。トランス脂肪酸 (共役脂肪酸を含む) の位置異性体分析には以下で述べる強極性または無極性のカラムを使用すると良い分離が得られる<sup>2, 3, 7)</sup>。脂肪酸 (通常メチルエステルとして分析する) のカラムからの流出時間は固定相 (液相) の極性によって大きく異なる。極性の小さい脂肪酸メチルエステルの極性液相に対する溶解度は小さいため、極性カラムは非極性カラムよりも早くメチルエステルを流出させる。強極性のシアノプロピルシロキサンやイオン液体を固定相に使用すると100 mやそれ以上の長さのカラムでも脂肪酸分析が可能になるのはこのためである。流出パターンの特徴として、非極性カラムは炭素数別分離に優れ、極性の大きいカラムは不飽和度別分離に優れている。たとえば、無極性カラム (poly-dimethylsiloxane 液相) では、16:0, 18:3, 18:2, 18:1, 18:0, 20:3, 20:2, 20:3, 20:0の順 (分子量順、沸点順) に流出するが、強極性カラム (poly-biscyanopropylsiloxane 液相) では20:0, 18:3, 22:0, 20:3, 20:4, 24:0, 20:5, 22:6の順に流出し、不飽和成分が強く保持される。このような特徴を知って両カラムを用いると各成分、特に少量成分の検出と同定が容易になる。

#### 3.3 キャリアガス

窒素、ヘリウム、水素等がキャリアガスとして利用できる。Fig. 3に3種のガスの平均線速度とカラム効率 (HETP: Height equivalent to a theoretical plate = 1 理論段当たりのカラムの長さを mm 単位で表したもの。小さいほど高性能のカラムといえる) の関係を示す。窒素は安価で扱い易いが、最適線速度が小さく、最適流速域も狭いため、分析時間が長くなる欠点をもつ。水素は

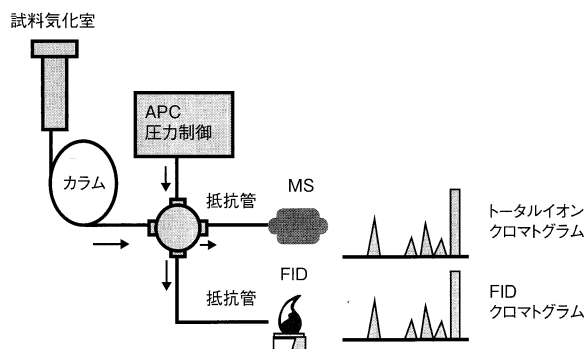


Fig. 2 GC 検出器の分岐<sup>5)</sup>

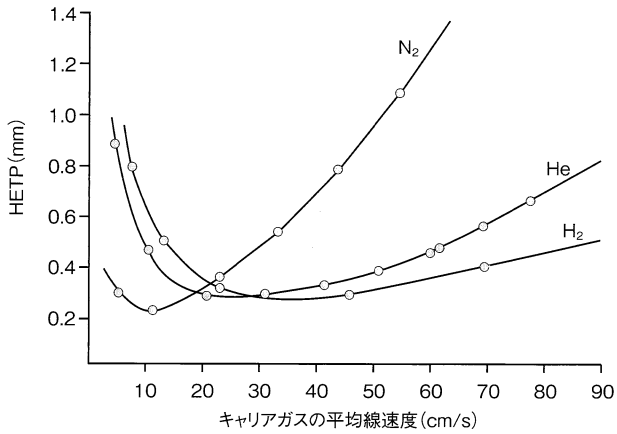


Fig. 3 キャリアガスの HETP プロット<sup>1)</sup>

安価で入手しやすく、高い拡散性を持ち最適流速域が広く、キャリアガスとして優れた性質を有するが、安全面での心配から敬遠されがちである。こうしたことから、通常、高価だが安全で比較的広い最適流速域をもつヘリウムが今日広く使用されている。筆者はガラスキャピラリーカラムの時代からキャリアガスに水素を使用して脂質を分析しているが<sup>8)</sup>、他のガスよりも低い温度で脂質成分が流出することから、耐熱性の低かった当時のガラスカラムの寿命を延ばすのに役立った。耐久性とカラム効率が大幅に向上した今日のフューズドシリカカラムを用いる脂肪酸分析ではヘリウムと水素の違いをほとんど実感できないが、ワックスエステルやトリアシルグリセロール (TAG) など脂質高沸点成分の分析や高速 GC (Fast GC) には水素が必須である<sup>2, 3, 8)</sup>。最近、ヘリウムガスの供給が滞ったことから、その代替として水素ガスに関心もたれている。最近の GC 装置は水素キャリアガスに対して安全を考慮したつくりになっている。このことを確認した上で、ガス漏れチェックを日常的に行って排気にも注意しながら水素を使用すれば (そもそも FID に水素を使用している) 深刻な事故は起こりえないと信ずる。なお、水素をキャリアガスに用いた場合、カラム内での不飽和脂質の還元 (水素添加) を心配されるかもしれないが杞憂である。

### 3.4 トラブルシューティング

美しいクロマトグラム (優れた分離, 良い定量値) を得るためには装置が保証する高い感度で安定したベースラインを保つことが必要である。ベースラインの異常 (ドリフト, うねり, ノイズ等) が現われた時は、以下のことをチェックして解決したい。うねりやドリフトなどはカラムの劣化によっても起こるが、注入口インサート (ライナー) の汚れやキャリアガス圧の変動 (不安定) が大きな原因となる。スパイク状のノイズは FID の汚れや腐食によることが多い。インサートの汚れは試料中の不

揮発性成分等が繰り返し注入されて発生する。脂質から脂肪酸メチルエステルを調製した場合は、固相抽出用シリカカラムかパストールピペットにカラムクロマトグラフィ用シリカゲルを充填したミニカラムを用いて精製してから分析すると注入口の汚れをよるトラブルを防ぐことができるほか、脂肪酸以外の夾雑物の共流出による混乱を回避できる。インサートの汚れた場合は目視できるので、洗浄して再使用するか新品と交換する。これで改善されないときはカラムの汚染を疑って注入口側を 50 cm 程度切り取って捨てる。インサートには上下がある。また、カラムも注入口側と検出器側では挿入する長さが異なる。これらを誤るとピーク形状と分離が悪くなり、感度低下が起こる。装置の移設など使用者が自らセットアップしなければならないときは、GC に供給するキャリアガスの圧力 (ポンペの 2 次圧) に気を付けたい。装置が必要とする圧力よりも余裕をもって高くしないとベースラインは安定しない。同時に装置側のフローコントローラーが正常かどうかともチェックしたい。FID で使用する空気はエアコンプレッサーよりも空気ボンベから供給するのが無難である。車や家電と同様、ガスクロも使わないと錆びついてうまく動かない。毎日のように使っていれば、多くのトラブルは未然に防げるし、トラブルの原因もすぐにわかる。

## 4. HPLC

### 4.1 装置

HPLC 装置は、送液用ポンプ、脱気装置、試料注入用インジェクター、カラム、カラムオープン、検出器、データ処理機から構成される。カラムオープンは GC のように必須ではないが、分析精度の向上 (保持時間の高い再現性) とより良い分離を得るために室温以下でも使用できる冷却機能付きオープンが必要である (脂質の鏡像異性体は一般に低温でより良い分離が得られる<sup>9-11)</sup>)。脱気装置も、特に水やアルコールなど極性の大きな移動相を使用する場合は必要である。ポンプは、内径数 mm (分取用は内径 10~50 mm 程度)、長さ 150~250 mm、充填剤粒径 3~5 μm のカラムを使用する汎用型装置の他に、粒径 2 μm 以下のカラムに対応した超高速 LC (UHPLC)、内径 0.1~0.32 mm のカラムを使用するマイクロ HPLC (キャピラリー HPLC) 装置が脂質の分析に利用される。ポンプの流量範囲は、分析用で ~10 mL/min、分取用で ~150 mL/min 程度である。UHPLC では、従来の 1/5~1/10 という短時間で高分離が得られる。一方、キャピラリー HPLC は、試料の微量化が可能、質量分析計との直結 (HPLC-MS) が容易、溶媒消費量の大幅な削減等の特長を有する。油脂・脂質の研究では大量の

有機溶剤を使用することから、これを可能な限り減らすことは油脂・脂質を扱うすべての人の願いであろう。キャピラリー HPLC で使用する移動相量は通常の HPLC の 1/1000 程度であり、環境低負荷型脂質分析法として興味深い。現在はキャピラリー HPLC 用のカラムもポンプも市販品を利用できるが、通常のポンプ及び自作した検出器セルとカラムを使用して脂質のキラル分離が達成されている<sup>10)</sup>。ただし、キャピラリー HPLC では充填カラムを使用するため、開管キャピラリー GC に匹敵する高分離は得られない。より良い分離を求めて、最近ではキャピラリー電気泳動法の脂質分析への適用が検討されている (S. Kodama *et al.*, Electrophoresis 投稿中)。

## 4.2 分離モード

脂質分野に限らず、現在の HPLC の主流は、全多孔性シリカゲルにオクタデシル基 (ODS, C18) などの炭化水素系官能基を化学結合させた充填剤 (固定相) を使用する逆相 HPLC である。脂質の分析には、この他にシリカ系充填剤を使用する順相 HPLC、銀イオンを固定相に含む銀イオン HPLC、キラル認識能をもつ固定相を使用するキラル HPLC が普及している。充填剤基材には機械的強度が高く、様々な官能基を導入できるシリカゲル (2  $\mu\text{m}$  ~ 10  $\mu\text{m}$ ) が多く使われているが、近年ではモノリス型シリカ (低圧での送液が可能のため長いカラムが使用できることから、特にキャピラリー HPLC による脂質の分析に有効であると思われる) とコアシェル型シリカ (細孔をもたない中心部の核に多孔性のシリカを結合させたもので、従来の多孔性シリカよりも粒度分布が狭く均一で高性能) が開発されている<sup>12, 13)</sup>。これらの基材を用いたカラムは脂質分析においても今後広く使用されると思われる。

### 4.2.1 逆相 HPLC

脂質の分析にも広く用いられている ODS 充填剤は、シリカゲル表面のシラノール基にオクタデシルシラン (ODS) を反応させて作られるが、反応条件によってモノメリックとポリメリックの2種の固定相ができる。一般に、モノメリック固定相は合成が容易で再現性に優れているが、保持力が小さい場合がある。一方、ポリメリック固定相は合成が難しく、様々なタイプの固定相が得られるが、一般に保持力が大きく、平面認識能に優れている。ODS 固定相の調製の際、反応せずに残存するシラノール基は試料と相互作用する。シラノール基の残ったカラムは酸性物質の分離に優れているが、塩基性化合物とは強く作用するため吸着によるピークのテーリングが起こる。この残存シラノール基を除くためにトリメチルモノクロルシランのようなシラン化合物を結合させる処理が行われるが、これをエンドキャッピングと呼んでい

る。多くの脂質成分はエンドキャッピング処理されたモノメリック固定相で再現性のある良好な分離が得られるが、TAG や DAG (ジアシルグリセロール) などグリセロ脂質の位置異性体の分離にはポリメリック固定相 (通常エンドキャッピングは行わない) がより優れた分離を示すことが知られている<sup>14, 15)</sup>。ポリメリック固定相の平面認識能が分離を可能にすると考えられている。また、シラノール基の残ったカラムは TAG や DAG などの中性脂質成分を早く溶出する特長を有するので、分離を変えずに分析時間を短縮することが可能である<sup>16)</sup>。

### 4.2.2 順相 HPLC

脂質クラス別分離にはシリカ (シリカ基材そのもの) カラム用いる順相 HPLC が使われるが、シリカは移動相に含まれる微量の水分で保持時間が変動しやすいため、移動相を変更した場合は十分な時間をかけてコンディショニングする必要がある。これに対し、シリカ基材をグリセロール、ポリビニルアルコール、アミノ基で修飾したジオール、PVA、アミノカラムは再現性のある保持時間を与えるので使用しやすい<sup>17, 18)</sup>。

### 4.2.3 銀イオン HPLC

銀イオン HPLC (Ag-HPLC) は脂肪酸や TAG 等極性の比較的小さい脂質成分の不飽和度別分離や位置異性体・幾何異性体分離に有効である<sup>2, 3)</sup>。現在、合成法が異なる銀イオンカラムが国内外のメーカーから発売されているが、安定性 (耐久性) や分離に違いが認められるので、使用の際は比較することを勧めたい。銀イオンクロマトグラフィーは古くから TLC やオープンカラムクロマトグラフィーで実施されてきたが、最近では固相抽出カラムが市販されるようになった。Ag-HPLC ほどの分離は得られないが、Ag-TLC に替わる方法として便利である。

### 4.2.4 HILIC

HILIC は Hydrophilic Interaction Chromatography の略で、親水性相互作用クロマトグラフィーと称される分離モードである。HILIC ではシリカ、アミノ、ジオールなど極性の大きな固定相が用いられる。移動相にも水/アセトニトリルなどの極性の大きな移動相が使われる。ただし、固定相の極性が移動相のそれよりも大きい。HILIC は逆相 HPLC では保持されない極性の大きな水溶性化合物 (糖、アミノ酸等) に専ら使用されてきたが、リン脂質のような両親媒性の分子もよく保持されて、非常に良いクラス別分離の得られることが報告されている<sup>19)</sup>。HILIC は逆相 HPLC と移動相組成が類似しており、MS への接続も容易であることから今後の脂質分野への普及が期待される。

#### 4.2.5 キラル HPLC

グリセロール骨格を有する脂質には、立体異性体（エナンチオマー、ジアステレオマー）と位置異性体が存在する。これらの分離には通常キラル固定相を使用する。キラル固定相には合成低分子化合物やアミロース、セルロースなどの多糖類系の高分子化合物が用いられる。低分子系キラルカラムの場合は試料を誘導体に変換する必要があるが（DAG や PtdGro など OH 基を有するグリセロ脂質はこの方法で分離された<sup>9-11</sup>）、最近では多糖類系のキラル固定相を用いて従来分離の困難であった TAG やリン脂質（PtdCho, PtdEtn）の鏡像体の直接分離が可能になりつつある<sup>11, 20</sup>。従来のカラムは順相系溶剤しか使用できなかったが、近年のキラルカラムは逆相系移動相も使用可能であることから分析対象化合物が大きく広がった。分離と検出において、両者（誘導体化法、直接法）にそれぞれ特長があるので、目的に合わせて使い分けるとよい。

#### 4.2.6 検出器その他

吸光光度検出器（UV/VIS 検出器、蛍光検出器等）の他に蒸発光散乱検出器（ELSD）が脂質成分の分析に広く使われている<sup>2, 3</sup>。ELSD における溶質の量と散乱光との関係は以下の式で示される。

$$I = km^b, \log I = b \log m + \log k$$

（ $I$ =散乱光の強度,  $m$ =散乱した溶質粒子の量,  $k, b$ =定数）

したがって、試料濃度とピーク面積の関係は非直線的であるが、両者の対数をとってプロットすると直線関係が得られる。ELSD は定量性に欠けるとの理由で敬遠されることがあるが、そうではないことを理解して使いこなしたい。ELSD と検出原理は異なるが、同様の万能型検出器として、近年、荷電化粒子検出器（CAD）が開発されている。一般に CAD は ELSD よりも高感度であり、試料濃度とピーク面積間にはかなり良い直線関係が得られる。まだ高価だが今後の普及が期待される。

分離不十分な成分を良好に分離するには幾つかの試してみるべき方法があるが、その1つに「リサイクル法」が上げられる。カラムから溶出する成分（ピーク）をリサイクルバルブを用いて同一のカラムに繰り返し導入して、カラムを何本も繋いで長くしたときと同様の効果を得ようとする方法である。この手法を用いて TAG のキラル分離が達成されている<sup>20</sup>。この他、2本の異なる種類のカラムを使用して目的成分を混合物から分離するカラムスイッチング HPLC も脂質のキラル分離に便利な方法として使われている<sup>21</sup>。

#### 4.3 トラブルシューティング

GC と同様、HPLC のトラブルも得られるクロマトグラムから判定される。様々なトラブルがあり、対処法も異なるので、詳しくはメーカー側の説明書やトラブル対策に関する成書<sup>22, 23</sup>を参考にされたい。ここでは2, 3に留める。ベースラインが安定しない、ピーク形状の異常（複数のピークにスプリットする）などは時々経験するが、ポンプや検出器のトラブルを疑う前に試料を溶解している溶剤をチェックしたい。試料は可能な限り移動相組成と同じ組成の溶剤に溶かして注入する。イソプロパノール（IPA）はヘキサンにもメタノールにも混じるので順相 HPLC でも逆相 HPLC でも問題なく使用できると思いがちだが、共用した場合、試料によっては異常な形状のピークが現われることがあるので注意が必要である。カラムの汚れを防ぐために、移動相と試料溶液を予め濾過し、ガードカラムも使用する。これらの操作はカラムの寿命を延ばすのに有効であるが、移動相の濾過は、濾過器具にも注意しないと逆に汚染する可能性があるし、ガードカラムはカラム効率を低下させることがある（分離が悪くなることもある）のできわどい分離を検討する場合は一度ガードカラムを外して分離が低下していないか確認することが望ましい。カラムに衝撃を与えたり（落としたり）、間違えて高流量の移動相を流したり、逆方向から送液してしまう取扱い上のミスはよくみられることかもしれない。こうしたミスによって回復不可能なダメージをカラムに与えてしまうこともあるが、高価なカラムの場合、捨てるのはメーカーに回復可能かどうか相談してからにしたい。

#### 文 献

- 1) "Analytical Chemistry", R. Kellner *et al.* eds., 2nd Edition, chapter 21, pp.523-605, Wiley-VCH, (2004).
- 2) W. W. Christie, H. Han, "Lipid Analysis. Fourth Edition". The Oily Press, Bridgwater, England (2010).
- 3) AOCS Lipid Library. <http://lipidlibrary.aocs.org/>
- 4) "ベーシック機器分析化学", 日本分析化学会近畿支部編, 化学同人, (2008).
- 5) "ガスクロマトグラフの最新の分析技術の紹介 - 高分離, 分析時間短縮, 微量分析 -", pp. 1-40, 島津製作所.
- 6) T. Takagi, M. Kaneniwa, Y. Itabashi, R. G. Ackman, *Lipids* **21**, 558-565 (1986).
- 7) T. Takagi, Y. Itabashi, *Lipids* **16**, 546-551 (1981).
- 8) Y. Itabashi, T. Takagi, *J. Chromatogr.* **299**, 351-363 (1984).
- 9) A. Kuksis, Y. Itabashi, *Methods* **36**, 172-185 (2005).
- 10) Y. Itabashi, Chiral phase HPLC of glycerolipids, in "HPLC of Acyl Lipids", J.-T. Lin and T. A. McKeon eds., Chapter 7, pp. 167-198, HNB Publishing, New York, NY (2005).

- 11) Y. Itabashi, *J. Lipid Nutr.* **21**, 27-34 (2012).
- 12) 木村宏, 池上亨, 田中信男, ぶんせき (10, 通号 358), 576-584 (2004).
- 13) 長江徳和, 塚本友康, *Chromatography* **34**, 41-47 (2013).
- 14) N. Gotoh, Y. Matsumoto, H. Yuji, T. Nagai, H. Mizobe, K. Ichioka, I. Kuroda, N. Noguchi, S. Wada, *J. Oleo Sci.* **59**, 71-79 (2010).
- 15) Y. Itabashi, *Chromatography* **32**, 59-72 (2011).
- 16) 相澤知里, 塩崎梨絵子, 板橋豊, *分析化学* **56**, 833-839 (2007).
- 17) W. W. Christie, S. Gill, J. Nordbäck, Y. Itabashi, S. Sanda, A. R. Slabas, *Phytochem. Anal.* **9**, 53-57 (1998).
- 18) K. Yunoki, M. Sato, K. Seki, T. Ohkubo, Y. Tanaka, M. Ohnishi, *Lipids* **43**, 77-83 (2009).
- 19) M. Schwalbe-Herrmann, J. Willmann, D. Leibfritz, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 5179-5183 (2010).
- 20) T. Nagai, H. Mizobe, I. Otakea, K. Ichioka, K. Kojima, Y. Matsumoto, N. Gotoh, I. Kuroda, S. Wada, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 2880-2886 (2011).
- 21) Y. Itabashi, S. Yoshioka, M. Suzui, H. Tsuda, A. Kuksis, 104<sup>th</sup> AOCS Annual Meeting & Expo, Quebec, April 28-May 1, 2013. An abstract.
- 22) 松下至, “あなたの液クロ正常ですか”, 講談社, 東京 (2010).
- 23) 日本分析化学会 (中村博編), “液クロ虎の巻”, 丸善, 東京 (2001).