

# 新しい銀イオンクロマトグラフィー用HPLCカラム“Silver column KANTO”の開発(2)

Development of New HPLC Column for Silver ion chromatography(2)

関東化学株式会社 草加工場 生産技術部 試薬生産技術課 大瀧 伸之

NOBUYUKI OHTAKI

Production Technique Dept. Soka Factory, kanto Chemical Co., Inc.

\*2009 No.3 (通巻213号) 新しい銀イオンクロマトグラフィー用HPLCカラム“Silver column KANTO”の開発(1) から続く

## 4. HPLCカラム“Silver column KANTO”のアプリケーションデータ

### 4.1 トリアシルグリセロールの分析

トリアシルグリセロールは動植物油脂の主成分であり、1分子のグリセロール(グリセリン)に3分子の脂肪酸がエステル結合した構造(図13)をもつ。炭素数や二重結合数、二重結合の位置などが異なるアシル基の組み合わせによって非常に多くの分子種が存在し得る。

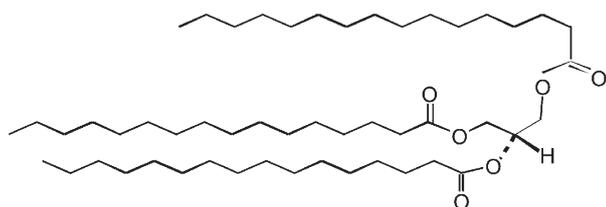


図13 トリアシルグリセロールの構造(例. トリパルミチン)

“Silver column KANTO”では、トリアシルグリセロールを構造の違いに基づいて分離することが可能である。図14は、アセトニトリル/ヘキサンを移動相とするリニアグラジェント溶離による炭素数が18のアシル基をもつトリアシルグリセロール10種のクロマトグラムである。

脂肪酸エステルの場合と同様に、アシル基の二重結合が多いほど強く保持される[SSS( $\Delta=0$ ( $\Delta$ は二重結合の数)、トリステアリン(tristearin);No.1]<OOO( $\Delta=3$ , トリオレイン(triolein);No.8]<LLL( $\Delta=6$ , トリリノレン(trilinolein);No.9]<LnLnLn( $\Delta=9$ , トリリノレニン(trilinolenin);No.10]。また、二重結合数が同じであればcis型二重結合を多く持つ分子種の方が強く保持されている[EEE(trans $\times 3$ , トリエライジン(trielaidin);No.6]<OEO(trans $\times 1$ , cis $\times 2$ , 1,3-ジオレイン-2-エラ

イジン(1,3-diolein-2-elaidin);No.7]<OOO(cis $\times 3$ , トリオレイン(triolein);No.8]。これに加えて、SES[1,3-ジステアリン-2-エライジン(1,3-distearin-2-elaidin);No.2]とSSE[1,2-ジステアリン-3-エライジン(1,2-distearin-3-elaidin);No.3]やSOS[1,3-ジステアリン-2-オレイン(1,3-distearin-2-olein);No.4]とSSO[1,2-ジステアリン-3-オレイン(1,2-distearin-3-olein);No.5]などの立体位置異性体では二重結合を有する脂肪酸部(E,O)を1(3)位にもつ分子種のほうが2位にもつ分子種よりも強く保持されている。なお、3個のアシル基に二重結合を持たないSSS(No.1)の“Silver column KANTO”に対する保持は3個のカルボニル基とAg<sup>+</sup>との相互作用によるものと考えられる。

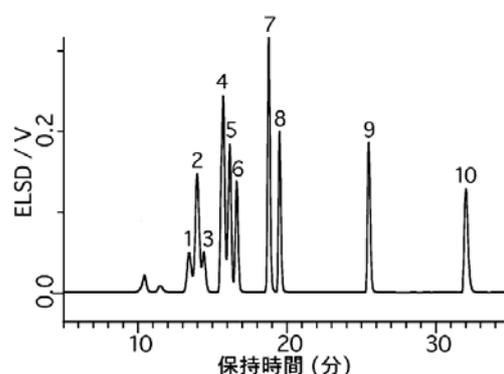


図14 トリアシルグリセロールのクロマトグラム  
試料: 1;SSS, 2;SES, 3;SSE, 4;SOS, 5;SSO, 6;EEE, 7;OEO, 8;OOO, 9;LLL, 10;LnLnLn (S; stearin, E; elaidin, O; olein, L; linolein, Ln; linolenin)  
移動相: リニアグラジェント溶離, 0.5-2% ACN (30分) /ヘキサン  
カラム: Silver column KANTO (4.6φ-250mmL.)  
流速: 1.0mL/分, カラム温度: 20℃

図15は、“Silver column KANTO”によるオリーブ油とナタネ油のクロマトグラムを比較したものである。それぞれに含有されるトリアシルグリセロール種の量的な違いなどを反映して明らかに異なるクロマトグラムが得られた。油脂はその由来

によって特徴的なトリアシルグリセロール組成を有するので、“Silver column KANTO”によるクロマトグラムのパターンを比較することによって試料油脂の由来を知ることができる。試料の前処理などを必要としない簡便な評価方法である。

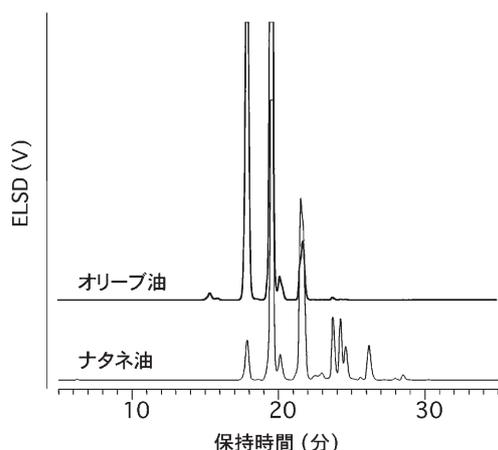


図15 オリーブ油となたね油のクロマトグラムの比較  
移動相:リニアグラジェント溶離, 0.5-2% ACN (30分)/ヘキサン  
カラム: Silver column KANTO (4.6φ-250mmL.)  
流速: 1.0mL/分, カラム温度: 20℃

#### 4.2 油脂中のトランス脂肪酸組成の定量分析

油脂中のトランス脂肪酸の主成分をなす trans-オクタデセン酸には、二重結合が4位から16位までの位置異性体が存在することが知られている。トランス脂肪酸は心疾患のリスクを高めることが報告されているが、そのリスクの大きさは二重結合の位置によって異なるものと推測されている。乳脂肪などの天然油脂とマーガリンやショートニングなどの加工油脂では、含有されるトランス脂肪酸の位置異性体組成が異なるので、総トランス脂肪酸含量だけではなく、それぞれの脂肪酸の位置異性体組成を定量的に評価することが重要視されている。しかしながら、油脂を構成する多種多様な脂肪酸類を分離分析するのは高分解能のキャピラリーGC法でも困難である。植物油に水添処理して調製された硬化油中の脂肪酸組成を“Silver column KANTO”および“キャピラリーGC<sup>15)</sup>”により分析し、比較した。図16-aと図16-bは、それぞれ“Silver column KANTO”と“キャピラリーGC”によって得られたクロマトグラムであり、trans-モノエン酸に相当する成分が溶出されている部分を拡大したものである。

なお、試料は硬化油を脂肪酸に分解後、“Silver column KANTO”ではナフタシルエステル化、“キャピラリーGC”ではメチルエステル化したものである。図16-bに示すように、キャピラリーGCではtrans体とcis体のピークの一部が重畳するので、それぞれのピーク面積を正確に求めること

は難しい。場合によってはcis体のピークがtrans体のピークを隠してしまうこともある。キャピラリーGC法によりトランス脂肪酸を正確に分析するための方法として、Ag<sup>+</sup>-TLC<sup>16)</sup>やAg<sup>+</sup>-HPLC<sup>17)</sup>によってcis体とtrans体を粗分画して得られたフラクションをGCに供することが推奨されている。これに対して、“Silver column KANTO”ではモノエン酸エステルのcis/trans異性体がよく分離されるので(図16-a)、特別な前処理を必要とせずトランス脂肪酸含量を分析することができる。さらに、“Silver column KANTO”ではそれらの位置異性体が分離されるので(図17)、従来法では困難であった位置異性体組成の定量分析が可能である。

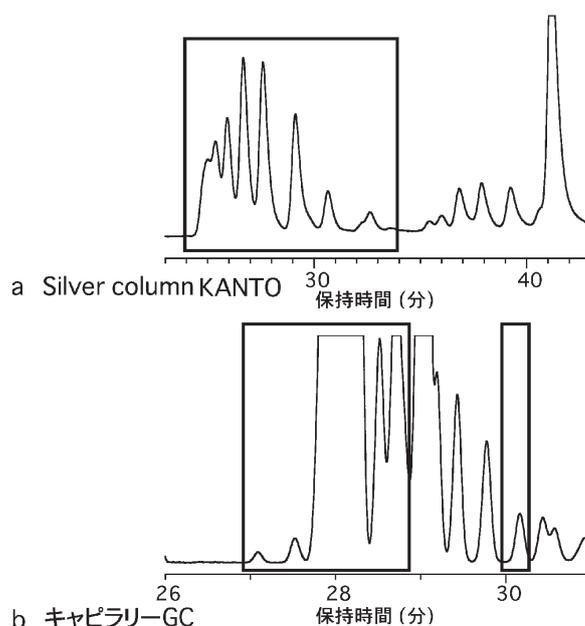


図16 Silver column KANTOとGCにおける硬化油中のtrans-モノエン酸の分離(枠の中のピークがtrans-モノエン酸の分子種)

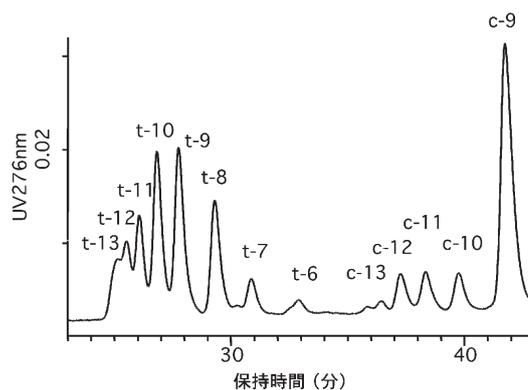


図17 Silver column KANTOによる硬化油中の脂肪酸分析(モノエン酸溶出画分)  
試料: 硬化油をけん化後、ナフタシルエステル化, 移動相: リニアグラジェント溶離, 2-5% AcOEt (60分)/ヘキサン, カラム: Silver column KANTO (4.6φ-250mmL.), 流速: 1.0mL/分, カラム温度: 20℃

表3にトランス脂肪酸含量の異なる3種の硬化油と乳脂肪中のtrans-モノエン酸組成の分析結果を示す。硬化油については総トランス脂肪酸量に関わらずトランス脂肪酸の組成はよく一致しており、8位から11位に二重結合を有するtrans-モノエン酸が多く含まれていること、また、乳脂肪に関しては主に11位に二重結合をもつtrans-モノエン酸が含まれている結果が得られた。これは、過去の研究報告<sup>18)</sup>と一致しており、“Silver column KANTO”によるトランス脂肪酸の組成分析法の有用性を示すものである。なお、trans-ジエン酸やtrans-トリエン酸の組成分析、cis体を含めた全脂肪酸の組成分析についても、同様の手法によって可能である。

表3 硬化油と乳脂肪中のtrans-モノエン酸位置異性体の組成(g/100g)

試料	trans結合の位置								総量	直接GC法
	6	7	8	9	10	11	12	13		
硬化油A	0.11	0.07	0.41	0.46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.87	0.13
硬化油B	0.26	0.39	0.98	1.81	1.40	0.80	0.56	0.56	6.75	6.55
硬化油C	0.75	1.80	6.93	9.78	8.94	5.18	3.66	3.15	40.20	42.09
乳脂肪	0.21	0.25	0.43	0.59	1.41	0.53	0.87	n.d.	4.29	-

n.d.:検出されず

## 5. まとめ

新たに開発した“Silver column KANTO”は不飽和化合物、特に、cis/trans異性体や位置異性体などの分離分析に有用な銀イオンクロマトグラフィー用のHPLCカラムである。その分離特性は銀イオンクロマトグラフィーモードと順相クロマトグラフィーモードを併せ持つものと性格づけられる。従来の分離剤やカラムの課題であった耐久性と安定性を改善し、1,000回の繰り返し使用においても再現性の高いデータが得られることを確認した。銀イオンクロマトグラフィーは脂質関連分野ではよく用いられているのに比べ、ほかの分野でのアプリケーションは多くなく、知名度も低いようである。本稿でも脂肪酸関連物質の分離例を多く紹介したが、そのほかにもいろいろな有機化合物を分離できることを確認している。有機化合物を扱うさまざまな分野で活用できるHPLCカラムであるので、多くの方々のお仕事に役立てていただければ幸いである。

## 引用文献

- 1) H.J.Dutton, C.R.Scholfield, E.P.Jones, *Chem.Ind. (London)*, 1874-1876 (1961)
- 2) B.de Vries, *Chem.Ind. (London)*, 1049-1050 (1962)
- 3) C.B.Barrett, M.S.J.Dallas, F.B.Padley, *Chem.Ind. (London)*, 1050-1051 (1962)
- 4) L.J.Morris, *Chem.Ind. (London)*, 1238-1240 (1962)
- 5) G.Dobson, W.W.Christie, B.Nikolova-Damyanova, *J.Chromatogr.B*, **671**, 197-222 (1995)
- 6) C.M.Williams, L.N.Mander, *Tetrahedron*, **57**, 425-447 (2001)
- 7) W.W.Christie, *J. High Res. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **10**, 148-150 (1987)
- 8) C.D.M.Beverwijk, G.J.M. van der Kerk, A.J.Leusink, J.G.Noltes, *Organometal.Chem.Rev.A*, **5**, 215-280 (1970)
- 9) S.D.Ittel, J.A.Iberis, in: *Advances of Organometallic Chemistry Vol.14*, pp.33-61, E.G.A.Stone, R.West (Eds.), Academic Press, New York (1976)
- 10) C.L.de Ligny, in: *Advances in Chromatography, Vol.14*, pp.265-304, J.C.Giddings, E.Grushka, J.Cazes, P.R.Brown (Eds.), Marcel Dekker, New York (1976)
- 11) H.Kasai, D.McLeod, T.Watanabe, *J.Am.Chem.Soc.*, **102**, 179-190 (1980)
- 12) B.Damyanova, S.Momtchilova, S.Bakalova, H.Zuilhof, W.W.Christie, J.Kaneti, *J.Mole.Struc.(Theochem)*, **589/590**, 239-249 (2002)
- 13) B.Nikolova-Damyanova, W.W.Christie, B.Herslof, *J.Planar Chromatogr.*, **7**, 382-385 (1994)
- 14) W.W.Christie, *Lipid Technol.* 17-19 (1998)
- 15) 日本油化学会, 基準油脂分析試験法 暫<sup>17</sup>2007 「トランス脂肪酸含量(キャピラリーガスクロマトグラフ法)」
- 16) 日本油化学会, 基準油脂分析試験法 暫<sup>8</sup>2003 「モノトランス脂肪酸(硝酸銀含浸薄層クロマトグラフ-ガスクロマトグラフ法)」
- 17) AOCS Recommended Practice Ce 1g-96<sup>(-1997)</sup> (trans fatty acids by silver-ion exchange HPLC)
- 18) 松崎ら, 日本油化学会誌, **47**, 277-282 (1998)