

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)

Development of New HPLC Column for Silver ion chromatography(1)

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.

1. はじめに

銀イオンクロマトグラフィー(Silver ion chromatography)は、有機化合物の不飽和結合と銀イオンが錯体を形成する性質を利用する液体クロマトグラフィーである。分離対象である有機化合物分子中の二重結合の数や位置、cis/trans異性などの違いに応じて分離が行われる。銀イオンクロマトグラフィーの歴史は古く、約50年前に、Dutton¹⁾やB.de Vries²⁾、Barrett³⁾、L.J.Morris⁴⁾らが不飽和脂肪酸エステル、cis/trans異性体や食用油脂中のグリセリド成分を銀イオンクロマトグラフィー(Ag⁺-カラムクロマト)や薄層クロマトグラフィー(Ag⁺-TLC)によって分離している。銀イオンクロマトグラフィーは、複雑な組成を持つ油脂類の分離分析・精製に有用な手法であり、脂質化学およびその関連分野で多くの応用例が報告されている⁵⁾。また、それ以外の分野でも種々の有機化合物の分離に用いられている⁶⁾。

Duttonらが用いた分離剤である硝酸銀含浸シリカゲルは、現在でもAg⁺-カラムクロマトやAg⁺-TLC用の分離剤として利用されている。硝酸銀含浸シリカゲルは、シリカゲルを硝酸銀溶液に浸漬処理して調製する。簡便に作製できる反面、シリカゲルに含浸された硝酸銀が移動相中に溶け出すために繰り返して使用できないことや、溶け出したAg⁺によってクロマトグラフの配管部や分画したフラクションが汚染されるといった問題がある。このような理由から、繰り返して使用することのないカラムクロマトグラフィーやTLCの分離剤に用途が限定され、高い繰り返し再現性が求められる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用の分離剤としては用いることができなかった。Ag⁺-HPLC用カラムとしては、Christie⁷⁾が開発したカチオン交換カラムにAg⁺を固定化したカラムが用い

られている。ベンゼンスルホン酸基が固定化されているカチオン交換カラムに硝酸銀溶液を通液し、Ag⁺をベンゼンスルホン酸基に固定化して調製する。比較的安定ではあるが、担体であるシリカゲル表面のシラノール基や、カチオン交換基であるベンゼンスルホン酸基のフェニル部のπ電子が試料と相互作用して保持の強さに影響を及ぼすことがある。

筆者らは、従来の銀イオンクロマトグラフィー用分離剤・HPLCカラムの課題を克服する高い安定性と特徴的な分離能を兼ね備える分離剤とHPLCカラムの開発を目指して検討を重ね、新しい銀イオンクロマトグラフィー用HPLCカラム“Silver column KANTO”を開発した。本稿では、銀イオンクロマトグラフィーの概要と、HPLCカラム“Silver column KANTO”の特徴とアプリケーションについて述べる。

2. 銀イオンクロマトグラフィーの原理と実際

Ag⁺と不飽和有機化合物は弱い電荷移動型錯体を形成する⁸⁾。銀イオンクロマトグラフィーにおいては、固定相上のAg⁺と試料である不飽和有機化合物が形成する電荷移動型錯体の安定性の差異に基づいてクロマト分離される。Ag⁺とアルケンは、(1)σ結合型:二重結合上の占有された2p結合軌道のπ電子がAg⁺の空の5s軌道に供与されて形成されるσ結合(図1-a)と、(2)π結合型:二重結合上の非占有のπ*-2p反結合性軌道に、Ag⁺の占有された4d軌道からd電子が供与されて形成されるπ結合(図1-b)の二種類の結合様式によって錯体を形成すると考えられている^{9,10,11)}。銀イオンクロマトグラフィーにおいては、固定相のAg⁺と試料である不飽和有機化合物が形成する錯体の安定性が高いほど、試料は固定相に強く保持されるものと考えられる。

Kanetiらの計算によれば、不飽和脂肪酸(エステル)の二重結合とカルボニル炭素が近いほど Ag^+ と形成する錯体の安定性は高く¹²⁾、銀イオンクロマトグラフィーにおいてモノエン脂肪酸エステル位置異性体の二重結合がカルボニル炭素と近いほど強く保持される結果¹³⁾とよく一致している。

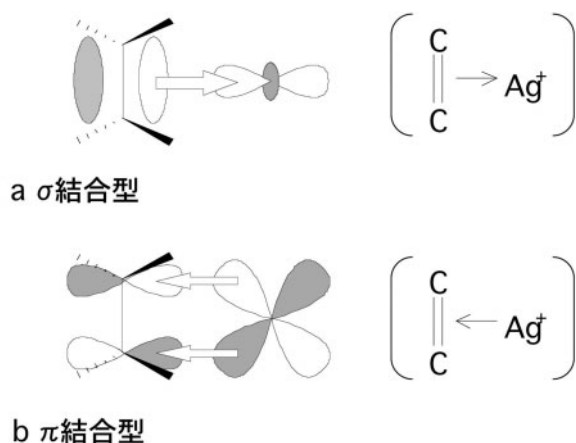


図1 Ag^+ とアルケンが形成する電荷移動型錯体の結合様式

銀イオンクロマトグラフィーでは、順相クロマトグラフィーと同様に移動相の極性を増加することによって試料分子をカラムから溶出する。移動相にはヘキサンなどの無極性溶媒に酢酸エチル(～10%)やアセトニトリル(～2%)を添加したものをを用いている。銀イオンクロマトグラフィーにおける不飽和有機化合物の保持の強さに関しては、以下のような傾向が知られている。

- ①試料分子の二重結合数が多いほど保持が強い。
- ②cis/trans異性体ではcis体(Z体)の方がtrans体(E体)よりも保持が強い。
- ③複数の二重結合をもつ有機化合物では、非共役二重結合の方が、共役二重結合よりも保持が強い。
また、二重結合と二重結合が離れている方が保持は強い。
- ④脂肪酸(およびそのエステル)では、二重結合とカルボニル炭素が近い方が保持は強い。

実際のクロマトグラフィーでは、 Ag^+ と不飽和有機化合物との錯体形成に加えて、固定相の担体と試料分子との副次的な相互作用も保持挙動に影響する。特に、シリカゲルを担体とする従来型の固定相ではシリカゲルの表面に存在するシラノール基の作用によって保持の強さが大きく影響される。

3. “Silver column KANTO” —分離剤—

3.1 銀イオン-高速液体クロマトグラフィー(Ag^+ -HPLC)用カラム“Silver column KANTO”の特徴

銀イオン-高速液体クロマトグラフィー(Ag^+ -HPLC)用カラム“Silver column KANTO”の固定相として新たに開発した分離剤の主な仕様を表1に示した。無機イオン交換体でもあるリン酸ジルコニウムを担体として用いている。非シリカ系の担体を用いていることと、担体自体がイオン交換体であることが大きな特徴である。担体の表面にシラノール基はなく、またイオン交換基などの導入もないので試料分子との副次的な相互作用は少ないと予想される。担体であるリン酸ジルコニウムに導入された Ag^+ はその結晶構造に取り込まれて安定に存在する。硝酸銀含浸シリカゲルなどは光に敏感で黒化しやすいが、本分離剤は白色の粉体である(図2)。

表1 分離剤の仕様

外観	白色粉末
Ag含有率	2wt%
粒子径	5 μm
比表面積	100 m^2/g
細孔径	200Å

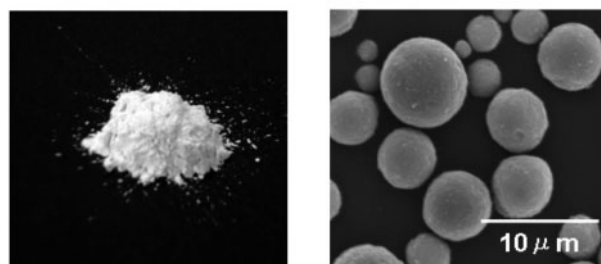


図2 “Silver column KANTO”用分離剤の外観とSEM写真(左:外観の写真、右:SEM写真)

担体は、独自の製法によってHPLCカラム用充填材として最適な多孔性球状粒子として作製した。カラムサイズは4.6 ϕ -250 mm Lであり、粒子径5 μm の分離剤を充填している。なお、分離剤のAg含有率を加減することによって保持の強さを調整できる。また、粒子径3 μm の分離剤も作製できるので、分離対象物質や迅速分析用など使用目的に応じたカラム設計が可能である。

移動相としてヘキサンやヘプタンにアセトニトリル(ACN)を添加したものをを用いると、よりよい分離が得られることが多い。

図3は、多環式芳香族化合物の分離について、2種の移動相、アセトニトリル/ヘプタンとイソプロピルアルコール (IPA)/ヘプタンを用いて比較したクロマトグラムである。アセトニトリル/ヘプタンを移動相に用いた方がピーク形状はシャープであり、アントラセンとフェナントレンがよく分離されている。図4はトリアシルグリセロールの立体位置異性体の分離に対する移動相(アセトニトリル/ヘキサン)のアセトニトリル濃度の影響を示すクロマトグラムである。アセトニトリル濃度の減少にともなってトリアシルグリセロールの保持時間は長くなり、立体位置異性体である1,2-ジパルミチン-3-オレイン(1,2-Dipalmitin-3-olein; PPO)と1,3-ジパルミチン-2-オレイン(1,3-Dipalmitin-2-olein; POP)の分離度も向上した。なお、アセトニトリル/ヘキサンでは、溶出力が強すぎると考えられるときには、アセトニトリルに代えて酢酸エチル(AcOEt)をヘキサンやヘプタンに添加した溶液を移動相に用いるのがよい。

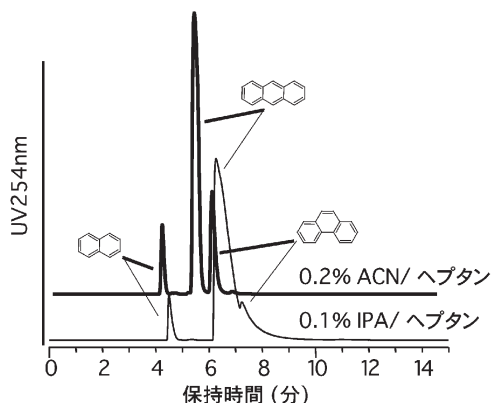


図3 移動相組成がクロマト分離に及ぼす影響
カラム: Silver column KANTO(4.6φ-250mmL)
流速: 1.0mL/分, カラム温度: 20℃

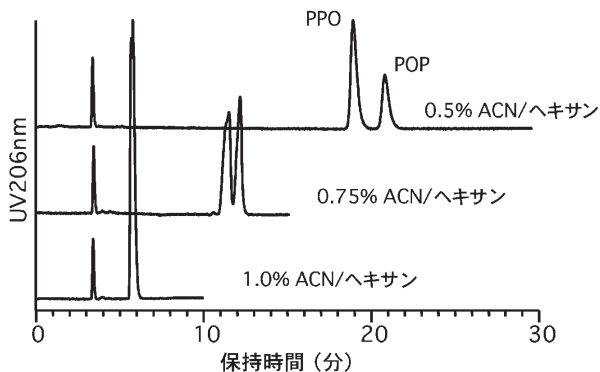


図4 トリアシルグリセロール立体位置異性体の分離に対する移動相中のアセトニトリル(ACN)濃度の影響
試料: PPO (1,2-ジパルミチン-3-オレイン), POP (1,3-ジパルミチン-2-オレイン), 他の条件は図3と同じ

3.2 カラムの耐久性—繰り返し再現性と銀イオンの溶出

“Silver column KANTO”は繰り返し使用におけるクロマトグラムの再現性が高いことと、分離剤から移動相へのAg⁺の溶出が無いことが大きな特長である。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おいて、高度不飽和脂肪酸メチルエステルの混合物を試料として1,000回の連続繰り返し分析を行い、それらの保持時間の変動を調べた。

不飽和脂肪酸エステルは二重結合数の少ない順に、また、二重結合数が同じであればtrans体がcis体よりも早く溶出される。表2において、比較的保持の弱いモノエン脂肪酸メチル(二重結合数1)のピークは、使用回数の増加にともなって1分から2分程度溶出が早くなる傾向が見られたことで保持時間の変動係数(CV%)は高めだが、比較的保持の強い不飽和脂肪酸メチル(二重結合数2以上)のCV%はおおむね1から2%以内であり、非常に高い再現性を示した。また、繰り返し使用1,000回目のクロマトグラムにおいてもピーク割れなどといったカラムの劣化を示唆するような変化は見られなかった(図5)。約2ヶ月間の長期間にわたる評価実験であり、HPLC装置自体の再現性(ポンプの送液精度など)や移動相組成の再現性(自然蒸発による組成変化の可能性)などのカラムと関係のない変動要因の影響を考慮すれ

表2 繰り返し使用における保持時間の再現性

ピークNo.*2	C18:0*1	C18:1		C18:2	C18:3	C20:4	C20:5	C22:6
	①	trans ②	cis ③	cis ④	cis ⑤	cis ⑥	cis ⑦	cis ⑧
平均(分)	4.95	6.63	10.06	17.70	20.09	22.54	25.33	27.58
標準偏差	0.21	0.46	0.69	0.38	0.26	0.20	0.19	0.23
CV(%)	4.39	6.95	6.85	2.12	1.30	0.87	0.76	0.85

*1 炭素の数: 二重結合の数 を表す

(n=1,000)

*2 図5のピークNo.

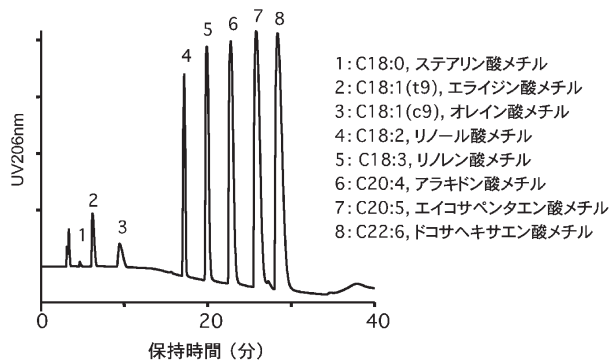


図5 使用回数1,000回の高度不飽和脂肪酸メチルのクロマトグラム
移動相: リニアグラジェント溶離, 0.2-2% ACN/ヘキサン(30分)
カラム温度: 40℃, 他の条件は図3と同じ

ば非常に高い再現性を示しているものと考えられる。

実試料(精製魚油、エチルエステル体)を試料とし、図5と同じ条件で1,000回の繰り返し分析を行い、カラム溶出液中のAg量、すなわち“Silver column KANTO”からのAgのリーク量を調べた。カラム溶出液を濃縮し原子吸光分析に供した結果、1,000回分の総溶出液60Lに対してAgのリーク量は最大で20ngと見積もられ、濃度に換算すると3pptに相当する。また、この評価実験においてはUV検出器(検出波長UV206nm)と蒸発式光散乱検出器(ELSD)を用いたが、Agの溶出が原因と考えられるようなベースラインの乱れやノイズの増加などの現象は見られなかった。以上の結果から、“Silver column KANTO”からのAgの溶出はほとんど無いと考えられ、クロマトグラムの繰り返し再現性が高いことが裏づけられる。

3.3 cis/trans異性体の分離

“Silver column KANTO”は不飽和化合物における二重結合の状態の違いを識別して試料分子を分離する。cis/trans異性体では、一般にcis体の方が双極子モーメントは大きく、立体的にも不安定である反面、Ag⁺と形成する錯体の安定性は高い。一方で、相対的に双極子モーメントが小さく、安定なtrans体とAg⁺が形成する錯体の安定性は低い。したがって、“Silver column KANTO”により安定な錯体を形成するcis体は強く保持され、相対的に安定性の低い錯体を形成するtrans体の保持は弱い。

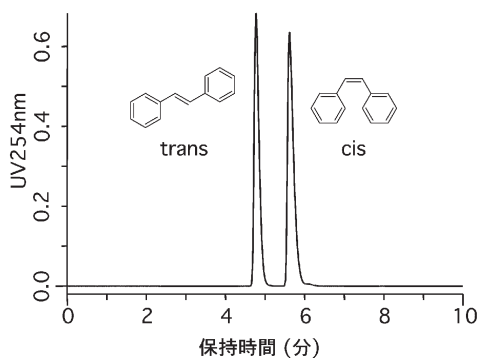


図6 スチルベン - cis/trans 異性体の分離
移動相: 0.2% ACN/ヘキサン, 他の条件は図3と同じ

“Silver column KANTO”におけるスチルベン(stilbene)のcis/trans異性体のクロマトグラムを図6に示した。カルボニル基などをもたない炭化水素の場合も、脂肪酸エステルであるエライジン酸メチル{elaidic(trans-9-octadecenoic)acid methyl ester; 図5のピークNo.2}とオレイン酸メチル{oleic(cis-9-octadecenoic)acid methyl ester; 図5のピークNo.3}の場合

と同様に、trans体がcis体よりも早く溶出される。1分子に3個の二重結合を有する不飽和脂肪酸であるリノレン酸{linolenic(9,12,15-octadecatrienoic)acid}にはcis型二重結合とtrans型二重結合の数と位置の組み合わせにより8種の異性体が存在する。図7は、“Silver column KANTO”により得られたリノレン酸メチル(Linolenic acid methyl ester)のクロマトグラムである。3個の二重結合について、cis型二重結合の数が少ない分子種から順に溶出されている。

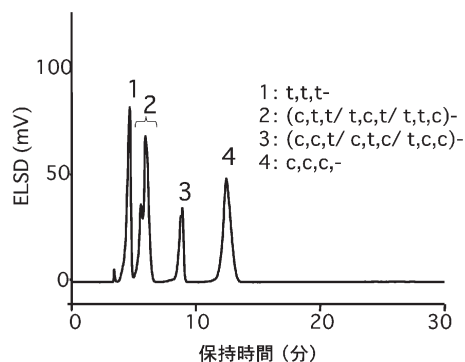


図7 リノレン酸メチル - cis/trans異性体の分離
移動相: リニアグラジェント溶離, 0.5-3% ACN/ 2% AcOEt/ ヘキサン(20分), 検出: 蒸発式光散乱検出器(ELSD), カラム温度: 40℃, 他の条件は図3と同じ

3.4 不飽和脂肪酸の保持挙動に対する共役二重結合と非共役二重結合の影響

1分子に2個の炭素-炭素二重結合をもつ炭素数18の不飽和脂肪酸(octadecadienoic acid)には、リノール酸{linoleic(cis,cis-9,12-octadecadienoic)acid}のほかに、二つの二重結合が共役している共役リノール酸(CLA: Conjugated Linoleic Acid)が知られている。共役リノール酸は、共役二重結合におけるπ電子の非局在化により、非共役のリノール酸よりも安定である。したがって分子の安定性とは反対に、それらとAg⁺が形成する錯体の安定性は、Ag⁺と非共役のリノール酸が形成する錯体よりも低いものと予想される。図8は、酢酸エチル/ヘキサンを移動相とする“Silver column KANTO”による共役リノール酸メチル異性体のクロマトグラムである。共役リノール酸メチルの溶出に必要な酢酸エチル濃度はcis型二重結合を1個もつcis-モノエン酸メチルと同等であった。なお、非共役型のリノール酸メチルは酢酸エチル/ヘキサンでは溶出されず、移動相には溶出力の大きなアセトニトリル/ヘキサンを用いる必要がある。試料分子中のπ電子の非局在化が“Silver column KANTO”に対する保持に影響することを示唆している。

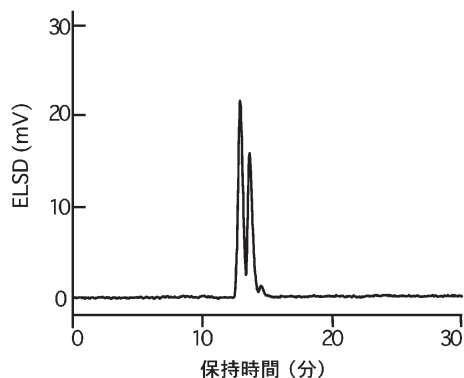


図8 共役リノール酸メチル - cis/trans異性体の分離
移動相: リニアグラジェント溶離, 2-10% AcOEt (20分)/ヘキサン, 他の条件は図3と同じ

3.5 位置異性体の分離

不飽和脂肪酸やそのエステルでは、 Ag^+ は炭素-炭素二重結合だけではなく、カルボニル基とも相互作用してより安定な錯体を形成する(図9)¹⁴⁾。また、trans体よりも分子内歪みが大きなcis体では Ag^+ を介して炭素-炭素二重結合とカルボニル基が環状構造をとる錯体を形成する。この場合、炭素-炭素二重結合とカルボニル基の位置が近いほど環が小さくなり、安定であるといわれている¹¹⁾。

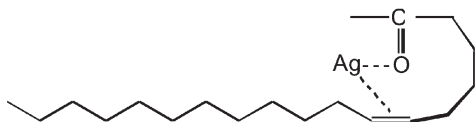


図9 Ag^+ とモノエン酸エステルが形成する錯体の模式図

図10は、“Silver column KANTO”によるcis-オクタデセン酸メチル位置異性体のクロマトグラムである。炭素-炭素二重結合がカルボニル炭素から遠いcis-バクセン酸メチル [cis-vaccenic (cis-11-octadecenoic) acid methyl ester]、オレイン酸メチル [oleic (cis-9-octadecenoic) acid

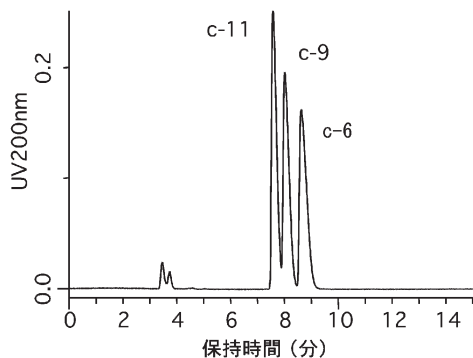


図10 cis-オクタデセン酸メチル - 位置異性体の分離
移動相: インクラティック溶離, 0.3% ACN/ヘキサン, 他の条件は図3と同じ

methyl ester]、ペトロセリン酸メチル [petroselinic (cis-6-octadecenoic) acid methyl ester]の順に溶出され、 Ag^+ と不飽和脂肪酸(エステル)が形成する錯体の安定性と保持の強さにはよい相関が認められる。図11は、炭素数(エステル部を除く)が14から24のモノエン酸メチルエステルについて二重結合の位置と保持時間の関係を示す図である。炭素数には関わりなく二重結合がカルボニル炭素から遠ざかるほど早く溶出される傾向が明らかである。trans体についてもcis体と同様の傾向が認められる。なお、電子供与性の官能基(ナフタシル基など)とのエステルであれば錯体の安定性は増し、カラムに対する保持はさらに強くなることが報告されている¹²⁾。

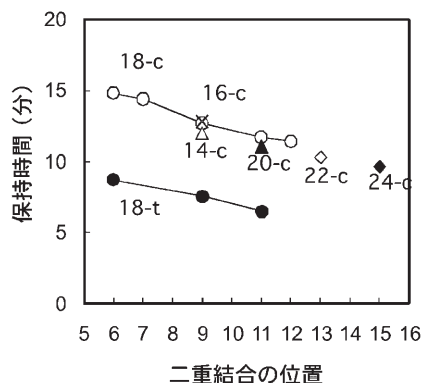


図11 モノエン酸メチルの二重結合の位置と保持時間
移動相: リニアグラジェント溶離, 2-10% AcOEt (20分)/ヘキサン, 他の条件は図3と同じ

図12に、“Silver column KANTO”によるテルフェニル (terphenyl)の位置異性体(*o*-、*m*-、*p*-異性体)のクロマトグラムを示す。芳香族化合物であるテルフェニルはビフェニル(biphenyl)に続いて*o*-体、*m*-体、*p*-体の順に溶出された。“Silver column KANTO”が脂肪族化合物だけではなく、芳香族化合物の分離にも適用できることを示す結果である。

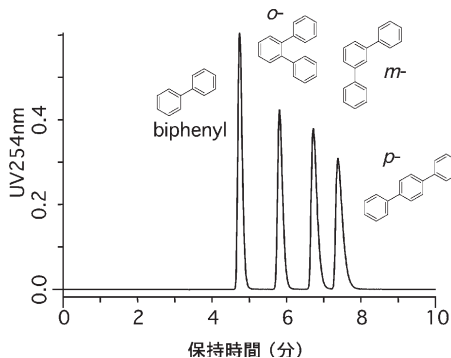


図12 テルフェニル - 位置異性体の分離
移動相: インクラティック溶離, 0.2% ACN/ヘキサン, 他の条件は図3と同じ

*以下,2009 No.4(214号)に続く。