

脂肪酸 9-アンスリルメチルエステル誘導体の逆相 HPLC での保持挙動

Retention Behavior of Fatty Acid 9-Anthrylmethyl Ester Derivatives in Reversed-phase HPLC

西村 一彦 藤井 良昭 板橋 豊*¹

Kazuhiko NISHIMURA, Yoshiaki FUJII and Yutaka ITABASHI

Key words : 9-anthrylmethylester (9-アンスリルメチルエステル) ; fatty acid (脂肪酸) ; elution order (溶出順)

緒 言

脂肪酸の分析は、逆相 HPLC (Reversed-phase HPLC、以下 RP-HPLC) による方法、特に 9-アンスリルジアゾメタン試薬により蛍光ラベル化することで高感度に分析可能な 9-アンスリルメチルエステル (以下、脂肪酸 ADAM 誘導体) を用いる分析法が生体試料などの分析に広く使用されている¹⁻¹²⁾。分析の移動相にはメタノールやアセトニトリルが使用されているが、脂肪酸 ADAM 誘導体の溶出順は移動相により異なっている。我々が行った赤潮プランクトンの分析⁷⁾で Palmitoleic acid (炭素数 16、二重結合数 1、以下 C 16 : 1 と表記)、Myristic acid (C 14 : 0)、Linoleic acid (C 18 : 2) の ADAM 誘導体の溶出順は、メタノール : 水 (98 : 2 v/v) 移動相で C 16 : 1、C 14 : 0、C 18 : 2 であったのに対し、アセトニトリル : 水 (98 : 2 v/v) 移動相で C 16 : 1、C 18 : 2、C 14 : 0 と異なっていた。これらの溶出順について、Yoshida らはメタノール : 水 (90 : 10 v/v) 移動相で C 16 : 1、C 14 : 0、C 18 : 2²⁾の順に、Roemen らはアセトニトリル : 水 (93 : 7 v/v) 移動相で C 14 : 0、C 16 : 1、C 18 : 2³⁾の順に溶出することを報告している。このようにいくつかの脂肪酸 ADAM 誘導体の溶出順は移動相により異なることが示されている。しかし、いずれの論文でもこの溶出順について詳細な検証はなされていない。今回、我々は、脂肪酸 ADAM 誘導体の RP-HPLC 保持挙動について検討を行ったところ若干の知見を得ることができたので以下に報告する。

方 法

1. 試薬

脂肪酸標準品は、動植物に含まれているものを中心に以

下の 12 種類を使用した。Myristic acid (C 14 : 0)、Palmitic acid (C 16 : 0)、Stearic acid (C 18 : 0)、Palmitoleic acid (C 16 : 1)、Oleic acid (C 18 : 1)、Linoleic acid (C 18 : 2)、 α -Linolenic acid (C 18 : 3) は富士フィルム和光純薬 (株) 製を、Myristoleic acid (C 14 : 1)、Octadecatetraenoic acid (C 18 : 4)、Aracinoenoic acid (C 20 : 4)、Eicosapentaenoic acid (C 20 : 5)、Docosahexaenoic acid (C 22 : 6) はシグマ社製を用いた。各脂肪酸はメタノールに溶解して 2000 μ g/mL の標準原液とし、適宜希釈、混合して使用した。

蛍光誘導体のうち ADAM 誘導体はフナコシ製 9-アンスリルジアゾメタン試薬を用い、Nimura らの方法¹⁾に従い誘導体化を行った。4-ヒドロキシメチル-7-メトキシマリン (HCM) 誘導体は東京化成工業 (株) 製 HCM、富士フィルム和光純薬 (株) 製 4-ジメチルアミノピリジン、N、N-ジシクロヘキシルカルボジイミドを用い、戸塚らの方法¹³⁾に従い誘導体化を行った。いずれの試験液もメタノールで 1 mL とした。

メタノール、アセトニトリル、ジクロロメタン、蒸留水は富士フィルム和光純薬 (株) 製 HPLC 用を使用した。

2. HPLC 分析条件

日立製作所製 L-7100/L-7100 高圧グラジエントシステムを用いたポンプによる移動相混合を行い、アイソクラティック分析を行った。移動相組成は、メタノール : アセトニトリル (100 : 0、75 : 25、50 : 50、25 : 75、0 : 100 v/v)、メタノール : 水 (100 : 0、98 : 2、96 : 4、94 : 6 v/v)、アセトニトリル : 水 (100 : 0、98 : 2、96 : 4、94 : 6 v/v) とした。カラム温度は 40℃、分析カラムは、Superspher RP-18 (関東化学 250×4.6 mm、4 μ m)、流速 0.5 mL/min、注入量は 10 μ L とした。検出には ADAM 誘導体は蛍光検出器を用い励起波長 365 nm、蛍光波長 412 nm で、HCM 誘導体は紫外吸光検出器を用い 254 nm、遊離脂肪酸は 210 nm で分析を行った。

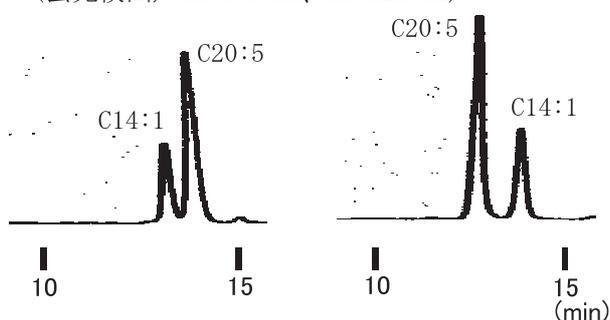
*1 北海道大学大学院水産科学研究院 (現所属 : 公益財団法人日本食品油脂検査協会)

メタノール：アセトニトリル

100:0 (v/v) 0:100 (v/v)

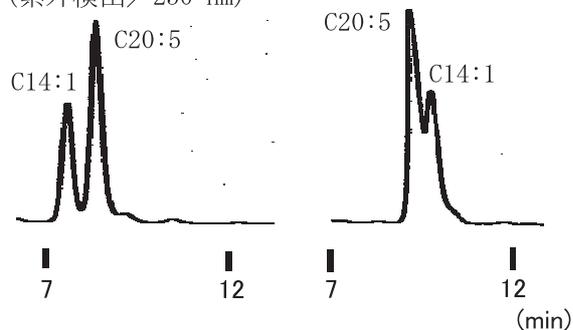
脂肪酸ADAM誘導体

(蛍光検出/ex:365 nm, em 412 nm)



脂肪酸HCM誘導体

(紫外検出/250 nm)



遊離脂肪酸

(紫外検出/210 nm)

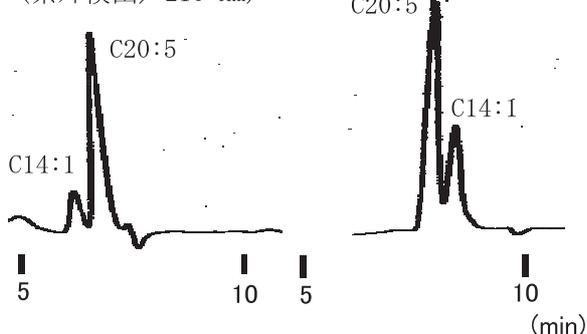


図1 誘導体の違いが溶出順に与える影響
(C14:1とC20:5の比較)

標準品混合比 (C20:5/C14:1) = 2/1 (wt/wt)

結果と考察

1. 移動相の有機溶媒組成による影響

はじめに移動相に用いる有機溶媒の種類と組成が与える影響について検討を行った。移動相組成メタノール：アセトニトリル (100:0、75:25、50:50、25:75、0:100 v/v) で得られた脂肪酸ADAM誘導体の溶出順を表1に示す。RP-HPLCによる分析でトリアシルグリセロール、リン脂質など脂肪酸関連物質はEquivalent Carbon Number (ECN = 炭素数 - 2 × 二重結合数) に従って溶出することが知ら

れており¹⁴⁻¹⁶⁾、脂肪酸ADAM誘導体も同じ規則に従うと考えられている。実際、メタノール：アセトニトリル (0:100 v/v) 移動相では、ECNに従った溶出順 (表1) を示していた。しかし、メタノール：アセトニトリル (100:0 v/v) 移動相では、二重結合の多いC20:5 (ECN=10) やC22:6 (ECN=10) がECN順ではなくECN=12の脂肪酸ADAM誘導体の間に溶出していた。移動相組成による溶出順の逆転がADAM誘導体に固有の現象かを確認するために、HCM誘導体と遊離脂肪酸 (C14:1、C20:5) を用い、メタノール：アセトニトリル (100:0、0:100 v/v) 移動相で比較を行った。その結果、ADAM誘導体と同様に溶出順が逆転しており (図1)、溶出順逆転は誘導体部分ではなく、脂肪酸部分により引き起こされていると考えられた。次にメタノール：アセトニトリル混合比を変え測定した結果を図2に示す。脂肪酸ADAM誘導体の保持時間 (RT) は移動相組成の変化に伴いいずれもRTが減少傾向から増加傾向に変化し、飽和脂肪酸のRTは、アセトニトリル含量25%付近、不飽和脂肪酸のRTは25~50%付近で最小の値を示していた。また、飽和脂肪酸は不飽和脂肪酸に比べ、アセトニトリル割合が高いRTの増加幅が大きいなど脂肪酸の二重結合数の違いがRT変化に影響していた (図2 (D))。また炭素数の違いでも同様の影響が認められた (図2 (A))。その結果C14:1 (ECN=12) とC20:5 (ECN=10) をはじめとする脂肪酸の溶出順逆転が複数認められた (図2、表1)。このように一部の脂肪酸で溶出順が逆転する理由として以下の相互作用を考えた。逆相HPLCでは移動相に用いる有機溶媒の極性に従いメタノールよりもアセトニトリルの方が一般的に溶出力は大きいとされる^{17,18)}。移動相中のアセトニトリル含量が増加することで移動相全体の極性が減り、飽和脂肪酸ではアセトニトリル含量25%、不飽和脂肪酸では25~50%付近までのRT減少に影響していると考えられた。一方、RTが増加に転じる理由として、カラムの固定相に対する移動相の溶媒和の違いが影響していると考えた。Grittiら¹⁹⁾や長江は^{20,21)}、固定相に移動相有機溶媒の一部が溶媒和し固定相として働くことを報告している。この溶媒和はメタノールよりアセトニトリルの方が大きく、移動相中のアセトニトリル含量が増加するとオクタデシル (ODS) 基表面で固定相として働く溶媒和が増え、固定相と構造が似た炭素数の脂肪酸がより強く影響を受け、そのRT増加が大きくなると考えた。これらが複雑に作用した結果、RTが近く、炭素数、二重結合数の違いが大きい脂肪酸の間で溶出順の逆転が引き起こされていると推察した。しかしこの仮説を明確に証明するには、さらなる検討が必要と考えられた。

2. 移動相中の水含量による影響

次に我々は、移動相中の水含量が溶出に及ぼす影響について検討を行った。メタノール：水 (100:0、98:2、96:4、94:6 v/v)、アセトニトリル：水 (100:0、98:2、96:4、94:6 v/v) 移動相による溶出順を表2にRT曲線を図3

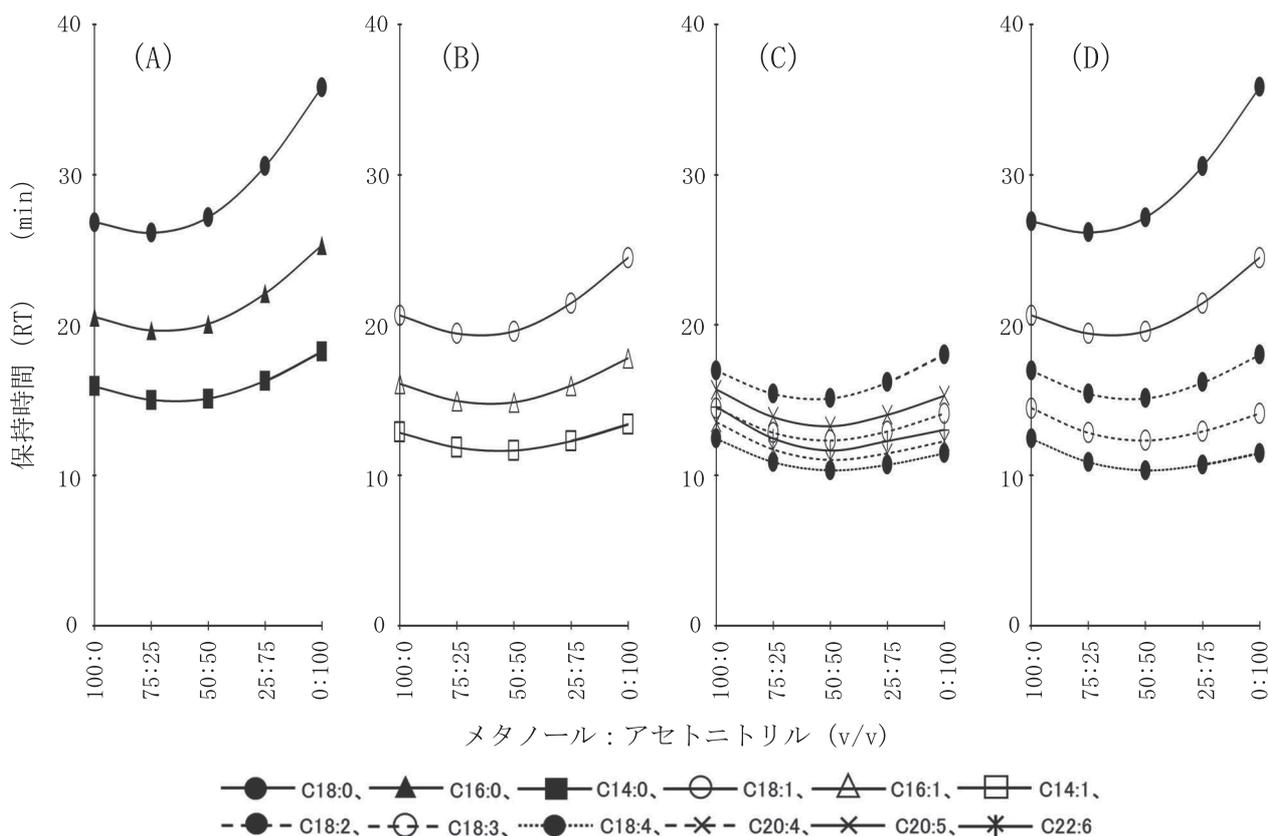


図2 移動相組成が脂肪酸 ADAM 誘導体保持時間に与える影響

- (A) 飽和脂肪酸 ADAM 誘導体 (18:0、16:0、14:0)
 (B) 一価不飽和脂肪酸 ADAM 誘導体 (18:1、16:1、14:1)
 (C) 多価不飽和脂肪酸 ADAM 誘導体 (18:2、18:3、18:4、20:4、20:5、22:6)
 (D) オクタデカン酸系列 ADAM 誘導体 (18:0、18:1、18:2、18:3、18:4)

表1 移動相組成による脂肪酸 ADAM 誘導体溶出順変化

メタノール：アセトニトリル (v/v)

溶出順	100:0	75:25	50:50	25:75	0:100
1	C 18 : 4 (10)				
2	C 14 : 1 (12)	C 20 : 5 (10)			
3	C 20 : 5 (10)	C 14 : 1 (12)			
4	C 18 : 3 (12)	C 22 : 6 (10)			
5	C 22 : 6 (10)	C 18 : 3 (12)			
6	C 20 : 4 (12)				
7	C 14 : 0 (14)	C 16 : 1 (14)			
8	C 16 : 1 (14)	C 14 : 0 (14)	C 14 : 0 (14)	C 18 : 2 (14)	C 18 : 2 (14)
9	C 18 : 2 (14)	C 18 : 2 (14)	C 18 : 2 (14)	C 14 : 0 (14)	C 14 : 0 (14)
10	C 16 : 0 (16)	C 18 : 1 (16)			
11	C 18 : 1 (16)	C 16 : 0 (16)			
12	C 18 : 0 (18)				

括弧内は ECN 値

ECN=炭素数-2×二重結合数

表2 移動相中水含量の違いによる脂肪酸 ADAM 誘導体溶出順変化

		メタノール：水 (v/v)			
溶出順	100：0	98：2	96：4	94：6	
1	C 18：4 (10)	———— C 14：1 (12)			
2	C 14：1 (12)	———— C 18：4 (10)			
3	C 20：5 (10)	———— C 20：5 (10)			
4	C 18：3 (12)	———— C 18：3 (12)			
5	C 22：6 (10)	———— C 22：6 (10)			
6	C 20：4 (12)	———— C 14：0 (14)			
7	C 14：0 (14)	———— C 20：4 (12)	———— C 16：1 (14)	———— C 16：1 (14)	———— C 16：1 (14)
8	C 16：1 (14)	———— C 16：1 (14)	———— C 20：4 (12)	———— C 20：4 (12)	———— C 20：4 (12)
9	C 18：2 (14)	———— C 18：2 (14)			
10	C 16：0 (16)	———— C 16：0 (16)			
11	C 18：1 (16)	———— C 18：1 (16)			
12	C 18：0 (18)	———— C 18：0 (18)			

		アセトニトリル：水 (v/v)			
溶出順	100：0	98：2	96：4	94：6	
1	C 18：4 (10)	———— C 18：4 (10)			
2	C 20：5 (10)	———— C 20：5 (10)			
3	C 22：6 (10)	———— C 14：1 (12)			
4	C 14：1 (12)	———— C 22：6 (10)			
5	C 18：3 (12)	———— C 18：3 (12)			
6	C 20：4 (12)	———— C 20：4 (12)			
7	C 16：1 (14)	———— C 16：1 (14)			
8	C 18：2 (14)	———— C 14：0 (14)			
9	C 14：0 (14)	———— C 18：2 (14)			
10	C 18：1 (16)	———— C 18：1 (16)			
11	C 16：0 (16)	———— C 16：0 (16)			
12	C 18：0 (18)	———— C 18：0 (18)			

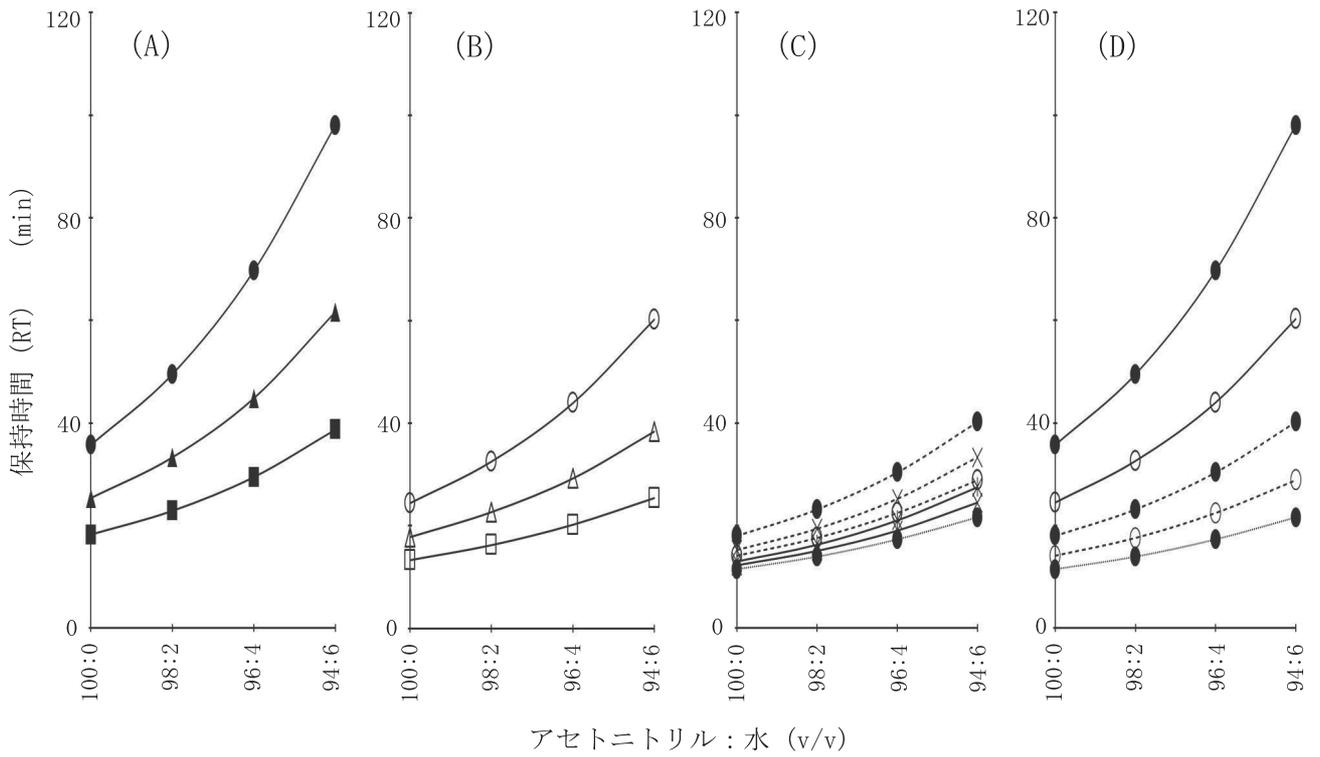
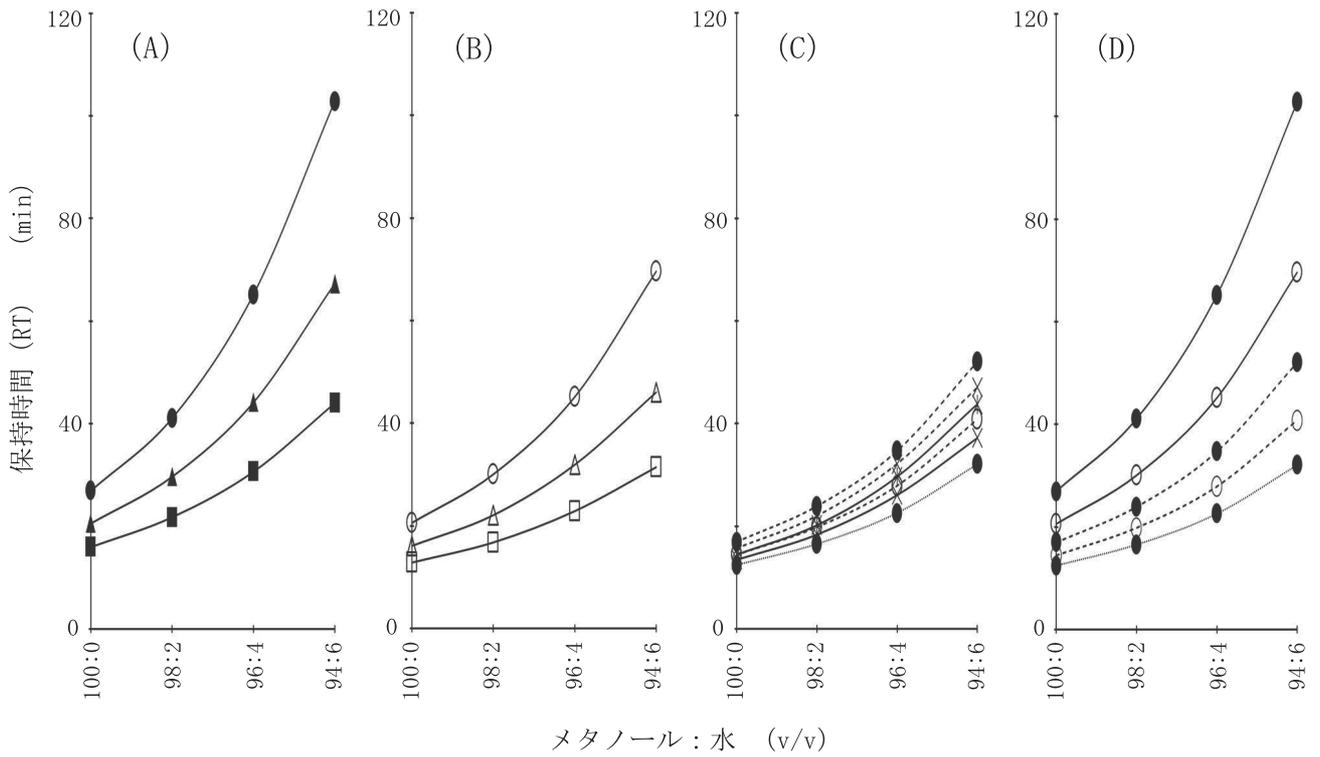
括弧内は ECN 値
ECN=炭素数-2×二重結合数

に示す。メタノール、アセトニトリルともに水含量の増加に伴い RT が急激に増加した。飽和脂肪酸、炭素数が多い脂肪酸の RT 増加がやや大きく、メタノール：水またはアセトニトリル：水 (100：0 v/v) の移動相で RT が近く、脂肪酸炭素数の差 (もしくは二重結合数の差) が大きい脂肪酸 ADAM 誘導体間で溶出の逆転が認められた。しかし移動相組成をメタノールからアセトニトリルへと変化させた図 1 と比較すると RT の変化は増加方向のみであること、水含量が 4% を越えるあたりからメタノール系移動相よりもアセトニトリル系移動相の RT が短いものが多くなるなど水含量が増加することによる移動相の極性、親水性が与える影響が支配的になると考えた。また移動相中における水含量が 1% 異なると特に飽和脂肪酸でその RT が大きく変わることも判明し、移動相の調製には水の影響に対する細心の注意が必要と考えられた。

3. 脂肪酸 ADAM 誘導体の溶出時間の推定

移動相中の水含量と脂肪酸 ADAM 誘導体の RT を近似プロットし水含量 12% まで外挿したグラフを図 4 に示す。水含量の増加に伴い各ピークの間隔は広くなるが分析時間も大きく増加するため、グラフから 12 種の脂肪酸 ADAM 誘導体が相互に分離できると予測されるメタノール：水 (91：9 v/v) 移動相が最適と考えた。そこでこの移動相条件で実際の分析を行ったところ、グラフから求めた RT と実際に測定した RT が良く一致し (表 3)、各ピークのベースライン分離が概ね達成できた (図 5)。

本研究で得られた結果は、脂肪酸 ADAM 誘導体の分離条件検討、各種天然物の脂肪酸組成分析に応用可能であるほかに、多くの ODS カラム分析条件検討の一助になると考える。



● C18:0、▲ C16:0、■ C14:0、○ C18:1、△ C16:1、□ C14:1、
 -●- C18:2、-○- C18:3、● C18:4、-×- C20:4、× C20:5、* C22:6

図3 移動相中の水含量が脂肪酸 ADAM 誘導体保持時間に与える影響

- (A) 飽和脂肪酸 ADAM 誘導体 (18:0、16:0、14:0)
 (B) 一価不飽和脂肪酸 ADAM 誘導体 (18:1、16:1、14:1)
 (C) 多価不飽和脂肪酸 ADAM 誘導体 (18:2、18:3、18:4、20:4、20:5、22:6)
 (D) オクタデカン酸系列 ADAM 誘導体 (18:0、18:1、18:2、18:3、18:4)

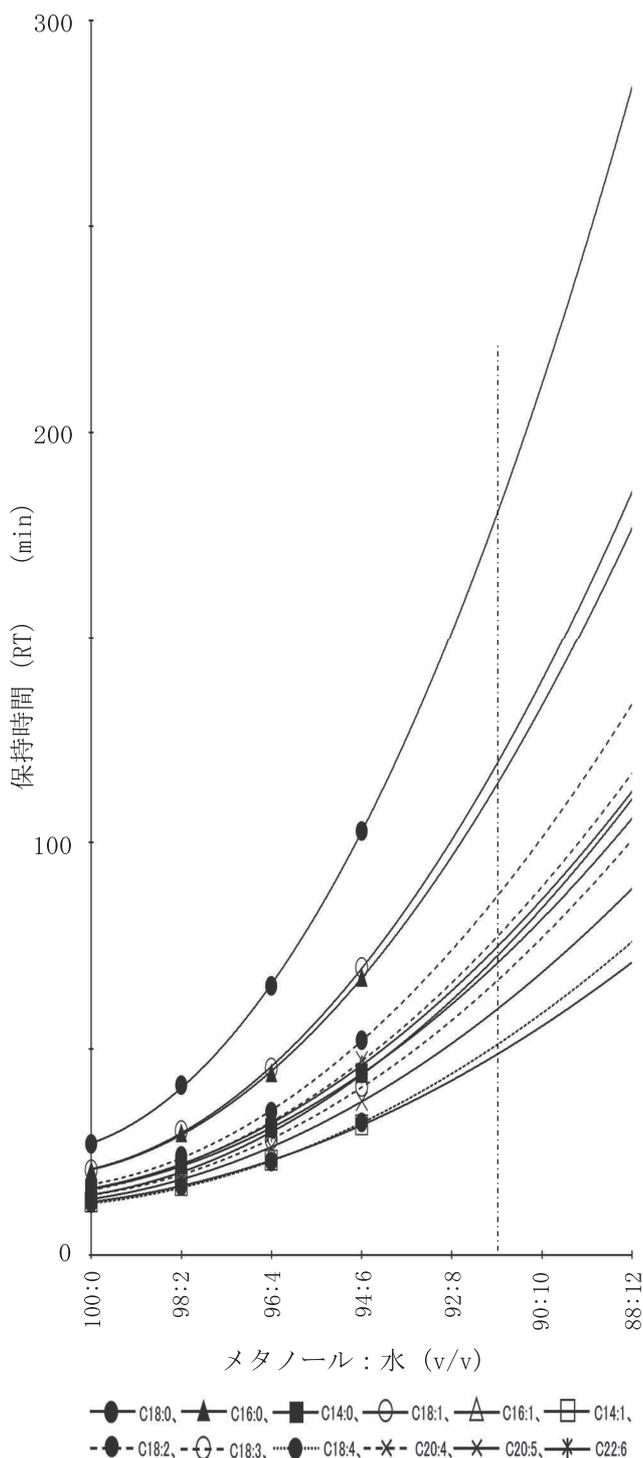


図4 脂肪酸 ADAM 誘導体の保持時間曲線 (予測)

—・— メタノール：水 (91：9) (v/v)

表3 脂肪酸 ADAM 誘導体保持間の予測値と実測値 (分)

溶出順	脂肪酸	計算値 (分)	実測値 (分)	誤差 (%)
1	C14：1	48.6	47.9	1.5
2	C18：4	50.9	49.8	2.3
3	C20：5	59.5	60.0	-0.8
4	C18：3	66.4	65.3	1.7
5	C14：0	70.6	70.2	0.6
6	C22：6	72.4	72.6	-0.2
7	C16：1	74.6	74.6	0.0
8	C20：4	77.1	78.1	-1.3
9	C18：2	86.9	85.9	1.2
10	C16：0	114.0	113.7	0.3
11	C18：1	119.1	118.7	0.3
12	C18：0	180.0	184.3	-2.3

移動相 メタノール：水 (91：9 v/v)

誤差 (%) = 計算値 ÷ 実測値 × 100

文 献

- 1) Nimura N, Kinoshita T: Fluorescent labeling of fatty acids with 9-anthryldiazomethane (ADAM) for high performance liquid chromatography. Anal. Lett., 13, 191-202 (1980)
- 2) Yoshida T, Uetake A, Yamaguchi H, Nimura N, Kinoshita T: New preparation method for 9-Anthryldiazomethane (ADAM) as a fluorescent labeling reagent for fatty acids and derivatives. Anal. Biochem., 173, 70-74 (1988)
- 3) Roemen THM, Van Der Vusse GJ: Assessment of fatty acids in cardiac tissue as 9-anthryldiazomethane esters by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B, 570 (2), 243-251 (1991)
- 4) Suzuki T, Matsuyama Y: Determination of free fatty acids in marine phytoplankton causing red tides by fluorometric high-performance liquid chromatography. J. Am. Oil Chem. Soc., 72, 1211-1214 (1995)
- 5) Suzuki T, Yoshizawa R, Kawamura T, Yamasaki M: Interference of Free fatty acids from the hepatopancreas of mussels with the mouse bioassay for shellfish toxins. Lipids, 31 (6), 641-645 (1996)
- 6) Matsuyama Y, Suzuki T: Free fatty acid in *Heterocapsa circularisquama* and *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae). Fish. Sci., 64 (4), 662-663 (1998)
- 7) Terasaki M, Itabashi Y, Suzuki T, Nishimura K: An improved method for determining the composition of FFA in red tide flagellates by RP-HPLC with fluorescence detection. J. Am. Oil Chem. Soc., 79, 1181-1186 (2002)
- 8) 西村一彦, 鈴木敏之, 板橋 豊: 蛍光検出 HPLC による乳及び乳製品の遊離脂肪酸の定量. 食衛誌, 43 (4), 230-233 (2002)
- 9) 西村一彦, 鈴木敏之, 桂 英二, 板橋 豊: 脂肪酸 9-アンスリルメチルエステル誘導体の高速液体クロマトグラフィ/質量分析法. 分析化学, 53 (6), 533-539 (2004)
- 10) 橋倉さやか, 柳瀬 毅, 原 啓二, 早船克己, 西村一彦: 高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いた細胞壁脂質成分ミコール酸分析による豚抗酸菌症の生化学的診断法の検討. 北獣会誌, 49, 10-14 (2005)
- 11) 西村一彦, 青柳直樹, 中山憲司, 内野栄治, 加藤芳伸, 板

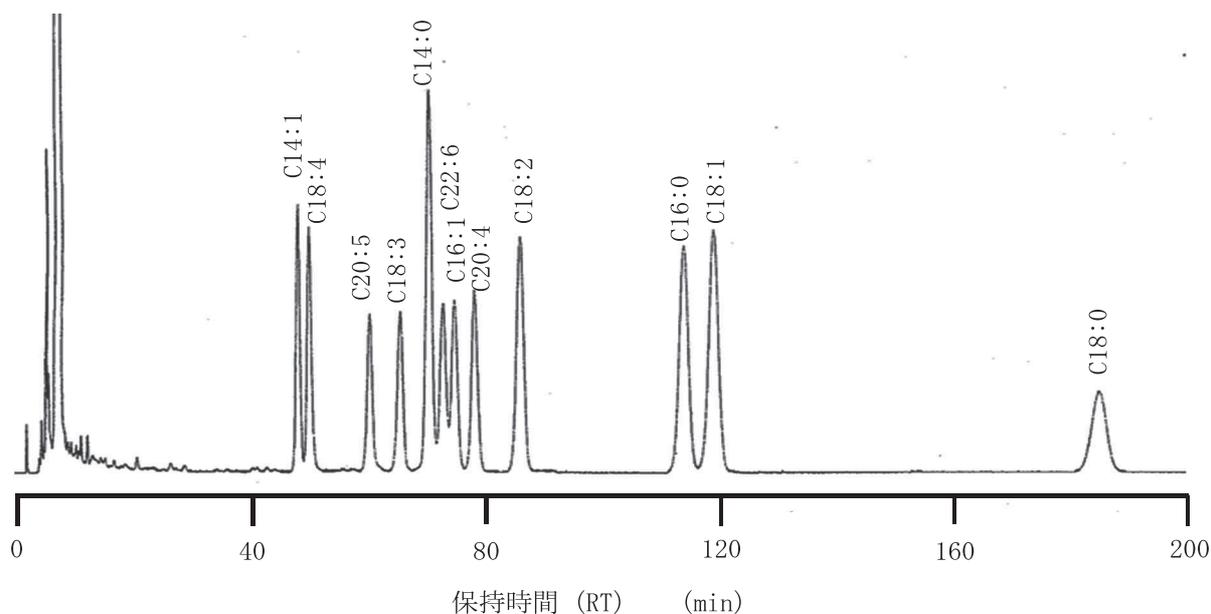


図5 メタノール：水 (91：9 v/v) 移動相を用いた12種脂肪酸ADAM誘導体のクロマトグラム

橋 豊：蛍光高速液体クロマトグラフィーによるNCN 24マウスの皮脂脂肪酸の高感度分析. 道衛研所報, 60, 25-28 (2010)

- 12) Nishimura K, Aoyanagi N, Uchino E, Itabashi Y: Influence of hot spring water on fatty acid composition of skin surface lipids in hairless mouse model of atopic dermatitis. *Biol. pharm. Bull.*, 39, 1718-1722 (2016)
- 13) 戸塚新一, 松田 恒, 佐藤孝義, 皆川憲夫: 高速液体クロマトグラフィーによる乳及び乳製品中の遊離脂肪酸の定量. *分析化学*, 45(10), 927-932 (1996)
- 14) 和田 俊: 天然油脂トリグリセリドの分子種に関する研究. *油化学*, 36(2), 105-109 (1987)
- 15) 深津 誠, 高橋康明, 小泉公志郎, 田村利武: 逆相 HPLC におけるトリアシルグリセリンの保持時間推定法. *日本油化学会誌*, 47(4), 339-343 (1998)
- 16) 田尻智計, 板橋 豊: 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法によるホスファチジルコリンの分子種分析. *分析化学*, 51(9), 667-674 (2002)
- 17) TSK-GEL TECHNICAL INFORMATION No. 133: アセトニ

トリルの供給不足への対応について (1), https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_JP/TechInfo/TI-133-アセトニトリル-1-.pdf (確認: 2021年6月23日)

- 18) YMC HPLC DATA SHEET: アセトニトリル使用量削減対策 —有機溶媒の変更—, <http://www.ymc.co.jp/data/tech/10.pdf> (確認: 2021年6月23日)
- 19) Gritti F, Guiochon G: Adsorption mechanism in RPLC. Effect of the nature of the organic modifier. *Anal. Chem.*, 77(13), 4257-4272 (2005)
- 20) ChromaNik Technologies Inc. テクニカルノート 1008: 水移動相で C18 カラムは使えるの? アルキル基は立っているの? 寝込んでいるの?, http://chromanik.co.jp/technical/pdf/technical_note_1008_jp.pdf (確認: 2021年6月23日)
- 21) ChromaNik Technologies Inc. テクニカルノート 100 B: 逆相固定相のアルキル基: 寝込んでいるのか (Ligand Collapse) または立ち上がっているのか? また試料との相互作用は?, http://chromanik.co.jp/technical/ligand_collapse.html (確認: 2021年6月23日)