

クロマトグラフィーを中心とする機器分析の実際(2)

(株)日東技術情報センター 堀 正典

1. はじめに

エンブラに代表される工業材料から電子材料、あるいは天然有機物、生体試料などの分析対象試料は単一成分であることは希であり、一般には複雑な混合物となっている。このような試料から各々の成分を分離・単離することは、組成分析において重要なプロセスとなっている。その手法としては、溶剤分離(溶媒抽出)、遠心分離、クロマトグラフィーが挙げられますが、高分離能からクロマトグラフィーが多用されている。また物質を単に分離するだけではなく、現在ではクロマトグラフィーは他の機器と組み合わせられた複合分析としての役割も果しており、熱分解 GC/MS や ヘットスペース GC もこの範疇にあると言える。さらに実分析においてもクロマトグラフィーのテクニックによって分析精度の向上やスピードアップが図られる場合も多い。今回はクロマトグラフィーとその周辺技術を使って得られた分析例について紹介する。

2・三次元硬化物の熱分解 GC/MS - ポリイミドフィルムを例として一

芳香族系酸無水物とジアミンより形成されるポリイミドは、耐熱性があり電気特性、機械強度にも優れた不溶不融の高分子である。この高分子の組成を分析する場合は、そのまま IR 分析を行うか、もしくは加水分解した後 IR 柑、NMR 測定する方法が一般的である。しかし試料が微量な場合は加水分解は難しい。

ポリイミドフィルムを Challinor によって開発された、テトラアンモニウムヒドロキシドを用いる熱分解 GC/MS (SPM 法) により測定した結果を図 1 に示した。パイログラム上で観測されるベンゼンやアニリン等の低沸点物から元の高分子の組成を推測することは、実際上は不可絵である。しかし高沸点側に観測されている種々のメチル化体まで含め解析すると、酸由来の物質とアミン由来の物質に分類される事がわかる。これらの情報よりジアミノジフェニルエーテルとピロメリット酸無水物より合成されるポリイミドと推定できる。またリン酸のメチル化体は滑剤としてリン酸カルシウムが使われていることを示唆している。ポリイミドのような縮重合の場合は重合反応が不可逆であるため、通常の熱分解法では主鎖のランダ開裂が起こる。そのため熱分解生成物はもとの高分子を直接的には反映しておらず、パイログラムの解析から化学構造を決定することは事実上、困難な場合が多かった。それに対し SPM 法は加水分解的熱分解とメチル化が同時に進行するため縮重合系ポリマーの分析に有効であり、一般の加水分解・溶媒抽出法に比べ分析時間も短縮できる。

3. 揮発成分の分析

試料に残存する微量な溶媒やモノマー、あるいは添加剤、重合触媒、主ポリマーなどが関与する揮発成分を分析することは、悪臭物質の探索（安全性や環境問題）や副反応生成物の同定、熱安定性の評価など多くの情報を与える。そのための分析法として従来からスタティックヘッドスペース法やパージ&トラップを用いるダイナミックヘッドスペース法が使用されてきた。後者の場合は検出感度がスタティック法に比べ 100 倍程度向上すると言われており、さらに高沸点物の検出も容易になる。その代表的な装置が JHS - 100 ですが、図 2 にはこれを用いた分析例を示した。筆者らの経験では、多数の試料を分析する場合はスタティック法が使いがってがよい面もあるが、ダイナミック法の場合、試料が微量でよい場合も多く、貴重な試料の場合有効である。

4. 室温付近での揮発成分の測定 - フェロモン放出速度の測定例一

新しい害虫防除システムとして、性フェロモンを用いる生物的駆除がある。これを実用化させるにはフェロモンを一定期間一定の量放出させる人工的フェロモン源（フェロモンデバイス）が必要とされる。このデバイスの評価として室温下でのフェロモン放出速度を求めることが要求されている。しかし室温付近（20 ~ 40 °C）での揮発成分の放出速度を正確に求めることは、温度制御や風速などの問題があり、市販のヘッドスペース法ではうまく行かない場合が多い。またフェロモンは立体構造の制御された脂肪族の酢酸エステルやアルデヒド、アルコールの場合が多く、高沸点を有するものもあり、これらを効率良く捕集する必要がある。我々はデバイスが設置された環境を再現できるような捕集システムを製作し、デバイスからの微量のフェロモンの放出量を測定してきた。検出下限はチャノコカクモンハマキの性フェロモン的一种である Z - 11 トテトラデセニルアセテート (Z - 11TDA) で 50ng / day である。JHS - 100 と組み合わせれば近い将来、一匹の虫から放出されるフェロモンの定量も比較的容易に可能かも知れない。

5. LC による天然油脂の分子種解明

トリグリセライド (TG) は天然油脂の主成分で、動物の皮下脂肪や植物の種子などに多く存在している。この分子構造は 3 個の脂肪酸が 1 個のグリセリンにエステル結合したトリエステルである。したがって、理論上油脂が n 種の脂肪酸観で構成されているとき異性体を全く考慮しなくても $(n^3 + 3n^2 + 2n) / 6$ 個の分子種が考えられる。天然油脂は通常数種類の脂肪酸よりなっているので、その組み合わせよりなる分子種は非常に複雑になる。これらの分子種の解明に最近では、逆相系の LC を使用することが多くなっている。これは脂肪酸の総炭素数と二重結合の総数から定義される

Partition Number (PN) と呼ばれる分離因子と TG の保持時間の対数が経験的にほぼ linear な関係になることが発見されたことが発端になっている。しかし脂肪酸組成の複雑な海産油の解明には今のところ適用が困難であるのが現状である。たとえば高度不飽和脂肪酸 (PUFA) が多く含まれる魚油の、個々の TG の分子種の同定と量的関係を明らかにするためには少なくとも理論段数が数十万以上のはカラムが必要とされている。従って現在ではその分析が困難であることから、分子種に関する知見はあまり得られていなく、試行錯誤的研究が続いている。分析をさらに進めるためには分取操作とスペクトル分析が必要になるため、LC - 908 を用いてリサイクル LC 行い分離不十分なピークに分取を試みた。完全に単態できないまでも、精製と分取が同時にできるリサイクル LC のメリットは後工程を考えれば大きいものがある。しかしリサイクル LC をもってしても、PN が同じで、かつ分子量が等しい分子種は分離が困難な傾向がある。現在は LC/MS と個々の脂肪酸が TG の保持時間に寄与する度合いを組み入れた、相対保持ポテンシャルインデックスから解析を進めている。

6. 結語

クロマトグラフィーは 1906 年、Tswett らが色素混合物を分離したことより始まったが、今現在でも分離、精製の中核をなしている。クロマトグラフィーの基礎理論は Martin や Golay によって確立されたが、測定技術は今後さらに発展していくと考えられる。その中でもパイロライザーやリサイクル LC により今まで限界であったことが少しずつ克服されていくことを期待する。

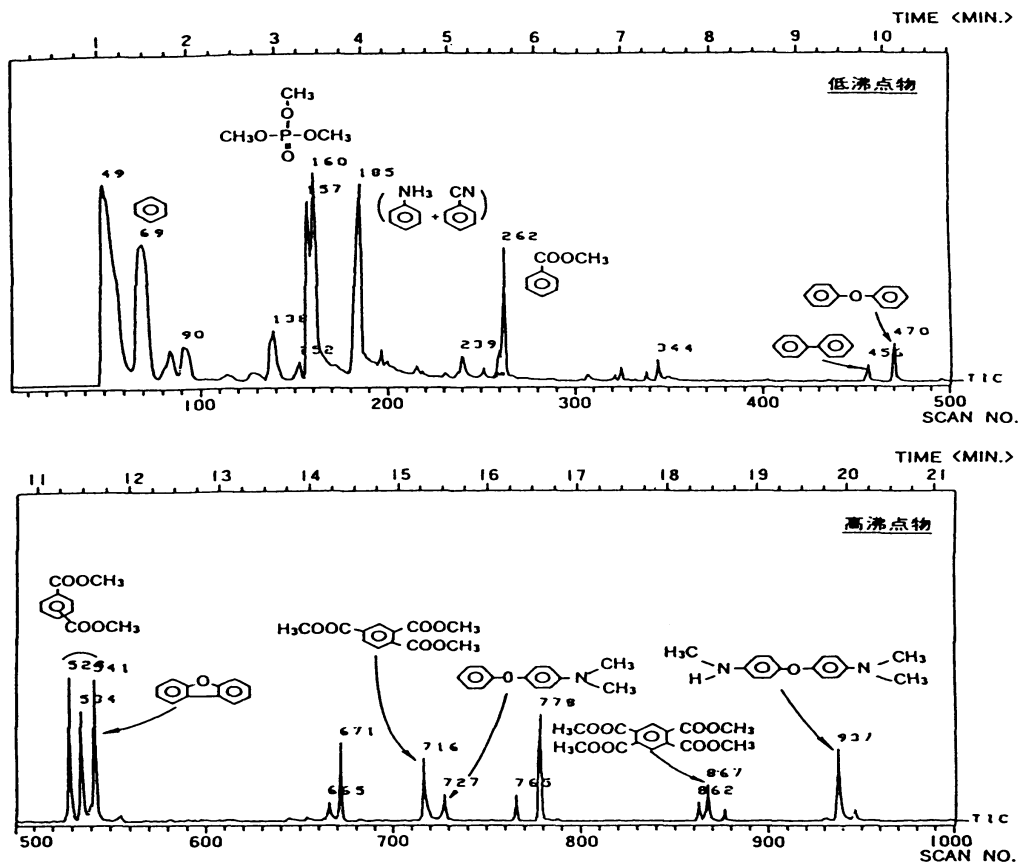


図1 ポリイミドフィルムのPyGC/MSによるバイログラム
熱分解温度 740°C (TMAHによるSPM法により測定)

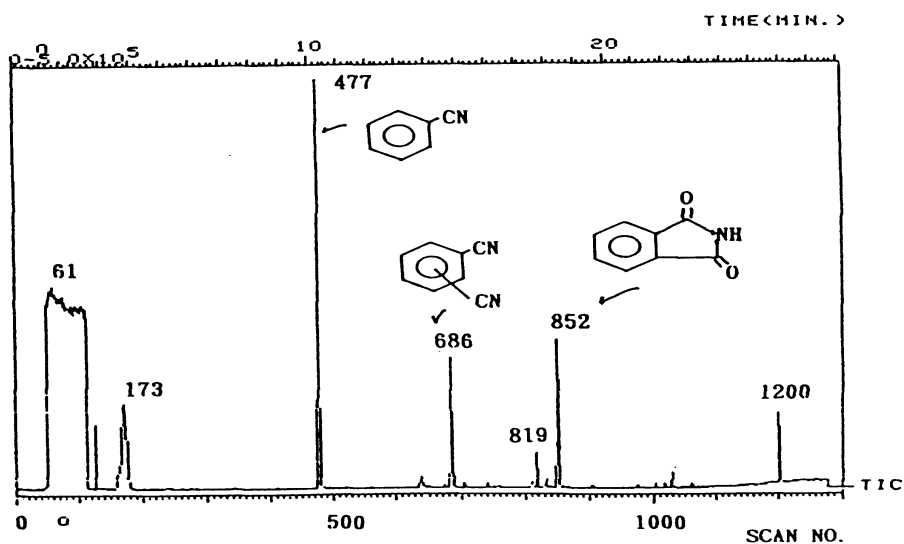


図2 エナメル皮膜の発生ガス分析

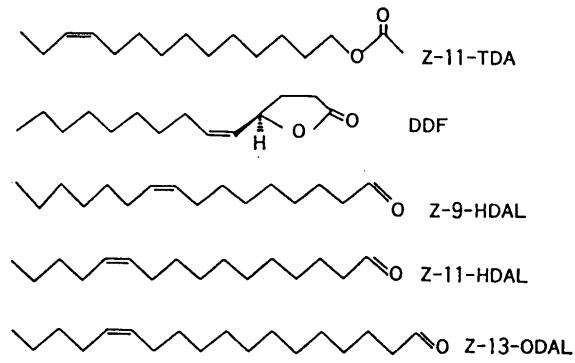


図3 フェロモンの化学構造
 Chemical structure of pheromones

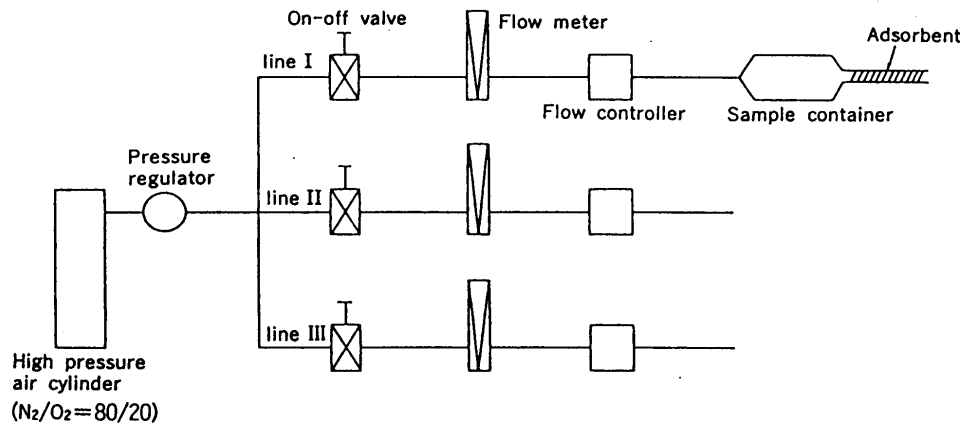


図4 捕集装置の概略図
 Schematic diagram of air flow apparatus for vapor collection

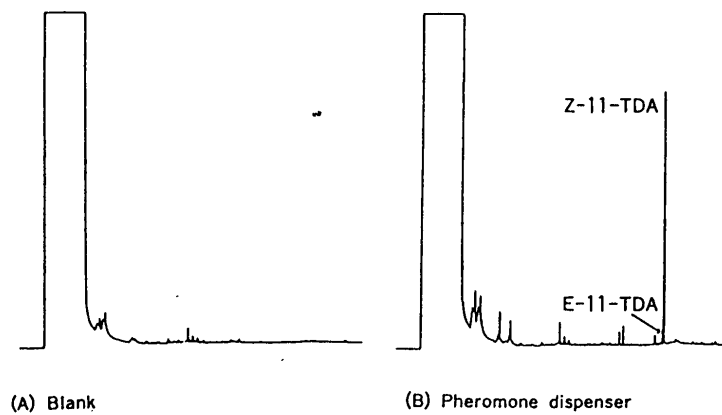


図5 捕集法によって得られたガスクロマトグラム
 Gas chromatograms obtained by vapor collection

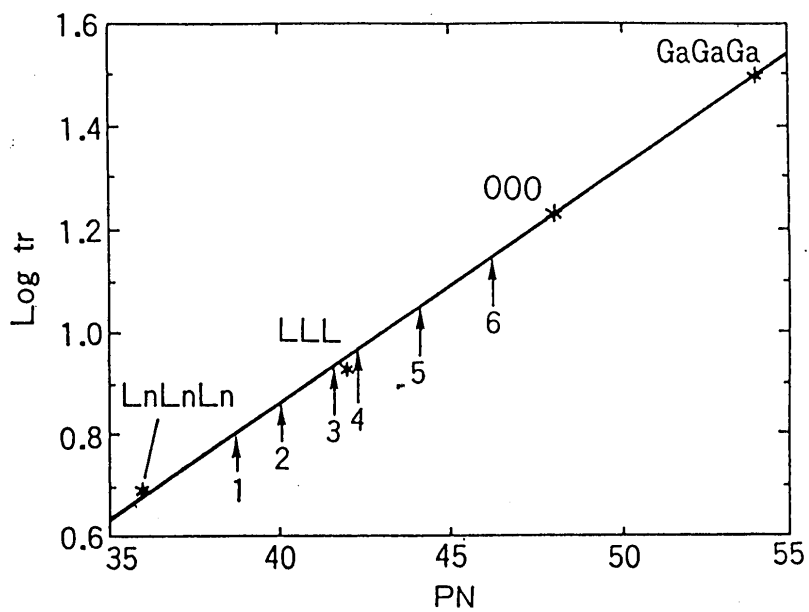


図6 Partition numberとトリグリセリドの保持時間との関係

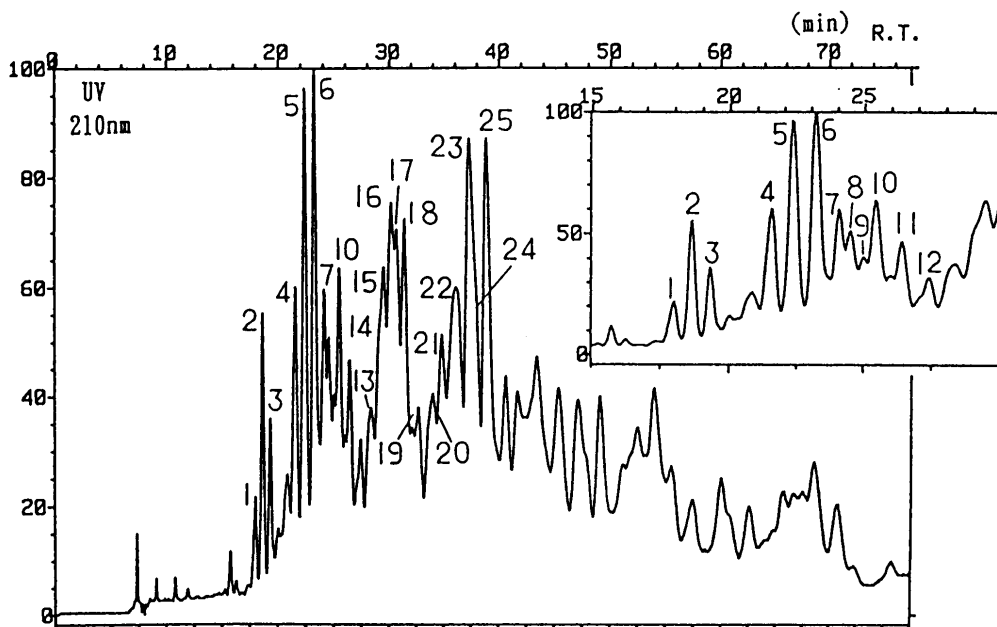


図7 UV trace of the triacylglycerol fraction of hydrolyzed fish oil with Lipase OF.

カラム: Inertsil PREP-ODS

250cm×I. D. 10mm, 2本連結

溶離液: アセトン/アセニト=50/50

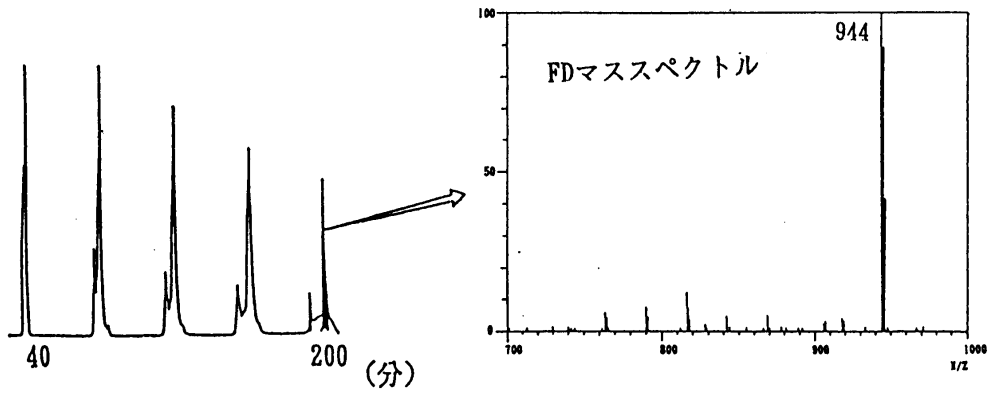
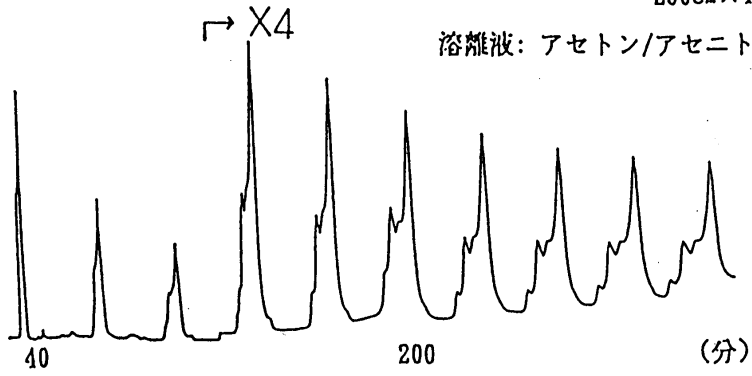


図8 ピーク4,5のリサイクルLC

POSITIVE AND NEGATIVE FAB MASS SPECTROMETRY BY FRIT-FAB LC/MS FOR THE CHARACTERIZATION OF ACYLGLYCEROLS IN FISH OIL

Masanori Hori¹, Yuko Sahashi², and Seiji Koike³

¹Nitto Technical Information Center Co., Ltd., 1-1-2, Shimozumi, Ibalaki 567, Japan

²Medical and Membrane Research Laboratory, Nitto Denko Corp., 1-1-2, Shimohozumi, Ibalaki 567, Japan

³Food, Fat and oil Laboratory, Asahi Denka Kogyo Corp., 8-4-1, Higashi-ogu, Arakawa, Tokyo 116, Japan

1. Introduction

Natural triacylglycerols (TGs), especially fish oil, are such complex mixture of different molecular species that it is difficult to separate all of them by a single chromatographic method. Therefore the experimental elucidation of the molecular species in the fish oil remains the most formidable problem in lipid chemistry. The composition analyses of TGs using FRIT-CI LC/MS with ammonia as a reagent gas have been reported previously (1), however this method was not suitable for the polar, labile and involatile fish oil. In this work FRIT-FAB LC/MS has been utilized to obtain the composition of the molecular species concerned with polyunsaturated fatty acids in the fish oil hydrolyzed with Lipase OF (*Candida cylindracea*).

2. Experimental

I

The HPLC analyses were performed on a Hewlett Packard model 1090L with reversed phase columns, ODS-Hypersil using a mobile phase of Acetone: acetonitrile (35:75) at a flow rate of 0.15 ml/min. The eluent via UV detector. Was introduced into a JEOL JMS-AX505H double focusing mass spectrometer equipped with a FRIT-FAB interface. The *m*-nitrobenzyl alcohol was used for the matrix of FAB ionization and introduced to the ion source by the post column addition.

3. Results and Discussion

According to the fundamental studies of the authentic TGs the negative ion FAB mass spectra of the TGs gave the RCOO⁻ ions as the base peak, and the other characteristic ions were not observed. Therefore the distribution of fatty acids in the oil could be determined by recording the mass chromatograms of the RCOO⁻ ions. Figure 1 shows the UV trace and the mass chromatograms of the RCOO⁻ ions of the TG fraction from the hydrolyzed fish oil (hydrolysis I-ate Was 5LL7E). The presence of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in the oil was confirmed by monitoring the RCOO⁻ ions at *m/z*: 301 and 327 respectively. For example it was evident that the TG in peak 1 consisted of at least two fatty acids of EPA and DHA. The positive ion FAB mass spectrum of peak 1 (shown in Fig. 1) represents the two species of EPA-EPA-EPA (tri-EPA) and 18:4-EPA-DHA as indicated by the [MH-RCOOH]⁺ ions and the [M+H]⁺ ion. The retention time of the peak 1 also

coincided with that of the authentic tri-EPA, and the retention time of the 18:4-EPA-DHA coincided well with the value that has been calculated by the relative retention potential index theory(2) as shown in Table 1. FAB mass spectrometric techniques combined with HPLC provided detailed information on the molecular species of the TGs in the fish oil.

References

- (1) M. Hori, Y. Sahashi, and S. Koike, *Mass Spectrosc.*, 39, 133(1991).
- (2) K. Takahashi, and T. Hirano, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 523(1988).

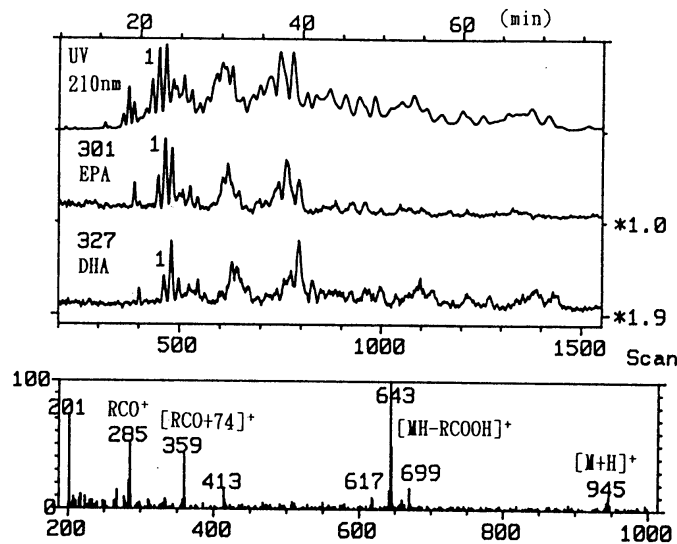


Fig. 1. Negative ion mass chromatograms of the hydrolyzed fish oil and positive ion FAB mass spectrum of peak 1.

Table 1. TG Molecular Species of the hydrolyzed fish oil determined by FRIT-FAB LC/MS

Molecular species ^{a)}	Empirically determined retention time (min)	Predicted ^{b)} retention time (min)	Relative retention time deviation (%)
(16:4)(18:4)(EPA)	17.95	17.87	0.45
(16:4)(EPA)(DHA)	19.27	19.28	0.05
(18:4)(EPA)(EPA)	21.55	21.64	0.42
(EPA)(EPA)(EPA)	22.36	—	—
(18:4)(EPA)(DHA)	22.36	22.45	0.40
(EPA)(EPA)(DHA)	23.21	23.35	0.60
(EPA)(DHA)(DHA)	24.10	24.22	0.50

^{a)} The binding position of fatty acids residues are not discriminated.

^{b)} Values that have been calculated by relative retention potential index theory.