



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	脂肪酸分析のための蛍光誘導体化試薬9-アントラセンメタノールの精製
Author(s)	端場, 祐介; 安藤, 靖浩
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 59(3), 67-72
Issue Date	2009-12-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/40204
Type	departmental bulletin paper
File Information	RFFS59-3_002.pdf



脂肪酸分析のための蛍光誘導体化試薬 9-アントラセンメタノールの精製

端場 祐介¹⁾・安藤 靖浩²⁾

(2009 年 6 月 22 日受付, 2009 年 7 月 30 日受理)

Purification of 9-Anthracenemethanol as a Fluorescent-Labeling Reagent for Microanalysis of Fatty Acids

Yusuke HABA¹⁾ and Yasuhiro ANDO²⁾

Abstract

A fluorescent-labeling reagent 9-anthracenemethanol was purified by recrystallization for use in microanalysis of natural oil fatty acids. A commercial reagent was dissolved in ethyl acetate at the boiling point, and allowed to stand at room temperature until the crystals precipitated in yellow needles. The product given in the yield of 74% was analyzed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Many contaminant peaks found in the crude material disappeared in the chromatogram, indicating successful purification of the reagent. The purified reagent could be used for fatty acid analysis of 1-5 μg of natural triacylglycerols including those of cod liver/mackerel oil and bonito head oil. 2-Butanone was also effective solvent for the purification. With these solvents, commercially available 9-anthracenemethanol can be purified by the simple recrystallization.

Key words: 9-Anthracenemethanol, Fatty acid analysis, Fish oil, Recrystallization, High-performance liquid chromatography

緒 言

蛍光試薬である 9-アントラセンメタノールはカルボキシ基のラベル化剤として有用で、得られるカルボン酸 9-アンスリルメチルエステル誘導体は蛍光高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による高感度分析に供される (Ohkura et al., 1994; Yasaka and Tanaka, 1994; Mukherjee and Karnes, 1996)。この誘導体化にエステル交換反応が適用された場合には、数 μg といった量の魚油トリアシルグリセロールの脂肪酸分析が可能である (Ando et al., 2007)。

誘導体化に使う試薬の純度は脂肪酸分析の正確さに影響する。特に 9-アントラセンメタノールは微量分析に使われるため、不純物が蛍光 HPLC で妨害ピークとなって出現すると分析は困難となる。筆者らの経験では、市販の 9-アントラセンメタノールは不純物のパターン、含有量がメーカー間で異なるだけでなく、同一のメーカーであってもロット間に顕著な差異が認められる。すなわち、未精製のまま脂肪酸分析に使用できる製品とできない製品とが存在する。不純物の影響を軽減するために試薬または誘導体の精製を行うことが必要になるが、現実には微量の誘導体の精製は容易ではなく、また試料の数だけ精製を繰り返さな

ければならない。

本研究では試薬側の 9-アントラセンメタノールを再結晶により精製することとした。再結晶の溶媒として酢酸エチルを使用した結果、1~5 μg の動植物油・魚油のトリアシルグリセロールの脂肪酸分析ができるレベルにまで精製できた。本報ではこの再結晶の手順とともに、得られた結晶の純度の判定、脂肪酸分析への適用性、他の溶媒を用いたときの精製について報告する。

実 験

材料

市販の 9-アントラセンメタノールとして Acros Organics 製 (>98%) の 1 ロットを用いた。酢酸エチルは和光純薬製 (特級) を未精製のまま使用した。分析試料には合成トリパルミチン (>99%, Extrasynthèse), 1,3-ジパルミチン-2-ステアリン (>99%, Sigma), 亜麻仁油 (関東化学), ラード (雪印乳業), サバ・スケトウダラ油 (日本化学飼料), カツオ頭部油 (相模中央化学研究所) のトリアシルグリセロールを用いた。天然油脂のトリアシルグリセロールは薄層クロマトグラフィーまたはカラムクロマトグラ

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学院生物資源化学講座
(Chair of Bioresources Chemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

²⁾ 北海道大学大学院水産科学研究院生物資源化学分野
(Laboratory of Bioresources Chemistry, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

フィーにより調製した。

再結晶

熱飽和溶液からの冷却法 (中川ら, 1993; 杉森, 2003) により再結晶を行った。ナス型フラスコ (200 ml 容量) に9-アントラセンメタノール 2.5~10 g をとり, 冷却器を付けて湯浴中で加熱還流しながら徐々に酢酸エチルを加えた。全量が溶解した時点で湯浴からフラスコを取り出し, その後室温下に静置して結晶を析出させた。吸引ろ過により結晶を目皿ロートまたはブフナーロート上に集め, そのまま溶媒臭が消えるまで通気乾燥した。得られた結晶の重量を測定し収率を決定した。

酢酸エチル以外の溶媒ではより小スケールで再結晶を行った。スクリュウキャップ付きバイアル (10 ml 容量) または共栓三角フラスコ (50 ml 容量) に9-アントラセンメタノール 200~250 mg をとり, 約 80°C の湯浴中で時々振り混ぜながら全量が溶解するまで溶媒を加えた。室温下で放冷, 次いで-30°C で 10 分間冷却して結晶を析出させたのち, 母液をパスツールピペットで吸引除去した。バイアル内の結晶を窒素ガスでブローし乾燥させた。

HPLC 分析

結晶を HPLC で分析し不純物ピークの溶出パターンを調べた。結晶 2.7 mg をスクリュウキャップ付きバイアル (0.6 ml 容量) に採取し, シクロヘキサン 160 μ l, アセトニトリル/水 (80:20, v/v) 160 μ l を加え十分に振とうした。分離上層 (主としてシクロヘキサン) 10 μ l を逆相蛍光 HPLC で分析した。分析条件は以下の通りである。ポンプ: Hitachi L-6200 (日立製作所); カラム: Superspher 100 RP-18e (25 cm $\times$ 4.6 mm 内径, 4 μ m 粒径; Merck); 移動相: アセトニトリル/トリエチルアミン (100:0.1, v/v) からアセトニトリル/エタノール/ヘキサン (30:40:30, v/v/v) へのリニアグラジェント (20 min), 流速 1 ml/min; カラムオープン: Shimadzu CTO-10AS_{VP} (島津製作所), 10°C; 蛍光検出器: Shimadzu RF-10A_{XL}, 励起波長 365 nm, 蛍光波長 412 nm, セル 20°C; インテグレーター: Shimadzu C-R6A。

脂肪酸9-アンスリルメチルエステルの調製とその分析

得られた結晶を使用してトリアシルグリセロールから脂肪酸9-アンスリルメチルエステル誘導体を調製し,

HPLC で分析した。調製にはカリウム *tert*-ブトキシドを触媒とする塩基性エステル交換反応 (Ando et al., 2007) を適用した。

加熱乾燥したスクリュウキャップ付きバイアル (0.6 ml 容量) に9-アントラセンメタノールの結晶 60 mg と 1 M カリウム *tert*-ブトキシド/テトラヒドロフラン溶液 (Aldrich 製) 20 μ l をとり, これに脱水テトラヒドロフラン 200 μ l を加えてカリウム 9-アントラセンメトキシド飽和溶液を調製した。次いで硫酸カルシウム 40 mg を添加して室温下 1 時間脱水し, 遠心上清を反応試薬として用いた。

トリアシルグリセロール 0.5~5 μ g を加熱乾燥済みのスクリュウキャップ付きバイアル (0.6 ml 容量) にとり, 脱水ジクロロメタン 10 μ l に溶かした。上記の反応試薬 10 μ l を加えてよく混合した後, 室温下 10 分間反応させた。酢酸/ジクロロメタン (1:10, v/v) 2 μ l を注入して反応を止め, 窒素ガスで溶媒を留去した。前項と同様に生成物をシクロヘキサンに分配抽出し, その 10 μ l を逆相蛍光 HPLC で分析した。

トリアシルグリセロールの試料量は, ブランクでは 0 μ g, トリパルミチン, 1,3-ジパルミチン-2-ステアリンでは 0.5 μ g, 亜麻仁油, ラードでは 1 μ g, サバ・スケトウダラ油, カツオ頭部油では 5 μ g とした。

結果と考察

結晶の収率

原料の未精製9-アントラセンメタノール量を 2.5, 3.2, 10.1 g として再結晶を行った際の酢酸エチルの所要量, 結晶の収量・収率, 形状, 呈色を Table 1 に示す。いずれの場合も酢酸エチルの所要量は原料 1 g につき約 8.7 ml であった。加熱還流時の溶液は透明であったため, 熱ろ過は行わなかった。また溶液は黄色を呈したが活性炭等による脱色の工程は省略した。結晶の収率は原料の量にかかわらず 74%, 形状は針状, 呈色は黄であった。

結晶の純度

原料9-アントラセンメタノールおよび得られた結晶を HPLC で分析した (Fig. 1)。未精製の原料 (Fig. 1(a)) では, 脂肪酸分析を行う際に妨害となる溶出時間 (7 分~19 分) に多数のピークが出現した。特に 11 分までのピーク群は高さ, 面積ともに顕著であり, 水産油脂の分析ではオク

Table 1. Recrystallization of 9-anthracenemethanol from ethyl acetate

Material ^{a)} applied (g)	Ethyl acetate required		Yield			
	(ml)	(ml/g)	(g)	(%)	Form	Color
2.5	21.5	8.6	1.8	73.6	Needles	Yellow
3.2	28.0	8.8	2.4	74.7	Needles	Yellow
10.1	87.0	8.6	7.5	74.0	Needles	Yellow

^{a)}Commercial product of 9-anthracenemethanol (>98%).

タデカテトラエン酸 ($18:4n-3+18:4n-1$) (8.2分), エイコサペンタエン酸 (EPA, $20:5n-3$) (8.6分), ドコサヘキサエン酸 (DHA, $22:6n-3$) (8.9分), 動植物油の分析ではリノレン酸 ($18:3n-3$) (9.4分), リノール酸 ($18:2n-6$) (11.0分) のピークに重なるものであった。この未精製の原料を使って誘導体化を行った場合, 生成物の HPLC では Fig. 1(a) とほぼ同様のピーク群が出現した。これらのピークに相当する不純物の大部分は塩基性エステル交換反応を経ても残存し, 脂肪酸分析の妨害ピークとなって出現する。

一方, 再結晶による精製物 (Fig. 1(b)) ではこれらのピークはほとんど消失した。脂肪酸ピークの溶出時間 7~19 分ではほぼ一定のベースラインが得られ, 不純物の除去が概ね達成されたことが明らかとなった。この結果から, 酢酸エチルを溶媒とする再結晶は 9-アントラセンメタノールの精製に有効な手段であると考えられる。

誘導体化試薬としての有効性

誘導体化反応のブランクおよび合成トリアシルグリセロールとの反応生成物を HPLC で分析した (Fig. 2)。ブランクでは, 結晶自体の分析結果以上に一定のベースラインが得られた (Fig. 2(a))。このことから, 同じ条件の HPLC

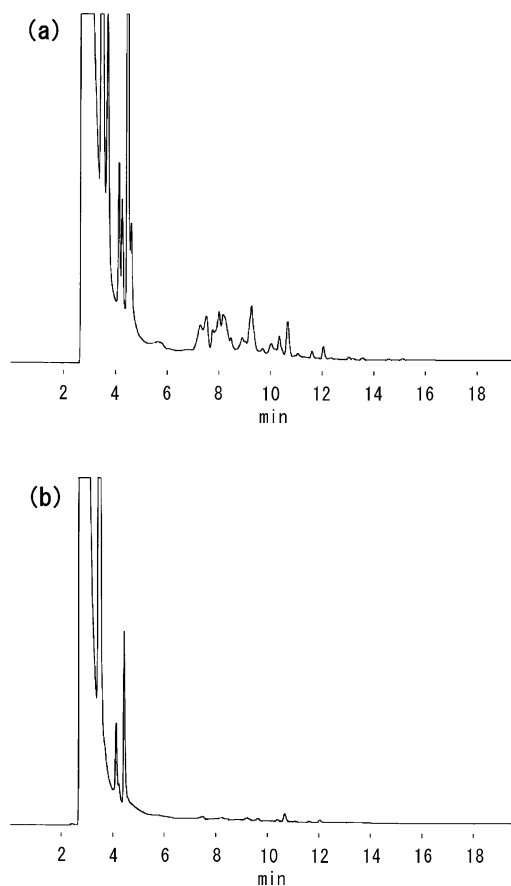


Fig. 1. HPLC profiles of crude and purified 9-anthracenemethanol. (a) 9-Anthracenemethanol of commercial origin; and (b) 9-anthracenemethanol recrystallized from ethyl acetate.

であれば妨害ピークのほとんどない脂肪酸分析が可能であることが明らかとなった。

トリパルミチンとの反応生成物では, 予想されるパルミチン酸 ($16:0$) 9-アンスリルメチルエステルのピークがほぼ平坦なベースライン上に出現した (Fig. 2(b))。同様に 1,3-ジパルミチン-2-ステアリンとの反応ではパルミチン酸 ($16:0$) とステアリン酸 ($18:0$) のエステルのピークが認められた (Fig. 2(c))。両ピークの面積比は 2:1 であり理論値と同等であった。再結晶で得た精製物は脂肪酸 9-アン

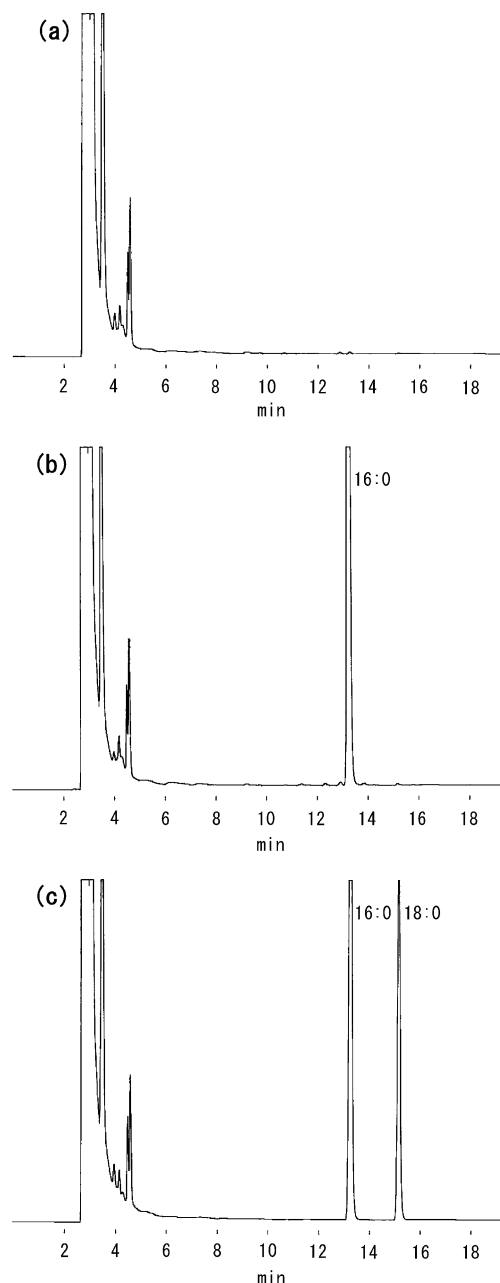


Fig. 2. HPLC profiles of fatty acid 9-anthrylmethyl esters produced from synthetic triacylglycerols. (a) Blank without triacylglycerols; (b) tripalmitoylglycerol ($0.5 \mu\text{g}$); and (c) 1,3-dipalmitoyl-2-stearoylglycerol ($0.5 \mu\text{g}$).

Table 2. Recrystallization of 9-anthracenemethanol from various solvents in 200–250 mg scales

Solvent	Material ^{a)} applied (mg)	Solvent required (ml)	Yield				Peak height of major impurity ^{b)} (mm)
			(mg)	(%)	Form	Color	
Acetone	250	2.5	139.6	55.8	needles	yellow	1.0
Acetonitrile	250	3.0	167.2	66.9	needles	yellow	3.5
2-Butanone	250	2.0	192.4	77.0	needles	yellow	0.4
<i>tert</i> -Butyl acetate	250	7.0	170.9	68.4	needles	yellow	1.5
<i>tert</i> -Butylmethy ether	250	18.0	141.1	56.4	needles	yellow	2.2
Chloroform ^{c)}	200	4.0/2.5	72.4	36.2	plates	yellow	17.0
1,2-Dichloroethane	250	3.0	172.3	68.9	needles	yellow	1.7
Ethanol ^{c)}	200	4.0/3.0	97.7	48.9	needles	yellow	10.0
Ethyl acetate	250	3.0	157.7	63.1	needles	yellow	0.4
Hexane	200	≧10	—	—	—	—	—
Methanol	250	6.0	155.3	62.1	needles	yellow	12.5
2-Propanol ^{c)}	200	8.0/3.0	35.3	17.7	needles	yellow	12.5
C/M (10 : 90) ^{d)}	250	4.5	156.8	62.7	needles	yellow	9.4
C/M (20 : 80) ^{d)}	250	4.0	153.2	61.3	needles	yellow	8.6
C/M (25 : 75) ^{d)}	250	3.5	154.9	62.0	needles	yellow	7.5

—, Not determined.

^{a)}Commercial product of 9-anthracenemethanol (>98%).

^{b)}Analyzed by reversed-phase HPLC. Conditions are presented in the text.

^{c)}Recrystallization was repeated twice from this solvent.

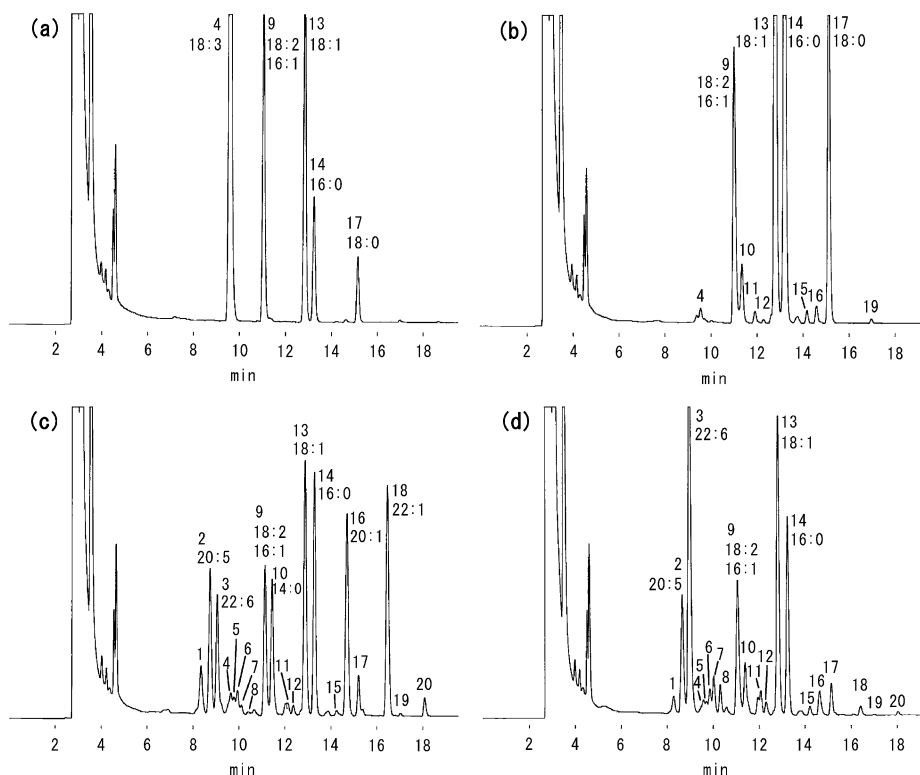
^{d)}Mixture of chloroform (C) and methanol (M) in the volume ratio shown in parentheses.


Fig. 3. HPLC profiles of fatty acid 9-anthrylmethyl esters produced from natural fat and oil triacylglycerols. (a) Linseed oil (1 μ g); (b) lard (1 μ g); (c) cod liver/mackerel oil (5 μ g); and (d) bonito head oil (5 μ g). The numbered peaks represent the following fatty acids: 1, 18:4n-3+18:4n-1; 2, 20:5n-3; 3, 22:6n-3; 4, 18:3n-3+18:3n-6+16:2+12:0; 5, 20:4n-3; 6, 22:5n-3; 7, 20:4n-6; 8, 22:5n-6; 9, 18:2+16:1; 10, 14:0; 11, 17:1n-8; 12, 15:0; 13, 18:1; 14, 16:0; 15, 17:0; 16, 20:1; 17, 18:0; 18, 22:1; 19, 20:0; 20, 24:1.

スリルメチルエステルの調製に使用でき、さらに、生成するエステルは HPLC による脂肪酸分析に使用可能であることが示された。

各種溶媒からの再結晶

種々の溶媒で小スケールの再結晶を行った結果を Table 2 に示す。表中でクロロホルム、エタノール、2-プロパノールについては再結晶を 2 回繰り返した結果を示す。得られた結晶の収率は 56~77% であった。再結晶 2 回の場合は 18~49% で、1 回当たりの収率は 43~70% に相当する。なお 9-アントラセンメタノールはヘキサンには加熱時でも難溶であった。

得られた結晶のうち、誘導体化のブランクで HPLC 分析の妨害ピークが最も小さかったものは酢酸エチルと 2-ブタノンからの結晶であった。このほかアセトン、1,2-ジクロロエタンからの結晶でも比較的良好なベースラインが得られた。クロロホルム (再結晶 2 回) の場合、結晶そのものの HPLC 分析では不純物ピークは検出されなかったが、ブランクでは 8.3 分に新たな妨害ピークが出現した。同ピークはエステル交換反応の過程で生成したものと考えられる。

種々の溶媒を試みた結果から、本報の目的に合う 9-アン

トラセンメタノールの精製には適切な溶媒の選択が重要であると思われる。Lingeman et al. (1984) はカップリング反応によって脂肪酸を誘導体化する際、エタノールから再結晶を 2 回繰り返すことによって 9-アントラセンメタノールの精製を行っている。このときの不純物の状況については記載されていないが、本研究ではエタノール (再結晶 2 回) を含めてアルコール類からの再結晶では十分な精製を行うことはできなかった。Table 2 の結果から酢酸エチル以外に有効と考えられる溶媒は 2-ブタノン (収率 77%) である。

脂肪酸分析への適用

酢酸エチルからの再結晶精製物を用いて天然油脂のトリアシルグリセロールの脂肪酸分析を行った。得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示す。ほぼ平らなベースライン上に、亜麻仁油とラードでは 1 μg 、サバ・スケトウダラ油とカツオ頭部油では 5 μg の試料量で少量成分も含めてピークが容易に検出された。ピーク面積比をもとに算出した脂肪酸組成を Table 3 に示す。魚油の脂肪酸組成は既報のデータ (Ando et al., 2007) に類似するものであった。

以上の結果から 9-アントラセンメタノールは酢酸エチ

Table 3. Fatty acid compositions of natural fat and oil triacylglycerols (mol%)

Fatty acid	Linseed oil (1 μg)	Lard (1 μg)	Cod liver/ mackerel oil (5 μg)	Bonito head oil (5 μg)
18 : 4n-3 ^{a)}	—	—	3.5	1.4
20 : 5n-3	—	—	8.5	8.0
22 : 6n-3	—	—	7.2	29.7
18 : 3n-3 + 16 : 2 ^{b)}	55.9	0.6	1.8	1.3
20 : 4n-3	—	Tr	0.9	0.7
22 : 5n-3	—	—	1.4	1.6
20 : 4n-6	—	Tr	0.5	2.4
22 : 5n-6	—	—	0.2	1.8
16 : 1 + 18 : 2n-6 ^{c)}	16.0	11.6	8.6	9.6
14 : 0	Tr	2.6	7.5	3.7
17 : 1n-8	—	0.5	0.6	1.4
15 : 0	Tr	0.2	0.5	0.8
18 : 1 ^{d)}	17.6	40.3	14.7	18.5
16 : 0	6.5	27.6	12.9	12.1
17 : 0	Tr	0.5	0.3	0.5
20 : 1	Tr	0.7	12.4	1.8
18 : 0	3.3	14.3	2.1	2.0
22 : 1	—	—	13.5	0.7
20 : 0	Tr	0.2	0.1	0.1
24 : 1	—	—	1.0	0.3
Others	0.8	0.9	1.9	1.6

Tr, trace amount ; —, not detected.

^{a)}Including 18 : 4n-1.

^{b)}Including 18 : 3n-6 and 12 : 0.

^{c)}Including 20 : 3 and 22 : 4n-6.

^{d)}Including 20 : 2n-6.

ルからの再結晶を1回行うことによって、1~5 μg のトリアシルグリセロールの脂肪酸分析が可能となるレベルに精製できることが明らかとなった。本報の条件による精製は2~10 g あるいはそれ以上の量であっても簡便な操作で実施できかつ比較的高収率であることから、市販の9-アントラセンメタノールを微量の脂肪酸分析に利用する上で極めて実用的である。

文 献

- Ando, Y., Haba, Y., Soma, K., Hiraoka, Y. and Takatsu, T. (2007) Rapid preparation of fluorescent 9-anthrylmethyl esters for fatty acid analysis of small amount of triacylglycerols. *Lipids*, **42**, 955-960.
- Lingeman, H., Hulshoff, A., Underberg, W.J.M. and Offermann, F.B.J.M. (1984) Rapid, sensitive, and specific derivatization methods with 9-(hydroxymethyl)anthracene for the fluorimetric detection of carboxylic acids prior to reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation. *J. Chromatogr.*, **290**, 215-222.
- Mukherjee, P.S. and Karnes, H.T. (1996) Ultraviolet and fluorescence derivatization reagents for carboxylic acids suitable for high performance liquid chromatography: a review. *Biomed. Chromatogr.*, **10**, 193-204.
- 中川昌子・長岡博人・山田泰司 (1993) 生成物の分離と精製. pp. 30-36, 富岡 清 (編), 化学と生物実験ライン 26 有機化学実験ガイド, 廣川書店, 東京.
- Ohkura, Y., Kai, M. and Nohta, H. (1994) Fluorogenic reactions for biomedical chromatography. *J. Chromatogr.*, **659B**, 85-107.
- 杉森 彰 (2003) 再結晶. pp. 162-167, 日本化学会 (編), 第5版実験化学講座1 基礎編I 実験・情報の基礎, 丸善, 東京.
- Yasaka, Y. and Tanaka, M. (1994) Labeling of free carboxyl group. *J. Chromatogr.*, **659B**, 139-155.