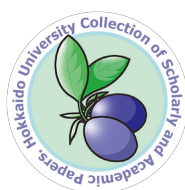




HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	不飽和脂肪酸含有脂質分子種の逆相高性能液体クロマトグラフィーにおける分離機序
Author(s)	高橋, 是太郎; 平野, 次彦
Description	報文
Citation	油化学, 40(4), 300-305
Issue Date	1991-04-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/42711
Type	journal article
File Information	takahashi_JJOCs40_300.pdf



報 文

不飽和脂肪酸含有脂質分子種の逆相高性能
液体クロマトグラフィーにおける分離機序

高 橋 是太郎*・平 野 次 彦**

* 北海道大学水産学部 (〒041 函館市港町 3-1-1)

** 日立北海セミコンダクター株式会社 (〒041-11 北海道亀田郡七飯町中島)

Theoretical Aspects of the Resolution of Lipid Molecular Species Containing
Unsaturated Fatty Acid on Reverse Phase High Performance
Liquid Chromatography

Koretaro TAKAHASHI* and Tsugihiko HIRANO**

* Faculty of Fisheries, Hokkaido University

(3-1-1, Minato-cho, Hakodate-shi, 〒041)

** Hitachi Hokkai Semiconductor Ltd.,

(Nakajima, Nanae-cho, Kameda-gun, Hokkaido, 〒041-11)

In this study, attention was directed to the theoretical aspects of the resolution of lipid molecular species containing unsaturated fatty acids on reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC).

The chemical potential of a lipid molecule in the chromatographic system was influenced by the sum of dipole, induction, and dispersion effects of van der Waals forces, among lipid molecules, mobile phase, and stationary phase.

Even in reverse phase HPLC, dipole effect was concluded to exert the greatest effect. Thus when polar domains such as double bonds are situated far away from each other, dipole moment may be large compared to that when they are near each other. Accordingly, the former which has greater affinity toward the polar mobile phase should elute earlier than the latter.

Analytical data on relative retention time of molecular species of diacyl glycerolipid on reverse phase HPLC confirmed this to actually be the case.

1 緒 言

脂質の二重結合数のみならずそれらの分子内における位置は生化学的に極めて重要な意味をもつ。

逆相高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) の進歩により、二重結合位置異性体含有脂質分子種の分離が比較的容易になりつつあるが、これらの分子種のクロマトグラム上の挙動については単なる経験論的に扱われているに過ぎない。

本研究は、これを論理的に裏打ちすべくクロマト系における分配を支配する van der Waals 力について詳細な検討を行った。

2 実 験

2.1 試 料

大豆ホスファチジルコリンより誘導したアセチルージアシルグリセリンならびにイコサペンタエン酸 (EPA)

を 20% 含有するいわし油飼料、またはとうもろこし油飼料で 10 d 飼育したラットの心筋、ヒト血小板、アラキドン酸と EPA 含有牛血清培地にて培養したチャイニーズハムスター V 79-R 細胞のおのおのより単離したホスファチジルコリン、ホスファチジリエタノールアミンのジニトロベンゾイル誘導体 (大豆を除き Takamura¹⁾ のものを引用) を用いた。

2.2 分 析

上記試料を下記の 2 通りの逆相 HPLC システムに供して各脂質分子種ごとの相対保持時間を求め、これを基に van der Waals 力の理論を導入して分離機序の物理化学的考察を行った。

システム A (著者ら) ; 分離管, LiChrosorb RP 18 (5 μ m, 8 mm i.d. $\times$ 250 mm) $\times$ 2 ; 溶媒, 2-プロパノール/アセトン/メタノール/アセトニトリル (1 : 1 : 3 : 4, vol/vol) ; 流速, 1.5 mL/min ; 分離管温度, 25 $^{\circ}$ C ; 検出器, 示差屈折計。システム B (Takamura

ら¹⁾); 分離管, Ultraspheere ODS (5 μ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm); 溶媒, 2-プロパノール/アセトニトリル (1:4, vol/vol); 流速: 1 mL/min; 分離管温度, 25 $^{\circ}$ C; 検出器, UV 254 nm. [なお, HPLC の各分取ピーク (*i.e.* 分子種) の同定は, メチルエステルもしくはジメチルアセタールとしたのち, GLCならびにGLC-MS 分析により行った。]

3 結 果

3.1 同一炭素数, 同一二重結合数の分子種における二重結合数の偏りに基づく保持時間の遅れ

HPLC における分子種の分析は Wada ら²⁾ や Platner ら³⁾ の溶出時間の経験的分離因子の規定から始まった。これがパーティションナンバー (PN) と呼ばれる経験則である。この経験則は Kaufman と Markus⁴⁾, Hirsch⁵⁾, Vereshchagin⁶⁾, Litchfield⁷⁾ によって端を発したものであるが, Wada ら²⁾ によって初めて逆相 HPLC においても同様の法則が成り立つことが示された。PN は今日の高分解能の逆相 HPLC においてもなお脂質分子種のおおよその溶出位置を知る上で極めて便利であることには変わりはなく, 現在でも脂質分子種の同定を行う上での一つの考慮条件にとり入れられている。しかしながら分解能の高い HPLC では Table-1 に示されているように, 少なくともジアシル型の脂質分子種においては同一の PN, 同一のアシル基の炭素数, 同一の二重結合数をもつ分子種のピークが複数個現れることは明らかである。しかもこの場合, アシル基の二重結合数の偏りが大きいほど保持時間が遅れることが認められた。

Table-1 Retard of the relative retention time on reverse phase HPLC of molecular species of diacylglycerolipid in the form of acetyl derivative that has the same acyl carbon number and number of total double bonds but one-sided distribution of double bonds in the molecule*.

Partition number	Molecular species	Relative retention time
28	(18:2, 18:2)	50.9
28	(18:1, 18:3)	53.1
30	(18:1, 18:2)	69.6
30	(18:0, 18:3)	81.3
32	(18:1, 18:1)	100.0
32	(18:0, 18:2)	107.9

* The relative retention time of the adjacent molecular species (each two) was compared.

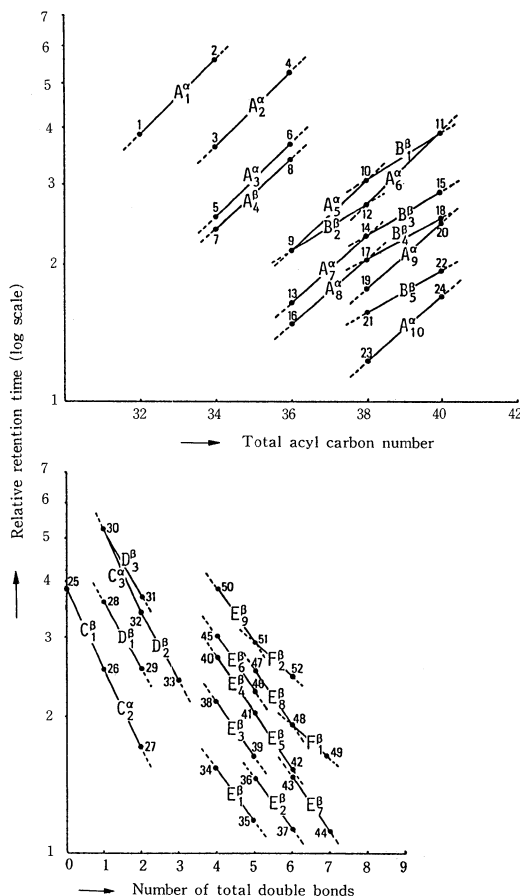
3.2 アシル基の二重結合数の増加にともなう相対保持時間の対数値の差の減少

一方, Fig.-1 に示すように脂質分子種のアシル基の総炭素数と log 相対保持時間, ならびに総二重結合数と log 相対保持時間との間には近似的には平行線群関係が認められるものの^{8),9)} 厳密にはアシル基の二重結合数が増えるにつれて log 相対保持時間の減少率は低下することが認められた。さらに, Table-2 にもみられるように 22:5 $\rightarrow$ 22:6 における log 相対保持時間の差は 0.06 台であるのに対し, 22:4 $\rightarrow$ 22:5, 20:4 $\rightarrow$ 20:5 等における log 相対保持時間の差は 0.11 から 0.12 台になっており, 明らかに差異が認められた。また, 同表よ

Table-2 Changes in logarithm of relative retention time of molecular species of diacylglycerolipid in the form of dinitrobenzoyl derivative when acyl carbon number or number of double bonds in sn-2 increases*.

sn-2 \ sn-1	14:0	16:0	18:0	18:1
20:4 $\rightarrow$ 22:4 (Δ 5, 8, 11, 14) (Δ 7, 10, 13, 16)		0.1030	0.1082	0.0952
20:5 $\rightarrow$ 22:5 (Δ 5, 8, 11, 14, 17) (Δ 4, 8, 12, 15, 19)		0.0974	0.1022	0.0953
20:4 $\rightarrow$ 20:5 (Δ 5, 8, 11, 14) (Δ 5, 8, 11, 14, 17)	0.1063	0.1162	0.1212	0.1193
22:4 $\rightarrow$ 22:5 (Δ 7, 10, 13, 16) (Δ 4, 8, 12, 15, 19)		0.1218	0.1272	0.1192
22:5 $\rightarrow$ 22:6 (Δ 4, 8, 12, 15, 19) (Δ 4, 7, 10, 13, 16, 19)		0.0666	0.0694	0.0603
18:1 $\rightarrow$ 18:2 (Δ 9) (Δ 9, 12)		0.1503	0.1546	0.1469

* The data on retention time reported by Takamura *et al.*¹⁾ were used for this analysis.



The data on relative retention times reported by Takamura *et al.*¹⁾ were used. Retention time of (1-12 : 0, 2-12 : 0) is regarded as 1.00 in the original data. The superscript on the alphabet shows the acyl carbon number or number of double bonds substituted position (α for sn-1 and β for sn-2). Lines A and B for the acyl carbon number substitutions, and lines C from F for acyl doublebonds substitutions. Lines with the same alphabet are parallel though there is a slight difference between sn-1 and sn-2; The 1,2-1,3-positional isomers are all discriminated here. Points are :

1.(16 : 0, 16 : 0), 2.(18 : 0, 16 : 0), 3.(16 : 0, 18 : 1), 4.(18 : 0, 18 : 1), 5.(16 : 0, 18 : 2), 6. (18 : 0, 18 : 2), 7.(18 : 1, 16 : 1), 8.(18 : 1, 18 : 1), 9.(16 : 0, 20 : 4), 10.(18 : 0, 20 : 4), 11.(18 : 0, 22 : 4), 12.(16 : 0, 22 : 4), 13. (16 : 0, 20 : 5), 14.(18 : 0, 20 : 5), 15.(18 : 0, 22 : 5), 16.(16 : 1, 20 : 4), 17. (18 : 1, 20 : 4), 18.(18 : 1, 22 : 4), 19.(16 : 0, 22 : 6), 20. (18 : 0, 22 : 6), 21.(18 : 1, 20 : 5), 22. (18 : 1, 22 : 5), 23.(16 : 1, 22 : 6), 24.(18 : 1, 22 : 6), 25.(16 : 0, 16 : 0), 26.(16 : 0, 16 : 1), 27. (16 : 1, 16 : 1), 28.(16 : 0, 18 : 1), 29.(16 : 0, 18 : 2), 30.(18 : 0, 18 : 1), 31.(18 : 0, 18 : 2), 32.(18 : 1, 18 : 1), 33.(18 : 1, 18 : 2), 34.(14 : 0, 20 : 4), 35.(14 : 0, 20 : 5), 36.(16 : 1, 20 : 4), 37.(16 : 1, 20 : 5), 38.(16 : 0, 20 : 4), 39.(16 : 0, 20 : 5), 40.(16 : 0, 22 : 4), 41. (16 : 0, 22 : 5) and (18 : 1, 20 : 4), 42.(18 : 1, 20 : 5), 43.(18 : 2, 20 : 4), 44.(18 : 2, 20 : 5), 45.(18 : 0, 20 : 4), 46.(18 : 0, 20 : 5), 47. (18 : 1, 22 : 4), 48.(18 : 1, 22 : 5), 49.(18 : 1, 22 : 6), 50.(18 : 0, 22 : 4), 51.(18 : 0, 22 : 5), 52.(18 : 0, 22 : 6)

Fig.-1 Relationship between relative retention time of molecular species of diacylglycerolipid in the form of dinitrobenzoyl derivative *vs.* total acyl carbon number or number of total double bonds on reverse phase HPLC¹⁰⁾.

り、 $20:4 \rightarrow 20:5 < 22:4 \rightarrow 22:5$ にみられるようにアシル基の総炭素数が大きいほど二重結合数の増加にともなう log 相対保持時間の差が大きくなること、 $20:5 \rightarrow 22:5 < 20:4 \rightarrow 22:4$ にみられるようにアシル基の二重結合数が大きいほど炭素数の増加にともなう log 相対保持時間の差が小さくなることも認められた。

以上のことより現在の HPLC においては、もはや従来まで行われてきたような単に分子種の炭素や二重結合の数だけを対象とした分離因子の規定だけでは不十分であることは明らかである。

4 考 察

4.1 アシルグリセリンを構成する原子団とクロマト系における van der Waals 力との関係

アシルグリセリンを構成する原子団としてメチルユニット(飽和炭素部)、エチレンユニット(不飽和部)、カルボニルエステルユニット($-\text{CO}-\text{O}-$)が存在する。これらのうち、メチルユニットは極性がほとんどないが、エチレンユニット及びカルボニルエステルユニットは極性を有する。従って、逆相クロマト系におけるアシルグリセリンの分離は、固定相及び移動相と上記原子団との双極子引力の差に依存するものと推察される。

一般に、van der Waals 引力(U)は、分子間の距離の6乗に反比例し、

$$U = U_{\text{dip.}} + U_{\text{ind.}} + U_{\text{dis.}}$$

で与えられる。ここに $U_{\text{dip.}}$ は、dipole effect すなわち双極子効果、 $U_{\text{ind.}}$ は induction effect すなわち誘起効果、 $U_{\text{dis.}}$ は dispersion effect すなわち分散効果を表すポテンシャルエネルギーである。双極子効果は極性分子間のみに存在し、一方、分散効果はすべての分子間に存在する。誘起効果は極性分子間ならびに極性分子と非極性分子との間に存在する。従って、クロマト系におけるアシルグリセリン分子のケミカルポテンシャル $\Delta\mu_{\text{TC}}$ は、固定相及び移動相分子とアシルグリセリン分子間に生ずる van der Waals 力の総和で表され、次式で与えることができる。

$$\Delta\mu_{\text{TC}} = U_{\text{dip.M}} + U_{\text{ind.M}} + U_{\text{dis.M}} - (U_{\text{dip.S}} + U_{\text{ind.S}} + U_{\text{dis.S}}) \quad (1)$$

($U_{\text{dip.S}}$, $U_{\text{ind.S}}$, $U_{\text{dis.S}}$: アシルグリセリン分子と固定相分子間に作用する各ポテンシャルエネルギー)

($U_{\text{dip.M}}$, $U_{\text{ind.M}}$, $U_{\text{dis.M}}$: アシルグリセリン分子と移動相分子間に作用する各ポテンシャルエネルギー)

(なお、右辺のおのの項は引力なので、符号はマイナスである。)

この関係式はアシルグリセリン分子を構成する原子団であるメチルユニット、エチレンユニット、及びカルボニルエステルユニットにも同様に成立する。すなわち、

$$\Delta\mu_{\text{C}} = U_{\text{dip.MC}} + U_{\text{ind.MC}} + U_{\text{dis.MC}}$$

$$- (U_{\text{dip.SC}} + U_{\text{ind.SC}} + U_{\text{dis.SC}}) \quad (2)$$

$$\Delta\mu_{\text{D}} = U_{\text{dip.MD}} + U_{\text{ind.MD}} + U_{\text{dis.MD}} - (U_{\text{dip.SD}} + U_{\text{ind.SD}} + U_{\text{dis.SD}}) \quad (3)$$

$$\Delta\mu_{\text{E}} = U_{\text{dip.ME}} + U_{\text{ind.ME}} + U_{\text{dis.ME}} - (U_{\text{dip.SE}} + U_{\text{ind.SE}} + U_{\text{dis.SE}}) \quad (4)$$

($U_{\text{dip.MC}}$, $U_{\text{ind.MC}}$, $U_{\text{dis.MC}}$: メチルユニットと移動相分子間に作用する各ポテンシャルエネルギー)

($U_{\text{dip.SC}}$, $U_{\text{ind.SC}}$, $U_{\text{dis.SC}}$: メチルユニットと固定相分子間に作用する各ポテンシャルエネルギー)

($U_{\text{dip.MD}}$, $U_{\text{ind.MD}}$, $U_{\text{dis.MD}}$: エチレンユニットと移動相分子間に作用する各ポテンシャルエネルギー)

($U_{\text{dip.SD}}$, $U_{\text{ind.SD}}$, $U_{\text{dis.SD}}$: エチレンユニットと固定相分子間に作用する各ポテンシャルエネルギー)

($U_{\text{dip.ME}}$, $U_{\text{ind.ME}}$, $U_{\text{dis.ME}}$: カルボニルエステルユニットと移動相分子間に作用する各ポテンシャルエネルギー)

($U_{\text{dip.SE}}$, $U_{\text{ind.SE}}$, $U_{\text{dis.SE}}$: カルボニルエステルユニットと固定相分子間に作用する各ポテンシャルエネルギー)

そこで、式(2), (3), (4), を用いて、アシルグリセリン分子の溶出順位について詳細な検討を行った。

4.1.1 アシルグリセリンを構成するメチルユニット、エチレンユニット、カルボニルエステルユニットの双極子モーメント

メチルユニットは極性が小さく、双極子モーメント $\mu'_{\text{C}}=0$ と見なせる(一般に、飽和炭化水素の双極子モーメントは0である)。また、固定相分子の極性も逆相ゆえ小さく、双極子モーメント $\mu'_{\text{S}}=0$ と見なせる。ゆえに、 $U_{\text{dip.MC}}=U_{\text{dip.SC}}=U_{\text{ind.SC}}=0$ と考えることができる。このため式(2)は次ぎのように簡略化できる。

$$\Delta\mu_{\text{C}} = U_{\text{ind.MC}} + (U_{\text{dis.MC}} - U_{\text{dis.SC}}) \quad (5)$$

一方、エチレンユニット及びカルボニルエステルユニットは双極子モーメントを有するが、固定相分子の双極子モーメントが0と見なせるので、 $U_{\text{dip.SD}}=U_{\text{dip.SE}}=0$ と考えることができる。このため式(3), (4)はつぎのようになる。

$$\Delta\mu_{\text{D}} = U_{\text{dip.MD}} + (U_{\text{ind.MD}} - U_{\text{ind.SD}}) + (U_{\text{dis.MD}} - U_{\text{dis.SD}}) \quad (6)$$

$$\Delta\mu_{\text{E}} = U_{\text{dip.ME}} + (U_{\text{ind.ME}} - U_{\text{ind.SE}}) + (U_{\text{dis.ME}} - U_{\text{dis.SE}}) \quad (7)$$

一般に特定原子団の双極子モーメントが増大すると $|U_{\text{dip.M}}|$ が増大するため、クロマト系におけるケミカルポテンシャルは減少する。(このとき $|U_{\text{ind.M}}|$ も増加するが、同時に $|U_{\text{ind.S}}|$ も増加するため、 $U_{\text{ind.}}$ トータルの変化は無視できる程度に小さいと推定される。なお、 $U_{\text{dip.M}}$, $U_{\text{ind.M}}$, $U_{\text{ind.S}}$ のいずれも符号はマイナスである。)

また、一般に逆相クロマト系では $\Delta\mu_{\text{D}} < \Delta\mu_{\text{C}}$ である

ことが知られているが、これは、エチレンユニットが双極子モーメントを有し、前述の $U_{\text{dip.M}}$ の影響を受けているためと考えられる。

4.1.2 アシルグリセリン分子内に極性基を複数有する場合の分子全体としての双極子モーメント

分子内に双極子モーメントを有する極性基が複数存在する場合、分子全体としての双極子モーメントは、近似的にこれらの基能率の和（空間ベクトルの加算則）で与えられる。すなわち、各極性基の双極子モーメントを μ'_1, μ'_2 とし、これらのなす方向角を θ とすると、分子全体としての双極子モーメント μ' は次式で近似される。

$$\mu' = \sqrt{\mu_1'^2 + \mu_2'^2 + 2\mu_1'\mu_2'\cos\theta} \quad (8)$$

式(8)より、 μ'_1 と μ'_2 の方向が同一 ($\theta=0$) のときのみ $\mu' = \mu'_1 + \mu'_2$ が成立するが、 μ'_1 と μ'_2 の方向が異なる ($\theta \neq 0$) ときには一般に $\mu' < \mu'_1 + \mu'_2$ となることが導かれる。

4.1.3 アシルグリセリン分子において、とくに1つのアシル基内に複数のエチレンユニットが存在する場合の分子内の各双極子モーメントの配向の変化

アシルグリセリン分子において、特に1つのアシル基内に複数のエチレンユニットが存在する場合、メチルユニットの電荷配置及び双極子同士の電荷の反発の影響のため、各双極子モーメントの配向が同一方向とはならない ($\theta \neq 0$) と推定される。

Fig.-2において、 $-\delta$ 電価同士の反発が生じ、各エチレンユニット同士は、その間に存在するメチルユニットとの結合部を軸にして回転し、ねじれた配向をとると考えられる。このため log 相対保持時間と二重結合数との間の関係は正確な直線関係からは幾分ずれることになる。

4.1.4 アシル基の炭素数とエチレンユニット一つ当たりの双極子モーメントの大きさとの関係

一般にエチレンユニットの極性は、結合するアルキル基 (Fig.-2 の R 及び R') が大きくなるほど大きくなる。このため、アシル基の総炭素数が一定の場合、エチレンユニットの数が増えるほどアルキル基は小さくなり、エチレンユニット1つ当たりの双極子モーメントは減少する。飽和脂肪酸で構成されているトリアシルグリセリンに比べ、不飽和脂肪酸で構成されているトリアシルグリセリンは、炭素数の増加にともなう log 相対保持時間の増加率は若干小さな値をとるが¹⁰ これも炭素数の増加にともないエチレンユニットの双極子モーメント μ'_0 が増大することから説明できる。

4.1.5 アシル基トータルの双極子モーメントとアシル基内のエチレンユニット数との関係

Fig.-1に示したように脂質分子種のアシル基の総炭素数と log 相対保持時間、ならびに総二重結合数と log 相対保持時間との間には近似的には平行線群関係が認め

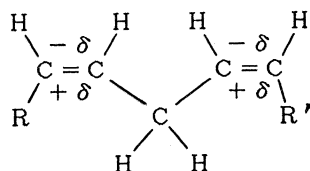


Fig.-2 Generation of repulsion force between the dipole electric charges inside the unsaturated fatty acyl group of glycerolipid molecule.

られるものの^{8),9)} 厳密にはアシル基の二重結合数が増えるにつれて log 相対保持時間の減少率は低下することが認められた。この現象はつぎのように説明できる。すなわち、1つのアシル基内におけるエチレンユニット数を n とすると、4.1.3, 4.1.4 よりエチレンユニットの双極子モーメント μ'_0 と、アシル基トータルの双極子モーメント μ'_{FA} (今、カルボニルエステルの極性は無視する) の間には、次ぎの不等式が成立する。

$$\mu'_{FA} < n \cdot \mu'_0 \quad (9)$$

この式(9)より、エチレンユニット数の増加につれて $|U_{\text{dip.MD}}|$ の増加率が低下することが導かれる。すなわち、式(9)の関係から、 $\Delta\mu_D$ とアシルグリセリンのケミカルポテンシャル $\Delta\mu_{TG}$ ($\equiv \log$ 相対保持時間) との間には直線関係は無く、エチレンユニット数の増加につれて、 $\Delta\mu_{TG}$ ($\equiv \log$ 相対保持時間) の減少率が低下することになる。

4.1.6 分子内の極性基の数が同一でその配列が異なる場合の分子全体の双極子モーメント

Table-1において同一のPN, 同一のアシル基の炭素数, 同一の総二重結合数をもつ分子種同士の場合、アシル基間の二重結合数の偏りが大きいほど保持時間が遅れることが認められた。さらに Table-2にみられるように 22:5→22:6における log 相対保持時間の差は0.06台であるのに対し、22:4→22:5, 20:4→20:5等における log 相対保持時間の差は0.11から0.12台になっており、明らかに差が認められた。また、同表より、20:4→20:5 < 22:4→22:5にみられるようにアシル基の総炭素数が大きいほど二重結合数の増加にともなう log 相対保持時間の差が大きくなること、20:5→22:5 < 20:4→22:4にみられるようにアシル基の二重結合数が多いほど炭素数の増加にともなう log 相対保持時間の差が小さくなることも認められた。これらの現象は以下のように説明できる。まず、極性基の分子内における配列を考えた場合、つぎのことが予想される。すなわち、4.1.3, 4.1.4より、極性基同士の相対的な距離が大きいほど、分子全体の双極子モーメントは大きくなる。それゆえ、①アシルグリセリン分子内に複数のエチレンユニットが存在し、総二重結合数が同一の場合、1つの

アシル基に配列されるエチレンユニットの数が少ないほど(すなわち、分子内のアシル基間の二重結合数の偏在が小さいほど)アシルグリセリン分子全体の双極子モーメントは大きく、有極性の移動相と親和性を増すことになり、 $\Delta\mu_{TG}$ ($\equiv \log$ 相対保持時間)は小さな値をとる(Fig.-3の①)。②1つのアシル基に複数のエチレンユニットが存在する場合、アシル基末端のカルボニルエステルユニットも含めてこれらの相対的な距離が大きく、かつ、エチレンユニットに結合するアルキル基が大きくなる形態をとるほどアシル基トータルの双極子モーメントは大きく、 $\Delta\mu_{FA}$ は小さな値となる(Fig.-3の②)、これらのうち、とくに②が二重結合位置異性体因子(二重結合の位置の違いによって相対保持時間がわずかながら異なる要因)相当すると考えられる。さらに、エチレンユニット1つあたりに対応する炭素数(メチルユニットの数)が大きいくほどエチレンユニットの双極子モーメント μ_b が大きくなるものと考えられ、それゆえ20:4 $\rightarrow$ 20:5<22:4 $\rightarrow$ 22:5となったり20:5 $\rightarrow$ 22:5<20:4 $\rightarrow$ 22:4となるものと推察される。一方、Table-2において22:5 $\rightarrow$ 22:6における相対保持時間の変化率は、22:4 $\rightarrow$ 22:5、20:4 $\rightarrow$ 20:5等から比べて極端に小さくなっている(約1/2程度となっている)が、これは二重結合配列因子の影響と考えられる。すなわち、22:5の二重結合の配列は $\Delta 4$, 8, 12, 15, 19であり、また、22:6の配列は $\Delta 4$, 7, 10, 13, 16, 19であるが、両者ともアシル基の末端における二重結合の位置が同一($\Delta 4$ と $\Delta 19$ が一致している)であるため、22:6の二重結合の配列は、22:5のそれに比べ過密である。このため先の4.1.3, 4.1.4, 4.1.6より、22:6における双極子モーメントは抑制されて22:5 $\rightarrow$ 22:6におけるlog相対保持時間の差が小さくなる現象が引き起こされるものと考察される。22:4 $\rightarrow$ 22:5及び20:4 $\rightarrow$ 20:5においても若干配列の違いによる影響が考えられるが、いずれも二重結合の増大にともない、アシル基末端における二重結合の位置が広がるため(22:4は $\Delta 7$ と $\Delta 16$ に

対し、22:5は $\Delta 4$ と $\Delta 19$ 、また20:4は $\Delta 14$ に対し、20:5は $\Delta 5$ と $\Delta 17$)、22:5 $\rightarrow$ 22:6に比べて、その影響は小さいと思われる。

4.2 結 論

以上より、脂質の分子構造から個々の極性基の双極子モーメントの大きさ、それらの相対的な位置による分子全体としての双極子モーメントの大きさが予測され、それによって同一の炭素数、同一の二重結合数の分子種同士であってもそれらの逆相 HPLC における溶出の前後関係を知ることができるという結論に達した。

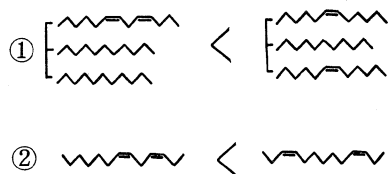
5 総 括

HPLC における分配を支配する要因は van der Waals 力であると考え、この点についての検討を行った。各種ジアシルグリセロ脂質の非極性化物を ODS 系の HPLC に供して、個々の分子種の相対保持時間を得、これを基にこれらの分子種の分離因子について物理化学的考察を行った。クロマト系における脂質分子のケミカルポテンシャルは、固定相及び移動相分子と脂質分子間に生ずる van der Waals 力の総和で表される。このことから有極性のエチレンユニット(二重結合部)は、それらの数はもちろんのこと、それらの間の相対的な距離によっても双極子モーメントが異なることとなり、これによって同一の炭素数、同一の二重結合数をもつ脂質分子種同士であっても、二重結合の位置の違いにより有極性の移動相との間に親和性の差が生じ、互いに分離されるものと結論された。この考え方の導入により、分子種の分子構造から分子全体の双極子モーメントの大きさが予測され、保持値の近い分子種同士であってもそれらの溶出の前後関係を知ることができることが証明された。

[平成2年(1990年)10月26日受理]

文 献

- 1) H. Takamura, H. Narita, R. Urade, M. Kito, *Lipids*, 21, 356 (1986)
- 2) S. Wada, C. Koizumi, J. Nonaka, *Yukagaku*, 26, 95 (1977)
- 3) R.D. Plattner, G.F. Spencer, R. Kleiman, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 511 (1977)
- 4) H.P. Kaufman, Z. Makus, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 62, 125 (1960)
- 5) J. Hirsch, *J. Lipid Res.*, 4, 1 (1963)
- 6) A.G. Vereshchagin, *J. Chromatog.*, 14, 184 (1964)
- 7) C. Litchfield, *Lipids*, 3, 170 (1968)
- 8) K. Takahashi, T. Hirano, K. Takama, K. Zama, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 48, 1803 (1982)
- 9) K. Takahashi, *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 32, 245 (1985)
- 10) K. Takahashi, M. Egi, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 887 (1987)
- 11) A. Stolyhwo, H. Colin, G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 57, 1342 (1985)



- ① In case when total acyl carbon number and total double bonds are the same.
- ② In case when acyl carbon number and acyl double bonds are the same.

Fig.-3 Comparison of the dipole moment between the double bond isomeric structures.