総 説

銀担持球状粘土鉱物を用いた高度不飽和
脂肪酸の新しい分離・精製法

山口 道広・田中 功・大津 裕

資生堂 基礎科学研究所

(〒223 横浜市港北区新羽町 1050)

New Method for Separation and Purification of Polyunsaturated Fatty
Acids Using a Silver Ion-exchanged Spherical Clay Mineral

Michihiro YAMAGUCHI, Isao TANAKA, and Yutaka OHTSU

Shiseido Basic Research Laboratories

(1050, Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama-shi, 〒223)

New method was developed for separation and purification of polyunsaturated fatty acid ethyl esters using a silver ion-exchanged spherical clay mineral [SC (Ag)]. The SC (Ag) was prepared by ion-exchanging silver ion into synthetic hectorite that had been spray-dried to form a spherical shape. Ethyl icosapentaenoate and ethyl docosahexaenoate were separated and purified from the mixture of fatty acid ethyl esters originated from several natural lipids, using SC (Ag) preparative columns under the step gradient condition of organic solvent.

1 はじめに

ある種の不飽和脂肪酸が、生体に対して優れた生理活性作用を示すという研究が近年数多く報告されている。生体内で合成されない $n-6$ 系列のリノール酸や $n-3$ 系列の α -リノレン酸に代表される脂肪酸は、体内に摂取されると種々の不飽和脂肪酸に変換し、それぞれが優れた生理活性を示すと言われている。しかしながらそれらの不飽和脂肪酸を高純度で分離・精製する技術はまだまだ充分には確立されていない。筆者らは、これらの不飽和脂肪酸の中で、特に $n-3$ 系列に属するイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの高度不飽和脂肪酸に関する新しい分離・精製技術を開発した。

従来不飽和脂肪酸のクロマトグラフィーに関しては、シリカやゼオライトに銀イオンを担持させ、これを充填剤として用いる方法などが知られていた。しかしながらこれらの方法では不飽和脂肪酸の保持量がそれ程多くないことや、担持された銀イオンが使用中に溶離液中へ溶出してしまふなどの問題点があり、分離・精製などに用いる充填剤としては充分な素材ではなかった。筆者らは、膨潤性粘土鉱物のカチオン交換反応に関する研究の過程で^{1)~4)}、粘土鉱物の層間カチオンを銀イオンで交換した

粘土鉱物が、飽和度の異なる脂肪酸を選択的に識別する能力のあることを見いだした。この銀イオン交換粘土鉱物を用いると、EPA や DHA などの高度不飽和脂肪酸の分離・精製が、従来に比べ極めて簡便でしかも効率よく行えることが分かった。本報では、種々の原料油を用いて EPA や DHA などの濃縮・精製例を紹介する。

2 膨潤性粘土鉱物を用いた球状粘土鉱物の調製

膨潤性粘土鉱物は一般に層状構造を持ち、下記の化学式 (1) で示され鉱物的にスメクタイト族と称せられている。

そしてスメクタイト族の中でも、ここで用いた粘土鉱物は合成で得たヘクトライト種と称せられるものであるが、その層状構造は図-1 に示す様に、2枚のシリカ4面体結晶の間にアルミナの8面体結晶がサンドイッチされた2:1型の層状構造をとることが知られている^{4), 5)}。

図中で示すように2:1の単位で繰り返す結晶層間は、一般に結晶中の金属カチオンの一部が置換(例えば Al³⁺ → Mg²⁺)し負電荷が過剰となるため、これを中和する目的から Na⁺ などの交換性のカチオンが介在している。そしてこの層間カチオンは他のカチオンと容易に交換可

図-1 合成ヘクトライトの層状構造

図-2 球状粘土鉱物のSEM 観察像 ($\times 10,000$)

能であり、その交換能は一般的に 100 g の粘土鉱物に対しておおよそ 60 ミリ当量から 100 ミリ当量である。また層間に Na^+ などが介在するため osmotic-swelling 現象により、この粘土鉱物は著しい水膨潤性を示す⁶⁾。合成のヘクトライト種は極めて微細な粒子であることから、水に膨潤した場合は透明性の高いゲルを生成する。筆者らは別の実験でのこのゲルを噴霧乾燥することによって、粘土鉱物の特性をまったく変えることなく、図-2 に示す様な $10\mu\text{m}$ 前後の真球状微粒子 (以下 spherical clay : SC と略す) の得られることを見いだした⁷⁾。

この SC は、機械的強度が従来から液体クロマトグラフィー用担体として用いられてきた球状のシリカと同程度であることから、クロマトグラフィー用充填剤としても充分機能し得ることが期待された。ここでは特に SC のカチオン交換性に着目し、層間のカチオンを銀イオン Ag^+ で交換した球状の粘土鉱物を開発し、これが優れた飽和-不飽和識別能を有する素材となった。

3 高度不飽和脂肪酸の分離・精製について

3-1 Ag^+ でカチオン交換した粘土鉱物の調製

従来、ルイス酸-塩基結合によって生成する錯体をウエルナー型錯体と称されているが、これとは異なり遷移元素の低い酸化数イオンまたは原子との作用で生成する錯体を、非ウエルナー型錯体と称し、一例として Ag^+ と不飽和炭化水素などの錯体生成 (オレフィン錯体) が知られている。ここでは Ag^+ に代わる素材として、SC 層間を Ag^+ でカチオン交換したものを開発した。

合成ヘクトライトの水性ゲルを噴霧乾燥して得られる球状粘土鉱物 SC は、比表面積が $330\text{ m}^2/\text{g}$ であり、細孔分布は $40\text{ \AA}$ にピークを持つ。またその粒度分布はおおよそ $2\sim 20\mu\text{m}$ であることから、ここではクロマト効率を高める目的から分級機を用いて平均粒度を $10\mu\text{m}$ にそろえたものを用いた。SC 層間を Ag^+ でカチオン交換する方法は、所望の Ag^+ 交換量を硝酸銀/メタノール溶液で調製し、これに SC を分散する。分散液をかくはんしていると層間の Na^+ が Ag^+ で交換し、同時に硝酸ナトリウムが副生成物として生成するため、メタノールで十分に洗浄除去する。こうして得られた球状粘土鉱物 (図-2 の形態とまったく同一) を SC (Ag) と称することにする。

カラムへの充填は、分析用及び分取用のステンレスカラムを用い、常法の平衡スラリー法によって行った。

3-2 SC (Ag) による標準化合物の分離

SC (Ag) のクロマト特性を評価する目的から、トルエン、安息香酸メチル及びニトロベンゼンなどの標準化合物の吸着クロマトグラフィー特性を調べた。図-3 に

Column: SC (Ag), S-3 $\sim 7\mu\text{m}$
4.6mm i.d. $\times$ 250mm
Mobile phase: 10% Ethanol/Hexane
Flow rate: 1mL/min
Detector : UV, 254nm
Sample : 1. Toluene
2. Methyl benzoate
3. Nitrobenzene

図-3 分析カラムにおける標準化合物の分析

図-4 セミ分取カラムにおける標準化合物の分析

分析用カラムを用いた場合を、図-4 に分取用カラムを用いた場合の結果を示す。移動相としては10% エタノール/*n*-ヘキサンを用いると、いずれの場合も4000段の理論段数を示し、良好な分離特性を示した⁸⁾。またこの結果は、SC層間のNa⁺をAg⁺でカチオン交換しない場合とまったく同じであり、順相系における分離と類似した挙動を示した。

3.3 高度不飽和脂肪酸エステルの分離・精製

3.3.1 γ-リノレン酸エチルの精製

糸状菌 (*Mortierella isabellina*) が、高度不飽和脂肪酸の中でもγ-リノレン酸を効率良く産生することが知られている⁹⁾。図-5 (A), (B) は、糸状菌 (*Mortierella isabellina*) が産生したγ-リノレン酸などの高度不飽和脂肪酸を含有するトリアシルグリセリンを、分解後エチルエステル化して得られた混合物の、逆相分配系充填剤 (CAPCELL PAK C 18) 及び SC (Ag) による分離クロマトグラムを示す (トリアシルグリセリンの形態のままでの分離・分析等については、それぞれの分子種の極性の問題から現在詳しく検討中である)。

(A) の CAPCELL PAK C 18 は典型的な逆相分配系の挙動を示すのに対し、(B) の SC (Ag) の場合は二重結合が多い分子種ほど充填剤に強く保持され、溶出順序が逆になることが分かる。また、逆相分配系充填剤では分離が困難であったパルミチン酸エチル (C₁₆) とオレイン酸エチル (C_{18:1}) が、充分とは言えないが分離する傾向が見られた⁸⁾。恐らく逆相分配系は充填剤と分子種との疎水性相互作用によって分離するのに対して、SC

図-5 γ-リノレン酸含有油脂のエチルエステル混合物の分離

図-6 SC (Ag) カラムを用いたγ-リノレン酸エチルエステルの分取クロマトグラム

(Ag) を用いた場合は、銀との相互作用 (非ウエルナー型錯体の生成) により分離するものと予想される。

次に同じ SC (Ag) を充填した分析用カラムを用いて、この脂肪酸エチルエステル混合物から、γ-リノレン酸エチルの分取を試みた。4.6 mm φ × 250 mm のカラムに、脂肪酸エチルエステル混合物 100 μL (86 mg) を負荷し、移動相として酢酸エチルを通液すると、図-6 の分取クロマトグラムが得られた。

フラクション1の画分とフラクション2の画分のそれ

図-7 分取した γ -リノレン酸含有油脂エチルエステルのガスクロマトグラム

それをガスクロマトグラフで分析した結果を図-7 (A), (B) に示す。

分取・濃縮前 (A) の γ -リノレン酸エチルの純度が 6.2% であったものが、このカラムを用いることによって 92.6% もの高純度に濃縮された。この結果から分かるように、この SC (Ag) の極めて特徴的なことは、二重結合の多い分子種ほど充填剤に強く保持されると同時に、その負荷量が従来の逆相分配系の充填剤に比べ、約 10 倍程も大きいことである。すなわち、この SC (Ag) は高度不飽和脂肪酸などの分取・精製に適していることを伺わせた。

3.3.2 おきあみ油からの EPA, DHA の濃縮

前項で述べた予測をさらに発展させる目的から、次に 20 mm ϕ $\times$ 250 mm の分取用カラムを用いて、おきあみ油からの不飽和脂肪酸の分離・濃縮を検討した⁸⁾。

おきあみ油を常法により分解後エチルエステル化し、そのエチルエステル混合物から EPA や DHA の濃縮を試みた。分取用カラムに、あらかじめ調製したおきあみ油由来の脂肪酸エチルエステル混合物 (EPA, 14.3%; DHA, 5.2% 含有) を 5 mL (4.2 g) 負荷し、1% アセトン/*n*-ヘキサン溶液 500 mL を通液する。この移動相を用いると、不飽和度の高い脂肪酸エチルエステル類はカラム内に吸着され、不飽和度の低い脂肪酸エチルエステル類は溶出した。次いで極性を高めた 12% アセトン/*n*-ヘキサン溶液 300 mL を通液すると、カラム内に吸着されていた不飽和度の高い脂肪酸エチルエステルが溶出した。原料油及び移動相を変えて得た画分のガスクロマトグラフィーの結果を図-8 に示す。12% アセトン/*n*-ヘキサン画分の EPA エチル及び DHA エチルの純度は、それぞれ 45.7%, 15.7% であり、濃縮前と比較して約 3 倍以上に濃縮された。この様に、充填剤として SC (Ag) を用いると、高度不飽和脂肪酸エチルエステ

図-8 オキアミ由来油脂エチルエステルの精製前後のガスクロマトグラム

ルを吸着・脱着という非常に簡便な操作で、しかも大量に濃縮可能であることが分かった。また、こうして濃縮に用いた SC (Ag) 充填カラムは、元の移動相溶媒に戻すことによって繰り返し何度も分離・濃縮に供することができ、極めて耐久性に優れた充填剤であることが分かった。

3.3.3 いわし油からの EPA, DHA の精製

前項と同様にしていわし油由来の脂肪酸エチルエステル混合物から、EPA, DHA の大量精製を試みた結果を紹介する¹⁰⁾。

分取カラムとして、50 mm ϕ $\times$ 500 mm カラムを用い、いわし油分解脂肪酸エチルエステル (図-9 にそのガスクロマトグラフィーの結果を示す) を 30 mL (25 g) 負荷し、最初に *n*-ヘキサン 5000 mL を通液すると、不飽和度の高い脂肪酸エチルエステルはカラム内にほとんど吸着され、飽和の脂肪酸エチルエステル類が溶出した。

次に 1% アセトン/*n*-ヘキサン 6000 mL、さらに 10% アセトン/*n*-ヘキサン溶液を 6000 mL 通液すると、カラム内に吸着した高度不飽和脂肪酸エチルエステルは順次溶出した。1% アセトン/*n*-ヘキサン通液画分の後半では、図-10 に示すように EPA 及び DHA の純度がそれぞれ 53.8%, 1.7% であり、EPA がかなり濃縮されていた。

また 10% アセトン/*n*-ヘキサンを通液した場合は、

図-9 精製前のいわし由来油脂エチルエステルのガスクロマトグラム

図-11 10% アセトン/*n*-ヘキサン通液画分のガスクロマトグラム

図-10 1% アセトン/*n*-ヘキサン通液画分のガスクロマトグラム

EPA が 27.9%, DHA は 46.5% の純度となり, より極性の高い移動相を用いることにより, 不飽和度の高い DHA が回収できることが分かった。

ここではさらに高純度の DHA を得ることを試みた。充填剤 SC (Ag) は, SC 層間の Ag^+ 量を幾分増やしたものを調製し, これをセミ分取カラム (20 mm ϕ $\times$ 250 mm カラム) に充填して用いた。移動相はこれまでと同じ様にアセトン/*n*-ヘキサンの比率を変えて用いた。その結果図-11 に示すように, 83.5% の高純度の DHA が得られた。

これは Ag^+ の量を増やすことによって DHA と相互作用が強まり, SC (Ag) がより DHA を強く吸着するためと考えている。

3.3.4 海洋細菌が産生する EPA の高純度精製

矢澤ら¹¹⁾ は, アジの腸内より分離した好気性海洋細菌 (SCRC-2738) が, 高濃度 EPA を含有する脂肪酸を産生することを見いだした。筆者らは, この混合脂肪酸を用いてこれまでと同様の方法でエチルエステル化し, その高純度精製を試みた結果を次に紹介する。

この脂肪酸組成は極めて特徴的であり, 高度不飽和脂肪酸は EPA が主に含有していることである。そしてそ

図-12 アジ腸内細菌由来の油脂エチルエステルの濃縮精製過程のガスクロマトグラム

の含有量は 18% もの高濃度である。

精製の方法は, 前項までの方法と同様にアセトン/*n*-ヘキサンの比率を変え, 極性を調整した移動相を用いて行った¹²⁾。SC (Ag) を充填したカラムは, 前項と同じセミ分取カラム (20 mm ϕ $\times$ 250 mm カラム) を用いた。図-12 は, 原料油及び精製過程で得られたガスクロマトグラフィーの結果を示す。1% アセトン/*n*-ヘキサンを通液して得た画分からは, EPA エチル以外の脂肪

図-13 魚眼窩油由来の油脂エチルエステルから得られた精製 DHA のガスクロマトグラム

酸エチルエステルのみが溶出しているのが分かる。

一方 40% アセトン/*n*-ヘキサンを通過した画分には、EPA エチルが 98.7% もの高純度で存在することが分かった。

3・3・5 魚眼か(窩)油からの DHA の大量精製

魚油には従来から高度不飽和脂肪酸が含有されていると言われてきたが、矢澤ら¹³⁾は特に魚眼窩油に高濃度の DHA の存在することを見いだした。これまでと同様に、魚眼窩油を分解後エチルエステル化し、同様の方法で DHA の大量精製を試みた。カラムとしては分取用として、100 mm φ×100 mm の大型カラムを用いた。

25% の DHA エチルを含む原料油をカラムに 50 mL (43.7 g) 負荷し、10% アセトン/*n*-ヘキサン溶液を通過した後に 40% アセトン/*n*-ヘキサン溶液を通過し、その画分からは 95.5% の高純度 DHA エチルが得られた。また、純度をさらに高める試みとして、途中の段階で得た 51.5% の DHA エチルを用い、5%~40% のアセトン/*n*-ヘキサン溶液を順次通過すると、最終的に図-13 に示す様に 99.0% の DHA エチルが得られた¹⁴⁾。

4 ま と め

このように、粘土鉱物のカチオン交換性を利用して開

発した SC (Ag) を充填剤として用いると、吸着・脱着という極めて簡単な操作により、目的とする高度不飽和脂肪酸が高純度に精製できることを見いだした。さらに、用いる原料油を選択することによって、より効率よく高度不飽和脂肪酸が濃度・精製できることが分かった。また、ここで開発した SC (Ag) 中の Ag⁺ が、濃縮・精製工程で移動相や油脂中へは全く溶出してこないことは、ICP 分析から確認している。そしてこの充填剤は、使用後に充分洗浄することによって繰り返し使用可能であり、耐久性の優れた充填剤であることも確認している。筆者らは、この技術が発展し、機能性が叫ばれている高度不飽和脂肪酸の食品や医薬品開発の一翼を担えればと念願している。

最後に、この研究を進めるにあたって試料(原料油)を提供していただいた(財)相模中央化学研究所の矢澤一良先生に、この紙面をお借りして厚くお礼申し上げます。

〔平成 3 年 (1991 年) 8 月 2 日受理〕

文 献

- 1) 山口道広, 油化学, 39, 90 (1990)
- 2) 山口道広, 油化学, 39, 100 (1990)
- 3) 山口道広, 油化学, 40, 491 (1991)
- 4) 白水晴雄, “粘土鉱物学” (1988) 朝倉書店
- 5) 加藤忠蔵, “層間化合物の開発と応用” (1980) シーエムシー
- 6) H. Van Olphen, “An Introduction to Clay Colloid Chemistry” ADAMHILGER (1977)
- 7) K. Tokubo, M. Yamaguchi, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, 24, 119 (1990)
- 8) 田中 功, 大津 裕, 山口道広, 第 23 回クロマトグラフ研究会 (1990)
- 9) 鈴木 修, 横地俊弘, 山科孝雄, 油化学, 30, 863 (1981)
- 10) 田中 功, 大津 裕, 山口道広, 第 1 回クロマトグラフィ学会 (1990)
- 11) K. Yazawa, *Bio Industry*, 6, 491 (1989)
- 12) 田中 功, 大津 裕, 山口道広, 中田興亜, 日本化学会第 59 回春季年会 (1990)
- 13) 矢澤一良, 第 29 回油化学討論会 (1990)
- 14) 田中 功, 大津 裕, 小島清隆, 包 勇二, 山口道広, 矢澤一良, 近藤 聖, 日本化学会第 61 回春季年会 (1991)