

二塩基酸およびそのエステルの高速液体 クロマトグラフィー

芳 崎 徳 蔵・田 崎 美 智 子

High Performance Liquid Chromatography of Dibasic Acid and its Esters

Tokuzo YOSHIZAKI and Michiko TAZAKI

Abstract

This paper described a procedure for the simultaneous determination of dicarboxylic acid, dicarboxylic acid monoester and diester that were formed when esterification of dicarboxylic acid was applied, using high performance liquid chromatography system with a Shodex OHpak B-804 column. Partial esterification of dicarboxylic acid is not possible if the esterification rate of the two carboxyl groups is not different. So the acid-catalyzed esterification of α, ω -dicarboxylic acid produces diester together with monoester.

The mobile phases were water, methyl alcohol or acetonitrile-water solution. The detection of the three substances was monitored by the UV spectrophotometer at the different wave length.

In this work, nonanedioic acid was treated as the dicarboxylic acid. Diethyl nonanedioate and nonanedioic acid could be separated when the mobile phases were the above. But the peaks of the ethyl hydrogen nonanedioate and the nonanedioic acid were overlapped. The theoretical plates and the height equivalent to a theoretical plate were calculated, respectively.

結 論

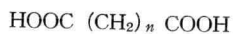
クロマトグラフィーは今世紀のはじめに考案されたが、しばらくはあまり注目すべき発展もなくすぎた。1952年になって James と Martin¹⁾はクロマトグラフィーを理論的に解明し、ガスクロマトグラフィー(GC)による分析方法を確立した。熱的に安定で気化しやすい物体は充填剤のつまったカラム中を移動相の気体で運ばれていく間に、固定相の充填剤との間に分配し、固定相に適した分配をする成分は移動相に適した分配をする成分より遅く移動するのでカラムから流出するのに時間的差が現われる。これを適当な検出器で検出記録して分離検出の目的を達する。有機物すべてが熱に安定で気化しやすいものではないのでこの方法で分離できないものも多くある。GCにおいてこのような物質を分析して満足する結果を得るためにとられている手段は、あらかじめ

物質の誘導体を得てからカラムに通じるかあるいはカラム通過後に何らかの変化を加えたりする。アルコール類をトリメチルシリル化したり、有機酸をエステル化したりしているのはその例である。しかしある物質を分析する前に分離しやすいように、あるいは後でその分析手段で感知できるように物質を変化させることは、化学変化をとまらう工程を経ることが一般である。

著者の一人²⁾はカルボキシル基をもつ有機二塩基酸について GC による分析を試みたことがあるが、これはあらかじめ有機酸をメチルエステルとしてから、分析条件を種々変えて試験したものである。

クロマトグラフィーの分野では1960年代の後半から、高圧ポンプなどの液送作用をつかさどるハードな部分の研究開発が進み、しかも GC で用いられているよりすぐれた充填剤などの新しいものの出現が広く影響して、試料の移動相として液体を用いていた液体クロマトグラフィーの高速化がすすんだ。いわゆる高速液体クロマト

グラフィー (HPLC) が開発された。GC による分析ができずに行きづまっていた物質、熱によって変化しやすい物質や、複雑な物質などにこれらの開発の光が照らし出されはじめるや、たちまちのうちに相当多数の物質が HPLC によって分析が試みられるようになった。著者の一人³⁾はこの方法を利用して有機二塩基酸のエステルを合成する際にモノエステル、ジエステルと変化していく反応過程を検討した。これは無水コハク酸をエタノールシスしてジエチルエステルとなる変化を一つの反応条件から考察したものであった。この報告の中で述べたように、鎖状の炭化水素の両末端の二ケの水素がカルボキシル基で置換したと考えられる α , ω -二塩基酸



のエステルは分析条件を選択することにより、原料が存在した系の中に生成物が混在した反応混合物の分析が可能となった。この報告は検出器として紫外分光光度計を用い、設定波長は 254 nm であった。しかし二塩基酸類を検出する波長はむしろ 210~230 nm の範囲の方が高い吸収率を有する。紫外分光光度計を HPLC の検出器として用いる場合、検出されるものはこの紫外外部範囲内の波長をより吸収する物質である必要がある。UV の範囲内に吸収が存在しなくても、比較的簡単に誘導体とすることができ、そしてこの波長範囲内に吸収をもつ物質に定量的に誘導されることがわかっている物質は、GC の場合のようにあらかじめそのような操作を施すことが一般化している。脂肪酸をラベル化して紫外外部に強い吸収を有する物質に誘導するラベル化剤として PNB⁴⁾ (0-p-nitrobenzyl-N, N'-diisopropylisourea) や BPB⁵⁾ (Bromophenacyl bromide) などが実用化されている。これらはカルボン酸をカラムに注入する前に誘導体を作り目的を達している。

二塩基酸をエステル化する場合、前述のようにモノエステル、 $\text{ROOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, ジエステル、 $\text{ROOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}$ が生成するが、本実験では、原料のジカルボン酸が残っていてこれにこの二者が共存している系を対象として HPLC を用いて同時に分析できる条件をさぐるうとした。前回³⁾のコハク酸の場合と違って、本報告では波長を変動させて検討した。これはいずれも室温で試み、ラベル化剤を使わないでノナン二酸 (アゼライン酸, C_9 acid), ノナン二酸モノエチルエステル (C_9 monoester), ノナン二酸ジエチルエステル (C_9 diester) の存在する状態で分離分析した結果である。

同一カラム (Shodex OHpak B-804) でも溶離剤が異なることによってピークの表れ方は非常にかわる。また

理論段数 (TP) や HETP などの値も変わる。これらを求めて比較検討を試みた。

1. 実験

1-1. 装置

高速液体クロマトグラフ

ガスクロ工業株式会社製 520-2B 型

紫外検出器

波長可変 (210~350 nm) のもの、セル容量 8 μl , 光路長 10 mm.

カラム

Shodex OHpak B-804, 分配, 吸着クロマトグラフィー用充填カラム, 充填剤は多数の水酸基を有するポリエステル系のゲルから成っている。内径 8 mm, 長さ 500 mm, ステンレス製。

1-2. 試薬および試料

溶離剤

アセトニトリル (関東化学株式会社製 HPLC 用)。

メチルアルコール (和光純薬株式会社製, HPLC 用)

イオン交換水

試料

ノナン二酸; 市販の試薬一級品を再結晶してから使用。mp 105~6 °C (文献値 106.5 °C)。

C_9 monoester, C_9 diester; ノナン二酸を硫酸触媒でエステル化し、蒸留してから使用。

C_9 monoester bp 155~157 °C (0.4 mmHg) (文献値 170 °C (1mmHg))。

C_9 diester bp 125~130 °C (2mmHg) (文献値 154~8 °C (8mmHg))。

1-3. 方法

溶離剤の調整

メチルアルコール; 市販品を脱気してから使用。

水; イオン交換水を煮沸放冷後脱気してから使用。

アセトニトリルの水溶液; アセトニトリルとイオン交換水を溶積比で 40:60 に混合し、脱気してから使用した。

試料の調整, カラムへの注入

試料はそれぞれ用いる溶離剤に溶解させてから所定量をマイクロシリンジを使ってカラムに注入した。

試料濃度はアセトニトリル, メチルアルコールに

は, C_9 acid, C_9 monoester, C_9 diester をそれぞれ 2.5 % (v/v) とした。溶離剤が水だけの場合は C_9 acid 0.2% (w/w) とした。

2. 結果および考察

高速液体クロマトグラフィーでカルボン酸類を分析する場合, どういう検出器を使用するかが一番問題となる部分である。万能型の屈折率を利用した装置は温度調節などのわずらわしい手続きが必要である。比較的使いやすく感度も高いものがここで使った紫外検出器であるが, これは取りあつかう物質が紫外領域に吸収をもたなくてはならない。紫外部長領域に構造上吸収をもたぬ基しか存在しない物質はあらかじめこの波長領域に感

応するように化学的に変化させたりして目的を達している。ジカルボン酸は脂肪酸の場合の誘導体試薬^{4,5,7)}やフェナシルプロミドを用いてラベル化⁶⁾して, UV 検

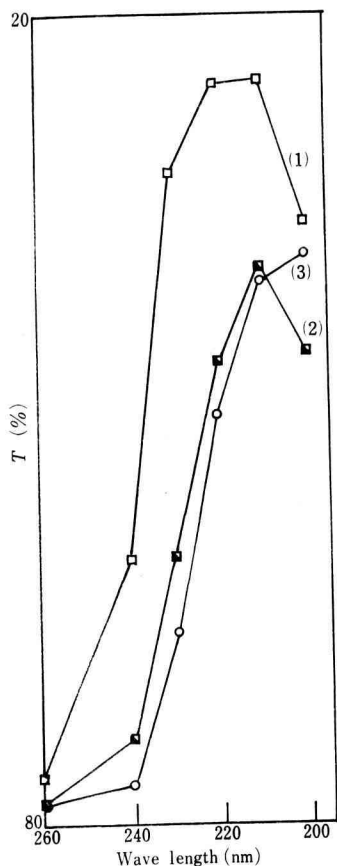


Fig 1 UV spectra of diethyl nonanedioate ((1), 18mmol/MeOH), ethyl hydrogen nonanedioate ((2), 5.18mmol/MeOH) and nonanedioic acid ((3), 4.89 mmol/H₂O).

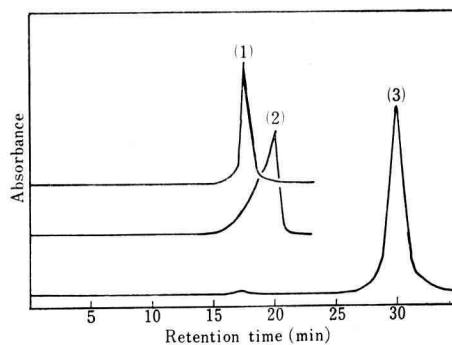


Fig. 2 Chromatograms of nonanedioic acid (1) ethyl hydrogen nonanedioate (2) diethyl nonanedioate (3) Conditions: Mobile phase, 40% acetonitrile/60% water; Flow rate, 40 ml/h; Detection, UV 220 nm.

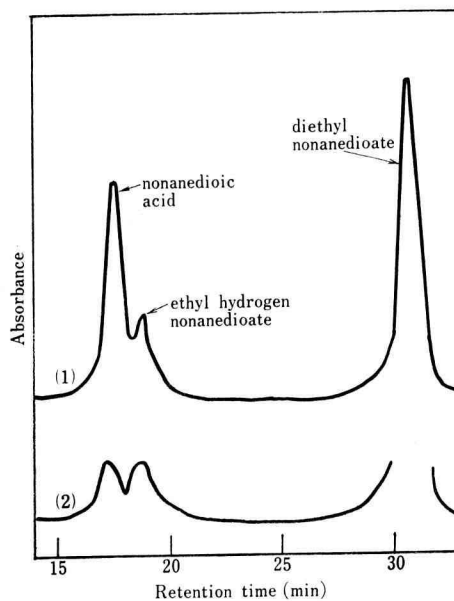


Fig. 3 Chromatograms of nonanedioic acid and its esters Conditions: Mobile phase, 40% acetonitrile/60% water; Flow rate, 40 ml/h; Detection, UV 220 nm.

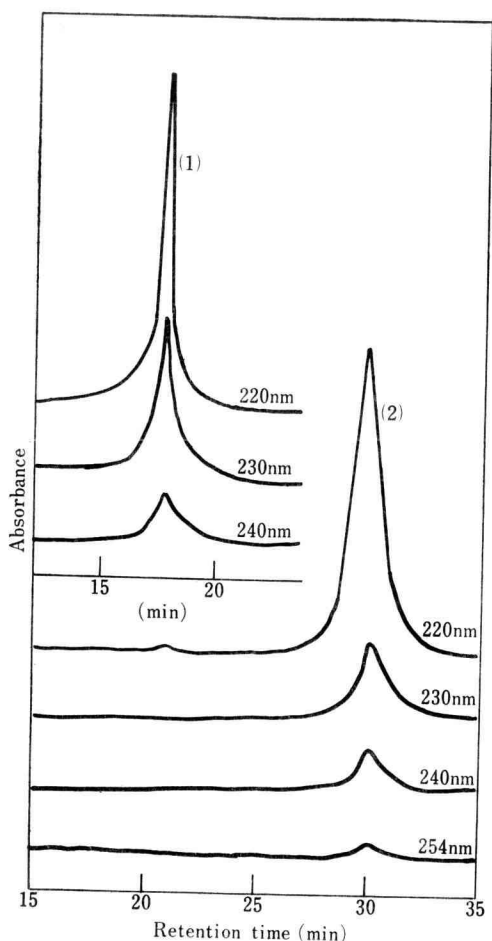


Fig. 4 Chromatograms at different UV wave length.

Conditions: Mobile phase, 40% acetonitrile/60% water; Flow rate, 40 ml/h, (1) nonanedioic acid, (2) diethyl nonanedioate.

出器に高い感度が得られるようになる。しかしこれはカルボキシル基がフリーの状態が存在している場合についてのもので、すでにアルコール類とエステル化してしまっている物質は適用できない。

Fig. 1 は C_9 acid, C_9 monoester および C_9 diester のそれぞれの UV 吸収スペクトルである。200~260 nm の波長領域ではこの程度の濃度であれば充分検出できる。Fig. 2 に三成分の約 2.5% 溶液を 10 μ l 液相に注入し、Shodex OHpak B-804 のカラムを通過後に UV 220 nm の波長で検出したクロマトグラムを示す。この時の溶離

剤はアセトニトリル 40%, 水 60% のものである。液相の流速は 40 ml/h である。 C_9 acid と C_9 diester, C_9 monoester と C_9 diester の分離状況はいいが、カルボキシル基が残っている C_9 acid と C_9 monoester のピークは重なりを生じてしまう。Fig. 3 がこれら三成分が混入した試料のクロマトグラムである。ピーク (1) はピーク (2) の試料に C_9 acid を追加した後に得たクロマトグラムで、三成分が混入している試料を図に示すような条件で分析するとまず C_9 acid が流出することがわかる。Fig. 4 は実際にそれぞれ検出器の波長を変えた場合、 C_9 acid と C_9 diester のピークの表れ方がどのように変化していくかを示したものである。注入した試料が同じものでも検出器の条件が違えばそのピークの表れ方はこの様に変化し、Fig. 1 と合わせて UV 検出器では波長の選択が非常に重要であることがわかる。特に成分が混入している試料を同時に分析するとき考慮しなければならない。220 nm の波長でカルボン酸を分析した例にリンゴ中のリンゴ酸やレモン中のクエン酸の場合⁹⁾がある。またドリンク剤中に添加されているこれらの酸類の同時分析¹⁰⁾も試みられ好ましいクロマトグラムが得られている。

これらの分析条件でそれぞれの物質を分離したときに得られたカラム理論段数 (TP) とカラムの一理論段の高さ (HETP) の値を求めて Table 1 に示す。溶離剤が変わることによりそれらの値も変化している。

ま と め

二塩基酸として炭素数が 9 ケの直鎖状 α, ω -ジカルボン酸のノナン二酸 (アゼライン酸) をえらび、これを硫酸触媒でエチルエステル化し、モノエチルエステル、ジエチルエステルを得てそれらを試料としてこの実験を試みた。カラムは Shodex OHpak B-804 だけを使い、溶離剤を変えて分離の状態を試験した。

ノナン二酸は水に一部溶解 (溶解度 20 $^{\circ}$ C で 0.24) するが、モノエステル、ジエステルはこれ程の溶解性がない。三成分混合の試料では試料の溶解性の面からみれば有機溶媒が溶離剤として適している。しかしメタノールで試みたものはノナン二酸とノナン二酸モノエチルエステルとのピークの重なりが大きすぎて好ましい結果とはならなかった。アセトニトリル 40% の水溶液がこのピークの重なりが少なくなりより好ましいクロマトグラムが得られた。

検出器は UV を用いて波長を 220 nm 付近に設定すれば、三成分が比較的感度よく分析できることがわかった。量的な関係については今後の課題としない。

Table 1. Retention time (Rt), retention volume (Rv), theoretical plates (TP) and HETP (H)

mobile phase		nonanedioic acid	ethyl hydrogen monanedioate	diethyl nonanedioate
CH ₃ CN: H ₂ O (40: 60) flow rate 40 ml/h	Rt ^{c)}	17.5	19	30.3
	Rv ^{d)}	11.7	12.5	20.2
	TP	2153	2131	1936
	H ^{e)}	0.23	0.23	0.26
CH ₃ OH flow rate a) 36 ml/h b) 42 ml/h	Rt ^{c)}	32 ^{a)}	29.6 ^{b)}	33.4 ^{b)}
	Rv ^{d)}	18.6	19.0	19.5
	TP	2078	1369	3136
	H ^{e)}	2.4	3.6	0.16
H ₂ O flow rate 40 ml/h	Rt ^{c)}	18		
	Rv ^{d)}	12		
	TP	2304		
	H ^{e)}	0.21		

c) min, d) ml, e) mm.

文 献

- 1) A.T. James, A.J. Martin, *Analyst*, **77**, 915 (1952).
- 2) 田崎, 幾徳工専紀要, 第一号 69 (1973).
- 3) 田崎, 幾徳工大研究報告 B, 第三号 83 (1978).
- 4) D.R. Knapp, S. Kruger, *Anal. Lett.*, **8**, 603 (1975).
- 5) H.D. Durst, M. Milano, *Anal. Chem.*, **47**, 1797 (1975).
- 6) E. Grushka, et al, *J. Chromatogr.*, **112**, 673 (1975).
- 7) T. Jupille, *J. Chromatogr. Sci.*, **17**, 160 (1979).
- 8) 島津ジュボン液体クロマトグラフデータ集 Technical データ集 No.3 p.3.
- 9) 島津高速液体クロマトグラフ LC-1 シリーズ p. 21.