赤外吸収スペクトル法によるショウノウ赤油中の サフロールの定量

田中 誠之*， 大野 幸雄**

赤外吸収スペクトル法によりショウノウ赤油中のサフロールの定量を検討した。

赤外法で試料中のサフロールを直接定量することは、共存成分による吸収帯との重複のためサフロールの key band を選ぶことができず困難であったので、薄層クロマトグラフ法(以下 TLC 法と略記)およびシリカゲルクロマトグラフ法により干渉成分除去を目的とした前処理法を検討したところ、展開溶媒の極性を順次変えることによりサフロールの定量的単離が可能となり、key band としてサフロールの 1040 cm^{-1} およびサフロール溶出液中に少量残存する *n*-ヘキサンの 1380 cm^{-1} を用いて2成分系で精度よく定量することができた。

1 緒 言

ショウノウ赤油はショウノウ原油の分留の際の副産油で、沸点 $210\sim 250^{\circ}\text{C}$ を有し、サフロール、ショウノウ、 α -テルピネオール、オイゲノール、セスキテルペンおよびセスキテルペンアルコールなどの混合物である。主成分のサフロールは約 50% で、これはヘリオトロピン、ワニリンの製造原料として工業的に重要なものである。

従来、ショウノウ赤油中のサフロールの定量には、酢酸第二水銀による付加物の重量法による定量¹⁾²⁾あるいはサフロールと 1,3,5-トリニトロベンゼンとの付加化合物の凝固点から求める凝固点法³⁾などがある。一般には凝固点法が採用されているが、凝固点の測定にはかなりの熟練を要し、また、抜赤油のようなサフロール含量の低い試料の場合には共存成分による影響が著しく、既知標準凝固点曲線を用いるこの方法の適用にはかなり問題があった。

著者らは、工業的にショウノウ赤油からサフロールを分離し、ヘリオトロピンを合成する際の管理分析において、原料油および抜赤油(深冷分離法によりサフロールを結晶させ分別した母液でサフロールの一部は溶存する)中のサフロール量を精度よく求める必要があり、これらに適用できる方法として赤外吸収スペクトル法による定量を試みた。しかし、赤外吸収スペクトル法でサフロールを直接定量することは、ショウノウ、 α -テルピネオール、オイゲノールなどの共存成分による吸収がサフ

ロールの吸収と重複する結果、適当な key band を得ることができず困難であった。

そこで、ショウノウ赤油からサフロールの単離を目的とした前処理法を研究したところ、シリカゲルを充てん剤とするクロマトグラフィーにおいて、極性の異なる溶媒で順次展開することにより、サフロールの定量的単離が可能であることが明らかになった。

したがって、この分離サフロールを用い、赤外吸収スペクトル法で定量することができた。定量値の精度および正確さは満足できるものであり、工程管理分析あるいは商品の鑑定試験などに十分応用できることを知った。

2 実験方法および結果

2.1 実験装置

実験装置は日本分光 K K 製 IR-S 型赤外分光光度計を用い、試料容器には液層約 0.1mm (定性用)および 0.2mm (定量用)の厚さの岩塩製のものを用いた。

また、ショウノウ赤油およびこの分離成分の TLC 法に用いた装置は東洋汙紙 K K 製のもので、シリカゲルは Wakogel B-5 を使用した。

なお、カラムクロマトグラフィー用分離管は $10\times 600\text{ mm}$ の 50ml 用ビュレットで、特にコックについては液もれのないようすり合わせ部分を注意して作製されたものを用いた。

2.2 標準試料

標準サフロールとして高砂香料 K K 提供によるサフロール 1104 をシリカゲルクロマトグラフ法により精製したもので、物理定数は次のとおりで、純サフロールの文献値に一致する。

* 東京大学工学部工業分析化学教室：東京都文京区本郷 7

** 横浜税関分析室：横浜市中区海岸通り 1

$$d_4^{20}=1.101, n_D^{20}=1.538, \alpha_D^{20}=\pm 0$$

なお、この標準サフロールの赤外吸収スペクトルは Fig. 1 のとおりである。

Fig. 1 標準サフロールの赤外吸収スペクトル
Liquid film

次に、サフロール単離法の検討に用いたショウノウ、 α -テルピネオール、オイゲノールなどは市販特級品または1級品を所定の方法で精製したもので、TLC 法および赤外吸収スペクトルから純度を確認した。

また、実験に用いたショウノウ赤油は台湾産のもので、それぞれ製造時を異にし、Table I に示すような性状のものである。

Table I 使用したショウノウ赤油の性状

試料名	比重 (d_4^{15})	屈折率 (n_D^{20})	酸価	エステル価
Brown camphor oil No. 1	1.0360	1.5150	1.30	5.69
Brown camphor oil No. 2	1.0349	1.5149	1.25	5.09
Brown camphor oil No. 3	1.0355	1.5151	1.32	5.04
Brown camphor oil No. 4	1.0349	1.5149	1.23	5.10
Brown camphor oil No. 5	1.0353	1.5151	1.40	5.53

2.3 ショウノウ赤油の赤外吸収スペクトル

ショウノウ赤油の赤外吸収スペクトルの1例は Fig. 2 の実線に示すように、主成分であるサフロールの強い吸収のために、共存成分による吸収の多くはかくれ、わずかに 1740 cm^{-1} のショウノウによる $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動吸収帯のみがその存在を示すに過ぎない。赤油中のこれら共存成分の含量も明らかでないが、実際の赤油試料の補償スペクトルを測定した結果は Fig. 2 の点線のとおりで、共存成分中主要なショウノウ、 α -テルピネオール、オイゲノールなどの標準スペクトル (Fig. 3~Fig. 5) と比較すれば、これら成分による吸収帯がサフロールの各吸収帯と重複していることは明らかであり、ベースライン法によっても 適当な key band の選択は困難であった。

なお定量の際に、共存成分を一括分離し、これを用いる補償法も、試料により共存成分の組成は必ずしも一定

でなく、試料ごとに定量的に分離する必要があるが、実際には揮発性成分が多く困難であった。そこで適当な前処理を行ない、サフロールの吸収帯と重複するような共存成分を除く必要があった。

Fig. 2 ショウノウ赤油の赤外吸収スペクトル

— 通常法スペクトル (二硫化炭素溶液)
--- 補償法スペクトル (二硫化炭素溶液)

Fig. 3 ショウノウの赤外吸収スペクトル
60 mg/ml CS_2 soln., 0.1 mm cell

Fig. 4 α -テルピネオールの赤外吸収スペクトル
Liquid film

Fig. 5 オイゲノールの赤外吸収スペクトル
Liquid film

2.4 前処理方法の検討

一般に、天然の精油中には多種類のテルペン化合物が含まれ、これらは空気、熱、酸およびアルカリなどにより酸化、重合、異性化あるいは分解などの変化をうけやすく、その成分分析には困難を伴う場合が多い。

近年開発された TLC 法では, 加熱などの操作を要せず適当な発色試薬を用いることにより簡単, 迅速に分離分析ができるので, このようなテルペン系化合物の分析にはきわめて効果的な方法であり, すでに Kirchner^{4)~6)}および Reitsema⁷⁾により精油および香料成分の分離分析に応用され, かなりの成果が得られている。

Kirchner らによる精油成分の TLC 法の結果では, すでに存在の確認されているショウノウ赤油成分^{8)~12)}も極性の異なる溶媒で展開した際, シリカゲルに対する吸着性から比較すると, 極性の最も少ないテルペン系炭化水素, ついでサフロール, 中程度のショウノウおよびオイゲノール, エチルグアヤコールなどのフェノール分, さらに極性の大きい α -テルピネオール, ボルネオールなどのセスキテルペンアルコール類などに分けることができる。

そこで, TLC 法で展開溶媒を変えることによりショウノウ赤油中のサフロールとこれら副成分との分離性を検討し, さらに, この結果をシリカゲルクロマトグラフ法に応用し, サフロールの定量的分離を試みた。

2.4.1 ショウノウ赤油の TLC 法 Table I に示した 5 種のショウノウ赤油の 20%, n -ヘキサン溶液を Wakogel B-5 を用い, 厚さ約 0.25 mm に調製し, 130°C, 1 時間活性化したプレート上に点着し, n -ヘキ

Fig. 6 ショウノウ赤油のクロマトグラム (その1)

展開溶媒: n -ヘキサン (市販1級品)
 シリカゲル: Wakogel B-5, 厚さ 0.25 mm
 温度: 25°C
 発色剤: 濃硫酸(ただし, ショウノウは濃硫酸と濃硝酸を加えて噴霧後約 300°C に加熱発色させる)
 試料記号
 a: ショウノウ赤油 No.1 b: ショウノウ赤油 No.2
 c: " No.3 d: " No.4
 e: " No.5 f: 標準サフロール
 g: オイゲノール h: α -テルピネオール
 i: ショウノウ

サンで約 10 cm 展開したときのクロマトグラムを Fig. 6 に示す。赤油成分中極性の最も少ないテルペン系炭化水素は溶媒の上昇先端付近まで展開されるが, α -テルピネオール, オイゲノールおよびショウノウなどの極性物質はほとんど原点付近に残留する。これに対し, サフロールのみは R_f 値約 0.55 付近まで上昇し, 炭化水素類, 極性物質との分離は良好であった。

次に, 展開溶媒にクロロホルムを用いた場合には, Fig. 7 に示すように, テルペン系炭化水素とサフロールはほとんど溶媒の上昇先端まで展開されるのに対し, 極性の大きいオイゲノール, ショウノウ, α -テルピネオールなどは R_f 値 0.6 以下である。

さらに, メチルアルコールで展開すれば, これら極性物質のほとんどが溶媒の上昇先端まで移動することが判明した。

したがって, 試料油をまず n -ヘキサンで展開し, テルペン系炭化水素を分離し, ついでクロロホルムで展開すればサフロールのみ分離できることが予想された。

Fig. 7 ショウノウ赤油のクロマトグラム (その2)

展開溶媒: クロロホルム
 シリカゲル: Wakogel B-5, 0.25 mm
 温度: 25°C
 発色剤: 濃硫酸(ただし, ショウノウは濃硫酸と濃硝酸を加えて発色させる)
 試料記号: Fig. 6 に準ずる。

2.4.2 カラムクロマトグラフィーによるショウノウ赤油中のサフロールの定量的分離 次に, 2.4.1 の結果をシリカゲルクロマトグラフ法に応用し, サフロールの定量的分離を検討した。

すなわち, 140°C, 8 時間活性化した 200 メッシュの Davison 社製シリカゲル 50 ml を 10×600 mm のクロマト管に湿式法で均一に充てんし, 試料 1 g を n -ヘキ

サン 20 ml に溶解して加え、*n*-ヘキサン、クロロホルムを溶媒として溶出速度約 1.5 ml/min で順次展開したときの溶出曲線はほぼ Fig. 8 のとおりである。

Fig. 8 ショウノウ赤油の溶出曲線

シリカゲル: Davison 200 メッシュ, 50 ml
 溶出速度: 1.5 ml/min
 クロマト管: 10×600 mm
 ① テルペン類 ② サフロール

TLC 法で予想されたように、まず *n*-ヘキサンで展開すると、流出量約 50 ml で後述のようにテルペン系炭化水素が溶出しはじめ、130 ml でほとんど溶出が完了するが、さらに 150 ml まで *n*-ヘキサン展開を続けたのち溶媒をクロロホルムに置換する。クロロホルムが流出しはじめるとまもなくサフロールが溶出を開始する。

Fig. 9 シリカゲルクロマトグラフ法による各分離成分のクロマトグラム

展開溶媒: クロロホルム
 シリカゲル: Wakogel B-5, 0.25 mm
 温度: 25°C
 発色剤: 濃硫酸 (ただし、ショウノウは濃硫酸と濃硝酸を加えて発色させる)

試料記号
 a: ショウノウ赤油
 b: クロマト分離 *n*-ヘキサン溶出分
 c: クロマト分離クロロホルム溶出分
 d: クロマト分離メチルアルコール溶出分
 e: 標準サフロール f: オイゲノール
 g: α -テルピネオール h: ショウノウ

クロロホルム約 40 ml の展開で溶出液中にはサフロール臭がなくなり、以後、100 ml の溶出を続けても他成分の溶出はみられなかった。

次に、各溶出分を分取し、減圧蒸留して濃縮し、2:3:1 と同様の操作で TLC 法により展開した結果は Fig. 9 のとおりであり、*n*-ヘキサン、メチルアルコール各溶出分 (メチルアルコール溶出分は *n*-ヘキサンおよびクロロホルムで展開したのち、メチルアルコールでカラム中に残留した極性物質を溶出させたもの) 中にはサフロールの特徴的な濃赤紫色のスポットはみられず、1,3,5-トリニトロベンゼン付加化合物法¹³⁾によるサフロールの検出反応は陰性であった。また分離サフロール中には炭化水素類、オイゲノール、ショウノウ、 α -テルピネオールなどの妨害成分によるスポットも認められなかった。

なお、これら分離成分の赤外吸収スペクトルを Fig. 10~12 に示す。分離サフロールについては同一厚さの試料容器を用い、等量の標準サフロールによる補償スベ

Fig. 10 *n*-ヘキサン溶出分の赤外吸収スペクトル
 0.025 mm liquid

Fig. 11 クロロホルム溶出分の赤外吸収スペクトル
 — 分離サフロール 100 mg/ml
 ---- 補償スペクトル (100 mg/ml の標準サフロールで補償)

Fig. 12 メチルアルコール溶出分の赤外吸収スペクトル
 0.025 mg liquid

クトルを測定したが, 他成分による吸収は全く見られなかった。

これらの結果から, シリカゲルクロマトグラフ法で展開溶媒を変えることにより, ショウノウ赤油中のサフロールの定量的分離が確認された。

2.5 key band の選定と定量方法の検討

2.4.2 に述べたシリカゲルクロマトグラフ法でサフロールを単離する際, サフロールは展開溶媒のクロロホルムが流出しはじめるとまもなく溶出されてくる結果, クロロホルム溶出分中には少量の *n*-ヘキサンが混入すること, および展開溶媒のクロロホルム中に通常 1~2% 程度添加されているエチルアルコールは, シリカゲルカラムを通過する際カラム中に完全に吸着されることが空試験における補償法赤外吸収スペクトル, ガスクロマトグラフ法などによる検討の結果から明らかになった。

そこで, 赤外法でサフロールを定量する際の key band として, 溶媒による強い吸収の影響をも考慮し, 吸収強度の大きいサフロールのメチレンジオキシ基の $=C-O-C$ 伸縮振動による 1040 cm^{-1} 吸収帯を選び, 検量線作成用クロロホルムは, あらかじめシリカゲルカラムを通し, ガスクロマトグラフ法でエチルアルコールの除去を確認したものを用いた。

また, クロロホルム溶液中に *n*-ヘキサンが混入する場合, 減圧蒸留法などで溶媒を除去するとサフロールの一部も留出し損失となるので, クロロホルム展開液をそのまま用いて定量する必要がある。混入量は 10 mg/ml 程度以上になることもあるが, カラムの充てん状態および展開速度などで混入量はさらに少なくなる場合もある。したがって, 簡便法として 1 成分系で定量も可能であるが, 著者らは *n*-ヘキサン混入量を考慮せずに定量できる方法として 2 成分系による方法を検討した。

すなわち, *n*-ヘキサンの key band として 1380 cm^{-1} 吸収帯を用い, サフロールと *n*-ヘキサンのクロロホルム溶液での 2 成分系の検量線から定量する方法を採用した。

この 2 成分系の検量線は Fig. 13 のとおりであり, 吸光度のバラツキも少なく, 直線性も良好であった。

以上述べた事項を考慮し, 定量方法を次の手順にした。

すなわち, 試料約 1 g (サフロールとして約 500 mg を含有するようにひょう取) を精ひょうし, 10 ml の *n*-ヘキサンに溶解し, 活性化したシリカゲルを充てんしたクロマト管に定量的に移し, *n*-ヘキサンで溶出速度 1.5 ml/min にして 150 ml 溶出後, クロロホルムで展開する。溶媒置換後約 50 ml 流出させるとクロロホルムが流

Fig. 13 サフロールおよび *n*-ヘキサンの検量線

a : サフロール b : *n*-ヘキサン, 1380 cm^{-1}
c : *n*-ヘキサン, 1040 cm^{-1}
d : サフロール, 1380 cm^{-1}

出しはじめる (カラム中での *n*-ヘキサンとクロロホルムの界面は両液の屈折率の違いから明りょうである) ので受器を 50 ml メスフラスコにかえ, 定容になるまで展開を続ける。

このようにして得たサフロール溶出液を液層約 0.2 mm の厚さの岩塩試料容器に充てんし, 通常法で 1380 cm^{-1} , 1040 cm^{-1} における透過率を測定し吸光度を求める。あらかじめ作成したサフロール, *n*-ヘキサン 2 成分系の検量線からサフロール量を求める。

なお, 定量の際の 100% 透過率曲線は脱エチルアルコールしたクロロホルムを両光束側に置いた場合とし, また, 0% 透過率曲線は試料光路側に厚さ約 1.0 mm のガラス板を置いた場合とする。

2.6 標準混合試料による定量

標準混合試料による本法の検定のためには, 標準サフロールにショウノウ, オイゲノール, α -テルピネオールなどの副成分のすべてを添加して試料油と類似組成のものを調製する必要があるが, ショウノウ赤油のような天然精油の場合には共存成分の種類も複雑で, またその組成も明らかでないので, このような方法で調製することは困難であった。

そこで, 2.3.1 と同じ方法で, 試料をシリカゲルクロマトグラフ法で分離する際の *n*-ヘキサン溶出分とメチルアルコール溶出分 (メチルアルコール溶出液に水を加え, *n*-ヘキサンで抽出したもの) とを合し, 減圧蒸留法

で溶媒を除去して得た脱サフロール油を用いる方法を採用した。この際、脱サフロール油中にサフロールが存在しないことは、1,3,5-トリニトロベンゼン付加物法による呈色などで確認した。

次に、標準サフロールに脱サフロール油を加え、調製した8個の標準混合試料について、実際の実験条件でサフロールを分離し、定量した結果は Table II に示す。

定量値の標準偏差は約 0.8% で、Youden 法による検定の結果も有意でなく、品質管理あるいは商品の鑑定分析などに十分応用可能であることが判明した。

なお、本法は広範囲なサフロール含量の試料に適用でき、また前処理に用いたシリカゲルクロマトグラフ法は、蒸留法などでは非常に困難であったサフロールの精製に、簡単で効果的に応用することができるなどの利点があり、従来法に比べ有用な方法と考える。

Table II 標準混合試料による定量結果

実験番号	混 合 値 (サフロール%)	定 量 値 (サフロール%)
1	26.7	26.9
2	29.9	30.6
3	41.4	41.9
4	47.5	47.6
5	51.4	50.6
6	60.0	59.5
7	71.1	72.3
8	87.1	86.1

Youden 法による回帰直線の検定結果

a (切片): 0.820	b (こ 配): 0.985
S (標準偏差): 0.76 (%)	S _a (a の標準偏差): 0.777
S _b (b の標準偏差)	t _a (a の t 検定値): 1.05
t _b (b の t 検定値)	ただし、t (自由度 6.5% 有意水準) = 2.45

3 結 論

シ ョ ウ ノ ウ 赤油中のサフロールの定量は、従来法または赤外吸収 スペクトル法のみでは非常に困難であったが、著者らは新たに前処理法を検討し、シリカゲルクロマトグラフ法で、展開溶媒の極性を順次変えることによってサフロールを単離し、赤外法で定量する新分析法を確立することができた。

本法の精度は標準偏差で 0.8% 程度であり、かたよりもなく満足できるものであった。

本研究に際し、標準試料を提供された高砂香料株式会

社にお礼を申しあげるとともに、終始ご懇篤なご指導を賜った東京大学工学部工業分析化学教室、鎌田 仁教授ならびに発表を許可された横浜税関鑑査部長、波来谷桂氏、分析官、蔵重昌輔氏に深謝いたします。

(昭和 39 年 10 月、本会第 13 年会において講演)

文 献

- 1) 池田鉄作, 竹田祥三郎: 日化, **57**, 565 (1936).
- 2) 藤田安二, 中原公男: 同上, **62**, 5 (1942).
- 3) 真弓莞爾: 第 3 回樟脳技術者協議会講演要旨 (1935).
- 4) J. G. Kirchner, J. M. Miller: *Ind. Eng. Chem.*, **44**, 318 (1952).
- 5) J. G. Kirchner, J. M. Miller, G. J. Kiler: *Anal. Chem.*, **23**, 420 (1951).
- 6) J. M. Miller, J. G. Kirchner: *ibid.*, **25**, 1107 (1953).
- 7) R. H. Reitsema: *ibid.*, **26**, 960 (1954).
- 8) 小野嘉七, 木村清三, 井本 稔: 日化, **57**, 119 (1936).
- 9) 小野嘉七, 井本 稔: 同上, **58**, 539 (1937).
- 10) 小野嘉七, 井本 稔: 同上, **58**, 537 (1937).
- 11) 野津竜三郎, 渡辺 照, 安積昭敬: 工化, **54**, 411 (1951).
- 12) 渡辺 照, 安積昭敬: 同上, **55**, 529 (1952).
- 13) J. J. Sudborough, S. H. Beard: *J. Chem. Soc.*, **99**, 214 (1879).

☆

Determination of safrole in red camphor oils by infrared spectra. Shigeyuki TANAKA* and Yukio ONO** (* Institute of Techno-analytical Chemistry, Faculty of Engineering, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo; ** Analytical Section of Yokohama Customs, Naka-ku, Yokohama)

The infrared spectrometric determination of safrole in red camphor oils was disturbed by the overlapping absorption bands of the coexisting components. This made the selection of the key band quite difficult and hinder the direct application of the I. R. spectrometry.

The pretreatments of the sample including thin layer chromatography and silica gel chromatography for removing interfering components was investigated, in which successive variation of developing solvents enabled the quantitative separation of safrole. Taking the absorption 1040 cm^{-1} of safrole and 1380 cm^{-1} of *n*-hexane usually remaining in the safrole fraction of the eluate as the key bands, the amount of safrole was determined accurately on the above two-component system.

(Received Mar. 29, 1965)