報 文

サンマ油中のエイコセン酸, ドコセン酸, オクタデカテトラエン酸, エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の単離とその構造

伊 東 祐 隆・福 住 一 雄

名古屋大学工学部応用化学教室 (名古屋市千種区不老町)

Isolation and Structure of the Eicosenoic, Docosenoic, Octadecatetraenoic, Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid in Skipper Oil

Suketaka ITÔ and Kazuo FUKUZUMI

Department of Applied Chemistry Faculty of Engineering, Nagoya University
(Furō-chō, Chikusa-ku, Nagoya, Japan)

Abstract

The methyl eicosenoate, docosenoate, octadecatetraenoate, eicosapentaenoate and docosahexaenoate were isolated from the fatty acid methyl ester of skipper oil by urea fractionation, followed by vacuum fractional distillation.

The process of the fractionations and the purity of each individual ester were checked by gas-liquid chromatography.

The structures of these acids were determined by oxidative ozonolysis with identification of the fragments (as benzyl and or methyl esters) by gas-liquid chromatographic analysis.

These five acids were identified as :

Δ^9 eicosenoic acid

Δ^{11} docosenoic acid

$\Delta^{6,9,12,15}$ octadecatetraenoic acid

$\Delta^{5,8,11,14,17}$ eicosapentaenoic acid

$\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ docosahexaenoic acid

The procedure, benzyl-esterification followed by gas-liquid chromatography, may be available for semi-quantitative analysis of low molecular monobasic acids in water, for its simple process and fairly high yield (80~90%).

1 緒 言

先に, ガスクロマトグラフィーにより, サンマ油脂脂肪酸エステルを分析し, 構成脂肪酸およびその組成を明らかにした¹⁾。

すなわち, サンマ油の構成脂肪酸は従来一般に考えられていたほど複雑でなく特に炭素数が20および22の脂肪酸に関しては, $C_{20}F_1$, $C_{20}F_5$, $C_{22}F_1$ および $C_{22}F_6$ が主成分であり, $C_{20}F_4$ および $C_{22}F_5$ が小量存在する程度で飽和酸およびそのほかの二重結合数の異なる不飽和酸は存在しないか, あるいは存在してもコン跡程度である。

魚油中の不飽和脂肪酸の構造に関する研究には, 比較的最近のものだけでも, E. Klenk ら^{2)~7)} および外山ら^{8)~11)}の研究をはじめ数多くの報告^{12)~16)}がある。

サンマ油中の不飽和脂肪酸については, $C_{18}F_2$, $C_{18}F_3$ および C_2F_6 はすでに検索されているが, そのほかの不

飽和脂肪酸については研究されておらず, サンマ油脂脂肪酸エステルのガスクロマトグラムの各ピークに対応する各成分の二重結合の位置を確定するため, 前記 $C_{20}F_1$, $C_{22}F_1$, $C_{18}F_4$, $C_{20}F_6$ および $C_{22}F_6$ の各成分を単離し, その構造について検討を行なった。

各成分の単離は, 脂肪酸メチルエステルの尿素分別と, 尿素分別区分の減圧精密分留とによって行なった。

また, 二重結合の位置の決定はオゾン分解法により, 分解生成物の同定は, 二塩基酸部はメチルエステルとして, 一塩基酸部はベンジルエステルとしてガスクロマトグラフィーによって行なった。

2 実験および結果

2.1 試料の性状

実験に用いた市販サンマ油の性状は, つぎのようである。

油 脂： $n_D^{20}=1.4786$, S.V.=185, I.V.=170 A.V.=
2.09, 不ケン化物：0.75%

脂肪酸： $n_D^{20}=1.4669$, N.V.=193, I.V.=175

同メチルエステル： $n_D^{20}=1.4619$, S.V.=184 I.V.=
166, 共役ジエン酸：1.5%

注) ヨウ素価はウィイス法による。以下同様。

また、ガスクロマトグラフィー法による脂肪酸メチル
エステルの組成は 表-1 のようである¹⁾。

表-1 サンマ油脂肪酸メチルエステルの組成

脂肪酸メチル	重量百分率	脂肪酸メチル	重量百分率
C ₁₄	6.9	C ₁₈ F ₄	5.9
C ₁₅	0.7	C ₂₀ F ₁	13.4
C ₁₆	13.4	C ₂₀ F ₄	0.9
C ₁₆ F ₁	5.1	C ₂₀ F ₅	8.4
C ₁₈	2.4	C ₂₂ F ₁	13.8
C ₁₈ F ₁	10.1	C ₂₂ F ₅	1.7
C ₁₈ F ₂	2.3	C ₂₂ F ₆	12.0
C ₁₈ F ₈	2.3	C ₂₄ F ₁	0.9

2.2 C₂₀F₁, C₂₂F₁, C₁₈F₄, C₂₀F₅ および C₂₂F₆ 酸メ チルの単離

減圧脱水した油脂 250 g に, 金属ナトリウム 0.75 g
を溶かしたメタノール 750 ml を加え, 湯浴上で 30 min
還流し, 冷却後, *n*-ヘキサンで抽出してメチルエステル
240 g (約 96%) を得た。

このエステル 200 g を尿素 150 g, メタノール 1.5 l
で尿素分別し, 尿素付加体をロ別後, 付加体を *n*-ヘキ
サンで洗浄し, 洗液からヘキサンを留去して, 残留部を
もとの母液に加えた。この母液に再び尿素 150 g を加
え, 同様に操作し, さらに尿素 150 g ずつで 2 回同じ処
理を行なった。各尿素付加体および第 4 回目の母液を温
希塩酸で処理し, 遊離したエステルを *n*-ヘキサンで抽
出した。

この結果を 表-2 に示し, 各区分のガスクロマトグラ
ムを 図-1 に示す。

表-2 尿素分別結果

区 分	収 量
原 エ ス テ ル	(200 g)
U ₁ (第 1 回付加部)	31
U ₂ (第 2 回付加部)	56
U ₃ (第 3 回付加部)	49
U ₄ (第 4 回付加部)	2
M ₄ (第 4 回非付加部)	53
損 失	9

2.2.1 C₂₀F₁ および C₂₂F₁ 酸メチルの単離

尿素分別区分 U₂ 48.0 g を内径 1.8 cm, 高さ 90 cm
の充テン塔 (太さ 0.2 mm のステンレススチール線 で
作った径 4 mm の環を充テンしたもの) を用いて減圧精
留し, 2.5 g ずつ 18 個の留分を得た (所要時間: 約 1 hr,

カ ラ ム: ジエチレングリコールコハク 酸 ポリエステル-セライ
ト 545 (60~80 mesh), 1/5 wt/wt, 6 mmφ×2.25 m,
225°C

キャリアーガス: He, 80 ml/min

図-1 サンマ油脂肪酸メチルエステル尿素分別
各区分のガスクロマトグラム

蒸留残サおよびホールドアップ: 3 g)。

分留留分 12~18 の組成をガスクロマトグラムのピー
ク面積比によって算出するとつぎのようである (表-3)。

このうち留分 13 (これを A とする) および留分 17

表-3 尿素分別 U₂ 区分の分留留分の組成

留 分	C ₁₈ +C ₁₈ F ₁ (%)	C ₂₀ F ₁ (%)	C ₂₂ F ₁ (%)
12	11.8	78.2	0
13	0	100	0
14	0	89.1	10.9
15	0	9.9	90.1
16	0	0.8	99.2
17	0	0	100
18	0	0	100

図-4 C (C₁₈F₄ 酸メチル) の赤外線吸収スペクトル 図-5 D (C₂₀F₆ 酸メチル) の赤外線吸収スペクトル 図-6 E (C₂₂F₈ 酸メチル) の赤外線吸収スペクトル
酸メチル)

区分A 200 mg を塩化メチレン中、 -15°C でオゾン化酸素 (約 5% オゾン) を 45 min 通じて (100 ml/min) オゾン化した後、これに 30% 過酸化水素 1.5 ml およびアセトン 20 ml を加え、2 hr 窒素ガスを通じてかくはんしながら水浴中で温度を徐々に 60°C まで上昇してオゾニドを分解した。

つぎにこの反応物をエーテル 200 ml に溶かし、無水硫酸ナトリウムで脱水乾燥後、エーテルを留去して残留物をメタノール-硫酸でエステル化し、メチルエステル

カラム：ジエチレングリコールコハク酸ポリエステル-セライト 545 (60~80 mesh), 1/5 wt/wt, 6 mmφ×2.25 m, 210°C
キャリアーガス：He, 80 ml/min (1) : A (2) : B—塩基酸部
のピークは省略

図-7 AおよびBのオゾン分解生成物メチルエステルのガスクロマトグラム (二塩基酸部)

測定温度 140°C , そのほかの条件は 図-7 と同じ

図-8 AおよびBのオゾン分解生成物メチルエステルのガスクロマトグラム (一塩基酸部)

179 mg を得た。これをガスクロマトグラフィーして主成分としてウンデカン酸メチルとアゼライン酸メチルを同定した (図-7, 図-8)。

また、区分 B 200 mg を同様に処理してオゾン分解生成物からメチルエステル 187 mg を得、主成分としてウンデカン酸メチルとウンデカンジオン酸メチルを同定した (図-7, 図-8)。

2.2.4 区分 C (C₁₈F₄ 酸メチル), D (C₂₀F₆ 酸メチル) および E (C₂₂F₈ 酸メチル)

区分C 200 mg を塩化メチレン 5 ml 中、 -15°C でオゾン化酸素 (約 5% オゾン) を 1.5 hr 通じて (100 ml/min) オゾン化した後、30% 過酸化水素 3 ml および 5% 水酸化カリウム水溶液 7.5 ml を加えて、2 hr 窒素ガス

を通じてかくはんしながら、温度を徐々に 80°C まで上昇してオゾニドを分解した。

つぎにこのアルカリ溶液を希硫酸で酸性とし、窒素ガスを通じて水蒸気蒸留を行ない、留出液をフェノールフタレインを指示薬として、 $N/10$ 水酸化カリウム水溶液で中和した後、水を蒸発除去し、残留した一塩基酸カリウム塩をエタノールで 20 ml の丸底フラスコに移し、エタノール溶液が 2~3 ml になるまで濃縮した。

ここへ、水酸化カリウム水溶液滴定数から逆算した当モルの臭化ベンジルを加えて 20 min 還流した後、エーテルで抽出しベンジルエステル 224 mg を得た。これをガスクロマトグラフィーして、ギ酸ベンジル、酢酸ベンジルおよびプロピオン酸ベンジルを同定した (図-9)。

つぎに同じく区分 C 200 mg から得たオゾニド (塩化メチレン 5 ml 中) を水 7 ml および 30% 過酸化水素 3 ml を加えて、温度 90°C まで上昇して分解した (窒素ガスを通じながら 2.5 hr)。

この分解処理物を少量のアセトンで別容器に移し、エーテル 300 ml を加え、無水硫酸ナトリウムで乾燥後エーテルを留去し、残留物をメタノール-硫酸でエステル化し、メチルエステル 89 mg を得た。これをガスクロマトグラフィーして主成分としてアジピン

カラム：ジエチレングリコールコハク酸
ポリエステル-セライト 545
(60~80mesh), 1/5 wt/wt, 6
mmφ×2.2 m, 160°C
キャリアーガス：He, 80 ml/min (1) : C
($C_{18}F_4$ 酸メチル), (2) : D (C_{20}
 F_5 酸メチル), (3) : E ($C_{22}F_6$
酸メチル)

図-9 C,D および E のオゾン分解生成物一塩基酸部ベンジルエステルのガスクロマトグラム

酸メチルを同定した (図-10)。

同様に区分 D 200 mg ずつからのオゾン分解生成物からベンジルエステル 294 mg およびメチルエステル 69 mg を得、主成分としてそれぞれギ酸ベンジル、酢酸ベンジル、プロピオン酸ベンジルおよびグルタル酸メチルを同定した (図-9, 図-10)。

また、区分 E 200 mg ずつからベンジルエステル 301 mg およびメチルエステル 55 mg を得、それぞれギ酸ベンジル、酢酸ベンジル、プロピオン酸ベンジルおよびコハク酸メチルを同定した (図-9, 図-10)。

測定条件は 図-9 と同じ

図-10 C,D および E のオゾン分解生成物二塩基酸部メチルエステルのガスクロマトグラム

3 考 察

3-1 高度不飽和脂肪酸エステルの単離

図-1 および 表-2 に示したように、ここで行なった尿素分別の条件では、テトラエン酸以上の不飽和酸エステルはほとんど尿素付加体を形成せず、飽和酸およびモノエン酸エステルはすべて尿素付加部として分離され、その上サンマ油中にはもともとジエン酸、トリエン酸が少量しか存在しないので、テトラエン酸以上の高度不飽和酸エステルの分別はきわめてクリティカルに行なわれ、理論値に近い収量で $C_{18}F_4$ 、 $C_{20}F_5$ および $C_{22}F_6$ 酸メチルの混合物 (少量の不純成分および酸化生成物などを含む) が得られた。

また 図-2 に示したように、尿素分別によって得られた高度不飽和酸エステル区分を充テン塔を用いて精密分留すると、高純度の $C_{18}F_4$ 酸メチル、 $C_{20}F_5$ 酸メチルおよび $C_{22}F_6$ 酸メチルを得ることができるが、これらにはそれぞれ微量ではあるが、もともと共存していた同一炭素数の二重結合の 1 個少ない成分が不純物として含まれ、そのためさらに純度を高めるには液体クロマトグラフィーなどの方法によって精製する必要がある。

なお、精留の際の充テン塔の温度は 200°C 前後の高温であるが、はじめに留出する $C_{18}F_4$ および $C_{20}F_5$ 酸エステルの留分は熱異性化による二重結合の共役化はほとんど起こらない。一方、おくれで留出する $C_{22}F_6$ 酸エステルの留分は、その留出順がおそいものほど共役化の程度が大きく、ガスクロマトグラムにおける $C_{22}F_6$ 酸メチルのピークに肩が現われ (図-2 (3) の矢印)、これが共役化の程度に比例して大となり、遂には別のピー

クを形成するようになる。したがって $C_{18}F_4$ 酸メチルや $C_{20}F_5$ 酸メチルの場合はともかく、 $C_{22}F_6$ 酸メチルを精密分留によって分離するには、充テン剤とか、塔長、減圧度などさらに検討する必要がある。

3.2 オゾン分解生成物のガスクロマトグラフィーによる同定

ガスクロマトグラフィーによるオゾン分解生成物の同定は、不飽和脂肪酸（およびそのエステル）の場合にはカルボキシル基側から生成する二塩基酸は、低級アルコールのエステルとして行なわれている¹⁵⁾が、炭素鎖の末端部からの生成物は一般に揮発性で、かつ水溶性であり、これは通常水溶液として得られるため、これをガスクロマトグラフィーによって分析することは困難である。そのためオゾニドを還元分解して、これをアルデヒドとして生成させ、2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンなどの誘導体に変えてペーパークロマトグラフィーなどの方法によって分析されている。

一方、脂肪酸の確認誘導試薬として、臭化-p-ニトロベンジルとか臭化-p-置換フェナシルなどのハロゲン化アリル型のハロゲン化物が用いられている¹⁸⁾が、この方法は脂肪酸のアルカリ塩をアルコール中で上記のハロゲン化物と反応させるため、低級脂肪酸の揮発性は問題とはならず、またその収率がよいのが特徴である。

そこで低級脂肪酸（特に水溶液中の）をガスクロマトグラフィーによって分析するためこの方法を利用し、ハロゲン化物として臭化ベンジルを用いて脂肪酸をベンジルエステルに誘導し、これをガスクロマトグラフィーした。このエステル化反応は非常に速く進み（還流開始後数分で臭化アルカリの沈殿が生成する）、収率もかなりよい（標準試料を用いて行なうと、脂肪酸の炭素数が1~9の範囲では80~90%の収率でエステルが得られた）。したがってこの方法は一般に、（水溶液中の）低級脂肪酸の準定量的方法として用いることができる。

なお脂肪酸の炭素数が小さい場合は、ベンジルエステルの沸点が低く、収率が比較的低いが、臭化ベンジルの代わりにこれより分子量の大きいハロゲン化物を用いれば、この点は改善する。

また、ここでは $C_{18}F_4$ 、 $C_{20}F_5$ および $C_{22}F_6$ 酸メチルのカルボキシル基側から生成する二塩基酸の確認は末端基とは別にオゾン化して行なったが、一塩基酸部の水蒸気蒸留の残さをアルカリで中和して水分を蒸発除去後、これをそのままアルコール-硫酸でエステル化しても二塩基酸エステルを得ることができる（二塩基酸の炭素数が小さい場合はその水に対する溶解度が大きいので、溶剤抽出-水洗処理はできない）。

3.3 オゾン分解による各不飽和脂肪酸の構造

図7~図10に示したように分解生成物は単一ではなく、多くの成分を含むが、これはオゾン化およびオゾニ

ドの分解が多くの副反応を伴うため¹⁹⁾であり、もとの試料に別の成分が含まれているためではない。

また図9に示したように、 $C_{18}F_4$ 、 $C_{20}F_5$ および $C_{22}F_6$ 酸メチルのオゾン分解によって多量のギ酸が生成しているが、これは他の2酸（酢酸およびプロピオン酸）との量的比率から考えて、主として上記の副反応によって生じたものである。なおプロピオン酸は末端基から、酢酸はジビニルメタン基からのマロンアルデヒドまたはマロン酸の熱分解によって生じたものであるがもしオゾン分解が副反応を伴わず定量的に進行するものであれば、両者の生成量の間に定量的関係が成り立つはずである。

しかしここで行なった実験条件では、そのような関係は見出せず、ただ $C_{18}F_4$ 、 $C_{20}F_5$ および $C_{22}F_6$ 酸メチルの間に、ジビニルメタン基の数の差による相対的な差違があるだけである。

以上2.4で同定された各分解生成物の主成分から、サンマ油中の $C_{20}F_1$ 、 $C_{22}F_1$ 、 $C_{18}F_4$ 、 $C_{20}F_5$ および $C_{22}F_6$ 酸はそれぞれ、 4^9 エイコセン酸、 4^{11} ドコセン酸、 $4^{6,9,12,15}$ オクタデカテトラエン酸、 $4^{5,8,11,14,17}$ エイコサペンタエン酸および $4^{4,7,10,13,16,19}$ ドコサヘキサエン酸である（図4、図5、図6の赤外線吸収スペクトルから、二重結合はすべてシス配置をとる）。

結局、これらの不飽和脂肪酸は、他種の魚油中^{20)~21)}に見出されているものとまったく同一の構造をとっていることになる。なお、 $C_{22}F_6$ 酸は既述のように、すでに検索されているので、その単離以後の部分は参考のために行なったものである。（昭和38年2月8日受理）

文 献

- 1) 伊東, 福住, 工化, **65**, 1963 (1962)
- 2) E. Klenk et al., *Z. Physiol. Chem.*, **292**, 51 (1953)
- 3) E. Klenk et al., *ibid.*, **307**, 42 (1957)
- 4) E. Klenk et al., *ibid.*, **307**, 272 (1957)
- 5) E. Klenk et al., *ibid.*, **310**, 153 (1958)
- 6) E. Klenk et al., *ibid.*, **316**, 31 (1959)
- 7) E. Klenk et al., *ibid.*, **317**, 243 (1959)
- 8) Y. Toyama et al., *Fette-Seifen Anstrichmittel*, **61**, 461 (1959)
- 9) Y. Toyama et al., *ibid.*, **61**, 47 (1959)
- 10) Y. Toyama et al., *ibid.*, **64**, 134 (1962)
- 11) Y. Toyama et al., *ibid.*, **64**, 137 (1962)
- 12) M.H. Silk et al., *Biochem. J.*, **57**, 582 (1954)
- 13) J.M. Whitcutt et al., *ibid.*, **63**, 469 (1956)
- 14) J.M. Whitcutt, *ibid.*, **67**, 60 (1957)
- 15) W. Stoffel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6604 (1958)
- 16) W. Stoffel et al., *J. Lipid Research*, **139** (1960)
- 17) E.G. Hammond et al., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **30**, 433 (1953)
- 18) 船久保, “有機化合物確認法” 中巻 p. 46~61 (1955) 養賢堂, 東京
- 19) たとえば, F.L. Benton et al., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **36**, 457 (1959)
- 20) たとえば, 外山, 土屋, 工化, **37**, 31 (1934)
- 21) たとえば, 外山, 同誌, **29**, 533 (1925)