報 文

海産甲殻類の肝油に関する研究 (第2報)

ズワイガニ, イバラガニおよびタラバガニ
肝油の脂肪酸組成および不ケン化物中の成分

河田和雄*・清野 肇*・渡辺昭一郎*・阿部芳郎**

*北里大学 衛生学部 (相模原市麻溝台1)

**慶応義塾大学工学部 (横浜市港北区日吉町 832)

Study on the Liver Oil of Marine Crustacea. II.

Fatty Acids and Unsaponifiable Matters in the Liver Oils of
Chionoecetes Opilio, *Lithodes Turrinus* and *Paralithodes Camtschatica*

Kazuo KAWADA*, Hajime SEINO*, Shōichirō WATANABE* and Yoshirō ABE**.

*Department of Chemistry, Faculty of Hygienic Sciences, Kitasato University
(1, Asamizodai, Sagami-hara-shi)**Faculty of Engineering, Keio University
(832, Hiyoshi-Machi, Kohoku-ku, Yokohama-shi)

Fatty acids and unsaponifiable matters from the liver oils of *Chionoecetes opilio*, *Lithodes turrinus* and *Paralithodes camtschatica* were examined. It was found that these liver oils were composed of $C_{12}\sim C_{24}$ fatty acids, in which major component was oleic acid, by GLC analysis.

Unsaponifiables were fractionated by low temperature fractional crystallization. The precipitate obtained from the unsaponifiables of *Paralithodes camtschatica* liver oil was further fractionated into two fractions. It was found that one of the fractions contained cholesterol and ergosterol and that the other consisted of $C_8\sim C_{19}$ α -alkyl glyceryl ethers by comparing their IR and NMR spectra with those of the authentic samples and by GLC analyses. From the mother liquors obtained from these liver oils, four fractions were obtained, respectively, by means of column chromatography and preparative TLC, and they were confirmed to be $C_{10}\sim C_{20}$ saturated hydrocarbons, $C_{11}\sim C_{18}$ aliphatic alcohols, higher aliphatic aldehydes and methyl ketones.

1 緒 言

著者ら¹⁾はさきにズワイガニおよびイバラガニ肝油不ケン化物中のステリンとグリセリルエーテルについて分析を行なった結果について報告した。ひきつづき、タラバガニ肝油不ケン化物中のステリンおよびグリセリルエーテルについて研究を行ない、さらにこれら3種の肝油の脂肪酸組成と不ケン化物のステリンとグリセリルエーテル以外の成分について分析を行なった。

カニ類の脂質に関しては、最近 Addison ら²⁾がズワイガニの筋肉組織の脂質と内臓油の脂肪酸組成について詳細に報告しており、また林ら³⁾、宮川ら⁴⁾がベニズワ

イガニ、ズワイガニの脂質についてそれぞれ報告している。著者らはズワイガニ、イバラガニおよびタラバガニ肝油の脂肪酸組成を GLC 分析して検討した結果、いずれもオレイン酸を主成分とする $C_{12}\sim C_{24}$ の脂肪酸の存在を認めた。また前報¹⁾と同様に、タラバガニ肝油不ケン化物中にコレステリンおよびエルゴステリンの存在、 α -オクタデシルグリセリルエーテルおよび α -ヘキサデシルグリセリルエーテルを主成分とする $C_8\sim C_{19}$ の α -アルキルグリセリルエーテルの存在を認めた。また、上記の3種の肝油不ケン化物中に、プリスタン⁵⁾を主成分とする $C_{10}\sim C_{20}$ の飽和炭化水素の存在、 $C_{11}\sim C_{18}$ の高級アルコールの存在、および高級アルデヒド、高級メチル

ケトンの存在を認めた。

2 実験および結果

2.1 不ケン化物の抽出

前報¹⁾と同様にして、自己消化法によって採取したズワイガニ、イバラガニおよびタラバガニ肝油から、常法によって不ケン化物を抽出した。すなわち、昭和 44 年～45 年にオホーツク海で捕獲されたカニの肝臓を 50～60°C に加温して、pH 6 (自己消化が遅い場合 pH 8～9) に保ちながら 3 hr かくはんして自己消化させ、浮上油を遠心分離して得、これをさらにエーテル抽出して分析用試料とした。肝油の性状は、A.V. 92.3, S.V. 195.7, I.V. 188.0, 不ケン化物含量 4.7% (以上タラバガニ肝油、そのほかの肝油の性状は既報¹⁾) であった。このようにして得た肝油に 1 N-エタノールカリを加え 2 hr 加熱還流してケン化後、不ケン化物をエーテル抽出した。このときのケン化溶液の一部は後の脂肪酸の調製に用いた。得られた不ケン化物を前報¹⁾と同じ条件で TLC 分析した結果を Fig.-1 に示す。

A: unsaponifiable matter of liver oil of *Chionoecetes opilio*
B: unsaponifiable matter of liver oil of *Lithodes turrinus*
C: unsaponifiable matter of liver oil of *Paralithodes camtschatica*

Adsorbent: Kieselgel G, 0.25 mm
Solvent: *n*-hexane-ethyl ether 30:70 (vol/vol)
Indicator: 30%-H₂SO₄

Fig.-1 TLC of the unsaponifiables from the liver oils of crabs.

2.2 脂肪酸の調製とメチルエステル化

2.1 で得た不ケン化物を除去したセッケン溶液 (肝油 5 g をケン化して得た溶液) を分液漏斗に移し、水 200 ml を加え、1 N-塩酸を溶液が酸性になるまで加えて振とうして脂肪酸を遊離させ、下層を除去後、100 ml のエーテルを加え、このエーテル溶液を溶液が中性になるまで水洗し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、エーテルを留去して脂肪酸を得た。この脂肪酸のメチルエステル化は次のような方法で行なった。すなわち、脂肪酸 200 mg

に 14% BF₃-メタノール試薬 3 ml を加え、5 min 水浴上で加熱還流させてメチルエステル化した。ついで反応液を分液漏斗に移し、水 200 ml を加えた後、石油エーテル (bp 38.0～60.0°C) 50 ml で脂肪酸メチルを抽出した。石油エーテル層を取り、不溶物を別後、溶媒を留去して脂肪酸メチルを得た。

2.3 ステリンとグリセリルエーテルの分離

前報¹⁾と同様にしてタラバガニ肝油不ケン化物を、メタノール、エチルエーテルを溶媒として用いて低温分別結晶を繰り返して行ない、mp 138.4～144.0°C の結晶、mp 64.0～65.3°C の結晶と母液とに分別した。これらの結晶を *n*-ヘキサン-エチルエーテル = 30:70 (vol/vol) の展開溶媒を用いて TLC を行なった結果、mp 138.4～144.0°C の結晶は標準コレステリンと、mp 64.0～65.3°C の結晶は標準 α -*n*-ヘキサデシルグリセリルエーテルとほぼ *R_f* 値が一致した。以後、これらをそれぞれステリン類とグリセリルエーテル類と称する。

2.4 Fr-1, Fr-2 および Fr-3 の分離

2.4.1 カラムクロマトグラフィー

ステリンとグリセリルエーテルをできるだけ除去した不ケン化物、すなわち 2.3 の母液から、Fig.-1 に示した不ケン化物の TLC における Fr-1, Fr-2 および Fr-3 を分離するためにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なった。すなわち、クロマト用シリカゲル (関東化学社製, 100 mesh 以上) 140 g を充てんしたカラム (内径 3 cm, 長さ 60 cm) に少量の *n*-ヘキサンに溶かした母液 5 g を *n*-ヘキサンで展開させた後、*n*-ヘキサン, 10% エチルエーテル-*n*-ヘキサン, 15% エチルエーテル-*n*-ヘキサン, 20% エチルエーテル-*n*-ヘキサンで徐々に溶出し、フラクションコレクターで分画した。各区分を TLC により調べ、同じ成分の区分を合わせた。炭化水素類と推定される Fr-1 はカラムクロマトグラフィーで分離されたが、Fr-2, Fr-3 は完全には分離されなかったため、Fr-2 と Fr-3 を含む区分について、さらに分取 TLC による分離を試みた。

2.4.2 分取 TLC

Fr-2 の分離が充分な TLC の条件を種々の溶媒系を用いて検討した結果、ベンゼン-クロロホルム 20:1.5 (vol/vol) の混合溶媒を用い、溶媒が 20 cm のプレートの上端までのぼった後、さらに 1 hr 展開を続けた場合に最もよい分離を示した。このような条件で分取 TLC を行ない、Fr-2 から Fr-2-1, Fr-2-2 を分離した。Fr-2-1 はシッフ試薬で陽性であることよりアルデヒド類、また Fr-2-2 はヨードホルム反応によりメチルケトン類と推定され、かつ *R_f* 値は *n*-カプリンアルデヒド、*n*-テトラデカノン-2 のそれとほぼ一致した。

同様に、Fr-3 の分離が充分な TLC の条件を検討した結果、ベンゼン-クロロホルム-アセトン = 80:10:10

(vol/vol) の混合溶媒を用いたときに最もよい分離を示したので、この展開溶媒を用いて Fr-3 を分取 TLC によって分離した。分取した Fr-3 の R_f 値はセタノールのそれとほぼ一致した。Fr-2-1, Fr-2-2 および Fr-3 は以上の結果より、それぞれアルデヒド類、メチルケトン類およびアルコール類と推定された。以下、これらをアルデヒド類、メチルケトン類およびアルコール類と称する。

2.5 分 析

分析機器は次の装置を用いた。

GLC 装置：日立 063-0050

IR 装置：日立 EPI-G 2 型 回折格子赤外分光光度計

NMR 装置：日電バリアン製 A 60 型

2.5.1 脂肪酸の分析

2.2 で調製したズワイガニ、イバラガニおよびタラバガニ肝油の脂肪酸メチルを GLC 分析した結果を Fig.-2 に示す。各ピークの同定は C_{16} ~ C_{22} の飽和および不飽和脂肪酸を標準試料として行ない、標準試料のないピークについては、保持時間の対数と炭素数とのグラフから推定した。また、Fig.-2 中の各成分の百分組成は各ピーク面積を半値幅法では正確な面積測定ができない微量

Fig.-2 GLC of the fatty acid methyl esters obtained from the liver oils of *Chionoecetes opilio* (top), *Lithodes turrinus* (middle) and *Paralithodes camtschatica* (bottom).

成分を無視して求めたものである。

2.5.2 ステリンの分析

2.3 で単離されたタラバガニ肝油ステリン類について IR スペクトルを測定し、標準コレステリンについての測定結果と比較したところほぼ一致した。この結果より、この成分がステリン類であることがほぼ認められるので、このステリン成分について GLC 分析を行なった結果、Fig.-3 に示したように二つのピークが認められた。また、これらをステリン類の標準品と同定した結果、それぞれコレステリンとエルゴステリンであると認められた。組成は各ピーク面積を半値幅法で測定して求めたものである。

Fig.-3 GLC of sterols obtained from the liver oil of *Paralithodes camtschatica*.

2.5.3 グリセリルエーテルの分析

タラバガニ肝油から得たグリセリルエーテル類について IR スペクトルを測定した。これによると、IR スペクトルで 3400 cm⁻¹ 付近に分岐した OH 伸縮振動の吸収、1120 cm⁻¹ にエーテル結合、1100 cm⁻¹ に第二アルコール、1040 cm⁻¹ に第一アルコールの吸収が認められる。この測定結果は、R. Wood ら^{5), 6)} および C.N. Joo ら⁶⁾ の合成 α -アルキルグリセリルエーテルならびに前報¹⁾ の分析結果とほぼ一致したので、この成分は α -グリセリルエーテル混合物であると認められる。

つぎに、このグリセリルエーテル成分を R. Wood ら⁸⁾ の方法に従ってトリフルオール酢酸エステルとし GLC 分析を行なった。この結果を Fig.-4 に示す。各ピークはそれぞれの標準グリセリルエーテルから得たトリフルオール酢酸エステルの GLC 分析の結果と比較して同定し、標準試料のないピークについては、保持時間の対数と炭素数とのグラフから推定した。また、各ピークの面積を半値幅法で測定し、各成分の百分組成を求めた。その結果は Fig.-4 中に示してある。さらに前報と同様に、 α -位に結合しているアルキル基の炭素鎖長をより詳細に調べるため、K.E. Guyer ら⁹⁾ に従ってエーテル結合をヨウ化水素酸で切断し、ヨウ化アルキル混合物とし、その GLC 分析を行なった。このヨウ化アルキル混合物の

GLC の結果を Fig.-5 に示す。この結果は、トリフルオル酢酸エステル GLC 分析の結果と厳密な一致は認められないが、主成分は一致した。なお GLC においては、 $C_8 \sim C_{18}$ の炭素数偶数個の直鎖飽和アルコールおよび C_{16} , C_{18} のモノ不飽和アルコールから同様にして得たヨウ化アルキルを標準試料として各ピークの同定を行なった。標準試料のないピークについては、保持時間の対数と炭素数とのグラフから推定した。

Column: 10%-SE30/Chromosorb W (80 mesh), 3mm×2m
Column temp.: 192°C
Carrier gas: N₂, 30 ml/min
Detector: FID
Attenuation: 128×10

Fig.-4 GLC of trifluoroacetates of α -alkyl glyceryl ethers obtained from the liver oil of *Paralithodes camtschatica*.

Column: 10%-SE30/Chromosorb W (80 mesh), 3mm×2m
Column temp.: 204°C
Carrier gas: N₂, 30 ml/min
Detector: FID
Attenuation: 512×10

Fig.-5 GLC of alkyl iodides obtained from the glyceryl ethers in the liver oil of *Paralithodes camtschatica*.

2.5.4 炭化水素類の分析

ズワイガニ、イバラガニおよびタラバガニ肝油から得た炭化水素類 (Fr-1) について IR および NMR スペクトルを測定し、標準 n -ヘキサデカンの測定結果と比較したところほぼ一致した。すなわち IR および NMR スペクトルはいずれも典型的な飽和炭化水素のスペクトルを示しているの、カラムクロマトグラフィーで一番最初に溶出してきた炭化水素区分中には、ほとんど不飽和炭化水素は含まれていないことを確認した。また、GLC 分析の結果を Fig.-6 に示す。標準プリスタン、 $C_{12} \sim C_{20}$ の飽和炭化水素を同様な条件で GLC を行なって各ピークの同定を行ない、標準試料のないピークについては、保持時間の対数と炭素数とのグラフから推定した。

Column: 10%-SE30/Chromosorb W (80 mesh), 3mm×1m
Column temp.: 162°C
Carrier gas: N₂, 30 ml/min
Detector: FID
Attenuation: 32×10

Fig.-6 GLC of hydrocarbons obtained from the liver oils of *Chionoecetes opilio* (top), *Lithodes turratus* (middle) and *Paralithodes camtschatica* (bottom).

2.5.5 アルデヒド類、ケトン類の分析

イバラガニおよびタラバガニ肝油から得たアルデヒド類 (Fr-2-1) について IR および NMR スペクトルを測定した結果をそれぞれ Fig.-7 および Fig.-8 に示す。IR スペクトルでは、 2720 cm^{-1} 付近にアルデヒド基の C-H 伸縮振動の吸収が認められ、また NMR スペクトルでは、 τ 値 0.2 ppm にアルデヒド基のプロトンに帰属するシグナルが認められ、それぞれ標準 n -カプリンアルデヒドの IR および NMR スペクトルとほぼ一致することから、このものは脂肪族高級アルデヒド類であると認められた。

同様に、イバラガニおよびタラバガニ肝油から得たメチルケトン類 (Fr-2-2) について IR および NMR スペクトルを測定した結果、それぞれ標準 2-オクタノンのスペクトルとほぼ一致したので、このものは脂肪族高級メチルケトン類であると認められた。次に、これらアルデヒド類およびメチルケトン類の GLC 分析を行なっ

たが、GLC 分析では同定できない多数のピークが見られた。しかし、これらは肝油中に本来存在していたものではなく、成分脂肪酸類、炭化水素類あるいはアルコール類から生じたものも含まれていると考えられる。

Fig.-7 IR spectra of aldehydes obtained from the liver oils of *Lithodes turrinus* (top) and *Paralithodes camtschatica* (bottom).

Fig.-8 NMR spectra of aldehydes obtained from the liver oils of *Lithodes turrinus* (top) and *Paralithodes camtschatica* (bottom).

2.5.6 アルコール類の分析

イバラガニおよびタラバガニ肝油から得たアルコール類 (Fr-3) について IR スペクトルを測定した結果を Fig.-9 に示す。これによると、 3420 cm^{-1} 付近に OH 伸縮振動の吸収が認められ、標準セタノールの IR スペクトルとほぼ一致することから、このものは脂肪族高級アルコール類であると認められた。つぎにアルコール類の GLC 分析を行なった結果を Fig.-10 に示す。 C_{10} ~ C_{18} の直鎖飽和アルコールおよび C_{16} , C_{18} のモノ不飽和アルコールを標準試料として各ピークの同定を行なった。標準試料のないピークについては、保持時間の対数と炭素数とのグラフから推定した。

Fig.-9 IR spectra of alcohols obtained from the liver oils of *Lithodes turrinus* (top) and *Paralithodes camtschatica* (bottom).

Fig.-10 GLC of alcohols obtained from the liver oils of *Lithodes turrinus* (top) and *Paralithodes camtschatica* (bottom).

3 検 討

ズワイガニ、イバラガニおよびタラバガニ肝油の脂肪酸組成をメチルエステルの GLC 分析で検討した結果、いずれもオレイン酸を主成分として C_{12} ~ C_{24} の飽和および不飽和脂肪酸が存在していることを確認した。また、3種の肝油ともモノエン酸の含有量が50%以上であり、Addison ら²⁾、林ら³⁾、宮川ら⁴⁾が分析した結果とほぼ一致している。なお、 C_{20} 以上の高度不飽和酸の存在も考えられるが、GLCのみで完全に同定するのは困難であるから、今回はこれ以上の検討は行なわなかった。

つぎに、前報¹⁾と同様にタラバガニ肝油不ケン化物の低温分別結晶より得た2種類の結晶はステリンと α -アルキルグリセリルエーテルであることを確認した。この

ステリンを 2%-OV 17 を固定相として標準ステリンと対比しながら GLC 分析を行なった結果、タラバガニ肝油不ケン化物中にはコレステリン 72.5% およびエルゴステリン 27.5% が含まれていることを確認した。また、 α -アルキルグリセリルエーテルをトリフルオール酢酸エステルとして GLC 分析を行なった結果、 α -*n*-ヘキサデシルグリセリルエーテル (41.0%) および α -*n*-オクタデシルグリセリルエーテル (38.5%) を主成分としており、さらに α -アルキルグリセリルエーテルをヨウ化アルキル混合物として GLC 分析を行なった結果、 $C_8 \sim C_{19}$ の α -アルキルグリセリルエーテルの存在が見いだされた。この結果は前報¹⁾ のズワイガニおよびイバラガニ肝油における結果とほぼ同様であった。

さらに、これらの肝油不ケン化物中のステリンとグリセリルエーテル以外の成分について検討するために、それらを除いた不ケン化物をカラムクロマトグラフィー、分取 TLC で極性の弱い順から分離し、それぞれ IR 分析、NMR 分析、GLC 分析を行なった結果、プリスタン²⁾を主成分とする $C_{10} \sim C_{20}$ の飽和炭化水素の存在、高級アルデヒド、高級メチルケトン³⁾の存在、および $C_{11} \sim$

C_{18} の高級アルコールの存在を確認した。このアルコール鎖長の分布は、 α -アルキルグリセリルエーテルのアルキル鎖長のそれとほぼ一致している。なお、アルキル鎖長の短いグリセリルエーテルの一部は完全に結晶として得られず、母液のほうに残存しているとも予想されるが、それらについてはさらに検討を行なわねばならない。

終わりに、試料の入手にご配慮いただいた北海道大学水産学部座間宏一助教授に深謝の意を表する。

(昭和 48 年 7 月 16 日受理)

文 献

- 1) 清野ら, 油化学, **20**, 802 (1971)
- 2) R.F. Addison *et al.*, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **29**, 407 (1972)
- 3) 林ら, 第 11 回油化学討論会講演予稿集, p. 79 (1972)
- 4) 宮川ら, 油化学, **22**, 275 (1973)
- 5) R. Wood *et al.*, *J. Lipid Res.*, **10**, 370 (1969)
- 6) R. Wood, F. Snyder, *Lipids*, **2**, 161 (1967)
- 7) C.N. Joo *et al.*, *J. Lipid Res.*, **9**, 782 (1968)
- 8) R. Wood, F. Snyder, *Lipids*, **1**, 62 (1966)
- 9) K.E. Guyer *et al.*, *J. Lipid Res.*, **4**, 385 (1963)