2. 醋酸エチル : 醋酸 水 (50 : 2 : 50 vol%) を展開溶媒とする事により flavone 類を糖の種類によつて分け之を更に *n*-ブタノール : 醋酸 : 水 (4 : 1 : 5 vol %) を用いて展開して OH 基の数によつて分ける二次元展開を行い, flavone 類の系統的分離を行つた。

尙本研究に使用した費用の一部は文部省科学研究費によつた。附記して謝意を表する。

Fig. 1. Two Dimensional Chromatogram of Flavones.

(1) 昭和 26 年 5 月日本農芸化学会総会 (京都) に於て発表.	(10) 近藤平三郎, 岩本薫, 丹羽与三郎: 薬学雑誌, 47, 232 (1929).
(2) 大島康義, 中林敏郎: 農化, 25, 21(1951).	(11) A. G. PERKIN & J. J. HUMMEL: <i>J. Chem. Soc. London</i> , 69, 1287 (1896); 99, 1721 (1911).
(3) R. WILLSTATTER u. E. H. ZOLLINGER: <i>Liebigs Ann.</i> , 412, 208 (1916).	(12) 柴田桂太, 服部静夫: <i>Acta Phytochim.</i> , 5, 117 (1930).
(4) R. RIBINSON: <i>J. Chem. Soc. London</i> 1932, 2296.	(13) W. H. LONGENEKER <i>Anal. Chem.</i> , 21, 1402 (1949).
(5) E. C. BATE-SMITH <i>Nature</i> , 161, 835 (1948).	(14) 佐竹一夫 化学の領域, 3, 263 (1949).
(6) S. H. WENDER & T. S. GAGE: <i>Science</i> , 109, 287 (1949).	(15) 桑田智, 水野公明, 那波速男: ビタミン, 3, 230 (1950).
(7) 刈米達夫, 橋本康平: 薬学研究, 22, 467 (1950).	(16) A. ENGLAND, JR. & E. J. COHN: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 57, 634 (1935).
(8) 谷久也: 有機化学の進歩, 8, 72.	
(9) A. E. BRADFIELD & E. C. BATE-SMITH: <i>Biochem. et Biophys. Acta</i> , 4, 441~444 (1950).	

Summary

When flavones are chromatographed on paper, *R_f* values are affected not only by the distribution coefficient but also by the adsorption based on the filter paper (Table 3.). When the ethyl acetate-acetic acid-water system (50 : 2 : 50) is used as the developing solvent, the *R_f* values of spots of flavones are controlled by those sugars, and when the *n*-butanol acetic acid-water system (4 : 1 : 5) is used, the *R_f* values of spots of flavones containing the same sugar are controlled by those -OH and -CH₃ radicals. (Table 4.) (*This journal*, 24, 50 (1950)). So by these methods, the two dimensional paper chromatogram of flavones is obtained (Figure 1.).

脂 肪 酸 の 分 離 と 決 定 (第 13 報)

ペーパー クロマトグラフィーによる不飽和脂肪酸の構造研究 (其の 1)

井 上 吉 之, 野田万次郎, 羽 室 康 正 (京都大学農学部生物化学研究室)

昭和 26 年 6 月 19 日 受 理

Separation and Identification of Fatty Acids. Part 13. Investigation of the Constitution of Unsaturated Fatty Acids by Paper Chromatography. I

By Yoshiyuki INOUE, Manjiro NODA and Yasumasa HAMURO
(Biochem. Laboratory, College of Agriculture, Kyoto University).

不飽和脂肪酸の構造研究, 特にその不飽和結合の位置決定法として従来行われている方法は試料不飽和脂肪酸

であつて、それぞれ次の如き方法でその純粋物を得た。

a. オレイン酸 主として LAPWORTH 等の方法⁽³⁾に準じて製取した。即ちオリーブ油の鹼化で得た脂肪酸を鉛塩とし、トルオール可溶の鉛塩の部分より粗オレイン酸を分離する。次にこの粗オレイン酸をバリウム塩とし、トルオール-アミールコール混合物で反覆処理してオレイン酸バリウムを精製し、次で塩酸で分解して遊離オレイン酸を得、之を繰返し減圧蒸溜して純オレイン酸を得た。

b. エルカ酸 木村法⁽⁴⁾に類似の方法で製取した。即ち菜種油を鹼化して得られる脂肪酸から固体飽和酸をアルコール不溶性鉛塩として除去した後、濾液のアルコール溶液に苛性カリを加えてエルカ酸の酸性カリ塩を析出せしめる。この塩を集めて酸で分解すると粗エルカ酸がえられるから、之をアルコールより反覆再結して純品を得た。

c. リノール酸 大豆油混合脂肪酸を石油エーテル溶媒中で臭素化し、石油エーテル不溶性の四臭化ステアリン酸を得、之を石油エーテルで再結精製した後常法によつて脱臭素及びメチルエステル化する。このメチルエステルを精溜精製後鹼化して試料リノール酸を得た。

d. リノレン酸 亜麻仁油混合脂肪酸を氷醋酸溶媒中で臭素化し、氷醋酸不溶性の六臭化ステアリン酸を得、之をベンゾールで再結精製した後、常法によつて脱臭素及びメチルエステル化する。このメチルエステルを精溜精製後鹼化して試料リノレン酸を得た。

以上4種の試料不飽和酸及びその臭化物の性状は Table 1 の如くである。

Table 1. Properties of Original Unsaturated Fatty Acids.

Acid	Mp., °C.	Bp.,		n_D^{20}	N.V.	I.V.	Bromide, mp., °C.
		°C.	mm.				
Oleic	13	231~233	15	1.4588 ²⁰	199.5	89.0	—
Erucic	34	—	—	1.4531 ²⁰	165.1	74.4	—
Linoleic	—	229~231	15	1.4692 ²⁰	200.8	180.7	114
Linolenic	—	229~231	15	1.4796 ²⁰	202.1	272.6	180

2. オゾン酸化とオゾニドの分解 試料不飽和脂肪酸約 1.5 g を約 15 cc の乾燥クロロフォルムに溶解し、溶液を氷と食塩とで冷却しつつ 1.5~2 時間オゾン化酸素を通じて飽和せしめた後、低温 (20° 以下) 減圧下でクロロフォルムを溜去すれば無色粘潤なオゾニドが得られる。

次にこのオゾニドに 7~10 倍量の水を加え、逆流冷却器をつけ湯浴上に約 30 分間加熱してオゾニドを完全に分解する。

3. 酸化銀による酸化 苛性ソーダ 2 g を 100 cc の水に溶解した液に酸化銀 2.5~6 g (原不飽和酸の不飽和度の大小に応じて増減する) を加えて懸濁せしめ、湯浴上で逆流冷却器をつけて 50~60° に加熱攪拌しつつ上記オゾニドの分解液を約 1 時間に亘つて徐々に滴下する。滴下終了後も溶液がアルデヒドの反応を示さなくなる迄猶数時間同温度に加熱攪拌を続け、アルデヒド類を完全にカルボン酸に酸化せしめる。反応液は濾過し、濾液を成るべく低温で蒸発乾固せしめると、生成カルボン酸のナトリウム塩混合物が得られる。

4. ヒドロオキシザム酸液の調製 上記の粗ナトリウム塩 0.2 g をとり、無水エタノール 5 cc 及び濃硫酸数滴を加えてコンゴレッド紙に対し強酸性とし、90° に約 3 時間逆流冷却器下に加熱してエステル化する。反応液は冷却後苛性カリのエタノール溶液で中和し、濾過する。

一方 0.15 g の塩酸ヒドロオキシルアミンを含む無水メタノール溶液 4 cc に、0.1 g の金属ナトリウムを無水エタノール 4 cc に溶解したナトリウムエチラート液を加え、生じた沈澱を濾別して透明なヒドロオキシルアミン液を予め調製し置き、この液を直ちに前記エステルを含む濾液に添加し 1 昼夜放置する。反応液は低温で溶媒を蒸発し、殆ど乾固せしめた後、エタノール-塩酸 (2:1) でコンゴレッド紙に対し微酸性とし、濾過する。濾液をベーパー クロマトグラフ分析の供試液とする。

上法は先に報告したヒドロオキシザム酸液調製法⁽²⁾の A 法に準ずるものであるが、B 法の如く含水アルコールを使用する簡易法でもクロマトグラフ分析が可能である。但し精密な結果を得る為には A 法に準じた方法の方が成績がよい。

5. 一次元ベーパー クロマトグラフィー 一次元ベーパー クロマトグラフィーの装置及び操作は従来著

者等が行つてきた方法⁽¹⁾と同一である。即ち濾紙として東洋濾紙 No. 2 の「機械漉」のものを 2.5 cm × 60 cm

Table 2. Analysis of Hydroxamic Acid Derivatives of Oxidation Products by One-dimensional Paper Chromatography.

Original acid	<i>n</i> -Butanol			Ethyl acetate			Acids identified
	R _f	Color	Intensity of color	R _f	Color	Intensity of color	
Oleic	0.72	P	++	0.12	P	++	Azelaic Pelargonic
	0.80	P	+	0.71	P	+	
	0.91	RP	++	0.92	RP	++	
Erucic	0.85	RP	+	0.04	RP	+	Brassylic Pelargonic
	0.85	RP	+	0.50	RP	±	
	0.92	RP	++	0.91	RP	++	
Linoleic	0.21	BP	++	0.05	BP	++	Malonic
	0.49	P	±	0.12~0.18	P	±	Acetic
	0.72	P	++	0.12~0.18	P	++	Azelaic
	0.82	P	+	0.70	P	+	
	0.89	P	++	0.88	P	++	Caproic
Linolenic	0.20	BP	++	0.04	BP	++	Malonic
	0.50	P	±	0.12~0.18	P	±	Acetic
	0.66	P	++	0.36	P	++	Propionic
	0.73	P	++	0.12~0.18	P	++	Azelaic
	0.81	P	+	0.71	P	+	

P, purple ; R, red ; B, brown.

に切つて使用し、温度 30° に於ける下降法を採用した。発色は 10% 塩化第二鉄のエタノール溶液の噴霧によつ

Fig. 1. Two-dimensional paper chromatograms of hydroxamic acid derivatives of the products obtained by ozonolysis of unsaturated fatty acids. (Ascending method ; temperature, 0°C.) Solvent system : *n*-butanol-water as the first solvent and ethyl acetate-water as the second solvent. The parenthesized letters stand for the colors of spots except purple : R, red ; P, purple ; B, brown.

ている。

Table 2. は上記のように調製した各不飽和脂肪酸のオゾン分解生成物のヒドロキザム酸誘導体を一次元ペーパークロマトグラフ法で分離した結果である。

表の様に各不飽和脂肪酸のオゾン分解によつてえられるカルボン酸はそれぞれ特有の色斑を示して一次元クロマトグラム上に分離された。尚リノール酸及びリノレン酸の分解物中にみられる少量の醋酸は、マロン酸乃至はマロンアルデヒド類の二次的分解に原因するものである。

6. 二次元ペーパークロマトグラフィー 上記のように一次元ペーパークロマトグラフィーによつても分解生成物は充分分離確認出来るのであるが、二次元ペーパークロマトグラフィーを適用すると更に

明確な分析結果を与える。

二次元法には従来の一次元法に用いた硝子円筒 (内径 16 cm, 高さ 60 cm) を用い, 円筒の底に結晶皿 (径 12 cm) を置いて溶媒槽とした。濾紙支持柱としては MA 及び FONTAINE の装置⁽⁵⁾に類似の硝子管製渦巻型支柱を用い, 上昇法によつて溶媒を展開せしめた。濾紙は東洋濾紙 No. 2 の「機械濾」を 50 cm×50 cm に切つて使用し, 溶媒展開距離は原点上約 35 cm とした。溶媒は第一次展開溶媒として水飽和 *n*-ブタノールを, 第二次展開溶媒として水飽和醋酸エチルを使用した。尚展開温度は 30°, 発色は塩化第二鉄によつてゐる。

Fig. 1. は各不飽和脂肪酸のオゾン分解物から前記の方法で調製したヒドロキザム酸誘導体の二次元ペーパークロマトグラムであつて, それぞれの不飽和酸のオゾン分解生成カルボン酸は余すところなく分離確認する事が出来た。マロン酸及びマロンアルデヒド類の二次的分解に基く醋酸の色斑も一次元法より更に鋭敏に検出されている。

以上のペーパークロマトグラフィーによる分析結果によつて, 試料不飽和酸の構造は夫々従来一般に認められている構造, 即ちオレイン酸は Δ^9 -オクテン酸, エルカ酸は Δ^{13} -ドコセン酸, リノール酸は $\Delta^{9,12}$ -オクタデカジエン酸, リノレン酸は $\Delta^{9,12,15}$ -オクタデカトリエン酸である事が容易に推定される。要するに斯様な二次元法は, その酸化分解によつて多種類の低級カルボン酸を生成する魚油高度不飽和脂肪酸の構造決定に不可欠な方法で, 本法が構造未知の高度不飽和酸の構造研究に多大の効果を發揮していることを附記しておく。

尙供試不飽和脂肪酸の採取量は 200 mg 程度でもなお充分分析可能で, 少量試料の構造研究が可能な点に於ても本法は有効な方法であると云うことが出来る。

要 約

1. ヒドロキザム酸法によるカルボン酸のペーパークロマトグラフィーを不飽和脂肪酸のオゾン酸化分解生成酸の分離確認に応用し, 不飽和脂肪酸の構造研究を簡易且つ精密化せんと企図した。
2. オレイン酸, エルカ酸, リノール酸, 及びリノレン酸の 4 種の不飽和脂肪酸のオゾン酸化分解物に就て本法を適用し, 一次元及び二次元ペーパークロマトグラフィーで全生成カルボン酸を分離確認する事に成功し, 同法が不飽和脂肪酸の構造決定に有力な方法であることを知つた。

- (1) 井上, 野田 : 農化, 23, 294, 368 (昭 25); 24, 295 (昭 26).
- (2) 井上, 野田 : 農化, 24, 291 (昭 26).
- (3) A. LAPWORTH, L. K. PEARSON and E. N. MOTTRAM : *Biochem. J.*, 19, 7 (1925).
- (4) 木村 工化, 32, 895 (昭 4).
- (5) R. M. MA and T. D. FONTAINE : *Science*, 110, 232 (1949).

Summary

Paper chromatography of carboxylic acids by means of the hydroxamic acid method has been applied to determine the constitution of unsaturated fatty acids. Each of pure oleic, erucic, linoleic, and linolenic acids was subjected to ozonolysis, and the products of ozonolysis were treated with alkaline silver oxide suspension, in order to oxidize thoroughly the carbonyl group of aldehydes and semialdehydes in the decomposition products to the carboxyl group. Thus obtained salts of mono- and dicarboxylic acids were esterified and then converted into their hydroxamic acid derivatives in the usual manner. [Cf. INOUE and NODA : *This Journal*, 23, 368 (1950); 24, 291 (1951).] These hydroxamic acids could be easily separated and identified on the one- and two-dimensional paper chromatograms.

Therefore, by using this paper chromatographic technique, the analysis of the ozonolysis products of unsaturated fatty acids, namely the determination of the constitution of these acids, can be carried out simply and minutely even from very small quantities of the original acids.