木酢液中フェノール成分のガスクロマトグラフィー

(昭和 41 年 5 月 31 日 受理)

藤 井 清 次^{*1} 加 藤 三 郎^{*2}

Analysis of Phenolic Components in Wood-Pyroligneous Liquid by Gas Chromatography

Seiji FUJII^{*1} and Saburo KATO^{*2}(*¹Tokyo College of Pharmacy: 4-600, Kashiwagi Shinjuku-ku, Tokyo; *²National Institute of Hygienic Sciences: Tamagawayoga-machi, Setagaya-ku, Tokyo)

Constituents in phenol fractions extracted from wood-pyroligneous liquids and its distillates (smoked flavor) were made clear by gas chromatography. Thirteen components were identified by the comparison of retention data with those of known phenols, using various polar columns packed with DC 550, DOS, TCP or DEGS+H₃PO₄ as the stationary phases. Phenol, guaiacol, *m*-cresol and 2,6-dimethoxyphenol were found as major components, and as minor components, *o*-cresol, *p*-cresol, creosol and xylenols were identified.

(Received May 31, 1966)

緒 言

木酢液およびその精製物である木酢くん液については、近年食品加工用として着目される傾向にあるが、その成分は複雑であって¹⁾²⁾、いまだ十分には解明されておらず、その成分規格および試験法のための基礎的研究が急がれている。著者らもその研究の一環として有効および有害性成分の追究を行なっているが、その主要成分の一つであるフェノール成分を、溶剤抽出によって分画したのち、ガスクロマトグラフィーによって分析したので報告する。

フェノール類のガスクロマトグラフィーについては多くの報告がみられる³⁾。また V. J. Jahnsen⁴⁾ は hard-wood smoke の揮発性成分および残留分について、とくに分画することなく diethylene glycol succinate (DEGS) のカラムによって組成の分析を試みている。

われわれもまず DEGS のカラムを使用してみたが、さらにリン酸を添加した DEGS+H₃PO₄ (5%+1%) のガラス管カラムを用いることにより、テーリングのない良好なクロマトグラムを得ることができた。

しかし、木酢液中のフェノール類は多種広範にわたるので、このような種類の分離カラムによるのみでは、

数種のフェノールの保持時間 (RT) が一致あるいは近接して単一ピークとして現われる場合が多く、完全な同定はできない。その場合、極性の異なる数種の分離カラムを用いれば、おのおのの相対保持時間 (RRT) がかわり、あらたに分離ピークが得られることがあり、またそれぞれ独特の分離状態を示す。

われわれも、種々の分離カラムを使用して得られるクロマトグラムを、試料 (木酢液からのフェノール分画) と、既知フェノール類 (標準試料) とについて比較して、14種のフェノール成分を同定した。

試料、装置および試薬

試料

実験に供した木酢液は、愛媛県喜多郡内子町産、黒炭がまによる クヌギ木酢原液 (I) およびその蒸留液 (II) である。

装置および試薬

ガスクロマトグラフ: 島津 GC-1C 形および付属水素炎イオン化検出器 FID-1B 形

分離カラム: 主としてつぎのカラムを使用した。

(1) DC 550 (10%): Silicon oil DC 550 を Gas-Chrom P (acid washed, 60~80 mesh) にコーティングしたものを、内径 3 mm×150 cm のステンレス U 字管に充填した。

(2) DOS (5%): dioctyle sebacate を Diasolid L

*¹ 東京薬科大学: 東京都新宿区柏木4-600

*² 国立衛生試験所食品添加物部: 東京都世田谷区玉川用賀町2-203

Fig. 1. Scheme of fractionation of Wood-pyrolygneous liquid

(80~100 mesh) にコーティングしたものを、内径 3 mm×75 cm のステンレスU字管に充填した。

(3) TCP (5 %): tricresyle phosphate を Diasolid L (80~100 mesh) にコーティングしたものを、内径 3 mm×75 cm のステンレスU字管に充填した。

(4) DEGS+H₃PO₄ (5 % + 1 %): diethylene glycol succinate および リン酸を Chromosorb W (60~80 mesh) にコーティングしたものを、内径 4 mm×225 cm のガラス管に充填した。

標準試料: phenol, guaiacol および cresol 類は市販特級試薬を蒸留精製し、他は市販品(特級または一級品, 東京化成 K.K.)をそのまま、融点測定その他により確認し用いた。

抽出用エーテルその他の試薬は市販特級試薬を使用した。

実験方法および結果

I. 抽出分画

溶剤抽出による分画は、百瀬⁵⁾の有機混合物分離法および伊沢ら⁶⁾がたばこ煙の組成分析に用いた抽出精製法を参考として、つぎのように行なった。その概要を Fig. 1 に示した。

(1) 試料(木酢原液あるいは蒸留液, それぞれ 200 ml)を分液漏斗にとり、食塩(約 30 g)を加えてから、エーテル(50 ml, 30 ml, ついで 20 ml ずつ5回)を加えよく振りまぜ分液して得た各エーテル層を合して(全容 200 ml)全抽出液(total extract)とした。

なお、このエーテル全抽出液を自然蒸発させて得た残留物は、その一部を24時間室内放置しさらに硫酸デングター内に12時間置いてからひょう量した結果では、試料I(木酢原液)では 2.91 mg/ml, 試料II(蒸留液)については 1.21 mg/ml であった。試料保存中および抽出操作中、重合析出、あるいは操作中の揮散による損失が考えられるが、これらの定量的検討は今回行なわなかった。

(2) このエーテル抽出液(100 ml)を 5 % 炭酸水素ナ

トリウム溶液(50 ml, 30 ml, ついで 20 ml ずつ5回)により抽出し(全容 200 ml とする)、これに30%硫酸を加えて酸性としたのちエーテル(30 ml, ついで 20 ml ずつ5回)により再抽出し(全容量 100 ml), これをカルボン酸分画(acid fraction)とした。

(3) このようにしてカルボン酸類を抽出除去したエーテル抽出液を、2N 水酸化ナトリウム溶液により、同様に、抽出したのち酸性としてエーテルで再抽出したエーテル層(全容 100 ml)をフェノール分画(phenol fraction)とした。

いずれも原試料と等容としたが、本実験における機器の感度ではやや希薄すぎたので、一部をロータリーエバポレーターにより軽い減圧で約 40° において濃縮して容とし、5倍濃度の検液としてガスクロマトグラフィー1/5を行なった。

なお、これらの分画にはカルボニル類も移行してくるが、予試験的に40%酸性亜硫酸水溶液で処理してガスクロマトグラムを比較したところ、フェノール類の領域には影響がみられなかったため、以後これを省略した。

II. ガスクロマトグラフィー

抽出分画したエーテル溶液を検液とし、ハミルトンマイトロシリンジ(10 μl)により注入した。注入は一般にカラム温度よりやや高温に保った機器の注入部(injection port)によったが、ガラスカラムにおいてはそのカラム口に注入して好結果を得た。注入口はときどき溶剤により洗浄し、カラム口の石英綿(silica wool)も汚染を認めた場合には取替えた。

分離カラムは、DC 550 はすでに種々の分析に使用してきた既存のものであり、DEGS+H₃PO₄ は本実験のためにガラスカラム(225 cm)とし 230° で約24時間窒素を流してエージングしたものであるが、遊離脂肪酸類の分析にも良好な結果を得ている。DOS および TCP はフェノールの分析に適するとされており⁴⁾、150° で24時間エージングしたのち使用したが、130° 以上ではノイズが大きくて良好なクロマトグラムは得られなかった。

キャリアーガスはすべて窒素を用いた。検出器用の水素は窒素流量の 1/2~1/3 程度に適宜に設定し、空気はすべて 0.35 kg/cm² によって流した。

標準試料は 1.0% エーテル溶液を調製しこれをさらに適宜薄めて用いたが、多くの場合、各 0.1% 溶液 1 μ l を注入し、機器の感度 Sensitivity 10³, Range (V) 3.2 においてチャート全幅の 30~70% の高さのピークを得た。なお、本実験の範囲では DC 550, DEGS などのカラムは Range (V) 0.8 まで十分安定したクロマトグラムが得られ、およそ 0.01 μ g まで検出しうる。

つぎに各種の分離カラムによる試料からのフェノール

分画のクロマトグラムを示した (Fig. 2)。これらはすべてチャート速度 1 cm/min で行ない、試料注入量は、5 倍濃縮液 1 μ l (B: DOS の場合のみ 2 μ l) である。

また、これらのクロマトグラムに現われるフェノール類の相対保持時間 (RRT) を phenol を 1.00 として Table 1 に要約して示した。ピーク番号はそれぞれ分離カラムによって現われる順位にしたがって付した。

(A) DC 550 カラムによる試料 I (原液) のフェノール分画のクロマトグラムを Fig. 2-A に示した。このような無極性カラムによるときは、おおむね沸点順に現わ

A Sample I (1 μ l)

Column: 10% DC 550 on Gas Chrom P (60/80 mesh), in 4 mm $\times$ 150 cm at 120°C and N₂ flow 84 ml/min.

Peak nos.: (1) Phenol, (2) *o*-Cresol, (3) *p*-Cresol, *m*-Cresol, (4) Guaiacol, 2,6-Xylenol, (5) 2,4-Xylenol, 2,5-Xylenol, (6) 3,5-Xylenol, (7) 3,4-Xylenol, Creosol, Catechol, (8) 2,6-Dimethoxyphenol

B Sample II (2 μ l)

Column: 5% DOS on Diasolid L (80/100 mesh), in 3 mm $\times$ 75 cm, at 100°C and N₂ flow 66 ml/min.

Peak nos.: (1) Guaiacol, (2) Phenol, (3) *o*-Cresol, 2,6-Xylenol, (4) Creosol, (5) *p*-Cresol, *m*-Cresol, (6) 2,4-Xylenol, 2,5-Xylenol, (7) 3,5-Xylenol, (8) 3,4-Xylenol, (9) 2,6-Dimethoxyphenol

C Sample I (1 μ l)

Column: 5% TCP on Diasolid L (80/100 mesh), in 3 mm $\times$ 75 cm, at 140°C and N₂ flow 54 ml/min.

Peak nos.: (1) Guaiacol, (2) Creosol, 2,6-Xylenol, Phenol, (3) *o*-Cresol, (4) *p*-Cresol, (5) *m*-Cresol, (6) 2,4-Xylenol, 2,5-Xylenol, (7) 3,5-Xylenol, (8) 3,4-Xylenol, (9) 2,6-Dimethoxyphenol

D Sample II (1 μ l)

Column: 5% DEGS+1% H₃PO₄ on Chromosorb W (60/80 mesh), in 4 mm $\times$ 225 cm (glass column) at 150°C and N₂ flow 60 ml/min.

Peak nos.: (1) Guaiacol, 2,6-Xylenol, (2) *o*-Cresol, (3) Phenol, Creosol, (4) 2,4-Xylenol, 2,5-Xylenol, (5) *p*-Cresol, *m*-Cresol, (6) Thymol, (7) 3,5-Xylenol, (8) 3,4-Xylenol, (9) 2,6-Dimethoxyphenol

Fig. 2. Gas chromatograms of phenol fractions of wood-pyrolygneous liquid (sample I) and its distillate (sample II)

Table 1. Relative Retention Times (RRT) of Phenols Corresponding to Peak Number

Column	DC 550		DOS		TCP		DEGS (+H ₃ PO ₄)	
Compound (bp)	Peak no.	RRT	Peak no.	RRT	Peak no.	RRT	Peak no.	RRT
Phenol (182°C)	1	1.00	2	1.00	2	1.00	3	1.00
<i>o</i> -Cresol (190.8°C)	2	1.52	3	1.29	3	1.20	2	0.96
<i>p</i> -Cresol (201.8°C)	3	1.75	5	1.68	4	1.52	5	1.29
<i>m</i> -Cresol (202.8°C)	3	1.75	5	1.72	5	1.59	5	1.29
Guaiacol (205°C)	4	2.17	1	0.84	1	0.59	1	0.74
2,6-Xylenol (201°C)	4	2.18	3	1.32	2	0.97	1	0.75
2,4-Xylenol (211.5°C)	5	2.58	6	2.31	6	1.76	4	1.21
2,5-Xylenol (211.5°C)	5	2.58	6	2.31	6	1.85	4	1.22
3,5-Xylenol (219°C)	6	3.00	7	2.90	7	2.56	7	1.76
3,4-Xylenol (225°C)	7	3.52	8	3.30	8	2.89	8	1.97
Creosol (220°C)	7	3.58	4	1.44	2	0.96	3	1.01
2,6-Dimethoxyphenol (262°C)	8	10.8	9	4.20	9	3.25	9	3.20

れ, phenol が単独でピークとなるのが特徴的であるが, われわれの使用したカラムはややテーリングが大きく, その他のフェノール類については分離不十分であった。しかし, どの特定の分離カラムについても保持時間の近接あるいは一致するものがあり, したがって種々の分離カラムを用いる必要があった。

(B) DOS カラムは guaiacol および phenol を単独で分離ピークとし, その順位は DC 550 による場合とは逆転する。Fig. 2-B に示したクロマトグラムは短い (75 cm) カラムにより 100° における試料 II (蒸留液) からの分画 (5 倍濃縮) 2 μ l 注入の場合であるが, この DOS カラムは 130° で Sensitivity 10³, Range 1.6 程度までは安定しており, 条件を変えた場合には *o*-cresol と creosol はほとんど分離したピークを示し, ほぼ同程度の量比であると推測された。

(C) TCP では, 使用したカラムがテーリングを示すものであり, また 130° 以上ではノイズが大きく, 良好なクロマトグラムが得られなかったが, *p*-cresol と *m*-cresol はこのカラムによるとき若干の分離を示し, その同定および量比の推定ができた。Fig. 2-C は試料 I について行なったものである。いろいろな条件および試料濃度によって検討した結果では *p*- および *m*-cresol の量比はほぼ 1:2 程度と思われる。*o*-cresol の量も *p*-cresol とほぼ同程度と思われる。

(D) DEGS+H₃PO₄ カラムは, ガラスカラムとしてカラム口注入を行ない, 対称性のよい尖鋭な分離ピークを得ることができた。使用したカラムの液相のうち量も極性の強いもので, たとえば *o*-cresol が phenol よりまゝに現われる。Fig. 2-D は試料 II についてのクロマトグラムである。

これらの実験結果では 2,6-xylenol は単独ピークと

して同定しえなかったが, guaiacol と重なる場合と guaiacol のみの単独ピークの場合とを比較して 2,6-xylenol は極微量であると推定した。

試料 I (原液) と II (蒸留液) のクロマトグラムを比較するとき, 後者には 2,6-dimethoxyphenol およびそれ以上の高沸点成分がはるかに少ないことがわかった。

I (原液) にはこれらの未確認の数ピークが存在するのでさらに検討中である。

総 括

木酢液 (I: 原液) およびその蒸留液 (II) から抽出分画したフェノール類を, 数種の分離カラムを用いてガスクロマトグラフィーにより同定した。phenol, guaiacol, *m*-cresol, 2,6-dimethoxyphenol などが比較的多く, ついで *o*-cresol, *p*-cresol, creosol, 3,5-xylenol などが見いだされ, さらに 3,4-xylenol, 2,4- および 2,5-xylenol, thymol, catechol などが同定された。

なお, 本研究は昭和39年度科学技術庁特別研究促進調整費によって行なったものであり, また実験に際しご協力いただいた東邦薬科大学 渡辺一江博士, ならびに国立衛生試験所食品添加物部 林敏夫室長および須佐順子技官に感謝します。

文 献

- 1) 白石慶子: 食衛誌. 4, 308 (1963).
- 2) 菰田太郎, 白石慶子: 同上. 5, 336 (1964).
- 3) 富永幸之: “実験化学講座” 続 9, p. 353 (1965) 丸善.
- 4) V. J. Jahnsen: “The Chemical Composition of Hardwood Smoke” (1961).
- 5) 百瀬勉: “有機定性分析法” p. 32 (1950).
- 6) 伊沢正夫, 小橋友助, 坂口惣一: 専売研. 101, 33 (1959).