酸化魚油の抗菌作用に関する研究—II.

酸化イカ肝油 methyl ester 中の carbonyl の paper chromatography による分離・同定*

豊 水 正 道

(1960 年 4 月 7 日受理)

STUDIES ON ANTIMICROBIAL ACTION OF OXIDIZED FISH OIL—II.
SEPARATION AND IDENTIFICATION OF CARBONYLS IN THE
OXIDIZED CALAMARY OIL METHYL ESTER BY
PAPER CHROMATOGRAPHY

Masamichi Toyomizu**

In the present paper experiment were done to separate, identify and estimate carbonyls in the oxidized methyl ester. By the combined use of column and paper chromatography and spectrophotometry, the joint quantitative and qualitative analyses for carbonyls were successfully carried out.

For the enrichment of carbonyls from the oxidized calamary oil methyl ester, steam distillation and acetic acid extraction were employed. Carbonyls were converted to 2,4-dinitrophenylhydrazones. The derivatives were fractionated on the basis of the molecular weight of the parent carbonyls except 2,4-dienal by chromatography on columns of silica gel and celite analytical filter aid (2: 1) with 2~6% ether solution in hexane as a developing solvent. The fractions were resolved into classes of carbonyls by paper chromatography using Toyo No. 51 filter paper and 5% ether solution in hexane as a developing solvent. Both paper chromatographic separation of the classes of carbonyls into the individual components and their identification were made by using Toyo No. 51A filter paper impregnated by dipping in 7% vaseline solution in hexane and 96% methanol as a developing solvent. Butanal, pentanal, hexanal, heptanal, nonanal, 2-butanal, 2-heptenal, 2-octenal, and 2,4-undecadienal were found in steam distillate. In ligroin and 85% acetic acid soluble fraction butanal, pentanal, hexanal, heptanal, 2-butanal, 2-heptenal, 2-octenal, and 2,4-undecadienal were found (Table 2, 3 and 4). Spectrophotometric examination of the column chromatographic fractions and paper chromatographic spots in vaseline-methanol system permitted the differential determination of all carbonyls in the oxidized calamary oil methyl ester (Table 5).

Further investigations were carried out on carbonyls in ligroin insoluble fraction, and the possibility of polymerization taking place through an oxygen linkage was considered.

著者は酸化魚油の微生物発育阻害作用が carbonyl によることを明らかにしたので、本報では魚油の酸化により生成する carbonyl の分離・同定を試みた。酸化物中の carbonyl の分析法については多くの報告があり、carbonyl を 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNPH) とし chromatography を用いて分離するようになって以来、その分離・同定の研究は急速に進歩した。

SWIFT 等¹⁾は綿実油自動酸化物の蒸気蒸溜物から hexanal, 2-octenal および 2,4-decadienal を単離した。このような初期の研究は専ら column chromatography (C.C.) のみによつて行われている。aldehyde

* 本研究の要は 1959 年 10 月, 日本水産学会秋季大会 (大阪) で発表した。

** 九州大学農学部水産化学教室 (Fish. Chem. Lab., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan).

および ketone の DNPH の C. C. の吸着剤については GORDON 等³⁾ が silica gel: celite analytical filter aid (2: 1) を用いて好結果を得て以来この吸着剤の組合せが多く用いられた。すなわち CHANG 等⁸⁾ は酸化大豆油および methyl linolenate から, JOHNSON 等⁴⁾ は ethyl linoleate の酸化重合物の分解産物からこの吸着剤の組合せにより, それぞれ acetaldehyde, propanal, *n*-pentanal, *n*-hexanal および methyl ethyl ketone, propanal, acetaldehyde, α -pentenal, crotonaldehyde, C₅ の未知の carbonyl を分離した。その他に BUSS 等⁵⁾ は吸着剤として MgSO₄·7H₂O を用いて酸敗植物油の揮発性 carbonyl を 30 区分に分け高級 aldehyde としては *n*-undecanal および *n*-undecenal を分離した。しかしながらこのように C. C. のみを用いる方法は多量の DNPH を必要とするのみでなく, 操作に多大の労と長い時間とを要するという欠点がある。この点を改良するために paper chromatography (P. C.) を併用して分離・同定することが企てられた。この方法によつて FORSS 等⁶⁾ は酸化脱脂乳から acetone, C₂ および C₆ の *n*-saturated aldehyde; C₃ および C₅~C₁₁ の alk-2-enal; C₅~C₁₁ の 2,4-dienal を分離した。PIPPEN 等⁷⁾ も調理した鶏の筋肉組織中に acetone, methyl ethyl ketone; C₂~C₆ および C₈~C₉ の *n*-saturated aldehyde; C₅~C₇ および C₁₀~C₁₁ の alk-2-enal; C₇ の alk-2,4-dienal が存在することを明らかにした。酸化油中の carbonyl の研究はこのような定性的のものからさらに進歩して定量的な研究へ進み, WITTING 等⁸⁾ は gamma 線照射した豚脂から C₈~C₉, C₉ および C₁₂ の saturated aldehyde; acrolein, crotonal; 2,4-undecadienal を同定するとともにその含量を測定して, 総量の約半分が 2,4-undecadienal であることを明らかにした。彼等は silicic acid と celite とを用いた C. C. にフラクションコレクターによる分離法とを併用して分離したものをさらに N,N-dimethylformamide で処理した濾紙を用いて decalin 飽和の dimethylformamide を移動相として P. C. を行つて同定している。このことは炭素数の多い飽和 aldehyde と不飽和 aldehyde が混在している相からの分離・同定が如何に困難であるかを示している。これらの研究結果から不飽和脂肪酸あるいは不飽和油の酸化によつて生ずる carbonyl は saturated aliphatic aldehyde, saturated ketone, alk-2-enal および alk-2,4-dienal に種類分けされることが分る。GADDIS 等⁹⁾ は 165°C, 15 分加熱した豚脂の揮発性 carbonyl を DNPH として最初は ether-石油エーテルを展開剤とした P. C. によつて carbonyl の種類分けを行い, ついでこの種類分けされた各々の carbonyl をさらに第 2 回の P. C. によつて同定して, C₆ および C₈~C₉ の *n*-alkanal; C₇~C₉ および C₁₁ の alk-2-enal; C₇ および C₁₀~C₁₁ の 2,4-dienal の存在を明らかにし, かつ定量を行つた。

著者は, 酸化イカ肝油 methyl ester 中の carbonyl を酢酸分別法または蒸気蒸溜法によつて分別し, DNPH とした後, 最初に C. C. でついで第 1 回目の P. C. で種類分けを行い, さらに第 2 回目の P. C. で同定を行つた。酸化油中には carbonyl は比較的小量しか存在しないので chromatography を用いるのは良い方法と考えられる。しかしながら今日までに報告されている種々の P. C. を試みたところ, ある方法は streaking が甚しく, ある場合には解析が充分でなく, またあるものは操作が極めて複雑で多大の労と時間を要するために利用し得なかつた。またある種の天然物では良い方法であつても魚油の酸化生成には適用し得ないものもあつた。このような予備実験の結果 carbonyl の種類分けには ether-hexane で展開すると, C. C. と P. C. を用い, carbonyl の同定には ELLIS 等¹⁰⁾ の方法を改良した P. C. を用いて酸化イカ肝油 methyl ester 中の carbonyl の分析を行つた。

実験方法

試料: アルカリ精製したイカ肝油から常法により調製した脂肪酸 methyl ester (186~210°C/2mm) に M/100 になるように Cu-stearate を加えて 100°C, 1.5 時間酸素吹込み下で酸化した。これを前報¹¹⁾で述べたように ligroin と酢酸とを用いて分別して得た ligroin, 85% 酢酸可溶性の区分, ligroin 不溶性の区分を試料とした。他方揮発性 carbonyl の分析には 200g の酸化 methyl ester を 1.5 時間蒸気蒸溜して得た 500cc の溜液を試料とし, これら 3 区分から DNPH を調製した。

2,4-dinitrophenylhydrazone の調製: 2g の ligroin, 85% 酢酸可溶性区分を 20cc の 95% ethanol

にとかし, 0.4 g の 2,4-dinitrophenylhydrazine, 2 cc の濃硫酸, 3 cc の水および 10 cc の 95% ethanol を混和して調製した hydrazine 試薬¹²⁾をこれに加え一夜放置後遠心分離して得た沈澱を硫酸々性 ethanol, 95% ethanol で洗滌して DNPH を得た。ligroin 不溶性区分は ethanol にとかし全く同様にして DNPH を調製した。揮発性 carbonyl の DNPH は蒸気蒸溜液を 2N-HCl に飽和した 2,4-dinitrophenylhydrazine 溶液 50 cc 宛で受け一夜放置後, 生じた沈澱をあつめ 2N-HCl, 95% ethanol, および水で洗滌して調製した。hydrazine 溶液は総計 500 cc 用いた。

column chromatography: 190°C で別々に 2 時間加熱した 12 g の silica gel (Mallinckrodt 社製, 100 mesh) と 6 g の celite analytical filter aid (Johns-Manville 社製) とをよく混和後適当量の hexane とともに 1.5×30 cm のガラスチューブに注入充填して column を準備した。100~150 mg の DNPH を 20 cc の chloroform に溶かして注入後, 最初は hexane のみで, ついで ether を加えてその濃度を 2, 4, 6% と順次増加した ether 含有 hexane 溶液で展開を行つた。展開終了後は column を押し出し各 band 毎に切りとつて ethyl acetate で DNPH を抽出した。

paper chromatography: C. C. で分別した各区分は carbonyl の同定を行う前に 5% ether を含んだ hexane を展開剤として上昇法により carbonyl の種類分けを行つた。すなわち 40×40 cm の東洋汙紙 No. 51 を 3 分して原線上に毛細管で DNPH の benzol 溶液を線状に sampling した。*n*-alkanal, alk-2-enal, alk-2,4-dienal はそれぞれ固有の R_f まで移動するから約 20 cm 展開後分離した band を切り取り, 下降法により benzol で溶出した。かくして得た DNPH はつぎに ELLIS 等¹⁰⁾の方法を改良して同定した。すなわち 2×40 cm の東洋汙紙 No. 51A を 7% white vaseline (丸石製薬会社製・日本局法) の hexane 溶液に浸漬し, 15 分間室温で乾かした後 Sampling して 96% methanol で上昇法により展開した。この場合一定の R_f を得るために mercury trap を使用した。これは側管をもつた水銀の入った 25 cc 容のフラスコで, クロマト塔に通じるガラス管がフラスコの中の水銀中に 2 mm 浸してある。この mercury trap はクロマト塔内の展開剤の蒸気圧を一定に保つことにより常に一定の R_f を与え非常に有効であつた。

DNPH の極大吸収波長の測定: vaseline-methanol 法による P. C. で分離した spot を methanol で溶出したものおよび authentic compound を ethanol にとかし極大吸収波長 ($\lambda_{\max}$) を測定した。さらに各試料について 0.25 N 苛性加里-ethanol 溶液を溶媒として $\lambda_{\max}$ を測定し, $\lambda_{\max}$ における吸光度を溶媒を加えた直後および 90 分後に測定してアルカリ性における褪色度を測つた。

carbonyl の定量: C. C. で分別した各区分の DNPH を CHIPAULT 等¹³⁾の分光分析法で飽和 carbonyl, 不飽和 carbonyl に分けて定量し, vaseline-methanol 法で分離した spot を methanol で溶出したものの $\lambda_{\max}$ における吸光度の比によつて配分比例して各 carbonyl の含量を mol % で算出した。

溶媒の精製: ethanol および chloroform は硫酸々性で 2,4-dinitrophenylhydrazine を加え逆流冷却器をつける 3 時間加熱後蒸溜して carbonyl を除去した。methanol は苛性曹達を加えて蒸溜し沸点 64.1°C の区分のみを用いた。ether は硫酸々性の硫酸第一鉄飽和溶液で洗滌後蒸溜して過酸化物を除去した。hexane は濃硫酸で洗滌後蒸溜して芳香属化合物を除去した。

実験結果および考察

ELLIS 等¹⁰⁾および GADDIS 等¹⁴⁾は *n*-alkanal および alk-2-enal の DNPH の P. C. を行い, C_1 ~ C_6 の carbonyl は propylene glycol で, C_7 ~ C_{14} の carbonyl は vaseline で前処理を行つた汙紙で同定できると報告している。彼等が用いた Cheesbrough 社製の vaseline, skellysolve C および Whatman No. 3 の汙紙等は国内で入手し難いので, 著者は国産の試薬・汙紙を用いて C_8 ~ C_{12} の *n*-alkanal および C_8 ~ C_9 の alk-2-enal で検討した結果, 7% vaseline 処理の汙紙を用いて展開剤である methanol の濃度を増加して 96% とすることにより Table 1 で示すように C_4 ~ C_{12} の carbonyl を同定し得た。ただ C_8 と C_4 との R_f は近似しているのでその区別の判定は難しいようである。飽和化合物か不飽和化合物かは P. C. によつては判定し得ないので, これを判定するために $\lambda_{\max}$ を測定して Table 1 の結果を得た。DNPH の母体

Table 1. R_f value in vaseline-methanol system and absorption maximum of carbonyl 2,4-dinitrophenylhydrazones.

	R_f	$\lambda_{\max}$ ($m\mu$)		R_f	$\lambda_{\max}$ ($m\mu$)
propanal	0.76	356	heptanal	0.64	356
2-propenal	0.72	375	octanal	0.60	356
butanal	0.75	356	nonanal	0.56	356
2-butenal	0.70	375	decanal	0.50	356
pentanal	0.70	356	undecanal	0.44	356
2-pentenal	0.66	375	dodecanal	0.24	356
hexanal	0.67	356			

Table 2. Carbonyls in steam distillate of the oxidized calamary oil methyl ester.

No. of band in column chromato.	R_f in ether-hexane system	R_f in vase- line-metha- nol system	$\lambda_{\max}$ ($m\mu$)	Identification
D-1	0.05 0.98	0.09 0.75	385 357	2,4-undecadienal butanal
D-2	0.05 0.98 0.98	0.10 0.75 0.69	385 357 358	2,4-undecadienal butanal pentanal
D-3	0.05 0.98	0.09 0.69	385 358	2,4-undecadienal pentanal
D-4	0.89	0.69	375	2-butenal
D-5	0.98 0.98	0.67 0.65	356 356	hexanal heptanal
D-6	0.88 0.88	0.61 0.58	374 376	2-heptenal 2-octenal
D-7	0.88 0.98	0.57 0.56	376 357	2-octenal nonanal

Table 3. Carbonyls in ligroin-85% acetic acid soluble fraction of the oxidized calamary oil methyl ester.

No. of band in column chromato.	R_f in ether-hexane system	R_f in vase- line-metha- nol system	$\lambda_{\max}$ ($m\mu$)	Identification
A-1	0.05 0.98	0.10 0.75	385 357	2,4-undecadienal butanal
A-2	0.05 0.98	0.10 0.71	385 357	2,4-undecadienal pentanal
A-3	0.90 0.98 0.98	0.70 0.67 0.64	375 357 357	2-butenal hexanal heptanal
A-4	0.89 0.89	0.61 0.57	375 376	2-heptenal 2-octenal

である carbonyl の化学構造と吸収スペクトルとの関係については多くの報告がある。BRAUD 等¹⁵⁾ および SZMANT 等¹⁶⁾ は DNPH の可視部光線の吸収は主として $>C:N-$ 基と $>NH$ 基とによるが、母体に二重結合があるときは励起されやすい η electron が存在するために DNPH の呈色に影響を与えると述べている。この際最も顕著に影響が表われるのは $\lambda_{\max}$ の位置であつて、JOHNSON¹⁷⁾ は DNPH の母体である carbonyl を 3 群に分け、それぞれに係数を与え $\lambda_{\max}$ を計算によつて算出し得るような式を提唱した。ROBERTZ 等¹⁸⁾、BUYSKE 等¹⁹⁾ および JOHNES 等²⁰⁾ は構造を異にする各種 aldehyde, ketone の DNPH の $\lambda_{\max}$ を測定し、飽和 aldehyde では $354\sim 358m\mu$ 、飽和 ketone では $364\sim 367m\mu$ 、不飽和 aldehyde では $375m\mu$ にそれぞれ $\lambda_{\max}$ があると報告している。揮発性 carbonyl および ligroin, 85% 酢酸可溶性性区分の carbonyl の C.C. および P.C. による分離とそれぞれの $\lambda_{\max}$ を Table 2, 3 に示した。この表から明らかに $silica\ gel: celite\ analytical\ filter\ aid$ (2: 1) の C.C. では飽和化合物と不飽和化合物の分離はできなかつたが、2,4-dienal は例外としてその他の carbonyl の DNPH は炭素数に応じて分別された。つぎに行つた 5% ether を含んだ hexane による P.C. では大別して 3 種類の R_f が得られ、明らかに carbonyl の種類により分けられたが、同一種類に属する carbonyl は C 数が異つても総て同一の R_f を示し C 数を推定することすらできなかつ

た。つぎに vaseline-methanol の P.C. で得た R_f と各 spot の $\lambda_{\max}$ とを Table 1 で示した authentic compound のそれらと比較・参照して *n*-alkanal として butanal, pentanal, hexanal, heptanal; alk-2-enal として 2-butenal を同定した。これらの他に Table 2 すなわち揮発性 carbonyl 区分のみから nonanal が同定された。Table 1 で明らかなごとく alk-2-enal の R_f は C 数の 1 ケ多い *n*-alkanal の R_f とほぼ同一であり、かつ $\lambda_{\max}$ が $375\text{m}\mu$ であるから、さらに 2-heptenal, 2-octenal の存在が推定される。D-1, D-2, D-3 および A-1, A-2 に含まれている $\lambda_{\max}$ が $385\text{m}\mu$ である区分は dialenal と推定される。これらの区分を集め A 区分と D 区分とは別々に C.C. を行ない展開剤の ether 量を増加して 15% ether として展開し、C.C. をさらに 2 回くり返した後 alcohol で再結した。M. P. は D 区分のものは 132.5°C , A 区分のものは 132.0°C で FORSS 等⁶⁾ が合成 2,4-undecadienal の DNPH で報告している $133\sim 134^\circ\text{C}$ とほぼ一致した。元素分析値は Table 4 に示した。これらの結果から 2,4-undecadienal の存在を確認した。なお half aldehyde の有無を明らかにするために野中²¹⁾の方法すなわち hexane: glacial acetic acid: xylene (5: 1: 3) で上昇法で展開したが、総ての試料は濾紙全面に流れて spot を与えず half aldehyde の存在

は確認できなかった。Table 2, 3 の $\lambda_{\max}$ から ketone の存在は否定されたが、さらにこれを確めるためにアルカリ性における褪色度を測定した。JOHNES 等²⁰⁾は ketone の DNPH はアルカリ性でも殆ど褪色しないと報告している。Table 2, 3 の vaseline-methanol 法で得た spot の溶出物はすべて 90 分後には 50% 内外の褪色率を示し ketone の存在はこの点からも否定された。つぎに分離・同定された carbonyl の含量を Table 5 に示した。すなわち ligroin, 85% 酢酸可溶区分の約半分は 2,4-undecadienal であるが、これに対し揮発性 carbonyl では 2,4-undecadienal は 14.34 mol % という低い値を示し、2-octenal は

Table 5. Carbonyl content in the oxidized calamary oil methyl ester (mol %).

Fraction Carbonyl	Steam distillate	Ligroin-85% acetic acid soluble fraction
butanal	13.56	8.10
2-butenal	3.50	4.37
pentanal	16.72	14.84
hexanal	9.97	5.52
heptenal	6.13	7.10
2-heptenal	8.20	2.84
2-octenal	26.09	3.77
nonanal	1.49	—
2,4-undecadienal	14.34	53.46

Table 6. Ultimate analysis of carbonyls in ligroin insoluble fraction.

Carbonyl	C	H	N	Formula
P-1	51.55	4.86	10.48	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_8$
P-2	55.96	5.87	9.13	$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{O}_7$
P-3	56.15	5.82	9.76	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_8$

Table 4. Ultimate analysis of 2,4-dienal.

Fraction	C	H	N	M. P. ($^\circ\text{C}$)
D	58.60	6.15	16.10	132.5
A	58.55	6.11	16.07	132.0
$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NNHC}_6\text{H}_5(\text{NO}_2)_2$ calculated	58.95	6.38	16.18	133~134

26.09% であつた。この減少は蒸溜のための加熱中における 2,4-undecadienal の変化によるものと考えられる。

酸化 methyl ester を酢酸分別する際に分別される ligroin 不溶性区分から得た DNPH は C.C. で P-1, 2, 3 の 3 区分に分別されたが、P.C. によつてもこれ以上には分別されなかつた。この 3 区分の元素分析の結果および nujol 法による赤外吸収スペクトルはそれぞれ Table 6, Fig. 1 に示した。Table 1 に示したようにこれらは $\text{C}_{17}\sim\text{C}_{28}$ の重合体であり、赤外吸収スペクトルは 3 区分のものは殆んど互に差異が認められない。このスペクトルは JOHNES 等²⁰⁾が報告しているように N-H, C-H, phenyl C-C, C-N, N-O₂ による吸収および phenyl 基の 1, 2, 4 置換による吸収等典型的な DNPH による吸収を示している以外に、WITTING 等²²⁾が ethyl linolenate の dimer, trimer で報告している CO , CH_2-CH_2 の吸収が表われている。この外に 2.99μ における OH および 10.25μ における trans 二重結合による吸収がある。これらによつて分子中に含まれた異常に多い酸素は OH, CO の型で存在し、酸化的結合は酸素をもつたこれらの基に

Fig. 1. The absorption spectrum of P-1 in the infrared region.

よつていると推定される。

要 約

1. Column chromatography と paper chromatography および分光分析法とを併用して酸化イカ肝油 methyl ester 中の carbonyl を定性・定量分析した。
2. 酸化イカ肝油 methyl ester の蒸気蒸溜物および ligroin, 85% 酢酸可溶性区分からの carbonyl を 2,4-dinitrophenylhydrazone とし, silica gel: celite analytical filter aid (2: 1) を用いる column chromatography により 2,4-dienal 以外を分子量にしたがって分別した。
3. 5% ether を含んだ hexane を展開剤として東洋汙紙 No. 51 を用いる paper chromatography により carbonyl を種類分けした。
4. 7% vaseline で処理した東洋汙紙 No. 51 A と展開剤として 96% methanol とを用いる paper chromatography により, 種類分けした carbonyl の分離同定を行った。
5. 蒸紙蒸溜物中には butanal, pentanal, hexanal, heptanal, nonanal, 2-butenal, 2-heptenal, 2-octenal および 2,4-undecadienal が存在し, ligroin, 85% 酢酸可溶性区分には butanal, pentanal, hexanal, heptanal, 2-butenal, 2-heptenal, 2-octenal および 2,4-undecadienal が存在していた。
6. Column chromatography で分別された区分と vaseline-methanol による paper chromatography で分離された spot との分光分析により飽和 carbonyl, 不飽和 carbonyl は別々に測定された。
7. Ligroin 不溶区分の重合物中の carbonyl を赤外分析・元素分析して, 重合は酸素結合によつて行われると推定した。

終稿に当り, 終始御懇篤な御指導を賜わつた富安教授に謝意を表する。

文 献

- 1) SWIFT, C. E., O'CONNOR, R. T., BROWN, L. E., and DOLLEAR, F. G.: J. Am. Oil Chem. Soc., **26**, 297 (1949).
- 2) GORDON, B. E., WOPAT, F., BURNHAM, H. D., and JONES JR. L. G.: Anal. Chem., **23**, 1754 (1951).
- 3) CHANG, S. S., and KUMMEROW, F. A.: J. Am. Oil Chem. Soc., **30**, 251 (1953).
- 4) JOHNSON, O. C., CHANG, S. S., and KUMMEROW, F. A.: *ibid.*, **30**, 317 (1953).
- 5) BUSS, C. D., and MACKINNEY, G.: *ibid.*, **32**, 487 (1955).
- 6) FORSS, D. A., PONT, E. G., and STARK, W.: J. Dairy Research, **22**, 91, 345 (1955).
- 7) PIPPEN, E. L., NONAKA, M., JONES, F. F., and STITT, F.: Food Research, **23**, 103 (1958).
- 8) WITTING, L. A., and SCHWEIGERT, B. S.: J. Am. Oil Chem. Soc., **35**, 413 (1958).
- 9) GADDIS, A. M., ELLIS, R., and CURRIE, G. T.: Food Research, **24**, 283, 392 (1959).

- 10) ELLIS, R., GADDIS, A. M., and CURRIE, G. T.: Anal. Chem., **30**, 475 (1958).
- 11) 豊水正道: 本誌, **26**, 721 (1960).
- 12) SHRINER, R. L.: The systematic identification of organic compounds p. 171 (1948).
- 13) CHIPAULT, J. R., PRIVETT, O. S., MIZUNO, G. R., NICKELL, E. C., and LUNDBERG, W. O.: Ind. Eng. Chem., **49**, 1713 (1957).
- 14) GADDIS, A. M., and ELLIS, R.: Anal. Chem., **31**, 870 (1959).
- 15) BRAUDE, E. A., and JONES, R. H.: J. Chem. Soc., 498 (1945).
- 16) SZMANT, H. H., and PLANINSEK, H. J.: J. Am. Chem. Soc., **72**, 4042 (1950).
- 17) JOHNSON, G. D.: *ibid.*, **75**, 2721 (1953).
- 18) ROBERTS, J. D., and GREEN, C.: *ibid.*, **68**, 214 (1946).
- 19) BUYSKE, D. A., OWEN, L. H., PELHAM, W., and HOBBS, M. E.: Anal. Chem., **28**, 910 (1956).
- 20) JOHNES, L. A., HOLMES, J. C., and SELIGMAN, R. B.: Anal. Chem., **28**, 191 (1956).
- 21) 野中順三九: 本誌, **21**, 1248 (1956).
- 22) WITTING, L. A., CHANG, S. S., and KUMMEROW, F. A.: J. Am. Oil Chem. Soc., **34**, 470 (1957).