酸化魚油の抗菌作用に関する研究—Ⅲ—

酸化イカ肝油 methyl ester 中の carbonyl の gas-liquid 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—III.
SEPARATION AND IDENTIFICATION OF CARBONYLS IN THE
OXIDIZED CALAMARY OIL METHYL ESTER BY
GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY

Masamichi Toyomizu*

The development of gas-liquid chromatography has made possible the rapid analysis of the volatile substances. In the present study, the technique was utilized for the analysis of carbonyls in the oxidized calamary oil methyl ester.

The chromatographic separations were carried out on Hitachi KGL-2 gas-chromatograph using silicon grease as a stationary liquid phase because of its thermal stability. Plots of the logarithm of the retention time against the number of carbon atom in authentic carbonyls gave straight lines (Fig. 1, 2). Results shown in Fig. 1, 2 clearly indicate that carbonyls whose numbers of carbon are 3~6 and 7~12 can be analyzed at 90°C and 150°C respectively.

Two kinds of samples, ether extract of the steam distillate of the oxidized calamary oil methyl ester and ether extract of the steam distillate treated with 2,4-dinitrophenylhydrazine solution in which carbonyls were converted to the unvolatile hydrazones were separated at 90°C and 150°C. The elution diagrams illustrated in Fig. 3, 4 demonstrate the successful separation and identification of propanal, butanal, 2-butenal, pentanal, hexanal, heptanal, 2-heptenal, 2-octenal, nonanal, and 2,4-undecadienal (Table 1).

In general the results agreed with those obtained by the combined use of column and paper chromatography except for separation of propanal, which indicated the superior accuracy of gas-chromatography. Unsaturated carbonyls identified by gas-liquid chromatography did not reveal any difference from those by paper and column chromatography, and a principal volatile carbonyl component in the oxidized methyl ester was 2-octenal.

著者は前報¹⁾で酸化イカ肝油 methyl ester 中の carbonyl を酢酸抽出法あるいは蒸気蒸溜法で分別した後, 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNPH) として分離し, column chromatography とさらに 2 回の paper chromatography とを併用して固定した。この方法は試料の必要量を少量化した点および分析時間を短縮した点等において従来から行なわれている方法に比較して一段と優れている。しかしこの方法によつて分離された carbonyl 中には不飽和 carbonyl, 特に不飽和基を 2 つもつたものも存在していたが, これ等不飽和 carbonyl が分析操作中にどのような変化をうけたかは全く明らかでない。このようにして考えると油脂の酸化生成物の分析には不安定な不飽和化合物を変化させないような簡便・敏速な分析方法がのぞまれる。最近揮発性物質の分析に gas-liquid chromatography (G. L. C.) が盛んに用いられるようになり, 油脂分

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

解物に関しては Cox 等²⁾ は steroid の側鎖を分解しその生成物を, NOWAKOWSKA 等³⁾ は不飽和油の酸化生成物を G. L. C. によつて分析している。G. L. C. の利点とする点は試料の少量化と分析操作の簡易および分析精度の高いことであり, 沸点の高い試料では分離に高温を必要とするが, 不活性の carrier gas 中で処理されるので試料は変化をうけることなく分離・同定されることは不安定な物質の分析法として特にすぐれた点である。著者はこれらの点に着目して酸化魚油中の不安定な carbonyl の分離・同定を G. L. C. によつて行なつた。

実験方法

I. 実験試料

authentic carbonyl mixture: propanal, butanal, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, undecanal, dodecanal の飽和 carbonyl の混合物および 2-propenal, 2-butenal, 2-pentenal の不飽和 carbonyl の混合物の 2 種を試料とした。

酸化イカ肝油 methyl ester の蒸気蒸溜物: 1l のイカ肝油脂肪酸 methyl ester に Cu-stearate を M/100 になるように加えて, 100°C で 1.5 時間, 乾燥酸素吹込み下で常法により酸化したものを蒸気蒸溜して 2l の溜液を氷と食塩の混合物で冷却しながら捕集した。この溜液に食塩を飽和になるまで加えてから ether で抽出し, ether 可溶性区分は 3% NaHCO₃ 溶液で洗滌した後 ether を溜去した。

2,4-dinitrophenylhydrazine 処理蒸気蒸溜物: 上述のごとく常法によつて酸化した 1l の酸化イカ肝油 methyl ester を蒸気蒸溜して 500cc の 2N-HCl の 2,4-dinitrophenylhydrazine 飽和溶液で受けた。蒸溜は 2l の蒸液を得るまで行なつた。これを 1 夜放置して carbonyl を DNPH として沈澱させ, 上澄液に食塩を飽和になるまで加えてから ether で抽出した。ether 可溶性区分は水洗後, 3% NaHCO₃ 溶液で洗滌し ether を溜去した。

II. gas-liquid chromatography

日立 KGL-2 型 gas-chromatograph を使用した。silicon grease (thermol) を固定液相とし, 直径 4mm, 長さ 1m のチューブに充填したものの 3 本すなわち 3m の column を用いた。column 温度は 90°C, 150°C で, 試料室温度は 165°C に調節した。記録紙は column 温度 90°C では 1cm/分, 150°C では 2cm/分の速さで回転させた。helium を carrier gas とし 60cc/分の量を流し, 検知器のブリヂ電流は 175mA, 記録計の指度は 3mV で測定を行なつた。

実験結果

I. Authentic carbonyl の gas-liquid chromatography

authentic carbonyl mixture を 90°C で分離し retention time (t_R) を測定した。その結果 octanal までは分離されたが nonanal 以上の炭素数の carbonyl は分離されなかつた。また heptanal および octanal はピークが炭素数 6 以下のものと比して幅が長く, 高さが低く分離不良を暗示している。C₃~C₈ の飽和 carbonyl および不飽和 carbonyl の t_R と炭素数との関係は Fig. 1 に示したように t_R の対数に対し炭素数は直線関係にある。150°C で分離を行なつた場合は Fig. 2 に示したように dodecanal まで総ての carbonyl は分離され, t_R と C 数とは C₃~C₁₂ の carbonyl で Fig. 1 の場合と同様に t_R の対数に対し炭素数は直線関係を示している。しかし hexanal までは t_R が短く, t_R 0.2 分から 0.8 分までの間に 4 つの carbonyl のピークがあるから, propanal, butanal, pentanal および hexanal の同定には 90°C の分離が適当である。不飽和 carbonyl の t_R は 90°C においても, また 150°C においても相当する飽和化合物の t_R よりも長く, 炭素数 1 個多い飽和化合物の t_R よりも常に短くて, この両者の中間にあつた。以上要するに C₃~C₈ の carbonyl は 90°C で, C₇~C₁₂ の carbonyl は 150°C で分離するのが最もよく, この条件においては t_R の対数と炭素数との間には常に直線関係が成立し容易に同定し得る。

Fig. 1. A plot of the logarithm of retention time against the number of carbon atom in carbonyl compounds at 90°C.

○—○ saturated
×—× unsaturated

Column silicon grease, 3m by 4mm, Flow of helium gas, 60cc/min., Bridge current 175mA, Recorder sens. 3mV, Chart speed 1cm/min., Injector temp. 165°C.

Fig. 2. A plot of the logarithm of retention time against the number of carbon atom in carbonyl compounds at 150°C.

○—○ saturated
×—× unsaturated

Column silicon grease, 3m by 4mm, Flow of helium gas, 60cc/min., Bridge current 175mA, Recorder sens. 3mV, Chart speed 2cm/min., Injector temp. 165°C.

Fig. 3. Separation of carbonyls in the oxidized calamary oil methyl ester at 90°C, under the same conditions as those in Fig. 1.

Fig. 4. Separation of carbonyls in the oxidized calamary oil methyl ester at 150°C, under the same conditions as those in Fig. 2.

II. 酸化イカ肝油 methyl ester 中の carbonyl の同定

90°C および 150°C で酸化イカ肝油 methyl ester 中の carbonyl を分離した elution diagram は Fig. 3, 4 に示した。酸化イカ肝油 methyl ester 蒸溜物の elution diagram (下段) は carbonyl 以外の成分も含んでいるかもしれないので、2,4-dinitrophenylhydrazine で処理して carbonyl を不揮発性として除去した elution diagram (上段) と比較・参照して carbonyl 以外の成分の示す diagram を除かねばならない。この場合には量的関係を考慮する必要があるので両試料を等量宛 sampling した。その結果 Fig. 3 では t_R 1.6 分のピーク、Fig. 4 では t_R 0.6 分のピーク (Fig. 3 の t_R 3.3 分のピークに相当する) は

Table 1. Identification of carbonyls in the oxidized calamary oil methyl ester by gas-liquid chromatography.

Retention time (min.)		Carbonyl
90°C	150°C	
0.5		propanal
1.1		butanal
1.7		2-butanal
2.0		pentanal
4.0	0.8	hexanal
7.4	1.2	heptanal
13.0	1.6	2-heptenal
	2.2	2-octenal
	2.8	nonanal
	10.0	2,4-undecadienal

carbonyl とは無関係のものであることを知り、さらに Fig. 1, 2 に示した t_R から同定を行なつて Table 1 に示したように propanal, butanal, 2-butanal, pentanal, hexanal, heptanal, 2-heptenal, 2-octenal, nonanal, および 2,4-undecadienal を同定した。このうち 2-heptenal と 2-octenal とは標品を入手し得なかつたので不飽和 carbonyl の炭素数と t_R の対数との関係を示す直線を延長して求めた t_R (Fig. 2) で同定した。また Fig. 4 の最後のピークの t_R 10.0 分は dodecanal の t_R 10.7 分より短く、undecanal の t_R 7.0 分および 2-undecenal の t_R 9.0 分より長いので、二重結合 2 個の C_{11} carbonyl と思われる。前報¹⁾で 2,4-undecadienal の存在が元素分析で確認されているので 2,4-undecadienal と推定した。このようにして分離・同定した carbonyl のうち hexanal, heptanal および 2-heptenal は

Fig. 3, 4 の両方から全く同じように分離・同定され、本法による分析が正確であることを示している。

考 察

gas-chromatography は今日まで分析不可能であつた多くの問題に解決を与へ、有機分析に画期的な進歩をもたらしたが、一種類の充填剤が総ての分析に好結果を与えうるのではなく充填剤の撰択は分析結果を支配する重要な因子である。本研究では carbonyl を分析するのであるから carbonyl の分離に適当な充填剤を撰択すればよいのであるが、酸化イカ肝油 methyl ester 中には 2,4-undecadienal が存在しているから分離のためには相当の高温度が必要であり、充填剤はその温度に耐えるものでなくてはならない。carbonyl のように極性の強いものを分離・同定するには極性の強い固定液相が適当とされ、dioctylphthalate, dinonylphthalate, ethylene glycol 等が carbonyl の分離に好結果を与えると報告されている⁴⁾。また TENNEY⁵⁾ は分子中に酸素をもつた化合物の分離には dipropionitrile が最も効果的な固定相であると述べている。しかしながらこれ等の固定相は何れも高温に耐え得ないので、高温に耐える固定相として polyethylene glycol 6000 を用いて 150°C で分離を試みたところ spreading が甚しく carbonyl の分離に不適であつたので silicon grease を 150°C で使用し、低温 (90°C) の分離には上記の極性の強い固定相を用いることにした。しかし silicone grease の 90°C における carbonyl の分離能は dioctylphthalate, dinonylphthalate 等と比較して劣らず、また 150°C における分離も満足すべきものであつたので silicon grease のみを用いることにした。

G. L. C. によつて分離・同定を行なう場合試料は目的とする物質以外の夾雑物を可及的に除去した濃厚なものであることがのぞましい。NOWAKOWKA³⁾ は酸化油の生成物を分析するのに当り酸化油をそのまま用いて同定不能の不明瞭な数多くのピークを得ている。この点からも G. L. C. では試料調製の重要であることがわかる。酸化油中の carbonyl を同定するのに当り carbonyl だけを変化させることなく純粋にとり出す方法がないので、著者は醋酸抽出法¹⁾と蒸気蒸溜法の2方法によつて分別して、G. L. C. の試料としての優劣を検討した。その結果、醋酸抽出法によつて濃縮された試料は spreading が甚しく試料として適当でなかつたので蒸気蒸溜液の ether 可溶性区分を試料とした。この蒸気蒸溜物の ether 可溶性区分には carbonyl 以外の物質が存在している。G. L. C. では同じ物質は同じ t_R を与えるが、同じ t_R を与えるから同じ物質であるという保証はないから、このような夾雑物の存在の下では試料と標品との t_R の比較のみによつては同定を行ない得ないので、推定成分の添加、特定成分の消去等の方法によつて同定することが考えられている。雨宮⁶⁾ は飽和炭化水素と不飽和炭化水素の混合物から不飽和炭化水素を G. L. C. で同定するために不飽和炭化水素を臭素化して不揮発性とする方法を用いた。著者は酸化 methyl ester の蒸気蒸溜液の ether 可溶性区分中の carbonyl を DNPH にかえて不揮発性として除去した試料の elution diagram と carbonyl を除去しない試料の elution diagram との比較から carbonyl の同定を行なつた。carbonyl を除去する方法としては 2,4-dinitrophenylhydrazine を用いる外に dimedone も用いたが結果は全く同一であつた。Table 1 で示されている G. L. C. で分離・同定された carbonyl と前報¹⁾で同一操作によつて調製した試料から paper chromatography で分離・同定された carbonyl とを比較・検討してみると、G. L. C. では propanal と butanal とが分離されたが、paper chromatography では propanal を butanal から分離・同定することができず、この両者の混合体を butanal と同定した。このことから G. L. C. は paper chromatography よりも精度において勝つてはいるが、このような例外を除いては G. L. C. で得た結果は paper chromatography で得た結果とよく一致し、Fig. 3, 4 から酸化 methyl ester 中の主要な揮発性 carbonyl は 2-octenal であることが分つた。

要 約

1. 酸化イカ肝油 methyl ester の carbonyl の分離・同定を silicon grease を固定液相とし gas-liquid chromatography によつて試みた。

2. carbonyl の炭素数と retention time の対数との間には直線関係が成立し, $C_3 \sim C_6$ の carbonyl は 90°C で $C_7 \sim C_{12}$ の carbonyl は 150°C で分離・同定された。

3. 酸化イカ肝油 methyl ester の蒸気蒸溜物と 2,4-dinitrophenylhydrazine で処理して carbonyl を不揮発性とした蒸溜物とを試料とし, 90°C および 150°C で gas-liquid chromatography を行なった。

4. これ等の elution diagram を比較・検討して, propanal butanal, 2-butenal, pentanal, hexanal, heptanal, 2-heptenal, 2-octenal, nonanal, 2,4-undecadienal が分離・同定された。

5. paper chromatography では分離されなかつた propanal が gas-liquid chromatography では分離され, 後者の精度が前者よりすぐれていることがわかつた以外は両者の分析結果はほぼ同一であつた。

終稿に当り, 終始御懇篤な御指導を賜つた富安教授に謝意を表する。

文 献

- 1) 豊水正道: 本誌, **26**, 726 (1960).
- 2) COX, J., HIGH, L. B.: Proc. Chem. Soc., 234 (1958).
- 3) NOWAKOWSKA, J., MELVEIN, E. H., and WIEBE, R.: J. Am. Oil Chem. Soc., **34**, 411 (1957).
- 4) 後藤良造・荒木長男: 化学の領域, **12**, 826 (1958).
- 5) TENNEY, H. M.: Anal. Chem., **30**, 2 (1958).
- 6) 岡宮良三: ガスクロマトグラフィー, p. 29 (1958).