

ペーパークロマトグラフィーによる 油鰈油脂脂肪酸の分析*

平 山 修 ・ 野 田 万 次 郎

OSAMU HIRAYAMA and MANJIRO NODA : Analysis of the Fatty Acids
of the Oil of *Reinhardtius matsuurae* by Paper Chromatography

I 緒 論

脂肪酸のペーパークロマトグラフィーに関する研究は最近かなり進められ種々の方法が既に発表されているが、低級脂肪酸に比較して高級脂肪酸に関するものは少く、特にその系統的研究は殆ど無い。著者等はこの高級脂肪酸の相互分離に関し実験を重ねて来たが、その結果先に発表¹⁾した如く、石油炭化水素を固定液相とし石油炭化水素飽和メタノールを移動液相とする方法が有効である事を知った。

そこで本実験に於ては、純粋脂肪酸に就て行つたこの方法が、更に天然脂肪酸の相互分離にどの程度有効であるかをみるために、未だ若干の研究²⁾³⁾しかなされていない油鰈 (*Reinhardtius matsuurae* JORDAN & SNYDER) 油脂脂肪酸を試料に選び、この分析を行つた。即ち、先ず塩類分別法によつて試料を飽和酸部、オレイン列不飽和酸部、リノール・リノレン列不飽和酸部及び高度不飽和酸部の 4-フラクションに大別し、更に減圧蒸溜によつてこれを各細分別して合計 29-フラクションに分けた。この各フラクションに就て夫々各恒数を測定すると共に、ペーパークロマトグラフィーによつて含有脂肪酸を検出した。その結果比較的好成績を得、特に不飽和酸に於て良い分離度を示した。

尙この結果より、従来常法として行われて来た脂肪酸の分別法である塩類法及び蒸溜法に就ても検討を行つた。

II 実験並に実験結果

(1) 試 料

実験に用いた油鰈油は北海道産にして、淡黄色の液体であり冬期著量の固形物を析出する。その恒数は、酸価 2.2, 沃素価 84.8, 鹼化価 188.4, n_D^{29} 1.4467, 不鹼化物 0.37 %で、他の魚油に比し沃素価が低いのが特徴である。

(2) 脂肪酸の分別

試料 230g を炭酸ガス気流中で鹼化、不鹼化物を除去後稀塩酸で分解し、混合脂肪酸 218g を

西京大学農学部生物化学研究室

* 本報は昭和 28 年 6 月 13 日 日本農藝化学会関西支部大会にて講演した。

得た。

この混合脂肪酸を先ず鉛塩アルコール法⁵⁾で固体酸と液体酸とに分別し、液体酸はリチウム塩アセトン法⁶⁾で低度不飽和酸部と高度不飽和酸部とに、そして更に低度不飽和酸部はリチウム塩アルコール法⁷⁾によつてオレイン列不飽和酸部とリノール・リノレン列不飽和酸部との合計4-フラクションに分けた。この操作及び収量を示すと Table 1 の如くである。

Table 1. Separation of mixed Fatty Acids by Metallic Salts

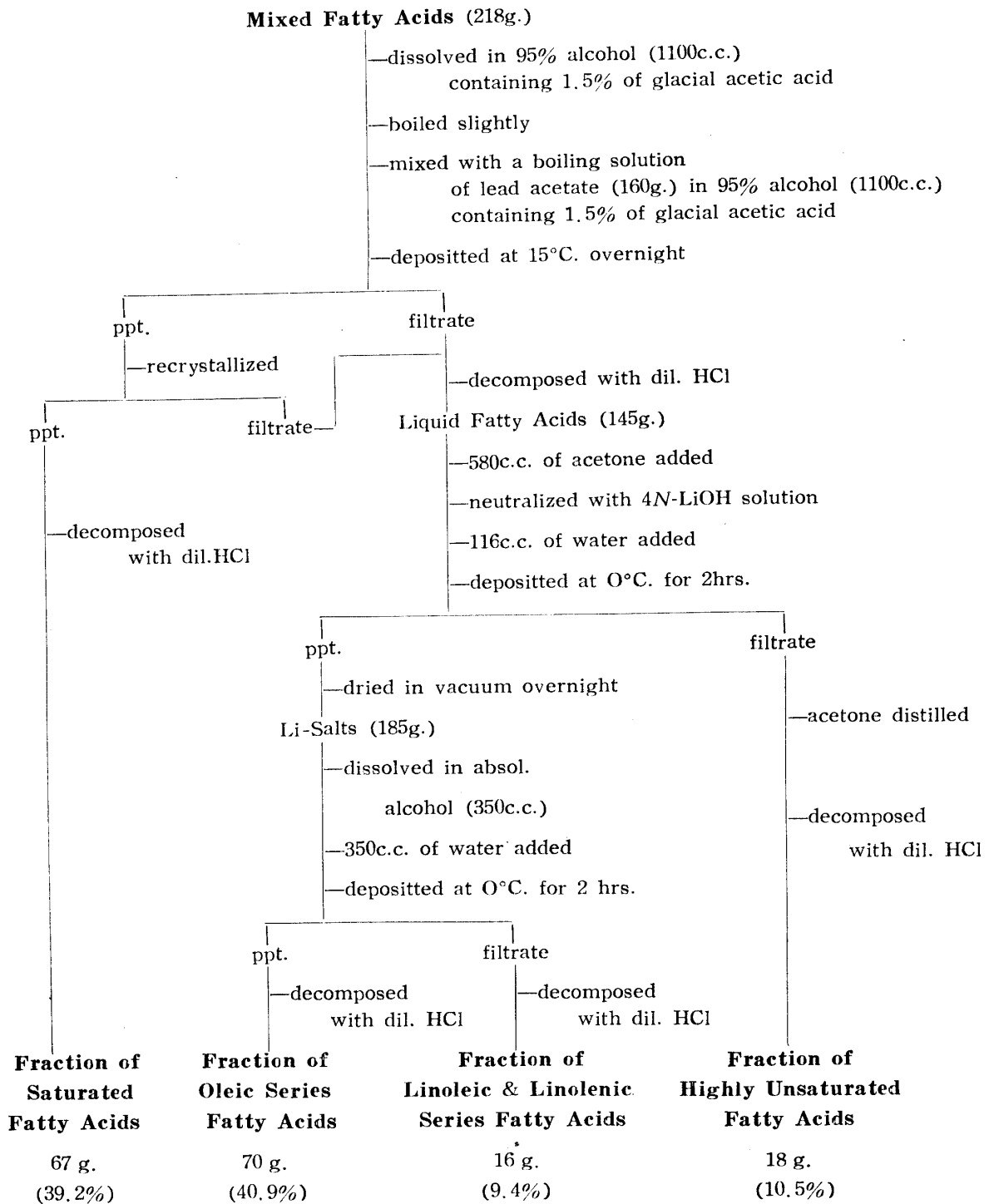


Table 1 で判る如く飽和酸部及びオレイン列脂肪酸部の収量が大きであつた。

次にこれ等 4-フラクションを夫々メチルエステル化し、炭酸ガス気流中で減圧蒸溜を行つて、合計 29-フラクションに細分別した。この各フラクションに就き、鹼化後遊離脂肪酸として各恒数を測定した。その結果は Table 2, Table 3, Table 4 及び Table 5 の如くである。

Table 2. Fractionation of Saturated Fatty Acids

Fraction no.	Methyl ester			Fatty acid			
	B. p.,		Yield, wt. (g.)	Yield, wt. (g.)	N. V.	I. V. (W ₁₃ S)	M. p., °C.
	°C.	mm.					
1	-162.6	5	4.0	3.5	222.3	3.5	54-57
2	162.6-177.8	〃	6.0	5.6	208.4	5.8	55-58
3	177.8-183.2	〃	3.0	2.6	199.1	23.4	52-55
4	183.2-193.5	〃	6.5	5.9	190.3	41.5	35-39
5	193.5-209.2	〃	5.4	5.0	183.6	70.1	13-17
6	209.2-219.7	〃	8.3	7.8	173.7	77.1	—
7	219.7-225.1	〃	9.0	8.6	164.5	74.3	26-28
8	225.1-234.0	〃	3.0	2.4	158.2	72.5	27-29

Table 3. Fractionation of Oleic Series Fatty Acids

Fraction no.	Methyl ester			Fatty acid			
	B. p.,		Yield, wt. (g.)	Yield, wt. (g.)	N. V.	I. V. (W ₁₃ S)	n _D ¹⁵
	°C.	mm.					
1	-173.0	5	3.1	2.7	211.3	62.5	—
2	173.0-177.8	〃	4.5	4.0	195.1	72.5	—
3	177.8-183.2	〃	6.4	5.8	189.5	77.3	—
4	183.2-188.3	〃	7.1	6.7	183.7	80.7	1.4631
5	188.3-193.5	〃	4.0	3.6	179.1	79.8	1.4628
6	193.5-198.7	〃	5.0	4.5	177.3	78.1	1.4620
7	198.7-203.4	〃	5.2	4.7	176.6	76.0	1.4603
8	203.4-209.2	〃	6.6	6.0	169.5	76.1	1.4605
9	209.2-214.4	〃	6.0	5.7	165.1	74.4	—
10	214.4-222.5	〃	5.5	4.9	160.2	71.7	—

Table 4. Fractionation of Linoleic and Linolenic Series Fatty Acids

Fraction no.	Methyl ester			Fatty acid			
	B. p.,		Yield, wt. (g.)	Yield, wt. (g.)	N. V.	I. V. (W ₁₃ S)	n _D ¹⁵
	°C.	mm.					
1	-173.0	5	3.5	3.0	194.1	70.0	1.4559
2	173.0-183.2	〃	3.0	2.6	190.5	98.2	1.4619
3	183.2-191.4	〃	2.9	2.5	189.2	132.7	1.4654
4	191.4-200.8	〃	1.5	1.3	186.3	169.3	1.4686

Table 5. Fractionation of Highly Unsaturated Fatty Acids

Fraction no.	Methyl ester			Fatty acid			
	B. p.,		Yield, wt. (g.)	Yield, wt. (g.)	N. V.	I. V. (W.I.J.S)	n_D^{15}
	°C.	mm.					
1	—141.8	5	1.5	1.1	223.7	83.5	1.4753
2	141.8—152.2	ク	1.5	1.2	211.5	91.0	1.4660
3	152.2—162.6	ク	2.5	2.1	196.3	122.3	1.4648
4	162.6—173.0	ク	9.0	8.5	189.4	152.7	1.4677
5	173.0—183.2	ク	1.4	1.1	178.1	199.6	1.4759
6	183.2—193.5	ク	2.1	1.8	173.6	255.3	1.4801
7	193.5—198.6	ク	1.0	0.7	170.1	305.7	1.4876

(3) ペーパークロマトグラフィー

a. 装置及び操作 先の報文と同じ装置を使用し、操作も略々これに従い下降法で行った。即ち、使用濾紙は、東洋濾紙 No. 2 (機械濾) 2.5cm×60cm, 固定液相は石油炭化水素 (沸点 140~170° の石油溜分を精製したもの), 移動液相は石油炭化水素飽和メタノール (石油炭化水素は固定液相に用いたものと同じもの) を使用し、展開温度は 10° で行なった。尙試料脂肪酸の石油炭化水素溶液の濃度は 5~10 %, 滴下量は 0.001~0.01cc で行なった。

呈色は 0.2 % のブロム・クレゾール・グリーン酒精溶液 (苛性カリを加え弱アルカリ性側に調整したもの) による方法と、5~8 % の沃度酒精溶液を用いる方法の 2 種を行なった。前者では、展開終了後直ちに発色液を噴霧すれば脂肪酸の部分は青色地に黄色のスポットとなつて現われる。但しパルミチン酸以上の高級酸ではスポットの形状が長い紡錘形となり、相互分離は少々不完全となる。後者では、展開終了後 5 分乃至 10 分空气中に放置し、濾紙片に附着しているメタノール及び石油炭化水素が殆ど揮発し去つた後発色液を噴霧すると、10 分乃至 15 分位にして過剰の沃素は昇華し去り、不飽和酸の部分のみが白地に褐色の鮮明なスポットとなつて残る。その輪廓は拋物線状になり、その頂点に相当する上端部が最も呈色濃厚で下端部にうすれている。相互分離は非常によく且飽和酸の部分は全然呈色しないので、不飽和酸の検出に優れていた。尙ブロム・クレゾール・グリーンでも不飽和酸の検出は出来るが、沃素法に比すればかなり劣る。

依つて本実験の呈色は、先ずブロム・クレゾール・グリーンで飽和酸を検出し、続いて沃素で不飽和酸を調べた。この際、ブロム・クレゾール・グリーンは沃素の呈色に全然影響しない。尙飽和酸に比し不飽和酸の量が大なる試料の際は、ブロム・クレゾール・グリーンによる呈色の時、不飽和酸の経路上に長い尾を引くので、飽和酸の検出は困難であつた。

b. 標準脂肪酸

本実験に用いた標準脂肪酸は、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、オレイン酸、鯨油酸、リノール酸及びリノレン酸の 8 種であつて、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸は Merck 又は Kahlbaum の製品を精製し、アラキジン酸はステアリルアルコールから沃化ステアリルを経てマロン合成し、オレイン酸はオリーブ油から主として LAPWORTH 等の方法⁸⁾ に従つて、鯨油酸は鯨油から外山氏の方法⁹⁾ に従つて製取した。又リノール酸及び

リノレン酸は夫々大豆油及び亜麻仁油から四臭化ステアリン酸及び六臭化ステアリン酸を得、脱ブロム後、メチルエステルを精溜鹼化して得た。

以上8種の標準脂肪酸の性状を表示すると Table 6 の如くである。

Table 6. Properties of Standard Fatty Acids

Acid	M. p., °C.	B. p.,		n_D^{20}	N. V.	I. V. (W.I.S.)	Bromide, m.p., °C.
		°C.	mm.				
Myristic	54.0	190.5	10	—	245.2	—	—
Palmitic	63.1	209.5	〃	—	219.4	—	—
Stearic	69.5	227.0	〃	—	196.9	—	—
Arachidic	75.0	—	—	—	179.0	—	—
Oleic	13.3	231.0—233.5	15	1.4588 ²⁰	199.5	89.0	—
Cetoleic	32.0—33.5	—	—	1.4531 ⁴⁵	165.3	74.5	—
Linoleic	—	229.0—231.3	15	1.4692 ²⁰	200.8	180.7	114
Linolenic	—	229.1—231.5	〃	1.4796 ²⁰	202.1	272.6	180

c. 脂肪酸の同定

先ず, Table 2, Table 3, Table 4 及び Table 5 より各フラクションに就て含有脂肪酸を推定し, 標準脂肪酸の R_F 値と比較して, 更にその標準脂肪酸を試料に混合し同一濾紙片上で展開させた場合, スポットが全く重るか否かをも確めて同定を行つた。

d. 実験結果

この方法によるペーパークロマトグラフィーは僅かの条件の差で R_F 値が移動し易い傾向があるため, 常に2種以上の標準脂肪酸と同一シリンダーで行い標準脂肪酸の R_F 値から未知試料の R_F 値を補正して条件による誤差を防いだ。

この結果を Table 7, Table 8, Table 9 及び Table 10 に示す。

Table 7. R_F Values of the Fraction of Saturated Fatty Acids

Fraction no.	S ₁	S ₂	S ₃	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U ₆	U ₇
1		0.48	(0.57)						(0.58)
2	(0.35)	0.49				(0.38)	(0.42)	<u>0.51</u>	
3	<u>0.34</u>	0.47				0.34	<u>0.44</u>	0.52	
4	0.32					0.37	0.42	0.51	
5	0.32				0.27	<u>0.36</u>	0.42	(0.49)	
6	0.34				<u>0.28</u>				
7				0.23	<u>0.29</u>				
8				0.22					
Standard fatty acids	0.34 Stearic	0.48 Palmitic	0.59 Myristic		0.30 Cetoleic			0.50 Oleic	

Table 8. R_F Values of the Fraction of Oleic Series Fatty Acids

Fraction no.	U_1	U_2	U_3	U_4	U_6	U_7
1				(0.43)	0.49	<u>0.56</u>
2				0.42	0.50	<u>0.55</u>
3				0.42	<u>0.51</u>	(0.57)
4			(0.37)	0.41	<u>0.50</u>	(0.56)
5			0.34	0.40	<u>0.49</u>	(0.57)
6		(0.30)	0.35	<u>0.44</u>	(0.51)	
7		0.31	<u>0.35</u>	0.42		
8		0.30	<u>0.34</u>			
9		0.28				
10	0.23	<u>0.29</u>				
Standard fatty acids		0.30 Cetoleic			0.50 Oleic	

Table 9. R_F Values of the Fraction of Linoleic and Linolenic Series Fatty Acids

Fraction no.	U_2	U_4	U_6	U_6	U_7	U_8	U_9	U_{10}	U_{11}
1				0.52	<u>0.54</u>	(0.61)			
2		0.40	0.45	<u>0.50</u>	[0.56			0.70]	
3			0.44	0.51	[0.55			0.73]	
4	0.30	0.40					<u>0.66</u>		0.79
Standard fatty acids	0.30 Cetoleic			0.50 Oleic		0.57 Linoleic	0.64 Linolenic		

Table 10. R_F Values of the Fraction of Highly Unsaturated Fatty Acids

Fraction no.	U_3	U_4	U_6	U_8	U_9	U_{10}	U_{11}	U_{12}
1				<u>0.60</u>		(0.72)		
2			0.52	[0.59		0.75]		
3		0.42	<u>0.52</u>	[0.58		0.74]		
4		0.43	0.51	[0.60		0.76]		
5	(0.35)	0.42	[0.52		0.68]			
6	(0.34)	(0.41)	0.50		[0.64		0.78]	
7	(0.34)	(0.42)			<u>0.66</u>			0.84
Standard fatty acids			0.50 Oleic	0.57 Linoleic	0.64 Linolenic			

但し、表中の「Fraction no.」は Table 2, Table 3, Table 4 及び Table 5 の「Fraction no.」に相当する。S₁, S₂ 及び S₃ は飽和酸を意味し、U₁, U₂, ……及び U₁₂ は不飽和酸を意味し、「()」はフラクション中最も呈色度の小なるもの、「 」は最も大なるもの、「[—]」はスポットの連続を意味する。

この結果より S_1 はステアリン酸, S_2 はパルミチン酸, S_3 はミリスチン酸, U_2 は鯨油酸, U_6 はオレイン酸である事を確認した。尚 U_1 はテトラコセン酸, U_7 はヘキサデセン酸, U_8 はリノール酸, U_9 はリノレン酸, 又 U_3 , U_4 の中何れかはエイコセン酸と推定出来る。又 U_{11} 及び U_{12} は炭素数 20 及び 22 の高度不飽和酸と推定出来る。

以上の結果より油鯨油脂肪酸は, 飽和酸は主としてステアリン酸, パルミチン酸, および少量のミリスチン酸より成り, 不飽和酸は主として鯨油酸, オレイン酸より成り, そしてその他リノール酸, リノレン酸, ヘキサデセン酸, エイコセン酸, テトラコセン酸, 高度不飽和酸等 10 種以上の不飽和酸が含まれていると推定出来る。

Ⅱ 考 察

以上述べた如く, このペーパークロマトグラフィーによつて分析すると, 塩類法及び蒸溜法によつて 29 に細分別されたフラクションも尚且数種或はそれ以上の脂肪酸が含まれている事を示している。而もこの方法によると飽和酸と不飽和酸との区別が明瞭であり, 天然脂肪酸の分析に有効である事を知つた。

Table 9 及び Table 10 に於てスポットが連続しているのは, オレイン列の比較的低级なものとしリノール・リノレン列の R_F 値が相近似している事, 又リノール・リノレン列の異性体の複雑さに原因するものと考えられる。

又不飽和酸の沃素による発色は, その化学的機構の詳細は不明であるが, 呈色が時間と共にうすれて行く点よりして, 不飽和部の π 電子に起因する沃度分子の不安定な吸着であろうと考えられる。

次に本実験の結果より, 従来常法として行われて来た脂肪酸の分別法である塩類法及び蒸溜法に就て検討する。

先ず鉛塩アルコール法に就てみると Table 7 で分る如く, 固体酸として分離されたフラクションにも尚相当の不飽和酸が含まれている。即ち, 微量のヘキサデセン酸, 少量のオレイン酸, そしてエイコセン酸は相当部分, ドコセン酸以上になると大部分が含まれている様である。又 Table 8 では飽和酸のスポットを検出する事は出来なかつたが, これは上述の如く, 不飽和酸が多量存在するため, 低溜分に少量のミリスチン酸が含まれている事は Table 3 より容易に想像出来る。次にリチウム塩アルコール法をみると Table 9 で明かな如く, リノール・リノレン列として分離されたフラクションに相当量のオレイン列が入り, 又 Table 10 で示されている如く, 高度不飽和酸部として分別されたものの中にも, リノール・リノレン列が, そして更にオレイン列も相当量混入している。

かくの如く, 塩類による脂肪酸の分別法はかなり不完全である事を知つた。勿論本実験に用いた油鯨油脂肪酸は, オレイン列に比較して, リノール・リノレン列及び高度不飽和酸がかなり少量のため, 他の魚油の分別の際以上にかかる傾向が著しく現われた事は考慮の必要がある。

蒸溜法に就てみると, Table 7, Table 8, Table 9 及び Table 10 で明かな如く, 各脂肪酸ともかなり広範囲に亘つて出て居り, 蒸溜法による脂肪酸相互の分別は不完全である。

IV 要 約

1. 石油炭化水素を固定液相とし石油炭化水素飽和メタノールを移動液相として展開し、プロム・クレゾール・グリーン酒精溶液及び沃度アルコール溶液で呈色するペーパークロマトグラフィーは、天然脂肪酸特に不飽和脂肪酸の分析に有効である。
2. 油鯨油脂肪酸は少くとも 15 種以上の脂肪酸から成つて居り、その中ステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、及び鯨油酸を確認した。
3. 炭素数の異なる多種類の脂肪酸が混在する場合には、塩類法及び蒸溜法による脂肪酸の分別はかなり不完全となることを認めた。

本研究に当り御懇篤なる御指導を賜つた京都大学農学部井上教授に対し深甚の謝意を表する。

文 献

- (1) 井上, 野田: 農化, **26**, 634 (昭 27); **27**, 50 (昭 28).
- (2) 辻本: 工化, **30**, 402 (昭 2); **40**, 368 (昭 12).
- (3) 上野, 小森: 工化, **38**, 833 (昭 10).
- (4) 広瀬: 工化, **33**, 535 (昭 5).
- (5) HILDITCH: The Chemical Constitution of Natural Fats, Chapman and Hall, London, 1949, p. 468.
- (6) 辻本: 工化, **23**, 1007 (大 9).
- (7) MOORE: J. Soc. Chem. Ind., **38**, 320T (1919).
- (8) LAPWORTH, PEARSON and MOTTRAM: Biochem. J., **19**, 7 (1925).
- (9) 外山: 工化, **9**, 533 (大15).

Summary

To analyse the fatty acids of the oil of *Reinhardtius matsuurae*, paper chromatography has been applied, in which petroleum hydrocarbon (b. p., 140~170°) was used as stationary liquid phase and methanol—petroleum hydrocarbon as mobile phase. This paper chromatographic technique was effective on the separation of the fatty acids, especially of the unsaturated fatty acids when a 5~8% solution of iodine in alcohol was employed as the spray reagent. It has been found that the fatty acids of the oil of *Reinhardtius matsuurae* are composed of myristic, palmitic, stearic, oleic, cetoleic, and more than 10 kinds of other unsaturated fatty acids. The separability of fatty acids by the metallic salt and distillation methods is also discussed.