

# ガスクロマトグラフィーによる組織中のコハク酸 および他の二塩基性酸の一定量法

宮原昭二郎 ・ 田端 義明

## A New Gas Chromatographic Method for the Determination of Succinic Acid and Other Di-basic Acids in Tissue

Shojiro MIYAHARA and Yoshiaki TABATA

There are various method hitherto employed to determine the contents of succinic acid in the tissue of aquatic animals, but the methods are troublesome. So far as we know, no reports have been made as to the gaschromatographic determination method for the succinic acid and other di-basic acids. But the authors have found out a method to determine these acids by the gaschromatography, in which the succinic acid contained in the tissue and other acids are changed into those dimethyl esters and dissolved in methanol, thus butanediol succinate polyester to serve as column.

By this method we could obtained the graph of oxalic, malonic, succinic, glutaric and adipic acids as shown in fig. 4. This method gives very reliable quantitative results without being disturbed by other substances when it was applied to the components of the tissue. Baby clams and oysters contained 0.354 and 0.096 per cent succinic acid respectively, but no oxalic, malonic, glutaric and adipic acid could be detected.

### 緒 言

水産物の中にはコハク酸を含んでいるものが少なくない。コハク酸の定量法としては、従来、いろいろの方法があるが、いずれも比較的はん雑で手間がかかり、そのために測定誤差が大きくなることも考えられる。それでガスクロマトグラフィーによって、コハク酸の簡単な定量法を確立しようとするのを本研究の目的とするが、同時にコハク酸に類似する二塩基性カルボン酸の分離・定量も同時に行なった。

二塩基性酸のガスクロマトグラフィーについては、NOWAKOWSKA ら<sup>1)</sup> がはじめて報告して以来、JAMES ら<sup>2)</sup>、TEPE ら<sup>3)</sup> その他<sup>4,5)</sup> の報告があるが、これらは定性を主としたものであったり、あるいは固定相の性能に関するものであって、動物体成分への応用はまだ行なわれていないようである。

筆者らは前記の研究者らが用いたカラム、およびポリエステル系のカラムについて検討した結果、ブタンジオールコハク酸ポリエステルをカラムとし、二塩基性酸はジメチルエステルとして分離する方法が最もよいことがわかったのでここに報告する。

## 実 験

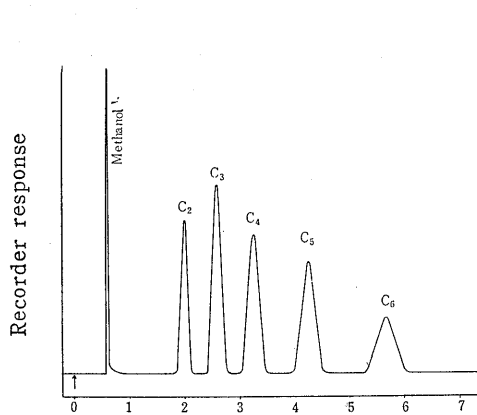
### 1. ガスクロマトグラフィーの条件

CRAIG<sup>6)</sup>の方法によって、合成したブタンジオールコハク酸ポリエステル(平均重合度約800)をシマライトCに10% coating し、長さ 2m、内径 4mm のカラムとした。キャリアーガスはヘリウムを用い、流速は毎分 36cc とし、水素焰式検出器(柳本製 GCG-500型)を用いたので、同時に水素の流速は毎分 60cc とした。カラム温度は 220°C (検出器温度 250°C) で分離を行なった。

### 2. 二塩基性酸ジメチルエステルของガスクロマトグラフィー

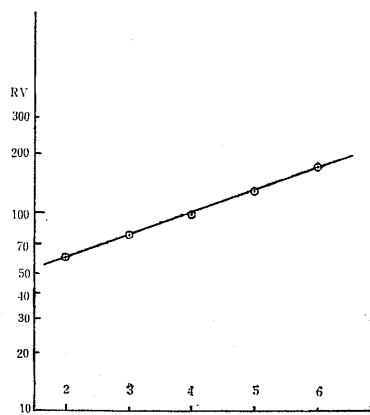
標準物質としてのシュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸およびアジピン酸の計5種の二塩基性酸のジメチルエステルを各々 10 $\mu$  mol ずつとり、上記のカラムで分離を行なうと Fig. 1 のようなクロマトグラムが得られる。

このときの各ピークの、Rv と二塩基性酸の炭素数との関係を示すと Fig. 2 のようになる。



Time (min.)

Fig. 1.



Number of carbon atoms

Fig. 2.

Fig. 1. Separation of mixture of di-basic acid dimethylesters.

Identification : C<sub>2</sub> oxalic acid, C<sub>3</sub> malonic acid, C<sub>4</sub> succinic acid, C<sub>5</sub> glutaric acid, C<sub>6</sub> adipic acid.

Conditions : Column 2m butanediol succinate polyester, temp. 220°C, carrier gas Helium, flow rate 36cc/min., detector H<sub>2</sub> flame type, detector temp. 250°C, flow rate of H<sub>2</sub> 60cc/min.

Fig. 2. Relation between retention volume (Rv) and number of carbon atoms of di-basic acid dimethyl esters.

### 3. 生体成分への応用, コハク酸のジメチルエステル化および回収率

カイ類〔アサリ *Tapes japonica* (粗脂肪0.54%を含む) およびマガキ *Crassostrea gigas* (粗脂肪1.55%を含む)〕の一定量を取り、細切し、水で5分間振とうして抽出し、更に残さを沸とう水で5分間抽出して両抽出液を一緒にし(抽出液Aとする)、それを蒸発乾固して無水メタノールと少量の濃硫酸を加えて30分加熱し、冷却後ナトリウムメトキ

サイドで硫酸を中和し、メタノールで一定容にメスアップしたものをガスクロマトグラフの試料として分離を行なうと Fig. 3 のようになり、Fig. 1 のコハク酸のジメチルエステルに相当する位置にピークが出る。

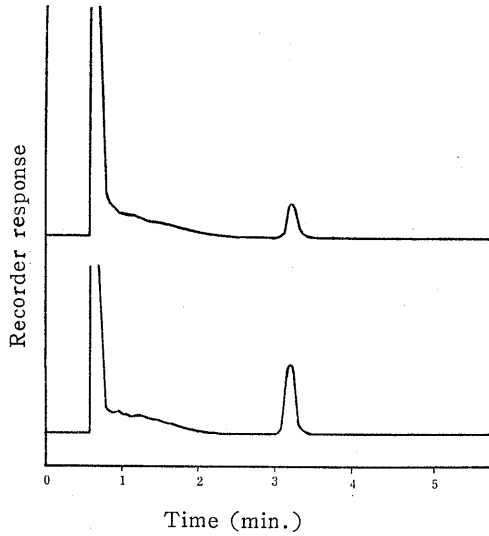


Fig. 3. Chromatograms of succinic acid dimethyl ester converted from succinic acid in baby clam and oyster.

Conditions as in Fig. 1.

Lower : Solution extracted with water of baby clam (*Tapes japonica*, contained 0.54% crude fat).

Upper : Solution extracted with water of oyster (*Crassostrea gigas*, contained 1.55% crude fat).

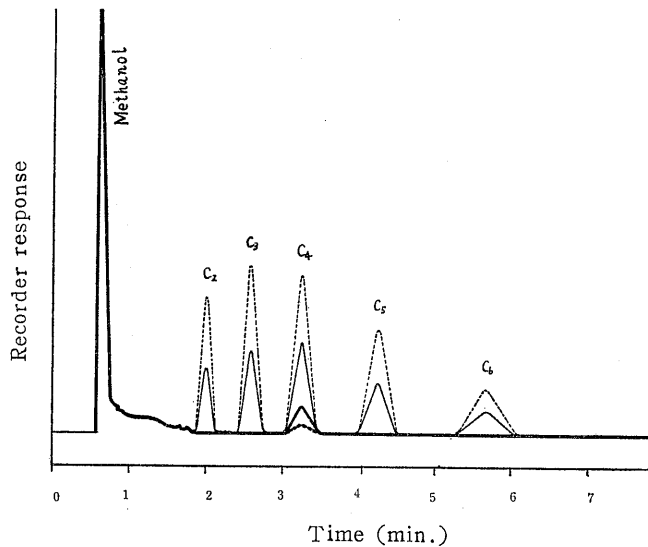


Fig. 4. Chromatograms of succinic acid in tissue of shell-fishes, and of added di-basic acids to extracted solution of shell-fish. Conditions and peak identification as in Fig. 1.

..... Solution extracted with water of oyster.

— Solution extracted with water of baby clam.

— Solution added each of 5g of di-basic acids to solution of baby clam.

..... Solution more added each of 5g of di-basic acids to upper solution.

Table 1. Recovery of dimethyl esters on the esterification of di-basic acids adding into shell-fish extracts.

Di-basic acid	Peak area (mm <sup>2</sup> ) and recovery (brackets)		
	10 / mol	20 μmol	40 μmol
C <sub>2</sub> Oxalic	24.1	47.5 [ 98.55]	98.9 [102.59]
C <sub>3</sub> Malonic	40.5	82.1 [101.36]	164.1 [101.30]
C <sub>4</sub> Succinic	37.2	75.8 [101.88]	153.0 [102.82]
C <sub>5</sub> Glutaric	35.9	71.9 [100.14]	145.2 [100.97]
C <sub>6</sub> Adipic	26.5	52.1 [ 98.30]	107.2 [101.13]

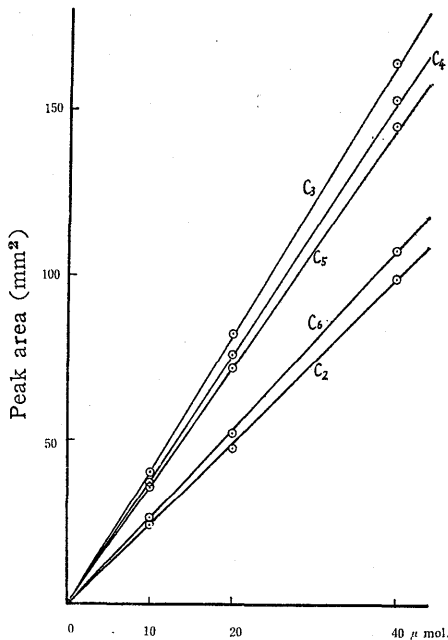


Fig. 5. Calibration curves for the estimation of di-basic acid dimethyl esters. Identification as in Fig. 1.

次に抽出液Aに5種類の二塩基性酸をそれぞれ一定量ずつ加えたものを蒸発乾固し、メタノールと濃硫酸を加え30分間加熱し、冷却後ナトリウムメトキサイドで中和したもの、および更に一定量の5種類の二塩基性酸を加えて、同様に処理したものとをガスクロマトグラフにかけると Fig. 4 のようになる。

これらの場合、加熱後の中和の操作を行わない場合でも、全く同様のガスクロマトグラムが得られる。

この Fig. 4 の二つの曲線が表わすピーク面積、および Fig. 1 のピーク面積から、5種類の二塩基性酸ジメチルエステルの回収率と検量線とを同時にもとめることが出来る。

回収率は Table 1 に検量線は Fig. 5 に示す。

また Fig. 3 からアサリ中には0.354%、マガキ中には0.096%のコハク酸を含むことが計算される。なお、シュウ酸、マロン酸、グルタル酸、アジピン酸は含まれていない。

#### 4. 脂肪酸メチルエステルの分離に及ぼす影響

5種類の二塩基性酸ジメチルエステル各 10 μmol と、50 μl のサバ油脂肪酸メチルエステルとの混合物のガスクロマトグラムは Fig. 6 の通りである。

次にアサリ肉 10g からの水抽出液の乾固物に、別途に抽出したアサリ油 (予め C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>18</sub><sup>-</sup>, C<sub>18</sub><sup>=</sup>, C<sub>22</sub><sup>-</sup> を含むことを確認したもの) 1.0g を加え、かつ、コハク酸をも 0.03g 加えて前記 2 および 3 と同様にメチルエステル化し、そのガスクロマトグラムをとると Fig. 7 のようになる。

いずれの場合もコハク酸ジメチルエステルは、他のエステル類から完全に分離することが出来る。

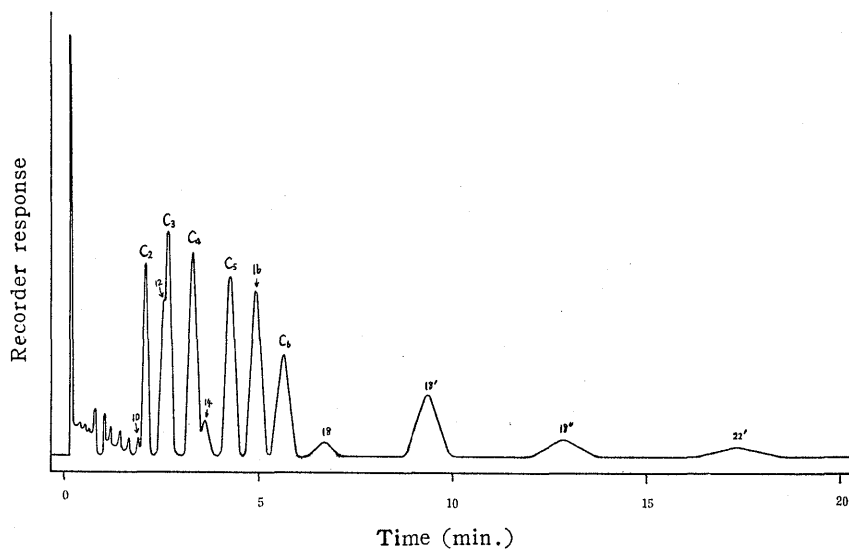


Fig. 6. Chromatogram of mono-basic and di-basic acids.  
Conditions as in Fig. 1.  
Identification : C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub> di-basic acid, 10~22' mono-basic acid.

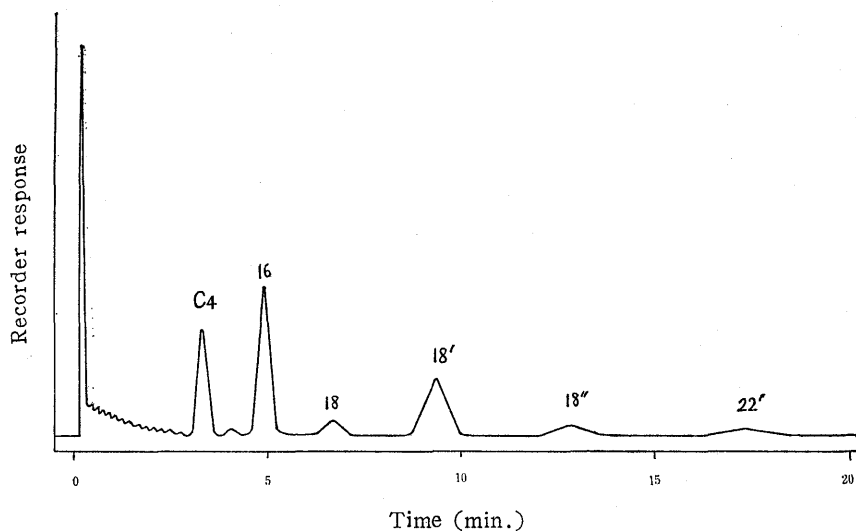


Fig. 7. Chromatogram of esterified mixture of baby clam extract,  
oil and succinic acid.  
Conditions as in Fig. 1.  
Identification : C<sub>4</sub> succinic acid, 16~22' mono-basic acid.

## 考 察

Fig. 1 の二塩基性酸ジメチルエステルのガスクロマトグラムについては、その理論段数は998を与え(コハク酸)、また Fig. 2 に示すように各ピークの  $R_v$  と二塩基性酸の炭素数との関係が直線になることから、この分離・定性は充分であると云うことが出来る。

次にこの分離・定性を生体成分に応用する場合、ジメチルエステル化が完全に行なわれるかどうか、換言すれば回収率は充分であるかどうかが問題になるが、この点に関しては、二塩基性酸の添加量に比例して、二塩基性酸ジメチルエステルの表わす面積が増大すること(Fig. 4 および Table 1)により回収率は充分であると云うことが出来る。第5図の検量線は原点と  $10\mu\text{ mol}$  の点とを結んだものであるが、 $20\mu\text{ mol}$  および  $40\mu\text{ mol}$  の点は殆んどその直線上にあると云って差支えないから、このことから回収率が充分であることがわかる。すなわち、面積の測定によって、原二塩基性酸の定量も可能である。

また、生体成分中の脂肪分が試料抽出液中へ混入した場合、それから生じる脂肪酸メチルエステルが二塩基性酸ジメチルエステルの分離に影響を与えないかと云う点については、Fig. 6 に示すとおり、二塩基性酸ジメチルエステルに対して相当多量の脂肪酸メチルエステルがあるにもかかわらず、分離は良好である。生体が多量の脂肪分を含んでいる場合、水または熱水で組織中の可溶成分を抽出するとき、脂肪分が抽出液の表面に浮くことがある。そのような場合はその脂肪分は捨て去ればよいわけであるが、捨てずにそのまま水分のみを除いてメチルエステル化し、ガスクロマトグラフの試料とした場合でも二塩基性酸ジメチルエステルの分離は良好であって、このカラムを用いるかぎり、生体成分中には二塩基性酸ジメチルエステルのピークに影響を及ぼすような物質はないと云うことが出来る。

Fig. 7 はアサリ(コハク酸0.3%を含む)抽出液に更に同量のコハク酸を追加し、かつアサリ油(別途に抽出したもの)を原料の10%加えたものを試料とした場合の分離曲線であるが、このようにコハク酸量に対し脂肪がはなはだしく多い場合でも、コハク酸エステルのピークは鮮鋭である。すなわち、かなり多量の脂肪があってもコハク酸の定性・定量には何ら影響を及ぼさない。

また実験3で記したように、エステル化した後の試料を中和しても中和しなくてもガスクロマトグラムは全く同一のものが得られ、 $R_t$  やピーク面積に差は表われない。このことはこの分析法の迅速化のための一つの利点である。ただし、出来るだけ中和した試料を用いることが、カラムの寿命を長くすると云う点において、有利であることは、もちろんである。なお、メチルエステル化の際に生ずる少量の水は分離の際メタノールと殆んど同時に析出するから、分離には全然影響を与えない。

また Fig. 5 および記録計の感度(Fig. 5 の場合の100倍にすることが出来る)から、この方法による二塩基性酸の最小検出量は  $0.004\mu\text{ mol}$  (シュウ酸では  $0.36\mu\text{g}$ 、またコハク酸では  $0.46\mu\text{g}$ ) である。

## 要 約

1. シュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸およびアジピン酸をジメチルエステルに変えブタンジオールコハク酸ポリエステルを固定相とするガスクロマトグラフィーによって分離、定量することができた、

2. この方法を生体成分中の二塩基性酸に応用する場合、回収率は充分に良く、ジメチルエステル化することが出来る。

3. 生体中の他の物質はこの方法に何ら影響を与えない。また定性・定量の場合、エステル化に要した硫酸も何ら影響を与えない。

4. この方法によってアサリ中に0.354%、マガキ中に0.096%、のコハク酸が含まれることがわかった。なおシュウ酸、マロン酸、グルタル酸、アジピン酸は含まれていない。

この研究の大要は昭和39年4月2日、日本水産学会年会において口頭発表した。

## 文 献

- 1) NOWAKOWSKA, J., E. H. MELVIN and R. WIEBER : *J. Am. Oil Chem. Soc.* **34**, 411-414 (1957).
- 2) JAMES, A. T. and J. WEBB : *Biochem. J.* **66**, 515-520 (1957).
- 3) TEPE, J. B. and H. J. WESSELMAN : *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* **47**, 457-458 (1958).
- 4) BARTSCH, R. C., F. D. MILLER and F. M. TRENT : *Anal. Chem.* **32**, 1101-1103 (1960).
- 5) DORFNER, K. : *J. Chromatog.* **4**, 502-503 (1960).
- 6) CRAIG, B.M. and N. L. MURTY : *J. Am. Oil Chem. Soc.* **36**, 549 (1959).