

ヨウ素価測定におけるハロゲン付加物の高速液体クロマトグラフィーによる同定

鈴木 義仁, 小泉 均^{®*}

(1989年6月24日受理)

不飽和結合の定量に利用されるヨウ素価はウィイス試薬やハヌス試薬を用いて、オレフィン性二重結合へハロゲンを付加させ消費されたハロゲンをヨウ素等に換算して求めている。このような試薬を用いる反応では試料量、反応時間などによりヨウ素価は異なる値を示すことが知られている。本報ではウィイス試薬、ハヌス試薬、及び臭素溶液を用いて付加反応によって得られたハロゲン付加物を HPLC により分離・定性分析し、これらの試薬との反応によって、どのような付加物が得られるかを明らかにした。スチレンへの付加反応では使用した試薬の違いによるハロゲン付加物は HPLC で分離できた。しかし長鎖不飽和脂肪酸の付加物ではハロゲン種の違いに基づく相互の分離は達成できなかった。保持の近接した付加物ピークについては分取後、酸素フラスコ燃焼法によりハロゲンイオンとしてイオンクロマトグラフィーにより付加したハロゲン種を同定し、その HPLC による分離挙動を明らかにした。

1 緒 言

ヨウ素価の測定は油脂化学や食品化学において、古くより油脂中の不飽和酸の総定量が必要な場合に採用されており、ウィイス法やハヌス法として一塩化ヨウ素又は一臭化ヨウ素を酢酸溶液として反応させ、余剰の試薬量をチオ硫酸ナトリウム標準溶液で滴定することによって測定している^{1)~5)}。

又、工業化学の分野においても各種の物質中の不飽和化合物をハロゲン付加を利用する方法によって定量分析をしている⁶⁾。しかし、これらの方法は分析する試料や対象となる化合物に適切な反応条件を選ぶことが必要とされている。例えば、ウィイス法によって油脂中の不飽和酸総量を求める際には含有されている不飽和酸をあらかじめ予測して反応条件を設定することが必要となる。そのため、組成が甚しく異なる際には、反応時間を一定として反応させてもオレイン酸やリノール酸の含有量によって測定値が変わることが知られている。これは付加反応が試薬に用いるハロゲンの種類によって、その付加選択性が異なるためと考えられる。そのため、ハロゲンの種類を異にするウィイス法とハヌス法では同一試料についての測定値は異なってくる。従って、分析値にはい

ずれの方法で測定したかを必ず明記することとしている³⁾。

そこで、本報ではこれらの二つのヘテロハロゲン試薬及び臭素溶液を試薬として用いる付加反応によって得られたハロゲン付加物を HPLC によって分離・定性分析し比較検討を行って、ヨウ素価測定時にどのような付加生成物が得られるかを明らかにした。

HPLC でヘテロハロゲン付加生成物ピークの相互分離が困難な際には、HPLC 溶離物を捕集した後酸素フラスコ燃焼法を用いて、付加生成物を燃焼分解した後、イオンクロマトグラフィーを行って付加生成物中のハロゲン種を明らかにしてピークを同定した。以下、これらの検討結果について記載する。

2 実 験

2.1 装 置

高速液体クロマトグラフィー装置は日本分光製 HPLC, Twinkle 型に検出器として UVDEC-100 V 型及び記録計として SIC Chromatocorder 11 を、又、カラムには東京化成工業製 Kaseisorb ODS (4.6×250 mm) を用いて逆相系での分析を行った。又、イオンクロマトグラフは横河電機 IC-100 を用い、プレカラムに PAM3-035, 分離カラムに SAM3-075 を用いて分析した。

* 山梨大学工学部化学生物工学科: 400 山梨県甲府市武田 4-3-11

2・2 試 薬

ハヌス試薬は一臭化ヨウ素 (関東化学一級) 0.40 g を 20 ml の氷酢酸に溶解したものである。ウィイス試薬は一塩化ヨウ素 (関東化学一級) の 0.40 g を氷酢酸の 20 ml に溶解したものである。臭素 (和光純薬工業特級) 試薬溶液は臭素 0.40 g を四塩化炭素 20 ml に溶解させた。不飽和脂肪酸オレイン酸, リノール酸及びスチレンは東京化成工業特級試薬をそのまま用いた。

2・3 操作手順

不飽和脂肪酸の四塩化炭素溶液 2 ml を遮光メスフラスコ中にとり, これにハロゲン化試薬 2 ml を加える。ときどき振り混ぜながら室温で 2 時間反応させる。反応終了後, 蒸留水 5 ml と四塩化炭素 5 ml とを加えてよく振り混ぜる。これに 10% ヒドラジン水溶液を滴加して溶液が無色となるまで加える。次いで分液漏斗に移し入れ, 水相と四塩化炭素相とに分相し, 四塩化炭素相を更に蒸留水 10 ml で 2 回洗浄をする。四塩化炭素相は減圧下で溶媒を除去して, ハロゲン付加脂肪酸を得た。

2・4 誘導体化

ハロゲン付加脂肪酸は HPLC 検出感度が低いため次のように誘導体に変換して分離・検出を行った。すなわち, 得られたハロゲン付加脂肪酸に 0.1 M 水酸化カリウムのメタノール溶液を滴加し微アルカリ性とした後, 触媒として 18-クラウン-6-エーテルを含む臭化フェナシル 5 mg/ml 濃度溶液 2 ml を加え, 80°C で 60 分間反応させた。

2・5 クロマトグラム測定

①HPLC の移動相はスチレン付加物の場合には 60% メタノール-水, 不飽和脂肪酸付加物では 90% メタノール-水を用いた。流量は特に記載しないかぎり 1.0 ml/min である。又, 検出波長は 254 nm である。

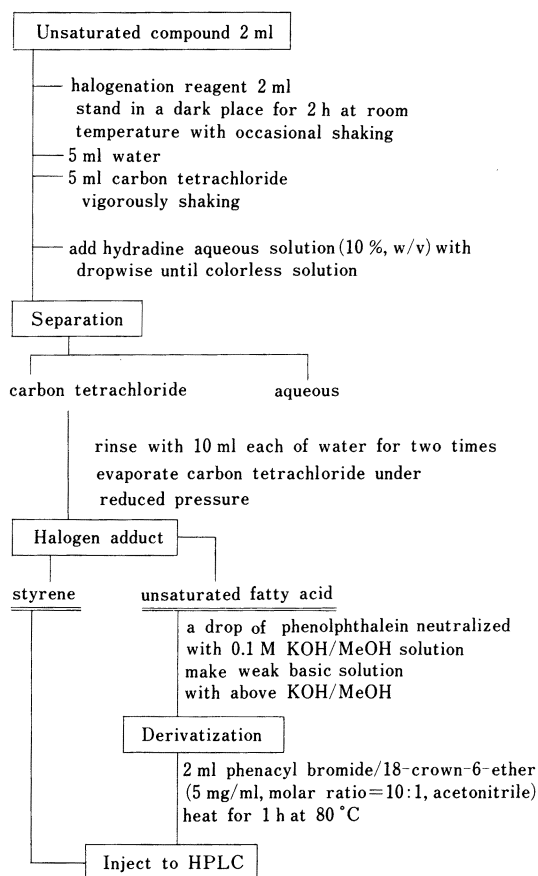
②イオンクロマトグラフはハロゲン付加脂肪酸中のハロゲン元素を特定する際に用いた。横河電機製 IC-100, 中空チューブサプレッサー及び電気伝導度検出器を備えた装置で, 陰イオン用分析カラム SAM3-075 (4.9×75 mm) にプレカラム PAM3-035 (4.6×30 mm) を接続して用いた。溶離液に 4.4 mM Na_2CO_3 と 1.2 mM NaHCO_3 の混合液を 1.0 ml/min の流量で送液した。

2・6 付加ハロゲン種の同定

HPLC により分離分離する各ピーク成分を分取した後, この一定量を無灰濾紙に付着させる。濾紙は酸素フラスコ中で燃焼させ, 0.1%-ヒドラジン水溶液 2 ml と 0.1 M Na_2CO_3 水溶液 5 ml の混合溶液中に吸収させる。吸収液はメスフラスコに移し入れ, 蒸留水で希釈し 10 ml とした後, イオンクロマトグラフィーにより成分中のハロゲン種を同定した。

3 結果と考察

オレイン酸, リノール酸及びスチレンにそれぞれハロゲン化試薬を定法¹⁾に従って反応させ, ハロゲン付加物



Scheme 1 Procedure of halogen adduct for HPLC

Unsaturated compounds: oleic acid, linoleic acid, styrene (2 mg/ml, carbon tetrachloride); Halogenation reagent: Wijs, ICl 0.40 g/20 ml acetic acid; Hanus, IBr 0.40 g/20 ml acetic acid; Bromine, Br_2 0.40 g/20 ml carbon tetrachloride

を得た。オレイン酸及びリノール酸については更に 2・4 の操作手順で HPLC のための誘導体に変換した。一連の操作手順を Scheme 1 に示す。

3・1 オレイン酸付加物の HPLC

Fig. 1 には(A)にオレイン酸に一塩化ヨウ素を、(B)に一臭化ヨウ素を、(C)に臭素溶液をそれぞれ反応させて得られる生成物のクロマトグラムを示した。図中の数字はクロマトグラム上より求めた Kováts index (保持指数) であり、パルミチン酸及びステアリン酸の保持指数を 1600 及び 1800 としてそれぞれを表示したものである。これらのピーク中のハロゲン種は分取した後酸素フラスコ燃焼法でハロゲンを遊離させたうえでイオンクロマトグラフィーで確認を行った。保持指数 1622~1623 は未反応のオレイン酸のピークであり、保持指数 1660 は一塩化ヨウ素付加物、1665 は一臭化ヨウ素付加物、1667 は二臭素付加物のピークであった。

このように、それぞれの付加生成物は Kováts index として分離・表示が可能であるが、HPLC ではハロゲン種の違いによる相互分離はできなかった。これは脂肪酸フェナシル骨格が巨大なため、ハロゲン種の違いに基づく保持差がなくなったものと考えられた。

Fig. 1 より明かなように、一塩化ヨウ素や臭素の反応による付加物は試薬と同一組成のハロゲン付加物が得られたがハヌス試薬による付加では I-Br の反応によるにもかかわらず二臭化物のみが得られた。ここではハロゲン種による交換反応が生じているものと推察される。

一方、一塩化ヨウ素や一臭化ヨウ素試薬を用いた付加反応では未反応のオレイン酸が付加物相対比にして、それぞれ 22%, 60% と極めて多量に残存するが、臭素溶液による付加反応ではわずか 4% となった。これは同一の反応条件 (暗所, 2 時間) のため、ハロゲン試薬による反応速度の大小によりオレイン酸が残存したものである。このことは、ヨウ素価測定の際、試薬の種類によって反応時間を正確に設定するように規定されており、臭素化は短時間でよいとすることを裏付けている。

3・2 スチレン付加物の HPLC

上述のように長鎖脂肪酸フェナシルでは骨格による保持が大きく影響し、そのためハロゲン種の違いによる保持差が生じなくなったものと考えた。そこで、骨格の小さい化合物としてスチレンのハロゲン付加反応について試みた。その結果を Fig. 2 に示した。付加反応の条件は Scheme 1 と全く同一である。Fig. 2 より明かなよ

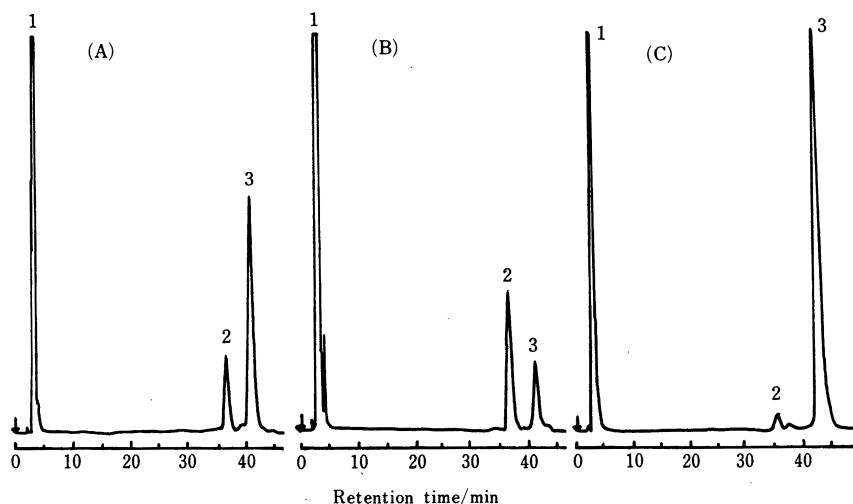


Fig. 1 Chromatograms of halogen adducts of oleic acid

(A) Wijs method ICl: Peak 1, phenacyl bromide; 2, oleic acid (1622); 3, monochloro-, monoiodo-adduct (1660). (B) Hanus method IBr: peak 1, phenacyl bromide; 2, oleic acid (1623); 3, dibromo-adduct (1665). (C) Br₂: Peak 1, phenacyl bromide; 2, oleic acid (1622); 3, dibromo-adduct (1667). () : Kováts retention index; Column: Kaseisorb ODS (4.6 mm i.d. × 250 mm); Mobile phase: MeOH: H₂O(90:10, w/w), 1.0 ml/min; Detector: UV 256 nm

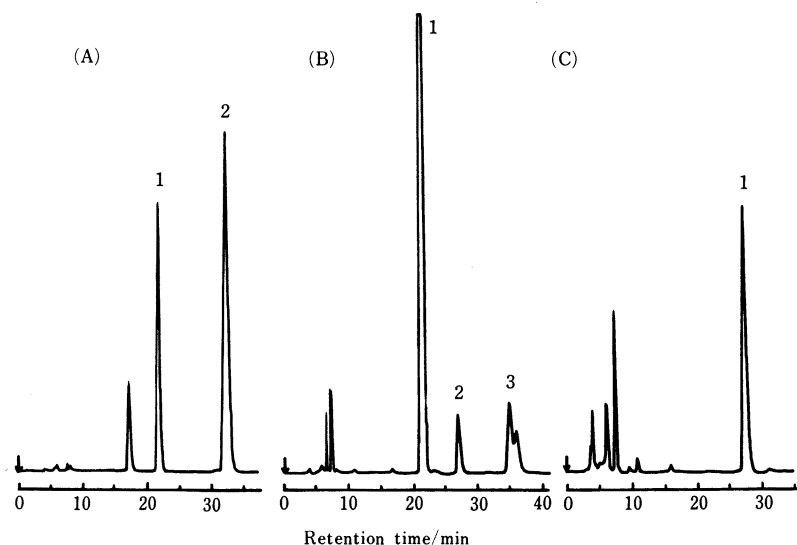


Fig. 2 Chromatograms of halogen adducts of styrene

(A) Wiji's method ICl: Peak 1, styrene; 2, monochloro-, moniodo-adduct. (B) Hanus method IBr: Peak 1, styrene; 2, dibromo-adduct; 3, monochloro-, moniodo-adduct. (C) Br₂: Peak 1, dibromo-adduct. Column: Kaseisorb ODS (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm); Mobile phase: MeOH: H₂O (60:40, w/w), 1.0 ml/min; Detector: UV 254 nm

うに, 反応試薬として使用した臭素溶液, 一塩化ヨウ素, 一臭化ヨウ素の順序で未反応のスチレンのピークが増大しておりオレイン酸の場合と同様に臭素試薬の反応速度が最も大きいことを示している。

一方, ハロゲン付加物ピークの保持時間(分)は二臭化物 27.04, 塩素ヨウ素化物 32.04, 臭素ヨウ素化物 34.6 と 36.1 となり, それぞれハロゲン付加物ピークは HPLC によって明確に分離できることが判明した。このように, 骨格の小さい分子ではハロゲン種の違いによる保持差は大きく, それらが相互に HPLC によって分離できることが分かった。

3・3 リノール酸付加物の HPLC

Fig. 2 から明らかなように, ハヌス試薬による付加反応においてもハヌス試薬の組成と異なる付加物ピークとしてクロマトグラム上に二臭化物のピークがあり, ハロゲン間での交換反応が起きているものと推察される。一方ウィイス試薬では交換反応と見られるピークは認められなかった。リノール酸のハロゲン付加物のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。リノール酸は付加の可能な二重結合を二個を持ち, 二重結合が近接しているためハロゲ

ン付加が立体効果の寄与を受けると考えられ, 得られる付加生成物も多種類であった。Fig. 3 は一臭化ヨウ素付加物のクロマトグラムであるが, これらのピークの特徴はそれぞれの溶離ピークを分取した後, 2・6 の操作を経てイオンクロマトグラフィーでハロゲン種の確認を行った。

これらの不飽和脂肪酸へのハロゲン付加物の保持指標を Table 1 に示す。()内の数字は相対付加物面積パーセントである。クロマトグラム上で, 保持指標 1490 の未反応のリノール酸は臭素付加及び一塩化ヨウ素付加により 2~3% 残存するのみとなるが一臭化ヨウ素試薬では 47% のリノール酸が残存する。

臭素試薬による付加では, 保持指標 1600 と 1621 の二臭化物が生成している。これは 8, 9 位と 12, 13 位に付加したものの異性体であろう。

一塩化ヨウ素試薬による付加では, 生成物はいっそう複雑となり HPLC のみでは明確に定性分析ができなかった。そこで, 溶離するピークを分取して酸素フラスコ燃焼法で生成したハロゲンをイオンクロマトグラフィーで確認を行った。その結果を Table 1 に記載してある。

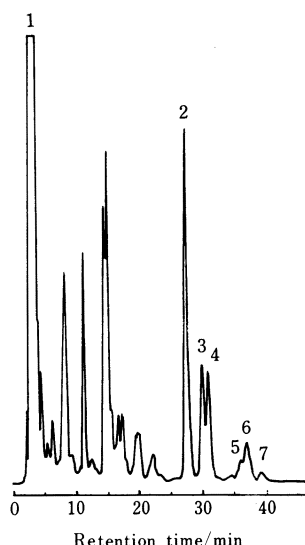


Fig. 3 Chromatogram of halogen adducts of linoleic acid

Hanus method IBr; Peak 1, phenacyl bromide; 2, linoleic acid (1489); 3, dibromo-adduct (1521); 4, dibromo-adduct (1533); 5, monobromo-, moniodo-adduct (1578); 6, monobromo-, moniodo-adduct (1600); 7, monobromo-, moniodo-adduct (1624). () Kováts retention index; Column: Kaseisorb ODS (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm); Mobil phase: MeOH: H₂O (90:10, v/w), 1.0 ml/min; Detector: UV 256 nm

Table 1 Kováts retention index of halogen adducts of unsaturated fatty acids

	IBr	ICl	Br ₂
C18 ⁼	1623(60%)	1622(22%)	1622(4%)
	1665(40%, Br)	1660(78%, Cl-I)	1667(96%, Br)
C18 ⁼	1490(47%)	1489(3%)	1489(2%)
	1521(19%, Br)	1519(12%, Cl-I)	
	1533(19%, Br)	1531(14%, Cl-I)	
	1578(1%, Br-I)	1578(18%, Cl-I)	
	1600(12%, Br-I)	1600(38%, Cl-I)	1600(51%, Br)
	1624(2%, Br-I)	1623(11%, Cl-I)	1621(47%, Br)
		1640(4%, Cl-I)	

C18⁼: oleic acid; C18⁼: linoleic acid.

$$I = 100n + 200 \times \frac{\log V_n - \log V_{n+1}}{\log V_{n+2} - \log V_n}$$

V : retention volume; n : carbon number of fatty acid

例えば、一臭化ヨウ素付加では保持指標 1521 と 1533 のピークはイオンクロマトグラフィーの結果からは臭素のみを含有するものとして検出され、この試薬による交換反応が生じていると考えられる。一臭化ヨウ素試薬中

の組成と異なり臭素のみの付加が優先していることを示している。このことは、ヘテロハロゲン試薬を用いる際には試薬中のハロゲン種による付加選択性が存在することを示唆している。

Table 1 より明らかなように、二重結合へのヘテロハロゲン化の反応は複雑であり、付加生成物も多種のものが生成していることが判明した。又これらの反応の解析に HPLC が有力な分析法であることが元唆された。今後、これらのヘテロハロゲン付加反応の機構を明らかにするには試薬濃度、反応条件、試料量などを変えて付加反応させると共に生成物を分取して MS 分析や NMR を試みる必要があらう。この検討は機会を改めて報告したい。

(1989 年 4 月, 日本化学会第 58 春
季年会において一部発表)

文 献

- 1) 日本油化学会編: “油脂化学便覧”, p. 341 (1958), (丸善).
- 2) 日本分析化学会編: “分析化学便覧”, p. 276 (1981), (丸善).
- 3) 日本油化学会編: “基準油脂分析試験法”, p. 147 (1966), (朝倉書店).
- 4) S. Siggia, J. G. Hanna: “Quantitative Organic Analysis VIA Functional Groups”, 4th ed. p. 373 (1979), (John Wiley and Sons, New York).
- 5) K. Muller: “Functional Group Determination of Olefinic and Acetylenic Unsaturation”, p. 74 (1975), (Academic Press, London).
- 6) A. Polgar, J. L. Jungnickel: “Determination of olefinic unsaturation”; Org. Analysis, Vol. III p. 203 (1956), (Interscience Publishers, New York).

☆

Identification of halogen adducts of olefins in iodine value determination by HPLC. Yoshihito SUZUKI and Hitoshi KOIZUMI (Faculty of Engineering, Yamanashi University, 4, Takeda, Kofu-shi, Yamanashi 400)

Addition reaction of iodine-halogen to olefinic compounds is used for the determination of iodine value, although the value obtained by Hanus method is lower than that by wijs method. In this study, unsaturated compounds such as oleic acid, linoleic acid and styrene were reacted with IBr, ICl and Br₂. For UV monitor, halogen adducts of fatty acids were derivatized with phenacyl bromide. Separation of halogen adducts was investigated with a reversed phase HPLC system. In styrene, halogen adducts were separated each other, but IBr addition resulted in the formation of two bromine adducts. The halogen adducts of long chain unsaturated fatty acids were fractionated by preparative HPLC,

because their HPLC separation was difficult. Fractionated halogen adducts were converted to halide ion by the oxygen combustion flask method. Halogen species were identified by the retention time of anion exchange chromatography and their abundances were determined by peak area. In the case of IBr addition reaction, only bromine adduct was observed for both

oleic acid and linoleic acid.

(Received June 24, 1989)

Keyword phrases

HPLC of halogen adduct; olefinic double bond; iodine value; Hanus and Wijs method.
