

有機酸のペーパークロマトグラフィー

赤塚尹己・佐藤正一・大内毅・平松昭

Paper Chromatography of Organic Acids

TADAMI AKATSUKA, MASAKAZU SATO, TAKESHI OUCHI, and AKIRA HIRAMATSU

1947年 LUGG⁽¹⁾等は paper chromatography による有機酸の分離について報告した。その後揮発性酸不揮発性酸及びケト酸に分けて或は単に有機酸として多くの報告がある。例えば揮発性酸については FINK⁽²⁾ (1949), THOMPSON⁽³⁾ (1951), 井上⁽⁴⁾ (1951)等は hydroxamate として分離を行い, FINK は水飽和の *n*-butanol 或は phenol を, THOMPSON は *n*-butanol-acetic acid-water, iso-amylalcohol-acetic acid-water を井上等は *n*-butanol, ethylacetate, butyrene を各々良好な溶媒として報告している。

佐竹⁽⁵⁾, 山本⁽⁶⁾等は hydrazide として分離し, iso-amylalcohol-lutidine-(collidine) water が良好であると報告している。又 BROWN⁽⁷⁾ (1950), KENNEDY⁽⁸⁾ (1951)等は各々の酸を, ナトリウム塩, 及びアンモニウム塩とし, *n*-butanol-NH₃, ethanol-NH₃, acetone-NH₃, *n*-butanol-ethanol-NH₃ を溶媒として分離を行っている。

不揮発性酸については上記の hydroxamate として分離している他に, LUGG 或は STARK⁽⁹⁾等により報告され, 前者は *n*-butanol-acetic acid-water を好適であると, 後者はブタノール或はフェノール系溶媒など数種について報告している。

ケト酸については CAVALLINI⁽¹⁰⁾ (1949)により, 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative として分離されている。

以上が著者の知る範囲の従前の文献の大略である。

著者等は一次元ペーパークロマトグラフィーにより, 揮発性酸不揮発性酸約20種について各種の溶媒を用いてその分離を検討し, 更に好適な溶媒の検索を試みた結果について茲に報告する。

本研究に当り貴重なる有機酸試料を載きました東大生物化学教室中村道徳氏, 有機化学教室山下恭平氏に対し厚く感謝致します。

尙実験に協力された柴田守君及び当教室の諸氏に感謝致します。

実験の部

(1) 実験方法 一次元上昇法により濾紙は東洋濾紙 No. 2 又は No. 3 を用い, 室温に於いて操作した。展開距離は 26~27cm で展開時間は特記せざる限り, ブタノール系, フェノール系溶媒に於いては 14~15 時間で,

エタノールアンモニヤでは 6 時間で充分であつた。

(2) 溶媒 すべての溶媒は常法⁽¹¹⁾によつて精製したものを下記の如く調製して使用した。

- (i) *n*-butanol-formic acid-water (4:1.5:1)
- (ii) *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:5)
- (iii) phenol-water (35g+10cc)
containing 1% HCOOH
- (iv) phenol-1.5N NH₃ (4:1)
- (v) ethanol-conc. NH₃-water (95:1:5)
- (vi) *n*-butanol-3NNH₃-ethanol (4:3:1)
- (vii) *n*-butanol saturated with 1.5NNH₃
- (viii) iso-amylalcohol-lutidine-water (10:2:1)
- (ix) iso-propanol-acetic acid-water (4:1:1)
- (x) *n*-butanol saturated with water

註 1. formic acid は 80% のものである。溶媒 (iii) の場合にはこれを用いて蟻酸濃度を 1% とするようにした。

2. ブタノール系溶媒はすべて分液漏斗内で混合し 3 日間放置後, 上層部を分離して使用した。
3. lutidine は b. p. 150°~156°C の溜分を用いた。

(3) 呈色試薬

- (i) Bromphenol blue 0.05% alcohol solution
- (ii) 10% アンモニヤ性硝酸銀ブタノール飽和液

不揮発性酸に対しては B.P.B 溶液に *N*/10 NaOH 溶液を添加して僅かに紫色を呈せしめ, 之を噴霧するとき紫色上に黄色の "spot" を得る。揮発性酸の sodium salt の場合には B.P.B 溶液 100 cc に対し 200 mg の citric acid を添加して用いるとき, 橙黄色上に紫青色の "spot" を得るアンモニヤ性 AgNO₃ 溶液は脂肪酸の hydrazide 上に噴霧して 95° の乾燥器中に 2~3 分間加温するとき褐色の "spot" を得る。

(4) 実験結果 第 I 表~第 IV 表の如くである。

a) 第 I 表について 表記の不揮発性酸 13 種について溶媒 (i)~(iv) を用いて比較検討した結果, 著者等の初めて用いた溶媒 (iv) が最も好適なることを認めた。即ちこの溶媒を用いた場合には各種の酸により *R_f* 値が 0.1~0.8 の間に於て個々に特異性を示す場合が多く, 而も tailing が殆どない点で著しく優れている。尙数種の酸については従前の文献値と明らかに異なる *R_f* 値を得た。又東洋濾紙 No. 3 が No. 2 に比較して溶媒 (iv) を

第 I 表 各種溶媒による不揮発性酸の R_f 値

Solvents No.	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(iv)*
Aconitic	0.76	0.77	0.55	0.38	0.42
Citric	0.46 (0.23)	0.47	0.47 (0.26)	0.29	0.30
Fumaric	0.88	0.85	0.64 (0.32)	0.45	0.58
Gluconic	0.03	0.14	—	0.08	0.14
Glutaric	0.81	0.82	0.83	0.82	0.77
Itaconic	0.85	0.85	0.79	0.70	0.68
Lactic	0.73	0.75	0.80	0.75	0.77
Maleic	0.68 (0.34)	0.55	0.68	0.62	0.69
Malic	0.47 (0.34)	0.54	0.65	0.48	0.46
Malonic	0.45	—	—	—	0.43
Oxalic	tailoring (0.06)	tailoring	tailoring (0.18)	tailoring	0.32
Succinic	0.80	0.80	0.81	0.71	0.66
Tartaric	0.35 (0.11)	0.39	0.36 (0.19)	0.26	0.25

室温 19°C, 濾紙—東洋濾紙 No. 2, *—同 No. 3
カッコ内は文献値⁽¹²⁾を示す。

第 II 表 数種の不揮発性酸混合物の分離

Sample.	R_f value
Aconitic, Citric, Gluconic	0.48, 0.29, 0.15
Glutaric, Itaconic	0.81, 0.74
Fumaric, Maleic, Malic, Tartaric, Succinic	0.68, 0.76, 0.50, 0.27, —
Oxalic, Lactic, Tartaric, Glutaric Citric	0.78, 0.28, 0.85, 0.32, —
Oxalic, Lactic, Succinic, Aconitic, Itaconic	0.32, 0.78, 0.66, 0.42, —
*Glutaric, Succinic, Malonic, Citric	0.74, 0.61, 0.44, 0.26

室温 19°C, 溶媒 フェノール—1.5N—アンモニア (4:1)

濾紙—東洋濾紙 No. 3, *—室温 14°C. 17 hrs. 展開

用いた場合好結果を得ることも認められた。

b) 第 II 表について 不揮発性酸について種々の配合組合せをつくり、各種混合酸について著者の初めて用いた溶媒 (iv) を適用した場合、いづれの組合せについても比較的明瞭に分離し得る場合の多いことを実証した。

c) 第 III 表について 表記の揮発性酸 8 種について Na 塩として実験した場合に、個々の酸の実験では明か

第 III 表 各種溶媒による揮発性酸 Na-塩の R_f 値

Solvents No.	(iii)	(iv)	(vi)*	(v)
Formate	0.39	tailoring	0.11	0.13
Acetate	0.32	0.15	0.09	0.10
Propionate	0.32	0.27	0.10	0.12
Butyrate	0.35	0.20	0.12	0.11
iso-Valerate	0.34	0.22	0.13	0.09
iso-Caproate	0.39	0.18		0.11
n-Caprylate	0.35	0.19		0.12
n-Caprinate	0.36	0.14		0.09

室温 19°C, *—室温 14°C, 東洋濾紙 No. 3

第 IV 表 揮発性酸ヒドラゼットの R_f 値

Acids	Formic	Acetic	Propionic	Butyric	iso-Valeric	iso-Caproic
R_f value	0.17	0.34	0.52	0.64	0.72	0.77

溶媒 iso-amylalcohol-lutidine-water (10:2:1)

室温 14°C, 東洋濾紙 No. 3(viii)

な“spot”が得られるが、各酸 R_f 値が相互に近似しているためこれらの酸の混合物から個々に分離確認することは溶媒 (iii)~(vi) では困難であることを認めた。

d) 第 IV 表について 蟻酸からカプロン酸に至る酸即ち C_1 ~ C_6 の各種の有機酸を hydrazide として実験した場合には、個々の酸により種々異なる R_f 値が得られた。佐竹等は C_1 ~ C_5 の酸混合物から 3 種だけ分離したと報告しているが、著者等は hydrazide 化を充分行えば C_1 ~ C_6 の混合物から個々の酸の hydrazide として全部を分離確認できた。

著者等の行つた簡易な hydrazide 化は酸混合物に過剰の hydrazine hydrate と無水アルコールを添加し、1~2 時間逆流冷却器を付けて 100° に加熱した後アルコールを溜去し 130° に 8 時間油浴中で加熱した。

(5) 総括

不揮発性酸 13 種、揮発性酸 8 種をとり、溶媒 10 種を用いて一次元ペーパークロマトグラフィーによる分離を検討した結果を第 I 表~第 IV 表に示した。

不揮発性酸及びそれらの混合物の分離には著者の初めて試みた展開剤 (iv) が好適であることを認めた。

揮発性酸の Na 塩としての分離は困難であつたけれども、揮発性酸の hydrazide として C_1 ~ C_6 の酸では分離確認し得た。

- | 文 献 | |
|---|--|
| (1) Lugg, J.W.H., and B.T.Overell : Nature 160, 87 (1947) | (7) Brown, F. and L.P.Hall : Nature 166, 522 (1950) |
| (2) Fink, K. and R.M.Fink : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 70, 650 (1949) | (8) Kennedy, E.P. and H.A.Barker : Anal. Chem. 23, 1033 (1951) |
| (3) Thompson, A.R. : Nature 163, 390 (1951) | (9) Stark, J.B. and A.E.Goodbau : Anal. Chem. 23, 413 (1951) |
| (4) 井上・野田 : 農化 23, 294 (1950), 24, 295 (1951) | (10) Cavallini, D., Frontali, N. and G.Toshi : Nature 163, 568 (1949), 164, 792 (1949) |
| (5) 佐竹・関 : 化学の領域 4, No.10, 49 (1950) | (11) 桑田 : 溶剤 p. 212, 216, 351, 360. |
| (6) 山本・嘉納 : 農化 27, 114 (1953) | (12) 実験農芸化学 下巻 p. 461 |

Summary

Paper chromatographical experiments were carried out on the 13 non-volatile organic acids and 8 volatile acids as samples, using 10 sets of solvents for developing.

The results were shown on the Table I~IV.

In the case of non-volatile organic acids, the developing solvent No. (IV) which was applied for the first time by the authors was proved most favorable for the separation of each acids from several sets of acid mixtures.

With regards to the volatile fatty acids, the separation of each acids from the mixture was difficult in the case of using sodium salts of these acids but was succeeded by employing hydrazides of these acids.