

ペーパークロマトグラフィーによる 植物性食品中の有機酸の検出

林 義 男

Detection of Organic Acids in Vegetable Foods by Paper Chromatography

Yoshio Hayashi

I 緒 言

生物体中の有機酸¹⁾を検索するのに濾紙クロマトグラフィーを最初に不揮発性有機酸に応用したのは Lugg, Overell²⁾ であってその後幾多の同様な研究を見受ける。その数例をあげるとケト酸の展開については El Hawary 等³⁾, 一般の有機酸について実験条件を詳細に検討した Stark 等⁴⁾, 揮発性酸について Kennedy 等⁵⁾, Hiscox 等⁶⁾, 有機酸の Na 塩について Brown 等⁶⁾, 有機酸の化学構造とその Rf 値の関係を説いた Opieńska-Blauth 等⁷⁾ その他多数の研究報告がある。

一方生物体中に各種植物性食品中には多種類の有機酸が知られているが之を濾紙クロマトグラフィーにより検定した例が少い。そこで筆者は標準とした有機酸の種類は少いが、上記諸家の業績を参考にし、種々の植物性食品中の有機酸を濾紙クロマトグラフィーにて検定したのでここにその結果を報告する。

II 実験並びに考察

展開装置は別法¹⁾に使用したと同一の硝子製円筒である。濾紙は東洋濾紙 No. 50, 2×50cm で、専ら下降法を行った。この濾紙を5%アンモニア水に浸し直ちに風乾又は低温乾燥(65°C 前後)する等の前処理を施して使用した。

発色剤は 0.04% Brom-cresol-purple の酒精溶液に 0.1N NaOH を加えて PH を約 5.0 とし紫青色にした溶液¹⁾ 又は揮発性酸の存在をも考慮して酸をアンモニウム塩としたために酒精、ホルマリン (5:1 v/v) 混液に同様¹⁰⁾ に調製したものである。

試料を展開した濾紙にこの発色剤を噴霧してアンモニア気中に入れると紫色の背景に酸の Spot が黄色に現れるものである。

標準の酸としては多数考えられるが、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、蓆酸、乳酸⁹⁾ 琥珀酸を用いた。而してその濃度は 0.1%¹⁾ 0.2% よりも 1% 溶液にした方が一般に

Spot の現れ方が確実であるので 1% を採用した。この濃度の酸溶液を用いて第 1 表~第 7 表の基礎実験を行い、これを標準にして植物性食品中の有機酸の種類を推定した訳である。

第 1 表
水飽和 n-Butanol¹⁾ による各酸の Rf

リンゴ酸	酒石酸	クエン酸	乳 酸
0.011	0.007	0.007	0.012
0.012	0.007	0.008	0.014
0.019	0.007	0.008	—
0.013	0.006	0.007	—
0.013	0.009	0.009	—
0.011	0.007	0.008	—
0.016	0.003	0.005	—

4種の酸は単独に 0.2% 溶液として使用した。その結果は各々の Rf 値が余りにも近似的であり混酸にしたとき各々の判別は不可能である。又 1% 溶液では各 Spot の tailing が大きくて実用的でない。

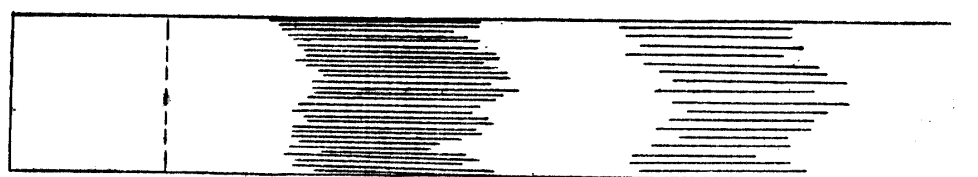
このことは Lugg 等も認めている事であった。

第 2 表
Phenol 水 (5:1)⁷⁾ による Rf

リンゴ酸	酒石酸	クエン酸	乳 酸
0.030	0.014	0.019	0.095
?	0.014	?	?

各酸共 0.2% 溶液の単独展開を行った結果である。Solvent が新調製溶液の場合には各 Spot の展開位置は明確であるが Solvent を 2 回、3 回と繰り返し使用するときは各 Spot は不明瞭にしか現れない。又酒石酸とクエン酸の位置が近すぎるので此の Solv. を使用する際に注意を要する。

第 3 表
n-Butanol, 醋酸, 水 (4:1:2)¹⁵⁾ による Rf



黄1 紫 黄2 淡紫 黄3

各酸についてすべて上図のようになり黄色の band の位置に変化なく従ってこの Solv. は全く不適當である。

第 4 表
Phenol, 水 (3:1), 蟻酸 (90%) 1%添加¹²⁾

	遊 離 酸						ア ン モ ニ ウ ム 塩					
	リンゴ酸	酒石酸	クエン酸	乳酸	蔞酸	コハク酸	リンゴ酸	酒石酸	クエン酸	乳酸	蔞酸	コハク酸
単	0.37	0.24	0.25	0.72	0.29	0.67	0.40	0.27	0.32	0.72	0.23	0.63
	0.39	0.25	0.27	0.74	—	—	0.46	0.21	—	—	—	0.73
独	0.40	0.26	0.32	0.74	—	—	0.50	0.23	0.35	—	0.36	0.73
	0.51	0.29	0.35	—	—	0.73	0.52	0.28	0.33	—	0.37	0.71
混 合	0.51	0.29	0.37	—	—	0.72	0.44	0.23	0.31	—	—	0.63

各酸の濃度は1%溶液とした。アンモニウム塩も又同じである。

各酸単独展開において4回目の Rf 値が一般にすべて大きくなっている原因は不明であるが、Solv. が次第に古くなり之に新調製の Solv. を加えて補充したところに原因があるものと考えられる。又混酸は3回の平均値であるが、この値と単独展開の4回目の値とが比較的一番良く一致する。

尙この Solv. を用いてリンゴ酸、コハク酸、クエン酸の Spot は常に明確であって、酒石酸、乳酸はやや不明確で、蔞酸の Spot は殆ど常に不明確であった。又 Spot の明確なリンゴ酸、コハク酸、クエン酸の中でも殊にリンゴ酸の Spot はその輪かくが最も判然としている点で他と区別出来る。乳酸はよく移動してその Rf 値は大きいが濾紙上における Solv. の前端が phenol による黄褐色の着色があって乳酸の Spot が判然としなくなる。

以上により乳酸を別に考えれば夫々の Rf 値と Spot の状態から今迄の Solv. の中で最も使用に適したものではないかと考えられる。

第 5 表

n-Butanol, 蟻酸, 水 (4:1.5:1) の上層¹³⁾による Rf

酸 名	遊 離 酸	ア ン モ ニ ウ ム 塩
リンゴ酸	0.43	0.43
酒石酸	0.17	0.18

クエン酸	0.35	0.34
乳 酸	0.74	0.72
蔞 酸	0.06	0.06
コハク酸	0.73	0.75

各単独酸を展開すると必ず2ヶの Spot を認める。即ち各々共通に原点に殆ど接触した所に小さな1 Spot があり、今1ヶは夫々の酸による Spot である。後者の Rf は上表の通りで夫々比較的大きな Spot である。従って蔞酸の Spot は大きく tailing するのが此の solv. の特徴であるから区別出来ぬことはない。

上表の示す通り Rf 値はかなり差があって有用のようであるが Spot が第4表の場合程明らかでない。

第 6 表

90%水飽和 iso-butanol, 蟻酸 (95:5v/v) による Rf

	乳 酸	コハク酸	リンゴ酸	クエン酸	酒石酸	蔞 酸
単 一 酸	0.67	0.63	0.54	0.43	0.24	?
	0.68	0.70	0.54	0.42	—	?
混 酸	0.70		0.47	0.22	0.17	0.06
	0.70		0.47	0.23	0.17	0.06

乳酸とコハク酸とが殆ど一致し混酸のときは区別出来ない。単独酸の場合には蔞酸が不明瞭であったが原因は明らかでない。

第 7 表

酸	solv.				遊離酸		遊離酸	
	A	B	C	D	E	アンモニウム塩	アンモニウム塩	
リンゴ酸	0.012	0.03	—	0.51	0.51	0.48	0.48	
酒石酸	0.007	0.014	—	0.29	0.27	0.17	0.18	
クエン酸	0.003	0.019	—	0.32	0.32	0.35	0.34	
蓚酸			—	0.29	0.30	0.06	0.06	
乳酸	0.013	0.095	—	0.74	0.72	0.74	0.72	
コハク酸			—	0.73	0.73	0.73	0.75	

- A: 水飽和 n-Butanol
- B: Phenol, 水 (5:1)
- C: n-Butanol, 醋酸, 水 (4:1:2)
- D: Phenol, 水 (3:1), 蟻酸 (90%) 1% 添加
- E: n-Butanol, 蟻酸, 水 (4:1.5:1)

第1表~第6表をとりまとめて第7表とした。表中の数字は各表の夫々の値の平均若くは實際上最も明確に現れるべき可能性の多いものを代表的数値として選び出したものである。従ってこの表にまとめた Rf 値を基礎として各種植物体中の有機酸を判定するために次の表を作製した。

第 8 表
各種野菜中の有機酸 Rf

試料	酸	リンゴ酸	クエン酸	蓚酸	コハク酸	備考
ちさ		0.54				Rf 値は何れも数回の平均値である
きゃべつ			0.33		0.70	
きぬさや			0.34			
ほうれん草				0.34		
玉葱		0.44				
きり		0.53			0.73	
人参(葉部)		0.40				
人参(根部)		0.45				
豆もやし		0.46				
蕨			0.35		0.67	
なす		0.51	0.36		0.66	
ごぼう			0.33			
れんこん		0.53	0.33			
甘藷				0.30	0.70	

第 9 表
各種果実中の有機酸 Rf

試料	酸	コハク酸	クエン酸	リンゴ酸
リンゴ果汁			0.24	0.33

夏ミカン (果皮)		0.44	0.53
夏ミカン (果汁)			0.49
三宝カン (果汁)			0.49
苺	0.67		0.50
きいちご	0.60		0.51
びわ			0.49

- 備考 1. りんごは果汁そのままを用いた。
- 2. Rf 値は何れも数回の平均値である。

第 10 表
野草中の有機酸 Rf

試料	酸	りんご酸
すいば		0.46
クロバー		0.52

備考 Rf 値は何れも数回の平均値である。

第7表の値を基準として有機酸を推定した。3つの表に於て夫々の酸における Rf 値に異同があつて揃わないが、之はその Spot の現れ方と従来の諸文献に説かれていた存在性とを考えその種類を認定したものであつて筆者が用いた標準用の酸以外に尙数多の有機酸もあり得る訳であるから尙将来の更に深い検討により明らかにされるべきである。

又試料の調製は材料を搗磨搾汁しアンモニアで中和した後、醋酸鉛、硫化水素処理により澄明液を得、適当量になるまで減圧濃縮したものによる。又試料の調製法から考えられることは試料中に当然、醋酸がアンモニウム塩として残留してくる訳であつて展開中に出現する可能性があるが Reid, Lederer¹⁰⁾ 等によれば Solv. は異つても醋酸の Rf 値は 0.1 前後にあるから蓚酸の Spot に接近して之より低い Rf を有することが予想できる。所がこのような Spot は出現しなかつたから、この試料調製法は展開の結果に混乱を来さなかつたことがわかる。

III 要 約

1. 各種の Solv. を用いてリンゴ酸、クエン酸、コハク酸、乳酸、蓚酸、酒石酸の Rf 値を検討した。
2. 各々の Solv. による展開の得失は Table 1~6 において夫々考察したが、phenol, water (3:1) (蟻酸 1% 添加) が Rf 値並びに Spot の現れ方に於て勝れている。
3. Spot の Rf が Solv. の種類により異なるは勿論であるが同一 solv. でも常に一定した Rf 値を示すものとは限らない。然し数回の測定の後最も明確に現れるときの値を中心として標準の Rf 値を定めた。
4. 植物体材料は搗磨搾汁アンモニア中和、醋酸鉛、硫化水素処理ののち減圧濃縮したものを試料とした。
5. この処理方法により醋酸の存在が考えられるが生成

量の少いためか展開を混乱させるべき Spot となって現れるまでには至らなかった。

6. 結果は Table 8, 9, 10 にとりまとめたがこの値は数回の平均値を示す。
7. Rf 値が殆ど同一であるにもかかわらず酸の種類を異にして分類したのは Spot の状況から判定したのと、Rf 値と更に文献を考え併せての結果である。
8. 同一の酸に統合されたもので、而も Rf 値の異なるものも 7 とほぼ同じ理によったものである。

終りに臨み終始御懇篤な御指導と御鞭撻を仰いだ恩師、京大教授 農学博士 近藤金助先生に深く感謝の意を表し、又本実験の遂行に当り、本学生活科学科四回生 原欣子氏の熱心なる助力を得たので、記して謝意を表する。

参 考 文 献

- 1) LUGG, J. W., OVERELL, B. T., *Nature*, **160**, 87 (1947).
- 2) HAWARY, M.F.S.EL., THOMPSON, R. H. S., *Bioch. J.*, **53**, 340 (1953).
- 3) STARK, J. B., GOODBAN, A. E., OWENS, H. S., *Analyt. Chem.*, **23**, 413 (1951).
- 4) KENNEDY, E.P., BARKER, H. A., *ibid.*, **23**, 1033 (1951).
- 5) HISCOX E. R., BERRIDGE, N.J., *ibid.*, **166**, 522 (1950).
- 6) BROWN, F., HALL, L. P., *Nature*, **166**, 66 (1950).
- 7) OPIENSKA-BLAUTH J. et. al., *ibid.*, **168**, 511 (1951).
- 8) JOSLYN, M. A., *Food Analysis*, p. 340. Acad. Press (N. Y.) (1950).
- 9) 宮道悦雄, 嶋野武: **動植物成分**, p. 89~94 共立出版株式会社 (昭27).
- 10) REID, R. L., LEDERER, M., *Bioch. J.*, **50**, 60(1951).
- 11) 林義男, 多田孝子: **西京大学学術報告**, **1**, 77 (昭28).
- 12) 和田英之助, 小橋友助: **日本農芸化学会誌**, **27**, No. 8 (昭28).
- 13) 東大農芸化学教室: **実験農芸化学**, 下巻, p. 460, 朝倉書店 (昭27).
- 14) 和田英之助, 小橋友助: **日本農芸化学会誌**, **27**, No. 8 (昭28).
- 15) 佐竹一夫: **クロマトグラフ**, p. 74 共立出版株式会社 (昭27).

(1953年12月受理)