

Column 分配 Chromatography による直鎖揮発性 脂肪酸の定量について

堀 慧・田 辺 昭

Quantitative estimation of the straight chain volatile fatty
acids by the column Partition chromatography

Satoshi HORI and Akira TANABE

In 1948 PETERSON and JOHNSON minutely described the column partition chromatographic method for the separation and quantitative estimation of the volatile fatty acids.

In this experiment the partition chromatograms we employed were prepared as follows.

The column was consisted of glass tube packed with silica gel, 30 cm in length and 8mm in diameter. Water was used as stational phase and benzene, 1.2% butanol benzene, 5% butanol chloroform, 12% butanol chloroform and butanol as mobile phase.

Recoveries of formic, acetic, propionic and butyric acid were 104%, 101%, 99%, and 100% respectively.

We tried in vain to estimate the valeric acid in the presence of the acids previously described.

I 緒 言

著者等¹⁾は向流分散法によりエンシレーシ中の揮発性脂肪酸（以下 V. F. As. と略称する）の定量を行つたが、この場合、含まれている酸が一種類であるか又は butyric a. と acetic a. である時はその量を正確に定量し得たが、この両酸に加えて propionic a. が含まれている時は、定量の正確度は可なり低下した。

Column を使用する分配 Chromatography による V. F. As. の分離定量はすでに多くの研究者によつて実施されている。即ち LESTER-SMITH²⁾ は silica gel を用い butanol を 1% 含んだ chloroform を展開剤として formic a. から valeric a. にいたる V. F. As. を分離定量した。又 ELSDEN³⁾ は LESTER-SMITH の方法に準拠し chloroform に 1-5% の butanol を含ませたものを展開剤として使用して良結果を得ている。RAMSEY & PATTERSON⁴⁾ 及び NIJKAMP も同じ様な報告を行つている。これらの方法はいずれも固定層を保持させた silica gel に標示薬を含ませて呈色させるいわゆる標示薬法である。しかるに 1948 年 PETERSON & JOHNSON⁵⁾ は Celite 545 を用い、固定層として水又は硫酸、展開剤として benzene, butanol-chloroform を用い formic a. から butyric a. にいたるまでの酸を分離定量した。そしてその recoveries は formic a. 89%, acetic a. 115.5%, propionic a. 97.3% n-butyric a. 98.2% であつたと報じている。著者等は silica gel を用い、夫々の酸に適合する展開剤を利用することにより V. F. As. の分離定量を達成し得たのでここに報告する。

II 実 験

1. Silica gel の調製

2-3 の市販品を塩酸処理して精製しこれを使用して見たが、いずれも成績が思わしくなかつたの

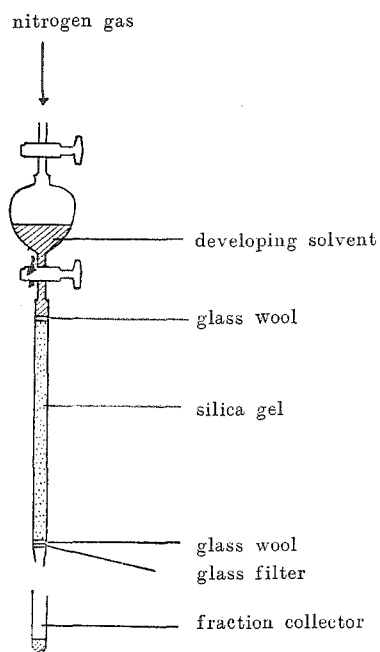
で次の方法で自製した。即ち、市販の水ガラスを少量の methyl orange を含む2倍容の蒸溜水で稀め、激しく攪拌しながら 10N HCl を滴下する。この間 silica gel の大きな塊が出来た時はガラス棒でくたく。液の pH がおゝむね2になつたならば HCl の滴下を中止し2~3時間ゆるやかに攪拌を続け、次でこれを大型の BUCHNER のロートで吸引濾過し繰り返して蒸溜水で洗う。水洗が終わつたならばこれを N/5 HCl に48時間懸濁させ、次で再び BUCHNER のロートで吸引濾過し Cl⁻ が完全に消失するまで水洗した後、これを200°Cで48時間乾燥し篩にかけて50~100 mesh のものを集めてデシケーター中に保存する。

2. 展開溶剤及び column の充填.

(1) 展開溶剤: developing solvents としては benzene, butanol, chloroform toluene を試みた。これらはすべて chemical pure であり、benzene は H₂SO₄ に色が移行しなくなるまで濃 H₂SO₄ と共に繰り返して振り、次でこれを蒸溜水と共に再三振つて H₂SO₄ を除いたものを使用した。

(2) Column の充填: Column は内径8mm,長さ30cm,底部に glass filter を附したガラス管(三田村製)を使用した。その構造は Fig. 1 の如くである。

Fig. 1. Diagram of column.



Column のつめ込みは、silica gel 9gm をとり、攪拌しながら水6.5ccを除々に加え、充分混和した後、更に benzene 30cc を加え、再びよく混和する。

この silica gel と benzene の混和物を、予め底部に少量の glass wool をつめ込んだ column 用のガラス管に均一且つ緻密に充填する。この様にして製した column は、一度使用したものでも benzene で洗えば数回は使用出来るので、使用しない時は column の両端にゴム栓を施して silica gel が乾燥しないようにして保存した。

(3) 実験の実施: Column を用いる chromatography では吸着剤に保持させた固定層と developing solvents に対する sample の分配係数によつて流出の態度が決定するから、ある酸に対してはその酸に最も適合した developing sol. がある訳である。そこで下に述べる様な実験を行つて developing sol. の種類とその組成を選定した。

これからの実験はすべて室温 (30~34°C) 下で行つたものであるが sample 中に含ませた酸は、水にとか

した formic a., acetic a., propionic a., 及び butanol に溶した butyric a. である。実施に際しては、これらの酸の一定量を少量の silica gel に吸着させて少量の benzene と共に column の上部に流し込み、ガラス棒でよく押しつけてからその上を glass wool で被つた。これを fraction collector に装着して developing sol. で展開し80滴(約2.5cc)づつの fraction として試験管にとり、各 fraction は phenolphthalein を indicator とし methanol 性 N/200 NaOH で滴定して酸度を知つた、なお、column の上端は N ボンベに接続して圧力を加減することより developing sol. の滴出速度を規正した。

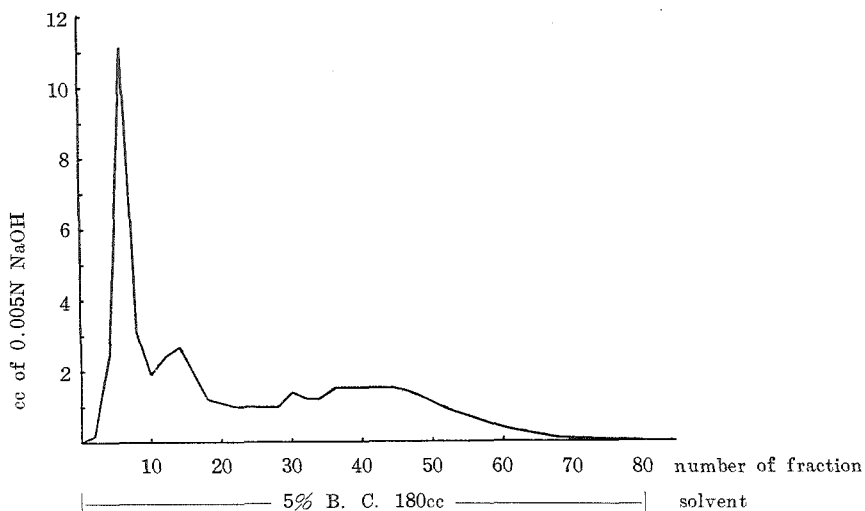
実験 1

Sample 中の V. F. As. の種類及びその量: Acetic a. 5.0 mg, propionic a. 5.5 mg, butyric acid 9.6 mg,

Developing sol.: 5% butanol-chloroform (以下 B. C. と略記する) 180cc

結果 Fig. 2 の如くであつて各酸は極めて速に流出し殆ど分離しない。

Fig. 2. Developing behaviour of butyric, propionic and acetic acid with 5% butanol chloroform as developing solvent.



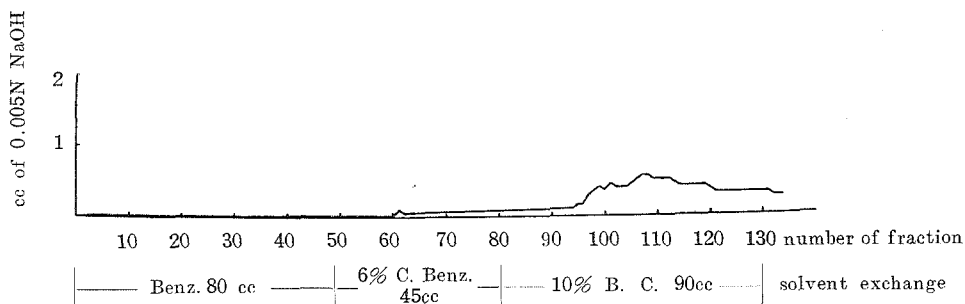
実験 2

Sample 中の V. F. As. の種類及びその量: Acetic a. 5.0mg, propionic a. 5.4mg, butyric 4.8mg.

Developing sol.: benzene 80cc, 6% chloroform-benzene, 10% B. C. 90cc.

結果 Fig 3 の如く, 溶出がおそすぎて各酸の分離は困難であつた。

Fig. 3. Developing behaviour of butyric, propionic and acetic acid with benzene, 6% butanol benzene, 10% butanol chloroform as developing solvents.



実験 3

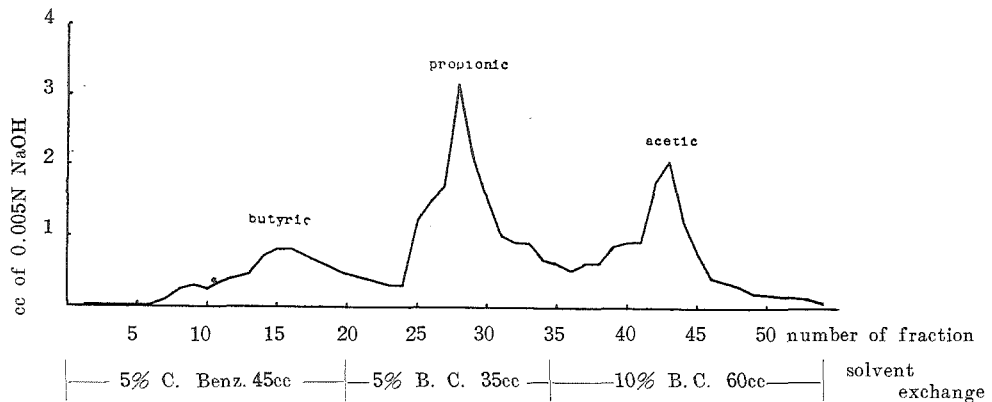
Sample 中の V. F. As. の種類及びその量 Acetic a. 5.0mg, propionic a. 5.4mg, butyric a.

4.8mg.

Developing sol. : 5% chloroform benzene 45cc, 5% B.C. 35cc, 10% B.C. 60cc.

結果 Fig 4 の如く, butyric a. と acetic a. の分離は不十分であるが propionic a. は 5% B.C. でよく分離溶出されることを知った.

Fig. 4. Developing behaviour of butyric, propionic and acetic acid with 5% chloroform benzene, 5% butanol chloroform and 10% butanol chloroform as developing solvents.



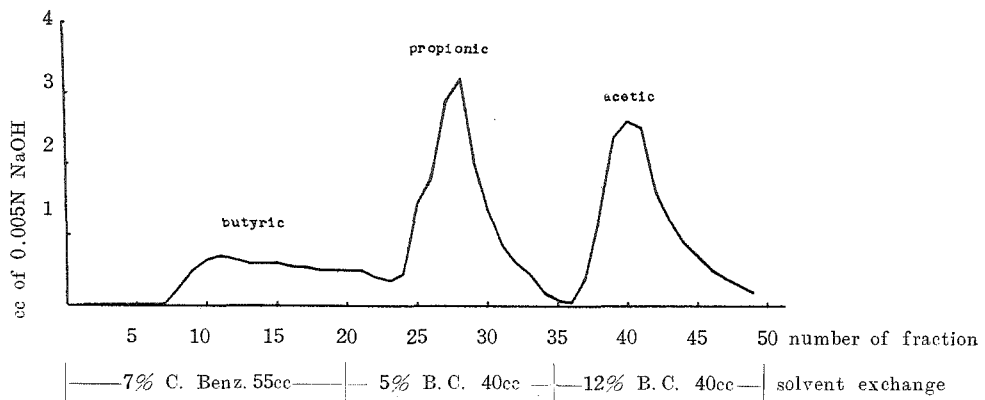
実験 4

Sample 中の V. F. As. の種類及びその量 : 実験 3 に同じ.

Developing sol. : 7% chloroform benzene, 55cc, 5% B.C. 40cc, 12% B.C. 40cc.

結果 Fig 5 の如くであつて, acetic acid は 12% B.C. でよく溶出することを知った.

Fig. 5. Developing behaviour of butyric, propionic and acetic acid with 7% chloroform benzene, 5% butanol chloroform and 12% butanol chloroform as developing solvents.



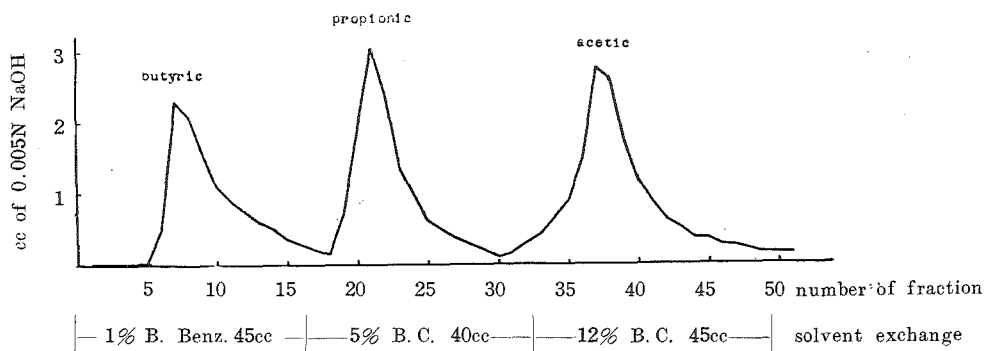
実験 5

Sample 中の V. F. As. の種類及びその量 : 実験 3 に同じ.

Developing sol. : 1% butanol benzene 45cc, 5% B.C. 40cc, 12% B.C. 45cc.

結果: Fig. 6 の如くであつて, 3つの酸はよく分離しその recoveriesは butyric a. 101%, propionic a. 100.7% acetic a. 100%であつた.

Fig. 6. Developing behaviour of butyric, propionic and acetic acid with 1% butanol benzene, 5% butanol chloroform and 12% butanol chloroform as developing solvents.



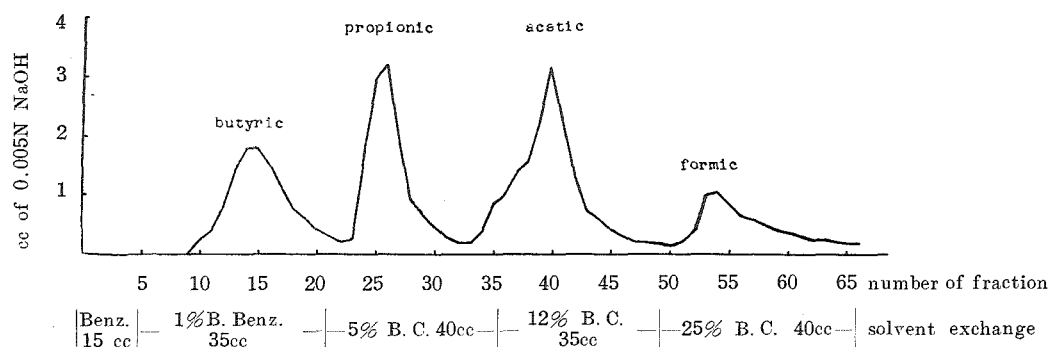
実験 6

Sample 中の V. F. As. の種類及びその量: formic a. 2.7mg, acetic a. 3.5mg, propionic a. 4.3mg, butyric a. 4.8mg.

Developing sol.: benzene 15cc, 1% butanol benzene 35cc, 5% B. C. 40cc, 12% B. C. 35cc, 25% B. C. 40cc.

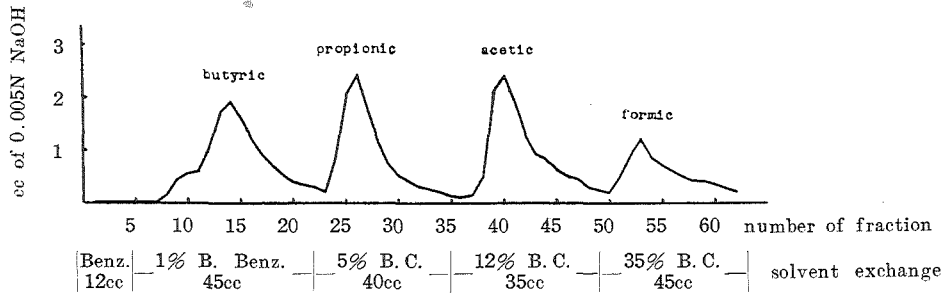
結果 Fig. 7 の如くで formic a. の溶出状態は不良であつた. (recoveries butyric a. 102.5% propionic a. 102.7% acetic a. 106% formic a. 71%)

Fig. 7. Developing behaviour of butyric, propionic, acetic and formic acid with benzene, 1% butanol benzene, 5% butanol chloroform, 12% butanol chloroform and 25% butanol chloroform as developing solvents.



又, 25% B. C. の代りに35% B. C. を展開して見たがその結果は Fig. 8 の如くであつて formic a. の分離溶出は不満足であつた.

Fig 8. Developing behaviour of butyric, propionic, acetic and formic acid with benzene, 1% butanol benzene, 5% butanol chloroform, 12% butanol chloroform and 35% butanol chloroform as developing solvents.



実験 7

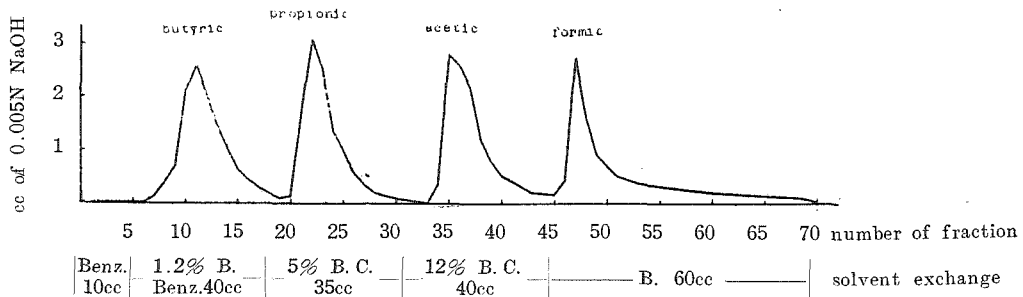
Sample 中の V. F. As. の種類及びその量: formic a. 2.8mg, acetic a. 3.7mg, propionic a. 4.6mg, butyric a. 5.4mg.

Developing sol. : benzene 10cc, 1.2% butanol benzene 40cc, 5% B. C. 35cc, 12% B. C. 40cc, butanol 60cc.

結果: Fig. 9 の如くであつて, formic a. は butanol を展開することにより分離溶出することが出来ることを知つた.

本実験における各酸の recoveries は butyric a. 98%, propionic a. 94%, acetic a. 95%, formic a. 98%であつた.

Fig. 9. Developing behaviour of butyric, propionic, acetic and formic acid with benzene, 1.2% butanol benzene, 5% butanol chloroform, 12% butanol chloroform and butanol as developing solvents.



以上の如く V. F. As. 中の formic a. から butyric a. に至る酸は概ね正確に分離定量し得たので, valeric a. の分離定量の目的で次の実験を行つた.

実験 8

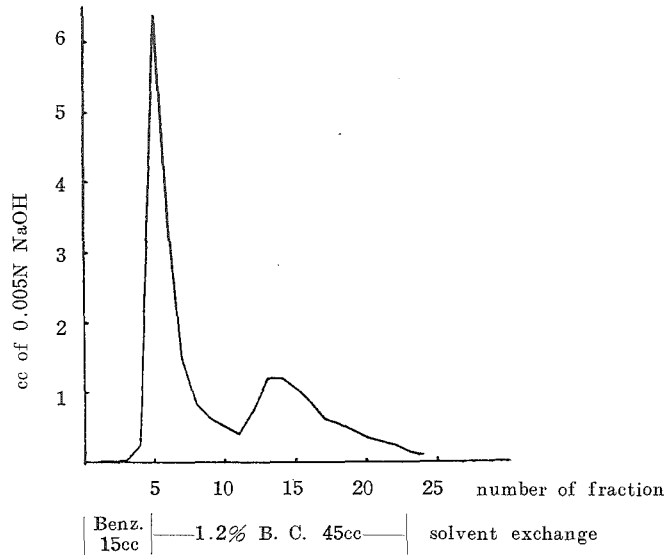
Sample 中の V. F. As. の種類及びその量: butyric a. 4.8mg, valeric a. 5.9mg.

Developing sol. : benzene 15cc, 1.2% B. C. 45cc.

結果: Fig. 10の如く, valeric a. は119%の recovery を示し, しかも valeric a. が共存する

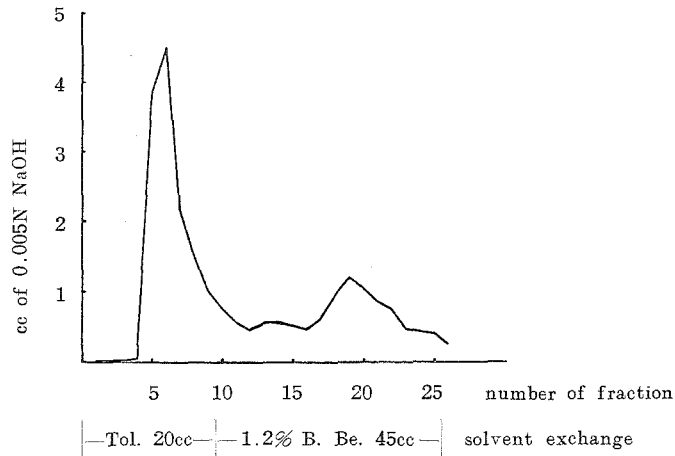
ために butyric a. の溶出位置に変化を来した。

Fig. 10. Developing behaviour of valeric and butyric acid with benzene and 1.2% butanol chloroform as developing solvents.



又, toluene が V. F. As. に対し benzene より小さい分配係数をもつことに着目し benzene の代りに toluene を流して見たが, その結果は Fig. 11 の如く, valeric a. の recovery は 127% を示し満足な結果は得られなかつた。

Fig. 11. Developing behaviour of valeric and butyric acid with toluene and 1.2% butanol chloroform as developing solvents.



Ⅲ 総 括

以上を総括すれば次の如くである。

1. 市販の silica gel は HCl 処理等の精製法を講じても column 分配 chromatography 用と

しては適当でなかつた。それでこの実験では, silica gel は水ガラスから造製して使用した。

2. 吸着剤としては自製の silica gel を, 固定層としては水を使用した。

Benzene, 1.2% butanol benzene, 5% butanol chloroform, 12% butanol chloroform 及び butanol を逐次展開することにより, formic a., acetic a., propionic a. 及び butyric a. の混合 sample から各酸を分離定量することが出来た。その recoveries の平均は formic a. 104%, acetic a. 101%, propionic a. 99%, butyric a. 100%であつた。

3. Valeric a. の分離定量を試みたが満足な結果を得ることは出来なかつた。

文 献

- 1) 堀, 田辺 (1956) : 岡山大学農学部学術報告, 第8号.
- 2) LESTER-SMITH, (1942) : Biochem. J., 36, XXii
- 3) ELSDEN, S. R., (1946) : ibid. 40, 252.
- 4) RAMSEY & PATTERSON, (1948) : J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 31, 139,
- 5) PETERSON & JOHNSON, (1948) J. Biol. Chem., 174, 775.