- (1) H. WALDMANN : *J. prakt. Chem.*, 128, 150 (1930).
- (2) M. FREUND and K. FLEISCHER : *Ann.*, 399, 182 (1913).
- (3) DAVIES and LEEPER : *J. Chem. Soc.*, 1927, 1126.
- (4) 八木 : 農化, 23, 43 (1949).

Summary

So-called 2, 3-cyanonaphthoic acid, synthesized by H. WALDMANN's method, was proved identical with 2, 3-naphthalenedicarboxylic imide, synthesized from 2, 3-naphthalenedicarboxylic anhydride. By this fact, the abnormality of so-called 2, 3-cyanonaphthoic acid, which had been reported by the present author, was attributed to the character of the latter substance.

たばこ化学成分の研究 (第 4 報)

たばこ中の有機酸の定量及び Paper Chromatography に依る検索

和田英之助, 小橋 友 助 (日本専売公社中央研究所)

昭和 28 年 1 月 12 日 受理

Chemical Constituents of Tobacco. Part 4. Determination of Organic Acids in Tobacco Leaves and Isolation of Organic Acids Paper Chromatography.

By Einosuke WADA and Yūsuke KOBASHI

(The Central Research Institute of the Japan Monopoly Corporation)

緒 言

たばこ化学成分の中、有機酸はたばこの化学及び生化学に重要な役割を果たして居る。現在迄に十数種の酸が抽出されているが⁽¹⁾、量的には林ゴ酸、蔞酸、クエン酸が多いので、たばこでは主として之等三つの酸が研究の対象となつてゐる。之等の酸を定量する方法は、後述のように種種あるが、充分満足すべき定量方法はまだ確立されてゐるとは言えない。著者らは種種の方法を比較検討して、良好な結果を与える方法を得たので、ここに纏めて報告する。また最近植物中の有機酸の分離に paper chromatography が応用されている例が多いが⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾、著者らもこれをたばこに応用して幾つかの酸を確認した。これもあわせて報告する。

実 験 の 部

(I) 有機酸の定量

たばこの有機酸の定量法としては諸種の方法があるが⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾、著者らはこれらの方法を比較検討した結果、この方法が最良のものと思われた。

A) 蔞酸の定量 : 純粋の林ゴ酸、クエン酸、蔞酸を各種の割合に混合し、KISSLING⁽⁶⁾ 法による重量法で定量したところ、平均 99.7% の回収率で定量する事が出来た。次に 5 種のたばこ試料* を用いて HALLIWELL⁽⁹⁾ 法による滴定法を追試し、同時に KISSLING 法により得た値と比較した。

Table 1. Comparison of KISSLING'S and HALLIWELL'S Methods for Oxalic Acid in Tobacco Leaves.

Sample	KISSLING'S Method ⁽⁶⁾	HALLIWELL'S Method ⁽⁹⁾
A	1.78%	1.75%
B	0.88 //	0.91 //
C	0.51 //	0.49 //
D	1.89 //	1.89 //
E	1.72 //	1.83 //

その結果は Table 1 に示す如く、両者の定量値に共に近い値を示し、共にたばこ中の蔞酸の定量に充ちてゐる。

B) 林檎酸の定量 純粋の酸を試料として、KISSLING⁽⁶⁾ 法、VICKERY and PUCHER 法⁽⁷⁾、ASKI 法⁽⁸⁾等を追試したが何れも良好な結果が得られなかつた。次に LEININGER 法⁽¹⁰⁾による蛍光定量法(林檎酸と β -ナフトールを濃硫酸中で反応させ、生じた螢光

の強さより林檎酸を定量する)を追試した処、Fig. 1 の如く 10 γ ~40 γ の間では螢光の強さと、林ゴ酸の濃度との間に直線的関係を有する事がわかつたので、4 種のたばこ試料* を用いて、その回収率を調べた結果、Table

* 本論文中的試料とは、実験 D) の i) の試料調製法と同一方法で得られたものである。以下*印のついてゐる試料は全て同様である。

2に示す如く、回収率は平均 98.5% であり、たばこ中の林ゴ酸を定量するのに充分である。なお、螢光光度計は、A・K・A・型の螢光光度計を使用し、第1の Filter は 365 m μ のものを、第2の Filter は 410 m μ 以下

Fig. 1. Relation between fluorometer scale readings and malic acid in the sample of the standard solution.

A. K. A. type photo electric fluorometer. The primary filter permits maximum transmittance in the spectral region of 365 m μ . The secondary filter does not transmit emission below 410 m μ .

を透過しないものを使用した。

Table 2. Recovery of Malic Acid⁽¹⁰⁾ added to Tobacco Leaves.

Sample	Malic Acid added (γ)	Malic Acid found (γ)	Recovered (γ)	Recovery (%)
A	0	13.0		
	10	22.9	9.9	99
B	0	18.0		
	10	27.9	9.9	99
C	0	20.5		
	10	30.5	10.0	100
D	0	27.7		
	10	37.3	9.6	96

C) クエン酸の定量： 純粋の蓚酸、クエン酸、林ゴ酸を種々の割合に混合した試料を用いて、HARTMANN 法⁽¹¹⁾に依る Pentabromoacetone 重量法を追試したところ、Table 3 の如く、蓚酸、林ゴ酸の存在はクエン酸の定量値に殆ど誤差を与えなかつた。

次に純粋のクエン酸より得た Pentabromoacetone (以下 P・B・A・と略記する) の結晶 (mp 69~71°) を用いて、NATERSON 法⁽¹²⁾による P・B・A・比色法を修正して、ブルフリッヒの比色計により濃度と吸光度との関係を調べた。Fig. 2 に示す如く、直線関係を有する事が解つたので、次にこれを標準として、純粋のクエン酸を試料とした場合の回収率を調べた。その結果は、Table 4 に示す如く、平均 100.5% の回収率で定量出来る事が解つた。

次に3種のたばこ試料*を用いて HARTMANN 法、及び NATERSON 法によりクエン酸を定量したところ Table 5 に示す如く、両者はともにたばこ中のクエン酸の定量に応用出来る事がわかつた。

D) 秦野種生葉、乾燥葉中の蓚酸、クエン酸、林ゴ酸の定量

i) 試料の調製 27 年 9 月頃、秦野試験場で採集した秦野種 (中、本葉) を次の様に処理した。(イ) 生葉

Fig. 2. Standard curve obtained by plotting optical density against concentration of pentabromoacetone at 446 m μ . in the PULFRICH's photometer with 3 cm cuvettes.

Table 3. Recovery of Citric Acid in a Mixture Solution.

Sample	Mixture proportion			Recovery	
	Citric	Malic	Oxalic	HARTMANN'S Method ⁽¹¹⁾	KISSLING'S Method ⁽⁶⁾
A	1	0	0	94.6%	—
B	1	2.0	0.5	97.3	—
C	1	1.5	0.5	94.6	—
D	1	3.0	5.0	95.5	—
E	1	10.0	0.5	94.8	149.4
F	1	0.5	0.5	94.0	152.9

Table 4. Recovery Test of Citric Acid with NATERSON'S Method⁽¹²⁾.

Citric Acid taken (γ)	Citric Acid found (γ)	Recovery (%)
250.7	267.4	106.6
246.5	237.6	96.5
405.4	382.8	94.5
411.7	436.9	104.5

Table 5. Comparison of HARTMANN'S and NATERSON'S Methods for Citric Acid in Tobacco Leaves.

Sample	HARTMANN'S Method ⁽¹¹⁾	NATERSON'S Method ⁽¹²⁾
A	0.25%	0.22%
B	0.32%	0.29%
C	1.42%	1.49%

の一部は即日沸騰水に 10 秒間浸漬した後、1 日風乾し、次いで硫酸デシケーター中で 1 日よく乾燥後、粉末とする。(ロ) 他の 1 部の生葉はそのまま、連干法で乾燥し、更に硫酸デシケーター中で乾燥後、粉末とする。ここに得られた (イ) (ロ) の粉末試料を軽石及び 20% 硫酸と共に乳鉢中でよく混合し、これをソックスレー抽出器に入れ、40~50 時間エーテルで抽出する。抽出液に少量の水を加え、エーテルを溜去する。液はひた濾紙でメスフラスコ中に濾過し、樹脂状物質を除き、更に冷水で洗滌、濾液と洗液を合せて一定量とする。この (イ) (ロ) 溶液を各、生葉及び乾燥葉の試料として扱った。

ii) 定量： 蓆酸は KISSLING 法及び HALLIWELL 法、又林ゴ酸は LEININGER 法と、全灰分より存在する蓆酸、クエン酸に相当する灰分を差引いた残りを林ゴ酸とする ASKU 法、クエン酸は HARTMANN 法及び NATERRON 法により定量した。以上の結果を Table 6 に示す。

Table 6. Organic Acids in Tobacco Leaves before and after curing.

	% of Dry weight			
	before curing		after curing	
Oxalic	1.06 ⁽⁸⁾	0.97 ⁽⁹⁾	0.85	0.85
Citric	0.49 ⁽¹¹⁾	0.48 ⁽¹²⁾	0.72	0.69
Malic	5.19 ⁽⁸⁾	4.70 ⁽¹⁰⁾	4.24	3.67

れる訳であるから、ASKU 法により得た林ゴ酸の値は、当然 LEININGER 法で得た林ゴ酸の値より高い値を示している。又 VICKERY も指摘した如く⁽¹³⁾、この場合も乾燥する事によりクエン酸は増加し、林ゴ酸は減少している。

(II) Paper Chromatography による酸の検索

試料： 前記 (イ) (ロ) の試料を用い、D) の i) の調製法により得た抽出液を濃縮したものを試料とした。

展開： 濾紙は Whatman No.1 を用い、展開剤としては、(A) 90% 水飽和 isobutanol, 90% formic acid 5%, (B) phenol. water (3:1), 90% formic acid 1%⁽⁴⁾, (C) 90%, 水飽和 isobutanol, chloroform (1:5), 90% formic acid 1%⁽⁴⁾, (D) isopropyl alcohol, isobutanol, benzyl alcohol, water (1:1:3:1), 90% formic acid 2%⁽⁴⁾, を用い上昇法により展開した。呈色試薬としては 0.04% brom cresol green⁽³⁾ (95% Alc. Soln.) を pH 5.5 に調整したもの、又クロロゲン酸、カフェー酸の検出には 5% 塩化第 2 鉄溶液及び 1% 亜硝酸ソーダ⁽³⁾ 溶液を用いた。

分離： 先に調製した試料も濾紙に一直線上に 2 mm の間隔につけ、展開剤 (A) を用いて展開後、その一部に B.C.G. 試薬を噴霧し、 $R_F=0.37, 0.44$ の部分 (Table 7 で示す如く、この部分はそれぞれ、クエン酸、林檎酸の R_F 値に一致する) の他に、少量ではあるが、 $R_F=0.62$, (I) 0.70, (II) 0.78, (III) の酸性反応を呈する部分及び、5% 塩化第 2 鉄溶液により検出される $R_F=0.58$ (a), 0.78 (b), を得る。この各部分を横に帯状に切りとり、70% メタノールで抽出し、各部分の濃縮液を得、これを前記の展開剤を用いて展開した。以上の結果を Table 7 及び Table 8 に示す。

Table 7. R_F Values of Organic Acids in Tobacco Leaves.

	Solvent											
	A			B			C			D		
	Pure	Before curing	After curing	Pure	Before curing	After curing	Pure	Before curing	After curing	Pure	Before curing	After curing
Citric	0.37	0.37	0.37	0.29	0.28	0.28	0.19	0.19	0.19			
Malic	0.44	0.44	0.43	0.41	0.42	0.41	0.30	0.31	0.30			
Malonic	0.59			0.48			0.36					
Fraction I		0.59	0.59		0.48	0.48		0.36	0.36			
Lactic	0.70			0.65			0.66			0.60		
Succinic	0.72			0.65			0.69			0.70		
Fraction II		0.71	0.71		0.65	0.65		0.69	0.69		0.60	0.59
											0.70	0.71
Fumalic	0.80			0.54			0.79					
Fraction III		0.77	0.78		0.86	0.54		0.78	0.78			
						0.86						

即ち、生葉、乾燥葉中にクエン酸、林ゴ酸以外にマロン酸、コハク酸、カフェー酸、クロロゲン酸及び未知の酸 ($R_F=0.77$ At solvent A) を、乾燥葉中にその他にフマル酸の存在を確認した。

(1) たばこ中の蔞酸, クエン酸, 林ゴ酸の定量法を種種, 比較検討した。蔞酸は KISSLING 法による重量

Table 8. Rf Values of Aromatic Acids in Tobacco Leaves.

	Solvent					
	A			B		
	Pure	Sample Before	After	Pure	Sample Before	After
Chlorogenic Fraction a	0.58	0.57	0.56	0.52	0.52	0.52
Caffeic Fraction b	0.80	0.79	0.80	0.60	0.60	0.59

A: 90% water saturated iso-butanol; 90% formic acid, 5%.
 B: phenol, water, (3:1), 90% formic acid, 1%.
 C: 90% water saturated iso-butanol, chloroform, (5:1), 90% formic acid, 2%.
 D: iso-propyl alcohol, iso-butyl, alcohol, benzyl alcohol, water, (1:1:3:1), 90% formic acid, 2%.

法, HALLIWELL 法による微量定量法の何れでも定量出来る。クエン酸は HARTMANN 法による P.B.A. 重量法, NATERSON 法による Pentabromoacetone 比色法の何れでも定量出来る。林ゴ酸は LEININGER 法による螢光定量法で定量出来る。

(2) Paper Chromatography を用いて, たばこ生葉, 乾燥葉 (秦野種) 中にクエン酸, 林ゴ酸, マロン酸, 乳酸, コハク酸, 及び一つの未知酸, ($R_F = 0.77$, Solvent A; $R_F = 0.86$, Solvent B; $R_F = 0.78$, Solvent C;) カフェー酸, クロロゲン酸を, 又乾燥葉中には, 以上の酸以外にフマル酸を確認した。

なお, 本報告の発表を許可された加藤多計夫所長, 大西勲たばこ研究部長に感謝すると共に, 試料の採集に便宜を与えられた秦野たばこ試験場の各位及び螢光光度計の使用に際して便宜を与えられ, 種種御指導戴いた国立衛生試験所の広瀬朝次技官に深甚の謝意を表する。又本実験に協力された本松雅子氏に感謝する。

- (1) 仁尾正義: 煙草工業, p.443 (1950).
BRÜCKNER, H.: *Die Biochemie des Tabaks und Tabakverarbeitung*, (Berlin): S. 131 (1926).
- (2) BUCH, M. L., MONTGOMERY, R. and PORTER, W. L.: *Anal. Chem.*, 24, 489 (1952).
- (3) LUGG, J. W. H.: *Nature*, 160, 87 (1947).
- (4) STARK, J. B., GOODBAN, A. E. and OWENS, H. S.: *Anal. Chem.*, 23, 413 (1951).
- (5) ROBERTS, E. A. H. and WOOD, D. J.: *Arch. of Biochem.*, 33, 229 (1951).
- (6) KISSLING, R.: *Handbuch der Tabakkunde*, (Berlin): S. 91 (1936).
- (7) VICKERY, H. B. and PUCHER, G. W.: *J. Biol. Chem.*, 90, 637 (1931).
- (8) ASKU, S.: *C. A.*, 45, 1305 (1951).
- (9) HALLIWELL, G.: *Anal. Chem.*, 22, 1184 (1950).
- (10) LEININGER, E. and KATZ, S.: *Anal. Chem.*, 21, 1375 (1949).
- (11) HARTMANN, B. G. and HILLIG, F.: *J. Assoc. Official Agr. Chem.*, 170, 264 (1927).
- (12) NATERSON, S., LUGOVOY, J. K. and PINCUS, J. B.: *J. Biol. Chem.*, 170, 597 (1947).
- (13) PUCHER, G. W. and VICKERY, H. B.: *Agr. Expt. Sta. Bull.* 324 (1931).

Summary

(1) Successful methods are described for determination of organic acids in tobacco.

(a) Oxalic acid was determined either by KISSLING's (gravimetric) or HALLIWELL's (micro-titrimetric) method as shown in Table 1.

(b) Malic acid was determined by LEININGER's (fluorometric) method as shown in Table 2.

(c) Citric acid was determined either by HARTMANN's (gravimetric) or NATERSON's (colorimetric) method as shown in Table 5.

(2) In the separation and identification of organic acids, the paper-chromatographic method was applied to both cured and uncured tobacco leaves, there were citric, malic, lactic, malonic, succinic and one unknown acid ($R_F = 0.77$, with solvent A, $R_F = 0.86$, with B, $R_F = 0.80$, with C). As aromatic acids, caffeic acid and chlorogenic acid were identified in both types of leaves. Fumaric acid was detected in slight quantity in cured tobacco leaves.