研究ノート

薄層クロマトグラフィーによる L-アスコルビン酸とエリソルビン酸の分離

梶田武俊*・堤喜代子*・富永育子*

Thin-layer Chromatographic Separation of L-Ascorbic Acid and Erythorbic Acid

Taketoshi Kajita, Kiyoko Tutumi and Ikuko Tominaga

The separation of L-ascorbic acid (AA) and erythorbic acid (EA) was investigated by thin-layer Chromatography. AA and EA were clearly separated by the employment of water saturated methylethyl ketone as developing solvent. Optimum concentration of EA and AA for separation was within the range of 0.04~0.05%.

The developing time was far more reduced than that of ordinary paper chromatography.

(Received Feb. 27, 1969)

近年、ペーパークロマトグラフ法により、L-アスコルビン酸（以下 AA と略記）と、その化学的異性体であるエリソルビン酸（以下 EA と略記）との分離定量が、2, 3 の研究者によって確立されたが^{1,2,3}、この方法は展開に長時間を要するという難点がある。

そこで筆者らは、迅速定量を目的とし、展開時間の短縮化に有利な薄層クロマトグラフィーによる両酸の分離定量について検討を加え、若干の知見を得たので、その結果を報告する。

1. 実験方法

(1) 試料

AA および EA は、いずれも市販結晶を用いた。

(2) 展開溶媒

i) ベンゼン系

ベンゼン：メタノール：アセトン：酢酸を 70：20：5：5 の割合に混合後、充分振盪して使用する。

ii) 水飽和メチルエチルケトン

メチルエチルケトンを 70~80℃ で蒸溜したもの 200 ml に、再蒸溜水 40 ml を加えて充分振盪し、一夜放置後上層を使用する。

iii) アセトニトリル系

アセトニトリル：アセトン：水：酢酸を 80：5：15：1 の割合に混合後、充分推盪して使用する。

(3) クロマト板

① 東洋科学産業 KK 製の Model HC-20 薄層クロマトグラフ装置を用い、メルク社のシリカゲル G を吸着剤とした標準薄層

③ 東洋汙紙のクロマトシート（ポリエチレンフィルムにシリカゲル G を塗布調整したもの）

(4) 実験操作

AA および EA の単独液と、混合液をそれぞれ一定濃度となるよう、2% EDTA 溶液で調整する。あらかじめ 10% メタリン酸を噴霧処理したクロマト板の一端から 2 cm の距離の原線上に、0.005 ml をマイクロシリンジにて添付し、ドライヤーにて乾燥後、展開液で飽和させた展開槽にクロマト板を入れて 30 分間保ち、その後、展開液（1 cm 深）に下端をひたして、30±1℃ の下で展開を行なう。あらかじめクロマト板の一定距離にのしをつけ、その位置まで展開液が上昇すれば、クロマト板をとりだし、上昇線を記録したあと、ドライヤーにて乾燥する。乾燥したクロマト板に、0.025% のインドフェノール溶液を噴霧し、淡紅色の地に現われた白色斑を記録し、Rf 値を算出した。

2. 実験結果

(1) 展開溶媒による影響

ベンゼン系、メチルエチルケトン、アセトニトリル系の 3 種の展開溶媒を使用して展開を行ない、得られた Rf 値は第 1 表に示すごとくである。

この表より明らかなごとく、ベンゼン系とアセトニ

第 1 表 展開溶媒による影響

展開溶媒 試料		ベンゼン系	メチルエチル ケ ト ン	アセトニトリル系
混合 (等量)	EA	0.50	0.40	0.53
	EA	0.49	0.40	0.48
	AA	(分離せず)	0.32	(分離せず)
	EA-AA	—	0.08	—
	AA	0.46	0.34	0.45
展開時間 (分)		75	115	51

注：試料濃度 40 mg %。

* 奈良女子大学家政学部（奈良市北魚屋西町）

Department of Living Science, Nara Women's University. Nara.

第 2 表 AA および EA の濃度変化と分離度との関係

濃度 (mg %)	15	25	30	35	40	50	60	70	75	80
試 料										
EA	0.38	0.39	0.40	0.40	0.40	0.40	0.41	0.41	0.41	0.42
混 合 (濃 度)										
EA			0.40	0.40	0.40	0.40	0.42	0.42	0.42	0.39
AA	還元斑が不明瞭		0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	分離せず
EA-AA	—	—	0.08	0.08	0.08	0.08	0.10	0.10	0.10	—
AA	0.30	0.31	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
展開時間 (分)	97	105	105	105	115	115	105	105	107	112

注：展開液…メチルエチルケトン水飽和等。

リル系の場合は、メチルエチルケトン水飽和液に比して展開時間は短かったが、AA と EA が混在する場合は分離しなかった。

ベンゼン系とアセトニトリル系については、すでに木田⁴⁾によって検討されているが、本実験結果とよく一致する。メチルエチルケトンは展開に約 2 時間を要したが、分離能はよかった。

(2) AA および EA の濃度変化と分離度との関係

AA および EA の濃度を 15~80 mg % まで変化させ、それが分離度との関係をみるため、メチルエチルケトン水飽和液を展開溶媒とし、第 1 表の場合と同様 R f 値の測定を行なった。その結果は第 2 表に示すごとくである。

第 2 表より、分離限界の濃度範囲は 30~75 mg % である。R f 値の差の大きい点は、60~75 mg % であるが、鮮明度、検出斑の大きさなどから、AA および EA の濃度は 40~50 mg % が最適であることを認めた。

3. 要約

3 種の展開溶媒について検討した結果、ベンゼン系とアセトニトリル系の場合は、一次元法では AA と EA の分離は不能で、メチルエチルケトン水飽和液のみ分離確

認を行なうことができた。しかし展開時間は、ベンゼン系およびアセトニトリル系に比し多少、長い時間を要した。なお、メチルエチルケトン水飽和液を展開溶媒とし、AA および EA の濃度変化による分離度を調べたところ、分離限界の濃度範囲は、30~75 mg % であり、分離能などの点から最適濃度は 40~50 mg % であった。

従来のペーパークロマトグラフ法では、展開に約 5 時間を要するが、本法によると約 2 時間に短縮することができた。

展開時間が短縮すれば、検出率もまたよくなるように思われるが、検討するまでには至らなかった。

文 献

- 1) 三木太平・佐藤佳一：ビタミン，25，171，178 (1962)。
- 2) 沢井秀樹・嶺和正他：ビタミン，27，21 (1963)。
- 3) 水谷清・藤崎和夫他：栄養と食糧，14，(3)，90 (1961)。
- 4) 木田安子：武庫川女子大学紀要，第 12 集，93 (1964)。

(1969 年 2 月 27 日受理)