

研究ノート

プリン系アルカロイド(caffeine, theobromine, theophylline, hypoxanthine)の薄層クロマトグラフィーによる分離

串岡慶子*

Separation of Purine Alkaloids (caffeine, theobromine, theophylline, hypoxanthine) by Thin-Layer Chromatography.

Keiko Kushioka

はじめに

クロマトグラフィーによる混合物の分離は非常に効率が良く、また成分の回収率も良い。このため食品の成分の分離、精製にも多く用いられ、同定も標品とRf値を比較する簡便な方法で行なわれるものが多い。そのうえ、他のスペクトル的方法から得られる情報も併用すると、物質の確認がさらに容易である。このため今日では、クロマトグラフィー、および機器による構造決定は実験室でのごく普通の操作といえる。このような現状から食物科の実験でも、基礎的な段階からクロマトグラフィー、機器分析(UV, IR, NMRなど)を導入することは、望ましいことと思われる。

この立場から本学においても、現在一回生の基礎化学実験で Rod O' Conner¹⁾の論文に基づき、コーヒー豆、茶葉を材料としてアルカロイドを抽出し、薄層クロマトグラフィーによる分離、同定、およびガスクロマトグラフィー、赤外線吸収スペクトル、核磁気共鳴吸収スペクトルによる同定を、融点測定と共に実施している。

しかし、未経験な多数(1クラス約70名)の学生を対象とした学生実験に薄層クロマトグラフィーを用いる時、熟練した研究者が行なうのとは、おのずと異なった次のような問題点があげられる。

1. 時間と設備の両方に制約されているため、例え

ば、薄層プレートが学生自身にひかせる余裕がない。もし、これをさせると、本来の目標がぼやけて、吸着剤薄層をガラス板上にひく技術の習得で終わってしまうことになりかねない。

2. 未経験者が実施しても、一応、初期の目標を果たしうる再現性の高い実験条件の設定が望ましい。

3. 未経験な学生が行なっても危険性(健康上、防火上など)のない方法を採用する必要がある。

このような立場から以下検討を行ない、さらに、コーヒー豆、茶葉の抽出物以外の一一般のプリン系アルカロイドに対する適用も考慮した。

従来 の 経 過

原報では、caffeine, theobromine の二種のアルカロイドを対象としている。薄層プレートは各自顕微鏡用のマイクロスライドガラスを用い、これをクロロホルムにシリカゲルGを懸濁させたものに浸して作製し、caffeine はクロロホルムに、theobromine は希水酸化ナトリウム溶液に溶かしてスポットしている。また、展開溶媒はクロロホルム:95% エタノール溶液=9:1を用い、検出はまず三ヨウ化カリウムの2% エタノール溶液を、ついで50% エタノール溶液を溶媒とした12% 塩酸溶液をふきつけて発色させている。

この方法を三種のアルカロイドに応用し、かつ、先にも述べたように、一定時間で未経験な多数の学生を対象とする学生実験の実情に合うよう、これまで薄層プレート、展開溶媒、発色法などを検討し次のように

* 基礎化学研究室

変更実施してきた。

変更点は、未経験者の取り扱いやすい薄層プレートとして Merck 社製の DC-Fertigplatten-Kieselgel 60 を使用し、スポットの方法は caffeine はクロロホルムに、他は希水酸化ナトリウム溶液に溶かし、クロロホルム：アルコール性水酸化カリウム飽和溶液 = 9:1 の展開溶媒で展開し、ヨウ素蒸気により発色検出するようにしたことである。

この方法は、スポット用検液の溶媒を二種類用い、またヨウ素による発色後、希水酸化ナトリウム溶液で溶かしたアルカロイドは原点に褐色のスポットが残り、さらに theobromine の確認が確実でなく、試料のスポットとまぎらわしい欠点があった。

今回これらの点を改めるべく以下の実験を行ない、一応の成果を得たので報告する。

実 験

(1) 薬品

caffeine, theobromine, theophylline は市販特級試薬を用い、hypoxanthine, xanthine は興人の試薬を用いた。溶媒およびその他の試薬は市販一級品を精製することなく用いた。

(2) スポット用検液の溶媒の検討

未経験な学生が実施した場合、三種のアルカロイドのうち theobromine の確認が一番むずかしいので、まず theobromine の溶解度が大きく、他のアルカロイドをも溶解させる溶媒を検討した。検討した溶媒は、2N 水酸化ナトリウム、6N アンモニア水、2N 塩酸、6N 酢酸である。

(3) 展開溶媒

展開溶媒は第Ⅱ表に示した各種の組合せを用いた。展開にあたっては DC-Fertigplatten-Kieselgel 60 プレート (5cm×20cm) を半分に切り、下から 1cm のところにアルカロイドをスポットした。展開溶媒を入れたインスタントコーヒーの空瓶に先のプレートを入れて密閉し、室温下で約 8cm 展開する。

(4) 検出法

展開後、プレートの溶媒を蒸発させ第Ⅰ表に示した各種検出法を試みた。

(5) 薄層プレートの固着剤の分析

Merck 社製 DC-Fertigplatten-Kieselgel 60 から削り落した吸着剤 (+ 固着剤) を 6N 塩酸に浸し固着剤を遊離させる。浸出液をヌッチェを用いて吸引ろ過し、6N 塩酸で洗浄後、ろ液と洗液はエバポレーターを用いて濃縮し蒸発乾固させる。水分を取り除くとともに赤外線吸収スペクトル用の試料を作るため、四塩化炭

第Ⅰ表 プリン系アルカロイド検出試薬

-
- I) 酸性ヨウ化物溶液³⁾
 - II) 硫酸酸性過マンガン酸カリウム溶液³⁾
 - III) 硝酸水銀 (I) 溶液³⁾
 - IV) クロラミン T³⁾
 - V) アセトン中に酒石酸、ヨード、塩化鉄 (III) を含む溶液³⁾
 - VI) Dragendorff 試薬²⁾
 - VII) 紫外線照射²⁾
 - VIII) ヨウ素蒸気
 - IX) その他
-

素を加えて一、二度同様の操作を繰り返す。この一部で赤外線吸収スペクトルをとる。(第Ⅰ図—c)

沈でんは水で洗浄後、陶土板の上で水分を取り除き、赤外線吸収スペクトルをとる。(第Ⅰ図—b)

薄層プレートの吸着剤 (+ 固着剤) の一部を削りとり、そのまま赤外線吸収スペクトルをとる (第Ⅰ図—a)

なお、赤外線吸収スペクトルの測定にはすべて KBr 錠剤法を用い、日本分光製 IRA-1 形回折格子赤外分光光度計を使用した。

結 果 と 考 察

(1) スポット用検液の溶媒

theobromine は有機溶媒には溶けず、酸や塩基にのみ溶解する。2N 水酸化ナトリウムにはよく溶けるが、このプレートを使用する限りどの様な展開溶媒を用いても原点に褐色のスポットが残る。2N 塩酸にもよく溶けるが、2N 塩酸は薄層プレートの固着剤を侵す (後述) ため、共に使用に適しない。6N アンモニア水、6N 酢酸ではどちらも溶け難いが、直火または熱湯で温めてできるだけ溶かし、この飽和溶液でスポットすることができる。

なお、後述するように、hypoxanthine に適用した場合、テーリングしない点で 6N 酢酸が最もすぐれている。

(2) 展開溶媒

各種展開溶媒を用いて行なった結果は第Ⅱ表に示した。

一般に、試料を 6N アンモニア水に溶かした場合も 6N 酢酸に溶かした場合も同一の R_f 値を与えるが、I)~VIII) は試料の 6N アンモニア水溶液を用いてスポットしたため展開溶媒にも塩基性のジエチルアミンやアンモニア水を添加した。

その結果、V) は展開溶媒の中に n-ブタノールが

第Ⅱ表 プリン系アルカロイドの展開溶媒と Rf 値

展 開 溶 媒	割 合	Rf 値		
		caffeine	theobromine	theophylline
I) クロロホルム ²⁾		0.10	0	0
II) クロロホルム/ジエチルアミン ²⁾	9:1	0.76	0.51	0.18テーリング
III) クロロホルム/アセトン/ジエチルアミン ²⁾	5:4:1	0.70	0.52	0.21テーリング
IV) シクロヘキサン/ジエチルアミン ²⁾	9:1	0	0	0
V) アセトン/クロロホルム/n-ブタノール/28% アンモニア水 ³⁾	7:7:9:2	0.63	0.49	0.33
VI) アセトン/クロロホルム/アセトニトリル/28% アンモニア水	9:5:9:2	0.78	0.51	0.16
VII) アセトン/クロロホルム/アセトニトリル/28% アンモニア水	9:2:5:2	0.73	0.51	0.26
VIII) アセトン/クロロホルム/28% アンモニア水	7:1:1	0.78	0.47	0.21
IX) アセトン/クロロホルム	1:2	0.39	0.17 テーリング	0.24
X) アセトン/クロロホルム	2:1	0.40	0.26	0.33
XI) アセトン/クロロホルム/酢酸	14:2:1	0.54	0.50	0.53
XII) クロロホルム/メタノール	8:1	0.76	テーリング	テーリング
XIII) クロロホルム/エタノール	8:1	0.66	0.40	0.47
XIV) クロロホルム/エタノール	4:1	0.76	0.58	0.63

用いられているため、展開と溶媒の蒸発に長時間かかり時間的に不相当である。VII), VIII) は三種のアルカロイドの Rf 値の差が著しく、比較的短時間に実験ができる長所があった。IX) 以下は試料の6N 酢酸溶液を用いてスポットしたが、クロロホルム:エタノール=8:1を展開溶媒に用いると6N アンモニア水、6N 酢酸いずれに溶かした場合も三種のアルカロイドの Rf 値に差があり、展開も溶媒の蒸発も早く、さらに回収溶媒の再生も比較的たやすい利点がある。

なお、hypoxanthine をも含めたプリン系アルカロイドを同定する場合には、クロロホルム:エタノール=4:1を用いるとよい。(後述)

(3) 検出法

プリン系アルカロイドの検出法には、第Ⅰ表のような試薬が一般に用いられている。

I), VI) は明確にアルカロイドの確認ができない。II), III) は爆発の危険や毒性があり、IV) はスプレー後の処理が面倒で時間がかかる。V) は咳や涙がでて学生の健康上望ましくない。VII) の紫外線照射は、展開後塩素蒸気にあてて2573Åの紫外線を照射すると、theobromine は黒色、theophylline は白色のスポットとして検出されたが caffeine は検出できなかった。

以上の点から、VIII) のヨウ素蒸気による検出は手軽で、検出感度も良好であるので引き続き使用するのが適当と結論した。

(4) Merck 社製プレートの特異性

Merck 社製の DC-Fertigplatten-Kieselgel 60 はシリカゲルのひき方が均一で、吸着層がはがれ難いので、未経験な学生には使用上便利である。このはがれ難い理由として、固着剤に普通用いられる硫酸カルシウム、デンプン以外の特殊な固着剤を使用していることが推定される。この固着剤が薄層クロマトグラフィー実施にあたって当然影響を与えることが考えられるので、以下検討を試みた。

赤外線吸収スペクトルは第Ⅰ図—a, b, cに示した。aは薄層プレートから削り落した吸着剤(+固着剤)のスペクトルで、bはこれから固着剤を除いたもののスペクトルである。cは薄層プレートから6N 塩酸でとりだした固着剤のスペクトルである。

スペクトル a, bはシリカゲルに特有な Si-O-Si 伸縮振動を 1100cm^{-1} に、Si-OH 伸縮振動を 800cm^{-1} に示している。 3400cm^{-1} の吸収はおもに Si-OH の O-H 伸縮振動である。スペクトル c は比較的単純で a, b と同様 3400cm^{-1} に大きな吸収があるが、これは N-H 伸縮振動と思われる。 1710cm^{-1} と 1630cm^{-1} の二つの吸収は C=O 伸縮振動を示している。 $2900, 2800\text{cm}^{-1}$ にメチル基、メチレン基の吸収がわずかしか現われていないことから、この固着剤はメチル基またはメチレン基をほとんど含んでいないことがわかる。 6N 塩酸でとりだした固着剤は、外見上高分子膜状で水に溶けないことも考慮すると、この結果から、このプレートは固着剤として尿素系樹脂を用いていると推

定される。なお、このスペクトルは、E. E. Lineken⁴⁾らが得た Aerotex Cream 450 (尿素ホルムアルデヒド系樹脂) の赤外線吸収スペクトルと比較しても、非常に良く似ている。

また、固着剤部分の Griess 反応の結果は陽性で窒素の存在を示した。⁵⁾

尿素系樹脂は、重合度が低い場合、極性の高い溶媒

には溶け易い場合があるので、展開溶媒の選択には注意を要すると思われる。スポット用検液の調製にあたって2N 塩酸を使用するとうまくスポットできないのも、固着剤が塩酸に侵されるためと思われる。

結 論

一定時間で未経験な多数の学生を対象とした学生実験では、短時間で、また誰が行なっても失敗なく実験ができることが望ましい。

この点、Merck社製プレートを使用し以下の条件で実験すると、ほぼ満足すべき結果が得られる。この時の Rf 値は第Ⅱ表 XⅢ) に示した。すなわち、実験条件としては、6N アンモニア水または6N 酢酸で三種のアルカロイドを溶かし、クロロホルム：エタノール＝8：1の展開溶媒で展開し、後ヨウ素蒸気で発色させて同定すればよい。

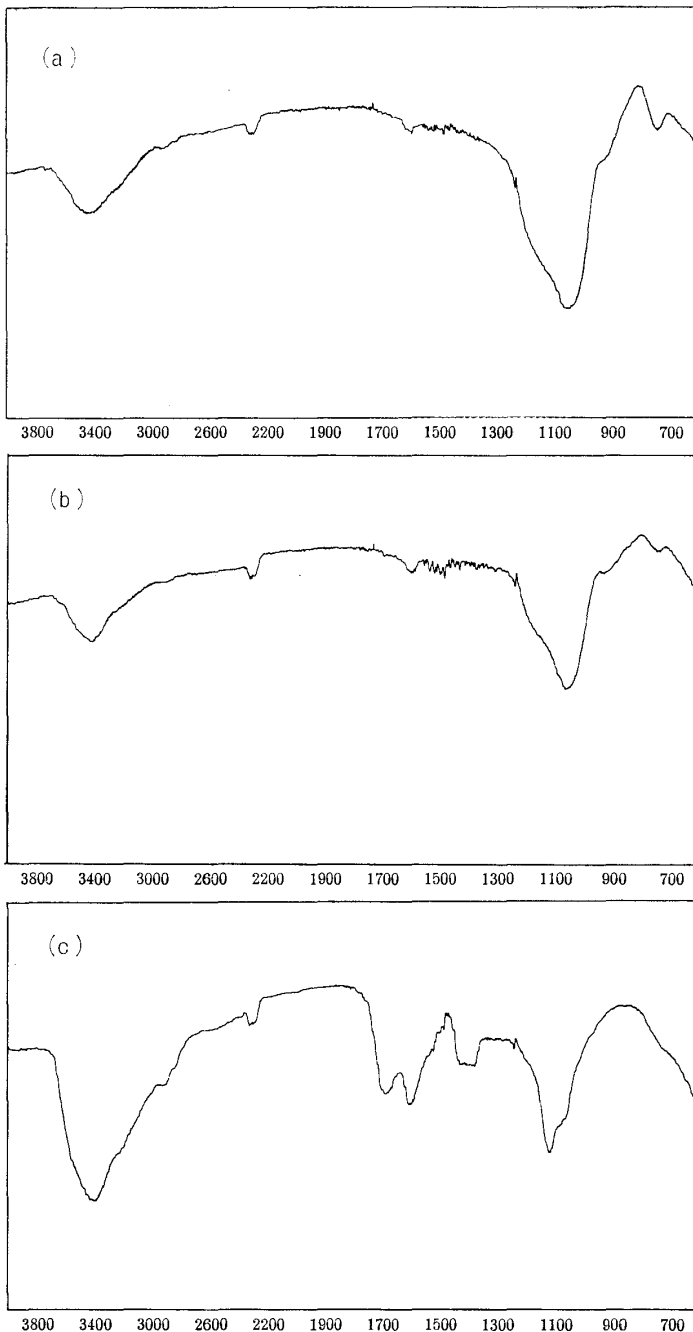
上記三種のアルカロイド以外のプリン系アルカロイド—hypoxanthine, xanthine についてこの方法を用いる時は、スポット用検液溶媒に6N 酢酸、展開溶媒にクロロホルム：エタノール＝4：1を用いると hypoxanthine について Rf 値 0.13 (caffeine 0.76, theobromine 0.58, theophylline 0.63) で同定することができる。

xanthine については、検出法に問題がありうまくいかなかった。

最後になりましたが、この実験にあたり御指導下さいました谷本岩夫教授に、また実験をお手伝下さいました東山容子さん、中山保子さんに深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Rod O' Conner, *J. Chem. Educ.* **42**, 492 (1965)
- 2) 石川正幸他, 薄層クロマトグラフィー—基礎と応用—南山堂, P.111 (1963)
- 3) Egon Stahl, *Thin-layer chromatography* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. P. 457 (1969)
- 4) E. E. Lineken, S. M. Davis and C. M. Jorgensen, *Textile Research J.* **26**, 945 (1956)
- 5) F. Feigl, *Spot tests in organic analysis*, 6th edition, Elsevier, Maruzen. P.97~99 (1960)



第 I 図

- a : DC-Fertigplatten-Kieselgel 60 の吸着剤 (+固着剤) の赤外線吸収スペクトル
 b : 同上吸着剤 (+固着剤) を 6N 塩酸で処理し固着剤を除いた後の吸着剤の赤外線吸収スペクトル
 c : 同上の固着剤の赤外線吸収スペクトル