

ペーパークロマトグラフィーによる無機リン酸塩の分離(第1報)

その他(別言語等)のタイトル	The Separation of Inorganic Phosphate Mixtures by Paper Chromatography (Part 1)
著者	上野 幸三
雑誌名	室蘭工業大学研究報告
巻	3
号	3
ページ	569-574
発行年	1960-06-15
URL	http://hdl.handle.net/10258/3144

ペーパークロマトグラフィーによる 無機リン酸塩の分離 (第1報)

上野 幸三

The Separation of Inorganic Phosphate Mixtures by Paper Chromatography (Part I)

Kozo Ueno

Abstract

In this paper the separation of inorganic phosphate mixtures by paper chromatography is studied as to how it influences on the variety of filter papers and the solvents. The papers used were No. 50, 51, 51 A, 52, 53 and 54 (Toyo Roshi Co., Chromatographic paper). The solvent systems used were: Solvent A) Iso-propyl alcohol-water-formic acid (Berg's solvent); Solvent system B) Aceton-water-20% trichloroacetic acid (Bernhart & Chess' solvent system). The time of run was 6 hours at 20°C. for solvent A, and 4 hours at 10°C. and 3 hours at 20°C. for solvent system B.

The following are the results obtained with paper No. 53:

1. Paper No. 53 gave the best result of separation and No. 51 came next, and No. 54 gave the worst result on both Berg's and Bernhart & Chess' solvents.
2. The R_f -values of ortho- and pyrophosphates were 0.67, 0.34 and 0.79, 0.65, respectively, on Berg's and Bernhart & Chess' solvents.
3. On the solvent system B, the solvent, mixed acetone 70, water 5 and 20% trichloroacetic acid 25 ml., gave the best result.
4. With this solvent, ortho-, pyro-, tri- and metaphosphates were separated successfully.

1. 緒 言

ここ数年間の研究の結果、各種の無機リン酸混合物および無機リン酸塩混合物の分離にはペーパークロマトグラフィーによるのが最も効果的であることがわかり、^{1)-4), 8)-12)} また各種のリン酸エステルの分離にもペーパークロマトグラフィーが有効に利用されており、⁵⁾⁻⁷⁾ 現在では分析化学や無機化学の分野はもちろんのこと、生物化学、生物学、農学、食品工業その他各方面でこれが利用されている。しかし、この方法の欠点は分離に比較的長時間を要することである。従つて分離度を悪くせずに分離に要する時間を短縮することを目的として、溶媒および口紙の選択の研究が多くなされている。例えば G. G. Berg¹⁾ はイソプロピルアルコール-水-ギ酸系の溶媒を用い、また D. N. Bernhart & W. B. Chess²⁾ はアセトン-水-トリクロロ酢酸系溶

媒を用い、ペーパークロマトグラフィーによる各種無機リン酸塩混合物の分離を比較的短時間でこなしている。著者は上記の両溶媒系によるペーパークロマトグラフィーを追試するとともに、最も適当な口紙を選び、最適の溶媒組成を決定する目的で本実験を行なった。

2. 試料, 溶媒および操作

試料 一水素正リン酸ナトリウム (Na_2HPO_4) およびピロリン酸ナトリウム ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) はともに、関東化学の特級品の水溶液にエチルアルコールを加えて再結晶し、 $105^\circ\sim 110^\circ\text{C}$ で脱水した。トリリン酸ナトリウム ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$) は和光純薬の分析用を、メタリン酸ナトリウム ($(\text{NaPO}_3)_n$) は関東化学の特級品をいずれもそのまま用いた*。

溶媒 2つの溶媒系 A, B を用いた。

i) 溶媒 A (イソプロピルアルコール-水-ギ酸系)⁷⁾

イソプロピルアルコール 75 ml, 水 20 ml, ギ酸 5 ml, 濃アンモニア水 0.1 ml を混合し、トリクロロ酢酸で pH 1.4 にした。

ii) 溶媒系 B (アセトン-水-トリクロロ酢酸系)⁷⁾

アセトン 60~70 ml, 水 15~5 ml, 20% トリクロロ酢酸 (20 g を水に溶かし, 濃アンモニア水 1.4 ml を加え水で 100 ml とする) 25 ml を混合したものと, アセトン 65~70 ml, 水 15~10 ml, 20% トリクロロ酢酸 20 ml を混合したものをを用いた。最適のものは, アセトン 70 ml, 水 5 ml, 20% トリクロロ酢酸 25 ml を混合したものであることがわかった。

モリブデン酸アンモニウム溶液⁷⁾ 特級品 10 g を 200 ml の水に溶かし, 濃塩酸 (特級品) 10 ml と 72% 過塩素酸 (特級品) 50 ml とを加え, 水でうすめて 1 l とする。

塩化第一スズ溶液⁷⁾ 結晶塩化第一スズ (特級品) 8 g を濃塩酸 (特級品) 3 ml に溶かしたものを源溶液とし, 使用時にこの 1~2 滴を 0.2 規定塩酸で 20 ml とした。源溶液は 10 日毎に新たに調製する。

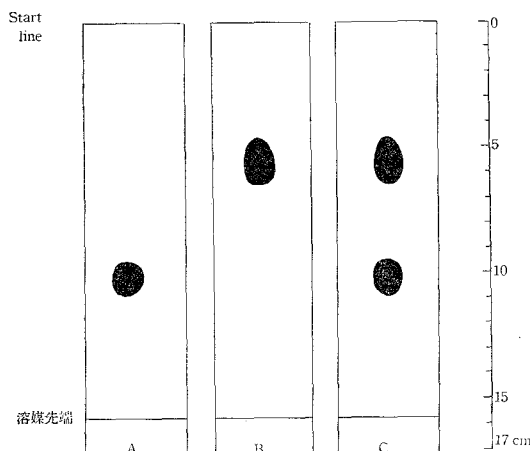
操作 40 cm 角の口紙を 4 cm 幅に切り, 一端から 9 cm の所を start line とし, 他端にガラス棒をつけておもりとする。各試料溶液をペーパークロマトグラフ用マイクロピペットでとり, start line の中央に少量吸収させ赤外線電球で乾燥し, 乾燥後また少量吸収させ, このようにして所定量の試料を吸収させた後, 東洋口紙製ペーパークロマトグラフ用装置 C 号器附属の口紙掛けに口紙をつるし, 装置の底に少量の溶媒を入れ, 所定の温度に一夜おいて口紙を溶媒蒸気で飽和させ, 翌日溶媒 40 ml を C 号器附属のロートから加え, 10° または 20°C (ともに $\pm 1^\circ\text{C}$) に一定時間おき, 口紙を装置から取出して口紙に吸収された溶媒先端に印をつけて風

* これらはともに水溶液から再結晶すると加水分解する恐れがある。

乾する。乾燥後モリブデン酸アンモニウム溶液をスプレーし、80°~90°Cの水蒸気で飽和している乾燥器内に5~7分おき、つぎに塩化第一スズ溶液をスプレーし、再び80°~90°Cの水蒸気で飽和している乾燥器内に4~5分おいて発色させる。

3. 実験および考察

ペーパークロマトグラフィでは溶媒を適当に選ぶこととロ紙の種類を選択することが、分離度をよくし分離所要時間を短縮する上に非常に大切である。そこでロ紙は東洋ロ紙製のペーパークロマトグラフ用 No. 50, 51, 51A, 52, 53 および 54; 溶媒としては G. G. Berg の溶媒¹⁾, すなわち溶媒 A と, 溶媒系 B のうち D. N. Bernhart & W. B. Chess の溶媒²⁾, すなわちアセトン 65 ml, 水 10 ml, 20% トリクロロ酢酸 25 ml のものを用い, Na₂HPO₄ および Na₄P₂O₇ (ともに 5:P) および両者の混合物 (1:1) の 20°±1°C におけるペーパークロマトグラフィを行なった。時間は溶媒 A については 6 時間, Bernhart & Chess の溶媒については 3



第1図 正およびピロリン酸塩のペーパークロマトグラム

A: Na₂HPO₄, B: Na₄P₂O₇, C: Na₂HPO₄+Na₄P₂O₇, 溶媒: G. G. Berg, 温度: 20°±1°C 時間: 6 hrs.

時間であつた。その結果, 両溶媒ともに No. 53 が一番良好で, No. 51 がこれにつき, No. 54 はスポットが全体に拡がり一番不適當であつた。No. 53 を用いた場合の溶媒 A によるペーパークロマトグラムは第1図に示す通りで, またこの時の正およびピロリン酸塩の R_f 値は第1表に示す通りである。

第1表 両溶媒系における正およびピロリン酸塩の R_f 値

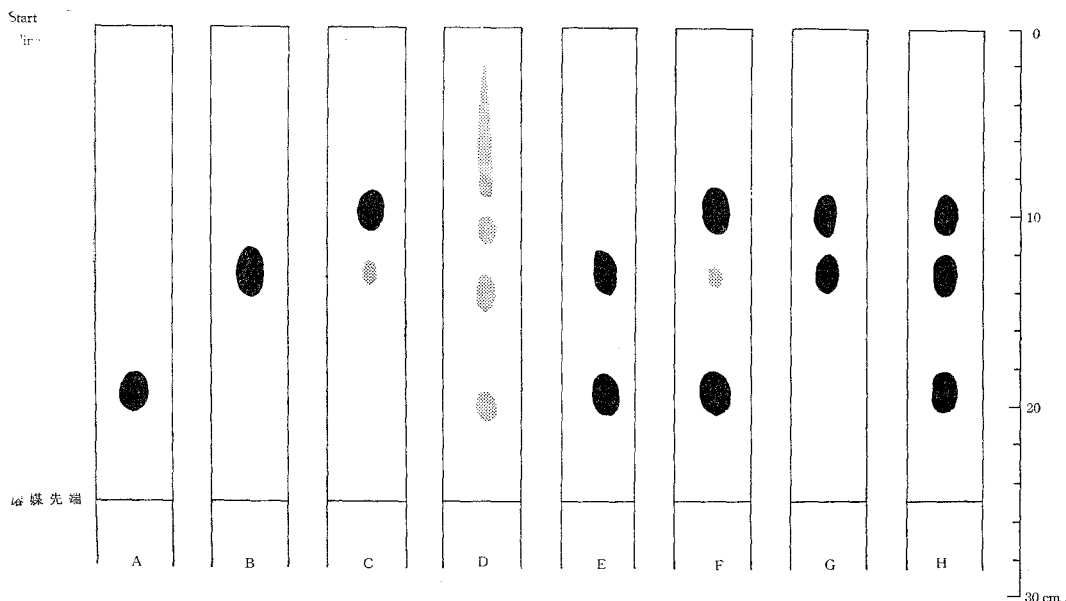
溶 媒	A	Bernhart & Chess
Na ₂ HPO ₄	0.67	0.79
Na ₄ P ₂ O ₇	0.34	0.65

第1表から明らかなように, 正およびピロリン酸塩のみの分離では, 溶媒 A を用いるの方が R_f 値の差が大であるからより効果的であるが, ピロリン酸塩よりもさらに高次のトリおよびテトラリン酸塩やメタリン酸塩の分離の場合を考えると, むしろピロリン酸塩の R_f 値がもう少し大きい溶媒の方が望ましく, 従つて著者の検討している2つの溶媒系では, アセトン-水-トリクロロ酢酸系の溶媒の方が適していると思われる。その上所要時間が短い方が, 実験中温度を一定に保ちやすい利点があるので, 溶媒系 B を採用することにした。

D. N. Bernhart & W. B. Chess²⁾ は、溶媒としてアセトン 65 ml, 水 10 ml, 20% トリクロ酢酸 25 ml の混合溶液を、ロ紙として Carl Schleicher & Schuell Co. の No. 589 (orange ribbon) を用い、下降法によつて 10°C では 3 時間、室温では 2 時間で、各種無機リン酸塩混合物のペーパークロマトグラフィーによる分離を行なつていたので、著者は本実験で最適であつた東洋ロ紙製ペーパークロマトグラフ用ロ紙 No. 53 を用い、溶媒系 B の組成を変え C 号器を用い 20°C で正およびピロリン酸ナトリウムの下降法による分離を行なつた。すなわち、20% トリクロ酢酸を 25 ml とし、アセトン：水を 60：15, 65：10, 70：5, 73：2, 75：0 とした場合と、トリクロ酢酸を 20 ml とし、アセトン：水を 65：15, 70：10 とした場合について実験を行なつた。その結果トリクロ酢酸は 25 ml とした場合の方が 20 ml とした場合より結果がよく、またアセトンの量は 70 ml 以下の方がよいことがわかつた。

そこでトリクロ酢酸の量を 25 ml とし、アセトン：水を 60：15, 65：10, 70：5 とした溶媒を用い、正、ピロ、トリおよびメタリン酸ナトリウムの各単独溶液 (いずれも 5 rP) について、10°C, 4 時間; 20°C, 3 時間の条件下で下降法によるペーパークロマトグラフィーを行ない、各リン酸塩の R_f 値を測定した。その結果を第 2 表に示す。

第 2 表の R_f 値の中で、トリリン酸塩についてかつこで示している数値はピロリン酸塩の



第 2 図 正、ピロ、トリおよびメタリン酸塩のペーパークロマトグラム

A: Na_2HPO_4 , B: $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, C: $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, D: $(\text{NaPO}_3)_n$, E: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$,
 F: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, G: $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + \text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, H: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + \text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$,
 溶媒: アセトン 70, 水 5, 20% トリクロ酢酸 25 ml, 温度: $10^\circ \pm 1^\circ\text{C}$

ものであることは、ピロリン酸塩の R_f 値と比較すれば明らかであり、また第2図のクロマトグラムをみてもわかる。トリリン酸ナトリウムは分析用を使用したのであるが、純粋なものでないことになり、またこのことは一方ではクロマトグラフィは非常に感度のよい分離法であること示す証拠でもある。

(試料は5 γ Pを含む溶液である。) またメタリン酸ナトリウムの場合、そのクロマトグラム(第2図参照)をみても明らかのように、正、ピロ、トリリン酸塩のほかにトリメタ、テトラメタリン酸塩等も混合しているものと考えられる。それで本試料も特級品を使用しているが、純粋なものではない。従つてメタリン酸塩の R_f 値は測定しなかつた。

第2表にみられるように、トリクロロ酢酸の量が一定の場合は、アセトンの量が少く、従つて水の量が多い場合は、各リン酸塩の R_f 値そのものは大きい、各リン酸塩の R_f 値の差はアセトンの量の多い場合の方が大きくなる。また前述のようにアセトンが70 ml以上では結果は良くない。それで本実験で最適の溶媒は、アセトン70 ml、水5 ml、20%トリクロロ酢酸25 mlを混合したものとした。

この最適の溶媒を用い、ロ紙 No. 53 で10°C、4時間の条件で下降法によつて正、ピロ、トリおよびメタリン酸ナトリウムの各単独溶液(いずれも5 γ P)、および正+ピロ、正+トリ、ピロ+トリ、正+ピロナトリリン酸ナトリウム混合溶液(各リン酸塩はいずれも5 γ P)のペーパークロマトグラフィを行なつた。その結果が第2図である。

なお、20°C、3時間の場合の下降法によるペーパークロマトグラムおよび R_f 値は、いずれも10°C、4時間の場合とほとんど同じであつた。

Bernhart & Chess の実験と比較すると、著者の場合は実験時間が10°C、20°Cの場合とも1時間長く、溶媒のアセトンと水の割合が違つている点に相違があるが、結果は満足すべきものであつた。

E. Karl-Kroupa⁹⁾ は各種リン酸塩の分離を二次元によつて行なつており、また、D. N. Bernhart & W. B. Chess²⁾ はデシトメーターを用いてペーパークロマトグラムからリン酸塩の定量を行なつているので、著者は今後さらに研究を重ねてこれらの点を検討してみる積りである。

4. 結 言

以上の結果を要約するとつぎのとおりである。

第2表 溶媒系Bによる正、ピロ
およびトリリン酸塩の R_f 値

アセトン, ml	60	65	70
Na ₂ HPO ₄	0.83	0.79	0.76
Na ₄ P ₂ O ₇	0.71	0.65	0.52
	(0.71)	(6.64)	(0.53)
Na ₅ P ₃ O ₁₀	0.65	0.54	0.41

(1) イソプロピルアルコール-水-ギ酸系溶媒とアセトン-水-トリクロロ酢酸系溶媒による、各種の無機リン酸塩のペーパークロマトグラフィーを下降法で20°Cで行なった。所要時間は前者では6時間、後者では3時間であつたので、分離に要する時間を短縮する意味から、後者の方を溶媒として採用した。

(2) アセトン-水-トリクロロ酢酸系溶媒では、アセトン70 ml, 水5 ml, 20% トリクロロ酢酸25 ml の場合が最適であつた。

(3) 東洋口紙製ペーパークロマトグラフ用口紙の中では、No. 53 が一番本実験に適していた。

(4) No. 53 および最適の溶媒を用いて正、ピロ、トリおよびメタリン酸ナトリウムの各単独溶液、および正、ピロおよびトリリン酸ナトリウムの混合溶液の下降法によるペーパークロマトグラムを作り、正、ピロおよびトリリン酸塩の R_f 値を測定した。

10°Cの実験は本字の低温室を恒温室として使用した。その際種々御便宜を与えて下さつた機械工学科の千谷、内藤の両教官、低温室の運転に援助を賜つた三橋、早川の両氏に厚く謝意を表わします。

(昭和34年11月、日本分析化学会北海道支部発表会および同35年4月、日本化学会年会で発表)

(昭和35年5月20日受理)

文 献

- 1) Berg, G. G.: Anal. Chem. **30**, 213 (1958)
- 2) Bernhart, D. N. & Chess, W. B.: Ibid. **31**, 1026 (1959)
- 3) Crowther, J.: Ibid. **26**, 1383 (1954)
- 4) Ebel, J. P.: Bull. soc. chim. France **20**, 991, 998 (1953)
- 5) Eggleston, L. V. & Hems, R.: Bioch. J. **52**, 156 (1959)
- 6) Fleckenstein, A. & Gerlach, E.: Naturwissenschaften **40**, 162 (1953)
- 7) Hanes, C. S. & Isherwood, F. A.: Nature **164**, 1107 (1949)
- 8) Karl-Kroupa, E.: Anal. Chem. **28**, 1091 (1956)
- 9) Smith, M. J.: Ibid. **31**, 1023 (1959)
- 10) Van Wazer, J. R. & Karl-Kroupa, E.: J. Amer. Chem. Soc. **78**, 1772 (1956)
- 11) Westman, A. E. R. & Scott, A. E.: Nature **164**, 1107 (1949)
- 12) Westman, A. E. R., Scott, A. E. & Podley, J.: Chemistry in Can. **4**, 189 (1952)