

Р. Я. ШКОЛЬНИК

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТАХ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

(Представлено академиком А. И. Опариним 13 IV 1953)

При исследовании самых разнообразных физиологических процессов растений или животных: фотосинтеза, дыхания, брожения и др., часто приходится определять органические кислоты, представленные в растворе в виде смеси. По этой причине нужны методы определения органических кислот, позволяющие разделять отдельные кислоты, не воздействуя на другие.

Такими методами являются бумажная хроматография и распределительная хроматография на колонке. Принципы этих методов разработаны классическими работами М. С. Цвета (1).

Нами изучался метод бумажной хроматографии в применении к экстрактам из растений.

Прежде чем приступить к работе с растительными экстрактами, было проведено изучение поведения смеси чистых органических кислот при применении различных растворителей для их разделения.

Были испытаны следующие растворители:

1. Этиловый спирт — аммиак — вода (2) в отношении 90 : 5 : 5.
2. Фенол — муравьиная кислота — вода (3). Фенол отогнан при 178°. 30 г белого кристаллического фенола растворено в 10 мл воды. Прибавлено 0,4 мл 90% муравьиной кислоты.
3. Хлороформ — этиловый спирт — муравьиная кислота (4). Хлороформа 2 мл, 95% этилового спирта 1 мл, 90% муравьиной кислоты 2 мл.
4. *n*-бутиловый спирт, насыщенный муравьиной кислотой и водой (5) в соотношении 18 : 2 : 9. Смесь встряхивается, после отстаивания отделяется вода.

Хорошее разделение кислот было получено при использовании в качестве растворителя фенола и *n*-бутилового спирта.

Однако для щавелевой и винной кислот величины R_F в феноле очень близки (0,16 и 0,17), а удаление фенола является весьма длительной операцией. Таким образом, наилучшим растворителем для разделения органических кислот следует признать *n*-бутиловый спирт, насыщенный муравьиной кислотой и водой. Поэтому в дальнейшем мы испытали возможность применения метода разделения нелетучих органических кислот в экстрактах из растений в том виде, в каком он описан А. Родопуло (5) для разделения органических кислот в вине.

Очень четкое и полное разделение кислот получалось в круглой металлической камере 70,5 × 29 см при экспозиции в 48 час.

В качестве «свидетелей» применялись водные 0,1 М растворы щавелевой, винной, лимонной, яблочной, гликолевой и янтарной кислот. Для фумаровой кислоты, которая очень плохо растворима в воде и хорошо

растворима в спирте, применялся 0,1 М спиртовой раствор. Смесь кислот в качестве «свидетеля» готовилась с таким расчетом, чтобы количество каждой кислоты, входящей в состав смеси, составляло 0,1 моля.

0,1 М растворы щавелевой, винной, лимонной и яблочной кислот наносились в количестве по 0,005 мл. Так как янтарная, гликолевая и фумаровая кислоты проявляются труднее названных выше, то янтарной и гликолевой наносилось по 0,02 мл 0,1 М раствора, а фумаровой 0,02 мл 0,1 М спиртового раствора. Смесь кислот 0,01 мл.

После 48 час. нахождения в растворителе лист бумаги высушивался и опрыскивался 0,04% раствором бромфенолблау. На синем фоне появлялись желтые пятна органических кислот. Получены следующие R_f для растворов чистых кислот: щавелевая 0,09; винная 0,21; лимонная 0,31; яблочная 0,46; гликолевая 0,56; янтарная 0,68; фумаровая 0,72.

Эти значения очень близки к значениям R_f , полученным А. Родопуло⁽⁵⁾ для тех же кислот, кроме гликолевой, им не приведенной.

Чтобы получить хроматограммы органических кислот из растительных экстрактов, кислоты извлекались эфиром из растительного материала. Чтобы освободить эфир от возможного присутствия перекисей, спиртов, кислот и др., эфир перед экстракцией обрабатывался соответствующим образом⁽⁶⁾.

Сначала эфир взбалтывался 3—4 раза с водой, затем каждый литр промытого эфира тщательно перебалтывался с 20 мл 10% NaOH с 5—10 г порошкообразного $KMnO_4$. После этого эфир просушивался над прокаленным Na_2SO_4 в течение ночи и отгонялся. Важно, чтобы эфир указанным образом был обработан не более, чем за 24 часа до употребления.

Для экстракции эфиром бралась навеска в 0,5 г высушенного до абсолютного веса растительного материала, прибавлялось 1 мл 4 N H_2SO_4 и после перемешивания прибавлялся 1 г асбеста. Затем смесь опять перемешивалась до получения гомогенной массы, и все количественно переносилось в экстракционные сосуды Сокслета для экстракции в течение 18 час. очищенным серным эфиром⁽⁷⁾.

После экстракции в экстракционные сосуды прибавлялось 8 мл воды. Смесь хорошо взбалтывалась и эфир отгонялся. Водный остаток переносился в мерную колбу на 10 мл, где доводился водой до метки.

Раствор отфильтровывался. Кроме этого раствора, который мог бы оказаться разбавленным, для некоторых кислот готовился также более концентрированный раствор. 7—8 мл разбавленного раствора выпаривались на водяной бане досуха и сухой остаток растворялся в 1 мл воды. Этими двумя растворами — сначала разбавленным, затем концентрированным — пользовались для того, чтобы подобрать наиболее удачную концентрацию, при которой проявлялись бы кислоты, содержащиеся в растении в большем и меньшем количестве. Обычно испытывали от 0,01 до 0,06 мл «разбавленного» или «сгущенного» раствора.

Нами получены хроматограммы органических кислот, содержащихся в экстрактах из листьев шелковицы (*Morus*), алоэ (*Aloe arborescens*), живучки (*Sempervivum globiferum*), молодило (*Sempervivum soboliferum*). Расположение кислот в этих экстрактах на хроматограмме показано на рис. 1.

Из хроматограммы органических кислот экстракта из листьев шелковицы видно, что в них содержатся щавелевая, винная, лимонная, яблочная, гликолевая и янтарная кислоты (см. рис. 1)*.

В листьях алоэ обнаружены щавелевая, лимонная, яблочная и янтарная кислоты. В листьях *Sempervivum globiferum* и *S. soboliferum* найдены щавелевая, лимонная, яблочная и гликолевая кислоты (см.

* Количественное изучение некоторых органических кислот в листьях шелковицы проводилось М. Люзиным⁽⁸⁾.

рис. 1). Согласно литературным данным ⁽⁹⁾, в растениях рода *Sempervivum* содержится изолимонная кислота. Однако отдельного пятна, помимо тех, для которых нами были нанесены «свидетели», не получено. Возможно, что R_F лимонной и изолимонной кислот настолько близки, что для обеих кислот получается одно пятно.

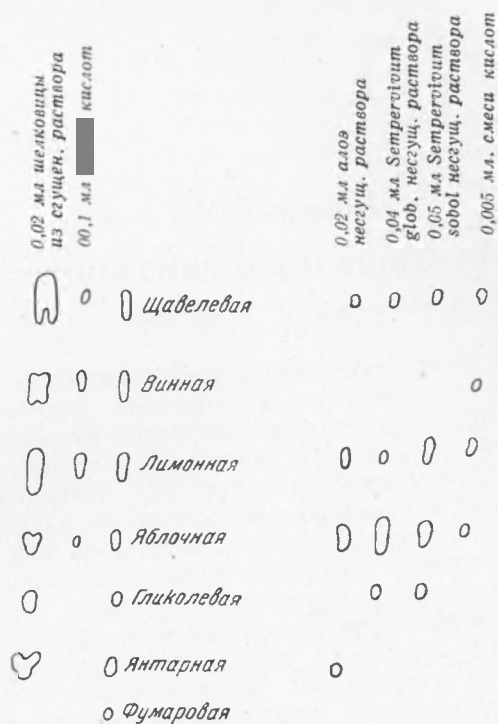


Рис. 1

Метод бумажной хроматографии органических кислот может оказать большую помощь при исследовании различных растворов растительного и животного происхождения, когда требуется предварительно узнать качественный состав этих растворов, чтобы после этого соответствующими методами количественно определить обнаруженные кислоты.

Если количественное определение кислот делается на колонке силикагеля, то метод бумажной хроматографии может существенно помочь в тех случаях, когда возникает необходимость идентифицировать отдельные кислоты.

Приношу глубокую благодарность проф. С. М. Прокошеву за ценные указания и советы при выполнении работы.

Поступило
9 II 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. С. Цвет, Тр. Варш. об-ва естествоисп., отд. биол., 11, 1 (1903).
- ² F. Brown, Nature, 167, No. 4246, 441 (1951).
- ³ I. Opienska-Blauth, O. Saklawska-Szymonowa, M. Kanski, Nature, 168, No. 4273, 511 (1951).
- ⁴ J. B. Stark, A. Goodban, H. Owens, Anal. Chem., 23, 3, 413 (1951).
- ⁵ А. Родопуло, Виноделие и виноградарство СССР, № 8 (128), 8 (1952).
- ⁶ G. Pucher, H. Vickery, A. Wakeman, Ind. Ing. Chem. Anal. Edit., 6 (2), 140 (1934).
- ⁷ G. Pucher, A. Wakeman, H. Vickery, ibid., 13, 244 (1941).
- ⁸ М. Лиозин, Зап. МГПИ, в. 2, 163 (1936).
- ⁹ H. Krebs, L. Eggleston, Biochem. J., 38, 426 (1944).