

Р. Я. ШКОЛЬНИК

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В РАСТЕНИЯХ МЕТОДОМ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА СИЛИКАГЕЛЕ

(Представлено академиком А. И. Опариным 2 VI 1954)

В настоящее время метод распределительной хроматографии применяется для количественного разделения органических кислот в растительных тканях. Для этой цели применяется колонка силикагеля. В литературе имеются указания, что силикагель теряет способность адсорбировать органические кислоты при обработке его 10 н HCl при комнатной температуре. Поэтому вначале нами была сделана попытка обработать 10 н HCl готовый силикагель марки АСК-2.

Однако разделить кислоты на силикагеле АСК-2 не удалось, так как этот силикагель и после соответствующей обработки адсорбирует органические кислоты. Поэтому из силиката натрия был приготовлен силикагель по методу, описанному Айшервудом (1).

В дальнейшем мы убедились, что силикагель, приготовленный таким образом, хорошо разделяет смесь органических кислот, но фильтрование растворителя идет очень медленно. Поэтому силикагель после его выделения, обработки 10 н HCl и полного освобождения от хлора сразу взмучивался в воде и разделялся на три фракции. Отдельные фракции затем высушивались спиртом, эфиром и 24 часа при 105°. Просушенный силикагель просеивался через шелковое сито № 43 и хранился в стеклянных банках с притертыми пробками. Фракции были получены после 10-минутного, 30-минутного и 24-часового отстаивания. Удовлетворительное фильтрование получалось только при применении фракции силикагеля, полученной после 10-минутного отстаивания.

Хроматографическая колонка. Хроматографическая колонка, несколько модифицированная по сравнению с описанной в литературе (2), представляет собой (рис. 1) стеклянную трубку 1 диаметром 1,1 см и длиной 45 см, суженную с одного конца и снабженную краном. В трубку в месте сужения впаян пористый стеклянный фильтр. Верхняя часть трубки плотно закрыта резиновой пробкой, в которую вставлена капельная воронка, заканчивающаяся тереходовым краном 2. Кран этот соединяет колонку с источником давления и регулирует приток растворителя в колонку. Сверху капельная воронка тоже плотно закрыта резино-

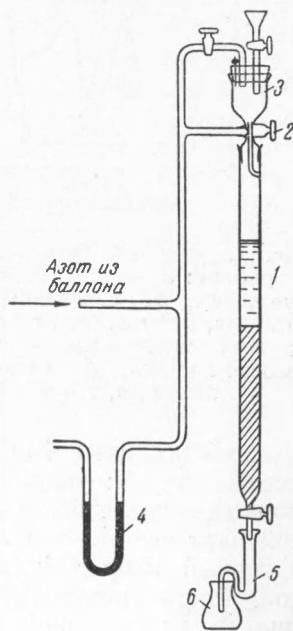


Рис. 1

вой пробкой 3, в которую вставлены воронка для приливания растворителя, трубка для сообщения с внешним воздухом и трубка для сообщения с баллоном азота. При помощи манометра 4 регулируется давление. Пробы отбираются при помощи сифона 5, из которого растворитель автоматически сливается в титровальную колбу 6.

Колонка готовилась таким образом. К 3,0 г силикагеля прибавляли 1,0 мл воды, тщательно перемешивали фарфоровой ложечкой, но не растирали пестиком, так как это ведет к дальнейшему измельчению силикагеля. После получения однородной массы силикагель переносился в стаканчик на 100 мл.

К силикагелю прибавляли 30 мл хлороформа, тщательно перемешивали и быстро переносили в колонку через воронку с коротко срезанным кончиком. В течение 20—30 мин. хлороформ стекал свободно. После этого колонка соединялась с баллоном с азотом и давалось внешнее давление 5—8 см рт. ст.; силикагель под давлением уплотняется. Когда уровень силикагеля больше не снижается, колонка готова к употреблению. Над колонкой должен все время оставаться слой растворителя.

Для титрования вносимых кислот отбирались пробы при помощи автоматического сифона по 4,5 мл и титровались 0,01 *N* спиртовым раствором NaOH в присутствии индикатора тимолблау (0,04 % спиртовой раствор). Водный раствор щелочи для титрования неудобен, так как получается плохо смешивающаяся с бутиловым спиртом — хлороформом эмульсия, в которой трудно уловить конец титрования.

Перед тем как приступить к определению органических кислот

в растениях, нами был проведен порядок выхода из колонки следующих чистых кислот: уксусной, фумаровой, пировиноградной, гликолевой, яблочной, щавелевой, малоновой, лимонной и винной. В качестве подвижной фазы использованы два растворителя: бутиловый спирт — хлороформ и серный эфир. Оба растворителя перед применением насыщались водой. Растворитель насыщался водой и отфильтровывался через сухой фильтр. При применении в качестве подвижной фазы бутилового спирта — хлороформа растворы чистых кислот готовились следующим образом. 15 мг кислоты растворялось в 10 мл 10% бутилового спирта — хлороформа. 15 мг фумаровой кислоты из-за плохой ее растворимости было растворено в 50 мл 10% бутилового спирта — хлороформа.

На колонку, на которой оставалось после ее приготовления около 1 мм хлороформа, наносилось 2 мл раствора кислоты и велось промывание кислот 10% и 35% бутиловым спиртом — хлороформом. Полученные результаты представлены на рис. 2.

При применении серного эфира в качестве подвижной фазы предварительно производилась его очистка от перекисей, спиртов, кислот и др. (3). 25 мг каждой из перечисленных выше органических кислот рас-

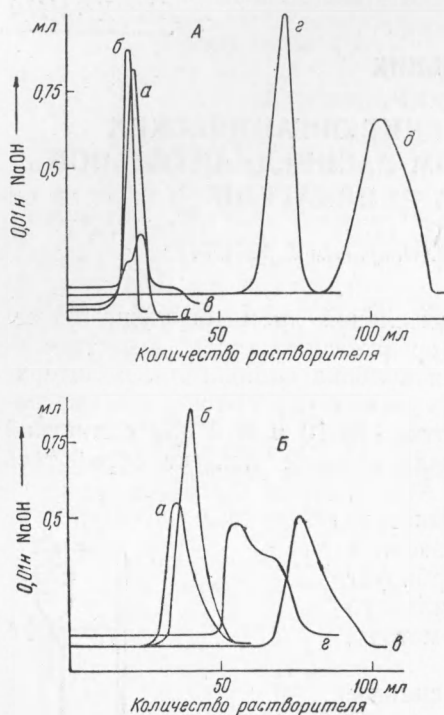


Рис. 2. А — 10% бутиловый спирт — хлороформ: а — уксусная кислота, б — фумаровая, в — пировиноградная, г — янтарная, д — малоновая. Б — 35% бутиловый спирт — хлороформ: а — щавелевая кислота, б — гликолевая, в — лимонная, г — яблочная

творялось в 25 мл очищенного эфира, в котором хорошо растворяются все кислоты, кроме малоновой и особенно винной. Однако через несколько часов и малоновая, а через сутки и винная кислоты полностью растворились. По 3 мл раствора кислоты вносились на колонку и промывалось эфиром, насыщенным водой. Полученные результаты представлены на рис. 3.

Для подготовки растительных экстрактов бралась навеска от 0,5 до 2,0 г абсолютно-сухого материала, обрабатывалась и экстрагировалась серным эфиром таким же образом, как это делается для бумажной хроматографии (4). Эфирный экстракт взбалтывался с 7—8 мл воды. Водный остаток после отгонки эфира доводился до 10 мл и отфильтровывался. Для разделения кислот бралось 0,5 мл водного раствора кислот и вносилось на колонку. Если этот раствор являлся слишком концентрированным, то его разбавляли с таким расчетом, чтобы на колонку попадало не более чем 0,5 мл водного раствора. Раствору давали впитаться до тех пор, пока его оставалось над колонкой около 1 мм, и только после этого постепенно давали соответствующее давление (если давление дать сразу, то верхняя часть колонки силикагеля, более оводненная, отслаивается и дает трещины). После этого велось промывание колонки вначале 10% бутиловым спиртом — хлороформом, а затем 35% раствором бутилового спирта — хлороформа. Если в растворе имелись кислоты с близкими значениями R_F и их не удавалось разделить из водного раствора, то брали новую порцию в 0,5 мл водного раствора, выпаривали на водяной бане досуха, прибавляли 5 мл 35% раствора бутилового спирта — хлороформа и оставляли на сутки для полного растворения. Этот раствор вносили на свежеприготовленную колонку и производили разделение кислот, как это описано выше.

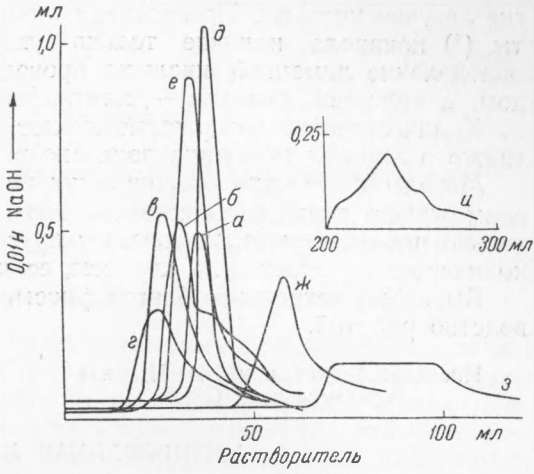


Рис. 3. а — щавелевая кислота, б — малоновая, в — янтарная, г — пировиноградная, д — уксусная, ж — фумаровая, з — гликолевая, и — лимонная

Таблица 1

Кислоты ягод черники, брусники и листьев молодило (в %)

Кислота	Черника		Брусника		Молодило	
	на сухой вес ягод				на сухой вес листьев	
	на колонке	друг. методами	на колонке	друг. методами	на колонке	друг. методами
Уксусная	0,24	0,09	—	—	0,55	0,52
Щавелевая	0,28	—	0,58	—	0,17	—
Гликолевая	—	—	—	—	2,23	—
Яблочная	0,56	0,48	2,98	2,93	3,13	3,27
Изолимонная	—	—	—	—	4,85	—
Лимонная	1,58	1,59	—	—	0,79	0,68

Были исследованы экстракты из ягод черники, брусники и из листьев молодило (*Sempervivum soboliferum*). После определения кислот на колонке некоторые кислоты были количественно идентифицированы. Количественное определение уксусной кислоты были проведено методом отгона ее с водяным паром. Однако с водяным паром могли отогнаться и другие летучие кислоты. Проведенная же идентификация отогнанной кислоты ⁽⁵⁾ показала наличие только уксусной кислоты. Количественное определение лимонной кислоты проведено пентабромацетоновым методом, а яблочной кислоты — динитрофенилгидразиновым методом.

Количественное содержание кислот в ягодах черники и брусники, а также в листьях молодило показано в табл. 1.

Метод определения органических кислот на колонке силикагеля дает возможность точно количественно определить отдельные кислоты значительно проще, чем это позволяют другие методы, а также разделить и количественно определить кислоты, если они имеются в смеси.

Выражаю искреннюю благодарность проф. С. М. Прокошеву за руководство работой.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
2 XI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. A. Ysherwood, *Biochem. J.*, **40** Nos 5 and 6, 688 (1946).
² W. A. Bullen, Y. E. Varher, R. C. Burell, *Anal. Chem.*, **24**, No 1, 187 (1952). ³ G. Pucher, H. Vickery, A. Wakeman, *Ind. Eng. Chem., Anal. Edit.*, **6** (2), 140 (1934). ⁴ Р. Я. Школьник, *ДАН*, **90**, № 5 (1953). ⁵ А. Н. Белозерский, Н. И. Проскураков, *Практическое руководство по биохимии растений*, М., 1951, стр. 316.