

キチンによるフェノール類および アミノ酸の薄層クロマトグラフィー*

武田 道夫・富田 輝雄

Chitin Adsorbent in Thin-Layer Chromatography for Separation
of Phenols and Amino Acids

By

Michio TAKEDA and Teruo TOMIDA

Chitin is known to resist many reagents because of the intermolecular hydrogen bonding between carbonyl and amide groups^{3) 4)}. FORWARD *et al*⁷⁾ reported that linear polyamide is able to absorb polar substances with the formation of hydrogen bond in the amorphous region.

The present investigation was undertaken to see if the polysaccharide have an ability for adsorbent of thin-layer chromatography. The results obtained were summarized as follows:

An adsorption activity of chitin powder was greater than that of cellulose powder for each coloring matter applied (*i.e.* methylene blue, tartrazine, victoria blue, and phloxine) in aqueous solution, especially the former two which has the nonionic nitrogen atom in molecule seems to be absorbed strongly.

The adsorbent activity, which was evaluated by STAHL's method¹²⁾, of chitin for thin-layer chromatography was somewhat greater than that of polyamide, but considerably smaller than that of silica gel.

A separating ability of chitin layer for some phenols was superior to those of silica gel and polyamide layers of which applications had already been reported in some studies¹⁴⁾.

For resolution of amino acids on thin-layer, chitin powder had the almost equal ability to silica gel. But, on chitin-layer, the basic amino acids travel much faster than on silica gel, while the *R_f*-values of acidic ones are decreased.

*水産大学校研究業績 第583号, 1969年6月30日 受理.

Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 583.

Received June 30, 1969.

日本化学会中国四国・九州支部合同徳島大会(昭和43年11月8日)で発表.

1. 緒 言

動植物の構造成分として、自然界に広く分布するキチンは、2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコースが、1, 4'-グリコシド結合によって直鎖状に重合しており、セルロースに良く似た構造を持つものと考えられている^{1) 2)}。また赤外スペクトルおよび X 線回折による研究^{3) 4)}の結果、分子間にはカルボニル基とアミド基間の強い水素結合が存在し、このことよりセルロースよりも種々の試薬に対して抵抗性を持つものと推論されている。

このキチンをアルカリ性試薬により脱アセチル化すると、アセトアミド基の約半分は比較的容易に除去されるが、残りの半分は徐々にしか脱離しない。これはキチンの高次構造のアクセシビリティの程度の差であると考えられている^{5) 6)}。

一方 FORWARD 等は直鎖状ポリアミドが、その無定形領域で、溶液中の極性溶質分子と水素結合して吸着することを報告している⁷⁾。

また最近、矢吹はキチンとタンパク質との結合性が強いので、その性質が酵素の精製に利用できることを報告している⁸⁾。

以上の研究結果から、著者らはキチンおよび部分脱アセチルキチンを、種々のクロマトグラフィー用吸着剤として利用することに関し一連の研究を行なっているが、今回は薄層クロマトグラフィー用吸着剤としての能力について、フェノール類およびアミノ酸の分離について行なった実験結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 キチン：既報⁹⁾と同じ方法で精製したキチンを、ボールミルにより粉碎し、ふるい分けして薄層用としては250~300メッシュのものをを用いた。

2.2 吸着活性度の測定¹⁰⁾：水溶性色素であるメチレンブルー、タートラジン、ピクトリアブルー、およびフロキシンの0.1M水溶液12mlに、2.1でふるいわけした100メッシュのキチンまたはセルロース*約1gを加え、よく振り混ぜた後25°に保って、平衡に達せしめた。遠心分離によりキチンまたはセルロースを除いた上澄液の、光電比色計における吸光度の減少より、吸着された色素の量を求め、吸着活性度とした。

2.3 薄層の形成：粉末キチンに5%の薄層クロマトグラフィー用ギプスを加えたもの10gを、25mlのジオキサンまたは酢酸エチル中に懸濁した。この懸濁液を矢沢科学製アプリケーションにより、20×20cmガラス板上に約0.25mmの厚みで薄層を作った。湿潤薄層は室温で乾燥した後、100°の恒温器中で約20分活性化を行ない、シリカゲル入りの格納箱中に保存した（なお懸濁液用溶媒として蒸留水を用いると、活性化の際ひび割れを生じ好ましい結果が得られなかった）。またキチンの薄層と比較するために、シリカゲルG、ポリアミド粉末（以上いずれもMERCK製）およびセルロース粉末（アビセルSF、旭化成製）による薄層も作製した。

2.4 薄層クロマトグラフィー：常法に従って展開を行ない、発色法はフェノール類に対してはベンジジン・ジアゾ化合物、アミノ酸に対してはニンヒドリンの溶液を用いた。

3. 実験結果および考察

3.1 水溶性色素に対するキチンの吸着活性：キチンおよびセルロースのメチレンブルー、タートラジン、

*カラムクロマトグラフィー用セルロース粉末

ビクトリアブルー、およびフロキシンに対する吸着活性度の測定結果を、各色素の酸性、塩基性および非イオン性窒素原子含有率の値とともに第1表に示した。

Table 1. Comparison of adsorption activity of chitin and cellulose for coloring matters at 30°C.

Name	Coloring matter		Adsorption activity (mM/g)	
	Acidic or basic	Content of nonionic N (%)	Chitin	Cellulose
methylene blue	basic	11.2	0.2	(0.01)
tartrazine	acidic	10.5	1.6	0
victoria blue	basic	2.4	2.5	2.3
phloxine	acidic	0	2.1	1.0

すなわち用いた各水溶性色素に対し、キチンのほうが、セルロースよりも吸着活性度が大きく、特にメチレンブルーおよびタートラジンに対して、その差が大きい。このことは、表から明らかなように、色素の酸性または塩基性に関係が無く、むしろ色素分子を構成する成分として、非イオン性窒素原子の含有率の多いものが、キチンに対して親和性があるのではないかと考えられる。このことに関しては、キチンのアミノ酸の吸着性に関する実験の結果¹¹⁾、塩基性アミノ酸であるアルギニンに対して特有のpH依存性と吸着量を示したことから推論できると思う。

3・2 キチン薄層の活性：薄層クロマトグラフィー用吸着剤としての活性度を STAHL¹²⁾の方法で測定し

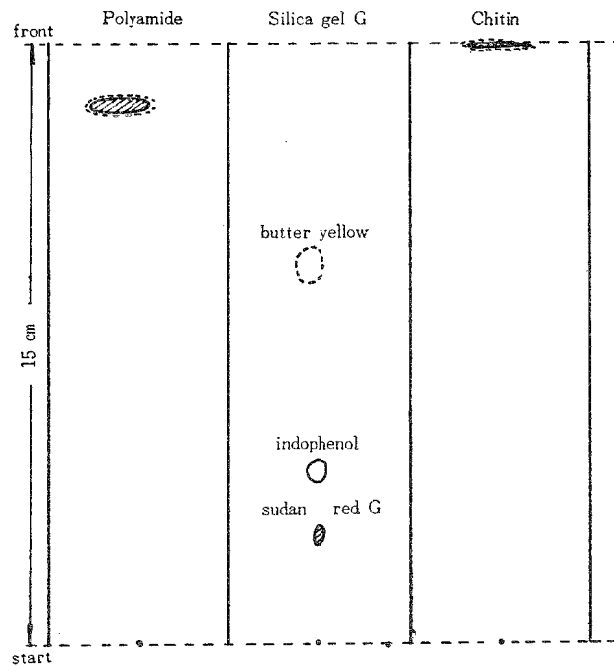


Fig. 1-a. Comparison of the activity of polyamide, silica gel G, and chitin for adsorbent of thin-layer chromatography.

Solvent : benzene.

た結果を、ポリアミドおよびシリカゲルのそれと比較したのが第1図 a および b である。すなわち展開溶媒としてベンゼンを使用する時は、シリカゲルではバターイエロー、インドフェノールおよびスーダンレッド

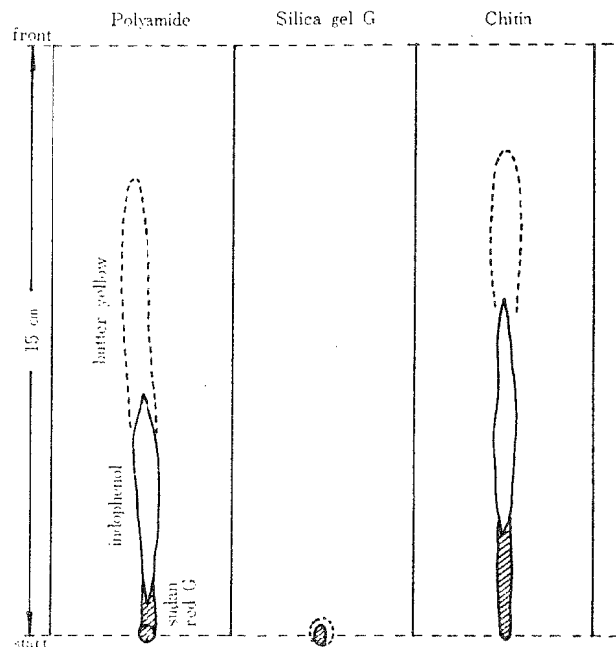


Fig. 1-b. Comparison of the activity of polyamide, silica gel G, and chitin for adsorbent of thin-layer chromatography.

Solvent : *n*-hexane.

Gの三つの色素は明らかに分離されるが、キチンおよびポリアミドでは共に溶媒の先端に各色素は移動し、全く分離が行なわれていない。一方無極性溶媒である *n*-ヘキサンで展開すると、シリカゲルでは吸着力の方が溶媒の力より強いために色素混液は原点に止ったままであるが、キチンおよびポリアミドでは、テーリングが大きい、3色に分離した。この場合ポリアミドではインドフェノール（青）とスーダンレッド（赤）の分離が特に良くなかった。以上のことから、キチン薄層の吸着力はシリカゲルより小さく、ポリアミドより僅かに大きいものと考えられる。これを STAHL の表¹³⁾ にあてはめて見ると、キチン薄層は極性化合物を極性溶媒で分離するのに適していると考えられる。

3.3 フェノール類の分離：前記の実験結果から、キチン薄層にはフェノール類のように、極性基を持つ化合物の分離が適当と考えられるので、レゾルシノール、 hidroキノン、ピロガロールおよびフロログルシノールについて薄層クロマトグラフィーを行なった。その結果を、ポリアミドおよびシリカゲルと比較したのが第2図である。先のバターイエロー、スーダンレッド G およびインドフェノール混液に対しては、キチンはポリアミドと良く似た分離能を示したが、フェノール類に対しては、むしろシリカゲル薄層の能力に似ており、しかもシリカゲルよりすぐれた効果を示した。すなわち、スポットのまとまりも良く、混合液の分離もシリカゲルより明瞭であった。フェノール類の分離に関しては、ポリアミドを用いたいくつかの研究が紹介されているので¹⁴⁾、追試を行なったが、キチンよりすぐれた結果は今までのところ得られなかった。なお第2図は展開溶媒として、20% アセトンを使用した結果であるが、水のみでもキチンでは十分な分離が行なわれた。

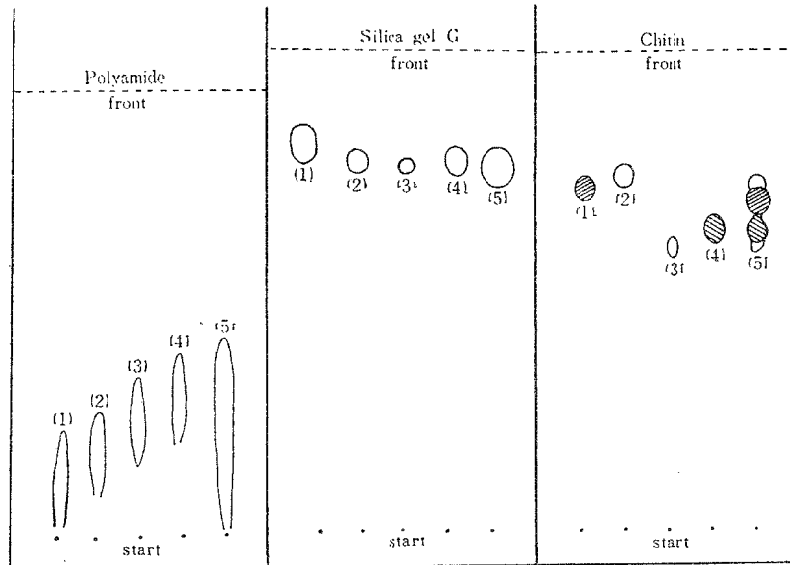


Fig. 2. Comparison of thin-layer chromatogram of some phenols on polyamide, silica gel G, and chitin with 20% acetone aqueous solution. Visualization with diazotized benzidine solution. Phenols: (1) resorcinol, (2) hydroquinone, (3) pyrogallol, (4) phloroglucinol, and (5) mixture.

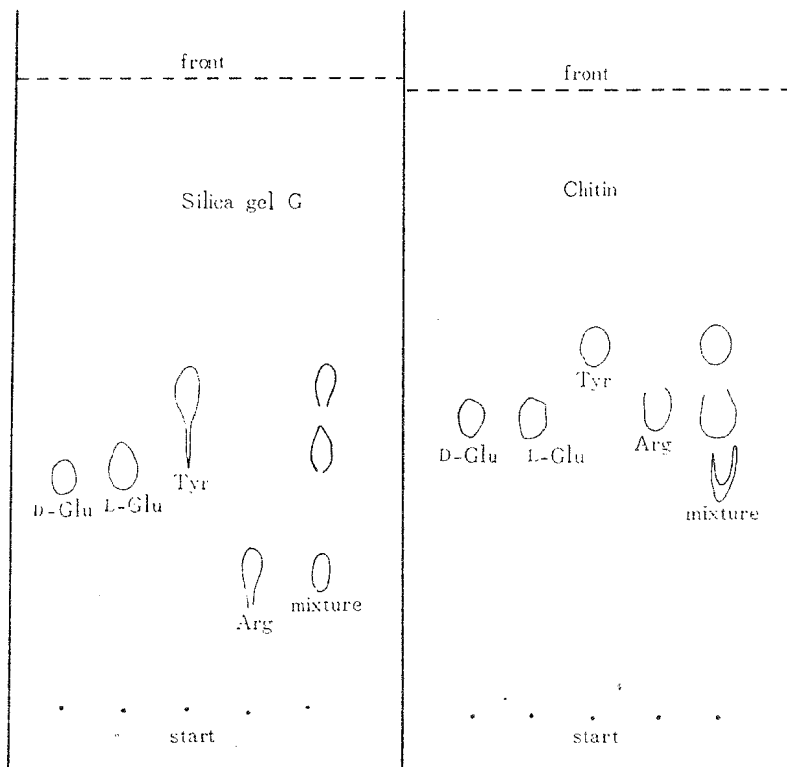


Fig. 3. Comparison of thin-layer chromatogram of amino acids on silica gel G and chitin, using solvent of *n*-butanol/acetic acid/water = 3 : 1 : 1. Abbreviations for amino acid : Glu=glutamic acid, Tyr=tyrosine, Arg=arginine. Visualization with ninhydrin solution.

3・4 アミノ酸の分離：極性有機化合物の一つとして、アミノ酸を選び酸性のグルタミン酸(DおよびL型)、塩基性のアルギニン、および中性のチロシンについて、キチンによる薄層クロマトグラフィーの結果をシリカゲルによる場合と比較したのが第3図である。 R_f 値に関しては、全体的にキチンの方が、わずかに大きい。塩基性アミノ酸アルギニンに対する値が、シリカゲルの場合と著しく異なった結果を示した。このことに関してさらに検討した結果は後述するが、一応酸性薄層であるシリカゲルと塩基性薄層キチンとの相違と考えることができる。またキチンはD-系列の多糖類であるが、グルタミン酸の光学異性体間の R_f の差は見られなかった。シリカゲルの場合、ニンヒドリンによる発色生成物は不安定で退色したが、アミノ酸の種類によって色が異なるので、その色にほとんど差が無いキチンよりは、同定には便利である。

3・1に記した水溶性色素に対するキチンの吸着活性の測定の結果、非イオン性窒素原子を含む化合物に対して、特に親和性の大きいことを推論したが、第3図に示した結果では、混合物の分離結果における、アルギニンの R_f が、グルタミン酸の値に近く、標準物質のアルギニンのそれとスポット位置とが一致しないので、アラニン、バリン、チロシン、シスチンおよびアルギニンについて、キチン薄層で分離した結果を第4図に示した。すなわちこの場合は予想どおりアルギニンの R_f 値は中性アミノ酸より小さく、塩基性であ

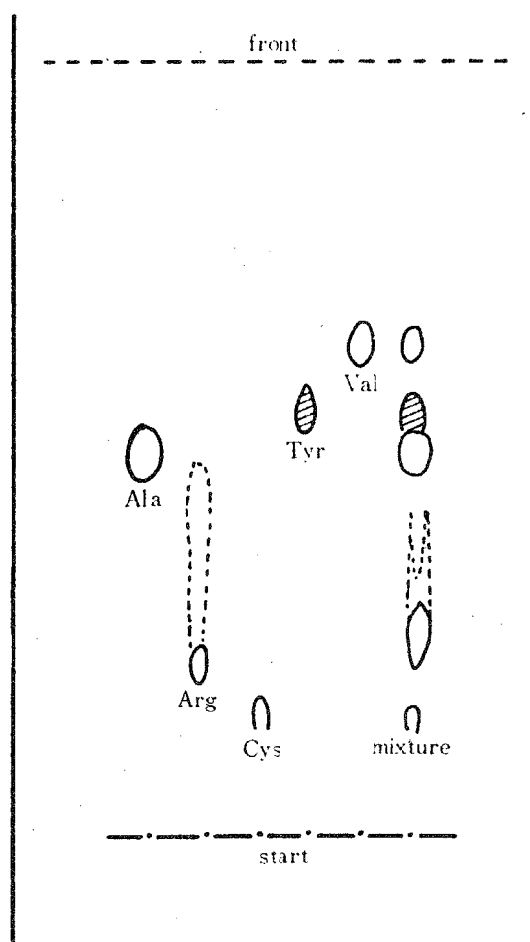


Fig. 4. Model separation of a mixture of some amino acids on chitin layer, using solvent of *n*-butanol/acetic acid/water=3:1:1.

Abbreviations : Ala=alanine, Arg=Arginine, Cys=cystine, Val=valine, Tyr=tyrosine (browned spot).

Visualization with ninhydrin solution.

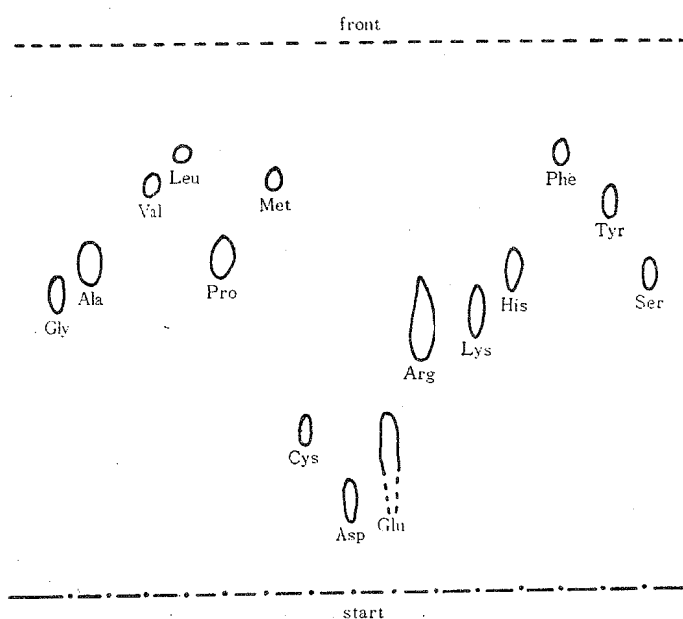


Fig. 5. Thin-layer chromatogram of some amino acids on chitin layer, using solvent of *n*-propanol/water=64:36 (w/w).

Abbreviations : Gly=glycine, Ala=alanine, Va=valine, Leu=leucine, Pro=proline, Met=methionine, Cys=cystine, Asp=asparatic acid, Glu=glutamic acid, Arg=arginine, Lys=lysine, His=histidine, Phe=phenylalanine, Tyr=tyrosine, Ser=serine. Visualization with ninhydrin solution.

Table 2. Comparison of R_f -values of some amino acids on silica gel and chitin layer in solvent of *n*-propanol/water=64:36 (w/w)

Amino acid	R_f -value $\times 100$		R'_f -value ^{**} $\times 100$		$\Delta R'_f$ ^{***}
	silica gel*	chitin	silica gel	chitin	
glycine	32	54	58	68	10
alanine	37	61	67	76	9
valine	45	75	82	94	12
proline	26	61	47	76	29
methionine	51	76	93	95	2
cystine	32	29	58	36	-12
asparatic acid	33	17	60	21	-39
glutamic acid	35	26	64	33	-31
arginine	2	48	4	60	56
lysine	2	51	4	64	60
histidine	20	58	36	73	37
phenylalanine	58	80	105	100	-5
tyrosine	57	70	104	88	-16
serine	35	57	64	71	7
leucine	55	80	100	100	0

* Values by BRENNER, M., *et al* : *Experientia*, **18**, 101 (1962).

** $R'_f = R_f$ - value in reference to leucine.

*** $\Delta R'_f = (R'_f \text{ on chitin} - R'_f \text{ on silica gel}) \times 100$.

りながら、強い吸着性を示し、特にフェノール性チロシンの差が大きいことに興味がある。

さらに15種類のアミノ酸について、展開溶媒として *n*-プロパノール/水 = 64 : 36 (w/w) を用いた時の、キチン薄層上のスポットの模様を第5図に示した。この R_f 値を、BRENNER 等¹⁵⁾によるシリカゲルを用いた時の R_f 値と比較したのが第2表である。これらの値から明らかなように、全般的にキチンを用いた時のほうが R_f 値が大きい、それぞれの場合のロイシンの R_f 値を100として計算した値を R'_f とし、その差を $\Delta R'_f$ として示した。これらの値から、酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸の R_f 値がシリカゲルとキチンとでは反転していることが特に目立っている。このほか、シスチンおよびチロシンに対する親和性が増大し、プロリンに対しては反発していることが見られる。

なお一般に、キチン薄層の展開時間が、シリカゲルやポリアミドの場合に比較して短いことも特色であった。

4. 結 言

キチン粉末の薄層クロマトグラフィー用吸着剤としての機能に関する実験を行ない、つぎのような結果を得た。

1. 水溶性色素(メチレンブルー、タートラジン、ピクトリアブルー、フロキシン)に対する吸着活性度をセルロース粉末と比較すると、キチンのほうが大きく、特に非イオン性窒素原子を含む染料に対して親和性が大きかった。

2. キチン粉末の薄層クロマトグラフィー用吸着剤としての活性度は、シリカゲルより小さく、ポリアミド粉末よりやや大きかった。

3. フェノール類(レゾルシノール、ハイドロキノン、ピロガロール、フロログルシノール)の薄層クロマトグラフィーによる分離能では、キチン粉末がシリカゲルおよびポリアミド粉末よりすぐれていた。

4. 塩基性、中性、酸性および光学異性アミノ酸の分離に関しては、キチン粉末の機能は、シリカゲルとほとんど同じ程度であったが、塩基性アミノ酸の R_f は増加した。

(なお現在オキシ酸および核酸類縁物についての分離能を検討中である。)

多量のタラバガニ殻を毎度供せられている北洋水産株式会社 手塚久雄、飯田 仁の両氏に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) BRIMACOMBE, J. S. and J. M. WEBBER, 1964: "Mucopolysaccharides", Elsevier, Amsterdam, p. 18.
- 2) FOSTER, A. B. and J. M. WEBBER, 1960: "Advances in Carbohydrate Chemistry", 15, Academic Press., New York, p. 380.
- 3) DARMON, S. E. and K. M. RUDALL, 1950: *Discussions Faraday Soc.*, 9, 251.
- 4) LIANG, C. Y. and R. H. MARCHESSAULT, 1959: *J. Polymer Sci.*, 37, 385.
- 5) PEARSON, F. G., R. H. MARCHESSAULT and C. Y. LIANG, 1960: *ibid.*, 43, 101.
MARCHESSAULT, R. H., F. G. PEARSON and C. Y. LIANG, 1960: *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 499.
- 6) 武田道夫, 1966: 本報告, 14, 173.
- 7) FORWARD, M. V. and H. J. PALMER, 1954: *J. Text. Inst.*, 45, T 510.
- 8) 矢吹 稔, 1966: 農化, 40, 201.
- 9) 武田道夫・勝浦 洋, 1964: 本報告, 13, 109.

- 10) 佐竹一夫・成田耕造, 1956: “実験化学講座(基礎技術)” 2, 丸善, p. 234.
- 11) 石松雍生, 1967: 水産大学校製造学科41年度卒業論文集, p. 1.
- 12) STAHL, E., 1958: *Chemiker-Ztg.*, **82**, 322.
- 13) 石川正幸等編, 1963: “薄層クロマトグラフィー”, 南江堂, p. 152.
- 14) 古谷 力, 1964: 化学の領域, 増刊59号, 87.
- 15) BRENNER, M, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI and A. R. FAHMY, 1962: *Experientia*, **18**, 101.
(STAHL, E., edited, 1965: “Thin-layer Chromatography”, Academic Press., New York, p. 400.)