

ODDELOVANIE VYŠŠÍCH MASTNÝCH KYSELÍN PAPIEROVOU CHROMATOGRAFIOU S VYUŽITÍM ZMENY KONCENTRÁCIE ROZPŮŠŤADLA POČAS VYVÍJANIA

V. PALO, V. KOMAN, Z. HRABĚ

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, špecializácia mlieko — tuky
Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave
Východoslovenský rudný prieskum v Spišskej Novej Vsi

Oddelovanie vyšších mastných kyselín papierovou chromatografiou naráža na ťažkosť, že jedným rozpúšťadlom možno rozdeliť len niekoľko mastných kyselín. Pre rozdelenie ďalších je potrebné použiť rozpúšťadlo so zmenenou koncentráciou alebo iný druh rozpúšťadla. Napríklad H. P. Kaufmann a J. Budwig [1] uvádzajú koncentrácie metanolu od 20 % do 80 % alebo pri kyseline octovej od 70 % do 90 % [2]. Priemerná vyvíjacia doba pre oddelenie vyšších mastných kyselín papierovou chromatografiou sa v literatúre uvádza 24 hod. [1, 2], ba v niektorých prípadoch [3] až 60 hodín. K ďalším nevýhodám papierovej chromatografie vyšších mastných kyselín patrí aj to, že možno súčasne vyvíjať len malý počet vzoriek.

Tieto nevýhody sa podarilo do určitej miery obmedziť nižšie opísanou metodikou.

Experimentálna časť

Pracovalo sa podľa systému F Franksa [4] na zariadení opísanom v [5]. Ako vyvíjacie činidlo sa použila kyselina octová nasýtená parafinom pri teplote vyvíjania. Pracovalo sa na filtračnom papieri Whatman 3, impregnovanom parafinom.

Príprava reagensii

Kyselina octová ľadová p. a. sa prečistila trojhodinovým refluxovaním zo 40 g kyslíčnika chrómového na 1 liter pod spätným chladičom, načo sa destiláciou za použitia rektifikačnej kolóny chytala frakcia pri 118 °C.

Parafínový olej medicínálny, bezfarebný, o hustote 0,880—0,895 g/cm³ sa nečistil.

Kyselina octová sa sýtala parafínovým olejom pri teplote vyvíjania za prídavku 50 ml na 1 liter. Po 15 minútovom trepaní sa oddelila vrstva kyseliny octovej.

Octan mednatý p. a., nasýtený roztok.

Ferokyanid draselný p. a., 7,5 % roztok.

Benzén p. a.

Kyselina laurová, myristová, olejová a palmitová sa osobitne nečistili.

Pracovný postup

Filtračný papier sa impregnoval 10 % roztokom parafínového oleja v benzéne. Impregnovalo sa vyvíjaním v chromatografickej skrini. Papier po vysušení pri izbovej teplote sa hneď použil.

Analyzoval sa repkový a ľanový olej získaný extrakciou semien repky a ľanu našich druhov. Po zmydelnení a rozštiepení sa pripravili 5 % roztoky mastných kyselín v benzéne.

Na filtračný papier, ktorý sa upravil na predpísaný tvar [5], naniesli sa presné množstvá štandardných mastných kyselín v benzénovom roztoku alebo 5 % benzénové roztoky zmesi mastných kyselín, získaných z olejov, v množstve 50—200 γ . Nanosené škvrny museli ležať presne oproti jednotlivým knôtom papiera.

Vyvíjalo sa na aparátúre opísanej v [5]. Aparatúra sa postavila do vodováhy. Všetky súčiastky, ktoré prišli do styku s vyvíjacím čínom a s papierom, dôkladne sa vyčistili (najmä sklá musia byť dokonale čisté a vyleštené). Filtračné papiere sa vložili medzi dvojicu sklenených dosiek tak, aby knóty papiera vyčnievali cez okraj. Medzi sklá sa môže vložiť takmer ľubovoľné množstvo papierov — vždy striedavo sklo, papier, sklo atď. (Pracovali sme s tromi papiermi v jednom sklenenom bloku.) Spodné a vrchné sklo bloku bolo hrubé, ostatné sklá boli tenké.

Koncentrovaná kyselina octová sa vliala do oddeľovacieho lievika aparátúry a jej prítok do vyvíjacej nádoby sa nastavil dvojicou tlačiek na konštantnú hodnotu vopred stanovenú (pracovali sme s prietokom 150 ml/hod.). Nastavovanie prietoku sa robí pri odstavení vyvíjacej nádoby. Po nastavení sa prietok kyseliny octovej úplne uzavrie kohútom.

Vyvíjacia nádobka sa naplnila 50 % kyselinou octovou. Jej množstvo nad 500 ml vytieklo dvojicou odpadových rúrok.

Z oboch strán vyvíjacej nádoby sa vložilo po jednom bloku sklenených dosiek s chromatografickými papiermi tak, aby vyčnievajúce knóty papierov boli ponorené do kyseliny octovej v nádobke. Sklá sa k nádobke pritiahli vrchnákom a prípadné medzery sa utesnili plastelínou. Potom sa spustilo miešanie rozpúšťadla vo vyvíjacej nádobke a zároveň sa otvoril kohút pre prívod koncentrovanej kyseliny octovej. Pod dvojicu výtokových rúrok sa podložil odmerný valec. Množstvo rozpúšťadla vytečeného týmito rúrkami vyjadrovalo množstvo koncentrovanej kyseliny octovej pritečenej do vyvíjacej nádoby.

Vyvíjanie prebiehalo dovtedy, kým čelo rozpúšťadla nedosiahlo 1—2 cm od okraja papiera. V niektorých prípadoch sme nechali chromatogramy pretiecť. Vyvíjalo sa pri teplote 20 °C.

Po skončení vyvíjania sa papiere opatrne vybrali zo skiel a 2 hodiny sa sušili pri 120 °C. Potom sa papiere na 45 minút vložili do roztoku octanu meďnatého (20 ml nasýteného roztoku a 240 ml vody). Na miestach mastných kyselín vznikli meďnaté mydlá. Nezeagovaný octan meďnatý sa potom vypieral tečúcou vodou. Prepieralo sa tak, že sa okraj papiera (pozdĺž čela) zasekol medzi sklenené dosky, na ktoré sa obojstranne privádzala voda. Prepieralo sa 30 minút. Vypraný papier sa pretiahol 7,5 % roztokom ferokyanidu draselného. Na miestach škvrn meďnatých mydiel vyšších mastných kyselín vystúpili červenohnedé škvrny na ružovkastom až bielom pozadí.

Vyjadrenie zmeny koncentrácie rozpúšťadla v závislosti od času

V procese vyvíjania prichádza koncentrované rozpúšťadlo z nádoby *A* do vyvíjacej nádoby *B* (obr. 1). Pritom sa mení koncentrácia vody vo vyvíjacej nádobke. Zmena koncentrácie vody závisí od rýchlosti výtoku rozpúšťadla z vyvíjacej nádoby. Ak do vyvíjacej nádoby priteká čistá koncentrovaná kyselina octová určitou konštantnou rýchlosťou a súčasne rovnakou objemovou rýchlosťou *w* za časovú jednotku vyteká z vyvíjacej nádoby roztok vody v kyseline octovej, pre diferenciálne malú zmenu koncentrácie vody *dc* v určitom čase *t* platí:

$$dc(t) = \frac{1}{V} dn,$$

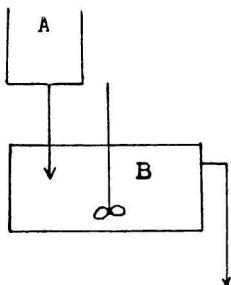
kde V je celkový objem roztoku a dn je diferenciálne malý úbytok vody vo vyvíjacej nádobke.

Ak predpokladáme, že miešanie zabezpečuje rovnakú koncentráciu kyseliny octovej v celom objeme vyvíjacej nádobky, pričom molárny objem príslušnej čistej zložky pokladáme za rovný parciálnemu molárnemu objemu danej zložky v roztoku, úbytok vody je:

$$dn = -c(t) \cdot w \cdot dt$$

alebo

$$dc(t) = -\frac{w}{V} c(t) \cdot dt$$



Obr. 1.

Po separácii premenných a integráciou poslednej rovnice dostaneme:

$$\ln c(t) = -\frac{w}{V} t + C$$

Hodnotu integračnej konštanty C nájdeme z počiatočnej podmienky pre $t = 0$

$$c(0) = c_0$$

a teda

$$C = \ln c_0,$$

pričom

$$c(t) = c_0 \cdot e^{-\frac{w}{V} t}$$

Po dosadení $\frac{w}{V} = a$ dostaneme:

$$c(t) = c_0 \cdot e^{-a \cdot t}$$

Uvedená rovnica vyjadruje zmenu koncentrácie vody vo vyvíjacej nádobke v závislosti od času priebehom vyvíjania.

Zmena koncentrácie kyseliny octovej vo vyvíjacej nádobke v čase t v procese vyvíjania je vyjadrená rovnicou

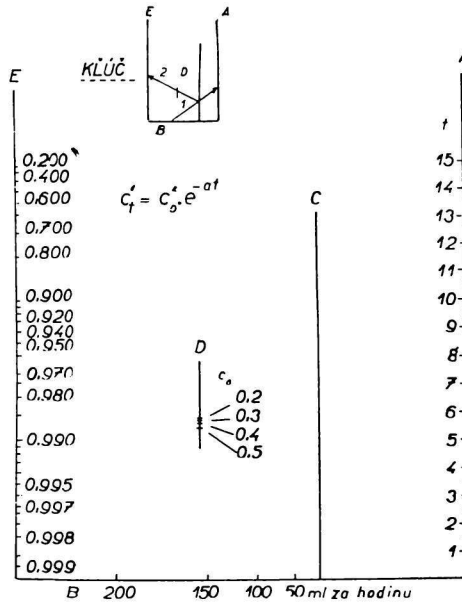
$$c'(t) = 1 - c(t)$$

Pre uľahčenie výpočtu koncentrácie kyseliny octovej vo vyvíjacej nádobke v čase t počas vyvíjania zostrojili sme nomogram (obr. 2).

Opis nomogramu

Os E vyjadruje koncentráciu kyseliny octovej v g/ml, os B vyjadruje prietok koncentrovanej kyseliny octovej v ml/hod., os A vyjadruje dobu vyvíjania v hod., os C je pomocná os, os D vyjadruje c_0 (počiatočnú koncentráciu rozpúšťadla vo vyvíjacej nádobke).

Práca na nomograme je znázornená kľúčom zakresleným v nomograme. Najprv sa spojí



Obr. 2. Nomogram pre výpočet koncentrácie rozpúšťadla vo vyvíjacej nádobke v rôznych časových intervaloch.

hodnota na osi B s hodnotou dĺžky vyvíjania na osi A . Priesečníkom na osi C vedieme čiaru cez hodnotu c_0 na osi D a priesečník tejto čiary s osou E vyjadri koncentráciu kyseliny octovej v g/ml.

Príklad výpočtu koncentrácie kyseliny octovej vo vyvíjacej nádobke v určitom čase

Údaje:

| | |
|---|-------------|
| obsah vyvíjacej nádobky | 500 ml |
| prietok koncentrovanej kyseliny octovej | 200 ml/hod. |
| doba vyvíjania | 5 hod. |
| počiatočná koncentrácia kyseliny octovej vo vyvíjacej nádobke | 0,200 g/ml |

Výpočet

Základná rovnica:

$$c(t) = c_0 \cdot e^{-a \cdot t}$$

$$\log c(t) = \log c_0 - a \cdot t \cdot \log e$$

$$\log c_0 = 0,90309$$

$$\log e = 0,43425$$

$$a = 200/500 = 0,4$$

$$\log c(t) = 0,90309 - 1 - 0,4 \cdot 5 \cdot 0,43425$$

$$\log c(t) = 0,03459 - 1$$

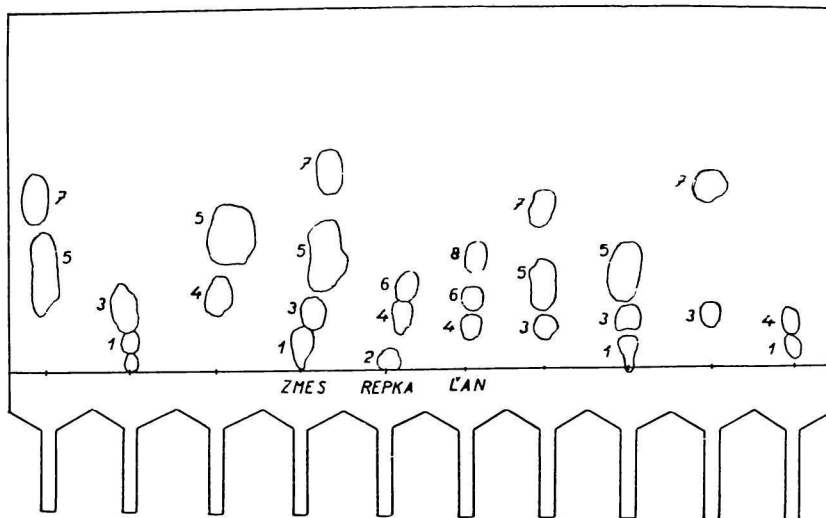
$$c(t) = 0,108 \text{ g H}_2\text{O/ml}$$

$$c(t) = 1 - c(t) = 1 - 0,108 = 0,892 \text{ g CH}_3\text{COOH/ml}$$

Hodnota odčítaná z nomogramu je ca 0,890 g CH₃COOH/ml.

Výsledky a diskusia

Opísaným spôsobom sme oddelili kyselinu palmitovú, stearovú, olejovú, myristovú, laurovú a mastné kyseliny zo zmydelneného repkového a ľanového oleja (obr. 3 a 4).

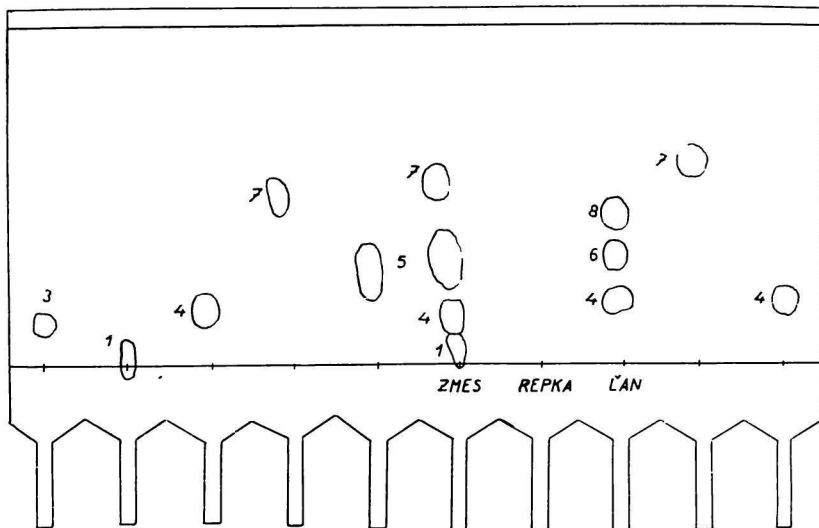


Obr. 3. Chromatogram s oddelenými mastnými kyselinami. Vytvájané s kyselinou octovou o počiatkovej koncentrácii 40 %. Prietoková rýchlosť koncentrovanej kyseliny octovej 150 ml/hod., teplota pri vyvíjaní 20 °C, doba vyvíjaní 14 hod. Chromatogram je pretečený.

1. kyselina stearová, 2. kyselina eruková, 3. kyselina palmitová, 4. kyselina olejová, 5. kyselina myristová, 6. kyselina linolová, 7. kyselina laurová, 8. kyselina linolénová.

Pracovali sme so štandardmi: kyselinou olejovou, palmitovou, myristovou, laurovou a stearovou. Kyselinu erukovú a linolovú sme na chromatogramoch posudzovali podľa percentuálneho zastúpenia mastných kyselín v repkovom oleji, kým kyselinu linolovú a linolénovú v ľanovom oleji. Ich poradie na papieri — v oboch prípadoch — smerom od štartu sme posudzovali podľa vzrastajúcej molekulovej váhy.

R_F hodnoty vyšších mastných kyselín oddelených opísaným spôsobom na papieri Whatman 3 vyvíjaním s kyselinou octovou o počiatočnej koncent-



Obr. 4. Oddelené mastné kyseliny.

1. kyselina stearová, 3. kyselina palmitová, 4. kyselina olejová, 5. kyselina myristová, 6. kyselina linolová, 7. kyselina laurová, 8. kyselina linolénová.

Repka nebola nanosená! Vyvíjané s kyselinou octovou o počiatočnej koncentrácii 50 %, prietoková rýchlosť koncentrovanej kyseliny octovej 150 ml/hod., teplota pri vyvíjaní 20 °C, doba vyvíjania 12 hod.

rácii 50 %, prietoku koncentrovanej kyseliny octovej 150 ml/hod., teplote vyvíjania 20 °C a dĺžke vyvíjania 12 hod. sú uvedené v tab. 1.

Tabuľka 1

| Mastná kyselina | R_F |
|-----------------|-------|
| eruková | 0,02 |
| stearová | 0,02 |
| palmitová | 0,12 |
| olejová | 0,17 |
| myristová | 0,28 |
| linolová | 0,32 |
| linolénová | 0,44 |
| laurová | 0,59 |

Kontrola rozpúšťadla vo vyvíjacej nádobke umožňuje predpokladať, ktoré zložky zmesi sú práve oddelované, pričom pôsobenie tejto koncentrácie je ľubovoľne voliteľné. Metódu možno použiť na určovanie optimálnych koncentrácií rozpúšťadiel pri chromatografickom rozdeľovaní binárnych zmesí mastných kyselín.

Súhrn

Opísali sme spôsob a výsledky oddelovania vyšších mastných kyselín papierovou chromatografiou na zariadení s kontinuálnou zmenou mobilnej fázy. Oddelovanie sa uskutočňovalo na celej šírke filtračného papiera Whatman 3. Súčasne sa môže oddelovať takmer ľubovoľné množstvo vzoriek.

ДЕЛЕНИЕ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРИ ПОМОЩИ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИЗМЕНЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРИТЕЛЯ В ТЕЧЕНИИ ПРОЯВЛЕНИЯ

В. ПАЛО, В. КОМАН, Ц. ГРАБЕ

Кафедра технической микробиологии и биохимии, специализация молоко — жиры
Словацкой высшей технической школы в Братиславе
Восточнословацкое рудное обследование в Спишской Новой Вси

Выводы

Был описан метод, способ работы а также и результаты для деления высших жирных кислот при помощи бумажной хроматографии на аппаратуре с непрерывным изменением мобильной фазы. Деление проводится на целой ширине фильтрационной бумаги Whatman 3. Одновременно предоставляется возможным делить произвольное количество проб.

Поступило в редакцию 4. 1. 1958 г.

TRENNUNG HÖHERER FETTSÄUREN DURCH PAPIERCHROMATOGRAPHIE UNTER AUSNÜTZUNG DER KONZENTRATIONSÄNDERUNG DES LÖSUNGSMITTELS WÄHREND DES ENTWICKELNS

V. PALO, V. KOMAN, Z. HRABĚ

Lehrstuhl für technische Mikrobiologie und Biochemie, Spezialisierung Milch — Fette
an der Slowakischen Technischen Hochschule in Bratislava
Ostslowakisches Institut für Erforschung in Spišská Nová Ves

Zusammenfassung

Die Autoren beschreiben eine Methode, das Arbeitsverfahren samt den Ergebnissen, für die Trennung höherer Fettsäuren mittels Papierchromatographie auf einer Vorrichtung mit kontinuierlicher Änderung der mobilen Phase. Diese Trennung wird auf der gesamten Breite des Filtrierpapiers Whatman 3 vorgenommen. Mittels dieser Methode kann man gleichzeitig eine fast beliebige Anzahl von Mustern trennen.

In die Redaktion eingelangt den 4. 1. 1958

LITERATÚRA

1. Kaufmann H. P., Budwig J., Fette u. Seifen 7, 390 (1951). — 2. Kaufmann H. P., Nitsch W. H., Fette, Seifen Anstrichmittel 3, 154 (1954). — 3. Jáky M., Fette, Seifen Anstrichmittel 58, 9 (1956). — 4. Franks F., Analyst 964, 384 (1956). — 5. Koman V., Palo V., Chem. zvesti 12, 513 (1958).

Došlo do redakcie 4. 1. 1958