

PRÍSPEVOK K CHROMATOGRAFICKÉMU STANOVENIU MASTNÝCH KYSELÍN C_2 — C_{22} V MLIEČNYCH VÝROBKOCH Z JEDNÉHO NÁVAŽKU

VLADIMÍR PALO

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, špecializácia technológie mlieka a tukov
Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave

Pri štúdiu biochémie zrenia syrov robí stanovenie mastných kyselín určité ťažkosti. Súborný prehľad analytických metód stanovenia nižších mastných kyselín v mliečnych výrobkoch podáva W. Ritter [1]. Z metód, ktoré uvádza, najvýhodnejšia pre nás sa ukázala chromatografia. Pre stanovenie nižších mastných kyselín prchajúcich s vodnou parou sa zvolila stĺpcová chromatografia, lebo lepšie vyhovovala z hľadiska kvantitatívneho stanovenia než papierová chromatografia. Nižšie opísaný spôsob prihliada na to, aby sa odstránili všetky straty vznikajúce izoláciou mastných kyselín bežnou extrakciou alebo destiláciou zo vzorky, ďalej straty vznikajúce samotným chromatografickým oddeľovaním, ako aj rušivé vplyvy ostatných zložiek mliečného výrobku. Prehľad prác o stĺpcovej a papierovej chromatografii nižších mastných kyselín podáva W. J. Harper [2]. A. Kopecký [3] uvádza aj podrobný prehľad prác o papierovej chromatografii vyšších mastných kyselín publikovaných v posledných rokoch. Všetky tieto práce sú vhodné na oddeľovanie mastných kyselín vopred vyizolovaných z mliečnych výrobkov.

Mastné kyseliny neprchajúce s vodnou parou sa stanovili papierovou chromatografiou. V ďalšom stručne opíšeme spôsob, podľa ktorého sa mastné kyseliny C_2 — C_{22} stanovia z jedného návažku syra za použitia vhodnej kombinácie stĺpcovej a papierovej chromatografie. Ide o aplikáciu niekoľkých chromatografických metód, ktoré sa preskúšali a upravili pre naše pracovné podmienky. Pracovné postupy už známych metód nebudú detailne opisované, ale podrobne budú uvedené zmeny a úpravy, ktoré sme úspešne používali pri svojej práci.

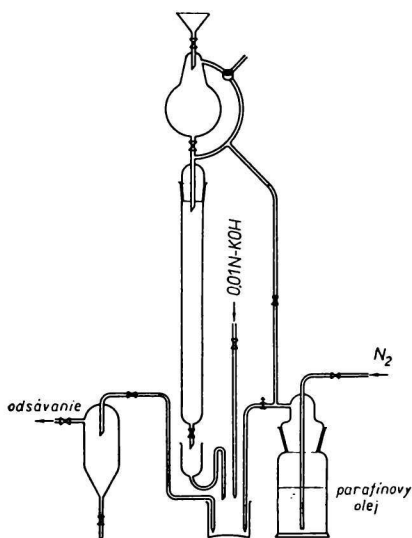
Experimentálna časť

Priemerná vzorka vyšetřovaného syra sa po odobratí jemne postrúhala, prípadne rozotrela a ihneď použila pre rozbor.

Stanovenie mastných kyselín C_2 — C_5

Na oddelenie a kvantitatívne stanovenie mastných kyselín: octovej, propiónovej, maslovej, prípadne valérovej sa za základ použili práce W. J. Harpera [2], W. Lehmana a K. Sahliho [4]. V oboch prípadoch ide o pufrovanú stĺpcovú chromatografiu s použitím kyseliny kremičitej ako nosiča a chloroformu s *n*-butanolom ako mobilnej fázy. Výhodou tejto metódy je, že vzorka sa pred analýzou vôbec neupravuje, ale priamo sa dáva do stĺpca ako časť náplne.

Jednotlivé 5 ml frakcie eluátu sa titrovali do jasnomodrého zafarbenia indikátora brómtymolovej modrej 0,01 N alkoholickým roztokom KOH (0,4 % alkoholický roztok brómtymolovej modrej sa vopred zneutralizoval 0,01 N-KOH do zeleného odtieňa). S úspechom sa použila kyselina kremičitá, ktorú sme laboratórne pripravili podľa H. J. Nijkampa [5]. Na jej prípravu sa použilo bežné obchodné vodné sklo. Pripravená kyselina kremičitá sa vysušila pri 105 °C do konštantnej váhy a uschovávala sa v exsíkátore nad koncentrovanou H_2SO_4 . Frakcie mastných kyselín vyšších než C_4 (prípadne C_5) sa zachytávali spoločne. Vo väčšine prípadov išlo o frakcie (1) až (45). So spoločným zachytávaním frakcií sa prestalo až vtedy, keď sa s určitou istotou zistilo, že začala zo stĺpca vytekať kyselina maslová. Oddeľovanie sa uskutočňovalo pod tlakom N_2 na zariadení znázornenom na obr. 1. Použila sa sklená kolónka dlhá 60 cm, s vnútorným priemerom

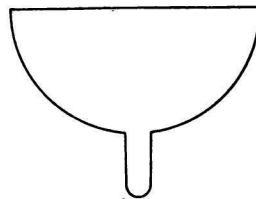


Obr. 1. Zariadenie na chromatografické oddeľovanie mastných kyselín C_2 , C_3 , C_4 a C vyššie pod tlakom N_2 s titračnou nádobkou, s príivodom N_2 na premiešavanie roztoku pri titracii a s odvodom stitrovaného roztoku do zbernej nádobky pomocou odsávania.

2 cm. Všetky časti aparatury boli opatrené dokonale tesniacimi zábrusmi a aparatura bola upravená tak, aby zniesla pretlak 0,5 atm.

Druh jednotlivých oddelených mastných kyselín sa zistil z grafickej závislosti spotreby ml 0,01 N-KOH od počtu 5 ml frakcií. Zistilo sa, že pri presne vykonanej analýze sa jednotlivé masné kyseliny vždy oddelia pri určitom počte 5 ml frakcií. Tieto hodnoty sú uvedené v tab. 1.

Tieto hodnoty len v ojedinelých prípadoch boli čiastočne posunuté smerom hore (2—5 frakcií). V niektorých prípadoch, najmä ak išlo o nízke obsahy mastných kyselín, keď nebolo dosť jasné, ktorá frakcia patrí k jednej alebo k druhej kyseline, vykonalo sa spresnenie spôsobom, ktorý spomenieme ďalej. Kvantitatívne vyhodnocovanie sa urobilo zo súčtu spotrieb 0,01 N-KOH, zodpovedajúcich jednotlivým frakciám tej-ktorej masnej kyseliny.



Obr. 2. Sklená odparovacia nádobka o objeme 200 ml. Dĺžka priehlbinky 2 cm, s objemom 2—3 ml.

Stanovenie mastných kyselín C_6 — C_{10}

Mastné kyseliny vyššie než C_4 , ktoré sa pri opísanom spôsobe zachytávali spoločne, zalkalizovali sa 0,01 N alkoholickým KOH. Mydlá týchto vyšších mastných kyselín sa potom kvantitatívne, po niekoľkonásobnom premytí teplou vodou, preniesli do oddeľovacieho lievika a vodná vrstva mydiel sa oddelila a preniesla do odparovacej nádoby lievikovitého tvaru, ktorá je znázornená na obr. 2.

Tabuľka 1

Počet 5 ml frakcií potrebných na oddelenie jednotlivých mastných kyselín

Mastné kyseliny	Poradové číslo frakcie		Množstvo ml rozpúšťadla potrebné na oddelenie mastných kyselín
	od	do	
C vyššie (včítane C_5)	1	38	195
C_4	38	50	60
C_3	50	79	145
C_2	79	120	205

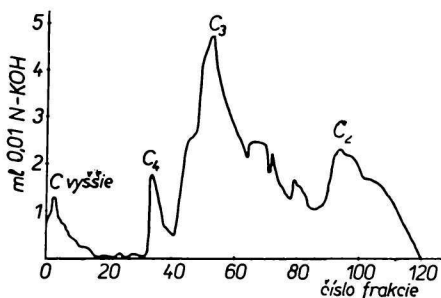
Obsah nádoby sa v prúde teplého vzduchu (asi 50 °C) odparil takmer až do sucha. Počas sušenia sa na povrchu nádoby prischnuté mydlá splachovali tyčinkou a teplou vodou tak dlho, pokiaľ sa celý zvyšok neodparoval v priehľbinke nádoby. Keď sa už celý zvyšok odparil do sucha, pridalo sa k nemu po ochladiení 0,1 g bezvodého $KHSO_4$. Uvoľnené mastné kyseliny rozpustené v najmenšom množstve izooktánu (asi 0,2 ml) sa po dôkladnom premiešaní stiahli kapilárnym sifónkom opatreným na širšom konci zátkou z odtučnenej vaty do kalibrovanej skúmavky. Toto sa opakovalo niekoľkokrát (5—10), až pokiaľ sa kvantitatívne nepreniesli všetky voľné mastné kyseliny do skúmavky. (Izooktán musí pretekať sifónkom úplne bezfarebný.) Takto sa v skúmavke zachytí 1—2 ml zmesi vyšších voľných mastných kyselín v izooktáne. Z tohto množstva sa 0,1 ml stitruje 0,01 N-KOH na brómtymolovú modrú a spotreba sa prepočíta na obsah C_{10} . Do analýzy sa berie také množstvo izooktánového roztoku mastných kyselín, aby neprevyšovalo 0,1 miliekvivalentu C_{10} . Oddelenie jednotlivých mastných kyselín a ich kvantitatívne stanovenie sa vykonalo podľa H. J. Nijkampa [5] na stĺpci kyseliny kremičitej (ten istý druh ako pri oddeľovaní C_2 — C_5) za použitia izooktánu ako mobilnej fázy. Plnenie, ako aj oddeľovanie na stĺpci sa uskutočnilo pod tlakom N_2 . Jednotlivé pásy oddelených mastných kyselín sa odoberali do kalibrovaných skúmaviek a titrovali 0,01 N alkoholickým KOH. Spotreba sa prepočítala na celkové množstvo izooktánového roztoku mastných kyselín, čo po prepočítaní príslušnými ekvivalentmi vyjadřilo vlastne množstvo jednotlivých mastných kyselín v návažku vzorky syra. Pri všetkých pokusoch treba brať do úvahy i slepý pokus na izooktán.

Stanovenie mastných kyselín C_{12} — C_{22}

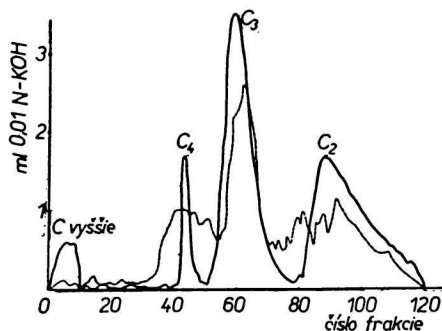
Vyššie mastné kyseliny, ktoré putujú stĺpcom pri oddeľovaní mastných kyselín C_8 — C_{10} ako prvé pásy, zachycujú sa v kalibrovanej skúmavke. V 0,1 ml roztoku titráciou 0,01 N-KOH na brómtymolovú modrú a po odpočítaní slepého pokusu na izooktán sa zistí obsah mastných kyselín prepočítaním na C_{22} . Z tejto zmesi vyšších mastných kyselín sa časť použije na chromatografické oddeľovanie na papieri. Na chromatografický papier Whatman 4, impregnovaný parafinovým olejom, naniesie sa také množstvo zmesi, aby nanáška škvrny predstavovala 100—200 μg mastných kyselín. Na vyvíjanie sa použila kyselina octová s koncentráciou stúpajúcou počas vyvíjania od 50 % do 99,9 %. Celý pracovný postup oddelenia vyšších mastných kyselín papierovou chromatografiou sa robil podľa prác V. Komana, V. Palu [6] a V. Palu a spolupracovníkov [7]. Kvantitatívne vyhodnotenie sa môže robiť fotometricky tak, že tmavočervené škvrny (detekcia octanom mednatým a ferikyanidom draselným) sa za použitia zeleného filtra GR-2 Zeiss fotografujú na kinofilm s nízkou citlivosťou a negatív sa vyhodnocuje na registračnom fotometri. Postupuje sa tak isto ako pri kvantitatívnom vyhodnocovaní aminokyselín, opísanom v práci [8].

Diskusia

Prv ako sa na stanovenie mastných kyselín použila kyselina kremičitá nami laboratórne pripravenej, skúšala sa pre tento účel vhodnosť kyseliny kremičitej tuzemskej výroby, dodávanej Lachemou, n. p., Brno. Tento druh bol kryštalický, matne mliečnej farby. Na použitie pre plnenie do stĺpca sa upravila tak, že sa rozdrvila v guľovom mlyne, preprala destilovanou vodou, vysušila pri 105 °C, preosiala cez sito s priemerom ôk 0,2 mm a znova sa sušila do konštantnej váhy pri 105 °C. S takto pripravenou kyselinou kremičitou sa nedosiahli uspokojivé výsledky. Grafické znázornenie oddelenia mastných kyselín s takto pripravenou kyselinou kremičitou je na obr. 3. Podobne sa na tento



Obr. 3. Oddelené mastné kyseliny pri ementálskom syre na náplni kyseliny kremičitej, slúžiacej ako náplň do exsikátora, upravená pre chromatografické účely.



Obr. 4. Oddelené mastné kyseliny pri ementálskom syre.

———— pribeh oddeľovania mastných kyselín na čerstvo pripravenej náplni
 - - - - - pribeh oddeľovania mastných kyselín po jednorazovom použití náplne.

účel nehodila ani kyselina kremičitá, pripravená podľa návodu T. J. Williamsa [9]. Pekné výsledky sa dosiahli s kyselinou kremičitou pripravenou podľa návodu [5] z obchodného vodného skla (36—38 Bé), ktoré vyrobil Spolek pro chemickou a hutní výrobu a Tatrachema v Trnave. Kyselina kremičitá pripravená z týchto druhov sa po vysušení pri 105 °C voľne preosiala cez sito s priemerom ôk 0,2 mm a potom sa znova sušila pri 105 °C až do konštantnej váhy. Ten istý druh kyseliny kremičitej sa použil i pri oddelovaní mastných kyselín C₆—C₁₀. Používanie indikátora fenolovej červene, ako predpisujú autori [2, 4], nevyhovovalo. Ekvivalentný bod bol markantnejší za použitia 0,4 % alkoholického roztoku brómtymolovej modrej.

Plnenie kolóny na oddelovanie mastných kyselín C₆—C₁₀ a vyššie bolo veľmi obťažné pre jej malý priemer (0,6 cm). Úspešne sa kolóna plnila pomocou injekčnej striekačky s hrubou ihlou alebo aj bez nej.

Vykonalo sa niekoľko pokusov, či sa nedá na použitej náplni stĺpca robiť nová analýza. V prípade stanovenia mastných kyselín C₂—C₄ bolo to znemožnené tým, že organické kyseliny, ktoré boli zadržované počas oddelovania mastných kyselín v stĺpci, rušili priebeh oddelovania, keďže sa dostali do pufrovanej časti kolóny (kyselina pyrohroznová, mravčia, mliečna atď.). Nepresné oddelenie mastných kyselín na použitom stĺpci vidieť z obr. 4, kde sú rozdelené mastné kyseliny pri tej istej vzorke ementálskeho syra.

Opätovné použitie náplne pri stanovení mastných kyselín C₆—C₁₀ bolo znemožnené tým, že stĺpec po premytí zvyškov kyseliny maslovej, ktorá tiež bola čiastočne prenesená do stĺpca, úplne vybledne, keďže brómkrezolová zeleň je zo stĺpca čiastočne vyplavovaná. Keby sa zvyšky kyseliny maslovej neodstránili, oddelenie jednotlivých pásov mastných kyselín by nebolo zreteľné.

Je dôležité, aby sa neoddelovali väčšie množstvá mastných kyselín (vyššie než C₄) ako 0,1 miliekvivalentu C₁₀. V mnohých prípadoch nedošlo k ostrému oddelovaniu jednotlivých pásov príslušných mastných kyselín ani vtedy, keď sa použilo množstvo len nepatrne nižšie než 0,1 miliekvivalentu. Zistilo sa, že najostrejšie oddelenie sa dosiahlo pri hodnotách približne 1/3 nižších než 0,1 miliekvivalentu. Je nevyhnutné, aby kolóna v obidvoch prípadoch bola dôkladne naplnená tak, aby náplň bola homogénna. V opačnom prípade nastane nezreteľné oddelenie.

Pri niektorých analýzach vzoriek syra sa môže stať, že nie je jasné, či nanesená krivka predstavuje napr. kyselinu maslovú alebo kyselinu valérovú, prípadne či obidva vrcholy odpovedajú len kyseline maslovej (v prípade nedokonalého plnenia stĺpca).

Podobne v niektorých prípadoch pri oddelovaní mastných kyselín C₆—C₁₀ môže nastať pochybnosť, či niektorý farebný pás skutočne zodpovedá identifikovanej mastnej kyseline. V takom prípade sme frakciu alebo pás po sti-

trovaní zalkalizovali, odparili takmer do sucha a mastnú kyselinu uvoľnili prídavkom KHSO_4 a extrahovali známym objemom chloroformu alebo izooktánu (pre C_2 — C_5 chloroform a pre C vyššie izooktán). Podiel extraktu sme potom podrobili chromatografickému oddelovaniu na papieri spolu so štandardom predpokladanej mastnej kyseliny. Mastná kyselina sa na papieri vyvolávala ako amónna alebo etylamínová soľ [10, 11].

Vyššie mastné kyseliny sa oddeľovali papierovou chromatografiou, a to už spomínanou metódou [6, 7]. Pretože kyselina valérová je prítomná v niektorých druhoch syra len zriedka a vo veľmi malých množstvách, jej presné stanovenie je sťažené. Vo väčšine prípadov bola kyselina valérová pojatá do spoločnej frakcie vyšších mastných kyselín. Pri stanovení C_6 — C_{10} sa tesne napojila na široký pás kyseliny maslovej, a ani tu nemohla byť s určitosťou dokázaná. V takých prípadoch sa identifikovala len kvalitatívne a jej kvantita sa hodnotila podľa intenzity zafarbenia a veľkosti škvrny pomocou papierovej chromatografie.

Opísaný postup s použitím metodík citovaných v literatúre sa hodí pre stanovenie mastných kyselín aj v iných mliečnych výrobkoch, ako sú napríklad maslo, zákysy, čisté kultúry atď. V našom prípade sme sa zaoberali len analýzou syrov či už mäkkých alebo tvrdých. Vhodnosť metodiky na stanovenie mastných kyselín C_2 — C_4 a C_6 — C_{10} pre iné mliečne výrobky sa uvádza v prácach [2, 5]. Opísaný spôsob oddelenia mastných kyselín je presný a reprodukovateľný.

Výsledky stanovenia mastných kyselín získané týmto spôsobom pri štúdiu biochémie zrenia syrov Romadur 40% t. v s. a ovčieho syra sú uvedené v prácach [12, 13] a budú zverejnené postupne v ďalších prácach.

Súhrn

Opisuje sa spôsob chromatografického oddelenia a kvantitatívneho stanovenia voľných mastných kyselín C_2 — C_{22} v mliečnych výrobkoch z jedného návažku, a to vhodnou kombináciou stĺpcovej a papierovej chromatografie, bez ich predbežnej izolácie zo vzorky. Metodika sa úspešne používala pri analýze mastných kyselín vznikajúcich v priebehu zrenia rozličných druhov syrov

ЗАМЕТКА К ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЖИРНЫХ КИСЛОТ C_2 — C_{22} В МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ ПРИ ОДНОЙ НАВЕСКЕ

ВЛАДИМИР ПАЛО

Кафедра технической микробиологии и биохимии, специализация технологии молока
и жиров Словацкой высшей технической школы в Братиславе

Выводы

В работе описывается, с соответствующими литературными данными, способ хроматографического разделения и количественного определения свободных жирных кислот C_2 — C_{22} в молочных продуктах из одной навески, целесообразной комбинацией колонной и бумажной хроматографии, без их предварительной изоляции из испытуемых проб. Методика была применена с успехом при анализе жирных кислот, получающихся в течении созревания различных сортов сыра.

Поступило в редакцию 15. 1. 1959 г.

BEITRAG ZUR CHROMATOGRAPHISCHEN BESTIMMUNG VON FETTSÄUREN C_2 — C_{22} IN MILCHERZEUGNISSEN AUS EINER EINWAGE

VLADIMÍR PALO

Lehrstuhl für technische Mikrobiologie und Biochemie, Spezialisierung Technologie
der Milch und Fette, an der Slowakischen Technischen Hochschule in Bratislava

Zusammenfassung

Unter Erwähnung entsprechender Literaturangaben wurde ein Verfahren zur chromatographischen Trennung und quantitativen Bestimmung freier Fettsäuren C_2 — C_{22} in Milcherzeugnissen aus einer Einwage beschrieben, u. zw. mittels einer geeigneten Kombination der Säulen- und der Papier-Chromatographie, ohne vorangegangener Isolierung dieser Fettsäuren aus dem Muster. Diese Methodik wurde bei der Analyse von Fettsäuren, welche im Verlaufe des Reifens verschiedener Käsesorten entstehen, erfolgreich angewendet.

In die Redaktion eingelangt den 15. 1. 1959

LITERATÚRA

1. Ritter W *Der Nachweis der flüchtigen Fettsäuren*, Milchwissenschaft 10, 122 (1955). — 2. Harper W J., *Direct Chromatographic Determination of Acetic, Propionic and Butyric Acids in Cheese*, J. Dairy Sci. 36, 808 (1953). — 3. Kopecký A., *Papírová chromatografie mastných kyselín*, Technické novinky IV/6, 429 (1958). — 4. Lehman W., Sahli K., *Zur Bestimmung der leichtflüchtigen Fettsäuren im Käse*. XIV-th Intern. Dairy Congress, Roma, II/II, 314 (1956). — 5. Nijkamp H. J., *On the Chromatographic Determination of the Volatile Fatty Acids C_4 — C_{10}* , Anal. Chim.

Acta 5, 325 (1951). — 6. Koman V., Palo V., *Nové zariadenie pre papierovú chromatografiu s plynulou zmenou koncentrácie rozpúšťadla*, Chem. zvesti 12, 513 (1958). — 7. Palo V., Koman V., Hrabě Z., *Oddelovanie vyšších mastných kyselín papierovou chromatografiou s využitím zmeny koncentrácie rozpúšťadla počas vyvíjania*, Chem. zvesti 12, 525 (1958). — 8. Palo V., Aufrichtová A., *Volné aminokyseliny v niektorých trhových druhoch syrov*, Chem. zvesti 13, 295 (1959). — 9. Williams T. J., *An Introduction to Chromatography*, London—Glasgow 1948, 65. — 10. Miettinen J. K., Virtanen A. I., *A Rapid Method for Determination of Fatty Acids and Ammonia in Silage by Means of Paper Chromatography*, *Anales Academie scientiarum fennicae*, Ser. A, II, *Chemica* 41 (1951).

11. Hiscox E. R., Berridge N. J., *Use of Paper Partiton Chromatography in the Identification of the Volatile Fatty Acids*, *Nature* 166, 522 (1950). — 12. Palo V., *Príspevok k štúdiu zrenia syra Romadur 40 % t. v s.* Sborník II. vedeckej konferencie Chemickej fakulty SVŠT v Bratislave 1959 (v tlači). — 13. Palo V., Švec I., Žuffa M., *Chemicko-fyzikálne zmeny prebiehajúce počas zrenia hrudkového ovčieho syra a konzumnej bryndze.* Sborník II. vedeckej konferencie Chemickej fakulty SVŠT v Bratislave 1959 (v tlači).

Došlo do redakcie 15. 1. 1959

Adresa autora:

Inž. Vladimír Palo, Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón.