

Chromatografické sledovanie polôh dvojitých väzieb nenасыtých mastných kyselín

V. KOMAN, D. ANDERLE

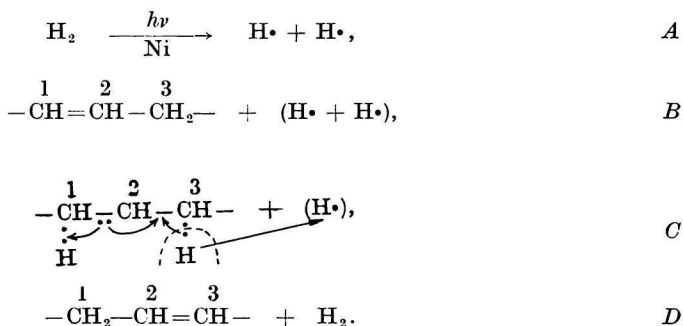
✓
*Katedra biotechnológie Slovenskej vysokej školy technickej,
Bratislava*

*Katedra analytickej chémie Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského,
Bratislava*

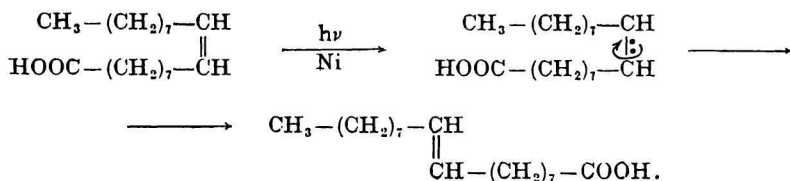
Rozdeľovacou chromatografiou na papieri sa mikrofotometricky určujú zmeny polôh dvojitých väzieb nenасыtých mastných kyselín počas laboratórnej parciálnej katalytickej hydrogenizácie snečnicového oleja po jeho oxidatívnom štiepení na dikarbónové kyseliny.

Parciálna katalytická hydrogenizácia olejov a izomerizácia ich nenасыtých mastných kyselín* sú paralelné, od seba neoddeliteľné javy. Okrem primárnej adície vodíka na dvojitú väzbu NeMK vzniká vždy väčšie alebo menšie množstvo PI a GI. Tieto tzv. vedľajšie produkty hydrogenizácie majú obyčajne iné fyzikálne, chemické a biologické vlastnosti než pôvodné NeMK prítomné v prírodných olejoch. Reakčný mechanizmus vzniku izomérov NeMK nie je doteraz úplne objasnený [1]. Prebiehajúce zmeny možno stručne vyjadriť schémami.

Polohové izoméry:



Priestorové izoméry:



* Použité skratky:

NeMK nenасыtené mastné kyseliny, PI polohové izoméry, GI priestorové izoméry.

Je zrejmé, že poznanie kvantitatívnych pomerov vzniknutých PI a GI v závislosti od podmienok katalytickej hydrogenizácie môže značne uľahčiť hlbší pohľad do samotného reakčného mechanizmu, problému tzv. selektivity a neselektivity stužovania, prípadne stužovania rastlinných olejov na oleje s vopred stanovenými vlastnosťami.

Stanovenie polohy dvojitej väzby NeMK pozostáva z dvoch operácií: z oxidatívneho rozštiepenia NeMK v mieste dvojitej väzby [2—14] a z nasledujúceho stanovenia reakčných spodín, t. j. dikarbónových kyselín rozdeľovacou chromatografiou [15—37]. Stanovenie GI v sledovaných vzorkách sme uviedli v prácach [39, 40].

Experimentálna časť

Podľa výsledkov chromatografickej analýzy [39] obsahoval pôvodný slnečnicový olej 37,24 % kyseliny olejovej (s jednou dvojitou väzbou v predpokladanej prirodzenej polohe medzi uhlíkmi 9 : 10) a 46,30 % kyseliny linolovej (s dvoma dvojitými väzbami v predpokladaných prirodzených polohách medzi uhlíkmi 9 : 10 a 12 : 13).

Vzorky slnečnicového oleja, odobrané vo zvolených časových intervaloch počas stužovania [39] z laboratórneho hydrogenizačného autoklávu, podrobili sa oxidácii ozónom a oxidatívne rozštiepeniu ozonidov peroxidom vodíka.

Príprava štandardov mastných a dikarbónových kyselín

Kyselina olejová — obchodná vzorka sa po prevedení na metylester prečistila molekulovou destiláciou [38]. (Jódové číslo je 89,3, číslo kyslosti 223.)

Kyselina linolová — izolovala sa a prečistila postupom podľa [41]. (Jódové číslo je 162,5, číslo kyslosti 220,0.)

Kyselina eruková — izolovala sa z repkového oleja a prečistila sa viacnásobnou kryštalizáciou z 80 % etanolu [42]. (Jódové číslo je 75,2, číslo kyslosti 164,5, b. t. 32,3 °C.)

Kyselina azelaová — izolovala sa z ricínového oleja po jeho oxidácii manganistanom draselným [43]. (Bod topenia je 107,3 °C.)

Kyselina brazýlová — pripravila sa oxidáciou kyseliny erukovej manganistanom draselným v kyslom prostredí [44]. (Bod topenia je 112 °C.)

Podmienky oxidatívneho štiepenia NeMK a izolácia dikarbónových kyselín

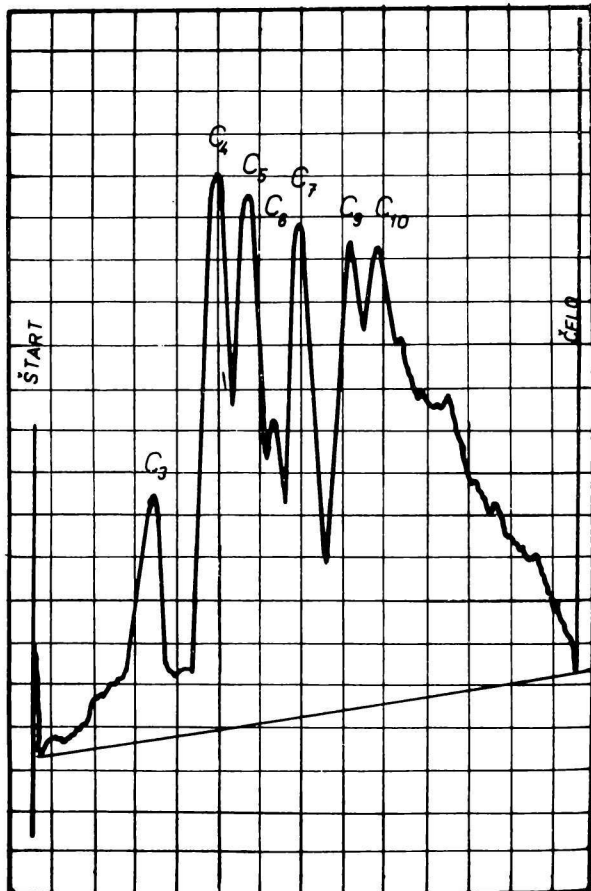
Ozón, vznikajúci vo výbojovej — ozonizačnej trubici (pracujúcej pod napätím 14 KV s prúdovou hodnotou 0,15 mA, privádzaných z vysokonapäťového generátora iskrového spektrografu ISP-2), prúdil cez 1 g vzorky rozpustenej v kyseline octovej. Prietok plynu trubicou a vzorkou sa udržiaval na konštantnej hodnote 20 ml/min. Percento ozónu v plyne (vzduch) sa pohybovalo v blízkosti 3 % (sledované jodometricky). Koniec oxidácie ozónom indikovala zmena sfarbenia roztoku jodidu draselného zapojeného za vzorkou. Po skončení ozonizácie sa do roztoku ozonidov pridalo 10 ml 30 % H_2O_2 a reakčná zmes sa 3 hodiny zahrievala na vodnom kúpeli pod spätným chladičom. Kyselina octová sa potom oddestilovala za zníženého tlaku v atmosfére dusíka. Zvyšok po oddestilovaní CH_3COOH sa 8 hodín extrahoval petroléterom [10]. Získali sa čisté dikarbónové kyseliny, ktoré sa v ďalšom sledovali rozdeľovacou chromatografiou na papieri.

Podmienky rozdeľovacej papierovej chromatografie dikarbónových kyselín

Z viacerých vyskúšaných postupov sa v našich podmienkach najlepšie osvedčil spôsob, ktorý opísal A. Seher [37]. Na chromatografické rozdelenie dikarbónových kyselín sa použil papier Whatman 1 o rozmeroch 27×30 cm. Ako mobilná fáza slúžil 1 N roztok amoniaku v 70,4 % etanole. Chromatogramy sa vyvíjali vzostupne do výšky čela 30 cm približne 24 hodín pri teplote 21°C v termostate a sušili sa voľne na vzduchu asi 12 hodín pri teplote miestnosti. Rozdelené dikarbónové kyseliny sa vyvolali postrekom ninhydrínom (200 mg ninhydrínu na 100 ml etanolu). Postriekaný chromatogram sa vkladal do sušiarne pri 120°C . Aby pozadie chromatogramu príliš nestmavelo, vyňímal sa chromatogram zo sušiarne ihneď po objavení prvého zafarbenia.

Podmienky kvantitatívneho vyhodnocovania chromatogramov

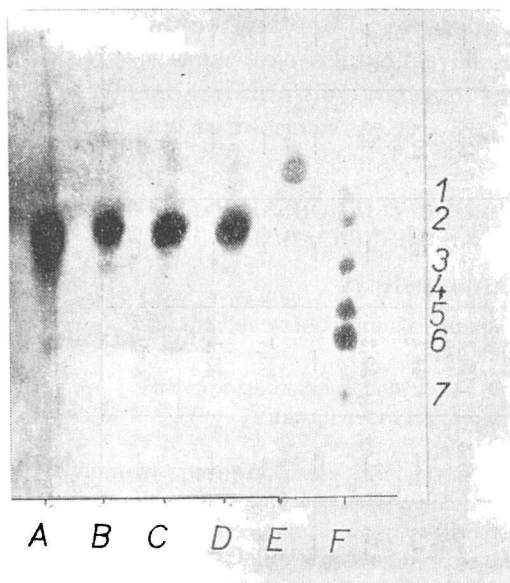
Chromatogramy vyvolané ninhydrínom sa snímkovali na film Dokument B vždy za rovnakých podmienok expozície i vyvolávania. Negatívny snímok sa potom vyhodnocovali pomocou mikrofotometra Keramos F-3. Na vyčíslenie percentuálneho zastúpenia jednotlivých dikarbónových kyselín sa použili hodnoty po zmeraní plôch príslušných vrcholov mikrofotometrických záznamov. Plochy sa premeriavali metódou výšok, trojuholníkov, štvorcov a metódou súčiny výšok a vzdialeností od štartu. Za konečnú hodnotu pre tú-ktorú dikarbónovú kyselinu sa bral aritmetický priemer.



Obr. 1. Mikrofotometrický záznam chromatograficky rozdelených štandardov dikarbónových kyselín (kyseliny malónovej, jantárovej, glutarovej, adipovej, pimelovej, azelaovej, sebakovej).

Výsledky a diskusia

Rozdelenie použitých štandardov dikarbónových kyselín je uvedené na ich mikrofotometrickom zázname (obr. 1). Rozdelenie dikarbónových kyselín získaných zo vzoriek laboratórne stužovaného slnečnicového oleja je na obr. 2.



Obr. 2. Chromatografické rozdelenie štandardných dikarbónových kyselín a dikarbónových kyselín získaných oxidatívnym štiepením vzoriek laboratórne stužovaného slnečnicového oleja.

A. po 60 min. stužovania; B. po 90 min. stužovania; C. po 120 min. stužovania; D. po 240 min. stužovania; E. kyselina brazýlová — C_{13} — z kyseliny erukovej; F. zmes štandardov dikarbónových kyselín. 1. kyselina sebaková — C_{10} —; 2. kyselina azelaová — C_9 —; 3. kyselina pimelová — C_7 —; 4. kyselina adipová — C_6 —; 5. kyselina glutarová — C_5 —; 6. kyselina jantárová — C_4 —; 7. kyselina malónová — C_3 —.

Celkový prehľad relatívnych hodnôt dikarbónových kyselín, ktoré zodpovedajú polohám dvojítých väzieb NeMK v jednotlivých vzorkách laboratórne stužovaného slnečnicového oleja, včítane štandardov kyseliny olejovej, linolovej a erukovej, je zhrnutý v tab. 1.

Teoreticky by po oxidatívnom štiepení kyseliny olejovej mala vzniknúť ako dikarbónová kyselina iba 9-uhlíkatá kyselina azelaová a z kyseliny linolovej 9-uhlíkatá kyselina azelaová a 3-uhlíkatá kyselina malónová. Z uvádzaných výsledkov možno však usúdiť, že už samotné štandardy NeMK — kyselina olejová a kyselina linolová — majú za daných podmienok oxidatívneho štiepenia a chromatografického stanovenia aj iné polohy dvojítých väzieb než predpokladané prirodzené polohy 9 10 a 9 10, 12 13. Kvantitatívne najvýraznejšie je vo všetkých sledovaných vzorkách zastúpená poloha dvojitej väzby medzi uhlíkmi 9 10 (kyselina azelaová).

Z porovnaní hodnôt kyseliny linolovej, uvedených v tab. 1, kde sa jedna zo vzoriek štandardnej kyseliny linolovej oxidovala ozónom za tepla (všetky ostatné vzorky sa ozonizovali pri 18 °C), vyplýva, že zmeny polôh dvojítých väzieb v uhlíkatom reťazci príslušnej NeMK môže okrem podmienok kata-

Tabuľka 1

Percentuálne zastúpenie dikarbónových kyselín vo vzorkách stužovaného slnečnicového oleja

Vzorka	<i>a</i> C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄
	<i>b</i> — 2:3	— 3:4	— 4:5	— 5:6	— 6:7	— 7:8	— 8:9	— 9:10	— 10:11	— 11:12	— 12:13	— 13:14	
1	2,2	2,3	3,7	6,0	13,4	—	—	62,2	12,3	—	—	—	—
2	—	0,9	5,1	5,9	7,4	—	—	48,8	—	—	17,7	16,0	—
3	0,4	2,9	3,7	4,5	5,2	16,3	25,2	19,7	12,9	12,5	—	—	—
4	2,8	1,8	4,0	3,4	5,6	12,0	—	48,7	—	7,9	6,8	7,8	—
5	3,4	3,3	5,4	6,3	9,4	11,5	—	49,8	—	12,9	—	—	—
6	2,8	2,5	2,6	4,8	9,9	13,1	15,8	43,1	—	7,4	—	—	—
7	1,3	1,2	2,5	2,9	4,2	8,4	11,5	44,4	—	11,8	—	13,0	—
8	2,9	1,1	7,2	4,8	6,6	14,2	—	44,4	6,2	10,1	—	7,0	—
kyselina olejová	2,0	8,2	4,4	8,9	14,4	—	—	39,3	—	9,5	—	14,0	—
kyselina eruková	3,2	—	—	21,8	—	—	—	—	—	—	—	49,4	24,4
kyselina linolová	1,6	7,5	7,1	6,2	—	21,2	—	55,7	—	—	—	—	—
kyselina linolová*	1,6	—	11,9	9,6	13,2	16,2	—	33,1	—	—	—	14,0	—
pôvodný slnečnicový olej	1,4	2,4	6,4	7,1	8,6	12,9	—	48,9	—	—	—	12,2	—

a — počet uhlíkov dikarónovej bkyseliny,*b* — poloha dvojitej väzby v pôvodnej NeMK,

* — oxidovaná za tepla.

lytickej hydrogenizácie v značnej miere ovplyvniť i samotný postup, prípadne voľba podmienok oxidatívneho štiepenia. Súčasne sa ukázalo, že stratám nižších dikarbónových kyselín (do C₄), ktoré nastávajú používaním H₂O ako rozpúšťadla pri ich izolácii, možno zamedziť, ak sa použije nepolárne rozpúšťadlo, napríklad éter. Polárne rozpúšťadlo môže byť totiž zdrojom chýb pri kvantitatívnom stanovení nižších dikarbónových kyselín.

Vcelku možno uzatvárať, že sledovanie zmien polôh dvojitéch väzieb NeMK, t. j. sledovanie sekundárnych reakcií parciálnej katalytickej hydrogenizácie rastlinných olejov pomocou rozdeľovacej chromatografie na papieri môže byť značne informatívne.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОЛОЖЕНИЙ ДВОЙНЫХ СВЯЗЕЙ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

В. Коман, Д. Андерле

Кафедра биотехнологии Словацкого политехнического института,
Братислава

Кафедра аналитической химии Фармацевтического факультета
Университета им. Коменского, Братислава

Результаты распределения дикарбоновых кислот полученные хроматографией на бумаге, окислительным расщеплением озоном образцов, полученных гидрогенизацией подсолнечного масла подтверждают, что в изучаемых интервалах времени происходят значительные изменения в положении двойных связей у ненасыщенных жирных кислот. Изменение положений двойных связей в цепях у ненасыщенных жирных кислот подтвердилось также и при различных условиях окислительного щепления примененных стандартов.

Preložil M. Fedoroňko

CHROMATOGRAPHIC STUDIES OF THE POSITIONS OF THE DOUBLE-BONDS OF UNSATURATED FATTY ACIDS

V. Koman, D. Anderle

Department of Biotechnology, Chemical Faculty of the Slovak Polytechnical University,
Bratislava

Department of Analytical Chemistry, Pharmaceutical Faculty of the Komenský
University, Bratislava

Samples of sunflowerseed oil hydrogenated in the laboratory were oxidatively cleaved by ozone and the resulting dicarboxylic acids were separated by paper chromatography the results of which indicate that in the periods studied, significant shifts in the position of the unsaturated double bonds take place. Shifts in the double bonds in the chains of unsaturated fatty acids were observed also in the standards oxidated in various ways.

Preložil J. Balan

LITERATÚRA

1. Ullrich L., *Chémia a technológia jedlých tukov a olejov*, 346. Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, Bratislava 1963.
2. Harries C., Tieme C., *Ann.* **343**, 354 (1905).
3. Molinari E., Soncini E., *Ber.* **39**, 2735 (1908).
4. Noller C. R., Adams R., *J. Am. Chem. Soc.* **48**, 1071 (1926).
5. Riebsomer J. L., Tallman R. C., *Proc. Indiana Acad. Sci.* **43**, 136 (1934).
6. Noorduyn A. C., *Rec. trav. chim.* **38**, 317 (1919).
7. Stoll M., Rouvé A., *Helv. Chim. Acta* **27**, 950 (1944).
8. Klenk E., Bongard W., *Z. physiol. Chem.* **290**, 181 (1952).
9. Benton F. L., Kiess A. A., Harwood H. J., *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **36**, 437 (1959).
10. Passero J., Naudet M., *Rev. franc. ccrp gras* **7**, 189 (1960).
11. Lemieux R. U., von Rudolff E., *Can. J. Chem.* **33**, 1701 (1955).
12. von Rudolff E., *Can. J. Chem.* **33**, 1714 (1955).
13. von Rudolff E., *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **33**, 126 (1956).
14. Criegee R., *International Ozone Conference*, Chicago, nov. 1956; *Advances in Chemistry*, ser. **21**, 133 (1958).
15. Haverkamp-Begemann P., Keppler J. G., Boekenoogen H. A., *Rec. trav. chim.* **69**, 439 (1960).
16. Higuchi T., Corcoran G. B., Hill N. C., *Anal. Chem.* **24**, 491 (1952).
17. Corcoran G. B., *Anal. Chem.* **28**, 168 (1956).
18. James A. T., Webb J. P. W., *Proceedings of the Fourth International Conference on Biochemical Problems of Lipids*, Oxford, July 1957.
19. Lugg J. W. H., Owerell B. T., *Nature* (London) **160**, 87 (1947).
20. Stark B., Goodban A. E., Owens H. S., *Anal. Chem.* **23**, 413 (1951).
21. Bryant I., Owerell B. T., *Nature* (London) **167**, 361 (1951).
22. Opienska-Blauth J., Saklawska-Szymonowa O., Kanski M., *Nature* **168**, 511 (1951).
23. Cheftel R. J., Munier E. R., Machenboeuf N., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **33**, 840 (1951).
24. Buch L. M., Montgomery R., Porter W. L., *Anal. Chem.* **24**, 489 (1952).
25. Owerell B. T., *Australian J. Sci.* **15**, 28 (1952).
26. Jones A. R., Dowling E. J., Skraba W. J., *Anal. Chem.* **25**, 394 (1953).
27. Bryant F., Owerell B. T., *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 417 (1953).
28. Kalbe H., *Z. physiol. Chem.* **297**, 19 (1954).
29. Nordmann R., Gauchery O., du Ruisseau J. P., Thomas J., Nordmann J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **36**, 1641 (1954).
30. Brown F., Hall L. P., *Nature* (London) **166**, 60 (1950).
31. Löffler J. E., Riechl E. R., *Mikrochim. Acta* **79** (1953).
32. Šanda V., Procházka Ž., Le-Moal H., *Chem. listy* **52**, 1546 (1958).
33. Hiscoxs R. E., Berridge N. J., *Nature* **166**, 522 (1950).
34. Brown F., *Biochem. J.* **47**, 598 (1950).
35. Isherwood F. A., Hanes C. S., *Biochem. J.* **55**, 826 (1953).
36. Long A. G., Quayle J. R., Stedman R. J., *J. Chem. Soc.* **1951**, 2197.
37. Seher A., *Fette u. Seifen* **58**, 401 (1956).
38. Anderle D., *Diplomová práca*, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava 1961.
39. Koman V., Komanová E., *Chem. zvesti* **14**, 690 (1960).
40. Koman V., Komanová E., *Chem. zvesti* **15**, 136 (1961).
41. McCutcheon J. W., *Can. J. Res. B* **16**, 158 (1938).

42. von Hadorn H., Biefer K. W., *Trav. chim. alim. d'hyg.* **47**, 84 (1956).
43. *Organic syntheses*, 6. vydanie, 427. J. Wiley, New York 1950.
44. Armstrong E. F., Hilditch T. P., *J. Soc. Chem. Ind.* **44**, 43 T (1925).

Do redakcie došlo 15. 9. 1965

V revidovanej podobe 8. 2. 1966

Adresa autorov:

Inž. Václav Koman, CSc., Katedra biotechnológie SVŠT, Bratislava, Jánska 1.

Prom. chem. Dušan Anderle, Katedra analytickej chémie Farmaceutickej fakulty UK, Bratislava, ul. Odbojárov 12.