

PRÍSPEVOK K PAPIEROVEJ CHROMATOGRAFII NEPRCHAVÝCH ORGANICKÝCH KYSELÍN

MOJMÍR TRAITER

Oddelenie farmaceutickej chémie a biochémie Chemického ústavu Slovenskej akadémie vied v Bratislave

V rámci problému izolácie a stanovenia organických kyselín, najmä kyseliny citrónovej a jablčnej v tabaku vystúpila do popredia potreba vypracovať dostatočne rýchlu a spoľahlivú metódu na ich stanovenie.

Staršie metódy analýz zmesí týchto kyselín boli vo väčšine prípadov založené na rôznej rozpustnosti ich solí, spravidla vápenatých, v rozličných rozpúšťadlách, najmä v alkohole [4, 7, 11, 17, 22, 31].

V novej dobe možno tento problém ľahšie a rýchlejšie riešiť pomocou papierovej chromatografie.

Papierovou chromatografiou neprchavých organických kyselín sa zaoberali viacerí autori [1, 9, 10, 13, 14, 15, 20, 21, 27, 29, 30]. Získané poznatky uplatnili pri rozdeľovaní rozličných prirodzených zmesí týchto kyselín [6, 16, 19, 25, 26, 28]. Vo svojich prácach použili jednak kyslé [1, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 25, 26, 29], jednak alkalické [12, 13, 14, 15, 20] rozdeľovacie sústavy. Detekciu najčastejšie uskutočňovali postrekom alkoholickým roztokom indikátora [3, 9, 13, 14, 15, 18, 25, 26] alebo 0,1 % alkoholickým roztokom merkuriochromu [2, 3]. Menej používaný spôsob detekcie škvrn kyselín je postriekanie chromatogramu 4 % alkoholickým roztokom formaldehydu a po usušení postriekanim roztokom 0,2 % škrobu, 0,3 % jodidu draselného a 0,2 % jodičnanu draselného [10], roztokom amoniakálneho dusičnanu strieborného [27] alebo roztokom 2,6-dichlórfenolindofenolu [5].

O kvantitatívnu papierovú chromatografiu organických kyselín sa pokúsili Bryant a Overell [8, 23]. Uvedení autori po izolácii kyselín z tkanív mrkvy a jablka a po ich rozdelení na papieri vystrihli škvrnu kyseliny a vážili papier zaujatý škvrnou.

Princíp planimetrického merania plochy škvrny a tým i kvantitatívneho stanovenia kyseliny aplikovali vo svojich prácach Perlusz a Jeney [24], Hennig a Flintje [12].

Experimentálna časť

Kvalitatívne rozdeľovanie a identifikácia

Pre chromatografiu sa použil čs. filtračný papier ch 85/285 vyrobený v neratovických papierňach, ktorý bol autorovi k dispozícii a ktorý sa za daných experimentálnych podmienok ukázal ako najvhodnejší.

Analyzovaná zmes piatich neprchavých organických kyselín: šťavelovej, vínnej, citrónovej, jablčnej a jantárovej sa obvyklým spôsobom nanášala mikropipetou na pruhy filtračného papiera o rozmeroch 15 × 39 cm, a to 5 cm od spodného okraja a päť vzoriek

vo vzdialenosti 2 cm od seba. Chromatogramy sa vyvolávali vzostupnou metódou. Vyvolávacia doba bola 24 hod. a úplne postačovala na dostatočné rozdelenie danej zmesi.

Chromatogramy sa po voľnom usušení na vzduchu postriekali roztokom 0,5 g bróm-krezolovej modrej v 1 litri 96 % etylalkoholu. Žlté škvrny kyselín na modrom podklade sa obkreslili a po označení ich stredu sa stanovila R_F hodnota.

Na rozdelenie uvedenej zmesi kyselín bolo vyskúšané väčšie množstvo rozličných rozdeľovacích sústav, z ktorých ako najvhodnejšie sa ukázali zmesi alifatických alkoholov s vodou za prítomnosti zásady, v našom prípade amoniaku a pyridínu.

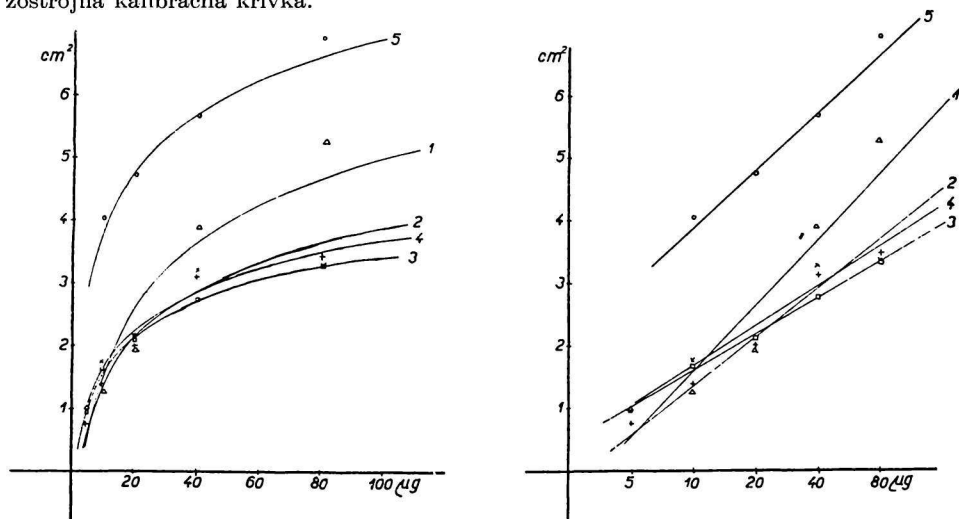
Tab. 1 udáva R_F vyššie uvedených kyselín v rozličných zmesiach etylalkoholu a propylalkoholu s vodou a s amoniakom, resp. s pyridínom. Ako najvhodnejšie pre daný druh papiera sa ukázali zmesi 3, 4, 9, 17, 18, 19 a 20.

Tieto zmesi pri neskoršom vyskúšaní na chromatografických papieroch Whatman 1 a 4 a Sch. Sch. 2043 a 2045 nevykazovali taký dobrý rozdeľovací efekt.

Kvantitatívne stanovenie

V snahe vypracovať rýchle a jednoduché kvantitatívne stanovenie uvedených kyselín vedľa seba rozdeľovala sa vyššie opísanou metódou ich zmes o koncentráciách 0,25 %, 0,5 %, 1,0 %, 2,0 % a 4,0 %, počítané na každú kyselinu. Všetky použité kyseliny boli čistoty p. a., okrem kyseliny jablčnej a jantárovej, ktoré boli označené ako „čisté“. Vodný roztok zmesi kyselín vyššie uvedených koncentrácií sa nanášal mikropipetou o obsahu 0,002 ml, čo odpovedá množstvám 5, 10, 20, 40 a 80 μg každej kyseliny. Na jeden chromatogram sa nanieslo vždy päť vzoriek vedľa seba.

Po vyvolaní chromatogramu v zmesi 18, ktorá sa zvolila ako najvhodnejšia, a po voľnom usušení na vzduchu sa škvrny kyselín detegovali postriekaním chromatogramu roztokom bróm-krezolovej modrej v etylalkohole. Žlté škvrny kyselín na modrom podklade sa obkreslili a ich plocha sa zmerala Amzlerovým polárnym planimetrom. Priemerné hodnoty z piatich jednotlivých meraní sa zakreslili do grafov a pre každú kyselinu sa zostrojila kalibračná krivka.



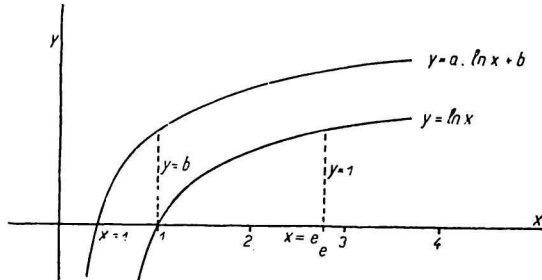
Graf 1. Závislosť plôch škvŕn od množstva nanesených kyselín.

1. kyselina vínna, 2. kyselina šťavelová, 3. kyselina citrónová, 4. kyselina jablčná, 5. kyselina jantárová.

Tabuľka 1
R_F hodnoty kyselín v rozličných alkalických zmesiach

Č. zmesi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
etylalkohol	95	90	85	80	75	70	95	90	85	80	75	70	—	—	—	—	—	—	—	—	
propylal- kohol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	90	80	70	60	77,5	75,0	72,5	70,0	
voda	—	5	10	15	20	25	—	5	10	15	20	25	5	15	25	35	20	20	20	20	
pyridín	—	—	—	—	—	—	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2,5	5,0	7,5	10	
amoniak 25 %	5	5	5	5	5	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Kyselina																					
vínna	0,03	0,04	0,08	0,17	0,47	0,45	0,07	0,16	0,30	0,39	0,52	0,66	0,06	0,10	0,27	0,50	0,25	0,23	0,22	0,21	
šťaveľová	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,20	0,20	0,31	0,43	0,53	0,63	0,75	0,06	0,21	0,40	0,58	0,39	0,35	0,32	0,31	
citrónová	0,01	0,01	0,02	0,06	0,36	0,32	0,33	0,45	0,57	0,65	0,74	0,85	0,29	0,30	0,51	0,69	0,51	0,47	0,45	0,44	
jablčná	0,03	0,04	0,13	0,25	0,57	0,56	0,42	0,55	0,68	0,72	0,79	0,85	0,29	0,41	0,61	0,69	0,63	0,59	0,55	0,56	
jantárová	0,04	0,09	0,20	0,32	0,66	0,64	0,77	0,90	0,93	0,92	0,94	0,97	0,83	0,81	0,87	0,86	0,96	0,95	0,92	0,96	
vzdialenosť čela	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	32,0	32,5	32,5	34,5	34,0	34,5	34,0

Ako zjavne vidieť z grafov, plocha škvŕny kyseliny je hodnota logaritmicky závislá od množstva nanesenej kyseliny.



Graf 2. Grafické vyjadrenie funkcie $y = a \cdot \ln x + b$ a $y = \ln x$.

Pre výpočet rovnice závislosti plochy škvŕny od množstva nanesenej kyseliny môžeme použiť všeobecnú rovnicu logaritmickej funkcie:

$$y = a \cdot \ln x + b$$

Pretože

$$\ln 1 = 0,$$

je pre

$$x = 1, \quad y = b.$$

Konštantu a vypočítame:

$$-y_1 = -a \cdot \ln x_1 \pm b$$

$$y_2 = a \cdot \ln x_2 + b$$

$$x_2 - y_1 = a \cdot \ln \frac{x_2}{x_1}$$

z čoho

$$a = \frac{y_2 - y_1}{\ln \frac{x_2}{x_1}}$$

Pre ľahší výpočet množstva kyseliny z plochy škvŕny, čo v praxi prichádza do úvahy, prevedme všeobecnú logaritmickú rovnicu do jej exponenciálneho tvaru:

$$y = a \cdot \ln x + b$$

$$\ln x = \frac{y - b}{a}$$

$$x = e^{\frac{y - b}{a}}$$

Uvedený vzťah platí však len približne a pre jednotlivé merania sa zistili značné odchýlky od priemernej veľkosti plochy škvŕny získanej z piatich meraní. Konštanty a a b značne závisia od podmienok pokusu.

Priemerné veľkosti plôch škvŕn vypočítané z piatich meraní v závislosti od množstva nanesených kyselín, ako aj maximálnu a minimálnu odchýlku jednotlivých stanovení od priemernej hodnoty, vyjadrenú v percentách, udávajú tab. 2 a 3.

Tabuľka 2
Závislosť plochy škvŕny od množstva nanesej kyseliny

Kyselina	Plocha škvŕny v cm ² stanovená											
	planimetricky		graficky		planimetricky		graficky		planimetricky		graficky	
	5 μg	10 μg	20 μg	40 μg	80 μg							
vínna	1,00	0,56	1,26	1,62	1,92	2,65	3,88	3,68	5,26	4,73		
šťaveľová	0,74	0,60	1,36	1,35	2,00	2,15	3,10	2,88	3,46	3,67		
citrónová	0,94	1,00	1,64	1,58	2,12	2,17	2,74	2,75	3,30	3,33		
jablčná	0,96	1,05	1,76	1,68	2,20	2,30	3,24	2,92	3,30	3,55		
jantárová		3,01	4,06	3,90	4,74	4,80	5,70	5,71	6,94	6,65		

Tabuľka 3

Maximálna a minimálna odchýlka jednotlivých stanovení od priemernej hodnoty v percentách

Kyselina		5 μg	10 μg	20 μg	40 μg	80 μg
vínna	+	10,0	11,6	14,5	5,6	14,1
	—	10,0	12,7	21,8	9,8	16,3
šťaveľová	+	21,6	17,6	15,0	3,2	12,7
	—	32,4	19,1	25,0	3,2	13,2
citrónová	+	27,6	21,9	13,2	5,8	15,1
	—	25,5	14,6	15,0	16,0	12,1
jablčná	+	14,6	25,0	18,1	14,2	10,7
	—	16,7	20,4	27,3	13,5	10,7
jantárová	+		8,3	22,3	14,0	12,3
	—		12,7	24,0	5,2	10,6

Ďakujem dr. E. Csereovi, vedúcemu OTK závodu Slovakofarma, n. p., Hlohovec, za záujem a praktickú pomoc pri matematickom riešení rovníc závislosti plôch škvŕn od množstva kyselín.

Súhrn

Bolo vypracované oddelovanie a identifikácia piatich neprechavých organických kyselín: vínnej, šťaveľovej, citrónovej, jablčnej a jantárovej papierovou

chromatografiou na neratovickom filtračnom papieri ch 85/285 v alkalických rozdeľovacích sústavách: etylalkohol, voda, amoniak; etylalkohol, voda, pyridín; *n*-propylalkohol, voda, pyridín.

Vykonal sa pokus o kvantitatívne stanovenie týchto kyselín v alkalickej rozdeľovacej sústave: *n*-propylalkohol, voda, pyridín = 75 : 20 : 5 a na základe závislosti plochy škvŕny od množstva nanesej kyseliny sa zostrojili kalibračné krivky pre každú kyselinu.

Z nameraných hodnôt sa vypočítali maximálne a minimálne odchýlky od priemerných veľkostí plôch.

Z výsledkov pokusov vyplýva, že opísaná metóda oddeľovania a stanovenia uvedených piatich neprechavých organických kyselín je vhodná ako metóda identifikačná a ako rýchla orientačná semikvantitatívna metóda pri stanovení týchto kyselín po ich vhodnej predbežnej izolácii z rastlinného materiálu.

ЗАМЕЧАНИЕ К ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ НЕЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

МОЙМИР ТРАЙТЕР

Отделение фармацевтической химии и биохимии Химического института Словацкой Академии Наук в Братиславе

Выводы

Разработан метод деления и идентификации пяти нелетучих органических кислот: винной, щавелевой, лимонной, яблочной и янтарной хроматографией на бумаге на нератовицкой фильтровальной бумаге х. 85/285 в щелочных распределительных системах: этиловый спирт, вода, аммиак; этиловый спирт, вода, пиридин; *n*-пропиловый спирт, вода, пиридин.

Проведен опыт количественного определения этих кислот в щелочной распределительной системе: *n*-пропиловый спирт, вода, пиридин 75:20:5 и на основании зависимости площади пятна от количества нанесенной кислоты были сконструированы градуировочные графики для каждой кислоты.

Из измеренных данных были исчислены максимальные и минимальные отклонения от средних величин плоскостей.

Из приобретенных результатов следует, что описанный метод деления и определения приведенных пяти нелетучих органических кислот подходящий для идентификации и для быстрого полуколичественного определения этих кислот по удобной предварительной изоляции их из растительного материала.

Поступило в редакцию 19. 3. 1957 г.

BEITRAG ZUR PAPIERCHROMATOGRAPHIE NICHTFLÜCHTIGER ORGANISCHER SÄUREN

MOJMÍR TRAITER

Abteilung für pharmazeutische Chemie und Biochemie des Chemischen Instituts an der Slowakischen Akademie der Wissenschaften in Bratislava

Zusammenfassung

Es wurde die Trennung und Identifizierung von fünf nichtflüchtigen organischen Säuren durchgeführt, u. zw. von Weinsäure, Oxalsäure, Citronensäure, Äpfelsäure und Bernsteinsäure, mittels Papierchromatographie auf Filtrierpapier ch. 85/285 (von Nera-

tovice) in alkalischen Trennungssystemen: Äthylalkohol, Wasser, Ammoniak; Äthylalkohol, Wasser, Pyridin; *n*-Propylalkohol, Wasser, Pyridin.

Es wurde ein Versuch der quantitativen Bestimmung dieser Säuren im alkalischen Trennungssystem durchgeführt: *n*-Propylalkohol, Wasser, Pyridin = 75 : 20 : 5, und auf der Grundlage der Abhängigkeit der Fläche des Flecks von der Menge der aufgetragenen Säure wurden für jede Säure Eichkurven konstruiert.

Aus den gemessenen Werten wurden die maximalen und minimalen Abweichungen von den durchschnittlichen Grössen der Flächen berechnet.

Aus den Ergebnissen der Versuche geht hervor, dass die beschriebene Trennungs- und Bestimmungsmethode der angeführten fünf nichtflüchtigen organischen Säuren geeignet erscheint, nicht nur als Identifiziermethode, sondern auch als rasche orientierende semi-quantitative Methode bei der Bestimmung dieser Säuren nach ihrer geeigneten vorausgegangenen Isolierung aus Pflanzenmaterial.

In die Redaktion eingelangt den 19. 3. 1957

LITERATÚRA

1. Airan J. W., *Curr. Sci.* 22, 51 (1953); *C. A.* 47, 7364b (1953). — 2. Airan J. W., Barnabas J., *Naturwissenschaften* 40, 510 (1953). — 3. Airan J. W., Joshi J. V., Barnabas J., Master R. W., *Anal. Chem.* 25, 659 (1953). — 4. Barfoed C. T., *Z. anal. Chem.* 7, 403 (1867). — 5. Barnabas J., Joshi G. V., *Anal. Chem.* 27, 443 (1955). — 6. Bigli C., TrabANELLI G., *Ann. Chim.* 45, 115 (1955). — 7. Bornträger A., *Z. anal. Chem.* 37, 477 (1898). — 8. Bryant F., Overell B. T., *Biochim. biophys. Acta* 10, 471 (1953). — 9. Dénison F. W., Phares E. F., *Anal. Chem.* 24, 1628 (1952). — 10. van Duuren A. J., *Rec. Trav. chim.* 72, 889 (1953).

11. Gowing-Scopes L., *Z. anal. Chem.* 53, 59 (1914). — 12. Hennig K., Flintje S. M., *Wein.-Wiss. Beihefte deutsch. Weinbau* 9, 1 (1955); *C. A.* 49, 10576g (1955). — 13. Cheftel R. I., Munier R., Machebocuf M., *Bull. Soc. Chim. biol.* 33, 840 (1951). — 14. Cheftel R. I., Munier R., Macheboeuf M., *Bull. Soc. Chim. biol.* 34, 380 (1952). — 15. Jones A. R., Dowling E. J., Skraba W. J., *Anal. Chem.* 25, 394 (1953). — 16. Kalyankar G. D., Krishnaswamy P. R., Sreenivasaya M., *Curr. Sci.* 21, 220 (1952); *C. A.* 124, 3615 (1953). — 17. Lindet M. L., *Bull. Soc. chim. France* (13) 15, 1160 (1896). — 18. Lugg J. W. H., Overell B. T., *Nature* 160, 87 (1947). — 19. Malý A., Eliášek J., *Průmysl potravin* 6, 138 (1955). — 20. Mohan Rao V. K., *J. Sci. Ind. Research* 14B, 161 (1955); *C. A.* 49, 15629h (1955).

21. Nordmann R., Gauchery O., *Bull. Soc. Chim. biol.* 36, 1641 (1954). — 22. Nuccorini R., Zaccagnini A., *Z. anal. Chem.* 87, 151 (1932). — 23. Overell B. T., *Austral. J. Sci.* 15, 28 (1952); *C. A.* 125, 388 (1954). — 24. Perlusz T., Jeney K., *Magyar kém. Fol.* 61, 13 (1955). — 25. Rodopulo A. K., *Vinodelije i Vinogradstvo SSSR* 12, 8 (1952); *C. A.* 49, 8552g (1955). — 26. Školnik R. A., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 90, 847 (1953). — 27. Smith F., Spriestersbach D., *Nature* 174, 466 (1954). — 28. Stark J. B., Goodban A. E., Owens H. S., Porter W. L., *Anal. Chem.* 23, 413 (1951). — 29. Vas K., *Acta chim. Acad. Sci. hung.* 1, 335 (1951). — 30. Vavruch I., *Chem. Zvesti* 9, 207 (1955). — 31. Wimmel T., *Z. anal. Chem.* 7, 411 (1868).

Došlo do redakcie 19. 3. 1957