

Néhány szerves sav papírkromatográfiás elválasztása kénessavas butanollal

VAS KÁROLY

Országos Magyar Mezőgazdasági Ipari Kísérleti Intézet, Budapest

Bevezetés

Egy korábban megjelent közleményünkben (1) leírtuk néhány mono-, di- és trikarbonsav kénessavas butanolban papiroskromatográfiával történő elválasztásának módszerét. Az ott vázolt munka elvégzése óta (1950. szeptember) több olyan közleményhez jutottunk hozzá, melyek alapján az akkor nyert adatokat most újabb szempontok szerint tudjuk értékelni és újabb kísérletekkel kiegészítve a munkát, a jelenségek helyes magyarázatát jobban meg tudjuk közelíteni. A jelen dolgozatban erről számolunk be és az eljárás gyakorlati alkalmazására vonatkozólag adunk közre néhány megfigyelést.

Az R_F -értéket befolyásoló néhány tényező vizsgálata

A kénessav alkalmazása szerves savak papírkromatográfiás elválasztásánál azért látszik kívánatosnak, mert 1. erős sav ($pK_1 = 1,81$; $18^\circ C$); 2. könnyen illó és így a papírról maradéktalanul eltávolítható; 3. az eddig leírt ecetsavval és a hangyasavval szemben a butanollal nem észtereződik és így az oldószerkeverék összetétele állás közben nem változik; 4. a vizsgálandó savak alkoholos hidroxiljaival nem reagál, amiért is e savak mennyisége a futtatás során — legalább is *cnn*ek következtében — nem változik és végül 5. a szükséges tisztaságban való beszerzése egyszerű.

Az R_F és a megoszlási hányados összefüggése

A kifejlesztő oldószer-keveréket egy térfogat friss (palackból, desztillált vízbe történő átbuborékolatással nyert) telített kénessavoldat és egy térfogat n-butanol rázóötölcserben való összekeverésével, majd a felső réteg elkülönítésével állítjuk elő. Ebben a rendszerben a tej- ($pK = 3,85$; $25^\circ C$), borostyánkő- ($pK_1 = 4,19$; $pK_2 = 5,48$; $25^\circ C$), alma- ($pK_1 = 3,42$; $pK_2 = 5,13$; $25^\circ C$), borkő- ($pK_1 = 2,98$; $pK_2 = 4,34$; $25^\circ C$) és a citromsav ($pK_1 = 3,08$; $pK_2 = 4,77$; $pK_3 = 6,40$; $18^\circ C$) disszociációja és adszorpciója a cellulózhoz várhatóan annyira visszaszorul, hogy a savak R_F -értéke a *Consd*en, *Gordon* és *Martin* (3) által levezetett összefüggést mutatja a savaknak a vizes és az organikus oldószerfázis közti megoszlási hányadosával (K):

$$R_F = \frac{A_L}{A_L + K \cdot A_S}$$

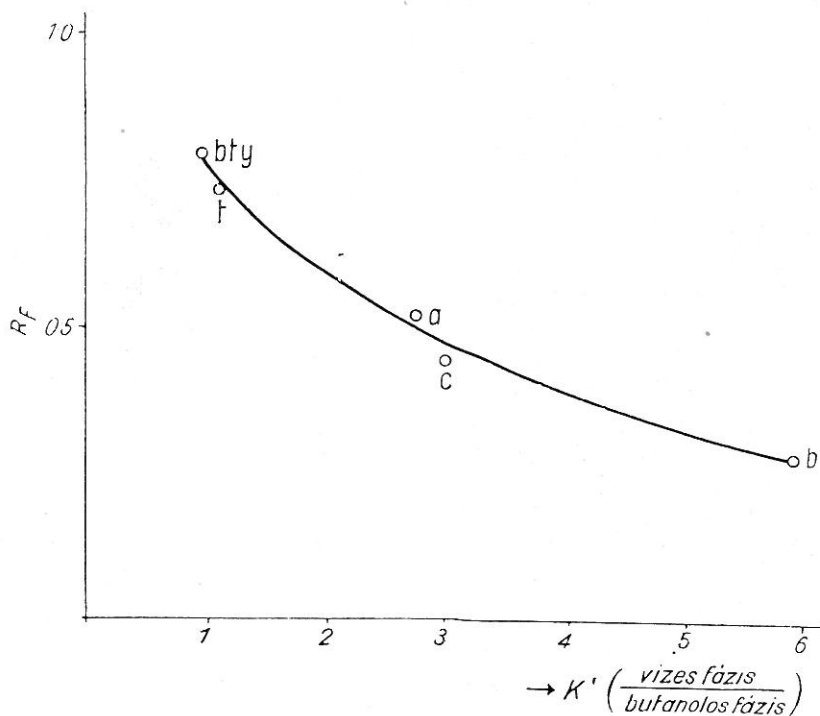
ahol: $R_F = \frac{\text{a savfolt súlypontjának elmozdulása a kezdővonalától (cm)}}{\text{az oldószer frontjának távolsága a kezdővonalától (cm)}}$

$A_L =$ az organikus oldószer-fázis keresztmetszetének területe

$A_S =$ a vizes fázis keresztmetszetének területe

$K =$ a sav megoszlási hányadosa a vizes és az organikus fázis között

Tekintettel arra, hogy a megoszlási hányados értéke állandónak csak akkor vehető, ha a megosztott anyag mindkét fázisban ugyanabban az alakban (tehát pl. nem disszociált formában) van jelen, erősebben disszociáló vegyületeknél a hányados értéke a koncentrációtól függően ingadozik, ha a vizes, ill. az organikus fázisban mutatkozó bruttó-koncentrációt vesszük számítási alapul: hiszen az



1. ábra

Rövidítések: *bty*: borostyánkősav; *t*: tejsav; *a*: almasav; *c*: citromsav; *b*: borkősav.

organikus fázisban általában csak a nem disszociált rész oldódik, a vizes részben viszont emellett az ionizált alak is jelen van. Ez esetben állandó értéket csak a nem-disszociált formának a két fázisban mutatkozó koncentrációiból képzett hányados ad.

K ilyenkor nem egyenlő $\frac{C_1}{C_2}$ -vel, hanem

$$K = \frac{C_1(1-a)}{C_2}$$

(ha t. i. asszociáció nem lép fel.)

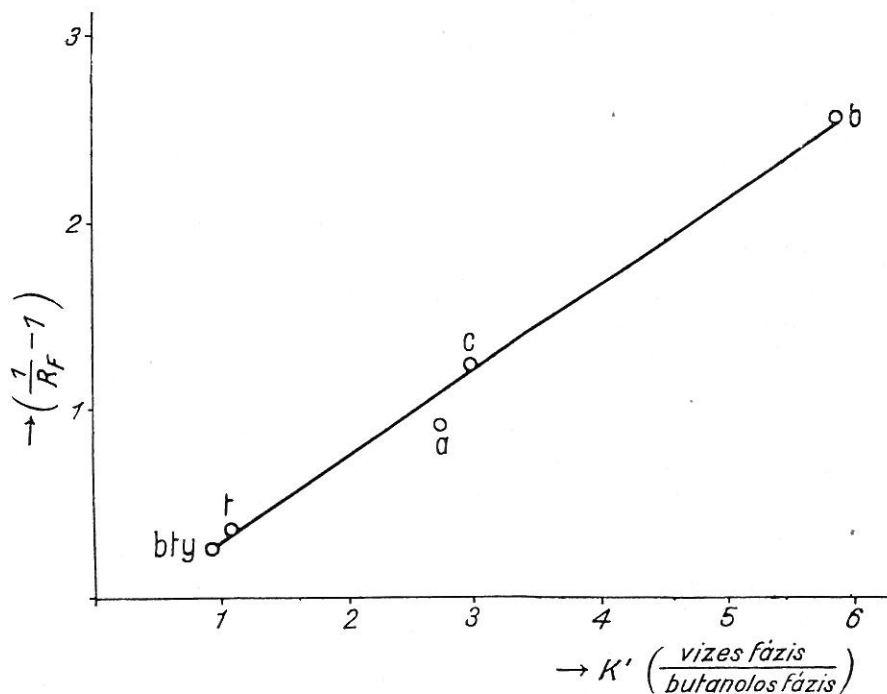
ahol: a = a disszociáció foka a vizes-fázisban

C_1 = a bruttó savkoncentráció a vizes fázisban

C_2 = a bruttó (és egyben a disszociálatlan) savkoncentráció az organikus fázisban.

Ha tehát $\frac{C_1}{C_2}$ -t ilyenkor K' -vel jelöljük, (»látszólagos megoszlási hányados«), akkor

$$K = K' \cdot (1 - a).$$



2. ábra

Megkíséreltük a látszólagos megoszlási hányadosok meghatározásával a korábban (7) nyert R_F -értékeket összevetni. Kb. 0,05 M-nyi (az összes térfogatra számítva) vizsgálandó savat feloldva a kénessavas-butanolos oldószer-keverékben, 20° C-on az egyensúly beállta (igen gyakori, alapos összerázás) után megmértük a két fázisban mutatkozó sav-koncentrációkat. A mérést 0,1 N NaOH-dal végeztük a kénessav, ill. a butanol teljes elpárlása után. Ez utóbbi nagy átmérőjű főző-poharakban, 80° C-os vízfürdőn történt, desztillált vízzel való gyakori feltöltés után. A vizes kezelés különösen a tejsavnál volt fontos, mert itt víz távolléte esetén anhidridek keletkezése meghiúsítja az eredményeket.

Ha a nyert K' -értékeket szembeállítjuk az R_F -ekkel, akkor a következő összefüggést kapjuk (1. ábra)

Mármost C o n s d e n és munkatársai (3) egyenletéből következőleg :

$$K = \frac{A_L}{A_S} \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right)$$

Tekintettel arra, hogy A_L/A_S adott körülmények között állandó szám, a megoszlási hányadosoknak és az $\left(\frac{1}{R_F} - 1 \right)$ -értékeknek grafikomba foglalásakor egyenest kell kapnunk. A mi esetünkben a K' — és az ugyancsak 20° C-on mért R_F -ekből számított $\left(\frac{1}{R_F} - 1 \right)$ -értékek a következő képet szolgáltatják (2. ábra).

A pontok — az almasav kivételével — eléggé rajta fekszenek egy egyenesen ami arra vall, hogy a fenti összefüggés általában érvényes és egyben arra is, hogy az adott körülmények között nagyobb mértékű disszociáció általában nem jött létre ($K' \simeq K$).

Az R_F -értékek befolyásolása a butanol részleges vagy teljes helyettesítésével

Már idézett közleményünkben (7) rámutattunk arra a lehetőségre, hogy sokszor a savfoltok jobb elválását érhetjük el, ha nem tiszta butanol alkalmazunk a kifejlesztő oldószer-keverékben, hanem pl. benzinnel vagy petroléterrel kevert butanolt. Járulékos előnye a benzín hozzáadásának, hogy a kifejlesztés folyamata ezáltal gyorsul.

Újabb megállapítások szerint (M ü l l e r és C l e g g) (6) a kifejlesztés sebessége az oldószer diffúziós-állandójától (D), ez utóbbi pedig a viszkozitástól (η), a felületi feszültségtől (γ) és a sűrűségtől (d) függ :

$$h^2 = D \cdot t - b$$

$$D = a \frac{\gamma}{\eta \cdot d} + c,$$

ahol h az oldószer által t idő alatt (perc) megtett út hossza (mm), a , b és c pedig konstansok.

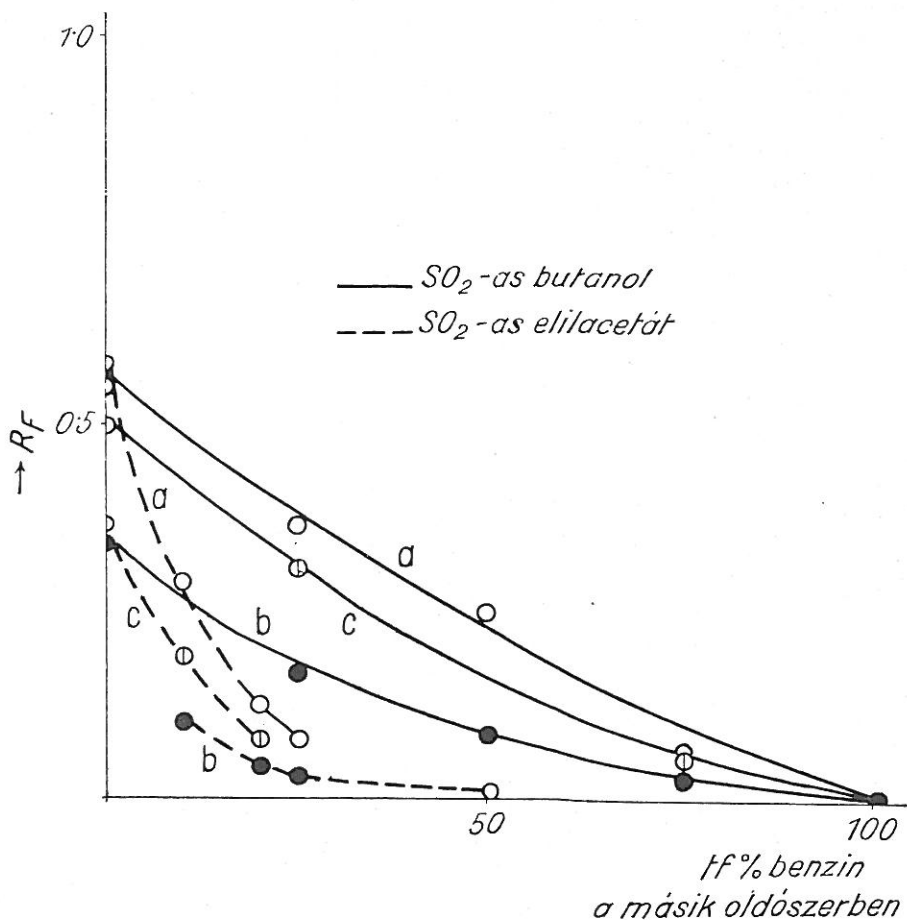
A kifejlesztés sebességét megszabó $\frac{\gamma}{\eta \cdot d}$ kifejezés értékét kiszámolva szobahőfokú tiszta n-butanolra és tiszta n-oktánra a következő eredményeket kapjuk :

Tablázat

	γ (dyn cm ⁻¹)	η (cpoise)	d (g/ml)	$\frac{\gamma}{\eta \cdot d}$
n-butanol	25	2,95	0,81	10,5
n-oktán	22	0,54	0,70	58,2

Ez az összeállítás jól megmagyarázza a benzines butanollal történő kifejlesztés nagyobb sebességét.

A savak R_F -értékei benzín vagy petroléter hozzáadásakor még erősebben csökkennek, ha butanol helyett etilacetátban történik a futtatás. Itt a benzinnel egészen kis százaléka is igen jelentős R_F -csökkenést hoz létre, amint azt a következő ábra is jól szemlélteti (3. ábra) :

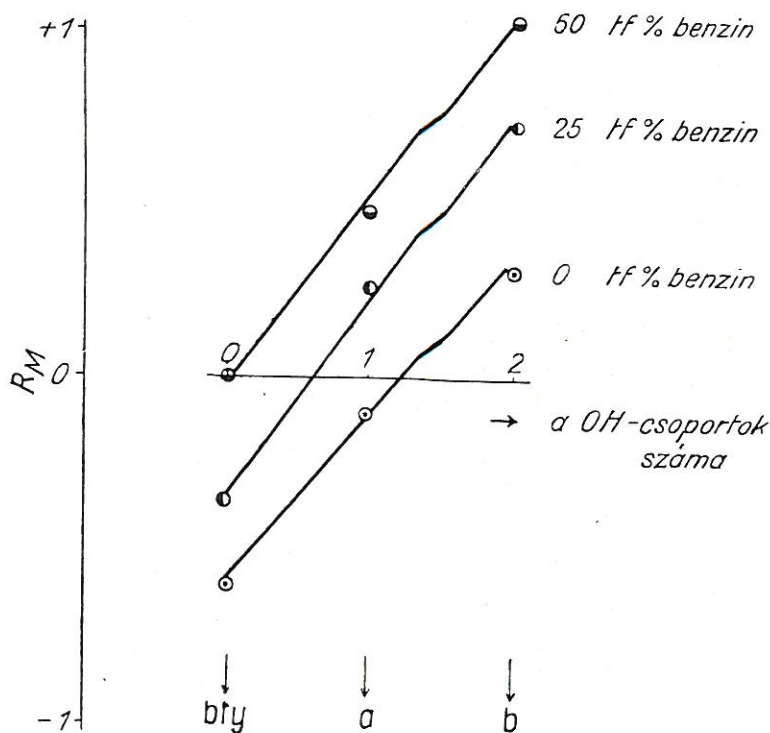


3. ábra

Tehát míg pl. almasavnál kb. 50 tf% benzinnel a butanolhoz adagolásával lehet kb. 50%-os R_F -csökkenést elérni, addig az (etilacetát + benzín)-rendszerben ugyanekkora csökkenéshez már 10 tf% benzín jelenléte is elegendő. Ha gyors kifejlesztésre van szükségünk, előnnyel használhatjuk a benzines etilacetátos keverékeket.

A vegyi-szerkezet és az R_M összefüggése

Bate-Smith és Westall (2) Martin (5) közlései alapján arra a következtetésre jutott, hogy az egymástól csak egy állandó szubsztituens-csoportban különböző, homolog-sort adó vegyületek R_F -értékei úgy viszonylanak egymáshoz, hogy a sor két szomszédos tagjánál az $R_F = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$ kifejezés értékeinek különbsége (ΔR_M) állandó számot ad. A természetben előforduló fenol-származékok (pl. virágfestékek: polifenolok, glükozidok stb.) között sok esetben sikerült ezt a következtetést igazolniok, részben a hidroxil-, részben a glükóz-csoportok számának növekedése esetében (pl. a galangin, kaempferol, kvercetin, kvercetagetin vagy a benzoésav, p-oxibenzoésav, protokatehusav, galluszsav esetén a hidroxil-csoportok számának növekedése, a pelargonidin, pelargonidinmonozid és a pelargonin esetén pedig a növekvő glükózcsoporttartalom szabályosan növekvő R_M -értékekhez vezet).



4. ábra

Az általunk vizsgált savak közül a borostyánkő-, az alma- és a borkősav kromatografálása alkalmas arra, hogy az R_M -értékeknek ezt a szabályszerű változását tanulmányozhassuk. E három sav tudvalevőleg abban különbözik egymástól, hogy mindegyik a sorban előtte állónál 1 hidrogénnel kevesebbet és 1 hidroxil-csoporttal többet tartalmaz. Ha kiszámítjuk R_M -értékeiket, minden hidroxil-csoport behelyettesítése átlagban $\Delta R_M = 0,45$ -tel emeli ezt a számot,

ami a fenti szerzők megállapításának a helyességét igazolja az általuk vizsgálttól eltérő természetű vegyületek (egyszerű szerves savak) és szubsztituensek (fenolos OH helyett alifás alkoholos OH-csoportok) esetében is.

A ΔR_M -nek ez a közelítő állandósága akkor is megmarad, ha a tényleges R_M -értékek a butanolba történő benzinadagolás hatására erős változást szenvednek. Jól szemlélteti a viszonyokat a 4. ábra.

Gyakorlati alkalmazás

Intézetünkben elsősorban mikroba-tisztatényészeink azonosítására, erjedési folyamatok követésére, továbbá növényi és állati eredetű élelmiszerek és ezek nyersanyagainak vizsgálatára alkalmaztuk eddig az eljárást.

Több mikroorganizmus tisztatényészetét tanulmányoztuk anyagcsere-termékeik szempontjából. Különösen érdekes volt a leukonosztok és ehhez hasonlóan szaharózból glükóz-alapú poliszaharidot képző pálca-baktériumtörzsek által termelt savak vizsgálata. Az aránylag alacsony hőmérsékleten besűrített és közvetlenül a papírra felvitt tenyészdát, valamint a tenyészet éteres kirázásával nyert extrakt kromatografálása azt mutatta, hogy a nem illó savak csak tejsav képződött a tápoldatban.

Minden növényi anyagnál, de különösen sűrítmények esetén ügyelni kell arra, hogy a kromatogramot elrontó mennyiségű kísérő anyag ne legyen jelen. Ezt vagy megfelelő ion-cserélőkön való átengedéssel vagy pedig alkalmas szelektív, *vízzel nem keveredő* oldószerrel történő kioldással érhetjük el.

Az állati eredetű élelmiszerek közül a libamáj mélyhűtés során történő változásaival kapcsolatban végeztünk vizsgálatokat. Számottevő mennyiségben *csak tejsavat lehetett* kimutatni.

Érdekes felhasználási lehetősége kínálkozik a módszernek egyes élelmiszerek vizsgálatánál a késztermék vagy a nyersanyag esetleges állottságára való következtetés terén. Sikertült igazolnunk, hogy egyes növényi készítményeknél az ú. n. poshadt nyersanyag az egészségestől többek között abban különbözik, hogy az előbbi tejsavat tartalmaz.

Intézetünkben K a r d o s E r n ő foglalkozott ezzel a kérdéssel részletesen (4) és a kénessavas butanolos eljárást kvantitatív tejsavmeghatározási módszerrel dolgozta ki. Azt találta, hogy itt is célszerű a zavaró kísérő anyagoktól a savakat kromatografálás előtt megszabadítani. Erre egy folytonos működésű folyadék-extraháló (1) látszott a legmegfelelőbbnek. Az étterrel történt előkísérletek után az etilacetát bizonyult a legalkalmasabb oldószernek. A kivonást követő elpárologtatásnál ügyelni kell arra, hogy víz állandóan legyen jelen a rendszerben, mert egyébként nagy veszteségek léphetnek fel a tejsavban (anhidrid-képződés stb.). Az így nyert törzsoldat alikvot-részét (pl. 50—70 mg.) mikropipettával egy szélesebb papírszeletre keresztcsík formájában felvisszük. A kontroll papírszelettel egyszerre szabályosan futtatva a savakat, végül az ellenőrző szeletet brómfenolkékkel előhívjuk és a tejsavnak megfelelő R_F -értékű helyeket a másik papíron ollóval kivágjuk. Lombikban, kiforralt és semlegesített (fenolftalein) desztillált vízzel kioldjuk a kivágott papírdarabból a savat, és 0,01 N nátriumhidroxiddal megtitráljuk. Ebből az értékből levonjuk a papír savat nem tartalmazó, de az oldószeres futtatáson átesett, az előbbivel egyenlő területű darabja által fogyasztott lúg mennyiségét. A visszanyerés általában 96—98%. Nagyobb veszteség inkább akkor keletkezik, ha az etilacetátos extrahálás nem történt kellő ideig. 8 órás folyamatos extrahálás esetén a vázolt berendezésben pl. kb. 8% hiánnyal kell számolnunk.

Összefoglalás

1. A megvizsgált szerves savak kénessavas butanolban történő kromatográfálással kapott R_F -értékei elég jó megegyezést mutatnak az ebben a rendszerben mért megoszlási hányadosokkal: $\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$ és K' értékei lineáris összefüggést mutatnak.

2. Az R_F -értékek változtatására a fenti oldószer-rendszerben nagyon alkalmas a benzín vagy a petroléter. Az (etilacetát + benzín)-elegyek is jól használhatók; itt sokkal kevesebb benzín is elégséges az R_F nagymértékű megváltoztatásához.

3. A borostyánkő-, alma- és a borkősav $R_M \left[= \log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) \right]$ -értékeinek szembeállítására a bennük levő alkoholos OH-ok számával közelítőleg lineáris összefüggést mutat. Az egy OH-csoport által okozott R_M -változás (ΔR_M) tiszta butanolban, 25, valamint 50 tf% benzint tartalmazó butanolban egyaránt közelítőleg állandó értékű.

4. A módszert eredménnyel alkalmaztuk baktériumok anyagcseretermékeinek, növényi és állati élelmiszerkészítményeknek és nyersanyagoknak a vizsgálatánál. Tejsavra vonatkozólag az eljárás kvantitatív kidolgozást nyert.

Érkezett: 1951. november 15.

Irodalom

1. A. O. A. C. Methods of Analysis, New-York, 1945.
2. Bate-Smith & Westall: Biochim. et Biophys. Acta, 4, 427. 1950.
3. Consden, Gordon & Martin: Biochem. J., 38, 224. 1944.
4. Kardos: Személyes közlés.
5. Martin: Biochem. Sc. Symp. No. 3., Cambridge 1949, Cambr. Univ. Press.
6. Müller & Clegg: Anal. Chem., 23, 408. 1951.
7. Vas: Agrokémia és Talajtan, 1. (2) 167—180. 1951.

РАЗДЕЛЕНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ ПРИ ПОМОЩИ СЕРНИСТОКИСЛОГО БУТАНОЛА

К. Ваш

Венгерский Государственный Исследовательский Институт Сельскохозяйственно Промышленности, Будапешт.

Выводы

1. В связи с одной из прежних наших работ (7), были нами проверены величины R_F (фильтровальная бумага Шлейхер и Шюлл № 597), полученные в предлагаемой нами раньше смеси растворителей сернистой кислоты и бутанола (1 объемная часть насыщенного раствора SO_2 + 1 объемная часть н. бутанола), а также принадлежащие к этим величинам R_F коэффициенты распределения для молочной, янтарной, яблочной, винокаменной и лимонной кислот (см. рис. 1.). Обнаружено, что измеренные при 20°-ах величины $\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$ и коэффициенты распределения (K') между водной и органической фазами, показывают линейную зависимость, выведенную Конденом, Гордсоном и Мартином (3) (см. рис. 2.). Для определения K' брались одинаковые объемные части из обеих фаз смеси растворителя, содержащей в пересчете на общий объем примерно 0,05 М кислоты, а затем после тщательного изгнания сернистой кислоты и бутанола производилось их титрование щелочью и вычисление коэффициентов.

2. В случае прибавления к бутанольной фазе бензина, величины R_F уменьшаются. В качестве органической фазы вместо бутанола может применяться также этилацетат. Если к последнему прибавляется бензин, величины R_F уменьшаются более сильно, чем в случае бутанола (см. рисунок 3.). В случае этилацетата уже прибавление 10 объемных %-ов бензина вызывает такое-же процентное уменьшение величины R_F , как в случае бутанола прибавление 50 объемных %-ов бензина.

3. Между величинами $R_M \left[\log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) \right]$ янтарной, молочной и винокаменной кислот и числом алкогольных гидроксидов в них, имеется линейная зависимость, обнаруженная Бате-Смисом и Вестоллом (2) (см рисунок 4.). Из рисунка 4. видно, что в бутанольных смесях с различной дозировкой бензина (0, 25, 50 объемных %-ов), несмотря на значительное отклонение абсолютных величин R_M , разницы в R_M (ΔR_M), обусловленные одним ОН, примерно одинаковые (около 0,5).

4. Метод бумажной хроматографии с сернистокислым бутанолом применялся нами до сих пор для разрешения целого ряда практических проблем (бактериальные культуры, пищевые продукты и их сырье). Данный метод кажется пригодным и для количественного определения молочной кислоты, что производится путем вырезания и последующего титрования кислотного пятна. В случае исходных веществ более сложного состава, целесообразно наносить кислоты на хроматограмму после экстрактирования эфиром или этилацетатом.

ОБЪЯСНЕНИЯ К РИСУНКАМ

Для всех рисунков:

bty = янтарная кислота

t = молочная кислота

a = яблочная кислота

c = лимонная кислота

b = винскокаменная кислота

Рисунок 1. и 2.

$$K' = \frac{\text{концентрация органической кислоты в водной фазе}}{\text{концентрация органической кислоты в бутанольной фазе}}$$

Рисунок 3. Абсцисса: объемный процент бензина в бутаноле (:—) и в этилацетате (:-----).

Рисунок 4. Абсцисса: число алкогольных ОН в кислоте. Надписи:

50 объемных % бензина в бутаноле

25 объемных % бензина в бутаноле

0 объемных % бензина в бутаноле

Paper Chromatographic Separation of Some Organic Acids in Butanol Containing Sulphurous Acid

By K. VAS

Hungarian Institute for Research in Agricultural Industry, Budapest

Summary

1. In connection with a previous report (7), the relation between the R_F values found in the sulphurous acid + butanol mixture, recommended at that time¹, and the *distribution coefficients* of lactic, succinic, malic, tartaric and citric acid resp., has been investigated (Fig. 1.). It was found (Fig. 2.) that the apparent partition coefficients (K') measured between the two

layers of the solvent mixture and the values of the expression: $\left(\frac{1}{R_F} - 1 \right)$ show the linear relationship derived by *Conden, Gordon and Martin* (3) — K' was determined by titrating with NaOH — after careful elimination of SO_2 and of butanol, equal volumes of both phases of the solvent mixture, containing about 0,05 M of the acid to be tested (calculated on total volume).

2. Introduction of gasoline into the organic phase decreases the R_F values. Ethyl acetate may also be used instead of butanol. If gasoline is added to the former, the R_F values show a much stronger decrease than in the case of butanol (Fig. 3.). With ethyl acetate, incorporation of 10 per cent (by volume) of gasoline will cause a drop in R_F similar to that observed in butanol containing 50 per cent (by volume) gasoline.

3. The $R_M \left[= \log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) \right]$ values of succinic, malic, and tartaric acids show a linear

correlation with the number of alcoholic hydroxylic substituents in the molecule, a rule first reported for phenolic substances by Batesmith and Westall (2). It can be seen from Fig. 4. that in spite of the great variation in absolute R_M values as measured in butanol mixtures containing gasoline in various proportions (0, 25, 50 per cent by volume), the differences in R_M (ΔR_M) caused by one OH group, are rather constant (around 0.5).

4. The chromatographic procedure using butanol and aqueous sulphurous acid has, so far, been applied to many practical problems (cultures of bacteria, foodstuffs, raw materials etc.). By cutting out and titrating the acid spot, this method seems to be applicable to the quantitative analysis, of e. g. lactic acid. In case of materials of a more complicated composition, it is advisable to apply the acids to the chromatograms after they have been extracted by a suitable solvent (e. g. ether, ethyl acetate etc.).

¹ One volume of a concentrated aqueous solution of SO_2 + 1 volume of n-butanol; paper: Schleicher & Schüll, No. 597.

Explanation of the Figures

In general :

<i>b</i> succinic acid	<i>a</i> malic acid
<i>t</i> lactic acid	<i>c</i> citric acid
<i>b</i> tartaric acid	

Figs. 1. and 2.

$$K' = \frac{\text{concentration of the organic acid in the aqueous phase}}{\text{concentration of the organic acid in the organic phase}} (20^\circ \text{C})$$

Fig. 3.

On the abscissa : per cent (by volume) of gasoline in butanol (————) and
in ethyl acetate (-----) resp.

Fig. 4.

On the abscissa : number of alcoholic OH groups in the acid

Inscriptions : 50 per cent (by volume) of gasoline in the butanol
25 per cent (by volume) of gasoline in the butanol
0 per cent (by volume) of gasoline in the butanol