

## BONYOLULT ZSÍRSAVKEVERÉKEK PAPÍRKROMATOGRÁFIÁJA

FARKAS TIBOR és HERODEK SÁNDOR

Érkezett : 1959. március 6.

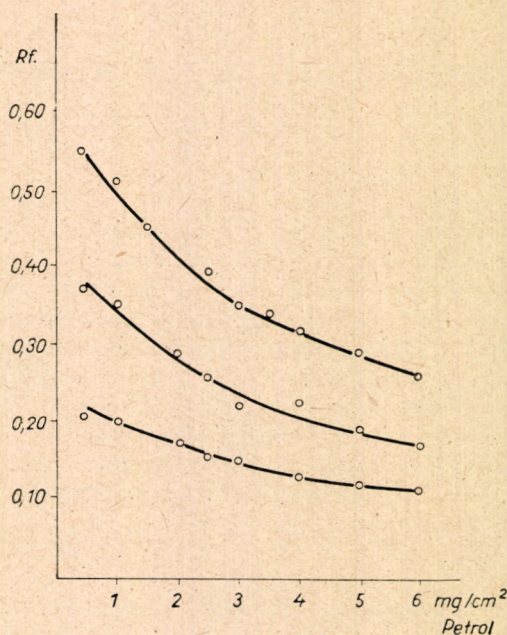
A zsírsavösszetétel fajlagosságát és a zsírsavösszetételt befolyásoló külső tényezőket vizsgáltuk édesvízi rákokon. A vizsgálatok a zsírsavösszetétel minőségi analizisét tették szükségessé. Ezért olyan módszert kellett keresnünk, amely lehetőleg egyszerű felszerelés segítségével lehetővé teszi igen kis anyagmennyiségek vizsgálatát. Módszertani megoldásként a papírkromatográfiához folyamodtunk. A papírkromatográfiát általában csak egyszerűbb összetételű zsírsavkeverékek analizisére használják, a rákokból nyert zsír viszont a halzsírokhoz hasonlóan rendkívül bonyolult összetételű. Ebbe a bonyolult összetételbe csak több eljárás kombinálásával tudtunk betekintést nyerni. Alábbiakban az eljárásokat és a papírkromatográfiában szerzett metodikai jellegű tapasztalatokat szeretnénk ismertetni.

### A kromatografáló papír telítettsége

A kromatografálást KAUFMANN (KAUFMANN, H. P., NITSCH, W. H. 1954) módszerével végezzük. Eszerint felszálló kromatografálást végzünk hidrofobizált (fordított fázisú) papíron. A hidrofobizálásra 190—220 C° forráspontú szénhidrogének elegyét használjuk. Megfigyeléseink szerint (FARKAS, T. 1958) az Rf-érték reprodukálhatósága szempontjából fontos a papír petróleumtartalma. Ide vonatkozó adatainkat az *I. ábra* tartalmazza.

Mint az *I. ábrából* látható, a petróleumtartalom csökkenése az Rf növekedéséhez vezet. Ez a növekedés annál nagyobb, minél nagyobb volt az eredeti Rf-érték. Így szárazabb papíron a foltok jobban szétválnak. Előnyös a szárazabb papír a hosszú szénláncú telített savak kimutatásánál is, mert ezek nagyobb petróleumtartalom mellett gyakorlatilag el sem mozdulnak a startpontról. Sok petróleum a front futását is lassítja és a kis savmennyiségek indikálhatósága is romlik. A túl száraz papíron viszont a foltok diffúz jellegűvé válnak. Gyakorlatilag legjobbnak találtuk (SCHLEICHER—SCHÜLL 2043/b papírral dolgozva) az 1,2 mg/cm<sup>2</sup> petróleumtelítettséget. Megjegyezzük még, hogy a foltok nagysága is változik a petróleummennyiséggel; ugyanaz a zsírsavmennyiség annál nagyobb foltot képez, minél szárazabb a papír. Gyakorlatilag azt az eljárást találtuk a legegyszerűbbnek, hogy a kromatografáló papírt először porlasztó segítségével addig permetezzük, amíg a petróleum egyenletesen át nem itatja a papírt. Ezután a kromatografáló papírt szűrőpapírok között leitatjuk, és felfüggesztve szobahőmérsékleten száradni hagyjuk. A zsírsavakat csak akkor vesszük fel, amikor a papír már a kellő súlyúra

száradt. A front kb. 40 óra alatt éri el a kívánatos 40 cm-es magasságot. A futtatást 90%-os (petróleummal telített) ecetsavval végezzük. Futtatás után a papírt szárítószekrényben szárítjuk. A mosást célszerű WAGNER et al. (WAGNER H., ABISCH, L. BERNHARD K., 1955) javaslata szerint végezni. Az élőhívást rézacetát, majd káliumferrocianid oldattal történő kezeléssel végezzük.



1. ábra. Az Rf-érték változása a papír petróleumtartalmával

Рисунок 1: Изменение значения Rf в зависимости от содержания керосина в бумаге  
Fig. 1. Veränderung des Rf-Wertes bei Veränderung des Petroleumgehaltes des Papiers

### Ólomsós frakcionálás

A  $-(CH_2)_2-$  különbség a szénláncban elegendő Rf differenciát hoz létre a zsírsavak papírkromatográfiás szétválasztásához. Emellett azonban a telítetlen kötések száma is befolyásolja az Rf-et olyan értelemben, hogy minden kettőskötés kialakulása az Rf szempontjából nagyjából a szénlánc  $-(CH_2)_2-$  val való rövidülésének felel meg (BALLANCE, P. E., CROMBIE, W. M. 1958). Az Rf ilyen kettős függősége nagy akadályokat okoz a zsírsavak szétválasztásában. A kérdés egyik megoldási módját az alacsony hőmérsékletű kromatográfia jelenti. Minthogy az ehhez szükséges hőmérséklet előállítása ( $-40\text{ }^\circ\text{C}$ ) nem állt módunkban, a zsírsavkeverék előzetes frakcionálására törekedtünk. Ebből a célból a TWICHELL-féle ólomsó-alkoholos elválasztási módszerhez folyamodtunk.

Az eljárás lényege az, hogy a szobahőmérsékleten folyékony zsírsavak ólomsói alkoholban oldódnak, míg a szilárd zsírsavaké az oldatból kiválnak. A módszert a rendelkezésünkre álló igen kis anyagmennyiségekre (10–50 mg) alkalmazva a következő eljárást dolgoztuk ki:

A zsírsavkeveréket kevés meleg alkoholban feloldjuk, majd centrifugacsőben meleg, 96%-os alkoholban oldott 10%-os ólomacetátot adunk hozzá úgy, hogy az ólomacetát kis feleslegben legyen. Az eljárás szelektivitását javítja, ha az ólomacetát 1% ecetsavat is tartalmaz. A reakció-elegyet 12 óra hosszat hűvös helyen hagyjuk állni, majd centrifugáljuk. A csapadékot háromszor alkohollal mossuk, és a folyékony savakat tartalmazó alkoholos felülúszókat kémcsőben egyesítve inert atmoszférában bepároljuk. A zsírsavakat mind a bepárolt oldatból, mind pedig a centrifugacsőben maradt csapadékból ecetsav segítségével szabadítjuk fel. A telített savak felszabadulását enyhe melegítéssel segítjük elő. Ezután az ecetsavas oldatokat választótölcsérbe visszük át, és a zsírsavakat petroléterrel kirázzuk. A vízzel savmentesre mosott petroléteres oldatokat bepároljuk, és megmérjük az így előállított szilárd és folyékony zsírsavfrakciók súlyát. A módszer pontosságára vonatkozóan az általunk vizsgált különböző zsírokon végzett frakcionálásokat közöljük (1. táblázat).

1. táblázat

	mg +	%	mg +	%	mg +	%	mg o	%	mg o	%	mg	%
Bemérve .....	105,9	—	51,4	—	24,2	—	41,2	—	24,7	—	11,2	—
Szilárd .....	23,8	21,5	10,9	21,1	5,3	21,9	8,8	21,3	5,5	22,	1,3	11,6
Folyékony .....	80,4	75,9	40,3	78,7	18,6	76,8	32,2	78,1	19,1	77,4	9,8	87,5
Vissza .....	104,2	97,4	51,2	99,8	23,9	98,7	41,0	99,4	24,6	99,6	11,1	99,5
Hiba .....	1,7	2,6	0,2	0,2	0,3	1,3	0,2	0,6	0,1	0,4	0,1	0,9

+ = párhuzamos mérések

o = párhuzamos mérések

## Ólomso-alkoholos frakcionálási adatok

A zsírsavak szeparálásán kívül az eljárás egyik előnye, hogy így egyben a szobahőmérsékleten szilárd és folyékony zsírsavak súlyarányára vonatkozó adatok birtokába is jutunk, ami a zsírok állapotának önmagában is egyik érdekes jellemzője. Másrészt a frakciók az eredeti keverékhez képest feldúsítva tartalmazzák a zsírsavakat.

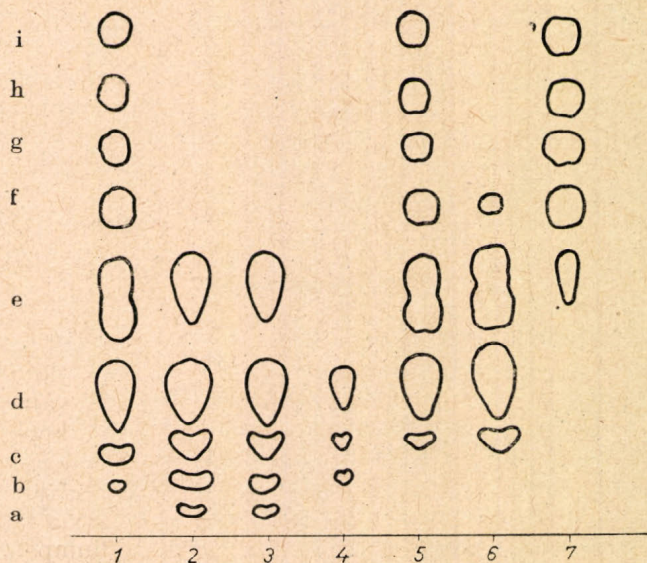
**C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub>-es zsírsavak**

Az ólomso frakcionálás után egyszerűbb zsírsavkeverékek esetében a foltok identifikálása könnyű volna. Vízi állatok zsírjainál a kérdést erősen megnehezíti a C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub>-es savak jelenléte. Ezen sorozatok telített tagjai (arachin és behensav) a sztearinsav alatt képeznek foltokat. A megfelelő monoensavak magas olvadáspontjuk alapján szintén a szilárd frakcióban válnak le, és Rf-értéküknek megfelelően a sztearin, illetve arachinsavval képeznek kevert foltot. Ezeknek a C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub> monoensavoknak a kimutatására a papírt ozmium-tetroxid gőzökkel kezeljük (KAUFMANN 1950). A telítetlen savak jelenlétében a kérdéses foltok megfeketednek. Ebben az esetben azt, hogy a foltok sztearin és arachinsavat is tartalmaznak, a savkeverék előzetes káliumpermanganáttal történő oxidációjával tudjuk igazolni. Az oxidálást CROMBIE et al. (1954) előírása szerint végezzük. A káliumpermanganát ugyanis eloxidálja a telítetlen

savakat, ezért az oxidáció után minden a szokásos módszerrel előhívható folt telített sav jelenlétét bizonyítja. A káliumpermanganátos oxidáció a papíron is elvégezhető (KAUFMANN 1950), ilyenkor azonban a papír önmaga is oxidálódik, és a kromatogram néhány perc alatt tönkremegy. A  $C_{20}$ ,  $C_{22}$  diensavak már a folyékony frakcióban válnak le. A  $C_{20}$  diensav az olajsavval fut együtt, a  $C_{22}$  diensav jelenléte viszont az olajsav alatti folt megjelenése után eldönthető, ugyanis az összes többi ilyen alacsony Rf-értékű foltokat szolgáltató savak a szilárd frakcióban válnak le. A  $C_{20}$ ,  $C_{22}$  sorozat 3—4 telítetlen kötést tartalmazó tagjai nem mutathatók ki külön, mert az olaj, linol és linolén-sav régiójában a rövidebb, de kevesebb telítetlen kötést tartalmazó savakkal keverten fordulnak elő, jelenlétüket azonban feltételezhetjük, ha a sorozatok többi tagjait ki tudtuk mutatni. Valószínűleg mennyiségük nem túl nagy, mert halolajra vonatkozó adatok szerint (KLENK, E., BROCKENHOFF, H. 1958) legnagyobb mennyiségben a sorozatok legtelítetlenebb tagjai ( $C_{20}$  pentaen,  $C_{22}$  hexaen) fordulnak elő. Planktonrások zsírjában a linolén-sav felett három foltot észleltünk. Úgy véljük, hogy ezek a foltok csak az igen erősen telítetlen  $C_{18}$  tetraen,  $C_{20}$  pentaen,  $C_{22}$  hexaensavak lehetnek. A kérdés vizsgálatára a folyékony frakciót további karbamidos frakcionálásnak vetettük alá.

### Karbamidos frakcionálás

Az eljárás azon alapszik, hogy a kevesebb telítetlen kötést tartalmazó zsírsavak karbamidos adduktumaik formájában bizonyos fokú szelektivitással már magasabb hőmérsékleten leválnak, mint a több telítetlen kötést tartalmazó savak. Az általunk használt eljárás folyamán — bizonyos tekintetben



2. ábra. Crustacea-plankton zsírsavkeverékének papírkromatogramja

Рисунок 2: Бумажная хроматограмма смеси жирных кислот планктона Crustacea

Fig. 2. Papierchromatogramm der Fettsäuremischung von Crustaceen-Plankton

Magyarázat: Az egyes foltokban lehetséges zsírsavak a következők:

1. kevert zsírsavak
  - a) behensav, b) arachin,  $C_{22}$  monoén, c) sztearin,  $C_{20}$  monoén, d) palmitin,  $C_{18}$  monoén,  $C_{20}$  dien,  $C_{22}$  trién, e) miristin  $C_{18}$  dien,  $C_{20}$ -trién,  $C_{22}$  tetraén, f)  $C_{18}$  trién,  $C_{20}$  tetraén,  $C_{22}$  pentaén, g, h, i)  $C_{18}$  tetraén,  $C_{20}$  pentaén,  $C_{22}$  hexaén (sorrend ismeretlen).
2. szilárd zsírsavak
  - a) behen, b) arachin,  $C_{22}$  monoén, c) sztearin,  $C_{20}$  monoén, d) palmitin,  $C_{18}$  monoén, e) miristin
3. szilárd zsírsavak káliumpermanganátos kezelés után
  - a) behen, b) arachin, c) sztearin, d) palmitin, e) miristin
4. szilárd zsírsavak ozmiumtetroxidos előhívással
  - b)  $C_{22}$  monoén, c)  $C_{20}$  monoén, d)  $C_{18}$  monoén
5. folyékony zsírsavak
  - e)  $C_{22}$  dien, d)  $C_{18}$  monoén,  $C_{20}$  dien,  $C_{22}$  trién, e)  $C_{18}$  monoén,  $C_{18}$  dien,  $C_{20}$  trién,  $C_{22}$  tetraén, f)  $C_{18}$  trién,  $C_{20}$  tetraén,  $C_{22}$  pentaén, g, h, i)  $C_{18}$  tetraén,  $C_{20}$  pentaén,  $C_{22}$  hexaén
6.  $-20^\circ\text{C}$ -nál karbamidos oldatból kiváló folyékony zsírsavak
7.  $-20^\circ\text{C}$ -nál karbamidos oldatban maradó folyékony zsírsavak. (6. és 7. pontnál betűik jelentése ugyanaz, mint az 5. pontnál.)

Объяснение: Возможно встречаемые в отдельных пятнах жирные кислоты:

1. смешанные жирные кислоты: а) бегеновая кислота; б) арахин; в) моноэн  $C_{22}$ ; б) стеарин, моноэн  $C_{20}$ ; д) пальмитин, моноэн  $C_{18}$ , dien  $C_{20}$ , trién  $C_{22}$ ; е) миристин, dien  $C_{18}$ , trién  $C_{20}$ , tetraén  $C_{22}$ ; ж) триэн  $C_{18}$ , tetraén  $C_{20}$ , pentaén  $C_{22}$ ; з-и-к) tetraén  $C_{20}$ , pentaén  $C_{22}$ , гексаэн (очередь неизвестна).
2. прочные жирные кислоты: а) беген; б) арахин, моноэн  $C_{22}$ ; в) стеарин, моноэн  $C_{20}$ ; г) пальмитин, моноэн  $C_{18}$ ; д) миристин.
3. прочные жирные кислоты, после обработки перманганатом калия: а) беген; б) арахин; в) стеарин; г) палмитин; д) миристин.
4. прочные жирные кислоты с проявлением осмиевым агидридом: б) моноэн  $C_{22}$ ; в) моноэн  $C_{20}$ ; моноэн  $C_{18}$ .
5. жидкие жирные кислоты: в) dien  $C_{22}$ ; г) моноэн  $C_{18}$ , dien  $C_{20}$ , trién  $C_{22}$ ; д) моноэн  $C_{18}$ , dien  $C_{18}$ , trién  $C_{20}$ , tetraén  $C_{22}$ ; е) trién  $C_{18}$ , tetraén  $C_{20}$ , pentaén  $C_{22}$ ; ж-з-и) tetraén  $C_{18}$ , pentaén  $C_{20}$ , гексаэн  $C_{22}$ .
6. жидкие жирные кислоты, выделяющиеся из карбамидного раствора при температуре  $-20^\circ\text{C}$ .
7. жидкие жирные кислоты, остающиеся в карбамидном растворе при температуре  $-20^\circ\text{C}$ . (При пунктах 6 и 7 буквы имеют то же самое значение, как при пункте 5.)

Anmerkung: In den einzelnen Flecken können folgende Fettsäuren enthalten sein:

1. Gemischte Fettsäuren:
  - a) Behensäure, b) Arachinsäure,  $C_{22}$  monoén, c) Stearin,  $C_{20}$  monoén, d) Palmitin,  $C_{18}$  monoén,  $C_{20}$  dien,  $C_{22}$  trién, e) Myristinsäure  $C_{18}$  dien,  $C_{20}$  dien,  $C_{20}$  trién,  $C_{22}$  tetraén, f)  $C_{18}$  trién,  $C_{20}$  tetraén,  $C_{22}$  pentaén, g, h, i)  $C_{18}$  tetraén,  $C_{20}$  pentaén,  $C_{22}$  hexaén (Reihenfolge unbekannt)
2. Feste Fettsäuren:
  - a) Behensäure, b) Arachinsäure,  $C_{22}$  monoén, c) Stearinsäure,  $C_{20}$  monoén, d) Palmitinsäure,  $C_{18}$  monoén, e) Myristinsäure
3. Feste Fettsäuren nach Kaliumpermanganat-Behandlung:
  - a) Behens., b) Arachins., c) Stearin.s, d) Palmitins., e) Myristinsäure
4. Feste Fettsäuren mit Osmiumtetroxyd-Entwicklung
  - b)  $C_{22}$  monoén, c)  $C_{20}$  monoén, d)  $C_{18}$  monoén
5. Flüssige Fettsäuren:
  - c)  $C_{22}$  dien, d)  $C_{18}$  monoén,  $C_{20}$  dien,  $C_{22}$  trién, e)  $C_{18}$  monoén,  $C_{18}$  dien,  $C_{20}$  trién,  $C_{22}$  tetraén, f)  $C_{18}$  trién,  $C_{20}$  tetraén,  $C_{22}$  pentaén, g, h, i)  $C_{18}$  tetraén,  $C_{20}$  pentaén,  $C_{22}$  hexaén.
6. aus einer Karbamidlösung bei  $-20^\circ\text{C}$  ausgeschiedene Fettsäuren
7. in einer Karbamidlösung bei  $-20^\circ\text{C}$  verbleibende flüssige Fettsäuren. (Bei den Pkten 6. und 7. ist die Bedeutung der Buchstaben dieselbe, wie beim Pkt. 5.)

eltérve DONART et al. (DONART C., MIYAUCHI D. T., SUMERVEL N., 1955) által ajánlott eljárástól — a folyékony zsírsav frakcióhoz annyi karbamiddal telített 96%-os metanolt adunk, hogy a karbamid : zsírsav súlyarány 2 : 1 legyen. Az először keletkezett csapadékot melegítéssel feloldva, az oldatot 12 óra hosszat —20 C°-on hagyjuk állni. Ezután centrifugáljuk és a csapadékból, illetve felülúszóból vizes hígítással felszabadítjuk a zsírsavakat, éterbe visszük át, majd az éteres oldatot bepároljuk. Az így nyert frakciókat külön papírkromatografálva azt találtuk, hogy a linolénsav szintje fölé kifutó 3 folt a —20 C°-on le nem váló frakcióban dúsult fel. Ennek a frakciónak téli planktonmintánál az átlag molsúlya 322, jódszáma 316 volt, ami arra utal, hogy a kérdéses foltok tényleg a telítettebb homológok mellett ebben a frakcióban található C<sub>18</sub> tetraen, C<sub>20</sub> pentaen, és C<sub>22</sub> hexaen savaktól származnak.

Az eljárás szemléletesebbé tételére közlünk egy papírkromatogramot, amelyet téli crustacea-plankton különbözőképpen kezelt zsírsavkeverékével nyertünk (2. ábra).

A szerzők ezen a helyen mondanak köszönetet dr. JÁKY MIKLÓSNAK, a Növényolajipari és Háztartásvegyi Kutatóintézet igazgatójának szíves szakmai útmutatásaiért.

### Összefoglalás

Szerzők vizsgálták a kromatografáló papír petróleumtartalmának a zsírsavak Rf-értékére gyakorolt hatását. A kisebb petróleumtartalom az Rf-érték növekedéséhez vezetett.

Bonyolult összetételű zsírsavkeverékeket vizsgálva olyan eljárást dolgoztak ki, amely a zsírsavak bizonyos fokú előzetes szeparálása révén jobb betekintést nyújt a zsírsavkeverék kvalitatív összetételébe. Erre a célra ólomsóalkoholos és karbamidos frakcionálást, káliumpermanganátos oxidációt és ozmiumtetroxid gőzökkel történő kezelést használtak.

### IRODALOM

- BALLANCE, P. E., CROMBIE, W. M. (1958) : Paper chromatography of saturated and unsaturated fatty acids. *Biochem. J.* **69**, 632—640.
- CROMBIE, W. M. L., COMBER, R., BOATMAN, S. G. (1955) : The estimation of unsaturated fatty acids by reversedphase partition Chromatography. *Biochem. J.* **59**, 309—316.
- DONART, C., MIYAUCHI, D. T., SUMERWELL, W. N. (1954) : The fractionation of marine-oil fatty acids with Urea. *J. Amer. Oil. Chemists' Soc.* **32**, 481—83.
- FARKAS T. (1958) : Vizsgálatok néhány, a hazai vizek anyagforgalmában fontosabb szerepet játszó rák zsírsavgarnitúráján. *Annal. Biol. Tihany* **25**, 197—208.
- KAUFMANN, H. P. (1950) : Adsorptionstrennungen auf dem Fettgebiet. *Cl. Papierchromatographie. Fette und Seifen.* **52**, 331—342.
- KAUFMANN, H. P., NITSCH, W. H. (1954) : Die Papierchromatographie auf dem Fettgebiet. XVI. Weitere Versuche zur Trennung von Fettsäuren. *Fette und Seifen.* **56**, 154—158.
- KLENK, E., BROCKENHOFF, H. (1958) : Über C<sub>18</sub> und C<sub>20</sub> Polyensäuren des Heringöls. *Hoppe — Seylers, Z.* **310**, 153—170.
- WAGNER, H., ABISCH, L., BERNHARD, K. (1955) : Zur papierchromatographischen Analyse von Fettsäuregemischen aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit 12 bis 22 C-Atomen. *Helvet. chim. acta* **38**, 1536—1541.

## БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ СЛОЖНЫХ СЕМЕСЕД ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Т. Фаркаш — Ш. Геродек

## Резюме

Авторы изучали влияние, оказанное содержанием керосина в хроматографической бумаге, на значение Rf жирных кислот. Меньшее содержание керосина привело к увеличению значения Rf.

При изучении смесей жирных кислот сложного состава был разработан метод, который — благодаря известному предварительному отделению жирных кислот — дает лучшее понимание качественного состава смеси жирных кислот. Для этой цели применились фракционирование свинцовосоляным спиртом и карбамидом, окисление перманганатом калия и обработка парами осмиевого ангидрида.

*Таблица:* Данные фракционирования свинцовосоляным спиртом

## PAPIERCHROMATOGRAPHIE KOMPLIZIERTER FETTSÄUREMISCHUNGEN

Tibor Farkas und Sándor Herodek

## Zusammenfassung

Die Verfasser haben die Wirkung des Petroleumgehaltes von chromatographischem Papier auf den Rf-Wert von Fettsäuren untersucht. Geringerer Petroleumgehalt führte zum Ansteigen des Rf-Wertes.

Bei der Untersuchung von Fettsäuremischungen komplizierter Zusammenstellung haben sie eine Methode ausgearbeitet, welche durch gewisse, vorherige Separation der Fettsäuren besseren Einblick in die qualitative Zusammensetzung der Fettsäuremischungen ermöglicht. Zu diesem Zweck verwendeten sie die bleisauer-alkoholische und Karbamid-Fraktionierung, die Kaliumpermanganat-Oxydation und eine Behandlung mit Osmiumtetroxyddunsten.

*Tabelle.* Daten bezüglich einer bleisauer-alkoholischen Fraktionierung