

В. Л. КРЕТОВИЧ, Т. В. ДРОЗДОВА и И. С. ПЕТРОВА

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

(Представлено академиком А. И. Опариным 26 VI 1951)

Вкус и аромат многих пищевых продуктов в значительной степени определяется содержащимися в них летучими жирными кислотами. В связи с этим возникает вопрос о разработке точных количественных методов разделения и определения летучих жирных кислот. Исследования в этом направлении представляют значительный интерес. Разработка количественных методов определения летучих жирных кислот затруднена тем, что в ряде пищевых продуктов они содержатся в малых количествах. В связи с этим особое значение приобретает применение хроматографического метода, отличающегося большой чувствительностью и точностью. Задачей данной работы являлась разработка количественного хроматографического метода определения летучих жирных кислот в сое и хлебе.

Хроматографический метод был использован рядом исследователей для определения высших жирных кислот и аминокислот. Так, В. Л. Кретович и А. А. Бундель использовали хроматографию на колонке из окиси алюминия для выделения токсических продуктов окисления ненасыщенных жирных кислот ⁽¹⁾, а также для микроопределения дикарбоновых аминокислот ⁽²⁾. Для хроматографического разделения летучих жирных кислот был использован принцип распределительной хроматографии на колонке из силикагеля с применением органических растворителей ^(3, 4).

В предлагаемом нами методе в качестве адсорбента применяется силикагель, «неподвижным» растворителем является вода, а «подвижным» — смесь бутилового спирта с хлороформом; для «проявления» адсорбируемых кислот путем окрашивания применяется бромкрезол-зеленый. Одним из наиболее ответственных моментов в данном методе является употребление силикагеля, отвечающего строго определенным требованиям. На основании большого числа опытов нами установлены требования, которым должен отвечать силикагель, используемый в предлагаемом нами методе. Он должен представлять собой порошок без примесей и посторонней окраски. Силикагель не должен обладать слишком высокой адсорбционной способностью, так как это делает невозможным вымывание кислот «подвижным» растворителем. Колонка, на которой полосы адсорбируемых кислот не передвигаются при промывании, не пригодна для работы. Силикагель, обладающий слишком малой адсорбционной способностью, проявляющейся в чрезвычайно быстром передвижении полос на колонке, также непригоден. При удовлетворительном качестве силикагеля получение хроматограммы и вымывание анализи-

руемой смеси занимают в среднем 1,5—2 часа, а скорость истечения растворителя из колонки составляет около 30 капель в минуту.

Мы пользовались готовым измельченным силикагелем, а также силикагелем, полученным из растворимого стекла по методу Рамзея и Паттерсона (³) в нашей модификации. Силикагель готовился следующим образом. К одному объему продажного жидкого растворимого стекла добавлялось 6—7 объемов воды и тимолблау (0,1 г тимолблау в 100 мл воды с добавлением 2 мл 0,1 *N* NaOH) до получения светлосиней окраски. Полученный раствор хорошо размешивался стеклянной палочкой, и при энергичном помешивании прибавлялась концентрированная соляная кислота до светлорозовой окраски. Непрерывное перемешивание необходимо для того, чтобы избежать образования комков выпадающего в осадок геля. После стояния геля в течение ночи верхний слой жидкости сливался при помощи сифона, гель вновь заливался водой и после отстаивания и сливания жидкости сифоном отфильтровывался на воронке Бюхнера через полотно. Затем он трижды промывался водой, переносился в стеклянный стакан, заливался *N*/5 соляной кислотой до образования слабо розовой окраски и оставлялся стоять на 2 дня при комнатной температуре. Затем жидкость сливалась при помощи сифона, гель отфильтровывался и промывался дистиллированной водой до полного исчезновения кислой реакции на конго. Промытый гель высушивался в сушильном шкафу при 110—115°, осторожно растирался в ступке и просеивался сначала через сито № 43 для отделения слишком крупных частиц, затем через сито № 55 для отделения слишком мелких частиц.

Разработка метода вначале проводилась нами на растворах чистых кислот. Смесь чистых летучих кислот (по 2 мл 0,1 *N* каждой кислоты) нейтрализуется 0,1 *N* раствором щелочи по фенолфталеину и выпаривается на водяной бане досуха. Приготовление хроматографической колонки производится следующим образом. 2 г силикагеля растирается в ступке с 0,5 мл водного раствора бромкрезол-зеленого (0,25 г на 100 мл воды с добавлением 1,5 мл 0,1 *N* NaOH) до получения однородной слабо желтой окраски, затем добавляется 1 капля 20% раствора аммиака и вновь осторожно растирается; при этом окраска геля меняется с желтой на темноголубую. Если при добавлении индикатора силикагель сразу окрашивается в голубой цвет, то добавление аммиака излишне. Полученная масса заливается 10—15 мл 1% раствора бутилового спирта в хлороформе (свежеперегнанных); при этом гель приобретает сине-голубую окраску. Затем гель переносится через воронку в трубку-колонку (диаметром 10 мм), где на дне колонки заложен кусочек гигроскопической ваты. Остаток геля переносится так, чтобы общий объем смеси спирта с хлороформом составлял 25 мл. Далее с верхнего конца в колонку нагнетается воздух при помощи резиновой груши и под давлением колонка силикагеля уплотняется. Так как в заполненную колонку не должен попадать воздух, поверхность силикагеля в колонке должна быть покрыта жидкостью. Если в исследуемом растворе имеются 3—4 кислоты, то более удобным является применение колонки, содержащей 3 г силикагеля и 0,75 мл раствора индикатора, так как большая колонка способствует лучшему разделению кислот, обладающих достаточно быстрой скоростью смывания (масляная, пропионовая). Выпаренный остаток нейтрализованного раствора летучих кислот обрабатывается 2 каплями серной кислоты (1 : 1) до растворения солей летучих кислот; затем добавляется 0,1 г безводного сернокислого натрия. Жидкость 5 раз извлекается 1% раствором бутилового спирта в хлороформе так, чтобы общее количество его составляло 6 мл. Все полученные растворы летучих жирных кислот переносятся на колонку из силикагеля, приготовленную непосредственно перед проведением опыта.

Затем, благодаря давлению, создаваемому при помощи резиновой

груши, раствор передвигается вниз по колонке, причем определенные части колонки, содержащие данную летучую кислоту, приобретают соответствующую окраску. Так например, уксусная кислота «проявляется» в виде канареечно- или оранжево-желтой полосы, масляная кислота — в виде светлозеленой полосы, муравьиная кислота — в виде белой с желтоватым оттенком полосы в самой верхней части колонки. Когда уровень раствора над колонкой силикагеля почти достигнет начала колонки, прибавляют новую порцию 1% раствора бутилового спирта в хлороформе и повторяют эту операцию до тех пор, пока слой, содержащий масляную кислоту, не достигнет нижнего конца колонки. Тогда, продолжая промывание этим же раствором, вымывают масляную кислоту из колонки и собирают ее в отдельный приемник. Затем начинают промывание колонки 5% раствором бутилового спирта в хлороформе. При этом вымывается сначала пропионовая, затем уксусная кислоты, которые также собираются в отдельные приемники. Таким образом, кислоты вымываются из колонки в определенном порядке, а именно — масляная, пропионовая, затем уксусная. В самой верхней части колонки остается муравьиная кислота.

Все собранные растворы элюированных кислот собираются в отдельные колбы и титруются раствором 0,05 *N* едкого натрия. Титрование извлеченных кислот производится с помощью прибора ППТ-2 для потенциометрического титрования. Белое кольцо муравьиной кислоты, находящееся в самой верхней части колонки, не элюируется. Поэтому слой силикагеля, содержащий муравьиную кислоту, механически отделяется от колонки, помещается в колбу, куда добавляется 30 мл воды, нейтрализуется 0,1 *N* едким натрием по фенолфталеину и фильтруется, причем остаток несколько раз промывается водой. Фильтрат подкисляется серной кислотой, и свободная муравьиная кислота отгоняется и титруется 0,05 *N* щелочью.

Предварительные опыты показали, что в процессе разделения кислот иногда не получается количественного выхода кислот, что является следствием частичной адсорбции кислот избыточными количествами сернокислого натрия. При этом установлено, что обработка Na_2SO_4 в количестве большем, чем 0,6 г, увеличивает потери кислот до 15—20%. Пользуясь описанным выше методом, можно получить при работе со смесями чистых летучих жирных кислот 97—98% их исходного количества. Это видно из данных, приведенных в табл. 1.

Таблица 1

Количественное извлечение летучих жирных кислот после разделения их смеси на колонке из силикагеля

Силикагель	В % к исходному количеству данной кислоты			% извлечения смеси
	масляная	уксусная	муравьиная	
Полученный по разработанному нами методу				
Образец № 1	92	100	100	96,0
„ № 2	95	110	100	97,5
Заводский препарат				
Образец № 1	95	103	100	98,0
„ № 2	95	100	100	97,5

Необходимо отметить, что масляная кислота извлекается неполностью, в то время как уксусная кислота иногда дает несколько завышенные результаты.

Описанный хроматографический метод мы применили для исследования летучих кислот, являющихся компонентами сложного комплекса ароматических веществ,

Таблица 2

Содержание летучих жирных кислот в красном ржаном солоде и хлебе (в мг на 100 г возд.-сух. в-ва)

	Муравьиная	Уксусная
Солод ржаной		
Образец № 1	134,8	351,6
„ № 2	110,4	312,0
Хлеб ржаной		
Кислый	23,5	159,0
Заварной	14,3	157,2

обуславливающих аромат и вкус ржаного хлеба и красного ржаного солода. Летучие кислоты выделялись из красного ржаного солода и ржаного хлеба следующим образом. Взвесь 50—100 г измельченного материала в 6-кратном количестве воды после настаивания в течение ночи при температуре +2° подкислялась серной кислотой до кислой реакции по метилвиолету и помещалась в перегонную колбу, откуда летучие вещества перегонялись с

парами воды в приемную колбу. Затем погон, содержащий кислоты, нейтрализовался 0,1 N щелочью по фенолфталеину и сгущался на водяной бане до малого объема. Раствор количественно переносился в маленькую пробирку и выпаривался досуха. Далее, для количественного разделения и определения кислот применялся описанный выше хроматографический метод. Проведенные нами анализы показали, что красный ржаной солод и ржаной хлеб содержат две летучих жирных кислоты — муравьиную и уксусную, причем уксусная кислота находится в преобладающем количестве (табл. 2).

Разработанный нами количественный хроматографический метод может быть с успехом применен для исследования летучих жирных кислот в пищевых продуктах.

Всесоюзный институт хлебопекарной промышленности
Министерства пищевой промышленности СССР и
Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
22 VI 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Л. Кретович и А. А. Бундель, Биохимия, 10, 3, 216 (1945).
- ² В. Л. Кретович и А. А. Бундель, ДАН, 61, 861 (1948); 73, 137 (1950).
- ³ L. Ramsey and W. Patterson, Journ. of Offic. Agricult. Chemists, 28, 644 (1945).
- ⁴ S. Elsdon, Biochem. Journ., 40, 252 (1946).