

## A lipidek papírkromatográfiás meghatározása\*

LUKÁCSNÉ HÁGONY PIROSKA

Növényolaj- és Mosószeripari Kutatóintézet, Budapest

Érkezett: 1966. jún. 4.

A lipidek vonalán a papírkromatográfiás módszer bevezetése tette lehetővé a lipidek részletesebb, mélyebb megismerését azáltal, hogy az elemzéshez kis mennyiségű anyag elegendő, ugyanakkor a klasszikus módszerekkel szemben kevésbé bonyolultan, megbízhatóan, rövidebb idő alatt végezhető el az elemzés. A lipidek kémiai sajátáguknál fogva a jellegüknek megfelelően többféle papírkromatográfiás módszerrel választhatók szét. Tekintettel az idő rövidségére, az egyes lipidfélések papírkromatográfiás elválasztásánál a részletes irodalmi ismertetést mellőzöm és csak az Intézetünkben alkalmazott módszerek ismertetésére szorítkozom.

### Rövidláncú zsírsavak meghatározása

A rövidláncú zsírsavakból hidroxamátokat képezünk és a hidroxámsav-ferrikkomplexen keresztül történik kimutatásuk (1).

A rövidláncú zsírsavakat a finoman aprított természetes nyersanyagokból vízgőz-desztillációval nyerjük ki, majd a kinyert savakat fenolftalein jelenlétében meglúgosítjuk ammóniumhidroxiddal és szárazra pároljuk. 0,4 n etanolos sósavval (kb. 1 mg zsírsavra számolva 2 ml etanolos sósav) kétszer extraháljuk.

Ezután diazometánt adagolunk az állandó sárga szín megjelenéséig, amikor is a zsírsavakat metilészterekké alakítottuk. A főlöleges diazometánt pár csepp 0,4 n alkoholos sósav hozzáadásával elűzzük, majd 3 ml (kb. 10 mg zsírsavra) 2 n hidroxilamin-klorhidrát és 3,5 n nátriumhidroxid metanolos elegyét adjuk és 15 percig 20°C-os termosztátba helyezzük. Ezután tömény sósavval semlegesítünk és a kiváló nátriumklorid csapadékot szűrjük. Háromszor 1 ml éterrel utánnamossuk a csapadékot és az étert kb. 1 ml-re betöményítjük. Ebből történik a zsírsavak kromatografálása. A kromatografáláshoz alkalmazott papír Schleicher – Schüll 2043/b, amelyet Mathiasz nyomán „lábás” kromatogramnak képezünk ki (2). A lábás kromatogramnak előnye, hogy a felvitt cseppek közelében az oldószer félkör alakban terjed. Ezzel a körpapír kromatográfiánál fennálló viszonyokat megközelítjük és így az elválasztást élesebbé tesszük azáltal, hogy az egyes komponensek foltjai az oldószer haladási irányára merőleges irányban kissé elnyújtottak, félhold alakúak lesznek, az  $R_f$  értékek ugyan kisebbek, ennek ellenére az elválasztás élesebb. Felsőálló kromatográfiát alkalmazunk.  $C_1 - C_6$ -ig a következő elválasztó elegyet használjuk: amilalkohol: ecetsav: víz 4 : 1 : 5.  $C_6 - C_{10}$ -ig pedig benzol: hangyasav: víz 1 : 1 : 1 elegyével történik a különválasztás. Az adott módszerrel 100 – 200 gamma zsírsavkeverék választható jól szét. A futási idő kb. 16 óra szobahőfokon. Kifuttatás után a kromatogramot 50 – 60°C-nál nem magasabb hőfokú szárítószekrényben szárítjuk. Ezután bepermetezzük a papíresikokat 2%-os metanolos ferriklorid oldattal. A savak bíborvörös színben jelennek meg.

\* A II. Élelmiszervegyész Ankét keretében 1966. április 7-én elhangzott előadás

A módszert kizárólag kvalitatív zsírsavmeghatározásra alkalmaztuk. Irodalomból ismert a mennyiségi meghatározásuk is (3). A kimutatás során a hidroxámsav ferrikomplexet a papírról eluálják és a szint fotometrálik. A módszerrel  $\pm 10\%$  hibával határozhatók meg a zsírsavkomponensek.

### Hosszúláncú zsírsavak kvalitatív meghatározása

#### *Hosszúláncú zsírsavak papírkromatográfiás előkészítése:*

Olajos magból Soxleth készülékben, petroléterrel 8 órás extrakcióval nyerjük ki a zsiradékot – amennyiben nem olajos magból, hanem vízet és egyéb nem lipid anyagot is (fehérje, cukor) tartalmazó rendszerből történik a lipidek kinyerése, úgy a finoman aprított anyaghoz legcélszerűbb a Folch-féle lipid oldószert adni (4). A kloroform/metanol (2 : 1) keveréket, az anyagra számolt tízszeres hígításban adjuk, kb. 20–30 percig rázógépen rázatjuk. A csapadékot szűrővel távolítjuk el s a bennmaradt lipid mennyiséget  $3 \times 20$  ml kloroformmal utánöblítjük, nitrogén felett ledesztilláljuk, a visszamaradt lipidokat 30–40 ml kloroformban oldjuk és 20 ml desztillált vizet hozzáadva rázótölcsérbe átrázzuk. A két fázis különválasztása után az alsó kloroformos fázist bepárolócsészébe engedve nitrogénáramban bepároljuk és a visszamaradt, nyers lipidot petroléterben vesszük fel. A nyers lipid elsősorban neutrálszírkeves szabadzsírsav, foszfátid és el nem szappanosítható részek keveréke. A zsiradékot szappanosításon keresztül alakítjuk át szabadzsírsavvá. 1 g zsiradékra 25 ml  $10\%$ -os alkoholos káliumhidroxidot adunk és visszafolyó hűtőn forraljuk 1 órán keresztül, majd petrolétert rétegezzük fölé és fenolftalein jelenlétében sósavval a zsírsavakat felszabadítjuk, rázótölcsérbe vesszük át és petroléterrel kirázzuk. Nátriumkloriddal telített desztillált vízzel metilnarancs jelenlétében sósavmentesre mossuk és nátriumsulfáton szűrjük, majd az oldószert ledesztilláljuk. Az így elkészített zsírsav papírkromatográfiás vizsgálatra alkalmas.

A hosszúláncú zsírsavak papírkromatográfiás elválasztása nehezebb feladat, mint a rövidláncú zsírsavaké. Ennek oka a hosszúláncú zsírsavak ( $C_{10}$ -tól felfelé) hidrofób tulajdonságában van. A vízben rosszul oldódó zsírsavak, vizes-állófázisú rendszerben magas  $R_f$  értékkel majdnem a fronttal vándorolnak, mert ezeket a vizesfázis csak kevésbé tartja vissza, ugyanis ilyen körülmények között a zsírsavak megoszlási hányadosa rendszerint annyira eltolódott a mozgófázis irányába, hogy a foltok közel azonos  $R_f$  értékkel vándorolnak. Ezért a zsírsavak szétválasztásához a hidrofilitás csökkentése miatt a papírost impregnálni kell hidrofób anyaggal. Az impregnálás mértékének megfelelően a papír hidrofilitásának fokát csökkentjük a jó elválasztás biztosítása érdekében. A papír hidrofób állófázissá alakult az impregnálás következtében, míg az elválasztó oldószerszisztem hidrophil mozgórendszer. Az ilyen típusú kromatográfiát fordított fázisú kromatográfiának nevezzük.

A zsírsavak papíron történő szétválasztása esetén a papír hidrofilitásának csökkentésére általában fizikai-kémiai módszereket alkalmaznak. Így Kaufmann (5) eleinte a petróleumfrakciónak  $190-200^\circ\text{C}$  közé eső részével dolgozott, későbbiekben rátért az undekánra és a parafinolajra (6). Ezenkívül az irodalomból nagyon sokféle hidrofobizáló ismeretes.

Magyarországon a zsírsav kromatográfiát a Növényolajipari Kutató Intézetben Jáky vezette be. Kaufmann után először a petróleum  $190-220^\circ\text{C}$ -ú frakcióját alkalmazta a papír impregnálásához (7). Futtatáshoz poláris oldószert használt,  $80-85\%$ -os ecetsavat. Az elválasztást Schleicher-Schüll 2043/b papíron végezte,  $20-21^\circ\text{C}$ -on  $48-72$  óráig. A módszerrel a zsírsavak jól definiált  $R_f$  értékkel különválaszthatóak. A módszer hátránya, hogy az impregnálásához alkalmazott petróleumfrakció meglehetősen párolog a papírról

és a papírnak az elválasztáshoz szükséges optimális hidrofób mértékét nehezen tudtuk definiáltan biztosítani, ami az elválasztás rovására ment, valamint a futtatási idő is hosszúnak bizonyult.

*Spiteri és Michales* (8) petróleum helyett 10% parafinolajat alkalmazott a papír hidrofóbizálásához a következő mozgófázissal: 90% ecetsav, 10% víz.

A gyógyszerári parafinolajat a peróleumnál, vagy az undekánál jobbnak találtuk, mivel az optimális hidrofób mennyiség felvitele definiálható, sőt a parafinolajjal hidrofóbizált papír hosszú időn keresztül tárolható anélkül, hogy az ideális hidrofób volta csökkenne. Ugyanakkor az alkalmazott futtató rendszerrel az elválasztás időtartama hosszú.

*Seher* a zsírsavak különválasztásának meggyorsítására az ecetsavvizrendszerbe acetonnitrilt is alkalmazott, de a hidrofóbizáláshoz továbbra is undekánt használt.

Mi áttértünk a 10% parafinolajjal történő impregnálásra és a *Seher* (9) által leírt, gyorsabb futtató rendszert a parafinolaj impregnáláshoz arányaiban megváltoztattuk. Ezáltal 15–16 óra alatt definiáltan el tudjuk választani a zsírsavakat és az impregnálás feltételét is stabilizáltuk.

Ezek alapján Intézetünkben 1960 óta a következő zsírsavválasztórendszert alkalmazzuk; (10) Schleicher–Schüll 2043/b papírt használunk 10% éterben oldott parafinolajjal impregnálva. Futtatórendszerünk: 75 ml ecetsav, 20 ml acetonnitril, 5 ml víz. E futtató elegyet parafinolajjal telítjük. Felszálló kromatográfiát végzünk. A rendszerrel jól szétválasztható zsírsavkeverék mennyisége: 300–500 gamma.

A zsírsavak előhívásakor 10% vizes rézacetáttal rézszappant képezünk, a papír által csak adszorbeált rezet folyóvizes kimosással kb. 3 órán keresztül eltávolítjuk, majd a visszamaradt rézszappannal 5% alkoholban oldott rubeansav oldattal réz-rubeankomplexet alakítunk ki, amely ellentétben a réz-káliumferrocianid műlékony és halvány színével rendkívül intenzív, sötét színt képez és az idők során nem veszít intenzitásából. A módszerrel 0,1–0,5 gamma zsírsavhoz kötött réz már kimutatható.

### A hosszúláncú zsírsavak mennyiségi meghatározása

A mennyiségi értékelési módszerek közül általában két módszer használatos. A zsírsavak rézóinak kioldása után, a réz mennyiségi meghatározásán keresztül kolorimetrikus módszerrel, vagy a zsírsavfoltok réz-rubeankomplexének közvetlen fotometrikus színerősség mérésével. Mi a zsírsavak százalékos megoszlását fotometrikusan Jouan fotodenzitométer segítségével határozzuk meg. A módszer azon az elven alapszik, hogy két zsírsavmolekula a rézszappan-képzéshez egy rézatomot vesz fel. Az adszorbeált réz kimosása után a kémiai kötésben lévő rézzel kialakítjuk a réz-rubeankomplexet, amelynek színerőssége a jelenlévő zsírsavak mennyiségétől függő tényező.

A fotodenzitométer a színerősséget félautomatikusan jelzi. A folt által át-eresztett fény intenzitását a csík mögött elhelyezett galvanométer segítségével mérjük. A kiértékelendő csík mozgatását a 0,3 cm rés előtt automatikus szerkezet végzi, az eredménynek megfelelő görbét a galvanométer kitérései alapján író-szerkezet regisztrálja. A fényáteresztési intenzitás fluktuációjának megfelelő extinkció értéket a folt-hosszúság függvényében harang alakú görbében kapjuk. A görbe által körülhatárolt terület arányos a foltban levő anyagmennyiséggel. A fotodenzitométerrel kapott görbék területeit planimetráljuk. A zsírsavak mennyiségének fotodenzitometriás kiértékelése +10%-on felüli hibával végezhető csak. Ez a hiba elsősorban a papír alapszín-egyenletlenségéből adódik. Rendkívül fontos követelmény a papírból teljes mértékben kimosni az adszorbeálódott rezet, mivel ez a körülmény nagymértékű alapszín elváltozást idézhet elő. A

hosszúlancú zsírsavak papírkromatográfiás módszerrel  $C_{10} - C_{14}$ -ig az általunk közölt módon különben jól elválaszthatók. A módszer további hátránya még az is, hogy a kettős kötessel rendelkező zsírsavak a kettős kötések számának megfelelően más és más rövidlancú zsírsavval kritikus párt alkotnak. Így pl. a 18-as szénatomszámú olajsav, a 16-os szénatomszámú palmitinsavval, a 18-as szénatomszámú linolénsav, a 12-es szénatomszámú laurinsavval alkot kritikus párt. Ha a papírra felcseppentett zsírsavkeveréket palládium katalizátor jelenlétében nyomás alatt hidrogénezzük, akkor a kettős kötések telítődnek és két kromatogramból tájékozódhatunk a vizsgált anyag összetételéről. Ugyanis a sztearinsav mennyisége a telített 18-as szénatomszámú zsírsavakkal nőni fog és a palmitin, mirisztin és laurinsav-foltok területe csökken.

A papírkromatográfia a lipoidok vonatkozásában a gázkromatográfiás módszer kialakítása előtt nagyon hasznos volt, mondhatnánk a lipoidok mélyebb vonatkozású megismerése e módszernek volt köszönhető. Hiányosságait elsősorban a kvantitatív kiértékelés nagy relatív hibáját a gázkromatográfiás módszer műszeres megoldással kiküszöbölte. Gázkromatográfiás készülék hiányában nem abszolút értékek szerzésére, bizonyos folyamatoknál fellépő zsírsav-változások kimutatására a papírkromatográfiás zsírsavmeghatározás nagyon alkalmas és hasznos. Könnyű kezelhetőségénél és nem utolsó sorban olcsóságánál fogva, kevésbé felszerelt laboratóriumok is eredményesen használhatják.

### Trigliceridek papírkromatográfiás elválasztása

A természetes zsíradékok trigliceridjeinek szétválasztásával nagyon sokan foglalkoztak. Intézetünk az irodalom alapján *Kaufmann* (11) által leírt módszert próbálta ki és alkalmazta. A módszert kizárólag a természetes zsíradékok kvalitatív meghatározására használtuk. A trigliceridek élelőbb szétválasztásához szükséges az esetleg jelenlevő kis mennyiségű szabadzsírsavak eltávolítása. Alumíniumoxid oszlopon történő adszorbcíóval végezzük a zsírsavak eltávolítását. A triglicerideket petroléterben eluáljuk az oszlopról. Az elválasztáshoz alkalmazott papír: *Schleicher - Schüll* 2040/bm, a glázpapír nem megfelelő. Impregnálásához parafinolaj 10%-os éteres oldatát használtuk. Futtató oldószer rendszer: aceton/acetonitril 1 : 4. Elválasztási idő 5 óra, alkalmazott hőfok 21 C. Lényeges a kromatografálás ideje alatt a hőmérséklet pontos betartása. A különválasztható gliceridek mennyisége 60 - 80 gamma. Előhívásra vagy az általános lipid-előhívót, a jódgőzt, vagy a Rodamin B 0,01%-os vizes oldatát alkalmazzuk. A módszer bizonyos tájékoztatást ad a természetes zsíradékok fő triglicerid féleségeiről. Sajnos olyan kis mennyiség választható külön a leírt módon, hogy az egyes triglicerid féleségek zsírsavösszetételét papírkromatográfiás módszerrel meghatározni már nem tudtuk.

A trigliceridek különválasztására az oszlop, vagy lapkromatográfiás módszer, ezüstnitráttal impregnált szilíciumoxid adszorbens alkalmazása mellett sokkal differenciálabb elválasztást biztosít. Az ily módon szétválasztott triglicerid mennyiségekből az egyes triglicerid féleségek zsírsavösszetétele már meghatározható.

### Foszfolipidok papírkromatográfiás kvalitatív meghatározása

A foszfolipidok különválasztásánál a papírt általában kovasavval impregnálják. (12) Újabban üvegpapírt alkalmaznak és ezt impregnálják kovasavval. (13) Az üvegrost papírnak előnye a gyors elválasztás mellett az is, hogy a szerves anyagok kimutatására a koncentrált kénsav általánosan használható.

A foszfolipidok legegyszerűbben az egyéb neutrális lipoidoktól acetons kicsapással választhatók el. A foszfolipidok acetonban kicsapódnak, míg a neutrális lipoidok oldatban maradnak. Az acetonban oldhatatlan foszfolipid

frakció 1–2% neutrális lipidot még tartalmaz ugyan, amely azonban az elválasztást már nem zavarja.

A felhasznált papír Whatman No I, amelyet szilikagéllal impregnálunk. 310 g szilíciumoxidot 1 liter 7,2 n nátriumhidroxid oldattal összekeverünk, az oldatot oldjuk 1,7 liter desztillált vízben. Az impregnálandó papírt bemártjuk a vízűveg oldatba, 10 percig benn tartjuk, majd hatzor n sósavoldatba tesszük át, úgy, hogy a sósav teljesen ellepje a papírt, kb. fél óráig benne tartjuk, majd a papírt folyóvíz áramban egy órán át mossuk, a felesleges sósav eltávolítására, majd 10 percre desztillált vízbe helyezzük és utána szűrőpapírok közé téve 80 C°-on szárítjuk. Az így előkezelt papír hosszú ideig tárolható. Az alkalmazott futtató elegy: diizobutilketon : ecetsav : víz 40 : 25 : 5. A kromatográfiás elválasztási idő kb. 16 óra, 23 C°-on. Kromatografálás után a papírt 80 C°-on szárítjuk, majd előhívjuk. Modellanyagok hiányában az egyes foszfolipoid féleségeket specifikus csoport festéssel azonosítjuk. Az aminosoportok, foszfatidetanolamin, azaz kefalín, foszfatidszerin, azaz szerinkefalín, ninhidrinnel mutathatók ki az irodalom által megadott  $R_f$  segítségével. A kolin tartalmú foszfatidok, lecitin féleségek a Dragendorf reagenssel identifikálhatók. Általános foszfatid előhívási módszer a jóddorf alkalmazása. *Hoogwinkel*, *Hoogveen* és *Lexmond* (14) *Marinetti* módszerével, tehát diizobutilketon, ecetsav, víz 40 : 21 : 5 elegyével választották külön a foszfolipoidokat, de Whatman No 1 papír helyett Schleicher–Schüll 2043/b papírt impregnálva a futtatási időt 16 órától 4–5 órára lerövidítették. Az egyes foszfatidféleségek identifikálásához specifikus csoport reakciókat dolgoztak ki. Véleményük szerint a ninhidrin reakció a priméraminok, kefalín, szerinkefalín kimutatására nem megbízható, mert kicsiny az érzékenysége. A kefalín szerinkefalint, ditiokarbamátos reakcióval mutatják ki. Ők vezették be a trikomplex reakciót is, amellyel a foszfatid tartalmú bázikus csoportok színezhetőek, tehát a kefalín és a lecitinféleségek.

Trikomplex reakcióelegy a következő:

Festőoldat:

50 ml 2%-os uranilnitrát vizes oldata

50 ml 0,2%-os savanyú fuxin vizes oldata

50 ml 0,1 n sósav

használatkor 500 ml-re desztillált vízzel feltöltjük.

Mosóoldat:

50 ml 2%-os uranilnitrát

50 ml 0,1 n sósav

használatkor 500 ml-re feltöltjük desztillált vízzel.

A trikomplex reakcióval a foszfatidok amfoter karakterű csoportja színeződik savanyú fuxin és uranilnitrát savanyú közegében. A kromatogramot legalább 3/4 órát tartjuk a színező oldatban, majd bemártjuk a mosófolyadékba 10 percre, és utána áramló melegben szárítjuk. A reakció érzékenysége nagy és az összes lényeges foszfatidcsoportot kimutatja.

A foszfatidok papírkromatográfiás különválasztását *Hoogwinkel* módosításában a *Marinetti* által leírt futtatórendszerben végezzük. Vizsgálataink során a vérlipoidok foszfatidjait választottuk külön. Kizárólag kvalitatív meghatározást végeztünk. A különválasztott foszfatidcsoportokat alkoholos káliumhidroxiddal elszappanosítottuk és a zsírsavakat papírkromatográfiás módszerrel határoztuk meg.

A lapkromatográfiás módszer bevezetése óta a foszfatidok különválasztását szilikagél adszorbensen 1–1,5 óra alatt végezzük. A módszer sokkal egyszerűbb és gyorsabb.

A lipoidok papírkromatográfiás meghatározását már nem használjuk. Tekintettel arra, hogy a zsírsavak meghatározásához gázkromatográfiás berendezés áll rendelkezésünkre, ugyanakkor a trigliceridek és foszfolipoidok különválaszt-

tására sokkal korszerűbbnek találjuk a lapkromatográfiás módszert, amelyet Intézetünkben sikeresen alkalmazunk.

Azon intézmények számára, amelyek gázkromatográfiás, valamint lapkromatográfiás berendezéssel nem rendelkeznek, összehasonlító és tájékoztató vizsgálatokhoz az ismertetett papírkromatográfiás módszereket ajánlani tudjuk.

#### I R O D A L O M

- (1) *Thompson, A. R.*: Austral. J. sci. Res. 4B, 180. (1951)
- (2) *Mathias, W.*: Naturwiss, 43, 351. (1956)
- (3) *Stadtman, E. u. Barker, H. A.*: J. biol. Chem. 184, 769. (1950)
- (4) *Folch, S, Lees, M.*: J. biol. Chem. 226, 497. (1957)
- (5) *Kaufmann, H. P.*: Fette u. Seifen, 57, 473. (1955)
- (6) *Kaufmann, H. P. u. Nitsch, W. H.*: Fette u. Seifen 56, 154. (1954)
- (7) *Növényolaj és Háztartásvegyipari Kutató Intézet évkönyve*: (1959)
- (8) *Spiteri, I.*: Bull. Soc. Chim. biol. 36, 1355. (1954)
- (9) *Seher, A.*: Fette u. Seifen 57, 475. (1955)
- (10) *Hágyony, P. L., Jáky, M.*: Biochemical Pharmacology 5, 46. (1960)
- (11) *Kaufmann, H. P.*: Fette u. Seifen, 7, 523. (1959)
- (12) *Mangold, H. K., Lamp, B. G.*: I. AM. Chem. Soc. 77, 6070. (1955)
- (13) *Dieckert, J., Reiser, R.*: Science 120, 678. (1954)
- (14) *Hoogwinkel, G. I. M., Hoogveen, I. Tn.*: Biochemistry 4, 62. (1959)

#### БУМАЖНО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

*П. Л. Хагонь*

Автор дает короткий обзор бумажно-хроматографического разделения липидов. Сообщает методы, примененные в институте автора для количественного и качественного определения жирных кислот, триглицеридов и фосфолипидов при помощи бумажной хроматографии.

#### PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER LIPIDE

*L. P. Hágyony*

Der Verfasser gibt eine kurze Übersicht über die papierchromatographische Trennung der Lipoide. Er bespricht diejenigen Methoden, mit welcher man in ihrem Institut die qualitative und quantitative Trennung der kurz- und langkettigen Fettsäuren, der Triglyceride und der Phospholipide durchführt.

#### DETERMINATION OF LIPIDES BY PAPER CHROMATOGRAPHY

*L. P. Hágyony*

A short survey is given of the separation of lipides by paper chromatography. The methods successfully employed in the Institute for the qualitative and quantitative paper chromatographic determination of short-chain and long-chain fatty acids, triglycerides and phospholipides are described in detail.

#### ANALYSE DES LIPIDES PAR LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

*L. P. Hágyony*

L'auteur donne un aperçu de la séparation des lipides par la chromatographie sur papier. Elle décrit les méthodes de chromatographie au papier qui servent dans notre institut pour la détermination qualitative et quantitative des acides gras à chaîne courte et à longue chaîne, des triglycérides et des phospholipides.