

Lipidosztályok félmikro-preparatív elválasztása vastag rétegű lapkromatográfiával

CZEGLÉDI-JANKÓ GÉZA

Technikai munkatárs: Szabó Mária

Országos Élelmezés és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1963. június 4.

A klasszikus zsíranalitikai eljárások segítségével a zsírnemű anyagoknak (lipoidoknak) vegyületszintű szerinti való elválasztása (osztályelválasztása) hosszú ideig szinte megoldhatatlan feladat, majd a módszerek fejlődésével is rendkívül hosszadalmas és kevésbé megbízható eljárás volt. E téren döntő változást hozott az adszorpciós és a megoszlási jelenségeken alapuló elválasztási módoknak a zsíranalitikába történő bevezetése. E módszerek alkalmazásával alapvetően új lipoidanalitikai szemlélet alakult ki, elsősorban Kaufmann és munkatársai nyomán. Kaufmann munkatársaival már 1937-ben tanulmányozni kezdte az akkor elterjedő oszlopkromatográfiát s annak a zsíranalitika területén való alkalmazását. Kézikönyve összefoglalja a saját és mások munkájának 1957-ig terjedő legfontosabb eredményeit [3]. Az újabb oszlopkromatográfiás lipoid-osztályelválasztási eljárások közül kiemelkedik Hirsch és Ahrens jr. gondosan kidolgozott módszere, amely standard-metódusnak tekinthető [1, 2].

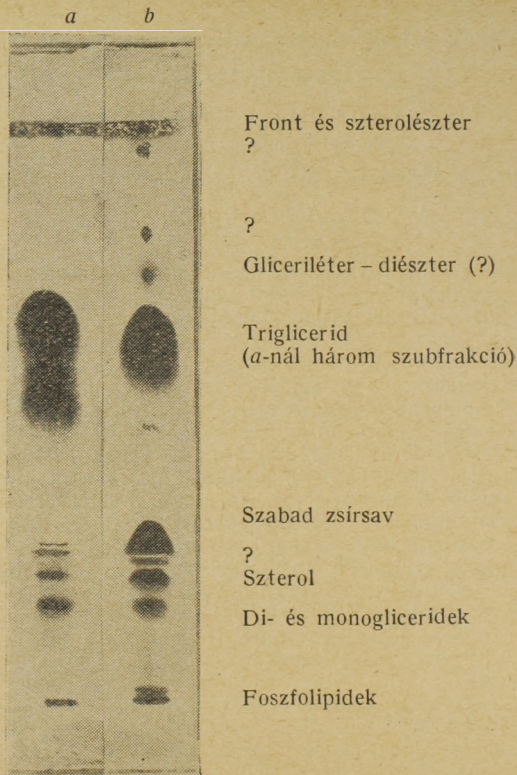
Ismét új utakat nyitott a lipoid-osztályok elválasztásában a – néhány korábbi rendszertelen kísérlet után – Stahl által bevezetett vékonyréteg-kromatográfia vagy lapkromatográfia. (Dünnschicht-chromatographie, Thin-layer-Chromatography, Chromatographie sur couches minces) [7], amely tulajdonképpen nyitott adszorpciós oszlop alkalmazása, üveglapra terített adszorpciós réteg alakjában, mint ahogyan annak idején a papíros-kromatográfia a zárt megoszlásos oszlopok megnyitását jelentette.*

A vékonyréteg-kromatográfianak a lipoid-kutatások területére való bevezetése Kaufmann és Makus nevéhez fűződik [4], akik megállapították, hogy a lipoidok funkcionális csoportjaik szerint osztályokra választhatók szét az adszorpciós rétegen. Megfelelően nagy molekulájú vegyületeknél ugyanis a bennük levő láncok hosszúsága és a kettős kötésekben mutatkozó különbözőség az Rf értékeket csak kis mértékben befolyásolják. Az egyes vegyületszintű csoportok (osztályok) ennek megfelelően, bár olykor elhúzódó, de jól elkülönülő foltokat adnak.

A későbbiekben kidolgozott vékonyréteges osztályelválasztási eljárások közül Malins és Mangolt eljárása mutatkozott a legjobban reprodukálhatónak [5, 6]. A „Merck: Silicagel G” készítményből előállított vékony réteget 105 °C-on aktiválták s a kromatogramokat petroléter-éter-jégecet különböző arányú elegyével fejlesztették ki.

A vékony rétegű lapkromatogrammon a lipoidosztályokról tökéletesebb képet kapunk, mint az oszlopon történő szétválasztás esetében, mégpedig a szó legszorosabb értelmében, mivel a szétváló vegyületszintű csoportok láthatóvá tétele valóságos, szemmel látható képet ad azok egymáshoz való viszonyáról, s egy pillanat alatt olyan összehasonlítást tehetünk két lipoid összetételét illetően, amilyent a „sötétben tapogató” oszlopelválasztás ilyen közvetlenül soha nem mutat meg (1. ábra).

* Az adszorpciós lapkromatográfia mellett újabban egyre inkább terjed az impregnált lapokon történő megoszlásos kromatográfia is. A lipoidok osztályelválasztási elve azonban változatlanul az adszorpciós jelenségen alapszik.



1. ábra

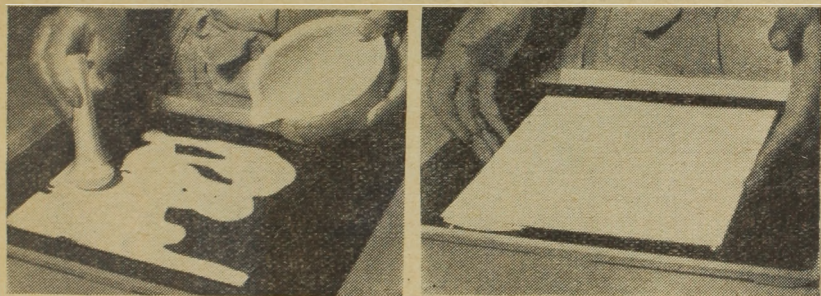
Tehéntej (a) és anyatej (b) lipidjainak összehasonlító rétegekromatogramja vékony lapon (Merck: Silicagel G.) 83 ml benzín (Fp. 60–120 °C) – 18 ml eliléter – 1 ml jégecet. 20 °C. Előhívás: alkoholos foszfomolibdén-savas permetezés, 115 °C, 15'.

A vékonyréteg-kromatográfia teherbírása azonban igen szűkre korlátozott. Egy-egy 20 × 20 cm-es lap kapacitása (attól függően, hogy a vizsgált anyag hány, s egymástól milyen távolra húzódó osztályra válik szét) 20–40 mg, s ahhoz, hogy az egyes osztályokat tovább elemezhesük, a kisebb frakciókra mérhetően keves mennyiség jut.

A preparatív, de legalábbis félmikro-preparatív mennyiségek eléréséhez kézenfekvő volt a lap vastagságának, s ez által kapacitásának növelése. Mikro-eljárásnak a makro-méretre felé való közelítése általában értelmetlen akkor, ha a nékik megfelelő klasszikus makro-módszerek a szóban forgó probléma megoldásához kielégítőek. A vékonyréteg-kromatográfianak azonban az oszlophoz képest sok előnye van – szemléletesség, gyorsaság, egyes osztályok szelektívbb elválasztása** és ezek az előnyök a makro-irányba növelve is megmaradnak.

Munkánk során 2,5 mm vastag adszorpciós réteget alkalmaztunk, amely 20 × 20 cm-es lapoknál (a szétváló osztályoktól függően) lehetővé tette a lipoi-

** Oszlopkromatográfiával pl. mindeddig nem sikerült elkülöníteni gliceriléter-diésztereket a trigliceridektől [1] Vékonyréteg-kromatográfiával az elválasztás tökéletes [8]



2. ábra

a: vastag réteg öntése és terítése, b: a réteg egyenletessé tétele ütögetéssel.

doknak 300 mg mennyiségig történő osztályelválasztását. Ez már félmikro-preparatív mennyiség, s több lap alkalmazásával még a kisebb frakciók is elegendő mennyiségben nyerhetők ki.

Az *adszorbens-réteg készítése*. Lipoid-osztályok vékonyréteg-kromatográfiás elválasztására legerjedtebb készítmény a „Merck: Silicagel G.” Ez kb. 10% gipszet tartalmaz. Vastag réteg előállítására nem alkalmas, mert száradáskor a réteg megrepedezik. Az összetételen gipsz hozzáadásával lehetett volna ugyan módosítani, ehelyett azonban az Épületvegyészeti Gyárnak a Növényolajipari és Háztartási Vegyipari Kutatóintézet által kipróbált ún. „Szűkpórusú szilikagél” készítményét használtuk fel, őrölve, 100–200 mesh szemcsenagyságban (MSZ 905:0,1/0,063 és 0,07/0,045 sziták között fennmaradó rész), többszöri forró kloroformos mosás után a következő arányban és mennyiségben:

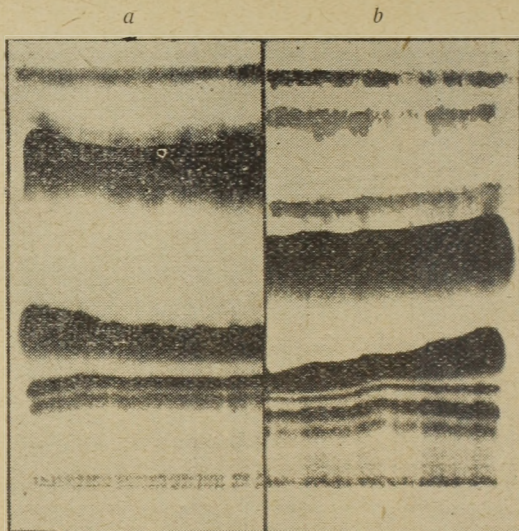
30 g szilikagél
13 g alabástromgipsz
50 ml desztilláltvíz

A víz apránkénti hozzáadása után a pépet mozsárban csomómentesre dörzsöljük, majd vékony sugárban az acetonnal zsírtalanra törölt, pontosan vízszintesen fekvő 20×20 cm-es üveglapra öntjük, s a mozsártörővel amennyire lehet, egyenletesen szétterítjük (2a ábra). Az így nyert réteg hullámos. Rögjön a szétterítés után azonban a bal kéz ujjain megütöztetett lapot a jobb kéz ujjainak szapora ütögetésével rezgő mozgásba hozzuk, ügyelve a lap vízszintes helyzetére. (2b-ábra) A rezgő mozgás hatására a még folyós pép tökéletes egyenletessé terül szét, majd néhány perc múlva megköt. A víz hozzáadásától a réteg egyenletessé tételéig 2 percnél több idő ne teljék el.

Másnapra a kiszáradás már olyan mértékű, hogy a lap szárítószekrénybe helyezhető aktiválás céljából. Az aktiválás 110–115 °C-on történik, kb. 1 1/2–2 órán át.

Az *anyag felvitel*e. A vizsgálandó lipoidból, az osztályok száma, elhelyezkedése és a kívánt elválasztási élesség szerint 1–3 ml 10%-os oldatot viszünk fel, lassú kifolyású pipettából. Vonalzó mellett a lap aljától kb. 2 cm-re végighúzzuk a pipettát a rétegen, úgy, hogy az finom árkocskát húzzon. A felvitel helyét N₂-árammal fúvatva és szárítva, ismételten végighúzzuk a pipettát. Egy-egy húzással – egyenletesen – 150–200 mikroliteret viszünk fel. Az üveg felől az átnedvesedés mutatja a felvitel egyenletességét.

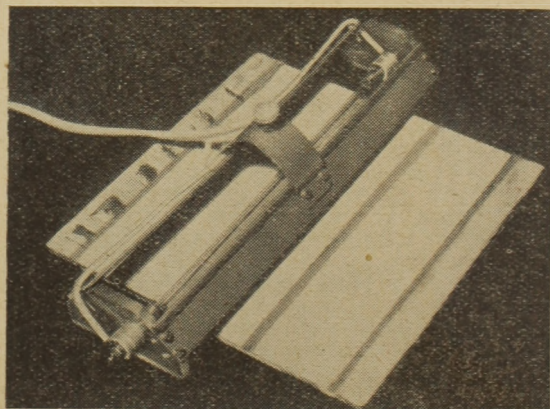
A *kromatogram kifejlesztése és előhívása*. Munkánk során az anyatej és a ehéntej lipoidjainak osztályelválasztását végeztük el. Legalkalmasabbnak bi-



3. ábra. Vastag rétegű kromatogram anyatej-lipoidból.

a: 80 ml petroléter (Fp. 60–80 C°) – 20 ml etiléter – 1 ml jégecet. *b*: ugyanez, petroléter helyett benzinnel (Fp. 60–120 C°.) Előhívás: alkoholos foszformolibdén-savas permetezés, 115 C°, 20'.

zonyult a benzin (Fp. 60–120 C°)-etiléter-jégecet 80:20:1 térfogatarányú elegye. A benzin szelektivebb elválást eredményez, mint a petroléter. A 3. ábra alkoholos foszformolibdén-sav-oldattal bepermetezett és 120 C°-on előhívott vastaglapkromatogramokon mutatja a sávok elhelyezkedését, benzines és petroléteres futtatás után.



4. ábra

Sáv-kijelölő csíkok előhívása ecsettel felvitt alkoholos foszformolibdén-savval vonalkályhával melegítve.

A leírás csak a lipoidok, közelebbről anya- és tehéntej lipoidoknak osztályokra történő vastaglap-kromatográfiás, félmikro-preparatív szétválasztását tárgyalja. Valószínű, hogy a vastaglapos módszer egyéb vegyületsportok szétválasztására is lehetőséget nyújt.

Az eljárást eddig kb. 50 anyatej lipoidjának szétválasztásánál alkalmaztuk. Jól aktivált lapon, friss oldószerkeverékkel, 20 °C hőmérséklet esetén a szétválasztás pontosan reprodukálható.

IRODALOM

- [1] Hirsch, J., E. H. Ahrens jr.: J. Biol. Chem. 233, 311, 1958
- [2] Hirsch, J.: Federation Proc. 20, 269, 1961.
- [3] Kaufmann, H. P.: Analyse der Fette und Fettprodukte, Springer Verlag, Berlin – Göttingen – Heidelberg, 1958. pag. 812 és köv.
- [4] Kaufmann, H. P., Makus Z.: Fette-Seifen-Anstrichmittel, 62, 1014 1960.
- [5] Malins, D. C., Mangold H. K. J. Amer. Oil Chemist's Soc. 37, 576, 1960.
- [6] Mangold, H. K., Malins D. C.: Idem, 37, 383, 160.
- [7] Stahl, E.: Ztschr. für Anal. Chem. 181, 303, 1961.
- [8] Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie. Springer-Verlag, Berlin – Göttingen – Heidelberg, 1962. pag. 159.

ПОЛУМИКРО-ПРЕПАРАТИВНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ГРУПП ЛИПОИДОВ МЕТОДОМ ЛИСТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ТОЛСТОМ СЛОЕ

G. Czegledi-Jankó

Хроматография в тонком слое успешно применяется для разделения разных материалов, но разделяемое количество материалов мало, не достаточно для препаративных целей. Автор сообщает листовую хроматографию в толстом слое, при помощи которой разделенные материалы получают в полу микропрепаративном количестве и можно их применить для дальнейших исследований.

HALBMIKRO-PRÄPARATIVE TRENNUNG VON LIPOID-KLASSEN VERMITTELS DICKSCHICHT-PLATTENCHROMATOGRAPHIE

G. Czegledi-Jankó

Die Dünnschicht-Chromatographie eignet sich zur Trennung verschiedener Substanzen. Die trennbare Substanzmenge ist jedoch gering und für präparative Zwecke zumeist nicht genügend.

Die Arbeit beschreibt eine – zur Trennung von Lipoiden geeignete – Dick-schicht-Plattenchromatographie – bei welcher die getrennten Substanzen in halbmikro-präparativen Mengen gewonnen und zu weiteren Operationen bzw. Untersuchungen verwendet werden können.

SEMIMICRO PREPARATIVE SEPARATION OF LIPOID TYPES BY THICK-LAYER SHEET CHROMATOGRAPHY

G. Czegledi-Jankó

Thin-layer chromatography proved to be suitable for the separation of various substances. However, the quantity of separated substances is small, and it is generally insufficient for preparative purposes.

For the separation of lipids, a procedure by thick-layer chromatography is described. By this method, semimicro preparative amounts of the separated substances can be obtained, and used in further operations or investigations.

SEPARATION DEMIMICRO-PREPARATIVE DES CLASSES DE LIPOIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR FEUILLE ÉPAISSE

G. Czeglédi-Jankó

La chromatographie sur feuille mince convient pour la séparation de diverses matières. Mais la quantité de la matière qu'on veut séparer est généralement peu et ne suffit pas à des buts préparatifs. L'auteur décrit pour la séparation des lipides un procédé chromatographique sur feuille épaisse qui permet l'obtention des matières séparées en quantités demimicro-préparatives suffisantes pour des manipulations ultérieures.