

Sorozatvizsgálatokhoz alkalmas eljárás lipoidok és lipoidfrakciók gyors metilészterezésére

SZŐKE KATALIN, KRÁMER MAGDA, LINDNER KÁROLY

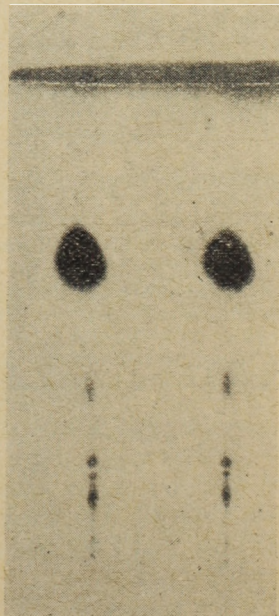
Országos Élelmezés és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1964. július 8.

A modern zsíranalitikában a zsírsavak vizsgálata észterek gázkromatográfiás elemzése segítségével történik, amely mint ismeretes, a jelenlegi eljárások között a legérzékenyebb és a legtökéletesebb zsírsavelválasztást teszi lehetővé.

A gázkromatográfiás vizsgálatok az anyagnak meglehetősen hosszadalmas és munkaigényes előkészítését igénylik. Az irodalomban ismertetett eljárások egy részénél az extrahált lipoidokat elszappanosítják, majd az elkülönített zsírsavakat metilezik (1, 4). Az elszappanosítás általában meleg úton történik, bár egyes szerzők (5) alacsony hőmérsékleten megfelelő mértékben megemelt lúgkoncentráció mellett végzik a műveletet. A metilezést leggyakrabban száraz sósavgázt tartalmazó abszolútmetanolal végzik (1), mások kénsavas metanolt (2, 3), vagy diazometánt (6) alkalmaznak.

Mivel a metilésztereknek így módon történő előállítása meglehetősen hosszadalmas, több szerző foglalkozott az eljárás leegyszerűsítésével és az egy lépésben végbemenő úgynevezett átészterezési folyamat megvalósításával (7–11). A közvetlen átészterezést részben lúgos, részben savanyú közegben sósav, vagy kénsav jelenlétében végzik. Smith (8) $n/10$ abszolút-metanolos káliilúggal 50 °C-on 1 órán át végzi az átészterezést. Dobiasová (9) 5%-os sósavas abszolút



1. ábra

metanollal leforrasztott ampullában 70 °C-on 3 óra alatt állítja elő az észtereket. *Nichaman* és munkatársai (10) kénsavas metanollal ugyancsak leforrasztott csőben 76 °C-on 15–18 órán át észtereznek át.

Az irodalomban ismertetett eljárások közül azokat, amelyek a lipoidok elszappanosítása után felszabaduló zsírsavakat az oldatból való elkülönítés után észterezik, hosszadalmasságuk miatt nem tartottuk alkalmasnak sorozatvizsgálatok végzéséhez. A közvetlen átészterezési módszerek közül a kénsavas közegben történő metilezés sem visszafolyós hűtővel, sem nyomás alatt zárt csőben végezve nem vezetett kielégítő eredményhez. Rétegekromatográfiával történő ellenőrzés alapján ugyanis megállapítottuk, hogy a trigliceridek hidrolízise korántsem nevezhető teljesnek néhány órás reakcióidő alatt még akkor sem, ha az irodalomban ajánlott 5%-os kénsav koncentrációt háromszorosára megnöveltük. A lúgos közegben történő metilezésnél atmoszférikus, vagy annál nagyobb nyomáson a trigliceridek hidrolízise ugyan végbemegy, a zsírsavaknak egy része azonban szabad formában marad vissza.

Elővizsgálataink eredményei alapján szükségesnek láttuk sorozatvizsgálatoknál is használható eljárás kidolgozását, amelynél a lipoidok hidrolízise és a zsírsavak metilészterré való átalakulása kielégítő mértékben végbemegy. Célkítűzésünk emellett az volt, hogy ez az előkészítő művelet a könnyen bomló anyagoknak minél kiméletesebb kezelésével, lehetőség szerint rövid idő alatt és alacsony hőmérsékleten menjen végre.

A zsírsavaknak a gázkromatografáláshoz való előkészítésekor, amennyiben nem az összzsírsav képét kívánjuk vizsgálni, hanem az egyes lipoidfrakciókban előforduló zsírsavak elemzéséről van szó, jelentős munkát ad és nagy oldószerveszettséggel jár az egyes frakcióknak az adszorbeáló rétegből való kinyerése. A szétválasztott lipoidosztályok a szilikagél rétegről kloroformmal eluálhatóak, üvegszőben megfelelő mennyiségű oldószer átfolytatásával. A művelet meglehetősen hosszadalmas, különösen, ha tekintetbe vesszük, hogy az eluáló oldószert a további feldolgozás előtt az anyagról le kell desztillálni. Munkánk másik célja tehát az volt, hogy a lipoidfrakcióknak ezt a hosszadalmas eluálását elkerüljük.

Az eljárás leírása

Az átészterezést a szétválasztott lipoidfrakciók eluálása nélkül a szilikagélen adszorbeált anyaggal közvetlenül végezzük alkalmas oldószer jelenlétében. Vizsgálataink szerint a poláros természetű éter lehetővé teszi az adszorbeált lipoidok megfelelő oldását és ezáltal biztosítja a metilészter képződését. Maga az észterezés abszolút metanolos kálilúggal történik zárt rendszerben, nitrogén atmoszférában, igen rövid idő alatt, a zsírsavak védelmét biztosító, alacsony hőmérsékleten. A reakciót a tömeghatás törvénye alapján koncentrált kénsavnak mint vízelvonószernek alkalmazásával tesszük teljesebbé. Az alkalmas lúgkoncentráció megválasztásánál figyelembe vettük a reakcióelegyen jelenlevő szilikagél jelentős lúgfogyasztását is. A vízelvonáshoz szükséges kénsav mennyiségét úgy állapítottuk meg, hogy növekvő kénsav adagok mellett vékonyrétegekromatográfiával ellenőriztük a szabad zsírsavak metilészterré való átalakulását.

Összészírsav meghatározáshoz kb. 0,2 g megolvasztott zsiradékot mérünk be kb. 20 ml-es ampullába, majd 6 ml peroxidmentes és vízmentes éterben feloldjuk. Ezután 6 ml 10%-os abszolút metanolos kálilúg oldatot adunk hozzá, az ampulla folyadék feletti részét N_2 gázzal töltjük és jeges vízzel történő hűtés közben leforrasztjuk. Az elegyet 15 percen keresztül 40 °C-on tartjuk. Az ampulla felbontása után a lúgfelesleget fenoltalein jelenlétében koncentrált kénsavval semlegesítjük, majd további 1,5 ml tömény kénsav hozzáadása után 10 percig állni hagyjuk szobahőmérsékleten. A reakcióelegyet ezután azonos térfogatú,

hidegen telített NaCl oldattal rázófőcsérbe átmoszuk, majd háromszor 10–15 ml éter:heptán 1 : 1 arányú keverékével a zsírsavésztereket kirázzuk. Na₂SO₄-tal történő vitzelenítés és az oldószer eltávolítása után az anyag gázkromatografálásra alkalmas.

Lipoidfrakciók zsírsav összetételének vizsgálatánál az anyagot 0,5 mm vastag szilikagél rétegen heptán : éter : jégcect 80 : 20 : 1 arányú keverékével kromatografáljuk. Foszforsolibdénsavval előhívott jelző sávok segítségével (4) az egyes frakciók helye kijelölhető. Az elő nem hívott lemezrészekről az egyes frakciókat tartalmazó lekapart szilikagél közvetlenül ampullákba visszük és a továbbiakban az összzsír elemzésénél leírtak szerint járunk el.

Az eljárás helyességének igazolására közöljük a tehéntej összzsírjából nyert zsírsav metilészterek vékonyrétegekromatogramját. A zsírsavésztereket egyfelől az elszappanosítással kapott zsírsavak észterezésével, másfelől az általunk kidolgozott eljárással állítottuk elő. Az ábrából látható, hogy a rövidített eljárással mind a trigliceridek hidrolízise, mind a zsírsavak metilészterré való átalakulása megfelelő.

Erre utal a metilészterek gázkromatográfias vizsgálata is. Az 1. sz. táblázatban a napraforgóolaj zsírsavainak százalékos megoszlását adjuk meg klasszikus eljárással történő észterezés után és a szilikagélen adszorbeált napraforgóolajnak egyszerűsített eljárásunk szerinti észterezése után végzett gázkromatográfias elemzés alapján. A kétféle módszerrel kapott eredmények egymás között és az irodalmi adatokkal (12) jól egyeznek.

1. táblázat

Napraforgóolaj zsírsavainak százalékos megoszlása

	Palmitin-sav	Sztearin-sav	Olajsav	Linolsav
Klasszikus eljárással	7,3	3,8	24,4	64,5
Saját eljárással	7,9	4,3	24,6	63,2
Jáky (12) szerint	9,6	3,6	25,7	61,0

A tehéntej összzsírjából nyert zsírsavmetilészter vékony rétegekromatogramja

- a) klasszikus eljárással
b) saját eljárásunkkal

IRODALOM

- (1) Richardson T., A. L. Tappel, L. M. Smith, C. R. Houle: J. Lipid. Res. 3, 344, 1962.
- (2) Duncan W. R. H., G. A. Garton: J. Lipid Res. 3, 53, 1962.
- (3) Sonnewald W., P. Harerkamp Begemann, G. J. Van Beers, R. Kenning: J. Lipid Res. 3, 351, 1962.
- (4) Czeglédi – Jankó G: ÉVIKE 9, 193, 1963.
- (5) Vioque E., L. J. Morris, R. T. Holman: J. Am. Oil Chem. Soc. 38, 489, 1961.
- (6) Roper R., T. S. Ma: Michochem. J. 1, 245, 1954.
- (7) Stoffel W., F. Chu, E. H. Ahrens: Anal. Chem. 31, 307, 1959.
- (8) Smith L. M.: J. Dairy Science 44, 607, 1961.
- (9) Dobiásová M.: J. Lipid Res. 4, 481, 1963.
- (10) Nichaman M. Z., C. C. Sweeley, N. M. Oldham, R. E. Olson: J. Lipid Res. 4, 484, 1963.
- (11) Stambasi Varao K., R. H. McCluer: J. Lipid Res. 5, 103, 1964.
- (12) Jáky M., Hágony P.: A Növényolaj- és Háztartási Vegyipari Kutatóintézet Közleményei, Bpest, 1962.

МЕТОД ДЛЯ БЫСТРОЙ, СЕРИЙНОЙ ЭТЕРИФИКАЦИИ ЛИПОИДОВ И ФРАКЦИЙ ЛИПОИДОВ МЕТИЛОВЫМ СПИРТОМ

У. Секе, М. Крамер и К. Лунднер

Авторы разработали простой метод для производства метиловых эфиров жирных кислот необходимых для анализа состава жирных кислот в фракциях липоидов при газовой хроматографии. Разработанным методом можно производить эфиры в 45 минут без элюации фракций липоидов разделенных слоевой хроматографией.

FÜR SERIENUNTERSUCHUNGEN GEEIGNETES VERFAHREN ZUR RASCHEN METHYLESTERISIERUNG VON LIPOIDEN UND LIPOID-FRAKTIONEN

K. Szőke, M. Krámer und K. Lindner

Verfasser arbeiteten eine vereinfachte Methode zur Darstellung der Fettsäure-Methylester aus, welche zur gaschromatographischen Analyse der Fettsäuren-Zusammensetzung verschiedener Lipoidfraktionen benötigt werden. Mit Hilfe dieser Methode können die Ester ohne Eluierung der vermittels Schichtenchromatographie getrennten Lipoidfraktionen serienweise binnen ungefähr 45 Minuten dargestellt werden.

METHOD FOR THE QUICK METHYLATION OF LIPIDS AND LIPID FRACTIONS, SUITABLE FOR ROUTINE SERIAL TESTS

K. Szőke, M. Krámer and K. Lindner

A simplified method was evolved for the preparation of the methylates of fatty acids required in the gas chromatographic analysis of the fatty acid composition of the various lipid fractions. On applying the described method, the methylates can be prepared in a serial operation in 45 minutes, without the elution of the lipid fractions separated by layer chromatography.

PROCÉDÉ APPLICABLE À DES RECHERCHES EN SÉRIES POUR L'ESTERIFICATION MÉTHYLIQUE DES LIPOÏDES ET DES FRACTIONS DE LIPOÏDES

K. Szőke, M. Krámer, K. Lindner

Les auteurs ont élaboré une méthode simplifiée pour la préparation des éthers méthyliques des acides gras qui sont nécessaires pour l'analyse chromatographique gazeuse des acides gras des diverses fractions lipoïdes. A l'aide de la méthode décrite les éthers peuvent être préparés en série en 45 minutes environ sans éluation des fractions de lipoïdes séparées par le procédé chromatographique.