

CHROM. 14,184

Note

Trennung einiger Bestandteile des Lecithins mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie. II*

A. NASNER und Lj. KRAUS*

*Lehrstuhl für Pharmakognosie der Universität Hamburg, Bundesstrasse 43, D-2000 Hamburg 13 (B.R.D.)
(Eingegangen am 11. Juni 1981)*

In der 1. Mitteilung¹ berichteten wir über eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung von Phosphatidylcholin (PC) im Lecithin.

Zu der weiteren qualitativen und quantitativen Beurteilung des Lecithins ist es notwendig neben dem PC auch den Gehalt an weiteren polaren Phospholipiden wie z.B. Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinosit (PI) und Phosphatidsäure (PA) bestimmen zu können. Die Trennung dieser polaren Phospholipide ist Gegenstand dieser Mitteilung.

In der Tabelle I sind die bisherigen Arbeiten²⁻⁶, welche sich mit der Einzelphospholipidbestimmung beschäftigen, zusammengefasst.

TABELLE I

QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON EINZELPHOSPHOLIPIDEN IM SOJALECITHIN MIT HILFE DER DÜNNSCICHT-CHROMATOGRAPHIE (DC)

<i>Methode</i>	<i>Lit.</i>
Phosphor-Bestimmung	2, 3
Präparative DC	4
Derivatisierung und Densitometrie	5
Densitometrie	6

In Tabelle II sind die Arbeiten aufgeführt, welche sich mit der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)-Trennung der Phospholipide beschäftigen.

Die Methoden (Tabelle II) lassen sich allerdings nicht auf die Trennung des natürlichen Sojalecithins übertragen. Die Schwierigkeit liegt nämlich darin, dass im Sojalecithin nicht nur Phospholipide sondern auch Glyko- und Neutrallipide vorliegen, welche wegen der Vielzahl der Verbindungen die Trennungen erschweren. Mit Hilfe einer von uns entwickelten neuen mobilen Phase konnten wir schliesslich die gewünschte Trennung erreichen.

* Teil der Dissertation von Alice Nasner, Universität Hamburg, Fachbereich Biologie.

TABELLE II

TRENnung DER PHOSPHOLIPIDE MIT HILFE DER HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHIE (HPLC)

<i>Ausgangsmaterial</i>	<i>Mobile Phase</i>	<i>Stationäre Phase</i>	<i>Lit.</i>
Blut, tierisches Gewebe, Frucht-wasser	Acetonitril-Methanol-Wasser	Micropak Si-10	7
Synthet. Phospholipide	Chloroform-Methanol-Wasser	μ Bondapak-NH ₂	8
Blut, synthet. Phospholipide, tierisches Gewebe	<i>n</i> -Hexan-Iso-propanol-Wasser	LiChrosorb Si 60 Spherisorb S 10W	9
Tierisches Gewebe, synthet. Phospholipide	Acetonitril-Methanol-Wasser	Whatman PXS 10/25 SCX	10
Tierisches Gewebe	Dichlormethan-Methanol-15 M NH ₃	Micropak Si-10	11
Blut, tierisches Gewebe	Dioxan- <i>n</i> -Hexan Methanol- <i>n</i> -Hexan Essigsäure- <i>n</i> -Hexan	Zipax	12
Eilecithin	Acetonitril-Methanol-Wasser Chloroform-Methanol-Wasser	Micropak Si-10 Kieselgel	13

MATERIAL UND METHODE

Für die Trennung von polaren Phospholipiden (PE, PI, PA, PC) im Sojalecithin auf Si 60 haben sich zwei mobile Phasen bewährt:

- (1) Mobile Phase bestehend aus einem Gemisch von *n*-Hexan-Isopropanol-Acetatpuffer (pH 5.8) (8:8:1). Die Trennung ist in Fig. 1 abgebildet.
- (2) Mobile Phase bestehend aus einem Gemisch von *n*-Hexan-Isopropanol-0.2 M Essigsäure (8:8:1). Die Trennung ist in Fig. 2 abgebildet.

Analysenbedingungen

	<i>Methode 1</i>	<i>Methode 2</i>
Mobile Phase	<i>n</i> -Hexan-Isopropanol-Acetatpuffer (pH 5.8) (8:8:1)	<i>n</i> -Hexan-Isopropanol-0.2 M Essigsäure (8:8:1)
Stationäre Phase		LiChrosorb Si 60, 10 μ m Länge: 25 cm Durchmesser: 4 mm
Flussgradient	von 0.3 ml/min auf 2.3 ml/min in 15 min erhöhen	von 0.5 ml/min auf 3 ml/min in 10 min erhöhen
Probenaufgabe		Perkin-Elmer Autosampler 420
Probenschleife		10 μ l
Flüssigkeits-Chromatograph		Perkin-Elmer Serie 3
Detektor		Perkin-Elmer LC 65 T, $\lambda = 206$ nm

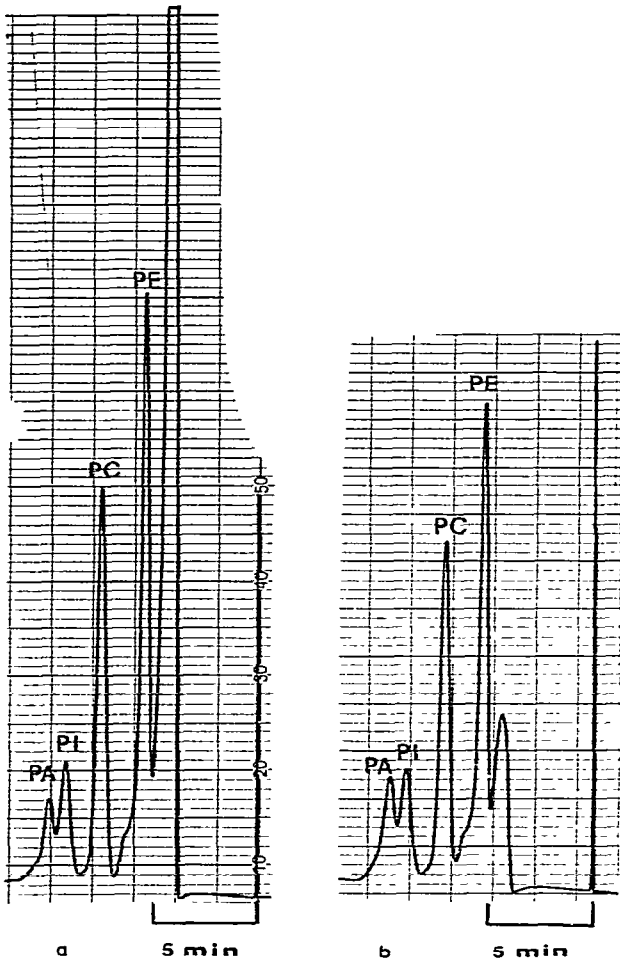


Fig. 1. a, HPLC-Trennung von Sojarahlecithin; b, HPLC-Trennung von entöltem Sojalecithin. Chromatographische Bedingungen: Säule, LiChrosorb Si 60, 10 μm ; mobile Phase, *n*-Hexan-Isopropanol-Acetatpuffer (pH 5.8) (8:8:1); Flussgradient, innerhalb von 15 min von 0.3 ml/min auf 2.3 ml/min erhöhen; Detektion, UV, 206 nm. PE = Phosphatidylethanolamin; PC = Phosphatidylcholin; PI = Phosphatidylinosit; PA = Phosphatidsäure.

Vergleichssubstanzen

PE, PI, PA und PC wurden von der Firma Lepharm (Köln, B.R.D.) bezogen.

Probenvorbereitung

50–250 mg des Sojalecithins werden in 10 ml *n*-Hexan-Isopropanol-Wasser (8:8:1) aufgelöst. Die Menge des einzuwiegenden Lecithins richtet sich nach der zu erwartenden Menge der polaren Phospholipide. Probenmenge: 10- μl Schleife.

Regeneration der Säule

Um eine längere Lebensdauer der stationären Phase zu erreichen, ist die Säule am Ende eines jeden Tages zu regenerieren:

(1) Mobile Phase mit Acetatpuffer: 30 min Spülen mit *n*-Hexan–Isopropanol–Wasser (8:8:1); Strömungsgeschwindigkeit 3 ml/min.

(2) Mobile Phase mit 0.2 *M* Essigsäure: 10 min Spülen mit *n*-Hexan–Isopropanol–Wasser (8:8:1) unter Zugabe von 1 ml Ammoniak, 25%ig, auf 200 ml mobiler Phase; Strömungsgeschwindigkeit 3 ml/min; anschliessend 30 min mit *n*-Hexan–Isopropanol–Wasser (8:8:1) spülen; Strömungsgeschwindigkeit 3 ml/min.

DISKUSSION

Die Trennung der wichtigsten polaren Bestandteile des Sojalecithins ist mit Hilfe einer gepufferten mobilen Phase (Methode 1) oder mit Hilfe einer sauren mobilen Phase (Methode 2) auf ein und derselben stationären Phase (Kieselgel Si 60) gelungen. Somit stehen zwei einfache Methoden zur Auswahl, welche die DC-Methoden ablösen könnten. Der Vergleich der HPLC-Trennung von entöltem Sojalecithin im

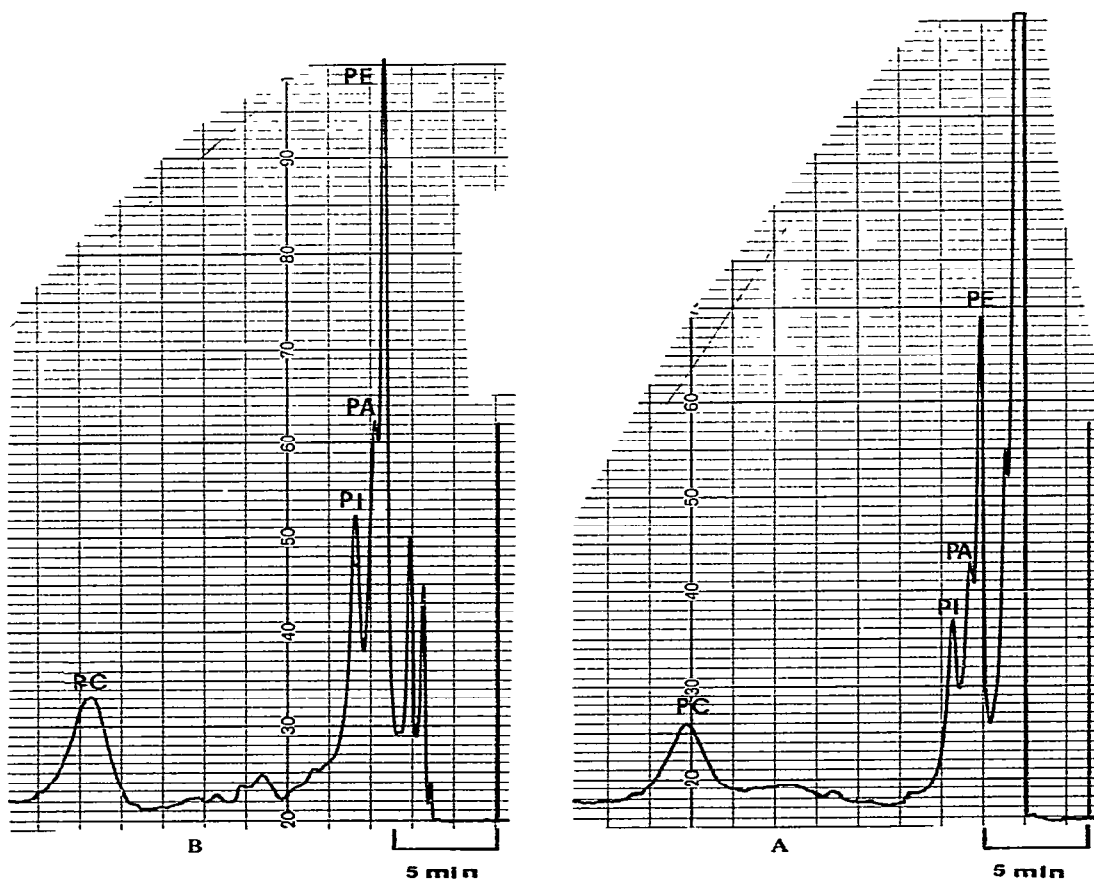


Fig. 2. A, HPLC-Trennung von Sojarohlecithin; B, HPLC-Trennung von entöltem Sojalecithin. Chromatographische Bedingungen: Säule, LiChrosorb Si 60, 10 μ m; mobile Phase, *n*-Hexan–Isopropanol–0.2 *M* Essigsäure (8:8:1); Flussgradient, innerhalb von 10 min von 0.5 ml/min auf 3 ml/min erhöhen; Detektion, UV, 206 nm. PE = Phosphatidylethanolamin; PI = Phosphatidylinosit; PA = Phosphatidsäure; PC = Phosphatidylcholin.

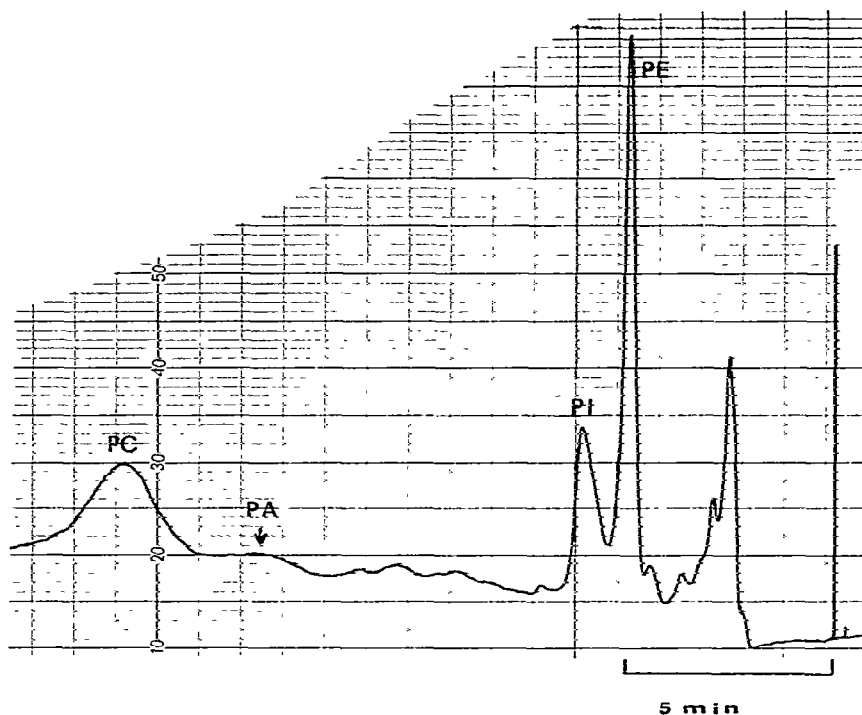


Fig. 3. HPLC-Trennung vom entölten Sojalecithin. Chromatographische Bedingungen: Säule, LiChrosorb Si 60, 10 μm ; mobile Phase, *n*-Hexan-Isopropanol-Wasser (8:8:1); Strömungsgeschwindigkeit, 1 ml/min auf 5 ml/min in 10 min erhöhen; Detektion, UV, 206 nm. PE = Phosphatidylethanolamin; PI = Phosphatidylinosit; PA = Phosphatidsäure; PC = Phosphatidylcholin.

n-Hexan-Isopropanol-Wasser (8:8:1) (Fig. 3) mit den beiden hier vorgestellten Methoden zeigt, dass durch das Verändern des pH-Wertes der mobilen Phase eine verbesserte Trennung der polaren Phospholipide erzielt wird. Bei der Anwendung der gepufferten Phase (Fig. 1) wird die Reihenfolge der polaren Phospholipide verändert und es resultiert auch eine kurze Analysenzeit (ca. 12 min). Die Benutzung der mit 0.2 *M* Essigsäure versetzten mobilen Phase (Fig. 2) verschafft einen schnellen Überblick über PE, PA und PI. Allerdings wird das PC dabei erst nach etwa der dreifachen Analysenzeit herauseluiert.

Die quantitative Bestimmung ist Gegenstand der 3. Mitteilung¹⁴.

DANK

Der Firma Lucas Meyer, Hamburg, B.R.D., wird für die Bereitstellung der Geräte und die Unterstützung gedankt.

LITERATUR

- 1 A. Nasner und Lj. Kraus, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 83 (1981) 70.
- 2 H. Wagner, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 63 (1961) 1119.

- 3 S. R. Eder, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 74 (1972) 519.
- 4 G. W. Chapman, Jr., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 57 (1980) 299.
- 5 G. Heidemann und D. Lekim, *J. Chromatogr.*, 128 (1976) 235.
- 6 W. L. Erdahl, A. Stolyhwo und O. S. Privett, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 50 (1973) 513.
- 7 F. B. Jungalwala, J. E. Evans and R. H. McCluer, *Biochem. J.*, 155 (1976) 55.
- 8 K. Kiuchi, T. Ohta und H. Ebine, *J. Chromatogr.*, 133 (1977) 226.
- 9 W. M. A Hax und W. S. M. Geurts van Kessel, *J. Chromatogr.*, 142 (1977) 735.
- 10 R. W. Gross und B. E. Sobel, *J. Chromatogr.*, 197 (1980) 79.
- 11 F. B. Jungalwala, R. J. Turel, J. E. Evans und R. H. McCluer, *Biochem. J.*, 145 (1975) 517.
- 12 R. H. McCluer und F. B. Jungalwala, *Chromatogr. Sci.*, 10 (1979) 7.
- 13 K. M. Patel und J. T. Sparrow, *J. Chromatogr.*, 150 (1978) 542.
- 14 A. Nasner und Lj. Kraus, im Druck.