B 5043

A tojáshéj lipoidjainak vizsgálata

Doktori értekezés

Készitette
Csanálosiné Németh Márta
okleveles vegyész

SZTE Egyetemi Könyvtár
SZEGED
14

Készült
a Szegedi Orvostudományi Egyetem Orvosi Vegytan
Intézetében
1970/71-ben

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14
B 5045

ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM KÖNYVTÁRA Szeged
E 1. 118

Ezuton mondok őszinte köszönetet dr.Krámli András Professzor Urnak,azért,hogy figyelmemet a témára irányitotta,és kidolgozására lehetőséget adott intézetében.Köszönöm,hogy munkámat mindvégig figyelemmel kisérte és támogatta.

Hálámat és köszönetemet fejezem ki dr.Pettkó Emma adjunktusnak a lipoid vizsgálatokban szerzett tapasztalatainak átadásáért,hasznos tanácsaiért,valamint a gázkromatográfiás vizsgálatban nyujtott értékes segitségéért.

Melegen köszönöm Gulyás Győző mezőgazdasági mérnöknek,hogy számomra a baromfikisérletet a szőregi Egyetértés MgTSz-ben lehetővé tette,és minden segitséget megadott zavartalan lebonyolitásához. E kisérlettel kapcsolatos röntgen felvételeket dr.Posgay Kázmér tanársegéd készitette,kifogástalanul,amiért ezuton is köszönetet mondok.

Végül külön köszönetem illeti meg mindazokat,akik készséges munkájukkal segitettek: Dósai Molnár Évát,a vizsgálatok során végzett gondos munkájáért;Nógrádi Imrét, a fényképek szakszerü elkészitéséért;Jancsó Pált, az előkészitésben kifejtett szorgalmas,kitartó munkájáért; Fehér Ferencet és feleségét,a kisérleti állatok lelkiismeretes gondozásáért.

Tartalomjegyzék

Bevezetés 5

I.Minőségi vizsgálatok

1.Elővizsgálatok.A D vitamin kérdése.Lipoidoldékony kalcium kimutatása. 7

2.Zsirsavak a tojáshéjban kalciumsó és gliceridek formájában. 21

3.Koleszterin és koleszterinészter kimutatása. 22

4.A zsirsavak azonositása gázkromatográfiás módszerrel. 29

5.7-oxikoleszterin megjelenése a tojáshéjban állás közben. 32

II.Mennyiségi vizsgálatok

Alkalmazott módszerek és mérési eredmények. 34

III.Előkészitő baromfikisérlet 39

IV.Kisérleti rész

1.A vizsgálat anyagai.Előkészités és extrakció. 57

2.Hidrolizis,a hidrolizátum feldolgozása.Észterszám meghatározása. 58

3.A rétegkromatográfia gyakorlata:vékonyréteg készitése,futtatószerek,előhivószerek. 60

4.Oszlopkromatografálás. 62

5.Szinreakciók. 63

6.Lipoidoldékony kalcium kimutatása és mennyiségi meghatározása. 65

7.Zsirsav-metilészter készitése és gázkromatografálása 68

8.Koleszterin és koleszterinészter mennyiségi meghatározása. 69
9.A glicerin meghatározása. 71
Összefoglalás 74
Irodalom 76

Bevezetés

A tojáshéjat tapasztalati alapon régóta alkalmazzák a népi gyógyászatban csontbetegségek,törések kezelésére, csonterősitésre és állati takarmányok mészpótlására.De előfordul az orvosi gyakorlatban is:a háborut követő években a csontosodással kapcsolatban tapasztalt általánosan jó hatásáról adtak hirt /1,2/.Még manapság is van rá példa,hogy az orvos - rendszerint csipőficamos gyermekek esetén - a combcsont fejecs csontosodásának elősegitésére,a D-vitamin kezelés mellett,tojáshéj fogyasztását ajánlja.

Orvosló hatásának tisztázására Krompecher I.1952-ben kezdte meg vizsgálatait,és nagyszámu állatkisérlettel,valamint saját orvosi praxisa során szerzett adatokkal és tényekkel bizonyitotta a tojáshéj kedvező hatását - orálisan adagolva - csontregenerációs folyamatokban,és ezzel összefüggésben a vörösvérsejt képződésben,ami következményesen a szervezet általános állapotában is megnyilvánult.A tojáshéj terápiával kapcsolatos tapasztalatait 1958-ban foglalta össze/3/.Munkatársai azóta további figyelemre méltó klinikai eredményről számoltak be sterilizált tojáshéjpor helyi alkalmazásával kapcsolatban.Jóindulatu csontdaganatok eltávolitása után visszamaradt, valamint tbc-s eredetü csontüregeket tojáshéj és gipsz keverékével töltöttek ki,és a gyógyulás a szokásos csontbeültetéshez képest kedvezőnek volt mondható /4,5/.

A tojáshéj kémiai vizsgálatával az 1930-as évektől kezdő-

dően sok szerző foglalkozott.Képződése,fizikai és szerkezeti jellemzői elég jól tisztázottak /6-15/.Szervetlen alkotórészeit a mintegy 94%-ot kitevő $CaCO_3$-on kívül foszfor,magnézium,valamint fluor,kadmium,kobalt és számos más nyomelem alkotja /16-18/.Szerves anyagai is változatosak:aminosavakat,fehérjét,aminocukrokat/19-21/, mukopoliszaharidokat /6,7,22/,pirrol színezékeket /23-24/,citromsavat /25-26/ és enzimeket /27,3/ tartalmaz; összesen 4% körüli mennyiségben /28/.

A fentiekből látható,hogy az eddigi vizsgálatok még nem terjedtek ki a lipoidokra,amelyeknek pedig szerep juthat a tojáshéj csontképződést serkentő erőteljes hatásában,és ezzel együtt a vérképzésben.A lipoidok külön figyelmet érdemelnek még azért is,mert említés található az irodalomban arról,hogy a tojáshéj lipoidokban oldódó kalciumot tartalmaz a szervetlen kalciumsókon kívül,ami a felszívódás szempontjából jelentős lehet /29/.Az idézett közlemény utal arra is,hogy a tojáshéj lipoid kivonatának UV spektruma alapján D-vitamin jelenlétére lehetett következtetni.Ezt látszottak később megerősíteni az intézetünkben folytatott rétegkromatográfiás vizsgálatok /3o/.Bár az alaposan kidolgozott és jól felhasználható módszerrel sikerült később ugyanazokat a kromatogramokat reprodukálnunk,az időközben beszerzett kontroll anyagokkal összehasonlítva fény derült arra,hogy az említett pályamunka következtetései -alkalmatlan kontroll anyagokra visszavezethetően - téves értékelésen alapultak.

A későbbiekben sem sikerült egyértelműen bizonyítanunk

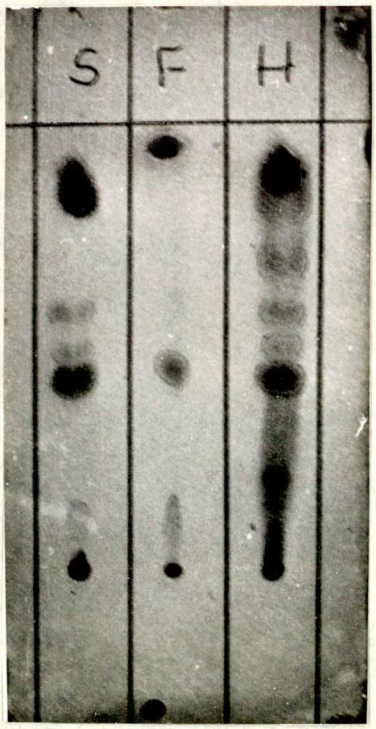
a D-vitamin jelenlétét,amit nem erősitett meg a spektroszkópiás mérés sem.De nem is a D-vitamin jelenlétének tisztázása indokolta az alaposabb vizsgálatokat, a tojáshéjjal folytatott kisérletek észleleteiből és nem dokumentált orvosi esetekből ugyanis arra lehet következtetni,hogy a tojáshéj hatásakor többről van szó, mint egyszerü vitaminhatásról,vagy a nyomelemek szerepéről. Valamilyen más faktorhoz kötődő hatásról,amelyet a kisérő anyagok feltehetően nagymértékben elősegitenek, vagy egy olyan faktor jelenlétéről,amely a D-vitamin hatását messzemenően elősegiti.Csirkékkel folytatott előkészitő állatkisérletünk is alátámasztotta ezt a gondolatot /III/. Nyitott tehát a tojáshéj antirachitikus faktorának kérdése,s ennek keresésével kapcsolatban terelődött figyelmünk a tojáshéj lipoidjaira.Indokolta ezt az a meglepő tény is,hogy a tojás sárgája,fehérje és héj lipoid-összetétele a felvett összehasonlitó rétegkromatogram alapján nem azonos /1.a,b.ábra/.

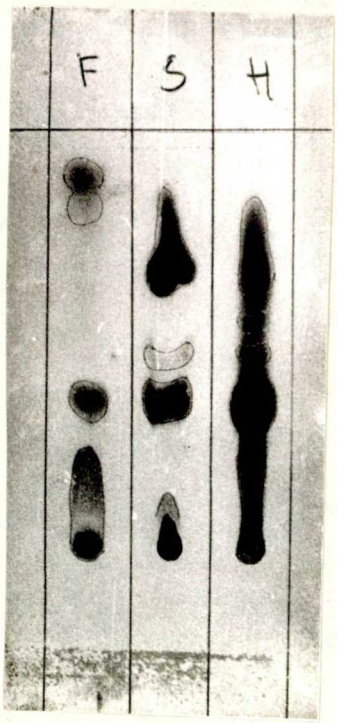
I.Minőségi vizsgálatok

I.1.Elővizsgálatok

A lipoidok kinyerése kényes feladat,és kellő körültekintést kiván.Annak eldöntésére,hogy melyik oldószer a legalkalmasabb a tojáshéj lipoidjainak a kinyerésére,extrakciós próbát végeztünk,és minden extraktumból rétegkromatogramot készitettünk /2,3.ábra/.A kromatogram előhivására alkoholos foszformolibdénsavat használtunk,amely a li-

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14



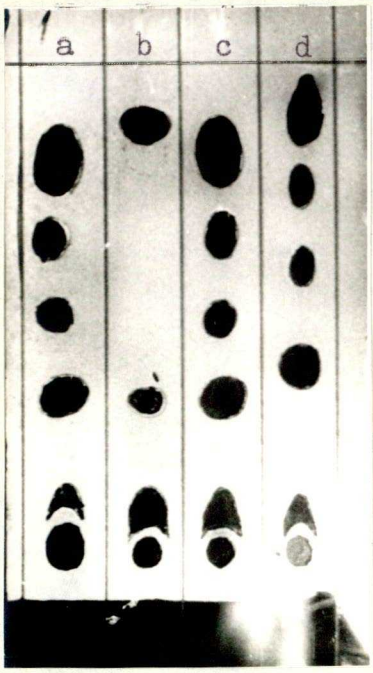


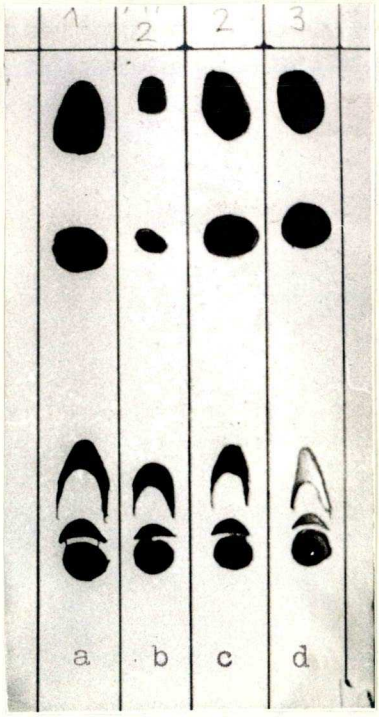
1.a.ábra 1.b.ábra

Kloroform-metanollal /2:1/ extrahált lipoidok kromatogramja:
S:tojássárga lipoid
F:tojásfehérje lipoid
H:tojáshéj lipoid
Futtatás:ciklohexán-éterben /1:1/,szilikagél vékonyrétegen
Előhívás:5%-os alkoholos foszformolibdénsavval 7o C°-on

poidokkal kékesfekete foltot ad,sárgászöld háttérben, így fényképezésre is alkalmas /31/.

A kinyert lipoid mennyisége akkor volt a legnagyobb, mintegy 2o mg%,ha a szokásos kloroform-metanol eleggyel extraháltunk,az így kezelt őrlemányből azonban petroléter-metanol elegye még további anyagmennyiséget oldott ki,amely a kromatogram szerint már csak az egyik komponenst tartalmazta,míg a többi nyomokban fordult elő benne /4,5.ábra/.





2.ábra 3.ábra

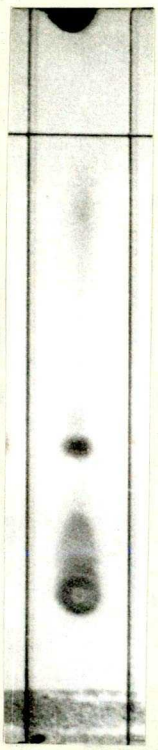
Tojáshéj lipoid extrahálása különféle oldószerekkel:
a:kloroform-metanol /2:1/
b:a-t követően petroléter /80°/ - metanol /3:5/
c:aceton
d:széntetraklorid
Futtató:2.ábra:ciklohexán-éter /1:1/
3.ábra:kloroform-aceton /4:1/

Az így kinyerhető összes lipoid mennyisége 25 mg% alatt maradt.Tekintettel e kis értékre,a minőségi vizsgálatok nagy részét rétegkromatográfiásan oldottuk meg.

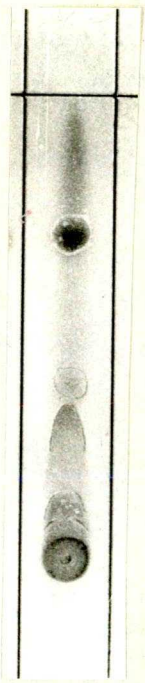
A tojáshéj lipoid halványsárga olajos anyag,amely lehűtve megdermed és grizes állományuvá válik.Állás közben szine erősödik,ami különösen kloroformos oldatban jelentkezik kifejezetten.A lipoid vizzel nem emulgeálható, UV fényben intenziv kék szinnel fluoreszkál.Bepárlás közben az edény falára tapadva egy rosszul oldódó frakció különül el belőle,amely azonban oldószer adagolásra ujból

feloldódik,s különösen jól oldódik a már említett petroléter-metanol elegyben.Kromatografálva a startból induló,elhuzódó folttal azonositható.A tojáshéj lipoidot alkoholok /metil-,etil-,benzilalkohol/ csak részben oldják,aceton kevésbé jól,kloroform,széntetraklorid jól oldják.Szilikagél vékonyrétegen kromatografálva az egyenletes folteloszlást adó ciklohexán-éter elegyében, 2o percig 11o°-on aktivált lapon,15 cm-es fronttávolságnál a következő foltokat szolgáltatja:

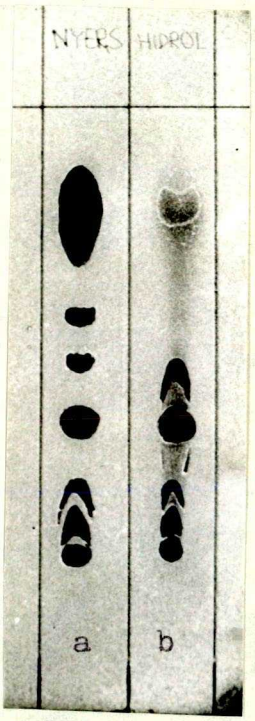
	R_f
I.	o,78
II.	o,61
III.	o,49
IV.	o,43
V.	o,37
VI.	bizonytalan /startpontból induló,elhuzódó/
F	o,68 /csak UV-ben látható,fluoreszkáló folt/



4.ábra



5.ábra



6.ábra

a:hidrolizis előtt
b:hidrolizis után

Tájékozódás céljából a fenti módon nyert kromatogramot különböző előhívószerekkel kezeltük: $SbCl_5$, foszforsav, Dragendorff reagens, foszforwolframsav, vanillin /31/, $SbCl_3$ /32/, kadmiumkloridos ninhidrin /33/, perklórsavas ammónium-molibdát /34/. A ninhidrin és Dragendorff próba negatív volt. Nappali fényben való értékelésre legalkal legalkalmasabbnak az előzőkben már említett foszformolibdénsavas előhívás mutatkozott, bár az UV-ben fluoreszkáló F jelzésű foltot nem tette láthatóvá /29.ábra/. Igaz, ez más előhívószereknek is ellenállt, csak tömény kénsavas kezelés és melegítés hatására jelent meg elszenesedett halvány barna foltként.

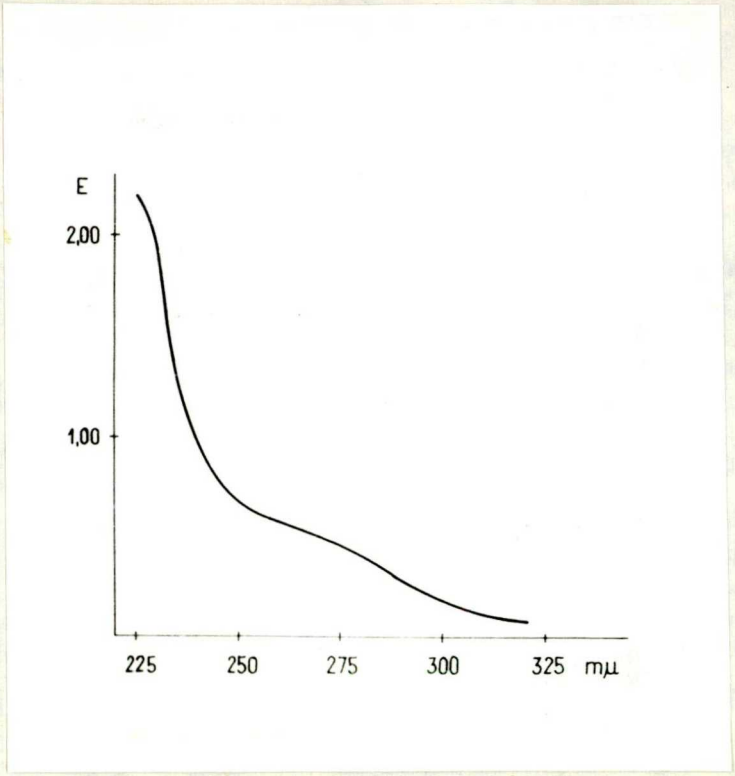
Elvégeztünk néhány színreakciót is:

A Liebermann-Burchard reakció lejátszódott, intenzív zöld színeződéssel, a koleszterinnél világosabb színárnyalatban.

Foszforsav és aceton jelenlétében furfurollal az epesavakra jellemző ibolyásvörös színeződést /35/ nem észleltük. Ugyancsak negatív volt a közismert Pettenkoffer-féle epesav próba is.

A lugos kezelés hatására bekövetkező változást kromatográfiásan figyeltük meg /6.ábra/. A lugos hidrolizátumból molibdénkék reakcióval /36/ foszfát iont kimutatni nem tudtunk, még akkor sem, ha a tojáshéjat előzetesen EDTA-val mésztelenítettük /37/.

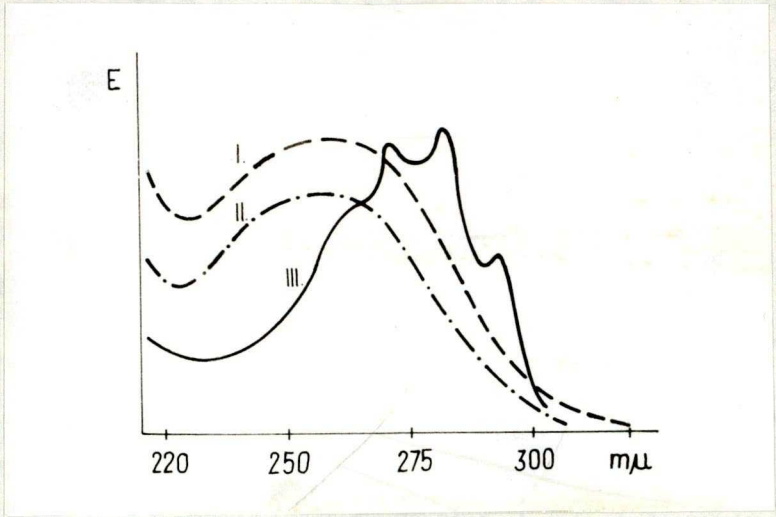
A tojáshéj extraktum hig metanolos oldatának UV spektruma 22o-37o mμ között maximum nélkül lefutó görbét szolgáltatott /7.ábra/. /Ugyanilyen jellegű volt a később felvett koleszterin standardé /28.ábra/. Egy ábrára vetitet-



7.ábra
Tojáshéj extraktum UV spektruma

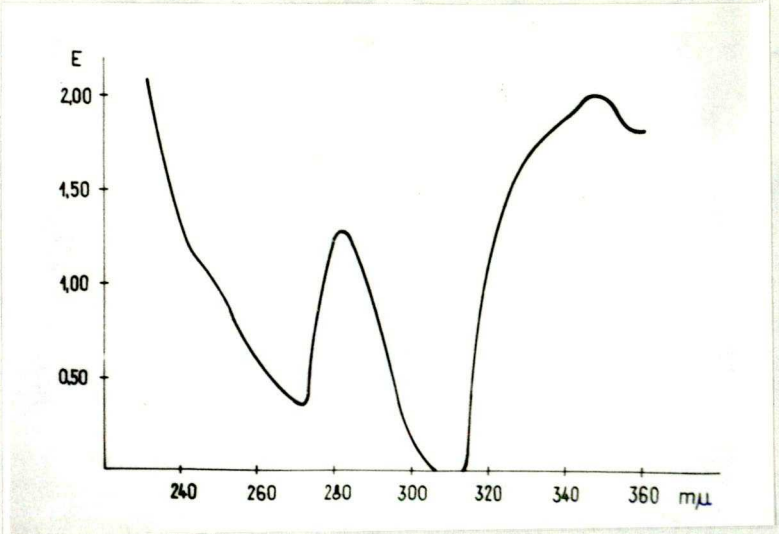
tük a D_2,D_3 és ergoszterin metanolos oldatának UV spektrumát /8.ábra/.A 9.ábrán látható a 7-dehidrokoleszterin UV spektruma./

Maximumot találtunk a vékonyrétegről elkülönitett fluoreszkáló anyagunk UV spektrumában,szintén metanolos oldatban,25o mμ-nál /1o.ábra/.Kisebb maximum található még 235,275 és 285 mμ-nál.A görbe lefutó ágán látható három kis hullám a többszörösen tisztitott frakciónál is jelentkezett./Az ábrán 1o-szeres nagyitással is feltüntettük./Ezt az anyagot a tojáshéj rendkivül kis mennyiségben tartalmazza:4 kg-ból csupán 1ooγ alatti mennyiséget sikerült tisztán izolálnunk.Kellemes illatu szintelen olaj,ampullába forrasztva,benzilalkoholos oldatban 11o°-on 15 perc alatt nem bomlik el,de a tojáshéj keltetése fo-



8.ábra

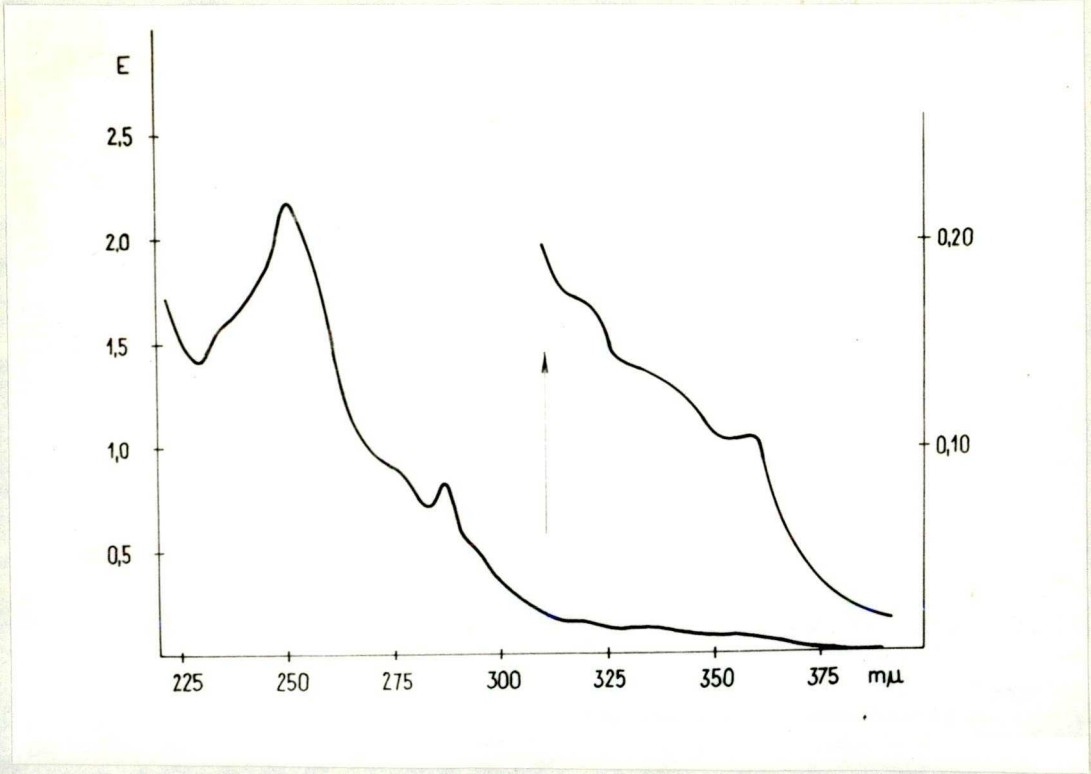
Standard anyagok UV spektruma:
I. D_3 vitamin
II. D_2 vitamin
III. 8-β-poszterin



9.ábra

7-dehidrokoleszterin UV spektruma

lyamán sem,ugyanis a már kikeltetett tojás héjában is kimutatható.Tömény kénsav melegitve elszenesiti. Lugos hidroliziskor nem bomlik el,csak tömény lug hasitja,UV-ben szintén fluoreszkáló termék keletkezése közben, amely azonban kromatografáláskor a startpontban marad,a ciklohexán-éterben o,68,széntetrakloridban o,5o R_f értékü /29.ábra/ kiindulási anyaggal szemben.Azonositásával a későbbiek folyamán sem jutottunk előbbre,csupán a fenti elővizsgálat adatai vannak kezünkben.
Felmerült bennünk az a gyanu,hogy "megfoghatatlan" anyagunk nem müvi termék-e;esetleg valamelyik oldószerrel



lo.ábra

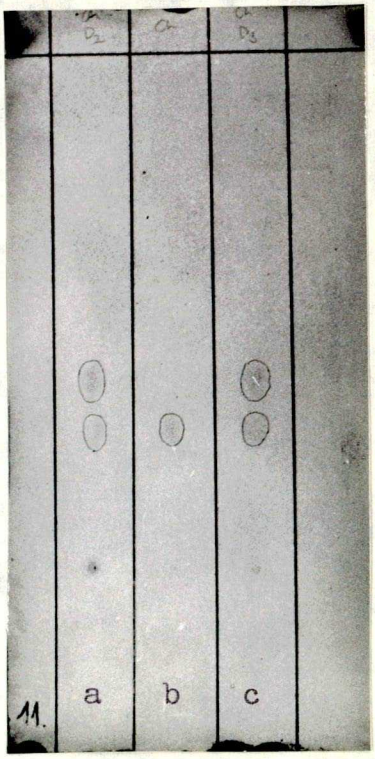
Tojáshéj lipoidból elkülönitett,UV-ben fluoreszkáló anyag spektruma.

visszük be az extraktumba,vagy -eleinte csak nagyüzemi tojáshéjjal dolgozván - nem a tojótáp egy komponense vagy adalékanyaga kerül-e át a héjba.E feltételezéseket azonban kizárta az,hogy az oldószerek egész sorát kipróválva /aceton,széntetraklorid,petroléter,éter,etilacetát,etanol/ az ismeretlen anyag mindig megjelent az extraktumban,és a háztáji tojások héjában is kimutattuk.A tápból való származását valószinütlenné teszi az,hogy sem a tojás sárgájában,sem a fehérjében nem fordul elő,és a táp sem tartalmazza.

A D-vitamin kérdése:

Vizsgálataink kezdetben a D vitamin kimutatására,kromatográfiás viselkedésére irányultak.Ciklohexán-éterben a D vitaminok és provitaminjaik jól futnak /38/,s minthogy a tojáshéj lipoid koleszterint is tartalmaz /14,17,2o.ábra/,fontos,hogy a koleszterintől elkülönülnek /11.ábra/.Alkoholos foszformolibdénsavval gyorsan, a koleszterint jóval megelőzve ,már hidegen is előjönnek,kékesfekete foltot adva,mig a koleszterin foltja kezdetben ibolyaszinü,és csak később feketedik meg.Még jobban elvándorolnak a D vitaminok a koleszterintől aktivált aluminiumoxid lapon,ciklohexán-kloroformban futtatva /12.ábra/.A szinárnyalatbeli különbség itt is fellép /a D vitamin friss foltja sötétkék,a később elötünő koleszterinné világosbarna a reagens hatására/,de a kromatogram tompább,a foltok elmosódottabbak.Látható, hogy a D_2 és D_3 R_f értéke mindkét futtatásban azonos/11,12. ábra/.Benzolban,majd kloroformban futtatva /3o/ szintén

11.ábra



12.ábra

a:koleszterin + D_2
b:koleszterin
c:koleszterin + D_3

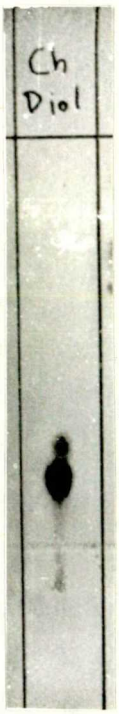
Futtatás:
ciklohexán-éterben /1:1/,
szilikagél vékonyrétegen

Futtatás:
ciklohexán-kloroformban /1:1/,aluminiumoxid vékonyrétegen

azonos magasságban jelennek meg,kevéssel a koleszterin felett.Érdekes az is,hogy az ösztradiol ciklohexán-éterben a D vitaminnal analóg fut,aluminiumoxid lapon azonban a startban marad /13,14.ábra/.

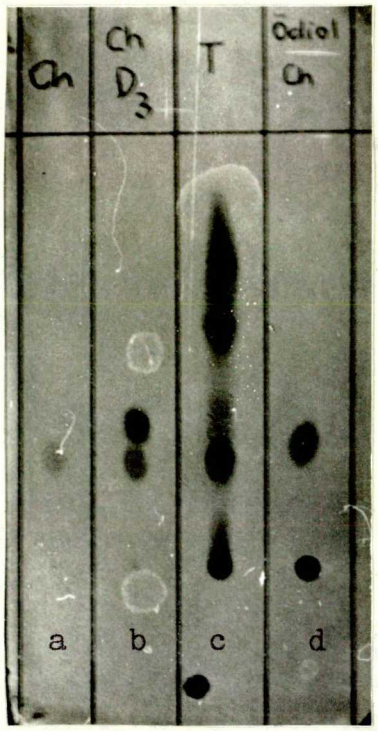
A mennyiségi összehasonlítások szerint 50γ koleszterin mellett 0,5γ D vitamin vékonyrétegen még kimutatható /15.a,b. ábra/.Az UV spektrumban is megjelenik a D vitamin maximuma ugyancsak 100-szoros mennyiségü koleszterin jelenlétében /16.ábra/.De feltehetően még ennél nagyobb mennyiségü koleszterin sem zavarja a D vitamin spektroszkópiás kimutatását.A természetes vitamin forrásokban azonban /tej,

máj/ a koleszterinhez képest ennél sokkal kisebb mennyiségben fordul elő a D vitamin. A bennünket közelebbről érdeklő tojássárgában pl. hozzávetőlegesen o,2 g koleszterin mellett 4o-15o NE, azaz 1-4 γ D vitamin található /39,4o/, így nem is várható, hogy közvetlenül akár akár vékonyrétegen, akár színreakcióval vagy spektrometriásan kimutatható legyen a koleszterin igen nagy feleslege miatt.



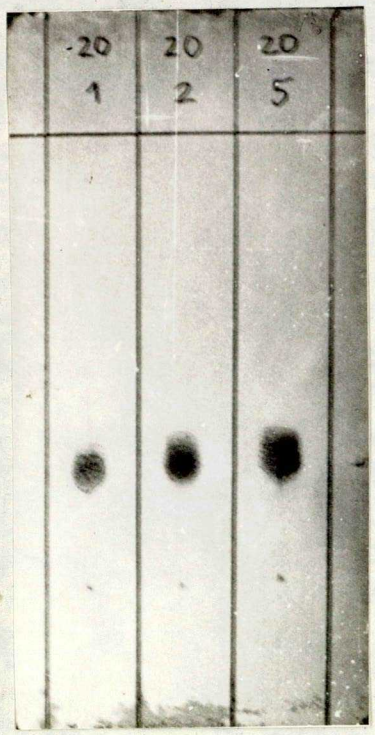
13.ábra

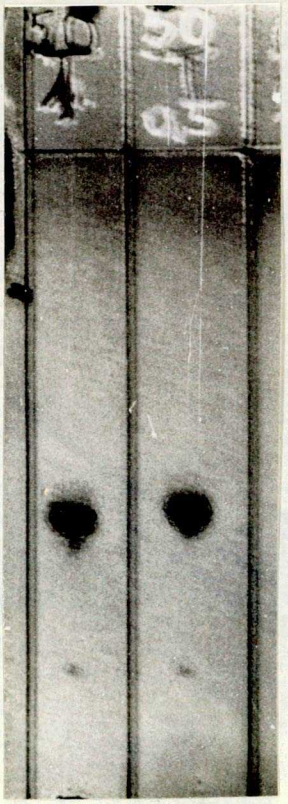
Koleszterin + ösztradiol ciklohexán-éterben /1:1/, szilikagél lapon futtatva



14.ábra

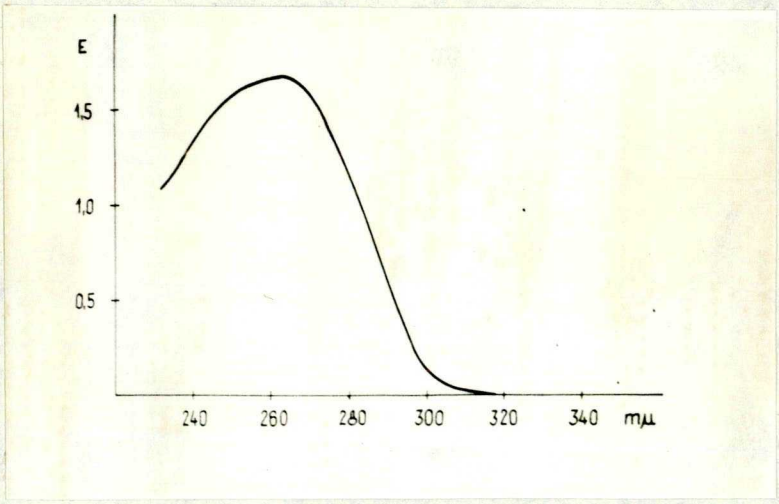
a: koleszterin
b: koleszterin + D_3
c: tojáshéj lipoid
d: koleszterin + ösztradiol ciklohexán-kloroformban /1:1/, aluminiumoxid lapon futtatva





15.a.ábra 15.b.ábra

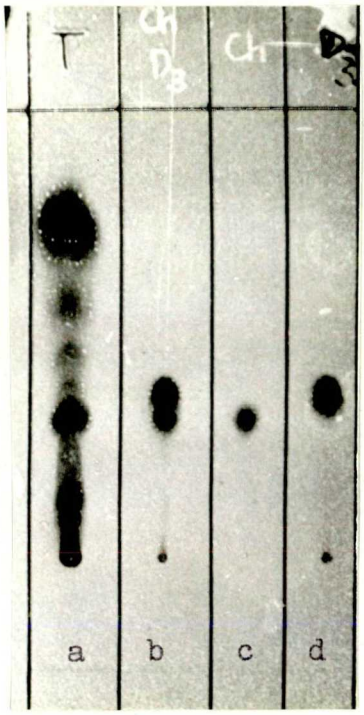
Kromatogram mennyiségi becsléshez
a: 20 γ koleszterin mellett 1,2 és 5 γ D_3
b: 50 γ koleszterin mellett 1 és 0,5 γ D_3



16.ábra

A D_3 vitamin 100-szoros mennyiségü koleszterin jelenlétében zavartalanul kimutatható spektrometriásan.

A tojássárga és a héj lipoid tartalmaz egy olyan frakciót,amely vékonyrétegen a D vitaminhoz nagyon hasonlóan viselkedik,közel azonos R_f értékkel fut /14,17.ábra/,de az nem D vitamin:előhíváskor ugyanis sokkal lomhábban reagál,és barnásszürke szinnel jelenik meg,míg a D vitamin frissen előhívott foltja kékesfekete . Az említett fizikokémiai sajátság feltűnő hasonlósága azt sugallja,hogy talán ez a frakció a D vitamin vivőanyaga,esetleg más szerepet is betölt vele kapcsolatban.Található olyan futtató rendszer,amelyben az említett hasonlóság nem érvényesül: benzolban majd kloroformban futtatva a tojáshéj lipoidnak a koleszterin felett,a D vitamin helyén,de még a közelében sem jelenik meg foltja /23.ábra/.



17.ábra

a:tojáshéj lipoid
b:koleszterin + D_3
c:koleszterin
d:D_3 vitamin
Futtató:ciklohexán-éter /1:1/

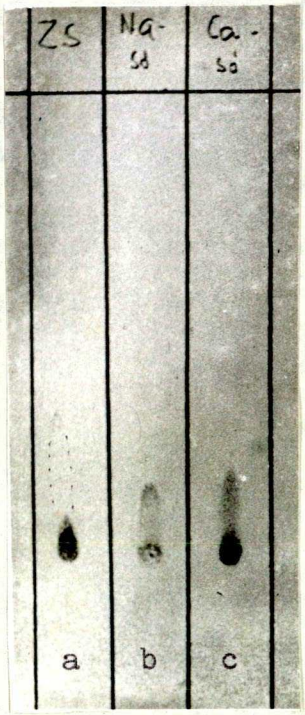
Az eddigiek alapján a D vitamin jelenlétét a tojáshéjban teljesen nem zárhatjuk ki,de annyit mondhatunk,hogy ha a tojáshéj tartalmaz is D vitamint, az egy héjra vonatkoztatva biztosan kevesebb,mint o,25γ, azaz 1o NE.A terápia szempontjából ez jelentéktelen, hiszen az ajánlott személyenként heti fél-egy tojáshéj által bevitt mennyiség a terápiásnak csak a töredéke./A továbbiakban meg lehetne kisérelni az UV-ben aktiv ismeretlen anyag eltávolitása,valamint a koleszterin digitoninos kicsapása után felveendő spektrum alapján megnyugtatóan tisztázni a D vitamin kérdést./
A provitaminok:az ergoszterin és a 7-dehidrokoleszterin sem mutathatók ki a tojáshéjban,jellegzetes fluoreszcenciájuk /sötétibolya ill.intenziv sárgászöld/, abszorpciós maximumuk ,valamint vékonyrétegen R_f értékük alapján könnyen azonosithatóak lettek volna.Említésre érdemes az,hogy a 7-dehidrokoleszterin vékonyrétegen alkoholos foszformolibdénsavval csak nagyon gyengén reagál,kis mennyiségben észre sem vehetően;ezzel és intenziv fluoreszcenciájával a mi nem azonositott anyagunkra emlékeztet.
A többi zsiroldékony vitamin /A,E és K vitamin,valamint karotin/ jelenlétét is kizártuk a lipoidban.
A tojáshéj extraktumból savas kezelést követően,ionreakcióval,oxalát formájában kalciumot mutattunk ki. 1oo g héjból kiindulva a jellemző,kristályos csapadék jól észlelhető mennyiségben vált le,és oldékonysági sajátságai is megfeleltek a kalciumoxalátnak.

I.2.Zsirsavak a tojáshéjban kalciumsó és gliceridek formájában

A rétegkromatogramok értékelésekor elsőként a startból induló,elhuzódó foltokat azonositottuk/VI.folt,1-5,14, 17.ábra./Ez a kromatográfiás viselkedés kezeletlen /ezüstnitrátos impregnálás nélküli/ vékonyrétegen a zsirsavakra ill. sóikra jellemző /18.ábra/.Minthogy a tojáshéj lipoid szabad zsirsavat nem tartalmaz - éteralkoholos oldata hidegen kálilugot nem fogyaszt - és az alkáliszappanok jelenlétében mutatkozó tenzid hatást sem mutatja,kézenfekvőnek látszik,hogy a lipoidban oldódó kalciumot zsirsavas sók formájában tartalmazza.Valóban,e foltoknak megfelelő,s rossz oldékonysága miatt elkülönithető frakcióból ki tudtuk mutatni mind a kalciumot,mind a zsirsavakat,amelyeket később gázkromatográfiásan azonositottunk /34.ábra/.Modellkisérlettel megállapitottuk,hogy a kalciumszappan,tapasztalatunkkal egyezően,meglehetősen rosszul oldódó anyag,és az általánosan használatos szerves oldószerek közül az általunk extraháláskor kipróbált petroléter-metanol viszonylag a legjobb oldószere.Igy ez valóban alkalmas a kloroform-metanolos extrakció után a maradék kalciumszappan kioldására./L.8,10.oldal és 4,5.ábra/

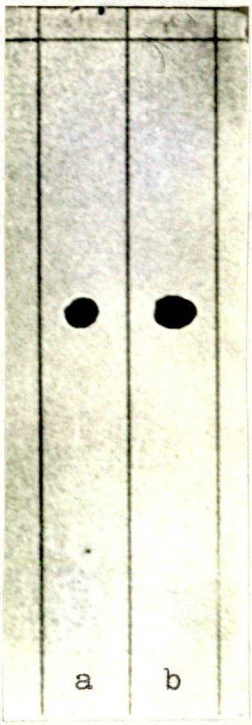
Az elővizsgálatokban végrehajtott kálilugos kezelés okozta változás /a kromatogram leegyszerüsödése mellett zsirsavak megjelenése/ gliceridek hidrolizisére utalt /6, 35.ábra/.Ezt támasztotta alá a glicerin megjelenése a hidrolizátum vizes fázisában,amelyet ionmentesités után vékonyrétegen specifikus reakcióval azonositottunk /19. ábra/.A glicerin perjodátos oxidáció után benzidin be-

vékonyrétegen azonosítottunk /19.ábra/: a glicerin perjodátos oxidáció után benzidin hatására világoskék háttérben citromsárga foltként jelent meg./Ha az ionmentesítést nem végeztük el,a folt egy része "leragadt" a sók zavaró hatása miatt./



18.ábra

a:palmitin- + sztearinsav
b:nátriumszappan
c:kalciumszappan
ciklohexán-éterben /1:1/

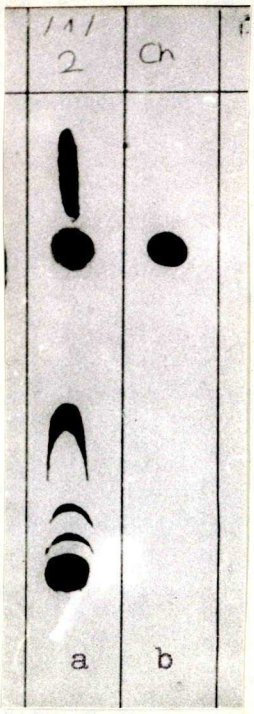


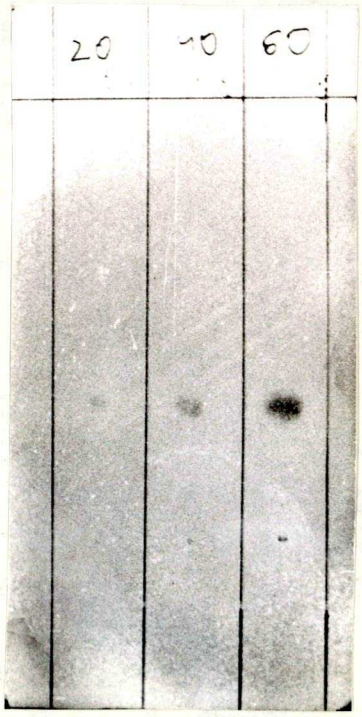
19.ábra

a:hidrolizátum,vizes fázis
b:kontroll glicerin
Futtató:kloroform-aceton-5n ammónia /1:8:1/
Előhívó:benzidin-perjodát reagens /31/

I.3.Koleszterin és koleszterinészter kimutatása

A tojáshéj extraktumot többféle oldószerben is futtattuk koleszterinnel párhuzamosan /14,17,23.20.ábra/,s így bizonyosodtunk meg jelenléteről.Ezszerint a koleszterin a tojáshéj lipoid V.frakcióját képezi,a 10.oldalon látható R_f





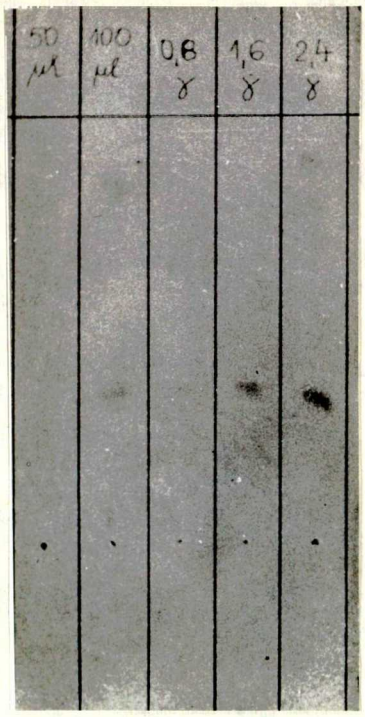
20.ábra

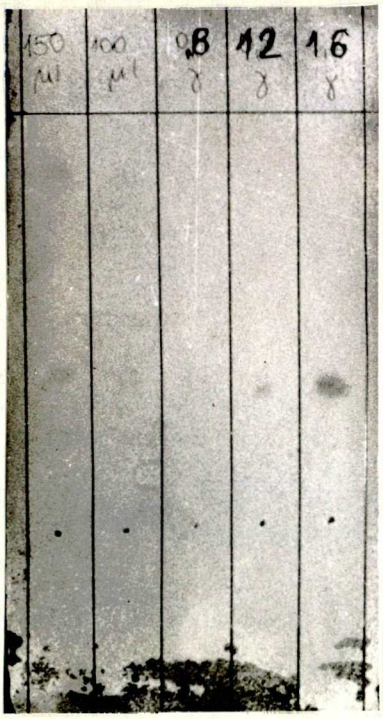
a:tojáshéj lipoid
b:koleszterin

21.a.ábra

Kromatogram mennyiségi becsléshez: 20,40 és 60 µl koleszterin standard oldatban 0,8;1,6 és 2,4 γ

érték szerinti megkülönböztetés alapján. Mennyiségére vonatkozóan félkvantitativ értékelést végeztünk: ismert mennyiségü extraktum meghatározott részletét futtattuk, és a foltok nagyságát és intenzitását párhuzamosan futtatott koleszterin standard sorozatához hasonlitottuk /21.a,b,c.ábra/. Ezzel a módszerrel a tojáshéj koleszterin tartalmát 6γ körüli értékre becsültük grammonként. A zsirsav és koleszterin tartalom alapján várható vit, hogy a tojáshéj koleszterinésztert is tartalmaz. Ezt a még nem azonositott I-IV. lipoid frakciók között keresték hidrolizis termékei alapján. Az egyes frakciókat vékonyrétegről izoláltuk a szokásos módon, majd többféle oldószerben ismét futtattuk /22-24,27.ábra/. Kitünt, hog



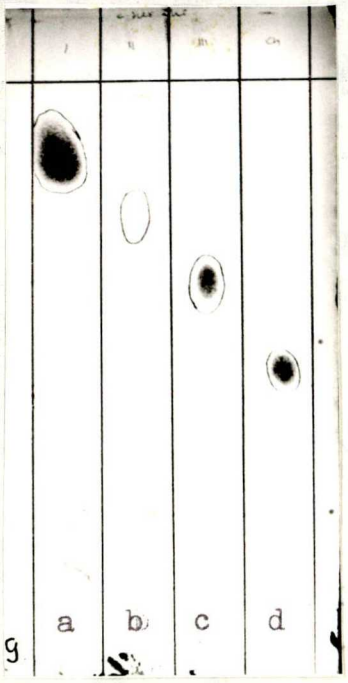


21.b.ábra 21.c.ábra

Kromatogramok mennyiségi becsléshez:
Törzsoldat:15o g tojáshéj lipoid extraktuma 1oo ml-ben
b:5o és 1oo µl törzsoldat mellett o,8;1,6 és 2,4γ koleszterin
c:15o és 1oo µl törzsoldat mellett o,8;1,2 és 1,6γ koleszterin

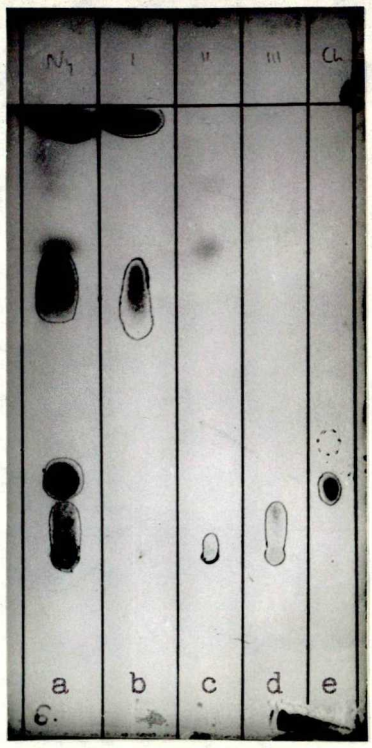
a II.és III.frakció egységes,az I.azonban nem: benzolban majd kloroformban futtatva /3o/ két frakcióra /I.A. és I.B./ válik szét /23.ábra/,melyek közül az I.A.jelzésü széntetrakloridban még további komponensekre bontható /24,27.ábra/.Az elkülönitett I.A,I.B,II.és III.frakciókat metanolos kálilúggal elszappanositva az I.A.bomlástermékeként jelent meg a koleszterinészterre - mint kiindulási anyagra - utaló koleszterin és zsirsav /25. ábra/.Mint látható,az anyag nagyobb része a nem tul erélyes hidrolizis után változatlan maradt,ami egyszerü kiegészitő bizonyitékként is elfogadható,mivel a kole-

SZTE Egyetem Könyvtár SZEGED 14.



22.ábra

a:I.frakció
b:II.frakció
c:III.frakció
ciklohexán-éterben /1:1/ futtatva
d:koleszterin

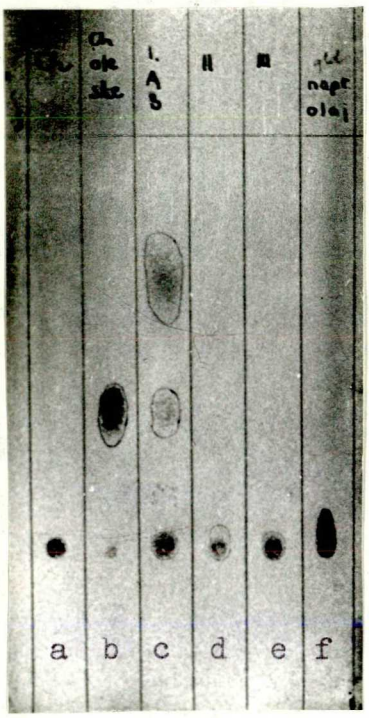


23.ábra

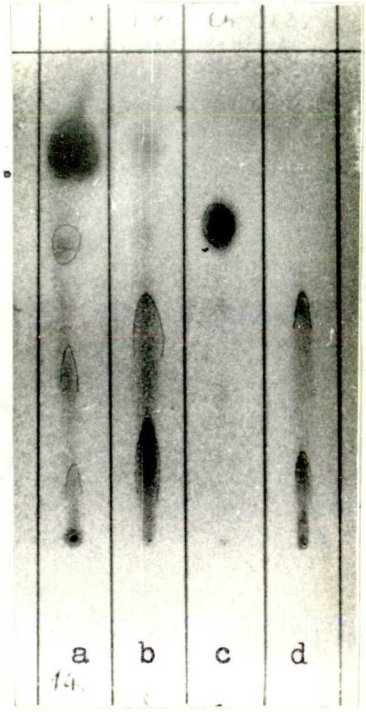
a:nyers extrakt
b:I.frakció
c:II.frakció
d:III.frakció
e:koleszterin + D_3
benzolban majd kloroformban futtatva

szterin észterei tudvalevően nehezen hidrolizálnak. Az I.B,II.ésIII.frakció glicerid,3o perc alatt mindhárom teljesen elhidrolizált,és a hidrolizátumban zsirsav /25,26.ábra/ és glicerin jelent meg.A IV.frakció is glicerid,bár teljesen tisztán nem tudtuk elkülöniteni a nagymennyiségü koleszterin közelsége miatt.Előző megállapitásainkkal kiegészitve: az V.frakció koleszterin, a VI.zsirsavas kalciumsó.Mindezek ismeretében felvettük a koleszterin és koleszterin-sztearát - mint tipusvegyület - UV spektrumát;nyilvánvalóan az előbbi nagyjából egyenletesen lefutó görbéje /28.ábra/ uralja a to-

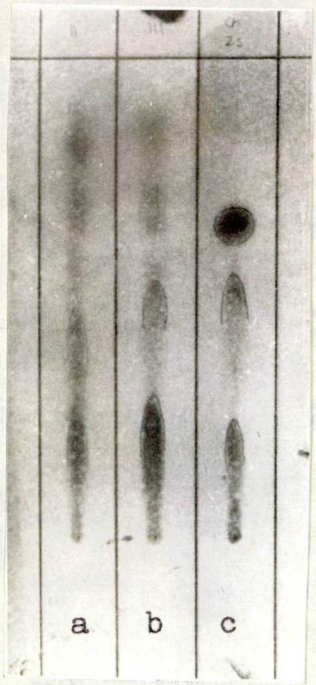
jásháj lipoid spektrumát/7.ábra/; a koleszterinészter ugyanis UV-ben inaktivnak mutatkozott.Vizsgálataink közben a széntatrakloridban olyan futtatószerre találtunk,amelyben a lipoidok többsége a startban maradnak /koleszterin,gliceridek,szabad zsirsav,lecitin,epesavak, ösztrogének,D vitaminok,7-dehidrokoleszterin/, a koleszterinészterek azonban kifutnak.Ennek tudatában a szétválasztott frakciókat széntatrakloridban futtetva a kromatogram várakozásunknak megfelelően alakult: az I.B,II.és III.frakció a startban maradt,az I.A. koleszterinészter frakció kifutott,és bizonyára a különböző zsirsav komponensek szerint vált szét /24,27.ábra/.



24.ábra
a:koleszterin
b:koleszterin-oleát+sztearát
c:I.frakció
d:II.frakció
e:III.frakció
f:napraforó olaj
Futtató:széntetraklorid

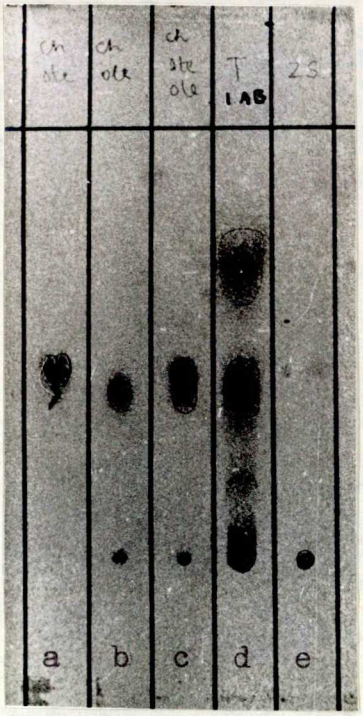


25.ábra
Lugos hidrolizis után
a:I.A.frakció
b:I.B.frakció
c:koleszterin
d:palmitin- + sztearinsav
Futtató:kloroform-aceton
/4:1/



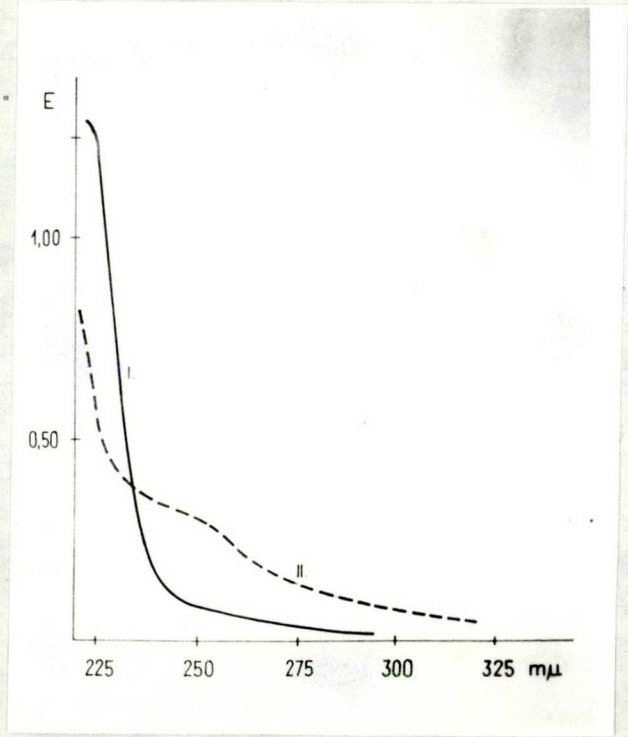
26.ábra

Lugos hidrolizis után
a:II.frakció
b:III.frakció
c:koleszterin + palmitin- és sztearinsav
Futtató:kloroform-aceton /4:1/



27.ábra

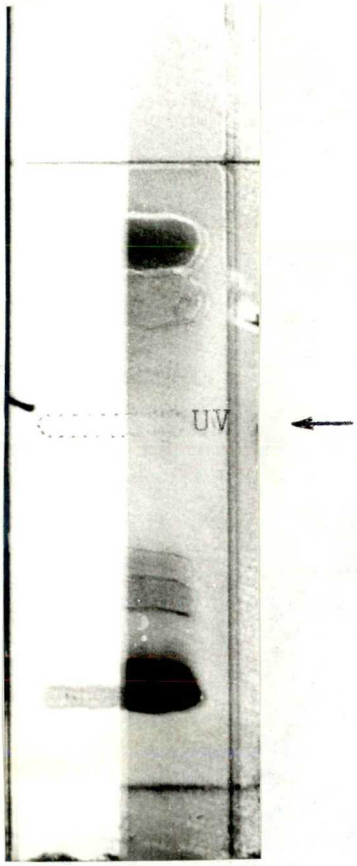
a:koleszterin-oleát
b:koleszterin-sztearát
c:koleszterin-oleát+sztearát
d:I.frakció
e:palmitin- + sztearinsav
Futtató:széntetraklorid



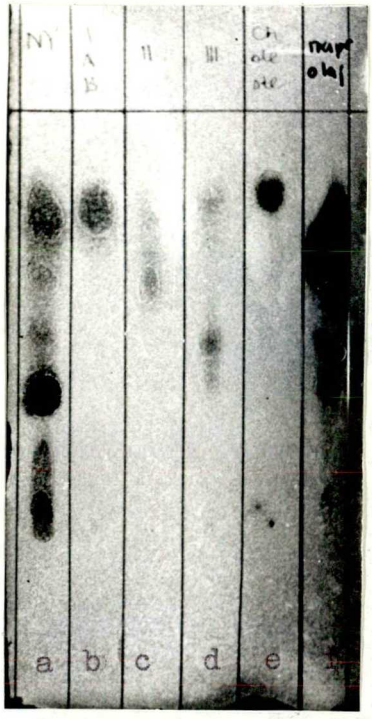
28.ábra

I.:koleszterin-sztearát
II.:koleszterin
UV spektruma

Széntetrakloridban a nem azonositott anyagunk /12,14. oldal/ o,5o R_f értékkel futott /29.ábra/.
Néhány tipusvegyület kromatográfiás viselkedésének hasonlósága is igazolta megállapitásainkat.Általában a koleszterinészterek a legmozgékonyabbak,ezt követi a triglicerid,azután a koleszterin /23,3o,31.ábra/.Ugyanezt a sorrendet tapasztaltuk aluminiumoxid oszlopon végrehajtott kromatografáláskor is /41/,bár ez minden egyes frakció finom elválasztására már nem volt alkalmas.

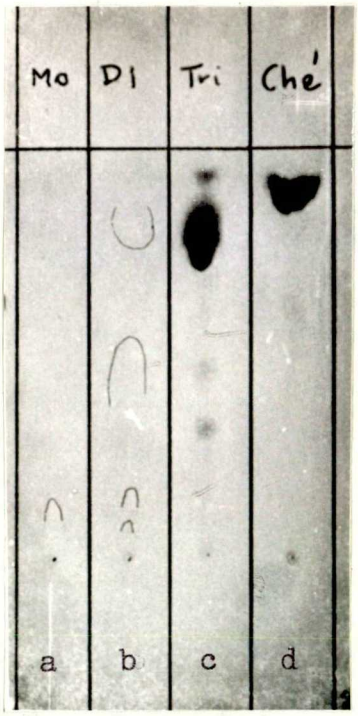


29.ábra



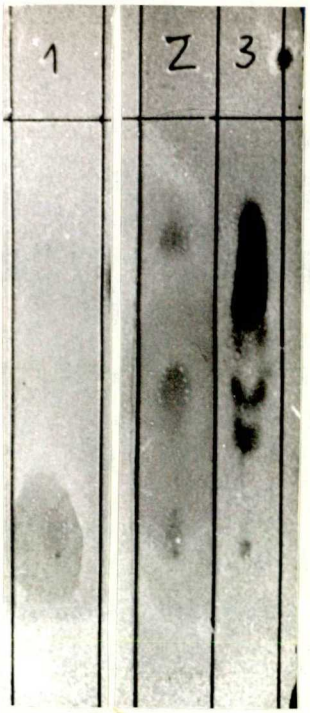
3o.ábra
a-d:tojáshéj lipoid és frakciói
e:koleszterin-oleát+sztearát
f:napraforgó olaj
Futtató:ciklohexán-éter/1:1/

A kromatogramokat mono- és digliceriddel összevetve elképzelhető,hogy a tojásháj ilyen tipusu vegyületet is tartalmaz,de inkább telitetlen zsirsav komponenssel /31,32.ábra/:



31.ábra

a:monopalmitin
b:1,2- és 1,3-dipalmitin
c:tripalmitin
d:koleszterin-oleát+sztearát
Futtató:benzol majd kloroform



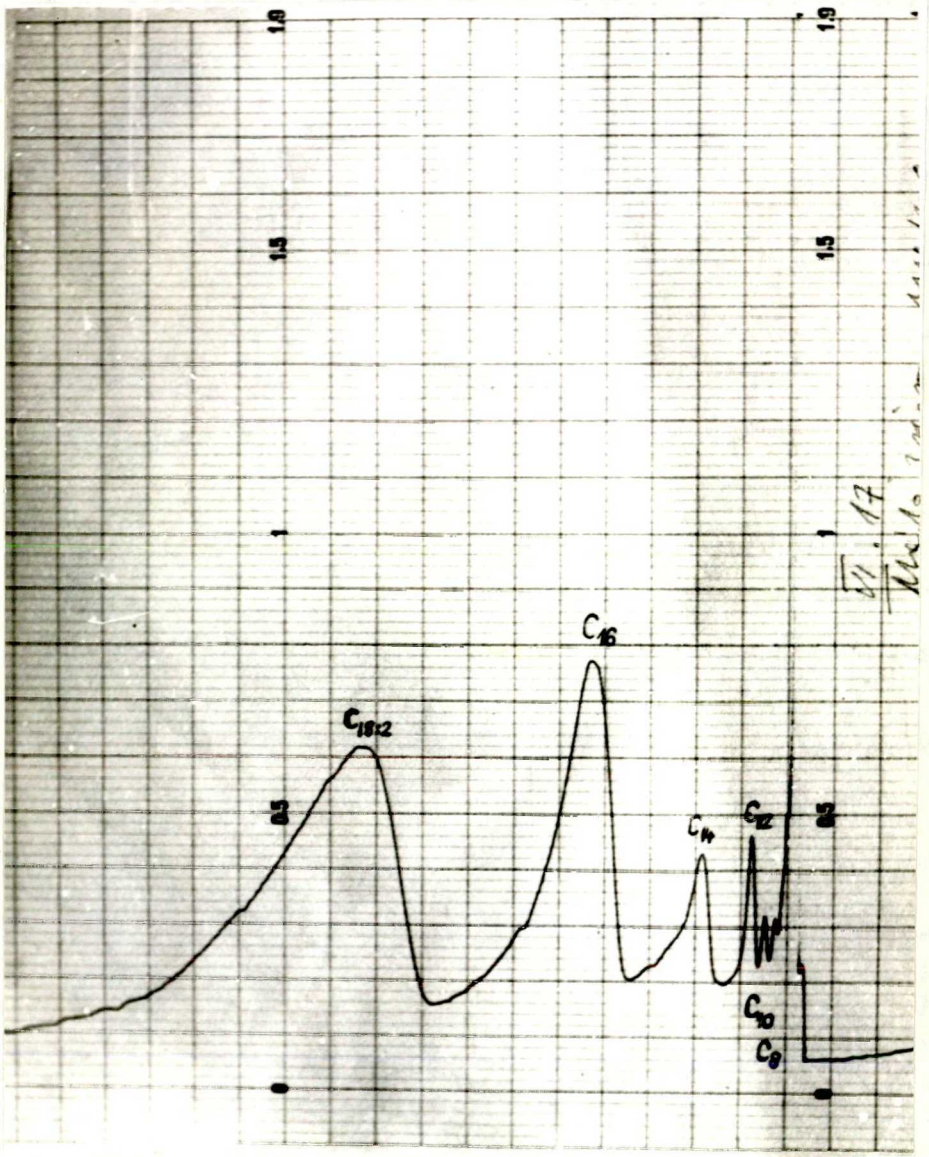
32.ábra

1:monopalmitin
2:1,2- és 1,3-dipalmitin
3:napraforgó olaj
Futtató:ciklohexán-éter /1:1/

I.4.A zsirsavak azonositása gázkromatográfiás módszerrel

A zsirsavakat az általában használatos metilészter formájában határoztuk meg,amelyet Szőke K. és munkatársai eljárásával állitottunk elő /42/,az elszappanositást és metilezést egy munkafolyamatban megvalósitva; a kapott metilésztert azután Willy-Giede 18/3 tipusu lángionizá-

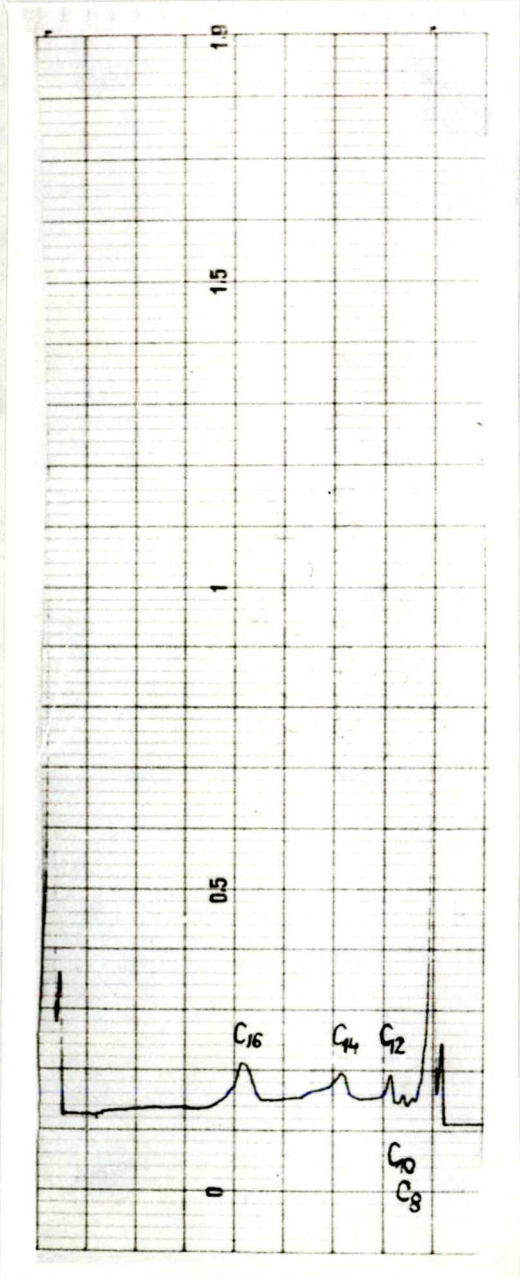
ciós készüléken kromatografáltunk. Szerint a tojáshéj alacsonyabb szénatomszámu telitett zsirsavak mellett /$C_{8,10,12,14}$/ nagyobb mennyiségü palmitinsavat /C_{16}/ és olajsavat /$C_{18:2}$/ tartalmaz /33.ábra/:



33.ábra

A tojáshéj zsirsavai

Hasonló feldolgozással a lipoidból elkülönithető kalciumszappan zsirsavai között az olajsavat nem találtuk meg.Lehetséges,hogy csak azért,mert jobb oldékonysága miatt izoláláskor az oldatban maradt /34. ábra/:

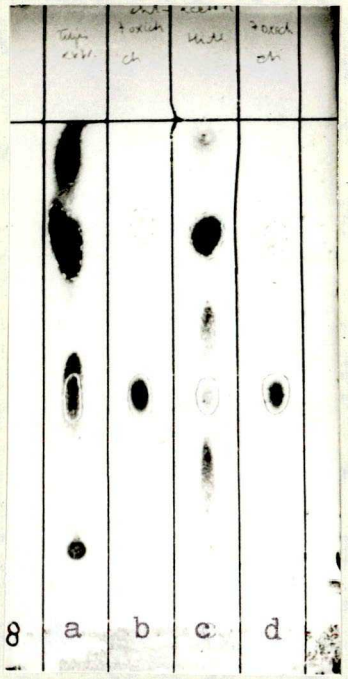


34.ábra

A tojáshéj lipoidból elkülönithető kalciumszappan zsirsavai

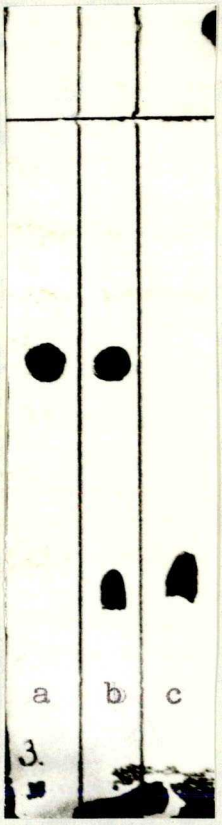
I.5.7-oxikoleszterin megjelenése a tojáshéjban állás közben

Kisérleteink során arra figyeltünk fel,hogy az őrölt tojáshéjban állás közben egy uj anyag jelent meg,amely nem szappanosodott el kálilúggal,és a Liebermann reakciót adta.Igen jellemző volt rá,hogy vékonyrétegen az előhivószerek többségével szép égszinkék szinnel reagált,később megszürkült,majd megfeketedett.Ez az átalakulási termék 7-oxikoleszterinnek bizonyult /35,36. ábra/:



35.ábra

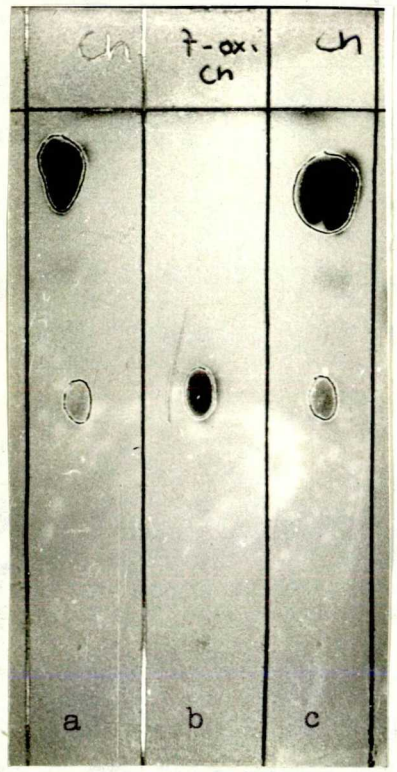
a:tojáshéj extrakt
b,d:7-oxikoleszterin
c:tojáshéj extrakt hidrolizis után
Futtató:kloroform-aceton/4:1/



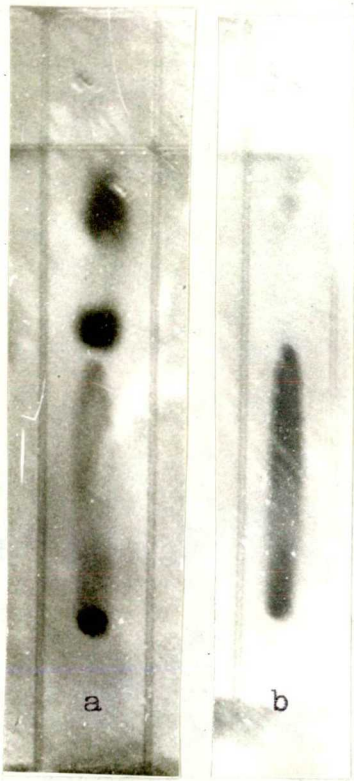
36.ábra

a:koleszterin
b:koleszterin+7-oxikoleszterin
c:tojáshéj lipoidból izolált 7-oxikoleszterin
Futtató:ciklohexán-éter /1:1/

Megjelenését eleinte mikroorganizmusok tevékenységének tulajdonitottuk,tekintettel arra,hogy a meleg időszakban sokkal kifejezettebben jelentkezett,mint a téli hideg hónapokban.A szterinek mikrobiológiai oxidációja egyébként kereken negyed százada ismeretes,és ezzel kapcsolatosan a 7-oxikoleszterin keletkezését is leirták /43/.Modellkisérlettel azonban sikerült bizonyitanunk,hogy finom eloszlásu koleszterinből szilárd fázisban a levegő oxigénjének hatására 7-oxikoleszterin keletkezik /37.ábra/;igy ez a 7-oxikoleszterin ke-



37.ábra



38.ábra

a:keltetői tojásféj lipoid
b:palmitin- + sztearinsav
Futtató:kloroform-aceton
/4:1/

keletkezésének egyszerübb és valószinübb utja. Szabó S. diákköri pályamunkájában szintén bizonyitotta a koleszterin levegő hatására bekövetkező oxidációját nátriumsztearáttal stabilizált vizes emulzióban /195o/.

A 7-oxikoleszterint a keltetőből kikerült héjban is megtaláltuk.

A 7-oxikoleszterin könnyen dehidratálódhat kémiai ágensek hatására, pl. oxálsavas főzéskor, 7-dehidrokoleszterin és más termékek keletkezése közben /44/, vagy mikobiológiai uton /43/. Elképzelhető, hogy ilyen folyamatok lezajlásának következményeként jelent meg az összegyüjtött hulladék tojáshéj extraktumának UV spektrumában a bevezetésben emlitett, D vitamint jelző abszorpciós maximum /29/.

II. Mennyiségi vizsgálatok

A tojáshéj lipoid azonositott komponenseinek meghatározására olyan eljárásokat kerestünk, amelyek megbizhatóságuk mellett egyszerüek is. A mérések a kicsiny anyagmennyiség miatt gondos előkészitést és kivitelezést követeltek meg. A hibahatár az alkalmazott analitikai módszer átlagos hibahatárránál nagyobb lett, főként az előkészités során alig kiküszöbölhető veszteségek miatt. Mégis az azonosan vezetett meghatározások - párhuzamosan mindig vakpróbát is végezve - összehasonlitásra alkalmas eredményeket szolgáltattak.

A vizsgálatokhoz először vegyes,ismeretlen helyről származó,majd ismert eredetü fehér /Nick chick,könnyütestü/ és barna /Plymouth,nehéztestü/ tipusu tojás héját dolgoztuk fel,ezenkivül már kikeltetett /New hampshire,nehéztestü/ tojását is,amelyben a nem keltetett tojáshéj lipoidjának valamennyi komponensén kivül szabad zsirsavat is találtunk /38.ábra/.

Lipoidban oldódó kalcium meghatározása:
A lipoidoldékony kalciumot képező kalciumszappant sósavval bontottuk meg,és a kalcium mennyiségét komplexometriásan mértük,pH 10-11-nél,eriokromkék SE indikátor jelenlétében,0,001M méretben,kiszoritásos eljárással /45/,ill.visszatitrálással.Az előbbieket az indokolta, hogy kismennyiségü kalcium meghatározásánál,mint esetünkben is,közvetlen titráláskor indikálási nehézségek mutatkoznak,a magnéziumnál azonban nem;igy a vizsgálandó oldathoz Mg-EDTE komplexet adva,a kalcium által kiszoritott magnézium kellő biztonsággal mérhető,vagy a feleslegben adagolt EDTE mérőoldat magnéziumszulfáttal minden további nélkül visszatitrálható.
A kalcium kimutatásakor ionreakcióval nyert kalciumoxalát csapadékot mennyiségileg feldolgozva permanganometriásan,az oxaláton keresztül mértük a kalciumot. /36/.Az eljárás a fentinél nagyságrenddel nagyobb mennyiségü vizsgálati anyagot követel.

A zsiradék teljes elszappanositásához szükséges kálilug mennyiségét /elszappanositási szám/ a szokásos acidi-alkalimetriás titrálással határoztuk meg,a hid-

rolizisre bevitt metanolos káliumhidroxid fölöslegének visszamérésével.

A szabad zsírsavtartalomra jellemző savszámot ugy határoztuk meg,hogy a lipoidot semlegesitett alkohol-éter elegyében felvettük,majd metanolos kálilug mérőoldattal fenolftalein jelenlétében megtitráltuk.Igy eljárva a közönséges tojáshéj extraktuma - a keltetőivel ellentétben - kálilugot nem fogyasztott,ami a szabad zsirsav hiányára utalt.

A koleszterint és koleszterinésztert spektrofotometriásan határoztuk meg a Liebermann reakció alapján,Rappaport eljárása szerint /46/.Az összes /szabad + észterkötésben lévő/ koleszterin mennyiségét a minta kloroformos oldatában ecetsavanhidrid és konc.kénsav hatására előállott zöld szineződés intenzitásából /645 mμnál mérve/ kaptuk meg,kalibrációs görbe alapján.Ha a szinreakciót a szabad koleszterin digitoninos kicsapása után végeztük el,a szinintenzitás az észterkötésü koleszterin mennyiségével volt arányos,a két érték különbsége pedig a szabad koleszterin mennyiségét adta meg.Tekintettel arra,hogy a szinintenzitás a rekció körülményeitől erősen függ,a mért értéket pedig a készülék tipusa és pillanatnyi állapota is befolyásolja,minden alkalommal külön kalibrációs görbét vettünk fel.

A glicerint kálilugos hidrolizissel szabaditottuk fel, és a hidrolizátum feldolgozásakor nyert vizes oldatból minden további tisztitást mellőzve Schiek és Maros

elegáns térfogati módszerével /47/ határoztuk meg mennyiségét.Az eljárás szelektiv: az oxidáló és redukáló anyagok zavaró hatását kiküszöböli,megbizható,s mindemellett kivitelezése is egyszerü.Lényege a következő: perjodátos oxidáció után a glicerinből keletkező formaldehidet biszulfittal addicionáltatjuk /ez egyben megköti a perjodát feleslegét,míg a szulfit feleslegét jóddal vesszük el/,ezután lugos közegben káliumcianiddal reagáltatunk,és a formaldehid-biszulfit adduktumból ekkor cserebomlással felszabaduló, a formaldehiddel és ezen át a glicerinnel egyenértékü szulfitot savanyitás után jodometriásan mérjük.A glicerin egyenértéksulya a reakció sorozat alapján a mólsuly 1/4 része.

Mérési eredmények

	γ/g tojáshéj			
	Vegyes	Barna	Fehér	Keltetői
Lipoidoldékony Ca	2,6	o,7	o,9	o,o8
Koleszterin:összes	15,5	18,4	13,3	43,1
észter	1o,2	15,1	11,2	3o,9
szabad	5,3	5,3	2,1	12,2
Glicerin	12,4	9,9	7,7	9,2
Savszám mgKOH/g zsir	o	o	o	46
Észterszám " "	89	152	155	8o
Összes lipoid	218	257	2o2	331

A mérési eredményeket áttekintve láthatjuk,hogy a különféle tipusu,nem keltetett tojáshéjak lipoidösszo-

tétele nagyjából megegyezik,nincs lényeges különbség közöttük,a fehér hój az egyes komponensekből arányosan kevesebbet tartalmaz.A vegyes eredetü hój nagyobb kalciumtartalmát annak tulajdonitjuk,hogy más évszakban mértük,nyáron,mig a barna és fehér tipusát télen;a biológiai értékek ilyen évszakonkénti eltérése nem ismeretlen.

Jellegzetes eltéréseket mutat az előbbiektől a keltetési tojáshéj lipoidja:nagymennyiségü szabad zsirsav jelenik meg benne,a lipoidoldékony Ca kb.1/10-ére csökken,ugyanakkor a koleszterin mintegy háromszorosára növekszik a nem keltetett hój adataihoz képest.Már ez önmagában is jelzi,hogy a keltetés folyamán lebonyolódó anyagforgalom a tojáshéjat is érinti.S hogy ebben a tojáshéj szerepe mennyire nem passziv,azt bizonyitja Tretyakov Ca-forgalomra vonatkozó adata,amely szerint a kifejlett embrió Ca-készletének kereken 80%-a a tojáshéjból származik!Ugyanez a tojáshéj Ca-tartalmának mintegy 6%-os veszteségét idézi elő /28/.

Elképzelhető,hogy ennek a kalciumnak a szállitásában a lipoidok valamilyen módon szerephez jutnak;gondolunk itt elsősorban az alacsonyabb szénatomszámu zsirsavakra, amelyek az élelmiszerek többségének nem szokványos komponensei.A Ca-szappanokkal kapcsolatban általában az az állásfoglalás,hogy mint oldhatatlan termékeknek nincs különösebb jelentőségük /49/,a héjból való csaknem teljes eltünésük ennek felülvizsgálását indokolja.

III. Előkészítő baromfikisérlet

A kémiai analizis után a biológiai hatás oldaláról próbáljuk majd megközeliteni a tojáshéj antirachitikus faktorát. Ehhez tájékozódás céljából végeztük előkisérletünket. Többféle szempontból is a baromfitetési kisérlet látszott leginkább célravezetőnek. A legfontosabb talán az volt, hogy a baromfi az un. intenziv tartásban, a nagyüzem mesterséges körülményei között rendkivül érzékeny a takarmányozási hibákra, s az ebből eredő hiánytünetek, betegségek erőteljesen jelentkeznek nála. Várakozásunknak megfelelően sikerült is csontosodási zavart előidéznünk részlegesen Ca-hiányos etetéssel, fiatal állatokon pedig rachitist, a D_3 vitamin megvonásával. Az előkisérletnek e betegségek kiváltásán és megfigyelésén kivül még egy célja volt: kipróbálni azt, hogy egy ilyen jellegü állatkisérletnél jelentkezik-e a tojáshéj csontosodást serkentő hatása, s ha igen, milyen irányban érdemes továbbvinni a kisérletet.

A kisérletet a szőregi Egyetértés MgTSz Baromfitelepén végeztük, bábolnai 910S tipusu hushibriddel, ketreces tartásban. Az állatokat az üzem körülményeihez igazodva láttuk el; napos korban baromfi indító tápot, 3 hetes kortól nevelő tápot adtunk. Ezeket az alapanyagokból saját magunk kevertük, az érvényben levő receptura szerint, s igy módunkban állt mind a mésztartalmat, ami $CaCO_3$ vakszinterőt és egyéb céljainkhoz megfelelően megváltoztatni.

mot,mind a D_3 vitamintartalmat céljainknak megfelelően szabályozni.

I.A Ca-hiányos etetésnél az volt a törekvésünk,hogy a D vitamin hatását kiszűrjük,mégpedig úgy,hogy vitaminnal jól ellátott csoportokat hasonlítunk össze,és ha így is fellép valamilyen különbség,akkor az biztosan nem a D vitaminnak tulajdonítható.A kísérletben az egyes csoportok normális,mindenben kielégítő tápja csak a mész komponensben tért el egymástól;az egyik kiegészítője közönséges kalciumkarbonát volt,a másik azonos mennyiségű őrölt tojáshéj /94% $CaCO_3$ tartalommal/. A baromfi indító táp 2oo NE,a nevelő táp 15o NE premix által bevitt,stabilizált D_3 vitamint tartalmazott 1oo grammonként,ehhez járult még a húsliszttel és hallisztel bevitt kisebb mennyiség.Amikor az 1,7 %-nyi takarmánymeszet a tápban tojáshéjra cseréltük le,a D vitamintartalmat ezáltal nem változtattuk meg. A normál tápos etetéssel a nyomelemek szerepét is kiszűrjük,mert a baromfi szervezetében,és így a tojáshéjban is csak a táppal bevitt nyomelemek fordulhatnak elő,e mivel a különféle baromfitápok /indító,nevelő,tojó,stb./ alapanyagai kisebb mennyiségi eltérésektől eltekintve azonosak,a tojáshéjjal bekevert nyomelemek elveszítik jelentőségüket.

A kísérletet 2o napos csibékkel kezdtük,és az 54.napon fejeztük be.Két vonalat követtünk:

a./Egy teljesen egészséges csoport egyik fele normál nevelő tápot kapott,/kontroll/,a másik fele pedig to-

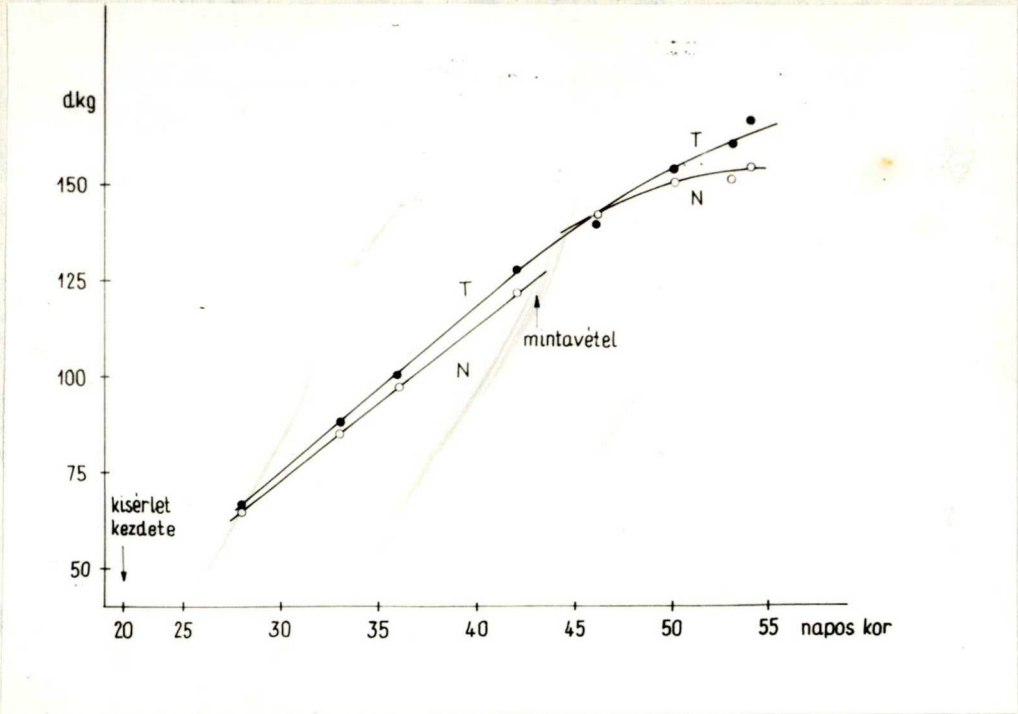
jáshéjast.

b./Különböző mértékben mészhiányosan táplált három csoportot 23 nap eltelte után megfeleztünk,és a csoportok egyik fele normál tápot,a másik tojáshéjast kapott.

A kisérlet során figyeltük a csoportok általános állapotát,viselkedését,és mértük az állatok sulyát.Ezenkivül 2-2 mintát vettünk,és a láb-,ill.mellcsontról röntgen felvételt készitettünk.

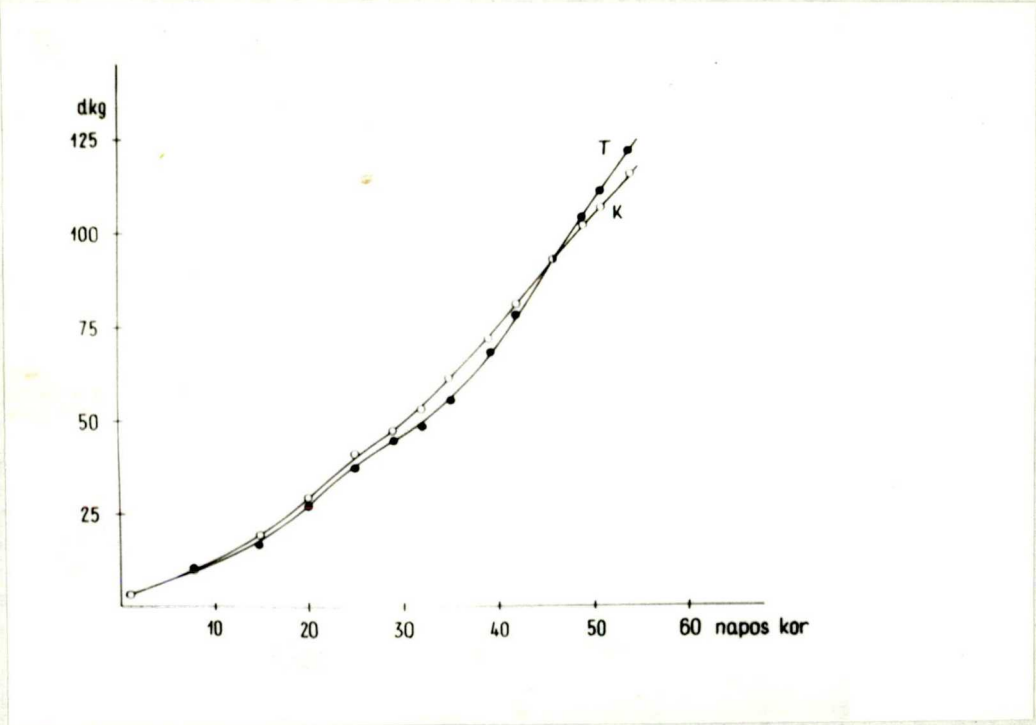
a./ Az egészséges csoportok sulygyarapodása egyenletes és gyors ütemü volt,a tojáshéjas csoporté kissé nagyobb mértékü,de nem számottevően./39.ábra./Mindkét csoport lényegesen jobb volt,mint a külső,alson tartott állomány,ami valószinüleg a ketreces tartásból eredő mozgásszegénységre vezethető vissza./A kisérlet utolsó hetében bekövetkezett nagymértékü felmelegedés /30 C° körüli napközbeni hőmérséklet/ a kontroll és a külső állomány sulygyarapodását megtorpantotta, a tojáshéjasét alig befolyásolta /39.ábra/.Egy másik kisérletben is tapasztaltuk a tojáshéjnak a sulygyarapodásra tett,kismértékü növelő hatását /40.ábra/.Ez ugy látszik jellemző,és hosszabb időszak alatt bizonyára jobban kifejezésre jutna.

b./ A mészhiányos csoportok a szokásos 1,7% takarmánymész kiegészités helyett 0;0,5 és 1,0% kiegészitést kaptak.Sulygyarapodásukat a hiányos étrend nem zavarta meg,3 hét alatt a kontrollal csaknem azonos sulyt értek el,ekkorra azonban már megnyilvánult a hiánytünet-



39.ábra

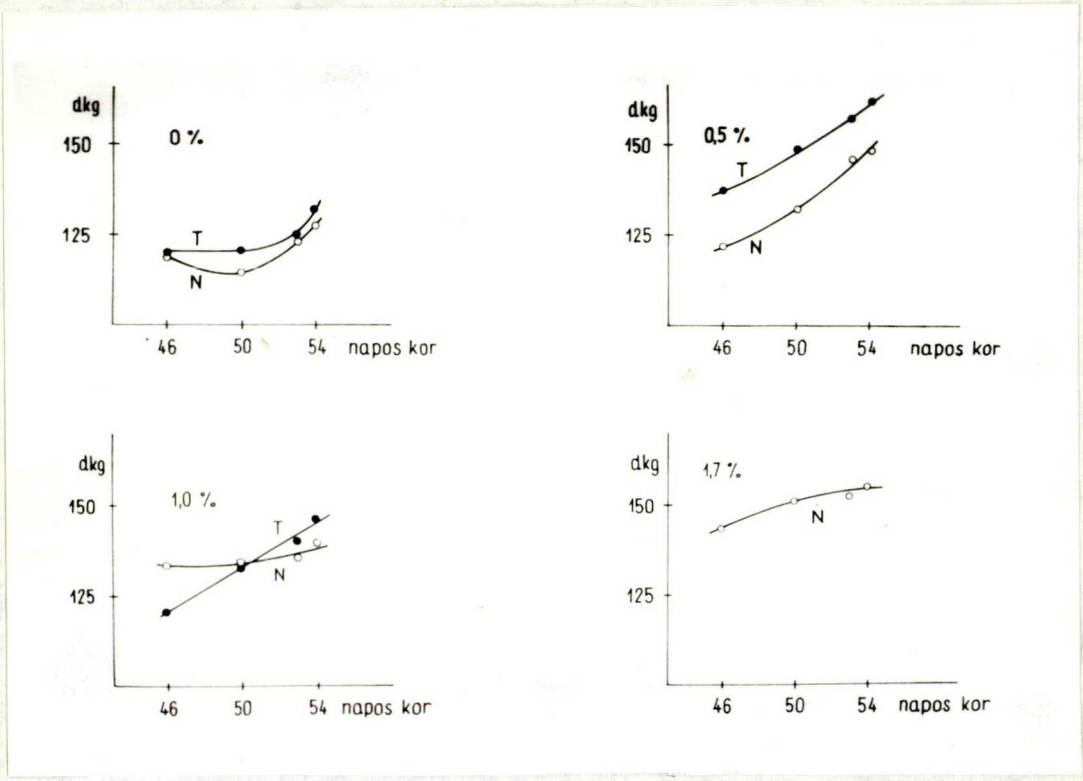
N:normál táplálás:1,7% takarmánymész kiegészítéssel
T:tojáshéjas táplálás:1,7% tojáshéj kiegészítéssel



40.ábra

K: kontroll csoport
T: tojáshéjas csoport

re utaló erős csipkedési hajlam,a lábtőizület észrevehetően megvastagodott,a mellcsont puhább tapintású volt,és szembetűnt az állatok jellegzetes "csánkra" támaszkodó ülése.E kezdeti tünetek megjelenése után megkezdtük a normál ill.tojáshéjas táp etetését. A hátralevő 11 nap alatt szemmellátható javulás nem mutatkozott,a súlygyarapodás jellegzetes alakulása azonban a tojáshéjas csoportok könnyebb "átállását" tükrözte a megemelt mészszinthez /41.ábra/:



41.ábra

N:normál táplálás:1,7% takarmánymész kiegészítéssel
T:tojáshéjas táplálás:1,7% tojáshéj kiegészítéssel

Az ábrán feltüntetett időszak előtt az egyes csoportok 23 napon át o;o,5;1,o és 1,7% /normál/ takarmánymész kiegészítést kaptak

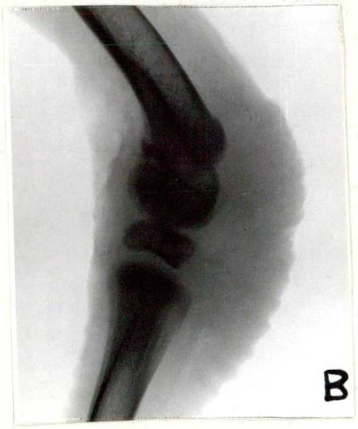
SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED

Röntgen felvételre először a 23.napon egy Ca-hiányosan táplált,kezdődő beteg és egy kontroll állatot emeltünk ki.A felvételeket összehasonlítva a lábtőízületnél nem észleltünk lényeges eltérést,csupán a beteg állat ízületi megvastagodása utalt rendellenességre /42,43.ábra/.A mellcsont felvételen viszont jól látható a kontroll éles konturjaival szemben a beteg csont porcosságát jelző elmosódott kép /44,45. ábra/.

Jól észlelhető különbséget találtunk a kísérlet végén kiemelt kontroll és tojáshéjas egyed között, az utóbbi javára,ami különösen a mellcsont felvételen látható jól:mind a szembőli,mind az oldalsó felvételen megfigyelhető az egyenlotesen kiépült szivacsos csontszerkezet /46,48.ábra/,míg a kontrollón a mellcsont teréj közepén ill. az alap felső boltozatában és két oldlón,körjben,elmosódott,szerkezet nélküli porcos rész látható /47,49.ábra/.A tojáshéjjal táplált állat lábtőízülete is kedvezőbb képet mutat /50,51.ábra/.

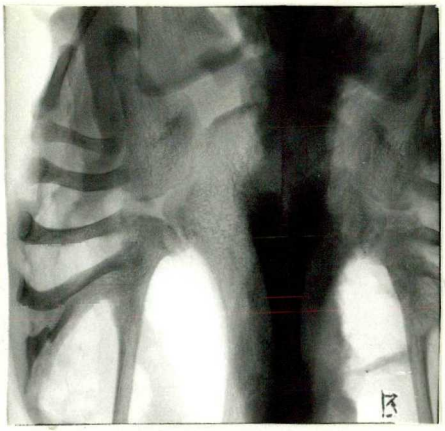
Fontosnak tartjuk megjegyezni,hogy az összehasonlitásra szánt egyedek kiválasztásánál ügyeltünk arra,hogy azonos súlyuak és neműek legyenek.

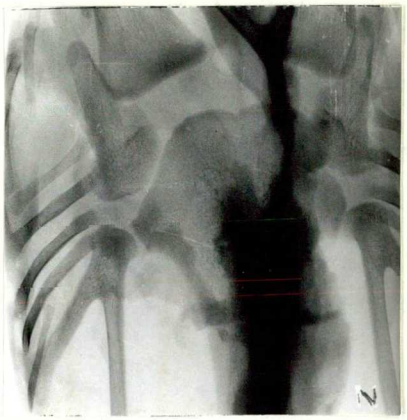
<u>II.A D-mentes diéta hatására</u> -napos korban indítva - a 3.héttől kezdődően,fokozatosan a 4.hét végére kifejlődtek a rachitis jellegzetes tünetei:mozgásszegénység,fájdalmas ízületek,görcsös lábtartás,gubbasztás,a fejlődésben való visszamaradás /52-55.ábra/.



42.ábra 43.ábra

Lábtőízület röntgen képe
B:beteg,Ca-hiányos táplálás miatt
N:normál tápos,kontroll



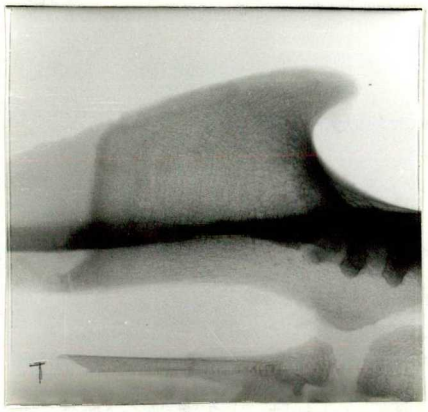


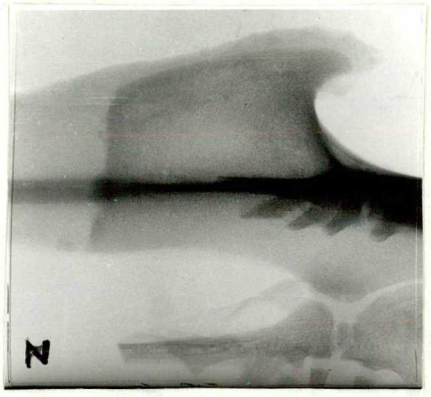
44.ábra 45.ábra

Medencecsont röntgen képe
B:beteg,Ca-hiányos táplálás miatt
N:normál tápos,kontroll

46.ábra 47.ábra

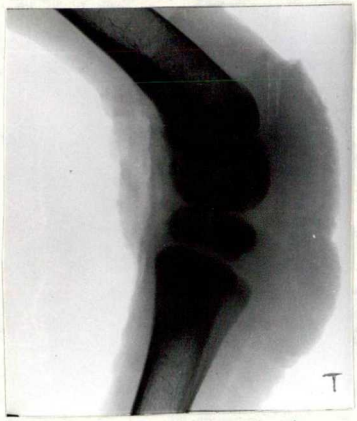
Mellcsont röntgen képe
T:tojáshéjas táplálás:1,7% tojáshéj kiegészitéssel
N:normál táplálás:1,7% takarmánymész kiegészitéssel





48.ábra 49.ábra

Mellcsont taréj röntgen képe
T:tojáshéjas táplálás:1,7% tojáshéj kiegészitéssel
N:normál táplálás:1,7% takarmánymész kiegészitéssel



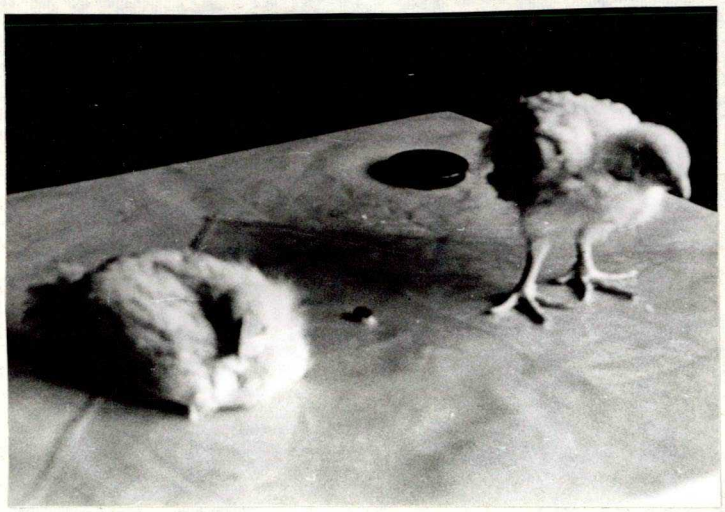
50.ábra 51.ábra

Lábtőízület röntgen képe
T:tojáshéjas táplálás:1,7% tojáshéj kiegészítéssel
N:normál táplálás:1,7% takarmánymész kiegészítéssel

Figyelemre méltó,hogy a kontroll és az angolkóros állatok között a 4.hét végére még nem volt feltűnően nagy különbség a súlygyarapodásban /56.ábra/,a röntgen felvétel mégis súlyos elváltozást mutatott /57.ábra/. Ezekkel a csoportokkal párhuzamosan még egy csoportot neveltünk,azintén D_3-mentes diétán,de az 1,7% takarmánymész helyett ugyanennyi tojáshéjjal egészítettük ki a tápot,ami a súlygörbe /58.ábra/ és a röntgen felvétel /57.ábra/ tanúsága szerint a rachitis kifejlődését meggátolta.A 8.hét végére azonban a rachitis ennél a csoportnál is kifejlődött/59.ábra/,tehát egy erősen késleltető hatás mutatkozott.A súlygyarapodást azonban a kifejlődő betegség a kísérlet időtartama alatt nem zavarta meg /58.ábra/.

A D_3 megvonásával rachitisessé tett állatokat három csoportra osztva a./ tojáshéjas,D_3 nélküli

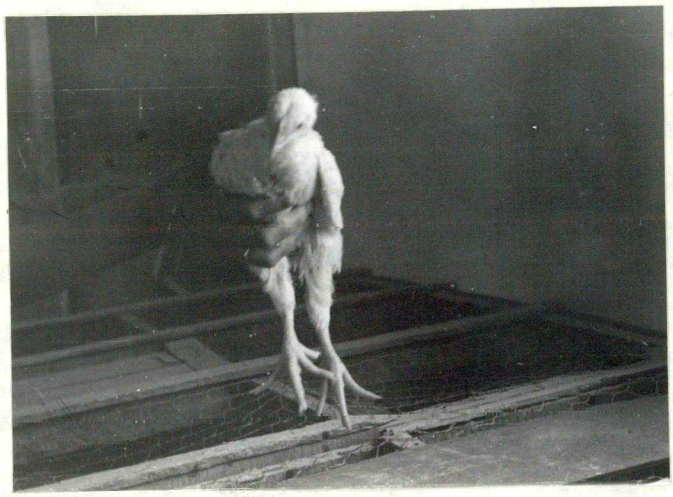
b./tojáshéjas D_3-mal ellátott



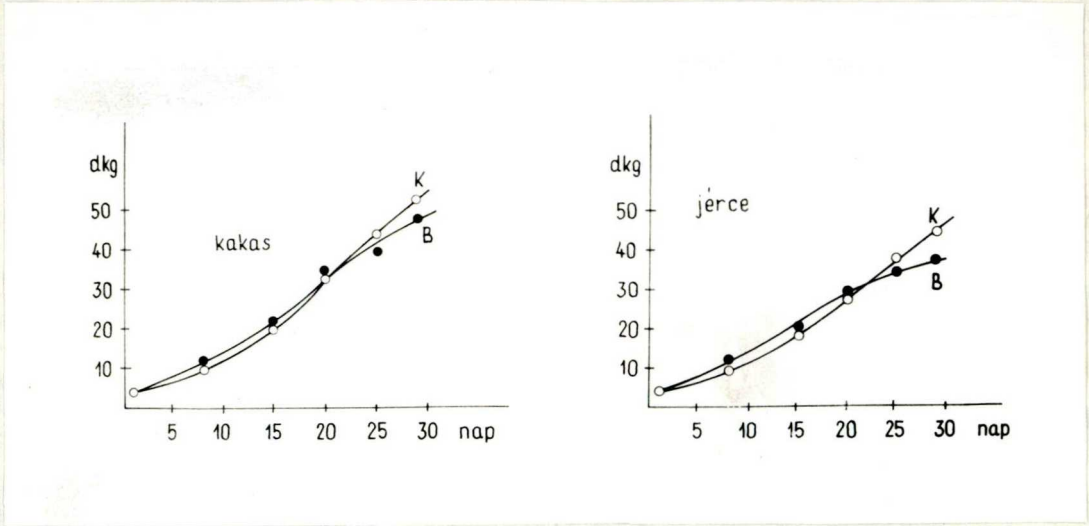
52.ábra
Angolkóros csibék /4 hetesek/

53.ábra
Angolkóros és egészséges csibe
/4 hetes/

54.Ábra
Angolkóros csibe lábtartása
a lábak fájdalmasságát jelzi



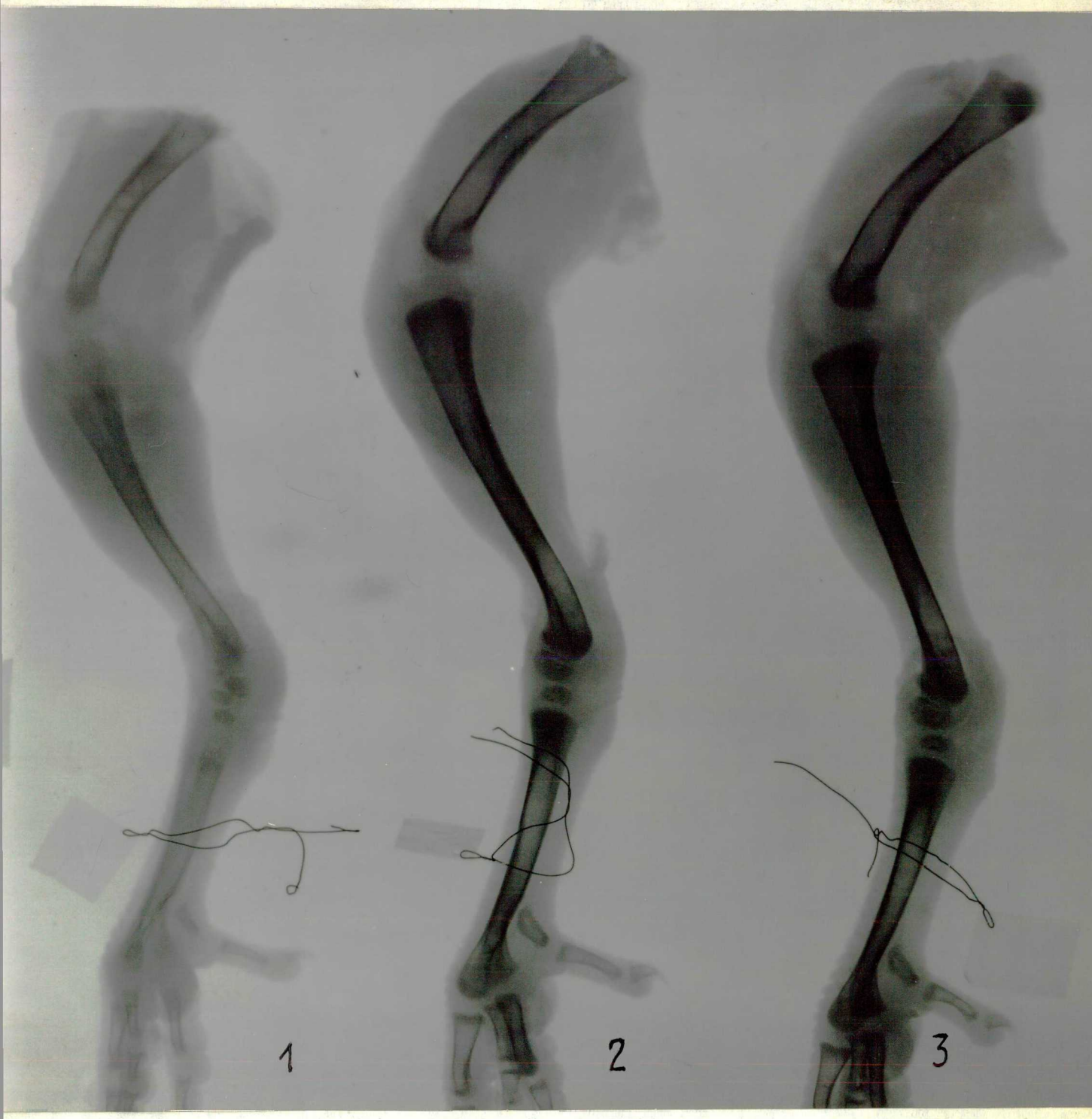
55.Ábra
Egészséges csibe lábtartása



56.ábra
K:kontroll
B:betog.D_3 megvonása miatt

c./ normál táppal etettük; 1-1 állatot a 21.naptól, 1-1 csoportot a 29.naptól kezdődően.A sulygyarapodás teljesen azonosan alakult mindkét esetben /60,61.ábra/: a b,tojáshéjas / + D_3/ csoport egyenletesen gyarapodott; a c,kontroll csoport a kisérlet végére elmaradt,annak ellenére,hogy ugyanannyi D_3 vitaminben részesült.A csontosodás zavara mind a b, mind a c.csoportnál megszünt,és a 3 hetes kezelés eredményeként a lábcsontok hosszusága elérte az egészséges kontrollét /62,59.ábra/.A továbbra is D_3 nélküli, de tojáshéj kiegészitésü táppal etetett a.csoport lassu javulást mutatott,a csontosodás is megindult /62. ábra/.

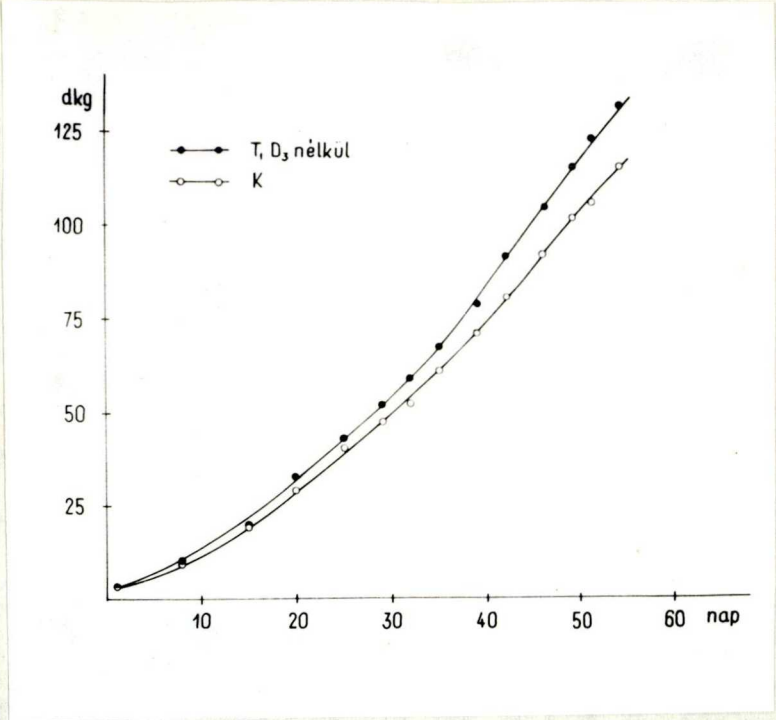
Ez utóbbi tapasztalat nem teljesen uj.Már Krompecher leirta a tojáshéj rachitist késleltető,és lassan gyó-



57.ábra

1:D_3 vitamin megvonásával kiváltott rachitis
2:D_3 vitamin megvonásakor a tápba kevert 1,7% tejföl-héj a rachitist meggátolja
3:kontroll

/4 hetes állatok/



58.ábra

Sulygyarapodás
1,7% tojáshéjjal, D_3 vitamin nélkül készitett táp és
1,7% takarmánymésszel+D_3 vitaminnal készitett normál táp
/kontroll/ etetése esetén

gyitó hatását, kisérletei alapján, amelyeket azonban egészen más körülmények között, patkányokon végzett. A hatást ő a tojáshéj feltételezett D vitamin tartalmának, részletesebben nem vizsgált lipoidoldékony Ca-tartalmának, valamint nyomelemeinek tulajdonitotta. A nyomelemekkel kapcsolatban azonban rámutatott arra, hogy a tojáshéj antirachitikus faktorát szerves anyagai között kell keresni, mert a 75 C° fölé hevitett tojáshéj antirachitikus hatása jelentősen csökken, a megmaradó enyhe hatásért fluor tartalma felelős /3/, amelyről közismert, hogy a Ca lerakódását fokozza /5o/.

A téma éppen ezáltal vált izgalmassá: kisérleteink szerint a tojáshéj hatásában a D vitamin nem játszik szere-

pet - a nyomelemek pedig,legalábbis szervetlen kötésben feltételezve, aligha játszhatnak lényeges szerepet. Ez arra enged következtetni,hogy a tojáshéjban a D vitamintól és a nyomelemektől független egyéb faktornak kell lennie,amelyet a tojó szervezete épít fel, egy olyan anyagnak,amely az emésztőrendszeren át bejuttatva képes kifejteni csontosodásra gyakorolt hatását.

A kezdeti adatokon és feltevésen tul a kisérlet értékét elsősorban a közben szerzett gyakorlati tapasztalatokban látjuk.A kisérletet a tojáshéj különféle kivonataival,elkülönitett frakcióival kivánjuk folytatni,és fokozatosan lesszükitve a lehetséges hatóanyagok körét reméljük megtalálni az antirachitikus faktort. Ennek során a tojáshéj rachitist késleltető hatását fogjuk kihasználni,mert ez mutatkozott legjobban értékelhetőnek.

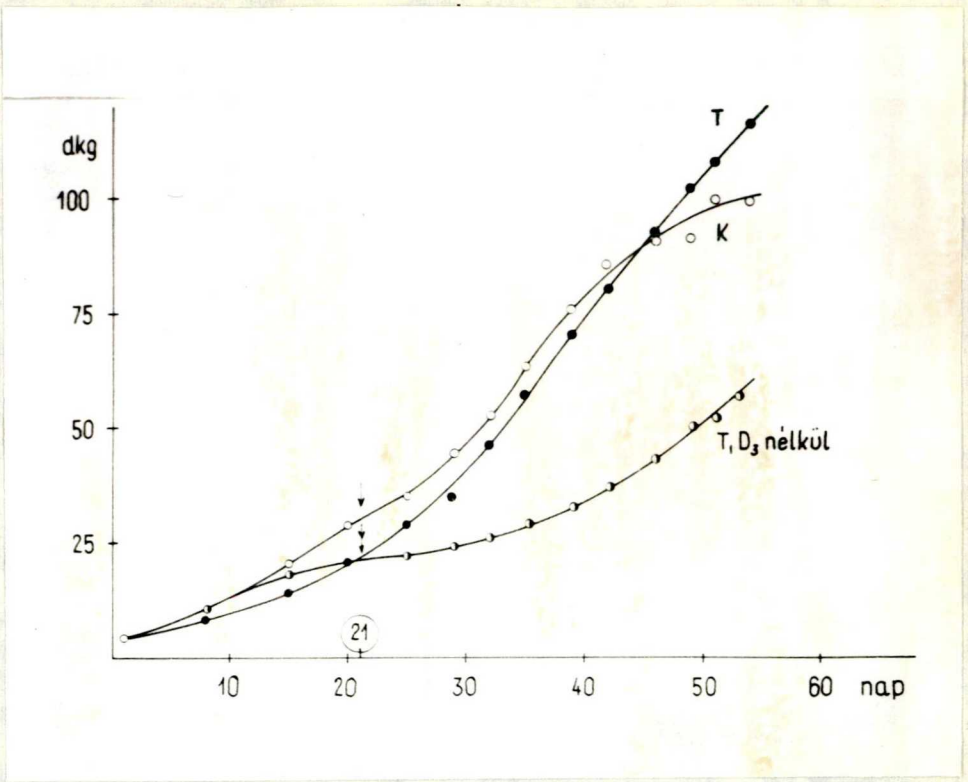
A tojáshéj etetésnel kapcsolatban meg kell még jegyeznünk,hogy a kisérlet folyamán a tápba kevert tojáshéjjal etetett állatokon semmiféle rendellenességet,fertőzésre utaló tünetet nem tapasztaltunk.Ez kiegészitik Hauss K. saját vizsgálatára támaszkodó levélbeli közlését,/1955/,amely szerint"a tyuktojás héjának fogyasztása ... fertőzési veszélyt nem rejt magában".

59.ábra

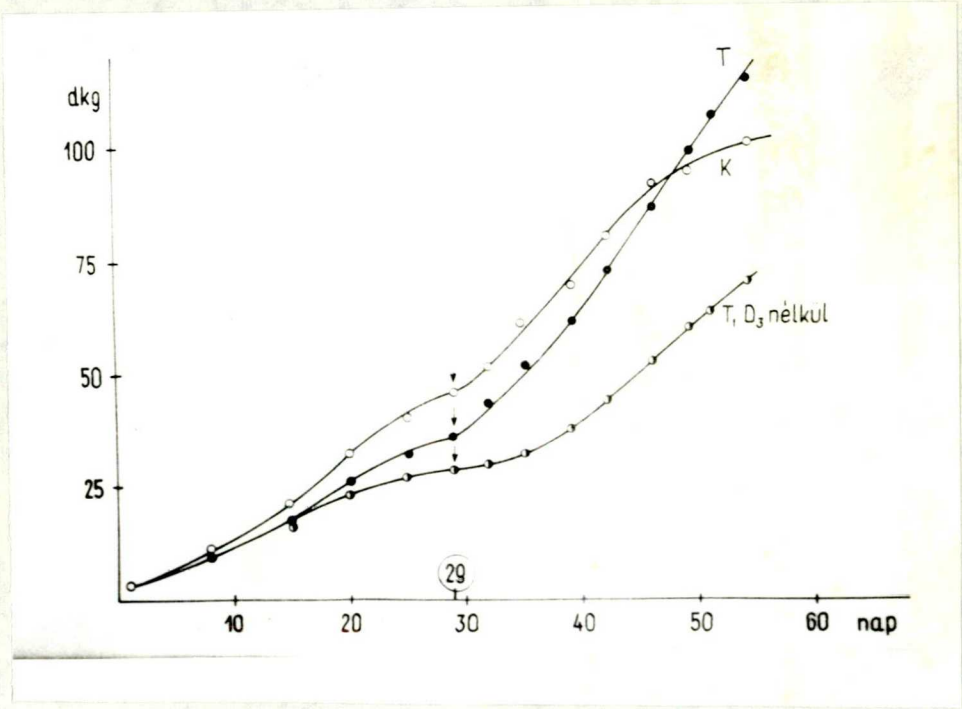
1:kontroll

2:D_3 nélküli, tojáshéjas táplon tartott állatoknál késve és kevésbé súlyos formában fejlődik ki a rachitis

/8 hetes állatok/



60.ábra



61.ábra

D_3 vitamin megvonásával rachitisessé tett állatok kezelése a 21.naptól /60.ábra/ és a 29.naptól /61.ábra/
tojáshéj + D_3 /T/
takarmánymész + D_3 /K,kontroll/
tojáshéj /T,D_3 nélkül/
tartalmu táp etetésével

62.ábra

1:takarmánymész + D_3 /kontroll/; 2:tojáshéj /D_3 nélkül/
3:tojáshéj + D_3 tartalmu táp etetésével 25 napon át
kezelt rachitis /8 hetes állatok/

IV. Kisérleti rész

IV.1.A vizsgálat anyagai.Előkészités és extrakció

A vegyes tojáshéjat üzemi konyháról szereztük be. A barna tipusu héj a hódmezővásárhelyi Állami Gazdaság szaporitó telepéről,G-65 broiler szülőállománytól /Cornish kakas,Plymouth tyuk/ eredt.A tojók 13 hónaposak voltak,tápjuk tojó A,2% mészkő gritt kiegészitéssel.A friss tojás átlagsulya 52 g,a héj suly 4,6 g volt.A fehér héju tojás a szőregi Egyetértés MgTSz Nick-chick tojóhibrid állományától eredt.A tojók 8 hónaposak,a tojások termékenyitetlenek voltak.A tojók tápláléka tojó A,amelyhez 2% takarmánymész /Futor/ kiegészitést és fejenként napi 1 dkg buzát kaptak.A friss tojások átlagsulya 55 g,a héj sulya 5,o g volt.
A szegedi Keltető Állomásról gyüjtöttük a keltetett tojáshéjat,amely szintén tojó A-val és mészkiegészitéssel táplált New hampshire hucsibe szülőállományától eredt.A kikeltetett héj átlagosan 4,9 g sulyu volt,a keltetés előtt 5,2 g,a friss tojás pedig 56 g.
A tojás héját a feltörés után azonnal langyos folyó vizben megmossuk, a keltetői héjat a szedés után 5-1o percig áztatjuk,majd a magzatburkok által képezett hártyát lehuzva alaposan leöblitjük,és szürőpapirra egyenként leboritva megszáradni hagyjuk.A légszáraz héjat porcelán golyósmalomban vagy elektromos kávédarálón dara finomságura őröljük,és 1oo grammonként 1ooo ml klo-

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED

roform-metanolt /2:1/ hozzáadva egy éjszakán át ledugaszolva állni hagyjuk. Másnap az elegyet durvább üvegszűrőn /G 3/ leszűrjük, majd az oldószer ujabb részleteivel, vizfürdőt használva, 45-5o C°-on folytatjuk az extrahálást. Végül a kalciumszappan tökéletes kinyerése céljából petroléter/8o°/-metanol /3:5/ elegyével fejezzük be az extrakciót. Az egyesitett extraktumot vákuumban 5o C° alatti hőmérsékleten bepároljuk. A maradékot kevés oldószerrel felvéve szűk pórusu /G 4 vagy G 5/ üvegszűrőn átszűrjük, a lombikot és a szűrőt a kétféle extrahálószerrel felváltva többször utánaöblitjük, ügyelve arra, hogy közben anyagveszteség ne támadjon. Az igy nyert kristálytiszta oldatot vákuumban ismét bepároljuk.

IV.2. Hidrolizis, a hidrolizátum feldolgozása. Észterszám meghatározása

loo g tojáshéj extraktumát lo ml o,1 n metanolos káliluggal, visszafolyós hűtőt alkalmazva, vizfürdőn 3o percig forraljuk. Lehűlés után a hidrolizátumot vizzel meghigitjuk, és a lugos elegyből peroxidmentes éterrel az el nem szappanosodott anyagokat kirázzuk. Ezután 1,2 ml 1 n sósavval savanyitunk, és a felszabaduló zsirsavakat 8o°-os petroléterrel extraháljuk. Az éteres és a petroléteres fázist vizmentes nátriumszulfáton száritjuk, szűrjük, majd bepároljuk. Tekintettel arra, hogy a lugos közegből való kirázás az emulzióképződés miatt különösen kis anyagmennyiségeknél nehezen megy, és veszteség-

gekkel jár,ezt a lépést általában elhagytuk,és a hidrolizis liofob termékeit együtt nyertük ki,ez a további vizsgálatokban nem okozott zavart.

A glicerin a vizes fázisban marad.

Ha a hidrolizist ismert mennyiségü extraktummal és ismert faktoru KOH mérőoldattal hajtjuk végre,majd ennek fölöslegét fenolftalein jelenlétében sósav mérőoldattal visszatitráljuk,az adatokból kiszámitható lugmennyiség az összes elszappanositható zsirsav /szabad + észterkötésben levő/ mennyiségével arányos.Ha a kálilug mennyiségét mg/g zsiradékra vonatkoztatjuk,akkor a szappanszámot kapjuk meg.Ha a szappanszámból a szabad zsirsavak mennyiségére utaló,és hasonlóképpen megadott savszámot levonjuk,az észterszámot kapjuk meg.

A savszámot ugy határozzuk meg,hogy a zsiradékot fenolftalein jelenlétében előzetesen semlegesitett alkohol-éter /1:1/ elegyében feloldjuk és o,1 n metanolos KOH mérőoldattal megtitráljuk a fenolftalein színének megjelenésig.

	Héj g	Zsiradék g	Fogyott o,1n HCl visszatitrálásra		Fogyás ml	Faktor	Szappanszám
			Vakpróba ml	Héj ml			
Vegyes	25o	o,o545	8,46	7,54	o,92	o,926	89
Fehér	114	o,o23o	1o,86	1o,2o	o,66	o,964	155
Barna	94	o,o241	8,7o	8,o5	o,65	1,oo5	152
Keltetési /törzsoldatból/	45	o,o149	8,72 7,7o	8,47 7,42	o,25 o,28	1,271	126

1 ml o,1n HCl 5,61 mg KOH-t mér.

	Héj g	Zsiradék g	Fogyott o,1nKOH ml	Faktor	Savszám	Észter-szám
Vegyes			o		o	89
Fehér			o		o	155
Barna			o		o	152
Keltetői /törzs-oldatból/	45	o,o149	o,11	1.119	46	8o

IV.3.A rétegkromatográfia gyakorlata

Vékonyréteg készitése /31/

25 g Silicagel G adszorbenst száraz Erlenmeyer lombikba mérünk,és 5o ml desztillált vizet hozzáadva másfél percig erőteljesen rázzuk,majd tiszta,száraz,zsirtalanitott üveglapra felvisszük vékony rétegben,amelyet 2o perc szikkasztás után 3o percig 11o°-on aktiválunk. Ha nem használjuk fel azonnal,akkor száritószerrel ellátott tankban néhány napig tárolhatjuk.

Futtatószerek

Valamennyit közvetlenül a felhasználás előtt kell készitenünk.

Lipoidokra:ciklohexán-éter 1:1 /38/

kloroform-aceton 4:1 /31/

ciklohexán-kloroform 1:1,aluminiumoxid lapon

benzol,majd kloroform /3o/

széntetraklorid

Glicerinre:kloroform-aceton-5n ammónia 1o:8o:1o /31/

Előhívószerek

Lipidekre,szteroidokra:

Foszformolibdénsav 5%-os alkoholos oldata /31/,leszürve. A kromatogramot bepermetezés után kb.5 percig 7o°-on tartjuk.

Antimontriklorid 24%-os kloroformos oldata /32/. A kromatogramot bepermetezés után 1o percig 11o°-on tartjuk.

Antimonpentaklorid 2 tf-át 8 tf széntetrakloriddal elegyitjük /31/,és bepermetezés után a kromatogramot a foltok megjelenéséig 12o°-on tartjuk.

Foszforsav /31/:1,7o fajsulyu ortofoszforsavat vizzel 1:1 arányban higitunk.A lapot átnedvesedésig befujjuk,1o-2o percig 12o°-on melegitjük,majd analitikai kvarclámpa alatt vizsgáljuk.Ezután 1,5%-os alkoholos foszformolibdénsavval is befujjuk,és 2-5 percig melegitjük a foltok előtünéséig.

Dragendorff reagens kvaterner ammóniumbázisokra,kolinra, lecitinre /31/:

I.8 g bázisos bizmutnitrátot 2o ml 2o%-os /1,15 fajsulyu/ salétromsavban oldunk.Az oldatot lassan összekeverjük 2o g KJ és 1 ml 6n sósav és 5 ml viz elegyével.Az igy nyert sötét szinü oldat térfogatát 95 ml-re kiegészitjük, ha üledéke van,leszürjük.A narancsvörös szinü oldatot végül 1oo ml-re feltöltjük./Kb.1o napig eláll./

II.Befujó oldat:2o ml vizet,5 ml 6n sósavat ,2 ml I. oldatot összekeverünk és 6 ml 6n nátriumhidroxidot összekeverünk.Ha bizmuthidroxid válnék ki,1-2 csepp sósavval visszasavanyitjuk a csapadék oldódásáig.

Vanillin-foszforsav,szteroidokra /31/:

1 g vanillint 1oo ml 5%-os foszforsavban oldunk.Elő-hivás 1o-2o percig 12o°-on.

Vanillin-kénsav,szteroid alkoholokra és ketonokra /31/:

3 g vanillint 1oo ml etanolban oldunk,és az oldathoz o,5 ml konc.kénsavat csöpögtetünk.A kromatogramot 12o°-on melegitjük a szürkéskék foltok megjelenéséig.

Primer aminokra,kolaminra:

Ninhidrin,kadmiumkloriddal /33/:

Összekeverünk o,o75 g kadmiumkloridot,6 ml vizet,o,3 ml jégecetet,2 g ninhidrint és 1oo ml acetont a felsorolás sorrendjében.A kromatogramot befujásuután enyhén melegitjük a vörös foltok megjelenéséig.A reagenst frissen készitjük.

A glicerin kimutatására:

Benzidin-perjodát reagens /31/

I.o,1%-os vizes nátrium-metaperjodát oldat.

II.2,8 g benzidint 8o ml 96%-os etanolban oldunk,hozzáadunk 7o ml vizet,3o ml acetont és 1,5 ml 1n sósavat.

A kromatogramot az I.reagenssel félig nedvesre befujjuk, majd a II.reagenssel is bepermetezzük.A glicerin szintelen vagy halványkék háttérben citromsárga folt alakjában jelenik meg.

IV.4.Oszlopkromatografálás / 41/

1,2 cm átmérőjü kromatografáló csövet 4o cm magasságig II.aktivitásu /3% viztartalommal;légszáraz/ aluminium-oxiddal megtöltünk./Ez kb.o,1 g zsiradék kromatografálására alkalmas.Kisebb mennyiség esetén 2o mg-onként

1o g adszorbenst veszünk./Az oszlopot petroléterrel /6o-8o°/ átmossuk,és a csepegési sebességet 11 ml-re percenként,beállitjuk.A zsiradékot petroléterben visszük fel,majd fokozatosan növekvő koncentrációju étert tartalmazó petroléterrel eluálunk.Először 2% éter tartalmu petroléterrel eluálva a koleszterinészterek jönnek le,az első 75-1oo ml frakcióban. Az eluálást 8%-os éter-petroléterrel folytatva a második 75-1oo ml-ben a trigliceridek jelennek meg.Végül 25%-ra emelve az éter koncentrációját a harmadik 75-1oo ml-ben a koleszterin jön le.

A fenti recepttől lényegében nem tértünk el.Brockman szerint készitett aluminiumoxidot használtunk,és 22 cm-es oszlopon 2%-os éter-petroléterrel eluálva 4o-6o ml között jött le a koleszterinészter és az UV-ben fluoreszkáló ismeretlen anyag,a legtöményebb az 5%-ik 1o ml-es frakció volt;az eluálást folytatva 7o-11o ml között jött le a glicerid,a fő frakció a 7o-8o ml-es részlet volt;25%-os oldattal tovább eluálva a 15o-19o ml-es részlettel jött le a koleszterin.

IV.5.Szinreakciók

Liebermann-Burchard reakció:

A szteroid kloroformos oldatához 1 ml jégecetet és 1 csepp konc.kénsavat adunk.

Epesavak kimutatása /35/:

A vizsgálandó anyag száraz maradékához 1 ml jégecetet, 1 ml acetont,o,5 ml 1,7o fajsulyu foszforsavat és o,2 ml 2%-os vizes furfurololdatot adunk,amelyet frissen

desztillált furfurolból készítünk.Összerázás után 7o°-os vízfürdőn tartjuk 3o percig,majd jeges vízbe helyezzük.Epesavak jelenlétében ibolyásvörös színeződés áll elő./Ha a hőmérsékletet megemeljük,vagy hosszabb ideig melegítjük az oldatot,teljesen megsötétedik,ezért a reakció körülményeit pontosan meg kell tartani./

Pettenkoffer-féle próba:

A vizsgálandó vizes oldat néhány ml-ét 1-2 csepp lúgos nádcukorral elegyítjük,majd 1-2 ml konc.kénsavat rétegezünk alá.Epesavak jelenlétében az érintkezési felületen ibolyásvörös korong látható.Hűtés közben összerázva az oldat biborszínűvé válik.

<u>Molibdénsók reakció</u> a foszfát ion kimutatására /36/:

A vizsgálandó oldat 2-5 ml-éhez 1 ml molibdén reagenst, 1 ml hidrokinon reagenst és 2 ml szulfit reagenst adagolunk kevergetés közben.2o-25 perenyi állás után fejlődik ki teljesen a foszfát ionok jelenlétében keletkező kék színeződés.

Molibdén reagens:
16o ml desztillált vizet 4o ml konc.kénsavval elegyítünk.A teljesen lehűtött oldatban 1o g ammóniummolibdátot oldunk fel.
Hidrokinon reagens:
2oo ml desztillált vízhez 1 ml konc.kénsavat adunk,majd 2 g tiszta,nem megbarnult hidrokinont oldunk fel benne.
Szulfit reagens:
4o g vízmentes nátriumszulfit és 4o g vízmentes nátriumbiszulfit keverékét apránként 32o ml vízben feloldjuk és az oldatot megszűrjük.

A reagensek hűtőszekrényben hetekig elállnak.

IV.6.Lipoidoldékony kalcium kimutatása és mennyiségi meghatározása

A kalcium kimutatásánál célszerű az extrahálást követően a lipoid oldatát G 5 jelzésű üvegszűrőn leszűrni az esetleg belekerült finom tojáshéjpor eltávolítása céljából.A meghatározáshoz szükséges valamennyi oldatot kétszer desztillált vízzel készítjük analitikailag legtisztább vegyszerekből.Ezenkívül minden meghatározással párhuzamosan üres kísérletet is végzünk.

Kimutatás /36/:

15o g tojáshéj extraktumát teljesen bepároljuk,majd a száraz maradékot 1o ml kloroform és 5 ml o,1n sósav keverékével felrázzuk,és a fázisokat kismérető választótölcsérben elválasztjuk.A savas fázishoz o,2 ml telített ammóniumklorid oldatot adunk,majd 1 csepp fenolftalein jelenlétében konc.ammóniumhidroxid oldattal semlegesítjük a fenolftalein színének megjelenéséig,végül 5o%-os ecetsavval visszasavanyítjuk elszintelenedésig.Az oldatot ezután 5o-6o°-os vízfürdőn felmelegítjük és néhány csepp telített ammóniumoxalát oldatot adunk hozzá.Kalcium ion jelenlétében fehér kristályos csapadék válik le, amely ecetsavban nem,kénsavban azonban feloldódik.

Permanganometriás meghatározás:

Elegendő mennyiségű csapadék mennyiségi mérésre továbbvihető:a leválasztott csapadékot leülepedésig vízfürdőn tartjuk,majd lehűlés után tömör analitikai szűrőpapíron /Schleicher-Schüll 589³/ leszűrjük,és hideg vízzel oxalát mentesre mosnuk./Kismennyiségű csapadék esetén a

csapadék leválasztásával párhuzamosan készitett mosófolyadékot használhatunk,amely a csapadék oldódását gátolja./Az oxalát mentes csapadékot meleg 5n kénsavval leoldjuk a papirról és a kénsavas oldatot egy főzőpohárba gyüjtjük.A papirt forró vizzel savmentesre utánamossuk, végül a meleg oldatot o,o5n $KMnO_4$ mérőoldattal megtitráljuk a permanganát színének megjelenéséig.

2 kg tojáshéjból ilyen módon határoztuk meg a lipoidban oldható kalciumot.A kinyert lipoidot 3oo ml 12o-as petroléterben felvettük és ennek 2oo ml-ét 3x2oo ml 1/2o n sósavval kiráztuk.A vizes fázist 55 ml-re bepároltuk,és az igy nyert törzsoldat 1o ml-ével a leirt módon eljárva 1,2o ml 1,1 ml 1,o76 faktoru o,o2 n $KMnO_4$ mérőoldat fogyott,a párhuzamosan végzett vakpróbára o,2 ml.Ennek alapján a tojáshéj lipoidoldékony kalcium tartalma 1,6 γ/g.

<u>Komplexometriás meghatározás kiszoritásos eljárással</u> /45/: 1oo-15o g tojáshéj extraktumát 1o ml kloroform és 5 ml o,1n sósav keverékével felrázzuk,és a fázisokat szétválasztjuk.A kloroformot 5 ml o,1n sósavval még egyszer átmossuk és a savas fázisokat egyesitjük,o,95 ml 1 n nátriumhidroxiddal közelitőleg semlegesitjük,2 ml ammóniás-ammóniumkloridos puffert,Mg-EDTE komplexet /készen kapható,szilárd,vagy titrálással készitett,1o ml o,o2M oldat/ adunk hozzá,végül o,5 ml Eriochromblau SE indikátor oldat jelenlétében o,oo1M EDTE mérőoldattal titráljuk színátcsapásig.Párhuzamosan vakpróbát végzünk,és a vizsgálandó minta és a vak fogyásának különbségével számolunk.

Meghatározás visszatitrálással:

A kalcium kinyerését és az oldat pH-jának beállitását a fentivel azonos módon végezzük,majd az indikátor hozzáadása után az oldatot EDTE mérőoldattal titráljuk szinátcsapásig /elhuzódó végpontot észlelünk/,ezután még néhány ml mérőoldatot adagolunk hozzá,pontosan mérve a mennyiségét,majd feleslegét o,ooIM $MgSO_4$ mérőoldattal pontosan visszatitráljuk.

A komplexometriás meghatározásokhoz szükséges oldatokat a felhasználás előtt készitjük el.

Indikátor:
Eriochromblau SE o,o5%-os vizes oldata.Az indikátor fémionokkal alkotott komplexe ibolyásvörös,a szabad indikátor kék szinü.
Puffer:
5o g ammóniumkloridot és 4oo ml 25%-os ammóniaoldat elegyét vizzel looo ml-re töltjük fel.
o,ooIM EDTE mérőoldat:
o,3722 g kristályos EDTE-dinátriumsót /mólsulya 372,2/vizzel looo ml-re oldunk.Faktorát $MgSO_4$-ra állitjuk be: lo ml pontosan o,ooIM $MgSO_4$ oldathoz l ml puffert és o,25 ml indikátort adunk, majd titrálunk szinátcsapásig az EDTE mérőoldattal.
o,ooIM $MgSO_4$ beállitó oldat:
Analitikai tisztaságu $MgSO_4.7H_2O$ ép,el nem állott kristályaiból o,2564 g-ot kétszer desztillált vizzel looo ml-re oldunk.
Mg-EDTE készitése titrálással:
o,37 g EDTE-dinátriumsót 25 ml vizben oldunk, egyidejüleg o,25 g $MgSO_4.7H_2O$-t is feloldunk 25 ml vizben.Az EDTE oldathoz 2,5 ml puffert és l ml indikátort adunk,majd az elkészitett $MgSO_4$ oldattal közelitőleg megtitráljuk.A titrálást o,ooIM oldattal fejezzük be.Az igy nyert Mg-EDTE oldat kb.o,o2M.Esetleges EDTE fogyasztását üres kisérletben határozzuk meg.

Mérési adatok:

Kiszoritásos eljárás:

15o g vegyes eredetü héj extraktumára ezzel az eljárással 12,1 ml o,ooIM EDTE oldat fogyott,melynek faktora o,962

Szegedi Egyetem Könyvtár

volt.A vakpróba fogyása 2,8 ml.Ezek alapján a lipoid-oldékony kalcium tartalom 2,4γ/g tojáshéj.

Visszatitrálás:

	Tojáshéj g	Hozzáadott EDTE ml	Visszatitrálásra fogyott $MgSO_4$ ml		Lipoid-oldékony Ca γ/g héj	
			vakpróba ml	héj ml		
Vegyes	300	50,0	45,0	17,7	3,6	
Fehér /törzs-oldatból/	73,3	10,0	6,48	5,02	0,80	0,92
	67,4	10,0	8,35	6,70	0,98	
Barna /törzs-oldatból/	67,2	10,0	6,68	5,42	0,75	0,67
	44,3	10,0	8,35	7,70	0,59	
Keltetési	450	3,0	2,87	2,03	0,075	

IV.7.Zsirsav-metilészter készitése és gázkromatografálása

0,1-1 g lipoidot 6 ml peroxidmentes éterben oldjuk és hosszunyaku 20 ml-os ampullába töltjük,majd 6 ml 10%-os metanolos kálilugot adunk hozzá.Az ampullát nitrogén gázzal átöblitjük,leforrasztjuk és 15 percre 40°-os vizfürdőbe mártjuk.Lehülés után az ampullát felnyitjuk,tartalmát néhány ml vizzel meghigitjuk,majd konc.kénsavval fenolftalein jelenlétében jeges vizes hütés és keverés közben óvatosan semlegesitjük.A végpont elérése után további 1,5 ml kénsavat adunk az elegyhez és 10 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk,majd kb.azonos térfogatu telitett nátriumkloriddal összekeverjük,és 3x10 ml éter-heptán 1:1 elegyével kirázzuk.Az organikus fázisokat egyesitve vizmentes nátriumszulfáton száritjuk,szürjük,az oldószert vákuumban ledesztilláljuk és a maradékot kloroformban felvesszük.

Kromatografálás: Willy-Giede 18/3 típusu készüléken, amelynek adatai: oszlophossza: 2 m

oszlop ø: 3 mm

töltet: 10% diethylenglycolsuccinate-Chromosorb P /100-120 mesh/

vivőgáz: nitrogén

elpárologtatási hőmérséklet: 190 C°.

IV.8. Koleszterin és koleszterinészter mennyiségi meghatározása /46/

A vizsgálathoz felhasznált anyagmennyiséget ugy választjuk meg, hogy a mérésre kerülő koleszterin mennyisége 20-400 γ legyen. Ez kb. 100 g tojáshéjból kiindulva 50 ml-es törzsoldat 5 ml-ének felel meg.

Összes koleszterin meghatározása

A lipoidból kloroformos törzsoldatot készitünk, amelynek 5 ml-ét nagyméretü /1,6x18/ kémcsőbe pipettázzuk, 2 ml ecetsavanhidridet és 0,1 ml konc. kénsavat adunk hozzá, összerázzuk, és 10 perc mulva az extinkciót 650 mμ hullámhosszon leolvassuk.

Koleszterinészter meghatározása

A kloroformos törzsoldat 10 ml-ét vizfürdőn beparoljuk, majd 2 ml alkoholban vesszük fel és 0,5 ml 10%-os alkoholos digitonint adunk hozzá, utána ismét szárazra paroljuk. /Ugy tapasztaltuk, hohy az eredmények jobban reprodukálhatók voltak, ha a digitoninnal egy éjszakán át állni hagytuk az anyagunkat./ A száraz maradékot 10 ml koroformban felvesszük, ekkor a kicsapódott koleszterin nem oldódik fel; az oldhatatlan résztől szüréssel megszabadulunk,

és a szűrlet 5 ml-ével a fentiekkel azonos módon elvégezzük a színreakciót. A meghatározással párhuzamosan kalibrációs görbét veszünk fel, és vakpróbát végzünk, amelynek értékét figyelembe vesszük.

Mérési adatok:

Összes koleszterin:

	Héj g /törzsoldatból/	E_{65o}	Kalibráció	γ	γ/g héj	γ/g tojáshéj
Vegyes	1o	o,o79	I.	155		15,5
Fehér	18,4	o,o64	II.	24o	13,o	
	18,4	o,o59	III.	248	13,5	13,3
	7,4	o,o28	III.	1oo	13,5	
Barna	16,8	o,o78	II.	312	18,6	
	16,8	o,o74	III.	3o8	18,3	18,4
	6,7	o,o37	III.	156	23,2?	
Keltetői	11,2	o,15o	IV.	96o	42,6	
	11,2	o,152	IV.	985	43,7	43,1

Koleszterinészter:

	Héj g /törzsoldatból/	E_{65o}	Kalibráció	γ	γ/g héj		Szabad koleszterin γ/g héj
Vegyes	1o	o,o53	I.	1o2	1o,2		5,3
Fehér	18,4	o,o53	II.	2oo	1o,8		
	18,4	o,o5o	III.	21o	11,4	11,2	2,1
	18,4	o,o5o	III.	21o	11,4		
Barna	16,8	o,o64	II.	24o	13,o		
	16,8	o,o58	III.	246	13,4	13,1	5,3
	16,8	o,o56	III.	236	12,8		
Keltetői	11,2	o,133	IV.	77o	34,2		
	5,6	o,o73	IV.	32o	28,5	3o,9	12,2

Kalibráció:

I.		II.		III.		IV.	
γ	E	γ	E	γ	E	γ	E
20	0,014	50	0,014	50	0,012	160	0,038
40	0,024	100	0,028	100	0,024	320	0,073
80	0,042	200	0,053	150	0,036	480	0,098
120	0,066	300	0,081	200	0,048	640	0,118
160	0,077	400	0,106	250	0,060	800	0,136
200	0,101			400	0,095	1600	0,183
300	0,158						
400	0,198						

IV.9.A glicerin meghatározása /47/

A méréshez minimálisan 100 g tojáshéj extraktumát használjuk fel,amelyet 10 ml 0,1n metanolos kálilúggal 30 percig forralva hidrolizálunk.Ezután az elegyet 1 csepp fenolftalein jelenlétében 0,1n kénsavval kénsavval semlegesitjük,majd a metanol elüzése céljából vizfürdőn szárazra pároljuk.A maradékot 15 ml kloroform és 10 ml víz keverékében felvesszük,és kisméretü választótölcsérbe visszük át.Alapos összerázás után a fázisokat szétválasztjuk.A hidrolizáló lombikot és a választótölcsért kloroform-víz elegyével utánaöblitjük,és a kloroformos fázist még 5 ml vizzel átmossuk.Az egyesitett vizes fázis,amelynek térfogata 17-18 ml,tartalmazza a tojáshéj lipoidban előforduló glicerin teljes mennyiségét.

A vizes oldatot 200 ml-es csiszolt dugós Erlenmeyer lombikban 3 ml 0,3M kénsavas perjódsavval /45 g $Na_3H_2JO_6$ 500 ml 5%-os kénsavban oldva/ elegyitjük és ledugaszolva összerázzuk.10 perc várakozás után 10 ml-es osztott pipettából addig csepegtetünk 1,5M nátriumszulfitot az ol-

datba,mig a kezdetben kiváló jód szine eltünik,majd további o,5 ml-t adunk még hozzá.Ezután 1 csepp metilvörös jelenlétében 2o%-os nátriumhidroxiddal semlegesitjük,majd 1 ml 1o%-os ecetsavval savanyitjuk.Az esetleg felmelegedett oldatot vizcsap alatt lehütjük.A lombik dugóját időnként kiemeljük,hogy a csiszolathoz tapadt perjodátot is redukáljuk,közben ledugaszolva összerázzuk az oldatot.Ezután 5-1o ml pentánt rétegezünk az oldatra,és 1o perc várakozás után a szulfit feleslegét, 1o csepp 1%-os keményitő indikátort használva jelzőül, 5%-os jódoldattal oxidáljuk./A jódoldatot célszerü bürettából adagolni./A végpont közelében ledugaszolva erőteljesen összerázzuk az oldatot,majd bürettából o,1n jód mérőoldattal kék szinig titráljuk az oldatot.A szin kialakitásához a végpontban 1 csepp mérőoldat szükséges. Amennyiben az 5%-os jódoldattal tultitráltunk volna, ugy 1 csepp szulfit hozzáadása után megismételjük a beállitást.Ezután 3 ml 2o%-os nátriumhidroxiddal lugositunk,o,2-o,3 g káliumcianidot adagolunk az oldathoz,majd a pentánréteg folytonosságának megtartása mellett óvatosan összekeverjük.3-4 perc elteltével 1o ml-es osztott pipettából 2o%-os sósavval semlegesitünk,majd további 1 ml-rel savanyitunk,végül lassu keverés mellett mikrobürettából o,1n jódoldattal kék szinig titrálunk.
A végpont elérése után ledugaszolva összerázzuk az oldatot,és ha szükséges,még 1-2 csepp jódoldattal befejezzük a titrálást.
A glicerin egyenértéksulya 23,o2 g.

Mérési adatok:

	Héj g	Fogyás ml	Normalitás	Faktor	Vakpróba ml	Glicerin γ/g héj	
Vegyes	46	3,77	0,01	0,716	0,70	11,0	
	46	3,80	0,01	0,794	0,20	14,3	12,4
	51	3,30	0,01	0,812	0	12,0	
Fehér /törzsoldatból/	73,3	0,28	0,1	0,994	0,04	7,5	7,7
	67,4	2,12	0,01	1,285	0,33	7,9	
Barna /törzsoldatból/	67,2	0,35	0,1	0,994	0,04	10,6	9,9
	44,3	1,69	0,01	1,285	0,33	9,1	
Keltetői	45	0,25	0,1	0,721	0		9,2

Összefoglalás

A tojáshéj gyakorlatban alkalmazott és kisérletileg igazolt antirachitikus hatása eddig még nem tisztázott faktornak köszönhető;ennek keresésével kapcsolatban foglalkoztunk a tojáshéj lipoidjaival,amely a kromatográfiás összehasonlités alapján nem mindenben azonos a tojássárgából ill.fehérjéből nyert lipoiddal.

Vizsgálataink szerint a tojáshéj lipoid alacsonyabb szénatomszámu telitett zsirsavak mellett /$C_{8,10,12,14}$/ nagyobb mennyiségü palmitinsavat és olajsavat tartalmaz.Ezek a zsirsavak glicerid,koleszterinészter és kalciumsó formájában fordulnak elő a tojáshéjban, utóbbi mint lipoidoldékony kalcium jelentkezik.

Szabad koleszterint,és egy,a 7-dehidrokoleszterinre emlékeztető,kicsiny mennyiségben jelenlevő,nem azonositott anyagot is tartalmaz a tojáshéj lipoid.

Foszfolipoidot,zsiroldékony vitaminokat /A,D,K,E/, és provitaminokat /karotin,7-dehidrokoleszterin, ergoszterin/,valamint epesavakat nem sikerült kimutatnunk.

A tojáshéjban állás közben 7-oxikoleszterin jelent meg,amely a koleszterinből keletkezett oxidativ uton.

A minőségi vizsgálatot mennyiségi mérésekkel kiegészitve azt tapasztaltuk,hogy a különböző eredetü és tipusu tojáshéj lipoidösszetétele nagyjából azo-

nos,míg a keltetett tojás héjáé lényegesen eltér az előzőtől,amennyiben viszonylag nagymennyiségü szabad zsirsav jelenik meg benne,lipoidoldékony kalcium tartalma pedig csaknem teljesen eltünik. Előkészitő baromfikisérletünk megerősitette azt a feltevésünket,hogy a tojáshéj biológiai hatása a D vitamintól és a nyomelemektől független,egyéb faktorhoz kötődik.

A kisérleti tapasztalatok közül a legjellemzőbb az,hogy fiatal állatokon a D vitamin megvonásakor jelentkező rachitist a tápba a takarmánymész helyett bekevert 1,7% tojáshéj etetése erősen késleltéti.A továbbiakban ezt a hatást felhasználva próbáljuk azonositani a tojáshéj antirachitikus faktorát,fokozatosan szükitve a kört a tojáshéj lehetséges anyagai között.Ha a hatás bizonyitottan a lipoid frakcióhoz kötődnék,tüzetesebben foglalkoznánk ennek minden komponensével,elsősorban a keltetés folyamán feltünően lecsökkenő lipoidoldékony kalciummal és a már emlitett,azonositatlan anyaggal,amelyet kisüzemi méretü extrakcióval nyernénk ki további vizsgálatokra alkalmas mennyiségben.

Irodalom

1.F.Lichtenstein:Zentralblatt f.Gynäkologie 5,346 /1948/;3,182 /1951/

2.Krompecher I.,Krámli A.,Leikes Gy.,Vályi-Nagy T., Szabó S.:Debreceni Orvostud.Egyetem Tud.Üléseinek Évkönyve 1952-53.21.

3.S.Krompecher:Die Grundlagen der Eierschalentherapie. VEB Gustav Fischer,Verlag Jena 1958

4.E.Tarsoly:Acta Chir.Acad.Sci.hung.4,63,367 /1963/; 7,263 /1966/;11/1/,51 /1970/

5.E.Tarsoly:Symp.Biol.Hung.7,251-256 /1967/

6.K.Bronsch,T.Diamanstein:Zeitschrift für Veterinarmedizin,Reihe A.11,323-332 /1969/

7.T.Diamanstein:Archiv für Geflügelkunde 30/5/,421-23 /1966/

8.W.Strempel:Probleme der Intensiven Geflügelwirtschaft 7,4-26 /1967/

9.J.Hawthorn,J.M.Leitch:Recent advance in food science. Vol.1.122-128,BulerWorth,London 1962

10.W.Masshoff,H.J.Stolpmann:Zeitschrift für Zellforshung und Mikroskopische Anatomie 55,818-832/1961/

11.C.F.Petersen:World's poultry Science Journal 21/2/, 110-138 /1965/

12.T.Itoh,T.Hatano:Poultry Science 43/1/,77-80 /1964/

13.C.Tyler:Journal of Ornithology 105,57-63 /1964/

14.A.R.Terepka:Experimental Cell Research 30/1/,171-182 /1963/

15.C.Tyler,F.H.Geake:Journal of the Science of Food and Agriculture 11,535-547 /1960/;9,473-483 /1968/; 4,587-596 /1953/

16.Nagy Z.,Oláh É.:Kisérl.Orvostudomány 8,516 /1956/

17.A.I.Romanoff,A.L.Romanoff:The Avian Egg.John Viley Co.Sons,New York 1949

18.H.Wetzel:Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung 133,353-357 /1966-67/

19.J.R.Baker,D.A.Balch:Biochem.Journal 82,352-361 /1962/

20.C.Tyler,K.Simkiss:Journal of the Science of Food and Agriculture 4,261-266 /1953/;9,375-380 /1958/

21.Yoshiyuki Inoue,Seisui Kawaguchi:J.Agr.Chem.Soc.Japan 19,653-657 /1943/.Ref:C.A.43 /1949/ 1450i

22.T.Diamanstein,H.Lueders:Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 77/12/,251-252 /1964/

23.L.Schwartz,W.Deckert,H.Ketels:Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und-Forschung 110,78 /1959/

24.O.Völker:Biologisches Zentralblatt 64,184-235 /1944/ Ref:C.A.40 /1946/ 5822/5

25.T.Thunberg:Acta Physiologica Scandinavica 17,83-85 /1949/.Ref:C.A.43 /1949/ 4751b

26.T.Thunberg:Ref:Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und-Forschung 87,260 /1944/

27.T.Diamanstein,K.Bronsch,J.Schluens:Nature 203/4940/, 88-89 /1964/

28.N.P.Tretyakov:Inkubacija.Moszkva 1953

29.Krámli A.:Magyar Kémikusok Lapja 5,148 /1952/

30.Tóth M. diákköri pályamunkája /1968/

31.E.Stahl:Dünnschichtchromatographie.Springer-Verlag, Berlin Göttingen Jena 1962

32.F.O.Osiyemi:West Afr.J.Biol.Appl.Chem.10/1/,28-30 /1967/

33.M.Montreuil,Y.Khouvine:Bull.Soc.Chim.Biol.36,425 /1954/

34.H.Wagner,L.Hörhammer,P.Wolff:Biochem.Z.334,175/1961/

35.M.Jenke:Klin.Woch.1939,317

36.MSZ 6830-53 sz.szabvány A/1 melléklet

37.T.Diamanstein:Archiv für Geflügelkunde 30,421-430 /1966/

38.Spanyár P.,Blazovich M.,Gábor I.-né:Élelmiszervizsgálati közlemények 13,130 /1967/

39.A.Pihl:Scand.J.Clin.Lab.Invest.4,115-121 /1952/ Ref:C.A.1952 8780f

40.Römpp:Vegyészeti Lexikon.Müszaki,Budapest 1961.760.

41.H.Schön,F.Gey:Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 303,81 /1956/

42.K.Szőke,M.Krámer,K.Linder:Fette Seifen Anstrichmittel 67,257 /1965/

43.J.Horváth,A.Krámli:Annales Instituti Biologiae Pervestigandae Hungarici Facs.1,163-165 /1949-1950/

44.A.Krámli:Arch.Biol.Hung.18,376 /1948/

45.Schulek-Szabó:A kvantitativ analitikai kémia elvi alapjai és módszerei.Tankönyvkiadó,Budapest 1966. 319,320,327.

46.F.Rappaport,F.Eichhorn:Clin.Chim.Acta 5,161 /1960/

47.Schulek E.,Maros L.:Magyar Kémiai Folyóirat 65,361 /1959/

48.F.Leuthard:Lehrbuch der Physiologischen Chemie. Walter de Gruyter Co.Berlin 1957.752.

49.S.M.Rapoport:Medizinische Biochemie.VEB Verlag volk und Gesundheit,Berlin 1969.869.

50.F.Bicknell,F.Prescott:Vitamins in medicine.W.Heinemann,London 1953

EGYETEM KÖNYVTÁRA BERLIN HUMBOLDT-EGYETEM 1045/1975