

Um genügend Material auch für eine *präparative* Isolierung des *Setoclavins* zu erhalten, setzten wir unter Einhaltung der beschriebenen Bedingungen einen neuen Versuch mit 20 Schüttelkulturen (=total 2 l Nährlösung) an, denen wir am 5. Tag insgesamt 400 mg Agroclavin in Form des Tartrates zusetzten. Da Agroclavin und Setoclavin sehr schnell abgebaut werden, wurden die Kulturen bereits nach 24 Std. im Turmix homogenisiert und die Basen sofort extrahiert.

Dabei erhielt man 240 mg eines Alkaloidgemisches (60% des eingesetzten Agroclavins), das laut der papierchromatographischen Analyse aus 25% Agroclavin und 75% Setoclavin neben Spuren von Isosetoclavin bestand.

Durch Chromatographieren an der 100fachen Menge Aluminiumoxid (MERCK) nach BROCKMANN wurde zuerst das Agroclavin mit abs. Chloroform eluiert, dann wurde mit Chloroform + 1/2% Methanol eine Fraktion von 160 mg reinem Setoclavin erhalten. Nach Umkristallisieren aus Aceton war das Alkaloid papierchromatographisch rein (135 mg). IR-Spektrum, Farbreaktionen, Smp. und optische Drehung waren genau wie diejenigen von authentischem Setoclavin.

Als Kontrollversuch wurden 5 ERMENMEYER-Kolben mit total 500 ml unbeimpfter Nährlösung mit total 100 mg Agroclavin versetzt und ebenfalls 24 Std. geschüttelt.

Aus diesem Ansatz liessen sich 90% des eingesetzten Agroclavins unverändert zurückgewinnen. Im Papierchromatogramm war nur reines Agroclavin, jedoch keine Spur Setoclavin nachzuweisen.

Wir danken FrI. MICHÈLE CARMELLINO für die Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Zusatz von Elymoclavin und von Agroclavin zu Kulturen des mexikanischen Rauschpilzes *Psilocybe semperviva* HEIM et CAILLEUX konnten diese beiden Mutterkornalkaloide am C-8 hydroxyliert werden, wobei aus Elymoclavin Penniclavin und Isopenniclavin, aus Agroclavin Setoclavin und Spuren Isosetoclavin entstanden.

Ergotamin oder Ergobasin (Ergometrin) wurden durch *Psilocybe*-Kulturen nach partieller Isomerisierung abgebaut, ohne dass hydroxylierte Zwischenprodukte mit intaktem Indolkern fassbar waren.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel

34. Über die Dünnschichtchromatographie von Lipiden

1. Mitteilung

Untersuchungen von Gehirngewebe Multiple-Sklerose-Kranker und Normaler

von C. G. Honegger

(7. XII. 61)

Die Multiple Sklerose wird zu den demyelinisierenden Erkrankungen gezählt und führt im pathogenetischen Geschehen zu herdförmigen Entmarkungen, vorwiegend im Bereiche der weissen Substanz von Gehirn und Rückenmark. Der Abbau der an Lipiden besonders reichen Myelinscheiden, als ein hervorstechendes Merkmal bei dieser Krankheit, hat das Interesse chemisch ausgerichteter Untersuchungen auf diese Stoffklasse gelenkt. Ausgangspunkt bildet eine vergleichende Studie von WEIL¹⁾,

¹⁾ A. WEIL, J. Neuropath. 7, 453 (1948).

welcher eine starke Verminderung von lipidlöslichem P und eine Vermehrung von nicht extrahierbarem P in weisser und grauer Substanz im Gehirn Multiple-Sklerose-Kranker gegenüber demjenigen Normaler fand. Von speziellem Interesse sind jedoch die Arbeiten von CUMINGS²⁾, sowie BAUER & HEITMANN³⁾, welche Analysen an kurzfristig (2 Wochen) formolfixiertem bzw. frischem, *isoliertem* Herd- und Nichtherdmaterial von Multiple-Sklerose- als auch Normal-Hirn durchführten. Übereinstimmend fanden beide Arbeitsgruppen eine deutliche Verminderung der Phospholipide, Cerebroside sowie des Cholesterins in den Herden. Ausser in einem Fall stellte CUMINGS in den Herden regelmässig das Auftreten von Cholesterinestern fest, was BAUER & HEITMANN nicht bestätigen konnten. In der den Herden angrenzenden weissen Substanz sowie der darüber liegenden grauen Substanz fand CUMINGS gegenüber Normalhirn ebenfalls einen Abfall der Phospholipide und teilweises Auftreten von Cholesterinestern, wie auch eine Vermehrung der Neuraminsäure in der grauen Substanz, obwohl diese Bezirke makroskopische Veränderungen nicht erkennen liessen. Zur Beurteilung dieser Befunde ist zu bedenken, dass nach histologischen Untersuchungen in der scheinbar (makroskopisch) normalen weissen Substanz bei der Multiplen Sklerose viele kleine, nur mikroskopisch feststellbare Herde vorhanden sein können. Der übereinstimmenden Farbtonung wegen sind auch die in der grauen Substanz regelmässig vorkommenden Herde von blosserem Auge kaum sichtbar⁴⁾.

In der vorliegenden Arbeit wurde an Stelle der klassisch chemischen Methoden, wie sie in den bisher erschienenen Publikationen Verwendung fanden, die Dünnschichtchromatographie zur Lipidanalyse eingesetzt. Die erfolgreiche Anwendung dieser Methode zur Auftrennung von Lipidextrakten aus Serum, Gehirn und anderen Organen haben WEICKER⁵⁾, JATZKEWITZ⁶⁾ und WAGNER *et al.*⁷⁾ bereits beschrieben. Es wurde vorerst versucht, einen Einblick speziell in die qualitativen Verhältnisse von normalem und pathologischem Gehirngewebe zu erhalten.

A. Material. – Zur Untersuchung gelangte unfixiertes Gehirngewebe von zwei Multiple-Sklerose-Patienten und zwei Normalen, welches im Zeitraum von ca. 6 bis 12 Stunden nach dem Tode entnommen und bis zur chemischen Analyse bei -20° aufbewahrt wurde⁸⁾. Vor der Aufarbeitung wurde das Gewebe aufgetaut, bis es sich schneiden liess, und die Multiple-Sklerose-Herde in Herdzentrum (ohne weisse Substanz) und Herdumgrenzendes (äusserer Teil des Herdes mit angrenzender weisser Substanz) getrennt. Zur Extraktion nach FOLCH⁹⁾ gelangte folgendes Hirngewebe: Multiple Sklerose graue Substanz (MSG), Multiple Sklerose weisse Substanz (MSW),

²⁾ J. N. CUMINGS, *Brain* 76, 551 (1953); 78, 554 (1955).

³⁾ H. BAUER & R. HEITMANN, *Deutsch. Z. Nervenheilk.* 178, 47 (1958).

⁴⁾ G. PETERS, in *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, XIII/2A, p. 527 und 539, Springer Verlag 1958.

⁵⁾ H. WEICKER, *Klin. Wschr.* 37, 763 (1959).

⁶⁾ H. JATZKEWITZ & E. MEHL, *Z. physiol. Chem.* 320, 251 (1960).

⁷⁾ H. WAGNER, L. HÖRHAMMER & P. WOLFF, *Biochem. Z.* 334, 175 (1961).

⁸⁾ Herr Prof. Dr. S. SCHEIDEGGER, Pathologisch-Anatomisches Institut der Universität Basel, stellte in grosszügiger Weise Gehirnmateriale von Multiple-Sklerose-Patienten und Normalen zur Verfügung. Herr Dr. R. WÜTHRICH, Neurologische Klinik der Universität Basel, führte die Isolierung von Multiple-Sklerose-Herd- und Nichtherdmaterial aus. Ich möchte diesen beiden Herren auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen.

⁹⁾ J. FOLCH, M. LEES & SLOANE STANLEY, *J. biol. Chemistry* 226, 497 (1957).

Multiple Sklerose Herdzentrum (MSWH), Multiple Sklerose Herdumgrenzendes (MSWHU), letztere beide aus weisser Substanz; Normal graue Substanz (NG) und Normal weisse Substanz (NW). Die Spaltung der Proteolipide geschah in bekannter Weise¹⁰). Der Wassergehalt des Gewebes wurde an einer kleinen Probe nach BRANTE¹¹) bestimmt. Die Trockengewichte aus verschiedenen Lipidextraktionen sind in Tab. 1 zusammengestellt. In Bezug auf das demyelinisierte Gewebe ist ersichtlich, dass die

Tabelle 1. Lipid- und Wassergehalt des untersuchten Materials

Gehirnmaterial	Lipidgehalt (g/100 g Frischgewebe)				Wassergehalt (g/100 g Frischgewebe)			
	1		2		1		2	
Fall	a	b	a	b	a	b	a	b
Weisse Substanz	16-22 ¹²)				67-74 ¹³)			
NW	16,5		11,5					
MSW	14,6		18,7				68,5	
MSWH	2,72	2,57	5,98		79,8			
MSWHU	9,47	10,9	13,8		72,2		65,6	
Graue Substanz	5-6,2 ¹²)				81-87 ¹³)			
NG	6,04		3,89	4,79				
MSG	5,26	5,25			78,0			
a und b entsprechen Werten aus verschiedenen Bestimmungen								

Lipidkonzentration im MSWH in überaus hohem Masse vermindert ist. Dieselbe Abnahme zeigt sich ebenfalls im MSWHU. Diese Befunde decken sich mit den Resultaten anderer Untersucher²⁾³⁾. Das Normalgehirn 2 weist einen kleineren Lipidgehalt auf, als es den Normalwerten von FOLCH¹²⁾ entsprechen würde. Die Lipidextrakte von MSWH zeichnen sich, wie diejenigen von MSG und NG, durch eine Gelbfärbung aus.

B. Methode. Von den getrockneten Lipidextrakten wurden 1- oder 5-proz. Lösungen in Chloroform hergestellt und davon jeweils eine bestimmte Menge aufgetrennt. Die Extrakte wurden punkt- oder strichförmig auf die mit Chloroform vorgereinigten⁶⁾ Kieselgel-G-Platten aufgetragen und mit drei Laufmitteln (Lauf CMW: Chloroform: Methanol:Wasser = 24:7:1 oder 60:20:3 (v/v); Lauf C: Chloroform⁶⁾; Lauf T: Tetrachlorkohlenstoff⁶⁾) chromatographiert. Die strichförmige Auftrageart führt zur Ausbildung scharfer Banden, wodurch die Auftrennung gewisser Substanzen noch möglich ist, die, wenn punktförmig aufgetragen, in einem Fleck erscheinen (vgl. Fig. 1 und Fig. 4). Die Tatsache, dass die Aktivität des Kieselgels G (MERCK) von Lieferung zu Lieferung Unterschiede aufweisen kann, nötigte uns, speziell die Zusammensetzung des Laufmittels 1 zu variieren, um möglichst vergleichbare Wanderungswerte zu

¹⁰⁾ J. FOLCH, I. ASCOLI, M. LEES, J. A. MEATH & F. N. LEBARON, *J. biol. Chemistry* 191, 833 (1951).

¹¹⁾ G. BRANTE, *Acta physiol. scand.* 78, Suppl. 63 (1949).

¹²⁾ J. FOLCH & F. N. LEBARON, in *Metabolism of the Nervous System*, ed. by D. RICHTER, p. 67, Pergamon Press 1957.

¹³⁾ R. J. ROSSITER, in *Neurochemistry*, ed. by K. A. L. ELLIOTT, I. H. PAGE & J. H. QUASTEL, p. 11, Thomas, Springfield Ill. 1955.

erhalten. Zur Kontrolle von Aktivitätsschwankungen und zur Berechnung der R_x -Werte wurde auf jeder Platte jeweils ein Eichgemisch, bestehend aus 4 bekannten Lipiden (Lecithin, Fleck 5; Cholesterin, Fleck 16; Cholesterinsteat, Fleck 26; Squalen, Fleck 28), neben den zu untersuchenden Extrakten mit aufgetrennt. Die Sichtbarmachung der Flecke erfolgte mit verschiedenen Reagenzien (Ammoniummolybdat, Phosphormolybdänsäure, Ninhydrin, Kaliumwismutjodid und Diphenylamin), welche sich jedoch mit Ausnahme von Ninhydrin für fettlösliche Bestandteile als eher unspezifisch erwiesen. Die Erfahrung, dass quantitative, mit Hilfe bestimmter Farbreaktionen durchgeführte Untersuchungen von nicht aufgetrennten Lipidgemischen Summationswerte darstellen, konnte mit dieser Methode eindeutig demonstriert werden.

Ergebnisse. Die Chromatogramme der Gehirnextrakte von einem Multiple-Sklerose-Patienten und zwei Normalen sind in Fig. 1–5 dargestellt. Zur Beurteilung der Chromatogramme wurden die deutlich sichtbaren Flecke vom Startpunkt aus, in der Reihenfolge Lauf CMW, Lauf C, Lauf T, fortlaufend nummeriert, was einer Skala steigender Lipophilie entspricht. Flecke, die im weniger lipophilen Laufmittel einen hohen R_f -Wert aufweisen, lassen sich im lipophileren Fließmittel meist noch in mehrere Substanzen auftrennen. Die Numerierung kann erfolgen, wenn der zu beurteilende Extrakt weitmöglichst in die einzelnen Komponenten aufgetrennt vorliegt. Aus den Chromatogrammen können ca. 30 sich deutlich abzeichnende Flecke unterschieden werden. Aus ihrer Anfärbbarkeit geht hervor, dass einige davon sich noch aus mehreren Substanzen mit dem gleichen R_f -Wert zusammensetzen. Anhand von Vergleichssubstanzen war es möglich, einige der Flecke zu identifizieren oder Hinweise über ihre mögliche chemische Zusammensetzung mit Hilfe der Wanderungswerte und Anfärbbarkeit zu gewinnen. Es handelt sich dabei um folgende Substanzen: Fleck 3 Sphingomyelin, Fleck 5 Lecithin, Flecke 8 und 9 Kephaline, Flecke 10 und 11 Cerebroside, Fleck 16 Cholesterin, Flecke 18 und 19 Neutralfette (Glyceride) und Flecke 22–26 Cholesterinester. Bei der vergleichenden Betrachtung der Multiple-Sklerose- und Normal-Extrakte muss man sich vor Augen halten, dass von jedem Extrakt dieselbe Lipidmenge aufgetrennt wurde. Anhaltspunkte über die quantitativen Verhältnisse, wie sie im Gewebe vorliegen, können demnach nur aus MSG und NG sowie MSW und NW erhalten werden, welche gleiche oder sehr ähnliche Trockengewichte aufweisen.

Aus Fig. 1 und 2 ist ersichtlich, dass MSW_1 und NW nur geringfügige Unterschiede aufweisen, die sich in einer schwachen Vergrößerung der Flecke 15 sowie 21–30 und einer Abnahme von Fleck 18 äussern. Zwischen NW_1 und NW_2 sind geringe Abweichungen in den Flecken 1, 6, 13 und 15 erkennbar. Dagegen sind im $MSWHU_1$ und speziell im $MSWH_1$ deutliche Veränderungen gegenüber NW und MSW_1 festzustellen, wobei die Flecke 7, 12, 13, 14, 15, 17 (nicht identifiziert), 18, 19 (Neutralfette), 20 und 21–30 (z. T. Cholesterinester, was schon von CUMINGS²⁾ festgestellt wurde) neu oder vergrößert erscheinen. Ein Auftreten von Neutralfetten und Cholesterinestern wurde auch histochemisch in frischen Herden der weissen Substanz, als erste sichtbare chemische Veränderung, festgestellt¹⁴⁾. Die Farbreaktion mit Diphenyl-

¹⁴⁾ F. SEITELBERGER, in *Modern scientific aspects of Neurology*, ed. by J. N. CUMINGS, p. 148 ff., Edward Arnold Ltd. 1960.

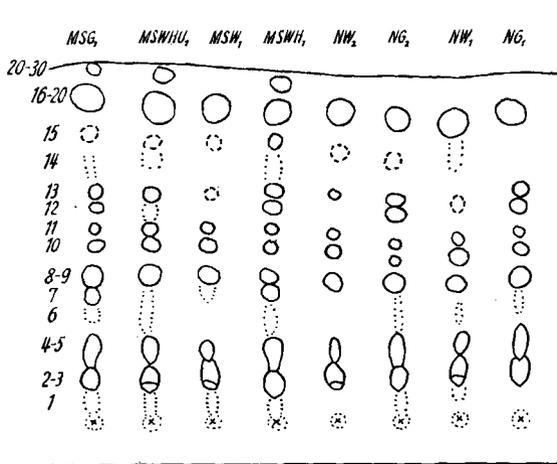


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm von je 2,5 mm³ 5-proz. Lipidextrakte auf Kieselgel G
 Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser = 24/7/1. Anfärbung mit Phosphor-
 molybdänsäure.

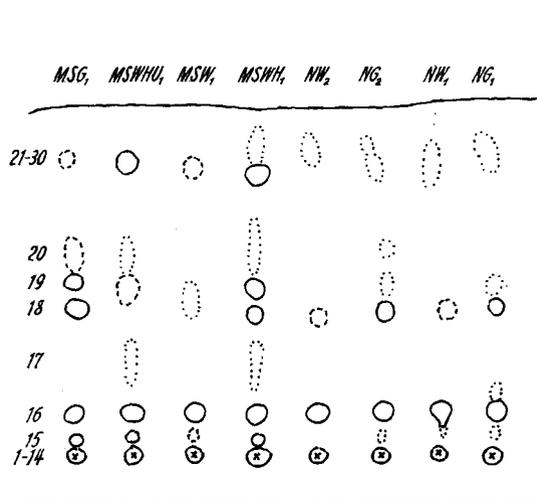


Fig. 2. Dünnschichtchromatogramm von je 2,5 mm³ 5-proz. Lipidextrakte auf Kieselgel G
 Laufmittel Chloroform. Anfärbung mit Phosphormolybdänsäure.

amin, welche Glykolipide zur Darstellung bringt (Fig. 3), zeigt ausserdem im MSWH mehrere Substanzen, zwischen Fleck 5 und 14, welche gegenüber MSW vermehrt auftreten. Dieser Befund ist von Interesse, da SCHWARZ *et al.*¹⁵⁾ mit Hilfe von Säulen- chromatographie an Kieselgel in der weissen Substanz bei der Multiplen Sklerose, neben den normalerweise vorhandenen Galaktolipiden signifikante Mengen Gluco- cerebroside sowie kleine Mengen eines Ceramids und einige weitere, noch unbekannte

¹⁵⁾ H. P. SCHWARZ, L. DREIBACH, M. BARRIONUEVO, A. KLESCHICK & I. KOSTYK, J. Lipid Research 2, 208 (1961).

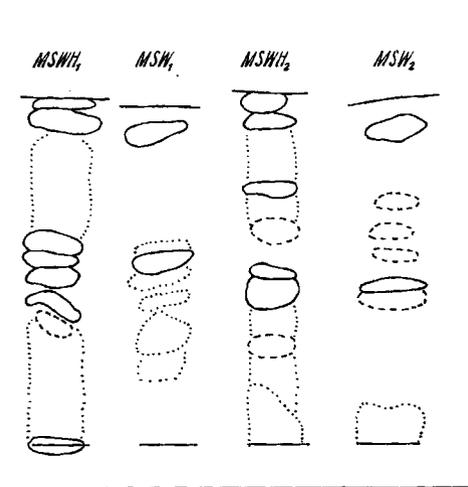


Fig. 3. Ausschnitte aus zwei Dünnschichtchromatogrammen von je 30 mm^3 1-proz. Lipidextrakte auf Kieselgel G
 Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser = 60/20/3. Anfärbung mit Diphenylamin.

Lipide nachweisen konnten. Die Autoren gaben dabei keine nähere Auskunft über den histologischen Zustand des verwendeten Gehirngewebes. Inwieweit unsere Befunde mit den erwähnten Resultaten übereinstimmen, kann vorläufig noch nicht beurteilt werden. Die Verhältnisse, wie sie in dem ersten Multiple-Sklerose-Fall vorliegen, treten im zweiten Multiple-Sklerose-Gehirnextrakt bei der Auftrennung im Laufmittel CMW nicht so deutlich auf (vgl. Fig. 1 und 4), was speziell die Vergrößerung von Fleck 7, 12, 14 und 15 betrifft, welche im MSWH_2 gegenüber MSWH_1

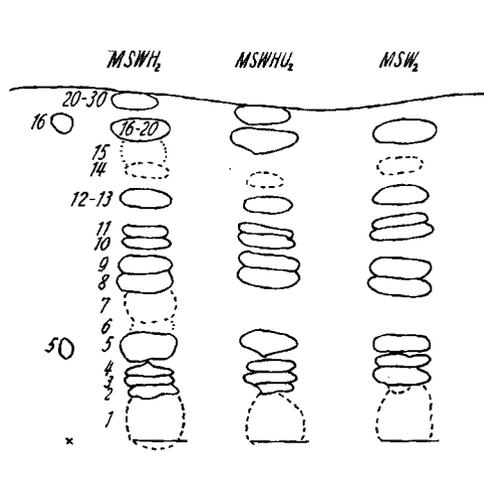


Fig. 4. Dünnschichtchromatogramm von 30 mm^3 1-proz. Lipidextrakte auf Kieselgel G
 Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser = 60/20/3. Anfärbung mit Phosphor-molybdänsäure.

weniger ausgeprägt ist. Durch die strichförmige Auftrageart werden die Flecke 1–2 der Fig. 1 in der 4. Figur in mindestens 4 Substanzen aufgetrennt, wobei Fleck 2 im $MSWH_2$ und $MSWHU_2$ verglichen mit MSW_2 vermehrt erscheint. Die Auftrennung im Lauf T (Fig. 5) zeigt im $MSWH_2$ und $MSWHU_2$ gegenüber MSW_2 das Auftreten von Cholesterinestern, Flecke 22–26, neben weiteren Substanzen, Flecke 27–30. Der Wanderungswert von Fleck 28 entspricht demjenigen des Squalens, wobei wir noch keine weiteren Anhaltspunkte für dessen Identität haben. Das Bild der Auftrennung im Laufmittel C und T von Multiple-Sklerose-Fall 1 und 2 zeigt eine weitgehende Übereinstimmung.

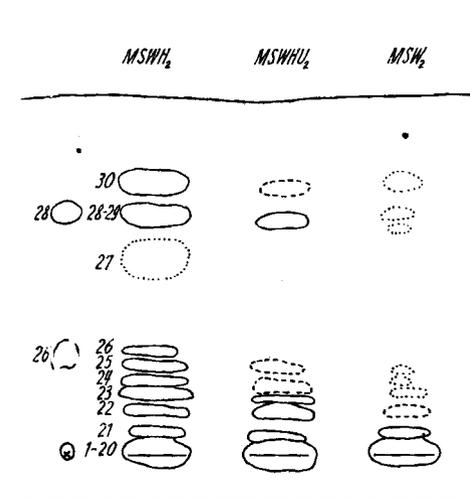


Fig. 5. Dünnschichtchromatogramm von je 45 mm^3 5-proz. Lipidextrakte auf Kieselgel G Laufmittel Tetrachlorkohlenstoff. Anfärbung mit Phosphormolybdänsäure.

Durch den Vergleich von gewichtsäquivalenten Lipidmengen aus Herd- und Nichtherdmaterial ist es wichtig, sich zu vergegenwärtigen, dass im Herdextrakt Substanzen neu oder vermehrt auftreten können, was allein durch den Abbau der normalerweise in grossen Mengen vorhandenen Myelinlipide bedingt sein kann. Überdies muss in Betracht gezogen werden, dass die vom Alter der Herde abhängigen histologischen Unterschiede, welche einer bestimmten Phase der Demyelinisation entsprechen, auch in chemischer Hinsicht Unterschiede erwarten lassen. Aus diesem Grunde ist eine weitere Interpretierung der Befunde, wie sie aus der weissen Substanz erhalten wurden, und ein direkter Vergleich mit den in der Literatur²⁾³⁾ beschriebenen Ergebnissen vorläufig noch nicht möglich. Immerhin war von Wichtigkeit, festzustellen, dass nicht nur im Herdzentrum, sondern auch im Herdumgrenzenden, das vorwiegend aus scheinbar intakter weisser Substanz besteht, chemische Veränderungen gefunden wurden, die über die bisher beschriebenen Befunde²⁾³⁾ hinausgehen.

In den Extrakten aus der grauen Substanz (Fig. 1 und 2) (die ähnliche Trockengewichte aufweisen) zeigt MS_1 gegenüber NG_1 und NG_2 als neuen Befund das Auftreten von Fleck 7 (nicht identifiziert) und Vergrösserung von Fleck 19 (Neutralfett). Angedeutet ist auch eine schwache Vergrösserung von Fleck 21–30 (z. T. Cholesterinester), wie sie CUMINGS²⁾ schon beschrieben hat. Bemerkenswert ist, dass MSG und

MSWH sich in sehr vielen Teilen decken. NG_2 zeigt gegenüber NG_1 eine schwache Vergrößerung der Flecke 1, 15 und 20 sowie das Fehlen von Fleck 2.

Aus diesen mit der Dünnschichtchromatographie gewonnenen Ergebnissen können noch keine Schlüsse in bezug auf die Pathogenese der Multiplen Sklerose gezogen werden. Sie demonstrieren jedoch die Nützlichkeit der Methodik, mit welcher einige bekannte Befunde der Multiplen-Sklerose-Hirnforschung bestätigt und ausserdem Anhaltspunkte über noch unbekannte Stoffe gewonnen wurden, die eventuell für die Erforschung dieser Krankheit wichtig sein können.

Experimentelles. – *Extraktion*⁹⁾: Abgewogenes Hirngewebe wurde im Glashomogenisator mit der 17-fachen Menge (Volumen-Teile) einer Mischung von 2 Vol. Chloroform (*p. a. MERCK*) und 1 Vol. Methanol (*p. a. MERCK*) homogenisiert (mindestens 3 Min.), durch einen Faltenfilter in einen Messzylinder mit Glasstopfen filtriert und mit der 3-fachen Menge Extraktionsmittel nachgewaschen. Der Extrakt (20 Teile Lösungsmittel / 1 Teil Gewebe) wurde sodann mit der 0,2-fachen Menge Wasser (*bidest.*) geschüttelt und dann zentrifugiert. Die obere (wässrige) Phase wurde möglichst vollständig abpipettiert und anschliessend 3mal mit Chloroform:Methanol:Wasser = 3:48:47 nachgewaschen. Die untere Phase (Lipide) wurde quantitativ in einen Rundkolben gespült, im Vakuum bis fast zur Trockene eingedampft, der Rückstand in viel Chloroform gelöst, die Lösung filtriert und zur Trockene eingedampft. Zur Trockengewichtsbestimmung wurde der Extrakt im Hochvakuum scharf getrocknet. – Glaswaren und Faltenfilter wurden zur Entfernung von eventuell vorhandenen Lipiden vor Gebrauch gut mit Chloroform:Methanol = 2:1 gewaschen.

*Wasserbestimmung*¹¹⁾: In ein trockenes, tariertes Wägegläschen wurden ca. 40 mg Gehirngewebe der inneren Wand nach gut verstrichen, gewogen und das Ganze (mit offenem Deckel) 2 Std. bei 104° im Ofen belassen. Anschliessend wurde die Trocknung im Exsikkator (über konz. Schwefelsäure) $\frac{1}{2}$ Std. im Hochvakuum vervollständigt und das mit Deckel verschlossene Gläschen gewogen. Die Gewichts Differenz ergibt den Wassergehalt.

Dünnschichtchromatographie (ausgeführt mit Standardausrüstung DESAGA): Zur Herstellung der Schichten¹⁶⁾ wurden 25 g Kieselgel G (MERCK) mit 50 ml Wasser in einer gut verschlossenen Pulverflasche während 30 Sek. kräftig geschüttelt und die Masse in der üblichen Weise auf sorgfältig gereinigte Glasplatten (20 × 20 cm) ausgestrichen. Die Schicht wurde 5 Min. an der Luft und anschliessend $\frac{1}{2}$ Std. im Ofen bei 110° getrocknet. Zur Reinigung der Kieselgel-G-Schicht⁶⁾ mit Chloroform wurde dasselbe in einer Trennkammer bis zum oberen Plattenrand aufsteigen gelassen; zur Aktivierung der Schicht wurden die Platten anschliessend 10 Min. im Ofen bei 110° getrocknet. In der üblichen Weise wurden sodann die in Chloroform gelösten Lipidextrakte (1- oder 5-proz. Lösungen) punkt- oder strichförmig (bis 10 resp. bis 5 Proben pro Platte) aufgetragen. Fünf Chromatogramme (eines pro Färbung) wurden im Laufmittel CMW (s. S. 283) und je ein weiteres in Chloroform⁵⁾ und Tetrachlorkohlenstoff⁶⁾ ausgeführt. Die Trennkammern wurden zur Ermöglichung einer vollständigen Sättigung auf 3 Seiten mit Filterpapierstreifen ausgeschlagen, welche in das Laufmittel eintauchen. Die Steighöhe betrug jeweils 12 cm. Die Markierung der Front muss für Lauf C und T beim Herausnehmen der Chromatogramme erfolgen, während sie für Lauf CMW nach dem Trocknen (ca. 5 Min. bei 110°) unter dem UV.-Licht durchgeführt werden kann.

Anfärbung: a) Ammoniummolybdat-Perchlorsäure⁷⁾. Reagens (im Eiskasten längere Zeit haltbar): 3 g Ammoniummolybdat (*p. a. MERCK*) + 25 ml Wasser + 30 ml 1N Salzsäure (*p. a. MERCK*) + 15 ml 60-proz. Perchlorsäure (*p. a. MERCK*). Platten bis feucht besprühen und 15 Min. bei 110° im Ofen erhitzen. Blauschwarze Flecke (1–2 Tage haltbar) auf fast weissem Untergrund erscheinen mit diesem Universalsprühareagens.

b) Phosphormolybdänsäure (*p. a. MERCK*)¹⁷⁾. Reagens (3 Tage gut haltbar): 10-proz. Lösung in abs. Äthanol (FLUKA). Platten besprüht bis gelblich und 10–15 Min. im Ofen bei 110° erwärmen.

¹⁶⁾ M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* 16, 378 (1960).

¹⁷⁾ Zusammensetzung des Reagens: R. L. SEARCY, L. M. BERGQUIST & R. C. JUNG, *Clin. chim. Acta* 5, 449 (1960).

Es entwickeln sich dunkelblaue Flecke (1–2 Tage haltbar) auf gelb-grünlichem Untergrund mit diesem Universalsprühereagens.

c) Ninhydrin (*p. a. MERCK*¹⁶). Reagens (im Eiskasten längere Zeit haltbar): 0,2-proz. Lösung in *n*-Butanol (für Chromatographie, *MERCK*) + 5 ml 10-proz. Essigsäure (*p. a. MERCK*). Platten bis feucht besprühen und 15–20 Min. bei 110° im Ofen erhitzen. Die rotvioletten Flecke (ca. 1 Tag haltbar) auf weissem Grund entsprechen Serin- und Äthanolamin-haltigen Phosphatiden.

d) Kaliumwismutjodid⁷). Zusammensetzung des Reagens: Lösung I: 1,7 g basisches Wismutnitrat (*p. a. RIEDEL*) in 100 ml 20-proz. Essigsäure; Lösung II: 40 g Kaliumjodid (*p. a. MERCK*) in 100 ml Wasser (beide Lösungen im Eiskasten längere Zeit haltbar). Zum Besprühen mischt man 20 ml I mit 5 ml II und 70 ml Wasser (filtrieren, wenn das Reagens trübe wird). Die Platten leicht besprühen; es erscheinen orange bis rotorange Flecke auf gelblichem Grund, die sofort anzuzeichnen sind und welche hauptsächlich Cholin-haltigen Lipiden entsprechen.

e) Diphenylamin⁶). Reagens (im Eiskasten längere Zeit haltbar): 20 ml 10-proz. alkoholische Diphenylamin- (*p. a. MERCK*) Lösung + 100 ml konz. Salzsäure (*p. a. MERCK*) + 80 ml Eisessig. Chromatogramm leicht besprühen, mit Deckplatte versehen, 30–40 Min. bei 110° im Ofen erhitzen und herausnehmen, bevor der Untergrund sich blau färbt. Flecke sofort einzeichnen, da der Untergrund rasch nachdunkelt. Man erhält blaugraue Flecke, welche Glykolipiden entsprechen.

Die Flecke werden von den Chromatogrammen auf Transparentpapier durchgezeichnet, wobei mindestens 3 Farbtintensitätsstufen unterschieden werden: ausgezogene Linie = kräftig entwickelt, gestrichelt = gut sichtbar und gepunktelt = schwache Farbtintensität.

Die Unterstützung dieser Arbeit durch den EMIL BARELL-FONDS sei auch an dieser Stelle herzlichst verdankt.

Frl. M. BERNHARDT danke ich für ihre geschickte experimentelle Mithilfe.

SUMMARY

1. Brain tissue (white and grey matter) of two multiple sclerosis patients and two normals has been extracted with 2:1 chloroform-methanol.

2. The dry weights clearly indicate for the pathological tissue a great loss of lipids in the demyelinated areas and the surrounding white matter, as compared with the apparently normal white matter.

3. The qualitative analysis by thin layer chromatography revealed the following results: (a) At least 30 spots (some identified) have been detected in the various extracts. – (b) Between macroscopically normal appearing white matter of the multiple sclerosis patients and of the normals, only minor differences could be detected. – (c) The demyelinated areas and their surrounding white matter differ from the normal white matter by over 10 spots (including cholesterol esters, neutral fat and glycolipids) which appear either anew or with increased intensity. – (d) The grey matter from one of the two multiple sclerosis patients was analysed and showed one additional unidentified spot, an increase in neutral fat and a slight increase of cholesterol esters, when compared to grey matter from normals.

4. The difficulties in the interpretation of these findings are discussed.

Forschungslaboratorium der
Neurologischen Universitätsklinik,
Basel, Socinstrasse 55