

Ein papierchromatographisches Trennverfahren für Lipoproteide

Die zeitraubenden Versuche bei der Untersuchung von Lipoproteiden, sowie die schwachen Trenneffekte die man mit der Papierelektrophorese erzielen kann, machten es nötig für diese Stoffe ein geeignetes chromatographisches Trennverfahren auszuarbeiten. Die bisher in Gebrauch befindlichen papierchromatographischen Trennverfahren für Lipoproteide wenden unbequeme, oft schädlich wirkende, Laufmittel an, mit denen kaum gute Trenneffekte zu erzielen sind^{1,2}.

Das Ziel unserer Forschungsarbeiten war, ein neues Kriterium für die Beurteilung von Lipoproteiden im Blutserum in der klinischen Praxis auszuarbeiten. In einer Reihe von Versuchen gelang es uns ein einfaches und unserem Erachtens nach, sehr effektives papierchromatographisches Trennverfahren auszuarbeiten. Ein Kurzbericht über die erzielten Resultate wurde auf dem Kongress der Gesellschaft Polnischer Gynäkologen in Gdańsk³⁻⁵ und auf dem I. Biochemischen Kongress in Łódź⁶ vorgetragen. Nach unserem Verfahren werden die Lipoproteide mit Hilfe der eindimensionalen Papierchromatographie aufsteigend getrennt, wobei als Trägerstoff das Papier Whatman Nr. 1 und als mobile Phase destilliertes Wasser verwendet werden.

Bei der experimentellen Ausführung unseres Verfahrens wird folgendermassen vorgegangen. Entsprechend gekennzeichnete Papierstreifen von 25 cm Länge werden in einer chromatographischen Kammer mit dem unteren Rand 2 cm tief in destilliertes Wasser eingetaucht. Nachdem die Lösungsmittelfront den oberen Rand des Papierstreifens erreicht hat, wird dieser noch für 10 Min. in der Kammer gelassen. Bei diesem Vorgang werden die Papierstreifen gleichmässig angefeuchtet und zum Teil ausgewaschen.

Die Papierstreifen werden nachher in einer gleichen Kammer, jedoch ohne Wasser, bei Raumtemperatur zum trocknen aufgestellt. Nach etwa 45 Min. werden mit einer Mikropipette oder kalibrierten Kapilare, 4 cm vom unteren Rand entfernt, auf eine 5 cm lange Startlinie 0.02 ml des zu untersuchenden Blutserums aufgetragen. Die startfertigen Papierstreifen werden in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Entwicklungskammer gebracht, wobei der untere Rand der Papierstreifen 2 cm tief ins Wasser eingetaucht wird. Nachfolgend wird bei geschlossener Kammer entwickelt. Nach einer Stunde werden die Papierstreifen herausgenommen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Auf dem trockenen Chromatogramm werden die Lipide mit Sudanschwarz nach SWAHN⁷ sichtbar gemacht. Zur quantitativen Bestimmung der Lipide werden die blaugefärbten Zonen aus dem Papierstreifen herausgeschnitten und mit 4 ml einer Äthylalkohol-Eisessigsäure-Mischung (4:1) eluiert. Die Extinktion des Eluats wird spektrophotometrisch bei $\lambda = 590 \text{ m}\mu$ bestimmt. Als Eichlösung dient dieselbe Mischung mit der ein ungefärbter Teil der gleichen Grösse, wie der der gefärbten Zone, aus demselben Streifen eluiert wurde. Auf diesem Wege kann das Verhältnis der einzelnen Lipoproteidfraktionen zueinander, sowie der gesamte Lipidgehalt in der untersuchten Probe bestimmt werden.

Besprechung der Versuche

Bei Anwendung unseres Verfahrens zur Trennung der Lipoproteide aus menschlichem Blute werden zwei (Fig. 1) bis drei (Fig. 2 a, c und d) gut getrennte Fraktionen erhalten. Im Blutserum einiger kranker Personen konnte ausserdem noch eine vierte,

zwischen dem ersten und zweiten Streifen liegende Fraktion festgestellt werden. Diese Fraktion konnte jedoch nicht in jedem Versuch festgestellt werden, manchmal sogar auch nicht bei wiederholter Trennung desselben Serums.

Bei lipemischen Blutseren und Seren mit Glycerintriolatezusatz blieb auf der Startlinie eine mehr oder wenig scharf angedeutete, aus freien Lipiden bestehende Zone zurück (Fig. 2 b). Aus technischen Gründen gelang es uns einstweilen noch nicht

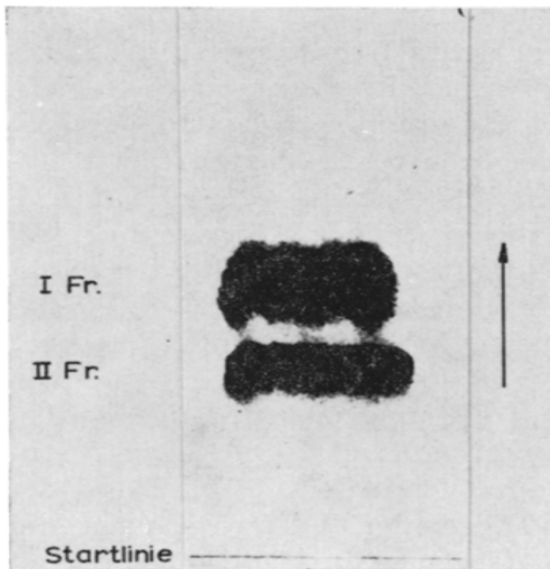


Fig. 1. Chromatogramm des normalen Serums.

die einzelnen Fraktionen zu identifizieren. Wir stellten jedoch fest, dass β -Lipoprotein-freie Seren sich nicht in der Streifenanzahl vom normalen Serum unterscheiden. Dieser Befund wurde mit einem β -Lipoprotein-freien Serum erhalten, aus dem das β -Lipoprotein nach WIEME⁸ entfernt wurde, sowie mit einem Serum aus Nabelblut, das wie bekannt, beinahe β -Lipoprotein-frei ist⁹ (Fig. 2 c und d). Ein nach BURSTEIN UND SAMAILLE¹⁰ erhaltenes β -Lipoprotein zeigte auf dem Chromatogramm nur eine Zone (Fig. 3 a) und zwar mit dem gleichen R_F -Wert wie der der zweiten Serumfraktion (Fig. 3 b). Hinter dieser Fraktion zieht sich ein farbiger Schwanz der bis zur Startlinie reicht, auf der auch noch deutliche Lipidspuren sichtbar sind. Diese Erscheinung kann als Zerfall des Lipoproteids gedeutet werden. Auf dem auf Fig. 3 c sichtbaren

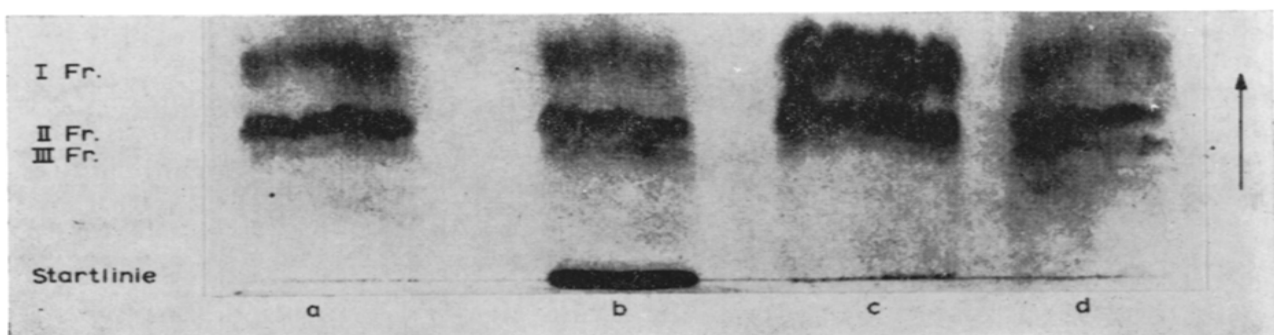


Fig. 2. Chromatogramm der Sera. (a) Normales Serum; (b) Normales Serum mit Triolatezusatz; (c) Mutterserum; (d) Nabelschnurblutserum.

Chromatogramm wurde eine mit der Ultrazentrifuge erhaltene, α -Lipoproteide enthaltene Fraktion, getrennt. Auf diesem Chromatogramm sind drei farbige Streifen erkennbar, die etwa den Lipoproteidfraktionen des Blutserums entsprechen. Die angeführten Beispiele zeigen, dass nach unserem Verfahren sehr einfach und mit gutem Erfolg Lipoproteidmischungen getrennt werden können. Dieses Verfahren kann auch zur Trennung von Lipoproteiden aus anderem biologischen Material verwendet werden.

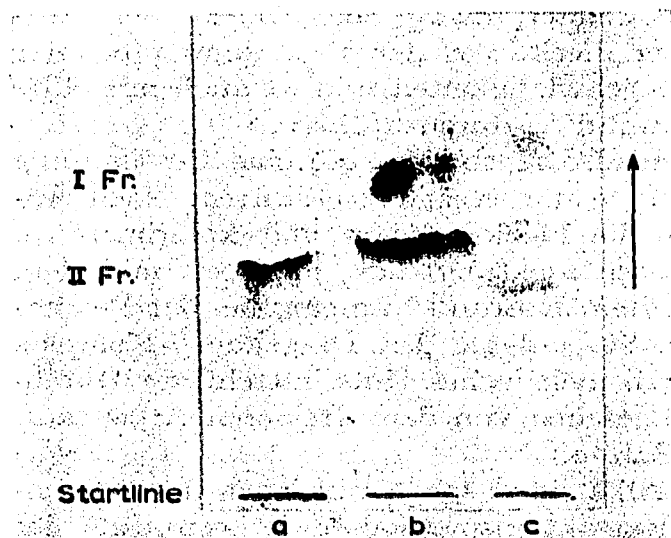


Fig. 3. Chromatogramm von Lipoproteiden. (a) β -Lipoproteid nach BURSTEIN UND SAMAILLE; (b) Serumlipoproteide; (c) α -Lipoproteide aus der Ultrazentrifuge.

Dank

Herrn Ing. M. SOBESLAVSKY aus dem Ustav Hematologie a Krevni Transfuze in Prag danken wir bestens für die Überlassung von Lipoproteidpräparaten.

Wissenschaftliches Biochemisches Laboratorium der II.
Frauenklinik der Medizinischen Akademie in Warschau
(Polen)

LEOPOLD MYSZKOWSKI
JANINA IWAŃSKA

- 1 C. MICHALEC, M. STASTNY UND E. NOVAKOVA, *Naturwiss.*, 45 (1958) 241.
- 2 H. J. McDONALD, L. J. BANASZEK UND J. O. KISSANA, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 44.
- 3 L. MYSZKOWSKI UND J. IWAŃSKA, *Ref. Streszcz. XV. Jub. Zjazdu Gin. Pol. Gdańsk*, (1962) 375.
- 4 I. ROSZKOWSKI, I. CHOJNOWSKA, J. IWAŃSKA, E. JANCZEWSKA, T. KRASSOWSKI UND L. MYSZKOWSKI, *Ref. Streszcz. XV. Jub. Zjazdu Gin. Pol. Gdańsk*, (1962) 204.
- 5 I. ROSZKOWSKI, I. CHOJNOWSKA, J. IWAŃSKA, J. LAMERS UND L. MYSZKOWSKI, *Ref. Streszcz. XV. Jub. Zjazdu Gin. Pol. Gdańsk*, (1962) 209.
- 6 L. MYSZKOWSKI UND J. IWAŃSKA, *I. Krajowy Kongres Biochemiczny, Edź Streszczenia*, (1963) 177.
- 7 B. SWAHN, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 5 (Suppl. 9) (1953) 44.
- 8 R. J. WIEME, *Protides Biol. Fluids, Proc. 7th Colloq.*, Elsevier, Amsterdam, 1960, p. 18.
- 9 F. A. PEZOLD UND H. E. SCHULTZE, *Prot. Biol. Fluids, Proc. 6th Colloq., Round Table Discussion*, Elsevier, Amsterdam, 1959, p. 311.
- 10 M. BURSTEIN UND J. SAMAILLE, *Presse Med.*, 66 (1958) 974.

Eingegangen den 28. Juli 1964