

Ein neues chromatographisches System zur Trennung strukturisomerer freier Gallensäuren

Die Trennung strukturisomerer Di- und Trihydroxycholansäuren stellt ein noch unbefriedigend gelöstes analytisches Problem dar¹.

Die chromatographische Auftrennung des gerade für klinische Untersuchungen wichtigen Isomerenpaares Chenodesoxycholsäure (CDCA) und Desoxycholsäure (DCA) kann trotz der von verschiedenen Autoren²⁻⁴ erprobten Verbesserungen nicht voll befriedigen. (Geringe R_F -Wert-Differenzen, grosse Laufstrecken).

Andere Bearbeiter⁵⁻⁷ versuchen, differenziertere Nachweisreaktionen für die einzelnen Gallensäuren einzusetzen, um eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen. Auch hierbei ergeben sich Schwierigkeiten. Einerseits sind die angewandten Farb-reaktionen nicht absolut spezifisch, andererseits beeinflusst Kieselgel, das man als Trägermaterial einsetzt, den Nachweis der Gallensäuren mittels Absorption in Schwefelsäure. GÄNSHIRT und Mitarbeiter⁸ prüften andere chromatographische Sorbentien auf ihre Eignung zur Trennung von Gallensäuren, darunter auch Polyamid, das sie für ungeeignet befanden.

Gerade zur Trennung strukturisomerer Verbindungen jedoch setzte man die Chromatographie an Polyamid erfolgreich ein⁹⁻¹¹. Diese Tatsache einerseits, zum anderen die guten Erfahrungen, die wir bei der Polyamid-Chromatographie von Steroiden¹²⁻¹⁵ und einfachen Indolderivaten¹⁵ sammelten, veranlassten uns, die

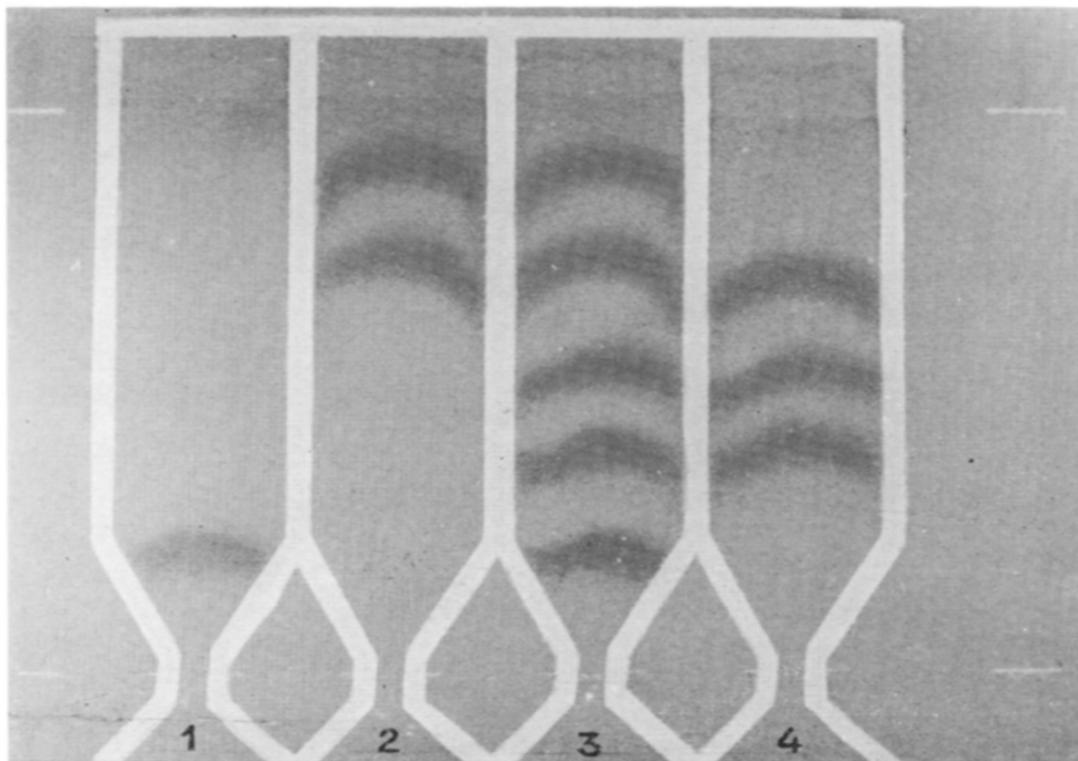


Fig. 1. Trennung freier Gallensäuren an Polyamid; Laufmittel A. Substanzen nach steigendem R_F -Wert geordnet. Keilstreifen 1: 10 μg Lithocholsäure; Keilstreifen 2: je 10 μg Hyocholsäure und Cholsäure; Keilstreifen 3: je 10 μg Lithocholsäure, Hyodesoxycholsäure, Chenodesoxycholsäure, Desoxycholsäure und Cholsäure; Keilstreifen 4: je 10 μg Hyodesoxycholsäure, Chenodesoxycholsäure und Desoxycholsäure.

Auftrennung strukturisomerer Gallensäuren an Polyamid-Dünnschichten zu erproben.

Solange wir die in der chromatographischen Analyse der Gallensäuren üblichen sauren Laufmittelsysteme anwandten, erhielten wir keine befriedigenden Ergebnisse. Erst als wir in Anlehnung an KRITCHEVSKY UND McCANDLESS¹⁶ basische Laufmittel benutzten, ergaben sich einwandfreie Trennungen.

Experimenteller Teil

*Reinigung des Trägermaterials*¹⁷. Als Ausgangsprodukt dient Miramid FP (Hersteller: VEB Chemische Werke Leuna, Krs. Merseburg).

Monomere, die die Chromatographie stören würden, beseitigt man folgendermassen: 150 g Miramid FP werden in 1000 ml eines Gemisches von Methanol p.a. und Wasser 1:1 suspendiert und im Dreihalskolben im siedenden Wasserbad unter Rückfluss 60 min lang mit geringer Tourenzahl gerührt. Nach dem Abkühlen saugt man ab, suspendiert anschliessend das Polyamid erneut in 800 ml Methanol p.a., kocht nochmals 60 min lang am Rückfluss, saugt ab und trocknet das Pulver bei 80°. Anschliessend wird das Produkt gemahlen, entweder in einer Kugelmühle 10 Std. lang oder in einer hochtourigen Mixette (3 mal 1 min lang). Schliesslich sibt man durch ein Sieb der Maschenweite 0.16 mm. Man erhält ein feinkörniges leicht gelblich gefärbtes Pulver.

Schichtbereitung. Weitgehend abriebfeste Schichten ergeben sich, wenn man nach KEIBEL¹⁸ das Polyamidpulver mit einer zweiprozentigen Stärkelösung anrührt, 30 sec in einem Erlenmeyer-Kolben kräftig schüttelt und in einer Schichtdicke von 0.5 mm ausstreicht. Die über Nacht bei Zimmertemperatur getrockneten Platten sind dann gebrauchsfertig.

Testsubstanzen

Cholsäure (CA)

Chenodesoxycholsäure (CDCA)

Hyocholsäure (HCA)

Desoxycholsäure (DCA)

Hyodesoxycholsäure (HDCA)

Lithocholsäure (LA)

CA und CDCA waren analysenreine Handelsprodukte, die restlichen vier Säuren wurden uns von der Forschungs- und Entwicklungsabteilung des VEB Berlin-Chemie überlassen, und von uns dünnschichtchromatographisch an Polyamid wie folgt gereinigt:

Laufmittel: Wasser, Butanon-(2), 25 %iges Ammoniak (80:20:5).

Auftragen: Bandförmig, kein Keilstreifen.

Nachweis: Eine schmale Randzone, die mit Phosphormolybdänsäure angefärbt wird, dient als Referenz.

Elution: mit Äthanol; die Extrakte werden im Vakuum eindampft.

Chromatographiebedingungen für die Analyse

Technik: Aufsteigend, Keilstreifen nach MATTHIAS¹⁹, entsprechende Schablone, Brückenbreite 4 mm, Länge der Brücke 10 mm.

Auftragen: Mit selbstgeechten Schmelzpunktröhrchen Punkt für Punkt über die ganze Brückenbreite, Breite des Startstriches in Laufrichtung 3...4 mm, Auftragsmenge 10 µg.

Laufmittel: (A) Wasser, Butanon-(2), 25%iges Ammoniak (80:20:5);
(B) 0.05 N Natronlauge (sämtlich p.a.-Substanzen).

Laufstrecke: 12 cm.

Laufzeit: 110 bis 120 min, je nach Kammersättigung.

Nachweis. Farbreaktion mit Phosphormolybdänsäure: Man besprüht die Platten leicht mit 10%iger wässriger Phosphorsäure, erhitzt sie 10 min lang auf 120°, besprüht die heissen Platten sofort mit 10%iger alkoholischer Phosphormolybdänsäure-Lösung und belässt die Platten so lange bei 120° im Trockenschrank, bis die Gallensäurebanden maximal kontrastreich erscheinen (durchschnittlich 6 bis 8 min).

Bei zu langem Erhitzen verblasen die angefärbten Zonen, und die Untergrundfärbung verstärkt sich. In Ammoniak-Atmosphäre verblasst die Untergrundfärbung.

Ergebnisse und Diskussion

Die aufgetrennten Gallensäuren, sowie die entsprechenden R_F -Werte sind in Tabelle I angeführt. Die R_F -Werte stellen Mittelwerte aus drei Analysen dar.

Es ergibt sich in kurzer Zeit eine Auftrennung der isomeren Di- und Trihydroxycholansäuren, lediglich HCA als Trihydroxysäure und DCA als Dihydroxysäure zeigen im Laufmittel A ähnliche R_F -Werte. Diese beiden Säuren lassen sich an Polyamid jedoch in Laufmittel B trennen.

Inzwischen stand uns MN-Polygram®-Polyamid-Folie zur Verfügung. Im Vergleich zu Miramid-FP ergeben sich ähnliche Trennungen und eine schärfere Fleckzeichnung bei einer um ca. 50% erhöhten Laufzeit.

TABELLE I

Substanz	Cholansäure, OH-substituiert in Stellung	$R_F \times 100$	
		Im Laufmittel A (H ₂ O, Butanon-(2), 25%iges NH ₃ , 80:20:5)	Im Laufmittel B 0.05 N NaOH
Lithocholsäure	3α	21	2
Hyodesoxycholsäure	3α, 6α	39	9
Chenodesoxycholsäure	3α, 7α	53	16
Desoxycholsäure	3α, 12α	71	21
Hyochocholsäure	3α, 6α, 12α	69	35
Cholsäure	3α, 7α, 12α	88	67

Die Ursache für die einwandfreien Trennungen sehen wir darin, dass es unter den angewandten Bedingungen zu einer günstigen Überlagerung von Wasserstoffbrücken- und Verteilungseffekten kommt, wobei sterische Effekte einen grossen Einfluss haben dürften.

Wir haben die Absicht, die Glyko- und Taurokonjugate der Gallensäuren im Hinblick auf ihr chromatographisches Verhalten an Polyamid zu untersuchen.

Da das Polyamid im Vergleich zu anderen Sorbentien eine hohe Beladungskapazität aufweist^{10, 20, 21}, sollte sich das angegebene Verfahren auch gut für präparative säulenchromatographische Trennungen der angeführten Säuren eignen.

Für die Überlassung von Gallensäuren möchten wir auch an dieser Stelle den Herren Dr. KOPPE (VEB Berlin-Chemie), Professor Dr. WEINGÄRTNER und Dipl.-Chem. GRÜNDIG (Universität Halle/Saale) danken, sowie Herrn Dr. WOLLENWEBER (Fa. Macherey-Nagel und Co., Düren) für die Sendung von MN-Polygram®-Polyamid-Folie.

*Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
der Technischen Universität Dresden**
*und Chemisches Zentrallaboratorium** des Bezirkskrankenhauses
Dresden-Friedrichstadt***, Dresden (D.D.R.)*

U. FREIMUTH
B. ZAWTA
M. BÜCHNER

- 1 J. SJÖVALL, *Methods Biochem. Anal.*, 12 (1964) 97.
- 2 P. ENEROTH, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 11.
- 3 J. G. HAMILTON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 101 (1963) 7.
- 4 A. F. HOFFMANN, *Anal. Biochem.*, 3 (1962) 145.
- 5 B. FROSCH UND H. WAGNER, *Z. Klin. Chem.*, 2 (1964) 7.
- 6 D. KRITCHEVSKY, D. S. MARTAK UND G. H. ROTHBLAT, *Anal. Biochem.*, 5 (1963) 388.
- 7 W. L. ANTHONY UND W. T. BEHER, *J. Chromatog.*, 13 (1964) 567.
- 8 H. GÄNSHIRT, F. W. KOSS UND K. MORIANZ, *Arzneimittel-Forsch.*, 10 (1960) 943.
- 9 V. CARELLI, A. M. LIQUORI UND A. MELE, *Nature*, 176 (1955) 70.
- 10 L. HÖRHAMMER UND H. WAGNER, *Pharm. Ztg.*, 104 (1959) 783.
- 11 K. HILLER, *Pharmazie*, 20 (1965) 353.
- 12 U. FREIMUTH, B. ZAWTA UND M. BÜCHNER, *Acta Biol. Med. Ger.*, 13 (1964) 624.
- 13 U. FREIMUTH, D. KEIBEL UND M. BÜCHNER, *Acta Biol. Med. Ger.*, 17 (1966) 241.
- 14 W. HUBL, *Z. Chem.*, 6 (1966) 225.
- 15 U. FREIMUTH, M. BÜCHNER, B. ZAWTA, W. HUBL UND D. KEIBEL, *Deut. Gesundheitsw.*, 21 (1966) 2039.
- 16 D. KRITCHEVSKY UND R. F. J. McCANDLESS, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 45 (1956) 385.
- 17 H. PÖTTER, *Privatmitteilung*, VEB Arzneimittelwerk Dresden.
- 18 D. KEIBEL, *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden, 1965.
- 19 W. MATTHIAS, *Naturwiss.*, 41 (1954) 18.
- 20 G. REICH UND W. BARTHEL, *Ges. Abhandl. Deut. Lederinst. Freiberg/Sa.*, 14 (1959) 27.
- 21 K. T. WANG UND J. S. Y. WANG, *J. Chromatog.*, 24 (1966) 458.

Eingegangen den 11. April 1967

- * Direktor: Professor Dr. rer. nat. habil. U. FREIMUTH.
** Leiter: Doz. Dr. rer. nat. habil. M. BÜCHNER.
*** Ärztl. Direktor: Professor Dr. med. habil. O. GÜNTHER.