

CHROM. 3971

Dünnschichtchromatographische Trennung der Gallensäuren, insbesondere der freien Dihydroxycholansäuren

Bei der Erfassung der Gallensäuren mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie stellten sich der quantitativen Bestimmung der freien Gallensäuren, insbesondere der freien Dihydroxycholansäuren, bisher gewisse Schwierigkeiten entgegen. Nicht hinreichende Auftrennung, schlechte Reproduzierbarkeit der R_F -Werte, für die nachfolgende quantitative Bestimmung unzureichende Lokalisierung waren die Haupt Hindernisse.

Mit den bisher bekannten Laufmitteln wird meist eine gute Gruppentrennung (freie Gallensäuren, konjugierte Gallensäuren, Methylester der Gallensäuren, Mono-, Di- bzw. Trihydroxycholansäuren) erreicht. Eine weitere Auftrennung der freien Gallensäuren scheiterte an der gedrängten Lage der R_F -Werte, insbesondere der Dihydroxycholansäuren¹⁻⁹, für deren getrennte Erfassung ohne chromatographische Auftrennung verschiedene sehr aufwendige Verfahren vorgeschlagen wurden¹⁰⁻¹³. In einigen Fällen wurde eine schwache Auftrennung erzielt, die jedoch infolge schlechter Reproduzierbarkeit der R_F -Werte eine gute quantitative Auswertung nicht zuließ¹⁴⁻²⁰.

Zur getrennten Erfassung der freien Dihydroxycholansäuren neben anderen Gallensäuren wird nachfolgend eine verbesserte Methode angegeben.

Methodik

Die mit Kieselgel G (E. Merck) beschichteten Glasplatten werden zur Trocknung über Nacht in einem von Labordämpfen freien klimatisierten Raum (23°, 50-60 % relat. Luftfeuchtigkeit) gehalten. Nach dem Auftragen werden die Platten ca. 30 min bei 110° aktiviert und sofort in das Chromatographiegefäß, auf dessen Boden sich seit mindestens einer Stunde eine Schale mit gesättigter Lithiumchlorid-Lösung befindet, gestellt und 30 min lang der Äquilibrierung überlassen. Anschliessend wird das Laufmittel Isooctan-Eisessig-Isopropyläther-Isopropylalkohol (10:6:5:1) eingefüllt. Nach Beendigung der Entwicklung (ca. 60 min) werden die Platten getrocknet und mit einer 1 %igen methanolischen Jodlösung besprüht. Die sofort auftretenden bräunlichen Flecken werden markiert und die Platten 5 min im Trockenschrank bei 110° entfärbt. Die weitere quantitative Bestimmung (Pettenkofer-Schwefelsäure-Reaktion) erfolgt nach GÄNSHIRT *et al.*⁹.

Ergebnisse

Zur Testung des Einflusses der relativen Feuchtigkeit auf die Fleckenlage wurde die Chromatographie in Kästen durchgeführt, die gesättigte wässrige Lösungen einiger Salze enthielten ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 93 % relat. Luftfeuchtigkeit; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 78 %; NaBr , 58 %; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 32 %; CH_3COOK , 20 %; LiCl , 15 %).

Die günstigsten Ergebnisse wurden bei niedrigen relativen Feuchtigkeiten erzielt. Hohe relative Feuchtigkeiten ziehen ein Zusammenrücken von Desoxy- und Chenodesoxycholsäure und von Ursodesoxy- und Hyodesoxycholsäure nach sich. Mittlere relative Feuchtigkeiten begünstigen die Schwanzbildung, die Flecken sind teilweise diffus. Bei Verwendung von gesättigter Lithiumchlorid-Lösung (15 % relat. Feuchtigkeit) sind Fleckenform und -lage am besten.

Zur gleichzeitigen Auftrennung der Gallensäuren in Gruppen und in freie Dihydroxycholansäuren erwies sich eine Kombination der Komponenten Isooctan-Eisessig-Isopropyläther-Isopropylalkohol (10:6:5:1) als am besten geeignet. Die Gallensäuren verteilen sich in folgender Weise über das Chromatogramm (vom Startpunkt zur Laufmittelfront): Konjugierte Gallensäuren, freie Tri-, freie Di-, freie Monohydroxycholansäuren, Cholesterin. Dabei sind die freien Dihydroxycholansäuren hinreichend weit auseinandergezogen. Fig. 1 zeigt ein unter diesen Bedingungen erhaltenes Chromatogramm. Die dazugehörigen reproduzierbaren R_F -Werte enthält Tabelle I.

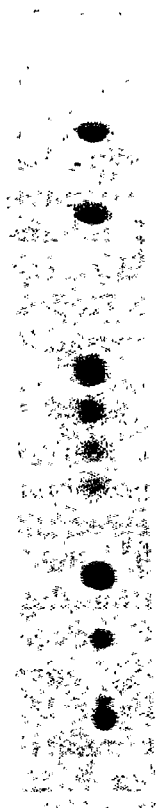


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm der Gallensäuren.

Die neben den Dihydroxycholansäuren genannten Gallensäuren stellen den Prototyp der jeweiligen Gruppe dar. Die in Tabelle I angegebene Dehydrocholsäure ist auf dem Chromatogramm nicht sichtbar, weil sie mit den normalerweise verwendeten Anfärbmethoden nicht nachweisbar ist. Sie wurde unter der U.V.-Lampe lokalisiert. Ausserdem ist zur Orientierung das Cholesterin, das häufig in biologischen Extrakten vorliegt, mit angeführt.

Diskussion

Das verwendete Laufmittel ist in ähnlicher Kombination¹⁵ und teilweise ohne Isopropyläther¹⁴ bzw. ohne Isopropylalkohol¹⁶, die nach unseren Feststellungen be-

TABELLE I

R_F-WERTE DER GALLENSÄUREN NACH DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHER TRENNUNG

<i>Gallensäure</i>	<i>R_F-Wert</i> × 100	<i>Gallensäure</i>	<i>R_F-Wert</i> × 100
Taurocholsäure	0	Hyodesoxycholsäure	40
Glycocholsäure	4	Ursodesoxycholsäure	46
Glycodesoxycholsäure	15	Chenodesoxycholsäure	51
Cholsäure	26	Desoxycholsäure	57
Dehydrocholsäure	32	Lithocholsäure	73
		Cholesterin	82

sonders die Lage der einzelnen Dihydroxycholansäuren zueinander beeinflussen, bereits zur Trennung von Gallensäuren verwendet worden. In keinem Falle gelang bisher eine einwandfreie Trennung der 4 Dihydroxycholansäuren. Darüber hinaus wurden mehrfach mit ein und demselben Laufmittel von verschiedenen Autoren unterschiedliche Ergebnisse mitgeteilt^{17,21; 14,18; 8,20}. Eine derartig schlechte Reproduzierbarkeit geht nach unseren Ergebnissen in erster Linie zu Lasten eines vernachlässigten Aktivierungseinflusses.

Die Anwendung der an verschiedenen Substraten gewonnenen Erkenntnisse²²⁻²⁵ über den Einfluss einer definierten Aktivierung auf die Fleckenform und die Reproduzierbarkeit der *R_F*-Werte ist für die Gallensäurentrennung bisher ausgeblieben. Unter diesen Umständen kann eine Aktivierung auch bei Beachtung weiterer die Reproduzierbarkeit der *R_F*-Werte beeinflussender Faktoren einen negativen Einfluss, insbesondere auf die Reproduzierbarkeit der Lage der einzelnen Flecken zueinander, ausüben; denn eine Aktivierung von Trägermaterial ist im allgemeinen kein irreversibler Prozess. Dünnschichtplatten, die z.B. bis 110° eine hohe Aktivität, d.h. eine sehr geringe Beladung mit Wassermolekülen annehmen, und die dann wieder bei normaler Laboratmosphäre aufbewahrt werden, verlieren ihre Aktivität relativ schnell und stellen sie auf die gerade herrschende relative Luftfeuchtigkeit ein²⁰. Es kommt daher zu starken Veränderungen je nachdem, ob kurz nach der Aktivierung oder erst nach Aufbewahrung der Platten aufgetragen wird. Darüber hinaus wird die Lage der Flecken verändert, wenn mit einem warmen oder kalten Luftstrom beim Auftragen gearbeitet oder wenn unterschiedlich grosse Mengen, d.h. unterschiedlich lange aufgetragen wird. Auch die Dauer des Laufprozesses spielt eine Rolle. Innerhalb dieser unterschiedlichen Zeitabläufe können Umladungen ablaufen, die *R_F*-Wertverschiebungen nach sich ziehen.

Um die für die quantitative Bestimmung am besten geeignete Messung der U.V.-Adsorption der eluierten Gallensäuren durchführen zu können, dürfen die Gallensäuren vorher nicht direkt mit einem Farbreagens behandelt werden. Die Lokalisierung auf Grund eines angefärbten Leitchromatogramms ist ebenfalls unzureichend, weil die Fleckenlage bei natürlichen Substraten infolge Wechselwirkung mit Begleitsubstraten häufig von der des Leitchromatogramms abweicht. Der Nachweis unter der Quarzlampe ist auch nach vorheriger Benetzung des Chromatogramms mit

Wasser¹ unbefriedigend. Zur Lokalisierung der Flecken hat die Jodbehandlung^{9,16,27,28} daher deutliche Vorteile gegenüber den anderen Verfahren.

*Institut für Ernährung, Bereich Mikrobiologie der Ernährung,
Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Potsdam-Rehbrücke (D.D.R.)*

F.-K. GRÜTTE
H. GÄRTNER

- 1 H. C. CURTIUS, *Z. Klin. Chem.*, 4 (1966) 27.
- 2 B. S. DRASAR, M. J. HILL UND M. SHINER, *Lancet*, (1966) 1237.
- 3 W. FORTH, P. DOENECKE UND H. GLASNER, *Klin. Wochschr.*, 43 (1965) 1102.
- 4 W. FORTH, W. RUMMEL UND H. GLASNER, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 254 (1966) 364.
- 5 B. FROSCH, *Klin. Wochschr.*, 43 (1965) 262.
- 6 H. GÄNSHIRT, F. W. KOSS UND K. MORIANZ, *Arzneimittel-Forsch.*, 10 (1960) 943.
- 7 S. HARA UND M. TAKEUCHI, *J. Chromatog.*, 11 (1963) 565.
- 8 T. IWATA UND K. YAMASAKI, *J. Biochem. (Tokio)*, 56 (1964) 424.
- 9 M. T. SUBBIAH UND A. KUKSIS, *J. Lipid Res.*, 9 (1968) 288.
- 10 P. D. G. DEAN UND R. T. APLIN, *Steroids*, 8 (1966) 565.
- 11 B. FROSCH UND H. WAGNER, *Z. Klin. Chem.*, 2 (1964) 7.
- 12 E. C. OSBORN, *Nature (London)*, 205 (1965) 284.
- 13 H. WAGNER UND B. FROSCH, *Klin. Wochschr.*, 41 (1963) 1094.
- 14 P. ENEROTH, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 11; 7 (1966) 511.
- 15 J. A. GREGG, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 579.
- 16 J. G. HAMILTON, *Gas-Chrom Newsletter*, 4 (1963) 4; *Arch. Biochem. Biophys.*, 101 (1963) 7.
- 17 A. F. HOFMANN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 127.
- 18 B. A. KOTTKE, J. WOLLENBERGER UND C. A. OWEN, Jr., *J. Chromatog.*, 21 (1966) 439.
- 19 H. S. SODHI UND P. D. S. WOOD, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 113 (1963) 714.
- 20 T. USUI, *J. Biochem. (Tokio)*, 54 (1963) 283.
- 21 A. KUKSIS, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42 (1965) 276.
- 22 M. S. J. DALLAS, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 267.
- 23 F. GEISS, H. SCHLITT UND A. KLOSE, *Z. Anal. Chem.*, 213 (1965) 321, 331.
- 24 C. G. HONEGGER, *Helv. Chim. Acta*, 46 (1963) 1730.
- 25 G. PATAKI, *Helv. Chim. Acta*, 47 (1964) 784.
- 26 W. L. REICHEL, *J. Chromatog.*, 26 (1967) 304.
- 27 S. M. GRUNDY, E. H. AHRENS, Jr. UND T. A. MIETTINEN, *J. Lipid Res.*, 6 (1965) 397.
- 28 J. S. MATTHEWS, A. L. PEREDA V. UND A. AGUILERA, P. *J. Chromatog.*, 9 (1962) 331.

Eingegangen am 28. Januar 1969

J. Chromatog., 41 (1969) 132-135