

CHROM. 4178

Die dünnschichtchromatographische Trennung der freien Gallensäuren im Durchlaufverfahren und ihre Isolierung mit einem modifizierten Leitchromatogramm

Der quantitativen Trennung der isomeren Gallensäuren Desoxycholsäure (DC) und Chenodesoxycholsäure (CDC) kommt im Hinblick auf Pool-Grössen- und Turn-over-Bestimmungen von Gallensäuren (WOLLENWEBER *et al.*¹) eine besondere Bedeutung zu. Bei den von verschiedenen Autoren²⁻⁷ beschriebenen Verfahren lassen sich diese beiden strukturisomeren Gallensäuren nur unvollständig trennen. BENNET UND HEFTMANN⁸ trennten verschiedene nahe verwandte Steroide mittels Dünnschichtchromatographie im Durchlaufverfahren. Auf ähnliche Weise lässt sich ebenfalls eine Trennung der DC und CDC mit ausreichendem Laufunterschied erreichen.

Methodik

Kieselgel G* wird in Schwefelsäure und Salzsäure gewaschen⁹. Das Kieselgel wird dann 48 Std. bei 100° im Trockenschrank getrocknet und anschliessend gesiebt (Porengrösse nach DIN 60). Zur Herstellung der Dünnschichten werden 50 g gewaschenes Kieselgel mit 95-100 ml Wasser gemischt. Dieser Brei wird zu 0.375 mm dicken Schichten ausgestrichen. Die lufttrockenen Platten werden 1 Std. bei 100° getrocknet und anschliessend offen aufbewahrt. Vor dem Auftragen werden die Platten 15 Min. bei 100° aktiviert.

Als Standard wurden äthanolische Lösungen von Cholsäure (C)**, Desoxycholsäure (DC)** und Chenodesoxycholsäure (CDC)** benutzt. CDC wurde nach der Wilzbach-Methode mit Tritium markiert***. Durch mehrfaches Abdestillieren von grossen Mengen Äthanol wurde das labile Tritium beseitigt und durch anschliessende Dünnschichtchromatographie die Substanz weiter gereinigt.

Zur Bestimmung der Gallensäuren der Galle wurde Duodenalsaft durch eine Sonde gewonnen und mit Methanol-Aceton extrahiert⁹. Die konjugierten Gallensäuren wurden enzymatisch**** (NAIR *et al.*¹⁰) gespalten und in Äthanol aufgenommen. Die Gallensäuren wurden als 0.5-0.75 cm breite Banden mittels Mikro-Pipetten aufgetragen. Dabei wurden jeweils 10 µl C, CD, und CDC Standardlösung bzw. 10 µl Gallenextrakt aufgetragen.

Zur Chromatographie werden Kammern[§] mit seitlich angebrachten Führungsrinnen verwendet. Der Deckel der Kammer wird nicht benutzt. Um ein Abdampfen des Fließmittels am oberen Rand der Platte zu erreichen, wird die Kammer oben durch zwei Glasplatten von 7 × 25 cm Grösse so abgedeckt, dass über der oberen Kante der Chromatographieplatte ein Spalt von 1 cm Breite offen bleibt.

Als Fließmittel dient ein Gemisch Isooctan-Essigsäureäthylester-Essigsäure (10:3:2), Gesamtmenge 75 ml. Dieses Gemisch lässt sich nur bei einer konstanten

* Merck, Darmstadt.

** Calif. Corp. for Biochem. Research, Los Angeles.

*** Farbwerke Höchst AG, Frankfurt am Main.

**** Mann Research Laboratories, New York.

§ Desaga, Heidelberg.

Raumtemperatur von 5° (Kühlraum) verwenden. Zur Chromatographie bei Zimmertemperatur kann ein Fließmittel Isooctan-Essigsäureäthylester-Essigsäure (10:5:2) verwendet werden. Die Laufzeit liegt je nach Luftbewegung am Chromatographieplatz zwischen 4 und 6 Std. DC und CDC laufen unter diesen Bedingungen etwa 12–14 cm hoch.

Als Reagens der getrennten Gallensäuren wird 5%-ige Phosphormolybdänsäure verwendet. Für analytische Zwecke wird ein modifiziertes Leitchromatogramm hergestellt. Hierzu werden die im Trockenschrank getrockneten Platten umgekehrt in eine 2.5 cm hoch mit destilliertem Wasser gefüllte Kammer gestellt. Die ursprünglichen Auftragstellen befinden sich dann am oberen Rand der Platte. Das Wasser zieht in wenigen Minuten in einer waagerechten Front hoch. Sobald es den DC-Fleck erreicht hat, bilden sich in der ursprünglich waagerechten Front kleine Einbuchtungen. Dadurch werden evtl. unterschiedliche Laufstrecken der einzelnen Banden erkenntlich. Sobald diese Buchten entstehen, werden die Platten aus dem Wasser genommen, die Scheitelpunkte der einzelnen Buchten sofort mit einer Nadel markiert und die Platten 30 Min. bei 100° getrocknet. Die Wasserfront läuft unter diesen Versuchsbedingungen noch etwa 0.5 cm weiter. Anschliessend wird eine Bande als Leitchromatogramm mit Phosphormolybdänsäure angesprüht und zwischen DC und CDC eine Trennungslinie gezogen. Bei den anderen Banden werden solche Trennungslinien entsprechend den unterschiedlichen Laufhöhen angebracht. Hierzu wird mit einem Stechzirkel der Abstand zwischen markiertem Punkt des Leitchromatogrammes und Trennungslinie des Leitchromatogrammes auf die nicht besprühten Banden übertragen und so die Trennungslinien festgelegt.

Zur quantitativen Bestimmung⁴ werden die der DC bzw. CDC im Leitchromatogramm entsprechenden unbesprühten Kieselgel-Bezirke in 3.5 × 4 cm grossen Feldern abgeschabt, in Zentrifugengläser gebracht und mit 65%-iger Schwefelsäure versetzt. Nach Durchmischen mit einem Vortexmischer werden die Zentrifugengläser 60 Min. lang in einem Wasserbad bei 60° erhitzt und anschliessend 60 Min. mit 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der klare Überstand wird in 1 ml-Küvetten dekantiert und die DC bei 385, die CDC bei 380 μm photometrisch bestimmt. Die Ablesung erfolgt gegen Leerwerte, die aus flächengleichen unbeladenen Schichtbezirken bei gleicher Behandlung angesetzt werden.

Ergebnisse

Fig. 1 zeigt die Trennung der Gallensäuren aus Testlösungen und Galle-Extrakt. Es ist ersichtlich, dass C, DC und CDC deutlich getrennt sind. Die Darstellung der Gallensäuren mit Hilfe des modifizierten Leitchromatogrammes zeigt Fig. 2. Die Laufhöhe jeder einzelnen Bande entspricht der Höhe der Scheitelpunkte der Wasserlinie. Da sich eine durch das Wasser bedingte Verteilung der DC nur am oberen Rand des DC-Fleckes findet, wird die Trennung von der CDC nicht beeinflusst.

Tabelle I gibt das Ergebnis der Untersuchungen mit ³H-markierter CDC wieder. Im Bereiche der DC wurden im Mittel 3.19% der Gesamtaktivität gefunden. Ob es sich bei der ober- und unterhalb des CDC-Fleckes gefundenen Aktivität um CDC handelt oder um Spaltprodukte, die bei der Markierung entstanden und durch das Reinigungsverfahren nicht vollständig beseitigt wurden, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht geklärt werden.

Bei der quantitativen Analyse eines Testgemisches aus DC und CDC nach Chro-

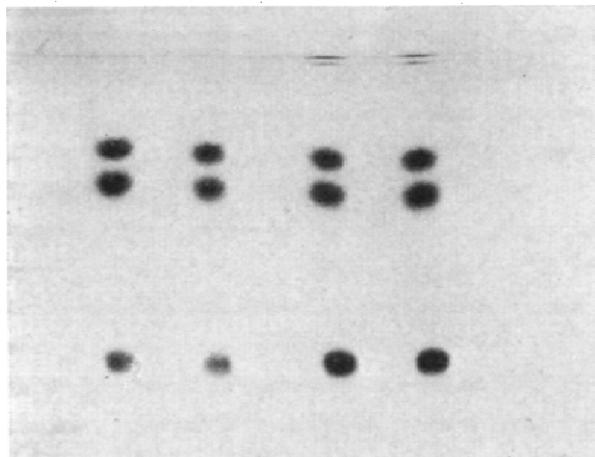


Fig. 1. Dünnschichtchromatographie im Durchlaufverfahren mit dem Fliessmittel Isooctan-Essigsäureäthylester-Eisessig. Anfärbung mit Phosphormolybdänsäure. Links wurde zweimal ein Testgemisch aufgetragen, rechts zweimal ein Gallenextrakt. Man erkennt von unten nach oben Cholsäure (C), Chenodesoxycholsäure (CDC) und Desoxycholsäure (CD).

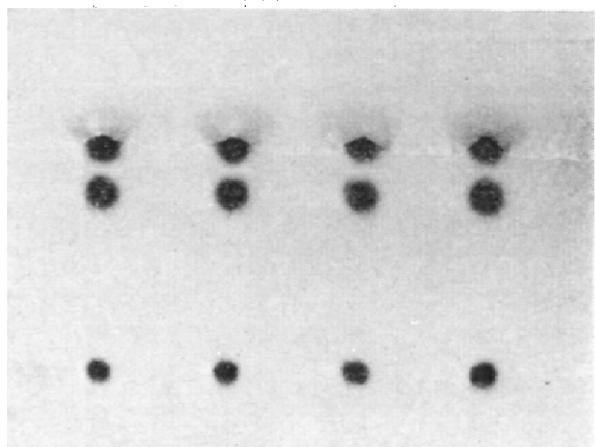


Fig. 2. Gleiche Versuchsanordnung wie in Fig. 1, jedoch mit Anwendung des modifizierten Leitchromatogrammes. Die Gallensäuren wurden nicht sofort nach Chromatographie angefärbt, sondern erst nach Darstellung der Trennung.

TABELLE I

CHROMATOGRAPHIE ^3H -MARKIERTER CDC; VERTEILUNG DER AKTIVITÄT ÜBER DIE PLATTE NACH EINTEILUNG IN FLÄCHENGLEICHE FELDER

% der Gesamtaktivität.

Oberhalb der DC	1.73
Bereich der DC ^a	3.14
Bereich der CDC	90.50
Unterhalb der CDC	1.72
Oberhalb der C	0.98
Bereich der C	0.75
Auftragfläche	1.18
	100.00

^aBei 20 Proben wurde im Bereich der DC im Mittel $3.19 \pm 1.8\%$ der Gesamtaktivität gefunden.

matographie wurden bei 20 Proben 82.4 ± 4.7 % DC und 82.2 ± 4.3 % CDC wiedergefunden.

Diskussion

Mit den bisher bekannten Verfahren zur dünn-schichtchromatographischen Trennung freier Gallensäuren wird eine für quantitative Bestimmungen ausreichende Trennung von Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure kaum erreicht. Mittels der von ENEROTH² und HAMILTON⁵ angegebenen Fließmittelsysteme lässt sich zwar eine weitgehende Trennung der beiden Isomeren erreichen, die Abstände zwischen den beiden Gallensäureflecken sind jedoch gering. Für einwandfreie quantitative Analysen sind grössere Laufunterschiede notwendig, falls nicht der direkte Nachweis durch solche Verfahren möglich ist, welche die nachfolgende quantitative Bestimmung nicht stören. Solche Verfahren zur Lokalisation der Gallensäuren sind bisher nicht bekannt. Nach Ansprühen mit Wasser^{4,7} heben sich die Flecke der DC und CDC hell gegen den dunkleren Hintergrund ab. Dabei entsteht jedoch ein Hof um die Gallensäuren (siehe Fig. 2), dessen äussere Begrenzung etwa 2 cm von der Fleckmitte entfernt ist. Diese Verteilung der Gallensäuren spielt sich auch zwischen den Gallensäureflecken ab. Das bedeutet bei nur geringem Laufunterschied eine weitere Verschlechterung der Trennung.

Mit der hier angegebenen dünn-schichtchromatographischen Methode zur Trennung der DC und CDC im Durchlaufverfahren wird eine bessere Trennung dieser beiden isomeren Gallensäuren erreicht. Durch Anwendung des modifizierten Leitchromatogrammes können die Gallensäuren isoliert werden, ohne dass es zu einer Verteilung der Gallensäuren in den Zwischenraum zwischen DC und CDC kommt. Das Wasser erreicht bei der angegebenen Methode nur den oberen Rand des DC-Fleckes. Ein Substanzverlust, wie er beim Ansprühen mit Wasser durch Wegblasen von Kieselgel leicht entstehen kann, ist ausgeschlossen.

Medizinische Universitätsklinik* (Ludolf-Krehl-Klinik),
Heidelberg 6900 (B.R.D.)

A. STIEHL
J. WOLLENWEBER
H. WAGENER

- 1 J. WOLLENWEBER, B. A. KOTTKE UND C. A. OWEN, *J. Lab. Clin. Med.*, 69 (1967) 584.
- 2 P. ENEROTH, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 11.
- 3 B. FROSCHE UND H. WAGENER, *Z. Klin. Chem.*, 2 (1964) 7.
- 4 H. GÄNSHIRT, F. W. KOSS UND K. MORIANZ, *Arzneimittel-Forsch.*, 10 (1960) 943.
- 5 J. G. HAMILTON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 101 (1963) 7.
- 6 A. F. HOFMANN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 127.
- 7 J. WOLLENWEBER, B. A. KOTTKE UND C. A. OWEN, *J. Chromatog.*, 24 (1966) 99.
- 8 R. D. BENNET UND E. HEFTMANN, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 488.
- 9 B. A. KOTTKE, J. WOLLENWEBER UND C. A. OWEN, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 439.
- 10 P. P. NAIR, M. GORDON, S. GORDON, I. REBACH UND A. I. MENDORFF, *Life Sci.*, 4 (1965) 1887.

Eingegangen am 12. Mai 1969

*Direktor: Prof. Dr. G. Schettler.