

CHROM. 6250

Fluorometrische Triglyceridbestimmung auf Dünnschichtchromatogrammen*

Die quantitative Direktauswertung von chromatographisch getrennten Substanzgemischen hat in der letzten Zeit immer mehr an Bedeutung gewonnen. Dieses Verfahren wird allerdings durch eine relativ schlechte Reproduzierbarkeit eingeengt, eine Folge vor allem der Sprayreagenzien beim Sichtbarmachen der Flecken. Aus diesem Grunde scheint es von Vorteil zu sein, wenn das Nachweisreagenz ein Bestandteil der Adsorptionsschicht selbst ist.

Es ist bekannt, dass eine Reihe von lipiden Substanzen, welche mit Schwefelsäure besprüht wurden, beim Erwärmen dann eine charakteristische Farbe bzw. Fluoreszenz zeigen^{1,2}. Den gleichen Effekt erhält man auch beim Erhitzen von Platten, welche mit Ammoniumsulfat imprägniert sind³. In dieser Arbeit wurde versucht, die erstmals von uns beobachtete Fluoreszenz bei Triglyceriden quantitativ auszuwerten.

Experimentelles

Die in Chromschwefelsäure gereinigten Glasplatten (20 × 20 cm) wurden mit Kieselgel G (Merck), das mit einer 10%igen Ammoniumsulfatlösung im Verhältnis 1:2.3 durchgemischt wird, 250 µm hoch beschichtet. Die Platten wurden luftgetrocknet und zur Reinigung in *n*-Heptan-Diäthyläther (7:3) laufen gelassen⁴. Nach einer einstündigen Aktivierung bei 110° wurden nach Abkühlen der Platten unter Stickstoff die Triglyceride aufgetragen. Beim Auftragen muss darauf geachtet werden, dass die Startflecken gleich gross sind, damit bei der anschliessenden Messung das Verhältnis Messfläche zu Fleckgrösse konstant bleibt. Gleichgrosse Startflecken werden am besten dadurch erhalten, dass gleiche Volumina aus einer Verdünnungsreihe aufgetragen werden. Nach dem Entwickeln bis zu einer Lauflänge von 10 cm im Fliessmittel *n*-Heptan-Diäthyläther (7:3)⁴ bei Kammersättigung wurden die Kammern luftgetrocknet. Je nach dem aufgetragenen Konzentrationsbereich wurden die Platten in einem abgeschlossenen Gefäss im Trockenschrank bei 150° 25, 45 oder 85 min erhitzt. Die Verwendung eines abgeschlossenen Gefässes verhindert die Verschmutzung des Chromatogramms während des Erhitzens.

Die quantitative Auswertung der so entwickelten Fluoreszenz wurde in unserem Labor mit einem Vitatron TLD 100 vorgenommen. Als Anregungslichtquelle diente eine Quecksilberlampe mit einem UVB-Filter. Das gelbgrüne Fluoreszenzlicht wurde unter Vorschaltung einer Kreisblende mit 2 mm Durchmesser und einem Filter bei 450 nm vermessen. Am Schreiber wurde der am stärksten fluoreszierende Fleck auf Vollausschlag, der Untergrund auf 0 eingestellt. Die Messfläche wurde dem Durchmesser des grössten Chromatogrammflckes angepasst. Zur Errechnung der Peakflächen wurde die Höhe mit der Halbwertsbreite multipliziert. Um Störlicht auszuschalten, musste bei grosser Verstärkung des Photostroms in einem halbdunklen Raum vermessen werden.

* Herrn Univ. Prof. DDr. Th. LEIPERT zum 70. Geburtstag gewidmet.

Ergebnisse und Diskussion

Während des Erhitzens steigt die Fluoreszenz auf einen Maximalwert an und sinkt mit fortschreitender Veraschung auf 0 ab. Total veraschte Flecken geben keine Fluoreszenz mehr. Beim Aufstellen der Eichkurve ergab sich, dass zur Erreichung von Eichgeraden die Einhaltung bestimmter Erhitzungszeiten notwendig war. Für einen Konzentrationsbereich von 1–7 μg Triglycerid wurden 45 min (Tabelle I), für einen Konzentrationsbereich von 7–30 μg Triglycerid 25 min (Tabelle II), als optimale

TABELLE I

ERMITTLUNG DER EICHKURVE FÜR DEN KONZENTRATIONSBEREICH VON 1–7 μg TRIOLEIN AUS 15 VERSUCHEN

Erhitzungsdauer 45 min.

Auftragsmenge (μg)	Peakfläche (mm^2)	s (%)
0.58	222 \pm 22	10
0.90	342 \pm 21	6
1.80	671 \pm 15	2
3.60	1290 ^a	a
5.40	1889 \pm 55	3

^a Die Fläche dieser Konzentration wurde bei jedem Versuch auf 1290 mm^2 rechnerisch korrigiert.

TABELLE II

ERMITTLUNG DER EICHKURVE FÜR DEN KONZENTRATIONSBEREICH 7–30 μg

Erhitzungsdauer 25 min.

Auftragsmenge (μg)	Peakfläche (mm^2)	s (%)
5.65	385 \pm 28	7
11.20	873 \pm 36	4
22.40	1787 \pm 39	
33.60	2700 ^a	a

^a Die Fläche dieser Konzentration wurde bei jedem Versuch auf 2700 mm^2 rechnerisch korrigiert.

Erhitzungsdauer ermittelt; die Messwerte innerhalb beider Bereiche liegen dann auf Geraden (Fig. 1 und 2). Bei zu langem Erhitzen bog die Eichkurve bei höheren Konzentrationen durch Fluoreszenzlöschung dagegen um (Fig. 3). Es wurde versucht, auch für einen Konzentrationsbereich von 0.1–1.0 μg Triolein eine Eichkurve zu ermitteln. Die Platten wurden dabei 85 min erhitzt. Zu reproduzierbaren Werten gelangt man in diesem Bereich allerdings nur bei Vorreinigung des Adsorptionsmittels und Destillation der Laufmittel, da ansonsten der Untergrund mittels des Vitatron TLD 100 nicht mehr kompensierbar ist. Gleiche Versuche wurden auch mit Tripalmitat durchgeführt. Sie zeigten bei gleichen Bedingungen eine geringere Intensität des Fluoreszenzlichtes im Vergleich zu Triolein, lieferten jedoch ebenfalls eine Eichgerade. Die fluoreszierenden Flecken liessen sich mit Methanol eluieren. Eine Rechromatographie im Laufmittel Chloroform–Methanol (9:1) zeigte, dass der fluoreszierende Fleck aus mindestens vier fluoreszierenden Anteilen besteht.

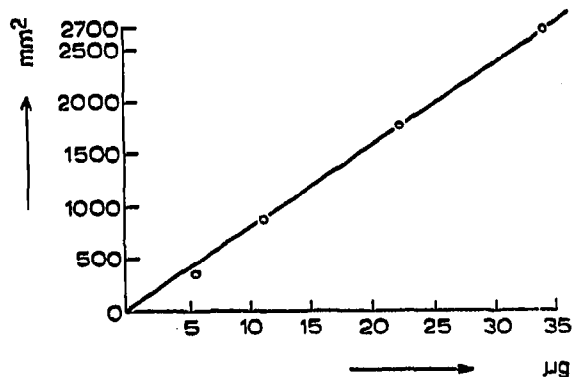
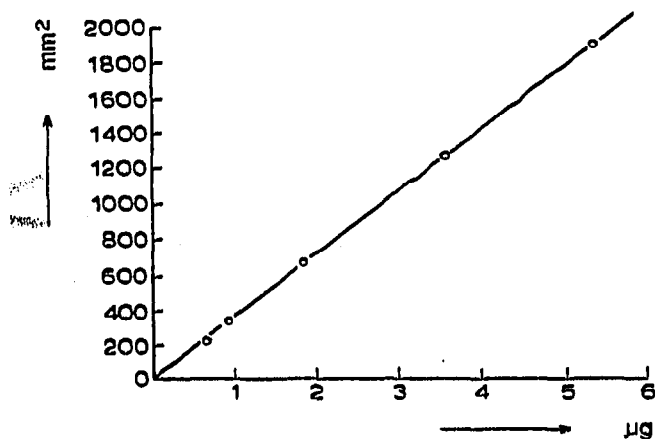


Fig. 1. Eichkurve für den Konzentrationsbereich von 1-7 μg Triolein.

Fig. 2. Eichkurve für den Konzentrationsbereich von 7-30 μg Triolein.

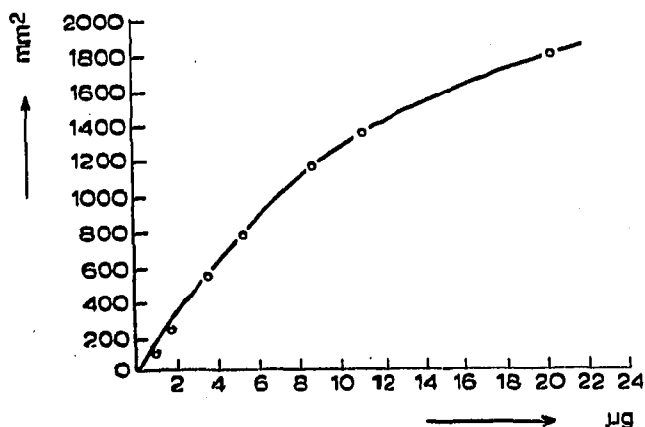


Fig. 3. Abweichung der Eichkurve bei höheren Konzentrationen nach einer Erhitzungsdauer von 45 min.

Eine Anwendung dieser Methode zur Bestimmung von Rattenleber-Triglyceriden ergab eine gute Übereinstimmung mit den enzymatisch gefundenen Werten. Die enzymatische Messung lieferte einen Triglyceridgehalt von 3.1%, während das fluorometrische Verfahren 3.0% (bezogen auf das Frischlebergewicht) Triglyceride ergaben.

Institut für Medizinische Chemie
und Pregl-Laboratorium der
Universität Graz,
Universitätspl. 2, A-8010 Graz
(Österreich)

WOLFGANG TRUPPE
WALTER MLEKUSCH
BENNO PALETTA

- 1 Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, E. Merck, Darmstadt, 1970.
- 2 J. C. TOUCHSTONE, T. MURAWEC, M. KASTAROW UND W. WORTMANN, *J. Chromatogr.*, 66 (1972) 172.
- 3 B. L. WALKER, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 320.
- 4 J. D. TURNER UND G. ROUSER, *Anal. Biochem.*, 38 (1970) 423.

Eingegangen am 18. Mai 1972