

CHROM. 6765

ZUR PROBLEMATIK DER DENSITOMETRISCHEN AUSWERTUNG VON DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMMEN AM BEISPIEL DES DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHEN LIPIDSTATUS IM SERUM

JOACHIM GARTZKE und KLAUS-DIETER NOLTE

Medizinisch-Diagnostisches Institut "Unter den Linden", Unter den Linden 40, DDR-108 Berlin (D.D.R.)

(Eingegangen am 28. Februar 1973)

SUMMARY

Theoretical aspects of the quantitative densitometric evaluation of thin-layer chromatograms are considered, using as an example the state of lipids obtained from serum. Calculated correction factors for phospholipoids, fatty acids, triglycerides and cholesterol esters after charring with sulphuric acid, which allow a comparison with results from chemical analysis, are discussed.

EINLEITUNG

Zur Erkennung von Erkrankungen, bei denen Veränderungen im Fettstoffwechsel auftreten, wird sehr oft eine dünn-schichtchromatographische Auftrennung der Lipide des Serums nach Extraktion in die einzelnen Lipidklassen durchgeführt¹. Diese Methode, seit langem erprobt, wird auch in neuerer Zeit durchgeführt²⁻⁵. Die quantitative Bestimmung der Lipide erfolgt bis auf wenige Ausnahmen^{6,7} densitometrisch²⁻⁴. Die Densitometrie besitzt gegenüber dem üblichen Verfahren — Elution und kolorimetrische Bestimmung in Küvetten — Vorteile, wie erhebliche Steigerung der Empfindlichkeit und gegenüber der Gaschromatographie den geringeren Zeit- und technischen Aufwand. Nach Weiss⁸ ist das Remissionsverfahren dem Transparenzverfahren aus verschiedenen Gründen überlegen und genauer, z.B. Transparenzänderungen durch Schichtinhomogenitäten beeinflussen die Remissionsmessungen nur wenig, da die Konzentrationsverhältnisse im allgemeinen auf der Oberfläche der stationären Phase mit denen im Inneren der Schicht identisch sind. Das hängt natürlich von der dünn-schichtchromatographisch zu trennenden Stoffklasse ab.

Eine quantitative densitometrische Auswertung chemisch unterschiedlicher Verbindungen ohne Vergleichsstandards, die wie beim dünn-schichtchromatographischen Lipidstatus aufgrund einer ermittelten Gesamtmenge dieses Substanzgemisches erfolgt, erfordert aber, dass alle diese dünn-schichtchromatographisch getrennten Substanzen den gleichen molaren Extinktions- bzw. Remissionskoeffizienten besitzen müssen. Diese Bedingungen sind aber nur selten erfüllt, obwohl

* Leiter: Dr. med. K. H. Goll.

sie auch in der neueren Literatur⁴ als erfüllt postuliert wurden. Egge und Mitarb.³ geben dagegen mit Modellsubstanzen experimentell ermittelte, ihrem dünn-schichtchromatographischen Verfahren angepasste Faktoren an. Wir haben Faktoren theoretisch, entsprechend der wahrscheinlichen Verteilung der Fettsäuren in den einzelnen Lipidklassen⁹ bzw. der Verteilung der Basenreste in den Phospholipoiden¹⁰ berechnet, um ihre Änderung bei Störungen des Lipidhaushaltes und damit den prinzipiellen Fehler, der durch Erkrankungen hervorgerufen werden kann, bei einem dünn-schichtchromatographischen Lipidstatus abschätzen zu können. Bei Unabhängigkeit der auf den unterschiedlichen "Schwärzungsgrad" der einzelnen Lipidfraktionen beruhenden Faktoren von der Erkrankung, kann die dünn-schichtchromatographische Methode angewendet werden.

METHODE

Die üblichen zur gemeinsamen Anfärbung der einzelnen Lipidklassen verwendeten Reagenzien wie Jod, Phosphormolybdänsäure oder Schwefelsäure setzt die gleiche Zahl von Doppelbindungen, reduzierenden Gruppen bzw. C-Atomen in der gleichen Menge jeder Lipidklasse voraus. Wir versuchen mit 10%iger alkoholisch-wässriger Schwefelsäure, doch werden aufgrund der errechneten Faktoren schonendere Veraschungsmethoden untersucht. Von den robusten Veraschungsverfahren, wie das mit Chromschwefelsäure oder halbkonzentrierter Schwefelsäure², ist wegen grosser Kohlenstoffverluste abzusehen, zumal die Quantität der Veraschung bisher nur durch die densitometrisch messbare Konstanz der Schwärzung der Fraktion bestimmt wurde^{2,4}. Die unterschiedliche Stabilität der einzelnen Fraktionen gegenüber dem Veraschungsmittel und ihre Fähigkeit zur Veraschung blieb bisher unberücksichtigt. Auch die Veraschung mit Phosphormolybdänsäure⁴ — bei der Anfärbung durch Reduktion zu Molybdänblau wird die Phospholipoid-Fraktion kaum oder gar nicht angefärbt — zeigte beim Nacharbeiten noch relativ grosse Kohlenstoffverluste und auch hier besonders bei den Phospholipoiden. Die Veraschung mit Kaliumtetrathionat¹¹ oder auch mit Ammoniumsulfat^{2,12} besitzt nach ersten Versuchen den Vorteil, dass diese in der Kieselgelschicht gleichmässig verteilt, die Veraschung schonend bewirken. Ammoniumsulfat in der Kieselgelschicht soll ferner die Trennung der polaren Lipide verbessern. Andere Anfärbverfahren^{6,7}, die auf einer Elution beruhen, sind zu aufwendig. Als wesentlicher Fortschritt können die von Egge und Mitarb.³ experimentell ermittelten "Schwärzungsfaktoren" angesehen werden. Diese sollten analog den Eichfaktoren der Photometrie aus Eichkurven ermittelt werden. Dabei ist zu beachten, dass Remissionsmessungen der Kubelka-Munk-Funktion gehorchen, was einen gewissen rechnerischen Aufwand bei der Auswertung erfordert. Zur experimentellen Ermittlung von "Schwärzungsfaktoren" beim Serum sollten aber entsprechend der dort "natürlichen" Lipidzusammensetzung zusammengesetzte Lipidstandards verwendet werden, da im Falle reiner Standardsubstanzen^{13,14} Werte gefunden werden, die den Verhältnissen im Serum nicht entsprechen. Der Faktor entspricht ja unter anderem der prozentualen Zusammensetzung der verschiedenen Fettsäuren der entsprechenden Lipidklasse. Bei den Phospholipoiden geht zusätzlich noch die prozentuale Zusammensetzung der Basenreste in den Faktor mit ein. Auch der Umrechnungsfaktor von Lipoid—Phosphor auf die Phospholipoidmenge beruht auf der durchschnittlichen Verteilung der Fett-

säuren- und Basenreste. Folglich muss der "Schwärzungsfaktor" bei den Phospholipoiden am stärksten streuen und kaum beim Cholesterin. Eine sehr geringe Streuung tritt allerdings auch beim Cholesterin nach üblicher Dünnschichtchromatographie^{2,4} auf, da die Cholesterinfraktion —nachweisbar durch zweidimensionale Chromatographie— vermutlich durch Cholsäurederivate verunreinigt ist. Dies führt aber nur zu einer geringen Abweichung vom prozentualen Kohlenstoffgehalt des Cholesterins.

BERECHNUNG DER "SCHWÄRZUNGSFAKTOREN"

Ohne auf mögliche Fehlerquellen der experimentellen Methodik einzugehen, haben wir uns bei der Fettsäurenverteilung in den einzelnen Lipidfraktionen in etwa an die Arbeit von Schrade und Mitarb.⁹ und bei Verteilung der Basenzusammensetzung in den Phospholipoiden an die Arbeit von Kunz und Kosin¹⁰ gehalten. Wir errechneten aus der prozentualen Zusammensetzung der Fettsäuren in den einzelnen Lipidfraktionen theoretische mittlere Fettsäuren und deren prozentualen Kohlenstoffanteil, der für die Schwärzung verantwortlich ist. Analog wurde für die Phospholipide ein theoretisches Phospholipoid ermittelt, dessen Kohlenstoffgehalt in etwa dem der natürlichen Verteilung der Phospholipide im Serum entspricht. Das Molekulargewicht der "mittleren" Fettsäure jeder Fraktion errechnet sich aus dem Molekulargewicht jeder in der Fraktion vorkommenden Fettsäure und ihres prozentualen Anteils an der Fettsäurenzusammensetzung in der entsprechenden Fraktion gemäss der Formel (1):

$$MG = \frac{\sum_i G_i}{\sum_i (G_i / MG_i)} \quad (1)$$

wobei MG das Molekulargewicht der "mittleren" Fettsäure, G_i der experimentell ermittelte prozentuale Anteil der i -ten Fettsäure an der Fettsäurenzusammensetzung in der entsprechenden Fraktion und MG_i deren Molekulargewicht ist. Der prozentuale Kohlenstoffgehalt der mittleren Fettsäure ergibt sich aus Formel (2):

$$\%C = \frac{\sum_i \%C_i \cdot G_i}{\sum_i G_i} \quad (2)$$

wobei $\%C$ der prozentuale Kohlenstoffgehalt der mittleren Fettsäure und $\%C_i$ der prozentuale Gehalt der i -ten Fettsäure ist. Der Ausdruck $\sum_i G_i$ müsste theoretisch 100 sein. Da aber nicht alle Fettsäuren in der Praxis identifiziert werden können, wird er stets kleiner als 100 sein. Tabelle I zeigt die Fettsäurenverteilung nach Schrade und Mitarb.⁹ einschliesslich ihrer Molekulargewichte, ihres prozentualen Kohlenstoffanteils und des Korrekturfaktors bezogen auf Cholesterin gleich eins an. Der Faktor 1 für Cholesterin wurde wegen der Einheitlichkeit der Fraktion in bezug auf den Kohlenstoffgehalt und den höchsten Kohlenstoffgehalt (83.79%) gewählt. Alle anderen Fraktionen mit geringerem Kohlenstoffgehalt erhalten dadurch einen Faktor grösser als eins, d.h. dass die Densitometerwerte mit dem Faktor korrigiert werden müssen, um auf die "wahren" Werte zu kommen. Die Verteilung der Phospholipide sieht in Anlehnung an Kunz und Kosin¹⁰ wie folgt aus: Lecithin 68.2%, Lysolecithin

TABELLE I
 FETTSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER LIPIDFRAKTIONEN IM "NORMALEN" HUMANSERUM

<i>i</i> -te Fettsäure	Prozentualer Anteil der <i>i</i> -ten Fettsäure an der Gesamtzusammensetzung der Fettsäure in der Fraktion ^a			Cholesterinester	Molekulargewicht der <i>i</i> -ten Fettsäure	%C-Gehalt der <i>i</i> -ten Fettsäure	Schwärzungsfaktor der <i>i</i> -ten Fettsäure Cholesterin = 1 (% Gehalt = 83.79%)
	Phospholipide	Freie Fettsäuren	Triglyceride				
C _{14:0}	0.67	2.14	1.68	0.96	228.38	73.56	1.139
C _{16:0}	30.76	27.52	28.78	12.09	256.43	74.87	1.119
C _{16:1}	3.33	7.78	7.71	7.58	254.42	75.47	1.110
C _{18:0}	11.97	13.90	4.00	2.92	284.49	75.93	1.103
C _{18:1}	15.09	25.58	36.46	19.80	282.47	76.47	1.096
C _{18:2}	21.17	12.81	11.58	45.93	280.45	77.02	1.088
C _{18+20:3} *	1.03	0.90	0.96	0.95	278.44	77.58	1.080
C _{20:4}	8.78	2.36	2.70	4.47	304.48	78.82	1.063
C _{20+22:5} **	2.12	1.27	1.28	1.34	330.51	79.88	1.048
C _{22:6}	3.00	1.84	1.90	1.82	328.59	80.37	1.043
Rest	2.22	3.85	2.97	2.17			

* Es wurde nur als C_{18:3} berechnet.

** Es wurde nur als C_{22:5} berechnet.

7.0%, Sphingomyelin 20.7% und Kephalin 5.4% (Phosphatidylinositol, Phosphatidyl-äthanolamin, Phosphatidylserin, Lysophosphatidyläthanolamin, Phosphatidsäure und Cardiolipin wurden dieser Fraktion zugerechnet und als Phosphatidyläthanolamin berechnet).

Der Einfachheit halber wurden die Fettsäuren als freie Säuren berechnet, das bei der Veresterung freiwerdende Wasser vom fettsäurefreien Lipidrest abgezogen und der prozentuale Kohlenstoffgehalt des "Torsos" ermittelt. Zur Abschätzung der Variationsbreite des Faktors haben wir an einigen Beispielen die Zusammensetzung der Fettsäuren willkürlich geändert. Wir verwendeten zu Berechnung des Faktors Myristinsäure (C_{14:0}) als Fettsäure mit einem geringeren Kohlenstoffgehalt und Arachidonsäure (C_{20:4}) als Fettsäure mit einem höheren Kohlenstoffgehalt als dem Kohlenstoffgehalt der "mittleren" Fettsäure, als einzige im Serum vorkommende Fettsäure. Die gleiche Manipulation machten wir bei den Lipidresten der Phospholipoide mit dem Lipidrest des Lysolecithins als Rest mit geringerem und dem des Kephalin als Rest mit höherem Kohlenstoffanteil (als dem theoretisch ermittelten Lipidrest) in Kombination mit Myristin- und Arachidonsäure. Tabelle II gibt die Kohlenstoffanteile und dazugehörigen Faktoren, sowie die daraus erhaltenen Mittelwerte an. Der Einfluss der Fettsäuren müsste sich bei den Triglyceriden am stärksten bemerkbar machen (Tab. III). Die Variationsbreite ist durch die zusätzliche Variabilität des fettsäurefreien Lipidrestes in den Phospholipoiden naturgemäss grösser (Tabelle IV). Da denkbar ist, dass Erkrankungen, die in den Lipidstoffwechsel eingreifen, eine Veränderung der Fraktion durch starke Änderung der Fettsäuren-

TABELLE II

VARIABILITÄT DES PROZENTUALEN KOHLENSTOFFANTEILS DER FRAKTION DER FREIEN FETTSÄUREN BEI BERÜCKSICHTIGUNG JEWEILS EINER FETTSÄURE MIT HOHEM UND NIEDRIGEM PROZENTUALEN KOHLENSTOFFANTEIL

Fettsäure	Molekulargewicht	%C-Gehalt	Faktor	Mittelwert	
				%C	Faktor
C _{14:0}	228.38	73.56	1.139	76.19	1.099
C _{20:4}	304.48	78.82	1.063		

TABELLE III

VARIABILITÄT DES PROZENTUALEN KOHLENSTOFFANTEILS DER FRAKTION DER TRIGLYCERIDE BEI BERÜCKSICHTIGUNG JEWEILS EINER FETTSÄURE MIT HOHEM UND NIEDRIGEM PROZENTUALEN KOHLENSTOFFANTEIL

Triglycerid verestert mit Fettsäure	Molekulargewicht	%C-Gehalt	Faktor	Mittelwert	
				%C	Faktor
C _{14:0}	723.15	74.4	1.126	76.9	1.090
C _{20:4}	751.15	79.4	1.055		

TABELLE IV

VARIABILITÄT DES PROZENTUALEN C-ANTEILS DER FRAKTION DER PHOSPHOLIPOIDE BEI BERÜCKSICHTIGUNG JEWEILS EINER FETTSÄURE MIT HOHEM UND NIEDRIGEM PROZENTUALEN C-ANTEIL UND EINEM LIPOIDREST MIT HOHEM UND NIEDRIGEM PROZENTUALEN C-ANTEIL

<i>Phosphorlipoid</i>		<i>%C-Gehalt</i>	<i>Faktor</i>	<i>Mittelwert je Phospholipoid</i>		<i>Mittelwert über alle Phospholipoide</i>	
<i>Lipoidrest von</i>	<i>Fettsäure</i>			<i>%C</i>	<i>Faktor</i>	<i>%C</i>	<i>Faktor</i>
Lysolecithin	C _{14:0}	56.4	1.486	59.05	1.416	62.23	1.346
Lysolecithin	C _{20:4}	61.7	1.358				
Kephalin	C _{14:0}	62.3	1.345	65.40	1.281		
Kephalin	C _{20:4}	68.5	1.223				

TABELLE V

VERGLEICH EXPERIMENTELL GEFUNDENER MIT DEN THEORETISCH ERMITTELTEN FAKTOREN

<i>Lipidfraktion</i>	<i>Experimentell</i>	<i>Berechnet</i>
Cholesterin	1.00	1.00 (83.8% C)
Phospholipoide	1.55	1.26 (66.4% C)
Freie Fettsäuren	1.10	1.10 (76.0% C)
Triglyceride	1.15	1.09 (76.9% C)
Cholesterinester	1.01	1.01 (82.9% C)

zusammensetzung bewirken können, wurde dieser Einfluss bei Arteriosklerotikern mit Hyperlipidämien⁹ rechnerisch untersucht. Es ergab sich bei den freien Fettsäuren mit einem prozentualen Kohlenstoffgehalt von 75.96 gegenüber 76.01% bei Gesunden keine Signifikanz.

Eine Gegenüberstellung zwischen den experimentell ermittelten² und berechneten Faktoren (s. Tabelle V) zeigt, wie auch schon die in früheren Arbeiten^{13,14} aufgestellten densitometrischen Eichkurven, die Richtigkeit der Überlegungen. Die gute Übereinstimmung der Faktoren sowie die angeführten Tabellen beweisen eine verhältnismässig grosse Unabhängigkeit von den Fettsäurezusammensetzungen der Fraktionen und somit —entgegen der Meinung anderer Autoren¹⁵— eine allgemeine Anwendbarkeit des dünn-schichtchromatographischen Lipidstatus mit densitometrischer Auswertung. Umgekehrt ergeben sich aus der Theorie praktische Schlussfolgerungen für das Experiment.

Wie schon aus dem Vergleich der Faktoren bei den Phospholipoiden hervorgeht, ist hier die Variationsbreite aus weiter oben angegebenen Gründen am grössten. Da aber Erkrankungen sich speziell in einer Veränderung der Zusammensetzung der Phospholipoide bemerkbar machen könnten¹⁶, sollte dünn-schichtchromatographisch eine Auftrennung der Phospholipoide in ihre Hauptgruppen erfolgen, um diese einzeln densitometrisch mit Hilfe des jeweilig dazugehörigen Faktors zu bestimmen. Der Vergleich der Faktoren zeigt ferner, dass Diskrepanzen dort auftreten, wo die Extraktion, besonders aber die Veraschung der Lipidfraktionen auf der Dünnschichtplatte Ursache dafür sein können.

Anhand der Phospholipoid-Fraktion z.B. kann man zeigen, dass ein grosser Kohlenstoffverlust vermutlich durch CO- und CO₂-Verlust infolge robuster Veraschung erfolgen muss. Die Kohlenstoffverluste liegen —neben wahrscheinlich einer geringen Fettsäureabspaltung, die auch bei den Triglyceriden auftritt— vermutlich bei der Abspaltung des Basenrestes. So findet man rechnerisch z.B. beim Lecithin eine Faktorzunahme von $F=1.25$ über eine Abspaltung des quartären Stickstoffrestes mit einem Faktor von $F=1.35$ zum Faktor von $F=1.42$, wenn der gesamte Cholinrest abgespalten wird. Aus diesem Grunde sollte eine Veraschung schonend durchgeführt werden. Somit stellen die theoretisch ermittelten Faktoren ein wertvolles Hilfsmittel zum Auffinden der optimalen Methode zur Bestimmung des Lipidstatus durch Dünnschichtchromatographie dar. Unter Berücksichtigung der Erfüllung der aufgestellten Forderungen an den dünnschichtchromatographischen Lipidstatus, stellt dieser eine an Aussagekraft den üblichen chemisch-analytischen Bestimmungen gleichwertige, wenn nicht sogar überlegene Methode dar.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden theoretische Überlegungen zur quantitativen densitometrischen Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen am Beispiel des Lipidstatus aus dem Serum gemacht. Errechnete Korrekturfaktoren für Phospholipoide, Fettsäuren, Triglyceride und Cholesterinester nach Anfärbung mit Schwefelsäure, die einen Vergleich mit nach chemisch analytischen Verfahren ermittelten Werten gestatten, werden diskutiert.

LITERATUR

- 1 H. K. Mangold, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 41 (1964) 762.
- 2 C. M. van Gent, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1968) 344.
- 3 H. Egge, U. Murawski, J. Müller und F. Zilliken, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 8 (1970) 488.
- 4 J. Wildgrube, W. Erb und E. Böhle, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 7 (1969) 514.
- 5 M. A. Abramzone und R. P. Egorova, *Lab. Delo*, (1971) 118.
- 6 J. Jage, P. Kunze und D. Olthoff, *Z. Med. Labortech.*, 11 (1970) 154.
- 7 W. Jaross und U. Freimuth, *Z. Med. Labortech.*, 11 (1970) 322.
- 8 P. A. M. Weiss, *Wien. Klin. Wochenschr.*, 82 (1970) 777.
- 9 W. Schrade, E. Böhle, R. Biegler, R. Teicke und B. Ullrich, *Klin. Wochenschr.*, 38 (1960) 739.
- 10 F. Kunz und D. Kosin, *Wien. Klin. Wochenschr.*, 80 (1968) 764.
- 11 F. Scheibe, H. J. Gerhardt, U. Esser und H. Haupt, *Acta Oto-Laryngol.*, 71 (1971) 392.
- 12 B. L. Walker, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 320.
- 13 K. Randerath, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag-Chemie, Weinheim/Bergstr., 1962, S. 139.
- 14 J. J. Biezanski, W. Pomerance und J. Goodman, *J. Chromatogr.*, 38 (1968) 148.
- 15 N. Zöllner und K. Kirsch, persönliche Mitteilung.
- 16 E. Gjone und O. M. Orning, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 18 (1966) 209.