

CHROM. 16,215

## DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE AUF pH-GRADIENTSCHICHTEN — EINE LEISTUNGSFÄHIGE METHODE ZUR TRENNUNG KOMPLEXER PHOSPHATIDMISCHUNGEN\*

KARL-WERNER QUIRIN

*Pharmakognosie und Analytische Phytochemie der Universität des Saarlandes, D-6600 Saarbrücken  
(B.R.D.)*

(Eingegangen am 22. Februar 1983; geänderte Fassung eingegangen am 10. August 1983)

---

### SUMMARY

*Thin-layer chromatography on pH-gradient layers — a suitable method for the separation of complex mixtures of phosphatides*

Separating and identifying the components of complex mixtures of phosphatides is an important task which is not easy to be managed on account of the partly similar, partly differing behaviours of the components and of their thermostability. As possible solution to this problem chromatography on pH-gradient layers is shown to be an efficient alternative. By acid-base interactions with the layer impregnation characteristic curves of all single components in the pH-T-gradient are obtained which are in good correlation with the molecular structure (monovalent, bivalent acid, betain). Thus, a safe identification of main and of trace components and a general idea of the composition of complex mixtures is possible within a short time. The procedure proved its efficiency when tested on crude phospholipid extracts of animal and of vegetable origin or on a model mixture of ten components.

---

### EINLEITUNG

Phospholipide sind als Fettbegleitstoffe ubiquitär in lebendem Gewebe anzutreffen. Sie besitzen eine wichtige Funktion beim Aufbau biologischer Zellmembranen und der Regulation von Stoffwechselfvorgängen. Neben der physiologischen und therapeutischen Bedeutung kommt ihnen eine überragende technologische Rolle als Emulgier- und Dispergierhilfsmittel u.a. auf dem Lebensmittel-, Kosmetik- und Pharmasektor zu. Eine entsprechende Relevanz besitzt die Analytik der Phospholipide, d.h. die Auftrennung, der Nachweis und die Identifizierung einzelner Unterklassen. Die Analytik erfolgt in der Regel mit Hilfe der Chromatographie, die erstmals eine Trennung komplex zusammengesetzter natürlicher Lipidgemische ermöglicht hat.

---

\* Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Egon Stahl gewidmet in Erinnerung an seine Verdienste um den Durchbruch der Dünnschicht-Chromatographie vor 25 Jahren<sup>1,2</sup>.

Wegen der geringen Flüchtigkeit und Thermolabilität polarer Lipide ist der Einsatz flüssigchromatographischer Methoden erforderlich, wobei sich bisher allein die "Normal Phase Liquid Chromatography" an Kieselgel als stationärer Phase als günstig erwiesen hat. Die Auftrennung der Phospholipide erfordert dann den Einsatz polarer, oft alkoholischer und wasserhaltiger Fließmittel<sup>3</sup>, so dass der eigentliche Trennvorgang durch eine Kombination von Adsorption und Verteilung erzielt wird. Die folgende Arbeit behandelt eine spezielle Technik der Dünnschicht-Chromatographie (DC), die zur Trennung und Identifizierung der Phospholipide bestens geeignet ist.

Die DC Trennung der polaren Lipide ist wie die Vielzahl der Publikationen andeutet, kein eindeutig gelöstes Problem. Meist existieren kritische Phosphatidpaare (Phosphatidylinosit und -serin oder Phosphatidylglycerol und -ethanolamin), deren Trennung in einer komplexen Mischung bei Einfachentwicklung nicht oder nur unzureichend gelingt. Bei der Durchsicht entsprechender Arbeiten fällt auf, dass eine verbesserte Auflösung durch Imprägnieren der Schicht mit sauren oder basischen Salzen, mit Borsäure<sup>4</sup>, Ammoniumsulfat<sup>5-9</sup>, Magnesiumsilikat<sup>10,11</sup>, Magnesium-<sup>12</sup> oder Natriumacetat<sup>5</sup> oder mit Natriumcarbonat<sup>13-15</sup> erreicht werden kann. Diese Zusätze bewirken eine Desaktivierung des Sorbens, beeinflussen aber vor allem durch Säure-Base-Wechselwirkung das Adsorptions- und Verteilungsgleichgewicht zwischen stationärer Phase, mobiler Phase und den Phospholipiden, die teils ionogen, als Salz, teils betainartig oder mit amphoterem Charakter vorliegen. Umgekehrt wird eine gute Trennung der Phospholipide auf neutralen, aber auch auf imprägnierten Schichten in vielen Fällen durch die Verwendung saurer oder basischer Fließmittel mit Zusätzen von Essigsäure<sup>7-27</sup>, Ammoniak<sup>4,5,8,9,11,12,24-32</sup>, Ameisensäure<sup>33</sup>, Pyridin<sup>34</sup>, Methyl-<sup>17</sup> oder Triethylamin<sup>35,36</sup> erhalten. Bei zweidimensionaler Arbeitsweise ist eine Kombination beider Fließmitteltypen möglich. Es war daher naheliegend, das chromatographische Verhalten der Phospholipide auf pH-Gradient-Schichten<sup>37</sup> quer zum Gradient (T-Gradient-Technik) zu untersuchen, eine Möglichkeit, die nur in einem offenen System realisierbar ist. Diese Technik wurde im Prinzip erstmals von Michl<sup>38</sup> zur Auswahl des optimalen pH-Wertes für die elektrophoretische Trennung eines Aminosäuregemischs angewandt. In dem vorliegenden Fall ergibt sich eine DC Methode, die ohne Mehrfach-, Stufen- oder zweidimensionale Entwicklung innerhalb von 30 min einen ausgezeichneten Überblick über die Zusammensetzung komplexer Phosphatidmischungen bietet, eine weitgehende Identifizierung einzelner Unterklassen auch ohne Referenzsubstanzen gestattet und die direkte Verwendung von Rohextrakten erlaubt.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

##### *Material*

Phospholipidstandards wurden von Sigma, St. Louis, MO, U.S.A., erhalten. Glycerinphosphatide: DL- $\alpha$ -Phosphatidsäure (PA) dipalmitoyl, Natriumsalz; DL- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (PC) dipalmitoyl, synthetisch; L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamin (PE) dipalmitoyl, synthetisch; L- $\alpha$ -Phosphatidyl-DL-glycerol (PG) aus Eidotter, Ammoniumsalz; L- $\alpha$ -Phosphatidylinosit (PI) aus Sojabohnen, Ammoniumsalz; L- $\alpha$ -Phosphatidyl-L-serin (PS) aus Rinderhirn; Diphosphatidylglycerol (DPG) aus Rinderherz (Cardiolipin), Natriumsalz; L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin (LPC) aus Eidotter. Sphingophosphatide: Sphingomyelin (SPH) aus Rinderhirn. Sphingoglycolipide: Ce-

rebroside (CER) aus Rinderhirn, Typ I mit Hydroxyfettsäuren (lower spot) und Typ II mit Fettsäuren ohne Hydroxylgruppe (upper spot); Ganglioside (GAN) aus Rinderhirn, Typ III<sup>39</sup>.

Phosphatidmischungen standen aus pflanzlichem und aus tierischem Gewebe zur Verfügung. Aus tierischem Gewebe: Ein Methanol-Rohextrakt, Typ VI aus Rinderhirn (PC, CER, SPH u.a.) wurde von Sigma erhalten. Ein vorwiegend CER und Cerebrosidsulfatide (CERS) enthaltendes Hydrolysat aus Rinderhirnextrakt wurde selbst hergestellt. Lecithin aus Eiern (73% PC, 15% PE, 5% LPC, 2% SPH u.a.) wurde von Merck (Darmstadt, B.R.D.) geliefert. Aus pflanzlichem Gewebe: von Lukas Meyer, Hamburg, B.R.D., wurden folgende Sojalecithine erhalten: Rohlecithin (30% PC, 22% PE, 18% PI, 3% PS, 2% LPC u.a.), Restölgehalt durch Säulenchromatographie<sup>40</sup> bestimmt 35%, Lysolecithin (66% LPC) mit Phospholipase hydrolysiert sowie das Systemlecithin Epicuron (80% PC, 10% PE u.a.) Von Sigma wurde eine Roh-PI-Fraktion (50%) aus Sojabohnen erhalten.

Die Reinsubstanzen wurden als 1%ige Lösungen, die Phosphatidmischungen als 3%ige Lösungen in Chloroform, Chloroform-Methanol oder Methanol angesetzt und bei  $-30^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Lösung der pflanzlichen Rohlecithine wies jeweils noch eine geringe Trübung auf. Durch Mischen aliquoter Volumenanteile der Lösungen von GAN, LPC, SPH, PI, PC, PE, DPG, PG, CER I, CER II wurde ein Testgemisch aus 10 Komponenten hergestellt.

### *Dünnschicht-Chromatographie*

pH-Gradientenschichten wurden mit Hilfe des Gradient-DC-Streichers 85<sup>41</sup> mit nivellierbarem Streichtisch zur Beschichtung von 5 Platten, 20 × 20 cm (Desaga, Heidelberg, B.R.D.) hergestellt. Zur Beschichtung wurde eine Suspension von je 18.5 g TLC-Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> (Merck) in 50 ml 0.5 N Schwefelsäure bzw. in 50 ml 0.5 N Natronlauge in die beiden diagonal geteilten Trochkammern des Streichgeräts gefüllt. Nach Entfernen der Trennwand wurde die Masse mit einer Rührwelle durchmischt und dann gleichmäßig auf 5 Glasplatten ausgestrichen. Nach Vortrocknen wurden die Platten 30 min bei  $110^{\circ}\text{C}$  aktiviert und in einem Exsikkator über Blaugel aufbewahrt. Die DC-Schichten wurden direkt zur Chromatographie verwendet, die relative Luftfeuchte lag unter 40%.

Das Auftragen der Untersuchungslösungen erfolgte mit dem Desaga Autoliner, Modell 121000 mit PTFE-Ventil, als schmales, 18-cm langes Startband, 1.5 cm über dem unteren Plattenrand, quer zur Richtung des pH-Gradients, Auftragemenge: 20–100  $\mu\text{l}$  Lösung.

Die Chromatographie erfolgte unter Standardbedingungen (aufsteigend, Kammerstättigung, 12 cm) mit dem Fließmittel A: Chloroform-Methanol-Wasser (62:32:6), sofern nicht anders angegeben.

Der gleichzeitige Nachweis aller polaren Lipide (Phosphatide, Cerebroside, Sulfatide und Ganglioside) erfolgte mit 8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure-Reagenz (8-ANS)<sup>16,42</sup>: gelbgrüne Fluoreszenz auf dunklem Untergrund in UV<sub>366</sub>. P-haltige Verbindungen (insbesondere die gesättigten synthetischen Phospholipide) wurden mit Ammoniumheptamolybdat-Perchlorsäure-Reagenz<sup>43</sup> sichtbar gemacht: blaue Zonen auf weißem Untergrund. Alle ungesättigten polaren Lipide (natürliche Lipidmischungen) wurden mit Molybdatophosphorsäure-Reagenz<sup>43</sup> nachgewiesen: blaue Zonen auf gelbem, nach Bedampfen mit  $\text{NH}_3$  auf weißem Untergrund.

## ERGEBNISSE

Zur DC der Phospholipide im pH-T-Gradient wurde eine grosse Anzahl teils neuer, teils bereits in der Literatur beschriebener neutraler Fliessmittel getestet. Das ideale Fliessmittel sollte eine gute Auflösung des Modellgemischs aus zehn Komponenten erzielen, eine charakteristische Kurvenform der Einzelsubstanzen im pH-T-Gradient ergeben und keine unnötig komplizierte Zusammensetzung besitzen. Als geeignet erwies sich die Lösungsmittelkombination Chloroform-Methanol-Wasser mit der Zusammensetzung 62:32:6. Diese Mischung ist in der älteren und neueren Literatur zur DC Trennung polarer Lipide entweder allein oder in Kombination mit anderen Fliessmitteln weit verbreitet<sup>4,10,18,27,44-53</sup> und wurde erstmals von Wagner *et al.*<sup>54</sup> vorgeschlagen. Zur Klärung der Frage, ob ein Auswaschen der Schichtimpregnierung durch das polare Fliessmittel erfolgt, wurden einige Gradientenschichten mit dem Fliessmittel vorgewaschen und wieder aktiviert. Bei der nachfolgenden Chromatographie konnte kein Einfluss der Vorbehandlung auf die Wanderung der Phospholipide festgestellt werden.

Die Untersuchung des chromatographischen Verhaltens einzelner Lipide im pH-T-Gradient ergab für jede Verbindungsklasse einen charakteristischen Kurvenzug. Die vom sauren bis zum alkalischen Bereich ohne Verzweigung durchgehenden Linien beweisen, dass keine durch den pH-Wert der Schicht bedingte Zersetzung (Hydrolyse) eintritt. In einigen Fällen wurden lediglich Spuren von Verunreinigungen (DPG, Fig. 9) oder schon vorhandenen Zersetzungsprodukten (PS, Fig. 10) festgestellt, die nicht in einem bestimmten pH-Bereich sichtbar werden, sondern ebenfalls einen geschlossenen Kurvenzug über die gesamte Schichtbreite ergeben.

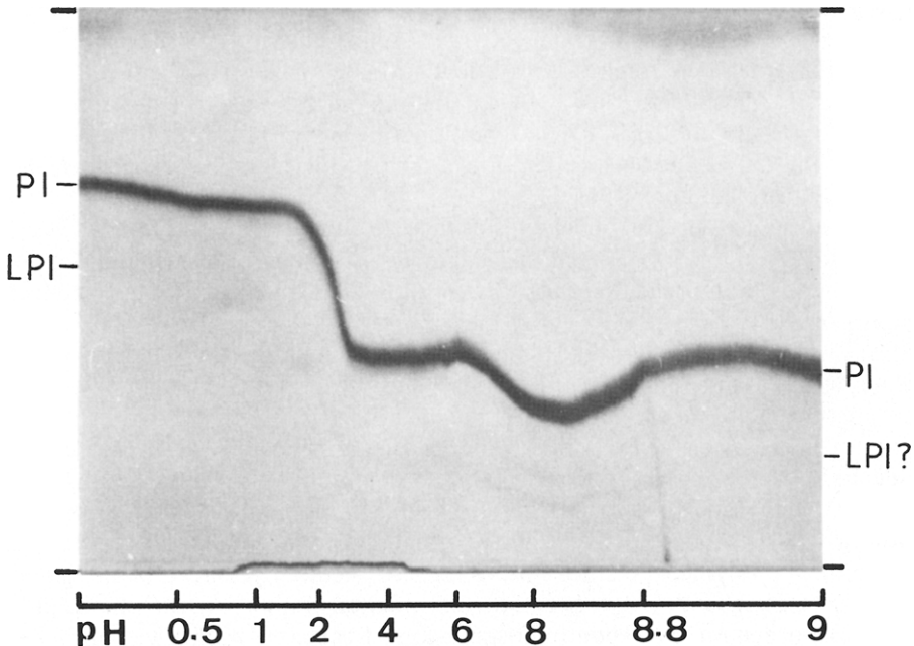


Fig. 1. Phosphatidylinositol, Fliessmittel A.

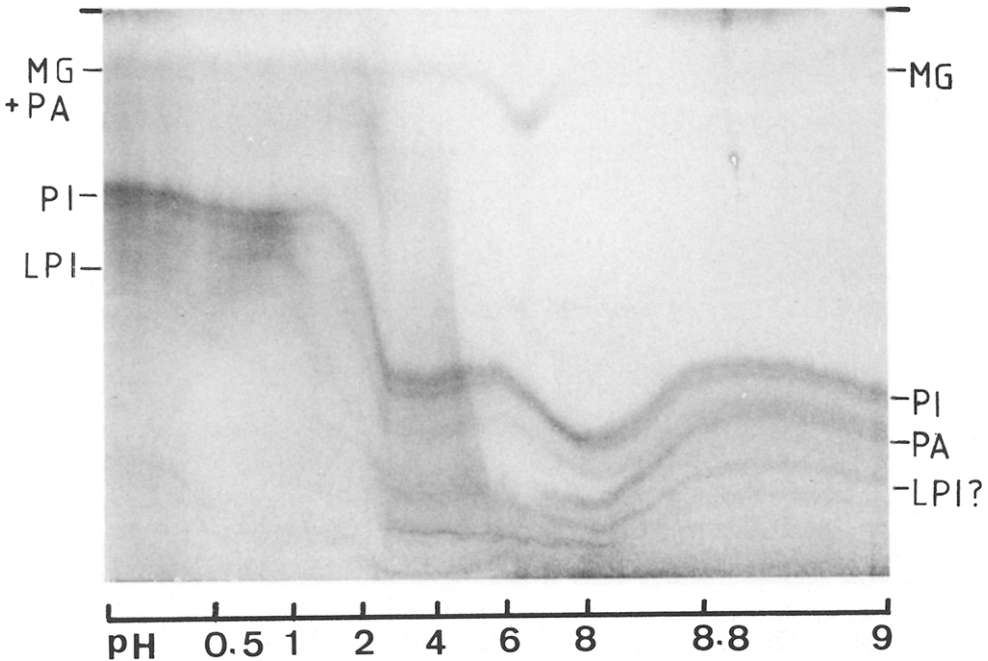


Fig. 2. Soja-Roh-PI-Fraktion, Fließmittel A.

Der Kurvenverlauf aller untersuchten Substanzen im pH-T-Gradient ist durch das Vorhandensein eines mehr oder weniger stark ausgeprägten Minimums im pH-Bereich von 8 gekennzeichnet. Diese Ausbuchtung tritt bei vielen Fließmittelsystemen (s. auch Figs. 15 und 16) und nicht nur bei der Chromatographie der Phospholipide, jedoch ausschliesslich bei der Verwendung von Kieselgel als Sorptionsmittel auf. Das Minimum ist demnach nicht substanzspezifisch, sondern wird durch die höhere Adsorptionskraft des Sorbens in diesem pH-Bereich verursacht. Als Folge der starken Adsorption resultiert, wie gezeigt werden konnte, ein ungleichmässiger Verlauf der  $\beta$ -Front (polare Fließmittelkomponenten werden stärker zurückgehalten) und damit der tieferliegenden Substanzzonen, während die  $\alpha$ -Front unbeeinflusst bleibt.

Die Figs. 1 und 2 zeigen das Chromatogramm von PI bzw. eines mit PI angereicherten Rohextrakts aus Sojabohnen. Der pH-Wert der Schicht, der wegen der logarithmischen Abhängigkeit von der Protonenkonzentration und den Puffer-eigenschaften des Sorbens nicht linear verläuft, reicht von 0 bis 9 und ist als Abszisse eingezeichnet. Während ein Chromatogramm auf uniformen Schichten auf Grund des starken Verwischungseffektes der Nebenkompenten kaum eine Aussage über einem Inhaltsstoff des Rohextrakts ermöglicht, gestattet der Vergleich von Figs. 1 und 2 eine eindeutige Identifizierung von PI als Hauptkomponente des Rohextrakts. Dem Gradientenchromatogramm kann sogar als weitere Information entnommen werden, dass im Rohextrakt zwei chromatographisch geringfügig unterschiedliche Molekülspezies vorliegen, da die PI-Kurve als Doppellinie ausgebildet ist. Als Nebenkompenten sind Monoglyceride (MG), PA und möglicherweise die Lysoverbindung LPI zu erkennen.

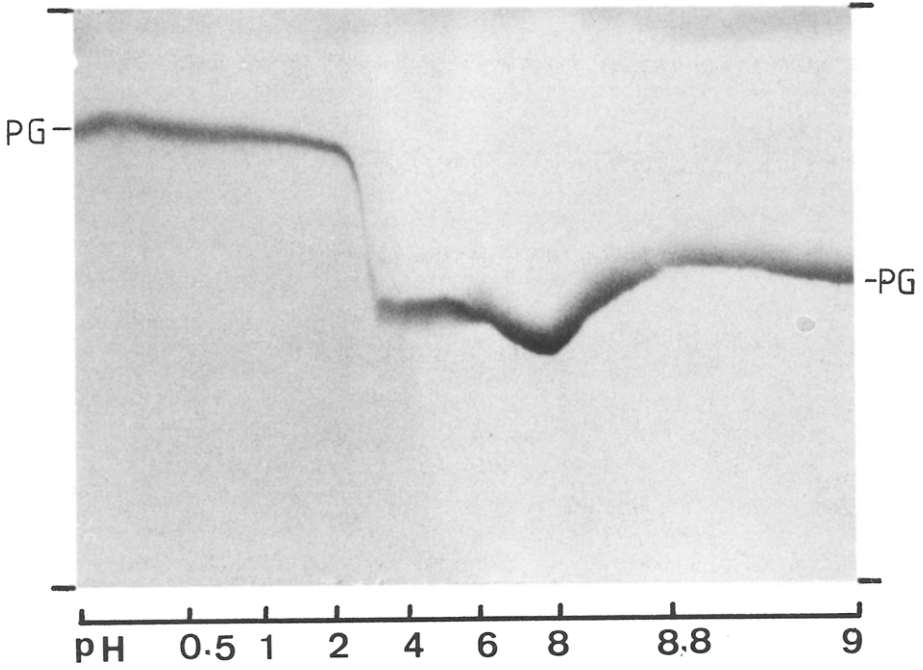


Fig. 3. Phosphatidylglycerol, Fließmittel A.

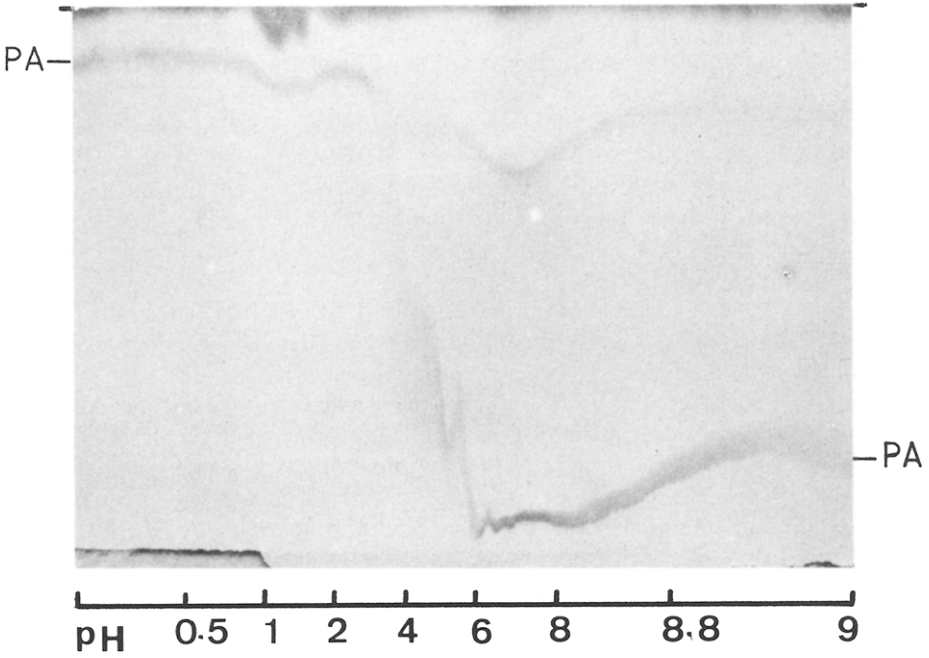


Fig. 4. Phosphatidsäure, Fließmittel A.

Der Kurvenverlauf von PI zeigt in Übereinstimmung mit der molekularen Struktur das typische Bild einer einwertigen Säure. Im sauren Bereich liegt die Verbindung als neutrales Molekül mit einem hohen  $R_F$ -Wert vor. Bei steigendem pH resultiert an einem bestimmten Punkt ein steiler Abfall der Kurve, da das Molekül infolge von Salzbildung eine negative Ladung und damit eine höhere Polarität erhält. Der  $R_F$ -Wert des gebildeten Anions bleibt danach, abgesehen von dem sorbensbedingten Minimum, bis zum basischen Schichtbereich konstant. Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit von undissoziierter Säure und korrespondierender Base ist immer im Zusammenhang mit der Fließmittelpolarität zu sehen, die bei richtiger Auswahl die typische Kurvenform einer sauren, basischen oder amphoteren Verbindung im pH-T-Gradient ergibt. Die Lage des Wendepunktes bei pH 3 ist nicht allein durch den  $pK_s$ -Wert der Säure, sondern auch durch Adsorptions- und Verteilungsgleichgewichte beeinflusst<sup>41,55</sup>.

PG (Fig. 3) zeigt als einwertige Säure mit einem Wendepunkt ebenfalls bei pH 3 und vergleichbarer  $R_F$ -Wert-Differenz von freier Säure und Säureanion keinen Unterschied zur Kurvenform von PI, liegt jedoch im Chromatogramm deutlicher höher. Für PA (Fig. 4) schliesslich liegt das Deprotonierungsgleichgewicht bei pH 5-6. Wegen der grossen Differenz der Wanderungsgeschwindigkeiten von undissoziierter Säure und Salz liegt die Verbindung in einem so grossen Schichtbereich in diffuser Form vor, dass sie dort kaum erkennbar ist. Dies erschwert eine definierte und reproduzierbare Zonenausbildung bei der Chromatographie auf neutralen Schichten mit neutralen Fließmitteln oder macht sie unmöglich. Der im alkalischen Bereich zu beobachtende erneute Kurvenanstieg ist ähnlich wie bei DPG und PS auf

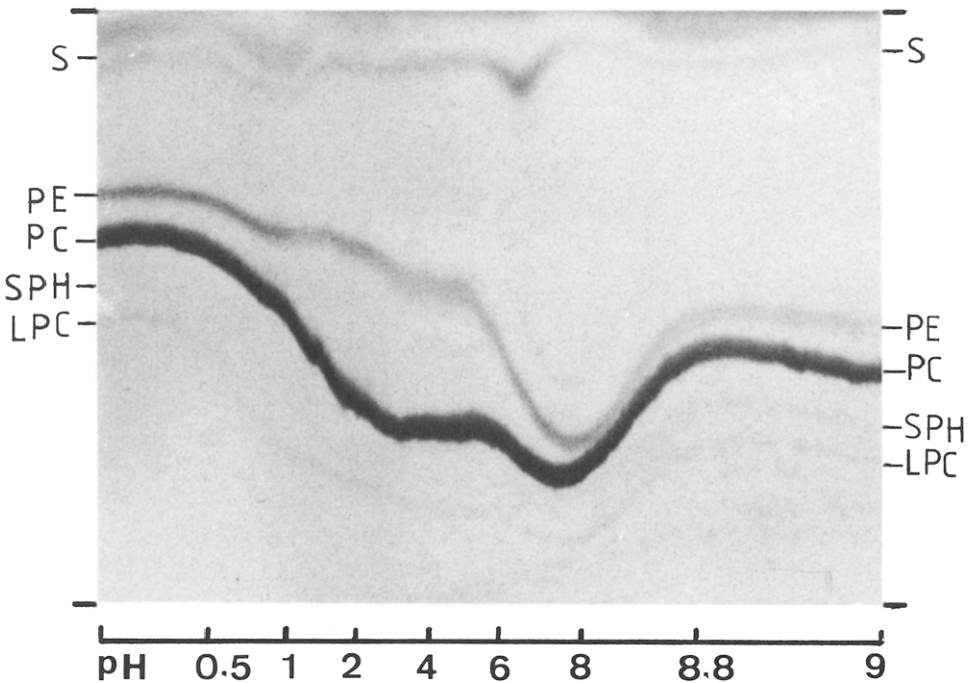


Fig. 5. Eilecithin, Fließmittel A.

das Zusammentreffen des Kurvenabfalls infolge Dissoziation mit dem erwähnten sorbensbedingten Minimum zurückzuführen.

Die Kurven der betainartigen Verbindungen PE und PC, den Hauptkomponenten von Eilecithin, sind in Fig. 5 dargestellt. PE zeigt einen leichten Abfall seines  $R_F$ -Wertes im pH-Bereich von 1–6, wird sonst jedoch von dem pH-Wert der Schicht kaum beeinflusst, da die Verbindung im sauren wie im alkalischen Bereich jeweils einfach geladen und im neutralen Bereich als Zwitterion vorliegt, wobei sich hier die Ladungen der einzelnen Molekeln teilweise kompensieren. Die Hauptkomponente des Eilecithins, PC, besitzt als echtes Betain nur im sauren Bereich eine einfache Ladung, während es sonst zweifach geladen vorliegt. Daher resultiert mit steigendem pH-Wert ein deutlicher Rückgang der Wanderungsgeschwindigkeit, der jedoch nicht so abrupt wie bei einer Säure erfolgt. Im alkalischen Bereich ist wieder ein Kurvenanstieg zu beobachten, der nicht mehr den  $R_F$ -Wert der Kurve im sauren Gebiet erreicht. Während im oberen Teil des Chromatogramms die Sterolzone (S) gut sichtbar ist, liegt dicht unterhalb der Kurve von PC diejenige des SPH (im Druck nicht mehr zu erkennen, s. jedoch Figs. 11 und 14), das nur in Spuren im Eilecithin enthalten ist. Die exakte Parallelität der Kurven von SPH und PC ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass beide Verbindungen mit Phosphorylcholin die gleiche polare funktionelle Gruppe besitzen, während lediglich der lipophile Molekülrest unterschiedlich ist, der das chromatographische Verhalten nur wenig beeinflusst. Das natürliche SPH besteht offensichtlich aus zwei Fraktionen unterschiedlicher Polarität und erscheint in dem ausgewählten Fließmittel als Doppellinie. Eine ähnliche Kurvenform bei wiederum tieferem  $R_F$ -Wert besitzt auch das LPC, das ebenfalls im Eilecithin als Spurenbestandteil zu erkennen ist. Diese Verbindung besitzt an Stelle

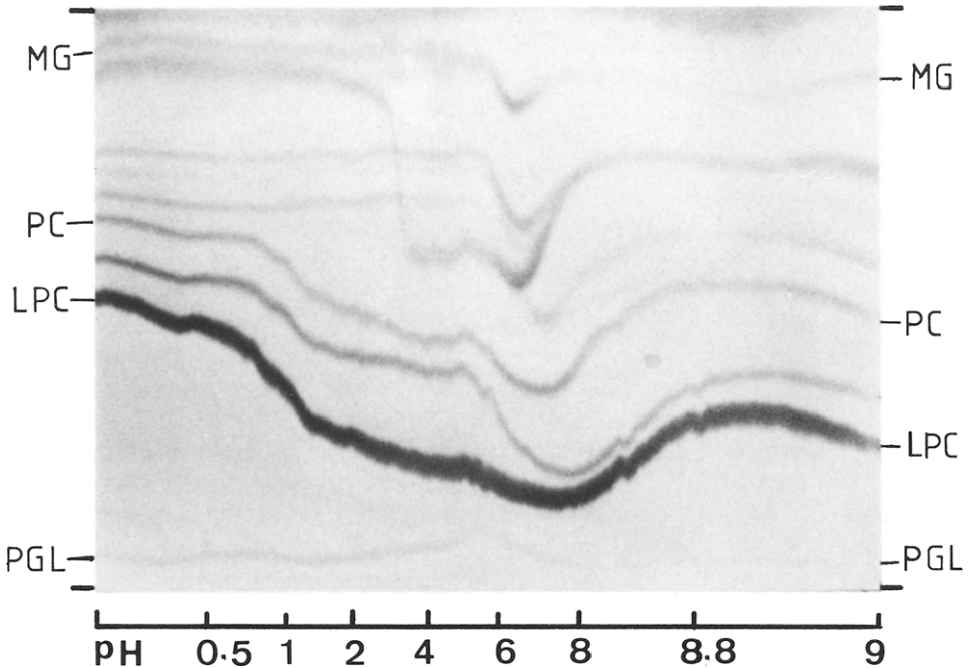


Fig. 6. LM Lysolecithin, Fließmittel A.



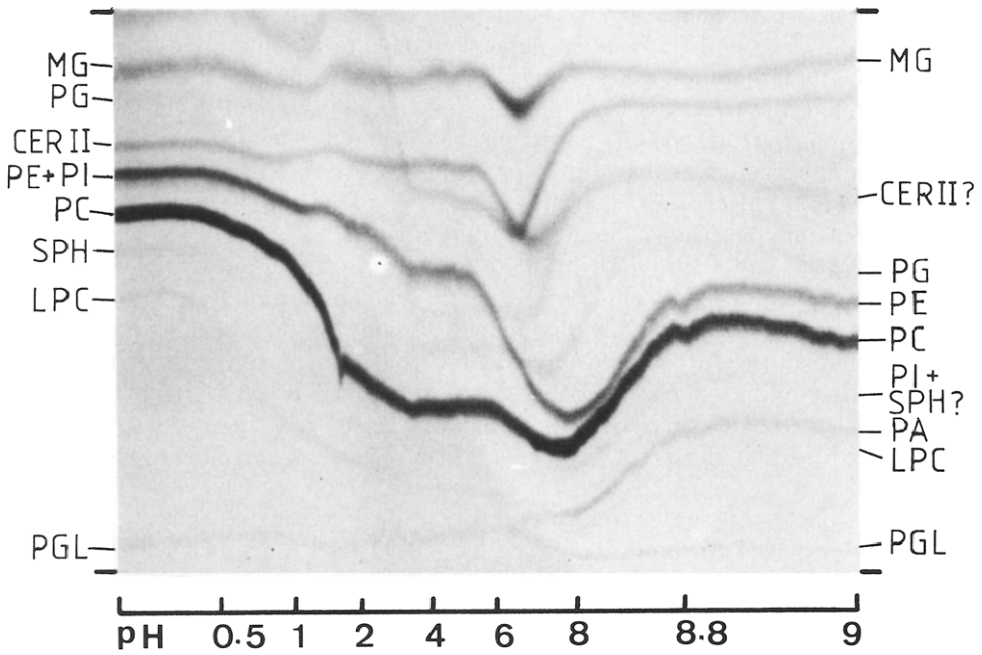


Fig. 7. LM Epicuron, Fließmittel A.

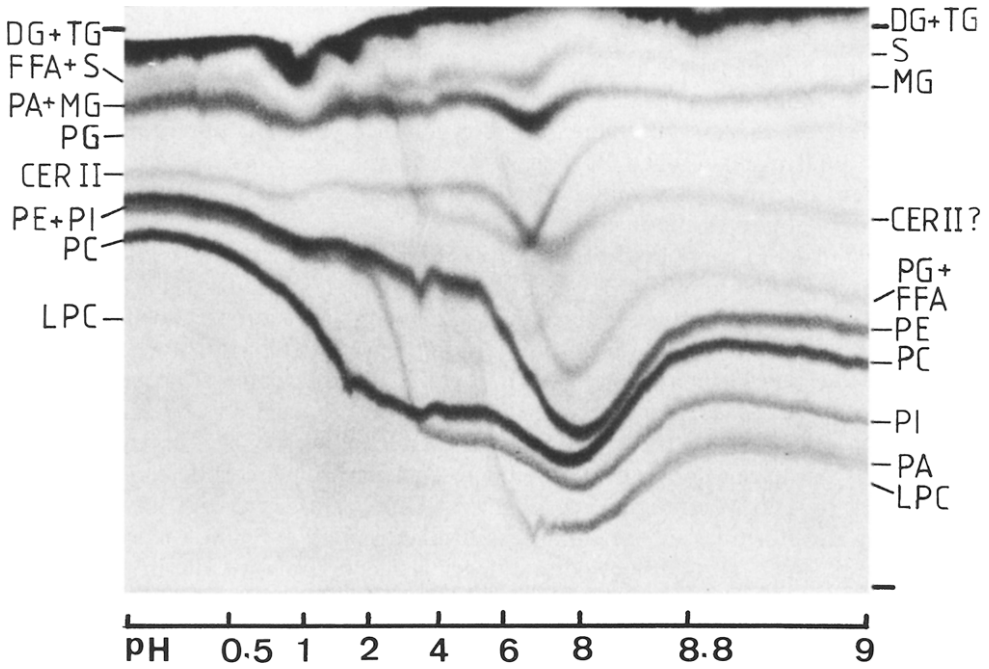


Fig. 8. LM Rohlecithin, Fließmittel A.

einer esterartig gebundenen langkettigen Fettsäure eine Hydroxylgruppe, wodurch ihre Polarität steigt und die Wanderungsgeschwindigkeit abnimmt. Das in Fig. 6 dargestellte Chromatogramm eines Sojalecithins, das mit Phospholipase hydrolysiert wurde, zeigt neben LPC als Hauptkomponente weitere Verbindungen, möglicherweise Lysophosphatide, da die enzymatische Hydrolyse stellungsspezifisch jedoch nicht substratspezifisch erfolgt. Im oberen Teil des Chromatogramms erkennt man daneben Verbindungen, die durch die enzymatische Reaktion unbeeinflusst blieben und auch in anderen pflanzlichen Rohextrakten vorliegen.

In Figs. 7 und 8 sind die Chromatogramme der Sojaprodukte LM Epicuron und LM Rohlecithin dargestellt. Hier zeigt sich deutlich die gute Reproduzierbarkeit der einzelnen Kurvenformen, die unabhängig von der Art und Anzahl der Phosphatidkomponenten ist und auch durch einen Neutralfettanteil von 35% unbeeinflusst bleibt. Ferner ergibt sich eine typische relative Lage der Kurven zueinander, die von den normalen Aktivitätsschwankungen des Sorbens und Schwankungen in der Laufstrecke des Fliessmittels (in den Figs. etwa 12 cm; Zeitdauer von 30 min) nicht beeinflusst wird.

Das Chromatogramm von Epicuron zeigt im Vergleich zu dem von Rohlecithin eine Anreicherung von PC, während die Kurve des PE deutlich schwächer und PI nur noch als Spur erkennbar ist. Ferner sieht man im unteren  $R_F$ -Bereich andeutungsweise die Kurven von PA, LPC und Phytoglycolipiden (PGL), die sich nur wenig von der Startlinie fortbewegen. Weiter sind die schwache Kurve des PG und im oberen Teil des Chromatogramms die Kurven einiger nicht identifizierter Verbindungen zu erkennen, die zum Teil die Form von PG, jedoch einen höheren  $R_F$ -Wert besitzen. Ferner ist eine mit der CER II-Linie identische Kurve sichtbar (möglicherweise auch Monoglycosyldiglyceride). Unterhalb der Fliessmittelfront liegt die waagerechte Linie der Monoglyceride (MG), die lediglich einen kleinen Einschnitt in der Plattenmitte aufweist. Im Chromatogramm des Rohlecithins ist neben einer stärkeren PA- und PI-Zone das Auftreten von freien Fettsäuren (FFA) zu beobachten, die im sauren Teil der Schicht zusammen mit den Sterolen (S) dicht über der MG-Zone wandern und im alkalischen Bereich zusammen mit PG einen mittleren  $R_F$ -Wert einnehmen. In der Lösungsmittelfront liegen Diglyceride (DG), Triglyceride (TG) und weniger polare Komponenten.

Die in der Phospholipidfraktion der Gewebeextrakte aus Herz und Hirn angereicherten Verbindungen DPG und PS zeigen im pH-T-Gradient markante Kurvenformen. Die zweiwertige Säure DPG (Fig. 9) liegt im sauren Schichtbereich als einziges Phospholipid in der Lösungsmittelfront. Die erste Deprotonierungsstufe äussert sich in einem kleinen, aber steilen und gut reproduzierbaren Rückgang des  $R_F$ -Wertes bei pH 3. Das einfach geladene Molekül bleibt bis pH 6 stabil (Plateau) und gibt dann sein zweites Proton ab. Dadurch resultiert ein steiler Kurvenabfall, der durch das Ansteigen der Schichtaktivität in dem nachfolgenden Bereich noch vergrössert wird. Das Minimum bei pH 7-8 weist eine charakteristische diffuse Zone in Richtung zur Startlinie auf. Im alkalischen Milieu steigt die Kurve wieder auf einen mittleren  $R_F$ -Wert an und liegt dann auf der gleichen Höhe wie diejenige von PG. Als Verunreinigungen sind die Verbindungen PI und SPH zu erkennen, deren Kurven im alkalischen Schichtbereich zusammenfallen.

Die Kurve von PS (Fig. 10) weist durch den in annähernd zwei gleich grossen Stufen bei pH 3 und 6 erfolgenden Abfall des  $R_F$ -Werts ebenfalls auf eine zweifache

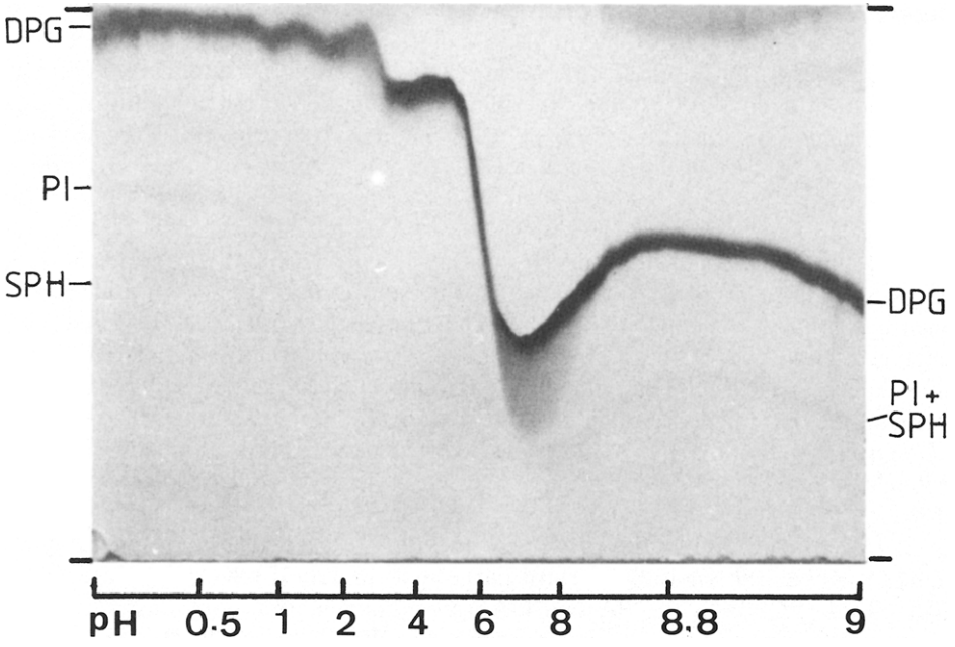


Fig. 9. Diphosphatidylglycerol, Fließmittel A.

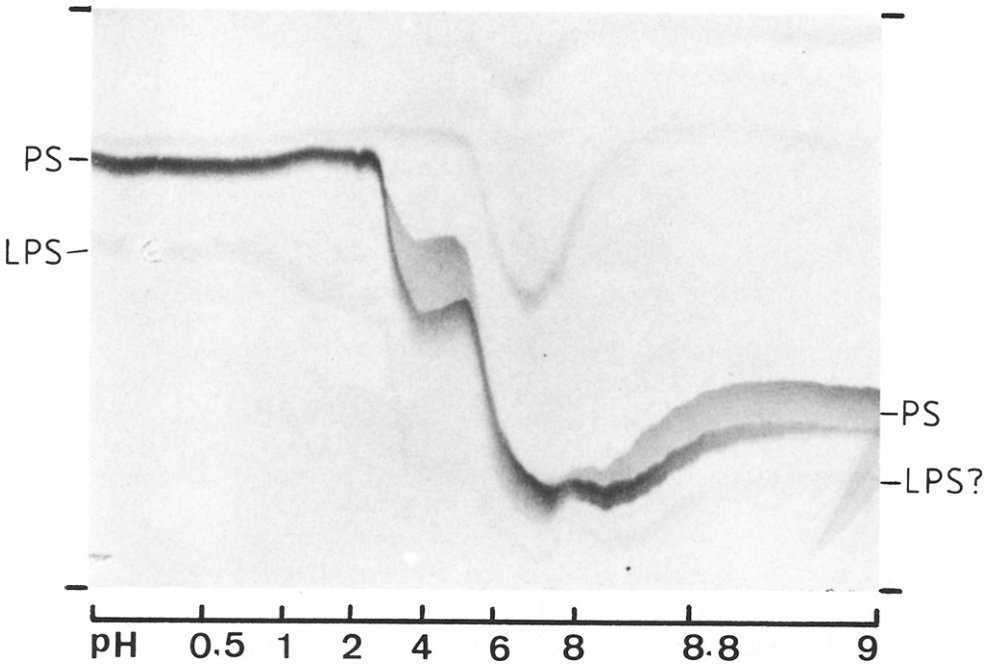


Fig. 10. Phosphatidylserin, Fließmittel A.

Deprotonierung der Substanz mit steigendem pH-Wert hin. Dabei zeigt sich vom Augenblick der ersten Deprotonierung an ein eigenartig diffuser Charakter der Kurve in Richtung zur Lösungsmittelfront, der möglicherweise durch Ladungsverschiebungen am amphoteren Serinrest hervorgerufen wird. Dieses Verhalten stimmt mit den Feststellungen in der Literatur überein, dass PS in dem verwendeten Fließmittel auf neutraler Schicht einen wenig definierten Fleck ausbildet<sup>54</sup> und dass PS in säurefreien Lösungsmitteln die Tendenz zeigt, einen lang ausgezogenen Fleck zu bilden, der die angrenzenden Komponenten teilweise überdeckt<sup>56</sup>. Die Ursache hierfür liegt jedoch nicht in der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von PS und seinen Salzen. Eine Ausnahme von dieser Regel scheinen Fließmittel mit Triethylamin als Komponente zu bilden, die das Tailing von PS in basischem Milieu unterdrücken<sup>35,36</sup>. Neben einigen nicht identifizierten Zersetzungsprodukten des labilen PS ist im Chromatogramm eine der PS-Linie annähernd parallele Kurve bei tieferem  $R_F$ -Wert zu erkennen, die der entsprechenden Lysoverbindung zukommen könnte.

Die mit und ohne Hydroxylgruppe an der langkettigen Fettsäure vorliegenden CER bilden eine Doppellinie und werden als neutrale Sphingoglycolipide durch den pH-Wert der Schicht nicht beeinflusst (Fig. 12). Auch die Doppellinie der CERS zeigt nur einen geringen Einfluss des pH-Werts. In Fig. 13 ist das Chromatogramm eines Methanol-Rohextrakts aus Rinderhirn dargestellt, in dem die Kurven von S, MG, CER, CERS, PC, SPH, PS, PA und GAN zu erkennen sind, ohne dass die Probe vor dem Auftragen auf die Schicht in irgendeiner Weise vorbereitet wurde.

Fig. 14 schliesslich zeigt das Chromatogramm des Modellgemischs aus zehn Komponenten im pH-T-Gradient. Aus praktischen Gründen und wegen der besseren Übersichtlichkeit wurden die Verbindungen PA und PS, die zur Zersetzung neigen

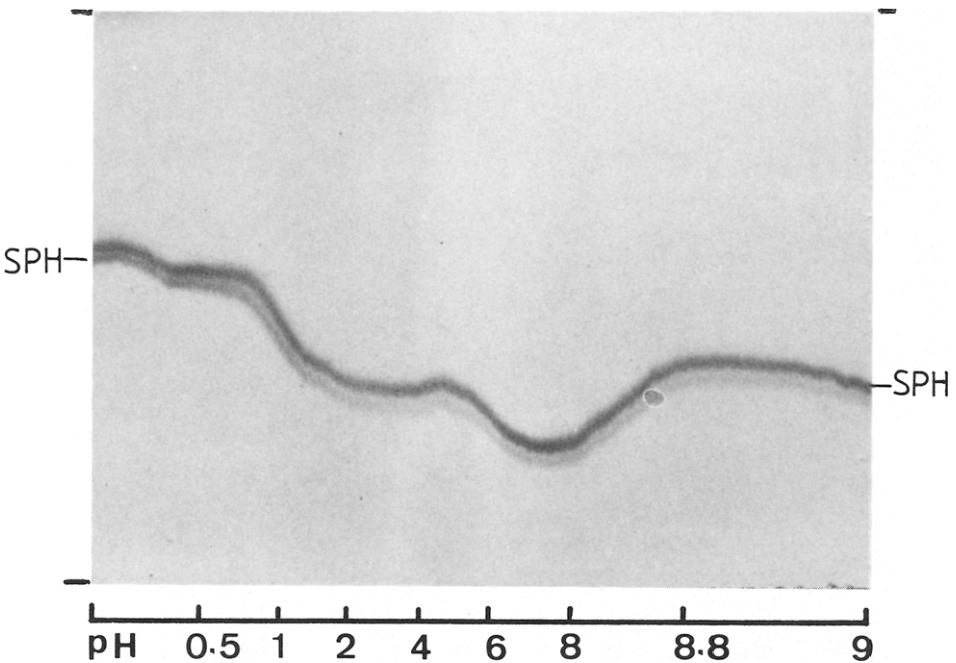


Fig. 11. Sphingomyelin, Fließmittel A.

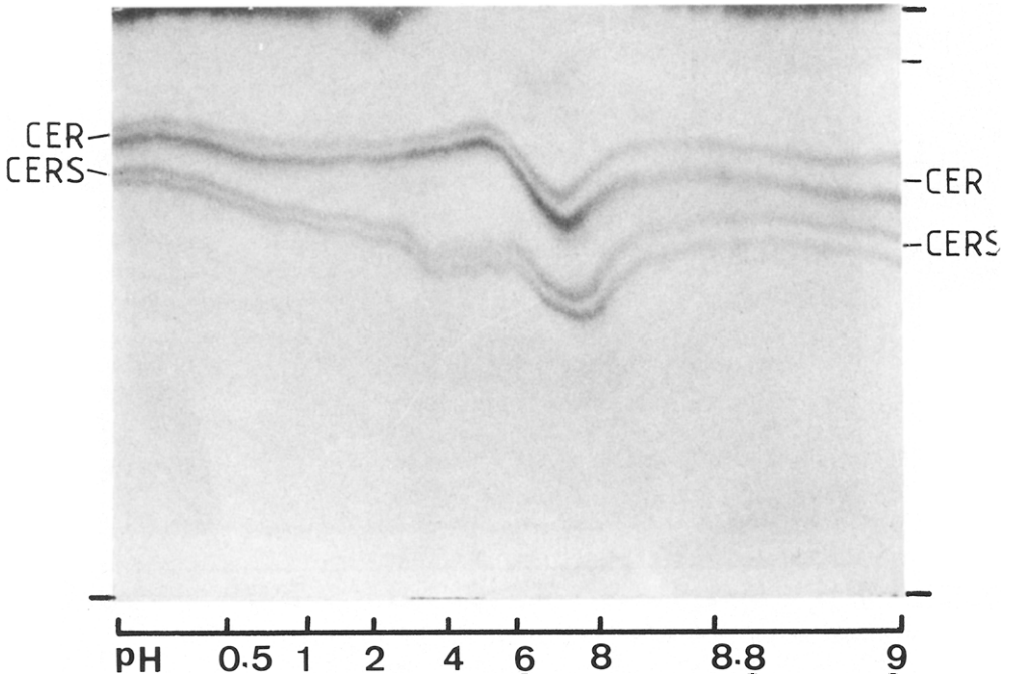


Fig. 12. Rinderhirn-Hydrolysat, Fließmittel A.

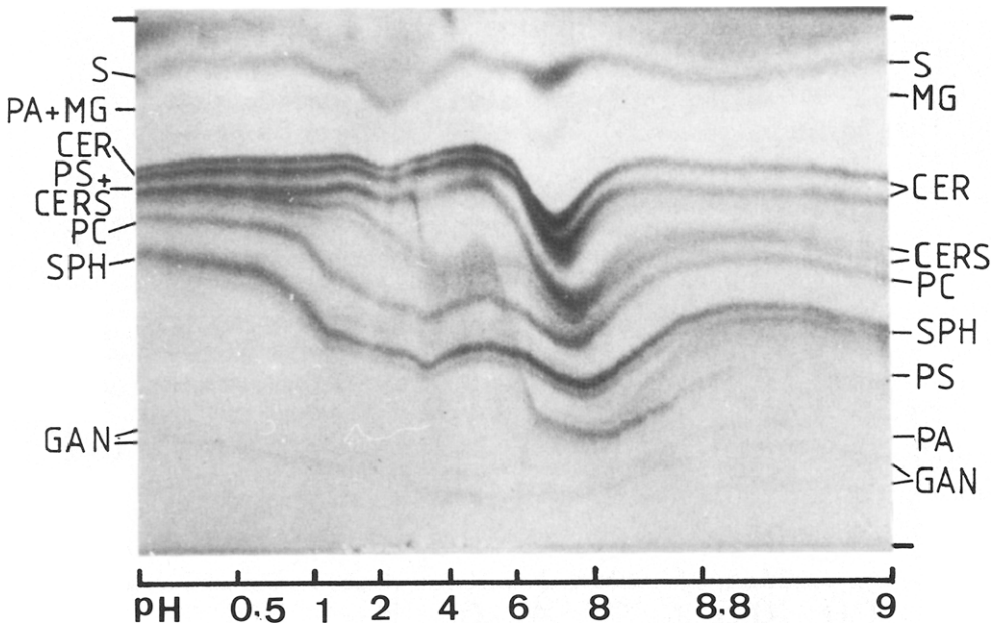


Fig. 13. Rinderhirn-Rohextrakt VI, Fließmittel A.

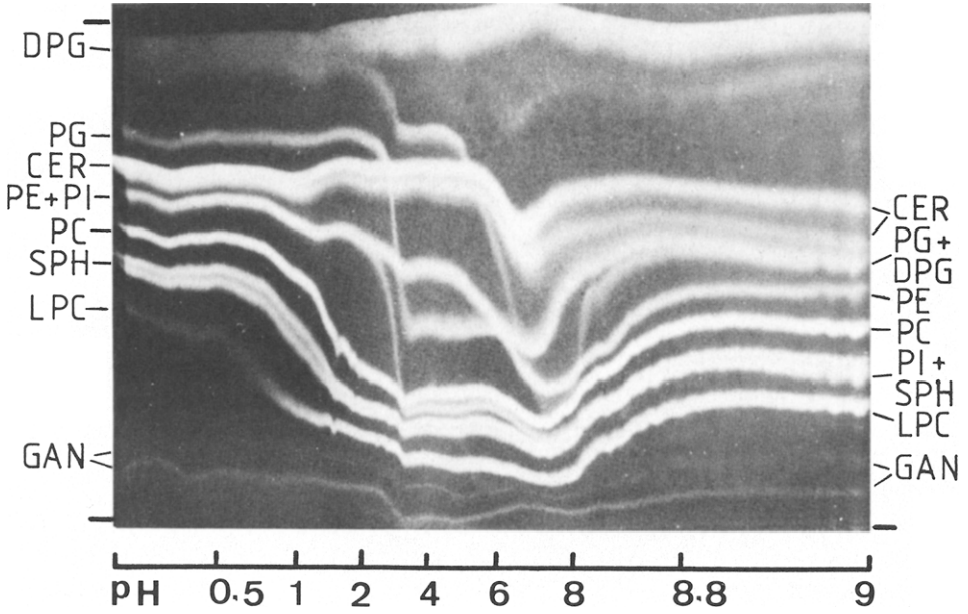


Fig. 14. Modellgemisch, Fließmittel A.

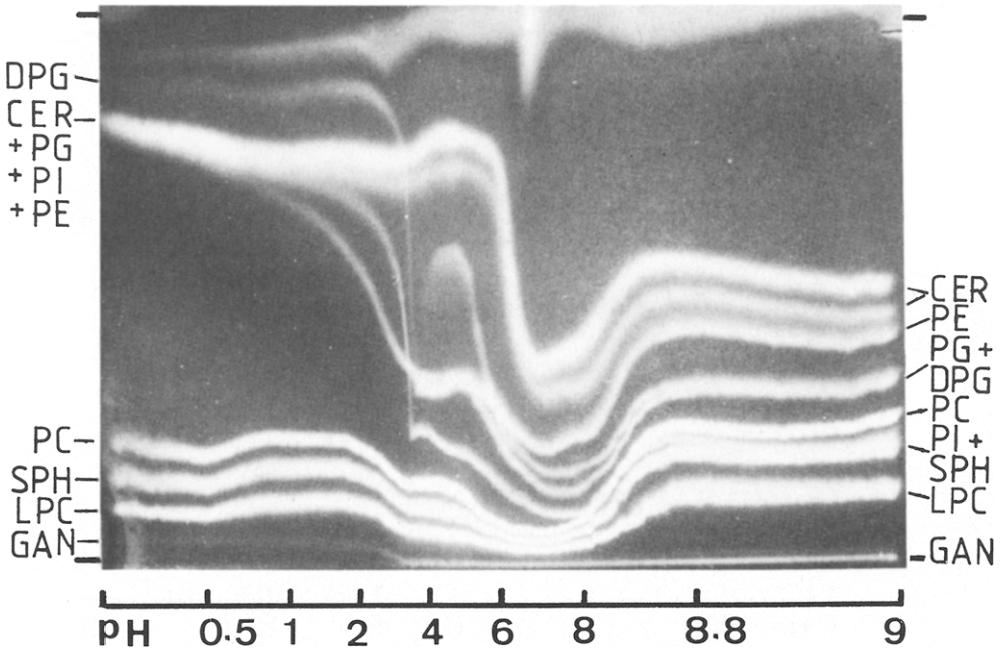


Fig. 15. Modellgemisch, Fließmittel B.

und Verwischungseffekte verursachen können, nicht einbezogen. Eine möglichst gleichmässige Detektion aller in aliquoten Anteilen vorhandenen Komponenten wurde durch Sichtbarmachung mit 8-ANS-Reagenz erreicht. Lediglich die Zone der GAN im unteren  $R_F$ -Bereich wird vergleichsweise unempfindlich detektiert. Wie man sieht sind alle enthaltenen Bestandteile deutlich voneinander zu unterscheiden, obwohl in dem dargestellten Chromatogramm praktisch kein pH-Bereich existiert, in dem eine saubere Trennung aller polaren Lipide gelingt. Beispielsweise liegen im sauren Bereich die Komponenten PI und PE, im alkalischen Bereich DPG und PG sowie PI und SPH in einer Zone zusammen. Im neutralen Bereich können Verwischungen und Änderungen in der Wanderungsgeschwindigkeit auftreten (DPG, PA, PS). Interessiert die Trennung einzelner kritischer Paare auf uniformen Schichten, gibt das pH-Gradientenchromatogramm Hinweise auf den hierzu erforderlichen optimalen pH-Wert der Schicht oder umgekehrt einen Anhaltspunkt, ob die Entwicklung neutraler Schichten mit sauren oder basischen Fließmitteln vorteilhafter ist.

In Fig. 15 ist das Verhalten des Modellgemischs bei der Entwicklung mit dem Fließmittel B: Chloroform-Methylacetat-*n*-Propanol-Methanol-Wasser (25:25:25:10:9) dargestellt, das unter Verwendung einer 25% wässrigen Kaliumchloridlösung statt Wasser von Vitiello *et al.*<sup>57</sup> vorgeschlagen wurde. Ähnliche flüssige Phasen sind wegen der guten Trenneigenschaften bei eindimensionaler Entwicklung auch von anderen Autoren<sup>35,58</sup> verwendet worden. Im sauren Schichtbereich ist eine deutliche Aufspaltung des Modellgemischs in zwei Gruppen zu beobachten, wobei die eine, im tiefen  $R_F$ -Bereich, alle Komponenten mit Phosphorylcholin als funktioneller Gruppe (PC, LPC, SPH) und GAN als getrennte Zonen enthält, während die übrigen Komponenten (CER I, II, PG, PI, PE) eine Zone im oberen  $R_F$ -

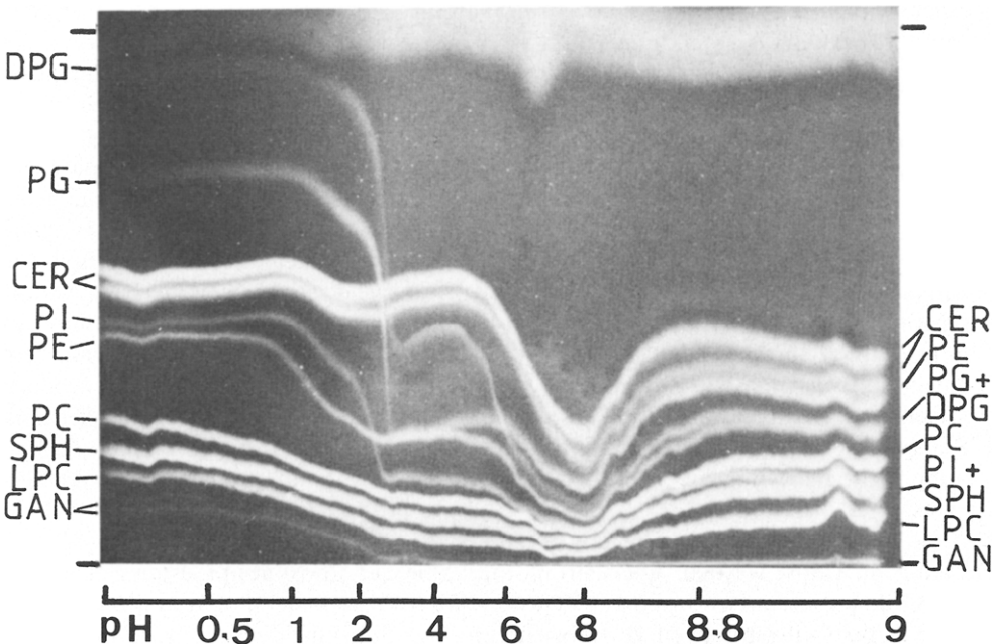


Fig. 16. Modellgemisch, Fließmittel C.

Bereich bilden und DPG fast in der Lösungsmittelfront zu finden ist. Im neutralen und schwach alkalischen Bereich ist die beginnende Auftrennung aller Komponenten (GAN am Start) des Testgemischs zu beobachten, die evtl. durch Zweifachentwicklung oder eine längere Laufstrecke des Fliessmittels noch verbessert werden könnte. Ein ähnliches Bild, jedoch mit einer gleichmässigeren Aufspaltung im sauren Schichtbereich, gibt das Fliessmittel C: Chloroform-Methylacetat-Ethylmethylketon-Methanol-Wasser (25:26:26:15:8) (Fig. 16).

## DISKUSSION

Polare Lipide natürlichen Ursprungs sind äusserst komplex zusammengesetzte Gemische. Mit flüssig-chromatographischen Methoden, insbesondere mit Hilfe der DC gelingt je nach Arbeitstechnik eine mehr oder weniger vollständige Auftrennung in einzelne Unterklassen. Die Schwierigkeit hierbei ist, dass einerseits kritisch zu trennende Paare (PI-PS, PE-PG) auftreten und andererseits Komponenten (PA, PS) ein starkes Tailing zeigen können. Um die Auflösung zu verbessern, das Tailing zu unterdrücken und damit möglichst alle vorhandenen Komponenten zu erkennen, bietet die Chromatographie der Phospholipide prinzipiell zwei Ansatzpunkte. Auf Grund der amphiphilen Natur kann durch Einstellen verschiedener definierter Werte der relativen Luftfeuchtigkeit gezielt die chromatographische Trennung beeinflusst und verbessert werden<sup>44,59</sup>. Ein zweiter, stärkerer Effekt auf das Verhalten der Phospholipide wird erreicht, wenn man die unterschiedlichen Ionisierungseigenschaften der zu trennenden Komponenten ausnutzt, wobei der Ionisierungsgrad von dem pH-Wert des umgebenden Milieus anhängt.

Die bisher zur Nutzung dieses Effekts angewandten Techniken bestehen in einer uniformen Imprägnierung der stationären Phase mit sauren oder basischen Salzen und/oder der Verwendung saurer oder basischer mobiler Phasen. Besonders die Kombination beider Fliessmitteltypen bei Mehrfachentwicklung oder zweidimensionaler Arbeitstechnik erlaubt gute Trennungen, bringt aber auch Nachteile mit sich. Beim Zwischentrocknen der Schicht tritt eine starke lokale Konzentrierung der Säure oder Base auf, die zu Zersetzungen führen kann. Beispielsweise werden Plasmalogene, die normalerweise mit den entsprechenden Diesterphosphatiden in einer Zone wandern, besonders leicht durch Säuren unter Abspaltung der Aldehyde in Lysoverbindungen umgewandelt<sup>5,23</sup>. Eine weitere Schwierigkeit bildet die Identifizierung der getrennten Substanzzonen, die besonders bei zweidimensionaler Arbeitstechnik schwierig und eventuell mit Unsicherheit behaftet ist. Aber auch bei Einfachentwicklung können Probleme auftauchen. So ist beim Vergleich des  $R_F$ -Werts mit dem einer authentischen Reinsubstanz zu beachten, dass sich auf Grund verschiedener Ursachen (Auftragmenge, Reinsubstanz-Mischung, synthetisches-natürliches Phospholipid) geringe Schwankungen ergeben können. Dies erschwert die Zuordnung dicht benachbarter Substanzzonen bei der Chromatographie komplexer Gemische.

Die meisten dieser Schwierigkeiten können mit der vorgestellten Methode befriedigend gelöst werden. Die Chromatographie der Phospholipide quer zu einem pH-Gradient vermittelt in kurzer Zeit ohne Mehrfachentwicklung und ohne zusätzliche Arbeitsaufwendungen zur Absicherung der Substanzidentität (z.B. sukzessive Anwendung spezifischer Nachweisreagenzien) einen hohen Informationsgehalt über



die Zusammensetzung einer Probe. Durch Wechselwirkung mit der Schicht, d.h. Protonierung basischer Zentren im sauren und Dissoziation saurer Gruppen im basischen Bereich, wird der Ionisierungsgrad und damit die Beweglichkeit der Einzelkomponenten so beeinflusst, dass sich charakteristische Kurvenformen ergeben, die in guter Korrelation zu dem molekularen Aufbau stehen. Dies erleichtert die Identifizierung der Komponenten und erlaubt einen schnellen Überblick über die Phospholipidzusammensetzung einer Probe ohne Referenzsubstanzen unter der Voraussetzung, dass die Kurven der Reinsubstanzen und ihre relative Lage zueinander bekannt sind.

Da die Protonenkonzentration auf der Schicht, die die Wanderungsgeschwindigkeit verschiedener Komponenten unterschiedlich beeinflusst und somit die Selektivität der Trennung bestimmt, sich kontinuierlich ändert, existiert immer ein pH-Bereich in dem die Trennung zweier Komponenten zufriedenstellend gelingt. Nebenkomponenten und Verunreinigungen lassen sich mit grösserer Sicherheit erkennen, da sie einen durchgehenden Kurvenzug besitzen, der mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht im ganzen pH-Bereich mit den Kurven der Hauptkomponenten zusammenfällt. Zersetzungen auf der Schicht konnten bisher nicht beobachtet werden. Sie sind gegebenenfalls leicht daran zu erkennen, dass über die Schichtbreits keine geschlossene Linie sondern eine Aufspaltung derselben sichtbar wird. Weiter lässt sich unmittelbar feststellen, ob zwei dicht benachbarte Substanzonen verschiedenen Phospholipidklassen zuzuordnen sind oder ob sie dieselbe polare funktionelle Gruppe besitzen und nur Differenzen im lipophilen Molekülrest aufweisen, was eine Doppellinie über den ganzen pH-Bereich zur Folge hat.

Das Verfahren lässt sich ohne aufwendiges "clean-up" direkt auf Rohextrakte anwenden. Auch in verunreinigten Proben, die starke Verwischungen auf der Schicht verursachen, sind die enthaltenen Komponenten auf Grund der typischen Kurvenform noch leicht zu erkennen.

Das Einstellen einer genau definierten Luftfeuchtigkeit ist nicht erforderlich, da die durch den pH-Wert der Schicht verursachten Effekte einen grösseren Einfluss haben. Die Reproduzierbarkeit der Kurvenform, die primär von der Güte des Schichtgradienten abhängt, hat sich bei einer Vielzahl untersuchter Proben tierischen und pflanzlichen Ursprungs als zufriedenstellend erwiesen. Das gute Verhältnis von Aussagekraft zur einfachen und schnellen Handhabung lässt die Gradient-DC im Rahmen der vorliegenden Problematik als leistungsfähige Alternative zu den bisherigen Verfahren erscheinen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die Trennung und Identifizierung der Bestandteile komplexer Phosphatidmischungen ist eine wichtige Aufgabe, die durch das teils ähnliche, teils unterschiedliche Verhalten der Komponenten und ihre Thermolabilität nicht einfach zu bewältigen ist. Als leistungsfähige Alternative wird zur Lösung dieses Problems die Chromatographie auf pH-Gradientschichten vorgeschlagen. Dabei ergeben sich durch Säure-Base-Wechselwirkungen mit der Schichtimprägnierung charakteristische Kurvenformen aller Einzelkomponenten im pH-T-Gradient, die in guter Korrelation mit dem molekularen Aufbau (einwertige, zweiwertige Säure, Betain) stehen. Auf diese Weise ist in kurzer Zeit eine sichere Identifizierung von Haupt- und Nebenbestandteilen

und ein guter Überblick über die Zusammensetzung komplexer Phosphatidmischungen möglich. Das Verfahren wurde an Rohextrakten polarer Lipide tierischen und pflanzlichen Ursprungs und an einem Modellgemisch aus zehn Komponenten erprobt und zeigt dabei eine gute Leistungsfähigkeit.

## LITERATUR

- 1 E. Stahl, *Pharmazie*, 11 (1956) 633.
- 2 E. Stahl, *Chem.-Z.*, 82 (1958) 323.
- 3 E. Stahl, *Pharm. Rundsch.*, 1 (Heft 2) (1959) 1.
- 4 B. J. H. M. Poorthuis, P. J. Yazaki und K. Y. Hostetler, *J. Lipid Res.*, 17 (1976) 433.
- 5 L. A. Horrocks, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 40 (1963) 235.
- 6 H. K. Mangold und R. Kammereck, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 39 (1962) 201.
- 7 S. K. Jain und D. Subrahmanyam, *Ital. J. Biochem.*, 27 (1978) 11.
- 8 M. J. Whittle, A. I. Wilson, C. R. Whitfield, R. D. Poton und R. W. Logan, *Brit. Med. J.*, 282 (1981) 428.
- 9 T. L. Gross, M. V. Wilson, P. M. Kuhnert und R. J. Sokol, *Clin. Chem.*, 27 (1981) 486.
- 10 G. Rauser, C. Galli und G. Kritchevsky, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 42 (1965) 404.
- 11 R. M. Broekhuysse, *Clin. Chim. Acta*, 23 (1969) 457.
- 12 G. Rouser, S. Fleischer und A. Yamamoto, *Lipids*, 5 (1970) 494.
- 13 V. P. Skipsky, R. F. Peterson und M. Barclay, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 467.
- 14 V. P. Skipsky, J. Sanders und M. Barclay, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 227.
- 15 V. P. Skipsky, R. F. Peterson und M. Barclay, *Biochem. J.*, 90 (1964) 374.
- 16 J. A. Vinson und J. E. Hooyman, *J. Chromatogr.*, 135 (1977) 226.
- 17 G. S. Setz, S. Jakovicic, J. Heywood, J. Frank und M. Robinowitz, *Biochim. Biophys. Acta*, 218 (1970) 441.
- 18 H. H. Althaus und V. Neuhoff, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 354 (1973) 1073.
- 19 H. K. Mangold und D. C. Malins, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 37 (1960) 383.
- 20 M. E. McKillican und R. P. A. Sims, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 40 (1963) 108.
- 21 G. S. Hodge, *Ann. Clin. Biochem.*, 10 (1973) 167.
- 22 L. T. Mann, *Clin. Chem.*, 24 (1978) 390.
- 23 A. Minenko und H. Lilse, *Pharmazie*, 34 (1979) 722.
- 24 D. Abramson und M. Blecher, *J. Lipid Res.*, 5 (1964) 628.
- 25 B. W. Nichols, *Biochim. Biophys. Acta*, 70 (1963) 417.
- 26 W. C. Beckenridge, G. Gambos und I. G. Morgan, *Biochim. Biophys. Acta*, 266 (1972) 695.
- 27 Č. Michalec und J. Reinišová, *J. Chromatogr.*, 162 (1979) 229.
- 28 H. Jatzkewitz, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 320 (1960) 134.
- 29 W. D. Skidmore und C. Entenman, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 471.
- 30 H. G. Müldner, J. R. Wherrett und J. N. Cumings, *J. Neurochem.*, 9 (1962) 607.
- 31 E. H. Coch, G. Kessler und J. S. Meyer, *Clin. Chem.*, 20 (1974) 1368.
- 32 C. F. Cusick, *Ann. Clin. Biochem.*, 13 (1976) 379.
- 33 O. W. Thiele und W. Wober, *Z. Anal. Chem.*, 202 (1964) 442.
- 34 E. Klenk und W. Gielen, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 323 (1961) 126.
- 35 J. C. Touchstone, J. C. Chen und K. M. Beaver, *Lipids*, 15 (1979) 61.
- 36 K. Korte und M. L. Casey, *J. Chromatogr.*, 232 (1982) 47.
- 37 E. Stahl, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 3 (1964) 784.
- 38 H. Michl, *Monatsh.*, 83 (1952) 210.
- 39 D. B. Gammack, *Biochem. J.*, 88 (1963) 373.
- 40 A. K. Gupta, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 158 (1975) 71.
- 41 J. Müller, *Dissertation*, Univ. d. Saarlandes, Saarbrücken, 1982.
- 42 K. G. Blass und C. S. Ho, *J. Chromatogr.*, 208 (1981) 170.
- 43 E. Stahl, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer Verlag, Berlin, 2. Aufl., 1967.
- 44 M. Caselli, *Anal. Lett.*, 14 (B20) (1981) 1693.
- 45 M. E. McKillican und R. P. A. Sims, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 41 (1964) 340.
- 46 R. J. Penick, M. H. Meisler und R. H. McCluer, *Biochim. Biophys. Acta*, 116 (1966) 279.
- 47 M. Lepage, *J. Chromatogr.*, 13 (1964) 99.

- 48 P. R. Gentner, M. Bauer und I. Dieterich, *J. Chromatogr.*, 206 (1981) 200.
- 49 R. A. Heyneman, D. M. Bernard und R. E. Vercauteren, *J. Chromatogr.*, 68 (1972) 285.
- 50 L. Gluck, M. V. Kulovich und S. J. Brody, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 570.
- 51 W. M. Frederiks und S. Broekhoven, *J. Chromatogr.*, 150 (1978) 171.
- 52 J. F. Pernes, Y. Nurit und M. de Heaulme, *J. Chromatogr.*, 181 (1980) 254.
- 53 H. F. Larsen und A. F. Trostmann, *J. Chromatogr.*, 226 (1981) 484.
- 54 H. Wagner, L. Hörhammer und P. Wolff, *Biochem. Z.*, 334 (1961) 175.
- 55 E. Stahl und E. Dumont, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 517.
- 56 U. Beiss, *J. Chromatogr.*, 13 (1964) 104.
- 57 F. Vitiello und J.-P. Zanetta, *J. Chromatogr.*, 166 (1978) 637.
- 58 E. Hedegaard und B. Jensen, *J. Chromatogr.*, 225 (1981) 450.
- 59 T. R. Watkins, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 5 (1982) 104.