

Journal of Chromatography, 163 (1979) 86-91

Biomedical Applications

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 308

Note

Eine rationelle, quantitative Bestimmungsmethode dünnenschichtchromatographisch getrennter Lipide des Serums

J. GARTZKE

Zentralinstitut für Arbeitsmedizin der DDR (Direktor OMR Prof. Dr. sc. med. H.-G. Häublein), Nöldnerstr. 40/42, DDR-1134 Berlin (D.D.R.)

(Eingegangen am 13. Oktober 1978)

Zur Diagnostik von Stoffwechselerkrankungen aus dem Serum gewinnt, trotz einer grossen Zahl an automatisierbaren chemischen und enzymatischen Methoden zur Bestimmung einzelner Lipidparameter, die Dünnschichtchromatographie (DC) als sehr leistungsfähige Methode an Bedeutung [1-4]. Die Entwicklung hat ihre Ursache in einer verbesserten Gerätetechnik zur densitometrischen in-situ-Auswertung [2, 5] der entwickelten Chromatogramme, einer vereinfachten Lipidextraktion [1], einer verbesserten DC [6] sowie einer besseren Richtigkeit durch Einführung objektiver Korrekturfaktoren [3, 7].

Als wesentlicher Vorteil der DC gegenüber chemischen bzw. enzymatischen Einzelbestimmungen gilt, dass die Bestimmung aller wesentlichen Lipidparameter in einem Arbeitsgang mit der gleichen Präzision erfolgt.

VERSUCHE ZUR METHODE

Extraktion

Die allgemein übliche Lipidextraktion nach Folch et al. [8] wird aus zweierlei Gründen abgelehnt, die Mischungslücke zwischen Extraktionsmittel und wässriger Phase führt zu Verlusten an wasserlöslichen Lipiden [9] und durch die Verwendung von Methanol besteht die Gefahr chemischer Umsetzungen, wie Reduktion und Umesterung [10].

Die von Segura und Gotto [1] vorgeschlagene Extraktion mit Isopropanol vermeidet diese Nachteile. Wir fanden in Übereinstimmung mit Dittmer et al. [11] bei dem Vergleich einer chemischen Cholesterinbestimmung nach Isopropanolextraktion [12] mit der enzymatischen Bestimmung [13] niedrigere Werte für die chemische Bestimmung (Heissextraktion: $y_{\text{enzym.}} = 6.74 + 0.88x, r = 0.847$ [11] .. Kaltextraktion: $y_{\text{enzym.}} = 6.40 + 0.97x, r = 0.950$ [14]). Bei DC-Untersuchungen von Isopropanol-Lipidextrakten konnte ein Verlust an Cholesterinestern nachgewiesen werden. Dieser Verlust konnte durch Extraktion des

Serums mit dem fünfzehnfachen Volumen eines Isopropanol-*n*-Hexan-Gemisches (2.75:1, v/v) vermieden werden. Nach Eindampfen des Extraktes mit einem Vakuumrotationsverdampfer wurde der verbleibende Rückstand in Chloroform gelöst.

DC und Detektion

Von Van Gent [6] wurde eine leistungsfähige Zweistufenmethode auf Kieselgel mit verschiedenen Laufmitteln im Mikroformat beschrieben, die von Egge et al. [15] durch eine weitere chromatographische Entwicklung zur Entfernung der Phospholipoide vom Start modifiziert worden ist.

Abgesehen davon, dass zumindest bei bandförmigem Auftragen, eine Entfernung der Phospholipoide vom Start nicht notwendig ist, konnte auch nicht die angegebene Qualität dieser Trennungen erreicht werden. Eine sehr gute Trennung aller im Serum üblichen Lipidklassen wurde durch eine eindimensionale Zweifachenentwicklung mit unterschiedlicher Trennstrecke (Gesammtlaufstrecke: 5–6 cm), zuerst in Benzol–Dioxan (94:6, v/v), dann nach Zischentrocknen in Tetrachlorkohlenstoff erhalten. Durch das zweite Laufmittel trennen sich Triglyceride und Cholesterinester, wobei es zu einer teilweisen Aufspaltung der Cholesterinesterbanden kommen kann. Als Sorbens wurden mit 10%iger Ammoniumsulfatlösung imprägnierte Kieselgelfolien der Fa. Merck (Darmstadt, B.R.D.; Art. Nr. 5553) verwendet. Fig. 1 zeigt ein solches Chromatogramm im Punkt- und Strichauftrag mit unterschiedlichen Mengen an Lipiddextrakt nach Verkohlung mit 10% methanolischer Schwefelsäure bei 180–200°. Monoglyceride, die im Serum normalerweise nicht auftreten, liegen dabei – vom Start aus gesehen – kurz vor dem Cholesterinfleck.

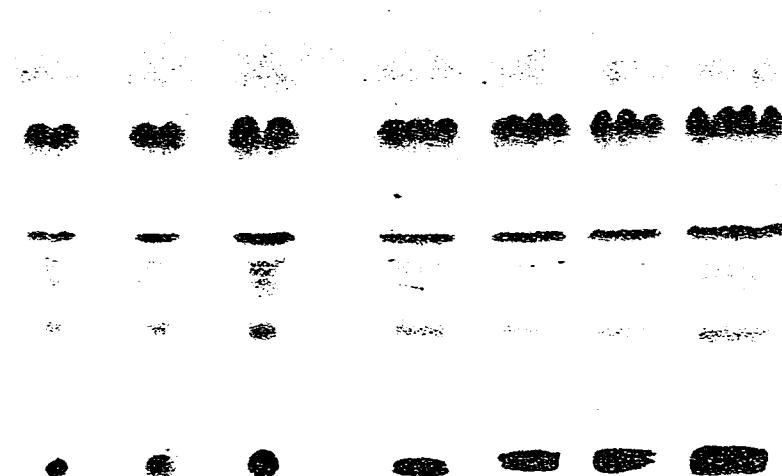


Fig. 1. Chromatogramm der Auf trennung eines Serumlipidextraktes im Punkt- und Strichauftrag mit jeweils steigenden Mengen (1, 2, 3 bzw. 3, 6, 8, 12 μ l Extrakt, 1 μ l Extrakt entspricht 3 μ l Serum) nach Verkohlung mit Schwefelsäure (Flecken vom Start aus: Phospholipoide, Cholesterin, Fettsäuren, 1,2-, 1,3-Diglyceride, Triglyceride, Cholesterinester).

Auswertung

Die Auswertung erfolgt in Remission mit dem Elektrophoreseauswertege- rät ERI 65 m der Fa. Carl Zeiss (Jena, D.D.R.) bei 530 nm (Spaltbreite: 0.3 mm). Da der nach der Sulfovanillinphospho-Reaktion (SVP) bestimmte Ge- samtlipidwert als Bezugsgrösse dient, erübrigt sich das Auftragen definierter Lipidextraktmengen zur Chromatographie. Die von Chobanov et al. [16] be- schriebene Empfindlichkeitssteigerung des Densitometers durch Verzicht auf eine Wellenlängenselektion wurde, obwohl dadurch die Sensitivität der Meth-ode erheblich gesteigert wird, nicht angewendet, da spektrale Veränderungen der Lichtquelle zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen können. Die aus der Integrationskurve ermittelten Fleckenflächenwerte der einzelnen Lipid- klassen werden wegen ihres unterschiedlichen Kohlenstoffgehaltes auf Cholesterin als einheitliche Lipidfraktion korrigiert [7] und ihre Absolutbeträge aus den korrigierten Relativflächenwerten und dem Gesamtlipidwert berechnet. Fig. 2 stellt das Schema eines Chromatogramms mit dazugehöriger Remissions- gradorts- und Integrationskurve dar.

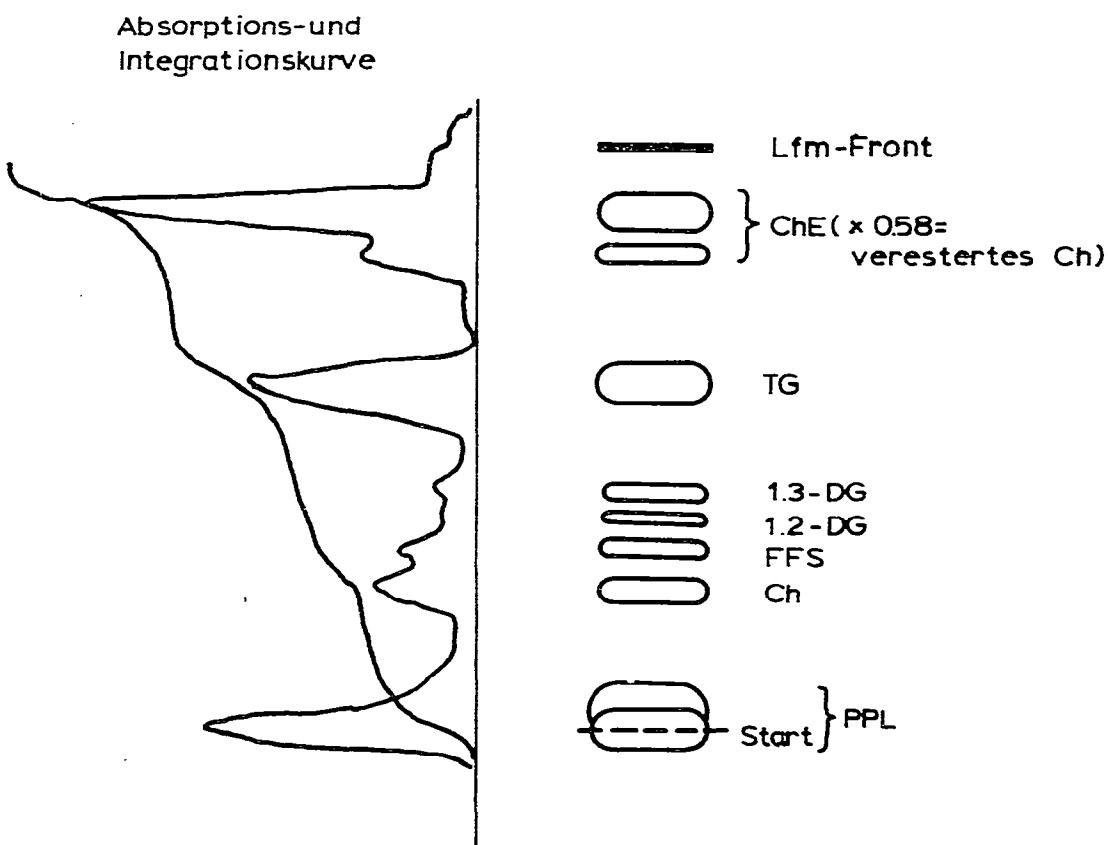


Fig. 2. Schema des Serumlipidechromatogramms mit dazugehöriger Absorptions- und Integrationskurve.

METHODE

0.2 ml Serum werden mit 3 ml eines Isopropanol-*n*-Hexangemisches (2.75:1, v/v) extrahiert. Nach schonendem Eindampfen des Extraktes im Vakuum wird der Rückstand in etwa 0.5 ml Chloroform gelöst und Anteile davon strichförmig auf ammoniumsulfatimprägnierte Kieselgel aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt in Stufentechnik zuerst 4.5 cm in Benzol-Dioxan (94:6, v/v) und anschliessend 6 cm in Tetrachlorkohlenstoff, die Detektion durch Besprühen mit 10%iger methanolischer Schwefelsäure und 10 min langes Erwärmen auf 180–200°. Nach Densitometrie und Korrektur der integrierten Werte für die Remissionsgrad-Ortskurven [7] erfolgt die Berechnung der Absolutbeträge der einzelnen Lipidfraktionen aus den korrigierten Einzelflächenwerten und dem Gesamtlipidwert (gleich Summe der korrigierten, integrierten Einzelflächenwerte).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Als Kriterium für die Brauchbarkeit, dem auch die Praktikabilität untergeordnet werden muss, ist die Richtigkeit anzusehen. Dazu wurden 31 Proben eines Humanserumpools nach vorstehend beschriebener Methode aufgearbeitet und die Mittelwerte der bei den Lipidklassen ermittelten Konzentrationen mit denen nach chemisch bzw. enzymatisch analytischen Methoden ($n = 30$) gefundenen Mittelwerten verglichen.

Die Tabelle I gibt den Vergleich der dünnenschichtchromatographisch ermittelten Lipidwerte nach Verkohlung mit den einzelanalytisch gefundenen Werten, die jeweiligen Variationskoeffizienten und das relative Richtigkeitsmass des DC-Verfahrens in Bezug auf die einzelanalytischen Bestimmungen wieder. Sie zeigt, dass die DC-Bestimmung des Lipidstatus den chemischen bzw. enzymatischen Bestimmungen ebenbürtige Werte, mit geringerer, vom Densitometer abhängender Präzision liefert. Andere in-situ-Auswerteverfahren wie die Messung der in den Lipidklassen enthaltenen Doppelbindungen bei 196 nm [2] oder auch fluorimetrische Messungen [1] erfordern einen grossen gerätetechnischen Aufwand. Während sich der Kohlenstoffgehalt kaum oder gar nicht durch Lipidstoffwechselstörungen ändert [7], sind im Falle der Remissionsmessungen bei 196 nm Unterschiede bis ca. 10% festzustellen [2]. Aus Fig. 1 ist ersichtlich, dass sich im ersten Laufmittel wahrscheinlich eine β -Front ausbildet. Das bedeutet eine Ausbildung scharfer Lipidbanden aber auch eine Abhängigkeit der R_F -Werte von der Laufstrecke.

Hohe Konzentrationen an freien Fettsäuren, wie sie in den untersuchten Seren niemals auftraten, können eine Verschiebung des Fettsäurenfleckes zwischen die Di- und Triglyceride bewirken. Aus praktischen Gründen wurde als Bezugswert für die relativen Flächenwerte der Gesamtlipidwert gewählt.

Weitere Vorteil dieser DC-Methode ist, dass sich ein Auftragen definierter Lipidextraktmengen erübrigt. Die Richtigkeit der Bestimmung des Gesamtlipidwertes ist eng an die Wahl des Standards gebunden. Die Verwendung von 860 mg Cholesterin/100 ml entsprechend 1000 mg Gesamtlipid pro 100 ml Serum als Standard entspricht wie aus der Tabelle I und aus Vergleichen mit Referenzlaboratorien (INSTAND, Düsseldorf, Berlin, B.R.D.) hervorgeht, weitgehend den "richtigen" Werten.

TABELLE I

VERGLEICH DER LIPID-EINZELBESTIMMUNGEN MIT DEM DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCH BESTIMMTEN LIPIDSTATUS

Parameter	Vergleichsbestimmung (n = 30)			DC-Bestimmung (n = 31)		
	Methode	x (g/l)	Variationskoeffizient (%) [*]	x (g/l)	Variationskoeffizient (%) ^{**}	Relatives Richtigkeitsmaß (%) ^{***}
Gesamtlipid	SVP [§]	7.91	2.65			
Triglyceride	Halbenzymatisch ^{§§}	1.61	3.98			2.48
	Vollenzymatisch ^{§§§}	1.50	1.90	1.65	8.17	10.0
Gesamt-cholesterin	ZAK-Reaktion [12]	1.98	5.32			1.01
	ZAK-Reaktion direkt [12]	2.08	1.96	2.00	8.80	3.85
Freies Cholesterin	Enzymatisch ⁺	2.02	2.18			1.00
	ZAK-Reaktion [13]	0.554	3.90			1.41
Verestertes Cholesterin	Enzymatisch ⁺	0.548	2.27	0.564	11,1	2.04
	ZAK-Reaktion [13]	1.42	3.80			1.41
Phospholipoide	Enzymatisch	1.47				2.04
	Zilversmit ⁺⁺	2.66	4.05	2.71	7.48	1.88

^{*}Serial ermittelt.^{**} Von Tag zu Tag ermittelt.^{***} $\frac{\bar{x}_{\text{chem.}} - \bar{x}_{\text{DC}}}{\bar{x}_{\text{chem.}}} \cdot 100\%$.[§] Testkombination der Fa. Boehringer (Mannheim; B.R.D.) Best. Nr. 124 303.^{§§} Boehringer-Testkombination Best. Nr. 125 032.^{§§§} Boehringer-Testkombination Best. Nr. 126 012.⁺ Boehringer-Testkombination Best. Nr. 124 087.⁺⁺ Boehringer-Testkombination Best. Nr. 124 974.

Die hier beschriebene DC-Methode ermöglicht eine schnelle Bestimmung aller Lipidklassen mit hinreichender Genauigkeit bei geringem arbeitstechnischen Arbeitsaufwand auf rationellem Wege. Weitere methodische Vereinfachungen, wie eine direkte Serumextraktion auf Dünnschichtplatten mit Konzentrierungszonen[17] sollten möglich sein.

LITERATUR

- 1 R. Segura und A.M. Gotto, IX. International Congress on Clinical Chemistry, Toronto, 1975, Abstracts, p. 74, ref. 264.
- 2 U. Murawski, H. Egge und F. Zilliken, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 12 (1974) 464.
- 3 J. Kabara und J.S. Chen, Anal. Chem., 48 (1976) 814.
- 4 W.R. Nelson und S. Natelson, Clin. Chem., 23 (1977) 835.
- 5 U. Hezel, GIT (Glas-Instrum.-Techn.) Fachz., 21 (1977) 694.
- 6 C.M. van Gent, Z. Anal. Chem., 236 (1968) 344.
- 7 J. Gartzke und K.-D. Nolte, J. Chromatogr., 84 (1973) 109.
- 8 J. Folch, M. Lees und G.H.S. Stanley, J. Biol. Chem., 226 (1957) 497.
- 9 G. Wolfram, persönliche Mitteilung.
- 10 B. Brisse und W. Dirscherl, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 7 (1969) 200.

- 11 H. Dittmer, K. Müller, C. Schäfer und P. Scholz, II. European Congress on Clinical Chemistry, Prague, 1976, Abstracts, p. 24.
- 12 Methodensammlung des Dt. Arzneimittelbuches der DDR, 7. Ausgabe, Cholesterolbestimmung Methoden I und II, Akademie-Verlag, Berlin, 1968.
- 13 F. Stähler, E. Munz und R. Kattermann, Deut. Med. Wochenschr., 100 (1975) 876.
- 14 H.H. Leffler und C.H. McDonalds, Amer. J. Clin. Pathol., 39 (1963) 311.
- 15 H. Egge, U. Murawski, J. Müller und F. Zilliken, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 8 (1970) 488.
- 16 D. Chobanov, R. Terandjiska und R. Chobanova, J. Amer. Oil Chem. Soc., 53 (1976) 48.
- 17 H. Halpaap und K.-F. Krebs, J. Chromatogr., 142 (1977) 823.