

## Die Trennung verschiedener Gallensäuren mittels Papierchromatographie.

Von

J. Beyreder und H. Rettenbacher-Däubner.

Aus der medizinischen Abteilung des Kaiserin-Elisabeth-Spitals der Stadt  
Wien.

*(Eingelangt am 18. Dez. 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 15. Jan. 1953.)*

Fünf verschiedene Gallensäuren, und zwar die Tauro-, Glyko-, Desoxy-, Dehydrocholsäure und die Cholsäure werden papierchromatographisch in einem Lösungsmittelsystem aus Toluol, Eisessig und Wasser getrennt. Die Trennung erfolgt aufsteigend und gibt gut reproduzierbare  $R_f$ -Werte. Die Entwicklung erfolgt durch Besprühen mit alkoholischer Jodlösung, wobei sich einzelne Gallensäuren charakteristisch anfärben. Sie können auch mit Phosphorsäure im UV-Licht nachgewiesen werden. Die Methode ist für die Untersuchung biologischen Materials brauchbar.

Als Voraussetzung für die Untersuchung biologischen Materials bezüglich dessen Gehaltes an verschiedenen Gallensäuren wurde die papierchromatographische Trennung einiger Gallensäuren mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen versucht und mit der, von uns angewandten Methode gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt.

Wir verwenden als Lösungsmittelsystem ein Gemisch von Toluol, Eisessig und Wasser. Die drei Komponenten werden im Scheidetrichter gut geschüttelt und nach Klärung der wäßrige Anteil verworfen. Zur chromatographischen Trennung findet nur die organische Phase Verwendung. Die Chromatographie wird aufsteigend durchgeführt, und zwar genügt eine Steighöhe von 25 bis 28 cm.

Untersucht wurde das Verhalten der Tauro-, Glyko-, Chol-, Desoxy- und Dehydrocholsäure, von denen die erste als 1%ige wäßrige und die drei folgenden als 1%ige alkoholische Lösungen vorlagen. Die Dehydrocholsäure wurde in der gleichen Konzentration in Eisessig gelöst. Es

wurde vorwiegend mit Substanzmengen von 50  $\gamma$  gearbeitet, wozu 5 cm der entsprechenden Gallensäurelösungen aufgebracht wurden. Die später angegebenen  $R_f$ -Werte sind ausschließlich die Ergebnisse der Trennung verschiedener Gallensäuregemische.

Wir verwendeten vorzugsweise das Filterpapier Whatman Nr. 1 und dafür ein Lösungsmittelgemisch von Toluol (T)-Eisessig (E)-Wasser (W) im Volumsverhältnis 40:40:8. Nach Trennung der beiden Phasen im Scheidetrichter wird die organische Phase in das Gefäß eingebracht und der Papierstreifen vor dem Eintauchen zur Sättigung 1 Std. eingehängt. Die Laufzeit bei einer Steighöhe von 27 cm beträgt etwa 2 Stdn.

Tabelle 1.  $R_f$ -Werte.

	Taurochol- säure	Glykochol- säure	Chol- säure	Desoxychol- säure	Dehydro- cholsäure
Whatman 1:					
T-E-W .....	0,01	0,16	0,58	0,83	—
40:40:8 .....	0,01	0,16	0,58	—	0,77

Außerdem wurden noch Versuche mit Filterpapier der Fa. Schleicher & Schüll ausgeführt, wobei sich das sehr harte, besonders langsam laufende Papier Nr. 2045 am besten bewährte. Um gute Trennungsergebnisse zu erzielen, mußte die volumsmäßige Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches variiert werden. Die Laufzeit ist zirka 4 $\frac{1}{2}$  Stdn.

Tabelle 2.  $R_f$ -Werte.

	Tourochol- säure	Glykochol- säure	Chol- säure	Desoxychol- säure	Dehydro- cholsäure
Schl. & Sch. 2045a:					
T-E-W .....	0,022	0,25	0,62	0,80	—
30:30:4 .....	0,022	0,25	0,62	—	0,72
Schl. & Sch. 2045b:					
T-E-W .....	0,022	0,25	0,60	0,78	—
30:30:4 .....	0,022	0,25	0,60	—	0,73
Schl. & Sch. 2045a:					
T-E-W .....	0,01	0,17	0,52	0,71	—
40:40:6					
Schl. & Sch. 2045b:					
T-E-W .....	0,02	0,20	0,57	0,76	—
40:40:6					

Die angegebenen  $R_f$ -Werte beziehen sich auf freie Gallensäuren, bei nicht zu hohen Konzentrationen verhalten sich die Na-Salze vollkommen gleich.

Zur Entwicklung des Chromatogrammes wird der Streifen gut an der Luft getrocknet und dann zuerst mit Wasser und sofort anschließend mit

einer kalt gesättigten alkohol. Jodlösung leicht besprüht. Das jetzt dunkelbraun gefärbte Papier hellt sich durch Verdampfen des Jods rasch auf und es erscheinen die einzelnen Gallensäuren charakteristisch angefärbt. Und zwar die Tauro- und Glykocholsäure als rotbraune, bei hoher Konzentration als schwarzbraune Spots, die beim Trocknen hellgelb werden und bei niedrigen Konzentrationen ganz abblassen. Die Cholsäure erscheint anfangs in einem schmutzigbraunen Farbton, der langsam in ein leuchtendes Blau übergeht. Die Dehydro- und Desoxycholsäure sind am schwächsten sichtbar und erscheinen kurz nach dem Besprühen mit der Jodlösung als zart gelbe, unscharf begrenzte Flecke. Die Desoxycholsäure kann gesondert besser sichtbar gemacht werden, wenn man den Filterpapierstreifen nach der oben beschriebenen Behandlung trocknen läßt, mit verd. Salzsäure (1:1) und anschließend nochmals mit der Jodlösung besprüht. Sie erscheint dann am trockenen Streifen als gelbbrauner Fleck. Mit dieser Methode sind noch 30  $\gamma$  der einzelnen Gallensäuren nachweisbar.

Bei den von uns verwendeten Substanzmengen sind die Spots der Tauro- und Glykocholsäure annähernd kreisrund, mit einem Durchmesser von zirka 1,5 cm. Etwas größere Flecke ergeben die Dehydro- und Desoxycholsäure, während die Spots der Cholsäure deutlich oval auseinandergezogen sind.

Eine Trennung verschiedener Gallensäuren mit anderen Lösungsmittelsystemen wurde von *D. Kritchevsky* und *M. Kirk*<sup>1</sup> angegeben, die allerdings nur zwei (nämlich die Chol- und Desoxycholsäure) biologisch wichtige Gallensäuren untersuchten. Zur Entwicklung modifizierten sie eine von *R. Neher* und *A. Wettstein*<sup>2</sup> beschriebene Methode mit Phosphorsäure. Wir haben sie ebenfalls verwendet. Dabei erschienen im sichtbaren (weißen) Licht die Tauro-, Glyko- und Cholsäure als hellrosa Spots, während im UV-Licht dieselben Gallensäuren eine leuchtend blaue Fluoreszenz zeigen. Die Dehydro- und Desoxycholsäuren sind nur im UV-Licht zu sehen, und zwar erstere schwach grüngelb, die Desoxycholsäure schwach rosa. Die Spots aller verwendeten Gallensäuren erscheinen im UV-Licht größer und mehr in die Länge gezogen als im sichtbaren Licht und bei der Entwicklung mit Jod. Die  $R_f$ -Werte stimmen gut überein.

Die von uns angegebene Methode zur papierchromatographischen Trennung verschiedener Gallensäuren hat sich auch für die Untersuchung von biologischem Material bewährt. Über diese Ergebnisse wird an anderer Stelle berichtet werden.

<sup>1</sup> *D. Kritchevsky* und *M. Kirk*, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 4713 (1952).

<sup>2</sup> *R. Neher* und *A. Wettstein*, Helv. Chim. Acta **34**, 2278 (1951).