

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON UBICHINONEN*

H. WAGNER, L. HÖRHAMMER UND B. DENGLER

*Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität
München (Deutschland)*

(Eingegangen den 7. August 1961)

EINLEITUNG

Da die Ubichinone** nach Arbeiten zahlreicher Autoren¹⁻⁵ in der Atmungskette, im Elektronentransportsystem und bei der oxydativen Phosphorylierung wichtige Funktionen erfüllen, ist ihr Nachweis und ihre quantitative Bestimmung in tierischen Organen und in daraus hergestellten pharmazeutisch verwendeten Lipoidextrakten von Interesse.

Zwar existieren bereits papierchromatographische Trennverfahren und spektrophotometrische Bestimmungsmethoden⁶⁻¹⁰, doch erfordern diese eine umständliche Lösungsmittelvorfraktionierung oder eine säulenchromatographische Vortrennung.

Im Anschluss an unsere kürzlich durchgeführten dünnenschichtchromatographischen Arbeiten zur Trennung von Phosphatiden und Glykolipiden auf Kieselgelplatten¹¹ haben wir nun versucht, Ubichinone ohne Vorreinigung direkt aus einem Acetonextrakt auf dünnenschichtchromatographischem Wege nachzuweisen. Die Dünnenschichtchromatographie selbst wurde auf dem Lipoidgebiet von STAHL¹² und anderen¹³⁻¹⁸ bereits mit Erfolg verwendet.

Als 1. System zur Abtrennung der Ubichinone oder des Ubichinons von den anderen Lipoidbestandteilen bewährte sich das System Benzol-Chloroform (1:1).

Als 2. System zur Auftrennung der verschiedenen Ubichinone untereinander bzw. um die Länge der Isoprenseitenkette festzulegen, verwendeten wir in Anlehnung an das Verfahren zur Papierchromatographie der Polyterpenalkohole¹⁹ eine Mischung aus 9 Teilen Aceton und 1 Teil Paraffin-gesättigtem Wasser. Beide Verfahren werden kombiniert, indem man das abgetrennte Ubichinon aus der 1. Kieselgelplatte eluiert und im 2. System auf einer 2. Kieselgelplatte zur weiteren Auftrennung bringt.

Als Sprühmittel dient eine 0.25 %ige äthanolische Rhodamin-B-Lösung bzw. eine gesättigte Lösung von Antimon(III)-chlorid in Chloroform. Die unterste Nachweisgrenze liegt für Ubichinone bei 0.5 μ , wenn man sie mit Reagenzien behandelt. Ohne Behandlung mit Sprühreagenzien ist 1 μ Ubichinon noch gut nachweisbar.

* Herrn Prof. FLÜCK zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Ubichinone sind 2,3-Dimethoxy-5-methylbenzochinone mit einer Isoprenseitenkette in C₆-Stellung, von denen bis heute natürlich vorkommend 5 bekannt sind. Sie werden nach Anzahl der Kohlenstoffatome in der Seitenkette als U₃₀, U₃₅, U₄₀, U₄₅ und U₅₀ oder nach Zahl der Isoprenreste als Coenzym Q₆, Q₇, Q₈, Q₉ und Q₁₀ bezeichnet.

ANWENDUNGSBEISPIEL

10 g Rinderherzmuskel werden im Starmix unter Acetonzusatz zerkleinert, die Suspension mit etwa 50 ml kaltem Aceton in einem Homogenisator 1 Min bei mittlerer Umdrehungszahl homogenisiert und filtriert. Der Rückstand wird ein zweites Mal und anschliessend ein drittes Mal mit je 50 ml Aceton homogenisiert. Wir konzentrierten die vereinigten Acetonauszüge im Vakuum unter Stickstoffatmosphäre auf etwa 25 ml und brachten 0.5 ml zur Chromatographie, so dass an der Auftragsstelle ein deutlich gelb gefärbter Fleck entstand. Das Verfahren ist ebenso gut mit 1 g Gewebematerial durchführbar. Die Acetonlösung muss nur entsprechend konzentriert werden. Liegt ein Rinderherzlipoidgesamtextrakt vor, so entfernt man die Phosphatide durch Acetonfällung aus Petrolätherlösung nach der Methode von BLOOR²⁰ und engt die überstehende Lösung entsprechend stark ein.

Zum Vergleich wurden von uns auf die Dünnschichtplatte ausser Ubichinon 50 noch α -Tocopherol, Vitamin K und β -Karotin mitaufgetragen, da diese häufig in Lipoidextrakten vorkommen (siehe Fig. 1).

Nach dem Einbringen der Platte in die abgedunkelte Laufmittelkammer aequilibriert man 20 Min und chromatographiert dann im System Benzol-Chloroform (1:1). Die Platte wird nach einer Laufstrecke von 12 cm (ca. 1 h Laufzeit) lichtgeschützt an der Luft getrocknet und im UV-Licht betrachtet. Ein braun fluoreszierender Fleck

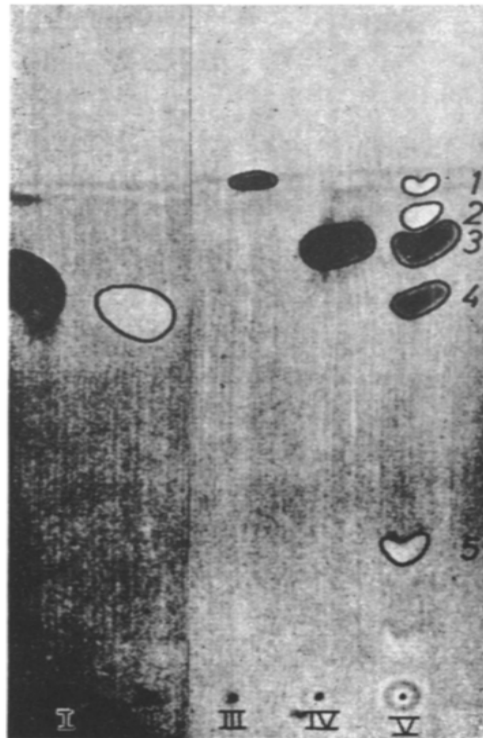


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm des Acetonlöslichen Anteils eines Rinderherzlipoidgesamtextraktes (V) mit den Bestandteilen: (1) Cholesterinester; (2) Lecithin; (3) Ubichinon 50; (4) α -Tocopherol; (5) Cholesterin. Testsubstanzen: I = α -Tocopherol, II = Vitamin K, III = β -Karotin, IV = Ubichinon 50 (UV-Licht-Aufnahme). Laufmittel: Benzol-Chloroform 1:1, Sprühreagenz: äthanol. 0.25%ige Rhodamin-B-Lösung.

in Höhe der Testsubstanz Ubichinon 50 ($R_F = 0.86 \pm 0.02$) entspricht der gesuchten Substanz. Ist der Fleck nicht deutlich sichtbar, so besprüht man mit einer 0.25 %igen äthanolischen Rhodaminlösung. Unter dem UV-Licht gibt sich dann Ubichinon als violett fluoreszierender Fleck zu erkennen*.

Wie aus Fig. 1 (I und V_4) ersichtlich, gibt zwar das α -Tocopherol die gleiche Reaktion wie Ubichinon, doch besitzt es einen deutlich tieferen R_F -Wert (0.80). Auch die anderen Lipoidbestandteile, Cholesterin (V_5), Cholesterinester (V_1), β -Karotin (III), Vitamin K (II), und das zumeist in geringer Menge noch vorliegende Lecithin (V_2) sind gut voneinander bzw. vom Ubichinon abgetrennt.

Zur sicheren Identifizierung trägt man die Ubichinon-haltige Lösung in stärkerer Konzentration auf eine 2. Platte auf und entfernt nach der chromatographischen Auftrennung den entsprechenden Fleck durch Abkratzen mit einem Feinspatel von der Platte. Das Kieselgel wird in einem Reagenzglas 3 mal mit einigen Millilitern warmen Acetons ausgezogen, die Lösung unter Stickstoff abgedunstet und der Rückstand in 5 ml Cyclohexan aufgenommen. Das Ubichinon gibt sich im UV-Spektrum durch ein Maximum bei $272 m\mu$ und ein Minimum bei $238 m\mu$ zu erkennen¹.

Um die Länge der Isoprenseitenkette im Ubichinon festzulegen, wird die Cyclohexanlösung bis auf etwa 0.1 ml im Stickstoffstrom eingengt und auf eine in folgender Weise vorpräparierte Kieselgelplatte aufgetragen:

Die Kieselgel G-Platte lässt man in einer Mischung von 5 % Paraffin in Äther aufsteigend durchlaufen und trocknet dann 2 bis 3 Min an der Luft. Als Testsub-

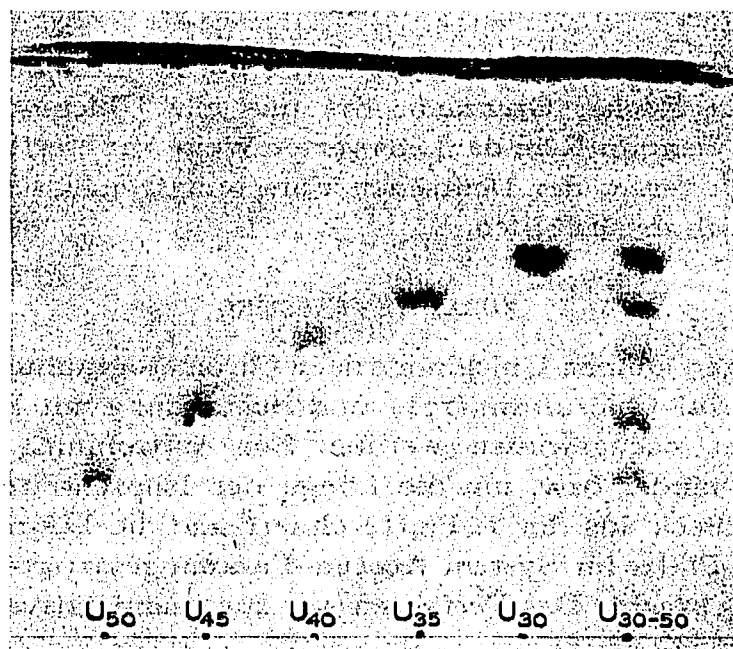


Fig. 2. Dünnschichtchromatogramm von Ubichinon 30 mit 50. In Punkt U_{30} - U_{50} ist das aus der Kieselgelplatte eluierte Ubichinon des Rinderherzmuskels anstelle der Testsubstanz U_{50} mitaufgetragen. Laufmittel: Aceton-Paraffin-gesättigtes Wasser 9:1; Sprühreagenz: Gesättigte Antimon (III)-chloridlösung in Chloroform.

* Die anderen Ubichinone liegen unter den angegebenen Versuchsbedingungen auf der Platte mit U_{50} an gleicher Stelle.

stanzen trägt man U_{30} , U_{35} , U_{40} , U_{45} und U_{50} in Aceton gelöst mit auf. Die Entwicklung erfolgt nach 20-minütiger Sättigung in einem Gemisch von 9 Teilen Aceton und 1 Teil Paraffin-gesättigtem Wasser bis zu einer Laufrhöhe von 10 cm. Zum Sichtbarmachen dient das Besprühen mit einer gesättigten Lösung von Antimon(III)-chlorid in Chloroform und anschliessendes 10-minütiges Trocknen bei 110°. Die Flecke erscheinen bei Normallicht grau-violett auf weissem Grund und im UV-Licht dunkelbraun fluoreszierend. Das aus der 1. Platte eluierte Ubichinon des Rinderherzmuskels, das entsprechend der Fig. 2 ganz rechts zusammen mit den Testsubstanzen U_{30} - U_{45} mit aufgetragen wurde, liegt mit der Testsubstanz U_{50} auf gleicher Höhe. Die R_F -Werte, Mittelwerte zahlreicher Einzelmessungen sind folgende:

$$\begin{aligned} U_{30} &= 0.71 \pm 0.04 \\ U_{35} &= 0.63 \pm 0.03 \\ U_{40} &= 0.55 \pm 0.02 \\ U_{45} &= 0.42 \pm 0.02 \\ U_{50} &= 0.31 \pm 0.02 \end{aligned}$$

Nach diesem kombinierten Verfahren konnten von uns Ubichinone in bisher noch nicht untersuchten tierischen Organen nachgewiesen und auch hinsichtlich ihrer Isoprenseitenkette identifiziert werden. Da sich die Methode auch für quantitative Bestimmungen gut eignet, ist dieses dünnschichtchromatographische Verfahren den bisherigen überlegen. Über weitere Anwendungsbeispiele und Einzelheiten dieser Untersuchungen berichten wir in einer weiteren Mitteilung.

DANK

Die vorliegende Arbeit wurde ermöglicht durch die freundliche Unterstützung der Firma Hoffmann La Roche, Grenzach, die uns alle Ubichinone und ausserdem α -Tocopherol sowie Vitamin K in dankenswerter Weise zur Verfügung stellte.

Unser Dank gilt ferner der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fond der Chemie für Forschungsbeihilfen.

ZUSAMMENFASSUNG

In Rohlipoidextrakten können Ubichinone nach Chromatographie an Kieselgel G-Platten im System Benzol-Chloroform (1:1) und Behandlung mit Rhodamin-B-Lösung im UV-Licht direkt nachgewiesen werden. Zur Auftrennung der verschiedenen Ubichinone untereinander bzw. um die Länge der Isoprenseitenkette festzulegen, wird der Ubichinonfleck aus der 1. Platte eluiert und die Lösung auf einer paraffinierten 2. Kieselgel-Platte im System Aceton-Paraffin-gesättigtem Wasser (9:1) zur Chromatographie gebracht. Das Verfahren ist zur quantitativen Bestimmung des Ubichinons geeignet.

SUMMARY

Ubiquinones can be determined in crude lipid extracts by chromatography on silica gel G plates, using the system benzene-chloroform (1:1), followed by treatment with Rhodamine B solution and observation under UV light. In order to separate the

various ubiquinones from each other or to determine the length of the isoprene side chain, the ubiquinone spot is eluted from the plate and the solution is rechromatographed on a second silica gel plate impregnated with paraffin, using the solvent system acetone-water saturated with paraffin (9:1). The method is suitable for the quantitative determination of ubiquinone.

LITERATUR

- ¹ F. L. CRANE, J. L. GLENN UND D. E. GREEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 475.
- ² F. WEBER, U. GLOOR UND O. WISS, *Helv. Chim. Acta*, 41 (1958) 1046.
- ³ F. L. CRANE, W. FECHNER UND K. S. AMBE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 81 (1959) 277.
- ⁴ R. L. LESTER, Y. HATEFI, C. WIDNER UND F. L. CRANE, *Biochim. Biophys. Acta*, 33 (1959) 169.
- ⁵ D. E. GREEN UND R. L. LESTER, *Federation Proc.*, 18 (1959) 987.
- ⁶ R. L. LESTER UND T. RAMASARMA, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 672.
- ⁷ J. BOUMAN UND E. C. SLATER, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 624.
- ⁸ A. T. DIPLOCK, J. GREEN, E. E. EDWIN UND J. BUNYAN, *Biochem. J.*, 76 (1960) 563.
- ⁹ A. M. PUMPHREY UND E. R. REDFEARN, *Biochem. J.*, 76 (1960) 61.
- ¹⁰ B. O. LINN, A. C. PAGE, JR., E. L. WONG, P. H. GALE, C. H. SHUNK UND K. FOLKERS, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 4007.
- ¹¹ H. WAGNER, L. HÖRHAMMER UND P. WOLFF, *Biochem. Z.*, 334 (1961) 175.
- ¹² E. STAHL, *Chemiker-Ztg.*, 82 (1958) 323.
- ¹³ E. DEMOLE, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 24.
- ¹⁴ H. WEIKER, *Klin. Wochschr.*, 37 (1959) 763.
- ¹⁵ H. JATZKEWITZ, *Z. physiol. Chem.*, 318 (1960) 265.
- ¹⁶ H. JATZKEWITZ UND E. MEHL, *Z. physiol. Chem.*, 320 (1960) 251.
- ¹⁷ D. C. MALINS UND H. K. MANGOLD, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 37 (1960) 576.
- ¹⁸ A. WINTERSTEIN UND B. HEGEDÜS, *Z. physiol. Chem.*, 321 (1960) 92.
- ¹⁹ W. NITSCH UND H. P. KAUFMANN, *Fette u. Seifen*, 56 (1954) 154.
- ²⁰ W. R. BLOOR, *J. Biol. Chem.*, 82 (1929) 273.