

CHROM. 7352

ZUR ANWENDUNG DER SULFOPHOSPHOVANILLINREAKTION AUF DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCH GETRENNTE LIPIDE

WALTER MLEKUSCH, WOLFGANG TRUPPE und BENNO PALETTA

Institut für Medizinische Chemie und Pregl-Labor, Universität Graz, Universitätsplatz 2, A-8010 Graz (Österreich)

(Eingegangen am 26. November 1973; geänderte Fassung eingegangen am 18. Januar 1974)

SUMMARY

Application of the sulpho-phospho-vanillin reaction to the determination of lipids separated by thin-layer chromatography

The "sulpho-phospho-vanillin" reaction has shown to be a simple and rapid routine method for quantitative determination of neutral lipids on thin-layer chromatograms. The technique also works well after visualization of the lipids by heating with sulphuric acid under UV light.

EINLEITUNG

Die Sulfophosphovanillin-Methode (SPV-Methode) ist erstmals von Chabrol und Charonnat¹ zur Bestimmung der Serumgesamtlipide verwendet worden. Nach mehrfacher Modifizierung und Verbesserung^{2–4} stellt sie heute ein einfaches, schnelles und gut reproduzierbares Verfahren zur Bestimmung der Gesamtlipide dar. Zöllner und Kirsch⁴ wiesen bereits auf die Möglichkeit der Anwendung der SPV-Methode zur Bestimmung dünnenschichtchromatographisch getrennter Lipide hin, ohne sie noch konsequent anzuwenden. Jage und Mitarbeiter⁵ zeigten dann die vorteilhafte Brauchbarkeit der Methode in Verbindung mit der Dünnschichtchromatographie.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass diese Reaktion auch anwendbar ist, wenn die Lipidzonen durch vorheriges Besprühen mit Schwefelsäure und Erhitzen sichtbar gemacht werden, wodurch die bekannten Schwierigkeiten einer genauen Markierung der Lipidzonen umgangen werden können.

EXPERIMENTELLES

Material

Phosphovanillinreagenz. Man löst 0.6 g Vanillin (Merck, Darmstadt, B.R.D.) in Wasser und füllt bis zur 100 ml Marke des Messkolbens auf. Das Reagenz ist bei Raumtemperatur bis zwei Monate haltbar, sofern es in einer braunen Flasche auf-

bewahrt wird. Diese Lösung wird unter ständigem Rühren mit 400 ml konzentrierter Orthophosphorsäure (85 %ig; Merck) vermischt. In einer dunklen Flasche bleibt das Phosphovanillinreagenz für drei Wochen stabil⁵. Triolein, Diolein, Monoolein, Cholesterin und Cholesterinpalmitat wurden von der Fa. Sigma (St. Louis, Mo., U.S.A.) zur Verfügung gestellt.

Standardlösung. 1 ml eines Gemisches aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 enthält 1 μM Triolein, 2 μM Diolein, 3 μM Monoolein, 2.5 μM Cholesterin und 2.5 μM Cholesterinpalmitat. Di-*tert.*-butyl-*p*-kresol wurde als Antioxidans in einer Konzentration von 0.1 % (bezogen auf das Lipidgewicht) zugegeben.

Methode

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung erfolgte auf einer mit dem Laufmittel Petroläther–Äther–Essigsäure (90:10:1) vorgereinigten, mit Kieselgel G beschichteten Platte. Von der Standardlösung wurden 20, 40, 60 und 80 μl in einer Punktreihe unter Stickstoff aufgetragen. Nach dem Lufttrocknen der Platten wurden sie mit 50 %iger Schwefelsäure nur wenig und möglichst gleichmässig besprüht, darauf im Trockenschrank bei 150° 7½ min lang auf einem Gestell erhitzt. Nach diesem Zeitraum treten Cholesterin und Cholesterinester durch ihre violette Färbung deutlich zutage, während Tri-, Di- und Monoglyceride nach dieser Behandlung bei der Betrachtung unter UV-Licht bei 366 nm eine gelbgrüne Fluoreszenz zeigen^{6,7}. Die entsprechenden Lipidzonen wurden in verschraubbare Sovirel-Zentrifugengläser übergeführt und mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt, die Gefässe gut verschlossen und mit einem Heidolph-Reax I Eprovettenschüttelgerät sorgfältig durchgemischt. Danach wurden sie 20 min lang in ein kochendes Wasserbad gestellt und anschliessend in einem Wasserbad mit Zimmertemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 6 ml Phosphovanillinreagenz wurden die Zentrifugengläser sofort wieder verschlossen und gut durchgeschüttelt, 30 min später bei 4500 g 15 min lang zentrifugiert und der rosa Farbkomplex bei 530 nm gegen einen in gleicher Weise behandelten Leerwert vermessen.

RESULTATE UND DISKUSSION

Während des Erhitzens mit Schwefelsäure besprühter Platten entwickeln lipide Substanzen eine charakteristische Farbe oder eine Fluoreszenz^{6,7}. Auch Cholesterin und seine Ester zeigen dieses Verhalten und entwickeln zunächst eine Fluoreszenz, die allerdings bald durch eine rote, dann violette Farbe überdeckt wird (sogenannte Salkowski-Reaktion).

Bei den Glyceriden dagegen steigt die gelbgrüne Fluoreszenz bis zu einem Maximalwert an und sinkt dann mit fortschreitender Veraschung wieder ab. Durch Ausnützung der Fluoreszenz der Glyceride bzw. der Rotviolettfärbung der Cholesterine kann man eine der hauptsächlichen Fehlerquellen der quantitativen Dünnschichtchromatographie, nämlich die Schwierigkeit einer präzisen Markierung der Lipidzonen, umgehen. Die Markierung erfolgt bekanntlich meistens entweder indirekt durch Anfärben eines mitentwickelten Leitchromatogramms oder aber direkt durch Bedampfen mit Jod. Beim indirekten Verfahren kann es leicht vorkommen, dass entweder zuwenig von einer Fraktion oder aber Teile anderer Fraktionen mitabgeschabt werden. Aber auch durch das rasche Ausblassen der Jodfärbung, besonders bei mengenmässig kleinen Fraktionen, kann es zu dem gleichen Fehler kommen. Wie

wir nun zeigen konnten, stört diese Art der Sichtbarmachung die Bestimmung der Triglyceride, Di- und Monoglyceride, sowie des Cholesterins und seiner Ester nach der SPV-Methode nicht und es können Eichgeraden für die oben angeführten Lipide erhalten werden (Fig. 1).

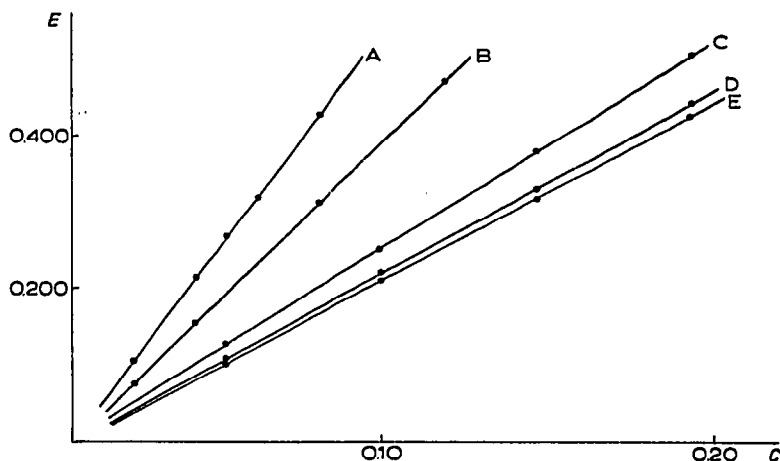


Fig. 1. Verhältnis zwischen Extinction (E) und Konzentration (C) in $\mu\text{Mol/l}$ Einsatz nach der SPV-Reaktion bei einer Erhitzungsdauer von $7\frac{1}{2}$ min. A = Triolein; B = Diolein; C = Estercholesterin; D = Monoolein; E = freies Cholesterin. Die Eichkurve verbindet Mittelwerte aus acht Bestimmungen. Der mittlere Fehler der Mittelwerte ausgedrückt in Prozenten war in allen Fällen kleiner als 4%. Der mittlere Fehler des Mittelwerts (F_M) wurde nach der Formel

$$F_M = \sqrt{\frac{\sum (m - M)^2}{n(n-1)}}$$

berechnet, wobei n = Anzahl der Einzelmessungen, m = Einzelwerte und M = Mittelwert.

Ein besonderer Vorteil für routinemässige Anwendungen ist, dass die Lipidfraktionen nicht vom Kieselgel eluiert zu werden brauchen und die Reaktion gleich mit dem Gel zusammen ausgeführt werden kann.

Es ist bekannt, dass gesättigte Lipide wie z.B. Tristearin, Tripalmitin, Stearinsäure, Palmitinsäure und Glycerin praktisch keine Extinktion ergeben, da die SPV-Reaktion an das Vorhandensein einer Doppelbindung geknüpft ist⁸. Aus Fig. 1 ersieht man auch, dass das Verhältnis der Extinktionen von Tri-, Di- und Monoolein in direktem Zusammenhang mit der Anzahl der vorhandenen Doppelbindungen steht. Dass dabei das Molekulargewicht der Verbindung keine besondere Rolle spielt, sieht man in den ungefähr gleich grossen Extinktionen von Monoolein und Cholesterin. Warum sich für Diolein nicht eine genaue Verdoppelung und für Triolein eine Verdreifachung der Extinktion des Monooleins ergibt, dürfte in einer zunehmenden sterischen Hinderung seine Ursache haben⁸.

Ausserdem wurde auch die Abhängigkeit der Reaktion von den Erhitzungszeiten ermittelt (Fig. 2-4). Man erkennt daraus deutlich die relativ starke Abhängigkeit des Trioleins und die relative Unabhängigkeit der Cholesterine von der Erhitzungsdauer. Ein Zeitraum von $7\frac{1}{2}$ min hat sich als günstig erwiesen, da die Fluoreszenz

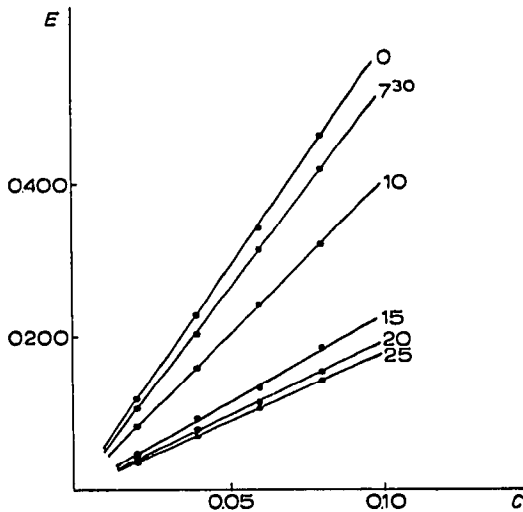


Fig. 2. Verhältnis zwischen Extinktion (E) und Konzentration (C) in μMol je Einsatz für Triolein nach der SPV-Reaktion bei verschiedenen Erhitzungszeiten (0, 7½, 10, 15, 20 und 25 min). Die Kurve verbindet Mittelwerte aus fünf Messungen.

der Glyceride nach dieser Zeit bereits deutlich sichtbar wird, wobei die Empfindlichkeit der Reaktion nur geringfügig abnimmt.

Ein Problem der SPV-Reaktion ist die Verwendung eines richtigen Standards, denn der Lipidstandard muss in Bezug auf seinen Sättigungsgrad möglichst der Probe angepasst werden. Pikaar und Nijhof⁹ haben gezeigt, dass im Serum ungefähr 30% der gesamten Fettsäuren gesättigt und 70% ungesättigt sind. Daraus ergibt sich, dass ein molares Gemisch von 70% Ölsäure und 30% Palmitinsäure oder Stearinsäure einen geeigneten Standard für die Serumgesamtlipidbestimmung darstellt.

Auch bei der Bestimmung dünnschichtchromatographisch getrennter Lipide ergibt sich dieses Problem. Da man jedoch in praktisch allen Fällen die ungefähre Fett-

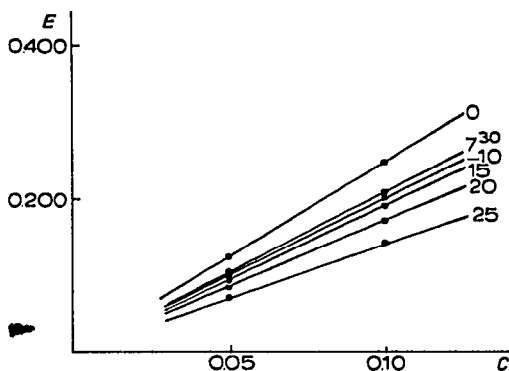


Fig. 3. Verhältnis zwischen Extinktion (E) und Konzentration (C) in μMol je Einsatz für freies Cholesterin nach der SPV-Reaktion bei verschiedenen Erhitzungszeiten. (0, 7½, 10, 15, 20 und 25 min). Die Kurve verbindet Mittelwerte aus fünf Messungen.

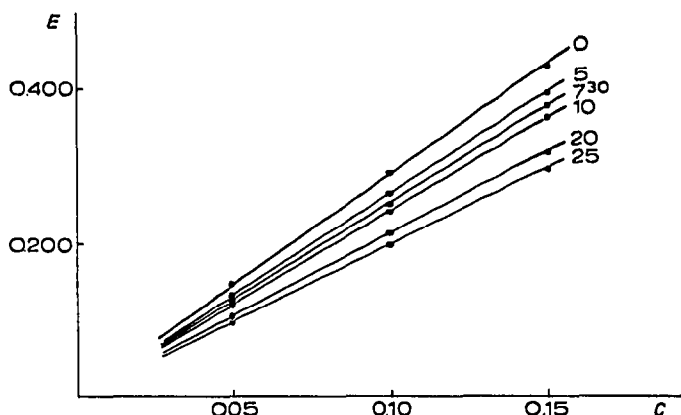


Fig. 4. Verhältnis zwischen Extinktion (E) und Konzentration (C) in μMol je Einsatz für Estercholesterin nach der SPV-Reaktion bei verschiedenen Erhitzungszeiten. (0, 5, 7½, 10, 20 und 25 min). Die Kurve verbindet Mittelwerte aus fünf Messungen.

säurezusammensetzung der Fraktionen aus der Literatur kennt, ist es nicht schwierig, sich ein entsprechendes Standardgemisch herzustellen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung eines Lipidextraktes als Standard, in welchem man zuvor mittels anderer Methoden die einzelnen Komponenten bestimmt hat. Auf diese Weise konnten bei der Bestimmung von Serumlipiden und Rattenleberlipiden mit dem von Biezenski *et al.*¹⁰ angegebenen Laufmittel sehr gut reproduzierbare Werte erhalten werden, welche mit den aus der Literatur bekannten Konzentrationen übereinstimmten. Die Bestimmung der Phospholipide nach Rouser *et al.*¹¹ wird durch unser Verfahren der Sichtbarmachung mittels Schwefelsäure nicht beeinflusst.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Sulfophosphovanillinreaktion hat sich als einfache und schnelle Methode zur quantitativen Bestimmung der dünnschichtchromatographisch getrennten Neutralfette bewährt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode auch noch gut anwendbar ist, wenn man die Lipide durch Erhitzen mit Schwefelsäure unter der UV-Lampe sichtbar macht.

LITERATUR

- 1 E. Chabrol und R. Charonnat, *Presse Med.*, 45 (1937) 1713.
- 2 B. Drevon und J. M. Schmit, *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon*, 8 (1964) 173.
- 3 C. S. Frings und R. T. Dunn, *Amer. J. Clin. Pathol.*, 53 (1970) 89
- 4 N. Zöllner und K. Kirsch, *Z. Ges. Exp. Med.*, 135 (1962) 545.
- 5 J. Jage, D. Kunze und D. Olthoff, *Z. Med. Labortech.*, 11 (1970) 154.
- 6 W. Truppe, W. Mlekusch und B. Paletta, *J. Chromatogr.*, 72 (1972) 405.
- 7 W. Mlekusch, W. Truppe und B. Paletta, *J. Chromatogr.*, 78 (1973) 438
- 8 J. A. Knight, S. Anderson und J. M. Rawle, *Clin. Chem.*, 18 (1972) 199
- 9 N. A. Pikaar und J. Nijhof, *Biochem. J.*, 70 (1958) 52.
- 10 J. J. Biezenski, W. Pomerance und J. Goodman, *J. Chromatogr.*, 38 (1968) 148.
- 11 G. Rouser, S. Fleischer und A. Yamamoto, *Lipids*, 5 (1970) 494.