

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 514—517, September 1969

Bestimmungen der Serumlipide mit Hilfe einer quantitativen eindimensionalen dünn-schichtchromatographischen Methodik

Von J. WILDGRUBE, W. ERB und E. BÖHLE

Zentrum der Inneren Medizin der Universität Frankfurt/Main

(Direktoren: Prof. Dr. J. Frey, Prof. Dr. W. Siede, Prof. Dr. K. Schöffling, Prof. Dr. H. Martin)

(Eingegangen am 30. Mai 1969)

Es wird eine Methode zur eindimensionalen dünn-schichtchromatographischen Trennung und quantitativen Auswertung der Serumlipidfraktionen beschrieben. Dieses Verfahren ermöglicht Aussagen über den Gehalt an Phospholipiden, Triglyceriden, Monoglyceriden, freien Fettsäuren, freiem Cholesterin und Cholesterinestern und genügt damit den Fragestellungen der Routinediagnostik. Die Ergebnisse von 20 Paralleluntersuchungen zu chemisch-analytischen Bestimmungen einzelner Lipidfraktionen werden verglichen und diskutiert.

Determination of serum lipids by quantitative one dimensional thin layer chromatography

A method is described for the one dimensional thin layer chromatographic separation and quantitative evaluation of serum lipid fractions. The method gives values for phospholipides, triglycerides, monoglycerides, free fatty acids, free cholesterol and cholesterol esters, and it therefore satisfies the requirements for routine diagnosis. The results from 20 parallel studies on the analytical chemical determination of individual lipid fractions are compared and discussed.

Dünn-schichtchromatographische Lipidtrennungen haben auch für die klinische Diagnostik zunehmend an Bedeutung gewonnen. Zahlreiche Autoren konnten bisher über Gruppentrennungen verschiedener Serumlipide (1—5) und weitergehendere Differenzierungen (6—13) berichten. Demgegenüber erforderten quantitative Auswertungen eine aufwendige Kombination mit kolorimetrischen (9, 14—16), spektrophotometrischen (17, 18) oder radiometrischen (19) Verfahren. Erst photodensitometrische Bestimmungen (20—22) und eine vereinfachende Methode durch direkte Extinktionsmessungen (23) konnten den apparativen und zeitlichen Aufwand vor allem bei der Bestimmung wenig polarer Lipide entscheidend reduzieren. In dieser Arbeit soll erstmals über eine analoge quantitative eindimensionale Trennung von Serumlipiden im Vergleich zu chemisch-analytischen Bestimmungen einzelner Lipidfraktionen berichtet werden.

Methodik

Lipidextraktion

Das Blut wird sofort nach der Entnahme auf $-1-2^{\circ}$ abgekühlt und nach Gerinnung im Kühlraum zentrifugiert. Man gibt 3 ml Serum tropfenweise zu 50 ml Äther-Äthanol 3:1 (v/v). Nach mindestens 8 Stdn. wird diese Lösung filtriert und die feinflockig ausgefallenen Proteine werden nochmals nachgewaschen. Der gesamte Serumlipidextrakt kann nun am Rotationsverdampfer eingengt und zum Auftragen auf die DC-Platten verwendet werden. Die Bestimmung der Gesamtlipide erfolgt in einem zweiten Ansatz gravimetrisch gemäß den Angaben von FOLCH und Mitarbeitern (24).

Dünn-schichtchromatographie

DC-Fertigplatten Kieselgel Merck (5×20 cm) werden zunächst mit n-Hexan-Diäthyläther 1:1 (v/v) vorgereinigt. Mit einer Sprühpistole kann der Lipidextrakt gleichmäßig aufgetragen werden; dabei ist die Kieselgelschicht durch eine Maske mit 2 mm breitem Spalt geschützt.

Als Fließmittel verwenden wir Chloroform-Methanol-Ameisensäure-Wasser (65:35:2:4 v/v) — Fließmittel I — und n-Hexan-

Diäthyläther-Eisessig (80:20:1,5 v/v) — Fließmittel II —. Die stark differierende Polarität der einzelnen Serumlipidfraktionen macht diese Fließmittelkombination notwendig. Dabei liegt der vorliegenden Stufentechnik folgendes Prinzip zugrunde: Fließmittel I verschiebt die Phospholipide vom Startpunkt und entwickelt die Fraktion der Monoglyceride. Die übrigen Lipidfraktionen wandern mit der Lösungsmittelfront und werden erst durch Fließmittel II weiter differenziert in freies und verestertes Cholesterin, freie Fettsäuren und Triglyceride.

Jede Platte wird zunächst für 3 cm vom Auftrag mit Chloroform-Methanol-Ameisensäure-Wasser entwickelt und bei Raumtemperatur getrocknet. Das zweite Fließmittel, n-Hexan-Diäthyläther-Eisessig, hat eine Laufstrecke von etwa 12 cm. Damit ist eine gleichmäßige Verteilung der Fraktionen über die Platte gewährleistet.

Die Auftrennung der Serumlipide erfolgt mit steigenden R_F -Werten in der Reihenfolge: Phospholipide, Monoglyceride, freies Cholesterin und Diglyceride, freie Fettsäuren, Triglyceride, Cholesterinester.

Wie Abbildung 1 erkennen läßt, werden die Phospholipide durch Fließmittel I vom Startpunkt verschoben und gespreizt. Vergleiche mit Testsubstanzen¹⁾ zeigten eine konstante Reihenfolge: Lysolecithin, Lecithin, Sphingomyelin und — bereits abgetrennt — Kephalin. Während die Monoglyceride eine selbständige Fraktion bilden, läßt sich eine Kontamination der 1,2- und 1,3-Diglyceride mit der starken Cholesterinfraktion nicht vermeiden. Da Mono- und Diglyceride nur etwa 10% der Triglyceride ausmachen (25), sind keine wesentlichen Ungenauigkeiten zu erwarten.

Die quantitative Auswertung erfolgt analog der direkten Extinktionsmessung von ERB und BÖHLE (23). Hierzu werden die getrockneten Platten bei 180° im Trockenschrank erhitzt, mit 20proz. äthanolischer Phosphormolybdänsäure besprüht und für weitere 20 Min. im Trockenschrank belassen. Die einzelnen Fraktionen heben sich als blauschwarze Banden von der homogen gelbgrün gefärbten Platte ab (Abb. 2). Der oben beschriebene Vorgang hat sich als vorteilhaft erwiesen, um sämtliche Fraktionen vollständig darzustellen (26). Andererseits ist die vorgegebene Dauer des Erhitzens erforderlich, da die einzelnen Lipide unterschiedlich schnell verkohlen. Der Zeitbedarf nimmt zu in der Reihenfolge

¹⁾ Als Testsubstanzen verwandten wir: 1-Monopalmitin, 1-Monolein, 1,2-Dipalmitin, 1,3-Diolein, Tripalmitin, Lysolecithin und Sphingomyelin (Appl. Science Inc. Corp.), Cholesterin, Cholesteryl-Palmitat, Triolein (Serva), DL- α -Lecithin synth. und DL- α -Kephalin synth. (Fluka).

freies Cholesterin, Cholesterinester, Lecithin, Triglyceride, freie Fettsäuren und Monoglyceride. Abbildung 3 demonstriert diese Abweichung vom tatsächlichen Gehalt an einem Testgemisch mit gleichen Gewichtsanteilen von Lecithin, Palmitinsäure, Cholesterin und Cholesteryl-Palmitat.

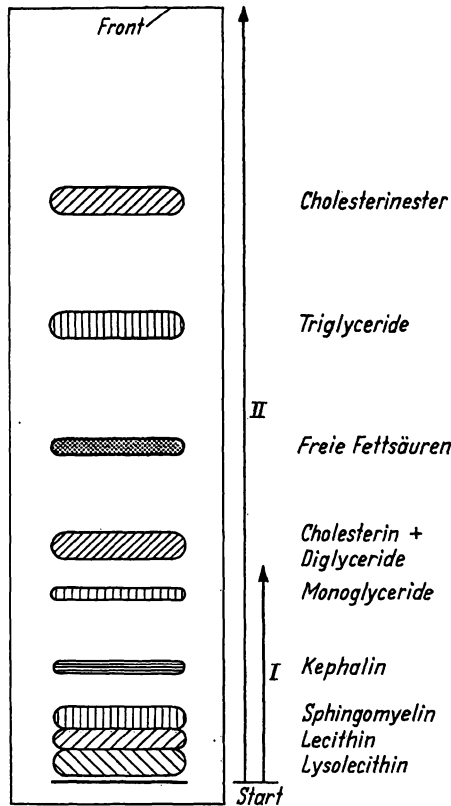


Abb. 1

Die Verteilung der einzelnen Lipidfraktionen nach optimaler Trennung durch Fließmittel I (Chloroform-Methanol-Ameisensäure-Wasser 65:35:2:4 v/v) und Fließmittel II (n-Hexan-Diäthyläther-Eisessig 80:20:1,5 v/v)

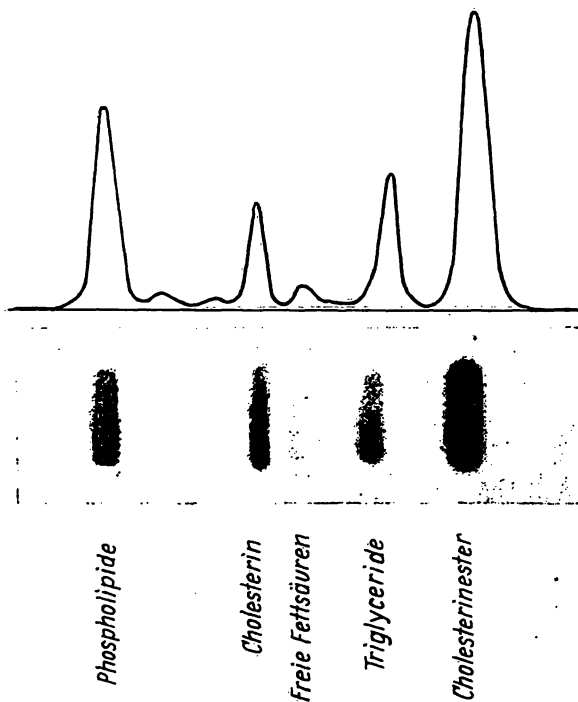


Abb. 2

Dünnschichtchromatogramm und Extinktionskurve der Serumlipide eines Gesunden

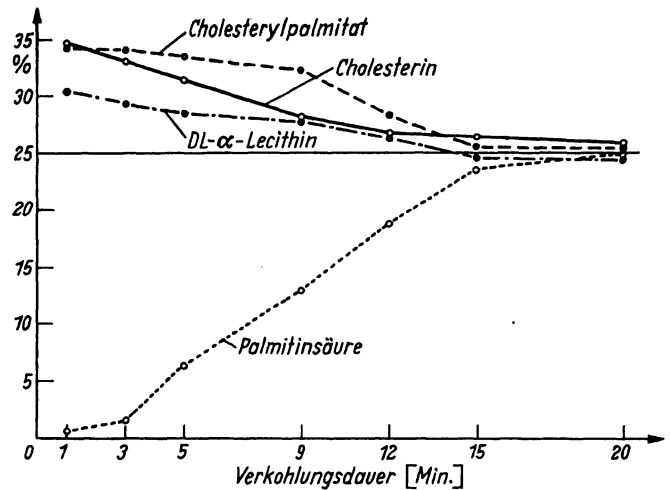


Abb. 3

Die Abhängigkeit der prozentualen Angaben von der Verkohlungszeit bei einem Testgemisch mit gleichen Anteilen von Lecithin, Palmitinsäure, Cholesterin und Cholesteryl-Palmitat

Mit diesen Substanzen und Tripalmitin sowie Triolein wurde auch untersucht, ob mit zunehmenden Mengen der gleichen Substanz die Auswertungsergebnisse korrespondieren. Eine Linearität bleibt gewährleistet, solange die auswertbare Kurve hinreichend genau zu planimetrieren ist. Die homogen gelbgrüne Färbung der Platte hat keinen Einfluß auf das Verhältnis der einzelnen Fraktionen zueinander.

Die vom Extinktionsschreiber gezeichneten Kurven werden planimetriert und die prozentualen Anteile in Beziehung gesetzt zum gravimetrisch bestimmten Gesamtlipidgehalt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Genauigkeit des vorliegenden Verfahrens liegt, gemessen an dem prozentualen Fehler, der auch Unterschiede beim Planimetrieren einschließt, mindestens im Bereich unserer übrigen chemisch-analytischen Methoden. Der aus 20 Doppelbestimmungen ermittelte methodische Fehler ($m = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - x_2)^2}{2n}}$) beträgt für die Phospholipide bei einem Mittelwert von (28,2 [rel.-%]) $\pm 1,9\%$, für freie Fettsäuren (1,8) $\pm 0,3\%$, Triglyceride (19,3) $\pm 1,9\%$, für freies Cholesterin (10,3) $\pm 0,9\%$ und für Cholesterinester (40,9) $\pm 2,1\%$.

Durch das Kalt-Extraktionsverfahren mit Äther-Äthanol lassen sich die Serumlipide nahezu quantitativ isolieren. Bei einer nochmaligen Extraktion des Eiweißrückstandes mit Chloroform-Methanol nach FOLCH und Mitarbeitern (24) wurden stets weniger als 5% der Gesamtlipidmenge gefunden. Darüber hinaus vermindert die Kaltextraktion eine Alteration einzelner Lipide wie wir sie unter Chloroform-Methanol sahen (Freisetzung von Fettsäuren und Umesterungen zu Fettsäuremethylestern, wobei nicht nur Triglyceride, sondern auch Cholesterinester und Phospholipide betroffen sind). Enzymatisch bedingte Lipolysen können durch das Abkühlen des Blutes sofort nach der Entnahme stark reduziert oder durch lipasehemmende Stoffe (wie p-Nitrophenyldiäthylorthophosphat [Mintacol], in einer Konzentration von 200 mg/100ml (27, 28)) unmittelbar gestoppt werden.

Demgegenüber ist die Umrechnung auf absolute Werte von einer exakten Gesamtlipidbestimmung abhängig.

Hier führen nur strengste Kautelen zu befriedigenden Doppelbestimmungen.

Die Ergebnisse von Paralleluntersuchungen zu 20 im Routinelabor bestimmten Fettstaten sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefaßt. Dabei wurden die Phospholipide als anorganischer Phosphor in einer Modifikation von BARTLETT (29), die Neutralfette nach EGGSTEIN und KREUTZ (30), nicht veresterte Fettsäuren nach MOSINGER (31) und das Gesamtcholesterin entsprechend den Angaben der Fa. Hyland nach SEARCY und BERGQUIST (32) bestimmt. Die Gegenüberstellung dieser und der dünn-schichtchromatographisch ermittelten Werte zeigt, daß die Differenzen im Bereich des methodischen Fehlers liegen. Die Regression ist linear; der Koeffizient $(b = \frac{\sum'x \cdot y - \bar{y} \sum'x}{\sum'x^2 - \bar{x} \sum'x})$ beträgt für die Bestimmungen der Phospholipide 0,97, der Neutralfette (Dünnschicht: Mono- und Triglyceride) 0,87 und des Gesamtcholesterins 0,94. Entscheidende Unterschiede ergeben sich in den Angaben der freien Fettsäuren; konstante Korrelationen sind hier nicht zu berechnen. Andererseits läßt sich nur wenig variierende prozentuale Anteil der freien Fettsäuren (Tab. 2) einen anderen Normbereich bei der dünn-schichtchromatographischen Trennung vermuten.

Der chemisch-analytischen Gesamt-Cholesterinangabe stehe zwei Werte gegenüber, die den Gehalt an freiem Cholesterin und Cholesterinestern (Cholesterin + Fettsäure) bestimmen. Unter der Voraussetzung, daß mit dem Cholesterin vorwiegend Fettsäuren mit 18 C-Atomen verestert sind (33—35), kann der Gesamtcholesteringehalt errechnet werden; es gilt:

$$\text{Gesamt-Cholesterin} = \text{freies Cholesterin} + (\text{Cholesterinester} \cdot 0,59).$$

Die prozentuale Aufschlüsselung der Lipidfraktionen zeigt bei Gesunden und Patienten mit erhöhten Serumlipidwerten erhebliche Schwankungsbreiten, die im einzelnen noch nicht zu deuten sind. Dazu zählen auch die unterschiedlich hohen Anteile des freien Cholesterins. Auf dieses Phänomen haben bereits LEONARD und Mitarbeiter (36) nachdrücklich hingewiesen. Entsprechende Unterschiede konnten wir auch bei Säuglingen unter verschiedenen Nahrungsregimen beobachten (37). Die vorliegende Methode ist gut für die Routinediagnostik geeignet, da sie mit relativ geringem Aufwand eine differenzierte Analyse der Serumlipide ermöglicht. Statt der angegebenen können auch mit Kieselgel G nach STAHL selbst beschichtete Platten nach

Tab. 1

Gegenüberstellung der dünn-schichtchromatographisch (dc) und chemisch-analytisch (ca) ermittelten Serumlipid-Fractionen (Angaben in mg/100 ml außer den chemisch-analytisch bestimmten Werten der freien Fettsäuren ($\mu\text{Val/l}$))

Nr.	Phospholipide		Neutralfette		freie Fettsäuren		Gesamtcholesterin		freies Cholesterin	Cholesterinester
	dc	ca	dc	ca	dc	ca	dc	ca	dc	dc
1	287	301	84	101	14	584	270	260	83	317
2	260	264	215	238	6	388	251	241	50	350
3	292	284	189	174	23	1060	293	265	97	332
4	338	360	122	145	6	310	291	306	87	346
5	237	234	201	202	10	480	342	318	109	395
6	316	336	177	198	16	590	253	287	49	347
7	309	306	163	129	18	614	213	248	120	362
8	255	240	146	155	10	502	210	215	46	278
9	192	238	143	119	12	600	205	203	63	240
10	276	304	184	199	18	650	294	256	124	289
11	179	202	259	241	22	797	254	210	66	320
12	217	237	133	124	5	258	179	180	58	204
13	189	203	170	193	31	1160	200	185	51	254
14	118	125	155	150	15	785	205	195	66	236
15	220	226	134	122	10	436	169	180	34	230
16	191	206	222	245	15	610	200	185	67	225
17	450	442	290	279	33	1270	385	330	83	511
18	354	385	160	145	24	961	437	420	146	493
19	607	635	383	362	37	1090	432	398	158	465
20	321	325	178	158	14	675	288	255	119	488

Tab. 2

Gesamtlipide und die dünn-schichtchromatographisch ermittelten prozentualen Anteile der Serumlipidfraktionen

Nr.	Gesamtlipide mg/100 ml	Phospholipide %	Neutralfette %	freie	freies	Cholesterin-	Gesamt-
				Fettsäuren %	Cholesterin %	ester- %	
1	785	36,5	10,7	1,8	10,6	40,4	34,4
2	881	29,5	24,4	1,3	5,1	39,7	28,5
3	933	31,3	20,3	2,4	10,4	35,6	31,4
4	899	37,6	13,6	0,6	9,7	38,5	32,4
5	952	24,9	21,1	1,0	11,5	41,5	35,9
6	905	34,9	19,6	1,8	5,4	38,3	27,9
7	972	31,8	16,8	1,8	12,4	37,2	21,9
8	735	34,7	19,9	1,4	6,2	37,8	28,6
9	650	29,5	22,0	1,9	9,7	36,9	31,5
10	891	31,0	20,6	2,1	13,9	32,4	33,0
11	846	21,1	30,6	2,7	7,8	37,8	30,0
12	617	35,3	21,6	1,4	8,7	33,0	29,0
13	695	27,2	24,5	2,1	7,7	38,5	28,8
14	590	20,0	26,2	2,6	11,2	40,0	34,7
15	628	35,0	21,3	1,7	5,4	36,6	26,9
16	720	26,5	30,8	2,1	9,3	31,3	27,8
17	1367	32,9	21,2	2,4	6,1	37,4	28,2
18	1177	30,1	13,6	2,0	12,4	41,9	37,1
19	1650	36,8	23,2	2,1	9,6	28,3	26,2
20	1120	28,7	15,9	1,2	10,6	43,6	25,7

Verkohlen mit Schwefelsäure (Methodisches bei ERB und BÖHLE (23)) ausgewertet werden. Freilich bleibt zu berücksichtigen, daß die Stufentechnik bei diesen Platten eine Vorreinigung wegen der empfindlichen Kieselgelschicht unmöglich macht. Damit muß eine Kontamination der Cholesterinester-Fraktion mit der Schmutzfront in Kauf genommen werden. Darüber

hinaus erfordert dieses Verfahren neben sehr sorgfältig beschichteten Platten einen höheren Zeitaufwand beim Verkohlen.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bo 150/10) durchgeführt. Frl. M. WILHELM danken wir für wertvolle Mitarbeit.

Literatur

1. WEICKER, H., *Klin. Wschr.* 37, 763 (1959). — 2. VOGEL, W. C., W. M. DOIZAKI und L. ZIEVE, *J. Lipid Res.* 3, 138 (1962). — 3. SACHS, B. A. und L. WOLFMAN, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* 115, 1138 (1964). — 4. SCHLIERF, G. und P. WOOD, *J. Lipid Res.* 6, 317 (1965). — 5. PIE, A. und A. GNER, *Nature (London)* 212, 402 (1966). — 6. ZÖLLNER, N., G. WOLFRAM und G. AMIN, *Klin. Wschr.* 40, 273 (1962). — 7. HABERMANN, E., G. BANDTLOW und B. KRUSCHE, *Klin. Wschr.* 39, 816 (1961). — 8. WAGENER, H., D. LANG und B. FROSCH, *Zschr. ges. Exp. Med.* 138, 425 (1964). — 9. AMENTA, J. S., *J. Lipid Res.* 5, 270 (1964). — 10. WAGENER, H., *Nature (London)* 205, 386 (1965). — 11. KAUFMANN, H. P., S. S. RADWAN und A. K. S. ALMAD, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 68, 261 (1966). — 12. FREEMAN, C. P. und D. WEST, *J. Lipid Res.* 7, 324 (1966). — 13. ZÄHLER, P., *diese Z.* 5, 191 (1967). — 14. VIOQUE, E. und L. J. MORRIS, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.* 38, 482 (1961). — 15. ROBINSON, N. und B. M. PHILLIPS, *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 8, 385 (1963). — 16. MANGOLD, H. K., *J. Amer. Oil Chemists' Soc.* 41, 762 (1964). — 17. KRELL, K. und S. A. HASHIM, *J. Lipid Res.* 4, 407 (1963). — 18. GÄNSHIRT, H., F. W. KOSS und W. K. MORIANZ, *Arzneimittelforsch. (Aulendorf)* 10, 943 (1960). — 19. SNYDER, F. und N. STEPHENS, *Biochem. biophysica Acta Amsterdam* 39, 244 (1959). — 20. PRIVETT, O. S., M. L. BLANK und W. O. LUNDBERG, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.* 38, 312 (1961). — 21. PAYNE, S. N., *J. Chromato-*

graphy 15, 173 (1964). — 22. PRIVETT, O. S., M. L. BLANK, D. W. CODDING und E. C. NICKELL, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.* 42, 381 (1965). — 23. ERB, W. und E. BÖHLE, *diese Z.* 6, 379 (1968). — 24. FOLCH, J., M. LEES und G. H. SLOANE STANLEY, *J. Lipid Res.* 1, 391 (1959). — 25. VOGELBERG, K. H. und F. A. GRIES, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 70, 851 (1968). — 26. HOFMAN, A. F., *Thin-layer adsorption chromatography of lipids in 'Biochemical problems of lipids' ed. by A. C. Frazer, Elsevier Publishing Comp. Amsterdam (1963).* — 27. ELMENDORF, H. von und D. VALLEE, *Blut* 10, 61 (1964). — 28. EHRLY, A. M., *Biorheology* 5, 209 (1968). — 29. BARTLETT, G. R., *J. biol. Chemistry* 234, 466 (1959). — 30. EGGSTEIN, M. und F. H. KREUTZ, *Enzymatische Glycerinbestimmung und Neutralfettberechnung, in 'Untersuchungen und Bestimmung der Lipoide im Blut' hrsg. von N. Zöllner und D. Eberhagen, Springer-Berlin (1965).* — 31. MOSINGER, F., *J. Lipid Res.* 6, 157 (1965). — 32. SEARCY, R. L. und L. M. BERGQUIST, *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 5, 192 (1960). — 33. SCHRÄDE, W., E. BÖHLE, R. BIEGLER, R. TEICKE und B. ULLRICH, *Klin. Wschr.* 43, 739 (1960). — 34. BÖHLE, E., E. HARMUTH und M. SCRIBA, *Gastroenterologia, Suppl. ad Vol. 104*, 254 (1965). — 35. GOODMAN, D. S., *Physiol. Rev.* 45, 747 (1965). — 36. LEONARD, P. J., A. G. SHAPER und K. W. JONES, *Amer. J. Clin. Nutr.* 17, 377 (1965). — 37. WILDGRUBE, J., *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 70, 852 (1968).

Prof. Dr. E. Böhle
493 Detmold
Lagesche Str. 47