

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München  
(Direktor: Prof. Dr. W. SEITZ)

**Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden  
(Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden  
(allen bekannten Plasmalipoiden)  
gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion\***

Von

**NEPOMUK ZÖLLNER und KATHARINA KIRSCH**

Mit 10 Textabbildungen

*(Eingegangen am 27. Dezember 1961)*

In der physiologisch-chemischen Analytik ergänzen sich spezifische Reaktionen und Gruppenreaktionen. Spezifische Bestimmungsmethoden erlauben die Verfolgung des Stoffwechsels bestimmter Substanzen, sagen aber nichts über das Verhalten einer Substanzgruppe aus, mit Gruppenreaktionen wird die Konzentration ganzer Stoffklassen erfaßt, ohne daß im allgemeinen Rückschlüsse auf einzelne Substanzen möglich wären. In der klinischen Chemie sind beide Arten von Bestimmungen unentbehrlich, kein Kliniker möchte z. B. auf eine möglichst spezifische Methode für Glucose und eine möglichst umfassende für Gesamteiweiß verzichten.

In der Biochemie der Lipide ist eine all diesen Stoffen gemeinsame Bestimmungsmethode besonders wünschenswert und zwar sowohl für rasche orientierende Untersuchungen vieler Proben, wie sie z. B. bei der säulenchromatographischen Trennung anfallen können, als auch zur Ergänzung der bisherigen Analytik der Serumlipide. Bei gewissen klinisch-chemischen Fragen ist eine Bestimmung der Gesamtlipide der heute meist geübten Cholesterinbestimmung vorzuziehen (z. B. beim Diabetes), im Zusammenhang mit einer Cholesterin-(und Phosphatid-)Bestimmung ermöglicht die Gesamtlipidbestimmung eine Schätzung der Neutralfette.

Die Lipide, wohl die heterogenste Stoffklasse der physiologischen Chemie, haben wenig chemische Gemeinsamkeiten; in ihrer Gesamtheit werden sie am besten durch Extraktion, Reinigung des Extraktes, Trocknung und Wägung bestimmt. Die Methodik ist schwierig, setzt größere Mengen biologischen Ausgangsmaterials voraus und liefert nur in geübten

---

\* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Händen zuverlässige Ergebnisse. Ähnliche Einwände gelten gegen Methoden, die durch Bichromatoxydation der Doppelbindungen in Lipoidextrakten die Lipoidmenge bestimmen; außerdem ist bei der Auswertung der Ergebnisse die Annahme nötig, daß die Zahl der Doppelbindungen der Lipoidmenge annähernd proportional ist. Diese Annahme ist für die natürlichen Lipide berechtigt, und in der frühen Erforschung des Stoffwechsels der Lipide war die Bichromatmethode ein wichtiges Hilfsmittel.

In letzter Zeit ist wiederholt versucht worden, den apparativen, personellen und zeitlichen Aufwand, den diese Methoden bedeuten, durch die Entwicklung einfacherer zu umgehen, meist durch quantitative Auswertung der Anfärbung von Lipoidproben auf Filterpapier. Alle diese Methoden haben einer Nachprüfung nicht standgehalten, und es bestand deshalb nach wie vor die Notwendigkeit für eine technisch einfache, gut reproduzierbare, möglichst auch im Ultramikromaßstab anwendbare Methode für die Gesamtlipoidbestimmung.

Wir haben die von CHABROL u. CHARONNAT<sup>4</sup> angegebene und von CHABROL, BÖSZÖRMÉNYI u. FALLOT<sup>3</sup> näher untersuchte „Sulfophosphovanillin-Reaktion“ (SPV-Reaktion) auf ihre Brauchbarkeit zur Bestimmung kleinster Lipoidmengen geprüft und geben im Folgenden eine etwas einfachere Modifikation, nebst Versuchen zur Methodik und Spezifität sowie Anwendungsbeispiele an.

### Methodik

**Reagentien.** Konzentrierte Schwefelsäure p. a., Dichte 1,84; Phosphorsäure p. a., Dichte 1,7; Vanillin (Merck DAB 6) 0,6% in destilliertem Wasser (die Löslichkeit des Vanillins in Wasser beträgt bei 25° 1%. Vanillinkonzentrationen oberhalb von 0,5% ergeben gleiche Farbreaktionen); Phosphorsäure-Vanillin-Reagens, bestehend aus 4 Teilen Phosphorsäure und 1 Teil Vanillinlösung (sorgfältig mischen!), begrenzt (in dunkler Flasche bei Zimmertemperatur mindestens 2 Wochen) haltbar.

**Bestimmung.** In ein 10-ml-Reagensglas gibt man eine Lipoidlösung, die (im Falle des Trioleins vgl. auch unten) 10–120  $\mu$ g Lipoid enthält. Das Lösungsmittel wird im Wasserbad restlos verjagt, die letzten Tropfen am besten unter Stickstoff. Die vollständige Entfernung der Lösungsmittel ist notwendig, da ohne Entfernung des Lösungsmittels die Farbreaktion ausbleibt (geprüft an alkoholischen Lösungen) und da einige Lösungsmittel (Aceton, Diisobutylketon, Äthylmethylketon, Heptan, Propanol, Butanol, Octanol, Isopropylalkohol, Isopropyläther, Petroläther) die SPV-Reaktion ebenfalls geben. Die Verwendung nicht zu hoch siedender Lösungsmittel ist deshalb zweckmäßig. Es werden 0,2 ml konzentrierter Schwefelsäure zugegeben, und die Wände des Glases werden bis etwas über den vorausgegangenen Stand des Lipoidlösungsmittels sehr sorgfältig mit ihr benetzt. Die Gläser werden 10 min ins kochende Wasserbad gestellt, anschließend wird in einem Wasserbad von Zimmertemperatur gekühlt. Nun werden 5 ml des Phosphorsäure-Vanillin-Reagens, am besten aus einer Bürette, zugegeben. (Auf den Nachlauf des zähen Reagens achten!) Mit einem am Ende breitgedrückten Glasstab wird sofort gemischt, der Glasstab wird aus dem Glas genommen. (Dieser zweite Schritt wird im weiteren gelegentlich als eigentliche Farbreaktion bezeichnet.) Es bildet sich ein rosa Farbton aus, der nach 30–50 min bei 530  $m\mu$  in der 1-cm-Küvette photome-

triert wird (Ablesung gegen Wasser). Ein Lösungsmittelerwert wird durch die gesamte Bestimmung mitgeführt und seine Extinktion wird von den Ablesungswerten abgezogen. (Bei genauen Bestimmungen ist die Durchführung des Leerwertes im Triplikat und Mittelung der Ergebnisse zu empfehlen; in Routineanalysen kann gegen den Leerwert abgelesen werden.) Im allgemeinen liegen die Extinktionswerte der Farbreaktion mit dem Rückstand von 1 ml Lösungsmittel unter 0,012, meist unter 0,009. (Bei höheren Lösungsmittelerwerten sind reinere Lösungsmittel zu verwenden bzw. die Sauberkeit der Glaswaren nachzuprüfen.)

### Ergebnisse

**Zur Methodik.** Abb. 1 gibt die Spektren der in der Sulfophosphovanillin-Reaktion aus Triolein, Linolsäure, Cholesterin und Phosphatiden gebildeten Farbstoffe an und zeigt in Bestätigung der Angaben der Erstbeschreiber<sup>3</sup>, daß die Absorptionsmaxima bei der gleichen Wellenlänge liegen und in keiner Kurve Nebengipfel auftreten. Die Abb. 1 zeigt weiterhin,

daß gleiche Mengen verschiedener Lipide nicht zur gleichen Farbintensität führen; hierauf wird unter „Spezifität“ noch einmal Bezug genommen.

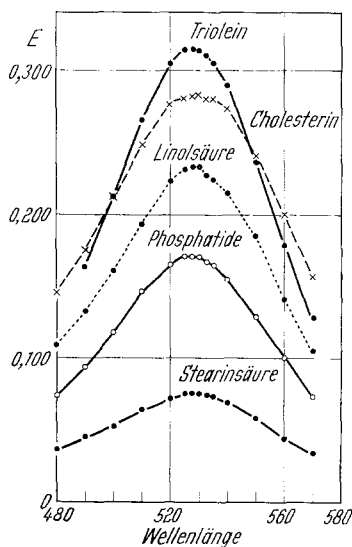


Abb. 1

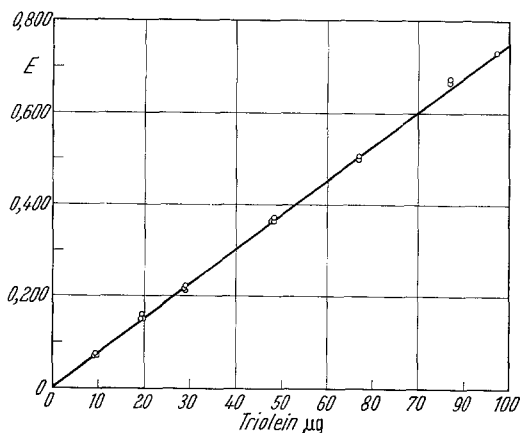


Abb. 2

Abb. 1. Absorptionsspektren der in der SPV-Reaktion gebildeten Farbstoffe aus Triolein, Linolsäure, Cholesterin, Phosphatiden und Stearinsäure bei Einsatz gleicher Mengen (40 µg). Ordinate: Extinktionswerte der Farbreaktion. Abszisse: Wellenlänge in m $\mu$ .

Abb. 2. Eichgerade für Triolein. Ordinate: Extinktionswerte der Farbreaktion. Abszisse: Eingesetzte Mengen in µg

Für alle von uns geprüften Lipide ist die Farbentwicklung der eingesetzten Menge proportional (Triolein, Linolsäure, Stearinsäure, Cholesterin und eine säulenchromatographisch gewonnene<sup>18</sup> Phosphatidfraktion aus dem Serum), und zwar wurden, je nach Lipoid, Mengen bis zu 200 µg bzw. Extinktionswerte bis zu 0,88 geprüft. Abb. 2 gibt die Ergebnisse eines Versuches mit Triolein wieder. Bei genau eingehaltenen

Versuchsbedingungen ist die Reproduzierbarkeit der Eichkurve gut. Bezieht man die Ergebnisse von Versuchen im Triplikate jeweils auf ihr Mittel, so beträgt die Streuung der Einzelwerte zwischen E 0,730 und 0,075 1,86% (berechnet aus 50 Einzelwerten). Die Abweichung der Punkte bei 87  $\mu\text{g}$  (in Abb. 2) erweist sich dadurch als nicht durch die Farbreaktion sondern durch andere, allen Mikrolipoidbestimmungen eigene Fehlerquellen bedingt; auf diese Fehlerquellen haben BRANTE<sup>2</sup>, THANNHAUSER<sup>15</sup>

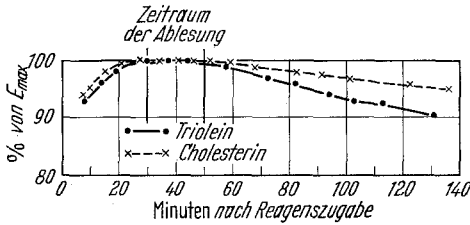


Abb. 3. Entwicklung und Stabilität des gebildeten Farbstoffes am Beispiel von Triolein und Cholesterin (Linolsäure, Phosphatide und Stearinsäure verhalten sich ebenso). Ordinate: Anstieg und Abfall der Farbintensität in Prozenten des höchsten Farbwertes. Abszisse: Zeit in Minuten nach Zugabe des Phosphovanillin-Reagens

und auch wir<sup>17</sup> wiederholt hingewiesen.

Abb. 3 gibt Entwicklung und Stabilität des gebildeten Farbstoffes an und begründet die Wahl des Zeitpunktes der photometrischen Ablesung.

Um festzustellen, ob größere Probenreihen ohne Verlust an Genauigkeit gleichzeitig analysiert werden können, wurden zwischen Abkühlen

und Zusatz von Phosphorsäure und Vanillin Pausen bis zu 20 min eingelegt, ohne daß die Ergebnisse sich meßbar änderten. Es können also so viele Proben behandelt werden, wie innerhalb von 20 min mit Phosphorsäure-Vanillin-Reagens versetzt und gemischt werden können; ein längeres Intervall wurde nicht geprüft, da auch für die Ablesung nur eine begrenzte Zeit zur Verfügung steht. Unserer Erfahrung nach können Reihen mit bis zu 30 oder 36 Gläsern parallel sorgfältig untersucht werden. (An die Regel, geringe Lipoidmengen nicht lange trocken stehen zu lassen, d. h. vor Schwefelsäurezusatz, sei erinnert!)

**Zur Spezifität.** Bei Einsatz gleicher Mengen liefern Cholesterin 91,2%, Linolsäure 77,5%, Phosphatide 53,7% und Stearinsäure 19% der Extinktion von Triolein. Größenordnungsmäßig entspricht also die Farbentwicklung der Zahl der einfachen Doppelbindungen im Molekül, eine Ansicht, die CHABROL und Mitarbeiter<sup>3</sup> auf Grund von Jodzählbestimmungen ebenfalls geäußert hatten. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren bilden weniger Farbstoff, vermutlich weil sie unter der Einwirkung der konzentrierten Schwefelsäure auch zu kleinen Bruchstücken abgebaut werden.

Gesättigte Fettsäuren haben bei CHABROL und Mitarbeitern keine Farbreaktion gegeben. Wir finden mit einer kommerziellen Stearinsäure (Stearinsäure reinst., Merck, Charge Nr. 912671) die oben angegebene Farbbildung. Gaschromatographische Nachprüfung\* ergab jedoch eine

\* Für die Durchführung dieser Untersuchung sind wir Frau Dr. H. DEBUCH, Physiologisch-chemisches Institut Köln, zu Dank verpflichtet.

Verunreinigung durch Palmitoleinsäure von etwa 8%. Rechnet man andererseits auf äquimolare Mengen um und unterstellt man, daß das Triolein keine größeren Mengen gesättigter Säuren enthält, so würde sich (aus mehreren Versuchen) unter der Annahme, daß gesättigte Säuren nicht reagieren, eine Verunreinigung des Stearinsäurepräparates mit 10—18% Monoensäuren ergeben. Bis zur Prüfung mit hochgereinigten Präparaten

Tabelle 1. *Oxysäuren, Mono- und Dicarbonsäuren, Zucker usw.*

Substrat	Vorversuch, unbekannte Menge	Einsatz: 4 mg		Einsatz: mögliches Vorkommen* × 10	
		H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> und Vanillin	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> und Wasser	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> und Vanillin	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> und Wasser
β-Sitosterin	dunkelrot	dunkelrot	dunkelrot	~0,990	~0,181
Heparin				0,074	0,048**
Glucose	schwarz	schwarz	schwarz	0,023	0,016
Fructose	schwarz	schwarz	schwarz	0,043	0,019
Glucuronsäure	braun	braun	braun	0,021	0,017
Glycerin	braun	0,032	0,020	0,011	0,005
α-Ketoglutarinsäure	hell gelbgrün	0,058	0,025		
Oxalessigsäure	braungrün	0,280	0,130		
Ka-Na-tartrat	gelb	~1,100	0,207	0,038	
Milchsäure		0,042	0,018	0,014	0,005
Brenztraubensäure	braun	braun	braun	0,008	0,004
Bernsteinsäure	farblos				
Fumarsäure	farblos				
Äpfelsäure	farblos				
d, l-Serin	farblos				
Harnsäure	farblos				

\* Erläuterung s. Text.

\*\* Für viele organische Substanzen ist ohne Vanillin diese geringe Extinktion festzustellen; sie entspricht einer Bräunung durch die Schwefelsäure, keiner Farb-  
bildung.

kann nicht entschieden werden, ob gesättigte Fettsäuren in der SPV-Reaktion keine oder eine geringe Färbung ergeben. Für praktische Zwecke kann man an der bei weitem bevorzugten Reaktion der ungesättigten Fettsäuren festhalten.

Eine Prüfung von nichtlipoiden Substanzen, die im Plasma vorkommen oder vorkommen können, gibt Tabelle 1 wieder. Bei Einsatz von 4 mg in die Farbreaktion geben einige Substanzen eine Bräunungsreaktion, die die Farbreaktion stört. (Neben den in der Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen wurden Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Serin und Harnsäure geprüft und gaben keinerlei Färbung.) Setzt man das Zehnfache der in 10 µl möglicherweise vorkommenden Substanzmenge ein (bei einer weiter unten zu beschreibenden Anwendung der Methode werden bis zu 10 µl Serum oder eine entsprechende Menge Serumextrakt eingesetzt), so ergeben nur noch Sitosterin, Heparin und Fructose eine

nennenswerte Färbung; die eingesetzten Mengen dieser im normalen Serum nicht vorkommenden Substanzen betragen 200  $\mu\text{g}$  Sitosterin (entsprechend einem Plasmaspiegel von 2000 mg-%), 400  $\mu\text{g}$  Heparin (entsprechend einem Plasmaspiegel von 4000 mg-%, d. h. 4000 IE ml) und

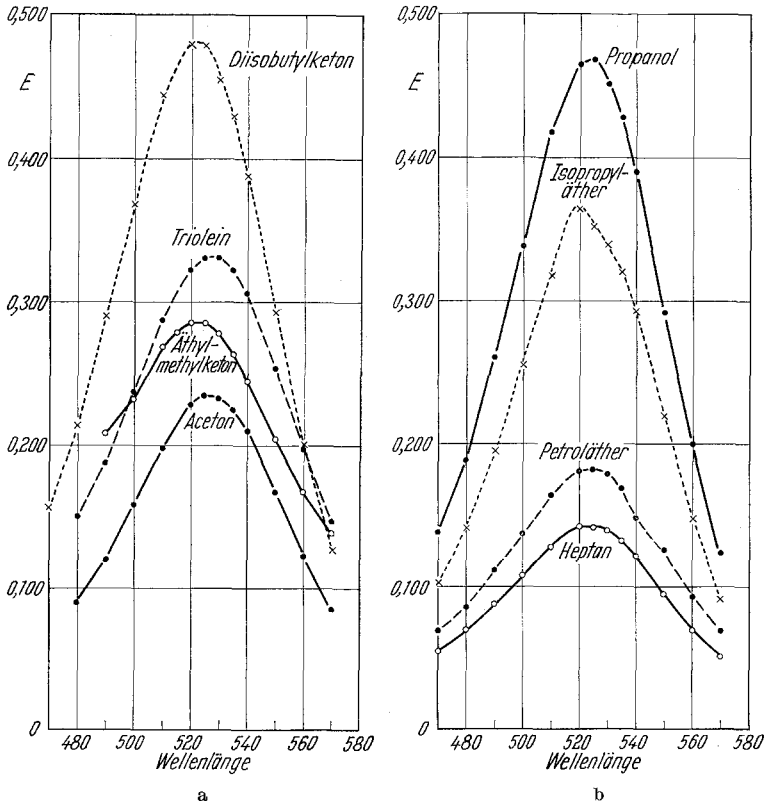


Abb. 4 a u. b. Absorptionsspektren der in der SPV-Reaktion aus Ketonen (4 a) bzw. Kohlenwasserstoffen, Alkoholen und Äther (4 b) gebildeten Farbstoffe. Einsatz: Aceton  $\sim 14,4$  mg; Äthylmethylketon  $\sim 5,2$  mg; Diisobutyketon  $\sim 114$   $\mu\text{g}$ ; Propanol  $\sim 64$   $\mu\text{g}$ ; Isopropyläther  $\sim 40$   $\mu\text{g}$ , bei Petroläther und Heptan unbekannte Mengen. Zum Vergleich eine Trioleinkurve 40  $\mu\text{g}$ . Ordinate: Extinktionswerte der Farbreaktion. Abszisse: Wellenlänge in  $\text{m}\mu$

100  $\mu\text{g}$  Fructose (entsprechend einem Plasmaspiegel von 100 mg-%). Die Farbreaktion des Sitosterins war zu erwarten, da Sitosterin mit Ausnahme der Länge der gesättigten Seitenkette an C-17 strukturell dem Cholesterin gleicht, also ein Lipoid mit einer Doppelbindung ist. Die Verbindung wurde geprüft, da unter dem Einfluß von Triparanol neuerdings nicht mit Cholesterin identische Sterine im Serum aufgefunden wurden<sup>14</sup> und bei Anwendung von Substanzen, die in den Cholesterinstoffwechsel eingreifen, solche Verbindungen häufiger angetroffen werden dürften. Alle übrigen Plasmainhaltstoffe stören die Farbreaktion nicht in nennens-

wertem Maße. Dies ist für die  $\alpha$ -Ketosäuren besonders bedeutsam, da Ketone (s. unten) die Reaktion geben.

Die Schlußfolgerung, daß nichtlipoide Plasmainhaltstoffe die Farb-reaktion nicht geben, wird durch die Feststellung bestätigt, daß weder in dem bei der Lipoidextraktion auftretenden, vornehmlich Protein enthaltenden Niederschlag noch in einem Wasser-Methanol-Extrakt des ursprünglichen Lipoidextraktes (bei Zimmertemperatur im Exsiccator getrocknet) farbgebende Substanzen nachgewiesen werden können, wenn man 10—100  $\mu$ l Serum entsprechende Mengen einsetzt.

Die meisten kurzkettigen Lösungsmittel geben die Reaktion nicht (Methanol, Äthanol, Diäthyläther, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff in Mengen von 0,01 ml), enthalten jedoch Spuren von farbgebenden Verunreinigungen, die im Lösungsmittelerwert (s. oben) berücksichtigt werden. Alkohole, beginnend mit Propanol, Isopropyläther, „Heptan“ und Petroleumbenzin geben die Reaktion. Auch Ketone bilden rote bis gelbe Farbstoffe. Abb. 4 a u. b gibt einige der Absorptionsspektren wieder. Die Farbbildung nimmt mit der Kettenlänge rasch zu, der Farbwert für 1 mg beträgt für Aceton (Dimethylketon) 0,014—0,019, für Äthylmethylketon 0,05c—0,059, für Diisobutylketon 2,69—3,48, doch mag dies mit der Höhe des Siedepunktes (unterschiedlicher Verlust beim Erhitzen mit Schwefelsäure) zusammenhängen. Es empfiehlt sich, bei der Vorbereitung zur Sulfophosphanillin-Reaktion (Lipoidextraktion, Chromatographie) auf diese Lösungsmittel zu verzichten, notfalls besonders gründlich auf ihr Verjagen zu achten.

**Zum Chemismus.** Diisobutylketon reagiert mit Phosphovanillin-Reagens auch ohne Zusatz von Schwefelsäure, wenngleich sehr langsam. Wird vor dem Zusatz von Phosphovanillin-Reagens Schwefelsäure zugesetzt, aber nicht gekocht, so kommt es rascher zu intensiver Farbbildung, erfolgt der Schwefelsäurezusatz nach dem Zusatz des Farb-reagens, so wird Farbstoff langsamer gebildet (Erhitzen mit Schwefelsäure führt zu wesentlich intensiverer Farbbildung in der eigentlichen Farb-reaktion) (Abb. 5).

Triolein reagiert mit Phosphovanillin-Reagens nur nach Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure, muß also dadurch in eine reaktionsfähige Zwischenstufe übergeführt werden. Möglicherweise bilden Ketone solche Zwischenstufen, nachdem ein Keton (genau eine 9,10-Ketohydroxysäure) ein bekanntes Oxydationsprodukt der Ölsäure darstellt<sup>6</sup>. Ein anderer zu einem Keton führender Weg wäre die Anhydratisierung der als Oxydationsprodukt ebenfalls bekannten 9,10-Dihydroxystearinsäure<sup>5</sup> durch die Schwefelsäure zu 9- oder 10-Ketostearinsäure. Für die mögliche Bedeutung der Ketohydroxyverbindung spricht die Beobachtung von MCALEER u. KOZLOWSKI<sup>10</sup>, daß bestimmte 17-Hydroxy-20-ketosteroide mit Vanillin in Phosphorsäure direkt unter Farbbildung reagieren.

Die Ketone müssen offenbar erst durch Schwefelsäure in eine Zwischenstufe übergeführt werden, die mit Vanillin in Phosphorsäure einen Farbstoff ergibt; diese Reaktion scheint aber rasch abzulaufen. Aldehyde

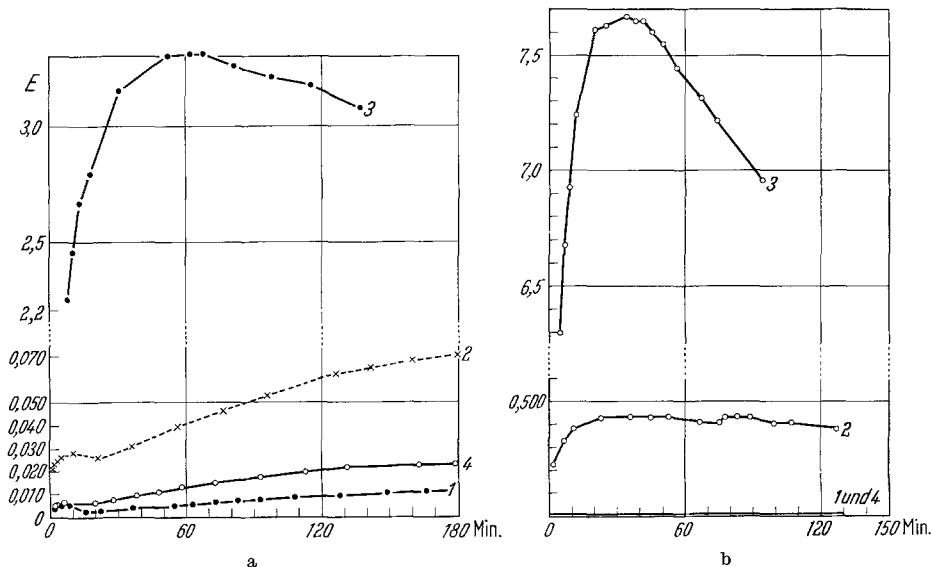
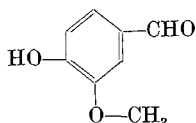


Abb. 5 a u. b. Farbentwicklung aus Diisobutylketon (a) und Triolein (b) bei unterschiedlicher Behandlung. Die Reihenfolge der Aufzählung gibt die Reihenfolge des Zusatzes der Reagentien an. Ansatz 1: Substrat + Phosphorsäure-Vanillin-Reagens. Ansatz 2: Substrat + Schwefelsäure + Phosphorsäure-Vanillin-Reagens. Ansatz 3: Substrat + Schwefelsäure + 10 min Kochen + Phosphorsäure-Vanillin-Reagens (übliche SPV-Reaktion). Ansatz 4: Substrat + Phosphorsäure-Vanillin-Reagens + Schwefelsäure. Einsatz jeweils 1 mg. Ordinate: Extinktionswerte der Farbreaktion. Abszisse: Zeit in Minuten nach Zugabe des Farbreagens

scheinen keine Zwischenstufe darzustellen, nachdem Nonanal, das aldehydartige Oxydationsprodukt der Ölsäure nur eine verschwindend geringe SPV-Reaktion gibt. (Kurzketten Aldehyde, sowie cyclische Aldehyde, d. h. Benzaldehyd, Dimethylaminobenzaldehyd und Anisaldehyd geben die Reaktion ebenfalls nicht.)

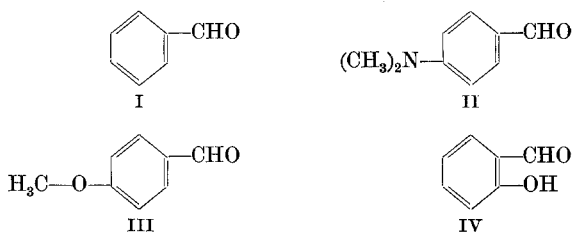
Vanillin ist 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd:



In einem Versuch, die für die Reaktion notwendigen Substituenten zu bestimmen, wurde eine Reihe ähnlicher Verbindungen anstelle des Vanillins zur Herstellung des Reagens verwendet. Dabei zeigte sich, daß auch andere aromatische Aldehyde in Phosphorsäure ein Farbreagens



darstellen, Benzaldehyd (I), Dimethylaminobenzaldehyd (II), Anisaldehyd (III) und Salicylaldehyd (IV).



Es handelt sich also bei der Sulfophosphanillin-Reaktion ganz allgemein um eine Reaktion der Abbauprodukte ungesättigter Lipoide mit aromatischen Aldehyden; Ton und Intensität der gebildeten Farbe sind

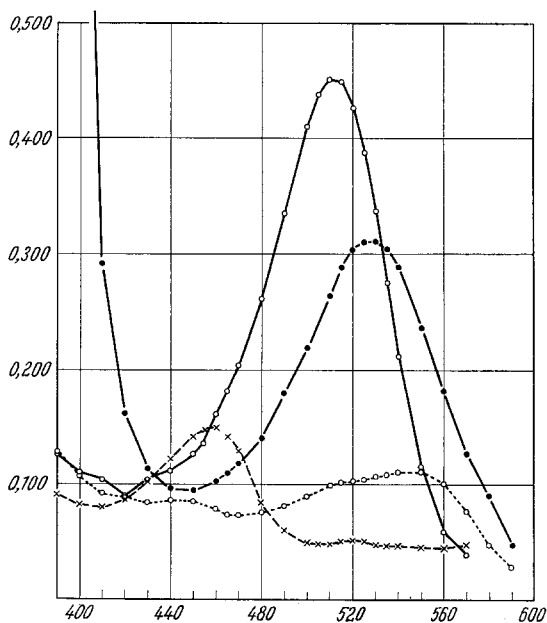


Abb. 6. Absorptionsspektren der aus Triolein (38,94  $\mu\text{g}$ ) gebildeten Farben bei Verwendung verschiedener aromatischer Aldehyde im Farbreagens. Vanillin ( $\bullet\text{---}\bullet$ ), Anisaldehyd ( $\circ\text{---}\circ$ ), Benzaldehyd ( $\times\text{---}\times$ ) und p-Dimethylaminobenzaldehyd ( $\circ\text{---}\circ$ ). Ordinate: Extinktionswerte der Farbreaktion. Abszisse: Wellenlänge in  $\text{m}\mu$

jedoch unterschiedlich (Abb. 6). Oxydation der Carbonylgruppe des Reagens hebt die Reaktionsfähigkeit auf (Vanillinsäure reagiert nicht); ausschließlich hydroxyl- oder methoxysubstituierte Benzolkerne (Phenol, Resorcin, Anethol) sind keine reaktionsfähigen Verbindungen. (Geringe Rotfärbung mit ihnen führen wir auf Verunreinigungen der handelsüblichen Präparate zurück.)

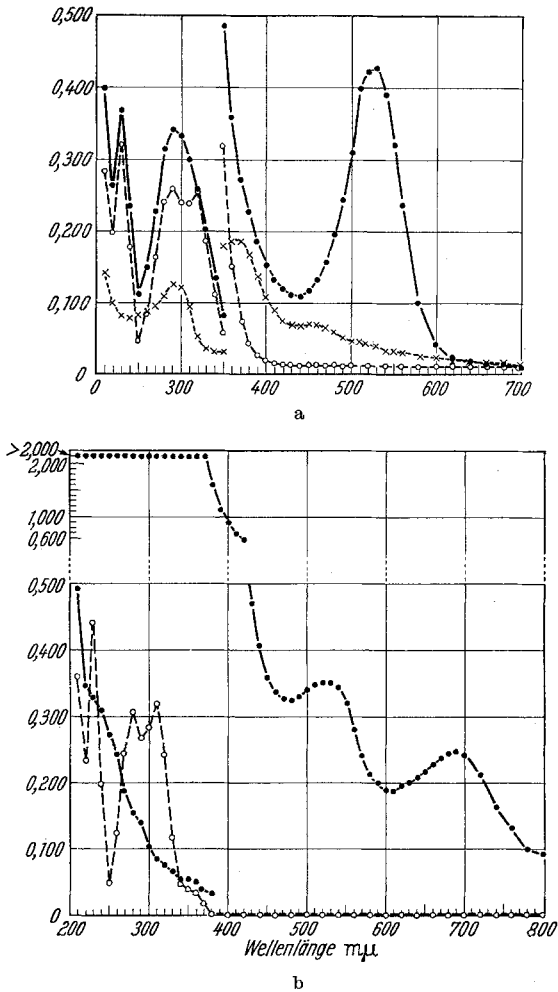


Abb. 7. a Spektrum der Reaktionsprodukte und der einzelnen Reaktionspartner der SPV-Reaktion bei Einsatz äquimolarer Mengen an Ölsäure und Vanillin. Ansatz I (●—●) enthält 0,658  $\mu\text{mol}$  Ölsäure (als Triolein) und 0,658  $\mu\text{mol}$  Vanillin; Ansatz II (×---×) nur 0,658  $\mu\text{mol}$  Ölsäure; Ansatz III (○---○) nur 0,658  $\mu\text{mol}$  Vanillin. Alle Ansätze wurden mit 0,2 ml Schwefelsäure im kochenden Wasserbad erhitzt, 4 ml Phosphorsäure und 1 ml Wasser wurden zugegeben, Vanillin mit dem Wasser. Abgelesen wurde gegen einen Leerversuch. Zur Ablesung im ultravioletten Licht wurden alle Ansätze im Verhältnis 1:5 mit Leeransatz verdünnt, um eine ablesbare Extinktion zu erhalten. Ordinate: Extinktionswerte der Farb-reaktion. Abszisse: Wellenlänge in  $\text{m}\mu$ . b Spektrum des Reaktionsproduktes und des Vanillins in absolutem Alkohol. (Es wurde ein Ansatz mit äquimolaren Mengen an Ölsäure und Vanillin gemacht. 295 mg Triolein wurden mit 2,0 ml Schwefelsäure versetzt und erhitzt, dazu ein Gemisch aus 40 ml Phosphorsäure und 10 ml Wasser, 152 mg Vanillin enthaltend, gegeben. Entwicklung einer sehr intensiven roten Farbe. Nach 30 min Zugabe von 50 ml Wasser, dabei fiel der rote Farbstoff aus. Er wurde nach wiederholtem Waschen mit der verdünnten Phosphorsäure in Alkohol gelöst und photometriert (●—●). Es wurden zwei Konzentrationen gemessen, um das Verhalten des Spektrums im ultravioletten und sichtbaren Licht deutlich zu zeigen. Die Kurve (○---○) zeigt das Spektrum von Vanillin in Alkohol, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Ordinate: Extinktionswerte des Reaktionsproduktes bzw. Vanillins. Abszisse: Wellenlänge in  $\text{m}\mu$

Die eigentliche Farbreaktion entspricht mit großer Wahrscheinlichkeit dem Mechanismus der „modifizierten“ Farbreaktion nach KÄGI-MIESCHER<sup>12</sup>. (Die Farbreaktion tritt auch ohne Zusatz von Phosphorsäure ein, das Reaktionsprodukt entfärbt sich jedoch rasch und fällt aus.) Dagegen handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um die Bildung eines Chalkons, an die ebenfalls gedacht werden mußte, da dem Reaktionsprodukt die für Chalkone typischen Banden im Bereich zwischen 206 und 350 m $\mu$ <sup>7</sup> fehlen (Abb. 7).

### Anwendung

**Säulenchromatographie.** Für die Säulenchromatographie der Lipide fehlte bislang eine einfache Methode zum Nachweis aller Plasmalipide, es war vielmehr notwendig, entweder die Fraktionen einzudampfen, um

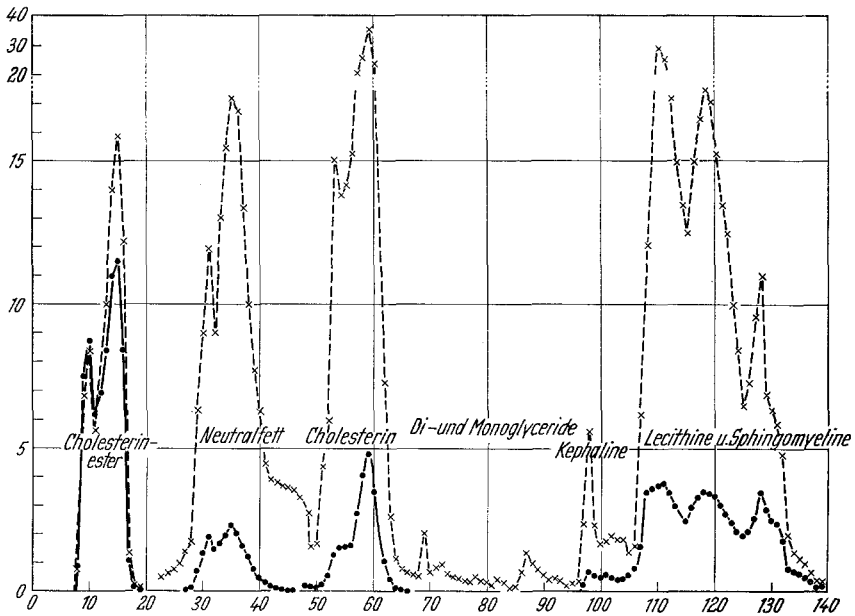


Abb. 8. Die Auswertung eines Säulenchromatogramms mittels spezifischer Reaktionen (3) (•—•) und der SPV-Reaktion (x--x). Für die Cholesterinester ist der Maßstab bei der Darstellung der SPV-Reaktion auf  $\frac{1}{10}$  reduziert. Ordinate: mg Lipoid/Röhrchen für die spezifische Reaktion bzw. E-Werte/Röhrchen für die SPV-Reaktion. Abszisse: Nummer der Röhrchen

zu prüfen, ob Rückstände verbleiben, oder mehrere Reaktionen parallel durchzuführen. Abb. 8 zeigt, daß die Sulfophosphovanillin-Reaktion als allgemeine Lipidbestimmungsmethode für Eluate von Chromatographiesäulen gut brauchbar ist. Selbstverständlich ist für jede Substanzgruppe ein eigener Umrechnungsfaktor nötig (das gilt aber z. B. auch für die Auswertung von Aminosäurechromatogrammen mit quantitativer

Ninhydrinmethode). Bei den Cholesterinestern ist der Umrechnungsfaktor nicht konstant, da zunächst vorwiegend die Ester gesättigter, später die ungesättigter Fettsäuren eluiert werden (durch Kontrolle der Fraktionen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie<sup>19</sup> erwiesen), und es mag sein, daß ähnliches auch für andere Fraktionen gilt.

**Bestimmung der Gesamtlipide im Serum.** Zur Bestimmung der Gesamtlipide im Serum können wir zwei Modifikationen der Methode ange-

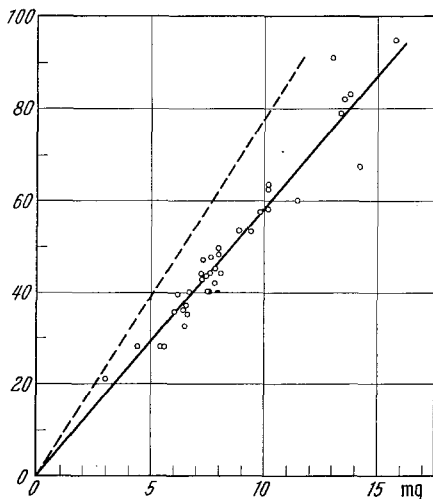


Abb. 9. Beziehung zwischen Gewicht und Farbwerten (Spektrophotometer 530 m $\mu$ ) für 37 Serumlipoidextrakte (berechnet für 1 ml Serum). — Regressionsgerade berechnet nach LINDER, --- Eichgerade für Triolein. Ordinate: Extinktionswerte der Farbreaktion. Abszisse: mg Lipoid in 1 ml Serum

geben. Beide sind leicht durchzuführen und geben damit auch kleineren Laboratorien die Möglichkeit, hyperlipämische Krankheiten mit Hilfe einer Gesamtlipoidmethode anstelle oder in Ergänzung einer Cholesterinmethode zu verfolgen. Auch eine brauchbare Abschätzung der Neutralfettwerte ist möglich. Damit wird der Blick, der bisher allzu oft ausschließlich auf das Cholesterin gerichtet war, auch den anderen Lipoiden zugewandt.

Abb. 9 gibt für 37 Serumlipoidextrakte die Beziehung zwischen dem Gewicht und den Extinktionen in der Sulfophosphovanillin-Reaktion wieder (angegeben für die 1 ml Serum entsprechende Menge). Ob eine

Extrapolation in dem Bereich noch größerer Lipoidmengen zulässig ist, ist noch nicht geprüft. Abb. 9 enthält auch eine Eichgerade für Triolein. Sie liegt erwartungsgemäß oberhalb der Geraden für die Gesamtlipoidextrakte, da die natürlichen Fette vor allem in den Phosphatiden und Neutralfetten eine größere Menge gesättigter Fettsäuren enthalten.

Die gleichzeitige Bestimmung dieser Geraden an einem Spektrophotometer und einem in der Routine angewandten Photometer erlaubt die Umrechnung der Eichkurve für Gesamtlipide auf dieses Photometer.

**Beispiele.** a) *Bestimmung der Gesamtlipide im Lipoidextrakt aus Serum.* Herstellung des Lipoidextraktes<sup>18</sup>: Fällung von 1 ml Serum mit 15 ml Chloroform/Methanol 1:1, Erhitzen zum Sieden, Abkühlen, Auffüllen auf 25 ml mit Chloroform, Abfiltrieren oder -zentrifugieren. Reinigung des Lipoidextraktes: 20 ml Extrakt im schließverschlossenen Meßzylinder mit 4 ml 0,02% wäßriger CaCl<sub>2</sub>-Lösung ausschütteln. Nach Schichttrennung das Volumen der (unteren) Lipoidphase für spätere Berechnungen notieren; es entspricht 0,8 ml Serum, gewöhnlich beträgt es 14 ml.

Bestimmung der Gesamtlipide: 0,1 ml vom gereinigten Lipoidextrakt werden in die Sulfophosphanillin-Reaktion eingesetzt. Noch genauer ist es, 1 ml gereinigten Extraktes mit Chloroform oder einem Alkohol auf 10 ml zu verdünnen und von der Verdünnung 1 ml in die Bestimmung einzusetzen. (Lösungsmittel sorgfältig verjagen, Lösungsmittelerwert!)

Berechnung: Der Extinktionswert wird mit 10 zur Umrechnung auf 1 ml gereinigten Extraktes, mit dem Volumen des gereinigten Extraktes, und mit 1,25 zur Umrechnung auf 1 ml Serum multipliziert. Betrag also der Extinktionswert 0,292 und das Volumen des gereinigten Lipoidextraktes 14,1 ml, so ist E für die Ablesung aus der Eichkurve

$$E = 0,292 \cdot 10 \cdot 14,1 \cdot 1,25 = 51,5$$

und das Gesamtlipoid betrug 8,8 mg/ml bzw. 880 mg-%.

b) *Bestimmung der Gesamtlipide bei Verwendung eines Photometers ohne beliebige Einstellung der Wellenlänge.* Zum Vergleich der Photometer wird mit einer Probe Triolein (etwa 40  $\mu$ g) (oder eine entsprechende Menge eines anderen Lipoids) die Farbreaktion durchgeführt und in beiden Photometern gemessen; dazu wird im Photometer ohne Wellenlängenwahl das 530  $m\mu$  nächstliegende Filter eingesetzt. Der Quotient der Extinktionswerte ergibt einen Umrechnungsfaktor, der auch für die Analyse von Lipoidextrakten gilt und zur Berechnung der Eichgeraden für das zweite Photometer gebraucht werden kann. Betrag z. B. der E-Wert für 40  $\mu$ g Triolein bei 530  $m\mu$  0,310 und im Eppendorf-Photometer mit Filter 546 0,260, so

ist die aus Abb. 9 errichtete Eichgerade für Gesamtlipide um  $\frac{0,260}{0,310}$  zu erniedrigen, am einfachsten durch Multiplikation des spektrophotometrischen E-Wertes für 10 mg mit  $\frac{0,260}{0,310}$ ; aus dem dadurch gewonnenen E-Wert für das zweite Photometer wird die Eichgerade durch Verbindung des Punktes (E 49,1; 10 mg) mit dem Nullpunkt konstruiert. Voraussetzung für die Berechnung ist die Gleichheit der Absorptionsspektren, die hinreichend gegeben ist, vgl. Abb. 1.

Ohne Vergleich der Photometer ist eine Umeichung durch Bildung des Quotienten aus den spektrophotometrischen E-Werten für Lipoidextrakt und Triolein (Abb. 9) und Bestimmung des E-Wertes für Triolein im neuen Photometer möglich.

Der Quotient beträgt (berechnet aus den E-Werten für 4 mg)  $\frac{23,59}{31,00} = 0,7605$ .

40  $\mu$ g Triolein geben im Eppendorf-Photometer (s. oben) eine Extinktion von 0,260; die Extinktion für 4 mg Triolein beträgt demnach 26,0 und die für 4 mg Gesamtlipoid  $26,0 \times 0,76 = 19,8$ ; durch Verbindung dieses Punktes mit dem 0-Punkt und Verlängerung bis 15 mg kann wiederum die Eichkurve konstruiert werden. Die zweite Methode der Umkonstruktion ist weniger verlässlich, da das zur Kontrolle verwendete Triolein unserer Charge (Merck, Bestellnr. 8361, Charge 640867) in der Farbbildung völlig gleichen muß.

Theoretisch ist eine neue Eichung durch Wägung von Lipoidextrakten und ihr Einsatz in die Farbreaktion vorzuziehen, erfahrungsgemäß ist dies aber aus apparativen wie personellen Gründen an vielen Stellen unmöglich. Andererseits ist der durch die Umrechnung eingeführte mögliche Fehler gering. Die durch Analysen bestimmte Eichgerade für Serumlipoidextrakte lag sowohl für das Photometer Eppendorf als auch für das analog geprüfte Colorimeter von Beckman (Modell C) um nur 4 bzw. 2% höher als die berechnete.

Zur Berechnung der Neutralfette ist die Konzentration von Cholesterin, Cholesterinestern und Phosphatiden von der Gesamtlipidkonzentration

abzuziehen, kleinere Lipoidfraktionen wie freie Fettsäuren und Carotinoide können dabei unberücksichtigt bleiben, da die für die Berechnung der Gewichtskonzentrationen der Hauptfraktionen eingesetzten Faktoren ebenfalls nur Mittelwerte darstellen. Die entsprechende Gleichung lautet (alle Werte in Milligrammprozent):

$$[\text{Neutralfette}] = [\text{Gesamtlipide}] - ([\text{Freies Cholesterin}] + 1,7 \cdot [\text{verestertes Cholesterin}] + [\text{Phosphatide}]).$$

Für die Berechnung ist es am zweckmäßigsten, vom oben angegebenen Lipoidextrakt weitere aliquote Teile für Lipoidbestimmungen abzupipetieren, 1 ml für Gesamtcholesterin, 2 ml für freies Cholesterin (nach ZAK und Mitarbeitern<sup>16</sup>), 0,5 ml für Lipoidphosphor (nach BARTLETT<sup>1</sup>), doch sind auch die Ergebnisse anderer Analysenmethoden verwendbar.

Ohne wesentlichen Verlust an Genauigkeit ist es, außer bei schwersten Leberschäden, möglich, für die Berechnung auf die Bestimmung des freien Cholesterins zu verzichten; unter der Annahme eines normalen Esterquotienten für Cholesterin von 70% berechnet sich die Gewichtskonzentration der Cholesterinfraktion zu  $0,3 [\text{Gesamtcholesterin}] + 1,7 \cdot 0,7 [\text{Gesamtcholesterin}] = 1,5 [\text{Gesamtcholesterin}]$ , und die obige Gleichung lautet nun  $[\text{Neutralfette}] = [\text{Gesamtlipide}] - (1,5 [\text{Gesamtcholesterin}] + [\text{Phosphatide}])$ .

Wo eine Lipoidphosphorbestimmung nicht möglich ist, gelangt man mit Hilfe einer von MAN und Mitarbeitern<sup>9</sup> angegebenen Formel, die die Beziehung von Gesamtcholesterin zu Lipoid beschreibt, immer noch zu einer groben Neutralfettabschätzung. Die Formel von MAN lautet nach Umrechnung für den angegebenen Zweck

$$[\text{Phosphatide}] = 0,73 [\text{Gesamtcholesterin}] + 90$$

und aus der Gleichung für Neutralfette wird

$$[\text{Neutralfette}] = [\text{Gesamtlipide}] - (2,25 [\text{Gesamtcholesterin}] + 90).$$

Diese letzte Gleichung stellt eine sehr grobe Annäherung dar, zur Verfolgung der Neutralfettbewegung bei hyperlipämischen Krankheiten (Diabetes, Nephrose, Pancreatitis usw.) ist sie aber geeignet.

c) *Direktbestimmung der gesamten Plasmalipide ohne vorhergehende Extraktion.* Da nichtlipide Bestandteile die SPV-Reaktion nicht stören, blieb anschließend zu prüfen, ob es möglich ist, Serum direkt in die Analysen einzusetzen; die Methode von CHABROL, FALLOT u. BÖSZÖRMÉNYI<sup>8</sup> war ursprünglich für Serum angegeben. Ein Vergleich von Analysen, in denen parallel Serum und ein mengenmäßig entsprechender Lipoidextrakt untersucht wurden, ergab zunächst schlechte Übereinstimmung, die Ergebnisse der Direktanalyse von Serum (Methode s. unten) lagen bei Einsatz von 10  $\mu$ l tiefer als die der Analysen von trockenem Lipoidextrakt. Die Diskrepanz konnte als Folge des Wassergehaltes des Serums aufgeklärt werden; die Zugabe kleiner Wassermengen hemmt die SPV-Reaktion in mit der Wassermenge zunehmendem Maß (Tabelle 2) und zwar sowohl gegenüber Lipoidextrakt als auch gegenüber Cholesterin und einer chromatographisch gewonnenen<sup>18</sup> Phosphatidfraktion. Die Reaktion mit Linolsäure oder Triolein als Substrat wird weniger gehemmt. Die zusätzliche Zugabe von Kochsalz hat keinen weiteren Einfluß.

Wegen des Einflusses des Wassers war es nötig, für die Direktanalysen des Serums eine neue Eichgerade zu erstellen (Abb. 10). (Diese Eichgerade schneidet die

Tabelle 2. Der Einfluß von Wasser auf den Ausfall der Sulfophosphovanillin-Reaktion eines Serumlipoidextraktes bzw. weitgehend reiner Lipoidfraktionen. Den trockenen Lipoiden wurde vor Zugabe der Schwefelsäure die angegebenen Mengen Wasser oder 0,9% NaCl-Lösung zupipettiert; die Ergebnisse sind in Prozent der Farbbildung des Versuches ohne Wasserzusatz ausgedrückt

Lipoid	Wasserzusatz ( $\mu$ l)			
	5	10	15	20
Gesamtlipoidextrakt				
aus Serum	89—93	83—88	78—81	79
Cholesterin	86—88	83	74—79	71—72
Phosphatide	90	85—87	84—87	83—85
Triolein	88—94	91—95	94—100	92—105
Linolsäure	94—97	90—95	93—102	98—105

Ordinate nicht im Nullpunkt, da die konzentrierte Schwefelsäure mit nichtlipoiden Plasmabestandteilen eine wenn auch geringe Bräunung ergibt.) Abschließend wird die Methode zur Gesamtlipoidbestimmung in kleinsten Serum- oder Plasamengen angegeben.

5  $\mu$ l Serum werden mit einer geeigneten Mikropipette\* in ein etwas mehr als 10 ml fassendes Reagensglas gegeben. Es werden 0,2 ml der konzentrierten Schwefelsäure so zugesetzt, daß durch den Einlauf der Säure Serumreste, die nach Abstreifen der Pipette nicht auf den Boden des Glases gelangten, mit heruntergewaschen bzw. benetzt werden. Im weiteren wird bezüglich Erhitzen, Abkühlen, Zugabe des Farbreagens usw. nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift verfahren. Abb. 10 enthält Eichgeraden für das Zeiß-Spektralphotometer und die Filterphotometer Eppendorf und Colorimeter Beckman, Modell C.

#### Dünnschichtchromatographie.

Die SPV-Reaktion eignet sich durch ihre Empfindlichkeit zur Analyse der Lipide in abgekratzten Dünnschichten. Auch der Nachweis auf der Platte durch Besprühen mit Schwefelsäure, kurzes Erhitzen und anschließendes Besprühen mit Phosphorsäurevanillin-Reagens ist möglich. Ohne Vorbehandlung mit Schwefelsäure wurde ein Phosphorsäurevanillin-Reagens zum Nachweis

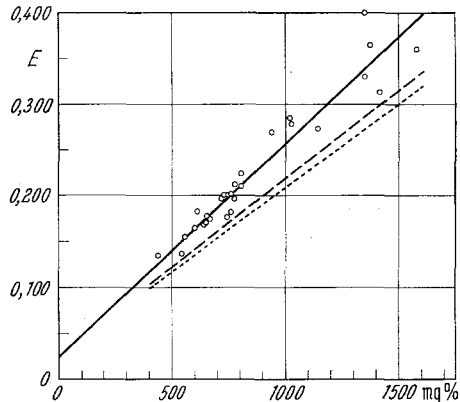


Abb. 10. Beziehung zwischen Lipoidgehalt (gravimetrisch) und Farbwerten (Spektrophotometer 530  $m\mu$ ) bei Einsatz von Serum in die SPV-Reaktion. — Regressionsgerade für die Ergebnisse von 28 Seren, berechnet nach LINDER<sup>8</sup>. --- Eichgerade für Eppendorf-Photometer Filter 546, ---- Eichgerade für das Colorimeter Beckman, Modell C, Grünfilter. Ordinate: Extinktionswerte der Farbreaktion bei Einsatz von 5  $\mu$ l Serum. Abszisse: Lipoidgehalt des Serums in mg-%

\* Wir verwendeten die Pipette von Sanz (Beckman Instruments).

von Steroiden auf Papierchromatogrammen bereits von McALEER u. KOZLOWSKI<sup>10</sup> und auf Dünnschichtchromatogrammen von METZ<sup>11</sup> verwendet. NEHER u. WETTSTEIN<sup>13</sup> haben die „modifizierte“ Kägi-Miescher-Reaktion<sup>12</sup> verwendet, bei der eine Lösung von Anisaldehyd in Eisessig/Schwefelsäure (50:1) aufgesprüht und anschließend erhitzt wird.

### Zusammenfassung

Die Sulfophosphovanillin-Reaktion (SPV-Reaktion) von CHABROL u. CHARONNAT wurde auf Chemismus und Anwendungsmöglichkeiten untersucht. Die gebildete Farbe entsteht durch Reaktion von Vanillin, aber auch anderer aromatischer Aldehyde mit den durch konzentrierte Schwefelsäure gebildeten Abbauprodukten von Lipoiden, vermutlich Ketonen bzw. Ketonen mit benachbarter Hydroxylgruppe.

Durch ihre weitgehende Unspezifität ist die SPV-Reaktion zum allgemeinen Lipoidnachweis gut geeignet. Beispiele sowie zwei Methoden für die Bestimmung der Gesamtlipide im Serum oder Plasma werden angegeben.

### Literatur

- <sup>1</sup> BARTLETT, G. E.: Phosphorus Assay in Column Chromatography. *J. biol. Chem.* **234**, 466 (1959).
- <sup>2</sup> BRANTE, G.: Studies on Lipids in the Nervous System. *Acta physiol. scand. Supp.* **18**, 63 (1949).
- <sup>3</sup> CHABROL, E., M. BÖSZÖRMÉNYI et P. FALLOT: Les lipides du sérum sanguin sous l'angle de la réaction sulfo-phosphovanillique. *Sem. Hôp. Paris* **25**, 3446 (1949).
- <sup>4</sup> — et R. CHARONNAT: Une nouvelle réaction pour l'étude des lipides: l'oléidémie. *Presse méd.* **45**, 1713 (1937).
- <sup>5</sup> GUNSTONE, F. D.: *An Introduction to the Chemistry of Fats and Fatty Acids.* London: Chapman and Hall 1958.
- <sup>6</sup> HOLDE, D., and J. MARCUSON: *Ber.* **36**, 2657 (1903); KING, G.: *J. chem. Soc.* **1936**, 1788; zit. n. H. J. DEUEL jr.: *The Lipids.* Vol. I, p. 158. New York: Interscience Publ. 1951.
- <sup>7</sup> KLINKE, P., u. H. GIBIAN: Über Chalkone. *Chem. Ber.* **94**, 26 (1961).
- <sup>8</sup> LINDER, A.: *Statistische Methoden*, S. 147. Basel-Stuttgart: Birkhäuser 1960.
- <sup>9</sup> MAN, E. B., B. L. KARTIN, S. H. DURLACHER and J. P. PETERS: Lipids of Serum and Liver in Patients with Hepatic Diseases. *J. clin. Invest.* **24**, 623 (1945).
- <sup>10</sup> McALEER, W. J., and M. KOZLOWSKI: Color Test for 17-Hydroxy, 20-Keto, 21-Methyl Steroids. *Arch. Biochem.* **62**, 196 (1956).
- <sup>11</sup> METZ, H.: Dünnschichtchromatographische Schnellanalyse bei enzymatischen Steroid-Umsetzungen. *Naturwissenschaften* **48**, 569 (1961).
- <sup>12</sup> MIESCHER, K.: Über Steroide. Über Farbreaktionen. *Helv. chim. Acta* **29**, 743 (1946).
- <sup>13</sup> NEHER, R., u. A. WETTSTEIN: Farbreaktionen mit Steroiden, insbesondere Corticosteroiden, im Papierchromatogramm. *Helv. chim. Acta* **34**, 2278 (1951).
- <sup>14</sup> STEINBERG, D., J. AVIGAN and E. B. FEIGELSON: Effects of Triparanol (MER-29) on Cholesterol Biosynthesis and on Blood Sterol Levels in Man. *J. clin. Invest.* **40**, 884 (1961).



- <sup>15</sup> THANNHAUSER, S. J.: *Lipidoses, Diseases of the Intracellular Lipid Metabolism*. New York-London: Grune & Stratton 1958.
- <sup>16</sup> ZAK, B., R. C. DICKENMAN, E. G. WHITE, H. BURNETT and P. J. CHERNEY: Rapid Estimation of Free and Total Cholesterol. *J. clin. Path.* **24**, 1307 (1954).
- <sup>17</sup> ZÖLLNER, N.: Die angeborenen hereditären Störungen im Stoffwechsel der Fette. In: *Mod. Probl. Pädiat.* **3**, 378 (1958).
- <sup>18</sup> — u. K. KIRSCH: Die säulenchromatographische Trennung der Plasmalipide. *Z. ges. exp. Med.* **134**, 10 (1960).
- <sup>19</sup> — — u. G. AMIN: Über die chromatographische Trennung der Cholesterinester des Plasmas. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **66**, 677 (1960).

Professor Dr. N. ZÖLLNER, München 15, Pettenkoferstraße 8a,  
Medizinische Poliklinik der Universität