

## DÜNNSCHICHTELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG QUATERNÄRER AMMONIUMVERBINDUNGEN

H. BAYZER

*Biologische Forschungsabteilung der Österreichischen Stickstoffwerke AG., Linz/Donau (Österreich)*  
(Eingegangen den 7. Februar 1966)

In letzter Zeit erschien eine Reihe von Arbeiten über die Dünnschichtchromatographie aliphatischer, quaternärer Ammoniumverbindungen<sup>1-6</sup>. Darin wurden als Vorteile dieser Methode gegenüber der Papierchromatographie übereinstimmend die grössere Nachweisempfindlichkeit und die schärfere Auftrennung der Substanzen hervorgehoben. Im Laufe unserer eigenen Untersuchungen über die Möglichkeiten zur Auftrennung und Identifizierung kleinster Mengen von physiologisch wichtigen quaternären Ammoniumverbindungen beschäftigten wir uns neben der Dünnschichtchromatographie auch mit der Dünnschichtelektrophorese dieser Verbindungen.

### EXPERIMENTELLES

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir eine Elektrophoreseapparatur nach WIELAND und PFLEIDERER<sup>7</sup>, doch kommt dafür prinzipiell jedes Elektrophoresegerät in Frage, das eine kühlbare Auflagefläche für das Trägermaterial besitzt und das Anlegen von Spannungen bis etwa 1000 V gestattet. Die Dünnschichtplatten vom Format 20 × 20 cm oder 20 × 10 cm wurden mit einem Streichgerät auf die übliche Art und Weise beschichtet. Wir überprüften Kieselgel G, Kieselgur G, Aluminiumoxid G und Cellulose auf ihre Brauchbarkeit als Trägermaterial und versuchten die Trennung der quaternären Ammoniumverbindungen in einer Reihe von verschiedenen Puffersystemen.

Nach Besprühen der Dünnschichtplatte mit dem Puffer, in dem die Elektrophorese durchgeführt wird, trägt man, um die Trennstrecke voll ausnützen zu können, das Substanzgemisch etwa 3 cm vom Plattenrand entfernt auf. Die Platte wird dann auf die gekühlte Auflagefläche der Elektrophoreseapparatur gelegt, durch Filterpapier- oder Leinenstreifen, die an den Enden, die auf der Trägerschicht aufliegen, in Cellophanfolien eingeschlagen sind, mit den puffergefüllten Elektrodengefässen verbunden und mit einer Glasplatte gleicher Grösse überdeckt. Die quaternären Ammoniumverbindungen wandern im elektrischen Feld zur Kathode. Die Trenndauer ist von der Art der Trägerschicht, der Pufferlösung und der Höhe der angelegten Spannung abhängig.

Der Nachweis der quaternären Ammoniumverbindungen erfolgte auf Kieselgel-, Kieselgur- oder Aluminiumschichten mit einem modifizierten Dragendorff-Reagens, dem eine alkoholische Jodlösung zugesetzt wurde<sup>4</sup>, auf den Celluloseschichten mit dem Dragendorff-Reagens nach THIES UND REUTHER<sup>8</sup>. Wie bei der Dünnschicht-

chromatographie liegt auch bei der Dünnschichtelektrophorese die untere Nachweisgrenze für die einzelnen Verbindungen bei 0.5–1.0 µg.

### ERGEBNISSE

Die besten Trennergebnisse erzielten wir bei Verwendung von Kieselgel G der Firma Merck, Darmstadt, als Sorptionsmittel. Mit einer Pufferlösung pH 3.6, die sich aus Pyridin–Eisessig–Wasser (1:10:89) zusammensetzt, gelingt in einem Spannungsgefälle von 30–40 V/cm innerhalb von etwa zwei Stunden die vollständige Auftrennung eines Gemisches der fünf in Tabelle I genannten quaternären Ammonium-

TABELLE I

DÜNNSCHICHTELEKTROPHORETISCHE WANDERUNGSWEGE VON QUATERNÄREN AMMONIUM-VERBINDUNGEN

	<i>R<sub>CH</sub></i> -Werte*	
	Kieselgel pH 3.6	Cellulose pH 6.5
Tetramethylammoniumchlorid	0.91	1.16
Cholinchlorid, (2-Hydroxyäthyl)-trimethylammoniumchlorid	1.00	1.00
Chlorcholinchlorid, (2-Chloräthyl)-trimethylammoniumchlorid	0.67	0.94
Acetylcholinchlorid, (2-Acetoxyäthyl)-trimethylammoniumchlorid	0.52	0.86
Glykokollbetain	0.10	0.19

$$* R_{CH} = \frac{\text{Wanderungsstrecke der Analysesubstanz}}{\text{Wanderungsstrecke von Cholin}}$$

verbindungen (Fig. 1a). Mit einem Pyridinacetatpuffer pH 6.5 ist auf Kieselgelschichten keine zufriedenstellende Auftrennung von Cholinchlorid und Tetramethylammoniumchlorid zu erreichen, während die Wanderungswege der übrigen quaternären Ammoniumverbindungen etwa gleich wie bei pH 3.6 sind.

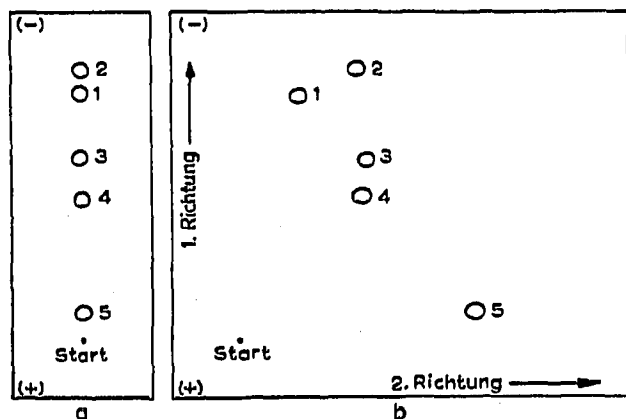


Fig. 1. Trennung quaternärer Ammoniumverbindungen auf Kieselgelschichten. (a) Dünnschichtelektrophorese, Pyridin–Eisessig–Wasser (1:10:89), pH 3.6, 40 V/cm; (b) 1. Richtung: Dünnschichtelektrophorese wie unter a; 2. Richtung: Dünnschichtchromatographie, aufsteigend in Methanol–Aceton–Salzsäure (90:10:4) (Lit. 5). 1 = Tetramethylammoniumchlorid; 2 = Cholinchlorid; 3 = Chlorcholinchlorid; 4 = Acetylcholinchlorid; 5 = Glykokollbetain.

Auch auf Dünnschichtplatten, die mit Cellulose MN 300, ohne Gipszusatz, der Firma Macherey, Nagel & Co., Düren, beschichtet sind, ist eine Auftrennung der quaternären Ammoniumverbindungen möglich, wenn man mit einem Puffergemisch aus Pyridin-Eisessig-Wasser (10:1:89), pH 6.5, arbeitet (Fig. 2a). In einem Spannungsgefälle von 30–40 V/cm beträgt die Trenndauer nur etwa 40 Min., doch sind die Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeiten von Cholinchlorid, Chlorcholinchlorid und Acetylcholinchlorid viel geringer als auf Kieselgelschichten bei Verwendung des Pyridinacetatpuffers pH 3.6 (Tabelle I). Auf Celluloseschichten ist daher nur dann eine zufriedenstellende elektrophoretische Auftrennung der drei genannten Substanzen zu erwarten, wenn sie in der Mischung in etwa gleichen Mengen vorhanden sind und die Beladung der Platte mit dem Substanzgemisch nicht zu gross ist.

Auf Kieselgur- und Aluminiumoxidschichten sind bei Verwendung der Pyridinacetatpuffer pH 3.6 oder pH 6.5 keine grossen Unterschiede zwischen den Wanderungsgeschwindigkeiten von Tetramethylammoniumchlorid, Cholinchlorid, Chlorcholinchlorid und Acetylcholinchlorid festzustellen. Cholinchlorid und Chlorcholinchlorid lassen sich unter diesen Bedingungen überhaupt nicht trennen.

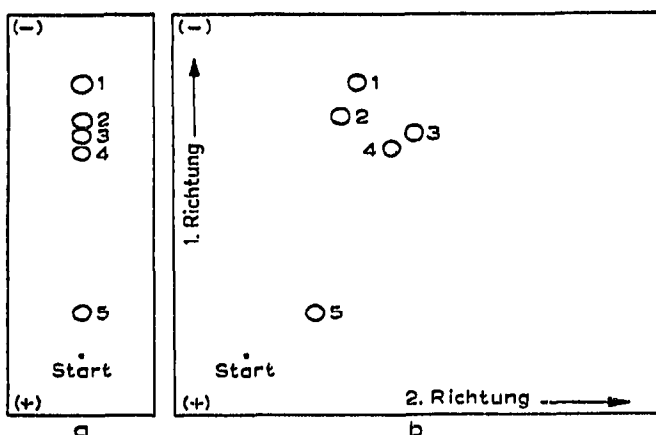


Fig. 2. Trennung quaternärer Ammoniumverbindungen auf Celluloseschichten. (a) Dünnschicht-elektrophorese, Pyridin-Eisessig-Wasser (10:1:89), pH 6.5, 40 V/cm; (b) 1. Richtung: Dünnschicht-elektrophorese wie unter a; 2. Richtung: Dünnschichtchromatographie, aufsteigend in *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) (Lit. 2). 1 = Tetramethylammoniumchlorid; 2 = Cholinchlorid; 3 = Chlorcholinchlorid; 4 = Acetylcholinchlorid; 5 = Glykokollbetain.

## DISKUSSION

Ein Vorteil der Dünnschichtelektrophorese besteht darin, dass sie im Gegensatz zur Dünnschichtchromatographie auch bei relativ stark verunreinigten Extrakten aus biologischem Material noch eine gute Auftrennung der quaternären Ammoniumverbindungen gibt, da anorganische Ionen sehr rasch aus dem Trennbereich auswandern und nach unseren Erfahrungen etliche andere Verunreinigungen nur sehr langsam wandern oder am Start hängen bleiben.

Die sichersten Aussagen über die Zusammensetzung eines Substanzgemisches erhält man auch bei den quaternären Ammoniumverbindungen, ähnlich wie bei Aminosäuren und Aminen, durch eine zweidimensionale dünnschichtelektrophoretische und chromatographische Auftrennung auf einer quadratischen Dünnschichtplatte. Es ist dabei vorteilhaft, zuerst die elektrophoretische Auftrennung durchzu-

führen, um gleichzeitig Verunreinigungen abzutrennen und nach einer Zwischentrocknung der Platte in der zweiten Richtung mit einem geeigneten Laufmittel aufsteigend chromatographisch zu entwickeln (Fig. 1b und 2b). Die Dünnschichtelektrophorese stellt somit bei der Auftrennung von Gemischen quaternärer Ammoniumverbindungen eine wertvolle Ergänzung der Dünnschichtchromatographie dar.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Auftrennung aliphatischer, quaternärer Ammoniumverbindungen mit Hilfe der Dünnschichtelektrophorese beschrieben. Die besten Trennergebnisse erzielt man auf Kieselgelschichten mit einem Pyridinacetatpuffer pH 3.6 und auf Celluloseschichten mit einem Pyridinacetatpuffer pH 6.5. Besonders vorteilhaft erweist sich auch bei den quaternären Ammoniumverbindungen eine zweidimensionale dünnschichtelektrophoretische und chromatographische Auftrennung.

#### SUMMARY

Separation of aliphatic, quaternary ammonium compounds by thin-layer electrophoresis is described. Use of silica gel layers and pyridine acetate buffer pH 3.6 or cellulose layers and pyridine acetate buffer pH 6.5 is recommended. Two-dimensional separation by combination of thin-layer electrophoresis and chromatography has proved very useful.

#### LITERATUR

- 1 D. WALDI, *Naturwiss.*, 50 (1963) 614.
- 2 H. BAYZER, *Experientia*, 20 (1964) 233.
- 3 E. H. TAYLOR, *Lloydia*, 27 (1964) 96.
- 4 J. JUNG UND G. HENJES, *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.*, 106 (1964) 108.
- 5 P. ENEROTH UND G. LINDSTEDT, *Anal. Biochem.*, 10 (1965) 479.
- 6 G. SULLIVAN UND L. R. BRADY, *Lloydia*, 28 (1965) 68.
- 7 TH. WIELAND UND G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 257.
- 8 H. THIES UND F. W. REUTHER, *Naturwiss.*, 41 (1954) 230.

*J. Chromatog.*, 24 (1966) 372-375