

CHROM. 12,568

PERLOLINBESTIMMUNG IN GRÄSERN

J. SACHSE

Eidgenössische Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen Pflanzenbau, 8046 Zürich (Schweiz)

(Eingegangen am 23. November 1979)

SUMMARY

Determination of perloline in grass species

A method was developed for the determination of the alkaloid perloline which occurs in different pasture grasses and is toxic to cattle and sheep.

Perloline was extracted with ethanol and hydrochloric acid, either partially purified by partitioning between an alkaline aqueous solution and chloroform or purified and further separated by thin-layer chromatography (TLC) and measured fluorometrically. The recovery after TLC separation was $96 \pm 3\%$ when 250–2000 μg of the alkaloid were added to 5 g dried grass, poor in perloline.

The content of perloline was determined in cultivars of *Lolium perenne* L., *Lolium multiflorum* Lamk. and the hybrids between both species. The amounts found were in the range of 2 to 76 mg in 100 g dry matter. The deviation of the individual values from the mean was $\pm 3\%$ on the average.

EINLEITUNG

Das Alkaloid Perlolin, das in unterschiedlichem Ausmass in den Gräsern *Festuca arundinacea* Schreb., *Lolium temulentum* L., *Setaria lutescens* (Weigel) F. T. Hubb¹, *Lolium perenne* L.², *Lolium multiflorum* Lamk., *Dactylis glomerata* L. und *Phleum pratense* L.³ neben anderen Alkaloiden vorkommt, wirkt auf Rinder und Schafe toxisch (tetanische Krämpfe "Raygrass Staggers Syndrome", Hemmung der Zelluloseverdauung)^{4,5}. Dies kann eine Herabsetzung der tierischen Leistung und Herdenverluste zur Folge haben. Um einen Ueberblick über den Gehalt dieses Hauptalkaloids in den genannten Futtergräsern zu bekommen, ist eine Methode zur Bestimmung des Perlolins erforderlich.

Melville und Grimmett² schrieben 1941 über das Vorkommen von Perlolin in englischem Raygras auf Neuseeland. Ueber seine chemischen Eigenschaften, Struktur und Isolierung berichteten Reifer und Bathurst³, Jeffreys und Sim⁶, Jeffreys¹ sowie Bush und Jeffreys⁷. Zur quantitativen Erfassung des Perlolins liegen bereits einige Arbeiten vor^{7–9}. Die Methode nach Shaffer *et al.*¹⁰, die auf einer säulenchromatographischen Reinigung des Perlolins und einer fluorimetrischen Messung beruht, schien für unsere Probleme am geeignetsten, da sie empfindlicher und spezifischer als z.B. die kolorimetrische ist.

Die Erfahrungen bei der Bestimmung von Perlolin in Raygras, durch die eine Auswahl perlolinarmer Sorten ermöglicht und somit ein Beitrag zur Gesunderhaltung des genannten landwirtschaftlichen Viehbestandes geleistet wird, sollen hier mitgeteilt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

Als Untersuchungsmaterial dienten Grasproben aus dem ersten Aufwuchs eines Sortenversuchs, die an zwei verschiedenen Terminen geerntet wurden: englisches Raygras (*Lolium perenne* L.), italienisches Raygras (*Lolium multiflorum* Lamk.) und Hybriden aus beiden Arten.

Reagenzien

Aethanol 95%ig, denaturiert, Salzsäure etwa 1 *N*, Natronlauge 40%ig, Natriumkarbonat krist. rein, Chloroform rein, Salzsäure 37%ig p.a., Perloinhydrochlorid, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan p.a., Riboflavin für biochemische Zwecke Nr. 7609 (Merck, Darmstadt, B.R.D.), Phosphatpuffer pH 7, Kieselgel G Typ 60 für die Dünnschichtchromatographie (Merck), Säurefuchsin für die Mikroskopie (Merck 7629), *n*-Butanol p.a., Essigsäure 100%ig p.a.

Extraktion

2–5 g gefriergetrocknetes, fein gemahlene Gras mit 50 ml denaturiertem Aethanol, der mit gleichem Volumen 1 *N* Salzsäure verdünnt wurde, unter Rückfluss 30 min und ein zweites Mal mit 60 ml vom gleichen Lösungsmittel 20 min lang extrahieren. Den Rückstand jeweils abnutschen und mit wenig heissem Äthanol, verdünnt mit Wasser (1:1), nachwaschen. Die vereinten Extrakte am Rotationsverdampfer (Wasserbad 50°) so weit einengen, bis der Äthanol vollständig vertrieben ist. Den Rückstand mit heissem Wasser quantitativ in einen 250 ml Scheidetrichter spülen und mit konzentrierter Natronlauge auf pH 6 einstellen. Nach Zugabe von 2 g Natriumkarbonat krist. den Extrakt dreimal 2 min lang mit je 60 ml Chloroform im Halbdunkel ausschütteln. Die beiden Phasen durch Zentrifugieren trennen, die untere Chloroformphase in einem 250-ml Rundkolben auffangen, genau 0.5 ml Salzsäure 37%ig p.a. zugeben und am Rotationsverdampfer unter Lichtschutz eindampfen. Den Rückstand mit warmem Äthanol, verdünnt mit Wasser (1:1), in einen 50 ml Messkolben spülen und nach dem Erkalten bis zur Marke auffüllen. Diese Untersuchungslösung (= Lösung A) kann bis zur Messung einige Tage bei –20° aufbewahrt werden.

Fluorimetrische Messung

Gerät. Spektrofluorimeter Aminco Bowman, Xenonlampe, Photomultiplier 1 P 21; Ausgangsspalt am ersten Monochromator 2 mm, Eingangsspalt am zweiten Monochromator 2 mm; Anregungswellenlänge 450 nm, Emissionswellenlänge 511 nm, Fluoreszenzküvetten 1 cm.

Eichgerade. Die Ausgangslösung, 1 mg Perloinhydrochlorid* in 100 ml

* Das Perloinhydrochlorid wurde uns von Herrn Dr. J. A. D. Jeffreys, University of Strathclyde, Glasgow, Great Britain, grosszügig zur Verfügung gestellt, wofür wir bestens danken.

Äthanol-Wasser (1:1), nach Tabelle I verdünnen, so dass die Perlolinkonzentration im Bereich von 0.004 bis 0.2 $\mu\text{g/ml}$ zu liegen kommt, wobei zu beachten ist, dass vor dem Auffüllen des Messkolbens 10 Vol. % einer 0.05 M wässrigen Tris(hydroxymethyl)-aminomethanolösung (= Trispuffer) zugegeben sind. Als Blindprobe dient Äthanol-Wasser (1:1) mit 10 Vol. % Trispuffer.

TABELLE I
VERDÜNNUNGEN

Stammlösung	Verdünnung (= A)	Verdünnung aus A	Verdünnen mit
1 mg Perloin in 100 ml	1:50	1:1 bis 1:50	Äthanol-Wasser (1:1)
50 ml Probelösung	1:10 bis 1:25	1:10 bis 1:25	Äthanol-Wasser (1:1)
DC-Fleck mit 50 ml eluiert	1:5 bis 1:10		Äthanol-Wasser (1:1)
5 mg Riboflavin in 100 ml	2:25	1:25	Phosphatpuffer pH 7

Zur späteren Eichung des Fluorimeters statt Perloin Riboflavin bei gleicher Anregungs- und Emissionswellenlänge wie für Perloin verwenden. 5 mg Riboflavin für biochemische Zwecke in 100 ml Phosphatpuffer pH 7 unter Erwärmen, evtl. mit Ultraschall, lösen. Nach zwei weiteren Verdünnungen (s. Tabelle I) ergibt sich bei dem von uns benutzten Gerät eine relative Intensität von 4.6. Als Blindprobe dient die oben erwähnte Äthanol-Wasser-Trispuffer-Mischung. Das Fluorimeter vor dem Messen mit der Riboflavin-Lösung jeweils auf die entsprechende relative Intensität zur Erreichung konstanter Messbedingungen einstellen.

Messung der Probe. In einen 25-ml Messkolben 1 ml Untersuchungslösung A pipettieren, je nach Perlolinkonzentration nach Tabelle I verdünnen, kurz vor dem Messen 10 Vol. % Trispuffer zufügen und mit Äthanol-Wasser (1:1) auffüllen. Die Messung unter den aufgeführten Bedingungen durchführen.

Dünnschichtchromatographische Reinigung des Perlolins. 40 ml der Untersuchungslösung A am Rotationsverdampfer eindampfen, den Rückstand mit genau 5 ml Äthanol 95%ig aufnehmen (= Untersuchungslösung B). Für eine Dünnschichtplatte 20 × 20 cm 5.5 g Kieselgel G Typ 60 für die Dünnschichtchromatographie in 20 ml Lösungsmittel (18 ml Äthanol + 2 ml Wasser) suspendieren und ausgießen. Nach dem Trocknen an der Luft die Platte bei 130° 30 min aktivieren und bis zum Gebrauch im Exsiccator aufbewahren. Je nach der Perlolinkonzentration 100 bis 300 μl der Untersuchungslösung B als Band auftragen. Ausserdem 50 μl einer Lösung von 10 mg Säurefuchsin für die Mikroskopie in 25 ml Äthanol-Wasser (1:1) gelöst auf den Start als Leitsubstanz applizieren. Fließmittel: *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser 6:1:2 (9 modif.) ohne Kammersättigung. Platte über Nacht entwickeln (Laufzeit für eine Strecke von 18 cm mindestens 7 h). Das aufgetragene Säurefuchsin wird unvollständig in drei kräftige rote Hauptflecken (R_F 0; 0.06; 0.14) und einen obersten roten blassen Fleck (R_F 0.31) aufgetrennt. Zwischen letzterem und dem intensiv roten Fleck (R_F 0.14) liegt als gelbes Band das gesuchte Perloin (s. Fig. 1). Nach sorgfältigem Trocknen der Platten, den Perloinfleck abschaben und in einem Allihnschen Filterröhrchen D 4 mit heissem Äthanol-Wasser (1:1) eluieren. Das Eluat in einem 50 ml Messkolben auffangen, die Lösung evtl. zum Messen nach Tabelle I verdünnen und zuletzt mit 10 Vol. % Trispuffer versetzen. Die Messbedingungen bleiben dieselben wie für die Untersuchungslösung A.

TABELLE II
PERLOLINGEHALT IN RAYGRÄSERN

Sorte	Ernte 23. Mai 1978			Ernte 29. Mai 1978		
	mg Perlolini/100 g TS**		Abweichung* (\pm %)	mg Perlolini/100 g TS**		Abweichung* (\pm %)
	Einzelwerte	Mittelwert		Einzelwerte	Mittelwert	
<i>Englisches Raygras</i> Barvestra	19.6	19.1	2.4	22.7	22.1	2.6
	18.7			21.5		
	23.9			31.2	31.0	
Cropper			30.8			30.8
	78.1	75.1	3.5	68.6	67.2	2.1
Grimalda	72.6			65.8		
Gremie	25.4	25.7	1.6	25.1	25.1	0.2
	26.1			25.0		
Reveille	33.8	33.8	0	24.6	24.7	0.4
	33.8			24.8		
Melino	20.1	21.0	3.8	20.8	20.8	0.3
	21.8			20.9		
Pablo	3.3	3.0	9.5	8.1	8.2	0.2
	2.7			8.2		
Vigor	2.3	2.4	3.7	3.5	3.3	6.9
	2.4			3.0		

Englisches Raygras

Barvestra

Cropper

Grimalda

Gremie

Reveille

Melino

Pablo

Vigor

ERGEBNISSE

Die Extraktion des Perlolins aus gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial ist vollständiger als aus solchem, das bei 60° getrocknet wurde. Die extrahierten Perlolinmengen liessen sich ausserdem durch Kochen der gemahlten Gräser erhöhen im Vergleich mit denen, die durch Rühren bei Raumtemperatur gewonnen wurden¹⁰. Weiterhin konnte die Alkaloidausbeute durch Zugabe von Salzsäure zum Extraktionsmittel gesteigert werden, das auf einem besseren Aufschluss des Zellmaterials und des Alkaloids sowie auf seiner Stabilisierung beruhen könnte. Die erhöhte Menge an Begleitstoffen muss bei der Extraktion in der Siedehitze in Kauf genommen werden. Die Äthanolkonzentration von etwa 50%¹⁰ wurde beibehalten, da diese für die Perlolinextraktion ausreichend ist und weniger Begleitstoffe erfasst als Äthanol höherer Konzentration.

Bei den säulenchromatographischen Versuchen an Dowex MSC-1 nach Shaffer *et al.*¹⁰ mussten die Bedingungen wegen des höheren Extraktgehaltes geändert werden. Jedoch stellten wir bereits bei der Chromatographie des reinen Perlolins an Dowex MSC-1 fest, dass ein Teil irreversibel gebunden oder zerstört wird. Ausserdem störte das Quellen, Schrumpfen und das Sicherwärmen des Harzes durch die wechselnden Eluenten. Um den Verlust des nicht sehr stabilen Alkaloids zu umgehen, sahen wir von einer Säulenchromatographie ab. Der gewonnene Extrakt wurde vom Alkoholanteil durch Eindampfen im Vakuum befreit, alkalisiert und mit Chloroform mehrfach ausgeschüttelt. Durch den Zusatz von Salzsäure zum erhaltenen Chloroformextrakt wird die im alkalischen Milieu, besonders unter Lichteinfluss, instabile Perlolinbase wieder in die stabilere Salzform überführt. Nach dem Verdampfen des salzsauren Chloroforms wurde der Rückstand mit Äthanol-Wasser (1:1) aufgenommen und mit dem gleichen Lösungsmittel entsprechend verdünnt. Nach Zugabe von Trispuffer beträgt der pH der zu messenden Lösung 9. Die Konzentration des Äthanol und des Puffers sind in dieser Lösung konstant zu halten, da hiervon einmal die Dissoziaten des Puffers und des Alkaloids und somit die Intensität der Fluoreszenz abhängen¹⁰. Wird Perlolin aus einer wässrigen alkalischen Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt und seine Fluoreszenz direkt in letzterem gemessen, so liegen die Maxima der Anregungs- und Emissionsspektren bei 467 bzw. 522 nm. Die Intensität der Fluoreszenz dieser Lösung ist gegenüber der in sauerstoffhaltigen alkoholischen Lösungen erhöht. Da aber die Fluoreszenz des Perlolins in alkalischem Chloroform durch die Bestrahlung sehr rasch abnimmt, ist von der Messung in diesem Lösungsmittel abzuraten. In dem Äthanol-Wasser-Trispuffer-Gemisch nimmt die Fluoreszenz nach zwei Stunden 5% ab. Im Konzentrationsbereich von 0.004 bis 0.8 µg Perlolin/ml ergeben die gefundenen Werte graphisch dargestellt eine Gerade. Es empfiehlt sich aber, die Messung in stark verdünnten Lösungen vorzunehmen, weil bei höheren Konzentrationen durch innere Absorption eine teilweise Fluoreszenzlösung eintreten kann.

Zur wiederholten Eichung des Fluorimeters wurde das nicht käufliche Perlolin durch Riboflavin, in Phosphatpuffer gelöst, ersetzt. Da die Maxima seines Anregungs- und Emissionsspektrums sehr nahe bei denen des Perlolins, nämlich bei 464 und 520 nm, liegen, ist diese Substanz besonders für diesen Zweck geeignet. Die Konzentration wurde so gewählt, dass die erzielte relative Intensität in der Mitte der benutzten Eichgeraden liegt.

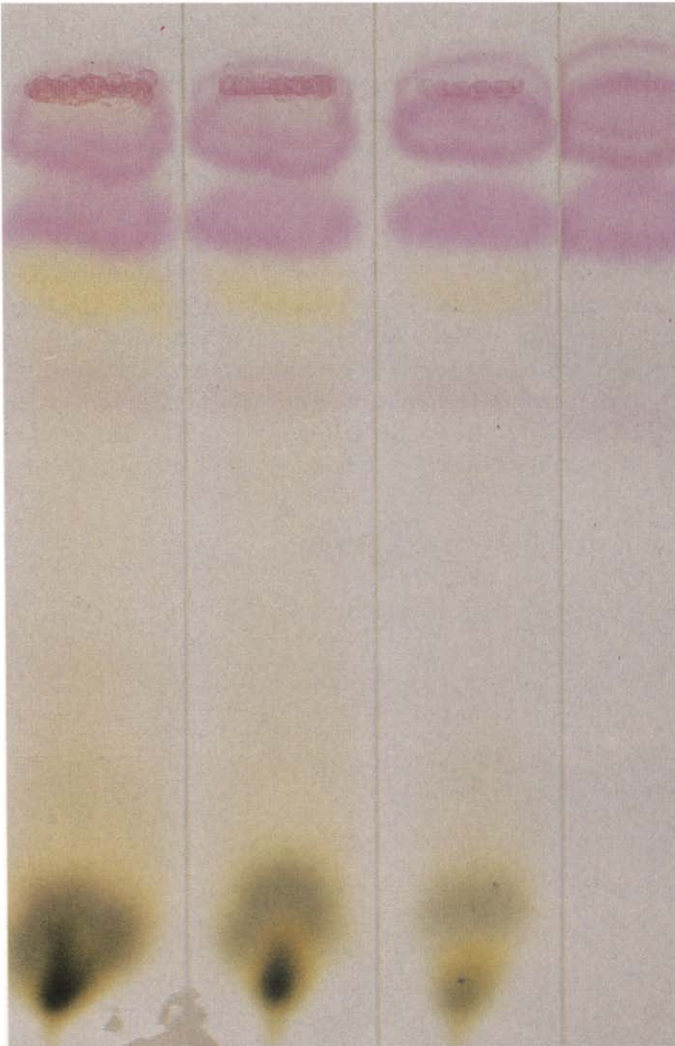


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm eines *Lolium*-Extraktes auf Kieselgel. Fließmittel: *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (6:1:2), Laufzeit 15 h. Linke Bahn = Blindprobe; gelber Fleck zwischen den roten Säurefuchsinflecken = Perlorin.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde geprüft, ob die direkte Messung des Perlorins nach dem Ausschütteln mit Chloroform durch Begleitstoffe zu hohe Werte liefert. Perlorin ist auf der Dünnschichtplatte bei Tageslicht als gelber, im UV-Licht als schmutziggelber Fleck (R_F 0.23) sichtbar. Der R_F -Wert des Perlorins ist umso höher je mehr Begleitstoffe auf der Platte mitlaufen. Als Alkaloidreagenzien eignen sich Kaliumjodoplatinat¹¹, mit dem Perlorin bräunlichgrün angefärbt wird, und Dragendorff-Reagenz¹², das einen orangefarbenen Fleck hervorruft. Proben mit geringem Perloringehalt ergeben ohne Besprühen trotz der Auftragsmenge von 300 μ l schwer erkennbare Flecken. Es wurde deshalb Säurefuchsin als Leitsubstanz verwendet. Der Perlorinfleck kommt unter den aufgeführten Bedingungen auf eine farb-

stofffreie Fläche zwischen die oberen zwei Säurefuchsinflecken zu liegen (s. Fig. 1). Sollte die Trennung vom Säurefuchsin nicht scharf sein, so kann ohne Bedenken ein Teil des roten Farbfleckes mit abgeschabt werden, da er die Fluoreszenz in keiner Weise beeinflusst. Die Blindprobe, die sich aus einem entsprechenden Fleck (auf dem Start wurde keine Probe, wohl aber das Säurefuchsin aufgetragen) ergibt, unterscheidet sich in ihrer Fluoreszenz von einer reinen Äthanol-Wasser-Trispuffer-Lösung sehr gering.

Tabelle II zeigt den Perlolingehalt einiger Sorten von englischem und italienischem Raygras sowie von Hybriden aus beiden Arten. Bei Sorten mit wenig Perlolin konnte beim zweiten Erntetermin ein Anstieg des Gehaltes, bei solchen mit hohem Alkaloidvorkommen eine Abnahme festgestellt werden. Auffallend viel Perlolin weisen die beiden Hybridgräser Sabel und Sabrina sowie das englische Raygras Grimalda auf. Die prozentuale Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert schwankt für den ersten Erntetermin von 0 bis $\pm 9.5\%$ und beträgt durchschnittlich $\pm 4\%$. Für den zweiten Erntetermin liegen die Schwankungen zwischen ± 0.2 und $\pm 6.9\%$ und der Durchschnitt bei $\pm 2\%$.

TABELLE III

PERLOLINGEHALT IN *PHLEUM PRATENSE* L. NACH ZUGABE VERSCHIEDENER ALKALOIDMENGEN

Perlolinzugabe [§] ($\mu\text{g}/5\text{ g Probe}$)	Gefundene (μg)		% Abweichung von der zugesetzten Menge	Gefundene ($\mu\text{g nach DC}^{***}$)		% Abweichung von der zugesetzten Menge
	Einzelwerte*	Mittelwert		Einzelwerte**	Mittelwert	
250	275	268	+ 7	237	241	-4
				242		
	262			242		
500	552	552	+10	495	483	-3
				479		
	552			472		
1000	1190	1115	+12	957	930	-6
				957		
	1040			927		
2000	1910	1955	- 2	880	2005	0
				2012		
	2000			1987		
				2032		
				1987		

* Die Einzelwerte ergeben sich aus Doppelbestimmungen.

** Jeder Einzelwert entspricht einem DC-Fleck, je zwei Werte beziehen sich auf den gleichen Extrakt wie in Rubrik 2.

*** DC = Dünnschichtchromatographie.

§ Berechnet als Perlolinhydrochlorid.

Extrakte einiger Raygrassorten wurden noch der Dünnschichtchromatographie zur Reinigung des enthaltenen Perlolins unterworfen. Die anschliessenden Messungen ergaben, dass die gefundenen Werte innerhalb des Fehlerbereiches gut mit denen, die ohne vorherige Isolierung des Perlolins ermittelt wurden, übereinstimmen. Für eine Sortenauswahl dürfte daher die direkte Messung ohne Dünnschichtchromatographie ausreichend sein. Exakte Untersuchungen erfordern allerdings eine chromatographische Reinigung des Perlolins, da störende Einflüsse auf die Fluoreszenz durch fremde Substanzen aus komplexem Pflanzenmaterial nicht von vornherein auszuschliessen sind. Zur Demonstration dieses Problems wurde ein anderes perlolinarmes Gras (*Phleum pratense* L.) extrahiert. Die Extrakte besaßen eine Fluoreszenz, die Werte von 60 µg bzw. 13 µg/5 g Trockensubstanz nach der chromatographischen Reinigung lieferten (berechnet als Perlolinhydrochlorid). Nach Zusatz von 250, 500, 1000 und 2000 µg Perlolinhydrochlorid zu 5 g Probe wurden ohne chromatographische Isolierung des Alkaloids abzüglich der obigen 60 µg maximal 12% mehr Perlolin als die zugegebene Menge ermittelt (s. Tabelle III). Durch die dünnschichtchromatographische Abtrennung der störenden Begleitstoffe vom Perlonin kommt die Wiederfindungsrate der zugesetzten Perlolinmenge zwischen 93 und 100% zu liegen.

ZUSAMMENFASSUNG

Für die Bestimmung des Alkaloids Perlolin, das in verschiedenen Gräsern vorkommt und eine toxische Wirkung auf Rind und Schaf ausüben kann, wurde eine Methode ausgearbeitet. Sie beruht auf einer salzsauren, äthanolischen Extraktion des Pflanzenmaterials, der Reinigung des Perlolins einmal durch Ausschütteln allein und zum anderen durch Ausschütteln und zusätzlicher Dünnschichtchromatographie sowie einer fluorimetrischen Messung des Alkaloids. Die wiedergefundene Perlolinmenge beträgt nach Zusatz von 250 bis 2000 µg Alkaloid zu 5 g perlolinarmen Gras und der dünnschichtchromatographischen Reinigung $96 \pm 3\%$.

Perlolinvorkommen in *Lolium perenne* L., *Lolium multiflorum* Lamk. und in Hybriden beider Arten werden mitgeteilt, die zwischen 2 und 76 mg pro 100 g Trockensubstanz liegen. Die Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert beläuft sich im Durchschnitt auf $\pm 3\%$.

LITERATUR

- 1 J. A. D. Jeffreys, *J. Chem. Soc. (London)*, (1964) 4504.
- 2 J. Melville und R. E. R. Grimmett, *Nature (London)*, 148 (1941) 782.
- 3 I. Reifer und N. O. Bathurst, *N. Z. J. Sci. Technol., Sect. B*, 24 (1942) 155.
- 4 A. J. Aasen, C. C. J. Culvenor, E. P. Finnie, A. W. Kellock und L. W. Smith, *Aust. J. Agr. Res.*, 20 (1969) 71.
- 5 L. P. Bush, H. Burton und J. A. Boling, *J. Agr. Food. Chem.*, 24 (1976) 869.
- 6 J. A. D. Jeffreys und G. A. Sim, *Proc. Chem. Soc. London*, (1963) 171.
- 7 L. P. Bush und J. A. D. Jeffreys, *J. Chromatogr.*, 111 (1975) 165.
- 8 N. O. Bathurst, I. Reifer und E. M. Clare, *N. Z. J. Sci. Technol., Sect. B*, 24 (1942) 161.
- 9 C. E. Gentry, R. A. Chapman, L. Henson und R. C. Buckner, *Agron. J.*, 61 (1969) 313.
- 10 S. R. Shaffer, M. Williams, B. J. Harmon, E. E. Pickett und G. B. Garner, *J. Agr. Food Chem.*, 23 (1975) 346.
- 11 E. Stahl, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, S. 837, Nr. 141.
- 12 E. Stahl, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, S. 829, Nr. 90.