

Zur Gewinnung von reinem Lecithin und Colaminkephalin mittels Dünnschicht-Chromatographie

Von

Karl H. Slotta

Department of Biochemistry, University of Miami, School of Medicine,
Miami (Fla.), U.S.A.

(Eingegangen am 16. September 1966)

Es wird eine einfache und schnelle Methode für die Gewinnung von kleinen Mengen Lecithin und Colaminkephalin aus Eigelb, Gehirn und Mitochondrien sowie aus käuflichem Rinderherz-Lecithin beschrieben. Die Phospholipide werden durch präparative Dünnschicht-Chromatographie an Silicagel-G-Platten mittels verschiedener Mischungen von CHCl_3 , CH_3OH und Wasser getrennt. Zum Nachweis ihrer Reinheit werden die molaren Verhältnisse von Glycerin, Ester, Vinyläther, Cholin- oder Aminorest zu Phosphor bestimmt. Um die nötigen fünf Bestimmungen für jedes isolierte Phospholipoid mit ungefähr 0,5 mg Substanz durchzuführen, wurden besondere mikroanalytische Verfahren entwickelt. Colaminkephalin und Lecithin aus Eigelb und Mitochondrien enthalten nur Diesterphospholipide, während Colaminkephalin aus Rattenhirn und Lecithin aus Rinderherz zur Hälfte aus Plasmalogen bestehen.

A simple and fast method is described for the preparation of small quantities of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine from egg yolk, brain, mitochondria, and commercial beefheart lecithin. The phospholipids were separated by preparative thin layer chromatography on silicagel G plates with different mixtures of CHCl_3 , CH_3OH and water. As proof of their purity the molar ratios of glycerol, ester, vinyl ether, choline or amino group, respectively, to phosphorus were determined. Special microanalytical techniques were developed to carry out the five necessary determinations for each case with only about 0.5 mg of substance. Phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine from egg yolk and mitochondria are diesterphospholipids, whereas phosphatidylethanolamine from rat brain and phosphatidylcholine from beefheart consist to about one half of plasmalogen.

Für Arbeiten über Thromboplastin^{1, 2}, über Kationentransport durch Membranen³, als Substrate für Phosphatidasen und für andere biochemische Probleme sind häufig reine, einheitliche Phospholipide nötig. Leider sind diese aber nicht sehr haltbar, selbst wenn sie bei tiefen Temperaturen und im hohen Vakuum aufbewahrt werden⁴. Das gilt besonders für Phospholipide⁴ mit Vinyläther- oder ungesättigten Seitenketten, wie wir das am Dioleoyl-colaminkephalin feststellten⁵. Die Isolierung der Phosphatide aus den natürlichen Mischungen kurz vor ihrem Gebrauch ist daher vorzuziehen. Obgleich dafür zahlreiche Methoden bekannt sind⁶, so sind sie meist sehr zeitraubend; sie geben oft keine reinen Substanzen. Während unserer Arbeit an den Phospholipiden aus den Mitochondrien von Rattenlebern⁷ fanden wir, daß reines Lecithin und Colaminkephalin leicht und schnell in Mikromol-Mengen mittels Dünnschicht-Chromatographie hergestellt werden kann. Später stellten wir sie auch aus Eigelb, Rattenhirn und Rinderherz her, worüber berichtet werden soll.

Obgleich die Anwendung der Dünnschicht-Chromatographie für präparative Zwecke mehrfach beschrieben worden ist, fanden wir, daß verschiedene Punkte bei Phospholipoid-Trennungen besonders genau beachtet werden müssen, um reine Produkte in genügender Ausbeute zu erhalten. Die getrennten Phospholipide müssen als vollständig horizontale, gerade Bänder wandern, das heißt, daß die Kammern bei konstanter Temperatur gehalten und keinem Luftzug ausgesetzt werden, und daß die Platten auf ebenem Boden stehen.

In Glaskammern mit gewölbtem Boden müssen Glasplatten eingelegt werden, auf welche die Silicagelplatten zu stehen kommen. Es ist auch wesentlich, daß die Platten vollkommen vertikal und parallel zu den Wänden der Kammern stehen. Ist das nicht der Fall, so ist die Atmosphäre an der einen Seite der Kammer mehr gesättigt, die Phospholipide wandern dort schneller, und die Bänder sind geneigt und nicht horizontal. Das Auftragen der Ausgangslösung muß sehr sorgfältig geschehen, um die Silicagelschicht nicht zu beschädigen. Zwar ließe sich jede Verletzung der Schicht nach dem Versuch durch Anfärben feststellen; da wir aber die

¹ K. H. Slotta, *Proceed. Soc. Exper. Biol. Med.* **103**, 53 (1960).

² E. Hecht und K. H. Slotta, *Amer. J. Clin. Path.* **37**, 126 (1962).

³ A. K. Solomon, F. Lionetti und P. F. Curran, *Nature* **178**, 582 (1956); R. Katzman und C. E. Wilson, *J. Neurochem.* **7**, 113 (1961); D. W. Wooley und N. K. Campbell, *Biochim. Biophys. Acta* [Amsterdam] **57**, 384 (1962).

⁴ L. Rathbone und P. M. Maroney, *Nature* **200**, 887 (1963).

⁵ K. H. Slotta und E. Deutsch, *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **4**, 283 (1960).

⁶ J. Folch, *J. Biol. Chem.* **146**, 35 (1942); D. G. Therriault, Th. Nichols und H. Jensen, *J. Biol. Chem.* **233**, 1061 (1958); D. J. Hanahan, J. C. Dittmer und E. Warashina, *J. Biol. Chem.* **228**, 685 (1957); G. Rouser, J. O'Brien und D. Heller, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **38**, 14 (1961).

⁷ K. H. Slotta, *J. Gerontol.* **18**, 326 (1963).

Bänder nicht färben, sondern abschaben, sind solche technischen Fehler nur am Ende bei der Analyse und Ausbeutebestimmung festzustellen. Weiterhin ist die Menge der aufgetragenen Mischung außerordentlich wichtig. Für Standardplatten von 20×20 cm mit einer 0,25 mm Silicagelschicht sind Phospholipoid-Mengen von 5 mg, d. h. 200 μg P angebracht. Bei Überladen tritt Schwanzbildung ein. Die Lage der Phospholipoid-Bänder kann durch Besprühen der getrockneten Platten mit Wasser sichtbar gemacht werden, da das mit Lipiden überzogene Silicagel weniger leicht angefeuchtet wird als der Rest der Platte. Wir bevorzugten aber das Anfärben eines schmalen Streifens an jeder Seite, wozu Joddampf, Ninhydrin, Rhodamin oder andere Reagentien benutzt werden können.

Am besten hat sich aber das Besprühen mit Molybdänreagens⁸ bewährt. Das Entfernen der Phospholipoid-haltigen Silicagelbanden geschieht am besten manuell mit dem Plastikspatel, ohne Benutzung eines Saugapparates. Die Phospholipide lassen sich ganz leicht aus dem Silicagel herauswaschen, wenn dazu eine polarere $\text{CHCl}_3\text{—CH}_3\text{OH—H}_2\text{O}$ -Mischung als die für die Chromatographie benutzte angewandt wird. Wenn die Lösungsmittelmischung, wie angegeben, genügend Wasser enthält, so besteht auch keine Gefahr, daß Silicagelteilchen die Sinterplatte passieren und in die Phospholipoid-Lösung gelangen. Während der Extraktion und Chromatographie befinden sich die Phospholipide in CHCl_3 -haltigen Mischungen, ohne daß sie während dieser kurzen Zeit nachweisbar leiden. Nach der Isolierung ist es besser, sie nicht in CHCl_3 aufzuheben. Colaminkephalin aus Gehirn, das in Chloroform unter Stickstoff im Eisschrank 24 Stdn. aufgehoben worden war, zeigte bei neuerlicher Dünnschicht-Chromatographie schon die Anwesenheit von Spaltungsprodukten. Colaminkephalin hält sich viel besser in Hexan, Lecithin in absolutem Alkohol.

Tab. 1 gibt die Mengen Phospholipoid-Phosphor an, die wir durchschnittlich aus *einem* Eigelb, *einer* Rattenleber und *einem* Rattenhirn erhielten, und weiterhin die Ausbeuten an Lecithin und Colaminkephalin, die wir bei Chromatographie von 25 mg Phospholipoid-Mischung auf fünf Standardplatten erhielten. Es zeigt sich, daß die Herstellung von Lecithin und Colaminkephalin aus Eigelb und die von Colaminkephalin aus Gehirn auf diesem Wege sehr einfach ist und fast quantitative Ausbeuten ergibt. Trotz aller Bemühungen war aber die präparative Darstellung von Lecithin und Serinkephalin aus Gehirn durch eindimensionale Chromatographie nicht möglich. Die Mengen von Lecithin und Colaminkephalin aus Eigelb⁹, Rattenhirn¹⁰ und aus Mitochondrien von Ratten-

⁸ J. C. Dittmer und R. L. Lester, J. Lipid Res. 5, 126 (1964).

⁹ D. N. Rhodes und C. H. Lea, Biochem. J. 65, 526 (1957).

¹⁰ H. Wagner, J. Hölzl, Ae. Lissau und L. Hörhammer, Biochem. Z. 339, 34 (1963).

Tabelle 1. Ausbeute an Phospholipoid-Phosphor bei der Extraktion verschiedener Rohmaterialien

Rohmaterial	1 Hühner-Eigelb	1 Rattenleber	1 Rattenhirn
Gewicht	20 g	5 g	1,8 g
Trockenes Pulver	3 g	150 mg Mitochondrien	300 mg
Phosphor	60 mg	1,3 mg	2,6 mg

Ausbeute an Colamin-kephalin (*C*) und an Lecithin (*L*) bei der Chromatographie von 25 mg Phospholipoidmischung (= 1 mg P) von

	Eigelb	Mitochondrien	Gehirn	Rinderherz-Lecithin
	mg	mg	mg	mg
<i>C</i>	3,1 (82%)	6,0 (72%)	5,8 (97%)	—
<i>C</i>	3,8	8,3	6,0	—
<i>L</i>	15,8 (88%)	7,3 (70%)	—	16,5 (66%)
<i>L</i>	18,0	10,5	—	25,0

lebern⁷ sind früher von anderen und uns sehr genau bestimmt worden. Die prozentualen Ausbeuten in Tab. 1 sind mit Hilfe dieser in der Literatur angegebenen Zahlen errechnet. Wir haben vorläufig von Versuchen Abstand genommen, auf Platten mit dickeren Silicagelschichten¹¹ oder auf längeren Glasplatten in größeren, nichtrostenden Stahlkammern¹² größere Mengen der Phospholipide zu gewinnen, weil für viele biologische Versuche nur Mikromengen gebraucht werden.

Die Menge und Reinheit der so erhaltenen Produkte kann neben der Chromatographie am besten durch eine vollständige Analyse überprüft werden. So bewährt sich die Bestimmung der molaren Verhältnisse von Glycerin, Cholin, Amino-, Ester- und Vinyläthergruppen zu Phosphor. Obgleich für diese Analysen viele Methoden beschrieben sind, fanden wir nur wenige empfindlich und genau genug, um alle nötigen Bestimmungen für jedes der hergestellten Phospholipoid-Präparate schnell mit ungefähr 0,5 mg Substanz auszuführen. Da alle weiteren Bestimmungen im Verhältnis zum Phosphorgehalt ausgewertet werden, ist eine sehr genaue Phosphorbestimmung unerlässlich. Es ergab sich, daß die Reduktion des Phosphormolybdän-Komplexes am besten mit „Elon“¹³ (photographi-

¹¹ V. P. Skipski, R. F. Peterson und M. Barklay, Biochem. J. **90**, 374 (1964).

¹² H. Halpaap, Chem. Ing. Tech. **35**, 488 (1963).

¹³ W. D. Harris und P. Popat, J. Amer. Oil Chem. Soc. **31**, 124 (1954).

scher Entwickler von Eastman-Kodak mit N-Methyl-p-aminophenol-sulfat als Reduktionsmittel) ausgeführt wird. Die Beständigkeit der Farbe ist dabei größer, als wenn SnCl_2 , Ascorbinsäure und andere Reduktionsmittel benutzt werden, und die Ergebnisse sind noch mit 3—6 μg Phosphor unbedingt zuverlässig. Für die *Glycerinbestimmung*¹⁴ ist es nötig, die Phospholipide 48 Stdn. mit 2*n*-HCl zu hydrolysieren. Mit schnelleren Methoden hatten wir keinen Erfolg. Die Hydrolyse im konstant siedenden Methoxyäthanol-Bad auszuführen, erwies sich als praktisch. Die außergewöhnlich empfindliche Reaktion mit Chromotropsäure ermöglicht die

Tabelle 2. Analysen des Colaminkephalins (*C*) und Lecithins (*L*) von Eigelb (*E*), Mitochondrien (*M*), Gehirn (*G*) und Herz (*H*)

μ	μMol	O. D.	μMol	Molares Verhältnis
			Glycerin	Glycerin/P
<i>C E</i>	0,013	0,160	0,013	1,0
<i>C E</i>	0,016	0,192	0,016	1,0
<i>C M</i>	0,01	0,152	0,01	1,0
<i>L M</i>	0,015	0,182	0,015	1,0
<i>L G</i>	0,01	0,153	0,01	1,0
<i>L H</i>	0,016	0,195	0,016	1,0
			NH_2	NH_2/P
<i>C E</i>	0,03	0,250	0,03	1,0
<i>C M</i>	0,04	0,312	0,04	1,0
<i>C G</i>	0,045	0,350	0,045	1,0
			Cholin	Cholin/P
<i>L E</i>	0,011	0,148	0,011	1,0
<i>L M</i>	0,014	0,187	0,014	1,0
<i>L H</i>	0,013	0,188	0,014	1,1
			Ester	Ester/P
<i>C E</i>	0,06	0,060	0,12	2,0
<i>L E</i>	0,12	0,120	0,24	2,0
<i>C M</i>	0,39	0,621	0,78	2,0
<i>L M</i>	0,45	0,710	0,89	2,0
<i>C G</i>	0,23	0,170	0,34	1,5
<i>L H</i>	0,51	0,370	0,74	1,5
		O. D.	Vinyläther	Vinyläther/P
<i>C E</i>			0	
<i>L E</i>			0	
<i>C M</i>			0	
<i>L M</i>			0	
<i>C G</i>	0,023	0,170	0,012	0,5
<i>L H</i>	0,038	0,325	0,021	0,5

¹⁴ O. Renkonen, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] 56, 367 (1962).

genaue Bestimmung von Hundertstel Mikromol Glycerin. Ebenso geringe Mengen von *Cholin* können durch die Komplexbildung mit Jod¹⁵, von *Amino-Gruppen* im nicht-hydrolysierten Phospholipoid-Molekül mit Ninhydrin¹⁶ und von *Vinyläther-Gruppen* mittels Jod in wäßrig-methanol. Lösung¹⁷ quantitativ erfaßt werden. Die Cholinbestimmung wurde in der *Beckmanschen* Mikrozentrifuge vorgenommen; sie kann aber natürlich mit etwas größeren Mengen in anderen Zentrifugen ausgeführt werden. Für die genaue Bestimmung der *Ester-Gruppen*¹⁸ sind etwas größere Mengen von Ausgangsmaterial nötig.

Tab. 2 enthält die Analysenwerte, die wir mit den angegebenen Methoden für das mittels Dünnschicht-Chromatographie hergestellte Lecithin und Colaminkephalin erhielten. Die Analysen von Lecithin und Colaminkephalin aus Eigelb und Mitochondrien zeigen, daß diese Substanzen kein Plasmalogen enthalten, was früheren Angaben widerspricht, wonach kleine Mengen von Plasmalogen in den Eigelb-Phospholipoiden gefunden wurden⁹. Allerdings wurden diese Bestimmungen mittels der *Schiff'schen* Reaktion gemacht, die leicht zu hohe Werte ergibt¹⁹.

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung des National Institute of Health in Bethesda, Maryland (USA), durchgeführt. — Der Autor dankt Frl. *D. R. Gimenez* und Frau *H. Collazo* für ausgezeichnete technische Hilfe.

Experimenteller Teil

Gewinnung der Roheextrakte

Von einem Hühnereigelb wurde durch viermalige Extraktion mit je 50 ml Aceton 3 g eines weißem Pulvers mit 60 mg Phospholipoid-Phosphor erhalten. Die Leber einer Ratte wurde in 0,25 *m*-Zuckerlösung homogenisiert und die *Mitochondrien* von Zellspaltstücken, Zellkernen und überstehender Lösung durch stufenweises Zentrifugieren in einer gekühlten Zentrifuge getrennt²⁰. Die Mitochondrien-haltige Fraktion wurde 4mal in Zuckerlösung und 2mal in physiol. Kochsalzlösung suspendiert und mit 10000 \times *g* zentrifugiert. Die gefriergetrockneten Mitochondrien wogen 150 mg und enthielten 1,3 mg Phosphor. Das *Gehirn* einer Ratte wurde unter Zusatz von 2 ml Wasser in einem „Omnimixer“ oder ähnlichem Apparat zu einem feinen Brei vermahlen. Das gefriergetrocknete Pulver enthielt 2,6 mg Phospholipoid-Phosphor.

¹⁵ *H. D. Appleton, B. N. La Du Jr., B. B. Lovy, J. M. Steele* und *B. B. Brodie*, *J. Biol. Chem.* **205**, 803 (1962).

¹⁶ *C. L. Lea* und *D. N. Rhodes*, *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 416 (1955).

¹⁷ *G. Camejo, M. M. Rapport* und *G. A. Morrill*, *J. Lipid Res.* **5**, 75 (1964).

¹⁸ *F. Snyder* und *N. Stephens*, *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 244 (1959); *O. Renkonen*, *l. c.* **54**, 361 (1961).

¹⁹ *M. M. Rapport* und *W. T. Norton*, *Annu. Rev. Biochem.* **31**, 133 (1962).

²⁰ *R. Duncan Dallam*, *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 395 (1958).

150—500 mg der trockenen Pulver wurden in einem Semi-Mikroextraktor²¹ mit 10 ml CHCl_3 — CH_3OH (2:1) 30 Min. unter N_2 extrahiert, auf 5 ml eingengt, der Phosphorgehalt der Lösung bestimmt und ohne weitere Reinigung auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.

Präparative Dünnschicht-Chromatographie

350 ml CHCl_3 — CH_3OH — H_2O (65:25:4)²² bzw. für Lecithin (70:30:5) wurden in die mit weißem Löschpapier ausgeschlagenen Kammern gegeben, die fest verschlossen wurden. Am nächsten Morgen wurden Extraktmengen, die 0,2 mg P enthielten, auf die 18 cm lange Startlinie von jeder der 5 bis 10 Silicagel-Platten mit einer 0,2 ml „Microsyringe“ (Roger Gilmont Instr., Great Nock, N. Y.) oder einer Pipette mit Fortuna-Mikrovorschub²³ aufgetragen. Wenn an der Pipette ein ungefähr 20 cm langer Polyäthylenschlauch von 2—3 mm innerem Durchmesser befestigt ist, so gelingt es, vollkommen gerade, sehr feine Striche zu erzielen. Die Platten werden in die Kammern so gestellt, daß sie genau senkrecht und parallel zu den Wänden stehen, was durch aufgesetzte W-förmige Stahlklammern gewährleistet ist. Wenn nach 45 Min. das Lösungsmittel 15 cm hoch gestiegen ist, werden die Platten getrocknet, ein 1,5 cm breiter Streifen an beiden Seiten mit der Molybdänlösung¹⁷ angefärbt, und die entsprechenden ungefärbten Bänder, die das Colaminkephalin ($R_f = \text{ca. } 0,70$) und Lecithin ($R_f = \text{ca. } 0,30$) enthalten, abgeschabt. Das Silicagel von bis zu zehn Platten wird in zwei 1×30 cm Chromatographieeröhre mit Glasfrittenboden gegeben und die Phospholipide mit CHCl_3 — CH_3OH — H_2O (30:50:20) unter leichtem Stickstoffdruck herausgewaschen. Der gesamte Phospholipoid-Gehalt befindet sich meistens schon in den ersten 10 ml Lösung und wird nach vollständigem Abdestillieren des Lösungsmittels im Vak. in 1 ml Hexan (Colaminkephalin) bzw. in 1 ml absol. Alkohol (Lecithin) gelöst.

Analytische Methoden

Phosphor-Bestimmung¹³

Lösungen mit 3—10 μg (0,1—0,2 Mikroäquivalent Phosphor) werden in 10×75 mm Reagensgläsern, die mit einer Markierung für 2 ml versehen sind, verdampft. Nach Hinzufügen von 0,1 ml einer Mischung von 5 Teilen 70proz. HClO_4 und 1 Teil konz. HNO_3 wird der Rückstand 5 Min. in einem ca. 250° heißen Sandbad (Silicagel in Becherglas auf Heizplatte) erhitzt; dabei werden die Gläsern mit einem Glasnagel von 5 mm Länge verschlossen, dessen Kopf als lose schließender Stopfen wie ein primitives Sicherheitsventil wirkt. 0,1 ml 5proz. Ammoniummolybdat und 0,2 ml „Elon“-Lösung (0,5 g p-Methylaminophenolsulfat + 12,5 g Natriumbisulfat + 2,4 g Natriummetasulfat in 100 ml Wasser) wird zugegeben. Verschiedene Proben einer Standardlösung (218,6 mg Monokaliumphosphat in 500 ml Wasser; 10 μl dieses Standards enthalten 1 $\mu\text{g} = 0,032$ Mikroäquivalent P) und Lösungen, die nur die Reagentien enthalten, werden in 1,2 ml Küvetten gebracht und die O. D. bei 820 m μ im Beckman Spectrophotometer gemessen.

²¹ W. G. Batt und H. K. Alber, Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. **13**, 127 (1941).

²² H. L. Wagner, L. Hörhammer und P. Wolff, Biochem. Z. **334**, 175 (1961).

²³ E. Habermann, G. Bandtlow und B. Krusche, Klin. Wochschr. **39**, 846 (1961).

Hydrolyse für die Bestimmung von Glycerin und Cholin

Proben mit 0,3 Mikroäquivalent P werden in die 10×75 mm Gläschen pipettiert, das Lösungsmittel vorsichtig verdampft, und die Rückstände in 0,25 ml 2*n*-HCl gelöst. Die zugeschmolzenen Gläschen werden 48 Stdn. in einem Ofen von 125° oder in einem unter Rückfluß siedenden Bad von 2-Methoxy-äthanol (= Methylcellosolve) belassen. Nach Öffnen werden die bräunlichen Teilchen durch 3malige Extraktion mit 0,5 ml Ligroin (30—60°) aus der Lösung entfernt. Nach Schütteln und Zentrifugieren läßt sich die obere Schicht mit einer Tropfpipette leicht entfernen. Die wäßrigen Lösungen werden im Vakuumexsikkator über festem NaOH verdampft und die Rückstände in 100 μ l Wasser aufgenommen. Verzichtet man auf die Bestimmung des Glycerins, so hydrolysiert man mit 0,1 ml 6*n*-HCl im Ofen bei 100—120° und behandelt das Hydrolysat wie oben.

*Glycerin-Bestimmung*¹⁴

10 μ l 0,1*m*-H₂O₄ werden zu 10 μ l des Hydrolysates in besonders langen (10 \times 150 mm) Gläschen gegeben, die mit einer Markierung für 2 ml versehen sind. Nach genau 15 Min. werden 20 μ l einer frisch bereiteten 10proz. Natriumbisulfidlösung und nach weiteren 20 Min. 1 ml 0,2proz. Chromotropsäure in 50proz. (Gew.) H₂SO₄ zugegeben. Die Gläschen werden geschüttelt und dann genau 30 Min. lang in einem siedenden Wasserbad, lichtgeschützt, erhitzt. Lösungen, die nur die Reagentien enthalten, und Standards (315,15 mg Dinatriumsalz der Glycerophosphorsäure in 100 ml Wasser; 100 μ l enthalten 0,1 μ Mol Glycerin) werden ebenso behandelt. Nach schnellem Abkühlen auf Zimmertemp. wird die O. D. bei 520 $m\mu$ im Beckman Spectrophotometer abgelesen.

*Cholin-Bestimmung*¹⁵

Zu 10 μ l des Hydrolysates (s. oben) und 150 μ l Wasser in einem Polyäthylen-Mikrozentrifugenröhrchen der „Beckman Spineo 152 Microfuge“ werden 50 μ l Jodlösung (2 g KJ in 10 ml Wasser + 1,57 g J₂, bei 4° aufbewahrt) hinzugefügt. Das geschlossene Röhrchen wird gequirlt, 20 Min. in einem Eisbad gelassen und dann im Kühlraum oder im Eisschrank zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird entfernt und das Kügelchen des Cholinperjodid-Komplexes in genau 2 ml Äthylenchlorid aufgelöst. (Es ist wichtig, nur Äthylenchlorid zu benutzen, das mit Bromthymolblau-Lösung eine blaugrüne Farbe ergibt; wenn es Spuren von Säure enthält, so muß man es mit K₂CO₃-Lösung waschen, mit CaCl₂ trocknen und filtrieren.) Lösungen, die nur die Reagentien und Standard enthalten, werden in derselben Weise behandelt (10 mg trockenes, salzsaures Cholin, das aus *n*-Butanol umgelöst worden war, in 100 ml Wasser; 10 μ l enthalten 0,0071 μ Mol Cholin). Die O. D. wird bei 365 $m\mu$ abgelesen.

*Aminogruppen-Bestimmung*¹⁶

Proben, die 0,02—0,06 Mikroäquivalent P enthielten, wurden in 10×75 mm Gläschen mit einer 2 ml-Markierung pipettiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird 1 ml frisch hergestellte Reagenslösung zugegeben: unter dem Schutz von N₂ werden zu einer Lösung von 800 mg Ninhydrin in 10 ml 4*n*-Natriumacetatpuffer, pH = 5,5, 30 ml Methylcellosolve und schließlich 16 mg trockenes SnCl₂ · 2 H₂O hinzugefügt. Die Gläschen werden

zusammen mit solchen, die nur das Reagens enthalten, und mit Standardproben (46,75 mg Monohydrat von Natriumglutamat in 100 ml Wasser; 10 μ l enthalten 0,025 μ Mol Aminogruppen) in ein heftig siedendes Wasserbad gestellt und nach 2 Min. mit Korkstopfen verschlossen, die vorher in siedendem Wasser ausgekocht worden waren. Alle Proben werden nach 20 Min. aus dem Bad genommen und 10 Min. in einem Eisbad belassen. Nach Zugabe von 90proz. Methoxymethanol bis zur 2 ml Markierung wird die O. D. bei 575 $m\mu$ bestimmt.

*Estergruppen-Bestimmung*¹⁸

Hydroxylaminlösung wird immer frisch hergestellt durch Mischen von gleichen Volumenteilen der folgenden Lösungen und Entfernen des Natriumchlorids durch Zentrifugieren:

- a) 200 mg $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ in 0,25 ml Wasser mit absol. Alkohol auf 5 ml aufgefüllt.
- b) 400 mg Natriumhydroxidpulver in 0,25 ml Wasser mit absol. Alkohol auf 5 ml aufgefüllt.

Proben mit 0,2—0,5 Mikroäquivalent P werden in 10 \times 25 mm-Gläschen (auf 2 ml kalibriert) vollständig vom Lösungsmittel befreit und 0,6 ml Hydroxylaminlösung hinzugefügt. Sie werden 2 Min. in einem 65° warmen Wasserbad gelassen und nach Abkühlen wird mit Eisenperchloratlösung bis zur 2 ml-Markierung aufgefüllt (50 mg Ferriperchlorat + 0,1 ml Wasser + 0,85 ml 70proz. HClO_4 auf 25 ml mit absol. Alkohol aufgefüllt). Gläsern mit nur Reagentien und solche mit Standard (26,912 mg Tripalmitin in 10 ml CHCl_3 ; 10 μ l enthalten 0,1 μ Mol Ester) werden ebenso behandelt und die O. D. nach 20 Min. Stehen im Beckman Spectrophotometer bei 530 $m\mu$ abgelesen.

*Vinyläthergruppen-Bestimmung*¹⁷

0,02—0,05 Mikroäquivalent P entsprechende Proben werden in 10 \times 75 mm-Gläschen mit einer 2 ml-Markierung pipettiert und das Lösungsmittel unter N_2 verdampft. 0,2 ml Methanol und 0,2 ml Jodlösung (7,615 mg in 100 ml 3proz. KJ) werden zugegeben, die verschlossenen Gläsern geschüttelt und 10 Min. bei Zimmertemp. stehengelassen. Nachdem bis zur 2 ml-Marke mit 95proz. Alkohol aufgefüllt worden ist, wird die O. D. dieser Gläsern bei 355 $m\mu$ parallel zu solchen, die dieselbe Jodmischung, aber kein Phospholipoid enthielten, und beide Sätze von Gläsern gegen solche, die auch kein Jod enthielten, abgelesen. Die O. D. der Jodlösung minus der O. D. der Jodlösung mit Phospholipoiden dividiert durch den Faktor 13,75 ergibt die Mikromol Vinyläther. Dieser Faktor wurde unter Benutzung des Extinktionskoeffizienten 27500 für Jod bei 355 $m\mu$ errechnet¹⁷.