

# Nachweis und quantitative Bestimmung von Chlorcholinchlorid in biologischem Material

Von

H. Bayzer

Biologische Forschung\* der Österreichischen Stickstoffwerke AG, Linz/Donau

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 3. April 1967)

Es wird eine Methode beschrieben, die es gestattet, Mikrogrammengen von Chlorcholinchlorid (*CCC*) aus grünem Pflanzenmaterial, Früchten, Getreidekörnern, Stroh, Mehlen usw., zu isolieren und quantitativ zu bestimmen. Aus der alkohol. Extraktionslösung werden die quartären Ammoniumverbindungen mit Hilfe eines stark sauren Kationenaustauschers abgetrennt und mit HCl von der Säule abgelöst. *CCC* wird hierauf mittels präparativer Dünnschichtchromatographie auf einer Celluloseschicht isoliert, eluiert und entweder mit Jodjodkalireagens quantitativ kolorimetrisch bestimmt oder mittels Dünnschichtchromatographie auf Celluloseschichten halbquantitativ nachgewiesen.

A method for isolation and quantitative determination of microgram amounts of chlorocholine chloride (*CCC*) extracted from green leaves, fruits, grains, straw, flour etc. is described. Quaternary ammonium compounds are separated by ion exchange column chromatography. Isolation of *CCC* by preparative thin layer chromatography on cellulose layers is followed either by a quantitative colorimetric method using iodine reagent or by a semiquantitative chromatographic method on cellulose thin layers.

Nachdem die pflanzenwachstumshemmende Wirkung von Chlorcholinchlorid [(2-Chloräthyl)-trimethylammoniumchlorid, *CCC*] erkannt worden war und man sich dies in der Praxis zunutze gemacht hat (vgl. *Cathey*<sup>1</sup>), ergab sich auch das Problem, die Aufnahme und den Stoff-

\* Leiter: Dr. H. H. Mayr.

<sup>1</sup> H. M. Cathey, Ann. Rev. Plant Physiol. **15**, 271 (1964).

wechsel dieser quartären Ammoniumverbindung in den Pflanzen näher zu untersuchen.

In der Literatur finden sich mehrere Arbeiten, die sich mit dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von *CCC* befassen. So berichteten *Mayr* und *Presoly*<sup>2</sup> sowie *Mayr* und *Paxton*<sup>3, 4</sup> über den Nachweis von *CCC* in grünen Pflanzen mittels Papierchromatographie und Papierelektrophorese, *Jung* und *Henjes*<sup>5</sup> arbeiteten eine kombinierte säulen- und dünn-schichtchromatographische Methode aus, mit der sie noch 0,5 ppm *CCC* in Weizenkörnern und -stroh nachweisen können, *Linser*, *Kühn* und *Bohring*<sup>6</sup> veröffentlichten eine kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung von *CCC* in Böden, *Bohring*<sup>7</sup> untersuchte verschiedene Möglichkeiten für Nachweis und quantitative Bestimmung von *CCC* in Pflanzenmaterial und *Bier* und *Faust*<sup>8</sup> bestimmten *CCC* in Pflanzenextrakten nach seiner säulenchromatographischen Abtrennung quantitativ als Reineckat.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Methode, die es gestattet, auch noch Mengen von wenigen Mikrogramm *CCC* aus grünem Pflanzenmaterial, Früchten, Stroh, Getreidekörnern, Handelsmehlen usw. zu isolieren, eindeutig zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen.

#### Vorbereitung und Extraktion des Probenmaterials

Soll *CCC* aus frischem oder eingefrorenem grünem Pflanzenmaterial extrahiert werden, wird je nach der zu erwartenden *CCC*-Menge eine 10–20 g Trockensubstanz entsprechende Probenmenge nach Zusatz von etwa 200 ml Äthanol einige Min. homogenisiert und die alkohol. Extraktionslösung durch Zentrifugieren oder Abnutschen von den zerkleinerten Pflanzenteilen abgetrennt. Die Extraktion wird hierauf noch ein- oder zweimal wiederholt.

Nach unseren Erfahrungen kann frisches Pflanzenmaterial aber auch bei 60–70° C unter Luftumwälzung getrocknet werden, ohne daß Verluste an *CCC* auftreten. Zur Extraktion von *CCC* aus getrocknetem Pflanzenmaterial, Getreidekörnern, Stroh und dgl. werden je nach Material 25–50 g der fein vermahlenden Probe in einem Becherglas mit 150 ml Äthanol versetzt und 3 Stunden bei Zimmertemperatur auf einem Magnetrührwerk gerührt. Hierauf wird die Suspension über eine Porzellannutsche

<sup>2</sup> H. H. Mayr und E. Presoly, *Planta* [Berlin] **57**, 478 (1961).

<sup>3</sup> H. H. Mayr und R. G. Paxton, *Experientia* [Basel] **18**, 440 (1962).

<sup>4</sup> R. G. Paxton und H. H. Mayr, *Planta* [Berlin] **59**, 165 (1962).

<sup>5</sup> J. Jung und G. Henjes, *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.* **106**, 108 (1964).

<sup>6</sup> H. Linser, H. Kühn und J. Bohring, *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.* **108**, 57 (1965).

<sup>7</sup> J. Bohring, Dissertation Gießen (1965).

<sup>8</sup> H. Bier und H. Faust, *Z. Chem.* **5**, 386 (1965).

abgesaugt und der auf dem Filter verbliebene Rückstand mit Äthanol gewaschen.

### Abtrennung der quartären Ammoniumverbindungen

Neben *CCC* und den gleichfalls in den Pflanzen vorkommenden quartären Ammoniumverbindungen Cholin und Glykokollbetain werden mit Äthanol auch ein Großteil der Lipoide und verschiedene Pflanzenfarbstoffe aus dem Probenmaterial extrahiert. Den nächsten Schritt stellt daher die Abtrennung der quartären Ammoniumverbindungen von den übrigen in Lösung gegangenen Substanzen dar.

Dazu wird die Extraktionslösung mittels Tropftrichter auf eine Ionenaustauschersäule von 1 cm Durchmesser aufgebracht, die 15 cm hoch mit dem stark sauren Kationenaustauscher Dowex 50 XWS, 20—50 mesh, H<sup>+</sup>-Form, gefüllt ist. Der Durchlauf durch die Säule wird soweit gedrosselt, daß die Lösung in etwa 3 Stdn. die Säule passiert hat. Anschließend wird mit 50 ml Äthanol nachgewaschen. Zur Elution der neben anderen Kationen auf der Ionenaustauschersäule zurückgehaltenen quartären Ammoniumverbindungen werden zuerst 20 ml 25proz. HCl auf die Säule aufgegeben und 1 Stde. einwirken gelassen. Dann werden weitere 100 ml 25proz. HCl auf die Säule gebracht und die Durchflußgeschwindigkeit soweit gedrosselt, daß die Säure in etwa einer Stunde die Säule passiert hat. Das Eluat wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei 50° C im Vak. zur Trockene eingedampft, sodann werden 15—20 ml Äthanol zugegeben und diese wieder zur Trockene gebracht, um Salzsäurereste zu entfernen. Der Rückstand wird mit 15—20 ml Äthanol aus dem Kolben gelöst und durch ein Weißbandfilter filtriert. Die Lösung wird hierauf im Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft, der verbleibende Rückstand mit etwa 500 µl Äthanol aufgenommen, aus dem Kolben gegossen und der im Kolben zurückbleibende Rest mit weiteren 200 µl Äthanol herausgelöst.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß es bei Temperaturen über 100° C durch Reaktion von HCl mit dem in biologischen Materialien fast stets vorhandenen Cholin zu einer Bildung von Chlorecholinchlorid kommen kann<sup>9</sup>. Wie unsere diesbezüglichen Untersuchungen gezeigt haben, ist jedoch eine solche Umsetzung beim Abdampfen der 25proz. Salzsäure bei 50° C im Vak. nicht zu befürchten.

### Auftrennung der quartären Ammoniumverbindungen

Da für *CCC* keine spezifische chemische Nachweisreaktion bekannt ist, muß es zur Identifizierung bzw. quantitativen Bestimmung von den übrigen quartären Ammoniumverbindungen getrennt werden. Hiefür bewährte sich vor allem die präparative Dünnschichtchromatographie auf Celluloseschichten.

<sup>9</sup> A. J. de Koning, J. Chromatogr. **12**, 264 (1963).

Auf Glasplatten, die mit Cellulose MN 300 der Firma Macherey, Nagel & Co., Düren, beschichtet sind, werden die ca. 700  $\mu$ l des Äthanolextraktes streifenförmig aufgetragen und nach dem Eintrocknen der Lösung die Platten zur Verschärfung der Startbande kurz in Äthanol gestellt, bis das Äthanol die obere Grenze der Bande erreicht hat. Hierauf wird 5—6 Stdn. in *n*-Butanol—Eisessig—Wasser (4 : 1 : 5) (obere Phase) aufsteigend entwickelt und die Platten bei Zimmertemp. getrocknet. Zum Sichtbarmachen der quartären Ammoniumverbindungen auf den Celluloseschichten verwendet man am besten das modifizierte *Dragendorff*-Reagens nach *Thies* und *Reuther*<sup>11</sup>, das die einzelnen quartären Ammoniumverbindungen unterschiedlich anfärbt<sup>10</sup>. Durch Besprühen eines schmalen Streifens mit dem *Dragendorff*-Reagens wird die Lage der *CCC*-Bande festgestellt und hierauf der betreffende Teil der Celluloseschicht von der Glasplatte geschabt, in einem Reagensglas mit 10 ml Äthanol unter Schütteln auf 50° C erwärmt und durch ein Weißbandfilter filtriert. Die im Vakuumrotationsverdampfer bei 50° C eingeeengte äthanol. Lösung wird dann für die weiteren Untersuchungen verwendet. Sie kann allerdings neben *CCC* auch noch Spuren von Substanzen enthalten, die im verwendeten chromatographischen System von *CCC* nicht oder nur unvollständig getrennt wurden. Man kann sich jedoch leicht von der Einheitlichkeit der abgetrennten Fraktion überzeugen, indem man eine kleine Menge davon auf einer Celluloseschicht in einem anderen Fließmittel, beispielsweise in  $\text{CHCl}_3$ —Methanol—Wasser (75 : 22 : 3) chromatographiert<sup>10</sup>.

### Identifizierung von Chlorcholinchlorid

Zur Identifizierung des abgetrennten *CCC* kann man reines *CCC* zutesten und die Identität der beiden Substanzen mittels Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtelektrophorese oder einer Kombination dieser beiden Methoden überprüfen<sup>10, 12</sup>. Es gelingt aber auch, *CCC* in Form seines Reineckates oder Pikrates nachzuweisen, wobei sich im Mikrogrammbereich die Fällung mit Reineckesalz als besonders vorteilhaft erwiesen hat.

Für die Durchführung und gleichzeitige Beobachtung der entsprechenden Versuche eignet sich ein Heiztischmikroskop, wie es zur Mikroschmelzpunktbestimmung verwendet wird, am besten: Ein Tropfen der alkohol. Lösung wird mit Hilfe einer Mikrometerspritze auf einen Objektträger aufgebracht und hierauf vorsichtig ein Tropfen einer kaltgesättigten, wäßrigen Reineckesalzlösung zugegeben. *CCC* fällt sofort als kristallines Reineckat aus. Die überschüssige Reagenslösung wird mit einem Filterpapierstreifen abgesaugt, die *CCC*-Reineckatkristalle mit einem Tropfen Eiswasser gewaschen und das Wasser mittels Filterpapier vorsichtig wieder abgesaugt. Nach dem Trocknen der Kristalle wird der Mikroschmelzpunkt bestimmt. Das *CCC*-Reineckat schmilzt bei 210—215° C (Zers.). Für die Durchführung dieser Mikroreineckatfällung und die anschließende Schmelzpunktbestimmung genügt bereits 1  $\mu$ g *CCC*.

<sup>10</sup> H. Bayzer, *Experientia* **20**, 233 (1964).

<sup>11</sup> H. Thies und F. W. Reuther, *Naturwiss.* **41**, 230 (1954).

<sup>12</sup> H. Bayzer, *J. Chromatogr.* **24**, 372 (1966).

## Quantitative kolorimetrische Bestimmung von Chlorcholinchlorid

Die kolorimetrische Methode zur Cholinbestimmung von *Kushner*<sup>13</sup>, die eine Modifikation und Vereinfachung der Methode von *Appleton, La Du, Levy, Steele* und *Brodie*<sup>14</sup> darstellt, läßt sich ohne wesentliche Abänderungen auch für die quantitative Bestimmung von *CCC* verwenden, doch ist dessen vorherige Trennung von anderen quartären Ammonium-

verbindungen unerlässlich; wir verwenden dafür die oben beschriebene präparative Dünnschichtchromatographie auf Celluloseschichten. *CCC* wird aus der entsprechenden Bande mit Äthanol eluiert und die Lösung im Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit wenig Wasser aufgenommen und kann direkt für die kolorimetrische Bestimmung verwendet werden.

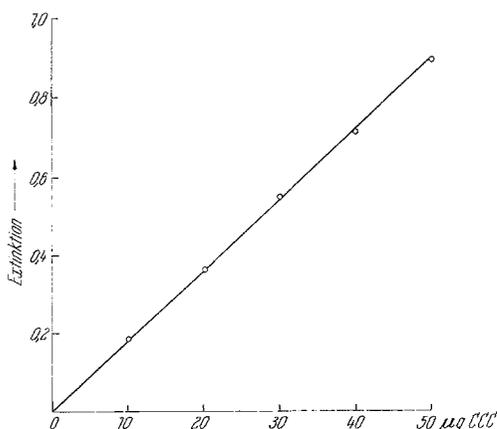


Abb. 1. Eichkurve zur kolorimetrischen Chlorcholinchlorid-Bestimmung

Die Probe, die 10–40 µg *CCC* enthalten soll, wird in ein 25 ml fassendes Reagensröhrchen gegeben und mit Wasser auf ein Volumen von genau 2 ml gebracht. Hierauf wird 1 ml Jodjodkalireagens (2,5 g Jod und 3,1 g KJ in 250 ml Wasser) zugesetzt, das Reagensglas geschüttelt und 40 Min. in Eiswasser gestellt. Danach werden 10 ml 1,2-Dichloräthan zugegeben und zur Vermischung der beiden Schichten 60 Sek. ein gleichmäßiger Stickstoffstrom durchgeleitet. Haben sich die beiden Schichten wieder entmischt, wird die wäßrige Phase abgesaugt und die Äthylenchloridschicht bei einer Wellenlänge von 365 nm in 1-cm-Küvetten im Spektralphotometer gegen einen Reagentienblindwert gemessen. Der Zeitraum zwischen der Äthylenchloridzugabe und der Messung im Spektralphotometer soll bei allen Proben gleich groß sein. Eine Eichkurve für 0–50 µg *CCC* wird unter den gleichen Bedingungen aufgestellt (Abb. 1).

### Halbquantitative dünn-schichtchromatographische Bestimmung von *CCC*

Bei Proben, die sehr wenig *CCC* enthalten, wird es vielfach von Vorteil sein, an Stelle der quantitativen kolorimetrischen Bestimmungsmethode

<sup>13</sup> D. J. Kushner, Biochim. Biophys. Acta **20**, 554 (1956).

<sup>14</sup> H. D. Appleton, B. N. La Du, jr., B. B. Levy, J. M. Steele und B. B. Brodie, J. Biol. Chem. **205**, 803 (1953).

eine halbquantitative dünn-schichtchromatographische Methode anzuwenden. Die Hauptschwierigkeit dabei ist, daß sehr wenig *CCC* neben einer relativ großen Menge Cholin und Glykokollbetain nachgewiesen werden muß. Es ist daher angezeigt, auch in diesem Falle zuerst eine präparative Auftrennung der quartären Ammoniumverbindungen auf einer Celluloseschicht in n-Butanol—Eisessig—Wasser (4 : 1 : 5) vorzunehmen. Der Bereich der *CCC*-Bande wird dann von der Glasplatte geschabt, mit Äthanol eluiert und die Lösung auf genau 100 µl eingeeengt. Von dieser Lösung, die neben *CCC* höchstens noch Spuren von Cholin enthält, wird eine Konzentrationsreihe von 1, 2, 4, 8 und 16 µl wiederum auf eine Celluloseschicht aufgetragen und im Fließmittel Chloroform—Methanol—Wasser (75 : 22 : 3) aufsteigend chromatographiert. Durch Vergleich mit *CCC*-Zutestungen zum gleichen Material kann die Menge *CCC*, die in der Probe vorhanden ist, recht genau abgeschätzt werden. Wird das modifizierte *Dragendorff*-Reagens nach *Thies* und *Reuther*<sup>11</sup> als Sprühreagens verwendet, liegt die untere Nachweisgrenze von *CCC* auf Celluloseschichten bei 0,3—0,5 µg. Werden also beispielsweise 25—50 g Probenmaterial für die Extraktion eingesetzt, können noch 0,05—0,1 ppm *CCC* einwandfrei nachgewiesen werden.

Die hier beschriebene Methode zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Chlorcholinchlorid wurde von uns bei der Bearbeitung der verschiedensten Probleme erfolgreich angewendet. So wurden während der Vegetationsperiode die Aufnahme und Verteilung von *CCC* in Getreide-, Grünfütter- und Tomatenpflanzen verfolgt und in ausgereiften Tomaten, Getreidekörnern, Stroh und Handelsmehlen die *CCC*-Rückstände bestimmt. Voraussetzung für eine volle Ausnützung der Empfindlichkeit der Methode ist die Abtrennung der Hauptmenge an Cholin und Glykokollbetain mittels präparativer Dünnschichtchromatographie, da bei einer punktförmigen Auftrennung der stark ankonzentrierten Lösungen vor allem das Cholin den Nachweis der geringen *CCC*-Mengen stört.