Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 45 (1954)

Heft: 4

Artikel: Die Mikrobestimmung der Phosphatidbestandteile Inosit, Äthanolamin, Serin und Cholin. 5. Mitteilung über Anwendung der Papierchromatographie auf lebensmittelchemische Probleme

Autor: Sulser, H.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-984026

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 12.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Die Mikrobestimmung der Phosphatidbestandteile Inosit, Äthanolamin, Serin und Cholin

5. Mitteilung über Anwendung der Papierchromatographie auf lebensmittelchemische Probleme

Von *H. Sulser*

(Laboratorium des Eidg. Gesundheitsamtes, Bern)

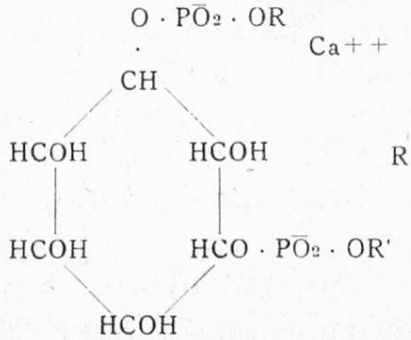
I. Die Bestimmung von Inosit in Phosphatidpräparaten

A. Problemstellung

Im Verlauf unserer Arbeiten über die Phosphatide in Weizenkeimen stellte sich die Frage, ob in gewissen, in Alkohol schwer löslichen Fraktionen dieser Pflanzenphosphatide Inosit anzutreffen sei, entweder in freier Form oder als Bestandteil eines Inositphosphatides, einer neu aufgefundenen Art von Phosphatiden. Die Menge des zur Verfügung stehenden Materials war sehr gering.

Inosit als Phosphatidbaustein wurde zuerst von *Anderson* und Mitarbeitern [1]) in Bakterienphosphatiden aufgefunden. Über das Vorkommen von Inosit in Phosphatiden anderer Herkunft berichteten zuerst *Klenk* und *Sakai* [2]), denen es gelang, aus Pflanzenphosphatiden (Sojabohnenphosphatide) eine Inositmonophosphorsäure zu isolieren. In den letzten Jahren wurden Phospholipoide mit gebundenem Inosit auch aus anderen Ausgangsmaterialien isoliert. Zu erwähnen sind hier vor allem die Arbeiten von *Folch* über die Fraktionierung von Ochsengehirn-«Kephalin» [3]). Dagegen scheint Ovophosphatid keinen gebundenen oder freien Inosit zu enthalten, wodurch es sich von manchen Pflanzenphosphatiden unterscheidet.

Bei den meisten Inositphosphatiden handelt es sich wahrscheinlich um Phosphatidsäuren, denen *Folch* (l.c.) die Bezeichnung Diphosphoinositide gab und die folgende Grundstruktur vorschlug:



R und R' = unbekannte Radikale

Inosithaltige Phosphatide, wie sie in der «Kephalin»-Fraktion der Phosphatide (vgl. nächster Abschnitt), die in Alkohol schwer löslich ist, angereichert sind, üben z.T. wichtige physiologische Funktionen aus. Beispielsweise können sie die antibakterielle Aktivität von Streptomycin unterdrücken [4]).

Auch in freiem Zustand ist die Mesoform des Inosits im pflanzlichen und tierischen Körper weit verbreitet. Mesoinosit gehört ebenso wie Aneurin, Adermin, Nicotinsäureamid usw. zu den Biosfaktoren. Getreidekeime sind besonders reich an diesen Stoffen.

Das Problem der Inositbestimmung ist auf mikrobiologischem Weg einwandfrei gelöst worden [5][6]), da sich Mesoinosit als spezifischer Wachstumsfaktor für gewisse Hefestämme erwiesen hat. Die Methode ist so spezifisch, dass man die Mesoform des Inosits von seinen Isomeren und verwandten Verbindungen unterscheiden kann. Für die Bestimmung genügen γ-Mengen bzw. Bruchteile von γ Inosit. Gebundener Inosit muss, wie bei allen Methoden, vor der Bestimmung in Freiheit gesetzt werden, was am besten durch Kochen mit starker Salzsäure geschieht.

Demgegenüber besitzt man noch keine befriedigende Methode, die es gestattet, den Inosit auf rein chemischem Weg bei Anwesenheit von Zuckerarten in kleinen Mengen zu bestimmen [7]).

Fleury und *Marque* [8]) wandten zur Bestimmung die oxydierenden Eigenschaften von Jodmercurat in alkalischem Milieu, *Fleury* und *Joly* [9]) später diejenigen der Perjodsäure in saurer Lösung an. Diese Methoden geben zwar bei reinen Proben befriedigende Resultate, aber sie sind nicht spezifisch und die Reagentien wirken auch auf die Zucker ein, mit denen der Inosit in der Natur vielfach zusammen vorkommt. *Fleury* und *Recoules* [7]) haben dann gezeigt, dass der Inosit auf chemischem Weg auch so bestimmt werden kann, dass man das bei der Umsetzung mit Perjodsäure entwickelte Kohlendioxyd misst. Pro 1 Molekül Inosit entstehen im Verlauf von 24—48 Stunden 1,2—1,3 Moleküle CO_2. Die Autoren warten aber nicht das Ende der Reaktion ab, sondern messen das Gas nach 4 Stunden mit der manometrischen Methode von *Warburg*. Nach dieser Zeit ist das Ende der ersten, schnellen Phase der Reaktion erreicht. In Bezug auf die Spezifität dieser Methode ist zu sagen, dass zwar lineare Polyalkohole kein CO_2 entwickeln, wohl aber die Zucker (z.B. Glucose, vor allem jedoch Ketosen). Daher müssen sie mit Magnesiumoxyd bei 100° zerstört und die Spaltprodukte mit Alkohol-Äther entfernt werden. Die Methode benötigt 0,3—1,2 mg Inosit für eine Bestimmung. Demgegenüber gelangen bei der papierchromatographischen Methode, auf die wir gleich zu sprechen kommen, 20—40 γ, nötigenfalls aber bis 5 γ Inosit, zur Messung; sie ist also fast so empfindlich wie die mikrobiologische. Ausserdem wird für die manometrische Bestimmung ein ziemlich kostspieliger Apparat benötigt. Der Zeitaufwand beträgt für die eigentliche Messung der entwickelten Gasmenge 4 Stunden, dazu kommen noch die Zerstörung der Zucker und Extraktion der Spaltprodukte.

Platt und *Glock* [10]) bestimmen den Inosit in tierischen Geweben in Mengen von 0,5—1,0 mg, indem nach der wässrigen Extraktion der Gewebe die Glucose durch Vergärung mit Hefe und anschliessend die übrigen störenden Substanzen (z.B. Kreatin und Kreatinin) mit Zeolith-Ionenaustauschern entfernt werden. Im Filtrat befinden sich neben Inosit noch Glycerin, das aber bei niedrigeren Tem-

peraturen (8° C) von Inosit verschieden schnell mit Perjodsäure reagiert, so dass beide Körper nebeneinander titriert werden können. Das ganze Verfahren scheint sehr umständlich zu sein.

Schon bald nachdem wir begonnen hatten, papierchromatographisch zu arbeiten, befassten wir uns mit dem Nachweis des Inosits in der Absicht, auf diese Weise eine relativ einfache, empfindliche und genügend spezifische Methode auszuarbeiten, um den Inosit in unsern Phosphatidpräparaten bestimmen zu können.

Inosit wurde mit Hilfe dieser Technik zuerst von *Partridge* [11]) in Blut von Schafen nachgewiesen, unter Verwendung von Phenol, Collidin und Butanol-Essigsäure zum Entwickeln und ammoniakalischem Silbernitrat zum Sichtbarmachen. Später überprüfte *Hough* [12]) allgemeiner das papierchromatographische Verhalten der Polyalkohole und fand neue Lösungsmittel zum Entwickeln. Zur quantitativen Bestimmung schlug er die Oxydation mit Perjodat vor.

Zum papierchromatographischen Nachweis des Inosits in unsern «Kephalin»-Fraktionen gingen wir zunächst so vor, dass in zugeschmolzenen Röhrchen hydrolysiert, das Chromatogramm mit einem der von *Hough* (l. c.) vorgeschlagenen Lösungsmittel (Butanol-Äthanol-Wasser) entwickelt und zum Sichtbarmachen mit der wässrig-ammoniakalischen Silbernitratlösung besprüht wurde. Die Resultate waren aber nicht sehr befriedigend wegen der undeutlichen Flecken und der ungenügenden Abtrennung von den Zuckerarten. Schliesslich gelang es doch, gut ausgebildete und kräftige Chromatogramme, die für die Auswertung mit unserer photometrischen Methode (vgl. 4. Mitteilung [13])) geeignet waren, zu erhalten, durch Hydrolyse am Mikrohaubenrückflusskühler (vgl. Ausführung der Bestimmung), Eindampfen in einer von uns entwickelten Vakuumglocke und Entwickeln mit Äthylacetat-Eisessig-Wasser. Zum Sichtbarmachen verwendeten wir eine methanolische Silbernitratlösung. Der Inosit besitzt unter diesen Bedingungen einen etwas kleineren Rf-Wert als Sorbit und lässt sich von ihm trennen, wie auch vom Glycerin und den Zuckerarten. Je nachdem, was für Verbindungen vorhanden sind, muss das Chromatographieren im Durchlauf mehr oder weniger lang fortgesetzt werden. Ob allerdings die Isomeren des Inosits [14]) sich in angemessener Frist so differenzieren lassen, erscheint nach den Erfahrungen beim Sorbit (Mannit) als zweifelhaft.

Diese Methode kann als verhältnismässig einfach und doch sicher angesehen werden im Vergleich zu älteren Verfahren, wo der Inosit zum Nachweis neben andern Verbindungen immer erst durch Fällung mit Bleiessig usw. isoliert werden musste [15]).

B. Ausführung der Bestimmung

1. Hydrolyse der Phosphatidpräparate

Man wägt 30—50 mg des zu untersuchenden Phosphatides in ein Spitzröhrchen ein und setzt 3—4 cm³ wässrige 6n-Salzsäure zu. Hierauf lässt man 24 Stunden am Mikrohaubenrückflusskühler nach *Gorbach* (Abb. 1) kochen.

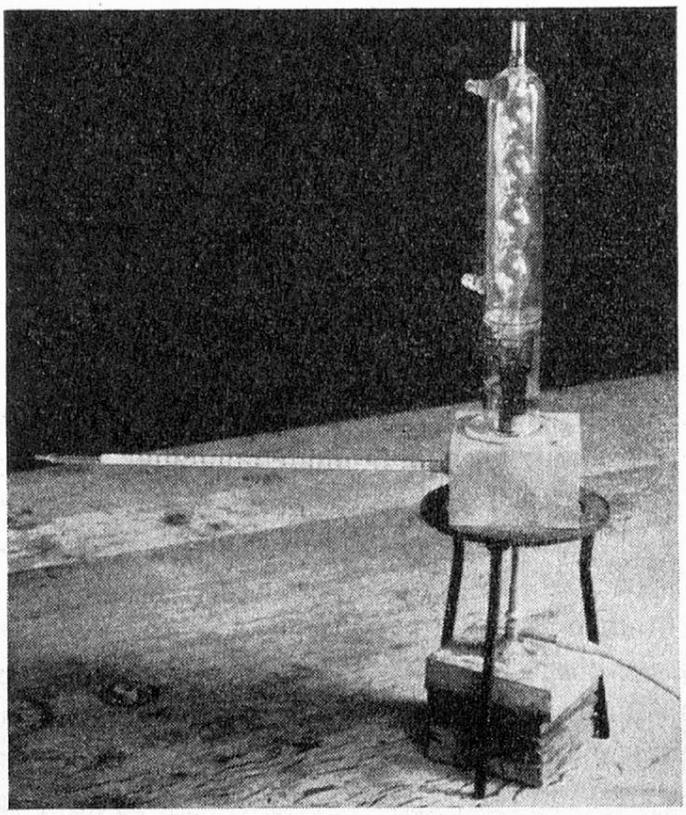


Abb. 1

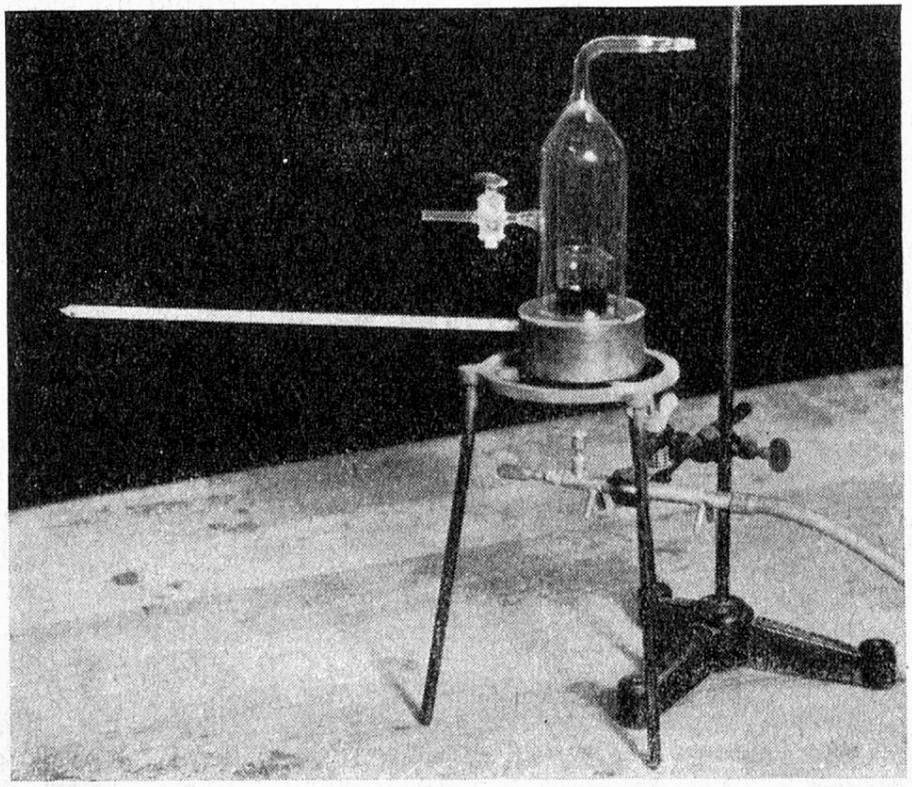


Abb. 2

Nach dem Abkühlen wird durch ein kleines Asbestfilter von den Fettsäuren abfiltriert und das Filtrat in einer Absaugglocke (Abb. 2) bei einem Vakuum von etwa 70 mm und einer Temperatur des Heizblockes von ungefähr 70° C zur Trockne verdampft. Infolge des ständig durch die Glocke streichenden Luftstromes werden die Salzsäuredämpfe fortlaufend von der Wasserstrahlpumpe absorbiert und können sich nicht unangenehm bemerkbar machen.

Den Rückstand nimmt man mit ein wenig Wasser auf und überführt in ein ganz kleines Mikrobecherglas, wobei eventuell nochmals filtriert wird, und verdampft im Vakuum nochmals zur Trockne. Der Rückstand wird in etwa 100 µl Wasser gelöst und mit einer Kapillare in eine Mikroeprouvette mit Marke bei 200 µl übergeführt. Dann wird mit ganz wenig Wasser nachgespült und zur Marke aufgefüllt, worauf man gut mischt.

Von diesen 200 µl Hydrolysat bringt man ein- oder mehrmals 2 µl, je nach dem Inositgehalt, mittels einer Kapillarpipette auf den Startpunkt.

Das so gewonnene Hydrolysat hat also, abgesehen vom Filtrieren, keine spezielle Reinigungsoperation durchgemacht. Ausser zur papierchromatographischen Inositbestimmung können aliquote Teile des gleichen Hydrolysates auch zur Bestimmung des Äthanolamins, Serins und Cholins, welche Methoden in den nächsten Abschnitten beschrieben werden, dienen. Dadurch lassen sich natürlich Ersparnisse an Material für die Analysen, Zeit und Arbeitsaufwand erreichen.

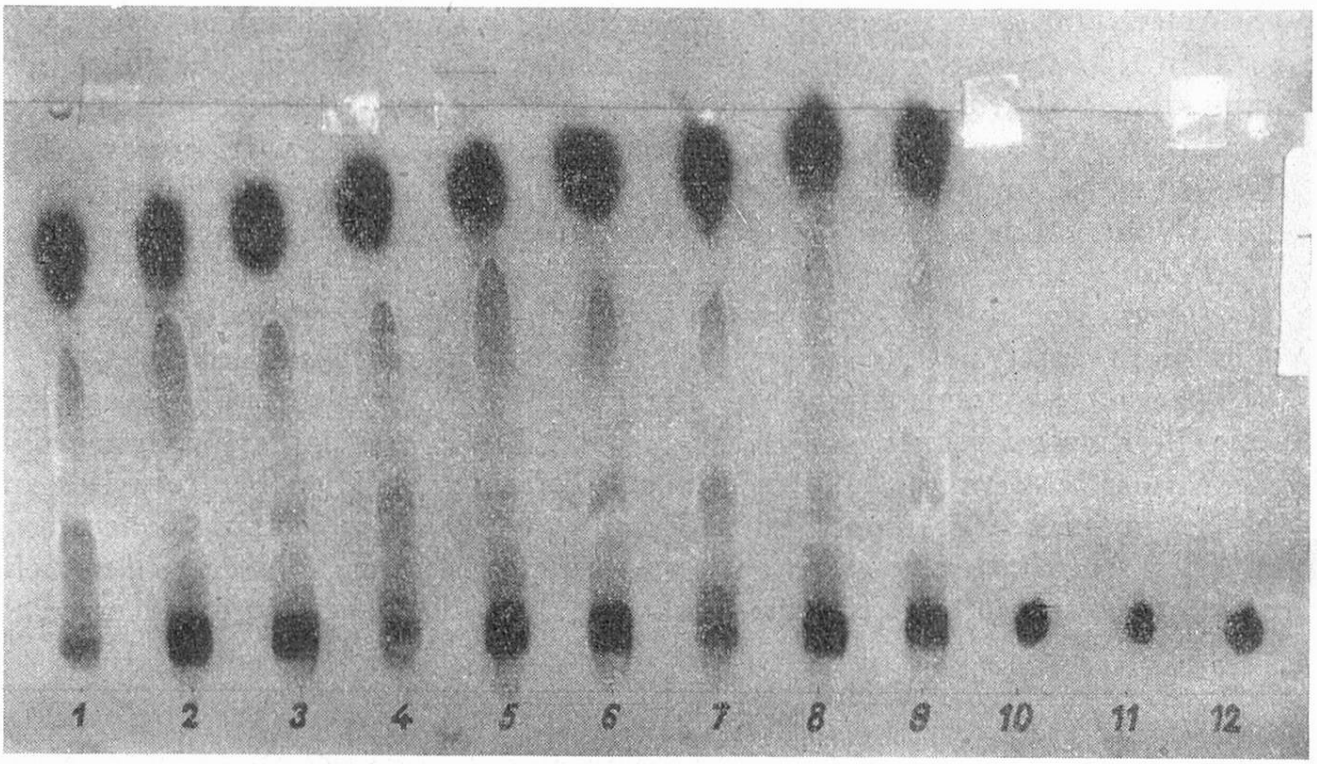
2. *Herstellung des Papierchromatogramms*

Tabelle 1

Reihenfolge	Art des Vorgehens	Ausführung
a	Vorbereitung der Proben	Hydrolyse, vgl. oben
b	Ausführungsform der Papierchromatographie	Durchlaufchromatogramm
c	Papiermaterial	Whatman Nr. 1
d	Menge Hydrolysat	ein- oder mehrmals 2 µl
e	Lösungsmittel	Äthylacetat-Eisessig-Wasser = 3 — 1 — 3
f	Entwicklungszeit	verschieden, je nach Anwesenheit anderer Verbindungen, von 6—48 Std., eventuell noch länger
g	Trocknen des Papiers	ca. 1 Stunde bei Zimmertemperatur
h	Reagens zum Sichtbarmachen	$AgNO_3$ in Methanol (2,5 %)
i	Sichtbarmachen	Besprühen, Trocknen bei Zimmertemperatur, 1 Stunde in Ammoniakdämpfe, 10 Min. in Trockenschrank bei 100°
k	Haltbarkeit der Chromatogramme	Günstigste Kontraste nach 4—5 Std., dann werden die Flecken zu dunkel

C. Resultate

1. Unterscheidung von Ovophosphatid und Pflanzenphosphatiden auf Grund des Inositgehaltes



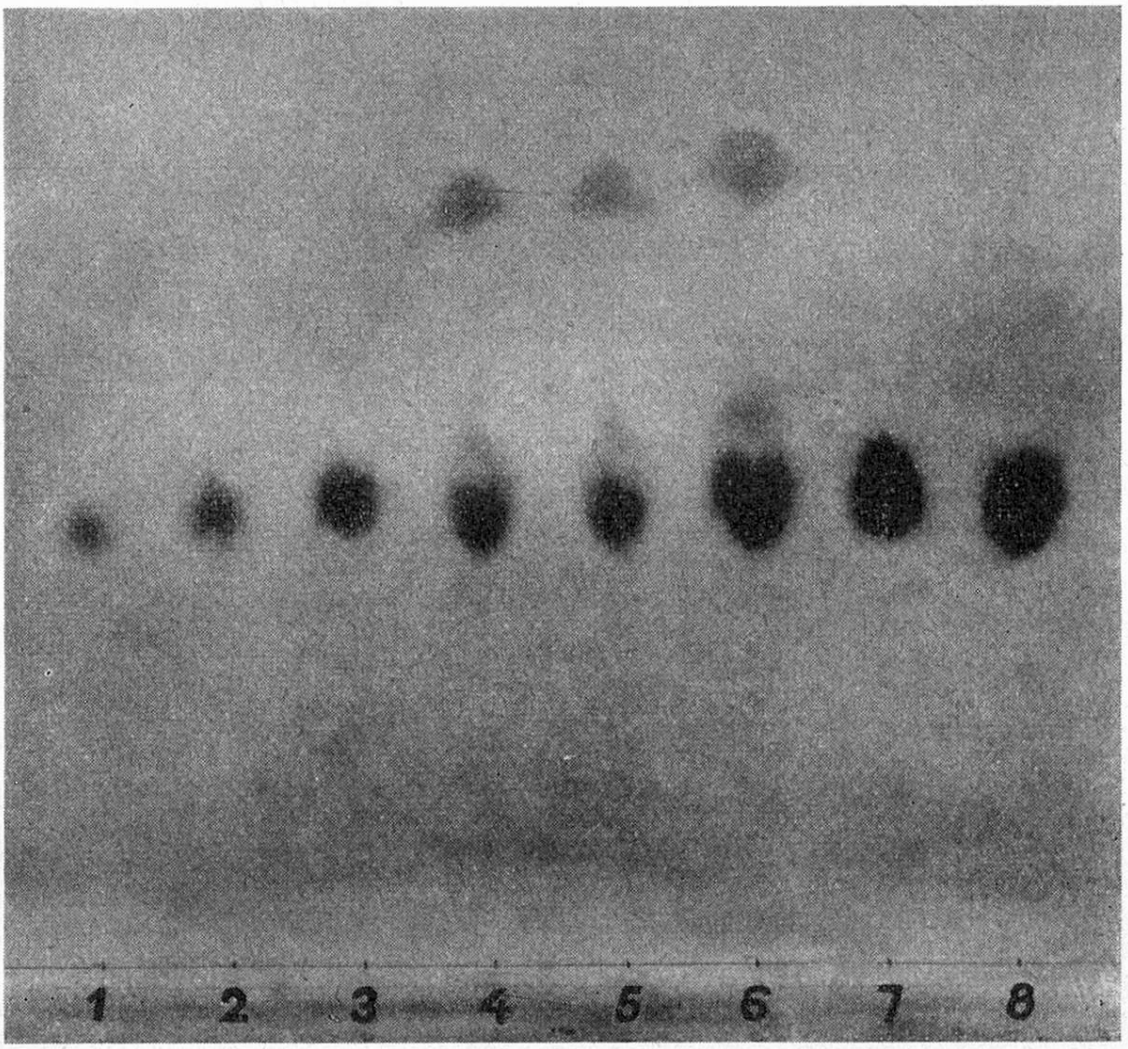
Chromatogramm 1

Nr.	Probe
1	Ovophosphatidhydrolysat
2	Sojaphosphatidhydrolysat
3	Rapsphosphatidhydrolysat
4	
5	wie Nr. 1—3
6	
7	
8	wie Nr. 1—3
9	
10	Test: 20 γ Inosit/2 µl
11	Test: 10 γ Inosit/2 µl
12	Test: 30 γfInosit/2 µl

Die Entwicklungszeit war relativ kurz. Das Glycerin ist noch sichtbar, während es sonst ausgewaschen wird. Es lässt sich vermutlich auf diese Weise in

Phosphatidpräparaten nach saurer Hydrolyse ebenfalls bestimmen. Versuche darüber sind im Gang.

2. *Inositbestimmung in Rapsphosphatid (Handelspräparat)*



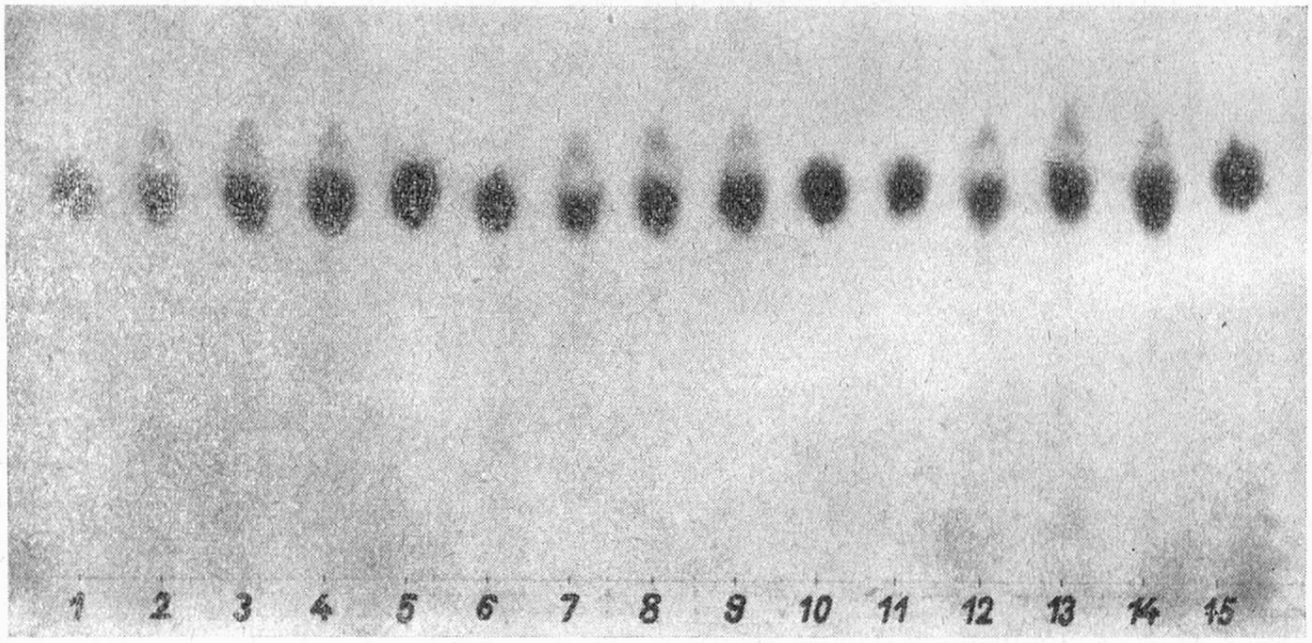
Chromatogramm 2

Nr.	Probe
1	Test: 5 γ Inosit/2 µl
2	Test: 10 γ Inosit/2 µl
3	Test: 30 γ Inosit/2 µl
4	Rapsphosphatidhydrolysat: 2 µl
5	Rapsphosphatidhydrolysat: 2 µl
6	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl
7	Test: 50 γ Inosit/2 µl
8	Test: 70 γ Inosit/2 µl

Tabelle 2

Einwaage mg	Inosit gefunden			
	γ / 2 μl		γ / 200 μl	%
	Einzel	Mittel		
44,5	20,2 18,0 20,3	19,5	1950	4,4

3. Zusatz von bekannten Mengen Inosit zu Rapsphosphatid



Chromatogramm 3

Nr.	Probe
1	Test: 30,3 γ Inosit/2 µl
2	Rapsphosphatidhydrolysat: 2 µl, ohne Zusatz
3	Rapsphosphatidhydrolysat: 2 µl, mit zugesetztem Inosit
4	Rapsphosphatidhydrolysat: 2 µl, mit zugesetztem Inosit
5	Test: 50,0 γ Inosit/2 µl
6	
7	
8	wie Nr. 1—5
9	
10	
11	
12	
13	wie Nr. 1—5
14	
15	

Tabelle 3

Inosit-Zusatz γ/2 µl	Inosit gefunden γ/2 µl		Theoretisch vorhanden γ/2 µl	Gefunden % der Theorie
	Einzel	Mittel		
—	26,4 25,0 17,4	22,9	—	—
10,0	32,4 35,2 29,4	32,4	32,9	98,5
20,0	41,9 43,3 42,4	42,5	42,9	99,0

Die bekannten Mengen Inosit wurden vor der Hydrolyse zugesetzt. Die Versuche mit und ohne Zusatz führte man gleichzeitig nebeneinander unter genau denselben Bedingungen aus. Wie aus der Tabelle 3 hervorgeht, stimmen die gefundenen Mengen gut mit den theoretisch vorhandenen überein.

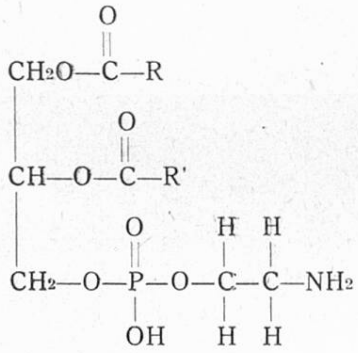
II. Die Bestimmung von Äthanolamin in Phosphatidpräparaten

A. Problemstellung

Die Phosphatide haben grosse physiologische Bedeutung für Stoffwechsel und Ernährung, sowie Therapie. Dank ihrer Zusammensetzung aus hydrophilen und hydrophoben Gruppen können sie vermittelnde Funktionen zwischen den fettartigen, wasserabstossenden und den wasseranlagernden, eiweissartigen Bestandteilen der Zelle ausüben.

Die aus natürlichem Material isolierten Phosphatide sind nie einheitlich, sondern stellen ein Gemisch von Lecithin, ««Kephalin» und Sphingomyelin, um nur die wichtigsten Komponenten zu erwähnen, dar.

Im Unterschied zum Lecithin (Phosphatidyl-Cholin) hat sich das «Kephalin» (in Alkohol schwer lösliche Fraktion) jedoch nicht als eine wohldefinierte Verbindung erwiesen. Zwar stellt das Phosphatidyl-Äthanolamin



R, R' = Fettsäurereste

die Hauptkomponente dieser Fraktion dar, daneben treten aber u.a. noch inositthaltige Phosphatide (vgl. den vorhergehenden Abschnitt), sowie Serinphosphatide (vgl. den nächsten Abschnitt) in oft beträchtlichen Mengen auf. Eine Bestimmung des Stickstoffs und Phosphors allein kann natürlich über die nähere Zusammensetzung solcher Präparate nicht viel aussagen. Vielmehr muss von jedem definierten Phosphatid der charakteristische Bestandteil bestimmt werden, im Fall des «Kephalins» u.a. das Äthanolamin (Colamin).

Im Verlauf von Untersuchungen über die Phosphatide des Weizenkeimes konnten *Antener* und *Högl* [16]) einen Komplex zwischen Phosphatid und Zucker isolieren. Während es damals gelungen war, sich über den zuckerartigen Anteil des Komplexes Klarheit zu verschaffen, gingen wir daran, die N- und P-haltige Komponente einer näheren Prüfung zu unterziehen, um wenn möglich über die Art der Bindung zwischen Phosphatid und Zucker etwas aussagen zu können. Zur Abklärung des Problems fassten wir die Bestimmung des Stickstoffs, Phosphors, des Äthanolamins und Cholins ins Auge. Die Darstellung des zu untersuchenden Materials ging naturgemäss ziemlich umständlich und zeitraubend, sowie in geringer Ausbeute vor sich. Daher kamen für unsere Zwecke nur Mikromethoden in Betracht.

In einer Arbeit aus dem Jahr 1940 bemerkt *Blix* [17]), dass eine zuverlässige Methode zur quantitativen Bestimmung von kleinen Mengen Äthanolamin in

biologischem Material bisher fehlt und dass die gewöhnlichen Verfahren zum qualitativen Nachweis dieser Verbindung (z.B. Schwermetallsalzfällungen) verhältnismässig grosse Mengen Analysenmaterial erfordern.

Tatsächlich erfassen die älteren Methoden ausschliesslich die primäre Aminogruppe des Äthanolamins, damit aber auch die Aminosäuren, Amine usw., welche in Phosphatidhydrolysaten vielfach noch vorkommen. Daher bestimmt man das Phosphatidyl-Äthanolamin bzw. das «Kephalin» oft indirekt, indem man den gefundenen Cholingehalt in Lecithin und Sphingomyelin umrechnet und vom Gesamtphosphatidgehalt (P-Bestimmung) subtrahiert [18][19].

Zur Bestimmung des Äthanolamins wurde bisher folgendermassen vorgegangen:

1. Primäre aliphatische Aminogruppen reagieren mit salpetriger Säure unter Bildung von Stickstoff nach der Gleichung:

$$R{-}NH_2 + HNO_2 \longrightarrow ROH + N_2 + H_2O$$

Der Stickstoff kann gasvolumetrisch oder manometrisch gemessen werden (*Van Slyke* [20]).

Die Methode von *Van Slyke* wurde zuerst 1913 von *Parnas* und *Baumann* [21] zur Untersuchung der Hydrolysate von Gehirn-Monoaminophosphatiden, später von andern Forschern zur Bestimmung des Aminostickstoffs in Hydrolysaten von Nebennierenrinden-«Kephalin» herangezogen. Vielfach diente sie auch zur Unterscheidung von Lecithin und «Kephalin», und der Amino-N sollte ein direktes Mass für die Reinheit eines «Kephalin»-Präparates sein. Da die Methode aber nicht spezifisch ist, müssen die Resultate vorsichtig interpretiert werden. In einer Arbeit von *Kirk* und Mitarbeitern [22] wird beispielsweise gezeigt, dass die Petrolätherextrakte von Blut und Geweben beträchtliche Mengen von Nichtphosphatidaminostickstoff enthalten.

Bei unseren früheren Bestimmungen [23] fanden wir leider immer verhältnismässig sehr hohe Stickstoffvolumina im Leerversuch (Blindwerte), obschon wir möglichst reine Reagentien verwendeten. Die Werte schwankten zudem je nach Schüttelzeit und -intensität usw. ziemlich stark. Man musste daher unter genau standardisierten Bedingungen arbeiten. In der Regel erhielten wir im Leerversuch 200—300 µl Stickstoff, in Übereinstimmung mit Angaben von *Hussey* [72]. Die Schwankungen betrugen ± 10—30 µl. Ein Präparat mit 12,3 % Phosphatidyl-Äthanolamin, entsprechend 259 γ Äthanolaminchlorid bei einer Einwaage von 16,9 mg, entwickelte beispielsweise ein Gesamtstickstoffvolumen von 369 µl, wovon der Blindwert aber 302 µl ausmachte. Schwankungen von ± 15 µl des Blindwertes würden in diesem Fall Abweichungen von ± 22 % im Aminostickstoffgehalt bewirken. Um eine angemessen genaue Bestimmung durchführen zu können, sind mindestens etwa 300 γ Aminostickstoff, entsprechend 550 µl Stickstoffgas, notwendig. Dies entspricht aber bereits 2,08 mg Äthanolaminchlorid und einer Einwaage von 134 mg des obigen Präparates für die Ausführung einer Bestimmung. In diesem Fall wird man nicht mehr von einer Mikromethode sprechen können.

2. Zur Bestimmung des Aminosäurestickstoffs im Wolframsäurefiltrat des Blutes wurde von *Folin* [24]) eine Methode ausgearbeitet, welche darauf beruht, dass Aminosäuren, Amine, Aminoalkohole, sowie Ammoniak mit β-Naphthochinonsulfosäure bzw. ihrem Alkalisalz eine stabile, orange-braune Farbe geben, die sich zur kolorimetrischen Messung eignet. Für die Reaktion verantwortlich ist die o-Chinongruppe, da gewöhnliches o-Chinon und viele seiner Derivate die Tendenz haben, ähnlich zu reagieren. Die grosse Mehrheit der Chinone ist aber ungeeignet, entweder wegen der eigenen intensiven Farbe oder wegen ungünstigen Löslichkeitsverhältnissen.

Mit dieser Methode kann nun auch das Äthanolamin bestimmt werden. Sie wurde von *Schmitz* und *Koch* [25]), bei gleichzeitiger Bestimmung des Phosphors, zur Mikrobestimmung des «Kephalins» neben Lecithin im Blutplasma nach saurer Hydrolyse angewendet. Es stand jeweils nur der Phosphatidgehalt weniger ml Plasma zur Verfügung, welcher für die gasometrische Methode nicht ausgereicht hätte. Um eine Bestimmung angemessen genau ausführen zu können, benötigt man etwa 100 γ Aminostickstoff, entsprechend 692 γ Äthanolaminchlorid, was einer Einwaage von 44,7 mg eines Präparates mit 12,3 % Phosphatidyl-Äthanolamin entspricht. Die Empfindlichkeit dieser kolorimetrischen Methode ist also etwa 3mal grösser als die der gasvolumetrischen. Demgegenüber können aber papierchromatographisch Mengen von ca. 20 γ Äthanolaminchlorid (entspr. etwa 3 γ Aminostickstoff) mit unserer photometrischen Arbeitsweise ohne weiteres gemessen werden, wie weiter unten gezeigt wird, vgl. auch 4. Mitteilung [13]), Tab.12. Bei normalen Bedingungen können so also etwa 100mal kleinere Mengen Äthanolamin bestimmt werden als gasvolumetrisch und ungefähr 30mal kleinere Mengen als kolorimetrisch.

In Anbetracht der geringen Spezifität auch dieser Methode nach *Folin* gilt Ähnliches, wie bei der vorhergehenden ausgeführt, bezüglich der Beurteilung der Resultate. In beiden Fällen reagiert allerdings gleichzeitig anwesendes Cholin nicht. — Wenn die Proben zu viel Salze enthalten (Neutralisieren), können Trübungen entstehen, welche die Extinktionswerte unbrauchbar machen.

3. Wesentlich spezifischer kann das Äthanolamin mittels der Perjodatmethode von *Artom* [26]) bestimmt werden. Sie gründet sich darauf, dass bei der Einwirkung von Perjodat auf Verbindungen mit einer Hydroxyl- und einer primären Aminogruppe an benachbarten Kohlenstoffatomen Ammoniak gebildet wird gemäss folgender Gleichung:

$$HCH(OH) \cdot CH_2(NH_2) + NaJO_4 = 2\ HCOH + NH_3 + NaJO_3$$

Das entstandene Ammoniak kann in einem Mikrokjeldahl-Apparat mit Wasserdampf destilliert und titrimetrisch bestimmt werden.

Die Methode geht auf *Nicolett* und *Shinn* [27]) zurück, welche zuerst den quantitativen Verlauf der Reaktion von Perjodat mit Serin (Oxyaminopropionsäure) nachgewiesen haben. Nach *Artom* (l. c.) können Äthanolamin und Serin getrennt

bestimmt werden, indem man das erstere quantitativ an Permutit adsorbiert und das Serin vollständig durchlaufen lässt. Nachher wird das Äthanolamin mit Kochsalzlösung eluiert.

In Bezug auf die Spezifität der Methode stellte *Artom* (l.c.) fest, dass weder Cholin noch Harnstoff stören. Dagegen erwartet er, dass Sphingosin (Aminoheptadecendiol), welches unter den Hydrolyseprodukten von Gewebe- und Ovophosphatiden zu erwarten ist und das eine benachbarte Amino- und Hydroxylgruppe besitzt, mit Perjodat Ammoniak gibt. Nun ist allerdings dieser höhere Aminoalkohol in Wasser ziemlich schwer löslich, aber im Verlauf der Hydrolyse (in der Regel 24 Stunden) entstehen offenbar leichter lösliche Spaltstücke, die dann mit Perjodat Ammoniak liefern, aber mit Naphthochinon nur schwach reagieren. Jedenfalls erhielten wir am gleichen Ovophosphatidhydrolysat (ohne Permutitbehandlung) mit der ersteren Methode bedeutend höhere Werte als mit der zweiten. Beim Rapsphosphatidhydrolysat zeigte sich dagegen die grössere Spezifität der Perjodatmethode, indem die Werte etwas geringer ausfielen als beim Kolorimetrieren, entsprechend den verschiedenen Grundlagen der Methoden. Weitaus am spezifischsten ist aber die Papirchromatographie, wie aus diesen Vergleichsversuchen, welche am Schluss des Kapitels zusammengestellt sind, hervorgeht.

Die Empfindlichkeit bzw. der Bereich der optimalen Erfassung liegt bei der Perjodatmethode wieder etwas ungünstiger als bei der kolorimetrischen. Einem Titrationswert von 2,2 cm^3 n/200-Thiosulfatlösung (jodometrische Titration der vorgelegten n/100-Salzsäure nach *Bang* [28]), welche Menge im Interesse der Genauigkeit nicht stark unterschritten werden sollte, entsprechen 154 γ Aminostickstoff, d.h. eine Bestimmung erfordert 1,06 mg Äthanolaminchlorid, also etwa 50mal mehr als für die Papierchromatographie (vgl. auch S. 262).

4. Von *Blix* [29]) ist der Versuch gemacht worden, das Äthanolamin auf Grund seiner geringen Wasserdampfflüchtigkeit von andern Stickstoffbasen (z.B. Cholin) zu trennen und zu bestimmen. Er entfernte durch Vakuumdestillation in einer Spezialapparatur die flüchtigen Basen bei 40—50° C und destillierte dann das Äthanolamin bei 10—15 mm Druck und 75—80° C in eine Vorlage mit n/100-Salzsäure, welche dann zurücktitriert wurde. Jedoch gelang es ihm noch nicht, die Methode quantitativ zu gestalten.

Mit dem Aufkommen der papierchromatographischen Technik zeigten sich auch für dieses Problem neue Möglichkeiten, sowohl in Bezug auf Spezifität wie Empfindlichkeit der Erfassung. *Wittcoff* [30]) weist in seiner Monographie über Phosphatide, welche 1951 erschien, noch kurz darauf hin.

Chargaff und Mitarbeiter [31]) haben als erste die Papierchromatographie zur qualitativen Analyse der stickstoffhaltigen Phosphatidbestandteile herangezogen. Zum Entwickeln verwendeten sie Phenol, Butanol-Morpholin, Butanol-Dioxan und Butanol-Pyridin. Um Äthanolamin (und Serin) nachzuweisen, besprühten sie

mit einer Lösung von Ninhydrin und erhitzten anschliessend im Trockenschrank. Die Versuche wurden ausgeführt mit Hydrolysaten von Gewebephosphatiden (aus Leber, Lunge usw.), welche sie durch längeres Erhitzen mit starker Salzsäure erhielten. Die Phosphatide waren gereinigt und von Sphingosiden (Sphingomyelin, Cerebroside) befreit worden.

Wir wandten diese Methode zunächst zur qualitativen Untersuchung der stickstoffhaltigen Komponenten von «Kephalin»-Präparaten aus Weizenkeimen an. Die Versuche zeigten, dass das Äthanolamin besonders stark die Tendenz zur Aufspaltung in mehrere Flecken bzw. Streifen besitzt, und es war nicht leicht, saubere Chromatogramme zu erhalten. Diese Erscheinung kam in erster Linie bei solchen Präparaten zum Vorschein, welche Sphingoside enthielten (z.B. bei Ovophosphatid), dagegen viel weniger bei den sphingosidfreien Pflanzenphosphatiden. Die Ursache ist demnach wohl im Auftreten des Sphingosins bzw. Spaltstücken davon, als Folge der Hydrolyse, zu sehen. Schon bei der Perjodatmethode gingen wir auf diese Frage ein (S. 263). Vorwegnehmend sei erwähnt, dass wir schliesslich eine Technik finden konnten, um auch von sphingosidhaltigen Präparaten, und zwar ohne spezielle Vorreinigung, saubere Chromatogramme herstellen zu können.

Von den oben erwähnten Lösungsmitteln gab Phenol relativ die besten Resultate. Mit Hilfe desselben gingen wir dann daran, das Äthanolamin quantitativ papierchromatographisch zu bestimmen. Wir fanden, dass die von *Boissonnas* [32]) zur Bestimmung der Aminosäuren angegebene Methode, bei der diese im Eluat kolorimetrisch mit Ninhydrin gemessen werden, ein Verfahren, welches zuerst von *Moore* und *Stein* für die Säulentechnik ausgearbeitet worden war, auch zur papierchromatographischen Bestimmung des Äthanolamins herangezogen werden kann. Dabei werden die herausgeschnittenen Papierstücke in feine Lamellen zerteilt, in Reagensgläser gegeben, eine Mischung von Propanol-Wasser und dann das Ninhydrinreagens zugegeben und im Wasserbad erwärmt. Die Intensität der entstandenen violetten Lösung misst man im Kolorimeter. Die Auswertung geschieht anhand einer Eichkurve.

Diese Methode, wie sie von uns ausgeführt wurde, lieferte zwar brauchbare Werte, welche jedoch vielfach allzustark streuten, so dass der Bestimmung etwas Unsicheres anhaftete. Dies rührte einerseits von einem unregelmässigen Blindwert her, verursacht durch geringe Mengen Ammoniak und flüchtigen Aminen im Papier bzw. in der Luft, anderseits davon, dass beim Äthanolamin plötzlich auftretende Streifenbildung nie ganz ausgeschlossen werden konnte, obschon ausser Phenol noch zahlreiche andere Lösungsmittel bzw. Reinigungsoperationen (Entfernung der Phosphorsäure usw.) mit den Hydrolysaten ausprobiert wurden. Dadurch war immer die Möglichkeit gegeben, dass man beim Ausschneiden der Papierstücke nicht den ganzen Bereich der Substanz erfasste. Durch Entfernung des Ammoniaks und der flüchtigen Amine sucht die Methode von *Boissonnas* den Blindwert des Papiers herabzusetzen und konstant zu halten. Zu diesem Zweck schreibt sie vor, nach dem Entwickeln mit einer Lösung von Kalium-

hydroxyd in Methanol zu besprühen und im Trockenschrank zu erwärmen. Dabei läuft man aber Gefahr, dass Verluste an Äthanolamin eintreten.

Während wir mit diesen Untersuchungen beschäftigt waren, erhielten wir Kenntnis der Publikation von *Levine* und *Chargaff* [33]), welche sich ebenfalls mit der papierchromatographischen Bestimmung des Äthanolamins und anderer stickstoffhaltiger Bestandteile der Phosphatide befasst. Die Autoren befolgen dasselbe Prinzip, wie wir es durchführten. Zum Entwickeln geben sie Butanol-Diäthylenglykol-Wasser an, das wir in der Folge auch ausprobierten, ohne damit aber günstigere Resultate als mit andern Lösungsmitteln erzielen zu können. Zur Herabsetzung des Blindwertes wird vorgeschrieben, in einer ammoniakfreien Atmosphäre zu arbeiten, was aber in der Praxis kaum durchführbar ist. — Auch eine Arbeit von *Schulte* und *Krause* [34]) beschäftigt sich mit den Stickstoffkomponenten der Weizen- und Roggenkeimphosphatide. Es wird der qualitative Nachweis von Äthanolamin, Serin und einer noch unbekannten Substanz mittels zweidimensionaler Papierchromatographie (Phenol-Collidin) geführt.

Nachdem es dann gelungen war, die in der 4. Mitteilung (l. c.) beschriebene photometrische Auswertung zu entwickeln, gingen wir dazu über, auch das Äthanolamin auf diese Weise zu bestimmen. Bei dieser «direkten» Methode wird das Chromatogramm vor der Ausmessung sichtbar gemacht, so dass eventuell aufgetretene Störungen erkannt werden können. Ferner spielt der Blindwert des Papiers hier ein geringere Rolle. Die Ausmessung einer Äthanolamin-Verdünnungsreihe auf diese Art ist in der 4. Mitteilung, Tabelle 12, schon zusammengestellt worden. Die für diese Versuche sowie zur Äthanolaminbestimmung in Phosphatiden pflanzlicher Herkunft zunächst verwendete Mischung Äthylacetat-Pyridin-Wasser erwies sich als recht brauchbar und zeigte verschiedene Vorteile gegenüber dem etwas schwerfälligen Phenol. Als es sich dann aber darum handelte, das Äthanolamin in Phosphatiden aus Volleipulver (sphingosidhaltig) zu bestimmen, versagte auch dieses Lösungsmittel. Wieder erhielt man starke Streifenbildung, welche eine quantitative Auswertung verunmöglichte. Die Entfernung der Phosphorsäure aus den Hydrolysaten führte nicht zu besseren Resultaten. Man versuchte auch, das Äthanolamin mittels eines Ionenaustauschers zu isolieren, doch führte dieses Verfahren bei den kleinen Mengen zu erheblichen Verlusten.

Es zeigte sich dann, dass eine leicht herstellbare Mischung von Butanol-Äthanol-Wasser, deren Zusammensetzung wir im Verlauf zahlreicher Versuche ermittelt hatten, zur Chromatographie des Äthanolamins in Phosphatidhydrolysaten sehr geeignet ist, und zwar, abweichend von den bisher ausgeführten Versuchen, in absteigender Richtung. Damit können auch von sphingosidhaltigen Eierphosphatiden, ohne spezielle Reinigung, nach saurer Hydrolyse gute Chromatogramme ohne Streifen, höchstens mit ein wenig länglichen Flecken, hergestellt werden (vgl. die folgenden Chromatogramme), die zur photometrischen Auswertung geeignet sind. In einer weiteren Arbeit über Identifizierung von Aminosäuren und Prüfung auf Reinheit [35]) wird ferner gezeigt, dass es mit diesem

Lösungsmittel auch gelingt, sehr viele Aminosäuren sauber voneinander zu trennen.

Das Äthanolamin besitzt mit diesem Lösungsmittel einen genügend hohen Rf-Wert, um sich vom Serin, das wir in den meisten Phosphatidpräparaten auf diese Weise festgestellt haben, einwandfrei abzutrennen. Dasselbe kann auf dem gleichen Chromatogramm ohne weiteres auch bestimmt werden (vgl. nächstes Kapitel). Cholin wird mit Ninhydrin nicht sichtbar und stört nicht. Aus den im Folgenden gezeigten Chromatogrammen geht ferner hervor, dass in den untersuchten Präparaten noch verschiedene andere Verbindungen ausser Äthanolamin und Serin vorhanden sind, welche mit Ninhydrin recht gut getrennte Flecken ergeben. Insbesondere scheint die Methode also auch geeignet zu sein, um die Untersuchung der stickstoffhaltigen Komponente des Phosphatidzuckerkomplexes aus Weizenkeimen, von welchem Problem wir ausgegangen sind, erfolgreich an die Hand zu nehmen.

B. Ausführung der Bestimmung

1. Hydrolyse der Phosphatidpräparate

Es kann hier auf die bei der Inositbestimmung genau beschriebene Arbeitsweise (S. 253) verwiesen werden.

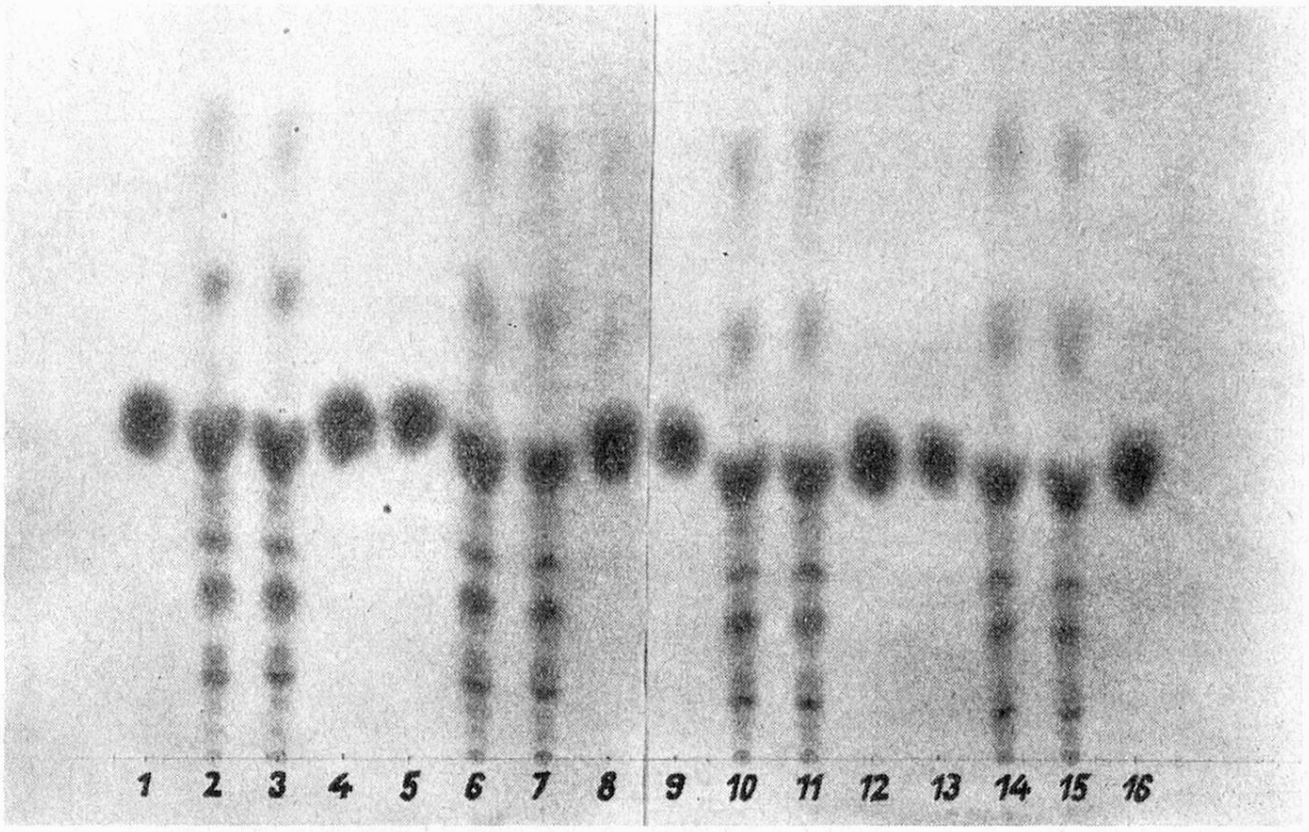
2. Herstellung der Papierchromatogramme

Tabelle 4

Reihenfolge	Art des Vorgehens	Ausführung
a	Vorbereitung der Proben	Hydrolyse, vgl. oben
b	Ausführungsform der Papierchromatographie	absteigendes Lösungsmittel, 1-dimensional
c	Papiermaterial	Whatman Nr. 1
d	Menge Hydrolysat	ein- oder mehrmals 2 µl
e	Lösungsmittel	n-Butanol-Äthanol-Wasser = 80 — 25,5 — 60
f	Entwicklungszeit	36—48 Stunden
g	Trocknen der Papiere	1 Stunde bei Zimmertemperatur
h	Reagens zum Sichtbarmachen	Ninhydrin in Äthanol (100 mg pro 50 cm^3)
i	Sichtbarmachen	Besprühen, 10 Minuten in Trockenschrank bei 80^0 In vielen Fällen ist es auch vorteilhaft, das Ninhydrin direkt in der Entwicklungsflüssigkeit aufzulösen. Dann muss nur erwärmt werden.
k	Haltbarkeit der Chromatogramme	1—2 Tage, beste Kontraste nach ca. 6 Stunden

C. Resultate

1. Bestimmung von Äthanolamin in Rapsphosphatid



Chromatogramm 4

Nr.	Probe
1	Test: 19,9 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
2	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl
3	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl
4	Test: 39,8 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
5	
6	wie Nr. 1—4
7	
8	
9	
10	wie Nr. 1—4
11	
12	
13	
14	wie Nr. 1—4
15	
16	

Tabelle 5

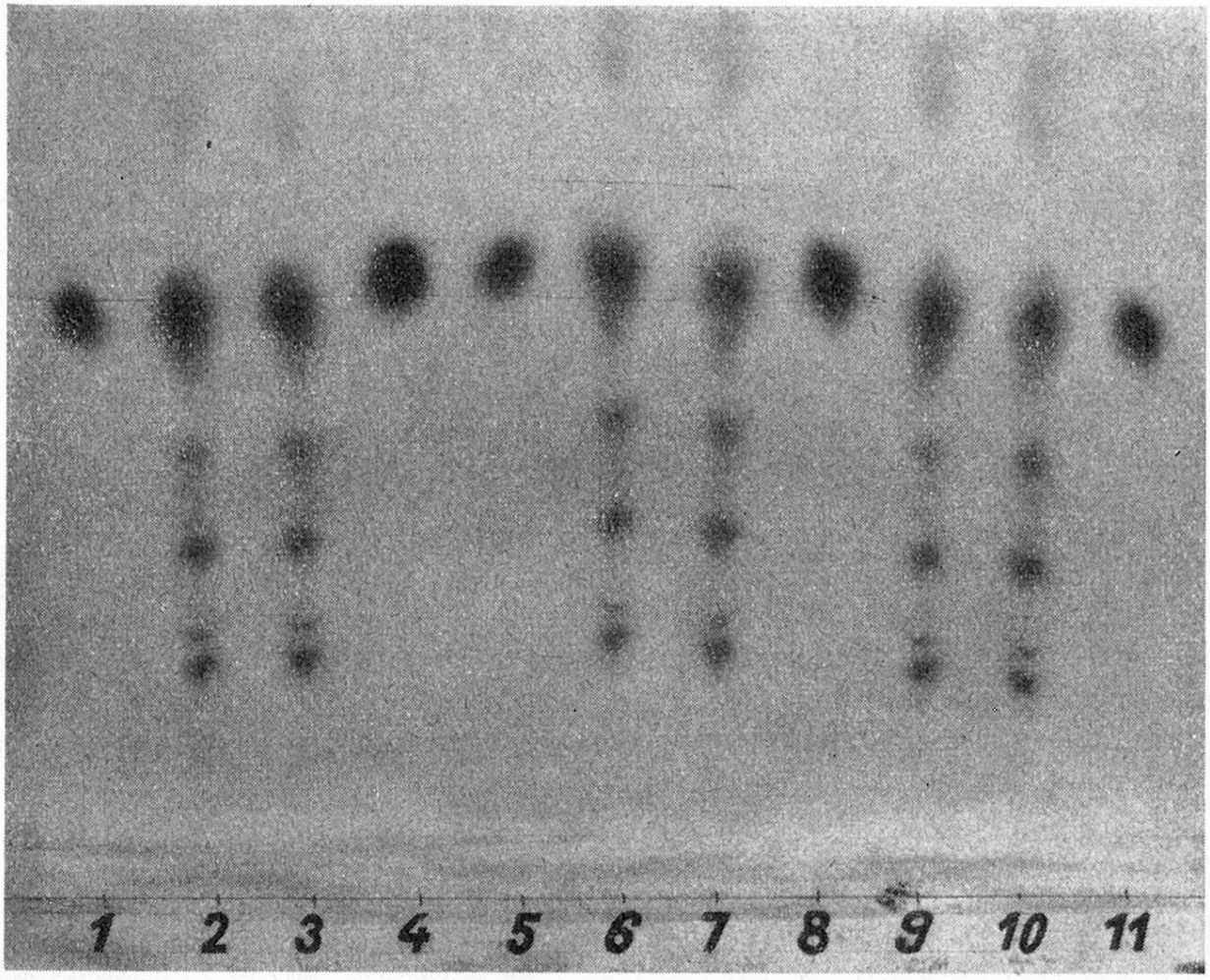
Einwaage mg	Äthanolamin gefunden				Phosphatidyl-Äthanolamin %
	γ / 4 μl		γ / 200 μl	%	
	Einzel	Mittel			
51,45	19,6 19,1 18,7 19,0 18,3 18,1	18,9	945	1,84	14,5

2. Zusatz einer bekannten Menge Äthanolamin zu Rapsphosphatid

Tabelle 6

Äthanolamin-Zusatz γ / 4 μl	Äthanolamin gefunden γ / 4 μl		Theoretisch vorhanden γ / 4 μl	Gefunden % der Theorie
	Einzel	Mittel		
—		20,3	—	—
10,0	29,8 28,4 33,4 32,4	31,0	30,3	102,4

3. Bestimmung von Äthanolamin in Ovophosphatid



Chromatogramm 5

Nr.	Probe
1	Test: 19,9 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
2	Ovophosphatidhydrolysat: 6 µl
3	Ovophosphatidhydrolysat: 6 µl
4	Test: 39,8 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
5	Test: 19,8 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
6	Ovophosphatidhydrolysat: 6 µl
7	Ovophosphatidhydrolysat: 6 µl
8	Test: 39,8 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
9	Ovophosphatidhydrolysat: 6 µl
10	Ovophosphatidhydrolysat: 6 µl
11	Test: 19,9 γ Äthanolaminchlorid/2 µl

Tabelle 7

Einwaage mg	Äthanolamin gefunden				Phosphatidyl-Äthanolamin %
	γ / 6 μl		γ / 200 μl	%	
	Einzel	Mittel			
50,37	17,5 18,4	17,95	598	1,19	9,4

D. Allgemeines zur Methode

Wie die Chromatogramme 4 und 5 gezeigt haben, ist die Abtrennung des Äthanolamins von allen andern mit Ninhydrin reagierenden Verbindungen einwandfrei, die Erfassung also spezifischer als mit den übrigen hier besprochenen Methoden. Sie lassen auch erkennen, dass in Phosphatidpräparaten des Handels sehr viele Nebenbestandteile vorhanden sind, die von allgemeinen Aminosäurebestimmungsmethoden ebenfalls erfasst werden, so dass natürlich zu hohe Werte erhalten werden, wie die folgende Zusammenstellung zeigt.

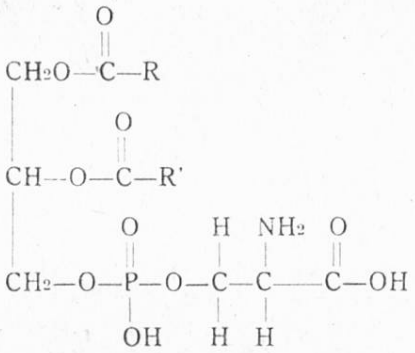
Tabelle 8

Nr.	Methode	% Phosphatidyl-Äthanolamin (Mittel)			
		Raps-phosphatid	Differenz	Ovo-phosphatid	Differenz
1	Naphthochinonmethode nach *Folin*	29,4	1—2: 4,6	20,0	1—2: 12,0
2	Perjodatmethode nach *Artom*	24,8	2—3: 10,3	32,0	2—3: 22,6
3	Papierchromatographie	14,5 (Tab. 5)	1—3: 14,9	9,4 (Tab. 7)	1—3: 10,6

III. Die Bestimmung von Serin in Phosphatidpräparaten

A. Problemstellung

Wie bei der Äthanolaminbestimmung schon kurz ausgeführt (S. 260), hat sich das «Kephalin» als eine etwas problematische Substanz erwiesen. Bis vor wenigen Jahren glaubte man, dass es sich vom Lecithin nur dadurch unterscheidet, dass an Stelle des Cholins das Äthanolamin als stickstoffhaltiger Baustein ins Molekül eintritt. Es zeigte sich dann aber, dass diese in Alkohol schwer lösliche Fraktion neben noch andern Verbindungen vielfach in wechselnden Mengen auch ein Serinphosphatid (Phosphatidyl-Serin)



enthält.

Die Auffindung des Serins geschah während des letzten Krieges an verschiedenen Stellen fast gleichzeitig und unabhängig voneinander [36][37][38]. In allen diesen Fällen wurde es in der «Kephalin»-Fraktion von Rinder- oder Ochsengehirn bzw. Menschengehirn festgestellt. Das Serinphosphatid macht 40—70 % dieser Fraktion aus. Die Anwesenheit desselben in der alkoholschwerlöslichen Fraktion der Phosphatide aus andern tierischen Geweben wurde von *Artom* [39] nachgewiesen, der Serin aus dem Hydrolysat dieser Fraktion isolierte.

Zur Bestimmung des Serins wurden dabei folgende Mikromethoden herangezogen:

1. *Van Slyke* und Mitarbeiter [40][41] haben eine gasometrische Bestimmung der Aminosäuren ausgearbeitet, welche darauf beruht, dass α-Aminosäuren vollständig decarboxyliert werden, wenn man sie bei pH 1—5 in wässriger Lösung mit einem Überschuss Ninhydrin erhitzt. Die Methode ist spezifisch für Aminosäuren, da die Anwesenheit sowohl der Carboxyl- wie der benachbarten primären Aminogruppe in freiem Zustand für den Eintritt der Reaktion erforderlich ist. Das entwickelte Kohlendioxyd kann manometrisch gemessen werden, was allerdings eine Ausrüstung verlangt, die nicht überall vorhanden sein dürfte (vgl. auch Inositbestimmung S. 252). Einfacher, aber bei geringen Mengen etwas weniger genau, ist die Titration [42][43]. Dabei wird das Kohlendioxyd in eingestellte Barytlauge überdestilliert, welche Operation in einem relativ einfachen Destillierbügel, den man evakuiert, ausgeführt werden kann. Die überschüssige Lauge wird dann

zurücktitriert. Beim Destillieren muss aber darauf geachtet werden, dass kein Stossen eintritt, weil dadurch leicht etwas von der schwach sauren Lösung in die Vorlage gelangen kann.

Man unterscheidet folgende Messbereiche, welche gewisse Modifikationen in der Art und Weise der Bestimmung bedingen:

Tabelle 9

Typ der Analyse	γ Carboxyl-N	entspricht γ Serin
Makro	4100 — 800	30 800 — 6000
Mikro	800 — 200	6000 — 1500
Submikro	200 — 40	1500 — 300

Für «Submikro»-Analysen auf titrimetrischem Weg ist eine Rehberg-Mikrobürette von 200 µl Fassungsvermögen notwendig. Für die «Mikro»-Bestimmungen, welche wir ausführten, genügt eine normale Mikrobürette [44]). Die Schwankungen der Resultate betrugen 1—2 %.

Wie die Bestimmungen mit der weiter unten beschriebenen papierchromatographischen Methode zeigen werden, kann auf diesem Weg noch im Bereich einiger γ Serin quantitativ gemessen werden, allerdings etwas weniger genau. Gegenüber der obigen «Submikro»-Analyse sind das noch ungefähr 100 mal kleinere Mengen.

2. Perjodatoxydation. Auf diese Methode wurde schon bei der Äthanolaminbestimmung (S. 262) näher eingegangen. Sie ist spezifisch für Verbindungen mit einer Hydroxyl- und einer primären Aminogruppe an benachbarten Kohlenstoffatomen, denn nur diese entwickeln unter den Reaktionsbedingungen Ammoniak. *Nicolett* und *Shinn* (l. c.) haben zuerst den quantitativen Verlauf der Reaktion von Perjodat mit Serin nachgewiesen. Zur Serinbestimmung in Phosphatidhydrolysaten muss das Äthanolamin mit Permutit abgetrennt werden. In Bezug auf die Empfindlichkeit gilt Ähnliches wie für die Ninhydrin-CO_2-Methode.

Es war dann naheliegend, auch pflanzliche Phosphatide, in denen bisher nur Äthanolamin und Cholin als stickstoffhaltige Bausteine nachgewiesen wurden, auf das Vorkommen von Serin zu prüfen. Dies schien um so aussichtsreicher, weil inzwischen in der Papierchromatographie eine Methode zur Verfügung stand, die es gestattete, schon sehr kleine Mengen aus einem Gemisch abzutrennen und zu identifizieren, bzw. zu bestimmen. Die Empfindlichkeit der Methode kommt dem Umstand, dass die pflanzlichen Phosphatide meist nur in niedriger Konzentration auftreten (vgl. auch die Ausführungen über den Phosphatidzuckerkomplex S. 260), entgegen.

Chargaff und Mitarbeiter (l. c.) wiesen zuerst, allerdings in Phosphatiden tierischer Herkunft, das Serin neben Äthanolamin mit dieser neuen Technik qualitativ nach. Die von diesen Autoren entwickelte Arbeitsweise wurde dann von *Hutt* und *Malkin* [45]) zum qualitativen Nachweis von Serin in Erdnuss-«Kephalin» übernommen. *Schulte* und *Krause* (l.c.) gelang mittels zweidimensionaler Papierchromatographie der qualitative Nachweis dieser Aminosäure neben Äthanolamin und einer noch unbekannten Verbindung in Phosphatiden aus Weizen- und Roggenkeimen.

Zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung des Serins neben Äthanolamin in Phosphatidhydrolysaten bildeten *Levine* und *Chargaff* (l.c.), wie schon erwähnt (S. 265), die kolorimetrische Messung mit Ninhydrin nach Elution aus.

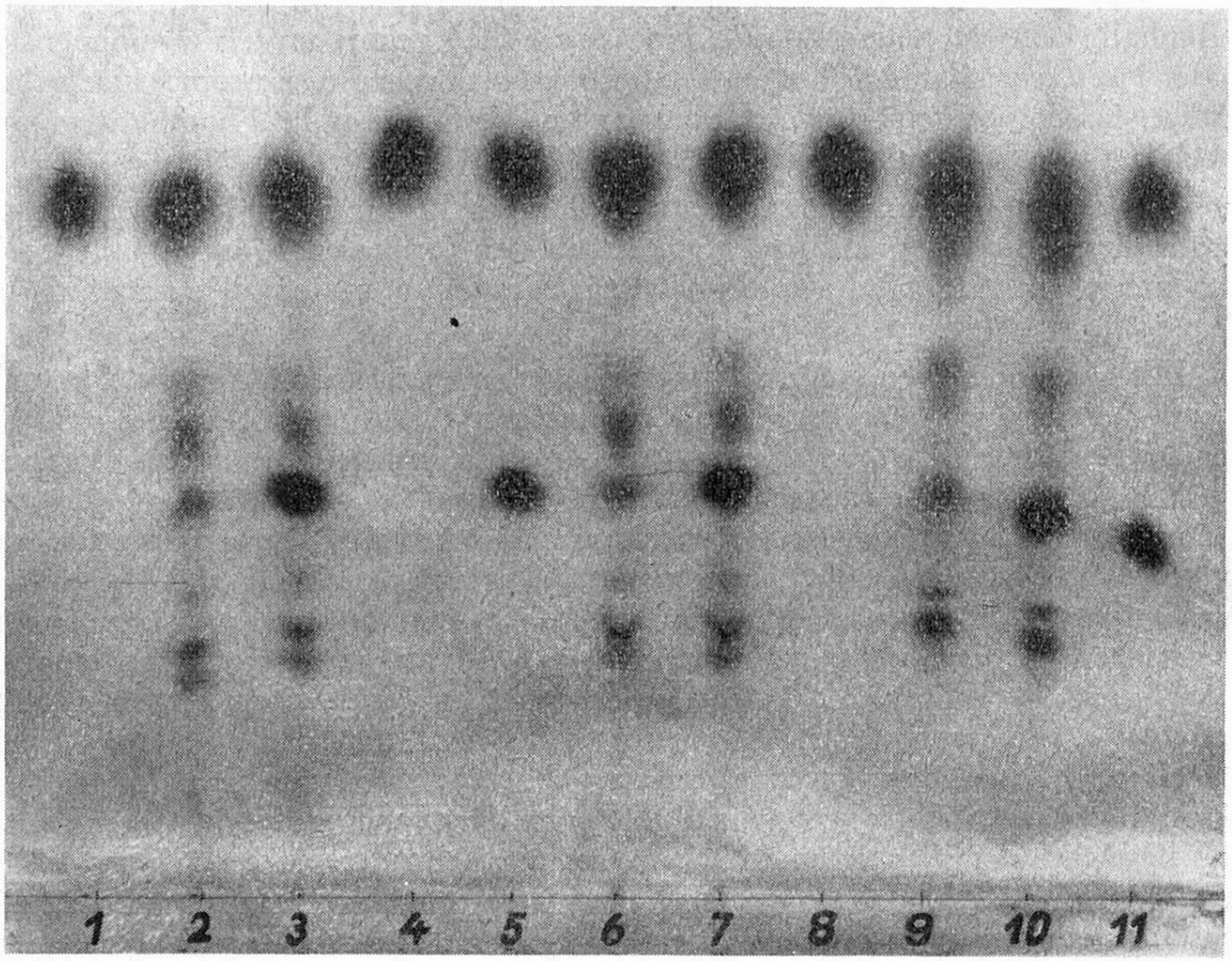
Mit dem von diesen Autoren vorgeschlagenen Lösungsmittelsystem (Butanol-Diäthylenglykol-Wasser), sowie mit zahlreichen andern, welche wir durchprobierten, konnten wir aber keine so guten Resultate erzielen wie mit der von uns nach eingehenden Versuchen gefundenen Butanol-Äthanol-Wasser-Mischung. Damit kann bei absteigender Entwicklung, wie schon dem vorhergehenden Kapitel zu entnehmen ist, das Serin einwandfrei vom Äthanolamin und den andern Verbindungen in Phosphatidhydrolysaten abgetrennt und mit unserer photometrischen Methode bestimmt werden. Dieses Lösungsmittel ist ja ganz allgemein zur Chromatographie der Aminosäuren geeignet, wie aus der folgenden 6. Mitteilung [35]) hervorgeht. Die Abtrennung des Serins von den unmittelbar benachbarten Verbindungen ist allerdings ohne unverhältnismässig lange Entwicklungszeiten nicht so weitgehend, dass eine Bestimmung durch Ausschneiden des Bereiches der Flecken und Elution, entsprechend der Methode von *Levine-Chargaff* (l.c.) bzw. *Boissonnas* (l.c.) zuverlässig erscheint. Sie genügt aber für unsere Methode, denn der Spalt des Photometers kann auf dem Diapositiv so eingestellt werden, dass nur gerade die Serinflecken erfasst werden. Wie aus den folgenden Chromatogrammen zu ersehen ist, kann das Serin auf diese Weise einwandfrei und relativ einfach sowohl in Raps- wie in Ovophosphatid festgestellt und bestimmt werden.

B. Ausführung der Bestimmung

In Bezug auf Hydrolyse und Herstellung der Papierchromatogramme sei auf die Äthanolaminbestimmung (S. 266) verwiesen, da ja die Serinbestimmung auf dem gleichen Chromatogramm erfolgt.

C. Resultate

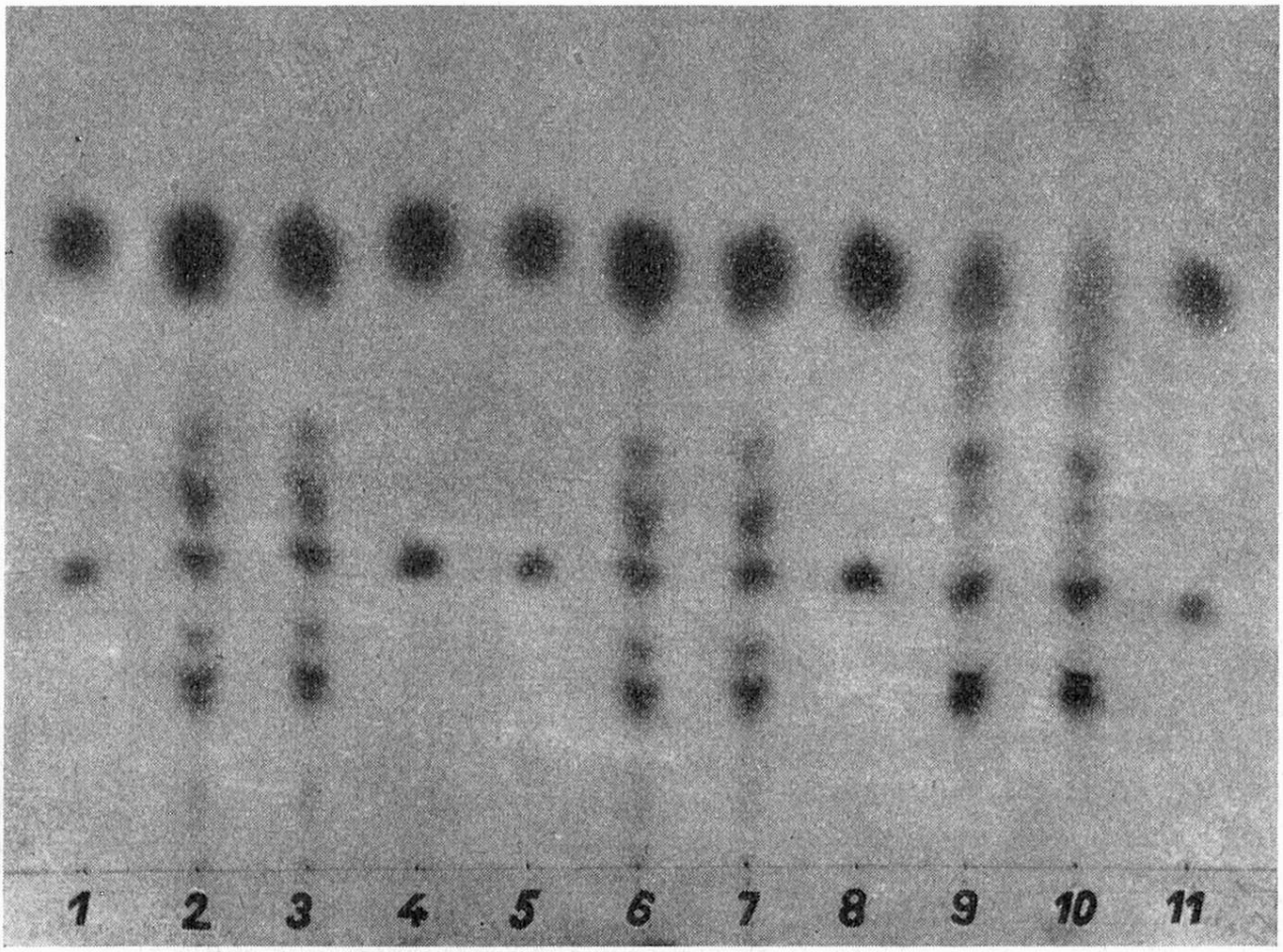
1. Chromatogramm eines Raps- und Ovophosphatidhydrolysates mit zugesetztem Serin



Chromatogramm 6

Nr.	Probe
1	Test: 19,9 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
2	Rapsphosphatidhydrolysat, ohne Zusatz
3	Rapsphosphatidhydrolysat, Zusatz von Serin
4	Test: 39,8 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
5	Test: 19,8 γ Äthanolaminchlorid/2 µl, Zusatz von Serin
6	Rapsphosphatidhydrolysat, ohne Zusatz
7	Rapsphosphatidhydrolysat, Zusatz von Serin
8	Test: 39,8 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
9	Ovophosphatidhydrolysat, ohne Zusatz
10	Ovophosphatidhydrolysat, Zusatz von Serin
11	Test: 19,9 γ Äthanolaminchlorid/2 µl, Zusatz von Serin

2. Bestimmung von Serin in Raps- und Ovophosphatid



Chromatogramm 7

Nr.	Probe
1	Test: 1,25 γ Serin/2 µl, 19,9 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
2	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl
3	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl
4	Test: 2,5 γ Serin/2 µl, 39,8 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
5	Test: 1,25 γ Serin/2 µl, 19,9 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
6	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl
7	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl
8	Test: 2,5 γ Serin/2 µl, 39,8 γ Äthanolaminchlorid/2 µl
9	Ovophosphatidhydrolysat: 6 µl
10	Ovophosphatidhydrolysat: 6 µl
11	Test: 1,25 γ Serin/2 µl, 19,9 γ Äthanolaminchlorid/2 µl

a) Bestimmung von Serin in Rapsphosphatid

Tabelle 10

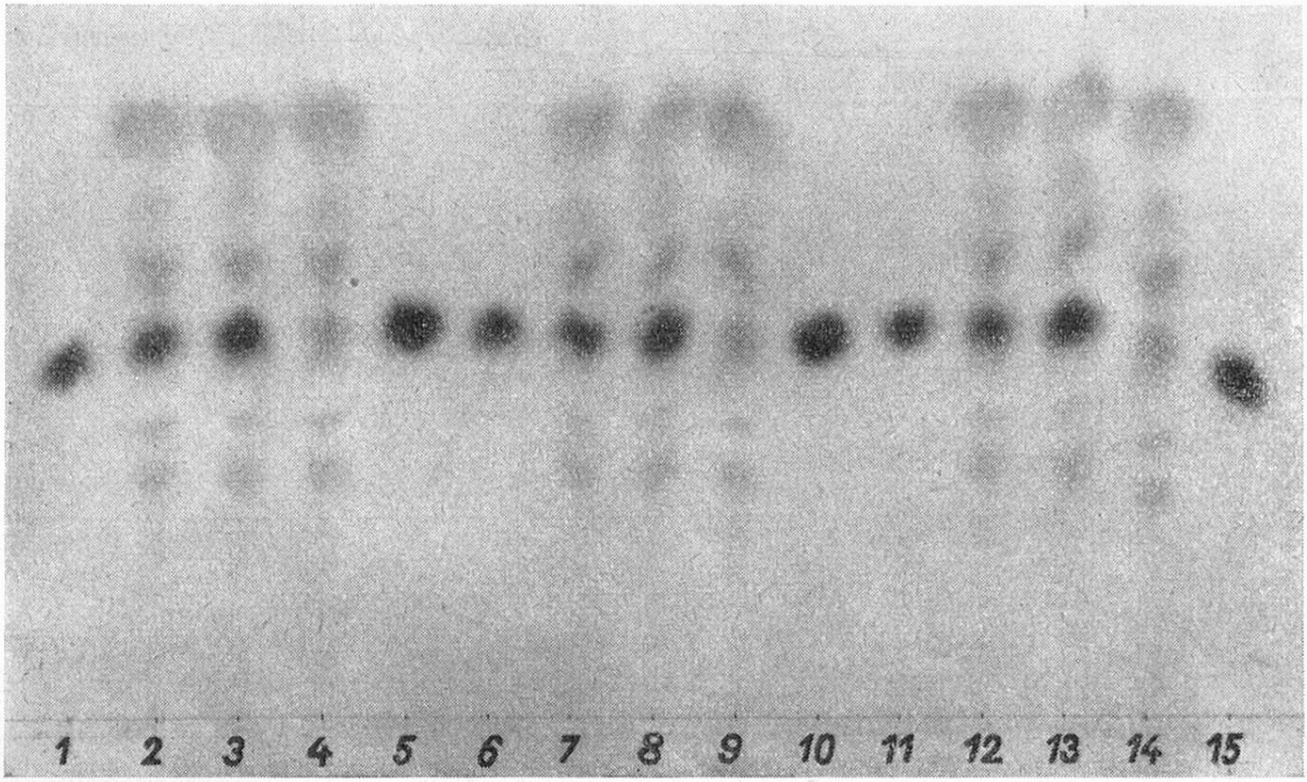
Einwaage mg	Äthanolamin gefunden				Phosphatidyl-Serin %
	γ / 4 μl		γ / 200 μl	%	
	Einzel	Mittel			
44,50	1,69 1,59 1,67 1,75	1,68	84,0	0,19	1,3

b) Bestimmung von Serin in Ovophosphatid

Tabelle 11

Einwaage mg	Serin gefunden				Phosphatidyl-Serin %
	γ / 6 μl		γ / 200 μl	%	
	Einzel	Mittel			
50,37	2,75 2,50	2,62	87,4	0,17	1,1

3. Zusatz von bekannten Mengen Serin zu Rapsphosphatid



Chromatogramm 8

Nr.	Probe
1	Test: 8,0 γ Serin/2 µl
2	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl, mit zugesetztem Serin
3	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl, mit zugesetztem Serin
4	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl, ohne Zusatz
5	Test: 18,6 γ Serin/2 µl
6	
7	
8	wie Nr. 1—5
9	
10	
11	
12	
13	wie Nr. 1—5
14	
15	

Tabelle 12

Serin-Zusatz γ / 4 μl	Serin gefunden γ / 4 μl		Theoretisch vorhanden γ / 4 μl	Gefunden % der Theorie
	Einzel	Mittel		
—	3,2 3,6 3,9	3,6	—	—
5,8	9,0 9,0 9,7	9,2	9,4	97,8
11,6	14,5 14,3 14,5	14,4	15,2	94,8

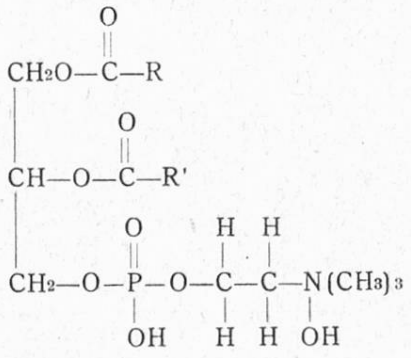
Die bekannten Mengen Serin wurden vor der Hydrolyse zugesetzt. Die Versuche mit und ohne Zusatz führte man parallel nebeneinander unter genau gleichen Bedingungen aus. Wie aus Tabelle 12 zu entnehmen ist, stimmen die gefundenen Mengen befriedigend mit den theoretisch vorhandenen überein.

IV. Die Bestimmung von Cholin in Phosphatidpräparaten und Eipulver

A. Problemstellung

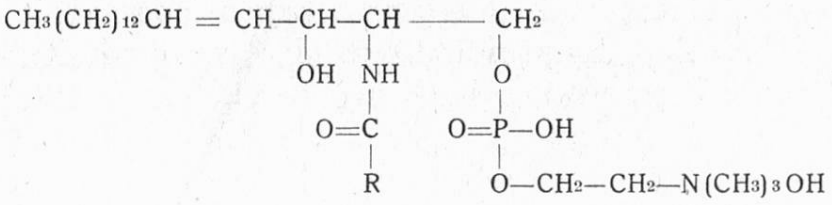
Cholin ist im tierischen und pflanzlichen Körper relativ häufig anzutreffen, sei es in freier Form oder, was häufiger vorkommt, als stickstoffhaltiger Bestandteil des Lecithins und Sphingomyelins.

Das Lecithin (Phosphatidyl-Cholin), die alkohollösliche



Fraktion der natürlich vorkommenden Phospholipoidgemische und das schon am längsten bekannte Phosphatid [46]) hat sich, im Gegensatz zum «Kephalin», als wohldefinierte Verbindung herausgestellt. Wohl unterscheidet man verschiedene Lecithine, diese weichen aber nur in der Natur der Fettsäuren und in deren Stellung im Molekül voneinander ab.

In Phosphatidpräparaten tierischer Herkunft überwiegt das Lecithin bei weitem alle andern Phosphatide, bei pflanzlichen Präparaten ist dies weniger ausgesprochen oder gar nicht der Fall. Ausserdem sind bei den ersteren meistens noch mehr oder weniger grosse Mengen Sphingoside, vor allem Sphingomyelin



enthalten. Auch hier ist Cholin ein integrierender Bestandteil, so dass diese Präparate einen besonders hohen Cholingehalt aufweisen. Anhand einer Cholinbestimmung kann daher nicht nur der Reinheitsgrad, d.h. der effektive Gehalt an Lecithin und Sphingomyelin beurteilt werden, sondern, in Verbindung mit andern Werten (P- und N-Gehalt), auch, ob es sich um tierisches (vor allem Ovo-) oder pflanzliches Phosphatid handelt.

Dieses Problem besitzt für die Praxis eine recht grosse Bedeutung, weil in der Nahrungsmittelindustrie Eiphosphatide, aber auch Produkte aus Sojabohnen, Rüböl usw. eine vielseitige Verwendung finden, beispielsweise bei der Fabrikation von Schokolade und Teigwaren. Die pflanzlichen Phosphatide waren früher oft lästige Nebenprodukte der Fettraffination. Dabei sind natürlich dieselben viel billiger, und es besteht das Risiko, dass sie in unzulässiger Weise an Stelle der Ovophosphatide gebraucht werden. Eigelb ist eines unserer lecithinreichsten Nahrungsmittel, und da es ausserdem noch Sphingomyelin enthält, weist es beträchtliche Mengen gebundenes Cholin auf. Daher kann wohl durch Cholinbestimmungen (und solche des Phosphatidphosphors) entschieden werden, ob zur Fabrikation Eier bzw. Ovophosphatide Verwendung fanden oder nur pflanzliche Phosphatide (Soja). — In Bezug auf die Unterscheidung von tierischem und pflanzlichem Phosphatid anhand von Cholin-, Äthanolamin-, P- und N-Bestimmungen haben wir schon ziemlich viel Material gesammelt, worüber in einer besonderen Arbeit, welche sich mit der Zusammensetzung der Phosphatide beschäftigt, berichtet werden soll.

Auch bei der Untersuchung des stickstoffhaltigen Anteils des Phosphatidzuckerkomplexes aus Weizenkeimen (vgl. Äthanolaminbestimmung S. 260) rechneten wir vor allem mit der Bestimmung des Cholins. Besonders hier erschien es wichtig, eine Methode zu finden, welche mit möglichst kleinen Mengen Analysenmaterial das Auslangen findet.

Indessen ist die Bestimmung des Cholins nicht nur wichtig auf dem Gebiet der Phosphatide, sondern allgemein für die pflanzliche und tierische Biochemie und Physiologie [47][48]). Trotzdem bereitete diese Bestimmung bis in die neueste Zeit beträchtliche Schwierigkeiten. Insbesondere findet man in der Lebensmittelchemie nur vereinzelte und recht ungenaue Angaben über Cholinbestimungen, speziell auch über den Gehalt in Hühnereigelb oder Trockeneiprodukten [49]).

Das Problem der Bestimmung kleiner Mengen Cholin scheint auf mikrobiologischem Weg einwandfrei gelöst worden zu sein, und diese Technik wird häufig zur Bestimmung herangezogen [50][51][52]) .

Dagegen vermögen die chemischen Mikromethoden trotz mancher Verbesserungen, die sie im Verlauf der Zeit erfahren haben, noch nicht allen Anforderungen bezüglich Spezifität, Empfindlichkeit oder anderer Kriterien zu genügen, wie die nachfolgende Besprechung der bisher benützten Verfahren zeigt.

1. Einer der ersten Versuche, auf chemischem Weg zu einer Bestimmung des Cholins zu gelangen, wurde 1905 von *Stanek* unternommen, der es mit Kaliumtrijodid fällte. Dabei bildet sich Cholinperjodid (-enneajodid) der folgenden Zusammensetzung: $[C_2H_5(CH_3)_3NO]J_9$. Infolge der relativ grossen Kaliumjodidkonzentration des Fällungsmittels war aber die Cholin-Jodverbindung darin merklich löslich, so dass *Stanek*, wie auch später *Sharpe* [53]), nur mit grösseren Cholinmengen arbeiten konnten.

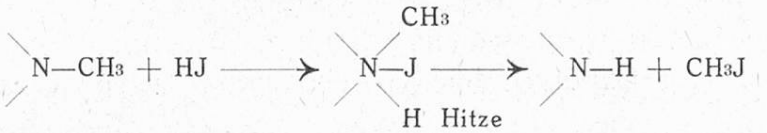
Auf der gleichen Grundlage entwickelte dann *Roman* [54]) eine Methode, welche es gestatten sollte, kleinste Mengen zu bestimmen, und zwar durch Herabsetzung der Kaliumjodidkonzentration im Reagens. Ferner erwies es sich zur Fällung des Cholins als notwendig, sowohl die Konzentration desselben wie die des fällenden Reagens (Jod) möglichst hoch zu wählen. Anderseits darf die Jodkonzentration die Kaliumjodidkonzentration nicht so weit übertreffen, dass freies Jod ausfallen kann, weil dieses sonst wieder mühsam und schwierig ausgewaschen werden müsste. Wegen dem leicht verdampfbaren Jod im Enneajodidniederschlag und einer gewissen Löslichkeit in Wasser von Zimmertemperatur muss der Niederschlag ausserdem mit Eiswasser gewaschen werden. Trotzdem beobachteten wir, wie auch *Hadorn* (l.c.), Verluste an Cholin im Verlauf dieser Operation. Ein weiterer Umstand, der zu Störungen führen kann, besteht darin, dass Salzmengen, wie sie beim Neutralisieren in die Hydrolysate gelangen, zu einer teilweisen Ausfällung von Jod (proportional zur Salzkonzentration) Anlass geben. Dieses wird beim normalen Auswaschen nicht mehr vollständig entfernt, so dass man zu hohe Werte erhält.

Die Fällung des Cholins mit Jod ist nicht spezifisch. Nach *Brante* [55]) reagieren in ähnlicher Weise viele andere stickstoffmethylierte Amine, gewöhnliche Amine, Aminosäuren, Guanidinbasen, Creatinin usw. mit Jod und bilden mehr oder weniger stabile Fällungen. In der Papierchromatographie dient ja eine alkoholische Jodlösung zum Sichtbarmachen dieser Verbindungen nach der chromatographischen Trennung. Bei der Äthanolaminbestimmung (S. 261) haben wir dar-

auf hingewiesen, dass beispielsweise die Petrolätherextrakte von Blut und Geweben beträchtliche Mengen von Nichtphosphatidaminostickstoff enthalten. — Dagegen kann die Jodfällung ohne Störung in Anwesenheit von Äthanolamin ausgeführt werden.

Die Empfindlichkeit der Methode kann als verhältnismässig hoch bezeichnet werden. *Roman* (l. c.) fand, dass es bei Einhaltung aller Vorsichtsmassnahmen möglich sei, 5—5000 γ Cholin mit einem Fehler von ± 5 % zu bestimmen. Wir führten die Versuche in der Modifikation von *Erickson* und Mitarbeiter [56]) durch, bei der das gefällte Jod mit Brom zu Jodat oxydiert (im Verlauf einiger Stunden) und dieses mit Thiosulfatlösung titriert wird, womit man eine 6fache Erhöhung der Titrierflüssigkeit erzielt. Etwa 15 cm^3 n/200-Thiosulfat entsprechen dann ungefähr 200 γ Cholinchlorid. Es können also theoretisch 20—40 γ noch recht genau titriert werden, was den Mengen entspricht, die papierchromatographisch zur Bestimmung gelangen, wie weiter unten ersichtlich ist. Trotz dieser Vorzüge sind wir von der Jodidmethode abgekommen, weil sie uns bei der praktischen Anwendung zu viele Fehlermöglichkeiten zu bieten schien.

2. Ein weiteres Prinzip der Cholinbestimmung beruht auf der Erfassung der 3 Methylgruppen am Stickstoff (Methylimidbestimmung). Nach *Herzig* und *Meyer* [57]) kann diese Gruppierung mit Jodwasserstoffsäure beim Erhitzen in das quartäre Ammoniumsalz übergeführt und daraus Alkyljodid abgespalten werden:



Bei der gewichtsanalytischen Bestimmung setzt sich das Alkyljodid in der Vorlage mit Silbernitrat um und wird als Jodsilber erfasst. Diese Makromethode wurde von *Pregl* [58]) in den Mikromasstab übertragen und später von *Viehböck* und *Brecher* [59]) so modifiziert, dass man das abgespaltene Alkyljodid in der Vorlage mit Brom zu Jodat oxydiert und dieses titriert. Das Glycerin gibt beim Erhitzen mit Jodwasserstoff Isopropyljodid und muss daher entfernt werden, wenn man es nicht gleichzeitig nach *Zeisel* bestimmen will.

Auf diese Art haben beispielsweise *Levene* [60]) Sphingomyelinpräparate auf Reinheit geprüft oder *Roth* [61]) in präparativ aus Pflanzen dargestellten Monoaminophosphatiden das Lecithin bestimmt.

Die praktische Ausführung der Methode gestaltet sich dadurch etwas umständlich und z.B. für Serienanalysen wenig geeignet, dass die Methylgruppen sehr fest am Stickstoff haften. Um eine vollständige Abspaltung zu erreichen, erweist sich eine 3malige Wiederholung der thermischen Zersetzung als notwendig, unter jeweiligem Zurücksaugen der destillierten Jodwasserstoffsäure. Die Dauer einer Bestimmung beträgt so etwa 3 Stunden, wobei eine fast ständige Überwachung der Apparatur erforderlich ist. Aber auch dann fielen bei unseren Versuchen die Werte meistens mehr als 10 % zu niedrig, ferner stark streuend

aus. Üblicherweise braucht man zum Titrieren n/50-Natriumthiosulfatlösung, wovon 1 cm^3 theoretisch 154 γ Cholinchlorid entspricht, so dass die Empfindlichkeit lange nicht an die der Jodidmethode heranreicht. Ob sie sich durch Verwendung verdünnterer Thiosulfatlösungen ohne weiteres steigern liesse, haben wir nicht nachgeprüft, da wir uns in der Folge nach andern Mikromethoden zur Bestimmung des Cholins in Phosphatidpräparaten umsahen.

3. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Cholins ergibt sich daraus, dass es zu Trimethylamin oxydiert und dieses acidimetrisch titriert werden kann. *Lintzel* und *Fomin* [62]) haben dieses Prinzip zuerst angegeben, und *Lintzel* und *Monasterio* [63]) übertrugen es auf die Bestimmung kleiner Mengen Lecithin in Blut und Plasma. Das Lecithin wird zuerst verseift und das Cholin mit Permanganat in alkalischer Lösung zu Trimethylamin oxydiert. Im Luftstrom treibt man dasselbe in eine Vorlage mit n/50-Schwefelsäure über und titriert den Überschuss der Säure mit n/50 wässriger Trimethylaminlösung zurück. Das vom Äthanolamin und andern stickstoffhaltigen Substanzen herrührende Ammoniak wird von alkalischer Formaldehydlösung absorbiert.

Eine Schwierigkeit bei dieser Methode ergibt sich daraus, dass beim Zurücktitrieren der Schwefelsäure (Phenolphthalein als Indikator) kein scharfer Farbumschlag eintritt. Ferner macht sich der durchdringende Geruch des Trimethylamins beim Arbeiten sehr lästig bemerkbar. Wie bei der Methylimidbestimmung ist ein spezieller Apparat notwendig. Die Empfindlichkeit ist nicht gross. Um genaue Resultate zu erhalten, müssen die Proben für eine Bestimmung 2—5 mg Cholin enthalten, also gegenüber der Papierchromatographie mehr als 100mal grössere Mengen.

4. *Kapfhammer* und *Bischoff* [64]) bedienten sich erstmalig des Reinecke-Salzes (Ammonium-tetrarhodanato-diamichromiat, $NH_4[Cr(CNS)_4(NH_3)_2]$ zur Fällung des Cholins, und zwar für die präparative Isolierung aus Geweben. Einige Jahre später führte *Beattie* [65]) auf dieser Grundlage eine kolorimetrische Methode zur Cholinbestimmung in relativ kleinen Mengen ein. Sie beruht darauf, dass die erwähnte Fällung mit eiskaltem Wasser und Alkohol praktisch ohne Verluste ausgewaschen werden kann, sich aber leicht in Aceton mit dunkelroter Farbe löst, deren Intensität dem Beerschen Gesetz folgt und z.B. mit dem Pulfrich-Photometer gut gemessen werden kann. *Marenzi* und *Cardini* [66]) suchten die Empfindlichkeit der Methode zu erhöhen, indem sie das Chrom im Rheineckatniederschlag bestimmten, das der Theorie entsprechend vorhanden sein soll. Dies bedeutet jedoch eine erhebliche Komplizierung in der Ausführung der Bestimmung, so dass sich diese Variante nicht allgemein einzuführen vermochte. Während nach *Beattie* (l.c.) die Ausfällung erst nach 12stündigem Stehen im Kühlschrank vollständig ist, gelang es *Entenman* und Mitarbeitern [67]), nach 30 Minuten eine quantitative Umsetzung zu erreichen, und zwar dadurch, dass sie nicht mehr in neutraler Lösung, sondern in 1,2n-salzsaurer arbeiteten. Dies erhöht die Konzentration des Ammoniumreineckates.

Wir führten die Bestimmungen in der zuletzt genannten Weise aus. Bei der Analyse von Phosphatidhydrolysaten kommt als Fehlermöglichkeit in Betracht, dass die Acetonlösung des Cholinreineckates im Photometer trüb aussehen kann, was viel zu hohe Werte ergibt. Wir fanden allerdings, dass sich eine fast sofortige Klärung erreichen lässt, und zwar durch Zusatz von 1—2 Tropfen einer alkoholischen Magnesiumchloridlösung. — Unbedingt notwendig ist, dass beim Auswaschen unter Eiskühlung gearbeitet wird, weil sonst infolge starker Erhöhung der Löslichkeit erhebliche Verluste eintreten. Dieses wiederholte Auswaschen jeder Probe mit anschliessendem Zentrifugieren und Absaugen der Flüssigkeit mit einem Mikrofilterstäbchen [68]) gestaltet die Methode bei Serienuntersuchungen etwas mühsam.

In Bezug auf die Spezifität herrschen bei einem pH von 12—13 optimale Bedingungen. Nur quaternäre Basen ohne Carboxylgruppen bilden dann unlösliche Reineckate [69]). Bei allen andern pH-Werten werden andere basische Substanzen mehr oder weniger weitgehend mitgefällt (z.B. Carnitin). Immerhin stört gleichzeitig vorhandenes Äthanolamin die Bestimmung des Cholins (und Acetylcholins) nicht. Die Übereinstimmung zwischen Reineckatmethode und Papierchromatographie, auf welches Verfahren wir gleich zu sprechen kommen, ist bei Phosphatidhydrolysaten verhältnismässig gut, viel besser als bei der Äthanolaminbestimmung (Tabelle 8). Für solche Untersuchungen scheint jedenfalls die Komplexsalzfällung genügend spezifisch zu sein.

Dagegen lässt die Empfindlichkeit der Methode in der üblichen Ausführungsform, d.h. ohne Mikroküvetten, Bestimmung des Chroms im Niederschlag usw., für viele Zwecke zu wünschen übrig. Beispielsweise sind von einem Präparat mit 25 % Lecithin 53 mg, entsprechend 2,33 mg Cholinchlorid, notwendig, um eine Extinktion von 330 Einheiten in der 1-cm-Küvette zu bewirken. Diese Mengen entsprechen etwa denjenigen der vorher besprochenen Methode. Als Ultramikroverfahren arbeitet die Papierchromatographie dagegen in einem Bereich, der zwei 10er Potenzen kleiner ist, vgl. auch 4. Mitteilung [13]), Tabelle 13. — In einer kürzlich erschienenen Publikation beschreibt *Hadorn* (l.c.) eine gravimetrische Ausführungsform der Reineckatmethode. Diese Arbeitsweise erfordert aber fast 10mal grössere Cholinmengen als die kolorimetrische und kann kaum noch als Mikromethode angesehen werden.

Anfänglich zogen wir zur Bearbeitung des uns gestellten Problems (Phosphatidzuckerkomplex aus Weizenkeimen) vorwiegend die Reineckatmethode heran. Jedoch liess es besonders die relativ geringe Empfindlichkeit bald nach Beginn unserer papierchromatographischen Studien als aussichtsreich erscheinen, auf dieser Grundlage eine empfindlichere, spezifischere und weniger zeitraubende Methode zur Bestimmung des Cholins auszuarbeiten.

Chargaff und Mitarbeitern [31]) war es zuerst gelungen, das Cholin in Phosphatidhydrolysaten mittels der Papierchromatographie qualitativ nachzuweisen. Als Lösungsmittel zum Entwickeln wurde Butanol-Morpholin-Wasser, Butanol-Dioxan-Wasser und Butanol-Pyridin-Wasser verwendet. Zum Sichtbarmachen

besprühten sie mit einer 2%igen wässrigen Lösung von Phosphormolybdänsäure, befreiten das Papier von überschüssigem Reagens durch Eintauchen in n-Butanol, worauf durch Eintauchen in eine 0,4%ige Lösung von Stannochlorid in 3n-Salzsäure die intensiv blau gefärbten Cholinflecken hervortraten.

Für reine Testproben fanden wir die Lösungsmittel von *Chargaff* und Mitarbeitern gut brauchbar. Bei der Anwendung auf Phosphatidhydrolysate ergaben sich hingegen Schwierigkeiten, indem die Cholinflecken in 2 oder mehr Teile aufgespalten wurden, allerdings in viel geringerem Mass als beim Äthanolamin. In der Folge probierten wir verschiedene andere Lösungsmittel und Papiersorten aus, wobei sich u.a. tert. Butanol-Ameisensäure-Wasser und Whatman Nr. 1 als recht zuverlässig erwiesen, noch besser aber tert. Butanol-Methanol-Wasser bei Verwendung des Spezialpapiers Nr. 2043a von Schleicher & Schüll, das wir dann ständig beibehielten. Die Hydrolysate können ohne Vorreinigung chromatographiert werden.

Eine Methode zur quantitativen Auswertung der Cholin-Papierchromatogramme war noch nicht bekannt, weder mittels Elution und anschliessender Mikrobestimmung, noch mit Hilfe «direkter» Methoden. Nachdem eigene Versuche zur direkten Photometrie nicht günstig verliefen, kamen wir auf den Gedanken, die Cholinflecken auf retentiometrischem Weg auszuwerten. Er erwies sich tatsächlich als durchführbar.

Die Retentionsanalyse, auf die wir schon in der 4. Mitteilung (l.c., S. 80) eingegangen sind, war zuerst von *Wieland* [70]) zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren im Anschluss an die Chromatographie angewendet worden. Er liess eine Lösung von Kupferacetat in Tetrahydrofuran im Papier aufsteigen. Beim Auftreffen auf Aminosäureflecken tritt Komplexbildung ein, und das Reagens wird am weiteren Aufsteigen verhindert, so dass eine Lücke entsteht. Durch Besprühen mit Rubeanwasserstoff in Aceton kann der ganze Bereich des Kupferacetats deutlich sichtbar gemacht werden. Die Grösse der Lücken kann planimetrisch ausgemessen werden und ist proportional der Aminosäuremenge. Die Methode eignet sich zur Bestimmung weniger γ.

Bei der Anwendung dieses Prinzips auf die Cholinbestimmung gingen wir so vor, dass nach der Chromatographie eine etwa 0,5%ige Lösung von Phosphormolybdänsäure in Chloroform-Methanol im Papier aufsteigen gelassen wurde. Beim Auftreffen auf Cholin bildet sich ein Niederschlag, und das Reagens kann nicht mehr weiter aufsteigen, was Lückenbildung zur Folge hat. Zum scharfen Sichtbarmachen der Zone der Phosphormolybdänsäure besprühten wir mit einer 0,1%igen Lösung von Zinn(II)chlorid in 3n-Salzsäure, wodurch sich das intensive Molybdänblau bildet, vgl. Abb. 3.

Die Prüfung der Methode mit Testproben ergab eine recht gute Proportionalität der Lückengrösse mit der Substanzmenge. Wir bestimmten dann das Cholin in Phosphatidpräparaten auf diese Weise, und die Resultate wichen teilweise nur wenig von denen mit der Reineckatmethode ab. Jedoch haftet dieser Arbeitsweise eine gewisse Unsicherheit wegen mangelhafter Reproduzierbarkeit

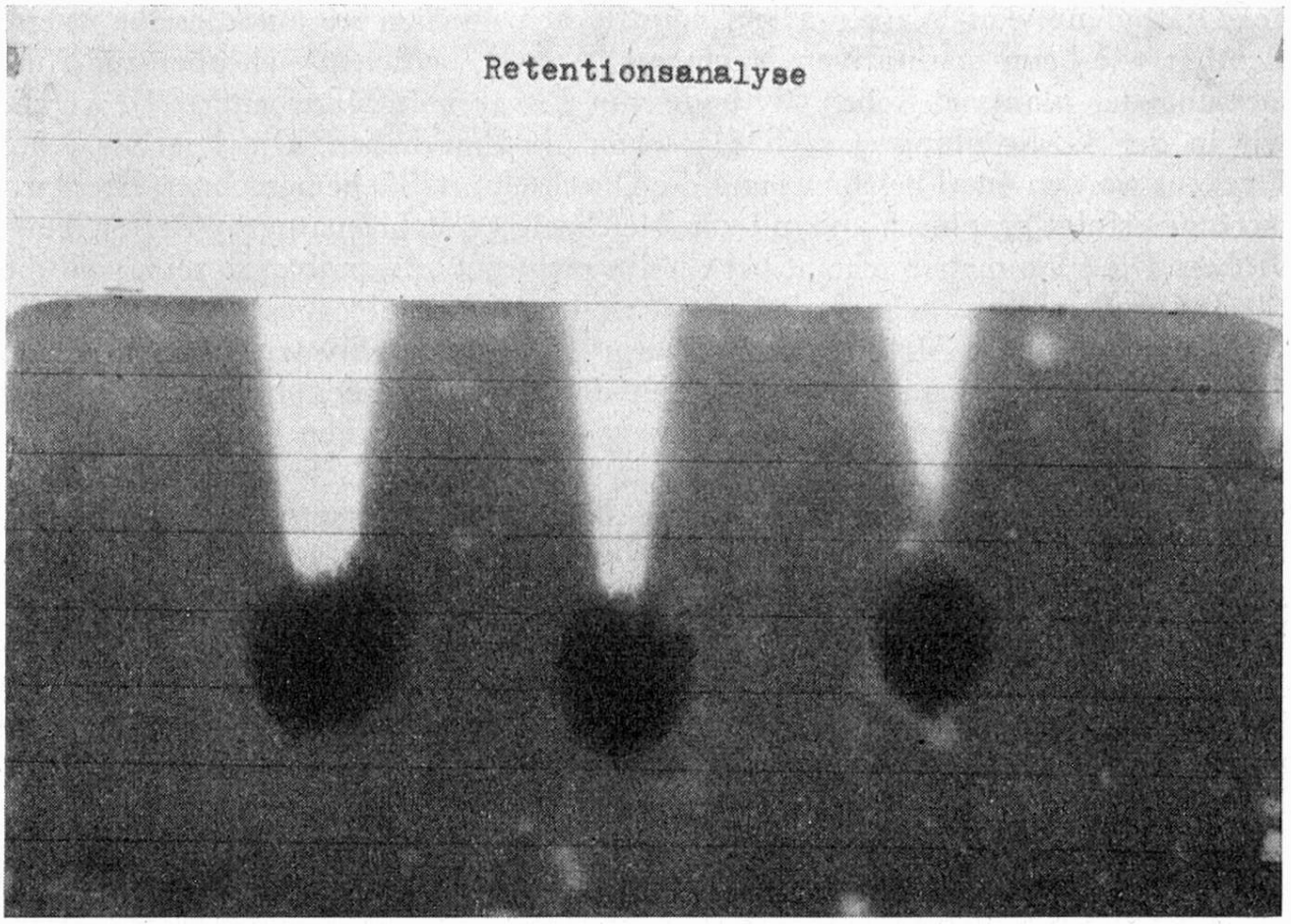


Abb. 3

an. Häufig kam es vor, dass die in Abb. 3 gezeigten, gut ausgebildeten Lücken nicht in gleicher Weise erhalten werden konnten. Statt dessen trat ein zackiger, unregelmässiger Frontverlauf in Erscheinung, und in vielen Fällen erwies sich eine quantitative Auswertung als unmöglich. Offensichtlich muss dafür die etwas wechselnde Struktur und Beschaffenheit des Papiers verantwortlich gemacht werden. Eine Vorbehandlung desselben mit verdünnten Säuren, ferner Versuche mit andern Papiersorten und Lösungsmitteln führten nicht zu gleichmässigeren Retentiogrammen. Bei der Analyse von Naturstoffen, Phosphatidpräparaten des Handels usw. muss ferner immer damit gerechnet werden, dass unbekannte Stoffe im Verlauf der Chromatographie nicht vollständig vom Bereich der Cholinflecken abgetrennt werden, ohne dass sie aber sichtbar gemacht werden können. Bei der Retentionsanalyse ist es aber möglich, dass sie das Aufsteigen der Reagensfront hindern und so die Lücken zusätzlich vergrössern, was zu falschen Resultaten führt.

Fast nach Abschluss dieser Untersuchungen erhielten wir Kenntnis der Arbeit von *Levine* und *Chargaff* (l.c.) über die papierchromatographische Bestimmung des Cholins (sowie Äthanolamins und Serins) in Phosphatiden. Zum Entwickeln verwenden sie für alle 3 Verbindungen dasselbe Lösungsmittel, nämlich n-Buta-

nol-Diäthylenglykol-Wasser. Die Cholinflecken machen sie auf dieselbe Weise sichtbar wie beim qualitativen Nachweis (S. 284), bedienen sich aber zur Ausmessung der planimetrischen Methode von *Fisher* und Mitarbeitern [71]), welche wir in der 4. Mitteilung (l. c., S. 81) schon erwähnt haben. Die Umrisse jedes Fleckens werden 4mal bestimmt und die Durchschnittsfläche berechnet. Die Auswertung erfolgt graphisch anhand von gleichzeitig mitchromatographierten Testproben. Die Planimetrie scheint bei Cholin recht gut anwendbar zu sein, weil die Fleckenränder relativ scharf abgegrenzt sind.

Wir haben diese Methode nicht überprüft, da es uns in der Folge gelungen war, die photometrische Auswertung mit dem Spektrallinienphotometer zu entwickeln, welche sich auch für die Messung der Cholinflecken brauchbar erwies. In der 4. Mitteilung, Tab. 4 und 13 sowie Fig. 13, wurde schon die Herstellung der Chromatogramme und der günstige Bereich der Messung angegeben. Das Lösungsmittel (tert. Butanol-Methanol-Wasser) erlaubt ein verhältnismässig rasches Chromatographieren, auch lässt es sich nachher leicht entfernen. Zum Sichtbarmachen verwenden wir keine wässrige Lösung von Phosphormolybdänsäure, sondern eine solche in Äthylalkohol-Chloroform. Als Reduktionsmittel bewährte sich die salzsaure Stannochloridlösung. In den bisher untersuchten Proben (Phosphatidhydrolysate) konnten wir auf diese Weise nur Cholin feststellen. Die Methode scheint also so spezifisch zu sein, dass eine Störung durch andere Verbindungen nur in Ausnahmefällen zu befürchten ist.

B. Ausführung der Bestimmung

1. Hydrolyse der Phosphatidpräparate

Es kann die gleiche Technik angewendet werden, wie bei der Inositbestimmung beschrieben (Abb. 1 und 2, S. 254).

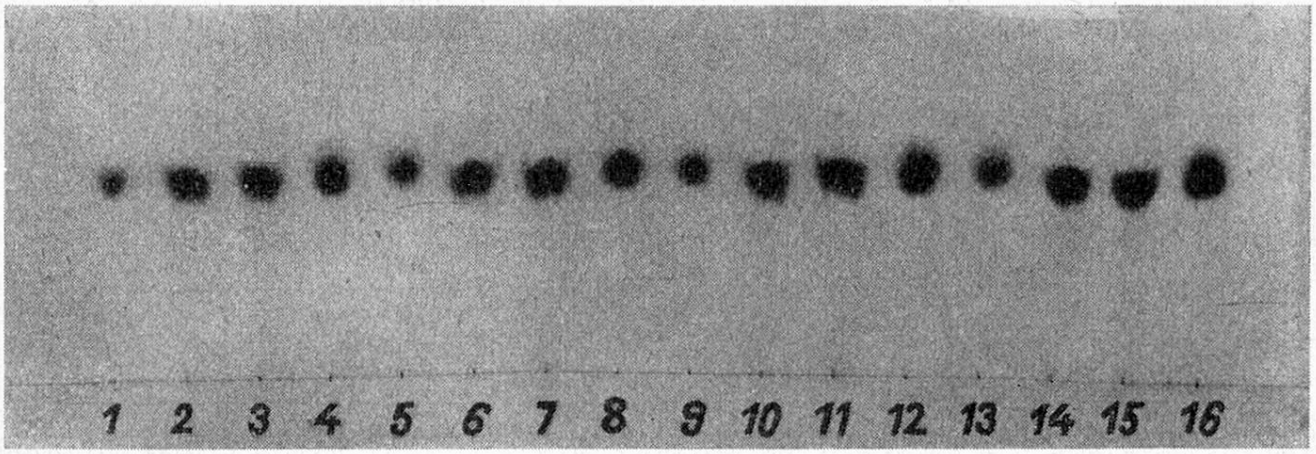
2. *Herstellung der Papierchromatogramme*

Tabelle 13

Reihenfolge	Art des Vorgehens	Ausführung
a	Vorbereitung der Proben	Hydrolyse, vgl. oben
b	Ausführungsform der Papierchromatographie	aufsteigendes Lösungsmittel (Zylindermethode)
c	Papiermaterial	Schleicher & Schüll Nr. 2043a
d	Menge Hydrolysat	ein- oder mehrmals 2 µl
e	Lösungsmittel	tert. Butanol-Methanol-Wasser = 4 — 5 — 1
f	Entwicklungszeit	3—4 Stunden
g	Steighöhe des Lösungsmittels	ca. 15 cm
h	Trocknen der Papiere	ca. 30 Minuten bei Zimmertemperatur
i	Reagens zum Sichtbarmachen	P-Mo-Säure (1%ige Lösung) in $CHCl_3$-Äthylalkohol (1:1), $SnCl_2$ in 3n-Salzsäure (1 %)
k	Sichtbarmachen	Besprühen mit P-Mo-Säurelösung, 20 Min. waschen in fliessendem Wasser, trocknen bei Zimmertemperatur, besprühen mit $SnCl_2$-Lösung
l	Haltbarkeit des Chromatogramms	Beste Kontraste nach ca. 5 Minuten, nach ca. 30 Minuten schon verfärbt

C. Resultate

1. Bestimmung des Cholins in Rapsphosphatid



Chromatogramm 9

Nr.	Probe
1	Test: 30,8 γ Cholinchlorid/2 µl
2	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl
3	Rapsphosphatidhydrolysat: 4 µl
4	Test: 57,8 γ Cholinchlorid/2 µl
5	
6	wie Nr. 1—4
7	
8	
9	
10	wie Nr. 1—4
11	
12	
13	
14	wie Nr. 1—4
15	
16	

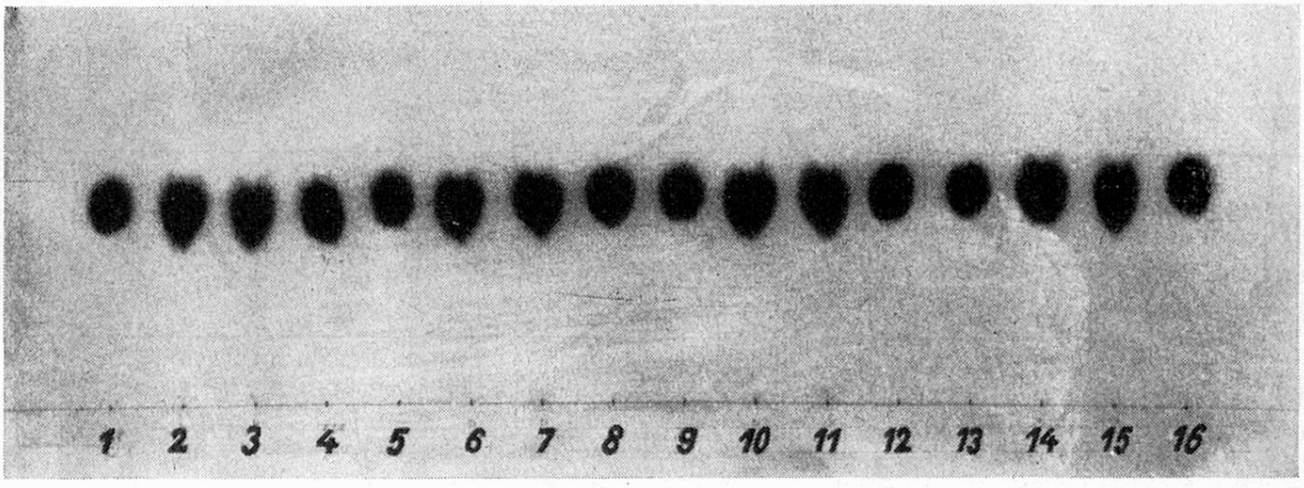
Tabelle 14

Einwaage mg	Cholinchlorid gefunden				Phosphatidyl-Cholin %
	γ / 4 µl		γ / 200 µl	%	
	Einzel	Mittel			
51,45	47,5 44,0 53,0 52,0 49,5 54,0 54,0 53,5	51,0	2550	4,95	28,7

2. *Bestimmung des Cholins in Ovophosphatid*

Tabelle 15

Einwaage mg	Cholinchlorid gefunden				Phosphatidyl-Cholin %
	γ / 4 μl		γ / 200 μl	%	
	Einzel	Mittel			
19,71	59,6 62,8 54,3 51,5 56,0 49,0	55,5	2775	14,1	81,7



Chromatogramm 10

Nr.	Probe
1	Test: 30,8 γ Cholinchlorid/2 µl
2	Ovophosphatidhydrolysat: 4 µl
3	Ovophosphatidhydrolysat: 4 µl
4	Test: 57,8 γ Cholinchlorid/2 µl
5	
6	wie Nr. 1—4
7	
8	
9	
10	wie Nr. 1—4
11	
12	
13	
14	wie Nr. 1—4
15	
16	

3. Zusatz einer bekannten Menge Cholinchlorid zu Ovophosphatid

Tabelle 16

Cholinchlorid-Zusatz γ / 4 µl	Cholinchlorid gefunden γ / 4 µl		Theoretisch vorhanden γ / 4 µl	Gefunden % der Theorie
	Einzel	Mittel		
—	—	73,8	—	—
11,3	69,2 100,5 87,0 92,2 101,0 107,0	92,0	85,1	108,1

4. Bestimmung von Cholin in Volleipulver

Tabelle 17

Methode	Volleipulver Nr. 109				Volleipulver Nr. 542			
	% Cholin, berechnet auf Trockensubstanz (92,55 %)							
	Einzel	Mittel	Einzel	Mittel	Einzel	Mittel	Einzel	Mittel
Reineckatmethode, gravimetrisch, ausgeführt im Laboratorium des VSK, Basel (Leiter: Dr. H. Hadorn)	1,81				1,778 1,773 1,790	1,780		
Papierchromatographie, Bestimmungen mit der beschriebenen Methode ausgeführt	1,86 1,74 1,73 1,77 1,81 1,91	1,80	2,15 2,18 2,08 1,82 2,15 2,22	2,10	1,80 1,92 2,08 1,80 1,98 2,15	1,95	2,40 2,59 2,06 1,97 2,20 2,38	2,26

Das Trockeneipulver wurde direkt der Hydrolyse unterworfen, keine Isolierung der Lipoide.

D. Allgemeines zur Methode

Die folgende Tabelle lässt erkennen, dass die Papierchromatographie, bei Analyse des gleichen Hydrolysates, relativ gut mit der Reineckatmethode übereinstimmende Werte ergibt. Die Spezifität der chromatographischen Methode wirkt sich in den untersuchten Fällen nicht so stark aus wie bei der Äthanolaminbestimmung (Tab. 8), da offenbar ausser Cholin nur geringe Mengen anderer Verbindungen vorhanden sind, welche unlösliche Reineckate bilden.

Tabelle 18

Methode	% Phosphatidyl-Cholin (Mittel)					
	Raps-phosphatid	Differenz		Ovo-phosphatid	Differenz	
		direkt	auf Phosphatidmenge bezogen		direkt	auf Phosphatidmenge bezogen
Reineckatmethode (kolorimetrisch, nach Methode 4, S. 282)	33,2	4,5	13,5	86,5	4,8	5,5
Papierchromatographie	28,7 (Tab. 14)			81,7 (Tab. 15)		

Zusammenfassung

Im Verlaufe von Untersuchungen über die Phosphatide in Weizenkeimen ergab sich die Notwendigkeit, genügend empfindliche, spezifische und ohne zu grossen Aufwand durchführbare Methoden zur Bestimmung der stickstoffhaltigen Spaltprodukte Äthanolamin, Serin und Cholin, sowie des Inosits zur Verfügung zu haben. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, zahlreiche ältere und neuere Methoden zu besprechen und miteinander zu vergleichen. Schliesslich werden Verfahren beschrieben, welche, auf papierchromatographischer Grundlage und Auswertung mit dem Spektrallinienphotometer, allen Anforderungen hinreichend genügen und zur Analyse von Phosphatidpräparaten nach vorangegangener saurer Hydrolyse geeignet erscheinen. Die zugesetzten bekannten Mengen von Inosit, Äthanolamin, Serin und Cholin konnten gut wiedergefunden werden. Ausserdem gelang es, in gereinigten Raps- und Ovophosphatidpräparaten papierchromatographisch noch mehrere unbekannte Verbindungen abzutrennen und sichtbar zu machen.

Résumé

Au cours de recherches sur les phosphatides des germes de blé on a constaté le besoin d'avoir des méthodes de dosage des produits de scission azotés (éthanolamine, sérine et cholin) et de l'inosite qui soient suffisamment sensibles, spécifiques et relativement simples. Dans le présent travail on examine et compare entre elles de nombreuses méthodes anciennes et récentes. Puis on décrit des méthodes, basées sur la chromatographie sur papier suivie de mesures au photomètre, qui suffisent à toutes les exigences et qui semblent convenir à l'analyse de produits contenant de phosphatides, après hydrolyse acide. C'est ainsi qu'on a bien retrouvé des additions de quantités connues d'inosite, d'éthanolamine, de sérine et de choline. Dans des préparations purifiées de phosphatides de colza et d'œuf on a pu séparer, par chromatographie sur papier, et rendre visibles, plusieurs substances inconnues.

Summary

Brief review of various methods for the determination of inosite, ethanolamine, serine and cholin in phosphatides followed by the description of new sensitive, specific and simple paper chromatographic methods for the detection and determination of these substances. Purified rape-seed and egg phosphatides have been found to contain several unknown substances.

Literatur

[1]) *G. Anderson* und Mitarbeiter, J. Am. Chem. Soc. 52, 1607 (1930).
[2]) *E. Klenk, H. Sakai,* Z. physiol. Chemie 258, 33 (1939).
[3]) *J. Folch,* J. Biol. Chem. 177, 505 (1949).
[4]) *J. Rhymer, G. J. Wallace,* J. Biol. Chem. 169, 457 (1947).
[5]) *D. W. Woolley,* J. Biol. Chem. 140, 453 (1941).
[6]) *W. H. Schopfer,* Chimia 5, 282 (1951).
[7]) *P. Fleury, A. Recoules,* Bull. Soc. Chimie Biol. 31, 256 (1949).
[8]) *P. Fleury, J. Marque,* J. Pharm. Chim. 10, 241 (1929).
[9]) *P. Fleury, M. Joly,* J. Pharm. Chim. 26, 341 (1937).
[10]) *B. S. Platt, G. E. Glock,* Analyst 69, 189 (1944).
[11]) *S. M. Partridge,* Biochemic. J. 42, 238 (1948).
[12]) *L. Hough,* Nature 165, 400 (1950).
[13]) *H. Sulser, O. Högl,* diese Mitt. 44, 79 (1953).
[14]) *P. Fleury,* Chimia 5, 282 (1951).
[15]) *L. Rosenthaler,* Nachweis organischer Verbindungen (1932) S. 103.
[16]) *J. Antener, O. Högl,* Mitt. 38, 226 (1947).
[17]) *G. Blix,* Biochem. Z. 305, 133 (1940).
[18]) *S. J. Thannhauser* und Mitarbeiter, J. Biol. Chem. 116, 533 (1936).
[19]) *H. H. Williams* und Mitarbeiter, J. Biol. Chem. 123, 111 (1938).
[20]) *D. D. Van Slyke,* J. Biol. Chem. 16, 121 (1913).
[21]) *J. Parnas, A. Baumann,* Biochem. Z. 56, 17 (1913).
[22]) *E. Kirk* und Mitarbeiter, J. Biol. Chem. 106, 203 (1934).
[23]) *F. Pregl, H. Roth,* Quantitative organische Mikroanalyse (1947) S. 210.
[24]) *O. Folin,* J. Biol. Chem. 51, 387 (1922).
[25]) *E. Schmitz, F. Koch,* Biochem. Z. 223, 257 (1930).
[26]) *C. Artom,* J. Biol. Chem. 157, 585 (1945).
[27]) *B. H. Nicolett, L. A. Shinn,* J. Am. Chem. Soc. 61, 1615 (1939).
[28]) *J. Bang,* Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile (1916).
[29]) *G. Blix,* Biochem. Z. 305, 133 (1940).
[30]) *H. Wittcoff,* The Phosphatides (1951).
[31]) *E. Chargaff, C. Levine, Ch. Green,* J. Biol. Chem. 175, 67 (1948).
[32]) *R. A. Boissonnas,* Helv. 33, 1975 (1950).
[33]) *C. Levine, E. Chargaff,* J. Biol. Chem. 192, 465 (1951).
[34]) *K. E. Schulte, H. Krause,* Biochem. Z. 322, 168 (1951).
[35]) *H. Sulser, H. Keksin,* diese Mitt. 45, 295 (1954).
[36]) *J. Folch, H. A. Scheider,* J. Biol. Chem. 137, 51 (1941).
[37]) *K. Schuwirth,* Z. physiol. Chem. 270, 1 (1941).
[38]) *E. Chargaff, M. Ziff, D. Rittenberg,* J. Biol. Chem. 138, 439 (1941).

[39]) *C. Artom,* J. Biol. Chem. 157, 585 (1945).
[40]) *D. D. Van Slyke, R. T. Dillon,* Proc. Exp. Biol. Med. 34, 362 (1936); Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg 22, 480 (1938).
[41]) *D. D. Van Slyke* und Mitarbeiter, J. Biol. Chem. 141, 627 (1941).
[42]) *D. D. Van Slyke* und Mitarbeiter, J. Biol. Chem. 141, 671 (1941).
[43]) *B. E. Christensen, E. S. West, K. P. Dimick,* J. Biol. Chem. 137, 735 (1941).
[44]) *F. Pregl, H. Roth,* Quantitative organische Mikroanalyse (1947) S. 192.
[45]) *H. Hutt, T. Malkin,* Nature 165, 314 (1950).
[46]) *M. Gobley,* J. pharm. chim. 9, 1, 81 (1846).
[47]) *C. C. Lucas, C. H. Best,* Vitamins and Hormones (1943).
[48]) *H. Wittcoff,* The Phosphatides (1951) S. 174.
[49]) *H. Hadorn,* Mitt. 43, 333 (1953).
[50]) *J. P. Fletcher, C. H. Best, O. M. Solandt,* Biochem. J. 29, 2278 (1935).
[51]) *A. Carayon-Gentil, E. Corteggiani, A. Pelou,* Compt. rend. soc. biol. 135, 1077 (19).
[52]) *N. H. Horowitz, G. W. Beadle,* J. Biol. Chem. 150, 325 (1943).
[53]) *J. S. Sharpe,* Biochem. J. 17, 40 (1923).
[54]) *W. Roman,* Biochem. Z. 219, 218 (1930).
[55]) *G. Brante,* Nature 163, 651 (1949).
[56]) *B. N. Ericson* und Mitarbeiter, J. Biol. Chem. 135, 671 (1940).
[57]) *J. Herzig,* H. Meyer, Ber. 27, 319 (1894).
[58]) *F. Pregl, H. Roth,* Quantitative organische Mikroanalyse (1947) S. 232.
[59]) *F. Viehböck, C. Brecher,* Ber. 63, 3207 (1930).
[60]) *P. A. Levene,* J. Biol. Chem. 18, 453 (1914).
[61]) *H. Roth,* Angew. Chemie 53, 273 (1940).
[62]) *W. Lintzel, S. Fomin,* Biochem. Z. 238, 452 (1931).
[63]) *W. Lintzel, G. Monasterio,* Biochem. Z. 241, 273 (1931).
[64]) *J. Kapfhammer, C. Bischoff,* Z. physiol. Chemie 191, 179 (1930).
[65]) *F. J. R. Beattie,* Biochem. J. 30, 1554 (1936).
[66]) *A. D. Marenzi, C. E. Cardini,* J. Biol. Chem. 147, 363 (1943).
[67]) *C. Entenman* und Mitarbeiter, J. Biol. Chem. 155, 13 (1944).
[68]) *F. Emich,* Mikrochemisches Praktikum (1931).
[69]) *H. Wittcoff,* The Phosphatides (1951) S. 174.
[70]) *Th. Wieland,* Z. angew. Chemie 60, 250 (1948); Die Naturwissenschaften 35, 29 (1948).
[71]) *R. B. Fisher, D. B. Parsons, G. A. Morrison,* Nature 161, 764 (1948).
[72]) *A. S. Hussey, J. E. Maurer,* Analyt. Chem. 24, 1642 (1952).