



Doctoral Thesis

Determination of acetylcholine and choline in biological materials using ion pair-high performance liquid chromatography and pyrolysis-gas chromatography-mass fragmentography

Author(s):

Boshart, Geraldine Edith

Publication Date:

1981

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000272523> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 6793

DETERMINATION OF ACETYLCHOLINE AND CHOLINE IN BIOLOGICAL MATERIALS
USING ION PAIR-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
AND PYROLYSIS-GAS CHROMATOGRAPHY-MASS FRAGMENTOGRAPHY

A DISSERTATION
submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE
OF
TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
GERALDINE EDITH BOSHART
M Sc (Biochemistry)
born on February 22, 1942
citizen of USA

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. P.G. Waser, referee
Prof. Dr. G. Semenza, co-referee

1981

6.0 Summary

Two new ion pair HPLC methods for the analysis of ACh and Ch have been developed. In HPLC method I, quaternary amines are analyzed as the picrate salts on 3-aminopropyl linked microsilica gel columns. In HPLC method II, quaternary amines are demethylated, derivatized with nitrobenzylbromide and analyzed by reversed phase HPLC. With both methods the analysis time is about 20 min and the detection limit for ACh about 5 ng (30 pmole). The detection limit for Ch is about 3 times (method II) or 7 times (method I) higher, unless Ch is esterified first, after which the Ch limit is similar to ACh (method II) or lower (method I).

A new syringe micropyrolyzer was used for the more rapid analysis of Ch esters by pyrolysis (Pyr)-GC-flame ionization detection (FID) (15 min) and Pyr-GC-chemical ionization (CI)-mass fragmentography (MF) (6 min). The detection limits for ACh and esterified Ch by Pyr-GC-FID are similar to those by HPLC, but Pyr-GC-CI-MF is 300 times more sensitive (10 pg, 0.1 pmole) than the other chromatographic methods.

An additional analytical method which looks quite promising for the analysis of ACh and underivatized Ch is direct inlet-thermal demethylation-CI-MF. Detection limits (500 pg) are between those of Pyr-GC-FID and Pyr-GC-CI-MF, but sample preparation is quicker, since no esterification is necessary. On the other hand, analysis times are longer (30 min), and the method will be practical only after modification of the direct inlet system to allow more rapid cooling between analyses.

All biological samples were deproteinized with 0.1N perchloric acid and the quaternary amines extracted with dipicrylamine (as counter ion) into methylene chloride. The organic extract was then further prepared according to the analytical method to be used.

Rats were sacrificed by microwave irradiation (1.9 kW) for 2.5 sec and the ACh and Ch levels in whole brain and 7 areas were determined. In whole brain, ACh levels were a little lower (18 nmoles/gr) and Ch levels a little higher (30 nmole/gr) than the optimum levels reported in the literature. This may be due to insufficient irradiation in some parts of the brain (cortex levels were particularly at variance with those in the literature). It is also possible that 0.1N perchloric acid is less effective than organic solvents in extracting ACh from biological tissues, and alternative deproteination procedures should be investigated further.

Choline levels in blood plasma and red blood cells were similar to those found in brain, but ACh levels were $\leq 1\%$ of brain levels.

The application of atropine sulfate (10 mg/Kg, i.p.) was found to decrease the level of rat whole brain ACh (-3 nmole/gr, $P < 0.01$), but no significant change was observed with the application of amitriptyline HCl (40 mg/Kg, i.p.), a tricyclic antidepressant with known anticholinergic properties. The GABA agonists muscimol (12 mg/Kg, i.p.) and diazepam (5 mg/Kg, i.p.) were both found to increase whole brain ACh slightly ($+2$ nmole/gr, $P < 0.05$). No significant changes in Ch levels were detected with any of these drugs.

Higher standard deviations were observed by Ch measurements ($\pm 15\%$) than by ACh ($\leq \pm 10\%$). A longer irradiation time (e.g. 3 sec) might improve the reproducibility of Ch measurements.

Zusammenfassung

Es wurden zwei neue Methode zur Bestimmung von Acetylcholin (ACh) und Cholin (Ch), mittels Ionenpaar-Hochleistungsfluessigkeitschromatographie (HPLC), entwickelt. Die erste HPLC-Methode besteht in der Trennung der quaternaeren Ammoniumionen als Pikrate an einer Saeule mit modifiziertem Kieselgel (kovalent gebundene 3-Aminopropyl-Reste). Bei der zweiten HPLC-Methode demethyliert man die quaternaeren Ammoniumionen und derivatisiert die so entstandenen tertiaeren Amine mit p-Nitrobenzylbromid. Die Derivate analysiert man anschliessend mit Umkehr-Phasen (Reversed Phase)-HPLC. Bei beiden Methoden betraegt die Analysenzeit ca. 20 Minuten und die Nachweisgrenze fuer ACh ca. 5 ng bzw. 30 pmol. Die Nachweisgrenze fuer Ch liegt ungefaehr dreimal (Methode II) oder siebenmal (Methode I) hoeher. Wird hingegen Ch zuerst verestert, so entspricht die Nachweisgrenze fuer Ch derjenigen von ACh (Methode II) oder liegt sogar noch tiefer (Methode I).

Fuer eine zeitsparende Analyse von Cholinestern mittels Pyrolyse-Gaschromatographie-Flammenionisations Detektion (Pyr-GC-FID) (Analysenzeit ca. 15 min) und Pyr-GC-Chemische Ionisation-Massenfragmentographie (CI-MF) (Analysenzeit ca. 6 min) verwendete man ein neues Mikropyrolyse-Einspritzgeraet. Die Nachweisgrenzen fuer ACh und verestertes Ch waren bei der Pyr-GC-FID-Methode aehnlich denjenigen der HPLC-Methoden. Die Pyr-GC-CI-MF-Methode erwies sich als ca. 300 mal empfindlicher (0.1 pmol) als die anderen chromatographischen Methoden.

Eine zusaetzliche, sehr vielversprechende Methode fuer die Bestimmung von ACh und nicht derivatisiertem Ch duerfte die Direkteinlass-thermische Demethylierung-CI-MF-Methode sein. Die Nachweisgrenzen (ca. 500 pg) liegen zwischen denjenigen, die man mit der Pyr-GC-FID oder Pyr-GC-CI-MF-Methode erreicht. Der Vorteil besteht aber in der schnelleren Proben-Vorbereitung, da die Veresterung wegfaellt. Andererseits sind die Analysenzeiten laenger (ca. 30 min). Die Methode duerfte erst nach Veraenderung am Direkteinlasssystem, die eine raschere Kuehlung zwischen zwei Analysen erlaubt, praktikabel sein.

Alle biologischen Proben (Gehirn, Blut und Urin) wurden mit 0.1N Perchlorsaure enteewisst. Dann extrahierte man die quaternaeren Ammoniumionen als Ionenpaare mit Dipikrylamin als Gegenion in Methylencchlorid. Entsprechend der anschliessend verwendeten Bestimmungsmethode

wurde der organische Extrakt weiter verarbeitet.

Ratten wurden durch Mikrowellen-Bestrahlung (1.9 kW) waehrend 2.5 sec getoetet. Danach bestimmte man die ACh- und Ch-Gehalte im Gesamthirn oder in 7 Hirnteilen. Im Gesamthirn war die mit den neuentwickelten Methoden bestimmten ACh Gehalt etwas tiefer (ca. 18 nmol/g) und der Ch Gehalt etwas hoeher (30 nmol/g) als die aus der Literatur bekannten optimalen Werte. Das koennte auf die ungenuegende Bestrahlung gewisser Hirnteile zurueckzufuehren sein (insbesondere die Cortex Gehalte wichen am staerksten von den Literaturwerten ab). Es ist auch moeglich, dass die Enteiweissung und Freisetzung der quaternaeren Ammoniumionen mit 0.1 N Perchlorsaure weniger effizient ist, als diejenige mit organischen Loesungsmitteln, um ACh aus biologischem Gewebe zu extrahieren. Deshalb sollten andere Methode zur Enteiweissung weiter untersucht werden.

Die Ch-Spiegel im Blut-Plasma und in den roten Blutkoerperchen entsprachen den im Gehirn gefundenden Gehalten, waehrend die ACh-Spiegel $\leq 1\%$ der Hirngehalte waren.

Die Verabreichung von Atropin-Sulfat (10 mg/kg, i.p.) an Ratten fuehrte zu einer Gehaltsabnahme von ACh im Gesamthirn (-3 nmol/g, $P < 0.01$). Bei der Verabreichung von Amitriptylin-Hydrochlorid (40 mg/kg, i.p.) konnte keine signifikante Veraenderung von ACh beobachtet werden, obwohl dem tricyclischen Antidepressivum anticholinergische Eigenschaften zugeschrieben werden. Die GABA-Agonisten Muscimol (12 mg/kg, i.p.) und Diazepam (5 mg/kg, i.p.) fuehrten beide zu einem geringen ACh-Anstieg im Gesamthirn ($+2$ nmol/g, $P < 0.05$). Mit keiner dieser Drogen konnte eine signifikante Aenderung des Ch-Spiegels im Gesamthirn festgestellt werden.

Bei den Ch-Bestimmungen waren die Standardabweichungen ($\pm 15\%$) groesser als bei den ACh-Bestimmungen ($\leq \pm 10\%$). Eine laengere Bestrahlungsdauer (z.B. 3 sec) koennte die Reproduzierbarkeit der Ch-Bestimmungen vielleicht verbessern.