

## DOSAGE DE LA CHOLINE EN SPECTROPHOTOMETRIE ULTRAVIOLETTE

par

JEAN-LOUIS DELSAL. \*

---

En précipitant le chlorure de choline, en milieu isopropanol par une solution de sel de Reinecke dans l'isopropanol et en dissolvant le reineckate de choline, après lavages, dans le méthanol, il est possible de doser à 310m $\mu$  de 20 à 60  $\mu$ g et à 235m $\mu$  de 5 à 40  $\mu$ g de chlorure de choline dans 10 ml de méthanol.

Le principe du dosage colorimétrique de la choline, précipitée par le sel de Reinecke, a été donné par F. J. R. Beattie (1). Les lectures à 525m $\mu$  permettent de titrer de 100 à 500  $\mu$ g de chlorure de choline par millilitre d'acétone.

Cette méthode a été transposée dans l'ultraviolet par R. J. Winzler et E. R. Meserve (2) et par Petersen (3). Le chlorure de choline est précipité en milieu aqueux et le reineckate de choline est dissout dans l'acétone. A 327m $\mu$  on peut titrer de 5 à 25  $\mu$ g de chlorure de choline par millilitre d'acétone.

Lorsqu'on veut doser la phosphatidylcholine et déterminer le rapport : phosphore/choline, on dispose pour le dosage du phosphore, d'une méthode très sensible permettant de titrer de 0,5 à 4  $\mu$ g de phosphore dans 4 ml de *n*-butanol (4), soit au maximum 1  $\mu$ g de phosphore par millilitre. Pour le dosage de la choline il serait utile d'avoir la même sensibilité et de pouvoir doser, avec la même précision, un maximum de 5  $\mu$ g de chlorure de choline par millilitre. Or la méthode à 327m $\mu$  ne permet pas une telle sensibilité.

---

\* C. R. Ac. Sc. 1957, 244, 2855 2858.

Nous montrons qu'on peut obtenir ce résultat à condition de faire la précipitation du chlorure de choline en milieu isopropanol et non aqueux et de dissoudre le reineckate de choline dans le méthanol et non dans l'acétone.

*Précipitation de la choline.* — D. Glick (5) a montré que le reineckate de choline était moins soluble dans le *n*-propanol que dans les autres solvants. Nous avons trouvé que l'isopropanol dissout encore un peu moins de reineckate de choline. Or l'isopropanol peut dissoudre 10 mg de sel de Reinecke et 13 mg de chlorure de choline par millimètre. On peut donc précipiter la choline en milieu strictement isopropanol. Dans ces conditions la solubilité du reineckate de choline est minimum, ce qui apporte un très grand avantage en microanalyse. Cette méthode de précipitation très sensible donne, avec 1  $\mu$ g de chlorure de choline, un précipité facilement visible en éclairant le tube latéralement et en l'examinant sur fond noir. Cette réaction est 20 fois plus sensible que celle de Florence.

*Lavages du reineckate de choline.* — Ils sont effectués avec des solutions saturées de reineckate de choline dans l'isopropanol et dans l'éther. Ces solutions de moins de 24 h seront centrifugées avant emploi.

*Dissolution du reineckate de choline.* — L'acétone est ici un très mauvais solvant pour la spectrophotométrie en ultraviolet, puisqu'à 327 $\mu$  il absorbe très fortement : 4% de transmission sous 1 cm. Il en résulte que cette longueur d'onde ne correspond pas du tout au minimum d'absorption du reineckate de choline. Par contre, le méthanol contrôlé par voie spectrale qui dissout à plus 20° par millilitre, un poids de reineckate de choline correspondant à 175  $\mu$ g de chlorure de choline absorbe peu dans l'ultraviolet : 80% de transmission à 235 $\mu$  et 96% à 310 $\mu$  pour une cuve de 1 cm d'épaisseur.

*Spectres d'absorption du sel de Reinecke et du reineckate de choline dans le méthanol et l'isopropanol.* — Une solution de sel de Reinecke ou de reineckate de choline dans le méthanol a un spectre d'absorption dans l'ultraviolet (210 à 350 $\mu$ ) présentant deux maxima à 235 et 310 $\mu$  A et deux minima à 220 et 256 $\mu$ . Il est donc possible, avec le méthanol, de faire les lectures à 235 $\mu$  (sensibilité maximum) ou à 310 $\mu$  (sensibilité réduite de 30%).

Le spectre du sel de Reinecke ou du reineckate de choline dans l'isopropanol présente également deux maxima d'absorption à 236 et 312 $\mu$  et deux minima à 220 et 256 $\mu$ .

Il en résulte que le spectre est celui de l'ion reineckate et que le lavage du reineckate de choline par la solution saturée de

reineckate de choline dans l'isopropanol devra être effectué avec soin pour enlever l'excès de sel de Reinecke.

Ajoutons que ces spectres se modifient au cours du temps, la densité optique à 235 et 310 $\mu$  diminue régulièrement jusqu'à la disparition totale de ces deux maxima. Il est donc indispensable d'utiliser pour la précipitation des solutions fraîches de sel de Reinecke dans l'isopropanol et pour les lavages des solutions saturées (ayant moins de 24 h) de reineckate de choline dans l'isopropanol et dans l'éther.

*Technique du dosage.* — Après hydrolyse de la phosphatidylcholine, élimination des acides gras et dissolution de la choline dans l'éthanol absolu selon la méthode de P. Fleury et H. Guitard (6), on verse quantitativement l'extrait éthanolique dans un tube à centrifuger conique de 12 ml. On chasse l'éthanol sous vide, à une température inférieure à 45°, et dissout la choline (20 à 60  $\mu$ g) dans 0,5 ml d'isopropanol purifié. On ajoute 1 ml de solution fraîche de sel de Reinecke, recristallisé, dans l'isopropanol (1 mg/ml, centrifugée avant emploi). La précipitation du reineckate de choline est immédiate. Après 1 h à la température du laboratoire on centrifuge et décante le surnageant à la pipette capillaire. On verse lentement 1 ml de solution saturée de reineckate de choline dans l'isopropanol le long des parois du tube à centrifuger. On met le précipité en suspension et centrifuge. On décante et lave les parois du tube avec 1 ml de solution saturée de reineckate de choline dans l'éther. On remet le précipité en suspension, centrifuge et décante. On le dissout ensuite dans 10 ml de méthanol. Après un repos de 30 mn, à l'obscurité, on effectue les lectures à 310 $\mu$  avec un spectrophotomètre, cuves en quartz de 1 cm d'épaisseur, contre un blanc de méthanol. Pour le calcul, on se reportera à la droite obtenue en traitant, dans les mêmes conditions, des quantités variables d'une solution de chlorure de choline (recristallisé deux fois et séché sous vide en présence d'anhydride phosphorique) à 100  $\mu$ g par millilitre d'isopropanol. La limite maximum est de 6  $\mu$ g de chlorure de choline par millilitre de méthanol et, malgré cette faible teneur, la précision est de  $\pm 1,5\%$ . On peut évidemment augmenter la sensibilité en dissolvant le précipité dans 3 ml de méthanol au lieu de 10 ml.

En faisant les lectures à 310 $\mu$  on perd en sensibilité, mais on gagne en précision par rapport aux lectures faites à 235 $\mu$ , celles-ci restant pourtant utilisables pour de plus faibles teneurs en chlorure de choline (5 à 40  $\mu$ g). Par rapport au dosage à 327 $\mu$  dans l'acétone cette méthode est 3,3 fois plus sensible à 310 $\mu$  et 4,7 fois plus sensible à 235 $\mu$ . A 310 $\mu$  ce dosage est 30% moins sensible que

les méthodes de H. D. Appleton et col. (7) et D. J. Kushner (8) précipitant la choline sous forme de périodure (instable) et faisant les lectures à 365m $\mu$  dans le dichlorure d'éthylène. A 235m $\mu$  il est aussi sensible et il a l'avantage de précipiter la choline sous forme de reineckate stable, en solution méthanolique, pendant au moins 1 h.

- (1) *Biochem. J.*, 30, 1936, p. 1554.
- (2) *J. Biol. Chem.*, 159, 1945, p. 395.
- (3) *Scand. J. Clin. Lab. Inv.*, 2, 1950, p. 14.
- (4) J. L. Delsal et H. Manhouari, *Bull. soc. chim. Biol.*, 37, 1955, p. 1041.
- (5) *J. Biol. Chem.*, 156, 1944, p. 643.
- (6) *Ann. Pharm. Franç.*, 6, 1948, p. 252.
- (7) *J. Biol. Chem.*, 205, 1953, p. 803.
- (8) *Biochim. Biophys. Acta*, 20, 1956, p. 554.