

ZUR PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN AUFTRENNUNG VON
PFLANZENLIPIDEN

ULRICH BEISS*

*Institut für landwirtschaftliche Technologie und Zuckerindustrie**,
Technische Hochschule, Braunschweig (Deutschland)*

(Eingegangen den 20. Juni 1963)

Die Analyse von Pflanzenlipiden und die Untersuchung ihrer funktionellen Aufgaben ist schwierig durchzuführen, da vor einer Bestimmung der einzelnen Stoffe ihre Abtrennung aus den sehr komplex zusammengesetzten Lipidextrakten erforderlich ist. Hierzu standen in der Vergangenheit eine Reihe präparativ-chemischer Methoden zur Verfügung, deren Genauigkeit für analytische Zwecke jedoch nicht ausreichend war^{1,2}. Einen Fortschritt bedeutete daher die Einführung der Chromatographie an Kieselgelsäulen, obwohl auch hierbei keine voll befriedigenden Auftrennungen erzielt werden konnten³.

Die Ergebnisse, die durch Anwendung üblicher papierchromatographischer Methoden erhalten wurden, waren ebenfalls nicht sehr ermutigend. BENSON UND MARUO⁴ konnten zwar Lipidextrakte aus Pflanzen in vier verschiedene Hauptfraktionen auftrennen; trotzdem wurde in dieser wie auch in späteren Arbeiten die zuerst von DAWSON⁵ angewandte Deacylierungstechnik vorgezogen, bei der die nach schonender hydrolytischer Abspaltung der Fettsäurereste entstehenden wasserlöslichen Spaltprodukte chromatographisch identifiziert wurden. Aus dem Ergebnis dieser Bestimmungen wurde dann auf die Zusammensetzung der nativen Lipide geschlossen.

Mit dieser Methode konnten in verschiedenen Pflanzen zwei neue Phosphatide, drei Glykolipide und ein Sulfolipid nachgewiesen werden^{4,6-8}. Ein Nachteil des Verfahrens besteht jedoch darin, dass zur Vermeidung von Reaktionen, die über die Abspaltung der Fettsäuren hinausgehen, die Hydrolysebedingungen ausserordentlich genau kontrolliert werden müssen und dass Diesterverbindungen die gleichen Spaltprodukte wie die entsprechenden Lysoverbindungen ergeben⁹.

Die von MARINETTI und Mitarb.^{10,11} entwickelte papierchromatographische Technik an mit Kieselgel imprägniertem Papier wurde bei der Untersuchung von Phosphatiden tierischer Herkunft in vielen Fällen erfolgreich angewandt¹². Bei der Auftrennung der *Chlorella*-Lipide liessen sich auf diesem Wege zunächst keine befriedigenden Resultate erzielen (FERRARI, nach Zit. 14). KATES^{13,14} konnte jedoch durch eine zweimalige Entwicklung mit dem gleichen Lösungsmittel den Trenneffekt so weit steigern, dass der Nachweis von mindestens 11 Lipidkomponenten im Blattextrakt von *Phaseolus multiflorus* gelang. Allerdings trat auch hier noch eine Überlagerung einzelner Flecke auf.

* Neue Anschrift: Institut für Zuckerrübenforschung, Göttingen.

** Direktor: Professor Dr. F. SCHNEIDER.

Bei der Untersuchung der Lipide verschiedener Pflanzenarten liessen sich von uns an einem kürzlich im Handel erschienenen Kieselgelpapier (Schleicher & Schüll 289) sehr gute Auftrennungen dieser komplex zusammengesetzten Gemische erzielen. Obwohl die Identifizierung aller aufgefundenen Komponenten noch nicht abgeschlossen ist, soll an dieser Stelle doch schon kurz über unsere Erfahrungen bei der Auftrennung pflanzlicher Lipide berichtet werden.

METHODIK

1. Herstellung der Lipidlösungen

Die Lipidextraktion wurde in Anlehnung an das Verfahren von BLIGH UND DYER¹⁵ in folgender Weise vorgenommen: 100 g frische Blätter werden in 100 ml Chloroform und 200 ml Methanol ca. 3 Min. im Starmix homogenisiert; danach werden weitere 100 ml Chloroform und etwa 1 Min. später 100 ml dest. Wasser hinzugefügt. Nach intensivem Mischen wird der Extrakt durch ein Filter abgesaugt. Der Filtrerrückstand mitsamt dem Filter wird nochmals kurz in je 100 ml Chloroform und Methanol homogenisiert; anschliessend wird das Homogenisat 15 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wird der Extrakt abgesaugt, mit 90 ml dest. Wasser versetzt und mit der ersten Lösung vereinigt. Nach mehrstündiger Aufbewahrung in der Kälte haben sich der tiefgrüne Lipidextrakt und die gelbbraune Waschphase, die die wasserlöslichen Verbindungen enthält, gut voneinander getrennt. Die organische Phase wird vorsichtig abgenommen und im Vakuum unterhalb von 35° zur Trockne gebracht. Zur Chromatographie wird eine 5 %ige Lösung der Lipide in Benzol-Amylalkohol (1:1) hergestellt.

Diese Rohlipidlösungen wurden auch zum Auffinden der günstigsten Lösungsmittelsysteme benutzt. Zur Identifizierung einzelner Flecke und zur Ermittlung von R_F -Werten kamen darüber hinaus gereinigte Testpräparate zur Anwendung.

2. Chromatographische Technik

Die Trennung wurde bei Raumtemperatur (18–22°) nach der aufsteigenden Methode in Glasstutzen mit eingeschliffenem Deckel durchgeführt. Die für das Kieselgelpapier (Schleicher & Schüll 289) brauchbaren Lösungsmittelsysteme sind in Tabelle I

TABELLE I
LÖSUNGSMITTELSYSTEME
(Angaben in Volumenteil)

Lösungsmittel	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Tetrahydrofuran	45	45	45	—	—	—	—	—	—	—
Wasser	4	6	6	12	1	3	1	1	6	6
Diisobutylketon	9	5	5	—	5	30	10	10	—	30
Methylisobutylketon	—	—	—	—	—	26	8	8	40	26
Methyläthylketon	—	—	—	—	—	20	10	8	20	20
Chloroform	—	10	—	—	40	110	90	100	180	110
Eisessig	—	6	—	—	—	—	—	10	45	45
Ameisensäure (98 %ig)	—	—	—	—	—	30	20	10	—	—
Äthylacetat	—	—	—	64	—	—	—	—	—	—
Isopropanol	—	—	—	24	—	—	—	—	—	—
Methanol	—	—	—	—	9	—	—	—	—	—

angegeben. Die verwendeten Lösungsmittel sollen frei von Peroxyden sein, da sonst die Trennungen und auch die Ninhydrinreaktion gestört werden; das Tetrahydrofuran und die Ketone wurden deshalb über Eisen-(II)-sulfat aufbewahrt und vor Gebrauch frisch destilliert.

Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten Verbindungen wurden verschiedene Farbreaktionen benutzt. So verwendeten wir zum *allgemeinen Lipidnachweis* die Anfärbung mit Rhodamin B. Um die störende stärkere Untergrundfärbung zu vermeiden, die bei Einwirkung einer rein wässrigen Farbstofflösung auf Kieselgelpapier auftritt, benutzten wir schliesslich eine 0.01 %ige Rhodamin B-Lösung in 25 %igem Methanol unter Zusatz von 0.5 % Ammoniak. Die Chromatogramme wurden 5 Min. in das Farbbad gelegt, anschliessend mehrere Male in dest. Wasser gewaschen und schliesslich im feuchten Zustand im U.V.-Licht betrachtet; dabei lassen sich unterschiedliche Farbtönungen bei den einzelnen Lipiden beobachten (siehe Tabelle III). Neben der Rhodaminfärbung konnten die Lipide ausserdem durch Anfärbung mit Joddämpfen¹⁶ oder Protoporphyrin¹⁷ sichtbar gemacht werden.

Einzelne Lipidbestandteile liessen sich auf den Chromatogrammen zusätzlich mit den folgenden Farbreaktionen nachweisen.

(a) *Cholin* durch Besprühen mit Dragendorff-Reagens (Stammlösung: 1 g Kaliumwismutjodid in 100 ml Methanol und 50 ml Eisessig lösen. Vor Gebrauch im Verhältnis 1:2 mit Methanol verdünnen).

(b) *Phosphorsäure* durch Einlegen der Chromatogramme in ein nach HAHN UND LUCKHAUS¹⁸ modifiziertes Zinzadze-Reagens (Herstellung: 6.85 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 400 mg Hydrazinsulfat in 100 ml Wasser lösen, 250 ml konz. Schwefelsäure p.a. und nach dem Abkühlen weitere 600 ml Wasser hinzufügen); der Reagensüberschuss kann anschliessend mit Methanol ausgewaschen werden.

(c) *NH₂-Gruppen* durch Besprühen mit Ninhydrin¹⁹.

(d) *Ungesättigte Bindungen* durch Einwirkungen von OsO₄-Dämpfen²⁰.

(e) *Kohlenhydrate* durch Reaktion mit Perjodat-Fuchsin-schwefliger Säure²¹, durch Besprühen mit Anilinphthalat²² oder Triphenyltetrazoliumchlorid²³.

Die angegebenen Färbungen wurden an Parallelchromatogrammen durchgeführt; es ist jedoch auch möglich, die Färbung mit Ninhydrin, Dragendorff, Rhodamin B und Zinzadze in der angegebenen Reihenfolge an einem Chromatogramm hintereinander auszuführen.

ERGEBNISSE

Die mit den in Tabelle I zusammengestellten Lösungsmittelsystemen und den zur Verfügung stehenden Testsubstanzen gefundenen R_F -Werte sind aus Tabelle II zu ersehen; es handelt sich dabei um Mittelwerte von mehreren Chromatogrammen mit jeweils einer Steighöhe von ca. 25 cm. In fast allen Fällen wurden die einzelnen Flecke gut voneinander getrennt; lediglich Phosphatidylserin zeigte in den säurefreien Lösungsmitteln die Tendenz, einen länger auseinandergezogenen Fleck zu bilden, der die angrenzenden Komponenten teilweise überdeckte. Dies Verhalten könnte einmal dadurch verursacht sein, dass auch die gereinigten Testsubstanzen noch Gemische darstellen, in denen die einzelnen Komponenten sich durch die verschiedenen Fettsäurereste unterscheiden. Andererseits ist auch die Möglichkeit gegeben, dass Phosphatidylserin und seine Salze eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit besitzen, wie an Kieselgelsäulen bereits früher festgestellt worden ist²⁴.

TABELLE II
R_F-WERTE VON TESTSUBSTANZEN

Testsubstanz	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Lyso-Phosphatidylcholin	0.06	0.09	0.13	0.14	0.13	0.31	0.26	0.14	0.10	0.09
Sphingomyelin	0.10	0.16	0.25	0.10	0.25	0.39	0.28	0.27	0.18	0.18
Phosphatidylcholin	0.17	0.25	0.32	0.21	0.45	0.48	0.44	0.40	0.42	0.36
Phosphatidylserin	0.32	0.40	0.49	0.17	0.22	0.41	0.38	0.29	0.35	0.33
Phosphatidyläthanolamin	0.42	0.49	0.53	0.63	0.61	0.52	0.49	0.46	0.64	0.66
Lyso-Phosphatidyl- äthanolamin	0.27	0.31	0.44	0.49	0.36	0.33	0.30	0.17	0.25	0.20
Phosphatidylinosit	0.24	0.33	0.51	0.09	0.20	0.15	0.27	0.08	0.09	0.09
Cerebrosid I	0.51	0.56	0.61	0.68	0.51	0.23	0.25	0.13		0.13
Cerebrosid II	0.79	0.83	0.81	0.88	0.75	0.51	0.50	0.48	0.74	0.50
Cerebrosid III	0.83	0.85	0.85	0.88	0.75	0.59	0.56	0.56	0.86	0.68

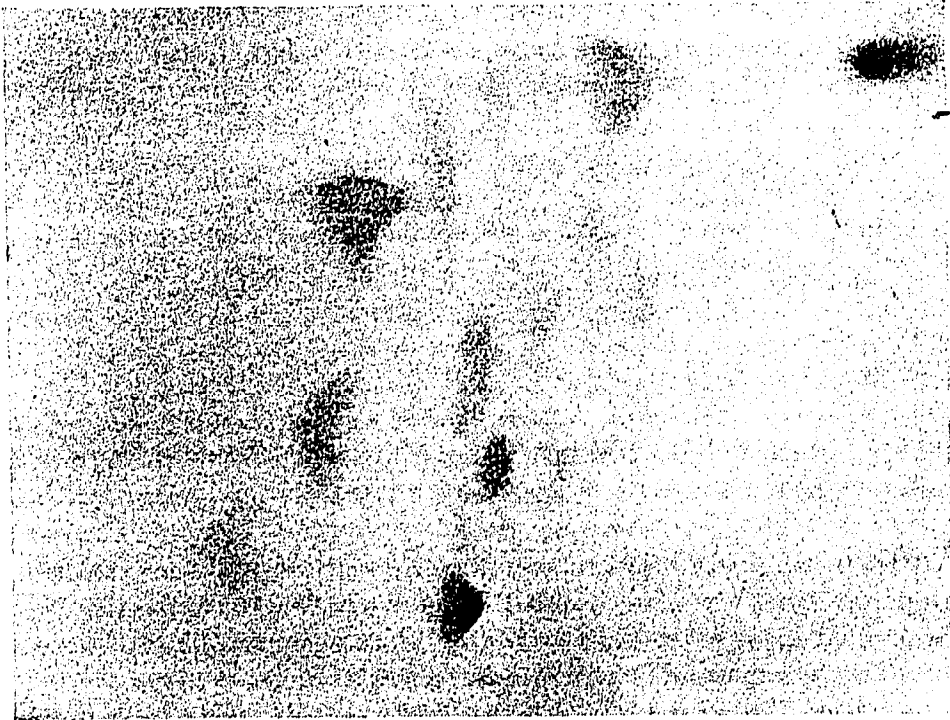
Auch nach Auftrennung von frisch gewonnenen Phosphatidextrakten aus Rinderhirn, Kaninchenherz und verschiedenen Pflanzen wurde Phosphatidylserin als langgezogener Fleck erhalten; es ist daher nicht anzunehmen, dass diese Überlappung durch eine Zersetzung unseres Testpräparates verursacht wurde.

Inzwischen haben THIELE UND WOBERT²⁵ mitgeteilt, dass sie am gleichen Kieselgelpapier unter Verwendung der von uns schon früher mitgeteilten²⁶ Lösungsmittelsysteme III und VI ebenfalls eine gute Auftrennung von Phosphatiden erzielt haben; die von ihnen angegebenen *R_F*-Werte stimmen grösstenteils mit den von uns gefundenen überein. Einige Abweichungen lassen sich wahrscheinlich damit erklären, dass ihre Trennungen bei 2°, unsere jedoch bei 18–22° durchgeführt wurden.

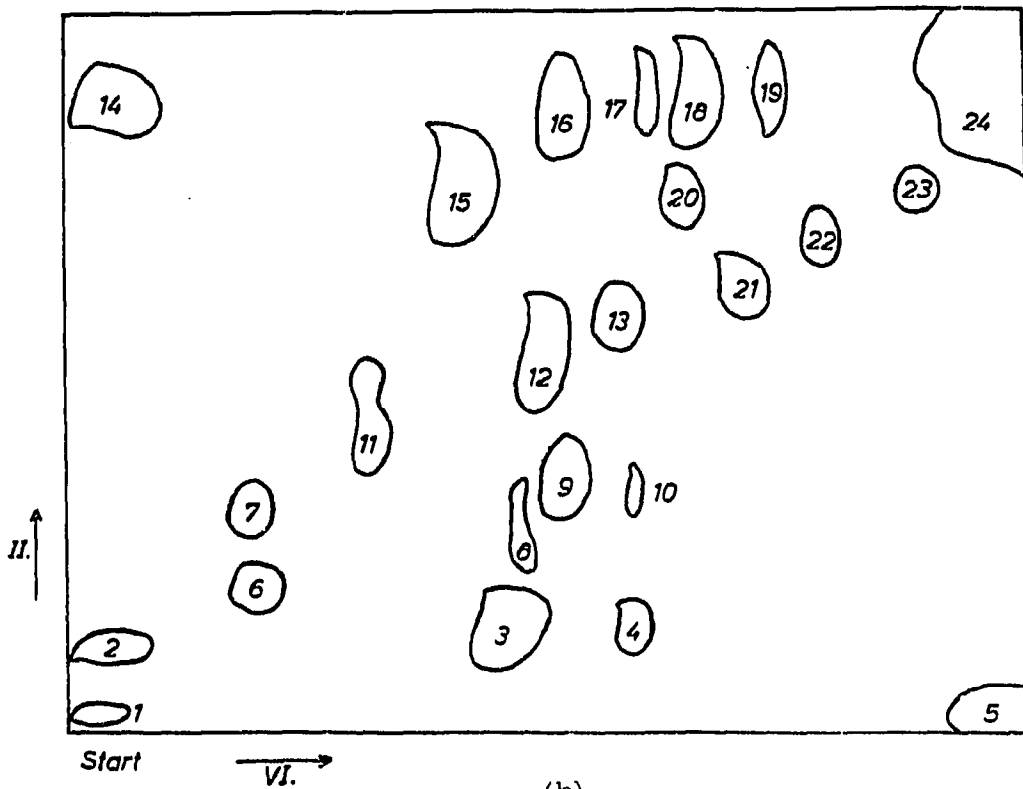
Bereits bei den ersten Versuchen erwies es sich als unmöglich, alle Komponenten eines Lipidextraktes aus Pflanzen im eindimensionalen Chromatogramm aufzutrennen. Daher wurde die zweidimensionale Technik angewendet, wobei sich zeigte, dass mit einer effektiven Lauffläche von 14 × 14 cm bereits sehr gute Auftrennungen möglich sind; die Laufzeit war dann sehr kurz und betrug insgesamt etwa 3 Stunden. Zusätzlich benutzten wir auch grössere Chromatogramme mit Laufflächen von 16 × 18 cm und 18 × 24 cm. Abgesehen davon, dass auf diese grössere Lipidmengen aufgetragen und dadurch Komponenten nachgewiesen werden konnten, die nur in geringer Konzentration vorlagen, fanden wir jedoch keinen Vorteil in der Verwendung grösserer Papierformate, da die schärfsten Trennungen auf den kleinen Laufflächen erzielt wurden.

Zur Auftrennung von Lipidrohextrakten haben sich die Lösungsmittelkombinationen II oder III (1. Lauf mit der Faserrichtung) und VI, VII oder VIII (2. Lauf) bewährt. Bei der Untersuchung der Lipide aus Zuckerrübenblättern wurden dabei 23 verschiedene Komponenten gefunden (siehe Tabelle III und Fig. 1), von denen auf Grund verschiedener Farbreaktionen 4 als Glykolipide und 10 als Phosphatide eingestuft wurden; 9 weitere Komponenten ergaben lediglich eine Anfärbung mit Rhodamin B, ohne dass jedoch auf Grund anderer Reaktionen eine Zuordnung möglich war.

Mit der angegebenen Methode lässt sich in relativ kurzer Zeit die Auftrennung eines Lipidgemisches erreichen; über ihre Anwendung zur Differenzierung der Lipide gesunder und viruskranker Pflanzen wird an anderer Stelle berichtet werden.



(a)



(b)

Fig. 1 (a). Auftrennung eines Lipidextraktes aus den Blättern vergilbungs kranker Zuckerrüben (Lösungsmittelsysteme II und VI; Anfärbung mit OsO_4). (b). Lage der Lipide im zweidimensionalen Chromatogramm. (Lösungsmittelsysteme II und VI; Erläuterung siehe Tabelle III).

TABELLE III

FARBREAKTIONEN DER PFLANZENLIPIDE (= ERLÄUTERUNG ZU FIG. 1)

Fleck Nr.	Anfärbung mit						Vorläufig identifiziert als
	Rhodamin B	Dragen- dorff	Nin- hydrin	OsO ₄	Zinnsäure	Perjodat- Schiff	
1	rot	±	+	—	—	—	—
2	orange	—	—	—	—	—	—
3	hell-orange	+ + +	—	+ + +	+ + +	—	Phosphatidylcholin
4	± orange	—	—	+	+	—	Phosphatid
5	rot	—	—	—	—	—	—
6	orange	—	—	+	+	+	Phosphatidylinosit
7	orange	—	—	+	+	+	Phosphatid
8	blau-rot	±	+	+	+	—	Phosphatidylserin
9	rosa-orange	±	+	+ + +	+ + +	—	Phosphatidyläthanolamin
10	orange	±	+	+	+	—	Phosphatid
11	orange	—	—	+ +	—	+	Glykolipid
12	orange	—	—	+ + +	+ +	+ + +	Phosphatid
13	± orange	—	—	+	—	—	—
14	rot-orange	—	—	±	—	—	—
15	gelb	±	—	+ + +	—	+ + + *	Glykolipid
16	rosa-rot	—	—	+ +	—	+	Glykolipid
17	rosa-rot	—	—	+	—	—	—
18	gelb	±	—	+ + +	—	+ + + *	Glykolipid
19	orange	—	—	±	—	—	—
20	± orange	—	—	+	+	+	Phosphatid
21	orange	—	—	+	+	+	Phosphatid
22	orange	—	—	+	—	—	—
23	orange	—	—	+	—	—	—
24	—	—	—	—	—	—	Farbstoffe, freie Fettsäuren, etc.

* Reagierten zusätzlich mit Anilinphthalat und Triphenyltetrazoliumchlorid.

DANK

Wir sind den Herren Prof. Dr. L. HÖRHAMMER, München, und Prof. Dr. E. KLENK, Köln, für die freundliche Überlassung von gereinigten Testsubstanzen zu Dank verpflichtet.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch zweidimensionale Chromatographie auf Kieselgelpapier gelingt es, Lipidrohextrakte in kurzer Zeit aufzutrennen. Bei der Untersuchung von Zuckerrübenblattextrakten wurden insgesamt 23 verschiedene Lipidkomponenten aufgefunden, von denen 10 als Phosphatide und 4 als Glykolipide charakterisiert werden konnten. 9 Komponenten liessen sich noch nicht näher klassifizieren.

SUMMARY

Crude lipid extracts may be separated rapidly by two-dimensional chromatography on a new type of silicic acid-impregnated paper. In the examination of lipid extracts of sugar beet leaves 23 different spots have been observed; 10 of these have been characterized as phospholipids and 4 as glycolipids, while the remaining 9 lipid spots could not yet be classified.

LITERATUR

- ¹ M. L. MEARA, in K. PAECH UND M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. II, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, S. 317.
- ² U. BEISS, in H. F. LINSKENS UND M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. VI, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1963, S. 52.
- ³ M. KATES UND F. M. EBERHARDT, *Can. J. Botany*, 35 (1957) 895.
- ⁴ A. A. BENSON UND B. MARUO, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 189.
- ⁵ R. M. C. DAWSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 374.
- ⁶ A. A. BENSON UND E. H. STRICKLAND, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 328.
- ⁷ A. A. BENSON, H. DANIEL UND R. WISER, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45 (1959) 1582.
- ⁸ A. A. BENSON, R. WISER, R. A. FERRARI UND J. A. MILNER, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 4740
- ⁹ R. M. C. DAWSON, *Biochem. J.*, 75 (1960) 45.
- ¹⁰ G. V. MARINETTI UND E. STOTZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 168.
- ¹¹ G. V. MARINETTI, J. ERBLAND UND J. KOCHEN, *Federation Proc.*, 16 (1957) 837.
- ¹² G. V. MARINETTI, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 1.
- ¹³ M. KATES, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1 (1959) 238.
- ¹⁴ M. KATES, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 315.
- ¹⁵ E. G. BLIGH UND J. W. DYER, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37 (1959) 911.
- ¹⁶ M. W. WHITEHOUSE, A. E. BRESLE UND E. STAPLE, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 385.
- ¹⁷ L. L. SULTA UND R. R. SMITH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2 (1960) 59.
- ¹⁸ F. L. HAHN UND R. LUCKHAUS, *Z. Anal. Chem.*, 149 (1956) 172.
- ¹⁹ F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1953, S. 55.
- ²⁰ M. H. HACK, *Biochem. J.*, 54 (1953) 602.
- ²¹ J. G. BUCHANAN, C. A. DEKKER UND A. G. LONG, *J. Chem. Soc.*, (1950) 3162.
- ²² S. M. PARTRIDGE, *Nature*, 164 (1948) 443.
- ²³ K. WALLENFELS, *Naturwiss.*, 37 (1950) 491.
- ²⁴ G. V. MARINETTI, J. ERBLAND UND E. STOTZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 41.
- ²⁵ O. W. THIELE UND W. WOBBER, *Z. Physiol. Chem.*, 326 (1961) 89.
- ²⁶ U. BEISS UND O. ARMBRUSTER, *Z. Naturforsch.*, 13b (1958) 79.