

# ZUR TRENNUNG DER GIBBERELLINE IN PFLANZENEXTRAKTEN MIT HILFE DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE UND DER HORIZONTALLEN SÄULENCHROMATOGRAPHIE\*

E. REINHARD, W. KONOPKA UND R. SACHER

*Botanisches Institut der Universität  
Würzburg (Deutschland)*

(Eingegangen den 25. Februar 1964)

Die Methode der Dünnschichtchromatographie hat sich im Laufe der letzten Jahre immer weitere Gebiete erobert und Möglichkeiten der Auftrennung von Stoffgemischen eröffnet, die mit anderen chromatographischen Methoden nicht zu erreichen waren.

Für die Trennung der neun bisher bekannten Gibberelline liegen mehrere Arbeiten vor, die die Trennung der Reinsubstanzen auf Kieselgel- und Kieselgur-Platten mit Hilfe verschiedener Laufmittel beschreiben. SEMBDNER *et al.*<sup>1</sup> benutzten als Laufmittel verschiedene Mischungen von Chloroform mit Essigester unter Zusatz von Eisessig. Das System Chloroform-Eisessig wurde bereits von WEST UND PHINNEY<sup>2</sup> zur Trennung von Gibberellinen an Kieselgel-Säulen verwendet. McMILLAN UND SUTER<sup>3</sup> benutzten als Entwicklungsgemisch Di-isopropyl-äther-Eisessig (95:5), des weiteren Benzol-Eisessig-Wasser (8:3:5) und Benzol-Propionsäure-Wasser (8:3:5). KAGAWA *et al.*<sup>4</sup> gebrauchten Gemische von Benzol-*n*-Butanol-Eisessig (80:15:5) resp. 70:25:5), sowie eine Mischung von Tetrachlorkohlenstoff-Eisessig-Wasser (8:3:5, untere Phase), zu deren Unterphase noch 10% resp. 20% Äthylacetat zugefügt wurden.

Mit keinem dieser Laufmittel ist es möglich, sämtliche Gibberelline in einem einzigen Trennungsgang voneinander zu isolieren. Sie werden vielmehr in Gruppen von Gibberellinen mit nahe beieinanderliegenden  $R_F$ -Werten getrennt. Generell wandern die Gibberelline  $A_1, A_8, A_9$  und  $A_2$  sehr langsam, die Gibberelline  $A_4, A_5, A_6, A_7$  bleiben in den mittleren  $R_F$ -Bereichen und  $A_9$  wandert am nächsten zur Lösungsmittelfront, wenn die Gibberelline als freie Säuren chromatographiert werden. Die Gibberelline innerhalb dieser Gruppen können dann in einem weiteren Trennungsgang unter Verwendung eines anderen Laufmittels weiter getrennt werden. So entwickelten KUTACEK *et al.*<sup>5</sup> ein Verfahren zur Trennung der Gibberelline  $A_1$  und  $A_3$  auf  $Al_2O_3$ -Platten mit dem Laufmittel Benzol-Eisessig (10:3).

Alle diese Trennungen wurden mit Reinsubstanzen ausgeführt, die nach erfolgter Trennung auf der Dünnschichtplatte mit chemischen Methoden sichtbar gemacht werden können, wie durch Besprühen mit Kaliumpermanganat-Lösung<sup>1</sup>, Schwefelsäure<sup>1, 3, 4</sup> oder Antimontrichlorid<sup>4</sup>. (Chemische Nachweismethoden siehe Zit.<sup>6</sup>). Selbst

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Für die freundliche Überlassung der Gibberelline sei an dieser Stelle Dr. M. RADLEY von den Imperial Chemical Industries, Akers, auf das Herzlichste gedankt.

Gibberelline, die mit den zuvor genannten Laufmitteln nur geringe  $R_F$ -Unterschiede zeigen, können bei chemischem Nachweis auf der Dünnschichtplatte noch als getrennt wahrgenommen werden.

Isoliert man jedoch Gibberelline aus Pflanzenmaterial und versucht die Gibberelline in den Extrakten — selbstverständlich nach entsprechender Vorreinigung — auf Dünnschichtplatten aufzutrennen, so ergeben sich erhebliche Komplikationen. Nun können die Gibberelline nicht mehr durch Verwendung der erwähnten Sprühreagenzien auf den Trennplatten nachgewiesen werden, da diese Reagenzien unspezifisch sind und gleiche Reaktionen auch mit anderen, in den Extrakten enthaltenen Verbindungen geben. Der Nachweis muss in diesem Falle durch biologische Teste erfolgen, d.h. die entsprechenden Zonen müssen von der Platte entfernt und rückextrahiert werden. Durch die hierbei notwendigen Manipulationen bedingt, können zwei Gibberelline nur dann sicher als getrennt wahrgenommen werden, wenn sie auf der Trennschicht wenigstens 2 cm auseinanderliegen. Ausserdem muss man berücksichtigen, dass die Platten unterschiedlich beschichtet sind und so die  $R_F$ -Werte nur in gewissen Grössenordnungen, nicht aber genau reproduziert werden können. Eine einmal aufgestellte Norm mit Reingibberellinen gilt also nicht immer. Hinzu kommen noch die verschiedenen Verunreinigungen der Pflanzenextrakte, die die Trennung auf der Dünnschichtplatte erheblich beeinflussen. Auch Reinsubstanzen am Rande der Dünnschichtplatte mit zu chromatographieren, um so die Lage eines bestimmten Gibberellins in einem aufgetrennten Pflanzenextrakt zu markieren, kann aus diesen Gründen zu Irrtümern führen. All dies lässt die Reproduzierbarkeit der Trennungen und die Charakterisierung eines Stoffes mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Grund der  $R_F$ -Werte sehr unsicher werden.

Diese Fehlerquellen lassen sich weitgehend ausschalten, wenn man den Extrakten, aus denen Gibberelline getrennt werden sollen, Farbstoffe beimischt, die in einem gegebenen Entwicklungssystem gleiche oder ähnliche  $R_F$ -Werte besitzen wie die betreffenden Gibberelline. Diese Farbstoffe unterliegen bei der Trennung auf der Dünnschichtplatte den gleichen  $R_F$ -Verschiebungen und kennzeichnen so sicher die einzelnen  $R_F$ -Zonen der Gibberelline. Das nachfolgend beschriebene Verfahren ist auf der Verwendung solcher Markierungsfarbstoffe aufgebaut. Hierbei werden besonders die Gibberelline berücksichtigt, die bisher in höheren Pflanzen gefunden wurden<sup>7</sup>. Als Farbstoffe dienen Frangulin\*, Fluoreszein\*\*, Eosin\*\*\* sowie Methylrot<sup>§</sup>. Als Laufmittel wird eine Mischung aus Chloroform-Äthylacetat-Eisessig (90:10:5) verwendet<sup>1</sup>. Die Dünnschichtplatten (20 × 20 cm) werden in der üblichen Weise mit Kieselgel G nach STAHL ausgestrichen<sup>8</sup>. Die Trennstrecke von 20 cm reicht allerdings nicht für eine befriedigende Trennung der Gibberelline aus. Es muss daher im Durchlaufverfahren gearbeitet werden. Hierfür hat sich die Trennkammer nach BRENNER UND NIEDERWIESER<sup>9</sup> besonders bewährt<sup>§§</sup>. Die Trennkammer muss während der Entwicklung der Chromatogramme unter Raumtemperatur gekühlt werden, weil sonst die Trennung durch Abtropfen von Kondensaten von der Deckplatte, gestört werden kann. Durch diese Kühlung wird gleichzeitig eine Temperatur-

\* Frangulin, Karl Roth, Karlsruhe.

\*\* Fluoreszeinum Erg.B.6, E. Merck, Darmstadt.

\*\*\* Eosin bläulich, Mercks Präparate für Mikroskopie und Bakteriologie.

§ Methylrot, Desaga, Heidelberg.

§§ BN-Kammer, Desaga, Heidelberg.

konstanz erzielt, die der Reproduzierbarkeit der Chromatogramme sehr förderlich ist. Bei der Entwicklung werden die Gibberelline zunächst in 3 Gruppen getrennt, und zwar in die Gruppe  $A_8, A_1, A_3$ , in die Gruppe  $A_4, A_5, A_6, A_7$  und in Gibberellin  $A_9$ . Gibt man in den Startpunkt der aufgetragenen Gibberelline die oben genannten Farbstoffe, so markiert Frangulin die Gibberelline  $A_8, A_1$  und  $A_3$ , Fluoreszein  $A_4, A_5, A_6$  und  $A_7$  und schliesslich Eosin  $A_9$ . Eosin dient gleichzeitig als Front. Die Chromatogramme werden so lange entwickelt, bis das Eosin 10 cm weit vom Startpunkt entfernt ist. Die Entwicklungszeit hierfür beträgt etwa 2 Stunden. Damit ist zunächst eine Gruppentrennung erreicht, welche die bisher in höheren Pflanzen gefundenen Gibberelline in zwei Gruppen teilt. Zu einer Gruppe gehören die Gibberelline  $A_8$  und  $A_1$ , zur anderen die Gibberelline  $A_5$  und  $A_6$  (Fig. 1).

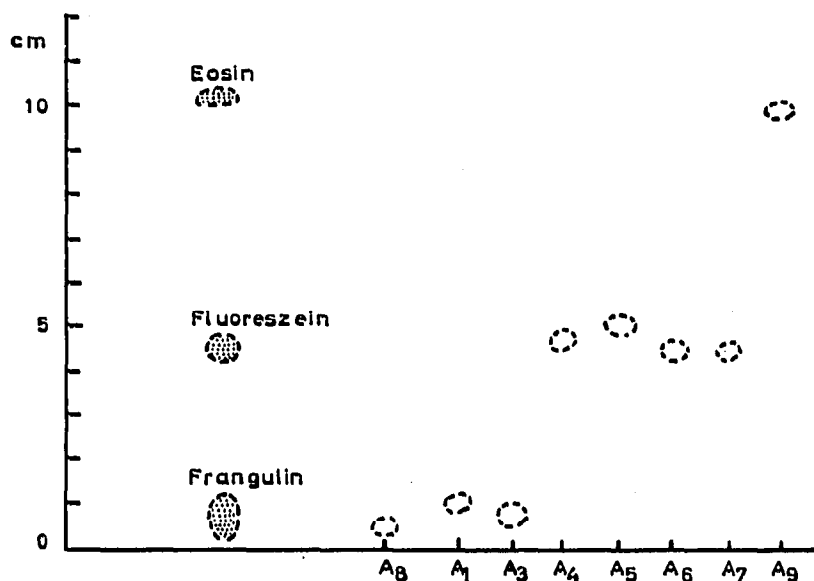


Fig. 1. Farbstoffmarkierung der Gruppentrennung der Gibberelline mit dem Laufmittel Chloroform-Äthylacetat-Eisessig (90:10:5) auf Kieselgel-G Platten. Der Farbstoff Eosin markiert das Gibberellin  $A_9$ , Fluoreszein die Gibberelline  $A_4, A_5, A_6$  und  $A_7$ , Frangulin die Gibberelline  $A_8, A_1$  und  $A_3$ .

In vielen Fällen ist es nicht möglich, diese erste Gruppentrennung bereits auf einer Dünnschichtplatte auszuführen, da die Extrakte noch zu viele Verunreinigungen enthalten, die eine Auftrennung nicht möglich machen. Dies gilt vor allem dann, wenn Blatt- und Stengelmaterial aufgearbeitet werden muss. In solchen Fällen kann die eben beschriebene Gruppentrennung mit Hilfe eines säulenchromatischen Trennverfahrens ausgeführt werden, das den Verhältnissen auf der Dünnschichtplatte entspricht<sup>10</sup>.

Als Säule dient ein nahtlos gezogener Dialysierschlauch aus Zellophan im Durchmesser von 2,8 cm, der mit den Adsorbentien Kieselgel G und Kieselgur nach STAHL im Wechsel gefüllt wird. Zur Markierung der Gibberellin-Zonen werden die oben beschriebenen Farbstoffe dem aufzutrennenden Pflanzenextrakt beigefügt. Nach der Auftrennung wird die Säule in die entsprechenden Zonen zerschnitten. Zur Bereitung der Zellophanssäule nimmt man ein Schlauchstück in der Länge von 20–25 cm und taucht es für einige Minuten in Wasser, um die Falten zu beseitigen. Dann wird das eine Ende auf ein Kernschliffstück aufgezogen, das andere mit einem Glasstopfen

verschlossen. Der Schlauch wird nun senkrecht gespannt, aufgeblasen und luftgetrocknet. Nach dem Trocknen erhält man eine völlig faltenlose Hülle, die leicht mit den Adsorbentien gefüllt werden kann. Zur eigentlichen Trennung der Gibberelline dient eine Schicht von Kieselgel G - Merck. Dieser wird eine 5 cm hohe Kieselgurschicht nachgeschaltet, die zur Aufnahme der schnell wandernden Begleitstoffe, Chlorophyll u.dgl. dient und die nach der Entwicklung der Säule verworfen wird. Vorgesaltet wird der Kieselgelzone eine 1 cm hohe Kieselgurschicht, auf die der Extrakt aufgebracht wird. Diese vorgeschaltete Kieselgurschicht dient dazu, die langsam wandernden Gibberelline  $A_8, A_1$  und  $A_3$  in kurzer Zeit genügend weit von der Startzone zu entfernen. Die Gibberelline werden nur schwach an Kieselgur adsorbiert und durch das Laufmittel schnell an die Kieselgelzone herangetragen, an der die eigentliche Auftrennung erfolgt. In der Startzone verbleiben die meisten der noch im Extrakt vorhandenen Verunreinigungen, die die biologischen Tests stören.

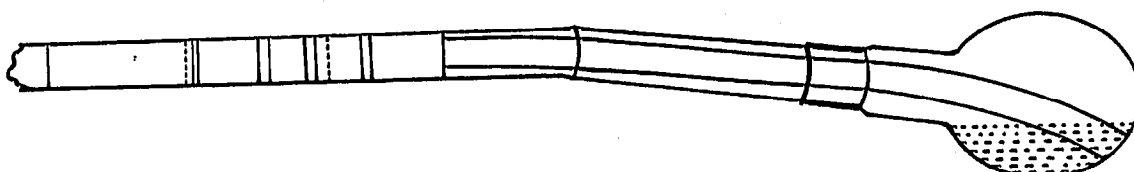


Fig. 2. Anordnung zur säulenchromatographischen Trennung der Gibberelline. Das Laufmittel befindet sich in einem Schließkolben. Über ein Schließzwischenstück, auf das der Dialysierschlauch aufgespannt ist, wird die Verbindung mit dem Vorratsgefäß mittels eines Doctes hergestellt. Die Säule liegt während der Entwicklung horizontal.

Der Extrakt, der auf die Säule aufgebracht werden soll, wird nach entsprechender Vorreinigung stark eingeengt, die Markierungsfarbstoffe, Frangulin, Fluoreszein und Eosin, sowie 0.8–1 g Kieselgel G beigefügt und weiter zur Trockne eingeengt. Dieses Gemisch wird zu einem gleichmässigen Pulver verrieben, das dann in die Säule eingebracht wird. Zum Schutze der Oberfläche der Startzone wird diese noch mit weiteren 2–3 cm Kieselgur überdeckt. Die so präparierte Säule wird nun mit einem Schließkolben verbunden, in dem sich 100 ml des Entwicklungsgemisches Chloroform–Äthylacetat–Eisessig (90:10:5) befinden. Dieses wird mit Hilfe eines Doctes (Fig. 2) an die Kieselgurschicht herangeführt. Der Verlauf der Trennung kann jederzeit leicht mit Hilfe der beigefügten Farbstoffe im Tages- und U.V.-Licht verfolgt und kontrolliert werden (Fig. 3). Entwickelt wird so lange, bis das Eosin das Ende der Kieselgelschicht erreicht hat. Hierzu werden etwa 2–2 $\frac{1}{2}$  Stunden

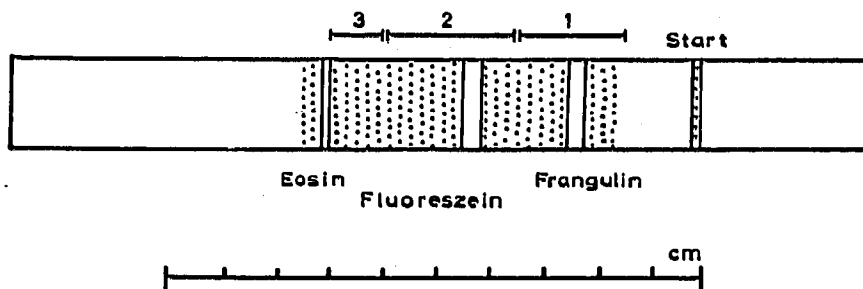


Fig. 3. Schema der Auftrennung der Gibberelline an der Säule und der Markierung durch die Farbstoffe Eosin, Fluoreszein, Frangulin. Die Trennung und Markierung entspricht völlig den Verhältnissen auf der Dünnschichtplatte.

benötigt. Nach der Auftrennung wird die Kieselgelschicht in drei Teile zerschnitten. Zone 1, markiert durch Frangulin, enthält die Gibberelline  $A_8, A_1$  und  $A_3$ , Zone 2, markiert durch Fluoreszein, enthält die Gibberelline  $A_4, A_5, A_6$  und  $A_7$ , während sich in der Zone 3, die durch Eosin markiert wird, nur Gibberellin  $A_9$  findet. Aus diesen einzelnen Zonen werden die Gibberelline mit Äthylacetat wieder eluiert. Diese Eluate können in biologischen Testen auf Gibberellin-Aktivitäten geprüft werden.

Die weitere Auftrennung der Gibberelline innerhalb der Gruppen kann nun auf Dünnschichtplatten erfolgen. Dies sei im Folgenden für die Gibberelline  $A_1$  und  $A_8$  sowie  $A_5$  und  $A_6$  beschrieben, für die Gibberelline also, die bisher aus höheren Pflanzen isoliert wurden.

Von diesen finden sich die Gibberelline  $A_1$  und  $A_8$  in dem Eluat der Zone 1. Diese beiden Gibberelline können auf Kieselgel G-Platten mit Chloroform-Äthylacetat-Eisessig (60:40:5)<sup>1</sup> aufgetrennt werden. Die Trennung erfolgt im Durchlaufverfahren in der oben erwähnten Kammer von BRENNER UND NIEDERWIESER. Als Bezugsfront dient wiederum Eosin. Um gute Trennungen zu erzielen, sind allerdings lange Entwicklungszeiten von 3–4 Stunden erforderlich. Die Lage von Gibberellin  $A_1$  auf dem Chromatogramm wird durch Frangulin markiert. Bezogen auf Frangulin hat Gibberellin  $A_8$  einen  $R_{St}$ -Wert von 0.41 (Fig. 4). Gibberellin  $A_3$ , das

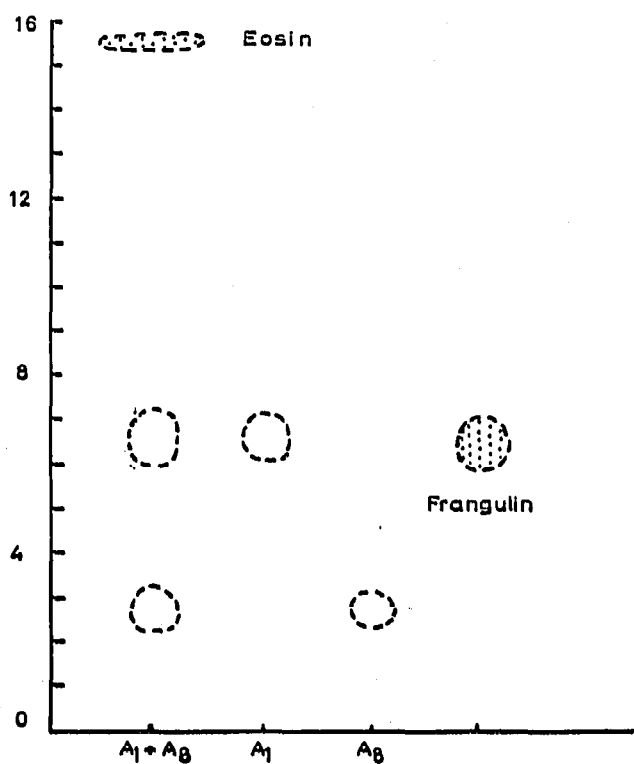


Fig. 4. Trennung der Gibberelline  $A_1$  und  $A_8$  auf Kieselgel-G Platten. Als Bezugs-Front dient Eosin. Gibberellin  $A_1$  wird durch den Farbstoff Frangulin markiert.

sich noch in der gleichen Gruppe finden könnte, würde mit Gibberellin  $A_1$  wandern und wäre hiervon nicht zu unterscheiden. Die übrigen Gibberelline, die hier allerdings bereits abgetrennt sein sollten, würden sich in der Front (Eosin) finden.

Die Auftrennung der Gibberelline  $A_5$  und  $A_6$  wird auf Kieselgur-Platten (Kiesel-

gur G nach STAHL, Merck) durchgeführt. Als Laufmittel dient Cyclohexan–Eisessig (80:5). Die Farbmarkierung erfolgt durch Methylrot. Auch bei dieser Trennung wird im Durchlaufverfahren gearbeitet. Die Entwicklungszeit beträgt 4–5 Stunden. Methylrot wandert zwischen den Gibberellinen  $A_5$  and  $A_6$  (Fig. 5). Die Gibberelline

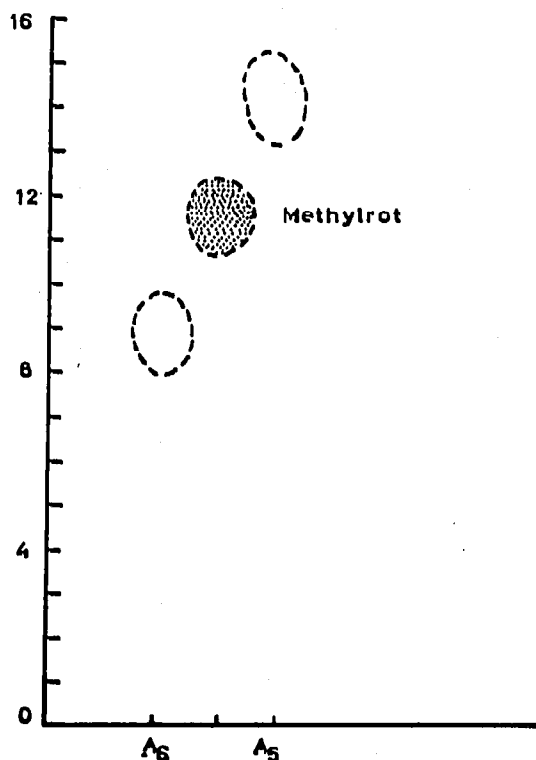


Fig. 5. Trennung der Gibberelline  $A_5$  und  $A_6$  auf Kieselgur-G Platten mit dem Laufmittel Cyclohexan–Eisessig (80:5). Zur Markierung dient Methylrot, das zwischen den beiden Gibberellinen wandert.

$A_4$  und  $A_7$ , die sich noch in der Zone 2 der Säule finden können, würden hier in der Front (Eosin) wandern. Ebenso Gibberellin  $A_9$ . Die Gibberelline  $A_8, A_1$  und  $A_3$ , die hier allerdings nicht mehr auftreten sollten, würden am Startpunkt zurückbleiben.

Durch Beimengung von Farbstoffen zu den Pflanzenextrakten wird das Auffinden der einzelnen Gibberelline auf den Trennschichten wesentlich erleichtert. Auch lassen sich die eingangs geschilderten Fehlerquellen weitgehend ausschalten. Die in geringen Mengen beigefügten Farbstoffe, die zusammen mit den Gibberellinen aus den Trennschichten eluiert werden, beeinträchtigen die anschließenden biologischen Tests zum Nachweis der Gibberelline nicht.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein dünn-schichtchromatographisches und säulenchromatographisches Verfahren zur Trennung von Gibberellinen aus Pflanzenextrakten beschrieben. Den Pflanzenextrakten werden vor der Trennung Farbstoffe beigefügt. Diese Farbstoffe geben dann eine sichtbare Kontrolle des Trennverlaufes und erleichtern das Auffinden der Gibberelline auf den Dünnschichtplatten und Säulen. In den beschriebenen Lauf-

mitteln dient Frangulin zur Markierung der Gibberelline  $A_1, A_3, A_8$ , Fluoreszein zur Markierung der Gibberelline  $A_4, A_5, A_6, A_7$  und Eosin markiert Gibberellin  $A_9$ . Diese erste Gruppentrennung kann auch an Kieselgel-Säulen ausgeführt werden. Die Trennung der Gibberelline  $A_1$  von  $A_8$  resp.  $A_5$  von  $A_6$  erfolgt in weiteren Trennungsgängen, wobei Frangulin zur Markierung von Gibberellin  $A_1$  dient, während Methylrot zwischen den Gibberellinen  $A_5$  und  $A_6$  wandert.

## SUMMARY

A method based on thin-layer and column chromatography is described for the separation of gibberellins in plant extracts. Colored compounds are added to the plant extracts which have the same  $R_F$  values as certain gibberellins. These colored compounds provide a visible control of the separation and mark the positions of the gibberellins on the thin-layer plates and the columns. Using the solvent mixtures described, frangulin marks gibberellins  $A_1, A_3, A_8$ , fluorescein marks gibberellins  $A_4, A_5, A_6, A_7$  and eosin marks gibberellin  $A_9$ . This initial group separation can be carried out on thin-layer plates as well as on silica gel columns. The separation of gibberellins  $A_1$  from  $A_8$  and  $A_5$  from  $A_6$  is achieved by further separation steps on thin layers where frangulin serves as marker for gibberellin  $A_1$ , while methyl red migrates between  $A_5$  and  $A_6$ .

## LITERATUR

- <sup>1</sup> G. SEMBDNER, R. GROSS UND K. SCHREIBER, *Experientia*, 18 (1962) 584.
- <sup>2</sup> C. A. WEST AND B. O. PHINNEY, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 2424.
- <sup>3</sup> I. MACMILLAN AND P. I. SUTER, *Nature*, 197 (1963) 790.
- <sup>4</sup> T. KAGAWA, T. FUKINBARA AND Y. SUMIKI, *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, 27 (1963) 598.
- <sup>5</sup> M. KUTACEK, J. ROSMUS AND Z. DEYL, *Biol. Plant. Acad. Sci. Bohemoslov.*, 4 (1962) 226.
- <sup>6</sup> G. KALLISTRATOS, D. PADVAL UND A. PFAU, in R. KNAPP (Herausgeber), *Eigenschaften und Wirkungen der Gibberelline*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962, S. 20-24.
- <sup>7</sup> I. MACMILLAN, I. C. SEATON AND P. I. SUTER, *Advan. Chem. Ser.*, 28 (1961) 18.
- <sup>8</sup> E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962.
- <sup>9</sup> M. BRENNER UND A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 17 (1961) 237.
- <sup>10</sup> H. DAHN UND H. FUCHS, *Helv. Chim. Acta*, 45 (1962) 261.