

EINE EINFACHE METHODE ZUR DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG VON PLASTIDENPIGMENTEN

HANSJÖRG A. W. SCHNEIDER

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang (Deutschland)

(Eingegangen den 17. August 1965)

Im Laufe der Zeit wurden von Naturstoffchemikern und Biologen zahlreiche Verfahren zur analytischen Trennung der Plastidenpigmente ausgearbeitet, sei es um reine Stoffe zur Konstitutionsaufklärung und Darstellung ihrer Absorptionsspektren zu erhalten, um das Auftreten und Verschwinden dieser Stoffe im Gewebe zu verfolgen, um das geänderte Mengenverhältnis der Farbstoffe bei Mutationen quantitativ zu bestimmen oder einfach zu Demonstrationszwecken. Die Methoden, beginnend mit der Trennung der Pigmente durch Ausschütteln zwischen zwei Phasen, in allen seinen Variationen, über Säulen- und Papierchromatographie, bis zur Trennung auf dünnen Schichten, erlaubten es, immer schneller und in kleinerem Massstabe, derartige Analysen auszuführen (Literatur bei GOODWIN¹, SMITH UND BENITEZ², BICKOFF³, HAGER⁴, ŠESTÁK⁵). Gerade in den letzten Jahren wurden zeitsparende, dünnschichtchromatographische Methoden beschrieben, die sehr schöne Trennungen ergeben (HAGER UND BERTENRATH⁶, EGGER^{7,8}, EGGER UND VOIGT⁹, BACON¹⁰, COLEMAN UND VISHNIAC¹⁴).

HAGER UND BERTENRATH⁶ trennen die Plastidenfarbstoffe mit einem Fließmittelgemisch aus Petroläther (Siedebereich 100–140°), Isopropanol und Wasser (100:10:0.25) auf Kieselgurschichten, denen Kieselgel, Calciumcarbonat, Calciumhydroxyd und Ascorbinsäure beigemischt ist. (Für 5 Platten 12 g Kieselgur G, 3 g Kieselgel, 3 g CaCO₃, 18 mg Ca(OH)₂ und 48.5 mg Ascorbinsäure in 55 ml Wasser.) Um eine ausreichende Trennung zu erzielen, ist der Zusatz von Kieselgel ausschlaggebend. EGGER^{7,8} gelangen unter Vermeidung der Adsorption an aktiven Oberflächen sehr scharfe Trennungen auf fettimpregnierten Kieselgur- und Zelluloseplatten, die in einem Fließmittel aus Methanol, Aceton und Wasser (20:4:3) entwickelt werden. BACON¹⁰ umgeht das unangenehme Arbeiten mit fettimpregnierten Platten und die Schwierigkeiten, die beim Arbeiten nach der Methode von HAGER UND BERTENRATH⁶ auftreten (geringe Lagerfähigkeit der kompliziert zusammengesetzten Platten, schnelles Verblässen der Farbstoffe), indem er Chlorophylle und deren Derivate auf reinen Zelluloseplatten mit Petroläther (Siedebereich 60–80°), Aceton und *n*-Propanol (90:10:0.45) chromatographiert.

Wegen der fehlenden Oberflächenaktivität, guten Haltbarkeit und Unempfindlichkeit gegen Verletzungen beim Auftragen der Farbstoffe wurden auch bei der im folgenden zu beschreibenden Methode zur gleichzeitigen Trennung von Chlorophyllen und Carotinoiden Zelluloseschichten gewählt.

Zur Herstellung von fünf Platten (200 × 200 mm) wurden 15 g MN-Zellulosepulver 300 der Firma Macherey, Nagel & Co. (allgemeine Methodik bei STAHL¹¹ und

RANDERATH¹²⁾ mit 100 ml destilliertem Wasser im elektrischen Mixgerät homogenisiert, mit einem Streichgerät der Firma Desaga in einer Schichtdicke von 0.4 mm aufgebracht und im Trockenschrank getrocknet. Als Fließmittel diente wässriges Methanol, dem eine kleinere Menge eines lipophileren Lösungsmittels zugesetzt wurde. Eine günstige Fließmittelzusammensetzung (Methanol-Dichlormethan-Wasser, 100:18:20) — die eine gleichmässige Verteilung der R_F -Werte ermöglichte — wurde aus Fließmittelreihen ermittelt, die zu einer gegebenen Menge Methanol und einer konstanten Menge Wasser oder Dichlormethan unterschiedliche Mengen Dichlormethan bzw. Wasser enthielten. Jeder Wasserzusatz lässt die R_F -Werte aller Farbstoffkomponenten sinken, die der Chlorophylle und der Carotine jedoch mehr als die der Xanthophylle. Zusatz eines lipophilen Lösungsmittels bewirkt ein Steigen der R_F -Werte, wobei wiederum die Xanthophylle weniger als die Chlorophylle beeinflusst werden. Im Gegensatz zu der Methode von BACON¹⁰ bleiben die R_F -Werte auch bei unterschiedlichen Mengen zu chromatographierender Farbstoffe ziemlich konstant. Dichlormethan kann, soweit es die Löslichkeit in wässrigem Methanol erlaubt, durch Benzol, Chloroform oder Petroläther ersetzt werden (in normalen Küvetten durch 12 Teile Tetrahydrofuran). Über die Lage der Farbstoffe auf dem Chromatogramm gibt Fig. 1 Auskunft. Die Methode ist gleicherweise für die Ausführung in

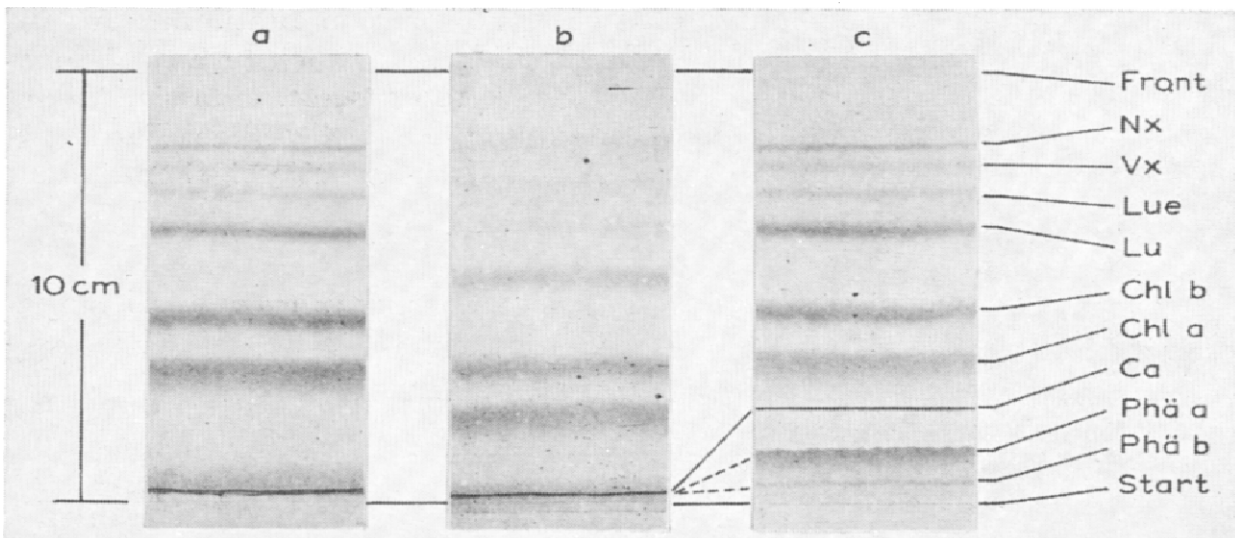


Fig. 1. Trennung der Plastidenpigmente auf Zelluloseplatten; (a) in schmaler; (b) in normaler Kammer; (c) Phäophytine nachträglich aufgetrennt. Ca = Carotine; Phä = Phäophytin; Chl = Chlorophyll; Lu = Lutein; Lue = Luteinepoxyd; Vx = Violaxanthin; Nx = Neoxanthin.

normalen wie in schmalen Küvetten geeignet. Bei gleicher Fließmittelzusammensetzung sind in der schmalen Kammer die Bandenzeichnungen schärfer und die R_F -Werte etwas höher. Für eine Laufstrecke von 10 cm werden etwa 45 Minuten benötigt. Phäophytine, die mit den Carotinen am Start verbleiben, können auf derselben Platte mit Petroläther (Siedebereich 90–100°)–Äthanol (10:0.2) leicht von diesen getrennt werden.

Um Anhaltspunkte über die Leistungsfähigkeit der neuen Methode zu bekommen, wurde sie mit den Methoden von EGGER^{7,8} und HAGER UND BERTENRATH⁶ verglichen.

Die zur Chromatographie erforderlichen Pigmente wurden aus in der Gefrier-

trocknung entwässerten und im Mörser mit etwas Quarzsand und Natriumsulfat zu Pulver zerriebenen Blättern mit Methanol und Äthylacetat herausgelöst. Durch die Gefriertrocknung wird die quantitative Extraktion der Plastidenfarbstoffe sehr erleichtert. Die im Vakuum nahezu zur Trockene gebrachten Extrakte wurden dann mit wenig wasserfreiem Aceton aufgenommen. Mitgelöste und später ausgefallene Fremdstoffe lösen sich nicht wieder.

Die Platten nach HAGER UND BERTENRATH waren bei ihrer Verwendung 2–5 Stunden alt. Für die von EGGER beschriebene Methode fanden Zelluloseplatten, die nach einer von diesem angegebenen Methode mit Öl imprägniert waren, Verwendung.

Im Kaltluftstrom wurden stets gleiche Mengen der in Aceton gelösten Pigmente als Band aufgetragen und bei Labortemperatur (*ca.* 25°) im Dunkeln chromatographiert. Nach einer Laufstrecke von 10 cm (bei Platten nach HAGER UND BERTENRATH 13 cm) wurden die Chromatogramme aus der Küvette genommen, im Kaltluftstrom kurz getrocknet und die Farbstoffbanden so schnell als möglich und stets in derselben Reihenfolge von der Glasplatte abgeschabt und in einer ähnlichen Weise, wie HAGER UND BERTENRATH es beschreiben, eluiert. Bis alle Farbstoffe abgeschabt und eluiert waren, wurden die Platten im Kühlschrank aufbewahrt. (In der Tiefkühltruhe bei –40° tritt ein Verblässen der Farbstoffe erst nach Wochen ein.) Die Extinktionswerte der auf gleiches Volumen aufgefüllten Eluate wurden dann im Spektralphotometer bei der Wellenlänge maximaler Absorption bestimmt. In Tabelle I sind die Ergebnisse dieser Versuche veranschaulicht. Der höchste Extinktionsmittelwert einer Versuchsreihe wurde willkürlich gleich 100 gesetzt. Man sieht, dass die neue Methode trotz ihrer einfachen Handhabung etwa dieselben Farbstoffausbeuten bringt wie die Methode nach EGGER. Auf Platten, die Kieselgel enthalten,

TABELLE I

FARBSTOFFAUSBEUTE BEI VERSCHIEDENEN METHODEN, BEZOGEN AUF DEN IM PHOTOMETER GEMESSENEN HÖCHSTEN EXTINKTIONSWERT (= 100) EINER VERSUCHSREIHE

HB = Methode nach HAGER UND BERTENRATH; E = nach EGGER; S = neue Methode.

	HB	E*	S
Carotine	92.0 ± 2.8	100.0 ± 1.4	96.9 ± 1.9
Chlorophyll a	85.4 ± 0.9	98.0 ± 2.0	100.0 ± 2.6
Chlorophyll b	90.2 ± 7.2	96.8 ± 5.2	100.0 ± 2.0
Lutein	100.0 ± 2.4	95.8 ± 4.0	98.2 ± 4.1
Luteinepoxyd	79.6 ± 3.1	97.8 ± 4.0	100.0 ± 2.6
Violaxanthin	61.2 ± 2.3	100.0 ± 6.2	92.0 ± 3.4
Neoxanthin	73.4 ± 3.3	80.5 ± 5.3	100.0 ± 4.6

* Der Fettgehalt der Eluate wurde vernachlässigt.

treten jedoch vor allem bei Chlorophyll a und den Xanthophyllen mit Epoxydgruppen grössere Verluste auf. Werden die Platten längere Zeit der Einwirkung von Licht und Sauerstoff ausgesetzt, so dürften die Farbstoffe auf mit Fett imprägnierten Platten am besten geschützt sein.

Um verlässliche Angaben über die bei der Chromatographie auf Zelluloseplatten auftretenden Stoffverluste machen zu können, wurden Aceton- (bei Carotin Hexan-) eluate von zahlreichen Chromatogrammen gesammelt, im Rotationsverdampfer

TABELLE II

FARBSTOFFE AUSBEUTE IN PROZENTEN NACH RECHROMATOGRAPHIE CHROMATOGRAPHISCH GEREIFTER PIGMENTE AUF ZELLULOSEPLATTEN NACH DER NEUEN METHODE

	Farbstoff- ausbeute
Carotine	97.2 ± 1.9
Chlorophyll a	94.3 ± 2.1
Chlorophyll b	84.8 ± 2.3
Lutein	84.2 ± 1.3
Luteinepoxyd	78.2 ± 1.9
Violaxanthin	79.2 ± 0.6
Neoxanthin	82.1 ± 1.0

eingeeht und in aliquoten Mengen rechromatographiert. Wie Tabelle II zeigt, liegen die Verluste maximal bei etwa 15–20 % der auf das Chromatogramm aufgetragenen Menge. Mit kristallinen Substanzen liessen sich die Werte vielleicht um einige Prozente verbessern. BACON findet über 90 % der aufgetragenen Substanzmenge wieder.

Die Frage, ob sich die prozentualen Verluste mit der aufgetragenen Menge ändern, wurde beim Lutein, einem Xanthophyll, das sich mit jeder der geprüften Methoden mit etwa gleicher Ausbeute chromatographieren lässt (vgl. Tabelle I), untersucht. Es zeigte sich, dass über den ganzen untersuchten Bereich (vgl. Fig. 2) die Verluste nahezu gleich bleiben. Im Bereich der kleineren Substanzmengen sind die Verluste und die Versuchsschwankungen etwas grösser.

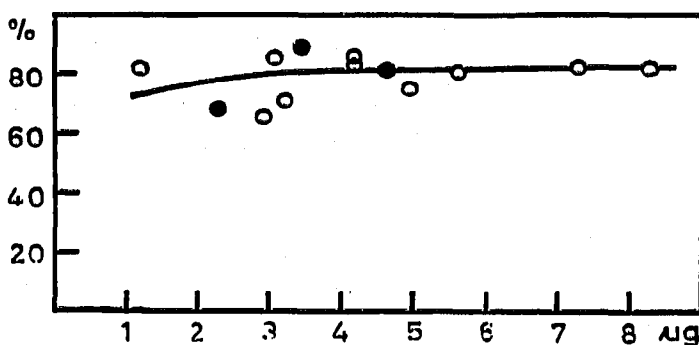


Fig. 2. Farbstoffausbeute in Prozenten in Abhängigkeit von der chromatographierten Farbstoffmenge (Lutein). Jeder Punkt gibt den Mittelwert aus 2–5 Einzelversuchen. Schwarze Punkte: Versuche in Stickstoffatmosphäre.

Zelluloseplatten mit einem Zusatz von Rohrzucker (0.5 g/15 g Zellulose), wie SPORER *et al.*¹³ es bei Papierchromatogrammen empfiehlt, Ascorbinat, wie HAGER UND BERTENRATH zu ihren Platten verwenden oder Cystein (je 50 mg/15 g Zellulose) bringen (vielleicht wegen ihrer Löslichkeit im Fliessmittel, bzw. wegen ihres Reduktionsvermögens) keinen Vorteil gegenüber reinen Zelluloseplatten. Die Extinktionswerte für die Xanthophylle waren bei der Chromatographie auf so präparierten Platten stets geringer als die Kontrollwerte unbehandelte Zelluloseschichten. Werte aus Versuchen mit Zucker und Cystein sind Tabelle III zu entnehmen. Auch das

TABELLE III

BEI ZUSATZ VON ROHRZUCKER UND CYSTEIN ZU ZELLULOSEPLATTEN AUFTRETENDE FARBSTOFF-
 VERLUSTE IN PROZENTEN DER JEWEILIGEN KONTROLLWERTE VON REINEN ZELLULOSEPLATTEN
 Z: bei Platten mit Rohrzucker; C: bei Platten mit Cystein.

	Z	C
Carotine	3	2
Chlorophyll a	2	2
Chlorophyll b	—6	4
Lutein	0	24
Luteinepoxyd	27	24
Violaxanthin	50	50
Neoxanthin	17	42

Auftragen der Extrakte im Stickstoffstrom und Chromatographie unter Stickstoffatmosphäre verbesserte die Ausbeute nicht in sichtbarer Weise (vgl. Fig. 2). Letzteres deutet darauf hin, dass Substanzverluste wohl weniger durch die Chromatographie als durch die darauffolgende Aufarbeitung bedingt werden.

DANK

Herrn Prof. Dr. J. STRAUB danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und Fräulein B. MEYER für die Ausführung der photographischen Aufnahmen.

Die Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten unterstützt.

ZUSAMMENFASSUNG

Plastidenpigmente werden auf mit MN-Cellulose 300 beschichteten Platten ohne katalytisch die Farbstoffe angreifenden Kieselgel- oder lästigen Fettzusatz mit Methanol, Dichlormethan (auch andere lipophile Lösungsmittel sind möglich) und Wasser im Verhältnis von 100:18:20 getrennt. Mit einem auf 0.4 mm Spaltbreite justierten DESAGA-Streichgerät sind 15 g Zellulose in 100 ml Wasser zur Beschichtung von 5 Platten (200 × 200 mm) ausreichend. Im Vergleich mit anderen Methoden ergibt sich bei Zelluloseplatten der geringste Farbstoffverlust; über 85 % der aufgetragenen Farbstoffe werden wiedergefunden. Den Platten als Desoxydantien beigefügte Stoffe wie Zucker, Ascorbinat und Cystein bzw. Chromatographie in Stickstoffatmosphäre erbringen keine besseren Resultate. Letzteres deutet darauf hin, dass die Verluste wohl weniger durch die Chromatographie als durch nachfolgende Manipulationen bedingt sind.

SUMMARY

A simple method is described for separating plastid pigments by thin-layer chromatography on cellulose. By means of a DESAGA applicator (slit width 0.4 mm) five plates (200 × 200 mm) are coated with a suspension of 15 g MN-Cellulose 300 (Macheréy, Nagel & Co.) in 100 ml of water. The developer consists of methanol,

dichloromethane and water in a ratio of 100:18:20 (v/v). The new method is compared with those of other authors and it is demonstrated that the losses of pigments are less on cellulose plates and that about 85 % of the pigments separated on pure cellulose can be recovered from the chromatogram. The R_F values are almost unaffected by the quantity of pigments applied to the plates. The yield of pigment cannot be improved if sugar, ascorbate or cysteine is added to the plates to prevent oxidation of the pigments or if chromatography is accomplished in an atmosphere of nitrogen. The last-mentioned finding indicates that the loss of substances is more likely due to the subsequent manipulations than to the chromatography itself.

LITERATUR

- 1 T. W. GOODWIN, in K. PAECH UND M. V. TRACEY (Herausgeber), *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. III, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, S. 272-311.
- 2 J. H. C. SMITH UND A. BENITEZ, in K. PAECH UND M. V. TRACEY (Herausgeber), *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. IV, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, S. 142-196.
- 3 E. M. BICKOFF, in D. GLICK (Herausgeber), *Methods of Biochemical Analysis*, Bd. IV, Interscience, New York, 1957, S. 1-42.
- 4 A. HAGER, in H. F. LINSKENS (Herausgeber), *Papierchromatographie in der Botanik*, 2. Auflage, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959, S. 218-228.
- 5 Z. ŠESTÁK, in I. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, Bd. I, VEB Fischer, Jena, 1963, S. 833-838.
- 6 A. HAGER UND TH. BERTENRATH, *Planta*, 58 (1962) 564.
- 7 K. EGGER, *Planta*, 58 (1962) 664.
- 8 K. EGGER, *Ber. Deutsch. Botan. Ges.*, 77 (1964) 145.
- 9 K. EGGER UND H. VOIGT, *Z. Pflanzenphysiol.*, 53 (1965) 64.
- 10 M. F. BACON, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 322.
- 11 E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962.
- 12 K. RANDEKATH, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse, 1962.
- 13 A. H. SPORER, S. FREED UND K. M. SANCIER, *Science*, 119 (1954) 68.
- 14 B. COLEMAN UND W. VISHNIAC, *Biochim. Biophys. Acta*, 82 (1964) 616.

J. Chromatog., 21 (1966) 448-453