

CHROM. 4689

**ZUR ANALYTIK PFLANZLICHER GLYKO- UND PHOSPHOLIPOIDE UND IHRER FETTSÄUREN****I. EINE NEUE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE METHODE ZUR TRENNUNG PFLANZLICHER LIPOIDE UND QUANTITATIVEN BESTIMMUNG IHRER FETTSÄURE-ZUSAMMENSETZUNG**

P. POHL, H. GLASL UND H. WAGNER

*Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, Karlstrasse 29, München (B.R.D.)*

(Eingegangen am 4. März 1970)

---

**SUMMARY**

By means of a new solvent system (acetone-benzene-water (91:30:8)) for one-dimensional thin-layer chromatography on silica gel the complete separation of plant glycolipids (monogalactosyldiglyceride, digalactosyldiglyceride, sulfolipid), phospholipids (cardiolipin, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylcholine) and of neutral lipids is achieved. By transmethylation of the singular lipid zones from the thin-layer plate with sodium methylate in test tubes the fatty acids of all the lipids out of 2-4 mg of total lipids can be determined and compared quantitatively within a short time.

---

**EINLEITUNG UND ALLGEMEINE METHODIK**

Auf dem Gebiet pflanzlicher Lipide hat sich in neuerer Zeit das Interesse vor allem auf die Gruppe der Glykolipoide (Mono- und Digalactosyldiglycerid sowie Sulfolipid) konzentriert. Diese Lipide, zusammen mit dem Phosphatidylglycerin charakteristische Inhaltsstoffe von assimilierenden Geweben<sup>1-9</sup>, stehen offenbar mit Photosynthese-Prozessen in engem Zusammenhang.

Für die schnelle Routine-Analyse dieser Lipide ist die Dünnschichtchromatographie (DC) die Methode der Wahl. Jedoch gelingt es mit keinem der bisher verwendeten Laufmittelsysteme (meist Mischungen von Chloroform, Methanol und Wasser bzw. Diisobutylketon und Wasser, z.T. unter Zusatz von Essigsäure oder  $\text{NH}_4\text{OH}$ )<sup>10-18</sup>, die oben erwähnten Glyko- und Phospholipoide sowie die Neutral-lipoide durch eindimensionale DC vollständig zu trennen. Einige "Lipoidpaare" bleiben in diesen Systemen völlig ungetrennt. Zumeist wird deshalb die zweidimensionale DC mit zwei verschiedenen Laufmittelsystemen benutzt. Diese Methode hat aber abgesehen von dem grösseren Zeitaufwand und der damit verbundenen grösseren Oxydationsgefahr für die Lipide den Nachteil, dass man in einem Arbeitsgang stets nur einen Extrakt und auch nur sehr geringe Mengen analysieren kann.

Wir berichten daher im Folgenden über ein neues Laufmittelsystem für die eindimensionale DC, das alle oben erwähnten Glyko- und Phospholipide vollständig voneinander trennt. Ausserdem werden die Neutral-Lipide von den genannten Lipiden abgetrennt und ihrerseits nochmals in zwei Gruppen unterteilt. Durch direkte Transmethylierung der aus dem Kieselgel eluierten Lipide mit Natriummethylat und anschliessender Gaschromatographie (GC) der erhaltenen Fettsäuremethylester kann in verhältnismässig kurzer Zeit für jedes Lipid die Fettsäure-Zusammensetzung ermittelt werden. Diese Methode wurde so ausgearbeitet, dass ein quantitativer Vergleich der einzelnen Lipide hinsichtlich ihrer Fettsäuren möglich ist.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### *Lipoid-Extrakte*

Die Extrakte können auf die übliche Weise durch Extraktion von frischem oder getrocknetem Pflanzenmaterial mit organischen Lösungsmitteln (Äther, Chloroform, Methanol u.a.) hergestellt werden. Es empfiehlt sich aber, eventuell vorhandenes Wasser durch Trocknung der Extrakte im Exsikkator zu entfernen.

### *Dünnschicht-Platten*

Die Platten (12 × 20 cm) werden mit einer Suspension von Kieselgel HF<sub>254</sub> (Merck) in Wasser (pro Platte 3.5 g Kieselgel und 9 ml Wasser) bestrichen und nach 30 Min. Trocknen an der Luft 2 Std. bei 130° aktiviert. Wichtig für gute Trennungen sind optimal aktivierte Platten. Nach dem Abkühlen werden deshalb die noch warmen Platten in einen Exsikkator gestellt und im Vakuum über frischem P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> aufbewahrt. Das P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ist öfters zu erneuern. KOH (*rotulis*) eignet sich nicht als Trocknungsmittel.

### *Auftragsmenge und Auftragen der Lipide*

Bei Bedarf wird eine Platte dem Exsikkator entnommen. Dann werden möglichst rasch die aufzutrennenden Lipide (gelöst in Chloroform-Methanol o.ä.) mit einem weichen Pinsel strichförmig auf die Platten aufgetragen. Pro Platte lassen sich etwa 2–4 mg Gesamtlipide auftrennen.

### *Laufmittel*

Aceton p.A.–Benzol p.A.–Wasser (91:30:8). Die DC-Kammern werden durch Einstellen von Filtrierpapier gesättigt. Zur Erreichung optimaler Trennungen empfiehlt es sich, nur p.A. Lösungsmittel zu verwenden und diese zusätzlich über eine Kolonne zu destillieren.

Laufzeit: ca. 30 Min/16 cm bei 23°.

### *Anfärben der Lipide*

Nach der Chromatographie werden die Platten im kalten Luftstrom getrocknet und mit alkalischer 0.003%-iger Lösung von Rhodamin 6 G besprüht. Dieses Reagenz wird unmittelbar vor dem Besprühen durch Mischen gleicher Volumina von wässriger 8%-iger NaOH und wässriger 0.006%-iger Rhodamin 6 G-Lösung hergestellt<sup>1</sup>. Die Platten werden solange besprüht, bis die ganze Schicht gleichmässig durchfeuchtet ist. Dann werden die Platten sofort unter dem UV-Licht (366 nm) betrachtet. Die Lipidzonen treten als hellgelbe Flecken auf blauviolettem Untergrund hervor.

### *Eluieren der einzelnen Lipoid-Zonen*

Die einzelnen Lipoid-Zonen einer besprühten und noch feuchten Platte werden mit einer Nadel umrandet. Dann wird die Platte im kalten Luftstrom vollständig getrocknet, die markierten Kieselgel-Zonen mit einem Spatel ausgekratzt und das Kieselgelmateriale in je ein Reagenzglas gegeben.

### *Darstellung der Fettsäuremethylester*

(a) *Herstellung der 2 N Natriummethylat-Standardlösung.* 4.6 g metallisches Natrium werden in 100 ml Methanol p.A. in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben gelöst. Nach vollständiger Lösung wird die Natriummethylat-Lösung mit Methanol p.A. bis auf 100 ml aufgefüllt und gut verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lösung ist so mehrere Monate haltbar.

(b) *Transmethylierung der Lipoid-Zonen.* Das in einem Reagenzglas befindliche Kieselgel-Material einer Lipoid-Zone (s.o.) wird mit 2.5 ml Methanol p.A. versetzt und einige Minuten gut geschüttelt. Dann werden 2.5 ml 2 N Natriummethylatlösung zugegeben und diese Mischung unter häufigem Umschütteln 20 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wird durch Zugabe von 1 ml 37%-iger HCl angesäuert, diese Mischung nach kurzem Umschütteln mit 20 ml Wasser verdünnt und durch Einstellen in kaltes Wasser auf Zimmertemperatur abgekühlt. Die Mischung wird in einen 250 ml Schütteltrichter überführt und das Reagenzglas mehrfach mit Wasser und abschliessend einmal mit 1 ml Methanol nachgespült, so dass sich etwa 70 ml im Schütteltrichter befinden. Diese Menge wird dreimal mit je 30 ml Petroläther-Äther (1:1) extrahiert und die vereinigten Oberphasen einmal mit Wasser gewaschen. Die Oberphase wird in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt, das Lösungsmittel im Stickstoffstrom vollständig entfernt, der Rückstand mit 3 × 5 ml Petroläther-Äther (1:1) in ein Reagenzglas überführt, wiederum das Lösungsmittel im N<sub>2</sub>-Strom entfernt und der Rückstand mit 3 × 0.5 ml Chloroform quantitativ in ein 2 ml-Reagenzglas überführt. Erst unmittelbar vor der GC wird dieses Lösungsmittel nochmals vorsichtig im N<sub>2</sub>-Strom entfernt, der Rückstand in genau 0.05 ml Chloroform p.A. gelöst und aliquote Mengen dieser Lösung gaschromatographisch analysiert.

Diese Methode der Transmethylierung erwies sich in Reihenversuchen als sehr gut reproduzierbar. Gegenüber der zweistündigen Verseifungsmethode mit methanolischer 2 N-KOH und anderen Verfahren ergaben sich keine Unterschiede.

### *Gaschromatographie*

Modell Packard, Säule: 3 m × 4 mm, Säulenmaterial: 20% Reoplex 400 auf Chromosorb WS (45–60 mesh), Säulentemperatur: 190°, Gasdurchfluss: 80 ml Argon/Min, Einspritzmenge: 0.01 mg.

### *Quantitativer GC-Vergleich der Fettsäuren aller Lipoide aus einem Gesamtlipoid-Extrakt*

Bei Auftrennung von ca. 2–4 mg eines Gesamtlipoid-Extrakts über eine Dünnschichtplatte (s.o., s. auch Fig. 1A) erhält man nach dem Eluieren aller Lipoid-Zonen aus der Platte und nach der Transmethylierung dieser Zonen unter gleichen Bedingungen die Fettsäuren aller Lipoide in den ursprünglich vorhandenen absoluten Mengen.

Wenn man nun die Fettsäuremethylester immer in der gleichen Lösungsmittel-

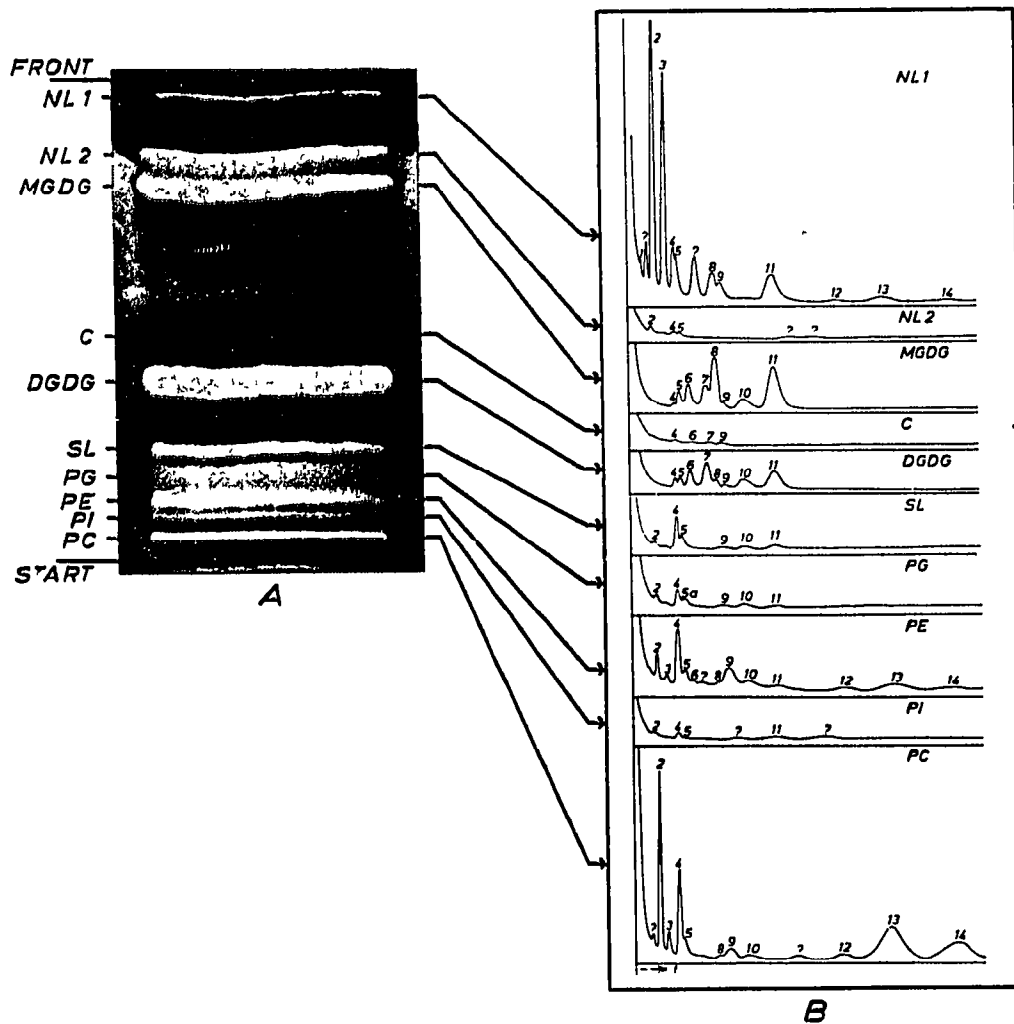


Fig. 1. (A) DC-Trennung der Lipide von *Euglena gracilis*. Laufmittel Aceton-Benzol-Wasser (91.30.8). (B) Fettsäure-Zusammensetzung der Lipide von *Euglena gracilis* (Züchtung der Algen in organischem Medium 5 Tage im Dunkeln, danach 4 Tage im Tageslicht bei ca. 800 lux). Abkürzungen. NL 1: Neutrallipide (vorwiegend Di- und Triglyceride), NL 2: Neutrallipide (vorwiegend Monoglyceride und Sterin-Ester; MGDG: Monogalactosyldiglycerid, DGDG: Digalactosyldiglycerid; C: Cardiolipin, SL: Sulfolipid; PG: Phosphatidylglycerin; PE: Phosphatidyläthanolamin; PI: Phosphatidylinositol; PC: Phosphatidylcholin. (B) 1: C<sub>12</sub>; 2: C<sub>14</sub>; 3: C<sub>15</sub>(?), 4: C<sub>10</sub>; 5: 7-C<sub>10</sub>(1<sup>-</sup>); 5a: *trans*-3-C<sub>10</sub>(1<sup>-</sup>); 6: C<sub>10</sub>(2<sup>-</sup>); 7: C<sub>10</sub>(3<sup>-</sup>); 8: C<sub>10</sub>(4<sup>-</sup>) + C<sub>18</sub>; 9: C<sub>18</sub>(1<sup>-</sup>); 10: C<sub>18</sub>(2<sup>-</sup>); 11: C<sub>18</sub>(3<sup>-</sup>); 12: C<sub>18</sub>(4<sup>-</sup>); 13: C<sub>20</sub>(4<sup>-</sup>); 14: C<sub>20</sub>(5<sup>-</sup>).

menge (z.B. 0.05 ml Chloroform, wie oben angegeben) löst, und jeweils gleiche Mengen (z.B. je 6  $\mu$ l) durch denselben Gaschromatographen bei gleichbleibender Apparat-Einstellung analysiert, erhält man (s. Fig. 1 B) einen quantitativen Vergleich der Fettsäuren aller Lipide eines Extraktes (unter der Voraussetzung, dass der Gaschromatograph linear auf die verschiedenen Substanzmengen anspricht). Proben, die bei der gewählten Standard-Einstellung des Gaschromatographen wegen der zu geringen Fettsäuremengen nur sehr niedrige GC-Peaks ergeben, können dann anschliessend bei höherer Empfindlichkeit des Apparates nochmals gaschromatographiert werden.

Wie in Fig. 1 B am Beispiel eines Lipoid-Extraktes aus *Euglena gracilis* gezeigt wird, haben die einzelnen Lipide in Übereinstimmung mit den Literaturangaben<sup>1-9</sup> unterschiedliche, aber für die jeweiligen Lipide eine charakteristische Fettsäure-Zusammensetzung: Die Zone NL 1 (überwiegend Di- und Triglyceride) sowie PC und PE enthalten die Hauptmenge der gesättigten und der C<sub>18</sub>- und C<sub>20</sub>-Polyenfettsäuren. MGDG und DGDG besitzen vorwiegend höher ungesättigte C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-Fettsäuren, SL ist durch die C<sub>16</sub>-Fettsäure und PG durch die *trans*-3-C<sub>16</sub>(1=)-Fettsäure charakterisiert. PI, C und NL 2 (vorwiegend Sterin-Ester und Monoglyceride) spielen mit ihrem geringen Gehalt an Fettsäuren nur eine untergeordnete Rolle.

#### DANK

Unser Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit mit Sachbeihilfen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe eines neuen Laufmittelsystems, Aceton-Benzol-Wasser (91:30:8) gelingt mit eindimensionaler Kieselgel-Dünnschichtchromatographie die vollständige Trennung pflanzlicher Glykolipide (Monogalactosyldiglycerid, Digalactosyldiglycerid, Sulfolipid), Phospholipide (Cardiolipin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidyl-ethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin) sowie der Neutrallipide. Durch Transmethylierung der einzelnen Lipidzonen aus der DC-Platte mit Natrium-Methylat können die Fettsäuren aller Lipide aus etwa 2-4 mg Gesamtlipoid-Extrakt in relativ kurzer Zeit gaschromatographisch bestimmt und quantitativ miteinander verglichen werden.

#### LITERATUR

- 1 C. F. ALLEN, P. GOOD, H. F. DAVIES, P. CHISUM UND S. D. FOWLER, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 43 (1966) 223.
- 2 A. A. BENSON, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 43 (1966) 265.
- 3 A. ROSENBERG, J. GOUAUX UND P. MILCH, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 733.
- 4 T. E. WEIER UND A. A. BENSON, *Am. J. Botany*, 54 (1967) 389.
- 5 G. CONSTANTOPOULOS UND K. BLOCH, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 3538.
- 6 B. W. NICHOLS, *Lipids*, 3 (1968) 354.
- 7 L. APPELQUIST, J. E. BOYNTON, P. K. STUMPF UND D. VON WETTSTEIN, *J. Lipid Res.*, 9 (1968) 425.
- 8 A. RADUNZ, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 349 (1968) 303.
- 9 P. POHL UND H. WAGNER, in Vorbereitung.
- 10 A. A. BENSON, H. DANIEL UND R. WISER, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45 (1959) 1582.
- 11 H. WAGNER, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 62 (1960) 1115.
- 12 H. WAGNER, L. HÖRHAMMER UND P. WOLFF, *Biochem. Z.*, 334 (1961) 175.
- 13 W. D. KIDMORE UND C. ENTENMAN, *J. Lipid Res.*, 3 (1962) 471.
- 14 A. T. JAMES UND L. J. MORRIS, *New Biochemical Separations*, Van Nostrand, London, 1964.
- 15 B. W. NICHOLS UND A. T. JAMES, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 66 (1964) 1003.
- 16 D. ABRAMSON UND M. BLECHER, *J. Lipid Res.*, 5 (1964) 628.
- 17 V. P. SKIPSKI, R. F. PETERSON UND M. BARCLAY, *Biochem. J.*, 90 (1964) 374.
- 18 N. PELICK, T. L. WILSON, M. E. MILLER, F. M. ANGELONI UND J. M. STEIM, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42 (1965) 393.