

CHROM. 5930

Präparative Trennung von Plastidenpigmenten auf Polyamidsäulen

Assimilationspigmente wurden auf Polyamid unseres Wissens nach bisher nur auf Dünnschichten getrennt¹. Auch zur Trennung der Karotenoide nach ihrer Abtrennung von Chlorophyll wurden Dünnschichten aus Polyamid resp. aus Polyamid und Zellulose verwendet²⁻⁸.

Die hier angeführte Methode der Säulenchromatographie ermöglicht die Arbeit auf inertem, standardisiertem Material unter Luftabschluss.

Methode

Das Pflanzenmaterial wird in wasserloses Azeton extrahiert und in *n*-Hexan übergeführt. Die bei der Auswaschung der Azetonreste mit dest. Wasser entstehende Emulsion sowie etwaige Spuren von Wasser müssen durch Zentrifugieren (2,000 g) entfernt werden.

Polyamid der Firma Koch-Light Laboratories Ltd. (Colnbrook, Buck., Great Britain), 0.2–0.08 Mesh Korngrösse, wird ohne vorherige Aktivierung in *n*-Hexan suspendiert und in eine Glasröhre gegossen. Eine Polyamidsäule von ungefähr 10 cm Länge und 6 mm Dicke ermöglicht bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min die Trennung von 5 ml konzentrierten Pigmentextraktes (ungefähr 1 mg Chlorophyll *a* + *b*). Allzu lange Säulen sind nicht zweckmässig.

Als Elutionsmittel für die einzelnen Pigmente werden folgende Lösungsmittel verwendet: (1) *n*-Hexan; (2) Benzen; (3) Benzen–Chloroform (9:1); (4) Benzen–Chloroform (1:1); (5) Benzen–Chloroform (1:3); (6) Chloroform und (7) Methanol.

Nach der Auftragung des in *n*-Hexan übergeführten Pigmentextraktes werden alle Pigmente mit Ausnahme von β -Karotin sehr fest am Start adsorbiert. β -Karotin fliesst durch die Säule und kann in praktisch unveränderter Konzentration mit *n*-Hexan aus der Säule gewaschen werden.

Als weiteres Lösungsmittel dient zunächst Benzen, das die Xanthophylle (Lutein, Violaxanthin, Zeaxanthin, Neoxanthin) als Pigmentmischung abtrennt. Diese Mischung wird dann mit einer Lösung von Benzen–Chloroform (9:1) quantitativ ausgewaschen. Mit dieser Lösung beginnt sich auch meist schon Chlorophyll *a* von *b* abzutrennen, fliesst aber nicht aus der Säule. Hier sei noch bemerkt, dass eventuell vorhandenes Phäophytin vor den Xanthophyllen läuft. Seine ersten Fraktionen können noch vor der Applikation von Benzen–Chloroform in reinem Zustand mit einer Mischung von *n*-Hexan–Benzen (9:1) eluiert werden, die weiteren Fraktionen sind aber schon mit Xanthophyllen verunreinigt.

Zwischen den Xanthophyll- und Chlorophyllfraktionen fliesst eine reine Zwischenphase. Chlorophyll *a* wird mittels einer Lösung von Benzen–Chloroform (1:1) in reinem Zustand gewonnen. Allerdings sind zur Elution des Grossteiles dieses Pigments grössere Mengen von Lösungsmittel erforderlich, wobei manchmal noch weiteres Waschen mit reinem Chloroform notwendig ist. Die vollständige Abtrennung des Chlorophylls *a* von Chlorophyll *b* erfordert sehr grosse Lösungsmittelmengen und ist nicht zweckmässig.

Die Schwierigkeit, Chlorophyll *a* von *b* zu trennen, zeigt sich noch mehr bei der Gewinnung von Chlorophyll *b*, das auch bei sehr sorgfältiger Elution immer mit

Spuren von Chlorophyll *a* verunreinigt ist. Verhältnismässig kleine Mengen reines Chlorophylls *b* können gewonnen werden, wenn das Pigmentgemisch vorerst mit Azeton ausgewaschen wird. Ein kleiner Teil von reinem Chlorophyll *b* bleibt dann auf der Säule adsorbiert und kann mit Methanol eluiert werden.

Für die praktische Arbeit bedeuten jedoch sowohl die starke Verdünnung von Chlorophyll *a* als auch die zweifache Elution von Chlorophyll *b* einen Nachteil, der durch die Reinheit der Pigmente nicht aufgewogen wird. Günstiger ist es, die Möglichkeit der starken Einengung von Chlorophyll *b* resp. von Chlorophyll *a* + *b* (bis zu ein Drittel des ursprünglichen Volumens) durch Methanol zu nutzen und die beiden Chlorophylle in einem weiteren Gang voneinander zu trennen.

Ein sehr grosser Vorteil der Methode ist die kurze Zeit von ungefähr einer halben Stunde, die die gesamte Trennung in Anspruch nimmt. Diese Zeit ist noch kürzer, wenn Chlorophyll *a* und *b* gemeinsam eluiert werden.

Die Trennung der einzelnen Pigmente, resp. Pigmentgruppen ist auf Fig. 1 veranschaulicht. Fig. 1 zeigt die Möglichkeit der starken Einengung der einzelnen

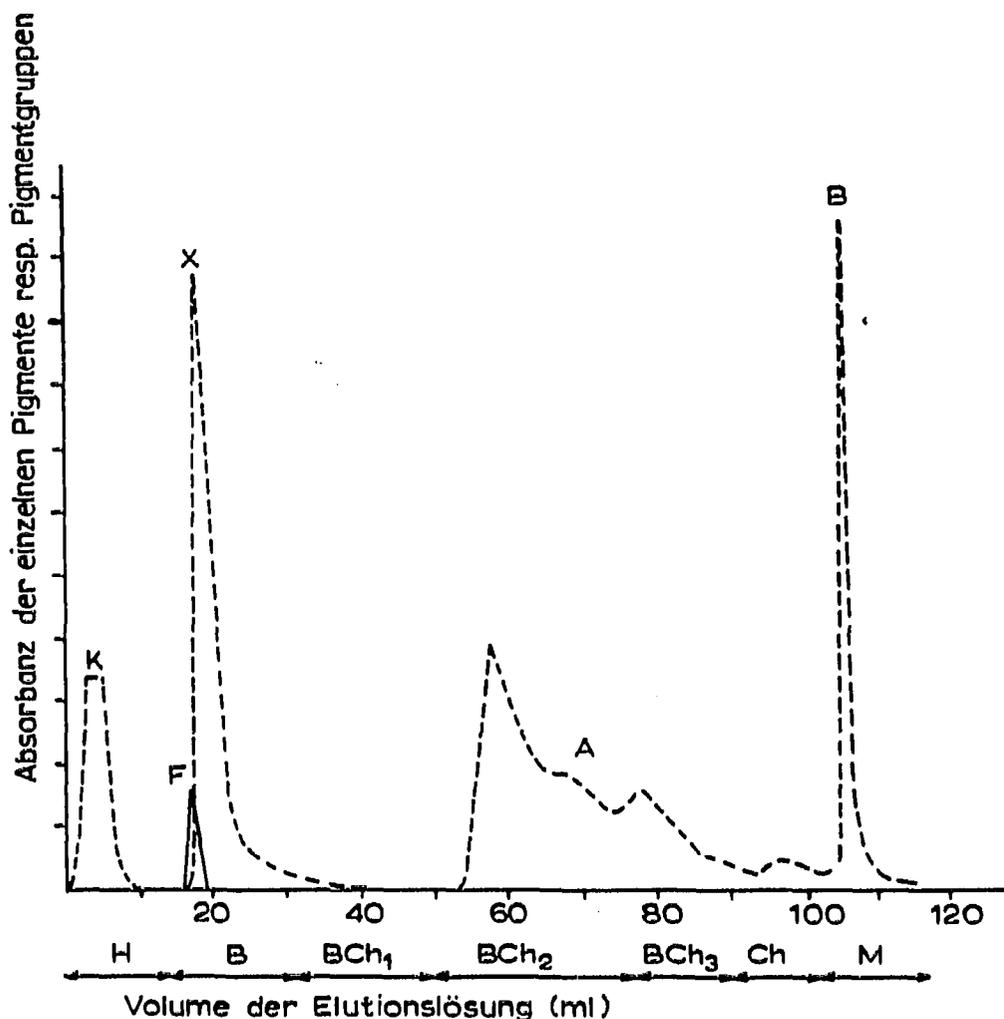


Fig. 1. Trennung der Pigmente durch die einzelnen Lösungsmittel. K = β -Karotin; F = Phäophytin; X = Xanthophylle; A = Chlorophyll *a*; B = Chlorophyll *b*. Abkürzungen der Elutionsmittel: H = *n*-Hexan; B = Benzen; BCh₁ = Benzen-Chloroform (9:1); BCh₂ = Benzen-Chloroform (1:1); BCh₃ = Benzen-Chloroform (1:3); Ch = Chloroform; M = Methanol.

Pigmente. Die Elutionskurve von Chlorophyll *a* ist mehrstufig, was mit dem sprunghaften Ansteigen der Polarität der Elutionsmittel zusammenhängt.

Diskussion

Nach der in der Einleitung erwähnten Methode von SHERMA UND LIPPSTONE¹ wurden zur Trennung der Assimilationspigmente präfabrizierte Dünnschichten (100 μ) mit Bindemittel ohne Aktivierung zur Trennung der Carotinoide verwendet. Die Chlorophylle blieben auch ohne Saponifikation am Start. Mit Petroläther konnte unter Beigabe von *n*-Propanol β -Karotin getrennt werden, die übrigen Pigmente gaben verwaschene Flecken. Nach der Saponifikation der Chlorophylle konnten mit einem Gemisch von Isooktan-Azeton-Äther (3:1:1) β -Karotin und Neoxanthin abgetrennt werden, Lutein und Violaxanthin dagegen nicht.

Nach der von EGGER UND VOIGT² beschriebenen Methode wurden die Karotinoide auf Polyamid dünnsschichten mit dem Laufmittel Petroläther-Methanol-Methyläthylketon getrennt, nach ihrer vorhergehenden Entmischung in Petroläther resp. 84 % Methanol.

Unsere Methode gestattet die exakte Abtrennung von β -Karotin, dem nach einer deutlichen Zwischenphase das Gemisch der Xanthophylle folgt. Dieses ist wieder von den Chlorophyllen durch eine deutliche Zwischenphase getrennt. Die Chlorophylle enthalten keinerlei Beimischungen von Karotinoiden. Die exakte Trennung von Chlorophyll *a* und *b*, sowie auch die von eventuell vorhandenem Phäophytin von der Xanthophyllfraktion ist dagegen unserer Methode nach nicht möglich, trotzdem die ersten Fraktionen sowohl von Phäophytin als auch von Chlorophyll *a* spektrophotometrisch rein sind.

Zum Schluss seien noch einige besondere Vorteile der angeführten Methode erwähnt: (1) Die Verwendung des inerten Polyamidpulvers in der geschlossenen Säule schützt die Pigmente in maximaler Weise vor der Degradation durch die Aussenatmosphäre. (2) Besonders vorteilhaft sind die grosse Kapazität der Trennsäule, der kurze Zeitaufwand und die Möglichkeit, das Polyamid nach Gebrauch zu regenerieren. (3) β -Karotin fliesst in der ursprünglichen Konzentration aus der Säule. Die Methode ist für die Preparation sehr grosser Mengen von β -Karotin auch für technische Zwecke geeignet. Es ist möglich Chlorophyll *b*, sowie auch das Gemisch von Chlorophyll *a* und *b* mit Methanol bis auf das Dreifache seiner ursprünglichen Konzentration einzuengen. (4) Die Methode ermöglicht die quantitative Abtrennung der Karotinoide von den Chlorophyllen ohne die Verseifung der letzteren und damit die Präparation grosser Mengen von Chlorophyll.

*Botanisches Institut der Slowakischen Akademie der
Wissenschaften, Abteilung für Pathologische Physiologie,
Bratislava (Tschechoslowakei)*

F. FRIČ
E. HASPEL-HORVATOVIČ

1 J. SHERMA UND G. S. LIPPSTONE, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 220.

2 K. EGGER UND H. VOIGT, *Z. Pflanzenphysiol.*, 53 (1965) 64.

3 K. EGGER UND H. KLEINIG, *Phytochemistry*, 6 (1967) 903.

4 H. KLEINIG UND K. EGGER, *Phytochemistry*, 6 (1967) 1681.

5 H. KLEINIG UND K. EGGER, *Z. Naturforsch.*, 22b (1967) 868.

6 K. EGGER UND H. KLEINIG-VOIGT, *Z. Naturforsch.*, 23b (1968) 1105.

7 H. KLEINIG UND N. CZYGAN, *Z. Naturforsch.*, 24b (1969) 927.

8 T. R. RICKETTS, *Phytochemistry*, 9 (1970) 1835.

Eingegangen am 28. Oktober 1971; geänderte Fassung am 20. Januar 1972