

CHROM. 13,018

Note

Trennung von Benzoesäurederivaten aus Pflanzenextrakten über Sephadex G-10-Säulen

U. ENKHARDT und H. GRÄSER*

Pädagogische Hochschule "Dr. Theodor Neubauer", Erfurt/Mühlhausen, Wissenschaftsbereich Botanik/Pflanzenphysiologie/Biochemie, Thälmannstrasse 28, 5700 Mühlhausen (D.D.R.)

(Eingegangen am 6. März 1980; geänderte Fassung eingegangen am 10. Juni 1980)

Zur Isolierung von Naturstoffen, Herbiziden und deren Metaboliten aus Pflanzen werden verschiedene Methoden genutzt. Zum Beispiel sind Benzoesäure und deren Derivate besonders durch Verteilungsverfahren aus Pflanzenextrakten abgetrennt worden^{1,2}. Zur Fraktionierung von Stoffgemischen wird vielfach die Gelchromatographie an Sephadexsäulen eingesetzt. Hierbei wird vor allem das Prinzip der Filtration durch Dextranringe angewendet. Dextranringe haben eine hohe Affinität zu verschiedenen Verbindungen³. Janson⁴ beschrieb die Adsorption von aromatischen Verbindungen an Sephadex. Die Adsorptionsstärke kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden⁵.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Möglichkeit der Trennung von Benzoesäure und deren Derivaten aus Pflanzenextrakten mit Hilfe der Sephadex G-10-Säulenchromatographie zu untersuchen.

MATERIAL UND METHODEN

Zur Trennung von Extraktkomponenten verwendeten wir eine Sephadex G-10-Säule (30 × 1.5 cm). Auf das Sephadex G-10-Gel trugen wir eine 1 cm hohe Sephadex G-50-Schicht auf. Diese Schicht verhindert das Aufwirbeln der Oberfläche und dient gleichzeitig als Sammelschicht. Die Säule wurde an ein Uvicord II 8 300 mit dem Detektor 8303 A und einem Fallbügelschreiber 6520 (LKB, Uppsala, Schweden) angeschlossen. Das Eluat wurde bei 258 nm photometriert.

Als Versuchsobjekt diente die Zuckerrübensorte *Beta vulgaris* cv. *hymona*. Die Pflanzen wuchsen 4 Wochen im Gewächshaus. Je 5 g Blätter wurden gefriergetrocknet. Die Homogenisation des getrockneten Materials erfolgte im Mörser mit 10 ml 80%igem Ethanol. Nach 20stündiger Extraktion wurde 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Dieser Überstand diente den weiteren Untersuchungen.

Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten verwendeten wir die Verbindungen in einer Konzentration von 10^{-3} mol·l⁻¹. Als Testsubstanz wurde *o*-Chlorbenzoesäure eingesetzt. Die Berechnung des Verteilungskoeffizienten (K_D), der die Verteilung des zu untersuchenden Stoffes zwischen der mobilen Phase und dem inneren Volumen der stationären Phase ausdrückt, erfolgte nach folgender Gleichung⁶:

$$K_D = \frac{V_e - V_0}{V_1}$$

V_e = Elutionsvolumen der Verbindung (ml), V_0 = Zwischenkornvolumen oder Volumen ausserhalb der kugelförmigen Partikel (ml); V_i = Inneres Volumen oder Volumen der Flüssigkeit innerhalb des Gels (ml).

Es wurde mit dem Elutionsvolumen einer Modellverbindung (Aceton) abzüglich dem Zwischenkornvolumen (V_0) bestimmt. Zur Bestimmung des Elutionsverhaltens setzten wir verschiedene Lösungen ein. Die Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

- (1) pH 4.0: 61.5 ml, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Citronensäure; 38.5 ml, $0.2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 .
 (2) pH 4.4: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 . (3) pH 7.0: 29.1 ml, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH; 50 ml, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 (mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen). (4) pH 9.0: 4.6 ml, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl; 50 ml, $0.025 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen).
 (5) $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl. (6) $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Trennung wurden jeweils 0.5 ml der Lösung auf die Sephadex-Säule aufgetragen. Die im ersten Teil angegebenen Lösungen benutzten wir zur Elution. Die Säule wurde vor der Verwendung mit dem jeweiligen Elutionsmittel gewaschen. Zur Bestimmung des Zwischenkornvolumens bzw. des inneren Volumens verwendeten wir $50 \mu\text{l}$ Dextran blau 2000 (10 mg/ml) bzw. $10 \mu\text{l}$ Aceton. Mit dem Elutionspuffer von pH 7.0 erhielten wir das in Fig. 1 dargestellte Profil.

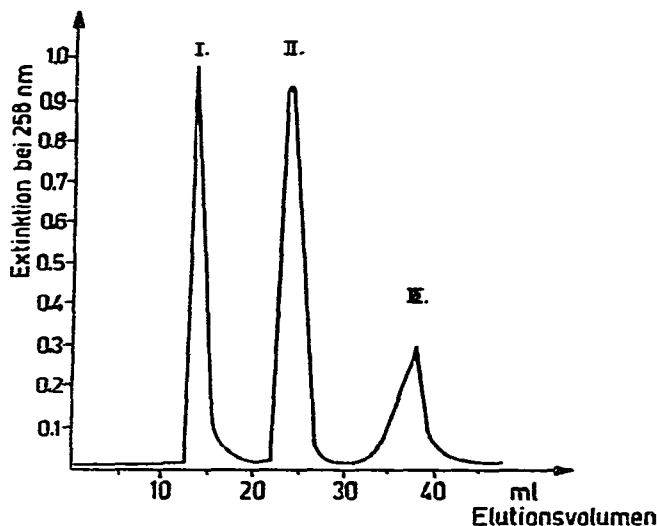


Fig. 1. Chromatogramm der *o*-Chlorbenzoesäure auf einer Sephadex G-10-Säule. I = Dextran blau 2000 (500 μg); II = Aceton (10 μl); III = *o*-Chlorbenzoesäure (30 μg). Elutionsmittel: Puffer pH 7; Durchflussgeschwindigkeit: 50 ml/h.

Bei den Trennungen mit den angegebenen Lösungen konnten wir die in Tabelle I dargestellten K_D -Werte berechnen.

Aus dieser Tabelle ist eindeutig die Tendenz zu erkennen, dass die verwendete *o*-Chlorbenzoesäure im sauren Bereich einen höheren K_D -Wert besitzt als im alkali-

TABELLE I

EINFLUSS DES ELUTIONSMITTELS AUF DEN VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN (K_D) VON *o*-CHLORBENZOE SäURE BEI DER SÄULENCHROMATOGRAPHIE AUF SEPHAD-DEX G-10

<i>Elutionsmittel</i>	K_D -Wert
Puffer pH 4.0	2.6
Puffer pH 4.4	3.6
Puffer pH 7.0	2.1
Puffer pH 9.0	0.4
0.05 mol/l NaOH	1.0
0.05 mol/l HCl	∞

schen Bereich. Die Zusammensetzung des Elutionsmittels spielt offensichtlich eine entscheidende Rolle, wie beim Vergleich der K_D -Werte der Puffer von pH 4.0 und 4.4 zu erkennen ist. Sie wurde aber bei weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Zum weiteren Arbeiten setzten wir auf Grund der vorliegenden Ergebnisse als Elutionsmittel 0.05 mol \cdot l⁻¹ NaOH bzw. 0.05 mol \cdot l⁻¹ HCl ein. Bei der Verwendung von Natronlauge entspricht der Verteilungskoeffizient dem Wert des Acetons. Bei 0.05 mol \cdot l⁻¹ HCl als Elutionsmittel wird die Benzoesäure nicht von der Sephadex-Säule eluiert. Es entsteht eine reversible Bindung an das Gel der Säule. Sie kann durch nachfolgendes Eluieren mit einem alkalischen Elutionsmittel gelöst werden.

Diese reversible Bindung an das Sephadex-Gel wurde für folgende Verbindungen nachgewiesen: Benzoesäure, deren Monochlor-, Mononitro-, Monohydroxy-Derivate, Anthranilsäure, *o*-Methoxybenzoesäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 2,3,5-Trijodbenzoesäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure.

Weitere Verbindungen wurden nicht zur Testung eingesetzt. Verantwortlich für die Bindung an das Gel der Säule ist die Struktur des Moleküls. Für alle getesteten Verbindungen sind der Benzolring und die Carboxylgruppe charakteristisch. Die Affinität für π -elektronenreiche Verbindungen und die hydrophobe Wechselwirkung von Ionenkomplexen an Dextrangele wurden bereits mehrfach als Ursache für die Veränderung des K_D -Wertes beschrieben^{3-5,8-11}.

Bei der Testung der Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin auf ihr chromatographisches Verhalten konnten wir ebenfalls eine Veränderung des K_D -Wertes nachweisen⁴. Sie zeigten unter den angegebenen Bedingungen aber keine Bindung an das Gel der Säule.

Die Struktur der Substanz, die Ionenzusammensetzung und der pH-Wert des Elutionsmittels spielen bei der Bindung eine wichtige Rolle.

Die Bindungsfähigkeit der Benzoesäure und der angeführten Derivate wurde zur Trennung aus Pflanzenextrakten genutzt (Fig. 2).

Zur Trennung mischten wir 0.5 ml Pflanzenextrakt mit 0.5 μ Ci ¹⁴C-Benzoesäure-7 (= 1.04 μ g). Das Gemisch wurde sofort auf eine Sephadex G-10-Säule aufgetragen, die vorher mit 0.05 mol l⁻¹ HCl gewaschen wurde. Die Reihenfolge der eingesetzten Elutionsmittel ist aus der Fig. 2 ersichtlich.

Im Szintillationszähler wurde die Radioaktivität der erhaltenen Fraktionen gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle II dargestellt. In der Fraktion 9 tritt die grösste Impulszahl auf. Die Aktivität in den anderen Fraktionen ist unbedeutend. Anhand

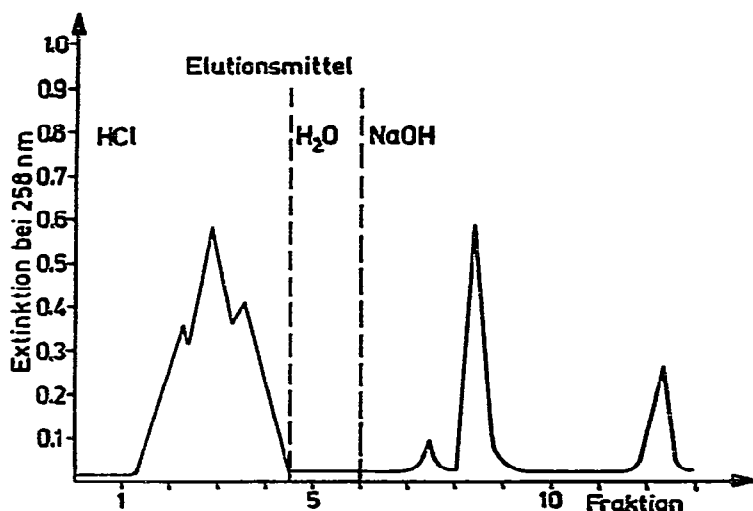


Fig. 2. Chromatogramm eines Pflanzenextraktes mit ^{14}C -Benzoessäure-7 auf einer Sephadex G-10-Säule. (Fraktion 9 Benzoessäure-Peak, Erläuterungen im Text.)

TABELLE II

MESSUNG DER RADIOAKTIVITÄT DER EINZELNEN ELUATFRAKTIONEN NACH DER IN FIG. 2 DARGESTELLTEN FRAKTIONIERUNG AUF EINER SEPHADEX G-10-SÄULE

	Fraktion					
	1-8	9	10	11	12	13
dpm	etwa 100	31,700	350	180	200	50

der auftretenden Radioaktivität kann die Fraktion 9 als Benzoessäurefraktion charakterisiert werden.

Die vorgestellte Methode ist somit geeignet, Benzoessäurederivate, die die freie Carboxylgruppe besitzen, aus Pflanzenextrakten abzutrennen.

LITERATUR

- 1 M. Tomaszewski, *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 8 (1960) 61.
- 2 H.-P. Thier, *Deut. Lebensm.-Rundsch.*, 11 (1970) 393.
- 3 B. Gelotte, *J. Chromatogr.*, 3 (1960) 330.
- 4 J.-C. Janson, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 12.
- 5 J. Churacék und P. Jandera, in Z. Deyl, K. Macek und J. Janák (Herausgeber), *Liquid Column Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1975, S. 543.
- 6 A. P. de Leenheer, S. S. Rigo, C. F. Gelijkens und P. M. van Vaerenbergh, *J. Chromatogr.*, 92 (1974) 339.
- 7 W. Edlich, nicht veröffentlichte Ergebnisse.
- 8 R. A. Carbis, S. J. Rodda und A. W. Hampson, *J. Chromatogr.*, 173 (1979) 182.
- 9 M. Sinibaldi und M. Lederer, *J. Chromatogr.*, 107 (1975) 210.
- 10 A. Ch. Haglund, *J. Chromatogr.*, 156 (1978) 317.
- 11 A. Sada, G. Di Pascale und M. C. Cacace, *J. Chromatogr.*, 177 (1979) 353.