

Die quantitative Bestimmung von Chloroplastenpigmenten im picomol-Bereich mit Hilfe einer isokratischen HPLC-Methode

A Method for the Quantitative Estimation of Chloroplast Pigments in the Picomole-Range by Use of a Isocratic HPLC-System

Harald Stransky

Institut für Biologie I der Universität Tübingen,
Lehrstuhl Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie

Z. Naturforsch. **33 c**, 836–840 (1978) ; eingegangen am 16. Oktober, 1978

Carotenoids, Chloroplast Pigments, High Performance Liquid Chromatography

A method is described for the estimation of the pigment content in chloroplasts by means of HPLC. The method is highly sensitive. Less than one picomole of individual pigments — equivalent to 1 milligramme fresh weight of spinach leaves — is needed for quantitative analysis. Analysis time is only 15 min, whereas in routine determination by thin layer chromatography a single sample needs 4 hours to be completed.

Moreover the pigments are protected against desintegration by light and air. Using a isocratic HPLC-method no equilibration of columns is necessary, thus permitting four runs per hour.

Die Trennung von Pflanzenfarbstoffen erfolgte erstmals in einer mit Calciumcarbonat gepackten Säule durch Tswett 1906 [1]. Bei Herausgabe der ersten Monographie über Carotinoide durch Zechmeister 1934 [2] war die Methode der Säulenchromatographie und ihre präparativen Möglichkeiten allgemein anerkannt. In der Monographie von Karrer und Jucker 1948 [3] und in der Arbeit von Strain 1958 [4] sind die verwendeten Sorbenzien (von Aluminiumoxid bis Zucker) und Elutionsmittel-Gemische sowie die erreichbaren Trennungen beschrieben.

Zur Lösung immer neuer Trennprobleme traten neben diese klassische Säulenchromatographie die Papier-, Dünnschicht- und Gas-Chromatographie.

Die Vorzüge der Dünnschichtchromatographie liegen in der Möglichkeit, sehr kleine Substanzmengen zu analysieren. Allerdings sind die empfindlichen Pigmente bei dieser Methode in erhöhtem Maße der Luft und dem Licht ausgesetzt. Beim Umgang mit Carotinoiden und Chlorophyllen soll deshalb im Dunkeln, u. U. mit Schutzgasen [5] oder unter Zusatz von Antioxidantien wie Ascorbinsäure gearbeitet werden [6].

Für die Chloroplastenpigmente sind sowohl adsorptionschromatographische als auch verteilungschromatographische Verfahren in Verwendung. Die Trennleistungen solcher Systeme sind in Abb. 1 dargestellt.

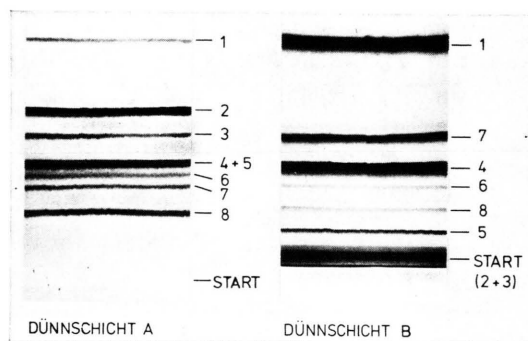


Abb. 1. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Chloroplastenpigmenten nach Hager und Meyer-Bertenrath 1966 [6].

Dünnschicht A: Verteilungschromatographische Trennung.

Dünnschicht B: Adsorptionschromatographische Trennung.
1 = β -Carotin, 2 = Chlorophyll a, 3 = Chlorophyll b, 4 = Lutein, 5 = Zeaxanthin, 6 = Antheraxanthin, 7 = Violaxanthin, 8 = Neoxanthin.

Das adsorptionschromatographische Verfahren (Abb. 1, Dünnschicht B) ermöglicht als einziges die Trennung der Isomeren Lutein und Zeaxanthin. Sehr scharfe Banden liefert das verteilungschromatographische Verfahren (Abb. 1, Dünnschicht A).

Ein weiteres System dieser Art ist die Trennung auf Schichten, welche mit pflanzlichen Ölen imprägniert sind [7]. Bei dieser „reversed-phase“-Methode wandern die Xanthophylle schneller als die Carotine. Das Verfahren hat den Nachteil, daß mit den Pigmenten das Imprägnierungsmittel ebenfalls eluiert wird. Aufgrund dieser nicht mehr abtrennbaren Lipidverunreinigungen ist eine Isolierung reiner Substanzen unmöglich.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Harald Stransky, Institut für Biologie I, Auf der Morgenstelle 1, D-7400 Tübingen.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Die dünnschichtchromatographischen Trennmethoden einschließlich zweidimensionaler 2-Schichten-Adsorptionschromatographie [8] sind brauchbare Verfahren zur Trennung von Carotinoiden und Chlorophyllen. Allerdings müssen teilweise längere Analysenzeiten und gewisse Verluste durch Oxidation der Pigmente während des Trennvorganges in Kauf genommen werden.

Die Vorteile der Gaschromatographie, wie z. B. kurze Analysenzeiten, gute Reproduzierbarkeit und Möglichkeit zur automatischen quantitativen Analyse lassen sich nicht für die Carotinoide nutzen, da diese nicht unzersetzt verdampfbar sind, sondern erst in mehreren Schritten aufbereitet werden müssen. Die von Taylor u. Davies [9] beschriebene Hydrierung und Silylierung sind für Routine-Analysen nicht geeignet.

Durch eine HPLC-Trennung der Blattpigmente können nun die Vorzüge der Gaschromatographie und der klassischen Säulenchromatographie vereinigt werden; vor allem die schonende Behandlung (kein Kontakt mit Licht und Luft), die Reproduzierbarkeit und die Automation.

Ein erster Versuch zur Trennung von Carotinoiden wurde an einer Säule mit ZnCO_3 -Füllung beschrieben [10].

Diese Trennung ist jedoch wegen des Zeitbedarfs von 5 Stunden noch nicht mit den heute an die HPLC gestellten Anforderungen in Einklang zu bringen. Gute Trennungen von Carotinoiden wurden mit einem „reversed-phase“-System erreicht, wobei hydrophobisiertes Kieselgel als Adsorbens verwendet wurde [16]. Allerdings ist zur Elution ein Lösungsmittelgradient notwendig, welcher den apparativen Aufwand erhöht und Wartezeiten erfordert, da vor jeder Analyse die Säule equilibriert werden muß.

Deshalb wird in dieser Arbeit ein isokratisches System vorgestellt, das eine schnelle und quantitative Bestimmung von Chloroplastenpigmenten ermöglicht.

Material und Methoden

Pigmentextrakt

Die Präparation von Chloroplasten erfolgte nach üblichen Methoden [11, 12]. Nach Zentrifugation wurden die sedimentierten Chloroplasten in Aceton überführt und im Glasperlenhomogenisator homogenisiert. Der so erhaltene Pigmentextrakt wurde durch eine Glasfilternutsche G 4 filtriert und im Dunklen bei -18°C aufbewahrt. Dazu werden die

Lösungen in Septum-Fläschchen gefüllt und mit Stickstoff überschichtet.

Apparativer Aufbau

Verwendet wurden Chromatographie-Komponenten der Fa. Spectra Physics, Darmstadt, bestehend aus Hochdruckpumpe Modell 740 B und UV-Vis Detektor Schoeffel Modell 770. Es wurde mit Stahlsäulen von 250 mm Länge und 3 mm Durchmesser gearbeitet. Zur Injektion der Proben diente eine pneumatisch gesteuerte Hochdruckspritze der Fa. Siemens, welche in den HPLC-Modellen S 200 eingebaut ist, oder das Probenschleifendosiersystem von Valco Modell CV-6-UHPa-N 60.

Trennsystem

a) Packungsmaterial: Die Trennung erfolgte an einem sphärischen porösen Kieselgel der Fa. Macherey-Nagel (Nucleosil 50-5), welches eine mittlere Korngröße von $5\text{ }\mu\text{m}$ besitzt.

b) Elutionsmittel: Das Laufmittel bestand aus einem Gemisch von iso-Octan: Äthanol 98prozentig = 9 : 1 v/v. Zur Herstellung des 98prozentigen Alkoholes wurde absolutes wasserfreies Äthanol mit der entsprechenden Wassermenge gemischt, da bei unbelegten Adsorbentien ein konstanter Wassergehalt für die Reproduzierbarkeit von Retentionszeiten sehr wichtig ist [13].

c) Durchflußrate: Die Durchflußrate des Elutionsmittels betrug 1 ml pro min.

Identifizierung

Die Identifizierung der eluierten Pigmente erfolgte durch Vergleichschromatographie an Dünnschichten [15] und durch Messung der Absorptionsspektren.

Chromatographisch reine Carotinoide für die Identifizierung und quantitative Eichung wurden durch aufeinanderfolgende Trennungen auf Dünnschicht A (Verteilung) und Dünnschicht B (Adsorption) gewonnen [14]. Das adsorptionschromatographische Verfahren erfordert eine sehr homogene Schicht. Für einwandfreie Trennungen muß die Suspension der Sorbentien (Magnesiumoxid, Calciumcarbonat und Calciumhydroxid) in der Kaliumhydroxidlösung homogenisiert werden (ca. 10 sec mit Homogenisator Ultra-Turrax T 18 der Fa. Janke und Kunkel, D-7813 Staufen). Die entstehende feine Körnung erhöht die Adsorption. Deshalb ist der Acetonanteil im Laufmittel zu verdoppeln.

Quantitative Bestimmung

Die Extinktion der Pigmentbanden wurde bei 445 nm gemessen. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Integration der Peak-Flächen mit Hilfe eines elektronischen Integrators (Rechner-Integrator, System IV der Fa. Spectra Physics, Darmstadt).

Ergebnisse und Diskussion

Die Trennung eines Extraktes aus Spinatchloroplasten ist in Abb. 2 dargestellt. Die Leistungen des Trennsystems lassen sich wie folgt beschreiben:

Auflösung

Bei der Entwicklung wurde eine Auflösung angestrebt, welche die exakte quantitative Auswertung auch mit einfachen Peakflächen-Integrationsmethoden ermöglicht. Dazu muß mindestens eine Auflösung zwischen allen aufeinanderfolgenden Substanzen von $R=1$ verlangt werden [14]. Eine höhere Auflösung ist zwar ohne weiteres erreichbar, jedoch im Hinblick auf kurze Analysenzeiten nicht zu empfehlen. Die erreichten Werte liegen zwischen 1,07 und 1,70.

Erfassungsgrenze

Die für eine sichere quantitative Auswertung benötigten Pigmentmengen liegen bei der Chromato-

graphie auf der Dünnschicht A bei 5 nmol pro Platte.

Das HPLC-System kommt mit 10 pmol pro Analyse gut aus. Bei Verwendung einer Injektionsspritze als Probenaufgabesystem reichen schon 100 µl Probenlösung für 2 Analysen mit zwischengeschaltetem Spülgang.

Quantitative Auswertung

Trotz unterschiedlicher Lichtabsorption der Farbstoffe wurde eine ideale Meßwellenlänge von 445 nm ermittelt, welche die in den Chloroplasten vorhandenen Pigmentmengen-Differenzen sehr gut ausgleicht. Aus Tab. I ist zu entnehmen, daß Chlorophyll b doppelt so gut erfaßt wird wie Chlorophyll a und die Carotinoide insgesamt etwa mit vierfacher Empfindlichkeit gegenüber dem Chlorophyll a registriert werden. Für die quantitative Berechnung ist zudem ein sehr großer linearer Bereich von 1 – 1000 pmol ausnutzbar. In der Abb. 3 ist die Eichgerade für Lutein dargestellt, wobei die eingetragenen Meßpunkte Einzelbestimmungen sind. Die Konstanten für die Auswertung sind in Tab. II angegeben.

Bei Verwendung des angegebenen Auswertesystems ist die Berechnung der Mengen wie folgt vorzunehmen:

$$\text{pmol}_{\text{Pigment}} = \frac{\text{Flächenindex}}{\text{Eichfaktor}_{\text{Pigment}}}$$

Reproduzierbarkeit

Das isokratische Trennsystem war der Gradientenelution an Reproduzierbarkeit überlegen. Die Retentionsvolumina sind sehr konstant (s. Tab. I, Standardabweichung), so daß bei Verwendung von Auswertautomaten die Identifizierung der eluierten

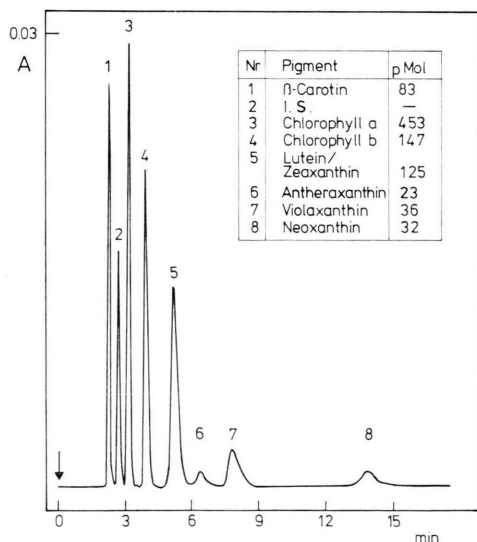


Abb. 2. Auftrennung von Chloroplastenpigmenten mit Hilfe der HPLC. Säule: L=250 mm, I. D.=3 mm. Sorbens: Nucleosil 50; 5 µm Korngröße. Elutionsmittel: iso-Octan:Äthanol (98-prozentig)=9:1 v/v. Detektor: 445 nm.

Tab. I. Retentionszeiten der Pigmente und relative molare Empfindlichkeit.

Pigment	t _R (sec)	Standardabw.	RME
β-Carotin	90.3	± 0.8	102.3
Sudan III	125.5	± 1.0	-
Chlorophyll a	144.5	± 1.5	24.3
Chlorophyll b	196.3	± 2.1	51.4
Lutein	256.5	± 3.0	100.0
Zeaxanthin	260.0	± 2.9	100.7
Antheraxanthin	330.3	± 5.9	143.8
Violaxanthin	407.6	± 6.7	102.0
Neoxanthin	750.8	± 10.9	93.5

* RME für Lutein = 100

Pigment	λ max	E 1% 1cm	Lösungsmittel	MG	Eichfaktor KF*
β -Carotin	462	2200	Chloroform	536.85	1501
Chlorophyll a	663	840	Aceton	893.48	356
Chlorophyll b	645	518	Aceton	907.62	755
Lutein	446	2540	Äthanol	568.85	1468
Zeaxanthin	451	2480	Äthanol	568.85	1479
Antheraxanthin	446	2350	Äthanol	584.85	2111
Violaxanthin	441	2500	Äthanol	600.85	1498
Neoxanthin	438	2270	Äthanol	600.85	1372

Tab. II. Daten für die quantitative Bestimmung der Pigmente.

* KF = Flächenindex pro picomol Pigment

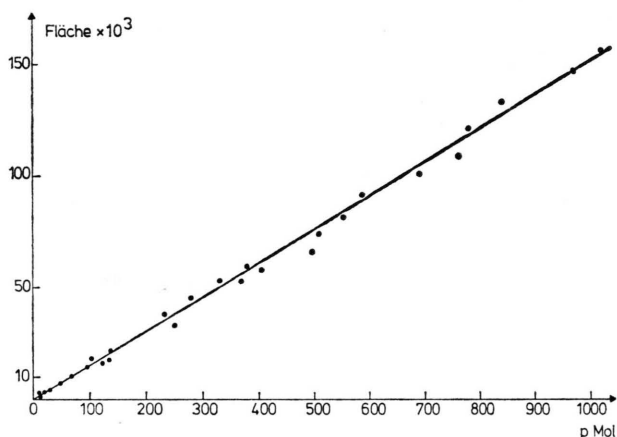


Abb. 3. Beziehung zwischen Dosiermenge und Detektorsignal für Lutein. Trennbedingungen s. Abb. 2.

Peaks und ihre Verrechnung mit spezifischen Eichfaktoren keine Schwierigkeiten bereitet.

Für exakte Mengenangaben ist das Probeaufgabesystem von entscheidender Bedeutung. Mit der verwendeten Injektionsspritze ergeben sich relative Standardabweichungen bei der Dosiergenauigkeit bis zu 2,3%. Der absolute Mengenfehler ist sehr gering (s. Tab. III).

Standardisierung

Mit dem Farbstoff Sudan III (Sudanrot B) wurde ein geeigneter innerer Standard gefunden, der eine Berechnung des Dosierfehlers ermöglicht.

Das käufliche Präparat (Merck 1380) mußte jedoch auf Dünnschicht B rechromatographiert werden, da eine Anzahl störender Begleitsubstanzen zugegen waren. Sudanrot B zeigte keine Reaktionen mit den Pigmenten. Bei seiner Verwendung als innerer Standard ist nur darauf zu achten, daß Phaeophytin a, welches als Abbauprodukt des Chlorophylls a in nicht sachgerecht behandelten Extrakten vorkommt, unter den angegebenen Bedingungen nur mit einer Auflösung von $R = 0,7$ abgetrennt wird. Sollte in den Extrakten Phaeophytin a auftreten, so muß die Auflösung durch eine Säule von 30 cm Länge verbessert werden.

Vergleich mit der dünnschichtchromatographischen Trennung

Bei der vergleichenden Analyse eines Extraktes mittels DC und HPLC – jeweils 3 Analysen – werden mit der HPLC, außer bei Neoxanthin, bei allen Pigmenten höhere Werte erhalten (s. Tab. IV).

Probe	berechnete Dosiermenge	Messungen μg	\bar{M} μg	s	Differenz μg %	
Chlorophyll a	1.349 μg	1.42	1.368 ± 0.033		+0.019	+1.4
		1.38				
		1.34				
		1.34				
		1.36				
Violaxanthin	3.501 μg	3.52	3.420 ± 0.105		-0.081	-2.3
		3.40				
		3.28				
		4.48				

Tab. III. Dosierungsgenauigkeit und Mengenfehler des HPLC-Systems.

Pigment	HPLC	DC	Differenz
β -Carotin	48.60 \pm 0.35	37.00 \pm 0.69	+ 11.60
Chlorophyll a	351.62 \pm 2.42	329.58 \pm 4.30	+ 22.04
Chlorophyll b	123.11 \pm 1.90	112.58 \pm 2.82	+ 10.53
Lutein	59.90 \pm 1.70	45.44 \pm 0.30	+ 14.46
Violaxanthin	36.28 \pm 0.69	25.44 \pm 0.79	+ 11.17
Neoxanthin	16.09 \pm 0.03	16.14 \pm 0.10	- 0.05

Tab. IV. Pigmentgehalt von Spinatchloroplasten. Vergleichende Bestimmung mit Hilfe der Dünnschicht A und des HPLC-Systems. Zahlenangaben in nmol pro g Frischgewicht des Blattes.

Die Pigment-Verluste an der Dünnschicht bestehen z. T. aus Oxidationsverlusten, z. T. sind sie durch Hängenbleiben von Substanzen an der Auftragelinie bedingt. Auch bleiben bei dem bandweisen Abschaben der Schicht visuell scheinbar leere Zonen zurück, in denen aber Pigmentreste verbleiben können.

Die Trennung durch die HPLC vermeidet diese Fehlerquellen und ermöglicht eine Analyse innerhalb

von 15 Minuten — bei Verwendung des Integrators inclusive vollständiger quantitativer Auswertung.

Die Untersuchungen wurden durch Beihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft an den Autor und an Herrn Prof. Dr. A. Hager gefördert.

- [1] M. Tswett, Ber. Deut. Botan. Ges. **24**, 316 und 384 (1906).
- [2] L. Zechmeister, Carotinoide, Springer-Verlag, Berlin 1934.
- [3] P. Karrer u. E. Jucker, Carotenoide, Birkhäuser-Verlag, Basel 1948.
- [4] H. H. Strain, Chloroplast Pigments and Chromatographic Analysis, Pennsylvania State Univ. Press 1958.
- [5] H. R. Bollinger u. A. König, Dünnschichtchromatographie, (E. Stahl, Ed.), 2. Auflage, p. 260, Springer-Verlag, Berlin 1967.
- [6] A. Hager u. T. Meyer-Bertenrath, Planta **69**, 198 (1966).
- [7] H. Kleinig u. K. Egger, Phytochemistry **6**, 611 (1967).
- [8] R. E. Knowles u. A. L. Livingstone, J. Chromatogr. **61**, 133 (1971).
- [9] R. F. Taylor u. B. H. Davies, J. Chromatogr. **103**, 327 (1975).
- [10] I. Stewart u. T. A. Wheaton, J. Chromatogr. **55**, 325 (1971).
- [11] R. G. Jensen u. J. A. Bassham, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **56**, 1095 (1966).
- [12] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Conolly, S. Izawa u. R. M. M. Singh, Biochemistry **5**, 467 (1966).
- [13] H. Engelhardt, Hochdruckflüssigkeitschromatographie, p. 97, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1975.
- [14] D. L. Saunders, Chromatography, (E. Heftmann, Ed.), 3. Auflage, p. 101, Van Nostrand Reinhold Company, New York 1975.
- [15] A. Hager u. H. Stransky, Arch. Mikrobiol. **71**, 132 (1970).
- [16] K. Langer, Trennung von Carotinoiden mit Hilfe der HPLC, Diss. Univ. Erlangen 1976.