

Note

Gibberelline

XLIII. Mitt.* Fraktionierung von Gibberellinen, Gibberellinkonjugaten und anderen Phytohormonen durch DEAE-Sephadex-Chromatographie**

ROLF GRÄBNER, GERNOT SCHNEIDER und GÜNTHER SEMBDNER

Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle (Saale), des Forschungszentrums für Molekularbiologie und Medizin der Akademie der Wissenschaften der D.D.R., 401 Halle (Saale), Weinberg (D.D.R.)

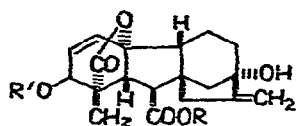
(Eingegangen am 11. Dezember 1975)

Nachweis, Identifizierung und Bestimmung von Gibberellinen und ihren Konjugaten in pflanzlichen Extrakten erfordern im allgemeinen folgende Schritte: (1) Fraktionierung des Rohextraktes in neutrale, basische und saure Stoffgruppen durch Extraktion und andere Verteilungsverfahren auf der Basis unterschiedlicher Acidität der Verbindungen³; (2) nachfolgende Auftrennung der vorfraktionierten Extrakte durch mannigfache chromatographische Methoden auf Grund unterschiedlicher Polarität der einzelnen Substanzen⁴; (3) Einsatz physikalisch-chemischer und biologischer Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung. Durch den Aufarbeitungsgang soll nicht nur ein hoher Reinigungsgrad bei möglichst geringer Verlustrate erzielt werden, sondern biologische Fragestellungen machen oft die gleichzeitige Erfassung und parallele Bestimmung weiterer vorkommender Phytohormongruppen wünschenswert.

Das rasche Anwachsen der Zahl strukturell bekannter Gibberelline war einerseits mit der Entwicklung neuer leistungsfähiger Trennmethoden gekoppelt, wozu gleichermaßen Verfahren der Liquid-Liquid Chromatographie^{5,6} und der Gas-Liquid Chromatographie^{7,8} gehören. Andererseits erwies sich eine vollständige Erfassung und Vorfraktionierung der ein weites Polaritätsspektrum umfassenden Gibberelline zunehmend problematischer. Das gilt besonders für die in letzter Zeit isolierten und synthetisierten Gibberellinkonjugate⁹⁻¹¹. So ist beispielsweise bei $\text{GA}_3\text{-O(3)-glucosid (II)}$ und $\text{GA}_3\text{-O-glucosylester (III)}$ infolge des stark hydrophilen Charakters eine Trennung durch Extraktion sehr erschwert, obwohl die Verbindungen unterschiedliche Acidität besitzen. Unbefriedigend waren auch die bisher bekannten chromatographischen Verfahren. Dagegen erwies sich eine Chromatographie unter Verwendung des schwach basischen Anionenaustauschers DEAE-Sephadex A-25 aussichtsreich, um eine Vorfraktionierung nach Acidität weitgehend unabhängig von der jeweiligen Polarität der Substanz zu erreichen². Darüber hinaus gelang damit eine für biologische Aktivitätsbestimmungen unbedingt notwendige Trennung von

* XLII. Mitteilung siehe Lit. 1.

** Teil der Dissertation von R. Gräbner².



I $R=R'=H$

II $R=H, R'=\beta-D\text{-glucosyl}$

III $R=\beta-D\text{-glucosyl}, R'=H$

Abscissinsäure (ABA) und Gibberellinen ähnlicher Polarität. Im folgenden wird über die Standardisierung dieser Methode berichtet.

EXPERIMENTELLES

Säulenfüllung

Das Austauscher-Gel DEAE-Sephadex A-25 wurde in der üblichen Weise nach Einquellen in Wasser, Waschen mit 0.5 *N* Salzsäure und 0.5 *N* Natronlauge durch Behandlung mit Natriumacetat in die Acetatform überführt. Nach Auswaschen des überschüssigen Natriumacetats wurde das Wasser entweder durch 100% Methanol oder durch 80% Methanol (in Wasser) verdrängt. Mit dem so zubereiteten Gel wurden normalerweise Standardsäulen von 50 ml Gelbett (bei 50 cm Gelbetthöhe) gefüllt.

Elution

Kontinuierliche Elution. Standardsäulen von 50 ml Gelbett in 100% Methanol wurden mit folgendem Gradienten eluiert: 150 ml Methanol, dem in einem Mischkolben zunächst 50 ml 0.25%ige methanolische Essigsäure und nachfolgend je nach Trennproblem 0.5 *N*, 1.0 *N* oder 3.0 *N* methanolische Essigsäure kontinuierlich zugemischt wurden (vgl. Lit. 2).

Diskontinuierliche Elution. Standardsäulen von 50 ml Gelbett in 100%igem oder 80%igem Methanol wurden nach folgendem Schema eluiert.

- (1) 50 ml Methanol (100 bzw. 80%)
- (2) 50 ml 0.25% Essigsäure in 100% bzw. 80% Methanol,
- (3) 80 ml 0.25 *N* Essigsäure in 100% bzw. 80% Methanol,
- (4) 80 ml 0.50 *N* Essigsäure in 100% bzw. 80% Methanol
- (5) 80 ml 0.75 *N* Essigsäure in 100% bzw. 80% Methanol,
- (6) 80 ml 1.00 *N* Essigsäure in 100% bzw. 80% Methanol,
- (7) 80 ml 3.00 *N* Essigsäure in 100% bzw. 80% Methanol.

Fraktionsgrößen: Fraktionsstufen 1 und 2: 50 ml (bzw. 25 ml), Fraktionsstufen 3–7: 20 ml (bzw. 10 ml).

Substanzen

Für die Modellversuche wurden im allgemeinen Substanzmengen zwischen 50 und 200 μg von Gibberellinen (GA_3 (I), GA_4 , GA_7 , GA_8 , GA_9), Gibberellin-O-glucosiden ($\text{GA}_3\text{-O}(3)\text{-glucosid}$ (II)¹¹, $\text{GA}_8\text{-O}(2)\text{-glucosid}$ ¹²) sowie vom $\text{GA}_3\text{-(O)-glucosylester}$ (III)¹³ verwendet. Darüber hinaus wurden zur Erprobung weiterer

Trennprobleme als Modells substanzen die Phytohormone Abscisinsäure, Zeatin und Indolyl-3-essigsäure (IES) sowie Glucose eingesetzt. Eine Empfindlichkeitsprüfung erfolgte durch Chromatographie geringer GA_3 -Mengen ($\leq 1 \mu g$).

Die Kapazität der Säule wurde geprüft, indem saure Essigester-Extrakte aus Weizenpflanzen (bis 100 g Frischmaterial) mit Modells substanzen gemischt und unter Standardbedingungen getrennt wurden. Die Substanzgemische wurden in wenig Methanol (100% bzw. 80%) gelöst auf den Säulenkopf gegeben.

Die Hydrolyse von U-T- GA_3 -O(3)-glucosid¹⁴ erfolgte mit Helicase in Phosphatpuffer pH 6.6¹³. Die eingeeengte Reaktionslösung wurde in Methanol gelöst appliziert.

Nachweis

Zum qualitativen Nachweis der eluierten Testsubstanzen diente die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G oder GF mit Laufmittelgemischen und Detektionsverfahren, die dem jeweiligen Problem angepasst wurden¹⁵. Die quantitative Bestimmung erfolgte für ABA UV-spektrophotometrisch², für die Gibberelline und ihre Derivate fluorimetrisch^{2,16}.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Fig. 1 sind Elutionsprofile von Standardsäulen mit kontinuierlichem Gradient dargestellt. Der Vergleich der drei Profile zeigt, dass durch Variation des Gradienten die Säule dem jeweiligen Trennproblem angepasst werden kann. Bei Verwendung von 0.5 N methanolischer Essigsäure (Fig. 1a) erhält man eine Gruppentrennung der freien Gibberelline; GA_3 -O(3)-glucosid wird jedoch nicht eluiert. Die Trennung von Gibberellinen und GA_3 -O(3)-glucosid sowie ABA gelingt gut mit einem Gradienten von 1 N methanolischer Essigsäure (Fig. 1b).

Wie die in Tabelle I zusammengefassten Daten zeigen, werden die applizierten Mengen von Gibberellinen und ABA quantitativ von der Säule eluiert. Selbst der Zusatz grösserer Anteile von Ballaststoffen in Form eines Essigester-Rohextraktes (Tabelle I, C) ergab keinerlei Beeinflussung der Elutionsvolumina und vollständigen Eluierbarkeit der Testsubstanzen. Entsprechende Ergebnisse erzielten wir mit den applizierten geringen Mengen von $\leq 1 \mu g$ GA_3 , die in der Eluatfraktion mit Hilfe des Zwergerbsen-Biotests quantitativ bestimmt wurden². Von entscheidender Bedeutung für diese günstigen Eigenschaften ist, dass durch die Verwendung von Methanol Ausfällungen und damit Einschluss von Spurenstoffen verhindert werden, die sonst in hydrophileren oder lipophilen Systemen leicht auftreten können.

Die im kontinuierlichen Elutionsverfahren gewonnenen Ergebnisse wurden auf einen diskontinuierlichen Gradienten (siehe Experimentelles) übertragen, um die Methode für einen Labor-Routinebetrieb zu vereinfachen. Wie Tabelle II zeigt, gelingt mit dem eingesetzten diskontinuierlichen Gradienten eine gute Gruppentrennung in: neutrale (Glucose, GA_3 -O-glucosylester) und basische (Zeatin) Verbindungen, ABA (schwach sauer), saure Gibberelline, IES sowie polare saure Substanzen (GA_3 -O(3)-glucosid).

Dabei ist die Verwendung von 80%igem Methanol 100%igem vorzuziehen, da bei letzterem die Elutionsvolumina insgesamt grösser sind.

Die Leistungsfähigkeit der Methode in qualitativer und quantitativer Hinsicht

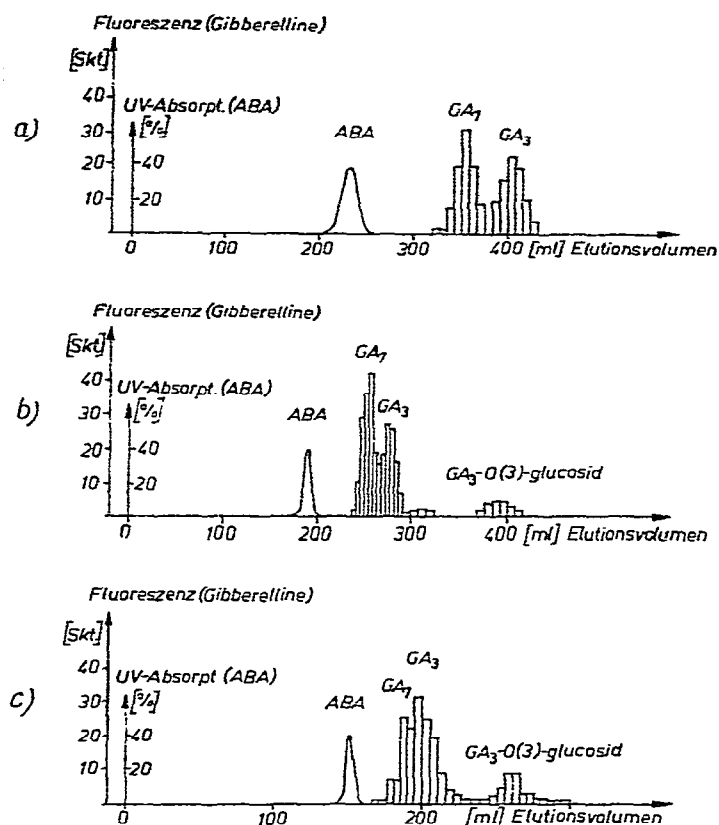


Fig. 1. Elutionsprofile von ABA (100 μ g), GA₇ (50 μ g), GA₃ (50 μ g) und GA₃-O(3)-glucosid (50 μ g) an DEAE-Sephadex A-25 mit kontinuierlichem Gradienten von (a) Methanol-0.5 N methanolische Essigsäure (b) Methanol-1.0 N methanolische Essigsäure (c) Methanol-3.0 N methanolische Essigsäure. Analysenbedingungen siehe Experimentelles.

TABELLE I

VERGLEICH DER EINGESETZTEN UND ELUIERTEN MENGEN VON ABA, GA₃, GA₇ UND GA₃-O(3)-GLUCOSID AN DEAE-SEPHADEX A-25 MIT KONTINUIERLICHEM GRADIENTEN

A: Methanol-1.0 N methanolische Essigsäure; B: Methanol-3.0 N methanolische Essigsäure; C: Elution wie A. Modellsubstanzen wurden vorher mit einem Essigester-Extrakt von 100 g Weizenpflanzen gemischt.

Testsubstanz	A		B		C	
	Eingesetzt (μ g)	Wiedergefunden (μ g)	Eingesetzt (μ g)	Wiedergefunden (μ g)	Eingesetzt (μ g)	Wiedergefunden (μ g)
ABA*	100	105	—	—	—	—
GA ₃ **	100	107	50	49	100	102
GA ₇ **	100	108	50	47	100	110
GA ₃ -O(3)-glucosid**	50	54	50	52	—	—

* UV-photometrisch gemessen.

** Fluorimetrisch gemessen.

TABELLE II

ELUTIONSBEREICH VON MODELLSUBSTANZEN BEI CHROMATOGRAPHIE AN DEAE-SEPHADEX A-25 MIT DISKONTINUIERLICHEM GRADIENTEN

A: 80 %igem wässrigem Methanol, B: 100 %igem Methanol. (Die angegebenen Bereiche sind Mittelwerte unabhängiger Versuche.)

Testsubstanzen	Elutionsbereich (ml)	
	A	B
Glucose	0-100	50-100
Zeatin	0-100	25- 75
GA ₃ -O-glucoseester	0-100	50- 75
ABA	160-220	220-260
GA ₉	220-240	260-300
GA _{4/7}	240-260	—
GA ₃	260-300	300-390
GA ₈	260-300	330-380
GA ₃ -O(3)-glucosid }	400-500	400-500
GA ₈ -O(2)-glucosid }		
IES	320-360	460-480

wurde weiterhin an einem durch partielle enzymatische Hydrolyse (mittels Helicase) von U-T-GA₃-O(3)-glucosid entstandenen Reaktionsgemisch demonstriert (Fig. 2). Das dargestellte Elutionsprofil ist durch eine saubere Trennung von Glucose, GA₃ und Rest-Glucosid sowie eine Aktivitätsbilanz von 95% gekennzeichnet.

Im Gegensatz zu Kieselgelchromatographie können die Fraktionen der DEAE-Sephadex-Chromatographie unmittelbar für eine fluorimetrische Gibberellinbestimmung verwendet werden, wodurch die Ermittlung der spezifischen Radioaktivität

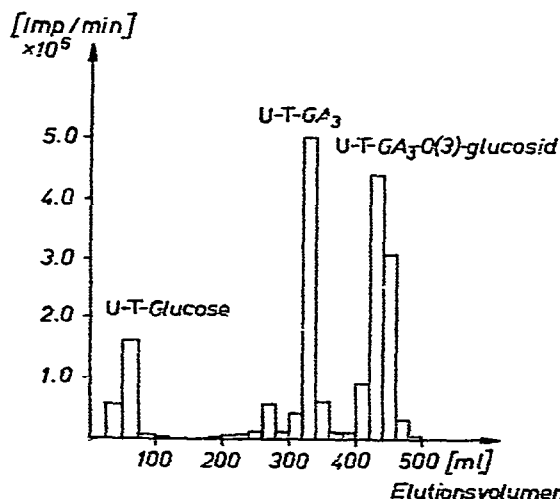


Fig. 2. Elutionsprofil eines partiellen Hydrolysats von U-T-GA₃-O(3)-glucosid an DEAE-Sephadex A-25 mit diskontinuierlichem Gradienten. Bedingungen siehe Experimentelles. Eingesetzt (insgesamt): 1.86×10^7 Imp/min; gefunden: 1.77×10^7 Imp/min.

in geringsten Mengen möglich ist. Die erhaltenen Fraktionen sind gleichfalls für biologische Aktivitätsbestimmungen in Biotestsystemen geeignet.

Somit hat sich gezeigt, dass die Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25 eine geeignete Methode darstellt für eine effektive Gruppentrennung mit hohem Reinigungseffekt für Gibberelline, Gibberellinkonjugate und weitere Phytohormone. Sie kann zur Vorfraktionierung eingesetzt werden für anzuschliessende spezielle Feinreinigungen oder unmittelbare gaschromatographische, fluorimetrische bzw. biologische Bestimmungen. Eine erfolgreiche praktische Erprobung der Methode ist bereits im eigenen Laboratorium^{2,17,18} und durch andere Gruppen^{19,20} erfolgt.

DANK

Frau B. Gentsch danken wir für ihre ausgezeichnete technische Mitarbeit.

LITERATUR

- 1 L. Kutschabsky, G. Reck, B. Voigt und G. Adam, *Tetrahedron*, 31 (1975) 3065.
- 2 R. Gräbner, *Dissertation*, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 1973.
- 3 R. C. Durley, A. Crozier, R. D. Pharis und G. E. McLaughlin, *Phytochemistry*, 11 (1972) 3029.
- 4 L. E. Powell und K. J. Tautvydas, *Nature (London)*, 213 (1967) 292.
- 5 D. W. Pitel, L. C. Vining und G. P. Arsenault, *Can. J. Biochem.*, 49 (1971) 185.
- 6 J. MacMillan und C. M. Wels, *J. Chromatogr.*, 87 (1973) 271.
- 7 J. E. Graebe, P. Hedden, P. Gaskin und J. MacMillan, *Phytochemistry*, 13 (1974) 1433.
- 8 G. Schneider, S. Jänicke und G. Sembdner, *J. Chromatogr.*, 109 (1975) 409.
- 9 T. Yokota, N. Murofushi, N. Takahashi und S. Tamura, *Agr. Biol. Chem.*, 35 (1971) 583.
- 10 K. Hiraga, T. Yokota und N. Takahashi, *Agr. Biol. Chem.*, 36 (1972) 345.
- 11 G. Schneider, G. Sembdner und K. Schreiber, *Z. Chem.*, 14 (1974) 474.
- 12 K. Schreiber, J. Weiland und G. Sembdner, *Phytochemistry*, 9 (1970) 189.
- 13 O. Miersch und H. W. Liebisch, *Z. Chem.*, im Druck.
- 14 H. W. Liebisch und G. Schneider, *II. Symp. Plant Growth Regulators, Sofia, 1975*, Bulg. Acad. Sci., M. Popov Inst. Plant Physiol., Sofia, 1975, Abstract, S. 9.
- 15 E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie — Ein Laboratoriumshandbuch*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1967.
- 16 G. Sembdner, G. Schneider, R. Gräbner, D. Knöfel, P. Müller und K. Schreiber, *Int. Congr. Natur. Plant Growth Substances, Liblice, 1972*, Czechoslovak Acad. Sci., Inst. Exp. Bot. and Czechoslovak Bot. Soc., Sect. Plant Physiol., Prag, 1972, Abstract, S. 88.
- 17 R. Gräbner und G. Sembdner, *Biochem. Physiol. Pflanz.*, im Druck.
- 18 D. Žemlova, H. W. Liebisch und G. Sembdner, *Biochem. Physiol. Pflanz.*, im Druck.
- 19 L. Čulafic und M. Nešković, *IV. Symp. Plant Growth Regulators, Torun, 1974*, Nicolaus Copernicus University, Inst. Biol., Torun, 1974, Abstract, S. 1.
- 20 G. W. M. Barendse und G. J. M. de Klerk, *Planta*, 126 (1975) 25.