

CHROM. 13,570

Note

Trennung von Chlorophyllen mittels "Reversed-phase"-Dünnschichtchromatographie auf ölgetränkten Zelluloseschichten

B. SCHOLZ*, K. D. WILLASCHECK, H. MÜLLER und K. BALLSCHMITER

Abteilung Analytische Chemie, Universität Ulm, D-7900 Ulm (B.R.D.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1980; geänderte Fassung eingegangen am 11. Dezember 1980)

Nahezu alle wissenschaftlichen Arbeiten mit Chlorophyll setzen die Reinheit des verwendeten Materials voraus. Es ist bekannt, dass sowohl die Absorptionsspektren als auch die bisher bekannten Reinheitstests mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und mono-chromatischer Detektion lediglich orientierende Aussagen bezüglich der Reinheit der isolierten oder hergestellten Chlorophylle ermöglichen. Erst die modernen Multi-Photodioden-Detektoren werden in der Multi-komponenten-Analyse neue Möglichkeiten eröffnen¹. Dies sind die wesentlichen Ursachen, warum die Dünnschichtchromatographie (TLC) zur Charakterisierung der Reinheit für Chlorophylle breite Anwendung findet².

Um das Ergebnis einer Reinheitsüberprüfung von Chlorophyll *a* und *b* mit TLC Methoden akzeptieren zu können, müssen aufgrund der hohen Reaktivität der Verbindungen bei der Durchführung dieser Tests einige grundlegende Voraussetzungen erfüllt sein. Es darf keine Reaktion der stationären Phase mit den zu testenden Chlorophyllen möglich sein, wie dies bei "Kieselgel", Aluminiumoxid und Magnesiumoxid bereits beschrieben ist^{3,4}. Die Bildung von Allomerisationsprodukten durch die mobile Phase z.B. bei Verwendung von niederen Alkoholen wie Methanol muss verhindert werden⁵. Bei der Trennung darf der in der TLC-Kammer vorhandene Luftsauerstoff zu keinem nachweisbaren Anteil an Oxidationsprodukten der Chlorophylle führen. Neben der Auftrennung der in grünen Pflanzen enthaltenen Anteile an Carotinoiden, Xanthophyllen und Phäophytinen sollte auch der Nachweis von isomeren Chlorophyllen möglich sein. Die Methode muss reproduzierbar sein, d.h. sämtliche, die Trennung beeinflussende Parameter müssen bekannt sein. Die Art der mobilen und stationären Phase sollte so gewählt werden, dass für die zu trennenden Substanzen eine lineare Adsorptionsisotherme gilt, d.h. kein "tailing" der Substanzen auftritt.

Zellulose ist als chemisch sehr inerte TLC-Trennphase in der Analytik der Chlorophylle schon seit längerem bekannt^{6,7}. Die Auftrennung der Chlorophyllisomeren untereinander ist aber auf unmodifizierten Zelluloseplatten bisher nicht möglich. Die Beschichtung von Zelluloseplatten mit Triglyceriden^{8,9} erlaubt mit wasserhaltigen Laufmitteln neben der vollständigen Abtrennung der Carotenoide, Xanthophylle und Phäophytine auch die Auftrennung der Chlorophyllisomeren untereinander. Dieses Trennsystem wurde hinsichtlich der Trennparameter verbessert und optimiert.

EXPERIMENTELLER TEIL

Herstellung der Extrakte

Für die Herstellung der Blattpigmente wurde frischer Spinat (*Spinacia oleracea*) verwendet. Die Extraktion der Blätter und die Darstellung von reinem Chlorophyll *a* und *b* sind in Lit. 10 beschrieben.

Lösungsmittel

Zum Herstellen des Fliessmittel- und Plattenbedampfungsgemisches wurden ausschliesslich p.a. Lösungsmittel (E. Merck, Darmstadt, B.R.D.) verwendet. Tetrahydrofuran ohne Stabilisator wurde säulenchromatographisch mit Aluminiumoxid neutral, Aktivitätsstufe I (Woelm, Eschwege, B.R.D.) von gelösten Peroxiden befreit.

Präparation der TLC-Platten

Zellulose-Fertigplatten ohne Fluoreszenzindikator (E. Merck) wurden mit einer 4%igen Lösung aus Olivenöl (z.B. Fa. Dante, Genua, Italien) in Petroläther (Kp. 40–60°C) ca. 2 min getränkt, an Luft getrocknet und anschliessend 15 h bei 60°C im Trockenschrank konditioniert. Nach dem Erkalten können die Platten direkt verwendet werden. Eine Variation des Ölgehaltes der Platten zwischen 2 und 8%, wie auch die Anwendung anderer Ölsorten (z.B. Paraffinöl, Triolein, Maiskeimöl) erbrachte keine Verbesserung der Trennleistung, aber auch keine signifikante Verschlechterung.

Fliessmittel und Plattenbedampfung

Das verwendete Fliessmittel hatte folgende Zusammensetzung: Acetonitril–Tetrahydrofuran–Tetrachlorkohlenstoff–Wasser (70:15:10:5). Das Sättigen der mobilen Phase mit Olivenöl ist nicht erforderlich. Zur Plattenbedampfung während der Entwicklung des Chromatogramms wurde folgendes Gemisch verwendet: Methanol–Aceton–Isopropanol–Wasser–Benzol (30:10:5:5:1). Die Plattenbedampfung bewirkt die zusätzliche Auftrennung von Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein neben den anderen Blattinhaltsstoffen. Zur Trennung der isomeren Chlorophylle allein wäre die Bedampfung nicht notwendig. Ein Zusammenschieben der Substanzzonen ist aber ein weiterer positiver Effekt der Plattenbedampfung. Fliessmittel auf der Basis von Methanol oder Aceton brachten stets eine Verschlechterung der Trennungen.

Entwicklung der Chromatogramme

Je 4- μ l einer ca. 10^{-3} M Lösung der Extrakte, gelöst in Isopropanol wurde auf die TLC-Platten aufgetragen. Als Entwicklungskammern standen die Vario-KS-Kammer¹¹ und die Doppelbodentrochkammer der Fa. Camag (Berlin, B.R.D.) zur Verfügung. Die Laufzeit betrug ca. 45 min.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Mit der hier beschriebenen Methode ist es möglich Chlorophyll *a* und *b* und deren Diastereomere Chlorophyll *a'* und *b'* von den in grünen Blättern enthaltenen weiteren Pigmenten abzutrennen. Fig. 1A zeigt das Chromatogramm eines Spinatextraktes gelöst in Isopropanol. Die hR_F -Werte und die Farben der Verbindungen sind der Tabelle I zu entnehmen. Zur Identifikation der gelben Blattpigmente wurden die

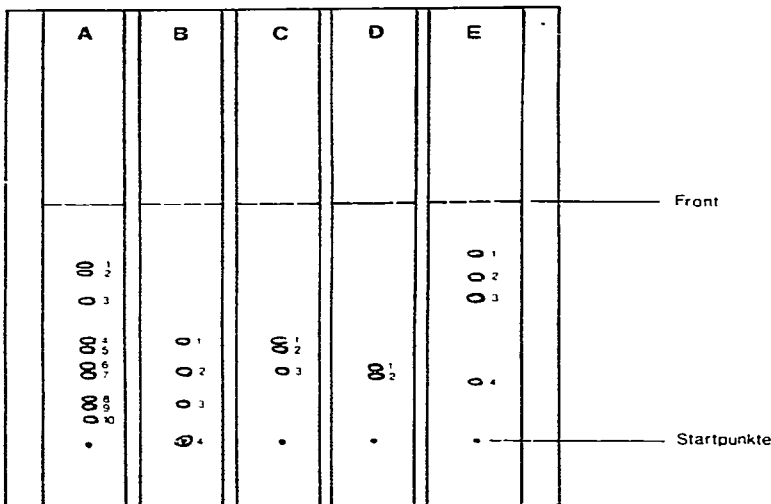


Fig. 1. Chromatogramme verschiedener Pigmentgemische. Bedingungen siehe Text. A: Chromatogramm eines nichtbehandelten Spinatextraktes in Isopropanol. Punktfolge: 1 = Neoxanthin (s); 2 = Violaxanthin (s); 3 = Lutein (st); 4 = Chlorophyll *b* (st); 5 = Chlorophyll *b'* (s); 6 = Chlorophyll *a* (st); 7 = Chlorophyll *a'* (s); 8 = unbekannt (m); 9 = Phäophytin *a* und *b* (st); 10 = β -Carotin (st). B: Chromatogramm von Pyrochlorophyll, hergestellt aus Chlorophyll *a*. Punktfolge: 1 = unbekannt (s); 2 = Pyro-Chlorophyll *a* (st); 3 = wahrscheinlich Pyro-Phäophytin *a* (s); 4 = unbekannt (s). C: Chromatogramm von Chlorophyll *b* aus eigener Produktion¹⁰. Punktfolge: 1 = Chlorophyll *b* (st); 2 = Chlorophyll *b'* (s); 3 = Chlorophyll *a* (s). D: Chromatogramm von Chlorophyll *a* aus eigener Produktion¹⁰. Punktfolge: 1 = Chlorophyll *a* (st); 2 = Chlorophyll *a'* (s). E: Chromatogramm von Bakteriochlorophyll *a*. Punktfolge: 1 = unbekannt (s); 2 = Bakteriochlorophyll *a'* (s); 3 = Bakteriochlorophyll *a* (st); 4 = wahrscheinlich Bakteriophäophytin *a* (st). Die Abkürzungen in Klammern bedeuten: Intensität des Punktes: (st) = stark; (s) = schwach; (m) = mittel.

TLC-Platten mit Chlorwasserstoffgas besprüht. Neoxanthin verfärbt sich dadurch blaugrün und Violaxanthin marineblau³. Lutein, β -Carotin und Phäophytin *a* und *b* ergeben keine Farbreaktion und sind deshalb durch ihre charakteristische Eigenfarbe

TABELLE I

hR_F -WERTE DER PIGMENTE EINES NICHTBEHANDELTEN SPINATEXTRAKTES
Chromatographiebedingungen siehe Text.

| Pigment | Farbe* | Fluoreszenz (366 nm Anregung) | hR_F -Werte |
|----------------------------------|------------|-------------------------------------|---------------|
| Neoxanthin | Hellgelb | — | 89 |
| Violaxanthin | Hellgelb | — | 77 |
| Lutein | Dunkelgelb | — | 58 |
| Chlorophyll <i>b</i> | Gelbgrün | Rötlich | 40 |
| Chlorophyll <i>b'</i> | Gelbgrün | Rötlich | 35 |
| Chlorophyll <i>a</i> | Blaugrün | Rötlich | 29 |
| Chlorophyll <i>a'</i> | Blaugrün | Rötlich | 25 |
| Unbekannt | Gelb | — | 16 |
| Phäophytin <i>a</i> und <i>b</i> | Grau | Rötlich | 14 |
| β -Carotin | Orange | — | 9 |

* In weissem Licht, unmittelbar nach der Entwicklung.

zuzuordnen. Chlorophyll *a* und *b* wurde durch die im TLC-Chromatogramm mitlaufenden Reinsubstanzen identifiziert. Um eine zusätzliche Überprüfung der Reinheit von Chlorophyll *a* und *b* zu ermöglichen, wurden die Verbindungen aus der stationären Phase herausgelöst und mittels HPLC, durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen der Reinstkomponenten charakterisiert. Die Zuordnung von Chlorophyll *a'* und *b'* erfolgte nach Umwandlung der Verbindungen in Chlorophyll *a* bzw. Chlorophyll *b*, wie dies erst kürzlich beschrieben wurde¹⁰. Damit ist bewiesen, dass durch die Anwendung von "Reversed-phase" (RP)-Zellulose-TLC keine Zersetzung der Chlorophylle auftritt und die grünen Flecke im TLC-Chromatogramm intakten Chlorophyllen entsprechen. Von dem in Fig. 1A gezeigten Dünnschichtchromatogramm wurde mit Hilfe eines Spektrodensitometers, Modell SD 3000 der Fa. Schoeffel, der "Scan" bei einer Wellenlänge von 436 nm aufgezeichnet (Fig. 2). Die Absorptionsmaxima von Chlorophyll *a'* und *b'* sind deutlich sichtbar. Ein sehr reines Chlorophyll *a*, das absolut frei von anderen Blattpigmenten und Chlorophylldegradationsprodukten ist, zeigt das Dünnschichtchromatogramm in Fig. 1D. Eine Überprüfung von käuflichem Bakteriochlorophyll *a* (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) ergab, neben dem Auftreten der diastereomeren Verbindung, zwei weitere Punkte, von denen der eine aufgrund der intensiven rot-violetten Farbe Bakteriophäophytin und der andere wahrscheinlich ein Oxidationsprodukt von Bakteriochlorophyll *a* ist (Fig. 1E)¹². Bei den in Fig. 1B bzw. C dargestellten Chromatogrammen von "reinem" Pyrochlorophyll *a* bzw. Chlorophyll *b* ist deutlich zu erkennen, dass Chlorophyll *b* mit einer geringen Menge Chlorophyll *a* und Pyrochlorophyll *a* wahrscheinlich mit Pyrophäophytin *a* und einer unbekannten grünen Verbindung verunreinigt ist.

Die Anwendung von kommerziell erhältlichen, chemisch gebundenen C₁₈-RP-

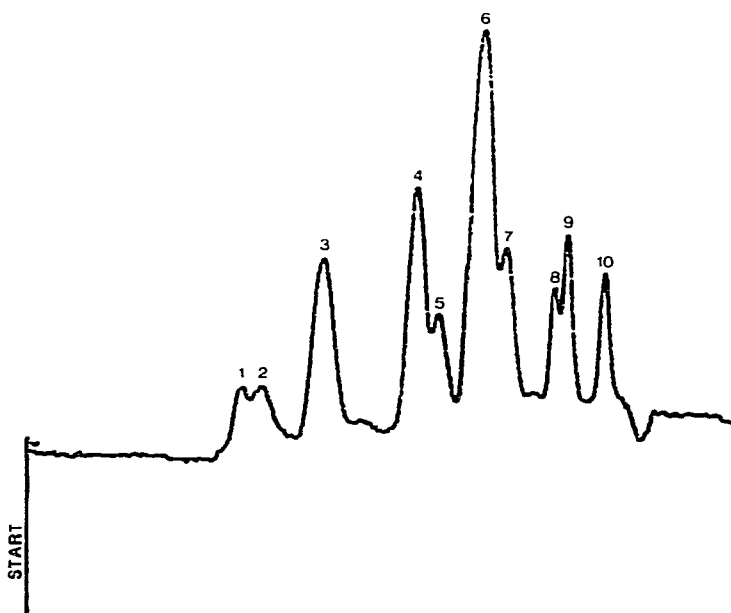


Fig. 2. "Scan" von Chromatogram A in Fig. 1 bei 436 nm. Punktfolge siehe Fig. 1A.

Platten mit einem Laufmittelgemisch aus Methanol–Aceton–Wasser (20:4:3) zur Trennung von Blattinhaltsstoffen wurde bereits beschrieben¹³. Es liess sich weder eine vollständige Auftrennung der Pigmente, noch eine Abtrennung der Chlorophyllisomeren erreichen. Selbst die Anwendung des Entwicklungssystems dieser Arbeit (d.h. Fliessmittel und Plattenbedampfungsmittel) mit chemisch gebundenen RP-Platten (KC-18-Platten, Whatman, Clifton, NJ, U.S.A. oder Opti-up C 12-Platten, Fluka, Buchs, Schweiz) erbrachte keine Verbesserung der Trennung.

Dieser Vergleich betont, dass *n*-Alkan-RP-Phasen ein weniger spezifisches Wechselwirkungsverhalten mit Chlorophyllen zeigen als die hier beschriebene Triglycerid–Zellulose-RP-Phase.

DANK

Herrn Dr. J. J. Katz, Argonne National Laboratory, Argonne, USA danken wir für die Überlassung einer Probe Pyrochlorophyll *a*. Herrn St. Wermuth, Abteilung Organische Chemie I, Universität Ulm, danken wir für das uns zur Verfügung gestellte Spektrodensitometer SD 3000.

LITERATUR

- 1 K. K. Knudsen und R. W. Widmayer, *Hewlett Packard J.*, 31, No. 2 (1980) 201.
- 2 Z. Sesták, *Photosynthetica*, 1 (1967) 269.
- 3 H. H. Strain, J. Sherma und M. Grandolfo, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 929.
- 4 H. H. Strain und J. Sherma, *J. Chem. Educ.*, 46 (1969) 476.
- 5 W. A. Svec, in D. Dolphin (Herausgeber), *The Porphyrins*, Vol. V, Part C, Academic Press, New York, London, 1978, S. 377.
- 6 G. Sievers und P. H. Hyninnen, *J. Chromatogr.*, 134 (1977) 359.
- 7 J. Sherma und G. S. Lippstone, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 220.
- 8 K. Egger, zit. in E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, 1967, 2. Aufl. S. 265.
- 9 J. Green und S. Marcinkiewicz, *Chromatogr. Rev.*, 5 (1963) 58.
- 10 B. Scholz und K. Ballschmiter, *J. Chromatogr.*, 208 (1981) 148.
- 11 F. Geiss, *Die Parameter der Dünnschichtchromatographie*, Vieweg, Braunschweig, 1972.
- 12 W. S. Kim, *Biochim. Biophys. Acta*, 112 (1966) 392.
- 13 J. Sherma und M. Latta, *J. Chromatogr.*, 154 (1978) 73.