

Anwendungen der HPLC in der Naturstoffchemie

Strukturaufklärung von Chlorobium-Bacteriochlorophyllen

Nikolaus Risch

Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

4800 Bielefeld , Universitätsstraße

Einführung :

Phototrophe Bakterien leben in den anaeroben Schichten vieler Gewässer, Teiche, Meeresbuchten und auch langsam fließender Flüsse. Sie sind zu einer recht einfachen Form der Photosynthese fähig, die aus der Sicht der Evolution als Vorläufer der Photosynthese in den höher entwickelten grünen Pflanzen gelten kann.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich unter anderem mit der Strukturaufklärung der Photosynthesepigmente solcher phototropher Bakterien — so konnten in jüngster Zeit zwei bis dahin unbekannte Bacteriochlorophylle isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden ¹⁻³⁾.

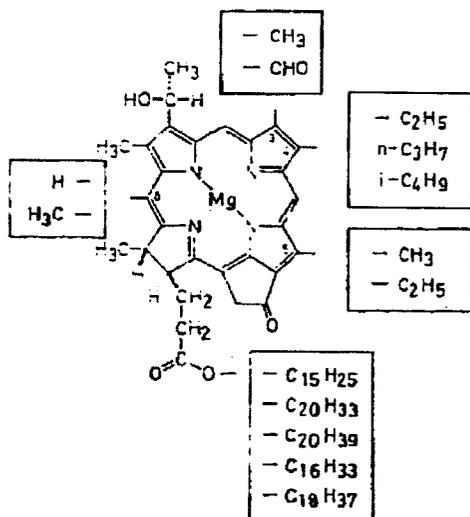


Abb. 1 : Schematischer Überblick über die bis heute bekannten Chlorobium-Bacteriochlorophylle .

Problemstellung :

Unser Interesse an einer Auftrennung wurde zum einen von dem Wunsch bestimmt, nicht nur mit den Gemischen arbeiten zu müssen, d.h. die Strukturaufklärung an den jeweils reinen Komponenten durchzuführen — zum anderen reizte uns das Trennproblem selbst. Auch bei der Zuordnung bzw. vollständigen Interpretation sämtlicher Signale der ^{13}C -NMR-Spektren dieser Verbindungsklasse sollten uns im Endeffekt — nach einer Trennung im präparativen Maßstab ⁷⁾ — die Spektren der einheitlichen Homologen weiterhelfen ⁸⁾ .

Wir haben dann relativ unbefangen versucht, unser Trennsystem am Beispiel der Trennung des von uns erstmals beschriebenen ¹⁾ Homologengemisches des Bchl e (3), bzw. des leichter zu handhabenden Derivates Bmph e (4), zu optimieren.

Das Bmph e (4) erhält man aus den Bakterienextrakten der Kulturbrühe nach geringfügigen chemischen Modifikationen am Chlorophyllgrundgerüst und anschließender Vortrennung an einer präparativen Kieselgelsäule, wo anhaftende Carotinoide, Fette und andere Beimengungen sauber abgetrennt werden können. Chemische und spektrometrische Untersuchungen zeigen bereits am Gemisch sofort, daß der Substituent R an C-4 ein Alkylrest ist, und zwar mit der Kettenlänge C_2 bis C_4 .

Trennsystem :

Von der Geräteseite her — sprich Pump- und Injektionssystem — haben wir uns auf den einen uns zur Verfügung stehenden Chromatographen beschränkt. Da wir zunächst nur qualitativ gute Ergebnisse erreichen wollten, war z.B. die Flußkonstanz bzw. die exakte Reproduzierbarkeit eines Trennergebnisses für uns noch nicht so entscheidend, da sowieso jeder Lauf für sich analysiert und aufgearbeitet wurde.

Als Detektor diente jeweils ein Zweistrahl-Spektralphotometer. Der Meßpunkt lag bei der für den jeweiligen Farbstoff charakteristischen langwelligen Absorptionsbande im Bereich von 660 nm. Besonders konzentriert haben wir uns auf die Auswahl der Trenn-

säulen und des Laufmittelsystems. Es wurden eine große Zahl von Adsorbentien getestet, wobei auch eine Reihe von Versuchen mit selbst gepackten Säulen durchgeführt wurden. Es hat sich schließlich herauskristallisiert, daß wir die besten Ergebnisse bei Verwendung von Hibar-Fertigsäulen mit dem Füllmaterial LiChrosorb SI 100, 10 μ m und dem Laufmittelsystem n-Hexan / Aceton (je nach Problem 10 : 1 bis 4 : 1) erhalten haben. Ebenfalls recht brauchbare Ergebnisse lieferten selbst mit LiChrosorb SI 100, 10 μ m gepackte Säulen und allgemein Fertigsäulen mit Kieselgelen geringer Korngröße. Positiv auf das Trennergebnis wirkte sich ein Thermostatisieren der Säulen auf 0° C aus.

Gearbeitet wurde bei Drucken bis zu 200 bar und Flußraten zwischen 0.5 und 2 ml/h , wodurch man relativ sinnvolle Analysenzeiten um 10 min erreichte.

Anwendungsbeispiele :

Ein gewisses Problem bei der adsorptionschromatographischen Trennung von Verbindungen dieser Substanzklasse ist die geringe Beladbarkeit des Kieselgels. Um nun die Effektivität der Trennsäule nicht zu sehr zu vermindern, haben wir pro Lauf auf eine Säule (25 mm x 3 mm) maximal 0.5 mg aufgegeben.

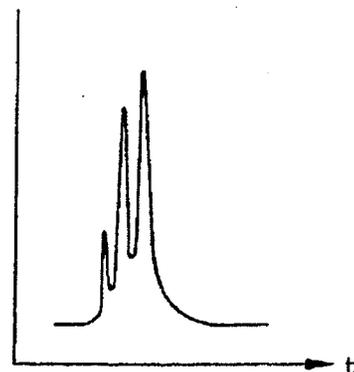
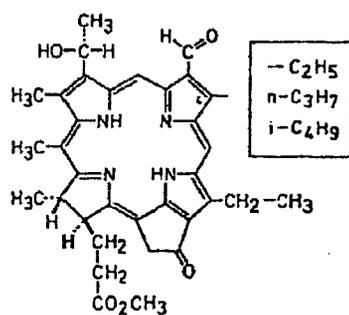


Abb. 3 : Elutionsdiagramm des Bacteriomethylphäophorbids e (4).

Die von den aufgetrennten Fraktionen aufgenommenen Massen- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ^{*)} belegen nun endgültig und eindeutig die angegebene Konstitution des Bmpha (4) .

Die entsprechenden Arbeitsgänge ergeben bei den Bacteriomethylphäophorbiden c (5) und d (6) folgende Ergebnisse :

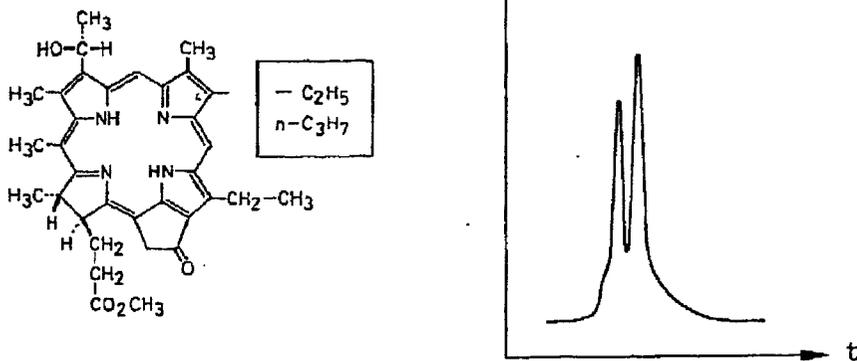


Abb. 4 : Elutionsdiagramm des Bmpha c (5) .

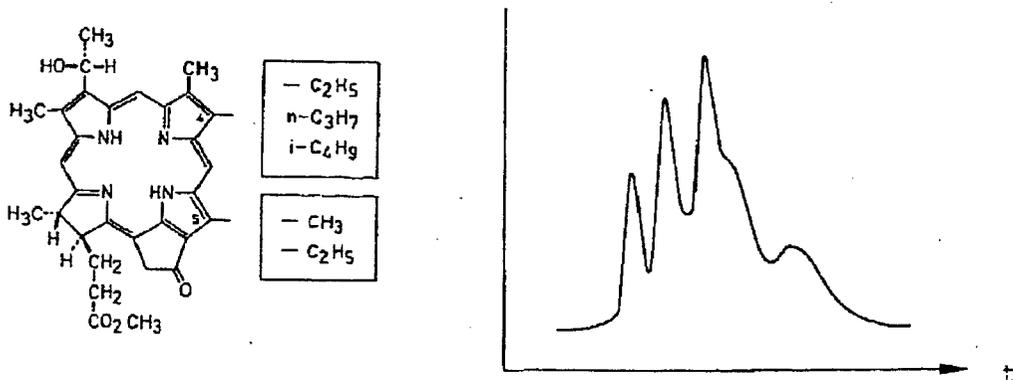


Abb. 5 : Elutionsdiagramm des Bmpha d (6) .

^{*)} Die hierzu notwendige Substanzmenge wurde durch präparative Flüssigkeitschromatographie ⁹⁾ erhalten.

Während die Trennung beim Bmph c (5) relativ problemlos ist, ergeben sich beim Bmph d (6) doch einige Schwierigkeiten. Und zwar erkennen wir bei der Untersuchung dieses Pigments eine Zahl von Komponenten, die durch das vorgegebene chromatographische System offensichtlich noch nicht vollständig getrennt werden. Verwendet man als Fließmittel jedoch Diisopropyläther, so erhält man nur zwei Fraktionen, die wiederum mit Hexan/Aceton in je drei Komponenten getrennt werden können. Das Trennergebnis entspricht qualitativ jeweils in etwa dem in Abb. 3 .

Die Massen- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigen, daß mit dem Diisopropyläther als Laufmittel ganz offenbar nur die Komponenten mit unterschiedlichen Substituenten an C-5 voneinander getrennt werden, während die Farbstoffe mit den unterschiedlichen Alkylgruppen an C-4 wie schon oben gezeigt mit n-Hexan/Aceton getrennt werden können.

Durch Kombination beider Fließmittelsysteme erhält man also aus dem Bmph d (6) sechs einheitliche und in ihrer Struktur eindeutig zuzuordnende Komponenten.

Das letzte Beispiel behandelt eine ganz aktuelle Arbeit aus unserer Gruppe. Untersucht man das Bacteriomethylphäophorbid aus Chloroflexus aurantiacus ³⁾, so bemerkt man sehr bald, daß man im Gegensatz zu den Bacteriomethylphäophorbiden c (5) , d (6) und e (4) überraschenderweise eine absolut einheitliche Verbindung vor sich hat. Hier jedoch ist im Phäophytin (7) ,

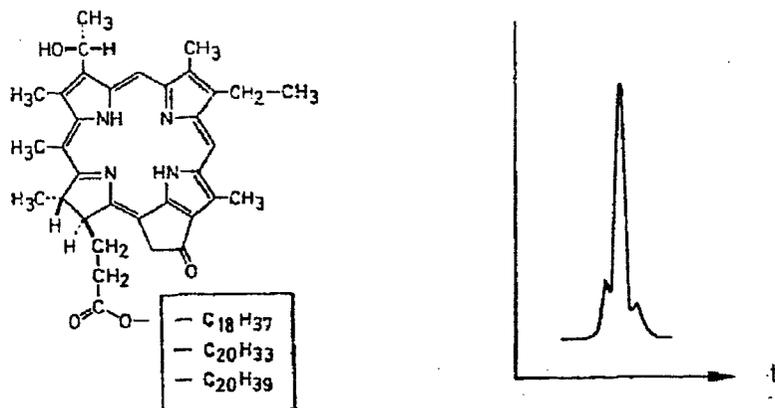


Abb. 6 : Elutionsdiagramm des Phäophytins 7 aus Chloroflexus aurantiacus .

einer Vorstufe des Bacteriomethylphäophorbids, der veresternde Alkohol an der Propionsäureseitenkette nicht wie bei den bisher bekannten Chlorobium-Bacteriochlorophyllen Farnesol, sondern zum Überwiegenden Teil der nichtisoprenoide Stearylalkohol. Wie das Elutionsdiagramm zeigt, treten noch zwei NebenkompONENTEN auf, die nach eingehenden Untersuchungen als solche Makrozyklen identifiziert werden können, die mit Geranylgeraniol bzw. Phytol verestert sind ¹⁰⁾ .

Diese wenigen Beispiele sollten zeigen, daß der Einsatz der HPLC in der Naturstoffchemie — auch wenn hier nur eine ganz spezielle Verbindungsklasse vorgestellt wurde — für den Chemiker sehr hilfreich ist und vielleicht gerade als erste analytische Methode die weitere Arbeitsstrategie im Labor ganz entscheidend beeinflussen kann.

Diese Arbeiten entstanden in Zusammenarbeit mit den Herren Dr. T. Kemmer und E. Hoffmann von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig/Stöckheim.

Wir danken für die Unterstützung durch das Technologieprogramm des Bundesministeriums für Forschung und Technologie und die finanzielle Förderung durch den Fonds der Chemischen Industrie.

Literaturverzeichnis :

- 1) H.Brockmann jr., A.Gloe, N.Risch und W.Trowitzsch ,
Liebigs Ann. Chem. 1976 , 566.
- 2) N.Risch und H.Brockmann jr. ,
Liebigs Ann. Chem. 1976 , 578.
- 3) A.Gloe, N.Risch und H.Brockmann jr. ,
Arch. Microbiol. in Vorbereitung .
- 4) D.W.Hughes und A.S.Holt ,
Can. J. Chem. 40 , 171 (1962) .
- 5) A.S.Holt, J.W.Purdje und J.W.F.Wasley ,
Can. J. Chem. 43 , 3347 (1965) .
- 6) G.W.Kenner, J.Rimmer, K.M.Smith und J.F.Unsworth ,
Philos.Trans.R.Soc.(London) Ser. B 273 , 255 (1976) .
- 7) T.Kemmer , Dissertation Techn. Univ. Braunschweig 1976 .
- 8) H.Brockmann jr. und N.Risch , Veröff. in Vorbereitung .
- 9) N.Risch, T.Kemmer und H.Brockmann jr. ,
Liebigs Ann. Chem. Veröffentlichung im Druck .
- 10) N.Risch, H.Brockmann jr. und A. Gloe ,
Veröffentlichung in Vorbereitung .