

HPLC

Trennung schwer löslicher Carotinoide mit umweltschonenden Lösungsmitteln

CAROLINE AUTENRIETH, ROBIN GHOSH

ABTEILUNG BIOENERGETIK, INSTITUT FÜR BIOMATERIALIEN UND BIOMOLEKULARE SYSTEME, UNIVERSITÄT STUTTGART

Many organic solvents for resolving apolar C_{40} carotenoids with ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) are harmful for human health. It is thought that aggressive solvents are required to prevent aggregation during sample delivery. However, the methoxylated C_{40} carotenoid spirilloxanthin, and its apolar precursors can be resolved with a C_{18} column and the safe solvent system methanol/tetrahydrofuran, and an optimized delivery solvent mixture of low toxicity.

DOI: 10.1007/s12268-019-0215-y
© Springer-Verlag 2019

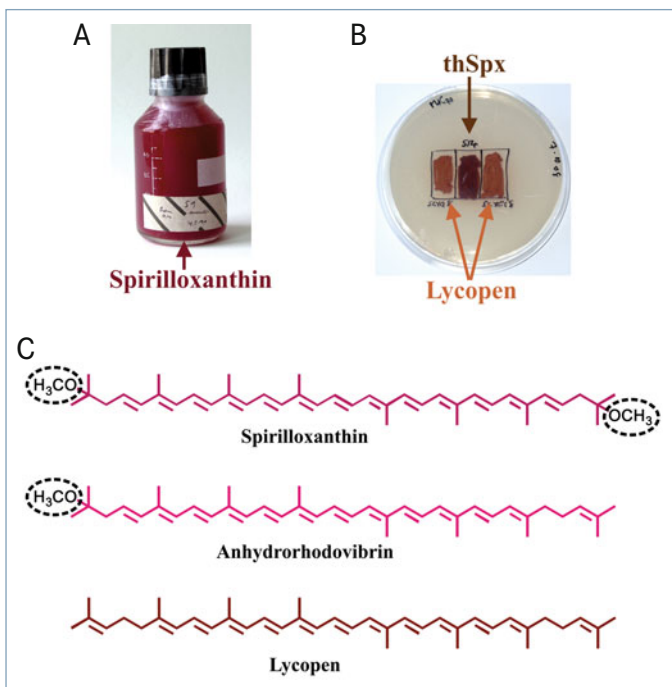
Carotinoide werden von Pflanzen und Mikroorganismen produziert und spielen dort eine wichtige Rolle bei der Photosynthese und beim Schutz gegen oxidativen Stress. Auch für den Menschen wird eine Carotinoid-reiche Ernährung empfohlen. Beispielsweise soll Lycopon, ein lineares C_{40} -Carotinoid, das ein Isoprenoidgerüst mit elf konjugierten Doppel-

bindungen enthält (Abb. 1), vorbeugend gegen Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen wirken [1]. Aus Lycopon wird durch Zyklisierung β -Carotin synthetisiert, die Vorstufe des für uns essenziellen Vitamins A. Die hydroxylierten Carotinoide Lutein und Zeaxanthin sind wichtig für unsere kognitiven Fähigkeiten und ein gesundes Sehvermögen [2].

Manche Bakterienarten können Carotinoide mit bis zu 13 konjugierten Doppelbindungen synthetisieren, z. B. das purpurfarbige Spirilloxanthin (Spx), ein lineares C_{40} -Carotinoid mit einer Methoxygruppe an beiden Molekülen (Abb. 1A, C). Spx ist in den photosynthetischen Membranen des Gram-negativen, Nicht-Schwefel-Purpurbakteriums *Rhodospirillum rubrum* eingebaut.

Durch *in vitro*-Mutagenese-Strategien können Carotinoide produziert werden, die sogar 14–15 Doppelbindungen enthalten [3, 4]. Diese Carotinoide haben erhöhte antioxidative Eigenschaften [5] und könnten somit bei der Krebstherapie zum Einsatz kommen. In diesem Zusammenhang ist möglicherweise auch Spx ein interessantes Carotinoid für industrielle Anwendungen.

Carotinoide sind sehr unpolare Moleküle. Daher kommen für ihre Extraktion und Analyse häufig Lösungsmittel zum Einsatz, die sehr umweltschädlich sind und auch für den Experimentator eine gesundheitliche Gefährdung darstellen. Insbesondere bei einer der Hauptmethoden zur Analyse und Aufreinigung von Carotinoiden, der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), haben technische Fortschritte sowohl beim Apparatbau als auch beim Säulenmaterial dazu geführt, dass die Ende der 1980er-Jahre übliche Verwendung des relativ harmlosen Laufmittels Methanol (MeOH) etwas in Vergessenheit geraten ist. Ab den späten 1990er-Jahren wurde z. B. häufig Acetonitril (AcN) eingesetzt, das eine sehr niedrige Viskosität besitzt und so HPLC-Läufe mit sehr hohen Drücken ermöglicht (Ultra-HPLC: UHPLC). Dies erlaubte wiederum die Verwendung von Säulen mit sehr kleinen Korngrößen (zwei Mikrometer und kleiner). Mit kleineren Korngrößen kann die Auflösung drastisch verbessert werden, und die hohen Drücke, verbunden mit einer schnelleren Flussrate, ermöglichen einen erhöhten Probendurchsatz. Eine weitere Verbesserung der Auflösung konnte durch den Einsatz moderner C_{30} -LC-Umkehrphasensäulen (statt bislang C_{18}) erreicht werden. Dieses Säulenmaterial erforderte jedoch

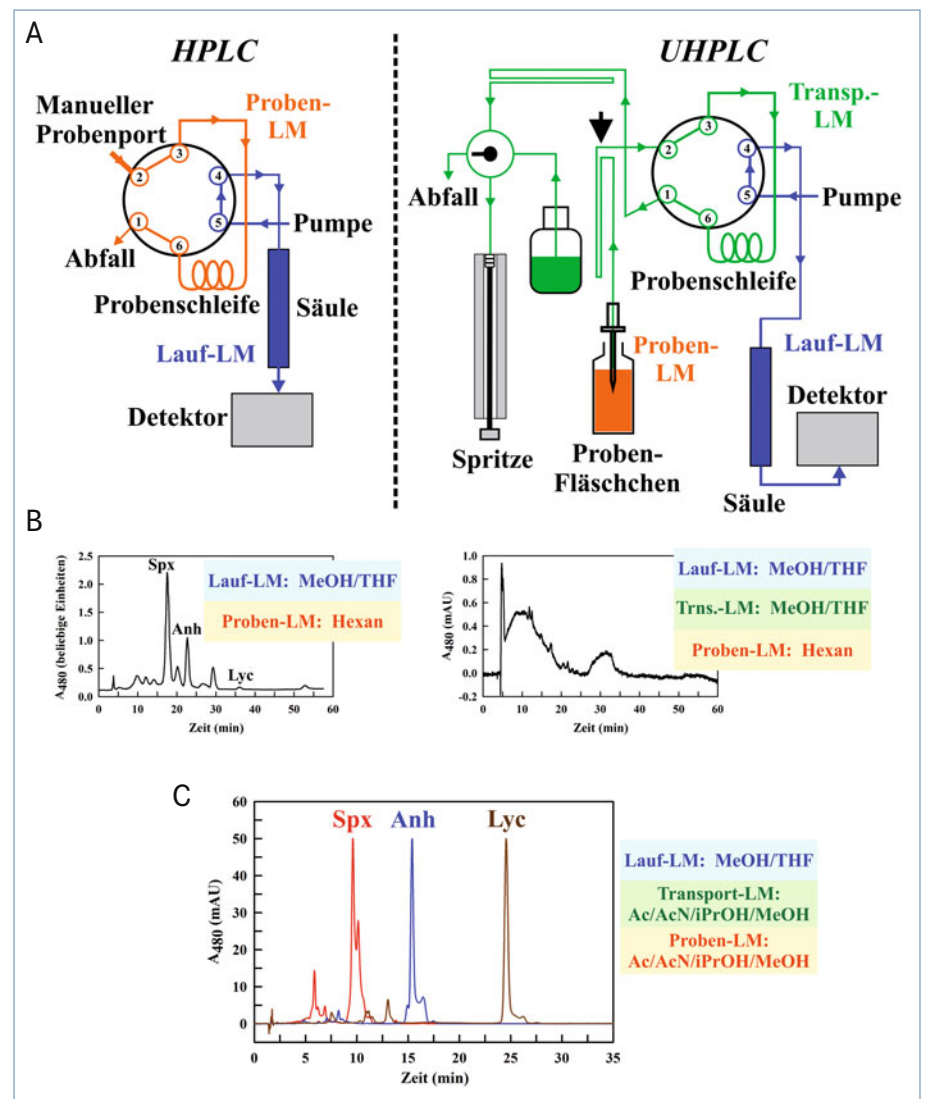


◀ **Abb. 1:** Carotinoide in *Rhodospirillum rubrum*. **A**, Kulturen des Wildtyps S1 enthalten nach Erreichen der stationären Phase nahezu ausschließlich Spirilloxanthin (Spx). **B**, Carotinoid-Stoffwechselweg-Mutanten, die Lycopon bzw. Tetrahydrospirilloxanthin (thSpx) enthalten [6, 7]. **C**, Strukturformeln von Carotinoiden. Lycopon und Anhydrorhodovibrin sind natürliche Intermediate im Spx-Stoffwechselweg.

die Verwendung sehr hydrophober Lösungsmittel, wie z. B. Methyl-*tert*-butylether (MTBE). Eine ausführlichere Übersicht über verschiedene Lösungsmittelgemische zur HPLC-Analyse von Carotinoiden findet sich in [7].

Trotz der oben genannten Vorteile sollte die Verwendung von AcN (mittlere letale Konzentration LC_{50} des Dampfes: 2.900 ppm [8]) und MTBE (LC_{50} des Dampfes: 23.600 ppm [8]) nicht ganz unkritisch betrachtet werden, da diese Lösungsmittel sehr toxisch sind und auch eine erhebliche Umweltbelastung darstellen können. So stellt sich die Frage, ob eine ältere HPLC-Methode [4], die hauptsächlich auf dem im direkten Vergleich weniger toxischen Laufmittel Methanol (LC_{50} des Dampfes: 64.000 ppm [8]) basiert, auf die Verwendung in einer modernen UHPLC-Anlage adaptiert werden könnte. Die Ergebnisse der Methodenentwicklung sind in **Abbildung 2** dargestellt. Dazu wurde ein Carotinoid-haltiger Hexanextrakt aus einer semi-aeroben *R. rubrum*-Kultur verwendet, die noch nicht die stationäre Phase erreicht hatte und somit neben dem Hauptcarotinoid Spx noch dessen Stoffwechselvorstufen enthielt. Bei Verwendung einer älteren HPLC-Anlage und einer C_{18} -Säule mit einer Korngröße von fünf Mikrometern (**Abb. 2A, B, links**) konnte dieses Gemisch mithilfe des Laufmittels Methanol (MeOH)/Tetrahydrofuran (THF) (98/2 [v/v]) zufriedenstellend aufgetrennt werden [4]. Doch bei Verwendung derselben Methode in einer modernen UHPLC-Anlage und einer C_{18} -Säule mit einer Korngröße von zwei Mikrometern (**Abb. 2A, B, rechts**) war die Spx-haltige Probe nicht auftrennbar, und im Chromatogramm konnten nur breite, verschmierte Peaks mit viel zu niedriger Intensität detektiert werden. Die Ursache dafür war, dass die Spx-Probe die Trennsäule nicht erreichen konnte, da sie während des Ladeprozesses im Schlauchsystem des Autosamplers ausfiel.

Üblicherweise ist das Schlauchsystem des Autosamplers mit dem Laufmittel gefüllt, mit dem auch die Trennsäule equilibriert ist. Für Substanzen, die in dem Laufmittel an ihrer Löslichkeitsgrenze sind, wie hier in unserem Beispiel Spx, das in MeOH nur gering löslich ist, ist dieses Vorgehen allerdings nicht erfolgreich. In der älteren HPLC-Anlage hatte dies keine Rolle gespielt, da durch den manuellen Probenport die Probe direkt in die Probenschleife injiziert wurde. In der UHPLC-Anlage musste daher das Schlauchsystem des Autosamplers mit einem Lösungsmittelgemisch gefüllt werden, in dem das Caroti-

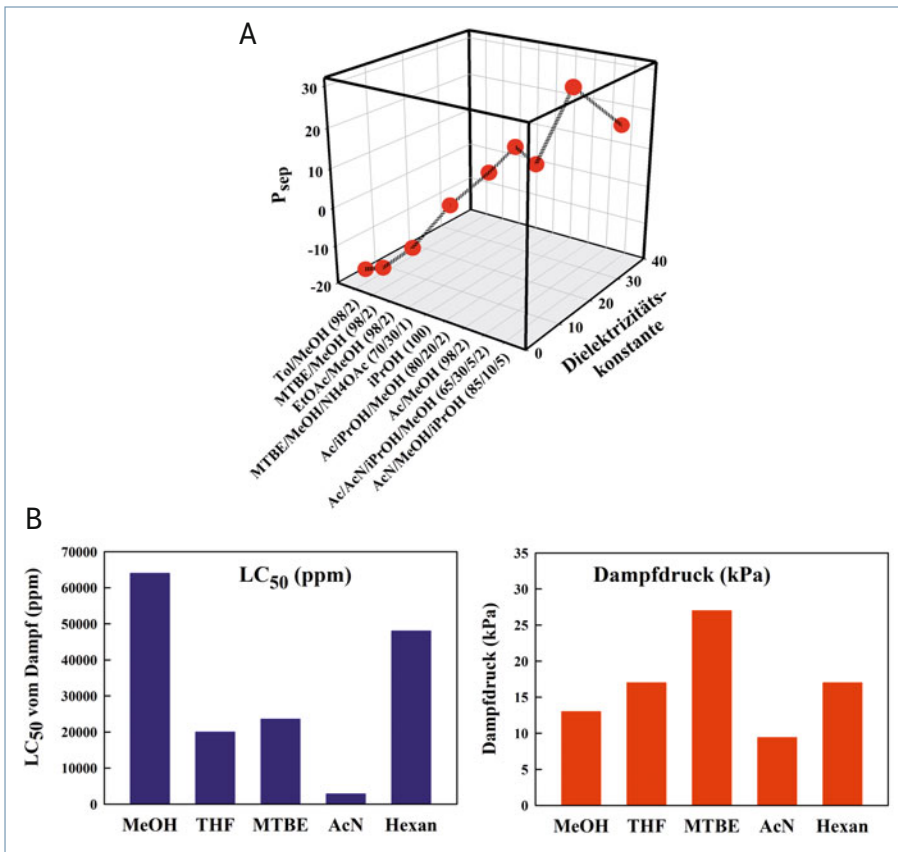


▲ **Abb. 2:** Vergleich von älteren HPLC-Systemen (mit manuellem Probenport) mit moderneren UHPLC-Systemen mit Probeninjektion über gängige Autosampler [7]. **A**, schematische Darstellung des Probenladeprozesses. **B**, HPLC- (links) bzw. UHPLC-Läufe (rechts) mit einer in Hexan gelösten Carotinoid-Probe. **C**, UHPLC-Läufe mit dem optimierten Lösungsmittelsystem. Ac: Aceton; AcN: Acetonitril; Anh: Anhydrorhodovibrin; iPrOH: Isopropanol; LM: Lösungsmittel; Lyc: Lycopon.

noidgemisch optimal löslich war. Im Folgenden wird dieses Lösungsmittel „Transport-Lösungsmittel (LM)“ genannt und das Lösungsmittelgemisch, in dem die Carotinoidprobe gelöst war, „Proben-LM“. Transport- und Proben-LM müssen nicht unbedingt identisch sein, doch im hier beschriebenen Beispiel stellte sich nach mehreren Optimierungsschritten heraus, dass der effizienteste Transport der Spx-Probe zur Trennsäule erfolgte, wenn beide die Zusammensetzung Aceton/Acetonitril/Isopropanol/Methanol (65/30/5/2 [v/v/v/v]) hatten. Mit diesem Lösungsmittelgemisch konnten Spx und dessen Stoffwechselintermediate – auch das im Allgemeinen als sehr schwer löslich angese-

hene Lycopon – effektiv aufgetrennt werden (**Abb. 2C**).

Die Effizienz der Auftrennung mit verschiedenen Proben- bzw. Transport-Lösungsmitteln wurde durch die Analyse der Peakhöhen und -breiten der entsprechenden Chromatogramme quantifiziert (**Abb. 3A**). Hierbei zeigte sich, dass die Effizienz der Auftrennung mit der gemittelten Dielektrizitätskonstanten (D_{av}) des entsprechenden Lösungsmittelgemisches korrelierte, wobei das Optimum bei einer D_{av} von ca. 26 erreicht wurde. Diese relativ hohe Polarität des Proben- bzw. Transport-Lösungsmittels für die unpolare Spx-Probe war zunächst überraschend. Wir vermuten, dass induzierte Dipol-Dipol-Wech-



▲ **Abb. 3:** Ergebnisse aus der Methodenoptimierung [7]. **A**, Korrelation zwischen der Dielektrizitätskonstanten D_{av} des verwendeten Proben-Laufmittels und der Effektivität des Transports P_{sep} . **B**, Vergleich der Toxizitäten (LC_{50} , mittlere letale Konzentration; links) und Dampfdrücke (rechts) gängiger Lösungsmittel. Tol: Toluol; EtOAc: Ethylacetat; NH₄OAc: Ammoniumacetat.

selwirkungen das Löslichkeitsverhalten von methoxilierten Carotinoiden positiv beeinflussen.

Durch die Optimierung des Transports der Sp_x-Probe zur Säule konnte das Laufmittel MeOH/THF (98/2 [v/v]) beibehalten werden. Methanol ist im Vergleich zu den bei der HPLC gängigsten Lösungsmitteln am ungiftigsten, ist biologisch gut abbaubar und hat zudem noch einen geringen Dampfdruck, was die Belastung der Laborumgebungsluft ebenfalls verringert (**Abb. 3B**). Das Transport-Lösungsmittel enthält als Hauptbestandteil Aceton, das ebenfalls biologisch gut abbaubar ist. Zwar kann auch hier nicht ganz auf Acetonitril verzichtet werden, die Gesamtmengen sind jedoch gering, da nur ein vergleichsweise kleines Volumen Transport-Lösungsmittel benötigt wird, um das Autosampler-Schlauchsystem zu füllen.

Fazit

Zusammenfassend ist es gelungen, eine gesundheits- und umweltverträgliche UHPLC-Methode zu entwickeln, die es ermöglicht,

auch schwer lösliche Carotinoide optimal aufzutrennen. Bei der Adaption dieser Methode auf andere Applikationen muss lediglich darauf geachtet werden, dass die Proben- und Transport-Lösungsmittel optimal für die zu untersuchende Substanz sind. Dann kann

beim Laufmittel auf harmlosere Lösungsmittel zurückgegriffen werden.

Danksagung

Dieses Projekt wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert (Projekt-Nr. 0315282 und 031A171A).

Literatur

- [1] Wang X-D (2012) Lycopene metabolism and its biological significance. *Am J Clin Nutr* 96:1214S–1222S
- [2] Ma L, Liu R, Du JH et al. (2016) Lutein, zeaxanthin and meso-zeaxanthin supplementation associated with macular pigment optical density. *Nutrients* 8:426–439
- [3] Schmidt-Dannert C, Umeno D, Arnold FH (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat Biotechnol* 18:750–753
- [4] Autenrieth C, Ghosh R (2015) Random mutagenesis and overexpression of rhodopin-3,4-desaturase allows the production of highly conjugated carotenoids in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch Biochem Biophys* 572:134–141
- [5] Albrecht M, Takaichi S, Steiger S et al. (2000) Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 18:843–846
- [6] Wang G-S, Grammel H, Abou-Aisha K et al. (2012) High-level production of the industrial product lycopene by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol* 78:7205–7215
- [7] Autenrieth C, Ghosh R (2019) The methoxylated, highly conjugated C₄₀ carotenoids, spirilloxanthin and anhydrosorbidovibrin, can be separated using high performance liquid chromatography with safe and environmentally friendly solvents. *Metabolites* 9:20
- [8] TOXNET, Toxicology Data Network, NIH U.S. National Library of Medicine. <https://toxnet.nlm.nih.gov>

Korrespondenzadresse:

Dr. Caroline Autenrieth
 Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme
 Abteilung Bioenergetik
 Pfaffenwaldring 57
 D-70569 Stuttgart
 Tel.: 0711-685-65048
 caroline.autenrieth@bio.uni-stuttgart.de

AUTOREN



Caroline Autenrieth

1997–2004 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart. 2010 Promotion, anschließend wissenschaftliche Assistentin am Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme in der AG Ghosh, Universität Stuttgart.



Robin Ghosh

1973–1976 Biochemiestudium an der University of Sheffield, UK; dort 1980 Promotion. 1980–1983 Postdoc am Biozentrum Basel, Schweiz. 1983–1985 Postdoc an der ETH-Zürich. 1985–1987 Gruppenleiter in der Abteilung für Antibiotikaforschung, Hoffmann-La Roche, Basel. 1987–1992 Postdoc an der Universität Zürich. 1992–1994 Postdoc am Biozentrum Basel. 1994–1996 unabhängiger Gruppenleiter an der Universität Genf. Seit 1996 Professor für Bioenergetik am Biologischen Institut (heute Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme), Universität Stuttgart.