

A kloroplasztisz pigmentjeinek papírkromatográfiás analízise

MÁRKUS LÁSZLÓ

Magyar Tudományos Akadémia Agrobiológiai Kutatóintézete, Budapest

A kromatográfikus adszorpciós analízis kezdetét a növényi levélpigmentek vizsgálata vezette be, Cvet úttörő munkája alapján. (1) Számos kutató, többek között Winterstein (4), Seybold és Egle (3), Zscheile és Comar (6) kisebb-nagyobb változtatásokkal, eljárásokat dolgoztak ki a klorofil *a* és *b*, xantofill és karotin oszlopon való szétválasztására. E módszerek hátránya, hogy a szétválasztás eléggé hosszadalmas, analitikai szempontból számos kívánalmat hagynak maguk után és több részletből tevődnek össze.

A levélpigmentek papírkromatográfiás módszerrel való elválasztása ezzel szemben azt az előnyt biztosítja, hogy egyszerűbb kivitelezésben, egyidőben nagyszámú vizsgálatot lehet végrehajtani. Ilymódon még nagyobb lehetőség nyílik a kloroplasztisz pigmentek biokémiai analízisére (biogenézis, klorofildefekt, normális vagy patológiás destrukció, stb.), takarménynövények, stb. karotintartalmának vizsgálatára, készítmények tisztaságának eldöntésére. Ezek az előnyök indítottak arra, hogy a levélpigmenteknek papírkromatográfiás szétválasztását megoldjuk és a későbbiekben a kvantitatív meghatározás kivitelezhetőségét tanulmányozzuk.

Módszer :

A vizsgálathoz *Solanum lycopersicum* és *Spinacea oleracea* frissen szedett levelét használtuk. Az összehasonlító vizsgálatokhoz szükséges pigmenteket magunk állítottuk elő. A klorofil *a* és *b* előállítását Zscheile & Comar (6) valamint Seybold & Egle (3) módszere szerint végeztük, *Spinacea oleracea* leveléből. A xantofill előállítására *Helianthus annuus* szíromleveléből indultunk ki Zechmeister és Tuzson (5) módszerét alkalmazva. A xantofill-epoxidot Karrer (2) eljárása szerint etiolál *Avena sativa* csíranövényből izoláltuk. A használt karotin gyári készítmény volt.

A szétválasztáskor alkalmazott oldószereket előzetesen tisztítottuk. A módszer tanulmányozása kiterjedt :

1. A megfelelő szűrőpapír kiválasztására. Schleicher & Schüll (S&S) 595, 597, 598, 602 e. h., Muktel OB, Macherey-Nagel 640 D jelzésű papirokat használtuk. A legmegfelelőbbnek S&S 602-es és 595-ös, ezenkívül a Muktel OB jelzésű szűrőpapírok mutatkoztak.

2. A megfelelő oldószer kiválasztására a következő tisztított oldószereket használtuk kettős, illetve hármas kombinációban, esetenként kevés vízzel ele-

gyítve: petroléter, benzin, benzol, kloroform, metilalkohol, éter, acetone, ciklohexan, ciklohexanol, n-butylalkohol. Az oldószerek különböző arányú elegyét próbáltuk ki. Legmegfelelőbbnek a petroléter-aceton és a benzin-aceton-metilalkohol elegye mutatkozott.

3. A kivitelezés szempontjából kipróbáltuk az ascedens és descedens módszert. A kétdimenziós módszer alkalmazása, a kevésszámú és aránylag jól szétválasztható komponens miatt nem indokolt.

A kromatogramm hossza általában 20–25 cm között változott. A szétválasztás már ilyen távolságon megfelelőnek mutatkozott. Ezt a nagyságot 2–3 óra alatt el lehet érni. A vizsgálathoz használt oldat mennyisége 5–20 μ l volt.

A vizsgálandó anyagból 0,5–0,25 grammot (friss, ritkábban szárított levelet) porcellán mozsárban kevés CaCO_3 , vagy MgCO_3 és vízmentes Na_2SO_4 hozzáadásával, üveggörrel és acetonnal jól eldörzsöltük. A pépet 1 G-3-as üvegszűrőre átvittük és acetonnal szívás közben elszintelenedésig extraháltuk. A kapott oldatot szükség szerint vízszintes nátriumsulfáttal víztelenítettük és vacuumban nitrogén atmoszférában bepároltuk vagy mikropipettából lassú, óvatos felvitellel magán a szűrőpapíron koncentráltuk be.

A kromatografálást zárt üveghengerben a szokásos módszer szerint végeztük. A szűrőpapírt előzetesen acetonos atmoszférában equilibráltuk. A fényben és a levegőn való állás a pigmentek gyors bomlásához vezet, nemkülönben egyes oldószereknek, mint a kloroform, benzol, ciklohexanol és nagyobb mennyiségű metilalkohol használata. A kromatografálást ezért 20° C-on elsötétített helyiségben hajtottuk végre. Ajánlatos a kromatografálást nitrogén atmoszférában végezni. A kész kromatogramm szobahőmérsékleten rövid idő alatt megszáradt. A foltok területét még száradás előtt grafitceruzával körülhatároltuk. A kromatogrammot ultraibolya fényben is megvizsgáltuk nagynyomású U y t e r h o e v e n - E l l e n b a s higanygőzlámpát használva. A klorofill b az ultraibolya fényben vörös fluorescenciát mutatott, a klorofill a gyenge zöld színben, a karotinoidok halvány szürkés árnyalattal jelentkeztek.

Az egyes komponensek relatív elmozdulási értékeinek (R_F) meghatározására általunk szerkesztett derékszögű mozgatható átfogójú háromszöget használtunk, melynek segítségével a foltok R_F értéke közvetlenül leolvasható.

Eredmények :

A különböző minőségű szűrőpapírok vizsgálatakor oldószerül petroléter-aceton (20:1) elegyét használtuk. A megvizsgált nyolcfajta szűrőpapírból legjobbnak a S&S 602 e. h. bizonyult.

A különböző oldószerek hatását az egyes pigment komponensek szétválaszthatóságára S&S 602-es e. h. papíron vizsgáltuk. E vizsgálatoknál feltűnt, hogy egyes oldószerek nagymértékű klorofill bomlást idéznek elő. Ilyenkor a kromatogrammban egy szürkés folt jelenik meg, vagy ha a mennyisége kicsi, csupán az ultraibolya fényben jelentkezik élénk vörös színnel. E folt fellép akkor is, ha a pigment kivonásakor nem alkalmazunk CaCO_3 -ot, vagy ha az oldat huzamosabb ideig fény hatásának van kitéve. Ilyen esetben klorofill bomlási termékről van szó. Az ilyen extraktumokból a xantofill-epoxid kimutatása sem jár eredménnyel.

Az oldószerek az egyes komponensek R_F értékeit a 2. ábrán összefoglaltak szerint befolyásolták.

A tájékoztató vizsgálatok eredményeit a következőkben foglalhatjuk össze: a levelekből nyert extraktumok négy, illetve hat komponensre bomlottak széjjel, amelyek az elővizsgálatok alapján klorofill *b*-nek, klorofill *a*-nak, xantofillnak, xantofill-epoxidnak, karotinnak és klorofill bomlási terméknek bizonyultak. Az egyes komponensek színe a fenti sorrendnek megfelelően sárgászöld (U. V.-ban vörös), kékeszöld (U. V.-ban zöld) sárga, sárgás vörös, halvány szürke (U. V.-ban vörös). A klorofill *a*-nak és *b*-nek szétválasztása igen kevés vizet tartalmazó kivonatban tökéletes. A xantofill-epoxid csak kiméletes extrahálás esetén jelentkezett, míg a klorofillok bomlási terméke a hosszabb ideig állt, vagy savat tartalmazó kivonatokban lépett fel.

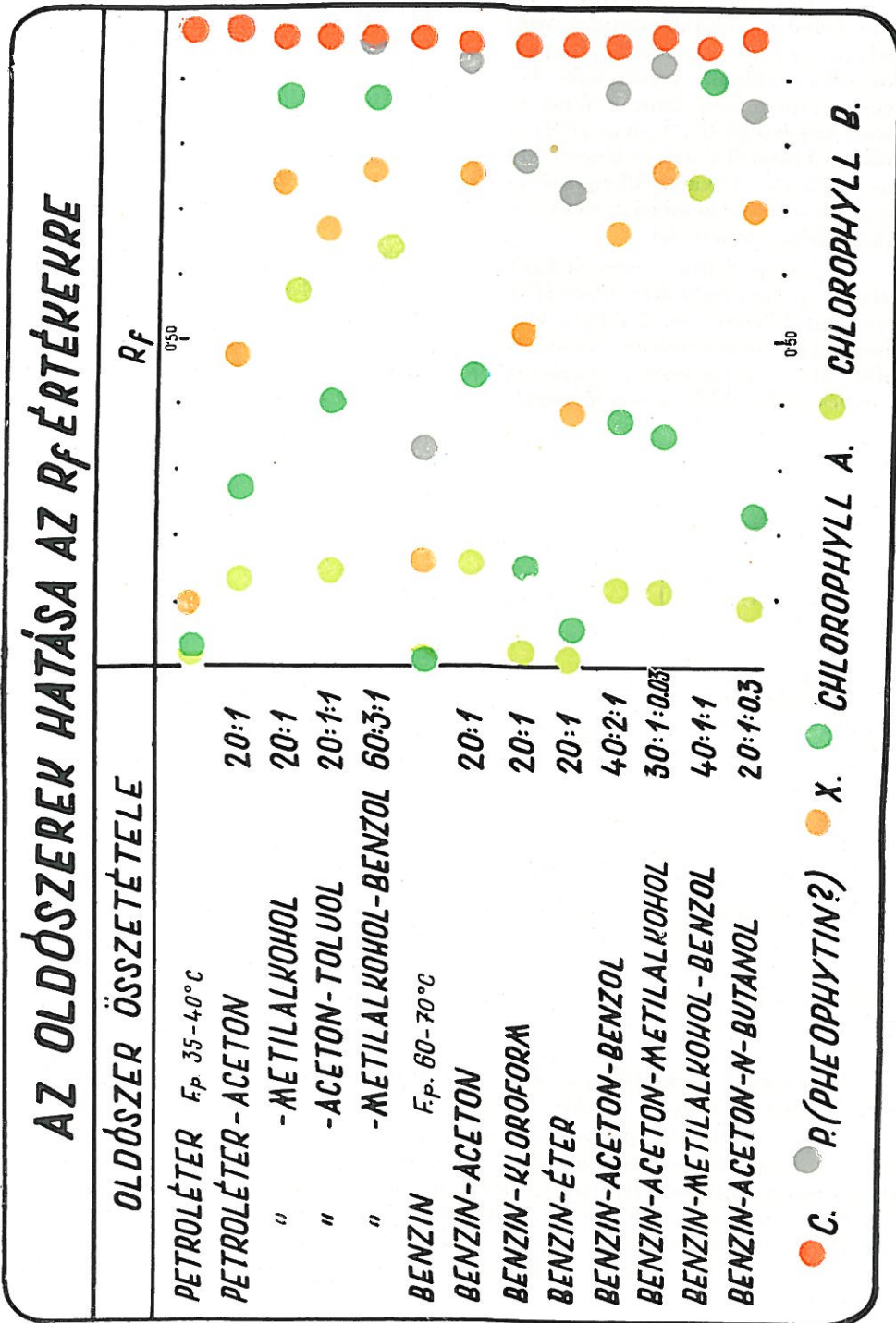
Az egyes foltok indentifikálására részben kromatografikus adszorpcióval tisztított preparátumokat használtunk, másrészt levél-extraktumot cukoroszlópon kromatografáltunk és átfolyós kromatogrammot létesítve az egyes frakciókat külön-külön szűrőpapíron kromatografáltuk. A szűrőpapíron való kromatografálásukkor a pigment preparátumokat, valamint a levélkivonatot is felvittük. Az egyes frakciók és a levélkivonat R_F értékeit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

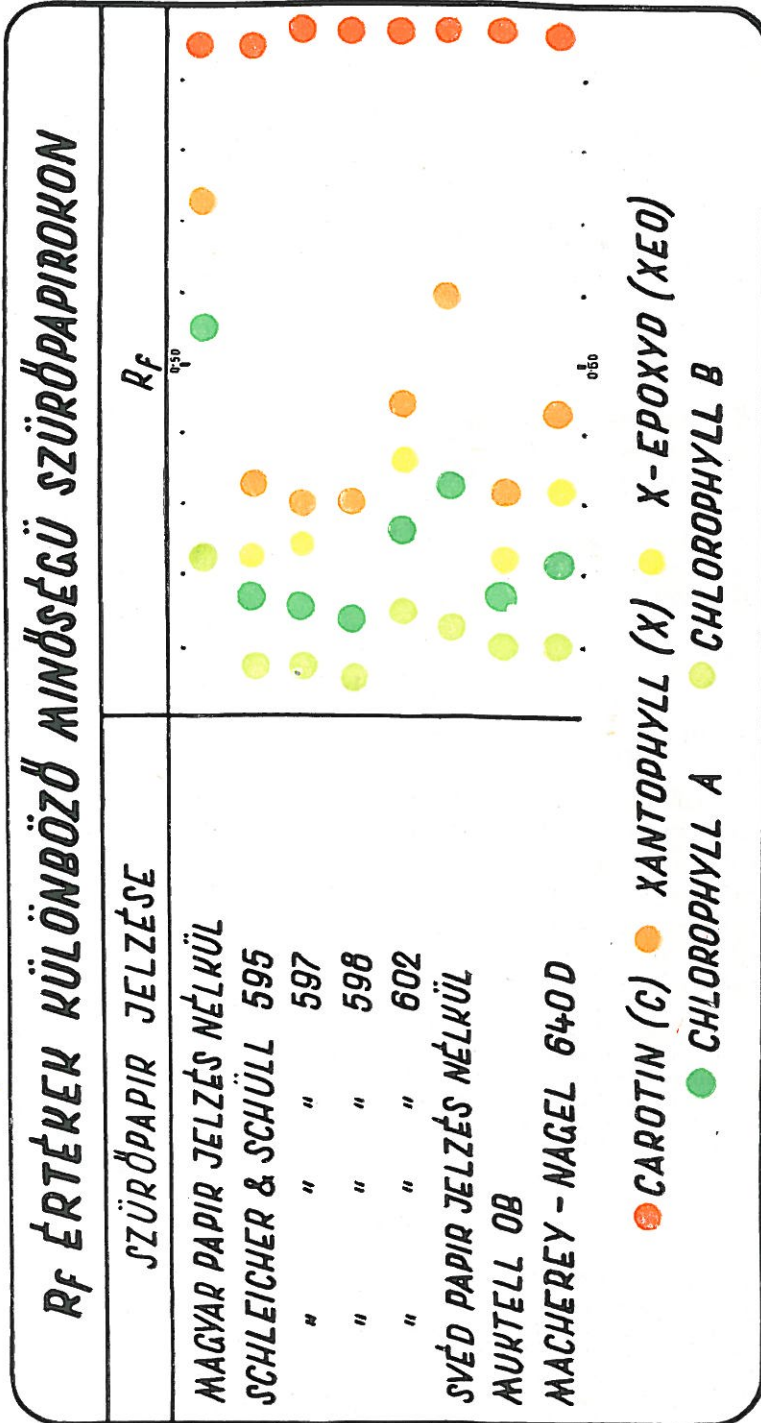
S & S 602.		Benzin-aceton-metilalkohol 30 : 1 : 0,03				
Felvitt anyag (1)	R_F érték (2)					Jelölés (3)
(4) Átfolyós kromatogramm:						
1. frakció	0,97					C
2. frakció	0,97	0,92				C + P
3. frakció	0,98	0,93	0,69	0,36		C + P + X + A
4. frakció			0,68	0,35		X + A
5. frakció				0,34		A
6. frakció					0,17	B
(5) Levél kivonat	0,98	0,95	0,72	0,41	0,15	C + P + X + A + B
(6) A preparátumok:						
Carotin	0,97					C
Xantophyll		0,72				X
Chlorophyll <i>a</i>			0,34			A
Chlorophyll <i>b</i>				0,12		B

Megbízható xantofill-epoxid preparátumot nem sikerült előállítani, ennek indentifikálását csupán spektroszkópiailag sikerült megoldani.

A spektroszkópiai indentifikálást oly módon végeztük, hogy a levélkivonathól nagyobb mennyiséget vittünk fel szűrőpapírra, sáv formájában. Ilyen módon sávós kromatogrammot nyertünk, melyből a megfelelő csíkokat kivágtuk. A pigmenteket benzinen, (karotin és xantofill) benzolban, (xantofill-epoxid) éterben (klorofill *a* *b*) kioldottuk. A kapott oldatokat Zeiss rácsspektroszkópban és Beckmann DU spektrográfban megvizsgáltuk. Az adatokat a 2. táblázat tartalmazza.



I. ábra



2. ábra

2. táblázat

Komponens	Oldószer 1)	Extinkciós max. m μ -ben		Meghatározás módja (4)
		irodalmi (2)	talált (3)	
Carotin	benzin	483,5	484,9	Zeiss rácsspektroszkóp (5)
Xantophyll.....	«	477,5	479,5	« «
Xantophyll-epoxyd.....	benzol	453,0	454,7	« «
Chlorophyll a	éter	482,0	481,5	Beckmann DU
		405,0	406,0	
b	«	430,0	430,0	« «
		660,0	660,0	
		642,5	642,1	

A levélkivonatnak izolált pigmentekkel, valamint a kromatografikus adszorpciós módszer felhasználásával nyert frakciókkal való együttfuttatásával, a nyert foltoknak spektroszkópi vizsgálatával sikerült az egyes foltok pigment minőségét megállapítani.

Köszönettel tartozom Györfly Barnának hathatós segítségével, valamint Jaschik Sándornak a spektroszkópi felvételek elkészítésében nyújtott segítségével.

Összefoglalás:

1. A levélkloroplasztiszpigmentek papírkromatografiás eljárással jól szétválaszthatók.

2. Erre a célra legalkalmasabbnak bizonyult a Schleicher & Schüll 602. e. h. szűrőpapír. A legjobb módszer összetélt a benzin-aceton-metilalkohol elegye adta 30 : 1 : 0,03 térfogatarányban.

3. A módszer alkalmasnak látszik kvantitatív meghatározás kivitelezéséhez.

4. Előnye az oszlopon való kromatografálással szemben, hogy kevés anyagmennyiséggel egyszerűen és rövid idő alatt kivitelezhető, a xantofillnak, a xantofill-epoxidtól való elválasztása lehetséges.

E füzet megjelenése közben L. Bauer-től megjelent (Die Naturwissenschaften 39.88.1952.) a klorofil és karotin származékok papírkromatografiás elválasztási módszeréről egy dolgozat. Ezzel kapcsolatban megjegyezzük, hogy vizsgálatainkat 1950. októberében fejeztük be. Ennek eredményéről a Magyar Tudományos Akadémia IV. (Biológiai és Agrártudományi) Osztálya Biológiai alosztályának felolvasó ülésén 1951. február 23-án számoltunk be. (Akadémiai Értesítő XVII. kötet — 487. füzet, 291. oldal. 1951. július—augusztus.)

Irodalom:

1. Cvet, M. Sz.: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 24, 316, 1906.
2. Karrer, P.: Jucker, E. Rutschmann, J. Steinlin, K.: Helv. Chim. Acta. 28. 1146, 1945.
3. Seybold, A. & Egle, K.: Planta. 29, 114, 1938.
4. Winterstein, A.: Handb. d. Pflanzenanalyse (Klein, G.) Bd. VI. 1933. Z. physiol. Chem. 220, 247, 1933.
5. Zechmeister, L. & Tuzson, P.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 60, 203, 1930.
6. Zscheile, P. & Comar, C. L.: Bot. Gaz. 102, 463, 1941.

БУМАЖНО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПИГМЕНТОВ ХЛОРОПЛАСТА

Л. Маркуш

Агробиологический Исследовательский Институт Венгерской Академии Наук,
Будапешт

Выводы

Проверялось разделение красящих веществ листьев, как то : хлорофила *a* и *b*, ксантофила, антофил-эпоксида и каротина при помощи бумажной хроматографии.

Испытания проводились с той целью, чтобы вместо применявшегося до сих пор хроматографического адсорбционного метода разработать более простой и работающий с меньшими количествами метод.

Для испытаний применялась ацетоновая вытяжка из листьев *Solanum lycopersicum* и *Spinacea oleracea*.

Проверив 8 фильтровальных бумаг различной марки, для данной цели самой подходящей оказалась фильтровальная бумага марки Шлейхер и Шюлл № 602 е. х. (рисунок 1).

При выборе растворителя проверялись нами двойные и тройные комбинации петролейного эфира, бензина, бензона, циклогексана, хлороформа, метилового спирта, нормального бутилового спирта, циклогексанола, эфира и ацетона, взятых в различных объемных частях. Самой подходящей оказалась смесь петролейного эфира и ацетона (30 : 1), а также смесь бензина, ацетона и метилового спирта (30 : 1 : 0,03) (рисунок 2).

Хроматографирование производилось в, одинарном восходящей и нисходящей виде.

В случае применения фильтровальной бумаги марки Шлейхер и Шюлл № 602 е. х. и растворителя бензин-ацетон-метиловый спирт (30 : 1 : 0,03), пигменты на фильтровальной бумаге располагались следующим образом : хлорофил *b*, хлорофил *a*, ксантофил-эпоксид, ксантофил, вещество распада хлорофила, каротин. Идентификация отдельных компонентов производилась помощью сравнения с препаратами пигментов, путем совместного «проявления» фракций, полученных на сахарном столбике, а также спектроскопическим испытанием раствора, полученного после промывания (элюция) образовавшихся пятен (таблица 1. и 2.).

ОБЪЯСНЕНИЯ К РИСУНКАМ И ТАБЛИЦАМ

Рисунок 1. Величины R_F на фильтровальной бумаге различных марок.

Рисунок 2. Влияние растворителей на величины R_F .

Таблица 1. (1) Исследуемое вещество (4) Проходная хроматограмма
(2) Величина R_F (5) Вытяжка из листьев
(3) Обозначение (6) Препараты.

Separation of Plastid Pigments by Paper Partition Chromatography

By L. MÁRKUS

Agrobiological Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Summary

The separation — by paper chromatography — of the leaf pigments : chlorophyll *a* and *b*, xanthophyll, xanthophyll-epoxide and carotene was studied.

Acetone extracts of tomato and spinach were applied in the experiments.

Eight types of filter papers have been tried, but none has been found superior to »Schleicher and Schüll 602 e. h.« (cf. Fig. 1.)

Petroleum ether, gasolene, benzene, cyclohexane, chloroform, methanol, *n*-butanol, cyclohexanol, ether and acetone were tested in two and three solvent combinations. Most effective were a 30 : 1 mixture of petroleum ether-acetone and a 30 : 1 : 0,03 mixture of gasolene-acetone-methanol. (Fig. 2.)

One-dimensional chromatography was applied in ascendent and descendent forms.

The sequence of pigments, with the use of filter paper »Schleicher and Schüll 602 e. h.«, and a 30 : 1 : 0,03 mixture of gasolene-acetone-methanol as solvent was : chlorophyll *b*, chlorophyll *a*, xanthophyll-epoxide, xanthophyll, decomposition product of chlorophyll, carotene. These components were indentified by parallel runs with fractions of pigment preparations obtained in sugar columns, further by spectrographic examination of the solutions of the spots (Tables 1 and 2).

Text to figures and tables.

Fig. 1. R_F values with different types of filter papers.

Fig. 2. Effect of solvents on R_F values.

Table 1. 1. Substance applied
2. R_F value
3. Sign of Sample

Table 2..

4. Fractions of the column
6. Leaf extract
6. Preparations
1. Solvent
2. Extinction max. in μ literal
3. Extinction max. in μ found
4. Methode of determination
5. Grating spectroscope (Zeiss)

After submission of this paper for publication, a treatise appeared by L. Bauer (Die Naturwissenschaften, 39, 88, 1952) on the methods of separating chlorophyll and carotene derivatives by paper chromatography. It must be noted that the studies described in this paper were terminated in October 1950 and a report was presented on the 23rd February 1951 on the session of the Biological Subsection of Section IV (Biology and Agricultural Sciences) of the Hungarian Academy of Science (cf »Akadémiai Értesítő« Vol. LVIII, no 487, page 291, July—August 1951).

Untersuchung der Chloroplastpigmente durch Papierchromatographie.

L. MÁRKUS

Agrobiologisches Institut der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

Zusammenfassung

Die Möglichkeit der Trennung der Blattfarbstoffe: Chlorophyll a und b, Xantophyll, Xantophyll-Epoxyd, und Carotin durch Papierchromatographie wurde untersucht um die bisher übliche chromatographische Adsorptionsmethode, durch ein einfach durchführbares, schnelleres, und geringere Substanzmengen erforderndes Verfahren zu ersetzen.

Die untersuchten Stoffe waren Azetonauszüge der Blätter von Solanum lycopersicum und Spinacia oleracea.

Die Prüfung von 8 Filtrierpapiersorten ergab, dass die Marke Schleicher & Schüll, Nr. 602, dem Zwecke am besten entspricht. (S. Abb. 1.)

Um das geeignetste Lösungsmittel zu finden, wurden Gemenge von zwei oder drei der folgenden in verschiedenen Mischungsverhältnissen untersucht: Petroläther, Benzin, Benzol, Zylohexan, Aether, Zylohexanol, Chloroform, Lösungsmittel Butylalkohol, Methylalkohol und Azeton. Am besten geeignet waren: ein Gemisch von Petroläther mit Azeton (30 : 1), sowie Benzin-Azeton-Methylalkohol (30 : 1 : 0,03). (S. Abb. 2.)

Die Reihenfolge der Pigmente auf dem Papier war, bei Verwendung von Filtrierpapier Schleicher & Schüll No 602 und Benzin-Azeton-Methylalkoholgemisch 30 : 1 : 0,03 folgende: Chlorophyll b, Chlorophyll a, Xantophyll, Epoxyd, Xantophyll, Zersetzungsprodukt von Chlorophyll, Carotin. Die Komponenten wurden mit Hilfe von Pigmentpräparaten, und mit auf Zuckersäule erhaltenen Fraktionen, sowie durch spektroskopische Untersuchung der entstandenen Flecke nach Elution (S. Tabellen 1. u. 2.) identifiziert.

Abb. 1. R_F -Werte auf verschiedenen Filtrierpapiersorten.

Abb. 2. Einfluss des Lösungsmittels auf die R_F -Werte.

Tabelle 1.

1. Entführte Substanz.
2. R_F -Wert.
3. Bezeichnung.
4. Durchflusschromatogramm.
5. Blattauszug.
6. Die Präparate.

Tabelle 2.

1. Lösungsmittel.
2. Maximalextinktion in $\mu\mu$ nach Schriftumsangabe.
3. Maximalextinktion in $\mu\mu$ gefunden.
4. Bestimmungsverfahren.
5. Gitterspektroskop. (Zeiss)

Nach dem diese Abhandlung eingegangen war, L. Bauer veröffentlichte eine Abhandlung über die Trennungsmethoden von Chlorophyll und Carotinderivaten durch Papierchromatographie (Die Naturwissenschaften 39, 88, 1952). In dieser Beziehung ist es nötig zu bemerken, dass die hier beschriebene Untersuchungen schon im Oktober 1950. beendet wurden und die Ergebnisse am 23. Februar 1951 vor der Sitzung der Untersektion für Biologie der IV. Section (Biologie und Agrarwissenschaften) der Ungarischen Akademie der Wissenschaft vorgetragen wurden (s. Akadémiai Értesítő, Bd LVIII, Heft 487, Seite 291, Juli—August 1951).