Zastosowanie chromatografii bibułowej do analizy barwników chloroplastów

*The use of paper chromatography for the separation of chloroplast
pigments*

R. W. SCHRAMM i ST. ORGANIŚCIAK-MATUSZAK

W pracy niniejszej zajęliśmy się zagadnieniem przydatności metody chromatografii bibułowej do badania zmian jakościowych i ilościowych barwników chloroplastów.

Znalezienie odpowiedniej, dokładnej i szybkiej metody równoczesnej analizy w materiale roślinnym wszystkich barwników chloroplastów (barwników chlorofilowych i karotenoidowych) napotyka na duże trudności. Nie jest od nich wolna również metoda chromatografii bibułowej; można nawet zaryzykować twierdzenie, że trudności tej metody są specjalnie liczne i różnorodne i wymagają wielkiej uwagi (Schramm 1957), jednakże jej prostota i szybkość sprawiają, że pomimo nie zawsze zadowalających wyników ciągle pojawiają się próby jej zastosowania. W naszych badaniach zależało nam na znalezieniu metody szybkiej, reproduktywnej, dającej się stosować przy użyciu niewielu prostych odczynników i normalnej bibuły chromatograficznej oraz małych ilości materiału wyjściowego. Ze względu na stosowanie bezpośredniej analizy porównawczej chromatogramów ważnym zagadnieniem stała się odpowiednia preparatyka i konserwacja barwników.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny (liście) zbierany był w godzinach rannych (6—8) z terenu parku Dębina w Poznaniu oraz sąsiednich ogrodów. Próbkę 1 g materiału (świeżej masy) oczyszczonego z kurzu rozcierano w moździerzu z szczyptą piasku kwarcowego i 1 ml rozpuszczalnika, po czym zalewano ją 10 ml rozpuszczalnika na $\frac{1}{2}$ godziny. Jako rozpuszczalnika ekstrahującego używano wybranej po wielu próbach mieszaniny acetonu z etano-

lem 2:1 (obj.), która dawała stosunkowo najpełniejszą ekstrakcję wszystkich barwników plastydowych. Ekstrahowany roztwór sączono, przemywano ok. 3 ml rozpuszczalnika i suszono na parownicze w eksyktorze pod zmniejszonym ciśnieniem (ok. 10 godz.). Wysuszone barwniki podejmowano następnie 1 ml rozpuszczalnika konserwującego.

Ryc. 1. Chromatogramy barwników chloroplastów *Verbascum thapsiforme*, ekstrahowanych mieszaniną acetonu z etanolem (2:1), konserwowanych w chlorobenzenie.

Chromatografia wstępująca: bibuła Whatman 1, rozwijacz benzyna: eter naftowy: aceton (10:2,5:1,5). A — wg Bauera (1952) dwukierunkowy; B — wg Bauera (1952) jednokierunkowy, rozwijacz I; C — wg Bauera (1952) jednokierunkowy rozwijacz II; D — wg Leforta i Signola (1955); E — własny; 1 — karoten; 2 — feofityna a; 3 — feofityna b; 4 — luteol; 5 — wiolaksantol; 6 — n_1 ; 7 — n_2 ; 8 — chlorofil b

W celu wybrania najodpowiedniejszej metody rozdzielu chromatograficznego sprawdziliśmy praktycznie kilka z podstawowych cytowanych w literaturze metod i modyfikacji (Bauer 1952, Hager 1957, Lefort, Signol 1955, Lind, Lane, Gleason 1953, Sapożnikow, Bronsztein, Krasowskaja 1955, Strain 1953). Jako materiału do tych prób używaliśmy wyciągu z liści *Verbascum thapsiforme*. Metody dwukierunkowe rozbijaliśmy również na jednokierunkowe, rozwijając każdy kierunek oddzielnie.

Przegląd porównawczy wymienionych metod wykazał, że najlepszy rozdział daje dwukierunkowa metoda Bauera (1952). Eksperymenty

tując ze stosowanymi przez B a u e r a rozpuszczalnikami zastosowaliśmy w końcu jako rozwijacz mieszaninę: benzyna apteczna (t. wrz. $60,2^{\circ}$) + eter naftowy (t. wrz. 48°) + aceton w stosunku 10 : 2,5 : 1,5 (obj.). Mieszanina ta, nieznacznie różniąca się od mieszaniny I Bauera, dawała przy rozwijaniu jednokierunkowym zdecydowanie najlepszy rozdział barwników, nie ustępujący wynikom dwukierunkowego rozwijania metodą Bauera (ryc. 1).

Wartość przesunięcia barwnika na chromatogramie określaliśmy przez R_f , tj. oznaczając przesunięcie czoła plamy, a nie jak zwykle jej środka, w stosunku do czoła rozpuszczalnika (R_f), podobnie jak to zastosowali E v a n s i wsp. (1949) dla fenoli. Na naszych chromatogramach czoło plamy zaznaczało się wyraźnie odcinającą się od tła ostrą linią, podczas gdy dolna część często była rozmyta, co w połączeniu z różnym, niejednokrotnie łukowatym kształtem plam bardzo utrudniało wyznaczanie ich środka.

Ekstrakty przygotowane do analizy przechowywaliśmy w ciemności w temperaturze pokojowej (chromatogramy roztworów przechowywanych w t. 0° i 18°C nie wykazywały żadnych różnic).

Chromatogramy rozwijaliśmy na bibule Whatman 1 (paski 22×3 cm krojone wzdłuż arkusza z zaznaczoną przestrzenią 18 cm do rozwijania chromatogramu) metodą wstępującą w cylindrycznych słojach szklanych, bez uprzedniego kondycjonowania bibuły, rozwijaczem: benzyna + eter naftowy + aceton (10 : 2,5 : 1,5). Do każdej analizy braliśmy 6 μl wyciągu barwników (1 g świeżej masy / 1 ml) nanosząc na bibulę mikropipetą w trzech porcjach po 2 μl . Czas rozwijania chromatogramu w temperaturze pokojowej wynosił średnio 45 minut.

KONSERWACJA BARWNIKÓW I JEJ WPŁYW NA OBRAZ CHROMATOGRAFICZNY

Ze względu na konieczność bezpośredniej analizy porównawczej ekstraktów sporządzanych w różnym czasie, przeprowadziliśmy doświadczenia nad wpływem różnego rodzaju rozpuszczalników na obraz chromatogramu barwników chloroplastów. Jako materiału użyliśmy ekstraktu z *Pinus strobus* wysuszonego i rozpuszczonego następnie w 1 ml następujących rozpuszczalników: aceton, etanol, aceton + etanol (2 : 1), eter naftowy, benzyna, chloroform i chlorobenzen. Otrzymane chromatogramy wykazały wyraźną zależność rozdziału barwników od zastosowanego rozpuszczalnika konserwującego (ryc. 2).

W świetle analizy chromatograficznej stosowane przez nas rozpuszczalniki konserwujące można podzielić na trzy grupy. Pierwszą, dającą bardzo podobne chromatogramy, tworzą eter naftowy, chloroform i chlo-

robenzen. Chromatogramy barwników *Pinus strobus* rozwinięte z ekstraktów przechowywanych w tych rozpuszczalnikach charakteryzują się stosunkowo małymi i dobrze rozdzielonymi plamami (dobry rozdział luteolu i wiolaksantolu), brakiem jakiegokolwiek pozostałości na miejscu nałożenia materiału i brakiem plam chlorofilów, które w całości przekształcają się

Ryc. 2. Wpływ rozpuszczalnika konserwującego na obraz chromatograficzny barwników chloroplastów. Barwniki chloroplastów *Pinus strobus* ekstrahowane mieszaniną acetonu z etanolem (2 : 1).

Rozpuszczalnik konserwujący: A — aceton; B — etanol; C — aceton z etanolem (2 : 1); D — benzyna; E — eter naftowy; F — chloroform; G — chlorobenzen. Chromatografia wstępująca, bibuła Whatman 1, rozwijacz benzyna + eter naftowy + aceton (10 : 2,5 : 1,5), 1 — karoten; 2 — feofityna; 3 — luteol; 4 — wiolaksantol; 5 — chlorofil b; 6 — chlorofil a; 7 — plama chlorofilidów na miejscu nałożenia materiału

w toku preparatyki w feofityny. Drugą grupę stanowią aceton, etanol oraz mieszanina acetonu z etanolem 2 : 1. Chromatogramy rozwinięte z tych rozpuszczalników charakteryzują się rozmytymi, wydłużonymi plamami, złym rozdzieleniem ksantofili i występowaniem, obok chlorofilu, silnej plamy produktów rozkładu na miejscu nałożenia materiału. Trzeci, pośredni typ rozpuszczalnika reprezentuje benzyna, dająca obraz podobny do rozpuszczalników typu drugiego, jednak bez śladów produktów rozkładu na miejscu nałożenia.

Do dalszych prac wybraliśmy jako rozpuszczalnik konserwujący chlorobenzen. Jak wykazały doświadczenia z ekstraktami z *Pinus strobus*, czas przechowywania barwników w chlorobenzenie nie wpływa na zmianę ich obrazu chromatograficznego. Eter naftowy i chloroform bardzo podobnie zachowujące się jako rozpuszczalniki konserwujące nadają się gorzej do badań porównawczych z powodu znacznie większej lotności, gdyż parując silnie w czasie pobierania próbek z roztworu zmieniają szybko jego stężenie. Również benzyna z tego powodu jest rozpuszczalnikiem nieodpowiednim.

Rozpuszczalniki grupy drugiej, jak wykazały dokładne badania spektrofotometryczne Johnstona i Watsona (1956), powodują z czasem znaczne zmiany chlorofilu. W acetonie następują jedynie zmiany ilościowe chlorofilu wskutek powolnego jego rozkładu; w alkoholach występuje zarówno degradacja jak i allomeryzacja wskutek autooksydacji. Zmiany te w pewnej mierze są uchwytne również chromatograficznie (z upływem czasu przechowywania słabnie natężenie plam chlorofilów). Równocześnie etanol w minimalnym tylko stopniu rozpuszcza feofityny, znajdujące się od początku w materiale roślinnym lub powstające w czasie ekstrakcji i suszenia barwników, które wytrącają się z roztworu w postaci nieużytecznej w analizie chromatograficznej.

OBRAZ CHROMATOGRAFICZNY BARWNIKÓW CHLOROPLASTÓW ŚWIEŻEJ TKANKI

W celu zbadania zmian zachodzących w barwnikach w toku preparatyki przeprowadziliśmy równolegle rozdział chromatograficzny barwników ekstrahowanych i konserwowanych w chlorobenzenie oraz ze świeżej tkanki. W tym celu używaliśmy krążków o średnicy 4 mm wyciętych z liści, które rozgniataliśmy wprost na bibule (do każdej analizy dwa krążki); rozwijając następnie chromatogram w identyczny sposób jak w przypadku barwników ekstrahowanych otrzymaliśmy następujący roz-

Ryc. 3. Porównanie chromatogramów barwników chloroplastów *Verbascum thapsiforme* konserwowanych i świeżych („surowego chlorofilu“)

A — chromatogram barwników ekstrahowanych acetonem z etanolem (2 : 1) i konserwowanych w chlorobenzenie; B — chromatogram barwników „surowego chlorofilu“. Chromatografia wstępująca, bibuła Whatman 1, rozwijacz benzyna; eter naftowy + aceton (10 : 2,5 : 1,5); 1 — karoten; 2 — feofityna a; 3 — feofityna b; 4 — luteol; 5 — wiolaksantol; 6 — η_1 ; 7 — η_2 ; 8 — chlorofil b; 9 — chlorofil a; 10 — plama chlorofilidów na miejscu nałożenia materiału

dział: karoten, luteol, wiolaksantol, chlorofil b, chlorofil a, plama produktów rozkładu (chlorofilidów) na miejscu nałożenia materiału (ryc. 3).

Jak widać, chromatogramy barwników wyciśniętych bezpośrednio z tkanki na bibule (tzw. „surowego chlorofilu“) różnią się znacznie od chromatogramów ekstraktów. Nie występują tu (lub występują w minimalnych tylko ilościach) produkty rozkładu chlorofilów pozbawione atomu Mg, przede wszystkim feofityny, w które w toku ekstrakcji przechodzi przeważająca masa chlorofilów (zwłaszcza chlorofilu a), natomiast występowanie na miejscu rozgniatań krążków plamy chlorofilidów świadczy o innego typu rozkładzie chlorofilów mianowicie z odszczepieniem fitolu, co łączy się z utratą własności lipofilnych, a za tym i możliwości przesuwania się tych barwników na chromatogramie.

WYNIKI PORÓWNAWCZE

Stosując podaną wyżej metodę badaliśmy skład barwników chloroplastów następujących roślin: *Acer campestre*, *Acer platanoides*, *Beta vulgaris*, *Chelidonium maius*, *Corylus avellana*, *Cucurbita pepo*, *Datura stramonium*, *Daucus carota*, *Euphorbia helioscopia*, *Fraxinus excelsior*, *Chelidonium maius*, *Hyoscyamus niger*, *Pinus strobus*, *Picea excelsa*, *Populus nigra*, *Robinia pseudoacacia*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Syringa vulgaris*, *Tilia parvifolia*, *Verbascum thapsiforme*.

Porównywaliśmy barwniki ze zdrowych, zielonych liści, ekstrahowane mieszaniną acetonu z etanolem 2:1 i konserwowane w chlorobenzenie (1 g świeżej masy/1 ml rozpuszczalnika konserwującego). Ze względu na niemożność dokładnego oznaczenia ilościowego poszczególnych barwników stężenie ich określaliśmy porównawczo przez stopniowanie wielkości i natężenia barwy plamy bezpośrednio po rozwinięciu chromatogramów, dla każdej serii pomiarów oddzielnie. Tak np. jeśli seria obejmowała chromatogramy 4 rodzajów roślin, oznaczaliśmy największe stężenie barwnika przez ++++, najmniejsze przez +; jeśli 8 — największe ++++, najmniejsze +. Oczywiście uniemożliwia to (szczególnie jeśli chodzi o natężenie barwy) porównania bezpośrednie chromatogramów nie należących do tej samej serii; jednakże skutek wyraźnych, a u niektórych barwników szybkich zmian w natężeniu barwy plam, a nawet kolorze, po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogramu, nie ma możliwości bezpośredniego porównywania chromatogramów nie rozwijanych równocześnie.

W podobny sposób staraliśmy się porównać natężenie barwników w liściach z różnych pięter tej samej rośliny.

T a b e l a 1

Stężenie (c) i wartości R_f plam barwników chloroplastów różnych roślin. Chromatografia wstępująca. Bibuła Whatman 1, rozwijacz benzyna + eter naftowy + aceton (10:2,5:2,5 obj.). Barwniki ekstrahowane mieszaniną aceton + etanol (2:1), konserwowane w chlorobenzenie.

			<i>k</i>	<i>fa</i>	<i>fb</i>	<i>l</i>	<i>w</i>	<i>n</i> ₁	<i>n</i> ₂	<i>chb</i>	<i>cha</i>
Seria 1. Materiał zebrany 21.9.1956 r.	<i>Acer platatanoides</i>	<i>c</i>	++++ ++++	++++ ++++	—	++++ ++++	++++ ++++	—	—	+	+
		<i>R_f</i>	100	93	—	82	79	—	—	57	53
	<i>Acer campestre</i>	<i>c</i>	++++ +++	++++ +++	—	++++ +++	++++ +++	—	—	+	+
		<i>R_f</i>	100	95	—	77	70	—	—	49	43
	<i>Chelidonium maius</i>	<i>c</i>	++++ ++	++++ +	—	++++ ++	++++ ++	—	—	+	+
		<i>R_f</i>	100	89	—	67	59	—	—	29	26
	<i>Datura stramonium</i>	<i>c</i>	++++ ++	++++ ++	+	++++ +	++++ +	—	+	—	—
		<i>R_f</i>	100	92	75	72	65	—	36	—	—
Seria 2. Materiał zebrany 25.9.56 r.	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>c</i>	++++ +	++++ +	—	++++ +	++++ +	—	—	+	—
		<i>R_f</i>	100	89	—	69	59	—	—	29	—
	<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>c</i>	++++	++++	—	++++ +	++++ +	—	—	+	—
		<i>R_f</i>	100	89	—	67	57	—	—	27	—
	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>c</i>	+++	+++	—	+++	+++	—	—	+	+
		<i>R_f</i>	100	89	—	65	57	—	—	23	13
	<i>Beta vulgaris</i>	<i>c</i>	+++	++	—	++	++	—	—	—	+
		<i>R_f</i>	100	86	—	64	55	—	—	—	19
	<i>Tilia parvifolia</i>	<i>c</i>	++++ ++	++++ ++	—	++++ ++	++++ ++	+	+	+	—
		<i>R_f</i>	100	96	—	76	67	50	44	36	—
	<i>Corylus avellana</i>	<i>c</i>	++++ ++	++++ +	—	++++ +	++++	+	++	+	+
		<i>R_f</i>	100	91	—	69	58	44	34	26	20
	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>c</i>	++++ ++	++++	—	++++	++++ +	+	+	+	+
		<i>R_f</i>	100	94	—	71	61	46	40	29	21
	<i>Euphorbia helioscopia</i>	<i>c</i>	++++	+++	—	++++ +	++++	—	—	+	—
		<i>R_f</i>	100	90	—	67	57	—	—	31	—
	<i>Hyoscyamus niger</i>	<i>c</i>	++++	+	—	+++	++	—	—	+	+
		<i>R_f</i>	100	87	—	67	57	—	—	25	20
	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>c</i>	++++ ++	++	—	++	+++	+	+	+	+
		<i>R_f</i>	100	89	—	65	58	37	30	25	18

Tabela 1 (c. d.)

			k	fa	fb	l	w	n ₁	n ₂	chb	cha
Seria 3. Mat. zebr. 3.10.56 r.	<i>Syringa vulgaris</i>	c	++++	++++	—	++++	++++	—	—	+	—
		R'f	100	78	—	55	48	—	—	28	—
	<i>Solanum lycopersicum</i>	c	+++	+++	—	+++	+++	—	—	+	—
		R'f	100	74	—	53	45	—	—	27	—
	<i>Solanum tuberosum</i>	c	++	++	—	++	++	—	—	+	—
		R'f	100	70	—	50	41	—	—	21	—
	<i>Populus nigra</i>	c	+	+	—	+	+	—	—	+	—
		R'f	100	61	—	44	35	—	—	16	—
Seria 4. Mat. zebr. 11.10.56 r.	<i>Daucus carota</i>	c	++++	++++	—	++++	++++	—	—	+	—
		R'f	100	81	—	66	50	—	—	31	—
	<i>Solanum lycopersicum</i>	c	+++	++++	—	++++	++++	+	—	+	—
		R'f	100	80	—	57	56	35	—	27	—
	<i>Beta vulgaris</i>	c	++	+++	—	++	++	+	—	+	—
		R'f	100	68	—	46	38	28	—	21	—
	<i>Populus nigra</i>	c	++	++	—	+	++	—	—	+	+
		R'f	100	61	—	45	37	—	—	15	10

k — karoten, fa — feofityna a, fb — feofityna b, l — luteol, w — wioletksantol, n₁, n₂ — niezidentyfikowane (feoforbidy?), chb — chlorofil b, cha chlorofil a.

Wyniki badań przeprowadzonych na *Hyoscyamus niger*, *Solanum lycopersicum* i *Solanum tuberosum* przedstawione są w tabeli 2.

Próby porównywania ilości barwników u tej samej rośliny (*Solanum lycopersicum*) na przestrzeni dłuższego okresu czasu nie dały zadowalających rezultatów. Wahania w stężeniu barwników były minimalne i nieregularne, a metoda zbyt mało dokładna do wyraźnego uchwycenia zmian.

DYSKUSJA

Ogromna labilność barwników plastydowych (Schramm 1957) stwarza szczególnie duże trudności w badaniach porównawczych. Do seryjnych analiz porównawczych konieczne jest stosowanie barwników konserwowanych, przy czym, jak wykazały doświadczenia, obraz chromatograficz-

T a b e l a 2

Stężenie (c) i wartość R^f plam barwników chloroplastów z liści pochodzących z różnych pięter rośliny. Warunki i oznaczenia jak w tabeli 1

Piętro		k	fa	fb	1	w	n ₁	n ₂	chb	cha
--------	--	---	----	----	---	---	----------------	----------------	-----	-----

A. *Hyoscyamus niger*. Materiał zebrany 27.9.1956.

górne	c	+++	+++	—	+++	+++	+	—	+	—
	R^f	100	93	—	76	68	56	—	41	—
środkowe	c	++	++	—	++	++	—	—	+	+
	R^f	100	92	—	68	60	—	—	26	20
dolne	c	+	+	—	+	+	—	—	+	+
	R^f	100	88	—	62	58	—	—	24	16

B. *Solanum lycopersicum*. Materiał zebrany 27.9.1956.

górne	c	+++	+	—	+++	+++	—	—	—	—
	R^f	100	93	—	72	66	—	—	—	—
środkowe	c	+	+++	—	++	+++	—	—	—	—
	R^f	100	95	—	71	62	—	—	—	—
dolne	c	++	++	—	++	++	—	—	—	—
	R^f	100	89	—	70	60	—	—	—	—

C. *Solanum tuberosum*. Materiał zebrany 27.9.1956.

górne	c	++	++	—	++	++	+	—	+	+
	R^f	100	85	—	61	53	35	—	22	17
środkowe	c	+++	+++	—	+++	+++	+	—	+	+
	R^f	100	89	—	66	60	39	—	32	21
dolne	c	++	+	—	++	++	—	—	+	+
	R^f	100	78	—	60	52	—	—	21	13

ny zależy nie tylko od rozpuszczalnika ekstrahującego, ale również i konserwującego. Obraz chromatograficzny tzw. „surowego chlorofilu“ (barwników wyciśniętych wprost z tkanki liściowej) różni się dosyć znacznie od obrazu barwników konserwowanych; jest rzeczą oczywistą, że w toku preparatyki barwników pod wpływem czynników zewnętrznych zachodzą w nich dosyć daleko idące zmiany (przede wszystkim rozkład chlorofilów), a uniknięcie ich jest tak kłopotliwe (H a g e r 1957, S c h r a m m 1957), że praktycznie uniemożliwia równoczesne prowadzenie większej ilości prób. Co więcej — zmiany te w wielu rozpuszczalnikach zachodzą stopniowo przez dłuższy czas (J o h n s t o n, W a t s o n 1956). Skutkiem

tego należy w badaniach porównawczych barwników chloroplastów metodą chromatograficzną pogodzić się z trudnościami uniknięcia zachodzących zmian, natomiast główny nacisk należy położyć na stałość warunków preparatyki i pomiarów, tak aby i zmiany zachodzące w tych warunkach w różnych preparatach były również mniej więcej takie same. Zasadniczą sprawą jest tu dobór odpowiedniego rozpuszczalnika konserwującego, w którym nie następowałyby już dalsze zmiany barwników. Warunkowi temu nie odpowiadają zupełnie rozpuszczalniki stosowane zwykle do ekstrakcji barwników (aceton, niższe alkohole), w których zachodzą szczególnie długo zmiany chlorofilów (Johnson, Watson 1956). Według naszych obserwacji stosunkowo najlepszym do konserwacji barwników okazał się chlorobenzen.

W toku naszych doświadczeń nie obserwowaliśmy ujemnego wpływu światła i tlenu powietrza na sam proces rozwijania chromatogramu. Światło bez wątpienia działa w pewnym — zresztą różnym stopniu na barwniki plastydowe, jednak uchwytność tych zmian w krótkim czasie trwania rozwijania chromatogramu leży poza zasięgiem dokładności stosowanych dotychczas metod. Podobnie nie udało nam się zaobserwować uchwytne go wpływu tlenu powietrza na obraz chromatograficzny w toku jego powstawania w wilgotnej atmosferze par rozwijacza w kamerze. Bez wątpienia największy i trudny do uniknięcia wpływ wywiera tlen już w czasie ekstrakcji barwników; zupełnie wyraźne i szybkie jest również działanie tlenu na rozdzielone barwniki po wysuszeniu chromatogramu, szczególnie na luteol i chlorofil *a*. W tym świetle wydaje się nam, że zalecane przez wielu badaczy chronienie barwników przed światłem w toku preparatyki i rozwijania chromatogramu oraz wykluczenie tlenu (bardzo zresztą kłopotliwe i niełatwe) nie jest konieczne w prostych badaniach porównawczych, zwłaszcza wobec ciągłego braku odpowiednich metod ilościowych. Nie obserwowaliśmy również wpływu suszenia bibuły na obraz chromatogramu.

W doświadczeniach naszych zaobserwowaliśmy dosyć wyraźną zależność wielkości przesunięcia się poszczególnych barwników (R'_f) od ich stężenia. Odnosi się to przede wszystkim do feofityn i ksantofili; karoteny niezależnie od stężenia wędrowały zawsze z frontem rozpuszczalnika, natomiast chlorofile, które wskutek zaszyłych w toku preparatyki zmian występowały zawsze w małych ilościach, wykazywały bardzo dużą i wyraźną zależność własnego R'_f od stężenia innych barwników w roztworze: im większe było sumaryczne stężenie barwników w roztworze, tym wyżej przesunęły się plamy chlorofili. Zależność wartości R_f chlorofili i ich pochodnych od stężenia była już obserwowana przez różnych badaczy

(A s a m i 1952, C h i b a, N o g u c h i 1954, L e f o r t, S i g n o l 1955), którzy wyciągali stąd wnioski o adsorpcyjnym charakterze chromatograficznego rozdziału tych barwników; o ile chodzi o karotenoidy, jedyny badający dokładniej to zagadnienie A s a m i (1952) nie znalazł tej zależności.

W świetle naszych obserwacji i zgodnie z doświadczeniem innych autorów (L e f o r t, S i g n o l 1955) wydaje się, że dla otrzymania dobrego rozdziału chromatograficznego i reproduktywnych wyników powinno się stosować nieduże stężenia barwników (rzędu kilku μg). Przybliżone wnioski ilościowe można wyciągnąć z wartości R_f oraz wielkości i natężenia barwy plam.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono próby zastosowania jednokierunkowej chromatografii bibułowej do oznaczania barwników chloroplastów i zmian zachodzących w nich u 21 gatunków roślin.

Opracowano i przedyskutowano zagadnienie ekstrakcji i konserwacji barwników do badań porównawczych. Przedyskutowano niektóre zagadnienia metodyczne dotyczące preparatyki oraz chromatografii barwników chloroplastów (wpływ światła, tlenu, stężenia roztworu).

Zakład Fizjologii Roślin
Uniwersytetu im. A. Mickiewicza
w Poznaniu

(Wpłynęło dn. 10.XI.1957 r.)

SUMMARY

Trials have been made to determine the applicability of paper chromatography to the separation of chloroplast pigments of several species of plants and to a study of the changes in these pigments.

Chloroplast pigments were extracted from *Verbascum thapsiforme* in a solution of acetone + ethanol (2:1 vol.) and then separated by a variety of chromatographic techniques with a view to selecting the best available method. As a result a modification of Bauer's solvent containing benzine + petrol ether + acetone (100:25:15 vol.) was used with one dimensional ascending paper chromatography in subsequent investigations. Using Whatman No. 1 paper the following pigments were separated (given in order from the solvent front): carotenes, pheophytin α , pheophytin b , luteol, violaxanthol, two unidentified (pheophorbides), and

chlorophylls *b* and *a*. The location of the pigment on the chromatogram was defined by its *R_f* (i. e. measured to the leading edge of the spot rather than to its „centre of gravity“).

Because of the necessity of immediate comparative analysis of pigment extracts prepared at different times, the behaviour of chloroplast pigments in the different preserving solvents was examined and chlorobenzene was selected as the best.

As a check on the changes which the pigments might have undergone in the above preparation, chromatographic separations of fresh leaf tissue pigments („crude chlorophyll“) were carried out. Compared with the chromatograms of the extracted pigments the crude chlorophyll had strong spots of chlorophylls, no spots of pheophytins and pheophorbides and a strong spot of chlorophyllides at the origin; there were also certain differences in the position of the xanthophyll spots.

Investigations were made into the preparation of the pigment solutions and development of the chromatogram (e. g. the influence of light and oxygen and the preparation of the paper). The chromatographic separation of pigments is closely related to the concentration of the pigments: the *R_f* value increases with the increase in concentration and therefore care must be taken when using this value to identify pigments. On the other hand the *R_f* value will serve as an approximate quantitative measure of the pigment in addition to the area and colour intensity of the spots.

Using the above method the chloroplast pigments of 21 plant species were examined qualitatively and semiquantitatively. The same pigments were detected in all the plants but they were present in very different (and sometimes quite small) amounts. The leaves borne on the lower nodes of the plants (*Hyoscyamus* and *Solanum* sp.) were found to contain the smallest amounts of the pigments. Some differences were observed in the quantitative relations between particular pigments in the different nodes.

Comparative semiquantitative determination of the pigments in several intervals of the time did not give satisfactory results.

LITERATURA

- Asami M.: Bot. Magaz. (Tokyo) 1952, **65**, 771.
Bauer L.: Naturwissensch. 1952, **39**, 88.
Chiba J., Noguchi I.: Cytologia, 1954, **19**, 41.
Evans R. A., Parr W. H., Evans W. C.: Nature (London) 1949, **164**, 674.
Hager A.: Planta 1957 **48**, (5), 592.
Johnston L. G., Watson W. F.: J. Chem. Soc. 1956, **5**, 1203.

- Lefort M., Signol M.: *Rev. Gen. Bot.* 1955, **62**, 683.
- Lind F., Lane H. C., Gleason L. S.: *Plant Physiol.* 1953, **28**, 325.
- Sapożnikow D. J., Bronsztein J. A., Krasowskaja T. A.: *Biochimia* 1955, **20**, 286.
- Schramm R. W.: *Postępy Biochemii* 1957 (3—4), 251.
- Strain H. H.: *J. Physic. Chem.* 1953, **57**, 638.