Porównawcza chromatografia bibułowa kwasów organicznych występujących w korzeniach spichrzowych roślin uprawnych z rodziny baldaszkowatych (*Umbelliferae*)

A comparative paper chromatography of organic acids in storage roots of some cultivable Umbelliferae plants

R. W. SCHRAMM

Kwasy organiczne odgrywają w metabolizmie dużą i wielostronną rolę, wiążąc ze sobą podstawowe jego działy. Rola ich przejawia się wyraźnie zwłaszcza w organizmach roślinnych, gdzie spotykamy bardzo dużą różnorodność jakościową i ilościową w występowaniu poszczególnych kwasów oraz wysoką niejednokrotnie ich sumaryczną zawartość w tkankach (Thimann, Bonner 1950; Davies 1959). W szczególności ważna i złożona jest rola kwasów organicznych w korzeniach, gdzie pośredniczą w pobieraniu i przyswajaniu związków nieorganicznych (Kursanow 1954, 1957). Stąd też coraz częściej spotykamy ostatnio prace nad kwasami organicznymi w korzeniach roślin, przede wszystkim uprawnych, jak marchwi (Lugg, Overell 1948; Overell 1952; Bryant, Overell 1953), buraka cukrowego (Vavrch 1954; Gołowin i in. 1955), dyni (Kursanow, Kulajewa 1957, 1958) i bobiku (Coic, Lesaint 1960).

Rośliny z rodziny baldaszkowatych (*Umbelliferae*), których jadalne korzenie spichrzowe stanowią obok niektórych komosowatych (*Chenopodiaceae*) i krzyżowych (*Cruciferae*) zasadnicze tego typu warzywa, są jeszcze stosunkowo mało zbadane pod względem ilościowej zawartości i jakościowego składu kwasów organicznych. Poza występującymi normalnie we wszystkich tkankach roślinnych takimi kwasami, jak jabłkowy, cytrynowy, bursztynowy, fumarowy, szczawiowy i winowy oraz paru rzadkimi, specyficznymi dla pojedynczych gatunków (Wehmer i in. 1933), znaleziono w korzeniach marchwi z pospolitszych jeszcze kwas mlekowy (Schneider 1941), izocytrynowy (Bryant, Overell 1953) i prawdopodobnie glikolowy (Overell 1952).

Celem niniejszej pracy miało być porównawcze zbadanie na zawartość kwasów organicznych kilku najpospolitszych korzeni jadalnych (jarzyn) z rodziny baldaszkowatych (*Umbelliferae*) przy pomocy chromatografii bibułowej.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiał

Do analiz używano wyciągów z następujących warzyw znajdujących się normalnie w handlu: marchew (*Daucus carota*), pietruszka (*Petroselinum sativum*) i seler (*Apium graveolens*) — wszystkie odmiany bliżej nie określone. Badania przeprowadzono w dwóch seriach: w pierwszej analizowano wyciągi z młodych korzeni zebranych w początku lipca, w drugiej — wyciągi z korzeni starych, już po zakończeniu okresu wegetacyjnego. Porównawczo przeprowadzono również chromatografię wyciągu z tkanki marchwi hodowanej *in vitro* na pożywce Hellera (1952) z dodatkiem 3% sacharozy i 1% agaru, biorąc do analizy czwarte przeszczepienie po wyszczepieniu pierwotnym.

Wzorce kwasów organicznych były preparatami firm Sigma Chemical Company, St. Louis USA, oraz California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles USA. Odczynniki do analiz były pochodzenia krajowego.

Przygotowanie ekstraktów tkankowych

Kwasy ekstrahowano z tkanek roślinnych etanolem na zimno według uproszczonej metody opartej na pracy Bryanta i Overella (1953). W tym celu 6 g świeżej tkanki (3 g w przypadku marchwi hodowanej *in vitro*) oczyszczonej, opłukanej w wodzie destylowanej i osuszonej na bibule, rozcierano z piaskiem kwarcowym w moździerzu z równą ilością 96% etanolu. Po dokładnym zhomogenizowaniu tkanki zadawano ją 40 ml 80% etanolu i macerowano przez 15 minut, często mieszając, a następnie odwirowywano. Supernatant przenoszono do parowniczk i odparowywano w suszarce w temperaturze 60°C, pozostałość podejmowano wodą i ponownie odwirowywano. Tak przygotowany ekstrakt przepuszczano przez silnie kwaśny kationit fenolosulfonowy w formie wodowej, o pojemności 2 mval/g suchej masy wobec NH_4^+ , wyprodukowany w Zakładzie Chemii Ogólnej UAM, oraz anionit nieznanego pochodzenia w formie węglanowej, średnio zasadowy, o pojemności 5 mval/g suchej masy wobec SO_4^{2-} . Zatrzymane na anionicie kwasy wymywano 2N węglanem amonu, wyciek odparowywano do sucha w suszarce w tempera-

turze 70°C i pozostałość podejmowano 1 ml wody (0,5 ml w przypadku marchwi hodowanej *in vitro*).

Chromatografia bibułowa

Analizy przeprowadzano drogą chromatografii bibułowej wstępującej w cylindrach (słojach) szklanych na bibule Whatmana Nr 1, metodą opisaną uprzednio (Schramm 1960). Do rozwijania chromatogramów używano alkalicznego rozpuszczalnika Nr 4 (Cheftel i in. 1952) o składzie etanol : amoniak : woda — 75 : 5 : 20 (Ch), eterowego rozpuszczalnika kwaśnego Sołdatienkowa i Mazurowej (1959) eter etylowy : kwas mrówkowy : woda — 18 : 5 : 9 faza eterowa (SM), oraz rozpuszczalników własnych: kwaśnego SchA — n-butanol : octan etylu : woda — 1 : 1 : 1 i alkalicznego SchB₂ — etanol : bufor amonowy (1,5 N węglan amonu w 3,0 N amoniaku) 3 : 1 (Schramm 1960), stosując dwugodzinne kondycjonowanie bibuły jedynie w przypadku rozpuszczalnika eterowego (SM). Ekstrakty z tkanek nakraplano w ilości około 10 µl w odległości 3,3 cm od dolnego brzegu bibuły. Rozwinięte i wysuszone chromatogramy wywoływano 0,04% zalkalizowanym roztworem purpury bromokrezolowej w etanolu.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki analiz chromatograficznych przedstawione są na ryc. 1 (młode tkanki) i ryc. 2 (tkanki stare, po zakończeniu okresu wegetacyjnego).

W badanych młodych korzeniach spichrzowych z rodziny baldaszkowatych (ryc. 1) z kwasów uważanych za typowe dla tkanek tego rodzaju występują w nieco większych ilościach jedynie kwas winowy i jabłkowy. Kwas cytrynowy bądź izocytrynowy (Bryant, Overell 1953) pojawia się w ilościach znacznie mniejszych, a kwasy bursztynowy i fumarowy w ilościach śladowych. W dużych ilościach występują natomiast nie zidentyfikowane kwasy, których R_f w rozpuszczalnikach kwaśnych jest bardzo niskie, a w alkalicznych waha się między 0,10 a 0,32.

W tkankach korzeni spichrzowych dojrzałych (ryc. 2) ilościowo dominuje zdecydowanie kwas jabłkowy, w szczególności u marchwi i selera. W sporej ilości pojawiają się również nie występujące w ogóle w młodych tkankach kwasy o wysokich wartościach R_f w rozpuszczalnikach alkalicznych (0,60—0,70); w rozpuszczalnikach kwaśnych lokalizują się one blisko linii startowej. W ekstrakcie ze starych korzeni pietruszki występuje ponadto kwas, którego wartość R_f w rozpuszczalnikach kwaśnych odpowiada kwasowi malonowemu; ustalenie położenia jego plamy na chromatogramie w rozpuszczalnikach alkalicznych jest trudniejsze.

Ryc. 1. Chromatogramy kwasów organicznych z młodych korzeni spichrzowych marchwi (M), pietruszki (P) i selera (S) oraz z tkanki marchwi hodowanej *in vitro* (Mv). Kwasy organiczne używane jako wzorce: 1 — winowy; 2 — cytrynowy; 3 — jabłkowy; 4 — szczawiowy; 5 — bursztynowy; 6 — fumarowy; 7 — glukuronowy; 8 — chinowy; 9 — szikimowy; 10 — glikolowy; 11 — gallusowy; 12 — malonowy; 13 — akonitowy; 14 — glioksyłowy. Rozpuszczalniki: SM — eter etylowy: kwas mrówkowy: woda, 18:5:9 (faza eterowa); SchA — butanol: octan etylu: woda, 1:1:1; SchB₂ — etanol: bufor amonowy 3:1; Ch — etanol: amoniak: woda, 75:5:20. Bibuła Whatman Nr 1, chromatografia wstępująca

Chromatograms of organic acids from young storage roots of carrot (M), parsley (P), celery (S), and from carrot tissue cultivated *in vitro* (Mv). The samples of organic acids: 1 — tartaric; 2 — citric; 3 — malic; 4 — oxalic; 5 — succinic; 6 — fumaric; 7 — glucuronic; 8 — quinic; 9 — shikimic; 10 — glycollic; 11 — gallic; 12 — malonic; 13 — aconitic; 14 — glyoxylic. Solvents: SM — ethylic ether: formic acid: water, 18:5:9 (ether phase); SchA — butanol: ethyl acetate: water, 1:1:1; SchB₂ — ethanol: ammonia buffer, 3:1; Ch — ethanol: ammonia: water, 7:5:20.

Whatman No. 1 paper, ascending chromatography

Ryc. 2. Chromatogramy kwasów organicznych ze starych korzeni spichrzowych marchwi (M), pietruszki (P) i selera (S) oraz z tkanki marchwi hodowanej *in vitro* (Mv). Oznaczenia jak na rys. 1

Chromatograms of organic acids from old storage roots of carrot (M), parsley (P), celery (S), and from carrot tissue cultivated *in vitro* (Mv). Explanation as in Fig. 1.

Tkanka marchwi hodowanej *in vitro* zawiera małe ilości kwasów winowego, cytrynowego i jabłkowego, ślady bursztynowego i fumarowego oraz pewne ilości kwasów o niskich wartościach R_f we wszystkich rozpuszczalnikach.

DYSKUSJA WYNIKÓW

W porównaniu z innymi roślinami uprawnymi, badanymi na zawartość kwasów organicznych w korzeniach przez różnych autorów, baldaszkowate nie stanowią jakiegś wyraźnie wyodrębniającej się grupy. Badania prowadzone w naszej pracowni przy pomocy chromatografii bibułowej z zastosowaniem rozpuszczalnika Ch (Kielńska, nie publikowane) wskazują, że sumaryczny obraz chromatograficzny wyciągów z korzeni roślin zielnych dwuliściennych jest, jeśli chodzi o kwasy organiczne, na ogół podobny. Natomiast nawet w obrębie tego samego gatunku, np. u marchwi, mogą wystąpić uchwytnie różnice w ilościowym składzie kwasów w zależności od odmiany (Bryant, Overell 1953), a być może także od warunków hodowli.

W niniejszej pracy wystąpiła bardzo wyraźnie zależność składu ilościowego kwasów, a częściowo nawet i jakościowego, od wieku rośliny; różnice w obrazie chromatograficznym ekstraktów z tkanek młodych i starych tego samego gatunku są znacznie większe niż różnice pomiędzy różnymi gatunkami, lecz w tym samym wieku.

Nie wszystkie podawane w literaturze kwasy udało się zidentyfikować na chromatogramach. Kwasy mlekowy i szczawiowy są w ogóle dość trudne do wykrycia drogą chromatografii bibułowej, tym niemniej większe ilości kwasu szczawowego powinny wystąpić wyraźnie przynajmniej w rozpuszczalniku SchB₂. Nie znaleziono również wykrywalnych ilości kwasu glikolowego. Wprawdzie w ekstrakcie z młodych korzeni marchwi pojawia się w rozpuszczalniku SchB₂ plama odpowiadająca wartości R_f kwasowi glikolowemu, jednak nie występuje ona na chromatogramach rozwijanych w innych rozpuszczalnikach.

Występujące w dużych ilościach kwaśne związki o niskich wartościach R_f w rozpuszczalnikach kwaśnych, nie były jeszcze dotychczas identyfikowane. Kursanow i Kulajewa (1957) tłumaczą występowanie podobnych plam na chromatogramach ekstraktów z korzeni dyni obecnością sporych ilości kwasów uronowych. Być może, że kwasy te występują również w korzeniach baldaszkowatych; w każdym razie nie jest to jednak na pewno kwas glukuronowy, który w rozpuszczalnikach alkalicznych ma nieco wyższe R_f (0,38—0,40) niż związki występujące

w analizowanym materiale (0,10—0,32). Tego typu kwasy występują przede wszystkim w młodych korzeniach; w starych znajdują się inne kwasy, także jeszcze nie zidentyfikowane, prawdopodobnie również o budowie pierścieniowej, o wysokich wartościach R_f w rozpuszczalnikach alkalicznych. Nie jest wykluczone, że i w starych korzeniach występują w pewnej ilości te same kwasy cykliczne co i w młodych; ich plamy w rozpuszczalnikach alkalicznych mogą być pokryte rozległą plamą kwasu jabłkowego (R_f 0,26 — 0,34). Prawdopodobne jest również występowanie pewnych ilości kwasów chinowego i szikimowego.

Pomiędzy sobą wyciągi z korzeni trzech badanych rodzajów różnią się dosyć znacznie zarówno co do jakościowego, jak i ilościowego składu występujących w nich kwasów. Odnosi się to szczególnie do pietruszki.

Różnice pomiędzy młodymi a dojrzałymi korzeniami spichrzowymi w rodzinie *Umbelliferae* wynikają prawdopodobnie z różnic funkcji fizjologicznych. W młodym wieku rośliny korzeń pełni w znacznej mierze funkcje organu metabolicznego w stosunku do całego organizmu; z chwilą zakończenia okresu wegetacyjnego natomiast staje się głównie organem spichrzowym dla wtórnego, generatywnego pędu.

Charakterystyczna dla wszystkich dojrzałych korzeni jest wysoka zawartość kwasu jabłkowego, co stwierdzili już Bryant i Overell (1953) dla marchwi. Pod tym względem dojrzałe korzenie spichrzowe baldaszkowatych są bardzo podobne do niedojrzałych nasion, w których również ilościowo przeważa kwas jabłkowy (Dupéron 1958), podczas gdy w nasionach dojrzałych, o małej zawartości wody, dominuje kwas cytrynowy.

Tkanka marchwi hodowana *in vitro* ma stosunkowo prosty i ubogi zestaw kwasów organicznych i różni się pod tym względem zdecydowanie od tkanek korzeni spichrzowych z rodziny *Umbelliferae*, nawet od macierzystej tkanki korzenia marchwi. O ile chodzi o rodzaj i ilościowe stosunki kwasów organicznych, zbliża się typem znacznie bardziej do młodych korzeni marchwi niż do starych, aczkolwiek wyszczerpienie pierwotne było przeprowadzone w zimie ze starego materiału wyjściowego. Świadczy to o przestawieniu funkcjonowania tkanki hodowanej *in vitro* głównie na czynności metaboliczne.

Chromatografia bibułowa kwasów organicznych, dająca dobre wyniki w przypadku czystych preparatów chemicznych (Carles i in. 1958; Schramm 1960), okazuje się metodą niewystarczającą w przypadku ekstraktów tkankowych, charakteryzujących się dużą różnorodnością kwasów organicznych i bardzo nierównym ich stężeniem. Oczyszczanie wyciągu na kolumnach jonitowych nie uwalnia go od różnego typu składników o charakterze kwaśnym, które powodują niedokładność rozdzielania na bibule, nieostrość występujących plam, powstawanie smug itp. oraz

trudności w identyfikacji. Nawet przy równoległym użyciu kilku rozpuszczalników chromatografia bibułowa w czystej postaci może dawać dobre wyniki jedynie w przypadku wyciągów ubogich w składniki kwaśne, jak na przykład tkanki hodowane *in vitro*, natomiast w przypadku wyciągów bardziej złożonych konieczne jest zastosowanie rechromatografii bądź też rozdzielu składników na kolumnach anionitowych lub z żelu krzemionkowego z zastosowaniem wzrastającego stężenia mieszaniny eluującej, oraz identyfikacja chemiczna poszczególnych składników.

Dziękuję Sigma Chemical Company i California Foundation for Biochemical Research za bezpłatne próbki kwasów organicznych.

STRESZCZENIE

Przy pomocy chromatografii bibułowej oznaczano kwasy organiczne w oczyszczonych wyciągach z młodych tkanek i starych korzeni marchwi, pietruszki i selera oraz z tkanki marchwi hodowanej *in vitro*. Wszystkie trzy badane rodzaje różnią się między sobą dość znacznie zarówno co do jakościowego, jak i ilościowego składu kwasów. Duże różnice występują między młodymi a starymi korzeniami tych samych gatunków. We wszystkich młodych korzeniach znaleziono kwasy winowy, jabłkowy, cytrynowy lub izocytrynowy oraz ślady bursztynowego i fumarowego. Obok nich występują prawdopodobnie kwasy chinowy i szikimowy oraz kwasy uronowe, a także szereg bliżej nie zidentyfikowanych. Stare korzenie są w ogóle bogatsze w kwasy organiczne; w szczególności występują w nich duże ilości kwasu jabłkowego, zwłaszcza u marchwi i selera oraz nie zidentyfikowane kwasy cykliczne o bardzo małych wartościach R_f w rozpuszczalnikach kwaśnych i dużych w rozpuszczalnikach alkalicznych. Tkanka marchwi hodowana *in vitro* ma znacznie prostszy zestaw kwasów niż tkanka badanych korzeni, zwłaszcza starych. Szczegółowe badania kwasów organicznych w tkankach roślinnych wymagają zastosowania dokładniejszych metod analizy.

Zakład Biochemii

Katedra Fizjologii Roślin

Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Wpłynęło dn. 28.XII.1960 r.

SUMMARY

Organic acids in purified extracts from young and old roots of carrot, parsley, celery, and of carrot tissue cultivated *in vitro* have been investigated by means of paper chromatography technique. The three analysed species of plants differ from each other in qualitative as well as in quantitative content of acids. There are remarkable differences between young and old roots of the same species. In young tissues of all species tartaric, malic, citric or isocitric, as well as traces of succinic and fumaric acids have been found. The possible presence of quinic and shikimic

acids as well as uronic acids is suggested. The old roots are in general much richer in organic acids than the young ones; a large quantity of malic acid is present especially in carrot and celery; some unidentified cyclic acids with a very small R_f value in acid solvents and a rather big one in basic solvents have also been found. The carrot tissue cultivated *in vitro* contains less acids than the analysed root tissues, especially the old ones. Detailed investigations of organic acid contents in plant tissues require more accurate methods of analysis.

Author is very indebted to Sigma Chemical Company and California Foundation for Biochemical Research for the samples of organic acids.

LITERATURA

- Bryant F., Overell B. T., 1953, Bioch. Biophys. Acta 10: 471.
 Carles J., Schneider A., Lacoste A. M., 1958, Bull. Soc. Chim. Biol. 40: 221.
 Chefftel A. I., Munier R., Macheboeuf M., 1952, Bull. Soc. Chim. Biol. 34: 380.
 Coic Y., Lesaint C., 1960, C. r. Acad. Sci. 250: 914; Ann. Physiol. Vég. 2: 73.
 Davies D. D., 1959, Biol. Revs 34: 407.
 Dupéron R., 1958, C. r. Acad. Sci. 247: 342.
 Gołowin P. W., Rominskij R., Suszkowa A. S., 1955, Ukr. chim. žurnal 21: 86.
 Heller R., 1952, Thèse, Paris, 233 pp.
 Kielińska J., nie publikowane.
 Kursanow A. L., 1954, Woprosy botaniki, 1: 131.
 Kursanow A. L., 1957, a, Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol. 689.
 Kursanow A. L., 1957, Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol. 689; Unesco Intern. Conf. Radioisotop. Sci. Res., Paris, NS/RIC/128.
 Kursanow A. L., Kulajewa O. N., 1957, Fizjol. rast. 4: 322.
 Kursanow A. L., Kulajewa O. N., 1958, Agrochimica 3: 29.
 Lugg J. W. H., Overell B. T., 1948, Austral. J. Sci. Res. A. 1: 98.
 Overell B. T., 1952, Austral. J. Sci. 15: 28.
 Schneider A., 1941 Planta 32: 234.
 Schramm R. W., 1960, Chemia Anal. 5: 1055.
 Soldatienkow S. W., Mazurowa T. A., 1959, Fizjol. rast. 6: 112.
 Thiemann K. V., Bonner W. D., 1950, Ann. Rev. Plant Physiol. 1: 75.
 Vavruč I., 1954, Chem. listy 48, 442; Sb. Českosl. chim. rabot 19: 817.
 Wehmer C., Thies W., Hadders M., 1932, w G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, 2 Bd, 1 Teil, 496, J. Springer, Wien.