Chromatografia bibułowa kwasów organicznych w toku rozwoju bobiku (*Vicia faba* L. *minor*)

*Paper chromatography of organic acids in growing horse bean
(Vicia faba L. minor)*

R. W. SCHRAMM, M. PIĄTKOWSKA

Rola, jaką pełnią kwasy organiczne w roślinach, przede wszystkim w toku przemian, sprawia, że badania nad nimi rozwijają się ostatnio coraz intensywniej. W szczególności dobrym materiałem okazały się rośliny strączkowe z rodziny motylkowatych (*Papilionaceae*), które w porównaniu z innymi roślinami uprawnymi wykazują wysoką zawartość kwasów organicznych zarówno w nasionach, jak i w organach wegetatywnych (Sołdatienkow, Mazurowa 1956a; Dupéron 1958). Spośród nich fasola, a zwłaszcza groch, już od dawna są klasycznym materiałem w fizjologii i biochemii roślin, ostatnio zaś zaczęto przeprowadzać badania nad bobikiem.

Prace nad zawartością i przemianami kwasów organicznych u bobiku, prowadzone głównie na uniwersytecie w Leningradzie, liczą zaledwie kilka lat i tymczasem ograniczają się do najbardziej uchwytnych zmian. Czesnokow (1954) stwierdził w liściach bobiku, podobnie jak u fasoli, duże ilości kwasu cytrynowego, sięgające nawet kilkunastu procent suchej masy. Sołdatienkow i Mazurowa (1956a, b) znaleźli w nich mniejszą zawartość kwasu cytrynowego, w granicach 4—5%, co stanowi około 40% wszystkich kwasów występujących w liściach; tyle samo mniej więcej przypada na kwas jabłkowy. W suchych nasionach zawartość kwasu cytrynowego jest według tych samych autorów znacznie mniejsza i wynosi niespełna 0,5%, co i tak, podobnie jak i u innych motylkowatych, stanowi ponad 50% wszystkich kwasów; kwas jabłkowy natomiast występuje w ilości dziesięciokrotnie mniejszej, a więc niespełna 0,05%. W czasie kiełkowania nasion stosunki te ulegają dużym zmianom i kwas cytrynowy przekształca się częściowo w jabłkowy (Czesnokow i in. 1955; Sołdatienkow, Mazurowa 1956a). W orga-

nach zielonych rośliny bezwzględna ilość kwasów organicznych wzrasta w ciągu dwóch tygodni od wykiełkowania około dwukrotnie w stosunku do nasion, przy czym wzrost ten przypada wyłącznie na kwas jabłkowy, podczas gdy ilość wszystkich innych nieco maleje (Sołdatienkow, Mazurowa 1956a). Obok tych dwóch kwasów, zdecydowanie przeważających ilościowo, znaleziono w bobiku jeszcze drobne ilości kwasów lotnych, kwasu szczawiowego oraz kwasy powstałe z pierwotnego utleniania pentoz i heksoz (Sołdatienkow, Mazurowa 1956b).

W naszej pracy chcieliśmy prześledzić, przy pomocy chromatografii bibułowej, zachowanie się kwasów organicznych w toku rozwoju bobiku, zwracając uwagę, poza organami zielonymi, również na nie badany dotychczas system korzeniowy, który w metabolizmie rośliny odgrywa dużą rolę (Kursanow 1954, 1957).

Już po zakończeniu naszych zasadniczych badań ukazała się praca Coic i Lesaint (1960) na podobny temat. Autorzy ci przy pomocy chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym i anionicie Dowex I przeprowadzili analizę jakościową i ilościową kwasów organicznych w liściach, korzeniach i brodawkach bobiku z jednorazowego zbioru, w zależności od nawożenia potasem. Wyniki ich doświadczeń są porównane z naszymi w dyskusji.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiał i metody

Materiałem doświadczalnym był bobik (*Vicia faba* L. *minor*), odmiana nadwiślańska. Dojrzałe nasiona, o sile kiełkowania ponad 90%, moczono przez 24 godziny w wodzie destylowanej, po czym wysadzano do wazonów z ziemią kompostową o pH 7,2. Hodowlę prowadzono w warunkach średniej wilgotności na oszklonej werandzie w temperaturze wahającej się pomiędzy 18°C w nocy a 28°C w dzień.

Nasiona kiełkowały przeciętnie 3—4 dnia, licząc jako pierwszy dzień namoczenia, 5—6 dnia następowało różnicowanie pędu i korzenia, około 7 dnia wybijanie się pędu na powierzchnię gleby, po czym od 8 dnia kolejne pojawianie się liści. Pełne kwitnienie miało miejsce około 70 dnia hodowli.

Do analizy brano nasiona suche, nasiona moczone 24, 36 i 48 godzin, nasiona kiełkujące w glebie po uprzednim namoczeniu przez 24 godzin, a następnie rozwijające się rośliny drugiego, czwartego, szóstego, ósmego, jedenastego, piętnastego i dwudziestego dnia od wysadzenia, i dalej co 10 dni aż do okresu kwitnienia. W pierwszych stadiach rozwoju analizow-

wano nasiona jako całość, począwszy od szóstego dnia osobno liścienie, korzenie, łodygi i liście, które w późniejszym okresie dzielono na liście stare i młodsze oraz najmłodsze, dopiero rozwijające się, które brano do analizy razem ze stożkami wzrostu, a wreszcie kwiaty.

Kwasy ekstrahowano z tkanek roślinnych etanolem na zimno wychodząc z 5 g świeżej masy i oczyszczano na kolumnach z wymiennicami jonowymi: kationowym i anionowym w sposób podany w pracy Schramma (1961). Odparowane do sucha wolne kwasy organiczne podejmowano 250 μ l wody. Do oddzielania kwasów jednokarboksylowych od dwu- i trójkarboksylowych i ich analizy rechromatograficznej brano wyciąg z całych piętnastodniowych roślin.

Wzorce kwasów organicznych były przeważnie preparatami firm amerykańskich (Sigma Chemical Company, St. Louis; California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles), a częściowo niemieckich (Schering-Kahlbaum, Berlin; E. Merck, Darmstadt) i szwajcarskich (Fluka). Odczynniki do analiz były pochodzenia krajowego.

Chromatografia bibułowa

Analizy przeprowadzano drogą chromatografii bibułowej używając bibuły Whatman Nr 1. Wyciągi z nasion suchych, moczonych oraz kiełkujących (do czwartego dnia włącznie) nakraplano na bibułę w ilościach 10, 14 i 18 μ l; począwszy od szóstego dnia, gdy zawartość kwasów w materiale roślinnym wyraźnie wzrosła, nakraplanie zmniejszono do 6, 10 i 14 μ l. W badaniach rechromatograficznych наносzono znacznie większe ilości eluatu, którego stężenie nie było znane. Rozwinięte i wysuszone chromatogramy wywoływano 0,04% zalkalizowanym roztworem purpury bromokrezolowej w etanolu.

Stosowano normalną technikę wstępującą na zwiniętych cylindrycznie szerokich paskach bibuły (Williams, Kirby 1948; Schramm 1960) oraz technikę wstępującą paskowo-krażkową Matthiаса (1954). Do rozwijania chromatogramów z ekstraktów używano jako podstawowych rozpuszczalników własnych (Schramm 1960): kwaśnego SchA — n-butanol: octan etylu: kwas mrówkowy, 1:1:1, i alkalicznego SchB₂ — etanol: bufor amonowy, 3:1. Do rozdzielania kwasów jedno- i wielokarboksylowych (Aronoff 1956) stosowano rozpuszczalnik alkaliczny BH — n-butanol nasycony 1,5 N amoniakiem (Brown, Hall 1950; Brown 1950; Reid, Lederer 1951). Dalsze rozdzielanie plam, rozwiniętych w rozpuszczalnikach SchA, SchB₂ i BH, przeprowadzano, względnie sprawdzano ich jednorodność, za pomocą rechromatografii. W tym celu eluowano odpowiednie plamy (lub prążki według Matthia-

s a) wycinając je z rozwiniętych chromatogramów, tnąc na małe skrawki, zalewając około 15 ml wody i gotując na małym płomieniu przez 40 minut. Eluat zagęszczony do około 0,5 ml наносzono na bibułę i rozwijano w drugim rozpuszczalniku podstawowym oraz w kwaśnym rozpuszczalniku eterowym SM — eter etylowy: kwas mrówkowy: woda, 18 : 5 : 9, faza eterowa (Soldatienkow, Mazurowa 1959; Schramm 1960). Kwasy jednokarboksylowe, eluowane z chromatogramów rozwiniętych w rozpuszczalniku BH, rechromatografowano równolegle we wszystkich trzech pozostałych rozpuszczalnikach.

Plamy kwasów porównywano z rozwijanymi równolegle na tych samych chromatogramach plamami kwasów wzorcowych: akonitowego, bursztynowego, cytrynowego, fumarowego, jabłkowego, malonowego, szczawiowego i winowego. Przy badaniu kwasów jednokarboksylowych, eluowanych z chromatogramów rozwiniętych w rozpuszczalniku BH, stosowano ponadto jako wzorce kwasy: chinowy, gallusowy, glikolowy, glioksyłowy (sól sodowa), glukonowy (δ -lakton), glukuronowy, mlekowy i szikimowy. Dodatkowo przeprowadzano identyfikację kwasów cytrynowego, jabłkowego, bursztynowego i fumarowego specyficznymi metodami chemicznymi. W tym celu wymywano odpowiednie plamy w sposób identyczny jak do rechromatografii i zagęszczony eluat uzupełniano do 5 ml. Biorąc do analizy całą objętość, identyfikowano kwas cytrynowy metodą Weil-Malherbe'a i Bone'a (1949) w modyfikacji Taylora (1953), kwas jabłkowy metodą Reifera (1955), kwas zaś bursztynowy oraz fumarowy, po uprzednim utlenieniu do kwasu bursztynowego (Krebs i in. 1940), srebrową metodą strącaniową Virtanena (1943).

Wyniki

We wszystkich fazach rozwoju bobiku i we wszystkich organach z wyjątkiem kwiatów stwierdzono obecność kwasów cytrynowego, jabłkowego, bursztynowego i fumarowego. Kwas cytrynowy występuje zdecydowanie w największych ilościach w nasionach suchych i moczonych oraz w liściach. W korzeniach przeważa kwas jabłkowy. Kwasy bursztynowy, a zwłaszcza fumarowy, występują w ilościach znacznie mniejszych, czasem nawet trudno uchwytne chromatograficznie. Kwas szczawiowy pojawia się w ilościach wykrywalnych w pierwszych liściach, stosunkowo większe jego ilości dadzą się też stale obserwować w tkankach zielonych.

Poza tymi kwasami występuje w bobiku szereg innych, których nie udało się zidentyfikować. We wszystkich tkankach znajdują się w dużych ilościach substancje kwaśne, dające na chromatogramach silne plamy o wartości R_f zbliżonej we wszystkich trzech rozpuszczalnikach do kwasu

winowego (około 0,20). Równocześnie występuje inna plama kwaśna o wartości R_f 0,11—0,15 w rozpuszczalniku SchA i 0,55—0,63 w SchB₂. Rechromatografia z osobna oraz razem tych plam, eluowanych z obu rozpuszczalników, zdaje się wskazywać na to, że jest to w obu przypadkach ta sama mieszanina co najmniej dwóch kwasów o wartościach R_f wynoszących w rozpuszczalniku BH 0,16—0,19 i 0,21—0,24.

Ryc. 1. Chromatogramy kwasów organicznych jednokarboksylowych z tkanek bobiku. Kwasy eluowane z chromatogramów rozwiniętych w rozpuszczalniku BH (n-butanol nasycony 1,5 N amoniakiem), rechromatografowane w rozpuszczalnikach: SM (eter etylowy: kwas mrówkowy: woda 18:5:9, faza eterowa), SchA (n-butanol: octan etylu: kwas mrówkowy 1:1:1) i SchB₂ (etanol: bufor amonowy 3:1). Kwasy organiczne używane jako wzorce: 1 — winowy, 2 cytrynowy, 3 — jabłkowy, 4 — szczawiowy, 5 — malonowy, 6 — bursztynowy, 7 — akonitowy, 8 — fumarowy, 9 — glukuronowy, 10 — glukonowy (δ-lakton), 11 — chinowy, 12 — szikimowy, 13 — glikolowy, 14 — gallusowy, 15 — mlekowy, 16 — glioksyłowy (sól sodowa).

Bibula Whatman Nr 1, chromatografia wstępująca

Fig. 1. Chromatograms of organic monocarboxylic acids from horse bean tissues. The acids eluted from the chromatograms developed in the solvent BH (n-butanol saturated with 1,5 N ammonia), rechromatographed in solvents: SM (ethyl ether: formic acid: water 18:5:9, ether phase), SchA (n-butanol: ethyl acetate: formic acid, 1:1:1) and SchB₂ (ethanol: ammonia buffer, 3:1). The samples of acids: 1 — tartaric, 2 — citric, 3 — malic, 4 — oxalic, 5 — malonic, 6 succinic, 7 — aconitic, 8 — fumaric, 9 — glucuronic, 10 — gluconic (δ-lacton), 11 — quinic, 12 — shikimic, 13 — glycollic, 14 — gallic, 15 — lactic, 16 — glyoxylic (sodium salt).

Paper Whatman No. 1, ascending chromatography

Obok tych wyróżniających się plam kwaśnych występują na chromatogramach jeszcze inne, mniej wyraźne, często zlewające się ze sobą, na ogół o niewysokich wartościach R_f . Z reguły występuje też plama kwaśna w miejscu naniesienia ekstraktu (R_f równe 0 we wszystkich rozpuszczalnikach).

Analiza rechromatograficzna kwasów jednokarboksylowych rozwiniętych pierwotnie w rozpuszczalniku BH wykazuje, że w bobiku poza kwasami dwu- i trójkarboksylowymi, których R_f w tym rozpuszczalniku wynosi 0, występuje jeszcze co najmniej 6 innych kwasów. Porównanie ich z wzorcami ośmiu kwasów jednokarboksylowych alifatycznych i cyklicznych (ryc. 1) wskazuje na to, że mogą być między nimi kwasy chinowy, szikimowy i ewentualnie glukuronowy.

Jeśli chodzi o zawartość kwasów w poszczególnych organach i fazach rozwoju bobiku, to na podstawie porównania poszczególnych chromatogramów przedstawia się ona następująco: Ilość kwasów znajdujących się w suchych nasionach (z czego większość stanowi kwas cytrynowy) wzrasta w czasie ich moczenia. W okresie kiełkowania (od trzeciego do szóstego dnia) zaznacza się ubytek kwasów w nasieniu. W szczególności eluat kwasów jednokarboksylowych z rozpuszczalników SchA i SchB₂ daje w tym stadium na rechromatogramach w rozpuszczalniku BH tylko jedną plamę o wartości R_f 0,16—0,19. W dalszym ciągu w rozwoju rośliny ilość kwasów silnie wzrasta. Maksimum ich zawartości wykazują młode liście, przy czym z kwasów zidentyfikowanych pierwsze miejsce zajmuje w nich znowu kwas cytrynowy. Zawartość kwasów w starych liściach, mających już tendencję wędnięcia i obumierania, jak również w najmłodszych, dopiero rozwijających się, jest mniejsza. Jeszcze mniejsza ilość kwasów występuje w pąkach szczytowych, łodygach i korzeniach, przy czym w tych ostatnich na pierwsze miejsce wysuwa się kwas jabłkowy. W kwiatach, w wykrywalnych ilościach, stwierdzono tylko kwas cytrynowy.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Wyniki naszych badań są w zasadzie zgodne z dotychczasowymi pracami, aczkolwiek nie wszystkie kwasy, podawane jako typowe dla roślin motylkowatych, udało się nam wykryć na chromatografach. W szczególności nie mogliśmy zidentyfikować pospolitego u motylkowatych kwasu malonowego (Bentley 1952; Soldatienkow, Mazurowa 1957; Young, Shannon 1959), który w bobiku występuje w dość dużych ilościach, zwłaszcza w korzeniach roślin rosnących w warunkach deficytu potasowego (Coic, Lesaint 1960). Być może jednak, że nie pozwalały na to stosowane przez nas rozpuszczalniki. W SchB₂ wartość R_f kwasu malonowego jest bardzo zbliżona do kwasu winowego, a przy tym oba te kwasy może maskować występująca w tym samym miejscu silna nie zidentyfikowana plama. W SchA, podobnie jak w większości rozpuszczalników kwaśnych, wartość R_f kwasu malonowego jest nieco niższa od

kwasu bursztynowego. Nie jest wykluczone, że występująca w tym rozpuszczalniku plama, niekiedy nawet dosyć silna, a zawsze rozmyta, jak wszystkie plamy o dużych wartościach R_f , którą przyjmowaliśmy za kwas bursztynowy na podstawie jej położenia i reakcji specyficznej, w rzeczywistości jest mieszaną plamą kwasów bursztynowego i malonowego. Wobec braku wzorca nie mogliśmy również zidentyfikować chromatograficznie kwasu glicerolowego, który występuje w bobiku w poważnych ilościach, szczególnie w liściach (Morrison, Dekock 1959; Coic, Lesaint 1960).

Duża zawartość kwasu jabłkowego w korzeniach, którą stwierdzili również Coic i Lesaint (1960), potwierdza wybitną rolę systemu korzeniowego w pobieraniu i wiązaniu dwutlenku węgla (Kursanow 1957; Jackson, Coleman 1959).

Identyfikacja na chromatogramach kwasów rozwijających się w rozpuszczalniku BH napotyka na duże trudności. Na podstawie położenia plam w rozpuszczalnikach SchA, SchB₂ i SM można przypuścić obecność kwasów chinowego, szikimowego i glukuronowego. Dwa pierwsze zostały znalezione w tkankach bobiku (Coic, Lesaint 1960). Kwas glukuronowy jest szeroko rozpowszechniony w tkankach roślinnych (Okubo 1957) podobnie zresztą jak i inne kwasy uronowe, i to nie tylko w stanie wolnym, lecz zwłaszcza jako składnik poliuronidów (hemiceluloz). Kwasy uronowe występują razem z innymi kwasami w ekstraktach z tkanek roślinnych i pojawiają się na chromatogramach niejednokrotnie w dużych ilościach (Kursanow, Kulajewa 1957). W tkankach roślinnych w ogóle tworzą się różnego typu kwaśne produkty utleniania cukrów (Bell 1955; Sołdatienkow, Mazurowa 1956b), jednak ich identyfikacja wyłącznie na podstawie chromatografii bibułowej jest praktycznie niemożliwa. Nie jest wykluczone że do jakiegoś związku tego typu należy również plama kwaśna o R_f zbliżonym do kwasu winowego; sam kwas winowy nie był dotychczas znaleziony w bobiku.

STRESZCZENIE

Przy pomocy chromatografii bibułowej badano kwasy organiczne w oczyszczonych alkoholowych wyciągach z tkanek bobiku. Do analizy brano nasiona suche, moczone 24, 36 i 48 godzin, nasiona kiełkujące w glebie oraz liście, łodygi, korzenie i kwiaty roślin hodowanych w kulturach wazonowych w ziemi kompostowej. We wszystkich stadiach rozwoju i we wszystkich organach, z wyjątkiem kwiatów, stwierdzono obecność kwasów: cytrynowego, jabłkowego i niewielkich ilości bursztynowego oraz fumarowego; w zielonych organach znaleziono również kwas szczawowy. Analiza rechromatograficzna kwasów jednokarboksylowych wykazała obecność w tkankach co najmniej sześciu tego typu związków między innymi kwasów

chinowego i szikimowego. W dużych ilościach występują prawdopodobnie kwasy uronowe, bliżej nie zidentyfikowane, oraz inne kwaśne produkty utleniania cukrów. Ilość kwasów znajdujących się w suchych nasionach wzrasta w czasie moczenia, następnie maleje nieco w okresie kiełkowania (3—6 dni), po czym znowu wzrasta, osiągając maksimum w liściach. W nasionach suchych, kiełkujących i w zielonych organach roślin większość stanowi kwas cytrynowy. Jest on także jedynym kwasem znalezionym w kwiatach. W korzeniach natomiast na pierwszym miejscu znajduje się kwas jabłkowy. Dokładne ilościowe badania zawartości kwasów organicznych w różnych organach bobiku w czasie jego rozwoju są w toku.

Zakład Biochemii

Katedry Fizjologii Roślin

Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

(Wpłynęło dn. 8.1.1961 r.)

SUMMARY

Organic acids in purified alcoholic extracts from horse bean tissues have been investigated by means of paper chromatography technique. Dry seeds and those being soaked during 24, 36 and 48 hours, then the seeds germinating in soil as well as leaves, stems, roots and flowers of plants cultivated in pot cultures, were analysed. In all stages of growth as well as in all tissues, except for the flowers, citric, malic, and small quantities of succinic and fumaric acids have been found; in the green tissues, oxalic acid has also been detected. At least six different monocarboxylic acids, among them the quinic and shikimic ones, have been demonstrated in horse bean tissues by means of rechromatographic analysis. The uronic acids not yet identified are possibly present in the tissues in big quantities as well as some other acid oxidation products of sugars. The quantity of acids available in the dry seeds increases while soaking to diminish in the period of germination (3 to 6 days) and finally grow again, reaching its maximum in the leaves. In dry seeds as well as in the soaked ones and in green plant tissues, citric acid makes the greater part; it is also the only acid found in the flowers. In the roots, however, malic acid is predominant. Detailed quantitative investigations of organic acid content in different growing tissues of horse bean are continued.

LITERATURA

- Aronoff S., 1956, Techniques of radiobiochemistry, ISCP, Ames, Iowa, 228 pp.
 Bell D. J., 1955, Mono- and oligosaccharides and acidic monosaccharide derivatives, w K. Paech, M. V. Tracey: Modern Methods of Plant Analysis, Springer Verl. Tom II.
 Bentley L. C., 1952, Nature 170: 847.
 Brown F., 1950, Biochem. J. 47: 598.
 Brown F., Hall L. P., 1950, Nature 166: 66.
 Coic Y., Lesaint C., 1960, C.r.Acad. Sci. 250: 914; Ann. Physiol. Vég. 2: 73.
 Czesnokow W. A., 1954, Wiest. Leningr. Uniw. 9: 29.
 Czesnokow W. A., Głagolewa T. A., Ljubimowa M. W., 1955, Ucz. zap. LGU Nr 186, Ser. biol. n. 39.

- Dupéron R., 1958, C.r.Acad. Sci. 246: 298.
- Jackson W. A., Coleman N. T., 1959, Soil Sci. 87: 311.
- Krebs H. A., Smyth D. A., Evans A., 1940, Biochem. J. 34: 1041.
- Kursanow A. L., 1954, Woprosy botaniki 1: 131.
- Kursanow A. L., 1957, Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol. 689; Unesco Intern. Conf. Radioisotop. Sci. Res., Paris, NS/RIC/128.
- Kursanov A. L., Kulajewa O. N., 1957, Fizjol. rast. 4: 322.
- Matthias W., 1954, Naturwiss. 41: 17.
- Morrison R. I., Dekock P. C., 1959, Nature 184, Suppl. Nr 11: 819.
- Ookubo N., 1957, Nihon Univ. Med. J. 16: 2192.
- Reid R. L., Lederer M., 1951, Biochem. J. 50: 60.
- Reifer I., 1955, Acta Biochim. Pol. 2: 367.
- Schramm R. W., 1960, Chemia Anal. 5: 1055.
- Schramm R. W., 1961, Acta Soc. Bot. Pol. 30: 285.
- Soldatienkow S. W., Mazurowa T. A., 1956a, Biochimia 21: 573.
- Soldatienkow S. W., Mazurowa T. A., 1956b, Biochimia 21: 652.
- Soldatienkow S. W., Mazurowa T. A., 1957, Biochimia 22: 345.
- Soldatienkow S. W., Mazurowa T. A., 1959, Fizjol. rast. 6: 112.
- Taylor T. G., 1953, Biochem. J. 54: 48.
- Virtanen A. I., Arhimo A. A., Sundman J., Jännes L., 1943, J. prakt. Chemie 162: 71.
- Weil-Malherbe H., Bone A. D., 1949, Biochem. J. 45: 377.
- Williams R. J., Kirby H., 1948, Science 107: 481.
- Young R. H., Shannon L. M., 1959, Plant Physiol. 34: 149.