Wykrywanie giberelin A_1 — A_4 na chromatogramach

The detection of gibberellins A_1 — A_4 on chromatograms

A. ADAMIEC, L. PAŚS, P. WIERZCHOWSKI

W miarę wzrastania ilości nowo odkrytych giberelin i substancji giberelinopodobnych, pochodzących zarówno z płynów fermentacyjnych drożdżoustrojów, jak i z roślin wyższych, szczególnego znaczenia nabiera technika chromatograficznego rozdzielania tych substancji oraz sposób ich wykrywania i wstępnego zidentyfikowania na chromatogramach.

Biologiczny sposób wykrywania jest wysokospecyficzny dla giberelin biologicznie czynnych, lecz jest pracochłonny i nie daje dokładnych wartości R_f . Chemiczny sposób wykrywania jest prostszy, łatwiejszy do przeprowadzenia i pozwala na dokładne umiejscowienie plam na chromatogramach. Stosowano wiele sposobów wykrywania chemicznego, lecz żadnym z nich nie wykryto dotychczas wszystkich giberelin.

Jeden ze sposobów wykrywania giberelin na chromatogramach polega na opryskiwaniu bibuły roztworem kwasu siarkowego. Gibereliny tworzą wówczas plamy fluoryzujące w świetle ultrafioletowym. Stężenia kwasu siarkowego i rozpuszczalniki, w jakich się go rozpuszcza, są różne. Zazwyczaj stosuje się alkoholowe roztwory kwasu siarkowego. Przy stosowaniu roztworów o niskich stężeniach kwasu siarkowego paski bibuły podgrzewa się w celu pobudzenia plam do fluorescencji.

Brian i współpracownicy (1958) stosowali 50% roztwór kwasu siarkowego w etanolu, a następnie ogrzewali chromatogram przez kilka minut w suszarce w temperaturze 80°C. Podojil i Ševčík (1960) używali 30% roztworu kwasu siarkowego w metanolu i nagrzewali chromatogram przez 3—5 minut w temperaturze 60—80°C. Phinney i współpracownicy (1957) pobudzali rozdzielone na chromatogramach gibereliny do fluorescencji przez zanurzenie paska bibuły w stężonym kwasie siarkowym. McComb i Carr (1958) stosowali 40% etanolowy roztwór kwasu siarkowego, a Bird i Pugh (1958) 60% wodny roztwór kwasu siarkowego. Barwa fluorescencji plam giberelinowych zależy od stężenia i rodzaju kwasu (Kalistratos, Padval, Pfau (1962) i od długości fal światła ultrafioletowego.

Drugim powszechnie stosowanym roztworem do wywoływania giberelin na chromatogramach jest niskoprocentowy wodny roztwór nad-

manganianu potasu. Odczynnik ten jest mało czuły na gibereliny, ale przy wyższych stężeniach większość giberelin na chromatogramach może być wykryta przy jego pomocy (McMillan, Seaton, Suter, 1961). Roztwór nadmanganianu potasu stosuje się zazwyczaj w stężeniu 0,5%.

Poza wymienionymi odczynnikiem, do wywoływania giberelin na chromatogramach stosowano odczynniki, które specyficznie reagują z rdzeniem gibanowym giberelin, lub grupami funkcyjnymi w tym rdzeniu.

Simpson (1958) stosowała w oryginalnej wersji odczynnik Folina-Ciocalteu, który daje z giberelinami niebieskie plamy. Odczynnik ten został zmodyfikowany przez Muromcewa i Nestjuk (1960), którzy zamiast środowiska alkalicznego zastosowali zakwaszenie stężonym kwasem solnym, uzyskując większą specyficzność na gibereliny (głównie na giberelinę A_3) i trwałość plam na chromatogramach. Kalistratos, Padval i Pfau (1962) podają szereg odczynników do wykrywania giberelin na chromatogramach. Do wykrywania giberelin z grupą metylenową używali oni mieszaniny kwasu siarkowego z aldehydem mrówkowym. Pierścień laktonowy wykrywali 0,5% roztworem nadmanganianu potasu w 1% roztworze węglanu sodu.

Gibereliny z grupą hydroksylową wykrywano przy pomocy fazy benzenowej, otrzymanej przez wytrząsanie z benzenem 6% wodnego roztworu kwasu octowego, w którym rozpuszczono 1 mg pięciotlenku wanaadu i 25 mg oksychinoliny. Dla wywołania giberelin na podstawie występowania w ich cząsteczce grupy karboksylowej, pasek bibuły traktowano 10% roztworem amoniaku i po wysuszeniu w temperaturze 130°C opryskiwano 0,1% roztworem błękitu bromotymolowego, lub bromofenolowego.

Do wykrywania giberelin, w szczególności giberelin A_2 , Grove, Jeffs i Mulholland (1958) stosowali barwnik — zieleń bromokrezolową, a Takahashi i inni (1955) — błękit bromofenolowy. Subba-Rao (1957) wykorzystując właściwości redukcyjne giberelin wywoływał gibereliny przy pomocy amoniakalnego roztworu srebra.

Baumgartner (1959) zastosował technikę izotopową do wykrywania giberelin na chromatogramach. Przed rozdzielaniem gibereliny przeprowadzał w estry metylowe znakowane węglem ^{14}C , a po rozwinięciu chromatogramu lokalizował promieniotwórcze pochodne przy pomocy automatycznego rejestratora impulsów.

Bogactwo sposobów wywoływania giberelin wskazuje na ustawiczne poszukiwanie nowych sposobów, ze względu na to, że metody dotychczas stosowane są na ogół mało specyficzne i mało czułe. Szczególnie duże trudności napotymano przy wykrywaniu gibereliny A_2 , którą dotychczas wykryto jedynie w większych stężeniach przy pomocy barwników, roztworu nadmanganianu potasu lub testu biologicznego.

W naszych badaniach stosowaliśmy od dłuższego czasu sposób wywoływania, który pozwolił nam na wykrywanie giberelin A_1 , A_2 , A_3 i A_4 na chromatogramach. Sposób ten jest bardzo czuły, a ponadto pozwala na wstępną identyfikację poszczególnych giberelin na podstawie ich barwy fluorescencji oraz kinetyki pojawiania się pod wpływem strumienia gorącego powietrza. Biorąc pod uwagę znikome różnice w budowie chemicznej poszczególnych giberelin mamy prawo przypuszczać, że niżej podanym sposobem można wykryć również pozostałe, dotychczas znane gibereliny.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały i metody

Preparaty giberelinowe

Do badań używano krystaliczną giberelinę A_3 otrzymaną przez wielokrotne przekryształowanie giberelinowego preparatu produkowanego przez Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne, krystaliczne gibereliny A_1 , A_2 i A_4 otrzymane od prof. Y. Sumiki z Uniwersytetu w Tokio, oraz mieszaninę giberelin zawartych w brzeczce fermentacyjnej grzyba *Gibberella fujikuroi*.

Chromatografia bibułowa

Chromatografię giberelin przeprowadzano techniką zstępującą, na bibule Whatmann Nr 1, w komorach szklanych. Do rozwijania chromatogramów używano dwóch solwentów:

1. Solwent podany przez Birda i Pugh'a (1958) o składzie: benzen, kwas octowy, woda, zmieszanych w proporcji 10:2,5:5. Chromatogramy rozwijano oryginalną metodą przepływową w ciągu 48 lub 72 godzin.
2. Solwent o składzie: toluen, kwas octowy, woda, zmieszanych w proporcji 6,5:3,5:10. Chromatogramy rozwijano w ciągu 3,5 godzin.

Wywoływanie chromatogramów

Rozwinięty i wysuszony chromatogram opryskiwano 5% roztworem kwasu siarkowego w 96% alkoholu etylowym i pozostawiono do wysuszenia na powietrzu. Następnie chromatogram umieszczano na płycie szklanej, w świetle analitycznej lampy rtęciowej z filtrem przepuszczającym fale o zakresie 365 m μ i nagrzewano strumieniem ciepłego powietrza przy pomocy suszarki do włosów (fen). W celu równomiernego nagrzania suszarkę przesuwano powoli wzdłuż całego paska bibuły. Odległość suszarki od bibuły wynosiła w pierwszej fazie nagrzewania, w zależ-

ności od mocy grzałki, od 12 do 20 cm. Po kilkudziesięciu sekundach nagrzewania na chromatogramie zaczęły pojawiać się pierwsze plamy fluoryzujące, różniące się barwą fluorescencji (giberelina A_3 , giberelina A_1 i jeden składnik gibereliny A_4). Kontury występujących plam zaznaczano ołówkiem i nagrzewanie chromatogramu kontynuowano, z tym, że przez zbliżenie suszarki do paska bibuły na odległość kilku centymetrów znacznie podwyższono temperaturę nagrzewania. Suszarkę przesuwano wzdłuż paska nagrzewając go równomiernie, unikając jednak przypalania bibuły na brunatny kolor. Po upływie dalszych 30 sekund zaczęły pojawiać się dalsze plamy fluoryzujące (giberelina A_2 , drugi składnik gibereliny A_4). Kontury każdej pojawiającej się plamy natychmiast zakreślano ołówkiem, ponieważ niektóre plamy pojawiają się na bardzo krótki okres czasu i po dłuższym nagrzewaniu znikają. Wywołany chromatogram przerysowywano na osobny papier, ponieważ tak wywołane paski chromatogramu łatwo rozpadają się i nie nadają się do przechowywania.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Podany sposób wywoływania chromatogramów pozwolił na wykrycie wszystkich badanych giberelin, gibereliny A_1 , A_2 , A_3 i A_4 , w postaci plam fluoryzujących w świetle ultrafioletowym i różniących się barwą fluorescencji.

Giberelina A_1 pojawia się przy niezbyt długim nagrzewaniu chromatogramu w postaci słabej, żółtofluoryzującej plamy. Giberelina A_2 daje plamę o silnej jasnofioletowej fluorescencji przy długim i intensywnym nagrzewaniu chromatogramu. Giberelina A_3 daje intensywną fluorescencję zielononiebieską przy krótkim nagrzewaniu. Przy pomocy techniki dwustopniowego nagrzewania chromatogramu udało się stwierdzić, że giberelina A_4 , która dotąd uważana była za związek jednorodny, występuje w postaci dwóch składników, które okazały się biologicznie aktywne. Przy słabym nagrzewaniu chromatogramu, rozwiniętego w solwencie 2, pojawia się najpierw składnik o żółtej fluorescencji (R_f 0,33), a przy silniejszym nagrzewaniu plama żółta zanika i pojawia się plama fioletowa (R_f 0,40).

Przy stosowaniu tej techniki czułość wykrywania dla wszystkich giberelin jest bardzo duża i leży w granicach czułości dla gibereliny A_3 , to znaczy około 0,01—0,1 mcg.

Stosowana przez nas technika daje dobre wyniki przy wykrywaniu giberelin występujących zarówno w brzeczce fermentacyjnej grzyba *Gibberella fujikuroi*, jak i w materiale roślinnym B a ņ k o w s k a (informacja ustna), rozdzielając w solwencie 2 wyciąg z roślin kukurydzy wykryła na chromatogramie, za pomocą wyżej podanej techniki obie

plamy (o R_f 0,33 i 0,40), które uzyskaliśmy przy rozdziale GA_4 . Stosując tę technikę przy wywoływaniu giberelin występujących w brzeczce fermentacyjnej, poza plamami odpowiadającymi używanym wzorom, na chromatogramie rozwinęty w solwencie 2, stwierdziliśmy występowanie dwu plam o R_f 0,28 i R_f 0,90 wykazujących aktywność biologiczną.

Twierdzenie o możliwości wykrycia wszystkich biologicznie aktywnych substancji giberelinowych przy pomocy naszej techniki opieramy na analogii strukturalnej dotychczas znanych giberelin oraz na niedawnych doświadczeniach McMillana i Sutura (1963), którzy wykryli testem fluorescencyjnym wszystkie gibereliny na chromatogramach, przy pomocy stężonego kwasu siarkowego i nagrzewania przez 10 minut w temperaturze $120^\circ C$. Jednak, jak twierdzą sami autorzy, sposób ten jest zbyt drastyczny, by mógł być stosowany do wywoływania giberelin na chromatogramach bibułowych.

STRESZCZENIE

Opracowano metodę wykrywania biologicznie aktywnych substancji giberelinowych — giberelin A_1 , A_2 , A_3 i A_4 — na chromatogramach bibułowych, przy pomocy testu fluorescencyjnego. Istotą tej metody jest stosowanie techniki dwustopniowego nagrzewania chromatogramu spryskanego 5% etanolem w roztworze kwasu siarkowego, przy pomocy strumienia gorącego powietrza, w warunkach kontrolowanych pod analityczną lampą rtęciową. Metodą tą stwierdzono, że giberelina A_4 występuje w postaci dwu składników biologicznie aktywnych, różniących się wartością R_f i barwą fluorescencji wywołanych plam.

Podczas druku niniejszej pracy pojawiła się publikacja angielskich autorów: Jones D. F., McMillan J., Radley M., 1963, Plant hormones III. Identification of gibberellic acid in immature barley and immature grass, *Phytochemistry* 2 (4): 307. Autorzy tej pracy podają sposób rozdzielania mieszaniny 9 giberelin przy pomocy dwuwymiarowej chromatografii cienkowarstwowej, w której dla odróżnienia poszczególnych giberelin przyjmują, oprócz wartości R_f , również czas powstawania i barwę fluorescencji po nagrzewaniu w temperaturze $120^\circ C$ chromatogramu uprzednio opryskanego alkoholowym roztworem kwasu siarkowego. Porównując wyniki ich analizy z danymi naszej pracy sądzimy, że omawiana przez nas substancja o R_f 0,33, jest GA_7 , a plama o R_f 0,40 jest GA_4 . Na podstawie uzyskanych przez nas wyników można sądzić, że GA_4 i GA_7 występują przeważnie w postaci mieszaniny. Pogląd ten potwierdza również praca: Ikuma H., Thimann K. V., 1963, Activity of gibberellin D on the germination of photosensitive lettuce seeds, *Nature* 197 (4874): 1313, która podaje, że GD jest mieszaniną GA_4

i GA₇. W doświadczeniach, w których rozdzielaliśmy GD, otrzymaną od prof. H. Borrisa z Greifswaldu, uzyskaliśmy podobny rozdział na dwa składniki jak dla GA₄ otrzymanej od prof. Y. Sumiki z Tokyo.

Zakład Biochemii
Instytutu Antybiotyków
w Warszawie

(Wpłynęło: 14.10.1963)

SUMMARY

A method for detection of biologically active gibberellins A₁, A₂, A₃ and A₄ on chromatograms with fluorescence test was worked out. The method is based on a technique of heating in two steps of chromatograms sprayed with 5% ethanol solution of sulphuric acid, using stream of heated air in controlled conditions under analytical mercury lamp. Using this method it was found that gibberellin A₄ exists in form of two components, biologically active differing in R_f value and in the colour of fluorescent spots.

LITERATURA

- Baumgartner W. E., Lazer A. M., Dalziel E. V. C., Varner E. L., 1959, Determination of gibberellins by derivative labeling with diazomethan-¹⁴C and by isotopic dilution analysis with tritium-labelled gibberellins, *Agricultural and Food Chemistry* 7:422.
- Bird H. L., Pugh C. T., 1958, A paper chromatographic separation of gibberellic acid and gibberellin A₁, *Plant Physiology* 33:45.
- Brian P. W., Grove F. J., Hemming H. G., Mulholland T. P. C., Radley M., 1958, Gibberellic acid. Part VI. The biological activity of allo-gibberic acid and its identify with gibberellin B, *Plant Physiology* 33:329.
- Grove J. F. P., Jeffs P. W., Mulholland T. P. C., 1958, Gibberellic acid. Part V. The relation between gibberellin A and gibberellic acid, *J. Chem. Soc.* 1236.
- Kalistratos G., Padval D., Pfau A., 1962, Über Chemische Reaktionen der Gibberellinsäure, Eigenschaften u. Wirkungen der Gibberelline (Hrsg. R. Knapp) Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, 20.
- McComb A. J., Carr D. J., 1958, Evidence from a dwarf pea bioassay for naturally occurring gibberellins in the growing plant, *Nature* 181:1548.
- McMillan J., Seaton J. C., Suter P. J., 1961, Isolation and structures of gibberellins from higher plants, *Advances in Chemistry Series* 28:18.
- McMillan J., Suter P. J., 1963, Thin layer chromatography of the gibberellins, *Nature* 197:790.
- Muromcew G. S., Nestjuk M. N., 1960, Koliczestwiennoje kolorimetriczeskoje opredelenie gibberellinowoj kisloty, *Wiestnik Sielsko-chozajstwiennoj Nauki* 2:119.
- Phinney B. O., West C. A., Ritzel M., Neely P. M., 1957, Evidence for "Gibberellin-like" substances from flowering plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 43:398.
- Podojil M., Ševčík V., 1960, Quantitative estimations of gibberellic acid by paper chromatography, *Folia Microbiologica* 5:192.

- Simpson G. M., 1958, A colorimetric test for gibberellic acid and evidence from a dwarf pea assay for the occurrence of a gibberellin-like substance in wheat leaves, *Nature* 182:528.
- Subba-Rao N. S., 1957, In vivo detection of gibberellic acid in "Foot-rot" infected rice (*Oryza sativa* L.), *Proc. Indian Acad. Sci.* 45 B:91.
- Takahashi N., Kitamura H., Kawarada A., Seta Y., Takai M., Tamura S., Sumiki Y., 1955, Biochemical studies on "Bakanae" fungus. Part XXXIV. Isolation of gibberellins and their properties, *Bulletin of the Agricultural Chemical Society Japan* 19:267.