

Н. В. БАЖАНОВА, М. Г. АЛТУНЯН

К ВОПРОСУ О РАЗДЕЛЕНИИ ПИГМЕНТОВ ПЛАСТИД МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ И ТОНКОМ СЛОЕ

Модифицирован ранее предложенный нами метод по определению пластидных пигментов. Описанный метод позволяет на одной хроматограмме отделить друг от друга сразу пять основных пигментов: хлорофилл а, хлорофилл б, каротин, лютеин, фиксаксантин.

Со времен открытия хроматографического анализа Цветов [1] как физико-химического метода разделения компонентов сложной смеси, появилась возможность углубленной разработки вариаций этого метода и использования их при изучении состава, динамики и метаболизма зеленых и желтых пигментов пластидного аппарата.

В настоящее время благодаря методу хроматографии насчитывается до 10 хлорофиллов и 200 желтых пигментов бактериального, растительного и животного происхождения. В зависимости от поставленной задачи экспериментатор, владея этими методами, может выбрать один из них.

Для препаративного получения чистых пигментов и их производных, где требуется разгонка больших количеств вытяжек, практичнее всего использовать метод колоночной или бумажной (накрученной в виде спиральных стоек) хроматографии [2, 3].

Применение бумаги в качестве адсорбента расширило возможности этого метода по сравнению с колоночной хроматографией. Метод тонкого слоя сорбента на пластинке соединил в себе преимущества колоночной и бумажной хроматографии [4, 5].

Для исследователей, занимающихся ацетилизированием пигментов, превращением ксантофиллов зеленого листа, а также выращиванием культур изолированных тканей, наибольший интерес представляет адсорбционно-хроматографический метод разделения пигментов на тонком закрепленном и незакрепленном слоях.

Использование смешанного 3-компонентного закрепленного слоя и 3-компонентной смеси растворителей делает метод селективным, позволяя разделять изомеры каротиноидов, отличающихся лишь по положению двойной связи: такие, как лютеин и зеаксантин; лютеин-5,6-эпоксид и антероксантин. Особенно ценным является большая чувствительность этого метода, позволяющая обнаружить ничтожно малые количества веществ, 0,1—0,005 мкг [4].

Для визуальной оценки можно употреблять незакрепленный слой активного адсорбента и получать разделение хлорофиллов и каротиноидов на одной пластинке [6].

Таким образом, для качественного анализа каротиноидов хроматография в тонком слое сорбента, безусловно, более совершенна, чем хроматография на бумаге.

Однако отсутствие строго стандартизированных адсорбентов, а также вариабельность условий приготовления тонкого слоя создают известные трудности при освоении и использовании этого метода. Некоторым препятствием к широкому использованию его является также большая, по сравнению с бумажной хроматографией, трудоемкость.

Выбор того или иного метода должен определяться не только целью исследования, но и возможностью быстрого воспроизведения всего процесса работы.

Метод бумажной хроматографии, подробно описанный в нашей книге [3], отличается простотой. Суть его заключается в том, что смесь пигментов разделяется на отдельные компоненты (хлорофиллы а и б, каротин, лютеин, виолаксантин и неоксантин) в подобранных растворителях на хроматографической бумаге, из которой каждый пигмент в отдельности элюируется и определяется колориметрически на фотоэлектроколориметре (ФЭК) или спектрофотометре (СФ).

Однако для получения этого набора пигментов надо одну вытяжку нанести на три разные хроматограммы и поставить их в камеры с тремя специально подобранными растворителями для разделения: в одной смеси растворителей отделяются друг от друга каротин, хлорофилл а и хлорофилл б; во второй—каротин, лютеин, виолаксантин, в третьей—неоксантин.

Поскольку для анализа следует брать не менее двух параллельных проб и с каждой наносить, как минимум, по 2—3 хроматограммы, то получается весьма трудоемкая работа, к тому же требуется большое количество материала для анализа. Особенно это ощутимо при проведении серийных опытов, проводимых с целью изучения накопления основных пигментов пластид в онтогенезе растений, в зависимости от естественных и создаваемых экспериментатором условий, а также при работе с культурой тканей, где весьма ограничено количество экспериментального материала.

Учитывая вышесказанное, мы модифицировали ранее предложенный метод [2, 3]. Он дает возможность на одной хроматограмме отделить друг от друга сразу все основные пигменты.

Начиная от стартового пятна (снизу вверх) пигменты располагаются в следующем порядке: стартовое пятно, на котором остается хлорофиллид*; желто-зеленый—хлорофилл б; сине-зеленый—хлорофилл а; бледно-желтый—виолаксантин; ярко-желтый—лютеин; оранжевый—каротин (α и β в смеси).

* Хлорофиллид спиртом с ацетоном с хроматограммы не смывается. Поэтому, если хлорофилл б остается где-то около стартового пятна, последнее не мешает.

Навеска растительного материала, величина которой определяется содержанием в ней пигментов (например, навеска культуры тканей может варьировать от 1 до 10 г в зависимости от количества накопленных пигментов; навеска листьев—от 0,5 (для теневыносливых) до 2 г (для светолюбных растений); корнеплодов, плодов—от 5 до 10 г, растирается в ступке при добавлении безводного сульфата натрия, если пробы слишком оводненные. Для облегчения растирания прибавляется толченное стекло, для нейтрализации клеточного сока—двууглекислая сода. Извлекаются пигменты смесью спирта с ацетоном, в объемном отношении 1:3. Полученный гомогенат количественно переносится на стеклянный фильтр № 1 или № 2, фильтруется с помощью вакуумного насоса и промывается до полной экстракции пигмента.

Из слишком оводненных вытяжек рекомендуется перевести пигменты в петролейный эфир. Для этого спирто-ацетоновый экстракт переносится в делительную воронку, наливается равный объем петролейного эфира и осторожно добавляется вода до полного расслоения двух фаз. Все пигменты переходят в верхний слой—эпифазу. На бумагу, высотой не менее 20—25 см, наносится эпифазная вытяжка пигментов и подвергается разгонке. Используется быстрая и медленная хроматографическая бумага, выпускаемая Ленинградской фабрикой № 2. Раньше мы рекомендовали [3] бумагу «крабовое основание», на которой разделение пигментов происходило медленно (до 60 мин). Использование медленной и быстрой, как более крупнопористой, бумаги сокращает процесс разделения пигментов до 15 мин.

Объем наносимой вытяжки зависит от концентрации пигментов и может варьировать в пределах 2—10 см³.

Бумагу сворачивают в виде полого цилиндра, верхние углы соединяют скрепкой и помещают в хроматографическую банку с притертой крышкой. Пигменты разделяются в восходящем токе растворителя.

Следует указать, что под действием света и кислорода воздуха пигменты разрушаются, поэтому анализ рекомендуется проводить в темноте и в возможно более короткий срок (банки с хроматограммами накрываются черным материалом).

Модификация метода касается в основном подбора растворителей.

Изучая разделение пигментов в различных условиях хроматографирования, мы пришли к выводу, что соотношение растворителей в их смесях необходимо варьировать прежде всего с учетом температуры окружающей среды и объема хроматографической банки. Чем выше температура окружающей среды и больше объем банки, тем больше должна быть доля петролейного эфира.

Для одновременного разделения пяти основных пигментов мы рекомендуем следующие объемные соотношения растворителей: 3 части бензола, 1 часть петролейного эфира и 0,006 частей этилового спирта; 5 частей бензола, 3 части петролейного эфира и 0,004 частей этилового спирта.

В обоих случаях на одной хроматограмме происходит четкое разделение всех пигментов. Элюирование желтых и зеленых пигментов производится так же, как описано в ранних методиках. Полученные концентрации пигментов определяются на фотоэлектроколориметре: каротиноиды—за синим светофильтром, хлорофиллы—за красным.

Желательно работать в средней области шкалы прибора, где относительная ошибка измерений минимальная.

Расчет количества пигментов на единицу растительного материала проводится по следующей формуле:

$$C = \frac{E \cdot K \cdot V \cdot V_1}{V_2 \cdot l \cdot m}, \text{ где}$$

C —концентрация пигментов в исследуемом растительном материале, мкг/мг или мг/г или г/кг сырого веса листьев; E —оптическая плотность; K —расчетный коэффициент; V —объем исходной вытяжки; V_1 —объем элюата; V_2 —объем вытяжки, нанесенный на хроматограмму; l —внутренняя толщина кюветы, см; m —навеска, г или мг.

Таким образом, предложенный метод позволяет четко и быстро на одной хроматограмме разделить пять основных пластидных пигментов: хлорофилл а, хлорофилл б, каротин, лютеин, виолаксантин.

Институт ботаники АН АрмССР

Поступило 23.II 1976 г.

Ն. Վ. ԲԱԺԱՆՈՎԱ, Մ. Գ. ԱԼՏՈՒՆՅԱՆ

ՔՂԹԻ ԵՎ ՆՐԲԱՇԵՐՏ ՔՐՈՄԱՏՈԳՐԱՖԻԿ ՄԵԹՈԴՆԵՐՈՎ
ՊԼԱՍՏԻԴԱՅԻՆ ՊԻԳՄԵՆՏՆԵՐԻ ԲԱԺԱՆՄԱՆ ՀԱՐՑԻ ՇՈՒՐՋ

Ա Վ Փ Ն Փ Ն Ն Ն

Հոդվածում ներկայացվում է մեր կողմից վաղուց առաջ բաշխած մեթոդի մոդիֆիկացիան, որը հնարավորություն է տալիս մեկ թղթի քրոմատոգրամայի վրա բաժանել հինգ հիմնական պիգմենտները: Սկսած սկզբնական շերտից (ներքևից վերև) պիգմենտները դասավորվում են հետևյալ հերթականությամբ. դեղնա-կանաչավուն-թլորոֆիլ Բ, կապտա-կանաչավուն-թլորոֆիլ ա, բաց-դեղնավուն-վիտլաքսանտին, վառդեղնավուն-լյուտեին, ծիրանագույն-կարոտին (ա և Բ միասին):

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Цвет М. С. Хромофиллы в растительном и животном мире. Варшава, 1—200 стр., 1910.
2. Попова И. А. Экспериментальная ботаника, серия IV, вып. 16, 154—163, 1963.
3. Сапожников Д. И., Бажанова Н. В., Маслова Т. Г., Попова И. А. и др. Пигменты пластид зеленых растений и методика их исследования. М.—Л., 1—120 стр., 1964.
4. Корнюшенко Г. А., Сапожников Д. И. Методы комплексного изучения фотосинтеза Л., 181—192 стр., 1969.
5. Корнюшенко Г. А., Попова И. А. Физиология растений, т. 17, вып. 6, 1970.
6. Бажанова Н. В., Геворкян А. Г. Разделение пигментов пластид на незакрепленном активном адсорбенте. Рукопись.