

Z Katedry Biochemii Wydz. Biologii i Nauk o Ziemi UMCS w Lublinie
Kurator: prof. dr Adam Paszewski

Jerzy ŁOBARZEWSKI

Rozdział chromatograficzny frakcji humusu nie strącalnych w obecności Ca

**Хроматографическое разделение фракций гумуса неосаждающихся
в присутствии ионов Ca**

Partition Chromatography of the Ca-unprecipitable Humic Fractions

Celem niniejszej pracy jest rozdział chromatograficzny związków próchnicznych rozpuszczalnych w alkoholu, a nie dających osadu w obecności jonów wapnia, w środowisku obojętnym. Według systematyki Scheffera (11) kompleks ten zaliczyć można do grupy „Produktów przejściowych kwasów humusowych”. Związki te rozpuszczają się w alkoholu etylowym, wodorotlenku sodu i bromku acetylu, a wytrącają się w kwasie. W toku pracy unikano jednak stosowania energicznie działających środków ekstrakcyjnych, takich jak alkalia, lub stężone kwasy mineralne (10, 19, 21, 27, 8). W ten sposób starano się uniknąć możliwości powstawania artefaktów. Wzięto pod uwagę wyniki notowane w literaturze z lat ubiegłych, mówiące o niebezpieczeństwie używania przy ekstrakcji materiału glebowego temperatury wyższej od 60°C (26). Stosowanie takich temperatur prowadzi do nieodwracalnych zmian w wydobywanym materiale. Punktem wyjścia pracy były rezultaty badań Trojanowskiego (23, 25). Uzyskane przez tego autora wyniki zachęcają do dalszych prac w tym zakresie.

Starano się dokonać rozdziału chromatograficznego metodą bibułową i kolumnową ekstraktów z różnych materiałów glebowych. Przyjęto stosować jako rozpuszczalniki związki organiczne łagodne w użyciu. Na podstawie dostępnej literatury sądzić by można, że wyżej wymienioną metodę da się zastosować do rozfrakcjonowania grupy niskocząsteczkowych związków humusu.

EKSTRAKCYJA MATERIAŁU

Do ekstrakcji użyto sześćioletniej ziemi kompostowej oraz torfu niskiego. Ziemia pochodziła z kompostowania liści drzew różnych gatunków. Torf niski wydobyto z łąk położonych w dzielnicy Lublina „Dzieśiąta”.

Dla przygotowania materiału do ekstrakcji torf rozcierano w młynku, a ziemię kompostową przesiewano przez sита o śr. oczek 1,5 mm. Następnie materiał umieszczano w perkolatorach i dekalcytowano używając 0,5 n HCl. Napęlnione perkolatory przemywano wielokrotnie kwasem aż do zaniku reakcji na Ca. Zawartość perkolatorów wymywano wodą destylowaną tak długo, aż wyciek wykazywał pH 7. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem usuwano wodę z naczyń ekstrakcyjnych. Z kolei ekstrahowano materiał alkoholem etylowym 95°. Ekstrakcję przerywano, gdy barwa perkolatu była jasno słomkowa. Zużywano przeciętnie 3 l alkoholu na 1 kg materiału. Wyciąg alkoholowy zadawano 5^{0/0} roztworem octanu wapnia w ilości 50 ml na 1000 ml ekstraktu. W tych warunkach wytrącają się połączenia kwasów huminowych z wapniem. Osad oddzielono przez dekantację i odrzucono. Pozostały po dekantacji humianów wapnia ekstrakt alkoholowy poddano rozdzielaniu chromatograficznemu. Wyciąg alkoholowy z torfu, uzyskany podanym sposobem, nadawał się bezpośrednio do chromatografowania ze względu na dużą zawartość związków próchnicznych w tym materiale. (W 100 ml roztworu znajdowało się przeciętnie 40 mg suchej masy substancji organicznej). Natomiast wyciąg alkoholowy z ziemi kompostowej należało zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem (15 mm Hg) w temp. 50°C. Po oddestylowaniu alkoholu w kolbie wytwarzała się trwała wodna zawiesina, która częściowo rozpuszcza się w mieszaninie n-butanolu i eteru naftowego (stosunek obj. 2:1). nierozpuszczalną pozostałość odrzucono. Dodatek eteru naftowego (temp. wrzenia 37°C) zmniejszał zdolność mieszania się wody zawartej w zawieszynie związków humusowych z n-butanolem. Eter naftowy usuwano pod zmniejszonym ciśnieniem (15 mm Hg) w temp. 25°C. Roztwór butanolewowy związków humusowych uzyskanych z ziemi kompostowej był przezroczysty o barwie ciemno brązowej. Zawierał w 100 ml 50 mg suchej substancji organicznej. Tak przygotowany ekstrakt użyto do chromatografii.

CHROMATOGRAFIA BIBUŁOWA

Rozdział chromatograficzny ekstraktów z ziemi kompostowej i torfu wykonano na bibule Whatman nr 1. Stosowano technikę chromatografii wstępującej na paskach bibuły o wymiarach 25×6 cm w kamerach

szklanych. Chromatogram w czasie rozwijania obserwowano w świetle lampy kwarcowej z filtrem Wooda.

Przebadano następujące układy w różnych stosunkach nie uzyskując rozdziela:

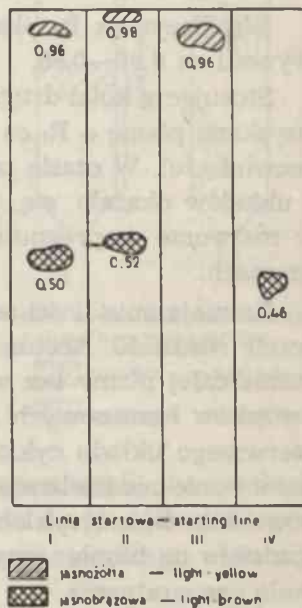
- aceton — n-butanol
- aceton — n-butanol — kwas octowy
- aceton — n-butanol — kwas winowy
- n-butanol — kwas olejowy
- n-butanol — cykloheksan
- alkohol etylowy — kwas olejowy

Ryc. 1. Chromatogramy i rechromatogramy bibułowe. Bibuła Whatman nr 1 buforowana mieszaniną 3% etanolowych roztworów: kwas cytrynowy — cytrynian sodu w stos. 1:40 obj. Chromatogram rozwijany kolejno układami: a) aceton — cykloheksan — kwas octowy (5:2, 5:0,1 obj.), b) n-butanol — HCL (10:0,2 obj.). Współczynniki R_f oznaczono na rycinie liczbami ułamkowymi. Barwy plam widoczne są w świetle ultrafioletowym. I. Chromatogram ekstraktu n-butanolowego z ziemi kompostowej sześćoletniej. II. Chromatogram ekstraktu etanolowego z torfu niskiego. III. Rechromatogram frakcji wymytej z kolumny układem a). Ułożenie plamy i jej barwa są analogiczne dla ekstraktu z ziemi kompostowej i torfu niskiego. IV. Rechromatogram frakcji wymytej z kolumny układem b). Ułożenie plamy i jej barwa są analogiczne dla ekstraktu z ziemi kompostowej i torfu niskiego.

Front układu po 3 godz.

Paper chromatograms and rechromatograms. Whatman paper No 1 buffered with mixture of 3 per cent ethanol solutions of citric acid and sodium citrate (1:40 vol.). Chromatogram developed successively with the systems: a) acetone — cyclohexane — acetic acid (5:2,5:0,1 vol.), b) n-butanol — HCL (10:0,2 vol.) R_f coefficients are shown in the Figure in form of fractions. Colours of spots are seen in ultraviolet light. I. Chromatogram of n-butanol extract from six-year old compost earth. II. Chromatogram of ethanol extract from low peat. III. Rechromatogram of fraction eluted from column with system a). Position and colour of spot analogous to those of the extract from compost earth and low peat. IV. Rechromatogram of fraction eluted from column with system b). Position and colour of spot analogous to those of the extract from compost earth and low peat.

Front of the system after 3 hours.



Użycie bibuły buforowanej i układu: aceton — cykloheksan — kwas octowy spowodowało rozwinięcie chromatogramu. Zastosowano także drugi układ: n-butanol — HCl. Do impregnacji używano mieszaniny 3%

alkoholowych roztworów: kwas cytrynowy — cytrynian sodu w stosunku 1 : 40.

Paski bibuły spryskiwano buforem i suszono w temp. 60°C. Na zaimpregnowaną bibułę наносono przygotowane roztwory związków próchnicznych z mikropipety. Pojemność mikropipety wynosiła 0,006 ml. Na jeden chromatogram zużywano 0,06 ml. Po nakropleniu roztworu substancji humusowych, bibułę suszono na powietrzu.

Chromatogram rozwijano kolejno dwoma układami w jednym kierunku. Skład eluentów:

1. aceton — cykloheksan — kwas octowy 5 : 2,5 : 0,1 obj.
2. n-butanol — HCl 10 : 0,2 obj.

Współczynnik R_f plamy przesuniętej przy użyciu pierwszego układu wynosił ca 0,96—0,98.

Stosując z kolei drugą mieszaninę rozpuszczalników: n-butanol — HCl uzyskano plamę o R_f ca 0,50—0,52. (Ryc. 1 uwidacznia chromatogram po rozwinięciu). W czasie prób nad dobraniem odpowiedniego składu buforu i układów okazało się, że zwiększanie zawartości kwasu cytrynowego w roztworze impregnującym powoduje rozlewanie plam na chromatogramach.

Zmniejszanie ilości acetonu w pierwszym układzie wywoływało hamowanie rozdziału. Aceton z dodatkiem kwasu octowego powodował podnoszenie całej plamy bez widocznego rozdziału. Cykloheksan nie rozpuszcza związków humusowych zawartych w badanych roztworach. Dodając do pierwszego układu cykloheksanu przypuszczano, że uzyska się wybiórcze hamowanie rozdzielanego kompleksu. Rozdział przy użyciu układu z odpowiednią ilością cykloheksanu dał pomyślne rezultaty. Po opracowaniu rozdziału na bibule przystąpiono do prób zastosowania tej metody na skalę preparatywną.

CHROMATOGRAFIA KOLUMNOWA

Z literatury wynika, że adsorbenty mineralne stosowane w chromatografii kolumnowej związków humusowych okazały się niekorzystne w preparatyce (7, 20, 6, 23).

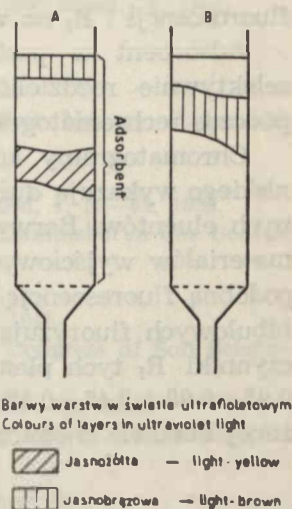
Autor używał do przygotowania kolumn celulozy sposzowanej Whatmana, wykonanej przez firmę W. i R. Balston. (Pełna nazwa brzmi: „Genuine Whatman Cellulose Powder for Chromatography, B. Quality, Chemically Prepared”). Celulozę suszono w temp. 100°C i przesiewano. Kolumnę formowano z 20 g celulozy. Tak przygotowany adsorbent zalewano 150 ml buforu cytrynianowego (kwas cytrynowy — cytrynian sodu 1 : 40). Po wymieszaniu napełniano tą zbuforowaną celulożą kolumnę szklaną. Nadmiar buforu odciekał swobodnie, po czym uciskano

adsorbent stemplem szklanym. Na gotową kolumnę nanoszono 25 ml roztworu przygotowanego do chromatografii. Kolejne dwie frakcje eluowano z kolumny:

- I) układem — aceton-cykloheksan-kwas octowy 5 : 2,5 : 0,1 obj.,
- II) układem — n-butanol-HCl 10 : 0,2 obj.

Rozdział obserwowano w świetle ultra fioletowym.

Wygląd kolumny w czasie rozdziału przedstawiony jest na rycinie 2.



Ryc. 2. Kolejne etapy elucji chromatogramu kolumnowego. A — chromatogram w czasie wymywania frakcji I przy użyciu układu aceton — cykloheksan — kwas octowy w stos. 5 : 2, 5 : 0,1 obj. B — chromatogram w czasie wymywania frakcji II przy użyciu układu n-butanol — HCL w' stos. 10 : 0,2 obj.

Successive stages of elution of column chromatogram. A — chromatogram during elution of fraction I with the system acetone — cyclohexane — acetic acid (5 : 2, 5 : 0,1 vol.) B — chromatogram during elution of fraction II with the system n-butanol — HCL (10 : 0,2 vol.).

Otrzymane z kolumny frakcje poddawano rechromatografii na paskach bibuły Whatman nr 1 wg zasad opisanych w rozdziale pt. „Chromatografia bibułowa”. Wykonane podaną metodą chromatogramy wykazują jednorodność otrzymanych z kolumn eluatów.

Zestawienie wartości rechromatografowanych frakcji

Frakcja	R_f	Zawartość suchej substancji organicznej w 100 ml roztworu
I	0,95 — 0,97	7,5 mg
II	0,46 — 0,48	5,0 mg

Otrzymane w trakcie rozdziału preparaty wysuszone w temp. 50°C pod zmniejszonym ciśnieniem i poddano hydrolizie 6 n HCl przez 12 godzin. W zubożonych hydrolizatach stwierdzono obecność aminokwasów próbą ninhydrynową. Dalsze badania nad składem aminokwasowym uzyskanych frakcji są w toku.

DYSKUSJA

Podaną metodą rozdziału uzyskano dwie jednorodne frakcje części alkoholowego wyciągu nie strącającego się w obecności jonów Ca. Materiałem była sześćioletnia ziemia kompostowa i torf niski. W literaturze nie spotyka się dotychczas badań nad rozdziałem tej grupy związków. Zastosowanie łagodnych metod ekstrakcji i rozdziału usuwa do pewnego stopnia możliwość powstawania artefaktów. Przechowywane przez 6 miesięcy roztwory przygotowane do chromatografii nie wykazywały różnic fluorescencji i R_f na wykonywanych w tym czasie chromatogramach.

Adsorbent w postaci celulozy sproszkowanej Whatmana pozwalał selektywnie rozdzielić eluowane warstwy z kolumny. Stwierdzono to podczas rechromatografii otrzymanych frakcji na bibule.

Chromatogramy kolumnowe ekstraktu z ziemi kompostowej i torfu niskiego wykazują duże podobieństwo w zachowaniu się wobec zastosowanych eluentów. Barwy kolejno spływających frakcji otrzymanych z obu materiałów wyjściowych obserwowane w świetle ultra fioletowym mają podobną fluorescencję. Odpowiadające sobie plamy na chromatogramach bibułowych fluoryzują podobnie w przechodzącym świetle U. F. Współczynniki R_f tych plam wykazują niewielkie odchylenia, a mianowicie 0,95—0,98 i 0,46—0,52. Na podstawie tych oznaczeń sądzić można o zbliżonej budowie chemicznej rozdzielanych związków humusowych.

WNIOSKI

1. Przeprowadzono rozdział chromatograficzny wyciągu etanolowego z ziemi kompostowej i torfu niskiego, metodą bibułową i kolumnową. Wyłączono z badań frakcję zwaną „kwasami hymatomelanowymi”. Jako adsorbenta użyto celulozy sproszkowanej Whatmana. Stosowano impregnacje buforem: kwas cytrynowy-cytrynian sodu w stosunku 1:40 obj. Eluacje przeprowadzano kolejno dwoma układami:

I) aceton-cykloheksan-kwas octowy 5:2, 5:0,1 obj.

II) n-butanol-HCl 10:0,2 obj.

2. W celu indykacji stosowano światło lampy kwarcowej wyróżniając dwa barwne składniki badanego roztworu.

3. Przeprowadzona rechromatografia na bibule Whatman nr 1 potwierdziła jednorodność otrzymanych z kolumn frakcji.

4. Odpowiednie frakcje wydzielone z różnych materiałów wyjściowych wykazywały na chromatogramach bibułowych niewielkie różnice współczynnika R_f . Wskazuje to na podobną budowę chemiczną związków.

Składam serdeczne podziękowanie Kuratorowi Zakładu Biochemii UMCS — Prof. Dr Adamowi Paszewskiemu za umożliwienie wykonania niniejszej pracy. Dziękuje również Kand. Nauk Jerzemu Trojanowskiemu za krytyczne uwagi dotyczące pracy oraz za korektę merytoryczną.

PIŚMIENNICTWO

1. Beutelspacher H.: Ztschr. für Pfl.-ern., Düng. u. Bodenk., 57, 57—65, 1952.
2. Biber W. A., Bogolubow N. S.: Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 76, 1951.
3. Forsyth W. G. C.: Biochem. J., 41, 176, 1947.
4. Fuchs W.: Die Chemie der Kohle, Berlin 1931.
5. Görtner R. A.: Soil. Sci., II, 395, 1916.
6. Hagashi Tsunetomo i Nagai Takeo: J. Sci. Soil Manure, Japan, 25, 285, 1955.
7. Hock A.: Bodenk. u. Pflanz.-ernährung, 5, 1937.
8. Jiro Kosaka, Chikabumi Honda: Soil and Plant Food, 1, 59—62, 1955.
9. Klamroth B.: Beiträge zur Charakterisierung der Huminsäuren des Bodens. Diss., Göttingen 1954.
10. Oden S.: Die Huminsäuren, Dresden u. Leipzig 1922.
11. Scheffer F.: Humus u. Humusdüngung. Stuttgart 1941.
12. Scheffer F.: Transaction of the V-th International Congress of Soil Science. Leopoldville, I, 208—228, 1954.
13. Scheffer F., Welte E.: Naturwissenschaft, 37, 321—329, 1950.
14. Scheffer F., Welte E.: Mitt. über Humins. Landw. Forschung, 1, 190—220, 1950.
15. Scheffer F., Welte E.: Landw. Forsch., 1, 81, 1950.
16. Scheffer F., Welte E.: Mit. über Humins. Landw. Forschung, 3,1—6, 1952.
17. Scheffer F., Welte E.: Ztschr. für Pfl.-ern., Düng. u. Bodenk., 63, 108, 98—119, 1953.
18. Scheffer F., Ziehlman i Schlüter: Ztschr. für Pfl.-ern., Düng. u. Bodenk., 70 (115), 3, 260—274, 1955.
19. Simon K.: Ztschr. für Pfl.-ern., Düng. u. Bodenk., 14, 252, 1929.
20. Souci S. W., Helnen O. L.: Zitt. bei die Chemie des Moores. Stuttgart, 55, 1938.
21. Springer U.: Bodenk. u. Pfl.-ernähr., 312, 1938.
22. Thiele H., Kettner H.: Kolloid Z., 130, 3, 131—160, 1953.
23. Trojanowski J.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C., vol. VI, 9, Lublin 1952.
24. Trojanowski J.: Acta Soc. Bot. Pol., XXIII, 1, 1954.
25. Trojanowski J.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C., vol. X, 11, Lublin 1957.
26. Welte E.: Ztschr. für Pfl.-ern., Düng. u. Bodenk., 56 (101), 1—3, 105—139, 1952.
27. Welte E.: Vortrag auf der Tagung der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft, Bonn 1953.

Р Е З Ю М Е

Декальцированный 6-летний компост и низинный торф экстрагировались этиловым спиртом. Было сделано хроматографическое разделение части спиртового экстракта не осаждающегося в присутствии ионов Са. Согласно систематике Шеффера (11) этот комплекс можно отнести к группе „Переходных продуктов гумусовых кислот”.

В бумажной хроматографии автором применялась восходящая техника.

Бумага Whatman № 1 пропитывалась смесью 3% ых спиртовых растворов: лимонная кислота—лимоннокислый натрий (1 : 40 объем).

Элюирование проводилось двумя смесями:

- а) ацетон — циклогексан — уксусная кислота (5:2,5:0,1 объем),
- б) n — бутанол — HCl (10:0,2 объем).

Ход процесса по разделению экстрактов из компоста и низинного торфа был почти аналогичен (Рис. 1).

Принимая во внимание величину Rf и цвета в ультрафиолетовом свете можно бы думать о сходном химическом строении гумусовых соединений, содержащихся в исследуемых экстрактах, полученных из обоих почвенных материалов. Для получения фракций в препаративном масштабе было проведено разделение экстрактов в колонке. Колонки формировались из порошкообразной целлюлозы Whatman'a (произидент W. и R. Balston „Genuine Whatman Cellulose Powder for Chromatography, B Quality, Chemically Prepared”).

Сперва приготавливалась смесь из 20 г высушенной в 100°С целлюлозы с 150 мл буфера: лимонная кислота—лимоннокислый натрий (1:40 объем), затем этим буферным адсорбентом наполнялась стеклянная колонка. Далее, на так приготовленную колонку было нанесено 25 мл раствора приготовленного для хроматографического анализа. Две фракции по очереди элюировались из колонки следующими системами:

- 1) ацетон — циклогексан — уксусная кислота (5:2,1:0,1 объем),
- 2) n — бутанол — HCl (10:0,2 объем).

Полученные в колонке хроматограммы экстрактов из компоста и низинного торфа обнаруживают большое сходство в реагировании на примененные элюаты. Цвета последовательно сплывающих фракций, наблюдаемые в ультрафиолетовом свете обладают сходной флюоресценцией (Рис. 2).

Рис. 1. Хроматограммы и рехроматограммы на бумаге.

Коэффициенты R_f обозначены на рисунке дробными числами. Цвета пятен видны в ультрафиолетовом свете. I. Хроматограмма п — бутанолового экстракта из 6-летнего компоста. II. Хроматограмма этанолового экстракта из низинного торфа. III. Рехроматограмма фракции вымытой из колонки системой „а”. Форма пятна и ее цвет аналогичны для экстракта из компоста и из низинного торфа.

IV. Рехроматограмма фракции вымытой из колонки системой „b”. Форма пятна и ее цвет аналогичны для экстракта из компоста и из низинного торфа.

Рис. 2. Последовательные фазы элюирования хроматограммы в колонке.

A—Хроматограмма во время вымывания фракции I при помощи системы: ацетон—циклогексан—уксусная кислота в отн. 5:2,5:0,1 объем.

B — Хроматограмма во время вымывания фракции II системой: п — бутанол—HCl в отн. 10:0,2 объем.

SUMMARY

Six-year old compost earth and low peat deprived of calcium were extracted with ethyl alcohol. The part of the alcohol extract not undergoing precipitation in the presence of the Ca ions was partitioned chromatographically. According to Scheffer's classification this complex may be included into the group of „transitory products of humic acids”.

In the paper chromatography the ascending technique was used. Whatman paper No 1 was impregnated with the mixture of 3 per cent alcohol solutions of citric acid and sodium citrate (1:40 vol.). Elution was carried out by means of two systems used successively:

- a. acetone — cyclohexane — acetic acid (5 : 2.5 : 0.1 vol.),
- b. n-butanol HCl (10 : 0.2 vol.).

The partition of extracts from compost earth and low peat was carried out in a similar way (Fig. 1).

The R_f values as well as the colours observed in ultraviolet light might point to a similar chemical structure of humic compounds contained in the examined extracts of both soil materials. In order to obtain fractions on a larger scale, the extracts were partitioned according to the column method. Columns were formed of Whatman's powdered cellulose (produced by W. & R. Balston „Genuine Whatman Cellulose Powder for Chromatography, B Quality, Chemically Prepared”). 20 g of cellulose dried at 100°C were mixed with 150 ml of citrate buffer (citric acid — sodium citrate), 1 : 40 vol. then the glass column was filled with the buffered adsorbent. 25 ml of solution prepared for chromatography

were then poured on the column. The two fractions were eluted from the column with the following systems:

I) — acetone — cyclohexane — acetic acid (5 : 2.5 : 0.1 vol.),

II) — n-butanol — HCl (10 : 0.2 vol.).

Column chromatograms of extracts from compost earth and low peat show a great resemblance in their behaviour against the applied eluents. The colours of the separate fractions obtained from both materials observed in the ultraviolet light have a similar fluorescence. (Fig. 2).