

JAN KĘPCZYŃSKI

*Instytut Sadownictwa w Skierniewicach*ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII GAZOWEJ  
W ANALIZIE HORMONÓW ROŚLINNYCH

Metoda chromatografii gazowej została po raz pierwszy zastosowana w badaniach biochemicznych przez Jamesa i Martina w 1952 r. (25). Od tego czasu metodzie tej poświęcono wiele uwagi. Zastosowaniu chromatografii gazowej w analizie chemicznej poświęcono szereg opracowań naukowych (3, 5, 7, 31, 36, 42, 45). Teoria chromatografii gazowej oraz zasada działania różnych detektorów jest szeroko opisana w podręcznikach oraz pracach specjalistycznych (23, 24, 29, 33, 35, 40, 41). Ze względu na coraz szersze zastosowanie chromatografii gazowej, a szczególnie w połączeniu ze spektrometrią masową do analizy mikroilości związków w materiale roślinnym, zwłaszcza związków hormonalnych, celowe wydaje się przedstawienie metodyki dotyczącej przygotowania próbek hormonów oraz warunków ich analizy.

Zastosowanie chromatografii gazowej w analizie hormonów roślinnych pozwala z jednej strony na stosunkowo łatwą i szybką identyfikację poszczególnych hormonów, z drugiej strony umożliwia badanie stosunkowo mniej doczyszczonych ekstraktów roślinnych. Nie bez znaczenia jest także wysoka czułość metody.

Wykorzystując chromatografię gazową można oznaczać jakościowo i ilościowo substancje hormonalne w stężeniach niższych niż w najbardziej specyficznych biotestach. Dla przykładu przy pomocy biotestu można wykryć stężenia 0,001  $\mu\text{g}$ , natomiast przy zastosowaniu chromatografów wysokiej klasy wykrywa się stężenie rzędu np.  $10^{-6}$  —  $10^{-5}$   $\mu\text{g}$  ABA \* (37).

Większość poznanych dotąd hormonów roślinnych, oprócz etylenu to

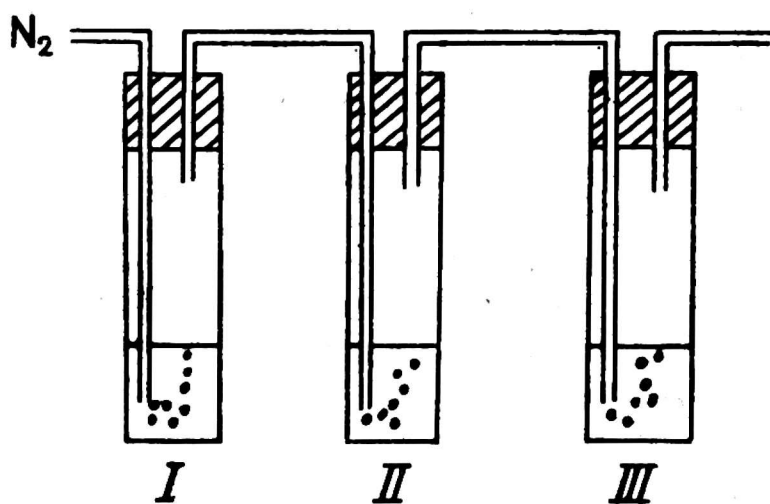
\*) Wykaz stosowanych skrótów:

ABA — kwas abscysynowy, GA — giberelina, IAA — kwas indoliloctowy, IAcA — kwas indoliloakrylowy, IBA — kwas indolilobutyrylowy, ICA — kwas indolilokarboksylowy, IPA — kwas indolilopropionowy, ILA — kwas indolilolaktonowy, 5OHIAA — kwas 5-hydroksyindoliloctowy, 15CA — kwas 5-indolilokarboksylowy, 12CA — kwas 2-indolilokarboksylowy, ME — estry metylowe, TMS — pochodne sililowe, TMSME — etery sililowe estrów metylowych.

substancje stałe, stosunkowo trwałe chemicznie, o charakterze słabych kwasów. Hormony roślinne z wyjątkiem etylenu nie mogą być poddane chromatografii gazowej w ich pierwotnej postaci. Odznaczają się one zbyt słabą lotnością oraz posiadają grupy reagujące z wypełnieniem kolumny. Dlatego też hormony roślinne przed poddaniem ich chromatografii gazowej należy przeprowadzić w odpowiednie bardziej lotne pochodne. W chromatografii gazowej hormonów roślinnych najczęściej analizowanymi pochodnymi są estry metylowe, pochodne siliłowe oraz etery siliłowe estrów metylowych.

### Metylacja

Estry metylowe hormonów roślinnych otrzymuje się w wyniku metylacji za pomocą roztworu trójfluorku boru (12, 42) lub dwuazometanu (31). Metylacja dwuazometanem znalazła jednak większe zastosowanie. Przeprowadza się ją wg metody Schlenka i Gellermana (34) lub wg modyfikacji Powella (31). Metylację przeprowadza się wykorzystując zestaw trzech probówek przedstawiony na rys. 1. Probówki powinny być



Rys. 1. Najczęściej stosowany układ do przeprowadzania metylacji kwasów organicznych

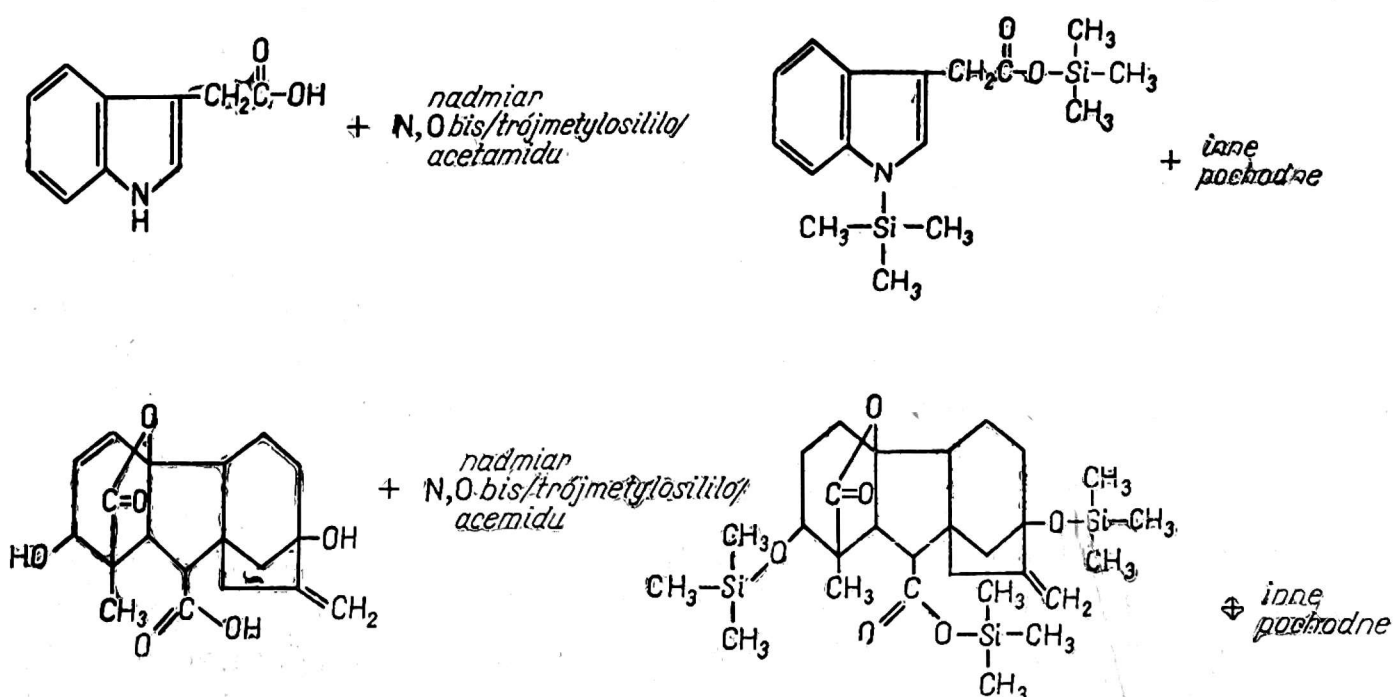
zamknięte teflonowymi korkami i połączone teflonowymi wężkami. W pierwszej probówce znajduje się eter lub chlorek metylu, w drugiej 1 ml 60% wodorotlenku potasowego i 1,5 ml carbitolu. Trzecia probówka zawiera 2—3 ml 10% metanolu w eterze lub chlorku metylenowym, w których rozpuszczony jest badany związek lub mieszanina. Dwuazometan ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ) powstaje w probówce drugiej po dodaniu 115 mg diazaldu rozpuszczonego w 1,5 ml eteru lub chlorku metylenowego wg reakcji:

$$\text{p-CH}_3 \text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{N}(\text{NO}) \text{CH}_3 + \text{KOH} \text{p-CH}_3 \text{C}_6\text{H}_4 \text{SO}_2 \text{OK} + \text{CH}_2\text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$$

Powstanie dwuazometanu uwidacznia się pojawieniem się w próbce drugiej żółtego zabarwienia. Dwuazometan zostaje rozcieńczony w strumieniu azotu nasyconym eterem lub chlorkiem metylenowym i jest przenoszony z próbki drugiej do trzeciej. W próbce trzeciej zachodzi natychmiastowa metylacja. Jedynym produktem ubocznym tej reakcji jest azot, co stanowi poważną zaletę dwuazometanu jako czynnika estryfikującego. Metanolowi przypisuje się rolę katalizatora tej reakcji (34). Po pojawieniu się w próbce trzeciej żółtego zabarwienia, pochodzącego od nadmiaru dwuazometanu, należy ją odłączyć, a roztwór odparować w strumieniu azotu. Dwuazometan jest związkiem bardzo toksycznym i silnie wybuchowym. Przy przeprowadzaniu metylacji należy zachować odpowiednie warunki bezpieczeństwa, używając niewielkich ilości diazaldy oraz przeprowadzając reakcję pod sprawnym wyciągiem. Zaleca się stosowanie okularów ochronnych oraz gumowych rękawiczek. Dwuazometan jest dobrym czynnikiem metylującym stosowanym szczególnie do kwasów trudno ulegających metylowaniu. Związek ten nie jest jednak chętnie używany ze względu na jego właściwości wybuchowe.

### Sililacja

Sililacja słabych kwasów organicznych jest niewątpliwie bezpieczniejszą metodą tworzenia lotnych pochodnych. Reakcja zachodzi wg przedstawionego schematu (rys. 2). Metoda ta wymaga bardzo ścisłego przestrzegania bezwodnego środowiska w mieszaninie reakcyjnej, gdyż uwod-



Rys. 2. Reakcje sililacji IAA i GA<sub>3</sub>

nienie może powodować odwrócenie reakcji. Przy niedoborze czynnika silylującego tworzy się więcej niż jedna pochodna badanego związku, stąd też konieczne jest stosowanie nadmiaru odczynnika. Silylację hormonów roślinnych przeprowadza się używając N, O-bis (trójmetylosililo) acetylamidu (BSA) jako odczynnika silylującego. W chromatografii gazowej hormonów roślinnych stosuje się również trójmetylosililowe etery estrów metylowych badanych substancji (10). Według tej metody rozpuszczone w suchej pirydynie próbki estrów metylowych traktuje się roztworem: pirydyna : sześciometylodwusilizan : chlorek trójmetylosililowy w proporcji 10 : 2 : 2.

### Chromatografia gazowa giberelin

Analiza giberelin w materiale roślinnym sprawia szczególnie duże trudności ze względu na ogromną liczbę tych związków i ich chemiczne podobieństwo (20).

Chromatografię gazową analizy giberelin zastosowali po raz pierwszy Ikekawa i wsp. w 1963 r. (19). Autorzy ci chromatografowali metylowe estry standardowych giberelin od  $A_1$ — $A_9$  na kolumnach z fazami ciekłymi QF-1 i SE-30. Uzyskane wyniki wykazały, że faza ciekła QF-1 daje lepszy rozdział giberelin  $A_1$  od  $A_3$  i  $A_4$  od  $A_7$ . Piki wszystkich badanych giberelin były ostre i wysokie, jedynie pik gibereliny  $A_8$  był zbyt szeroki na SE-30, a na QF-1 giberelinie  $A_8$  odpowiadało kilka pików.

Cavel i MacMillan 1967 (10) używając wypełniaczy QF-1 i SE-30 przeprowadzili identyfikację 17 giberelin w niedojrzałych nasionach *Phaseolus multiflorus* (tab. 1). Hormony te rozdzielano jako estry metylowe i etery silylowe estrów metylowych. Gibereliny  $A_1$ ,  $A_4$ ,  $A_5$ ,  $A_6$ ,  $A_7$ , wykryto w surowym kwaśnym ekstrakcie z niedojrzałych nasion bezpośrednio po estryfikacji. Na kolumnie QF-1 nie udało się jednak rozdzielić estrów metylowych giberelin  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  co zaprzeczyło danym uzyskanym przez Ikekawa (19). Metylowe pochodne giberelin  $A_5$  i  $A_{10}$  nie rozdzielały się na żadnej ze stosowanych kolumn. Niektóre zmetylowane gibereliny odznaczające się długimi czasami retencji miały zbyt szerokie piki na kolumnie wypełnionej QF-1. Natomiast wszystkie etery silylowe estrów metylowych dawały na obu kolumnach ostre piki.

Gibereliny  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  oraz  $A_5$  i  $A_{10}$  są łatwo odróżniane jeśli są chromatografowane jako etery silylowe estrów metylowych (TMSME). Gibereliny  $A_4$  i  $A_7$  są najlepiej rozdzielane jako TMSME pochodne. Metylowy ester gibereliny  $A_8$  chromatografowany na obydwu wypełnieniach charakteryzował się bardzo długimi czasami retencji i zbyt szerokimi pikami. Giberelina  $A_8$  jest łatwo wykrywana dopiero po przeprowadzeniu jej



Tabela 1

Czasy retencji ME i TMSME pochodnych giberelin wg Cavella MacMillana (10)

Gibereliny	Estry metylowe		Etery silylowe estrów metylowych	
	a) 2% QF-1	b) 2% SE-33	c) 2% QF-1	d) 2% SE-33
A <sub>1</sub>	19,7	14,7	16,3	16,8
A <sub>2</sub>	20,7	15,1	23,1	8,3
A <sub>3</sub>	20,6	17,6	19,1	18,3
A <sub>4</sub>	8,4	7,4	11,2	8,9
A <sub>5</sub>	10,4	6,7	11,3	8,1
A <sub>6</sub>	17,1	9,4	19,1	11,4
A <sub>7</sub>	9,1	7,9	12,8	9,5
A <sub>8</sub>	38,6	30,7	20,7	29,3
A <sub>9</sub>	4,3	3,9	(7,4)	(4,5)
A <sub>10</sub>	10,4	6,9	16,0	10,8
A <sub>11</sub>	6,9	5,1	(12,3)	(6,0)
A <sub>12</sub>	2,0	4,0	(3,5)	(4,9)
A <sub>13</sub>	6,2	11,9	6,2	12,2
A <sub>14</sub>	4,8	8,4	4,5	8,7
A <sub>15</sub>	14,6	9,9	(24,9)	(12,4)
Bambo	8,7	9,9	9,8	12,9
Lupinus	10,7	16,5	6,9	13,3
5 Cholestan	3,1	20,4	5,1	23,3

Aparat — chromatograf Pye 104, detektory płomieniowo-jonizacyjne, kolumny szklane 5 stóp  $\times \frac{1}{4}$ , 2% SE-33 i 2% QF-1 na silanizowanym Gaschrom Q

a) temperatura kolumn 201°C, gaz nośny N<sub>2</sub>, prędkość przepływu 60 ml/min

b) temperatura kolumn 190°C, gaz nośny N<sub>2</sub>, prędkość przepływu 80 ml/min

c) temperatura kolumn 179°C, gaz nośny N<sub>2</sub>, prędkość przepływu 84 ml/min

d) temperatura kolumn 187°C, gaz nośny N<sub>2</sub>, prędkość przepływu 75 ml/min

W nawiasach podano t<sub>R</sub> metylowych estrów.

w silylowy eter estru metylowego, przy czym lepszy rozdział uzyskano na kolumnie SE-33. Estrów metylowych giberelin A<sub>5</sub> i A<sub>10</sub> i ich eterów silylowych nie udało się jednak rozdzielić na żadnej z używanych kolumn (25).

Cavel i MacMillan (10) zauważyli korelację między czasem retencji estrów metylowych giberelin rozdzielanych na QF-1, a ilością grup hydroksylowych lub epoksydowych. Najkrótszymi czasami retencji charakteryzują się gibereliny A<sub>12</sub> i A<sub>9</sub> nie posiadające żadnej z rozpatrywanych grup. Dłuższymi czasami retencji odznaczają się kolejno gibereliny A<sub>14</sub>, A<sub>13</sub>, A<sub>11</sub>, A<sub>4</sub>, giberelina „Bambo”, A<sub>7</sub>, A<sub>5</sub>, i A<sub>10</sub> natomiast „Lupinus” 1, A<sub>6</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub> i A<sub>2</sub> zajmują miejsce pośrednie. Najdłuższym czasem retencji cha-

rakteryzują się giberelina A<sub>8</sub>, która posiada trzy grupy hydroksylowe. Spośród przebadanych 17 giberelin jedynie A<sub>15</sub> nie podlega tej zależności. W wyniku dalszych badań (25) okazało się, że tej zależności nie podlegają także inne gibereliny.

Gibereliny można również badać jako siliłowe pochodne otrzymane bezpośrednio bez uprzedniej metylacji. Davis i wsp. (11) zidentyfikowali trójmetrylosililową (TMS) pochodną kwasu giberelowego w częściowo oczyszczonych ekstraktach z owoców bawełny. Gibereliny A<sub>3</sub>, A<sub>8</sub>, A<sub>9</sub>, A<sub>4</sub> i A<sub>7</sub> zostały wykryte jako TMS pochodne w dwóch mutantach genowych *Lycopersicum esculentum* (30).

Do indentyfikacji zastosowano SE-30, SE-52 oraz OV-22. Pochodne siliłowe giberelin A<sub>1</sub> i A<sub>3</sub> nie rozdzielały się na kolumnie SE-30 natomiast rozdzielały się na pozostałych.

Stwierdzono, że czasy retencji dla giberelin A<sub>4</sub> i A<sub>7</sub> są identyczne na SE-30 i OV-22, a na SE-52 różnią się tylko w nieznacznym stopniu.

Tabela 2

Względne czasy retencji metylowych pochodnych indoli wg Grunwald i wsp. (16)

Estry związków indolowych	Stosowane wypełnienia kolumn			
	3,5% Versamid 900 (a)	3% HI-EFF -8BP (b)	4,8% SE-52 (c)	7,3% SE-30 (d)
Etyl IAA	1	1	1	1
ICA	2,26	1,79	0,84	0,99
IAA	0,96	1,02	1,09	0,99
IPA	1,09	1,25	1,23	1,05
IBA	1,48	1,78	1,53	1,47
ILA	2,72	3,6	1,79	1,91
IACA	7,19	6,29	2,65	2,53
I2CA	0,33	0,35	0,40	0,45
I5CA	1,49	1,34	0,87	0,84
5-OH IAA	2,16	2,82	1,72	1,76

Chromatograf Research Specialties model 600, kolumny 1,83 m × 6 mm, detektor jonizacyjny (90 Sr)

a) temperatura kolumn 205°C, detektor 300°C, gaz nośny Ar, prędkość przepływu 110 ml/min

b) temperatura kolumn 110°C, detektora 210°C, gaz nośny Ar, prędkość przepływu 110 ml/min

c) temperatura kolumn 210°C, detektora 300°C, gaz nośny Ar, prędkość przepływu 110 ml/min

d) temperatura kolumn 208°C, detektora 300°C, gaz nośny Ar, prędkość przepływu 110 ml/min

Fazy ciekłe nanoszono na Anakrom ABS 70/80 mesh.

Aung i wsp. (2) zastosowali chromatografię gazową do identyfikacji giberelin jako TMSME pochodnych w różnych tkankach cebuli *Tulipa gesneriana*. Autorzy wykryli w frakcji wolnych giberelin z łusek tulipana gibereliny A<sub>1</sub>, A<sub>5</sub>, A<sub>8</sub>, A<sub>9</sub>, natomiast w frakcji zawierającej gibereliny w formie związanej znajdowała się jedynie giberelina A<sub>9</sub>. W korzeniu wykryto giberelinę A<sub>5</sub> w frakcji wolnej i giberelinę A<sub>9</sub> w związanej. Standardowe gibereliny A<sub>4</sub>, A<sub>6</sub>, A<sub>7</sub> nie uległy rozdzielaniu na używanej przez tych autorów kolumnie. Przy pomocy chromatografii gazowej stwierdzono także obecność szeregu różnych giberelin, analizowanych w postaci estrów metylowych, w dojrzałych nasianach *Cucumis sativus* i *Cucumis melo* (17).

Stosując estry metylowe i etery silylowe estrów metylowych można obecnie identyfikować za pomocą chromatografii gazowej przeszło 20 giberelin. Do oznaczania giberelin za pomocą chromatografii gazowej nadają się szczególnie ich pochodne trójmetylosilylowe estrów metylowych, które charakteryzują się krótszymi czasami retencji i ostrzejszymi pikami niż odpowiadające im estry metylowe. Metylowe pochodne mają zbyt długie czasy retencji i zbyt szerokie piki, co utrudnia ilościowe i jakościowe ich określenie.

Dodatkową zaletą chromatografii gazowej w badaniach giberelin jest eliminowanie niekorzystnego wpływu prostych kwasów organicznych, które przeszkadzają w rozdzieleniu giberelin za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. W chromatografii gazowej kwasy te opuszczają kolumnę chromatograficzną razem z rozpuszczalnikiem, nie zakłócając w ten sposób analizy giberelin.

### Chromatografia gazowa auksyn

Jakkolwiek auksyny, a szczególnie IAA, należą do grupy najwcześniej poznanych hormonów roślinnych, technikę chromatografii gazowej do ich analizy wprowadzono nieco później niż do analizy giberelin. Chromatografia gazowa auksyn sprawia znacznie mniej kłopotów niż związków z grupy giberelin.

Chromatografię estrów metylowych, propylowych i butyrylowych kwasów indolowych stosowali Stowe i Schilke (42). Całkowity rozdział badanych związków uzyskali autorzy na złożu Versamid 900 dla estrów propylowych i butyrylowych. Używając pochodnych metylowych Powell (31) zidentyfikował kwas 3-indoliloctowy w kukurydzy oraz nityl kwasu 3-indoliloctowego w kapuście. Dedio i Zalik (12) chromatografowali neutralne związki indolowe oraz estry metylowe i propylowe kwaśnych indoli. Uzyskali całkowity rozdział estrów metylowych i propylowych kwasów indoliloctowego, indolilobutyrylowego. Dłuższe czasy retencji uzyskano dla pochodnych propylowych. Autorzy ci otrzymali najlepszy rozdział ba-

danych związków stosując fazę ciekłą SE-30, natomiast Versamid 900 okazał się mniej przydatny. Wyniki te nie zostały potwierdzone w pracy Grunwalda (16). Autor ten przebadął rozdział metylowych pochodnych związków indolowych używając szeregu faz ciekłych: Versamid 900, SE-30, SE-52 i HI-EFF-8BP (tab. 2). Najlepszym złożem do rozdziału tych związków okazał się Versamid 900, a najgorszym SE-30. Spośród 10 estrów metylowych związków indolowych jedynie dwa estry indolilo-3-butyrylowy i indolilo-5-karboksyłowy rozdzielały się niedostatecznie. Rozdzielono je dopiero używając HI-EFF-8BP jako fazy ciekłej. Przy pomocy chromatografii gazowej zidentyfikowano też kwas indoliloctowy, indolilokarboksyłowy, indolilopropionowy, indolilobutyrylowy w *Nicotiana glauca* i *N. langsdorffii* (4).

### Chromatografia gazowa niektórych roślinnych inhibitorów wzrostu

Chromatografię gazową zastosowano również do identyfikacji i ilościowego oznaczania w materiale roślinnym kwasu abscysynowego powszechnie występującego hormonu o charakterze inhibitora wzrostu. Pierwsze doniesienia na ten temat ukazały się w 1968 r. jednocześnie z kilku laboratoriów. Gaskin i MacMillan (14) oznaczyli kwas abscysynowy bezpośrednio po metylowaniu nieoczyszczonej kwaśnej frakcji z soku jabłek. W tej frakcji wykryto równocześnie dwa izomery kwasu abscysynowego (ABA), cis-trans ABA, trans-trans ABA. Wyniki te potwierdzono stosując chromatografię gazową z spektrometrem masowym jako detektorem. W tym samym roku Lenton i wsp. (21) wykryli ABA w postaci estru metylowego przy pomocy chromatografii gazowej w soku z drewna *Salix viminalis*. Przy pomocy chromatografii gazowej stwierdzono również występowanie kwasu abscysynowego w oczyszczonych ekstraktach z *Betula pubescens*, *Citrus medica* i *Taxus baccata* po ich uprzednim zmetylowaniu (21). Kwas abscysynowy oznaczono także jako pochodną siliolową, w częściowo oczyszczonych ekstraktach z owoców bawełny (11). Kochankov i wsp. (18) użyli chromatografii gazowej do identyfikacji izomerów cis-trans i trans-trans ABA w gruszkach.

Lenton i wsp. (21, 22) zastosowali chromatografię gazową także do ilościowego oznaczania kwasu abscysynowego. Seeley i wsp. (38) przy pomocy tej metody określili zawartość izometrów cis-trans ABA i trans-trans ABA w postaci estrów metylowych w soku jabłek. Kępczyński i wsp. (niepublikowane dane) zastosowali chromatografię gazową do oszacowania zawartości cis-trans ABA w owocach żurawiny.

Za pomocą chromatografii gazowej w połączeniu ze spektrometrią ma-



Tabela 3

## Czasy retencji ME i TMS pochodnych ABA wg różnych autorów

Pochodne ABA	Rodzaj wypełnienia kolumn	Czas retencji ( $t_R$ )
TMS cis-trans ABA	SE-30	16,8
TMS trans-trans ABA	SE-30	17,6
TMS cis-trans ABA	QF-1	17,6 a (11)
TMS trans-trans ABA	QF-1	18,4
ME cis-trans ABA	DC 200	12,0
ME trans-trans ABA	DC 200	16,5 b (37)
ME cis-trans ABA	OV-1	8,5 c (18)
ME cis-trans ABA	SE-30	4,7 d (Kępczyński i wsp. niepubl. dane)
ME cis-trans ABA	XE-60	4,8
ME-fazeinowy	DC 200	11,0 e (44)

- a) Chromatografy Varian Aerograph Model 204 i 650, kolumny stalowe 5 stóp  $\times$   $\times$  1,8 cala, detektor płomieniowo-jonizacyjny, gaz nośny  $N_2$ , prędkość przepływu 25 ml/min, powietrza 300 ml/min,  $H_2$  — 25 ml/min, program temperatury 60—220°C z szybkością 12,8 lub 9,1, temperatura dozownika 180°—190°C, detektora 190°C.
- b) Barber-Colman model 5000, kolumny szklane U-kształtne 6 $\times$ 3 mm, DC 200 na Analabs SD 60—70 mesh, temperatura kolumny 200°C, dozownika 210°C, detektora 225°C, gaz nośny Argon, prędkość przepływu 120 ml/min.
- c) Chromatograf LKB-2091 GL z spektrometrem masowym, kolumny szklane 1,5 m  $\times$  2 mm, 2% OV-1 na Chromosorbie W 60—80 mesh, temperatura początkowa 150°C, końcowa 250°C, szybkość przyrostu temperatury 5 C/min, gaz nośny hel, prędkość przepływu 30 ml/min.
- d) Chromatograf Willy Giede — 18,3, detektory płomieniowo-jonizacyjne, kolumny 2 mm  $\times$  4 mm, 2% SE-30 na Gaschrom Q 80—100 mesh, temp. kolumn 220°C, dozownika 300°C, detektora 260°C, gaz nośny azot, prędkość przepływu 25 ml/min, 2% XE-60 na Gaschrom Q 80—100 mesh temp. kolumn 250°C, dozownika 310°C, detektora 270°C, prędkość przepływu  $N_2$  37,5 ml/min.
- e) Hewlett-Packard Model 15750, detektor rekombinacyjny, kolumny szklane 183 cm  $\times$  2 mm, 3% DC-200 na Gaschrom Q 60—80 mesh, temp. kolumn 169°C, gaz nośny Argon: metan (95 : 5) prędkość przepływu 25 ml/min.

sową MacMillan i Pryce (25) wykryli kwas fazeinowy w postaci pochodnej metylowej oraz oszacowali jego zawartość w nasionach *Phaseolus multiflorus*. Estry metylowe kwasu fazeinowego oraz kwas abscysynowy zostały oznaczone w oczyszczonych ekstraktach *Brophyllum daigremontianum* (15). Metoda chromatografii gazowej w analizie jakościowej i ilościowej ABA w materiale roślinnym nie stwarza specjalnych problemów. ABA bada się w postaci estrów metylowych lub pochodnych silylowych na złożach SE-30, SE-33, QF-1, OV-17, DC-200, XE-60.

## Chromatografia gazowa cytokinin

Hormony roślinne takie jak kwas abscysynowy, gibereliny i auksyny były analizowane metodą chromatografii gazowej jako estry metylowe, pochodne sililowe lub etery sililowe estrów metylowych. Natomiast cytokininy mogą być chromatografowane jedynie w postaci sililowych pochodnych. Most i wsp. (27) skutecznie rozdzielili w postaci sililowych pochodnych trzy podstawowe cytokininy: kinetynę, zeatynę, dwuhydrozeatynę oraz dwa rybozydy: rybozyd kinetyny i rybozyd zeatyny. Upper i wsp. (44) podają czasy retencji dla 14 cytokinin (tab. 4). Autorzy ci użyli chro-

Tabela 4

Czasy retencji i względne czasy retencji puryn i ich pochodnych wg Uppera i wsp. (44)

Pochodne purynowe	Rodzaj wypełnienia kolumn	
	2 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> QF-1	
	t <sub>R</sub>	r
Metyloadenina	1,1— 1,3	0,082
Adenina	1,3— 1,4	0,121
Kinetyna 1 pik	3,8	0,335
2iP	4,5— 4,7	0,398
Guanina	5,0— 5,7	0,404
Kinetyna 2 piki	6,5	0,57
Dwuhydrozeatyna	7,0	0,62
Zeatyna	8,5— 8,9	0,75
6-benzyloaminopuryna	8,8	0,78
Adenozyna 1 pik	9,2— 9,4	0,81
Adenozyna 2 piki	9,9—10,2	0,87
Guanozyna	11,3—11,6	1,0
2iPA	11,55	1,0
Rybozyd kinetyny	13,0	1,14
Rybozyd zeatyny	14,3	1,27

Chromatograf Aerograph model 1520-A, kolumny szklane 1,5 mm × 1,5 mm, 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub> QF-1 na Gaschrom Q 80/100 mesh, detektor płomieniowo-jonizacyjny, gaz nośny N<sub>2</sub>, prędkość przepływu 28 ml/min.

matografii gazowej do analizy cytokinin w hydrolizatach t-RNA i filtratach kultur *Agrobacterium tumefaciens*. W hydrolizatach drożdżowych t-RNA wykryto 6-(3 metyl-2-butenylamine), 9-B-D-rybofuranozylpuryny (2 i PA) natomiast w filtratach kultur *Agrobacterium tumefaciens* 6-(3 metyl-2-butenylaminopuryne (2 i P). Najczęściej stosowanymi wypełniaczami kolumn w gazowej chromatografii cytokinin są SE-33, QF-1.

## Chromatografia gazowa etylenu

Wszystkie omówione powyżej hormony roślinne wymagają odpowiedniego przygotowania zanim mogą być poddane analizie techniką chromatografii gazowej. Spośród znanych hormonów roślinnych jedynie etylen jako substancja gazowa w normalnych warunkach może być analizowany bezpośrednio. Po raz pierwszy chromatografię gazową do oznaczania endogenego etylenu zastosowali w 1959 r. Burg i Stolwijk oraz Burg i Thimann (9). W chromatografii gazowej etylenu szczególną trudność przy pobieraniu go z materiału roślinnego stwarza ilościowe pobranie i wstrzyknięcie próbki. Powszechnie stosowanymi wypełniaczami w analizie etylenu są: Porapak Q i tlenek glinu.

Za pomocą chromatografii gazowej badano między innymi produkcję etylenu przez jabłka (8) oraz przez segmenty owoców, homogenat, mitochondria, mikrosomy i supernatant z jabłek i pomidorów (28). Przy pomocy chromatografii gazowej badano wydzielenie etylenu przez jabłka traktowane różnymi stężeniami kwasu giberelowego (6). Kępczyński i wsp. (niepublikowane dane) badali produkcję etylenu przez jabłka przechowywane w kontrolowanych atmosferach. Określano produkcję etylenu w pomarańczach i grejfrutach (13). Chromatografię gazową zastosowano także do oznaczania mikroilości etylenu w tkankach ksylemu (39). Używając techniki chromatografii gazowej oznaczano etylen we wszystkich gatunkach *Magnifera indica* i *Persea americana* (1).

Zastosowanie chromatografii gazowej do analizy hormonów roślinnych spotkało się z powszechnym zainteresowaniem biochemików i fizjologów roślin ze względu na fakt, że technika ta pozwala identyfikować i oznaczać ilości rzędu ułamków mikrogramów w mało oczyszczonych ekstraktach gazowych.

Stosowanie tej techniki w analizie hormonów roślinnych umożliwia znaczne zmniejszenie wielkości próby analizowanego materiału, jak również wielokrotnie skraca, w porównaniu z biotestami, czas uzyskania wyników. Stąd też mimo wysokiej ceny nowoczesnych chromatografów ta sprawna metoda rozdziału jest coraz powszechniej stosowana w laboratoriach biochemicznych i fizjologicznych.

## LITERATURA

1. Akamine E. K., Goe T.: J. Amer. Soc. Hort. Sci. 98, 4, 381, 1973.
2. Aung L.H., Hertogh A.A., Staby G.L.: 10, 215, 1971.
3. Baker B.E.: J. Sci. Food Agr., 12, 203, 1961.
4. Bayer M.H.: Plant Physiol. 44, 267, 1961.
5. Bayer E., Widder R.: Anal. Chem., 36, 1452, 1964.
6. Becka J.: Biol. Plant. 15, 3, 217, 1973.
7. Bethea R.M., Adams F.S.: Anal. Chem., 33, 7, 832, 1961.

8. Burg S.P., Thimann K.: *Plant Physiol.*, 35, 24, 1960.
9. Burg S.P.: *Ann. Rev. of. Plant Physiol*, 13, 265, 1962.
10. Cavel B.D., MacMillan, Pryce R.J., Shepard A.C.: *Phytochem.* 6, 868, 1967.
11. Davis L.A., Heine D.E., Adicott F.T.: *Plant Physiol.* 43, 1389, 1968.
12. Dedio W., Zalik.: *Analyt. Biochem.*, 16, 36, 1966.
13. Eaks I. L.: *Plant Physiol.* 45, 334, 1970.
14. Gaskin P., MacMillan J.: *Phytochem.* 7, 1699, 1968.
15. Gaskin P., MacMillan J., Zeevaart J.A.D.: *Planta.*, 111, 347, 1973.
16. Grunwald C., Venderell M., Stowe B.B., *Analyt. Biochem.*, 20. 484, 1967.
17. Hemphill D.D., Baker L.R., Sell H.M.: *Planta.*, 103, 241, 1972.
18. Kochankov R.M., Rudnicki R.M., Kępczyński J., Machnik J.: *Fruit. Sci. Rep.*, 2, 13, 1973.
19. Ikekawa N., Sumiki Y.: *Chem. Ind.*, 1728, 1963.
20. Lang A.: *Ann. Rev. of. Plant Physiol.* 21, 537, 1970.
21. Lenton J.R., Bowen M.R., Saunders P.F.: *Nature* 220, 5162, 86, 1968.
22. Lenton J.R., Perry V. M., Saunders P.F.: *Planta* 96, 271, 1971.
23. Lindenau L.P., Annis J.L.: *Anal. Chem.* 32, 13, 1742, 1960.
24. Lovelock J.E.: *Anal. Chem.* 35, 4, 474, 1963.
25. MacMillan J., Pryce R.J.: *Society of Chemical Industry Monograph.* 31, 1968.
26. Martin A.J.P., James A.T.: *Biochem. J.*, 50, 679, 1952.
27. Most B.H., Williams J.C., Parker K.J.: *Chromat*, 38, 136, 1968.
28. Meigh D.F., Norbis K.H., Craft C., Lieberman M.: *Nature.*, 186, 902, 1960.
29. Middlehurst I., Kennet B.J., *Chromat.*: 10, 3, 294, 1963.
30. Perez A.T., Lachman W.H.: *Phytochem.* 10, 2799, 1971.
31. Powell L.E.: *Plant Physiol.*, 39, 836, 1964.
32. Reiser R.W.: *Anal. Chem.*, 36, 96, 1964.
33. Schay'a G.: *Theoretische Grundlagen der Gaschromatographie* VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1960.
34. Schlenk H., Gellerman J.L.: *Analyt. Chem.*, 32, 1412, 1960.
35. Schupp O.E.: *Chromatografia gazowa* PWN, Warszawa 1972.
36. Scott R.P.W., Grant D.W.: *Analyst.* 89. 179, 1964.
37. Scott C.G., Rowell D.A.: *Nature* 187, 143, 1960.
38. Seely S.D., Powell L.E.: *Analyt. Biochem.*, 35, 530, 1970.
39. Shain L., Hillis W.E.: *Phytopathology*, 62, 1407, 1972.
40. Sikorski Z.E.: *Chromatografia gazowa w analizie żywności WPL i S*, Warszawa 1964.
41. Sikorski Z.E.: *Chromatografia gazowa WNT* Warszawa 1962.
42. Stowe B.B., Schilke J.F.: *Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale Colleques Internationaux du Centre National de la Reserche Scientifique.*, 123, 409, 1964.
43. Swoboda PAT: *Chem. Ind.* 1, 1262, 1960.
44. Upper C. D., Helgeson J. P., Kemp J., Schmidt C. J.: *Plant Physiol.* 145, 543, 1970.
45. Walton D.C., Dorn B., Fey J.: *Planta*, 112, 87, 1973.
46. Zubyk W.J., Conner A.Z.: *Anal. Chem.* 32, 8, 912, 1960.