

KÂĞIT KROMATOĞRAFİSİ METODU İLE AUXİN'LERİN İNCELENMESİ

Doç. Dr. NİMET ARSLAN

Ankara Üniversitesi Botanik Enstitüsü

I. Kâğıt kromatografisi metodu :

Bugün bütün dünyada kâğıt kromatografisi metodunun kullanılmadığı pek az Biokimya lâboratuvarı vardır. Birkaç sene içinde bütün dünyaya yayılmıştır. Umumî kromatografi metodu TSWETT tarafından 1906 da meydana çıkarılmıştır. Umumî kromatografik analizin esası alüminyum oksit, nişasta, sellüloz gibi muhtelif absorbantlarda, maddelerin farklı derecede massolmasıyla ayrılmasıdır.

Kâğıt kromatografisi metodu 1941 de MARTİN ve SYNGE tarafından TSWETT'in metodunun değiştirilmesiyle gelişmiştir. Kâğıt kromatografisi metodunda kullanılan eşya: *Tank*; 45.24.14 sm. çapında kalın çeperli cam kap kromatografi kabı olarak kullanılır. Tankın ağzı vâzelinli uygun bir cam ile sıkıca kapatılır. Tank harareti sabit (25°C.) karanlık odada veya tahtadan 160.75.50 sm. genişlikte bir odacıkta muhafaza edilir. *Trof* (Trough); eritici mahlûlü koymak için 23. 2.5. 2.5 sm. çapında porselen bir oluktur. *Mikropipet*; kromatogram üzerine muayyen hacimde eriyik koymak için kullanılır.

Kâğıt kromatografisi tecrübeleri için 2.5—3 sm. genişlikte 50 sm. uzunlukta kullanılan filtre kâğıdı [(Whatman I) veya (Schleicher ve Schuell 2043 b)] uygundur.

Kromatogramın hazırlanması: Kromatogram üzerinde evvelce işaretlenmiş noktaya tecrübe edilecek maddenin eriyiği mikropipetle çok yavaş ve dikkatle tatbik edilir. İşaretli nokta üzerinde damlalar kuru kâğıtta dairevî lekeler halinde dağılır. Eriyiğin çok yayılmaması için lekeler derhal saç kurutma makinası ile kurutulur.

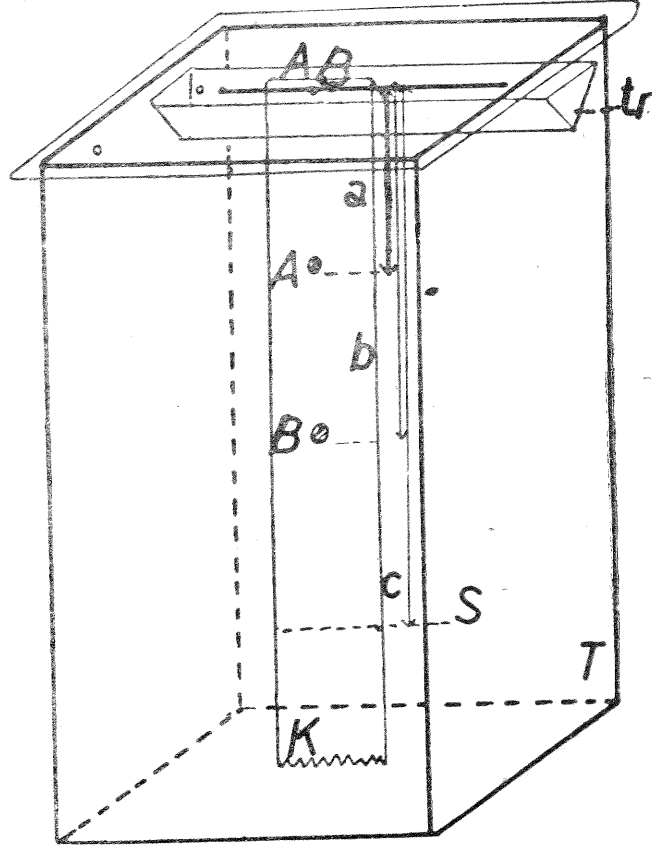
İnici kromatogramlarda (Descending Chromatography) hazırlanan şerit üst ucundan trof içindeki eriticiye daldırılır. Eritici (solvent) kâğıt tarafından emilir ve tetkik edilecek maddeyi ihtiva eden lekeyi aşağıya doğru hareket ettirir. *Münferit maddeler erime nisbetine tabi olarak mahlûl tarafından farklı süratte çekilir.* Eritici sınırı (Solvent front) şeridin sonuna erişince şerit trofdan çıkarılır ve eritici sınırının önü kurşun kalemle işaretlendikten sonra kurumaya bırakılır. Eriticinin 40 sm. koşması için lâzım gelen zaman mahlûlün tabiatına göre değişir. Umumiyetle 12—24 saattir. Kromatogramı koşturmaya akşam başlayıp ertesi günü sabahleyin bitirmek elverişlidir. Bundan başka çıkıcı kromatogram (Ascending Chromatography) usulünde şerit sadece asılır ve alt ucu mahlûle batırılır. Eritici eriyik kâğıt tarafından emilir ve maddeyi muayyen süratte taşır. Bu tarzda hazırlanan kuru kromatogramlara uygun ayraçlar (sprayer) püskürtülür. Madde ile püskürtülen ayraç arasında renkli reaksiyonlar husule gelir. Eğer tetkik edilen madde önceden renkli ise ayraç kullanmak lüzumsuzdur.

Kromatografik analizi yapılabilen her bileşik muayyen mahlûlde muayyen bir hareket süratine sahiptir. Uzun zincirli amino asitler glyocoll'den, monosakkaritler disakkaritlerden daha çabuk hareket ederler. Bir madde hareket sürati ile karakterize edilebilir.

Rf - kıymeti: Bir bileşiğin hareket süratinin ölçüsüdür. Rf-kıymeti; başlangıç noktasından maddenin hareket ettiği uzaklığın, eriticinin hareket ettiği uzaklığa bölümüdür.

$$\text{Rf-kıymeti} = \frac{\text{fark-başlangıç noktası- A maddesi}}{\text{fark-başlangıç notkası-eritici sınırı}} = \frac{a}{c}$$

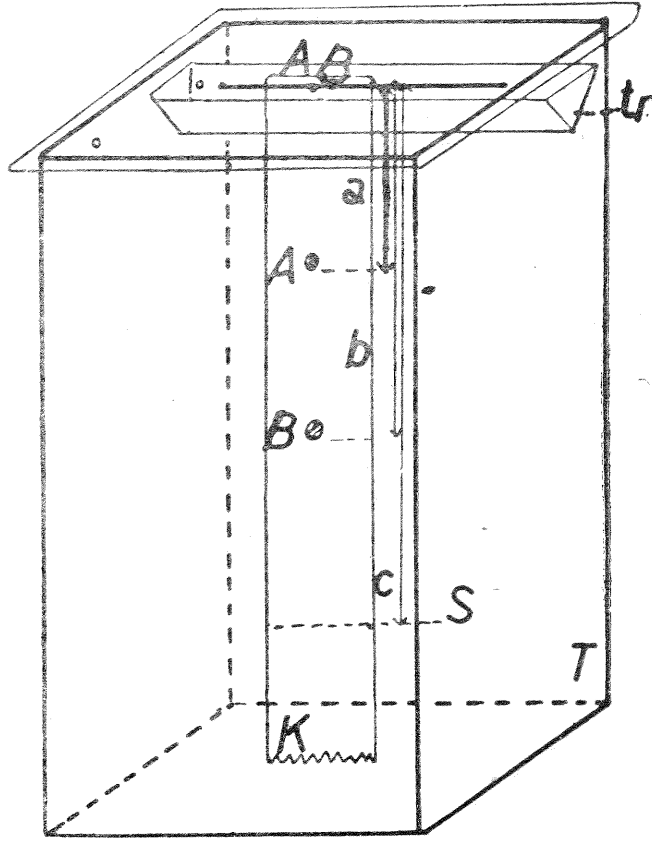
Rf-kıymeti her zaman birden küçük veya bire müsavidir. Rf kâğıt şeridin boyuna tabi değildir. Kesin ayrılma kaide olarak Rf-kıymeti 0.90 dan daha az olunca elde edilir. Rf-kıymeti suhnet ve yoğunluk değişikliklerine göre % 10 farkedebilir. Bunun için her zaman bilinmeyen madde yanında bir kontrol madde koşturmak daha emin bir usuldür. Çünkü beraber koşan kontrol maddesi kromatogramı bozan aynı faktörlere maruzdur. Rf-kıymetinden bahsedildiği zaman hangi eriticinin tatbik edildiği ve kullanılan kâğıt tipini zikretmek lüzumludur (Şekil: 1).



Şekil 1: Kâğıt kromatografi cihazı; T, Tank; tr, trof; K, Kromatogram; AB, başlangıç noktasına konan tecrübe maddesi; A, A maddesi; B, B maddesi; S, eritici mahlülün sınırı; a, A maddesinin başlangıç noktasına uzaklığı; b, B maddesinin başlangıç noktasına uzaklığı; c, eritici sınırının başlangıç noktasına uzaklığı.

II. Sentetik büyüme maddelerinin incelenmesi :

Büyüme maddesi üzerine artan araştırmalar, tabii olarak elde edilen nebat ekstralarında az miktarda bulunan büyüme maddelerinin tayini için basit bir metoda ihtiyaç gösterdi. Şimdiye kadar kullanılan tekniklerle büyümeyi engelleyici maddeleri, büyümeyi teşvik eden maddelerden, yahut muhtelif büyüme teşvik edici maddeleri birbirinden ayırmak güç yahut imkânsızdı. Kâğıt kromatografisi tekniğiyle az matrielle çalışmak mümkün olmuştur.



Şekil 1: Kâğıt kromatografi cihazı; T, Tank; tr, trof; K, Kromatogram; AB, başlangıç noktasına konan tecrübe maddesi; A, A maddesi; B, B maddesi; S, eritici mahlûlün sınırı; a, A maddesinin başlangıç noktasına uzaklığı; b, B maddesinin başlangıç noktasına uzaklığı; c, eritici sınırının başlangıç noktasına uzaklığı.

II. Sentetik büyüme maddelerinin incelenmesi :

Büyüme maddesi üzerine artan araştırmalar, tabii olarak elde edilen nebat ekstralarında az miktarda bulunan büyüme maddelerinin tayini için basit bir metoda ihtiyaç gösterdi. Şimdiye kadar kullanılan tekniklerle büyümeyi engelleyici maddeleri, büyümeyi teşvik eden maddelerden, yahut muhtelif büyüme teşvik edici maddeleri birbirinden ayırmak güç yahut imkânsızdı. Kâğıt kromatografisi tekniğiyle az matrielle çalışmak mümkün olmuştur.

İndole mürekkeplerinin kromatogramları BENNET-CLARK ve TAMBIAH, KEFFORD (1951) tarafından tetkik edildi. Sentetik büyüme maddelerinin absolu alkolle yapılan mahlülleri -10°C . da karanlıkta saklanır. WHATMAN I kromatografi kâğıdına $3 \mu\text{l}$. alkolik mahlül mikropipetle tatbik edilir. Saf indole-3-acetic acid, indole-3-propionic acid ve indole-3-butyric acid'le yapılan tecrübeler bu üç maddenin ayrılabilceğini gösterdi. Muhtelif eriticilerin geniş miktarda tetkiki 30 indole mürekkebi üzerine yapılan çalışmalardan sonra BENNET-CLARK, TAMBIAH, KEFFORD (1951) STOWE ve THIMANN (1953) de İso-propanol-amonyak-su karışımının Indole-carboxylic acidlerin kâğıt üzerinde ayırmak için en iyi karışım olduğu neticesine vardılar.

- a) IPA Eriticinin hazırlanması : 10 kısım Iso-propyl alkol
1 kısım con. amonyak (D = 0.880)
1 kısım damıtık su ile karıştırılır.
- b) Butanol » » : 80 n-butyl alkol
2 con. amonyak (D=0.880)
14 damıtık su.

Kromatogramlar eritici mahlülle meşbu atmosferde 8—16 saat sabit suhnette (25°C) develope edilir. Bu şekilde hazırlanan kromatogramlar direkt gün ışığından mahrum olarak kurutulur ve hemen ayıraçla püskürtülür.

İso-propanol eritici Indole mürekkepleri için en uygun bir Rf-kıymeti verir; husule gelen lekeler yayılmaz, 25°C . Rf-kıymeti:

(IAA) Indole-3 acetic acid = 0.52 (koyu kırmızı)

(IPA) Indole-3 propionic acid = 0.59 (pembe-kahve rengi)

(IBA) Indole-3 butyric acid = 0.66 (portakal rengi)

İndole mürekkepleri kuru kromatogramlarda Ferricperchloric ayırıcı ile IBA çok bariz renkler verir. Sırasıyla IAA koyu kırmızı, IPA pembe kahverengi, IBA portakal rengi.

Ferricperchloric ayırıcın hazırlanması :

50 kısım % 5 perchloric acid: 1 kısım 0,05 M. ferric chloride.

III. Büyüme maddelerinin kantitatif tayini :

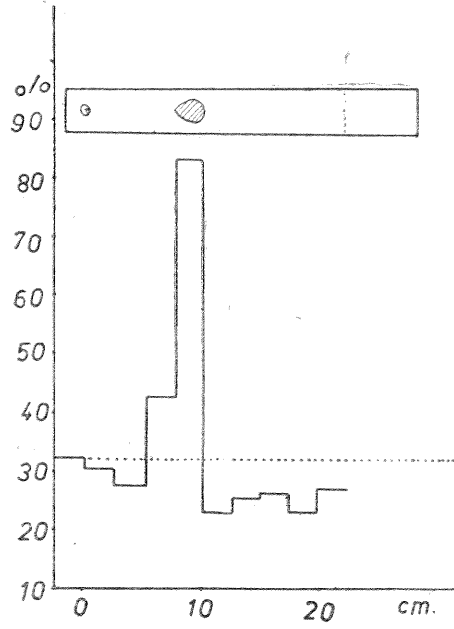
- a) Indole mürekkeplerinin yüz ölçüsü-logaritm miktar münasebeti :

Indole serilerinin kromatogramları Ferric-perchloric veya diğer ayıraçlarla püskürtüldükten sonra, tam renk boyanınca lekenin sınırı işaretlenir. Yüzey ölçüsü plânimetre ile ölçülür. Lekenin yüz ölçüsü başlangıçta konan madde miktarının logaritmasına karşı grafiği çizilir. Lekelerin yüz ölçüsü, başlangıç noktalarındaki tatbik edilen büyüme maddelerinin miktarının logaritması ile

$$\text{IAA} = 0.25-8 \mu\text{g.}$$

$$\text{IPA} = 2-20 \mu\text{g.}$$

IBA = 2-20 μg arasında orantılıdır. Daha aşağı yoğunluklar keyfi olarak tayin edilirler (Şekil: 2).



Şekil 2: Ferric-perchloric ayıraç püskürtülmüş kromatogramdaki IAA lekesinin yüzölçüsü ile miktarın logaritması arasındaki münasebet. Ordinat: yüzölçüsü (plânimetre birimi). Absissa: miktarın logaritması. Kefford (1954)

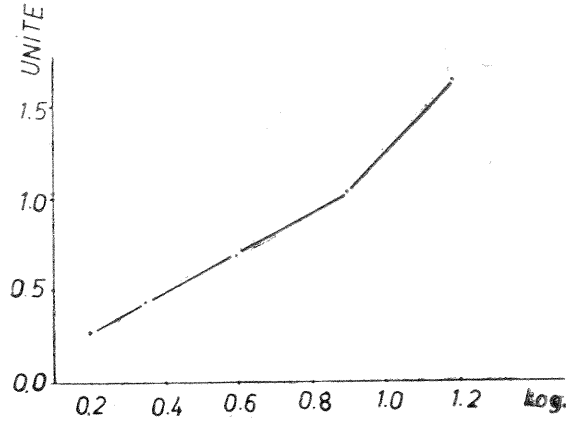
IAA'nın faaliyetinin kromatogramda kaybı :

Kromatogramlar develope olduktan hemen sonra ayıraçlarla püskürtülürlerse kayıp olmaz. Kromatogramları azot içinde develope etmek hiç bir avantaj temin etmez. Fakat ışık ve havada bırakılınca IAA dan % 60 kadar kayıp olur. Eğer kromatogramların sak-

lanması lâzımsa, azot atmosferinde develope olan kromatogramlar karanlıkta -10°C . muhafaza edilmelidir TAMBAH (1951).

b) Biyolojik tecrübelerle büyüme maddelerin kantitatif tayini:

Avéna sativa (var. Victory) kabukları çıkarılır ve ıslatılır. Rutubetli kumda devamlı kırmızı ışık altında 25°C . (72 saat'da) koleoptiller 1.5–2 sm. uzun oluncaya kadar büyür. Aynı uzunluktaki koleoptillerin apikal ucundan 12 koleoptil beraber 3 mm. kesilir ve müteakip 3 mm. parçalar kullanılır. Tecrübe kablarının % 3 sakkaroz 2 ml. ve $\text{pH} = 5,0$ temini için 0,2 ml. 0,06 m. KH_2PO_4 tampon ilâve edilir. Kromatogramlar 2,5.2,5 sm. parçalara ayrılır 3.5 sm. kutrundaki pyrex kaplara takriben 10 koleoptil kesidi ile beraber dağıtılır. Bir tane boş ve bir tane bilinen miktarda IAA ihtiva eden



Şekil 3: İdrar ekstresinin koleoptil uzama aktivitesi.
Ordinat: koleoptil uzaması (%).
Absissa: başlangıç noktasından uzaklığı (sm.)
Bennet-Clark, (1952).

kromatogram parçası standart olarak seriye ilâve edilir. Pyrex kab- lar içindeki bu kesitler 25°C . 24 saat hususî bir masa üzerinde ha- fifce çalkanır. Kesitlerin uzaması mikroskopta mikrometre ile öl- çülür. Koleoptil boyu orijinal uzunluğunun % si olarak ifade edilir. Koleoptilin orijinal boyunun % uzaması kromatogramların başlan- gıçtaki lekede büyüme maddesindeki yoğunluk ile orantılıdır (Şe- kil: 3).

IV. Bitki ekstralarının incelenmesi :

Kullanılacak bitki materyeli -10°C . dondurulur yahut materyel keser kesmez mümkün olduğu kadar çabuk takriben 5 dakika az hacim de absolu alkolle (metil alkol veya etil alkol) kaynatılır ve derhal soğutulur, sonra mazere edilir. Mazere edilmiş doku -10°C . hiç olmazsa 24 saat tutulduktan sonra alkolik ekstrakt santrifujla ayrılır. Sulp bakiye iki defa taze alkolle yıkanır. Ekstrakt ve sulp bakiyenin yıkandığı alkol birleştirilir ve eğer lüzum görülürse filtre edilir. Bütün alkol buharlaştırılıncaya kadar (vacum distillation) aşağı tazyikte buharlaştırılır. Bakiye olarak sulu mahlül kalır. Ph kâğıdı kullanarak % 10 H_3PO_4 , Ph = 3 temin edildikten sonra üç defa ethyl acetat (ether de olabilir). (10 gr madde için 3×25 ml.) ile ekstraksiyon hunisinde çalkalanır su atılır.

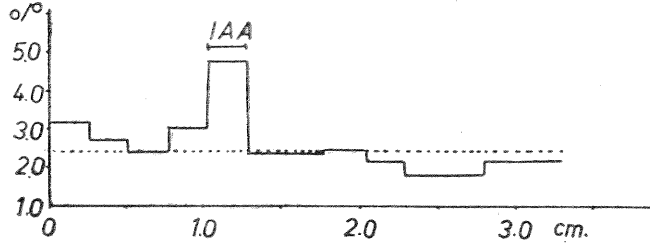
Ekstraksiyonun saflaştırılması :

Ethyl acetat ekstraktı üç defa % 5 (NaHCO_3) sodyum bikarbonat eriyiğı ile çalkalanır. Ethyl asetat atılır. Ph = 3 temini için % 10 H_3PO_4 fosforik asitle asitleştirilir. Tekrar üç defa ethyl acetat ile çalkalanır. Bu usulle asidik maddeler ethyl acetat veya ether ekstraktında ayrılır. Burada Neutral ve bazı phenolic maddeleri ihtiva eden ekstrakt kısımları tetkik edilmemiştir. Asidik maddeleri ihtiva eden ethyl acetat sıcak su banyosunda yoğunlaştırılır. Bakiye kalan beyaz kristalleri halletmek için ethyl alkol ilâve edilir.

Elde edilen 0.5 ml. ekstrakt ve iki defa pipeti, kabı yıkamak için kullanılan alkol veya ethyl acetat kromatogram üzerine konur. Ekstraktın kromatogramdaki yolu ultra viole ışık altında işaretlenir. Kontrol IAA şeritleri kromatogramlardan kesip ayrılır ve Ferric-perchloric ayırıcı ile püskürtülür. Kromatogram 2.5 sm. fasıllarla başlangıç noktasına paralel olarak bölünür. Biyolojik tecrübeler yapılır ve büyümeyi teşvik eden ve engelleyen maddelerin kromatogramdaki yerleri bulunur. Kimyevî terkinin ne olduğunu bulmak için beraber koşan belli büyüme maddelerinin mukayesesi yapılır, veyahut çok miktarda kromatogramlardan elde edilen (elute) süzütünün kimyacılar tarafından tahlili yapılır. Fakat bu tahlil ancak kıymetli maddeler için elverişlidir aksi halde çok pahalı bir usuldür.

Bütün tetkik edilen nebat ekstraktlarının kromatogramlarında KEFFOD (1954), koleoptil büyümesinde aktif üç nahiye bulunur.

Bölgenin birisi IAA ile işaretlenmiş lekenin mevkiine tekabül eder. Bu lekenin alanı ile tayin edilen IAA'nın kantitatif tayini ve koleoptilin uzama faaliyeti ile makûl bir şekilde uygundur. IAA işaretine tekabül eden nahiyenin büyüme faaliyeti IAA dan ileri gelir (Şekil: 4). Büyümede faal olan diğer iki bölgenin büyüme faaliyetinin mes'ul olduğu madde malûm değildir. Rf-kıymeti IAA'ninkinden az olan nahiyenin tekabül ettiği maddeye acceleratör- α (teşvik edici) terimi kullanılır. Rf-kıymeti IAA'ninkinden daha büyük olan madde koleoptil kesitlerinde engelleyici tesir gösterir. Bu maddeye engelleyici β terimi verildi.



Şekil 4: Etirole bezelye (*Pisum sativum*) sürgünü ekstresinin koleoptil uzama aktivitesi.
 Ordinatt: koleoptil uzaması (%).
 Absissa: başlangıç noktasından uzaklığı (cm.).
 Kefford (1954).

IAA, acceleratör α ve engelleyici β ; *Vicia faba* sürgün ve kök, *Pisum* sürgün ve kök; *Helianthus* sürgün, *Zea Mays* kökü ve olgunlaşmamış *Zea Mays* tane, *Solanum tuberosum* sürgün ve tuberleri gibi bir çok nebat materielinde bulunduğu gösterilmiştir. KEFFOD (1954) Kök ve sürgünlerin ekstrelerinin ihtiva ettikleri büyüme maddesi arasında büyük bir benzerlik vardır. Bir çok hormon kontrolunda olan büyüme reaksiyonları sürgünler ve köklerde zıddırlar. Sürgün ve köklerin büyüme maddelerindeki bu benzerlik sürgün ve köklerin büyüme maddelerine karşı fizyolojik reaksiyonları zıd olmadıkça beklenmeyen bir hadisedir. Eğer bu doğru ise IAA köklerde hücre uzamasını bozan bir rol oynar.

Literatür

BENNET-CLARK T.A., TAMBIAH, KEFFORD(1952): Nature vol. 169, S. 452.

BENNET-CLARK T.A., KEFFORD N.P. (1953): Nature vol. 171,
p. 645

BLOCK RICHARD J., Paper Chromatography, New York (1952).

CRAMER FRIEDRICH: Paper Chromatography, London (1954).

KEFFORD N. P. (1954): Journal of Exp. Botany Vol. 6, S. 129.

KEFFORD N.P. (1955): Journal of Exp. Botany Vol. 6, S: 245.

POWELL LOYD E. (1959): Botanical review Vol 25, S: 198.