

Studija o klorofilu III.

Kromatografska istraživanja klorofila

T. VRBAŠKI

Ovaj rad predstavlja nastavak radova na istraživanju klorofila. U ovim je radovima pokazano, da neki aromatski spojevi dušika mogu stvarati po svoj prilici sa klorofilom labave molekularne spojeve, koji posjeduju veliku fotostabilnost. Kromatografska ispitivanja pokazala su, da klorofil u prisutnosti p-nitrozodimetilanilina pokazuje izrazitu stalnost prema svjetlu i u adsorbiranom stanju. U odsutnosti ove tvari dolazi naprotiv do vrlo brzog izbljeđivanja na stupcu saharoze. Dokazano je, da se ovdje ne radi o djelovanju dodatka kao unutrašnjeg filtra. Nađeno je, da se fluorescencija klorofila u odsutnosti i prisutnosti dodatka u adsorbiranom stanju poklapa kvalitativno s fluorescencijom u alkoholnoj otopini. Nadalje je utvrđeno, da veza između klorofila odnosno nitrozoklorofilnog kompleksa s neutralnim adsorbensom ima svojstvo pravog adsorpcionog, a ne polarnog spoja.

Ovi rezultati istraživanja klorofila potvrđuju, iako samo kvalitativno, osnovnu pretpostavku, da klorofil može stvarati molekularne spojeve sa aromatskim nitrozoi i nitrospojevima.

Nastavljajući radove na istraživanju klorofila¹⁾ izveo sam također i kromatografska istraživanja klorofila, koja s ovim radovima čine jednu cjelinu. U ovim radovima pokazao sam, da stanoviti aromatski nitrozoi i nitrospojevi na pr. p-nitrozodimetilanilin, nitrozobenzen, N-nitrozop-nitrozofenilpiperazin i nitrobenzen stvaraju po svoj prilici sa klorofilom labave molekularne ili kompleksne spojeve, koji su u velikoj mjeri ili čak potpuno stabilni prema fotokemijskoj i termičkoj oksidaciji.

Rezultati istraživanja gašenja fluorescencije otopine klorofila pomoću ovih dodataka također potvrđuju u stanovitoj mjeri egzistenciju ovakovog molekularnog ili kompleksnog spoja.

Teoretsko tumačenje pojave kromatografske adsorpcije ispravno je već postavio M. Tswett²⁾. Ova pojava može se smatrati kao selekciona adsorpcija smjese organskih i anorganskih spojeva raznog adsorpcionog afiniteta na istom adsorbensu. Pojedine komponente smjese adsorbiraju se na stupcu adsorbensa prema njihovom opadajućem adsorpcionom afinitetu, stvarajući kod toga uže ili šire zone. Kod jednako izvedenih pokusa važan je samo redoslijed, kojim dolaze pojedine komponente adsorbirane na stupcu adsorbensa, dočim širina same zone nije mjerodavna za ocjenu količine adsorbirane tvari.

Biljno zelenilo spada među prve organske tvari, koje je M. Tswett kromatografski ispitao. Stoga se može ustvrditi sa sigurnosti, da čitav razvoj novootkrivene kromatografske metode rada počiva na kromatografskim studijama biljnog zelenila. Ch. Dhèrè prvi je uveo kromatografsku metodu rada u laboratorijsku praksu. Sam adsorbens može prilikom

¹⁾ T. Vrbaški, Arhiv kem., 22 (1950) 101 i 23 (1951) 6.

²⁾ M. Tswett, Die Chromophylle in der Pflanzen- u. Tierwelt, Warszawa 1910.

adsorpcije utjecati na klorofil i izazvati alomerizaciju istog³⁾. Takovi adsorbensi jesu kalcijev karbonat, aluminijev oksid, natrijev sulfat i dr. Čista saharoza u prahu pokazala se prikladnom kao adsorbens, a postojanost dobivenih klorofilnih komponenta je dovoljna za daljnju preradu.

Kromatografska istraživanja klorofila, koja sam izveo, a koja ću ovdje opisati, imala su za cilj da se utvrdi, da li klorofil mijenja u prisutnosti dodatka p-nitrozodimetilanilina svoj adsorpcijski afinitet prema istom adsorbensu, čistoj saharozi u prahu, zatim stabilnost dobivenih kromatograma prema djelovanju svijetla, kao i promjene fluorescencije, barem kvalitativno, kromatograma klorofila u odsutnosti i prisutnosti ovog dodatka. Na osnovu ovih podataka moći će se zaključiti da li klorofil stvara molekulski ili kompleksni spoj s dodatkom p-nitrozodimetilanilina i u suhom stanju adsorbiran na neutralnom adsorbensu. Ujedno će se moći zaključiti o karakteru vezivanja klorofila s neutralnim adsorbensom, čistom saharozom u prahu, t. j. da li ova veza ima karakter pravog adsorpcionog spoja, ili ona predstavlja polarni spoj. Potrebno je spomenuti, da čista saharoza predstavlja tvar, koja se pokazala prikladnom za stvaranje pravih adsorpcionih spojeva.

Otopinu klorofila za kromatografske pokuse priredio sam metodom brze ekstrakcije brašna od koprive *Urtica dioica* pomoću smjese otapala benzen-benzin i metanola⁴⁾. Prema tome, otopina klorofila, koju sam upotrebljavao za ova ispitivanja nije predstavljala čisti kemijski preparat, već smjesu klorofila *a* i *b*, karotina, ksantofila i violaksantina. Ovi dodaci ne smetaju kod kromatografskih pokusa klorofila, te se ova otopina može upotrebljavati.

Staklene cijevi za kromatografske pokuse bile su slijedećih dimenzija: $2r = 1$ cm, visina cijevi $v = 16$ cm, a visina stupca adsorbensa $v_1 = 10$ cm. Cijevi za kromatograme punjene su sa čistom saharozom u prahu⁵⁾, koja je prethodno samljevena i sušena 2 sata kod 45°C.

EKSPERIMENTALNI DIO

Otopinu klorofila za kromatografske pokuse priredio sam prema L. Zechmeister i L. v. Cholnoky-u⁴⁾ na slijedeći način.

0,5 g suhog brašna od koprive prelije se s 54 ml smjese benzen-benzina (1:9) uz dodatak od 18 ml metanola. Upotrebljeni benzin treba da ima vrelište 70°C. Nakon 10 min. miješanja sa staklenim štapićem, otopina se profiltrira u staklenu čašu od 200 ml. Brašno od koprive, koje je zaostalo na filtru isprao sam s daljnjih 54 ml. smjese benzen-benzina (1:9), a dobiveni filtrat prelio sam u lijevak za odjeljivanje i isprao blagim pokretanjem bez mućkanja tri puta, svaki put s 100 ml destilirane vode. Ovim ispiranjem destiliranom vodom odstranjen je prisutni metanol,

³⁾ H. Fischer u. A. Stern, Die Chemie des Pyrrols, II, 2, Leipzig 1940, str. 24; R. Willstätter u. A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Methoden und Ergebnisse, Berlin 1913.

⁴⁾ L. Zechmeister u. L. v. Cholnoky, Die chromatographische Adsorptionsmethoden, II, Aufl. Wien 1938, str. 90.

⁵⁾ Isto kao i pod ⁴⁾ str. 68.

koji nepovoljno utječe na pravilan tok kromatografiranja, a dodaje se smjesi otapala radi bolje ekstrakcije. Preostalu otopinu klorofila u benzen-benzinu profiltrirao sam kroz suhi filterpapir u bocu od smeđeg stakla.

5 ml. otopine klorofila kromatografira se u priređenom stupcu saharoze. U najgornjem sloju stupca adsorbirao se crvenkasto zeleni klorofil *b*, a u sloju niže modro zeleni klorofil *a*. U najdonjem sloju nalazi se izrazito žuta zona violaksantina s nešto ksantofila. Najveći dio ksantofila i karotina ne adsorbira se na stupcu saharoze, već prolazi skroz i sakuplja se u boci. Za kromatografiranje ksantofila i karotina potrebni su drugi adsorbensi na pr. kalcijev karbonat odnosno aluminijev oksid.

U iste uvjete kromatografira se 5 ml otopine klorofila, kojoj se prethodno doda jedan kristalić p-nitrozodimetilanilina. Redoslijed i podjela zona klorofila *a* i *b* i violaksantina ostali su potpuno isti. Sam dodatak p-nitrozodimetilanilin ne adsorbira se na stupcu adsorbensa, već prolazi u cijelosti kroz stupac saharoze. Ovo se također može lako utvrditi na posebnom kromatogramu bez klorofila.

Tako priređeni kromatogrami klorofila u odsutnosti dodatka p-nitrozodimetilanilina pokazali su se vrlo fotoaktivnim, t. j. oni vrlo lako izbljede na svijetlu, dočim kromatogrami klorofila priređeni u prisutnosti dodatka p-nitrozodimetilanilina pokazali su izrazitu otpornost prema djelovanju svijetla. To upućuje na činjenicu da se klorofil nalazi u prisutnosti dodatka adsorbiran na adsorbensu, čistoj saharози, u obliku nitrozoklorofilnog kompleksa, koji posjeduje izrazita fotostabilna svojstva i u alkoholnoj otopini, a otporan je i prema termičkoj oksidaciji, kao što je pokazano u prijašnjim radovima.

Kromatogrami klorofila priređeni u odsutnosti dodatka p-nitrozodimetilanilina pokazuju nadalje živu crvenu fluorescenciju u ultraljubičastom svijetlu. U prisutnosti dodatka ona je znatno slabija i prelazi u slabu sivkasto crvenu niansu. Fluorescencija klorofila u odsutnosti i prisutnosti dodatka u adsorbiranom stanju poklapa se prema tome kvalitativno s fluorescencijom u alkoholnoj otopini.

Budući da je redoslijed zona klorofila *a* i *b* i violaksantina ostao isti, može se zaključiti, da se stvaranjem nitrozoklorofilnog kompleksa ne mijenja bitno adsorpcioni afinitet klorofila prema neutralnom adsorbensu.

S druge strane može se zaključiti, da veza između klorofila odnosno nitrozoklorofilnog kompleksa s neutralnim adsorbensom ima svojstvo pravo adsorpcionog, a ne polarnog spoja. U slučaju polarnog vezivanja morao bi adsorpcioni afinitet nitrozoklorofilnog kompleksa znatno oslabiti, jer su već zaposjednute raspoložive valencije klorofila, koje su potrebne za stvaranje polarne veze sa saharozom. Da kod toga nije došlo do istiskivanja dodatka p-nitrodimetilanilina iz klorofilnog kompleksa i do naknadnog vezivanja klorofila s adsorbensom, pokazuju pokusi izbljeđivanja dobivenih kromatograma klorofila i nitrozoklorofilnog kompleksa.

Ovi rezultati kromatografskog istraživanja klorofila u prisutnosti i odsutnosti dodatka p-nitrozodimetilanilina stoje u skladu s dosadašnjim istraživanjima na tom području¹⁾, te predstavljaju daljnju potvrdu, iako

samo kvalitativnu, osnovnoj pretpostavci stvaranja kompleksnog spoja između klorofila i aromatskih nitrozo- i nitrosojeva.

LABORATORIJ ZA ORGANSKU SINTEZU
INSTITUT ZA INDUSTRIJSKA ISTRAZIVANJA
ZAGREB

Primljeno 15. srpnja 1951.

ABSTRACT

Studies on Chlorophyll III.

Chromatographic Investigations on Chlorophyll

T. VRBAŠKI

Continuing the previous investigations on physico-chemical properties of chlorophyll and on the extinction of the fluorescence of chlorophyll in a methanol solution by means of certain substances e. g. p-nitrosodimethylaniline, nitrobenzene and α -nitronaphthalene, the influence of these substances was examined upon the chromatographic adsorption of chlorophyll on a neutral adsorbens e. g. pure powdered saccharose.

The chromatographic investigation has shown that chlorophyll is in presence of p-nitrosodimethylaniline quite fast to light, even in an adsorbed state. The absence of this substance causes on the contrary a very rapid bleaching of the chlorophyll adsorbed on the saccharose column.

The added substance when chromatographed alone passes the saccharose column unadsorbed. These facts demonstrate that the chlorophyll is adsorbed on the saccharose in the presence of the later compound in form of a nitrosochlorophyll complex with light-fast properties.

It was found further that the chlorophyll chromatograms prepared in the absence of p-nitrosodimethylaniline show a pronounced red fluorescence in the ultraviolet light. In the presence of the later compound the fluorescence of the chlorophyll is extinguished to a high degree and turns to a grey redish shade. These experiments show clearly that the fluorescence of the chlorophyll in the presence and absence of the added substance in the adsorbed state coincides perfectly with the results obtained by measuring the extinction of fluorescence of chlorophyll in a methanol solution.

On the other hand it was stated that the union of the chlorophyll and nitrosochlorophyll compound respectively with the neutral adsorbens has a character of a true adsorption compound. These results of chromatographic investigation of the chlorophyll are in accordance with previous investigations carried out in this field and present a further proof, although only qualitative, to the supposition of the existence of a complex compound between the chlorophyll and the aromatic nitroso compound.

INSTITUTE OF INDUSTRIAL INVESTIGATIONS
LABORATORY OF ORGANIC SYNTHESIS
ZAGREB, CROATIA

[Received, July 15, 1951]