

Gyakrabban előforduló pázsitfűvek és herefélék karotin tartalmának meghatározása és értékelése

IHÁSZ IMRE

*Mezőgazdasági Akadémia Kémia-Talajtani Tanszék,
Keszthely*

A modern takarmányozástudomány és agrokémia napjainkban mind több figyelmet fordít a szokásos vegyelemzési adatok mellett a karotintartalomra.

A rétek és legelők növényállománya karotintartalmának meghatározásával foglalkozó, viszonylag kis létszámú kutató közül első helyen Mel'nik nevét kell említeni. Különösen két értekezése [14, 15] az, amely e téren kiemelendő. Egyik közleményében Alma-Ata vidéke félsivatagi legelőfűveinek karotintartalmát vizsgálja; másik értekezésében a Délkelet-Kazahsztán pusztáin található növények karotintartalmával foglalkozik. A legnagyobb karotintartalmat a *Stipa tenecissima*-nál találta. A minták 151—206 mg karotintartalmúaknak bizonyultak szárazanyag kg-onként. Kirsanova [10] a susamiri legelőkön előforduló pázsitfűfélék karotintartalmát vizsgálva a *Festuca sulcata*-ban bokrosodáskor 188,6 mg karotintartalmat mért szárazanyagra vonatkoztatott kg-onként. Papendick [18] a növekedési időszak alatt mérte a különböző réti pázsitfűfélék karotintartalmát és azt átlagosan 160 mg-nak találta a teljes növényekre számítva kg-onként. Káldy és Zubricky [8] 236 takarmányminta karotintartalmára vonatkozóan közöl adatokat. Vizsgálati eredményeik között több pázsitfű- és hereféle karotintartalma is szerepel. Wierzechowski [20, 21] növények és növényi részek karotintartalmának változásait mérte. Megfigyelései szerint az egyes növények leveleinek karotin koncentrációja, azonos fejlődési időszakban, fajra nézve specifikus. Ramujan és Ananta Krishnan [19] zöld takarmányok E-vitamin- és karotintartalmát vizsgálta. A száraz karotintartalma a levelekének mindössze 2—10%-a volt.

A karotin mennyiségi meghatározására alkalmazott módszereket általában három fő csoportba lehet sorolni. A legrégebben Willstätter [22] által javasolt csoportba az ún. fázikus elkülönítő megoldások tartoznak, amelyek a növényi pigmenteknek különböző oldószerekkel szemben tanúsított oldékonysági eltérésein alapulnak. A fázikus megoldások azonban — amint azt az utóbbi időben Moffit és Mehl [17] megállapították — csak tájékozódó jellegű vizsgálatokra alkalmasak. A Willstätter-féle módszerrel ugyanis mindenkor nagyobb karotinérték mutatkozik, mint a Cvet [4, 5] által felfedezett oszlopkromatográfiás meghatározással. Az eltérés oka a fázikus módszerben rejlő tökéletlen elválasztás következménye.

A karotin mennyiségének meghatározására leírt módszerek többsége az extrakciós-kromatográfiás pigmentanalitikai eljárások közé sorolható. Ezek között két alcsoportot kell megkülönböztetni. Az egyik a papírkromatográfia,

a másik az adszorpciós oszlopkromatográfia. Karotin mennyiségi meghatározására az utóbbi módszer bizonyult alkalmasabbnak és terjedt el.

A karotin meghatározás extrakciós-oszlopkromatográfias módszere a következő fő részműveletekből áll:

1. A növényi festékanyagok extrakciója. 2. A pigment-keverék oldat kromatografálása adszorpciós oszlopon. 3. A kromatográfias módszerrel elkülönített karotin oldat koncentrációjának meghatározása.

A karotinelemzés első részműveletére többféle megoldás használatos. E megoldások két csoportra oszthatók, egyrészt hideg, másrészt meleg extrakciós eljárásokra.

A hideg extrakciós megoldás egy elterjedt formája a poláros oldószerekkel történő kioldás. Oldószerként többnyire acetont szoktak alkalmazni. Worker [24] is ezt a módszert alkalmazza, aki pázsítfü- és hercfélék növényi pigmenttartalmának meghatározása céljából a festékeket acetonnal vonja ki, majd könnyű petroléteres-fázisba viszi át, kromatografálás előtt. A takarmányt kvarchomokkal dörzsöli el oldószer jelenlétében. A már elszíneződött oldószer adagot leönti és félreteszi. Mindaddig adagol újabb oldószer részletet — dörzsölés közben — amíg az extraháló folyadék már teljesen színtelen marad. Az acetonos műveletnek előnye, hogy nedves anyagok elemzésénél is alkalmazható, mert az aceton a vizet is kivonja. Mjutan az acetonos fázisban levő növényi festékanyagok kromatográfiasan általában nem különíthetők el, a pigmenteket acetonos fázisból benzolos, sőt célszerűbben petroléteres oldatba kell át vinni és az adszorpciót erősen gátló aceton maradványoktól is alaposan meg kell tisztítani.

A meleg extrakciós eljárások között megemlíthető a Soxhlet-féle extrakció. A karotin Soxhlet extrakciója száraz takarmányok esetében lényegileg a nyerszsír kivonásához hasonlóan történik. Nedves növényi anyagok esetében többnyire 96%-os alkoholt vagy acetont alkalmaznak és az összes festéket kivonatolják. Daghetta és Bruss [6] petroléter és aceton keveréket használnak e módszerrel.

A legelterjedtebb meleg extrakciós karotinkivonási eljárás az elszappanosítós megoldás. Inezédi és Demelné [7] szintén e módszert alkalmazta különböző élelmiszerek karotintartalmának meghatározásánál. A mintát alkoholos KOH-al melegítik vagy főzik. Ezt az eljárást követi némi módosítással Aust [1], valamint Mazziotti és Di Celsio [13] is, és némileg hasonlóképpen járnak el Wiseman és munkatársai [23] is.

A második fő részművelet a tulajdonképpeni kromatográfia. E műveletnél adszorbenként a legkülönfélébb anyagokat szokták alkalmazni. Cvet [4] alapvető műveletében kréport (CaCO_3) használt. Zechmeister [26], valamint Zechmeister és Cholnoky [27] ajánlatára karotinmeghatározási célra különösen az oltott mész terjedt el. Újabbban különösen gyakran alkalmazzák Brockmann [2] ajánlatára az Al_2O_3 -ot, amelyet Brockmann különböző adszorpciós képességű standard-preparátumokban állított elő.

Nagyon sok kutató, így Zechmeister [25], Zechmeister és Cholnoky [27], valamint Cholnoky és munkatársai [3], a Willstätter-féle [22] fázikus módszert kombináltan alkalmazza a Cvet-féle oszlopkromatográfiával. Bár e csoportba tartozó eljárások rendkívül pontos eredményt nyújtanak, meglehetősen komplikált voltuknál fogva karotin szériaelemzések elvégzésére nem alkalmazhatók.

A karotinoldatok mennyiségi meghatározására eleinte főként a kolorimetriás mérési módszereket alkalmazták. Willstätter és Stoll [22], újabbban pedig Mazurek [12] $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -ot ajánl összehasonlító oldatként, de a Kuhn és Brockmann [11], valamint Zechmeister [25] által javasolt azobenzol standard oldattal történő színösszehasonlítás terjedt el leginkább.

A kolorimetriás mérési módszerrel sokkal alkalmasabbnak bizonyult a fotometria a növényi festékanyagok mennyiségi mérésére. Cholnoky a karotinoidok fotometriás mérésének könnyebbé tétele céljából több karotin-izomerre és egyéb karotinoidra kalibrációs görbét vett fel, azok előzetes vegytiszta állapotban történő preparatív előállítását után (3. ábra). A különböző fotométerek között a Pulfrich-féle vált be legjobban a karotintartalom mennyiségi meghatározására is. Újabbban az elektromos fotométerek alkalmazásával igyekeznek kiküszöbölni a Pulfrich-féle fotométeren történő mérésnél előforduló szubjektív hibalehetőségeket. A karotinoid pigmentek azonosítására az abszorpciós-spektrószkóp és a spektrofotométer bizonyultak a legmegfelelőbbnek.

Kísérleti rész

Mironenko [16], valamint Wierchowski [20] arra az eredményre jutottak, hogy a karotintartalom a növény tenyészideje alatt állandó változásban van. E megállapításra való hivatkozással célszerűnek mutatkozott a vizsgálatokat a virágzási időszak alatt megejteni.

Több honos pázsitfűfélélet, egy amerikai fűfajt és hét herefélélet vizsgáltam meg karotintartalomra. A mintákat a Keszthelyi Mezőgazdasági Akadémia növénynevelési osztályának tenyészertjéből szereztem be, azonban nem kizárólagosan. Minden vizsgálathoz ugyanazon fajból kb. 20—25 szál virágzásban levő gyökérmentes növényt szedtem ki úgy, hogy lehetőleg a teljes levélzetet is tartalmazza a minta. A növényminták feldolgozását egy órán belül megkezdtem. A mintát kvantitatíve összedaraboltam, az így nyert kb. 100—150 g-nyi vagdalékot alaposan összekeverve homogenizáltam. Minden mintából két párhuzamos bemérésben 5—5 g-ot, centigrammnyi pontossággal, dörzscsészében aprószemű horzsakővel dörzsolva pss minőségű acetonnal hidegen extraháltam. 80—120 ml acetont használtam fel, amit kis részletekben adagoltam dörzsolés közben a mintához. A már elszíneződött oldószert lombikba gyűjtöttem és a dörzsolést tiszta oldószer adagolásával folytattam mindaddig, amíg az újabb oldószer részleg szintelen nem maradt.

Az extrakció alatt vigyázni kellett, hogy az megszakítás nélkül a festékanyagok teljes kivonásáig tartson, és hogy a növényi részeket az oldószer mindenkor fedje. E rendszabály azért bizonyult fontosnak, mivel a mérések alkalmával mindig akkor észleltem a párhuzamosok között nagyobb szórást, ha ezeket a szempontokat valamilyen okból nem tudtam betartani.

Az extrakció befejeztével a mintegy 80—120 ml acetonos növényi festék-kivonatot „G 3-as” jénei üvegszűrőn vízlégszivattyú segítségével átszűrtem. Tapasztalatom szerint, gyors vákuum-szűrés alkalmával karotinveszteség nem állott elő. Az átszűrt átlátszó sötétzöld színű acetonos oldatot 250 ml-es választótölcsérbe és 50 ml 50—60 °C között forró petroléterrel elegyítettem. Ezután kevés csapvizet folyattam az elegyhez rázás nélkül, mire az két fázisra különült; az eredetileg acetonos fázisban levő pigmentek gyakorlatilag teljes mennyiségben a petroléteres részbe mentek át.

A vizes acetonos fázis világos sárgásbarna színeződése, tájékozódó megfigyeléseim szerint, legnagyobb részben a klorofilbomlási termékektől eredt és csak elenyésző mennyiségben karotinoid, főként fitoxanthin származékoktól.

A kromatográfia sikeres végrehajtása szempontjából elsőrendű fontos-ságúnak bizonyult a petroléteres fázis teljes acetonmentesre való mosása. Figyelemmel kellett lenni arra is, hogy lehetőleg elkerüljem tartós emulzió képződését, mivel az ilyen rendkívül stabil emulzióból, mely a növényi extraktban jelenlevő emulgeáló anyagok hatására vízből, petroléteres pigment kivonathól és levegőből képződik, csak nagy nehézségek árán lehet a növényi festékanyagokat elkülöníteni.

A petroléteres-fázis acetonmentesítését a következőképpen hajtottam végre: a még acetont tartalmazó petroléteresfázist az acetonos-fázistól elkülönítettem, majd ismétlen addig elegyítettem pár ml-nyi vízzel, rázás nélkül, amíg végül is a petroléteres extrakt és a mosófolyadék határfelületén emulzió képződést kezdtem észlelni. Ekkor 20 ml 65%-os metanolt adagoltam az elegyhez, mire az acetonszennyezőanyagok nagy része kevés fitoxanthinnal együtt a hipofázisba ment át. Meg kell jegyezni, hogy a 65%-os metanol kis mennyi-

nyisége a további kromatográfiai műveletek tanulsága szerint az összes fitoxanthinnak csak nagyon kis hányadát vonta ki az extraktból, klorofil pedig gyakorlatilag és karotint abszolúte semmit.

A 20 ml 65%-os metanollal történő kirázást még kétszer megismételtem.

Metanolos kezelés után 100 ml deszt. víz rázás nélküli kétszer ismételt hozzáadásával mostam a petroléteres-fázist, az oldatban maradt kis mennyiségű metanol eltávolítása végett. A metanolnyomok teljes kiküszöbölése céljából egy-két ml deszt. vízzel ötször egymás után ráztam ki a már csaknem teljesen tiszta petroléteres pigmentoldatot. Az öt ismételt kirázás közben képződött kis mennyiségű (kb. 10—15 ml) stabil emulziót választótölcsérbe gyűjtöttem és csekély petroléter-részletek adagolásával teljesen elszíntelenedéssig ráztam. A kis térfogatú petroléteres-extraktot a pigmentkivonat fő tömegével egyesítettem. A növényi festékolddatot végül vízmentes Na_2SO_4 -al szárítottam.

A kromatográfia műveletét 18 mm átmérőjű és 9 cm hosszú Witt-lemezzel ellátott csőben hajtottam végre, Brockmann II-féle Al_2O_3 adszorbens alkalmazásával eluciós eljárással.

Az adszorbens anyagot petroléterrel pépesítve egyenletes enyhe szívatás mellett töltöttem a kromatografáló csőbe. Az adszorbens oszlopot üvegbottal egyenletesen tömörítettem. Az esetleges, oszlopba kerülő víznyomok kiküszöbölésére az oszlop tetejére másfél cm vastag rétegben vízmentes Na_2SO_4 -ot rétegeztem. A teljesen kész adszorpciós oszlopon átszívatam vízlégszivattyú segítségével a növényi festékanyagok petroléteres oldatát.

A növényi pigmenteknek az oszlopon történő átszívatása közben a kromatogram a következőképpen fejlődött ki:

Lefelül — a Na_2SO_4 alatt — viszonylag széles sötétzöld gyűrű alatt, keskeny, élénk citromsárga sáv helyezkedik el, amitől kissé lejjebb szélesebb, halvány kékeszürke sáv található. A kékeszürke sáv alatt közvetlenül vékony, halvány rózsaszínűsárga gyűrű alakul ki. Ez alatt az adszorbens egyenletesen halványsárgára színezett a petroléterrel az oszlopon áthaladó sárga festék által. Ez utóbbi ugyanis az adszorbens tölteten nem kötődik meg és petroléteres oldata a szívópalackba csepeg. A pigmentoldat átszívatása után a nem adszorbeálódó sárga festéket alacsonyforrponitú tiszta petroléterrel kvantitatíve a szívópalackba öblítve, az oszlop tiszta oldószerrel történő mosása után, a kromatogram felső negyedén elhelyezkedő keskeny sárgászínű sáv alatt még egy-két halványsárga sáv szakott kialakulni. Az egyik egy vékony halványsárga sáv — mely nem mindig alakul ki — az oszlop közepe táján fejlődik. Ez utóbbi alatt közvetlenül jelentkezik egy viszonylag szélesebb és intenzívebb színű halvány barackrózsaszínű gyűrű, csaknem minden esetben.

A kromatogram felső sávjainak azonosítását nem találtam szükségesnek, miután azokat több kutató már régebben elvégezte. Így legrégebben Cvet [4] már alapvető munkájában meghatározta néhány színes sáv abszorpciós maximumát és a zöld gyűrűben levő pigmentet klorofilnak, az alatta levő citromsárgát xanthofilnak, az ez alatt elhelyezkedő kékeszürke sávot klorofilánnak (klorofil bomlási termék), míg a nem adszorbeálódó és így a pigmentoldat kromatográf oszlopon való átszívatásakor a szívópalackba csepegő sárga festéket karotinnak találta.

Nehézséget okozott a klorofilán gyűrű alatt elhelyezkedő sárgászínű sáv pigmentjének azonosítása. Ezt ugyanis tévesen karotinepoxidnak tartottam, mivel minőségi meghatározása alkalmával a sáv éteres extraktuma tömény HCl-al zöld színeződést mutatott. Az epoxidok kimutatása ui. éteres közegben cc. HCl-al történik, amikor is epoxid jelenlétében az oldat kékre színeződik: Karrer és Jucker [9]. Azonban kitűnt, hogy a színreakciót nem a sárga pigment, hanem a hozzákeveredett klorofilán adta, aminek világosbarna színű éteres oldata cc HCl hatására élénk kékeszöld színt nyer. Megfelelő műszerek híján nem állt módomban e pigment abszorpciós maximumának pontos meghatározása és így azonosítását megkíséreltem a kromatogramon elfoglalt adszorpciós helye alapján elvégezni. A Karrer és Jucker [9] által megadott karotinoid kromatogram táblázat alapján kriptoxanthinnak kellett feltételeznem. Míután közsmerten a kukorica festékanyaga viszonylag nagy hányadban tartalmazza e festéket, a

kukorica pigmentkivonatát kromatografáltam ugyancsak petroléterből Al_2O_3 oszlopon. A kukorica fő festékanyagai közül a legelső szélesebb sáv úgy színre, mint a kromatogramon elfoglalt helyzetre nézve megegyezett az eredetileg tévesen epoxidnak vélt klorofilán alatti sávval, s a fűkivonat és kukoricaextrakt keverék kromatografálásakor valóban a kriptoxanthinnal azonos helyen adszorbeálódott a kérdéses pigment.

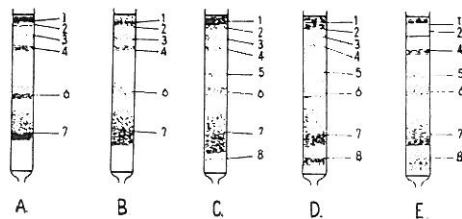
Problemátikus volt a kromatogram közepén egyes esetekben kifejlődő keskeny halványsárga sáv azonosítása is. Ezt eleinte γ -karotinnak tételeztem fel. E sáv pigmentjét epoxidra vizsgálva azonban pozitív reakciót észleltem. Éteres extraktja ugyanis HCl hatására kékre színeződött átmenetileg, s így bebizonyosodott, hogy a pigment karotin epoxid. Abszorpciós színképét ennek sem határozhattam meg a fentebbi okok miatt, s így nem tudtam eldönteni, hogy α -, vagy β -karotinepoxid-e, e pigment.

Az oszlop aljához legközelebb levő barackrózsaszínű sávot Karrer és Jucker [9] megállapításaira támaszkodva Neo- β -karotin-U-nak tételeztem fel, mivel petroléteres oldata Pulfrich-fotométerrel az S 47-es színszűrőnél (a β -karotinhoz hasonlóan) mutatott maximális fényabszorpciót, s a Carr—Price-reakciót is a β -karotinhoz hasonlóan adta. [Carr—Price reakcióban a karotinoidok kloroformos közegben antimontrikloriddal ($SbCl_3$) jellemző kék színeződést adnak.]

Amennyiben csak β -karotint kívántam meghatározni, akkor az egész kromatográfiás művelet rendkívül leegyszerűsödött. Ilyen esetben a kromatografáló oszlopra egyszerűen felöntöttem a mintegy 40—60 ml petroléteres pigmentoldatot és vízlégszivattyú segítségével közepes áramban átszívattam. A β -karotin kivételével az összes többi festék az oszlopon maradt és amennyiben α -karotin jelenléte nem zavart, a β -karotint nagy tisztaságban fotometriára alkalmas minőségben nyertem. Tekintve, hogy az adszorbens töltet acetonnal, majd petroléterrel öblítve teljesen regenerálhatónak bizonyult, így olyan növényi mintáknál, ahol α -karotin nem volt jelen, a kromatografálást szűrőszexhez hasonlóan, különösebb elővigyázat nélkül egymás után szériában lehetett végezni. Ha úgy látszott, hogy α -karotin is jelen van a pigmentelegyben (a lefelé haladó rózsaszínű front előtt okker színű sáv), az esetben szükségesnek bizonyult a festékkoldat vákuum alatti bepárlása és kis térfogathól történő kromatografálása.

Az eredetileg 40—60 ml petroléteres növényi pigmentoldatot hozzávetőlegesen két ml-re töményítve öntöttem fel az oszlopra, mire az összes festék az oszlop felső harmadában adszorbeálódott. Kovás könnyűpárlatú tiszta petroléter hatására a kromatogram teljesen kifejlődött (1. ábra). Felülről lefelé a sötétzöld klorofil-sáv után a keskeny élénk citromsárga fitoxanthin, majd kissé lejjebb a szürke klorofilán, az alatt a kriptoxanthin. Ez után, szélesebb üres mező alatt viszont a neo- β -karotin-U szélesebb barackszínű sávja helyezkedik el. Ez alatt, viszonylag szélesebb üres mező után, a β -karotin széles barackszínű gyűrűje következik éles rózsaszínű fronttal, mely alatt, végül is az oszlop aljához közel, közvetlenül az α -karotin okkersárga sávja található.

Néhány ml könnyű petroléter átszívása után az α -karotin sáv az oszlop aljára jutva megjelent a szívópalackban. Az első halványsárga csepp után a leesepegő oldat színe rohamosan intenzívebbé vált, majd bizonyos stagnálás után gyengülni kezdett. Mivel az α - és β -karotin már az oszlopon sem különül szét teljesen, az α -karotin eluátum elszíntelenedése előtt már megjelent a leesepegő oldatban a β -karotin is, fokozódó inten-



1. ábra

Kis térfogatra bepárolt petroléteres oldatból „Brockmann II” Al_2O_3 oszlopon adszorbeáltatott növényi pigmentkivonatok kromatogramjai. A) *Phleum pratense* L (teljes növényből). B) *Dactylis glomerata* L (teljes növényből). C) *Phleum pratense* L (levélből). D) *Lotus corniculatus* L (levélből). E) *Lotus corniculatus* L (virágból). 1. Klorofilok. 2. Fitoxanthinok (xanthofil). 3. Klorofilán (klorofil. bomlás termék.) 4. Kriptoxanthin 5. Karotinepoxid. 6. Neo- β -karotin-U. 7. β -karotin. 8. α -karotin

zítással. Ily módon nem sikerült az α - és β -karotint egymástól kvantitatíve elkülöníteni, bár a frakcionált elució két ml-cnkénti fotometrikus ellenőrzése során kitűnt, hogy a β -karotin megjelenése előtt az eluátum már alig tartalmaz egy kevés α -karotint. A továbbiakban petroléter könnyű párlattal a β -karotint teljes mennyiségben eluálni lehetett, azonban az erősebben adszorbeálódó neo- β -karotin-U és a csekély mennyiségben jelenlevő karotinepoxid csak nagyobb polaritású oldószerrel, azaz a petroléter polaritásának kevés acetont hozzáadásával való megnövelésével deszorbeálódott az oszlopról. A kriptoxanthin, valamint a klorofilán sáv leoldását 20 : 1 arányú petroléter-aceton eleggyel valósítottam meg. A fitoxanthinok elucióját Brockmann II Al_2O_3 oszlopról még az így megnövelt polaritású petroléter-aceton oldószerrel sem sikerült elérni. A karotinok izomereinek szétválasztása tehát meglehetősen szelektívnek bizonyult, s véletlenül sem fordulhatott elő az, hogy a karotin eluátumokba xanthofil kerüljön. A fitoxanthin keverék sávot nem sikerült széthúzni keverék komponensekre, bár érdekesnek ígérkezett volna annál is inkább, mivel nagyobb arányban kell epoxidot tartalmaznia, mivel az eluátumot, amit végül is 90%-os metanollal sikerült leoldani az oszlopról, tömény sósav és éter eleggyel összerázva, élénk és tartós kék színeződést észleltem. A fitoxanthinokat a klorofiltól csaknem minden esetben el tudtam különíteni. Ilyen módon végül is az adszorpciós oszlopon kizárólag a klorofilok keveréke maradt vissza. A klorofil sáv legalább két mezőre való szétkülönítését különféle oldószerekkel kezelve kíséreltem meg, azonban sikertelenül. Ennek ellenére szétválasztás nélkül a klorofil keverék tiszta acetonnal történő öblítéssel rendkívül éles frontban és viszonylag nagy koncentrációban teljesen eluálható. A fentebbi eljárással tehát végeredményben az összes pigmentet le lehet az oszlopról frakcionáltan oldani (3. ábra).

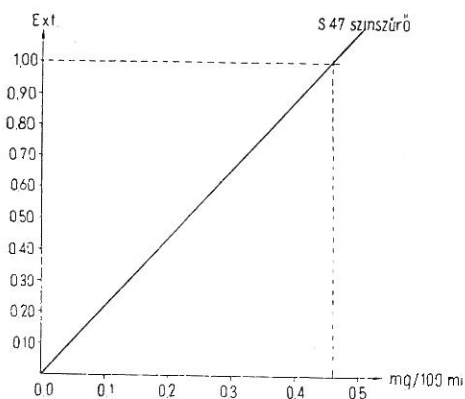
A pigmentek eluálása után az oszlop kevés petroléterrel történő öblítéssel teljesen regenerálódik és újabb festékektartókromatografálására alkalmas.

Mivel a klorofil is leoldhatóan bizonyult és további petroléteres kezelés után az oszlop regenerálódott, úgy látszott, hogy egyszeri adszorbens töltettel akárhány pigmentanalízist el lehet végezni. Gyakorlatilag azonban 15–20 kromatográfiás művelet elvégzése után a töltetet új adszorbenssel kellett kicserélni az adszorbens oszlop tartós elszennyeződése miatt. Az irreverzibilisen szennyezett töltetet 600 °C-on kiizzítva, majd egy napig szabadlevegőn tartva lehetett regenerálni. Az így reaktívált adszorbens minősége közelítőleg megfelelt a Brockmann II-es minőségnek.

A kromatográfiával elkülönített egyes pigment eluátumokat 100 ml-es mérőlombokban petroléterrel jelleg feltöltöttem, majd Pulfrich-féle szakaszos fotométerrel megmértem azok extinkciós értékeit. Az α -karotint és az epoxidot S 42-es, a β -karotint, a neo- β -karotin-U izomért,

valamint a kriptoxanthint S 47-es színszűrő mellett határoztam meg, maximális fényelnyelőképességüknek megfelelően. Az egyes oldatok töménységétől függően 5, 10, vagy 20 mm-es küvetát használtam. A nyert extinkciós értékeket a Cholnoky által megadott diagram alapján értékeltem ki (2. ábra).

Az előzőekben ismertetett pigmentanalitikai módszerrel nagyon pontos mérési eredményeket nyertem, s bár a meghatározás viszonylag komplikált és sok hibalehetőségre ad alkalmat, ennek ellenére a minták külön-külön feldolgozott párhuzamosai alig mutattak némi eltérést.

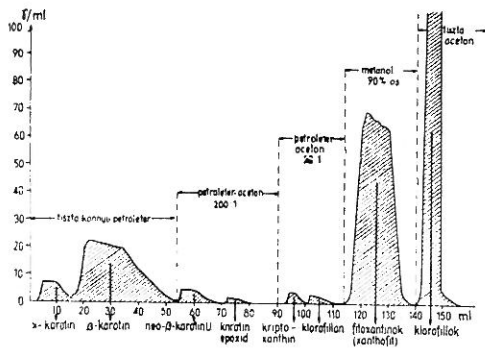


2. ábra

A β -karotin Cholnoky által meghatározott kalibrációs görbéje

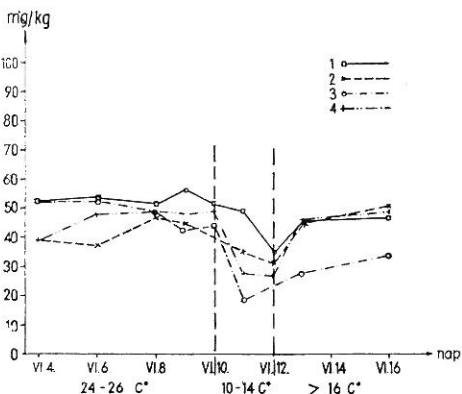
Az eredmények értékelése

A β -karotin tartalomra megvizsgált növényi minták egy részének elemzési adatait a mellékelt 1. táblázat tünteti fel. Feltüntettem a növények neve mellett azok szárazanyag tartalmát %-ban, a meghatározott két párhuzamos extinkciós értékeit, kalibrációs görbe alapján kiszámított nyers zöld növényi anyagra vonatkoztatott ún. relatív karotintartalmat mg/kg-ban, a relatív és szárazanyag alapján kiszámított szárazanyagra vonatkoztatott abszolút karotinértéket. Az elemzési adatok mellett még a minták szedési idejét is egyes esetekben származási helyét is megjelöltem. Egyes növényfajnál (pl. *Lolium perenne*) több, egymástól eltérő időben is vizsgáltam karotintartalmát. Az egyes pázsitfűfajok karotintartalma között nem lehet túl nagy különbségeket észlelni. A pázsitfűfajok átlag karotintartalma 109 minimum és 350 mg/kg maximum közt van, szárazanyagra vonatkoztatva. A legtöbb pázsitfűfajnál azonban 160 és 220 mg/kg között ingadozik az átlag karotintartalom abszolút értéke. A különböző időben vett azonos fűfaj egésznövényekből vett átlag-



3. ábra

Öt gramm *Lotus corniculatus* levélminta petroléterből Al_2O_3 oszlopon adszorbeáltatott acetonos extraktjának eluciós kromatogramja



4. ábra

Arelatív (nedves anyagra vonatkoztatott) β -karotinszint változása az időjárás függvényében a virágzási időszak alatt (gyökérmentes egész növények átlagmintáiból mérve) négy növényfajnál. 1. *Lotus corniculatus* L. 2. *Lolium perenne* L. 3. *Phleum pratense* L. 4. *Agrostis alba* L.

mintáinál több esetben nagyobb eltérést lehet észlelni, mint merőben különböző fajok között. Így pl. a *Dactylis glomerata*-nál a V. 11-én szedett minta abszolút karotintartalma több mint kétszerese a VI. 1-én szedettének. Értéke 152—350 között variál. Az utóbbi körülmény miatt nem állapítható meg, hogy melyik pázsitfűfajnak van specifikusan a legmagasabb karotintartalma.

Annak eldöntésére tehát, hogy mennyiben befolyásolja az időjárás ugyanazon növényfajnál a karotintartalom abszolút szintjének alakulását, négy különböző növényfajt választottam ki és egy-két napos időközben vizsgáltam azok karotintartalmának alakulását két héten keresztül, virágzásuk időszakában. A négy különböző növényfaj két héten át rendszeresen vizsgált karotinszint változásait az 4. és 6. ábra tünteti fel. A 5. ábra ugyanazon növ-

nyeknél a fentebbi időszak alatti nedvességtartalom ingadozását mutatja. A három ábra összevetéséből kiviláglik, hogy a relatív karotinszint nem változik arányosan a nedvességgel, mert ez esetben az abszolút karotinszint-változás grafikonjainak közelítőleg egyenesnek kellene lenniök. Kedvező időjárás emeli az abszolút karotinszintet, kedvezőtlen viszont csökkenti. E törvényszerűség a hereféléknél sokkal kevésbé mutatkozik, így a pázsitfűvekkel ellentétben, a teljes növényekből vett minták vizsgálatával is, közelítőleg specifikusnak mutatkozott a karotin abszolút mennyisége növényfajonként. Kiténik, hogy a

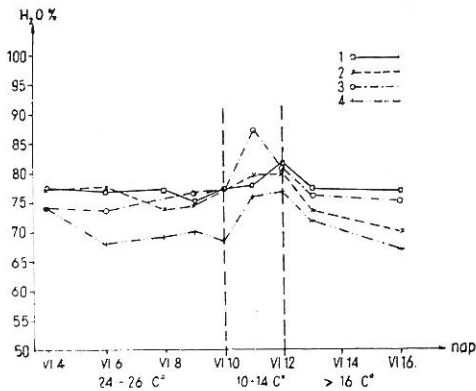
1. táblázat

Különbféle pázsitfűfajok és herefélék gyökérmentes teljes növényi átlagmintáinak β -karotin tartalma virágzáskor

(1) Latin név	(2) Magyar név	(3) Szárz- anyag %	(4) Karotin tartalom				(5) Szedés ideje 1959
			relatív		abszolút		
			mért extinkció	átlag	érték	átlag	
a	b	mg/kg	mg/kg				
A) Pázsitfűfajok							
1. <i>Agropyron cristatum</i> L. (Gärt.)	Tarajos búzafű	33,2	0,56	0,60	55	166	V. 28.
		40,6	0,80	0,90	81	200	VII. 22.
2. <i>Arrhenatherum elatius</i> L (Presl.)	Francia v. magas perje	34,2	0,81	0,83	76	222	V. 28.
		31,0	0,74	0,67	65	216	VII. 16.
3. <i>Bromus catharticus</i> (Kahl.)*	Zöld rozsnok	24,2	0,51	0,52	48	198	VII. 16.
		24,0	0,44	—	41	171	VI. 8.
4. <i>Dactylis glomerata</i> L.	Csomós ebír	32,3	1,25	1,19	113	350	V. 11.
		26,3	0,42	0,43	40	152	VI. 1.
		27,4	0,49	0,52	47	172	VII. 16.
5. <i>Festuca rubra</i> L.	Vörös esenkesz	26,8	0,58	—	54	201	VI. 1.
6. <i>Lolium perenne</i> L.	Angol v. kurta perje	23,2	0,42	0,45	41	177	V. 18.
		26,2	0,50	0,52	48	183	VI. 8.
		26,6	0,75	0,80	71	267	VII. 16.
		23,8	0,68	0,67	62	260	VII. 21.
7. <i>Phleum pratense</i> L.	Réti komócsin	26,2	0,63	0,69	61	233	V. 28.
		26,0	0,56	0,58	53	204	VI. 4.
		30,6	0,72	0,72	66	216	VII. 16.
8. <i>Trisetum flavescens</i> L. (Beauv.)	Arany zab	29,9	0,76	0,78	71	238	V. 28.
		33,5	1,01	1,04	92	278	VII. 16.
B) Herefélék							
9. <i>Lotus corniculatus</i> L.	Szarvaskerop	21,0	0,70	0,74	66	314	V. 18.
		26,0	0,58	0,58	54	208	VII. 20.
10. <i>Medicago lupulina</i> L.	Komlós lucerna	20,5	0,60	0,66	58	283	VII. 19.
		18,2	0,45	0,50	44	241	V. 18.
11. <i>Medicago sativa</i> L.	Kék lucerna	27,7	0,47	0,48	45	163	VII. 19.
		20,0	0,33	—	31	155	V. 19.
12. <i>Trifolium pratense</i> L.	Vörös here	28,2	0,56	0,56	51	181	V. 15.
		24,5	0,46	0,46	43	176	VII. 19.
13. <i>Trifolium procumbens</i> L.	Mezei here	20,8	0,60	—	56	269	V. 28.
		23,3	0,61	0,65	58	249	VII. 19.
14. <i>Trifolium repens</i> L.	Fehér here	20,0	0,40	—	39	190	V. 18.
		22,5	0,50	0,52	48	210	VII. 19.
		13,3	0,42	0,39	38	286	VII. 21.**

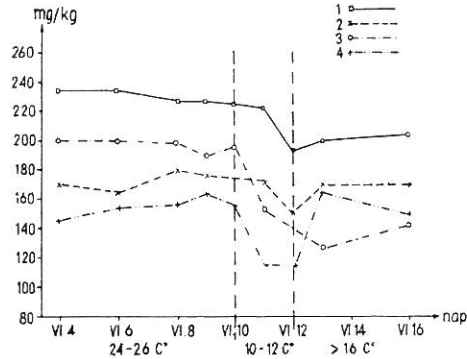
* Amerikai fűfaj.

** A Mg. Ak. tanintézet udvarán langyos zápor után szedett minta.



5. ábra

A nedvességtartalom változás az időjárás függvényében a virágzási időszak alatt (gyökérmentes egész növények átlagmintáiból mérve) a négy növényfajnál



6. ábra

Az abszolút (szárazanyagra vonatkoztatott) β -karotinszint változása az időjárás függvényében a virágzási időszak alatt (gyökérmentes egész növények átlagmintáiból mérve) a négy növényfajnál

sárgavirágú herefélék abszolút karotintartalma magasabb — legalábbis a virágzás állapotában — mint az egyéb színűeké.

Vizsgálataim során arra a tapasztalatra jutottam, hogy a különböző helyekről vett növényi átlagminták karotintartalmát elsősorban az határozza meg, hogy milyen a levélzet mennyiségi viszonya a növény többi részeihez viszonyítva. Hogy megfigyeléseimre számszerű adatokat nyerhessek, kiválasztottam három növényfajt és azokból a négy fő növényrészre külön-külön átlagmintát vettem, majd megvizsgáltam azok karotintartalmát. A három vizsgált növényfaj levél, szár, virág és gyökér átlagmintáinak karotintartalmát

2. táblázat.

Két fű és egy hereféle epifázikus karotinoid pigmentjeinek megoszlása növényi részenként

(1) Név	(2) Szerv	(3) karotinoidok mg/kg nedves anyag (relatív)				
		α -karotin	β -karotin	neo- β -karotin U	karotin eposid	kriptoxantin
1. <i>Phleum pratense</i> L (Réti komócsin)	levél	1	99	6	+	3
	szár	—	9	2	—	+
	virágzat	1	31	4	2	2
	gyökér	—	2	+	—	—
2. <i>Bromus catharticus</i> (Valh)	levél	+	94	4	+	2
	szár	—	14	2	—	+
	virágzat	+	21	2	+	1
	gyökér	—	1	+	—	—
3. <i>Lotus corniculatus</i> L. (Szarvas kerep)	levél	15	92	10	4	5
	szár	+	25	2	+	2
	virágzat	38	42	25	10	11
	gyökér	—	+	—	—	—

+ nyomok.

a 2. táblázat tünteti fel. Világosan kitűnik, hogy a szár karotintartalma a levéléhez viszonyítva annak csak mintegy 9—12%-a a pázsitfűveknél, s csak a hereféléknél magasabb az arány. E kísérlet egyszersmind eldöntötte azt, hogy mennyiben befolyásolja valamely zöld tömeg karotintartalmát annak levél és szár aránya. A táblázatban a β -karotin növényrészek szerinti megoszlásán kívül feltüntettem az egyéb epifázikus karotinoidok mennyiségét is.

3. táblázat

Fülevél-minták β -karotin tartalmának hely és egyed szerinti eltérései három növényfajnál

(1) Latin név	(2) Magyar név	(3) Szár az anyag %	(4) Karotintartalom				(5) Szedés ideje 1959	(6) Hely Keszthely
			relatív		abszolút érték átlag mg/kg			
			mért extinkció					
			b	a	mg/kg			
1. <i>Agropyron cristatum</i> L (Gärtn.)	Taréjos búzafű	37,6	2,16	2,26	203	540	VII. 24.	Mg. Akad. tenyészkertje
		37,0	2,00	2,00	186	502	VII. 24.	" " "
		36,5	2,06	2,06	191	523	VII. 22.	" " "
2. <i>Lolium perenne</i> L DC.	Angol perje	37,3	2,05	2,16	194	520	VII. 24.	" " "
		24,6	1,12	1,12	103	420	V. 11.	Mg. Akad. udvara
		25,3	1,16	1,24	110	435	VII. 22.	Utca árok
3. <i>Trisetum flavescens</i> L (Beauv.)	Arany zab	23,8	1,03	1,06	97	407	VII. 24.	Mg. Akad. tenyészkertje
		*31,5	1,40	1,38	129	410	VII. 22.	Helikon liget
		*26,6	1,19	1,20	110	414	VII. 24.	Mg. Akad. tenyészkertje
		*26,0	1,10	1,16	104	400	VII. 24.	" " "
		30,0	1,48	1,40	133	442	VII. 22.	" " "
		30,6	1,56	1,54	144	471	VII. 24.	" " "
29,2	1,36	1,46	132	449	VII. 24.	" " "		

* Világosabb színű egyedi fücsomókból szedett levélminták.

4. táblázat

Különféle pázsitfűfajok leveleinek β -karotintartalma

(1) Latin név	(2) Magyar név	(3) Szár az anyag %	(4) Karotintartalom				(5) Szedés ideje 1959
			relatív		abszolút érték átlag mg/kg		
			mért extinkció				
			a	b	mg/kg		
1. <i>Agropyron cristatum</i> L (Gärtn.)	Taréjos búzafű	36,5	2,06	2,06	191	522	VII. 22.
		37,3	2,05	2,16	194	520	VII. 24.
2. <i>Arrhenatherum elatius</i> L pers.	Francia v. magas perje	31,9	1,15	1,15	106	333	VII. 22.
3. <i>Dactylis glomerata</i> L	Csomós ebír	35,7	1,41	1,50	136	381	VII. 22.
4. <i>Festuca rubra</i> L	Vörös csenkesz	28,0	1,10	—	101	361	VII. 22.
5. <i>Lolium perenne</i> L DC.	Angol vagy kurta perje	25,3	1,16	1,24	110	435	VII. 22.
6. <i>Phleum pratense</i> L	Réti komócsin	28,0	1,36	1,38	125	446	VII. 22.
7. <i>Trisetum flavescens</i> L (Beauv.)	Arany zab	30,0	1,48	1,40	133	444	VII. 22.

5. táblázat

Néhány pázsitfűfaj és hereféle gyökérmentes teljes növényi átlagmintáiból meghatározott epifázikus karotinoid pigmentjeinek megoszlása mg/kg-ban nedves (relatív) és száraz (abszolút) anyagra vonatkoztatva

(1) Növény neve	(2) Relatív karotinoid tartalom					(3) Száraz anyag %	(4) Abszolút karotinoid tartalom				
	α-ka- rotin	β- karotin	neo- β-ka- rotin U	ka- ro- tin epoxid	kripto- xan- thin		α-ka- rotin	β-ka- rotin	neo-β- karotin U	ka- ro- tin epoxid	krip- to- xan- thin
A) Pázsitfűfajok											
1. <i>Agropyron cristatum</i> L. (Gärtn.)	—	55,0	5,0	—	1,5	33,2	—	160	15,1	++	4,8
	+	81,0	9,0	1,0	2,5	40,6	++	202	19,7	2,0	6,2
2. <i>Arrhenatherum elatius</i> L pers.	+	76,0	7,0	1,0	2,5	34,2	++	222	20,4	3,0	7,3
	+	67,0	6,0	+	2,0	31,0	++	216	19,4	++	6,5
3. <i>Bromus catharticus</i> (Kahl.)	+	28,0	3,0	1,0	2,5	20,0	++	140	15,0	5,0	12,5
4. <i>Dactylis glomerata</i> L	1,0	40,0	4,0	+	1,5	26,3	4,0	152	15,2	++	5,7
5. <i>Festuca rubra</i> L	—	54,0	1,5	—	1,0	26,8	—	200	5,6	—	3,7
6. <i>Lolium perenne</i> L DC.	+	41,0	2,0	+	3,0	23,2	++	177	8,6	++	12,9
7. <i>Phleum pratense</i> L	1,0	61,0	7,0	1,5	2,0	26,2	4,0	233	26,7	5,7	7,6
	1,0	66,0	6,0	1,0	3,0	30,6	3,0	216	19,6	3,3	9,8
8. <i>Trisetum flavescens</i> L (Beauv.)	+	71,0	3,0	+	1,0	29,9	++	238	10,6	++	3,0
	+	92,0	2,0	+	1,0	33,5	++	278	6,0	++	3,0
B) Herefélék											
9. <i>Lotus corniculatus</i> L	10,0	54,0	7,0	5,0	5,0	26,0	38,5	204	26,9	19,2	19,2
10. <i>Medicago lupulina</i> L	10,0	58,0	5,0	3,0	6,0	20,5	48,8	283	24,4	14,6	29,2
11. <i>Medicago sativa</i> L	1,0	45,0	3,0	+	1,0	27,7	3,0	163	11,0	++	3,6
12. <i>Trifolium pratense</i> L	+	43,0	4,0	+	2,0	24,5	++	175	16,3	++	8,2
13. <i>Trifolium procumbens</i> L	6,0	58,0	4,0	1,0	3,0	25,7	24,9	249	17,1	4,3	12,9
14. <i>Trifolium repens</i> L	+	48,0	3,0	—	2,0	22,5	++	210	13,3	—	8,8

+ Nyomok.

W i e r z c h o w s k i [21] különféle lombos fák leveleinek karotintartalmát vizsgálva arra a megállapításra jutott, hogy azonos fejlődési stádiumban levő levelek karotintartalma fajra nézve meghatározott. Érdekesnek találtam annak kivizsgálását, hogy a pázsitfűvek leveleinek karotintartalma azonos fejlődési stádiumban és hasonló körülmények között szintén fajspecifikusnak adódik-e. E kérdés eldöntése végett három pázsitfűfajt választottam ki és különböző időpontokban, különböző helyekről vett levélminták karotintartalmát határoztam meg. Eredményeimet a 3. táblázatban közlöm. Amint a mellékelt táblázatból is látható, sem egyed, sem hely szerint nem észleltem lényegesebb eltérést az egyes pázsitfűfajok abszolút levélkarotintartalma között, sőt a két hónappal előbb szedett levélminta (bokrosodásban levő növény) karotintartalma sem mutatott lényegesebb különbséget. Külön csoportosítva a világosabb és külön a sötétebb levélzettel rendelkező egyedeket, megállapítható

volt, hogy azonos fűfajon belül a világosabb levélzettel rendelkező levélkarotin tartalma hozzávetőlegesen 10%-kal adódik alacsonyabbnak átlagosan, mint a sötétebb levelű egyedeké. A vizsgálat eredményeit összegezve kitűnt, hogy hasonló körülmények között az átlag abszolút levélkarotintartalom a különböző pázsitfűfajokra meghatározott. Ki lehetett mutatni azt, hogy a három vizsgált pázsitfűfaj közül a legmagasabb levélkarotinszinttel az *Agropyron cristatum*, míg a legalacsonyabban a *Lolium perenne* rendelkezik. A két pázsitfűfaj abszolút átlag levélkarotintartalma között mintegy 100 mg eltérés mutatkozik kg-onként. E kísérletsorozat befejezéseként végül is 7 közismert pázsitfűfaj leveleinek β -karotintartalmát határoztam meg annak megállapítása céljából, hogy a 4. táblázatban feltüntetett fajok között melyeknek abszolút átlag levélkarotintartalma mutat kiemelkedő értéket.

Bár agrokémiai szempontból kétségkívül a β -karotintartalom a legjelentősebb, mindazonáltal tájékozódni kívántam az egyéb karotinoidok mennyiségére nézve is. Megvizsgáltam 8 fűfaj és 7 herefaj epifázikus karotinoid-pigment tartalmát. E vizsgálataim eredményeit az 5. táblázatban tüntettem fel. E kísérletsorozatban a vizsgált pázsitfűfajoknál α -karotint csak nyomokban találtam, a herefélék között viszonylag magas és kromatográfiásan jól elkülöníthető α -karotintartalommal a sárgavirágúak rendelkeztek. Az α -karotintartalom azonban ez utóbbiaknál sem emelkedett a β -karotin mennyiségéhez viszonyítva 20% fölé. A vizsgált növények valamennyie 5—20%-ban tartalmazott neo- β -karotin-U izomért — a β -karotin tartalmát 100-nak véve. Az említett karotin-izomérek kivül nagyon kis mennyiségben még karotinepoxidot és valamivel nagyobb arányban kriptoxanthint is meg lehetett határozni a különböző növényfajokban.

Bár e közleményben ismertetett munkám hézgapótló jellegénél fogva több kívánnivalót hagyhat maga után, mindenesetre igyekeztem a takarmányozásban még mindig jelentős szerepet játszó rét és legelői növényállomány gyakoribb pázsitfűvei karotintartalmát értékelni. Igyekeztem e közleményemmel a növénynevelőknek is bizonyos támponttal szolgálni és megkísérlettem növényfiziológiai szempontból összefüggést találni az időjárás és a vizsgált növények karotintartalmának alakulása között. Elsősorban növénybiokémiai szempontokat vettem tekintetbe mikor a β -karotintartalom meghatározásán kívül más epifázikus karotinoidok mennyiségét is megmértem.

Ö s s z e f o g l a l á s

Megállapítható volt, hogy a pázsitfű- és herefélék karotintartalmának vizsgálatánál a hideg acetonos extrakciós és Brockmann II-féle Al_2O_3 adszorbens oszlopon elvégzett kromatográfiás módszerrel nagyon pontos mérési eredményeket lehet nyerni. A vizsgálatok eredményeként kitűnt, hogy a teljes növény abszolút karotintartalma nem, csak a levél karotintartalma fajspecifikus, azonos körülmények között. A növények karotintartalmának változása nagymértékben függ az időjárástól. Ez részben abból adódik, hogy a karotinszintet a növény levél—szár aránya befolyásolja. A levél karotinszintje ugyanis lényegesen magasabb, mint a többi növényrészeké. Kedvező időjárás alkalmával a növény dúsabb levélzettel rendelkezik, mint kedvezőtlen körülmények között.

mények között. Tehát a karotintartalom szempontjából sem közömbös a növényne mesítőknek azon törekvése, hogy kedvezőtlenebb időjárási viszonyok között is vegetatívabb dúslevélzetű pázsitfű- és hereféléket tenyésztenek ki.

Érkezett : 1959. december 28.

Irodalom

- [1] *Aust, H.* : Die Bestimmung von β -Carotin in Pflanzen Material. Milchwiss. Ber. **5.** 31—42. 1955.
- [2] *Brockmann, H.* : Die chromatographische Adsorption. Springer. Berlin. 1943.
- [3] *Cholnoky, L., Györfy, K., Nagy, E. & Pánczél, M.* : Untersuchungen über Carotinoid-Farbstoffe I. (Die Farbstoffe des roten tomatenförmigen Paprikas.) Acta Chim. Acad. Sci. Hung. **6.** 143—171. 1955.
- [4] *Cvet, (Tswett), M.* : Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. Ber. Deutsch. Botan. Gesell. **24.** 316—324. 1906.
- [5] *Cvet, M.* : Hromofilü v mire rasztényij i zsvotnüh. Varsava. 1910.
- [6] *Daghetta, A. & Bruss, O.* : Osservazioni sui metodi di determinazione del carotene nei foraggi. Ann. Sper. Agrar. **10/4.** Suppl. 109—114. 1956.
- [7] *Inezédi, A. & Demel, E.-né* : Karotinmeghatározás élelmiszerekben. Élelmecési ip. (7) 221—225. 1956.
- [8] *Káldi, A. & Zubrický, J.* : Obsah karoténu v zelených a konzervovaných krmivách. Pol'nohospodárstvo. **5/3.** 533—568. 1958.
- [9] *Karrer, P. & Jucker, E.* : Carotenoids. Elsevier. New-York. 1950.
- [10] *Kirsanova, Y. V.* : Szogyerzsányie karotina v nyekotorüh travah szuszamirszkih pasztbiszcs. Trudi Inst. Botan. Akad. Nauk Kirgiz. SSR. (3) 1958.
- [11] *Kuhn, R. & Brockmann, H.* : Bestimmung von Carotinoiden. Z. physiol. Chem. **206.** 41—64. 1932.
- [12] *Mazurek, J.* : Metodika oznaczania karotenow w swiecym materiale roslinnim. Roczn. Nauk Roln. **A 1.** 71. 123—129. 1955.
- [13] *Mazziotti, P. & Di Celso* : Illustrazione di un metodo rapido per la determinazione del carotene nei magimi. Ann. Sper. Agrar. **10.** Suppl. II—LV. 1956.
- [14] *Mel'nik, A. F.* : Szogyerzsányie karotina v kormah puszttünnüh pasztbiszcs Alma-Atinszknoj oblasztyi. Vesznik Akad. Nauk Kazah. SSR. **12/5.** 74—79. 1956.
- [15] *Mel'nik, A. F.* : Karotin v pasztbiszcsnüh kormah puszttüny Jugo-Vosztoecsnoego Kazahsztana. Izv. Akad. Nauk Kazah. SSR. Szer. Biol. **2.** 58—65. 1956.
- [16] *Mironenko, A. V.* : Izmenenye pitáteljnüh veszcseszty v odoljetnih i mnogoljetnih kormovüh travah v tecsényie vegetacionnoo periodo. Izv. Akad. Nauk Beloruss. SSR. (6) 163—167. 1955.
- [17] *Moffit, R. A. & Mehl, J. W.* : Comparison of the phasic and chromatographic methods for analysis of carotene in dehydrated alfalfa. Assoc. Offic. Agr. Chem. **39.** 255—259. 1956.
- [18] *Papendick, K.* : Über den Karotingehalt von Wiesenfutter. Landw. Forsch. Sonderh. **7.** 135—143. 1956.
- [19] *Ramanujan, A. & Anantkrishnan, C. P.* : Tocopherol and carotene contents of green fodder. Indian J. Dairy Sci. **11.** 101—108. 1958.
- [20] *Wierzchowski, Z.* : Przebieg gromadzenia siec karotenów w roslinach pastewnych. Roczn. Nauk Rolnich. **69.** Ser. B. 303—304. 1955.
- [21] *Wierzchowski, Z., Leonowicz, A., Scepiecko, K. & Sykut, A.* : Occurence of α - and β -carotene in plants. Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska Lublin, Pol. Sect. C **12.** 141—182. 1957.
- [22] *Willstätter, R. & Stoll, A.* : Untersuchungen über Chlorophyll. Springer. Berlin. 1913.
- [23] *Wiseman, H. G., Irvin, H. M. & Moore, L. A.* : Determination of carotene in silage and forages. J. Agric. Food chem. **5.** 134—137. 1957.
- [24] *Worke, N. A.* : Rapid procedure for the chromatographic separation and spectrophotometric estimation of certain pasture lipides : Carotene, xanthophyll and chlorophyll. J. Sci. Food Agric. **8.** 442—444. 1957.
- [25] *Zechmeister, L.* : Carotinoide. Springer. Berlin. 1934.
- [26] *Zechmeister, L.* : Progress in chromatography. Wiley and Son. New York. 1947.
- [27] *Zechmeister, L. & Cholnoky, L.* : Die chromatographische Adsorptionsmethode. Springer. Wien. 1938.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАРОТИНА В САМЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ЗЛАКОВЫХ И БОБОВЫХ КОРМОВЫХ ТРАВАХ

И. Ихас

Кафедра Химии и Почвоведения Сельско-хозяйственной Академии, Кестхей (Венгрия)

Резюме

Автор определил содержание каротина в злаковых и бобовых травах, наиболее распространенных в Дунайской долине. Автор сравнивал различные методы определения пигментов. Сравнивались различные холодные и горячие методы экстракции. Самым пригодным методом оказался метод холодной экстракции ацетоном. Для разделения растительных пигментов столбчатая хроматография является более пригодной, чем бумажная хроматография.

Автор исследовал 43 отечественных и иностранных видов злаковых трав, в том числе одну разновидность и 7 видов бобовых растений. Из каждого вида было взято 20–25 растений, которые измельчались. Из них два образца по 5 грамм растирались с пемзой в ступке и проводили холодную экстракцию ацетоном. Полученный таким образом 80–120 мл раствор ацетона фильтровался, потом туда добавлялся петролейный эфир и небольшое количество воды. Удаление ацетона из раствора проводилось 65% раствором метанола и водой, высушивание проводилось с помощью сухого сульфата натрия. Хроматографическое распределение осуществлялось в трубках небольшого размера на адсорбенте Al_2O_3 (по Brockmann II). Степень распределения увеличивалась с помощью промывания петролейным эфиром. Выделение фракции проводилось петролейным эфиром с добавлением небольшого, но возрастающего количества ацетона. Концентрация растительных пигментов в отдельных выделенных фракциях определялась при помощи фотометра Пульфриха. На первом рисунке показаны некоторые хроматограммы растительных пигментов на столбе. Калибрационная кривая — каротина показана на рисунке 2. На рисунке 3 видны хроматограммы ацетонной экстракции 5 граммового образца из листьев *Lotus corniculatus*. Содержание β -каротина, изученных растений, приведено в таблице 1. Видно, что при анализе целых растений не получаем данных каротина, характеризующих своеобразие отдельных злаковых трав. Поэтому автор определил содержание каротина в отдельных частях растений. Результаты этих исследований приведены в таблице 2. Согласно данным видно, что содержание каротина в листьях злаковых трав примерно в 10 раз больше, чем в стеблях в фазе цветения. Содержание каротина в образцах зеленых растений определяется в первую очередь соотношением листьев к стеблям.

В таблице 3, видно, что содержание каротина в пересчете на средний сухой вес листьев является примерно одинаковым для данного вида, если злаковые выращиваются примерно в одинаковых условиях, и если образцы были взяты в один срок. В таблице 4 приведено содержание β -каротина в образцах листьев некоторых видов злаковых трав.

В отдельных опытах изучалось влияние погоды на содержание каротина в злаковых и бобовых растениях. Автор определял содержание каротина и сухой вес растений трех видов злаковых и одного вида бобовых. В течение двух недель определение проводилось через день. Полученные данные показаны на графиках, 4, 5 и 6. Видно, что содержание каротина не изменилось пропорционально изменению содержания влаги в растениях. Было проведено определение содержания других эпифазических каротиноидов злаковых и бобовых трав. Результаты этих исследований приведены в таблице 5. Из данных таблиц видно, что α -каротин содержится в измеряемых количествах только в желтоцветных бобовых растениях. Содержание нео- β -каротина-U составляет 5–20% от общего содержания β каротина в различных злаковых и бобовых. Наличие каротин-эпоксида было установлено у многих из изученных растений, при помощи синеветной реакции, возникающей в эфирной среде под влиянием концентрированной соляной кислоты. Криптоксантин содержится в небольших количествах во всех растениях, относительно больше его в желтоцветных бобовых растениях.

Рис. 1. Хроматограммы растительных пигментов, адсорбированных на столбе Al_2O_3 «Brockmann II». A. *Phleum pratense* L — из целого растения; B. *Dactylis glomerata* L — из целого растения; C. *Phleum pratense* L — из листьев; D. *Lotus corniculatus* L — из листьев; E. *Lotus corniculatus* L — из цветов. 1. Хлорофилл. 2. Фитоксантин (ксантофилл); 3. Хлорофиллан (продукт разрушения хлорофилла); 4. Криптоксантин; 5. Каротинэпоксид; 6. Нео- β -каротин-U; 7. β -каротин; 8. α -каротин.

Рис. 2. Калибрационная кривая β -каротина по Cholnoky.

Рис. 3. Хроматограммы ацетонной экстракции 5-ти граммового образца из листьев *Lotus corniculatus*, адсорбированного на столбе Al_2O_3 .

Рис. 4. Изменение относительного содержания (в пересчете на сырое вещество) β -каротина, в зависимости от погодных условий в фазе цветения у 4-х видов растений. (Определение проводилось в надземной части растений.) (1) *Lotus corniculatus* L (2). *Golium pecten* L (3) *Phleum pratense* L (4) *Agrostis alba* L.

Рис. 5. Изменение влажности растений в зависимости от погодных условий в фазе цветения у 4-х видов растений. (Определение проводилось в надземной части растений.) От 14.V. — 8.VI. — солнечная сухая погода. 10.VI. — 12.VI. — холодная дождливая погода. 14.VI. — 16.VI. — постепенное нагревание.

Рис. 6. Изменение абсолютного содержания (в пересчете на сухое вещество) β -каротина, в зависимости от погодных условий в фазе цветения у 4-х видов растений. (Определение проводилось в надземной части растений.)

Табл. 1. Содержание β -каротина в средних образцах надземной части различных злаковых и бобовых травах в фазе цветения. (1) Латинское название. (А) Злаковые, (В) бобовые. (2) Венгерское название. (3) % сухого вещества. (4) содержание каротина (релятивное), показаны параллельные измерения и средние величины в мг/кг и абсолютное содержание каротина (среднее в мг/кг). (5) время взятия образцов.

Табл. 2. Распределение эпифазических каротиноидов в отдельных частях 2-х злаковых и 1-го бобового растения. (1) Название. (2) Части растений (листья, стебли, соцветие, корень). (3) каротиноиды в мг/кг сырого вещества (релятивное содержание). α -каротин, β -каротин, нео- β -каротин-У, каротинэпоксид, криптоксантин.

Табл. 3. Отклонения в содержании β -каротина в листьях 3-х видов злаковых на различных местобитаниях и у различных растений. (1) — (5) обозначения смотри в таблице 1. (6) место взятия образцов.

Табл. 4. Содержание β -каротина в различных видах злаковых трав. Обозначение смотри в таблице 1.

Табл. 5. Распределение пигментов эпифазических каротиноидов, определенных в средних образцах надземной части некоторых злаковых трав, выраженное в мг/кг в пересчете на сырое (релятивное содержание) и сухое (абсолютное содержание) вещество. (1) Название растений. (2) Релятивное содержание каротиноидов. (3) % сухого вещества. (4) Абсолютное содержание каротиноидов, α -, β -, нео- β -каротин-У, каротинэпоксид, криптоксантин.

The Carotene Content of the Most Widespread Grasses and Legumes

I. IHÁSZ

Academy for Agriculture, Keszthely (Hungary)

Summary

The carotene content of the grasses and legumes most frequently occurring in the Danubian basin was the object of the reported investigations. Different methods for the chemical determination of plant pigments are compared, and different extraction procedures were studied. Extraction with cold acetone was finally chosen which was found to yield reliable results. Column chromatography is shown to be more adequate for separation of plant pigments than paper chromatography.

Samples consisted of 25 plants which were cut into pieces and mixed. Five grams in two parallels were ground in a mortar and extracted repeatedly with cold acetone. The 80 to 120 ml united acetic solution was filtered and the clear solution extracted, after the addition of water, with petrolether. The petrolether phase was freed from acetone by shaking out with 65% methanol + water, and desiccated with Na_2SO_4 sicc. Chromatography followed in minute columns of Al_2O_3 Brockmann II. The chromatograms were run with petrolether, and fractional elution was achieved by increasing gradually the polarity of petrolether (by the addition of increasing though low amounts of acetone to the petrolether). The pigment content of the separated fractions was determined with the Pulfrich „Stufen” photometer. Some of the chromatograms are shown in Fig. 1. The calibration curve for β -carotene is presented in Fig. 2. Figure 3. gives the elution chromatogram of a 5 g leaf sample of *Lotus corniculatus*.

The β -carotene content of the species studied is given in Table 1. It is shown that carotene contents characteristic of the grass species studied are impossible to be obtained by the analysis of whole-plant samples. Carotene determinations were therefore made in samples of different plant parts separated in further studies.

Results are given in Table. 2. It is seen, that in flowering grasses the carotene content of the leaves is ten times greater than that of the stems. The carotene content of a given green sample is largely determined by the leaves to stem ratio.

The data of Table 3. show, that the „absolute” carotene content (calculated on an average dry weight basis) of the leaves is characteristic of a given species, if grown under identical conditions, and measured in the same season. Table 4. presents the β -carotene contents found in leaf samples of some grass species.

The effects of meteorological conditions on the carotene content of grasses and leguminous plants was investigated in a following series of experiments. The carotene and dry weight content of three species of grasses and that of leguminous plant was measured for two weeks at intervals of 1 to 2 days. Results are summarized in Figs. 4. to 6. The figures show that carotene contents did not change parallel with water contents.

Other carotenoids were also measured in plant samples. The data are summarized in Table 5. It is seen that detectable amounts of α -carotene were found only in yellow flowered legumes. Neo- β -carotene-U content of the studied species ranged between 5 and 20 per cent of the corresponding β -carotene contents. Traces of carotene epoxides, identified by the development of blue colour in the etheric solutions after the addition of conc. HCl, were found in several species. Low amounts of cryptoxanthin were found in every species studied, but higher amounts were characteristic of the yellow flowered legumes.

Fig. 1. Some column chromatograms of plant pigments, adsorbed from concentrated petrolether solutions on Al_2O_3 „Brockmann II”. A: *Phleum pratense* L. — whole plant. B: *Dactylis glomerata* L. — whole plant. C: *Phleum pratense* L. — whole plant, D: *Lotus corniculatus* L. — leaves; E *Lotus corniculatus* L. — flowers. 1. Chlorophylls; 2. Phytoxanthines (xanthophylls); 3. Chlorophyllane (degradation product of chlorophyll); 4. Cryptoxanthine; 5. Carotene epoxide; 6. Neo- β -carotene U; 7. β -carotene; 8. β -carotene

Fig. 2. The calibration curve of β -carotene after Cholnoky

Fig. 3. The elution chromatogram of the acetone extract of a 5 g leaf sample of *Lotus corniculatus*, adsorbed from petrolether on Al_2O_3 column

Fig. 4. The effect of the weather conditions on the „relative” α -carotene content (fresh weight basis) of four species of plants. (Above-ground plant samples taken in the flowering stage.) 1. *Lotus corniculatus* L., 2. *Lolium perenne* L., 3. *Phleum pratense* L., 4. *Agrostis alba* L.

Fig. 5. The effect of weather conditions on the water content of four species of plants (the same as in Fig. 5.). (Above-ground plant samples taken in the flowering stage:) June 4. to 8: dry, sunny weather, nearly stable day temperatures; June 10. to 12: cold, rainy weather; June 14. to 16: weather gradually warming up

Fig. 6. The effect of the weather conditions on the „absolute” β -carotene content (dry weight basis) of four species of plants (Above-ground plant samples taken at the flowering stage.) 1. to 4.: see Fig. 5

Table 1. The β -carotene content at the flowering stage of different grasses and legumes (in samples of whole plants). (1) Species: A) grasses, B) legumes. (2) Common names of the species in Hungarian (3) Per cent dry matter content. (4) β -Carotene content, mg per kg („relative” and „absolute” values). (5) Samples collected

Table 2. The distribution of carotenoids in the different parts of four species of plants. (1) Species. (2) Plant part (leaf, stem, flower, root). (3) Carotenoids (α - and β -carotene, neo- β -carotene-U, carotene epoxide, plus cryptoxanthine) content, mg per kg fresh weight

Table 3. The β -carotene content of grass leaf samples; differences between individual plants, and differences due to locality. For (1) to (5) see Table 1. (6) Locality

Table 4. The β -carotene content in leaves of different grass species. For (1) to (5), see Table 1

Table 5. The carotenoid content in whole-plant samples of some grass species (mg per kg fresh, and dry weight, respectively.) (1) Species. (2) „Relative” carotenoid content. (3) Per cent dry weight content (4) „Absolute” carotenoid content