

Néhány zöld pillangós β -karotin és össztokoferol tartalmának vizsgálata

IHÁSZ IMRE

Agártudományi Főiskola, Keszthely

Bár a külföldi agrokémiai szakirodalom több takarmánynövény β -karotin és össztokoferol tartalmának párhuzamos vizsgálatával foglalkozik, hazai takarmányainkra vonatkozóan e téren csupán csekély adat áll rendelkezésünkre.

Az utolsó tíz év idevonatkozó irodalmában elsősorban is RAMANUJAN és ANANTAKRISHNAN [13] adatai figyelemreméltóak.

Vizsgálataik szerint lucerna esetében az abszolút karotin és tokoferol tartalom 253–281 mg/kg, illetve 406–453 mg/kg között ingadozik. Pázsitfűveknél mind az össztokoferol, mind a karotin tartalom alacsonyabb a lucernáénál.

LAUTNER [9] ugyancsak egyidejűleg vizsgálta a lucerna karotin és tokoferol tartalmát és fiatalabb növényeknél 79,98% nedvességtartalom mellett 300 mg/kg abszolút karotin és 224 mg/kg abszolút össztokoferol tartalmat, később 71,74% víztartalmú növényekben 161 mg/kg karotint és 391 mg/kg tokoferolt talált szárazanyagra vonatkoztatva.

LAUTNER [10] másik közleményében három zöldsztakarmánynaként termesztett gabonanövény β -karotin és E-vitamin tartalmára közöl adatokat. Búzánál a karotin tartalmat 159–163 mg/kg-nak, árpánál 83–117 mg/kg-nak, a zabnál 100–138 mg/kg-nak, az össztokoferol tartalmat pedig zabnál 232–473 mg/kg-nak, árpánál 177–297 mg/kg-nak találja száraz anyagra vonatkoztatva.

BASZYNSKI [1] karotin esetében 39–99 mg/kg, tokoferol esetében pedig 33–129 mg/kg tartalmat talált szárazanyagra vonatkoztatva, réti növényeknél.

GREEN [5] össztokoferolra búzánál zöld kalászos állapotban 87,3 mg/kg, árpa esetében 67,4 mg/kg-ot, kukoricánál fiatal növény esetében 83,5, csónélküli kifejlett stádiumban viszont 304,8 mg/kg-ot, borsónál pedig virágzás alatt 139 mg/kg-ot talált szárazanyagra vonatkozóan.

HJARDE [6] vöröshere esetében vizsgálta a karotin és tokoferol tartalmát, s azt

több vizsgálat eredményében 100 mg/kg átlag értéknel magasabbnak találta.

PALMARU [12] táblázatba foglalva ismertet néhány takarmánynövény esetében E-vitamin értékeket.

Mivel az állati szervezet egészséges fejlődése szempontjából mind a karotin, mind a tokoferol elsőrendű jelentőségű biofaktor, így érdekesnek látszott a két bioaktív anyag egyidejű és egymás melletti meghatározása. Ugyanakkor adatokat kívántam szerezni arra vonatkozólag is, hogy van-e valamilyen összefüggés a vizsgált növények esetében a β -karotin és össztokoferol tartalom között.

A kísérletek leírása

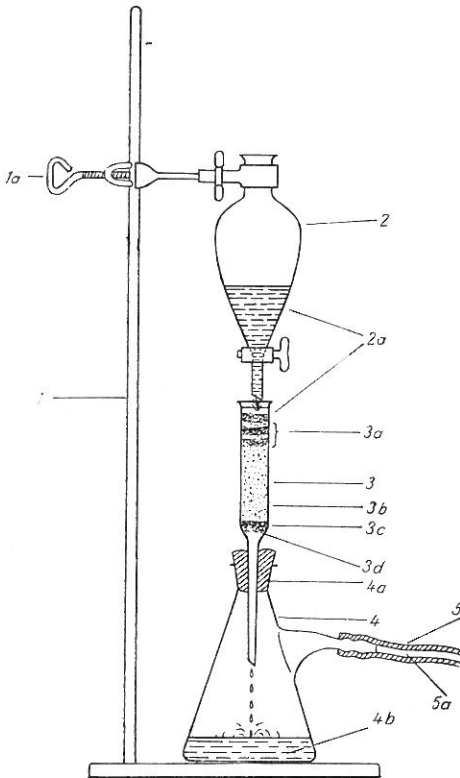
Növényfajonként három párhuzamosban, a begyűjtött mintegy 100 g mennyiségű apróra vágott és jól homogenizált mintákból 10–10 g-ot mértem be egy pontossággal. Szárazanyag meghatározáshoz két-két párhuzamosban 20–20 g-ot mértem, ugyancsak táramérlegben. A nedvességtartalomra bémért anyag szárazanyag tartalmát a szokásos módon határoztam meg.

A minták pigment és tokoferol tartalmát az IHÁSZ [7] által módosított WORKER [15] féle hideg acetonos kidrzsöléssel extraháltam. A petroléteres fázisba vitt kivonatot 100 ml-es mérőlombikba töltöttem, majd tiszta petroléterrel jellegű kiegészítettem. Ebből 50 ml-t a kromatográfáló berendezés adagoló tölcserébe öntöttem, majd lassú áramban az oszlopra folytattam úgy, hogy az adszorbens fölött mindig legyen egy csekély folyadék réteg (1. ábra).

A kromatografálást analitikai minőségű precipitált kalciumkarbonát oszlopon végeztem. A pigmentkivonatot az oszlopon átszívva, az átfolyó sárga színű oldatot összegyűjtöttem, néhány ml tiszta petroléterrel az oszlopról teljesen lemostam, s az egyesített oldatot 100 ml-es mérőlombik-

ban petroléterrel jelig töltöttem. Ezután „Spektromom” fotométerrel abszorpciós görbe felvétellel karotinja (2. ábra) azonosítottam és végül Pulfrich-féle szakaszos fotométeren S 47-es színszűrő mellett töménységét meghatároztam.

A mérőlombikban maradt 50 ml térfogatú pigmentkivonatot 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba öntöttem át, 15 ml 5% KOH tartalmú metanolt adtam hozzá, vízfürdőre helyeztem és mintegy 15 percig forralva szappanosítottam, majd egy órát pihenttettem. Ez után az elegyet kevés petroléterrel választótölcsérbe öblítettem



1. ábra

Egyszerű kromatografáló berendezés. 1. laboratóriumi vasállvány. a) lombikfogó. 2. adagoló tölsér csappal. a) petroléteres pigment kivonat. 3. Ahlin-eső. a) pigment sávok az adszorbensen. b) adszorbens oszloptöltet. c) gyapot. d) porozus üveglap, vagy Vit-lemez. 4. Szívó palack. a) gumí- vagy becsiszolt üvegdugó. b) kromatografált oldat. 5. csatlakozás a légszivattyúhoz

s mintegy 10 ml vizet adva hozzá, két fázisra különítettem. Az elkülönített sárga színű petroléteres oldatot lúgmentesre mostam, vízmentes nátriumszulfáttal szárítottam, s végül csökkentett nyomáson vízfürdőről 10–15 ml-re besűrítettem. A bepárolt extraktot precipitált szénsavas mész oszlopra vittem, s tiszta petroléterrel fejlesztve kromatografáltam. E közben a fitoxantinnok az oszlopon adszorbeálódtak és lassanként szétkülönültek. A lecsepegő karotintokoferol elegyet felfogtam. A karotin eluálása után a lecsepegő szintelen oldatból 10 ml-t külön edénybe gyűjtöttem. (Minőségi vizsgálat alapján ui. a karotin után még némi tokoferol is eluál.)

A tokoferolos karotin oldatot csökkentett nyomáson 2–3 ml térfogatra pároltam, s újonnan készített CaCO_3 oszlopra víve petroléterrel fejlesztve eluáltam. A lecsepegő karotin oldat első részleteit elkülönítettem, mivel ez gyakorlatilag tokoferolmentesnek bizonyult. A többi karotintartalmú oldatrészletet mely az összes tokoferolnak kb. a felét tartalmazta, ugyancsak elkülönítettem. Az utóljára csepegő szintelen oldatból kb. 20 ml-t felfogtam s az első tokoferol tartalmú oldat részlettel, mely karotint már nem tartalmazott, egyesítettem. A maradék tokoferolos karotinoldatot újból bepároltam és a kromatografálást megismétltem. A frakcionálási műveletet mintegy négyszer ismétltem.

Az összegyűjtött tokoferololdatokat csökkentett nyomás mellett vízfürdőről 3–3,5 ml-re bepároltam és keskeny, 0,1 ml beosztású kémcsőbe víve térfogatát petroléterrel pontosan 5,0 ml-re kiegészítettem.

Az 5 ml térfogatú tokoferol oldatokból egy-egy vizsgálathoz 1,0 ml-t vettem 1,0 ml-es kétjelű pipettával és nagyon gondosan tisztított kémcsőbe helyeztem.

Hozzáadtam 3,0 ml p. a. tisztaságú aldehidmentes metanolt, majd 3 csepp 1%-os FeCl_3 izopropanolos oldatát és összerázás után kis idő elteltével 3 csepp 1%-os -dipiridil izopropanolos oldatát, valamint 1 csepp 10%-os NH_4OH -ból és tömény NH_4Cl 1:1 tf. arányú elegyből álló puffert. A rögtön jelentkező és a tokoferol koncentrációtól függően rózsaszíntől vörösig terjedő színárnyalatú oldat extinkcióját 10 perces pihentetés után Pulfrich-fotométeren S 53-as színszűrő mellett vakpróba ellenében mértem és egy előzőleg felvett kalibrációs görbe alapján értékeltem.

A kalibrációs görbe felvételéhez 0,4–0,5 g gyógyszerkönyvi minőségű tokoferolacetátot mértem be. Ezt 25 ml 0,25 n alkoholos KOH-ban oldottam, majd az elegyet vízfürdőre helyeztem, és 15 percig forralva szappanosítottam. A szappanosított oldatot lúgmentesre mostam, petroléterrel 100

ml-re töltöttem, s tokoferol tartalmát a gyógyszerkönyv szerint meghatároztam.

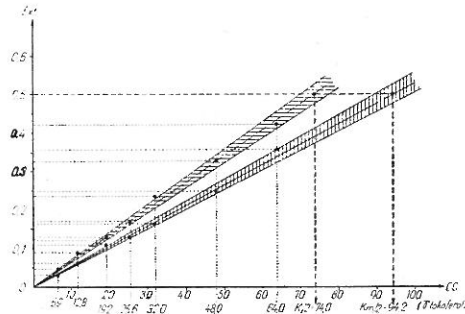
A törzsoldat minden ml-e 3,25 mg tokoferolt tartalmazott. E törzsoldatból tízszeres hígítással olyan oldatot készítettem, mely ml-enként 325 gamma; százszoros hígítással pedig olyan oldatot, melynek minden ml-e 32 gamma tokoferolt tartalmazott.

A fentebbi oldatokból a következő sorozatot készítettem: a százszoros hígítású oldatból 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 és 1,0 ml-t, a tízszeres hígításúból 0,15 és 0,2 ml-t mértem kémcsövekbe. Ezután az egyes bemérések összterfogatát petroléterrel 1 ml-re kiegészítettem, majd 3 ml metanol, 3 csepp reagens vaskloridot, 3 csepp reagens dipiridilt, valamint 1 csepp bázisos ammóniumklorid puffert adtam és 1 ml tiszta petroléterrel készített vakpróba ellenében Pulfrich-fotométeren S 53-as színszűrő mellett fotometráltam. Az egyes bemérésekre nyert értékeket a tokoferol koncentráció függvényében ábrázolva olyan kalibrációs görbéhez jutottam, melynek alapján a tényleges tokoferol tartalmat becsülhettem. E kalibrációs görbe azonban nem volt alkalmas a frakcionált kromatográfiával elkülönített tokoferol mérésére a növényi minták esetében, a művelet alatt előálló tokoferol veszteség miatt. A növényi anyagokból elkülönített tokoferol mennyiségét csakis olyan munkagörbe alapján lehetett értékelni, melynek minden egyes adatát ismert tokoferol tartalmú karotin oldat négyszer ismételt kromatografálásával nyertem.

A kalibrációs munkagörbe felvételéhez szintetikus — karotinból olyan alapoldatot készítettem, melynek karotin tartalma Pulfrich-fotométeren S 47-es szűrő mellett

1,00 extinkciós értéket mutatott. Ez az érték magasabb pigmentkoncentrációjú zöld növényi anyagok karotin tartalmának megfelelő. Ez után két párhuzamosban a következő oldatsorozatot készítettem:

100 ml-es lombikokba sorban egymás után bemértem a 32 γ /ml tokoferol tartalmú oldatból 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ml-t, a 325 γ /ml tartalmúból pedig 0,15 és 0,2 ml-t majd minden egyes beméréshez 50—50 ml tokoferolmentes karotinoldatot adtam. Az így nyert modelleket alaposan összeráztam, s az említett karotin-tokoferolegység frakcionált kromatografálásával azonosan feldolgoztam. A növényi anyagokból elkülönített tokoferolegységek kiértékelését az ily módon felvett munkagörbe alapján végeztem (3. ábra).



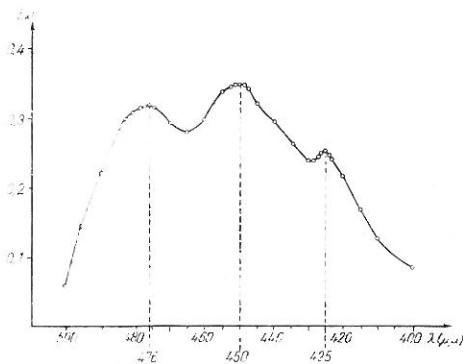
3. ábra

Össztokoferol mérőgörbék. a) tiszta tokoferol standard mérőgörbe. b) mérő munkagörbe — Felvéve tiszta tokoferol és karotin készítmény mesterséges oldatelegységének frakcionált kromatografálása után. A két görbe extinkciós érték különbsége a tokoferol kromatografiai veszteségével azonos.

A kísérleti pontosság megvitatása

A karotin tartalmat mind az elszappanosítatlan, mind pedig az elszappanosított mintákból meghatároztam.

Az eredmények összehasonlításakor kitént, hogy rendszeresen 4—6%-kal alacsonyabb karotin tartalom mutatkozott az elszappanosítással kezelt minták esetében. Tiszta karotinoldat hasonló feltételek mellett elszappanosításakor azonban mindössze 1% körüli veszteség mutatkozott maximálisan. Feltételezhető ezért, hogy a karotinveszteség a klorofill elszappanosításával áll valamilyen összefüggésben. Az is feltehető, hogy a frakcionált kromatografálás során az oszlopon maradó, vagy



2. ábra

Lotus corniculatusból preparált β -karotin spektruma a látható fény-tartományban

a tokoferoldoldathoz szennyezésként került karotin okozza e veszteséget. Megfigyelésem szerint kétségtelen, hogy Al_2O_3 adszorbens alkalmazásakor, még originál „Broeckmann II” esetében is, négyszeri kromatografálás után már tetemes, 12–15%, sőt vastartalmú töltet esetében 30–40% veszteség is elő áll. Az elszappanosítási veszteségnél tehát sokkal nagyobb veszteséget okozhat a nem megfelelő adszorbens alkalmazása. Inaktív precipitált $CaCO_3$ oszlopon viszont négyszer ismételt kromatografálás után sem mutatkozott 2–3%-nál nagyobb karotin veszteség. A 3–4%-os elszappanosítási veszteség azonban az adszorpciós veszteségtől függetlenül is fenn áll. Leszögezhető tehát, hogy pontosabb eredmények elérése érdekében célszerűbb a karotin tartalmat közvetlenül az elszappanosítatlan, azaz klorofill tartalmú, petroléteres kivonatból elkülöníteni.

A kalciumkarbonát oszlopot karotinoidek elkülönítésére már CVET [3] ajánlotta. Ő széndiszulfidot alkalmazott eluálószerként, amivel a karotint még a kisebb diszperzitású öröklt kréta oszlopon is sikeresen tudta a fitoxantinoktól izolálni. Petroléter alkalmazásakor azonban lényeges $CaCO_3$ töltet esetében a nagy diszperzitásfok, mert csak így biztosítható a karotinnak az egyéb pigmentektől való szelektív elhatárolása. Megemlítendő, hogy sok tekintetben a precipitált szén-savammészhez hasonló szelektivitással dolgozik a WALGER és THURÁNSZKINÉ [14] által ajánlott csontliszt oszloptöltet is, mely katalitikusan szintén inaktív. Mindenesetre megállapítható, hogy az aktív adszorbensek pontosabb és különösen frakcionált, azaz ismételt kromatografálásra kritika nélkül nem alkalmazhatók.

Ellentétben előző közleményem [7] erre vonatkozó adataival, precipitált mészkarbonát oszlopon nem sikerült sem β -karotin-U izomért, sem karotinoxidot elkülöníteni. Feltételezhető lenne tehát, hogy az alumíniumoxid szelektívebben különíti el a karotinoideket. Az Al_2O_3 tölteten azonban ugyanezen oldat ismételt kromatografálása esetén minden ismételt művelet után csökkent a karotin mennyisége. Így tehát joggal merülhet fel az a gyanú is, hogy a neo- β -karotin-U izomér nincs is jelen a növényekben, hanem csak az aktív adszorbens katalitikus hatásának „artefact”-ja. Vastartalmú alumíniumoxid adszorbens esetében pedig még a karotinoxidok mennyisége is kétséges lehet. Az Al_2O_3 töltetnél mutatózó káros katalitikus hatást igazolja az a tapasztalatom is, hogy ha az adszorbens aktivitását sósavas öblítéssel erősen fel-fokozzuk, akkor a karotin egész mennyiségét átfordíthatjuk annak cisz módosula-

taiba. Ha pedig sósavval erősebben aktívált tölteten az oldat felöntése után levegőt is szívattunk át, a karotin nagy része epoxiddá oxidálódik, amit narancsszínű sávjának kékké való átesapása indikál.

Vizsgálati módszeremet értékelve tárgyilagosan meg kell állapítanom, hogy rutin azaz sorozat meghatározáshoz kevésbé alkalmas, mint a WALGER és THURÁNSZKINÉ [14] által ajánlott eljárás. Ugyanakkor viszont a 2–3%-kal magasabb karotin tartalmat és pontosabb eredményt éppen a nehezkesebb hideg acetonos extrakció biztosítja.

Vitatta a pigment tartalmú növényi anyagok tokoferol tartalmának meghatározására alkalmas módszereket, megállapítható, hogy ezideig még egyetlen olyan meghatározás sem ismeretes, mely rutin jellegű vizsgálatok végzésére alkalmas lehetne. Nemcsak EMERIE és ENGEL [4] ferrokolorimetriás módszere alkalmazatlan ilyen célra, de ugyanez mondható el a BENCE [2] által kidolgozott és az utóbbi időben PALMARU [21] által ajánlott salétromsavas módszerrel is. A takarmányok tokoferol tartalmára vonatkozó adatokat nem lehet többnyire minden fenntartás nélkül fogadni. Különösen vitatható az adatok megbízhatósága akkor, ha a gyorsabb adatszérés érdekében mellőzik a kromatográfias elkülönítést. Ilyenkor többnyire tetszetős, magas tokoferol értékek mutatkoznak. A többletet okozhatják a növényi anyagokban levő zavaró vegyületek is, de főként ferrokolorimetriás meghatározás alkalmazásával az elszappanosításkor sok esetben alkalmazott oxidációgátló pirogallol. Ha ugyanis a pirogallol eltávolítása nem volt tökéletes, mint erélyes redukálószer maga is redukálja a Fe^{3+} ionokat és „többlet fogyást” idéz elő. A tokoferol tartalomra vonatkozó megbízhatóbb adat csakis kromatográfias elkülönítés mellett nyerhető. A növények össztokoferol tartalma azonban több hasonló szerkezetű (ún. tokol) vegyület összességéből adódik. A vegyületek nem színesek, így oszlopkromatográfias elkülönítésük nehezkes és nagy gyakorlatot kíván. Ezen kívül nagyon óvatosan kell eljárni a megfelelő oszloptöltet megválasztásában. Éppen ezért többben az aminósavak elkülönítésére jól bevált papírkromatográfia ajánlják. E téren megemlíthető GREEN [5] továbbá MASON és JONES [11] közleménye. Ez utóbbiak ausztráliai mezőgazdasági és malomipari termékek tokoferoljainak megoszlását vizsgálták. Saját tapasztalataim alapján azonban a tokoferolok papírkromatográfias meghatározása közel sem olyan megbízható, mint például az aminósavaké és mindamellett nagyon nehezkes is.

Oszlopkromatográfias elkülönítés alkal-

1. táblázat

A vizsgált zöld pillangósok karotin és tokoferol tartalma nedves (relatív) és száraz (abszolút) anyagra vonatkoztatva

(1) Zöld pillangósok neve	(2) Karotin (relatív)		(3) Tokoferol (relatív)		(4) Száranyag %	(5) Karotin (abszolút) mg/kg	(6) Tokoferol (abszolút) mg/kg
	ex- tinkció	mg/kg	ex- tinkció	mg/kg			
<i>Dornicum herbaceum</i>	0,53	48,7	0,22	41,4	15,8	308	262
<i>Lutus corniculatus</i>	0,58	53,3	0,20	37,4	19,3	277	194
<i>Lutus uliginosus</i>	0,68	62,5	0,19	35,6	15,0	414	237
<i>Medicago falcata</i>	0,76	70,0	0,20	37,4	22,1	317	169
<i>Medicago sativa</i>	0,49	45,0	0,12	22,6	19,8	228	114,2
<i>Trifolium incarnatum</i>	0,79	72,6	0,14	26,4	19,2	379	137,4
<i>Trifolium medium</i>	0,46	42,4	0,14	26,4	20,4	208	129
<i>Trifolium ochroleucum</i>	0,50	46,0	0,12	22,6	19,2	240	118
<i>Trifolium pannonicum</i>	0,64	58,8	0,19	35,6	19,7	299	180,4
<i>Trifolium pratense</i>	0,64	59,0	0,15	28,4	20,4	289	138,8
<i>Trifolium repens</i>	0,58	53,3	0,11	20,7	18,4	290	131
<i>Vicia silvatica</i>	0,36	33,1	0,29	54,6	14,3	232	382

mával a gyakran alkalmazott aktív adszorbensek tetemes tokoferolvesztéséget idézhetnek elő, katalitikus hatás és kemoszorpció révén. Az inaktív adszorbensek viszont nem különítik szét a tokoferolokat a karotinoktól. A tokoferolok láthatatlan kromatogramm sávjai viszonylag széles réteget foglalnak el az oszlopon és csaknem egybeesnek a β -karotin sávjával. Így kisebb szelektivitású adszorbenssel csak többször ismételt — ún. fracionált — kromatografálással lehet a tokoferolokat a karotintól elkülöníteni, azon az alapon, hogy a tokoferolok kissé erősebben adszorbeálódnak és így nehezebben eluálthatók. A fracionált szétkülönítés azonban nehézkes, nagy türelmet és gyakorlatot kíván és így sorozatvizsgálatok végzésére nem alkalmas. Ezenkívül csakis megközelítő pontosságú szétválasztás érhető el, még 5–6-szor ismételt kromatografálással is. Ennek ellenére a rendelkezésemre álló adszorbensekre való tekintettel megbízhatóbbnak láttam a kisebb szelektivitású de inaktív precipitált kalcium karbonát töltet alkalmazását. — Négyeszeri ismétléssel a karotin és tokoferol kb. 85%-ban szétkülöníthető és így amennyiben a kiértékelést munkagörbe alapján végezzük, két párhuzamos mérés között $\pm 5\%$ -nál nagyobb szórás alig mutatkozik. Ennek megfelelően a módszerrel a tokoferol tartalom a gyakorlati célnak megfelelő pontossággal mérhető.

A karotin tartalmat benzolból kétszer átkristályosított p. a. minőségű kereskedelmi β -karotinnal felvett kalibrációs görbe alapján értékeltem. A görbe meghatározott extinkciós-koefficiens értéke 0,461-nek adó-

dott 100 ml oldattérfogat, S 47-es színszűrő, valamint 10 mm-es küvetta esetében, Pulfrich-féle szakaszos fotométeren. A karotin tartalomra vonatkozó adatokat a kísérletileg mért extinkciós értékből a koefficienssel valamint ezerrel való szorzással nyertem közvetlenül mg/kg értékben 1 g bemért takarmányra.

A tokoferol tartalmat az egyes növényfajokra két párhuzamos középértékeként, S 53-as szűrő mellett 10 mm-es küvettaiban az előzőekben leírt módon végzett kezelés és színreakció után ugyancsak Pulfrich-fotométeren mértem és a mellékelt munkagörbe (3. ábra) alapján értékeltem.

Az eredmények értékelése

A Keszthely város különböző területein, valamint az Agrártudományi Főiskola füves telepi tenyészkertjéből gyűjtött mintegy tizenkét pillangós növényfaj β -karotin valamint össztokoferol tartalmát mértem. A különböző helyekről gyűjtött azonos fajtájú növények egyesített mintáira nyert eredményeket az 1. táblázat szemlélteti. Amint az adatokból kitűnik, a vizsgált minták esetében a legnagyobb karotin tartalom nedves anyagra vonatkoztatva a *Trifolium incarnatum*-nál mutatkozott 72,6 mg/kg relatív értékben. Ha azonban a víztartalmakat is figyelembe vesszük, akkor a szárazanyagra vonatkoztatott karotin tartalom a kisebb relatív karotin tartalmú de nagyobb nedvességtartalmú *Lotus uliginosus* esetében volt a legmagasabb.

A karotin és össztokoferol tartalom kö-

2. táblázat

Néhány zöld pillangós karotin és össztokoferol tartalmának megoszlása a levélben és a szárban nedves anyagra vonatkoztatva

(1) Zöld pillangós neve	(2) Karotin mg/kg			(3) Levél— szár arány	(4) Össztokoferol mg/kg		
	levél	szár	átlag növény		levél	szár	átlag növény
	Lotus corniculatus	113	21	53,3	34 : 66	71	20
Medicago sativa	92	15	45,0	38 : 62	37	14	22,6
Trifolium incarnatum	110	36	72,6	49 : 51	38	18	26,4
Trifolium medium	65	23	42,4	45 : 55	35	19,5	26,4
Trifolium pratense	78	30	59,0	60 : 40	36,5	21	28,4
Trifolium repens	59	42	53,3	65 : 35	20	21,5	20,7

zött semmi összefüggés nem figyelhető meg. Viszont érdekesnek látszik az, hogy a nagyobb nedvességtartalmú növények esetében a relatív össztokoferol tartalom is általában magas, minek következtében az abszolút össztokoferol szint kiugró értékeket mutat. — E megfigyeléssel kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy az utóbbi időben a nedvesség és tokoferol tartalom között száraz szőjababban Komoda és munkatársai [8] fordított összefüggést találtak. Megfigyelésük azonban, mivel száraz terméstről van szó, nem ellentétes a zöld növényeknél tapasztaltakkal. — Az általam vizsgált esetben *Dornicum herbaceum* relatív össztokoferol szintje 15,8%, szárazanyag tartalom mellett 41,4; a *Lotus uliginosus* 15% szárazanyaggal 35,6; a *Vicia silvatica* tokoferoltartalma pedig 14,3% szárazanyag tartalomnál 54,6 mg/kg relatívnak adódott. Ennek megfelelően mivel egy adott biovegyület tartalom mellett nagyobb nedvességtartalom esetében az abszolút szint is magasabb, az említett növényfajoknál az összes vizsgált minta átlagához viszonyítva az abszolút tokoferol tartalom is kiugró, azaz a 183 mg/kg abszolút átlaghoz viszonyítva a *Dornicum herbaceum* esetében 262 mg/kg abszolút; *Lotus uliginosus*-nál 237 mg/kg abszolút; a *Vicia silvatica*-nál pedig kiemelkedő értékkel 382 mg/kg abszolút.

A karotin tartalomra ilyen összefüggés nem állítható fel. A vizsgálatok eredménye szerint az alacsonyabb szárazanyag tartalmú *Dornicum herbaceum* valamint *Vicia silvatica* esetében a relatív karotin szint is alacsonyabb az átlagosnál, azaz az 53,6 mg/kg relatívnál szemben csak 48,7, illetve 33,1. Ennek megfelelően az abszolút karotin tartalmuk sem mutathat kiugró értéket, s így a *Vicia silvatica*-nál az átlag 290 mg/kg abszolút értékkel szemben csak 232 mg/kg abszolút karotin szint adódott. Viszont a *Lotus uliginosus* esetében mivel magas nedvességtartalom mellett a relatív

karotin szint is átlag feletti, így az abszolút karotin tartalom az átlagosnak csaknem másfélszerese azaz 414 mg/kg abszolút.

Hat pillangós faj karotin és össztokoferol tartalmát külön-külön a levélben és szárban is meghatároztam. Az adatokat a 2. táblázat mutatja. Amint megfigyelhető a vizsgált fajok mindegyikében magasabb a levelek relatív karotinszintje a szárazanyag arányánál. A keményebb, illetve fásabb szárú növények esetében pl a *Lotus corniculatus*-nál és a *Medicago sativa*-nál a vizsgált növényfajok átlagához viszonyítva magasabb a levelek és alacsonyabb a szárazanyag relatív karotinszintje. Azonban a lágyszárú növényeknél már nem annyira nagy a különbség a levél és szár karotinszintje között úgy, hogy pl. a lágyszárú *Trifolium repens* esetében a szár karotinszintje megközelíti a levélét.

Az össztokoferol tartalmat illetően a levél és a szár relatív szintje között már nem olyan határozott a különbség, mint a karotinnál. A lágyszárú növényeknél különbség már alig észlelhető, sőt a *Trifolium repens* esetében már valamivel magasabb is a szár relatív tokoferolszintje a levélénél.

Összefoglalás

A karotin tartalommal párhuzamosan az össztokoferol tartalom is meghatározható hideg acetonos extrakció útján nyert és elszappanosított petroléteres oldat precipitált CaCO₃ oszlopon történő frakcionált kromatografálásával.

Munkagörbe szerint történő értékelés alapján a karotin tartalmú növényi anyagok össztokoferol tartalma a gyakorlati pontosságnak megfelelően mérhető. — A karotin és tokoferol tartalom együttes meghatározása azonban az alkalmazott módszer bonyolultságánál fogva sorozat (rutin) vizsgálatok végzésére nem alkalmas.

A karotin és tokoferol tartalomra köz-

vetlen a virágzási stádium előtt vizsgált 12 pillangós növényfaj esetében a száraz-anyagra vonatkoztatott (abszolút) tokoferol tartalom és a nedvesség tartalom között egyenes összefüggés látszik fennállani. Az abszolút karotin tartalom azonban sem a nedvességtartalommal, sem a tokoferol tartalommal nincs összefüggésben.

Megállapítható, hogy lágyabb szárú növények szárának mind karotin, mind tokoferol tartalma nagyobb a kemény-szárúakénál. A száraz tokoferol tartalma nem mutat olyan nagy eltérést a levelekétől, mint a karotin tartalom.

Irodalom

- [1] BASZYŃSKI, T.: Traces elements and vitamins in meadow grass associations of the Pioning National Park. Acta Agrobotan. (Warsava). **7**. 131–142. 1958.
- [2] BENCE, B.: Az E-vitamin (tokoferol) meghatározása természetes E-vitamint tartalmazó anyagokban Magyar Kémiai Folyóirat. **60**. 257–264. 1954.
- [3] CVET, (TSWETT), M.: Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. Ber. Deutch. Botan. Gesell. **24**. 316–324. 1906.
- [4] EMMERIE, A. & ENGEL, C.: Colorimetric Determination of dl- α -Tocopherol (Vitamin E). Nature, **142**. 873. 1938.
- [5] GREEN, J.: Distribution of tocopherols during the life cycle of some plants. J. Sci. Food Agr. **9**. 801–812. 1958.
- [6] HJARDE, W.: Collection and examination of clover samples for determination of the contents of tocopherol and carotene. Acta Agric. Scand. Stockholm. **12**. 325–334. 1962.
- [7] IHÁSZ, I.: Gyakrabban előforduló pázsítfűvek és herefélék karotin tartalmának meghatározása és értékelése. Agrokémia és Talajtan. **9**. 559–574. 1960.
- [8] KOMODA, M., ONUKI, N. & HARADA, I.: Studies on cause of color reversion of edible soybean oil and its preservation. Part I. Relation between the moisture of soybean and the quantity of tocopherol in them. Agr. Biol. Chem. **30**. 906–912. 1966.
- [9] LAUTNER, V.: Vyzkum obsahn β -karotenu a vitaminu E v pšenách. I. sl.: Medicago Sativa. Sbornik Ceskoslov. Akad. zemedel. ved. Zivocisná Vyroba. Praha, **3**. 707–722, 1958.
- [10] LAUTNER, V.: Vyzkum obsahn β -karotenu a vitaminu E v pšenách. II. sl.: Triticum L., Hordeum L., Avena L. Sbornik Ceskoslov. Akad. zemedel. ved. Zivocisná Vyroba. Praha, **3**. 853–870., 1958.
- [11] MASON, E. L. & JONES, W. L.: The tocopherol contents of some Australian cereals and flour milling products. J. Sci. Food. Agr. **9**. 525–527., 1958.
- [12] PALMARU, E.: Bestimmung des Gehaltes an Vitamin E in Futtermitteln sowie sonstigen biologischen Materialien. — Das Problem der Futtermittelbewertung und Futterwarheit. Sitzungsberichte 5, Berlin DAL **11**. 31–38. 1962.
- [13] RAMANUJAN, R. A., & ANANTAKRISHNAN, C. P.: Tocopherol and carotene contents of green fodder. Indian Dairy Sci. **11**. 101–108. 1958.
- [14] WALGER, J., & THURÁNSZKI, Á.-NÉ.: Egyszerű módszer zöld növények és szénák karotintartalmának meghatározására. Agrokémia és Talajtan. **11**. 443–454. 1962.
- [15] WORKER, N. A.: Chromatographic separation and estimation of certain pasture lipids. II. Tocopherol. J. Sci. Food Agric. **9**. 122–124. 1958.

Érkezett: 1967. február 2.

Investigations on the Content of beta-Carotene and Total Tocopherol in Some Green Leguminous Plants

I. IHÁSZ

College of Agricultural Sciences, Keszthely (Hungary)

Summary

A method is described for the simultaneous determination of carotene and total tocopherol contents in 12 species of leguminous plants.

The samples were rubbed with cold acetone until they lost colour, the solution was shaken out with petroleum ether. Saponification of the pigment dissolved in petroleum ether was performed by boiling the solution 15 min. long with methanol-containing 5% KOH. The yellow-coloured petroleum ether epiphase was parted from the green alkaline hypophase by using a separatory funnel. The hypophase had been washed with small amounts of petroleum ether until free from carotene, washings became united with the epiphase solution. This united solution was washed until free from alkali, dried above moisture-free Na_2SO_4 and evaporated to

a smaller volume under reduced pressure. Then it was chromatographed using columns of precipitated CaCO_3 (Fig. 1). The obtained solution of carotene which contained tocopherol was again evaporated to a smaller volume and chromatographed using a fresh column. The first and the second half of the yellow stripe descending on the column were collected separately because the last part of the dripping solution of the pigment proved to contain some tocopherol. After complete elution of the carotene about 10 ml more colourless solution was collected because the qualitative analysis proved that it contained the greater part of the tocopherol. — The separately collected, tocopherol-containing solution of carotene was chromatographed again in the same manner as before, repeat-

ing the fractionation four times in all. The collected parts of tocopherol-free carotene solution were united for every sample, the same was done with the practically colourless tocopherol solutions obtained after the single fractionating chromatographical operations.

The work thus resulted in the separation of carotene and total tocopherol by the use of only one adsorbent. The carotene could be identified on the basis of the absorption curve obtained with the MOM 202 spectrophotometer (Fig. 2); the concentration was determined with a Pulfrich-photometer using filter No. S. 47. The calculation of mg/kg was performed by multiplying the extinction value by an extinction coefficient of 0.46 determined on the basis of standard carotene preparations; the sample weight being taken into consideration. — As experience showed a loss of about 15% tocopherol (scattering about 5%) occurred on fractionation, thus the evaluation of the tocopherol content could be performed with the aid of a model curve (Fig. 3) derived from the chromatography of a standard series of pure carotene and tocopherol.

Data pertaining to the 12 species of leguminous plants investigated are shown in table 1. It can be seen that absolute values of tocopherol (calculated on a dry-matter basis) are generally higher in plants with higher moisture content. This interrelation was not found with carotene.

As to the distribution of carotene and tocopherol between leaves and stalks (Table 2.) it is evident that though the carotene and tocopherol contents of stalks are generally less than that of leaves, this difference is not large in the soft-stalked plants.

On the contrary, in *Trifolium repens* the stalks contain somewhat more tocopherol than the leaves.

Table 1. Carotene and tocopherol contents of the examined green leguminous plants referred to raw (relative) and dry (absolute) matter. (1) Name of plant. (2) Carotene (relative) extinction and mg/kg. (3) Tocopherol (relative) extinction and mg/kg. (4) Dry matter, %. (5) Carotene (absolute) mg/kg. (6) Tocopherol (absolute) mg/kg.

Table 2. The distribution of the carotene and total tocopherol contents of some green leguminous plants in the leaf and in the stalk, referred to the raw matter. (1) Name of plant. (2) Carotene mg/kg, leaf, stalk, average plant. (3) Ratio of leaf to stalk. (4) Total tocopherol mg/kg, leaf, stalk, average plant.

Figure 1. Simple apparatus for chromatography. 1. laboratory iron stand, 1.a. flask pliers. 2. batcher with tap. 2.a. pigment extract prepared with petrolether. 3. Ahlin-tube. 3.a. pigment stripes on the adsorbent. 3.b. adsorbent column. 3.c. cotton. 3.d. porous glass-plate or Vitt-plate. 4. suction flask, 4.a. rubber or glass stopper, 4.b. chromatographed solution. 5. joint to the air pump.

Figure 2. Spectrum of carotene prepared from *Lotus corniculatus* in the visible light range.

Figure 3. Absorption curves of total tocopherol. 3.a. pure tocopherol standard absorption curve, 3.b. model curve — plotted after the fractional chromatography of standard series of pure tocopherol and carotene preparations. The difference between the extinction values of the two curves is identical with the tocopherol loss incurring during chromatography.

Untersuchung des β -Karotin- und des Gesamttocopherolgehaltes bei einigen Leguminosen in grünem Zustande

I. IHÁSZ

Hochschule für Agrarwissenschaften, Keszthely (Ungarn)

Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit der Untersuchung von 12 Leguminosensorten wird eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung des β -Karotin- und Gesamttocopherolgehaltes der grünen Pflanzen beschrieben.

Die Pflanzenmuster wurden mit kaltem Aceton bis zur Entfärbung mittels Zerreibung extrahiert und anschliessend wurde der Extrakt mit Petroläther ausgeschüttelt. Die petrolätherige Pigmentlösung wurde

mit einer 5%-igen methanolischen KOH-Lösung 15 Minuten lang gekocht, verseift. Die gelbe, aus Petroläther bestehende Epiphase wurde von der grünen, alkalischen Hypophase in einem Scheidetrichter getrennt. Die Hypophase wurde sodann mit kleineren Mengen Petroläther karotinfrei gewaschen und die Petrolätherauszüge wurden mit der Epiphase vereinigt. Die vereinigte Lösung wurde alkalifrei gewa-

schen, über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet, anschliessend bei reduziertem Druck auf ein kleineres Volumen eingeeengt und auf einer präzipitierten CaCO_3 -Säule chromatographiert (Abb. 1.). Die so gewonnene, Tokopherol enthaltende Karotinlösung wurde nochmals eingeeengt und durch eine frische Säule wieder chromatographiert. Der erste und der zweite Teil der sich an der Säule abwärtsbewegenden gelben Zone wurde gesondert aufgefasst, da sich der zweite Teil der abtropfenden Pigmentlösung als tokopherolhaltig erwies. Nach der vollkommenen Elution des Karotins wurde zusätzlich noch ungefähr 10 ml farblose Lösung getrennt gesammelt, da diese auf Grund der Analysen den grösseren Anteil an Tokopherol enthielt. Die getrennt aufgefasste, tokopherolhaltige Karotinlösung wurde auf die vorige Weise nochmals chromatographiert und die Fraktionierung insgesamt viermal wiederholt. Die einzelnen tokopherolfreien Karotinlösungen wurden je Muster vereinigt, sowie die nach jeder Fraktionierung gewonnenen, praktisch farblosen Tokopherollösungen.

Auf diese Weise konnte mit Hilfe der fraktionierten chromatographie das Karotin vom Tokopherol vollständig, durch Anwendung eines einzigen Adsorbenten, getrennt werden. Das getrennte Karotin konnte mit Hilfe einer Absorptionskurve, die mit einem Spektrophotometer vom Typ MOM 202 aufgenommen wurde, identifiziert und seine Konzentration durch eine mit Pulfrich-Photometer bei Filter S 47 gemessenen Extinktion bestimmt werden. Der so erhaltene Extinktionswert wurde durch Multiplikation mit einem Extinktionskoeffizienten 0,46 — der mit Hilfe eines Karotin-Standardpräparates gewonnen wurde — unter Berücksichtigung der Einwaage in mg/kg umgerechnet. Da, nach Erfahrungen, bei der Fraktionierung ein ungefähr 15%-iger Tokopherolverlust mit ungefähr 5%-iger Streuung auftritt, so konnte der Tokopherolgehalt

auf Grund eines Arbeitsdiagrammes, das durch die Chromatographierung einer, mit reinem Karotin- und Tokopherolpräparaten hergestellten Standardreihe ausgemessen wurde, bestimmt werden. (Abb. 3.)

Tabelle 1. enthält die Messangaben der untersuchten 12 Leguminosensorten. Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass der auf die Trockensubstanz bezogene (absolute) Wert des Tokopherolgehaltes bei Pflanzen mit grösserem Wassergehalt im allgemeinen höher liegt. Im Falle des Karotingehaltes war ein solcher Zusammenhang nicht nachzuweisen. Die Verteilung des Karotin- und Tokopherolgehaltes der Blätter und Stiele betrachtend (Tab. 2), kann festgestellt werden, dass der Unterschied bei Pflanzen mit weicherem Stiel nicht allzu gross ist, und z. B. im Falle von *Trifolium repens* der Tokopherolgehalt des Stieles sogar etwas höher liegt, obwohl im allgemeinen der Karotin- und Tokopherolgehalt des Stieles mit demjenigen des Blattes verglichen, niedriger ist.

Tab. 1. Karotin- und Tokopherolgehalt der untersuchten Leguminosen auf die Frischsubstanz (relativ) und auf die Trockensubstanz (absolut) bezogen. (1) Leguminosensorten; (2) Extinktion der Karotinlösungen und der Karotingehalt in mg/kg (relativ); (3) Extinktion der Tokopherollösungen und Tokopherolgehalt in mg/kg (relativ); (4) Trockensubstanz %; (5) Karotingehalt in mg/kg (absolut); (6) Tokopherolgehalt in mg/kg (absolut).

Tab. 2. Die Verteilung des Karotin- und des Gesamttokopherolgehaltes in den Blättern und Stielen einiger Leguminosensorten in grünem Zustand auf den Frischstoffgehalt bezogen. (1) Leguminosensorten; (2) Karotingehalt in mg/kg, im Blatt; im Stiel, durchschnittlich in der Pflanze; (3) Blatt-Stiel Verhältnis; (4) Gesamttokopherolgehalt in mg/kg, im Blatt, im Stiel, durchschnittlich in der Pflanze.

Изучение содержания общего токоферола и В-каротина в некоторых зеленых бобовых растениях

И. ИХАС

Высшая аграрная школа, Кестхей (Венгрия)

Резюме

В работе описывается метод совместного определения каротина и общего токоферола в зеленой массе 12-ти видов бобовых растений.

Образцы растений экстрагировались प्रतिрацием холодным ацетоном до обесцвечивания, затем экстракт переносился в

петролейный эфир. Петролейно-эфирный пигментный раствор омыливался при 15-ти минутном кипячении метаноловым щелочным раствором, содержащим 5% КОН. На разделительной воронке отделили жел-

тую петролейно-эфирную эпифазу от зеленой щелочной гипофазы. Гипофаза отмывалась от каротина порциями петролейного эфира и промывная жидкость присоединялась к эпифазному раствору. Объединенный раствор отмывался от щелочи, сушился над обезвоженным сернистым натрием, затем под редуцированным давлением выпаривался до меньшего объема и хроматографировался в столбике чистого CaCO_3 . (Рис. 1). Полученный раствор каротина, содержащий токоферол снова выпаривался до меньшего объема и в свежем столбике снова хроматографировался. Первую и вторую порции стекающей в столбике кислоты желтого цвета собирали отдельно, так как последняя порция стекающего пигментного раствора содержала токоферол. После полной элюции каротина было отдельно взято примерно 10 мл бесцветного раствора, так как на основании качественного анализа образец содержал большую часть токоферола. Отдельно собранный раствор каротина, содержащий токоферол подобно предыдущему повторно хроматографировался и это повторялось четыре раза. Собранные порции раствора каротина, не содержащие токоферол объединялись, также объединялись практически бесцветные растворы токоферола, полученные после фракционного хроматографирования.

В конечном итоге фракционным хроматографированием, применяя один адсорбент, можно отделить каротин от общего токоферола. Выделенный каротин можно опознать на основании адсорбционной кривой (Рис. 2), снятой спектрофотометром МОМ—202, а концентрацию определить на основании измерения экстинкции фотометром Пульфрихта при светофильтре S 47. Помножая измеренную экстинкцию на коэффициент экстинкции 0.46, полученный на основе стандартного препарата каротина, принимая во внимание навеску, можно пересчитать на величину мг/кг. На основании опыта при фракционировании потеря токоферола составляет примерно 15% при отклонении примерно в 5%, оценку содержания токоферола можно проводить на основании кривой, полученной после хроматографирования стандартной серии, приготовленной из препаратов чистого каротина и токоферола (Рис. 3).

В таблице № 1 приводятся данные определения 12-ти видов изученных бобовых растений. Из таблицы видно, что величина

(абсолютная), относящаяся к содержанию токоферола в сухом веществе, почти всегда выше у растений с более высоким содержанием влаги. Для каротина подобной закономерности не наблюдалось.

Рассматривая распределение содержания каротина и токоферола в листьях и стеблях растений (Табл. 2), можно отметить, что хотя содержание каротина и токоферола в стеблях в основном ниже, чем в листьях, в растениях с более мягким стеблем эта разница не так заметна, наоборот, содержание токоферола в стеблях *Trifolium repens* значительно выше.

Табл. 1. Содержание каротина и токоферола в зеленой массе изученных бобовых растений в пересчете на сырое (релятивное значение) и сухое (абсолютное значение) вещество. (1) Название бобовых растений. (2) Каротин (релятивное значение) экстинкция и мг/кг. (3) Токоферол (релятивное значение) экстинкция и мг/кг. (4) Сухое вещество в %. (5) Каротин (абсолютное значение) мг/кг. (6) Токоферол (абсолютное значение) мг/кг.

Табл. 2. Распределение содержания каротина и общего токоферола в листьях и стеблях нескольких зеленых бобовых растений, в пересчете на сырое вещество. (1) Название бобового растения. (2) Каротин мг/кг в листьях, стеблях и в среднем во всем растении. (3) Соотношение лист/стебель. (4) Общий токоферол в мг/кг в листьях, стебле и в среднем в растении.

Рис. 1. Простое устройство для хроматографирования. 1. Лабораторная металлическая стойка. 1а. Держатель для колбы. 2. Дозирующее устройство с краном. 2а. Петролейная пигментная вытяжка. 3. Трубка Ахлин. 3а. Пигментные кислоты на адсорбенте. 3б. Адсорбентная зарядка столбика. 3с. Хлопок. 3д. Пористое стекло или Вит-пластинка. 4. Всасывающий баллон. 4а. резиновая или отшлифованная стеклянная пробка. 4б. Хроматографируемый раствор. 5. Присоединение к воздушному насосу.

Рис. 2. Спектр каротина препарированного в области видимого света.

Рис. 3. Кривые измерения общего токоферола. 3а. Стандартная кривая чистого токоферола. 3б. Измеренная рабочая кривая — после фракционального хроматографирования раствора искусственно приготовленного из чистого токоферола и каротина. Разница величин экстинкций двух кривых идентична хроматографической потери токоферола.