

## SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENIE CHLOROFYLU *A* A CHLOROFYLU *B* VEDĽA SEBA

J. RÁCIK, V. MEGO

Chemické laboratórium Šľachtiteľskej stanice v Bučanoch

Stanovenie sumárneho chlorofylu, jeho *A* i *B* komponentov a ich vzájomného pomeru získava stále viac na význame. Intenzita sfarbenia alebo farebné odtiene listov nadobúdajú dôležitosť v súvislosti s rozličnými kvalitatívnymi ukazovateľmi kultúrnych rastlín, pravda, vždy v súčasnej konfrontácii s anatomickými a cytologickými faktormi. Množstvo celkového chlorofylu v jednotlivých rastlinných druhoch sa už viackrát stanovilo a v literatúre sa možno stretnúť s hojnosťou predmetných údajov [1, 2]. Pomer jednotlivých zložiek chlorofylu zostával zanedbanejší a literatúra udáva veľmi široké medze jeho premenlivosti. Pomer zložiek kolíše od 3:1 až ku 7,9:1 a pri vegetácii v slabom svetle dokonca 16,7:1, ba až 20:1.

Sumárny chlorofyl sa bežne stanovuje kolorimetricky. Na stanovenie jednotlivých zložiek sú najzaužívanejšie chromatografické metódy, ktoré sú dosť náročné a málo vhodné pre sériové a rýchle práce. Oveľa výhodnejšie je na kvantitatívne stanovenie obidvoch zložiek vedľa seba použiť rozdiely v optických vlastnostiach obidvoch chlorofylov.

Pre sledovanie obsahu chlorofylu v listoch kultúrnych rastlín upravili sme u nás menej známu metódu Comar-Zscheileho [3], ktorá je založená na princípe spektrofotometrickej analýzy dvojzložkovej sústavy.

Spektrálne krivky chlorofylu *A* a chlorofylu *B* sa podstatne líšia (pozri tab. 1). Najväčšie rozdiely absorpčných koeficientov sú pri vlnových dĺžkach

Tabuľka 1  
Špecifické absorpčné koeficienty chlorofylu *A* a *B*

Vlnová dĺžka <i>A</i>	Chlorofyl <i>A</i>	Chlorofyl <i>B</i>
6600	102,0	4,5
6425	16,3	57,5
6130	15,6	8,05
6000	9,95	9,95
5890	5,9	10,3
5810	8,05	8,05
5680	7,11	7,11

660 m $\mu$  a 642,5 m $\mu$ . Preto obsah chlorofylu *A*, chlorofylu *B* a celkový chlorofyl počítame z priepustností, resp. extinkcií extraktu pri týchto dvoch vlnových dĺžkach.

Tabuľka 2

Tabuľka pre výpočet celkového chlorofylu a chlorofylu A

$$\text{Celkový chlorofyl [mg/l]} = C_x + C_y$$

$$\text{Chlorofyl A [mg/l]} = A_x - A_y$$

T %	$\lambda = 660 \text{ m}\mu$		$\lambda = 642,5 \text{ m}\mu$		T %	$\lambda = 660 \text{ m}\mu$		$\lambda = 642,5 \text{ m}\mu$		T %	$\lambda = 660 \text{ m}\mu$		$\lambda = 642,5 \text{ m}\mu$	
	$C_x$	$A_x$	$C_y$	$A_y$		$C_x$	$A_x$	$C_y$	$A_y$		$C_x$	$A_x$	$C_y$	$A_y$
15	5,86	8,18	—	—	32	3,53	4,92	8,31	0,384	49	2,21	3,08	5,21	0,241
16	5,66	7,90	—	—	33	3,43	4,78	8,10	0,374	50	2,14	2,99	5,05	0,234
17	5,49	7,65	—	—	34	3,34	4,66	7,88	0,364	51	2,08	2,90	4,91	0,227
18	5,31	7,40	—	—	35	3,25	4,53	7,65	0,354	52	2,02	2,82	4,77	0,221
19	5,14	7,16	—	—	36	3,13	4,37	7,45	0,342	53	1,97	2,74	4,64	0,214
20	4,97	6,95	—	—	37	3,08	4,29	7,25	0,336	54	1,91	2,66	4,51	0,208
21	4,83	6,74	—	—	38	2,99	4,17	7,05	0,326	55	1,85	2,58	4,37	0,202
22	4,68	6,54	—	—	39	2,91	4,07	6,87	0,318	56	1,80	2,50	4,23	0,196
23	4,55	6,35	—	—	40	2,82	3,94	6,68	0,308	57	1,74	2,42	4,10	0,189
24	4,41	6,15	—	—	41	2,73	3,81	6,50	0,298	58	1,69	2,36	3,98	0,184
25	4,28	5,98	—	—	42	2,68	3,74	6,33	0,293	59	1,63	2,28	3,85	0,178
26	4,17	5,81	—	—	43	2,61	3,64	6,15	0,285	60	1,58	2,21	3,73	0,172
27	4,05	5,65	—	—	44	2,54	3,54	6,00	0,277	61	—	—	3,62	0,167
28	3,93	5,48	—	—	45	2,47	3,44	5,83	0,269	62	—	—	3,50	0,162
29	3,84	5,35	—	—	46	2,40	3,34	5,65	0,262	63	—	—	3,38	0,156
30	3,73	5,20	8,80	0,407	47	2,34	3,26	5,51	0,255	64	—	—	3,26	0,151
31	3,62	5,06	8,55	0,396	48	2,27	3,17	5,35	0,248	65	—	—	3,14	0,144

Ak hodnoty, vzťahované na tieto vlnové dĺžky, označíme  $x, y$  ( $x$  pre vlnovú dĺžku 660  $m\mu$  a  $y$  pre 642,5  $m\mu$ ), za predpokladu aditivity extinkcií platí:

$$\begin{aligned} \text{konc. chlorofylu } A &= K_{ax}E_x - K_{ay}E_y \\ \text{konc. chlorofylu } B &= K_{by}E_y - K_{bx}E_x \\ \text{konc. celkového chlorofylu} &= K_{cx}E_x + K_{cy}E_y \end{aligned}$$

pričom

$$K_{cx} = K_{ax} - K_{bx}; \quad K_{cy} = K_{by} - K_{ay}$$

Jednotlivé koeficienty, vypočítané raz pre vždy pre daný prípad, udávajú sa v citovanej práci [3] pre éterický roztok a 10 mm kvety hodnotami (mg/l):

$$\begin{aligned} K_{ax} &= 9,93 & K_{ay} &= 0,777 \\ K_{bx} &= 2,81 & K_{by} &= 17,6 \\ K_{cx} &= 7,12 & K_{cy} &= 16,8 \end{aligned}$$

Pretože výpočet extinkcií z nameraných priepustností a ďalšie prepočítavanie na koncentráciu je zdĺhavé, nahradili sme tento výpočet tabuľkou 2, v ktorej sú k nameraným priepustnostiam  $T$  % uvedené súčiny týchto koeficientov s príslušnými extinkciami pre výpočet koncentrácie chlorofylu  $A$  a celkového chlorofylu. Týmto spôsobom sa výpočet obmedzí na rozdiel, resp. súčet dvoch hodnôt:

$$\begin{aligned} \text{chlorofyl } A \text{ [mg/l]} &= A_x - A_y \\ \text{celkový chlorofyl [mg/l]} &= C_x + C_y \end{aligned}$$

*Príklad:*

Pri vlnovej dĺžke 660  $m\mu$  sa namerala priepustnosť 29 %, pri 642,5  $m\mu$  priepustnosť 54 %. Celkový chlorofyl je súčtom hodnôt  $C_x + C_y = 3,84 + 4,51 = 8,35$  mg/l; chlorofyl  $A$  je rozdielom hodnôt  $A_x - A_y = 5,35 - 0,208 = 5,14$  mg/l.

Ako sme už spomenuli, meranie sa robí v éterickom roztoku. Postup, ktorým autori [3] získavajú tento roztok, podarilo sa nám urýchliť tým, že namiesto zdĺhavého rozotierania materiálu v trecej miske drvíme materiál v turmixe za prídavku vodného acetónu. Na extrakciu éterom z tohto roztoku používame Klimešovu premývačku [4].

## Experimentálna časť

### *Pracovný postup*

2 g čerstvého materiálu sa 3—5 minút rozsekáva v turmixe za prídavku 0,1 g  $\text{CaCO}_3$  a 50 ml 85 % acetónu. Potom sa obsah nádoby kvantitatívne spláchnu na Büchnerov lievik s dvojakým filtrom s modrou páskou. Zvyšok na filtri sa premýva acetónom, kým filtrát neodteká bezfarebný. Nato sa premyje minimálnym množstvom éteru a objem filtrátu sa na 100 ml doplní 85 % acetónom. K 50 ml tohto roztoku sa pridá rovnaký objem deperoxydovaného éteru, dôkladne sa pretrepe a vpraví sa do Klimešovho premývacieho prístroja. Premýva sa 10—15 minút. Získaný éterický extrakt sa doplní

éterom na 100 ml a časť roztoku sa vysuší prídavkom bezvodého síranu sodného p. a. Vysušený roztok sa naplní do 10 mm kyvety a zmerá sa jeho priepustnosť pri vlnových dĺžkach 660 m $\mu$  a 642,5 m $\mu$ . Porovnávaciu kyvetu plníme suchým éterom.

Pretože maximá absorpcií chlorofylu *A* a *B* sú ostré, treba presne nastaviť vlnovú dĺžku, pri ktorých meriame. Ak nemáme istotu, že prístroj, s ktorým pracujeme, je správne ciachovaný, premeriame krátku oblasť v okolí udaných vlnových dĺžok a potom meriame pri takom nastavení prístroja, pri ktorom sú priepustnosti minimálne. Priepustnosť pri  $\lambda = 660$  m $\mu$  sa má blížiť hodnote 25 %; ak by sa podstatne líšila od tejto hodnoty, treba pozmeniť množstvo materiálu vzaté do práce.

Metodika sa preverila na listoch orgovánu (*Syringa vulgaris* L.), z kultúrnych rastlín na pšenici a cukrovej repe. Pracovalo sa na spektrofotometri Koutský K56.

### Súhrn

Opisuje sa modifikovaná metodika menej známej Comar-Zscheileho metódy na spektrofotometrické stanovenie celkového chlorofylu a jeho zložiek vedľa seba. Zjednodušený pracovný postup je vhodný pre rýchle a sériové práce a možno ho použiť pri štúdiu súvislostí medzi obsahom chlorofylu a rozličnými kvalitatívnymi ukazovateľmi kultúrnych rastlín.

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА А И В ПРИ СОВМЕСТНОМ ПРИСУТСТВИИ

Ю. РАЦИК, В. МЕГО

Химическая лаборатория селекционерской станции в Бучанах

### Выводы

В предлагаемой работе описывают авторы модифицированную методику мало известного метода Комар-Шейля для спектрофотометрического определения общего хлорофилла и его компонент при совместном присутствии. Упрощенный ход работы является вполне подходящим для быстрой и серийной работы и его можно применить при изучении зависимости между содержанием хлорофилла и различными количественными показателями культурных растений.

Поступило в редакцию 6. 4. 1960 г.

## SPKTROPHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON CHLOROPHYLL A UND B NEBENEINANDER

J. RÁCIK, V. MEGO

Chemisches Laboratorium der Pflanzenzüchtungsstation in Bučany

### Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit beschreiben die Autoren eine modifizierte Methodik der weniger bekannten Comar-Zscheileschen Methode der spektrophotometrischen Bestimmung des Gesamtchlorophylls und dessen Komponenten nebeneinander. Dieses vereinfachte Arbeitsverfahren eignet sich gut für rasche und serienmässige Arbeiten

und es lässt sich beim Studium der Zusammenhänge zwischen dem Gehalt an Chlorophyll un den verschiedenen quantitativen Merkmalen der Kulturpflanzen anwenden.

In die Redaktion eingelangt den 6. 4. 1960

#### LITERATÚRA

1. Němec B., Pastýrik L., *Všeobecná botanika*, Bratislava 1956, 115. — 2. Sabinin D. A., *Fiziologičeskije osnovy pitanija rastenij*, Moskva 1955. — 3. *Official Methods of Analysis of the AOAC*, Washington 1950, 112. — 4. Klimeš I., *Rychlá metoda pro seriová stanovení karoténů v zelených i silážovaných píceňinách, seně a zelenině*. Sborník vědec. prací VÚK-ČSAZV, Brno 1957.

Do redakcie došlo 6. 4. 1960

*Adresa autorov:*

*Inž. dr. Juraj Rácik, prom. chemik Vladimír Mego, Bučany, Chemické laboratórium Šľachtiteľskej stanice.*