

# Gyümölcsök savtartalmának papírkromatográfiás vizsgálata

BAJNOK ISTVÁN

Kertészeti és Szőlészeti Főiskola Technológiai Tanszék, Budapest

Érkezett: 1958. július 14-én

A gyümölcslevelekben előforduló savak jellegeről az irodalomban gyakran ellentmondó adatokat találunk. Pedig a gyümölcs ízének kialakításában nem érdektelen az előforduló savak minősége, aránya, kapcsolatban a cukortartalommal. Az összes savtartalom nem méréje a savas íznek. Az egyes savfélések speciális izreakciókat váltanak ki. Az a küszöbérték — amely alatt már nem érzékelünk — különböző nagyságú és függ a savfélésegektől és arányuktól. Mindezideig a klasszikus analízis módszereinek nehézsége és a kérdéses savak kémiai rokon természete miatt a gyümölcsökben és gyümölcslevelekben előforduló gyümölcssavakat csak többé-kevésbé sikerült szétválasztani. Ez magyarázza az ellentmondó adatokat, amelyhez hozzájárul az a körülmény is, hogy az egyes savak rendkívül csekély mennyiségben fordulnak elő bennük. A gyümölcsfélésekben a gyümölcssavak — a gyümölcsökben előforduló nem illékony szerves savak — aránya nem állandó, a változást több tényező okozza. A savfélésegeket és arányukat belső és külső okok befolyásolják. A belső okok közé sorolhatjuk a gyümölcstípus, fajtajelleget és az érettségi fok általi befolyást. A külső okok közé viszont a növekedés alatti természeti feltételeket, a vizsgálatnál alkalmazott eljárásokat és a gyümölcs prezelésétől a vizsgálatig eltelt idő befolyását sorolhatjuk.

Már régebben megállapították, hogy a gyümölcstípusoktól függően más és más szerves sav fordul elő nagyobb mennyiségben a gyümölcsben. Ezért az almástermésűeknél az összes savtartalom számításánál almasavban számolunk, viszont a bogyóstermésűeknél citromsavban. *Tavernier* és *Jacquin* (1, 2) almákban főleg almasavat talált. Hasonló eredményre jutott *Tanner* és *Rentschler* (3) papírkromatográfiás módszerrel. *Mulleit* (4) bogyógyümölcsűeknél állapította meg a citromsav jelentős mennyiségét a többi savfélésekkel szemben. Papírkromatográfiás módszerrel *Mulleit* eredményét *Mehlitz* és *Matzka* (5) erősítette meg. Más savak is előfordulnak a gyümölcsökben, azonban a legnagyobb mennyiséget az említett gyümölcstípusoknál az almasav, illetve a citromsav adja.

Az egyes gyümölcstípusok között a különböző fajták is más-más arányban tartalmazzák az egyes savakat. *Nelson* (6) különböző almafajtákat vizsgált. Megállapította, hogy csak almasav fordul elő bennük, kivéve egyes fajtákat, amelyekben nyomokban citromsavat is és a gránátalmát, amelyben csak citromsavat talált. *Tavernier* és *Jacquin* (1, 2) is vizsgált alma- és körtefajtákat. Fajtajától függően, túlnyomó részt hol almasavat, hol citromsavat talált, csekély borostyánkősav és tejsav mellett.

Gyümölcsöket érettségi fok szerint vizsgált *Nuccorini* és *Cerri* (7). Megállapították, hogy az őszibarack különböző érési stádiumaiban az alma-, citrom-, és borkősav különböző arányban fordul elő. Hasonló vizsgálatokat végeztek papírkromatográfiával *David* és munkatársai (8). Ők is megállapították az érettségi fok befolyását, ami a szerves savak arányában jelentkezik. Az érés előrehaladtával az összes savtartalom belől almasav növekedést figyeltek meg, a citromsav és a kinasav mennyisége rovasára. Különböző gyümölcsök érettségi fokának vizsgálatával foglalkozott még *Jordan* és munkatársai (9). Ők is hasonló megfigyeléseket tettek.

A külső ok által előidézett savváltozások közül erős befolyást gyakorol az évszám, az éghajlat, a természeti hely, a talaj minősége, stb. Ezeknek a hatásoknak tudható be, hogy pl. különböző országokban természetesen ugyan-

azon fajtájú egyedekben az egyes kutatók más-más arányban írják le a savféleségeket. Pl. svájci származású körtelé összes savtartalma *Rentschler és Tanner* (10) vizsgálatai szerint 30–50% citromsav, 20–30% almasav, ugyanannyi kinasav volt. A körtelé további csekély mennyiségben glykol-savat, nyomokban borostyánsavat és tejsavat is tartalmazott. Francia eredetű körtelében *Tavernier és Jacquin* (1, 2) főként almasavat mutatott ki kevés citromsav, nyomokban borostyánkősav és tejsav mellett. Az eltéréseknek módszertani okai is lehetnek, ezek azonban teljes magyarázatul nem szolgálnak.

A gyümölcssavak meghatározásánál valamely speciális reakciót használnak fel, ez lehet oxidáció, eszterifikáció, stb. vagy egyes oldószerekben való különböző oldékonyságon alapszik. (11, 15). Ma leginkább kromatográfiás módszereket használnak: *Van Dame* (13), *Zueva* (14), *Hulme Wooltorton* (12) stb. A különböző oldószerekben azonban a gyümölcsavak különböző sebességgel haladnak (16). A papírfajta (17), hőmérséklet és kutatás körülményei, valamint a kromatografálásához való előkészítés különbözőségei is mind befolyásolják az eredményt (18). Ezért szükséges, hogy egyöntetű eljárással történjék az egyes gyümölcsfélék és fajták minőségi és mennyiségi vizsgálata. Ezáltal lesznek összehasonlíthatók termesztési szempontból pl. a különböző termesztési adottságok között természetett gyümölcsök adatai. Jelen munka ezt a célt kívánja szolgálni.

Gyümölcsavak vizsgálati eredményeire nem utolsó sorban befolyással van a gyümölcs préselésétől a meghatározásig eltelt idő. A változást mikroorganizmusok és enzimek okozzák. A gyümölcsavakat nagyon nehéz megvédeni a mikroorganizmusoktól, úgy hogy pl. a préseléssel előállított lé más eredményeket ad, mint a vizsgálathoz azonnal felhasznált vizsgálati anyag. Ehhez járul még a gyümölcslemben levő enzimek tevékenysége, amelyeket ha időben nem inaktíválunk, meghamisíthatják eredményeinket.

A gyümölcsfélék papírkromatográfiás vizsgálata majdnem valamennyi gyümölcsfélére kiterjedt. Azonban az irodalmi adatok sokszor ellentmondanak egymásnak. Erről részletesebb adatokat közöl *Mehlitz és Matzlik* (5) cikke.

Mielőtt kromatografálnánk, tudni kell, hogy ezek a gyümölcsféleségek minőségi szempontból milyen savakat tartalmazhatnak. Rf. értékek alapján és az ismert savak együtt futtatásával azonosíthatjuk a gyümölcsle savait. Az alább közölt módszer elve, hogy vizsgálat céljából a gyümölcsből levét préselünk ki, amelyből közvetlenül papírra viszünk egy részletet. A visszamaradó gyümölcsle enzimeit inaktíváljuk, a nagy molekulájú pektin anyagokat eltávolítjuk, majd kation cserélőn tisztítjuk, erős anion cserélőre adszorbeáljuk és eluálás után kromatografálva, az ismert savak együtt futtatásával azonosítjuk a gyümölcsle savait.

## Módszer

### 1. A lé előkészítése

A vizsgálathoz csak teljesen ép, egészséges gyümölcsöt használunk. A gyümölcs zúzása után lenkendőn préseljük. Ebből egy részletet azonnal papírra viszünk és kromatografáljuk. A nyert levét 75 C°-on 15 percig tartjuk az enzimek inaktíválása céljából, majd 3000 ford/sec-al 30 percig centrifugáljuk. A lé tisztáját leöntjük és a megfelelően előkészített ioncserélőre visszük.

### 2. Az ioncserélők előkészítése

Dowex 50 kationcserélőt és Dowex 2 erős anioncserélőt használunk. Az ioncserélők előkészítését és használatát *Rentschler és Tanner* eljárása szerint (10) végezzük az alábbiak szerint:

Kb. 50 g ioncserélőt, amit már előző nap vízben szuszpendáltunk, egy 50 cm hosszú, 13 mm átm. üvegesőbe töltünk, az üvegeső végét üveggyapattal, vattával, vagy gézzel zárjuk. Az ioncserélő alsó végére egy gumielzárót szerelünk, a felső végéhez gumicsővel egy 250 ml-es választótölcsért kapcsolunk. A kationcserélő feltöltéséhez 200 ml normál sósavat adunk és úgy állítjuk be a gumielzárót, hogy *Icsepp/sec.-mal* csepegjen. Utána vízzel kimoszuk semleges kémhatásig 2 csepp/sec.-mal. Az esetleg visszamaradt HCl nyomokat 200 ml 70 C°-os vízzel eltávolítjuk. Az anioncserélőt 250 ml n NaOH-val aktiváljuk 1 csepp/sec.-mal, majd 2 csepp/sec.-mal semlegesítjük. A karbonátok adsorbeálása céljából 20 g kristályos Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-t 150 ml vízben oldunk és ezt 1 csepp/sec.-mal átfolyatjuk az ioncserélőn, majd vízzel kimoszuk semleges kémhatásig 2 csepp/sec.-al.

### 3. Az ioncserélők használata

Az ioncserélőket oly módon kapcsoljuk össze, hogy felül helyezkedjék el az aktivált kationcserélő, alatta az aktivált anioncserélő. A kationcserélőre öntünk 20 ml vizsgálandó levet és 30 ml vízzel utána öblítünk 1 csepp/sec.-al. Ezután 3 csepp/sec.-al mossuk, az ioncserélőket óvatosan szétszereljük és az anioncserélőt 100 ml frissen készített 2 n ammonium karbonáttal eluáljuk. (1 csepp/sec.). A lefolyó oldatot felfogjuk, ami a gyümölcslezből származó összes savakat tartalmazza. A felesleges ammónia eltávolítása céljából vízfürdőn mintegy 20 ml-re bepároljuk. Ammóniának nem szabad visszamaradni, az oldat pH-nak 7-nek kell lenni. Amennyiben az ammónia nem távozna el, úgy kevés desztillált vizet adunk hozzá és folytatjuk a bepárlást, amíg az oldat a 7 pH-t nem éri el. Közben a kationcserélőt előírás szerint ismét aktiváltuk és a bepárlás után visszamaradó oldatot (ami ammóniumsó alakban tartalmazza az összes savakat), 1 csepp/sec.-mal a kationcserélőre visszük. 30 ml vízzel utána öblítjük. Az átfolyó oldatot felfogjuk — ami a gyümölcssavakat már szabad alakban tartalmazza — és vízfürdőn 1—2 ml térfogatra bepároljuk. Ezután kromatografáljuk.

E módszernél az erős anioncserélőt csak karbonát alakban használjuk, ugyanis OH-os alakú ioncserélőnél *Phillips, Pollárd* (19) és *Hulme* (20) is megfigyelt, cukortartalmú oldatok keresztülfutásánál savak képződését. A megfigyelt savak tej- és glicolsavak voltak, amelyek a cukrok részbeni elbomlásából és a sav képződéséből eredtek.

### 4. A papírkromatográfia véghezvitele

Mind a leszálló, mind a felszálló kromatográfia egyaránt használható. *Oldószer:* 75% fenol, 24% víz, 1% hangyasav, amit *Stark* és munkatársai (21. ajánlottak. Papír: *Schleicher, Schüll* 2043/b Mgl.

*Futtatás:* A gyümölcslevek direkt kromatografálásánál a startpontra mintegy 5—10 mml levet viszünk, úgyszintén az ioncserélőre adsorbeált és eluált oldatból is. Az anyag mennyiségét mindenkor úgy választjuk, hogy legalább 8—10  $\gamma$  legfeljebb pedig 50  $\gamma$  savmennyiséget vigyünk a papírra. A kromatogramra már előzőleg felvittük az ismert savakat, amelyeket a vizsgált anyagban gyanítunk. Az anyagok rávitte után a papírt megszáritjuk és a kromatográfiai edénybe tesszük. Mind a felszálló, mind a leszálló módszernél úgy választjuk az oldószer mennyiségét, hogy kb. 2 cm-re lépje el a kromatogrammot. A felvitt savkeverékek szétválasztásához 20—22 C°-on 24 óra szükséges. Ez alatt az idő alatt az oldószer front 32—34 cm utat tesz meg.

*Előhívás:* A kromatogrammot előhívás előtt a fenol eltávolítása céljából szárítószekrénybe tesszük és 100 C°-on 10 percig tartjuk. Ezután 0,04%-os etanolos bromkrezolölddel vagy 0,04%-os etanolos bromfenolkék indika-

torral permetezzük be, amikor a savak sárga foltokban jelentkeznek, kék vagy ibolya háttérben.

### Kísérleti eredmények

Vizsgálataink kiterjedtek érett, friss gyümölcsökre, hangyasavval, kénessavval és nátriumbenzoáttal tartósított gyümölcslevekre. Megfigyeléseink szerint az előbb említett tartósító szerek a gyümölcslevek savainak összetételét nem befolyásolják, mert illósavak (a nátriumbenzoát kivételével). A nátriumbenzoát sem zavar, mivel kémiai természeténél fogva közömbös gyümölcssav vizsgálataink szempontjából. Egyéb szervezeten savak (sósav, kénsav) hasonlóképp nem befolyásolták a vizsgálatokat.

Almánál több irodalmi adattal egyetértően megállapítottuk, hogy a friss almalében főként almasav fordul elő (90—95%, csekély citromsav (5—8%), és egy eddig meg nem határozott gyümölcssav nyomokban. Tartósított almalénél megfigyeléseink szerint, az arányok eltolódtak. Csaknem 100% almasavat találtunk, s csak nyomokban citromsavat. Ez arra enged következtetni, hogy a tárolás folyamán további átalakulások mennek végbe a gyümölcslében, amelyek a savváltozásokat kiváltják. Hasonló megfigyeléseket tettünk más kémiai tartósító szerrel tartósított gyümölcslénél is. Ezzel magyarázható, hogy kémiai tartósító szerrel tartósított gyümölcslevekből gyártott termékek, nem azonos élvezeti értékűek a friss gyümölcsléből készített termékekkel, organoleptikus vizsgálatok szerint sem.

Egyedül a kékyszőlő vizsgálatoknál találtunk tekintélyes mennyiségben borkósavat. A borkósav mellett hasonló mennyiségben almasavat, nyomokban citrom- és csersavat is találtunk. Hasonló megállapításokhoz jutott *Böhringer* és *Wenzler* (22), azzal a különbséggel, hogy csersav helyett galakturonsav, vagy kinasav jelenlétét gyanították.

A málna friss gyümölcsének savtartalmát csaknem 100%-ban a citromsav teszi ki. Nyomokban almasavat találtunk mellette, ami azonban a hangyasavas tárolás folyamán teljesen eltűnt.

Vizsgálataink szerint egyenlő mennyiségben van az almasav és citromsav a kajsziban, amit *Anet* és *Reynolds* (23) is megállapít. Kimutatták a kajsziban még kinasavat és borostyánkósavat is. Ezek közül kinasavat Rf. érték alapján vizsgálataink is valószínűsítenek. Borostyánkósavat nem találtunk a friss gyümölcsben, csak kénessavval tartósított kajszilében, amely egy lassú erjedési folyamaton már keresztülment. Az erjedés megtörténtét papírkromatográfiás cukorvizsgálattal állapítottuk meg. A friss gyümölcslében az előbb említett savfélések mellett, megfelelő mennyiségben fruktózt és glükózt találtunk. A lassú erjedésen átment kajszilében sem fruktózt, sem glükózt nem találtunk. Az előbb említetteket alátámasztják *Böhringer* és *Wenzler* (22), *Tanner* és *Rentschler* (10) vizsgálatai is. Ugyanabban az erjedt kénessavval tartósított kajszilében a sav-arányok a tárolás folyamán sem változtak, valószínűleg az erjedés következményeként.

Őszibaracot a friss gyümölcsben és hangyasavval tartósított gyümölcslében vizsgáltunk *Noccurini R. Cerri F.*; *David* és *mtársai* és *Anet E. F. L. J. Reynolds T. M.* szerint (7, 8, 24) almasav, citromsav, borkósav, kinasav, galakturonsav fordul elő a friss gyümölcsben. Vizsgálataink alkalmával almasavat, citromsavat és egy még pontosan meg nem határozott savat találtunk, valószínűleg kinasav, vagy galakturonsav. Borkósavat nem találtunk egy vizsgálatban sem. A tartósított őszibaracklében a savarányok a tárolás folyamán megváltoztak, az almasav javára. Az almasav mennyisége gyarapodott, csak nyomokban maradt citromsav.

A gyümölcsökben található nem illó szerves savak Rf értékei. Fenolvíz-hangyasavban (75—24—1), *Schleicher Schüll* No. 2043/n papíron.

tejsav . . . . .	70	almasav . . . . .	45	oxálsav . . . . .	20
borostyánkösav	64	citromsav . . . . .	32	kínasav . . . . .	15
maleinsav . . . . .	57	borkösav . . . . .	26	csersav . . . . .	11
malonsav . . . . .	51				

#### IRODALOM

- (1) *Tavernier, J.—Jacquin, P.*: C. R. Acad. Sci 225, (1373), 1947.
- (2) *Tavernier, J.—Jacquin, P.*: Ind. Agr. et Alim. 66, 513, 1949.
- (3) *Tanner, H., Rentschler, H.*: Mitt. 45, 305, 1954.
- (4) *Mutteleit, C. F.*: Anal. 17, 454, 1924.
- (5) *Mehlitz, A., Matsik B.*: Ind. Obst u. Gemüseverw. 42, 6, 1957.
- (6) *Nelson, E. K.*: J. Amer. Chem. Soc. 49, 1300, 1927.
- (7) *Nuccorini, R., Cerri, F.*: Part. V. Boll. R. Ist. Super Agrar, Pisa 6. 303, 1930.
- (8) *David, J. J., Luh, B. S., Marsh, G. L.*: Food Res. 21, 184, 1956.
- (9) *Jordan, Korte, Sengbusch*: D. Züchter 27, 69, 1957.
- (10) *Rentschler, H.—Tanner, H.*: Mitt. 45, 142, 1954.
- (11) *Kielhöjer, E., Anmann, H., Specht, M.*: Z. L. u. F. 100, 6, 1955.
- (12) *Hulme, A. C., Wooltorton, I. S. C.*: J. Sci Food a. Agric. 8, 117, 1957.
- (13) *Van Dame*: J. Ass. off. Agr. Chem. (O. M. K. ford. 45.508) 36, 3, 1953.
- (14) *Zueva*: Fiziol. rasztelij. Izd. A. N. CCCP. (O. Mg. K. fordítás 8901) 1, 1, 1954.
- (15) *Bonner, J.*: Plant Biochemistry (New-York) (O. Mg. K. fordítás 7183.) 1950.
- (16) *Jones, A. R., Dawling, E. J., Skraba, W. J.*: Z. A. CH. 25, 394, 1953.
- (17) *Michael, F., Albers, P.*: Mikrochem. Acta (Wien) 489, 1954.
- (18) *Cramer, F.*: Papierchromatographie (Weinheim) 1954.
- (19) *Phillips, J. D., Pollard, A.*: Nature 171, 41, 1953.
- (20) *Hulme, A. C.*: Nature 171, 41, 1953.
- (21) *Stark, J. B., Goodban, A. E., Owens H. S.*: Anal. Chem. 413, 1951.
- (22) *Böhringer, P., Wenzler, J.*: Z. L. U. F. 100, 458, 1955.
- (23) *Anet, E. F. L. J., Reynolds, T. M.*: Austral. J. Chem. 8, 267, 1955.
- (24) *Anet, E. F. L. J., Reynolds, T. M.*: Nature 174, 930, 1954.

### БУМАЖНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОТЫ В ФРУКТАХ

И. Байнок

На основе собственных исследований автор установил следующие:

1. Разночерчия отдельных литературных данных относительно содержания кислоты в фруктах вызываются различиями сортов, видов, степени зрелости, условий разведения во время возрастания (место, климат, почва и т. д.) фруктов, а также различиями исследовательского метода и времени прошедшего от прессования до определения.

2. Химические консервирующие средства летучие или с нейтральном рН не мешают описанный бумажнохроматографический метод определения.

3. В фруктовых соках, консервированных химическими средствами, соотношение кислот изменяется относительно соотношения кислот в свежих фруктах на сторону какой-нибудь кислоты.

4. После брожения соотношение кислот в броженном соке сравнительно постоянное во время хранения.

5. Описанный метод удовлетворительный, применением метода отстраняется источник ошибки ввиду разницы времени от прессования до определения. Таким путем возможно сравнивать фрукты, разведенные в тождественных условиях.

### PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG DES SÄUREGEHALTES VON OBST

И. Байнок

Verfasser stellt auf Grund seiner Untersuchungen Folgendes fest:

1. Die Widersprüche einzelner literarischer Angaben hinsichtlich des Säuregehaltes von Obst sind auf Obstart, Spezies, Reifegrad, Anbaubedingungen (Ort, Klima, Boden usw.) während des Wachstums, auf die Prüfungsmethode sowie auf die von dem Pressen bis zur Bestimmung verflussene Zeit zurückzuführen.

2. Die flüchtigen chemischen Konservierungsmittel, oder diejenigen von neutraler Reaktion stören die mitgeteilte papierchromatographische Bestimmungsmethode in keiner Beziehung.

3. Die Mengenverhältnissen zwischen den Säuren der mit chemischen Konservierungsmitteln konservierten Obstsäfte verändern sich während der Lagerung im Vergleich zu den Säureverhältnissen des frischen Obstes zu Gunsten der einen Säureart.

4. Nach der Fermentation bleibt das Säureverhältnis des fermentierten Saftes während der Lagerung verhältnismässig beständig.

5. Die beschriebene Methode ist zuverlässig, mit ihrer Hilfe kann die seit dem Auspressen verstrichene Zeit als Fehlerquelle eliminiert werden. Dadurch wird es möglich, die unter identischen Umständen angebauten Früchte miteinander zu vergleichen.

## INVESTIGATION BY PAPER CHROMATOGRAPHY OF THE ACID CONTENT OF FRUITS

### *I. Bajnok*

On the basis of results of his investigations, the author states :

1. That the contradictions of certain data of literature with respect to the acid content of fruits are due to differences in species, variety, degree of maturity of fruits, in conditions of growth (sites, climate, soil, etc.), in methods of investigations and in the length of the period elapsed from the preparation of fruit juice to the time of analysis.

2. That chemical preserving agents of volatile nature or of neutral reaction do not interfere with the described method of determination by paper chromatography.

3. The ratio of acids in fruit juices preserved by chemical agents, compared to that in fresh fruits, change during storage in that one of the acids increases in quantity.

4. Subsequent to fermentation, the ratio of acids in the fermented juice remains relatively stable during storage.

5. The described method is reliable. Errors due to the period elapsed from the preparation of fruit juice can be eliminated by its use and fruits grown under identical conditions can be compared.

## L'ACIDIMÉTRIE DES FRUITS AU MOYEN DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

### *I. Bajnok*

Sur la base de ses analyses, l'auteur a établi les suivants :

1 — L'écart des données particulières dans la bibliographie relatives à l'acidité des fruits est causé par la différence des genres, des espèces et de l'état de maturité des fruits particuliers, comme aussi par les conditions culturales, le lieu, la méthode d'analyse employée et le temps écoulé depuis le pressage jusqu'à l'analyse.

2 — La méthode d'analyse de chromatographie sur papier, ci-dessus décrite, n'est perturbée point par des produits conservateurs volatiles ou neutres.

3 — Les proportions d'acide des sirops conservés par des produits chimiques, par rapport à celles des fruits frais, se modifient pendant le magasinage, au bénéfice de quelque variété d'acide.

4 — Après la fermentation, la proportion des acides du jus fermenté pendant le magasinage, reste relativement constante.

5 — Grâce à la méthode décrite complètement sûre, la source d'erreur, causée par le temps écoulé dès le pressage, peut être éliminée.