

# Gyorsfagyasztott gyümölcsök barnulása

## II. Polifenolok minőségi kimutatása

ALMÁSI ELEMÉR és MOLNÁR DÁVID

Központi Élelmiszeripari Kutatóintézet, Budapest

Érkezett: 1962. február 13.

A növényekben előforduló polifenolok nagyrészenek azonosítása csak az utóbbi években vált lehetővé elsősorban új laboratóriumi eljárások kidolgozása révén, amelyek lehetővé tették ezen nagyszámú vegyületcsoport megfelelő szétválasztását, tisztítását. Ezek a laboratóriumi eljárások a Craig-féle megoszlásos eljárás (1) és a papírkromatografia.

### A megoszlásos szétválasztási eljárás

A megoszlásos szétválasztási eljárás alapja *Berthelot*nak még 1872-ben végzett megfigyelése, hogy valamely oldott anyag megoszlása két egymással nem elegyedő folyadék között állandó arányt mutat.

A két fázis közötti megoszlásnak ezt a törvényszerűségét alkalmazzuk primitív formában a laboratóriumi gyakorlatban, amikor pl. valamely anyagot vizes oldatából választótölcsérben éterbe, kloroformba viszünk át „kirázással”. Ez elsősorban olyan anyagokra alkalmazható eredményesen, amelyeknek nagy a  $k$  megoszlási hányadosuk, vagyis egy kirázással az anyag túlnyomó része átmegy a felső fázisba.

A választótölcséres kirázásnál általában 50 rázási művelet alatt áll be az egyensúly, illetve az anyagra jellemző megoszlási hányados, ha egy-egy rázási művelet alatt a választótölcsért hosszanti tengelyére merőlegesen  $180^\circ$ -al elfordítjuk és visszafordítjuk, az elfordítás és visszafordítás között megvárva, míg a levegő teljes egészében felszáll.

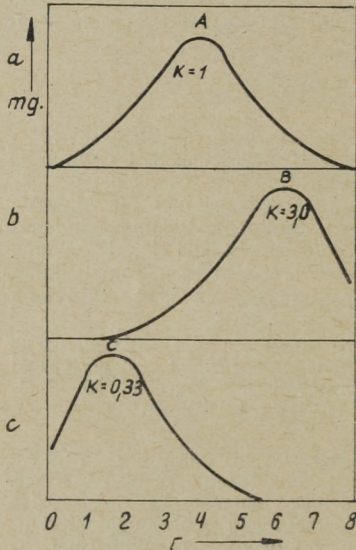
Természetesen hatékonyabb lesz a kirázás, ha egymás után többször friss felső fázist teszünk a választótölcsérbe és összerázzuk az alsó fázissal. Ismerve a megoszlási hányadost, kiszámítható, hogy hányszor kell felső fázist tennünk a vizes oldathoz, hogy a szétválasztás megfelelő pontosságot elérjen.

Ha egyidőben többféle anyag van oldatban, amelyeknek megoszlási hányadosa különböző, a nagyobb megoszlási hányadosú anyag a felső fázisban, a kisebb megoszlási hányadosú anyag az alsó fázisban található. Lényegében ezen alapul a megoszlásos szétválasztási eljárás.

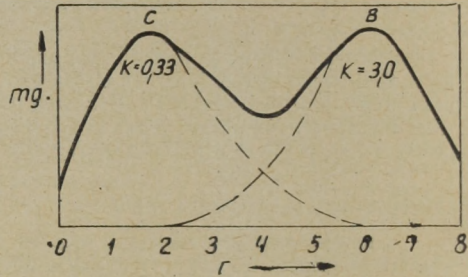
Legegyszerűbb formájában a megoszlásos szétválasztási eljárás lefolytatható megfelelő számú választótölcsér segítségével. Az eljárás ilyenkor a következő: A szétválasztandó anyagot tartalmazó vizes oldatot betesszük az első (0-val jelölt) választótölcsérbe. Beadagoljuk a vízzel csak korlátozottan elegyedő felső fázist, a szükséges számú rázással beállítjuk a megoszlási egyensúlyt. Ezután a fázisokat szétválasztjuk, az alsó fázist visszavisszük az 0-s választótölcsérbe, a felső fázist pedig átvisszük a következő választótölcsérbe (1-s). A 0-s választótölcsérbe friss felső fázist, az 1-s választótölcsérbe friss alsó fázist teszünk. Ezután mindkét választótölcsérben rázással beállítjuk az egyensúlyt, majd az 1-s választótölcsérből egy újabb (2-s) választótölcsérbe visszük a felső fázist, a 0-s tölcérből pedig átvisszük az 1-s tölcérbe. A 0-s tölcérbe új felső fázist, a 2-s tölcérbe új alsó fázist teszünk. A következő lépéseknél a felső fázist mindig egy-egy választótölcsérral előbbre visszük, a 0-s választótölcsérben pótoljuk a felső fázist, a legutolsó választótölcsérbe pedig megfelelő mennyiségű alsó fázist teszünk. Az anyag eloszlása az egyes választótölcsé-

rekben (alsó + felső fázis) a megoszlási hányados értékétől függ. A következő ábra 0,33 1 és 3 megoszlási hányadosú anyagok eloszlását tünteti fel  $r = 9$  db választótölcsérben, ha külön-külön vannak oldatban.

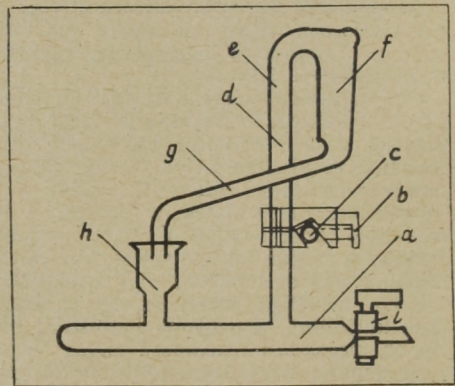
Két különböző megoszlási hányadosú (pl.  $k = 0,33$  és  $k = 3$ ) anyagot együttesen tartalmazó oldatot a fenti eljárásnak alávetve az anyagok eloszlását a választótölcsérekben a 2. ábra tünteti fel.



1. ábra. 0,33, 1,3 megoszlási hányadosú anyagok eloszlása 9 db választótölcsérben



2. ábra. 0,33 és 3 megoszlási hányadosú anyagot együttesen tartalmazó oldatban az eloszlás

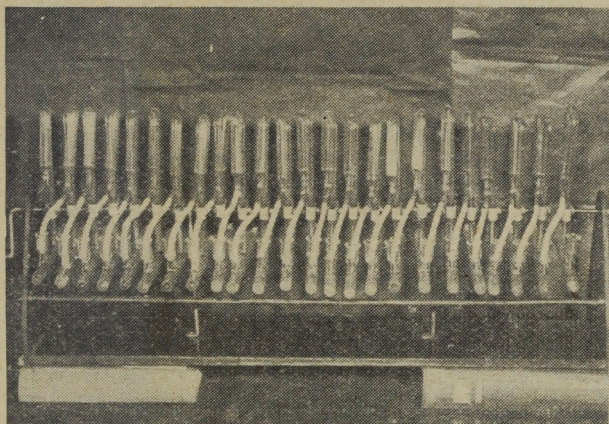


3. ábra. Választóedény. a – rázócső, b – felerősítés, c – tengely, d – dektantáló cső, e, – átfolyó-edény g – átfolyó cső, h – dektantáló tölsér, i – csap

Megfelelően növelve a választótölcsérek számát elég élesen szét lehet választani a különböző megoszlási hányadosú anyagokat.

Mint az elmondottakból is kitűnik, a választótölcsérekkel való manipulálás nehézkes és időrabló eljárás, mert minden egyes választótölcsért külön-külön kézbe kell fogni és egyenként kell a rázást elvégezni. Ezért olyan szerkezeteket dolgoztak ki, amelyeknél a választótölcsérek, illetve a megfelelően kialakított választóedények rázása együttesen történik és egyszerre oldható meg minden egyes felső fázis rész egy választóedénnyel előbbre való továbbítása. Az általunk szerkesztett és használt választó edény vázlatát tünteti fel a következő ábra.

Ezekből a választó edényekből 24 db-t erősítettünk fel egy készülékre, amellyel megoldható a választóedények együttes rázása és megfelelő elfordítással a felső fázisok továbbítása is.



4. ábra. A szerzők által szerkesztett 24 csöves Craigező készülék

A megoszlásos szétválasztási eljárást nemcsak a laboratóriumi technikában, hanem az iparban is alkalmazzák (gyógyszeripar, atomtechnika stb.). Ilyen célokra sok esetben többszáz választóedényes készülékeket használnak. A megoszlásos szétválasztási eljárás modern formájának kidolgozása Craig nevéhez fűződik. Rajta kívül többen is kidolgoztak szétválasztási metodikákat, amelyek a szétválasztandó anyag beadagolási helyében, a felső és alsó fázisok elvitele módjában különböznek egymástól. (Craig, O'Keeffe, Watanabe – Morikawa stb. eljárások).

#### *A megoszlásos szétválasztási eljárás alkalmazása polifenolok minőségi kimutatására*

A gyümölcsökben levő polifenolok minőségi kimutatására a következő eljárást alkalmaztuk.

500 – 1000 g gyümölcsöt kevés vízzel 15 percig forraltunk a polifenoloxidáz inaktíválása céljából. Lehűtés után a gyümölcsöket turmixben felaprítottuk. A kapott pépet laborcentrifugán centrifugáltuk, a maradékot kipréseltük. A szűrletet egyesítve vakuumban 50 – 100 ml-re sűrítettük be, hozzáadtunk ötszörös mennyiségű metanolt, 24 óráig hidegben állni hagytuk, majd szűrés után a szűrletet vakuumban 50 ml-re sűrítettük be. A sűrítmény pH-ját 5-re állítottuk be, majd a polifenolok előzetes szétválasztása céljából egymásután ötször 50 – 50 ml éterrel választóülsérben kiráztuk, az éteres fázisokat egyesítettük és kb. 10 ml-re besűrítettük. Ezután a sűrítményt ötször 50 – 50 ml etilacetáttal ráztuk ki és az etilacetátos fázisokat külön egyesítettük, 10 ml-re bepároltuk. Az éteres kivonatban elsősorban az oxifahéjsavak és katechinek dúsulnak fel, az etilacetátos kivonatban pedig a klorogénsavak és más oxifahéjsav észterek (2).

Az éteres, illetve etilacetátos kivonat, bár már jelent bizonyos szétválasztást, még nem alkalmas a minőségi kimutatásra tekintve, hogy igen sokféle anyag van bennük. Történtek ugyan próbálkozások ezen kivonatok kétdimenziós papírkromatográfiájára (3, 4, 5, 6), de a polifenolok közeli  $R_f$  értékei miatt az azonosítás nem bizonyult eléggé megbízhatónak. Ezért a megoszlásos szétválasztási eljárást alkalmaztuk a polifenolok papírkromatográfiás előzetes szétválasztására.

A megoszlásos szétválasztási eljárást külön-külön elvégeztük az éteres és az etilacetátos kivonaton. Az éteres kivonaton alsó fázisként a  $0,5\text{ M} - \text{s pH} = 6,3$  foszfátpuffer oldatot és felső fázisként  $5:1$  arányú éter-etilacetátot használtunk. Az etilacetátos kivonaton az alsó fázis azonos volt az előzővel, a felső fázis pedig  $2:3$  arányú éter-etilacetát volt.

A megoszlásos szétválasztási eljárásnál általában csak egy ún. alapfolyamatot végeztünk el, vagyis a vizsgálendő kivonatot a készülék segítségével 24 alsó és 24 felső fázis között oszlattuk szét.

Ezután a felső fázisokból kis mennyiséget papírkromatografáltunk. Ultraibolya fényben, illetve vanilines oldattal megállapítottuk a foltok helyét. Az azonos  $R_f$  értékű anyagokat tartalmazó felső fázisokat (rendszerint  $2-3$ ) egyesítettük. A hozzájuk tartozó alsó fázisokat szintén egyesítettük, vakuumban besűrítettük, majd ötször  $5-10$  ml friss felső fázissal kiráztuk. Ezeket is egyesítettük, hozzáadtuk az előzőekben egyesített felső fázisokhoz, az egész mennyiséget  $2-3$  ml-re besűrítettük és papírkromatográfiás vizsgálatnak vetettük alá.

#### *A polifenolok papírkromatográfiája*

Tekintve, hogy a megoszlásos szétválasztás után egy-egy besűrített mintában csak egy, legfeljebb két féle anyag van jelen, azonosításuk már különösebb nehézséget nem okoz.

A kromatografáláshoz Whatman 1 papírt használtunk felszálló módszerrel. Az oldószerék közül legelterjedtebben a  $4:1:5$  arányú *n*-butanil-ecetsav-víz oldat és a  $15\%$ -os ecetsav oldat használatos (2, 9, 10). Alkalmazzák még a  $4:1:2$  arányú *n*-butanol-ecetsav-víz oldatot (11), a  $2\%$ -os ecetsav oldatot (3,7) továbbá a nátrium formiát-hangyasav-víz oldatot, ecetsavas NaCl oldatot, izopropilalkohol -  $\text{NH}_4\text{OH}$ -víz (8) oldószert is.

Célszerű a kromatografálást kétféle oldószerral elvégezni, hogy az azonosítás megbízhatóbb legyen. Legmegfelelőbbnek a  $4:1:5$  arányú *n*-butanol-ecetsav-víz és a  $15\%$ -os ecetsav oldószereket találtuk.

A polifenol kromatogramok előhívására igen sokféle módszert dolgoztak ki. Ezek közül ismertetjük a fontosabbakat, amelyeket a gyakorlatban is kipróbáltunk:

1. Az oxifahéjsav származékok ultraibolya fényben ( $365\text{ m}\mu$  maximális transzmisszió) fluoreszkáló, színes foltot adnak. A foltok színe kék, zöld, sárga, ibolya különböző színárnyalatokban és erősségekben. Tekintve, hogy nemcsak a polifenolok mutatják ezt a fluoreszkálást, hanem a vegyületek széles skálája, ezt a módszert megfelelő óvatossággal kell kezelni a polifenolok azonosításánál.

2. A kromatogramokat ultraibolya lámpa alatt  $10\%$ -os ammónia oldattal bepermetezve a foltok egyrészenek megváltozik a színe. Általában a fluoreszkálás erősebb lesz. A következő táblázat néhány fontosabb oxifahéjsav származék színét tünteti fel ultraibolya lámpa alatt ammóniás bepermetezéssel és enélkül.

## POLIFENOLOK SZÍNE ULTRAIBOLYA FÉNYBEN

A vegyület megnevezése	Ultraibolya fényben	Ultraibolya fényben ammóniával bepermetezve
p-kumársav	gyenge kékes-ibolya	kékes-ibolya
ferulasav	kék	kék
kávésav	világoskék	világoskék
klorogénsav	világoskék	zöld
izoklorogénsav	világoskék	sárgászöld

3., 0,1–2%-os vizes  $\text{FeCl}_3$  oldat. A soros trioxivegyületek kék-szürke, az orto dioxivegyületek pirosas-ibolya színű foltot adnak.

4. Ammóniás ezüstnitrát oldat az o-dioxivegyületekkel már hidegen barnás-fekete foltot ad, a p-dioxivegyületek lassabban, a m-dioxi vegyületek pedig csak melegítve reagálnak.

5. A katechinek előhívására legjobban használható a 100 ml 25%-os sósavban 1 g vanillint tartalmazó reagens. A reagenssel bepermetezve a papírkromatogramot a katechinek és leukoanthociánok piros színű foltot adnak.

6. A felsoroltakon kívül a fontosabb reagensek még: diazotált p-nitranilin, diazotált szulfanilsav, Folin-Denis reagens.

A következő táblázat a fontosabb polifenolok  $R_f$  értékeit tünteti fel az általunk használt oldószereknél részben irodalmi adatok (2, 9), részben saját mérések alapján.

2. táblázat

POLIFENOLOK  $R_f$  ÉRTÉKEI

A vegyület megnevezése	4:1:5 n-butanol-ecetsav-víz oldószerezrel	15% ecetsav oldószerezrel
p-kumársav .....	0,90	0,59
ferulasav .....	0,88	0,53
kávésav .....	0,82	0,45
klorogénsav .....	0,66	0,71
izoklorogénsav .....	0,80	0,39
neoklorogénsav .....	0,62	0,71
kinasav .....	0,34	0,80
(+)-katechin .....	0,76	0,58
(-)-epikatechin .....	0,65	0,48
(+)-gallokatechin .....	0,57	0,52
(-)-epigallokatechin .....	0,47	0,41

Kontrollként a futtatásokhoz Merck gyártmányú kinasavat használtunk. Az azonosítás egyszerűsítése céljából a craigezéssel kapott fázisokat hidrolízisnek is alávetettük 2%-os sósavval vízfürdőn 45 percig melegítve, hogy az oxifahéjsav eszterekből megkapjuk a megfelelő oxifahéjsavakat.

Az  $R_f$  értékek meghatározásán kívül szokásos egyéb azonosítási eljárásokat is alkalmazni. Így alkalmazzák az összetétel megállapítást, a fajlagos forgatóképesség meghatározását etanolos, aceton-vizes oldatban, a  $\lambda_{\max}$ , az o. p. meghatározását.

### Vizsgálati eredmények

Az előzőekben vázolt eljárással a következő gyümölcsfélésegek polifenol összetételét vizsgáltuk: sárgabarack, őszibarack, szilva, alma és kökény. Ez utóbbit, bár nem tartozik a gyorsfagyasztott gyümölcsök körébe, azért vizsgáltuk, mert igen nagy a polifenol tartalma, 157 mg/100 g.

A kapott eredményeket a következő táblázat tünteti fel:

3. táblázat

EGYES GYÜMÖLCSFÉLESEGEK BEN AZONOSÍTOTT POLIFENOLOK

A gyümölcsfélése- g megneve- zése	Kloro- génsav	p-kumársav	Ferulasav	Kávésav	(-)-epi- katechin	(+)-kate- chin
Sárgabarack	+	+	+		+	
„ hidrolizátum				+		
Szilva	+					
„ hidrolizátum		+		+		
Őszibarack	+	+				+
Kökény	+	+				+

### I R O D A L O M

- (1) Hecker, E.: Verteilungsverfahren im Laboratorium. Weinheim. 1955.
- (2) Hermann, K.: ZUL 106, 341, 1957.
- (3) Hunter, A. S., Heister, E. G. et al.: Food Research, 22, 648, 1957.
- (4) Mikhailov, M. K.: Acta Chimica, 10, 421, 1957.
- (5) Ibrahim, R. K., Towers G. M.: Archives of Biochemistry and Biophysics, 87, 125, 1960.
- (6) Hillis, W. E., Swain, T.: J. Sci. Food Agric. 10, 533, 1959.
- (7) Roberts, E. A., Myers, M.: J. Sci. Food Agric. 77, 153, 1960.
- (8) Hais, I. M., Maccek M.: Handbuch der Papierchromatografie I. Jena, 1958.
- (9) Hermann, K.: ZUL, 109, 487, 1959.
- (10) Cheng, R., Hanning, F.: Food Research, 20, 506, 1055.
- (11) Hermann, K.: Die Fruchtsaftindustrie, 3, 87, 1960.
- (12) Roux, D. G., Maihs, E. A.: The Biochemical Journal, 74, 44, 1960.

## ПОТЕМНЕНИЕ БЫСТРОЗАМОРОЖЕННЫХ ПЛОДОВ II. КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ

Э. Альмаши и Д. Мольнар

Авторы сообщают метод примененный для качественного определения полифенолов в плодах. Основа метода заключается в том, что после распределительного разделения полифенолы определяют бумажной хроматографией. Для бумажной хроматографии применяют растворы 4 : 1 : 5 н-бутанол-уксусная кислота и 15%-ая уксусная кислота. Сообщают реагенты примененные для появления хроматограмм. Показывают идентифицированные полифенолы некоторых плодов.

## B RÄUNUNG VON SCHNELLGEFRORENEM OBST. II. QUALITATIVER NACHWEIS DER POLYPHENOLE

*E. Almási und D. Molnár*

Die Verfasser beschreiben das zur Identifizierung des Polyphenolgehaltes von Obst angewendete Verfahren. Nach einem Verteilungstrennverfahren wiesen sie die Polyphenole mit papierchromatographischer Methode nach. Zur Papierchromatographie verwendeten sie n-Butanol-Essigsäure-Wasser im Verhältnis von 4 : 1 : 5 und 15%-ige Essigsäure, als Lösungsmittel. Sie beschreiben die zur Entwicklung verwendeten Reagenzien. Sie teilen die identifizierten Polyphenole bei einigen Obstsorten mit.

## BROWNING OF QUICK-FROZEN FRUITS, II. DETECTION OF POLYPHENOLS

*E. Almási and D. Molnár*

A method for the identification of the polyphenol content of fruits is presented by the authors. Namely, polyphenols are detected, after their separation by a partition procedure, with the use of a paper chromatographic method. In this paper chromatographic process, a 4 : 1 : 5 mixture of n-butanol: acetic acid: water and 15% acetic acid served as solvents. The composition of the reagents applied on developing chromatograms is also given. The polyphenols identified in some fruit types are presented.

## BRUNISSEMENT DES FRUITS À CONGÉLATION RAPIDES II. DÉCÈLEMENT QUALITATIF DES POLYPHÉNOLS

*E. Almási et D. Molnár*

Les auteurs donnent la description du procédé employé par eux pour l'identification des polyphénols contenus dans les fruits. Ils ont décélé les polyphénols par chromatographie sur papier après les avoir soumis à un procédé de fragmentation. Pour la chromatographie ils ont employé les solvants suivants: n-butanol-acide acétique-eau 4 : 1 : 5 et acide acétique à 15%. Ils énumèrent aussi les réactifs employés pour le développement des chromatogrammes. Ils donnent la liste des polyphénols identifiés pour quelques espèces de fruit.