

Néhány klorogénsav meghatározási módszer kritikai tanulmányozása

S ZILASNÉ KELEMEN MAGDA és BARÁTH ÁGNES

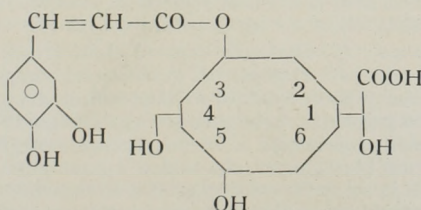
Budapesti Műszaki Egyetem Élelmiszerkémia Tanszék

Érkezett: 1973. március 16.

Az életszínvonal emelkedésével párhuzamosan növekszik az ember élvezeti szerek iránti igénye. Az élvezeti szerek közül legnagyobb mértékben a kávéital fogyasztása terjedt el, és napjainkban is egyre növekvő tendenciát mutat (1,2). A kávé iránti igény azonban nemcsak mennyiségben, hanem minőségben is változott. Ez ösztönözte a kutatókat a kávé összetételére vonatkozó új vizsgálati módszerek kidolgozására és fejlesztésére.

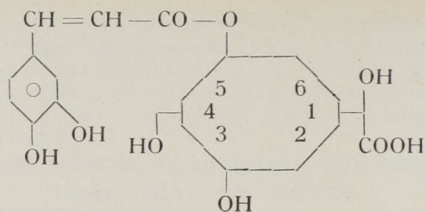
A kávé fontos hatóanyagai közé tartozik a koffein és az élettani hatások újabb kutatásainak eredményei alapján a klorogénsav. Míg a koffein – normális fogyasztás mellett – általában élénkítő, frissítő hatást fejt ki, a klorogénsav érzékenyebb embereknél gyomor és egyéb panaszokat idézhet elő, gátolhatja a pepszin és tripszin működését.

Fischer az aromás oxisavak egymással alkotott észtereit depszideknek nevezte. Ilyen vegyület a kávéban előforduló klorogénsav is.

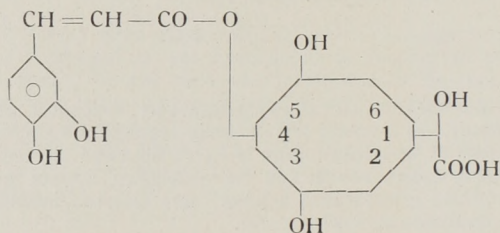


Klorogénsav (3-kafeil-kinasav)

Az észterkötés a kávésav (3,4-dihidroxi-fahéjsav) karboxil csoportja és a kinasav (1,3,4,5-tetrahidroxi ciklohexánkarbonsav) hármasszénatomján levő hidroxil csoportja között jön létre. Vízben és alkoholban jól oldódik, éterben, kloroformban és széntetrakloridban oldhatatlan. Levegő oxigénjének hatására ammónia jelenlétében zöld színű vegyületté, viridinsavvá alakul, savas kémhatású. A klorogénsav több izomerjét (Barnes, Feldman, White (3), Corse (4), Sondheimer (5)) csak az utóbbi időben fedezték fel.



Neoklorogénsav (5-kafeil-kinasav)



„Compound 510” (4-kafeil-kinasav)

Az izoklorogénsav tulajdonképpen öt vegyület keveréke, közülük hármát dikafeilkinasavként azonosítottak (3,4; 3,5 és 4,5 dikafeil-kinasav).

Pictet és *Brandenberger* (6) a kávéban a klorogénsavon kívül, ahhoz nagyon hasonló vegyületeket mutattak ki, mint például a 3-feruloil-kinasavat és a p-kumaroil-kinasavat. Klorogénsav izomerként megemlíthető még a cinarin is (-kinasav 1,4 dikávéészter-), amelyet *Panizzi* és *Scarpati* nem kávéban, hanem articsókában fedeztek fel; ez a vegyület kávéban nem fordul elő (7).

Czok (2) és *Ginader* (8) állatokon végzett kísérleteinek eredményeiből megállapították, hogy növekvő klorogénsav koncentráció nagyobb mértékben akadályozza a béltevékenységet. *Raff* (9) a lélegzésre és a vérkeringésre gyakorolt hatást vizsgálta: klorogénsav befecskendezéskor szaporábbá vált a légzés, a vérnyomás és a pulzus frekvencia csökkent. Ezeket a megfigyeléseket savhatásnak tekintette, mivel klorogénsav oldatokkal azonos pH értékű tejsav oldatok befecskendezésével is hasonló vérkeringési változásokat észlelt, ugyanakkor neutrális Na-klorogénát adagolása nem gyakorolt észrevehető befolyást a vérkeringésre.

Booth, *Emerson*, *Jones* és *De Eds* (10) megállapították, hogy a klorogénsav az ember szervezetében alkotórészeire – kávésavra és kinasavra – bomlik. A kinasavból aromásodás közben eddig még nem azonosított pirokatechin származék keletkezik, míg a kávésav egész sor biokémiai változáson megy keresztül. Egymás mellett és egymás után zajlik le a melléklánc β -oxidációja és dehidrálása, a fenolos hidroxil csoportok metilezése, demetilezése, dehidroxilezés, végül kondenzáció glicinnel és glükuronsavval. A dehidroxilező reakciókban a bélmikroorganizmusok is részt vesznek.

Fentiek indokolták a klorogénsav meghatározására kidolgozott módszerek beható irodalmi áttekintését; az egyes eljárások pontosságára, eszköz- időigé-

nyére vonatkozó felmérés és néhány eljárás összehasonlító vizsgálat elvégzését. Az összehasonlító mérésekkel, azok matematikai-statisztikai értékelésével a gyakorlat számára jól használható klorogénsav-meghatározási módszert kívántunk az ipari laboratóriumok rendelkezésére bocsátani.

A tanulmányozott meghatározási módok általában a klorogénsav következő tulajdonságainak valamelyikén alapszanak: az ólomklorogenát oldhatatlanságán, fenol vagy sav jellegén, oxidálhatóságán, az UV spektrumban történő jellegzetes abszorpción.

Hoepfner (11) módszere azon alapszik, hogy a klorogénsav vagy más ortodifenol típusú vegyület ecetsavas oldatához NaNO_2 -et adva sárga elszíneződés következik be. NaOH hatására piros színreakció játszódik le. A reakció kemizmusát még nem derítették fel. A szín intenzitása és stabilitása nagymértékben függ a kísérleti körülményektől (12), a hőmérséklettől, valamint attól, hogy a színreakció lejátszódása után mennyi idővel végzik a mérést. Pörkölt kávé modell alkalmazásánál egyes szerzők erősen kétségbe vonják a Hoepfner reakció specifitását (13).

Plücker és *Keilholz* (14) a klorogénsavat a kávéből forró vízzel extrahálták ki. Nátriumacetát, NaNO_2 és NaOH hozzáadásával létre hozták a színreakciót, és a színes oldat extinkcióját Pulfrich fotométeren mérték. Meghatározásuk ipari gyors módszerként alkalmazható.

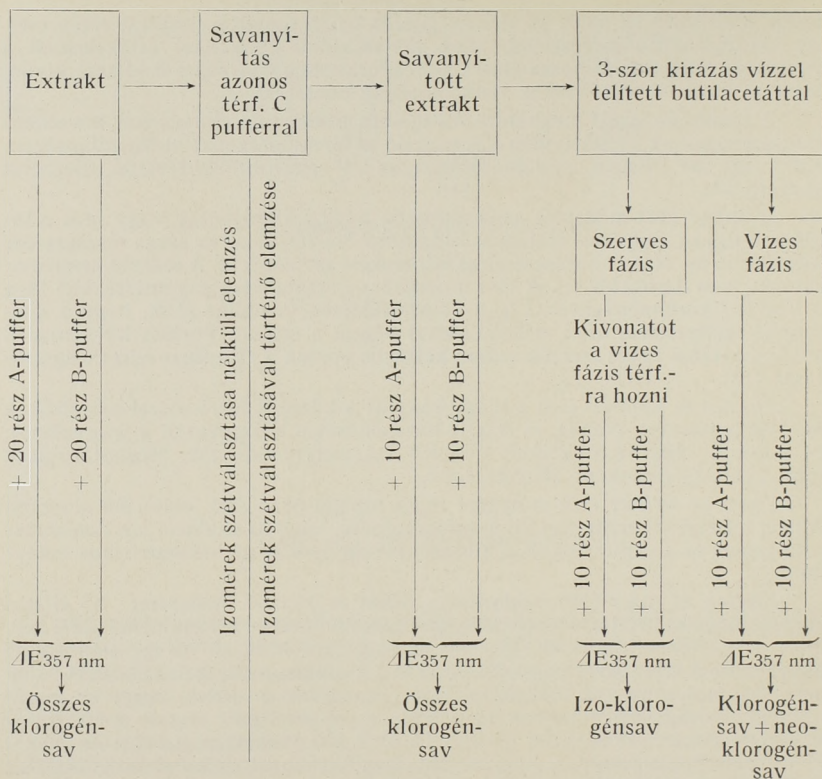
Slotta és *Neisser* (15) módszere lúgos hipojodittal való oxidáción alapszik. A nem kielégítő specifitáson kívül kifogásolható, hogy az oxidáció mechanizmusa nem ismert és a jódfogyasztás a klorogénsavval nem áll sztöchiometrikus arányban.

Hadorn és *Suter* (16) módosította *Slotta* és *Neisser* módszerét. Az eljárás lényege, hogy az őrölt kávé első lépésben zsírtalanítani és koffeinmentesíteni kell, amit petroléteres, illetve kloroformos extrakcióval értek el. Az így előkészített kávéból forró vizes extrahálással vonták ki a klorogénsavat, melyet telített ólomacetáttal lecsaptak. Az ólomklorogenát csapadékot megfelelő mértékű mosás után kénhidrogénnel elbontották, a kávésav eltávolítását éteres extrakcióval végezték. Az extrakció után a vizes fázisból jodometriásan határozták meg a klorogénsavat oly módon, hogy az oldathoz fölös mennyiségű jódot adtak és a jódfölösleget nátriumtioszulfáttal titrálták vissza.

Moores, Mc. Dermott és *Wood* (17) spektrofotometriás módszert dolgoztak ki. A klorogénsavnak ólomsóként történő kicsapása előtt és után mérték az oldat UV abszorpcióját. A meghatározás viszonylag gyors és pontos, az AOAC előírásában is szerepel, bár bizonyos hátrányok – főleg a specifitásra vonatkozólag – ennél az eljárásnál is vannak. Amikor *Moores* és munkatársai fenti eljárásukat közzétették, a klorogénsav izomerjei még nem voltak ismertek. Ezért szükségessé vált olyan specifikus módszer kidolgozása, amely az izomer klorogénsavak egymás melletti és egyidejű meghatározását is lehetővé tette.

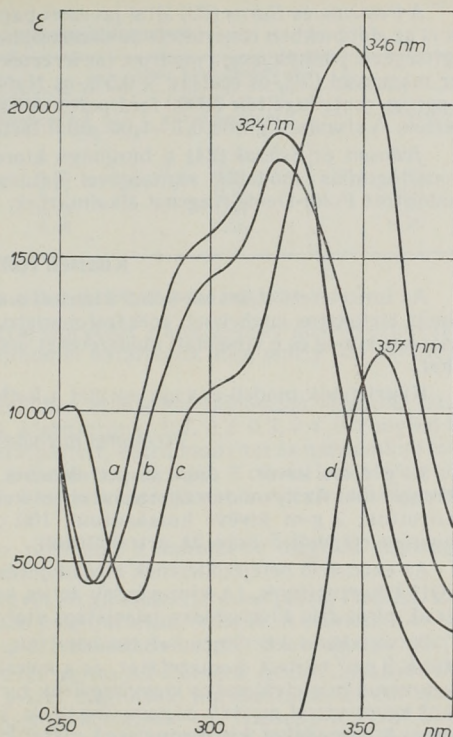
E problémával *Haussermann* és *Brandenberger* (18) foglalkozott. Az általuk kidolgozott módszer egyrészt a klorogénsavak bórsavval való kelátképzésén, másrészt a vizes és szerves fázis közötti megoszláson alapszik. A megoszlási hányadosok különbözőségéből fakadóan sikerült az izoklorogénsavat elválasztani a klorogén és neoklorogénsavtól.

Módszerüket a következő séma szemlélteti:



(Az „A, B, C” puffer részletes leírását a klorogén-sav-bórsav komplex képződésén alapuló módszernél ismertetjük.)

Swain és Jurd (19,20) megállapították, hogy a kelátképződést batokróim abszorpciós eltolódás kíséri. A klorogén-sav-bórsav komplex pH = 5,5 fölött állandó. Calzolari (21) vizsgálta, hogyan alakul a klorogén-sav abszorpciós maximuma különböző pH-kon. Kísérleteit bórsavas pufferoldatokkal végezte, és így tulajdonképpen a kelátképződést figyelte meg. A bórsavas kelátképződés okozta eltolódást az 1. ábrán ismertetjük. A klorogén-sav oldatot pH = 7 foszfátpufferral elegyítve, felvették az abszorpciós spektrumot, a maximum 324 nm-nél adódott. A mérést pH = 7 bórsavas foszfátpufferral kezelt klorogén-savval is elvégezték, ebben az esetben az abszorpciós maximum 346 nm volt. A két görbe különbségként felrajzolták az ún. differencia spektrumot, amely 357 nm-nél mutatott maximumot. A maximum intenzitása a klorogén-sav koncentráció mértéke. A klorogén-sav izomerek szétválasztása a megoszlási hányadosaik különbözősége alapján lehetséges. A három izomer (klorogén-sav, izo- és neoklorogén-sav) hígított vizes oldatát pH = 4,35 foszfátpufferral kezelve, majd vízzel telített butilacetáttal kirázva, az izoklorogén-sav elválasztható, tekintettel arra, hogy az a szerves



7. ábra. A klorogénsav-bórsav komplex képződését kísérő abszorpciós eltolódás. A klorogénsav a vizes oldatának abszorpciós spektruma (a)- Foszfát pufferban pH = 7 (b), bórsav foszfát pufferben pH = 7 (c), differenciaspektrum (a - b = d)

fázisba megy át, míg a klorogénsav és neoklorogénsav a vizes fázisban marad. A klorogénsav és neoklorogénsav elválasztása már nehezebb feladat, csak ellenáramú megoszlás elvén különíthetők el egymástól.

Erkama és Kauppi (22) papírkromatográfiás meghatározást dolgoztak ki. Az extrakcióhoz 70%-os izo-propilalkoholt alkalmaztak, a felcseppentést Whatmann No. 1 papíron végezték, futtatóként n-butanol: ecetsav: víz = 4:1:5 arányú elegyét használták. A futtatás 26 órát vett igénybe. Módszerüknél az előhívás a Hoefner-féle színreakción alapszik. Klorogénsavra ez a reakció nem specifikus, mert más fenolos vegyületek is adják, ennek ellenére, ha az analizálandó oldat nem tartalmaz túl sok zavaró komponenst, alkalmas lehet klorogénsav meghatározására és a kávésav elválasztására. A klorogénsav R_f értékét 0,5-nek, a kávésavét 0,8-nak találták. Véleményük szerint e módszerrel kvantitatív meghatározás is lehetséges. Azonos körülmények között két kromatogramot készítettek és csak az egyiket hívták elő Hoefner reagenssel, ennek alapján bejelölték a másik kromatogramon a foltokat, melyeket kivágás után 70%-os izo-propanollal eluálták. Az így nyert oldat spektrofotométeres mérését 327 nm-en végezték. (0,0004% és 0,016% közötti koncentráció tartományban érvényes a Lambert-Beer törvény, tehát a klorogénsav mennyiségi meghatározása ebben az intervallumban végezhető el).

A *Pomenta és Burns* (23) által javasolt papírkromatográfiás eljárás annyiban tér el az előbbieken ismertetett módszertől, hogy a klorogénsav foltot UV lámpa segítségével jelölték meg a papíron, (az R_f érték 0,60). A folt kivágása után Hoepfner reagenssel (5%-os ecetsav + 0,5%-os NaNO_2 1 : 1 arányban) összerázták és 4 percig centrifugálták (2000 ford/perc). A kapott oldat extinkcióját 520 nm-en mérték. A standard görbe 0,1 – 1,00 μmol tartományban lineáris.

Johnson és Schaal (24) a burgonya klorogénsav tartalmát szintén papírkromatográfiás módszer segítségével határozták meg, azonban előhívóként módosított Folin-Denis reagenst alkalmaztak.

Kísérleti rész

Az ismertetett eljárások közül kísérleti munkákban a kávé klorogénsav tartalmát térfogatossal analizissal, spektrofotometriás és kromatográfiás eljárásokkal határoztuk meg és e vizsgálati módszereket összehasonlítva végeztük el értékelésüket.

Kísérleteink modell-anyaga normál a koffeinmentesített robusta kávé volt.

Térfogatoss meghatározás

10 g őrölt kávé 5 órán át petroléterrel, majd 10 órán át kloroformmal extraháltunk. Az ily módon zsírtalanított és koffeinmentesített anyagot 70 °C-on szárítottuk, 2 g-ot kivéve hozzáadtunk 100 cm³ forró vizet és a klorogénsav kinyerése céljából 5 órán át extraháltunk.

Az extrakció befejeződésének megállapítására Hoepfner reagenst és 10%-os NaOH-t használtunk. (A klorogénsav teljes kivonása esetén az oldat szintelen marad, piros szín klorogénsav jelenlétére utal.)

Az extraktot kb. 50 cm³-re besűrítettük, centrifugacsöbe öntöttük, hozzáadtunk 2 cm³ telített ólomacetátot, és a keletkezett csapadékot centrifugáltuk. A szupernatánt elválasztva megvizsgáltuk tartalmaz-e klorogénsavat. A csapadékot kevés vízzel mostuk és centrifugáltuk. Ezt a műveletet kétszer megismélteltük. A csapadékot kis mennyiségű vízzel kónikus kémcsöbe vittük, forgásig melegítettük, fél órán át erős kénhidrogén áramot vezettünk keresztül. A kénhidrogén felesleget forralással kiűztük, a még meleg szuszpenziót 100 ml-es mérőlombikba vittük, jelig töltöttük és redős szűrőn szűrtük.

Az így ólommentesített oldatból a kávésavat távolítottuk el: 50 cm³-t (1 g eredeti mintának felel meg) peroxidmentes desztillált éterrel 5 órát extraháltuk. A vizes réteget elválasztottuk és a maradék éter eltávolítására vízfürdön melegítettük.

Az étermentesített vizes fázist 100 cm³-re töltöttük és 50 cm³-éből a következő módon jodometriásan határoztuk meg a klorogénsavat. Az 50 cm³ vizsgálandó oldathoz 25 cm³ 0,05 n jódoldatot, valamint 30 csepp 2 n NaOH-t adtunk, óraüveggel lefedve, sötétben 1 órát állni hagytuk. Ezután 2,5 cm³ 2 n kénsavval megsavanyítottuk és a jódfesleget keményítő jelenlétében 0,05 n nátriumtioszulfáttal visszatitáltuk.

1 cm³ jódoldat 1,77 mg klorogénsavnak felel meg (1. táblázat).

Spektrofotometriás meghatározások

A klorogénsavnak nyers kávéból történő meghatározására három spektrofotometriás módszert hasonlítottunk össze. E módszerek a klorogénsav különböző tulajdonságait használják fel a mérés céljára, közös vonásuk, hogy a kinyerés minden esetben forró vízzel történik.

Kávé klorogénsav tartalma

Kávéminta	Össz klorogénsav %		
	Térfogatós módszerrel	NaNO ₂ -es színreakcióval	AOAC módszerrel
ROBUSTA nyers	6,82	5,76	8,41
	6,55	6,01	8,44
	6,91	6,12	8,28
	6,13	5,94	8,34
	6,46	5,88	8,20

Nátriumnitrites színreakción alapuló módszer

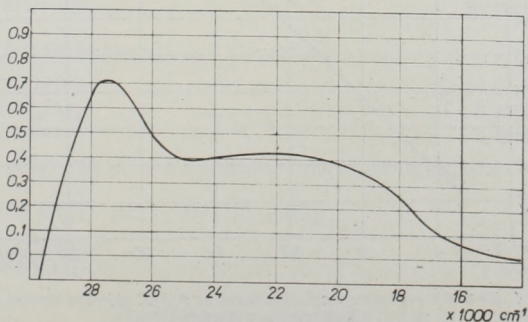
Kalibrációs görbe készítése: Első lépésként a klorogénsav nitrites színreakciójának megfelelő abszorpciós maximumot határoztuk meg, amely 365 nm hullámhosszon adódott (2. ábra).

Az extinkciómérést a továbbiakban ezen a hullámhosszon végeztük. Ezután p. a. klorogénsavból hígítási sort készítettünk: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mg/ml koncentrációkkal. Az oldatokhoz acetátpuffert, nátriumnitritet és nátriumhidroxidot adtunk. A pirosra színeződött oldatok extinkcióját 1 cm-es kvarcküvetében 365 nm-en mértük, az extinkcióértékeket a klorogénsav koncentráció függvényében ábrázoltuk (3. ábra).

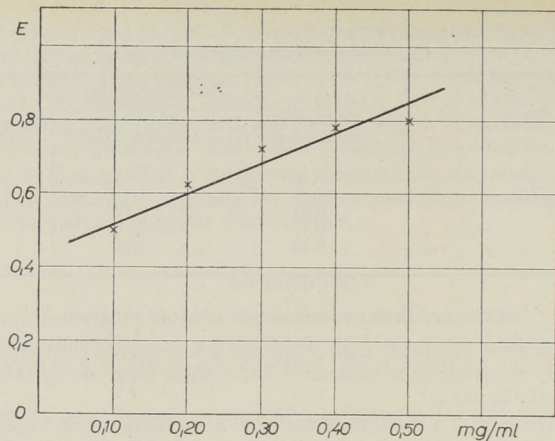
A kávékivonat klorogénsav tartalmát a kalibrációs diagram segítségével számoltuk ki (1. táblázat).

Kivonás: 5 g finomra őrölt kávét 80 ml vízzel harminc percig főztünk. Lehűtés után 100 cm³-es mérőlombikban jelig töltöttük, szűrtük. A szűrletből 10 cm³-t 100 cm³-re hígítottunk, az így kapott törzsoldatból végeztük a meghatározást.

Színreakció és spektrofotométeres mérés: Az előbbieket szerint készített törzsoldat 2 cm³-ét 8 cm³ desztillált vízzel hígítottuk, hozzáadtunk 0,3 cm³ acetátpuffert (10 cm³ jégcet + 30 g nátriumacetát 100 cm³ vízben), 0,3 cm³ 40%-os nátriumnitritet és 0,3 cm³ 10%-os nátriumhidroxidot. A reagensek hatására az oldat pirosra színeződött, amelynek az extinkcióját 1 cm-es küvetében 365 nm-en mértük. Összehasonlító oldatként a kávékivonat 2 cm³-ének 8,9 cm³ deszt. vizes hígítását használtuk.



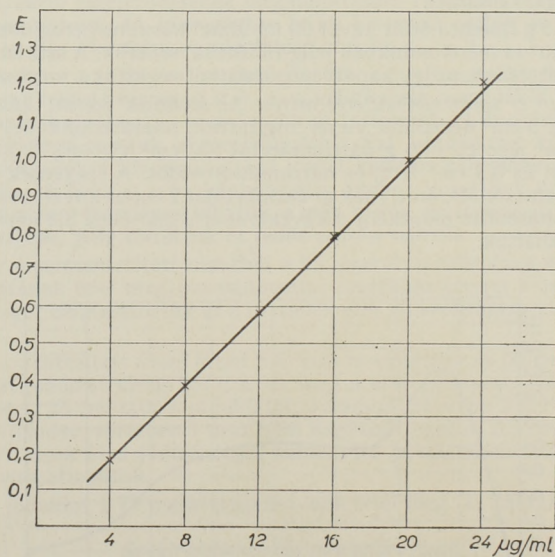
2. ábra. Klorogénsav oldat abszorpciós spektruma NaNO₂-es színreakció esetén



3. ábra. Kalibrációs diagram a klorogénsavnak NaNO_2 -es színreakcióval történő meghatározásához

Regressziós egyenes egyenlete: $y = 0,479 + 0,306x$

Korrelációs koefficiens: $r = 0,84$



4. ábra. Klorogénsav meghatározása az AOAC előírása szerint.

Kalibrációs diagram

Regressziós egyenes egyenlete: $y = -0,024 + 0,051x$

Korrelációs koefficiens: $r = 0,99$

AOAC módszer: Az őrölt és szitált kávé 1 g-ját 50 cm³-es centrifugacsőbe vittük, 25 cm³ petrolétert (fp. 30–50 C°) adtunk hozzá, összekeverés után centrifugáltuk, majd a petrolétert leöntöttük. Fenti műveletet kétszer megismételtük. A petroléter maradékot levegőáramban távolítottuk el. Az így zsírtalanított kávé két kevés vízzel 500 cm³-es Erlenmeyer lombikba vittük, hozzáadtunk kb. 400 cm³ deszt. vizet és tizenöt percig enyhén forraltuk. Lehűtés után 500 cm³-es mérőlombikban jelig töltöttük, majd szűrtük, a szűrlet első 25–50 cm³-ét elöntöttük. Abban az esetben, amikor a szűrlet zavaros volt, a szűrést zsgorított üvegszűrőn végeztük (szűrési segédanyagok nem használhatók).

A szűrlet 10 cm³-ét 100 cm³-re hígítottuk és az extinkciót 1 cm-es kvarcküvetében vízzel szemben 324 nm-en mértük.

Kalibrációs diagram készítése

40 mg p. a. klorogénsavat deszt. vízben feloldottunk, mérőlombikban 500 cm³-re töltöttünk. A kapott oldatból 5, 10, 15, 20, 25, 30 cm³-t 100 cm³-re hígítottunk, az extinkciókat 1 cm-es kvarcküvetében vízzel szemben 324 nm-en mértük. A mért extinkcióértékeket a klorogénsav koncentráció függvényében ábrázoltuk (4. ábra).

A kávékivonat mért extinkciójából a kalibrációs diagram segítségével számítottuk a vizsgált kávé klorogénsav tartalmát (1. táblázat).

Klorogénsav-bórsav komplex képződésén alapuló módszer

A vizsgálandó nyers kávé megőröltük, 0,4 mm-es szitán átszitáltuk. Az így előkészített mintából 2,5 g-ot 0,0001 g pontossággal lemértünk, maradék nélkül 500 cm³-es Erlenmeyer lombikba vittük, hozzáadtunk 450 cm³ forró vizet, és öt percig vízfürdőn melegítettük. Lehűtés után térfogatát 500 cm³-re egészítettük ki, összeráztuk, redős szűrőn szűrtük. A szűrlet első 100 cm³-ét elöntöttük, a meghatározást a maradékból végeztük.

Alkalmazott oldatok:

Foszfát puffer pH = 7 (A puffer)

1 m Na ₂ HPO ₄	17 térfogat
1 m KH ₂ PO ₄	8 térfogat
desztillált víz	25 térfogat

Bórsavas foszfát puffer pH = 7 (B puffer)

1 m Na ₂ HPO ₄	17 térfogat
1 m KH ₂ PO ₄	8 térfogat
1 m bórsav	25 térfogat

A bórsav oldat pH = 7-re beállítandó nátriumhidroxiddal.

Mc. Ilwaine puffer pH = 4,35 (C puffer)

0,1 m citromsav	4 térfogat
0,2 m Na ₂ HPO ₄	3 térfogat

Összklorogénsav meghatározása

1–1 cm³ kávékivonatot A, illetve B pufferoldattal 20 cm³-re hígítottunk, és az extinkciókülönbségeket (ΔE -t) 1 cm-es kvarcküvetében 357 nm-en mértük.

Klorogénsav és neoklorogénsav együttes meghatározása

25 cm³ kávékivonatot 25 cm³ C puferral elegyítettünk és háromszor 10–10 cm³ vízzel telített butilacetáttal kiráztuk. A vizes és szerves fázis szétválása után a vizes fázist elkülönítettük. 2–2 cm-t kipipettázva 20 cm³-re hígítottuk A, illetve B pufferral, majd az extinkciókülönbséget 357 nm-en mértük.

Izoklorogénsav-tartalom = összklorogénsav – (klorogénsav + neoklorogénsav)

A nyers kávé szárazanyagtartalmára vonatkoztatott klorogénsav mennyiséget a következő képletek segítségével számítottuk:

$$\text{Súly \%} = f \frac{E \cdot M (V - sP)}{\varepsilon \cdot 1000 \cdot P} \cdot 100$$

f = hígítási faktor = 20

E = mért extinkciókülönbség

M = klorogénsav mólsúlya = 354,3

V = szűrlettérfogat cm³-ben

P = bemért minta súlya g-ban

s = fajlagos térfogat cm³(g) s = 0 teljesen oldódó anyagnál,

s = 1 részben oldódó anyagnál

ε = moláris extinkciós differencia = 11840

Előző képletből az állandókat összevonva az alábbi összefüggést kapjuk:

$$\text{Súly \%} = \frac{0,05985 \cdot E (V - sP)}{P}$$

E módszerrel kapott eredményeket a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat

A vizsgált kávéminták klorogénsav tartalma (klorogénsav-bórsav komplex képződésén alapuló módszerrel)

Kávéminták	Klorogénsav + neoklorogénsav %	Izoklorogénsav %	Össz klorogén- sav %	$M = \bar{x} \pm S_{mt}$
ROBUSTA nyers	5,24	1,81	7,05	6,92 ± 0,272
	5,03	1,63	6,66	
	5,18	1,74	6,92	
	5,12	1,80	6,92	
	5,26	1,79	7,05	
ROBUSTA koffein- mentesített	5,39	1,95	7,34	7,45 ± 0,106
	5,67	1,89	7,56	
	5,39	2,01	7,40	
	5,56	1,99	7,55	
	5,49	1,93	7,42	

Papírkromatográfiás és vékonyréteggromatográfiás meghatározások

Őrölt, nyers kávé 5 g-ját Erlenmeyer lombikba téve összekevertük 80 cm³ 70%-os izo-propilalkohollal és három óra hosszat rázógépen tartottuk. Rázatás után redős szűrőn szűrtük, a szűrőn maradt kávéőrleányt kétszer átmostuk

5–5 cm³ 70%-os izo-propilalkohollal. Az összegyűjtött szűrletek térfogatát 100 cm³-re egészítettük ki.

Az így kapott i-propanolos kávékivonatból 20 μl-t, valamint az 1 mg/cm³ koncentrációjú standard klorogénsav oldatból 30 μl-t vittünk fel Whatman No 1 papírra. Futtatószerként n-butanol: ecetsav: víz = 4:1:5 arányú elegyét használtuk.

Futtatási idő: 18–24 óra.

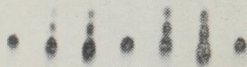
Futtatás után a papírt meleg levegővel megszáritottuk. A klorogénsav két módszerrel tehető láthatóvá. Egyrészt UV lámpa alatt a foltok fluoreszkálnak, másrészt sárgára színeződnek 1%-os NaNO₂ és 10%-os ecetsav 1:1 arányú elegyének a papírra porlasztásával.

Az előbb leírt módszer módosításával papír helyett vékonyrétegen végeztük a futtatást. Az alkalmazott vékonyréteg POLYGRAM SIL G volt, melyet konstans rétegvastagsága (0,25 mm) miatt választottunk vizsgálatainkhoz.

Ugyanazt a kávékivonatot, standard klorogénsavat és futtatószer alkalmaztuk mint papír esetében, a futtatási idő azonban 3 órára rövidült, mellyel nagymértékben sikerült csökkenteni a meghatározás időigényét.

A futtató befektével a vékonyréteget meleg levegővel megszáritottuk és a foltokat Hoepfner reagenssel hívtuk elő. A klorogénsav foltok sárgásbarna színnel jelentek meg (5. ábra).

A vékonyrétegen a standard klorogénsav R_f értékét 0,55-nek, a kávékivonatból kapott klorogénsav R_f értékét 0,54-nek találtuk.



5. ábra. Klorogénsav meghatározása vékonyrétegekromatográfián 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.

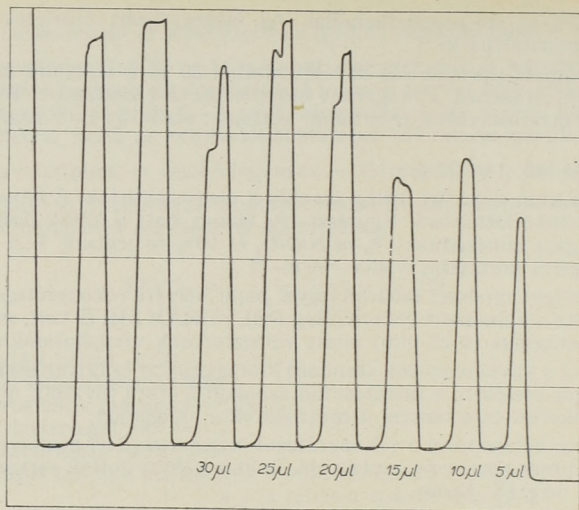
1. Standard klorogénsav oldat 10 μl
2. I-propanolos kivonat nyers kávéból 10 μl
3. I-propanolos kivonat nyers kávéból 20 μl
4. Standard klorogénsav oldat 10 μl
5. I-propanolos kivonat koffeinmentes kávéból 10 μl
6. I-propanolos kivonat koffeinmentes kávéból 20 μl
7. Standard klorogénsav oldat 10 μl

Futtatószer: n-butanol: ecetsav: víz = 4:1:5
Futtatási idő: 3 óra

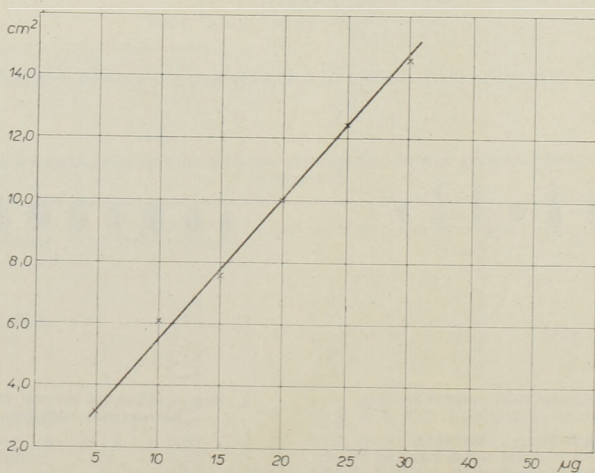
Előhívó: 1%-os NaNO₂ + 10%-os ecetsav
1:1 arányban.

6. ábra. Kalibrációs sorozat standard klorogénsav oldatból

- | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. |
| 1. | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 40 |
| | | | | | | | 50 |
- μl



7. ábra. A kalibrációs sorozat denzitométrés értékelése



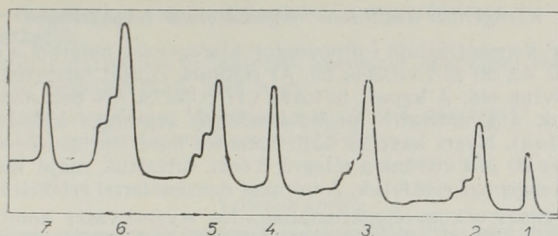
8. ábra. A denzitóméterrel kiértékelt sorozatból felvett kalibrációs diagram

Regressziós egyenes egyenlete:

$$y = 0,99 + 0,45 \times$$

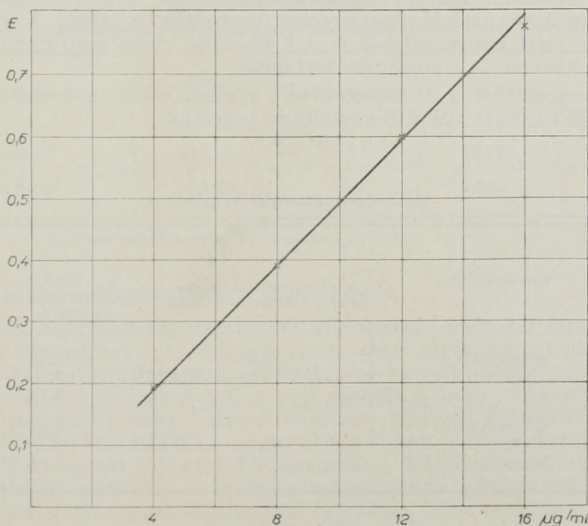
Korrelációs koefficiens:

$$r = 0,92$$



9. ábra. Klorogénsav kvantitatív meghatározása vékonyrétegekromatográfiásan, denzitométeres értékeléssel

1. Standard klorogénsav oldat	10 μ l
2. i-propanolos kivonat nyers kávéból	10 μ l
3. i-propanolos kivonat nyers kávéból	20 μ l
4. Standard klorogénsav oldat	10 μ l
5. i-propanolos kivonat koffeinn.entes kávéból	10 μ l
6. i-propanolos kivonat koffeinn.entes kávéból	20 μ l
7. Standard klorogénsav oldat	10 μ l



10. ábra. Klorogénsav meghatározása vékonyrétegekromatográfiás-spektrométeres módszerrel. Kalibrációs diagram

Regressziós egyenes egyenlete:

$$y = 0,001 + 0,049 x$$

Korrelációs koeficiens:

$$r = 0,99$$

Klorogénsav kvantitatív meghatározása vékonyrétegen

1 mg/cm³ koncentrációjú i-propanolos klorogénsav oldatból a rétegre 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 µl-t vittünk fel. Az előbbieket szerint futtattuk és Hoepfner reagenssel hívtuk elő. A kapott foltokat CHROMOSCAN denzitométerrel értékelve, kaptuk a kvantitatív meghatározáshoz szükséges kalibrációs görbét. (6, 7 és 8. ábra). Nyers kávé és koffeinmentes kávé i-propanolos kivonatából 10 µl-t, illetve 20 µl-t vittünk a rétegre, 3 órát futtattuk, majd megszáritottuk és Hoepfner reagenssel előhívtuk. A foltokat denziméterrel értékeltük (9 ábra).

A klorogénsav vékonyrétegekromatográfiás elválasztását kombinálva spektrofotométeres méréssel, mennyiségi meghatározást is végeztünk. 0,25 mm vastagságú Kieselgel G rétegre 30 µl 1 mg/cm³ koncentrációjú standard klorogénsav oldatot és 100 µl i-propanolos kávékivonatot vittünk fel. Futtatókeverék: N-butanol : ecetsav : víz = 4 : 1 : 5. Futtatási idő: 3 óra. Futtatás után a réteget meleg levegővel megszáritottuk, UV lámpa alatt megjelöltük a foltok körvonalait és lekapartuk a lemezről, majd 10 cm³ 70%-os i-propanollal eluáltuk. A szilikagél G4-es üvegszűrőn elválasztottuk és az eluátum extinkcióját 1 cm-es kvarcküvetében 327 nm-en mértük. A réteg más helyéről a klorogénsavval azonos nagyságú foltot is lekapartuk és az előbbieket szerint kezeltük. Ilyen módon meghatároztuk a szilikagél vak értékét, amely 0,05-nek adódott.

Kalibrációs diagram készítése: 4, 8, 12, 16 µg/ml koncentrációban p. a. klorogénsavat 70%-os i-propanolban oldottunk és 1 cm-es kvarcküvetében 70%-os i-propanollal szemben mértük az extinkcióját. A mért extinkcióértékeket a klorogénsav koncentráció függvényében ábrázoltuk (10. ábra). A rétegről eluált klorogénsav mért extinkciójából – a kalibrációs görbe segítségével – számítottuk ki a kávé minta klorogénsav tartalmát.

Eredményeinket a 3. táblázatban foglaltuk össze. A spektrofotométeres méréseket SPECORD UV VIS készüléken végeztük.

3. táblázat

Kávéminták klorogénsav tartalma

Kávéminták	Klorogénsav %	
	VRK-s meghatározás denzitométeres értékelés	VRK-s spektrofotometriás meghatározás
ROBUSTA nyers	3,91	3,65
	3,65	4,13
		3,84
ROBUSTA koffein- mentesített	5,76	4,85
	5,12	5,10
		5,41

Összefoglaló értékelés

Az összehasonlított térfogatos, spektrofotometriás és kromatográfiás eljárások közül a klorogénsavra specifikus két spektrofotometriás módszert (AOAC és klorogénsav-bórsav komplex) találtuk a legmegfelelőbbnek.

Mindkét módszernél mérési eredményeink megegyeztek az irodalmi adatokkal.

Eszköz- és időigény, valamint kivitelezési megoldásukat illetően közel azonosnak tekinthetők.

Matematikai-statisztikai értékeléssel, variancia analízissel való összehasonlításuk alapján megállapítható volt, hogy

- közöttük szignifikáns különbség van (4. és 5. táblázat),
- az AOAC módszeren belül a szórás kisebb.

4. táblázat

Variancia analízis

(Klorogénsav meghatározási módszerek összehasonlítása nyers kávé vizsgálatánál)

Variancia forrás	Eltérés négyzet	Szabadsági fok	S ²	F
Csoportok között	5,302	1	5,302	
Csoportokon belül	5,53	8	0,691	7,672*

* $\alpha = 0,05$ -nél a módszerek között szignifikáns különbség van.

5. táblázat

Variancia analízis

(Klorogénsav meghatározási módszerek összehasonlítása koffeinmentes kávé vizsgálatánál)

Variancia forrás	Eltérés négyzet	Szabadsági fok	S ²	F
Csoportok között	16,129	1	16,129	
Csoportokon belül	16,159	8	2,019	7,988*

* $\alpha = 0,05$ -nél a módszerek között szignifikáns különbség van.

- az AOAC módszeren belül a szórás kisebb.

Az AOAC eljárásnál kapott nagyobb klorogénsav értékeket azzal magyarázunk, hogy a klorogénsavon kívül egyéb polifenolos vegyületek is kioldódtak.

A papírkromatográfiás eljárás általunk végrehajtott módosításával (vékonyréteg) az eredetileg 26 órás futtatási időt sikerült 3 órára csökkentenünk, ezen túlmenően jobban definiált foltokat kaptunk, amelyek CHROMOSCAN VÉKONYRÉTEGÉRTÉKELŐVEL pontosabban voltak értékelhetők. A vékonyrétegértékelővel kapott kalibrációs diagramnál – amint az a korrelációsoefficiensek értékéből is kitűnik – az egyes mérési pontok szórása nagyobb mint a spektrofotométerrel felvett kalibrációs görbénél.

I R O D A L O M

- (1) Szilasné, K. M. (1964): Műszaki doktori értekezés. Budapest.
- (2) Czok, G. (1966): Untersuchungen über die Wirkung von Kaffee. Darmstadt.
- (3) Barnes, H. M., Feldman, J. R., White, W. V.: J. Amer. Chem. Soc. 72, 4178, 1950.
- (4) Corse, I. W.: Nature (London) 172, 771, 1953.
- (5) Sondheimer, E.: Arch. Biochem. Biophys. 74, 131, 1958.
- (6) Pictet, G., Brandenberger, H.: Chromatog., 4., 396, 1960.

- (7) Panizzi, L., Scarpati, M. L.: Gazz. chim. ital. 84, 792, 1954.
- (8) Ginader, G. Z.: Z. U. L. 73, 109, 1937.
- (9) Raff, W.: Die Wirkung von Chlorogensäure, chlorogensäurem Natrium und Coffein auf Kreislauf und Atmung der Ratte Diss. Düsseldorf, 1965.
- (10) Booth, A. N., Emerson, D. H., Jones, F. T.: De Eds F., J. Biol. Chem. 229, 51, 1957.
- (11) Hoepfner, W.: Z. U. L. 66, 239, 1933.
- (12) Hoepfner, W.: Chem. Ztg. 56, 991, 1932.
- (13) Plücker, W., Keilholz, W.: Z. U. L. 66, 200, 1933.
- (14) Plücker, W., Keilholz, W.: Z. U. L. 68, 97, 1934.
- (15) Slotte, K., Neisser, K.: Ber. dtsh. chem. Ges., 71, 1611, 1938.
- (16) Coste, R.: Les cafeiers et les cafes dans le monde II. Ed. Larose, Paris, 1959.
- (17) Moores, R., Mc. Dermott, D. L., Wood, T. R.: Anal. Chem. 20, 620, 1948.
- (18) Häusermann, M., Brandenberger, H.: Z. U. L. 115, 516, 1961.
- (19) Swain, T.: Chem. and Ind., 1480, 1954.
- (20) Jurd, L.: Arch. Biochem. Biophys., 63, 376, 1956.
- (21) Calzolari, C., Furlani donda A.: Ann. di Chimica. 47, 1267, 1957.
- (22) Erkama, J., Kauppila, K.: Suomen Kemistilehti, 37, 82, 1958.
- (23) Pomenta, J. V., Burns, E. E.: J. of Food Sci., 36, 490, 1971.
- (24) Johnson, G., Schaal, L. A.: Science, 119, 627, 1952.

КРИТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ХЛОРОГЕННЫХ КИСЛОТ

М. Силашнэ-Келемен и А. Барат

Авторы из среды методов испытания важнейших действующих веществ кофе, вариационным анализом сравнивали результаты опытов полученных по методам которых считают самым подходящим. Кроме того ознакомились быстрый способ испытания применением изменённой тонкослойной хроматографии.

EIN KRITISCHES STUDIUM EINIGER METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER CHLOROGENSÄURE

M. Szilas-Kelemen und Á. Barát

Von den zur Bestimmung wichtiger Wirkstoffe des Kaffees ausgearbeiteten Methoden studierten die Verfasser versuchungsmethoden für Chlorogensäure. Die Versuchsergebnisse der für geeignet befundenen Verfahren wurden auch vermittels Variantien-Analyse miteinander verglichen. Ausserdem wird auch eine auf Dünnschichtchromatographie beruhende modifizierte Schnellmethode der Verfasser besprochen.

CRITICAL STUDY OF SOME METHODS FOR THE DETERMINATION OF CHLOROGENIC ACID

M. Szilas-Kelemen and Á. Barát

Of the analytical methods for the determination of the important active components of coffee, those for the determination of chlorogenic acid were studied. The experimental results considered to be suitable were compared also by means of variance analysis. Besides, also a rapid method of investigation based on modified thin layer chromatography is described.