

# Almalevek karbonsav- és szacharid-összetevőinek egy oldatból történő gázkromatográfiai mérése

PERLNÉ MOLNÁR IBOLYA és MORVAI MAGDOLNA

ELTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Budapest

Érkezett: 1990. február 25.

A citromsav ciklusban résztvevő karbonsavak közül az egyes növényfajokra jellemző összetevő felhalmozódik. E főkomponens, s a szacharidok (a fruktóz, a glükóz és a szacharóz) egyenkénti mennyisége, és egymáshoz viszonyított arányai is meghatározók a gyümölcsök, vagy az azokból készült termékek minősége, azonosítása és autenticitása szempontjából egyaránt.

Az irodalom a karbonsavak és a cukrok analízisére enzimatis eljárást<sup>1-5,7</sup> és különböző kromatográfiai meghatározásokat<sup>6-16</sup> javasol. A karbonsavak és szacharidok együttes analízise során két különböző módszert, vagy kétféle kromatográfiai eljárást, párhuzamosan, alkalmaznak. Az utóbbi időben a karbonsavak és a cukrok egymás jelenlétében, egy oldatból történő meghatározása kerül előtérbe<sup>10-13,16</sup>.

Gomis<sup>9,10</sup> almalevek és mustok, valamint Lazaro<sup>11</sup> uborka-fermentátumok főkomponenseinek mérésére nagynyomású folyadékromatográfiai módszert dolgozott ki. Más szerzők<sup>12,15,16</sup> többféle gyümölcs és a propolisz<sup>13</sup> összetevőit trimetil-szilil (TMS) származékká átalakítás után, gázkromatográfiaán mérték. Chapman és munkatársai<sup>16</sup> az alma, körte, sárgabarack és a burgonya karbonsav és szacharid összetevőit, TMS-származékképzés után, GC/MS együttes alkalmazásával vizsgálta.

Az irodalomban található módszerek mindegyike előkészítő eljárást, mint membrán szűrést<sup>6-9</sup>, előzetes kromatográfiai elválasztást<sup>10,11,14</sup>, papíron szűrést és alkoholos extrakciót<sup>16</sup>, alkoholos lecsapást<sup>13</sup>, alkohol +ólom-acetáttal kicsapást, illetőleg, extrakciót<sup>17</sup> igényel.

Jelen munkánk, (-mely idevonatkozó korábbi tapasztalatainkon is alapul<sup>18-22</sup>-), köztös célú:

1. Az almalevek (sűrítmenyek, nyers gyümölcszúvalék) főkomponenseinek (almasav, glükóz, fruktóz, szacharóz), előzetes extrakciót, vagy/és elválasztást nem igénylő, egyetlen felvételtől, gyors, rutinmérésre alkalmas, gázkromatográfiai módszerünk közreadása, valamint,

2. A kis mennyiségben jelenlévő savösszetevők, s a főkomponensek szimultán, mérési lehetőségének bemutatása, (az 1. pontban részletezett, egyszerű, gyors előkészítés után).

## Anyagok és módszerek

*Reagensok:* Valamennyi modellvegyület és vegyszer analitikai tisztaságú, a Reanal, a Fluka, valamint a Serva gyár készítményei voltak. A kolonna-töltetet és a nedvesítő fázist az Applied Sci. Labs. (State College Pa. USA) cégtől vásároltuk.

A Golden, a Jonatan és a Sztarking almakészítményeket a Nagyörösi Konzervgyártól kaptuk: A nyers almát aprítás után enzim-kezelésnek vetették alá Phylazim C (1000 g/1000 g alma) és Pectinol M17 (200/1000 kg alma) felhasználásával, mindkét esetben 15-20-perc kezelési időt alkalmaztak. Ezután a szűrt almalevet Bentonittal derítették (a továbbiakban derített almalé), majd betöményítették. Az így elkészített almalevek szárazanyagtartalma 13,5 m/m%.

Az analíziseket Chromatron G.C.H. 18.3 NDK gyártmányú készüléken, Digint L80 típusú integrátor segítségével végeztük. Rozsdamentes acélkolonnánk (2mx4mm) töltete 3 % SE-30-cal nedvesített Chromosorb WAW DMCS (100-120 mesh) volt. Vivőgázként nagy tisztaságú nitrogént használtunk, 60 cm<sup>3</sup>/perc áramlási sebességgel.

A származékkészítéshez Block-Therm elektromos fűtőberendezést (MTA Kutesz) használtunk. A Block-Thermhez tartozó 4 cm<sup>3</sup> űrtartalmú, teflonbetétes kupakkal ellátott reakcióedények, megfelelő átmenettel, a vákuumlejáróló készülékhez csatlakoztathatók.

### *A származékkészítés előirata*

A 4 cm<sup>3</sup> térfogatú reakcióedényben, analitikai pontossággal mért, különböző mennyiségű almasavat (0,3–0,5 mg) és szacharidokat (fruktóz: 1,1–2 mg, glükóz: 0,8–1,6 mg, szacharóz: 0,75–1,5 mg) tartalmazó modelloldatokat, valamint a vizsgálandó almalevet (0,10–0,15 g), vagy almasűrítményt (0,02–0,03 g) vákuumlejáróló készüléken, 50–60 °C-os vízfürdőből szárazra pároljuk. A mintákat egymást követően 3x0,5 cm<sup>3</sup> izo-propilalkohol hozzáadásával, a vákuumlejáróló készüléken vízmentesítjük. A leszártott maradékhoz 0,5 cm<sup>3</sup> 2,5 % hidroxil-amin-HCl-t tartalmazó piridint mérünk, s az edényt lezárva, tartalmát 75 °C-on, 30 percig reagáltatjuk. A lehűtött reakcióelegyhez 0,9 cm<sup>3</sup> hexametil-diszilazánt (HMDS) és 0,1 cm<sup>3</sup> trifluor-ecetsavat (TFE) elegyítünk és 100 °C-on, 1 órán át reagáltatjuk. A reakcióidő elteltevel, a lehűtött reakcióelegy tisztájából, közvetlenül 5-, vagy 10 µl-t injektálunk.

### *Gázkromatográfias elválasztási feltételek*

A kolonna 110–280 °C-ig 16 °C/perc sebességgel fűtve, majd 5 perc izoterm elúció. Elpárologtató és FID hőfoka rendre: 360 °C, 370 °C.

## **A kísérleti eredmények értékelése**

### *Származékkészítési és reprodukálhatósági vizsgálatok*

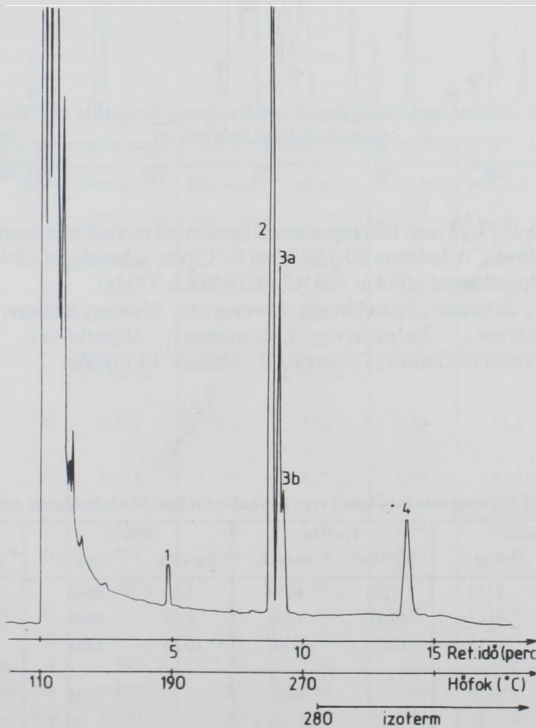
A cukrok oximálási és szililezési reakciójának általános feltételei, mint ismeretes<sup>17</sup>, a 70–75 °C hőfok és a 30–60 perc reakcióidő. Az alifás zsírsavak és dikarbonsavak, de főleg a ciklikus, nagy molekulatömegű karbonsavak (kávésav, ferulasav, klorogénsav) mennyiségi szililésztérre alakulásához, szisztematikus modellvizsgálataink tanúsága szerint (1. táblázat), hosszabb reakcióidő (60 perc) és magasabb hőfok (100 °C) szükséges. 100 °C hőfokon, a „Származékkészítés előirata” c. fejezetben feltüntetett körülmények között, a cukrok mellékreakciókban nem vesznek részt, 5 óra reakcióidő esetén sem. Itt jegyezzük meg, hogy az e munkában részletezett származékkészítési előírat a főkomponensek (almasav, fruktóz, glüóz, szacharóz: 1. ábra) és a nem főkomponensek (tejsav, oxálsav, szorbinsav, benzoésav, borostyánkősav, fumársav, pimelinsav, borkősav, sikimisav, kinasav, kávésav, klorogénsav; 2. ábra) együttes szililezésére alkalmas: A főkomponensek és nem főkomponensek szimultán analízisének sokoldalú hasznosítása, soronkövetkező terveink között szerepel.



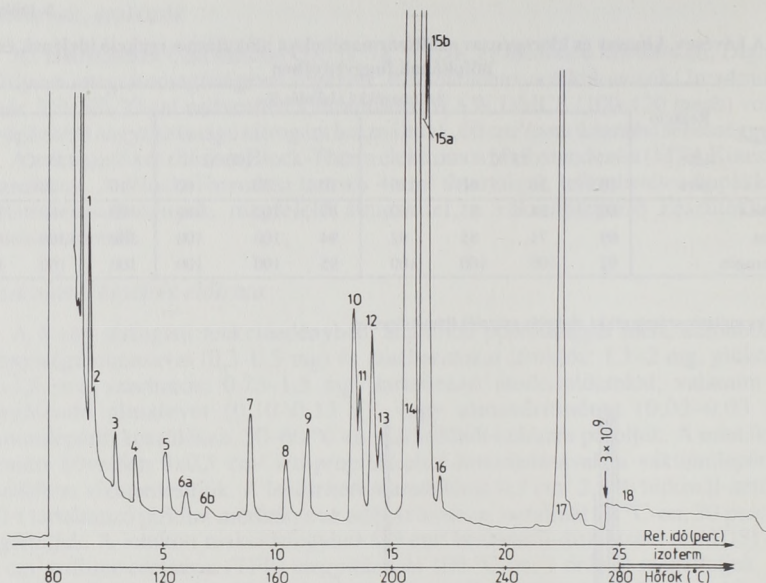
A kávésav, kinasav és klorogénsav sziliszármazékokká alakulása a reakció idejének és hőfokának függvényében

A sav	Reakció idő: perc	Származékká alakulás %									
		75 °C				100 °C			125 °C		
		10	30	60	120	10	30	60	10	30	60
Kávé		80	84	85	100	87	100	100	100	100	100
Kína		69	71	85	92	94	100	100	100	100	100
Klorogén		92	100	100	100	95	100	100	100	100	100

\*A kvantitatív származékká alakulás százalékában kifejezve



**1. ábra:** A Jonatan almálé főkomponenseinek (1-4) kromatogramja  
 Felvételi körülmények: mint az „Anyagok és Módszerek” fejezetben.  
 Csúcsok: 1: almasav, 2: fruktóz, 3a: glükóz<sub>1</sub>, 3b: glükóz<sub>2</sub>, 4: szacharóz



**2. ábra :** Az almalé fő- és nem főkomponenseit tartalmazó modelloldat kromatogramja  
 Felvételi körülmények: A kolonna 80-280 °C-ig 8 °C/perc sebességgel fűtve, majd 8 perc izoterm elúció. Elpárologtató hőfoka: 360 °C, FID hőfoka: 370 °C.

Csúcsok: 1:tejsav, 2:oxálsav, 3:szorbinsav, 4:benzoesav, 5:borostyánkősav, 6a:fumársav<sub>1</sub>, 6b:fumársav<sub>2</sub>, 7:almasav, 8:pimelinsav, 9:borkősav, 10:arabinóz, 11:citromsav+sikimissav, 12:ramnóz, 13:kínasav, 14:fruktóz,

2. táblázat

A főkomponensek TMS-származékokkénti reprodukálhatósága: Modelloldatok értékelése alapján

A kísérlet*	Almasav		Fruktóz		Glükóz		Szacharóz	
	µg/10 µl	integr.e.	µg/10 µl	integr.e.	µg/10 µl	integr.e.	µg/10 µl	integr.e.
1	1,96	4136	7,52	6374	5,35	6599	4,94	4010
2	2,62	4137	10,52	6551	8,02	6548	7,41	4021
3	3,27	4115	12,03	6567	10,69	6424	9,88	4078
	átlagérték	4129		6497		6524		4036
	standard hiba	11,1		42,1		55,7		36,5
	relatív standard hiba %	0,27		0,65		0,85		0,90

\*Az 1-3 számú kísérletek integrátoregységei 2 párhuzamos származékkészítésből eredő oldat, kétszeri felvétellelő nyert átlagértékek: integr.e. = integrátor egység

A származékok stabilitására vonatkozó adatot az irodalomban nem találtunk. A szilil-éter (észter) származékok állandóságára vonatkozó vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a törzsoldatok összetételüket nem változtatják, melléktermékek állás közben nem képződnek; Így az oldatokat 2-3 hónapos tárolás után is, mennyiségileg és minőségileg változatlanul mértük.

A modelloldatok mérési eredményeiből számított reprodukálhatósági adatokat a 2. táblázat tartalmazza. E táblázat adataiból kitűnik, hogy mind az almasav, mint a cukrok mérése 12 µg/10µl koncentrációtartományban jól reprodukálható, a relatív szórás értéke az almasav és a három szacharid esetében rendre 0,27 % (almasav), 0,65 % (fruktóz), 0,85 % (glükóz) és 0,90 % (szacharóz) volt.

### Különböző almaminták analízise

Saját eredményeink, s az irodalomban fellelhető, azonos almafajták, közel azonos koncentrációjú oldataiban (12–14 m/m%) meghatározott főkomponensek mennyiségeinek együttes értékelésekor (3. táblázat), az alábbi megállapítások tehetők:

3. táblázat

Almalevek almasav- és szacharid-összetevőinek összehasonlító értékelése; Saját vizsgálatok és irodalmi adatok alapján

Eltartás ideje (nap)	Almasav(A)	Fruktóz(F)	Glükóz(G)	Szacharóz (Sz)	Szacharid összes(Sz <sub>o</sub> )	G/F	Sz <sub>o</sub> /A
<i>Saját vizsgálatok</i>							
Derített almálé	g/1000 g		g/100 g				
Golden	0,397	5,59	2,07	1,85	9,5	0,37	24
Jonatán	0,540	3,91	1,95	2,06	7,9	0,50	15
Sztarking	0,390	3,61	1,81	2,05	7,5	0,49	19
<i>Irodalmi adatok</i>							
	g/1000 ml		g/100 ml				
(14) Golden Delicious '81 WA	0,407	8,61	3,64	0,20	12,5	0,42	31
(14) Golden Delicious '82 WA	0,533	7,88	2,75	1,53	12,4	0,35	23
(14) Golden Mexico	0,515	7,26	2,15	2,96	12,4	0,30	24
(14) Jonatán	0,685	4,01	1,33	0,57	5,9	0,33	9
	g/1000 g		g/100 g				
(6) Golden Delicious	-	5,70	1,90	0,70	8,5	0,34	-
(6) Jonatán	-	6,30	2,80	1,0	10,1	0,44	-
(1) Golden Delicious	0,560	7,30	2,10	3,10	12,5	0,29	22 (é)
(1) Golden Delicious	68 0,470	7,10	2,40	1,80	11,3	0,34	24 (é)
(1) Golden Delicious	103 0,390	7,10	2,50	1,40	11,0	0,35	28 (é)
(1) Golden Delicious	146 0,370	7,10	2,50	1,20	10,8	0,35	29 (é)
(1) Golden Delicious	195 0,280	7,50	2,60	0,70	10,8	0,35	39 (é)
(1) Golden Delicious	216 0,270	7,70	2,50	0,70	10,9	0,32	40(n.é.)

( ) zárójelben az irodalmi hivatkozás száma; é = élvezetes; e = elfogadható; n.é. = nem élvezhető



- Az eltérő fajtájú (Golden, Jonatán, Sztarking) almák főkomponenseinek egyenkénti és egymáshoz viszonyított mennyiségei számottevően különböznek egymástól.

- Nagy eltérést mutatnak az azonos fajtájú, de eltérő származású (különböző Goldenek), vagy évjáratú (Golden Delicious '81 WA és '82 WA) almákban mért főkomponensek egyenkénti mennyiségei is.

- Összehasonlító értékelésre alkalmas mutatószámok, mint a glükóz-fruktóz arány (G/F), vagy az összes szacharidtartalom-almasav arány (Szö/A) figyelemre méltó összefüggést mutatnak.

Legszembetűnőbb tapasztalat a friss Golden almákban mért összes szacharid tartalom-almasav arány, mely a származási helytől függetlenül 22 és 31 között változott. Ugyancsak értékes információ eme arányszámoknak az eltartás függvényében, Gorin<sup>1</sup> vizsgálatai szerin-ti változása: E változó arányszámok érzékszervi vizsgálatokkal is párosítva (élvezetes = é; elfogadható = e; nem élvezhető = n.é.), azt mutatják, hogy az arányszám drasztikus növekedése a minőség romlásával párosul.

A Sztarking és Jonatán almákkal kapcsolatos összefüggések értékelése céljából további fajták, s adott fajták eltartás közbeni összetétel-változásainak nyomonkövetésére van szükség.

Utóbbi, tervezett vizsgálatainkon kívül, kutatásaink további célja, a nem főkomponensek, s a főkomponensek együttes analízise: A fajta, a származási hely és az eltartás, valamint más, az alma-termékek előállítási technológiájával összefüggő változások nyomonkövetése.

### Irodalom

1. Gorin N.: Several Compounds in Golden Delicious Apples as Possible Parameters of Acceptability, *J. Agric. Food Chem.* 21 (1973) 4, 670–673
2. Gorin N. és Rudolph J.W.: Criteria for Keeping Quality in Golden Delicious Apples, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 167 (1978) 11–15
3. Bielig H.J. és Gründing H.: Technologische Einflüsse auf den Säuregehalt bei Fruchtsäften und Fruchtsaftkonzentraten, *Flüssiges Obst* 52 (1985) 6, 308–315
4. Eckert M., Baumann G. és Gierschner K.: Vergleichende hochdruck-flüssigkeitschromatographische und enzymatische Analyse der Fruchtsäuren in Fruchtsäften, *Flüssiges Obst* 54 (1978) 3, 134–138
5. Assolant-Vinet C.H., Bardeletti G. és Coulet P.R.: A Novel Enzyme Membrane Electrode for Oxalate Determination in Foodstuffs, *Anal. Letters* 20 (1987) 4, 513–527
6. Brause A.R. és Raterman J.M.: Verification of Authenticity of Apple Juice, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65 (1982) 4, 846–849
7. Zyren J. és Elkins E.R.: Interlaboratory Variability of Methods Used for Detection of Economic Adulteration in Apple Juice, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68 (1985) 4, 672–676
8. Coppola E.D. és Starr M.S.: Liquid Chromatographic Determination of Major Organic Acids in Apple Juice and Cranberry Juice Cocktail: Collaborative Study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69 (1986) 4, 594–597
9. Gomis D.B., Gutiérrez M.J.M., Alvarez M.D.G. és Alonso J.J.M.: Application of HPLC to Characterization and Control of Individual Acids in Apple Extracts and Ciders, *Chromatographia* 25 (1988) 12, 1054–1058
10. Gomis D.B., Alvarez M.D.G., Alonso J.J.M. és Vallina A.N.: Determination of Sugars and Alcohols in Apple Juice and Cider by High Performance Liquid Chromatography,

11. *Lázaro M.J., Carbonell E., Aristoy M.C., Safón J. és Rodrigo M.*: Liquid Chromatographic Determination of Acids and Sugars in Homolactic Cucumber Fermentations, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72 (1989) 1, 52–55
12. *Marcy J.E. és Carroll D.E.*: Research Note a Rapid Method for the Simultaneous Determination of Major Organic Acids and Sugars in Grape Musts, Am. J. Enol. Vitic. 33 (1982) 3, 176–177
13. *Maciejewicz W., Daniewski M. és Mielniczuk Z.*: Gas Chromatography–Mass Spectrometry Investigation of Propolis Analysis of Phenolic Acids and Sugars, Chem. Anal. 29 (1984) 421–427
14. *Lee H.S. és Wrolstad R.E.*: Apple Juice Composition: Sugar, Nonvolatile Acid, and Phenolic Profiles, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71 (1988) 71, 789–794
15. *Flores E.F., Kline D.A. és Johnson A.R.*: GLC Determination of Organic Acids in Fruits as Their Trimethylsilyl Derivatives, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 53 (1970) 1, 17–20
16. *Chapman G.W. és Horvat R.J.*: Determination of Nonvolatile Acids and Sugars from Fruits and Sweet Potato Extracts by Capillary GLC and GLC/MS, J. Agric. Food Chem. 37 (1989) 4, 947–950
17. *Blau K. és King G.S.*: Handbook of Derivatives for Chromatography Heyden and Son Ltd. 1978, London, Philadelphia, Pa. Rheine 4. fejezet C.F. Poole: Recent Advances in the Silylation of Organic Compounds for Gas Chromatography pp. 152–200
18. *Perl I.M. és Szakács M.P.*: Gas-Liquid Chromatographic Separation and Determination of the Components of Maltitol Syrups, J. Chromatogr. 216 (1981) 219–228
19. *Perl I.M. és Szakács M.P.*: Gas-Liquid Chromatographic Determination of the Raffinose Family of Oligosaccharides and Their Metabolites Present in Soya Beans, J. Chromatogr. 295 (1984) 433–443
20. *Perl I.M., Szakács M.P., Kővágó Á. és Petróczi J.*: Quantitative Extraction and Gas-Liquid Chromatography of the Soluble Saccharide in Soya Bean, Carb. Res. 138 (1985) 83–89
21. *Perl I.M. és Szakács M.P.*: Monitoring of Maillard Reactions in Soy Products, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 183 (1986) 18–25
22. *Morvai M., Szakács M.P. és Perl I.M.*: Gas Chromatographic Analysis of Different Homologue Series of Acids with Various Aliphatic Alcohols Esterifying in Salt Containing Aqueous Solutions, J. Chromatogr. 446 (1988) 237–246

## Almalevek karbonsav- és szaharidösszetevőinek egy oldatból történő gázkromatográfiás mérése

PERLNÉ MOLNÁR IBOLYA és MORVAI MAGDOLNA

Szerzők az alma szilil-származékká alakítható és gázkromatográfiás eljárással mérhető, összetevőinek meghatározására, rutin vizsgálatokra is alkalmas eljárást dolgoztak ki. A módszer az alma és termékei főkomponenseinek (almasav, fruktóz, glükóz és szacharóz), előzetes elválasztás nélküli, egy oldatból, egyetlen felvételből való quantitív értékelését teszi lehetővé. Az eljárás felhasználásával a fajta jellemzésére, s a termék minőségére vonatkozó mutatószámot vezettek be. A származékok törzsoldatának módosított gázkromatográfiás elúciója, az alma nem főkomponenseinek, további 12 karbonsavnak és 2 szacharidnak minőségi-mennyiségi mérését teszi lehetővé. A módszer gyors kivitelezhetősége és jó reprodukálhatósága alapján az alma íz- és zamatanyagainak jellemzésére alkalmas mutatószámok, új összefüggések megismerése várható



# Gas chromatographic measurement of carboxylic acid and saccharide components of apple juices in a single solution

PERL-MOLNÁR, I. and MORVAI M.

The authors developed a method suitable for the determination of those components of apple which can be silylated and gas chromatographically measured. The method is also useful for routine examinations. It permits the quantitative evaluation of main components of apple (malic acid, fructose, glucose and saccharose) in a single solution in one chromatographic run. Using this procedure, authors introduced an index for the characterization of apple variety and product quality. Modified gas chromatographic elution of stock solution of derivatives allows the qualitative and quantitative measurement of some other components of apple, further 12 carboxylic acids and 2 saccharides. As the method is quick and well reproducible, the cognition of new indices suitable for the characterization of flavour substances of apple, and of new correlations are to be expected.

## Газохроматографическое измерение составных частей карбоновой кислоты и сахара яблочных соков из одного раствора

И. ПЕРЛИНЭ МОЛНАР и М. МОРВАИ

Авторы разработали пригодный для серийных испытаний метод определения преобразуемых в силлил-производные и измеряемых газохроматографическим методом составных частей яблок. Метод делает возможным проведение количественной оценки с помощью одного единственного измерения из одного раствора без предварительного разделения главных компонентов (яблочная кислота, фруктоза, глюкоза и сахароза) яблок и яблочных продуктов. Вследствие применения метода был введен числовой показатель, связанный с анализом сорта и качеством продукта. Модифицированная газохроматографическая элюация исходного раствора производных позволяет качественное и количественное измерения не главных компонентов, 12-ти карбоновых кислот и 2-х сахаринов. Метод не требует много времени, на основе возможности его проведения и сходимости можно ожидать установление числовых показателей, пригодных для анализа ароматных и вкусовых материалов яблок и ожидается установление новых взаимосвязей.



# Gaschromatographische Messung der Carbonsäure- und Saccharid-komponenten aus einer Lösung

*PERELNÉ MOLNÁR, I. und MORVAI M.*

Verfasser haben ein Verfahren für die Bestimmung von zu Silyl-Derivaten umwandelbaren und mit gaschromatographischer Methode meßbaren Komponenten ausgearbeitet, das auch für Routineuntersuchungen geeignet ist. Die Methode ermöglicht die quantitative Beurteilung der Hauptkomponenten (Apfelsäure, Fructose, Glucose und Saccharose) ohne vorherige Trennung, aus einer Lösung und von einer Aufnahme. Durch die Anwendung des Verfahrens wurde eine Kennziffer für die Charakterisierung und für die Produktqualität eingeführt. Die modifizierte gaschromatographische Elution der Derivatensammlösung ermöglicht die qualitative und quantitative Messung der nicht als Hauptkomponenten geltenden Apfelbestandteile sowie von weiteren 12 Carbonsäuren und 2 Sacchariden. Die schnelle Durchführbarkeit und gute Reproduzierbarkeit der Methode sichern geeignete Kennziffern zur Charakterisierung der Geschmacks- und Aromastoffe von Äpfeln, wodurch auch neue Zusammenhänge erkannt werden können.