

Almasav és tejsav gyors kimutatása és meghatározása borokból

SELMECI GYÖRGY és HANUSZ BÉLA
Megyei Élelmiszerellenőrző és Vegyvizsgáló Intézet, Szeged

Érkezett: 1980. február 9.

A borok mikrobiológiai stabilitásának ellenőrzésére nélkülözhetetlen az almasav, tejsav és borostyánkősav jelenlétének kimutatása. A tejsav és almasav mennyiségének változása, illetve az almasav átalakulása tejsavvá a borok mikrobiológiai stabilitását jellemzi (1).

Az erjedés során keletkezett kis molekulatömegű szerves savak kimutatására a leggyorsabb elemzési eljárások a rétegekromatográfiai módszerek. Amíg korábban a papirkromatográfiai elválasztásokat használtuk, egy-egy analízis ideje 4–5 óra volt, addig rétegekromatográfiai módszerrel már harminc percen belül is nyerhetünk megbízható eredményt.

A kis molekulatömegű alifás monokarbonsavak, hidroxikarbonsavak és dikarbonsavak rétegekromatográfiai elválasztására több eljárás ismeretes (2–6). Általában cellulózpor, szilikagél G, polietilén-glikollal impregnált szilikagél G és szilikagél G+kovaföld G réteget használnak, futtatószerként pedig különböző oldószerek, így: metanol, etanol, n-butanol, éter, di-izopropil-éter, butil-acetát, di-etil-amin, benzol, ecetsav, hangyasav, ammónia és víz binér vagy terner elegyeit alkalmazzák. *Salques és André* 1977-ben közölt eljárása szerint kloroform-ecetsav (10 : 1) futtatóval igen vékony, gyári készítésű (Gelman ITLC SG) szilikagél rétegen optimális sav-elválasztás lehetséges (7).

Vizsgálat tárgyává tettük, hogy a *Salques – André*-féle futtatószer alkalmas-e tejsav-almasav-borostyánkősav és borkősav nem gyári, hanem laboratóriumi körülmények között, „kézi” úton előállított szilikagél rétegen történő elválasztására.

A réteget a szokásos módon, *Kieselgel G nach Stahl* adszorbenssel, víz hozzáadásával készítettük. Említett futtatószerrel az általunk előállított rétegen nem sikerült a savakat egymástól elválasztani, a tejsav, almasav és borostyánkősav egy foltot adnak, „együtt” futnak a rétegen. Ha a kloroform-ecetsav (10 : 1) futtatószer polaritását etilalkohollal növeljük, a savak elválása egymástól még nem megfelelő, de ha acetonnitrillel növeljük az oldószerkelet polaritását az almasav, tejsav és borostyánkősav már kielégítő mértékben válik el egymástól. A metanollal végzett polaritásnövelés egészen jó eredményt ad és ha az így nyert kloroform-metanol-ecetsav (45 : 8 : 4) terner elegy polaritását az ecetsavnak hagymasavval történő cseréjével tovább növeljük, igen jó az elválasztás határfoka. Bebizonyosodott, hogy a kloroform-metanol-hangyasav (45 : 9 : 3) terner elegy a leghatékonyabb futtató szilikagél rétegen a tejsav-almasav-borkősav-borostyánkősav egymástól egy lépésben történő elválasztására. Az 1. táblázaton összefoglalva közöljük a különböző futtatókkal kapott $R_f \times 100$ értékeket.

Borkősav, almasav, borostyánkősav és tejsav $R_f \times 100$ értékei szilikagél rétegen

Sav	$R_f \times 100$		
	O ₁	O ₂	O ₃
Borkősav	20	31	47
Almasav	34	47	56
Borostyánkősav	52	73	37
Tejsav	67	70	33

O₁: kloroform – metanol – hangyasav (45 : 9 : 3)

O₂: kloroform – metanol – ecetsav (45 : 8 : 4)

O₃: benzol – metanol – ecetsav (45 : 8 : 4)

Kloroform-metanol-hangyasav (45 : 9 : 3) futtatóval laboratóriumi körülmények között készített, 0,25–0,50 mm vastag szilikagél rétegen a vizsgált savak kimutatásának határa bróm-fenolkéssel: borkősav 5,0 μg , almasav 10,0 μg , borostyánkősav 10,0 μg és tejsav 5,0 μg . A savak izolálása, elválasztása és kimutatása borokból közvetlenül, – előkészítés nélkül – a bor rétegre történő cseppentésével végezhető (4, 7).

Kísérleti rész

Reagensek, vegyszerek:

1. Kiesegel nach Stahl adszorbens.

A réteg előállítására (20 × 20 cm-es üveglapokon):

a pép elkészítéséhez 0,25 mm-es réteghez 30 g adszorbenst, 65 cm³ deszt. vizet, a 0,50 mm-eshez 35 g adszorbenst és 70 cm³ deszt. vizet, illetve a 0,75 mm-eshez 45 g adszorbenst és 95 cm³ deszt. vizet alkalmazunk. A lemezeket szobahőmérsékleten szárítjuk és felhasználás előtt 1 órán át 105 C°-on aktiváljuk.

2. Kloroform at.

3. Metanol at.

4. Hangyasav at.

5. Bróm-fenolkék n-butanolos oldata: 1 g/l

6. Etilalkoholos kálium-hidroxid oldat: 20 g/l

7. Előhívószér: 100 cm³ bróm-fenolkék n-butanolos oldatához cseppenként annyi etilalkoholos kálium-hidroxid oldatot adunk, amennyi a bíborszín eléréseig szükséges.

Borok kromatografálása

10 g fehér és vörös borból szobahőmérsékleten 20–25 mm³-t cseppentünk fel a rétegre. A lemezeket megszáritjuk és ha 20 × 20 cm-es méretűek, a szokásos kromatográfiás kádakba helyezzük (Normal Kammer nach Desaga Firma), ha pedig kisebb, pl. 12 × 6 cm-es lemezekkel dolgozunk, a célra megfelel egy jól zárható konzerves üveg is. Utóbbi használata a pincészetek üzemi laboratóriumaiiban célszerű, mert a kivitelezés egyszerű, olcsó és az elemzés ideje 20 percre rövidíthetőn, a pontosság különösebb károsodása nélkül. A kádban (illetve a konzerves üvegben)

kloroform-metanol-hangyasav (45 : 9 : 3) elegyét használjuk futtatószerként. A futtatás ideje a normál-lapon általában 50 perc. A réteget a kifejlesztés után szobahőmérsékleten szárítjuk, majd a kromatogramot porlasztó segítségével bróm-fenolkék oldattal előhívjuk. Sárga foltok megjelenése kék alapon jelzik az egyes savat. Az azonosítást úgy végezzük, hogy párhuzamosan tejsav-almasav-borkósav-borostyánkósav keverékéből készült 1%-os etanolos oldatból 5 – 10 mm³-t cseppentünk fel a lemezre.

Savak félkvantitatív meghatározása borokból

A tejsav, almasav, borkósav, borostyánkósav egyidejűleg végzett félkvantitatív meghatározásához a borokból kivett 20–25 mm³-es aliquot rész mellett az 1%-os összehasonlító etanolos oldatból 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 mm³-t cseppentünk fel a lemezre. A kromatogram kifejlesztése és előhívása után vizuális komparációval választjuk ki a legmegfelelőbb folt-intenzitást. Három párhuzamosan végzett meghatározás esetén 10–100 µg sav/folt koncentrációtartományban a relatív hiba ±18–22%.

I R O D A L O M

- (1) Schormüller, J.: Handbuch der Lebensmittelchemie. VII. Alkoholische Genussmittel, 275, 1968.
- (2) Gültbauer, F.: J. Chromatogr. 45, 104, 1969.
- (3) Hansen, S. A.: J. Chromatogr. 26, 123, 1967.
- (4) Lupton, C. J.: J. Chromatogr. 104, 223, 1975.
- (5) Knappe, E., Petri, D.: Z. Anal. Chem. 188, 184, 1962.
- (6) Petrowitz, H. J., Pastuska, G.: J. Chromatogr. 7, 128, 1962.
- (7) Salques, M., André, J.: Vignes et Vins, No. 261. Juil–Aout, 1977.

БЫСТРОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЯБЛОЧНОЙ И МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ВИНАХ

Дь. Шелмеци и Б. Ханус

Авторы разработали слоистохроматографический метод для обнаружения яблочной кислоты и молочной кислоты в винах и для полуколичественного определения янтарной кислоты и винокаменной кислоты. Разделение четырех кислот осуществили на силикагельном слое помощью хлороформ-метанол-муравьиной кислоты ((45 : 9 : 3). Для проявления компонентов применяли индикатор бром-фенол-синего. Нижний предел обнаружения в случае яблочной и янтарной кислоты составлял 10 µг/пятна; в случае молочной и винокаменной кислоты пять микрограмм/пятна.

С точки зрения созревания и стабильности вин данным методом хорошо можно измерять соотношение молочной и яблочной кислоты после непосредственного хроматографирования вин проявленных нового пятна отдельных кислот, оцениваем визуально серией стандартного раствора определенной концентрации.

Относительная визуальная компарация 10–100 µг кислота в области ±18–22%-ой концентрации пятна.

Разработанный метод применим на месте в винах погребах.

SCHNELLNACHWEIS UND BESTIMMUNG VON APFELSÄURE UND MILCHSÄURE IN WEINEN

Gy. Selmeçi und B. Hanusz

Eine schichtchromatographische Methode wurde zum Nachweis von Apfelsäure und Milchsäure in Weinen und zu ihrer halb quantitativen Bestimmung in Gegenwart von Bernsteinsäure bzw. Weinsäure entwickelt. Die Abtrennung dieser vier Säuren wird auf einer Silikagelschicht unter Anwendung eines 45 : 9 : 3 Gemisches von Chloroform : Methanol : Ameisensäure als Laufmittel durchgeführt. Zur Entwicklung der Komponenten wird Bromphenolblau als Indikator angewendet. Bei Apfelsäure und Bernsteinsäure beträgt die untere Grenze der Nachweisbarkeit 10 $\mu\text{g}/\text{Fleck}$, während bei Milchsäure und Weinsäure ist sie 5 $\mu\text{g}/\text{Fleck}$. Das vom Standpunkt der Reifung und Stabilität der Weine wichtige Verhältnis der Milchsäure zu Apfelsäure kann mittels dieser Methode gut gemessen werden: nach der unmittelbaren Chromatographie der Weine werden die entwickelten Flecke der abgetrennten Säuren mittels einer Reihe von Standardlösungen bekannter Konzentrationen visuell ausgewertet. Der relative Fehler des visuellen Vergleiches beträgt +18–22% im Konzentrationsbereich 10–100 μg Säure/Fleck. Das entwickelte Verfahren ist in Kellereien auch an Ort und Stelle durchführbar.

RAPID DETECTION AND DETERMINATION OF MALIC ACID AND LACTIC ACID IN WINES

Gy. Selmeçi and B. Hanusz

A layer chromatographic method was developed for the detection of malic acid and lactic acid in wines and for the semiquantitative determination of these acids in the presence of succinic acid or tartaric acid. The separation of these four acids is carried out on a silica gel layer, using a 45 : 9 : 3 mixture of chloroform : methanol : formic acid as running agent. Bromophenolblue indicator serves for the developing of the components. The lower limit of detection is 10 $\mu\text{g}/\text{spot}$ in case of malic acid and succinic acid whereas this limit is 5 $\mu\text{g}/\text{spot}$ in case of lactic acid and tartaric acid. The ratio of lactic acid to malic acid which is of importance from the aspect of the ripening and stability of wines can be readily measured by this method: in that after the direct chromatography of the wines the developed spots of the separated acids are visually evaluated with the use of a series of standard solutions of known concentration. The relative error of the visual comparison is $\pm 18-22\%$ in the concentration range of 10–100 μg acid/spot. The developed method can be used in wine-cellars also at the spot.