

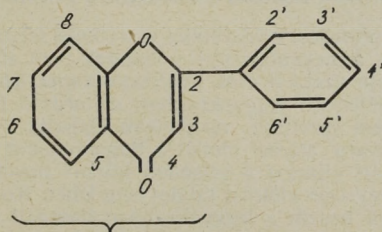
Élelmiszereink összetételének legújabb adatai XXVI.

Eljárás gyümölcsök néhány P-vitamin hatású flavonoidjának papírkromatográfiás meghatározására

SZ. SZOTYORI KATALIN, és W. JURICS ÉVA
Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1966. május 28.

1936-ban Szentgyörgyi és munkatársainak (1, 2) eredményei nyomán indultak meg azok a vizsgálatok, amelyek a flavonoidok farmakológiai hatásának megismerését célozzák és amelyek száma ma már szinte áttekinthetetlen. Említett szerzők paprika- és citromléből egy citrinnek elnevezett keveréket izoláltak, amellyel a hajszálerek átteresztőképességének és törékenységének csökkenését tudták előidézni. Mint új esszenciális étrendi faktor a vitamin P elnevezést kapták a flavonoidoknak tartott anyag, amelyről Bruckner és Szentgyörgyi hamarosan megállapították, hogy főképpen heszperidinből és rutinból álló keverék. A későbbi vizsgálatok alapján kiderült, hogy számos, a növényvilágban igen elterjedt flavonoid típusú vegyületeknek hasonló hatása van.



chromon váz

1. ábra

A flavonoidok családjába tartozó vegyületek az alap kromonvázból (1. ábra) felépülő, hidroxilcsoportokat tartalmazó fenilchromon és fenil-4-kromanon származékok. Az alapvegyületeknek rendkívül sok származéka ismeretes, amelyek a különböző gyűrűkön előforduló hidroxilcsoportok számában és elhelyezésében, a hidroxilcsoportok metilálásával térhetnek el egymástól. A variációk számát növeli az a lehetőség, hogy a flavonoidok rendszerint glükozidjaik alakjában fordulnak elő. Leggyakrabban a 3-as és 7-es szénatomon elhelyezkedő hidroxilcsoport hidrogénjának különféle egyszerű, vagy összetett cukrokkal való helyettesítése útján számtalan mono-, di-, vagy poliglukozid származék kialakulását teszi lehetővé.

Anélkül, hogy a szervezetben kifejtett funkciójukról pontos tudomásunk volna, igen sok farmakológiai hatásuk ismeretes. Fényvédő hatásukat élőlényeken Jeney és Czimmer (4) vizsgálta először, más szerzők röntgenbesugárzás esetén, (5, 6) figyeltek meg védőhatást. Ezenkívül a gyógyászatban sikeresen alkalmazzák a véredek átteresztőképességének megnövekedésében megnyilvánuló betegségeknel, így pl. a retina és vesevérzések, hipertonia stb. esetében.

Mivel a flavonoidok jó fémmegkötő képességű, könnyen oxidálódó és nem toxikus vegyületek, egyes szerzők (7, 8) az utóbbi években zsírok bomlásának megakadályozására javasolják felhasználásukat. A flavonoidok redukálóképessége részben az alap kromon-váz telítetlenségére, részben a különböző helyzetű és számú hidroxil csoport jelenléte miatt a két-értékű fenolok jellegzetes oxidációs-redukációs mechanizmusára vezethető vissza. Antioxidáns hatásukat kifejezhetik oly módon, hogy a keletkezett szabad gyökkel, vagy peroxiddal reagálnak és így az antioxidációs láncot megállítják, vagy pedig azáltal, hogy az oxidációs meggyorsító nehézfém-ionokat, ún. kelát komplex képződése közben megkötik (9). Ilyen irányú felhasználhatóságuknak bizonyos fokig akadályt jelent, hogy zsírokban rosszul oldódnak, ezért magasabb alifás alkoholokkal, vagy savakkal történő alkilezés, vagy észterezés útján először zsiroidékony formáik előállítására van szükség.

Hazánkban is felmerült a flavonoidoknak élelmiszerekben antioxidánsként történő felhasználásának lehetősége, állattakarmányokkal végzett eredményes kísérletek alapján (10) azonban a felhasználásra javasolt készítmény pontos összetételének és annak ellenőrzésére alkalmas analitikai módszer hiányában a javaslat nem kerülhetett megvalósításra. Újabbban *Gáborné* (11) foglalkozott egyes flavonoidok és a propilgallát antioxidáns hatásának összehasonlításával.

Mivel Intézetünkben fennállása óta folytatunk olyan munkákat, amelyek az élelmiszerek természetes összetevőinek mind tökéletesebb megismerését tűzték ki feladatul, vizsgálatainkat a flavonoid típusú vegyületek meghatározására is kiterjesztettük.

A flavonoidok elemzési módszereinek áttekintése

A flavonoidok kimutatási módszereire vonatkozó irodalom csak tájékoztató jellegűnek tekinthető, a meghatározási módszerek nem alkalmasak mennyiségi meghatározásra, hanem azokkal csak kvalitatív képet lehet nyerni egyes gyümölcs- vagy zöldségfélékben leggyakrabban előforduló flavonoidokról, mivel legnagyobb részük nem specifikus reakciókon alapszik.

A nagyszámú zavaró anyag mellől a flavonoidokat ki kell vonni, de az extrahálásra felhasznált eljárást a vizsgálni kívánt flavonoidok oldékonysága szabja meg, így arra egységes előírást találni nem lehet. Kis szénláncú alkoholok, acetone, éter és könnyű benzinek a leggyakrabban használt extrahálószerke (12), vizet ritkán alkalmaznak, mivel az rendkívül sok szennyező anyagot kiold. Az elkülönítésre leggyakrabban az oszlop- és papírkromatográfiás eljárásokat alkalmazzák, mivel a régebben használt megoszlásos kirázás nagy anyag- és oldószer mennyiségeket, valamint igen sok munkát igényel. Az elkülönítés rendszerint két fázisban történik. Oszlopkromatográfiát használnak előtisztítás-ként s utána papírkromatográfiával történik egy-egy csoport flavonoidjainak további elválasztása. A leggyakrabban használt adszorbens a cellulóz por és újabban a poliamidok. Az alumíniumoxid túl erős adszorpció, a kationcsereelőlk és a magnéziumszilikátok a hidrolízis vagy komplexképzés veszélye miatt nem kvantitatívok és ezért nem megfelelőek.

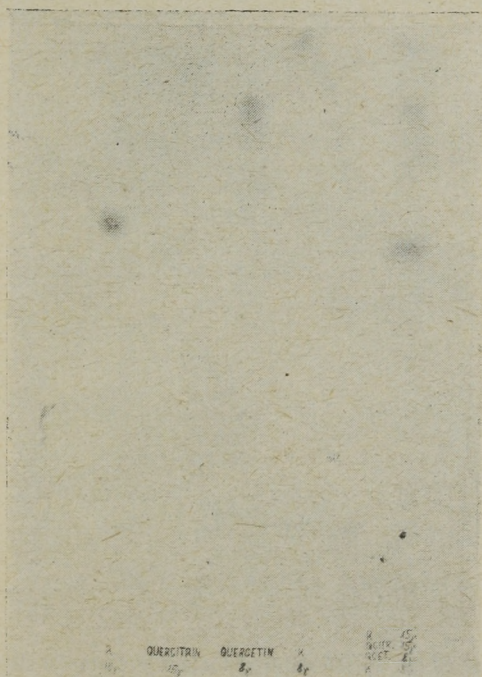
Ezenkívül természetes anyagok flavonoidtartalmának meghatározására egyes szerzők biológiai módszereket is alkalmaznak (13), amikor a vizsgált anyag profilaktikus, vagy kuratív formában történő adagolása mellett adott bőrfelületen kifejtett nyomásesökkentés hatására fellépő kapillárvérzések megjelenése alapján ún. heszperidin egységben adják meg a P-vitamintartalmat, mások viszont (14, 15) nem specifikus reagensek felhasználásával kolorimetriás módszereket használnak.

Flavonoidok analitikájával foglalkozó legtöbb munka a különféle extrakciós eljárások leírására, a kinyert flavonoidoknak különféle oldószerkeverékekben

történő kromatografálására és az R_f értékek megállapítására, valamint a színreakciók alapján történő azonosítására szorítkoznak. A mennyiségeket még Geissmann (16) szerkesztésében 1962-ben megjelent összefoglaló jellegű munka is csak keresztekkel jelöli.

A kidolgozott eljárás ismertetése

A számbajövő vegyületek sokfélesége miatt elsősorban arra törekedtünk, hogy az irodalom alapján leggyakrabban és legnagyobb mennyiségben előforduló és biológiailag hatásosnak bizonyult flavonoidokat meghatározzuk a hazai gyümölcsökben.

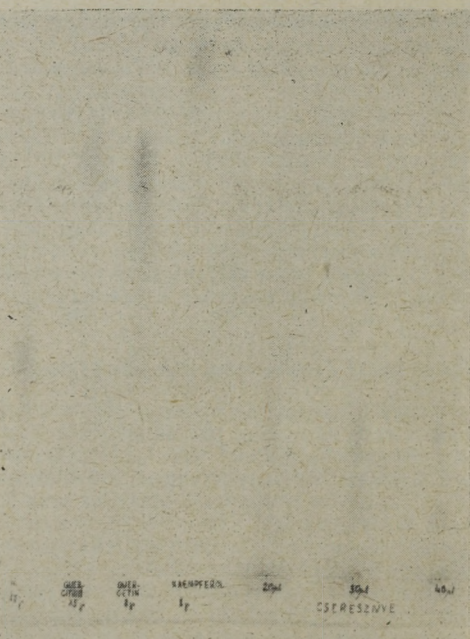


2. ábra

Az extrahálást metanollal végeztük. 40 g vizsgálandó gyümölcsöt vízmentes nátriumsulfáttal összedörzsölve kiszárítottunk, majd 15–20 órán keresztül Soxhlet-készülékben extraháltunk. A kivonatot vízfürdön betöményítettük, majd metanollal ismert térfogatra töltöttük fel.

Az alkoholos extraktból a flavonoidok közvetlen elválasztására papírkromatográfiai eljárást dolgoztunk ki, mivel ezt tartottuk legalkalmasabbnak mikroanalitikai szempontból, bár az irodalomban a papírkromatográfiai eljárást elsősorban a már oszlopokon vagy vékonyrétegen szétválasztott flavonoidok elkülönítésére tartják alkalmasnak. A különböző oldószer kombinációk közül butanol-jégecet-víz 4:2:4 arányú elegyével sikerült legjobban elválasztani a tiszta flavonoid preparátumokat (2. ábra).

A különféle gyümölcsökből kinyert extraktumokból azonban a fenti oldószer keverékkel nem sikerült egyértelműen elválasztani flavonoidokat még abban az esetben sem, ha a kromatografálást háromszor vagy négyszer megismételtük ún. nyújtott kromatografálással. A foltok sáv-szerűen szétnyíltak és így nem a várt R_f értékeknél jelent meg, gyakran pedig egyáltalán nem lehetett flavonoidokat kimutatni. A jobb elválás biztosítására a Lindner által (17) bevezetett tisztítási eljárást használtuk. Az elválást zavaró anyagoktól a W. Jurics (18) által az oxifahéjsavak elválasztásánál alkalmazott butanol-jégecet-víz 7 : 1 : 2 arányú

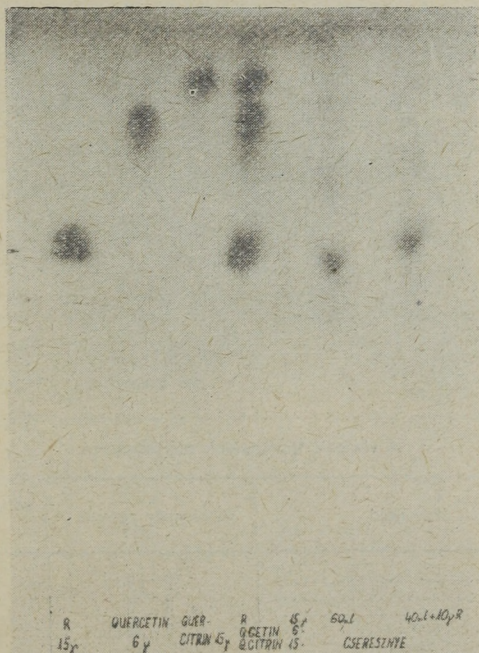


3. ábra

keverékével éjen át 43 cm hosszú papíron történő futtatással sikerült a flavonoidokat elkülöníteni. Ebben a futtatóban ugyanis az általunk vizsgáltak között legalacsonyabb R_f értékű rutin is kb. R_f ,25-nél elválik és a nagy mennyiségű festék, valamint egyéb, egyelőre nem azonosított zavaró anyag a startvonalnál, illetve R_f ,20 érték alatt marad. A megszáritott szűrőpapír aljáról a zavaró anyagok foltjait tartalmazó alsó részt levágva, a második futtatást kb. 20 órán át, a tiszta anyagoknál jól bevált butanol-jégecet-víz 4 : 2 : 4 arányú keverékével végeztük. A levágandó rész kijelölése ultraibolya fényben történt, amellyel a zavaró anyagok igen jó elkülönülése látható. Fluoreszcenciájuk a flavonoidoktól erősen eltérő színű, főleg antocián jellegű vegyületek jelenlétére utal. A 3. ábra az első, a 4. ábra a második futtatás után mutatja be egy cseresznye extrakt és a megfelelő flavonoidok kromatográfiás elválasztását. A foltok azonosítását az R_f értékekben mutatkozó ingadozások miatt – amelyeket a futó anyag mennyisége és az egyes foltok egymáshoz való aránya is befolyásol –

minden esetben hozzáadás és a megfelelő folt megnövekedése, valamint a színazonosítás alapján végeztük el.

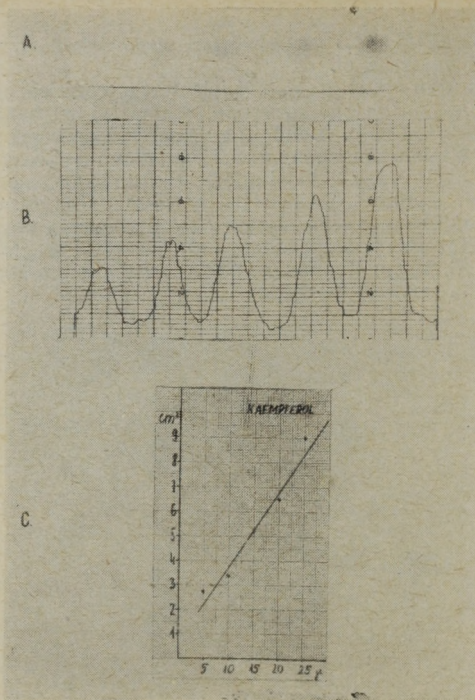
Az elválasztás után újabb problémát jelentett a megfelelő színreakció alkalmazása, amely a papírról történő közvetlen mennyiségi meghatározást a rendelkezésünkre álló Locarte Comp. (London) gyártmányú denzitométer segítségével lehetővé teszi. Az általánosan ismert és használt flavonoid reagensek vagy nem voltak elég érzékenyek, vagy a keletkezett színintenzitása nem volt elegendő, vagy pedig a papír elszíneződése miatt a hátteret változtatták meg és így a denzitometriás kiértékelésnél nehézségeket okoztak. Számos reagens kipróbálása után az uranil acetát 1%-os vizes oldata (19) bizonyult megfelelőnek a kívánt cél elérésére. Az 5. ábrán egy ily módon előhívott kromatogramot, denzitogramot és az annak alapján szerkesztett kalibrációs görbét láthatjuk.



4. ábra

A különféle flavonoidokkal kapott vöröses-barna foltok színintenzitása nem volt teljesen azonos, a jól meghatározható mennyiségek kismértékben eltérnek egymástól. Az 1. táblázatban tüntettük fel az egyes flavonoidoknál már jól mérhető mennyiségeket és a denzitometrállással kapott területeket cm^2 -ben.

A meghatározás pontosságának ellenőrzésére kétféle mérést végeztünk. Egyrészt meghatároztuk a mérés reprodukálhatóságát modelloldatokból történő futtatás esetében, amikor is a vizsgált alsó- és felső határ esetében 5–5 párhuzamos mérés eredményét felhasználva meghatároztuk a középértékek százalékos hibáját. A 2. táblázat alapján látható, hogy a kempferolnál az 5 μg -nyi mennyiség esetében talált nagyobb eltéréstől eltekintve a középértékek hibája $\pm 10\%$ körül van.



5. ábra

1. táblázat

A vizsgált flavonoidok méréshatárai

A vizsgált flavonoid	menyiség gamma	görbe alatti terület cm ² -ben
Rutin.....	10-25	3-8
Kempferol.....	2-10	2-10
Kvercetin.....	2-8	3-9
Kvercitrin.....	5-25	2-8

2. táblázat

A középértékek szórása a denzitometriás meghatározásánál (±%)

A vizsgált flavonoid	Mennyiség	
	5 gamma	20 gamma
Rutin.....	6,6	1,7
Kvercetin.....	10,9	12,5
Kempferol.....	15,7	10,0
Kvercitrin.....	6,1	10,0

A módszer pontosságának további vizsgálata céljából az egyes növényi extraktoknál vizsgáltuk a hozzáadás után visszanyerhető flavonoidok mennyiségét. Itt már nagyobb eltéréseket tapasztaltunk és azt találtuk, hogy az eltérések nemcsak a flavonoidoktól, hanem a vizsgált extrakt minőségétől is függenek. Így pl. a rutin a sárgabarackból, ribizkéből vagy birsalmából 100% körül nyerhető vissza, míg a görögdinnyéből és almából csak 80% körüli mennyiségben. A kvercetin a legtöbb esetben $\pm 10\%$ pontossággal visszanyerhető, míg a kvercitrin visszanyerése csak 80% körüli. Az eltérések okát nem sikerült tisztázni, valószínű, hogy a kísérő anyagok minőségében levő változás a start-helynél megnövekedett adszorpciót eredményez. A kérdés végleges eldöntése további vizsgálatokat igényel.

Az elmondottak alapján kidolgozott módszer szerint megvizsgáltuk 17-féle friss hazai gyümölcsféle flavonoidtartalmát. A 3. táblázatból láthatjuk, hogy a kimutatott flavonoidok 100 g-onként néhány mg %-os mennyiségben találhatók a hazai gyümölcsökben. A gyümölcsök között a legnagyobb különbség a rutin-tartalomban mutatkozott, 3–46 mg % közötti értékekkel. A kvercitrinben az alma a leggazdagabb, hozzá hasonló értéket a főzelékfélék között vizsgált zöldpaprikában találtunk. Lehetséges, hogy a nagy redukálóképességű kvercitrin mennyiség jelenlétének köszönhető, hogy az almában az aránylag hosszú tárolási idő alatt is csak kevés C-vitaminvesztéssel lehet számolni. Kemperolt csupán földieperben és az őszibarackban sikerült kimutatnunk, ezekben is csak igen kis, 1 mg % körüli mennyiségben, a többi gyümölcsben legfeljebb nyomok voltak találhatóak.

3. táblázat

Metanollal extrahálható flavonoidok a hazai gyümölcsökben

A vizsgált anyag	Rutin mg %	Kvercitrin mg %	Kvercetin mg %	Kemperol mg %
Alma	—	22,6	—	—
Körte	12,5	—	25,0	—
Birsalma	6,3	—	3,8	—
Cseresznye	13,4	5,7	2,4	—
Meggy	—	7,6	4,5	—
Sárgabarack	25,0	3,1	—	—
Őszibarack	3,1	—	10,0	1,0
Szilva	—	2,6	—	—
Ríngló	—	3,1	—	—
Málna	25,0	5,3	—	—
Szamóca	—	—	2,2	1,3
Eper (fa, fehér)	45,6	3,9	16,3	—
Egres	—	—	—	—
Ribizke	25,0	—	—	—
Szőlő	12,5	6,3	15,0	—
Sárgadinnye	—	—	—	—
Görögdinnye	3,3	2,5	—	—

További vizsgálatainkat a zöldségfélék flavonoidtartalmának meghatározására, valamint a flavonoidoknak a C-vitamin bomlását befolyásoló hatásának tanulmányozására terjesztjük ki.

Az azonosításra és modellként felhasznált flavonoidokat a Debreceni Kossuth Lajos Tudományegyetem Szerveskémiai Tanszékétől kaptuk, amelyekért ezúton is köszönetet mondunk.

- (1) Armentano L.: Z. Klin. Med., 129, 685, 1936.
- (2) Armentano L., Bentsáth K., Bérés T., Rusznyák S., Szentgyörgyi A.: Dtsch. med. Wschr., 62, 1325, 1936.
- (3) Bruckner Gy., Szentgyörgyi A.: Nature, 138, 1057, 1936.
- (4) Jeney E., Címmer A.: Arch. exp. Path. Pharm. 190, 648, 1938.
- (5) Rekers P. E., Field J. B.: Science 107, 16, 1948.
- (6) Gábor M., Skultéty S.: Magyar Radiológia 3, 86, 1951.
- (7) Heimann W., Heimann A., Gremminger M., Holland H.: Fette u. Seifen, 55, 394, 1953.
- (8) Richardson G. A., El-Rafey M. S., Long M. L.: Dairy Sc. 30, 397, 1947.
- (9) Lea C. H.: J. Sci. Food Agric, 9, 621, 1958.
- (10) Szabó V.: Kossuth L. Egyetem Szerveskémiai Tanszék, Debrecen, személyes közlés.
- (11) Gábor M.: Elelmezési Ipar, 19, 309, 1965.
- (12) Fragner I.: Vitamine VEB G. Fischer Verlag, Jena, 1964.
- (13) Scarborough H.: Biochem J. 39, 271, 1945.
- (14) Krewson C. F., Couch J. F.: J. Amer. Chem. Soc., 70, 257, 1948.
- (15) Fontaine T. D., Poola J. B., Porter W. L., Maghski J.: Arch. Biochem., 15, 89, 1947.
- (16) Geissmann T. A.: The chemistry of flavonoid compounds, Pergamon Press Oxford — Paris, 1962.
- (17) Lindner K.: Die Nahrung 3, 299, 1959.
- (18) W. Jurics É.: ÉVIKE, 12, 3, 1966.
- (19) Páris S.: Prod. Pharm., 15, 347, 1960. cit. J. M. Bobbit: Thin Layer Chromatography Reinhold Publ. Corporation New York — London 1963.

БУМАЖНО — ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ ПОКАЗЫВАЮЩИХ ДЕЙСТВИЕ ВИТАМИНА Р В ПЛОДАХ

К. Сотьори и В. Э. Юрич

— Авторы разработали простой бумажнохроматографический метод для определения флавоноидов известных по фармакологическим действиям и примененных в пищевой промышленности в виде антиоксидантов. При помощи метода установили содержание флавоноидов наиболее часто происходящих в 17 видов отечественных плодов и ягод. Экстракция их производится метанолом из плодов сушеных сульфатом натрия, а разделение при помощи двух смесей растворов во время удлиненной хроматографии. После первого разделения, смешивающие вещества имеющие R_f ниже 0,2 и размещенные на нижней части бумаги удаляют срезанием этой части бумаги. Совершенно разделенные пятна флавоноидов проявляют уранилацетатом, а количественное определение производится денситометром на основе калибрационной кривой полученной при помощи одновременно хроматографированных известных флавоноидов в увеличивающем количестве.

Ошибка определения рютина, кверцетина и кемпферола $\pm 10\%$, а кверцетрина случайно больше.

EIN VERFAHREN ZUR PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN BESTIMMUNG EINIGER OBSTFLAVONOIDE MIT VITAMIN-P WIRKSAMKEIT

Sz. K. Szotyori, W. É. Jurics

Verfasser arbeiteten zur Bestimmung der auf Grund ihrer pharmakologischen Wirksamkeit bekannten und in Lebensmitteln als Antioxidantien verwendbaren Flavonoide eine einfache papierchromatographische Methode aus. Mittels derselben bestimmten sie die Mengen der am häufigsten vorkommenden Flavonoide in 17 einheimischen Obstarten. Die Extraktion erfolgte aus mit Natriumsulfat getrocknetem Obst durch Methanol. Die Trennung wurde mit

gestreckter Chromatographie in zweierlei Lösungsmittelgemischen durchgeführt. Nach der ersten Entwicklung entfernten sie die unterhalb R_f 0,20 liegenden störenden Substanzen durch Abschneiden des unteren Papierteiles. Die auf diese Weise vollständig trennbaren Flavonoidflecke wurden mit Uranylacetat hervorgerufen, ihre quantitative Bestimmung erfolgte durch Densitometrie auf Grund einer Kalibrationskurve, welche mit Hilfe der in jedem Falle in steigenden Mengen mitlaufenden Flavonoide aufgenommen wurde. Die Fehlerbreite der Methode für Rutin, Quercetin und Kämpferol beträgt $\pm 10\%$, bei Quercitrin kann der Fehler auch grösser sein.

METHOD FOR THE PAPER CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF SOME FLAVONOIDS OF VITAMIN P EFFECT IN FRUITS

dr. K. Szöke-Szotyori and É. W.-Jurics

A simple paper chromatographic method was developed by the authors for the determination of flavonoids known as pharmacological agents and suitable for use in foods as antioxidants. With the aid of this method, the quantity of flavonoids occurring most frequently in 17 Hungarian fruit types was established. Fruit samples dried with sodium sulfate were extracted with methanol. Separation was carried out with extended chromatography, using two types of solvent systems. After the first run, the interfering substances located at a level below $R_f = 0.20$ were removed by simply cutting off the lower portion of the paper. The flavonoid spots completely separated from each other in this way were developed with uranyl acetate, and quantitatively investigated by densitometry. In each case, a calibration curve served as a basis for the determination. This curve was prepared with increasing amounts of flavonoids which were allowed to run parallel. By this method, rutin, quercetine and kämpferol can be determined with an error of $\pm 10\%$ while in the case of quercitrine, the error may be greater.

MENGEBIER, H.

Vaj víztartalmának meghatározása

(Die Wassergehaltsbestimmung in Butter)

Molkerei- und Käserei-Zeitung, 15, 1362, 1964.

A tej és tejtermékek vizsgálatának egységesítése keretében a vaj víztartalmának kisütéses úton történő meghatározását vizsgálták. Az ismert módszer fő hibaforrásai a következők:

1. A vaj lassú bemérése.
2. A vaj kifröccsenése a kisütésnél.
3. A vaj túl rövid, vagy túl hosszú ideig tartó hevítése.

4. A pohár nem megfelelő lehütése.
5. Pontatlan mérleg.

A pohár két percen belüli lehütése villamos melegítő, vagy ventilátor segítségével elvégezhető. A pohár melegen történő visszamérése pontatlanságokra vezet és a mérleget is károsítja. A vaj kisütése szobahőmérsékletű óraüveggel ellenőrizhető, ugyanis a pohár fölé tartott óraüvegen a kondenzvíz lecsapódása könnyen észlelhető.

Két meghatározás közt – homogén vízeloszlást feltételezve – a megengedett legnagyobb eltérés $0,2\%$ víztartalom.

Kacs Kovics M. (Pécs)