

Borostyánkősav meghatározása gyümölcsökben

W. JURICS ÉVA

Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1968. január 2.

A gyümölcs ízének kialakításában fontos szerep jut a szerves savaknak, ugyanis a gyümölcsök üdítő hatása, savanykás íze e vegyületektől származik. Ezért a hazai gyümölcsök szerves sav-tartalmának megállapítására irányuló vizsgálatainkat az almasav, borkősav, citromsav (1) és a hidroxifahéjsavak (2) gyümölcsökben végzett mennyiségi meghatározása után kiterjesztettük a borostyánkősavra is.

A gyümölcsök savtartalmát régebben acidimetriás úton állapították meg (3). Ez a módszer azonban csak a gyümölcs összes savtartalmára ad felvilágosítást, de nem alkalmas a gyümölcsökben levő savak minőségének és egyenkénti mennyiségének megállapítására. Később a gyümölcsök savanyú ízét befolyásoló anyagok külön-külön történő meghatározására dolgoztak ki eljárásokat. A borostyánkősav mérésére leggyakrabban használt módszerek a következők:

Kunz (4) titrimetriásan határozta meg a borostyánkősav mennyiségét. A vizsgálandó anyagból kénsavval szabadabbá tett borostyánkősavat bárium-sója alakjában különítette el a meghatározást zavaró anyagoktól, majd a borostyánkősav bárium-sóját ezüstnitrát oldattal ezüstsóvá alakította át, végül az ezüstnitrát feleslegét ammóniumrodanid oldattal megtittrálta. Az ismert és a titrálással meghatározott ezüstnitrát mennyiségek közötti különbség megfelel a borostyánkősav tartalomnak.

Dimotaki-Kourakou (5) módosította a *Kunz*-féle eljárást, mégpedig úgy, hogy ioncserélő gyanta segítségével végzett előtisztítást, majd éteres extrakciót alkalmazott. Az extrakt alikvot részében végezte el a borostyánkősav meghatározását *Kunz* szerint.

Wollmann és Pohloudek-Fabini (6) potenciometrikus titrálással állapította meg növényi anyagok borostyánkősav-tartalmát. A növényből nyert vizes extraktot anion- és kationcserélő gyanták segítségével tisztították. Ezután a vizsgálandó savakat papírkromatográfiás úton szétválasztották, a borostyánkősavat eluálták és potenciometrikus titrálással megállapították mennyiségét.

Meghatározható a borostyánkősav mennyisége acidimetriásan is a gyümölcsből nyert alkoholos extrakt kation- és anioncserélő gyantával történő tisztítása, majd az egyes savak oszlopkromatográfiával való szétválasztása után (7, 8). *Scheffer* és munkatársai (9) ioncserélő-oszloppal választották szét a vizsgálandó savakat, majd 0,01 n NaOH-val titrimetriásan állapították meg mennyiségüket.

A borostyánkősav meghatározására papírkromatográfiás eljárást is használnak (10).

Lehmann és Martinod (11) fehér borbán határozta meg a borostyánkősav mennyiségét vékonyréteg-kromatográfia segítségével.

Kísérleti rész

Az ismertetett módszerek eléggé nehezen kivitelezhetők, sorozatvizsgálatra való alkalmazásuk körülményes. Ezért szükségesnek tartottuk, hogy a gyümölcsökben előforduló borostyánkősav mennyiségi meghatározására módszert dolgozzunk ki.

Az első problémát az jelentette, hogy a kipréselt gyümölcslemből meghatározható-e közvetlenül, azaz extrahálás nélkül a borostyánkősav, illetve, hogy melyik oldószer a legalkalmasabb a vizsgálandó sav gyümölcsökből történő kivonására.

Közvetlenül a gyümölcs kipréselt levéből nem sikerült a borostyánkősavat meghatározni, mert ahhoz, hogy jól mérhető borostyánkősav foltot kapjunk, olyan nagy mennyiségű gyümölcslevet kellett a papírra felvenni, amely kiértékelhetetlen kromatogramot adott.

Ezért a borostyánkősav kivonásához a vizsgálatra felhasznált gyümölcsöt turmix készülékkel felaprítottuk, majd vízmentes nátriumsulfáttal eldörzsölve Soxhlet készülékben extraháltuk. A borostyánkősav kivonását a leggyakrabban használt extrahálószerekkel kíséreltük meg, mégpedig acetonnal, etanollal, etilacetáttal és metanollal. Vizsgálataink szerint a legjobbnak bizonyult a metanollal végzett extrahálás, eredményeink az 1. táblázatban láthatók.

A megfelelő oldószer kiválasztása után megállapítottuk a borostyánkősav extrahálásához szükséges időt. A 2. táblázat eredményei azt mutatják, hogy 20 óra elegendő a borostyánkősav kivonására. Az extrahálás befejezése után a borostyánkősavat tartalmazó kivonatot vízfürdőn besűrítettük és ezt használtuk fel a továbbiakban vizsgálat céljára.

1. táblázat

A borostyánkősav kivonása különböző oldószerekkel

Oldószer megnevezése	Borostyánkősav mg/100 g birs
Aceton	86
Etanol	144
Etilacetát	53
Metanol	238

2. táblázat

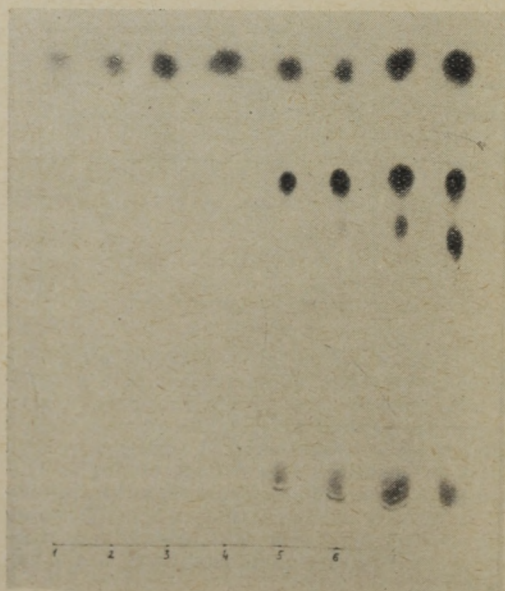
Az extrahálás időtartamának hatása a metanollal kivonható borostyánkősav mennyiségére

Extrakció időtartama óra	Borostyánkősav mg/100 g birs
2	48
5	106
10	170
15	205
20	262
25	259

A borostyánkősav meghatározását zavaró anyagok eltávolítására papírkromatográfiai eljárást használtunk. A borostyánkősav, valamint a gyümölcsökben a szerves savak közül a leggyakrabban és legnagyobb mennyiségben előforduló almasav, borkősav, citromsav papírkromatográfiai szétválasztásához kipróbált futtatószerkeket, valamint az egyes savak R_f értékeit Schleicher – Schüll 2043 b Mgl papíron a 3. táblázat tartalmazza. Vizsgálataink szerint az etilacetát-jégecet-víz 3 : 1 : 1 arányú kromatografáló elegy mutatkozott a legjobbnak felszálló futtatás esetén. E futtatószer alkalmazásakor a borostyánkősav kerek, jól értékelhető foltokat ad. Azonban a gyümölcsökből végzett borostyánkősav meghatározáskor felszálló ismételt futtatást kell alkalmazni, hogy megfelelő, értékelhető elválasztást kapjunk.

A vizsgált szerves savak papirkromatografálásánál kipróbált futtatószer

Futtatószer összetétele	Almasav	Borkősav	Borostyánkősav	Citromsav
	<i>R_f</i> értékek			
Éter-hangyasav-víz 13:1:1	0,44	0,17	0,79	0,29
Éter-jégecet-víz 13:1:1	0,38	0,14	0,73	0,26
Éter-90%-os hangyasav-víz 60:14:9 ...	0,73	0,56	0,92	0,66
n-butanol-hangyasav-víz 10:1:5	0,56	0,31	0,79	0,46
n-butanol-hangyasav-víz 15:10:15	0,53	0,47	0,73	0,52
n-butanol-hangyasav-víz 18:2:9	0,54	0,33	0,75	0,45
n-butanol-ecetsav-víz 4:1:1	0,45	0,22	0,75	0,33
n-butanol-hangyasav-víz 4:1:1	0,53	0,32	0,76	0,40
n-butanol-benzilalkohol-hangyasav-víz 7:7:1:1	0,35	0,12	0,65	0,27
n-butanol-hangyasav-víz 4:1:5	0,54	0,33	0,75	0,47
Fenol-víz-hangyasav 75:24:1	0,52	0,35	0,76	0,45
Fenol-víz-hangyasav 3:1:1	0,62	0,52	0,81	0,56
Etanol-fenol-víz 50:25:25	0,59	0,51	0,75	0,56
Etanol-víz-ammónia 80:16:4	0,26	0,20	0,32	0,06
Etilacetát-hangyasav-víz 3:1:1	0,69	0,51	0,88	0,61
Etilacetát-jégecet-víz 3:1:1	0,60	0,44	0,80	0,52
i-amilalkohol-kloroform-hangyasav (vízzel telített) 4:1:1	0,26	0,09	0,55	0,15
Pentán-5m hangyasav 1:1	0,88	0,86	0,89	0,90
Amilalkohol-jégecet-víz 4:1:2	0,31	0,12	0,61	0,18
Propanol-ammónia 70:30	0,16	0,13	0,24	0,05



1. ábra. Meggyből kapott borostyánkősav-tartalmú extrakt kromatogramja

Futtatószer: etilacetát-jégecet-víz 3:1:1 (ismételt futtatás)

Előhívó: anilin, glükóz etanolos oldata

1., 2., 3., 4. kalibrációs sorozat, mennyiségek: 20, 30, 40, 50 μg borostyánkősav

5. 20 μg borostyánkősav + 2 μl extrakt

6. 3 μl -, 7. 5 μl -, 8. 7 μl extrakt

A vizsgált szerves savak színe az alkalmazott reagensek hatására

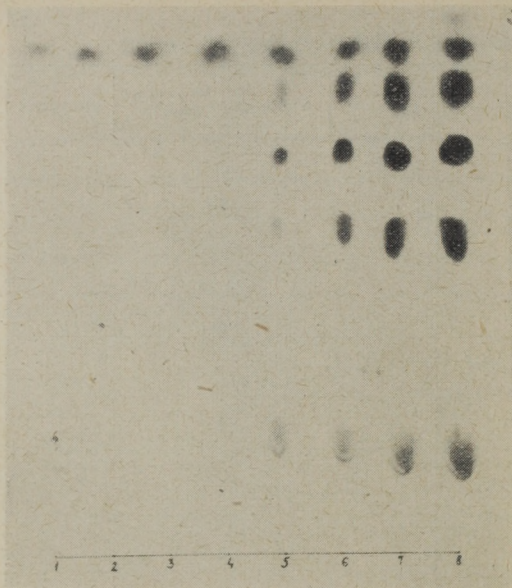
Előhívó reagens megnevezése	Almasav	Borkősav	Borostyánkősav	Citromsav
Metilvörös-indikátor (12)	vörös			
Metilvörös-metilénkék-ind. (13)	piros			
Brómfenolkék-indikátor (14)	sárga			
Brómtimolkék-indikátor (13)	sárga			
Brómkrezolöld-indikátor (15)	sárga			
Ecetsavanhidrid-piridintartalmú előhívó (16)	szintelen			sárga
p-dimetilaminobenzaldehid-tartalmú előhívó (17)	szintelen	lila	halv. ibolya	ibolya
Schweppe-féle reagens (18, 19)	barna			
8-hidroxi kinolin tartalmú-reagens (20)	UV fényben lila			
Jodid-jodát-reagens (21)	kék			
Brómkrezolöld-brómfenolkék-káliumpermanganát-nátrium karbonát tartalmú előhívó (22)	narancs-sárga	bíbor-piros	vörös	ibolya
Diazotált α -naftilaminreagens (23)	piros			

A borostyánkősav elválasztása után újabb problémát jelentett olyan megfelelő előhívó alkalmazása, amely a papíron történő közvetlen mennyiségi meghatározást denzitométer segítségével lehetővé teszi. A szerves savak előhívására az általánosan használt – általunk is kipróbált – előhívók hatására keletkezett szint a 4. táblázat tartalmazza.

Irodalmi adatok szerint legelterjedtebb a savbázis-indikátorokkal történő előhívás. Az indikátorokkal végzett kimutatásnak azonban az a hátránya, hogy a színkontraszt a folt és a háttér között nagyon gyorsan eltűnik.

Az általunk kipróbált előhívók közül legmegfelelőbbnek – az almasav, borkősav, citromsav előhívására is jól alkalmazható (1) – Schweppe-féle reagenst találtuk. Az előhívás lényegében a Maillard-reakción alapszik, a cukor és az aminok között hő hatására lejátszódó reakciót a jelen levő szerves sav katalizálja. Schweppe-féle reagenssel bepermetezve a papírt, hőkezelés után barna színnel jelenik meg a savfolt fehér alapon. Az 1. ábra meggyből, a 2. ábra pedig egresből kapott borostyánkősav-tartalmú extrakt kromatogramját mutatja.

Mint már említettem, a borostyánkősav mennyiségét denzitometriásan mértük, azaz meghatározásához a folterület nagysága, színintenzitása és az anyag mennyisége közötti összefüggést használtuk fel. A 3. ábrán Schweppe-féle reagenssel előhívott kromatogramot, denzitogramot és az annak alapján szerkesztett kalibrációs görbét láthatjuk.



2. ábra. Egresből kapott borostyánkősav-tartalmú extrakt kromatogramja

Futtatószer:
etilacetát-jégecet-víz 3 : 1 : 1
(ismételt futtatás)

Előhívó: anilin, glükóz
etanolos oldata

1., 2., 3., 4. kalibrációs sorozat,
mennyiségek: 20, 30, 40, 50 µg
borostyánkősav

5. 20 µg borostyánkősav
+ 2 µl extrakt

A meghatározás pontosságának ellenőrzésére kétféle mérést végeztünk. Egyrészt meghatároztuk a mérés reprodukálhatóságát standard oldatokból történő futtatás esetében a kalibrációs görbe készítéséhez használt legkisebb, középső és legnagyobb koncentrációkkal. Az 5. táblázatból láthatók vizsgálati eredményeink.

5. táblázat

A kidolgozott módszer pontossága

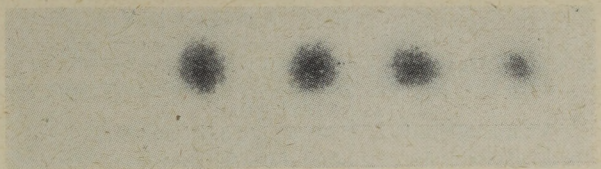
A borostyánkősav mennyisége µg-ban	Az egyes mérések hibája az átlag %-ában
20	± 10,1
35	± 8,0
50	± 6,8

6. táblázat

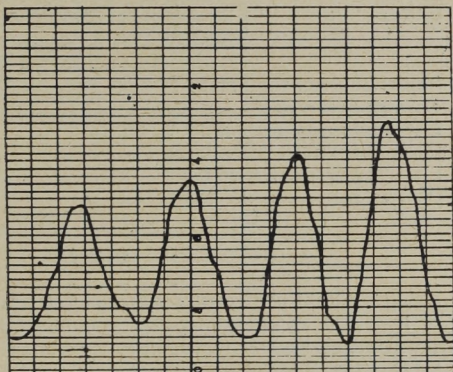
A gyümölcshez hozzáadott borostyánkősav visszanyerése

Gyümölcs neve	Hozzáadott	Visszanyert	Visszanyerés %
	borostyánkősav µg/µl		
Birs	20	19,2	96,0
Egres	20	19,5	97,5
Meggy	20	18,3	91,7

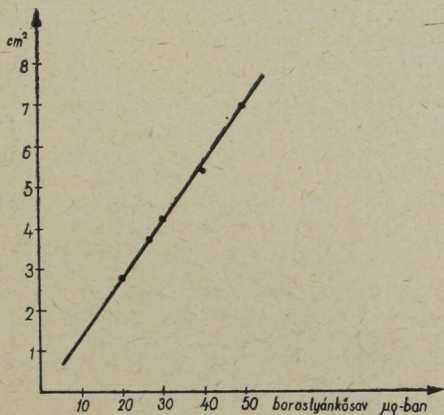
a.



b.



c.



3. ábra. A borostyánkősav értékelése

a) Borostyánkősav kromatogramja

Mennyiségek: 20, 30, 40, 50 μg borostyánkősav

b) Borostyánkősav denzitogramja

c) Kalibrációs görbe

A módszer pontosságának további tisztázása céljából egyes gyümölcs-extraktoknál vizsgáltuk a mintához hozzáadott borostyánkősav visszanyerhetőségét, vagyis azt, hogy a munkafolyamat milyen veszteséggel jár. Ezért a vizsgálandó, megfelelően aprított gyümölcshöz ismert mennyiségű tiszta borostyánkősavat adtunk – mégpedig annyit, hogy az extrakt 1 μl -e 20 μg hozzáadott borostyánkősavat tartalmazzon – és a kialakított vizsgálati eljárás szerint mértük a borostyánkősav mennyiségét. A kapott eredményeket a 6. táblázat tartalmazza.

A módszer leírása

Szükséges vegyszerek és eszközök:

Standard anyag: p. a. borostyánkősav 1%-os vizes oldata (gyártó cég: REANAL)

Vízmentesítéshez: vízmentes nátriumszulfát

Extrahálószer: p. a. metanol

Futtatószer: etilacetát-jégecet-víz 3 : 1 : 1

Előhívó oldat: 20 g glukózt 200 ml desztillált vízben oldunk, majd az oldatot 20 ml frissen desztillált anilinnal, 200 ml etanollal elegyítjük és n-butanollal 1000 ml-re feltöltjük

Papír: Schleicher – Schüll 2043 b Mgl

Turmix készülék

Extraháló eszköz: Soxhlet készülék

Kromatografáló berendezés

Locarte-féle denzitométer

Planiméter

Eljárás

100 g gyümölcsöt turmix készülékkel felaprítunk. A turmixolt anyagból 40 g-ot lemérünk és nátriumszulfáttal eldörzsöljük. Ezután Soxhlet készülékben 20 órán át végezzük a borostyánkősav kivonását. Az extrahálás befejezése után a kivonatot kb. 5–8 ml-re vízfürdön besűrítjük, lehülés után 10 ml-re feltöltjük.

Az extraktból papírkromatográfiás úton végezzük a borostyánkősav elválasztását a többi anyagtól. A startvonalra először a borostyánkősav-standardot visszük fel – ami a kalibrációs sorozatot adja – mégpedig a következő mennyiségeket: 20, 30, 40, 50 μg -ot, majd a startvonalnak a kalibrációs sorozat után következő pontjára 20 μg borostyánkősavat és néhány μl extraktot csepentünk fel. A kromatogram startvonalára ezután a vizsgálandó extraktot visszük fel különböző koncentrációkban.

Egy éjszakán át tartó kondicionálás után végezzük a kromatografálást. Az első futtatást 2, a másodikat pedig 6 órán át folytatjuk. Futtatás után a kromatogramot egy éjszakán át állni hagyjuk, hogy az oldószer a papírról elpárologjon. Az előhívóval bepermetezett kromatogramot 5–10 percig 125 C°-os szárítószekrényben tartjuk, míg a borostyánkősav fehér alapon barna folt alakjában megjelenik. Előhívás után a kromatográfiás úton elválasztott borostyánkősav mennyiségét denzitometriásan mérjük, ezután a denzitogram alapvonala és a csúcsok által bezárt területet planimetráljuk. Helyes értéként ötször végzett planimetrálás középértékét fogadjuk el. A keresett ismeretlen borostyánkősav mennyiségét kalibrációs görbe segítségével határozzuk meg.

Eredmények

Az előbb elmondottak alapján kidolgozott módszerrel megvizsgáltuk kereskedelemből beszerzett 17 féle friss, hazai gyümölcs borostyánkősav-tartalmát. Eredményeink a 7. táblázatban láthatók. A táblázatból kitűnik, hogy a cukor- és a görögdió kivéve, gyümölcsaink tartalmaznak borostyánkősavat. Vizsgálati eredményeinket nem tudtuk összehasonlítani más szerzők adataival, mert a rendelkezésünkre álló irodalomban nem találtunk olyan munkát, amely a gyümölcsök borostyánkősav-tartalmára felvilágosítást adna.

**A vizsgált gyümölcsök
borostyánkósav-tartalma**

Gyümölcs neve	Borostyánkósav mg/100 g gyümölcs
Alma	23
Birs	300
Cukordinnye	0
Cseresznye	78
Egres	215
Görögdinnye	0
Körte	60
Málna	48
Meggy	198
Naspolya	65
Őszibarack	55
Ribizke (piros) ..	78
Sárgabarack	70
Szamóca	85
Szilva	163
Szőlő	62
Zöldringlő	200

I R O D A L O M

- (1) *W. Jurics Éva, Lindner K.: ÉVIKE 11, 40, 1965.*
- (2) *W. Jurics Éva: Z. U. L. 132, 193, 1966.*
- (3) *Vuk M., Sándor Z., Vas K.: Élelmiszerek és élvezeti cikkek vizsgálata Hungária MTE XXVIII. Molekula csoportja Budapest, 1943.*
- (4) *Kunz R.: Z. U. L. 6, 721, 1903.*
- (5) *Dimotaki-Kourakou V.: Ann. Falsif. Expert. Chim., 54, 70, 1961.*
- (6) *Wollmann H., Pohloudek-Fabini R.: Pharmazie, 16, 548, 1961.*
- (7) *Wolf J.: Planta (Berlin), 51, 547, 1958.*
- (8) *Enebo L., Blomgren G., Johnson E.: J. Inst. Brewing, 61, 408, 1955.*
- (9) *Scheffer F., Kickuth R., Lorenz H.: Qualitas Plantarum et Mater. veget., 12, 342, 1965.*
- (10) *Becker E.: Z. U. L., 98, 249, 1954.*
- (11) *Lehmann G. s Martinod P.: Z. U. L., 130, 269, 1966.*
- (12) *Schormüller J., Langner H.: Z. U. L., 113, 104, 1960.*
- (13) *Pertusz T., Jeney K.: Magyar Kémiai Folyóirat, 61, 13, 1955.*
- (14) *Ribereau-Gayon P.: Ann. Falsif. Fraudés., 47, 3, 1954.*
- (15) *Bajnok I.: ÉVIKE, 4, 242, 1958.*
- (16) *Buch M. L., Montgomery R., Porter W. L.: Anal. Chem., 24, 489, 1952.*
- (17) *Schreier K., Hack E.: Naturwissenschaften, 43, 178, 1956.*
- (18) *Pohloudek-Fabini R., Wollmann Chr., Wollmann H.: J. Chromat., 2, 525, 1959.*
- (19) *Smith F., Spriestersbach D.: Nature (London), 174, 466, 1954.*
- (20) *Resnik F. E., Lee L. A., Powell W. A.: Anal. Chem., 27, 928, 1955.*
- (21) *Pohloudek-Fabini R., Wollmann H.: Pharmazie, 16, 57, 1961.*
- (22) *Paskova J., Munk V.: J. Chromat., 4, 241, 1960.*
- (23) *Schmidt G. C., Fischer C., McOwen J. M.: J. Pharm. Sci., 52, 468, 1963.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ В ФРУКТАХ

Е. В. Юрич

Автор разработал метод определения содержания янтарной кислоты в фруктах помощью бумажной хроматографии. Применением повторной восходящей наводки в смеси этил - ацетат - уксусная кислота - вода 3 : 1 : 1, из метанолового экстракта фруктов отделил янтарную кислоту от веществ

мешающих определение. Количество таким образом отделенной янтарной кислоты и проявленная реагентом Швеппе определил денситометрически. Хорошо измеримое самое меньшее количество вещества 20 микрограмм. Точность метода 10%. При исследованиях автор определил содержание янтарной кислоты в 17 видах фруктов.

BESTIMMUNG DER BERNSTEINSÄURE IN OBST

W. É. Jurics

Verfasserin arbeitete eine papierchromatographische Methode zur Bestimmung des Bernsteinsäuregehaltes von Obst aus. Aus dem Methanolextrakt des Obstes wurde mit dem Laufmittel Aethylacetat-Eisessig-Wasser 3 : 1 : 1 wiederholt aufsteigend die Bernsteinsäure von den störenden Substanzen getrennt. Die Menge der so getrennten und mit dem Schweppe'schen Reagens entwickelten Bernsteinsäure wurde densitometrisch ausgewertet. Die gut messbare geringste Substanzmenge beträgt 20 μ g. Genauigkeit der Methode ist $\pm 10\%$. Im Laufe der Untersuchungen wurde der Gehalt an Bernsteinsäure von 17 Obstarten bestimmt.

DETERMINATION OF SUCCINIC ACID IN FRUITS

É. W. Jurics

A paper chromatographic method was evolved by the author for the determination of the contents of succinic acid in fruits. A methanolic extract of the fruit has been subjected to repeated ascendent runnings, and succinic acid has been separated from substances which interfere with the determination, in a 3 : 1 : 1 mixture of ethyl acetate: glacial acetic acid: water. The amount of succinic acid separated in this way and developed with Schweppe's reagent has been evaluated by densitometry. The minimum quantity of substance which can be measured reliably ranged 20 μ g. The error of the results obtained by the method is ± 10 per cent. In the course of the investigations, the contents of succinic acid have been determined in 17 varieties of fruits.

DOSAGE DE L'ACIDE SUCCINIQUE DANS LES FRUITS

E. W. Jurics

L'auteur a élaboré une méthode de chromatographie au papier pour le dosage de l'acide succinique dans les fruits. Elle a séparé l'acide succinique des corps perturbateurs en faisant courir par ascension plusieurs fois l'extrait méthanolique du fruit dans un mélange d'acétate éthylique-acide acétique glacial - eau 9 : 1 : 1. Elle a évalué par densitométrie la quantité d'acide succinique ainsi isolé et développé avec le réactif de Schwappe. La plus petite quantité d'acide succinique que l'on peut encore doser avec exactitude est 20 mg. L'exactitude de la méthode est $\pm 10\%$. Au cours de son travail elle a déterminé la teneur en acide succinique de 17 sortes de fruits.