

Paweł Paśko¹, Henryk Barton¹, Anna Krzysztyniak¹, Zofia Zachwieja¹, Shela Gorinstein²

ANALIZA WYBRANYCH KWAŚÓW ORGANICZNYCH W SOKACH CYTRUSOWYCH METODĄ IZOTACHOFOREZY KAPILARNEJ

¹Zakład Bromatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. Z. Zachwieja

²Department of Medicinal Chemistry and Natural Products School of Pharmacy,
The Hebrew University – Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel

Kwas cytrynowy, askorbinowy oraz winowy zostały rozdzielone i oznaczone ilościowo w soku pomarańczowym, grejpfrutowym, mandarynkowym oraz cytrynowym metodą izotachoforezy kapilarnej. Ponadto na przykładzie grejpfrutów przebadano trwałość tych trzech kwasów podczas przechowywania soków w różnych temperaturach. W sokach tych kwas cytrynowy wykazywał najwyższą stabilność. stężenie kwasu askorbinowego malało, natomiast wzrastała w nich zawartość kwasu winowego, który jest markerem starzenia się soków

Słowa kluczowe: izotachoforeza kapilarna, kwas winowy, kwas askorbinowy, kwas cytrynowy, soki cytrusowe
Key words: capillary isotachopheresis, citric acid, tartaric acid, ascorbic acid, citric juices

Owoce cytrusowe to bogate źródło antyoksydantów, witamin, składników mineralnych, kwasów organicznych oraz błonnika. Według najnowszej piramidy żywieniowej opracowanej przez Willetta (USA) (cyt. za 1) owoce powinny być spożywane w ilości 2-4 porcji na dobę. Ostatnio opublikowane doniesienia naukowe (2; 3) oraz raport Joint FAO/WHO Expert Consultation na temat diety, żywienia i prewencji chorób przewlekłych podaje iż, codziennie powinno spożywać się minimum 400 g owoców i warzyw, aby zapobiec schorzeniom sercowo-naczyniowym, nowotworom, cukrzycy i otyłości. Najnowsze badania epidemiologiczne przeprowadzone w Polsce przez Fundację „Promocja Zdrowia” we współpracy z Centrum Onkologii im. Marii Curie-Skłodowskiej w Warszawie wykazały, że tylko 50% dorosłych spożywa codziennie świeże owoce, zaś 37% sporadycznie pije soki owocowe lub nie pije ich wcale. W badaniach tych stwierdzono, że więcej surowych owoców spożywają kobiety niż mężczyźni. Jedynie 5% Polaków zjada 5 załęganych porcji owoców i warzyw dziennie, zaś przeciętny Polak spożywa ich średnio 1,5 porcji na dobę. Dla porównania statystyczny Niemiec spożywa w ciągu roku blisko 50 kg jabłek, podczas gdy Polak tylko 15,5 kg. W USA przeprowadzana jest kampania upowszechniająca 5 – krotne spożywanie warzyw i owoców w ciągu doby. Jedna lub dwie porcje owoców lub warzyw mogą być zamieniane na soki (4). Wśród owoców polecanych jako doskonałe źródło antyoksydantów i innych substancji korzystnych dla zdrowia znajdują się owoce cytrusowe m.in. grejfruty, pomarańcze, mandarynki oraz cytryny (5). Witamina C jako substancja o działaniu przeciwutleniającym, występująca w dużych ilościach w tych

owocach jest stosunkowo stabilna, a jej straty przy ich przechowywaniu w chłodni nie przekraczają 10 %. W owocach tych jest ona trwalsza w porównaniu z innymi owocami, gdyż pH występujące w nich powoduje zmniejszenie aktywności enzymu askorbinazy, rozkładającej witaminę C.

Celem niniejszej pracy była ocena zawartości kwasu askorbinowego, kwasu cytrynowego i winowego w sokach z owoców cytrusowych. Ponadto przebadano wpływ czasu i temperatury przechowywania soków z owoców sweetie oraz grapefruitów czerwonych i białych na zawartość poszczególnych kwasów.

MATERIAL I METODY

Materiał do badań stanowiły świeże soki wyciśnięte z grejpfрутów *Citrus paradisi* białych (Cypr) i czerwonych (Hiszpania) oraz odmiany sweetie (oroblanco) pochodzącej z upraw w Izraelu, a także mandarynek (*Citrus reticulata*, Cypr) pomarańcz (*Citrus sinensis*, Hiszpania) i cytryn (*Citrus limonum*, Hiszpania).

Soki z owoców sweetie oraz z grejpfрутów białych i czerwonych przechowywane były w zamrażarce (temp = -22 °C) przez 17 miesięcy, a także dodatkowo z owoców sweetie w tym samym czasie w lodówce (temp. = 9 °C).

Do analizy jakościowej i ilościowej badanych kwasów organicznych zastosowano analizator izotachoforezy firmy Villa Labeco s.r.o. (EA-202 M), złożony z: kolumny preseparacyjnej (z kapilarą o średnicy 0,8 mm i długości 90 mm) połączonej z detektorem konduktometrycznym, oraz kolumny analitycznej (z kapilarą o średnicy 0,3 mm i długości 160 mm) połączonej z detektorem konduktometrycznym oraz z detektorem UV (firmy Knauer K-2600). W metodzie izotachoforezy kapilarnej wykorzystuje się dwa układy buforowe, LE (leading electrolyte) - układ wiodący i TE (terminating electrolyte) - układ kończący. Do sporządzenia buforu (500 ml) LE o pH = 3,56 użyto β-alaniny (1,782 g), kwasu solnego 1M (5 ml) i metylohydroksyetylocelulozy - MHEC 1% (50 g) Substancje chemiczne wchodzące w skład buforu LE zostały użyte zgodnie z danymi pochodzącymi z pracy *Sadecka* i wspólnie (6) TE stanowi 5 mM kwas kapronowy (7).

Analizę statystyczną wyników badań wykonano przy pomocy pakietu procedur statystyczno-graficznych „STATISTICA 5 1 PL” (firmy StatSoft Polska, Sp z o. o.). Dla badanych zmiennych sprawdzono typ rozkładu, zastosowano test Chi-kwadrat i test Kolmogorowa – Smirnova. W celu porównania wartości średnich użyto testu różnic między dwiema średnimi. Jako krytyczny poziom istotności przyjęto $p \leq 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki badań zamieszczono w tabeli I.

Kwas cytrynowy jest podstawowym składnikiem owoców cytrusowych i występuje w nich w dużych ilościach. Najwyższe stężenie tego kwasu stwierdzono w soku z cytryn (80,61 g/l = 80610 mg/l), dużo niższe 27,73 g/l w soku z grejpfрутów białych oraz najniższe w soku z grejpfрутów czerwonych, pomarańczy, mandarynek i sweetie odpowiednio 19,20 g/l, 18,10 g/l, 16,46 g/l, 11,65 g/l.

W badaniach przeprowadzonych przez *Sadecką* i wspólnie (6) stężenie kwasu cytrynowego w sokach pomarańczowych wynosiło maksymalnie 9,05 g/l. Jednakże analizy te dotyczyły soków handlowych, które nie są produktami 100 %, lecz są one rozcieńczane. Podobne badania soków dostępnych na rynku przeprowadzone przez *Jeżek* i wspólnie (9) wykazały, iż zawartość w nich kwasu cytrynowego mieściła się w zakresie od 6,3 g/l do 12,4 g/l. Analogiczne wyniki dotyczące zawartości kwasu cytrynowego w sokach grejpfрутowych otrzymali *Saccani* i wspólnie (8). Stężenie tego kwasu w przebadanych przez nich sokach mieściło się w zakresie od 8,33 g/l do 26,68 g/l.

W sokach z owoców sweetie przechowywanych w lodówce oraz w zamrażarce zawartość tego kwasu jedynie nieznacznie się obniżyła odpowiednio do 10,14 g/l i 10,16 g/l. W grejpfрутach odmiany białej, forma przechowywania soków również nie wpłynęła na zawartość kwasu cytrynowego (świeże - 27,73 g/l, zamrożone - 27,31 g/l).

Podobnie w sokach z grejpfрутów odmiany czerwonej przechowywanych jak wyżej stężenie kwasu cytrynowego nie uległo zmianie (świeże - 19,2 g/l, zamrożone 19,18 g/l).

Kwas askorbinowy występował w badanych sokach w dużych ilościach. Najwyższe stężenie tego kwasu stwierdzono w sokach z pomarańcz (1027,9 mg/l), nieco niższe z grejpfрутów czerwonych, cytryn, grejpfрутów białych odpowiednio 865,25 mg/l, 852,82 mg/l, 818,91 mg/l, zaś najniższe ale również wysokie w sokach ze sweetie (770,79 mg/l) i mandarynek (685,26 mg/l).

Sadecka i wspólnie (7) badali zawartość witaminy C w napojach z pomarańczy i uzyskali znacznie niższe wartości od nas (120,5 mg/l), co również wynika z rozcieńczania soków.

Podczas przechowywania soków ze sweetie w zamrażarce stężenie kwasu askorbinowego obniżało się do 688,74 mg/l, natomiast większe straty wykazano w warunkach temp +9°C (w lodowce) 427,42 mg/l. Powyższe różnice były istotne statystycznie. Podobne zależności obserwowano w sokach grejpfrutowych odmiany czerwonej oraz białej. W sokach odmiany czerwonej zawartość witaminy C po przechowywaniu w zamrażarce spadła do 745,65 mg/l (różnica istotna statystycznie), zaś w przypadku odmiany białej średnio do 795,45 mg/l.

Kwas winowy obecny był we wszystkich sokach owocowych. Najwyższe stężenie tego kwasu stwierdzono w sokach ze sweetie (377,36 mg/l), pomarańcz (374,52 mg/l) oraz mandarynek (372,42 mg/l), niższe z grejpfrutów czerwonych (204,30 mg/l), zaś dużo niższe z grejpfrutów białych (80,48 mg/l) i cytryny (27,78 mg/l). W badaniach przeprowadzonych przez *Sevedra* i wśópr. (10) stężenie tego kwasu było niższe i wyniosło 134 mg/l, jednakże były to soki handlowe, rozcieńczone.

W sokach ze sweetie przechowywanych w zamrażarce stężenie kwasu winowego wzrastało do 480,36 mg/l, zaś w lodowce do 526,37 mg/l. Różnice te były istotne statystycznie. W sokach z grejpfrutów czerwonych stężenie kwasu winowego wzrastało do 339,46 mg/l, zaś w sokach z odmiany białej do 276,42 mg/l. Obecne różnice były statystycznie istotne.

Tabela I
Stężenie badanych kwasów w sokach z owoców cytrusowych

Table I.
Concentration of examined acids in juice obtained from different citrus fruits

Sok ze świeżych owoców:	N (liczba próbek)	Kwas cytrynowy [mg/l]	Kwas askorbinowy [mg/l]	Kwas winowy [mg/l]
Sweetie	9	11650	770,79 ^D	377,36 ^A
Grejpfrut czerwony	6	19200	865,25 ^E	204,30 ^B
Grejpfrut biały	4	27730	818,91	80,48 ^C
Pomarańcza	5	18100	1027,90	374,52
Cytryna	7	80610	852,82	27,78
Mandarynka	7	16460	685,26	372,42
Sok przechowywany w lodowce				
Sweetie	8	10140	427,42 ^D	526,37 ^A
Soki przechowywane w zamrażarce				
Sweetie	15	10160	688,74 ^D	480,34 ^A
Grejpfrut czerwony	6	19180	745,65 ^E	339,46 ^B
Grejpfrut biały	2	27310	795,45	276,42 ^C

Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) zaobserwowano w stężeniach kwasu winowego pomiędzy poszczególnymi sokami w grupach zaznaczonych indeksami A, B, C, zaś w stężeniach kwasu askorbinowego w grupach zaznaczonych indeksami D, E.

WNIOSKI

W niniejszej pracy przeanalizowano metodą izotachoforezy kapilarnej, zawartość kwasu cytrynowego, askorbinowego i winowego w świeżych sokach z owoców cytrusowych. Ponadto na przykładzie grejpfrutów przebadano trwałość tych trzech kwasów podczas przechowywania soków w różnych temperaturach.

1) Kwas cytrynowy

- a) w świeżych sokach, najwyższe stężenie kwasu cytrynowego stwierdzono w cytrynach, które zawierały go około 4 – krotnie więcej niż pozostałe badane soki. Najmniej kwasu cytrynowego zawierały soki z grejpfrutów odmiany sweetie.

- b) podczas przechowywania soków z grejpfrutów, w różnych temperaturach, niezależnie od odmiany stężenie kwasu cytrynowego prawie nie ulegało zmianie
- 2) Kwas askorbinowy
- a) wszystkie badane soki są bogatym źródłem kwasu askorbinowego
- b) najwyższe stężenie kwasu askorbinowego stwierdzono w sokach z pomarańcz zaś najmniejsze z mandarynek.
- c) podczas przechowywania soków z grejpfrutów w różnych temperaturach, niezależnie od odmiany, malała ilość kwasu askorbinowego, jednakże najmniejsze straty uzyskano w warunkach zamrażania
- 3) Kwas winowy
- a) w świeżych sokach najwyższe stężenie kwasu winowego stwierdzono w grejpfrutach odmiany sweetie, pomarańczach i mandarynkach, zaś najmniej w cytrynach.
- b) podczas przechowywania soków z grejpfrutów w różnych temperaturach, niezależnie od odmiany, wzrastała istotnie ilość kwasu winowego. Potwierdza to sugestie innych autorów, iż kwas winowy może być markerem starzenia się soków (10).

P. Paško, H. Bartoň, A. Krzysztyniak, Z. Zachwieja, S. Gorinstein

DETERMINATION OF CERTAIN ORGANIC ACIDS IN CITRUS JUICES BY CAPILLARY ISOTACHOPHORESIS

Summary

An isotachophoretic method was developed to determine directly organic acids in juices samples. Three organic acids: citric, tartaric and ascorbic have been separated and quantified in orange, grapefruit, mandarin and lemon juices. Also the influence of storage temperature on the amount of those acids in grapefruit juices from various strains was analysed. An EA-202 M isotachophoretic analyser (Villa-Labeco, Slovak Republic) with conductivity detection was used for capillary isotachophoretic determination of anions in tested samples. Sample injection volume was 30 µl. Two operating systems for the separation were found: hydrochloric acid adjusted with β-alanine plus methylhydroxyethylcellulose was used as the leading electrolyte (pH 3.56) caproic acid as the terminating electrolyte. Citrus juices contain great amount of ascorbic acid (the highest concentration – orange juice, the lowest concentration – mandarin juice). The amount of tartaric acid, which is adulteration marker, increases due to storage term, however the amount of ascorbic acid and citric acid decreases due to storage term in grapefruit juices.

PIŚMIENNICTWO

1. Willett W.C., Stampfer M.J. Piramida żywności w przebudowie, Świat Nauki, 2003, 3:46-51. - 2. Lee K.W., Lee H.J., Suh Y.J., Lee C.Y.: Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 78:1074-1078. - 3. Van't Veer P., Jansen M.C., Klerk M., Kok F.J.: Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr.*, 2000, 3:103-107. - 4. Hellmuss M. Kuracje sokami – zdrowie i szczupła sylwetka. PZWL, Warszawa 2002. - 5. <http://www.cdc.gov/ncedphp/dnpa/5day/month> - 6. Sadecka J., Polonsky J., Simko P., Karasova G.: Determination of citric and isocitric acids in fruit juices by capillary isotachopheresis. *Eur. Food Res. Technol.*, 2001, 213:161-164. - 7. Sadecka J., Polonsky J.: Determination of ascorbic and isoascorbic acid in beverages and additives to meat products by capillary isotachopheresis. *Eur. Food Res. Technol.*, 2001, 212:511-517. - 8. Saccani G., Gherardi S., Trifiro A., Soresi Bordini C., Calza M., Freddi C.: Use of ion chromatography for the measurement of organic acids in fruit juices. *J. Chromatogr. A*, 1995, 706:395-403. - 9. Jezek J., Suhaj M.: Application of capillary isotachopheresis for fruit juice authentication. *J. Chromatogr. A*, 2001, 916:185-189. - 10. Saavedra L., Garcia A.: Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juices. *J. Chromatogr. A*, 2000, 881:395-401.