

**Farbivá bazy čiernej (*Sambucus nigra*)****VI. Izolácia frakcií farbív a ich vlastnosti**

MILAN DRDÁK — RENÁTA VORSOVÁ

Súhrn. Farbivá po izolácii na polyvinylpyrolidóne — Polyclar AT sa rozdelili na tenkých vrstvách mikrokryštalickej celulózy. Opakovaným delením sa získali štyri frakcie, ktorých identita sa porovnávala so známymi farbivami v baze čiernej. V práci sa ďalej sledovala stabilita dvoch základných frakcií získaných po prvom rozdelení na základe kinetických meraní. Stabilita frakcií sa porovnávala so vzorkou pred jej chromatografickým delením.

V predchádzajúcich prácach [1—5] sme sa zaoberali vlastnosťami a stabilitou celého komplexu farbív v baze čiernej. Na základe kinetických meraní sme porovnali stabilitu farbív vo vylisovanej šťave z plodov tohto výdatného zdroja prírodných farbív, ako aj v koncentráte farbív vyrobeného podľa nami vypracovaného postupu [17]. Rovnako sme sa zaoberali možnosťami využitia koncentrátu farbív v potravinárskom priemysle. V predkladanej práci sme sa zamerali na rozdelenie a izoláciu jednotlivých frakcií farbív v baze čiernej a na skúmanie ich stability a základných charakteristík.

**Experimentálna časť****Materiál a metódy**

*Získanie a úprava šťavy z bazy čiernej.* Bobule bazy čiernej sa do spracovania skladovali pri teplote  $-18^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrazení sa vylisovaná šťava odstreďovala 5 min pri frekvencii  $3000\text{ min}^{-1}$  a pasterizovala pri teplote  $85\text{--}90^{\circ}\text{C}$  v prieto-

---

Ing. Milan Drdák, CSc., Ing. Renáta Vorsová, Katedra chémie a technológie sacharidov a potravín, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Jánska 1, 812 37 Bratislava.

kovom pastéri. Ďalším úkonom bola fermentácia pri 28 °C (48 h) kvasinkami *Saccharomyces oviformis* Tokaj 76 D a odstredenie. Získaná šťava sa skladovala pri teplote 0 °C. Uvedený postup zaručoval spracovanie priemernej vzorky, zvýšenú stabilitu počas skladovania a odstránenie niektorých látok, ktoré urýchľujú deštrukciu farbív [1, 2].

**Izolácia antokyáninov.** Farbivá zo šťavy sa izolovali na polyvinylpyrolidóne — Polyclar AT, a to jeho prídavkom v množstve 2 g na 10 ml šťavy alebo na stĺpci Polyclaru AT (150 × 15 mm). Opakovaným premytím odfiltrovaného polyvinylparolidónu (PVP) alebo stĺpca destilovanou vodou a metanolom sa odstránili látky, ktoré sa nezachytili na PVP. Antokyánové farbivá v dôsledku tvorby pevných vodíkových mostíkov protónu hydroxylovej skupiny ostali viazané na PVP. Pigmenty sa potom eluovali metanolom s prídavkom 0,1 % kyseliny chlorovodíkovej. Získané eluáty sa koncentrovali na rotačnej vákuovej odparke pri teplote do 40 °C.

**Chromatografické delenie antokyáninov.** Izolované antokyány sa delili na tenkých vrstvách pripravených z mikrokryštalickej celulózy LK a LT a z práškovej celulózy Whatman. Suspenzia celulózy na prípravu tenkých vrstiev z celulózy LK sa pripravila miešaním s vodou v pomere 1 : 4, LT v pomere 1 : 6. Prášková celulóza sa použila v zmesi s mikrokryštalickou celulózu LT v pomere 1 : 2. Na určenie R<sub>f</sub> hodnôt jednotlivých oddelených frakcií sa použili komerčne vyrábané vrstvy mikrokryštalickej celulózy Lucefol. Ako vyvíjacie zmesi sa použili BAW (6 : 1 : 2) a WHCIP (10 : 2 : 3) (B — n-butanol, A — kyselina octová, HCl — kyselina chlorovodíková, W — voda, P — kyselina propiónová).

**Stanovenie antokyánových farbív.** Antokyánové farbivá sa stanovili pH diferenčnou metódou podľa Fulekiho a Francisa [5, 6]. Stabilita oddelených frakcií sa porovnala na základe kinetických meraní po zatavení do sklenených ampuliek pri teplotách zahrevu 70, 80 a 90 °C v termostate s reguláciou teploty ±0,5 °C. Zo stanovených hodnôt obsahu farbív po odobratí vzoriek, ich ochladení a filtrácii sa vypočítali rýchlostné konštanty, polčas rozkladu a hodnoty Q<sub>10</sub>. Ďalej sa určila aktivačná energia a aktivačná entropia za predpokladu platnosti Arrheniovej rovnice pre sledované reakcie deštrukcie antokyánov [2, 7—10]. Absorpčné spektrá sa merali na prístroji Specord UV/VIS (C. Zeiss, Jena) a pH hodnota na pH-Acidimetri typ 323 (Druopta, Praha).

## Výsledky a diskusia

Na posúdenie vlastností antokyánových farbív v baze čiernej vzhľadom na ich stabilitu treba skúmať ich správanie za pravdepodobných podmienok ich

uplatnenia v potravinárstve, a to ako prirodzenej súčasť produkcie alebo ako farbiva pri prifarbovaní niektorých výrobkov. V predchádzajúcich prácach sme poukázali na odlišnosti v chemickej štruktúre a v zastúpení jednotlivých antokyanových farbív v skúmanom materiáli. Štruktúra látok vplýva na reakčnú rýchlosť odbúrania farbív a na možné reakcie s ďalšími látkami. Poznatky o stabilite jednotlivých farbív, resp. frakcií umožňujú posúdiť celkovú stabilitu farbiaceho preparátu, prípadne následne zamerať úsilie na zníženie obsahu najmenej stabilnej zložky v preparáte.

V prvej časti experimentálnej práce sme sa zamerali na chromatografické delenie antokyanínov bazy čiernej. Pigmenty izolované na Polyclare AT sa po skoncentrovaní delili na tenkých vrstvách pripravených z rôznych druhov mikrokryštalickej celulózy. Najlepšie oddelenie sa dosiahlo na tenkej vrstve z práškovej celulózy Whatman a mikrokryštalickej celulózy LT po zmiešaní v pomere 1 : 2 v sústave BAW (6 : 1 : 2). Odporúčaná sústava BHClW (5 : 2 : 1) sa ukázala ako nevhodná. Aj sústava BWA (4 : 1 : 5) poskytovala dobré výsledky. Chromatografické delenie za uvedených podmienok umožnilo oddelenie dvoch frakcií, ktoré ďalej označujeme ako frakcie A a B.

Frakcie A a B sme eluovali postupne z adsorbenta tenkých vrstiev 0,01 % HCl v metanole, koncentrovali pri teplote do 40 °C (v atmosfére N<sub>2</sub>) a opäť rozdelili na tenkých vrstvách celulózy v sústave WHClP (10 : 2 : 3). Frakcia A sa rozdelila na ďalšie frakcie A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>. Frakcia B sa ďalej nerozdelila.

Na porovnanie  $R_f$  hodnôt získaných frakcií s údajmi v literatúre sme použili komerčne vyrábané tenké vrstvy mikrokryštalickej celulózy Lucefol, pretože  $R_f$  hodnota je parameter, ktorý okrem iných faktorov značne závisí aj od hrúbky a rovnomernosti nanesej vrstvy. V tabuľke 1 uvádzame prehľad o rozdelení antokyanínov na Lucefole v použitých sústavách, ako aj údaje o  $R_f$  hodnotách jednotlivých frakcií. V tabuľke 2 je prehľad o  $R_f$  hodnotách antokyanínov podľa doteraz publikovaných údajov o zložení farbív bazy čiernej [11—13]. Na základe farebnosti (absorpčných maxím) a porovnania  $R_f$  hodnôt s údajmi

Tabuľka 1. Prehľad o rozdelení antokyanínov bazy čiernej na Lucefole a ich  $R_f$  hodnotách  
Table 1. Separation of antocyanines of black elder on Lucefol and their  $R_f$  values

Škvrna <sup>1</sup>	BAW <sup>2</sup> (6 : 1 : 2)	Farba <sup>3</sup>	Škvrna <sup>1</sup>	WHClP <sup>4</sup> (10 : 2 : 3)	Farba <sup>3</sup>	Identifikácia <sup>5</sup>
A	0,26	červeno-fialová <sup>6</sup>	A <sub>1</sub>	0,66	modro-fialová <sup>7</sup>	Cy-3-sambubiozid <sup>8</sup>
			A <sub>2</sub>	0,25		Cy-3-glucosid <sup>9</sup>
			A <sub>3</sub>	0,08		neidentifikovaná <sup>10</sup>
B	0,13		B	0,84		Cy-3-sambubiozid-3-glukozid <sup>11</sup>

<sup>1</sup>Stain; <sup>2</sup>Composition n-butanol—acetic acid—water; <sup>3</sup>Dye; <sup>4</sup>Composition water—hydrochloric acid—propionic acid; <sup>5</sup>Identification; <sup>6</sup>Reddish violet; <sup>7</sup>Bluish violet; <sup>8</sup>Cy-3-sambubioside; <sup>9</sup>Cy-3-glucoside; <sup>10</sup>Unidentified; <sup>11</sup>Cy-3-sambubioside-3-glucoside.

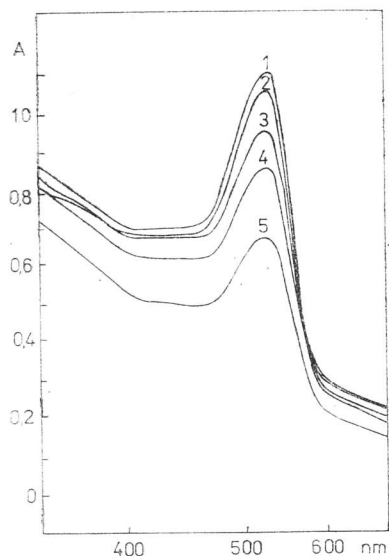
Tabuľka 2. Údaje o  $R_f$  hodnotách antokyanínov [11]  
Table 2. Data on  $R_f$  values of antocyanines [11]

Pigment <sup>1</sup>	BAW <sup>2</sup> (6 : 1 : 2)	WHCIP <sup>3</sup> (10 : 2 : 3)
Cy-3-glukozid <sup>4</sup>	0,26	0,29
Cy-3-sambubiozid-5-glukozid <sup>5</sup>	0,15	0,81
Cy-3-sambubiozid <sup>6</sup>	0,25	0,65

<sup>1</sup>Pigment; <sup>2</sup>Composition n-butanol—acetic acid—water; <sup>3</sup>Composition water—hydrochloric acid—propionic acid; <sup>4</sup>Cy-3-glucoside; <sup>5</sup>Cy-3-sambubioside-5-glucoside; <sup>6</sup>Cy-3-sambubioside.

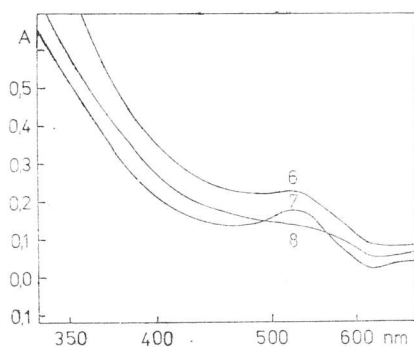
v literatúre sme pre danú chromatografickú sústavu identifikovali jednotlivé antokyánové frakcie ako kyanidín-3-sambubiozid, kyanidín-3-glukozid, kyanidín-3-sambubiozid-5-glukozid. Frakcia A<sub>3</sub> ostala bližšie neurčená, ale vychádzajúc z poznatku, že glykozidácia zvyšuje  $R_f$  hodnoty vo vodnom rozpúšťadle, možno predpokladať, že ide o kyanidín vzniknutý hydrolyzou počas koncentrovania eluátov a počas fermentácie. Identifikáciu farbív pokladáme za orientačnú vzhľadom na dostupné a použité metódy.

V práci sme sa ďalej zamerali na izolované frakcie A a B v prvej chromatografickej sústave. Označenie frakcií budeme používať naďalej, pretože sa identita farbív inými metódami ani porovnaním so štandardmi bližšie nepotvrdila, a navyše frakcia A sa skladá z niekoľkých farbív. Percentuálne zastúpenie



Obr. 1. Absorpčné spektrá frakcie A v závislosti od pH roztoku.

Fig. 1. Absorption spectra of the fraction A in dependence on pH of the solution.

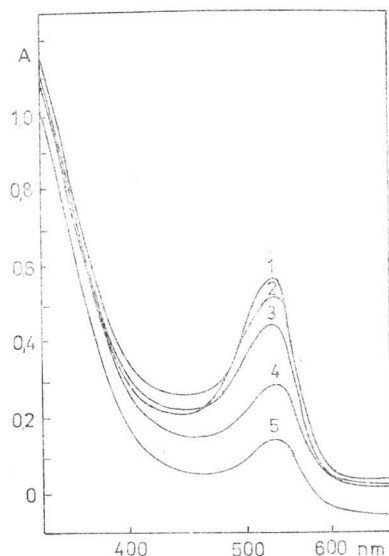


Obr. 2. Absorpčné spektrá frakcie A v závislosti od pH roztoku.

Fig. 2. Absorption spectra of the fraction A in dependence on pH of the solution.

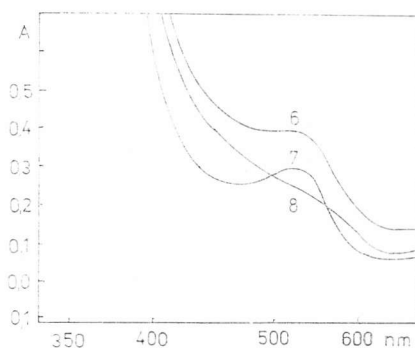
frakcií v eluáte sme stanovili podľa Lambertovho—Beerovho zákona pre viac zložiek, podľa ktorého je celková absorbancia súčtom všetkých absorbancií patriacich každej jednotlivéj zložke. Z eluovaného množstva farbív po ich rozdelení na tenkej vrstve predstavovala frakcia A 75,3 % a frakcia B 24,7 %. Premeraním absorpčných spektier frakcie A a B v 0,01 % roztoku kyseliny chlorovodíkovej v metanole sa upresnilo absorpčné maximum pre zložku A pri 526 nm a pre zložku B pri 524 nm, čo potvrdzuje predpoklad, že ide o 3- a 3,5-substituované antokyanidíny.

Obrázky 1—4 znázorňujú vplyv zmeny pH na priebeh absorpčných spektier vo viditeľnej oblasti. Izolované frakcie tenkovrstvovou chromatografiou po



Obr. 3. Absorpčné spektrá frakcie B v závislosti od pH roztoku.

Fig. 3. Absorption spectra of the fraction B in dependence on pH of the solution.



Obr. 4. Absorpčné spektrá frakcie B v závislosti od pH roztoku.

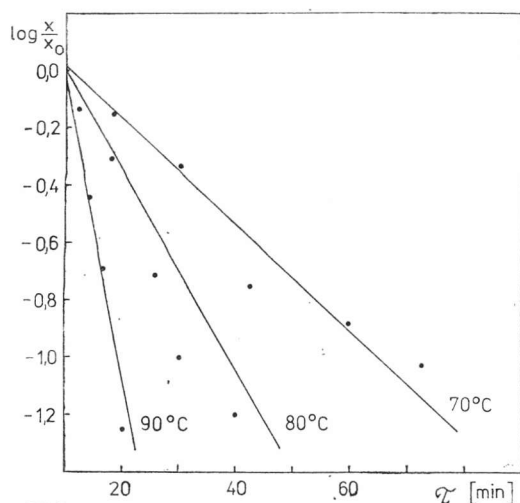
Fig. 4. Absorption spectra of the fraction B in dependence on pH of the solution.

koncentrovaní na rotačnej vákuovej odparke sme rozpustili v tlmivých roztokoch s pH hodnotami: 1,01, 2,04, 2,5 3,0; 3,5; 4,5 5,0 a 6,1. Tlmivé roztoky sa pripravili z monohydrátu kyseliny citrónovej a dodecylhydrátu hydrofosforečnanu sodného. Roztoky s pH 1 a 2 sa pripravili pridaním kyseliny chlorovodíkovej do tlmivého roztoku s pH 2,5 ( $c/\text{HCl}$ ) = 1 mol.l<sup>-1</sup>). Závislosť zmeny absorbancie od vlnovej dĺžky a pH,  $A = f(\text{pH}, \lambda)$  sa zaznamenala na spektrofotometri Specord UV VIS vo viditeľnej oblasti v rozsahu vlnových dĺžok 400—700 nm. Medzi frakciami sa zaznamenali podstatné rozdiely v posune absorpčného maxima. V oboch zložkách absorbancia klesala s rastúcou hod-

notou pH, čo spôsobuje úbytok červenej kationovej formy a zvýšenie obsahu pseudobázy. Poloha absorpčného maxima pri pH 1—3 bola v oboch prípadoch blízko 512 nm, pri pH 3,5 a 4,5 v rozmedzí 514—516 nm a pri pH 5 a 6 pri 518—522 nm.

Dôležitým ukazovateľom stability farbív sú kinetické merania úbytku farbív s následným výpočtom určujúcich faktorov na posúdenie rýchlosti chemickej reakcie. Izolované frakcie A a B sme zahrievali pri teplote 70, 80 a 90 °C. Na porovnanie ich stability sme podrobili súčasne rovnakému tepelnému zaťaženiu vzorku pred chromatografickým delením. Úbytok farbív sme sledovali pH diferenčnou metódou. Priebeh závislosti zmeny koncentrácie farbív od času zahrevu pri konštantnej teplote sme posúdili na základe vypočítaných korelačných koeficientov ( $r$ ) za predpokladu lineárnej závislosti  $\log(X/X_0) = f(\tau)$  a pre  $1/X = f(\tau)$ . Hodnoty korelačných koeficientov za predpokladu lineárnej závislosti oboch nezávisle premenných boli v prevládajúcom počte vyššie pre prvý vzťah, čo potvrdilo správnosť predpokladu priebehu reakcií 1. poriadku. Hodnoty korelačných koeficientov pre daný počet experimentálne nameraných údajov boli vo všetkých prípadoch vyššie ako kritické hodnoty. Aj pri testovaní korelačného koeficientu  $t$ -testom sa vypočítali hodnoty niekoľkonásobne vyššie ako hodnoty  $t$  uvádzané v tabuľkách [14].

Na ilustráciu znázorňujeme priebeh úbytku farbív vo frakcii B na obrázku 5. Smernica závislosti  $\log(X/X_0) = f(\tau)$  pri konštantnej teplote, vypočítaná metódou najmenších štvorcov pre regresnú priamku (predpoklad reakcie 1. poriadku), je rýchlostná konštanta  $k$ . V tabuľke 3 uvádzame hodnoty korelačného koeficientu pre uvažovanú závislosť, rýchlostné konštanty, polčasy rozkladu a hodnoty  $Q_{10}$  pre vzorku upravenej bazovej šťavy, frakcie A a frakcie B. Frakciu A sme zahrievali pri rôznych hodnotách pH. Potvrdil sa vplyv tejto



Obr. 5. Deštrukcia farbív vo frakcii B počas zahrevu.

Fig. 5. Destruction of dyes in the fraction B while tempering.

Tabuľka 3. Hodnoty rýchlostných konštánt, polčasov rozkladu a hodnoty  $Q_{10}$  pre bazovú šťavu, frakcie A a B  
 Table 3. Values of rate constants, separation half-times and  $Q_{10}$  for black elder, fractions A and B

Vzorka <sup>1</sup>	pH	$t$ [°C]	$\log (X/X_0) = f(\tau)$		$k \cdot 10^5$ [s <sup>-1</sup> ]	$\tau_{1/2}$ [h]	$Q_{10}$
			$r$	$\lg \alpha$			
Štava <sup>2</sup>	2,5	70	—0,9625	—0,0002	6,77	25,00	2,43
	2,5	80	—0,9287	—0,0005	11,92	10,03	
	2,5	90	—0,9228	—0,0017	16,53	2,95	
Frakcia A <sup>3</sup>	1,5	70	—0,9806	—0,0018	6,91	2,79	2,05
	1,5	80	—0,9680	—0,0037	14,20	1,36	
	2,5	90	—0,9941	—0,0031	11,9	1,62	
Frakcia B <sup>4</sup>	2,5	70	—0,9836	—0,0162	62,18	0,31	1,94
	2,5	80	—0,9782	—0,0323	123,98	0,16	
	2,5	90	—0,9793	—0,0641	246,04	0,08	

<sup>1</sup>Sample; <sup>2</sup>Juice; <sup>3</sup>Fraction A; <sup>4</sup>Fraction B.

hodnoty na rýchlosť odbúrania antokyánových farbív. Preto v tabuľke neuvádzame hodnotu  $Q_{10}$  pre zmenu teploty z 80 °C na 90 °C.

Z porovnania výsledkov vyplýva, že frakcie A a B sú v porovnaní so vzorkou pripravenou na chromatografické delenie menej stabilné. Postupom izolácie farbív a ich rozdelenia na tenkých vrstvách sa odstránia látky, ktoré môžu ovplyvniť rýchlosť reakcie v pozitívnom i negatívnom zmysle. Postup získania frakcií separačnými postupmi koncentrovania je značne zdĺhavý, a preto pri použití dostupnej metodiky je veľmi pravdepodobná hydrolýza v kyslom prostredí za vzniku nestáleho aglykónu. Namerané rýchlostné konštanty v porovnaní s údajmi v literatúre sú vyššie [15, 16]. Pretože 3,5-substituované antokyandíny sú menej stabilné ako 3-substituované antokyandíny, možno z porovnania stability frakcií A a B usudzovať, že frakciu B tvorí 3,5-substituovaný aglykón v súlade s identifikáciou na základe hodnôt  $R_f$ .

Tabuľka 4. Hodnoty aktivačnej energie, aktivačnej entropie a frekvenčného faktora (hypotetická rýchlostná konštanta)

Table 4. Values of activation energy, activation entropy and frequency factor (hypothetic rate constant)

Vzorka <sup>1</sup>	$A$ [s <sup>-1</sup> ]	$E_A$ [kJ.mol <sup>-1</sup> ]	$S$ [J.K <sup>-1</sup> .mol <sup>-1</sup> ]
Štava <sup>2</sup>	3,1.10 <sup>6</sup>	75,78	— 146,62
Frakcia B <sup>3</sup>	0,7.10 <sup>6</sup>	13,48	— 161,45

Štandardná teplota na výpočet entropie je 80 °C.  $A$  — frekvenčný faktor (hypotetická rýchlostná konštanta),  $E_A$  — aktivačná energia,  $S$  — aktivačná entropia.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Sample; <sup>2</sup>Juice; <sup>3</sup>Fraction B; The standard temperature for entropy computation is 80°C.  $A$  — frequency factor (hypothetic rate constant),  $E_A$  — activation energy;  $S$  — activation entropy.

Tabuľka 4 uvádza údaje o vypočítaných hodnotách aktivačnej energie na základe Arrheniovej rovnice a hodnoty aktivačnej entropie a frekvenčného faktora pre frakciu B pre nerozdelenú vzorku. Na výpočet entropie sa uvažovala ako štandardná teplota 80 °C. V súlade s prechádzajúcimi závermi je aktivačná energia vyššia pre vzorku pred jej rozdelením na frakcie, čiže pôvodná vzorka pripravená fermentáciou je stabilnejšia proti záhrevu ako izolovaná frakcia B.

## Literatúra

1. DRDÁK, M. — GREIF, G. — FARKAŠOVÁ, J.: Bull. potrav. Výskumu, XXII, 1983, č. 1, s. 29.
2. DRDÁK, M. — HAYDEN, J.: Bull. potrav. Výskumu, XXII, 1983, č. 3, s. 149.
3. DRDÁK, M. — HAYDEN, J.: Bull. potrav. Výskumu, XXII, 1983, č. 3, s. 157.
4. DRDÁK, M. — KUKUČKOVÁ, B.: Bull. potrav. Výskumu, XXIII, 1984, č. 2, s. 231.
5. DRDÁK, M. — GREIF, G. — FARKAŠOVÁ, J.: Bull. potrav. Výskumu, XXII, 1983, č. 1, s. 21.
6. FULEKI, T. — FRANCIS, F. J.: J. Food Sci., 33, 1968, s. 72.
7. KOPANICA, M. — STARÁ, V.: Kinetické metody v chemické analýze. Praha, SNTL 1978.
8. KIREEV, V. A.: Kratij kurs fizikaľnoj chimii. Moskva, Nauka 1978.
9. TANCHEV, S. S.: Nahrung, 18, 1974, s. 303.
10. TANCHEV, S. S. — YONCHEVA, N.: Nahrung, 18, 1974, s. 747.
11. NYBOM, N.: J. Chromatogr., 38, 1968, s. 386.
12. REICHEL, L. — STROH, H. — REICHWALD, W.: Naturwissenschaften, 44, 1957, s. 68.
13. REICHEL, L. — REICHWALD, W.: Naturwissenschaften, 47, 1960, s. 40.
14. ECKSCHLAGER, K. — HORSÁK, I. — KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. Praha, SNTL 1980.
15. JONTSCHIEVA, N. — TANCHEV, S.: Z. Lebensm.-Untersuch. -Forsch., 150, 1972, s. 31.
16. JONTSCHIEVA, N. — TANCHEV, S.: Z. Lebensm.-Untersuch. -Forsch., 153, 1973, s. 37.
17. Patent ČSSR 225 530.

## Красители бузины черной (*Sambucus nigra*)

### VI. Изоляция фракций красителей и их свойства

#### Резюме

Красители после изоляции на поливинилпирролидоне — Polyclar AT разделялись на тонких слоях микрокристаллической целлюлозы. Путем повторного разделения были получены четыре фракции, идентичность которых сравнивалась с известными красителями в черной бузине. В работе изучается далее устойчивость двух основных фракций, полученных после первого разделения на основании кинетических измерений. Устойчивость фракций сравнивается с образцом до его хроматографического разделения.



## Dyes of black elder (*Sambucus nigra*)

### VI. Isolation of dyes' fractions and their properties

#### Summary

After isolating the dyes, using polyvinylpyrrolidone — Polyclar AT, these were separated on thin layers of microcrystalline cellulose. By repeated separation four fractions were obtained identity of which was compared with the already known dyes of black elder. Using kinetic measurements, stability of the two basic fractions obtained after the first separation was also studied. Stability of fractions was compared with the samples before its chromatographic separation.