

Izolácia farbív z bazy chabzdovej (*Sambucus ebulus* L.)

MAGDA MÁRIÁSSYOVÁ – ALEXANDER PRÍBELA – MILAN DRDÁK

Súhrn. Práca sa zaoberá izoláciou a identifikáciou antokyanínových farbív bazy chabzdovej. Z vylisovanej a fermentovanej šťavy sa antokyaníny čistili cez stĺpec polyvinylpyrolidónu a vymieňače iónov Dowex 50W X4 a Lewatit S 100 v cykle H^+ . Zahustený eluát sa delil na tenkej vrstve mikrokryštalickej celulózy. Rozdelené frakcie jednotlivých antokyanínov sa charakterizovali spektrami vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti. Po hydrolýze jednotlivých farbív sa cukorné zložky rozdelili chromatografiou na tenkej vrstve celulózy a papierovou chromatografiou. Na základe týchto výsledkov sa zistila prítomnosť kyanidín-3-glukozidu, kyanidín-3-sambubiozidu a kyanidín-3-sambubiozidu-5-glukozidu.

Vzhľadom na zdravotnú závadnosť syntetických farbív sa v poslednom čase zintenzívnili tendencie nahradiť ich prírodnými farbivami. Sprísnil sa požiadavky na ich čistotu a značne sa obmedzuje ich počet.

Antokyanínové farbivá patria do skupiny prírodných farbív, ktoré sú pojaté do Závazných opatrení MZ SSR zo dňa 30. 11. 1977. Hygienické požiadavky na cudzorodé látky v požívatinách [1]. Hľadajú sa nové zdroje prírodných farbív, či už odpady z výroby (napr. výlisky ovocia) alebo netradičné suroviny. Jednou z takýchto surovín je baza chabzdová. Zrelé plody sú čierne bobulovité kôstkovice s vysokým obsahom antokyanínových farbív [2, 3]. Plody bazy chabzdovej sa pomerne málo skúmali z hľadiska obsahu jednotlivých zložiek. Z antokyanínov sa identifikovali kyanidín-3-sambubiozid a kyanidín-3-sambubiozid-5-glukozid. Baza chabzdová obsahuje ešte dve farbivá, ale v takom malom množstve, že sa ich nepodarilo identifikovať [4].

Oveľa podrobnejšie sa preštudovali farbivá bazy čiernej (*Sambucus nigra* L.). Prvé práce publikovali Karrer a Widmer [5] a Nolan a Casey [6]. Práce venované upresneniu štruktúry publikovali Reichel a Reichwald [7-9]. Cukornú zložku tvorí O - β -D-xylopyranózyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopyranóza. Tento

Ing. Magda Máriássyová, Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, pracovisko Modra, Fučíková 45, 900 01 Modra.

Prof. Ing. Alexander Príbela, DrSc., doc. Ing. Milan Drdák, CSc., Katedra chémie a technológie sacharidov, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

disacharid sa nazýva sambubióza. Aglykón je kyanidín. Ďalšie identifikované farbivá bazy čiernej sú kyanidín-3-glukozid, kyanidín-3,5-diglukozid, kyanidín-3-sambubiozid-5-glukozid, kyanidín-3-sambubiozid-5-*p*-kumaroylgukozid a kyanidín-3-sambubiozid [10–12]. Okrem antokyanínových farbív sa v rôznych druhoch bazy nachádzajú aj flavonoidné farbivá, napr. v baze čiernej a baze červenej sa zistil kvercitol a kamferol, v baze chabzdovej dominuje kamferol [13].

Experimentálna časť

Materiál. Bazu chabzdovú sme nazbierali koncom septembra v okolí Modry. Plody oddelené od vrcholíkov sa skladovali v polyetylénových vreckách pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a postupne spracovali na šťavu. Surovinu rozmrazenú pri laboratórnej teplote (10 h) sme vylišovali na ručnom lise, tuhé disperzné častice oddelili odstredením (7000 min^{-1} , 5 min). Prítomné enzýmy boli inaktivované v prietokovom pastéri pri teplote $90\text{--}95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 minúty. Takto upravenú šťavu sme fermentovali 48 h pri $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ kvasinkami *Saccharomyces oviformis*. Na 1 l šťavy sme použili 1 g kvasiniek. Po ukončení fermentácie sme kvasničnú biomasu odstredili a číru šťavu skladovali v tmavých fľašiach pri $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Separácia farbív. Antokyaníny sme z fermentovanej šťavy bazy chabzdovej izolovali pomocou polyvinylpyrolidónu a vymieňačov iónov Dowex 50W X4 a Lewatit S 100 (cyklus H^{+}). Po naadsorbovaní farbív, premytí vymieňača iónov vodou a metanolom sme pigmenty eluovali 0,1 % HCl v metanole. Eluát sme zahustili na vákuovej rotačnej odparke pri teplote kúpeľa $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Získaný koncentrát farbív sme skladovali pri $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Chromatografické delenie farbív. Na rozdelenie farbív sme použili chromatografiu na tenkých vrstvách. Preparačné celulóзовé platne sme pripravili zmiešaním 50 g mikrokryštalickej celulózy s 200 ml destilovanej vody. Pripravenú suspenziu (50 ml) sme rovnomerne naniesli na odmastené sklené platne $200 \times 200\text{ mm}$ a nechali schnúť 24 h pri $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na takto pripravené platne sme nanášali koncentrát vo forme pásu a vyvíjali v sústavách BOV (*n*-butanol–kyselina octová–voda) 5 : 2 : 3, 5 : 2 : 4, 6 : 2 : 3, 6 : 2 : 4, 4 : 1 : 5. Vyvíjanie trvalo 2 h. Rozdelené frakcie farbív sme zoškrabali, vyeľuovali 0,1 % HCl v metanole, zahustili a opäť delili v sústavách: VHCIP (voda–kyselina chlorovodíková–kyselina propiónová) 10 : 2 : 3, BHCIV (butanol–kyselina chlorovodíková–voda) 5 : 2 : 1, VHCIF (voda–kyselina chlorovodíková–kyselina mravčia) 8 : 4 : 1, 1 % HCl, BOV (butanol–kyselina octová–voda) 6 : 1 : 2.

Po rozdelení farbív a nasledujúcej elúcii sme získané frakcie odparili na vá-

kuovej odparke, rozpustili v metanole pre UV frakciu a zmerali absorpčné spektrá na prístroji Specord a na upresnenie λ_{\max} aj na prístroji Specol 10.

Identifikácia farbív. Farbívá sme identifikovali na základe R_f hodnôt v rôznych sústavách papierovou a tenkovrstvovou chromatografiou a na základe spektrálnych vlastností. Pri hydrolyze sa pigment štiepi na cukornatú zložku a aglykón. 1 ml koncentráту farbív jednotlivých frakcií sme refluxovali 1 h s 2 ml HCl ($c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol.l}^{-1}$) na viacom vodnom kúpeli pod spätným chladičom. Po ochladení sme hydrolyzát naniesli na stĺpec Dowexu 50W X4 (cyklus H^+) a premyli vodou. Aglykón sme potom eluovali 0,1 % HCl v metanole, eluát zahustili a použili na ďalšiu identifikáciu.

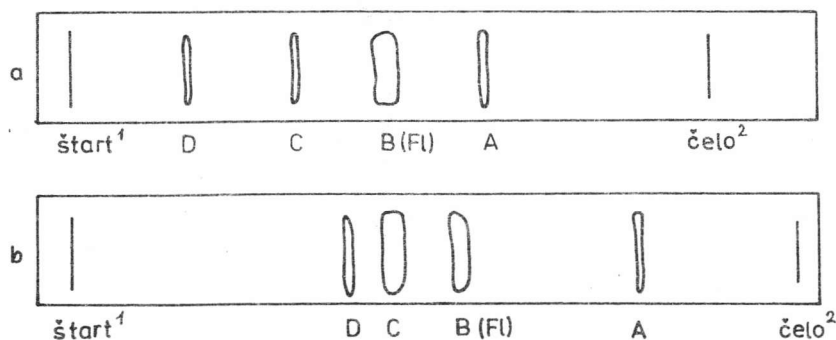
Filtrát získaný z hydrolyzátu po premytí vymieňača iónov sme odparili za vákuu do sucha, pridali 0,5 ml 80 % etanolu. Tento roztok sme použili na identifikáciu cukrov chromatografiou na tenkých vrstvách celulózy a na papieri Whatman 1 vo vyvíjaciach sústavách BOV 4 : 1 : 5, 2 : 1 : 1 a octan etylový–voda–kyselina octová 3 : 1 : 3. Detekcia – anilínftalát, po postriekaní sa chromatogramy sušia pri 105 °C 10 min. Z hodnôt R_f a R_g (pohyblivosť vzhľadom na glukózu) a na základe štandardov sme zistili druh cukru.

Výsledky a diskusia

Na izoláciu farbív zo šťavy je výhodnejšie použiť Polyclar AT vzhľadom na jeho vyššiu kapacitu (Polyclar AT 10 g – 100 ml, ionex 100 g – 75 ml šťavy). Čistota získaných farbív je v oboch prípadoch rovnaká. Izolácia a rozdelenie farbív na stĺpci mikrokryštalickej celulózy sa neosvedčila. Získali sme dve nevyrazne oddelené zóny farbív pri elúcii 0,25 % kyselinou mravčou. Neosvedčili sa ani sústavy BOV.

Zo sústav uvedených v experimentálnej časti sa na delenie farbív najviac osvedčila sústava BOV (6 : 2 : 3) pre mikrokryštalickú celulózu MKC, keď sa pigmenty rozdelili na 4 frakcie (obr. 1). V prípade iných pomerov v sústave BOV dochádza k nedostatočnému oddeleniu frakcií B, C a D. Frakcia A sa vo všetkých prípadoch výrazne oddelila od ostatných frakcií.

Jedno vyvíjanie nestačilo na získanie čistých frakcií. Preto sme eluáty po skoncentrovaní opäť naniesli na platničky a vyvíjali v sústavách opísaných v experimentálnej časti. Rozdelenie jednotlivých frakcií zhŕňa tabuľka 1. Z výsledkov v tabuľke 1 možno usudzovať, že opätovným rozdelením vylučovaných frakcií sme získali štyri látky, ktorých R_f hodnoty sú v rozmedzí $\pm 0,03$, t.j. 3 %. Frakcie B_2 , C_3 a D_4 sú totožné s A, C_2 a D_3 je totožné s B_1 , D_2 s C_1 a D_1 vykazovala jednu látku. Totožné frakcie sme spojili, označili A, B_1 , C_1 a D_1 a použili na ďalšie analýzy.



Obr. 1. Rozdelenie frakcií farbív na tenkej vrstve. a – mikrokryštalická celulóza LT, sústava BOV (5 : 2 : 4), b – mikrokryštalická celulóza MKC, sústava BOV (6 : 2 : 4). A, B, C, D – frakcie, Fl – fluorescencia.

Fig. 1. Separation of pigment fractions on thin layer. a – Microcrystalline cellulose LT, system BOV (5 : 2 : 4), b – Microcrystalline cellulose MKC, system BOV (6 : 2 : 4). A, B, C, D – fractions, Fl – fluorescence. (¹Start; ²Front.)

Tabuľka 1. R_f hodnoty farbív bazy chabzovej po druhom rozdelení na tenkých vrstvách mikrokryštalickej celulózy LT ($R_f \cdot 100$)

Table 1. R_f values of elderberry pigments after the second separation on thin layers of microcrystalline cellulose LT ($R_f \cdot 100$)

Zložka ¹	BOV (6:1:2)	BHCIV (5:2:1)	VHCIP (10:2:3)	VHCIF (8:4:1)	1 % HCl
A	60	75	92	8	1
B ₁	19	28	80	73	35
B ₂	65	70	89	8	1
C ₁	39	36	65	40	20
C ₂	18	28	83	75	40
C ₃	64	73	88	7	1
D ₁	22	27	26	11	4
D ₂	40	34	64	42	19
D ₃	16	30	86	70	38
D ₄	62	73	91	9	1

¹Component.

Po kyslej hydrolýze vzoriek A, B₁, C₁ a D₁ a po odstránení zvyškov hydrolyzátu na katexe Dowex 50W X4 sa aglykóny rozdelili na tenkej vrstve celulózy sústavami uvedenými v tabuľke 1. R_f hodnoty aglykónov potvrdili prítomnosť jedného aglykónu – kyanidínu v antokyanínoch bazy chabzdovej. Hydrolýzou uvoľnené cukornaté zložky po rozdelení a identifikovaní ukazuje tabuľka 2. Z výsledkov uvedených v tabuľke 2 možno konštatovať, že frakcia A neobsahuje nijaký cukor, frakcie B₁ a C₁ obsahujú glukózu a xylózu a frakcia D₁ obsahuje iba glukózu. Vzhľadom na to, že v UV oblasti sa nepozoro-

Tabuľka 2. Hodnoty R_f a R_g cukornatých zložiek farbív bazy chabzovej po kyslej hydrolýze
Table 2. R_f and R_g values auf sugar components of elderberry pigments after acid hydrolysis

Zložka ¹	1		2		3		4		5		Identifikácia ²
	R_f	R_g	R_f	R_g	R_f	R_g	R_f	R_g	R_f	R_g	
A	—		—		—		—		—		glukóza ⁴ xylóza ⁵
B ₁	29	100	19	100	20	100	33	99	34	99	
C ₁	41	141	30	130	28	149	50	148	48	147	glukóza ⁴ xylóza ⁵
	31	100	18	100	18	100	34	99	35	100	
D ₁	40	142	28	132	30	151	49	147	48	146	glukóza ⁴ xylóza ⁵
	29	99	20	100	19	100	33	100	34	100	
štandard ³											
glukóza ⁴	30	100	19	100	19	100	35	100	34	100	
xylóza ⁵	42	142	29	129	29	151	49	148	48	147	

1 – octan etylový-pyridín-voda 2 : 1 : 2, Whatman 1; 2 – butanol-kyselina octová-voda 4 : 1 : 5, Whatman 1; 3 – octan etylový-kyselina-octová-voda 3 : 1 : 3, Whatman 1; 4 – butanol-kyselina octová-voda 2 : 1 : 1, Whatman 1; 5 – butanol-kyselina octová-voda 2 : 1 : 1, mikrokryštaliká celulóza LT.

¹Component; ²Identification; ³Standard; ⁴Glucose; ⁵Xylose.

1 – Ethyl acetate-pyridine-water 2 : 1 : 2, Whatman 1; 2 – Butanol-acetic acid-water 4 : 1 : 5, Whatman 1; 3 – Ethyl acetate-acetic acid-water 3 : 1 : 3, Whatman 1; 4 – Butanol-acetic acid-water 2 : 1 : 1, Whatman 1; 5 – Butanol-acetic acid-water 2 : 1 : 1, microcrystalline cellulose LT.

vala fluorescencia nehydrolyzovaného pigmentu, ide o 3-glukozid. Vo frakciách B₁ a C₁ sme dokázali prítomnosť glukózy a xylózy, ktoré vznikli pravdepodobne hydrolýzou disacharidu sambubiózy. Keďže sa vo frakcii B₁ pozorovala výrazná fluorescencia v UV svetle, ide o 5-substituovaný antokyanín.

Po dvojnásobnom rozdelení antokyanínov sa v získaných frakciách A, B₁, C₁ a D₁ zmerali spektrá vo VIS a UV oblasti (obr. 2). Získané údaje o spektrálnych vlastnostiach sú v tabuľke 3. Kyanidín, ktorý je prítomný vo všetkých frakciách, vznikol pravdepodobne kyslou hydrolýzou antokyanínov pri zahusťovaní metanolicých extraktov. Medzi antokyanínmi obsahujúcimi cukor v polohe 3 a 3,5 je veľmi malý rozdiel v λ_{\max} . Na základe pomeru A_{440}/A_{\max} sa však dajú odlíšiť antokyaníny, ktoré majú polohu 5 voľnú. Tieto majú

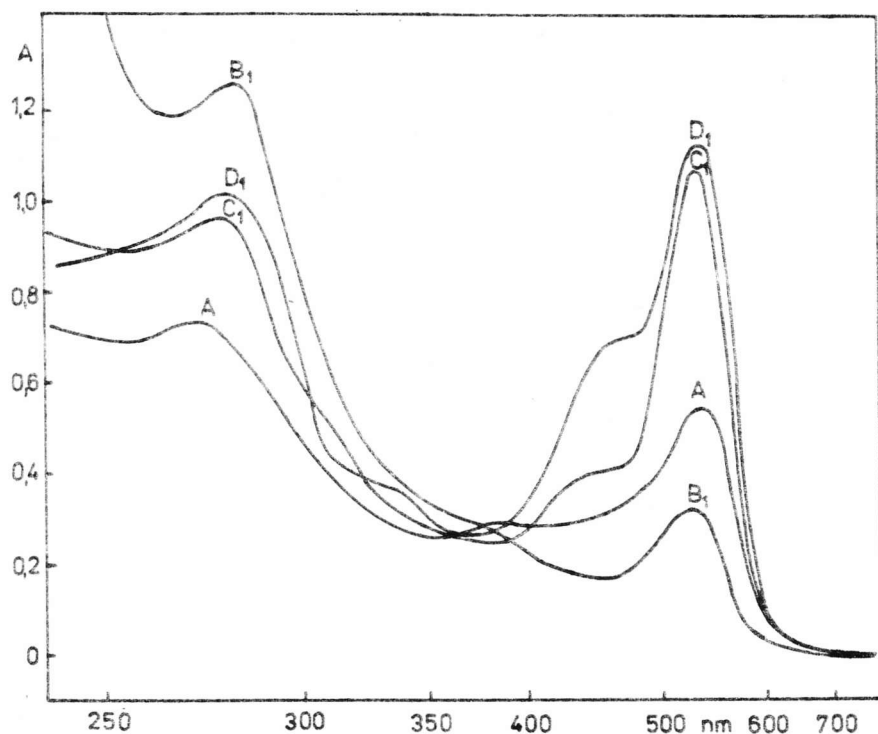
Tabuľka 3. Spektrálne charakteristiky antokyanínov bazy chabzovej

Table 3. Spectral characteristics of elderberry antocyanins

Zložka ¹	λ_{\max} VIS Ac [nm]	λ_{\max} VIS Ad [nm]	λ_{\max} UV Ac [nm]	Posun ² AlCl ₃	A_{440}/A_{\max} [%]
A	536	536	275	554 (+18)	19
B ₁	525	537	282	576 (+39)	13
C ₁	523	535	280	550 (+15)	22
D ₁	527	536	281	557 (+21)	23

Ac – antokyanín; Antocyanin; Ad – antokyanidín; Antocyanidin.

¹Component; ²Shift.



Obr. 2. Spektrá izolovaných antokyanínov z bazy chabzdovej (v 0,1 % HCl v metanole pre UV oblasť).

Fig. 2. Spectra of anthocyanins isolated from elderberry (in methanolic HCl solution for UV region, 0,1 % HCl).

v oblasti 420–450 nm lokálne maximum. Spektrálne údaje A_{440}/A_{\max} poukazujú na to, že iba frakcia B_1 má polohu 5 blokovanú cukrom [14]. Pigmenty, ktoré majú hydroxylové skupiny v kruhu B v *orto*-polohe, vytvárajú s $AlCl_3$ komplexy a dochádza k posunu λ_{\max} . Z údajov v tabuľke 3 vyplýva, že identifikovaný antokyanidín má voľné $-OH$ skupiny v *orto*-polohe.

Na základe porovnania chromatografickej pohyblivosti farbív bazy chabzdovej a bazy čiernej (pripravené rovnakým postupom), porovnaním literárnych údajov R_f hodnôt farbív [15–17], R_f a R_g hodnôt cukrov [18–20] s našimi hodnotami a na základe spektrálnych charakteristík farbív možno predpokladať, že baza chabzdová obsahuje tieto pigmenty: A – kyanidín, B_1 – kyanidín-3-sambubiozid-5-glukozid, C_1 – kyanidín-3-sambubiozid, D_1 – kyanidín-3-glukozid.

Literatúra

- [1] Hygienické požiadavky na cudzorodé látky v požívatinách. Záväzné opatrenia 35. Vestník MZ SSR 1977.
- [2] OGYANOV, I., Riv. Ital. Essen, Prof. Pianta Off. Aromat., Synders, Sapony, Cosmetic., 61, 1979, č. 3. s. 114.
- [3] NOVRUZOV, E. N. – ASLANOV, S. M., Dokl. Akad. Nauk Azerb. SSR, 40, 1984, č. 6, s. 61.
- [4] CHIARLO, B. – CAJELLI, E. – PIAZZAI, A., Fitoterapia, 49, 1978, s. 99.
- [5] KARRER, E. – WIDMER, J., Helv. Chim. Acta, 10, 1927, s. 80.
- [6] NOLAN, T. J. – CASEY, H. M. T., Proc. R. Irish Acad., 40, 1939, s. 56.
- [7] REICHEL, L. – STROH, H. H., Naturwissenschaften, 44, 1957, s. 468.
- [8] REICHEL, L. – REICHWALD, W., Naturwissenschaften, 47, 1960, s. 40.
- [9] REICHEL, L. – REICHWALD, W., Pharmazie, 32, 1977, s. 40.
- [10] STROH, H. H., Z. Chem., 2, 1962, s. 373.
- [11] SHIN, M. S. – AHN, S. Y., Korean J. Food Sci. Technol., 12, 1980, č. 4, s. 305.
- [12] BRØNNUM-HANSEN, K. – HANSEN, S. H., J. Chromatogr., 262, 1983, s. 385.
- [13] RADU, A. – TAMAS, M. – OTLACAN, A., Farmazia (Bucharest), 24, 1976, č. 1, s. 9.
- [14] HARBORNE, J. B., Biochem. J., 70, 1959, č. 1, s. 22.
- [15] BARRITT, B. H. – TORRE, L. C., J. Chromatogr., 75, 1973, s. 151.
- [16] NYBOM, N., J. Chromatogr., 38, 1968, s. 382.
- [17] ANDERSEN, O. M. – FRANCIS, G. W., J. Chromatogr., 318, 1985, s. 450.
- [18] HSIA, C. L. – LUH, B. S. – CHICHESTER, C. O., J. Food Sci., 30, 1965, s. 5.
- [19] PUECH, A. A. – REBEIZ, C. A. – CATLIN, P. B. – CRANE, J. C., J. Food Sci., 40, 1975, s. 775.
- [20] BOBBIO, F. O. – BOBBIO, P. A. – DEGASPARI, C. H., Food Chem., 18, 1985, č. 2, s. 153.
- [21] DU, C. T. – FRANCIS, J. F., J. Food Sci., 38, 1973, s. 811.

Изоляция красок из бузины (*Sambucus ebulus* L.)

Резюме

В работе мы занимались изоляцией и идентификацией антокианиновых красок бузины. Из выжатого и ферментированного сока мы очистили антокианины через колонку поливинилпирролидона и ионообменителей Dowex 50W X4 и Lewatit S 100 в N^+ цикле. Сгущенный элюат разделялся на тонком слое микrokристаллической целлюлозы. Разделенные фракции отдельных антокианинов мы характеризовали спектрами зримой и ультрафиолетовой области. После гидролиза отдельных красок мы разделили сахарные составные части с помощью хроматографии на тонком слое целлюлозы и бумажной хроматографией. На основе этих результатов мы обнаружили наличие кианидин-3-глюкозида, кианидин-3-самбубиозида и кианидин-3-самбубиозида-5-глюкозида.

Isolation of pigments from elderberry (*Sambucus ebulus* L.)

Summary

The isolation and identification of anthocyanin pigments from elderberry (*Sambucus ebulus* L.) were studied in this paper. Anthocyanins obtained from pressed and fermented elderberry juice were purified in polyvinylpyrrolidone column, as well as in ion exchangers Dowex 50W X4 and Lewatit S 100 in the cycle H^+ . The concentrated eluate was separated on thin layer of microcrystalline cellulose. Separated fractions of respective anthocyanins were characterized through spectra in visible and UV regions. Sugar components were separated using the chromatographic method on thin cellulose layer. The paper chromatography was used after the hydrolysis of pigments. The presence of cyanidine-3-glucoside, cyanidine-3-sambubioside and cyanidine-3-sambubioside-5-glucoside was determined.