

## Organické kyseliny bazy chabzdovej a čiernej

JOLANA KAROVIČOVÁ—MICHAL ROSENBERG—JOZEF POLONSKÝ  
ALEXANDER PRÍBELA

Súhrn. Kapilárnou izotachoforézou, papierovou a tenkovrstvovou chromatografiou sa zisťovala prítomnosť a zloženie organických kyselín v divorastúcej baze chabzdovej a baze čiernej. Kyselina citrónová, jablčná, mliečna, šťaveľová a askorbová sa stanovili v baze čiernej a navyše kyselina vínna a octová v baze chabzdovej.

Organické kyseliny v ovocí a ovocných výrobkoch majú význam ako senzory aktívne zložky a súčasti, ktoré vytvárajú prostredie nevhodné pre rozvoj niektorých mikroorganizmov a veľmi významne pôsobia na sterilizačný režim. Popri bežných organických kyselinách (tzv. ovocné kyseliny) sa v niektorých druhoch vyskytujú menej frekvencované fenolické, alebo iné kyseliny. O kvalitatívnom a kvantitatívnom zastúpení organických kyselín v baze chabzdovej (*Sambucus ebulus* L.) a baze čiernej (*Sambucus nigra* L.) nie je veľa informácií.

V jedinej publikácii [1] sme zistili, že 1 kg plodov bazy chabzdovej obsahuje 9,2—12,7 g celkových kyselín (prepočítaných na kyselinu citrónovú). Bez udania konkrétnych hodnôt sa tvrdí, že prevláda kyselina citrónová, ďalej kyselina jablčná, valérová a vínna. Okrem týchto kyselín sa v plodoch bazy chabzdovej zistil vysoký obsah kyseliny askorbovej, 1920—2350 mg · kg<sup>-1</sup>. V semenách bazy chabzdovej sa zistili niektoré fenolické kyseliny, napr. kyselina kávová a *p*-kumarová [2].

Pomerne viac údajov sa v literatúre uvádza o obsahu kyselín v rôznych častiach bazy čiernej. V plodoch sa obsah celkových kyselín pohybuje v rozmedzí 4,2 až 14 g · kg<sup>-1</sup> [3], resp. 7,3 g · kg<sup>-1</sup> [4].

Podľa Míkovej [5] plody bazy čiernej obsahujú kyselinu jablčnú (5,5—7,5 g · kg<sup>-1</sup>) a kyselinu askorbovú (490 mg · kg<sup>-1</sup>).

Ing. Jolana Karovičová, CSc., prof. Ing. Alexander Príbela, DrSc., Katedra chémie a technológie sacharidov a potravín, Ing. Michal Rosenberg, CSc., Katedra biochemickej technológie, doc. Ing. Jozef Polonský, CSc., Katedra analytickej chémie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Z fenolkarboxylových kyselín boli v kvetoch a listoch bazy čiernej nájdené viazané formy kyseliny kávovej a ferulovej [6, 7]. Pfannhauser a Riedl [8] dokázali v plodoch bazy čiernej kyselinu *p*-kumarovú, kávovú a ferulovú, viazané na antokyanidíny. Obsah kyseliny kávovej počas vegetácie klesá, pretože sa považuje za prekursor kvercetínu a kyanidínu.

### Materiál a metódy

Na analýzu sme použili plody bazy chabzdovej a čiernej zbierané v technologickej zrelosti v oblasti Bratislavy. Bobule zbavené stopiek sme zmrazili pri  $-18^{\circ}\text{C}$  a v takom stave skladovali v polyetylénových vreckách až do analýzy. Pred použitím sme vzorky rozmrazili pri laboratórnej teplote a na zistenie obsahu organických kyselín sme použili zhomogenizované plody, rozdrvené plody a vylisovanú šťavu. Šťavu z homogenizovaných a rozdrvených plodov sme získali prefiltrovaním cez gázu. Vylisovanú šťavu sme odstredovali 10 minút pri 7000 otáčkach za min.

Na stanovenie organických kyselín sme použili chromatografické metódy — papierovú chromatografiu, chromatografiu na tenkých vrstvách a kapilárnu izotachofóru. Na papierovú chromatografiu sa použil papier Whatman 1 a vyvíjacie zmesi:

A: butanol — kyselina mravčia — voda (10:2:3) alebo

B: terciárny amylalkohol — *n*-butanol — 98 % kyselina mravčia — voda (5:15:6:6).

Chromatogramy sa vyvíjali vzostupne a štandardy kyselín sme nanášali v roztoku brómfenolovej modrej. Pri chromatografii na tenkých vrstvách sme

Tabuľka 1. Zloženie použitých elektrolytov pre izotachofóru  
Table 1. The composition of electrolytes being used for isotachopheresis

	I	II
Vodiaci elektrolyt <sup>1</sup>		
HCl ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )	$10^{-2}$	$10^{-2}$
Protión <sup>2</sup>	$\beta$ -alanín <sup>5</sup>	$\beta$ -alanín <sup>5</sup>
pH	3,8	3,2
Aditívum (polyvinylpyrrolidón) <sup>3</sup>	0,1 %	0,1 %
Zakončujúci elektrolyt <sup>4</sup>	kyselina kaprónová <sup>6</sup>	kyselina octová <sup>7</sup>
<i>c</i> ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )	$10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$
Protión <sup>2</sup>	TRIS	TRIS
pH	3,9	4,0

1 — Leading electrolyte, 2 — Counterion, 3 — Additive matter (polyvinylpyrrolidone), 4 — Terminating electrolyte, 5 —  $\beta$ -Alanine, 6 — Caproic acid, 7 — Acetic acid.

použili silufolové platne a vyvíjacie sústavy uvedené pri papierovej chromatografii. Analyzované vzorky boli aj eluáty organických kyselín získaných vytlačeníím z kolóny s náplňou silný anex Dowex 1 typ X4 mesh 100/200 a filtrát organických kyselín získaný octanovou metódou [9].

Kapilárna izotachoforéza sa robila na prístroji izotachoforetický analyzátor s technikou spájania kolón ZKI 001 s vodivostným detektorom (ÚRVJT, Spišská N. Ves) s dvojkanálovým zapisovačom TZ 4200 (Laboratórni prístroje, Praha). Vzorky sa analyzovali pri prúde  $200\text{ }\mu\text{A}$  v predseparačnej kolóne a  $40\text{ }\mu\text{A}$  v analytickej kolóne. Zriedené vzorky  $1\text{ cm}^3/50\text{ cm}^3$  sme dávkovali pomocou dávkovacieho kohúta zariadenia. Na identifikáciu a stanovenie organických kyselín sme použili dva systémy elektrolytov (I, II), zloženie ktorých uvádza tab. 1. Čas analýzy sa pohyboval v závislosti od aplikovaných elektrolytov v intervale 20 až 30 min. Na základe zistenia prítomnosti jednotlivých kyselín sme urobili kvantitatívnu analýzu metódou analytickej kalibračnej čiary. V operačných systémoch I a II sme namerali kalibračné čiary pre identifikáciu

Tabuľka 2. Parametre kalibračných čiar  $y = a + bx$   
Table 2. Parameters of the calibration lines  $y = a + bx$

Kyselina <sup>1</sup>	Parameter <sup>2</sup>	Operačný systém <sup>3</sup>	
		I	II
vínna <sup>4</sup>	<i>a</i>	0,134	$5,502 \cdot 10^{-3}$
	<i>b</i>	$4,435 \cdot 10$	$4,734 \cdot 10$
	<i>r</i>	0,999	0,999
octová <sup>5</sup>	<i>a</i>	0,149	
	<i>b</i>	$1,840 \cdot 10$	
	<i>r</i>	0,999	
citrónová <sup>6</sup>	<i>a</i>	$4,490 \cdot 10^{-3}$	$4,045 \cdot 10^{-4}$
	<i>b</i>	$3,993 \cdot 10$	$4,622 \cdot 10$
	<i>r</i>	0,999	0,999
jablčná <sup>7</sup>	<i>a</i>	0,287	0,150
	<i>b</i>	$7,301 \cdot 10$	$4,388 \cdot 10$
	<i>r</i>	0,999	0,999
mliečna <sup>8</sup>	<i>a</i>	0,366	1,075
	<i>b</i>	$5,294 \cdot 10$	$6,640 \cdot 10$
	<i>r</i>	0,999	0,999
askorbová <sup>9</sup>	<i>a</i>	0,929	0,118
	<i>b</i>	$6,787 \cdot 10$	$7,325 \cdot 10$
	<i>r</i>	0,999	0,999
šťaveľová <sup>10</sup>	<i>a</i>		0,018
	<i>b</i>		$8,412 \cdot 10$
	<i>r</i>		0,999

1 — Acid, 2 — Parameter, 3 — Operating system, 4 — Tartaric acid, 5 — Acetic acid, 6 — Citric acid, 7 — Malic acid, 8 — Lactic acid, 9 — Ascorbic acid, 9 — shikimic acid, 10 — oxalic acid.

vané kyseliny. Tieto boli štatisticky zhodnotené lineárnou regresiou. Parametre kalibračných čiar pre analytickú kolónu uvádza tab. 2. Pre analýzu vzoriek sme aplikovali oba systémy.

### Výsledky a diskusia

Na kvalitatívne stanovenie organických kyselín v šťave bazy čiernej sme použili kapilárnu izotachofórezu, ktorou sme získali výsledky uvedené v tab. 3. Z použitých dvoch systémov elektrolytov sa lepšie osvedčil systém II, ktorým sme v šťave bazy čiernej pri riedení  $1\text{ cm}^3/50\text{ cm}^3$  zistili prítomnosť a stanovili obsah kyseliny šťaveľovej, citrónovej, jablčnej a mliečnej. V systéme elektrolytov I kyselina citrónová a jablčná vytvárali spoločnú zónu, ale v tomto systéme sme stanovili aj kyselinu askorbovú. Obsahy jednotlivých kyselín uvedené v tab. 3 sú v určitom rozpätí, čo možno vysvetliť prirodzeným kolísaním obsahu kyselín v analyzovaných šťavách z rôznych vzoriek. Ak sa porovnávajú naše výsledky s údajmi z literatúry [10, 11] vidieť, že obsah kyseliny citrónovej, ktorý bol stanovený enzýmovo bol vyšší, zatiaľ čo kyselina vínna stanovená enzýmovo dosahovala v priemere nižšie hodnoty ( $1,3$  až  $3,6\text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), pričom rozmedzie koncentrácií bolo podstatne väčšie.

Z výsledkov je zrejmé, že najväčší podiel predstavuje kyselina citrónová (57 %) a kyselina jablčná (23 %). Zaujímavá je prítomnosť a pomerne vysoký obsah kyseliny mliečnej, asi 14 %, ktorá doteraz v baze čiernej nebola stanovená

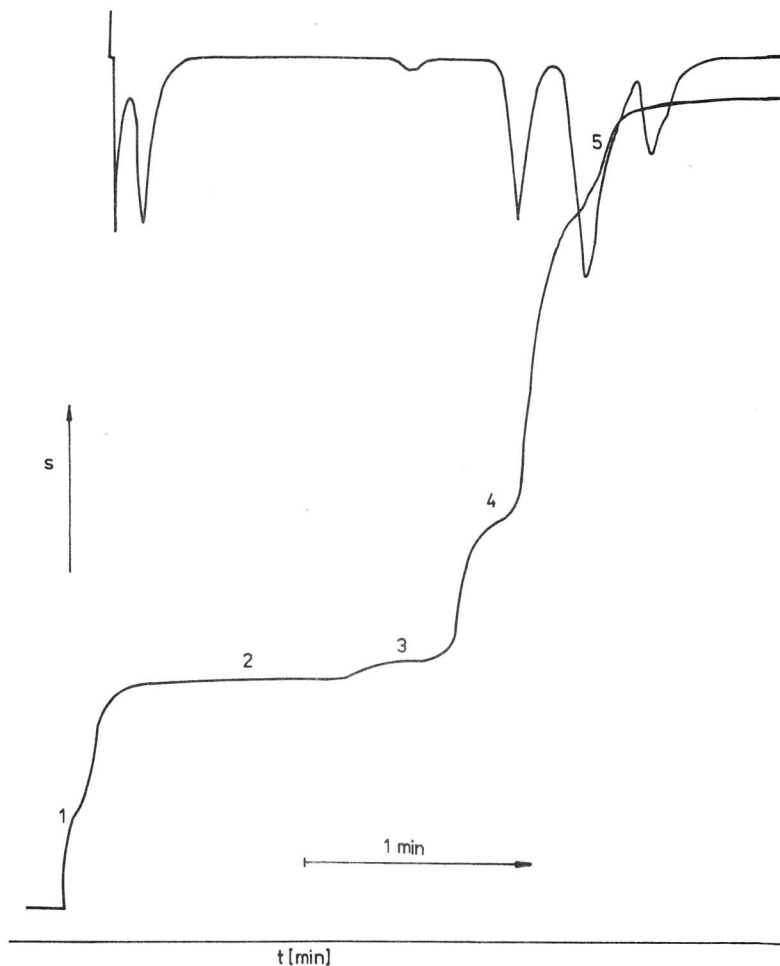
Tabuľka 3. Organické kyseliny v šťave bazy čiernej  
Table 3. Organic acids in elderberry juice

Kyselina <sup>1</sup>	Min. a max. hodnoty <sup>2</sup> ( $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ )	Kuhlmann [10]	Bergmann [11]
šťaveľová <sup>3</sup>	0,40— 0,46	—	—
citrónová <sup>4</sup>	6,95— 7,68	10,7 —14,0	9,7 —12,7
jablčná <sup>5</sup>	2,96— 3,07	1,6 — 3,6	1,3 — 2,0
mliečna <sup>6</sup>	1,78	—	—
askorbová <sup>7</sup>	0,127	0,018— 0,045	0,12— 0,18
chinová <sup>8</sup>	—	0,3 — 0,6	—
šikimová <sup>9</sup>	—	0,03 — 0,1	—
izocitrónová <sup>10</sup>	—	0,15 — 0,17	—
$\Sigma$	12,22—13,12	12,80 —18,52	11,12—14,88

1 — Acid, 2 — Minimal and maximal values, 3 — Oxalic acid, 4 — Citric acid, 5 — Malic acid, 6 — Lactic acid, 7 — Ascorbic acid, 8 — Quinic acid, 9 — Shikimic acid, 10 — Isocitric acid.

[10, 11]. Rovnako kyselina šťaveľová, ktorá sa považuje z hľadiska výživy za nežiadúcu, vyskytuje sa v množstve 3,4 % z celkového obsahu kyselín zistených izotachoforézou; jej prítomnosť bola dokázaná aj tenkovrstvovou chromatografiou. Záznam izotachoforeogramu kyselín v šťave bazy čiernej je na obr. 1.

Obsah kyseliny askorbovej stanovenej izotachoforézou sa pohyboval okolo 12,7 mg/100 g, čo je hodnota približne zhodná s údajom uvádzaným Bermanom [11], zatiaľ čo hodnoty podľa Kuhlmana [10] sú asi 10-krát nižšie.



Obr. 1. Izotachoforeogram organických kyselín bazy čiernej. 1 — kyselina šťaveľová, 2 — kyselina citrónová, 3 — kyselina jablčná, 4 — kyselina mliečna, 5 — kyselina askorbová, S — odozva vodivostného detektora.

Fig. 1. Isotachophoreogram of elderberry organic acids. 1 — oxalic acid, 2 — citric acid, 3 — malic acid, 4 — lactic acid, 5 — ascorbic acid, S — response of thermal conductivity detector.

Niektorí autori zistili ešte kyselinu izocitrónovú  $0,16 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , ďalej kyselinu šikimovú v priemere asi  $0,05 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  a chinovú  $0,3\text{--}0,6 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Na stanovenie organických kyselín v šľave bazy chabzdovej sme použili tie isté systémy elektrolytov. Pri použití systému I sme zistili prítomnosť kyseliny vínnej, mliečnej, octovej a askorbovej. Keďže sme predpokladali aj prítomnosť kyseliny citrónovej a jablčnej, ktoré pri použití daného systému elektrolytov vytvárali spoločnú zónu, použili sme ešte aj systém II. Týmto systémom sme identifikovali a stanovili obsah kyseliny šťaveľovej, citrónovej, jablčnej, mliečnej a askorbovej. Obsah identifikovaných organických kyselín v šľave bazy chabzdovej uvádza tab. 4.

Tabuľka 4. Organické kyseliny v šľave bazy chabzdovej  
Table 4. Organic compounds in the danewort juice

Kyselina <sup>1</sup>	Min. a max. hodnoty <sup>2</sup> ( $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ )
šťaveľová <sup>3</sup>	1,17—1,23
citrónová <sup>4</sup>	1,58—1,68
jablčná <sup>5</sup>	1,09—1,31
vínna <sup>6</sup>	0,11
mliečna <sup>7</sup>	2,0 —2,14
octová <sup>8</sup>	1,06
askorbová <sup>9</sup>	0,28—0,40
$\Sigma$	7,29—7,93

1 — Acid, 2 — Minimal and maximal values, 3 — Oxalic acid, 4 — Citric acid, 5 — Malic acid, 6 — Tartaric acid, 7 — Lactic acid, 8 — Acetic acid, 9 — Ascorbic acid.

Z tab. 4 je zrejmé, že v šľave bazy chabzdovej je viac kyselín ako v baze čiernej. Navyše sa zistila kyselina octová a vínna. Najvyšší obsah sa zistil pri kyseline mliečnej, až takmer 30 %. Obsah kyseliny citrónovej bol asi 20 %, kyselina jablčná a šťaveľová mali približne rovnaké zastúpenie, asi 16 %. Pomerne vysoký obsah sa zistil aj pri kyseline octovej, 14 %, naproti tomu kyselina vínna tvorila len asi 1,5 %. Obsah kyseliny askorbovej bol v šľave bazy chabzdovej vyšší ako v baze čiernej, v priemere o 37 %. Celkový obsah kyselín bazy chabzdovej bol však nižší o 61 %. Naše výsledky môžeme porovnať len s jedinou prácou, ktorá sa zaoberala kvalitatívnym zložením (papierovou chromatografiou) kyselín, a ktorá uvádza iba kyselinu citrónovú a jablčnú, pričom prvá prevláda [1]. Relatívne vysoký je obsah najmä kyseliny oxálovej, asi  $1,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , oproti obsahu v šľave bazy čiernej, kde priemerná hodnota je  $0,43 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Tento fakt môže negatívne ovplyvniť nutričnú hodnotu bazy chabzdovej.

Kvantitatívnu analýzu jednotlivých kyselín sme vyhodnotili metódou analytickej kalibračnej čiary. Experimentálne namerané hodnoty sme štatisticky

spracovali lineárnou regresiou na 5 % hladine významnosti. Správnosť výsledkov sme testovali buď použitím smerodajnej odchýlky pomocou Studentovho  $t$ -testu, buď použitím rozptatia pomocou Lordovho testu  $u_n$  [12]. Testy potvrdzujú, že rozdiel ( $\xi - \bar{x}$ ) nie je štatisticky významný, výsledky sú zaťažené len náhodnou chybou (napr. pri kyseline jablčnej testovanie  $t$ -testom na hladine významnosti  $\alpha = 0,05$  je  $t: 1,38 < t_{0,05}: 2,776$  a testom  $u_n$ ,  $u_n = 0,4 < u_{n, 0,05} = 0,507$ ).

Diametrálne výsledky sme dosiahli v porovnaní s Novruzovom a Aslanovom [1], ktorí uvádzajú obsah vitamínu C až vyše  $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ovocia oproti našim asi  $0,13 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ovocia. Vypočítaná smerodajná odchýlka  $s_x$  [12] pri stanovení obsahu organických kyselín v šťave bazy čiernej sa pohybovala od  $1,7 \cdot 10^{-2}$  do  $6,9 \cdot 10^{-2}$  a miera presnosti od 2,09 % do 7,50 %. Pri stanovení obsahu organických kyselín v šťave bazy chabzdovej bola smerodajná odchýlka od  $2,40 \cdot 10^{-2}$  do  $7,05 \cdot 10^{-2}$  a miera presnosti od 2,75 % do 8,52 %.

Na kvalitatívne stanovenie organických kyselín v baze čiernej a chabzdovej sme použili aj papierovú a tenkovrstvovú chromatografiu. Papierovou chromatografiou sme analyzovali vzorky rôznych riedení (50, 100, 200, 500,  $800 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ ), šťavu z rozdrvených plodov a odstredenú šťavu bazy čiernej. Z bazy chabzdovej sme rozdelili vzorky odstredenej šťavy, vzorky rôznych riedení (20, 40, 80, 120,  $160 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ ), šťavu z rozdrvených plodov. Sústavou označenou A sa chromatogramy vyvíjali za použitia štandardov kyselín. Hodnoty  $R_F$  vo vzorkách bazy čiernej sa pohybovali od 0,432 do 0,439 po štyroch rôznych analýzach, čím sa dokázala prítomnosť kyseliny citrónovej. Vo vzorkách bazy chabzdovej sa potvrdil výskyt kyseliny vínnej.  $R_F$  hodnoty sa pohybovali od 0,288 do 0,291.

Pri tenkovrstvovej chromatografii sme použili vyvíjacie sústavy označené A, B. Zo získaných chromatogramov, z vypočítaných  $R_F$  hodnôt pomocou štandardov kyselín sme zistili vo vzorkách bazy čiernej prítomnosť kyseliny vínnej, šťaveľovej a citrónovej. Vypočítané  $R_F$  hodnoty z troch analýz jednotlivých kyselín sa pohybovali od 0,292 do 0,294 pre kyselinu vínnu, od 0,313 do 0,316 pre kyselinu šťaveľovú, od 0,428 do 0,434 pre kyselinu citrónovú. Použitím vyvíjacej sústavy označenej B sme identifikovali ešte škvrnu s  $R_F$  od 0,163 do 0,165 a vo vzorkách organických kyselín izolovaných octanovou metódou sme zistili prítomnosť kyseliny jablčnej s  $R_F$  0,510.

Vo vzorkách bazy chabzdovej sme zistili prítomnosť kyseliny jablčnej, priemerné  $R_F$  hodnoty boli od 0,509 do 0,514 pre obe vyvíjacie sústavy, a kyseliny vínnej s  $R_F$  od 0,291 do 0,296. Obdobne ako vo vzorkách bazy čiernej sme ešte stanovili hodnoty  $R_F$  škvrn 0,159—0,164, čo by mohla podľa údajov literatúry [9] byť kyselina glukónová.

Vypočítané smerodajné odchýlky  $s_x$  sa pohybovali od  $1,15 \cdot 10^{-3}$  do  $2,91 \cdot 10^{-4}$  a miera presnosti od 0,20 % do 0,89 %, pričom lepšiu identifikáciu

sme dosiahli použitím tenkovrstvovej chromatografie. Použitie vyvíjacej sústavy označenej B bolo účinnejšie, jej aplikáciou sme získali väčší počet škvrn. Preto sa daná vyvíjacia sústava použila na rozdelenie kyselín v eluátoch, vo vzorkách kyselín získaných octanovou metódou. Týmito technikami sme chceli len overiť prítomnosť jednotlivých kyselín, ktoré sme predtým stanovili.

## Literatúra

1. NOVRUZOV, E. N.—ASLANOV, S. M., Dokl. Akad. Nauk Az. SSR, 40, 1984, s. 61.
2. CHIARLO, B., Phytotherapy, 49, 1978, s. 99.
3. STRMISKA, F. akol.: Poživatinové tabuľky. Bratislava, VÚP 1983.
4. SOUCI, S. W.—FACHMANN, W.: Nährwert-Tabellen 1986/87. Stuttgart Wiss. Verlag GmbH 1986.
5. MÍKOVÁ, K., Prům. Potrav., 34, 1983, s. 456.
6. LACHMANN, J.—PIVEC, V.—ŘEHÁKOVÁ, V.—HUBÁČEK, J., Potrav. Vědy, 7, 1989, s. 29.
7. STROH, H. H.—SCHÄFFER, H.—HASCHKE, E., Z. Chem., 2, 1982, s. 374.
8. PFANNHAUSER, W.—RIEDL, O., Ernährung (Wien), 7, 1983, s. 560.
9. PRÍBELA, A.: Analýza prírodných látok v poživatinách. Bratislava, Alfa 1978.
10. KUHLMANN, F., Dtsch. Lebensm.-Rdsch., 75, 1979, s. 390.
11. BERGMANN, R., Flüssiges Obst, 46, 1979, s. 8.
12. ECKSCHLAGER, K.—HORSÁK, I.—KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků. Praha, SNTL 1982.

Do redakcie došlo 14. 3. 1991

## Органические кислоты бузины травянистой и черной

### Резюме

Капиллярным изотохофорезом, бумажной и тонкослойной хроматографией определялось наличие и состав органических кислот в дикорастущей бузине травянистой и черной. Кислоты лимонная, яблочная, молочная, щавелевая и аскорбиновая были определены у бузины черной и более того кислоты винная и уксусная определены у бузины травянистой.

## Organic acids of both danewort and elderberry

### Summary

A composition of organic acids contained in wild-growing danewort and elderberry was investigated by means of capillary isotachopheresis, as well as by the paper and thin-layer chromatography. The citric, malic, lactic, oxalic and ascorbic acids have been determined in elderberry. The all mentioned acids, and in addition, tartaric and acetic acids have been determined in danewort.