

Důkaz a stanovení antokyanů v barevných nápojích

663.8.031

Ing. Zdeněk ZLOCH, CSc., Hygienický ústav lékařské fakulty, UK, Plzeň

Předneseno na 6. konferenci o technologii a hodnocení výrobků nápojového průmyslu, Plzeň, 30.—31. května 1984

Klíčová slova: antokyan, barviva, nápoje, chromatografická separace

1. ÚVOD

Antokyan jsou přirozená barviva vytvářející červené zbarvení potravinářských výrobků rostlinného původu, např. ovocných nápojů a vín, pokud zde ovšem nebyly simulovány syntetickými barvivy. V říši flóry tvoří velmi pestrá směs chemicky příbuzných látek majících společný polyfenolový základ, tzv. flavyliový ion, který je strukturně blízký katechinům a flavonoidům. Pro jeho označení se používá správného názvu antokyanidin, jeho glykosylované formy se nazývají antokyaniny. Jejich chemické vlastnosti jsou mnohotvárné a složité. Z nich vyplývá i komplikovanost dějů, jimiž se vytváří, mění nebo zaniká přirozené zbarvení ovoce a výrobků z něho, ale také bohatý výběr způsobů, jimiž lze tyto látky rozlišit od jiných přirozených a od syntetických barviv.

Pro stanovení antokyanů v potravinách jsou uvedeny laboratorní postupy v odborných příručkách [1, 2]; ty jsou však spíše určeny pro analýzu ovocných surovin a nebyly zatím inovovány v kontextu s vývojem moderních laboratorních prostředků a technik. Vypracovali jsme proto metodu pro důkaz přítomnosti antokyanů a pro jejich kvantitativní stanovení v některých potravinářských výrobcích a zde uvádíme postupy při hodnocení červeně zbarvených nealkoholických i alkoholických nápojů.

2. LABORATORNÍ ČÁST

Při separaci a identifikaci antokyanů v tekutých výrobcích se mohou uplatnit téměř všechny známé izolační techniky, zejména chromatografické, včetně dělení elektroforetického, na molekulových sítích a rozdělení vysokotlakou kapalinovou chromatografií (přehledně zpracovaná analytika antokyanů je např. v pracích 3, 4, 5, 9). Prověřovali jsme několik dostupných metod s cílem najít a popř. modifikovat postupy pro rutinní použití, jež by vyhovovaly nezbytným požadavkům na spolehlivost stanovení. Pozornost jsme zaměřili zejména na separaci, kvalitativní důkaz a kvantitativní stanovení všech barevných sloučenin s flavyliovým jádrem, tzn. jak aglykonů (antokyanidinů), tak i jejich glykosidů (antokyaninů), které uvažujeme sdružené a společně je nazýváme antokyan.

2.1 Extrakce barviv

Z nápojů intenzivně barevných (červená vína, ovocné sirupy, džusy apod.) se barviva adsorbují na práškový polyamid (pro chromatografické účely) nebo na polyvinylpyrrolidon (byl používán nerozpustný Polyclar AT, výrobce GAF, Rakousko). Příliš husté nebo suché nápojové výrobky se předtím zředí, popř. protřepávají s několika násobným objemem vody. Nápoje slabě zbarvené (limonády, mošty) se pro kvantitativní analýzu zahušují ve vakuu při teplotě pod 40 °C. Pro účely kvantitativního stanovení je nutné adsorpci 2—4krát opakovat, popř. suspenzi sorbentu s nápojem zahřívát na 40 °C. Operaci je

možno provést ve zkumavce (5 ml vzorku a 1 g sorbentu); sorbent se oddělí odstředěním nebo filtrací a před elucí barviv se promyje vodou a metanolem, které odstraní cukry a přebytek vody. Antokyan se z něho eluuje promytím metanolem okyseleným 0,1—0,5 % HCl (více okyselený alkohol má větší eluční účinnost). Nesmí se opomenout, že spolu s antokyanem se uvedeným postupem zčásti separují i syntetická barviva, která se projevují silnější vazbou na sorbent.

Jiným použitelným sorpčním prostředkem je katex Dowex 50 W X 4 v H⁺-formě, který reverzibilně váže flavyliové kationty. Desorpci antokyanů lze i v tomto případě provést okyseleným metanolem. Ze slabě zbarvených nápojů je možné antokyan izolovat srážením olovnatou solí [6]. Z precipitátu se uvolňují okyseleným butanolem, převedou se do petroleteru a z něho se vytřepou do malého objemu vody, v němž tak jsou několiknásobně zkoncentrovány. Avšak ani při tomto postupu nejsou zcela eliminována syntetická barviva, z nichž zejména Viktoriarubin přechází ve velkém podílu do výsledného extraktu.

2.2 Chromatografická separace antokyanů ze směsi s jinými přirozenými a syntetickými barvivy

Z mnoha vyzkoušených technik uvádíme stručný přehled těch, jež se nejlépe osvědčily a jsou univerzálně použitelné pro extrakty z nejrůznějších druhů nápojů. Ověřování těchto metod bylo prováděno s koncentrovanými barevnými roztoky (připravenými postupy uvedenými v kap. 2.1), jako standardů bylo používáno čistých extraktů z různých rostlinných zdrojů (květy růží, slupky řeckviček, plody černého jeřábu aj.). Společně s nimi bylo hodnoceno chromatografické chování všech červených syntetických potravinářských barviv povolených v ČSSR.

Dělení na tenkých vrstvách

Mikrokrystalická celulóza LT (Lachema Brno), vyvíjecí směs č. 1, 2, 3

Lucefol, vyvíjecí směs č. 4

Silikagel (Kieselgel G, Woelm DC), vyvíjecí směs č. 5, 6, 7

Silufol, vyvíjecí směs č. 8, 9

Polyamid pro TLC, vyvíjecí směs č. 10, 11

Směs polyamidu a mikrokrystalické celulózy LT (4:1), vyvíjecí směs č. 2, 11, 12

Polyvinylpyrrolidon, vyvíjecí směs č. 11

Spheron S 1000 (kyselý katex, glykolmetakrylátový gel se sulfonovými skupinami, výrobce Lachema Brno, 0,040—0,063 mm), vyvíjecí směs č. 2, 3

Alufol, vyvíjecí směs č. 7

Dělení na sloupcích (50—150 × 5—12 mm)

Mikrokrystalická celulóza LK (Lachema Brno), vyvíjecí směs č. 2, 13

Polyamid, vyvíjecí směs č. 2 (obsah alhokolu se postupně zvyšuje na 70 a 90 %)

Spheron S 1000, vyvíjecí směs č. 2, 14, 15
Polyvinylpyrrolidon, vyvíjecí směs č. 7, event. následně
č. 16 a 17
Dowex 1X2 v acetátové formě, vymývací roztok č. 18

Složení vyvíjecích směsí

- č. 1 1-butanol — kys. octová — voda 6:1:2
- č. 2 etanol — voda 1:1
- č. 3 HCl — kyselina octová — 1:2:8
- č. 4 1-butanol — 5% kyselina octová 1:1
- č. 5 methylethylketon — 1-butanol — kys. mravenčí —
voda 5:3:1:1
- č. 6 dioxan — voda — kyselina octová 6:3:1
- č. 7 octan ethylnatý — kyselina mravenčí — voda
70:15:15
- č. 8 1-butanol — etanol — kyselina octová — voda
5:2:1:2
- č. 9 aceton — octan ethylnatý — kyselina mravenčí —
voda 10:11:2:4
- č. 10 etanol (nebo metanol) — voda 1:1
- č. 11 etanol — methylethylketon — aceton — voda
15:15:5:65
- č. 12 metanol — voda — kyselina octová 7:2:1
- č. 13 1,2 g NaCl ve 200 ml 50% etanolu + 2 ml HCl
- č. 14 voda — HCl 100:1
- č. 15 voda HClO₄ 100:1
- č. 16 etanol — voda 10:5 + 1 % H₂SO₄
- č. 17 metanol — voda 1:1 + 0,1 % HCl, obsah alko-
holu se zvyšuje na 70 a 90 %; syntetická barviva se
fixují na hladině sloupce a lze je desorbovat ace-
tonem nebo dioxanem okyseleným kyselinou síro-
vou (1 %)
- č. 18 0,02–0,1 M HCl nebo 0,2–0,5 M kyselina octová

Uvedené chromatografické postupy umožňují dosta-
tečně výrazné a rychlé rozdělení antokyanových od syn-
tetických barviv a v mnoha případech i rozdělení jedno-
tlivých antokyanů zastoupených v analyzované směsi.
U většiny popsaných typů sorbentů a příslušných vyví-
jecích směsí jsou antokyanany nejpohyblivější barevnou
látkou. Jejich chromatografické chování však může být
v některých případech zcela odlišné. Je proto potřebné
ověření druhu barviva, a to provedením rychlé a jedno-
duché chemické reakce s jednotlivými chromatograficky
rozdělenými složkami (tj. s eluáty při sloupcové a s vy-
mytými skvrnami při tenkovrstvé technice).

2.3 Detekce antokyanů selektivními chemickými reakcemi

Z početné řady reakcí, jimiž se pozitivně projevuje
většina antokyanů a naopak jsou zpravidla inertní syn-
tetická i jiná přirozená červená barviva, se nejlépe osvěd-
čují:

1. Změna zbarvení roztoku po alkalizaci; s amonia-
kem do pH 7 se odbarvuje, při pH 8–10 vzniká fialové
modré zbarvení, s louhem nad pH 10 se vytvoří šedo-
modré a posléze žluté (chalkonové) zbarvení; po oky-
selení na pH 5 se obnovuje původní červená barva.

2. Reakcí s oxidem siřičitým (nebo hydrogensířičita-
nem) se antokyanany obvykle odbarvují (reverzibilně).

3. Reakcí s octanem olovnatým (8% roztok) v mírně
kyselém prostředí vzniká šedomodrá sraženina; rozpouš-
tí se v koncentrované kyselině chloristé na červeně zbar-
vený roztok.

4. Z etanolového roztoku lze antokyanany vysrážet 10ná-
sobným přebytkem diethyletheru.

5. Peroxid vodíku odbarvuje většinu antokyanů.

6. Reakcí antokyanů s hlinitou solí vznikají silně
zbarvené červené komplexy.

7. Smísením některých antokyanů s flavonolem, např.
s rhamnetinem v poměru 1:3 vzniká kopigmentační
efekt; projevuje se posunem vlnové délky maximální
absorbance o 20 nm a zvětšením hodnoty extinkce o 200
až 250 %.

Protože žádná z těchto reakcí není univerzálně plat-
ná, je žádoucí použít k ověření antokyanového charak-
teru barviva současně několika z nich.

2.4 Kvantitativní stanovení antokyanů

Provádí se kolorimetricky po chromatografické izolaci.
Zdrojem nesnází je obtížná dostupnost krystalických
preparátů použitelných jako standardů. Je možné postu-
povat nepřímou fotometrickým měřením roztoku barviva
při dvou různých hodnotách pH; obsah látky lze vypo-
čítat empirickými vzorci, např. podle Rayleigha [7].
Alternativní postup doporučený Wrolstadem *et al.* [8]
spočívá v diferenčním měření absorbance původního
extraktu a extraktu odbarveného hydrogensířičitanem při
odlišných hodnotách pH. K výpočtu slouží opět navrže-
ný vzorec. Podaří-li se na základě chromatografického
chování stanovit u izolovaných látek jejich příslušnost
k základnímu typu antokyanů (tj. kyanidin, pelargon-
idin, peonidin, petunidin, delfinidin, malvidin), je mož-
no k výpočtu jejich koncentrace použít tabelovaných
hodnot molových absorpčních koeficientů [8, 9, 10].

3. ZÁVĚR

Popsané laboratorní postupy dovolují izolovat antokya-
nová barviva od všech barevných látek — přírodních
i umělých — jež se mohou v nápojích vyskytovat. Spo-
lehlivost stanovení je založena na chromatografické se-
paraci a navazujících chemických reakcích, jimiž je
struktura těchto látek potvrzena. Přesné kvantitativní
stanovení antokyanů v nápojích je složitější, neboť jeho
předpokladem je dokonalé oddělení a použití srovná-
cího identického standardu. Není-li tato podmínka spl-
něna, je nutné vystačit s aplikací absorpčních koeficien-
tů anebo s diferenčním fotometrickým měřením při
různých hodnotách pH roztoku a s výpočtem koncentra-
ce podle doporučených empirických vzorců.

Určení přítomnosti a přibližného množství antokyanů
v nápojích umožňuje objektivně posoudit, do jaké míry
je zachováno přirozené zbarvení nápojů a jaký je stu-
peň jeho náhrady barvivy syntetickými, a tím i objek-
tivně zhodnotit senzoričskou a fyziologickou kvalitu vý-
robků.

Literatura

- [1] DAVÍDEK, J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin,
Alfa — SNTL, Praha 1981
- [2] PRÍBELA, A.: Analýza přírodních látek v poživatinách. Alfa,
Bratislava 1978
- [3] TIMBERLAKE, C. F., BRIDLE, P.: The anthocyanins. In: The
flavonoids, Chapman a. Hall, London 1975
- [4] ESKIN, N. A. M.: Plant pigments, flavors and textures: The
chemistry and biochemistry of selected compounds. Acad.
Press New York, San Francisco, London 1979
- [5] VAN SUMERE, C. F., VAN BRUSSEL, W., CASTEELE, K. V., VAN
ROMPAEY, L.: Recent advances in the separation of plant
phenolics
In: Biochemistry of plant phenolics. Recent advances in phyto-
chemochemistry **12**, 1979, s. 1
- [6] J. Ass. Off. Anal. Chem. **50**, 1967, s. 207
- [7] LANGE, H., SHROPSHIRE, W., MOHR, H.: Plant Physiol. **47**,
1971, s. 649
- [8] WROLSTAD, R. E., CULBERTSON, J. D., CORNWELL, C. J.,
MATTICK, L. R.: J. Ass. Off. Anal. Chem. **65**, 1982, s. 1417
- [9] FRANCIS, F. J.: Analysis of anthocyanins.
In: Anthocyanins as food colors. Acad. Press New York, 7,
1982, s. 181
- [10] HRAZDINA, G.: J. Agr. Food Chem. **18**, 1970, s. 243

Zloch, Z.: Důkaz a stanovení antokyanů v barevných ná-
pojích. Kvas. prům., **31**, 1985, č. 3, s. 58–60.

V práci je popsáno stanovení přítomnosti antokyanidinů
a antokyaninů vedle jiných přirozených i umělých bar-
viv v ovocných a zeleninových nápojích. Pracovní labo-
ratorní postup vychází z extrakce barviv vhodným sor-
bentem, nejčastěji polyvinylpyrrolidonem, polyamidem

nebo pryskyřici typu Dowex. Jeho těžiště spočívá v separaci antokyanů metodou tenkovrstvé nebo sloupcové chromatografie, nejčastěji na mikrokrystalické celulóze, silikagelu, polyvinylpyrrolidonu a na gelu Spheron S 1000. Izolované antokyany jsou verifikovány chemickými reakcemi selektivními pro tuto skupinu přírodních látek. Kvantitativní stanovení antokyanů se provádí po dokonalé chromatografické separaci kolorimetrickým měřením, k výpočtu jejich koncentrace se obvykle používá doporučených empirických vzorců.

Злох, З.: Доказательство и определение антоцианов в цветных напитках. Квас. прум. 31, 1985, № 3, стр. 58—60.

В статье описывается определение присутствия антоцианидинов и антоцианинов рядом с другими натуральными и искусственными красящими веществами в фруктовых и овощных напитках. Рабочий лабораторный способ исходит из экстрагирования красителей при помощи подходящего сорбента, чаще всего поливинилпирролидона, полиамида или смолы типа Довекс. Центр тяжести его состоит в отделении антоцианов методом тонкослой или столбцовой хроматографии, чаще всего на микрокристаллической целлюлозе, силикагеле, поливинилпирролидоне и на геле Сферон S 1000. Изолированные антоцианы подтверждаются при помощи химических реакций, избирательными для этой группы природных веществ. Количественное определение антоцианов проводится путем их совершенной хроматографической сепарации при помощи колориметрического измерения, для расчета их концентрации обычно используются рекомендуемые эмпирическими формулами.

Zloch, Z.: Proof and Determination of Anthocyanins in Color Beverages. Kvas. prům. 31, 1985, No 3, pp 58—60.

A determination of anthocyanidins and anthocyanins in addition to other natural and synthetic dyestuffs in fruit and vegetable beverages is described. The first step of the determination comprises an extraction of dyestuffs using a suitable sorbent, e.g. polyvinylpyrrolidone, polyamide or Dowex resin. Second step is the separation of anthocyanins by the TLC or column chromatography using microcrystalline celluloses, silica gel, polyvinylpyrrolidone and Spheron S 1000. Isolated anthocyanins are verified by selective chemical reactions. The quantity determination of anthocyanins after their chromatographic separation is made by the colorimetry. Empirical formulae are used for the calculation of their concentrations.

Zloch, Z.: Beweis und Bestimmung der Anthocyane in Farbgetränken. Kvas. prům. 31, 1985, Nr. 3, S. 58—60.

In der Arbeit wird die Bestimmung der Anwesenheit der Anthocyanidine und Anthocyanine neben anderen natürlichen und künstlichen Farbstoffen in Getränken aus Obst und Gemüse beschrieben. Das analytische Arbeitsverfahren besteht auf der Extraktion der Farbstoffe durch geeignetes Sorbens, am häufigsten Polyvinylpyrrolidon, Polyamid oder Harz vom Typ Dowex. Den Schwerpunkt des Verfahrens bildet die Separation der Anthocyane mittels Dünnschicht- oder Säulenchromatographie, meist auf mikrokrystallischer Cellulose, Silikagel, Polyvinyl-Pyrrolidon und auf Gel Spheron S 1000. Die isolierten Anthocyane werden durch chemische Reaktionen verifiziert, die für diese Gruppe von Naturstoffen selektiv sind. Die quantitative Bestimmung der Anthocyane wird nach ihrer vollkommenen chromatographischen Separation mittels kolorimetrischer Messung durchgeführt; zur Errechnung ihrer Konzentration werden die empfohlenen empirischen Formeln angewendet.