



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa  
Owoców i Warzyw

## **Metodyka**

### **OZNACZANIA ANTOCYJANÓW W OWOCACH ŚWIDOŚLIWY**

Autorzy:

dr inż. Monika Mieszczakowska-Frać

dr inż. Jarosław Markowski

dr inż. Dorota Kruczyńska

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 1.4**

„Nowe gatunki dla poszerzenia i zróżnicowania produkcji roślin ogrodniczych, w tym żywności funkcjonalnej”

**Programu Wieloletniego:**

„Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”  
finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

**Skierniewice 2016**

## Spis treści:

1. Wstęp
2. Cel zadania
3. Opis metodyki oznaczania antocyjanów w świdoliwie
  - a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy
  - b) Analiza chromatograficzna (HPLC)
4. Walidacja metody chromatograficznej
5. Wnioski
6. Literatura

### **1. Wstęp**

Coraz większa świadomość konsumentów sprawia, że coraz chętniej sięgają oni po rzadko spotykane w Polsce gatunki owoców, które często są bardzo bogatym źródłem bioaktywnych składników, między innymi antocyjanów i kwasu askorbinowego. Wiele badań potwierdza korzystny wpływ antocyjanów w żywieniu człowieka (Wang i in. 1997; Kong i in. 2003; Matsumoto i in. 2005; Mazza 2007) i ich zdrowotny efekt: stabilizacja kolagenu, zwiększanie przepuszczalności naczyń krwionośnych, ochrona wzroku (Bridle i Timberlake 1997; Antal i in. 2003; Heinonen 2007). Niestety biodostępność antocyjanów jest mała (Antal i in. 2003; Mazza 2007), dlatego też bardzo ważne jest, aby w codziennej diecie znalazło się dużo owoców bogatych w antocyjany.

Kwas askorbinowy natomiast, dzięki właściwościom przeciwutleniającym wpływa na prawidłowe funkcjonowanie ludzkiego organizmu, przede wszystkim przez podnoszenie odporności i działania przeciwinfekcyjnym.

### **2. Cel zadania**

Celem zadania było opracowanie i walidacja metody chromatograficznej oznaczania antocyjanów w owocach świdoliwy.

### **3. Opis metodyki oznaczania antocyjanów w świdoliwie**

#### **a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy**

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce świdoliwy zostały rozdrobnione w stanie zamrożonym w malakserze z użyciem suchego lodu (stały ditlenek węgla).

Naważki 5 g, 10 g i 20 g rozdrobnionych owoców homogenizowano przez 2 minuty w 50 ml metanolu, następnie wirowano przy obrotach 10 tys. G przez 10 minut. Otrzymany supernatant sączono na sączku jakościowym i rozcieńczono 1:3 buforem octanowym (solwent A). Przeprowadzono ekstrakcję antocyjanów z owoców świdoliwy stosując 3 poziomy stężenia metanolu: 60%, 70% i 80%. Doświadczenie przeprowadzono na odmianie 'Prince Williams' z sezonu 2015. Przeprowadzono 3 ekstrakcje próbki dla każdego poziomu stężenia metanolu i naważki. Najniższe wartości analizowanych związków otrzymano po zastosowaniu do

ekstrakcji 60% metanolu (Tabela 1). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zawartości antocyjanów w zależności od wielkości naważki próbki (Tabela 2). Jednak wyniki otrzymane z ekstrakcji naważki 20 g obarczone były największym odchyleniem (około 10%). W dalszych badaniach do ekstrakcji związków antocyjanowych z owoców świdośliwy stosowano 70% metanol i naważkę 10g.

Tabela 1. Wpływ stężenia roztworu ekstrahującego na wydajność ekstrakcji antocyjanów z surowca świdośliwy [mg/kg]

| stężenie metanolu | gal-c  | gluk-c | ara-c | ksyl-c | Suma |
|-------------------|--------|--------|-------|--------|------|
| 60%               | 482,3a | 87,6a  | 37,8a | 31,8a  | 639a |
| 70%               | 614,3b | 108,8b | 46,9b | 39,4b  | 809b |
| 80%               | 662,6c | 114,5b | 49,1b | 41,8b  | 868b |

Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w kolumnie nie różnią się istotnie (test HSD Tukeya,  $\alpha = 0,05$ ,  $n=6$ ). Skróty: gal-c – galaktozyd cyjanidyny, glu-c – glukozyd cyjanidyny, ara-c – arabinozyd cyjanidyny, ksyl-c – ksylozyd cyjanidyny.

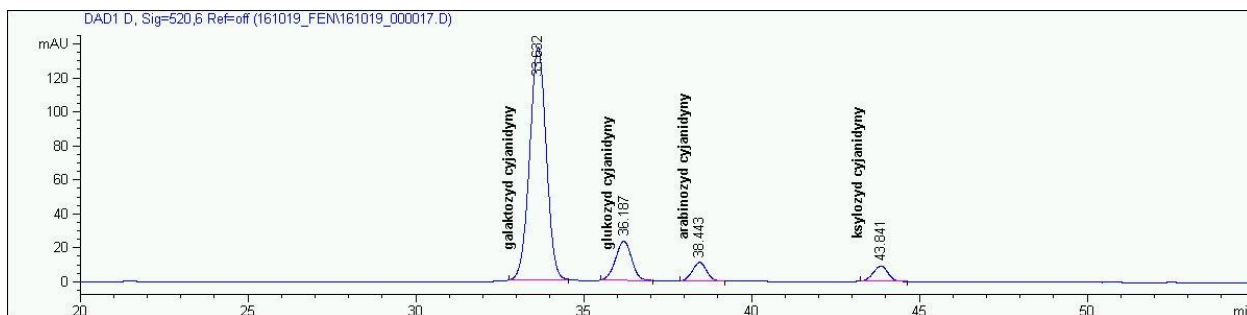
Tabela 2. Wpływ naważki próbki na wydajność ekstrakcji antocyjanów z surowca świdośliwy [mg/kg]

| naważka | gal-c  | gluk-c | ara-c | ksyl-c | Suma    |
|---------|--------|--------|-------|--------|---------|
| 5 g     | 630,5a | 110,6a | 47,2a | 42,6a  | 831±15a |
| 10 g    | 614,3a | 108,8a | 46,9a | 39,4a  | 809±36a |
| 20 g    | 611,7a | 110,5a | 46,6a | 39,7a  | 808±82a |

Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w kolumnie nie różnią się istotnie (test HSD Tukeya,  $\alpha = 0,05$ ,  $n=6$ ). Skróty: patrz Tab. 1.

### b) Analiza chromatograficzna (HPLC)

Rozdział prowadzono na kolumnie Synergi Fusion-RP 80A (250 mm x 4,6 mm; 4  $\mu$ m) z prekolumną. Warunki elucji były następujące: przepływ 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ , temperatura 25 °C, długość fali 520 nm, faza ruchoma składa się z 10,2% kwasu octowego w 2mM octanie sodu (solwent A) i acetonitrylu (solwent B). Analiza HPLC była prowadzona w przepływie gradientowym: 0–20 min, 3 % B; 20–40 min, 17 % B; 40–65 min, 40 % B; 65–68 min, 90 % B; 68–72 min, 90 % B izokratycznie; 72–73 min, 0 % B. Rysunek 1 przedstawia rozdział analizowanych antocyjanów wyżej opisaną metodą chromatograficzną. W świdośliwie zidentyfikowany zostały następujące związki antocyjanowe: **galaktozyd-**, **glukozyd-**, **arabinozyd-** i **ksylozyd cyjanidyny**. Wyniki zostały obliczone według krzywej wzorcowej standardu galaktozydu cyjanidyny i wyrażone w mg/kg.



Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdzielania antocyjanów w świdoliwie.

#### 4. Walidacja metody chromatograficznej

Wyznaczono następujące parametry walidacji:

**Zakres stężeń** substancji, w którym metoda daje wyniki badań proporcjonalne do stężenia substancji.

**Liniowość** czyli wyznaczenie krzywej regresji  $y = ax + b$ , a do oceny liniowości wykorzystano współczynnik korelacji  $R_2$ , współczynnik ten nie może być mniejszy niż 0,999. Liniowość wyznaczano na 11 poziomach wzorca substancji, a każdy ze wzorców analizowano 3-krotnie.

**Granica wykrywalności (LOD)** czyli najmniejsza zawartość substancji, którą można wykryć z 95% pewnością statystyczną (wzór 1).

**Granica oznaczalności (LOQ)** czyli najmniejsze stężenie substancji, które można oznaczyć z dopuszczalną precyzją i dokładnością w ustalonych warunkach badania (wzór 2).

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot \text{Se}/a \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \text{Se}/a \quad (2)$$

Wzory opierają się na odchyleniu standardowym oraz nachyleniu krzywej kalibracji, przedstawiającej zależność odpowiedzi detektora od stężenia analitu.

**Precyzja aparatury:** 6 -krotne nastrzyknięcie tej samej próbki i wyznaczenie względnego odchylenia standardowego (RSD).

**Precyzja metody:** 3 ekstrakcje próbki, 2-krotne nastrzyknięcie każdego ekstraktu. Analiza jednego dnia (intra-day), analiza przez 3 kolejne dni w takich samych warunkach (inter-day); parametr wyrażony jako RSD.

**Powtarzalność:** precyzja wyników uzyskanych w tych samych warunkach pomiarowych, wyliczona w oparciu o RSD (wzór 3).

$$u = \text{RSD}/\text{pierwiastek}(n) \quad (3)$$

**Stabilność próbki:** 6-krotna analiza tej samej próbki w dniu przygotowania oraz po 24 i 48 godzinach przechowywania w temperaturze pokojowej i w lodówce.

**Odzysk:** wzbogacenie próbki w standard zewnętrzny na dwóch poziomach 50% i 100%. 3-krotna ekstrakcja na każdym poziomie wzbogacania.

Tabela 3. Zestawienie parametrów walidacji metody chromatograficznej oznaczania antocyjanów w surowcu świdoliwy

| galaktozyd cyjanidyny |                          |
|-----------------------|--------------------------|
| zakres stężeń         | 0,36-23,67 mg/l          |
| Liniiowość            | $y = 0,00882x + 0,15747$ |
| R <sup>2</sup>        | 0,999                    |
| LOD                   | 0,96 mg/l                |
| LOQ                   | 2,90 mg/l                |

Tabela 4. Charakterystyka metody dla świdoliwy

| świdoliwa 'Prince William'        | galaktozyd cyjanidyny | glukozyd cyjanidyny | arabinozyd cyjanidyny | ksylozyd cyjanidyny | suma antocyjanów |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|------------------|
| zawartość mg/ kg                  | <b>667,5</b>          | <b>118,4</b>        | <b>50,6</b>           | <b>42,9</b>         | <b>872,3</b>     |
| precyzja aparatury [RSD %]        | <b>0,62</b>           | <b>1,32</b>         | <b>0,55</b>           | <b>1,05</b>         | <b>0,64</b>      |
| precyzja metody intra-day [RSD %] | <b>4,7</b>            | <b>5,09</b>         | <b>4,79</b>           | <b>5,12</b>         | <b>4,77</b>      |
| precyzja metody inter-day [RSD %] | <b>8,43</b>           | <b>8,5</b>          | <b>7,95</b>           | <b>8,75</b>         | <b>8,43</b>      |
| powtarzalność [u]                 | <b>1,92</b>           | <b>2,08</b>         | <b>1,96</b>           | <b>2,09</b>         | <b>1,95</b>      |
| stabilność (48 godz. T-pokojowa)  | <b>90,1</b>           | <b>88,8</b>         | <b>87,4</b>           | <b>89,3</b>         | <b>89,6</b>      |
| stabilność (48 godz. w lodówce)   | <b>96,8</b>           | <b>95,6</b>         | <b>95,5</b>           | <b>96,2</b>         | <b>96,1</b>      |
| odzysk [%]*                       |                       | <b>100,7</b>        |                       |                     |                  |
| odzysk [RSD %]                    |                       | <b>3,11</b>         |                       |                     |                  |

\*Ze względu na ograniczoną ilość standardów antocyjanowych odzysk został wykonany tylko dla glukozydu cyjanidyny, który jest zgodny z wytycznymi AOAC (średni odzysk dla stężeń analitu poniżej 10 ppm powinien mieścić się w przedziale 80-110%).

## 5. Wnioski

- Opracowana metodyka jest przydatna do oznaczania antocyjanów w badanej matrycy roślinnej jaką jest świdoliwa. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury jak i metody, RSD w przedziale 0,5-9%. Szacunkowe wartości wymagane dla precyzji w przypadku próbek biologicznych, żywności wynosi  $\sim 2 \div 20\%$ .
- Odzysk badanych związków bioaktywnych jest na poziomie 101%, a stabilność po dwóch dobach przechowywania w lodówce powyżej 95%.

## 6. Literatura

- Wang H., Cao G., Prior R.L. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45(2): 304-309.
- Koponen J.M., Buchert J., Poutanen K.S., Törrönen A.R. 2008. Effect of pectinolytic juice production on the extractability and fate of bilberry and black currant anthocyanins. *Eur. Food Res. Technol.* 227(2): 485-494.
- Matsumoto H., Takenami E., Iwasaki-Kurashige K., Osada T., Katsumura T., Hamaka T. 2005. Effects of blackcurrant anthocyanin intake on peripheral muscle circulation during typing work in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 94(1-2): 36-45.
- Mazza G. 2007. Bioactivity, absorption and metabolism of anthocyanins. *Acta Hort.* 744: 117-126.
- Bridle P., Timberlake C.F. 1997. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. *Food Chem.* 58(1-2): 103-109.
- Antal D.S., Gârban G., Gârban Z. 2003. The anthocyanins: biologically-active substances of food and pharmaceutical interest. *Food Technol.*: 106-115.
- Heinonen M. 2007. Berry phenolics is there enough scientific evidence for nutrition and health claims? NHClaims seminar, 8-9 November 2007, Helsinki, Finland.