



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa
Owoców i Warzyw

Metodyka

OZNACZANIA ANTOCYJANÓW W OWOCACH ŻURAWINY

Autorzy:

dr inż. Monika Mieszczakowska-Frać

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 2018

Spis treści:

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

1. Wstęp

Zdrowie człowieka w dużej mierze zależy od tego, w jaki sposób się odżywiamy. Wiele badań potwierdza fakt, że szereg chorób jest dietozależnych, dlatego też organizacje takie jak WHO (2014), Rada UE (2014) zwracają uwagę na konieczność zwiększenia spożycia owoców i warzyw. Szczególnie ważne są te owoce, które są bogate w składniki bioaktywne. Do takich owoców można zaliczyć żurawinę, która zawiera antocyjany – związki o właściwościach prozdrowotnych (Antal i in. 2003; Heinonen 2007), ale jest owocem rzadko spożywanym. Niestety biodostępność antocyjanów jest mała (Antal i in. 2003; Mazza 2007), dlatego też bardzo ważne jest, aby w codziennej diecie znalazło się dużo różnorodnych owoców bogatych w antocyjany.

2. Cel zadania

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

3. Opis metodyki oznaczania antocyjanów w żurawinie

a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce żurawiny 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 żurawiny stosując 3 poziomy stężenia metanolu: 60%, 70% i 80%. Doświadczenie przeprowadzono na odmianie 'Stevens' z sezonu 2017. Przeprowadzono 3 ekstrakcje próbki dla każdego poziomu stężenia metanolu i naważki. Najniższe wartości analizowanych związków otrzymano po zastosowaniu do ekstrakcji 60% metanolu (Tabela 1), a wyniki otrzymane dla ekstraktów otrzymanych po zastosowaniu metanolu o stężeniu 70% i 80% nie różniły się między sobą statystycznie. Najniższe zawartości antocyjanów otrzymano, gdy ekstrakcja była prowadzona z próbki o wielkości 20 g (Tabela 2).

W dalszych badaniach do ekstrakcji związków antocyjanowych z owoców żurawiny stosowano 70% metanol i naważkę 10 g.

Tabela 1. Wpływ stężenia roztworu ekstrahującego na wydajność ekstrakcji antocyjanów z surowca żurawiny (mg/kg)

stężenie metanolu	gal-c	arab-c	gal-p	arab-p	Suma
60%	95,4 a	54,7 a	62,8 a	24,8 a	243 a
70%	99,0ab	56,6ab	70,5ab	25,6 a	252ab
80%	103,2 b	58,9 b	73,6 b	26,7 a	262 b

Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w kolumnie nie różnią się istotnie (test HSD Tukeya, $\alpha = 0,05$, $n=6$). Skrót: gal-c – galaktozyd cyjanidyny, arab-c – arabinozyd cyjanidyny, gal-p – galaktozyd peonidyny arab-p – arabinozyd peonidyny.

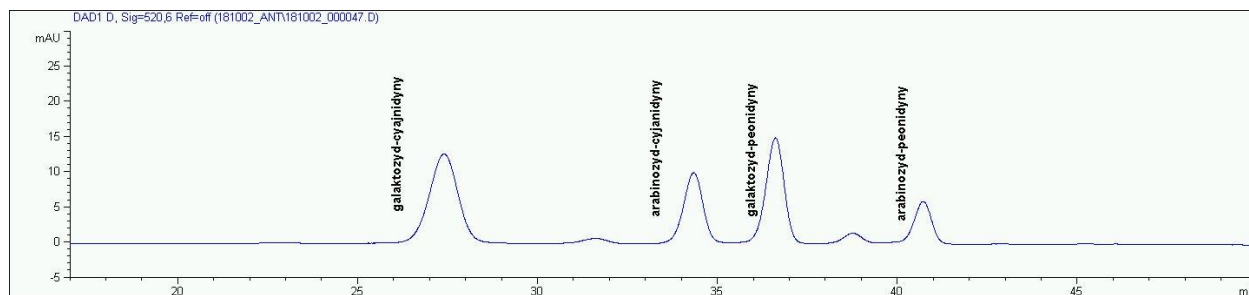
Tabela 2. Wpływ naważki próbki na wydajność ekstrakcji antocyjanów z surowca żurawiny (mg/kg)

naważka	gal-c	arab-c	gal-p	arab-p	Suma
5 g	104,3 c	63,2 c	69,8 a	24,3 a	262a
10 g	101,2 b	56,6 b	72,2 b	27,0 b	257ab
20 g	93,2 a	51,5 a	69,9ab	26,8 b	241a

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

b) Analiza chromatograficzna (HPLC)

Rozdział prowadzono na kolumnie Synergi Fusion-RP 80A (250 mm x 4,6 mm; 4 μ m) z prekolumną. Warunki elucji były następujące: przepływ 0,5 ml 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 żurawinie zidentyfikowany zostały następujące związki antocyjanowe: **galaktozyd-cyjanidyny**, **arabinozyd-cyjanidyny**, **galaktozyd-peonidyny** i **arabinozyd-peonidyny**. Wyniki zostały obliczone według krzywej wzorcowej standardu galaktozydu cyjanidyny, arabinozydu cyjanidyny oraz glukozydu peonidyny i wyrażone w mg/kg.



Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdziału antocyjanów w żurawinie.

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 10 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 próbek: 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 75% i 50%. 3-krotna ekstrakcja na każdym poziomie wzbogacania.

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

	galaktozyd cyjanidyny	arabinozyd cyjanidyny	glukozyd peonidyny
zakres stężeń	0,44-29,00 mg/l	0,70-29,20 mg/l	0,49-28,20 mg/l
liniowość	$y = 0,00945x + 0,16593$	$y = 0,00913x + 0,37159$	$y = 0,00933x - 0,15466$
R ²	0,999	0,998	0,999
LOD	1,51 mg/l	1,36 mg/l	0,91 mg/l
LOQ	4,58 mg/l	4,13 mg/l	2,77 mg/l

Tabela 4. Charakterystyka metody dla żurawiny

Żurawina 'Stevens'	galaktozyd cyjanidyny	arabinozyd cyjanidyny	galaktozyd peonidyny	arabinozyd peonidyny	suma antocyjanów
zawartość mg/ kg	100,6	57,1	71,9	26,4	258,2
precyzja aparatury [RSD %]	0,94	2,41	0,74	1,77	0,96
precyzja metody intra-day [RSD %]	0,87	1,53	0,98	1,01	0,97
precyzja metody inter-day [RSD %]	1,67	2,25	1,76	2,37	1,69
powtarzalność [u]	0,35	0,62	0,40	0,41	0,40
Stabilność % (48 godz. T-pokojowa)	98,1	99,9	98,9	94,8	98,4
Stabilność % (48 godz. w lodówce)	101,6	103,5	102,1	98,4	101,8
odzysk [%]*	97,3				
odzysk [RSD %]	1,35				

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

5. Wnioski

- W owocach żurawiny dominującym antocyjanem jest galaktozyd cyjanidyny, który stanowi 39% udziału wszystkich antocyjanów, a następnie galaktozyd-peonidyny (28% udziału)
- Opracowana metodyka jest przydatna do oznaczania antocyjanów w badanej matrycy roślinnej, jaką jest żurawina. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury jak i metody, RSD w przedziale 0,7-2,4%. Szacunkowe wartości wymagane dla precyzji w przypadku próbek biologicznych, żywności wynosi $\sim 2 \div 20\%$.
- Powtarzalność metody jest poniżej 0,6, co świadczy o bardzo wysokiej precyzji otrzymanych wyników.

- Odzysk badanych związków bioaktywnych jest na poziomie 97%, a stabilność po dwóch dobach przechowywania wynosi 98-102%, odpowiednio w temperaturze pokojowej i w lodówce.

6. Literatura

- WHO. 2014: European Food and Nutrition Action Plan 2015-2020. Regional Committee for Europe 64th Session Copenhagen, Denmark, 15-18 September 2014 http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0008/253727/64wd14e_FoodNutAP_140426.pdf
- Council, EU 2014: Council conclusions on nutrition and physical activity. Luxembourg, 20 June 2014 http://www.consilium.europa.eu/uedocs/cms_data/docs/pressdata/en/lsa/143285.pdf
- Antal D.S., Gârban G., Gârban Z. 2003. The anthocyanins: biologically-active substances of food and pharmaceutic 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.