



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa
Owoców i Warzyw

Metodyka

OZNACZANIA ANTOCYJANÓW W OWOCACH BORÓWKI NISKIEJ

Autorzy:

dr inż. Justyna Szwejda-Grzybowska
dr hab. Monika Mieszczakowska-Frać
dr inż. Dorota Kruczyńska

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 1.4**
„Nowe gatunki dla poszerzenia i różnicowania 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 2020

Spis treści:

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

1. Wstęp

Borówka niska (*Vaccinium angustifolium* Aiton) należy do mało znanych gatunków roślin ogrodniczych w Polsce. Występuje głównie w USA i w Kanadzie w lasach o luźnym drzewostanie. Dane literaturowe donoszą, że jagody borówki niskiej są bogatym źródłem substancji o charakterze prozdrowotnym m.in. antocyjanów (Barnes i in., 2009; Giovanelli i in., 2012; Lohachoompol i in., 2008; Sinelli i in., 2008). 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 tj.: 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. Najczęstsze antocyjany występujące w jagodach to glikozydy delfinidyny, cyjanidyny, petunidyny, peonidyny i malwidyny (Gavrilova i in., 2011; Li i in., 2017).

2. Cel zadania

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

3. Opis metodyki oznaczania antocyjanów w owocach borówki niskiej

a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce borówki niskiej zostały rozdrobnione w stanie zamrożonym w malakserze z użyciem suchego lodu (stały ditlenek węgla). Naważkę 5 g rozdrobnionych owoców homogenizowano przez 2 minuty w 50 ml 1% HCOOH w 60% metanolu, a następnie sączono na sączku jakościowym. Doświadczenie przeprowadzono na odmianie 'Emil' z sezonu 2019.

b) Analiza chromatograficzna (HPLC)

Rozdział prowadzono na kolumnie Synergi Fusion-RP 80A (250 mm x 4,6 mm; 4 µm) z prekolumną. Warunki elucji były następujące: przepływ 1 ml min⁻¹, temperatura 25 °C, długość fali 520 nm, faza ruchoma składa się z 5% roztworu kwasu mrówkowego (solwent A) i acetonitrylu (solwent B). Analiza HPLC była prowadzona w przepływie gradientowym: 0–16 min, 97% B; 16–30 min, 91% B; 30–54 min, 88% B; 54–58 min, 67% B; 58–64 min, 10% B 64–

65 min, 97% B. Rysunek 1 przedstawia rozdział analizowanych antocyjanów wyżej opisaną metodą chromatograficzną. W borówce niskiej zidentyfikowane zostały następujące związki antocyjanowe: **galaktozyd-delifinidyny, glukozyd-delifinidyny, arabinozyd-delifinidyny, acetylo-3-galaktozyd-delifinidyny, galaktozyd-cyjanidyny, glukozyd-cyjanidyny, arabinozyd-cyjanidyny, galaktozyd-petunidyny, glukozyd-petunidyny, arabinozyd-petunidyny; galaktozyd-peonidyny, glukozyd-peonidyny, galaktozyd-malwidyniny, glukozyd-malwidyniny, arabinozyd-malwidyniny oraz siedem niezidentyfikowanych związków**. Zawartość antocyjanów obliczono według krzywej wzorcowej dla dominującego standardu galaktozydu delfinidyny i wyrażone w mg/100g.

Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdziału antocyjanów w borówce niskiej.

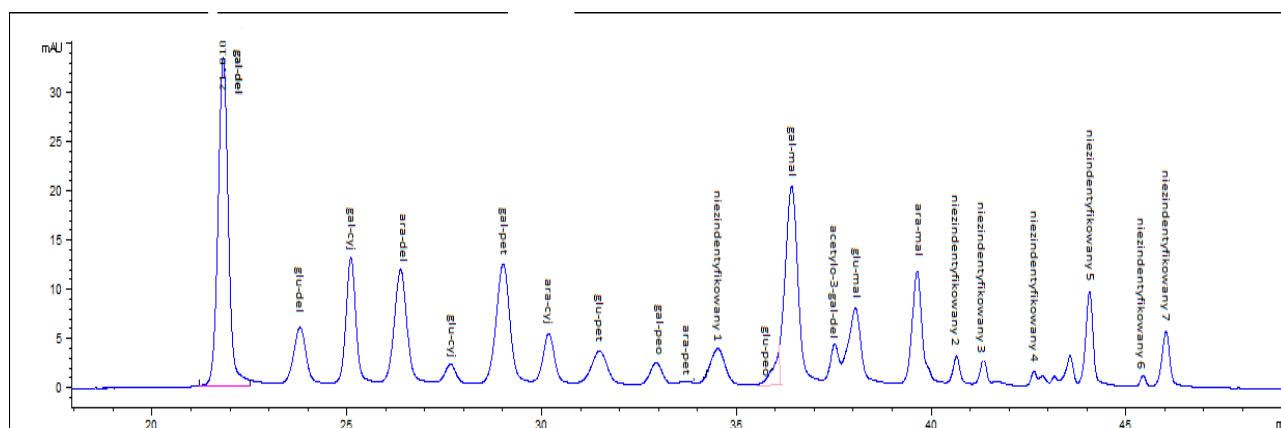


Tabela 1. Zawartość poszczególnych antocyjanów w borówce niskiej 'Emil' (mg/100 g).

	Antocyjan	mg/100 g
1	Delphinidin -3-galactoside	61,4
2	Delphinidin -3-glucoside	15,2
3	Cyanidin -3-galactoside	24,9
4	Delphinidin -3-arabinoside	28,3
5	Cyanidin -3-glucoside	6,4
6	Petunidin-3-galactoside	32,8
7	Cyanidin-3-arabinoside	13,4
8	Petunidin-3-glucoside	12,4
9	Peonidin-galactoside	6,7
10	Petunidin-3-arabinoside	2,5
11	Niezidentyfikowany 1	12,4
12	Peonidin-3-glucoside	4,1
13	Malvidin-3-galactoside	47,6
14	Delphinidin -3-galactoside acetylated	8,0
15	Malvidin-3-glucoside	20,0
16	Malvidin-3-arabinoside	21,0
17	Niezidentyfikowany 2	5,6
18	Niezidentyfikowany 3	4,5
19	Niezidentyfikowany 4	2,6
20	Niezidentyfikowany 5	14,1
21	Niezidentyfikowany 6	2,0

22	Niezidentyfikowany 7	9,1
	Suma	355,0

4. Walidacja metody chromatograficznej

Walidację metody HPLC oznaczania antocyjanów w borówce niskiej wykonano bazując na dominującym antocyjanie – galaktozydzie-delfinidyny.

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).

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

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

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 2. Zestawienie parametrów walidacji metody chromatograficznej oznaczania antocyjanów w surowcu borówki niskiej.

	galaktozyd delfinidyny
zakres stężeń	0,2-9,8 mg/100 ml
liniowość	$y = 0,00981x + 0,06139$
R ²	0,999
LOD	0,33 mg/100 ml
LOQ	0,99 mg/100 ml

Tabela 3. Charakterystyka metody dla borówki niskiej.

Borówka niska Emil	galaktozyd delfinidyny
zawartość mg/ 100g	61,4
precyzja aparatury [RSD %]	0,31
precyzja metody intra-day [RSD %]	2,21
precyzja metody inter-day [RSD %]	1,0
powtarzalność [u]	0,9
stabilność po 48 godz. w temp. pokojowej [%]	97,6
stabilność po 48 godz. w lodówce [%]	99,3
odzysk [%]	101,1
odzysk [RSD %]	2,21

*Ze względu na ograniczoną ilość standardów antocyjanowych odzysk został wykonany tylko dla galaktozydu delfinidyny, 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 borówka niska. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury jak i metody, RSD w przedziale 1,0 - 2,21%. Szacunkowe wartości wymagane dla precyzji w przypadku próbek biologicznych, żywności wynosi $\sim 2 \div 20\%$.
- stabilność galaktozydy-delfinidyny po dwóch dobach przechowywania w temperaturze pokojowej oraz w lodówce jest na poziomie 97,6-99,3%.
- Odzysk badanych związków bioaktywnych jest na poziomie 101%, a RSD dla odzysku 2,21%.

6. Literatura

- Antal D.S., Gârban G., Gârban Z. 2003. The anthocyanins: biologically-active substances of food and pharmaceutical interest. *Food Technol.*: 106-115.
- Barnes, J.S., Nguyen, H.P., Shen, S., Schug, K.A., 2009. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216 (23): 4728–4735.
- Bridle P., Timberlake C.F. 1997. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. *Food Chem.* 58(1-2): 103-109.
- Gavrilova, V., Kajdzanoska, M., Gjamovski, V., Stefova, M., 2011. Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J. Agric. Food Chem.* 59 (8): 4009–4018.
- Giovanelli G., Brambilla A., Rizzolo A., Sinelli N. 2012. Effects of blanching pre-treatment and sugar composition of the osmotic solution on physico-chemical, morphological and antioxidant characteristics of osmodehydrated blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Research International* 49(1): 263-271.
- Heinonen M. 2007. Berry phenolics is there enough scientific evidence for nutrition and health claims? NHClaims seminar, 8-9 November 2007, Helsinki, Finland.
- 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.
- Li D., Li B., Ma Y., Sun X., Lin Y., Meng X. 2017. Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62: 84-93.
- Lohachoompol, V., Mulholland, M., Szrednicki, G., Craske, J., 2008. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chem.* 111 (1): 249–254.
- 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.
- Sinelli N., Spinardi A., Di Egidio V., Mignani I., Casiraghi E. 2008. Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* 50(1): 31–36.
- Wang H., Cao G., Prior R.L. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45(2): 304-309.