



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa  
Owoców i Warzyw

## Metodyka

### OZNACZANIA KWASU ELAGOWEGO W JEŻYNIE

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 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 2020**

## Spis treści:

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

### 1. Wstęp

Rośliny zawierają wiele związków chemicznych, które mają pozytywny wpływ na nasze zdrowie (Krishnaiah i in. 2011). Jednym z nich jest kwas elagowy należący do kwasów fenolowych. Może on występować w owocach zarówno w postaci wolnej, jak i związanej estrowo z glukozą, tworząc tzw. elagotanniny (Edderkaoui i in. 2008). Z dostępnych danych wynika, że kwas elagowy wykazuje m. in. silne działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne oraz przeciwnowotworowe dzięki temu, że może hamować podziały komórkowe oraz indukować apoptozę w komórkach rakowych. Wpływa też korzystnie na profil lipidowy oraz nadciśnienie tętnicze (Aiyer i in. 2006, Han i in. 2006, Corbett i in. 2010). Znaczne ilości kwasu elagowego występują w owocach jagodowych, takich jak: jeżyna, truskawki, maliny, żurawina, winogrona, granaty oraz orzechy włoskie.

Jeżyny należą do rodziny różowatych *Rosaceae*, rodzaju *Rubus*. Są bogatym źródłem związków o charakterze prozdrowotnym tj.: kwasy fenolowe (elagowy, galusowy, syryngowy, kaftarowy, kawowy), flawonoidy (flawonole - kwercetyna, kemferol, mirycetyna, rutyna, glukozyd kwercetyny; antocyjany - 3-O-glukozyd cyjanidyny, 3-O-ksylozyd cyjanidyny, 3-O-glukozyd pelargonidyny, 3-O-glukozyd malwidyny, 3-O-glukozyd rutynozyny; flawanole - katechina, epikatechina, galusan epikatechiny, procyanidyna B<sub>1</sub>), taniny (proantocyjanidyna B<sub>2</sub>) oraz witaminy (C, E) (Patel i in. 2004, Lee i in. 2012).

### 2. Cel zadania

Celem zadania było opracowanie i walidacja metody chromatograficznej oznaczania kwasu elagowego w owocach jeżyny.

### 3. Opis metodyki oznaczania kwasu elagowego w jeżynie

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

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce jeżyny zostały zliofilizowane, a następnie rozdrobione w stanie zamrożonym w ciekłym azocie.

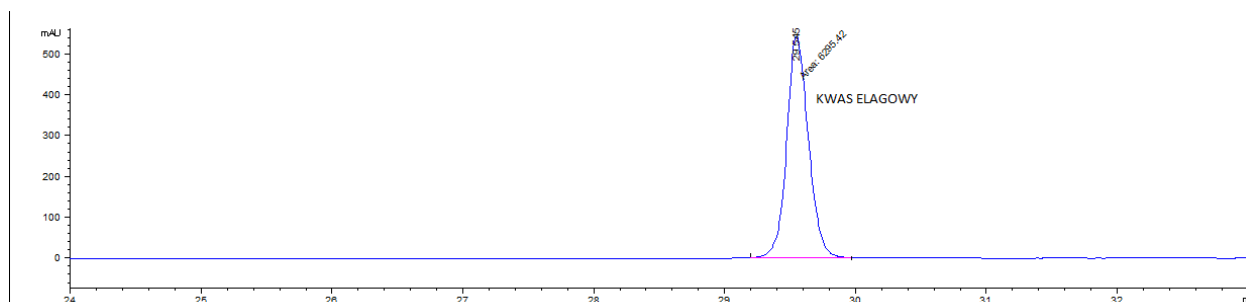
0,5 mg próbki owoców jeżyny przeniesiono do probówki wirówkowej, zalano 25 ml mieszaniny aceton-woda (4:1) i homogenizowano przez 2 min. Szczelnie zamkniętą (pod strumieniem gazowego azotu) próbkę umieszczono w wytrząsarce na 1 godzinę. Następnie odwirowano 10 000

obr/min przez 15 min. Powyższą ekstrakcję powtórzono 2-krotnie. Połączone supernatanty odparowywano na wyparce próżniowej i przenoszono do kolby o poj. 25 ml. Następnie pobierano 10 ml próbki do plastikowej probówki, dodawano 10 ml roztworu 4 N kwasu trójchlorooctowego (TFA), zawartość mieszało i wstawiano do łaźni z wrzącą wodą na 1 h. Po ochłodzeniu filtrowano przez filtr teflonowy do probówki autosamplera. Doświadczenie przeprowadzono na odmianie 'Apache' z sezonu 2019.

#### a) Analiza chromatograficzna (HPLC)

Rozdział prowadzono wykorzystując kolumnę Phenomenex Fusion (250 mm x 4,6 mm; 4  $\mu$ m) z prekolumną. Warunki elucji były następujące: 1 ml min<sup>-1</sup>, temperatura 30 °C, długość fali 255 nm, faza ruchoma składa się z 4,5 % roztworu kwasu mrówkowego (solwent A) i acetonitrylu (solwent B). Analiza HPLC była prowadzona w przepływie gradientowym: 0–36 min, 100% A; 36–40 min., 75% A; 40–46 min, 10% A; 46–48 min, 10% A; 48–50 min, 100% A.

Rysunek 1 przedstawia rozdział kwasu elagowego wyżej opisaną metodą chromatograficzną. Wyniki zostały obliczone według krzywej wzorcowej standardu kwasu elagowego i wyrażone w mg/100 g.



Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdziału kwasu elagowego w jeżynie

## 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).

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

**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 1. Zestawienie parametrów walidacji metody chromatograficznej

	kwas elagowy
zakres stężeń	0,22-10,9 mg/100 ml
liniowość	$y = 0,00087x + 0,02284$
R <sup>2</sup>	0,999
LOD	0,37 mg/100 ml
LOQ	1,13 mg/100 ml

Tabela 2. Charakterystyka metody dla jeżyny odmiany ‘Apache’

Jeżyna ‘Apache’	kwas elagowy
zawartość mg/100g ś.m.	<b>41,6</b>
precyzja aparatury [RSD %]	<b>2,77</b>
precyzja metody intra-day [RSD %]	<b>0,3</b>
precyzja metody inter-day [RSD %]	<b>6,54</b>
powtarzalność [u]	<b>0,12</b>
stabilność po 48 godz. w temp. pokojowej [%]	<b>95,0</b>
stabilność po 48 godz. w lodówce [%]	<b>92,0</b>
odzysk [%]	<b>97,4</b>
odzysk [RSD %]	<b>1,13</b>

## 5. Wnioski

- Opracowana metodyka jest przydatna do oznaczania kwasu elagowego w owocach jeżyny. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury, jak i metody, RSD w przedziale 0,3-6,5%. Szacunkowe wartości wymagane dla precyzji w przypadku próbek biologicznych, żywności wynosi  $\sim 2 \div 20\%$ .
- Odzysk badanych związków bioaktywnych jest powyżej 97,4%, a stabilność po dwóch dobach przechowywania w temp. pokojowej i lodówce 92-95%.

## 6. Literatura

Aiyer H.S., Vadhanam M.V., Stoyanova R., Caprio G.D., Clapper M.L., Gupta R.C. 2008. Dietary berries and ellagic acid prevent oxidative DNA damage and modulate expression of DNA repair genes. *Int. J. Mol. Sci.*, 9: 327-341.

Corbett S., Daniel J., Drayton R., Field M., Steinhardt R., Garrett N. 2010. Evaluation of the anti-inflammatory effects of ellagic acid. *J. PeriAnesthesia Nursing*, 25 (4): 214-220.

Edderkaoui M., Odinkova I., Ohno I. 2008. Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor KB in pancreatic cancer cells, *World J., Gastroenterol*, 14(23): 3672–80.

Han D.H., Lee M.J., Kim J.H. 2006. Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. *Anti-cancer Research*, 26: 3601-3606.

Krishnaiah D., Sarbatly R., Nithyanandam R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod, Pro.*, 89(3): 217-33.

Lee J., Dossett M., Finn C.E. 2012. Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chem.*, 130(4):785-96.

Patel A.V., Rojas-Vera J., Dacke C.G. 2004. Therapeutic constituents and actions of Rubus species. *Curr. Med. Chem.*, 11(11):1501-12.