



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa
Owoców i Warzyw

Metodyka

OZNACZANIA ANTOCYJANÓW W OWOCACH JAGODY KAMCZACKIEJ

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 jagodzie kamczackiej
 - 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 działaniu przeciw infekcyjnym.

2. Cel zadania

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

3. Opis metodyki oznaczania antocyjanów w jagodzie kamczackiej

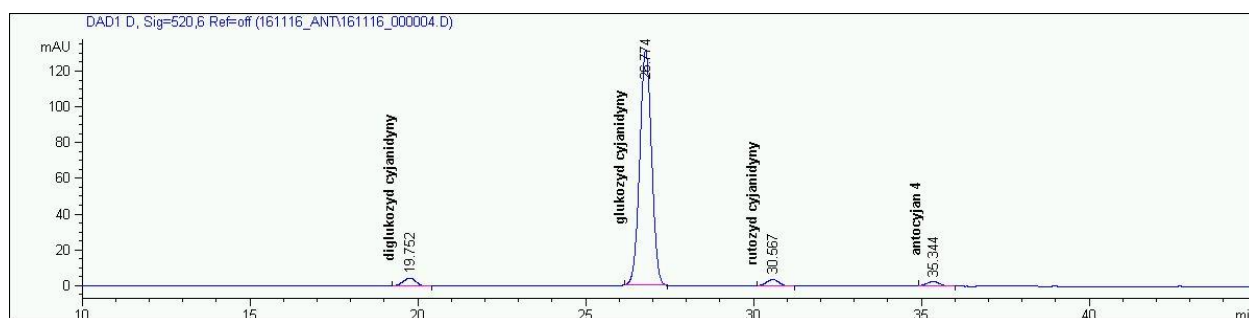
a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce jagody kamczackiej zostały rozdrobnione w stanie zamrożonym w malakserze z użyciem suchego lodu (stały dwutlenek węgla). Naważkę 10 g rozdrobnionych owoców homogenizowano przez 2 minuty w 50 ml roztworu 70% metanolu, następnie wirowano przy obrotach 10 tys. G przez 10 minut. Otrzymany supernatant sączone na sączku jakościowym i rozcieńczono 1:3 70% metanolem. Doświadczenie przeprowadzono na odmianie ‘Wojtek’ z sezonu 2016

a) Analiza chromatograficzna (HPLC)

Próbkę w ilości 5 µl analizowano za pomocą systemu HPLC wyposażonego w detektor DAD (diode array detection). Rozdział prowadzono na kolumnie Phenomenex® Fusion-RP 80A (250

mm x 4,6 mm; 4 μ m) z prekolumną. Warunki elucji były następujące: przepływ 1 ml min⁻¹, temperatura 25 C, długość fali 520nm, faza ruchoma składa się z 5% kwasu mrówkowego (solwent A) i acetonitrylu (solwent B). Analiza HPLC była prowadzona w przepływie gradientowym: 0÷16 min 3-9% liniowo B; 16÷30 min 12% B liniowo; 30÷54 min 33% B liniowo; 54÷58 min 90% B liniowo; 58÷62 min 90% B izokratycznie; 62÷64 min 3% B liniowo; 64÷65 min 3% B izokratycznie. Następnie układ jest kondycjonowany w warunkach gradientu początkowego przez 15 min. Rysunek 3 przedstawia rozdział analizowanych antocyjanów wyżej opisaną metodą chromatograficzną. W jagodzie kamczackiej zidentyfikowane zostały następujące związki antocyjanowe: **diglukozyd- , glukozyd- i rutozyd - cyjanidyny** oraz jeden niezidentyfikowany antocyjan. Wyniki zostały obliczone według krzywej wzorcowej standardu glukozylu cyjanidyny i wyrażone w mg/kg.



Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdziału antocyjanów w jagodzie kamczackiej.

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 1. Zestawienie parametrów walidacji metody chromatograficznej oznaczania antocyjanów w surowcu jagody kamczackiej

glukozyd cyjanidyny	
zakres stężeń	0,78-180 mg/l
liniowość	$y = 0,05777x + 0,44420$
R ²	0,998
LOD	8,8 mg/l
LOQ	26,9 mg/l

Tabela 2. Charakterystyka metody dla jagody kamczackiej

jagoda kamczacka 'Wojtek'	diglukozyd cyjanidyny	glukozyd cyjanidyny	rutozyd cyjanidyny	antocyjan 4	suma antocyjanów
zawartość mg/ kg	115,3	2933,5	94,8	70,8	3194,5
precyzja aparatury [RSD %]	0,42	1,86	1,95	1,78	1,80
precyzja metody intra-day [RSD %]	1,24	1,27	2,29	1,23	1,25
precyzja metody inter-day [RSD %]	1,46	1,63	2,36	4,52	1,41
powtarzalność [u]	0,50	0,52	0,93	0,50	0,51
stabilność (48 godz. T-pokojowa)	85,9	82,0	82,5	83,0	82,1
stabilność (48 godz. w lodówce)	97,3	92,7	92,4	93,8	92,9
odzysk [%]*		97,3			
odzysk [RSD %]		1,62			

*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 tj. w owocach jagody kamczackiej. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury jak i metody, RSD w przedziale 0,5-4,5%. Szacunkowe wartości wymagane dla precyzji w przypadku próbek biologicznych, żywności wynosi $\sim 2 \div 20\%$.
- Odzysk badanych związków bioaktywnych jest powyżej 97%, a stabilność po dwóch dobach przechowywania w lodówce powyżej 92%.

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.