



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa  
Owoców i Warzyw

## **Metodyka**

### **OZNACZANIA ANTOCYJANÓW W OWOCACH JEŻYNY**

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
  - 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 przeciw infekcyjnym.

### **2. Cel zadania**

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

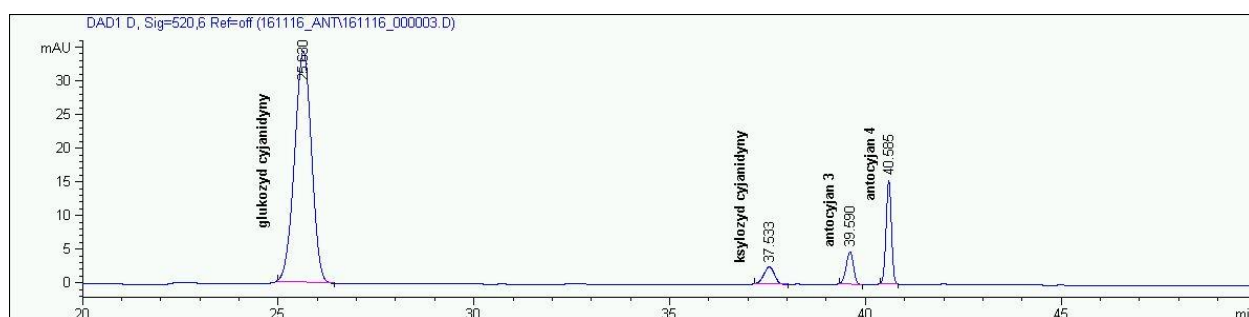
### **3. Opis metodyki oznaczania antocyjanów w jeżynie**

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

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

#### **a) Analiza chromatograficzna (HPLC)**

Próbkę w ilości 5  $\mu\text{l}$  analizowano za pomocą systemu HPLC wyposażonego w detektor DAD (diode array detection). Rozdział prowadzono na kolumnie Phenomenex<sup>®</sup> Fusion-RP 80A (250 mm x 4,6 mm; 4  $\mu\text{m}$ ) z prekolumną. Warunki elucji były następujące: przepływ 1 ml  $\text{min}^{-1}$ , temperatura 25  $^{\circ}\text{C}$ , długość fali 520 nm, 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 2 przedstawia rozdział analizowanych antocyjanów wyżej opisaną metodą chromatograficzną. W jeżynie zidentyfikowane zostały następujące związki antocyjanowe: **glukozyd- i ksylozyd cyjanidyny** oraz dwa inne niezidentyfikowane antocyjany. Wyniki zostały obliczone według krzywej wzorcowej standardu glukozydu cyjanidyny i wyrażone w mg/kg.



Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdziału antocyjanów 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).

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

**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 jeżyny

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

Tabela 2. Charakterystyka metody dla jeżyny

jagoda kamczacka 'Wojtek'	glukozyd cyjanidyny	ksylozyd cyjanidyny	antocyjan 3	antocyjan 4	suma antocyjanów
zawartość mg/ kg	<b>944,8</b>	<b>50,3</b>	<b>63,3</b>	<b>139,5</b>	<b>1178,4</b>
precyzja aparatury [RSD %]	<b>1,64</b>	<b>1,69</b>	<b>1,79</b>	<b>1,65</b>	<b>1,63</b>
precyzja metody intra-day [RSD %]	<b>1,30</b>	<b>1,78</b>	<b>1,15</b>	<b>0,93</b>	<b>1,18</b>
precyzja metody inter-day [RSD %]	<b>2,84</b>	<b>2,33</b>	<b>2,42</b>	<b>2,30</b>	<b>2,70</b>
powtarzalność [u]	<b>0,5</b>	<b>0,73</b>	<b>0,47</b>	<b>0,38</b>	<b>0,48</b>
stabilność (48 godz. T-pokojowa)	<b>84,2</b>	<b>86,2</b>	<b>83,5</b>	<b>83,8</b>	<b>83,9</b>
stabilność (48 godz. w lodówce)	<b>96,8</b>	<b>97,2</b>	<b>92,9</b>	<b>95,0</b>	<b>96,3</b>
odzysk [%]*	<b>98,1</b>				
odzysk [RSD %]	<b>0,82</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 roślinnych tj. w owocach jeżyny. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury jak i metody, RSD w przedziale 1-3%. Szacunkowe wartości wymagane dla precyzji w przypadku próbek biologicznych, żywności wynosi  $\sim 2 \div 20\%$ .
- Odzysk badanych związków bioaktywnych jest powyżej 98%, 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., Gârbán G., Gârbán 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.