

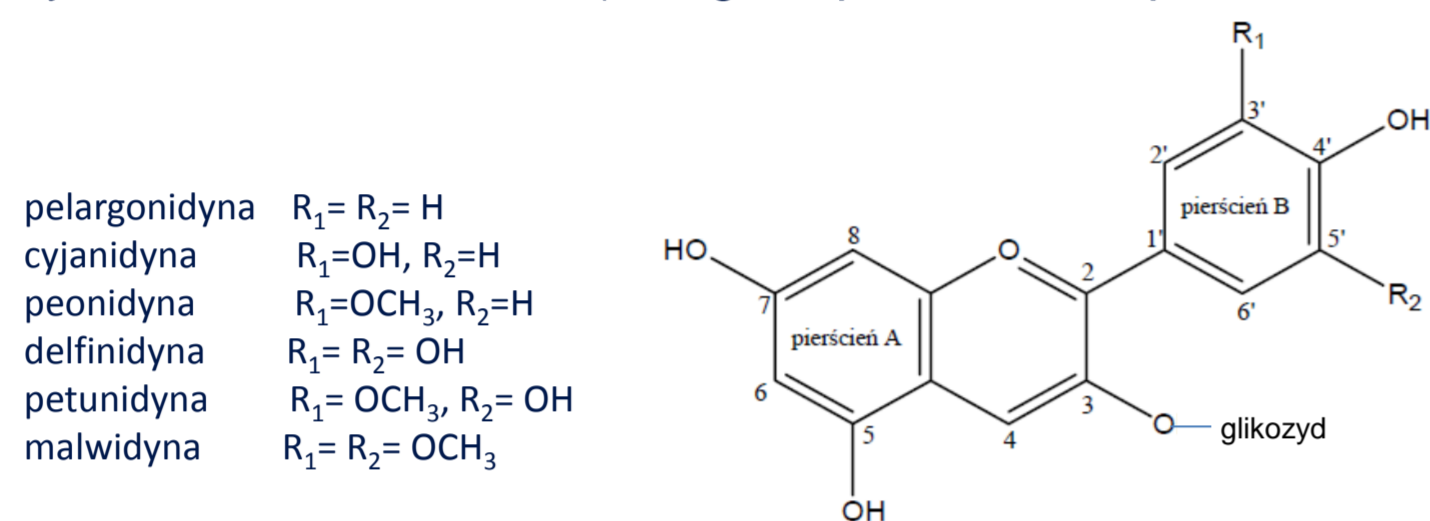
ZAWARTOŚĆ ANTOCYJANÓW JAKO PARAMETR CHARAKTERYZUJĄCY ZŁOŻONOŚĆ MATRYCY OWOCÓW

Agnieszka Szmagara⁽¹⁾, Ilona Sadok⁽²⁾, Agnieszka Krzyszczak⁽¹⁾, Elżbieta Anna Stefaniak⁽¹⁾

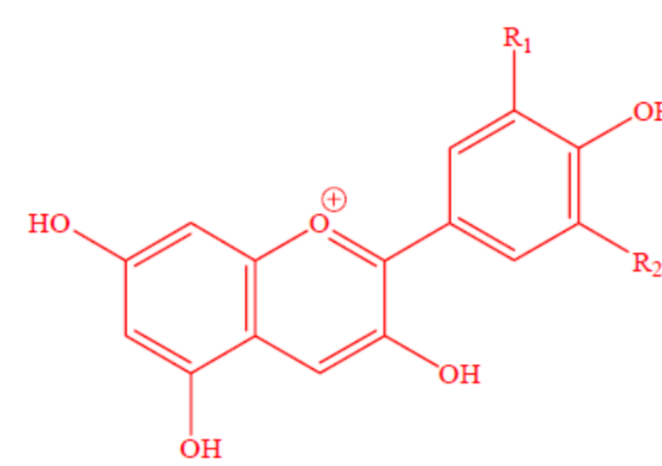
¹Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Pracownia Materiałów Kompozytowych i Biomimetycznych, ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin, szmagara@kul.pl

²Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Pracownia Zastosowań Metod Separacji i Spektroskopii, ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin

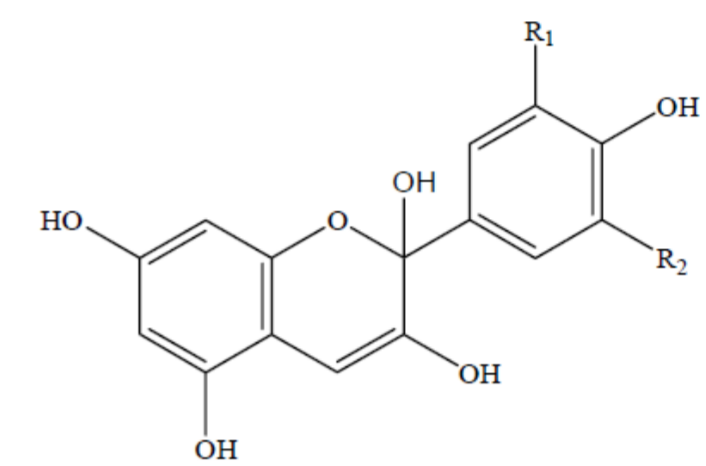
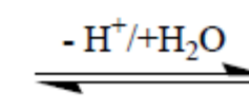
W ostatnich latach znacząco wzrosło zainteresowanie owocami ze względu na ich potencjalny wpływ na zdrowie człowieka. Owoce stanowią bardzo złożoną matrycę pod względem analitycznym, głównie ze względu na obecność charakterystycznych antocyjanów odpowiadających za wszystkie odcienie czerwonej, niebieskiej bądź purpurowej barwy [1]. Zasadniczo obecność antocyjanów w owocach jest bardzo cenna ze względów zdrowotnych i związana zwłaszcza z ich właściwościami antyoksydacyjnymi [2]. Jednakże, aby materiał roślinny można było bezpiecznie wykorzystać musi być on skontrolowany pod względem zawartości substancji szkodliwych, tj. pozostałości pestycydów i ich metabolitów, czy mykotoksyn, występujących z reguły na bardzo niskim poziomie stężeń. Inne składniki próbki mogą wzmacniać lub osłabiać rejestrowany sygnał analityczny oznaczanych substancji. Stąd konieczne jest określenie stopnia złożoności badanej matrycy i uwzględnienie go przy wyborze procedury analitycznej. W przypadku owoców dobrym parametrem służącym do tych celów może być wyznaczenie całkowitej zawartości antocyjanów, gdyż wysokopigmentowe owoce stanowią większe wyzwanie analityczne i często wymagają znaczącego uproszczenia matrycy. Wiąże się to z koniecznością zastosowania dodatkowego etapu doczyszczania próbki np. wykorzystania techniki dSPE (z ang. dispersive solid phase extraction) przed analizą chromatograficzną.



Podstawowa struktura antocyjanidyn (rdzenia antocyjanów)



Forma oksoniowa, barwna, pH=1,0



Forma hemiketalowa, bezbarwna, pH=4,5

METODYKA BADAŃ

MATERIAŁY

Materiał badawczy stanowiło 25 prób pochodzących z 11 różnych czerwonych owoców (Tab.1). Owoce zostały oczyszczone, pozbawione ogonków, szypulek, pestek, itp., a następnie zhomogenizowane.

METODY

W celu określenia całkowitej zawartości antocyjanów zastosowano spektrofotometryczną metodę różnicowego pH [3], opartą na założeniu, że antocyjany wykazują charakterystyczną intensywną barwę formy oksoniowej przy pH=1, zaś w wyższym pH (4,5) przechodzą w bezbarwną formę hemiketalową. Pomiary spektrofotometryczne (Halo DB-20S, Dynamica Scientific Ltd.) próbek rozcieńczonych odpowiednimi buforami przeprowadzono przy długościach fali, $\lambda_1=520$ i $\lambda_2=700$ nm, a uzyskane wartości absorbancji wyrażono w mg cyjanidyno-3-glukozydu (c3g) na litr (Tab.1) wg wzoru:

$$\text{gdzie: } \text{zawartość antocyjanów} \left(\text{c3g}, \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}$$

MW- (masa molowa c3g), 449,2 g/mol,

DF – współczynnik rozcieńczenia

10^3 – współczynnik konwersji z g na mg

ϵ – współczynnik ekstynkcji molowej, $26900 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

l – długość drogi optycznej, cm

Analiza chromatograficzna

Preparatyka: ekstrakcja z owoców metodą QuEChERS z użyciem acetonitrylu (ACN) zakwaszonego 1% (v/v) CH₃COOH oraz mieszaniny buforowej (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g cytrynianu sodu, 0,5 g seskwihydratu wodorocytrynianu sodu). Oczyszczanie ekstraktu techniką dSPE (150 mg MgSO₄, 25 mg PSA, 7,5 mg Carbon).

aparatus: chromatograf HPLC (Agilent Technologies 1200 Series) z detektorem DAD

kolumna: Zorbax Eclipse Plus-C18 RR HT 4,6x150 mm, 3,5 μm

kolumna ochronna: Zorbax Eclipse Plus-C18 2,1x12,5mm, 5 μm Narrow Bore Guard

faza ruchoma: A: H₂O + 0,1% (v/v) CH₃COOH, B: ACN + 0,1% (v/v) CH₃COOH

program gradientowy: 0-15 min 5% B, 15-20 min 5-95% B, 20-24 min 95-5% B

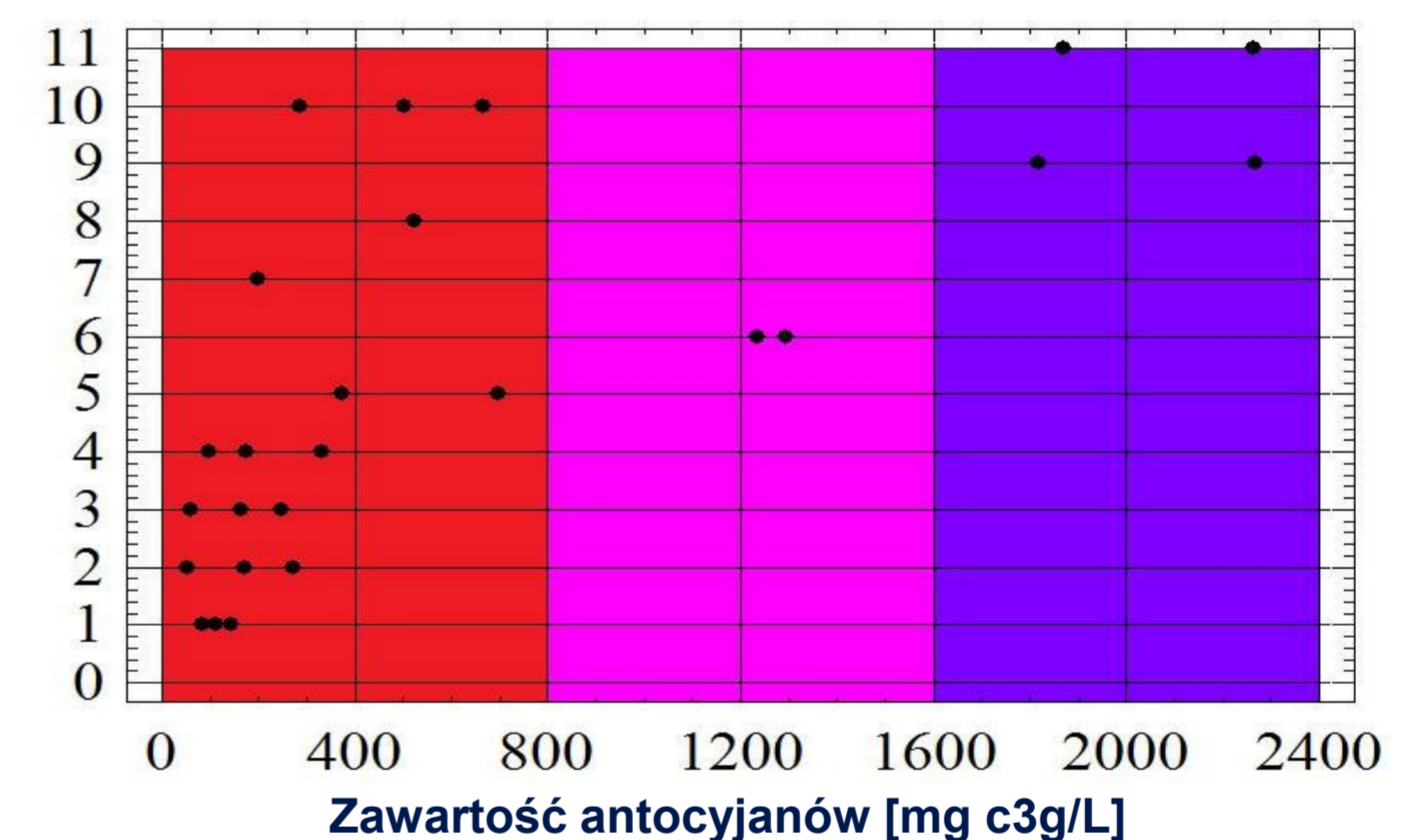
przepływ: 0,5 ml/min, temp. 40 °C, $\lambda=276$ nm

Tabela. 1. Zawartość antocyjanów w wybranych owocach (n=3)

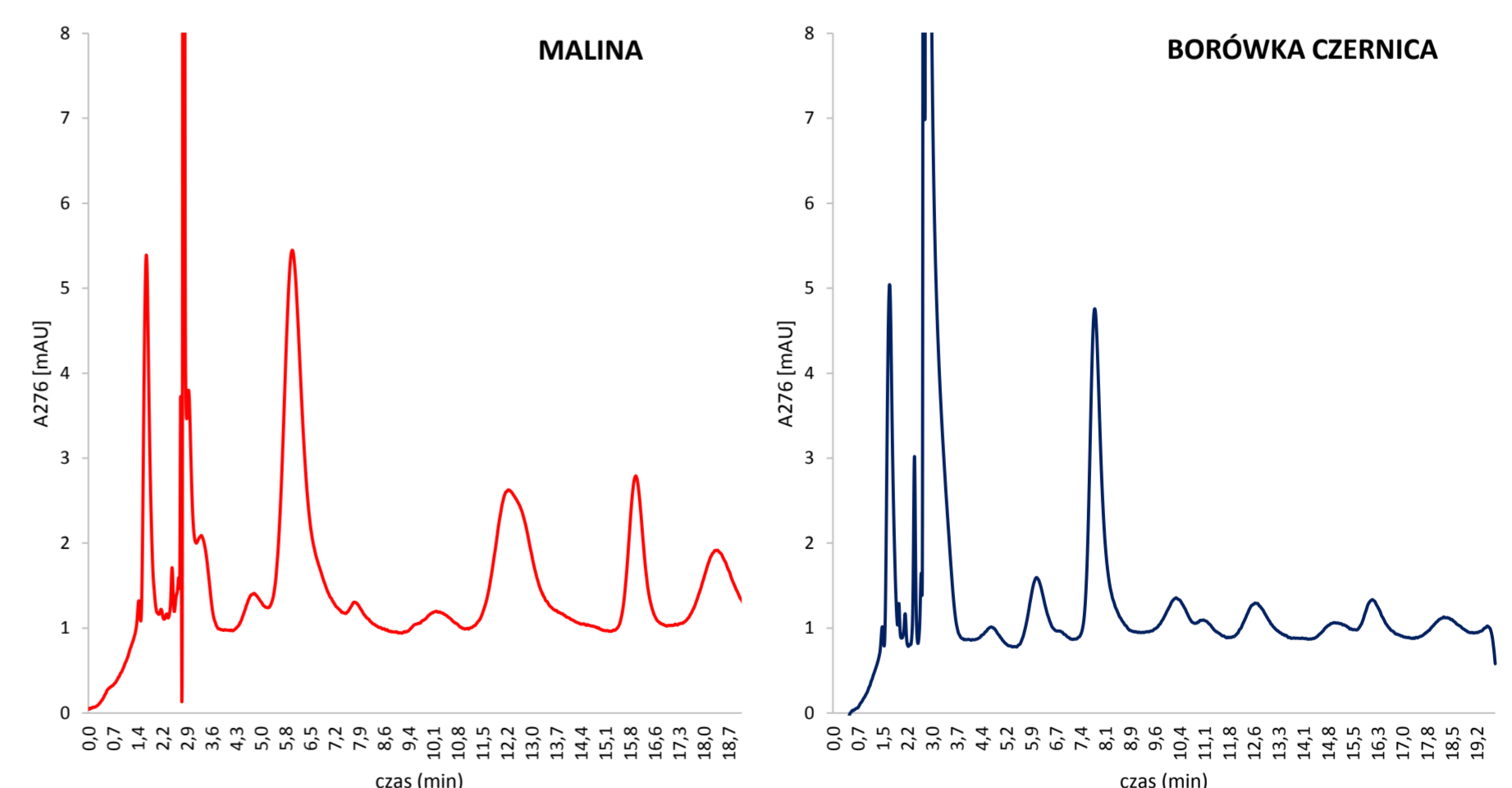
Lp.	Owoc	całkowita zawartość antocyjanów \pm SD [mg c3g/L]		
		A	B	C
1	truskawka	144 \pm 2	113 \pm 1	83 \pm 2
2	malina	171 \pm 1	271 \pm 1	52 \pm 1
3	wiśnia	58 \pm 3	248 \pm 2	163 \pm 2
4	żurawina	332 \pm 3	174 \pm 3	98 \pm 1
5	jeżyna	373 \pm 1	699 \pm 1	
6	porzeczka czarna	1296 \pm 2	1235 \pm 1	
7	porzeczka czerwona	199 \pm 2		
8	aronia	524 \pm 1		
9	bez czarny	2269 \pm 4	1818 \pm 4	
10	borówka amerykańska	284 \pm 3	665 \pm 2	503 \pm 1
11	borówka czernica	1868 \pm 4	2265 \pm 2	

WYNIKI

Uzyskane wyniki układają się w trzy grupy określające poziom zawartości antocyjanów: 0-800, 800-1600 i 1600-2400 (Rys.1). W grupie o najwyższej zawartości antocyjanów znalazł się bez czarny oraz borówka czernica.



Rys. 1. Dystrybucja wyników zawartości antocyjanów w badanych owocach.



Rys. 2. Chromatogramy ekstraktów dwóch wybranych owoców.

Na Rys. 2 przedstawiono przykładowe chromatogramy uzyskane podczas analizy ekstraktów owoców z grupy o najniższej (malina) i najwyższej (borówka czernica) zawartości antocyjanów. Pomimo wykorzystania tej samej metodyki przygotowania próbek (technika QuEChERS poprzedzająca dSPE) oraz jednakowych warunków rozdzielania chromatograficznego, rejestrowane chromatogramy różnią się istotnie od siebie. Oznacza to, że przeprowadzenie analizy ilościowej konkretnego analitu lub grupy analitów (np. pestycydów, mykotoksyn) metodą HPLC-DAD w próbkach owoców o wysokiej zawartości antocyjanów z wykorzystaniem metodyki opracowanej dla owoców o niższej zawartości antocyjanów (mniej skomplikowanej matrycy) może okazać się trudne do realizacji bez wprowadzenia dodatkowych modyfikacji m.in. ze względu na nakładanie się pików chromatograficznych interferentów z sygnałami analitów, wysokie straty analitów na etapie przygotowania próbki.

Literatura

[1] Fang J., Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. Nutrition 31 (2015): 1301-1306.

[2] Jakobek L., Seruga M., Medvidović-Kosanović M., Novak I., Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 103(2) (2007): 58-64.

[3] Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E., Determination of total anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. J AOAC Int. (2005) 88(5):1269-1278.