

RADOSŁAW DEMBCZYŃSKI, WOJCIECH BIAŁAS, ANNA OLEJNIK,
PRZEMYSŁAW KOWALCZEWSKI, AGNIESZKA DROŹDŻYŃSKA,
TOMASZ JANKOWSKI

POZYSKIWANIE ANTOCYJANÓW Z OWOCÓW ARONII, CZARNEGO BZU, CZARNEJ PORZECZKI I KORZENIA CZARNEJ MARCHWI METODĄ EKSTRAKCJI

Streszczenie

Celem badań było opracowanie metody ekstrakcji barwników antocyjanowych z owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki oraz korzeni czarnej marchwi. Do ekstrakcji antocyjanów zastosowano roztwory: wodę zakwaszoną kwasem octowym (0,75 % m/m), wodę zakwaszoną kwasem solnym (0,75 % w/w), metanol/wodę/kwas octowy (40 : 60 : 0,5 v/v/v), aceton/wodę/kwas octowy (70 : 29,5 : 0,5 v/v/v). W otrzymanych ekstraktach oznaczono zawartość związków fenolowych oraz antocyjanów i na ich podstawie wykonano analizę kinetyki ekstrakcji. Zbadano również właściwości przeciwutleniające uzyskanych ekstraktów metodami ABTS^{•+} i FRAP. W procesie ekstrakcji antocyjanów z owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki optymalnymi ekstrahentami okazały się: wodny roztwór metanolu z dodatkiem kwasu octowego oraz wodny roztwór kwasu octowego, natomiast w trakcie ekstrakcji antocyjanów z korzenia czarnej marchwi najlepsze rezultaty uzyskano przy użyciu wodnego roztworu metanolu z dodatkiem kwasu octowego oraz wodnego roztworu acetonu z dodatkiem kwasu octowego.

Słowa kluczowe: antocyjany, ekstrakcja, właściwości przeciwutleniające, ABTS^{•+}, FRAP

Wprowadzenie

Antocyjany są ważną grupą barwników roślinnych. Ich struktura chemiczna jest bardzo złożona. Zbudowane są z części niecukrowej (aglikonu) połączonej wiązaniem glikozydowym z resztą cukrową. Aglikon zawiera szkielet antocyjanidyny zwany kationem 2-fenylbenzopiryliowym lub flawyliowym. Wyróżnia się ponad 20 typów

*Dr inż. R. Dembczyński, dr inż. W. Białas, dr hab. A. Olejnik, mgr inż. P. Kowalczewski, mgr inż. A. Drożdżyńska, prof. dr hab. T. Jankowski, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań.
Kontakt: rdembcz@up.poznan.pl*

budowy antocyjanidyn, przy czym najczęściej spotykane są: cyjanidyna, delfinidyna, malwidyna, pelargonidyna, petunidyna i peonidyna. Część cukrowa to najczęściej glukoza, rzadziej galaktoza, ramnoza lub arabinoza. Różnice w budowie części cukrowej, jak rodzaj i liczba cząsteczek cukru i rodzaj cząsteczek acetylujących, są także przyczyną dużego zróżnicowania struktury antocyjanów. Obecnie znanych jest kilkaset barwników antocyjanowych [24].

Barwniki antocyjanowe występują w kwiatach, owocach, a także w liściach, łodygach i korzeniach. Konkretny gatunek rośliny zawiera zwykle charakterystyczny zestaw od kilku do kilkunastu antocyjanów o różnej budowie i właściwościach [17]. Podstawową metodą pozyskiwania barwników antocyjanowych jest ekstrakcja selektywnymi rozpuszczalnikami [24]. Możliwa jest także synteza chemiczna antocyjanów występujących *in vivo*, jednak jest ona bardzo kosztowna i mało wydajna [5, 16].

Ekstrakcja jest bardzo istotnym etapem procesu separacji, identyfikacji oraz produkcji na szeroką skalę związków polifenolowych, w tym także barwników antocyjanowych. Związki te najczęściej pozyskuje się metodą ekstrakcji w układzie ciecz – ciało stałe oraz ekstrakcji w warunkach nadkrytycznych [3]. Wydajność procesu zależy od szeregu czynników związanych zarówno z właściwościami separowanych związków, jak i stosowanych rozpuszczalników. Szczególną uwagę zwraca się na polarność oraz pH ekstrahenta. Antocyjany nie są stabilne w roztworach obojętnych i zasadowych, stąd podczas ekstrakcji stosuje się wyłącznie zakwaszone wodne roztwory wybranych rozpuszczalników organicznych. Najpowszechniej używanymi rozpuszczalnikami są roztwory wodno-alkoholowe zawierające etanol lub metanol, ale można również stosować roztwory zawierające n-butanol, aceton, glikol propylenowy [9, 10]. Ekstrahent zakwasza się za pomocą kwasu solnego lub kwasu organicznego (np. kwasu octowego), co według Strack i Wray [26] jest szczególnie przydatne w separacji złożonych poliacylowanych antocyjanów. Ze względu na złożoną budowę tych związków oraz na rodzaj materiału, z którego są one pozyskiwane, trudno wskazać jedną, uniwersalną metodę pozwalającą na ich wydajną separację.

Celem badań było opracowanie metody ekstrakcji barwników antocyjanowych z owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki oraz korzeni czarnej marchwi.

Material i metody badań

Przygotowanie materiału roślinnego

Materiałem do badań były owoce: aronii czarnowoocowej (*Aronia melanocarpa* Ellliata), czarnego bzu (*Sambucus nigra* L.) i czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) oraz korzenie spichrzowe czarnej marchwi odmiany Deep Purple (*Daucus carota* subsp. *sativus* var. *atrorubens* Alef). Owoce czarnego bzu pochodziły z obszaru Natura 2000 Dolina Samicy Kierskiej. Korzenie czarnej marchwi pozyskano z firmy Bejo Zaden

Poland (Ożarów Mazowiecki, Polska), natomiast owoce czarnej porzeczki i aronii pochodziły z gospodarstwa ekologicznego w miejscowości Borowo (gmina Czemiń, Wielkopolska). Materiał roślinny zebrano w sezonie wegetacyjnym w 2012 roku, a następnie zamrażano w temperaturze $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ i suszono sublimacyjnie w liofilizatorze Beta 1-16 (Martin Christ, Niemcy) przez 48 h (suszenie właściwe – 40 h i dosuszanie – 8 h). Temperatura półek, na których umieszczano zamrożony surowiec w trakcie suszenia właściwego wynosiła $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, natomiast podczas dosuszania – $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suszenie właściwe przebiegało pod ciśnieniem równym 10 Pa, natomiast dosuszanie odbywało się bez kontroli ciśnienia. Susz mielono w młynku MF 10 Basic (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Niemcy) do proszku o maksymalnej średnicy ziaren równej 2 mm, a następnie przechowywano we fiolkach w atmosferze gazowego azotu w temp. $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zawartość suchej masy w liofilizatach oznaczano metodą wagową zgodnie z normą PN-EN 12145 [19].

Ekstrakcja antocyjanów

Do ekstrakcji antocyjanów zastosowano następujące roztwory: wodę zakwaszoną kwasem octowym (0,75 % w/w), wodę zakwaszoną kwasem solnym (0,75 % w/w), metanol/wodę/kwas octowy (40 : 60 : 0,5 v/v/v), aceton/woda/kwas octowy (70 : 29,5 : 0,5 v/v/v).

Ekstrakcję prowadzono wielostopniowo w temp. $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. W probówce wirówkowej umieszczano 1 g zmielonego liofilizatu aronii, czarnej porzeczki lub czarnego bzu oraz 10 ml roztworu ekstrakcyjnego. W trakcie trwającego 15 min pierwszego stopnia ekstrakcji zawartość próbówki poddawano działaniu ultradźwięków przez 5 min w łaźni ultradźwiękowej (Sonic 6, Polsonic Sp. z o.o., Polska) oraz pięciokrotnie wytrząsano przy użyciu wytrząsarki wortex przez 30 s. Następnie zawartość próbówki wirowano ($3500\times\text{g}$, 10 min).

W czasie ekstrakcji antocyjanów z czarnej marchwi, 1 g suszu zawieszano w 20 ml roztworu ekstrakcyjnego. Procedura pierwszego stopnia ekstrakcji była identyczna z zastosowaną do badanych owoców. Separację osadu od ekstraktu wykonywano w próżniowym filtrze siatkowym własnej konstrukcji. Czas trwania ekstrakcji pierwszego stopnia wynosił 17 min. Dodatkowo po ekstrakcji roztworem zawierającym aceton/wodę/kwas octowy wykonywano płukanie ekstraktu chloroformem w celu usunięcia związków lipofilnych. Do ekstraktu dodawano chloroform (1 : 2 v/v), a uzyskaną mieszaninę intensywnie mieszano przez 2 min. Po separacji faz ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 h) zbierano górną fazę wodną.

Uzyskane ekstrakty przenoszono do nowej próbówki, natomiast do osadu otrzymanego po pierwszym stopniu ekstrakcji dodawano kolejną, świeżą porcję roztworu ekstrakcyjnego. Ekstrakcja w kolejnych stopniach, których było 8, przebiegała w taki sam sposób jak w stopniu pierwszym. Ekstrakty przechowywano w temp. $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Analiza fizykochemiczna ekstraktów

Oznaczanie zawartości związków fenolowych ogółem wykonywano z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu'a, według Fang i wsp. [7]. Zawartość związków fenolowych w ekstrakcie wyrażano jako równoważnik kwasu chlorogenowego w przeliczeniu na gram suchej masy ekstrahowanego materiału roślinnego (mg CAE/g s.m.).

Całkowitą zawartość antocyjanów w ekstraktach z owoców oznaczano spektrofotometryczną metodą różnicową według Fuleki i Francis [8], natomiast zawartość antocyjanów w ekstraktach z czarnej marchwi oznaczano za pomocą procedury opracowanej przez Kidonia i Czapskiego [15].

Właściwości przeciwutleniające mierzono jako efektywność wygaszania stabilnego kationorodnika ABTS^{•+} według Re i wsp. [23]. Stężenie wygaszonego ABTS przeliczano na równoważniki Troloxu.

Właściwości redukujące ekstraktów określano metodą FRAP, opisaną przez Benzie i Strain [2]. Miarą zdolności redukujących był równoważnik Troloxu.

Modelowanie kinetyki ekstrakcji

Do analizy kinetyki ekstrakcji związków fenolowych i barwników antocyjanowych zastosowano równanie [3]:

$$E = E_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t}$$

gdzie:

E – zawartość związków fenolowych lub antocyjanów [mg/g s.m.] w czasie t [min],

E_0 – początkowa zawartość związków fenolowych lub antocyjanów [mg/g s.m.] wyznaczona w $t = t_0$,

K_1 – stała szybkości [min. g s.m./mg],

K_2 – stała określająca pojemność układu [g s.m./mg].

Parametry równania obliczano w module Solver programu Microsoft Excel. Wyznaczano je, obliczając minimum funkcji straty stanowiącej kwadrat różnicy pomiędzy wartością obserwowaną i przewidywaną. Warunkiem ograniczającym były nieujemne wartości estymowanych parametrów. Na podstawie wielkości stałej K_1 obliczano szybkość ekstrakcji B_0 [mg/min. g s.m.] w fazie początkowej ($t = t_0$):

$$B_0 = \frac{1}{K_1}$$

Wyznaczano także maksymalną teoretyczną zawartość związków fenolowych lub antocyjanów E_m [mg/g s.m.]:

$$E_m = E_0 + \frac{1}{K_2}$$

Analiza statystyczna

W celu oceny związku pomiędzy parametrami równań modelowych opisujących ekstrakcję polifenoli i antocyjanów wyznaczono współczynniki korelacji liniowej Pearsona. Wyniki przedstawiające zawartość antocyjanów i polifenoli w ekstraktach analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji oraz testu wielokrotnych porównań post-hoc Tukeya. Analizy statystyczne wykonano w programie Statistica 12.0 PL ($p = 0,05$).

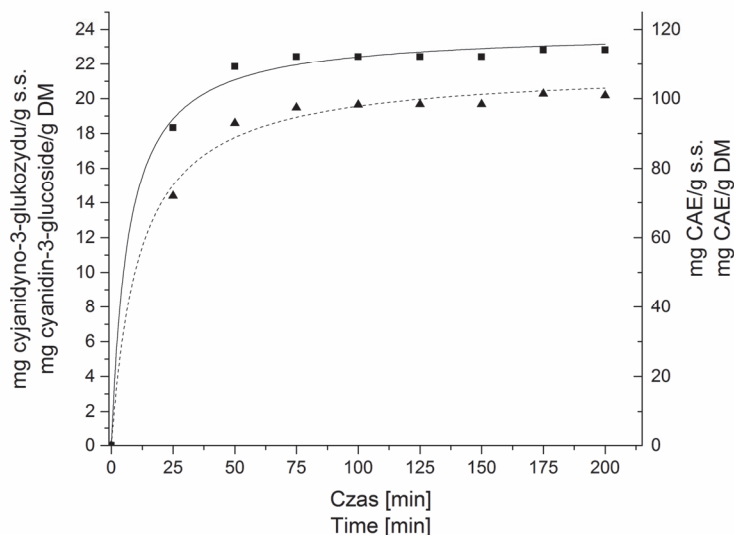
Wyniki i dyskusja

Kinetyki ekstrakcji

W niniejszej pracy do matematycznego opisu kinetyki procesu zastosowano model Pelega [3]. Na jego podstawie wyznaczono szybkość ekstrakcji B_0 w fazie początkowej procesu oraz maksymalną zawartość związków fenolowych lub antocyjanów w ekstrakcie E_m , odpowiadającą stężeniu równowagowemu. Przykładowe dane dotyczące kinetyki ekstrakcji wspomnianych wyżej związków przedstawiono na rys. 1. Zawartość suchej masy w liofilizatach aronii, czarnego bzu, czarnej porzeczki i czarnej marchwi, które następnie poddano ekstrakcji, średnio wynosiła odpowiednio [%]: 88, 90, 89 i 88.

Krzywa ekstrakcji miała przebieg nieliniowy. Największą szybkość ekstrakcji obserwowano w pierwszych 25 min, co wynikało z dużej różnicy stężeń. W kolejnych 25 min szybkość ekstrakcji znacznie malała na skutek zmniejszenia się różnicy stężenia ekstrahowanych substancji pomiędzy ekstrahentem a materiałem poddanym ekstrakcji.

Po 75 minutach ekstrakcji układ osiągał stan zbliżony do równowagowego, co oznacza, że podczas kolejnych wymian rozpuszczalnika stężenie badanych substancji w ekstrakcie zmieniało się w niewielkim zakresie. Parametry równań modelowych oraz współczynniki dopasowania (R^2) modelu opisującego kinetykę ekstrakcji do danych doświadczalnych przedstawiono w tab. 1. i 2. Obliczone współczynniki dowodzą, że w przypadku wszystkich badanych surowców największą szybkością ekstrakcji barwników antocyjanowych w początkowej fazie procesu cechował się układ, w którym ekstrahentem był wodny roztwór metanolu z dodatkiem kwasu octowego. Największą szybkością odznaczała się ekstrakcja owoców aronii ($B_0 = 3,717$ mg/min g s.m). Mniejszą szybkość ekstrakcji antocyjanów uzyskano przy użyciu wodnych roztworów acetonu i kwasu solnego. Wielkości otrzymane w obrębie tych dwóch



Objaśnienia: / Explanatory notes:

Dane doświadczalne: ■ - mg cyjanidyno-3-glukozydu/g s.m./ mg cyanidin-3-glucoside/g DM; ▲ - mg CAE/g s.m./ mgCAE/g DM

Linie / lines – model ekstrakcji /extraction model.

Rys. 1. Kinetyka ekstrakcji antocyjanów oraz polifenoli ogółem z owoców czarnego bzu za pomocą metanolu/wody/kwasu octowego (40 : 60 : 0,5 v/v/v)

Fig. 1. Extraction kinetics of anthocyanins and total phenolics from fruits of elderberry using methanol/water/acetic acid (40 :60 : 0.5 v/v/v)

rozpuszczalników były porównywalne dla większości badanych surowców. Z najmniejszą szybkością przebiegała ekstrakcja wodnym roztworem kwasu octowego. Szczególnie wyraźne różnice zaobserwowano w przypadku aronii ($B_0 = 0,52$ mg/min g s.m.) – szybkość ekstrakcji za pomocą wodnego roztworu kwasu octowego była ponad siedmiokrotnie mniejsza od szybkości osiągniętej przy zastosowaniu wodnego roztworu metanolu z dodatkiem kwasu octowego. Maksymalne teoretyczne zawartości antocyjanów w ekstrakcie E_m , odpowiadające stężeniu równowagowemu (czas ekstrakcji, $t \rightarrow \infty$) uzyskane podczas ekstrakcji wodnym roztworem kwasu octowego były w większości przypadków porównywalne do tych, jakie uzyskano podczas ekstrakcji wodnym roztworem metanolu z dodatkiem kwasu octowego. Eliminacja metanolu, który charakteryzuje się bardzo wysoką toksycznością, jest korzystna ze względów bezpieczeństwa produktu, a jego ewentualne pozostałości zwykle usuwa się za pomocą destylacji, co dodatkowo zwiększa koszty procesu. Przedstawione dane są zgodne z danymi literaturowymi [1, 14, 27]. Różnice w kinetyce ekstrakcji można wyjaśnić różną polarnością stosowanych rozpuszczalników. Jak podaje Snyder [25], najwyższym wskaźnikiem

polarności charakteryzuje się woda, następnie metanol, aceton i kwas octowy. Antocyjany, ze względu na obecność w cząsteczce grup hydroksylowych, karboksylowych oraz metoksyłowych, związanych z pierścieniem aromatycznym, zaliczane są do grupy związków polarnych, stąd znacznie lepiej rozpuszczają się w rozpuszczalnikach polarnych aniżeli w niepolarnych [11].

Znacznie większe różnice pomiędzy badanymi surowcami stwierdzono w odniesieniu do kinetyki ekstrakcji związków fenolowych. Największą szybkością ekstrakcji owoców aronii i czarnej porzeczki charakteryzowały się układy, w których zastosowano aceton – wartość liczbowa współczynnika B_0 wynosiła odpowiednio: 53,17 oraz 12,47 mg/min. g s.m. Szybkość ekstrakcji korzenia czarnej marchwi z zastosowaniem kwasu octowego ($B_0 = 4,06$ mg/min. g s.m.) była około dwukrotnie wyższa aniżeli z zastosowaniem kwaśnego roztworu metanolu ($B_0 = 2,31$ mg/min. g s.m.) czy acetonu ($B_0 = 2,16$ mg/min. g s.m.). Zdecydowanie inaczej przebiegała kinetyka ekstrakcji związków fenolowych z owoców czarnego bzu. Najskuteczniejszym ekstrahentem zarówno pod względem szybkości ekstrakcji (B_0), jak i maksymalnej zawartości związków fenolowych w ekstrakcie (E_m) był wodny roztwór kwasu solnego. Ponadto, podobnie jak w pracy Piljac-Zegarac i wsp. [18], nie było zasadniczo statystycznie istotnej ($p > 0,05$) korelacji pomiędzy współczynnikami określającymi kinetykę ekstrakcji związków polifenolowych i antocyjanów. Występowanie statystycznie istotnej korelacji stwierdzono jedynie w przypadku współczynnika K_1 wyznaczonego dla ekstrakcji antocyjanów i polifenoli z owoców aronii ($r = 0,95$, $p = 0,042$) i czarnej porzeczki ($r = 0,96$, $p = 0,034$). Warto zauważyć, że każdy z badanych surowców zaliczany jest do innej rodziny: aronia do różowatych, czarny bez do piżmaczkowatych, czarna porzeczka do agrestowatych, a czarna marchew do selerowatych. Zróżnicowane pochodzenie botaniczne oraz warunki wzrostu mogą być przyczyną znacznych różnic w obrębie składu chemicznego poszczególnych surowców, co w istotny sposób będzie wpływało na przebieg ekstrakcji oraz wyniki analiz chemicznych. Według Escarpa i Gonzales [6], odczynnik Folina-Ciocalteu'a charakteryzuje się niską selektywnością, która wynika z jego reaktywności także z innymi substancjami redukującymi znajdującym się w owocach (cukry, karotenoidy, aminokwasy, witamina C). Poszczególne ekstrakty, w zależności od zastosowanego surowca oraz rozpuszczalnika, mogą różnić się pod względem zawartości substancji reagujących z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a, co przekłada się na wspomniany wyżej brak wyraźnej korelacji pomiędzy kinetyką ekstrakcji związków polifenolowych i antocyjanów.

Tabela 1. Współczynniki równania modelowego opisującego kinetykę ekstrakcji antocyjanów i polifenoli z owoców aronii i czarnego bzu
 Table 1. Coefficients of model equation to describe extraction kinetics of anthocyanins and total phenolics from fruits of chokeberry and elderberry

Surowiec Material	Ekstrahent Extractant	Parametry ekstrakcji antocyjanów Extraction parameters of anthocyanins				Parametry ekstrakcji polifenoli Extraction parameters of total phenolics					
		K_1	K_2	B_0	E_m	R^2	K_1	K_2	B_0	E_m	R^2
Aronia Chokeberry	Kwas octowy Acetic acid	1,914	0,049	0,522	20,553	0,98	0,233	0,008	4,296	123,079	0,99
	Kwas solny Hydrochloric acid	0,462	0,062	2,167	16,057	0,99	0,069	0,008	14,568	125,102	0,98
	Metanol/woda/kwas octowy Methanol/water/acetic acid	0,269	0,042	3,717	23,999	0,99	0,058	0,007	17,133	152,234	0,98
	Aceton/woda/kwas octowy Acetone/water/acetic acid	0,466	0,09	2,148	11,073	0,98	0,019	0,008	53,173	130,729	0,97
Czarny bez Elderberry	Kwas octowy Acetic acid	0,727	0,037	1,375	26,674	0,98	0,147	0,008	6,814	122,745	0,99
	Kwas solny Hydrochloric acid	0,302	0,056	3,313	17,983	0,97	0,062	0,007	16,134	142,812	0,99
	Metanol/woda/kwas octowy Methanol/water/acetic acid	0,283	0,042	3,532	23,942	0,98	0,103	0,009	9,703	108,791	0,98
	Aceton/woda/kwas octowy Acetone/water/acetic acid	0,342	0,082	2,921	12,23	0,99	0,1	0,009	10,003	107,291	0,98

Objaśnienia: / Explanatory notes:
 we wszystkich równaniach $E_0 = 0$, dlatego nie zostało ujęte w tab. 1./ in all the equations, $E_0 = 0$, thus, it was not included in Tab. 1; K_1 – stała szybkości [min g s.m./mg] / rate constant [min g DM/mg]; K_2 – stała określająca pojemność układu [g s.m./mg] / capacity constant [g DM/mg]; B_0 – szybkość ekstrakcji [mg/min g s.m.] w fazie początkowej ($t = t_0$) / extraction rate [mg/min g DM] during initial phase ($t = t_0$); E_m – maksymalna, teoretyczna zawartość związków fenolowych lub antocyjanów [mg/g s.m.] / theoretical maximum of extraction yield [mg/g DM]; R^2 – współczynnik determinacji / coefficient of determination.

Tabela 2. Współczynniki równania modelowego opisującego kinetykę ekstrakcji antocyjanów i polifenoli z owoców czarnej porzeczki i korzeni czarnej marchwi

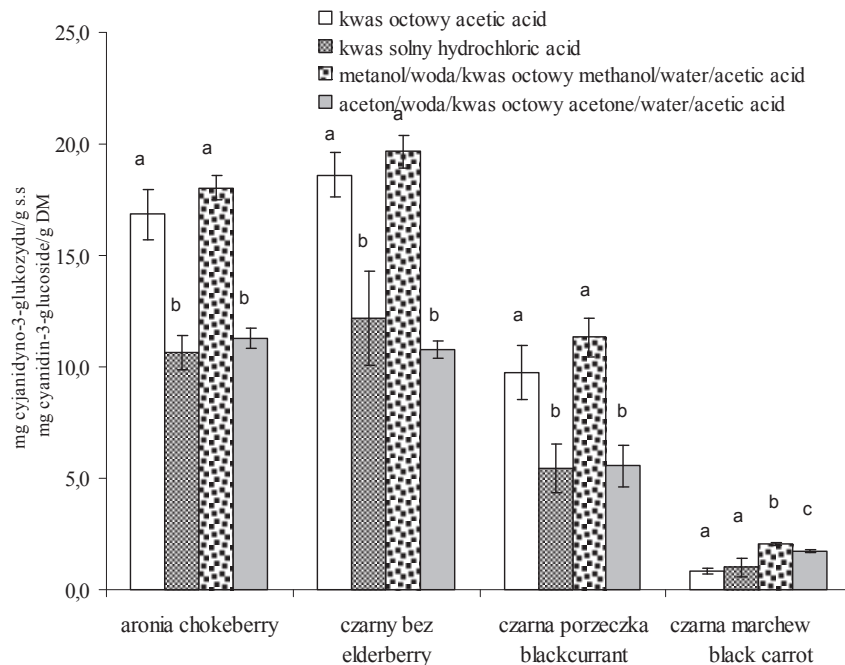
Table 2. Coefficients of model equation to describe extraction kinetics of anthocyanins and total phenolics from fruits of blackcurrant and roots of black carrot

Surowiec Material	Ekstrahent Extractant	Parametry ekstrakcji antocyjanów Extraction parameters of anthocyanins				Parametry ekstrakcji polifenoli Extraction parameters of total phenolics					
		K_1	K_2	B_0	E_m	R^2	K_1	K_2	B_0	E_m	R^2
Czarna porzeczka Blackcurrant	Kwas octowy Acetic acid	2,443	0,08	0,409	12,55	0,98	0,256	0,011	3,903	91,046	0,97
	Kwas solny Hydrochloric acid	0,706	0,109	1,416	9,17	0,98	0,088	0,01	11,342	98,794	0,98
	Metanol/woda/kwas octowy Methanol/water/acetic acid	0,511	0,077	1,958	12,957	0,97	0,109	0,011	9,177	93,998	0,98
	Acetone/woda/kwas octowy Acetone/water/acetic acid	0,747	0,159	1,338	6,282	0,96	0,08	0,011	12,473	87,301	0,96
Czarna marchew Black carrot	Kwas octowy Acetic acid	3,419	0,755	0,293	1,324	0,98	0,246	0,031	4,064	32,368	0,98
	Kwas solny Hydrochloric acid	3,985	0,532	0,251	1,88	0,97	0,669	0,062	1,496	16,192	0,97
	Metanol/woda/kwas octowy Methanol/water/acetic acid	1,876	0,371	0,533	2,694	0,99	0,433	0,059	2,311	17,005	0,98
	Acetone/woda/kwas octowy Acetone/water/acetic acid	2,523	0,612	0,396	1,634	0,99	0,461	0,073	2,169	13,674	0,99

Objasnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Właściwości fizykochemiczne ekstraktów

Zawartości antocyjanów i polifenoli w ekstraktach po zakończeniu procesu ekstrakcji przedstawiono na rys 2. i 3. Uzyskane wielkości były zasadniczo niższe od współczynników E_m (E_m oznacza maksymalną, teoretyczną zawartość składnika, który może zostać wyekstrahowany z badanego surowca). W praktyce uzyskanie ekstraktów o zawartości składnika odpowiadającego E_m wymagałoby znacznego wydłużenia czasu procesu, ponieważ ekstrakcja w stopniu większym niż trzeci w niewielkim stopniu wpływała na stężenie ekstrahowanych substancji. Pod względem ekonomicznym uzasadnione jest zatem wcześniejsze zakończenie procesu ekstrakcji, zanim zostanie osiągnięta wielkość E_m . Po ekstrakcji wodnym roztworem kwasu octowego, w zależności od rodzaju materiału poddanego ekstrakcji, stanowiły one w odniesieniu do polifenoli i antocyjanów odpowiednio: $77 \div 87 \% E_m$ i $70 \div 82 \% E_m$. Jedynie po zakończeniu ekstrakcji korzeni czarnej marchwi rzeczywista zawartość antocyjanów w ekstrakcie była jeszcze mniejsza i równa $62 \% E_m$ maksymalnej, teoretycznej zawartości. Z kolei po ekstrakcji wodnym roztworem kwasu solnego zawartość polifenoli w ekstrakcie była równa $55 \div 78 \% E_m$, zaś zawartość antocyjanów – $54 \div 68 \% E_m$. Zawartości polifenoli i antocyjanów bardziej zbliżone do współczynników E_m uzyskano podczas ekstrakcji wodnym roztworem metanolu z dodatkiem kwasu octowego (polifenole – $73 \div 100 \% E_m$; antocyjany – $75 \div 87 \% E_m$). Największą zbieżność rzeczywistej zawartości polifenoli i antocyjanów w ekstraktach do współczynników E_m osiągnięto w trakcie ekstrakcji wodnym roztworem acetonu z dodatkiem kwasu octowego (polifenole – $82 \div 100 \% E_m$; antocyjany – $88 \div 100 \% E_m$). Niemniej zastosowanie do ekstrakcji wodnego roztworu acetonu z dodatkiem kwasu octowego spowodowało, że ilość uzyskanych antocyjanów z owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki była znacznie mniejsza niż otrzymana w trakcie ekstrakcji wodnym roztworem kwasu octowego czy wodnym roztworem metanolu z dodatkiem kwasu octowego. Przykładowo, po ekstrakcji wodnym roztworem metanolu z dodatkiem kwasu octowego ekstrakt z owoców czarnego bzu zawierał blisko dwa razy więcej antocyjanów niż ekstrakt po ekstrakcji wodnym roztworem acetonu z dodatkiem kwasu octowego. Podobną zależność stwierdzono po ekstrakcji antocyjanów wodnym roztworem kwasu solnego z owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki. Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno aceton, jak i kwas solny nie są odpowiednimi rozpuszczalnikami do ekstrakcji antocyjanów z wymienionych owoców. Wniosek ten potwierdzają także wyniki eksperymentów przeprowadzonych przez innych autorów [4]. Inną zależność między rodzajem zastosowanego ekstrahenta a zawartością antocyjanów zaobserwowano w ekstraktach z korzenia czarnej marchwi. Największą zawartość antocyjanów uzyskano, gdy jako ekstrahent stosowano wodny roztwór metanolu z dodatkiem kwasu octowego, najmniejszą natomiast – gdy ekstrakcję wykonywano przy użyciu wodnych roztworów kwasu solnego i octowego.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

wyniki podano jako wartość średnia \pm odchylenie standardowe / results are expressed as mean value \pm standard deviation, $n = 3$;

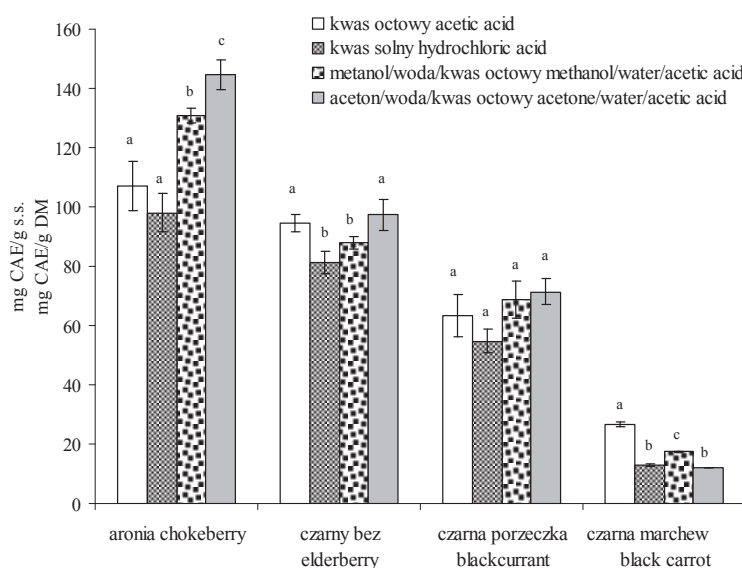
a, b, c – różne litery oznaczają występowanie statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$) w obrębie danego rodzaju materiału roślinnego/ different letters denote statistically significant differences at $p < 0.05$ for a specified type of plant material.

Rys. 2. Zawartość antocyjanów w badanych ekstraktach

Fig. 2. Content of anthocyanins in extracts analyzed

W zależności od rodzaju zastosowanego ekstrahenta, otrzymane ekstrakty różniły się także zawartością antocyjanów w stosunku do ogólnej zawartości związków fenolowych. Podczas ekstrakcji antocyjanów z owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki największą selektywnością w stosunku do tych związków wyróżniały się wodne roztwory kwasu octowego i metanolu z dodatkiem kwasu octowego. W ekstraktach wodnego roztworu kwasu octowego antocyjany stanowiły $15,4 \div 19,6$ % związków fenolowych, natomiast ekstrakty wodnego roztworu metanolu z dodatkiem kwasu octowego zawierały $13,8 \div 22,3$ % antocyjanów w stosunku do ogólnej zawartości związków fenolowych. Najmniejszą selektywnością w stosunku do antocyjanów odznaczał się wodny roztwór acetonu z dodatkiem kwasu octowego. Wymywał on najmniejszą ilość antocyjanów z owoców, przy stosunkowo największym obciążeniu ekstraktu innymi związkami fenolowymi. Dlatego w tych ekstraktach antocyjany

stanowiły tylko 7,8 ÷ 11,1 % związków fenolowych. Ponownie inne tendencje dotyczyły ekstraktów z korzenia czarnej marchwi. Największą selektywność w stosunku do antocyjanów zawartych w tym surowcu wykazywały wodne roztwory acetonu i metanolu z dodatkiem kwasu octowego. Wyekstrahowane związki fenolowe zawierały 14,2 % antocyjanów w przypadku pierwszego z wymienionych rozpuszczalników oraz 11,9 %, gdy zastosowano drugi z ekstrahentów. Z kolei zawartość antocyjanów w stosunku do związków fenolowych była najmniejsza i równa 3,1 %, gdy jako rozpuszczalnik zastosowano wodny roztwór kwasu octowego.



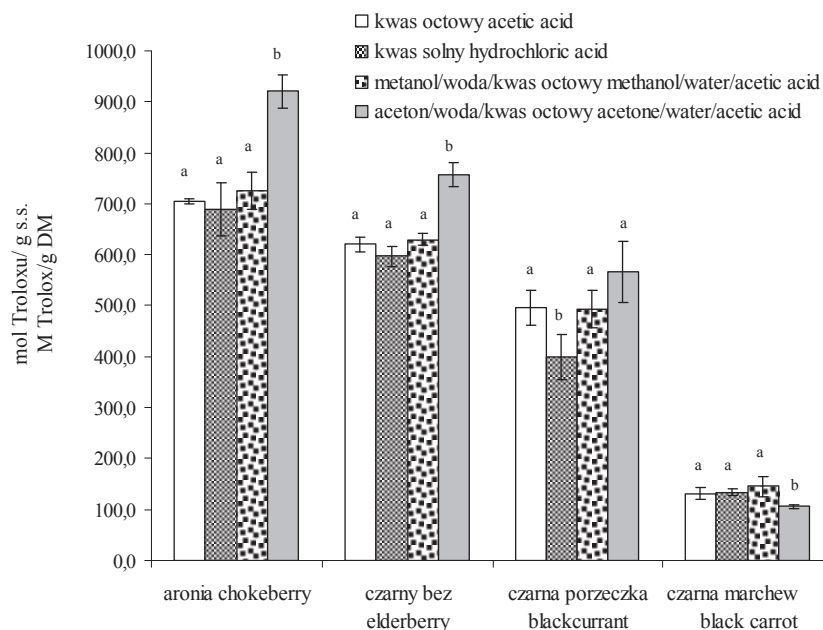
Objaśnienia jak pod rys. 2. / Explanatory notes as in Fig. 2.

Rys. 3. Zawartość polifenoli w badanych ekstraktach

Fig. 3. Content of total phenolics in extracts

Po zakończeniu ekstrakcji zmierzono także potencjał przeciwutleniający poszczególnych ekstraktów. W tym celu zastosowano dwie metody analizy właściwości przeciwutleniających: ABTS^{•+} (rys. 4) i FRAP (rys. 5). Wyniki uzyskane za pomocą metody ABTS^{•+} były znacznie większe od osiągniętych przy wykorzystaniu metody FRAP. Trudno jednak porównywać rezultaty uzyskane za pomocą obu metod, ponieważ każda z nich charakteryzuje się odmiennym mechanizmem detekcji związków przeciwutleniających. Metoda FRAP wykrywa związki, które inaktywują wolne rodniki na zasadzie transferu pojedynczego elektronu, natomiast metoda ABTS^{•+} uwzględnia także związki, które mają zdolność wygaszania wolnych rodników poprzez oddanie wodoru

[20]. Niemniej wyniki uzyskane za pomocą obu metod były ze sobą silnie skorelowane ($r = 0,92$). Najwyższym potencjałem przeciwutleniającym charakteryzowały się ekstrakty uzyskane z owoców po ekstrakcji wodnym roztworem acetonu z dodatkiem kwasu octowego. Natomiast właściwości przeciwutleniające ekstraktów z korzenia czarnej marchwi były podobne, niezależnie od rodzaju użytego ekstrahenta. Jedyne potencjał przeciwutleniający ekstraktów otrzymanych przy udziale wodnego roztworu acetonu z dodatkiem kwasu octowego był nieznacznie niższy w porównaniu z pozostałymi ekstraktami z korzenia czarnej marchwi. Potencjał przeciwutleniający ekstraktów był silniej skorelowany z zawartością związków fenolowych (metoda ABTS – $r = 0,96$; metoda FRAP – $r = 0,97$) niż z zawartością antocyjanów (metoda ABTS – $r = 0,76$; metoda FRAP – $r = 0,79$). Podobną korelację pomiędzy właściwościami przeciwutleniającymi a zawartością polifenoli zaobserwowali także Wu i wsp. [28]. Na zawartość związków fenolowych, jak i na potencjał przeciwutleniający, wpływa bardzo wiele czynników. Są one zdeterminowane nie tylko przez cechy gatunkowe, ale zależą także m.in. od sezonu wegetacyjnego, nasłonecznienia uprawy, dojrzałości zebranego materiału czy sposobu jego przechowywania po zbiorze [12, 21, 22]. Potwierdzają

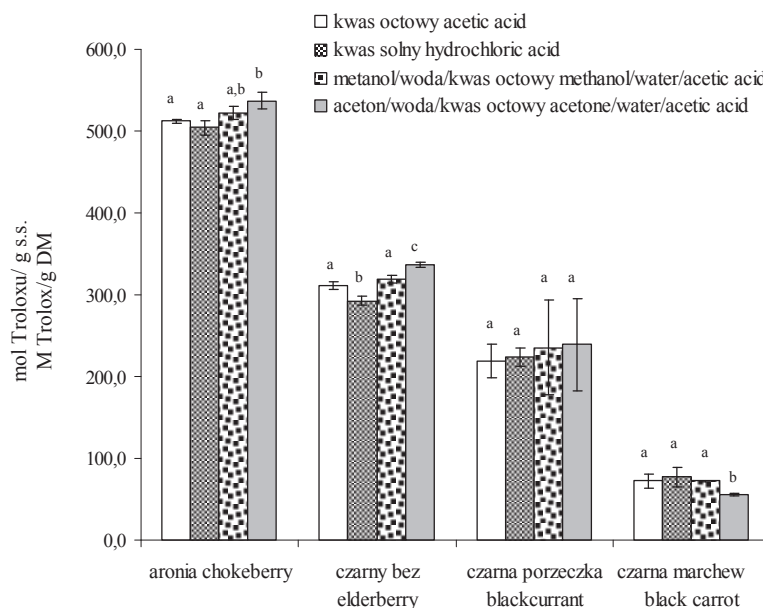


Objaśnienia jak pod rys. 2. / Explanatory notes as in Fig. 2.

Rys. 4. Właściwości przeciwutleniające badanych ekstraktów oznaczone metodą ABTS

Fig. 4. Antioxidant capacity of the extracts measured by the ABTS method

to doniesienia, w których nie stwierdzono statystycznie istotnych korelacji pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą a zawartością związków fenolowych w ekstraktach [13].



Objaśnienia jak pod rys. 2. / Explanatory notes as in Fig. 2.

Rys. 5. Właściwości przeciwutleniające badanych ekstraktów oznaczone metodą FRAP
Fig. 5. Antioxidant properties of extracts as determined by FRAP method

Wnioski

1. W procesie ekstrakcji antocyjanów z owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki optymalnymi ekstrahentami spośród zbadanych są: wodny roztwór metanolu z dodatkiem kwasu octowego (metanol/woda/kwas octowy – 40 : 60 : 0,5 v/v/v) oraz wodny roztwór kwasu octowego (0,75 % m/m).
2. Wybrane rozpuszczalniki umożliwiają uzyskanie zbliżonej zawartości antocyjanów w ekstraktach oraz największej zawartości antocyjanów w stosunku do wszystkich związków fenolowych. Szybkość ekstrakcji za pomocą wodnego roztworu metanolu z dodatkiem kwasu octowego jest znacznie większa. Jednak metanol charakteryzuje się bardzo wysoką toksycznością, a jego usuwanie jest kosztowne. Dlatego w praktyce zaleca się, aby zamiast tego ekstrahenta użyć wodnego roztworu kwasu octowego.

3. W procesie ekstrakcji antocyjanów z korzenia czarnej marchwi najlepsze rezultaty, zarówno pod względem szybkości procesu, jak i zawartości antocyjanów w ekstraktach, uzyskuje się przy zastosowaniu wodnego roztworu metanolu z dodatkiem kwasu octowego (metanol/woda/kwas octowy – 40 : 60 : 0,5 v/v/v) oraz wodnego roztworu acetonu z dodatkiem kwasu octowego (aceton/woda/kwas octowy – 70 : 29,5 : 0,5 v/v/v).

Badania zrealizowano w ramach projektu NN 312 211 338 finansowanego przez MNiSW.

Literatura

- [1] Awika J.M., Rooney L.W., Waniska R.D.: Properties of 3-deoxyanthocyanins from sorghum. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 4388-4394.
- [2] Benzie I.F.F., Strain J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 1996, **239**, 70-76.
- [3] Bucic-Kojic A., Planinic M., Tomas S., Bilic M., Velic D.: Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.*, 2007, **81**, 236-242.
- [4] Castañeda-Ovando A., de Lourdes Pacheco-Hernández Ma., Páez-Hernández Ma.E., Rodríguez J.A., Galán-Vidal C.A.: Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.*, 2009, **113**, 859-871.
- [5] Cruz L., Mateus N., de Freitas V.: First chemical synthesis report of an anthocyanin metabolite with in vivo occurrence: cyanidin-4'-O-methyl-3-glucoside. *Tetrahedron Lett.*, 2013, **54**, 2865-2869.
- [6] Escarpa A., González M.C.: Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal. Chim. Acta*, 2001, **427**, 119-127.
- [7] Fang Z., Zhang M., Sun Y., Sun J.: How to improve bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) juice color quality: effect of juice processing on bayberry anthocyanins and polyphenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 99-106.
- [8] Fuleki T., Francis F.J.: Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction of total anthocyanins and degradation index for cranberry juice. *J. Food Sci.*, 1968, **33**, 78-83.
- [9] Garcia-Viguera C., Zafrilla P., Tomas-Barberan F.A.: The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochem. Anal.*, 1998, **9**, 274-277.
- [10] Giusti M.M., Rodriguez-Saona L.E., Baggett J.R., Reed G.L., Durst R.W., Wrolstad R.E.: Anthocyanin pigment composition of red radish cultivars as potential food colorants. *J. Food Sci.*, 1998, **63**, 219-224.
- [11] Harbone J.B., Grayer R.J.: The anthocyanins. In: *The Flavonoids*. Ed. J.B. Harborne. Chapman and Hall Ltd, London 1988, pp 1-20.
- [12] Howard L.R., Clark J.R., Brownmiller C.: Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J. Sci. Food Agric.*, 2003, **83**, 1238-1247.
- [13] Kahkonen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.-P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M.: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3954-3962.
- [14] Kapasakalidis P.G., Rastall R.A., Gordon M.H.: Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residue. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 4016-4021.

- [15] Kidoń M., Czapski J.: Spektrofotometryczna różnicowa metoda oznaczania acylowanych antocyjanów na przykładzie barwników marchwi purpurowej. *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna*, 2008, **4**, 82-86.
- [16] Oyama K., Kawaguchi S., Yoshida K., Kondo T.: Synthesis of pelargonidin 3-O-6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside, an acylated anthocyanin, via the corresponding kaempferol glucoside. *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 6005-6009.
- [17] Piątkowska E., Kopeć A., Leszczyńska T.: Antocyjany – charakterystyka, występowanie i oddziaływanie na organizm człowieka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **4 (77)**, 24-35.
- [18] Piljac-Zegarac J., Valek L., Martinez S., Belscak A.: Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chem.*, 2009, **113**, 394-400.
- [19] PN-EN 12145:2001. Soki owocowe i warzywne. Oznaczanie całkowitej suchej substancji. Metoda gravimetryczna oznaczania ubytku masy w wyniku suszenia.
- [20] Prior R.L., Wu X., Schaich K.: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 4290-4302.
- [21] Radziejewska-Kubzdela E., Biegańska-Marecik R., Kidon M.: Applicability of vacuum impregnation to modify physico-chemical, sensory and nutritive characteristics of plant origin products – A review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15**, 16577-16610.
- [22] Radziejewska-Kubzdela E., Biegańska-Marecik R.: A comparison of the composition and antioxidant capacity of novel beverages with an addition of red cabbage in the frozen, purée and freeze-dried forms. *LWT- Food Sci. Technol.*, 2015, **62**, 821-829.
- [23] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.*, 1999, **26**, 1291-1237.
- [24] Saluk-Juszczak J.: Antocyjany jako składnik żywności funkcjonalnej stosowanej w profilaktyce chorób układu krążenia. *Post. Hig. Med. Dośw.* [online], 2010, **64**, 451-458.
- [25] Snyder L.R.: Classification of the solvent properties of common liquids. *J. Chromatogr. A.*, 1974, **92**, 223-230.
- [26] Strack D., Wray V.: Anthocyanins. In: *Methods in Plant Biochemistry-Vol 1*. Eds. P.M. Dey and J.B. Harborne. Academic Press, New York 1989, pp. 325-356.
- [27] Wang Z.Y., Xu M.L., Zhu B.W.: Optimum conditions for extraction of anthocyanidin from blueberry. *J. Dalian Inst. Light Ind.*, 2007, **26**, 196-198.
- [28] Wu X., Gu L., Prior R.L., McKay S.: Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 7846-7856.

OBTAINING ANTHOCYANINS FROM CHOKEBERRY, BLACKCURRANT AND ELDERBERRY FRUITS, AND FROM ROOTS OF BLACK CARROT USING EXTRACTION METHOD

S u m m a r y

The objective of the research study was to develop a method of extracting anthocyanins from fruits of chokeberry, elderberry and blackcurrant as well as from black carrot roots. The following solutions were used to extract anthocyanins: water acidified with acetic acid (0.75 % w/w), water acidified with hydrochloric acid (0.75 % w/w), methanol/water/acetic acid (40: 60: 0.5 v / v / v), and acetone/water/acetic acid (70: 29.5: 0.5 v / v / v). In the extracts produced, the content of phenolic compounds and anthocyanins was determined, and, on the basis thereof, the extraction kinetics was analyzed. Furthermore, the antioxidant

properties of the extracts obtained were analyzed with the use of ABTS and FRAP tests. During the process of extracting anthocyanins from fruits of chokeberry, elderberry, and blackcurrant, the aqueous methanol with acetic acid added and the aqueous solution of acetic acid appeared to be the optimal extractants, while, during the extraction of anthocyanins from black carrot roots, the best results were achieved when using the aqueous solution of methanol with acetic acid added and the aqueous solution of acetone with acetic acid added.

Key words: anthocyanins, extraction, antioxidant properties, ABTS•+, FRAP 