

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

SEPARACJA ANTOCYJANÓW Z OWOCÓW ARONII, CZARNEGO BZU, CZARNEJ PORZECZKI I KORZENIA CZARNEJ MARCHWI ZA POMOCĄ CHROMATOGRAFII PREPARATYWNEJ

Streszczenie

Celem badań było opracowanie metody pozyskiwania barwników antocyjanowych z ekstraktów owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki oraz korzeni czarnej marchwi. Separację antocyjanów na poszczególne frakcje przeprowadzono za pomocą chromatografii preparatywnej w kolumnie Agilent Zorbax SB C18 (250 × 21,2 mm). W ekstraktach z owoców aronii i czarnej porzeczki zidentyfikowano cztery barwniki antocyjanowe. Owoce aronii zawierały pochodne cyjanidyny: cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd, cyjanidyno-3-*O*-arabinozyd i cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd, natomiast w owocach czarnej porzeczki stwierdzono obecność pochodnych delfinidyny i cyjanidyny i były to: delfinidyno-3-*O*-glukozyd, delfinidyno-3-*O*-rutynozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd, cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd. Z owoców czarnego bzu pozyskano dwie frakcje, z których każda stanowiła mieszaninę dwóch antocyjanów, pierwsza zawierała cyjanidyno-3-*O*-sambubiozyd-5-*O*-glukozyd i cyjanidyno-3,5-*O*-diglukozyd, natomiast druga składała się z cyjanidyno-3-*O*-sambubiozylu oraz cyjanidyno-3-*O*-glukozydu. Z korzenia czarnej marchwi wyizolowano trzy barwniki antocyjanowe: cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd(synapoiloglukozyd)galaktozyd, cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd(feruloiloglukozyd)galaktozyd oraz cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd(kumaryloglukozyd)galaktozyd. Preparaty antocyjanów w formie stałej otrzymano po zagęszczeniu uzyskanych frakcji w wyparce rotacyjnej i suszeniu sublimacyjnym. Analizę czystości barwników antocyjanowych wykonano za pomocą HPLC w kolumnie analitycznej Agilent Zorbax SB C18 (5 μm, 250 × 4,6 mm). Z 13 otrzymanych stałych preparatów antocyjanów 7 charakteryzowało się czystością większą niż 90 % i były to: cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd i cyjanidyno-3-*O*-arabinozyd, wyizolowane z owoców aronii, delfinidyno-3-*O*-glukozyd, delfinidyno-3-*O*-rutynozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd i cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd – otrzymane z owoców czarnej porzeczki oraz cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd(feruloiloglukozyd)galaktozyd pozyskany z korzenia czarnej marchwi. Czystość pozostałych preparatów antocyjanów zawierała się w zakresie 51 ÷ 87 %.

*Dr inż. R. Dembczyński, dr inż. W. Białas, dr hab. Anna 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*

Słowa kluczowe: antocyjany, ekstrakcja, chromatografia cieczowa, chromatografia preparatywna, suszenie sublimacyjne

Wprowadzenie

Barwniki antocyjanowe występują w kwiatach, owocach, a także w liściach, łodygach i korzeniach. Konkretny gatunek rośliny zawiera charakterystyczny zestaw od kilku do kilkunastu antocyjanów o różnej budowie i właściwościach. W związku z powszechnym występowaniem w owocach i warzywach antocyjany, jako tzw. naturalne substancje nieodżywcze, stanowią ważny składnik żywności [8]. Antocyjany wykazują silne działanie przeciwutleniające, polegające na neutralizacji wolnych rodników i usuwaniu negatywnych skutków stresu oksydacyjnego. Przypisuje się im wiele właściwości prozdrowotnych, m.in. pozytywny wpływ na funkcjonowanie wzroku, działanie przeciwzapalne i przeciwmiażdżycowe, zapobieganie powstawaniu i rozwojowi nowotworów. O wysokiej aktywności biologicznej antocyjanów świadczą wyniki eksperymentów z wykorzystaniem kultur komórkowych oraz zwierząt doświadczalnych, jak również wyniki nielicznych badań klinicznych [6, 8, 15].

Należy zauważyć, że w tego typu doświadczeniach powszechnie stosuje się ekstrakty, soki lub liofilizaty owoców, które oprócz antocyjanów zawierają szereg innych związków bioaktywnych o właściwościach przeciwutleniających i prozdrowotnych [13, 14]. W literaturze istnieją doniesienia wskazujące, że oczyszczone preparaty antocyjanów mogą wywoływać korzystny efekt fizjologiczny, który nie występuje lub objawia się w mniejszym nasileniu, gdy organizm otrzymuje antocyjany równocześnie z innymi substancjami [10, 11]. Ponadto poszczególne antocyjany różnią się aktywnością biologiczną, która w dużym stopniu zależy od struktury chemicznej ich cząsteczek [12].

Zawartość antocyjanów w ekstraktach jest relatywnie niewielka i związki te występują w otoczeniu innych polifenoli oraz substancji takich, jak: cukry, kwasy organiczne i lipidy. Produkcja na szeroką skalę antocyjanów występujących w postaci preparatów o czystości przekraczającej 90 % jest, jak dotąd, możliwa jedynie przy zastosowaniu chromatografii przeciwprądowej w układzie ciecz-ciecz (ang. *counter-current chromatography*, CCC) oraz preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie ciecz-ciało stałe. Pierwsza z wymienionych metod polega na selektywnym rozdziale separowanych substancji (względem ich współczynników podziału) pomiędzy dwie niemieszające się fazy ciekłe. Podstawową zaletą tej metody jest brak konieczności stosowania stałej matrycy stanowiącej fazę stacjonarną, co całkowicie eliminuje niekorzystne zjawisko polegające na nieodwracalnej adsorpcji próbki do jej powierzchni. W rezultacie odzysk oczyszczanych substancji wynosi ponad 90 % [1].

Poza chromatografią przeciwwądowną antocyjany można także oczyszczać za pomocą preparatywnej chromatografii kolumnowej w odwróconym układzie faz. Dzięki postępowi, jaki w ostatnich latach dokonał się w zakresie konstrukcji preparatywnych kolumn chromatograficznych, proces separacji charakteryzuje się bardzo dobrą powtarzalnością i jest opłacalny ekonomicznie, a uzyskiwane produkty cechują się wysoką czystością [1].

Obecnie w handlu dostępne są nieliczne antocyjany w formie preparatów pojedynczych związków o dużej czystości, ale równocześnie o wysokiej cenie. Koszt zakupu 1 g preparatu o czystości powyżej 95 % może wynosić nawet kilkadziesiąt tysięcy złotych [17].

Celem badań było opracowanie metody otrzymywania barwników antocyjanowych z owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki oraz z korzeni czarnej marchwi poprzez ich ekstrakcję, a następnie separację za pomocą chromatografii preparatywnej w odwróconym układzie faz, a w dalszej kolejności określenie czystości uzyskanych liofilizatów antocyjanów.

Material i metody badań

Przygotowanie materiału roślinnego i ekstrakcja antocyjanów

Materiałem doświadczalnym były owoce: aronii czarnowoocowej (*Aronia melanocarpa* Elliiata), 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). Materiał roślinny poddawano liofilizacji według procedury opisanej przez Dembczyńskiego i wsp. [2]. Po rozdrobnieniu, wysuszone materiały przechowywano we fiolkach w atmosferze gazowego azotu w temp. -85 °C. Zawartość suchej masy w liofilizatach oznaczano metodą wagową zgodnie z normą PN-EN 12145:2001 [9].

Do ekstrakcji antocyjanów zastosowano roztwory: wodę zakwaszoną kwasem octowym (0,75 % m/m), wodę zakwaszoną kwasem solnym (0,75 % m/m), metanol/wodę/kwas octowy (40 : 60 : 0,5 v/v/v), aceton/wodę/kwas octowy (70 : 29,5 : 0,5 v/v/v). Ekstrakcję wykonywano wielostopniowo w temp. 20 °C, zgodnie z metodą opracowaną przez Dembczyńskiego i wsp. [2]. Ekstrakty przechowywano w temp. -85 °C.

Separacja antocyjanów

Separację antocyjanów zawartych w ekstraktach wykonywano przy użyciu chromatografu ÄKTA Explorer 100 Air (Amersham Pharmacia, Szwecja), wyposażonego w detektor UV/VIS i kolumnę Agilent Zorbax SB C18 (250 × 21,2 mm). Szybkość przepływu fazy ciekłej wynosiła 15 ml/min. Rozdział przebiegał w temp. 20 °C i od-

bywał się w gradiencie. Fazę A stanowił 0,5-procentowy wodny roztwór kwasu mrówkowego, natomiast fazą B był metanol (ekstrakty z owoców) lub acetonitryl (ekstrakt z czarnej marchwi). Programy gradientu do separacji antocyjanów z różnych rodzajów ekstraktów przedstawiały się następująco:

- ekstrakt z owoców aronii i czarnej porzeczki: 0 min 5 % B, 17 min 5 % B, 28 min 20 % B, 35 min 20 % B, 56 min 30 % B, 62 min 30 % B, 84 min 35 % B, 91 min 45 % B, 92 min 100 % B, 97 min 5 % B,
- ekstrakt z owoców czarnego bzu: 0 min 5 % B, 16 min 5 % B, 27 min 24 % B, 35 min 24 % B, 93 min 35 % B, 94 min 100 % B, 105 min 5 % B,
- ekstrakt z czarnej marchwi: 0 min 5 % B, 17 min 5 % B, 70 min 13 % B, 85 min 25 % B, 86 min 100 % B, 91 min 100 % B, 98 min 5 % B.

Z ekstraktów metanolowych, przed podaniem na szczyt kolumny, usuwano metanol przez odparowanie w wyparce rotacyjnej Laborota 4003 HB control (Heidolph, Niemcy) w temp. 40 °C. Wszystkie ekstrakty przed analizą filtrowano przy użyciu filtra 0,45 µm (Millipore, USA). Frakcje antocyjanów (piki o maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 520$ nm) zbierano za pomocą kolektora frakcji do oddzielnych próbek.

Otrzymywanie preparatów antocyjanów w postaci stałej

Frakcje preparatów antocyjanów uzyskane w trakcie chromatografii preparatywnej zagęszczano w wyparce rotacyjnej Laborota 4003 HB control (Heidolph, Niemcy) w temp. 40 °C, przenoszono do szklanych fiolek i zamrażano w temp. -85 °C, a następnie umieszczano w liofilizatorze Beta 1-16 (Martin Christ, Niemcy). Suszenie sublimacyjne prowadzono przez 48 h. Suszenie właściwe odbywało się pod ciśnieniem 10 Pa przez 40 h (20 h w temperaturze półki wynoszącej -15 °C i 20 h – w temp. 15 °C). Dosuszenie przebiegało w temp. 22 °C przez 8 h bez kontroli ciśnienia. Stałe preparaty antocyjanów przechowywano w hermetycznie zamkniętych fiolkach w atmosferze gazowego azotu, w temp. -85 °C.

Analiza czystości preparatów antocyjanów

Analizę czystości barwników antocyjanowych wykonywano za pomocą HPLC. Pomiaru dokonywano przy użyciu chromatografu cieczowego Agilent Technologies 1200 (Agilent Technologies, USA), który składał się z pompy podwójnej G1312B, automatycznego podajnika próbek G1329B oraz detektora diodowego G1315C z przeglądem widma w zakresie 220 ÷ 700 nm. Rozdział wykonywano w kolumnie Agilent Zorbax SB C18 (5 µm, 250 × 4,6 mm). Fazę A stanowił 5-procentowy wodny roztwór kwasu mrówkowego, natomiast fazą B był metanol (antocyjany z czarnej marchwi – acetonitryl). Analizy prowadzono w temp. 20 °C, a przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min. W trakcie analizy antocyjanów z owoców aronii i czarnej porzeczki zasto-

sowano następujący schemat gradientu: 0 min 5 % B, 2 min 5 % B, 10 min 20 % B, 15 min 20 % B, 30 min 30 % B, 35 min 30 % B, 50 min 45 % B, 55 min 45 % B, 65 min 5 % B, 68 min 5 % B.

W analizie barwników antocyjanowych z owoców czarnego bzu powyższy gradient został zmodyfikowany i kształtował się w następujący sposób: 0 min 5 % B, 2 min 5 % B, 10 min 24 % B, 15 min 24 % B, 30 min 35 % B, 35 min 35 % B, 50 min 45 % B, 55 min 45 % B, 65 min 5 % B, 68 min 5 % B. Podczas chromatografii antocyjanów z czarnej marchwi realizowano gradient według schematu: 0 min 5 % B, 2 min 5 % B, 20 min 10 % B, 40 min 13 % B, 44 min 20 % B, 50 min 25 % B, 55 min 5 % B, 60 min 5 % B. Stałe preparaty antocyjanów rozpuszczano w 5-procentowym wodnym roztworze kwasu mrówkowego i sączono przez filtry o średnicy 0,22 μm .

Czystość preparatów antocyjanów wyrażano w procentach i obliczano jako iloraz powierzchni pików danego związku do sumy powierzchni wszystkich pików na chromatogramie ($\lambda = 280 \text{ nm}$).

Analiza statystyczna

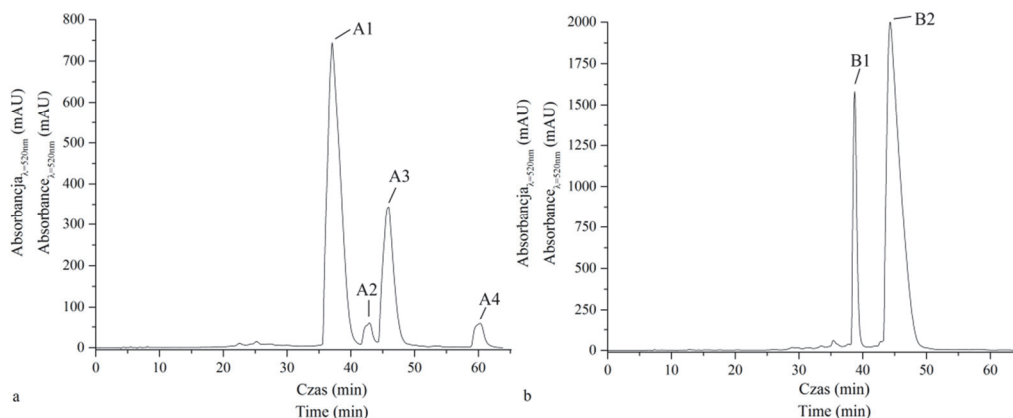
Wyniki przedstawiające czystość preparatów antocyjanów w zależności od rodzaju roztworu zastosowanego do ekstrakcji analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji oraz testu wielokrotnych porównań post-hoc Tukeya. Analizy statystyczne wykonano w programie Statistica 12.0 PL ($p = 0,05$).

Wyniki i dyskusja

Separacja antocyjanów

Antocyjany zidentyfikowano na podstawie widm i czasów retencji porównywalnych z dostępnymi standardami (cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd, cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd) [7] oraz na podstawie literatury [4, 5, 16].

W ekstraktach aronii zidentyfikowano cztery związki zaliczane do grupy antocyjanów, stanowiących pochodne cyjanidyny (rys. 1a). Podobnie jak w pracy Wu i wsp. [16], w trakcie rozdzielania z kolumny wymywały się kolejno antocyjany zawierające reszty galaktozy, glukozy, arabinozy i ksylozy. W największej ilości występował cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd, który stanowił około 66,21 % wszystkich antocyjanów. Blisko trzykrotnie mniej było cyjanidyno-3-*O*-arabinozydu (25,02 %), natomiast cyjanidyno-3-*O*-glukozyd oraz cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd stanowiły odpowiednio: 2,87 i 3,86 % wszystkich zidentyfikowanych antocyjanów. Inaczej przedstawiał się profil związków antocyjanowych w ekstraktach z czarnego bzu (rys. 1b). W podanych warunkach rozdzielania uzyskano dwa pików, które zgodnie z danymi przedstawionymi przez Wu i wsp.



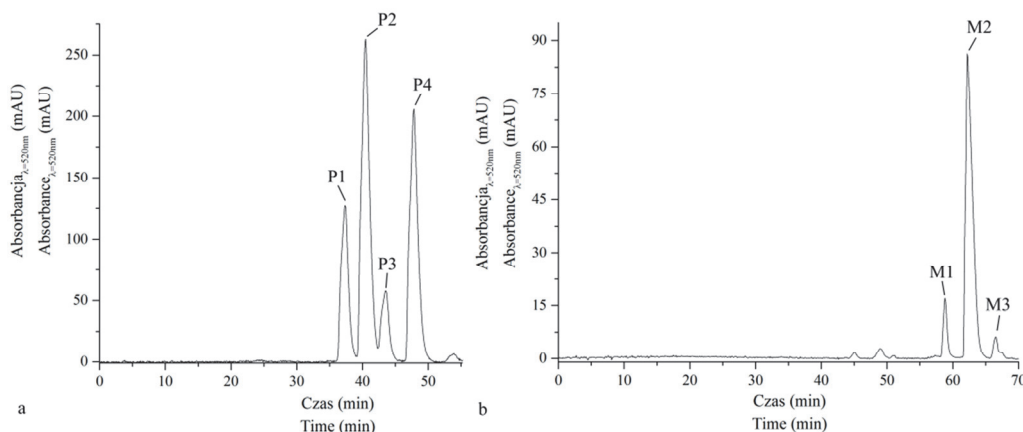
Objaśnienia: / Explanatory notes:

A1 – cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd / cyanidin-3-*O*-galactoside; A2 – cyjanidyno-3-*O*-glukozyd / cyanidin-3-*O*-glucoside; A3 – cyjanidyno-3-*O*-arabinozyd / cyanidin-3-*O*-arabinoside; A4 – cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd / cyanidin-3-*O*-xyloside; B1 – cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydo-5-*O*-glukozyd+cyanidyno-3,5-*O*-digluukozyd / cyanidin-3-*O*-sambubioside-5-*O*-glucoside+cyanidin-3,5-*O*-diglucoside; B2 – cyjanidyno-3-*O*-sambubiozyd+cyanidyno-3-*O*-glukozyd / cyanidin-3-*O*-sambubioside+cyanidin-3-*O*-glucoside.

Rys. 1. Chromatogramy przedstawiające separację związków antocyjanowych z ekstraktów z owoców aronii (a) oraz czarnego bzu (b) w preparatywnej kolumnie chromatograficznej w odwróconym układzie faz

Fig. 1. Chromatograms depicting separation of anthocyanins from chokeberry (a) and elderberry (b) fruit extracts in the preparative, reverse-phase chromatography column

[16] stanowiły mieszaninę dwóch związków antocyjanowych: cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydo-5-*O*-glukozydu oraz cyjanidyno-3,5-*O*-digluukozydu (pik B1) i cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydu oraz cyjanidyno-3-*O*-glukozydu (pik B2). Wymienione związki (reprezentowane przez piki B1 i B2) stanowiły odpowiednio: 17,65 % oraz 80,62 % wszystkich antocyjanów obecnych w badanym ekstrakcie. W trakcie separacji w kolumnie preparatywnej nie udało się rozdzielić pików B1 oraz B2 na frakcje zawierające poszczególne związki antocyjanowe. Dopiero zastosowanie kolumny analitycznej umożliwiło rozdział pików B1 i B2 na dwa piki, B2a oraz B2b zawierające odpowiednio: cyjanidyno-3-*O*-sambubiozyd oraz cyjanidyno-3-*O*-glukozyd (rys. 3). Przyczyną mniejszej rozdzielczości kolumny preparatywnej w odniesieniu do kolumny analitycznej była prawdopodobnie inna średnica ziaren wypełnienia. W kolumnie preparatywnej średnica ta wynosiła 7 μm , podczas gdy w kolumnie analitycznej – 5 μm . W celu uzyskania czystych związków obecnych w pikach B1 oraz B2 wymagana jest zatem dalsza optymalizacja warunków rozdziału chromatograficznego. Podczas zmiany skali procesu prowadzonego w warunkach przeladunku objętościowego, należy zwrócić uwagę na stosunek długości kolumny do kwadratu średnicy ziaren wypełnienia [3].



Objaśnienia: / Explanatory notes:

P1 – delfinidyno-3-*O*-glukozyd / delphinidin-3-*O*-glucoside; P2 – delfinidyno-3-*O*-rutynozyd / delphinidin-3-*O*-rutinoside; P3 – cyjanidyno-3-*O*-glukozyd / cyanidin-3-*O*-glucoside; P4 – cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd / cyanidin-3-*O*-rutinoside; M1 – cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(synapoyloglukozylo)galaktozyd, / cyanidin-3-*O*-xylosyl(sinapoylglucosyl)galactoside; M2 – cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(feruloiloglukozylo)galaktozy / cyanidin-3-*O*-xylosyl(feruloylglucosyl)galactoside; M3 – cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(kumaryloglukozylo)galaktozyd / cyanidin-3-*O*-xylosyl(coumaroylglucosyl)galactoside.

Rys. 2. Chromatogramy przedstawiające separację barwników antocyjanowych z ekstraktów z owoców czarnej porzeczki (a) oraz korzeni czarnej marchwi (b) w preparatywnej kolumnie chromatograficznej w odwróconym układzie faz

Fig. 2. Chromatograms depicting separation of anthocyanins from extracts of blackcurrant (a) fruits and black carrot (b) roots in the preparative, reverse-phase chromatography column

Przy zachowaniu wspomnianej proporcji oraz przy zwiększeniu przepływu eluentu można będzie teoretycznie uzyskać istotną poprawę jakości rozdzielania, pozwalającą na separację obu pików na frakcje odpowiadające pojedynczym związkom. W ekstraktach z czarnej porzeczki zidentyfikowano natomiast dwa związki zaliczane do grupy antocyjanów stanowiących pochodne delfinidyny oraz dwa stanowiące pochodne cyjanidyny (rys. 2a). Analogicznie, jak w pracy Wu i wsp. [16], w trakcie rozdzielania z kolumny wymywały się kolejno: delfinidyno-3-*O*-glukozyd, delfinidyno-3-*O*-rutynozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd oraz cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd. Substancje te stanowiły odpowiednio: 17,54, 41,02, 7,79 i 32,06 % wszystkich antocyjanów obecnych w badanych ekstraktach. W podanych warunkach rozdzielania nie uzyskano pozostałych antocyjanów obecnych w ekstraktach z czarnej porzeczki, stanowiących pochodne petunidyny, pelargonidyny oraz peonidyny [16]. Największe dysproporcje ilościowe pomiędzy poszczególnymi związkami zaobserwowano natomiast w odniesieniu do separacji antocyjanów z ekstraktów czarnej marchwi (rys. 2b). Pomimo że przedstawione dane pod względem liczby pików uzyskanych podczas rozdzielania są zgodne z wynikami przed-

stawionymi przez Kammerer i wsp. [4], to w warunkach chromatografii preparatywnej pozyskano jedynie trzy frakcje zawierające związki antocyjanowe stanowiące pochodne cyjanidyny i zidentyfikowane jako: cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo (synapoioglukozylo)galaktozyd (pik M1), cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo (feruloiloglukozylo)galaktozyd (pik M2), cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo (kumaryloglukozylo)galaktozyd (pik M3). Wymienione związki (reprezentowane przez piki M1, M2 oraz M3) stanowiły odpowiednio: 3,32, 88,73 i 1,54 % wszystkich antocyjanów obecnych w badanym ekstrakcie.

Tabela 1. Czystość preparatów antocyjanów w zależności od rodzaju roztworu zastosowanego do ekstrakcji

Table 1. Purity of anthocyanin preparations depending on type of solution applied for extraction

Rodzaj preparatu Preparation type	Czystość preparatów antocyjanów [%] Purity of anthocyanin preparations [%]			
	Kwas octowy Acetic acid	Kwas solny Hydrochloric acid	Metanol/woda/kwas octowy Methanol/water/acetic acid	Aceton/woda/kwas octowy Acetone/water/acetic acid
Aronia / Chokeberry				
A1	96 ^a ± 1,5	97 ^a ± 2,1	96 ^a ± 1,0	95 ^a ± 2,3
A2	76 ^a ± 3,2	76 ^a ± 3,8	73 ^a ± 2,0	72 ^a ± 1,5
A3	96 ^a ± 1,5	97 ^a ± 2,0	96 ^a ± 2,5	94 ^a ± 2,3
A4	88 ^a ± 2,3	87 ^a ± 3,2	91 ^a ± 2,5	90 ^a ± 2,3
Czarny bez / Elderberry				
B1*	85 ^a ± 2,5	84 ^a ± 1,5 ^a	85 ^a ± 1,5	83 ^a ± 2,0
B2a**	67 ^a ± 2,3	65 ^a ± 2,5	66 ^a ± 1,0	64 ^a ± 2,5
B2b**	30 ^a ± 1,5	33 ^a ± 2,3	32 ^a ± 1,7	34 ^a ± 3,2
Czarna porzeczka / Blackcurrant				
P1	94 ^a ± 1,7	95 ± 2,0 ^a	95 ^a ± 1,5	94 ^a ± 0,6
P2	93 ^a ± 2,9	92 ± 2,1 ^a	92 ^a ± 0,6	92 ^a ± 2,3
P3	95 ^a ± 3,2	94 ± 1,5 ^a	96 ^a ± 2,0	94 ^a ± 1,2
P4	100 ^a ± 0,6	99 ± 1,0 ^a	99 ^a ± 1,5	100 ^a ± 0,0
Czarna marchew / Black carrot				
M1	59 ^a ± 3,8	57 ^a ± 4,0	58 ^a ± 3,2	58 ^a ± 1,7
M2	95 ^a ± 1,0	94 ^a ± 1,5	95 ^a ± 2,0	93 ^a ± 1,5
M3	51 ^a ± 3,6	52 ^a ± 2,9	52 ^a ± 3,0	53 ^a ± 3,8

Objaśnienia: / Explanatory notes:

- oznaczenia preparatów jak na rys. 1., 2. i 3. / labelling of preparations as in Fig. 1., 2. and 3.;

* preparat B1 zawiera cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydo-5-*O*-glukozyd i cyjanidyno-3,5-*O*-diglukozyd, które nie zostały rozdzielone w trakcie chromatografii preparatywnej i analitycznej / B1 preparation comprises cyanidin-3-*O*-sambubioside-5-*O*-glucoside and cyanidin-3,5-*O*-diglucoside, which were not separated during analytical and preparative chromatography;

** preparat B2 zawiera cyjanidyno-3-*O*-sambubiozyd i cyjanidyno-3-*O*-glukozyd, które nie rozdzieliły się w trakcie chromatografii preparatywnej, ale rozdzieliły się w trakcie chromatografii analitycznej / B2 formulation comprises cyanidin-3-*O*-sambubioside and cyanidin-3-*O*-glucoside, which did not separate during preparative chromatography, but they separated in the course of analytical chromatography;

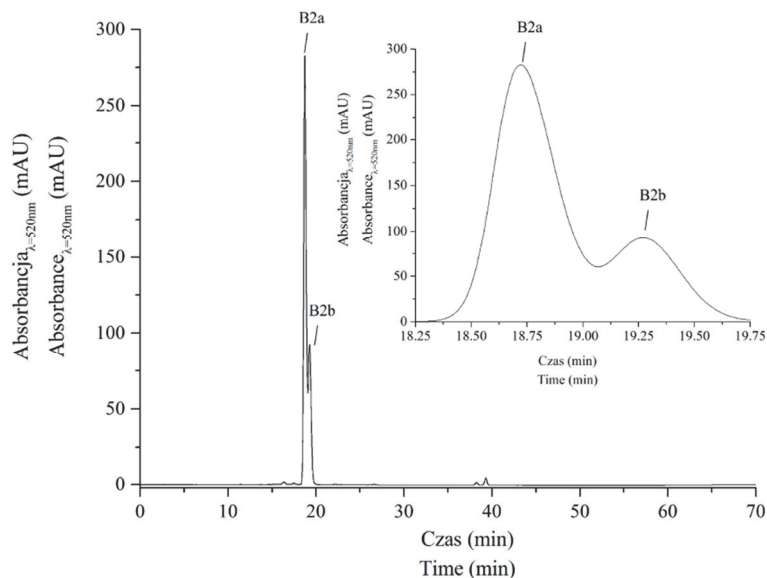
- wyniki podano jako wartość średnia \pm odchylenie standardowe / results are expressed as mean values \pm standard deviation, $n = 3$;

- a- takie same litery w obrębie analizowanego czynnika (wiersze) oznaczają brak statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$) / the same letters within one analyzed parameter (rows) denote no statistically significant differences ($p < 0.05$).

Ocena czystości preparatów antocyjanów

Uzyskane za pomocą chromatografii preparatywnej preparaty antocyjanów zagęszczono w wyparce rotacyjnej, a następnie wysuszone sublimacyjnie. Czystość stałych preparatów antocyjanów zbadano przy użyciu kolumny analitycznej Zorbax SB C18 (5 μm , 250 \times 4,6 mm). Przed analizą preparaty rozpuszczono w roztworze wodnym kwasu mrówkowego o stężeniu 5 %. W celu obliczenia czystości preparatów antocyjanów wykorzystano chromatogramy wykreślone przy długości fali $\lambda = 280$ nm (tab. 1), ponieważ przy tej długości fali wykrywano, oprócz poszczególnych antocyjanów, także substancje zanieczyszczające. W świetle widzialnym ($\lambda = 520$ nm), detekcja wielu substancji obecnych w preparacie nie była możliwa. Przykładowo, frakcja M1 (czarna marchew) charakteryzowała się czystością równą ponad 98 % przy $\lambda = 520$ nm, podczas gdy czystość przy $\lambda = 280$ nm nie przekraczała 60 %. Z tej przyczyny zrezygnowano z monitorowania czystości preparatów przy długości fali równej 520 nm.

Nie stwierdzono statystycznie istotnego ($p < 0,05$) wpływu rodzaju ekstrahenta na czystość uzyskanych preparatów antocyjanowych. Preparaty antocyjanów pozyskane z czarnej porzeczki (P1-P4) odznaczały się największą czystością, wynoszącą ponad 92 %. Trzy preparaty (A1, A3 i A4) aronii cechowały się czystością większą niż 87 %, natomiast cyjanidyno-3-*O*-glukozyd (A2) charakteryzował się czystością na poziomie 72 \div 76 %. Z kolei z korzenia czarnej marchwi uzyskano tylko jeden preparat o czystości większej niż 93 % (M2). Czystość pozostałych dwóch preparatów (M1 i M3) nie przekraczała 60 %. Jedynie z czarnego bzu nie zdołano otrzymać preparatów w postaci pojedynczych antocyjanów. Jak już wcześniej wspomniano, preparat B2 był mieszaniną dwóch barwników, w blisko jednej trzeciej składającą się z cyjanidyno-3-*O*-glukozydu (B2b) i w dwóch trzecich z cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydu (B2a). Także preparat B1 był mieszaniną, która w 83 \div 85 % była złożona z dwóch antocyjanów: cyjanidyno-3-*O*-sambubiozydo-5-*O*-glukozydu i cyjanidyno-3,5-*O*-diglukozydu. Za pomocą zastosowanych metod nie udało się jednak ustalić zawartości poszczególnych związków w tym preparacie.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

B2a – cyjanidyno-3-*O*-sambubiozyd / cyanidin-3-*O*-sambubioside; B2b – cyjanidyno-3-*O*-glukozyd / cyanidin-3-*O*-glucoside.

Rys. 3. Chromatogram preparatu antocyjanów B2 z czarnego bzu w kolumnie analitycznej w odwróconym układzie faz

Fig. 3. Chromatogram of the B2 anthocyanin preparation from elderberry in the analytical, reverse-phase column

Wnioski

1. Chromatografia preparatywna w kolumnie preparatywnej Zorbax SB C18 (250 × 21,2 mm) umożliwia rozdział antocyjanów obecnych w ekstraktach na poszczególne frakcje.
2. Z 13 otrzymanych stałych preparatów, 7 charakteryzowało się czystością większą niż 90 % i były to: cyjanidyno-3-*O*-galaktozyd i cyjanidyno-3-*O*-arabinozyd, wyizolowane z owoców aronii, delfinidyno-3-*O*-glukozyd, delfinidyno-3-*O*-rutynozyd, cyjanidyno-3-*O*-glukozyd i cyjanidyno-3-*O*-rutynozyd – otrzymane z owoców czarnej porzeczki oraz cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(feruloilglukozylo)galaktozyd – pozyskany z korzenia czarnej marchwi. Mniejszą czystością (co najmniej 87 %) cechował się preparat cyjanidyno-3-*O*-ksylozyd wyizolowany z owoców aronii. Z kolei cyjanidyno-3-*O*-glukozyd z owoców aronii oraz cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(synapoilglukozylo)galaktozyd i cyjanidyno-3-*O*-ksylozydo(kumaryloglukozylo)galaktozyd z korzenia czarnej marchwi zawierały stosunkowo

najwięcej niepożądanych substancji zanieczyszczających (czystość w zakresie 51 ÷ 76 %).

3. Zastosowana metoda separacji pozwoliła także na pozyskanie 2 preparatów antocyjanów z owoców czarnego bzu. Oba były mieszaninami dwóch różnych związków antocyjanowych.

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

Literatura

- [1] Dai J., Mumper R.J.: Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 2010, **15**, 7313-7352.
- [2] Dembczyński R., Białas W., Olejnik A., Kowalczewski P., Drożdżyńska A., Jankowski T.: Ekstrakcja antocyjanów z korzenia czarnej marchwi, owoców aronii, czarnego bzu i czarnej porzeczki. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, **5 (102)**, 165-181.
- [3] Kamiński M., Kartanowicz R.: Chromatografia cieczowa. Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Gdańsk 2004.
- [4] Kammerer D., Carle R., Schieber A.: Detection of peonidin and pelargonidin glycosides in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 2407-2412.
- [5] Montilla E.C., Arzaba M.R., Hillebrand S., Winterhalter P.: Anthocyanin composition of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) cultivars Antonina, Beta Sweet, Deep Purple, and Purple Haze. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 3385-3390.
- [6] Olejnik A., Tomczyk J., Kowalska K., Grajek W.: Rola naturalnych składników diety w chemiopreencji nowotworów jelita grubego. *Postępy Hig. Med. Dośw.* [online], 2010, **64**, 175-187.
- [7] Oszmiański J., Wojdyło A., Matuszewski P.: Zmiany zawartości związków fenolowych podczas produkcji zagęszczonego soku truskawkowego w warunkach przemysłowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **1 (50)**, 94-104.
- [8] Piątkowska E., Kopeć A., Leszczyńska T.: Antocyjany – charakterystyka, występowanie i oddziaływanie na organizm człowieka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **4 (77)**, 24-35.
- [9] PN-EN 12145:2001. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczenie zawartości suchej masy metodą wagową.
- [10] Prior R.L., Wu X., Gu L., Hager T., Hager A., Wilkes S., Howard L.: Purified berry anthocyanins but not whole berries normalize lipid parameters in mice fed an obesogenic high fat diet. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2009, **53**, 1406-1418.
- [11] Prior R.L., Wilkes S., Rogers T., Khanal R.C., Wu X., Hager T.J., Hager A., Howard L.: Dietary black raspberry anthocyanins do not alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 3977-3983.
- [12] Prior R.L., Wilkes S.E., Rogers T.R., Khanal R.C., Wu X., Howard L.R.: Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 3970-3976.
- [13] 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.

- [14] 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.
- [15] Saluk-Juszczak J.: Antocyjany jako składnik żywności funkcjonalnej stosowanej w profilaktyce chorób układu krążenia. *Postępy Hig. Med. Dośw.* [online], 2010, **64**, 451-458.
- [16] 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.
- [17] Wykaz internetowy produktów. Dostęp w Internecie [02.02.2015.]: www.sigmaaldrich.com

SEPARATION OF ANTHOCYANINS FROM BLACK CARROT, CHOKEBERRY, BLACKCURRANT, AND ELDERBERRY WITH THE USE OF PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY

S u m m a r y

The objective of the research study work was to develop a method to obtain anthocyanin pigments from the extracts of chokeberry, elderberry and blackcurrant as well as black carrot roots. The separation of anthocyanins into individual fractions was carried out using preparative chromatography in an Agilent Zorbax SB C18 column (250 × 21.2 mm). Four anthocyanin pigments were identified in the extracts of chokeberry and blackcurrant. Chokeberry fruits contained derivatives of cyanidin, namely: cyanidin-3-*O*-galactoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-arabinoside, and cyanidin-3-*O*-xyloside, while in the fruits of blackcurrant, the derivatives of delphinidin and cyanidin were reported, i.e.: delphinidin-3-*O*-glucoside, delphinidin-3-*O*-rutinoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, and cyanidin-3-*O*-rutinoside. Two fractions were obtained from elderberry fruits and each one was a mixture of two anthocyanins; the first fraction contained cyanidin-3-*O*-sambubioside-5-*O*-glucoside, and cyanidin-3,5-*O*-diglucoside, whereas the second one consisted of cyanidin-3-*O*-sambubioside and cyanidin-3-*O*-glucoside. Three anthocyanins were isolated from the roots of black carrot i.e.: cyanidin-3-*O*-xylosyl(sinapoylglucosyl)galactoside, cyanidin-3-*O*-xylosyl(feruoylglucosyl)galactoside, cyanidin-3-*O*-xylosyl(coumaroylglucosyl)galactoside. Anthocyanin preparations in a solid form were obtained after the produced fractions were concentrated in a rotary evaporator and freeze-dried. A purity analysis of the anthocyanins was carried out by HPLC using an analytical Agilent Zorbax SB C18 column (5 mm, 250 × 4.6 mm). Of the 13 solid anthocyanin preparations, seven were characterized by a purity level above 90 %: cyanidin-3-*O*-galactoside and cyanidin-3-*O*-arabinoside isolated from chokeberry; delphinidin-3-*O*-glucoside, delphinidin-3-*O*-rutinoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, and cyanidin-3-*O*-rutinoside obtained from fruits of blackcurrant, and cyanidin-3-*O*-xylosyl(feruoylglucosyl)galactoside obtained from black carrot roots. The purity of other anthocyanin preparations ranged between 51 and 87 %.

Key words: anthocyanins, extraction, liquid chromatography, preparative chromatography, freeze-drying

