

ELŻBIETA KLIMCZAK, BOGUSŁAW KRÓL

## OZNACZANIE ZAWARTOŚCI ROŻNYCH FORM KWASU ELAGOWEGO W UBOCZNYCH PRODUKACH PRZEROBU TRUSKAWEK

### Streszczenie

Celem pracy był wybór rozpuszczalnika i warunków ekstrakcji elagotanin (ET) z wysuszonych odpadów przerobu truskawek oraz opracowanie sposobu hydrolizy estrów kwasu elagowego (KE) w glicerolowych roztworach kwasu trifluorooctowego (TFA). Równorzędnym celem było zastosowanie nowej generacji kolumny chromatograficznej do oznaczania zawartości wolnego i związanego KE w wybranych, ubocznych produktach przemysłowego przerobu truskawek. Uzyskane wyniki analiz były podstawą do obliczenia zawartości ET w badanych materiałach roślinnych.

Wykazano, że 70 % wodny roztwór acetonowy zastosowany w temperaturze ( $22 \pm 2$  °C), w co najmniej trójstopniowej ekstrakcji, umożliwił zadowalające wyodrębnienie KE i ET z wysuszonych wycieków truskawkowych i śruty poekstrakcyjnej z nasion truskawek odfuszczonych ditenkiem węgla w stanie nadkrytycznym. Udowodniono, że ET utrzymywane w temp.  $95 \pm 1$  °C, przez co najmniej 6 h, w 70 % wodnym roztworze glicerolu, zawierającym TFA w stężeniu 2 mol/l, uległy całkowitej hydrolizie z uwolnieniem KE. Zarejestrowanie chromatogramów składników ekstraktów, przed i po hydrolizie, z zastosowaniem techniki HPLC, umożliwiło oznaczenie zawartości wolnego i uwolnionego KE w wybranych odpadach przerobu truskawek oraz pozwoliło na obliczenie w nich udziału ET. Stwierdzono, że w próbkach wysuszonych, przemysłowych wycieków truskawkowych pozbawionych nasion zawartość wolnego KE wyniosła poniżej 100 mg/100 g, uwolnionego około 900 mg/100 g, a udział ET wyniósł 1,4 % (m/m). W wysuszonych próbkach przemysłowych odpadów z przecieraczek zawartość wolnego KE wahała się w granicach 30 - 150 mg/100 g, uwolnionego KE 300 - 680 mg/100 g i ET 0,5 - 1,1 % (m/m).

**Słowa kluczowe:** truskawki, wycieki truskawkowe, kwas elagowy, elagotanimy, ekstrakcja, hydroliza

### Wprowadzenie

Truskawka (*Fragaria ananasa*) należy do popularnych owoców jagodowych w strefie klimatu umiarkowanego. Od wielu lat Polska należy do największych producentów owoców miękkich na świecie, a ze zbiorem truskawek około 200 tys. ton rocz-

nie zajmuje drugie miejsce w produkcji tych owoców w Europie [20]. Owoce truskawek, poza cenionymi walorami smakowymi, charakteryzują się wysoką zawartością witaminy C, makro- i mikroelementów, błonnika pokarmowego oraz polifenoli [10]. Wśród związków polifenolowych na szczególną uwagę zasługuje kwas elagowy (KE), jego glikozydy i elagotaniny (ET) [19, 23]. Według Silva Pinto [23] sumaryczna zawartość KE w owocach truskawek waha się od 5 do 50 mg/100 g ś.m. Wolny KE stanowi jedynie niewielki procent wśród ogólnej liczby jego pochodnych, obejmujących glikozydy i wielkocząsteczkowe ET. Glikozydy KE składają się z aglikonu tego kwasu i reszty odpowiedniej heksozy lub pentozy. ET są estrami kwasu heksahydroksydifenylowego (kwas HHDP) i alkoholu wielowodorotlenowego, zwykle  $\beta$ -D-glukozy. Te wielkocząsteczkowe związki wykazują tendencję do tworzenia dimerów i oligomerów, których jednostki strukturalne połączone są wiązaniem C-O-C [8, 22, 23]. ET dominującą w owocach truskawek jest sanguina H-6, tj. dimer  $\beta$ -1-O-galloilo-2,3:4,6-bis-HHDP-D-glukozy [1, 22, 28]. Specyficzna różnorodność strukturalna, w tym podatne na hydrolizę wiązania estrowe ET są prawdopodobną podstawą prozdrowotnych właściwości surowców leczniczych i żywnościowych bogatych w te związki. Podatność ET na hydrolizę odróżnia tę grupę garbników od tanin skondensowanych i umożliwia ich oznaczenie na podstawie ilości KE uwolnionego z wiązań estrowych [4]. Dotychczas jest to najczęściej stosowana metoda oznaczania zawartości KE związanego w postaci glikozydów i estrów w materiałach roślinnych [22, 23].

Sezonowość występowania oraz mała trwałość owoców powodują, że truskawki są powszechnie stosowane do produkcji mrożonek, zagęszczonych soków, napojów, nektarów i dżemów. Podczas przerobu truskawek, w toku przecierania lub tłoczenia, powstają odpady w ilości około kilku procent masy przerabianego surowca [9]. Wytloki truskawkowe, powstające w procesie wytwarzania soku i odpady z przecierania charakteryzują się stosunkowo dużym udziałem owoców właściwych w całkowitej masie. Nasiona (orzeczki) stanowią około 1 % masy owoców, lecz zawierają nawet do 11 % sumy związków polifenolowych obecnych w owocach truskawek [1]. Nasiona truskawek są również źródłem oleju bogatego w kwas  $\alpha$ -linolenowy, otrzymywanego metodą ekstrakcji ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym [21]. W związku z tym odpady z przetwórstwa truskawek są potencjalnie dobrym źródłem substancji przeciwutleniających [16], a zwłaszcza proantocyjanidyn [18], oleju [21], KE i ET [1]. Współczesne sposoby utylizacji wytlóków w polskich warunkach dotyczą kompostowania, biotransformacji i wyodrębniania komponentów do herbat [25]. Dotychczas brakuje jednak danych o zawartości ET w wytlókach, osadach z przecieraczek i nasionach truskawek poddanych procesom przetwórczym w Polsce. W części wynika to z niedoceniań tych odpadów, a w części z niedoskonałości istniejących metod analitycznych, wykorzystujących kwasową hydrolizę ET. Istotną trudność oznaczania jest związana z jednej strony z dużą reaktywnością KE i powstaniem estrów w roztworach alkoholowych,

zaś z drugiej strony z jego małą rozpuszczalnością w roztworach wodnych [2]. Hydrolizę ET prowadzi się zarówno w alkoholowych, jak i w wodno-alkoholowych roztworach odpowiednich ekstraktów, względnie zawiesinie próbek roślinnych zakwaszonych kwasem chlorowodorowym lub trifluoroctowym (TFA). Hydroliza przebiega w zakresie temp. 85 - 125 °C, w ciągu 1 - 20 h i niekiedy w zatopionych ampułkach [3, 4, 6, 9, 12, 13, 23, 24, 26, 28, 29]. Wariantowość postępowania analitycznego prowadzi do bardzo dużej rozbieżności wyników oznaczania ET w owocach truskawek tej samej odmiany (5 - 50 mg/100 g ś.m.) [23]. Silva Pinto [23] podjęła próby unifikacji metody oznaczania KE i jego pochodnych przez optymalizację zarówno warunków ekstrakcji, jak i przebiegu hydrolizy ET. Autorka wykazała zachowanie selektywności hydrolizy pochodnych KE w 2 M TFA, w wodnych 70 % roztworach metanolowych i acetonowych, podczas wielogodzinnych reakcji oraz niezadowalającą przydatność wodnych roztworów metanolowych do ekstrakcji ET z owoców truskawek.

Celem niniejszej pracy był wybór najkorzystniejszych warunków ekstrakcji ET z wysuszonych odpadów przerobu truskawek oraz opracowanie sposobu hydrolizy estrów KE w glicerolowych roztworach TFA. Równorzędnym celem było oznaczenie zawartości wolnego i związanego KE w wybranych ubocznych produktach przemysłowego przerobu truskawek metodą HPLC i na tej podstawie obliczenie zawartości ET w badanych materiałach roślinnych w przeliczeniu na  $\beta$ -1-O-galloilo-2,3:4,6-bis-HHDP-D-glukozę.

### **Materiał i metody badań**

Materiał do badań stanowiły przemysłowe odpady z przetwórstwa truskawek na soki i przeciera, pochodzące z linii produkcyjnych nowoczesnych zakładów zlokalizowanych w województwie mazowieckim i lubelskim:

- wysuszone, przemysłowe wytloki truskawkowe z kampanii 2008 r., rozdzielone na frakcje o wielkości cząstek 1-2 mm i 2-5 mm;
- wysuszone osady z przemysłowych przecieraczek z kampanii 2009 r., o granulacji 0,6-1,2 mm i powyżej 1,2 mm;
- jako materiał odniesienia wykorzystano próbki nasion truskawek z kampanii 2008 r., odtłuszczonych ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym [21].

#### *Wybór warunków ekstrakcji ET z badanych materiałów oraz przygotowanie roztworów do hydrolizy*

W pierwszej kolejności porównano skuteczność metod wyodrębniania ET z dwóch standartowych materiałów, z wykorzystaniem dotychczas najczęściej stosowanych technik ekstrakcji opisanych w literaturze [1, 11, 27, 28, 29]. Zbadano wpływ wybranych rozpuszczalników oraz metod ekstrakcji na wydajność izolowania ET z materiału roślinnego. Przed ekstrakcją badany materiał, tj. wytloki i odtłuszczone

nasiona, rozdrabniano w młynku laboratoryjnym Lab Mill-1 (Węgry), do wielkości cząstek  $\varnothing \leq 0,2$  mm. Ekstrakcje wykonywano wg poniżej cytowanych autorów w następujący sposób:

Metoda 1. – wg Kołodziejczyka i wsp. [11]. Ekstrakcję ET z badanego materiału przeprowadzano trójstopniowo z użyciem kolejno 70 % roztworu etanolu i trójstopniowo z użyciem 70 % roztworu acetonu. Do plastikowych probówek o poj. 7 ml odważano po około 0,5 g badanego materiału z dokładnością do 0,0001 g. Do każdej próbki dodawano po 4 ml 70 % etanolu, dokładnie mieszano i umieszczano w myjce ultradźwiękowej na 15 min. Następnie próbki wirowano przez 5 min w wirówce laboratoryjnej, typ 317a przy 4800 x g. Po odwirowaniu ciecz z nad osadu zlewano do kolby miarowej o poj. 10 ml. Pozostały w probówce osad poddawano, analogicznie wykonywanym, dwóm ekstrakcjom z użyciem ekstrahenta w ilości po 3 ml. Uzyskiwane kolejne ekstrakty alkoholowe umieszczano w kolbie miarowej o poj. 10 ml. W podobny sposób zbierano trzy ekstrakty acetonowe. Ekstrakty etanolowe i acetonowe łączono, oddestylowano rozpuszczalniki, po czym suchą pozostałość w kolbie rozpuszczano w 2 ml 70 % wodnego roztworu gliceryny.

Metoda 2. – modyfikacja metody wg Aaby i wsp. [1]. ET ekstrahowano sukcesywnie sześciokrotnie 70 % wodnym roztworem acetonu. Postępowanie analityczne wykonywano w analogiczny sposób jak w metodzie 1. Uzyskiwane kolejne ekstrakty zbierano do dwóch kolb miarowych o poj. 10 ml każda i łączono. Ekstrakty przenoszono ilościowo do kolby destylacyjnej wyparki próżniowej i oddestylowano rozpuszczalnik, po czym suchą pozostałość w kolbie rozpuszczano w 2 ml 70 % wodnego roztworu gliceryny.

Metoda 3. – modyfikacja metody wg Aaby i wsp. [1] z zastosowaniem jedynie trójstopniowej ekstrakcji wykonywanej wg postępowania analitycznego opisanego powyżej (metoda 2).

Metoda 4. – wg Vrhovsek i wsp. [29]; 10 g rozdrobnionego materiału ekstrahowano 100 ml 70 % wodnego roztworu acetonu przez 1 min, stosując blender Broun Minipimer 400 Watt. Ekstrakt sączono, oddestylowano rozpuszczalnik, po czym suchą pozostałość w kolbie rozpuszczano w 70 % roztworze gliceryny, w ilości odpowiednio 50 ml w przypadku wyłoków truskawkowych i 25 ml w przypadku odtłuszczonych nasion truskawek, a następnie poddawano hydrolizie.

Metoda 5. – wg Vekari i wsp. [27]; 0,5 g rozdrobnionego materiału zalewano 30 ml 100 % metanolu, pozostawiano na 30 min w temp.  $22 \pm 2$  °C, a następnie umieszczano w myjce ultradźwiękowej na 20 min. Ekstrakt sączono, oddestylowano rozpuszczalnik, po czym suchą pozostałość w kolbie rozpuszczano w 2 ml 70 % wodnego roztworu gliceryny i poddawano hydrolizie.

Każdą z ekstrakcji wykonywano w dwóch powtórzeniach z każdej próbki badanego materiału.

*Warunki hydrolizy KE związanego w postaci estrów i glikozydów*

Hydrolizę ET i glikozydów prowadzono w 70 % wodnym roztworze glicerolu zawierającym TFA w stężeniu odpowiednio 0,5, 1, 2, 3, 4 mol/l. W tym celu w próbówce z PET o poj. 2 ml umieszczano po 0,5 ml 70 % ekstraktu glicerynowego otrzymywanego według najkorzystniejszej z wyżej opisanych metod ekstrakcji i odpowiednio 18, 37,5, 75, 112,5, 150  $\mu$ l stężonego TFA. Następnie składniki dokładnie mieszano w vortexie i utrzymywano w temp.  $95 \pm 1$  °C, w ciągu od 1 do 24 h, w odstępach czasu 1, 2, 4, 6, 8 h w celu ustalenia czasu niezbędnego do osiągnięcia całkowitej hydrolizy. Po zakończeniu hydrolizy próbki przenoszono ilościowo do kolby miarowej o poj. 5 ml i uzupełniano metanolem do kreski, uzyskując roztwór podstawowy zhydrolizowanych ET.

*Oznaczanie zawartości wolnego i całkowitego KE oraz ET w odpadach z przerobu owoców truskawek*

Zawartość wolnego KE oznaczano metodą HPLC z roztworów uzyskanych po oddestylowaniu rozpuszczalnika z ekstraktów i rozpuszczeniu suchej pozostałości w 2 ml wodnego 70 % roztworu glicerolu. Po 0,5 ml powyższego roztworu umieszczano w kolbie o poj. 5 ml, uzupełniano metanolem do kreski, po czym, po przefiltrowaniu przez filtr o porach 0,45  $\mu$ m, poddawano analizie w układzie HPLC.

Zawartość całkowitego KE oznaczano metodą HPLC z roztworów po hydrolizie wykonanej w temp.  $95 \pm 1$  °C, w ciągu 6 h, w 70 % wodnym roztworze glicerolu, zawierającym 2 mol/l TFA. Do analizy pobierano 1 ml roztworu podstawowego zhydrolizowanych ET, rozcieńczano dwu - pięciokrotnie metanolem i po przefiltrowaniu przez filtr o porach 0,45  $\mu$ m poddawano analizie HPLC. Zawartość uwolnionego KE, w mg/100 g materiału, wyliczano z różnicy oznaczonych zawartości całkowitego i wolnego KE. ET, w % (m/m), obliczano na podstawie ilości uwolnionego KE i mnożnik 1,55, który uwzględnia udział masowy KE w  $\beta$ -1-O-galloilo-2,3:4,6-bis-HHDP-D-glukozie, która jest monomeryczną jednostką ET.

*Układ chromatograficzny do oznaczania zawartości KE w badanym materiale*

Stosowano układ chromatograficzny (chromatograf firmy Dionex) z detektorem diodowym UV-DAD 340U. Rozdział prowadzono w kolumnie Kinetex 2,6  $\mu$  C18 100A, 100 x 2.10 mm, Phenomenex. Kolumnę termostatowano w temp. 35 °C. Faza A – 0,25 % kwas mrówkowy w wodzie, faza B – 85 % acetonitryl w metanolu. Przepływ fazy ruchomej: 0,3 ml/min. Rozdział w układzie gradientowym: stabilizacja przez 5 min z 6 % fazy B; 0 - 3 min 6 % fazy B; 3 - 20 min 6 - 20 % fazy B; 20 - 31,5 min 20 - 50 % fazy B; 31,5 - 33 min 50 - 70 % fazy B; 33 - 38 min 70 % fazy B; 38 - 45 min 70 - 6 % fazy B. Objętość nastrzyku 5  $\mu$ l. Warunki detekcji: 360 nm. Dane rejestrowano za pomocą programu do rejestracji i obróbki danych chromatograficznych.

Zweryfikowana została stabilność KE w zaproponowanych warunkach hydrolizy. Próbki wzorca KE (Extrasynthese, France) o znanym stężeniu poddawano hydrolizie. Na tej podstawie obliczano procentowy odzysk KE w stosunku do jego wyjściowej zawartości. Nie zaobserwowano strat zawartości KE poddanego działaniu TFA w zaproponowanych warunkach hydrolizy, w stosunku do jego ilości przed hydrolizą.

Wykonano elementy walidacji opracowanej metody oznaczania KE i jego pochodnych w odpadach z przerobu truskawek, z uwzględnieniem najkorzystniejszych metod ekstrakcji ET z wyłoków truskawkowych, na podstawie czterech powtórzeń. Każda z prób poddawana była hydrolizie. Obliczano wartość średnią uwolnionego KE, odchylenie standardowe, a na tej podstawie określano współczynnik zmienności, który w przypadku KE uwolnionego z wyłoków truskawkowych, rozdrobnionych po wysuszeniu do cząstek o średnicy 1-2 mm, wyniósł 11 %.

Wyniki badań poddano jednoczynnikowej analizie wariancji przy użyciu programu statystycznego Anova.

## Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie badań porównano skuteczność ekstrakcji związanych form KE, występujących w dwóch typowych, naturalnych matrycach, zróżnicowanych składem chemicznym i strukturą, a mianowicie: wysuszonych wyłokach truskawkowych, z których usunięto nasiona oraz w śrucie z nasion truskawek odtłuszczonych ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym. Do ekstrakcji zastosowano metanol, wodne roztwory etanolu i acetonu użyte w ilościach, stężeniach i postępowaniach analitycznych stosowanych przez innych autorów do wyodrębniania polifenoli i/lub ET z owoców truskawek [23, 24, 27], nasion truskawek [1] lub wyłoków innych owoców [11]. W tab. 1. przedstawiono ilość KE uwolnionego z estrów i glikozydów zawartych w poszczególnych ekstraktach i przeliczoną na 100 g badanego materiału, świadcząca o skuteczności wybranych metod ekstrakcji ET. Hydrolizę wykonano w jednakowy sposób opisany w metodyce. Zawartość KE uwolnionego w wyłokach wahała się w granicach 112 - 1170 mg/100 g, a w odtłuszczonych nasionach od 104 do 430 mg/100 g. Z danych w tab. 1. wynika tendencja wyższej precyzji oznaczeń KE w odtłuszczonych nasionach niż w wyłokach, co można przypisać mniej korzystnym warunkom wydobywania ET z rozdrobnionych cząstek miąższu i szypulek. Skutecznym sposobem izolowania ET z badanego materiału było zastosowanie wielokrotnej i wspomaganej ultradźwiękami, sukcesywnej ekstrakcji 70 % wodnym roztworem acetonu w temp.  $22 \pm 2$  °C. Wyniki oznaczenia przy użyciu trój- i sześciostopniowej ekstrakcji nie różniły się statystycznie, jednak sześciostopniowa ekstrakcja zapewniła lepszą powtarzalność wyników. Ekstrakcja momentalna 70 % wodnym roztworem acetonu, w ciągu 1 min, z użyciem blendera, jest prostą oraz szybką metodą analityczną stosowaną do ekstrakcji polifenoli z owoców truskawek [29]. Metoda ta nie nada-

wała się jednak do ekstrakcji wielkocząsteczkowych pochodnych KE z wycieków i odtłuszczonych nasion. Wydajność tej metody ekstrakcji wyniosła bowiem odpowiednio 37 % oraz 74 % wydajności uzyskanej w przypadku sześciokrotnej ekstrakcji tym samym rozpuszczalnikiem. Powyższe dane zgodne są z wynikami badań Silva Pinto [23], która zaleca stosowanie 80 % acetonu jako efektywnego ekstrahenta tanin hydrolizujących z owoców truskawek. Według badań Okudy i wsp. [17] taniny hydrolizujące w warunkach ekstrakcji prowadzonej w temperaturze pokojowej z dostępem powietrza są trwałe, podczas gdy taniny skondensowane w tych samych warunkach ulegają utlenianiu.

Tabela 1

Zawartość uwolnionego kwasu elagowego w wyciekach truskawkowych o średnicy cząstek 2-5 mm oraz w odtłuszczonych nasionach truskawek, uzyskana w wyniku ekstrakcji różnymi metodami i rozpuszczalnikami oraz hydrolizy kwasem trifluorooctowym.

Content of released ellagic acid in strawberry pomace with particles of a 2 to 5 mm diameter and defatted strawberry achenes obtained as a result of extraction using different methods and solvents, and of subsequent hydrolysis with trifluoroacetic acid.

Rodzaj ekstrakcji Extraction methods	Kwas elagowy uwolniony Released ellagic acid		Zawartość uwolnionego kwasu elagowego w stosunku do metody 2 Content of released ellagic acid in comparison with method 2	
	[mg/100 g]		[%]	
	Wytłoki truskawkowe Ø 2-5 mm Strawberry pomace Ø 2-5 mm	Odtłuszczone nasiona truskawek Defatted strawberry achenes	Wytłoki truskawkowe Ø 2-5 mm Strawberry pomace Ø 2-5 mm	Odtłuszczone nasiona truskawek Defatted strawberry achenes
Metoda 1 Method 1	784 ± 19 c	307 ± 1 b	67 ± 7	73 ± 1
Metoda 2 Method 2	1170 ± 95 d	421 ± 4 c	100	100
Metoda 3 Method 3	1079 ± 151 d	431 ± 45 c	93 ± 20	102 ± 10
Metoda 4 Method 4	430 ± 6 b	310 ± 81 b	37 ± 4	74 ± 20
Metoda 5 Method 5	112 ± 3 a	104 ± 5 a	10 ± 1	25 ± 1

Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – wartości w kolumnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie przy  $\alpha = 0,05$ ,

a, b, c – values in one column denoted by the same letters do not statistically significantly differ at  $\alpha = 0.05$ .

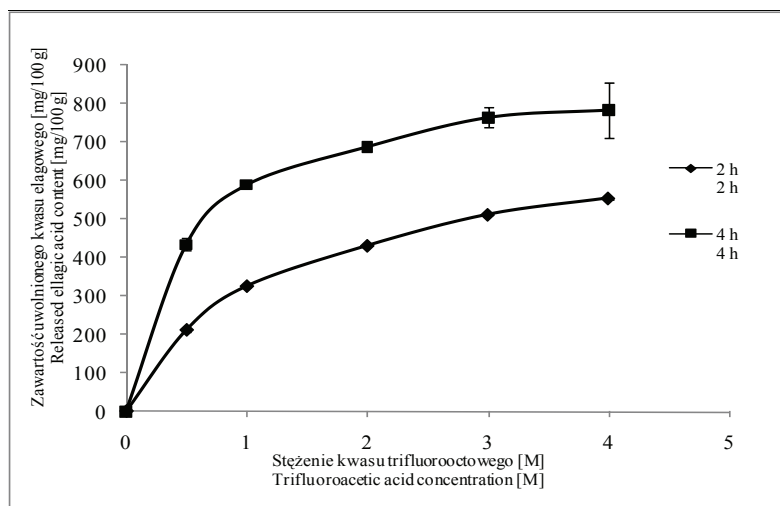


Wyniki przedstawione w tab. 1. wskazują na nieprzydatność metanolu i wodnych roztworów etanolu do ekstrakcji wielkocząsteczkowych pochodnych KE z wycieków i odtłuszczonych nasion truskawek. Wydajność jednokrotnej ekstrakcji ET metanolem, wspomaganej ultradźwiękami, w temperaturze pokojowej, w ciągu 30 min, była, w stosunku do trójstopniowej ekstrakcji acetonem, wielokrotnie niższa, tj. odpowiednio dziesięciokrotnie w przypadku wycieków i czterokrotnie w przypadku odtłuszczonych nasion. Mueller-Harvey [15] podkreśla, że metanol znajduje zastosowanie do izolowania tanin o niskiej masie cząsteczkowej, a do ekstrakcji wysokocząsteczkowych pochodnych KE zaleca stosowanie acetonu, z uwagi na mniejszą niż metanol czy woda podatność na reakcje z cząsteczkami tanin hydrolizujących. Taniny o dużej masie cząsteczkowej oraz związki o budowie oligomerycznej mogą być łatwo degradowane do związków o mniejszej masie cząsteczkowej nawet przez takie rozpuszczalniki, jak woda czy roztwory rozcieńczonych kwasów, szczególnie w podwyższonej temperaturze. Zastosowanie jako ekstrahenta wody w temp. 100 °C może powodować uwalnianie KE z ET [15].

Z uwagi na dwukrotnie większe zużycie rozpuszczalnika, wydłużenie czasu analizy oraz nieznaczny przyrost skuteczności stosowanie sześciokrotnej ekstrakcji acetonowej, w odniesieniu do trzykrotnej, nie jest analitycznie uzasadnione. W dalszym postępowaniu analitycznym do izolowania ET z badanego materiału stosowano trzykrotną ekstrakcję 70 % wodnym roztworem acetonu.

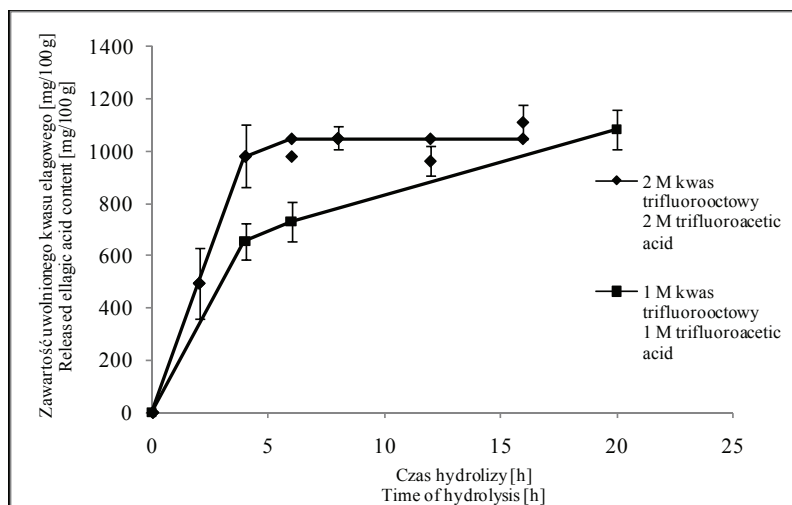
W następnym etapie doświadczeń badano przebieg hydrolizy ET wyekstrahowanych w najkorzystniejszych warunkach z wycieków i ogrzewanych w temp.  $95 \pm 1$  °C, przez 2 i 4 h, w 70 % wodnym roztworze glicerolu, zawierającym TFA w stężeniu odpowiednio: 0,5; 1; 2; 3; 4 mol/l (rys. 1.) oraz zależność stopnia hydrolizy ET od czasu, pod wpływem TFA o stężeniu 1 i 2 mol/l w 70 % glicerolu (rys. 2.). Z przebiegu zależności przedstawionych na rys. 1. wynika, że w zakresie stężeń 1 - 3 mol/l TFA użytego do hydrolizy, w wodnym 70 % glicerolu, występowała prostoliniowa zależność stężenia uwolnionego KE z ET i każde z tych stężeń czynnika hydrolizującego może być brane pod uwagę przy wyznaczaniu czasu niezbędnego do całkowitej hydrolizy. Ze względów praktycznych zasadne jest stosowanie stężenia 2 mol/l, które zapewnia należytą powtarzalność wyników.





Rys. 1. Wpływ stężenia kwasu trifluorooctowego na ilość uwolnionego kwasu elagowego w ciągu 2 i 4 h hydrolizy.

Fig. 1. Effect of trifluoroacetic acid concentration on content of released ellagic acid during 2 and 4 h lasting hydrolysis.



Rys. 2. Wpływ czasu hydrolizy w 1 M i 2 M roztworze kwasu trifluorooctowego na ilość uwolnionego kwasu elagowego.

Fig. 2. Effect of hydrolysis time in 1 M and 2 M trifluoroacetic acid solution on content of released ellagic acid.

Przebieg wykresów na rys. 2. wskazuje, że całkowita hydroliza ET wyekstrahowanych z wytlóków truskawkowych w 70 % wodnym roztworze glicerolu, zawierającym TFA w stężeniu 1 mol/l, w temp.  $95 \pm 1$  °C, następowała po około 20 h lub po 5 -

6 h, gdy hydroliza przebiegała w analogicznych warunkach w środowisku zawierającym TFA w stężeniu 2 mol/l. W roztworze o wyższym stężeniu TFA przebieg procesu był prostoliniowy do osiągnięcia około 90 % stopnia hydrolizy, zaś w stężeniu TFA 1 mol/l występowały dwie różne szybkości hydrolizy i cały proces przebiegał znacznie dłużej. Korzystny wpływ wyższego stężenia TFA w roztworach glicerolu może wynikać z ograniczenia ubytku TFA w procesach odparowania z parą wodną oraz zwiększenia rozpuszczalności KE jako produktu reakcji w mieszaninie glicerolu i TFA.

W procesie hydrolizy nie ma potrzeby stosowania specjalnych ampulek lub chłodnic zwrotnych, a ilość analitu jest dostosowana do potrzeb i wymagań efektywnej i bezpiecznej analizy chromatograficznej. Mieszanina po reakcji hydrolizy, po odpowiednim rozcieńczeniu metanolem i rutynowej filtracji, była stosowana do nastrzyku do układu chromatograficznego. Dotychczas brak jest danych w dostępnej literaturze o stosowaniu glicerolu jako rozpuszczalnika do hydrolizy estrów i glikozydów KE pod wpływem TFA. W literaturze znane są natomiast liczne opisy przebiegu hydrolizy ET z kwasem solnym [9, 23, 28, 29] lub TFA [7, 23, 24] w szerokim zakresie stężeń (od 1,2 do 4 M) i temperatury (85 - 120 °C) w ciągu 1 - 20 h. Zastosowanie do hydrolizy kwasu solnego wymaga jego neutralizacji (doprowadzenie do pH 2,5 wodorotlenkiem sodu) przed poddaniem próbki analizie HPLC [28, 29]. Takie postępowanie jest czasochłonne, a nadto skraca żywotność typowych kolumn chromatograficznych. Zastosowanie TFA, który często jest składnikiem faz ruchomych, nie wymaga dodatkowego oczyszczania, a jego obecność zwiększa rozpuszczalność KE w mieszaninie z glicerolem. Opracowany sposób hydrolizy ET wyodrębnionych z wyłoków truskawkowych jest możliwy do zastosowania w przeciętnie wyposażonym laboratorium chromatograficznym.

Współczynnik zmienności w przypadku KE uwolnionego z wyłoków truskawkowych, rozdrobionych po wysuszeniu do cząstek o średnicy 1 - 2 mm, wyniósł 11 %. Wynik ten można uznać za zadowalający, biorąc pod uwagę niejednorodność rozpatrywanego materiału, spowodowaną dużą zmiennością udziału nasion i miąższu. Hakkinen [9], dla zaproponowanej przez siebie metody hydrolizy, uzyskał współczynnik zmienności na poziomie 5,3 % w przypadku owoców truskawek oraz 6,0 % w przypadku malin. Procentowy odzysk wzorca KE w zaproponowanych warunkach hydrolizy, w stosunku do jego wyjściowej zawartości, wyniósł 99 %. Silva Pinto [23], stosując do hydrolizy 2 M TFA, uzyskała odzysk KE również na poziomie 99 %. Według Mangels [14] odzysk na poziomie 80 % jest akceptowalny.

Wyznaczone korzystne warunki ekstrakcji KE i jego pochodnych z wyłoków truskawkowych oraz opracowany sposób hydrolizy ET kwasem TFA w roztworze glicerolu zastosowano do oznaczenia tych substancji w typowych, ubocznych produktach przemysłowego przerobu truskawek. Za pomocą techniki HPLC oznaczono w ekstraktach wolny KE, a w roztworach po hydrolizie sumę kwasu wolnego i uwolnionego. Na

podstawie wyników analiz obliczono zawartość ET w sposób opisany w metodyce. Wyniki analiz przedstawiono w tab. 2. Zawartość wolnego KE w badanych, wysuszonych wyłokach pozbawionych nasion wyniosła 90 - 100 mg/100 g. Zawartość KE w wysuszonych odpadach z przecieraczek wahała się w granicach 31 - 151 mg/100 g i była istotnie różna w zależności od granulacji, a zwłaszcza składu morfologicznego.

Tabela 2

Zawartość wolnego i uwolnionego kwasu elagowego oraz stosunek kwasu elagowego wolnego do całkowitego w przemysłowych odpadach z przetwórstwa truskawek.

Content of free and released ellagic acid, as well as ratio of free ellagic acid to total ellagic acid in industrial by-products from strawberry processing.

Materiał Material	Kwas elagowy wolny Free ellagic acid	Kwas elagowy uwolniony Released ellagic acid	Elagotaniny w przeliczeniu na galloilo-HHDP-glukozę Ellagitannins expressed as galloyl-HHDP-glucose	Kwas elagowy wolny/kwas elagowy całkowity Free ellagic acid/ released ellagic acid
	[mg/100 g]			[%]
Wyłoki truskawkowe Ø 2-5 mm Strawberry pomace Ø 2-5 mm	90 ± 1 b	971 ± 99 c	1505 ± 154 c	8 ± 1 a
Wyłoki truskawkowe frakcja beznasienna Ø 1-2 mm Strawberry pomace, seedless fraction, Ø 1-2mm	100 ± 1 b	859 ± 81 b, c	1332 ± 126 b, c	10 ± 1 a
Osady z przecieraczek Ø > 1,2 mm Rubbing machine pomace, Ø > 1,2 mm	151 ± 8 c	683 ± 18 b	1059 ± 28 b	18 ± 1 b
Osady z przecieraczek Ø 0,6-1,2 mm Rubbing machine pomace, Ø 0,6-1,2 mm	31 ± 1 a	328 ± 9a	509 ± 14 a	8 ± 1 a

Objaśnienie jak pod tab. 1. / Explanatory note as in Tab. 1.

Odpady o granulacji 0,6 - 1,2 mm zawierały głównie nasiona, które były uboższe w ET niż beznasienna część wyłoków (tab. 1). Zawartość KE związanego w postaci estrów i glikozydów w badanych materiałach wyniosła od blisko 330 mg/100 g w odpadach z przecieraczek o granulacji 0,6 - 1,2 mm do 971 mg/100 g w wysuszonych wyłokach pozbawionych nasion i różniła się istotnie w każdej z grup tych sortymentów. Udział wolnego KE w sumie wolnego i uwolnionego wyniósł od 8 do 18 % i różnił się istotnie tylko w przypadku odpadów z przecieraczek o granulacji powyżej 1,2 mm. Według wyników badań Silva Pinto [24], procentowy udział wolnego KE w całkowitej ilości kwasu po hydrolizie wynosi od 3 do 8 % w owocach truskawek i od 1,2 do 10 % w dżemach truskawkowych. W zależności od materiału obserwowano od pięcio- do dziesięciokrotny wzrost ilości KE uwolnionego w wyniku hydrolizy wiązań estrowych w cząsteczkach ET. Jest to zgodne z wynikami badań Silva Pinto i wsp. [24], którzy w dżemach truskawkowych, po wykonaniu hydrolizy kwasowej, uzyskali ośmio- do czternastokrotny wzrost ilości KE w stosunku do materiału przed hydrolizą. Obliczony udział ET w wysuszonych materiałach, w przeliczeniu na  $\beta$ -galliolo-HHDP-D-glukozę, wyniósł 0,5 - 1,5 %. Wyłoki truskawkowe pozbawione nasion mogą być brane pod uwagę jako potencjalnie dobre źródło ET i KE. Godne uwagi jest również rozpatrzenie wykorzystania nasion także z tego samego względu.

### Wnioski

1. Wielokrotna i wspomagana ultradźwiękami, sukcesywna ekstrakcja wodnym 70 % roztworem acetonu w temp.  $22 \pm 2$  °C, umożliwiła ilościowe wyodrębnienie KE wolnego i związanego z wysuszonych wyłoków i odtłuszczonych nasion truskawek.
2. Związane formy KE, wyodrębnione z wysuszonych odpadów przerobu truskawek na soki i przeciery, uległy całkowitej hydrolizie podczas 6-godzinnego ogrzewania w temp.  $95 \pm 1$  °C, w 70 % wodnych roztworach glicerolu, zawierających TFA w stężeniu 2 mol/l.
3. Wysuszone wyłoki truskawkowe pozbawione nasion i wysuszone osady z przecierania zawierały od 0,5 do 1,5 % ET i mogą być brane pod uwagę jako potencjalnie dobre źródło ET i KE, których właściwości prozdrowotne są już znane.

### Literatura

- [1] Aaby K., Skrede G., Wrolstad R.E.: Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananasa*). J. Agric. Food Chem., 2005, **53**, 4032-4040.
- [2] Bala I., Bhardwaj V., Hariharan S., Ravi Kumar M.N.V.: Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. J. Pharm. Biomed. Anal., 2006, **40**, 206-210.
- [3] Bushman B.S., Phillips B., Isbell T., Ou B., Crane J.M., Knapp S.J.: Chemical composition of cranberry (*Rubus* spp.) seed and oils and their antioxidant potential. J. Agric. Food Chem., 2004, **52**, 7982-7987.

- [4] Carpita N.C.: Hemicellulosic polymers of cell-walls of *Zea coleoptiles*. *Plant Physiology*, 1983, **72**, 515-512.
- [5] Cerda B., Thomas-Barberan F.A., Espin J.C.: Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 227-235.
- [6] Daniel E.M., Krupnick A.S., Heur Y.H., Blinzler J.A., Nims R.W., Stoner G.D.: Extraction, stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *J. Food Compos. Anal.*, 1989, **2**, 338-349.
- [7] Godevac D., Tesevic V., Vajs V., Milosavljevic S., Stankovic M.: Antioxidant properties of raspberry seed extracts on micronucleus distribution in peripheral blood lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 2009, **47**, 2853-2859.
- [8] Grundhofer P., Niemetz R., Schilling G., Gross G.G.: Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolysable tannins. *Phytochemistry*, 2001, **57**, 915-927.
- [9] Hakkinen S.H., Karenlampi S.O., Mykkanen H.M., Heinonen I.M., Torronen A.R.: Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *Eur. Food. Res. Technol.*, 2000, **212**, 75-80.
- [10] Kalisz S., Marszałek K., Mitek M.: Badania nad wpływem dodatku preparatów pektyn wysoko metylowanych na parametry jakościowe nektarów truskawkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **6 (67)**, 129-139.
- [11] Kołodziejczyk K., Markowski J., Kosmala M., Król B., Płocharski W.: Apple pomace as a potential source of nutraceutical products. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2007, **57**, 291-295.
- [12] Lee J.H., Talcott S.T.: Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 361-366.
- [13] Maas J.L., Wang S.Y., Galletta G.J.: Evaluation of strawberry cultivars for ellagic acid content. *HortScience*, 1991, **26**, 66-68.
- [14] Mangels A.R., Holden J.M., Beecher G.R., Forman M.R., Lanza E.: Carotenoid content of fruit and vegetables: An evaluation of analytic data. *J. Am. Diet. Assoc.*, 1993, **93**, 256-384.
- [15] Mueller-Harvey I.: Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2001, **9**, 3-20.
- [16] Nawirska A., Sokół-Lętowska A., Kucharska A.Z.: Właściwości przeciwutleniające wyłoków z wybranych owoców kolorowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **4 (53)**, 120-125.
- [17] Okuda T., Yoshida T., Hatano T.: New methods of analyzing tannins. *J. Nat. Prod.*, 1989, **52**, 1-31.
- [18] 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.
- [19] Oszmiański J., Wojdyło A.: Comparative study of phenolic content and antioxidant activity of strawberry puree, clear and cloudy juices. *Eur. Food Res. Technol.*, 2009, **228**, 623-631.
- [20] *Rocznik Statystyczny*, Warszawa 2007, poz. 468.
- [21] Rój E., Dobrzyńska-Inger A., Kostrzewa D., Kołodziejczyk K., Sójka M., Król B., Miszczak A., Markowski J.: Otrzymywanie ekstraktów olejowych z nasion owoców jagodowych z wykorzystaniem CO<sub>2</sub> w warunkach nadkrytycznych. *Przem. Chem.*, 2009, **88/12**, 1325-1330.
- [22] Seeram N.P., Lee R., Scheller S., Heber D.: Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chem.*, 2006, **97**, 1-11.
- [23] Silva Pinto M., Lajolo F.M., Genovese M.I.: Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananasa* Duch). *Food Chem.*, 2008, **107**, 1629-1635.
- [24] Silva Pinto M., Lajolo F.M., Genovese M.I.: Bioactive compounds and antioxidant capacity of strawberry jams. *Plant Food Hum. Nutr.*, 2007, **62**, 127-131.
- [25] Tarko T., Sobusiak J., Duda-Chodak A.: Sposoby wykorzystania odpadów przemysłu owocowo-warzywnego. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2009, **3**, 32-34.

- [26] Wilson T.C., Hegerman A.E.: Quantitative determination of ellagic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, **38**, 1678-1683.
- [27] Vekiari S.A., Gordon M.H., Garcia-Macias P., Labrinea H.: Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit. *Food Chem.*, 2008, **110**, 1007-1011.
- [28] Vrhovsek U., Palchetti A., Reniero F., Guillou C., Masuero D., Mattivi F.: Concentration and mean degree of polymerization of *Rubus* ellagitannins evaluated by optimized acid methanolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 4469-4475.
- [29] Vrhovsek U., Giongo L., Mattivi F., Viola R.: A survey of ellagitannin content in raspberry and blackberry cultivars grown in Trentino (Italy). *Eur. Food. Res. Technol.*, 2008, **226**, 817-824.

#### MACRO- AND MICROELEMENTS IN DETERMINATION OF DIFFERENT FORMS OF ELLAGIC ACID IN BY-PRODUCTS FROM STRAWBERRY PROCESSING

##### S u m m a r y

The objective of the research was to select a solvent and the conditions for extracting ellagitannins (ET) from dried by-products from strawberry processing, as well as to develop a method for hydrolyzing ellagic acid (EA) esters in glycerol solutions of trifluoroacetic acid (TFA). Another equal objective was to determine the free and bond EA in some selected by-products from strawberry processing. The results obtained constituted a basis for the calculation of the ET content in the analyzed plant materials.

It was evidenced that a 70 % aqueous acetone solution, applied at a room temperature ( $22 \pm 2$  °C) to at least three-step extraction, made it possible to satisfactorily isolate EA and ET from dried strawberry pomace and from post-extraction strawberry achenes defatted under a supercritical CO<sub>2</sub> extraction process. It was proved that ET, if maintained at a temperature of  $95 \pm 1$  °C in a 70 % aqueous glycerol containing 2 M TFA for at least 6 hours, were completely hydrolyzed and the release of free EA occurred. The chromatograms were recorded of extract components before and after the hydrolysis using a HPLC method; this made it possible to determine the content of free and released EA in the selected strawberry by-products and to calculate a percent content of ET therein. It was found that, in the dried industrial seedless strawberry pomace, the content of free EA was below 100 mg/100 g and the content of released EA was about 900 mg/100 g, whereas the percent content of ET was 1.4 % m/m. In the dried industrial residues obtained from a rubbing machine, the content of free EA, released EA, and ET ranged from 30 to 150 mg/100 g, 300 to 600 mg/100 g, and 0.5 to 1.1 %, respectively.

**Key words:** strawberries, strawberry pomace, ellagic acid, ellagitannins, extraction, hydrolysis ☒