

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

ANALÝZA OBSAHU ANTOKYÁNŮV V BOBULIÁCH *Vaccinium corymbosum*, *Vitis vinifera* A *Aronia melanocarpa* Z VÝCHODNÉHO SLOVENSKA

ONDREJ RAGAČ^a, JANKA PORÁČOVÁ^b,
JANKA VAŠKOVÁ^c, MARTA MYDLÁROVÁ
BLAŠČÁKOVÁ^b a VINCENZO DE FEO^d

^a AtB Pharma s.r.o., 970 00 Slovenská Lupča, Slovenská republika, ^b Katedra biológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove, 17. novembra 1, 081 16 Prešov, Slovenská republika, ^c Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11 Košice, Slovenská republika, ^d Katedra farmácie, Univerzita v Salerne, Via Giovanni Paolo II, 132, 84084 Fisciano Salerno, Taliansko
janka.vaskova@upjs.sk

Došlo 27.6.19, prijaté 29.8.19.

Kľúčové slová: antokyány, čučoriedka, arónia, hrozno, MeOH extrakcia, lyofilizácia

Úvod

Antokyány, podskupina flavonoidov, sú široko distribuovanou skupinou vo vode rozpustných rastlinných pigmentov. Sú to glykozidy alebo acylglykozidy antokyanidínov odvodených z flavyliového iónu a tvoria polyhydroxy- a polymetoxyderiváty, kde stupeň ich chemickej modifikácie poskytuje vyššiu stabilitu a rozpustnosť^{1–3}. Najčastejšie prirodzene sa vyskytujúce antokyány sú kyanidín, delfidín, pelargonidín, malvidín, petunidín a peonidín⁴. Antioxidačná aktivita flavonoidov v živých systémoch bola dokázaná niekoľkými štúdiami, pričom táto aktivita silne koreluje s obsahom antokyanínov^{5,6}. Uvádza sa, že táto vlastnosť závisí, okrem iných faktorov, od druhu rastliny, zemepisného pôvodu a času zberu^{7,8}.

Niektoré výhody príjmu antokyanínov sa týkajú znižovania rizika „ochorení životného štýlu“⁹. Ich priaznivé účinky na znižovanie metabolických rizikových faktorov a rozvoj mŕtvice, srdcových ochorení a diabetu sú pripisované schopnosti zlepšiť antioxidačný stav, dyslipidémiu, zníženiu postprandiálnej glykémie, sekrécie inkretínu a inzulínu^{10–12}. Ich potenciál v prevencii ako aj v liečbe rakoviny je odvodený zo schopnosti modulovať mitochondriálne funkcie, čím ovplyvňujú energetický metabolizmus

buniek a potenciálne indukujú vnútorné cesty apoptózy^{13,14}. Okrem vnútorného použitia sa zistili aj priame foto-protetické účinky antokyanínov, pri priamom topickom použití¹⁵.

Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott patrí do čeľade Rosaceae a pochádza zo Severnej Ameriky, kde sa plody tradične používajú v ľudovom liečiteľstve na liečbu prechladnutia^{16,17}. V 20. storočí, okolo roku 1946, sa zaviedla ako odroda v Sovietskom zväze a vo východnej Európe^{16,18}. Bobule arónie majú najvyššiu antioxidačnú kapacitu spomedzi bobuľových a iných plodov, ktoré boli doteraz preskúmané¹⁹. Bobule arónie sa vyznačujú vysokým obsahom antokyanínov, prokyanidínov a fenolových kyselín^{20,21}. Kultivary boli pestované pre získanie väčšieho ovocia alebo ako okrasné rastliny. Medzi najvýznamnejšie kultivary v Európe patria „Nero“, „Rubina“, „Viking“, „Hugin“, „Fertödi“ a „Aron“¹⁷. *Vaccinium corymbosum* L. (syn. *V. coveleanum* Butkus et Pliszka) patrí do čeľade Ericaceae. Čučoriedky sú spomínané pre vysoký obsah antokyanínov, fenolových kyselín (benzoovej a škoricovej), flavanolov, flavonolov, prokyanidínov a stilbénov²². Špecifický obsah účinných látok je zaujímavý z hľadiska záhradníctva a pre ľahkú dostupnosť pre spotrebiteľov. Hrozno je jednou z najstarších rastlín pestovaných človekom²³. S cieľom zvýšiť odolnosť viniča voči určitým chorobám sa získali viaceré nové medzidruhové hybridy spätným krížením s európskymi odrodami *Vitis vinifera* L.²⁴. Antokyány sú hlavné flavonoidy zodpovedné za červenú farbu odrôd viniča vzhľadom na umiestnenie v koži bobúľ. Je dobre známe, že koncentrácia antokyanínu sa môže medzi rôznymi ročníkmi daného kultivaru značne líšiť v dôsledku environmentálnych a agronomických faktorov²⁵.

Vzhľadom na potenciálne zdravotné prínosy má analýza obsahu antokyanínov kľúčový význam, najmä pre ich použitie v potravinárskej a doplnkovej výrobe. V Európe sú predávané mnohé potravinové doplnky obsahujúce extrakty z týchto troch plodov, získané rôznymi postupmi. Cieľom tohto výskumu bolo porovnať dve metódy prípravy s ohľadom na obsah antokyanínov v troch komerčných kultivaroch týchto plodov.

Materiály a metódy

Rastlinný materiál a chemikálie

Zobieralo sa desať kilogramov z každého druhu bobúľ: *V. corymbosum* 'Berkeley' z Krivá na Orave (N49° 28'13", E19°47'34"); *A. melanocarpa* 'Nero', z Pozdišovce, (N48°71'83", E21°84'41"); *V. vinifera* 'Lemberger', z územia Prešovskej univerzity (N48°59'22", E21°13'35") na Slovensku. Chemikálie analytickej kvality boli zakúpené od Sigma-Aldrich (Nemecko).

Postup lyofilizácie a extrakcie

Po odstránení stoniek a iných častí rastlín sa plody rozomleli a homogenizovali. Do zásobníkov z nehrdzavejúcej ocele sa umiestnilo 187 g každého homogenátu a potom sa skladovalo v lyofilizátore GEA Lyophil SMART® SL 2 (Kolín, Nemecko). Parametre lyofilizačného procesu sú uvedené v tab. I, podľa postupu Michalczyka a spol.²⁶. Lyofilizáty a homogenáty čerstvého ovocia boli pripravené na extrakciu nasledovne: pomer extrahovateľného materiálu/rozpúšťadla bol 1:10; proces extrakcie rozpúšťadlom prebiehal počas jednej hodiny za stáleho miešania v zmesi metanol: voda: kyselina mravčia (70:29:1, v/v/v). Zmes sa potom ochladila na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, nasledovala filtrácia a kvantitatívny prenos s 10 ml metanolu do odparovacej banky. Konečný objem extraktu z rotačnej odparky bol 2 ml. Na kvantitatívny prenos výsledného zvyšku sa použili 3 ml 1% kyseliny mravčej v metanole a extrakty sa uskladnili v mrazničke pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Postup sa opakoval trikrát. Koncentrovanie extraktov sa uskutočnilo na rotačnej odparovačke: odparovanie sa začalo pri tlaku 10 až 15 kPa. Následne sa tlak znížil na asi 5 kPa. Konečné odparenie rozpúšťadla sa uskutočnilo pri zvyškovom tlaku asi 2,5 kPa.

Kvantitatívna a kvalitatívna analýza

ESI-LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Japonsko) prístroj bol použitý na kvalitatívne a kvantitatívne sledovanie antokyánov za nasledujúcich podmienok: HPLC: Shimadzu HPLC systém, systémový kontrolér: CMB – 20A, binárne čerpadlo LC – 20AB, automatický dávkovač SIL – 20A, stojan na vzorky – 1,5 ml /105 injekčných liekoviek, rúra:

Tabuľka I
Parametre lyofilizačného procesu

Krok	Teplota produktu [°C]	Tlak v komore [kPa]	Čas [min]
Nakladanie	5	100	–
Zmrazovanie	–23	100	60
Zmrazovanie	–23	100	120
Evakuácia	–23	20	30
Primárne sušenie	0	20	120
Primárne sušenie	0	20	615
Primárne sušenie	15	20	60
Primárne sušenie	15	20	555
Sekundárne sušenie	35	10	60
Sekundárne sušenie	35	10	540
Prevzdušňovanie		100	–
Trvanie procesu lyofilizácie			2160

CTO – 20A, LCMS: kolóna C18 ($150 \times 3\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), pH v rozmedzí 2–7, prietok: $0,8\text{--}1,2\text{ ml min}^{-1}$. MS: Shimadzu LCMS-IT-TOF®, softvér: LCMS Solution®, Formula predictor®.

Separácia antokyánov sa uskutočnila gradientovou chromatografiou na kolóne s reverznou fázou s použitím externého štandardu modifikovanou metódou pôvodne podľa Kšonžekovej a spol.²⁷. Vzhľadom k tomu, že medzi potenciálne zisťovanými antokyánmi sa vyskytuje viacero látok s identickou mólovou hmotnosťou, ako napr. kyanidín-3-*O*-galaktozid a kyanidín-3-*O*-glukozid, ktoré majú identickú hodnotu m/z iónov $[\text{M}+\text{H}]^+$, bolo nutné prispôbiť podmienky HPLC analýzy tak, aby tieto látky eluovali v odlišných časoch. Zloženie mobilnej fázy bolo nasledovné: A: acetonitril, B: kyselina mravčia vo vodnom roztoku (pH 2,35) $0,19\text{ mol dm}^{-3}$, prietok: $0,3\text{ ml min}^{-1}$, injekčný objem: $20\text{ }\mu\text{l}$, teplota kolóny: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, doba: 40 min ; priebeh gradientovej elúcie (čas A/B): $0,0\text{--}10,0\text{ min }10/90$, $10,0\text{--}20,0\text{ min }20/80$, $20,0\text{--}33,0\text{ min }50/50$, $33,0\text{--}40,0\text{ min }10/90$. Parametre kvalitatívnej analýzy pomocou hmotnostnej spektrofotometrie s elektrosprejovou ionizáciou boli nasledovné: teplota CDL: $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, prietok N_2 (nebulizér): $1,50\text{ l min}^{-1}$, N_2 (sušiaci plyn), tepelný blok: $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, čas analýzy: 40 min , MS s manuálnym skenovaním a rozsah analýzy: m/z $150,0000\text{--}800,0000$. Komerčne čisté antokyány (kyanidín-3-*O*-galaktozid, kyanidín-3-*O*-glukozid, malvidín-3-*O*-galaktozid, malvidín-3-*O*-glukozid, kyanidín-3,5-di-*O*-glukozid, kyanidín-3-*O*-glukozid, 3-*O*-rutinozid a pelargonidín-3-*O*-glukozid v koncentráciách $13,34\text{ mg l}^{-1}$, $95,2\text{ mg l}^{-1}$ a 667 mg l^{-1}) sa použili na overenie úplnej separácie na HPLC kolóne a tiež k informáciám o MS a MS^2 počas experimentu. Celkový obsah stanovených antokyánov bol vyjadrený ako mg ekvivalentov kyanidín-3-*O*-glukozidu na kg čerstvej hmotnosti (fresh weight, FW) zo spektrofotometricky stanovených koncentrácií vzoriek pri rozdielnom pH podľa nasledujúceho prepočtu: $(A \times M_w \times DF \times 10^3)/(\epsilon \times a)$. A predstavuje rozdiel absorbancií meraných pri 520 a 700 nm $(A_{520} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH4,5}}$. M_w – molekulová hmotnosť kyanidín-3-*O*-glukozidu ($449,2\text{ g mol}^{-1}$), DF – faktor riedenia, a – optická dĺžka kvety, ϵ – molárny absorpčný koeficient pre kyanidín-3-*O*-glukozid ($26900\text{ dm}^3\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$).

Štatistická analýza

Na štatistické vyhodnotenie účinnosti lyofilizačného procesu a porovnanie výťažnosti extrakcie rozpúšťadlom a lyofilizácie boli použité neparametrické Kruskal-Wallisove a Wilcoxonove testy (STATISTICA, Ver. 10 StatSoft, USA).

Výsledky

Kvalitatívna analýza

Rôzne antokyány boli identifikované pomocou LC-MS analýzy s použitím potvrdzovacieho algoritmu.

Hmotnostné spektrá antokyánov boli získané ionizáciou elektrosprejom v pozitívnom móde. V priebehu celého experimentálneho procesu v žiadnych bobuliach nebol nájdený ani kyanidín-3-*O*-rutinozid ani pelargonidín-3-*O*-glukozid (tab. II).

Kvantitatívna analýza

Stanovenie antokyánov sa uskutočnilo pomocou HPLC v reverznej fáze s gradientovou elúciou s použitím externej štandardnej kalibračnej krivky (obr. 1). Výsledný obsah pevnej látky po lyofilizácii bol $23,49 \pm 1,16$ g pre *V. corymbosum*, $34,29 \pm 0,36$ g pre *A. melanocarpa* a $40,59 \pm 0,79$ g pre *V. vinifera*, z počiatočnej celkovej hmotnosti 187 g homogénátu.

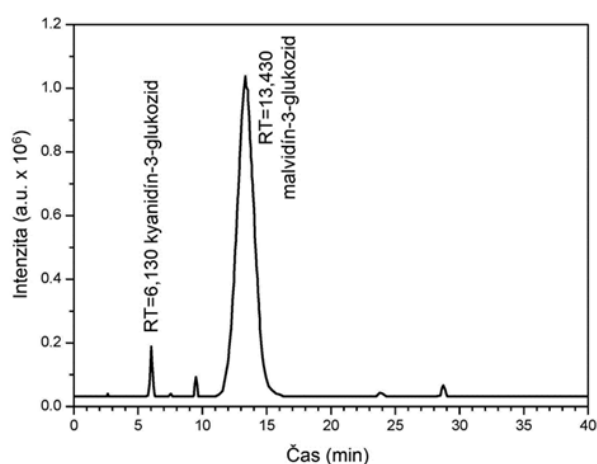
Výsledky ukazujú priemerný celkový obsah antokyánov v metanолоvom extrakte z hrozna $1576,3 \pm 132,5$ mg kg⁻¹ FW a s 2,1-násobným zvýšením, teda $3325,3 \pm 156,7$ mg kg⁻¹ FW v lyofilizáte. Pre antokyány čučoriedky bol priemerný obsah v metanолоvom extrakte $364,3 \pm 49,35$ mg kg⁻¹ FW na rozdiel od $2840,4 \pm 123,8$ mg kg⁻¹ FW v lyofilizovanom stave, s 7,8-násobným zvýšením pri lyofilizácii. Najvyššie množstvá antokyánov sme získali v extrakte z čučoriedok s hodnotami $3963,2 \pm 140,2$ mg kg⁻¹ FW a s 3,7-násobným zvýšením pri lyofilizácii ($14758,8 \pm 235,2$ mg kg⁻¹ FW).

Koncentrácie jednotlivých antokyanínov zistené v metanолоvých a lyofilizovaných extraktoch z troch typov bobúľ sú uvedené v tab. III. Najvyšší obsah antokyánu malvidín-3-*O*-glukozidu bol detegovaný v lyofilizátoch

Tabuľka II

Kvalitatívna analýza antokyánov v bobuliach – *Vaccinium corymbosum* L., *Vitis vinifera* L., *Aronia melanocarpa* L.

Antokyán	Retenčný čas [min]	Molekulárny ión	Fragmentačný ión
<i>V. corymbosum</i>			
Delfinidín + 3 hexózy	3,105	627,16	465,10 303,05
Delfinidín-3- <i>O</i> -galaktozid	3,118	465,10	303,05
Delfinidín-3- <i>O</i> -glukozid	3,905	465,10	303,05
Delfinidín-3- <i>O</i> -arabinozid	5,067	435,09	303,05
Kyanidín-3- <i>O</i> -galaktozid	5,290	449,11	287,06
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	6,023	449,11	287,06
Petunidín-3- <i>O</i> -galaktozid	6,083	479,12	317,07
Petunidín-3- <i>O</i> -glukozid	6,267	479,12	317,07
Kyanidín-3- <i>O</i> -arabinozid	7,334	419,09	287,06
Petunidín-3- <i>O</i> -arabinozid	8,954	449,11	317,07
Peonidín-3- <i>O</i> -galaktozid	9,233	463,13	301,07
Malvidín-3- <i>O</i> -galaktozid	10,91	493,13	331,08
Malvidín-3- <i>O</i> -glukozid	13,22	493,13	331,08
Malvidín-3- <i>O</i> -arabinozid	16,39	463,12	331,08
<i>V. vinifera</i>			
Delfinidín-3- <i>O</i> -glukozid	4,216	465,10	303,05
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	6,130	449,11	287,06
Petunidín-3- <i>O</i> -glukozid	7,156	479,12	317,07
Peonidín-3- <i>O</i> -glukozid	11,45	463,13	301,07
Malvidín-3- <i>O</i> -glukozid	13,43	493,13	331,08
<i>A. melanocarpa</i>			
Kyanidín-3,5- <i>O</i> -diglukozid	4,305	611,16	449,11 287,06
Kyanidín-3- <i>O</i> -galaktozid	5,290	449,11	287,06
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	6,023	449,11	287,06
Kyanidín-3- <i>O</i> -arabinozid	7,188	419,09	287,06
Kyanidín + pentóza	12,57	419,09	287,06



Obr. 1. Ukážka HPLC analýzy obsahu antokyánov v čerstvých bobuliach viniča. Podmienky uvedené v texte

V. corymbosum a *V. vinifera*. Podobne vysoký obsah kyanidín-3-*O*-galaktozidu a kyanidín-3-*O*-glukozidu bol nájdený v metanolovom extrakte z plodov *A. melanocarpa*. Zďaleka najvyšší obsah antokyánov, kyanidín-3-*O*-glukozidu a kyanidín-3-*O*-galaktozidu bol nájdený v lyofilizovaných čučoriedkach. Hodnoty kyanidín-3-*O*-glukozidu sa použili na kvantitatívne hodnotenie lyofilizovaných a metanolových extraktov Kruskal-Wallisovým testom^{28–30} vo všetkých extraktoch. Jeho obsah sa výrazne líšil v extraktoch ($df = 2$, $N = 15$, $12,3750$, $p = 0,0021$) po viacnásobnom porovnaní hrozno/arónia, ako aj po viacnásobnom porovnaní čučoriedky/arónia ($df = 2$, $N = 15$, $12,5000$, $p = 0,0019$).

Extrakty z arónie, buď metanolové extrakty alebo lyofilizáty, vykazovali najvyšší obsah kyanidín-3-*O*-glukozidu. Priemerná hodnota metanolových extraktov bola $1488,2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FW}$ a lyofilizátov $5492,7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FW}$, čo predstavuje 3,7-násobné zvýšenie (tab. III). Pre čučoriedky bol nárast obsahu kyanidín-3-*O*-glukozidu v lyofilizátoch približne 1,6-násobný, s priemernými hodnotami pre extrakty metanolu $33,76 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FW}$ a $54,01 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FW}$ pre lyofilizáty (tab. III). Najvyššie množstvá boli zistené v hrozne, kde obsah kyanidín-3-*O*-glukozidu v metanolovom extrakte bol $12,71 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FW}$ a $178,8$

Tabuľka III

Štatistické vyhodnotenie obsahu antokyánov (mg/kg FW) v extraktoch z procesu extrakcie rozpúšťadlom a lyofilizácie

Antokyány	MeOH extrakcia			Lyofilizácia		
	stredná hodnota (min-max)	SD	CV [%]	stredná hodnota (min-max)	SD	CV [%]
<i>Vaccinium corymbosum</i> 'Berkeley'						
Kyanidín-3- <i>O</i> -galaktozid	64,46 (61,15–71,46)	4,77	7,40	537,7 (485,7–586,3)	44,03	8,18
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	33,76 (28,74–39,00)	4,74	14,05	54,01 (30,89–64,87)	14,20	26,30
Malvidín-3- <i>O</i> -galaktozid	230,0 (200,1–282,3)	36,57	15,90	2071,4 (1870,0–2266,2)	161,9	7,81
Malvidín-3- <i>O</i> -glukozid	36,05 (32,99–38,10)	2,38	6,62	177,3 (151,3–204,9)	18,98	10,70
<i>Vitis vinifera</i> 'Lemberger'						
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	12,71 (10,53–16,04)	2,17	17,06	178,8 (89,40–308,9)	85,05	47,57
Malvidín-3- <i>O</i> -glukozid	536,2 (436,8–721,5)	122,9	21,81	3146,5 (2283,1–3674,1)	521,5	16,57
<i>Aronia melanocarpa</i> 'Nero'						
Kyanidín-3,5- <i>O</i> -diglukozid	13,37 (12,61–14,55)	0,69	5,16	76,51 (74,61–78,36)	1,47	1,92
Kyanidín-3- <i>O</i> -galaktozid	2461,7 (2170,3–2666,3)	169,1	6,86	9189,6 (8930,9–9662,6)	276,8	3,01
Kyanidín-3- <i>O</i> -glukozid	1488,2 (1306,0–1687,9)	147,8	9,92	5492,7 (4849,5–6797,5)	770,0	14,01

mg kg⁻¹ FW v lyofilizáte, čo predstavuje približne 14,06-násobné zvýšenie (tab. III). Wilcoxonov test ukázal závislosť medzi obsahom antokyánov a extrakčnou metódou z arónie a hrozna ($p = 0,043$).

Napriek tomu, že proces lyofilizácie vedie k zvýšeniu obsahu antokyánov vo všetkých extraktoch. Výsledky ukázali, že počas lyofilizačného procesu dochádza k degradácii významného množstva kyanidín-3-glukozidu. Potvrzuje to relatívne vysoký variačný koeficient (tab. III) pre obsah kyanidín-3-*O*-glukozidu v metanolových extraktoch a lyofilizátoch (14,05–26,30 % pre čučoriedky, 17,6–47,58 % pre hrozno a 9,92–2,14 % pre arónie). Koeficienty variácie pre ostatné antokyány boli v rozpätí od 1,925 do 9,928 % pre arónie, 16,57–21,82 % pre hrozno a 7,407–15,90 % pre čučoriedky.

Diskusia

Antokyány sú veľmi dobre rozpustné v polárnych rozpúšťadlách, ľahko sa extrahujú vodou, metanolom a etanolom². Konkrétne sa zistilo, že metanol je vo všeobecnosti účinnejší pri extrakcii polyfenolov s nižšou molekulovou hmotnosťou, pričom sa dosiahli najlepšie výtazky extrakcie antokyánov pridaním slabých organických kyselín, ako je kyselina mravčia, kyselina octová atď., ktoré zabraňujú ich oxidácii³¹. Hua a spol.³² a Thao a spol.³³ určili pre extrakciu antokyánov najlepšie pomery rozpúšťadla/suroviny v pomere 1:10 a 1:20. V našej štúdiu bola taktiež dodržaná odporúčaná doba extrakcie 60 min (cit.³⁴). Účelom štúdie bolo porovnať účinnosť extrakcie rozpúšťadlom a lyofilizácie pre tri druhy bobúľ stanovením obsahu celkových antokyánov.

Výsledky niekoľkých štúdií zhrnutých Jovančevićom a spol.³⁵ sa zhodujú, že čučoriedky sú charakteristické 15 antokyánovými glykozidmi (5 antokyánov je kombinovaných s galaktózou, glukózou a arabinózou). Koncentrácie antokyánov môžu byť ovplyvnené podmienkami prostredia a genetickými rozdielmi. Stupeň ich akumulácie však závisí predovšetkým od svetelných podmienok a nízkych teplôt. U *V. corimbosum* sme zistili prítomnosť piatich antokyánov v kombinácii s vyššie uvedenými sacharidmi. Obsah antokyánov súhlasí so zisteniami Diaconea a spol.³⁶, pričom ich množstvo sa líši medzi odrodami. V porovnaní so štúdiou Pereira a spol.³⁷ bol obsah malvidínu-3-*O*-galaktozidu najvyšší (tab. III); avšak peonidín-3-*O*-arabinóza zistená nebola. Naše výsledky potvrdzujú úspešnosť metódy extrakcie rozpúšťadlom. Celkový obsah antokyánov v lyofilizovaných extraktoch predstavoval 7,8-násobné zvýšenie obsahu v porovnaní s extrakciou rozpúšťadlom.

Najvyšší obsah jednotlivých antokyánov bol zistený v bobuliach arónie 'Nero'. Extrakty vykazovali najvyšší obsah nielen v metanolovom extrakte (3963,2 mg kg⁻¹ FW), ale aj v lyofilizovanom stave (14758,8 mg kg⁻¹ FW), kde sa celkový obsah zvýšil až na 3,7-násobok. Arónie patria k najbohatším rastlinným zdrojom antokyánov, ktoré obsahujú najmä glykozidy, predstavujúce približne

25 % celkového obsahu polyfenolov^{38,39}. V našej štúdiu sme našli len kyanidínové glykozidy. Hoci množstvo antokyánov z extrakcie rozpúšťadlom (3963,2 mg kg⁻¹ FW) je nižšie ako množstvo stanovené pre kultivar 'Nero' z rôznych oblastí, ako je uvedené v Hwang a Thi⁴⁰, vysoký obsah kyanidínu-3-*O*-galaktozidu je totožný s údajmi uvádzanými pre koncentrát šťavy z arónie⁴¹. V našej štúdiu však bolo zistené množstvo kyanidín-3-*O*-galaktozidu v lyofilizovaných extraktoch oveľa vyššie ako najvyššie množstvá detegované Hwangom a Thi⁴⁰ z oblasti Sangju. Najvyšší obsah bol pozorovaný pre kyanidín-3-*O*-glukozid. Bolo ho len asi trojnásobne menej ako kyanidín-3-*O*-galaktozidu, ale v uvedených štúdiách bol obsah až 15 až 20× nižší.

Podobne sme zistili prítomnosť kyanidín-pentóz. Hoci Brazdauskas a spol.⁴² identifikovali iné antokyány, ako je napríklad delfinidín arabinozid, petunidín *p*-kumaroylglukozid alebo peonidín-glukozid, rozdiel je v množstve diglukozidu. Identifikovali sme antokyány glykozylované iba glukózou (tab. III) a nižším množstvom kyanidínu v hrozne cv 'Lemberger', ako už bolo uvedené v extraktoch z celých bobúľ z rôznych odrôd červeného hrozna²⁵. Podľa zistených profilov antokyánov v tejto štúdiu, antokyány s kyanidínom sa vyskytovali v odrodách *V. vinifera* v nižších množstvách. Priemerné množstvá jednotlivých pigmentov boli 49 % malvidín-3-*O*-glukozidu, 12 % malvidín-3-*O*-(6'-*O*-kumaroyl)glukozidu, 10 % peonidín-3-*O*-glukozidu, 6 % petunidínu-3-*O*-glukozidu a 6 % delfinidín-3-*O*-glukozidu, s významným obsahom malvidín-3-*O*-glukozidu. Po procese lyofilizácie sa v porovnaní s metanolovým extraktom pozoroval viac ako 5-násobný nárast (tab. III). Výsledky našej štúdie sú podobné zisteniam Lukića a spol.⁴³. V porovnaní s kvantifikovaným obsahom tej istej odrody sa zistili vyššie hladiny kyanidín-3-*O*-glukozidu⁴⁴.

Výťažok lyofilizácie sa medzi plodmi líšil. Ako vyplýva zo štatistického spracovania, táto skutočnosť bola ovplyvnená viacerými faktormi; najmä zložením lyofilizovaných plodov. Plody čučoriedky sa skladajú najmä z pokožky a dužiny, pričom podstatná časť matrix je voda. Bobule hrozna však obsahuje okrem pokožky a dužiny aj jadierka, ktoré zvyšujú hmotnosť lyofilizačného produktu, čím ovplyvňujú účinnosť lyofilizačného procesu. Lyofilizáty však tiež vykazovali niekoľkokrát vyššie množstvá antokyánov. Bolo pozorované, že zahrievanie na 40–60 °C významne neovplyvňuje celkovú koncentráciu antokyánov⁴⁵, naopak, ohrev na teploty nad 60 °C celkovú koncentráciu antokyánov môže ovplyvniť. Dokonca bolo preukázané, že nižší tlak pri procese sušenia vymrazovaním zvyšuje degradáciu⁴⁶.

Záver

Množstvo a zloženie antokyánov ukázané v predchádzajúcich štúdiách sa líši aj v rámci odrôd. Z výsledkov štúdie vyplýva, že aj keď je celkový obsah antokyánov v lyofilizovaných extraktoch niekoľkonásobne vyšší

v porovnaní s extrakciou rozpúšťadlom, hodnoty štandardnej odchýlky a variačného koeficientu zo štatistického vyhodnotenia a tiež z relatívnych pomerov koncentrácií jednotlivých antokyánov v metanolových extraktoch v porovnaní s lyofilizátmi poukazujú na fakt, že degradácia významného množstva glukozidov (najmä kyanidín-3-O-glukozidu) počas procesu lyofilizácie je zrejmä.

Radi by sme sa poďakovali doc. prof. R. Mariychukovi za jeho skúsenosti a cenné pripomienky k procesu extrakcie.

Tento výskum bol podporený projektom KEGA 018PU-4/2018: Inovácia metód a foriem vyučovania predmetu biochémie.

LITERATÚRA

- Dia V. P., Wang Z., West M., Singh V., West L., Gonzalez de Mejia E.: *J. Agric. Food Chem.* **64**, 3205 (2015).
- Lima A. B., Corrêa A. D., Saczk A. A., Martins M. P., Castilho R. O.: *Rev. Bras. Frutic.* **33**, 877 (2011).
- Zhao C. L., Yu Y. Q., Chen Z. J., Wen G. S., Wei F. G., Zheng Q., Wang C. D., Xiao X. L.: *Food Chem.* **214**, 119 (2017).
- Trouillas P., Sancho-Garcia J. C., De Freitas V. A., Gierschner J., Otyepka M., Dangles O.: *Chem. Rev.* **116**, 4937 (2013).
- Domoráková I., Burda J., Mechírová E., Feriková M.: *Cell. Mol. Neurobiol.* **26**, 1193 (2006).
- Kucharska A. Z., Sokół-Łętowska A., Oszmiański J., Piórecki N., Fecka I.: *Molecules* **22**, E045 (2017).
- Kapci B., Neradová E., Čížková H., Voldřich M., Rajchl A., Capanoglu E.: *J. Food Nutr. Res.* **52**, 219 (2013).
- Zafra-Stone S., Yasmin T., Bagchi M., Chatterjee A., Vinson J. A., Bagchi D.: *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 675 (2007).
- Cassidy A., Bertoia M., Chiuve S., Flint A., Forman J., Rimm E. B.: *Am. J. Clin. Nutr.* **104**, 587 (2016).
- Alvarez-Suarez J. M. a 12 spoluautorov: *J. Nutr. Biochem.* **25**, 289 (2014).
- Castro-Acosta M. L., Smith L., Miller R. J., McCarthy D. I., Farrimond J. A., Hall W. L.: *J. Nutr. Biochem.* **38**, 154 (2016).
- Liu C., Sun J., Lu Y., Bo Y.: *PLoS One* **11**, e0162089 (2016).
- Forbes-Hernandez T. Y., Giampieri F., Gasparrini M., Mazzoni L., Quiles J. L., Alvarez-Suarez J. M., Battino M.: *Food Chem. Toxicol.* **68**, 154 (2014).
- Pistollato F., Giampieri F., Battino M.: *Food Chem. Toxicol.* **75**, 58 (2015).
- Gasparrini M., Forbes-Hernandez T. Y., Afrin S., Alvarez-Suarez J. M., González-Paramás A. M., Santos-Buelga C., Bompadre S., Quiles J. L., Mezzetti B., Giampieri F.: *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 17870 (2015).
- Kokotkiewicz A., Jaremicz Z., Luczkiewicz M.: *J. Med. Food* **13**, 255 (2010).
- Kulling S. E., Rawel H. M.: *Planta Med.* **74**, 1625 (2008).
- Valcheva-Kuzmanova S. V., Belcheva A.: *Folia Med.* **48**, 11 (2006).
- Zapolska-Downar D., Bryk D., Małecki M., Hajdukiewicz K., Sitkiewicz D.: *Eur. J. Nutr.* **51**, 563 (2012).
- Skrovankova S., Sumczynsk D., Mice J., Jurinkov T., Sochor J.: *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 24673 (2015).
- Yamane T., Kozuka M., Yamamoto Y., Nakano Y., Nakagaki T., Ohkubo I., Ariga H.: *Funct. Foods Health Dis.* **6**, 144 (2016).
- Contreras R. A., Köhler H., Pizarro M., Zúñiga G. E.: *Antioxidants* **4**, 281 (2015).
- Vanini L. S., Hirata T. A., Kwiatkowi A., Clemente E.: *Braz. J. Food Technol.* **12**, 213 (2009).
- Kozma P. Jr.: *Acta Hort.* **528**, 505 (2000).
- Balík J., Kumšta M., Rop O.: *Chem. Pap.* **67**, 1285 (2013).
- Michalczyk M., Macura R., Matuszak I.: *J. Food Process. Preserv.* **33**, 11 (2009).
- Kšonžeková P., Mariychuk R., Eliašová A., Mudroňová D., Csank T., Király J., Marcincáková D., Pistl J., Tkáčiková L.: *J. Sci. Food Agric.* **96**, 1093 (2016).
- Aschenbach J. R., Borau T., Gäbel G.: *J. Nutr.* **132**, 1254 (2002).
- Chan Y., Walmsley R. P.: *Phys. Ther.* **77**, 1755 (1997).
- Ostertagova E., Ostertag O.: *Appl. Mech. Mat.* **611**, 115 (2014).
- Dai J., Mumper R. J.: *Molecules* **15**, 7313 (2010).
- Hua Z., Yuesheng D., Ge X., Menglu L., Liya D., Li Jia A., Zhilong X.: *J. Chromatogr. Sep. Tech.* **4**, 167 (2013).
- Thao N. L. T., Thoa D. T. K., Thang L. P., Xi T. T. U., Mai D. S., Tram N. T. N.: *J. Food Nutr. Sci.* **3**, 45 (2015).
- Michiels J. A., Kevers C., Pincemail J., Defraigne O., Dommès, J.: *Food Chem.* **130**, 986 (2012).
- Jovančević M., Balijagić J., Menković N., Šavikin K., Zdunić G., Janković T., Dekić-Ivanković M.: *J. Med. Plants Res.* **5**, 910 (2011).
- Diaconeasa Z., Leopold L., Ruginã D., Ayvaz H., Socaciu C.: *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 2352 (2015).
- Pereira S. R., Pereira R., Figueiredo I., Freitas V., Dinis T. C. P., Almeida L. M.: *PLoS One* **12**, e0174116 (2017).
- Jakobek L., Seruga M., Medvidovic-Kosanovic M., Novak I.: *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **103**, 58 (2007).
- Oszmiański J., Wojdylo A.: *Eur. Food Res. Technol.* **221**, 809 (2005).
- Hwang E. S., Thi N. D.: *Prev. Nutr. Food Sci.* **25**, 255 (2016).
- Baum J. I., Howard L. R., Prior R. L., Lee S. O.: *J. Berry Res.* **6**, 203 (2016).
- Brazdauskas T., Montero L., Venskutonis P. R., Ibañez E., Herrero M.: *J. Chromatogr. A* **1468**, 126 (2016).

43. Lukić I., Budić-Leto I., Bubol M., Damijanić K., Staver M.: *Food Chem.* 224, 251 (2017).
44. Kumšta M., Pavloušek P., Kárník P.: *Food Technol. Biotechnol.* 52, 383 (2014).
45. Khanal R. C., Howard L. R., Prior R. L.: *Food Res. Int.* 43, 1464 (2010).
46. Buckow R., Kastell A., Terefe N. S., Versteeg C.: *J. Agric. Food Chem.* 58, 10076 (2010).

O. Ragač^a, J. Poráčová^b, J. Vašková^c, M. Mydlárová Blaščáková^b, and V. de Feo^d (^a*AtB Pharma Ltd., Slovenská Lupča, Slovak Republic*, ^b*Department of Biology, Faculty of Humanities and Natural Sciences, University of Prešov, Prešov, Slovak Republic*, ^c*Department of Medical and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Pavol Jozef Šafárik University in Košice, Košice, Slovak Republic*, ^d*Department of Pharmacy, University of Salerno, Fisciano Salerno, Italy*): **Analysis of Anthocyanin Content of *Vaccinium corymbosum*, *Vitis vinifera* and *Aronia melanocarpa* from East Slovakia**

Biologically active natural compounds (e.g., isoprenoids, flavonoids, anthocyanins, alkaloids, organic acids,

coumarins, etc.) have proven significant preventive and curative effects in various diseases. In the present study, we have provided a qualitative and quantitative monitoring of anthocyanins in a methanolic extract and a freeze-dried extract of three fruits rich in anthocyanin: blueberries of *Vaccinium corymbosum* “Berkeley”, grapes of *Vitis vinifera* “Lemberger” and chokeberries of *Aronia melanocarpa* “Nero”. The identification of anthocyanins was carried out by the reverse phase liquid chromatography and mass spectrometry. The results indicated that the average content of anthocyanins in the methanolic extract was lower than in the freeze-dried extract. The highest content of anthocyanins was obtained in chokeberry extracts. The process of freeze-drying, however, leads to changes that probably affect the biological activity via changes in the ratio of biologically active compounds.

Keywords: anthocyanins, blueberry, aronia, grape, MeOH extraction, lyophilisation

Acknowledgments

This study was supported by project KEGA 018PU-4/2018: Innovation of methods and forms of teaching the subject biochemistry.