

Identifikacija karakterističnih antocijanina u proizvodima dobijenim iz ploda aronije tehnikom visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC)

Nada Pavičić¹,
Ivan Velikinac¹,
Tamara Miladinović¹

¹Kontrola kvaliteta, Pharmanova d.o.o.,
Industrijska 8, Obrenovac, Srbija

Rad primljen: 12.20.2015.

Autor za korespondenciju:

Nada Pavičić
e-mail: nadapavicic@pharmanova.com

Kratak sadržaj

Plod aronije ima široku primenu kao boja i korigens ukusa u prehrambenoj industriji, zbog svojih adstringentnih osobina i tamnoljubičaste boje. Ova biljka ima dugogodišnju primenu u tradicionalnoj medicini u Evropi i Severnoj Americi, i postoje brojne naučne studije o njenim farmakološkim efektima. Plodovi su bogati fenolnim sastojcima (procijanidinima, antocijaninima i fenolnim kiselinama). Poznato je da ovi sastojci imaju osobine antioksidanasa, i stoga imaju primenu u prevenciji srčanih, inflamatornih i malignih bolesti. Antocijanini su biljni pigmenti široko rasprostranjeni u obojenom voću i cveću. Količina i sastav u bobicama se razlikuju u odnosu na biljnu vrstu, način uzgajanja i obrade. U poređenju sa ostalim bobicama i voćem, aronija ima jednostavan sastav antocijanina, koji uglavnom čine cijanidin glikozidi. Cilj ovog rada je bio identifikacija karakterističnih antocijanina u proizvodima od aronije i razlikovanje aronije od drugih biljnih izvora sličnog sastava. Za dobijanje karakterističnog hromatografskog fingerprinta korišćena je HPLC/PDA tehnika. Na hromatogramu rastvora uzorka aronije, karakteristična su četiri pika, koji odgovaraju pikovima glavnih antocijanina aronije (cijanidin-arabinozid, cijanidin-glukozid, cijanidin-galaktozid i cijanidin-ksilozid). Na hromatogramima dobijenim iz rastvora drugih uzoraka, razlikuje se distribucija pikova. Ima više pikova, na različitim retencionim vremenima, i nema pikova karakterističnih antocijanina aronije. Ovo ukazuje da se navedna metoda može primeniti za razlikovanje preparata aronije od mogućih falsifikata.

Cljučne reči: Aronia melanocarpa, antocijanini, hromatografija

UVOD

Biljke iz roda Aronia, familija Rosaceae potiču iz istočnih predela Severne Amerike i Kanade, u Evropu je doneta početkom XX veka. Aronia melanocarpa je žbunasta biljka, raste 2-3 m u visinu, cveta od maja do juna. Štitaste cvasti sa 30-tak sitnih belih cvetova, sazrevaju u crvene do ljubičasto-crne bobice. Plodovi se sakupljaju u avgustu i septembru [1]. Danas se gaji u zemljama Istočne Evrope i Nemačkoj, uglavnom vrsta Aronia melanocarpa. Biljka ne zahteva poseban tretman prilikom uzgoja: štetočine je retko ugrožavaju, upotreba mineralnih đubriva povećava prinos, ali ne i sadržaj farmakološki aktivnih jedinjenja [2]. Koristi se u prehrambenoj industriji kao boja i aroma, a poslednjih decenija postaje atraktivna i zbog svojih lekovitih osobina.

Antocijanini su biljni pigmenti široko rasprostranjeni u obojenim plodovima i cvetovima biljaka. Ispoljavaju značajnu antioksidantnu aktivnost i sposobnost da vezuju slobodne radikale, čime se može objasniti njihov doprinos u prevenciji kardiovaskularnih, malignih i inflamatornih bolesti. Plodovi (bobice) aronije, borovnice, crne ribizle, zove, sadrže antocijanine u visokom procentu. Zato se ovo voće često koristi kao biološki izvor aktivnih principa u sastavu biljnih lekovitih proizvoda i dodatka ishrani.

Sastav i odnos pojedinih antocijanina specifičan je za različite biljne vrste, a može zavistiti od uslova kultivacije i obrade biljnog materijala [3].

Nema dostupnih podataka o farmakološkoj aktivnosti aronije iz kliničkih studija na ljudima, ali su dostupni izveštaji iz studija na in vitro i animalnim modelima. Jedna skorašnja studija pokazala je da sveži plodovi aronije imaju najveću sposobnost za neutralisanje slobodnih radikala u poređenju sa plodovima drugih biljnih vrsta [1]. Mehanizam kojim se ostvaruje aktivnost može se objasniti prisustvom o-dihidroksifenil grupe u molekulima procijanidina i antocijanidina, koji mogu da grade helatne komplekse sa jonima teških metala (Fe, Cu) [4]. Izveštaji iz različitih in vitro studija ukazuju da antocijanini ispoljavaju sledeća dejstva: inhibiraju lipidnu peroksidaciju, aktiviraju enzime uključene u antioksidativni sistem, suzbijaju proliferaciju i stimulišu apoptozu malignih ćelija, deluju antimutageno, hepatoprotektivno, zaštitno na endotelijalne ćelije srca.

U plodovima aronije suva materija čini 17-29%, od toga 5-10% u vodi nerastvorne supstance. Glavni sastojci ploda su dijetetska vlakna (celuloza, pektini, lignini) oko 5%, organske kiseline (jabučna i limunska kiselina) 1-1,5%, redukujući šećeri (glukoza i fruktoza) 16-18%, lipidi, proteini, minerali (K i Zn) i vitamini [1].

Najvažniji sastojci ploda aronije, odgovorni za njenu farmakološku aktivnost, su fenolna jedinjenja: procijanidini (epikatehini), fenolne kiseline (hlorogenska i neohlorogenska), antocijanini (cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-galaktozoid, cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-ksilozid) i flavonoli (derivati kvercetina: kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-rutinozid) [3]. Ne postoji opšteprihvaćen zahtev za sadržaj polifenola u oficijelnoj literaturi. Takođe, u literaturi se pominju različite tehnike kojima se mogu ispitivati (spektrofotometrijski, HPLC/DAD, HPLC/ESI-MS), koje daju različite i često neuporedive rezultate.

Antocijanidini (cijanidin, delfinidin, petunidin) su klasa flavonoida od kojih potiče boja plodova. U biljkama su prisutni u vidu heterozida - antocijanina, koji za aglikon imaju vezanu šećernu komponentu (glukozu, galaktozu, arabozu) [5]. *Aronia melanocarpa* je jedan od najbogatijih izvora antocijanina i oni predstavljaju glavnu karakteristiku kvaliteta kojoj se teži tokom kultivacije i prerade biljnog materijala [2]. Čine oko 25% ukupnih polifenola, a najviše je zastupljen cijanidin-3-galaktozid (Tabela 1). Kvalitativni i kvantitativni sastav ovih jedinjenja isti je i u proizvodima od ploda aronije.

Sastav i međusobni odnos antocijanina u aroniji i sličnim plodovima specifičan je za svaku

biljnu vrstu. Npr. ekstrakti ploda dve vrste borovnice, *Vaccinium myrtillus* i *Vaccinium ashei*, sadrže trinaest identičnih antocijanina, ali u različitom odnosu. Crna ribizla (*Ribes nigrum*) ima šest, a zova (*Sambucus nigra*) dva karakteristična antocijanina [3].

Tema ovog rada je primena metode zasnovane na visoko-efikasnoj tečnoj hromatografiji za ispitivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava karakterističnih antocijanina u proizvodima dobijenim iz ploda aronije (sok, ekstrakt, sirup). Razmotrena je mogućnost primene hromatografskog fingerprinta za njihovo razlikovanje od eventualnih falsifikata, proizvoda dobijenih iz drugih botaničkih izvora sličnog sastava.

MATERIJALI I METODE

Za ispitivanje uzoraka korišćena je HPLC/DAD metoda objavljena u monografiji za ekstrakt borovnice (Powdered Bilbery Extract) USP36/NF31.

Uslovi hromatografskog sistema

Gradijentna elucija sa mobilnim fazama A - mravlja kiselina/voda (1/9) i B - acetonitril/metanol/mravlja kiselina/voda (45/45/20/80), po programu datom u Tabeli 3.

Razdvajanje se vrši na koloni C18, dimenzija 4,6x250mm, sa veličinom čestica 5µm, temperiranoj

Tabela 1: Sadržaj antocijanina u plodu aronije(1)

Antocijanin	Sadržaj (%)
cijanidin-3-O-galaktozoid	68,9
cijanidin-3-O-arabinozid	27,5
cijanidin-3-O-glukozid	1,3
cijanidin-3-O-ksilozid	2,3

Tabela 2: Sastav antocijanina u plodovima različitih biljnih vrsta dobijen HPLC/PDA/ESI-MS tehnikom (rastući intenzitet pikova označen je sa + < ++ < +++ < ++++ < +++++ < ++++++) (3)

Komponenta	Borovnica	Crna ribizla	Aronija	Zova
cijanidin 3,5-diglukozid				++
delfinidin 3-galaktozid	++++			
delfinidin 3-glukozid	+++	++		
delfinidin 3-rutinozid		++++		
cijanidin 3-galaktosid	+++		+++++	
delfinidin 3-arabinozid	+++			
cijanidin 3-sambukozid				+++++
cijanidin 3-glukosid	+++	+	+	
petunidin 3-galaktozid	++			
cijanidin 3-rutinozid		++++		
cijanidin 3-arabinozid	+++		++++	
petunidin 3-glukozid	++			
peonidin 3-galaktozid	+			
petunidin 3-arabinozid	+			
peonidin 3-glukozid	++			
cijanidin 3-ksilozid			+	
peonidin 3-arabinozid	++			
malvidin 3-arabinozid	+			

na 30°C. Uzorci se rastvore u smeši metanola i hloridne kiseline (49/1), a zatim razblaže smešom fosforne kiseline 85% i vode (1/9); i do injektovanja čuvaju na temperaturi od 4 °C. Hromatogrami se snimaju pomoću UV/VIS detektora na 535nm[6].

Pripremana su dva uzorka:

– koncentrovani sok dobijen iz ploda aronije (ceđeni sok plodova aronije sa vitaminom C i fruktozom, komercijalni proizvod sa tržišta)

– tečni ekstrakt nepoznatog botaničkog izvora - predmet međulaboratorijskog uporednog ispitivanja (PT šeme), za potvrdu identiteta aronije (Black chokeberry, Phyto Identity Confirmation), čiji je rezultat bio negativan.

Referentni rastvor pripreman je od cijanidin -3-O-galaktozida, sertifikovane referentne supstance (proizvođač European Directorate for the Quality of Medicine and HealthCare, EDQM).

REZULTATI I DISKUSIJA

Primenom navedene hromatografske metode moguće je razdvojiti pikove različitih antocijanina u analiziranim uzorcima. Na hromatogramu uzorka dobijenog iz ploda aronije nalaze se četiri pika, koji po rasporedu i veličini odgovaraju antocijaninima prisutnim u plodu aronije: cijanidin-galaktozid, cijanidin-glukozid, cijanidin-arabinozid i cijanidin-ksilozid (Slika 1). Cijanidin -galaktozid se eluiru prvi i daje najveći pik. Identifikovan je na osnovu retencionog vremena, u poređenju sa hromatogramom referentnog rastvora (Slika 3). Ostali pikovi identifikovani su na osnovu relativnih retencionih vremena dostupnih u literaturi [6]. Na hromatogramu nepoznatog uzorka raspored pikova je drugačiji: veliki broj pikova sa retencionim vremenima različitim od onih na kojima se nalaze antocijanini karakteristični za plod aronije (Slika 2). Dobijeni rezultati ukazuju da se metoda može koristiti za dobijanje karakterističnog fingerprinta i identifikaciju proizvoda dobijenih iz plodova aronije.

Fingerprint podrazumeva sveobuhvatnu analizu sastojaka složenih biljnih droga i njihovih proizvoda primenom pogodnog analitičkog postupka. Ova tehnika prihvaćena je od strane WHO kao racionalan pristup za identifikaciju i kontrolu kvaliteta biljnih lekovitih proizvoda. Kineska SFDA (State Food and Drug Administration) od 2000. godine razvija fingerprinting kao standard kontrole kvaliteta tradicionalnih biljnih lekova[7,8]. U literaturi su dostupni naučni radovi čija je tema razvoj i validacija hromatografskih metoda (HPLC/PDA,

MS) za generisanje karakterističnog fingerprinta antocijanina u različitim biljnim vrstama [3,9]. Uspostavljanje opšteprihvaćenog standardnog fingerprinta omogućilo bi poređenje gotovih proizvoda sa originalnim biljnim materijalom dobrog kvaliteta. Ovo može biti korisno za praćenje stabilnosti proizvoda, održivosti kvaliteta od serije do serije ili između proizvođača, otkrivanje produkata razgradnje zbog neadekvatnog čuvanja, prisustva stranih materija ili falsifikata.

ZAKLJUČAK

Obojeno voće, bobice različitih biljnih vrsta, bogato je u sadržaju fenolnih jedinjenja. Zbog potencijalnih pozitivnih uticaja na ljudsko zdravlje široko se upotrebljavaju u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, a u novije vreme raste i broj naučnih studija u kojima se ispituju hemijske i farmakološke karakteristike njihovih sastojaka.

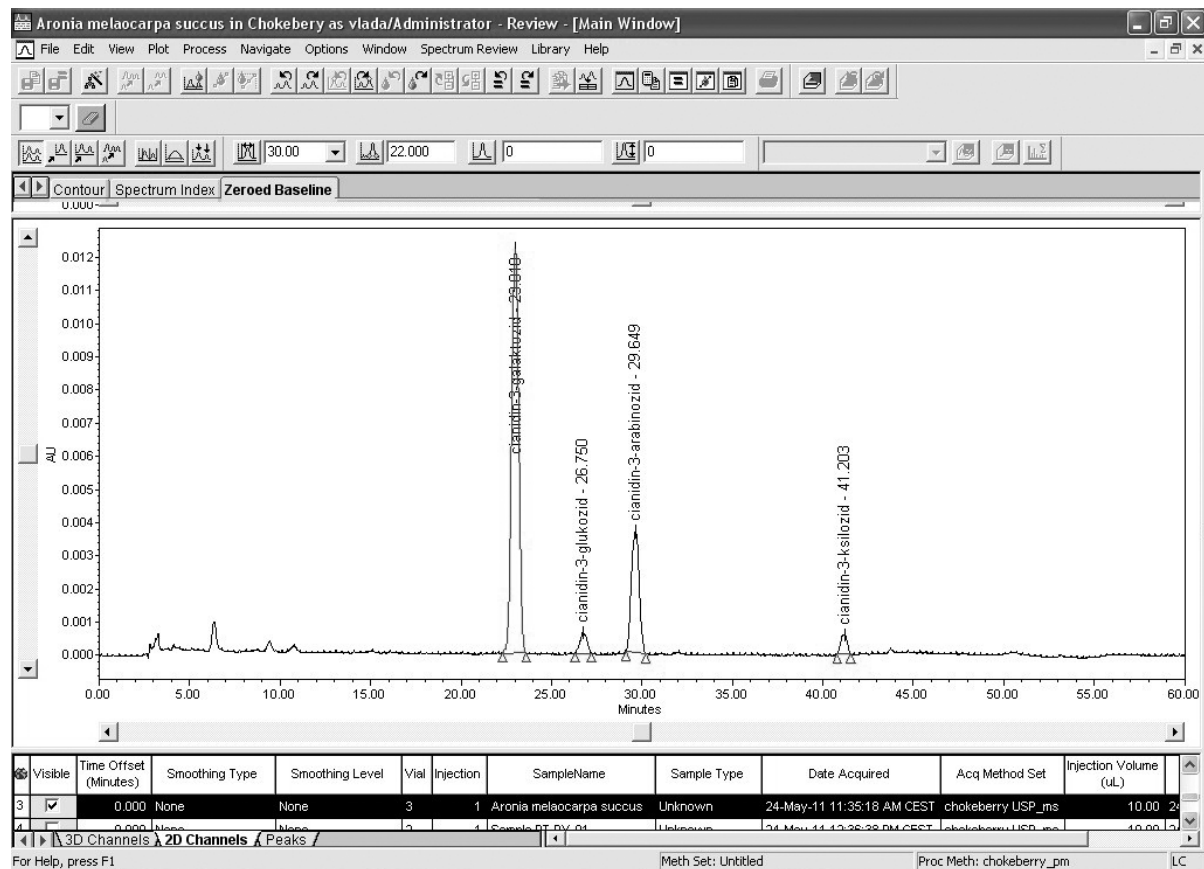
Fenolna jedinjenja od kojih potiče boja plodova i za koje se smatra da su nosioci farmakološke aktivnosti su antocijanini. Kvalitativni i kvantitativni sastav antocijanina različit je zavisno od biljne vrste [3]. Aronija melanocarpa i proizvodi dobijeni od njenih plodova mogu se identifikovati na osnovu karakterističnog fingerprinta primenom pogodne hromatografske metode.

Značaj ove metode u kontroli kvaliteta hrane i dodataka ishrani je u potvrđivanju prisustva ploda aronije kao prirodne boje i korigensa ukusa, odnosno u otkrivanju upotrebe falsifikata, npr. veštačkih boja.

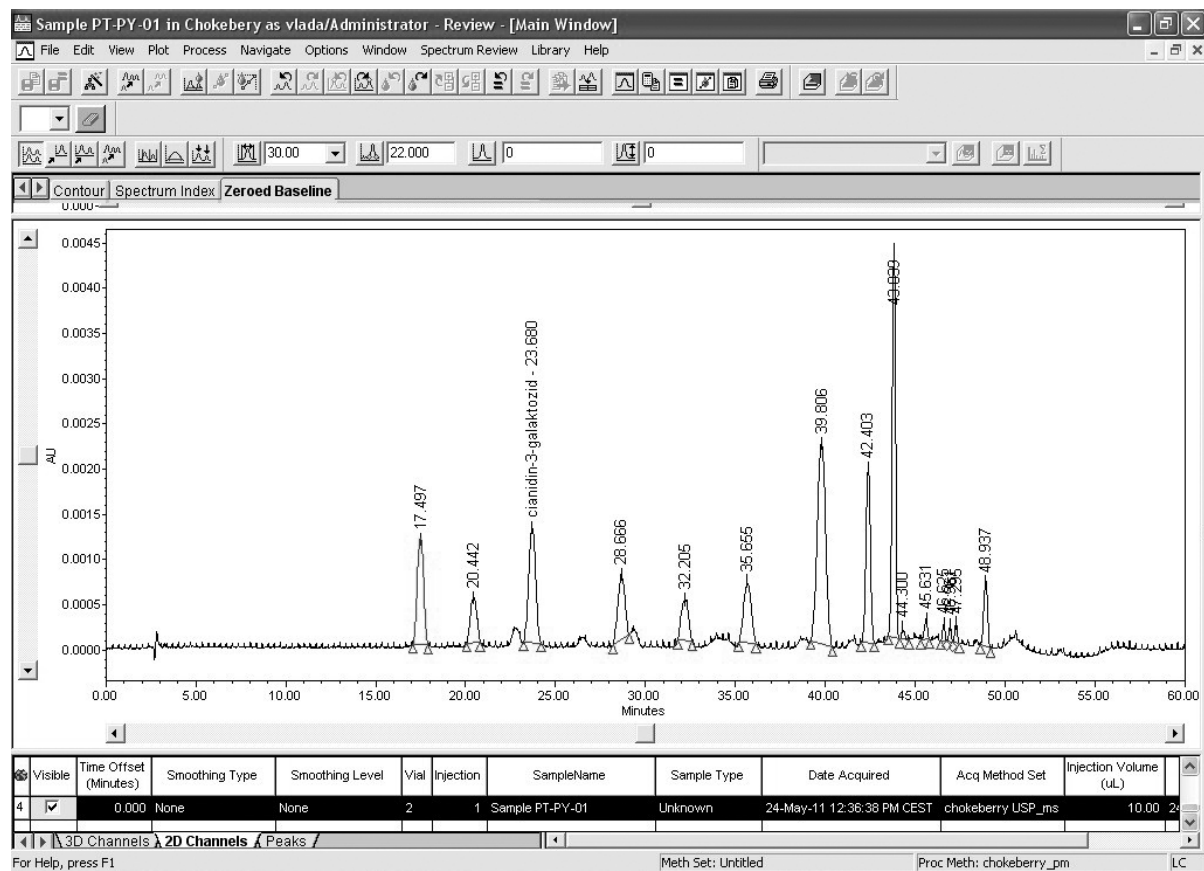
Značaj ove metode u kontroli kvaliteta u farmaceutskoj industriji je u identifikaciji proizvoda dobijenih iz ploda aronije kao aktivnih sastojaka u biljnim lekovitim proizvodima.

Tabela 3: Program gradijentne elucije

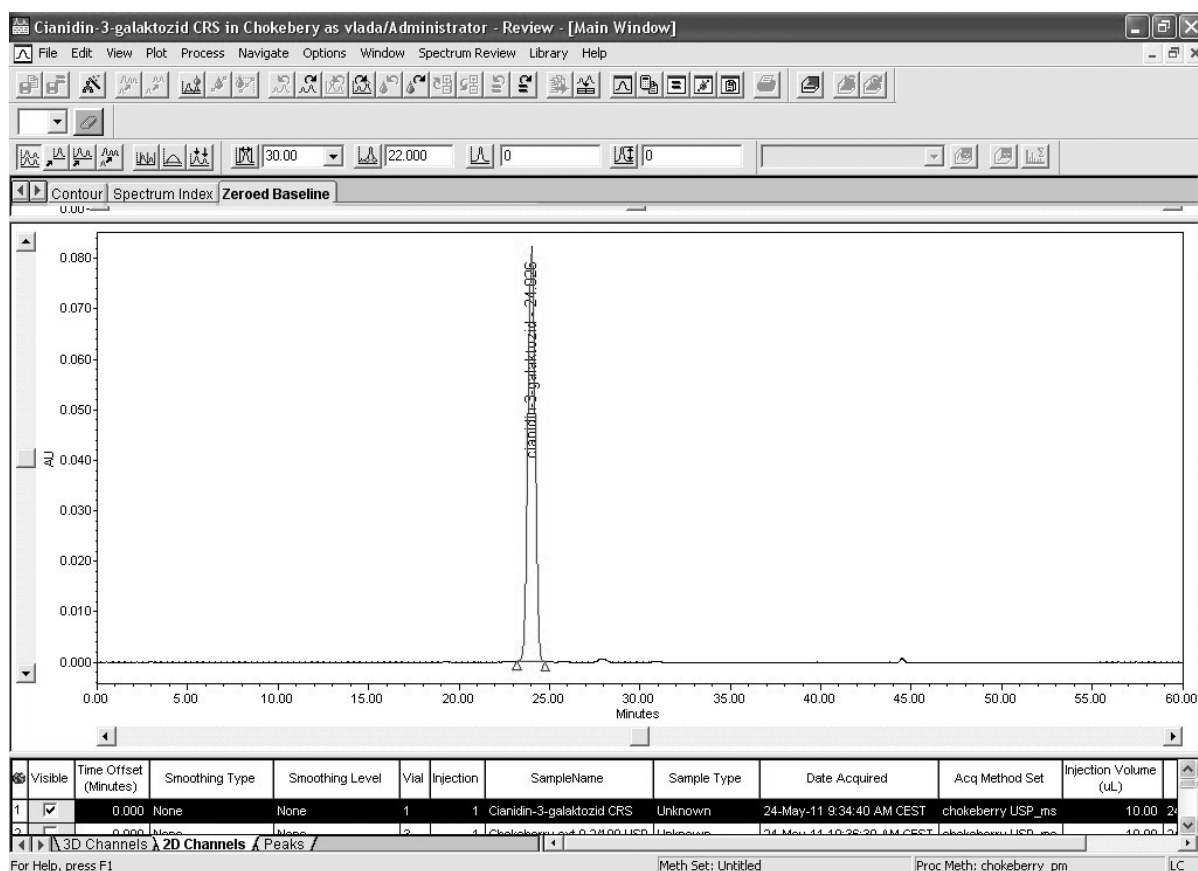
Vreme	Protok	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
0 min	1 ml/min	93	7
35 min		75	25
45min		35	65
46 min		0	100
50 min		0	100
51 min		93	7
60 min		93	7



Slika 1. Hromatogram uzorka koncentrovanog soka aronije



Slika 2. Hromatogram nepoznatog uzorka



Slika 3. Hromatogram referentnog rastvora

LITERATURA

1. Kulling S., Rawel H., Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)- A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects, *Planta Medica* 2008; 74:1625-1634
2. Skupien K., Oszmianski J., The effect of mineral fertilization on nutritive value and biological activity of chokeberry fruit, *Agricultural and Food Science* 2007; 16:46-45
3. Nakajima J, Tanaka I, Seo S, Yamazaki M, Saito K, LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries, *J Biomed Biotechnol* 2004; 2004(6):241-247.
4. Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidović-Kosanović M, Šeruga B, DPPH radical inhibition kinetic and antiradical activity of polyphenols from chokeberry and elderberry fruits, *P Croatica*, 2008; 14(2): 101-117.
5. Bondre S, Patil P, Kulkarni A, Pillai M, Study on isolation and purification of anthocyanins and its application as pH indicator, *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 2012; 3(3): 698-702
6. U.S. Pharmacopoeia, Dietary Supplements: Official Monograph Powdered Bilberry Extract, USP36/NF31, 2013; Vol1:13501352.
7. Xie P, Chen S, Liang Y, Wang X, Tian R, Upton R, Chromatographic fingerprint analysis-a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine, *Journal of chromatography A*, 2006, 1112(1-2):171-180
8. Tang D, Yang D, Tang A, Gao Y, Jiang X, Mou J, Yin X, Simultaneous chemical fingerprint and quantitative analysis of Ginkgo biloba extract by HPLC-DAD, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396:3087-3095
9. Chandra A, Rana J, Li Y, Separation, Identification, Quantification, and Method Validation of Anthocyanins in Botanical Supplement Raw Materials by HPLC and HPLC-MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49:3515-3521

Identification of Characteristic Anthocyanins in the Chokeberry Fruit Products by HPLC

Nada Pavičić¹,
Ivan Velikinac¹,
Tamara Miladinović¹

¹Department of Quality Control,
Pharmanova, Industrijska 8, 11500
Obrenovac, Serbia

Abstract:

Aronia melanocarpa (black chokeberry) fruits are commonly used in food industry as colouring and flavouring agent, due to bitter, astringent taste and deep purple colour. This plant has a long tradition in European and North American folk medicine, and there is a growing number of scientific studies that examine its pharmacological properties. Fruits are rich in phenolic constituents (procyanidins, anthocyanins and phenolic acids). These structures are known to exhibit antioxidant activities and therefore may contribute to the prevention of heart disease, cancer and inflammatory diseases. Anthocyanins are plant pigments widely distributed in coloured fruits and flowers. The amount and distribution in berries differ depending on their plant species, cultivating and processing. In comparison with other berries and fruits, which are rich in various anthocyanins, black chokeberries have a simple anthocyanin spectrum, mainly containing cyanidin glycosides. The aim of this study was to identify characteristic anthocyanins in the Aronia products (juice, extract, syrup) and to distinguish chokeberry from other plant sources with similar composition. The HPLC/PDA technique has been used to obtain characteristic chromatographic fingerprint. On the chromatograms obtained from Aronia samples, four peaks with the same distribution appear, corresponding to four main chokeberry anthocyanins (cyanidin-arabinoside, cyanidin-glucoside, cyanidin-galactoside and cyanidin-xyloside). Chromatograms obtained from unknown samples have different peak distribution. There are more peaks with other retention times and lack of peaks characteristic for chokeberry anthocyanins. This indicates that the applied method can be useful in distinguish the chokeberry products from possible counterfeits.

Key words: black chokeberry, anthocyanins, chromatography