

Metodyczne aspekty oznaczania flawonoidów w produktach żywnościowych o potencjale kardioprotekcyjnym – przegląd warunków HPLC

STRESZCZENIE

Wzrasta zainteresowanie flawonoidami jako bioaktywnymi składnikami żywności funkcjonalnej. Flawonoidy to obszerna grupa naturalnych związków polifenolowych, które pełnią wiele istotnych funkcji biologicznych, działając przeciwutleniająco, przeciwzapalnie, przeciwzakrzepowo oraz kardioprotekcyjnie. W kontekście rosnącej zachorowalności na choroby układu sercowo-naczyniowego, spożywanie żywności zawierającej flawonoidy, jako czynnika prewencyjnego, nabiera szczególnego znaczenia. Źródłem tych związków są przede wszystkim owoce, takie jak aronia, czarna porzeczka, jabłka, głóg, cytryny czy czerwone winogrona. Oznaczono w nich flawonoidy o udokumentowanym działaniu kardioprotekcyjnym, tj. katechinę, epikatechinę, kwercetynę, kemferol, myricetynę, rutynę, apigeninę, luteolinę, naringeninę i hesperetynę. Precyzyjna identyfikacja i oznaczenie flawonoidów wymaga zastosowania odpowiednich metod analitycznych. Wysokosprawna chromatografia cieczowa pozostaje obecnie jedną z najczęściej wykorzystywanych technik w analizie jakościowej i ilościowej. Wybór warunków ekstrakcji oraz parametrów chromatograficznych, takich jak typ kolumny, rodzaj fazy ruchomej, sposób elucji czy zastosowany detektor, są kluczowe dla zapewnienia selektywności i powtarzalności oznaczeń. Celem niniejszej pracy jest przegląd metodycznych aspektów oznaczania flawonoidów w wybranych produktach żywnościowych, stosowanych w profilaktyce chorób krążenia. Zestawiono metody ekstrakcji flawonoidów oraz warunki prowadzenia chromatografii cieczowej. Analizowane badania zawierały surowce roślinne, zarówno w postaci świeżej, jak i liofilizowanej czy mrożonej. Ekstrakty pochodziły z całych surowców, jak również z ich miąższu, skórek czy liści. Praca stanowi przegląd praktycznych rozwiązań i może posłużyć jako wsparcie w planowaniu analiz ilościowych flawonoidów.

WPROWADZENIE

Zarówno medycyna ludowa, jak i współczesna podkreślają znaczenie spożywania znacznych ilości owoców. Szczegółowa analiza literatury naukowej wskazuje na to, że dieta zawierająca owoce może przeciwdziałać chorobom układu sercowo-naczyniowego. Na podstawie ilości publikacji, dostępnych w bazie danych Google Scholar, obejmujących lata 2010–2025, wybrano, do scharakteryzowania pod względem warunków ekstrakcji flawonoidów i oznaczeń ilościowych, produkty żywnościowe o najlepiej udokumentowanym działaniu kardioprotekcyjnym (Tab. 1). Spożywanie tych owoców czy też ich suplemen-

Tabela 1. Ilość dostępnych publikacji w bazie danych Google Scholar (2010–2025), na temat owoców zawierających flawonoidy o działaniu kardioprotekcyjnym.

Owoce	Ilość publikacji
Aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>)	7 050
Czarna porzeczka (<i>Ribes nigrum</i>)	7 020
Głóg (<i>Crataegus Monogyna</i>)	2 630
Jabłko (<i>Malus</i>)	19 000
Winogrona czerwone (<i>Vitis vinifera</i>)	17 400
Cytryny (<i>Citrus limon</i>)	17 800

tów wykazuje działanie hipotensyjne i wspomagające krążenie i wpływa na poprawę elastyczności naczyń krwionośnych [1-14]. Odpowiadają za to flawonoidy, takie jak katechiny, epikatechiny, kwercetyna, kemferol, myricetyna, rutyna, apigenina, luteolina, naringenina i hesperetyna. Wzory strukturalne tych związków zostały przedstawione na rycinie 1. Ze względu na ich właściwości, związki te są coraz częściej postrzegane, nie tylko jako składniki odżywcze, ale również jako czynniki bioaktywne o potencjale terapeutycznym, zwłaszcza w kontekście profilaktyki chorób układu krążenia. Ich obecność w diecie człowieka wiąże się z szeregiem korzystnych efektów biologicznych, w tym działaniem przeciwutleniającym, przeciwzapalnym, przeciwplatekcyjnym oraz kardioprotekcyjnym. Redukują szkodliwe skutki stresu oksydacyjnego wywołanego nagromadzeniem się w organizmie dużych ilości reaktywnych form tlenu, hamują utlenianie lipidów i kwasów nukleinowych. Badania naukowe potwierdziły, że zmniejszają

dr inż. Iwona Sergiel✉

Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski

https://doi.org/10.18388/pb.2017_625

✉ autor korespondujący: i.sergiel@wnb.uz.zgora.pl

Słowa kluczowe: flawonoidy, wysokosprawna chromatografia cieczowa, optymalizacja warunków chromatograficznych, żywność o właściwościach kardioprotekcyjnych

Wykaz skrótów: DAD – detektor z matrycą diodową (ang. *diode array detector*); HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high performance liquid chromatography*); MS – spektrometr mas (ang. *Mass Spectrometry*); PTFE – politetrafluoroetylen (ang. *polytetrafluoroethylene*); PVDF – polifluorek winylidenu (ang. *polyvinylidene fluoride*); TBHQ – tert-butylohydrochinon (ang. *tert-butylhydroquinone*); TFA – kwas trifluorooctowy (ang. *trifluoroacetic acid*); UV-VIS – spektroskopia z zakresu ultrafioletu i światła widzialnego (ang. *ultraviolet-visible spectroscopy*)

ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia poprzez rozszerzanie naczyń krwionośnych, obniżanie ciśnienia krwi i poziomu lipoproteiny o niskiej gęstości (cholesterolu LDL). Hamują tworzenie się blaszek miażdżycowych i indukują działanie enzymu metaloproteiny, co zmniejsza śmiertelność pacjentów z chorobami wieńcowymi serca [15-20]. Ba-

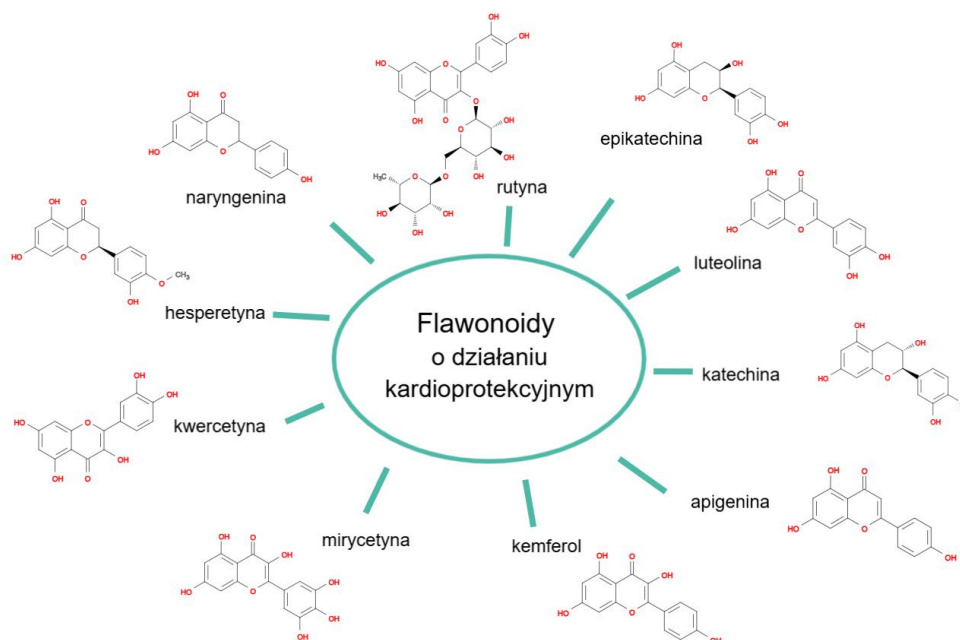
datce sugerują, że spożycie 400–600 mg/dobę flawonoidów może zmniejszać ryzyko związane z chorobami układu krążenia [18]. O ile rola tych związków w profilaktyce chorób układu krążenia została już wielokrotnie udokumentowana i nie budzi już obecnie wątpliwości, to sposób ich oznaczenia nie został jednoznacznie ujednolicony i zoptymalizo-

Tabela 2. Warunki ekstrakcji flawonoidów w wybranych produktach żywnościowych stosowanych w profilaktyce chorób układu krążenia.

Surowiec/ część rośliny	Flawonoid	Metoda ekstrakcji	Temperatura	Przygotowanie próbki do HPLC	Referencje
Aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>) / owoce mrożone	katechina, epikatechina	rozmrozić i zmielić w blenderze; przepuścić przez prasę (3 bar/5 min); rozcieńczyć z wodą (3:1); przepuścić przez filtr membranowy; przechowywać przez 90 dni w ciemnym miejscu	pasteryzować w temp. 80°C przez 10 minut	rozcieńczyć za pomocą mieszaniny: 50 ml metanolu (99,9%), 345 ml dejonizowanej wody, 0,5 ml kwasu octowego (99,7%) i 1 g kwasu askorbinowego; przefiltrować przez 0,45 µm PTFE	[46]
Aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>) / owoce mrożone	katechina, kwercetyna	zblendować 40 g owoców; dodać 200 ml 50% etanolu; wytrząsać przez 1 godz. przy 30 obr./min; przepuścić przez filtr No2. Whatman;	wytrząsać w temp. pokojowej; odparować pod próżnią w temp. 40°C	4 mg próbki rozpuścić w 1 ml 50% etanolu; sonifikować przez 30 min; przefiltrować przez 0,22 µm PVDF	[47]
Aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>) / owoce liofilizowane	kemferol, kwercetyna	liofilizować przez 48 godz. zmiażdżyć i poddać liofilizacji; zmielić i hydrolizować za pomocą kwasu askorbinowego; wytrząsać w łaźni wodnej przez 16 godz.	wytrząsać w temp. 35°C	przefiltrować przez 0,22 µm PVDF	[45]
Czarna porzeczka (<i>Ribes nigrum</i>) / owoce i liście liofilizowane	katechina, epikatechina, kwercetyna, kemferol	owoce: 50 mg próbki ekstrahować z 1,5 ml mieszaniny: kwas mrówkowy:acetonitryl 10:5 (v/v); sonifikować 20 min; wirować (13000 obr./min przez 10 min) liście: 400 mg próbki ekstrahować z 14 ml 50% etanolu, z 0,05 mol/dm ³ H ₃ PO ₄ ; sonifikować 15 min; wirować (13000 obr./min przez 10 min)	temp. pokojowa	przefiltrować przez 0,22 µm PVDF	[48]
Czarna porzeczka (<i>Ribes nigrum</i>) / owoce mrożone	kwercetyna, kemferol, myricetyna	rozdrobnić 100 g próbki w blenderze; przygotować 4 próbki po 5 g; dodać do każdej 50 ml 50% metanolu i 20 mg tert-butylohydrochinonu (TBHQ); sonifikować 2 godz.; odwirować (10 min, 4000 obr./min); 10 ml ekstraktu przenieść do szklanej probówki; dodać 2 ml 6-molowego HCl i ogrzać w łaźni wodnej przez 1 godz.; dodać 2 ml 6-molowego NaOH; ekstrahować za pomocą 20 ml octanu etylu przez 15 min; odparować do sucha warstwę z octanem etylu	sonifikować w temp. 35°C; ogrzać w łaźni wodnej w temp. 80°C; odparować w temp. 35°C	rozpuścić w 500 µl metanolu i przefiltrować przez 0,45 µm PVDF	[49]
Czarna porzeczka (<i>Ribes nigrum</i>) / skórki owoców	rutyna	zmieszać próbki z wodą destylowaną w stosunku 1:10 (w/v); sonifikować w łaźni ultradźwiękowej przez 2 godz.	25°C	przefiltrować przez filtr membranowy 0,22 µm	[50]

Jabłko (<i>Malus</i>) (odmiany: King Luscious, Amasya, Ervin Spur, Sky Spur, Arap Kizi, Lutz Golden, Granny Smith) / miąższ i skórka-liofilizowane	katechina, epikatechina	1 g skórek i 10 g miąższu ekstrahować w trzech etapach z 70% roztworem metanolu: (10 ml/60 min), (10 ml/45 min), (5 ml/15 min); przefiltrować przez bibułę filtracyjną i 0,45 µm PTFE; hydrolizować w 50% metanolu, zakwaszonym 1,2 -molowym roztworem HCl (2 godz.)	hydrolizować w temp. 80°C	przefiltrować przez bibułę filtracyjną i 0,45 µm PTFE	[51]
Jabłko (<i>Malus</i>) (odmiany: Auksis, Aldas, Ligol, Lodel) /owoce liofilizowane	epikatechina, kwercetyna, rutyna	zmielić próbki na proszek; odważyć 2,5 g próbki i dodać 30 ml etanolu (70%, v/v); ekstrahować w łaźni ultradźwiękowej przez 20 min	ekstrahować w łaźni ultradźwiękowej w temp. 40°C	przefiltrować przez filtr papierowy; przemyć dwukrotnie 10 ml etanolu (70%, v/v); przefiltrować przez filtr 0,22 µm	[52]
Winogrona czerwone (<i>Vitis vinifera</i>) (odmiany: Summer Royal, Autumn Royal, Crimson, Carati, Thompson) / skórki owoców	katechina, kwercetyna, kemferol	zebrać 3 próbki po 10 jagód, z różnych kiści winogron dla każdej odmiany; zamrozić i obrać ze skórek; do skórek dodać 25 ml 70% etanolu z 1% roztworem HCl; zawiesinę pozostawić na noc bez dostępu światła	temp. pokojowa	przefiltrować przez filtr celulozowy 0,45 µm	[53]
Winogrona czerwone (<i>Vitis vinifera</i>) (odmiany: Cardinal, Gros noir, Muscat noir) /skórki owoców	kwercetyna	próbki wysuszyć i zetrzeć na proszek; ekstrahować dwukrotnie w 80 ml metanol/woda/TFA (80:20:0,05) i 50 ml aceton/woda (60:40) przez 15 min; wirować przez 10 min (10000 obr./min); przefiltrować przez szklany filtr z mikrofibry; suszyć pod próżnią	wysuszyć w temp. 50°C; ekstrahować w (temp. 25°C; wirować w temp. 10°C; suszyć pod próżnią w temp. 30°C	rozpuścić w 5 ml metanolu	[54]
Głóg (<i>Crataegus monogyna</i> , <i>Crataegus Azarolus</i>) /owoce liofilizowane	epikatechina, kwercetyna, kemferol, apigenina, luteolina	2 g próbki ekstrahować w łaźni ultradźwiękowej trzykrotnie za pomocą 15 ml mieszaniny etanolu i wody, zakwaszonej 1,5-molowym roztworem HCl (30 minut); do fazy wodnej dodać octan etylu (3 x 100 ml); zebraną fazę z octanem etylu wysuszyć nad Na ₂ SO ₄ ; odparować próżniowo do sucha i ponownie rozpuścić w wodzie, a następnie ponownie liofilizować	ekstrahować w temp. pokojowej	dodać metanol i przefiltrować przez filtr membranowy 0,45 µm	[55-56]
Głóg (<i>Crataegus</i>) / liście	katechina, rutyna, myricetyna, kwercetyna, kemferol	przygotować napary z 15 g świeżych liści w 100 ml wody destylowanej; sonifikować w łaźni ultradźwiękowej przez 30 minut; wirować przez 10 min (2000 obr./min)	temp. pokojowa	przefiltrować przez filtr 0,45 µm	[57]
Cytryny (<i>Citrus limon</i>) (odmiany: Pica lemon, Genova lemon, Sutil lemon) / skórki i miąższ owoców	kwercetyna, kemferol, apigenina, luteolina, hesperetyna, naringenina, rutyna	umyć i obrać cytryny; oczyścić miąższ z pestek; 100 g skórki i 100 g miąższu zmiksować oddzielnie i dodać 100 ml 0,1% HCl w metanolu; ekstrahować trzykrotnie w łaźni ultradźwiękowej przez 1 godz. bez dostępu światła; połączyć ekstrakty, odparować próżniowo; próbki nanieść na złożo Amberlite XAD-7; przepłukać 100 ml ultraczystej wody; eluować za pomocą 100 ml 0,1% HCl w metanolu	odparować próżniowo w temp. 40°C	rozpuścić ekstrakty w 2 ml 0,1% HCl w metanolu; przefiltrować 0,45 µm PTFE	[44]

Cytryny (<i>Citrus limon</i>) Lemon IntegroPectin /skórki liofilizowane	hesperetyna, kemferol	do 600 mg próbki dodać 50 ml etanol/woda (v/v, 4:1); sonifikować przez 15 min w temp. 40°C; wirować (10000 obr./min, 10 min)	sonifikować w temp. 40°C	przefiltrować przez filtr membranowy	[58]
Cytryny (<i>Citrus limon</i>) /skórki liofilizowane	rutyna, naringenina, kwercetyna	zetrzeć próbki na proszek; ekstrahować 95% etanolem (1/10, w/v) w łaźni ultradźwiękowej (60 min); filtrować próżniowo; przepuścić przez makroporowatą żywicę AB-8 i odparować w wyparce próżniowej	ekstrahować w temp. 50°C	rozpuścić w metanolu	[59]



Rycina 1. Wzory strukturalne flawonoidów o działaniu kardioprotekcyjnym.

wany. Brak standaryzacji w tym zakresie może prowadzić do rozbieżności w wynikach i trudności w porównywaniu danych literaturowych. W praktyce laboratoryjnej analizie poddawane są różne postacie produktów żywnościowych, zarówno świeże, jak i liofilizowane, suszone czy mrożone, a także różne wyizolowane części, takie jak miąższ, skórka czy liście. Różnorodność ta wpływa nie tylko na skład jakościowy i ilościowy flawonoidów, ale także na stopień ekstrakcji i stabilność tych związków [21-23]. Z tego względu niezbędna jest dokładna, powtarzalna i selektywna analiza flawonoidów, którą umożliwia wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Jednakże, ze względu na różnice

w składzie chemicznym flawonoidów, ich polarności, masie cząsteczkowej oraz powinowactwie do fazy stacjonarnej, nie istnieje uniwersalna metoda rozdzielania, dlatego warunki chromatograficzne muszą być zoptymalizowane indywidualnie dla danej matrycy i grupy analitów [24-33]. Stosowanie różnych kolumn chromatograficznych pozwala dostosować selektywność rozdzielania do charakterystyki flawonoidów, umożliwiając rozdzielanie nawet bardzo podobnych strukturalnie związków. Z kolei dobór eluentów wpływa na efektywność elucji, jonizację związków i ich wykrywalność. Gradient elucji, temperatura kolumny, przepływ fazy ruchomej czy typ detekcji również wymagają precyzyjnego



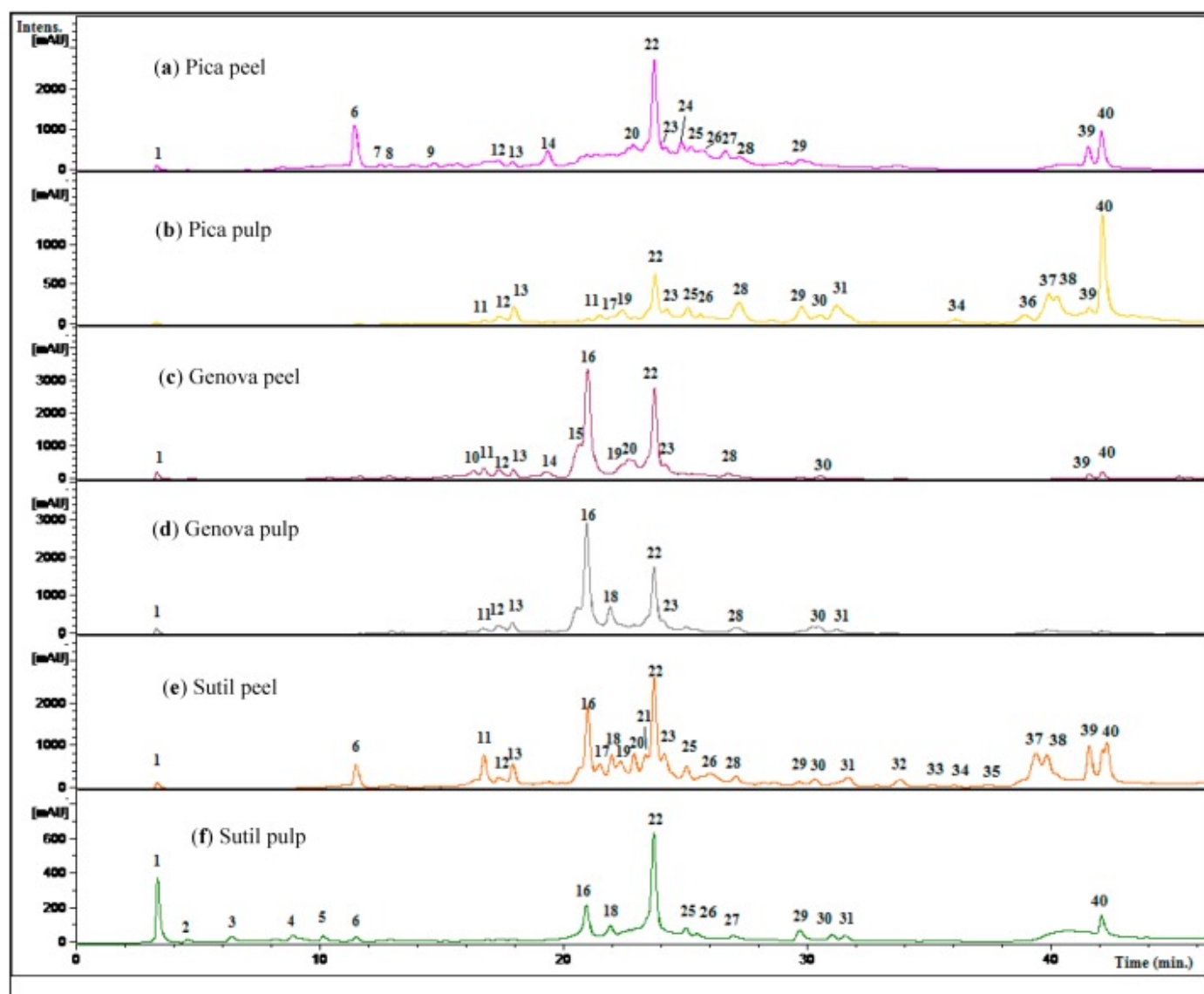
Rycina 2. Schemat ogólnej procedury analitycznej oznaczania flawonoidów w próbkach żywności.

Tabela 3. Warunki oznaczania flawonoidów metodą HPLC w wybranych produktach żywnościowych stosowanych w profilaktyce chorób układu krążenia.

Surowiec	Kolumna	Temp. termostatu, objętość próbki, szybkość przepływu	Detektor	Eluenty	Warunki elucji	Czas ana- lizy	Referencje
Aronia (<i>Aronia melano- carpa</i>)	C18 (50 mm x 4,6 mm); wielkość cząstek 1,8 µm	25°C, 10 µl, 1 ml/ min	UV-VIS	A-4,5% kwas mrówkowy w wodzie, B-acetonitryl	0 min, 3% B; 7 min, 9% B; 13 min, 12% B; 20 min, 14% B; 21 min, 80% B; 26 min, 80% B; 27 min, 3% B; 36 min, 3% B	36 min	[46]
Aronia (<i>Aronia melano- carpa</i>)	C18 (250 mm x 4,6 mm); wielkość cząstek 5 µm	30°C, 10 µl, 1 ml/ min	UV-VIS	A-0,5% kwas mrówkowy w wodzie, B-0,5% kwas mrówkowy w acetoni- trylu	7-40% B	70 min	[47]
Aronia (<i>Aronia melano- carpa</i>)	C18 (150 mm x 3,6 mm)	b.d., b.d., 0,5 ml/ min	DAD	A-50 mM diwodorofos- foran amonu (pH=2,6), B-20% A w 80% acetonitrylu, C-0,2 mM kwas fosforowy(V) (pH=1,5)	A:B:C od (100:0:0) do (0:80:20)	60 min	[45]
Czarna porzec- zka (<i>Ribes nigrum</i>)	C18 (250 mm x 4,6 mm); wielkość cząstek 4 µm	24°C, 20 µl (owoce), 10 µl (liście), 1,2 ml/min	DAD	A-kwas mrówkowy/ woda (7:93 v/v), B- acetonitryl/ metanol/ woda (90:5:5 v/v/v)	0-2 min, 8% B; 2-21,5 min, 8-16% B; 21,5-51,5 min, 16-23% B; 51,5-56,5 min, 23-40% B; 56,5-61,5 min, 8% B	61,5 min	[48]
Czarna porzec- zka (<i>Ribes nigrum</i>)	C18 (125 mm x 3 mm); wielkość cząstek 5 µm	b.d., 10 µl, 0,4 i 0,5 ml/min	DAD	A-1% kwas mrówkowy w wodzie, B-acetoni- tryl	0-10 min, 5-40% B w A; 10-20 min, 40-70% B w A; 20-22 min, 70-90% B w A; 22-25 min, 90-5% B w A	25 min	[49]
Czarna porzec- zka (<i>Ribes nigrum</i>)	C18 (250 mm x 4,6 mm); wielkość cząstek 5 µm	35°C, b.d., 1,2 ml/min	UV-VIS	A-0,1% (v/v) wodny roztwór kwasu mrówkowego, B- acetonitryl	0-20 min, 8-30% B; 20-35 min, 30-70% B; 35-40 min, 70-8% B	40 min	[50]
Jabłko (<i>Malus</i>) (odmiany: King Luscious, Amasya, Ervin Spur, Sky Spur, Arap Kizi, Lutz Golden, Granny Smith)	C18 (250 mm x 4,6 mm); wielkość cząstek 5 µm	b.d., 20 µl, 1 ml/min	UV-VIS	A- metanol, B-H ₃ PO ₄ (0,2%, v/v)	0-5 min, 30% A; 40 min, 66% A	40	[51]
Jabłko (<i>Malus</i>) (odmiany: Auksis, Aldas, Ligol, Lodel)	C18 (250 mm x 4,6 mm); wielkość cząstek 5 µm	25°C, 10 µl, 1 ml/min	DAD	A-2% (v/v) kwas octowy w wodzie, B-100% acetonitryl	0-30 min, 3-15% B; 30-45 min, 15-25% B; 45-50 min, 25-50% B; 50-55 min, 50-95% B	55 min	[52]
Winogrona czerwone (<i>Vitis vinifera</i>) (odmiany: Sum- mer Royal, Autumn Royal, Crimson, Carati, Thomp- son)	C18 (250 mm x 4,6 mm); wielkość cząstek 5 µm	b.d., 3 µl, 0,7 ml/ min	DAD, MS	A-acetonitryl, B-woda/ kwas mrówkowy (90:10, v/v)	0 min, 5% A; 10 min, 13% A; 20 min, 15% A; 30 min, 22% A; 50 min, 22% A; 55 min, 5% A	55 min	[53]
Winogrona czerwone (<i>Vitis vinifera</i>) (odmiany: Cardinal, Gros noir, Muscat noir)	C18 (250 mm x 4,6 mm)	10°C, b.d., 0,8 ml/ min	DAD	A-kwas mrówkowy/ woda/acetonitryl (10:60:30 v/v/v), B-kwas mrówkowy/ woda (10:90 v/v)	0-26 min, 80-15% A; 26-30 min, 15-80% A	30 min	[54]
Głóg (<i>Crataegus monogyna</i> , <i>Crataegus Azarolus</i>)	C18 (150 mm x 4,6 mm); wielkość cząstek 5 µm	25°C, 20 µl, 0,5 ml/ min	DAD, MS	A-woda, B-acetonitryl, C-kwas mrówkowy (1%), D-kwas mrówkowy (1%) z acetonitrylem (90:10)	3 min, od 100% C do 100% D; 4 min, od 100% D do 1% B; 3 min, 1% B; 20 min, 12% B; 5 min, 50% B; 2 min, 100%	37 min	[55-56]

Głóg (<i>Crataegus</i>)	C18 (150 mm x 4,6 mm); wielkość cząstek 5 µm	25°C, 20 µl, 0,5 ml/ min	DAD, MS	A-0,1% kwas octowy w wodzie (99:1), B-0,1% kwas octowy w ace- tonitrylu	2 min, 5% B; 2-18 min, 5-40% B; 18-20 min, 40- 90% B; 20-24 min, 24-25 min, 90-5% B	25 min	[57]
Cytryny (<i>Citrus limon</i>) (odmiany: Pica lemon, Sutil lemon, Genova lemon)	C18 (250 mm x 5 mm); wielkość cząstek 4,6 µm	25°C, 10 µl, 1 ml/ min	UV-VIS, MS	A-10% kwas mrówkowy w wodzie, B-acetonitryl	4 min, 90% A; 25 min, 75% A	29 min	[44]
Cytryny (<i>Citrus limon</i>) Lemon Integro- Pectin	C18 (50 mm x 2,1 mm); wielkość cząstek 1,8 µm	20°C, 5 µl, 0,25 ml/ min	UV-VIS, MS	A-0,1% wodny roztwór kwasu mrówkowego, B- 0,1% metanolowy roztwór kwasu mrówkowego	1 min, 95% A; 1-14 min, 100% B; 15-20 min, 100% B; 20-21 min, 95% A	21 min	[58]
Cytryny (<i>Citrus limon</i>)	C18 (50 mm x 4,6 mm); wielkość cząstek 2,6 µm	30°C, 10 µl, 0,5 ml/min	UV-VIS, MS	A-0,5% wodny roztwór kwasu octowego, B- acetonitryl	b.d.	b.d.	[59]

b.d. - brak danych



Rycina 3. Chromatogramy ekstraktów z różnych odmian cytryn [44]. Pica - flawonoidy w skórce: 12, 39 - apigenina, 14, 20, 25, 27, 40 - luteolina, 22 - hesperetyna, 28 - naringeina. Pica - flawonoidy w miąższu: 12, 39 - apigenina, 19 - rutyna, 22 - hesperetyna, 25, 40 - luteolina, 28 - naringeina, 36 - kwercetyna. Genova - flawonoidy w skórce: 12, 20, 39 - apigenina, 14, 40 - luteolina, 19 - rutyna, 22 - hesperetyna, 28 - naringeina. Genova - flawonoidy w miąższu: 12 - apigenina, 22 - hesperetyna, 28 - naringeina. Sutil - flawonoidy w skórce: 12, 20, 33, 34, 35, 39 - apigenina, 19 - rutyna, 21 - kemferol, 22 - hesperetyna, 25, 40 - luteolina, 28 - naringeina, 32 - kwercetyna. Sutil - flawonoidy w miąższu: 2, 3 - apigenina, 4 - kwercetyna, 22 - hesperetyna, 25, 27, 40 - luteolina.

dostosowania, ponieważ niewłaściwe warunki mogą prowadzić do niepełnego rozdzielu, nakładających się pików lub degradacji analitów. Optymalizacja tych parametrów jest zatem kluczowa dla zapewnienia dokładności, czułości i powtarzalności oznaczeń [34-42].

OZNACZANIE FLAWONOIDÓW W PRODUKTACH ŻYWIENIOWYCH - WARUNKI EKSTRAKЦИИ I POMIARU ZA POMOCĄ HPLC

Wybór odpowiednich warunków ekstrakcji oraz warunków chromatograficznych stanowi kluczowy etap metody analitycznej i determinuje jakość uzyskanych wyników. Na rycinie 2 przedstawiono schemat blokowy ogólnej procedury analitycznej oznaczania flawonoidów w próbkach żywności. Tabela 2 zawiera przegląd warunków ekstrakcji flawonoidów w wybranych produktach żywnościowych stosowanych w profilaktyce chorób układu krążenia. Warunki oznaczania flawonoidów metodą HPLC, takie jak typ kolumny chromatograficznej, temperatura termostatu, objętość próbki, szybkość przepływu eluentów, zastosowany detektor, rodzaj eluentu, sposób elucji oraz czas analizy zostały przedstawione w tabeli 3. Większość naturalnych produktów żywnościowych zawiera dużą liczbę różnych związków fenolowych, z których wiele ma podobne właściwości chemiczne, takie jak polarność, co sprawia, że całkowite rozdzielenie i identyfikacja wszystkich związków jest niezwykle trudna [43]. Przykładowy chromatograf związków fenolowych wyizolowanych z różnych odmian cytryn przedstawia rycina 3 [44]. Obecny stan wiedzy nie pozwala na zoptymalizowanie metod wstępnego przygotowania próbek czy doboru warunków chromatograficznych. Niemniej jednak, naukowcy stale opracowują, modyfikują i stosują nowe metody, aby osiągnąć prostsze, szybsze, bardziej przyjazne dla środowiska i tańsze metody analizy. Waliduje się takie parametry jak rodzaj i temperaturę kolumny, rodzaj eluentów czy różne stężenia rozpuszczalników ekstrakcyjnych [45].

PODSUMOWANIE

W kontekście rosnącego zainteresowania prewencją chorób układu krążenia, analiza flawonoidów w matrycach roślinnych wymaga zastosowania czułych i selektywnych metod chromatograficznych. HPLC, w połączeniu z różnymi typami detekcji, pozwala na oznaczanie ilościowe flawonoidów w różnych formach produktów (świeżych, liofilizowanych, suszonych czy mrożonych). Zaletą HPLC jest możliwość stosunkowo szybkiego dostosowania warunków analitycznych, takich jak typ kolumny, skład fazy ruchomej, gradient elucji czy temperatura kolumny do konkretnej grupy flawonoidów i badanej matrycy. W pracy dokonano przeglądu i porównania warunków ekstrakcji oraz parametrów chromatograficznych stosowanych w analizie flawonoidów w różnych produktach żywnościowych o udokumentowanym znaczeniu kardioprotekcyjnym. Ze względu na ogromną różnorodność flawonoidów, nie istnieje optymalna metoda ekstrakcji i ich oznaczenia w złożonych matrycach. Przyszłe perspektywy w tej dziedzinie powinny koncentrować się na rozwoju czułych i przyjaznych dla środowiska metod analitycznych, a także na szybszej i bardziej selektywnej ekstrakcji flawonoidów.

PIŚMIENNICTWO

1. Abbasi M, Gohari S, Ahangar H, Bahrami M, Kamalinejad M, Reshadmanesh T, Nazari SS (2021) Efficacy of Hawthorn Fruit Extract on Blood Pressure and Quality of Sleep in Patients with Hypertension along with Sleep Disorders: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *J Contemp Med Sci* 7(4): 196-201
2. Bondonno NP, Bondonno CP, Ward NC, Hodgson JM, Croft KD (2017) The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends Food Sci Technol* 69: 243-256
3. Draijer R, De Graaf Y, Slettenaar M, De Groot E, Wright CI (2015) Consumption of a polyphenol-rich grape-wine extract lowers ambulatory blood pressure in mildly hypertensive subjects. *Nutr* 7(5): 3138-3153
4. Emiliano AF, de Cavalho LCRM, da Silva Cristino Cordeiro V, da Costa CA, de Oliveira PBR, Queiroz EF, Col Moreira DD, Boaventura GT, de Moura RS, Resende AC (2011) Metabolic disorders and oxidative stress programming in offspring of rats fed a high-fat diet during lactation: Effects of a *Vitis vinifera* grape skin (ACH09) extract. *J Cardiovasc Pharmacol* 58(3): 319-328
5. Gopalan A, Reuben SC, Ahmed S, Darvesh AS, Hohmann J, Bishayee A (2012) The health benefits of blackcurrants *Food Funct* 3(8): 795-809
6. Hellström JK, Shikov AN, Makarova MN, Pihlanto AM, Pozharitskaya ON, Ryhänen EL, Kivijärvi P, Makarov VG, Mattila PH (2010) Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii*, var. Viking). *J Funct Foods* 2(2): 163-169
7. Horie K, Nanashima N, Maeda H, Tomisawa T, Oey I (2021) Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) extract exerts potential vasculoprotective effects in ovariectomized rats, including prevention of elastin degradation and pathological vascular remodeling. *Nutr* 13(2): 560-573
8. Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, Snopek L, Orsavova J (2017) Fruits of black chokeberry *Aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases. *Mol* 22(6): 944-967
9. Kasprzak-Drozd K, Oniszcuk T, Soja J, Gancarz M, Wojtunik-Kulesza K, Markut-Miotła E, Oniszcuk A (2021) The efficacy of black chokeberry fruits against cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci* 22(12): 6541-6560
10. Sandoval-Ramírez BA, Catalán Ú, Calderón-Pérez L, Companys J, Pla-Pagà L, Ludwig IA, Romero MP, Solà R (2020) The effects and associations of whole-apple intake on diverse cardiovascular risk factors: A narrative review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 60(22): 3862-3875
11. Tassell MC, Kingston R, Gilroy D, Lehane M, Furey A (2010) Hawthorn (*Crataegus* spp.) in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacogn Rev* 4(7): 32-41
12. Vaisman N, Niv E (2015). Daily consumption of red grape cell powder in a dietary dose improves cardiovascular parameters: A double blind, placebo-controlled, randomized study. *Int J Food Sci Nutr* 66(3): 342-349
13. Zhang Y, Zhao Y, Liu X, Chen X, Ding C, Dong L, Zhang J, Sun S, Ding Q, Khatoom S, Cheng Z, Liu W, Shen L, Xia F (2021) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) as a new functional food relationship with health: An overview. *J Future Foods* 1(2): 168-178
14. Mahmoud AM, Hernández Bautista RJ, Sandhu MA, Hussein OE (2019) Beneficial Effects of Citrus Flavonoids on Cardiovascular and Metabolic Health. *Oxid Med Cell Longev* 1-19
15. Brodowska KM (2017) Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *Eur J Biol Res* 7(2): 108-123
16. Curry SJ, Krist AH, Owens DK, Barry MJ, Caughey AB, Davidson KW, Doubeni CA, Epling JW Jr, Kemper AR, Kubik M, Landefeld CS, Mangione CM, Silverstein M, Simon MA, Tseng CW, Wong JB (2018) Risk assessment for cardiovascular disease with nontraditional risk factors: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *JAMA* 320(3): 272-280
17. Dias MC, Pinto DC, Silva AM (2021) Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Mol* 26(17): 5377-5393
18. Sergiel I (2024) Flawonoidy - naturalne związki o potencjale przeciwwirusowym i przeciwnowotworowym. *Postępy biochemii* 70(4): 474-482

19. Majewska M, Czczot H (2009) Flawonoidy w profilaktyce i terapii. *Farm Pol* 65(5): 369-377
20. Safe S, Jayaraman A, Chapkin RS, Howard M, Mohankumar K, Shrestha R (2021) Flavonoids: structure-function and mechanisms of action and opportunities for drug development. *Toxicol Res* 37: 147-162
21. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* 117(4): 426-436
22. Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valéro JR (2011) Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Crit Rev Biotechnol* 31(3): 227-249
23. Sergiel I, Pohl P, Biesaga M (2014) Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chem* (145): 404-408
24. Boyes BE, Dong MW (2018) Modern trends and best practices in mobile-phase selection in reversed-phase chromatography. *LCGC North America* 36(10): 752-768
25. Chaves JO, de Souza MC, da Silva LC, Lachos-Perez D, Torres-Mayanga PC, da Fonseca Machado AP, Forster-Carneiro T, Vázquez-Espinoza M, Velasco González-de-Peredo A, Fernández Barbero G, Rostagno MA (2020) Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. *Front Chem* (8): 507887
26. Chávez-González ML, Sepúlveda L, Verma DK, Luna-García HA, Rodríguez-Durán LV, Iliina A, Aguilar CN (2020) Conventional and emerging extraction processes of flavonoids. *Processes* 8(4): 434-463
27. Dongare MVS, Kohale NB, Rathod SB (2023) A review of chromatograph: Principal, classification, application. *Int J Humanit Soc Sci Manag* 3(2): 367-373
28. Mohan Varma M, Thulluru A, Sunil Kumar KT, Sai Kumar G, Pavani K (2021) HPLC method development and validation: A review. *World J Pharm Res* 10(11): 405-426
29. Gumul D, Korus J, Achremowicz B (2005) Wpływ procesów przetwórczych na aktywność przeciwutleniającą surowców pochodzenia roślinnego. *Żywn nauka technol jakość* 4(45): 41-48
30. Jadhav TR, Moon RS (2015) Review on lyophilization technique. *WJPPS* 4(5): 1906-1928
31. Jurikova T, Mleck J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, Snopce L, Orsavova J (2017) Fruits of black chokeberry *Aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases. *Mol* 22(6): 944-967
32. Khan H (2017) Analytical method development in pharmaceutical research: Steps involved in HPLC method development. *Asian J Pharm Res* 7(3): 203-207
33. Kittibunchakul S, Temviriyankul P, Chaikham P, Kemsawasd V (2023) Effects of freeze drying and convective hot-air drying on predominant bioactive compounds, antioxidant potential and safe consumption of maoberry fruits. *LWT* (184): 114992-115001
34. Lee JE, Kim GS, Park S, Kim YH, Kim MB, Lee WS, Jeong SW, Lee SJ, Jin J S, Shin SC (2014) Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity. *Food Chem* (146): 1-5
35. Oprescu EE, Enascuta CE, Radu E, Ciltea-Udrescu M, Lavric V (2022) Does the ultrasonic field improve the extraction productivity compared to classical methods-Maceration and reflux distillation? *CEP:PI* (179): 109082
36. Patwekar SL, Sakhare RS, Nalbalwar NN (2015) HPLC method development and validation - A general concept. *Int J Chem Pharm Sci* 6(1): 8-14
37. Rao G, Goyal A (2016) An overview on analytical method development and validation by using HPLC. *Pharm Chem J* 3(2): 280-289
38. Srivastava PK, Sit N (2025) A review on fruit and vegetable processing using traditional and novel methods. *FPF2*(1): 4-26
39. Téllez-Pérez C, Cardador-Martínez A, Tejada-Ortigoza V, Soria-Mejía MC, Balderas-León I, Alonzo-Macías M (2020) Antioxidant content of frozen, convective air-dried, freeze-dried, and swell-dried chokecherries (*Prunus virginiana* L.). *Mol* 25(5): 1190-1205
40. Thi ND, Hwang ES (2016) Effects of drying methods on contents of bioactive compounds and antioxidant activities of black chokeberries (*Aronia melanocarpa*). *Food Sci Biotechnol* (25): 55-61
41. Usman I, Hussain M, Imran A, Afzaal M, Saeed F, Javed M, Afzal A, Ashfaq I, Al Jbawi E, Saewan SA (2022) Traditional and innovative approaches for the extraction of bioactive compounds. *Int J Food Prop* 25(1): 1215-1233
42. Vidushi Y, Yadav B, Bharkatiya M (2017) A review on HPLC method development and validation. *RJLBPCS* 2(6): 178
43. Cetinkaya A, Yayla S, Hurkul MM, Sibel A, Ozkan SA (2025) Comprehensive review on chromatographic analysis of flavonoids in fruits. *J Chromatogr Open* 7: 100209
44. Brito A, Ramirez JE, Areche C, Sepúlveda B, Simirgiotis MJ (2014) HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. *Mol* 19(11): 17400-17421
45. Häkkinen S (2000) Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. *Kuopio University Publications D. Medical Sciences* 221: 1-92
46. Sidor A, Drożdżyńska A, Brzozowska A, Szwengiel A, Gramza-Michałowska A (2020) The effect of plant additives on the stability of polyphenols in cloudy and clarified juices from black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *Antioxid* 9(9): 801
47. Cho CW, Rustamov R, Gao D, Kim HM, Kang, JS (2023) Characterization of the bioactive components in *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) fruit extracts and purified fractions by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC). *Anal Lett* 56(14): 2291-2308
48. Vagiri M, Ekholm A, Andersson SC, Johansson E, Rumpunen K (2012) An optimized method for analysis of phenolic compounds in buds, leaves, and fruits of black currant (*Ribes nigrum* L.). *J Agric Food Chem* 60(42): 10501-10510
49. Mikkonen TP., Määttä KR, Hukkanen AT, Kokko HI, Törrönen AR, Kärenlampi SO, Karjalainen RO (2001) Flavonol content varies among black currant cultivars. *J Agric Food Chem* 49(7): 3274-3277
50. Vorobyova V, Skiba M, Vasylyev G, Chygyrynets O (2021) Component composition and antioxidant activity of the blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and apricot pomace (*Prunus armeniaca* L.) extracts. *J Chem Technol Metall* 56(4): 710-719
51. Karaman S, Tütem E, Baskan KS, Apak R (2013) Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties. *J Sci Food Agric* 93(4): 867-875
52. Liaudanskas M, Viškelis P, Kviklys D, Raudonis R, Janulis V (2015) A comparative study of phenolic content in apple fruits. *Int J Food Prop* 18(5): 945-953
53. Crupi P, Coletta A, Anna Milella R, Perniola R, Gasparro M, Genghi R, Antonacci D (2012) HPLC-DAD-ESI-MS Analysis of flavonoid compounds in 5 seedless table grapes grown in Apulian Region. *J Food Sci* 77(2): C174-C181
54. Benmeziane F, Cadot Y, Djamai R, Djermoun L (2016) Determination of the main anthocyanin pigments and flavonols in the skin of red grapes of some table grape varieties (*Vitis vinifera* sp.) by high-performance liquid chromatography with a photodiode detector (HPLC-DAD). *OENO One* 50(3): 125-135
55. Mraih F, Fadhil H, Trabelsi-Ayadi M, Chérif JK (2015) Chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS of flavonoids from hawthorn fruits and their inhibition of human tumor growth. *J New Sci Agri Biotec JS-INAT* (3): 840-846
56. Mraih F, Hidalgo M, de Pascual-Teresa S, Trabelsi-Ayadi M, Cherif JK (2015) Wild grown red and yellow hawthorn fruits from Tunisia as source of antioxidants. *Arab J Chem* 8(4): 570-578
57. Badalica-Petrescu M, Dragan S, Ranga F, Fetea F, Socaciu C (2014) Comparative HPLC-DAD-ESI(+)/MS Fingerprint and Quantification of Phenolic and Flavonoid Composition of Aqueous Leaf Extracts of *Cornus mas* and *Crataegus monogyna*, in Relation to Their Cardiotoxic Potential. *Not Bot Horti Agrobo* 42(1): 9-18

58. Scurria A, Sciortino M, Albanese L, Nuzzo D, Zabini F, Meneguzzo F, Alduina R, Presentato A, Pagliaro M, Avellone G, Ciriminna R (2021) Flavonoids in Lemon and Grapefruit IntegroPectin. *Chem Open* (10): 1055-1058

59. Bao G, Zhang Y, Yang X (2020) Effect of lemon peel flavonoids on anti-fatigue and anti-oxidation capacities of exhaustive exercise mice. *Appl Biol Chem* 63(85): 1-11

Methodological aspects of determining flavonoids in food products with cardioprotective potential – a review of HPLC conditions

Iwona Sergiel✉

Institute of Biological Sciences, University of Zielona Góra

✉corresponding author: i.sergiel@wnb.uz.zgora.pl

Keywords: flavonoids, high-performance liquid chromatography, optimization of chromatographic conditions, foods with cardioprotective properties

ABSTRACT

There is growing interest in flavonoids as bioactive components of functional foods. Flavonoids are a broad group of natural polyphenolic compounds that perform many important biological functions, including antioxidant, anti-inflammatory, antithrombotic, and cardioprotective effects. Given the rising incidence of cardiovascular disease, consuming foods containing flavonoids as a preventive factor is particularly important. These compounds are primarily sourced from fruits such as chokeberry, blackcurrant, apples, hawthorn, lemons, and red grapes. Flavonoids with documented cardioprotective effects have been identified in these foods, including catechin, epicatechin, quercetin, kaempferol, myricetin, rutin, apigenin, luteolin, naringenin, and hesperetin. Precise identification and characterization of flavonoids requires the use of appropriate analytical methods. High-performance liquid chromatography remains one of the most commonly used techniques in qualitative and quantitative analysis. The selection of extraction conditions and chromatographic parameters, such as column type, mobile phase, elution method, and detector, are crucial for ensuring selectivity and repeatability of determinations. The aim of this paper is to review the methodological aspects of flavonoid determination in selected food products used in the prevention of cardiovascular disease. Flavonoid extraction methods and liquid chromatography conditions are summarized. The analyzed studies included plant materials in both fresh, freeze-dried, and frozen forms. Extracts were derived from whole plants, as well as from their flesh, peels, and leaves. This paper provides an overview of practical solutions and can be used to support planning quantitative flavonoid analyses.

