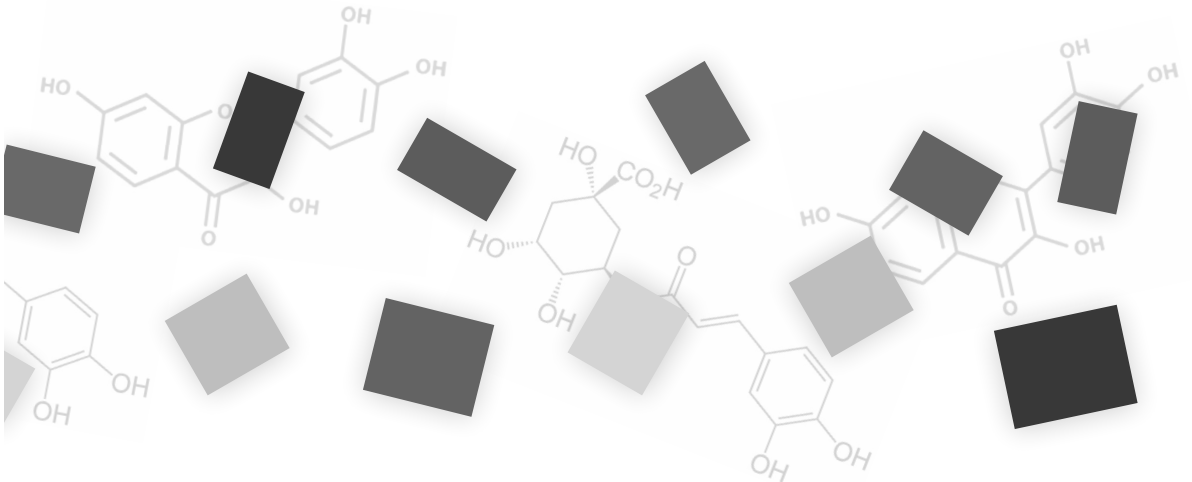


Związki fenolowe
w nalewkach z wybranych owoców

Anna Sokół-Łętowska

Związki fenolowe w nalewkach z wybranych owoców



Autor
Anna Sokół-Łętowska

Opiniodawca
prof. dr hab. Witold Płocharski

Redaktor merytoryczny
prof. dr hab. Ewelina Dziuba

Opracowanie redakcyjne
Magdalena Kozińska

Korekta
Elżbieta Winiarska-Grabosz
Justyna Murdza

Łamanie
Teresa Alicja Chmura

Projekt okładki
Paweł Wójcik

Monografie CLXI

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław 2013

ISSN 2083-5531
ISBN 978-83-7717-133-2

WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO WE WROCŁAWIU

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. inż. Andrzej Kotecki

ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel. 71 328 12 77

e-mail: wyd@up.wroc.pl

Nakład 100 + 16 egz. Ark. wyd. 7,2. Ark. druk. 7,0
Druk i oprawa: Expol, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

Wykaz skrótów – Abbreviations	7
1. Wstęp	9
2. Geneza i cel pracy	16
3. Materiał i metodyka doświadczeń	17
3.1. Materiał badawczy i technologia produkcji nalewek	17
3.2. Metody analiz	22
3.2.1. Aktywność przeciwutleniająca	22
3.2.2. Identyfikacja związków fenolowych	23
3.2.3. Oznaczenie parametrów barwy.....	23
3.2.4. Ocena organoleptyczna	23
3.2.5. Statystyczne opracowanie wyników	23
4. Omówienie wyników	24
4.1. Jakość nalewek w zależności od stężenia etanolu	24
4.2. Rola sposobu przyrządzania w jakości nalewek	29
4.2.1. Nalewki z czarnej porzeczki.....	29
4.2.2. Nalewki z mahonii.....	31
4.2.3. Nalewki z berberysu.....	35
4.2.4. Nalewki z tarniny	41
4.3. Identyfikacja i przemiany związków fenolowych nalewek z wybranych owoców podczas przechowywania	49
4.3.1. Związki fenolowe owoców i nalewek z czarnych porzeczek	55
4.3.2. Związki fenolowe owoców i nalewek z mahonii.....	59
4.3.3. Związki fenolowe owoców i nalewek z berberysu.....	69
4.3.4. Związki fenolowe owoców i nalewek z tarniny.....	75
5. Dyskusja	82
5.1. Jakość nalewek w zależności od stężenia etanolu użytego do ich wytworzenia.....	82
5.2. Jakość nalewek w zależności od sposobu przygotowania	83
5.3. Identyfikacja i przemiany związków fenolowych owoców oraz nalewek	88
6. Wnioski	95
7. Piśmiennictwo	97

Wykaz skrótów – Abbreviations

- ABTS^{•+} – kationorodnik kwasu 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) – radical cation of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- Cy 3-glu – 3-glukozyd cyjanidyny – cyanidin 3-glucoside
- Dp 3-glu – 3-glukozyd delfinidyny – delphinidin 3-glucoside
- DPPH[•] – rodnik 1,1-difenyl-2-pikrylohydrazylowy – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical
- FRAP – zdolność redukcji jonów żelaza Fe⁺³ – ferric reducing antioxidant power
- GAE – ekwiwalent kwasu galusowego – gallic acid equivalent
- HMF – hydroksymetylofurfural – hydroxymethylfurfural
- Ir 3-rut – 3-rutynozyd izoramnetyny – isorhamnetin 3-rutinoside
- Pg 3-glu – 3-glukozyd pelargonidyny – pelargonidin 3-glucoside
- Pt 3-glu – 3-glukozyd petunidyny – petunidin 3-glucoside
- Q 3-gal – 3-galaktozyd kwercetyny – quercetin 3-galactoside
- Q 3-glu – 3-glukozyd kwercetyny – quercetin 3-glucoside
- Q 3-rut – 3-rutynozyd kwercetyny – quercetin 3-rutinoside
- TE – ekwiwalent troloxu – Trolox equivalent
- TEAC – pojemność przeciwutleniająca wyrażona w równoważnikach troloxu – Trolox equivalent antioxidant capacity
- TIC – tryb pracy spektrometru mas polegający na rejestrowaniu całkowitego prądu jonowego (total ion current) w określonym zakresie *m/z* – full scan acquisition resulting in the total ion current plot

1. WSTĘP

Owoce i przetwory owocowe są cennym źródłem związków o charakterze przeciwutleniającym, a także niektórych witamin i składników mineralnych. Natomiast etanol, uznawany za środek spożywczy, przy nadmiernej konsumpcji oddziałuje toksycznie na wątrobę i trzustkę [Apte i wsp. 1997, Epstein 1997] oraz zwiększa ryzyko wystąpienia wielu innych chorób. Zagrożenia związane z nadmierną konsumpcją napojów alkoholowych są znane od dawna. Jednocześnie wskazuje się również na pozytywne konsekwencje zdrowotne spożywania umiarkowanej ilości alkoholu. Guidelines Advisory Committee (DGAC) [U.S.D.A. Dietary Guidelines for Americans 2010] w wytycznych żywieniowych dla Amerykanów z roku 2010 wskazuje, że korzystne skutki zdrowotne występują u osób spożywających niewielką ilość napojów alkoholowych. Amerykański Departament Zdrowia wyjaśnia, że stanowi to 30–40 cm³ czystego etanolu (dwie porcje dziennie) dla dorosłych mężczyzn i 20–30 cm³ czystego etanolu (jedna porcja dziennie) dla dorosłych kobiet. Uważa się, że efekty działania alkoholu w organizmie, których skutkiem jest między innymi zwiększona produkcja wolnych rodników, mogą być neutralizowane przez przeciwutleniacze zawarte także w napojach alkoholowych. Zostało to wielokrotnie potwierdzone w przypadku win gronowych [Akçay i wsp. 2004, Assunção i wsp. 2007, de Lorimier 2000, Rodrigo i wsp. 2002]. Wieloletnie badania epidemiologiczne dodatkowo wskazują, że umiarkowane spożycie alkoholu wraz z jednoczesnym spożywaniem antyoksydantów może redukować ryzyko rozwoju chorób serca [Gaziano i wsp. 1999, de Lorimier 2000, di Castelnuovo 2006, U.S.D.A. 2010]. Spożywanie wina, piwa, whisky lub nalewek w niewielkich ilościach jest obecnie uważane za korzystne dla zdrowia, ze względu na przeciworodnikowe i przeciwdrobnoustrojowe działanie antyoksydantów, które wchodzi w skład tych napojów. Za umiarkowaną dzienną porcją alkoholu uważa się ilość poniżej 0,3 g·kg⁻¹ masy ciała, co odpowiada około 80–90 cm³ alkoholu o mocy 30% [Gaziano i wsp. 2000, Markus i wsp. 2004, Lin i wsp. 2005, U.S.D.A. 2010].

Z szeroko zakrojonych badań epidemiologicznych w większości krajów zachodnich, w których choroby cywilizacyjne takie jak choroba wieńcowa, nowotwory, udary mózgu i cukrzyca są podstawowymi przyczynami śmierci, wynika, że umiarkowane spożywanie alkoholu korzystnie koreluje z niższą umieralnością, zwłaszcza wśród osób w średnim i starszym wieku. Krzywa umieralności przybiera kształt litery J z najmniejszym ryzykiem śmiertelności dla osób spożywających 1–2 drinki dziennie [di Castelnuovo 2006, de Lorimier 2000, Petti i Scully 2006, Kim i wsp. 2009].

Powszechnie uznaje się, że o korzystnym działaniu napojów alkoholowych decydują przede wszystkim obecne w nich związki polifenolowe. Ich występowanie w winach, zwłaszcza czerwonych, sprawia, że napoje te zostały wnikliwie przebadane i uznane za sprzyjające zdrowiu. Niealkoholowe składniki wina mogą poprawić ochronę antyoksydacyjną, zmniejsz-

szyc agregację płytek krwi, spowodować rozszerzenie naczyń krwionośnych i poprzez te procesy wywierać pozytywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Stwierdzono, że polifenole obecne w napojach o umiarkowanej zawartości alkoholu mogą skutecznie neutralizować rodniki powstające podczas jego metabolizmu w organizmie [Imark i wsp. 2000]. Uważa się, że poza związkami fenolowymi za te dobroczynne efekty częściowo odpowiedzialny jest również alkohol, który powoduje wzrost poziomu lipoprotein wysokiej gęstości (HDL) oraz zmniejsza frakcję lipoprotein niskiej gęstości (LDL). Niektóre prace wskazują również, że etanol może korzystnie redukować wątrobową produkcję fibrynogenu, przez co wywiera działanie przeciwzakrzepowe. Według Ronksley i wsp. [2011] oraz Holahan i wsp. [2012] wiele prac doświadczalnych wskazuje, że pozytywne aspekty wpływu umiarkowanego spożycia wina na choroby sercowo-naczyniowe przeważają nad negatywnymi. Należy nadmienić, że czerwone wino i piwo, a więc napoje zawierające dużą ilość związków fenolowych, miały większy wpływ na tę cechę niż napoje wysokoprocentowe [Castelli i wsp. 1977, de Jong i wsp. 2008, de Lorimier 2000, Mann i Folts 2004]. Zauważono pozytywne działanie na organizm zarówno w przypadku wina pozbawionego związków fenolowych, jak również wina pozbawionego alkoholu [Caccetta i wsp. 2000, Wang i wsp. 2005].

Aktywność przeciwutleniająca związków fenolowych i ich związek z zapobieganiem chorobom serca zostały wielokrotnie dowiedzione [Akçay i wsp. 2004, Arranz i wsp. 2012, Cassidy i wsp. 2012, Cordova i Sumpio 2009, Pace-Asciak i wsp. 1995]. Do najważniejszych aspektów aktywności biologicznej flawonoidów zaliczają się: działanie wzmacniające i uszczelniające ściany naczyń krwionośnych, działanie antymutagenne, antykancerogenne, przeciwzapalne oraz aktywność antyoksydacyjna. Wykazano, że są to związki o wysokiej aktywności wobec większości wolnych rodników i reaktywnych form tlenu.

Za składniki szczególnie aktywne biologicznie uważa się między innymi flawonole (kwercetynę), resweratrol, proantocyjanidyny, katechiny oraz kwas ferulowy, a także wysoką, całkowitą zawartość związków fenolowych [Goldberg i wsp. 1995, 1998, Frankel i wsp. 1995, Lamuela-Raventos i Waterhouse 1993, McDonald i wsp. 1998, Maxwell 1997, Soleas i wsp. 1997].

W wielu badaniach dowiedziono, że aktywność związków polifenolowych wobec wolnych rodników jest często wyższa niż witamin C i E [Grotewold 2006]. Niektóre grupy związków wykazują większą aktywność, występując w formie spolimeryzowanej – dimerów lub trimerów, takie jak procyanidyny – pochodne katechin, inne – jako glikozydy [Lu i Foo 2000]. Reakcje utleniania, polimeryzacji i kondensacji są dobrze zbadane w winach, których aktywność przeciwutleniająca została wielokrotnie potwierdzona. Rola związków fenolowych w przetworach owocowych jest dobrze poznana. Istnieje również niewielka liczba doniesień na temat udziału związków fenolowych w aktywności przeciwutleniającej w napojach o wysokiej zawartości alkoholu [Alonso i wsp. 2004, Canas i wsp. 2008, Imark i wsp. 2000, Schwarz i wsp. 2009]

Uważa się, że także w nalewkach owocowych biologicznie aktywną frakcję stanowią przede wszystkim związki fenolowe. Związki aromatyczne i smak to główne czynniki decydujące o pozytywnym odbiorze produktu przez konsumenta. W zależności od rodzaju użytych owoców ilość i skład wyekstrahowanych do roztworu związków oraz ich przemiany podczas przechowywania sprawiają, że nalewki są bardzo zróżnicowaną grupą produktów [Alamprese i wsp. 2005, Alamprese i Pompei 2005, Heinonen i wsp. 1998, Tseng i wsp. 2006].

O stabilności składników w roztworach etanolowych decydować może wiele czynników, między innymi temperatura, pH, obecność tlenu, promieniowanie UV, zawartość kwasu askorbinowego i cukru oraz produkty ich degradacji. Główne reakcje odpowiedzialne za

przemiany zachodzące w winach to utlenianie, polimeryzacja i kondensacja tanin, reakcje Maillarda oraz degradacja kwasu askorbinowego. W wyniku tych przemian potencjał antyoksydacyjny wina może ulegać zmniejszeniu na skutek degradacji czynnych związków lub wzrastać na skutek wytworzenie nowych, aktywnych związków [Atala-Zavala i wsp. 2004, Liu i wsp. 2003, Montoro i wsp. 2006a, Shen i Wu 2004, Shen i wsp. 2007, Varming i wsp. 2004].

W dostępnych źródłach literaturowych znajdują się nieliczne doniesienia dotyczące aktywności przeciwrodnikowej w roztworach alkoholowych zawierających związki polifenolowe owoców i cukier, takich jak nalewki. Autorzy włoscy i słoweńscy [Alamprese i wsp. 2005a,b, Jakopic i wsp. 2007, Vacca i wsp. 2003] prowadzili badania nad składem i aktywnością antyoksydacyjną likierów otrzymywanych z orzechów włoskich (nocino) i z owoców mirtu. W wymienionych publikacjach oceniony został między innymi wpływ terminu zbioru, odmiany, warunków środowiskowych, stopnia dojrzałości surowców na zawartość polifenoli w likierach. Inne opublikowane prace dotyczyły nalewek z kwiatów róży, owoców moreli japońskiej, wiśni, związków aromatycznych likieru cytrynowego [Crupi i wsp. 2007, Liu i wsp. 2003, Montoro i wsp. 2006a,b, Rødtjer i wsp. 2006, Shen i wsp. 2007, Tseng i wsp. 2006]. Prace te wytworzyły bardzo ogólny pogląd na przemiany polifenoli zachodzące w tego typu roztworach i na czynniki decydujące o jakości produktów. Prezentowane są także doniesienia o aktywności antyoksydacyjnej produktów utleniania polifenoli i produktów reakcji Maillarda [Manzocco i wsp. 2000, Morales i Jiménez-Pérez 2004, Roche i wsp. 2005].

Związki fenolowe uczestniczą również w kształtowaniu jakości żywności. Nadają charakterystyczną barwę, smak i cierpkość sokom owocowym, winom, piwu, a także nalewkom [Alamprese i wsp. 2005, Alamprese i Pompei 2005, Liu i wsp. 2003].

W krajach Europy Zachodniej nie ma odpowiednika słowa „nalewki”. Używana jest nazwa „spirit drinks” lub „spirit” poprzedzona nazwą owocu, albo też nazwa likier (liqueur lub cordial), pod którą rozumie się oprócz klasycznych ekstraktów z owoców i ziół także destylaty z owoców fermentowanych lub ekstrahowanych alkoholem, napoje sporządzone ze spirytusu z dodatkiem olejków zapachowych i dużej ilości cukru (nawet do 50%), czasem dokwaszane kwasem cytrynowym i z dodatkiem stabilizatorów (np. Cointreau, Maraschino). Likierki występują także pod nazwami własnymi, np. nocino – nalewka z orzechów włoskich, limoncello – nalewka cytrynowa, prunelle, pacharan – nalewka tarninowa [Alamprese i wsp. 2005, Crupi i wsp. 2007, Rozporządzenie (EWG) nr 1576/89].

Likiery są napojami spirytusowymi o wysokiej zawartości cukru, natomiast nalewki mogą być zarówno słodkie, jak i wytrawne, w zależności od upodobania konsumenta. Wytwarza się je na bazie ziół, korzeni i owoców. Zwyczajowo na ziemiach polskich sporządzano nalewki z owoców uprawianych w przydomowych ogrodach i sadach, z owoców drzew i krzewów dziko rosnących oraz ziół, kwiatów i korzeni. Doceniany był ich smak, barwa i aromat. Nalewek owocowych, ziołowych i korzennych używano także w leczeniu różnych niedyspozycji, wykorzystując lecznicze działanie substancji wchodzących w ich skład.

W dostępnej literaturze niewiele jest badań nad związkami fenolowymi w nalewkach, które zawierają zwykle 15–30% alkoholu. Aktywność badawcza ukierunkowana jest przede wszystkim na świeże owoce i warzywa oraz przetwory z nich wykonane, takie jak soki, przeciera, kompoty i inne produkty. Bogata literatura dotyczy również win gronowych, w aspekcie ich aktywności przeciwutleniającej oraz stabilności i przemian składników podczas przechowywania [Netzel i wsp. 2003, Villaño i wsp. 2006]. Warunki klimatyczne naszego kraju nie sprzyjają uprawie winorośli i wytwarzaniu win gronowych na dużą skalę. Tradycją jest natomiast wytwarzanie nalewek owocowych, często o niewielkiej zawartości alkoholu, które

pełnić mogą podobną rolę jak wino. Nie są one jednak tak rozpowszechnione, ponieważ po II wojnie światowej nastąpiło w Polsce odejście od tradycji wytwarzania nalewek i zastąpienie ich trunkami wysokoprocentowymi.

W Polsce w ostatnich latach zmieniają się upodobania konsumentów, jeśli chodzi o styl spożywania napojów spirytusowych. Zmniejsza się spożycie wódek wysokoprocentowych na rzecz wina, piwa i napojów o niższej zawartości alkoholu w porównaniu z wódką. Producenci nalewek i likierów, odpowiadając na zmieniające się preferencje konsumentów, dążą do wzbogacenia swojej oferty w nowe produkty, charakteryzujące się atrakcyjnym smakiem i zapachem, a jednocześnie nawiązujące do starych polskich wytworów alkoholowych.

Produkty takie, wytwarzane na bazie starych receptur, trafiają na Listę Produktów Tradycyjnych Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Są one zachętą do ubiegania się o rejestrację i ochronę poprzez umieszczenie ich nazw w europejskim systemie ochrony nazw produktów. Na liście tej w kategorii napojów znajduje się już ponad 20 różnych nalewek (np. z orzechów, miodu, żurawiny, derenia, pigwy i innych), co świadczy o długiej tradycji spożywania tych produktów. Różnorodność nalewek może być dodatkową przesłanką do podjęcia badań prowadzących do wytworzenia produktu o wysokich walorach zdrowotnych.

Z przedstawionego przeglądu literatury wynika, że jest bardzo niewiele prac podejmujących tematy związane z pełną charakterystyką procesu sporządzania nalewek, zwłaszcza z owoców rosnących w naszym regionie geograficznym. Brak jest badań obejmujących analizy składu jakościowego i ilościowego, z wykorzystaniem metod spektroskopowych, zarówno podczas sporządzania nalewek, jak i ich długotrwałego przechowywania.

Nalewki mogą być w naszych warunkach klimatycznych alternatywą dla win, znanych ze swojej aktywności antyoksydacyjnej. Ponadto nalewki sporządza się tradycyjnie z wielu różnych gatunków owoców o zróżnicowanym składzie przeciwutleniający, barwie i aromacie. Wydaje się, że aktywność antyoksydacyjna nalewek może być porównywalna, a nawet wyższa aniżeli aktywność win. Stabilność tej aktywności podczas przechowywania nalewek, gdy nabierają odpowiednich cech organoleptycznych, stanowić może przyczynek do otrzymania atrakcyjnego produktu o wysokiej aktywności biologicznej.

Do wytwarzania nalewek wykorzystuje się najczęściej owoce popularne, takie jak wiśnie czy czarne porzeczki. Znane i lubiane są także nalewki z owoców roślin mniej znanych, często pozyskanych ze stanu dzikiego i tradycyjne uznawanych za lecznicze, takich jak dzika róża, berberys, mahonia czy tarnina. Charakteryzują się one wysoką zawartością związków fenolowych i aktywnością antyoksydacyjną (tab. 1 i 2).

Czarne porzeczki (*Ribes nigrum* L.) to owoce z rodziny różowatych (*Rosaceae*), ciesząca się w Polsce ogromną popularnością ze względu na walory zdrowotne i barwę. Stanowią atrakcyjny surowiec do przetwórstwa. Wytwarza się z nich nektary, dżemy, konfitury, kompoty, wina, nalewki i likiery zarówno w gospodarstwach domowych, jak również na skalę przemysłową. Charakteryzują się dużą zawartością związków fenolowych i barwników antocyjanowych, które decydują o ich walorach prozdrowotnych (tab. 1).

Do rodziny różowatych (*Rosaceae*) należy także tarnina (*Prunus spinosa* L.). W medycynie ludowej wykorzystuje się jej kwiaty i owoce, które dzięki obecności flawonoidów działają wykrztuśnie, napotnie, moczopędnie oraz antyseptycznie i przeciwzapalnie. Stosuje się je w stanach zapalnych dróg moczowych, zaporciach i nieżytkach żołądka [Lamer-Zarawska i wsp. 2007, Ożarowski i Jaroniewski 1987].

Tabela 1
Table 1

Zawartość polifenoli ogółem i antocyjanów w wybranych owocach
The total phenolic and anthocyanins content in selected fruits

Owoc Fruit	Polifenole ogółem Total phenolics [mg GAE·100 g ⁻¹]	Źródło Reference	Antocyjany Anthocyanins [mg cy 3-glu·100 g ⁻¹]	Źródło Reference
Berberys Barberry (<i>Berberis vulgaris</i> L.)	789–1074	Akbulut i wsp. 2009, Sokół-Łętowska 2009	55–93	Akbulut i wsp. 2009, Sokół- Łętowska 2009
Czarna porzeczka Blackcurrant (<i>Ribes nigrum</i> L.)	200–890	Khoo i wsp. 2012, Fukumoto i Mazza 2000, Jakobek i wsp. 2007, Mar- kowski i Płocharski 2003, Shahidi i Naczek 2003	74–280	Benvenuti i wsp. 2004, Fukumoto i Mazza 2000, Jakobek i wsp. 2007, Markow- ski i Płocharski 2010, Shahidi i Naczek 2003
Mahonia – Mahonia (<i>Mahonia aquifo- lium</i> (Pursh) Nutt.)	806	Sokół-Łętow- ska 2009	227	Sokół-Łętowska 2009
Tarnina – Sloe (<i>Prunus spinosa</i> L.)	127–851	Dragovic-Uzelac i wsp. 2007, Egea i wsp. 2010	31–171	Dragovic-Uzelac i wsp. 2007, Paul- ovicsová i wsp. 2009

Tabela 2
Table 2

Aktywność przeciwutleniająca wybranych owoców
Antioxidant activity of selected fruits

Owoc Fruit	Aktywność przeciwutleniająca Antioxidant activity [μmol TE·100 g ⁻¹]	Metoda Method	Źródło Reference
Berberys Barberry (<i>Berberis vulgaris</i> L.)	4200–10 000	DPPH [•]	Sokół-Łętowska 2009
Czarna porzeczka Blackcurrant (<i>Ribes nigrum</i> L.)	4000–10 000	DPPH [•] ABTS ^{•+}	Jakobek i wsp. 2007, Khoo i wsp. 2012
Mahonia – Mahonia (<i>Mahonia aquifo- lium</i> (Pursh) Nutt.)	3000–5000	DPPH [•]	Sokół-Łętowska 2009
Tarnina – Sloe (<i>Prunus spinosa</i> L.)	2400–9000	DPPH [•] ABTS ^{•+} TEAC	Dragovic-Uzelac i wsp. 2007, Jakobek i wsp. 2007, Egea i wsp. 2010

Jadalne owoce tarniny *Prunus spinosa* L. (fot. 1, tab. 1) mają kulisty kształt, średnicę od 1 do 1,5 cm, ciemną skórkę. Wskutek obecności flawonoidów wykazują charakterystyczną cierpkość, która zmniejsza się po przemrożeniu owoców. Można z nich robić konfitury, kompoty, nalewki, wina owocowe, soki i syropy. Przetworom nadają delikatny aromat i pikantny smak. Słodkie przetwory z owoców tarniny podawane były niegdyś jako aromatyzujący i wzbo-gacający w garbniki dodatek do potraw [Grochowski 1986, Lamer-Zarawska i wsp. 2007].



Fot. 1. Owoce tarniny *Prunus spinosa* L. (fot. A. Sokół-Łętowska)
Phot. 1. Sloe fruits *Prunus spinosa* L. (photo A. Sokół-Łętowska)

Berberys zwyczajny (*Berberis vulgaris* L.) (fot. 2, tab. 1 i 2) jest przedstawicielem rodziny berberysowatych (*Berberidaceae*). Obecnie roślina ta rzadko występuje w stanie naturalnym gdyż została prawie całkowicie wytępiona ze względu na to, że jest pośrednim żywicielem rdzy zbożowej, uprawiana jest natomiast w ogrodach działkowych i jako krzew ozdobny. Berberys był stosowany w medycynie ludowej, ponieważ owoce wykazują działanie moczopędne, przeciwgorączkowe i regulujące przemianę materii, wpływają na procesy metaboliczne oraz ogólną odporność organizmu. W lecznictwie stosowano także korę, liście i korzenie, które podnoszą krzepliwość krwi oraz pobudzają przepływ żółci. W Polsce berberys nazywano kwaśnicą lub polską cytryną, ze względu na kwaśny smak owoców zawierających do 6,5% kwasów. Z owoców można wytwarzać soki, syropy, nalewki, wina, dżemy, konfitury i marmolady [Ożarowski 1982, Ożarowski i Jaroniewski 1987].

Mahonia pospolita, ościąg (tab. 1, 2), (*Mahonia aquifolia* (Pursh) Nutt.), również należąca do rodziny berberysowatych, obecnie uprawiana jest przede wszystkim jako krzew ozdobny (fot. 3). Znana jest i od dawna wykorzystywana w lecznictwie do leczenia przewlekłych chorób skórnych, takich jak na przykład łuszczyca, oraz do łagodzenia objawów trądziku. Do celów leczniczych wykorzystuje się korę i korzenie tej rośliny, a w mniejszym stopniu owoce. Przetwory z owoców mahonii regulują przemianę materii. W celach spożywczych owoców o ciemnej barwie i kwaskowym smaku można używać do wytwarzania galaretek, dżemów, kompotów, win i nalewek [Francis 2003, Janick i Paull 2008].



Fot. 2. Owoce berberysu zwyczajnego *Berberis vulgaris* L. (fot. B. Guziec)
Phot. 2. Barberry fruits *Berberis vulgaris* L. (photo B. Guziec)



Fot. 3. Owoce mahonii *Mahonia aquifolia* (Pursh) Nutt. (fot. A. Sokół-Łętowska)
Phot. 3. Mahonia fruits *Mahonia aquifolia* (Pursh) Nutt. (photo A. Sokół-Łętowska)

Liście i korzenie berberysu oraz mahonii zawierają alkaloid berberynę, która ma działanie przeciwpasożytnicze i przeciwbakteryjne, ale jednocześnie odkłada się w sercu, wątrobie i trzustce, dlatego zastosowanie wyciągów z kory liści i korzeni jest ograniczone. Alkaloid ten jest jednak nieobecny w owocach [Zovko Končić i wsp. 2010].

Wysoka zawartość polifenoli oraz znacząca aktywność antyoksydacyjna omówionych owoców stanowi przesłankę do otrzymania nalewek o wysokim potencjale antyoksydacyjnym.

2. GENEZA I CEL PRACY

Nalewki owocowe są napojami alkoholowymi spożywanymi na całym świecie. Swoją popularność zawdzięczają walorom organoleptycznym pochodzącym od owoców użytych do ich sporządzenia.

Na podstawie przedstawionego przeglądu piśmiennictwa można zauważyć, że niewiele jest doniesień naukowych na temat zawartości i przemian związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej nalewek owocowych.

Istnieje bogata literatura na temat składników antyoksydacyjnych win i alkoholi wysokoprocentowych typu koniak czy brandy. Bardzo niewiele jest natomiast opracowań dotyczących związków aktywnych w napojach alkoholowych w rodzaju nalewek i likierów. Na podstawie nielicznych dotychczasowych doniesień literaturowych można przypuszczać, że w napojach alkoholowych, takich jak nalewki, sporządzonych z różnych owoców, zawartość polifenoli oraz aktywność antyoksydacyjna i jej stabilność będzie porównywalna lub większa niż określana dla win. Mnogość owoców, ich odmienne cechy organoleptyczne i skład stanowią przesłankę do przeprowadzenia badań nad oceną możliwości wytwarzania nalewek z owoców charakteryzujących się wysoką zawartością aktywnych związków.

Celem pracy było ilościowe i jakościowe badanie związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej nalewek owocowych otrzymanych z różnych owoców dostępnych w Polsce – zarówno popularnych, jak i mniej znanych, a także określenie metody sporządzania nalewek bogatych w przeciwutleniacze, o korzystnych cechach organoleptycznych.

Realizacja tego celu obejmowała następujące etapy:

- Porównanie jakości nalewek otrzymanych z wykorzystaniem wodnych roztworów etanolu o różnych stężeniach.
- Ocena zmian zawartości związków fenolowych i aktywności przeciwutleniającej w zależności od procesu technologicznego zastosowanego przy wytwarzaniu nalewek.
- Otrzymanie nalewek z 4 wybranych gatunków owoców jedną metodą i określenie w nich zmian składu i zawartości związków fenolowych (w tym antocyjanów ogółem) i aktywności przeciwutleniającej oraz określenie stabilności składu i aktywności przeciwutleniającej w nalewkach w zależności od czasu przechowywania.

3. MATERIAŁ I METODYKA DOŚWIADCZEŃ

Przedmiotem pracy były owoce i nalewki owocowe z czarnych porzeczek, mahonii, berberysu i tarniny, przygotowane z dodatkiem sacharozy na podstawie zróżnicowanych wariantów technologicznych. W wybranych nalewkach oceniono zmiany składu i stężenia związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej podczas ich przechowywania.

Oznaczanie polifenoli ogółem, antocyjanów i aktywności antyoksydacyjnej przeprowadzono, stosując metody spektrofotometryczne oraz metodę HPLC. Identyfikację związków polifenolowych w surowcach i nalewkach wykonano metodą spektrometrii mas UPLC-ESI-MS/MS.

3.1. Materiał badawczy i technologia produkcji nalewek

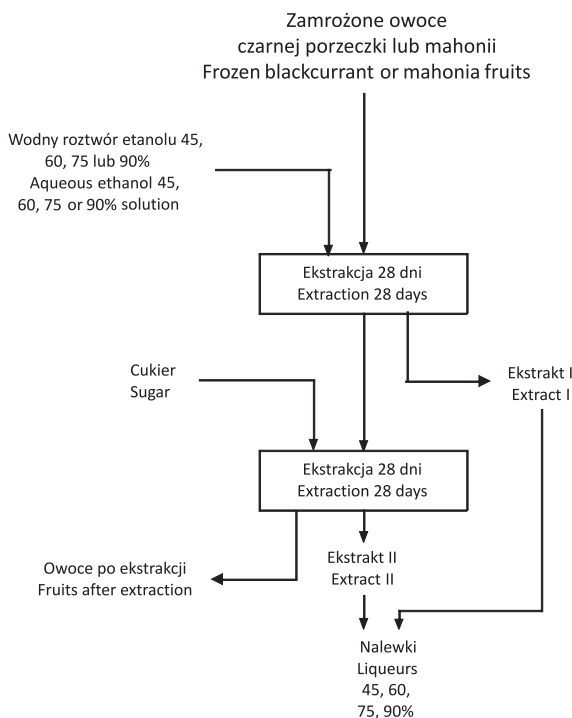
Materiałem badawczym były owoce i nalewki z czarnych porzeczek, berberysu, tarniny i mahonii.

Owoce czarnych porzeczek odmiany 'Tisel', zebrano na plantacji w okolicach Lubina, natomiast owoce berberysu, mahonii i tarniny zebrano w okolicach Wrocławia w latach 2006 i 2007. Surowiec, po oczyszczeniu i umyciu, przechowywano w temperaturze -18°C do czasu przygotowania nalewek.

Badania wykonano w Zakładzie Technologii Owoców Warzyw i Zbóż Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Podjęte badania obejmowały trzy etapy. W pierwszym ustalono rolę stężenia etanolu w jakości nalewek z czarnej porzeczki i mahonii, przyjmując za kryterium wysoką zawartość związków fenolowych. W etapie drugim sporządzono nalewki, stosując różne sposoby przygotowania i zbadano ich wpływ na jakość produktów gotowych. W etapie trzecim przygotowano nalewki z czterech surowców jedną metodą i określono skład związków fenolowych oraz zbadano, jak przechowywanie przez 12 i 60 miesięcy wpłynie na skład i aktywność przeciwutleniającą nalewek. We wszystkich nalewkach proporcje wagowe roztworu alkoholu i cukru w stosunku do wyjściowej masy owoców wynosiły 2 części owoców: 1 część cukru : 2 części roztworu etanolu. Wszystkie prace technologiczne wykonano w dwóch powtórzeniach.

W etapie pierwszym owoce zalano 45, 60, 75 lub 90% wodnym roztworem etanolu i prowadzono macerację przez 28 dni, następnie oddzielono roztwór alkoholowy (ekstrakt I), a do owoców dodano sacharozę i kontynuowano proces maceracji przez kolejne 28 dni. Po upływie tego czasu roztwór (ekstrakt II), zawierający składniki owoców, alkohol i cukier, oddzielono od owoców i połączono z otrzymanym uprzednio roztworem alkoholowym (rys. 1). Nalewek nie przechowywano. W tym etapie pracy oceniono zależność skuteczności ekstrakcji aktywnych związków z owoców od stężenia alkoholu etylowego. Na podstawie wyników otrzymanych w pierwszym etapie badań zdecydowano, że w etapie drugim wykorzystane zostaną 45 i 60% roztwory etanolu.

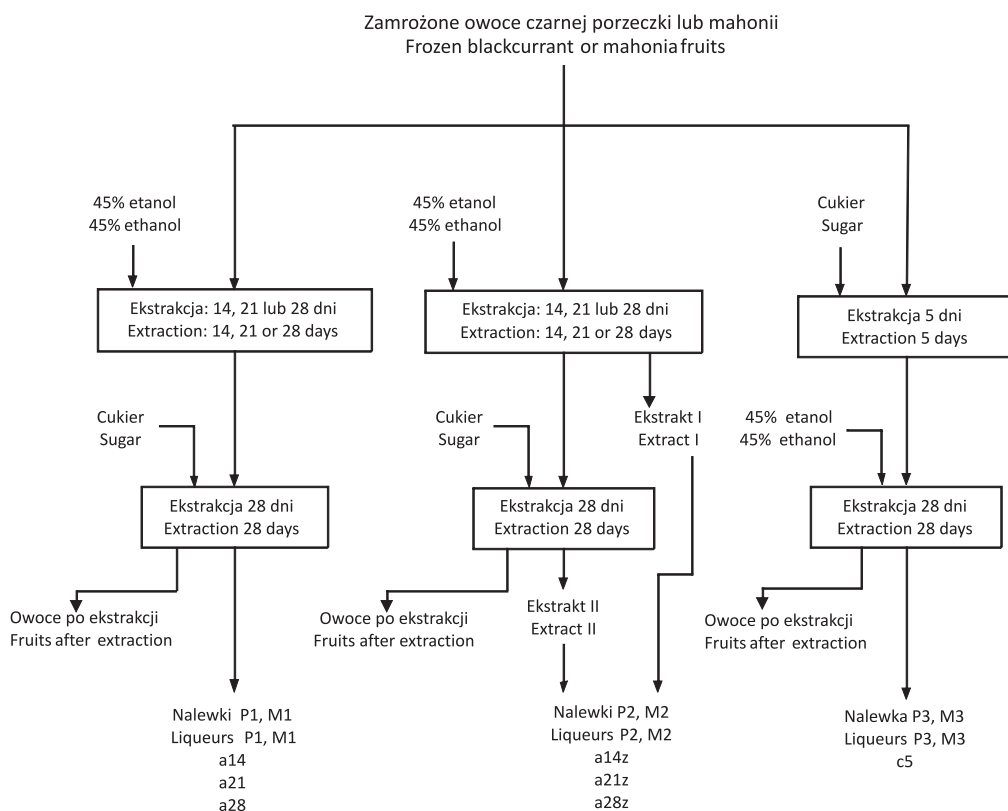


Rys. 1. Schemat przygotowania nalewek z czarnej porzeczki i mahonii z użyciem 45, 60, 75 oraz 90% etanolu

Fig. 1. The scheme of blackcurrant and mahonia liqueurs preparation with 45, 60, 75 and 90% aqueous ethanol

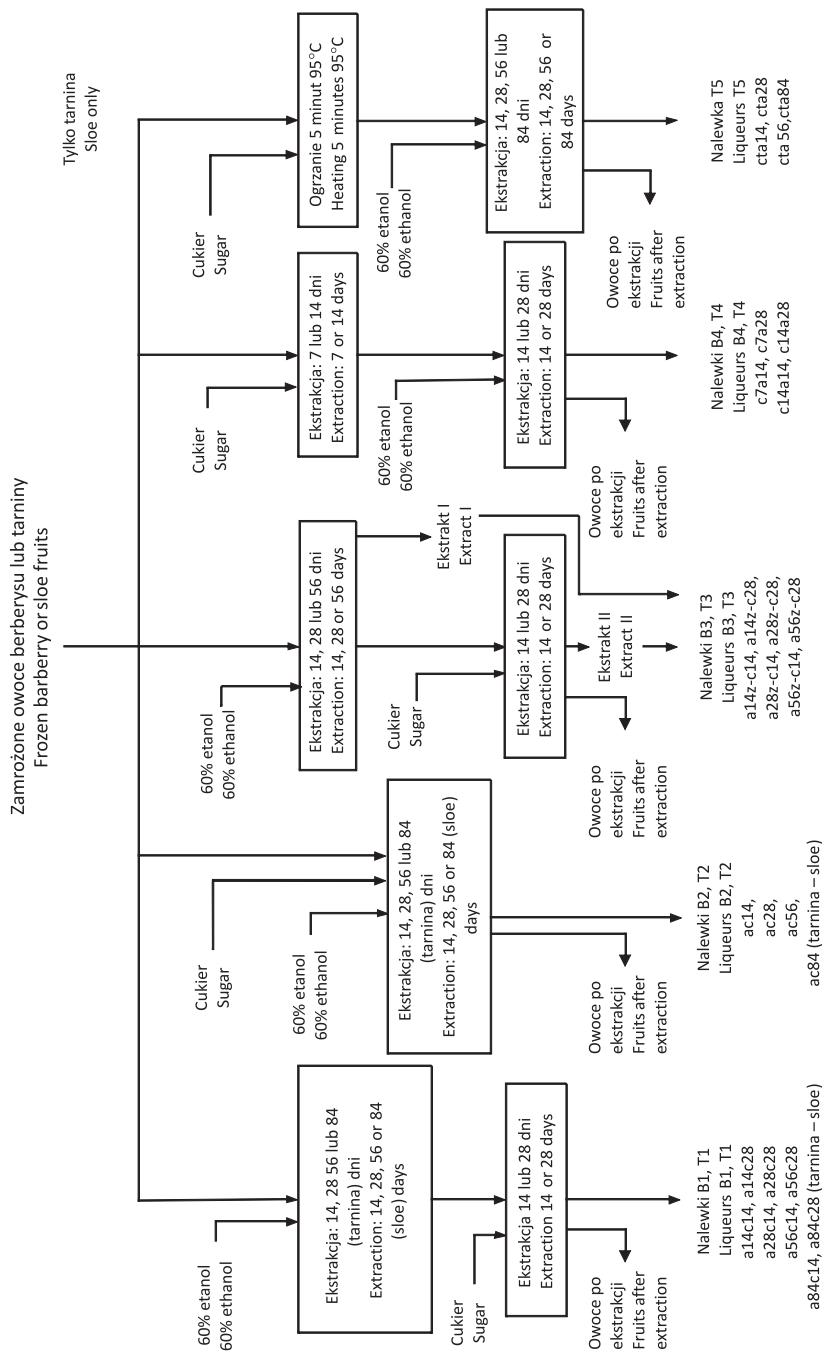
W etapie drugim zróżnicowano metody otrzymania nalewek, zmieniając sposób dodania cukru i czas maceracji owoców (rys. 2 i 3). W przypadku nalewek z czarnych porzeczek (P) i mahonii (M) wykonano po 3 warianty nalewek, do produkcji których zastosowano 45% wodny roztwór etanolu (rys. 2).

- Wariant **P1** i **M1**: owoce zalano roztworem etanolu i prowadzono macerację przez 14, 21 lub 28 dni, co oznaczono w tabelach i na wykresach indeksami odpowiednio **a14**, **a21** lub **a28**. Następnie do mieszaniny owoców z etanolem dodano sacharozę i kontynuowano proces maceracji przez kolejne 28 dni.
- Wariant **P2** i **M2**: owoce zalano roztworem etanolu i prowadzono macerację przez 14, 21 lub 28 dni, następnie oddzielono roztwór alkoholowy (ekstrakt I), a do owoców dodano sacharozę i kontynuowano proces maceracji przez kolejne 28 dni. Po upływie tego czasu roztwór (ekstrakt II), zawierający wyekstrahowane składniki owoców, alkohol i cukier, oddzielono od owoców i połączono z otrzymanym uprzednio roztworem alkoholowym. W tabelach i na wykresach oznaczono czasy ekstrakcji alkoholem indeksami odpowiednio **a14z**, **a21z** lub **a28z**.
- Wariant **P3** i **M3**: wykonano nalewki, które otrzymano przez początkowe wymieszanie owoców z cukrem, a po 5 dniach dodano roztwór alkoholu i kontynuowano proces maceracji przez 28 dni. W tabelach i na wykresach oznaczono próbki indeksem **c5**.



Rys. 2. Schemat przygotowania nalewek z czarnej porzeczki (P) i mahonii (M)

Fig. 2. The scheme of blackcurrant (P) and mahonia (M) liqueurs preparation



Rys. 3. Schemat przygotowania nalewek z berberysu (B) i tarniny (T)
Fig. 3. The scheme of barberry (B) and sloe (T) liqueurs preparation

Nalewki z berberysu (B) i tarniny (T) przygotowano z wykorzystaniem 60% wodnego roztworu etanolu (rys. 3).

Wariant B1 i T1: owoce zalano 60% wodnym roztworem etanolu i prowadzono macerację przez 14, 28 lub 56 dni, a w przypadku owoców tarniny dodatkowo 84 dni (oznaczenie a14, a28, a56 i a84), następnie dodano sacharozę i kontynuowano proces maceracji przez kolejne 14 lub 28 dni (oznaczenie c14 i c28). Na wykresach i tabelach oznaczono więc kolejne kombinacje czasów maceracji indeksami **a14c14, a14c28, a28c14, a28c28, a56c14, a56c28, a84c14 i a84c28**.

Wariant B2 i T2: 60% roztwór etanolu i cukier dodano do owoców i prowadzono ekstrakcję przez 14, 28 lub 56 dni (w przypadku owoców tarniny dodatkowo 84 dni). W tabelach i na wykresach oznaczono próbki indeksami **ac14, ac28, ac56 i ac84**.

Wariant B3 i T3: owoce zalano 60% wodnym roztworem etanolu i prowadzono macerację przez 14, 28 lub 56 dni (oznaczenie a14, a28, a56), następnie oddzielono roztwór alkoholowy (ekstrakt I), a do owoców dodano sacharozę i kontynuowano proces maceracji przez kolejne 14 lub 28 dni (oznaczenie c14 i c28). Po upływie tego czasu roztwór (ekstrakt II) połączono z otrzymanym uprzednio roztworem alkoholowym. W tabelach i na wykresach oznaczono próbki indeksami **a14z-c14, a14z-c28, a28z-c14, a28z-c28, a56z-c14 i a56z-c28**.

Wariant B4 i T4: owoce wymieszano z cukrem, a po 7 lub 14 dniach (oznaczenie c7 lub c14) dodano 60% wodny roztwór alkoholu etylowego i kontynuowano proces maceracji przez 14 lub 28 dni (oznaczenie a14 lub a28). W tabelach i na wykresach oznaczono próbki nalewek przygotowanych według tego wariantu indeksami **c7a14, c7a28, c14a14, c14a28**.

Przygotowano również jeden dodatkowy wariant nalewek z tarniny – **T5**, w którym owoce z cukrem najpierw ogrzano przez 5 minut do temperatury 95°C, a po ostudzeniu dodano 60% roztwór etanolu i macerowano przez 14, 28, 56 lub 84 dni. W tabelach i na wykresach oznaczono próbki tego wariantu indeksami **cta14, cta21, cta56 i cta84**.

Nalewek przygotowanych podczas pierwszego i drugiego etapu badań nie przechowywano. W etapie III owoce z dodatkiem 60% etanolu (w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła) ekstrahowano przez 28 dni. Po tym czasie do owoców dodano sacharozę i prowadzono proces maceracji przez kolejne 28 dni, od czasu do czasu mieszając. W tym etapie pracy określono skład związków fenolowych surowców i nalewek. Wyznaczono także zmiany zawartości polifenoli ogółem oraz aktywności przeciwutleniającej w nalewkach nieprzechowywanych i przechowywanych przez 12 i 60 miesięcy.

3.2. Metody analiz

W surowcach przeznaczonych do badań oznaczono:

- zawartość suchej masy metodą wagową (Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. PN-90/A-75101/03);
- ekstrakt refraktometryczny (Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. PN-90/A-75101/02) z wykorzystaniem refraktometru Pocket PAL-1 (Pocket Refraktometr, Polska);
- kwasowość ogólną – metodą miareczkową (Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. PN-90/A-75101/04), wyniki podano w $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ w przeliczeniu na kwas cytrynowy;
- zawartość pektyn metodą Morisa [Pijanowski i wsp. 1976];
- zawartość witaminy C – metodą miareczkową (Produkty spożywcze – Oznaczanie zawartości witaminy C, PN-A-04019:1998);
- zawartość cukrów redukujących i ogółem (Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. PN-90/A-75101.07).

W surowcach i produktach oznaczono również:

- Zawartość polifenoli ogółem metodą Folin-Ciocalteu [Gao i wsp. 2000], wyniki wyrażono w miligramach kwasu galusowego na 100 cm^3 roztworu [$\text{mg GAE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$].
- Zawartość antocyjanów i związków fenolowych metodą HPLC [Kucharska i wsp. 2009b], wyniki podano w miligramach 3-głukozydu cyjanidyny na 100 cm^3 roztworu [$\text{mg cy 3-glu}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$].

W surowcach oraz nalewkach z tarniny i mahonii oznaczono obecność glikozydów cyjanogennych metodą HPLC podaną przez Gomez i wsp. [1998]. Wyniki wyrażono w miligramach cyjanowodoru w przeliczeniu na litr roztworu [$\text{mg HCN}\cdot\text{L}^{-1}$].

W nalewkach przeznaczonych do przechowywania wyznaczono indeks degradacji antocyjanów metodą Fuleki i Francis [1968].

W nalewkach oznaczono zawartość alkoholu metodą HPLC na chromatografii cieczowym Surveyour Plus, Thermo Scientific, Finnigan Spectra System (USA) z detektorem RI Surveyour Plus. Związki rozdzielano na kolumnie Aminex-HPX-87 H (300 x 7,8 mm; Bio-Rad, (USA) w temperaturze 60°C . Jako faza ciekła stosowany był 5 mm roztwór H_2SO_4 o szybkości przepływu $0,6\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$.

3.2.1. Aktywność przeciwutleniająca

Aktywność przeciwutleniającą oznaczono trzema metodami:

- zmiatania stabilnych syntetycznych rodników DPPH^{*} [Yen i Chen 1995],
- z kationorodnikiem ABTS⁺ według metody podanej przez Re i wsp. [1999],
- jako zdolność redukcji żelaza Fe^{+3} do Fe^{+2} , metodą FRAP [Benzie i Strain 1996].

Analizy wykonano z wykorzystaniem spektrofotometru UV 2401 PC (Shimadzu, Japonia). Wyniki wyrażono jako ekwiwalent mikromoli troloxu na 100 cm^3 nalewki [$\mu\text{mol TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$].

3.2.2. Identyfikacja związków fenolowych

Identyfikację związków polifenolowych prowadzono przy użyciu chromatografu UPLC połączonego ze spektrometrem masowym Q-TOF-MS (XEVO-G2QTOF Waters). Rozdział prowadzono z wykorzystaniem kolumny Acquity™ BEH C₁₈ (100 mm × 2,1 mm φ, 1,7 μmol) firmy Waters. Jako eluentu używano 4,5% wodnego roztworu kwasu mrówkowego (odczynnik A) i 100% acetonitrylu (odczynnik B), stosując szybkość przepływu 0,45 ml·min⁻¹ oraz objętość nastrzyku 5 μl. Rozdział prowadzono według gradientu:

- 0 min: 99% A,
- 12 min: 75% A,
- 12,5 min: 100% B,
- 13,5 min: 99% A.

Kolumnę termostatowano w temperaturze 30°C. Zastosowano następujące warunki pracy aparatu MS: napięcie kapilary – 2,0 kV; napięcie stożka próbkującego – 45 V; przepływ gazu na stożku – 11 l·h⁻¹, energia kolizji 50 eV. Aparat używano w ujemnym trybie skanowania jonów *m/z* od 100 do 1000. System współpracował z oprogramowaniem Mass-Lynx™ V 4.1.

3.2.3. Oznaczenie parametrów barwy

Barwę nalewek określono metodą obiektywnego pomiaru w systemie CIE Lab, przy użyciu aparatu Color Quest firmy HunterLab (USA). Pomiary wykonywano w kuwetach o długości drogi optycznej 10 mm, w świetle przechodzącym, dla obserwatora typ 10° i iluminantu D65. Oznaczono parametry barwy w skali CIE L*a*b*. Przed pomiarem barwy próbki nalewek z czarnych porzeczek, mahonii i tarniny rozcieńczono 5-krotnie.

3.2.4. Ocena organoleptyczna

Nalewki wytworzone w pierwszym i drugim etapie badań oceniono organoleptycznie metodą konsumencką, stosując oceny opisowe (bardzo nie lubię; nie lubię; ani lubię, ani nie lubię; lubię; bardzo lubię), którym następnie przypisano odpowiednio wartości punktowe w przedziale wartości od 1 do 5. Oceniano smak, zapach, barwę nalewek oraz wrażenie ogólne. Oceny dokonał zespół dwunastu przeszkolonych osób, o odpowiedniej wrażliwości sensorycznej, na podstawie opracowanych przez autora pracy tabel ocen.

3.2.5. Statystyczne opracowanie wyników

Otrzymane wyniki poddano analizie wariacji przy zastosowaniu programu STATISTICA 9.0 firmy StatSoft Inc. 2009, USA). Obliczenia wykonano przy poziomie istotności $\alpha=0,05$. Grupy jednorodne wyznaczono testem Duncana i przedstawiono za pomocą oznaczeń literowych a,b,c... i A,B,C.... – przy czym wartości oznaczone takimi samymi literami nie różniły się istotnie między sobą.

Wyniki zamieszczone w pracy są średnimi z 2 powtórzeń technologicznych.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jakość nalewek jest wypadkową zarówno obecności aktywnych składników przeciwutleniających, jak i odpowiednich cech organoleptycznych – przede wszystkim smaku i barwy. W przedstawionym omówieniu wyników skupiono się na roli parametrów procesu technologicznego w kształtowaniu tych wyróżników jakościowych (Etap I i II). Następnie przedstawiono wyniki badań dotyczących zmian składu związków fenolowych i aktywności antyoksydacyjnej podczas przechowywania nalewek (Etap III).

4.1. Jakość nalewek w zależności od stężenia etanolu

W pierwszej części pracy omówiono oddziaływanie stężenia etanolu użytego do maceracji owoców na jakość nalewek z czarnej porzeczki i mahonii.

Jakość nalewek z czarnej porzeczki zależała od zastosowanych stężeń etanolu (tab. 3). Użycie etanolu o wyższych stężeniach (75 i 90% obj.) spowodowało lepszą ekstrakcję polifenoli i wyższą aktywność przeciwutleniającą w stosunku do próbek ekstrahowanych alkoholem 45%. W przypadku nalewek porzeczkowych były to różnice istotne statystycznie.

Tabela 3

Table 3

Wpływ mocy alkoholu na zawartość polifenoli ogółem i aktywność przeciwutleniająca nalewek z czarnej porzeczki

Influence of alcohol solution strength on total phenolic content and antioxidant activity of blackcurrant liqueurs

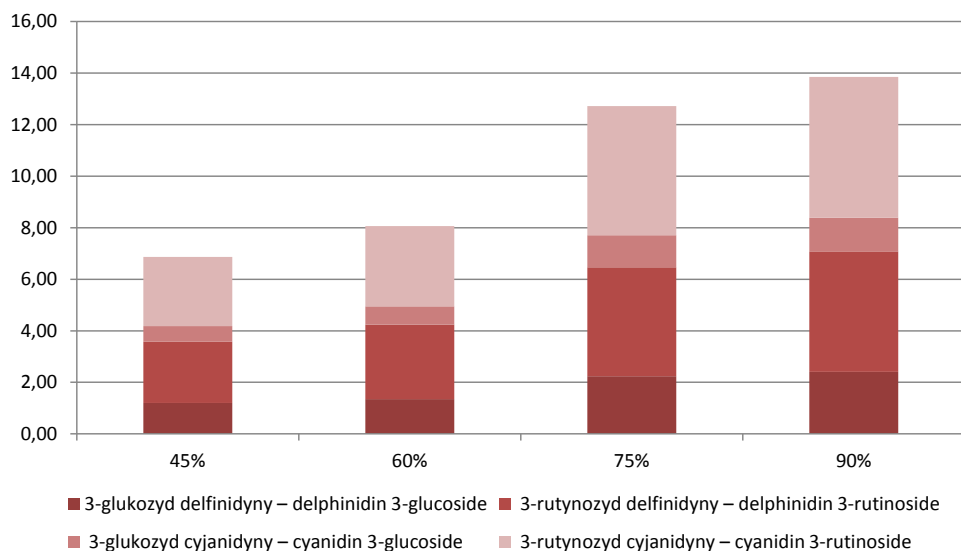
Moc alkoholu [% obj.] Alcohol strength [% vol.]	Polifenole ogółem Total phenolics [mg·100 cm ⁻³]	Aktywność przeciwutleniająca – Antioxidant activity		
		DPPH [•]	FRAP	ABTS ^{••}
		[μmol TE·100 cm ⁻³]		
45	104,2±16,2 ^b	467,9±39,6 ^{bc}	1253,0±89,9 ^b	755,8±16,6 ^b
60	109,2±6,8 ^b	473,6b±30,6 ^{bc}	1331,5±73,8 ^{ab}	814,8±104,0 ^a
75	112,3±7,6 ^{ab}	526,0±12,4 ^{ab}	1504,7±104,9 ^a	867,8±81,7 ^a
90	128,9±5,8 ^a	550,9±32,7 ^a	1546,7±18,4 ^a	906,4±19,0 ^a

a,b,c – te same litery w kolumnach oznaczają grupy jednorodnie przy poziomie istotności $p < 0,05$

a,b,c – the same letters in columns mean homogenous groups $p < 0.05$

Po zastosowaniu wyższych stężeń alkoholu etylowego polepszała się ekstrakcja związków fenolowych z owoców. Na przykład, przy takich samych warunkach wytwarzania najuboższe w antocyjany były nalewki, do sporządzenia których użyto 45% etanolu (rys. 4). Zawierały one o około połowę mniej antocyjanów niż nalewki otrzymane z użyciem alkoholu 90%.

W nalewkach porzeczkowych nieco więcej proporcjonalnie cyjanidyn zawierały nalewki przygotowane z wyższymi stężeniami etanolu.



Rys. 4. Profil antocyjanów nalewek porzeczkowych otrzymanych przy użyciu 45, 60, 75 i 90% etanolu
 Fig. 4. Anthocyanins profile of blackcurrant liqueurs prepared with 45, 60, 75 and 90% ethanol

Bardzo podobne rezultaty w odniesieniu do aktywności przeciwutleniającej uzyskano w badaniach nalewek z mahonii (tab. 4). Próbkę przygotowane z etanolem 75 i 90% miały wyższą aktywność wobec rodników DPPH^{*}, kationorodników ABTS⁺ oraz siłę redukującą w porównaniu z nalewkami otrzymanymi z etanolem 45 i 60%. Zawartość polifenoli w nalewkach z mahonii przygotowanych z 60 i 75% etanolem była najwyższa wśród badanych, ale były to różnice nieistotne statystycznie.

Stwierdzono, że skuteczność ekstrakcji antocyjanów, flawonoli i kwasów fenolowych z owoców mahonii do nalewek wzrasta wraz ze zwiększeniem stężenia etanolu użytego do maceracji (tab. 5). Zawartość barwników antocyjanowych w nalewkach otrzymanych z wykorzystaniem 60, 75 i 90% roztworów etanolu, w porównaniu z nalewkami otrzymanymi z etanolem 45%, była 1,6–2,4-krotnie wyższa. Podobną zależność zaobserwowano dla flawonoli (1,5–2 razy więcej). Zawartość kwasów fenolowych zwiększyła się 1,1–1,3-krotnie).

Tabela 4
Table 4

Wpływ mocy alkoholu na zawartość polifenoli ogółem i aktywność przeciwutleniająca nalewek z mahonii
Influence of alcohol solution strength on total phenolic content and antioxidant activity of mahonia liqueurs

Moc alkoholu [% obj.] Alcohol strenght [% vol.]	Polifenole ogółem Total phenolics [mg·100 cm ⁻³]	Aktywność przeciwutleniająca – Antioxidant activity		
		DPPH•	ABTS ⁺	FRAP
		[μmol TE·100 cm ⁻³]		
45	268,5±4,55 ^a	518,3±31,50 ^c	808,6±40,43 ^c	742,5±34,79 ^c
60	303,7±9,45 ^a	587,1±29,43 ^b	922,9±39,30 ^{bc}	884,0±48,47 ^{bc}
75	317,3±1,40 ^a	611,1±23,18 ^b	1001,2±59,04 ^{bc}	951,1±46,78 ^{ab}
90	289,4±19,74 ^a	628,6±10,87 ^b	1174,9± 76,33 ^a	1029,9±57,26 ^a

a,b,c – te same litery w kolumnach oznaczają grupy jednorodnie przy poziomie istotności p < 0,05
a,b,c – the same letters in columns mean homogenous groups p < 0.05

Tabela 5
Table 5

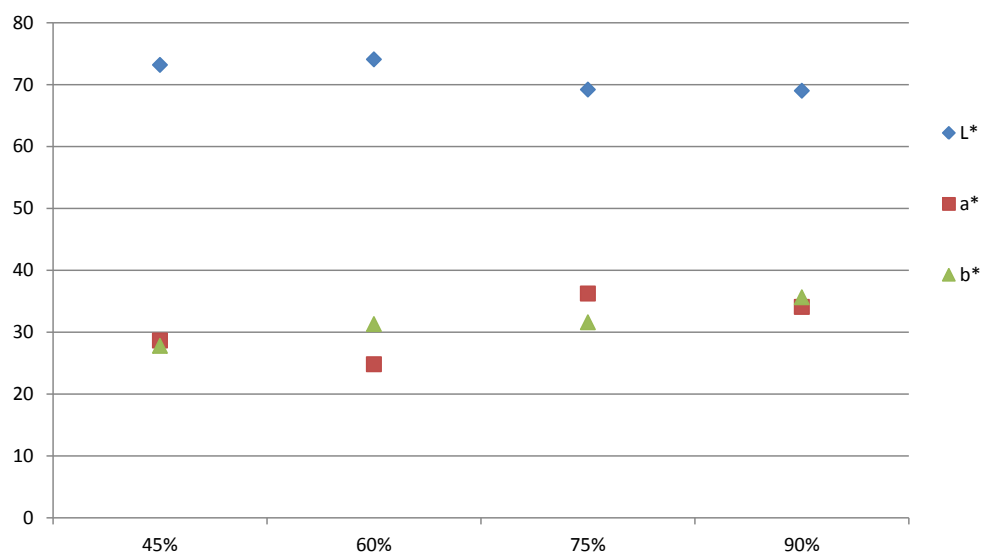
Wpływ stężenia alkoholu na ekstrakcję związków fenolowych w nalewkach z mahonii
Influence of alcohol solution strength on phenolic compounds extraction in mahonia liqueurs

Moc alkoholu [% obj.] Alcohol strenght [% vol.]	Antocyjany Anthocyanins	Flawonole Flavonols	Kwasy fenolowe Phenolic acids	
			Suma kwasów Sum of acids	W tym kwas chlorogenowy Chlorogenic acid in sum
			[mg·100 cm ⁻³]	
45	4,5±0,87 ^d	5,7±0,66 ^d	115,5±5,46 ^c	107,3±7,24 ^b
60	7,3± 1,2 ^c	9,2±1,10 ^c	131,9±2,78 ^b	122,5±5,70 ^a
75	10,3±0,46 ^b	10,9±1,02 ^b	135,3±6,32 ^b	124,9±9,76 ^a
90	10,9±1,17 ^{ab}	12,2±0,21 ^a	144,3±5,15 ^a	131,62±9,23 ^a

a,b,c – te same litery w kolumnach oznaczają grupy jednorodnie przy poziomie istotności p < 0,05
a,b,c – the same letters in columns mean homogenous groups p < 0.05

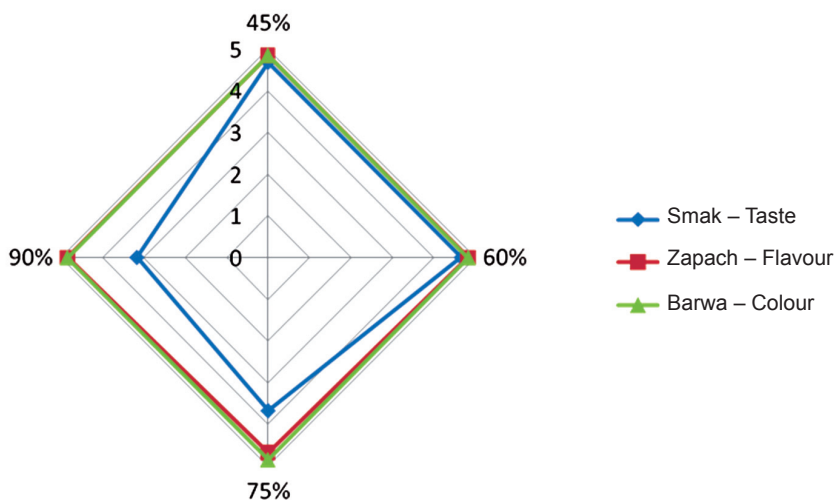
Barwę nalewek porzeczkowych metodą instrumentalną mierzono w roztworach 5-krotnie rozcieńczonych (rys. 5). Większy udział barwy czerwonej (wyższa wartość parametru a*) odnotowano w nalewkach przygotowanych z dodatkiem 75 i 90% etanolu. Były one również ciemniejsze od pozostałych, na co wskazują niższe wartości parametru określającego jasność barwy (L*).

Podczas oceny organoleptycznej nierozcieńczonych nalewek, przeprowadzonej metodą punktową, oceniający nie wskazali jednak na istnienie różnic barwy (rys. 6). Zapach określono jako typowy dla nalewek z czarnej porzeczki i nie wykazano istotnych różnic pomiędzy ocenianymi nalewkami. W ogólnej ocenie nieco niższe noty uzyskały nalewki przygotowane z użyciem 75 i 90% alkoholu etylowego (4,3 i 4,4 pkt), w porównaniu z nalewkami przygotowanymi z 45 i 60% etanolem (po 4,8 pkt), ze względu na smak (noty 3,2 i 3,7).



Rys. 5. Parametry barwy nalewek z czarnych porzeczek otrzymanych przy użyciu różnych stężeń alkoholu

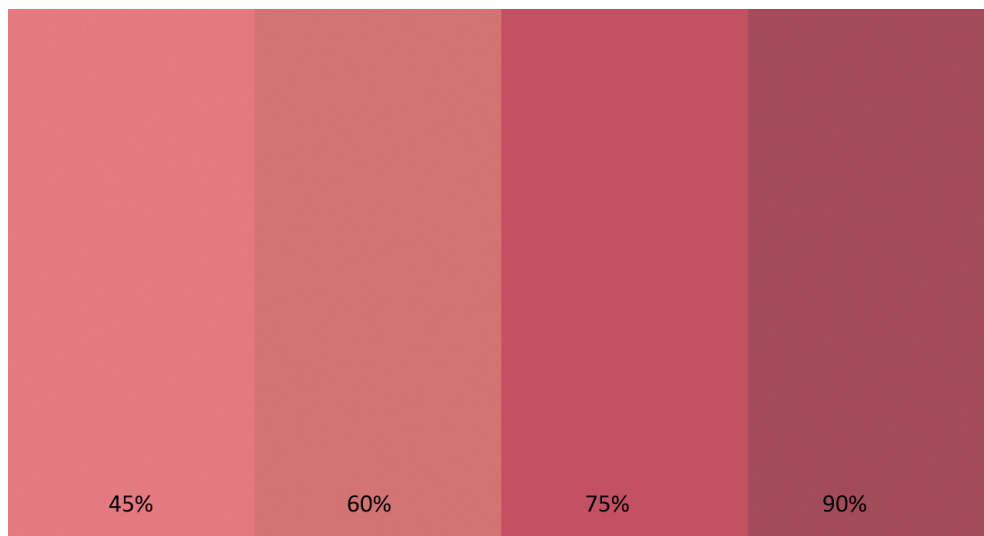
Fig. 5. Colour parameters of blackcurrant liqueurs prepared by using alcohol solutions of different strength



Rys. 6. Ocena organoleptyczna nalewek z czarnej porzeczki sporządzonych przy użyciu roztworów etanolu o mocy 45, 60, 75 i 90%

Fig. 6. Organoleptic evaluation of blackcurrant liqueurs prepared using 45, 60, 75 and 90% ethanol solutions

Moc alkoholu użytego do maceracji owoców mahonii rzutowała na barwę nalewek. Najlepszą barwą w ocenie instrumentalnej charakteryzowały się dwie nalewki o największej zawartości alkoholu (rys. 7), dla których parametr a^* wynosił 35,4 i 33,6, podczas gdy dla nalewek przygotowanych z etanolem o stężeniach 45 i 60% wartość tego parametru wyniosła odpowiednio 23,3 i 30,8. Podobnie jak w przypadku nalewek porzeczkowych w ocenie organoleptycznej nierozcieńczonych nalewek z mahonii nie stwierdzono różnic barwy. W ocenie smaku nalewki z mahonii otrzymały noty od 3,2 do 4,5 pkt, przy czym najniżej (noty 3,2 i 3,7) ponownie oceniono nalewki przygotowane przy użyciu etanolu 75 i 90%.



Rys. 7. Barwa nalewek z owoców mahonii rozcieńczonych 5-krotnie
Fig. 7. Colour of diluted (5x) mahonia fruit liqueurs

Tradycyjnie nalewki owocowe uważa się za napoje spirytusowe zawierające mniej alkoholu etylowego niż wódki. Według Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) [Rozporządzenie (WE) nr 110/2008] napoje spirytusowe wytworzone na drodze destylacji nie powinny zawierać mniej niż 37,5% alkoholu, a zawartość alkoholu w likierach owocowych nie powinna być niższa niż 15%. Nalewki z czarnej porzeczki i mahonii, wytworzone przy użyciu roztworów etanolu o stężeniach 45 i 60%, zawierały odpowiednio 22,4–24,0% i 33,1–33,3% alkoholu – nawiązywały więc bardziej do likierów niż nalewki, które sporządzono z 75 i 90% etanolem, które zawierały 38,8–39,8 i 47,4–47,8% alkoholu.

W konsumenckiej ocenie organoleptycznej potwierdzono wyższą akceptowalność nalewek o zawartości alkoholu nieprzekraczającej 35%, a więc sporządzonych z 45 i 60% etanolem. Nalewki o większym stężeniu etanolu otrzymały niskie oceny, stąd uznano, że zastosowanie wysokich stężeń alkoholu do maceracji owoców wpłynie negatywnie na cechy smakowe nalewek wytwarzanych w kolejnych etapach doświadczeń. Dodatkowo, na podstawie analizy zawartości polifenoli ogółem i aktywności przeciwutleniającej nalewek stwierdzono, że w części oznaczeń różnice pomiędzy nalewkami wykonanymi z użyciem alkoholu o różnej mocy nie były na tyle duże, aby mieć praktyczne znaczenie.

Dlatego w kolejnym etapie badań do wytworzenia nalewek z mahonii i czarnej porzeczki użyto 45% etanolu, a do przygotowania nalewek z tarniny i berberysu wykorzystano 60% wodne roztwory etanolu.

4.2. Rola sposobu przyrządzania w jakości nalewek

4.2.1. Nalewki z czarnej porzeczki

W tabeli 6 przedstawiono zawartość polifenoli ogółem i aktywność przeciwutleniającą nalewek porzeczkowych. Zastosowano procedury technologiczne polegające na zmianie kolejności dodawania alkoholu i cukru do owoców oraz zróżnicowano czas maceracji owoców.

Tabela 6

Table 6

Zawartość polifenoli ogółem i antocyanów oraz aktywność przeciwutleniająca nalewek z czarnej porzeczki
Total phenolic content and antioxidant activity of blackcurrant liqueurs

Warianty technologiczne Technological variants		Polifenole ogółem Total phenolics	Aktywność przeciwutleniająca Antioxidant activity		
			DPPH*	FRAP	ABTS**
		[mg·100 cm ⁻³]	[μmol TE·100 cm ⁻³]		
P1	a14	160,0±10,96 ^{ab}	477,4±40,78 ^{ab}	1014,0±90,68 ^{abc}	1097,3±55,00 ^{ab}
	a21	168,1±7,89 ^{ab}	500,5±12,53 ^a	1066,3±101,41 ^{abc}	1164,6±33,13 ^a
	a28	174,1±4,36 ^a	507,9±3,46 ^a	1083,7±99,38 ^{abc}	1165,8±82,30 ^a
	Średnia – Average	167,4 ±8,97^A	495,3± 23,84^{AB}	1054,7±91,06^B	1142,6± 58,22^A
P2	a14z	100,5±7,70 ^d	387,5±4,87 ^d	830,4±52,09 ^d	717,2±41,52 ^c
	a21z	136,6±3,89 ^c	459,9±19,91 ^b	941,6±65,58 ^{bc}	820,3±13,71 ^c
	a28z	152,6±3,42 ^{bc}	462,2±20,83 ^b	975,1±74,56 ^{bc}	1075,5±102,67 ^{ab}
	Średnia – Average	129,9±14,16^B	436,5±40,19^{bc}	915,7±109,61^B	871,0± 133,19^B
P3	c5	87,95±3,03 ^{dD}	362,49±14,99 ^{dC}	980,4±13,20 ^{abCB}	718,28±75,15 ^{cC}
Średnia – Average		140,0±29,67	479,7±40,79	984,5±117,04	1006,8±102,77

a,b,c – te same litery w kolumnach oznaczają grupy jednorodne przy poziomie istotności p < 0,05. A,B,C odnoszą się do wariantów

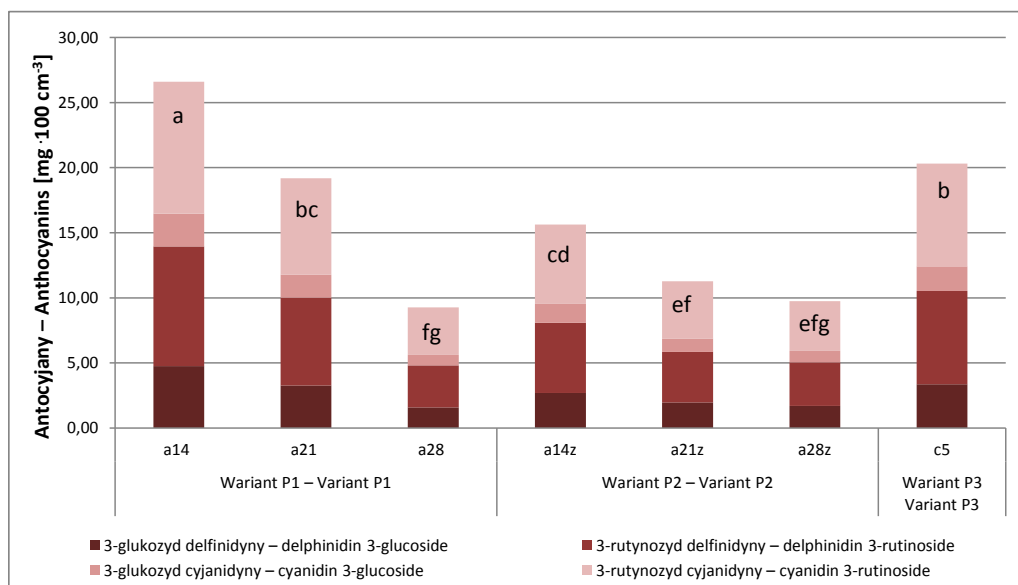
a,b,c – the same letters in columns mean homogenous groups p < 0.05. A,B,C – refer to variants

Na podstawie wyników otrzymanych w tej części badań stwierdzono, że najlepsza ekstrakcja związków polifenolowych wystąpiła w pierwszym wariantcie technologicznym (P1), tj. w próbkach, które najpierw poddano działaniu alkoholu, a następnie po dodaniu cukru w dalszym ciągu prowadzono macerację owoców. Zawartość polifenoli wyniosła średnio 167,4 mg w 100 cm³ nalewki w przeliczeniu na kwas galusowy. W pozostałych nalewkach zawartość polifenoli była niższa; najmniej tych związków, o 48% mniej niż w najlepszym wariantcie, oznaczono w próbce, w której najpierw owoce wymieszano z cukrem, a następnie po 5 dniach dodano alkoholu (P3).

W zastosowanych różnych wersjach przygotowania nalewek otrzymano produkty różniące się pomiędzy sobą zarówno zawartością polifenoli, jak też aktywnością przeciwutleniającą, która była najwyższa w nalewkach otrzymanych metodą P1, a najniższa dla nalewek otrzymanych według procedury P3 (tab. 6).

W obrębie poszczególnych wersji zastosowano modyfikacje polegające na wydłużaniu czasu maceracji owoców (warianty P1 i P2). W większości przypadków nie miały one istotnego wpływu na końcowe stężenia polifenoli i aktywność przeciwutleniającą (tab. 6). Jedynie nalewki z owoców poddanych działaniu etanolu krótko, bo tylko 14 dni, wykazywały mniejszą aktywność przeciwutleniającą i niższe stężenie polifenoli ogółem w porównaniu z nalewkami z owoców dłużej ekstrahowanych, ale różnice te nie zawsze były istotne statystycznie.

Wydłużanie czasu maceracji owoców w większości wariantów nie wpłynęło na zwiększenie potencjału antyoksydacyjnego ani na zawartość polifenoli w sposób istotny statystycznie, natomiast spowodowało niekorzystną, większą degradację barwników antocyjanowych (rys. 8). I tak, w wariantcie pierwszym (P1) wydłużenie czasu maceracji z 14 do 28 dni (a14 i a28) spowodowało obniżenie zawartości barwników w gotowym produkcie o ponad 60%, a w wariantcie drugim (P2) o prawie 40%. Wszystkie oznaczone barwniki antocyjanowe degradowały się w podobnym stopniu, a ich wzajemne proporcje w nalewkach były zbliżone. W ekstrakcie z owoców i w nalewkach ilość 3-glukozydu delphinidyny wahała się pomiędzy 16,6 i 17,9%, 3-rutynozydu delphinidyny od 33,1 do 35,8%, 3-glukozydu cyjanidyny od 8,6 do 9,9%, a 3-rutynozydu cyjanidyny od 38,1 do 39,6% sumy antocyjanów.



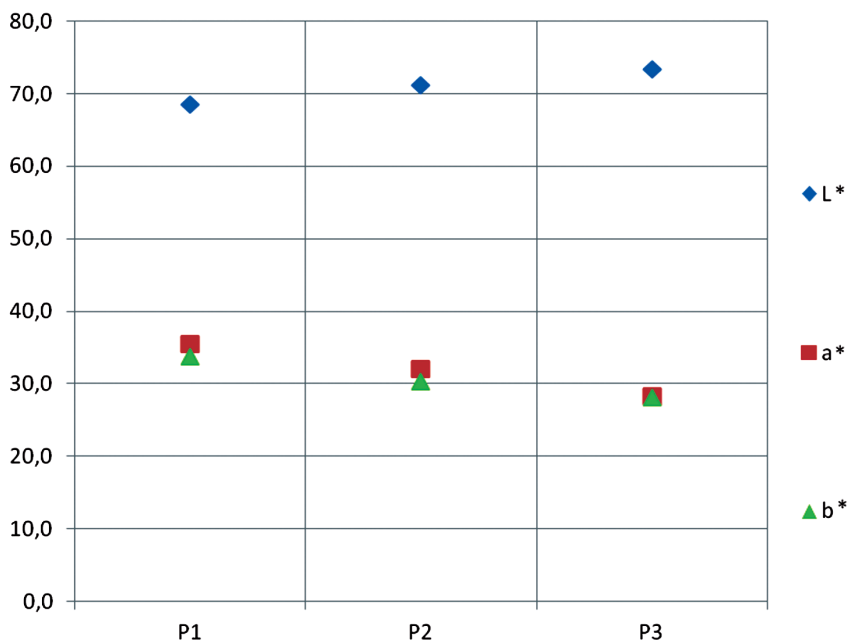
Rys. 8. Zawartość antocyjanów w nalewkach z czarnej porzeczki

Fig. 8. Anthocyanins content in blackcurrant liqueurs

Barwa nalewek z czarnej porzeczki otrzymanych według różnych procedur, oceniona na podstawie pomiaru instrumentalnego próbek rozcieńczonych pięciokrotnie, różniła się w zakresie jasności i udziału barwy czerwonej (rys. 9). Udział barwy czerwonej, charakteryzowanej parametrem a^* odpowiadał zawartości antocyjanów w nalewkach i przyjmował

wyższe wartości dla nalewek przygotowanych metodą P1 i P2. Barwę nalewki P3, o najniższej zawartości barwników antocyjanowych, opisywała najniższa wartość a^* oraz najwyższa L^* , co wskazuje, że barwa tej nalewki była najjaśniejsza.

Podczas oceny organoleptycznej przeprowadzonej metodą punktową oceniający nie wskazali jednak na istnienie różnic barwy. Nalewki porzeczkowe otrzymane z użyciem 45% etanolu zostały w ocenie organoleptycznej ocenione wysoko, średnia nota wyniosła 4,8 punktu w pięciopunktowej skali, a pomiędzy nimi nie wykazano istotnych różnic również pod względem smaku i zapachu.



Rys. 9. Parametry barwy nalewek z czarnych porzeczek

Fig. 9. Colour parameters of blackcurrant liqueurs

4.2.2. Nalewki z mahonii

Wyniki oznaczeń zawartości polifenoli ogółem i aktywności przeciwutleniającej nalewek z mahonii zamieszczono w tabeli 7.

Stężenie polifenoli w nalewkach było zróżnicowane i w zależności od metody przygotowania wynosiło od 173 do ponad 300 mg w 100 cm³. Spośród badanych wariantów przygotowania nalewek, z wykorzystaniem 45% etanolu, największą zawartość polifenoli ogółem oznaczono w nalewkach, podczas przygotowywania których najpierw zalano owoce alkoholem, a potem, po oddzieleniu roztworu, do owoców dodano cukier i kontynuowano macerację owoców, a następnie roztwory połączono (wariant M2). W wariacie, w którym po wstępnej maceracji owoców roztworem alkoholu dodano cukier i kontynuowano proces maceracji (M1), średnia zawartość polifenoli wyniosła 227 mg GAE·100 cm⁻³.

Tabela 7
Table 7

Zawartość polifenoli ogółem i aktywność przeciwutleniająca nalewek z mahonii
Total phenolic content and antioxidant activity of mahonia liqueurs

Warianty technologiczne Technological variants		Polifenole ogółem Total phenolics	Aktywność przeciwutleniająca – Antioxidant activity		
			DPPH*	ABTS**	FRAP
		[mg·100 cm ⁻³]	[μmol TE·100 cm ⁻³]		
M1	a14	224,65±18,78 ^{cd}	791,66±30,65 ^a	983,28±55,68 ^b	1804,65±35,00 ^a
	a21	234,30±15,03 ^{bcd}	812,21±18,99 ^a	1005,78±33,41 ^{ab}	1916,93±92,60 ^a
	a28	220,77±8,00 ^d	792,41±27,05 ^a	1014,28±45,13 ^{ab}	1864,50±61,94 ^a
	Średnia – Average	226,57±12,11^B	798,76±46,37^A	1001,11±55,41^A	1862,03±123,07^A
M2	a14z	276,46±17,15 ^{ab}	564,83±31,50 ^b	874,58±43,66 ^b	780,68±81,99 ^b
	a21z	273,98±5,25 ^{abc}	565,99±13,63 ^b	862,08±25,99 ^b	804,30±24,18 ^b
	a28z	281,16±7,70 ^{ab}	576,23±35,21 ^b	898,83±41,85 ^b	847,28±84,11 ^b
	Średnia – Average	277,20±9,32^A	569,01±22,70^B	878,49±46,21^A	810,75±61,55^B
M3	c5	173,25±4,20 ^{Cc}	229,14±30,03 ^{Cc}	417,04±18,37 ^{Bc}	302,04±21,09 ^{Cc}
Średnia – Average		240,7	618,9	865,1	1188,6

a,b,c; A,B,C – te same litery w kolumnach oznaczają grupy jednorodnie przy poziomie istotności $p < 0,05$
a,b,c; A,B,C – the same letters in columns mean homogenous groups $p < 0.05$

Zastosowanie w wariacie trzecim (M3) odmiennej kolejności dodawania składników (najpierw cukier) ujemnie wpłynęło na ekstrakcję polifenoli (mniej o 37% w porównaniu z najlepszym wariantem) i aktywność przeciwutleniającą nalewek (mniejsza o 37–89%). Aktywność przeciwutleniająca nalewek z mahonii wyrażona jako TEAC mieściła się w zakresach 229,1–812,2 μmol TE·100 cm⁻³ (DPPH*), 417,0–1175,0 μmol TE·100 cm⁻³ (ABTS**), 302,0–1916,9 μmol TE·100 cm⁻³ (FRAP). Najlepszą średnią aktywność antyoksydacyjną, niezależnie od metody pomiaru aktywności, oznaczono w próbkach przygotowanych według wariantu pierwszego (M1).

Pomiędzy nalewkami przygotowanymi według takiej samej procedury, ale o różnym czasie maceracji owoców, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic (tab. 7).

W nalewkach z mahonii antocyjany stanowiły przeciętnie od 4,9 do 8,2%, a flawonole od 5,7 do 7,4% całkowitej zawartości związków fenolowych. Najwięcej było kwasów fenolowych – powyżej 130 mg w 100 cm³. Wśród tej grupy związków fenolowych dominował kwas chlorogenowy, którego było ponad 90% w całkowitej ilości kwasów fenolowych (tab. 8). Wzajemne proporcje różnych grup związków fenolowych w nalewkach otrzymanych według wariantów przygotowania M1 i M2 były porównywalne.

Nalewki przygotowane różnymi metodami zawierały od 0,48 do 13,27 mg·100 cm⁻³ antocyjanów, w przeliczeniu na 3-glukozyd cyjanidyny (tab. 8). Najwięcej barwników zawierały nalewki otrzymane według wariantu pierwszego M1 (najpierw ekstrakcja alkoholem, potem dodatek cukru) – średnio 12,85 mg w 100 cm³. Wydłużanie czasu ekstrakcji nie wpłynęło na statystycznie istotne zmiany stężenia antocyjanów w gotowym produkcie. W wariacie trzecim M3 (cukier dodany na początku maceracji) prawie nie było antocyjanów (tylko 0,48 mg·100 cm³), a flawonoli i kwasów fenolowych było odpowiednio 5,03 i 19,2 mg w 100 cm³.

Prawdopodobnie ze względu na wysoką aktywność polifenolooksydazy (lub innych enzymów utleniających) oraz brak inhibitora tego enzymu, którym w przypadku pozostałych wariantów był etanol, a także przy większym dostępie tlenu, antocyjany uległy szybkiej degradacji, podobnie jak pozostałe związki fenolowe.

Aktywność antyoksydacyjna nalewek była dobrze skorelowana z zawartością związków polifenolowych należących do różnych grup, co przedstawiono w tabeli 9. Współczynniki korelacji wahały się od 0,46 do 0,94 i były wyższe dla antocyjanów i kwasów fenolowych niż flawonoli.

Tabela 8

Table 8

Zawartość antocyjanów, flawonów i kwasów fenolowych w nalewkach z mahonii
Anthocyanin and flavones and phenolic acids content in mahonia liqueurs

Warianty technologiczne Technological variants	Antocyjany Anthocyanins	Flawonole Flavonols	Kwasy fenolowe Phenolic acids		
			Suma kwasów Sum of acids	W tym kwas chlorogenowy Chlorogenic acid in sum	
[mg·100 cm ⁻³]					
M1	a14	13,27±1,05 ^a	9,34±0,37 ^{ab}	139,18±3,8 ^{ab}	128,67±5,40 ^{ab}
	a21	12,91±0,97 ^a	9,25±0,67 ^{ab}	138,68±3,76 ^{ab}	127,93±4,39 ^{ab}
	a28	12,36±1,16 ^a	9,46±0,42 ^a	138,12±3,36 ^{ab}	127,31±4,35 ^{ab}
	Średnia – Average	12,85±1,04^A	9,35±0,46^{AB}	138,66±3,33^A	127,97±4,33^A
M2	a14z	8,52±1,67 ^b	8,25±1,01 ^c	128,00±10,23 ^c	118,80±11,20 ^b
	a21z	8,00±1,53 ^b	8,84±0,4 ^{bc}	130,18±4,33 ^{bc}	119,99±7,03 ^{ab}
	a28z	7,41±1,86 ^b	8,57±0,96 ^c	127,88±6,88 ^c	118,66±9,13 ^b
	Średnia – Average	7,98±1,6^B	8,55±0,80^B	128,68±4,60^B	119,15±8,42^B
M3	c5	0,48±0,25 ^{Cc}	5,03±0,55 ^{Cd}	19,20±4,61 ^{Cd}	15,19±4,43 ^{Cc}
Średnia – Average		9,0	8,4	135,0	108,1

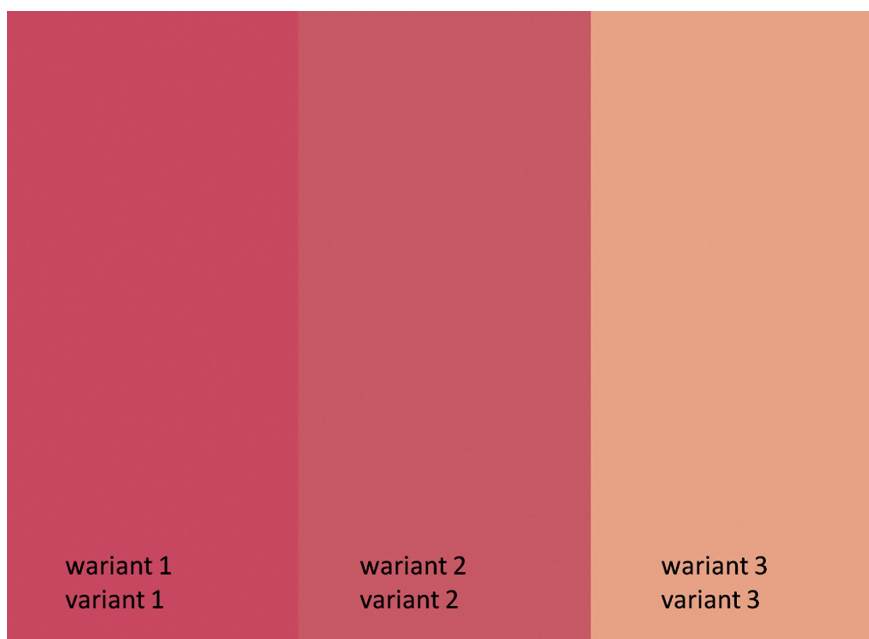
a,b,c – te same litery w kolumnach oznaczają grupy jednorodnie przy poziomie istotności p < 0,05
a,b,c – the same letters in columns mean homogenous groups p < 0.05

Tabela 9

Table 9

Współczynniki korelacji pomiędzy grupami związków fenolowych a aktywnością antyoksydacyjną nalewek z mahonii
Correlation coefficients between phenolic compounds groups and antioxidant activity of mahonia liqueurs

Grupa związków – Group of compounds	DPPH [•]	ABTS ^{••}	FRAP
Flawonole – Flavonols	0,64	0,87	0,46
Kwasy fenolowe – Phenolic acids	0,85	0,91	0,60
Antocyjany – Anthocyanins	0,94	0,86	0,86



Rys. 10. Barwa nalewek z mahonii (rozcieńczenie 5-krotne) przygotowanych według różnych wariantów

Fig. 10. Colour of mahonia liqueurs (diluted 5-fold) prepared according to different variants

Tabela 10
Table 10

Parametry barwy nalewek z mahonii¹
Colour parameters of mahonia liqueurs¹

Warianty technologiczne Technological variants		L*	a*	b*	a*/b*
Wariant M1 Variant M1	a14 c28	70,3	23,3	13,4	1,74
	a21 c28	69,1	24,0	14,0	1,71
	a28 c28	70,9	23,2	14,3	1,62
	Średnia – Average	70,1	23,5	13,9	1,69
Wariant M2 Variant M2	a14-z-28	69,3	18,4	13,5	1,36
	a21-z-28	77,8	18,2	13,2	1,38
	a28-z-28	72,0	16,7	14,3	1,17
	Średnia – Average	73,0	17,8	13,6	1,31
Wariant M3 Variant M3	c5a28	86,6	5,1	16,0	0,32

¹ nalewki rozcieńczone 5-krotnie

¹ liqueurs diluted 5-fold

Ilość antocyjanów w próbkach nalewek miała decydujący wpływ na ich barwę. W zależności od zastosowanego wariantu technologicznego otrzymano nalewki o zróżnicowanej barwie (rys. 10). Nalewki bogatsze w antocyjany charakteryzowały się większym udziałem czerwonej barwy (parametr a^* w zakresie 13,3–24,0), a mniejszym udziałem barwy żółtej (parametr b^* wahał się w zakresie 11,4–14,3) i były one ciemniejsze (parametr L^* w zakresie 70,3–73,0) od nalewki M3 przygotowanej przez początkowe wymieszanie owoców z cukrem, a następnie dodatek alkoholu (tab. 10).

Degradacja antocyjanów, która najsilniej wystąpiła w nalewce przygotowanej według wariantu trzeciego, była wyraźnie widoczna w ocenie wzrokowej i analizie parametrów barwy.

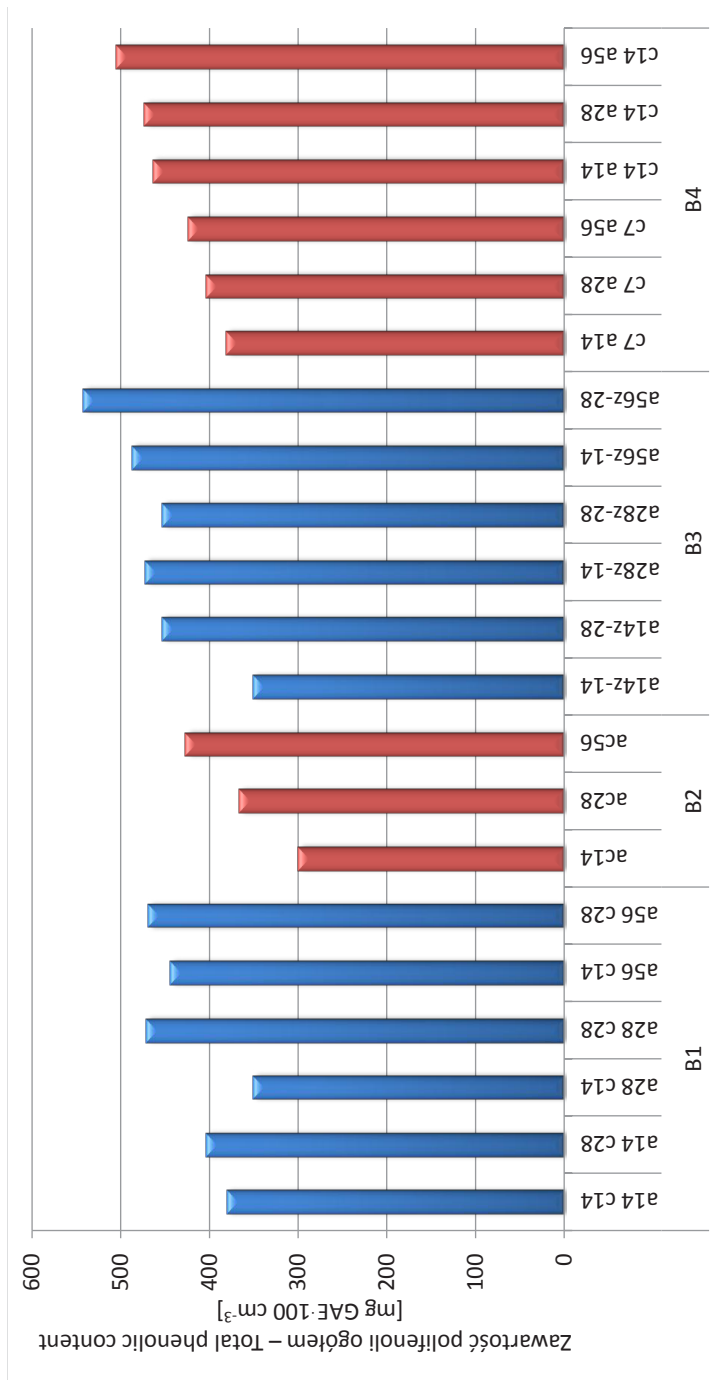
Nalewki z mahonii poddane ocenie organoleptycznej otrzymały średnie noty 3,2–3,6 i była to ocena najniższa spośród czterech rodzajów nalewek przedstawionych w niniejszej pracy. Najniżej, ze względu na barwę, oceniono nalewki wytworzone według wariantu M3, a najwyższej nalewki wykonane według wariantu pierwszego (M1).

4.2.3. Nalewki z berberysu

Nalewki z berberysu przygotowano, używając etanolu o stężeniu 60%. Gotowe produkty zawierały przeciętnie 28% alkoholu.

Średnia zawartość polifenoli ogółem w nalewkach z berberysu wyniosła prawie 430 $\text{mg}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$ w przeliczeniu na kwas galusowy (rys. 11). Najwięcej polifenoli ogółem, 541 $\text{mg}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$ zawierała nalewka, wykonana według wariantu B3, w którym owoce były poddane maceracji alkoholem przez 56 dni, po tym czasie, po oddzieleniu otrzymanego roztworu, do owoców został dodany cukier na 28 dni, a następnie oba roztwory połączono. Najmniej polifenoli – 300 $\text{mg}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$ – oznaczono w nalewce, którą przygotowano, stosując 14-dniową macerację z alkoholem i cukrem (wariant B2). W każdym z wykonanych wariantów nalewek wydłużenie czasu kontaktu owoców z alkoholem spowodowało lepszą ekstrakcję polifenoli z owoców (rys. 11).

Średnia aktywność przeciwrodnikowa wobec rodników DPPH \cdot i ABTS $\cdot\cdot$ wynosiła odpowiednio 1450 i 1740 $\mu\text{mol TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$, a siła redukująca FRAP – 1506 $\mu\text{mol TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$. W nalewkach z berberysu nie zaobserwowano tak dużych różnic w aktywności przeciwutleniającej, pomiędzy wariantami technologicznymi, jak w przypadku pozostałych surowców (tab. 11). Pojemność przeciwutleniająca oznaczona metodami DPPH \cdot , ABTS $\cdot\cdot$ i FRAP wyniosła średnio w nalewkach berberysowych odpowiednio 1450, 1740,2 i 1506,5 $\mu\text{mol TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$, przy czym była niższa w tych próbkach, które w obrębie poszczególnych wariantów poddano najkrótszemu procesowi ekstrakcji.



Rys. 11. Zawartość polifenoli ogółem w nalewkach z berberysu przygotowanych według różnych wariantów (B1, B2, B3, B4)
 Fig. 11. Total phenolic content in barberry liqueurs prepared according to different technological variants (B1, B2, B3, B4)

Tabela 11
Table 11

Aktywność przeciwutleniająca nalewek z berberysu
Antioxidant activity of barberry liqueurs

Warianty technologiczne Technological variants		DPPH*	ABTS**	FRAP
		μmol TE·100 cm ⁻³		
B1	a14c14	1436,4±186,2 ^{bcd}	1867,1±169,7 ^{bcd}	1584,3±130,3 ^{cd}
	a14c28	1475,9±96,0 ^{bcd}	1808,6±97,0 ^{de}	1566,3±188,2 ^{cd}
	a28c14	1458,4±22,7 ^{bcd}	1650,6±200,8 ^{fg}	1348,3±217,3 ^{fg}
	a28c28	1514,8±128,5 ^{bc}	1969,9±218,8 ^{abc}	1649,9±70,2 ^{bc}
	a56c14	1498,5±37,6 ^{bc}	1691,7±139,1 ^{efg}	1573,7±150,0 ^{cd}
	a56c28	1520,2±39,5 ^{bc}	1850,2±129,3 ^{cd}	1505,3±133,3 ^{de}
	Średnia – Average	1484,0±100,3^A	1806,3±187,5^A	1538,0±173,0^A
B2	ac14	1198,3±85,0 ^h	1225,7±307,1 ^j	887,8±69,6 ⁱ
	ac28	1324,1±104,1 ^{efg}	1609,2±160,0 ^{gh}	1250,8±90,8 ^g
	ac56	1555,5±98,0 ^b	2051,0±265,6 ^a	1476,3±260,4 ^e
	Średnia – Average	1359,3±177,0^B	1628,6±420,0^B	1205,0±293,3^B
B3	a14z-c14	1364,1±75,0 ^{def}	1557,5±151,0 ^{ghi}	1081,0±102,2 ^h
	a14z-c28	1389,4±232,1 ^{def}	1782,6±85,5 ^{def}	1652,8±82,7 ^{bc}
	a28z-c14	1480,6±100,2 ^{bcd}	1782,4±79,7 ^{def}	1678,3±54,4 ^b
	a28z-c28	1476,8±48,2 ^{bcd}	1824,0±102,8 ^{de}	1625,0±80,0 ^{bc}
	a56z-c14	1512,7±60,5 ^{bc}	1852,9±114,2 ^{cd}	1709,6±50,4 ^b
	a56z-c28	1692,5±88,7 ^a	2047,0±146,9 ^a	1921,2±100,4 ^a
	Średnia – Average	1486,0±153,3^A	1807,7±181,2^A	1611,3±270,2^A
B4	c7a14	1222,2±86,7 ^{gh}	1452,4±78,9 ⁱ	1255,0±41,3 ^g
	c7a28	1304,3±90,2 ^{fgh}	1500,8±138,1 ^{hi}	1294,3±166,5 ^{fg}
	c7a56	1421,8±182,9 ^{def}	1758,6±148,2 ^{def}	1498,5±186,6 ^{de}
	c14a14	1432,5±62,1 ^{bcd}	1474,9±190,8 ^{hi}	1512,3±57,5 ^{de}
	c14a28	1495,6±84,0 ^{bc}	1787,6±78,1 ^{def}	1648,5±44,1 ^{bc}
	c14a56	1677,5±196,4 ^a	2000,5±136,3 ^{ab}	1917,1±81,8 ^a
	Średnia – Average	1425,6±188,2^{AB}	1662,5±239,6^B	1520,9±248,2^A
Średnia – Average		1450,1±160,1	1740,2±155,4	1506,5±172,7

Te same litery w kolumnach oznaczają grupy jednorodne (p < 0,05) – a,b,c... odnoszą się do wszystkich nalewek, A,B,C – odnoszą się do wariantów

The same letters in the columns indicate homogenous groups (p < 0.05) – a,b,c... refer to all liqueurs, A,B,C – refer to variants

Średnio najniższą aktywnością charakteryzowały się nalewki otrzymane według wariantu B2, w którym macerację prowadzono, dodając jednocześnie cukru i alkoholu do owoców na 14, 28 lub 56 dni. Obecność cukru spowodowała wzrost lepkości roztworu i prawdopodobnie z tego powodu ekstrakcja aktywnych składników była utrudniona.

Zawartość polifenoli ogółem była wysoko skorelowana z aktywnością przeciwrodnikową i siłą redukującą, co przedstawiono w tabeli 12.

W owocach berberysu oznaczono dwa dominujące antocyjany, 3-glukozydy cyjanidyny i pelargonidyny, które stanowiły w owocach odpowiednio 5,8 i 94,2%, a w nalewkach odpowiednio od 3,7 do 6,2% i od 93,8 do 96,3% całkowitej zawartości antocyjanów. Średnia zawartość tych barwników w nalewkach była niewielka i wynosiła $7,45 \text{ mg} \cdot 100 \text{ cm}^{-3}$, w przeliczeniu na 3-glukozyd cyjanidyny (tab. 13). Zarówno w owocach, jak i w nalewkach z nich sporządzonych dominowały kwasy fenolowe, przede wszystkim kwas chlorogenowy, którego było od 70 do 77% w ogólnej zawartości kwasów fenolowych, a jednocześnie jego udział w całkowitej zawartości związków polifenolowych wynosił, w zależności od sposobu otrzymania nalewki, od 67,3 do 72,6%.

Czas ekstrakcji był istotnym czynnikiem wpływającym na jakość produktu. W próbkach, które otrzymano przez wydłużoną macerację owoców berberysu, oznaczono wysoką zawartość polifenoli ogółem (rys. 11), ale jednocześnie następowało widoczne zmniejszenie się zawartości antocyjanów (tab. 13). Zaobserwowano nieco wyższe stężenie antocyjanów w tych próbkach, do których dodano jednocześnie alkoholu i cukru (wariant B2) lub najpierw dodano cukru do owoców na 7 lub 14 dni, a potem dodano alkoholu (wariant B4). W porównaniu z pozostałymi nalewkami jedynie w nalewkach z berberysu cukier pełnił pewną rolę ochronną w stosunku do antocyjanów.

Tabela 12

Table 12

Korelacje pomiędzy zawartością polifenoli ogółem a aktywnością przeciwrodnikową i siłą redukującą nalewek z owoców berberysu

Correlation coefficients between total phenolic content and antioxidant activity of barberry fruit liqueurs

	Polifenole ogółem Total phenolics	DPPH [•]	ABTS ^{••}	FRAP
Polifenole ogółem Total phenolics	1,00			
DPPH [•]	0,80	1,00		
ABTS ^{••}	0,71	0,88	1,00	
FRAP	0,91	0,86	0,83	1,00

Tabela 13
Table 13

Zawartość antocyjanów w nalewkach z berberysu
Anthocyanin content in barberry liqueurs

Warianty technologiczne Technological variants		Cy 3-glu [mg cy 3-glu·100 cm ⁻³]	Udział % % of total	Pg 3-glu [mg cy 3-glu·100 cm ⁻³]	Udział % % of total	Antocyjany Anthocyanins
B1	a14c14	0,3	4,8	6	95,4	6,29 ^{abcde}
	a14c28	0,32	4,9	6,25	95,0	6,58 ^{abcd}
	a28c14	0,31	4,8	6,18	95,2	6,49 ^{abcde}
	a28c28	0,27	4,2	6,18	95,8	6,45 ^{abcde}
	a56c14	0,2	3,8	5,03	96,4	5,22 ^{bcdef}
	a56c28	0,2	4,1	4,66	95,9	4,86 ^{def}
	Średnia – Average	0,26	4,3	5,72	95,7	5,98^C
B2	ac14	0,37	4,9	7,11	95,1	7,48 ^a
	ac28	0,36	4,9	7,06	95,3	7,41 ^{ab}
	ac56	0,3	4,6	6,26	95,4	6,56 ^{abcd}
	Średnia – Average	0,34	4,8	6,81	95,2	7,15^B
B3	a14z-c14	0,29	4,6	6,08	95,4	6,37 ^{abcde}
	a14z-c28	0,26	5,1	4,88	94,9	5,14 ^{cdef}
	a28z-c-14	0,28	5,2	5,06	94,8	5,34 ^{abcdef}
	a28z-c28	0,25	4,8	4,93	95,4	5,17 ^{cdef}
	a56z-c14	0,21	4,6	4,36	95,4	4,57 ^{ef}
	a56z-c28	0,16	3,9	3,9	96,1	4,06 ^f
	Średnia – Average	0,24	4,7	4,87	95,3	5,11^A
B4	c7a14	0,25	4,8	4,96	95,2	5,21 ^{abcd}
	c7a28	0,37	5,7	6,08	94,3	6,45 ^{abcde}
	c7a56	0,3	5,0	5,65	95,0	5,95 ^{abcdef}
	c14a14	0,34	5,1	6,27	94,9	6,61 ^{abc}
	c14a28	0,36	5,2	6,59	94,7	6,96 ^{abcd}
	c14a56	0,31	4,9	5,97	95,1	6,28 ^{abcdef}
	Średnia – Average	0,32	5,1	5,92	94,7	6,25^{BC}
Średnia – Average	0,29	4,9	5,69	95,3	5,97	

Te same litery w kolumnach oznaczają grupy jednorodne ($p < 0,05$) – a,b,c... odnoszą się do wszystkich nalewek, A,B,C – odnoszą się do wariantów

The same letters in the columns indicate homogenous groups – a,b,c... refer to all liqueurs, A,B,C – refer to variants

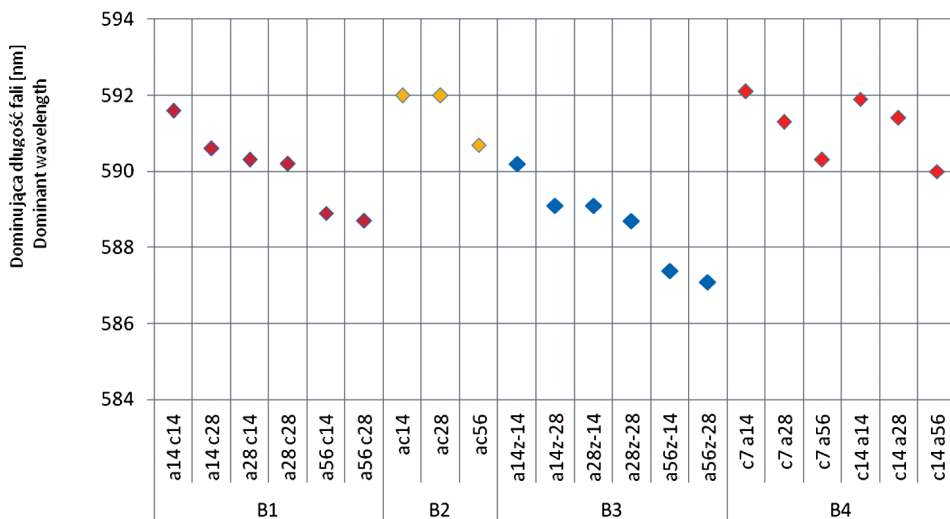
Obecność antocyjanów decydowała o barwie nalewek, która jest jednym z wyróżników ich jakości. Przy wydłużeniu czasu ekstrakcji ilość antocyjanów znacząco się zmniejszała, co przy ich stosunkowo niewielkiej zawartości w owocach istotnie wpłynęło na barwę nalewek. Wartość parametru a^* , podobnie jak współczynnika a^*/b^* była mniejsza, czyli nalewki były mniej czerwone (tab. 14). Dominująca długość fali we wszystkich próbkach o wydłużonym czasie przygotowania zmniejszyła się o około 3 nm z jasnoczerwonej w kierunku barwy pomarańczowej (rys. 12).

W ocenie organoleptycznej oceniający nie wyróżnili żadnego z wariantów przygotowania nalewek. Wszystkie próbki otrzymały wysokie noty, średnio 4,5 pkt w pięciopunktowej skali. Wysoka kwasowość nalewek spowodowała jednak, że ich smak nalewek oceniono średnio na 4,3 pkt, najniżej z badanych wyróżników.

Tabela 14
Table 14

Parametry barwy nalewek z berberysu
Parameters of barberry liqueurs color

Warianty technologiczne Technological variants		L*	a*	b*	a/b
B1	a14c14	73,5	32,3	30,7	1,1
	a14c28	73,4	29,8	29,4	1,0
	a28c14	71,6	29,9	30,4	1,0
	a28c28	72,0	30,7	31,5	1,0
	a56c14	72,7	27,9	30,3	0,9
	a56c28	73,4	27,6	30,3	0,9
B2	ac14	73,8	30,0	27,2	1,1
	ac28	75,7	32,0	29,3	1,1
	ac56	75,3	31,1	30,6	1,0
B3	a14z-c14	72,0	28,7	28,9	1,0
	a14z-c28	69,0	26,1	27,7	0,9
	a28z-c14	67,7	26,7	28,7	0,9
	a28z-c28	72,3	26,7	29,3	0,9
	a56z-c14	70,7	23,8	27,9	0,8
	a56z-c28	73,2	23,9	28,5	0,8
B4	c7a14	77,4	29,5	26,0	1,1
	c7a28	77,1	30,4	28,5	1,0
	c7a56	76,9	29,3	29,0	1,0
	c14a14	76,5	32,5	30,0	1,1
	c14a28	75,9	32,5	31,1	1,1
	c14a56	75,0	30,2	30,8	1,0



Rys. 12. Dominująca długość fali barwy nalewek z berberysu
 Fig. 12. Dominant wavelength of barberry liqueurs colour

4.2.4. Nalewki z tarniny

Nalewki z tarniny przygotowano przy użyciu 60% roztworu etanolu. W gotowych produktach zawartość alkoholu wynosiła od 27,5 do 30,3% obj.

W przeciwieństwie do owoców berberysu owoce tarniny charakteryzowały się dużo grubszą skórką, co w istotny sposób wpłynęło na skuteczność i stopień ekstrakcji związków fenolowych do nalewek (tab. 15). Zawartość tych związków w nalewkach z tarniny różniła się znacznie w zależności od sposobu przygotowania i wynosiła średnio od 102,4 mg GAE w 100 ml w nalewkach otrzymanych według wariantu T4 (najpierw cukier) do 697,9 mg GAE w 100 ml w wariantcie T5 (owoce rozparzone).

W nalewkach otrzymanych według wariantu czwartego (T4), w którym owoce najpierw zasypano cukrem na 7 lub 14 dni, a następnie dodano roztworu etanolu i kontynuowano ekstrakcję przez 14, 28 lub 56 dni zawartość polifenoli zmniejszała się wraz z wydłużeniem czasu kontaktu owoców z alkoholem etylowym. Prawdopodobnie degradacja polifenoli zapoczątkowana przez enzymy obecne w surowcu zachodziła również, już jako proces nieenzymatyczny, podczas maceracji owoców w obecności etanolu. Dodatkowo, początkowy dodatek cukru zwiększył lepkość środowiska, co utrudniło ekstrakcję polifenoli do roztworu.

Próbki o wydłużonym czasie kontaktu owoców z alkoholem we wszystkich zastosowanych wariantach zawierały nieco więcej polifenoli ogółem niż te, w których całkowity czas przygotowania wynosił 28 dni.

Tabela 15
Table 15

Zawartość polifenoli ogółem i aktywność przeciwutleniająca nalewek z tarniny
Total phenolic content and antioxidant activity of sloe liqueurs

Warianty technologiczne Technological variants		Polifenole ogółem Total phenolics	Aktywność przeciwutleniająca – Antioxidant activity		
			DPPH*	ABTS**	FRAP
		[mg·100 cm ⁻³]	[μmol TE·100 cm ⁻³]		
T1	a14c14	357,2±23,5 ^{efg}	949,4±60,3 ^{ij}	1987,4±147,3 ^{cde}	1358,3±113,0 ^e
	a14c28	385,3±35,1 ^{def}	977,0±100,9 ^{ij}	1986,6±140,7 ^{cde}	1400,2±94,6 ^e
	a28c14	433,1±15,6 ^{de}	1167,3±118,6 ^{fg}	2227,4±183,3 ^c	1609,1±161,9 ^c
	a28c28	393,5±18,8 ^{def}	1028,5±243,7 ^{hi}	2110,9±114,4 ^{cd}	1532,2±119,6 ^d
	a56c14	416,9±28,4 ^{def}	1153,8±62,0 ^{gh}	2097,7±59,6 ^{cd}	1545,5±38,4 ^d
	a56c28	413,1±33,3 ^{def}	1147,6±97,5 ^{gh}	2095,5±59,8 ^{cd}	1495,0±73,6 ^{de}
	a84c14	435,3±30,3 ^{de}	1310,7±106,6 ^{cde}	2187,0±182,6 ^c	1733,7±37,1 ^c
	a84c28	446,1±48,3 ^d	1201,2±110,0 ^{efg}	2184,9±59,5 ^c	1606,5±26,9 ^c
	Średnia – Average	410,1±39,9^B	1116,9±163,1^C	2109,7±145,6^B	1535,1±143,2^B
T2	ac14	169,3±27,5 ⁱ	375,9±35,6 ^{mn}	720,2±55,9 ^h	372,2±7,0 ^{hi}
	ac28	248,6±29,7 ^h	527,9±59,5 ^l	1043,9±76,8 ^{fg}	661,6±58,6 ^g
	ac56	297,0±20,0 ^{gh}	673,0±178,6 ^k	1183,7±142,0 ^f	717,1±27,3 ^{gh}
	ac84	301,4±29,5 ^{gh}	878,8±24,2 ^j	1289,6±154,5 ^f	836,5±37,2 ^{fg}
		Średnia – Average	254,1±59,8^C	613,9±209,8^D	1059,4±243,8^D
T3	a14z-c14	347,9±44,9 ^{fg}	1121,7±70,2 ^{gh}	1696,8±146,5 ^e	1146,1±51,9 ^f
	a14z-c28	397,4±34,9 ^{def}	1141,9±93,9 ^{gh}	1705,4±209,1 ^e	1194,1±97,7 ^f
	a28z-c14	412,0±34,5 ^{def}	1372,1±95,6 ^{bcd}	2204,3±120,6 ^c	1544,8±136,6 ^d
	a28z-c28	382,0±26,2 ^{def}	1283,9±114,3 ^{def}	1850,5±155,6 ^{de}	1366,0±76,7 ^e
	a56z-c14	418,0±43,1 ^{def}	1412,4±81,4 ^{abc}	2065,9±63,9 ^{cd}	1583,5±42,9 ^{cd}
	a56z-c28	441,9±16,6 ^d	1437,0±43,4 ^{ab}	2216,9±152,2 ^c	1421,1±257,4 ^{de}
		Średnia – Average	399,9±44,0^B	1294,8±149,6^B	1956,6±259,3^C
T4	c7a14	162,2±50,9 ^{ij}	465,0±191,3 ^{lm}	763,8±244,4 ^{gh}	528,6±77,7 ^{ghi}
	c7a28	122,0±22,4 ^{ijk}	291,6±53,1 ^p	558,4±128,0 ^{hi}	656,7±148,4 ^{ghi}
	c7a56	67,3±5,7 ^k	150,9±25,6 ^{no}	242,2±40,5 ^j	307,0±15,1 ⁱ
	c14a14	100,9±10,3 ^{ijk}	222,3±41,1 ^p	394,0±47,2 ^{ij}	485,7±76,9 ^{ghi}
	c14a28	89,2±2,1 ^{jk}	174,6±30,6 ^{po}	319,3±10,7 ^{ij}	371,7±52,1 ^{hi}
	c14a56	72,5±2,3 ^k	147,1±18,7 ^{po}	249,0±13,8 ^j	336,4±40,9 ^{hi}
		Średnia – Average	102,4±39,2^D	241,9±137,5^E	421,1±217,5^E
T5	cta14	621,2±148,9 ^c	1458,4±85,8 ^{ab}	4657,1±440,9 ^a	4022,3±604,5 ^b
	ct28	781,6±28,6 ^a	1532,0±40,0 ^a	4411,4±709,9 ^{ab}	4635,5±819,0 ^a
	cta56	682,8±56,5 ^{bc}	1500,6±107,3 ^a	4240,6±478,6 ^b	4736,8±570,7 ^a
	cta84	705,9±239,9 ^b	1518,9±116,6 ^a	4229,9±660,4 ^b	4224,8±932,3 ^b
		Średnia – Average	697,9±147,1^A	1502,5±90,6^A	4384,7±572,4^A
Średnia – Average		360,8	950,8	1890,0	1551,0

Te same litery w kolumnach oznaczają grupy jednorodne (p < 0,05) – a,b,c... odnoszą się do wszystkich nalewek, A,B,C – odnoszą się do wariantów

The same letters in the columns indicate homogenous groups – a,b,c... refer to all liqueurs, A,B,C – refer to variants

W wariancie piątym (T5) owoce tarniny poddano działaniu temperatury 90°C przez 15 minut, a następnie prowadzono ekstrakcję etanolem. Korzystne działanie temperatury w wariancie T5 polegało na zniszczeniu tkanki owoców i dezaktywacji enzymów utleniających, co przyczyniło się do dużo skuteczniejszej ekstrakcji polifenoli. W pozostałych trzech wariantach przygotowania zmieniano sposób dodawania cukru do roztworu ekstrahującego. W przygotowaniu nalewek według wariantów T1 i T3 ekstrakcja początkowo przebiegała w roztworze alkoholu etylowego bez dodatku cukru, późniejszy jego dodatek nie wpływał na zawartość polifenoli w nalewkach. W wariancie T2 dodawano cukru i alkoholu do owoców jednocześnie. Obecność cukru podniosła lepkość roztworu i utrudniła ekstrakcję polifenoli, wskutek czego otrzymane nalewki zawierały istotnie mniej tych związków (tab. 15). Wydłużanie czasu ekstrakcji w niewielkim stopniu zmieniło zawartość polifenoli ogółem w gotowym produkcie. Tylko w próbkach o najkrótszym – 14-dniowym czasie maceracji alkoholem zawartość ich była nieco mniejsza.

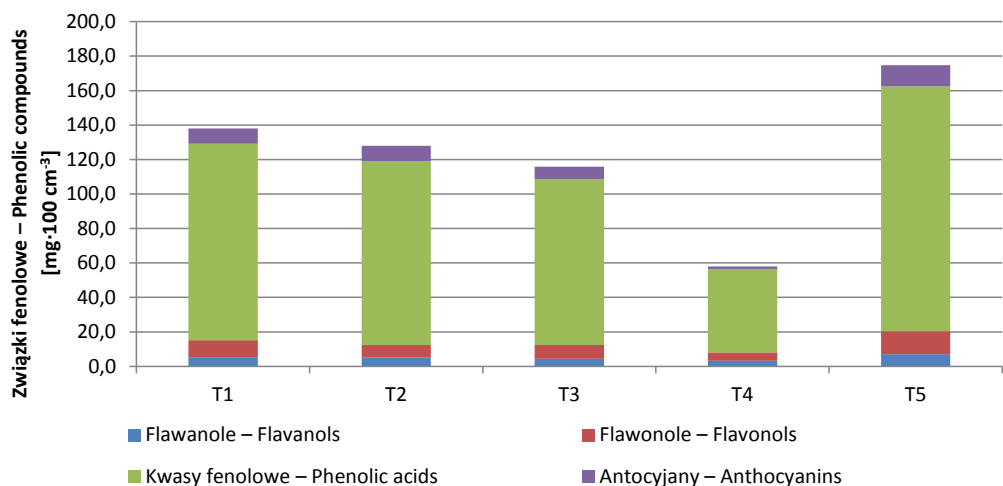
Aktywność przeciwrodnikowa zmierzona wobec rodników DPPH• i ABTS^{•+} oraz siła redukująca FRAP zależały od sposobu wykonania nalewek, co przedstawiono w tabeli 15.

Najwyższą średnią aktywność przeciwutleniającą wykazywały nalewki tarninowe otrzymane w wyniku początkowego podgrzania owoców (wariant T5). Aktywność wobec kationorodników ABTS^{•+} i siła redukująca FRAP była w tych nalewkach wielokrotnie wyższa od odnotowanej dla pozostałych wariantów i wynosiła ponad 4000 $\mu\text{mol TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$. W próbkach nalewek otrzymanych przez początkową ekstrakcję owoców etanolem (warianty T1 i T3) średnia aktywność mierzona metodą DPPH wynosiła 1117 i 1295 $\mu\text{mola TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$, metodą ABTS^{•+} odpowiednio 2110 i 1957 $\mu\text{mola TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$, a metodą FRAP 1535 i 1376 $\mu\text{mola TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$. Ekstrakcja owoców roztworem, który zawierał jednocześnie etanol i cukier (wariant T2), przyczyniła się do zmniejszenia aktywności przeciwutleniającej gotowego produktu o 48–56% w porównaniu z nalewkami otrzymanymi przez początkową ekstrakcję tylko roztworem etanolu.

Najsłabszą aktywność przeciwutleniającą spośród nalewek tarninowych odnotowano, podobnie jak w przypadku nalewek z pozostałych surowców, w wariancie T4 (cukier dodany na początku procesu). W obrębie poszczególnych wariantów różnice aktywności były niewielkie. W próbkach o dłuższym czasie kontaktu alkoholu z owocami w większości przypadków obserwowano zwiększenie się potencjału przeciwutleniającego nalewek, z wyjątkiem wariantu czwartego (T4), w którym tendencja była odwrotna (tab. 15).

W nalewkach tarninowych podstawowym składnikiem wśród związków fenolowych były kwasy fenolowe (80,4–83,7%). Najwięcej było kwasu neochlorogenowego, który w tej grupie związków stanowił od 70 do 80%, w zależności od sposobu przygotowania nalewek i czasu ekstrakcji. Flawonoli było od 5,6 do 8,0%, a flawanoli od 3,7 do 5,1%. Barwniki antocyjanowe odpowiadały za 2,6 do 8,5% składu polifenoli (rys. 13).

Zawartość polifenoli ogółem dobrze korelowała z aktywnością przeciwrodnikową (tab. 16). Współczynniki korelacji wynosiły od 0,74 do 0,97. Wyższe wartości obliczone dla polifenoli ogółem świadczą, że na aktywność przeciwutleniającą nalewek miały wpływ również inne substancje reagujące z odczynnikiem Folin-Ciocalteu.



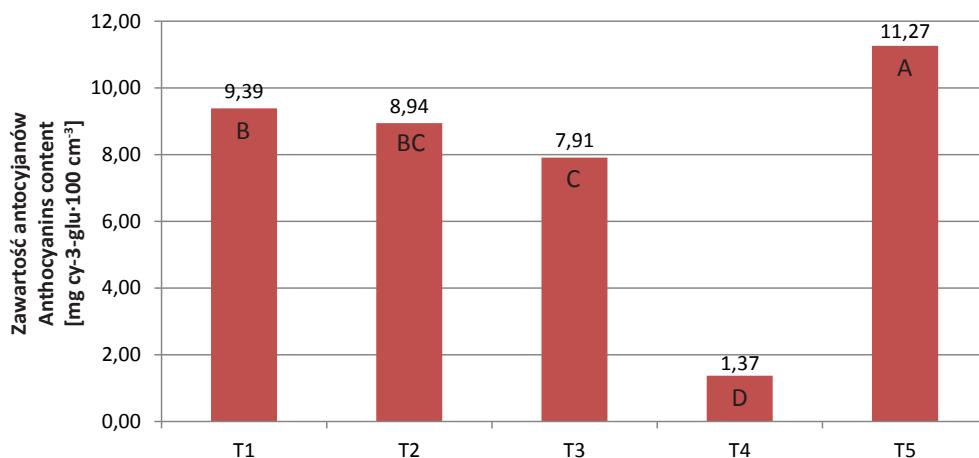
Rys. 13. Skład związków fenolowych nalewek z tarniny
 Fig. 13. Composition of phenolic compounds of sloe liqueurs

Tabela 16
 Table 16

Współczynniki korelacji pomiędzy zawartością związków polifenolowych w nalewkach z tarniny a aktywnością przeciwutleniającą mierzoną metodami DPPH[•], FRAP i ABTS^{••}
 Correlation coefficients of sloe liqueurs between phenolic compounds and antioxidant activity measured with methods DPPH[•], FRAP and ABTS^{••}

	DPPH [•]	ABTS ^{••}	FRAP
Flawanole – Flavanols	0,77	0,92	0,88
Flawonole – Flavonols	0,88	0,98	0,94
Kwasy fenolowe – Phenolic acids	0,83	0,86	0,78
Antocyjany – Anthocyanins	0,80	0,82	0,74
Polifenole ogółem – Total phenolics	0,92	0,97	0,92

Nalewki wykonane według pięciu wariantów technologicznych różniły się istotnie zawartością barwników antocyjanowych (rys. 14). Najmniej antocyjanów zawierały nalewki, których przygotowanie polegało na dodaniu cukru do owoców, a alkoholu dopiero po 7 lub 14 dniach (wariant T4). Degradacja barwników, prawdopodobnie wskutek działania enzymów surowca, była znaczna, a zawartość antocyjanów w tych próbkach wynosiła bezpośrednio po ich przygotowaniu 1,7–2,1 mg·100 cm⁻³ w przeliczeniu na 3-glukozyd cyjanidyny. Najwyższą zawartością barwników, podobnie jak polifenoli ogółem, charakteryzowały się nalewki otrzymane przez rozparzenie owoców (wariant T5), czyli te, w których enzymy własne surowca zostały termicznie zniszczone – średnio 11,3 mg·100 cm⁻³ (rys. 14).



Rys. 14. Średnia zawartość antocyjanów ogółem w nalewkach z tarniny przygotowanych różnymi metodami (T1, T2, T3, T4, T5). ABC... – grupy jednorodne ($p < 0,05$)

Fig. 14. Average content of anthocyanins in sloe liqueurs prepared by different methods (T1, T2, T3, T4, T5). ABC – homogenous groups ($p < 0.05$)

Zawartość antocyjanów w nalewkach zmieniała się we wszystkich wariantach przygotowania wraz z wydłużaniem czasu maceracji owoców. Czas maceracji wynoszący 14 lub 21 dni był zbyt krótki – wtedy do roztworu przechodziła mniejsza ilość antocyjanów niż w próbkach poddanych dłuższemu procesowi. Z kolei w nalewkach przyrządzonych przy wydłużonym czasie maceracji – powyżej 28 dni – następowała degradacja tych barwników (tab. 17) i pogarszała się barwa.

Tabela 17

Table 17

Zawartość antocyjanów w nalewkach z owoców tarniny sporządzonych przy zastosowaniu różnych wariantów technologicznych
Anthocyanins content in sloe liqueurs prepared by using different technological variants

Warianty technologiczne Technological variants	3-glukozyd cyjanidyny Cyanidin 3-glucoside	3-rutynozyd cyjanidyny Cyanidin 3-rutinoside	3-glukozyd peonidyny Peonidin 3-glucoside	3-rutynozyd peonidyny Peonidin 3-rutinoside	Suma antocyjanów Sum of anthocyanins	
	[mg cy 3-glu·100 cm ⁻³]					
1	2	3	4	5	6	
T1	a14c14	6,57±1,31 ^b	3,50±0,20 ^c	1,12±0,18 ^b	1,43±0,02 ^{bc}	12,62±1,71 ^{bc}
	a14c28	5,30±1,19 ^{bcd}	3,11±0,80 ^{cde}	0,98±0,17 ^{bcd}	1,32±0,22 ^{bcd}	10,70±2,38 ^{bcdef}
	a28c14	5,49±0,99 ^{bcd}	3,17±0,51 ^{cd}	1,06±0,17 ^{bc}	1,42±0,34 ^{bc}	11,13±2,01 ^{bcde}
	a28c28	5,21±1,25 ^{bcd}	2,95±0,85 ^{cde}	0,99±0,16 ^{bcd}	1,31±0,21 ^{bcd}	10,45±2,47 ^{bcdefg}
	a56c14	4,14±0,61 ^{cde}	2,61±0,34 ^{defg}	0,73±0,09 ^{def}	1,07±0,10 ^{defg}	8,56±1,14 ^{defghi}

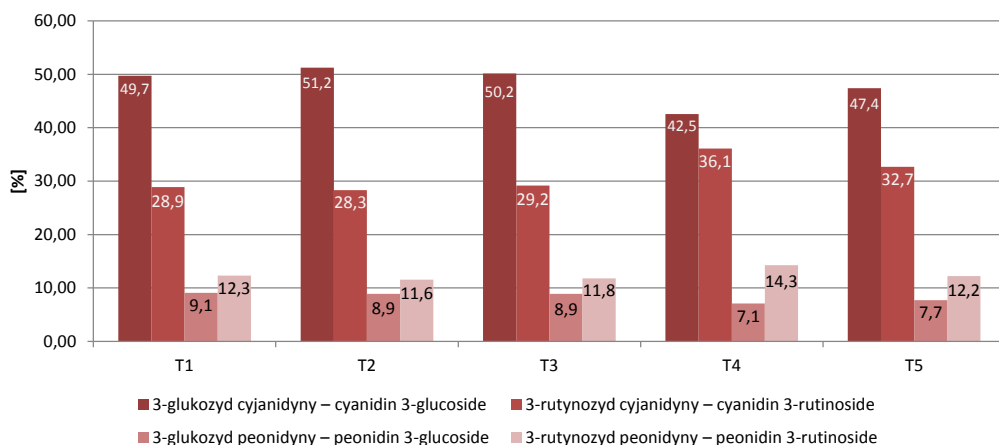
Tabela 17 cd.
Table 17 cont.

	1	2	3	4	5	6
T1	a56c28	4,02±0,77 ^{de}	2,32±0,52 ^{efg}	0,69±0,09 ^{def}	0,93±0,19 ^{efg}	7,96±1,57 ^{defghi}
	a84c14	3,55±0,35 ^{ef}	2,03±0,27 ^{fgh}	0,67±0,01 ^{def}	0,91±0,05 ^{efg}	7,16±0,68 ^{ghi}
	a84c28	3,08±0,56 ^{ef}	2,01±0,46 ^{fgh}	0,59±0,06 ^{ef}	0,86±0,12 ^{fg}	6,53±1,21 ^{hij}
	Średnia Average	4,67±1,32^{AB}	2,71±0,67^B	0,85±0,22^A	1,16±0,27^B	9,39±2,43^B
T2	ac14	4,11±1,12 ^{de}	1,98±0,29 ^{fgh}	0,78±0,14 ^{cdef}	0,90±0,04 ^{efg}	7,77±1,60 ^{fghi}
	ac28	6,07±2,19 ^{bc}	2,94±0,41 ^{cde}	1,01±0,41 ^{bc}	1,21±0,31 ^{cde}	11,24±3,32 ^{bcd}
	ac56	4,46±0,28 ^{cde}	2,65±0,08 ^{defg}	0,74±0,02 ^{cdef}	1,02±0,05 ^{defg}	8,87±0,28 ^{defghi}
	ac84	3,69±0,51 ^{de}	2,55±0,09 ^{defg}	0,64±0,10 ^{ef}	1,01±0,01 ^{defh}	7,89±0,52 ^{efghi}
Średnia Average	4,58±1,36^{AB}	2,53±0,42^{BC}	0,79±0,22^{AB}	1,04±0,17^{BC}	8,94±2,05^{BC}	
T3	a14z-c14	4,28±1,00 ^{cde}	2,27±0,36 ^{efg}	0,74±0,12 ^{cdef}	0,90±0,09 ^{efg}	8,20±1,58 ^{defghi}
	a14z-c28	3,75±0,24 ^{de}	2,09±0,18 ^{fgh}	0,68±0,02 ^{def}	0,86±0,03 ^{fg}	7,37±0,47 ^{fghi}
	a28z-c14	4,89±0,06 ^{bcde}	2,80±0,03 ^{cdef}	0,88±0,01 ^{bcde}	1,15±0,08 ^{cdef}	9,72±0,00 ^{cdefgh}
	a28z-c28	4,38±0,09 ^{cde}	2,42±0,34 ^{defg}	0,79±0,03 ^{cdef}	1,01±0,07 ^{defg}	8,61±0,47 ^{defghi}
	a56z-c14	3,59±0,11 ^{def}	2,34±0,24 ^{defg}	0,61±0,02 ^{ef}	0,91±0,04 ^{efg}	7,45±0,37 ^{fghi}
	a56z-c28	2,92±0,29 ^{ef}	1,92±0,03 ^{gh}	0,52±0,04 ^f	0,76±0,01 ^g	6,12±0,29 ^{ij}
Średnia Average	3,97±0,74^B	2,31±0,34^C	0,70±0,13^B	0,93±0,14^C	7,91±1,29^C	
T4	c7a14	0,91±0,18 ^g	0,77±0,13 ^{ij}	0,13±0,06 ^g	0,31±0,05 ^h	2,12±0,42 ^k
	c7a28	0,66±0,11 ^g	0,74±0,33 ^j	0,11±0,02 ^g	0,27±0,12 ^h	1,78±0,57 ^k
	c7a56	0,53±0,03 ^g	0,39±0,04 ^{ij}	0,09±0,00 ^g	0,16±0,01 ^h	1,16±0,09 ^k
	c14a14	0,47±0,03 ^g	0,40±0,15 ^j	0,09±0,02 ^g	0,17±0,03 ^h	1,13±0,18 ^k
	c14a28	0,52±0,21 ^g	0,37±0,15 ^j	0,09±0,03 ^g	0,14±0,06 ^h	1,11±0,45 ^k
	c14a56	0,42±0,16 ^g	0,31±0,09 ^j	0,07±0,02 ^g	0,12±0,04 ^h	0,91±0,31 ^k
Średnia Average	0,58±0,20^C	0,50±0,23^D	0,10±0,03^C	0,20±0,09^D	1,37±0,53^D	
T5	cta14	1,76±0,10 ^{fg}	1,37±0,09 ^{hi}	0,24±0,02 ^g	0,45±0,03 ^h	3,82±0,24 ^{jk}
	ctat28	8,90±0,57 ^a	5,56±0,42 ^a	1,58±0,02 ^a	2,30±0,03 ^a	18,35±1,05 ^a
	cta56	6,45±1,79 ^b	4,30±0,36 ^b	1,03±0,39 ^{bc}	1,63±0,41 ^b	13,41±2,95 ^b
	cta84	4,25±0,49 ^{cde}	3,49±0,12 ^c	0,62±0,02 ^{ef}	1,13±0,03 ^{cdef}	9,49±0,61 ^{cdefgh}
Średnia Average	5,34±2,92^A	3,68±1,64^A	0,87±0,56^A	1,38±0,74^A	11,27±5,82^A	
Średnia Average	3,73±2,20	2,26	0,65	0,92	7,56	

Te same litery w kolumnach oznaczają grupy jednorodne ($p < 0,05$) – a,b,c... odnoszą się do wszystkich nalewek, A,B,C – odnoszą się do wariantów

The same letters in the columns indicate homogenous groups ($p < 0.05$) – a,b,c... refer to all liqueurs, A,B,C – refer to variants

Nalewki z tarniny zawierały w swoim składzie następujące antocyjany: cyjanidyno-3-glukozyd (37–54%) cyjanidyno-3-rutynozyd (25–41%), peonidyno-3-glukozyd (6–10%) oraz peonidyno-3-glukozyd (11–15%), a ich wzajemne proporcje w zawartości barwników ogółem zależały od sposobu przygotowania nalewek oraz czasu kontaktu z roztworem etanolu (rys. 15).

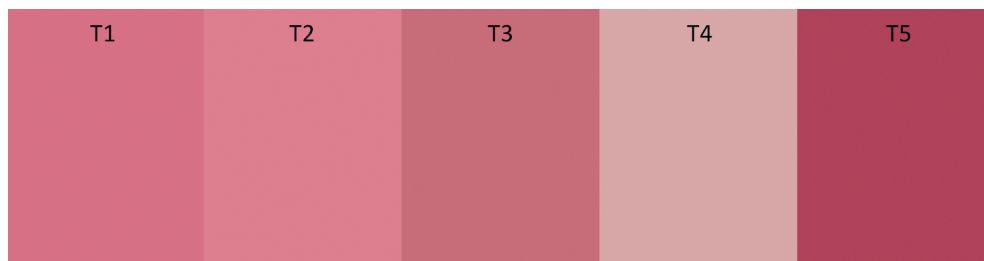


Rys. 15. Profil antocyjanów nalewek z tarniny przygotowanych różnymi metodami (T1, T2, T3, T4, T5)

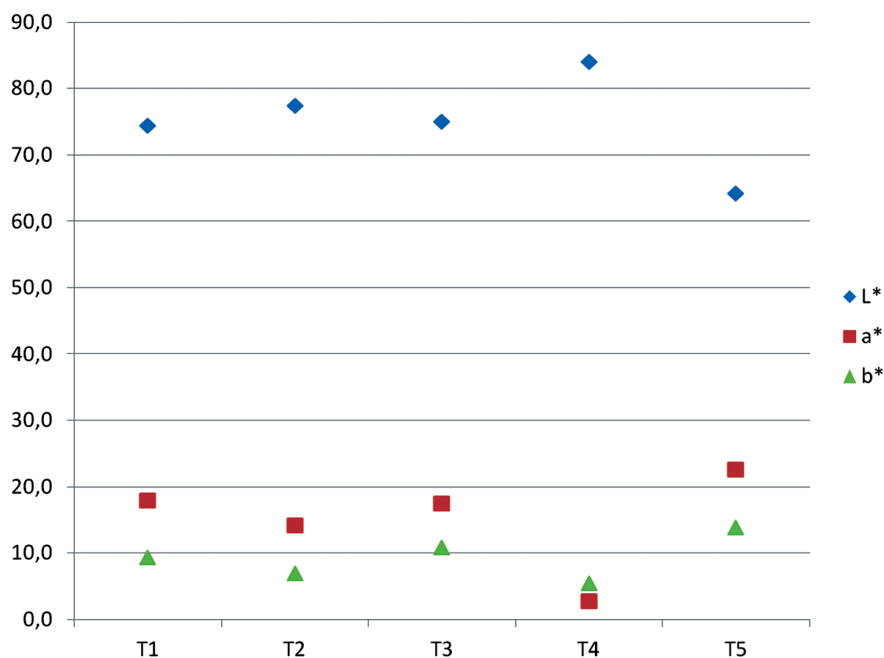
Fig. 15. Anthocyanin composition profile of sloe liqueurs prepared by different methods (T1, T2, T3, T4, T5)

W nalewkach przygotowanych według wariantów T4 (cukier dodany na początku procesu) i T5 (owoce ogrzewane) stabilność glukozydów cyjanidyny i peonidyny była mniejsza, a rutynozydów większa niż w pierwszych trzech wariantach, w których owoce od razu poddano działaniu etanolu. O trwałości barwników antocyjanowych decyduje ich budowa, w szczególności glikozylacja, metylacja i acylacja. Rutynozydy są bardziej stabilne od glukozydów, dlatego zostało ich proporcjonalnie więcej w tych nalewkach, które poddane były działaniu enzymów rodzimych i cukru (T4) lub temperatury (T5).

Owoce tarniny tak jak owoce mahonii charakteryzowały się prawdopodobnie wysoką aktywnością enzymów utleniających, co powodowało znaczącą degradację związków fenolowych i antocyjanów. Niekorzystna degradacja barwników antocyjanowych najbardziej uwidoczniła się w barwie nalewek tarninowych (rys. 16), które wykonano według wariantu T4, czyli najpierw do owoców dodano cukru. W nalewkach tych udział barwy czerwonej (a^*) i żółtej (b^*) był najniższy (rys. 17). Były one także jaśniejsze niż nalewki wykonane według pozostałych wariantów (wartość parametru L^* była najwyższa). Najciemniejsze, a jednocześnie najbardziej czerwone były nalewki otrzymane przez wstępne ogrzanie (T5).



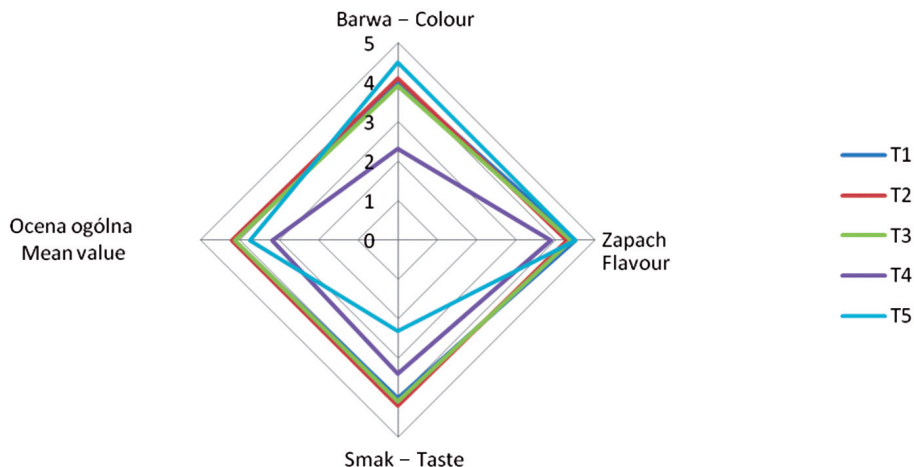
Rys. 16. Barwa nalewek z tarniny przygotowanych różnymi metodami (T1, T2, T3, T4, T5)
 Fig. 16. Colour of sloe liqueurs prepared by different methods (T1, T2, T3, T4, T5)



Rys. 17. Parametry barwy (L^* , a^* , b^*) nalewek z tarniny przygotowanych różnymi metodami (T1, T2, T3, T4, T5)
 Fig. 17. Colour parameters (L^* , a^* , b^*) of sloe liqueurs prepared by different methods (T1, T2, T3, T4, T5)

Nalewki poddano analizie organoleptycznej z udziałem odpowiednio przeszkolonego zespołu, który ocenił barwę nalewek, ich zapach i smak oraz wrażenie ogólne (rys. 18).

W ocenie ogólnej nalewki wykonane według wariantów T1, T2 i T3 wypadły korzystnie niż pozostałe nalewki z tarniny i otrzymały wysoką ocenę (4,1–4,2). W nalewkach otrzymanych według wariantu T4 na niską ocenę wpłynęły przede wszystkim barwa (oceniona jako „błada”) i smak, który oceniono jako słodki, ale o bardzo słabej nucie charakterystycznej dla użytych owoców. Z kolei nalewki wariantu T5 (owoce rozparzane) uznane zostały jako zbyt cierpkie i przez to nieprzyjemne w smaku, co obniżyło ich ogólną notę, pomimo ładnej, intensywnej barwy.



Rys. 18. Profilogram oceny organoleptycznej nalewek z tarniny
 Fig. 18. Organoleptic analysis profile of sloe liqueurs

4.3. Identyfikacja i przemiany związków fenolowych nalewek z wybranych owoców podczas przechowywania

W trzecim etapie badań wykonano nalewki z czarnej porzeczki, mahonii, berberysu i tarniny przy użyciu 60% roztworu etanolu. Oznaczono zawartość polifenoli, antocyjanów i aktywności przeciwutleniającej w surowcach oraz w nalewkach nieprzechowywanych i przechowywanych przez 12 i 60 miesięcy. Porównano skład związków fenolowych surowców i nalewek.

W tabeli 18 zamieszczono wyniki oznaczeń zawartości podstawowych składników w **owocach** czarnej porzeczki, mahonii, berberysu i tarniny. Surowce wykorzystane do przyrządzenia nalewek zawierały od 22,7 (czarna porzeczka) do 32% (tarnina) suchej masy, a ekstrakt refraktometryczny czarnych porzeczek, mahonii, berberysu i tarniny wynosił odpowiednio 18,5, 15,8, 19,4 i 22,5%. Zawartość cukrów była najwyższa w owocach czarnych porzeczek (11,8%), a następnie tarniny (9,8%). Pozostałe surowce zawierały 7,0% (mahonia) i 6,8% (berberys) cukrów ogółem. Ilość pektyn zawierała się w granicach od 1,0 do 1,7%. Najwyższą kwasowością charakteryzowały się owoce berberysu – 5,4% w przeliczeniu na kwas cytrynowy. Kwasowość czarnych porzeczek wynosiła 3,7%, natomiast mahonii i tarniny – 3,0 i 2,9%.

Najbogatsze w **polifenole ogółem** były owoce berberysu (ponad 1000 mg GAE·100 g⁻¹), a najuboższe – owoce czarnej porzeczki – 606 mg GAE·100 g⁻¹, które powszechnie uważane są za bardzo bogate źródło związków fenolowych (tab. 19).

Tabela 18
Table 18

Skład chemiczny surowców użytych do wytworzenia nalewek
Chemical composition of raw material used for liqueurs production

Rodzaj nalewki Kind of liqueur	Sucha masa Dry matter [%]	Ekstrakt Extract [%]	pH	Kwasowość (jako kwas cytrynowy) Acidity (as citric acid) [%]	Cukry – Sugars		Pektyny Pectins [%]	Kwas askorbinowy Ascorbic acid [mg·100 g ⁻¹]
					Redukujące Reducing [%]	Ogółem Total [%]		
Berberys Barberry (<i>Berberis vulgaris</i>)	32,08	19,4	2,81	5,37	6,46	6,76	1,31	11,5
Czarna porzeczka Blackcurrant (<i>Ribes nigrum</i>)	22,71	18,5	2,87	3,72	11,42	11,82	1,66	166,6
Mahonia Mahonia (<i>Mahonia aquifolium</i> (Pursh) Nutt.)	24,52	15,8	3,04	2,96	7,01	6,97	1,14	0,4
Tarnina Sloe (<i>Prunus spinosa</i>)	28,32	22,5	3,33	2,88	9,35	9,82	1,01	0,4

Zawartość polifenoli ogółem i antocyjanów w surowcach użytych do wytworzenia nalewek
Total phenolic and anthocyanin content in raw material used for liqueurs production

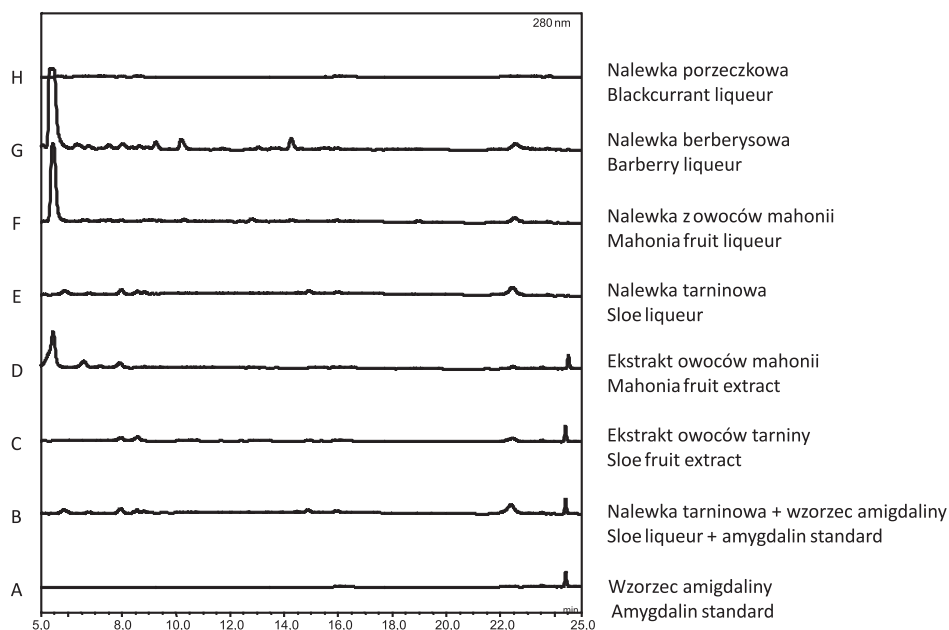
Rodzaj nalewki Kind of liqueur	Polifenole ogółem Total phenolics [mg GAE·100 g ⁻¹]	Antocyjany Anthocyanins [mg·100 g ⁻¹]	Aktywność wobec rodników DPPH [•] Antioxidant activity against DPPH [•] radicals [μmol TE·100 g ⁻¹]
Berberys Barberry (<i>Berberis vulgaris</i> L.)	1074±13,46	54,6±1,03	9978,6±60
Czarna porzeczka Blackcurrant (<i>Ribes nigrum</i> L.)	606±2,56	182,4±4,51	12763±0,05
Mahonia Mahonia (<i>Mahonia aquifolium</i> (Pursh) Nutt.	806±7,70	227±1,95	5235±80
Tarnina Sloe (<i>Prunus spinosa</i> L.)	701±1,94	91,9±0,83	6004,5±50

Największą zawartością **antocyjanów** charakteryzowały się owoce mahonii i czarnej porzeczki (odpowiednio 227,3 i 182,4 mg·100 g⁻¹ w przeliczeniu na 3-glukozyd cyjanidyny). Najmniej tych barwników zawierały owoce berberysu – 54,6 mg·100 g⁻¹. Największą **aktywność** wobec rodników DPPH[•] wykazywały owoce czarnej porzeczki i berberysu, a następnie tarniny oraz mahonii.

Niektóre owoce, szczególnie pestkowe, zawierają **glikozydy cyjanogenne** (amigdalinę), które pod działaniem kwasów żołądkowych w przewodzie pokarmowym mogą uwalniać kwas cyjanowodorowy. W surowcach i nalewkach oznaczono zawartość amigdaliny metodą HPLC-DAD (rys. 19).

Świeże owoce tarniny i mahonii zawierały odpowiednio 84,7 i 82,0 mg amigdaliny w 100 g, co odpowiada możliwości uwolnienia około 5 mg cyjanowodoru ze 100 g owoców. Nalewki zawierały poniżej 0,2 mg amigdaliny w 100 cm³, co przelicza się na 0,012 mg HCN w 100 cm³. Kwasy organiczne obecne w nalewkach, a pochodzące z owoców, i wydłużony czas maceracji spowodowały rozkład amigdaliny, stąd jej śladowe ilości w gotowych produktach.

Podczas przygotowania nalewek przede wszystkim barwniki antocyjanowe uległy znacznej degradacji ze względu na obecność etanolu i cukru. Stężenie antocyjanów w nalewkach i ich stabilność były zróżnicowane. W 100 cm³ produktów oznaczono od 5,8 do 9,2 mg antocyjanów, w przeliczeniu na 3-glukozyd cyjanidyny, najwięcej w nalewkach tarninowych, a najmniej w porzeczkowych (tab. 20). Jednym z wyznaczników stopnia degradacji barwników jest indeks degradacji antocyjanów. Im jego wartość jest wyższa, tym degradacja antocyjanów jest większa. W analizowanych nalewkach najbardziej niekorzystny, czyli najwyższy indeks degradacji, obliczono dla nalewek z czarnej porzeczki (DI=2,13) i z berberysu (DI=1,83). W pozostałych nalewkach indeks degradacji był mniejszy i wynosił: 1,28 (nalewka z mahonii) i 1,21 (nalewka z tarniny).



Rys. 19. Chromatogramy HPLC-DAD (280 nm) wzorca amigdaliny (A), nalewki z tarniny z dodanym wzorcem amigdaliny (B), ekstraktów z owoców tarniny (C) i mahonii (D) oraz nalewek tarninowych (E), mahoniowych (F), berberysowych (G), porzeczkowych (H)

Fig. 19. HPLC-DAD chromatograms (280 nm) of amygdalin standard (A), sloe liqueur with amygdalin standard (B), sloe (C) and mahonia (D) fruit extracts and sloe (E), mahonia (F), barberry (G) and blackcurrant (H) liqueurs

Tabela 20

Table 20

Średnia zawartość antocyjanów oraz indeks degradacji antocyjanów w nieprzechowywanych nalewkach owocowych

Average anthocyanins content and anthocyanin degradation index of not stored fruit liqueurs

Rodzaj nalewki Kind of liqueur	Antocyjany Anthocyanins [mg cy 3-glu·100 cm ⁻³]	Indeks degradacji antocyjanów Anthocyanins degradation index
Czarna porzeczka Blackcurrant (<i>Ribes nigrum</i>)	7,45 ± 0,05 ^{bc}	1,58 ± 0,093 ^b
Mahonia Mahonia (<i>Mahonia aquifolium</i>)	5,87 ± 0,45 ^{bc}	2,13 ± 0,277 ^c
Berberys Barberry (<i>Berberis vulgaris</i>)	8,04 ± 0,09 ^{ab}	1,28 ± 0,006 ^a
Tarnina Sloe (<i>Prunus spinosa</i>)	9,21 ± 0,24 ^a	1,21 ± 0,001 ^a

Nalewki zawierały także o wiele mniej polifenoli ogółem niż surowce, z których zostały wykonane, z powodu dodatku cukru i alkoholu podczas ich przygotowania. Jednak nalewki z owoców mało popularnych: berberysu, mahonii i tarniny, które w 100 cm³ zawierały od 312 do 429 mg polifenoli ogółem w przeliczeniu na kwas galusowy były bogatsze w polifenole niż nalewki porzeczkowe, które zawierały 117 mg polifenoli ogółem w 100 cm³ (tab. 21).

Tabela 21

Table 21

Zawartość polifenoli ogółem i aktywność przeciwutleniająca nalewek przed i po przechowywaniu przez 12 i 60 miesięcy

Total phenolic content and antioxidant activity of liqueurs before and after 12 and 60 months ageing

Nalewka Liqueur	Czas przechowywania [miesiące] Time of ageing [months]	Polifenole ogółem [mg GAE·100 cm ⁻³] Total phenolics [mg GAE·100 cm ⁻³]	DPPH*	ABTS**	FRAP
			[μmol TE·100 cm ⁻³]		
Nalewka z czarnej porzeczki Blackcurrant liqueur	0	117,7	496,4	731,3	1202,3
	12	85,3	463,5	663,0	1531,8
	60	87,6	477,5	557,7	1513,0
Nalewka z mahonii Mahonia liqueur	0	312,4	989,1	942,5	1893,6
	12	230,7	852,0	1218,4	2011,9
	60	245,7	894,0	1320,1	2143,6
Nalewka z berberysu Barberry liqueur	0	429,1	1450,1	1740,2	1506,5
	12	320,2	1377,0	1935,0	1413,1
	60	313,0	1280,8	1924,7	1518,9
Nalewka z tarniny Sloe liqueur	0	382,0	1128,0	2352,6	1764,9
	12	262,0	1037,5	1791,8	1369,5
	60	279,1	1248,6	1893,4	1366,0

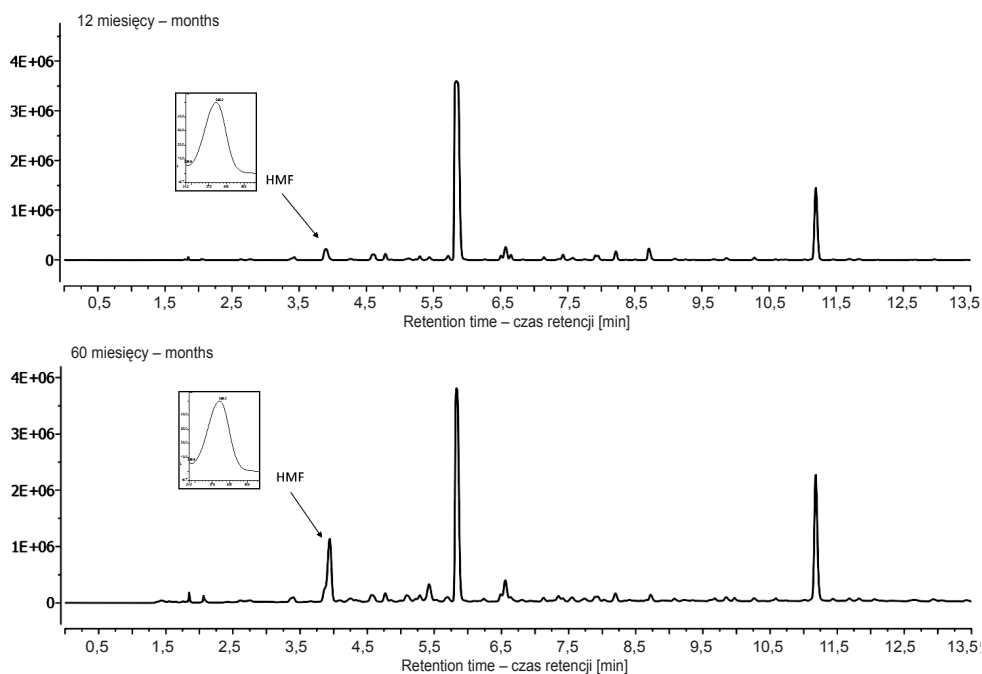
Aktywność antyoksydacyjna nalewek była wielokrotnie mniejsza niż oznaczona dla surowców (tab. 21). Nalewka z czarnej porzeczki wykazywała najniższą aktywność przeciwutleniającą spośród analizowanych próbek, pomimo że aktywność wyznaczona dla owoców była najwyższa. Owoce czarnej porzeczki były natomiast szczególnie zasobne w kwas askorbinowy (166 mg·100 g⁻¹), który podczas przygotowania nalewek uległ utlenieniu. Może to świadczyć o dużym udziale kwasu askorbinowego w aktywności przeciwrodnikowej tych owoców. Aktywność przeciwrodnikowa nalewek oznaczona metodami DPPH*, ABTS** i FRAP wahała się w szerokich granicach, odpowiednio: 496–1450, 731–1893 i 1202–1764 μmola TE·100 cm⁻³. Najwyższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się nalewki z berberysu oraz tarniny.

Nalewki z wybranych owoców przygotowane jedną metodą przechowywano w temperaturze pokojowej przez 60 miesięcy. Po 12 i 60 miesiącach oznaczono w nich zawartość polifenoli ogółem i aktywność przeciwutleniającą (tab. 21).

Podczas przechowywania przez 60 miesięcy zawartość polifenoli ogółem oznaczanych metodą Folin-Ciocalteu obniżyła się o 22–32% w porównaniu z nalewkami nieprzechowywanymi. W oznaczeniach aktywności przeciwutleniającej zauważono, że w zależności od rodzaju surowca, z którego wykonano nalewkę oraz zastosowanej metody pomiaru, aktywność przeciwutleniająca podczas przechowywania zmniejszała się, rosła lub pozostawała na podobnym poziomie (tab. 21). Świadczy to o zachodzących w czasie przechowywania reakcjach związków fenolowych. Niektóre z produktów tych przemian prawdopodobnie wykazywały aktywność przeciwutleniającą i odnotowano zwiększenie aktywności w testach ABTS^{•+} i FRAP w nalewkach przechowywanych, jak na przykład w nalewkach z mahonii i berberysu. Inne produkty mogły nie wykazywać takiej aktywności i wówczas w porównaniu z aktywnością oznaczoną w nalewkach nieprzechowywanych nie stwierdzono zmian aktywności lub jej zmniejszanie się, na przykład w odniesieniu do rodników DPPH[•].

W wyniku długotrwałego przechowywania, w produktach zawierających związki azotowe o wolnych grupach aminowych i cukry, tworzą się związki wpływające na barwę i smak produktów (produkty reakcji Maillarda). Najczęściej są one niepożądane w żywności, ponieważ uważa się, że mogą negatywnie wpływać na organizm ludzki. Charakterystycznym związkiem powstającym na skutek rozpadu cukrów jest hydroksymetylofurfural (HMF).

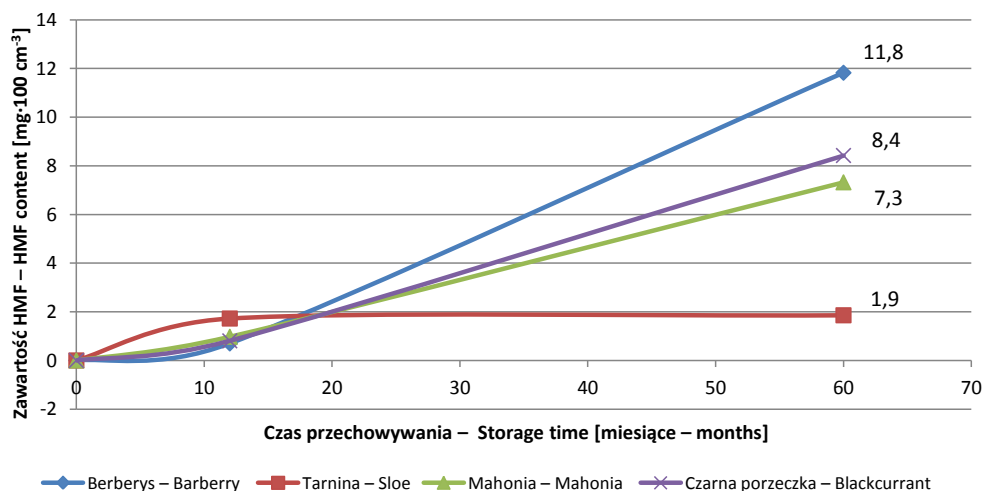
Hydroksymetylofurfural w bardzo niewielkim stopniu ulega jonizacji, dlatego nie był widoczny na chromatogramach mas, natomiast pik pochodzący od tego związku widoczny był na chromatogramach UPLC-DAD zarejestrowanych przy długości fali 280 nm, co przedstawiono na przykładzie nalewki z owoców berberysu na rysunku 20.



Rys. 20. Chromatogramy UPLC (280 nm) nalewek z berberysu przechowywanych 12 i 60 miesięcy
 Fig. 20. UPLC Chromatograms (280 nm) of barberry liqueurs aged 12 and 60 months

Obecność hydroksymetylofurfuralu odnotowano w nalewkach ze wszystkich owoców dopiero po 12 miesiącach przechowywania (rys. 21). W nalewkach z czarnej porzeczki, mahonii, berberysu i tarniny oznaczono po tym czasie odpowiednio 1,07, 1,03, 0,9 oraz 0,45 mg·100 cm⁻³ tego związku.

Po 60 miesiącach przechowywania zaobserwowano zwiększenie się stężenia HMF w nalewkach. Najwięcej, bo 11,8 mg HMF w 100 cm³ zawierała nalewka z berberysu, a najmniej – 1,9 mg HMF w 100 cm³ oznaczono w nalewce z tarniny.



Rys. 21. Zmiany zawartości HMF w nalewkach z czarnej porzeczki, mahonii, berberysu i tarniny podczas 60 miesięcy przechowywania

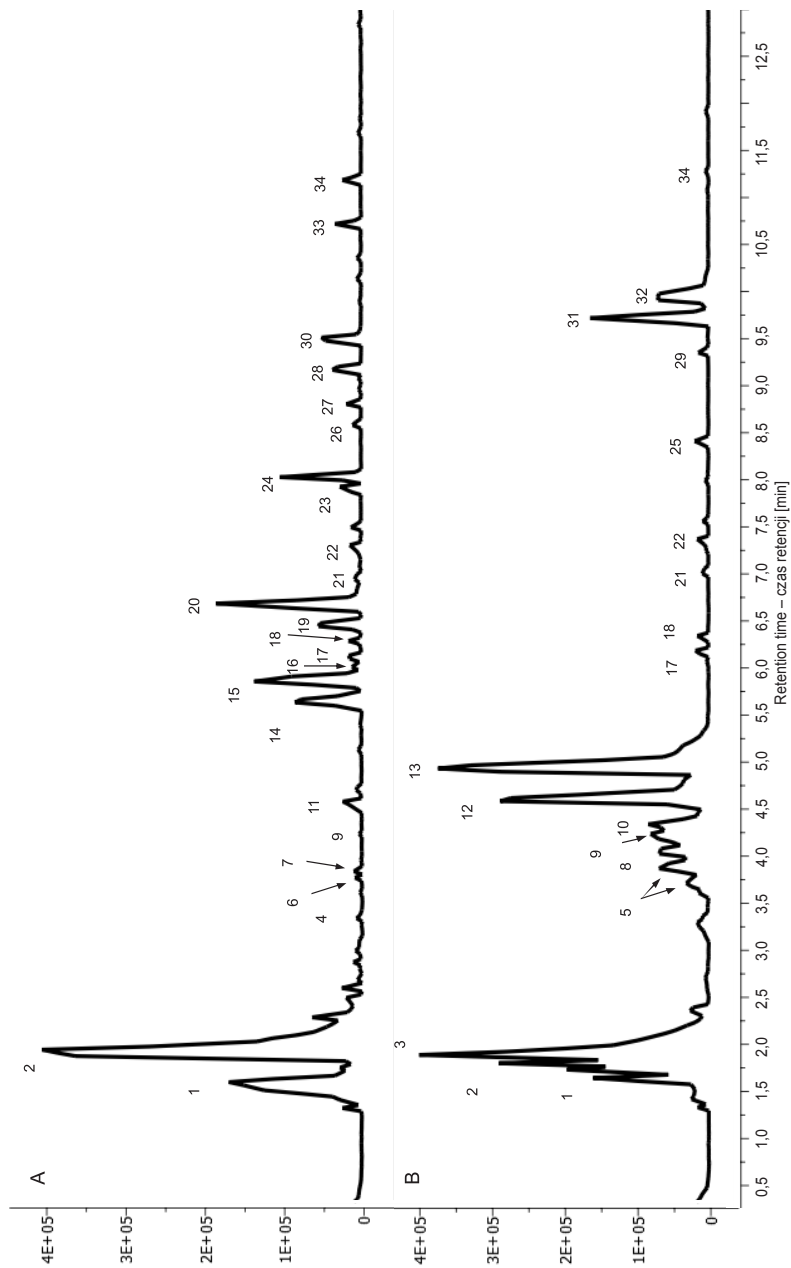
Fig. 21. Changes in HMF content in blackcurrant, mahonia, barberry and sloe liqueurs during 60 months of storage

4.3.1. Związki fenolowe owoców i nalewek z czarnych porzeczek

W owocach i nalewkach z czarnych porzeczek oznaczono skład związków polifenolowych.

Skład owoców czarnych porzeczek jest dobrze poznany. Na podstawie porównania z wzorcami oraz danymi literaturowymi przeprowadzono analizę chromatogramów UPLC oraz widm UV-VIS i MS. Na rysunku 22 i w tabeli 22 przedstawiono związki, które zidentyfikowano w owocach czarnych porzeczek oraz ich jony uzyskane w wyniku odłączenia wodoru i po fragmentacji.

W czarnych porzeczkach i nalewkach porzeczkowych zidentyfikowano związki z grupy antocyjanów – glukozydy i rutynozydy delfinidyny i cyjanidyny (piki 14, 15, 19 i 20), kwasów hydroksycynamonowych – kawoilochinowego (pik 2 i 9), protokatechowego (pik 7) i kawowego (pik 11 i 22), a także pochodne kwasu sinapowego (pik 16) i *p*-kumarowego (pik 17), kwasu hydroksybenzoesowego (pik 6) i oraz kwasy jabłkowy i cytrynowy (piki 1 i 3). Na widmie masowym po fragmentacji zaobserwowano piki o wartościach *m/z* 317, 301 i 285, które odpowiadały fragmentom pochodzącym od pochodnych flawonoli: myricetyny (piki 23, 24 i 26), kwercetyny (piki 28, 29 i 30) i kemferolu (pik 33).



Rys. 22. Porównanie chromatogramów mas ekstraktu owoców (A) i nalewek z czarnej porzeczki przechowywanych w temperaturze pokojowej przez 60 miesięcy (B). Numery pików na chromatogramie odpowiadają związkom wymienionym w tabeli 22

Fig. 22. Comparison of mass chromatograms of blackcurrant fruit extract (A) and blackcurrant liqueurs stored in ambient temperature during 60 months (B). Peak numbers on chromatogram refer to compounds listed in table 2

Tabela 22

Table 22

Wyniki identyfikacji polifenoli ekstraktu owoców (s) i nalewek z czarnej porzeczki metodą HPLC-ESI-MS przed przechowywaniem (0) i po przechowywaniu przez 12 i 60 miesięcy w temperaturze pokojowej

HPLC-ESI-MS analysis of polyphenols in blackcurrant fruit extract (s) and liqueurs before (0) and after 12 and 60 months of storage in ambient temperature

Nr piku Peak No.	Związek Compound	Rt [min]	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	S	Nalewki – Liqueurs		
						Miesiące – Months		
						0	12	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Kwas jabłkowy Malic acid	1,67	133,0140	115,0038	+	+	+	+
2.	Izomer kwasu chlorogenowego Chlorogenic acid isomer	1,73	353,0711	179,0551 111,0088	+	+	+	+
3.	Kwas cytrynowy Citric acid	1,86	191,0192	111,0095 173,0144 383,0460	+	+	+	+
4.	Glukuronid metylepikatechiny Methyl-epicatechin glucuronide	3,16	479,0821	303,0506 175,0032 137,0164	+	-	-	-
5.	Niezidentyfikowany Not identified	3,41	434,0151	381,0360 317,0513 261,0071 183,0296	-	-	-	+
6.	Heksozyd kwasu 4-hydroksybenzoesowego 4-hydroxybenzoic acid hexoside	3,50	299,0767	137,0248	+	-	-	-
7.	Glukozyd kwasu protokatechowego Protocatechuic acid glucoside	3,57	315,0710	153,0176 109,0296	+	-	-	-
8.	Niezidentyfikowany Not identified	3,73	434,0142	381,1032 183,0293	-	-	-	+
9.	Pochodna kwasu chlorogenowego Chlorogenic acid derivative	3,87	353,0380	191,0191	+	+	+	+
10	Niezidentyfikowany Not identified	3,96	434,0149	381,1020 183,0290 116,9283	-	-	+	+
11.	Heksozyd kwasu kawowego Caffeoyl-hexose	4,22	341,0873	179,0321 161,0241 116,9290	+	-	-	-

Tabela 22 cd.
Table 22 cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
12.	Niezidentyfikowany Not identified	4,31	439,1089	219,0505 111,0093	-	+	+	+
13.	Niezidentyfikowany Not identified	4,63	219,0507	439,1087 157,0500	-	+	+	+
14.	3-glukozyd delfinidyny Delphinidin 3-glucoside	5,85	463,0876	301,0337	+	+	-	-
15.	3-rutynozyd delfinidyny Delphinidin 3-rutinoside	6,13	609,1449	301,0338	+	+	-	-
16.	Heksozyd kwasu sinapowego Sinapic acid hexoside	6,18	385,1137 223,0612	208,0375 164,0474	+	-	-	-
17.	Kwas <i>p</i> -kumarowy <i>p</i> -coumaric acid	6,54	163,0391	119,0502	+	+	+	+
18.	Niezidentyfikowany Not identified	6,65	361,0957	281,1393 237,1488 171,1171	+	+	+	+
19.	3-glukozyd cyjanidyny Cyanidin 3-glucoside	6,75	447,0928	285,0391	++	+	-	-
20.	3- rutynozyd cyjanidyny Cyanidin 3-rutinoside	6,96	593,1506	285,0388	++	+	-	-
21.	Heksozyd eriodiktiolu Eriodictyol hexoside	7,00	449,1075	287,0556 269,0451	+	+	+	+
22.	Heksozyd kwasu kawowego Caffeic acid hexoside	7,40	341,1227	179,0709	-	-	+	+
23.	Ramnozylo- -glukozyd myricetyny Myricetin 3-rham- nozyglucoside	7,89	625,1406	116,9324 317,0277	+	+	+	-
24.	3-glukozyd myricetyny Myricetin 3-glucoside	8,10	479,0821	317,0278	++	+	+	-
25.	Pochodna kwasu syringinowego Syringic acid derivative	8,56	197,0449	167,0350 124,0170 122,9786	-	-	-	+
26.	Malonylo-glukozyd myricetyny Myricetin malonylglucoside	8,64	565,0829	521,0928 479,0825 317,0266	++	+	-	-
27.	Glukozyd aureusydyny Aureusidin glucoside	8,76	447,0930	327,0520 285,0402	++	-	+	-
28.	3-rutynozyd kwercetyny Quercetin 3-rutinoside	9,37	609,1451	301,0339	++	+	+	-

Tabela 22 cd.
Table 22 cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
29.	Pochodna kwercetyny Quercetin derivative	9,45	548,0830	301,0332 229,0712 183,0294 157,0502	-	-	-	+
30.	3-heksozyd kwercetyny Quercetin 3-hexoside	9,63	463,0875	301,0334	++	+	+	-
31.	Niezidentyfikowany Not identified	9,78	548,0833	232,0035 183,0294 138,0291 112,9885	-	-	+	+
32.	Niezidentyfikowany Not identified	10,16	548,0834 549,0864	331,0482 261,0428 112,9982	-	-	+	+
33.	3-glikozyd kemferolu Kaempferol 3-glucoside	10,74	447,0940	285,0390	+	+	+	+
34	Pochodna kwasu <i>p</i> -kumarowego i nigruminy Nigrumin 5- <i>p</i> -coumarate	11,25	420,1296	163,0396	+	+	+	+

Na widmie MS obecny był także pik o m/z 479 i 303 (pik 4). Różnica mas pomiędzy masą 479,0821 Da a 303,0506 Da (charakterystyczną dla metyloepikatechiny) wynosiła 175,0315, co wskazuje na obecność kwasu glukuronowego. Na widmie masowym po fragmentacji obecny był również jon o masie 137,0164, który jest typowym fragmentem powstającym podczas rozpadu pierścienia A cząsteczki flawonoidu w reakcji Retro-Diels-Aldera. Dlatego związek ten zidentyfikowano jako glukuronid metyloepikatechiny.

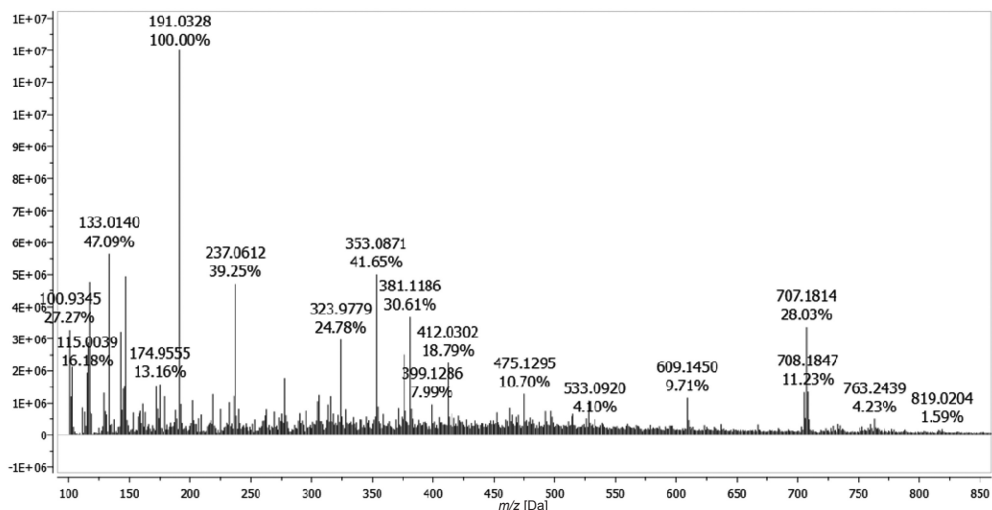
Oznaczono również jeden auron (pik 27), który na podstawie danych literaturowych odpowiadał glikozydowi aureusydyny oraz jeden posiadający grupę nitrylową, który zidentyfikowano jako nigruminę acylowaną kwasem *p*-kumarowym (pik 34).

Podczas przechowywania nalewek nastąpiły znaczące zmiany składu (rys. 22, tab. 22). Całkowitej degradacji uległy antocyjany oraz w dużym stopniu związki z grupy flawonoli, które oznaczono tylko w próbkach nalewek po 12 miesiącach przechowywania (tab. 22). Kwas fenolowe były obecne w próbkach przechowywanych zarówno 12, jak i 60 miesięcy. W nalewkach przechowywanych, pomimo degradacji antocyjanów i innych polifenoli, wytworzyły się nowe związki (piki 5, 8, 10, 12, 13, 22, 25, 29, 31, 32).

4.3.2. Związki fenolowe owoców i nalewek z mahonii

W owocach i nalewkach z mahonii na podstawie czasów retencji pików oraz sygnałów w widmach masowych zidentyfikowano, po porównaniu z wzorcami i danymi literaturowymi, związki polifenolowe z grupy antocyjanów, kwasów fenolowych i flawonoli.

Intensywne sygnały zaobserwowane na widmach ESI-MS (rys. 23) ekstraktów z owoców i nalewek z mahonii o wartościach m/z 191, m/z 353 i m/z 707 pochodziły od kwasu chlorogenowego.



Rys. 23. Przykładowe widmo ESI-MS otrzymane dla nalewki z mahonii

Fig. 23. Exemplary ESI-MS spectrum of mahonia liqueur

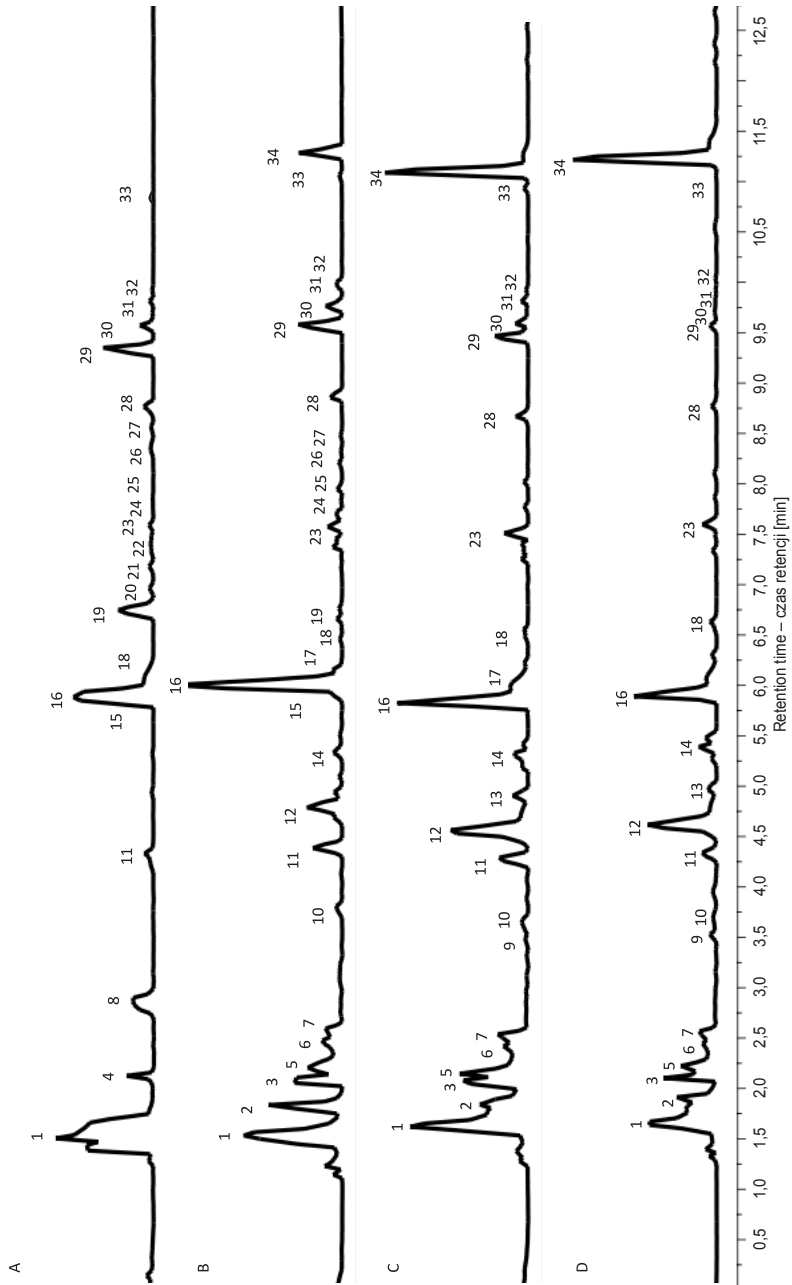
Na chromatogramach mas ekstraktu z owoców i nalewek z mahonii (rys. 24) zaobserwowano sygnały o m/z 133 i m/z 115 (tab. 23), które pochodziły od kwasu jabłkowego (pik 1), i sygnały o m/z 191 i m/z 111 charakterystyczne dla kwasu cytrynowego i jego izomeru (piki 2 i 4).

Dodatkowo w nalewkach zaobserwowano pojawienie się adduktów etanolu z kwasem cytrynowym (piki 3, 5, 6, 7), których nie było w ekstrakcie z owoców. Sygnały jonów $[M-H]^-$ o m/z 353 i m/z 191 pochodziły od kwasu chlorogenowego (5'-kawoilochionowego), który stanowił ponad 85% kwasów fenolowych (pik 16). Jego identyfikację potwierdzono przez porównanie widma i czasu retencji z wzorcem. W owocach, na podstawie widma MS-MS, zaobserwowano jony o masie $[M-H]$ równej 315 i $[M-162-H]$ o masie równej 153, które wskazywały na obecność heksozowej pochodnej kwasu protokatechowego (pik 11), a w nalewkach zaobserwowano jony o masie m/z 381 i charakterystyczny dla kwasu kawowego jon $[M-H]$ o masie m/z 179, na podstawie których zidentyfikowano ten związek jako pochodną kwasu kawowego (pik 34).

W widmach masowych owoców i nalewek występował również pik (nr 18), o charakterystycznych wartościach m/z 163 i 119, pochodzący od kwasu *p*-kumarowego. Pochodne kwasów protokatechowego, kawowego i *p*-kumarowego zidentyfikowano w owocach i nalewkach z mahonii po raz pierwszy.

W owocach mahonii znajdowało się dziesięć antocyjanów o charakterystycznych maksymalnych wartościach absorpcji.

Na chromatogramie zarejestrowanym przy długości fali 520 nm (rys. 25) zaobserwowano parę pików o porównywalnych maksimach absorpcji λ_{\max} : 524/525 nm, 515/516 nm, 525/7 nm, 516/517 nm i jeden pik, który zawierał dwa związki o λ_{\max} 525 i 527 nm, na podstawie których zaliczono je do pochodnych pięciu antocyjanidyn: odpowiednio delfinidyny, cyjanidyny, petunidyny, peonidyny i malwidyny (rys. 25). Wartości te odpowiadają glikozydom wymienionych antocyjanidyn.



Rys. 24. Chromatogram mas ekstraktu (A) i nalewki z owoców mahonii przed (B) i po przechowywaniu przez 12 (C) i 60 (D) miesięcy w temperaturze pokojowej. Numery pików na chromatogramie odpowiadają związkom wymienionym w tabeli 30

Fig. 24. Mass chromatogram of mahonia fruit extract (A) and liqueurs before (B) and after 12 (C) and 60 (D) months storage in ambient temperature. Peak numbers on chromatogram refer to compounds listed in table 30

Tabela 23

Table 23

Wyniki identyfikacji polifenoli ekstraktu owoców (s) i nalewek z mahonii metodą HPLC-ESI-MS przed przechowywaniem (0) i po przechowywaniu przez 12 miesięcy i 60 miesięcy w temperaturze pokojowej

HPLC-ESI-MS analysis of polyphenols in mahonia fruit extract (s) and liqueurs before (0) and after 12 and 60 months of storage in ambient temperature

Nr piku Peak No.	Związek Compound	R _t	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	s	Nalewki – Liqueurs		
						Miesiące – Months		
						0	12	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Kwas jabłkowy Malic acid	1,43	133,0142	115,0040	+	+	+	+
2.	Kwas cytrynowy Citric acid	1,67	191,0196	111,0093	-	-	+	+
3.	Addukt etanolu z kwasem cytrynowym Ethanol adduct with citric acid	2,09	237,0610	191,0192 111,0094	-	+	+	+
4.	Kwas cytrynowy Citric acid	2,13	191,0196	111,0091	+	-	-	-
5.	Addukt etanolu z kwasem cytrynowym Ethanol adduct with citric acid	2,14	237,0612	191,0192 111,0093	-	+	+	+
6.	Addukt etanolu z kwasem cytrynowym Ethanol adduct with citric acid	2,5	237,0611	191,0191 111,0092	-	+	+	+
7.	Addukt etanolu z kwasem cytrynowym Ethanol adduct with citric acid	2,68	237,0619	191,0192 111,0093	-	+	+	+
8.	Niezidentyfikowany Not identified	2,87	347,9782	305,9677 275,9933	+	-	-	-
9.	Pochodna heksozydu dihydroxyflawonu Dihydroxyflavon hexoside derivative	3,53	468,0933 415,1801	253,0922 299,0987	-	-	+	+
10.	Niezidentyfikowany Not identified	3,68	492,0204	251,0765 129,0191 116,9289	-	+	+	+
11.	Heksozyd kwasu protokatechowego Protocatechuic acid hexoside	4,35	315,1081	153,0555	+	+	+	+

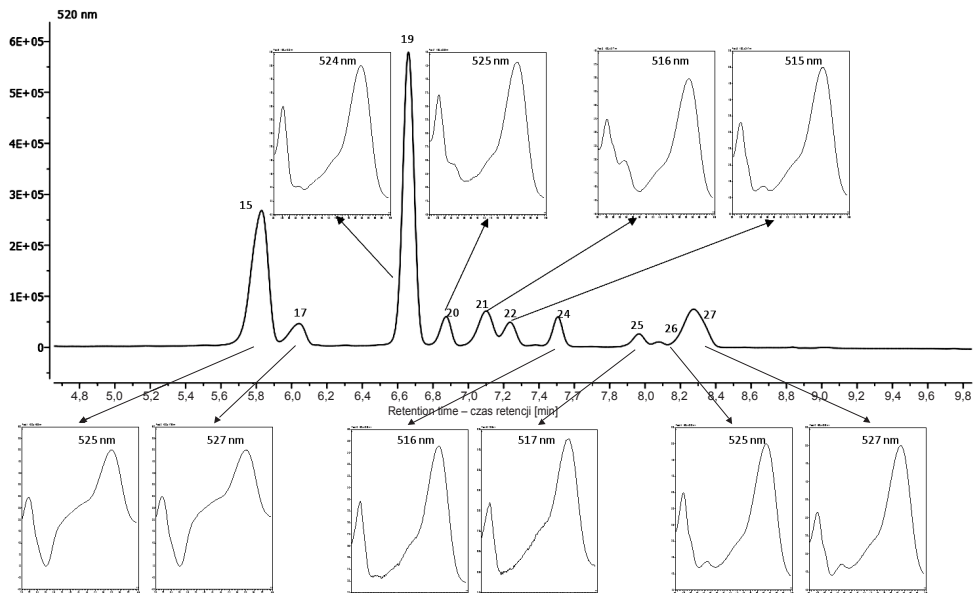
Tabela 23 cd.
Table 23 cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
12.	Niezidentyfikowany Not identified	4,61	376,0085	143,0345	-	+	+	+
13.	Dehydrodimer kwasu chlorogenowego Chlorogenic acid dehydrodimer	4,96	705,1658	492,0193 173,0084 111,0093	-	-	+	+
14.	Dehydrodimer kwasu chlorogenowego Chlorogenic acid dehydrodimer	5,33	705,1654	514,1561 191,0549 111,0091	-	+ -	+	+
15.	3-glukozyd delfinidyny Delphinidin 3-glucoside	5,89	463,0879	301,0323	+	+	-	-
16.	Kwas chlorogenowy Chlorogenic acid	5,90	353,0872	191,0552 135,0448 707,1815	+	+	+	+
17.	3-rutynozyd delfinidyny Delphinidin 3-rutinoside	6,13	609,1445	301,0336	+	+	-	-
18.	Pochodna kwasu <i>p</i> -kumarowego <i>p</i> -coumaric acid derivative	6,56	326,1390	163,0396 119,0504	+	+	+	+
19.	3-glukozyd cyjanidyny Cyanidin 3-glucoside	6,75	447,0934	285,0388	+	+	-	-
20.	3-rutynozyd cyjanidyny Cyanidin 3-rutinoside	6,96	593,1511	285,0389	+	+	-	-
21.	3-glukozyd petunidyny Petunidin 3-glucoside	7,18	477,1031	315,0505	+	+	-	-
22.	3-rutynozyd petunidyny Petunidin 3-rutinoside	7,34	623,1610	315,0498	+	+	-	-
23.	Pochodna kwasu chlorogenowego Chlorogenic acid derivative	7,59	399,1297	353,0879 191,0558 179,0347	-	+	+	+
24.	3-glukozyd peonidyny Peonidin 3-glucoside	8,04	461,1079	299,0545	+	+	-	-
25.	3-rutynozyd peonidyny Peonidin 3-rutinoside	8,19	607,1694	299,0550	+	+	-	-
26.	3-glukozyd malwidyny Malwidyno 3-glucoside	8,34	491,1192	329,0656	+	+	-	-
27.	3-rutynozyd malwidyny Malvidin 3-rutinoside	8,43	637,1765	329,0648	+	+	-	-
28.	Niezidentyfikowany Not identified	8,78	340,1549 341,1587	310,1079 252,0418	+	+	+	+

Tabela 23 cd.
Table 23 cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
29.	3-rutynozyd kwercetyny Quercetin 3-rutinoside	9,57	609,1460	301,0348	+	+	+	+
30.	3-galaktozyd kwercetyny Quercetin 3-galactoside	9,70	463,0887	301,0334	+	+	+	+
31.	3-glukozyd kwercetyny Quercetin 3-glucoside	9,82	463,0887	301,0347	+	+	+	+
32.	Kwercetyna Quercetin	9,94	463,0887 301,0338	151,0041	+	+	+	+
33.	3-rutynozyd izoramnetyny Isorhamnetin rutinoside	11,07	623,1589	315,0514	+	+	+	+
34.	Pochodna kwasu kawowego Caffeic acid derivative	11,22	381,1191	179,0343	-	+	+	+

Rt – czas retencji – retention time



Rys. 25. Chromatogram UPLC (520 nm) i widma UV-VIS antocyjanów ekstraktu z owoców mahonii (numery pików odnoszą się do tabeli 23)

Fig. 25. UPLC Chromatogram (520 nm) and UV-VIS spectra of mahonia fruit extract (peak numbers refer to table 23)

W tabeli 24 przedstawiono miejsca hydroksylacji i metylacji delfinidyny, cyjanidyny, petunidyny, peonidyny i malwidyny.

Kolejność eluowania związków z kolumny podczas analizy HPLC zależy od ich polarności. Najpierw eluują związki bardziej polarne, co związane jest z liczbą grup hydroksylowych w cząsteczce. Wraz ze wzrostem liczby grup hydroksylowych w cząsteczce, rośnie jej polarność; natomiast obecność grup metoksyowych zmniejsza polarność cząsteczek. Wcześniej na chromatogramie pojawiają się dwucukry (ramnozydy) niż jednocukry, najpóźniej eluują antocyjany acylowane.

Tabela 24
Table 24

Miejsca hydroksylacji i metylacji antocyjanidyn owoców mahonii
Hydroxylation and methoxylation pattern of mahonia anthocyanidins

	Delfinidyna	Cyjanidyna	Petunidyna	Peonidyna	Malwidyna
-OH	3',4',5'	3',4'	4',5'	4'	4'
OCH ₃	-	-	3'	3'	3',5'

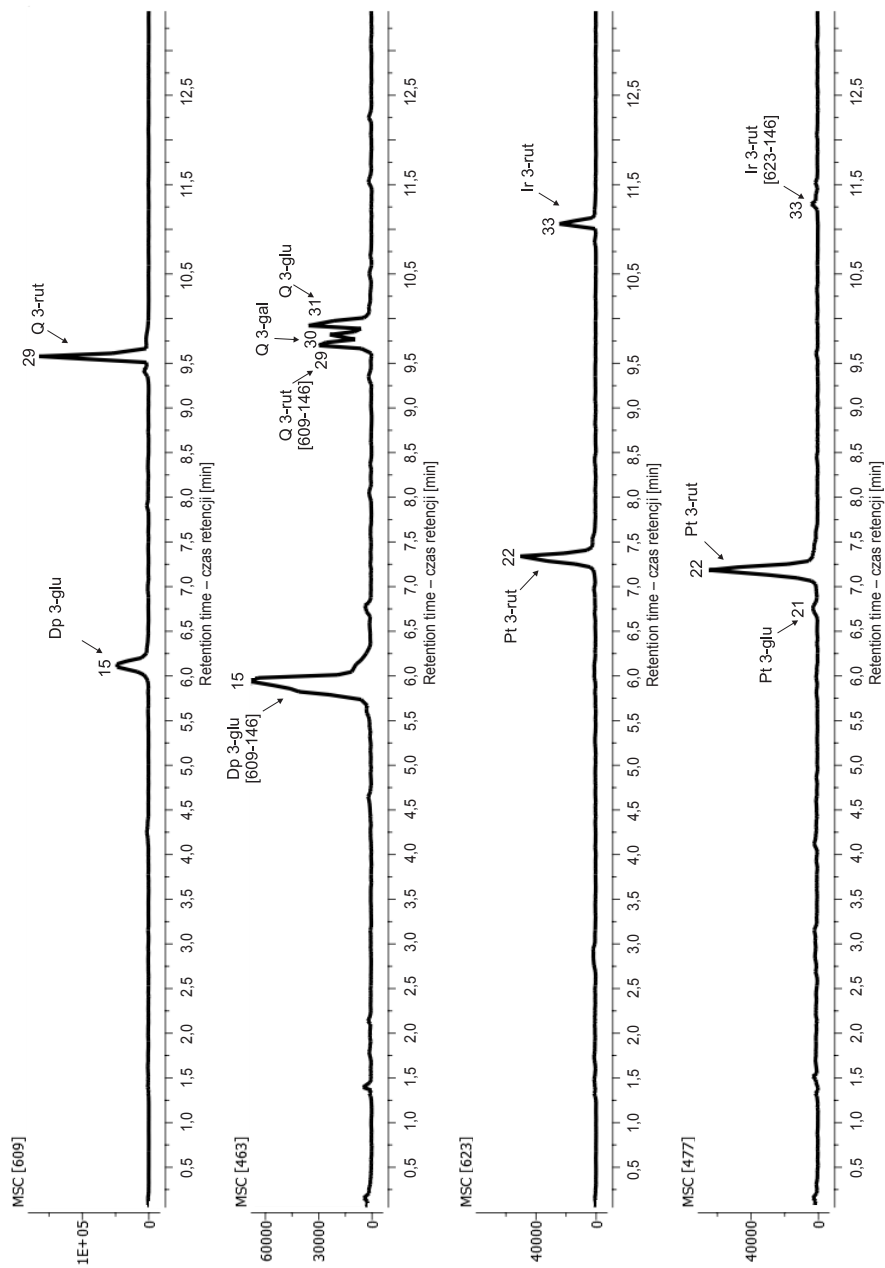
W wyniku analizy chromatogramów UPLC, widm masowych i szlaków fragmentacji antocyjanów zidentyfikowano jony wskazujące na obecność glukozydów i rutynozydów wymienionych antocyjanidyn (piki **15**, **17**, **19–22**, **24–27**).

Dominowały glukozydy, które łącznie stanowiły ponad 70% puli antocyjanów, przy czym najwięcej oznaczono 3-glukozydu delfinidyny (pik nr **15**) i 3-glukozydu cyjanidyny (pik nr **19**).

Owoce i nalewki z mahonii zawierały również związki z grupy flawonoli, które w tych surowcach i produktach zidentyfikowano po raz pierwszy. Na chromatogramie z detektora masowego (rys. 26) znajdowały się piki o wartościach m/z : 609, 463, 463, 301, 623 charakterystyczne dla flawonoli, odpowiednio: 3-rutynozydu kwercetyny (rutyny) (pik **29**), 3-galaktozydu kwercetyny (pik **30**), 3-glukozydu kwercetyny (pik **31**), kwercetyny (pik **32**) i 3-rutynozydu izoramnetyny (pik **33**). Po fragmentacji tych związków otrzymano jony o masie 301 Da, charakterystyczne dla kwercetyny, oraz sygnał o wartości m/z 315 w przypadku 3-rutynozydu izoramnetyny.

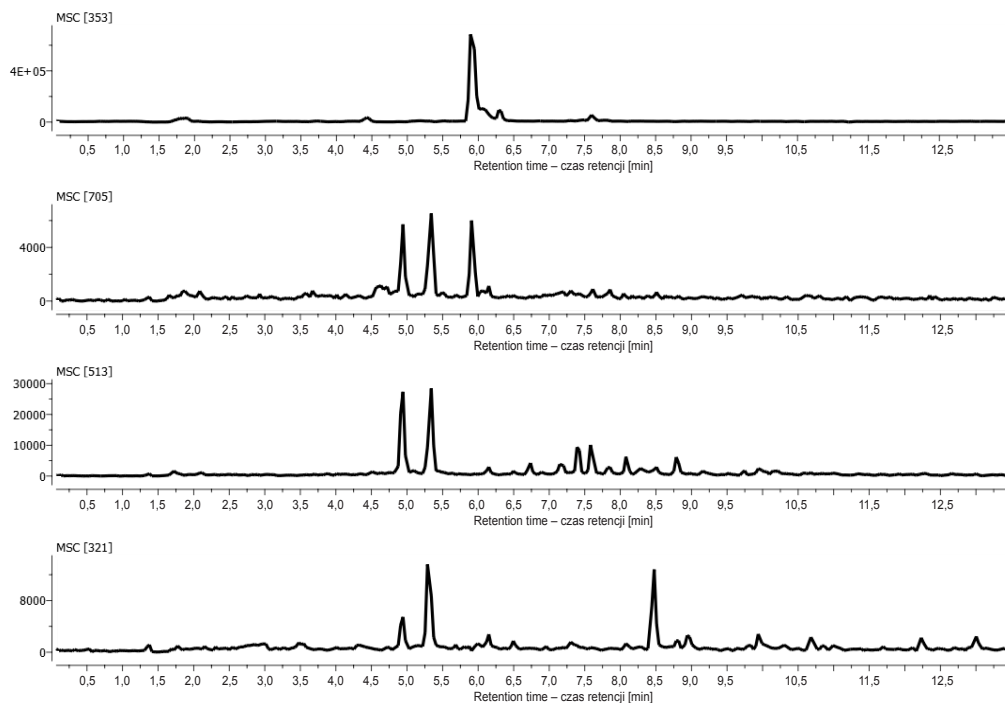
Widoczne na rysunku 26 sygnały o wartościach: m/z 463 (609 Da-146 Da) i m/z 477 (623 Da-146 Da) otrzymane odpowiednio dla rutynozydu kwercetyny (609 Da) i dla 3-rutynozydu izoramnetyny (623 Da) potwierdziły obecność fragmentu ramnozy o masie 146 Da w cząsteczkach tych związków. Po całkowitej fragmentacji cząsteczek na widmie masowym pojawiły się piki o wartościach m/z 301 w miejscach o czasach retencji odpowiadających pochodnym kwercetyny $[M-162-H]^- = 301$ i $[609-162-146-H]^- = 301$, a m/z 315 dla pochodnej izoramnetyny: $[623-162-146-H]^- = 315$. Widoczne na rysunku 26 dodatkowe piki o m/z 477, m/z 463 i m/z 623 pochodziły od trzech antocyjanów o takiej samej masie cząsteczkowej jak zidentyfikowane flawonole, odpowiednio 3-glukozydu petunidyny ($R_t=7,18$ min), 3-glukozydu delfinidyny ($R_t=5,89$ min) i 3-rutynozydu petunidyny ($R_t=7,34$ min).

W nalewkach z mahonii występowały także produkty utleniania kwasu chlorogenowego (rys. 27).



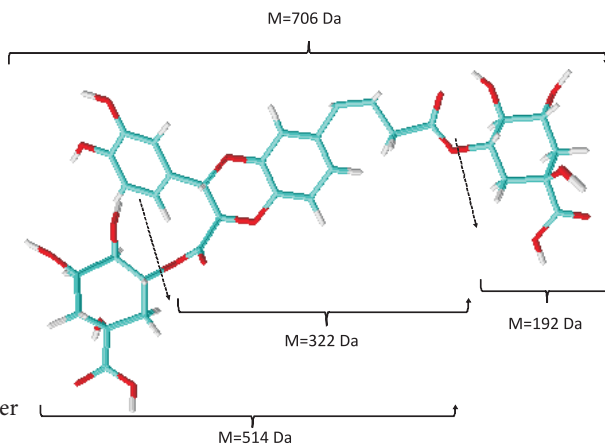
Rys. 26. Chromatogramy mas dla jonów o m/z 609, 463, 623 i 477 (numery pików odnoszą się do tab. 23)

Fig. 26. Mass chromatograms for ions m/z 609, 463, 623 i 477 (peak numbers refer to table 23)

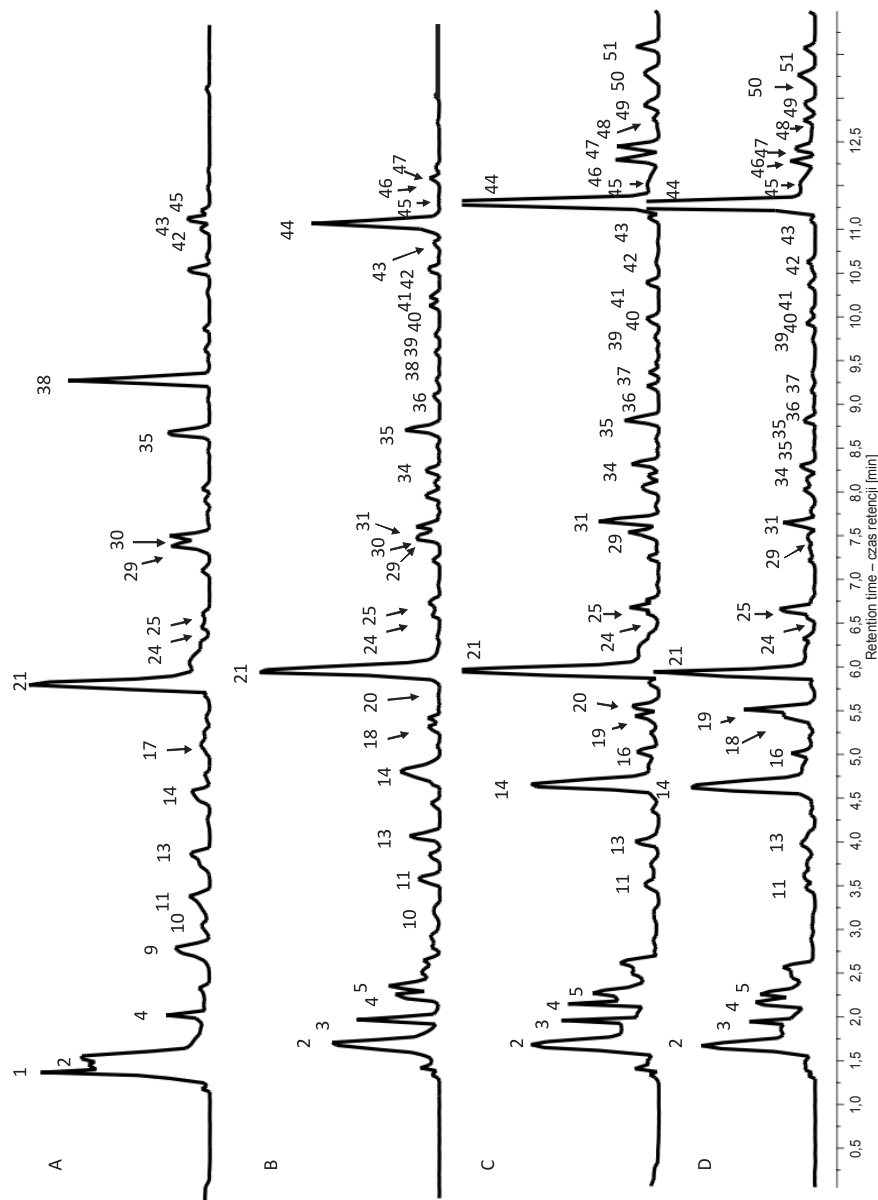


Rys. 27. Widma masowe jonów odpowiadających cząsteczkom kwasu chlorogenowego (m/z 353) i jego dimerom (m/z 705, m/z 513 i m/z 321) w nalewkach z mahonii przechowywanych 60 miesięcy
 Fig. 27. Mass spectrum of ions which refer to chlorogenic acid (m/z 353) and its dimers (m/z 705, m/z 513 and m/z 321) in mahonia liqueurs ageing for 60 months

Na widmie MS otrzymanym dla nalewek znajdowały się jony o m/z odpowiednio 705 i 513, właściwe dla dehydrodimerów kwasu chlorogenowego [707-2H] i cząsteczek, od których odłączył się kwasu chinowy [705-192-H]. W nalewce przechowywanej przez 60 miesięcy oznaczono po fragmentacji również jony o m/z 321, które odpowiadały utracie obu cząsteczek kwasu chinowego przez dehydrodimer kwasu chlorogenowego [705-192-192-H] (rys. 28).



Rys. 28. Dehydrodimer kwasu chlorogenowego
 Fig. 28. Chlorogenic acid dehydrodimer



Rys. 29. Chromatogram mas ekstraktu (A) i nalewki z owoców berberysu przed (B) i po przechowywaniu przez 12 (C) i 60 (D) miesięcy w temperaturze pokojowej. Numery pików na chromatogramie odpowiadają związkom wymienionym w tabeli 25

Fig. 29. Mass chromatogram of barberry fruit extract (A) and liqueurs before (B) and after 12 (C) and 60 (D) months storage in ambient temperature. Peak numbers on chromatogram refer to compounds listed in table 25

4.3.3. Związki fenolowe owoców i nalewek z berberysu

Identyfikacja związków fenolowych owoców i nalewek z berberysu metodą UPLC-ESI-MS polegała na porównaniu czasów retencji i widm w zakresie UV-VIS ze standardami oraz ocenie widma masowego.

Na rysunku 29 przedstawiono porównanie chromatogramów mas owoców i nalewek z berberysu. W owocach berberysu stwierdzono obecność kwasu chinowego o czasie retencji 1,51 min (pik 1) i o masie jonowej m/z równej 191,0555 (tab. 25), natomiast nie odnotowano tego związku w nalewkach. Zarówno w owocach, jak i w nalewkach obecny był kwas jabłkowy (pik 2), który na widmie mas zidentyfikowano na podstawie charakterystycznych jonów masowych: m/z 115 i m/z 133, oraz kwas cytrynowy i jego izomery (piki 3, 4, 5, 6) o masie jonowej m/z 191,0190 Da, przy czym w nalewkach znajdowało się więcej pochodnych (w formie dimerów) tego kwasu.

Wśród kwasów fenolowych dominował kwas chlorogenowy (pik 21) o charakterystycznych jonach masowych: m/z 707, m/z 353 i m/z 191.

Po raz pierwszy zidentyfikowano w nalewkach z berberysu związki należące do grupy hydroksylowych pochodnych kwasu cynamonowego. W analizie HPLC-ESI-MS, w negatywnej jonizacji, znaleziono jony $[M-H]^-$ o m/z 371, a po fragmentacji, także jony o m/z 209, które odpowiadały jonom kwasu 5'-hydroksyferulowego. Niektóre piki na chromatogramie TIC zawierały jony o m/z 743 odpowiadające dimerom $[2M-H]^-$ tego związku. W tej grupie kwasów i ich pochodnych było sześć związków o takiej charakterystyce (piki 7, 8, 10, 11, 13, 14), które określono jako estry heksozowe kwasu 5'-hydroksyferulowego.

Na chromatogramie masowym ekstraktu z owoców oznaczono jony o m/z 385 (piki 15, 17, 23 i 28), odpowiadające heksozowym pochodnym kwasu sinapowego. Potwierdzeniem identyfikacji były otrzymane po fragmentacji jony $[M-H]^-$ o masie 223 Da, charakterystyczne dla kwasu sinapowego. Piki 27 i 30 na podstawie analizy widm UV-VIS i widm mas przed i po fragmentacji zidentyfikowano jako 3-glukozydy cyjanidyny i pelargonidyny.

Tabela 25

Table 25

Wyniki identyfikacji polifenoli ekstraktu owoców (s) i nalewek z berberysu metodą HPLC-ESI-MS przed przechowywaniem i po przechowywaniu przez 12 miesięcy i 60 miesięcy w temperaturze pokojowej

HPLC-ESI-MS analysis of polyphenols in barberry fruit extract (s) and liqueurs before and after 12 and 60 months storage in ambient temperature

Nr piku Peak No.	Związek Compound	Rt [min]	$[M-H]^-$ (m/z)	MS/MS (m/z)	s	Nalewki Liqueurs		
						Miesiące – Months		
						0	12	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Kwas chinowy Quinic acid	1,51	191,0555	383,1041 173,0206 127,0402 111,0263	+	-	-	-
2.	Kwas jabłkowy Malic acid	1,67	133,0138	115,0039	+	+	+	+

Tabela 25 cd.
Table 25 cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3.	Kwas izocytrynowy Isocitric acid	1,95	191,0189	383,0455 173,0091 111,0090	-	+	+	+
4.	Dimer kwasu cytrynowego Citric acid dimer	2,17	383,0854	191,0190	+	+	+	+
5.	Addukt kwasu cytryno- wego z etanolem – dimer Ethanol adduct with Citric acid – dimer	2,26	475,1296	237,0607 191,0188	-	+	+	+
6.	Addukt kwasu cytryno- wego z etanolem – dimer Ethanol adduct with citric acid – dimer	2,48	475,1297	237,0614 191,0185	-	+	+	+
7.	5-hydroksyferulo- heksozyd 5-hydroxyferulic acid hexoside	2,78	371,0613	209,0295 743,1314	-	+	+	+
8.	Pochodna 5-hydrok- syferuloheksozydu 5-hydroxyferulic acid hexoside derivative	2,88	415,1232	371,0605 306,0024 209,0296	-	-	+	+
9.	Niezidentyfikowany Not identified	2,95	347,9761	305,9670 191,0129 202,9644 131,9513	+	-	-	-
10.	5-hydroksyferulo- heksozyd 5-hydroxyferulic acid hexoside	3,19	371,0617	291,9517 209,0295	+	+	+	-
11.	5-hydroksyferulo- heksozyd 5-hydroxyferulic acid hexoside	3,45	371, 0617	209,0300 743,1318	+	+	+	+
12.	Niezidentyfikowany Not identified	3,74	492,0205	596,0672 363,9729 285,9413 251,0763	-	+	+	+
13.	5-hydroksyferulo- heksozyd 5-hydroxyferulic acid hexoside	3,93	371, 0613	209,0299	+	+	+	+

Tabela 25 cd.
Table 25 cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
14.	5-hydroksyferulo- heksozyd 5-hydroxyferulic acid hexoside	4,65	371,0608	209,0295	+	+	+	+
15.	Heksoza kwasu sinapowego Sinapic acid hexoside	4,70	385,0771	223,0456	+	-	-	-
16.	Dehydrodimer kwasu chlorogenowego Chlorogenic acid dehydrodimer	5,01	705,1628	513,1025	-	-	+	+
17.	Heksozyd kwasu sinapowego Sinapic acid hexoside	5,26	385,0771	223,0453	+	-	-	-
18.	Dehydrodimer kwasu chlorogenowego Chlorogenic acid dehydrodimer	5,43	705,1652	513,1027 321,0394 191,0554	-	-	+	+
19.	Kwas 4-hydroksy benzoesowy 4-hydroxybenzoic acid	5,51	137,0240	-	-	-	+	+
20.	Heksozyd kwasu kawowego Caffeic acid hexoside	5,82	341, 0871	179,0344 135,0453	+	+	+	+
21.	Kwas chlorogenowy Chlorogenic acid	5,96	353,0505	191,0555 111,0092 707,1017	+	+	+	+
22.	Kwas chlorogenowy Chlorogenic acid	6,28	353,0869	707,1809 191,0553	+	+	+	+
23.	Heksozyd kwasu sinapowego Sinapic acid hexoside	6,44	385,0771	223,0452	+	+	-	-
24.	Glukozyd kwasu <i>p</i> -kumarowego <i>p</i> -coumaric acid glucoside	6,60	325,0920	163,0396 119,0396	+	+	+	+
25.	Addukt etanolu z kwasem kawoilochinowym Ethanol adduct with caffeoylquinic acid	6.66	399,0187	237,0607 179,0341	-	+	+	+
26.	Glukozyd eriodiktiolu Eriodictyol-glucoside	6,75	449,1090	287,0557 151,0030	+	+	+	+

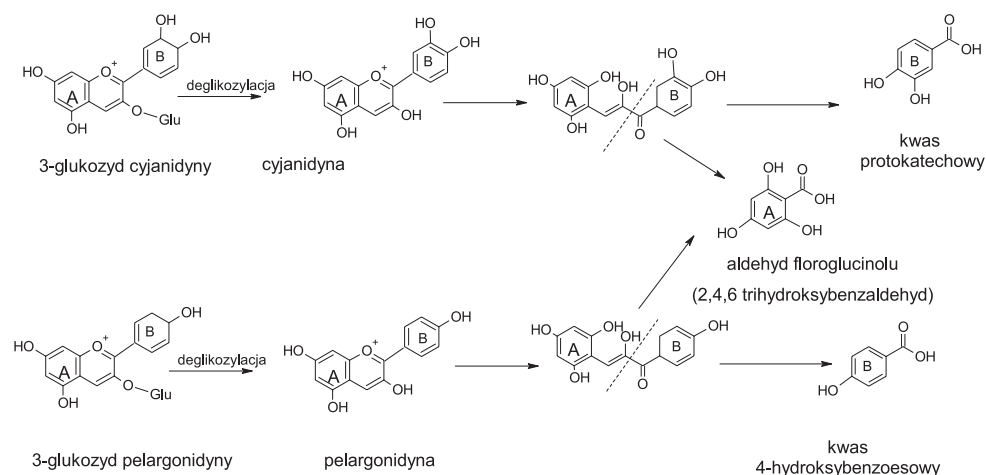
Tabela 25 cd.
Table 25 cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
27.	3-glukozyd cyjanidyny Cyanidin 3-glucoside	6,82	447,0922	285,0398	+	+	-	-
28.	Heksozyd kwasu sinapowego Sinapic acid hexoside	7,25	385,0077	223,0451 205,9646	+	+	-	-
29.	Pochodna kwasu kawoilochinowego Caffeoylquinic acid derivative	7,53	353,0873	191,0555 707,1817	+	+	+	+
30.	3-glukozyd pelargonidyny Pelargonidin-3-glucoside	7,65	431,0976	269,0452	+	+	-	-
31.	Addukt etanolu z kwasem kawoilochinowym Ethanol adduct with caffeoylquinic acid	7,67	399,1291	353,0872 191,0554	-	+	+	+
32.	Addukt etanolu z kwasem kawoilochinowym Ethanol adduct with caffeoylquinic acid	8,06	399,0926	353,0495 237,0609 191,0379 179,0341	+	+	+	+
33.	Addukt etanolu z kwasem kawoilochinowym Ethanol adduct with caffeoylquinic acid	8,18	399,0927	385,1863 353,0495 237,0609 191,0379 179,0341	-	+	+	+
34.	Addukt etanolu z kwasem kawoilochinowym Ethanol adduct with caffeoylquinic acid	8,30	399,0927	237,0611 191,0190 179,0341	-	+	+	+
35.	Niezidentyfikowany Not identified	8,82	340,1548	310,1086 267,0605 252,0419 191,0553 144,9224	+	+	+	+
36.	Addukt etanolu z kwasem kawoilochinowym Ethanol adduct with caffeoylquinic acid	9,20	399,0926	353,0506 237,0608 191,0189	-	+	+	+
37.	Dimer kwasu chinowego Quinic acid dimer	9,35	381,0821	191,0560 179,0243 161,0239	-	-	+	+

Tabela 25 cd.
Table 25 cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
38.	Ester metylo-chinowy kwasu kawowego Caffeoyl methyl quinate	9,42	367,1031	735,2132 191,0554 179,0343 161,0235 135,0449	+	-	-	-
39.	3-rutynozyd kwercetyny Quercetin 3-rutinoside	9,65	609,1457	301,0336 300,0273	+	+	+	+
40.	3-galaktozyd kwercetyny Quercetin 3-galactoside	10,02	463,0877	301,0347 300,0270	+	+	+	+
41.	3-rutynozyd-kemferolu Kaempferol-3rutinoside	10,85	593,1504	447,0927 285,0401 151,0035	+	+	+	+
42.	Ramnozo-glukozyd izoramnetyny Isorhamnetin rhamnoside-glucoside	11,13	623,1614	315,0565 477,0461	+	+	+	+
43.	Ramnozyd kwercetyny Quercetin-3-rhamnoside	11,27	447,0926	301,0347 300,0274	+	+	+	+
44.	Dimer kwasu chlorogenowego Chlorogenic acid dimer	11,28	381,1173	191,0556 179,0347 161,0241	-	-	-	+
45.	Heksozyd kemferolu Kaempferol hexoside	11,38	477,0928	285,0395 381,1186	+	+	+	+
46.	Niezidentyfikowany Not identified	11,78	427,1240	381,1179 287,0555 161,0239	-	+	+	+
47.	Niezidentyfikowany Not identified	11,95	427,1268	287,0540 395,1936	-	+	+	+
48.	Niezidentyfikowany Not identified	12,20	427,1606	381,1173	-	-	-	+
49.	Niezidentyfikowany Not identified	12,46	427,1238	381,1038 179,0343 161,0239	-	-	+	+
50.	3-ramnozyd kemferolu Kaempferol-rhamnoside	12,77	431,0974	285,0395	+	+	+	+
51.	Niezidentyfikowany Not identified	13,07	427,1245	161,0237	-	-	+	+

Związek **19** o czasie retencji 5,51 min i masie jonowej 137,0240 Da zidentyfikowano jako kwas *p*-hydroksybenzoesowy. Pojawił się on w nalewkach po co najmniej 12-miesięcznym przechowywaniu i prawdopodobnie był produktem degradacji 3-glukozydu pelargonidyny – głównego antocyjanu berberysu, która może przebiegać według schematu przedstawionego na rysunku 30.



Rys. 30. Schemat degradacji antocyjanów
Fig. 30. Anthocyanin degradation scheme

Podobnie jak w nalewkach z mahonii – w nalewkach berberysu po przechowywaniu przez 12 i 60 miesięcy – stwierdzono obecność dehydrodimerów kwasu chlorogenowego (piki **16** i **18**) o masach jonowych m/z 705, m/z 513 i m/z 321.

Zarówno w owocach, jak i nalewkach oznaczono związek o masie jonowej m/z 341 (pik **20**), a po fragmentacji i utracie cząsteczki cukru, w widmie dodatkowo zaobserwowano jony $[M-162-H]$ o m/z 179 oraz m/z 135, typowe dla rozpadu kwasu kawowego. Dlatego związek ten zidentyfikowano jako heksozyd kwasu kawowego.

Piki związków oznaczonych w tabeli 25 numerami **22** i **29**, na podstawie maksimum absorbancji ($\lambda_{\max}=327$ nm) oraz widm ESI-MS, w których dominowały jony o m/z 707, m/z 353 i m/z 191, charakterystyczne dla kwasu kawoilochinowego (chlorogenowego), zidentyfikowano jako izomery tego związku. Oznaczono również dimery kwasu chinowego (piki **37** i **44**) o masie m/z 381 Da, które występowały w nalewkach po 12 i 60 miesiącach przechowywania.

Na widmie mas związku oznaczonego w tabeli 25 numerem **24** zaobserwowano jony $[M-H]^-$ o m/z 325 i $[M-162-H]^-$ o m/z 163, a po fragmentacji jony o m/z 163, 145 i 119, charakterystyczne dla kwasu *p*-kumarowego. Utrata neutralnego fragmentu o masie 162 Da wskazuje na obecność fragmentu pochodzącego od heksozy lub kwasu kawowego. Kwas *p*-kumarowy wykazuje maksimum absorbancji przy długości fali 310 nm. Widmo UV-VIS omawianego związku wykazywało maksimum przy długości fali 295, co może świadczyć o przesunięciu hipsokromowym na skutek przyłączenia cząsteczki cukru, w formie glikozydu, do kwasu *p*-kumarowego. Przyjęto więc, że związek ten jest heksozową pochodną kwasu *p*-kumarowego.

Dla pików **25**, **31**, **32**, **33**, **34** i **36** zaobserwowano jony o m/z 399, 353, 341, 237, 191 i 179, a po fragmentacji także o m/z 191, 135 i 237. Jony o m/z 353, 191, 179 i 135 są charakterystyczne dla rozpadu izomerów kwasu kawoilochinowego. Wydaje się, że jon o m/z 237 nie mógł pochodzić od cząsteczki kumaroilo-kawoiloglicerolu o podobnej masie, ponieważ ani w widmie MS, ani MS/MS nie stwierdzono obecności jonu o m/z 163, który powstaje po odłączeniu protonu od kwasu *p*-kumarowego. Jony o m/z 399 i 237 mogły odpowiadać adduktom etanolu lub kwasu mrówkowego z jonami o m/z 353 i 191. Dodatkowo, obliczona różnica dokładnych mas jonów 399,092 i 353,050 wynosiła 46,042 Da, co odpowiada dokładnie masie etanolu. Na tej podstawie przyjęto, że jon o masie 399,092 Da jest adduktem etanolu i kwasu kawoilochinowego. Związki te występowały wyłącznie w nalewkach.

Związek **26** o czasie retencji 6,75 min i masie $[M-H]^-$ równej 449 Da, po fragmentacji w jonizacji ujemnej, dał jony o m/z 237, m/z 151 i m/z 125, a na widmie UV-VIS zaobserwowano charakterystyczne dla glukozydu eriodiktiolu maksimum absorpcji długości fali λ 285 i 334 nm. Glukozyd eriodiktiolu zidentyfikowano w owocach i przetworach z berberysu po raz pierwszy.

Związek o jonie masowym $[M-H]^-$ o m/z 367 Da (pik **38**) i czasie retencji R_t 9,44 min zidentyfikowano na podstawie mas jonów widocznych po fragmentacji, odpowiadających fragmentom kwasu kawowego (179 Da) i chinowego (191 Da) jako ester metylo-chinowy kwasu kawowego. W ujemnej jonizacji masa 367 Da może również odpowiadać deprotonowanej cząsteczce kwasu ferulochinowego, jednakże na widmie ESI-MS-MS nie znaleziono jonów o wartościach 193 i 134, charakterystycznych dla tego związku. Ester metylo-chinowy kwasu kawowego zidentyfikowano tylko w ekstrakcie z owoców berberysu.

Na podstawie charakterystycznych widm masowych i UV-VIS zidentyfikowano związki z grupy flawonoidów (piki **39–43** i **45**), które występowały w owocach i nalewkach: ramnozo-glukozyd (rutynozyd) kwercetyny (m/z 609, 463 i 301), glukozyd lub galaktozyd kwercetyny (m/z 463 i 301), ramnozyd kwercetyny (m/z 447 i 301), ramnozo-glukozyd (rutynozyd) kemferolu (m/z 593, 447 i 285), glukozyd lub galaktozyd kemferolu (m/z 477 i 285) i ramnozyd kemferolu (m/z 431 i 285) oraz ramnozo-glukozyd (rutynozyd) izoramnetyny (m/z 623, 477 i 315). Rutynozydy, heksozydy i ramnozydy kwercetyny i kemferolu oraz rutynozyd izoramnetyny zidentyfikowano w owocach berberysu i nalewkach z nich wykonanych po raz pierwszy.

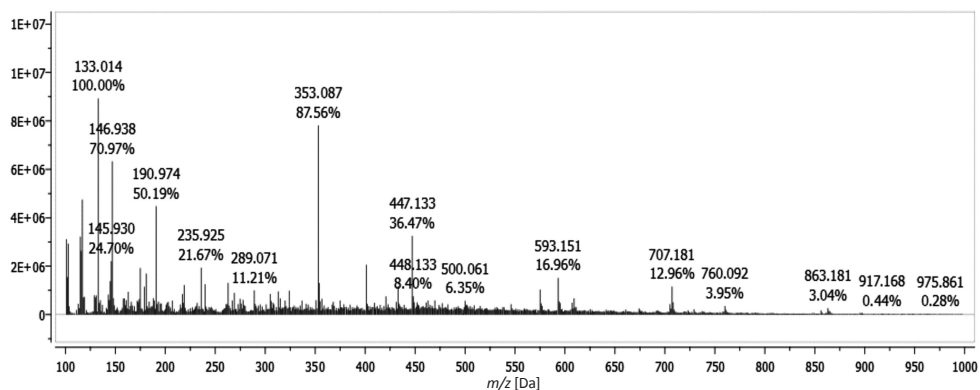
Na widmach masowych nalewek z berberysu zaobserwowano pojawienie się pięciu nowych pików o m/z 427 i 381 (piki **46–49** i **51**), które prawdopodobnie były adduktami etanolu ze związkiem będącym pochodną kwasu chinowego (m/z 191) i kawowego (m/z 179, 161, 135).

4.3.4. Związki fenolowe owoców i nalewek z tarniny

Na podstawie czasów retencji pików oraz sygnałów w widmach masowych zidentyfikowano, po porównaniu z wzorcami i danymi literaturowymi, związki polifenolowe z grupy antocyjanów, kwasów fenolowych, flawanoli i flawonoli.

Na widmach ESI-MS wykonanych dla całego zakresu chromatogramu nalewek z tarniny (czas retencji 0–13 min, rys. 31) dominowały sygnały pochodzące od kwasu jabłkowego (m/z 133, 115) oraz od kwasu kawoilochinowego (neochlorogenowego) o m/z 707 i 353. Na chromatogramach TIC (rys. 32) najwyższe piki (piki **1** i **6**) pochodziły od związków o czasach retencji 1,6 i 4,4 min, które odpowiadały wymienionym kwasom (tab. 26). Ponadto na

podstawie widm UV-VIS i danych dostępnych w literaturze zidentyfikowano kwas cytrynowy (m/z 191 i 111) i wanilinowy o m/z 167 i 123 (piki 2 i 4) oraz pochodne kwasu chinowego z kwasami: *p*-kumarowym o charakterystycznych jonach molekularnych: 337, 163 i 119 Da i ferulowym o m/z 367, 193 i 134 (piki 9 i 12). Na widmie mas ekstraktu z owoców tarniny zaobserwowano również niewielki pik (11) pochodzący od kwasu chlorogenowego (m/z 353, m/z 191 i m/z 179), którego intensywność była większa w nalewkach, co może świadczyć o powstawaniu tego izomeru z kwasu neochlorogenowego.



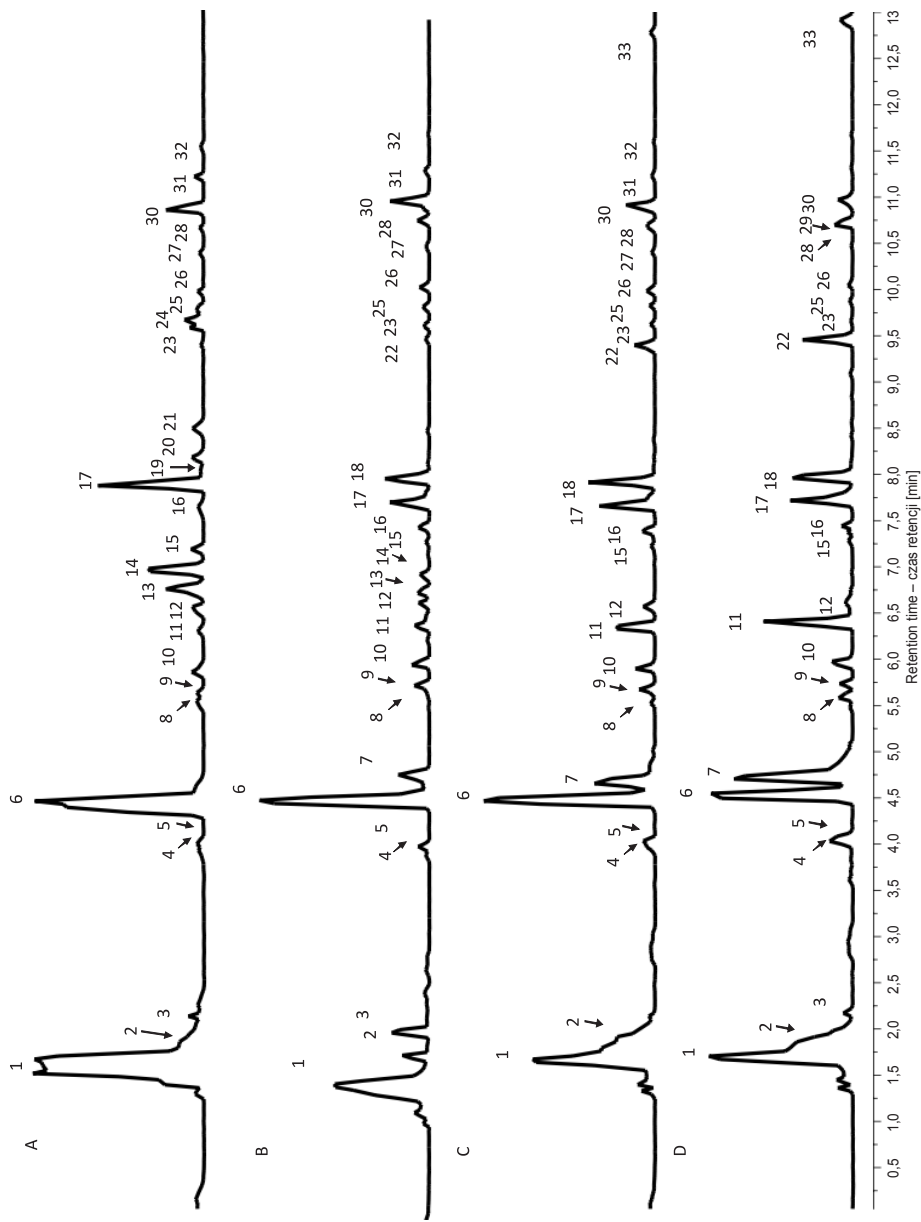
Rys. 31. Przykładowe widmo ESI-MS nalewki z tarniny

Fig. 31. Exemplary ESI-MS spectrum of sloe liqueur

W ekstrakcie z owoców po analizie widm UV-VIS oraz widm ESI-MS-MS zidentyfikowano cztery antocyjany (rys. 33). Na widmie mas występowały jony o wartościach: m/z 447, 593, które po fragmentacji dały jony $[M-H-162]^-$ i $[M-H-308]^-$ o wartości m/z 285 charakterystyczny dla aglikonu cyjanidyny. Różnice mas 162 i 308 Da świadczą o obecności heksozy (glukozy) i rutynozy, dlatego piki 13, 14 zidentyfikowano jako 3-glukozyd i 3-rutynozyd cyjanidyny. Fragmentacja jonów o m/z 461 i 607 spowodowała powstanie jonów $[M-H-162]^-$ i $[M-H-308]^-$ o wartości m/z 299, typowej dla peonidyny w jonizacji ujemnej.

Na podstawie różnic mas jonów molekularnych przed i po fragmentacji zidentyfikowano piki 19, 20 jako 3-glukozyd i 3-rutynozyd peonidyny. W nalewkach nieprzechowywanych zidentyfikowano 3-glukozyd i 3-rutynozyd cyjanidyny oraz 3-rutynozyd peonidyny (tab. 26).

Spośród flawonoli zidentyfikowano siedem pochodnych kwercetyny (piki 23, 25-28, 30, 31). W analizie UPLC-ESI-MS o negatywnej jonizacji znaleziono jony o wartościach m/z 609 (pik 23), i m/z 463 (pik 26), które po fragmentacji dały piki o wartościach m/z 463 i m/z 301, co świadczy o przyłączeniu do kwercetyny dwóch cukrów: glukozy (162 Da) i rannozy (146 Da) w przypadku związku 23 oraz heksozy (glukozy lub galaktozy) o masie 162 Da w przypadku związku 26 do cząsteczki kwercetyny. Związki te zidentyfikowano więc odpowiednio jako kwercetyno 3-rutynozyd i kwercetyno 3-heksozyd. Piki 27, 28, 29 o masach jonów m/z 433 przed fragmentacją i m/z 301 po fragmentacji, na podstawie czasów retencji i widm masowych oraz danych literaturowych, zidentyfikowano jako trzy pentozydy kwercetyny (prawdopodobnie 3-ksylozyd, 3-arbinopyranozyd i 3-arabinofuranozyd).



Rys. 32. Chromatogramy mas ekstraktu (A) i nalewki z owoców tarniny przed (B) i po przechowywaniu przez 12 (C) i 60 (D) miesięcy w temperaturze pokojowej. Numery pików na chromatogramie odpowiadają związkom wymienionym w tabeli 26

Fig. 32. Mass chromatogram of sloe fruit extract (A) and liqueurs before (B) and after 12 (C) and 60 (D) months of storage in ambient temperature. Peak numbers on chromatogram refer to compounds listed in table 26

Wyniki identyfikacji polifenoli ekstraktu owoców (s) i nalewek z tarniny metodą HPLC-ESI-MS przed przechowywaniem (0) i po przechowywaniu przez 12 miesięcy i 60 miesięcy w temperaturze pokojowej

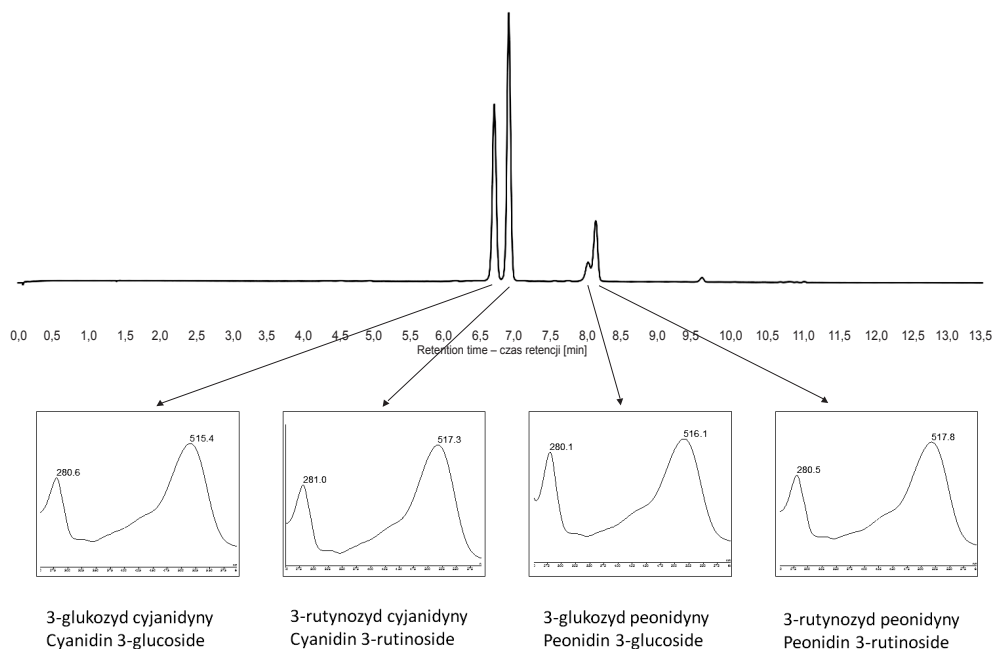
HPLC-ESI-MS analysis of polyphenols in sloe fruit extract (s) and liqueurs before (0) and after 12 and 60 months storage in ambient temperature

Nr piku Peak No.	Związek Compound	Rt	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Nalewki – Liqueurs			
					Miesiące – Months			
					s	0	12	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Kwas jabłkowy Malic acid	1,63	133,0146	115,0044	+	+	+	+
2.	Kwas cytrynowy Citric acid	2,00	191,0190	111,00094	+	+	+	+
3.	Niezidentyfikowany Not identified	2,20	253,0923	308,0976 128,0355	+	+	+	+
4.	Kwas wanilinowy Vanillic acid	3,93	167,0348	152,0114 144,0454 123,0450	+	+	+	+
5.	Niezidentyfikowany Not identified	4,00	467,0158	368,0982 421,0107 137,0110 153,0190	+	+	+	+
6.	Kwas neochlorogenowy Neochlorogenic acid	4,43	707,1808 353,0869	179,0344 191,0553	+	+	+	+
7.	Niezidentyfikowany Not identified	4,72	376,0092	143,0349	-	+	+	+
8.	(+) Katechina (+) Catechin	5,55	289,0713	137,0240	+	+	+	+
9.	Kwas kumaroilochinowy Coumaroylquinic acid	5,60	337,0920 163,0396	119,0503	+	+	+	+
10.	Niezidentyfikowany Not identified	5,85	313,0924	269,1029 191,0560	+	+	+	+
11.	Kwas chlorogenowy Chlorogenic acid	6,22	353,0871	179,0341 135,0445 191,0556	+	+	+	+
12.	Kwas ferulochinowy izomer Feruloylquinic acid isomer	6,51	431,1554 367,1030	339,0510 193,0498 134,0374	+	+	+	+
13.	3-glukozyd cyjanidyny Cyanidin 3-glucoside	6,75	447,0924	284,0323 285,0386	+	+	-	-
14.	3- rutynozyd cyjanidyny Cyanidin 3-rutinoside	6,98	593,1509	447,0934 285,0393	+	+	-	-
15.	(-) Epikatechina (-) Epicatechin	7,22	289,0713	137,0236	+	+	+-	-

Tabela 26 cd.
Table 26 cont.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
16.	Niezidentyfikowany Not identified	7,65	415,1241	121,0298 348,0128	+	+	+	+
17.	Addukt etanolu z pentozo- -heksozową pochodną alkoholu benzylowego Ethanol adduct with benzyl alcohol-pentose-hexose derivative	7,87	477,1503	401,1449 269,1024 107,0522	+	+	+	+
18.	Addukt etanolu z pentozo- -heksozową pochodną alkoholu benzylowego Ethanol adduct with benzyl alcohol-pentose-hexose derivative	7,96	477,1501	401,1449 269,1023 107,0521	+	+	+	+
19.	3-glukozyd peonidyny Peonidin 3-glucoside	8,06	461,1075	299,0554	+	-	-	-
20.	3-rutynozyd peonidyny Peonidin 3-rutinoside	8,18	607,1655	299,0555	+	+	-	-
21.	Dimer procyjanidyny Procyanidin dimer	8,49	577,1257 575,1185	289,0714 245,0688 125,0246	+	-	-	-
22.	Niezidentyfikowany Not identified	9,45	381,1193	332,0199 275,0208 161,0240	-	+	+	+
23.	Kwercetyno 3-rutynozyd Quercetin 3-rutinoside	9,58	609,1460	301,0343	+	+	+	-
24.	Dimer procyjanidyny Procyanidin dimer	9,66	577,1257 575,1185	289,0714 245,0688 125,0246	+	-	-	-
25.	Kwercetyno 3-pentozylu-heksozyd Quercetin 3-pentosyl-hexoside	9,78	595,1297	463,0873 301,0270	+	+	+	+
26.	3-galaktozyd kwercetyny Quercetin 3-galactoside	9,97	463,0873	301,0337	+	+	+	-
27.	3-arabinozyd kwercetyny Quercetin 3-arabinoside	10,39	433,0762	301,0267	+	+	+	-
28.	Niezidentyfikowany Not identified	10,7	381,1185	300,0259 161,0243	-	-	+	+
29.	3-ksylozyd kwercetyny Quercetin 3-xyloside	10,85	433,0771	301,0342	+	+	+	+
30.	3-ramnozyd kwercetyny Quercetin 3-rhamnoside	11,21	447,0929	301,0269	+	+	+	+
31.	Acetyloheksozyd kwercetyny Quercetin 3-acetylhexoside	11,52	505,0979	301,0337	+	+	+	+
32.	Niezidentyfikowany Not identified	12,9	181,0499	108,0221	-	-	+	+

R_t – czas retencji – retention time



Rys. 33. Chromatogram HPLC-DAD (520 nm) i widma UV-VIS antocyjanów ekstraktu z owoców tarniny

Fig. 33. HPLC-DAD chromatogram (520 nm) and anthocyanins UV-VIS spectra of sloe fruit extract

Na widmach masowych owoców i nalewek z tarniny stwierdzono również obecność dwóch pików (**25** i **31**) o masach $[M-H]^-$ odpowiednio 595,1297 Da i 505,0979 Da, które po fragmentacji dały piki o masie 301 Da, charakterystyczne dla kwercetyny. Pik o masie jonowej m/z 595 po fragmentacji oprócz jonu 301 Da dał również jon 463 odpowiadający utracie cząsteczki pentozy $[M-132-H]^-$; ze względu na zbyt małą ilość danych pozwalających określić rodzaj pentozy i heksozy przyłączonej do cząsteczki kwercetyny, zidentyfikowano ten związek jako pentozydo-heksozyd kwercetyny. W przypadku związku **31** dokładna różnica mas jonu macierzystego i po fragmentacji wyniosła 204,063 (heksoza -162,052 Da, acetyl -42,011 Da), co wskazuje na obecność acetyloheksozy w cząsteczce. Dlatego pik **31** zidentyfikowano jako acetyloglukozyd kwercetyny.

Oznaczono także dwa związki (piki **17** i **18**), które charakteryzowały się występowaniem jonów o m/z 447 i m/z 401, z których po fragmentacji otrzymano jony o masie 269 Da. Dokładna różnica mas jonów: 447,1505 i 401,1446 Da wskazała na obecność adduktu etanolu do cząsteczki o m/z 401. Dokładna różnica mas jonów molekularnych o m/z 401,1446 i m/z 269,1026 Da, wyniosła 132,0424 Da, co wskazywało na obecność pentozy. Z kolei różnica mas pomiędzy jonem masowym 269,1024 Da a jonem o masie 107,0522 Da otrzymanym po fragmentacji i charakterystycznym dla alkoholu benzylowego wyniosła 162,0502 Da, co wskazywało na odłączenie cząsteczki heksozy. Prawdopodobnie więc związki te były pentozo-heksozowymi pochodnymi alkoholu benzylowego.

Związki z grupy flawanoli charakteryzowały się małą intensywnością pików. Na chromatogramach masowych zidentyfikowano monomery (piki **8** i **15**) o m/z 289 i dimery (piki **21** i **24**) o m/z 577 związków z tej grupy.

Po długotrwałym przechowywaniu nalewek antocyjany (piki **13**, **14**, **19** i **20**) uległy całkowitej degradacji, a liczba dimerów flawanoli znacznie zmalała. Flawonole były obecne zarówno w ekstrakcie z owoców, jak i nalewkach.

W nalewkach przechowywanych przez 12 i 60 miesięcy wytworzyły się nowe, nieobecne w surowcu związki o masach jonowych: 376 (pik **7**), 381 (pik **22**) oraz 181 Da (pik **32**).

5. Dyskusja

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowane do produkcji nalewek surowce oraz modyfikacje technologiczne wprowadzone podczas ich wytwarzania wpłynęły w zróżnicowany sposób na jakość i skład polifenoli otrzymanych produktów.

5.1. Jakość nalewek w zależności od stężenia etanolu użytego do ich wytworzenia

Optymalizacja metod ekstrakcji przeprowadzona przy sporządzaniu nalewek z czarnej porzeczki i mahonii pozwoliła na wybór **stężenia alkoholu** użytego w dalszych doświadczeniach. Stwierdzono, że stężenie wodnych roztworów etanolu użytego do maceracji owoców wpłynęło na skuteczność ekstrakcji związków fenolowych do nalewek. Abad-Garcia i wsp. [2007] prowadzili optymalizację ekstrakcji związków fenolowych z owoców. Stwierdzili, że ze wzrostem stężenia etanolu rosła skuteczność ekstrakcji wszystkich grup związków fenolowych z uwagi na dwa czynniki: polarność alkoholu oraz jego właściwość hamowania aktywności polifenolooksydazy. W przypadku niniejszej pracy było to szczególnie widoczne w nalewkach z mahonii, w których przy zastosowaniu do maceracji owoców 90% wodnego roztworu etanolu uzyskano najlepszą ekstrakcję barwników antocyjanowych oraz związków fenolowych. W pozostałych nalewkach ze względu na niższe stężenie alkoholu prawdopodobnie nie nastąpiła pełna inaktywacja polifenolooksydazy, co skutkowało także gorszą barwą nalewek. Etanol jako rozpuszczalnik polarny skutecznie ekstrahuje związki fenolowe z owoców, ale skuteczność ekstrakcji może być zwiększona przez dodatek wody. Według między innymi Spigno i wsp. [2007] oraz Cacace i Mazza [2003] najlepszą skuteczność ekstrakcji większości grup związków fenolowych osiąga się przy użyciu wodnych roztworów etanolu o stężeniach 60–70%. Według Chew i wsp. [2011] oraz Xu i wsp. [2012] stężenie etanolu powinno wynosić 40–60%. Wydajność procesu zależy także od proporcji rozpuszczalnika do próbki, temperatury i czasu ekstrakcji. Temperatura ekstrakcji zwykle nie przekracza 40°C, bowiem temperatury ekstrakcji wyższe niż 40°C powodują obniżenie wydajności ze względu na degradację polifenoli, hydrolizę, wewnętrzne reakcje redox i polimeryzację. Uważa się, że optymalną temperaturą jest 25°C [Bazykina i wsp. 2002, Cacace i Mazza 2003, Hong i Kim 2010, Spigno i wsp. 2007, Yilmaz i Toledo 2006]. Większa zawartość antocyjanów uzyskana w wyniku zastosowania wysokich stężeń etanolu nie zawsze przekłada się na korzystniejszą barwę gotowego produktu. Na przykład w obecności wyższych stężeń etanolu, które występują w nalewkach, zjawisko kopigmentacji jest ograniczone, a stabilność antocyjanów mniejsza.

Boulton [2001] wskazuje, że zjawisko kopigmentacji zmniejsza się o 15% w 20% roztworze etanolu, a zanika w roztworze o stężeniu 50%. Dodatkowo, w przypadku produktów takich jak nalewki czy wódki, w roztworze znajdują się promotory degradacji antocyjanów, np. cukry, kwasy organiczne i niektóre związki fenolowe [Tseng i wsp. 2006, Shen i Wu 2007]. Barwa nalewek owocowych w wyniku degradacji antocyjanów z czerwonej staje się brązowa, na skutek tworzenia się brązowych produktów reakcji Maillarda, utleniania antocyjanów i innych polifenoli. Na przykład aldehyd octowy, który jest produktem utleniania etanolu, działa na dwa sposoby – z jednej strony zwiększa intensywność barwy, ale z drugiej sprzyja jej utracie poprzez tworzenie bezbarwnych form z antocyjanów. W połączeniach flawanol-antocyjan lub w oligomerach flawanolowych i antocyjanowych wytwarzają się etylowe addukty, a stopień skomplikowania cząsteczek rośnie w czasie przechowywania [Cheynier 2005a,b]. Cukier często dodawany do produktów owocowych jest uważany za czynnik sprzyjający degradacji antocyjanów [Thakur i Arya 1989, Lewis i wsp. 1995, Tsai i wsp. 2005]. Znane są również opracowania, które podają, że w niektórych warunkach cukier pełni rolę ochronną w stosunku do antocyjanów [Wrolstad i wsp. 1990, Nikkha i wsp. 2007]. Część napojów alkoholowych o zawartości alkoholu nieprzekraczającej 50%, takich jak piwo, słodkie wina czy likiery, zawierają w swoim składzie substraty reakcji Maillarda. Prace Shen i wsp. [2007] oraz Shen i Wu [2004] wskazują na odmienny mechanizm tych reakcji w roztworach etanolowych i wodnych. W prowadzonych na roztworach modelowych badaniach ilość tworzącego się HMF obniżała się wraz z rosnącym stężeniem etanolu [Shen i Wu 2004]. Produkt degradacji cukrów – HMF, podobnie jak kwas askorbinowy, przyspiesza rozkład barwników antocyjanowych, a skutkiem jest powstanie brązowo zabarwionych związków.

5.2. Jakość nalewek w zależności od sposobu przygotowania

Stwierdzono, że zastosowanie niewielkich modyfikacji w technologii przygotowania nalewek istotnie wpłynęło zarówno na zawartość związków polifenolowych, jak i aktywność antyoksydacyjną. Wykazano, że na skuteczność ekstrakcji związków fenolowych wpłynęły, oprócz stężenia użytego alkoholu, także czas trwania ekstrakcji oraz kolejność dodawania cukru i alkoholu do nalewek.

Podczas procesów przetwarzania surowców owocowych, które są cennym źródłem związków bioaktywnych, zachodzą przemiany na skutek oddziaływania warunków środowiska. Następują zmiany barwy, smaku, zapachu, za które między innymi odpowiedzialne są związki polifenolowe owoców. Tak jak dowiedziono w niniejszej pracy – kluczowe znaczenie mają czas maceracji owoców i sposób przygotowania nalewek. Zagadnienia związane ze zmianami podstawowego składu chemicznego i aktywności przeciwutleniającej w nalewkach były tematem dotychczas prowadzonych badań [Alamprese i wsp. 2005, Castañeda-Olivares i wsp. 2010, Gorinstein i wsp. 1993, Jakopic i wsp. 2007, Kucharska i wsp. 2007, Li i Beta 2011, Liu i wsp. 2003, Montoro i wsp. 2006a,b, Rødtjer i wsp. 2006, Shen i wsp. 2007, Staško i wsp. 2007, Sokół-Łętowska i Kucharska 2008, Kucharska i wsp. 2009b, Sokół-Łętowska i wsp. 2011a,b, Vacca i wsp. 2003]. Prace te dotyczyły likierów zarówno wykonanych metodą tradycyjną, jak również na potrzeby badań, ale stosunkowo niewiele z nich dotyczyło nalewek owocowych. Badano wpływ odmiany i terminu zbioru na jakość nalewek z niedojrzałych orzechów włoskich przeznaczonych na tradycyjny likier „nocino” [Alamprese i wsp. 2005a,b, Jakopic i wsp. 2007]. Autorzy włoscy i francuscy [Barboni i wsp. 2010, Montoro i wsp. 2006a,b, Vacca i wsp.

2003] charakteryzowali zmiany w zawartości związków fenolowych i aktywności przeciwutleniającej oraz barwy i związków zapachowych likierów z owoców mirtu. Staško i wsp. [2007] zbadali pod kątem aktywności antyoksydacyjnej likiery ziołowe dostępne w handlu detalicznym i porównali je z aktywnością win czerwonych. Podobne badania prowadzili Heinonen i wsp. [1998], którzy porównali pod względem zawartości związków polifenolowych likiery owocowe i wina owocowe. Prace Kucharskiej i Sokół-Łętowskiej [2007, 2008, 2009b, 2011a,b] obejmowały, podobnie jak w obecnej pracy, badania nad zmianami aktywności przeciwutleniającej i zawartości polifenoli ogółem w nalewkach dereniowych, porzeczkowych i różanych podczas krótkotrwałego przechowywania. Określono także wpływ stężenia cukru na jakość nalewek wiśniowych, jak również możliwości zwiększenia potencjału antyoksydacyjnego oraz polepszenia jakości nalewek aroniowych przez dodatek przypraw aromatycznych.

Wina gronowe zawierają przeciętnie od 100 (białe) do 4000 (czerwone) mg polifenoli ogółem w litrze, w przeliczeniu na kwas galusowy; wina z niektórych owoców mogą być równie bogate w te związki [Rupasinghe i Clegg 2007, Johnson i de Mejia 2012]. Podczas przeprowadzonych badań ustalono, że nalewki będące alkoholowymi ekstraktami owoców zawierają w swoim składzie **związki fenolowe**, które decydują o ich aktywności antyoksydacyjnej. Duże zróżnicowanie potencjalnych surowców nadających się do sporządzania nalewek, a także szerokie możliwości wzbogacania ich aktywności poprzez dodatek przypraw, poszerza możliwości otrzymania produktów o wysokim potencjale przeciwutleniającym. W zależności od surowca użytego do przygotowania nalewek opisanych w niniejszej pracy – zawartości polifenoli, antocyjanów i aktywność antyoksydacyjna były zróżnicowane. To właśnie ze względu na dużą odmienność składu w porównaniu z winami, szeroko opisywanymi jako źródło przeciwutleniający, nalewki mogą stanowić dla nich alternatywę o równie wysokim potencjale przeciwutleniającym i zróżnicowanych walorach organoleptycznych [Heinonen i wsp. 1998, Alamprese i Pompei 2005, Alamprese i wsp. 2005, Kucharska i wsp. 2007, Sokół-Łętowska i wsp. 2011a,b].

Do badań użyto bardzo popularnego surowca o znanym składzie polifenoli – czarnej porzeczki oraz trzech mniej znanych – mahonii, berberysu i tarniny, które według wiedzy autorki dotychczas zostały scharakteryzowane w bardzo niewielkim stopniu. Rodzaj surowca użytego do wytworzenia nalewki miał zasadniczy wpływ na jej skład, aktywność przeciwutleniającą i barwę. W przeprowadzonych doświadczeniach dowiedziono, że nalewki owocowe są produktami bogatymi w związki polifenolowe, które istotnie podnoszą aktywność przeciwutleniającą. Zawartość związków fenolowych, zależnie od surowca i przyjętej metody przygotowania, wynosiła od 67 do ponad 700 mg·100 cm⁻³ w przeliczeniu na kwas galusowy. Są to wartości wyższe niż oznaczane przez innych badaczy w likierach. Na przykład Heinonen i wsp. [1998] oznaczyli w likierach owocowych od 16 do 180 mg polifenoli w 100 cm³, Kucharska i wsp. [2007] w nalewkach dereniowych oznaczyli 120–250 mg polifenoli w 100 cm³, a w nalewkach z różnych gatunków róż 28–120 mg polifenoli w 100 cm³ [Kucharska i wsp. 2009]. Likieri z owoców mirtu zawierały 100–208 mg polifenoli w 100 cm³ [Barboni i wsp. 2010, Vacca i wsp. 2003]. Tradycyjne włoskie likiery nocino z orzechów włoskich były badane przez Alamprese i wsp. [2005], którzy oznaczyli w nich zawartość polifenoli ogółem w zakresie 23–388 mg·100 cm⁻³. Wysokie wartości otrzymane w badaniach własnych były spowodowane prawdopodobnie innymi proporcjami owoców do roztworu etanolu, które we wspomnianych pracach wynosiły 0,5–0,6 kg owoców na 1 liter etanolu, czyli prawie dwukrotnie mniej niż w niniejszej pracy.

Czynnikiem odróżniającym nalewki od win, poza stężeniem alkoholu i ewentualnie cukru, jest zawartość w nich **barwników antocyjanowych**, które w nalewkach już podczas przygotowania ulegają degradacji. Według Macheix i wsp. [1990] istnieją dwie główne grupy czynników decydujących o stabilności antocyjanów w przetworach, pierwsza związana z początkowym składem związków fenolowych w owocach i obecnością enzymów, a druga związana z czynnikami zewnętrznymi, takimi jak temperatura i środowisko przetwarzania owoców.

Działanie temperatury na stabilność antocyjanów jest dobrze poznane. Sugeruje się, że termiczna degradacja tych barwników może przebiegać na dwa sposoby: poprzez hydrolizę wiązania 3-glikozydowego i utworzenie mniej trwałego aglikonu oraz hydrolityczne otwarcie pierścienia pyryliowego i utworzenie chalkonu, który następnie degraduje się do brunatnych związków o charakterze polifenoli. Ten sam mechanizm występuje podczas długotrwałego przechowywania [Tseng i wsp. 2006, Patras i wsp. 2010].

Według Patras i wsp. [2010] podczas przechowywania antocyjany ulegają przede wszystkim procesom polimeryzacji i kondensacji z innymi polifenolami i kwasami fenolowymi. Ze względu na mnogość związków uczestniczących w reakcjach ustalenie mechanizmu degradacji antocyjanów i innych polifenoli jest trudne. Wiadomo, że są to związki łatwo podlegające utlenianiu, a sam proces przebiega wielostopniowo.

Poszczególne antocyjany różnią się pomiędzy sobą stabilnością. Jest to w głównej mierze związane ze strukturą ich cząsteczek. Na przykład diglikozydy są odporniejsze na działanie ciepła niż monoglikozydy. Metoksylacja i acylacja cząsteczki dodatkowo podnosią stabilność. Znaczenie ma także rodzaj przyłączonego cukru. Obecność kwasu winowego czy fruktozy w środowisku powoduje przyspieszenie degradacji antocyjanów [Macheix i wsp. 1990], podobnie jak kwas askorbinowy. Szybki rozkład antocyjanów w nalewkach porzeczkowych związany był z wysoką zawartością kwasu askorbinowego w surowcu, którego było wielokrotnie więcej niż w owocach pozostałych gatunków (tab. 18). Aktywność antyoksydacyjna jest zazwyczaj wysoko skorelowana z zawartością polifenoli ogółem, chociaż różne grupy polifenoli w niejednakowym stopniu uczestniczą w kształtowaniu potencjału przeciwutleniającego produktów. Badanie aktywności antyoksydacyjnej żywności *in vitro* zwykle prowadzone jest kilkoma metodami. W większości badań, podobnie jak w niniejszej pracy, aktywność tych samych próbek była różna w zależności od zastosowanego testu aktywności. Wynika to z faktu, że stosowane metody obejmują nieco inne grupy przeciwutleniaczy. Metoda FRAP określa możliwość redukowania metali przez komponenty zawarte w próbce, natomiast metody ABTS^{•+} i DPPH[•] określają zdolność przeciwutleniaczy obecnych w badanym materiale do zmiana wolnych rodników w środowisku lipofilnym lub hydrofilnym. Należy zauważyć, że FRAP i ABTS^{•+} wykorzystują w reakcji mechanizm przeniesienia pojedynczego elektronu, zaś DPPH[•] również transfer atomu wodoru [Aruoma 2003, Pellegrini i wsp. 2003, Pérez-Jiménez i wsp. 2008, Floegel i wsp. 2011]. Związki polifenolowe wykazują na przykład różne powinowactwo do niwelowania wolnych rodników DPPH[•]. Najwyższe wartości oznaczano dla rodziny flawan-3-oli, a zwłaszcza procyanidyn B1 i B2 [Villaño i wsp. 2007]. Na aktywność przeciwutleniającą produktów wpływa również obecność innych składników żywności. Mogą one zakłócać wyniki pomiarów [Pérez-Jiménez i Saura-Calixto 2006, Stratil i wsp. 2007].

W nalewkach z wybranych owoców zmierzono znaczącą **aktywność przeciworodnikową**, która wyrażona jako ekwiwalent Troloksu wynosiła od 300 do 2200 $\mu\text{mol TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$, w zależności od rodzaju użytego surowca i metody pomiaru aktywności. Według szeregu

autorów aktywność antyoksydacyjna likierów owocowych waha się w szerokim zakresie od 2 do 3100 $\mu\text{mol TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$ [Alamprese i Pompei 2005b, Kucharska i wsp. 2007, Vacca i wsp. 2003]. Na zawartość polifenoli i aktywność wpływają w ogromnym stopniu zmienność surowca i sposób przygotowania nalewek. Na przykład Alamprese i wsp. [2005] oznaczyli w nalewkach orzechowych aktywność przeciwrodnikową rzędu 1,9–894 $\mu\text{mol TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$. Zależała ona od terminu zbioru orzechów i sposobu przygotowania. Nalewki z owoców mirtu (*Myrtus communis*) w badaniach Montoro i wsp. [2006a] charakteryzowały się aktywnością około 300 $\mu\text{mol TE}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$.

To prawdopodobnie wysoka aktywność polifenolooksydazy w owocach wpłynęła na ostateczną zawartość polifenoli w nalewkach z mahonii. Odnotowano to szczególnie wyraźnie w wariantcie M3 nalewek, który polegał na początkowym dodatku cukru do owoców; w próbkach tych degradacja związków polifenolowych, w tym antocyjanów, była najbardziej widoczna. Nalewki zawierały wielokrotnie mniej tych związków w porównaniu z nalewkami uzyskanymi innymi metodami.

Do sporządzenia nalewek użyto owoców zamrożonych, dzięki czemu tkanka owoców była naruszona przez kryształki lodu, co ułatwiało ekstrakcję. Skuteczność ekstrakcji zależała także od wielkości owoców i grubości ich skórki. Różnice pomiędzy próbkami nalewek z berberysu były mniejsze niż zaobserwowano w nalewkach z czarnej porzeczki i tarniny. Owoce berberysu są niewielkie, a ich skórka jest cienka, dlatego ekstrakcja związków aktywnych przebiegała łatwiej aniżeli w przypadku pozostałych owoców o twardej skórce, zaś modyfikacje technologiczne miały mniejszy wpływ na jakość i skład gotowych produktów. W nalewkach z pozostałych trzech surowców zastosowanie zmiennej kolejności dodawania alkoholu i cukru podczas ich wytwarzania różnicowało jakość powstałych produktów. W tych wariantach, w których na początku procesu owoce mieszano z cukrem, zaobserwowano najgorszą barwę w porównaniu z pozostałymi wariantami i odnosiło się to do wszystkich rodzajów badanych owoców. Podobne wyniki uzyskali Kucharska i wsp. [2007] w badaniach nad wpływem sposobu przygotowania nalewek z owoców derenia na ich aktywność przeciwutleniającą i barwę.

W tlenowej degradacji związków fenolowych podstawową rolę odgrywają dwa enzymy, polifenolooksydaza i peroksydaza, których działanie wpływa na jakość żywności. Obecnie przyjmuje się, że oksydaza polifenolowa katalizuje w obecności tlenu dwie reakcje: hydroksylowanie monofenoli do *o*-difenoli i utlenianie *o*-difenoli do *o*-chinonów. Następnie, wytworzone chinony, już bez udziału enzymów, polimeryzują. Tworzą się brunatne związki, które zmieniają barwę produktów żywnościowych. W większości przypadków uważa się te zmiany za niekorzystne, pomijając czarną herbatę, rodzyńki, daktyle, a także likiery i nalewki otrzymane z naturalnych surowców [Macheix i wsp. 1990, Tomás-Barberán i Espín 2001]. Zaobserwowana utrata barwy nalewek na skutek obniżenia zawartości antocyjanów, zwłaszcza w nalewkach z mahonii i tarniny, wynikała prawdopodobnie z wysokiej aktywności polifenolooksydazy, która powodowała brązowienie owoców uszkodzonych podczas zbioru i przygotowania nalewek. Potwierdzeniem tej obserwacji mogą być mniejsze zmiany barwy występujące w próbkach, w których owoce miały od początku procesu ekstrakcji kontakt z roztworem etanolu, skutecznie hamującym działalność enzymów utleniających. Działanie etanolu na polifenolooksydazę zostało opisane między innymi przez Leric i Manzocco [2000] oraz Herter i wsp. [2011]. Należy również wspomnieć, że dominującymi związkami w nalewkach z mahonii, berberysu i tarniny były kwasy fenolowe: chlorogenowy i neochlorogenowy, które są aktywnymi substratami reakcji brązowienia, co dodatkowo wyjaśnia przyczyny szyb-

kiej utraty barwy przez nalewki z mahonii i tarniny [Laranjinha 2002, Rice-Evans i Packer 2003, Herter i wsp. 2011].

Wydłużanie **czasu ekstrakcji** owoców wpłynęło na zwiększenie zawartości polifenoli w nalewkach ze wszystkich owoców, ale wzrost ten nie był duży, a istotne statystycznie różnice obserwowano pomiędzy najkrótszymi i najdłuższymi czasami maceracji. Podobna tendencja miała miejsce dla aktywności przeciwutleniających. Jednocześnie wydłużanie czasu maceracji owoców wpływało na zwiększenie degradacji antocyjanów. Badania Alamprese i Pompei [2005] nad opracowaniem najlepszej metody ekstrakcji niedojrzałych orzechów włoskich wykazały, że wraz z wydłużeniem czasu rosła w nalewkach zawartość polifenoli i były one stabilniejsze aniżeli w nalewkach z orzechów krócej macerowanych. Wspomniani autorzy wyjaśniają, że związki mniej stabilne uległy utlenieniu, polimeryzacji lub innym przemianom już podczas dłuższej maceracji, a w nalewkach krócej przygotowywanych labilne związki pozostały w roztworze i procesy ich degradacji zachodziły później, czyli podczas przechowywania.

W procesie przygotowania win czerwonych prowadzi się wstępną macerację owoców w celu polepszenia barwy win. W badaniach Kelebek i wsp. [2006] nad wpływem czasu maceracji na ilość antocyjanów w roztworze stwierdzono, że optymalną barwę miały próbki macerowane przez 6 dni, a przedłużanie tego czasu powodowało obniżanie ilości antocyjanów w roztworze.

W przypadku większości doniesień literaturowych stwierdzono, że zawartość polifenoli obniżała się podczas wydłużonego czasu maceracji, przy czym oznaczenia metodą HPLC wskazywały na wyższe straty aniżeli oznaczenia metodą Folin-Ciocalteu. Jedną z przyczyn mogła być wysoka aktywność polimerów polifenolowych, powstałych podczas przechowywania, wobec niespecyficznego odczynnika Folin-Ciocalteu. W ten sposób następowało kompensowanie strat niskocząsteczkowych polifenoli, co potwierdzają prace Tsai i Huang [2004]. Zawartość i skład polifenoli podlegają wahaniom podczas obróbki technologicznej i przechowywania produktów [Mullen i wsp. 2002, Zafrilla i wsp. 2003, Hurst i wsp. 2009]. Na przykład podczas obróbki cieplnej ziemniaków odnotowano zmiany we wzajemnych proporcjach kwasów chlorogenowych przy jednoczesnym wzroście zawartości polifenoli ogółem [Truong i wsp. 2007].

Barwniki antocyjanowe są najmniej stabilnymi składnikami nalewek, ponieważ na ich trwałość wpływa wiele czynników, takich jak struktura chemiczna, stężenie, pH, światło, obecność kopigmentów, tlenu, kwasu askorbinowego, cukrów i produktów ich degradacji oraz czas i temperatura przechowywania. Łatwo utleniają się w obecności tlenu cząsteczkowego, zwłaszcza w obecności chinonów, powstałych z innych polifenoli przy udziale polifenolooksydazy (PPO; EC 1.14.18.1). Chinony, które są wysoce reaktywnymi cząsteczkami, podlegają reakcjom kondensacji, w wyniku których tworzą się ciemno zabarwione polimery o nie do końca poznanej strukturze [Douglas 2002]. Zazwyczaj obniżenie zawartości antocyjanów w przetworach spożywczych zmniejsza atrakcyjność produktu dla konsumenta, jednak w przypadku niektórych przetworów zmiana barwy z czerwonej na czerwono-brązową jest akceptowana, jak ma to miejsce w przypadku suszonych owoców czy czarnej herbaty [Douglas 2002]. Wydaje się, że również w nalewkach, tradycyjnie postrzeganych jako produkty długo przechowywane, dopuszcza się barwę o odcieniu przesuniętym w kierunku bardziej brązowej. Często nalewki sporządzane są z ziół i przypraw albo z ich dodatkiem, co zwykle powoduje, że otrzymane produkty nie zawierają antocyjanów i mają barwę brązową. Światło i temperatura są czynnikami silnie wpływającymi na degradację antocyjanów i innych związków fenolowych.

Barwa jest jednym z najważniejszych wyróżników jakości żywności, zwykle decyduje o akceptowalności produktów przez konsumenta. Stosunek parametrów a^*/b^* jest użytecznym wskaźnikiem w określaniu zmian udziału barwy czerwonej i żółtej produktów. Stosując ten wskaźnik, wykazano, że najlepszą barwę miały nalewki otrzymane w wyniku zalania owoców roztworem etanolu i dodatek cukru w późniejszym czasie.

5.3. Identyfikacja i przemiany związków fenolowych owoców oraz nalewek

Wybrane do badań owoce, poza czarnymi porzeczkami, są owocami mało znanymi i wykorzystywanymi dotychczas w niewielkim stopniu. Badane surowce oraz sporządzone z nich nalewki charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem składu chemicznego i aktywności przeciwutleniającej. Ilość związków bioaktywnych w owocach powszechnie wykorzystywanych do spożycia i przetwarzania oscyluje w szerokim zakresie stężeń. Zawartość polifenoli ogółem w owocach może wahać się od kilkunastu do kilku tysięcy miligramów na kilogram produktu, co sprawia, że również zakres aktywności przeciwutleniającej owoców jest bardzo duży. W obszernej pracy autorów norweskich i amerykańskich [Halvorsen i wsp. 2002] przebadano aktywność przeciwutleniającą metodą FRAP, wyrażoną jako $\text{mmol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} / 100 \text{ g}^{-1}$, w owocach, warzywach, zbożach i orzechach. Według tego opracowania aktywność przeciwutleniająca owoców wynosi od 0,04 (melon) do 11,33 (granat) i 40 $\text{mmol} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (róża). Owoce pozyskane ze stanu dzikiego zwykle zawierają więcej polifenoli i mają wyższą aktywność przeciwutleniającą niż owoce z upraw (plantacji) [Leja i wsp. 2007]. Surowce wykorzystane do wytworzenia nalewek opisanych w niniejszym opracowaniu były szczególnie bogate w polifenole (606–1074 $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) i miały wysoką pojemność antyoksydacyjną.

Skład polifenoli **czarnych porzeczek** jest dobrze poznany. Jak podaje wielu autorów [Anttonen i Karjalainen 2006, Sójka i wsp. 2009, Gavrilova i wsp. 2011, Shahidi i Naczek 2003], w owocach czarnej porzeczki znajdują się flawonole, głównie glikozydy myricetyny i kwercetyny, a także malonylo-glukozydy myricetyny i kemferolu oraz acylowana kwasem ferulowym lub *p*-kumarowym nigrumina. Identyfikację związków fenolowych czarnych porzeczek i nalewek z nich wykonanych przeprowadzono przy wykorzystaniu widm UV-VIS i widm masowych oraz danych literaturowych [Anttonen i Karjalainen 2006, Määttä i wsp. 2003, Flamini i Traldi 2010, Laaksonen i wsp. 2012] na podstawie obecności jonów molekularnych o charakterystycznych wartościach *m/z*. Zidentyfikowano wymienione związki, a ponadto pochodne kwasów kawowego, kumarowego i ferulowego. **Czarne porzeczki** zawierają 4 podstawowe antocyjany: 3-rutynozyd cyjanidyny (ok. 33–38%), 3-rutynozyd delfinidyny (27–34%), 3-glukozyd cyjanidyny (8–10%), i 3-glukozyd delfinidyny (8–10%), przy czym proporcje poszczególnych antocyjanów mogą się wahać w pewnym zakresie w zależności od odmiany [Khoo i wsp. 2012, Rubinskiene i wsp. 2005]. Podobne proporcje antocyjanów oznaczono w ekstraktach z owoców i badanych nalewkach porzeczkowych.

Skład chemiczny owoców **mahonii** i **berberysu** nie jest dobrze poznany. Badano przede wszystkim wyciągi z korzeni i kory tej rośliny, czasami z liści, które stosowane są w celach leczniczych [Rackova i wsp. 2007, Suess i Stermitz 1981, Reuter i wsp. 2010]. Za główny związek aktywny **mahonii** i **berberysu** uważany jest alkaloid izochinolinowy – **berberyna** i jej pochodne. Uważa się, że związki te działają przeciwbakteryjnie, przeciwbiegun-

kowo, przeciwcukrzycowo, przeciwnadciśnieniowo, antydepresyjnie i przeciwzapalne oraz obniżają poziom cholesterolu [Rackova i wsp. 2007, Zeng i wsp. 2006]. Są to związki słabo wchłaniające się z przewodu pokarmowego, ale odkładające się w sercu, trzustce i wątrobie. Większość badaczy podaje, że alkaloidy te nie występują w dojrzałych owocach [Grycova i wsp. 2007, Imanshahidi i Hosseinzadeh 2008]. W widmach masowych ekstraktów z owoców i nalewek poszukiwano sygnałów pochodzących od jonów [M-H]⁺ o *m/z* równych 336 (berberyna i epiberberyna), 352 (palmatyna), 338 (jatroryzyna i kolumbamina), 320 (koptyzyna), 322 (berberastyna). Brak wymienionych jonów potwierdził nieobecność powyższych alkaloidów w badanych próbkach owoców mahonii i berberysu.

Zarówno w mahonii, jak i w berberysie występowały kwasy jabłkowy i cytrynowy, a w owocach berberysu zidentyfikowano po raz pierwszy kwas chinowy.

W dostępnej literaturze istnieje zaledwie kilka pozycji dotyczących zawartości i składu **antocyjanów** i kwasów fenolowych w owocach **mahonii** [Akbulut i wsp. 2009, Deineka i wsp. 2003, 2008, Sorokopudov i wsp. 2005]. Sorokopudov i wsp. [2005] i Deineka i wsp. [2003] w swoich badaniach nad owocami roślin z rodziny berberysowatych zidentyfikowali antocyjany owoców mahonii. Sorokopudov i wsp. [2005] zauważyli jednak, że wzajemne proporcje barwników zależą w dużej mierze od pochodzenia roślin. W owocach mahonii będących przedmiotem ich badań dominowały pochodne delfinidyny (udział 47–63%), a tylko w jednym przypadku głównym antocyjanem był 3-glukozyd cyjanidyny. Udział pozostałych antocyjanów w zależności od próbki wynosił od ilości śladowych do 15%. W niniejszych badaniach również głównym antocyjanem był 3-glukozyd delfinidyny, a następnie 3-glukozydy cyjanidyny i malwidyny. Flawonole, zidentyfikowane w owocach mahonii po raz pierwszy, reprezentowane były przez pochodne kwercetyny: rutynozyd, galaktozyd i glukozyd oraz rutynozyd izoramnetyny.

W owocach **berberysu** zidentyfikowano jako główny barwnik antocyjanowy 3-glukozyd pelargonidyny (ponad 83%) oraz 3-glukozyd cyjanidyny. Jak podają Vereskovskii i Shapiro [1985], poza tymi dwoma antocyjanami, w owocach berberysu zwyczajnego znajduje się również w niewielkich ilościach 3-glukozyd petunidyny, a według innych autorów także 3-glukozyd delfinidyny oraz 3-glukozydy peonidyny i malwidyny, ale w ilościach śladowych [Deineka i wsp. 2003, Sorokopudov i wsp. 2005]. W niniejszych badaniach nie zidentyfikowano wymienionych związków.

Kwasy hydroksycynamonowe, przede wszystkim kawowy, chlorogenowy i *p*-kumarowy, są szeroko rozpowszechnione w roślinach. Badania epidemiologiczne wskazują na ich przeciwutleniające i przeciwnowotworowe właściwości, poprzez korzystne dla zdrowia skutki diety bogatej w owoce, warzywa i ich przetwory. W pracy autorów rosyjskich [Deineka i wsp. 2008] podano, że w owocach **berberysu** zwyczajnego i **mahonii** znajduje się w przeważającej ilości kwas chlorogenowy, co znalazło potwierdzenie również w niniejszej pracy. Dominującym związkiem, który zidentyfikowano w owocach mahonii oraz i berberysu był **kwas 5'-kawaoilochinowy** (chlorogenowy).

Ponadto w owocach **mahonii** po raz pierwszy oznaczono **heksozyd kwasu protokatechowego**, a także pochodne kwasów kumarowego i kawowego. W owocach berberysu Imanshahidi i Hosseinzadeh [2008] oznaczyli kwas kawowy, chlorogenowy i jabłkowy. W wyniku niniejszych badań po raz pierwszy oznaczono **heksozyd kwasu kumarowego**, a także pochodne **kwasu sinapowego i hydroksyferulowego**. Połączenie analizy widm UV-VIS (ustalenie przynależności do klasy związków fenolowych) i ESI-MS (ustalenie struktury związku) jest wartościowym narzędziem do analizy związków fenolowych. W niniejszej pracy, na pod-

stawie analizy i porównania czasów retencji oraz widm związków chemicznych w ekstraktach z berberysu z wybranymi standardami, a także na podstawie danych spektrometrycznych (UPLC-ESI-MS, drogi fragmentacji), po raz pierwszy zidentyfikowano w owocach i nalewkach z berberysu cztery pochodne estrowe kwasu 5'-**hydroksyferulowego** z heksozą. Na widmach masowych tych związków otrzymano charakterystyczne dwa jony $[M-H]^-$ o m/z 371 i $[M-H-162]^-$ o m/z 209 odpowiadające heksozowej pochodnej kwasu 5-hydroksyferulowego i kwasowi 5-hydroksyferulowemu. Na estrowy rodzaj połączenia kwas-heksoza dodatkowo wskazał efekt batochromowy [Simirgiotis i wsp. 2009, Hyötyläinen i Kivilompolo 2010]. Maksima absorpcji widma UV-VIS były przesunięte w kierunku wyższych wartości λ_{\max} o 4 nm w porównaniu z widmem kwasu 5-hydroksyferulowego. Izomery takie oznaczyli także Simirgiotis i wsp. [2009] w owocach papai. W nalewkach z berberysu zidentyfikowano pochodną cukrową kwasu kumarowego o wartości m/z 325 $[M-H]^-$, a po fragmentacji m/z 163 $[M-H-162]^-$. Na podstawie analizy widma MS po fragmentacji (piki o m/z 163 i m/z 119 $[M-H-44]^-$) i przesunięcia hipsochromowego z 310 do 296 nm na widmie UV-VIS zaproponowano, że może to być heksozyd (glukozyd lub galaktozyd) kwasu kumarowego. Taki sposób identyfikacji pochodnych heksozowych kwasów fenolowych zaproponowali Hyötyläinen i Kivilompolo [2010] oraz Määttä i wsp. [2003].

Obecność glikozydowej pochodnej **eriodiktiolu** w owocach i nalewkach z berberysu oznaczono po raz pierwszy i potwierdzono na podstawie analizy widma MS i danych literaturowych, opierając się na charakterystyce rozpadu związków flawonoidowych. Z tego względu zaliczono związek do klasy flawanonów, które po fragmentacji dają charakterystyczne jony o masach 151 i 125 Da [Hvattum i Ekeberg 2003, Gates i Lopes 2012. Imanshahidi i Hosseinzadeh [2008] podają, że owoce berberysu zwyczajnego zawierają eskuletynę, 3-galaktozyd kwercetyny i 3-ramnozyd kwercetyny. Wyniki badań własnych nie wykazały obecności eskuletyny w owocach, natomiast oznaczono galaktozyd i ramnozyd kwercetyny. Po raz pierwszy na podstawie analizy widm i przez porównanie z wzorcami oznaczono w owocach berberysu **rutynozydy kwercetyny, kemferolu i izoramnetyny oraz ramnozyd kemferolu** i jego pochodną heksozową, prawdopodobnie galaktozyd.

Przedmiotem badań wielu autorów są przede wszystkim liście i kwiaty tarniny, w których zidentyfikowano kwercetynę, kemferol oraz ich glikozydy i diglikozydy jak i ich acylowane formy [Makarov i wsp. 1969, Olszewska i Wolbiś 2001, 2002]. Składniki owoców tarniny są słabo poznane. Riihinen [2005] i Fraternali i wsp. [2009] podają, że znajdują się w nich kwasy neochlorogenowy i chlorogenowy, pochodne kwasu kumarowego, (+) katechina oraz glikozydy kwercetyny. W owocach **tarniny** wykorzystanych w badaniach własnych również zidentyfikowano kwasy hydroksycynamonowe: 3'-kawoilochinowy, 5'-kawoilochinowy (neochlorogenowy i chlorogenowy), oraz kumaroilochinowy i feruilochinowy, a ponadto kwasy jabłkowy i cytrynowy. Obecne były również monomery i dimery flawanoli ((+) katechiny i (-) epikatechiny).

Podczas rozdzielania na kolumnie RP-C18, glikozydy flawonoidów eluują w następującym porządku: galaktozyd, glukozyd, ksylozyd, arabinopyranozyd, arabinofuranozyd, ramnozyd i glukuronid [Grotewold 2006, Lin i Harnly 2008]. Profil flawanoli owoców tarniny był uboższy niż w trzech pozostałych surowcach, ponieważ zidentyfikowano tylko pochodne kwercetyny: rutynozyd, galaktozyd, glukozyd, ksylozyd, arabinopyranozyd, arabinofuranozyd, ramnozyd o charakterystycznych masach jonowych, odpowiednio m/z 609, m/z 463, m/z 463, m/z 433, m/z 433 i m/z 447. Po raz pierwszy w owocach **tarniny** zidentyfikowano pentozydo-

heksozyd kwercetyny i acetyloglukozyd kwercetyny, a także dwie pochodne heksozowo-pentozowe alkoholu benzylogowego.

W nalewkach, w porównaniu z surowcami, znajdowało się dużo mniej aktywnych związków, co było oczywiście spowodowane dodaniem etanolu i cukru do owoców oraz procesem maceracji. W porównaniu z zawartością w surowcach, oznaczono w nalewkach od 16 do 54% ilości polifenoli i tylko 3–10% antocyjanów. Zaobserwowano rozkład niektórych związków obecnych w owocach i pojawienie się nowych, będących produktami przemian podczas wytwarzania i przechowywania nalewek.

W nalewkach z **mahonii** oznaczono produkty utleniania kwasu chlorogenowego. Na widmie ESI-MS zaobserwowano jony molekularne $[M-H]^-$ o m/z 705, odpowiadające **dehidrodimerom** – utlenionym cząsteczkom kwasu chlorogenowego i jony $[M-192-H]^-$ o m/z 513, które wskazywały na oderwanie jednej cząsteczki kwasu chinowego od dehidrodimeru. Wyniki porównano z pracami szeregu autorów [Guyot i wsp. 2008, Prigent i wsp. 2008, Schilling i wsp. 2008] nad utlenianiem związków fenolowych w sokach jabłkowych i cydrach, co pozwoliło na identyfikację związków o tych wartościach m/z jako produktów utleniania kwasu chlorogenowego. Ich obecność potwierdzono następnie po przeprowadzeniu fragmentacji cząsteczki, w wyniku której na widmie MS/MS zaobserwowano jon $[M-H-192-192]^-$ o m/z 321, odpowiadający utracie dwóch cząsteczek kwasu chinowego przez dehidrodimer kwasu chlorogenowego.

Podczas wytwarzania nalewek są szczególnie niekorzystne warunki, niesprzyjające zachowaniu ładnej, naturalnej barwy surowca ze względu na nietrwałość barwników antocyjanowych. Podczas przygotowania obserwowano duże straty antocyjanów, które następnie podczas przechowywania ulegały całkowitej degradacji.

Degradacja antocyjanów przebiega poprzez początkowe odszczepienie cząsteczki cukru, przy czym łatwiej reakcja ta zachodzi w przypadku pentoz aniżeli heksoz, następnie powstały aglikon ulega rozpadowi do aldehydu floroglucynolu (z pierścienia A antocyjany), w przypadku cyjanidyny i pelargonidyny. Powstają przy tym odpowiednie kwasy fenolowe (z pierścienia B): protokatechowy z cyjanidyny i 4-hydroksybenzoowy z pelargonidyny. W podwyższonej temperaturze mogą tworzyć się również glikozydy kwasów hydroksycynamonowych. Większość badań nad degradacją antocyjanów prowadzona jest w roztworach modelowych, przeważnie wodnych. Bada się działanie temperatury i pH środowiska na stabilność antocyjanów. Badania Sadiłowej i wsp. [2006] oraz Woodwarda i wsp. [2009] wykazały, że w zależności od rodzaju roztworu modelowego rodzaj i ilość produktów degradacji istotnie ulegają zmianie. Przykładowo, ilość wytworzonych kwasów fenolowych wynosiła w roztworze wodnym 30–40% początkowego stężenia molowego antocyjanu, a w roztworze buforowym tylko 8–18%. Natomiast aldehyd floroglucynolu tworzył się w ilościach od 3 (w wodzie) do 30% (w buforze) w stosunku do stężeń antocyjanów.

Według Watsona i Sparkmana [2007] do jonów pochodzących od związków obecnych w próbce mogą przyłączać się także cząsteczki pochodzące z rozpuszczalnika lub fazy ruchomej użytej do rozdzielania UPLC. W przypadku niniejszej pracy odnotowano na widmach mas sygnały odpowiadające jonom o wartościach m/z powiększonych o 46 Da, które mogą świadczyć o powstaniu adduktów odpowiadających cząsteczkom etanolu lub kwasu mrówkowego o masie 46 Da [Iijima i wsp. 2008, Ma i wsp. 2007, Watson i Sparkman 2007]. Addukty takie zaobserwowano w nalewkach z mahonii, berberysu oraz tarniny.

Kwasy fenolowe stanowiły główny czynnik aktywności przeciwnadciwnikowej nalewek z owoców mahonii, berberysu i tarniny, w których kwasy kawoilochinowe były związkami

dominującymi. Według wielu badaczy kwas chlorogenowy cechuje się bardzo wysoką aktywnością przeciwrodnikową ze względu na katecholową strukturę *o*-dihydroksy w połączeniu z wiązaniem podwójnym w łańcuchu bocznym [Apte 1997, Bors i wsp. 1990, He i wsp. 2008, Moridani i wsp. 2001, Osman i wsp. 2012].

W nalewkach z tarniny oznaczono również pochodne kwasu chinowego z kwasami kawowym, *p*-kumarowym i ferulowym. Zidentyfikowano także glikozydy i diglikozydy kwercetyny z heksozami i pentozami.

Bardzo istotny z punktu widzenia zdrowotnego jest fakt, że nie stwierdzono w nalewkach z owoców mahonii i berberysu obecności glikozydu – **berberyny** ani jej pochodnych. Substancje te występujące powszechnie w korzeniach, korze oraz liściach mahonii i berberysu są związkami, które mogą kumulować się w organizmie. Na widmach mas nie stwierdzono sygnału charakterystycznego dla berberyny o wartości $[M-H]^-$ równej 336,1244 ani sygnałów pochodzących od odszczepionych fragmentów o *m/z* 321,09; 292,09; 306,08; 278,07 [Suess i Stermitz 1981, Rackova i wsp. 2007, Imanshahidi i Hosseinzadeh 2008].

W owocach tarniny i mahonii oznaczono obecność **amigdaliny** – glikozydu cyjanogenego, który pod działaniem kwasów żołądkowych ulega hydrolizie z uwolnieniem toksycznego dla organizmu kwasu cyjanowodorowego. W nalewkach nie stwierdzono obecności tego związku. Ilość glikozydów cyjanogennych w żywności regulowana jest Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego Nr 1334/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. „W sprawie środków aromatyzujących i niektórych składników żywności o właściwościach aromatyzujących do użycia w oraz na środkach spożywczych” [Rozporządzenie (WE) nr 1334/2008]. W rozporządzeniu tym określono najwyższą dopuszczalną zawartość kwasu cyjanowodorowego w napojach alkoholowych na 35 mg·kg⁻¹. Większą zawartość tego związku dopuszcza się jedynie w nugatach, marcepanach i ich substytutach, do 50 mg·kg⁻¹, a w owocach pestkowych w puszkach dopuszcza się do 5 mg HCN·kg⁻¹ [Rozporządzenie (WE) nr 1334/2008]. W badaniach wstępnych do niniejszej pracy przeprowadzono doświadczenia nad skutecznością ekstrakcji glikozydów cyjanogennych w nalewkach tarninowych. Porównano dwie metody przygotowania owoców tarniny – nakłucie i zgniecenie. Owoce następnie ekstrahowano etanolem przez 2–12 tyg., podczas których mierzono stężenie powstającego kwasu cyjanowodorowego. Nalewki przygotowane z owoców zgniecionych zawierały ok. 17 mg HCN w litrze nalewki, a nalewki z owoców nakłutych – 5,3 mg HCN. Podczas 12 tygodni ekstrakcji zawartość HCN znacznie się obniżyła – do 1,7 mg HCN·L⁻¹ w próbkach z owoców zgniecionych i do 0,7 mg HCN·L⁻¹ w nalewkach z owoców nakłutych. Podczas 8 tygodni przechowywania próbek zawartość HCN dalej się obniżała [Sokół-Łętowska 2009]. Najlepiej poznana jest zawartość glikozydów cyjanogennych w słodkich i przede wszystkim gorzkich migdałach oraz nasionach moreli, w których oznaczano 5–9 g amigdaliny w 100 g [Gómez i wsp. 1998], a także manioku stanowiącym znaczącą część pożywienia ludności tropikalnych obszarów Ameryki, Afryki i Azji [Krafft i wsp. 2012, Oluwole i Onabolu 2003, Sefer i wsp. 2006, Tuncel i wsp. 1998]. W żywności oznacza się następujące ilości HCN: 0,001 mg·kg⁻¹ w zbożach, 2,5 g·kg⁻¹ w manioku, do 8 g·kg⁻¹ w młodych jadalnych pędach bambusa. W przetworach z owoców pestkowych oznaczano 0–4,6 mg·kg⁻¹ [Voldrich i Kyzlink 1992, Anon 2007]. Jako metody obniżenia zawartości glikozydów cyjanogennych zaleca się fermentację, suszenie, ogrzewanie lub obniżenie pH [Agbor-Egbe i Lape Mbome 2006, Oluwole i Onabolu 2003]. Owoce zazwyczaj charakteryzują się wysoką kwasowością, co może korzystnie wpływać na obniżenie zawartości glikozydów cyjanogennych w nalewkach owocowych podczas ich przygotowania i przechowywania.

Hydroksymetylofurfural (HMF) jest uważany za wskaźnik obniżenia jakości żywności o wysokiej zawartości cukru, spowodowanej długotrwałym przechowywaniem, zwłaszcza w podwyższonej temperaturze. HMF jest bowiem prawie lub całkowicie nieobecny w surowcach i świeżych produktach. W produktach żywnościowych szczególną uwagę przywiązuje się do obecności HMF w miodach, w których dopuszcza się zawartość do 40 mg HMF w kilogramie (tylko miody „tropikalne” mogą zawierać do 80 mg·kg⁻¹) [Dyrektywa 2001/110/WE 2001]. W innych produktach oznaczano szeroki zakres stężeń HMF. Na przykład Rada-Mendoza i wsp. [2002] oznaczyli w dżemach od 0,05 do 3,77 mg HMF·100 g⁻¹. W napojach alkoholowych typu brendy, starzonych w dębowych beczkach, Alcazar i wsp. [2006] oznaczyli od 5 do 18 g HMF w litrze, w likierach kawowych i miodowych od 33 do 57 g·l⁻¹, a w likierach wiśniowych 12 i 21 g·l⁻¹. W octach balsamicznych oznaczano początkowo około 200 mg·l⁻¹, po rocznym przechowywaniu ponad 350, a po półtorarocznym ponad 450 mg·l⁻¹ [Cerezo i wsp. 2010]. W nalewkach po roku przechowywania oznaczono hydroksymetylofurfural (HMF) w przedziale 0,45–1,07 mg·100 cm⁻³, a jego zawartość zwiększyła się w miarę upływu czasu. W nalewkach przechowywanych przez pięć lat oznaczono od 1,97 do 15,7 mg·100 cm⁻³ tego związku. Jego tworzeniu się w produktach, poza wysoką temperaturą, sprzyja wysoka kwasowość. Potwierdzono tę zależność również w nalewkach z berberysu i czarnej porzeczki, które charakteryzowały się wyższą kwasowością i zawierały więcej hydroksymetylofurfuralu niż nalewki z owoców mahonii i tarniny o mniejszej zawartości kwasów.

Badania nad degradacją barwników antocyjanowych prowadzone w różnych roztworach modelowych i produktach dowiodły, że w obecności etanolu w roztworze tworzą się nowe brązowe półprodukty, a degradacja antocyjanów zachodzi szybciej aniżeli w roztworach wodnych [Moldovan i wsp. 2012, Shen i Wu 2004, Tseng i wsp. 2006].

Vacca i wsp. [2003] podają, że zawartość antocyjanów ogółem w likierze z owoców mirty zmniejszyła się w ciągu roku o 80%, a monomerów antocyjanów o 90%. Ilość związków polifenolowych z grupy procyanidyn – zmniejszyła się tylko o około 20%, natomiast aktywność antyoksydacyjna wahała się w tym czasie w zakresie 20%. Na zawartość i stabilność aktywnych związków w likierach duży wpływ miały dostęp powietrza oraz mniejszy – światła.

Obecność etanolu wpływa istotnie na przemiany zachodzące podczas dojrzewania i przechowywania napojów alkoholowych, jak wina, nalewki czy napoje typu brendy. Uważa się, że składniki owocowe obecne w środowisku reagują powoli z alkoholem i kwasami organicznymi, tworząc estry, aldehydy oraz acetale [Soleas 1997].

Związki fenolowe ulegają degradacji w różnym stopniu. Przykładowo, według Gliszczynskiej-Świągło i Tyrakowskiej [2003], podczas przechowywania soków jabłkowych zaobserwowano zmniejszanie się zawartości niektórych kwasów fenolowych (chlorogenowego, kawowego), a zwiększanie się zawartości innych (*p*-kumarowego, ferulowego). Inne badania wskazują natomiast na wzrost zawartości kwasu chlorogenowego podczas przechowywania jabłek. Stężenie flawonoli w sokach jabłkowych również ulegało wahaniom – na przykład zawartość kwercetyny była dość wyrównana, ale ilość kemferolu rosła lub malała podczas przechowywania [Napolitano i wsp. 2004, D'Archivio i wsp. 2010].

Jak podają Moyer i wsp. [2001], aktywność przeciwutleniająca produktów owocowych zależy nie tyle od antocyjanów ale bardziej od innych polifenoli, co znalazło potwierdzenie również w niniejszych badaniach. Choi i wsp. [2011] zauważyli, że aktywność wobec rodników DPPH· i stężenie polifenoli ogółem w tradycyjnej przyprawie chińskiej Chenpi (suszona skórka mandarynki) rosła wraz z dłuższym czasem przechowywania oraz podczas wydłużonej obróbki cieplnej. Zaobserwowali, że aktywną i trwałą grupą związków były kwasy fenolowe

podobnie jak w nalewkach badanych w niniejszej pracy. Wyniki innych opracowań wskazują, że aktywność przeciwutleniająca zmniejsza się lub pozostaje bez zmian podczas przechowywania produktów [Piljac-Žegarac i wsp. 2009, Fadda i wsp. 2012, Oliveira i wsp. 2012].

Podczas **przechowywania** nalewek nastąpiło znaczne obniżenie zawartości antocyjanów. Degradacji tych barwników może sprzyjać wiele czynników takich jak obecność tlenu, kwasu askorbinowego, cukrów i produktów ich degradacji oraz enzymów. Na stabilność antocyjanów podczas przetwarzania owoców oddziałują zarówno początkowy ich skład, jak i czynniki zewnętrzne mające wpływ w późniejszym czasie, takie jak temperatura, światło czy środowisko, w którym proces się odbywa [Rubinskiene i wsp. 2005, Sokół-Łętowska i Kucharska 2006, Kopjar i wsp. 2012]. Wielu autorów podaje, że produkty degradacji kwasu askorbinowego, takie jak kwas dehydroaskorbinowy, nadtlenek wodoru czy furfurale, przyspieszają degradację antocyjanów [Boulton 2001, Özkan 2002, González-Molina i wsp. 2009].

Przechowywanie napojów alkoholowych modyfikuje ich barwę. W winach tworzą się pochodne antocyjanów, pyranoantocyjany, produkty kopigmentacji i kondensacji antocyjanów z flawanolami oraz inne związki, często o czerwonej barwie. Antocyjany jako szczególnie nietrwałe barwniki roślinne mogą być skutecznie stabilizowane przez niefenolowe składniki żywności i te zjawiska obserwuje się w winach [Maier i wsp. 2009].

Przeprowadzone analizy umożliwiły identyfikację aktywnych związków w badanych surowcach. W doświadczeniach wykazano, że z owoców czarnej porzeczki, berberysu, tarniny i mahonii otrzymano nalewki bogate w polifenole. Wyznaczono metody przygotowania nalewek najlepiej wpływające na jakość tego produktu.

6. WNIOSKI

Przeprowadzone badania pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Ustalono, że wykorzystane do badań owoce czarnej porzeczki, mahonii, berberysu i tarniny charakteryzowały się wysoką zawartością polifenoli, od 600 do 1000 mg w 100 g oraz aktywnością przeciwutleniającą od 5,2 do 12 mmol TE·100 g⁻¹, wyższą aniżeli większość owoców używanych do sporządzania nalewek. Nalewki z owoców czarnej porzeczki, mahonii, berberysu i tarniny zawierały od 117,7 do 429,0 mg GAE·100 cm⁻³ i mogą być uważane za dobre źródło związków aktywnych biologicznie oraz za produkty o wysokiej aktywności przeciwutleniającej.

2. W owocach berberysu, mahonii i tarniny dominowały pochodne kwasów hydrokscynamonowych. W owocach berberysu i mahonii najwięcej było kwasu chlorogenowego, który w berberysie stanowił około 70% związków fenolowych, a w mahonii prawie 80%. W owocach tarniny kwas neochlorogenowy stanowił około 80% związków fenolowych.

3. W owocach mahonii po raz pierwszy zidentyfikowano i oznaczono pochodne kwasów: protokatechowego, *p*-kumarowego i kawowego, galaktozyd i glukozyd kwercetyny oraz ramnozydy kwercetyny i izoramnetyny.

4. Po raz pierwszy w owocach i nalewkach z berberysu zidentyfikowano estry heksozowe kwasów: 5'hydroksyferulowego, sinapowego i kawowego oraz związki z grupy flawonoli – glukozyd eriodiktiolu, ramnozydy i rutynozydy kwercetyny i kemferolu oraz ramnozo-glukozyd izoramnetyny. Owoce berberysu zawierały także ester metylo-chinowy kwasu kawowego.

5. W owocach i nalewkach z tarniny zidentyfikowano (po raz pierwszy) heksozydy i pentozydy oraz acetyloheksozyd kwercetyny.

6. Owoce i nalewki z berberysu i mahonii nie zawierały w swoim składzie berberyny i jej pochodnych, a w nalewkach z tarniny i mahonii nie stwierdzono obecności amigdaliny – prekursora szkodliwego dla zdrowia kwasu cyjanowodorowego.

7. Wykazano, że jakość nalewek zależy od stężenia etanolu użytego do maceracji owoców. Stężenie alkoholu w nalewkach z dodatkiem 60% roztworu wynosiło przeciętnie 30% i było najbardziej akceptowane przez oceniających. Użycie wyższych stężeń polepszało ekstrakcję polifenoli, ale niekorzystnie zmieniało smak nalewek.

8. Wykazano, że jakość nalewek uzależniona była od czasu maceracji owoców. Po 14-dniowej maceracji owoców nalewki zawierały małe stężenie polifenoli, a wydłużenie czasu ekstrakcji do 56 dni i dłużej powodowało istotne pogorszenie barwy nalewek.

9. Wykazano, że podczas otrzymywania nalewek na początku procesu powinien być dodawany alkohol, który ułatwia ekstrakcję aktywnych związków owoców. Stwierdzono, że dodanie cukru na początku procesu otrzymywania nalewek wpływało bardzo niekorzystnie

na produkt gotowy ze względu na znaczną degradację barwników i związków fenolowych. Szczególnie niekorzystny efekt był widoczny w nalewkach z tarniny i mahonii.

10. Określono, na podstawie badań technologicznych, optymalny sposób przygotowania nalewek. Najlepsze nalewki pod względem składu i cech organoleptycznych można uzyskać po 28-dniowej maceracji owoców 60% roztworem alkoholu.

11. W badaniach przechowalniczych uzyskano informacje o przemianach związków czynnych oraz o pojawieniu się nowych związków, nieobecnych w owocach. W czasie przechowywania przez 60 miesięcy degradacji ulegały w szczególności antocyjany oraz w pewnym stopniu flawonole. Stabilnymi składnikami nalewek były kwasy – pochodne kwasu chlorogenowego; w nalewkach przechowywanych oznaczono również dehydrodimery kwasu chlorogenowego, które są produktami jego degradacji (w berberysie i mahonii) oraz kwasy fenolowe będące produktami degradacji antocyjanów (w berberysie).

12. Podczas przechowywania nalewek wytwarzał się hydroksymetylofurfural, w nalewkach po 12 miesiącach przechowywania oznaczono niewielkie jego ilości, bo od 0,5 do 1,1 mg w 100 cm³, natomiast po 60 miesiącach oznaczono od 2,0 do 15,7 mg w 100 cm³, najwięcej w nalewkach z berberysu.

13. Wyniki badań opisane w niniejszej pracy wskazują na możliwości wykorzystania mało popularnych owoców, takich jak berberys zwyczajny, mahonia i tarnina do wytwarzania nalewek o wysokim potencjale przeciwutleniającym, które dodatkowo charakteryzują się przyjemnym, akceptowalnym smakiem i zapachem oraz charakterystyczną dla nalewek z owoców kolorowych czerwono-brązową barwą.

7. PIŚMIENNICTWO

- Abad-Garcia B., Berrueta L.A., Lopez-Marquez D.M., Crespo-Ferrer I., Gallo B., Vicente F., 2007. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *J. Chromatogr. A*, 1154, 87–96.
- Agbor-Egbe T., Lape Mbome I., 2006. The effects of processing techniques in reducing cyanogen levels during the production of some Cameroonian cassava foods. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 354–363.
- Akbulut M., Calisir S., Marakoglu T., Coklar H., 2009. Some physicochemical and nutritional properties of barberry (*Berberis vulgaris*) fruits. *J. Food Process Eng.*, 32, 497–511.
- Akçay Y.D., Yildirim H.K., Güvenç U., Sözmen E.Y., 2004. The effects of consumption of organic and nonorganic red wine on low-density lipoprotein oxidation and antioxidant capacity in humans. *Nutr. Res.*, 24, 541–554.
- Alamprese C., Pompei C., 2005. Influence of processing variables on some characteristics of nocino liqueur. *Food Chem.*, 92, 203–209.
- Alamprese C., Pompei C., Scaramuzzi F., 2005. Characterization and antioxidant activity of nocino liqueur. *Food Chem.*, 90, 495–502.
- Alcázar A., Jurado J.M., Pablos F., González A.G., Martín M.J., 2006. HPLC determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in alcoholic beverages. *Microchem. J.*, 82, 22–28.
- Alonso A.M., Castro R., Rodriguez M.C., Guilen D.A., Barroso C.G., 2004. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Res. Int.*, 37, 715–721.
- Anonymous, 2007. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission on ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages, *The EFSA Journal*, 1–44.
- Anttonen M.J., Karjalainen R.O., 2006. High-performance liquid chromatography analysis of black currant (*Ribes nigrum* L.) fruit phenolics grown either conventionally or organically. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7530–7538.
- Apte M., Wilson J., Korsten M., 1997. Alcohol related pancreatic damage: Mechanisms and treatment. *Alcohol Health Res. World*, 21, 13–20.
- Arranz S., Chiva-Blanch G., Valderas-Martínez P., Medina-Remón A., Lamuela-Raventós R.M., Estruch R., 2012. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*, 4, 759–781.

- Aruoma O.I., 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res. Fund. Mol. M.*, 523–524, 9–20.
- Assunção M., Santos-Marques M.J., de Freitas V., Carvalho F., Andrade J.P., Lukoyanov N.V., Paula-Barbosa M.M., 2007. Red wine antioxidants protect hippocampal neurons against ethanol-induced damage: a biochemical, morphological and behavioral study. *Neuroscience*, 146, 1581–1592.
- Atala-Zavala J.F., Wang S.Y., Wang C.Y., Gonzales-Aguilar G.A., 2004. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 37, 687–695.
- Barboni T., Venturini N., Paolini J., Desjobert J.-M., Chiaramonti N., Costa J., 2010. Characterisation of volatiles and polyphenols for quality assessment of alcoholic beverages prepared from Corsican *Myrtus communis* berries. *Food Chem.*, 122, 1304–1312.
- Bazykina N.I., Nikolaevskii A.N., Filippenko T.A., Kaloerova V.G., 2002. Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials. *Pharm. Chem. J. USSR*, 36, 100–103.
- Benvenuti S., Pellati F., Melegari M., Bertelli D., 2004. Polyphenols, Anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *J. Food Sci.*, 69, 164–169.
- Benzie I.F.F., Strain J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70–76.
- Bors W., Heller W., Mitchel C., Saran M., 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods. Enzymol.*, 186, 343–355.
- Boulton R., 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 67–87.
- Cacace J.E., Mazza G., 2003. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *J. Food Sci.*, 68, 240–248.
- Caccetta R.A., Croft K.D., Beilin L.J., Puddey I.B., 2000. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect *ex vivo* lipoprotein oxidizability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 67–74.
- Canas S., Casanova V., Belchior P., 2008. Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *J. Food Compos. Anal.*, 21, 626–633.
- Cassidy A., Rimm E.B., O'Reilly E.J., Logroscino G., Kay C., Chiuve S.E., Rexrode K.M., 2012. Dietary flavonoids and risk of stroke in women. *Stroke*, 43, 946–951.
- Castañeda-Olivares F., Pless R.C., González-Jasso E., 2010. Effect of Light and Sweeteners on Color in an Amaretto-Type Liqueur. *J. Food Sci.*, 75, C766–C773.
- Castelli W.P., Gordon T., Hjortland M., Kagan A., Doyle J., Hames C., Hulley S., Zukel W., 1977. Alcohol and blood lipids: the cooperative lipoprotein phenotyping study. *Lancet*, 310, 153–155.
- Cerezo A.B., Tesfaye W., Soria-Díaz M.E., Torija M.J., Mateo E., Garcia-Parrilla M.C., Troncoso A.M., 2010. Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing. *J. Food Compos. Anal.*, 23, 175–184.
- Chew K.K., Ng S.Y., Thoo Y.Y., Khoo M.Z., Wan Aida W.M., Ho C.W., 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *Int. Food Res. J.*, 18, 571–578.

- Cheyrier V., 2005a. Flavonoids in Wine [in:] Flavonoids, CRC Press, 263–318.
- Cheyrier V., 2005b. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81(1), 223S–229S.
- Choi M.Y., Chai C., Park J.H., Lim J., Lee J., Kwon S.W., 2011. Effects of storage period and heat treatment on phenolic compound composition in dried *Citrus* peels (Chenpi) and discrimination of Chenpi with different storage periods through targeted metabolomic study using HPLC-DAD analysis. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 54, 638–645.
- Cordova A.C., Sumpio B.E., 2009. Polyphenols are medicine: Is it time to prescribe red wine for our patients? *Int. J. Angiol.*, 18(3), 111–117.
- Crupi M.L., Costa R., Dugo P., Mondello L., 2007. A comprehensive study on the chemical composition and aromatic characteristic of lemon liquor. *Food Chem.*, 105 (2), 771–783.
- D'Archivio M., Filesi C., Vari R., Scazzocchio B., Masella R., 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 1321–1342.
- de Jong H.J.I., de Goede J., Oude Griep L.M., Geleijnse J.M., 2008. Alcohol consumption and blood lipids in elderly coronary patients. *Metabolism*, 57, 1286–1292.
- de Lorimier A.A., 2000. Alcohol, wine, and health. *Am. J. Surg.*, 180, 357–361.
- Deineka V.I., Chlebnikow V.A., Sorokopudov V.N., Anisimovicz I.P., 2008. Chlorogenovaja kislota plodov i listev niekotorych rastenij semejstwa Berberidaceae. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 1, 57–61.
- Deineka V.I., Grigor'ev.A.M., Staroverov V.M., Borzenko O.N., 2003. Incremental approach to HPLC analysis of anthocyanins. *Chem. Nat. Comp.*, 39, 401–402.
- Di Castelnuovo A., Costanzo S., Bagnardi V., Donati M., Iacoviello L. de Gaetano G., 2006. Alcohol dosing and total mortality in men and women: An updated meta-analysis of 34 prospective studies. *Arch. Intern. Medicine*, 166, 2437–2445.
- Douglas B.M., 2002. Colour in food, improving quality. Woodhead Publ., Cambridge.
- Dragovic-Uzelac V., Levaj B., Bursac D., Pedisic S., Radojic I., Biško A., 2007. Total phenolics and antioxidant capacity assays of selected fruits. *Agric. Conspec. Sci.*, 72, 279–284.
- Dyrektywa Rady 2001/110/WE z dnia 20 grudnia 2001 r. odnosząca się do miodu, *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*, L 010, 12/01/2002, 47–52.
- Egea I., Sanchez-Bel P., Romojaro F., Pretel M.T., 2010. Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 65, 121–129.
- Epstain M., 1997. Alcohol's impact on kidney function. *Alcohol Health Res. World*, 21 (1), 84–92.
- Fadda C., Del Caro A., Sanguinetti A.M., Urgoghe P.P., Vacca V., Arca P.P., Piga A., 2012. Changes during storage of quality parameters and in vitro antioxidant activity of extra virgin monovarietal oils obtained with two extraction technologies. *Food Chem.*, 134, 1542–1548.
- Flamini R., Traldi P., 2010. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey.
- Floegel A., Kim D.O., Chung S.J., Koo S.I., Chun O.K., 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.*, 24, 1043–1048.
- Francis J.K., 2003. Plants For a Future: *Mahonia aquifolium*. http://www.ibiblio.org/pfaf/cgi-bin/arr_html?Mahonia+aquifolium.

- Frankel E., Waterhouse A.L., Teissedre P., 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 890–894.
- Fraternal D., Giamperi L., Bucchini A., Ricci D., 2009. Antioxidant activity of *Prunus spinosa* L. fruit juice. *Ital. J. Food Sci.*, 21, 337–346.
- Fukumoto L.R., Mazza G., 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3597–3604.
- Fuleki T., Francis F.J., 1968. Quantitative Methods for Anthocyanins. *J. Food Sci.*, 33, 266–274.
- Gao X., Ohlander M., Jeppsson N., Björk L., Trajkovski V., 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1485–1490.
- Gates P.J., Lopes N.P., 2012. Characterisation of flavonoid aglycones by negative ion chip-based nanospray tandem mass spectrometry. *Int. J. Anal. Chem.*, 2012, 1–7.
- Gavrilova V., Kajdžanoska M., Gjamovski V., Stefova M., 2011. Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC–DAD–ESI–MSn. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 4009–4018.
- Gaziano J.M., Gaziano T.A., Glynn R.J., Sesso H.D., Ajani U.A., Stampfer M.J., Manson J.E., Buring J.E., Hennekens C.H., 2000. Light-to-moderate alcohol consumption and mortality in the physicians' health study enrollment cohort. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 35, 96–105.
- Gaziano J.M., Hennekens C.H., Godfried S.L., Sesso H.D., Glynn R.J., Breslow J.L., Buring J.E., 1999. Type of alcoholic beverage and risk of myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, 83, 52–57.
- Gliszczynska-Świągło A., Tyrakowska B., 2003. Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity. *J. Food Sci.*, 68, 1844–1849.
- Goldberg D.M., Karumanchiri A., Tsang E., Soleas G.J., 1998. Catechin and epicatechin concentrations of red wines: regional and cultivar-related differences. *Am. J. Enol.*, 49, 317–322.
- Goldberg D.M., Yan J., Ng E., Diamandis E.P., Karumanchiri A., Soleas G., Waterhouse A.L., 1995. A global survey of trans-resveratrol concentrations in commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 159–165.
- Gómez E., Burgos L., Soriano C., Marín J., 1998. Amygdalin content in the seeds of several apricot cultivars. *J. Sci. Food Agric.*, 77, 184–186.
- González-Molina E., Moreno D.A., García-Viguera C., 2009. A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chem.*, 115, 1364–1372.
- Gorinstein S., M.R., Weisz M., Hilevitz J., Tilis K., Feintuch D., Bavli D., Amram D., 1993. Effect of processing variables on the characteristics of persimmon liqueur. *Food Chem.*, 46, 183–188.
- Grochowski W., 1986. *Jadalne owoce leśne*. PWRiL, Warszawa.
- Grotewold E., 2006. *The Science of Flavonoids*. Springer, New York, USA.
- Grycova L., Dostal J., Marek R., 2007. Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, 68, 150–175.

- Guyot S., Bernillon S., Poupard P., Renard C., 2008. Multiplicity of phenolic oxidation products in apple juices and ciders, from synthetic medium to commercial products [in:] Recent Advances in Polyphenol Research, Vol. 1, Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
- Halvorsen B.L., Holte K., Myhrstad M.C.W., Barikmo I., Hvattum E., Remberg S.F., Wold A.-B., Haffner K., Baugerød H., Andersen L.F., Moskaug Ø., Jacobs D.R., Blomhoff R., 2002. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J. Nutr.*, 132, 461–471.
- He Q., Luo Y., Chen P., 2008. Elucidation of the mechanism of enzymatic browning inhibition by sodium chlorite. *Food Chem.*, 110, 847–851.
- Heinonen I.M., Lehtonen P.J., Hopia A.I., 1998. Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liqueurs. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 25–31.
- Herter S., Schmidt M., Thompson M., Mikolasch A., Schauer F., 2011. Study of enzymatic properties of phenol oxidase from nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum*. *AMB Express*, 1, 14.
- Holahan C.J., Schutte K.K., Brennan P.L., North R.J., Holahan C.K., Moos B.S., Moos R.H., 2012. Wine consumption and 20-year mortality among late-life moderate drinkers. *Journal of studies on alcohol and drugs*, 73, 80–88.
- Hong E., Kim G.H., 2010. Comparison of extraction conditions for phenolic, flavonoid content and determination of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 45, 1353–1359.
- Hurst W.J., Payne M.J., Miller K.B., Stuart D.A., 2009. Stability of cocoa antioxidants and flavan-3-ols over time. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 9547–9550.
- Hvattum E., Ekeberg D., 2003. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 38, 43–49.
- Hyötyläinen T., Kivilampolo M., 2010. Application of HPLC in the Analysis of Phenols, Phenolic Acids, and Tannins [in:] High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis, CRC Press. Boca Raton.
- Iijima Y., Nakamura Y., Ogata Y., Tanaka K.I., Sakurai N., Suda K., Suzuki T., Suzuki H., Okazaki K., Kitayama M., Kanaya S., Aoki K., Shibata D., 2008. Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *The Plant J.*, 54, 949–962.
- Imanshahidi M., Hosseinzadeh H., 2008. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytother. Res.*, 22, 999–1012.
- Imark C., Kneubühl M., Bodmer S., 2000. Occurrence and activity of natural antioxidants in herbal spirits. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 1, 239–243.
- Jakobek L., Š.M., Medvidovic-Kosanowic M, Novak I., 2007. Antioxidant Activity and Polyphenols of Aronia in Comparison to other Berry Species. *Agric. Conspec. Sci.*, 72, 301–306.
- Jakopic J., Colaric M., Veberic R., Hudina M., Solar A., Stampar F., 2007. How much do cultivar and preparation time influence on phenolic content in walnut liqueur? *Food Chem.*, 104, 100–105.
- Janick J., Paull R.E., 2008. *The Encyclopedia of Fruit & Nuts*. Cabi Publishing, Cambridge.
- Johnson M.H., de Mejia G.E., 2012. Comparison of chemical composition and antioxidant capacity of commercially available blueberry and blackberry wines in Illinois. *J. Food Sci.*, 77, 141–148.

- Kelebek H., Canbas A., Selli S., Saucier C., Jourdes, M., Glories Y., 2006. Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs. Boğazkere and Öküzgözü. *J. Food Eng.*, 77, 1012–1017.
- Khoo G.M., Clausen M.R., Pedersen H.L., Larsen E., 2012. Bioactivity and chemical composition of blackcurrant (*Ribes nigrum*) cultivars with and without pesticide treatment. *Food Chem.*, 132, 1214–1220.
- Kim S.H., Abbasi F., Lamendola C., Reaven G.M., 2009. Effect of moderate alcoholic beverage consumption on insulin sensitivity in insulin-resistant, nondiabetic individuals. *Metabolism*, 58, 387–392.
- Kopjar M., Jaksic, K., Pilizota, V., 2012. Influence of sugars and chlorogenic acid addition on anthocyanin content, antioxidant activity and color of blackberry juice during storage. *J. Food Process Pres* (in press).
- Krafft C., Cervellati C., Paetz C., Schneider B., Popp J., 2012. Distribution of amygdalin in apricot (*Prunus armeniaca*) seeds studied by Raman microscopic imaging. *Applied Spectrosc.*, 66(6), 644–649.
- Kucharska A.Z., Sokół-Łętowska A., Nawirska-Olszańska A., 2009a. Estimation of chemical composition and colour of cornelian cherry compotes [in:] *Food Quality and Safety*, Wyd. UP, Wrocław.
- Kucharska A.Z., Sokół-Łętowska A., Przybylik-Demonchaux A., Nawirska-Olszańska A., 2009b. Antioxidant activity of rose liqueurs [in:] *Food Quality and Safety*, Wyd. UP, Wrocław.
- Kucharska A.Z., Sokół-Łętowska A., Hudko J., Nawirska A., 2007. Influence of the preparation procedure on the antioxidant activity and color of liqueurs from cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 57, 343–347.
- Laaksonen O., Sandell M., Nordlund E., Heiniö R.L., Malinen H.L., Jaakkola M., Kallio H., 2012. The effect of enzymatic treatment on blackcurrant (*Ribes nigrum*) juice flavour and its stability. *Food Chem.*, 130, 31–41.
- Lamer-Zarawska E., Kowal-Gierczak B., Niedworok J., 2007. *Fitoterapia i leki roślinne*. PZWŁ, Warszawa.
- Lamuela-Raventos R., Waterhouse A., 1993. Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 521–523.
- Laranjinha J., 2002. Caffeic acid and related antioxidant compounds: biochemical and cellular effects [in:] *Handbook of Antioxidants.*, Marcel Dekker, New York.
- Leja M., Mareczek A., Nanaszko B., 2007. Antyoksydacyjne właściwości owoców wybranych gatunków dziko rosnących drzew i krzewów. *Rocz. Akad. Rol. Pozn., Ogr.*, CCCLXXXIII, 327–331.
- Lerici C.R., Manzocco L., 2000. Biological activity of ethanol in relation to its vapour pressure. Note 1 : inactivation of polyphenoloxidase in model systems. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 33, 564–569.
- Lewis C.E., Walker J.R.L., Lancaster J.E., 1995. Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. *Food Chem.*, 54, 315–319.
- Li W., Beta T., 2011. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of anthograin liqueur. *Food Chem.*, 127, 968–975.
- Lin L., Harnly J.M., 2008. LC-MS profiling and quantification of food phenolic components using a standard analytical approach for all plants [in:] *Food Science and Technology: New Research*, Nova Science Publishers, New York.

- Lin Y.T., Vatter D., Labbe R.G., Shetty K., 2005. Enhancement of antioxidant activity and inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic phytochemical-enriched alcoholic beverages. *Process Biochem.*, 40, 2059–2065.
- Liu S.C., Chang H.M., Wu J.S.B., 2003. A study on the mechanism of browning in mei liqueur using model solutions. *Food Res. Int.*, 36, 579–585.
- Lu Y., Foo L.Y., 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.*, 68, 81–85.
- Ma C., Xiao S.Y., Li Z.-G., Wang W., Du L.J., 2007. Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1165, 39–44.
- Määttä K.R., Kamal-Eldin A., Törrönen A.R., 2003. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: *Ribes* species. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6736–6744.
- Macheix J.-J., Fleuriot A., Billot J., 1990. *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Maier T., Fromm M., Schieber A., Kammerer D., Carle R., 2009. Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts. *Eur. Food Res. Technol.*, 229, 949–960.
- Makarov V., Shinkarenko A., Litvinenko V., Kovalev I., 1969. Flavonoid diglycosides of *Prunus spinosa*. *Chem. Nat. Comp.*, 5, 287–288.
- Mann L.B., Folts J.D., 2004. Effects of ethanol and other constituents of alcoholic beverages on coronary heart disease: a review. *Pathophysiology* 10, 105–112.
- Manzocco L., Calligaris S., Mastrocola D., Nicoli M.C., Lerici C.R., 2000. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci. Tech.*, 11, 340–346.
- Markowski J., Plochanski W., 2003. Przydatność porzeczek czarnych i agrestu do przetworstwa. *Hasło Ogrodnicze*, 10.
- Markus C.R., Sierksma A., Verbeek C., van Rooijen J.J.M., Patel H.J., Brand A.N., Hendriks H.F.J., 2004. Moderate whisky consumption in combination with an evening meal reduces tryptophan availability to the brain but does not influence performance in healthy volunteers. *Brit. J. Nutr.*, 92, 995–1000.
- Maxwell S.R.J., 1997. Wine antioxidants and their impact on antioxidant function *in vivo* [in:] *Wine-nutritional and therapeutic benefits*. Am. Chem. Soc., Washington.
- McDonald M.S., Hughes M., Burns J., Lean M.E., Matthews D., Crozier A., 1998. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 368–375.
- Moldovan B., David L., Chişbora C., Cimpoiu C., 2012. Degradation kinetics of anthocyanins from european cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts. effects of temperature, pH and storage solvent. *Molecules*, 17, 11655–11666.
- Montoro P., Tuberoso C.I., Piacente S., Perrone A., De Feo V., Cabras P., Pizza C., 2006a. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 41, 1614–1619.
- Montoro P., Tuberoso C.I.G., Perrone A., Piacente S., Cabras P., Pizza C., 2006b. Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of antho-

- cyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J. Chromatogr. A*, 1112, 232–240.
- Morales F., Jiménez-Pérez S., 2004. Peroxyl radical scavenging activity of melanoidins in aqueous systems. *Eur. Food Res. Technol.*, 218, 515–520.
- Moridani M.Y., Scobie H., Jamshidzadeh A., Salehi P., O'Brien P.J., 2001. Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. *Drug Metab. Dispos.*, 29, 1432–1439.
- Moyer R.A., Hummer K.E., Finn C.E., Frei B., Wrolstad R.E., 2001. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 519–525.
- Mullen W., Stewart A.J., Lean M.E.J., Gardner P., Duthie G.G., Crozier A., 2002. Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5197–5201.
- Napolitano A., Cascone A., Graziani G., Ferracane R., Scalfi L., Di Vaio C., Ritieni A., Fogliano V., 2004. Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6526–6531.
- Netzel M., Strass G., Bitsch I., Koenitz R., Christmann M., Bitsch R., 2003. Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. *J. Food Eng.*, 56, 223–228.
- Nikkhah E., Khayami M.R., Heidari R., Jamee R., 2007. Effect of sugar treatment on stability of anthocyanin pigments in berries. *Journal of Biological Sciences*, 7, 1412–1417.
- Oliveira A., Pintado M., Almeida D.P.F., 2012. Phytochemical composition and antioxidant activity of peach as affected by pasteurization and storage duration. *LWT – Food Sci. Technol.*, 49, 202–207.
- Olszewska M., Wolbiś M., 2001. Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.*, 58, 367–372.
- Olszewska M., Wolbiś M., 2002. Further flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.*, 59, 133–137.
- Oluwole O., Onabolu A., 2003. Cyanogenic compounds in cassava and exposure to cyanide [in:] *Reviews in Food and Nutrition Toxicity*, CRC Press, London.
- Osman A., El Agha A., Makris D., Kefalas P., 2012. Chlorogenic acid oxidation by a crude peroxidase preparation: biocatalytic characteristics and oxidation products. *Food and Bioprocess Tech.*, 5, 243–251.
- Ożarowski A., Jaroniewski W., 1987. *Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie*. Inst. Wyd. Zw. Zaw., Warszawa.
- Ożarowski A., 1982. *Ziołolecznictwo poradnik dla lekarzy*. PZWL, Warszawa.
- Özkan M., 2002. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *J. Food Chem.*, 78, 499–504.
- Pace-Asciak C.R., Hahn S., Diamandis E.P., Soleas G., Goldberg D.M., 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta*, 235, 207–219.
- Patras A., Brunton N.P., O'Donnell C., Tiwari B.K., 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci. Technol.*, 21, 3–11.
- Paulovicsova B., Turianica I., Jurikova T., Baloghova M., Matuskovic J., 2009. Antioxidant properties of selected less common fruit species. *Lucrari Stiintifice*, 42, 608–614.

- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.*, 133, 2812–2819.
- Pérez-Jiménez J., Arranz S., Tabernero M., Díaz-Rubio M.E., Serrano J., Goñi I., Saura-Calixto F., 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int.*, 41, 274–285.
- Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F., 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res. Int.*, 39, 791–800.
- Petti S., Scully C., 2006. Association between different alcoholic beverages and leukoplakia among non- to moderate-drinking adults: A matched case-control study. *Eur. J. Cancer*, 42, 521–527.
- Pijanowski E., Mrożewski S., Horubała A., Jarczyk A., 1976. *Technologia produktów owocowych i warzywnych*, tom I, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
- Piljac-Žegarac J., Valek L., Martinez S., Belščak A., 2009. Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chem.*, 113, 394–400.
- PN-90/A-75101/02. Przetwory owocowe i warzywno. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Ekstrakt ogólny.
- PN-90/A-75101/03. Przetwory owocowe i warzywno. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Sucha masa.
- PN-90/A-75101/04. Przetwory owocowe i warzywno. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Kwasowość ogólna.
- PN-90/A-75101.07. Przetwory owocowe i warzywno. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości cukrów i ekstraktu bezcukrowego.
- PN-A-04019: 1998. Produkty spożywcze – Oznaczanie zawartości witaminy C.
- Prigent S.V.E., Voragen A.G.J., Li F., Visser A.J.W.G., van Koningsveld G.A., Gruppen H., 2008. Covalent interactions between amino acid side chains and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *J. Sci. Food Agric.*, 88, 1748–1754.
- Rackova L., Obložinský M., Kostalova D., Kettmann V., Bezakova L., 2007. Free radical scavenging activity and lipoxygenase inhibition of *Mahonia aquifolium* extract and isoquinoline alkaloids. *J. Inflamm.*, 4, 15.
- Rada-Mendoza M., Olano A., Villamiel M., 2002. Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chem.*, 79, 513–516.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.*, 26, 1231–1237.
- Reuter J., Wölflle U., Weckesser S., Schempp C., 2010. Which plant for which skin disease? Part 1: Atopic dermatitis, psoriasis, acne, condyloma and herpes simplex. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 8, 788–796.
- Rice-Evans C.A., Packer L., 2003. *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker., New York.
- Riihinen K., 2005. Phenolic compounds in berries. Doctoral dissertation. *C. Nat. and Environ. Sci.*, 187, 1–97.

- Ronksley P.E., Brien S.E., Turner B.J., Mukamal K.J., Ghali W.A., 2011. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ* 342, 1–13.
- Roche M., Dufour C., Mora N., Dangles O., 2005. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Org. Biomol. Chem.*, 3, 423–430.
- Rodrigo R., Rivera G., Orellana M., Araya J., Bosco C., 2002. Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. *Life Sci.*, 71, 2881–2895.
- Rødtjer A., Skibsted L., Andersen M., 2006. Identification and quantification of phenolics in aromatic bitter and cherry liqueur by HPLC with electrochemical detection. *Eur. Food Res. Technol.*, 223, 663–668.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 110/2008 z dnia 15 stycznia 2008 r. w sprawie definicji, opisu, prezentacji, etykietowania i ochrony oznaczeń geograficznych napojów spirytusowych.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1334/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie środków aromatyzujących i niektórych składników żywności o właściwościach aromatyzujących do użycia w oraz na środkach spożywczych.
- Rozporządzenie Rady (EWG) nr 1576/89 z dnia 29 maja 1989 r. ustanawiające ogólne zasady definicji, opisu i prezentacji napojów spirytusowych.
- Rubinskiene M., Viskelis P., Jasutiene I., Viskeliene R., Bobinas C., 2005. Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Res. Int.*, 38, 867–871.
- Rupasinghe H.P.V., Clegg S., 2007. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *J. Food Compos. Anal.*, 20, 133–137.
- Sadilova E., Stintzing F.C., Carle R., 2006. Thermal Degradation of Acylated and Nonacylated Anthocyanins. *J. Food Sci.*, 71, C504–C512.
- Schilling S., Sigolotto C.-I., Carle R., Schieber A., 2008. Characterization of covalent addition products of chlorogenic acid quinone with amino acid derivatives in model systems and apple juice by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 22, 441–448.
- Schwarz M., Rodríguez M.C., Martínez C., Bosquet V., Guillén D., Barroso C.G., 2009. Antioxidant activity of Brandy de Jerez and other aged distillates, and correlation with their polyphenolic content. *Food Chem.*, 116 29–33.
- Sefer F., Misirli A., Gülcan R., 2006. A research on phenolic and cyanogenic compounds in sweet and bitter kernelled apricot varieties. *Acta Hort. (ISHS)* 701, 167–170.
- Shahidi F., Naczki M., 2003. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press. Boca Raton.
- Shen S.C., Tseng K.C., Chao F.T., Wu J.S.B., 2007. Color quality of rose liqueur. *J. Food Quality*, 30, 202–217.
- Shen S.C., Wu J.S.B., 2004. Maillard browning in ethanolic solution. *J. Food Sci.*, 69, 273–279.
- Simirgiotis M.J., Caligari P.D.S., Schmeda-Hirschmann G., 2009. Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Food Chem.*, 115, 775–784.

- Sójka M., Guyot S., Kołodziejczyk K., Król B., Baron A., 2009. Composition and properties of purified phenolics preparations obtained from an extract of industrial blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) pomace. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 100–106.
- Sokół-Łętowska A., 2009. Badania własne. Dane niepublikowane.
- Sokół-Łętowska A., Kucharska A.Z., 2008. Aktywność antyoksydacyjna nalewek z czarnych porzeczek. Monografia: Flawonoidy i ich zastosowanie. Pr. zbiorowa pod red. M. Kopacz i S. Kopacz, Wyd. Politechniki Rzeszowskiej, 168–177.
- Sokół-Łętowska A., Kucharska A.Z., Nawirska-Olszańska A., 2011a. Nalewki aroniowe wzbogacane przyprawami. *Przem. Spoż.*, 65, 42–44.
- Sokół-Łętowska A., Kucharska A.Z., Nawirska-Olszańska A., 2011b. Wpływ dodatku cukru na jakość nalewek wiśniowych podczas przechowywania. *Zeszyty Naukowe. Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*, 205, 126–134.
- Sokół-Łętowska, Kucharska A.Z., 2006. Zmiany barwy, zawartości polifenoli i właściwości przeciwnadrodnikowych soku z czarnej porzeczki podczas przechowywania. *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 1, 24–26.
- Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M., 1997. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal.*, 11, 287–313.
- Sorokopudov V.N., Chlebnikov V.A., Deineka V.I., 2005. Antocyany niektórych roślin se-mejstwa Berberidaceae *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 4, 57–60.
- Spigno G., Tramelli L., De Faveri D.M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.*, 81, 200–208.
- Staško A., Brezová V., Biskupič S., Rapta P., 2007. Antioxidant properties of liqueurs – An EPR study. *J. Food Nutr. Res.*, 46, 145–149.
- Stratil P., Klejdus B., Kubáň V., 2007. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71, 1741–1751.
- Suess T.R., Stermitz F.R., 1981. Alkaloids of *Mahonia repens* with a brief review of previous work in the genus *mahonia*. *J. Nat. Prod.*, 44, 680–687.
- Thakur B.R., Arya S.S., 1989. Studies on stability of blue grape anthocyanins. *International J. Food Sci. Technol.*, 24, 321–326.
- Tomás-Barberán F.A., Espín J.C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 853–876.
- Truong V.D., McFeeters R.F., Thompson R.T., Dean L.L., Shofran B., 2007. Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars in the United States. *J. Food Sci.*, 72, 343–349.
- Tsai P.J., Delva L., Yu T.Y., Huang Y.T., Dufosse L., 2005. Effect of sucrose on the anthocyanin and antioxidant capacity of mulberry extract during high temperature heating. *Food Res. Int.*, 38, 1059–1065.
- Tsai P.J., Huang H.P., 2004. Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. *Food Res. Int.*, 37, 313–318.
- Tseng K.C., Chang H.M., Wu J.S.B., 2006. Degradation kinetics of anthocyanin in ethanolic solutions. *J. Food Process. Pres.*, 30, 503–514.
- Tuncel G., Nout M.J.R., Brimer L. 1998. Degradation of cyanogenic glycosides of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*) by endogenous and added enzymes as affected by heat treatments and particle size. *Food Chem.*, 63, 65–69.

- U.S.D.A. 2010. Dietary Guidelines for Americans, 2010. U.S. Department of Agriculture, U.S. Department of Health and Human Services. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, Washington.
- Vacca V., Piga A., Del Caro A., Fenu P.A.M., Agabbio M., 2003. Changes in phenolic compounds, colour and antioxidant activity in industrial red myrtle liqueurs during storage. *Nahrung*, 47, 442–447.
- Varming C., Andersen M.L., Poll L., 2004. Influence of thermal treatment on black currant (*Ribes nigrum* L.) juice aroma. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7628–7636.
- Vereskovskii V., Shapiro D., 1985. Chromatographic investigation of the anthocyanin pigments of the fruit of some species of barberry. *Chem. Nat. Comp.*, 21, 536–537.
- Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Moyá M.L., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C., 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71, 230–235.
- Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C., 2006. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chem.*, 95, 394–404.
- Voldrich M., Kyzlink V., 1992. Cyanogenesis in canned stone fruits. *J. Food Sci.*, 57, 161–162.
- Wang Z., Zou J., Cao K., Hsieh T.C., Huang Y., Wu J.M., 2005. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int. J. Mol. Med.*, 16, 533–40.
- Watson J.T., Sparkman O.D., 2007. Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation. John Wiley and Sons. Chichester.
- Woodward G., Kroon P., Cassidy A., Kay C., 2009. Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 5271–5278.
- Wrolstad R.E., Skrede G.L., Lea P., Enersen G., 1990. Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. *J. Food Sci.*, 55, 1064–1065, 1072.
- Xu P., Bao J., Gao J., Zhou T., Wang Y., 2012. Optimization of extraction of phenolic antioxidants from tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel biomass using response surface methodology. *BioResources*, 7, 2431–2443.
- Yen G.-C., Chen H.Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 27–32.
- Yilmaz Y., Toledo R.T., 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 41–44.
- Zafrilla P., Morillas J., Mulero J., Cayuela J.M., Martínez-Cachá A., Pardo F., López Nicolás J.M., 2003. Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4694–4700.
- Zeng X., Dong Y., Sheng G., Dong X., Sun X., Fu J., 2006. Isolation and structure determination of anti-influenza component from *Mahonia bealei*. *J. Ethnopharmacol.*, 108, 317–319.
- Zovko Končić M., Kremer D., Karlović K., Kosalec I., 2010. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 2176–2180.

IDENTYFIKACJA I PRZEMIANY ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH NALEWEK Z WYBRANYCH OWOCÓW

Streszczenie

W dawnej Polsce tradycyjnie nalewki wykonywano z wielu surowców roślinnych zarówno zielarskich, jak i owocowych. Początkowo w medycynie ludowej traktowane były jako środek leczniczy i wspomagający leczenie. W czasach późniejszych, ze względu na walory organoleptyczne, nalewki owocowe były popularnym napojem alkoholowym, który stanowił specjalność domu lub też, dzięki intensywnemu smakowi i zapachowi, pozwalał ukryć złą jakość alkoholu. Dzisiaj wiadomo, że lecznicze działanie nalewek wiązało się między innymi z obecnością w nich związków fenolowych, które są cennym składnikiem diety. Najnowsze zalecenia żywieniowe dopuszczają spożycie niewielkiej porcji napojów alkoholowych. Nalewki owocowe mogą w polskich warunkach klimatycznych stanowić atrakcyjny produkt o właściwościach biologicznych podobnych do walorów wina, ale o spektrum smaków i zapachów o wiele bogatszym.

Krajowe surowce, takie jak na przykład czarna porzeczka (*Ribes nigrum* L.) są bogatym źródłem związków fenolowych, które decydują o wysokiej aktywności przeciwutleniającej tego owocu. W poszukiwaniu nowych, bogatych w związki fenolowe surowców ważną rolę odgrywają owoce mniej popularne oraz mało znane, a więc rzadko dotychczas wykorzystywane.

Celem pracy była identyfikacja, analiza ilościowa i określenie stabilności związków fenolowych, a także zbadanie aktywności przeciwutleniającej nalewek owocowych otrzymanych z owoców czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.), tarniny (*Prunus spinosa* L.), berberysu (*Berberis vulgaris* L.) i mahonii (*Mahonia aquifolia* (Pursch.) Nutt) oraz udoskonalenie technologii ich przygotowania.

W badaniach wykazano, że wybrane surowce są zasobne w polifenole, a zwłaszcza w pochodne kwasu kawoilochinowego, które stanowiły ponad 70% związków fenolowych zawartych w surowcach i charakteryzowały się dużą stabilnością w czasie przechowywania gotowych produktów.

W ekstraktach i nalewkach z owoców mahonii zidentyfikowano po raz pierwszy pochodne kwasów protokatechowego, *p*-kumarowego i kawowego, galaktozyd i glukozyd kwercetyny oraz ramnozydy kwercetyny i izoramnetyny. W owocach i nalewkach z berberysu, także po raz pierwszy, zidentyfikowano estry heksozowe następujących kwasów: 5'-hydroksyferulowego, sinapowego, i kawowego oraz związki z grupy flawonoli – glukozyd eriodiktiolu, ramnozydy i rutynozydy kwercetyny i kemferolu, a także ramnozo-glukozyd izoramnetyny. Ekstrakt z owoców berberysu zawierał również ester metylo-chinowy kwasu kawowego. W owocach i nalewkach z tarniny zidentyfikowano (po raz pierwszy) heksozydy i pentozydy

oraz acetyloheksozyd kwercetyny. Badania nad identyfikacją tych aktywnych biologicznie związków przeprowadzono metodami chromatograficznymi i spektroskopii mas ESI-MS/MS.

Wykazano w badaniach, że moc etanolu użytego do ekstrakcji owoców porzeczki i mahonii istotnie oddziaływała na jakość produktu, a mianowicie wraz ze wzrostem stężenia etanolu polepszała się skuteczność ekstrakcji polifenoli z owoców, natomiast równocześnie następowało pogorszenie smaku nalewek. Wykazano, że czas maceracji owoców w roztworze powinien wynosić co najmniej 28 dni. W procesie, który łącznie trwał dłużej aniżeli 8 tygodni, następowała częściowa degradacja związków fenolowych, a otrzymane produkty charakteryzowały się gorszą barwą.

W przeprowadzonych doświadczeniach udowodniono, że zastosowanie niewielkich modyfikacji w technologii otrzymywania nalewek, polegających na kolejności dodawania alkoholu i cukru, w istotny sposób może zmieniać jakość gotowego produktu. Najmniej korzystnym wariantem był ten, w którym w pierwszym etapie owoce mieszano z cukrem i pozostawiano przez kilka dni. W tym czasie, wskutek działania enzymów własnych surowca, następowała znaczna degradacja polifenoli, co bezpośrednio przekładało się na jakość nalewek. Roztwór etanolu dodany do owoców na początku procesu prawdopodobnie powodował inaktywację enzymów i polepszał ekstrakcję. Stwierdzono, że cukier najlepiej jest dodawać po przeprowadzeniu wstępnej, trwającej przez około 4 tygodni, ekstrakcji alkoholem.

Mahonia i berberys to rośliny, których liście i korzenie zawierają alkaloid berberynę i jej pochodne, mogące kumulować się w organizmie. Wykazano, że owoce nie zawierają tych związków, nie oznaczono ich również w nalewkach z owoców mahonii i berberysu. W owocach mahonii i tarniny oznaczono natomiast obecność glikozydu cyjanogennego – amigdaliny. Badane w niniejszej pracy nalewki nie zawierały jednak tego związku. Wysoka kwasowość owoców sprzyjała rozkładowi cyjanogenów. Podczas trwającej kilka tygodni ekstrakcji owoców wydzielony z amigdaliny kwas cyjanowodorowy, jako związek lotny, prawdopodobnie uwolnił się do otoczenia. W trakcie długotrwałego przechowywania nalewek wytwarzał się hydroksymetylofurfural. Znaczące jego stężenia zawierały nalewki przechowywane 60 miesięcy (od 2 mg w 100 cm³ w nalewkach z tarniny do prawie 16 mg w 100 cm³ w nalewkach z berberysu).

Przedstawione wyniki doświadczeń potwierdziły tezę, że wybrane do badań owoce są zasobne w związki fenolowe i mogą stanowić cenny surowiec do wytwarzania nalewek o wysokim potencjale przeciwutleniającym, który utrzymuje się również podczas długiego przechowywania produktu. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zaproponowano metodę wytwarzania nalewek, sprzyjającą ekstrakcji z owoców aktywnych związków, co pozwala na otrzymanie atrakcyjnych produktów.

Słowa kluczowe: Czarna porzeczka (*Ribes nigrum* L.), mahonia (*Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt), berberys (*Berberis vulgaris* L), tarnina (*Prunus spinosa* L.), związki fenolowe, nalewki, HPLC, ESI-MS/MS

IDENTIFICATION AND TRANSFORMATIONS OF PHENOLIC COMPOUNDS IN THE LIQUEURS MADE FROM SELECTED FRUITS

Summary

In old Poland, liqueurs were traditionally made from many plant materials, both herbal and fruit. Initially, in folk medicine they were treated as a therapeutic agent, supporting the treatment. In later times, due to their organoleptic values (features), fruit liqueurs became a popular alcoholic beverage, which was the specialty of the house. Sometimes, because of their intensive taste and flavor it allowed to hide the poor quality of alcohol. Today, it is known that the therapeutic effects of liqueurs are associated with the presence of phenolic compounds, which are valuable components of the diet. Recent dietary recommendations permit for small portion of alcoholic beverages. Fruit liqueurs are in the Polish climatic conditions an attractive product with properties similar to the values of wine, but with much richer range of tastes and smells.

The Polish domestic fruits, such as blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) are a rich source of phenolic compounds, which determine the high antioxidant activity of the fruit. While searching new fruits, rich in phenolic compounds an important role play fruits which are less popular, less known and that have been rarely used so far.

The aim of this study was the identification, the quantification and the determination of the stability of phenolic compounds, and the research of the antioxidant activity of liqueurs obtained from such fruits as: black currant (*Ribes nigrum* L.), sloe (*Prunus spinosa* L.), barberry (*Berberis vulgaris* L.) and mahonia (*Mahonia aquifolia* (Pursch.) Nutt) and the improvement of their preparation technology.

The studies have shown that the selected fruits are rich in polyphenols, particularly in caffeoylquinic acid derivatives, which represented more than 70% of the phenolic compounds contained in the raw materials and are characterized by a high stability during the storage of liqueurs.

In the extracts and liqueurs of mahonia fruit, protocatechuic acid, p-coumaric acid and caffeic acid derivatives, galactoside and glucoside of quercetin and quercetin and isorhamnetin rhamnosides were identified for the first time. In the fruits and liqueurs of barberry, hexose esters of the following acids: 5'-hydroxyferulic, sinapic, and caffeic and flavonols: eriodictyol glucoside, rhamnoside and rutynoside of quercetin and kaempferol, and rhamnoside-glucoside of isorhamnetin were identified for the first time. The extract from the barberry fruit contained also the methylquinic ester of caffeic acid. In the fruit and liqueurs of sloe, hexosides, pentosides and acetylhexoside of quercetin were identified (for the first time).

Studies on the identification of these biologically active compounds were carried out using chromatographic methods and mass spectrometry ESI-MS/MS.

It has been shown in studies that the concentration of ethanol used for the extraction of blackcurrant and mahonia fruit significantly influenced the quality of the product, namely with increasing the concentration of ethanol, the extraction of polyphenols from the fruit was more efficient, while at the same time organoleptic features of the liqueurs were worse. It has been shown that the time of fruit maceration should be at least 28 days. In the process, which lasted more than eight weeks partial degradation of phenolic compounds was observed, and the resulting products were characterized by a worse color.

During the experiments, it has been proved that the use of small modifications in the technology of liqueurs, involving the sequence of adding alcohol and sugar, may significantly alter the quality of the finished product. The worse variant was that in which during the first stage, the fruits were mixed with sugar and left for several days. At this time, probably by the action of enzymes, significant degradation of polyphenols was observed, which is directly translated into the quality of liqueurs. A solution of ethanol added to the fruit at the beginning of the process caused inactivation of enzymes and improved the efficiency of extraction. It has been found that sugar addition should be done after an initial, lasting for about four weeks, ethanolic solution extraction of fruits.

Leaves and roots of mahonia and berberis plants contain the alkaloid berberine and its derivatives that can be accumulated in the body. It has been shown that the fruits do not contain these compounds, also mahonia and barberry liqueurs did not contain these compounds. In mahonia and sloe fruit cyanogenic glycoside - amygdalin was determined, however liqueurs did not contain this compound. The high acidity of the fruit favored decomposition of cyanogenic compounds. During the extraction of fruit for several weeks, volatile hydrocyanic acid from amygdalin probably was released into the environment. During long-term storage of liqueurs, the hydroxymethylfurfural (HMF) was produced. Significant concentrations was determined in the liqueurs stored for 60 months (ranging from 2 mg in 100 cm³ in the sloe liqueur to almost 16 mg in 100 cm³ in barberry liqueurs).

The experimental results confirmed the hypothesis that selected fruits are rich in phenolic compounds and can be a valuable raw material for the manufacturing of liqueurs with high antioxidant potential that is stable even during long-term storage of the product. As a result of the experiments, a method for producing liqueurs was proposed, which promotes the extraction of active compounds from the fruit which allows to obtain attractive products.

Key words: Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.), mahonia (*Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt), barberry (*Berberis vulgaris* L.), sloe (*Prunus spinosa* L.), phenolic compounds, liqueurs, HPLC, ESI-MS/MS