

Opracowanie metodyk
METODYKA OZNACZANIA KWASU ASKORBINOWEGO,
KWASU JABŁKOWEGO I KWASU CYTRYNOWEGO
W JABŁKACH, GRUSZKACH I BRZOSKWINIACH

Autorzy:

dr inż. Monika Mieszczakowska-Frać

dr inż. Jarosław Markowski

mgr inż. Aneta Matulska

dr inż. Krzysztof P. Rutkowski

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 3.5**

„Rozwój innowacyjnych technologii przechowywania i wykorzystania owoców i warzyw”

Programu Wieloletniego:

„Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodnictwa w celu zapewnienia
wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodnictwa oraz zachowania
bioróżnorodności środowiska i ochrony jego zasobów”
finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Skierniewice 2015

Spis treści

1. Wstęp	3.
2. Cel zadania.....	3.
3. Metodyka oznaczania kwasów organicznych	3.
3.1. Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy	3.
3.2. Analiza chromatograficzna (HPLC)	4.
4. Walidacja metody chromatograficznej	5.
5. Wnioski	7.
6. Literatura.....	7.

1. Wstęp

Według danych GUS w 2014 roku konsumpcja owoców świeżych w Polsce wynosiła niecałe 28 kg na osobę (bez owoców południowych). Połowa z tego przypada na jabłka, które w handlu dostępne są praktycznie przez cały rok. Konsumenci chętnie sięgają po owoce innych gatunków (bardziej sezonowe) w tym gruszki i brzoskwinie, pod warunkiem że są wysokiej jakości. Ważne jest dla nich aby spożywane owoce stanowiły wartościowe źródło bioaktywnych składników niezależnie od tego czy trafią do sprzedaży bezpośrednio po zbiorach, czy też po przechowywaniu. Jabłka, brzoskwinie i gruszki zawierają wiele cennych składników bioaktywnych, między innymi kwas askorbinowy (inaczej witamina C), jabłkowy i cytrynowy. Pomimo, że nie są to szczególnie bogate źródła zwłaszcza kwasu askorbinowego, ich obecność w diecie zapewnia systematyczne uzupełnianie składników bioaktywnych.

Kwas askorbinowy dzięki właściwościom przeciwutleniającym wpływa na prawidłowe funkcjonowanie ludzkiego organizmu, przede wszystkim przez podnoszenie odporności i działanie przeciwinfekcyjne. Pełni on również bardzo ważną rolę dla ograniczania chorób fizjologicznych jabłek, gruszek i brzoskwiń, a tym samym sprzyja ograniczeniu niekorzystnych zmian jakościowych owoców jak i strat przechowalniczych. Niestety, zawartość wszystkich wymienionych kwasów ulega znaczącemu spadkowi podczas przechowywania, dlatego też wprowadzanie innowacyjnych technologii przechowywania pozwalających zachować je jak najdłużej w owocach staje się kluczowym wyzwaniem.

2. Cel zadania

Celem zadania było opracowanie i walidacja metody chromatograficznej oznaczania bioaktywnych składników tj. kwasu askorbinowego, kwasu jabłkowego i kwasu cytrynowego w jabłkach, gruszkach i brzoskwiniach.

3. Metodyka oznaczania kwasów organicznych

3.1. Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce zostały rozdrobnione w stanie zamrożonym w malakserze z użyciem suchego lodu (stały ditlenek węgla). Następnie 5 g rozdrobnionych owoców homogenizowano przez 2 minuty w 50 ml kwasu metafosforowego, następnie sączono na sączku jakościowym i filtrowano przez filtr nylonowy 0,45 μ m. Przeprowadzono ekstrakcję analitu z owoców jabłek stosując 3 poziomy stężenia roztworu kwasu metafosforowego: 3%, 6% i 10%. Doświadczenie przeprowadzono na dwóch odmianach jabłek różniących się zawartością kwasów: 'Szampion' i 'Alex Red' oraz jednej odmianie brzoskwiń ('Redhaven') i jednej odmianie gruszy ('Konferencja'). Przeprowadzono 3 ekstrakcje próbki obydwóch odmian jabłka dla każdego poziomu kwasu metafosforowego. Najniższe wartości analizowanych związków otrzymano po zastosowaniu do ekstrakcji 10% kwasu metafosforowego (Tabela 1). Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości kwasu askorbinowego pomiędzy traktowaniem 3% i 6% roztworu ekstrahującego. Natomiast kwasu

jabłkowego było więcej po zastosowaniu 6% kwasu metafosforowego, jednak w przypadku odmiany 'Alex Red' nie były to statystycznie istotne różnice.

W dalszych badaniach do ekstrakcji kwasów stosowano 6% kwas metafosforowy zarówno dla jabłek, jak i gruszek i brzoskwiń.

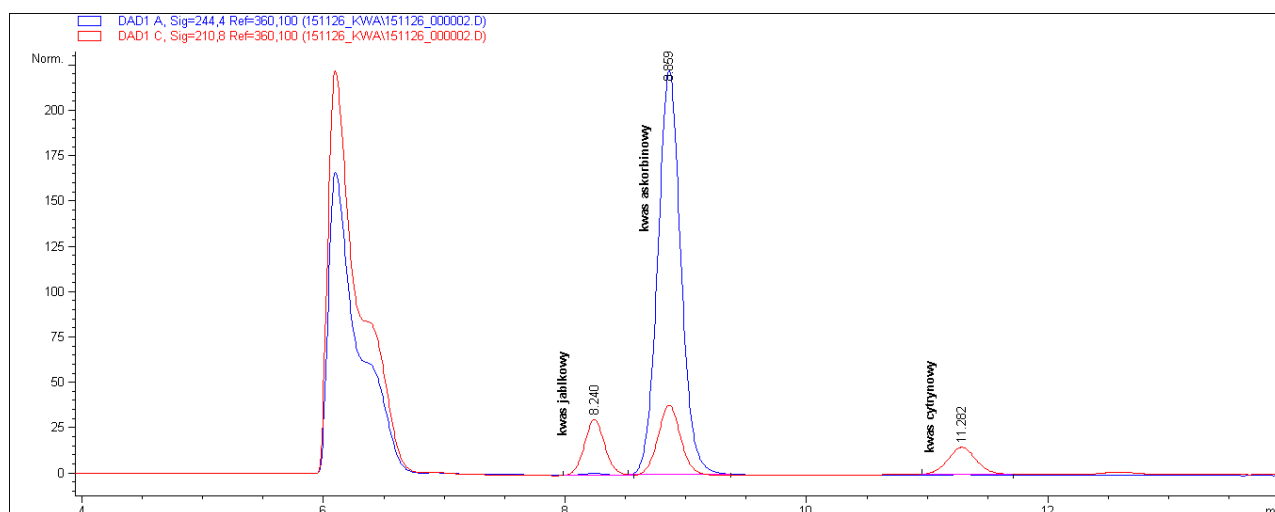
Tabela 1. Wpływ stężenia roztworu ekstrahującego na zawartość (mg/100g) kwasu askorbinowego, jabłkowego i cytrynowego w ekstrakcje z surowca jabłka

Stężenie kwasu metafosforowego	Szampion			Alex Red		
	KA	KJ	KC	KA	KJ	KC
3%	17,3 b	301,3 a	2,34 b	7,94 a	1427,2 a	12,1 a
6%	16,9 b	306,3 b	1,28 a	8,02 a	1447,5 a	12,2 a
10%	15,6 a	300,4 a	1,28 a	7,87 a	1439,4 a	12,5 a

Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w kolumnie nie różnią się istotnie (test HSD Tukeya, $\alpha = 0,05$, $n=3$). Skróty: KA – kwas askorbinowy, KJ – kwas jabłkowy, KC – kwas cytrynowy.

3.2 Analiza chromatograficzna (HPLC)

Rozdział prowadzono wykorzystując dwie kolumny Supelco LC-18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) z prekolumną, połączone szeregowo. Warunki elucji były następujące: 0,8 ml min⁻¹, temperatura 30 °C, długość fali 244 nm (dla kwasu askorbinowego) i 210 nm (dla kwasu jabłkowego i cytrynowego), faza ruchoma to 1% bufor fosforanowy (KH₂PO₄) o pH=2,5 w przepływie izokratycznym. Rysunek 1 przedstawia rozdział analizowanych kwasów wyżej opisaną metodą chromatograficzną.



Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdziału kwasów (jabłkowego, askorbinowego i cytrynowego) na kolumnach Supelco LC-18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) połączonych szeregowo.

4. Walidacja metody chromatograficznej

Wyznaczono następujące parametry walidacji:

Zakres stężeń substancji, w którym metoda daje wyniki badań proporcjonalne do stężenia substancji.

Liniowość czyli wyznaczenie krzywej regresji $y = ax + b$, a do oceny liniowości wykorzystano współczynnik korelacji R_2 , współczynnik ten nie może być mniejszy niż 0,999. Liniowość wyznaczano na 11 poziomach wzorca substancji, a każdy ze wzorców analizowano 3-krotnie.

Granica wykrywalności (LOD) czyli najmniejsza zawartość substancji, którą można wykryć z 95% pewnością statystyczną (wzór 1).

Granica oznaczalności (LOQ) czyli najmniejsze stężenie substancji, które można oznaczyć z dopuszczalną precyzją i dokładnością w ustalonych warunkach badania (wzór 2).

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot \text{Se}/a \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \text{Se}/a \quad (2)$$

Wzory opierają się na odchyleniu standardowym oraz nachyleniu krzywej kalibracji, przedstawiającej zależność odpowiedzi detektora od stężenia analitu.

Precyzja aparatury : 6 -krotne nastrzyknięcie tej samej próbki i wyznaczenie względnego odchylenia standardowego (RSD).

Precyzja metody: 3 ekstrakcje próbki, 2-krotne nastrzyknięcie każdego ekstraktu. Analiza jednego dnia (intra-day), analiza przez 3 kolejne dni w takich samych warunkach (inter-day); parametr wyrażony jako RSD.

Powtarzalność: precyzja wyników uzyskanych w tych samych warunkach pomiarowych, wyliczona w oparciu o RSD (wzór 3).

$$u = \text{RSD}/\text{pierwiastek}(n) \quad (3)$$

Stabilność próbki: 6-krotna analiza tej samej próbki w dniu przygotowania oraz po 24 i 48 godzinach przechowywania w temperaturze pokojowej i w lodówce.

Odzysk: wzbogacenie próbki w standard zewnętrzny na dwóch poziomach 50% i 100%. 3-krotna ekstrakcja na każdym poziomie wzbogacania.

Tabela 2. Zestawienie parametrów walidacji metody chromatograficznej

	kwas askorbinowy	kwas jabłkowy	kwas cytrynowy
zakres stężeń	0,01-10,1 mg/100 ml	0,05-20,0 mg/100 ml	0,3-20 mg/100 ml
liniowość	$y = 0,0012x + 0,0351$	$y = 0,0774x + 0,0527$	$y = 0,0589x + 0,0494$
R^2	0,999	0,999	0,999
LOD	0,1 mg/100 ml	0,1 mg/100 ml	0,1 mg/100 ml
LOQ	0,5 mg/100 ml	0,3 mg/100 ml	0,4 mg/100 ml

Tabela 3. Charakterystyka metody dla jabłek

‘Szampion’	kwas askorbinowy	kwas jabłkowy	kwas cytrynowy
zawartość mg/ 100 g	16,9	306,3	1,28
precyzja aparatury [RSD %]	0,43	1,50	10,65
precyzja metody intra-day [RSD %]	2,09	0,83	6,42
precyzja metody inter-day [RSD %]	2,64	0,91	6,74
powtarzalność [u]	0,85	0,34	2,64
stabilność (48 godz. T-pokojowa)	96,1	102,7	106,4
stabilność (48 godz. w lodówce)	97,2	99,4	94,7
odzysk [%]	98,7	99,7	
odzysk [RSD %]	1,57	0,69	

* Ze względu na niską zawartość kwasu cytrynowego (poniżej LOQ) określenie odzysku jest utrudnione.

Tabela 4. Charakterystyka metody dla jabłek

‘Alex Red’	kwas askorbinowy	kwas jabłkowy	kwas cytrynowy
zawartość mg/ 100 g	8,02	1447,5	12,1
precyzja aparatury [RSD %]	0,26	0,83	2,63
precyzja metody intra-day [RSD %]	1,26	1,66	2,54
precyzja metody inter-day [RSD %]	2,22	0,54	5,91
powtarzalność [u]	0,51	0,68	1,04
stabilność (48 godz. T-pokojowa)	92,5	103,8	95,7
stabilność (48 godz. w lodówce)	97,8	100,4	86,3
odzysk [%]	99,7	101,3	
odzysk [RSD %]	1,02	1,41	

Tabela 5. Charakterystyka metody dla brzoskwiń

‘Redhaven’	kwas askorbinowy*	kwas jabłkowy	kwas cytrynowy
zawartość mg/ 100 g	0,85	309,6	294,8
precyzja aparatury [RSD %]		1,16	1,03
precyzja metody intra-day [RSD %]		1,67	1,70
precyzja metody inter-day [RSD %]		1,40	5,91
powtarzalność [u]		0,68	0,69
stabilność (48 godz. T-pokojowa)		101,6	99,3
stabilność (48 godz. w lodówce)		102,3	102,1
odzysk [%]	90,5	101,6	103,0
odzysk [RSD %]	7,35	1,30	1,60

*Ze względu na śladową zawartość kwasu askorbinowego w badanej odmianie brzoskwini wyznaczono tylko jeden parametr walidacji dla tej matrycy – odzysk, który jest zgodny z wytycznymi AOAC (odzysk dla stężeń analitu poniżej 10 ppm powinien mieścić się w przedziale 80-110%).

Tabela 6. Charakterystyka metody dla gruszek

'Konferencja'	kwas askorbinowy*	kwas jabłkowy	kwas cytrynowy
zawartość mg/ 100 g	0,77	303,9	2,99
precyzja aparatury [RSD %]		1,00	4,66
precyzja metody intra-day [RSD %]		1,45	6,63
precyzja metody inter-day [RSD %]		1,14	11,40
powtarzalność [u]		0,59	2,71
stabilność (48 godz. T-pokojowa)		97,1	123,4
stabilność (48 godz. w lodówce)		100,6	126,9
odzysk [%]	89,1	100,2	99,6
odzysk [RSD %]	6,13	1,95	4,89

*Ze względu na śladową zawartość kwasu askorbinowego w badanej odmianie gruszki wyznaczono tylko jeden parametr walidacji dla tej matrycy – odzysk, który jest zgodny z wytycznymi AOAC (średni odzysk dla stężeń analitu poniżej 10 ppm powinien mieścić się w przedziale 80-110%).

5. Wnioski

- Zastosowana metoda jest przydatna do badań składu kwasów organicznych (jabłkowy i cytrynowy) oraz kwasu askorbinowego w świeżych owocach jabłek, brzoskwiń i gruszek.
- Granica wykrywalności (LOD) tych związków wynosi 0,1 mg/100 ml ekstraktu zaś granica oznaczalności waha się od 0,3 do 0,5 mg/100 ml.

6. Literatura

Strojewska I. (2015). Spożycie owoców, warzyw i ich przetworów w Polsce. Biuletyn Informacyjny ARR Rynek owoców i warzyw. Produkcja, konsumpcja handel zagraniczny. 3. 2-9.

http://www.arr.gov.pl/data/400/biuletyn_informacyjny_arr_3_2015.pdf