



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa
Owoców i Warzyw

METODYKA OZNACZANIA BARWNIKÓW ANTOCYJANOWYCH I KAROTENÓW W OWOCACH BRZOSKWINI METODĄ CHROMATOGRAFICZNĄ

Autorzy:

dr inż. Monika Mieszczakowska-Frać
dr inż. Jarosław Markowski
mgr Aleksandra Połubok
dr inż. Krzysztof Rutkowski

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 3.5**
„Rozwój innowacyjnych technologii przechowywania i wykorzystania owoców i warzyw”

Programu Wieloletniego 2015-2020:
„Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”
finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Skierniewice 2016

Spis treści:

1. Wstęp.....	3
2. Cel zadania	3
3. Walidacja metody chromatograficznej.....	3
4. Opis opracowanej metodyki	4
4.1. Oznaczanie barwników antocyjanowych w brzoskwini	4
a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy	4
b) Analiza chromatograficzna (HPLC)	4
4.2. Oznaczanie karotenów w brzoskwini	5
a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy	5
b) Analiza chromatograficzna (HPLC)	6
5. Wnioski.....	6

1. Wstęp

Owoce brzoskwiń dostarczają do diety człowieka barwniki zarówno antocyjanowe, jak i karotenoidowe, które wykazują szerokie spektrum działania przeciwutleniającego, dzięki czemu wykazują korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Ponadto, karotenoidy posiadają aktywność prowitaminową, a spośród nich najwyższą aktywność witaminy A wykazuje β -karoten, który występuje w owocach brzoskwiń. Spożycie barwników antocyjanowych i karotenoidowych z dietą może być obniżone wskutek usuwania zewnętrznej części owoców czy warzyw, ponieważ w skórce przeważnie znajduje się najwięcej tych składników prozdrowotnych. Tak więc, aby w pełni korzystać z prozdrowotnych właściwości brzoskwiń, zalecane jest ich spożycie w całości wraz ze skórką.

2. Cel zadania

Celem zadania było opracowanie i walidacja metody chromatograficznej oznaczania barwników antocyjanowych i karotenów w owocach brzoskwiń.

3. 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.

4. Opis opracowanej metodyki

4.1 Oznaczanie barwników antocyjanowych w brzoskwini

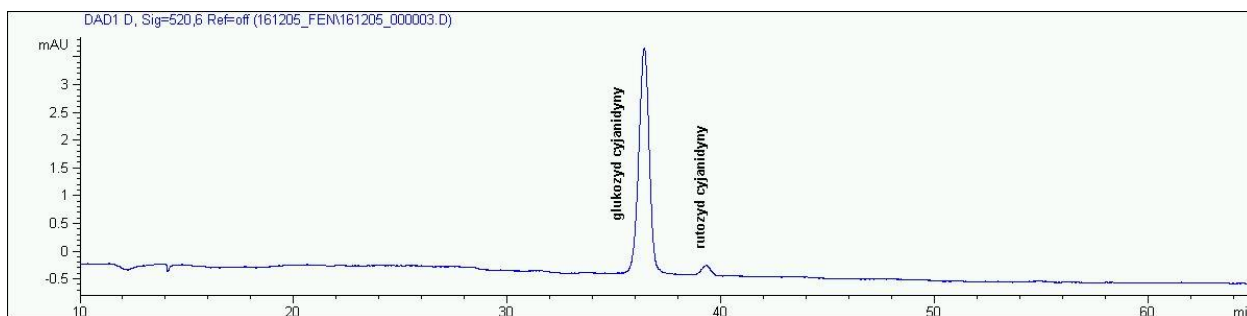
a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce brzoskwini odmiany ‘Redhaven’ zostały rozdrobnione w stanie zamrożonym w malakserze z użyciem suchego lodu (stały ditlenek węgla).

Naważki 10 g rozdrobnionych owoców homogenizowano przez 2 minuty w 50 ml 70% metanolu, następnie wirowano przy obrotach 10 tys. G przez 10 minut. Otrzymany supernatant sączono na sączku jakościowym i rozcieńczono 1:3 buforem octanowym (solwent A).

b) Analiza chromatograficzna (HPLC)

Rozdział prowadzono na kolumnie Synergi Fusion-RP 80A (250 mm x 4,6 mm; 4 μm) z prekolumną. Warunki elucji były następujące: przepływ 0,5 ml min⁻¹, temperatura 25 °C, długość fali 520 nm, faza ruchoma składa się z 10,2% kwasu octowego w 2mM octanie sodu (solwent A) i acetonitrylu (solwent B). Analiza HPLC była prowadzona w przepływie gradientowym: 0–20 min, 3 % B; 20–40 min, 17 % B; 40–65 min, 40 % B; 65–68 min, 90 % B; 68–72 min, 90 % B izokratycznie; 72–73 min, 0 % B. Rysunek 1 przedstawia rozdział analizowanych antocyjanów wyżej opisaną metodą chromatograficzną. W brzoskwini występują dwa związki antocyjanowe: **glukozyd- i rutozyd cyjanidyny**. Wyniki zostały obliczone według krzywej wzorcowej standardu glukozydu cyjanidyny i wyrażone w mg/kg.



Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdziału antocyjanów w brzoskwini.

Tabela 1. Zestawienie parametrów walidacji metody chromatograficznej oznaczania antocyjanów w surowcu brzoskwini

glukozyd cyjanidyny	
zakres stężeń	0,39-36,0 mg/l
Liniiowość	$y = 0,00812x + 0,29945$
R ²	0,998
LOD	1,85 mg/l
LOQ	5,60 mg/l

Tabela 2. Charakterystyka metody dla brzoskwini

Brzoskwinia 'Redhaven'	glukozyd cyjanidyny	rutozyd cyjanidyny	suma antocyjanów
zawartość mg/ kg	21,5	5,1	27,6
precyzja aparatury [RSD %]	0,61	6,05	0,63
precyzja metody intra-day [RSD %]	2,09	9,91	2,25
precyzja metody inter-day [RSD %]	1,69	4,14	1,60
powtarzalność [u]	0,85	4,05	0,92
stabilność (48 godz. T-pokojowa)	92,6	98,0	92,4
stabilność (48 godz. w lodówce)	98,6	98,5	98,3
odzysk [%]*	90,8		
odzysk [RSD %]	3,71		

*Ze względu na ograniczoną ilość standardów antocyjanowych odzysk został wykonany tylko dla glukozydu cyjanidyny, który jest zgodny z wytycznymi AOAC (średni odzysk dla stężeń analitu poniżej 10 ppm powinien mieścić się w przedziale 80-110%).

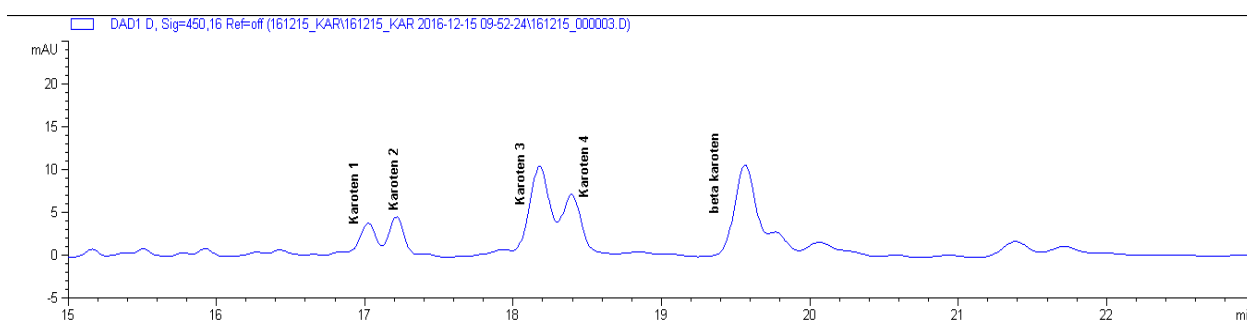
4.2 Oznaczanie karotenów w brzoskwini

a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce brzoskwini zostały rozdrobnione w stanie zamrożonym w malakserze z użyciem suchego lodu (stały ditlenek węgla). Naważkę 10 g rozdrobnionych owoców i 0,1 g węglanu magnezu (MgCO₃) zalewano 5 ml wody destylowanej i 50 ml roztworu ekstrahującego (heksan:aceton 6:4 (v/v)), a następnie homogenizowano przez 5 minut. Otrzymany ekstrakt sączono na lejku Buchnera zlewając najpierw heksan, a osad na lejku przemywano niewielką ilością roztworu ekstrahującego. Ekstrakt z niewielką ilością wody dejonizowanej wytrząsano w rozdzielaczu (500 ml) przez 20 sekund. Po rozdzieleniu faz, dolną fazę odrzucano, a wypukiwanie acetonu za pomocą wody powtarzano kilkakrotnie do momentu aż górna faza nie zawierała acetonu. Fazę heksanową zawierającą karoteny sączono na sączku bibułowym z bezwodnym siarczanem sodu do kolby wyparkowej na 250 ml. Heksan odparowano do sucha na wyparce próżniowej przy minimalnej prędkości obrotów w temperaturze 40 °C. Suchą pozostałość przeniesiono ilościowo do kolby na 25 ml roztworem: acetonitryl:metanol:octan etylu 55:25:20 + 0,1% BHT (butylowany hydroksytoluen) + 1 ml TEA (trietyloamina).

a) Analiza chromatograficzna (HPLC)

Próbkę w ilości 20 µl analizowano za pomocą systemu HPLC wyposażonego w detektor DAD (diode array detection). Rozdział prowadzono na kolumnie Kinetex C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) z prekolumną. Warunki elucji były następujące: przepływ 0,7 ml min⁻¹, temperatura 28 °C, długość fali 450 nm, faza ruchoma składa się z acetonitrylu (solwent B), octanu etylu (solwent C) oraz metanolu + 1ml TEA + 1g BHT na 1L (solwent D). Analiza HPLC była prowadzona w przepływie gradientowym: 0÷3 min 95% B/ 3% C/ 2% D, izokratycznie; 3÷10 min 55% B/ 25% C/ 20% D, liniowo; 10÷25 min 55% B/ 25% C/ 20% D, izokratycznie; 25÷35 min 95% B/ 3% C/ 2% D, liniowo. Następnie układ jest kondycjonowany w warunkach gradientu początkowego przez 5 min. Rysunek 2 przedstawia rozdział analizowanych karotenów wyżej opisaną metodą chromatograficzną, która umożliwia detekcję 5 karotenów w owocach brzoskwini (w tym jeden zidentyfikowany jako β-karoten).



Rysunek 2. Przykładowy chromatogram rozdziału karotenów w brzoskwini

Tabela 3. Zestawienie parametrów walidacji metody chromatograficznej oznaczania karotenów

	B-karoten
zakres stężeń	0,4-5 mg/l
liniowość	$y = 0,00282x - 0,03730$
R ²	0,999
LOD	0,12 mg/l
LOQ	0,37 mg/l

5. Wnioski

- Opracowane metodyka jest przydatna do oznaczania antocyjanów w badanej matrycy roślinnych tj. w owocach brzoskwini. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury jak i metody, RSD w przedziale 0,6-9,9%. Szacunkowe wartości wymagane dla precyzji w przypadku próbek biologicznych, żywności wynosi ~2÷20%.
- Odzysk badanych związków bioaktywnych jest powyżej 90%, a stabilność po dwóch dobach przechowywania w lodówce powyżej 98%.