



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa
Owoców i Warzyw

Metodyka

OZNACZANIA KAROTENÓW W OWOCACH RÓŻY OWOCUJĄCEJ

Autorzy:

dr inż. Monika Mieszczakowska-Frać

dr inż. Justyna Szweja-Grzybowska

mgr Alina Majka

dr inż. Dorota Kruczyńska

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 1.4**

„Nowe gatunki dla poszerzenia i różnicowania produkcji roślin ogrodniczych, w tym żywności funkcjonalnej”

Programu Wieloletniego:

„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 2018

Spis treści:

1. Wstęp	2
2. Cel zadania.....	2
3. Opis metodyki oznaczania karotenów w owocach róży owocującej.....	2
a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy	2
b) Analiza chromatograficzna (HPLC).....	3
4. Walidacja metody chromatograficznej	3
5. Wnioski.....	5
6. Literatura.....	5

1. Wstęp

Owoce dzikiej róży są cennym źródłem związków o charakterze antyoksydacyjnym tj.: kwasu askorbinowego, polifenoli i karotenoidów. Dieta bogata w karotenoidy wpływa korzystnie na zdrowie oraz zapobiega rozwojowi szeregu chorób, w tym nowotworów (Jenab i in. 2005). W roślinach karotenoidy są pigmentami, które odgrywają ważną rolę w ochronie roślin przed działaniem fotooksydacyjnym. Są efektywnymi antyoksydantami i uczestniczą w wymiataniu tlenu singletowego oraz rodników nadtlenkowych (Igielska-Kalwat i in. 2015). Skład karotenoidów owoców i warzyw różni się w zależności od gatunku, odmiany, dojrzewania, nawożenia i warunków agroklimatycznych. Ich zawartość w tkankach roślinnych zależy od wielu czynników i może podlegać zmianom nie tylko w żywych roślinach, ale także podczas ich przetwarzania i przechowywania (Shi 2000, Fanasca 2006, Giuffrida i in. 2013, Pugliese i in. 2013, Haejin i in. 2014, Yuan i in. 2015, Yuan i in. 2016).

2. Cel zadania

Celem zadania było opracowanie i walidacja metody chromatograficznej oznaczania karotenów w owocach róży owocującej.

3. Opis metodyki oznaczania karotenów w owocach róży owocującej

a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

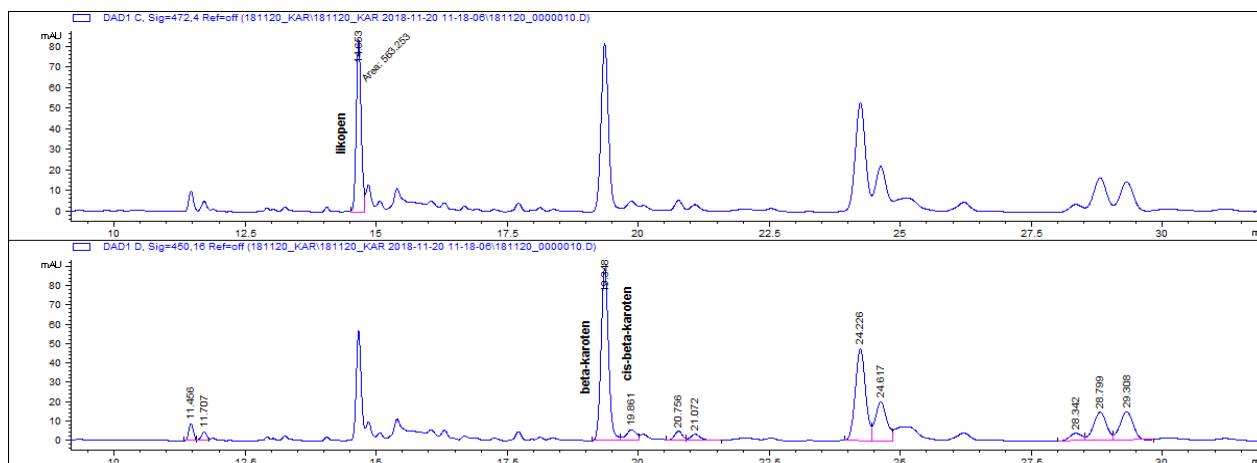
W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce róży zostały rozdrobnione w stanie zamrożonym w malakserze z użyciem suchego lodu (stały ditlenek węgla).

Naważkę w ilości 2 g homogenizowano w roztworze ekstrahującym (heksan:aceton 6:4) z dodatkiem 0,1 g węglanu magnezu i 5 ml wody przez 5 min, następnie roztwór przenoszono do rozdzielacza, wytrząsano i czekano do rozdzielenia faz (dolną fazę acetonową odrzucano). Operację wyflukiwania acetonu powtarzano do momentu, aż faza dolna nie będzie zawierać acetonu. Fazę heksanową zawierającą karoteny sączono przez sączonek bibułowy zawierający bezwodny siarczan sodu do kolbki wyparkowej na 250 ml. Następnie odparowywano heksan do sucha w wyparce próżniowej w temp. 40 °C. Suchą pozostałość przenoszono ilościowo do

kolbki na 25 ml za pomocą roztworu do HPLC (acetonitryl:metanol:octan etylu 55:25:20) z dodatkiem 0,1 % BHT i 1 ml TEA. Ekstrakt z kolbki przesączano za pomocą filtra strzykawkowego PTFE 45 µm do bursztynowej buteleczki i poddawano analizie HPLC.

b) Analiza chromatograficzna (HPLC)

Rozdział prowadzono wykorzystując kolumnę Kinetex C-18 (250 mm x 4,6 mm; 5µm). Warunki elucji były następujące: 0,7 ml min⁻¹, temperatura 28 °C, długość fali 450 nm dla β-karotenu i 472 nm dla likopenu, faza ruchoma: acetonitryl, octan etylu, metanol w przepływie gradientowym. W owocach róży owocującej zostały zidentyfikowane następujące związki karotenoidowe: β-karoten, likopen, cis-β-karoten, β-kryptoksantyna. Obliczenia wykonano według krzywej standardu β-karotenu (Sigma-Aldrich, Niemcy). Zawartość karotenoidów wyrażono w mg/100g.



Rysunek 1. Rozdział analizowanych karotenoidów wyżej opisaną metodą chromatograficzną.

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 7 poziomach wzorca substancji, a każdy ze wzorców analizowano 2-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 poziomach 50%, 100% i 150%. 3-krotna ekstrakcja na każdym poziomie wzbogacania.

Tabela 1. Zestawienie parametrów walidacji metody chromatograficznej oznaczania karotenów w owocach róży owocującej.

	β-karoten
zakres stężeń	0,05-0,5 mg/100ml
liniowość	$y = 0,00027x + 0,001$
R ²	0,998
LOD	0,03 mg/100g
LOQ	0,09 mg/100g

Tabela 2. Charakterystyka metody dla owoców róży owocującej.

dzika róża 'Carpatias'	β-karoten	likopen	pozostałe karoteny	suma karotenów
zawartość mg/100g	3,7	2,2	6,5	12,9
precyzja aparatury [RSD %]	0,21	3,29	0,58	0,84
precyzja metody intra-day [RSD %]	8,51	5,62	8,10	7,65
precyzja metody inter-day [RSD %]	5,38	7,16	11,11	8,08
powtarzalność [u]	3,47	2,29	3,31	3,12
stabilność (48 godz. T-pokojowa)	101,2	86,7	103,2	99,8
stabilność (48 godz. w lodówce)	102,4	86,9	106,4	101,9
odzysk [%]*	94,8			
odzysk [RSD %]	7,84			

*odzysk wykonany dla β-karotenu

5. Wnioski

- Owoce róży owocującej zawierają karoteny na poziomie 12,9 mg/100g. Dominującymi karotenami są β-karoten i likopen.
- Opracowana metodyka jest przydatna do oznaczenia zawartości karotenów w matrycy roślinnej, jaką są owoce róży owocującej. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją aparatury i wysoką powtarzalnością wyników.
- Precyzja metody charakteryzuje się parametrami na poziomie RSD 5,38-11,11%, krytycznym punktem wpływającym na precyzję metody jest etap wytrząsania próbki z roztworem organicznym, gdzie mogą być popełniane największe błędy metodyczne.
- Stabilność karotenów ogółem po 48 godzinach w temperaturze pokojowej i chłodniczej jest na wysokim poziomie i wynosi 99,8%. Najmniej stabilny okazał się likopen, którego zawartość po dwóch dobach spada do około 87% początkowej zawartości.
- Odzysk związków karotenoidowych jest na poziomie 95%.

6. Literatura

- Fanasca S., Colla G., Maiani G., Venneria E., Roupael Y., Azzini E., Saccardo F. 2006. Changes in Antioxidant Content of Tomato Fruits in Response to Cultivar and Nutrient Solution Composition. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (12): 4319–4325.
- Giuffrida D., Dugo P., Torre G., Bignardi C., Cavazza A., Corradini C., Dugo G. 2013. Characterization of 12 Capsicum varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry* 140 (4): 794-802.

- Haejin B., Jayaprakasha G., Crosby K., Yoo K., Leskovaar D., Jifon J., Patil B. 2014. Ascorbic acid, capsaicinoid, and flavonoid aglycone concentrations as a function of fruit maturity stage in greenhouse-grown peppers. *Journal of Food Composition and Analysis* 33: 195-202.
- Igielska-Kalwat J., Gościańska J., Nowa I. 2015. Carotenoids as natural antioxidants. *Postepy Hig. Med.* 69: 418-428.
- Jenab M., Ferrari P., Mazuir M., Tjonneland A., Clavel-Chapelon F., Linseisen J., Trichopoulou A., Tumino R., Bueno-de-Mesquita H., Lund E. 2005. Variations in lycopene blood levels and tomato consumption across European countries based on the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Study. J. Nutr.*, 135: 2032-2036.
- Shi J.: Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* 2000, 39: 110-114.
- Pugliesea A., Loizzoa M.R., Tundis R., O'Callaghanb Y., Galvinb K., Menichini F., O'Brien N. 2013. The effect of domestic processing on the content and bioaccessibility of carotenoids from chili peppers (*Capsicum* species). *Food Chemistry* 141: 2606-2613.
- Yuan H., Zhang J., Nageswaran D., Li L. 2015. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research* 2, Article number: 15036.
- Yuan L., Wenquan N., Miles D., Jingwei W., Xiaoyang Z. 2016. Yields and Nutritional of Greenhouse Tomato in Response to Different Soil Aeration Volume at two depths of Subsurface drip irrigation. *Sci. Rep.* 6:39307.