



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa  
Owoców i Warzyw

# **METODYKA**

## **OZNACZANIA KWASU ASKORBINOWEGO**

### **W OWOCACH PAPRYKI**

#### Autorzy:

dr inż. Justyna Szwejda-Grzybowska

dr hab. Monika Mieszczakowska-Frać

dr inż. Krzysztof P. Rutkowski

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 3.5**

„Rozwój innowacyjnych technologii przechowywania i wykorzystania owoców i warzyw”

#### **Programu Wieloletniego IO 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 2019**

Spis treści:

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

## 1. Wstęp

Papryka (*Capsicum annuum* L.) jest ważnym gatunkiem warzyw cenionym ze względu na wysoką wartość biologiczną i atrakcyjny smak. Ma szerokie zastosowanie w żywieniu człowieka i w przemyśle farmaceutycznym. Owoce papryki charakteryzują się wysoką zawartością witaminy C, E, prowitaminy A, a także witamin z grupy B: B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> oraz PP. Zawiera również dużo składników mineralnych, głównie wapnia, żelaza, potasu, fosforu i magnezu. Skład chemiczny owoców papryki uzupełniają cukry (glukoza, fruktoza i sacharoza), kwasy organiczne (kwas jabłkowy, winowy, cytrynowy), białko, związki tłuszczowe, a przede wszystkim polifenole (Gajc-Wolska 2002, Markus 1999).

Zawartość kwasu L-askorbinowego w papryce zależy od odmiany, warunków uprawy, w tym warunków pogodowych w okresie wegetacji (nasłonecznienia), od fazy dojrzałości owoców i terminu zbioru (Buczkowska 2005, Navarro i in. 2006).

Kwas L-askorbinowy wzmacnia naszą odporność, jest skutecznym przeciwutleniaczem, który spowalnia procesy starzenia się organizmu, ma działanie przeciwnowotworowe oraz poprawia pracę układu krążenia (Burini 2007). Jest niezbędnym składnikiem, którego nie powinno zabraknąć w naszej codziennej diecie, a głównym jej źródłem są pokarmy roślinne (Lebiedzińska i in. 2010).

Dzienne zapotrzebowanie na witaminę C ustalone przez National Academy of Sciences, Food and Nutrition Board, USA, wynosi od 15 do 90 mg/dzień/osobę w zależności od wieku i płci. Zapotrzebowanie to silnie wzrasta u kobiet karmiących, nawet do 120 mg/dzień.

## 2. Cel zadania

Celem zadania było opracowanie i walidacja metody chromatograficznej oznaczania kwasu L-askorbinowego w owocach papryki.

## 3. Opis metodyki oznaczania kwasu askorbinowego w owocach papryki

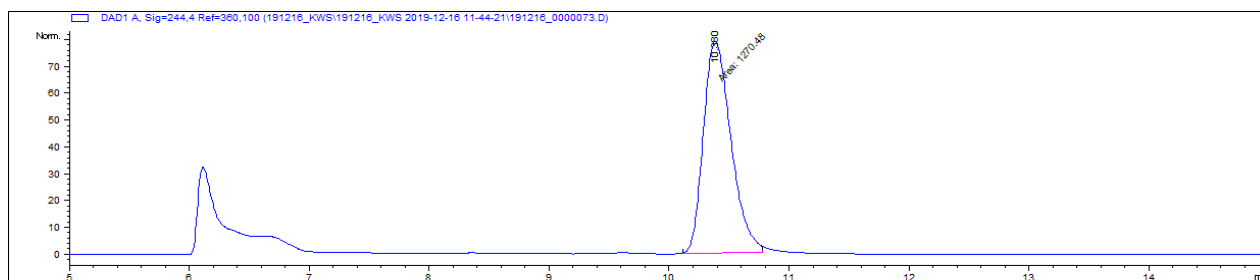
### a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce papryki zostały rozdrobnione w stanie zamrożonym w malakserze z użyciem suchego lodu.

5 g rozdrobnionej próbki homogenizowano przez 2 minuty w 50 ml 6% kwasu metafosforowego, następnie sączono na sączku jakościowym, a otrzymany przesącz rozcieńczano 1:10 kwasem metafosforanowym.

#### b) Analiza chromatograficzna (HPLC)

Rozdział chromatograficzny prowadzono wykorzystując dwie kolumny Supelco LC-18 (250 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) z prekolumną, połączone szeregowo. Warunki elucji były następujące: 0,8 ml min<sup>-1</sup>, temperatura 30 °C, długość fali 244 nm (kwas askorbinowy), faza ruchoma to 1% bufor fosforanowy (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) o pH=2,5 w przepływie izokratycznym. Rysunek 1 przedstawia rozdział kwasu askorbinowego wyżej opisaną metodą chromatograficzną. Wyniki zostały obliczone według krzywej wzorcowej standardu kwasu askorbinowego i wyrażone w mg/100 g.



Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdziału kwasu askorbinowego w papryce.

#### 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 6 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 trzech poziomach 50%, 100% i 150%. 3-krotna ekstrakcja na każdym poziomie wzbogacania.

Tabela 1. Zestawienie parametrów walidacji metody chromatograficznej.

	Kwas askorbinowy
zakres stężeń	0,31 -35,6 mg/100 ml
liniowość	$y = 0,00127x + 0,01533$
R <sup>2</sup>	0,999
LOD	0,25 mg/100ml
LOQ	0,75 mg/100ml

Tabela 2. Charakterystyka metody dla owoców papryki.

papryka	Kwas askorbinowy
zawartość mg/ 100 g	<b>160,6</b>
precyzja aparatury [RSD %]	<b>1,41</b>
precyzja metody intra-day [RSD %]	<b>0,58</b>
precyzja metody inter-day [RSD %]	<b>3,86</b>
powtarzalność [u]	<b>0,24</b>
stabilność (48 godz. T-pokojowa)	<b>103,0</b>
stabilność (48 godz. w lodówce)	<b>105,9</b>
odzysk [%]*	<b>99,5</b>
odzysk [RSD %]	<b>0,53</b>

## 5. Wnioski

- Opracowana metodyka jest przydatna do oznaczania kwasu L-askorbinowego w owocach papryki. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury jak i metody, RSD w przedziale 0,58–3,86%. Szacunkowe wartości wymagane dla precyzji w przypadku próbek biologicznych, żywności wynosi  $\sim 2 \div 20\%$ .
- Stabilność kwasu L-askorbinowego po dwóch dobach przechowywania w temperaturze pokojowej oraz w lodówce jest na poziomie 103-106%
- Odzysk kwasu L-askorbinowego wynosi  $\sim 99,5\%$ , a RSD dla odzysku 0,53%.

## 6. Literatura

- Buczowska H. 1991. Plonowanie papryki słodkiej (*Capsicum annuum* L.) w uprawie polowej na tle warunków pogodowych. Ann. UMCS, sect. E 46 (27): 211-220.
- Burini G. 2007. Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 1154 (1-2): 97-102.
- Gajc-Wolska J., Skąpski H. 2002. Yield of sweet pepper depending on cultivars and growing conditions. Folia Horticulture 14(1): 95-103.

- Lebiedzińska A., Czaja J., Najmowicz M., Petrykowska K., Szefer P. 2010. Oznaczanie witaminy C w sokach i suplementach diety z wykorzystaniem HPLC. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 3(43): 249-254.
- Markus F., Daood H., Kapitany J., Pizza C. 1999. Changes in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper as a function of ripening and some technological factors. *J. Agric. Food Chem.* 47: 100-107.
- Navarro J.M., Flores P., Garrido C., Martinez V. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem.* 96: 66-73.