



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa
Owoców i Warzyw

Metodyka

OZNACZANIA KWASU ASKORBINOWEGO W JEŻYNIE

Autorzy:

dr inż. Monika Mieszczakowska-Frać

dr inż. Jarosław Markowski

dr inż. Dorota Kruczyńska

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 1.4**

„Nowe gatunki dla poszerzenia i zróżnicowania 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 2016

Spis treści:

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

1. Wstęp

Coraz większa świadomość konsumentów sprawia, że coraz chętniej sięgają oni po rzadko spotykane w Polsce gatunki owoców, które często są bardzo bogatym źródłem bioaktywnych składników, między innymi antocyjanów i kwasu askorbinowego. Wiele badań potwierdza korzystny wpływ antocyjanów w żywieniu człowieka (Wang i in. 1997; Kong i in. 2003; Matsumoto i in. 2005; Mazza 2007) i ich zdrowotny efekt: stabilizacja kolagenu, zwiększanie przepuszczalności naczyń krwionośnych, ochrona wzroku (Bridle i Timberlake 1997; Antal i in. 2003; Heinonen 2007). Niestety biodostępność antocyjanów jest mała (Antal i in. 2003; Mazza 2007), dlatego też bardzo ważne jest, aby w codziennej diecie znalazło się dużo owoców bogatych w antocyjany.

Kwas askorbinowy natomiast, dzięki właściwościom przeciwutleniającym wpływa na prawidłowe funkcjonowanie ludzkiego organizmu, przede wszystkim przez podnoszenie odporności i działania przeciwinfekcyjnym.

2. Cel zadania

Celem zadania było opracowanie i walidacja metody chromatograficznej oznaczania kwasu askorbinowego w owocach jeżyny.

3. Opis metodyki oznaczania kwasu askorbinowego w jeżynie

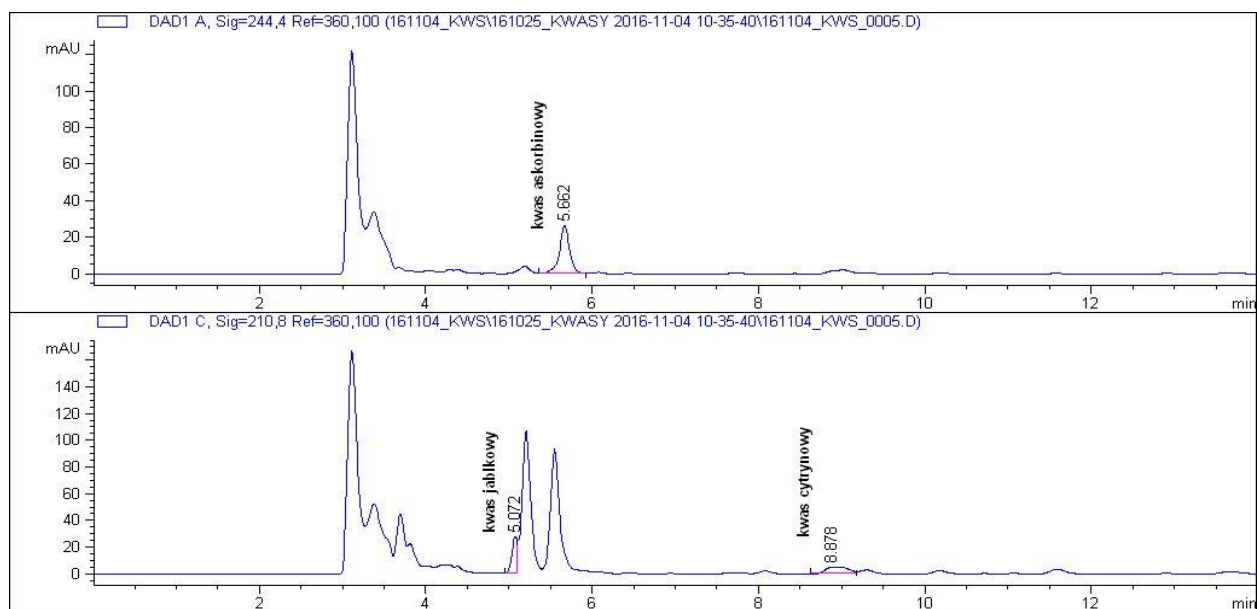
a) Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

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

5 g rozdrobnionych owoców homogenizowano przez 2 minuty w 50ml 6% kwasu metafosforowym, następnie sączono na sączku jakościowym, a otrzymany przesącz rozcieńczano 1:2 kwasem metafosforanowym. Doświadczenie przeprowadzono na odmianie 'Orkan' z sezonu 2016

a) Analiza chromatograficzna (HPLC)

Rozdział prowadzono wykorzystując kolumnę Supelco LC-18 (250mm x 4,6 mm; 5 μ m) z prekolumną. Warunki elucji były następujące: 0,8ml min⁻¹, temperatura 30°C, długość fali 244nm (kwas askorbinowy) i dodatkowo przy długości fali 210nm oznaczono kwas jabłkowy i cytrynowy, faza ruchoma to 1% bufor fosforanowy (KH₂PO₄) o pH=2,5 w przepływie izokratycznym. Rysunek 4 przedstawia rozdział kwasów organicznych wyżej opisaną metodą chromatograficzną. Wyniki zostały obliczone według krzywej wzorcowej standardu kwasu askorbinowego, jabłkowego i cytrynowego i wyrażone w mg/100 g.



Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdziału kwasów organicznych w jeżynie

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 1. 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 2. Charakterystyka metody dla jeżyny odmiany 'Orkan'

jeżyna 'Orkan'	Kwas askorbinowy	kwas jabłkowy	kwas cytrynowy
zawartość mg/ 100 g	10,4	416,5	79,8
precyzja aparatury [RSD %]	1,30	0,33	2,43
precyzja metody intra-day [RSD %]	2,75	1,75	2,67
precyzja metody inter-day [RSD %]	2,24	5,08	6,11
powtarzalność [u]	1,59	1,01	1,54
stabilność (48 godz. T-pokojowa)	99,8	105,7	96,3
stabilność (48 godz. w lodówce)	105,9	107,5	94,1
odzysk [%]*	99,3		
odzysk [RSD %]	3,17		

*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%).

5. Wnioski

- Opracowana metodyka jest przydatna do oznaczania kwasu askorbinowego w owocach jeżyny. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury jak i metody, RSD w przedziale 0,3-6%. Szacunkowe wartości wymagane dla precyzji w przypadku próbek biologicznych, żywności wynosi $\sim 2 \div 20\%$.
- Odzysk badanych związków bioaktywnych jest powyżej 99%, a stabilność po dwóch dobach przechowywania w lodówce powyżej 94%.

6. Literatura

- Wang H., Cao G., Prior R.L. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45(2): 304-309.
- Koponen J.M., Buchert J., Poutanen K.S., Törrönen A.R. 2008. Effect of pectinolytic juice production on the extractability and fate of bilberry and black currant anthocyanins. *Eur. Food Res. Technol.* 227(2): 485-494.
- Matsumoto H., Takenami E., Iwasaki-Kurashige K., Osada T., Katsumura T., Hamaka T. 2005. Effects of blackcurrant anthocyanin intake on peripheral muscle circulation during typing work in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 94(1-2): 36-45.
- Mazza G. 2007. Bioactivity, absorption and metabolism of anthocyanins. *Acta Hort.* 744: 117-126.
- Bridle P., Timberlake C.F. 1997. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. *Food Chem.* 58(1-2): 103-109.
- Antal D.S., Gârban G., Gârban Z. 2003. The anthocyanins: biologically-active substances of food and pharmaceutical interest. *Food Technol.*: 106-115.
- Heinonen M. 2007. Berry phenolics is there enough scientific evidence for nutrition and health claims? NHClaims seminar, 8-9 November 2007, Helsinki, Finland.