



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa
Owoców i Warzyw

Metodyka

OZNACZANIA PEKTYN OGÓLEM W OWOCACH JAGODY KAMCZACKIEJ

Autorzy:

mgr Alina Majka

dr inż. Monika Mieszczakowska – Frąc

dr inż. Dorota Kruczyńska

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 1.4**

„Nowe gatunki dla poszerzenia i zróżnicowania produkcji roślin ogrodnich, 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 substancji pektynowych w jagodzie kamczackiej	2
a. Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy	2
b. Oznaczenie kolorymetryczne – reakcja barwna ze stężonym kwasem siarkowym w obecności karbazolu.....	3
c. Wyznaczenie krzywej wzorcowej.....	3
4. Walidacja metody spektrofotometrycznej.....	4
5. Wnioski	5
6. Literatura.....	5

1. Wstęp

Jagoda kamczacka (*Lonicera Kamtschatica*) w niektórych krajach jest uważana za „super owoc”, ze względu na dużą zawartość przeciwutleniaczy takich jak związki fenolowe w tym antocyjany, witaminy [1, 2, 3]. Jagody te są owocami soczystymi o słodko-kwaśnym smaku, choć niektóre odmiany mogą posiadać wyraźną goryczkę, mogą być spożywane w stanie świeżym jak również nadają się na przetwory. Ponadto jagoda kamczacka zawiera w swoim składzie pektyny i błonnik, które są również bardzo ważnymi składnikami odżywczymi korzystnie wpływającymi na układ pokarmowy. Zarówno pektyny jak i błonnik powinny stanowić udział codziennej diety, co może być uzupełniane w postaci 5 porcji owoców i warzyw dziennie [4].

2. Cel zadania

Celem zadania było opracowanie i walidacja metody spektrofotometrycznej oznaczenia substancji pektynowych w owocach jagody kamczackiej.

3. Opis metodyki oznaczania substancji pektynowych w jagodzie kamczackiej

a. Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

Przed przystąpieniem do ekstrakcji analitu z próbki, owoce jagody kamczackiej rozdrobniono w stanie zamrożonym w malakserze z użyciem stałego dwutlenku węgla (suchego lodu), w celu uzyskania jednorodnej próbki analitycznej.

Naważki 1 g, 2 g i 3 g rozdrobnionych owoców umieszcza się w kalibrowanej 50 ml tubie do wirowania ze stożkowym końcem i dopełnia do 40 ml gorącym 95% etanolem (85 °C). Roztwór ogrzewa się przez 10 minut w łaźni wodnej w temperaturze 85 °C, mieszając od czasu do czasu szklaną bagietką. Bagietkę obmywa się etanolem i objętość

mieszaniny jest dopełniania do 50 ml etanolem. Następnie roztwór należy odwirować przy 3000xg przez 15 minut. Supernatant jest odrzucany, a osad ponownie płukany 63% etanolem i ogrzewany w łaźni wodnej (85 °C) przez 10 minut. Następnie odwirowany (3000xg przez 15 minut) i supernatant ponownie odrzucany. Pozostały osad po wytrącaniu alkoholem przenosi się do kolby o pojemności 200 ml, dodaje 10 ml 1N wodorotlenku sodu (NaOH) i dopełnia wodą destylowaną. Całość pozostawia się na 15 minut, od czasu do czasu mieszając, a następnie sączy na sączku jakościowym i oznacza się pektyny kolorymetrycznie.

b. Oznaczenie kolorymetryczne – reakcja barwna ze stężonym kwasem siarkowym w obecności karbazolu

Z roztworów przygotowanych wg przepisu podanego w podpunkcie 3a przenosi się po 1 ml ekstraktu i dodaje 0,5 ml 0,1% alkoholowego roztworu karbazolu. Do ślepej próby dodaje się 1 ml wody oraz 0,5 ml etanolu odwodnionego. W próbkach (za wyjątkiem ślepej próby) powinien pojawić się biały osad. Następnie dodaje się 6 ml stężonego kwasu siarkowego (H₂SO₄) przy ciągłym mieszaniu. Pożądana jest biureta automatyczna, dodająca 6 ml kwasu w ciągu 7 sekund, tak aby roztwór osiągnął temperaturę 85 °C. Ta temperatura powinna być utrzymana w łaźni wodnej, w przypadku wahań temperatury możliwe są wahania intensywności koloru. Próbki umieszcza się w łaźni wodnej (85 °C) na 5 minut, a następnie chłodzi i mierzy ekstynkcję próbki względem ślepej próby przy 525 nm. Wyniki oblicza się według krzywej wzorcowej kwasu galakturonowego.

c. Wyznaczenie krzywej wzorcowej

Naważyć 109,3 mg kwasu galakturonowego, suszonego przez 5 godzin w temperaturze 55 °C. Przenieść do kolby na 1 dm³, dodać 1 ml 1M NaOH i uzupełnić do kreski wodą destylowaną. Po wymieszaniu zostawić na noc. 1 ml roztworu zawiera dokładnie 100 µg kwasu galakturonowego. Do 10 kolb o pojemności 100 ml pobiera się odpowiednio: 2 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml roztworu i dopełnia do kreski wodą destylowaną. Następnie z tych kolb pobiera się po 1 ml roztworu wzorca do oznaczenia, co odpowiednio odpowiada stężeniom: 2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 µg/ml.

Tabela 1. Wpływ naważki próbki na wydajność ekstrakcji substancji pektynowych ogółem z surowca jagody kamczackiej (µg/g)

naważka	1 g	2 g	3g
Zawartość pektyn ogółem	3673	3623	3611
średnia wartość pomiaru (ekstynkacja)	58,17	34,97	21,59

Ekstrakt przygotowany z naważki 2 g posiadał wynik pomiaru (ekstynkacja) z środkowego zakresu krzywej wzorcowej. Obszar ten był obciążony najmniejszym odchyleniem punktów

od krzywej, dlatego też do dalszych etapów walidacji metody stosowano naważkę próbki jagody kamczackiej 2 g.

4. Walidacja metody spektrofotometrycznej

Podczas walidacji metody wyznaczono następujące parametry:

- **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 , który nie może być mniejszy niż 0,999. Liniowość wyznaczano na 10 poziomach wzorca substancji, a każdy ze wzorców analizowano 2-krotnie.

- **Granice wykrywalności (LOD)**, czyli najmniejszą zawartość substancji, którą można wykryć z 95 % pewnością statystyczną.

- **Granice oznaczalności (LOQ)**, czyli najmniejsze stężenie substancji, które można oznaczyć z dopuszczalną precyzją i dokładności w ustalonych warunkach badania.

- **Precyzja aparatury**: 10-krotny pomiar ekstynkcji tej samej próbki, bez zmiany położenia kuwety pomiarowej i wyznaczenie odchylenia standardowego.

- **Precyzja metody**: 3 ekstrakcje próbki w 3 powtórzeniach przez 3 dni w takich samych warunkach, parametr wyrażony jako odchylenie standardowe.

- **Powtarzalność**: precyzja metody uzyskanych w tych samych warunkach pomiarowych wyliczona w oparciu o RSD.

- **Stabilność próbki**: 4-krotna analiza tej samej próbki w dniu przygotowania, po 24 i 48 godzinach w temperaturze pokojowej oraz lodówce.

- **Odzysk**: wzbogacenie próbki w standard zewnętrzny (pektyny z owoców cytrusowych) na trzech poziomach: 50 %, 100 % oraz 150 %, 3-krotna ekstrakcja na każdym poziomie wzbogacania.

Tabela 2. Zestawienie parametrów walidacji metody chromatograficznej oznaczania substancji pektynowych w surowcu jagody kamczackiej

kwas galakturonowy	
zakres stężeń	2 – 90 µg/g
Liniowość	$y = -35,44 x + 162,37$
R^2	0,999
LOD	0,008 µg/g
LOQ	0,017 µg/g

Tabela 3. Charakterystyka metody dla jagody kamczackiej

	Pektyny ogółem
zawartość µg/g	3570
precyzja aparatury [RSD %]	0,08
precyzja metody intra-day [RSD %]	2,17
precyzja metody inter-day [RSD %]	1,79
powtarzalność [u]	0,89
stabilność (48 godz. T-pokojowa)	98,0
stabilność (48 godz. w lodówce)	97,0
odzysk [%]	91,8
odzysk [RSD %]	2,21

5. Wnioski

- Owoce jagody kamczackiej są bardzo bogate w pektyny ogółem i ich średnia zawartość wynosi 357 mg/100g owoców.
- Wykonana analiza walidacyjna spektrofotometrycznej metody oznaczania pektyn ogółem wykazała bardzo dobrą precyzję zarówno metody jak i aparatury oraz bardzo wysoką powtarzalność otrzymanywnych wyników.
- Ekstrakty pektynowe z matrycy jagody kamczackiej są stabilne i po 48 godzinach stabilność ich jest na poziomie 97-98%.
- Odzysk badanej metody wynosi 91,8%

6. Literatura

- [1] Svarcova I., Heinrich J., Valentova K. 2007. Berry fruits as a source of biologically active compounds: the case of *Lonicera caerulea*. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Repub., 151 (2), 163-174.
- [2] Wojdyło A., Jáuregui P.N.N., Carbonell-Barrachina A.A., Oszmiański J., Golis T. 2013. Variability of phytochemical properties and content of bioactive compounds in *Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* berries. J. Agric. Food Chem., 61 (49), 12072-12084.
- [3] Szot I., Lipa T., Sosnowska B. 2014. Jagoda kamczacka- właściwości prozdrowotne owoców i możliwości ich zastosowania. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 4(95), 18-29.
- [4] Płocharski W., Markowski J., Rutkowski K.P., Konopacka D. 2017. Wartości odżywcze i zdrowotne owoców i warzyw. Instytut Ogrodnictwa. ISBN 978-83-65903-03-7