



Zakład Przechowywania i Przetwórstwa
Owoców i Warzyw

Metodyka

OZNACZANIA KWASÓW ORGANICZNYCH W BROKUŁACH

CZĘŚĆ I – KWAS ASKORBINOWY

Autorzy:

dr inż. Monika Mieszczakowska-Frać
dr inż. Justyna Szwejda-Grzybowska
dr inż. Krzysztof P. Rutkowski

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

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	3
2. Cel zadania.....	3
3. Opis metodyki oznaczania kwasu askorbinowego w brokułach.....	3
3.1. Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy	3
3.2. Analiza chromatograficzna (HPLC).....	3
4. Walidacja metody chromatograficznej	4
5. Wnioski	6
6. Literatura.....	6

1. Wstęp

Brokuł (*Brassica oleracea* var. *italica*) jest warzywem należącym do roślin kapustnych. Warzywo to w ostatnich latach zyskuje na znaczeniu ze względu na swoje właściwości sensoryczne, jak również korzystne oddziaływanie na organizm człowieka. Różę brokuła charakteryzują się dużą zawartością przede wszystkim witaminy C, błonnika pokarmowego oraz glukozynolanów (Steinmetz i Potter 1996, Martinez-Tome i in. 2001). Zawartość witaminy C w roślinach zależy od wielu czynników: odmiany, sposobu uprawy, warunków klimatycznych, terminu zbioru, stopnia dojrzałości, a także od czasu i warunków przechowywania i przetwarzania (Wierzbicka i Kuskowska 2002, Noichinda i in. 2007, Ignat i in. 2012). Głównym źródłem witaminy C w diecie człowieka są pokarmy roślinne (Lebiedzińska i in. 2010). Kwas askorbinowy dzięki właściwościom przeciwutleniającym wpływa na prawidłowe funkcjonowanie ludzkiego organizmu, przede wszystkim przez podnoszenie odporności i działania przeciwinfekcyjnym.

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.

2. Cel zadania

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

3. Opis metodyki oznaczania kwasu askorbinowego w brokułach

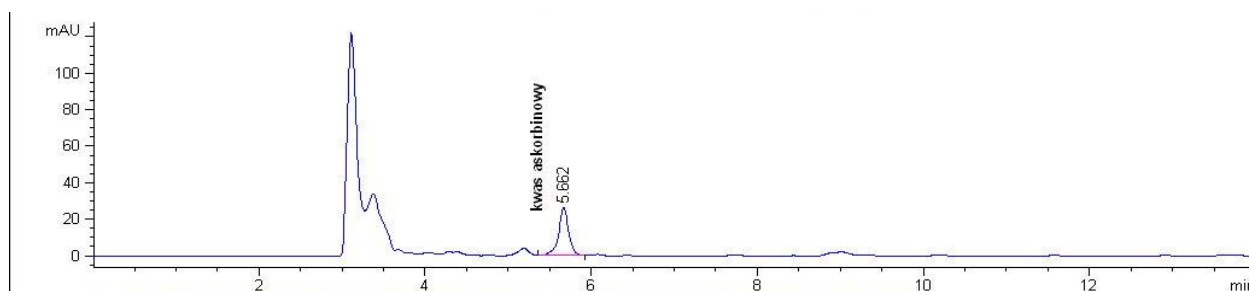
3.1. Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, różę brokuła 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 sączone na sączku jakościowym, a otrzymany przesącz rozcieńczano 1:2 kwasem metafosforowym. Doświadczenie przeprowadzono na odmianie 'Porthenoon' z sezonu 2018.

3.2. Analiza chromatograficzna (HPLC)

Rozdział prowadzono wykorzystując dwie kolumny Supelco LC-18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) połączone szeregowo z prekolumną. Warunki elucji były następujące: 0,8 ml min⁻¹, temperatura 30 °C, długość fali 244 nm (kwas L-askorbinowy), faza ruchoma to 1% bufor fosforanowy (KH₂PO₄) o pH=2,5 w przepływie izokratycznym. Rysunek 1 przedstawia rozdział kwasów organicznych 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 L-askorbinowego w brokułach.

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 0,995 (optymalnie 0,999). Liniowość wyznaczano na 7 poziomach wzorca substancji, a każdy ze wzorców analizowano 3-krotnie.

Granica wykrywalności (ang. Limit of Detection – **LOD**), czyli najmniejsza zawartość substancji, którą można wykryć z 95% pewnością statystyczną (wzór 1).

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot \text{Se}/a \quad (1)$$

gdzie: Se – wariancja resztkowa

a – współczynnik kierunkowy prostej kalibracyjnej

Granica oznaczalności (ang. Limit of Quantification – **LOQ**), czyli najmniejsze stężenie substancji, które można oznaczyć z dopuszczalną precyzją i dokładnością w ustalonych warunkach badania (wzór 2).

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \text{Se}/a \quad (2)$$

gdzie: Se – wariancja resztkowa

a – współczynnik kierunkowy prostej kalibracyjnej

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).

$$u = \frac{RSD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

gdzie: RSD – względne odchylenie standardowe
n – liczba próbek

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

	kwask askorbinowy
zakres stężeń	0,02-125 mg/100 ml
Liniowość	$y = 0,00127x + 0,22604$
R ²	0,998
LOD	1,03 mg/100 ml
LOQ	3,13 mg/100 ml

Tabela 2. Charakterystyka metody dla brokuła odmiany ‘Porthenoon’

Brokuł ‘Porthenoon’	kwask askorbinowy
zawartość mg/ 100 g	21,4
precyzja aparatury [RSD %]	0,12
precyzja metody intra-day [RSD %]	5,88
precyzja metody inter-day [RSD %]	16,7
powtarzalność [u]	2,40
stabilność (48 godz. T-pokojowa)	68,1
stabilność (48 godz. w lodówce)	75,0
odzysk [%]	96,9
odzysk [RSD %]	3,12

5. Wnioski

- Opracowana metodyka jest przydatna do oznaczania kwasu askorbinowego w surowcu brokuła. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury jak i metody, RSD w przedziale 0,1-5,88%. Szacunkowe wartości wymagane dla precyzji w przypadku próbek biologicznych, żywności wynoszą $\sim 2 \div 20\%$.
- Precyzja metody inter-day (pomiaru przez kolejne 3 dni) jest niska ze względu na niską stabilność kwasu askorbinowego w badanej matrycy.
- Odzysk kwasu askorbinowego jest powyżej 96%.
- Kwas L-askorbinowy jest mało stabilny w matrycy brokuła, o czym świadczą wartości stabilności po dwóch dobach przechowywania w lodówce -75% i w temperaturze pokojowej - 68%.

6. Literatura

- Ignat T., Schmilovitch Z., Fefoldi J., Steiner B., Alkalai-Tuvia S. 2012. Non-destructive measurement of ascorbic acid content in bell peppers by VIS-NIR and SWIR spectrometry. *Postharvest Biology and Technology* 74:91-99.
- 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.
- Martinez-Tome M., Garcia-Carmona F., Murcia M.A. 2001. Comparison of the antioxidant and pro-oxidant activities of broccoli amino acids with those of common food additives. *J. Sci. Food Agric.* 81:1019-1025.
- Noichinda S., Bodhipadma K., Mahamontri C., Narongruk T., Ketsa S. 2007. Light Turing storage presents loss of ascorbic acid, and increases glucose, and fructose levels in Chinese kale. *Postharvest Biology and Technology* 44(3): 312-315.
- Wierzbicka B., Kuskowska M. 2002. Wpływ wybranych czynników na zawartość witaminy C w warzywach. *Acta Scientiarum Polonorum*. 1(2):49-57
- Steinmetz K. A., Potter J. D. 1996. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *J. Amer. Diet. Assoc.* 96:1027-1039.