



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa
Owoców i Warzyw

Metodyka

METODYKA OZNACZANIA LIKOPENU W OWOCACH POMIDORA

Autorzy:

dr inż. Justyna Szwejda-Grzybowska
dr hab. Monika Mieszczakowska-Frać
mgr inż. Alina Majka
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 2020

Spis treści

1. Wstęp	3
2. Cel zadania.....	3
3. Opis metodyki oznaczania likopenu w owocach pomidora	3
3.1. Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy.....	3
3.2. Analiza chromatograficzna (HPLC).....	4
4. Walidacja metody chromatograficznej	5
5. Wnioski.....	7
6. Literatura.....	7

1. Wstęp

Owoce pomidora należą do roślin z rodziny psiankowatych. Charakteryzują się wysoką wartością odżywczą, bardzo dobrymi właściwościami zdrowotnymi i dietetycznymi oraz niską wartością energetyczną. Pomidory są cennym źródłem związków o charakterze prozdrowotnym tj.: likopenu, kwasu askorbinowego i polifenoli. Zawartość likopenu w świeżych owocach pomidora waha się w granicach od 0,88 do 7,74 mg/100 g (Compos i in. 2010). Likopen jest głównym pigmentem owoców pomidora i jest odpowiedzialny za występowanie charakterystycznego czerwonego zabarwienia, ponadto wykazuje silne właściwościami antyoksydacyjne. Bierze też udział w regulacji cyklu komórkowego oraz indukcji programowanej śmierci komórki. Związek ten coraz częściej traktowany jest nie tylko jako suplement diety, ale również jako potencjalny lek. Dieta bogata w likopen 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 odmiany, dojrzewania, nawożenia i warunków agroklimatycznych. Ich zawartość w tkankach roślinnych zależy od wielu czynników i może podlegać zmianom nie tylko w świeżych roślinach, ale także podczas ich przetwarzania i przechowywania (Shi 2000, Fanasca S. 2006, Giuffrida i in. 2013, Pugliesea i in. 2013, Haejin i in. 2014, Yuan i in. 2015, Yuan L. i in. 2016).

2. Cel zadania

Celem zadania było opracowanie i walidacja metody chromatograficznej oznaczania likopenu w owocach pomidora.

3. Opis metodyki oznaczania likopenu w owocach pomidora

3.1. Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce pomidora zostały rozdrobnione w stanie zamrożonym w malakserze z użyciem suchego lodu (zestalonego dwutlenku węgla). Naważki 1g, 2 g i 5 g rozdrobnionej próbki homogenizowano w 50 ml roztworze ekstrahującym (heksan : aceton 6:4) z dodatkiem 0,1g węglanu magnezu i 5 ml wody przez 5 min. Roztwór sączono na lejku Büchnera, przemywano niewielką ilością roztworu ekstrahującego i przenoszono do rozdzielacza. Następnie wytrząsano i czekano do rozdzielenia faz, dolną, wodną fazę odrzucano.

Operację wypłukiwania acetonu powtarzano do momentu, aż faza dolna nie będzie zawierać acetonu, a fazę górną - heksanową zawierającą karoteny sączono przez sączek bibułowy zawierający bezwodny siarczan sodu do kolbki wyparkowej na 250 ml. Heksan odparowywano do sucha w wyparce próżniowej w temp. 40°C, suchą pozostałość przenoszono ilościowo do kolbki na 25 ml za pomocą roztworu acetonitryl : metanol : octan etylu 55:25:20+0,1 % BHT + 1ml TEA i 4ml heksanu. Ekstrakt z kolbki przesączano za pomocą filtra PTFE 45µm do bursztynowej buteleczki i poddano analizie HPLC.

Najlepszą ekstrakcję likopenu otrzymano przy zastosowaniu naważki 2 g – 15,1 mg/100 g, a najniższą przy naważce 1 g – 12,2 mg/100 g (Tabela 1). W dalszych badaniach walidacji do ekstrakcji likopenu z owoców pomidora stosowano naważkę 2 g.

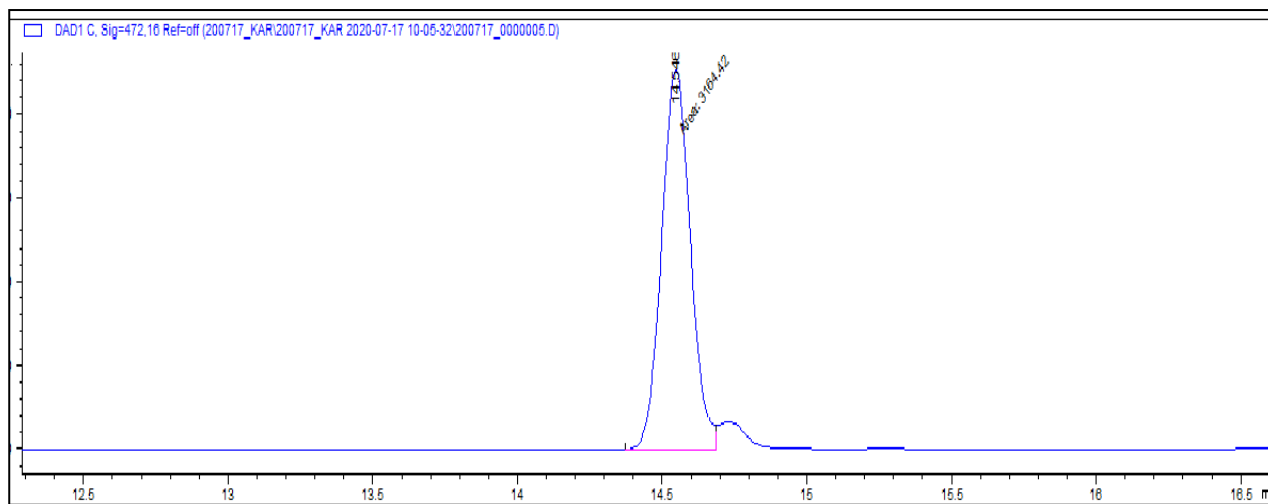
Tabela 1. Wpływ naważki próbki na wydajność ekstrakcji likopenu z surowca pomidora

Naważka	Zawartość likopenu mg/100g
1 g	12,2 ± 0,7 a
2 g	15,1 ± 0,0 c
5 g	13,0 ± 0,2 b

Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w kolumnie nie różnią się istotnie (test HSD Tukeya, $\alpha = 0,05$).

3.2. Analiza chromatograficzna (HPLC)

Rozdział prowadzono wykorzystując kolumnę Kinetex C-18 (250 mm x 4,6 mm; 5µm) na systemie HPLC Agilent 1200, wyposażony w detektor DAD. Warunki elucji były następujące: 0,7 ml min⁻¹, temperatura 28 °C, długość fali 472 nm, faza ruchoma: acetonitryl, octan etylu, metanol + 1 ml TEA + 1 g BHT w przepływie gradientowym. Obliczenia wykonano według krzywej wzorcowej dla standardów likopenu (Sigma-Aldrich, Niemcy). Rysunek 1 przedstawia rozdział likopenu wyżej opisaną metodą chromatograficzną. Zawartość likopenu wyrażono w mg/100 g.



Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdzielania likopenu w pomidorach.

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 13 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 próbek, 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 2. Zestawienie parametrów walidacji metody chromatograficznej.

	Likopen
zakres stężeń	0,46 -1,68 mg/100 ml
liniowość	$y = 0,00046x + 0,02170$
R ²	0,999
LOD	0,04 mg/100ml
LOQ	0,13 mg/100ml

Tabela 3. Charakterystyka metody dla owoców pomidora.

Pomidor	Likopen
zawartość mg/ 100 g	15,1
precyzja aparatury [RSD %]	1,15
precyzja metody intra-day [RSD %]	3,33
precyzja metody inter-day [RSD %]	2,37
powtarzalność [u]	1,36
stabilność (48 godz. T-pokojowa)	86,2
stabilność (48 godz. w lodówce)	98,3
odzysk [%]*	85,1
odzysk [RSD %]	4,43

5. Wnioski

- Opracowana metodyka jest przydatna do oznaczania likopenu w owocach pomidora. Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury, jak i metody, RSD w przedziale 2,37–3,33%. Szacunkowe wartości wymagane dla precyzji w przypadku próbek biologicznych, żywności wynosi $\sim 2 \div 20\%$.
- stabilność likopenu po dwóch dobach przechowywania w temperaturze pokojowej oraz w lodówce jest odpowiednio na poziomie 86,2 i 98,3%
- odzysk likopenu wynosi 85,1%, a RSD dla odzysku 4,43%.

6. Literatura

- Compos F.M., Chaves J.B., Raquel M.C. 2010. Adequate handling conditions to preserve vitamin C and Carotenoids in tomatoes. *Journal of Food Quality* 33: 230-245.
- Fanascia S., Colla G., Maiani G., Venneria E., Roupheal Y., Azzini E., Saccardo F. Changes in Antioxidant Content of Tomato Fruits in Response to Cultivar and Nutrient Solution Composition *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54 (12), pp 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., Leskova 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., Gościńska 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.
- Pugliese A., Loizzo M.R., Tundis R., O'Callaghan Y., Galvin 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.
- Shi J.: Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* 2000, 39: 110-114
- Yuan H., Zhang J., Nageswaran D., Li L. 2015. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research* volume 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.