



IN MARI-VIA-CIA

Uniwersytet Gdański
Wydział Chemii

Chemia żywności
Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 10

**Wykrywanie i identyfikacja syntetycznych
przeciwutleniaczy w tłuszczach**

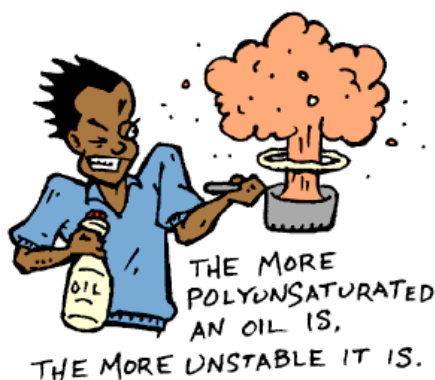
Chemia żywności

Gdańsk, 2016

10. Wykrywanie i identyfikacja syntetycznych przeciwutleniaczy w tłuszczach

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

W wielu produktach spożywczych w czasie przechowywania lub obróbki technologicznej zachodzą przemiany chemiczne powodujące obniżenie jakości żywności. Do tego typu procesów zalicza się utlenianie, w wyniku którego np. jęlczeją tłuszcze, brązowieją jabłka po obraniu czy odbarwia się sok jagodowy. Proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych zawartych w tłuszczach zwierzęcych i olejach (jęlczenie oksydatywne) przebiega łańcuchowo i nazywa się antyoksydacją. Procesowi samorzutnego utleniania się tłuszczów sprzyjają: światło, promieniowanie UV, podwyższona temperatura, obecność metali (głównie Fe i Cu), niektórych naturalnych barwników jak chlorofil i hemoglobina oraz produktów utleniania innych związków. Reakcje utleniania tłuszczów są endotermiczne – wymagają energii, ale im bardziej nienasycony jest kwas tłuszczowy tym mniej tej energii wymaga – tym mniej jest stabilny (**Rysunek 1**).



Rysunek 1. [[https://1missio\]fornutrition.files.wordpress.com/2013/11/08643bg.gif](https://1missio]fornutrition.files.wordpress.com/2013/11/08643bg.gif)]

W wyniku procesów oksydacyjnych pogorszeniu ulegają tego cechy jak: smak, zapach, barwa i konsystencja, wartość odżywcza (zmniejsza się zawartość witaminy A, D, E i B6 oraz NNKT). Ponadto, powstają związki toksyczne (nadtlenki, wolne rodniki, produkty polimeryzacji), negatywnie wpływające na zdrowie. Z tych względów konieczne jest zapobieganie procesom utleniania.

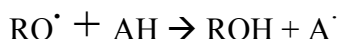
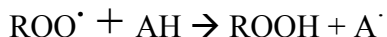
Niektóre procesy technologiczne jak np. hermetyczne pakowanie, blanszowanie, wkładanie do opakowań torebek z substancjami reagującymi z tlenem, mogą chronić niektóre produkty przed utlenianiem. Utlenianiu zapobiega także wędzenie (składniki dymu posiadają działanie przeciwutleniające) oraz peklowanie (s-nitrozocysteina powstająca w czasie peklowania jest przeciwutleniaczem). Związki Maillarda, powstające np. w czasie pieczenia i smażenia, również mają właściwości przeciwutleniające. Właściwości przeciwutleniające wykazują także takie przyprawy jak: rozmaryn, kminek, tymianek, cynamon, majeranek, goździki) ze względu na fakt, iż

10. Wykrywanie i identyfikacja syntetycznych przeciwutleniaczy w tłuszczach

występują w nich związki flawonowe i produkty reakcji Maillarda.

Zasadniczo, **przeciwutleniaczami** nazywa się substancje, które dodane do produktów spożywczych w małych stężeniach zabezpieczają je przed niekorzystnymi zmianami spowodowanymi utlenianiem i przedłużają ich trwałość. Przeciwutleniacze można podzielić na *naturalne* (występujące w żywności naturalnie, np. tokoferole w olejach roślinnych, związki flawonowe w owocach i warzywach) oraz *syntetyczne* (dodawane do produktów spożywczych).

Mechanizm ich działania jest zróżnicowany, ale większość z nich przerywa łańcuch oksydacyjny. Przeciwutleniacze w tłuszczach hamują ich utlenianie poprzez akceptację rodników inicjujących proces utleniania (rodników nadtlenkowych) i wprowadzenia atomu wodoru do wolnego rodnika. Tworzący się rodnik przeciwutleniacza jest stabilny i tworzy stabilne produkty. Schemat takiej reakcji przedstawiono poniżej:



gdzie: AH – przeciwutleniacz,

ROO[·] – rodnik nadtlenkowy,

RO[·] – rodnik lipidowy.

Wykaz dozwolonych do stosowania w Polsce substancji przeciwutleniających (zgodnie z *Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 18 września 2008 roku w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych, Dz. U. 2008, nr 177, poz. 1094*) i ich ADI - dopuszczalne dzienne spożycie (ang. *Acceptable Daily Intake*) zostały przedstawione w **Tabeli 1 i 2**.

Tabela 1. Wykaz typowych przeciwutleniaczy dopuszczonych do stosowania w Polsce

Lp.	Nazwa	Nr E	ADI [mg/kg masy ciała]
1	Mieszanina tokoferoli	E 306	0 – 2,0
2	α-tokoferol	E 307	0,15 – 2,0
3	γ-tokoferol	E 308	0,15 – 2,0
4	δ- tokoferol	E 309	0,15 – 2,0
5	Galusan propylu (PG)	E 310	0 – 1,4
6	Galusan oktylu (OG)	E 311	0 – 0,1 tymczasowe*
7	Galusan dodecyłu (DDG)	E 312	0 – 0,1 tymczasowe*
8	Tert-butylohydrochinon (TBHQ)	E 319	0 – 0,7
9	Butylohydroksyanizol (BHA)	E 320	0 – 0,5
10	Butylohydroksytoluen (BHT)	E321	0 – 0,3

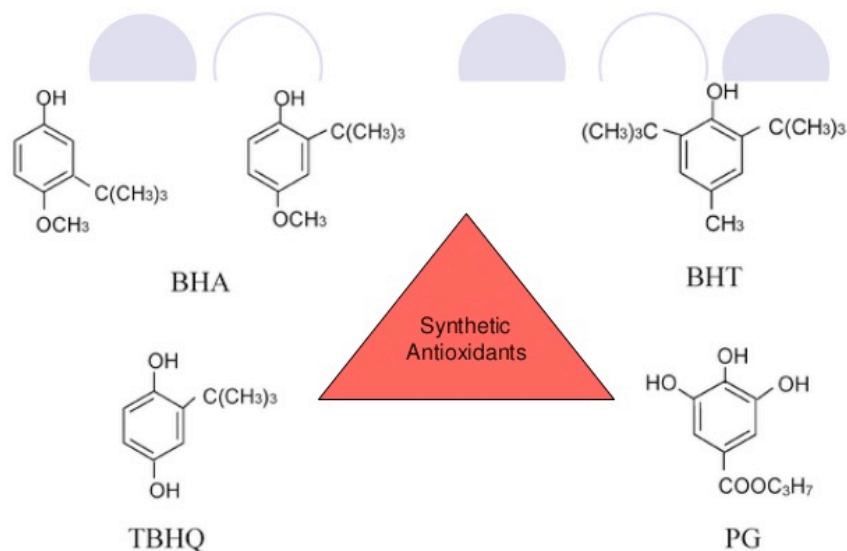
*ustalono tymczasowe ADI ze względu na ujemny wpływ na reprodukcję

10. Wykrywanie i identyfikacja syntetycznych przeciwutleniaczy w tłuszczach

Tabela 2. Wykaz innych związków o działaniu przeciwutleniającym dopuszczonych do stosowania w Polsce

Lp.	Nazwa	Nr E	ADI [mg/kg masy ciała]
1	Kwas L-askorbinowy, askorbiniany sodu	E 300, E 301	Nie wymaga limitowania
2	Estry kwasów tłuszczowych i kwasu askorbinowego – palmitynian i stearynian askorbylu	E 304	
3	Kwas erytrobowy (izoaskorbinowy), izoaskorbinian sodu	E 315, E 316	Nie wymaga limitowania
4	Mleczan sodu/potasu/wapnia	E 325/E 326/E 327	Nie wymaga limitowania
5	Kwas cytrynowy	E 330	Nie wymaga limitowania
6	Cytrynian sodu/potasu/wapnia	E 331/E 332/E 333	Nie wymaga limitowania
7	Kwas winowy L(+)	E 334	Nie ustalono
8	Winiany sodu	E 335	0-30
9	Winiany potasu	E 336	Brak danych
10	Winiany sodowo-potasowy	E 337	0-30

Struktury chemiczne wybranych przedstawicieli tej grupy dodatkowych do żywności przedstawiono na poniższym rysunku.



Rysunek 2. Struktury chemiczne wybranych syntetycznych przeciwutleniaczy

[<http://www.slideshare.net/SadanandPatel1/oxidative-rancidity-in-oils-and-fats-causes-and-prevention>]

Niektóre przeciwutleniacze działają synergistycznie, co oznacza, że w połączeniu z innymi związkami działają skuteczniej niż użyte pojedynczo. Typowe przeciwutleniacze dozwolone do

10. Wykrywanie i identyfikacja syntetycznych przeciwutleniaczy w tłuszczach

stosowania do żywności muszą spełniać odpowiednie wymagania:

- muszą przeprowadzone być szczegółowe badania toksykologiczne, mające na celu wyznaczenie ADI;
- muszą rozpuszczać się w tłuszczach;
- nie mogą przekazywać obcej barwy, zapachu i smaku tłuszczowi, nawet podczas długiego przechowywania;
- muszą skutecznie przeciwdziałać utlenianiu co najmniej przez rok w temperaturze 25-30 °C;
- muszą być odporne na działanie temperatur;
- muszą być łatwe do wprowadzenia do produktu;
- muszą być efektywne w stężeniach 0,001-0,1%.

Wybierając przeciwutleniacze, należy brać pod uwagę, jak mogą one działać w obecności peroksydantów i antyoksydantów już obecnych w żywności lub powstających w wyniku przetwarzania żywności. Dodawanie ich jest możliwe tylko wtedy gdy jest to technologicznie uzasadnione. Należy je dodawać w minimalnych dawkach, gwarantujących skuteczność. Stosując większe dawki przeciwutleniaczy (np. fenolowych i tokoferoli) można przyspieszyć utlenianie, a więc spowodować efekt odwrotny.

Przeciwutleniacze można dodawać bezpośrednio do olejów roślinnych czy rozpuszczonych tłuszczów zwierzęcych. Produkty spożywcze można też spryskiwać lub zanurzać w przeciwutleniaczach, lub też pakować żywność w folie zawierające przeciwutleniacze.

We wspomnianym Rozporządzeniu Ministra Zdrowia określono także zastosowania poszczególnych przeciwutleniaczy i synergenów. Na zasadzie *quantum satis* (z łac. ile trzeba), to jest zgodnie z dobrą praktyką produkcyjną, można stosować kwas askorbinowy, askorbiniany sodu i potasu, palmitynian i stearynian askorbylu, tokoferole, kwas mlekowy, mleczyan, kwas cytrynowy i cytryniany, kwas winowy oraz jabłczany. Dla przykładu:

- niezemulgowane oleje i tłuszcze pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego (z wyjątkiem Oliwy vergin i oliwy z oliwek) – estry kwasów tłuszczowych i kwasu askorbinowego, mieszanina tokoferoli, α -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol, lecytyny, kwas cytrynowy, cytrynian sodu, potasu, wapnia;
- niezemulgowane oleje i tłuszcze pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego (z wyjątkiem Oliwy vergin i oliwy z oliwek) szczególnie przeznaczone do gotowania, smażenia, lub przygotowania zasmażek – kwas mlekowy, kwas askorbinowy, estry kwasów tłuszczowych

10. Wykrywanie i identyfikacja syntetycznych przeciwutleniaczy w tłuszczach

i kwasu askorbinowego, mieszanina tokoferoli, α -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol, lecytyny, kwas cytrynowy, cytrynian sodu, potasu, wapnia;

- rafinowana oliwa z oliwek łącznie z olejem z wycłoczyn z oliwek - α -tokoferol.

Oddzielnie natomiast wyszczególnione zostały przeciwutleniacze, które wolno dodawać do konkretnych produktów spożywczych w ściśle określonych ilościach. Zalicza się do nich galusany, TBHQ, BHA, BHT oraz kwas erytrobowy i izoaskorbinian sodu. Gdy dodawane są łącznie, dodaje się je na zasadzie proporcjonalności, to jest indywidualne poziomy każdego z nich muszą być odpowiednio zmniejszone.

Zastosowanie tych substancji omówiono poniżej:

- galusany, TBHQ, BHA – tłuszcze i oleje do przemysłowej produkcji środków spożywczych poddawanych obróbce termicznej, oleje i tłuszcze do smażenia z wyjątkiem oleju z wycłoków oliwek, smalec, olej ryby; ciasta w proszku, wyroby typu sneksy, mleko w proszku do automatów, sosy, suszone mięso, przetworzone orzechy, produkty zbożowe poddane wstępnej obróbce termicznej; guma do żucia, suplementy uzupełniające dietę; olejki eteryczne;
- BHT – tłuszcze i oleje tłuszcze i oleje do przemysłowej produkcji środków spożywczych poddawanych obróbce termicznej, oleje i tłuszcze do smażenia z wyjątkiem oleju z wycłoków oliwek, smalec, olej ryby; guma do żucia, suplementy uzupełniające dietę;
- Kwas erytrobowy (izoaskorbinowy) i izoaskorbinian sodu – produkty mięsne peklowane i utrwalone, utrwalone i częściowo utrwalone przetwory rybne, w tym konserwy, marynaty, mrożone ryby o czerwonej skórze.

W Rozporządzeniu odrębnie omówiono substancje dodatkowe stosowane w procesie produkcji żywności dla niemowląt i małych dzieci.

Ograniczenia w stosowaniu przeciwutleniaczy wynikają z ciągle niejednoznacznej odpowiedzi na temat ich szkodliwości. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę wybranych przedstawicieli.

10. Wykrywanie i identyfikacja syntetycznych przeciwutleniaczy w tłuszczach

Tabela 3. Charakterystyka wybranych przeciwutleniaczy

Nazwa	Działanie
BHA	Dobrze się wchłania z przewodu pokarmowego i może dokładać się w tkance tłuszczowej. Metabolizm przebiega z wytworzeniem połączeń z kwasem glukuronowym i siarkowym. BHA i metabolity wydalone są głównie z moczem. Dzięki utleniającym właściwościom chroni organizm przed niekorzystnymi zmianami oksydacyjnymi, ale te same właściwości czynią z BHA związek o potencjalnym działaniu rakotwórczym. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach doświadczalnie (głównie na szczurach) stwierdzono, że BHA w większych dawkach powoduje m. in.: spadek krzepliwości krwi; przyczynia się do zwiększonego wydalania z moczem sodu i potasu; zmiany w korze nadnerczy; odczyny alergiczne i inne. Uważa się, że BHA w ilościach w jakich dodawany jest do żywności, nie jest szkodliwy, wręcz stwierdzono, że może działać antykancerogennie. Mimo wszystko jego stosowanie jest ograniczone, szczególnie zakazane w żywności dla niemowląt i dzieci.
BHT	Najczęściej jest używane w mieszankach z BHA, galusanami i synergentami. Dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego i odkłada się w tkance tłuszczowej. Jest metabolizowane wolniej niż BHA i w mniejszym stopniu wydala z moczem. Może również działać szkodliwie, gdy podawany w większych dawkach: może powodować rozrost tarczycy, zwiększa masę płuc i nerek; wpływa niekorzystnie na metabolizm witaminy K _m obniżając jej wchłanianie i tym samym zmniejsza krzepliwość krwi, przyczyniając się do wewnętrznych i zewnętrznych krwotoków; u zwierząt działa teratogennie, powodując większą śmiertelność potomstwa; może powodować odczyny alergiczne. Z tych względów BHT jest dodawany do opakowań artykułów szybko jęczących, niż bezpośrednio do żywności. Ze względu na szkodliwe skutki BHT przy długoterminowym narażeniu zezwala się na dodawanie tego przeciwutleniacza jedynie do tłuszczów i gumy do żucia i w dawkach mniejszych niż BHA. Produktów z BHT nie powinno podawać się małym dzieciom.
Galusany	Galusany występują naturalnie w wielu roślinach. Są stosowane z BHA i BHT, dla których są synergentami. Galusany mają niską odporność termiczną, tracą dlatego swoje właściwości w produktach smażonych. Są one hydrolizowane w organizmie do kwasu galusowego, który jest następnie przekształcany do metylogalusowego i wydala z moczem w postaci wolnej lub z kwasem glukuronowym. Z badań przeprowadzonych na zwierzętach wynika, że galusany w większych dawkach mogą: powodować niedokrwistość, zmniejszają wchłanianie żelaza; mogą włąćwać niekorzystnie na rozrodczość; mają działanie hepatotoksyczne; wywoływać odczyny alergiczne. Nie stwierdzono natomiast działania rakotwórczego galusanów.
TBHQ	Jest jednym z najbardziej efektywnych przeciwutleniaczy, szczególnie efektywny dla wielonienasyconych kwasów tłuszczowych olejów roślinnych i różnych rodzajów tłuszczu zwierzęcych. Zapewnia wyższą stabilność olejów roślinnych. W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że w dużych dawkach może powodować uszkodzenia DNA i przyczyniać się do powstania nowotworów żołądka.
Tokoferole syntetyczne	Chronią NNKT przed utlenianiem. W badaniach dot. toksyczności tokoferoli nie stwierdzono ich działania rakotwórczego, mutagennego czy teratogenego. W porównaniu z innymi przeciwutleniaczami wysuwanych jest wobec nich najmniej zastrzeżeń zdrowotnych.

10. Wykrywanie i identyfikacja syntetycznych przeciwutleniaczy w tłuszczach

2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z wykazem i zakresem stosowania przeciwutleniaczy w żywności oraz wykrywania i identyfikacja przeciwutleniaczy występujących w tłuszczach spożywczych.

2.2 Wykonanie ćwiczenia

Analizowane produkty spożywcze

- Oleje, margaryny, smalec, oliwa z oliwek

Odczynniki chemiczne

- bezwodny etanol
- roztwór rodanku żelazowego (1 cz. 0.2% chlorku żelazowego i 1cz. 0,1 N rodanku amonowego rozcieńczonego 2 cz. Wody destylowanej)
- 2,6-dichlorochinonochlorimid w 75% etanolu; 0,002% roztwór
- czteroboran sodowy 2%
- stężony amoniak
- kwas octowy, 5%
- żelazocyjanek potasu, 1% roztwór wodny
- siarczan miedziowy, 0,1 N roztwór wodny

Szkló laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- probówki z korkami
- pipeta V = 5 ml, 2 szt.
- pipeta V = 2 ml, 3 szt.
- pipeta V = 1 ml, 3 szt.
- pipeta V = 0,02 ml, 1 szt.
- pompka do pipet
- statyw do probówek
- statyw do pipet
- zlewka
- łopatką do naważania
- pipeta pasteurą

10. Wykrywanie i identyfikacja syntetycznych przeciwutleniaczy w tłuszczach

- płaszcz grzejny, waga techniczna

SPOSÓB WYKONANIA [1]

2.2.1 Wstępne wykrywanie obecności środka przeciwutleniającego w tłuszczach

Zasada metody polega na stwierdzeniu wystąpienia zabarwienia roztworu tłuszczu po dodaniu rodanku żelazowego, które powstaje w wyniku reakcji jonów Fe^{3+} z przeciwutleniaczem.

Wykonanie:

W probówce umieścić 1 cm³ lub 1 g tłuszczu i dodać 2 cm³ bezwodnego etanolu; ogrzać na łaźni wodnej do otrzymania jednolitego roztworu, po ostudzeniu dodać stopniowo (kroplami) 0,2 cm³ roztwór rodanku żelazowego do otrzymania trwałego czerwonego zabarwienia i obserwować zmiany barwy.

Wynik:

W obecności środka przeciwutleniającego rodatek żelazowy znacznie odbarwiać się po 2-3 minutach (w przypadku galusanów powstanie niebieskoszare zabarwienie). W przypadku czystych tłuszczów i olejów już dodatek 0,1 cm³ wskaźnika powoduje powstawanie czerwonego zabarwienia, utrzymującego się przez kilka godzin. Stężenie jonów Fe^{3+} oraz środowisko zostały tak dobrane, że tokoferoli (które mogą naturalnie występować w olejach) nie można wykryć w tej próbie. W przypadku BHA reakcja nie zachodzi.

2.2.2 Wykrywanie BHA

Wykonanie

W probówce umieścić 1 cm³ lub 1 g tłuszczu i dodać 2 cm³ bezwodnego etanolu; ogrzać na łaźni wodnej do otrzymania jednolitego roztworu, po ostudzeniu dodać 12 cm³ 0,002% roztworu 2,6-dwuchlorochinonochloramidu w 75%, a po dokładnym wymieszaniu – 2 cm³ buforu boranowego.

Wynik

W obecności BHA występuje niebieskie (indofenolowe) zabarwienie, którego intensywność osiąga maksimum po 10 minutach. Przy równoczesnej obecności BHA i galusanów zabarwienie niebieskie przyjmuje szarawy odcień i szybko blednie.

2.2.3 Wykrywanie obecności galusanów

Wykonanie

W probówce umieścić 1 cm³ lub 1 g tłuszczu i dodać 2 cm³ bezwodnego etanolu; ogrzać na łaźni wodnej do otrzymania jednolitego roztworu, po ostudzeniu dodać 0,5 – 1 cm³ stężonego amoniaku, silnie wstrząsnąć.

10. Wykrywanie i identyfikacja syntetycznych przeciwutleniaczy w tłuszczach

Wynik:

Różowe zabarwienie świadczy o obecności galusanów. Barwa znika po 10-15 minutach.

2.2.4 Wykrywanie obecności hydrochinonu (niezgodzony) w tłuszczach

Zasada metody polega na reakcji hydrochinonu żelazicyjankiem potasu w kwaśnym środowisku. Powstający w wyniku utleniania hydrochinonu chinon może dawać przejściowo zabarwienie żółte, natomiast w wyniku redukcji żelazicyjanku powstaje żelazocyjanek, który z jonami Cu^{2+} daje czerwono-brunatny osad sześciocyjanożelazianu miedziowego.

Wykonanie:

W probówce umieścić 1 cm³ lub 1 g tłuszczu, dodać 2 cm³ wody, wymieszać i dodać 3 cm³ 5% kwasu octowego, a następnie 3 krople 1-procentowego roztworu żelazicyjanku potasu i 0,5 cm³ 0,1 N roztworu siarczynu miedziowego.

Wynik:

Czerwono-brunatne zabarwienie lub płatkowaty osad wskazują na obecność hydrochinonu.

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Sprawozdanie powinno zawierać opis części eksperymentalnej, zestawienie uzyskanych wyników w formie poniższej tabeli wraz z dyskusją otrzymanych rezultatów.

Tabela 4. Zestawienie uzyskanych wyników

Próba na obecność	Dokonane obserwacje	Wnioski
Środka przeciwutleniającego		
BHA		
galusanów		
hydrochinonu		

LITERATURA

1. Toksykologia żywności, Przewodnik do ćwiczeń pod redakcją A. Brzozowskiej, Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2010.