



IN MARI VIA CUA

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii

**Chemia żywności**  
**Katedra Analizy Środowiska**

# **Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych**

## **Ćwiczenie nr 9**

**Wpływ procesów technologicznych na zawartość  
tiocyanianów w warzywach**

**Chemia żywności**

Gdańsk, 2016

## 7. Wpływ procesów technologicznych na zawartość tiocyjanianów w warzywach

### 1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

#### 1.1. Substancje antyodżywcze

Do substancji antyodżywczych w żywności zaliczane są takie substancje, które ograniczają lub uniemożliwiają wykorzystanie składników odżywczych ze spożywanych produktów. Nazywane są także substancjami wywierającymi szkodliwy wpływ na organizm ludzki. Zalicza się do nich: związki pochodzenia naturalnego; związki toksyczne, które przenikają do żywności na skutek zanieczyszczenia środowiska, m.in. w wyniku zabiegów agrotechnicznych (pozostałości środków ochrony roślin, pestycydów) oraz procesów technologicznych, niektóre substancje celowo dodawane do żywności (dodatki do żywności). Do substancji antyodżywczych pochodzenia naturalnego zalicza się m.in.: goitrogeny.

#### 1.2. Goitrogeny

Goitrogeny to substancje wolotwórcze, do których zaliczne są związki (szczególnie ich metabolity), które mogą wpływać na metabolizm jodu, prowadząc do obniżenia jego stężenia w organizmie. To skolei prowadzi do zaburzenia syntezy hormonów tarczycy oraz przerostu gruczołu (stąd nazywa się substancjami wolotwórczymi). Do naturalnych substancji wolotwórczych (goitrogenów) należą: tioglikozydy, glikozydy cyjanogenne, polifenole oraz hemaglutyniny.

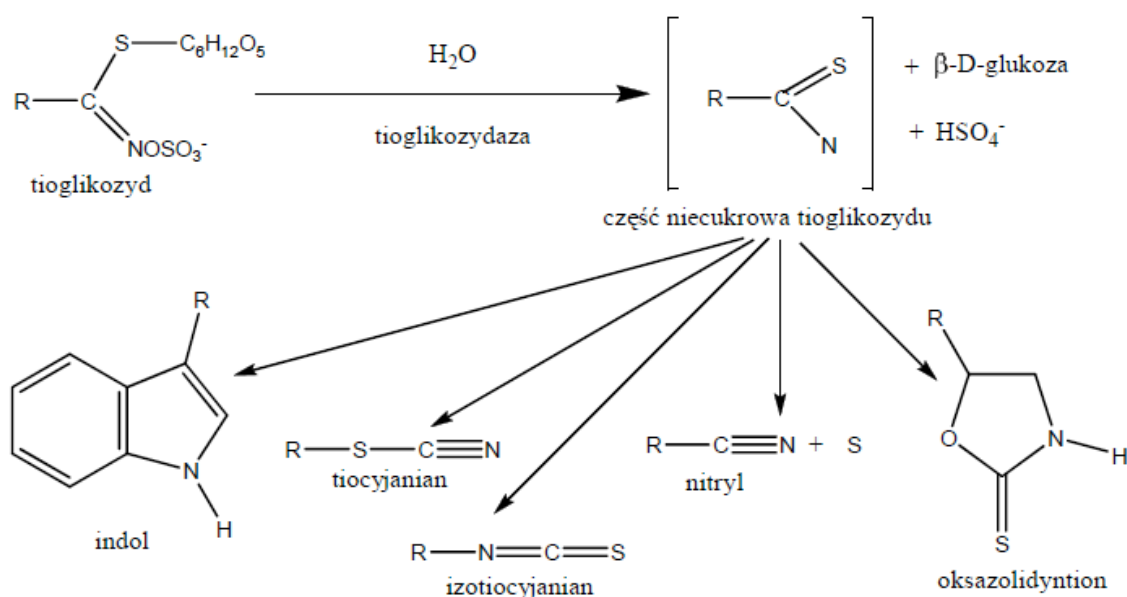
##### 1.2.1 Tioglikozydy (glukozynolany)

Tioglikozydy (glukozynolany, GLS) są anionami organicznymi posiadającymi cząsteczkę  $\beta$ -D-glukozy, sulfonowany oksym i łańcuch boczny o strukturze alifatycznej lub aromatycznej (**Rysunek 1**). Substancje te występują głównie w roślinach z rodziny krzyżowych tj.: kapuście, brukselce, jarmużu, kalafiorze, rzepie, kalarepie, rzepaku. Mimo iż obecne są we wszystkich częściach roślin, to w największym stężeniu występują nasionach. Do organizmu człowieka trafiają przez bezpośrednie spożywanie wyżej wymienionych warzyw lub dostają się wraz z mlekiem pochodzącym od krów karmionych paszą zawierającą dużą ilość roślin krzyżowych.

Różnorodność występujących kombinacji łańcucha bocznego sprawia, że w chwili obecnej znanych jest około 100 różnych związków, z czego w warzywach kapustnych występuje około 20 glukozynolanów (np. synigryna, progoitryna, glukonapina, glucoiberyna, neoglukobrassicyna). W roślinach tioglikozydy występują w postaci glikozydowej i połączenia te nie wykazują toksyczności

## 7. Wpływ procesów technologicznych na zawartość tiocyjanianów w warzywach

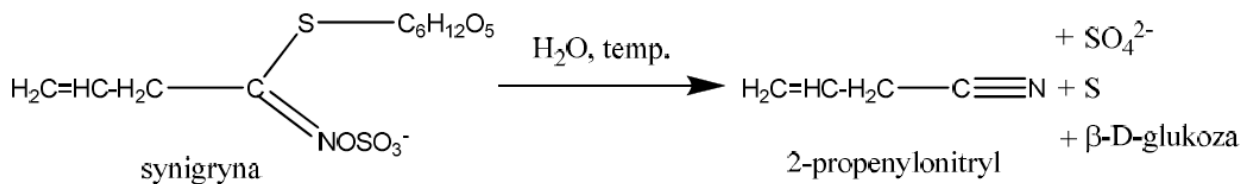
w stosunku do roślin, zwierząt jak i patogenów. Jednakże wszystkie rośliny zawierające te substancje antyodżywcze posiadają również enzym myrozynazę (tioglikozydazę, glukohydroksydazę tioglikozydową, EC 3.2.1.147) zdolną do degradacji tych związków do form prostszych. W wyniku ich hydrolizy enzymatycznej powstaje glukoza, jon siarczanowy oraz w zależności od warunków (głównie od pH) szereg produktów degradacji, m.in. tiocyjaniany, izotiocyjaniany, związki indolowe, nityle oraz oksazolidyntiony (**Rysunek 1**).



**Rysunek 1.** Hydroliza enzymatyczna tioglikozydów

Tenże enzym, który odpowiedzialny jest za przeprowadzenie hydrolizy enzymatycznej tioglikozydów (myrozynaza) składa się z trzech do czterech izoenzymów i występuje w roślinach krzyżowych. Ponieważ występuje w komórkach, jej działanie (w szerokim zakresie pH od 3 do 8, w obecności wody) jest możliwe dopiero po zmiążdżeniu tkanek i uwolnieniu z nich soku komórkowego. Enzymatyczny rozkład tioglikozydów ma zatem miejsce w jamie ustnej w czasie żucia pokarmu, a także przy rozdrabnianiu warzyw podczas przygotowywania potraw. Dopiero jednak ekstrakcja wodą oraz gotowanie uwalnia większość tych aktywnych substancji. Temperatura 90 °C powoduje denaturację tego enzymu i hamuje jej działanie. Należy także podkreślić fakt, iż w czasie gotowania niektóre tioglikozydy ulegają destrukcji pod wpływem temperatury, z wytworzeniem nityli (**Rysunek 2**), zaś większość tiocyjanianów jest lotna i podczas gotowania warzyw w otwartym naczyniu ulatnia się z parą wodną.

## 7. Wpływ procesów technologicznych na zawartość tiocyjanianów w warzywach



**Rysunek 2.** Destrukcja tioglikozydów pod wpływem temperatury

Te tioglikozydy, które nie uległy hydrolizie podczas jedzenia czy przygotowywania w dalszych odcinkach układu pokarmowego ulegają hydrolizie pod wpływem tioglikozydazy bakteryjnej.

Produkty hydrolizy mogą wykazywać działanie toksyczne, mogą negatywnie wpływać na zahamowanie wzrostu zwierząt, ograniczać ich reprodukcję, wywołać zaburzenia metabolizmu jodu, a także powodować uszkodzenia wątroby i nerek.

W kapuście występują cztery rodzaje glikozydów, w których część niecukrową, aktywną wolotwórczo stanowią tiocyjaniany (50 mg/kg), izotiocyjaniany (100 mg/kg), tiooksazolidyny (10 mg/kg) oraz antocyjany (związki z grupy polifenoli), występujące w dużych ilościach, np. w kapuście czerwonej.

Stosunek  $SCN^-/I > 500$ , jak np. w racji pokarmowej zawierającej około 500 g kapusty o zawartości około 100 mg tiocyjanianów i przy podaży jodu w granicach norm, to jest ok. 100 µg, może stworzyć warunki dla przerostu tarczycy. Zaburzenie metabolizmu tarczycy można wywołać nie tylko przez spożywanie dużej ilości roślin krzyżowych, ale także: manioku, soi, cebuli i czosnku. Wolotwórcze działanie wyżej wymienionych produktów jest zwykle tym silniejsze, im mniejsza jest podaż jodu. Występowanie wola endemicznego ma miejsce w środkowej i wschodniej Europie, w regionach oddalonych od morza, co związane jest z dużym spożyciem kapusty i niedostatecznej ilości jodu w powietrzu i pożywieniu. Spożywanie większej ilości wyżej wymienionych produktów powoduje w pierwszym okresie spadek aktywności sekrecyjnej tarczycy przez zahamowanie syntezy tyroksyny. W konsekwencji następuje obniżenie we krwi poziomu trijodotyroniny (T3) i tetrajodotyroniny (T4, tyroksyna), które są aktywnymi formami hormonu gruczołu tarczycy. W drugim etapie zmniejszony ich poziom w płynach ustrojowych powoduje wzrost aktywności tyreotropowej, przez zwiększoną sekrecję hormonu tyreotropiny (TSH) z przysadki mózgowej, co powoduje przerost masy tarczycy (wole). Sposób działania czynników goitrogennych jest różny.

**Tiocyjaniany (SCN<sup>-</sup>)** z łatwością przenikają przez wszystkie błony komórkowe. Konkurując z jonami jodu powodują hamowanie ich transportu do tkanek, w tym gruczołu tarczycy

## 7. Wpływ procesów technologicznych na zawartość tiocyjanianów w warzywach

(kompetencyjna inhibicja transportu I<sup>-</sup>). Tiocyjaniany przyspieszają dodatkowo wydalanie jodu przez nerki; inaktywują peroksydazę tarczycową odpowiedzialną za utlenianie anionu I<sup>-</sup>, tak zwaną organifikację jodu (konwersja jodu nieorganicznego w organiczny) i sprzężanie jodotyrozyn. W wyniku ich działania następuje spadek stężenia jodu w tarczycy, utrudnione jodowanie tyrozyny, gromadzenie się mono- i diiodotyrozyny, co powoduje wzrost masy gruczołu.

Tiocyjaniany mogą być metabolizowane w różnych tkankach do cyjanianów i siarczanów. Rozkład jonów tiocyjanianowych może następować pod wpływem peroksydazy, której rolę może pełnić również hemoglobina.

**Izotiocyjaniany (NSC<sup>-</sup>)** są głównymi toksycznymi produktami powstającymi w wyniku działania myrozynazy na tioglikozydy. Izotiocyjaniany i tiooksazolidyny hamują aktywność peroksydazy tarczycowej, wpływają przez to hamująco na syntezę hormonów tarczycy. Izotiocyjaniany mogą przekształcać się w organizmie w tiocyjaniany.

**Nitryle** natomiast są najbardziej toksycznymi produktami rozpadu tioglikozydów, ale głównie działają na nerki. Detoksykacja tych związków w organizmie jednak prowadzi do wytworzenia tiocyjanianów.

Bardzo silną aktywność goitrogeną wykazują także **tiooksazolidyny**. Hamują one syntezę tyroksyny oraz jej sekrecję do krwi. Dodatkowa podaż jodu w diecie tylko w nieznacznym stopniu łagodzi ich wolotwórcze działanie. Świadczy to o tym, że tiooksazolidyny zaburzają metabolizm tarczycy, ale nie dopływ i gromadzenie jodu przez tarczycę. Tiooksazolidyny przenikają przez łożysko i do mleka. Najlepiej poznanym przedstawicielem tej grupy substancji wolotwórczych jest progoitryna. Występuje ona w ziarnach żółtej rzepy i rzepaku. Jej aktywną częścią jest goitryna (5-winylo-2-tiooksazolidon). Udowodniono, że podawanie 10 µg goitryny królikom przez 3 tygodnie może zwiększyć znacznie masę tarczycy. U ludzi również stwierdzono, że niewielkie ilości tego tioglikozydu hamują wbudowywanie jodu do tarczycy.

### **UWAGA!!!:**

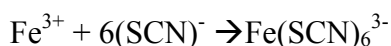
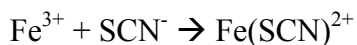
Student zobowiązany jest do zapoznania się także z informacjami zawartymi w **Rozdziale 4.3.3 (Spektrofotometria UV-Vis, str. 154-161)** oraz **Rozdziale 4.3.4. (Metody analizy ilościowej – metody krzywej kalibracyjnej, str. 162-163)** zawartych w pozycji: Kumirska J., Gołębiowski M., Paszkiewicz M., Bychowska A., *Analiza żywności, skrypt elektroniczny* dla studentów Ochrony Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 2010, ISBN 978-83-7326-711-4, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.

## 2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

### 2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości tiocyjanianów w wybranych warzywach oraz wykazanie wpływu ogrzewania w środowisku wodnym na zachowanie tych związków w produkcji.

Zasada metody polega na wyekstrahowaniu tiocyjanianów z badanej próby kwasem trichlorooctowym (TCA) i przeprowadzeniu reakcji z jonami żelazowymi. W środowisku kwaśnym powstaje krwistoczerwone zabarwienie w wyniku tworzenia się kompleksów od  $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$  do  $\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$ :



### 2.2. Wykonanie ćwiczenia [1]

#### *Analizowane produkty spożywcze*

- kapusta biała
- jeśli po wykonaniu oznaczenia jonów  $\text{SCN}^-$  i przygotowaniu krzywej kalibracyjnej Studentom pozostanie czas dodatkowo mogą oznaczyć jony  $\text{SCN}^-$  w cebuli

#### *Odczynniki chemiczne*

- kwas trichlorooctowy (TCA), roztwór 5%
- roztwór azotanu(V) żelaza(III) (rozpuścić 80 g  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \times 9\text{H}_2\text{O}$  (404 g/mol) w 250 ml 2M kwasu azotowego(V), uzupełnić wodą do 500 ml)
- roztwór A - roztwór podstawowy jonów  $\text{SCN}^-$  (rozpuścić 16,7 mg rodanku potasu (97 g/mol) w 100 mL 5% kwasu trichlorooctowego)

#### *Szkló laboratoryjne, sprzęt i akcesoria*

- Sprzęt do rozdrabniania warzyw (deska, nóż)
- Zlewka o poj. 150 ml - 1 szt.
- Moździerz porcelanowy o poj. 100 ml z pistelem - 2 szt.
- Cylinder miarowy o poj. 50 ml - 2 szt

### 7. Wpływ procesów technologicznych na zawartość tiocyjanianów w warzywach

- Lejek średni - 2 szt., mały – 1 szt.
- Kolbka stożkowa o poj. 100 ml ze szlifem - 2 szt.
- Bagietka - 1 szt.
- Filtry strzykawkowe wraz ze strzykawkami o obj. 5 ml – 2 sztuki
- Probówki szklane w statywie
- Pipeta o poj. 2 ml - 2 szt.
- Pipeta o poj. 10 ml – 1 szt.
- Pipeta o poj. 5 ml – 3 szt.
- Bibuła filtracyjna
- Waga techniczna, płyta grzejna, spektrofotometr, kuwety.

### **SPOSÓB WYKONANIA**

#### ***Sporządzanie krzywej wzorcowej***

10 ml roztworu A rozcieńczyć 5% roztworem TCA do 100 ml, uzyskując w ten sposób roztwór wzorcowy B, którego 1 ml zawiera 10 µg jonów SCN<sup>-</sup>. Z tego roztworu przygotowuje się krzywą wzorcową według schematu podanego w Tabeli 1, pobierając do kolejnych probówek od 0 do 5 ml roztworu wzorcowego B i uzupełniając do 5 ml 5% TCA. Po przygotowaniu tak opisanych roztworów wzorcowych należy zmierzyć absorbancję trzykrotnie wobec próby ślepej odczynnikowej przy długości fali 470 nm. Uzyskane wyniki zapisać w Tabeli 2.

**Tabela 1.** Sposób przygotowania roztworów wzorcowych

<b>Roztwór B</b>	<b>5% TCA</b>	<b>Azotan żelazowy</b>	<b>stężenie</b>
<b>ml</b>	<b>ml</b>	<b>ml</b>	<b>µg/ml</b>
0	5	5	0 (ślepa)
1	4	5	2
2	3	5	4
3	2	5	6
4	1	5	8
5	0	5	10

## 7. Wpływ procesów technologicznych na zawartość tiocyjanianów w warzywach

**Tabela 2.** Wyniki pomiaru absorbancji przygotowanych roztworów wzorcowych

Stężenie [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Pomiar absorbancji 1	Pomiar absorbancji 2	Pomiar absorbancji 3	Średnia wartość absorbancji

### ***Oznaczenie tiocyjanianów w warzywach surowych i gotowanych***

Z jednorodnej, rozdrobnionej próby badanego materiału przygotować dwie naważki po 5 g. Jedną z nich przenieść do zlewki 150 ml, dodać 50 ml wody i ogrzewać, utrzymując w lekkim wrzeniu przez 10 min.

Następnie surowy i gotowany (po odlaniu wody) materiał rozetrzeć dokładnie w moździerzu porcelanowym, przenieść ilościowo do kolb stożkowych ze szlifem o poj. 100 ml, dodać po 45 ml 5% kwasu trichlorooctowego (TCA) i wytrząsać przez 10 min. Następnie próbki przenieść do plastikowych tup wirowkowych i odwirować przy 3000 obrotów/min przez 10 min i sączyć przez sączek twardy.

Z każdego przesączu (po dokładnym wymieszaniu) pobrać po 2 ml do 2 probówek. Do jednej probówki dodać 2 ml wody (ślepa próba), a do drugiej – 2 ml roztworu  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$  (od tej chwili przetrzymywać próby bez dostępu światła). Dodatkowo należy przygotować próbę ślepa odczynnikową, biorąc 2 ml wody i 2 ml azotanu żelazowego.

Następnie zmierzyć absorbancję przygotowanych prób wobec wody destylowanej przy długości fali 470 nm w czasie nie dłuższym niż 5 min od dodania azotanu żelazowego w następującej kolejności: próba ślepa, próba ślepa odczynnikowa i próby właściwe – najpierw próbka surowa a potem po gotowaniu. Stężenie tiocyjanianów w badanej próbce odczytać z krzywej wzorcowej, pomniejszając uzyskana absorbancję o wartości odpowiednich prób ślepych (ślepej próby i ślepej odczynnikowej).

Wynik przeliczyć na naważkę i na 100 g produktu.



## 7. Wpływ procesów technologicznych na zawartość tiocyjanianów w warzywach

### **3. OPRACOWANIE WYNIKÓW**

Sprawozdanie powinno zawierać opis części eksperymentalnej, zestawienie uzyskanych wyników wraz z opracowaniem statystycznym oraz dyskusją otrzymanych rezultatów.

#### LITERATURA

1. Toksykologia żywności. Przewodnik do ćwiczeń, red. A. Brzozowska, Wyd. SGGW, Warszawa, 2010.
2. Oznaczanie metabolitów tioglikozydów w warzywach z rodziny krzyżowych, D. Szczukocki, B. Krawczyk, R. Dałkowski, R. Juszcak, <http://www.chemia.uni.lodz.pl/kchogin/dydaktyka/toksykologia/pdf/T3.pdf>
3. Kumirska J., Gołębiowski M., Paszkiewicz M., Bychowska A., *Analiza żywności*, skrypt elektroniczny dla studentów Ochrony Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 2010, ISBN 978-83-7326-711-4, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.