



UNIWERSYTET GDAŃSKI  
WYDZIAŁ CHEMII

Pracownia studencka  
**Katedry Analizy Środowiska**

# **Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych**

## **Ćwiczenie nr 3**

### **Oznaczanie właściwości antyoksydacyjnych wybranych produktów spożywczych**

**Analiza żywności II**

Gdańsk, 2017

## 1. Wstęp teoretyczny

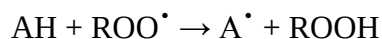
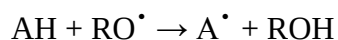
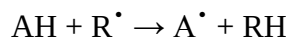
**Wolne rodniki** to atomy, cząsteczki lub jony posiadające na zewnętrznej orbicie pojedynczy niesparowany elektron, który chcą sparować. Wynikiem tego jest ich duża aktywność chemiczna do utleniania napotkanych cząsteczek. Wolne rodniki powstają naturalnie w naszych organizmach w wyniku przemian metabolicznych, są także dostarczane z żywnością. W organizmie utleniają białka, lipidy, powodują także uszkodzenia i mutacje DNA. W konsekwencji powodują powstanie nowotworów i chorób sercowo naczyniowych. Ogólnie można stwierdzić, że wolne rodniki przyspieszają starzenie się organizmów. Na szczęście, istnieją naturalne mechanizmy zmniejszania stężenia wolnych rodników. Można je wspierać poprzez dostarczanie antyoksydantów z żywnością.

**Antyoksydanty (przeciwutleniacze)** są to przeważnie małe cząsteczki, które są donorami atomów wodoru i zmiatają wolne rodniki.

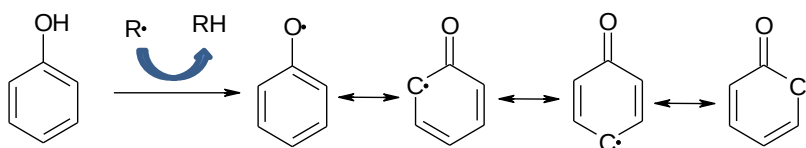
Procesy utleniania zachodzą również w trakcie przechowywania żywności, co powoduje pogorszenie jej walorów smakowych i zdrowotnych. Tłuszcze są jednymi ze składników żywności bardziej podatnymi na utlenianie, w wyniku czego powstają takie substancje jak: wodoronadtlenki, nadtlenki, epoksydy, związki cykliczne. Część z tych związków negatywnie wpływa na zdrowie człowieka, a gdy utlenienie postępuje powstają związki toksyczne.

Przeciwutleniacze można podzielić według mechanizmu ich działania:

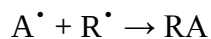
1. Przeciwutleniacze pierwotne (pierwszorzędne, właściwe), najbardziej efektywne, przerywają łańcuch reakcji utleniania poprzez dostarczenie wodoru lub elektronu rodnikom i tworzenie bardziej stabilnych związków. Można to zobrazować następującymi reakcjami:



Powstałe rodniki  $\text{A}^\bullet$  są stosunkowo trwałe i niezdolne do udziału w kolejnej reakcji łańcuchowej i przyłączenia tlenu, ponieważ ich struktura stabilizowana jest przez rezonans (występowanie form mezoemerycznych). Dla przykładu można to zobrazować przykładową reakcją:



Powstałe rodniki  $\text{A}^\bullet$  reagują z sobą i się dezaktywują:



Ten rodzaj przeciwutleniaczy, nazywanymi również fenolowymi, może być pochodzenia naturalnego lub syntetycznego. Do naturalnych zaliczyć można tokoferole i polifenole (fenolokwasy, flawonoidy), występujące w surowcach roślinnych. Natomiast syntetyczne, to syntetycznie uzyskane galusany, butylohydroksyanizol (BHA) i butylohydroksytoluen (BHT). Najbardziej pożądane są związki, które potrafią przetrwać obróbkę termiczną żywności.

## 2. Przeciwutleniacze wtórne (drugorzędne, pomocnicze, synergenty)

Związki tego typu opóźniają jęłczenie tłuszczu poprzez reakcje inne niż przerywanie łańcucha autooksydacji. Ich zaletą jest to, że wydłużają i zwiększają właściwości przeciwutleniaczy pierwotnych. Ich działanie polegać może na:

- a. Chelatowaniu (kompleksowaniu) jonów metali, głównie żelaza i miedzi, które są silnymi katalizatorami reakcji utleniania. Przykładem tego typu związków są: kwas winowy, askorbinowy, cytrynowy, fosforowy, fosfolipidy, kwas etylenodiaminotetraoctowy – EDTA, produkty reakcji Millarda.
- b. Częściową regenerację przeciwutleniaczy pierwotnych przez ich redukcję (np. kwas askorbinowy i związki tiolowe regenerują witaminę E, hydrolizaty białkowe regenerują przeciwutleniacze fenolowe)
- c. Zmianianiu tlenu (np. kwas askorbinowy i jego ester palmitynowy, kwas izoaskorbinowy i jego sole)
- d. Tworzenie ochronnej powierzchni pomiędzy tłuszczem a powietrzem, np. fosfolipidy
- e. Rozkład nadtlenu do produktów nierodnikowych (np. tokoferole, niektóre enzymy, produkty reakcji Millarda)
- f. Absorpcję promieniowania UV
- g. Dezaktywację tlenu singletowego (np.  $\beta$ -karoten, tokoferole)

Działanie antyoksydantów obserwowane jest już w ich małych stężeniach, rzędu 0,001-0,1 %. W optymalnym przypadku powinny być wprowadzone na wczesnym etapie autooksydacji produktu żywieniowego. Idealny antyoksydant powinien być nietoksyczny, działać efektywnie w niskich stężeniach, być mieszalny z produktem lub jego substratem, nie wpływać na właściwości organoleptyczne żywności, działać skutecznie w dużym asortymencie produktów.

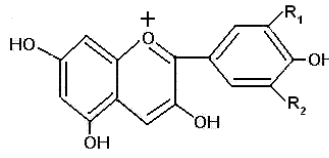
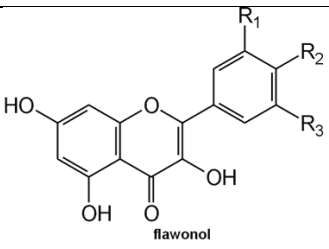
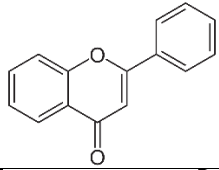
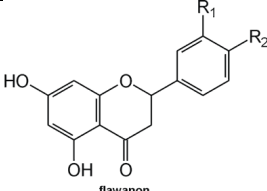
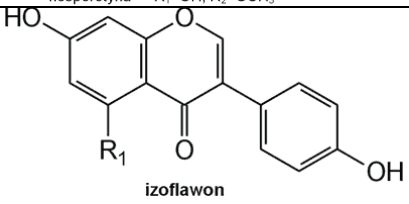
Przeciwutleniacze naturalne pochodzą z surowców roślinnych, mogą również powstawać w procesie technologicznym. Są to m.in.: tokoferole, karotenoidy, kwas askorbinowy, związki fenolowe, fosfolipidy, ekstrakty przypraw aromatycznych (np. z curry), niektóre białka i aminokwasy. Nie mają one właściwości odżywczych, ale już w niewielkich ilościach mogą działać antyoksydacyjnie. Ten rodzaj przeciwutleniaczy jest coraz bardziej popularny, w związku ze znikomą toksycznością i często wyższą skutecznością niż syntetyczne odpowiedniki. Przypisuje się im rolę profilaktyczną przy zwalczaniu wielu chorób, w tym cywilizacyjnych. Niestety, często brak jest efektywnych źródeł i sposobów pozyskiwania tego typu związków. Wynika z tego fakt, że antyoksydanty syntetyczne są powszechniej stosowane.

Antyoksydanty naturalne można także podzielić ze względu na rozpuszczalność w wodzie - hydrofilowe: glutation i witamina C, antyoksydanty hydrofobowe: witamina E, karotenoidy, ksantofile i zredukowany koenzym Q10 oraz antocyjaniny, flawonoidy, fitoestrogeny.

Największą grupą antyoksydantów pochodzenia roślinnego są polifenole. Ze względu na budowę szkieletu węglowego wyróżniamy kilka grup polifenoli: kwasy hydroksybenzoesowe, kwasy hydroksycynamonowe i kumaryny, naftochinony, ksantony, stilbeny i flawonoidy. Występują w łodygach, liściach i owocach prawie wszystkich roślin w różnej ilości i stężeniu, najczęściej w połączeniu z cukrami. Szczególne znaczenie profilaktyczne pełnią flawonoidy ze względu na różnorodność budowy i wielokierunkowość aktywności biologicznej. Występują w naziemnych częściach roślin, niejednokrotnie nadając barwę kwiatom czy owocom w zakresie od żółtej (flawonoidy) do czerwonej i fioletowej (antocyjany). Flawonoidy w roślinach spełniają rolę ochronną przed chorobami grzybowymi, insektami oraz szkodliwym działaniem promieni słonecznych. Dotychczas opisano budowę ponad 4 000 związków z tej grupy. Obecność flawonoidów stwierdzono

m.in. w owocach, warzywach, roślinach strączkowych, a także w licznych roślinach leczniczych. Flawonoidy wykazują silne właściwości antyoksydacyjne, związane jest to z obecnością w molekuale kilku grup hydroksylowych. Zdolności antyoksydacyjne flawonoidów zależą od położenia i liczby grup hydroksylowych, większa liczba grup hydroksylowych nasila ich właściwości przeciwutleniające. W Tabeli 1 przedstawiono przykładowe flawonoidy i ich źródła.

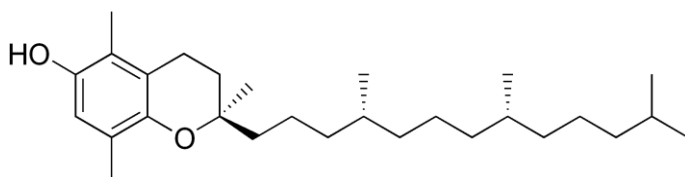
Tabela 1. Przykłady flawonoidów, ich źródeł i struktur chemicznych

| Flawonoidy    | Źródło                                                             | Przykładowa struktura                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Antocyjany    | Czerwone wino, wiśnie, czarna porzeczka, aronia truskawki          |  <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <div> <math>R_1</math><br/>OH<br/>OH<br/>H<br/>OCH<sub>3</sub><br/>OCH<sub>3</sub><br/>OCH<sub>3</sub> </div> <div> <math>R_2</math><br/>OH<br/>H<br/>H<br/>H<br/>OH<br/>OCH<sub>3</sub> </div> <div> Delfinidyna<br/>Cyjanidyna<br/>Pelargonidyna<br/>Peonidyna<br/>Petunidyna<br/>Malwidyna </div> </div> |
| Proantocyjany | Czerwone wino, czarna herbata, czekolada, jabłka, kiwi             | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Flawonole     | Czerwone wino, herbata, sałata, cebula, szpinak, brokuły, pomidory |  <p style="text-align: center;">flawonol</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <div>kemferol<br/>kwercetyna</div> <div> <math>R_1=R_3=H, R_2=OH</math><br/> <math>R_1=R^2=OH, R^3=H</math> </div> </div>                                                                                                                                       |
| Flawony       | Seler, czosnek, papryka, czerwony pieprz                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Flawanony     | Owoce cytrusowe                                                    |  <p style="text-align: center;">flawanon</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <div>naryngenina<br/>hesperetyna</div> <div> <math>R_1=H, R_2=OH</math><br/> <math>R_1=OH, R_2=OCH_3</math> </div> </div>                                                                                                                                     |
| Izoflawony    | Soja, orzeszki                                                     |  <p style="text-align: center;">izoflawon</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <div>daidzeina<br/>genisteina</div> <div> <math>R_1=H</math><br/> <math>R_1=OH</math> </div> </div>                                                                                                                                                          |

Większość flawonoidów w roślinach występuje, obok wolnych aglikonów, w postaci połączeń glikozydowych (głównie O-glikozydy). W części cukrowej zazwyczaj występuje glukoza, także galaktoza, ramnoza, ksyloza, arabinoza. Stwierdzić można, że związki flawonoidowe charakteryzują się stosunkowo niską dostępnością biologiczną. Część z nich, jak pochodne flawonu i flawanu, ze względu na rozpowszechnienie lub częstość spożycia produktów, w których są obecne, przyjmowane są w ilości wystarczającej do istnienia wyraźnego efektu farmakologicznego.

Stosowanie przeciwutleniaczy w Polsce normowane jest Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 17 marca 2003 r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych, substancji pomagających w przetwarzaniu i warunków ich stosowania (Dz. U. nr 87/2003, poz. 805), które dzieli je na dwie grupy:

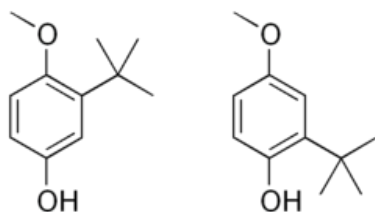
1. Substancje dodatkowe stosowane do wszystkich środków spożywczych zgodnie z zasadą *quantum satis* (stosowanie w dawce „*quantum satis*” oznacza, iż daną substancję stosuje się w dawce najniższej, niezbędnej do osiągnięcia zamierzonego efektu technologicznego, zgodnie z dobrą praktyką produkcyjną). W grupie tej znalazły się m.in.
  - kwas mlekowy (E 270)
  - kwas askorbinowy (E 300) i jego sole
  - palmitynian i stearynian askorbylu (E 304)
  - mieszanina tokoferoli (E 306)
  - $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -tokoferol (wit. E)



- kwas cytrynowy i jego sole

2. Warunkowo dozwolone przeciwutleniacze, stosowane w określonych produktach i w określonej dawce:

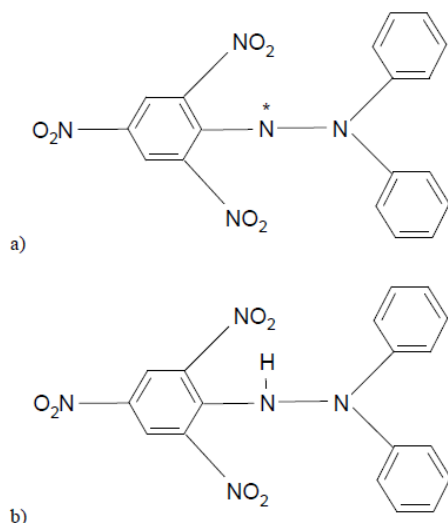
- galusany propylu, oktylu i dodecyłu (E 310, 311, 312)
- butylohydroksyanizol – BHA (E 320)



- butylohydroksytoluen – BHT (E 321)
- kwas izoaskorbinowy (E 315)
- izoaskorbinian sodu (E 316)

### 1.1. Oznaczanie aktywności antyrodnikowej

Jedną z najpopularniejszych i prostych technik oznaczania aktywności antyrodnikowej jest wykorzystanie rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH), który jest stosunkowo trwały i można go przechowywać w formie proszku (Rysunek 1). Jego alkoholowy roztwór ma barwę fioletową. Zasada pomiaru opiera się na zasadzie, że DPPH reaguje z przeciwutleniaczami, a jego procentowy ubytek, badany spektrofotometrycznie przy długości fali 517 nm, jest wyznacznikiem aktywności rodnikowej produktu spożywczego, surowca lub płynu biologicznego.



Rys. 1. DPPH a) wolny rodnik, b) forma zredukowana

## 2. Wykonanie ćwiczenia

Ćwiczenie podzielone jest na dwie części. W pierwszej sprawdzana jest obecność antyoksydantów fenolowych w próbce olejów jadalnych. W drugiej badane są właściwości antyoksydacyjne tych samych olejów w sposób jakościowy.

### 2.1. Badanie obecności antyoksydantów fenolowych

Odczynniki:

- alkohol etylowy, roztwór 72 %
- alkohol etylowy, roztwór 96 %
- eter etylowy
- heksacyjanożelazian (II) potasu  $K_4Fe(CN)_6$ , roztwór 0,2 %
- siarczan żelaza (III)  $Fe_2(SO_4)_3$ , roztwór 0,5 % w 1N kwasie siarkowym

Sprzęt:

- rozdzielacz o pojemności 50 ml
- suszarka
- wialka 10 ml
- zlewka 100 ml
- bibuła do wycinania
- strzykawka 50  $\mu$ l
- szkiełko zegarkowe / szalka Pertiego

Ekstrakcja przeciwutleniaczy z oleju jadalnego: W zlewce o pojemności 100 ml odważyć ok. 10 g badanego oleju i przenieść ilościowo do rozdzielacza używając 25 ml eteru etylowego. Następnie do rozdzielacza dodać 2 ml 72 % etanolu, ostrożnie wytrząsać przez 3 min. Pozostawić do rozdzielenia warstw. Część dolną etanolową przenieść do wialki 10 ml. Ekstrakcję powtórzyć jeszcze dwukrotnie. Otrzymany ekstrakt wysuszyć do sucha w strumieniu azotu. Pozostałość rozpuścić w 0,5 ml 96 % etanolu.

Wykrywanie substancji przeciwutleniających: Na pasek bibuły dopasowany do szkiełka zegarkowego nanieść 10 i 20  $\mu$ l uzyskanego ekstraktu i wysuszyć suszarką. Następnie zanurzyć pasek w kąpeli wywoławczej, składającej się z mieszaniny objętościowej 1:1 0,5 % siarczanu żelaza (III) w kwasie siarkowym i 0,2 % heksacyjanożelazianie potasu, na okres do 10 min.

Powstanie niebieskich plam w miejscu naniesionych kropli świadczy o obecności przeciwutleniaczy fenolowych.

## 2.2. Oznaczenie aktywności ekstraktów biologicznych i olejów roślinnych z wykorzystaniem rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu)

Odczynniki:

melisa (Sir Roger), rumianek (Sir Roger), mięta (Sir Roger), lipa (Herbapol), herbata czarna (Bartek), herbata zielona (Herbapol) oraz kawa mielona (Jacobs Kronung) i kawa rozpuszczalna (Tchibo Family Classic).

- olej roślinny
- wywar z wybranego zioła (1g badanego materiału zalać 100ml wody o temperaturze 90 °C, po upływie 8 minut napar przesączyć i schłodzić do temperatury pokojowej, rozcieńczyć wodą w stosunku 1:1)
- metanol
- octan etylu
- etanolowy roztwór 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu o stężeniu 300 µmol/l (19,71 mg DPPH w 100 ml etanolu)

Sprzęt:

- próbówka z korkiem
- pipeta
- spektrofotometr z kuwetami

Wykonanie: do 0,1 ml ekstraktu biologicznego lub oleju roślinnego dodać 3,9 ml metanolu (w przypadku ekstraktu lub soku) lub octanu etylu (w przypadku oleju). Następnie dodać 1 ml roztworu DPPH i natychmiast po wymieszaniu wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 517 nm. Pomiary wykonywać co 5 min przez pół godziny. Wykonać również pomiary dla próby kontrolnej, zawierającej 4 ml metanolu lub octanu etylu i 1 ml roztworu DPPH. Aktywność antyrodnikową podać w ilości wygaszonych rodników DPPH (%).

$$\% \text{ inhibicji} = 100 (A_0 - A_{\text{sr}}) / A_0$$

$A_0$  – absorbancja rodnika DPPH

$A_{\text{sr}}$  – średnia wartość absorbancji badanego roztworu zawierającego antyoksydant

## 3. Literatura

1. Maria Małecka (red.), Wybrane metody analizy żywności, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, 2003.
2. Małgorzata Nogala-Kałucka (red.), Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności, Wydawnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, 2013.
3. Iwona Zych, Anna Krzepiło, Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH, CHEMIA DYDAKTYKA EKOLOGIA METROLOGIA 2010, R. 15, NR 1.
4. Magdalena Człapka-Matysik, Małgorzata Fejfer, Anna Gramza- Michałowska, Aleksandra Kostrzewa-Tarnowska, Jan Jeszka, Właściwości antyrodnikowe wybranych soków owocowych dostępnych na rynku polskim, Probl Hig Epidemiol 2011, 92(4): 991-993.
5. <http://www.czytelniamedyczna.pl/2549,biodostepnosc-polifenoli-roslinnych.html>.