



IN MARI VIA CUA

UNIwersytet GDAŃSKI
WYDZIAŁ CHEMII

Pracownia studencka
Zakład Analizy Środowiska

Ćwiczenia laboratoryjne - teoria

Naturalne antyoksydanty polifenolowe

ANALIZA PRODUKTÓW POCHODZENIA NATURALNEGO

Gdańsk, 2012

I. WOLNE RODNIKI W KOMÓRCIE

Gdy odkryto w zdrowych organizmach wolne rodniki tlenowe, które powodują uszkodzenia komórek, zwłaszcza jądra i mitochondriów, okazało się, że tlen, pierwiastek niezbędny do życia, może być toksyczny. Wolne rodniki są to atomy lub cząsteczki mające na ostatniej powłoce (orbitalu walencyjnym) niesparowany elektron, co sprawia, że są niestabilne i bardzo reaktywne, zdolne do reakcji z różnorodnymi składnikami komórki.

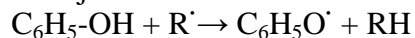
Najważniejszymi reaktywnymi formami tlenu są: tlen cząsteczkowy (słabo reaktywny, zwiększający swą reaktywność pod wpływem jonów żelaza i miedzi); tlen singletowy ($^1\text{O}_2$); anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), powstający w wyniku przeniesienia elektronu na tlen cząsteczkowy; nadtlenek wodoru (H_2O_2), powstający w wyniku redukcji tlenu cząsteczkowego; rodnik hydroksylowy (HO^\cdot); tlenek azotu (NO^\cdot); anion kwasu nadtlendioazotawego (ONOO^-); rodniki alkoksyłowe (RO^\cdot , ROO^\cdot).

Wolne rodniki są istotnymi czynnikami procesu starzenia oraz wielu chorób ogólnoustrojowych. Nieodpowiednia dieta, niewłaściwe przyrządzanie i przechowywanie żywności, zanieczyszczenie środowiska to powody dostarczania organizmowi wielu ksenobiotyków i wolnych rodników.

II. NATURALNE ANTYOKSYDANTY POLIFENOLOWE

II.1. Właściwości antyoksydacyjne związków fenolowych

Antyoksydacyjne właściwości posiadają związki zawierające grupę -OH, która redukuje wolne rodniki. Związki fenolowe (grupa hydroksylowa związana z pierścieniem aromatycznym o właściwościach kwasowych) wykazują szczególne właściwości antyoksydacyjne: łatwo wychwytyją rodnik a powstały wolny rodnik fenolowy jest na tyle stabilny (delokalizacja rodnika na skutek rezonansu), że nie jest w stanie oderwać atomu wodoru z cząsteczki kwasu tłuszczowego.



Polifenole są związkami organicznymi zawierającymi przynajmniej dwie grupy hydroksylowe przyłączone do pierścienia aromatycznego. Są grupą związków o bardzo zróżnicowanej budowie i właściwościach.

Działanie przeciwutleniające związków fenolowych zachodzi wg różnorodnych mechanizmów:

- mogą oddawać elektron lub atom wodoru (wł. redukujące),
- mogą stabilizować i delokalizować niesparowany elektron,
- mogą chelatować jony metali enzymów katalizujących reakcje utleniania,
- mogą być inhibitorem oksydaz,
- mogą być terminatorem przerywającym łańcuchowe reakcje rodnikowe,
- mogą być stabilizatorem wolnych rodników, powstających w reakcjach oksydacyjnych.

II.2. Właściwości biologiczne naturalnych związków fenolowych.

Działanie związków fenolowych sprawia, że pełnią one funkcje biologiczne i mają pozytywny wpływ na ludzkie zdrowie. Wśród właściwości leczniczych poszczególnych polifenoli wymienia się kilka głównych, które zostały udowodnione w różnych badaniach na zwierzętach i w badaniach statystycznych:

- Ochrona organizmu przed kancerogenami, mutagenami i chorobami nowotworowymi, udział w leczeniu raka. Polifenole powodują blokowanie kancerogenów, np. 4-nitrochinolino-1-tlenków, innych trujących związków azotowych, spożywanych z wędzonymi i peklowanymi produktami mięsnymi. Hamują tworzenie się mutagennych związków, hamują ekspresję enzymów, które metabolizują węglowodory aromatyczne do genotoksycznych metabolitów. Hamują proces neowaskularyzacji, przez obniżenie aktywności enzymów biorących w niej udział oraz hamują powstawanie naczyń krwionośnych rosnącego nowotworu, zapobiegając w ten sposób jego rozrostowi i przerzutom.

- Zapobieganie schorzeniom układu sercowo-naczyniowego, w tym hamowanie aterogenezy - procesu prowadzącego do miażdżycy. Polifenole powodują hamowanie utleniania cholesterolu LDL i odkładania się produktów jego utleniania się w naczyniach krwionośnych (co utrudnia utratę cennych witamin), hamowanie utleniania lipidów błon komórkowych. Redukują peroksydację lipidów płytkowych lipoprotein, przez zapobieganie utlenianiu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, modulują metabolizm lipidów i lipoprotein, uszczelniają naczynia krwionośne, przez co biorą udział w kontroli spójności naczyń włosowatych i zapobiegają opuchliznom, wybroczynom i krwawieniom, pomagają w leczeniu miażdżycy, rozluźniają mięśnie gładkie naczyń krwionośnych i poprawiają przepływ krwi w naczyniach wieńcowych oraz obniżają ciśnienie krwi, hamują agregację płytek krwi.
- Zapobieganie i leczenie infekcji, alergii i chorób przewodu pokarmowego. Polifenole działają żółciopędnie, moczopędnie, przeciwwrzodowo, ochronnie na wątrobę, antybakteryjnie, (szczególnie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, co wykorzystywane jest w zwalczaniu różnych postaci dermatoz, jak: świerzb, martwica tkanek, rak), działają przeciwwirusowo, przeciwgrzybiczo, wykazują działanie przeciwalergiczne i przeciwzapalne (poprzez przyspieszenie powstawania tzw. mediatorów procesów zapalnych).
- Pobudzanie wydzielania estrogenów w organizmie kobiety.

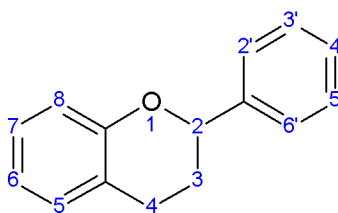
II.3. Występowanie naturalnych polifenoli

Naturalne antyoksydanty polifenolowe to związki o różnej strukturze i właściwościach. Produkowane są przez niektóre rośliny w odpowiedzi na stres, uszkodzenie, infekcję grzybową lub promieniowanie ultrafioletowe(UV). Na te związki, w technologii żywności, zwraca się w ostatnich latach szczególną uwagę.

Polifenole są związkami organicznymi powszechnie występującymi w postaci glikozydów rozpuszczalnych w wodzie, dzięki temu zapobieganie autooksydacji może zachodzić w środowisku wodnym, jakim są naturalne układy biologiczne (np. błona komórkowa). Polifenole to duża grupa związków o bardzo zróżnicowanej budowie i właściwościach trudna do jednoznacznego podziału. Do roślinnych związków fenolowych należą: **flawonoidy**, **taniny** (skondensowane i łatwo hydrolizujące), **kwasy fenolowe**, **stilbenoidy**, **lignany**, **ligniny** i inne. Występują powszechnie w roślinach, zwłaszcza w liściach, tkankach kwiatowych i zdrewniałych częściach, jak łodygi i kora, w mniejszym stężeniu w owocach, nasionach i innych.

II.4. Flawonoidy

Flawonoidy są największą i najlepiej dotąd poznaną grupą związków fenolowych, występujących powszechnie w świecie roślin więc i w żywności (dziennie spożycie flawonoidów w postaci warzyw, owoców wynosi 1-2 g). Występują we wszystkich nadziemnych częściach roślin, głównie w kwiatach, owocach i liściach (wyjątek stanowi cebula, która w częściach podziemnych zawiera bardzo duże ilości kwercetyny) a ich nazwy wywodzą się od kolorów. Podstawowy szkielet budowy flawonoidów wywodzi się ze struktury 2-fenylochromanu (flawanu). Jest to cząsteczka zbudowana z dwóch pierścieni aromatycznych (A i B) połączonych heterocyklicznym pierścieniem (C) zawierającym atom tlenu. Na rys. 1 przedstawiono budowę szkieletu węglowego flawonoidów.



flawan

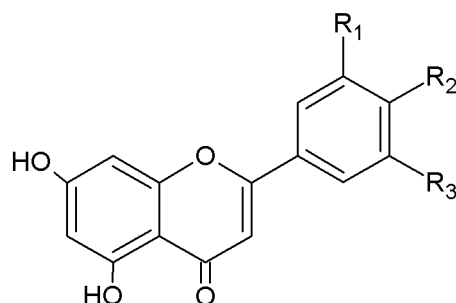
Rys. 1. Budowa szkieletu węglowego flawonoidów - struktura flawanu.

Pierścień piranowy C występuje z różnym stopniem utlenienia, a jego budowa decyduje o podziale na podklasy związków flawonoidowych. Znanych jest kilka tysięcy różnych flawonoidów. Taką ilość i różnorodność związków powoduje obecność grup hydroksylowych, metoksyłowych, czycukrowych. Cukry mogą być połączone wiązaniem O- (częściej) lub C-glikozydowym, przeważnie są to glukoza, galaktoza, ramnoza, ksyloza, arabinoza, kwas glukuronowy. We flawonach i izoflawonach wiązanie glikozydowe często występuje w pozycji C-7, we flawonolach w pozycji C-3 i C-7 i w antocyjanidynach w pozycji C-3 i C-5. Różnorodność wynika również z możliwości tworzenia struktur polimerycznych. Flawonoidy są substancjami stałymi, rzadko bezbarwnymi, najczęściej żółtymi (głównie flawony i chalkony), niebieskimi, czerwonymi i fioletowymi (głównie antocyjanidyny). Nadają również smak roślinom i produktom, w których występują, np. narynginina nadaje smak gorzycy grejpfrutom, kapsaicyna - ostrość chili. Rozpuszczają się dobrze w wodzie i alkoholu etylowym, większość też w octanie etylu. Aglikony nie rozpuszczają się w wodzie.

Za surowce flawonoidów uznaje się te, w których flawonoidy są głównymi substancjami czynnymi. Są to najczęściej ziele, liście i kwiaty, np. koszyczek rumianku, liść brzozy, kwiat czarnego bzu, ziele skrzypu, ziele dziurawca, ziele fiołka trójbarwnego, kwiatostan głogu, kwiatostan lipy i inne. Badania wskazują, że niektóre flawonoidy są znacznie skuteczniejsze jako ekstrakty flawonoidowe z roślin niż jako pojedyncze substancje. Na przyswajalność flawonoidów mają też wpływ inne składniki pożywienia. Flawonoidy spożywane z pokarmem ulegają resorpcji i przemianom metabolicznym z udziałem flory bakteryjnej jelit. Przede wszystkim ulegają deglikolizacji nawet przed wchłonięciem. Metabolizm polega na przyłączeniu do grup hydroksylowych reszt siarczanowych lub kwasu glukuronowego. Zniesienie lub zachowanie aktywności biologicznej metabolitów zależy od sposobu podstawienia tych grup.

Flawony

Szkielet budowy flawonów przedstawiono na rys. 2.



flawon

Rys.2. Szkielet budowy flawonów. $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = OH$ - Apigenina

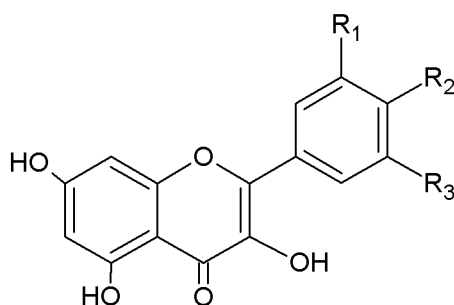
$R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$ - Luteolina

$R_1 = OH$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = H$ - Diosmetyna.

Flawony występują w częściach naziemnych roślin, głównie w liściach i skórkach owoców. Główne źródła flawonów to pietruszka i seler oraz zielona herbata, cytrusy, winogrona, jabłka, pomidory, czerwona papryka i in.. Flawony odpowiedzialne są za żółtą barwę roślin. Flawony podobnie jak flawonole występują jako aglikony w glikozydach. Zidentyfikowano w roślinach ok. 100 różnych flawonów.

Flawonole

Podstawowy szkielet budowy flawonoli przedstawiono na rys. 3.



Rys. 3. Struktura flawonolu i jego pochodnych. $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = OH$ - Kemferol
 $R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$ - Kwercetyna

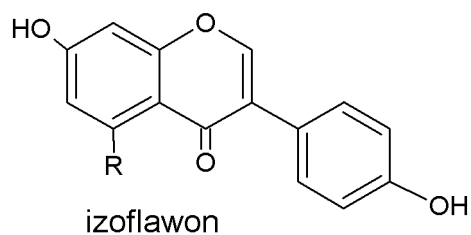
Źródła flawonoli to brokuły, endywia, sałata, cebula, pomidory, jabłka, grejpfruty, jagody, herbata. Podobnie jak flawony występują głównie w częściach naziemnych roślin i w przede wszystkim jako glikozydy.

Najbardziej rozpowszechnionym flawonolem jest kwercetyna. Występuje w stanie wolnym ale najczęściej w postaci glikozydów. Jej działanie lecznicze polega na zmniejszaniu przepuszczalności naczyń krwionośnych, regulowaniu stężenia lipidów w surowicy krwi i przeciwdziałaniu oksydacji. Jest tzw. "wymiataczem wolnych rodników" i z witaminą C jest stosowana w geriatric. Najpowszechniejszym glikozydem kwercetyny jest rutyna (zwana też rutozydem lub witaminą P). Rutyna hamuje przepuszczalność naczyń krwionośnych, poprawia ich elastyczność. Stosowana jest razem z witaminą C (Rutinoscorbin), której przedłuża działanie poprzez hamowanie aktywności oksydazy kwasu askorbinowego. Występuje powszechnie w owocach i warzywach oraz w surowcach leczniczych, jak zieleń fiołka trójbarwnego i kwiatach bzu czarnego.

Kemferol występuje w postaci glikozydów, ma działanie antyoksydacyjne i słabe spazmolityczne. Występuje w wielu owocach i warzywach oraz w takich surowcach jak liście herbaty i kwiaty tarniny.

Izoflawony

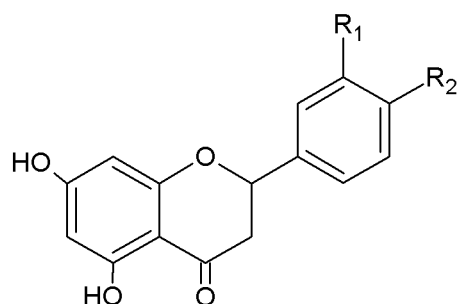
Bogatym źródłem izoflawonów jest soja (do kilkaset mg na 100g), produkty sojowe i warzywa strączkowe. Izoflawony z soi zasługują na uwagę ze względu na właściwości antymutagenne, antyproliferacyjne i antyrakowe, poza tym zapobiegają i łagodzą objawy menopauzalne. Genisteina stosowana jest w chemioterapii, zwłaszcza w przypadkach nowotworów narządów wydzielniczych, nerki, prostaty, jajnika. Genisteina blokuje enzymy topoizomerazy, odpowiedzialne za zachowanie porządku w jądrze komórkowym (naprężenia helisy) co powoduje szybkie zabicie komórki. Budowa izoflawonów przedstawiona jest na rys. 4.



Rys. 4. Budowa izoflawonu i jego pochodnych, R = H - daidzeina; R = OH - genisteina.

Flawanony

Flawanony to flawonoidy cytrusów. Przedstawicielami tej grupy związków są hesperetyna i jej glikozydy (np. hesperydyna), znajdujące się w dużych ilościach w cytrynach, pomarańczach i mięcie pieprzowej oraz naryngenina i jej glikozydy, której dużo zawierają grejpfruty. Flawanony poprawiają elastyczność naczyń włosowatych i zwiększają szczelność śródbłonka naczyń krwionośnych. Hesperydyna razem z diosminą wchodzi w skład leku o nazwie Detralex. Są doniesienia o działaniu przeciwwirusowym hesperydyny. Oprócz korzystnego działania flawanonów, zauważono, że naryngenina jest odpowiedzialna za upośledzenie wchłaniania leków podawanych razem z sokiem grejpsfrutowym. Budowę flawanonów przedstawiono na rys.5.

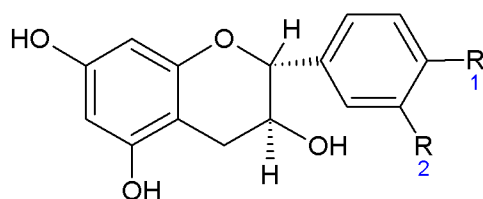


Rys. 5. Budowa flawonoidów z grupy flawanonów.

R₁ = H; R₂ = OH - Naryngenina
R₁ = OH; R₂ = OCH₃ - Hesperetyna

Flawanole

Szkielet budowy flawanoli oraz wzór chemiczny katechiny przedstawiono na rys. 6.



Rys. 6. Budowa szkieletu flawan-3-oli. R₁ = R₂ = OH - (+)-katechina.

Flawan-3-ole to flawonoidy herbaty. Występują w dużych ilościach w herbacie zielonej. W herbacie czarnej jest ich zdecydowanie mniej, ponieważ dla walorów smakowych poddaje się ją fermentacji, która utlenia polifenole. Poza herbatą flawanole występują w winie (procyjanidyny), owocach i roślinach strączkowych. Właściwości lecznicze flawan-3-oli to ochrona przed chorobami serca, układu krążenia i nowotworowymi. Spowalniają procesy starzenia, podnoszą odporność na infekcję.

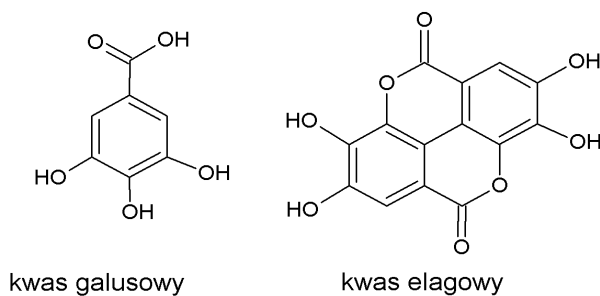
II.5. Taniny

Taniny są naturalnymi substancjami roślinnymi o dużej masie cząsteczkowej, od 300 do 5000 Da, mające właściwości polifenoli i zdolność tworzenia trwałych połączeń z białkami i innymi makrocząsteczkami. Substancje te były od wieków stosowane do garbowania surowej skóry

na przemysłową; równoległa nazwa tanin to garbniki. Taniny dzieli się na **skondensowane**, których budowa chemiczna oparta jest na strukturze flawan-3-oli, głównie katechiny, epikatechiny, flawa-3,4-dioli lub mieszaniny oraz garbniki **hydrolizujące** (galotaniny i elagotaniny).

Oligomery i polimery tanin skondensowanych powstają z cząsteczek flawanoli połączonych wiązaniem C - C, które nie ulega hydrolizie, stąd nazwa tanin skondensowanych - taniny niehydrolizujące.

Galotaniny i elagotaniny mają charakter estrów i są garbnikami hydrolizującymi. W centrum cząsteczki taniny hydrolizującej jest monosacharyd (np. glukoza) a jego grupy hydroksylowe są częściowo lub całkowicie zestryfikowane fenolokwasem. W przypadku galotaniny jest to kwas galusowy (rys.7), m-digalusowy lub heksahydroksydifenylowy; w przypadku elagotaniny jest to kwas elagowy (rys.7), dehydrodigalusowy lub dilakton kwasu waloneinowego.



Rys.7. Struktura chemiczna kwasu galusowego i elagowego (didepsydu kwasu galusowego).

Najprostszą galotanią jest kwas taninowy o wzorze sumarycznym $C_{76}H_{56}O_{46}$. Rdzeń kwasu taninowego to pentagalusan glukozy, do którego dołączone są kolejne cząsteczki kwasu galusowego.

Taniny występują powszechnie w dużych ilościach w korze roślin drzewiastych (dąb, kasztanowiec, wierzba), korzeniach, kłączach (rdest wężownik, retania, pięciornik, tatarak) i rzadziej w liściach (herbata, poziomka, orzech włoski) i owocach (chebułowiec, borówka czernica). Mają cierpki smak, czym odstrasza żerujące owady.

Właściwości antyoksydacyjne tanin z dębiny wykorzystuje się przy produkcji wina i piwa - dębowe beczki umożliwiają długie dojrzewanie.

Zdolność tanin do koagulacji białek została wykorzystana w medycynie. Stosuje się je jako leki o miejscowym działaniu ściągającym. Garbniki na powierzchni ran i błon śluzowych wytrącają białko, tworząc ochronną warstwę dla głębiej położonych tkanek, poza tym mogą przenikać głębiej obkurczając drobne naczynia krwionośne, hamując ruchy leukocytów i unieczynnając histaminę, czym dodatkowo działają przeciwwysiękowo, przeciwobrzękowo i przeciwzapalnie. Zmniejszają też swędzenie i pieczenie, gdyż działają odwadniająco na włókna nerwowe.

Te same właściwości garbników wykorzystane są w leczeniu wewnętrznym: w leczeniu wrzodów przewodu pokarmowego, biegunki, jako leki przeciwbakteryjne, zwłaszcza na drobnoustroje Gram-ujemne oraz jako odtrutki przy zatruciach alkaloidami i metalami ciężkimi. Garbniki stosowane są również w kosmetyce jako adstringenty (środki ściągające) np. w dezodorantach.

III. Kwasy fenolowe

Flawonoidy i kwasy fenolowe są to dwie główne grupy polifenoli spożywane przez człowieka wraz z pokarmem. Stosunek ilościowy spożywanych flawonoidów i kwasów fenolowych wynika z ich rozpowszechnienia w żywności roślinnej i wynosi 2:1. Przykłady zawartości kwasów fenolowych w żywności roślinnej zamieszczono w tabeli 1.

Kwasy fenolowe są metabolitami wtórnymi roślin i pełnią funkcje ochronne przed działaniem owadów i mikroorganizmów, przed utlenianiem lipidów zawartych w owocach, nasionach. Roślina w fazie wzrostu i dojrzewania nasion i owoców wymaga większej ochrony, stąd zawartość kwasów fenolowych w młodych roślinach jest większa i zmniejsza się w dojrzałych. Ma to wpływ na właściwości smakowe produktów roślinnych, przykładem może być zanikanie cierpkiego smaku

owoców w miarę dojrzewania. W tabeli 2 podano zmianę zawartości kwasów fenolowych w dojrzewającym ziarnie jęczmienia.

<i>Produkt spożywczy</i>	<i>Zawartość kwasów fenolowych</i>	
	Kwas	Zawartość w mg/kg (w cieczach mg/dm ³)
Jabłko	chlorogenowy	200
Sok jabłkowy	chlorogenowy	180
	<i>p</i> -kumaroilochinowy	100
Czereśnia	chlorogenowy	400
	<i>p</i> -kumaroilochinowy	180
Śliwka	chlorogenowy	500
	<i>p</i> -kumaroilochinowy	25
Brzoskwinia	chlorogenowy	250
Czarna porzeczka	chlorogenowy	50
	<i>p</i> -kumarowy	40
	ferulowy	15
Czarna jagoda	chlorogenowy	2 000
	<i>p</i> -kumarowy	10
	ferulowy	10
Ziemniaki surowe	chlorogenowy	1 400
gotowane	chlorogenowy	300
Marchew surowa	chlorogenowy	80
gotowana	chlorogenowy	45
Szpinak	<i>p</i> -kumarowy	350
	ferulowy	110
Pomidory	synapinowy	130
	<i>p</i> -kumarowy	30
	ferulowy	700
Kabaczek	kawowy	80
	<i>p</i> -kumarowy	200
	ferulowy	220
Mąka pszenna	synapinowy	25
	ferulowy	150
	kawowy	30
	<i>p</i> -kumarowy	10
Otręby pszenne	<i>p</i> -kumarowy	50
	ferulowy	700
Płatki owsiane	ferulowy	145
	kawowy	17
	<i>p</i> -kumarowy	50
Ziarno kawowe surowe	chlorogenowy	60 000
	dikawoiloichinowy	10 000
	feruiloichinowy	8 000
Napar kawowy	chlorogenowy	500
	kawowy	250
	ferulowy	50

Tabela 1. Zawartość kwasów fenolowych w wybranych roślinnych produktach spożywczych.

<i>Kwasy</i>	<i>Liczba dni po kwitnieniu</i>		
	19	31	42
	<i>Zawartość mg/g s.m.</i>		
salicylowy	0,85	0,28	0,06
<i>p</i> -hydroksybenzoesowy	5,65	2,76	1,82
wanilinowy	2,11	0,56	0,11
<i>o</i> -kumarowy	0,31	0,12	0,11
protokatechowy	0,62	0,23	0,30
<i>m</i> -kumarowy	0,76	0,21	0,12
syringinowy	0,92	0,23	0,36
<i>p</i> -kumarowy	1,86	0,84	0,23
sinapowy	0,28	0,13	0,05
ferulowy	14,80	12,72	2,58
Suma kwasów w mg/g s.m.	28,16	18,03	5,80

Tabela 2. Zmiany zawartość kwasów fenolowych w czasie dojrzewania ziarna jęczmienia.

Kwasy fenolowe, szczególnie pochodne kwasu cynamonowego pełnią funkcję konstytucjonalne (usztywniają ściany komórkowe), wchodząc w skład białek i polisacharydów - np. hemiceluloz, polisacharydów ściany komórkowej, gdzie fenolokwasy (głównie ferulowy i kawowy) przyłączone są do łańcucha arabinoksyłanowego.

Kwasy fenolowe hamują wiele szlaków metabolicznych (kwas ferulowy aktywuje oksydazę hormonu wzrostu - auksyny IAA) i odgrywają ważną rolę w dojrzewaniu roślin, np. w kształtowaniu spoczynku u ziarniaków oraz w ochronie przed patogenami i szkodnikami.

Kwasy fenolowe to związki zawierające grupę hydroksylową(e) i karboksylową.

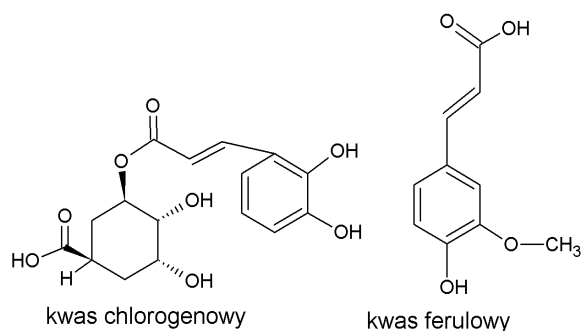
Są to:

- hydroksylowe pochodne kwasu benzoowego (związki typu C_6C),
- kwasy fenylooctowe (związki typu C_6C_2),
- pochodne kwasu cynamonowego (związki typu C_6C_3).

Do grupy fenolokwasów typu C_6C należą kwas salicylowy (*o*-hydroksybenzoesowy), *p*-hydroksybenzoesowy, protokatechowy (kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy), galusowy, wanilinowy (kwas 3-metoksy,4-hydroksybenzoesowy) i inne.

Fenolokwasy typu C_6C_3 to pochodne kwasu cynamonowego, takie jak kwas *p*-kumarowy, kawowy, ferulowy i synapinowy.

Wymienione kwasy mogą formować złożone estry, które też zalicza się do fenolokwasów, jak np. kwas chlorogenowy, który jest depsydem kwasu kawowego i chinowego (rys.8). Depsydy to międzycząsteczkowe estry kwasów fenolokarboksylowych.



Rys. 8. Struktura kwasu chlorogenowego i ferulowego.

Kwasy hydroksycynamonowe są najbardziej rozpowszechnionymi kwasami fenolowymi w roślinach. Występują w nich przeważnie w formie związanej w postaci estrów i glikozydów jako składowe lignin i tannin hydrolizujących, antocyjanów i flawonów. Najczęściej są to połączenia z kwasami karboksylowymi i glukozą. W owocach związane są przeważnie z glukozą i kwasem chinowym, w ziarniakach z arabinoksyfanami. Występują w postaci depsydów i depsydonów (depsydony zawierają dodatkowo, oprócz estrowego, wiązanie eterowe).

IV. WYKRYWANIE I SPOSOBY IZOLACJI ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W SUROWCACH I ŻYWNOŚCI POCHODZENIA ROŚLINNEGO

IV.1 Szybkie wykrywanie związków fenolowych

Do wstępnego wykrywania flawonoidów wykorzystuje się fakt, że rozpuszczają się w alkaliach z tworzeniem żółtego zabarwienia. Do identyfikacji poszczególnych grup flawonoidów wykorzystuje się barwne reakcje. Glikozydy flawonoidowe należy poddać wcześniej hydrolizie kwaśnej, która prowadzi do uzyskania części cukrowej i aglikonu.

- W reakcji cyjanidynowej ze stężonym kwasem solnym i magnezem, na skutek redukcji, powstają barwne połączenia typu antocyjanidyn. I tak aglikony flawonowe dają zabarwienie pomarańczowe, flawonolowe - różowe, flawanonowe - różowofioletowe. Chalkony i izoflawony - nie dają zabarwienia.

- Produkty reakcji flawonoidów z kwasem borowym i szczawiovym, rozpuszczone w eterze etylowym, wykazują żółtozieloną fluorescencję.

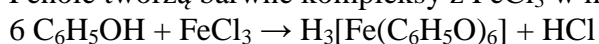
- Większość flawonoidów pod wpływem par amoniaku wykazuje fluorescencję w UV oraz jej zmiany.

- Barwne odczynniki jak roztwory chlorku żelazowego, glinowego, tlenochlorku cyrkonu lub zdiazowany kwas sulfanilowy, wanilina z kwasem siarkowym tworzą barwne kompleksy z flawonoidami, co wykorzystuje się w chromatografii cienkowarstwowej. Barwne kompleksy absorbują światło widzialne i ultrafioletowe.

Reakcja z solami żelaza wykorzystywana jest w laboratorium do szybkiego sprawdzania postępu ekstrakcji, gdyż jest bardzo czuła i można ją wykonać szybko i w prosty sposób, sprawdzając intensywność barwy plamki ekstraktu naniesionego na papierek nasączony 1,5% roztworem ałunu żelazowo-amonowego i wysuszony na powietrzu.

Wizualizacja plamek kwasów fenolowych w chromatografii cienkowarstwowej polega na spryskaniu 1% roztworem FeCl_3 w metanolu.

Fenole tworzą barwne kompleksy z FeCl_3 w myśl reakcji:



Kompleksy fenoli mają barwę zieloną, niebieską, fioletową lub purpurową, żółta lub pomarańczowa wskazuje na brak fenoli.

IV.2. Sposoby izolacji związków fenolowych

Izolowanie związków naturalnych z matrycy takich jak rośliny czy żywność jest

skomplikowane z różnych powodów:

-ze względu na obecność aktywnych enzymów, które mogą powodować modyfikacje chemiczne analitu;

-izolowanie analitów jest związane z usunięciem ich naturalnej matrycy, w której są chronione np. przed utlenianiem, izomeryzacją, hydrolizą i innymi procesami prowadzącymi do modyfikacji chemicznej analitu;

-skomplikowane i bogate w składniki matryce naturalne dają duże prawdopodobieństwo artefaktów;

-podczas przetwarzania surowców roślinnych może dochodzić do zmniejszenia zawartości analitów, zmiany ich aktywności biologicznej i biodostępności.

Dopracowanie sposobu wyodrębniania, zapewniającego dobrą selektywność, wydajność i opłacalność oraz zachowawcze warunki jest wyzwaniem dla analityka.

Sposób pozyskiwania związków fenolowych z surowców lub produktów roślinnych zależy od celu, typu surowca, rodzaju związków polifenolowych, od tego, czy oznacza się całkowitą ich zawartość, czy zawartość poszczególnych klas lub związków polifenolowych oraz zależy od stosowanej metody ich identyfikacji.

Rozpuszczalność polifenoli zależy od polarności rozpuszczalnika, stopnia depolimeryzacji fenoli, od interakcji polifenoli z innymi składnikami materiału roślinnego i tworzenia nierozpuszczalnych kompleksów.

Flawonoidy w postaci glikozydów nie rozpuszczają się w rozpuszczalnikach niepolarnych (np. w eterze, chloroformie czy benzenie), natomiast rozpuszczają się w wodzie, w alkoholu etylowym i metylowym, a większość również w octanie etylu. Aglikony prawie nie rozpuszczają się w wodzie a rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. Zróżnicowaną rozpuszczalność flawonoidów wykorzystuje się do ich wydzielenia.

Najczęściej stosowaną techniką wyodrębniania polifenoli jest ekstrakcja rozpuszczalnikowa, do której stosuje się rozpuszczalniki polarne, przeważnie metanol i etanol często w połączeniu z wodą, kwasem solnym lub słabymi kwasami organicznymi, jak kwas octowy czy mrówkowy oraz octan etylu i aceton. Czas ekstrakcji polifenoli jest różny, od kilkudziesięciu sekund do 24 godzin, w zależności od materiału roślinnego. Przy długim czasie ekstrakcji, należy chronić fenole przed utlenieniem, dodając do rozpuszczalnika niewielkich ilości substancji redukujących. Wydajność ekstrakcji zależy też od ilościowego stosunku próbki do rozpuszczalnika. Najczęściej wynosi on odpowiednio 1 do 5÷10 (m/v).

Związki fenolowe występujące w postaci związanej należy poddać hydrolizie alkalicznej, kwaśnej lub enzymatycznej.

Jednakże nie ma uniwersalnej procedury ekstrakcji wszystkich polifenoli czy poszczególnej ich grupy z materiału roślinnego. Każda ekstrakcja wiąże się z obecnością w ekstrakcie substancji nie będących analitami: związków polarnych niefenolowych i związków niepolarnych, jak woski, węglowodory, tłuszcze, terpeny czy chlorofile.

Wyekstrahowane związki polifenolowe oczyszcza się i rozdziela na poszczególne grupy różnymi metodami, najczęściej przez ekstrakcję sekwencyjną, ekstrakcję do fazy stałej i różnymi technikami chromatograficznymi.

Wiele związków fenolowych ma zbliżoną budowę i właściwości fizyko-chemiczne, stąd izolowanie poszczególnych jest trudne i często bardzo skomplikowane lub wręcz niemożliwe. Do wydzielenia stosuje się prawie wszystkie techniki chromatograficzne, począwszy od klasycznych, takich jak kolumnowa czy cienkowarstwowa do wysokosprawnej chromatografii ciekłej (HPLC), SPE, SPME i elektroforezy kapilarnej włącznie. W chromatografii stosuje się wszystkie mechanizmy rozdziału - jonowymienny, adsorpcyjny, podziałowy, sączenie molekularne lub ich połączenia. Do sączenia molekularnego wykorzystuje się polimery porowate a nawet, do rozdziału proantocyjanidyn w zależności od stopnia polimeryzacji, puder szklany o rozdrobnieniu ziaren 200-400 μm .

Najczęściej używanym detektorem w chromatografii związków fenolowych jest detektor spektrofotometryczny, gdyż wszystkie związki fenolowe absorbują promieniowanie

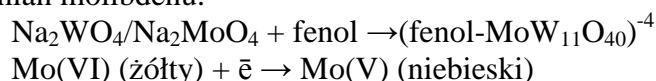
elektromagnetyczne z zakresu UV, a wiele, jak flawonoidy - również światło widzialne. Stosowane są też detektory fluorescencyjne i elektrochemiczne. W badaniach strukturalnych wykorzystuje się spektrometr mas (MS), magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) oraz spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR). Do wykrywania pojedynczych związków fenolowych szczególnie przydatna jest metoda z wykorzystaniem połączonych technik - HPLC/MS, zwłaszcza HPLC/MS/MS z rejestracją jonów ujemnych.

V. OZNACZANIE CAŁKOWITEJ ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH

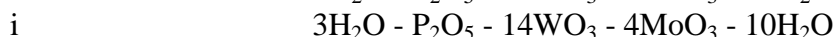
Wiele ekstraktów roślinnych wykazuje właściwości lecznicze potwierdzone badaniami klinicznymi, np. ekstrakt z ziela dziurawca, korzenia żeń-szenia, liści miłorzębu i nie ma potrzeby wydzielania poszczególnych związków. Ponad to, w złożonych mieszaninach, często występują składniki o działaniu synergistycznym, wzmagające działanie aktywnych biologicznie składników. W takich przypadkach wydzielanie poszczególnych składników nie jest uzasadnione. Aktywność biologiczną czy właściwości przeciwutleniające badanej mieszaniny odnosimy zarówno do zawartości poszczególnych aktywnych składników jak i ich sumy.

V.1. Oznaczanie całkowitej zawartości związków fenolowych metodą Folina-Ciocalteu (F-C)

Oznaczanie całkowitej zawartości związków fenolowych przeprowadza się metodami kolorymetrycznymi, z których najczęściej stosowaną jest metoda Folina-Ciocalteu (F-C). Podstawą oznaczania jest odwracalna reakcja redukcji przez fenole w środowisku alkalicznym molibdenu(VI) do molibdenu(V) zawartego w odczynniku Folina-Ciocalteu (F-C). W wyniku reakcji powstaje niebieski związek, który wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 745 - 750 nm. Intensywność absorpcji przy tej długości fali jest proporcjonalna do stężenia fenoli. Odczynnik F-C przygotowuje się z mieszaniny wolframianu sodu (Na_2WO_4), molibdenianu sodu (Na_2MoO_4), siarczanu litu (Li_2SO_4), wody bromowej i stężonych kwasów solnego i fosforowego. Struktura powstającego związku nie jest znana, przypuszcza się, że powstaje heteropolifosfowolframian molibdenu.



Mechanizm reakcji polega na przenoszeniu elektronu. Do reakcji potrzebne jest alkaliczne środowisko (pH 10), w którym powstaje anion fenolanowy redukujący molibden. Niebieski barwnik powstaje w reakcji odczynnika F-C z fenolami niezależnie od ich struktury. W 1965 r Singleton i Rossi zmodyfikowali tę metodę, stosując mieszaninę tlenków tungstenu i molibdenu:



Mieszanina tlenków utlenia fenole bardziej specyficznie, dając produkt reakcji wykazujący maksimum absorpcji przy λ_{max} 765 nm.

Interferencje w tej metodzie mogą powodować różne, niefenolowe związki, jak cukry redukujące, aromatyczne aminy, ditlenek siarki, kwas askorbinowy, sorbowy, Fe(II) i inne i powinny być brane pod uwagę, ewentualnie usuwane wcześniej z badanej próbki.

Dla uzyskania wiarygodności wyników pomiarów należy zachować następujące warunki, które są krytyczne w tej metodzie:

1. Należy zachować odpowiedni stosunek ilościowy zasady do odczynnika F - C.
2. Zoptymalizować czas i temperaturę reakcji dla uzyskania właściwej barwy i trwałości produktu.
3. Mierzyć absorbancję przy długości fali 765 nm.
4. Używać kwasu galusowego jako fenolowego standardowego odniesienia.

Dla uzyskania środowiska alkalicznego stosuje się nasycony roztwór bezwodnego węgla sodu. Próbkę o odpowiednim rozcieńczeniu miesza się z odczynnikiem F - C i po 30s, ale przed upływem 8 min, dodaje się nasyconego roztworu Na_2CO_3 . Próbkę inkubuje się w temperaturze 40°C przez 30 min, po czym wykonuje pomiar absorbancji. Przy temperaturze pokojowej, czas inkubacji wydłuża się do 2 godzin. Zalecana proporcja objętości nasyconego roztworu Na_2CO_3 i

odczynnika

F-C wynosi 3:1.

Kwas galusowy jest rekomendowany jako standard z wielu powodów. Stosowanie go jako pojedynczego standardu ułatwia porównywanie danych. Otrzymanie kwasu galusowego w postaci czystej nie jest drogie a przechowywany jako substancja sucha jest trwały. W roztworze alkoholowo-wodnym przechowywany w lodówce jest trwały przez 2 tygodnie. Metoda Folina-Ciocalteu jest stosowana w analizie ekstraktów roślinnych, żywności, również leków zawierających grupy fenolowe, jak salbutamol czy morfina.

LITERATURA

1. Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne. W. Grajek (red.), WNT, Warszawa, 2007,
2. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. G. Bartosz, PWN, Warszawa, 2003,
3. Chemia żywności. Składniki żywności, tom 1. Red. Z. E. Sikorski, WNT, Warszawa, 2007.