



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

**Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych
z Chemii Żywności**

Ćwiczenie 6

Oznaczanie substancji antyodżywczych w żywności

Gdańsk, 2024

1. Wprowadzenie

Produkty odżywcze, oprócz składników odżywczych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu, zawierają wiele substancji mogących niekorzystnie wpływać na organizm ludzki. **Substancje antyodżywcze** to substancje, które mogą ograniczać bądź uniemożliwiać wykorzystanie składników odżywczych ze spożywanych produktów przez organizm i/lub wpływać szkodliwie na nasze zdrowie.

Do substancji antyodżywczych, obecnych w produktach roślinnych i zwierzęcych należą:

- związki pochodzenia naturalnego,
- związki toksyczne, przenikające do żywności wskutek zanieczyszczenia środowiska, np. poprzez zabiegi nawożenia pól uprawnych oraz procesów technologicznych,
- niektóre substancje celowo dodawane do żywności (dodatki do żywności).

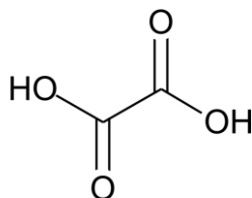
Substancje antyodżywcze w zależności od składników odżywczych, w stosunku do których wykazują takie antyodżywcze działanie, przyjęto dzielić na grupy utrudniające wykorzystanie białka, witamin, składników mineralnych i węglowodanów [1].

Mechanizm ich działania jest bardzo różny. Substancje utrudniające wykorzystanie białek i węglowodanów mają charakter inhibitorów enzymów trawiennych, takich jak tripsyna, chymotrypsyna, amylazy; te które utrudniają wykorzystanie witamin to enzymy (askorbinaza, tiaminaza) powodujące rozkład witamin do związków nieaktywnych lub związki tworzące z witaminami nieprzyswajalne w przewodzie pokarmowym połączenia (awidyna w stosunku do biotyny, o-dihydroksyfenole w stosunku do tiaminy) [1]. Inny mechanizm działania wykazują związki o budowie podobnej do struktury witamin, które wchodząc w przemiany metaboliczne zamiast witamin nie mogą spełniać ich funkcji (dikumarol w stosunku do witaminy K, aminopteryna w stosunku do folianów). Do substancji utrudniających wykorzystanie składników mineralnych zalicza się przede wszystkim te, które tworzą z nimi trudno rozpuszczalne połączenia (kwas szczawiowy, fityniany, taniny, wielofosforany, polifenole) oraz konkurujące z nimi w procesach wchłaniania lub wychwytywania przez tkanki docelowe (siarkocyjaniny), a także wpływające na gospodarkę tymi pierwiastkami (siarkocyjaniany, węglowodory polichlorowe, karbaminiany, goitrogeny) [1].

1.1. Kwas szczawiowy i szczawiany

Kwas szczawiowy (Rysunek 1) zaliczany jest do naturalnych substancji o działaniu antyodżywczym w stosunku do składników mineralnych [1-3]. Jest on kwasem dikarboksylowym,

który tworząc nierozpuszczalne sole z metalami dwu- i trójwartościowymi, powoduje zmniejszenie ich wykorzystania z pożywienia. Wchłania się łatwo z przewodu pokarmowego. Szczawian wapnia wchłania się po częściowym rozkładzie w żołądku. Im wyższa kwasowość soku żołądkowego, tym więcej szczawianu wapnia ulega rozkładowi.



Rysunek 1. Struktura kwasu szczawowego

Kwas szczawowy powstaje w roślinach na drodze biosyntezy z substratów takich, jak: kwas askorbinowy, tryptofan, hydroksyprolina, seryna i etyloamina. Żywność pochodzenia zwierzęcego zawiera go stosunkowo mało. Produktami zaliczanymi do bogatoszczawianowych są: rabarbar, szpinak, szczaw, orzechy, soja, a także używki – kawa (szczególnie naturalna i mocna), herbata (długo parzona czarna, zwłaszcza liściasta) oraz kakao.

Liczne dane literaturowe wskazują na istnienie związku pomiędzy nadmiernym spożyciem szczawianów, a takimi chorobami, jak: kamica nerkowa, wytrącanie się stałych kryształów szczawianów wapnia, uszkodzenie systemu immunologicznego, jak również autyzm, czy różne odmiany artretyzmu [1-3]. Dopuszczalne dzienne spożycie (ADI) szczawianów w diecie dorosłej osoby wynosi ok. 250 mg/dobę, natomiast osoby ze zwiększonym ryzykiem do tworzenia kamieni nerkowych nie powinny przekraczać dziennej dawki 40 – 50 mg szczawianów w ciągu doby. W badaniach przeprowadzonych wśród osób na tradycyjnej diecie, dowiedziono, że 85% szczawianów w diecie kobiet i 80% w diecie mężczyzn pochodzi z kawy i herbaty, a jedynie 15-20% z innych produktów. Kwas szczawowy w organizmie człowieka pochodzi nie tylko z pożywienia; jest on końcowym produktem metabolizmu m.in. kwasu askorbinowego [1-3]. W licznych badaniach zalecane jest spożycie naparów kawy czy herbaty z dodatkiem mleka w ilości 160 mg wapnia/100 cm³ (25 cm³ odtłuszczonego mleka). Istotne jest także dziennie przyjmowanie ok. 2,5 dm³ płynów. W wyniku procesu gotowania warzyw w wodzie ilość szczawianów obniża się w nich o ok. 50% [1-3].

Antyodżywcze działanie kwasu szczawowego jest uwarunkowane nie tylko zawartością jonów szczawianowych w pożywieniu, ale również stosunkiem molowym kwasu szczawowego do

pierwiastków, z którymi tworzy on nierozpuszczalne sole. Biorąc pod uwagę stosunek molowy kwasu szczawiowego do wapnia produkty spożywcze można podzielić na takie, w których:

- **zawartość kwasu szczawiowego wielokrotnie przekracza zawartość wapnia**, np. szpinak, szczaw, rabarbar, botwina, buraki, herbata, kawa, kakao). Wapń występujący w tych produktach jest praktycznie niedostępny, a ponadto nadmiar kwasu może wiązać wapń z innych produktów spożywanych jednocześnie lub jony szczawianowe mogą być wchłaniane do krwi.
- **zawartość kwasu szczawiowego jest prawie równoważna zawartości wapnia**, np. ziemniaki, owoce jagodowe). Wapń w tych produktach jest praktycznie niedostępny, ale spożywanie tych produktów nie ogranicza biodostępności wapnia z innych produktów.
- **zawartość kwasu szczawiowego jest niższa niż zawartość wapnia**, np. sałata, kapusta, kalafior, marchew, niektóre rośliny strączkowe). Z uwagi na dużą zawartość wapnia pomimo, iż zawierają kwas szczawiowy, są źródłem tego pierwiastka

Aby ochronić organizm przed nadmiernymi stratami składników mineralnych (wapnia) należy: ograniczyć spożywanie produktów, w których zawartość kwasu szczawiowego jest kilkakrotnie wyższa od zawartości wapnia lub wykluczyć je z diety, uzupełnić dietę w wapń poprzez spożywanie dodatkowej ilości produktów bogatych w ten składnik, takich jak: mleko i przetwory mleczne. Ze względu na stwierdzone negatywne właściwości powyższych związków, spożywanie nadmiernej ilości produktów bogatych w szczawiany nie jest wskazane szczególnie w warunkach nieprawidłowego funkcjonowania wątroby, nerek, trzustki i gruczołów wydzielania wewnętrznego.

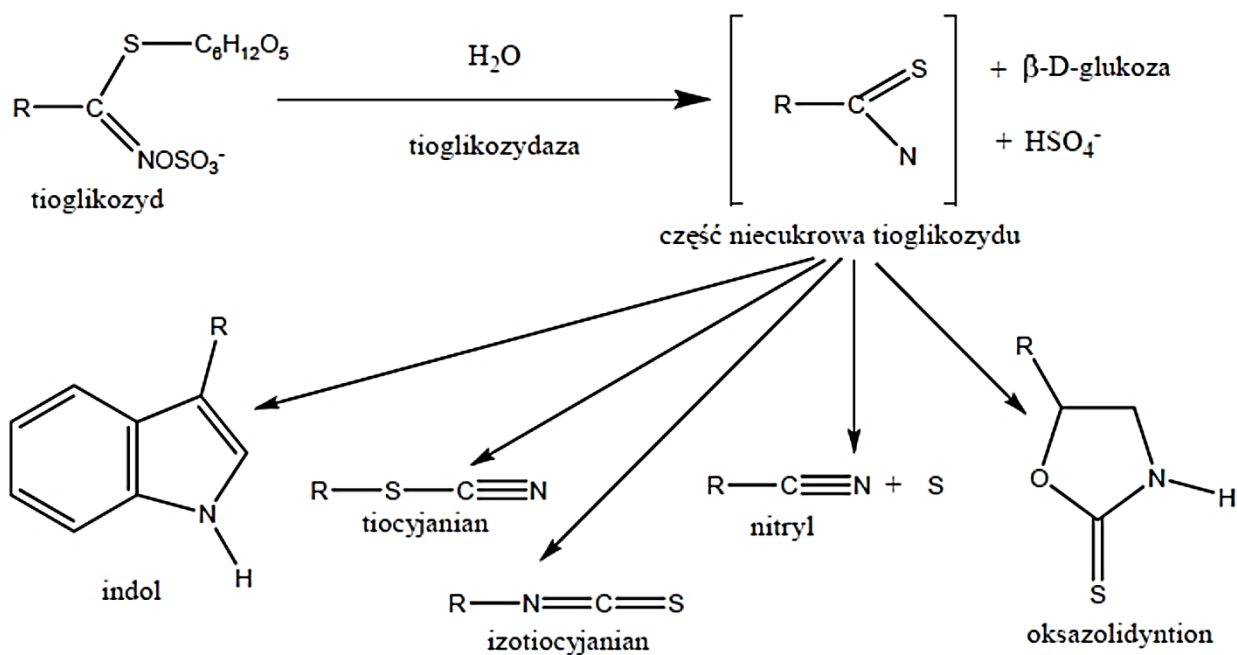
1.2. Goitrogeny

Do substancji antyodżywczych pochodzenia naturalnego zaliczyć można również **goitrogeny**. Goitrogeny są to substancje wolotwórcze, do których zaliczane 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.

Tioglikozydy (glukozynolany, GLS) są anionami organicznymi posiadającymi cząsteczkę β -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, rzemie, 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. synigrina, progoitryna, glukonapina, glucoiberyna, neoglukobrassicyna). W roślinach tioglikozydy występują w postaci glikozydowej i połączenia te nie wykazują toksyczności 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 2. Hydroliza enzymatyczna tioglikozydów

Myrozynaza występuje w komórkach, a jej działania (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 nitryli, zaś większość tiocyjanianów jest lotna i podczas gotowania warzyw w otwartym naczyniu ulatnia się z parą wodną. 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.

Tiocyjaniany (SCN^-) z łatwością przenikają przez wszystkie błony komórkowe. Konkurując z jonami jodu powodują hamowanie ich transportu do tkanek, w tym gruczołu tarczycy (kompetencyjna inhibicja transportu I^-). Tiocyjaniany przyspieszają dodatkowo wydalanie jodu przez nerki; inaktywują peroksydazę tarczycową odpowiedzialną za utlenianie anionu I^- , 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 [4-6].



2. Część eksperymentalna

2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości wybranych substancji antyodżywczych w produktach żywnościowych oraz zapoznanie się z metodami zmniejszającymi ich negatywne działanie na organizm ludzki.

2.2. Odczynniki, akcesoria laboratoryjne i aparatura

a) Odczynniki

- 5% roztwór CoCl_2 – 100 ml
- 10% kwas siarkowy – 100 ml
- 0,2 N roztwór KMnO_4 – 500 ml
- 5% roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA) – 500 ml
- roztwór azotanu(V) żelaza(III) (rozpuścić 80 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (404 g/mol) w 250 ml 2M kwasu azotowego(V), uzupełnić wodą do 500 ml) – 500 ml
- roztwór A - roztwór podstawowy jonów SCN^- (rozpuścić 16,7 mg rodanku potasu (97 g/mol) w 100 ml 5% kwasu trichlorooctowego) – 100 ml
- Aceton cz.d.a. – 100 ml

b) Akcesoria laboratoryjne

- Sprzęt do rozdrabniania warzyw (deska, nóż)
- Zlewka 250 ml – 3 szt.
- Zlewka 150 ml – 2 szt.
- Kolbka stożkowa o poj. 100 ml ze szlifem - 2 szt.
- Lejek duży – 3 szt.
- Lejek średni - 2 szt.,
- Lejek mały – 2 szt.
- Sączek (średnica 15 cm) – 6 szt.
- Cylinder miarowy o poj. 50 ml - 2 szt.
- Pipeta szklana 10 ml – 4 szt.
- Pipeta szklana 5 ml – 5 szt.
- Pipeta szklana 2 ml – 2 szt.



Analiza Żywności

6. Oznaczanie substancji antyodżywczych w żywności

- Biureta 25 ml – 1 szt.
- Tuby wirówkowe duże – 4 szt.
- Pipety Pasteura – 10 szt.
- Smoczki – 2 szt.
- Moździerz porcelanowy o poj. 100 ml z pistelem - 2 szt.
- Bagietka - 1 szt.
- Probówki szklane w statywie
- Kuweta kwarcowa
- Łyżka – 1 szt.

c) Aparatura

- Wirówka
- Spektrofotometr UV-Vis
- Waga techniczna
- Łaźnia wodna

2.3. Materiał badawczy

Do badań należy wykorzystać różne rodzaje herbaty (czarna, czerwona, zielona) oraz kapustę białą.

2.4. Wykonanie oznaczenia

2.4.1. Oznaczanie zawartości szczawianów rozpuszczalnych w herbacie

a) Przygotowanie naparów

Odważyć na wadze technicznej 4 g herbaty, przenieść do zlewki o objętości 250 ml i zalać 100 ml wrzącej wody dejonizowanej. Odczekać 5 minut, otrzymany napar przesączyć przez sącdek. Procedurę wykonać dla każdej ze wskazanych przez prowadzącego herbaty.



Analiza Żywności

6. Oznaczanie substancji antyodżywczych w żywności

b) Oznaczenie właściwe

10 ml naparu uzyskanego w **Punkcie 2.4.1.a** przenieść do probówki wirówkowej, dodać 5 ml 5% roztworu CaCl_2 i 5 ml acetonu, wymieszać i wstawić do lodówki na 30 minut. Powstały osad szczawianu wapnia odwirować wirówce (3000 obrotów na minutę przez 10 minut). Płyn z nad osadu wylać, a osad przenieść ilościowo do kolby stożkowej o poj. 100 ml za pomocą 5 ml 10% kwasu siarkowego i rozpuścić na gorąco w łaźni wodnej. Po rozpuszczeniu osadu miareczkować natychmiast (na gorąco) 0,02 N roztworem KMnO_4 do uzyskania różowej barwy utrzymującej się przez ok. 1 minutę. Procedurę przedstawioną powyżej wykonać dla każdej herbaty wskazanej przez prowadzącego.

2.4.2. Oznaczanie tiocyjanianów w warzywach surowych i gotowanych

a) Sporządzenie roztworów do krzywej kalibracyjnej

Roztwór podstawowy jonów SCN^- o stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ (roztwór A) rozcieńczyć za pomocą 5% wodnego roztworu kwasu trichlorooctowego (TCA) w taki sposób, aby otrzymać roztwór roboczy jonów SCN^- o stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ (roztwór A). Roztwór sporządzić w kolbie miarowej o objętości 100 ml. Z otrzymanego roztworu przygotować roztwory do krzywej kalibracyjnej (każdy o objętości 10 ml) na siedmiu poziomach stężeń: 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ (wykonać odpowiednie obliczenia). Roztwory rozcieńczać za pomocą 5% roztworu TCA!

b) Ekstrakcja tiocyjanianów

Kapustę pociąć na mniejsze kawałki i przygotować dwie naważki, każda po 5 g. Jedną z nich przenieść do zlewki 250 ml, dodać 50 ml wody i ogrzewać, utrzymując w lekkim wrzeniu przez 10 minut. Następnie, surowy i gotowany (po odlaniu wody) materiał osobno rozetrzeć w moździerzu, przenieść ilościowo do kolb stożkowych o objętości 100 ml, dodać 30 ml 5% roztworu TCA i wytrząsać przez 10 minut. Po tym czasie próbki umieścić w plastikowych tubach wirówkowych, odwirować (3000 obrotów/min przez 10 minut), a roztwór z nad osadu dodatkowo przesączyć przez sączek twardy. Uzyskany oczyszczony ekstrakt zostawić do dalszych badań.



c) Oznaczenie właściwe

Przygotować 12 próbek, ponumerować od 1 do 12, a następnie:

- do próbki nr 1 – dodać 2 ml 5% TCA – **próba ślepa**
- do próbek od 2 do 8 – dodać po 2 ml roztworów przygotowanych do krzywej wzorcowej (tak jak opisano w Punkcie 2.4.2.a (do każdej próbki inne stężenie)) – **krzywa wzorcowa**
- do próbek 9 i 10 – dodać po 2 ml ekstraktu z kapusty surowej (uzyskanego zgodnie z procedurą w Punkcie 2.4.2.b) – **próbki kapusty surowej**
- do próbek 11 i 12 – dodać po 2 ml ekstraktu z kapusty gotowanej (uzyskanego zgodnie z procedurą w Punkcie 2.4.2.b) – **próbki kapusty gotowanej**

Następnie, do próbek od 1 do 9 oraz próbki 11 dodać po 2 ml roztworu azotanu (V) żelaza (II), a do próbek 10 i 12 po 2 ml wody dejonizowanej (próba ślepa). Zmierzyć absorbancję wszystkich przygotowanych prób przy długości fali równej 470 nm.

WAŻNE! Analizy wykonać w czasie nie dłuższym niż 5 minut od dodania roztworu azotanu (V) żelaza (II)!

2.5. *Opracowanie wyników*

a) Obliczanie zawartości szczawianów rozpuszczalnych

- Na podstawie wyników uzyskanych zgodnie z procedurą w **Punkcie 2.4.1** obliczyć ilość rozpuszczalnego kwasu szczawowego w 100 g produktu przyjmując, że w 1 ml 0,02 N KMnO_4 odpowiada 0,9 mg $(\text{COOH})_2$;
- Podać jaka ilość wapnia jest wiązana przez kwas szczawowy zawarty w naparze przygotowanym z 4 g badanego produktu, przyjmując, że 90 mg kwasu szczawowego wiąże 40 mg wapnia;
- Podać ile mleka należy dodać do naparu sporządzonego z 4 g produktu, aby wapń zawarty w mleku związał rozpuszczalny kwas szczawowy z naparu (100 g mleka zawiera 120 mg wapnia);
- Otrzymane wyniki przedyskutować z danymi literaturowymi, zwracając szczególną uwagę na różnice w zawartości kwasu szczawowego w różnych gatunkach herbat.



Analiza Żywności

6. Oznaczanie substancji antyodżywczych w żywności

b) Oznaczanie tiocyjanianów w warzywach surowych i gotowanych

- Na podstawie wyników uzyskanych podczas analizy roztworów wzorcowych wykreślić zależność absorbancji od stężenia jonów SCN^- w roztworze (wyznaczyć współczynnik determinacji (R^2) oraz równanie prostej);
- Z równania prostej obliczyć zawartość tiocyjanianów w kapuście (wynik przeliczyć na naważkę oraz na 100 g produktu);

WAŻNE! Wyniki absorbancji uzyskane dla ekstraktów z dodatkiem roztworu azotanu (V) żelaza (II) (próbówki 9 i 11) należy najpierw pomniejszyć o wyniki uzyskane dla ekstraktów z dodatkiem wody (próbówki 10 i 12).

- Omówić różnice w zawartości tiocyjanianów w kapuście surowej i gotowanej.

3. Literatura:

- [1] Anna Brzozowska (Red): Toksykologia żywności. Przewodnik do ćwiczeń. Wydanie IV uzupełnione. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2010.
- [2] Ćwiczenie nr 4. Naturalne substancje antyodżywcze w produktach spożywczych. Dostęp online: http://www.farmacja.umed.wroc.pl/sites/default/files/farmacja/files/Toksyk_Cwiczenie_4.pdf (data dostępu 31.01.2017).
- [3] Monika Michalak-Majewska: analiza zawartości szczawianów w popularnych naparach herbat i kaw. Bromat. Chem. Toksykol. – XLVI(1) 74-79, 2013.
- [4] Toksykologia żywności. Przewodnik do ćwiczeń, red. A. Brzozowska, Wyd. SGGW, Warszawa, 2010.
- [5] 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>
- [6] 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



Informacje dodatkowe

Zakres informacji, które student powinien umieć, aby móc uczestniczyć w zajęciach:

- Definicja, mechanizm działania i źródło w pożywieniu substancji antyodżywczych;
- Charakterystyka i wpływ na organizm szczawianów i kwasu szczawowego;
- Charakterystyka i wpływ na organizm goitrogenów;
- Ekstrakcja;
- Metoda krzywej kalibracyjnej;
- Spektrofotometria UV/Vis.

Przydatna literatura:

- Literatura spisana w Rozdziale 3.