



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych z Chemii Żywności

Ćwiczenie 5

Antyoksydanty w produktach spożywczych

Gdańsk, 2024

1. Wprowadzenie

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) to substancje, które obecne w niskich stężeniach (w porównaniu z substancją ulegającą utlenianiu) znacznie opóźniają, bądź zapobiegają utlenianiu [1]. W układach biologicznych chronią przed uszkodzeniami oksydacyjnymi i pomagają zapobiegać chorobom sercowo-naczyniowym, neurologicznym i/lub nowotworowym [2]. W żywności przeciwutleniacze budzą zainteresowanie z co najmniej czterech powodów:

- mogą chronić składniki żywności przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (np. przyprawy bogate w przeciwutleniacze opóźniały psucie się żywności podczas przechowywania);
- mogą być wchłaniane przez organizm i mieć korzystny na niego efekt (np. witamina C lub α -tokoferol);
- mogą wywierać korzystne działanie, nie ulegając wchłanianiu w przewodzie pokarmowym (np. wywierając ochronne działanie na żołądek przed reaktywnymi formami azotu (powstałymi w wyniku reakcji azotanów (stosowane do konserwacji mięsa) z kwasem żołądkowym) potencjalnie uszkadzającymi DNA, chroniąc przed rakiem);
- ekstrakty roślinne mogą być stosowane jako środki terapeutyczne (np. jako środki przeciwwzapalne, przeciw niedokrwieniu i przeciwzakrzepowe).

Sugeruje się, że setki związków pochodzenia naturalnego mogą wykazywać działanie przeciwutleniające [1]. Są to związki głównie z grupy karotenoidów i związków fenolowych.

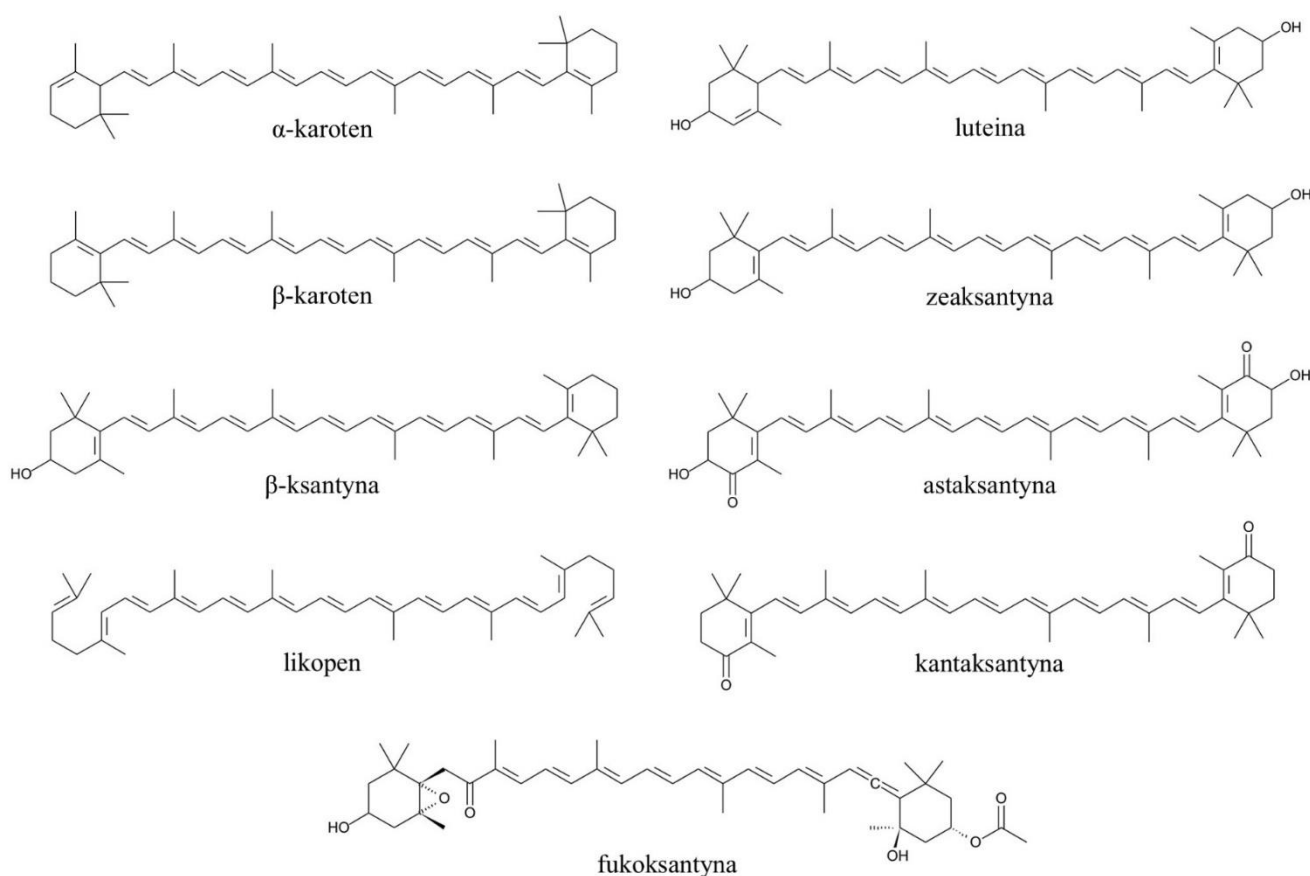
1.1. Charakterystyka karotenoidów

Karotenoidy to grupa pigmentów, głównie pochodzenia roślinnego (ale produkowane są również przez niektóre organizmy zwierzęce), odpowiedzialnych za żółtą, pomarańczową i czerwoną barwę owoców i warzyw. Wszystkie mają działanie przeciwutleniające, a niektóre są prekursorami witaminy A. Ponadto karotenoidy odgrywają rolę w komunikacji

międzykomórkowej, aktywacji układu odpornościowego i zapobieganiu chorobom, a tym samym wpływają na zdrowie człowieka.

Karotenoidy są związkami polienowymi zbudowanymi z 40 atomów węgla. Składają się z ośmiu powtarzalnych jednostek izoprenu, z cyklicznymi lub liniowymi strukturami na obu końcach łańcuchów węglowych, co skutkuje wieloma izomerami *cis* i *trans*, przy czym te ostatnie są bardziej powszechne w przyrodzie [3]. Związki te są ciałami stałymi, słabo rozpuszczalnymi w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczalnymi w rozpuszczalnikach organicznych m.in. aceton, heksan, metanol. W zależności od długości łańcucha i liczby wiązań podwójnych temperatura rozkładu tych związków jest w zakresie od 170 do 200 °C [4].

Uwzględniając posiadanie właściwości witaminy A karotenoidy można podzielić na takie, które posiadają tę własność (np. α -karoten, β -karoten, β -kryptoksantyna) oraz takie, które tej własności nie posiadają (likopen, luteina, zeaksantyna, astaksantyna, kantaksantyna, fukoksantyna). Struktury ww. karotenoidów przedstawiono na Rysunku 1, natomiast właściwości prozdrowotne i źródła w pożywieniu wybranych karotenoidów zestawiono w Tabeli 1.



Rysunek 1. Struktury wybranych karotenoidów

Tabela 1. Wpływ na organizm oraz źródło w pożywieniu wybranych karotenoidów.

Nazwa karotenoidu	Właściwości	Źródło w pożywieniu
α -karoten	Chroni komórki przed nadmiernym rozrostem	Marchew, dynia, brzoskwinia
β -karoten	Najważniejszy prekursor witaminy A, chroni skórę przed szkodliwym działaniem promieni słonecznych oraz neutralizuje wolne rodniki, opóźnia procesy starzenia się skóry	Marchew, dynia, czerwona papryka, szpinak, brokuły, słodkie ziemniaki, melon, pomarańcza
likopen	Charakteryzuje się najwyższą zdolnością do wychwytywania tlenu singletowego, zmniejsza częstotliwość występowania niektórych nowotworów, np. przełyku, żołądka, prostaty i płuc.	Pomidory i produkty ich przetwarzania (lepiej wchłaniany z pomidorów przetworzonych), arbuzy, różowe lub czerwone grejpfruty, guawa, papaja
luteina	Niezbędna do wzrostu oraz rozwoju narządu wzroku	Szpinak, kapusta, brukselka, brokuł, groszek, warzywa kapustne, żółtka jaja kurzego

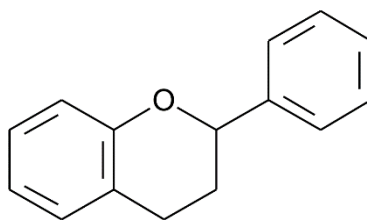
1.2. Charakterystyka związków fenolowych

Związki fenolowe (polifenole) uważane są za cenne składniki żywności ze względu na swoje działanie przeciwutleniające (antyoksydacyjne). Produkowane są przez niektóre rośliny w warunkach normalnego wzrostu, ale także w odpowiedzi na stres, uszkodzenie, infekcję grzybową lub promieniowanie ultrafioletowe (UV).

Polifenole to duża grupa związków o bardzo zróżnicowanej budowie i właściwościach, trudna do jednoznacznego podziału. Ich cechą wspólną jest obecność pierścienia aromatycznego, do którego przyłączone są przynajmniej dwie grupy hydroksylowe. Do roślinnych związków fenolowych należą m.in. flawonoidy, kwasy fenolowe, stilbenoidy, lignany i inne. Występują powszechnie w roślinach, zwłaszcza w liściach, kwiatach i zdrewniałych częściach roślin (łodyga i kora), w mniejszym stężeniu w owocach i nasionach. Dwie najpowszechniejsze grupy związków polifenolowych to flawonoidy oraz kwasy fenolowe.

Kwasy fenolowe są metabolitami wtórnymi roślin i pełnią funkcje ochronne przed działaniem owadów oraz mikroorganizmów, przed utlenianiem lipidów zawartych w owocach czy nasionach. Są to hydroksylowe pochodne kwasu benzoowego lub cynamonowego. 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.

Flawonoidy są największą i najlepiej dotąd poznaną grupą związków fenolowych, występujących powszechnie w świecie roślin (dzienne spożycie flawonoidów pochodzących z warzyw i owoców wynosi średnio 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). Podstawowy szkielet budowy flawonoidów wywodzi się ze struktury 2-fenylochromanu (flawanu) (Rysunek 2.).



Rysunek 2. Struktura szkieletu węglowego flawonoidów (flawan)

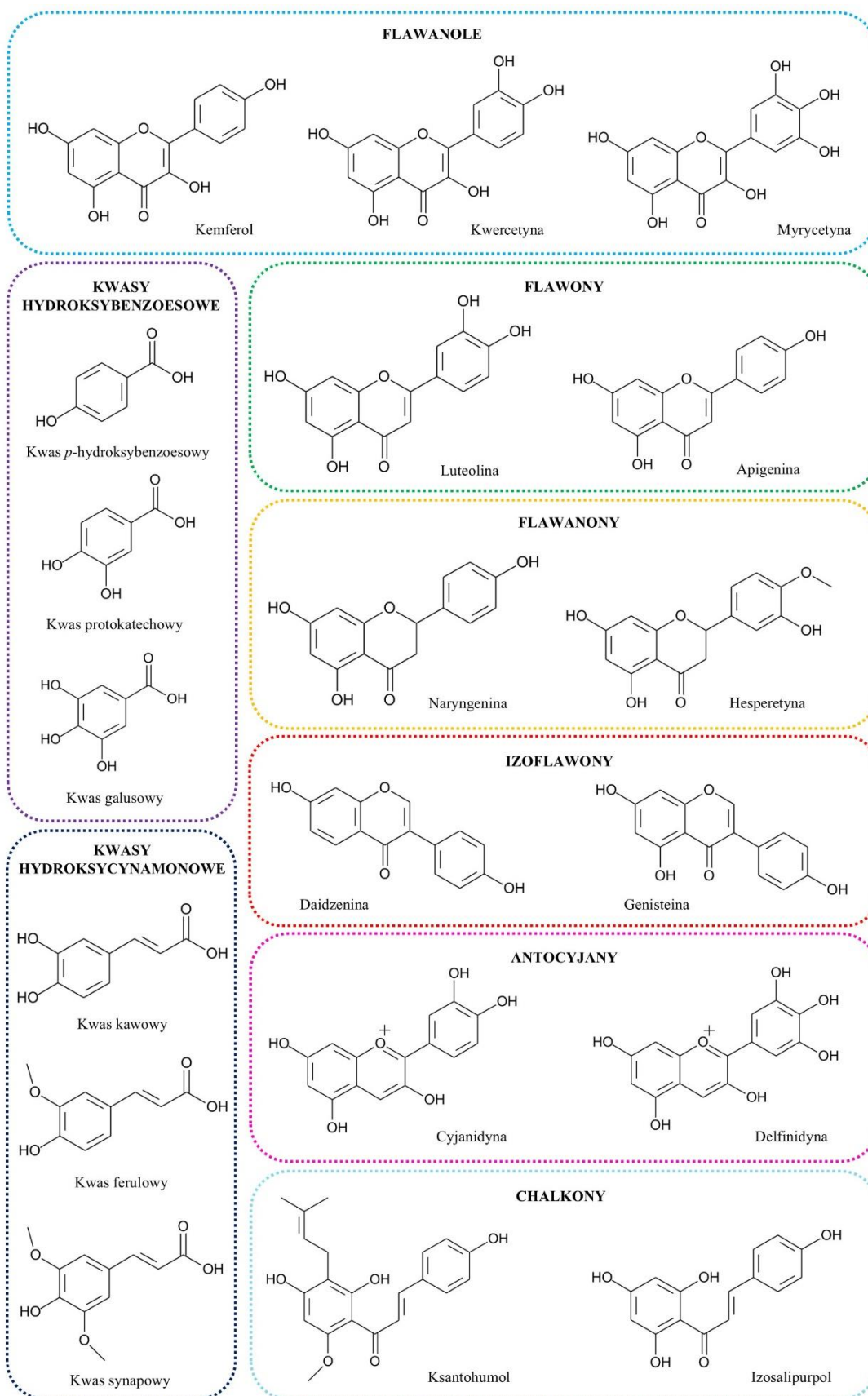
Znanych jest kilka tysięcy różnych flawonoidów. Taką ilość i różnorodność związków powoduje obecność grup hydroksylowych, metoksyłowych czy reszt cukrowych. Ze względu na różnice w budowie dzieli się je na: flawony, flawanony, flawanole, izoflawony, antocyjany i chalkony. Flawonoidy są substancjami stałymi, najczęściej żółtymi, niebieskimi, czerwonymi i fioletowymi (głównie antocyjanidyny). Rozpuszczają się dobrze w wodzie i alkoholu etylowym, większość też w octanie etylu [5-8].

Struktury wybranych związków fenolowych przedstawiono na Rysunku 3.



Analiza Żywności

5. Antyoksydanty w produktach spożywczych



Rysunek 3. Struktury wybranych związków fenolowych

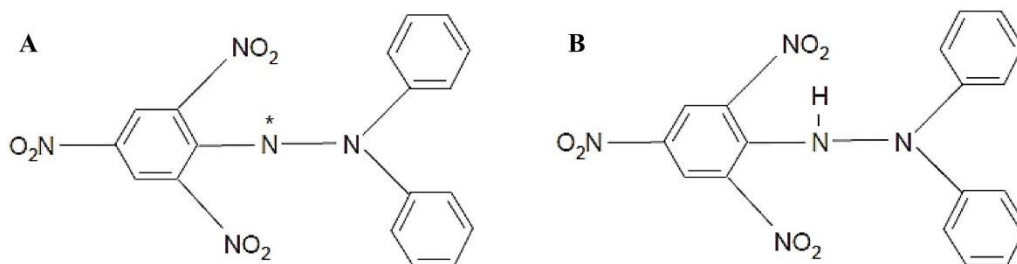
1.3. Metoda Folina-Ciocalteu'a (F-C) do oznaczania sumy związków fenolowych

Istnieją liczne metody analizy ilościowej związków polifenolowych, z których większość polega na ich ekstrakcji z badanego materiału, oczyszczaniu uzyskanych ekstraktów, a następnie analizie przy użyciu zaawansowanych technik chromatograficznych (chromatografia gazowa oraz cieczerwowa) i spektroskopowych. Spośród metod prostszych, najbardziej rozpowszechnione jest spektrofotometryczne oznaczanie sumy związków fenolowych po reakcji z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a (F-C).

Podstawą oznaczania jest odwracalna reakcja redukcji przez fenole w środowisku alkalicznym molibdenu (VI) do molibdenu (V) zawartego w odczynniku 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 wolframanu 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. Mechanizm reakcji polega na przenoszeniu elektronu. Do reakcji potrzebne jest alkaliczne środowisko (pH ok. 10, które otrzymuje się dzięki użyciu roztworu węgłanu sodu), w którym powstaje anion fenolanowy redukujący molibden. Niebieski barwnik powstaje w reakcji odczynnika F-C z fenolami niezależnie od ich struktury [9].

1.4. Oznaczanie właściwości przeciwutleniających

Jedną z najpopularniejszych i prostych technik oznaczania aktywności przeciwutleniających jest wykorzystanie rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH), który jest stosunkowo trwały i można do przechowywać w formie proszku (Rysunek 4). 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 [10].



Rysunek 4. Struktura DPPH w postaci wolnego rodnika (A) oraz w formie zredukowanej (B)



2. Część eksperymentalna

2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości karotenoidów i związków fenolowych oraz określenie właściwości przeciwutleniających w ekstraktach roślinnych.

2.2. Odczynniki, akcesoria laboratoryjne i aparatura

a) Odczynniki

- Aceton, cz.d.a. – 100 ml
- Metanol cz.d.a. – 100 ml
- Heksan cz.d.a. – 100 ml
- Roztwór DPPH w metanolu o stężeniu 0,1 mg/ml – 50 ml
- odczynnik Folina-Ciocalteu (F-C)
- Nasycony węgiel sodu – 100 ml
- Roztwór kwasu galusowego metanolu o stężeniu 2 mg/ml

b) Akcesoria laboratoryjne

- Tarka z drobnymi oczkami
- Deska i nóż
- Zlewki 250 ml – 2 szt.
- Kolby stożkowe 250 ml – 2 szt.
- Kolby miarowe 100 ml – 4 szt.
- Kolba miarowa 10 ml – 10 szt.
- Kolba okrągłodenna 50 ml – 4 szt.
- Butelka zakręcana o objętości 250 ml - 1 szt.
- Cylinder 25 ml – 1 szt.
- Pipeta szklana 5 ml – 5 szt.
- Pipeta szklana 1 ml – 8 szt.
- Pipeta szklana 2 ml – 1 szt.
- Lejek duży – 2 szt.
- Szkiełka zegarkowe (średnica ok. 10 cm) – 2 szt.
- Bagietki szklane – 2 szt.



Analiza Żywności

5. Antyoksydanty w produktach spożywczych

- Sączki miękkie (średnica 15 cm) – 2 szt.
- Tuby wirówkowe (duże) z korkami – 4 szt.
- Kuweta kwarcowa
- Szpatułka – 1 szt.
- Bursztynowe buteleczki 4ml z korkami – 22 szt.

c) Aparatura

- Vortex
- Wirówka
- Wyparka rotacyjna
- Spektrofotometr UV-Vis
- Bloczek grzejny

2.3. Materiał badawczy

Do badań należy wykorzystać koncentrat pomidorowy, sok pomidorowy, sok marchwiowy, świeżą marchew, herbatę zieloną i herbatę miętową

2.4. Wykonanie oznaczenia

2.4.1. Ekstrakcja

a) Herbaty

Do szklanych zlewek o pojemności 250 ml przenieść po 0,1 g odważonego suszu roślinnego. Zalać każdą z naważek dokładnie 100 ml **wrzącej wody dejonizowanej**. Zlewki przykryć szkiełkami zegarkowymi i odczekać 10 minut, mieszając w tym czasie napary 2-3 razy za pomocą bagietek szklanych. Następnie napary zdekantować lub przesączyć (w zależności od przejrzystości naparu oraz obecności cząstek stałych) do kolb stożkowych o pojemności 250 ml.

b) Produkty z marchwi i pomidorów

Do tub wirówkowych przenieść po 1 g produktów (świeżą marchew uprzednio zetrzeć na drobnych oczkach na gładką masę). Do każdej próbki dodać po 15 ml mieszaniny aceton:metanol (1 : 1; v/v), zatkać korkiem i intensywnie wytrząsać przez 1 minutę, wykorzystując do tego celu wytrząsarkę typu Vortex. Następnie każdą próbkę otworzyć, aby uwolnić pary acetonu, ponownie

zamknąć korkiem i odwirować (10 minut, 4000 rpm). Po odwirowaniu, ciecz z nad osadu przenieść do osobnych kolb miarowych o objętości 100 ml, a do pozostałych w tubie osadów dodać kolejne 10 ml mieszaniny aceton:metanol (1 : 1; v/v) i powtórzyć wytrząsanie oraz odwirowywanie tak jak opisano wyżej. Ciecz z nad osadu zebrać, przenieść do odpowiednich kolb miarowych, w których znajdują się pierwsze porcje ekstraktów (**nie mieszać ekstraktów pochodzących z różnych próbek żywności**) i rozcieńczyć do kreski metanolem.

2.4.2. Oznaczenie zawartości sumy karotenoidów metodą spektrofotometryczną

Pobrać 5 ml ekstraktu i odparować do sucha stosując wyparkę rotacyjną (temperatura łaźni 45 °C). Suchą pozostałość rozpuścić w 5 ml heksanu, przenieść do kuwety kwarcowej i wykonać analizy z wykorzystaniem spektrofotometru UV-Vis przy długości fali równej 470 nm.

2.4.3. Oznaczenie zawartości związków fenolowych

a) Przygotowanie roztworów do krzywej kalibracyjnej

Przygotować 10 ml roztworu kwasu galusowego w metanolu o stężeniu 2 mg/ml (roztwór podstawowy). Z roztworu podstawowego przygotować po 10 ml roztworów roboczych na ośmiu poziomach stężeń: 0,0025 mg/ml, 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml.

b) Oznaczenie właściwe

Przygotować 15 bursztynowych butelek zakręczanych o pojemności 4 ml. Następnie:

- do ośmiu z nich dodać po 50 µl roztworów roboczych do krzywej kalibracyjnej (**każde stężenie osobno**)
- do sześciu kolejnych dodać po 50 µl ekstraktów uzyskanych w punkcie 2.4.1 a i b (**każdy ekstrakt osobno**)
- do ostatniej dodać 50 µl metanolu (**próba ślepa**).

Następnie do każdej próbki dodać po 2 ml wody, 200 µl odczynnika Folina-Ciocalteu (F-C) i odstawić na 3 minuty. Po tym czasie do każdej próbki dodać 500 µl nasyconego węgla sodu i ogrzewać w termostacie, w temperaturze 40 °C, przez 30 minut. Na koniec dla każdej próbki wykonać analizy za pomocą spektrofotometru UV-Vis przy długości fali równej 765 nm.

2.4.4. Oznaczanie właściwości przeciwutleniających

a) Oznaczenie właściwe:

Przygotować 7 bursztynowych butelek zakręczanych o pojemności 4 ml. Następnie:

- Sześciu z nich dodać po 0,5 ml każdego z ekstraktów (**każdy ekstrakt osobno**);
- Do ostatniej dodać 0,5 ml metanolu (**odnośnik**, próbka w której nie zachodzi inhibicja rodnika DPPH).

Następnie do każdej dodać po 1,5 ml metanolu oraz 0,5 ml roztworu DPPH. Probki pozostawić na 30 minut. Po tym czasie wykonać pomiary absorbancji za pomocą spektrofotometru UV-Vis przy długości fali 517 nm.

2.5. Opracowanie wyników

a) *Obliczanie zawartości sumy karotenoidów w próbkach żywności.*

- Zawartość sumy karotenoidów obliczyć z wykorzystaniem poniższego wzoru:

$$C = \frac{A \cdot 10^4}{A_1} \quad (1)$$

gdzie:

C - stężenie karotenoidów [mg/l]

A – absorbancja ekstraktu w heksanie

A₁ – molowy współczynnik absorpcji (3450)

- Wynik przedstawić w mg karotenoidów na 100 g produktu.

b) *Wyznaczanie zawartości polifenoli w produktach żywnościowych*

- Na podstawie wyników uzyskanych podczas analizy roztworów roboczych kwasu galusowego wykreślić wykres zależności absorbancji od stężenia kwasu w roztworze (wyznaczyć współczynnik determinacji (R²) oraz równanie prostej);
- Z równania prostej obliczyć zawartość związków fenolowych w ekstraktach;
- Obliczyć zawartość polifenoli w produktach żywnościowych, wynik wyrazić w mg/100 g.

c) *Oznaczanie właściwości przeciwutleniających produktów żywnościowych*

— Właściwości przeciwutleniające ekstraktów obliczyć zgodnie ze wzorem:

$$\%I = \left(\frac{A_o - A_x}{A_o} \right) \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie:

%I – procent inhibicji rodnika DPPH

A_o – absorbancja odnośnika

A_x – absorbancja badanej próbki

3. Literatura:

- [1] E. Cadenas, L. Packer (red.), „Handbook of Antioxidants”, Marcel Dekker Inc., 2002
- [2] C. Andre, I. Castanheira, J.M. Cruz, P. Paseiro and A. Sanchez-Silva, “Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: review”, Trends in Food Science & Technology 2010, 21, 229 – 246,
- [3] M. A. Gonzalez-Pena, A. E. Ortega-Regules, C. A. de Parrodi, J. D. Lozada-Ramires, “Chemistry, occurrence, properties, applications and encapsulation of carotenoids – a review”, Plants 2023, 12, 313
- [4] A.V. Rao, S. Agarwal; “Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease”, Journal of the American College of Nutrition, 19 (5), 563 - 569
- [5] W. Grajek (red.), „Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne”, WNT, Warszawa, 2007
- [6] Z. E. Sikorski (red.), „*Chemia żywności. Składniki żywności, tom I*”, WNT, Warszawa, 2007
- [7] M.S. Stankovic, N. Niciforovic, V. Mihailovic, M. Topuzovic, S. Solijic, „Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *Polium*”, Acta Societatis Botanicorum Poloniae 2012, 81(2), 117-122,
- [8] A. Sadowska, F. Świdorski, R. Kromołowska, „Polifenole – źródło naturalnych przeciwutleniaczy”, Postępy techniki przetwórstwa spożywczego 2011, 1, 108 – 111
- [9] A. Blainski, G. C. Lopes, J. C. P. de Mello, “Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L.”, Molecules 2013, 18 (6), 6852 – 6865

- [10] K. Mishra, H. Ojha, N. K. Chaudhury, “Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results”, Food Chemistry 2012, 130, 1036 – 1043, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>

4. Informacje dodatkowe

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

- Definicja i aktywność biologiczna antyoksydantów;
- Definicja, budowa, właściwości fizykochemiczne, występowanie i aktywność biologiczna związków fenolowych i karotenoidów;
- Metody oznaczania antyoksydantów;
- Właściwości przeciwutleniające składników żywności, metody wyznaczania;
- Rodnik DPPH;
- Ekstrakcja;
- Metoda krzywej kalibracyjnej;
- Spektrofotometria UV/Vis.

Przydatna literatura:

- Literatura spisana w Rozdziale 3.