

# **PRZEWODNIK DO ZAJĘĆ LABORATORYJNYCH**

## **BIOLOGICZNIE AKTYWNE SUBSTANCJE POCHODZENIA ROŚLINNEGO**



UNIwersytet  
WARMIŃSKO-MAZURSKI  
W OLSZTYNIE

**WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI**

**Katedra Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych**



DR INŻ. Beata Piłat

## ZWIĄZKI FENOLOWE BUDOWA I PODZIAŁ

Związki fenolowe to zróżnicowana grupa produktów wtórnych o często o niewyjaśnionej funkcji. Mają one pierścień aromatyczny, który zawiera grupę hydroksylową i inne podstawniki, takie jak grupa karboksylowa lub metoksyłowa. Podstawniki te sprawiają iż związki fenolowe mają charakter polarny, ułatwiający rozpuszczalność w środowisku wodnym.

Większość związków fenolowych pochodzi się od **fenyloalaniny** oraz **tyrozyny**, które powstają z fosforanu erytrozy oraz kwasu fosfoenolopirogronowego, w wyniku reakcji **szlaku kwasu szikimowego**. Inne powstają jako produkty aktywności **szlaku kwasu malonowego**.

Ze względu na strukturę szkieletu węgla, związki fenolowe można podzielić na trzy grupy

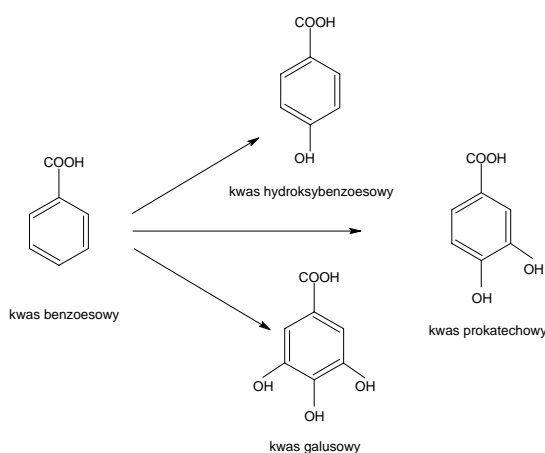
kwas fenylkarboksylowe – pochodne kwasu benzoowego, o szkielecie węglowym C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>.

Tab. 1a. Rys 1a. Przykłady kwasów pochodnych kwasu benzoowego.

Tab.1a.

Kwas	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
p-hydroksybenzoowy	- H	- H
Protokatechowy	- H	- OH
Galusowy	- OH	- OH
Wanilinowy	- OCH <sub>3</sub>	- H
Siryngowy	- OCH <sub>3</sub>	- OCH <sub>3</sub>

Rys. 1a

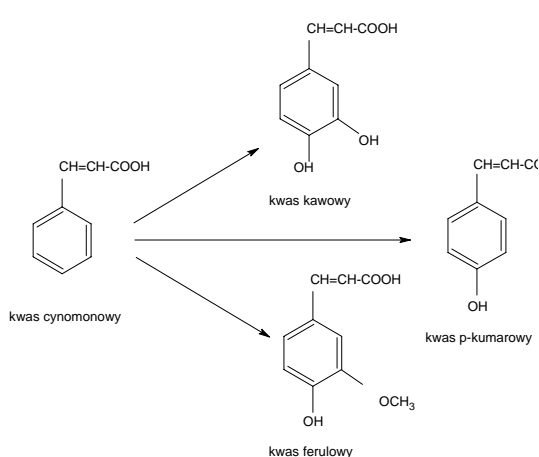


kwas fenylpropenowe – pochodne kwasu cynamonowego, o szkielecie węglowym C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, np.: Tab. 1b. Rys 1b. Przykłady kwasów pochodnych kwasu cynamonowego

Tab. 1b.

Kwas	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
o-kumarowy	- H	- H
p-kumarowy	- H	- H
Kawowy	- H	- OH
Felurowy	- OCH <sub>3</sub>	- H
Sinapowy	- OCH <sub>3</sub>	- OCH <sub>3</sub>

Rys 1b.



flawonoidy, o szkielecie węglowym C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, do których zalicza się:

- flawony i flawonole, np. kwercetynę i rutynę;
- flawanony, np. hesperydynę i narynginę;
- flawany: katechiny, leuko – i proantocyjanidyny;
- antocyjany, cyjaninę i malwinę;
- chalkony, np. florydzyne;
- izoflawony i auryony

Struktury ważniejszych związków fenolowych przedstawia rysunek 1a i 1b.

W świecie roślin kwasy fenolowe występują przeważnie w formie związanej, jako składowe lignin i tanin, w postaci estrów oraz glikozydów. Niektóre z kwasów hydroksycynamonowych występują w połączeniach estrowych z kwasami karboksylowymi lub z glukozą, natomiast kwasy hydroksybenzoesowe są obecne zazwyczaj jako glikozydy (BREINHOLT, 1999).

### **Kwasy hydroksybenzoesowe**

Największe ilości kwasów hydroksylowych znajdują się w owocach kwaśnych. Kwasy: p-hydroksybenzoesowy, syryginowy, protokatechowy oraz wanilinowy występują w stanie wolnym, natomiast pozostałe jak np. kwas galusowy częściej można znaleźć w formie związanej z innymi fenolami, niektóre występują w postaci dimerów- kwas elagowy, bądź też trimerów kwas tergalowy (MITEK I GASIK , 2007).

### **Kwasy hydroksycynamonowe**

Kwasy hydroksycynamonowe występują głównie jako estry kwasu chinowego lub glukozy (FOLEY I IN. 1999), należą do nich min: kwasy kawowy, kumarowy, felurowy i sinapowy (MITEK, GASIK, 2007). Kwasy hydroksycynamonowe pełnią rolę ochronną frakcji LDL przed oksydacyjną modyfikacją w wyniku czego hamują aterosclerozę (proces powstawania blaszki miażdżycowej w naczyniach wieńcowych, który może prowadzić do choroby niedokrwiennej serca). Wykazują również zdolności do hamowania powstawania mutagennych związków, oraz do hamowania rozwoju choroby nowotworowej (GAWLIK-DZIKI, 2004)

# ĆWICZENIE 1

## Temat: Związki fenolowe w wybranych surowcach roślinnych

*Cel ćwiczeń: Zapoznanie studentów z wybranymi grupami związków fenolowych, sposobami ich wyodrębniania oraz oznaczaniem ogólnej zawartości związków fenolowych w różnych surowcach roślinnych.*

### **SZKŁO LABORATORYJNE** ( na 1 oznaczenie):

- kolba erlenmeyera 250ml szt 2
- kolba okrągła płaskodenna ze szlifem 100ml
- kolbka miarowa 10ml
- zlewka 400ml
- lejek duży
- lejek mały do kolbki miarowej
- moździerz
- sączi filtracyjne średnie

### **ODCZYNNIKI:**

- alkohol metylowy 80%
- węglan sodowy 14%
- odczynnik Folin-Ciocalteu (1:1)

### **SPRZĘT:**

- waga 160g
- wyparka
- spektrofotometr

## WYKONANIE ĆWICZENIA

### **Związki fenolowe – oznaczanie ogólnej zawartości polifenoli (AOAC,1974)**

#### OTRZYMANIE EKSTRAKTU

W zależności od spodziewanej ilości związków fenolowych odważyć od 1-10g rozdrobnionej próbki, dodać 20 cm<sup>3</sup> 80% metanolu i wytrząsać na wytrząsarce przez 20 minut. Ekstrakcję przeprowadzić jeszcze dwukrotnie używając do tego celu po 20cm<sup>3</sup> 80% metanolu i wytrząsać na wytrząsarce przez 15 minut. Uzyskane ekstrakty sączyć przez sącze do kolby okrągłej płaskodennej o poj 100ml. Połączony ekstrakt zagęścić na wyparce próżniowej do całkowitego odparowania rozpuszczalnika. Rozpuścić ekstrakt w 2-3 cm<sup>3</sup>

metanolu i przenieść ilościowo do kolbki miarowej o poj. 10ml popłukując kolbkę 2-3 krotnie metanolem (używając do tego celu nie więcej niż 2cm<sup>3</sup> metanolu), uzupełnić do kreski.

## OZNACZANIE POLIFENOLI

### Odczynniki:

- **Folin-Ciocalteu** rozcieńczony w stosunku 1:1 z wodą destylowaną – odczynnik przygotowujemy kilka minut przed wykonaniem oznaczenia i w takiej ilości jaką zużyjemy w ciągu jednego dnia
- **Węglan sodu** 14%

### Wykonanie oznaczenia

Ilość pobranej próbki do oznaczenia jest uzależniona zawartością związków fenolowych w badanej próbce

250μl. badanej próbki

250μl odczynnika Folin-Ciocalteu

500 μl węglanu sodowego

4000 μl wody destylowanej (ilość wody zależy od ilości pobranej próbki)

$\text{ilość wody} = 5 - \text{ilość pobranej próbki} - 250\mu\text{l} - 500\mu\text{l}$

---

5ml całkowita objętość próbki wraz z odczynnikiem

próbki przygotowujemy w probówkach wirowniczych delikatnie mieszamy, zamykamy korkiem, odstawiamy na 25 minut, po tym czasie wstawiamy do wirówki i wirujemy przez 5 minut przy 7000 obrotów/min. następnie mierzymy wartość absorbancji przy długości fali 720 nm wobec próby zerowej

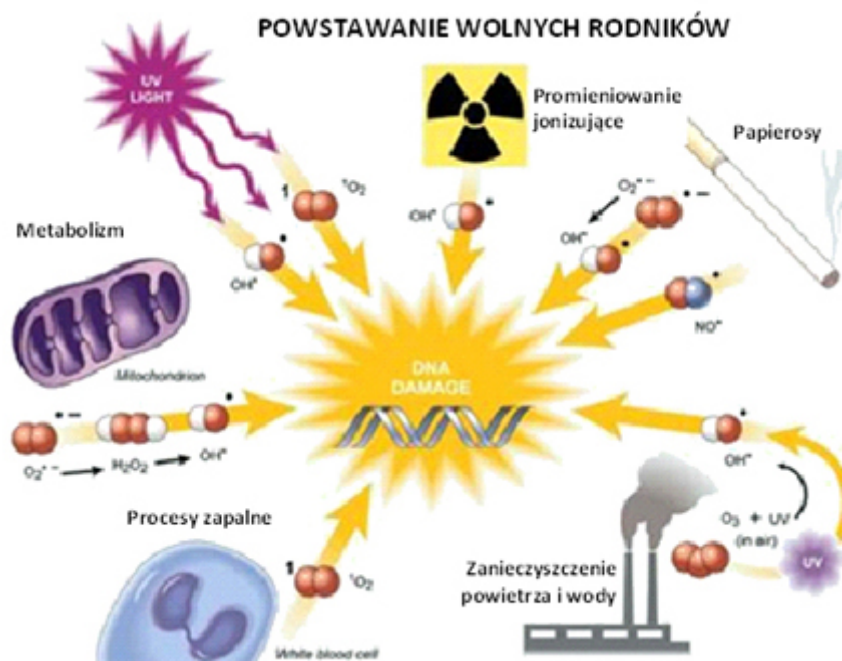
**próba zerowa:** 250μl odczynnika Folin-Ciocalteu, 500 μl węglanu sodowego, 4250 μl wody destylowanej

równanie do obliczenia ilości związków fenolowych zawartych w próbce pobranej do analizy:

**wartość absorbancji\*0,3707-0,0005 [mg/ml]**

## ***PRZECIWUTLENIACZE I METODY POMIARU AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ***

**Wolne rodniki** są cząsteczkami mającymi niesparowany elektron na ostatniej orbicie powstającymi przede wszystkim w procesie tak zwanego stresu oksydacyjnego, będącego następstwem: promieniowania UV, zażywania leków, zanieczyszczenie powietrza, palenia papierosów czy konserwantów zawartych w pożywieniu. Wszystko to powoduje, że nasze komórki żyją w ciągłym stresie, nieustannie walcząc ze szkodliwymi substancjami, starając się je neutralizować. Neutralizacje te to szereg reakcji chemicznych wymagających chociażby tlenu a skutkiem, których produktem ubocznym są wolne rodniki, atakujące białka, lipidy czy DNA. (<http://www.flavonoidy.com/bioflavonoidy.php>)

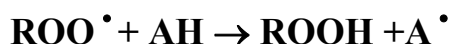


<http://www.mojacukrzyca.org/?a=text&id=1834>

**Przeciwutleniacze** są to wszystkie te substancje, które obecne w niewielkiej ilości w stosunku do substratu reakcji utleniania, w znaczący sposób opóźniają a nawet zapobiegają utlenianiu tegoż substratu.

Przeciwutleniacze dzielimy na dwie grupy:

- **Pierwszorzędowe** – mechanizm ich działania polega dezaktywacji rodników biorących udział w reakcji łańcuchowej poprzez konwersję do form mniej aktywnych lub nierodnikowych:



Najsilniejszymi przedstawicielami tej grupy są:

- ❖ polifenole
- ❖ oraz tokoferole.

- **Drugorzędowe** ( lub wtórne) – mechanizm ich działania polega na opóźnianiu utleniania poprzez:

1. wiązanie jonów metali katalizujących autooksydację (chelatowanie)
  - ❖ kwasy: askorbinowy, cytrynowy, fosforowy
  - ❖ związki fenolowe
  - ❖ białka
2. tworzenie ochronnej powierzchni pomiędzy fazą wodną zawierającą czynniki prooksydacyjne, a lipową zawierającą nienasycone kwasy tłuszczowe ( białka, fosfolipidy).
3. dezaktywację tlenu singletowego ( $\beta$ -karoten)
4. absorpcję promieniowania UV (m.in. białka)
5. pochłanianie tlenu ze środowiska reakcji poprzez preferencyjne utlenianie się ( kwas askorbinowy i jego pochodne).

**Metody pomiaru aktywności przeciwutleniającej** można podzielić na :

- **addycyjne** - metody, które opierają się na określeniu opóźnienia procesu oksydacyjnego zachodzącego w obecności przeciwutleniaczy w mieszaninie reakcyjnej;
- **postaddycyjne** - metody, które polegają na mieszanii badanej substancji z określoną ilością czynnika oksydacyjnego i oznaczeniu jego pozostałości po

pewnym czasie. Pozostałość czynnika oksydacyjnego jest odwrotnie proporcjonalna do aktywności przeciwutleniacza.

## ĆWICZENIE 2

### Temat: Właściwości przeciwutleniające wybranych związków bioaktywnych

**SZKŁO LABORATORYJNE** ( na 1 oznaczenie):

- probówki
- pipety

**ODCZYNNIKI:**

- alkohol metylowy 80%
- 0,36mM roztwór rodnika DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphenyl-1picrylhydrazyl) 0,033518g/250ml

**SPRZĘT:**

- stoper
- spektrofotometr

### WYKONANIE ĆWICZENIA

#### Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą rodnika DPPH<sup>•</sup>(2,2-diphenyl-1-piryldhydrazyl) (MOURE i wsp.2001)

Do 2 cm<sup>3</sup> 0,36 mM metanolowego roztworu DPPH<sup>•</sup> wprowadzić 200μl metanolowego roztworu związków fenolowych. Pomiar absorbancji przy długości fali 515 nm wykonać na początku oraz po upływie 16 min trwania reakcji wobec próby ślepej ( próba ślepa: 2ml roztworu DPPH<sup>•</sup> +200μl metanolu)

**OBLICZENIA:**

1. ilość mM DPPH<sup>•</sup> w 2ml

$$0.36 * 2 \text{ml} / 1000$$

2. ilość mM DPPH<sup>•</sup> po reakcji

$$\text{absorbancja}_{T_{16}} * \text{ilość mM DPPH}^{\bullet} \text{ w 2ml} / \text{absorbancja } T_0$$

3. ilość DPPH<sup>•</sup>zużyta do wychwytywania



ilość mM DPPH<sup>•</sup> w 2ml - ilość mM DPPH<sup>•</sup> T<sub>16</sub>

**4. ilość związków fenolowych w badanej próbce**

$V_{\text{pobrane do badania}} \cdot \text{ilość związków fenolowych próbce badanej (wynik z obliczeń z równania :wartość absorbancji} \cdot 0,3707 - 0,0005) / 10$

**5. ilość uM DPPH<sup>•</sup> wychwycona przez 1mg związków fenolowych**

$\text{ilość DPPH}^{\bullet} \text{ zużyta do wychwytywania} / \text{ilość związków fenolowych w badanej próbce} \cdot 1000$

## ANTOCYJANY

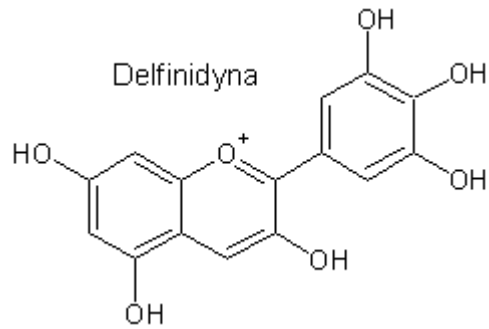
Antocyjany stanowią dużą grupę barwników, rozpowszechnionych w świecie roślin, nadających owocom i kwiatom atrakcyjne kolory, od pomarańczowego poprzez różne odcienie czerwieni i fioletu aż do barwy niebieskiej. W owocach są one zlokalizowane w zewnętrznych warstwach hipodermi. W komórkach antocyjany występują w wakuolach, w postaci granulek o różnej wielkości, natomiast ściany komórkowe i tkanki miękiszu nie zawierają antocyjanów. Dopiero po mechanicznym lub termicznym uszkodzeniu struktury wszystkie tkanki ulegają zabarwieniu.

Barwniki antocyjanowe są drugorzędowymi metabolitami roślin, zaliczonymi do flawonoidów charakteryzującymi się szkieletem węglowym  $C_6-C_3-C_6$ . W roślinach występują w formie glikozydów polihydroksy i polimetoksy pochodnych kationu flawyliowego – 2-fenylobenzopiryliowego. Ten kation może występować w formie karbonyowej lub oksoniowej, formą dominującą jest bardziej trwała struktura oksoniowa.

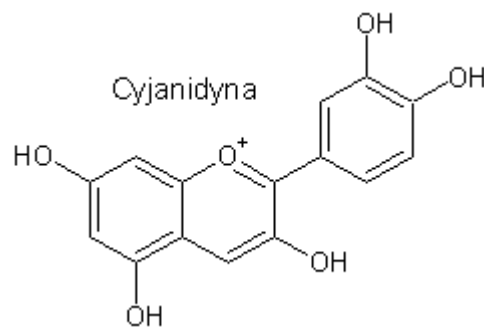
W produktach naturalnych antocyjany występują w postaci mono-, di-, lub triglikozydów. Reszty glikozydowe najczęściej są podstawione w pozycji 3, rzadziej w pozycji 5 lub 7. Glikozylacja grup hydroksylowych w pozycjach 3', 5' i 7' jest bardzo rzadko spotykana.

Skład antocyjanin występujących w owocach czy innych częściach roślin jest charakterystyczny dla danego gatunku i odmiany. W niektórych przypadkach są to tylko dwa związki a w innych nawet kilkanaście. Najczęściej występującym aglikonem jest cyjanidyna obecna prawie we wszystkich owocach. Przykładem owocu nie zawierającego glikozydów cyjanidyny są bakłażany, w których występują tylko pochodne delfinidyny.

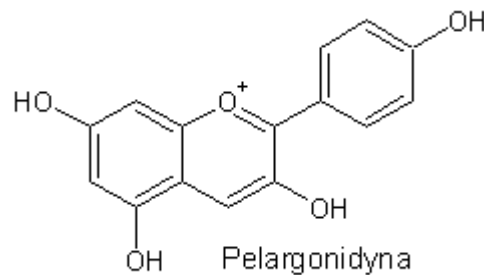
**Delfinidyna** – często spotykana antocyjanidyna. Występuje między innymi w rodzinie *Boraginaceae*.



**Cyjanidyna** – często spotykana antocyjanidyna, szczególnie w postaci glikozydu – cyjaniny. Tworzy niebieskie kompleksy z metalami, nadaje barwę płątkom bławatka.

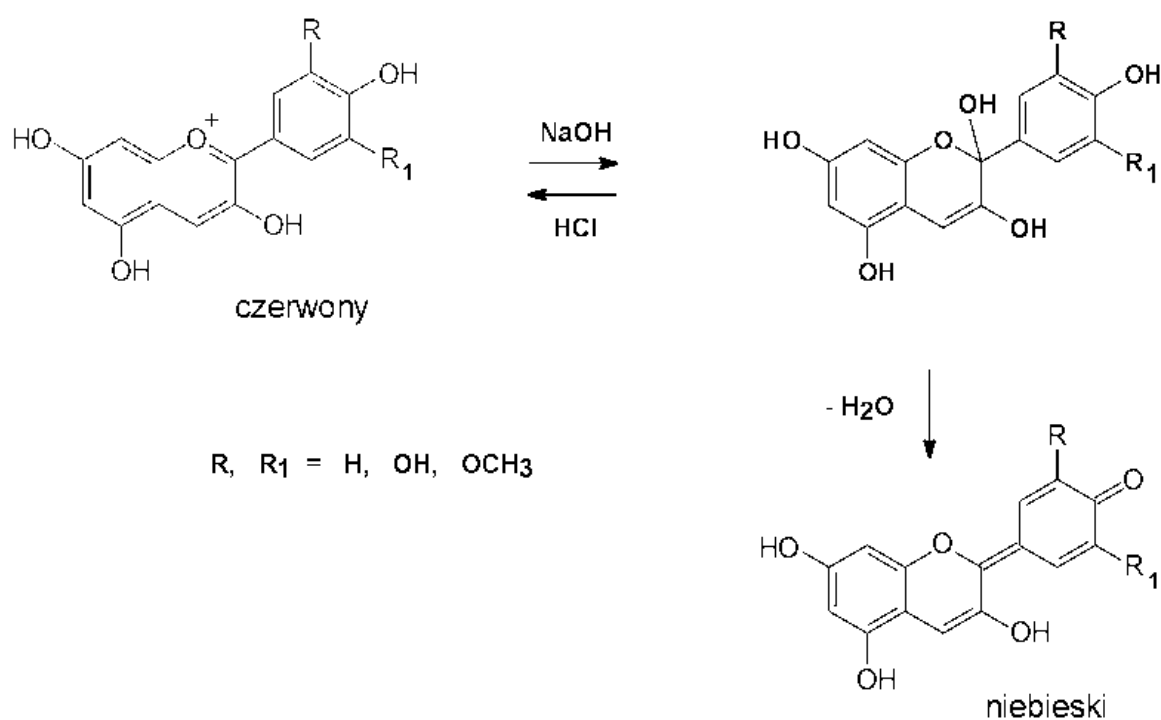
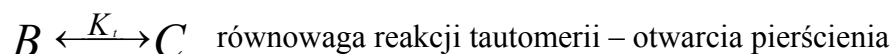


**Pelargonidyna** – jedna z najbardziej rozpowszechnionych antocyjanidyn. Charakteryzuje się intensywną czerwoną barwą.



[[farmakognozja.farmacja.pl/fitochem](http://farmakognozja.farmacja.pl/fitochem)]

Antocyjany to związki mało stabilne. W środowisku wodnym ulegają odwracalnym przemianom, które powodują zmiany barwy. Brouillard (3).twierdzi, iż w słabo kwaśnym lub obojętnym środowisku, występują w równowadze cztery formy antocyjanów: kation flawyliowy  $AH^+$ , zasada chinoidowa A, pseudozasada karbinolwa B i chakon C



<http://www.chem.univ.gda.pl//>

Czerwony kation flawyliowy  $AH^+$ , tracąc jeden proton przechodzi w niebieską zasadę chinoidową A, która może występować w dwóch formach. W wyniku nukleofilowego ataku cząsteczki wody na atom węgla w pozycji 2, powstaje bezbarwna pseudozasada karbinolowa B, która ulega dalszej przemianie do chalkonu C, występującego w formie izomerów Z i E.

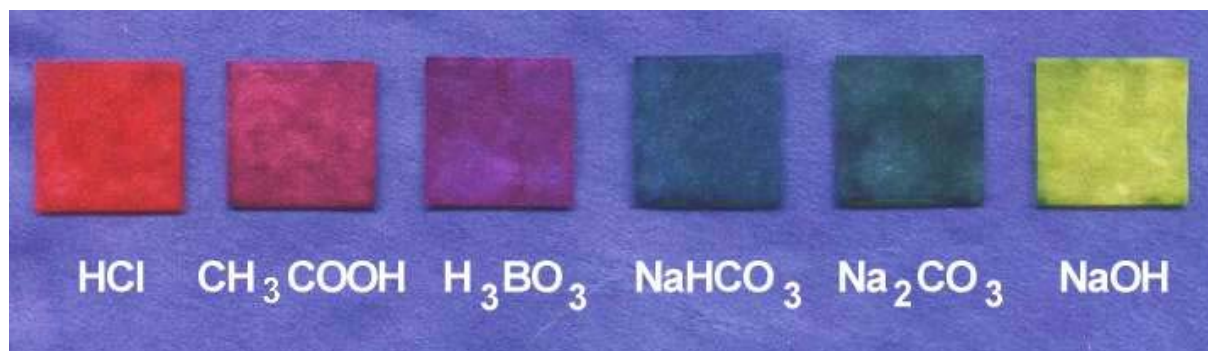
Szybkości tych przemian są bardzo zróżnicowane i zależą od struktury antocyjanów. Najszybciej zachodzi reakcja przeniesienia protonu, a najwolniej i niezależnie od pH proces tautomerii. Wszystkie te reakcje są endotermiczne,

więc ogrzewanie przyspiesza ich przebieg, a zwłaszcza proces tautomerii i powstania chalkonu.

Równowaga między wymienionymi formami antocyjanów, a więc i barwa roztworu czy produktu zawierającego antocyjany zależy od pH. W silnie kwaśnym środowisku, przy  $\text{pH} < 0.5$ , występuje tylko czerwony kation flawyliowy. W miarę wzrostu pH maleje udział barwnego kationu a rośnie udział pseudozasady, co powoduje stopniowy zanik czerwonej barwy.

Barwa antocyjanów jak i produktów zawierających antocyjany zależy przede wszystkim od:

- struktury i zawartości poszczególnych barwników,
- pH środowiska,



<http://www.chem.univ.gda.pl/>

- obecności kopigmentów, jonów metali, ditlenku siarki lub innych związków zdolnych do tworzenia z antocyjanami, w reakcjach odwracalnych, barwnych i bezbarwnych pochodnych,
- występowania substancji przyspieszających nieodwracalne procesy degradacji antocyjanów, takich jak: tlen, fenolooksydazy, jony metali katalizujące procesy utleniania, kwas askorbinowy i produkty jego degradacji [Sikorski Z.E.,2004].

# ĆWICZENIE 3

## Temat: Antocyjany w wybranych surowcach roślinnych

*Cel ćwiczeń: Zapoznanie studentów z wybranymi grupami antocjanów, sposobami ich wyodrębniania oraz oznaczaniem ogólnej ich zawartości w różnych surowcach roślinnych.*

### SZKŁO LABORATORYJNE ( na 1 oznaczenie):

- kolba erlenmeyera 250ml szt 2
- kolba okrągła płaskodenna ze szlifem 100ml
- kolbka miarowa 25ml
- zlewka 400ml
- lejek duży
- lejek mały do kolbki miarowej
- moździerz
- sączi filtracyjne średnie

### ODCZYNNIKI:

- alkohol metylowy 80% zakwaszony do pH= 2
- bufor pH=4,5 : 450cm<sup>3</sup> 1M octan sodu, 220 cm<sup>3</sup> 1M kwas solny oraz 330 cm<sup>3</sup> wody destylowanej
- bufor pH=1 : 120 cm<sup>3</sup> 0,2M chlorek sodu, 390 cm<sup>3</sup> 0,2M kwas solny

### SPRZĘT:

- waga 160g
- wyparka
- spektrofotometr

## WYKONANIE ĆWICZENIA

### Oznaczanie zawartości antocyjanów wg metody Ronalda E. Wrolstade'a (AOAC,1974)

Odważyć 10g rozdrobnionej próbki i ekstrahować czterokrotnie w 30ml 80% metanolu zakwaszonego do pH =2. Uzyskany ekstrakt sączyć przez sącze, i po zagęszczeniu przenieść do kolbki miarowej o pojemności 50ml. Tak uzyskany ekstrakt służy do dalszych badań. Z przygotowanego ekstraktu pobrać 1ml do próbek po czym do jednej dodać 4 cm<sup>3</sup> bufor o pH=1 a do drugiej 4 cm<sup>3</sup> buforu o pH=4,5 i odczytać absorbancję przy długości fali  $\lambda =526\text{nm}$  używając jako próby odczynnikowej odpowiednich buforów. W celu

wyeliminowania błędów wywołanych zakłóceniami dokonać odczytu również przy długości fali  $\lambda=700\text{nm}$ .

Zawartość antocyjanów wyrazić w mg pelargonidyny-3glukozydu /100g próbki

$$A=(A_{502\text{nm pH}1,0} - A_{700\text{nm pH}1,0}) - (A_{502\text{nm pH}4,5} - A_{700\text{nm pH}4,5})$$

zawartość antocyjanów przeliczyć wg wzoru:

$$C = \frac{A}{\xi L} * MW * N * 10$$

gdzie:

A – wyliczona absorbancja

$\xi$ - absorbancja molarna ( dla pelargonidyny 3-glikozydu wynosi 31600)

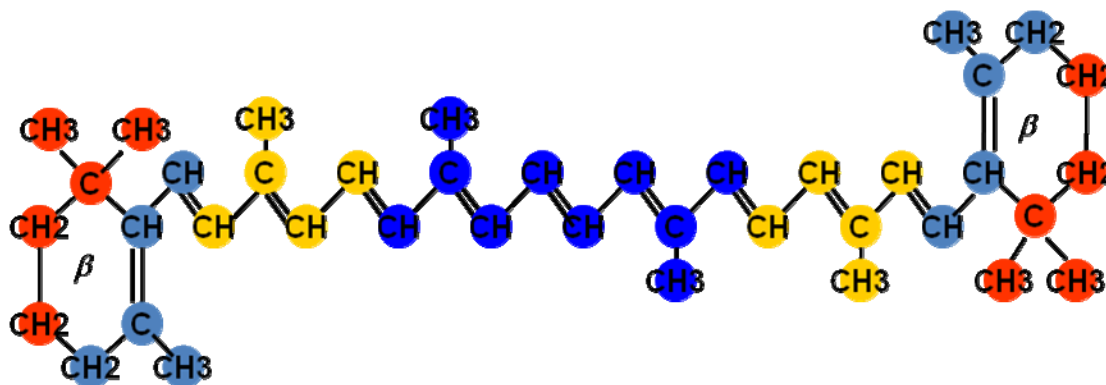
L – grubość kuwety (1cm)

MW – masa molekularna (dla pelargonidyny 3-glikozydu wynosi 433,1)

N - współczynnik rozcieńczenia

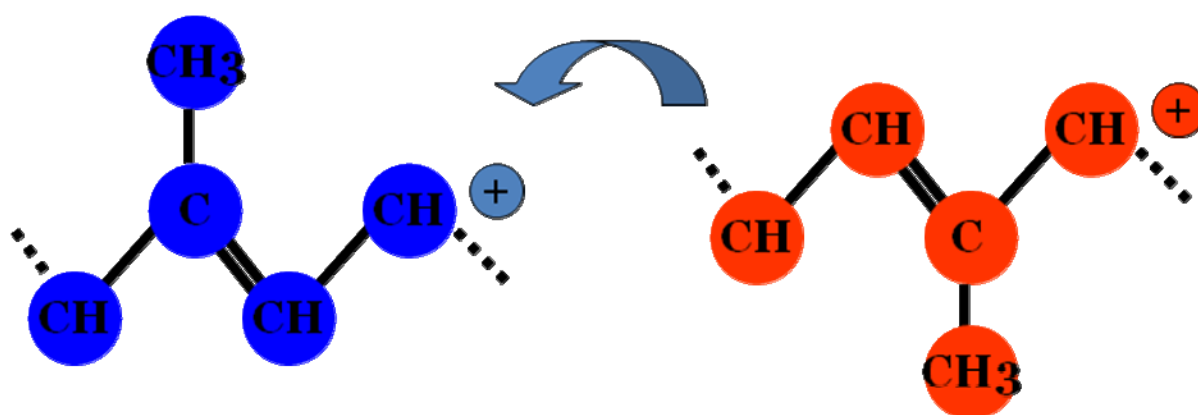
## KAROTENOIDY

W budowie karotenoidów charakterystyczne jest występowanie dwóch pierścieni cykloheksylowych, połączonych długim łańcuchem węglowym, w którym występuje układ sprzężonych wiązań podwójnych węgiel-węgiel. W cząsteczce karotenoidu wyróżnić można osiem jednostek izoprenowych



Rys. Ułożenie jednostek izoprenowych w obrębie cząsteczki karotenoidu (Zadernowski –wykład)

Reszty izoprenowe są względem siebie są obrócone o  $180^\circ$  (Grajek i inni, 2007). Dwie grupy metylowe w pobliżu środka cząsteczki znajdują się w pozycji 1-6 podczas gdy pozostałe grupy metylowe znajdują się w pozycji 1-5, (Zadernowski- wykład)



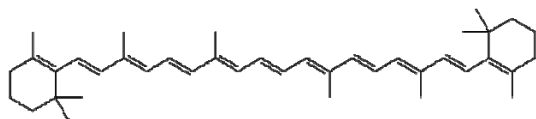
Rys. Schemat obrazujący wzajemne ułożenie reszt izoprenowych względem siebie (Zadernowski –wykład)

Barwniki karotenoidowe są syntezowane tylko przez rośliny. Towarzyszą one chlorofilowi w chloroplastach, ale występują również w innych częściach roślin:

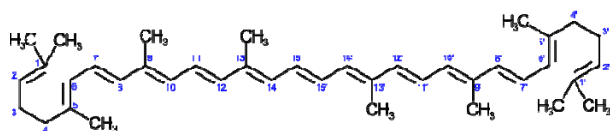


w kwiatach, owocach, nasionach, korzeniach i bulwach. Karotenoidy zbudowane są z 8 jednostek izoprenowych połączonych w ten sposób, że układ reszt izoprenowych jest odwrócony w środku cząsteczki. Mogą one występować w formie związków acyklicznych, monocyklicznych lub bicyklicznych. Są to związki polienowe, w których podwójne wiązania występują w układzie sprzężonym, w naturalnych barwnikach najczęściej w konfiguracji *all trans*. Cząsteczka musi zawierać najmniej 7 podwójnych wiązań, aby pojawiła się barwa żółta. Ze wzrostem liczby sprzężonych wiązań podwójnych maksimum absorpcji związku przesuwa się w kierunku fal długich, czyli barwa zmienia się z żółtej na pomarańczową. Ogrzewanie produktów zawierających barwniki karotenoidowe powoduje izomeryzację niektórych podwójnych wiązań, co wiąże się z osłabieniem barwy.

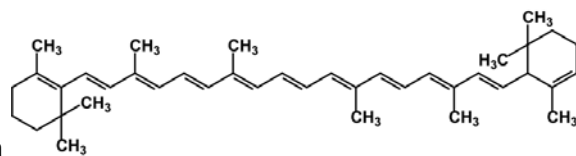
W produktach naturalnych występują mieszaniny kilku do kilkudziesięciu barwników karotenoidowych. Najczęściej występuje likopen,  $\alpha$ -karoten i  $\beta$ -karoten oraz ksantofile, często w formie zestryfikowanej.



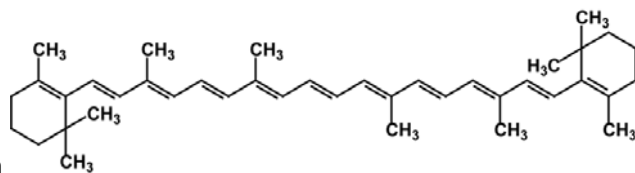
Karoten



likopen



$\alpha$ -karoten



$\beta$ -karoten

# ĆWICZENIE 4

## Temat: Charakterystyka chemiczna karotenoidów

*Cel ćwiczeń: Zapoznanie studentów z wybranymi grupami karotenoidów, sposobami ich wyodrębniania i sposobami oznaczania.*

### SZKŁO LABORATORYJNE ( na 1 oznaczenie):

- kolba erlenmeyera 250ml , 500ml
- kolba okrągła płaskodenna ze szlifem 100ml
- zlewka 400ml
- lejek Buchnera
- rozdzielacz gruszkowy 500ml
- cylinder miarowy 100ml, 250ml
- kolumna chromatograficzna (długość około 10cm i średnica około 2,4cm)

### ODCZYNNIKI:

- alkohol etylowy 95%
- eter naftowy
- aceton
- bezwodny siarczan sodu
- tlenek magnezu

### SPRZĘT:

- waga 160g
- wyparka

### POZOSTAŁE:

- sączi filtracyjne średnie
- wata szklana
- spektrofotometr

## WYKONANIE ĆWICZENIA

### Oznaczanie zawartości sumy karotenoidów i $\beta$ -karotenu

PN-90/A-75101/12

Zasada metody polega na wyekstrahowaniu karotenoidów z badanej próbki za pomocą eteru naftowego i oznaczeniu ich w otrzymanym ekstrakcie metodą kolorymetryczną przy długości fali  $\lambda = 450\text{nm}$ .

Odważyć 10g rozdrobnionej próby i poddać ją ekstrakcji przy użyciu 150ml mieszaniny alkoholowo-eterowej (2:1). Zawartość kolby wytrząsać przez 10 minut. Po tym czasie przenieść ilościowo na lejek Büchnera i przemywać aż do całkowitego odbarwienia przesączu, spływającego z lejka. Cały uzyskany przesącz przenieść do rozdzielacza i dodać 75ml wody destylowanej w celu rozdzielenia warstw. Dolną warstwę alkoholowo-wodną, spuszczało do kolbki stożkowej i poddać dalszej ekstrakcji eterem naftowym używając do tego celu każdorazowo po 40ml eteru naftowego, natomiast frakcję eterową przenoszono do kolby ze szlifem. Ekstrakcję zakończyć w momencie gdy stwierdzony zostanie brak widocznego przechodzenia barwników karotenoidowych do eteru naftowego. Ekstrakt uzyskany przepłukano wodą destylowaną. Po 10 minutach oddzielić wodę, przeniesiono ekstrakt do cylindra i po odczytaniu objętości dodać bezwodnego siarczanu sodowego. W otrzymanym ekstrakcie oznaczyć spektrofotometrycznie zawartość karotenoidów ogółem.

Do obliczenia zawartości sumy karotenoidów wykonano według następującego schematu:

$$A = 0,46605n + 0,0332 \text{ [}\mu\text{g/ml]}$$

gdzie:

A – stężenie  $\beta$ -karotenu w 1ml badanego roztworu, [ $\mu\text{g/ml}$ ]

n – absorbancja roztworu  $\beta$ -karotenu przy długości fal 467 nm

$$X = \frac{A * V * 100}{G * 100} \text{ [mg/100g]}$$

gdzie:

A – stężenie  $\beta$ -karotenu w 1ml badanego roztworu, [ $\mu\text{g/ml}$ ]

V - całkowita objętość ekstraktu karotenoidów [ml]

G – masa próbki pobrana do analizy [g]

### **Rozdział metodą chromatografii kolumnowej na tlenku magnezu**

#### **PRZYGOTOWANIE KOLUMNY**

Na dno kolumny włożyć niewielką ilość waty szklanej, 0,2cm bezwodnego siarczanu sodu, adsorbent – tlenek magnezu 6-7cm, bezwodny siarczan sodu 0,5cm. Tak napakowaną kolumnę przemyć 50ml eteru naftowego.

## PRZYGOTOWANIE PRÓBKI

Z otrzymanego ekstraktu karotenoidowego pobrać 50ml próby zagęścić do objętości 2-3ml i nanieść na uprzednio przygotowaną kolumnę. Próbkę наносimy w momencie gdy rozpuszczalnik ( eter naftowy) tworzy nad adsorbentem film grubości 0,5 cm.

Kolumnę przepłukujemy eterem naftowym używając każdorazowo 2ml eteru naftowego do momentu zaadsorbowania próbki na adsorbencie, jednocześnie pilnując żeby nad adsorbentem przez cały czas był rozpuszczalnik około 0,5ml .

Po zaadsorbowaniu próbki w tlenku magnezu zaczynamy wymywanie poszczególnych frakcji przy użyciu mieszaniny eterowo-acetonowej (100:1). Uzyskane frakcje zbieramy każdą oddzielnie do cylindra pomiarowego, odczytujemy objętość.

Do obliczenia zawartości sumy karotenoidów wykonano według następującego schematu:

$$A = 0,46605n + 0,0332 \text{ } [\mu\text{g/ml}]$$

gdzie:

A – stężenie  $\beta$ -karotenu w 1ml badanego roztworu, [ $\mu\text{g/ml}$ ]

n – absorbancja roztworu  $\beta$ -karotenu przy długości fal 467 nm

$$X = \frac{A * V * V_2 * 100}{G * V_3 * 100} \text{ } [\text{mg}/100\text{g}]$$

gdzie:

A – stężenie  $\beta$ -karotenu w 1ml badanego roztworu, [ $\mu\text{g/ml}$ ]

V - całkowita objętość ekstraktu karotenoidów [ml]

V<sub>2</sub> - objętość ekstraktu uzyskana z rozdziału [ml]

V<sub>3</sub> - objętość ekstraktu pobrana do rozdziału [ml]

G – masa próbki pobrana do analizy [g]

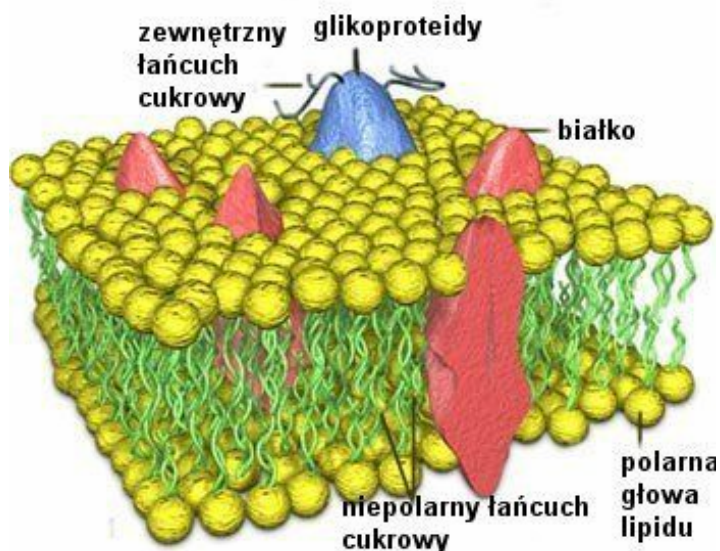
## **BIOOLEJE ROŚLINNE**

Biooleje są lekami o budowie triacylogliceroli, zawierającymi kwasy tłuszczowe o właściwościach leczniczych potwierdzonych klinicznie.

W przypadku ludzi zdrowych biooleje są przede wszystkim źródłem energii, natomiast w przypadku ludzi chorych są źródłem suplementowanych NNKT. (wykład R. Zadernowski)

Lipidy należą do dużej grupy naturalnych związków organicznych, nierozpuszczalnych w wodzie, natomiast rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych takich jak eter etylowy, eter naftowy, chloroform, benzen, aceton itd. Do lipidów zalicza się też pochodne lipidów naturalnych i pokrewne im związki, które zachowują cechy lipidów. (Sikorski Z.E. 2007) Lipidy występują we wszystkich żywych organizmach. W roślinach są one obecne przede wszystkim w nasionach i w miąższu owoców, a w organizmach zwierząt w różnych narządach lub jako wyodrębniona tkanka tłuszczowa.

Powszechnie akceptowany obecnie model błony komórkowej opublikowany został w 1972 r. przez SINGERA i NICHOLSONA. Jest to tzw. model płynnej mozaiki. Podstawowe elementy strukturalne błon komórkowych wg tego modelu przedstawione są na rysunku:



Model ten zakłada, że lipidy w błonie zorganizowane są w postaci dwuwarstwy. W dwuwarstwą tę wbudowane są białka błonowe. Zewnętrzną część tej dwuwarstwy stanowią polarne, często obdarzone ładunkiem głowy lipidów, a część wewnętrzną, hydrofobowe ogony, stanowiące barierę przepuszczalności dla rozpuszczalnych w wodzie związków. Grubość dwuwarstwy równa jest w przybliżeniu podwójnej długości cząsteczek fosfolipidów i wynosi ok.7 nm. Samoorganizowanie się fosfolipidów i glikolipidów w strukturę dwuwarstwy w środowisku wodnym jest procesem spontanicznym i szybkim. Możliwe jest to dzięki amfofilowej budowie lipidów, a główną siłą napędową tego procesu są oddziaływania hydrofobowe. Ponadto pomiędzy łańcuchami węglowodorowymi lipidów występują oddziaływania van der Waalsa ułatwiające ich lepsze upakowanie. W polarnym regionie błony duże znaczenie mają oddziaływania o charakterze elektrostatycznym pomiędzy polarnymi głowami lipidów oraz tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy tymi głowami oraz głowami lipidów i cząsteczkami wody. Między cząsteczkami lipidów nie występują wiązania kowalencyjne. Dzięki temu struktura dwuwarstwy lipidowej poddawanej działaniu pola elektrycznego wykazuje właściwości samoregeneracyjne, co nie jest możliwe w przypadku klasycznych dielektryków (<http://www.uwm.edu.pl/kchem/badania/blm/lipidy/budowa.html>)

## **Funkcje**

- ❖ są najbardziej skoncentrowanym źródłem energii, z 1 g tłuszczów wyzwala się 9 kcal,
- ❖ są wygodnym i głównym źródłem materiału zapasowego (umożliwiają robienie przerw między posiłkami, podczas pracy, umożliwiają funkcjonowanie organizmu poza strefą neutralności cieplnej - utrzymywanie temperatury ciała),
- ❖ nagromadzony w tkance tłuszcz chroni przed nadmiernym wydzieleniem ciepła, pozwala na adoptowanie się w niskiej temperaturze,
- ❖ odłożone w organizmie lipidy są magazynem wody, 30-50% tkanki tłuszczowej stanowi woda, spalenie 100 g tkanki tłuszczowej wyzwala 107 g wody,
- ❖ mieszane tłuszcze pożywienia są źródłem witamin rozpuszczalnych w tłuszczach: A, D, E, K i Niezbędnych Nienasyconych Kwasów Tłuszczowych ,
- ❖ tłuszcze w pożywieniu oszczędzają gospodarkę białkami i witaminami z grupy B,
- ❖ mają dużą wartość sytną - hamują wydzielenie soku żołądkowego, podnoszą smak potraw,

- ❖ pełnią funkcję budulcową, są składnikiem błon komórkowych oraz stanowią ważny element wchodzący w skład wielu hormonów, cholesterolu oraz ważnych substancji wewnątrzkomórkowych.

### Zapotrzebowanie

Tłuszcze powinny dostarczać 25-30% wartości energetycznej dziennej racji pokarmowej dorosłego człowieka. Powinny to być tłuszcze nienasycone, nie utwardzane chemicznie, pozbawione izomerów trans.

### Podział

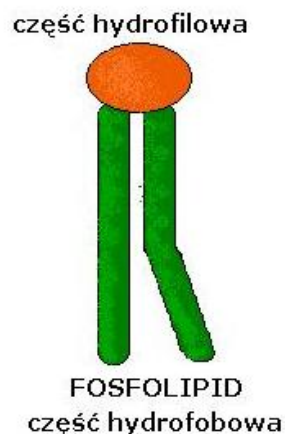
Ze względu na budowę chemiczną lipidy można podzielić na:

Lipidy proste

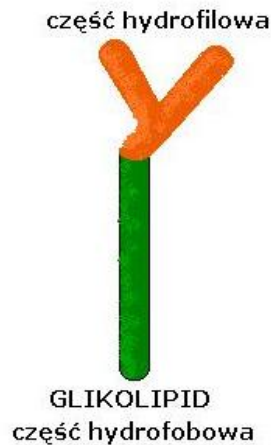
- Lipidy właściwe- estry kwasów tłuszczowych i alkoholi
- Woski - estry wyższych kwasów tłuszczowych i alkoholi innych niż glicerol

Lipidy złożone - związki zawierające oprócz kwasów tłuszczowych i alkoholi także inne składniki.

- [Fosfolipidy](#) – lipidy zawierające kwas fosforowy jako mono lub Dieter



- [Glikolipidy](#) - to związki zawierające co najmniej jeden cukier połączony wiązaniem glikozydowym z częścią lipidową



- Inne lipidy złożone np. sulfolipidy

Lipidy pochodne - pochodne lipidów prostych i złożonych, powstałych przede wszystkim w wyniku ich hydrolizy, zachowując ogólne właściwości lipidów.

- [Kwasy tłuszczowe](#) - tłuszcze zbudowane są z kwasów tłuszczowych, których budowa chemiczna determinuje podział tych związków na kwasy tłuszczowe nasycone, jednonienasycone (monoenurowe) i wielonienasycone (polienowe).
- Alkohole (inne niż glicerol)
- Węglowodory

( Sikorski Z.E. 2004)

Kwasy tłuszczowe nasycone (ważniejsze):

- ❖ masłowy
- ❖ kapronowy
- ❖ kaprylowy
- ❖ kaprynowy
- ❖ laurynowy
- ❖ mirystynowy
- ❖ palmitynowy
- ❖ stearynowy
- ❖ arachidowy
- ❖ behenowy
- ❖ lignocerowy



Kwasy tłuszczowe jednonienasycone (ważniejsze):

- ❖ oleomirystynowy
- ❖ oleopalmitynowy
- ❖ oleinowy
- ❖ elaidynowy
- ❖ wakcenyowy
- ❖ gadoleinowy
- ❖ erukowy
- ❖ brasydynowy

Kwasy tłuszczowe wielonienasycone - Niezbędne Nienasycone Kwasy Tłuszczowe (ważniejsze):

- ❖ linolowy (omega-6)
- ❖  $\gamma$ -linolenowy (gamma-linolenowy) (omega-6)
- ❖ arachidonowy (omega-6)
- ❖  $\alpha$ -linolenowy (alfa-linolenowy) (omega-3)
- ❖ dokozaheksaenowy (omega-3)
- ❖ eikozapentaenowy (omega-3)

### **Niezbędne Nienasycone Kwasy Tłuszczowe (NNKT)**

Kwasy tłuszczowe są składnikami tłuszczów. Istnieją dwa Niezbędne Nienasycone Kwasy Tłuszczowe. Niezbędne to znaczy musimy pozyskiwać je z pożywienia ponieważ organizm nie potrafi ich sam wytworzyć. Pierwszym takim kwasem jest  $\alpha$ -linolenowy należący do rodziny kwasów omega-3. Źródłem tego kwasu w pożywieniu są: tłoczone na zimno oleje: lniany i rzepakowy, nasiona lnu i rzepaku, siemię lniane, orzechy włoskie, kielki pszenicy. Drugim Niezbędnym Kwasem Nienasyconym jest kwas linolowy należący do rodziny omega-6. Możemy go znaleźć w tłoczonych na zimno oleju sojowym i kukurydzianym, nasionach słonecznika, nasionach dyni, nasionach sezamu i w większości orzechów. Poza kwasami:  $\alpha$ -linolenowym (omega-3) i linolowym (omega-6) istnieją inne kwasy należące do rodziny kwasów omega-3 i omega-6. Do rodziny kwasów omega-3 należą: kwas dokozaheksaenowy i kwas eikozapentaenowy, które nasz organizm może wytworzyć z kwasu  $\alpha$ -linolenowego. Zawarte są one przede wszystkim w żywności pochodzenia morską (w rybach tj. makrela, łosoś, halibut, dorsz, śledź, sardynka). Dla niemowląt i dzieci kwas dokozaheksaenowy ze względu na swoje funkcje jest Niezbędnym Nienasyconym Kwasem Tłuszczowym (jest on zawarty w mleku ludzkim). Do rodziny kwasów omega-6 należą: kwas  $\gamma$ -linolenowy i kwas arachidonowy, które nasz organizm może wytworzyć z kwasu linolowego. Największą wartością i aktywnością biologiczną odznaczają się należące do rodziny omega-3. Prawidłowy stosunek kwasów tłuszczowych z rodziny omega-6 do kwasów z rodziny omega-3 powinien wynosić (<5:1).

### **Rola Niezbędnych Nienasyconych Kwasów Tłuszczowych:**

- ❖ stanowią jeden z niezbędnych składników budulcowych komórek,
- ❖ biorą udział w metabolizmie cholesterolu (zwłaszcza kwas arachidonowy) i jego transporcie (przeszło połowa estrów cholesterolu występuje w postaci połączeń z kwasem linolowym, co ułatwia ich rozprowadzenie w organizmie, obniżają poziom cholesterolu we krwi),
- ❖ hamują agregację płytek krwi, powodują rozszerzanie naczyń krwionośnych, w tym i wieńcowych, działają antyarytmicznie,
- ❖ są prekursorami do biosyntezy prostaglandyn i prostacyklin,
- ❖ biorą udział w transporcie wody i elektrolitów przez błony biologiczne,
- ❖ regulują wydalanie jonów sodu z organizmu.

### **Niedobór Niezbędnych Nienasyconych Kwasów Tłuszczowych powoduje:**

- ❖ zahamowanie wzrostu i spadek przyrostu masy,
- ❖ zmiany skórne i wypadanie włosów,
- ❖ zwiększona wrażliwość na zmiany alergiczne i zakażenia bakteryjne,
- ❖ spadek napięcia mięśnia sercowego (mniejsza siła skurczu, gorsze krążenie, obrzęki).

<http://zdrowezywienie.w.interia.pl/tluszcz.html>

# ĆWICZENIE 5

## Temat: Charakterystyka chemiczna bioolejów roślinnych

*Cel ćwiczeń: Zapoznanie studentów ze sposobami wyodrębniania i sposobami oznaczania składu kwasów tłuszczowych bioolejów*

### SZKŁO LABORATORYJNE ( na 1 oznaczenie):

- zlewka 400ml, 100ml
- ampułki
- pipeta

### ODCZYNNIKI:

- mieszanina metylująca (chloroform: metanol : kwas siarkowy ; 100:100:1)
- cynk
- heksan do GC

### SPRZĘT:

- wirówka
- palnik gazowy
- szczypce
- ciepłarka

## WYKONANIE ĆWICZENIA

### Otrzymanie tłuszczu

Próbkę 100g nasion oleistych poddać tłoczeniu na prasie ślimakowej, otrzymany olej odwirować (czas 15 min; obroty ok. 12000/min.)

### Oznaczanie kwasów tłuszczowych (Zadernowski i Sosulski 1978.)

Próbkę ok. 10 µg ( 2 krople) umieścić w ampułce i dodać 2 cm<sup>3</sup> mieszaniny metylującej (metanol-chloroform-kwas siarkowy, 100:100:1, v/v/v). Metylację prowadzić ogrzewając zatopione ampułki w suszarce w temperaturze 70°C przez 2 godziny. Po zakończeniu metylacji i otwarciu ampulek dodać niewielkie ilości pyłu cynkowego (w celu neutralizacji kwasu siarkowego), odparowywać rozpuszczalnik a estry metylowe kwasów tłuszczowych (EMKT) rozpuścić w heksanie. Tak przygotowany roztwór analizować z zastosowaniem techniki chromatografii gazowej (GC) na kolumnie DB-225 30m × 0,25mm × 0,15 µm stosując hel jako gaz nośny.

## ĆWICZENIE 6

**Temat: Praktyczne wykorzystanie wybranych substancji biologicznie aktywnych w żywności i kosmetyce**

*Cel ćwiczeń: Zapoznanie studentów ze kierunkami i możliwościami wykorzystania aktywności przeciwutleniającej poszczególnych substancji biologicznie aktywnych*

**Wykonanie ćwiczenia:**

**Eksperyment własny**

- zastosowanie naturalnych wyciągów substancji biologicznie aktywnych w żywności i kosmetyce na przykładzie własnych propozycji

## LITERATURA

- AOAC (Association of the Official Analytical Chemists), 1974. **Official Methods of Analysis**, Washington DC, 9. 110,
- Obiedziński M., 2009, **Wybrane zagadnienia z analizy żywności** , Wydawnictwo SGGW Warszawa
- Breinholt V. 1999, **Desirable versus harmful of intake of flavonoids and phenolic acids. Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease.** . J.T. Kumpulainen, J.T Salonen, The Royal Society of Chemistry, str. 93-99
- Kopcewicz J., Lewaka S. 2002. **Fizjologia roślin**. PWN str. 386-410
- Mitek M., Gasik A., 2007. **Polifenole w żywności. Właściwości przeciwutleniające**. Przemysł Spożywczy, 9, str. 36-44
- Foley S., Navaratnam S., McGarvey D.J., Land E.J., Truscott G., Rice-Evans C.A., 1999. **Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids**. Free Rad. Biol. Med., 26, 9/10 str. 1202-1208
- Gawlik-Dziki U., 2004. **Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności**. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 4(41) str. 29-40
- Praca zbiorowa pod redakcją Grajka W. 2007. **Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne technologiczne molekularne i analityczne.**; WNT W-wa str.203
- Sikorski Z. E. (pod red.): **Chemia Żywności**. Wyd. IV. WNT, Warszawa 2004.
- Zadernowski R., Sosulski F., 1978, **Composition of total lipids in rapeseed**, JAOCS 55, 870 – 87

