

## Ćwiczenie nr 4. Naturalne substancje antyodżywcze w produktach spożywczych

### 1. Wiadomości wprowadzające

Do substancji antyodżywczych obecnych w żywności należą **szczawiany i tiocyjaniany**.

#### Szczawiany

**Szczawiany** występują w żywności pochodzenia roślinnego w formie rozpuszczalnych soli sodu i potasu oraz nierozpuszczalnych – szczawianu wapnia. W roślinach najczęściej szczawianów występuje w ogonkach i dolnych liściach, a najmniej w korzeniach.

Kwas szczawiowy -  $(\text{COOH})_2$  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.

Kwas szczawiowy w organizmie człowieka pochodzi z pożywienia lub jest końcowym produktem metabolizmu m.in. kwasu askorbinowego. Najbardziej znanymi źródłami szczawianów są: szpinak, rabarbar i szczaw. Duże ilości tych związków dostarczane są również z kawą i herbatą.

Sporadyczne spożycie produktów zawierających szczawiany nie wpływa negatywnie na stan zdrowia człowieka, natomiast nadmierna ich podaż z dietą przy niedostatecznej ilości wapnia i witaminy D może wywierać ujemny wpływ na wchłanianie i retencję wapnia, a konsekwencji na bilans wapnia w organizmie. Może również prowadzić do kamicy nerkowej. Aby ograniczyć ryzyko powstania kamieni nerkowych zaleca się nieprzekraczanie podaży 40-50 mg szczawianów/dobę. W wyniku procesu gotowania warzyw w wodzie ilość szczawianów obniża się w nich o ok. 50%.

Antyodżywcze działanie kwasu szczawiowego jest uwarunkowane nie tylko zawartością jonów szczawianowych w pożywieniu, ale również stosunkiem molowym kwasu szczawiowego do pierwiastków, z którymi tworzy on nierozpuszczalne sole. Biorąc pod uwagę stosunek molowy kwasu szczawiowego do wapnia produkty spożywcze można podzielić na trzy grupy:

- produkty, w których zawartość kwasu szczawiowego wielokrotnie przekracza zawartość wapnia – stosunek molowy  $(\text{COOH})_2 / \text{Ca} > 2$   
szpinak, szczaw, rabarbar, botwina, buraki, herbata, kawa, kakao,
- produkty, których zawartość kwasu szczawiowego jest prawie równoważna zawartości wapnia – stosunek molowy  $(\text{COOH})_2 / \text{Ca}$  wynosi 1-2  
ziemniaki, owoce jagodowe,

- produkty, których zawartość kwasu szczawiowego jest niższa niż zawartość wapnia – stosunek molowy  $(\text{COOH})_2/\text{Ca} < 1$   
sałata, kapusta, kalafior, marchew.

Aby ochronić organizm przed nadmiernymi stratami składników mineralnych (wapnia) należy:

- ograniczyć spożywanie produktów, w których stosunek molowy kwasu szczawiowego do wapnia jest większy niż 2 lub wykluczyć je z diety,
- uzupełnić dietę w wapń poprzez spożywanie dodatkowej ilości produktów bogatych w ten składnik, takich jak: mleko i przetwory mleczne.

Tabela 1. Zawartość kwasu szczawiowego oraz jego stosunek molowy do wapnia w niektórych produktach.

Produkt	Zawartość kwasu szczawiowego (mg/100g)	Zawartość wapnia (mg/100g)	Stosunek molowy [mEq(COOH) <sub>2</sub> /mEqCa]
Buraki, korzeń	124-450	18-30	5,10
Kalafior	0-21	150-200	0,03
Kapusta pekińska	0-6	60-100	0,02
Marchew	5-60	30-50	0,36
Rabarbar	275-1336	40-50	8,50
Sałata	5-20	73-90	0,06
Szczaw	270-730	35-40	5,60
Szpinak	320-1260	80-122	4,30
Ziemniaki	20-141	10-34	1,60
Herbata	300-2000	400-500	1,13
Kakao	500-900	100-150	2,60
Kawa	50-150	10-15	3,90

### Tiocyaniany

W roślinach krzyżowych występują tioglikozydy (glukozynolany), związki chemiczne posiadające wiązanie S-glikozydowe, będące naturalnymi substancjami wolotwórczymi. Antyodżywcze działanie tych związków polega na zaburzeniu wchłaniania jodu przez gruczoł tarczycowy i zaburzeniu syntezy hormonów tarczycy. Oprócz działania antyżywniowego tioglikozydy wykazują także korzystne właściwości antykancerogenne. Z glukozynolanów w

wyniku enzymatycznej hydrolizy pod wpływem tioglikozydazy (mirozynazy) powstają: **tiocyjaniany** ( $\text{SCN}^-$ ), izotiocyjaniany, związki indolowe, nityle i izooksazolidyny. Enzymatyczny rozkład tioglikozydów ma miejsce podczas żucia pokarmów i rozdrabiania warzyw w wyniku zmiężdżenia tkanek i uwolnienia mirozynazy z komórek. Większość aktywnych tioglikozydów uwalnia się podczas ekstrakcji wodą i gotowania warzyw. W temperaturze  $90^\circ\text{C}$  następuje denaturacja i zahamowanie działania mirozynazy. Większość tiocyjanianów jest lotna i podczas gotowania warzyw w otwartym naczyniu ulatnia się z parą wodną.

Tiocyjaniany łatwo przenikają przez wszystkie błony komórkowe. W wyniku konkurencji z jonami jodu, hamują ich transport do tkanek, w tym do tarczycy. Przyspieszają również wydalanie jodu przez nerki, inaktywują także peroksydazę tarczycową i sprzęganie jodotyrozyny, co skutkuje obniżeniem stężenia jodu w tarczycy, gromadzeniem się mono- i diiodotyrozyny, co z kolei prowadzi do przerostu masy gruczołu tarczycowego. Wolotwórcze działanie tych związków jest tym silniejsze im mniejsza jest podaż jodu z dietą. Częste spożywanie warzyw kapustnych jest istotnym elementem profilaktyki chorób nowotworowych, wymaga jednak równoczesnej podaży produktów o wysokiej zawartości jodu takich jak: ryby morskie, owoce morza, mleko i jaja.

Tabela 2. Zawartość tiocyjanianów w niektórych warzywach

Produkt	$\text{SCN}^-$ (mg/100g produktu)
Kapusta głowiasta	3-6
Jarmuż	3-25
Kapusta włoska	18-31
Brukselka	10
Kalafior	4-10
Kalarepa	2-3
Żółta rzepa	9
Rzepak	2,5
Sałata, szpinak, cebula, seler, rzodkiewka, pomidory	< 1

## 2. Część praktyczna

### 2.1. Oznaczanie zawartości szczawianów rozpuszczalnych w kawie i/lub herbacie

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości szczawianów rozpuszczalnych w naparach herbaty, kawy i kakao oraz określenie stopnia wiązania wapnia przez kwas szczawiowy.

#### Material do ćwiczeń

1. Herbata - różne rodzaje (np. czarna, czerwona, zielona, owocowa) i różne formy ( np. ekspresowa, liściasta, granulowana, liściasta, rozdrobniona),
2. kawa, kawa zbożowa, kakao.

### Odczynniki

1. 5% roztwór chlorku wapnia ( $\text{CaCl}_2$ )
2. aceton
3. 10% roztwór kwasu siarkowego(VI) ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
4. 0,02 N roztwór manganianu(VII) potasu ( $\text{KMnO}_4$ )

### Sprzęt

Probówki wirówkowe poj. 10 ml

Pipety poj. 5, 10 ml,

Kolby stożkowe poj. 50 ml,

zlewki poj. 250 ml,

sączki bibułowe,

lejki szklane,

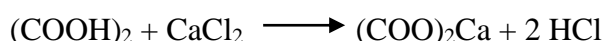
bagietki szklane,

łaźnia wodna o temperaturze  $100^\circ\text{C}$ .

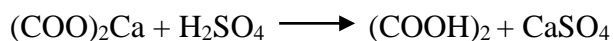
### Zasada metody

Szczawiany rozpuszczalne wmywane są z produktu wodą na gorąco, a szczawiany ogółem roztworem kwasu solnego. Oznaczenie polega na:

1. Wytrąceniu nierozpuszczalnego szczawianu wapnia w postaci osadu buforowym 5% roztworem  $\text{CaCl}_2$ :



2. Rozpuszczeniu na gorąco szczawianu wapnia w 10% roztworze kwasu siarkowego:



3. Miareczkowaniu na gorąco 0,02 N  $\text{KMnO}_4$



### Wykonanie oznaczenia:

Odważyć na wadze technicznej 3 g kawy, herbaty lub kakao. Zalać  $50 \text{ cm}^3$  wrzącej destylowanej wody. Odczekać 5 min. Następnie napar przesączyć,  $3 \text{ cm}^3$  naparu przenieść do probówki wirówkowej o poj.  $10 \text{ cm}^3$ . Dodać  $1,75 \text{ cm}^3$  5% roztworu  $\text{CaCl}_2$  i  $1,75 \text{ cm}^3$  acetonu, wymieszać. Wstawić do lodówki na 30 min. Powstały osad szczawianu wapnia odwirować w wirówce przy 3000obr./min. przez 10 min. Płyn znad osadu wylać, a osad przenieść ilościowo

do kolby stożkowej poj. 50 cm<sup>3</sup> za pomocą 5 cm<sup>3</sup> 10% kwasu siarkowego i rozpuścić na gorąco w łaźni wodnej. Miareczkować natychmiast (na gorąco) 0,02 N roztworem manganianu(VII) potasu do uzyskania różowej barwy, utrzymującej się ok. 1 min.

Na podstawie uzyskanych wyników:

- Obliczyć ilość rozpuszczalnego kwasu szczawiowego w 100 g produktu przyjmując, że 1 cm<sup>3</sup> 0,02 N KMnO<sub>4</sub> odpowiada 0,9 mg (COOH)<sub>2</sub>
- Podać jaka ilość wapnia jest wiązana przez kwas szczawiowy zawarty w naparze przygotowanym z 3 g badanego produktu, przyjmując, że 90 mg kwasu szczawiowego wiąże 40 mg wapnia.
- Podać, ile mleka należy dodać do naparu sporządzonego z 3 g produktu, aby wapń zawarty w mleku związał rozpuszczalny kwas szczawiowy z naparu (100 g mleka zawiera 120 mg wapnia).
- Zaproponować sposoby zmniejszania antyodżywczego działania kwasu szczawiowego.

Wyniki przedstawić w tabeli:

Produkt	Zawartość kwasu szczawiowego [mg/100g]	Ilość wapnia wiązanego przez kwas szczawiowy w naparze otrzymanym z 3 g produktu

## 2.2. Oznaczenie zawartości tiocyjanianów w warzywach kapustnych surowych i po obróbce kulinarnej

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości tiocyjanianów w wybranych warzywach oraz ocena wpływu ogrzewania w środowisku wodnym (gotowanie) na ilość tych związków w badanych produktach.

### Material do ćwiczeń:

Kapusta biała, kapusta włoska, kalafior, brukselka, brokuł

### Odczynniki

5% roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA),

Azotan żelaza(III) (80 g Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> x 9 H<sub>2</sub>O rozpuścić w 250 g 2 N HNO<sub>3</sub> i uzupełnić do 500 cm<sup>3</sup>)

## Sprzęt

Zlewki poj. 50 ml,

Cylindry miarowe poj. 10 ml,

Pipety poj. 2 ml,

Bagietki szklane,

Lejki szklane,

Sączki bibułowe twarde,

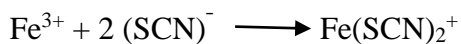
Probówki poj. 10 ml,

Łażnia wodna,

Spektrofotometr

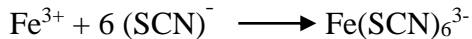
## Zasada metody

Polega na wyekstrahowaniu tioocyanianów z badanej próby kwasem trichlorooctowym (TCA) i przeprowadzeniu reakcji z jonami żelazowymi. W środowisku kwaśnym powstaje krwistoczerwone zabarwienie w wyniku tworzenia się kompleksów żelazowo-rodankowych:



.

.



Od stężenia reagentów i pH środowiska zależy który z powyższych kompleksów przeważa w roztworze.

## Wykonanie oznaczenia

Z jednorodnej rozdrobnionej próby badanego materiału odważyć na wadze technicznej 2 próbki po ok. 5 g. Jedną z nich przenieść do zlewki o poj. 50 cm<sup>3</sup>, dodać 5 cm<sup>3</sup>, wody destylowanej i ogrzewać utrzymując w lekkim wrzeniu przez 10 min. Następnie materiał surowy i gotowany (po odlaniu wody) dokładnie rozetrzeć w moździerzach porcelanowych. Odważyć po 1 g próbki i przenieść ilościowo do probówek z korkiem o poj. 10 cm<sup>3</sup>, używając 9 cm<sup>3</sup> 5% kwasu trichlorooctowego (TCA) i wytrząsać przez 10 min. Następnie próbki odwirować przy 3000 obr./min. przez 10 min. i przesączyć przez twarde sączki bibułowy. Z każdego przesączu po dokładnym wymieszaniu pobrać po 2 cm<sup>3</sup> do dwóch probówek. Do jednej probówki dodać 2 cm<sup>3</sup> wody destylowanej (próba ślepa), a do drugiej 2 cm<sup>3</sup> azotanu żelaza(III). Probówki od tej chwili przetrzymywać bez dostępu światła. Przygotować także próbę ślepa odczynnikową pobierając 2 cm<sup>3</sup> wody i 2 cm<sup>3</sup> azotanu żelaza(III). Następnie zmierzyć absorbancję prób właściwych i ślepych wobec wody

destylowanej przy długości fali 470 nm w czasie nie dłuższym niż 5 min. od dodania azotanu żelaza(III).

Stężenie tiocyjanianów w badanej próbce odczytać z krzywej wzorcowej, pomniejszając uzyskaną absorbancję o wartości odpowiednich prób ślepych (ślepej próby i ślepej odczynnikowej). Wynik przeliczyć na naważkę i na 100 g produktu.

#### Wykonanie krzywej wzorcowej:

Przygotować roztwór podstawowy jonów  $\text{SCN}^-$ , rozpuszczając 16,7 mg rodanku potasu w 100  $\text{cm}^3$  5% kwasu trichlorooctowego (TCA) (roztwór A), następnie 10  $\text{cm}^3$  tego roztworu rozcieńczyć tym samym kwasem do 100  $\text{cm}^3$ , uzyskując w ten sposób roztwór wzorcowy B, którego 1  $\text{cm}^3$  zawiera 10  $\mu\text{g}$  jonów  $\text{SCN}^-$ . Z tego roztworu przygotować krzywą wzorcową według schematu podanego w tabeli:

Roztwór B ( $\text{cm}^3$ )	5% kwas trichlorooctowy (TCA), (ml)	Azotan żelaza(III) ( $\text{cm}^3$ )	Stężenie $\text{SCN}^-$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )
0	5	5	0 (ślepa)
1	4	5	1
2	3	5	2
3	2	5	3
4	1	5	4
5	0	5	5

Zmierzyć absorbancję wobec próby ślepej przy długości fali 470 nm.

Wyniki oznaczeń zawartości tiocyjanianów w badanych produktach przedstawić w tabeli:

Produkt	Zawartość tiocyjanianów ( $\text{mg}/100\text{g}$ )	Straty podczas gotowania (%)
surowy		
gotowany		

Wyciągnij wnioski z otrzymanych wyników i oceń wpływ procesu gotowania na zawartość tiocyjanianów w badanych produktach.

#### Zakres wiadomości wymaganych do kolokwium wstępnego

1. Zasada oznaczania zawartości szczawianów rozpuszczalnych w produktach spożywczych

2. Zasada oznaczania zawartości tiocyjanianów w warzywach
3. Źródła tiocyjanianów i szczawianów w pożywieniu i wpływ tych związków na organizm człowieka

Opracowano na podstawie:

1. Orzeł D., Biernat J. (red). Wybrane zagadnienia z toksykologii żywności. Wyd. UP, Wrocław, 2012
2. Brzozowska A. Toksykologia żywności. Wyd. SGGW, Warszawa 2010
3. Dżugan M. Znaczenie warzyw kapustnych w profilaktyce nowotworów. Zdr. Publ. 2007, 117, 397-401
4. Jabłońska-Ryś E. Wpływ sposobu parzenia różnych rodzajów herbat na zawartość w nich szczawianów rozpuszczalnych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2012, 80, 187-195