**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 i zwierzęcego w formie rozpuszczalnych soli sodu i potasu oraz nierozpuszczalnych – szczawianu wapnia. W roślinach najwięcej szczawianów występuje w ogonkach i dolnych liściach, a najmniej w korzeniach.

Kwas szczawiowy 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 (COOH)2 /Ca > 2

szpinak, szczaw, rabarbar, botwina, buraki, herbata, kawa, kakao,

* produkty, których zawartość kwasu szczawiowego jest prawie równoważna zawartości wapnia – stosunek molowy (COOH)2 /Ca wynosi 1-2

ziemniaki, owoce jagodowe,

* produkty, których zawartość kwasu szczawiowego jest niższa niż zawartość wapnia – stosunek molowy (COOH)2/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)2/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 |

**Tiocyjaniany**

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 antyżywieniowego tioglikozydy wykazują także korzystne właściwości antykancerogenne. Z glukozynolanów w wyniku enzymatycznej hydrolizy pod wpływem tioglikozydazy (mirozynazy) powstają: **tiocyjaniany,** izotiocyjaniany, związki indolowe, nitryle i izooksazolidyny. Enzymatyczny rozkład tioglikozydów ma miejsce podczas żucia pokarmów i rozdrabiania warzyw w wyniku zmiażdżenia tkanek i uwolnienia mirozynazy z komórek. Większość aktywnych tioglikozydów uwalnia się podczas ekstrakcji wodą i gotowania warzyw. W temperaturze 90°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 dijodotyrozyny, 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 | SCNˉ (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.

**Materiał 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 wapniowego (CaCl2),
2. aceton,
3. 10% roztwór kwasu siarkowego (H2SO4),
4. 0,02 N roztwór nadmanganianu potasowego (KMnO4)

**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°C.

**Zasada metody**

Szczawiany rozpuszczalne wymywane 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 CaCl2:

(COOH)2 + CaCl2 (COO)2Ca + 2 HCl

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

(COO)2Ca + H2SO4 (COOH)2 + CaSO4

1. Miareczkowaniu na gorąco 0,02 N KMnO4

2 KMnO4 + 5 (COOH)2 + 3 H2SO4  2 MnSO4 + K2SO4 + 10 CO2 + 8 H2O

**Wykonanie oznaczenia:**

Odważyć na wadze technicznej 3 g kawy, herbaty lub kakao. Zalać 50 ml wrzącej destylowanej wody. Odczekać 5 min. Następnie napar przesączyć, 3 ml naparu przenieść do probówki wirówkowej o poj. 10 ml. Dodać 1,75 ml 5% roztworu CaCl2  i 1,75 ml 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 ml za pomocą 5 ml 10% kwasu siarkowego i rozpuścić na gorąco w łaźni wodnej. Miareczkować natychmiast (na gorąco) 0,02 N roztworem nadmanganianu potasowego 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 ml 0,02 N KMnO4 odpowiada 0,9 mg (COOH)2
* 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 |
|  |  |  |

* 1. **Oznaczanie zawartości tiocyjanianów w warzywach kapustnych surowych i po obróbce kulinarnej**

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

**Materiał do ćwiczeń:**

Kapusta biała, kapusta włoska, kalafior, brukselka, brokuł

**Odczynniki**

5% roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA),

Azotan żelazowy (80 g Fe(NO3)3 x 9 H2O rozpuścić w 250 g 2 N HNO3 i uzupełnić do 500 ml)

**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,

Łaźnia wodna,

Spektrofotometr

**Zasada metody**

Polega na wyekstrahowaniu tiocyjanianów 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:

Fe3+ + SCNˉ Fe(SCN)2+

Fe3+ + 2 (SCN)ˉ Fe(SCN)2+

.

.

Fe3+ + 6 (SCN)ˉ Fe(SCN)63-

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 ml, dodać 5 ml 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 ml, używając 9 ml 5% kwasu trichlorooctowego (TCA) i wytrząsać przez 10 min. Następnie próbki odwirować przy 3000 obr./min. przez 10 min. i przesączyć przez twardy sączek bibułowy. Z każdego przesączu po dokładnym wymieszaniu pobrać po 2 ml do dwóch probówek. Do jednej probówki dodać 2 ml wody destylowanej (próba ślepa), a do drugiej 2 ml azotanu żelazowego. Probówki od tej chwili przetrzymywać bez dostępu światła. Przygotować także próbę ślepą odczynnikową pobierając 2 ml wody i 2 ml azotanu żelazowego. 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 żelazowego.

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 SCNˉ, rozpuszczając 16,7 mg rodanku potasowego w 100 ml 5% kwasu trichlorooctowego (TCA) (roztwór A), następnie 10 ml tego roztworu rozcieńczyć tym samym kwasem do 100 ml, uzyskując w ten sposób roztwór wzorcowy B, którego 1 ml zawiera 10 μg jonów SCNˉ. Z tego roztworu przygotować krzywą wzorcową według schematu podanego w tabeli:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Roztwór B (ml) | 5% kwas trichlorooctowy (TCA), (ml) | Azotan żelazowy (ml) | Stężenie SCNˉ (μg/ml) |
| 0  1  2  3  4  5 | 5  4  3  2  1  0 | 5  5  5  5  5  5 | 0 (ślepa)  1  2  3  4  5 |

Zmierzyć absorbancję wobec próby ślepej przy długości fali 470 nm.

Wyniki oznaczeń zawartości tiocyjanianów w badanych produktach przedstawić w tabeli:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Produkt | Zawartość tiocyjanianów  (mg/100g) | 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 za zawartość w nich szczawianów rozpuszczalnych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2012, 80, 187-195