

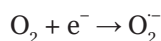
<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.17>

ROZDZIAŁ XVII. **CAŁKOWITA ZDOLNOŚĆ
ANTYOKSYDACYJNA
PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH
POCHODZENIA ROŚLINNEGO**

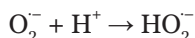
CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają na skutek niecałkowitej, czyli jedno-, dwu- lub trójelektronowej redukcji cząsteczki tlenu, a także w wyniku wzbudzenia cząsteczki tlenu, prowadzącego do przegrupowania elektronów. Całkowita redukcja cząsteczki tlenu, prowadząca do powstania dwóch cząsteczek H_2O , wymaga przyłączenia czterech elektronów i czterech protonów. Do RFT należą:

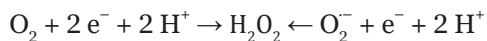
- 1) anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-) – produkt jednoelektronowej redukcji tlenu:



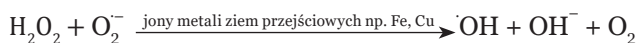
- 2) rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^-) – produkt przyłączenia w roztworze wodnym protonu przez anionorodnik ponadtlenkowy:



- 3) nadtlenek wodoru (H_2O_2) – produkt przyłączenia kolejnego elektronu do anionorodnika ponadtlenkowego lub dwóch elektronów do cząsteczki tlenu:



- 4) rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$) – produkt przyłączenia trzech elektronów do cząsteczki tlenu:



Reakcja ta, katalizowana przez jony metali ziem przejściowych, określana jest jako reakcja Habera-Weissa.

- 5) tlen singletowy (${}^1\text{O}_2$), powstający w wyniku wzbudzenia cząsteczki tlenu, czyli dostarczenia energii umożliwiającej przegrupowanie i sparowanie elektronów w cząsteczce tlenu.

Głównym źródłem RFT w komórkach aerobowych jest transport elektronów w mitochondriach. U roślin ważnym źródłem RFT jest proces fotosyntezy, w którym podobnie jak w mitochondriach dochodzi do „przeciekania” elektronów z fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów, co prowadzi do powstania O_2^- . Nadtlenek wodoru (H_2O_2) powstaje głównie w peroksydomach w procesie fotooddychania i β -oksydacji kwasów tłuszczowych.

RFT są bardziej reaktywne niż cząsteczka tlenu w stanie podstawowym, czyli są zdolne do nieselektywnej reakcji z większą liczbą substancji znacznie szybciej niż tlen cząsteczkowy. RFT uważane są za czynniki powodujące uszkodzenia oksydacyjne białek, peroksydację lipidów i mutagenezę.

Powstawanie RFT jest zjawiskiem fizjologicznym związanym z metabolizmem tlenowym, ale w następstwie działania na komórki czynników stresowych dochodzi do wzmożonego generowania RFT, co może prowadzić do stresu oksydacyjnego. Powstawaniu i negatywnym skutkom stresu oksydacyjnego zapobiega **system antyoksydacyjny**, który tworzą współdziałające ze sobą **antyoksydanty enzymatyczne** i **nieenzymatyczne**. Antyoksydanty nieenzymatyczne to związki, które działając w małych stężeniach w porównaniu z substancją ulegającą utlenieniu, opóźniają bądź hamują utlenianie tej substancji. Efektywność działania systemu nieenzymatycznego można określić poprzez pomiar **całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (CZA)** materiału biologicznego. CZA jest to wypadkowa zdolność badanego materiału do przeciwdziałania określonej reakcji utleniania. Pomiar CZA nie dostarcza informacji, z jakimi antyoksydantami mamy do czynienia.

Rośliny użytkowe są ważnym źródłem antyoksydantów niskocząsteczkowych, do których należą:

- 1) związki fenolowe: witamina E (tokoferole, np. α -tokoferol i tokotrienole), flawonoidy (np. rutyna), antocyjany,

kwasy fenolowe (np. kwas kawowy), chalkony (np. floretyna);

2) związki zawierające azot: alkaloidy (np. kofeina), betalainy, pochodne chlorofilu, aminokwasy i aminy;

3) karotenoidy;

4) witamina C (kwas askorbinowy);

5) peptydy (np. glutation).

Badania epidemiologiczne wykazały, że dieta bogata w owoce i warzywa oraz w produkty pochodzenia roślinnego znacząco redukuje częstotliwość występowania chorób przewlekłych, takich jak: miażdżyca tętnic, zaćma, nowotwory, cukrzyca, reumatoidalne zapalenie stawów, choroby neurologiczne, autoimmunizacyjne, u których podłoża leży stres oksydacyjny.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Porównanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (CZA) produktów spożywczych pochodzenia roślinnego.

Zasada metody

Metoda oparta jest na pomiarze zdolności redukcyjnej antyoksydantów. Związek będący antyoksydantem, reagując z RFT, ulega utlenieniu, czyli jest reduktorem. W mieszaninie reakcyjnej obecny jest heksacyjanożelazian (III) potasu – $K_3[Fe(CN)_6]$ oraz $FeCl_3$. Dodanie do tej mieszaniny związku o właściwościach redukcyjnych powoduje redukcję $Fe(CN)_6^{3-}$ do $Fe(CN)_6^{4-}$. Powstały jon sześciocyjanożelazianowy tworzy z Fe^{3+} niebieski heksacyjanożelazian (II) żelaza (III) – $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$, tzw. błękit pruski, powodując wzrost absorbancji mierzonej przy długości fali 593 nm. Przyrost absorbancji jest proporcjonalny do zawartości antyoksydantów w próbce.



Materiał

- a) susz, np. herbata czarna, czerwona, zielona, biała, turkusowa, yerba mate (ostrokrzew paragwajski), rooibos (czerwonokrzew), susz owocowy, ziołowy
- b) soki z warzyw, np. z pomidorów, marchwi, buraków, w tym przygotowane metodą „domową”
- c) soki z owoców, np. z jabłek, pomarańczy, wiśni, porzeczek, w tym przygotowane metodą „domową”
- d) napoje alkoholowe, np. wino białe, czerwone, piwo jasne, ciemne, karmi, gin, nalewki lub wina owocowe przygotowane metodą „domową”
- e) kawa rozpuszczalna, naturalna zielona i palona, zbożowa

Odczynniki

1 mM Trolox (syntetyczny analog tokoferolu rozpuszczalny w wodzie) w etanolu, 96% C_2H_5OH , 1% żelazicyjanek potasu ($K_3[Fe(CN)_6]$), 2% $FeCl_3$, 0,2 M bufor octanowy pH 3,6

Sprzęt laboratoryjny

bagietki, pipety (0,01–5 cm^3), zlewki 100 cm^3 , cylinder miarowy 100 cm^3 , próbówki szklane krótkie, kuwety spektrofotometryczne 1 cm z przykrywką, spektrofotometr, waga laboratoryjna, minutnik, czajnik elektryczny, lignina, markery

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie ekstraktów z produktów suchych
Odważyć po 0,5 g suchego materiału roślinnego, przenieść do zlewki o pojemności 100 cm^3 i zalać 55 cm^3 wrzącej wody. Odstawić do oziębienia, w tym czasie kilkukrotnie zamieszać bagietką.
2. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej CZA
 - a) W statywie przygotować zestaw par próbek w liczbie odpowiadającej liczbie badanych materiałów + 2 dla próby odczynnikowej + 2 dla próby wzorcowej + 1 dla próby odnośnikowej.
 - b) Do próbek dodać 2,5 cm^3 buforu octanowego, statyw przenieść na stanowisko pomiarowe przy spektrofotometrze.

- c) Przygotowywać próby w następującej kolejności: próba odnośnikowa, odczynnikowa, wzorcowa i badana bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia.

Próba odnośnikowa: do buforu octanowego dodać 0,02 cm³ 96% C₂H₅OH, wymieszać, przelać do kuwety pomiarowej, wyzerować spektrofotometr ($\lambda = 593$ nm).

Pozostałe próby przygotować kolejno według opisu w tabeli 17.1.

Tabela 17.1.
Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej CZA

Odczynnik	Dodawane objętości [cm ³]		
	Próba odczynnikowa	Próba wzorcowa	Próba badana
0,2 M bufor octanowy	2,5	2,5	2,5
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,25	0,25	0,25
FeCl ₃	0,25	0,25	0,25
1. Wymieszać, pobrać pipetą 0,75 cm ³ do kuwety spektrofotometrycznej, zmierzyć absorbancję A ₅₉₃ w czasie t ₀ , 2. Kuwetę wyjąć ze spektrofotometru i do mieszaniny odczynników dodać:			
96% C ₂ H ₅ OH	0,02	–	–
1 mM Troloks	–	0,02	–
Produkt lub ekstrakt	–	–	0,02
1. Natychmiast włączyć stoper – reakcja się rozpoczyna, 2. Kuwetę szybko zakryć i wymieszać zawartość, 3. Mierzyć absorbancję A ₅₉₃ co 15 sekund w czasie 3 minut.			
<i>Absorbancję wszystkich prób oznaczyć wobec próby odnośnikowej o składzie: 2,5 cm³ 0,2 M buforu octanowego pH 3,6 + 0,02 cm³ 96% C₂H₅OH</i>			

Pomiar dla wszystkich prób wykonać dwukrotnie, policzyć średnie wartości absorbancji w poszczególnych punktach pomiarowych.

Opracowanie wyników

1. Wykreślić krzywe $A = f(t)$ dla próby odczynnikowej, wzorcowego roztworu Troloksu i prób badanych.
2. Obliczyć wartości $\Delta A = A_{t_{180}} - A_{t_0}$ dla próby odczynnikowej (ΔA_o), wzorcowego roztworu Troloksu (ΔA_{Tr}) i prób

badanych (ΔA_B). W oparciu o uzyskane wartości obliczyć CZA badanych produktów w przeliczeniu na jednoelektronowe równoważniki Troloksu. Obliczyć, jakiemu stężeniu Troloksu [mg] odpowiada CZA 1 cm³ badanego produktu lub ekstraktu produktu spożywczego, korzystając ze wzoru:

$$\text{CZA}_B [\text{mg TrE cm}^{-3}] = 2 \times \frac{\Delta A_B - \Delta A_0}{\Delta A_{Tr} - \Delta A_0} \times C_{Tr} \times \frac{0,77}{0,02}$$

gdzie:

CZA_B – całkowita zdolność antyoksydacyjna 1 cm³ produktu lub ekstraktu z produktu spożywczego w przeliczeniu na 1 mg jednoelektronowych równoważników Troloksu (ang. *Trolox Equivalents*, TrE),

2 – współczynnik dla przeliczenia na jednoelektronowe równoważniki Troloksu,

0,77 – objętość mieszaniny reakcyjnej (0,75 + 0,02 cm³),

0,02 – objętość próby badanej w mieszaninie reakcyjnej [cm³],

C_{Tr} – masa Troloksu dodanego do mieszaniny reakcyjnej = 0,005 mg.

Wyniki przedstawić w tabeli 17.2.

Produkt spożywczy pochodzenia roślinnego	$\Delta A_B = At_{180} - At_0$	CZA [mg TrE cm ⁻³ produktu/ekstraktu]
Material 1		
Material 2		
Material ...		

3. Porównując wykresy i wartości CZA uzyskane dla poszczególnych produktów, wyciągnąć wnioski dotyczące całkowitej zdolności antyoksydacyjnej produktów spożywczych pochodzenia roślinnego. Na podstawie danych literaturowych zasugerować zależność pomiędzy potencjałem antyoksydacyjnym a typem metabolitów wtórnych obecnych lub dominujących w badanym produkcie roślinnym.

Tabela 17.2.

Całkowita zdolność antyoksydacyjna badanych produktów

Literatura

- Bartosz G., *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Sikorski Z. E. (red.), *Chemia żywności, t. 3: Odżywcze i zdrowotne właściwości składników żywności*, Wydawnictwo WNT, Warszawa 2007.