

Grażyna Budryn, Ewa Nebesny

FENOLOKWASY – ICH WŁAŚCIWOŚCI, WYSTĘPOWANIE W SUROWCACH ROŚLINNYCH, WCHŁANIANIE I PRZEMIANY METABOLICZNE

Zakład Technologii Skrobi i Cukiernictwa Instytutu Chemicznej
Technologii Żywności Politechniki Łódzkiej
Kierownik: prof. dr hab. inż. *E. Nebesny*

Hasła kluczowe: fenolokwasy, metabolizm hydroksycynaminianów, aktywność antyoksydacyjna.

Key words: polyphenolic acids, metabolism of hydrocinnamates, antioxidant activity.

Polifenole w ostatnich latach zyskują coraz większe zainteresowanie konsumentów i wytwórców żywności. Wyniki badań epidemiologicznych wskazują na prozdrowotne efekt spożywania żywności bogatej w polifenole. Związki polifenolowe są silnymi antyutleniaczami i wspólnie z kwasem askorbinowym, tokoferolami i karotenoidami zabezpieczają organizm ludzki przed stresem oksydacyjnym. Spośród wymienionych przeciwutleniaczy właśnie polifenole dominują w diecie człowieka, a ich dzienne spożycie dochodzi do jednego grama. Flawonoidy i fenolokwasy, stanowiące dwie podstawowe grupy polifenoli, spożywane są z typową dietą w proporcji 2:1. Regularne picie kawy, która jest bogatym źródłem fenolokwasów, zwiększa wyraźnie wymienioną proporcję na korzyść tych związków. Badania *Svillaasa* i współpr. (1) potwierdzają bardzo wysoką pozycję kawy wśród produktów żywnościowych dostarczających antyoksydantów do organizmu ludzkiego. W cytowanej pracy podano średni udział procentowy poszczególnych produktów, będących źródłem przeciwutleniaczy, w dostarczaniu tych związków do organizmu:

kawa	62%
owoce i soki owocowe	13%
herbata	8%
wino	5%
zboża	5%
warzywa	2%
pozostałe produkty	5%

Do grupy fenolokwasów należą hydroksylowe pochodne kwasu benzoowego i cynamonowego. W żywności dominują jednak kwasy hydroksycynamonowe, do których zalicza się kwas *p*-kumarowy, kawowy i ferulowy. Występują powszechnie w tkankach roślinnych, najczęściej w postaci estrów i glikozydów, rzadziej jako wolne kwasy. Najbardziej rozpowszechnione są depsydy z udziałem kwasu chinowego – przede wszystkim kwas kawoilochinowy, nazywany inaczej kwasem chlorogenowym. Związek ten występuje w wielu owocach i warzywach (tab. I), najwyższą jego zawartość stwierdzono w kawie (2). Zawartość kwasów chlorogenowych w wybranych surowcach roślinnych i ich przetworach podano w tab. I.

Kwasy hydroksycynamonowe zabezpieczają rośliny przed działaniem mikroorganizmów i owadów, a w połączeniach z polisacharydami, usztywniają ściany komórkowe (3). W związku z ich funkcją ochronną w okresie wzrostu i dojrzewania ziaren i owoców, w miarę osiągania przez roślinę pełnej przydatności konsumpcyjnej, zawartość kwasów fenolowych zmniejsza się, co wiąże się z sensorycznie

Tabela I
Średnia zawartość fenolokwasów
w wybranych produktach spożywczych pochodzenia roślinnego (4, 29-37)

Table I
Mean content of phenolic acids in selected foodstuffs of plant origin (4, 29-37)

Produkt	Zawartość kwasów fenolowych	
	rodzaj kwasu	zawartość mg/kg (* mg/dm ³)
Jabłko Sok jabłkowy	chlorogenowy	200
	chlorogenowy	180*
	<i>p</i> -kumaroilochinowy	100*
Gruszka	hydroksycynamonowe	100
	hydroksybenzoesowe	20
Czereśnia	chlorogenowy	400
	<i>p</i> -kumaroilochinowy	180
Śliwka	chlorogenowy	500
	<i>p</i> -kumaroilochinowy	25
Brzoskwinia	chlorogenowy	250
Truskawka	<i>p</i> -kumarowy	15
	galusowy	120
	wanilinowy	25
Malina	<i>p</i> -kumarowy	10
Morela	chlorogenowy	180
Jeżyna	chlorogenowy	50
	<i>p</i> -kumarowy	10
	ferulowy	8
Czarna porzeczka	chlorogenowy	50
	<i>p</i> -kumarowy	40
	ferulowy	15
Czerwona porzeczka	<i>p</i> -kumarowy	10
Agrest	kawowy	10
	ferulowy	10
Czarna jagoda	chlorogenowy	2 000
	<i>p</i> -kumarowy	10
	ferulowy	10
Ziemniaki surowe gotowane	chlorogenowy	1 400
	chlorogenowy	300
Marchew surowa gotowana	chlorogenowy	80
	chlorogenowy	45
Sałata	cykoriowy (dikawoilowinowy)	100
	kawoiljabłkowy	30
Szpinak	<i>p</i> -kumarowy	350
	ferulowy	110
Rzepa	chlorogenowy	60
Kabaczek	kawowy	80
	<i>p</i> -kumarowy	200
	ferulowy	220
Pomidory	synapinowy	130
	<i>p</i> -kumarowy	30
	ferulowy	700
Brokuły	synapinowy	100
Lucerna	kawowy	500
	<i>p</i> -kumarowy	1 000
	ferulowy	2 100

Tabela I (cd.)

Produkt	Zawartość kwasów fenolowych	
	rodzaj kwasu	zawartość mg/kg (* mg/dm ³)
Mąka pszenna	synapinowy	25
	ferulowy	150
	kawowy	30
	p-kumarowy	10
Otręby pszenne	p-kumarowy	50
	ferulowy	700
Otręby żytnie	ferulowy	180
Płatki owsiane	ferulowy	145
	p-kumarowy	50
	kawowy	17
Ziarno kawowe surowe	chlorogenowy	60 000
	dikawoilochinowy	10 000
	feruloichinowy	8 000
Napar kawowy	chlorogenowy	500*
	kawowy	250*
	ferulowy	50*
Czerwone wino	p-kumarowy	5*
	kawowy	5*
Piwo	ferulowy	14*
	synapinowy	3*
	p-kumarowy	1*
	kawowy	1*

odczuwanym zmniejszaniem cierpkości, choć w truskawkach stwierdzono niewielki wzrost ich stężenia podczas dojrzewania (4). Podczas przetwarzania surowców roślinnych dochodzi do zmniejszenia zawartości fenolokwasów, zmiany ich aktywności biologicznej i biodostępności. Proces ten jest bardzo złożony i charakteryzuje się różnym przebiegiem w przypadku poszczególnych produktów (5). W projektowaniu technologicznym należy zatem pamiętać o takich warunkach i parametrach przechowywania i przetwarzania żywności, które zapewnią najwyższą retencję przeciwutleniaczy (6).

Wśród pochodnych kwasów hydroksybenzoesowych w żywności, największe znaczenie ma kwas galusowy oraz jego formy zestyfikowane z glukozą, w tym gallotaniny (taniny hydrolizujące), np. w owocu mango. W czarnej porzeczce, truskawkach i malinach kwas galusowy występuje w postaci ellagitanin (7). Są one produktami oksydacji, w wyniku której dochodzi do wiązania pomiędzy dwoma pierścieniami aromatycznymi tego kwasu. W liściach zielonej herbaty kwas galusowy związany jest z epikatechiną i gallokatechiną jako galusan (ECG i EGCG).

W tkankach roślinnych fenolokwasy występują zarówno w formie niskocząsteczkowej – wodnorozpuszczalnej w cytozolu lub tłuszczorozpuszczalnej związanej z woskami – jak i w postaci estyryfikowanej lub eteryfikowanej z polimerami ścian komórkowych. Przykładem tej ostatniej może być wiązanie poprzez arabinozę z hemicelulozą (burak cukrowy) lub poprzez reszty galaktozowe z pektyną (szpinak) (8).

Fenolokwasy wykazują zróżnicowaną aktywność biologiczną w organizmie ludzkim. Między innymi przyczyniają się do zmiatania wolnych rodników, chelatowania jonów metali, zmiany aktywności enzymów i dostępności białka. Udowodniono także, iż przeciwdziałają chorobie wieńcowej, nowotworom, stanom zapalnym i cukrzycy. Zabezpieczają również przed uszkodzeniami fotooksydacyjnymi skóry, przy czym kwas kawowy jest w tym zakresie bardziej aktywny niż ferulowy (9). Największe spożycie związków z grupy fenolokwasów dotyczy kwasu chlorogenowego, występującego obficie w kawie i jej naparach. Badania epidemiologiczne wykazały, że spożycie kawy jest związane ze zmniejszaniem się poziomu transpeptydazy γ -glutamylowej, która jest biomarkerem wczesnej fazy stresu oksydacyjnego. Regularne picie kawy przyczynia się do zmniejszenia zachorowalności na raka pęcherza moczowego i jelita grubego, chorobę Parkinsona, kamicę żółciową, marskość wątroby i cukrzycę 2 typu. Fenolokwasy wykazują korzystny efekt synergiczny z innymi związkami biologicznie

aktywnymi obecnymi w diecie (1). Natomiast produkty ich metabolizowania mogą wykazywać mniejszą aktywność biologiczną, w tym przeciwutleniającą.

Przyswajalność fenolokwasów zależy od formy (postać wolna lub związana), w jakiej dostają się do przewodu pokarmowego oraz lokalizacji w roślinie. Formy rozpuszczalne w wodzie są bardziej dostępne i wchłaniane w górnym odcinku przewodu pokarmowego. Formy związane są dostępne w wyniku aktywności enzymów mikroflory jelitowej, co następuje w końcowym odcinku jelita (10). Fenolokwasy, ponieważ nie są całkowicie absorbowane w jelicie cienkim, mogą docierać do jelita grubego wywołując tu szereg efektów fizjologicznych (11).

Ze względu na wysoką zawartość kwasu chlorogenowego w surowcach i produktach roślinnych jego metabolizm stanowił przedmiot wielu badań i jest stosunkowo dobrze opisany. Po podaniu dożylnym kwasu chlorogenowego stwierdzono jego obecność w stanie niezmienionym w moczu. Takiej postaci nie obserwowano po podaniu doustnym. Zatem jego absorpcja z przewodu pokarmowego wymaga hydrolizy do kwasu kawowego i chinowego w jelicie cienkim, albo metabolizmu przez mikroflorę jelita grubego (12).

W początkowych partiach przewodu pokarmowego kwas chlorogenowy epimeryzuje do mieszaniny kwasów 3-, 4- i 5- kawoilochinowych (ryc. 1). Środowisko żołądka, w którym pH wynosi ok. 2, nie wywołuje jego hydrolizy, gdyż jest on w tych warunkach stabilny. Częściowa hydroliza kwasu chlorogenowego zachodzi w jelicie cienkim. Stwierdzono tu obecność esterazy, zarówno w ściankach jak i w świetle jelita. Obecność kwasu kawowego w osoczu już po 1 godz. od momentu spożycia potwierdza obecność odpowiedniej esterazy już w górnym odcinku jelita. W jelicie cienkim wchłania się ok. jednej trzeciej ilości spożytego kwasu chlorogenowego.

Pozostała część osiąga jelito grube, gdzie jest metabolizowana przez mikroflorę jelitową. Zidentyfikowano kilka szczepów bakterii wytwarzających esterazę hydrolizującą kwas chlorogenowy. Są to trzy szczepy bakterii *Echerichia coli*, dwa szczepy *Lactobacillus gasseri* i jeden *Bifidobacterium lactis*. Podawanie kwasu chlorogenowego przyczynia się do wzrostu tych bakterii, z których część wykazuje właściwości probiotyczne, więc może być substancją o potencjalnym działaniu prebiotycznym (13). Jednak wpływ spożycia kwasu chlorogenowego na wzrost tych szczepów bakterii i ewentualne wynikające z tego modyfikacje rozwoju innych szczepów bakterii, stanowi odrębne zagadnienie, które nie zostało jak dotąd dokładnie poznane.

Kwas kawowy, po uwolnieniu z kwasu chlorogenowego przez enzymy jelita cienkiego lub esterazę mikroflory jelitowej, staje się dostępny dla gospodarza i może wykazywać aktywność biologiczną, w ściankach jelita oraz w innych tkankach i organach, także w postaci zmodyfikowanej przez enzymy, głównie wątrobowe. Kwas kawowy może wchodzić w połączenie z kwasem glukuronowym – reakcja

→

Ryc. 1. Schemat szlaku metabolicznego kwasu chlorogenowego, a także kawowego i ferulowego w organizmie ludzkim; \dashrightarrow proces przebiegający przy udziale enzymów wytwarzanych przez człowieka, w wątrobie lub nerkach; \rightarrow proces prowadzony przy udziale enzymów wytwarzanych przez mikroflorę jelitową. Nazwy poszczególnych metabolitów: 1. kwas 5-kawoilochinowy (chlorogenowy), 2. kwas 4-kawoilochinowy, 3. kwas 3-kawoilochinowy, 4. kwas kawowy, 5. kwas 3-(3,4-dihydroksyfenilo)-propionowy, 6. kwas 3-(3-hydroksyfenilo)-propionowy, 7. kwas 3-fenylpropionowy, 8. kwas benzoesowy, 9. kwas hipurowy, 10. kwas chinowy, 11. kwas cykloheksanbenzoesowy, 12. kwas *m*-kumarowy, 13. kwas 3-hydroksybenzoesowy, 14. kwas 3-hydroksyhipurowy, 15. kwas cynamonowy, 16. kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 17. kwas 4-hydroksy-3-metoksybenzoesowy (wanilinowy), 18. kwas 3-hydroksy-4-metoksybenzoesowy, 19. kwas 4-hydroksy-3-metoksyhipurowy, 20. kwas 3-hydroksy-4-metoksyhipurowy, 21. kwas ferulowy, 22. kwas izoferulowy, 23. feruloglicyna, 24. izoferuloglicyna, 25. winylkatechol, 26. etylkatechol, 27. katechol.

Fig. 1. Metabolic pathway of chlorogenic, caffeic and ferulic acids in humans; \dashrightarrow process mediated by human liver or kidney enzymes, \rightarrow process mediated by intestinal microflora enzymes. The names of individual metabolites: 1. 5-caffeoylquinic (chlorogenic) acid, 2. 4-caffeoylquinic acid, 3. 3-caffeoylquinic acid, 4. caffeic acid, 5. 3-(3,4 dihydroxyphenyl)-propionic acid, 6. 3-(3-hydroxyphenyl)-propionic acid, 7. 3-phenylpropionic acid, 8. benzoic acid, 9. hippuric acid, 10. quinic acid, 11. cyclohexanbenzoic acid, 12. *m*-coumaric acid, 13. 3-hydroxybenzoic acid, 14. 3-hydroxyhippuric acid, 15. cinnamic acid, 16. 3,4-dihydroxybenzoic acid, 17. 4-hydroxy-3-metoxybenzoic (vanilic) acid, 18. 3-hydroxy-4-metoxybenzoic acid, 19. 4-hydroxy-3-metoxyhippuric acid, 20. 3-hydroxy-4-metoxyhippuric acid, 21. ferulic acid, 22. isoferulic acid, 23. feruloylglycine, 24. isoferuloylglycine, 25. vinylcatechol, 26. etylcatechol, 27. catechol.

katalizowana jest przez UDP-transferazę glukuronową (14). Glukuronizacja zachodzi prawdopodobnie w wątrobie, ale możliwa jest także w jelicie cienkim i grubym (15). Kwas ferulowy i izoferulowy w osoczu występuje w formie zmetylowanej (16). Połączenie kwasów fenolowych z kwasem glukuronowym i siarkowym zmniejsza ich właściwości antyoksydacyjne (17).

Wolny kwas kawowy, który nie został wchłonięty przez ścianki jelita, ulega dalszej modyfikacji poprzez aktywność mikroflory jelitowej, w wyniku której po biouwodornieniu pojawia się kwas dihydrokawowy 3-(3,4-dihydroksyfenilo)-propionowy, a dalej na skutek dehydroksylacji powstaje: kwas 3-(3-hydroksyfenilo)-propionowy i 3-fenylpropionowy. Dwa ostatnie są wchłaniane przez ściany jelita grubego i ulegają w wątrobie β -oksydacji tworząc kwas benzoesowy i hydroksybenzoesowy, a następnie glicynacji. Ostatecznie powstają: kwas 3-hydroksyhipurowy i hipurowy, które wydalane są z moczem (18). Reakcja połączenia kwasu benzoesowego z glicyną została scharakteryzowana już w ostatnim 10-leciu XX wieku, jako ważny mechanizm eliminowania potencjalnie toksycznych aromatycznych kwasów karboksylowych. U ludzi, którym usunięto jelito grube, nie obserwowano obecności kwasu hipurowego wśród metabolitów hydroksycynaminianów, co wskazuje na częściowy przebieg reakcji jego powstawania właśnie w tym odcinku przewodu pokarmowego. Kwas hipurowy, jeden z ważniejszych metabolitów kwasu chlorogenowego, nie wykazuje właściwości antyoksydacyjnych, ponieważ nie posiada grupy hydroksylowej.

Część kwasu chlorogenowego, którą jest absorbowana w jelicie górnym, wpływa na efekt biologiczny przede wszystkim w układzie krwionośnym, natomiast część metabolizowana w jelicie grubym, oddziałuje głównie na ten właśnie organ (19). W osoczu zidentyfikowano również glukuronidy kwasu *p*-kumarowego, ferulowego i izoferulowego, a w moczu ferulowego i izoferulowego i wanilinowego. Kwas ferulowy obecny w organizmie może pochodzić bezpośrednio z żywności lub być pośrednim metabolitem kwasu kawowego. Natomiast kwas izoferulowy nie występuje w żywności i pochodzi z biotransformacji kwasu kawowego, przez co może być biomarkerem spożycia kawy. Kwas kawowy może być również przekształcany w wyniku aktywności mikroflory jelitowej w procesie dekarboksylacji do winylokathecholu, następnie poprzez biouwodornienie do etylokathecholu, a dalej do katecholu (20). Około 10% kwasu kawowego pochodzącego z hydrolizy kwasu chlorogenowego wydalane jest z moczem w formie niezmienionej. Związek ten wprowadzany do organizmu w postaci wolnej ulega metabolizmowi w jelicie cienkim w ilości przekraczającej 95%, podczas gdy, jak wspomniano wcześniej, wprowadzany w postaci zestyfikowanej do kwasu chlorogenowego, w tym odcinku jelita jedynie w ilości nieco przekraczającej 30% (21). Kwas chinowy, powstający obok kwasu kawowego w wyniku hydrolizy kwasu chlorogenowego, ulega dehydroksylacji i aromatyzacji przez mikroflorę jelitową. Największa koncentracja metabolitów kwasu chlorogenowego w moczu występuje w okresie pierwszych czterech godzin po spożyciu (22).

Kwas ferulowy z żywnością wprowadzany jest głównie w postaci połączonej z wiązaniami kowalencyjnymi z nierozpuszczalnym błonnikiem pokarmowym. Znaczące ilości są uwalniane poprzez fermentację dopiero w jelicie grubym 95%, a zaledwie 5% jest uwalniane w żołądku i jelicie cienkim. Początkowo błonnik hydrolizowany jest przez enzymy, w tym ksylanazy, zmniejsza się jego masa cząsteczkowa, co sprzyja dostępności esterazy kwasu ferulowego, pochodzenia bakteryjnego, która uwalnia kwas ferulowy (23). Badania *Kroona* i współpr. wykazały, iż po deestryfikacji kwas ferulowy pozostaje w postaci wolnej, rozpuszczonej w masie jelitowej, gdzie jest dalej intensywnie metabolizowany przez mikroflorę jelitową, w procesach, które włączone są również w szlak metaboliczny kwasu kawowego (8). Wchłanianie kwasu ferulowego ma miejsce po jego uwolnieniu i następuje przede wszystkim w żołądku i jelicie cienkim, natomiast już w niewielkim stopniu w jelicie grubym. Stąd biodostępność kwasu ferulowego związanego z błonnikiem zbożowym jest ograniczona i znacznie mniejsza niż depsydów kwasu kawowego (24, 25). W osoczu znajduje się głównie w formie glukuronianów lub sulfonianów – ok. 75%, natomiast tylko 25% w formie wolnej (26).

Kwas galusowy po metylacji, która zachodzi w wątrobie, przedostaje się do krwi i wydalany jest z moczem jako kwas 3-, 4-metoksygalusowy i 3,4-dimetoksygalusowy (27). Nie wyjaśniono jednak, czy powstaje on w żołądku z hydrolizy kwasowej wyżej spolimeryzowanych ellagitanin, czy też w wyniku działania mikroflory jelitowej (21). Zgodnie z badaniami *Konishi* i współpr. (28) wchłanianie zarówno kwasu galusowego i epigalokatechiny jest bardzo ograniczone w stosunku do wchłaniania kwasu kawowego.

W świetle danych piśmiennictwa można stwierdzić, że fonolokwasy w przewodzie pokarmowym zachowują swą aktywność przeciwutleniającą, chociaż w dalszych jego odcinkach jest już ona mniejsza. Aktywność biologiczną przejawiają również w osoczu metabolity fenolokwasów. Fenolokwasy mogą korzystnie wpływać na niektóre szczepy bakterii, które aktywnie uczestniczą w ich metabolizmie na poziomie jelitowym.

G. Budryn, E. Nebesny

PHENOLIC ACIDS – THEIR PROPERTIES, OCCURRENCE
IN PLANT MATERIALS, ABSORPTION AND METABOLISM

PIŚMIENNICTWO

1. *Svilaas A., Sakhi A.K., Andersen L.F., Svilaas T., Ström E.C., Jacobs, Jr. D.R., Ose L., Blomhoff R.*: Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *J. Nutr.* 2004; 134: 562-567. – 2. *Plumb G.W., Garcia-Conesa M.T., Kroon P.A., Rhodes M., Ridley S., Williamson G.*: Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *J. Sci. Food Agric.* 1999; 79: 390-392. – 3. *Faulds C.B., Williamson G.*: The role of hydrocinnamates in the plant cell wall. *J. Sci. Food Agric.* 1999; 79: 393-395. – 4. *Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P.*: Fruits and fruit products, w: *Food Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, Hilderberg. 2004: 764-766. – 5. *Nicoli M.C., Anese M., Parpinel M.*: Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Tech.* 1999; 10: 94-100. – 6. *Lindley M.G.*: The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Tech.* 1998; 9: 336-340. – 7. *Azuma K., Ippoushi K., Nakayama N., Ito H., Higashio H., Terao J.*: Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 48: 5496-5500. – 8. *Kroon P.A., Faulds C.B., Ryden P., Robertson J.A., Williamson G.*: Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 661-667. – 9. *Saija A., Tomaino A., Cascio R.L., Trombetta D., Proteggente A., de Pasquale A., Uccella N., Bonina F.*: Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *J. Sci. Food Agric.* 1999; 79: 476-480. – 10. *Chesson A., Provan G.J., Russell W.R., Scobbie L., Richardson A.J., Stewart C.*: Hydrocinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J. Sci. Food Agric.* 1999; 79: 773-778.

11. *Jenner A.M., Rafter J., Halliwell B.*: Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radical Bio. Med.* 2005; 38: 763-772. – 12. *Choudhury R., Srail S.K., Debnam E., Rice-Evans C.A.*: Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radical Bio. Med.* 1999; 27: 278-286. – 13. *Couteau D., McCartney A.L., Gibson G.R., Williamson G., Faulds C.B.*: Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 90: 873-881. – 14. *Rechner A.R., Spencer J.P.E., Kuhnle G., Hahn U., Rice-Evans C.A.*: Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radical Bio. Med.* 2001; 30: 1213-1222. – 15. *Nardini M., Cirillo E., Natella F., Scaccini C.*: Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 5735-5741. – 16. *Gonthier M.-P., Verny M.-R., Besson C., Révész C., Scalbert A.*: Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J. Nutr.* 2003; 136: 1853-1859. – 17. *Olthof M.R., Hollman P.C., Buijsman M.N.C.P., van Amelsvoort J.M.M., Katan M.B.*: Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J. Nutr.* 2003; 136: 1806-1814. – 18. *Rechner A.R., Smith M.A., Kuhnle G., Gibson G.R., Debnam E.S., Kaila S., Srail S., Moore K.P., Rice-Evans C.A.*: Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Bio. Med.* 2004; 36: 212-225. – 19. *Olthof M.R., Hollman P.C.H., Katan M.B.*: Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* 2001; 131: 66-71. – 20. *Phipps A.N., Stewart J., Wright B., Wilson I.D.*: Effect of diet on the urinary excretion of hippuric acid and other dietary-derived aromatics in rat. A complex interaction between diet, gut microflora and substrate specificity. *Xenobiotica.* 1998; 28: 527-537.

21. *Scalbert A., Morand C., Manach C., Révész C.*: Absorption and metabolism of polyphenols in gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.* 2002; 56: 276-282. – 22. *Clifford M.N.*: Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* 2000; 80: 1033-1043. – 23. *Andreasen M.F., Kroon P.A., Williamson G., Garcia-Conesa M.T.*: Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 5679-5684. – 24. *Zhao Z., Egashira Y., Sanada H.*: Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *J. Nutr.* 2004; 134: 3083-3088. – 25. *Kern S.M., Bennett R.N., Mellon F.A., Kroon P.A., Garcia-Conesa M.T.*: Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 6050-6055. – 26. *Rondini L., Peyrat-Maillard M.-N., Marsset-Baglieri A.*

Berset C.: Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3037-3041. – 27. *Hodgson J.M., Morton L.W., Puddey I.B., Beilin L.J., Croft C.D.*: Gallic acids metabolites are markers of black tea intake in humans. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 2276-2280. – 28. *Konishi Y., Hitomi Y., Yoshioka E.*: Intestinal absorption of *p*-coumaric and gallic acids in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 2527-2532. – 29. *Huang H.-M., Johannig G.L., O'Dell B.L.*: Phenolic acid content of food plants and possible nutritional implications. *J. Agric. Food Chem.* 1986; 34: 48-51. – 30. *De Maria C.A.B., Trugo L.C., De Mariz e Miranda L.S.*: The content of individual caffeoylquinic acids in edible vegetables. *J. Food Compos. Anal.* 1999; 12: 289-292.

31. *Awad M.A., de Jager A., van Westing L.M.*: Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. *Sci. Hortic.-Amsterdam.* 2000; 83: 249-263. – 32. *Guerrero G.S., Surez M., Moreno G.*: Chlorogenic acids as a potential criterion in coffee genotype selections. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 2454-2458. – 33. *De Maria C.A.B., Trugo L.C., De Mariz e Miranda L.S., Salvador E.*: Stability of 5-caffeoylquinic acid under different conditions of heating. *Food Res. Int.* 1998; 31: 475-477. – 34. *Łoś J., Wilska-Jeszka J., Pawlak M.*: Polyphenolic compounds of plums (*Prunus domestica*). *Pol. J. Nutr. Sci.* 2000; 9/50: 35-38.-35. – 35. *Bitsch R., Netzell M., Carlé E., Strass G., Kesenheimer B., Herbst M., Bitsch I.*: Bioavailability of antioxidative compounds from Brettacher apple juice in humans. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 2001; 1: 245-249. – 36. *Harder H., Tetens I., Let M.B., Meyer A.S.*: Rye bran bread intake elevates urinary excretion of ferulic acid in humans, but does not affect the susceptibility of LDL to oxidation ex vivo. *Eur. J. Nutr.* 2004; 43: 230-236. – 37. *Nardini M., Natella F., Scaccini C., Ghiselli A.*: Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *J. Nutr. Biochem.* 2006; 17: 14-22.

Adres: 90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 4/10.

Halina Grajeta

WPLYW SKŁADNIKÓW POKARMOWYCH NA WCHŁANIANIE ŻELAZA

Katedra i Zakład Bromatologii Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. *J. Biernat*

Hasła kluczowe: żelazo, wchłanianie, składniki pokarmowe.
Key words: iron, absorption, food components.

ROLA ŻELAZA W ORGANIZMIE I JEGO ŹRÓDŁA POKARMOWE

W organizmie człowieka dorosłego żelazo występuje w ilości 3–5 g, z czego ok. 60% znajduje się w hemoglobinie, 10% w mioglobinie i 1% w enzymach tkankowych (cytochromach, katalazach, peroksydazach, dehydrogenazach). Pozostała część żelaza znajduje się w puli zapasowej w postaci połączeń z białkami. Są to ferrytyna i hemosyderyna znajdujące się w wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym (1).

Żelazo, jest mikroelementem niezbędnym do prawidłowego wzrostu i rozwoju organizmu. Przez swoją obecność w strukturze hemoglobiny, mioglobiny i enzymów pełni w organizmie wiele ważnych funkcji: odgrywa decydującą rolę w przenoszeniu tlenu z płuc do wszystkich komórek ciała, peroksydaza i katalaza tarczycowa, enzymy zawierające żelazo hemowe, uczestniczą w procesie jodowania tyrozyny, bierze udział w tworzeniu nie tylko czerwonych ale także białych krwinek, występuje w niektórych enzymach katalizujących powstawanie neurotransmiterów z aminokwasów, odgrywa też rolę w tworzeniu się mieliny w rozwijającym się mózgu u małych dzieci (1, 2).

W związku z istotną rolą jaką żelazo pełni w organizmie powinno być ono dostarczane z pożywieniem w odpowiedniej ilości, którą określają normy żywienia ustalone dla różnych grup ludności (2). Niedobór żelaza w organizmie wywołuje niedokrwistość (anemię) niedobarwliwą, w której krwinki czerwone zawierają mniejszą niż normalnie ilość hemoglobiny. Przyczynami anemii z niedoboru żelaza mogą być: przewlekłe krwawienia (miesiączne u kobiet oraz z przewodu pokarmowego), upośledzone wchłanianie żelaza z przewodu pokarmowego, niedostateczna jego podaż z pożywieniem (najczęściej wskutek błędów żywieniowych i nieracjonalnego, jednostronnego odżywiania się np. stosowanie diety wegetariańskiej czy odchudzającej) oraz zwiększone zapotrzebowanie na ten pierwiastek (np. w okresie ciąży i karmienia) (1, 3).

Niedobór żelaza w organizmie wpływa na zmniejszenie wydajności pracy – nawet umiarkowana niedokrwistość może obniżyć zdolność ustroju do krótkotrwałego wysiłku. Zmniejsza także odporność organizmu na infekcje, obniża jego zdolność do utrzymania właściwej temperatury ciała przy niskiej temperaturze otoczenia, zwiększa ryzyko zatrucia ołowiem, zwłaszcza u małych dzieci, co związane jest ze zwiększonym wchłanianiem tego pierwiastka. Szczególnie niebezpieczny jest niedobór żelaza w czasie ciąży. Powoduje niedotlenienie macicy, czego konsekwencją mogą być poronienia, wcześniejsze porody oraz osłabienie akcji porodowej. Niedobór żelaza u kobiet ciężarnych może być przyczyną zwiększonej śmiertelności okołoporodowej matek, a także większego ryzyka poporodowych zgonów niemowląt (1, 2, 3). U dzieci może powodować zmiany behawioralne i zahamowanie rozwoju psychicznego (4).

Żelazo w produktach żywnościowych występuje w dwóch formach: jako hemowe i niehemowe. Ponad 80% żelaza występującego w pożywieniu to żelazo niehemowe, głównie w postaci soli Fe^{+3} . Jego

źródłem w diecie są nasiona roślin strączkowych, pieczywo razowe i pełnoziarniste, kasze, płatki zbożowe, otręby pszenne, jaja (zwłaszcza żółtko), kakao. Wchłanianie żelaza niehemowego z diety jest niskie (waha się od 1% do 5%) i zależy od innych składników pożywienia, które mogą zwiększać lub zmniejszać jego absorpcję w jelicie cienkim. Żelazo hemowe pochodzi z hemoglobiny i mioglobiny mięsa, drobiu i ryb. Jego udział w zwyczajowo spożywanej diecie wynosi ok. 10% całej puli żelaza. Organizm wchłania go znacznie więcej, niż żelaza niehemowego i wchłanianie to jest mniej uzależnione od innych składników pożywienia. Wchłanianie żelaza hemowego z pożywienia wynosi ok. 20% (1, 2).

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA WCHŁANIANIE ŻELAZA

Ilość żelaza wchłoniętego w jelicie cienkim zależy od czynników fizjologicznych oraz od innych składników pożywienia, które mogą zwiększać lub zmniejszać jego przyswajalność.

Podstawowym czynnikiem fizjologicznym wpływającym na absorpcję żelaza w jelicie cienkim jest stopień wysycenia organizmu tym pierwiastkiem. Jego absorpcja wzrasta, gdy zapasy żelaza maleją, a zmniejsza się, gdy wysycenie organizmu tym pierwiastkiem jest wystarczające (2). Czynnikiem wpływającym na absorpcję żelaza, głównie niehemowego, jest także wydzielanie kwasu solnego w żołądku. Kwas solny odpowiedzialny jest m.in. za redukcję jonów żelazowych do żelazawych i jego niedostateczne wydzielanie może zmniejszać ilość wchłanianego żelaza, zwłaszcza występującego w pożywieniu w postaci jonów żelazowych. Świadczy o tym występowanie niedokrwistości z niedoboru żelaza w bezkwaśności, po częściowym usunięciu żołądka, czy w przebiegu zapalenia błony śluzowej żołądka. Czynnikiem ten ma również szczególne znaczenie u małych dzieci i osób starszych, u których obserwuje się zmniejszoną sekrecję kwasu solnego w żołądku (5). Na wchłanianie żelaza może wpływać również czas pasażu pokarmu przez przewód pokarmowy. Im dłuższy jest czas przebywania papki pokarmowej w żołądku, tym więcej związków żelaza ulegnie rozpuszczeniu w sokach trawiennych i będzie mogła zostać wchłonięta. Dłuższy czas przebywania treści pokarmowej w jelicie cienkim oznacza zaś dłuższy jej kontakt ze śluzówką jelita, co wpływa na zwiększenie absorpcji żelaza (6).

Wchłanianie żelaza niehemowego w jelicie cienkim mogą zwiększać takie składniki obecne w pożywieniu, jak: mięso, kwas askorbinowy (wit. C), skrobia oporna, oligosacharydy, wit. A i β -karoten, alkohol, a zmniejszać: błonnik pokarmowy i kwas fitynowy, wapń, polifenole oraz białka inne niż białko mięsa. Wchłanianie żelaza hemowego w jelicie może hamować wapń.

SKŁADNIKI POKARMOWE ZWIĘKSZAJĄCE WCHŁANIANIE ŻELAZA

Mięso. Mięso (wołowina, cielęcina, wieprzowina, drób, ryby) oprócz tego, że zawiera dobrze wchłanialne żelazo hemowe, zwiększa absorpcję żelaza niehemowego. Zjawisko to zostało nazwane „czynnikiem mięsa” (meat factor) i zostało zaobserwowane w badaniach na zwierzętach (7, 8) i z udziałem ludzi (9, 10, 11). Doświadczenia na zwierzętach wykazały, że obecność mięsa w ich pożywieniu przyczyniała się do wzrostu wchłaniania żelaza niehemowego w przewodzie pokarmowym (7, 8). W badaniach przeprowadzonych z udziałem ludzi wykazano, że dodanie wołowiny, wieprzowiny, wątroby, drobiu czy ryb do posiłku zawierającego żelazo niehemowe powodowało 2–4-krotny wzrost wchłaniania tego pierwiastka (9, 10, 11). Mechanizm oddziaływania mięsa na proces wchłaniania żelaza w jelicie cienkim nie został do końca poznany. Niektóre badania sugerują, że wpływ „czynnika mięsa” na absorpcję żelaza polega na zdolności peptydów, powstających w trakcie trawienia białka mięśniowego, do wiązania żelaza w kompleksy, co ułatwia rozpuszczanie i wchłanianie tego pierwiastka w jelicie cienkim (8). Korzystny wpływ „czynnika mięsa” na wchłanianie żelaza jest także przypisywany obecności w tkance mięśniowej białek zawierających aminokwas cysteinę. Mechanizm pozytywnego wpływu peptydów zawierających cysteinę na wchłanianie żelaza tłumaczy się ich zdolnością do kompleksowania żelaza i do redukcji jonów żelazowych do żelazawych, które są lepiej rozpuszczalne (11). Inne badania na zwierzętach sugerują, że za korzystny wpływ mięsa na wchłanianie żelaza w jelicie może odpowiadać oprócz białek także jego frakcja tłuszczowa (12). Mechanizm tego zjawiska tłumaczy się tym, że żelazo zostaje w świetle jelita zredukowane do Fe^{+2} przez produkty trawienia białka mięsa, a następnie ulega kompleksowaniu przez wolne kwasy tłuszczowe powstające podczas hydrolizy tłuszczu. Kompleksy te lepiej wchłaniają się przez śluzówkę jelita, ponieważ szybciej przenikają przez barierę lipidową błon enterocytów. Spośród użytych w badaniach tłuszczów, tłuszcz wołowy zawierał

największą ilość kwasów tłuszczowych jednonienasyconych i autorzy sugerują, że właśnie ta grupa kwasów jest głównie odpowiedzialna za wzrost wchłaniania żelaza niehemowego w jelicie cienkim (12).

Kwas askorbinowy. Kwas askorbinowy (wit. C) jest głównym czynnikiem ułatwiającym wchłanianie żelaza niehemowego w jelicie cienkim. W różnych badaniach wykazano, że zarówno wit. C znajdująca się w owocach i warzywach, jak i syntetyczna są jednakowo skuteczne. Wpływ ten jest wprost proporcjonalny do ilości spożytej wit. C i występuje tylko w przypadku, gdy kwas askorbinowy jest spożywany jednocześnie z posiłkiem zawierającym żelazo (13, 14). Wykazano, że podanie 500 mg wit. C razem z posiłkiem spowodowało 6-krotny wzrost absorpcji żelaza z pożywienia, podczas gdy spożycie tej samej ilości witaminy 4 i 8 godz. przed posiłkiem nie miało wpływu na wchłanianie tego pierwiastka (14). Mechanizm korzystnego wpływu wit. C na absorpcję żelaza tłumaczy się jej zdolnością do redukcji w jelicie cienkim jonów żelazowych do żelazawych i zdolnością chelatowania żelaza z utworzeniem rozpuszczalnych kompleksów (1). Podobny wpływ na wchłanianie żelaza, jak kwas askorbinowy, wykazuje kwas izoaskorbinowy. Jest to stereoisomer kwasu askorbinowego, który ze względu na posiadanie silnych właściwości redukujących, podobnie jak kwas askorbinowy, jest używany w USA jako antyoksydant w przetwórstwie żywności. Badania wykazały, że kwas izoaskorbinowy ma silniejszy wpływ na wchłanianie żelaza niehemowego z badanego posiłku, niż kwas askorbinowy. Tłumaczono to tym, że jest on wolniej wchłaniany w jelicie cienkim, niż askorbinowy, co powoduje, że proces redukcji żelaza zachodził znacznie szybciej. Korzystny wpływ kwasu izoaskorbinowego na absorpcję żelaza, podobnie jak askorbinowego, był wprost proporcjonalny do jego spożytej ilości (15).

Skrobia oporna. Skrobia oporna, to suma skrobi i produktów jej rozpadu, które są odporne na działanie enzymów trawiennych i nie są wchłaniane w jelicie cienkim. Jednym ze znaczniejszych źródeł skrobi opornej w diecie są produkty żywnościowe poddane w procesach technologicznych obróbce hydrotermicznej oraz wytworzone z dodatkiem skrobi chemicznie modyfikowanych (16). U zwierząt doświadczalnych karmionych paszami z dodatkiem skrobi opornej obserwowano wzrost absorpcji żelaza (17, 18). Mechanizm takiego działania tłumaczy się tym, że skrobia oporna jest rozkładana przez bakterie jelita grubego do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Kwasy te stymulują rozrost ścian jelita, wydłużenie czasu pasażu jelitowego i zwiększają ukrwienie ścian jelita, co przyczynia się do wzrostu absorpcji żelaza z pożywienia. Powodują one także obniżenie pH w świetle jelita grubego, co zwiększa rozpuszczalność jonów żelaza i ich wchłanianie (18).

Oligosacharydy. Podobny wpływ jak skrobia oporna, na wchłanianie żelaza, mają oligosacharydy. Są to wielocukry składające się z 2–10 cząsteczek cukrów prostych, które nie są trawione, ale stanowią pożywkę dla pożądaných bakterii bytujących w przewodzie pokarmowym. Nazywane są prebiotykami – czyli składnikami żywności, które mają zdolność stymulowania wzrostu określonych bakterii w jelicie grubym (19). W badaniach na szczurach i z udziałem ludzi stwierdzono korzystny wpływ oligosacharydów na wchłanianie składników mineralnych, w tym żelaza. Ich działanie zależy od jakości i ilości w pożywieniu oraz od stopnia fermentacji. W badaniu z udziałem ludzi wykazano, że oligosacharydy są fermentowane przez florę bakteryjną przewodu pokarmowego nawet w 83%, podczas gdy skrobia oporna tylko w 46% (20). Mechanizm korzystnego działania oligosacharydów na wchłanianie żelaza i innych pierwiastków tłumaczy się tym, że są one substratami w procesach hydrolizy i fermentacji zachodzących pod wpływem flory bakteryjnej bytującej w jelicie grubym. Produktami fermentacji są krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe i inne kwasy organiczne, które zakwaszają środowisko okrężnicy, co zwiększa rozpuszczalność składników mineralnych i ich wchłanianie. Przypuszcza się także, że oligosacharydy w świetle jelita grubego tworzą związki kompleksowe ze składnikami mineralnymi, co może zwiększać ich wchłanianie (20).

Witamina A i β -karoten. Wyniki badań nad wpływem wit. A i β -karotenu (prowitaminy A) na wchłanianie żelaza nie są jednoznaczne. Ich korzystny wpływ na absorpcję tego pierwiastka stwierdzono w badaniu z udziałem ludzi, którym podawano posiłki zbożowe (chleb pszenny, chleb kukurydziany i gotowany ryż) z dodatkiem fumaranu żelaza i różnych ilości wit. A i β -karotenu (21). Wyniki badania wykazały, że wit. A i β -karoten niwelowały negatywny wpływ fitynianów obecnych w zbożach na wchłanianie żelaza i poprzez to zwiększały jego wchłanianie. Jednak obserwacji tych nie potwierdziły wyniki późniejszego badania, w którym nie wykazano różnic we wchłanianiu żelaza z posiłku z dodatkiem i bez wit. A (22). W doświadczeniach z wykorzystaniem linii komórek Caco-2 stwierdzono natomiast, że wit. A nie miała wpływu na wchłanianie żelaza, ale β -karoten nasilał absorpcję tego pierwiastka (23). Komórki inkubowano w roztworach fumaranu żelaza z dodatkiem wit. A, β -karotenu, kwasu taninowego i fitynianów. Wchłanianie żelaza było wyraźnie zwiększone w obecności β -karotenu w porównaniu z mieszaniną nie zawierającą tego związku. Obecność

β -karotenu powodowała wzrost wchłaniania żelaza z mieszanin zawierających fityniany lub kwas tanninowy, co wskazuje na to, że prowitamina A może w pewnym stopniu niwelować hamujący wpływ tych substancji na absorpcję żelaza.

Alkohol. Badania z udziałem ludzi wykazały korzystny wpływ alkoholu na wchłanianie tylko żelaza niehemowego. Wpływ ten został przypisany wywołanej przez alkohol stymulacji wydzielania kwasu solnego w żołądku. Stwierdzono, że spożycie z hamburgerem 23,8 g alkoholu (40% roztworu) zwiększało wchłanianie żelaza z posiłku o 23% w porównaniu z posiłkiem spożywanym bez alkoholu (24).

SKŁADNIKI POKARMOWE ZMNIEJSZAJĄCE WCHŁANIANIE ŻELAZA

Błonnik pokarmowy i kwas fitynowy. Wysokie spożycie produktów bogatych w błonnik, takich jak: otręby, płatki owsiane czy pieczywo z pełnoziarnistej mąki może przyczynić się do zmniejszonego wchłaniania żelaza w przewodzie pokarmowym. Wykazano jednak, że błonnik *per se* nie wpływa niekorzystnie na wchłanianie tego pierwiastka (25). Produkty bogate w błonnik, zwłaszcza zbożowe, są bogate także w fityniany i raczej tym związkom przypisuje się hamowanie wchłaniania żelaza w przewodzie pokarmowym. W świetle jelita cienkiego fityniany tworzą z żelazem niehemowym i produktami degradacji białek nierozpuszczalne kompleksy, z których pierwiastek ten nie może być wchłaniany. Są to kompleksy dwu- lub czterozelazowe (26). Hamujący wpływ fitynianów na wchłanianie żelaza zależy od ich zawartości w pożywieniu. Wykazano to w badaniach z udziałem ludzi, którym podawano pieczywo z dodatkiem różnych ilości otrąb kukurydzianych będących źródłem fitynianów. Stwierdzono, że wchłanianie żelaza z tego pieczywa malało wraz ze wzrostem w nim zawartości fitynianów (27).

Fityniany, sole kwasu inozyto-6-fosforowego (kwasu fitynowego), stanowią formę zapasową fosforanów i składników mineralnych w ziarnach zbóż, nasionach, orzechach, warzywach i owocach (1, 28). Szczególnie dużo kwasu fitynowego zawierają ziarna zbóż i nasiona roślin strączkowych. Kwas ten w ziarnach gromadzi się pod łupiną nasienną i jest w dużej mierze eliminowany w procesie mielenia mąki. Wypiekany z nich chleb, źródło zarówno kwasu fitynowego, jak i żelaza, jest podstawowym pokarmem wielu ludzi. Także mieszanki do żywienia niemowląt i dzieci są produkowane z dodatkiem zmielonych zbóż: ryżu, kukurydzy, pszenicy, owsa czy sorgo (26). Skład chemiczny mąki zależy od ilości łupin nasiennych usuniętych w trakcie mielenia ziarna. Mąki białe, wysokooczyszczzone, zawierają małe ilości zarówno fitynianów, jak i żelaza. W mąkach pełnoziarnistych występują natomiast duże ilości otrąb. Im większa zawartość łupin nasiennych w mące, tym bogatsza jest ona w kwas fitynowy i żelazo. Kwas fitynowy może być w ziarnach zbóż całkowicie rozłożony przez fitazy – enzymy, które kolejno odczepiają grupy fosforanowe z kwasu. Można je aktywować w mące używanej do wypieku chleba przez zastosowanie odpowiedniej kombinacji namaczania, kiełkowania i fermentacji. Fityniany są wtedy częściowo lub całkowicie degradowane do fosforanów nieorganicznych i do fosforanów inozytolu z mniejszą ilością grup fosforanowych (28).

Hamowanie wchłaniania żelaza przez kwas fitynowy można zmniejszyć nie tylko przez jego rozkład albo usunięcie, ale także przez dodatek do posiłku mięsa lub kwasu askorbinowego (27, 29). Po dodaniu do posiłku 50 g mięsa obserwowano wzrost wchłaniania żelaza o 44%, a po dodaniu 75 g – o 57% (29). Kwas askorbinowy w odpowiednich ilościach jest również w stanie zmniejszyć niekorzystny wpływ fitynianów na absorpcję żelaza. W badaniu z udziałem ludzi wykazano, że aby zniwelować negatywny wpływ 58 mg kwasu fitynowego na wchłanianie żelaza, wystarczyło dodać do posiłku 30 mg kwasu askorbinowego, a dodanie 50 mg kwasu askorbinowego zwiększyło wchłanianie żelaza z tego posiłku 3-krotnie (27).

Wapń. Jest składnikiem pokarmowym, który może hamować w jelicie cienkim wchłanianie zarówno żelaza hemowego, jak i niehemowego (30, 31). Negatywny wpływ wapnia na absorpcję żelaza występuje wtedy, gdy oba składniki mineralne są spożywane równocześnie w tym samym posiłku. Wykazały to badania z udziałem kobiet, gdzie obserwowano wyższą o 30–50% absorpcję żelaza z posiłków nie zawierających mleka lub sera, jako źródeł wapnia, w porównaniu z posiłkami z dodatkiem tych produktów (31). Podobny wpływ wapnia na wchłanianie żelaza stwierdzono także po równoczesnym zastosowaniu suplementów wapnia (węglanu, cytrynianu i fosforanu) z suplementem żelaza (siarczanem żelaza) (32). Suplementy te, były zażywane w postaci oddzielnych kapsułek popijanych wodą, lub podawanych w trakcie posiłku. Węglan wapnia zmniejszał wchłanianie siarczanu żelaza o 30%, gdy oba związki spożywane były z posiłkiem. Interakcja ta nie występowała, gdy suplement wapnia stosowany był między posiłkami. Fosforan i cytrynian wapnia hamowały wchłanianie

żelaza zarówno wtedy, gdy suplementy popijane były wodą, jak i wtedy, gdy spożywane były w trakcie posiłku. W badaniu tym wykazano także niekorzystny wpływ suplementów wapnia na absorpcję żelaza zawartego w pokarmie. Wszystkie związki wapnia hamowały wchłanianie tego pierwiastka, ale stopień tego hamowania zależał od rodzaju posiłku. Był on większy jeżeli posiłek zawierał dużo wapnia i żelazo o niskiej biodostępności niż w przypadku posiłku zawierającego mało wapnia i żelazo o wysokiej przyswajalności.

Mechanizm niekorzystnego wpływu wapnia na absorpcję żelaza z przewodu pokarmowego nie jest do końca wyjaśniony. Sugeruje się, że wapń konkuruje z żelazem na etapie transportu wewnątrz komórek błony śluzowej jelita. Konkurencja ta, dotyczyć może miejsc wiązania w białku transportującym żelazo w cytozolu enterocytów – mobilferynie (30).

Obniżone pod wpływem wapnia wchłanianie żelaza z pojedynczych posiłków nie jest jednak już tak znaczące w przypadku regularnie spożywanych racji pokarmowych. W badaniu, w którym kobiety spożywały przez 4 dni 3 razy dziennie posiłki o zróżnicowanym składzie, dostarczające 13,2 mg żelaza/dzień i ok. 800 mg wapnia/dzień, pochodzącego z różnych źródeł: mleka, mleczanu wapnia i izolatu z mleka, nie stwierdzono niekorzystnego wpływu wapnia na wchłanianie żelaza z jelita cienkiego (33). Podobny wynik uzyskano w innym badaniu, w którym ochotnicy spożywali przez 5 dni diety o różnej zawartości wapnia: 280 mg, 684 mg i 1281 mg (34). Nie stwierdzono różnic w ilości wchłoniętego żelaza niehemowego z badanych posiłków i autorzy wnioskują, że wapń nie ma istotnego wpływu na absorpcję żelaza z posiłków o zróżnicowanym składzie, spożywanych regularnie.

Polifenole. Główne źródła polifenoli w pożywieniu to: owoce, soki, zboża, nasiona roślin strączkowych, warzywa oraz napoje: herbata, kawa, kakao, piwo, wino. Podstawowymi grupami związków polifenolowych występujących w żywności są: kwasy fenolowe i flawonoidy. Najbardziej popularnymi związkami zaliczanymi do grupy kwasów fenolowych i ich pochodnych są: kwas ferulowy związany z hemicelulozą błonnika pokarmowego występującego np. w otrębach pszennych, kwas chlorogenowy występujący w wielu owocach, warzywach oraz kawie, taniny występujące w czarnej herbacie i winie. Do flawonoidów zalicza się między innymi flawony, flawonole, izoflawony, antocyjany, flawanole, flawanony, proantocyjanidyny. Bogatym źródłem izoflawonów jest soja. Flawonol kwercetyna występuje powszechnie w owocach, warzywach i napojach (m. in. herbacie). Katechiny, związki będące flawanolami, są powszechne w herbacie, a także w czerwonym winie i czekoladzie. Antocyjany i proantocyjanidyny występują głównie w owocach oraz czerwonym winie (35). Polifenole mogą hamować absorpcję żelaza poprzez tworzenie w świetle jelita nierozpuszczalnych kompleksów z jonami żelaza(III) (36).

W badaniu na szczurach, którym podawano chlorek żelaza rozpuszczony w wodzie lub herbacie, stwierdzono znacznie niższe wchłanianie tego pierwiastka, kiedy był on podany w herbacie, niż kiedy był podany w wodzie (36). Autorzy sugerują, że herbata ma istotny wpływ na absorpcję żelaza tylko wtedy, kiedy jest spożywana razem z posiłkiem zawierającym żelazo. Pita między posiłkami nie wpływa na wchłanianie żelaza.

W badaniu z udziałem ludzi stwierdzono, że przy takiej samej zawartości polifenoli czarna herbata silniej obniżała wchłanianie żelaza z fortyfikowanego tym pierwiastkiem chleba, niż kakao i różne herbaty ziołowe, z wyjątkiem herbaty miętowej, której wpływ na absorpcję żelaza był porównywalny z herbatą czarną (37). Badania te wykazały, że herbaty ziołowe, podobnie, jak czarna herbata, kawa i kakao, mogą być potencjalnymi inhibitorami wchłaniania żelaza niehemowego z posiłku. Hamujący wpływ polifenoli zawartych w różnych napojach na wchłanianie żelaza z chleba zależał od ich ilości w porcji tych napojów tj. w 275 cm³. Spożycie napojów zawierających 20–50 mg polifenoli w porcji zmniejszyło absorpcję żelaza niehemowego o 50–70% w porównaniu z jego absorpcją z chleba popijanego wodą, a spożycie napojów zawierających 100–400 mg tych związków/porcję o 60–90%.

W innym doświadczeniu badano wchłanianie żelaza niehemowego u ludzi spożywających dietę z niską jego zawartością, popijających posiłki herbatą czarną, czarną pozbawioną kofeiny oraz zieloną (zawierającą 10-krotnie więcej polifenoli niż czarna). Zaobserwowano znacznie mniejszą absorpcję żelaza z posiłku popijanego herbatą zieloną, niż z posiłku popijanego herbatą czarną i czarną bezkofeinową. Autorzy sugerują, że przyczyną tego była 4–10-krotnie większa zawartość katechin w herbacie zielonej, niż w czarnej (38).

Jednak, jak wynika z porównania wyników 16 różnych badań przeprowadzonych z udziałem ludzi (39) istotny negatywny wpływ związków polifenolowych zawartych w herbacie na wchłanianie żelaza z pożywienia występuje tylko u osób z niedoborem tego pierwiastka w organizmie. Autorzy tej pracy wnioskują, że w populacjach krajów zachodnich, w których liczba osób z deficytem żelaza jest marginalna, konsumpcja herbaty nie wpływa negatywnie na wysycenie organizmu tym pierwiastkiem.

Badano również wpływ związków polifenolowych zawartych w czerwonym winie na wchłanianie żelaza (40). Stwierdzono, że absorpcja żelaza z pieczywa popijanego czerwonym winem o obniżonej zawartości alkoholu była niższa o 28%, w porównaniu z przyswajalnością tego pierwiastka z posiłku popijanego winem białym, które zawierało 10-krotnie mniej polifenoli niż czerwone.

Badania z udziałem ludzi sugerują, że negatywne działanie polifenoli na wchłanianie żelaza niehemowego może zostać zmniejszone przez kwas askorbinowy (27, 41). W jednym z nich (27) badano wpływ polifenoli na przyswajanie żelaza z białego chleba popijanego wodnym roztworem witaminy C. Stwierdzono, że do zniwelowania niekorzystnego działania 100 mg tanin zawartych w posiłku na wchłanianie żelaza konieczne było spożycie ≥ 50 mg kwasu askorbinowego.

Białka inne niż białko mięsa. Wchłanianie żelaza z posiłków zawierających białko mleka – kazeinę oraz białko sojowe może być obniżone (13). Kazeina stanowi ponad $\frac{3}{4}$ ogólnej ilości białek występujących w mleku. W przemyśle stosuje się także jako dodatek do żywności kazeiniany powstające w wyniku zobojętniania kazeiny kwasowej odpowiednimi zasadami w podwyższonej temperaturze. Kazeiniany znajdują zastosowanie w przemyśle mięsnym, garmażeryjnym, piekarniczym, cukierniczym, koncentratów spożywczych i farmaceutycznym (42). Przyczyną negatywnego wpływu kazeiny na wchłanianie żelaza niehemowego z pożywienia jest tworzenie się nierozpuszczalnych kompleksów tego pierwiastka z fosfopeptydami powstającymi w czasie trawienia kazeiny. Całkowita hydroliza tego białka lub enzymatyczne usunięcie grup fosforowych z bocznych łańcuchów seryny, aminokwasu wchodzącego w skład kazeiny, w znacznym stopniu zmniejsza niekorzystne działanie tego białka na przyswajanie żelaza (13).

Koncentraty białka sojowego są głównym składnikiem mieszanek żywieniowych dla niemowląt i dzieci, są stosowane do wyrobu produktów imitujących nabiał jako zamienniki białka oraz dodaje się je do pieczywa (43). Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za hamowanie wchłaniania żelaza przez izolaty białka sojowego jest obecny w nich kwas fitynowy. Wykazano to w badaniu, w którym podawano ludziom posiłki zawierające izolaty białka sojowego o różnej zawartości fitynianów (44). Wyniki wykazały, że zmniejszenie ilości fitynianów z 220 mg do 110 mg/posiłek nie miało istotnego wpływu na wchłanianie żelaza, dopiero przy zawartości fitynianów ≤ 10 mg absorpcja tego pierwiastka z badanego posiłku wzrosła znacząco. Autorzy sugerują, że występujące w nasionach soi inne, niż kwas fitynowy, składniki mogą także wpływać negatywnie na absorpcję żelaza. Prawdopodobnie są to peptydy wiążące ten pierwiastek w nierozpuszczalne w środowisku dwunastnicy kompleksy. Jak wykazały badania na szczurach, za obniżenie wchłaniania żelaza niehemowego przez izolaty białka sojowego mogą być częściowo odpowiedzialne także białka zwane lektynami (45). Przypuszcza się, że mechanizm tego zjawiska polega na łączeniu się lektyn z cukrami błony śluzowej jelita, co powoduje jej uszkodzenie i zmniejszenie absorpcji żelaza.

WPLYW POSIŁKÓW O ZRÓŻNICOWANYM SKŁADZIE NA WCHŁANIANIE ŻELAZA

Przyswajalność żelaza z pokarmu zależy od składu posiłku. Prawidłowa dieta zawiera różne składniki pokarmowe i ich wpływ na wchłanianie żelaza z posiłków jest wynikiem ich wzajemnych oddziaływań zachodzących w świetle przewodu pokarmowego. Zaobserwowano różnice w absorpcji żelaza z pojedynczych posiłków testowych zawierających zazwyczaj jeden badany składnik pokarmowy wpływający pozytywnie lub negatywnie na wchłanianie tego pierwiastka, w porównaniu z posiłkami o różnym składzie, spożywanymi regularnie. Dotyczy to np. negatywnego wpływu wapnia na wchłanianie żelaza z pojedynczego, mało urozmaiconego posiłku, który to wpływ w przypadku spożywania posiłków o zróżnicowanym składzie był znikomy (33, 46). Innym przykładem może być hamujący wpływ kwasu fitynowego na absorpcję żelaza, który może być w znacznym stopniu zredukowany przez obecność w racji pokarmowej wit. C lub mięsa (28, 29).

W doświadczeniu z udziałem ludzi badano absorpcję żelaza niehemowego z 25 posiłków o różnym składzie, w których oznaczono zawartość wapnia, polifenoli, kwasu fitynowego, kwasu askorbinowego i mięsa (46). Wyniki badania wykazały znaczący wpływ na wchłanianie żelaza niehemowego z tych posiłków tylko trzech składników pokarmowych. Były to: kwas fitynowy, mięso i wit. C.

W innym badaniu (47) uczestnicy spożywali diety o różnej zawartości kwasu askorbinowego: diety dowolną oraz o małej i dużej zawartości wit. C. Stwierdzono, że pomimo znacznych różnic w zawartości tej witaminy pomiędzy poszczególnymi racjami pokarmowymi, różnice we wchłanianiu z nich żelaza niehemowego były umiarkowane. Autorzy wnioskują, że korzystny wpływ kwasu askorbinowego na

wchłanianie żelaza niehemowego z diety o zróżnicowanym składzie jest dużo mniejszy, niż ten obserwowany w badaniach z zastosowaniem pojedynczych posiłków. Jest on jednak na tyle znaczący, że wit. C, podobnie jak mięso i fityniany została zaliczona do grupy składników pokarmowych, które mogą wpływać na wchłanianie żelaza z racji pokarmowych.

PODSUMOWANIE

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że wchłanianie żelaza niehemowego w jelicie cienkim z pojedynczych posiłków lub potraw mogą nasilać takie składniki obecne w pożywieniu jak: mięso, wit. C, skrobia oporna, oligosacharydy, wit. A i β -karoten oraz alkohol, a hamować: błonnik pokarmowy i kwas fitynowy, wapń, polifenole oraz białka inne niż białko mięsa. Z urozmaiconej racji pokarmowej natomiast wchłanianie żelaza niehemowego mogą zwiększać: mięso i witamina C, a zmniejszać: kwas fitynowy.

Wchłanianie żelaza niehemowego z pożywienia można poprawić przez odpowiednie skomponowanie diety, uwzględniając wpływ różnych składników pokarmowych na jego absorpcję w przewodzie pokarmowym. Dieta zwiększająca wchłanianie żelaza niehemowego powinna zawierać produkty mięsne oraz bogate w wit. C, takie jak: owoce, soki owocowe i warzywa. Należy unikać popijania posiłków mlekiem, herbatą, kawą czy kakao, ponieważ wapń i polifenole mogą zmniejszać absorpcję żelaza niehemowego. Posiłki można popijać sokami owocowymi – zawarta w nich wit. C korzystnie wpływa na wchłanianie tego pierwiastka. Hamujący wpływ fitynianów na absorpcję żelaza niehemowego można zmniejszyć poprzez dodanie mięsa oraz warzyw i owoców bogatych w wit. C do posiłków zawierających produkty zbożowe.

H. Grajeta

THE EFFECT OF FOODSTUFFS ON THE ABSORPTION OF IRON

PIŚMIENICTWO

1. *Garrow J.S., James W.P.T., Ralph A.*: Human nutrition and dietetics. Churchill Livingstone, London, 2000; 177-192. – 2. *Ziemlański S.*: Normy żywienia człowieka. Fizjologiczne podstawy. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa, 2001; 379-396: 506-525. – 3. *Ziemlański Ś.*: Niedokrwistość a żywienie. Kw. Biul. Pol. Tow. Diet., 1998; 11/12: 20-36. – 4. *Książek J.*: Czy niedobory żelaza u dzieci mogą prowadzić do zaburzeń motoryki i zachowania?. Ped. Współ. Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziecka, 2001; 3: 127-128. – 5. *Baranowski W.J.*: Chemiczne podstawy wchłaniania żelaza z pokarmów, Bromat. Chem. Toksykol., 2004; 3: 237-242. – 6. *Brzozowska A.*: Czynniki warunkujące wykorzystanie składników mineralnych z pożywienia. Ped. Współ. Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziecka, 2001; 3: 135-138. – 7. *South P.K., Lei X., Miller D.D.*: Meat enhances nonheme iron absorption in pigs. Nutr. Res., 2000; 20: 1749-1759. – 8. *Meehye K., Dong-Tae L., Yeon-Sook L.*: Iron absorption and intestinal solubility in rats are influenced by dietary proteins. Nutr. Res., 1995; 15: 1705-1716. – 9. *Engelmann M.D.M., Davidsson L., Sandstrom B., Walczyk T., Hurrell R.F., Michaelsen K.F.*: The influence of meat on nonheme iron absorption in infants. Ped. Res., 1998; 43: 768-773. – 10. *Baech S.B., Hansen M., Bukhave K., Kristensen L., Jensen M., Sorensen S.S., Purslow P.P., Skibsted L.H., Sandstrom S.*: Increasing the cooking temperature of meat does not affect nonheme iron absorption from a phytate – rich meal in women. J. Nutr., 2003; 133: 94-97.

11. Taylor P.G., Martinez-Torres C., Romano E.L., Layrisse M.: The effect of cysteine-containing peptides released during meat digestion on iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1986; 43: 68-71. – 12. Kapsokefalou M., Miller D.D.: Lean beef and beef fat interact to enhance nonheme iron absorption in rats. *J. Nutr.*, 1993; 123: 1429-1434. – 13. Fairweather-Tait S., Hurrell R.F.: Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutr. Res. Rev.*, 1996; 9: 295-324. – 14. Lynch S.R., Stoltzfus R.J.: Iron and ascorbic acid: proposed fortification levels and recommended iron compounds. *J. Nutr.*, 2003; 133: 2978S-2984S. – 15. Fidler M.C., Davidsson L., Zeder Ch., Hurrell R.F.: Erythorbic acid is a potent enhancer of nonheme – iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004; 79:99-102. – 16. Soral-Śmietana M., Wronkowska M.: Resistant starch-nutritional and biological activity. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2004; 13: 51-64. – 17. Morais M.B., Feste A., Miller R.G., Lifschitz C.H.: Effect of resistant and digestible starch on intestinal absorption of calcium, iron, and zinc in infant pigs. *Ped. Res.*, 1996; 39: 872-876. – 18. Lopez H.W., Levrat-Verny M.A., Coudray Ch., Besson C., Krespine V., Messanger A.: Class 2 resistant starches lower plasma and liver lipids and improve mineral retention in rats. *J. Nutr.*, 2001; 131: 1283-1289. – 19. Śliżewska K., Libudzisz Z.: Wykorzystanie oligosacharydów jako prebiotyków. *Przem. Spoż.*, 2002; 4: 10-16. – 20. Scholz-Ahrens K.E., Schaafsma G., van den Heuvel E.G.H.M., Schrezenmeir J.: Effect of prebiotics on mineral metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001; 73: 459S-464S.
21. Garcia-Casal M.N., Layrisse M., Solano L., Baron M.A., Arguello F., Llovera D., Ramirez J., Leets I., Tropper E.: Vitamin A and β -carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. *J. Nutr.*, 1998; 128: 646-650. – 22. Walczyk T., Davidsson L., Rossander-Hulthen L., Hallberg L., Hurrell R.F.: No enhancing effect of vitamin A on iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77: 144-149. – 23. Garcia-Casal M.N., Leets I., Layrisse M.: β -carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J. Nutr.*, 2000; 130: 5-9. – 24. Hallberg L., Hulthen L.: Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71: 1147-1160. – 25. Coudray C., Bellanger J., Castiglia-Delavaud C., Remesy C., Vermorel M., Rayssiguier Y.: Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1997; 51: 375-380. – 26. Brune M., Rossander-Hulten L., Hallberg L., Gleerup A., Sandberg A.S.: Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J. Nutr.*, 1992; 122: 442-449. – 27. Siegenberg D., Baynes R.D., Bothwell T.H., Macfarlane B.J., Lamparelli R.D., Car N.G., MacPhail P., Schmidt U., Tal A., Mayet F.: Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; 53: 537-541. – 28. Hurrell R.F., Reddy M.B., Juillerat M.A., Cook J.D.: Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subject. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77: 1213-1219. – 29. Baech S.B., Hansen M., Bukhave K., Jensen M., Sorensen S.S., Kristensen L., Purslow P.P., Skibsted L.H., Sandstrom B.: Nonheme-iron absorption from a phytate-rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77: 173-179. – 30. Hallberg L., Brune M., Erlandsson M., Sandberg A.S., Rossander-Hulten L.: Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; 53: 112-119.
31. Gleerup A., Rossander-Hulthen L., Gramatkovski E., Hallberg L.: Iron absorption from the whole diet: comparison of the effect of two different distributions of daily calcium intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995; 61: 97-104. – 32. Cook J.D., Dassenko S.A., Whittaker P.: Calcium supplementation: effect on iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; 53: 106-111. – 33. Grinder-Pedersen L., Bukhave K., Jensen M., Hojgaard L., Hansen M., Grahn E.: Calcium from milk or calcium-fortified foods does not inhibit nonheme-iron absorption from a whole diet consumed over a 4-d period. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004; 80: 404-409. – 34. Reddy M.B., Cook J.D.: Effect of calcium intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997; 65: 1820-1825. – 35. Bravo L.: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 1998; 56: 317-333. – 36. South P.K., House W.A., Miller D.D.: Tea consumption does not affect iron absorption in rats unless tea and iron are consumed together. *Nutr. Res.*, 1997; 7: 1303-1310. – 37. Hurrell R.F., Reddy M., Cook J.D.: Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br. J. Nutr.*, 1999; 81: 289-295. – 38. Prystai E.A., Kies C.V., Driskell J.A.: Calcium, copper, iron, magnesium and zinc utilization of humans as affected by consumption of black, decaffeinated black and green teas. *Nutr. Res.*, 1999; 19: 167-177. – 39. Temme E.H.M., Van Hoydonck P.G.A.: Tea consumption and iron status. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2002; 56: 379-386. – 40. Cook J.D., Reddy M.B., Hurrell R.F.: The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995; 61: 800-804.

41. *Tuntawiroon M., Sritongkul N., Brune M., Rossander-Hulten L., Pleehachinda R., Suwanik R., Hallberg L.*: Dose-dependent inhibitory effect of phenolic compounds in foods on nonheme-iron absorption in men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; 53: 554-557. – 42. *Szpendowski J., Śmietana Z.*: Otrzymywanie, właściwości funkcjonalne i zastosowanie kazeinianów. *Przem. Spoż.*, 2002; 5: 34-40. – 43. *Dłużewska E., Krygier K.*: Sojowe preparaty białkowe – otrzymywanie i zastosowanie. *Przem. Spoż.*, 2005; 4: 30-35. – 44. *Baech S.B., Hansen M., Bukhave K., Jensen M., Sorensen S.S., Kristensen L., Purslow P.P., Skibsted L.H., Sandstrom B.*: Nonheme-iron absorption from a phytate-rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77: 173-179. – 45. *Hisayasu S., Orimo H., Migita S., Ikeda Y., Satoh K., Shinjo (Kanda) S., Hirai Y., Yoshino Y.*: Soybean protein isolate and soybean lectin inhibit iron absorption in rats. *J. Nutr.*, 1992; 122: 1190-1196. – 46. *Reddy M.B., Hurrell R.F., Cook J.D.*: Estimation of nonheme-iron bioavailability from meal composition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71: 937-943. – 47. *Cook J.D., Reddy M.B.*: Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001; 73: 93-98.

Adres: 50-140 Wrocław, pl. Nankiera 1.

Anna Lebedzińska, Marcin Marszałł¹⁾, Jan Sperra²⁾, Piotr Szefer

PIECZYWO WZBOGACONE MĄKĄ Z NASION WINOGRON ŹRÓDŁEM WITAMIN GRUPY B

Katedra i Zakład Bromatologii Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: prof. dr hab. *P. Szefer*

¹⁾ Katedra i Zakład Toksykologii Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: prof. dr hab. *W. Czarnowski*

²⁾ Gdańskie Młyny i Spichlerze Dr Cordesmeier – Sp. z o.o
Prezes Zarządu: *P. Górski*

Oznaczono zawartość witaminy B₆ i tiaminy w pieczywie wypieczonym z mąki wzbogaconej ekstraktem z nasion winogron za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją elektrochemiczną i UV/VIS.

Hasła kluczowe: mąka z nasion winogron, pieczywo, witaminy grupy B, HPLC.
Key words: flour from grape seeds, bread, vitamins B, HPLC.

Zalecenia Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dotyczące diety pozwalającej zmniejszyć czynniki ryzyka zachorowalności i śmiertelności ludzi, sugerują zwiększenie spożycia produktów zbożowych, zwłaszcza pełnoziarnistych oraz orzechów, roślin strączkowych, warzyw i owoców. Naukowcy i lekarze podkreślają, że poprzez właściwy sposób żywienia i stosowną do wieku aktywność fizyczną można zmniejszyć ryzyko rozwoju chorób cywilizacyjnych (1, 2, 3).

Badania nad etiopatogenezą wielu chorób oraz procesami starzenia się organizmu, prowadzone w ciągu ostatnich lat, wskazują na rolę równowagi pro- i antyoksydacyjnej. Wolne rodniki są nieuchronną konsekwencją oddychania tlenowego. Są one naturalnym produktem ubocznym wielu procesów komórkowych. W warunkach nadprodukcji wolnych rodników dochodzi do stresu oksydacyjnego. Charakteryzują się one wówczas bardzo dużą reaktywnością, reagując z białkami, lipidami czy kwasami nukleinowymi, powodując zmiany w ich strukturze, co prowadzi do zaburzeń funkcji życiowych komórek, a w konsekwencji do wielu schorzeń (miażdżycy naczyń, choroby niedokrwiennej serca, chorób nowotworowych) i innych zmian degeneracyjnych (4, 5, 6, 7).

Pieczywo, w grupie produktów zbożowych, ze względu na powszechność spożycia zajmuje jedną z pierwszych pozycji w całodziennym żywieniu człowieka. W Polsce, chleb jest chętnie i często spożywany niezależnie od wieku i statusu społecznego konsumenta (8).

W piekarni laboratoryjnej Gdańskich Młynów i Spichlerzy opracowano proces wypieku pieczywa z mieszanek wypiekowych sporządzonych na bazie mąki

pszennej i mąki z nasion winogron. Przygotowano receptury piekarnicze, uwzględniające opracowane zalecenia technologiczne (R20/ZDN-02/GMiS-20).

Celem pracy było oznaczenie zawartości witamin B₁ i B₆ w pieczywie wypieczonym z dodatkiem mąki z pestek winogron na bazie receptury opracowanej w laboratorium Gdańskich Młynów i Spichlerzy.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiot badań stanowiły dwa rodzaje pieczywa: bułki pszenne oraz bułki upieczone z mieszanki piekarniczej z dodatkiem mąki z nasion winogron. Przeanalizowano także próbki mąki z pestek winogron. Materiał do analiz otrzymano z piekarni laboratoryjnej Gdańskich Młynów i Spichlerzy.

Badany materiał (próbki dwugramowe) poddano hydrolizie kwaśnej i enzymatycznej. Hydrolizie kwaśną prowadzono za pomocą kwasu solnego o stęż. 0,055 mol/dm³ (4 h, 121°C) dla witaminy B₆ oraz 0,1 mol/dm³ (30 min., 100°C) dla witaminy B₁, natomiast hydrolizie enzymatyczną stosując mieszaninę diastazy i papainy. Przed wykonaniem analizy chromatograficznej hydrolizaty uzupełniano do określonej objętości metanolem i sączono przez sączek membranowy o wielkości porów 0,22 μm.

Po ekstrakcji witamin ich zawartość oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (9, 10). Tiaminę oznaczono stosując detektor UV/VIS Dionex przy dł. fali 280 i 288 nm. Witaminę B₆ jako sumę pirydoksaminy, pirydoksalu i pirydoksyny oznaczono przy użyciu detektora elektrochemicznego Coulochem II (ESA, Bedford, USA). Zastosowano następujące potencjały: dla celki ochronnej 900 mV, dla celki analitycznej pierwszej 350 mV, dla celki analitycznej drugiej 850 mV. Analizę chromatograficzną wykonano w temp. 22°C na kolumnie LC 18 Supelco 25 cm × 4,6 mm, stosując izokratyczny rozdział przy prędkości przepływu fazy ruchomej 1 cm³/min. Fazę ruchomą stanowił: 0,05 mol/dm³ bufor fosforanowy o pH 3,55; metanol (8%); trimetylamina (0,008 mol/dm³).

Tabela I
Porównanie wartości deklarowanych z zawartością witaminy B₁ i B₆ oznaczonych
w materiale referencyjnym CRM121 Wholemeal Flour

Table I
The determined and declared content of vitamins B₁ and B₆
in certified reference material CRM 121 Wholemeal Flour

Witamina	n*	Wartość deklarowana (mg/kg)	Wartość oznaczona (mg/kg)	RSD (%)	Odzysk (%)
B ₁	6	4,63	4,50 (4,45–4,53)	1,09	97,2
B ₆	6	4,10	4,06 (4,02–4,12)	1,88	99,02

n* – liczba próbek.

W celu sprawdzenia dokładności metody oznaczono zawartość badanych witamin w certyfikowanym materiale referencyjnym CRM 121 Wholemeal Flour (tab. I), uzyskując wysoce zadawalającą dokładność oraz precyzję pomiarów analitycznych.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki badań przedstawiono w tab. II. Uwzględniono średnią zawartość, odchylenia standardowe ±SD i zakres stężeń analizowanych witamin.

Porównanie zawartości witamin w analizowanych produktach pozwala stwierdzić, że zarówno mąka z nasion winogron, jak i bułki z dodatkiem tej mąki zawierały wyższe poziomy witaminy B₁, tj. 0,156 i 0,094 mg w 100 g produktu, a w przypadku witaminy B₆, odpowiednio 0,521 i 0,279 mg w 100 g w porównaniu z bułkami upieczonymi z mąki pszennej (0,083 mg tiaminy i 0,16 mg witaminy B₆ w 100 g).

Tabela II
Zawartość witamin w badanych produktach zbożowych (mg/100 g)

Table II
Concentrations of vitamins B in cereals (mg/100 g)

Rodzaj produktu	n*	Witamina B ₁ (mg/100 g)	Witamina B ₆ (mg/100 g)			
			pirydoksamina (PM)	pirydoksal (PL)	pirydoksyna (PN)	(PM+PL+PN)
Mąka z pestek winogron	6	0,156±0,004 (0,121–0,195)	ND	0,059±0,004 (0,054–0,059)	0,462±0,01 (0,452–0,472)	0,521
Bułki z 5% dodatkiem mąki z pestek winogron	6	0,094±0,001 (0,087–0,099)	0,011±0,008 (0,011–0,012)	0,022±0,001 (0,018–0,024)	0,246±0,008 (0,240–0,254)	0,279
Bułki pszenne	6	0,083±0,001 (0,072–0,091)	0,01±0,001 (0,010–0,011)	ND	0,15±0,004 (0,144–0,155)	0,16

n* – liczba próbek;

ND – poniżej progu oznaczalności metody.

Wartość odżywcza pieczywa jest zróżnicowana i uzależniona od rodzaju używanych do jego produkcji mąk oraz zastosowanych dodatków polepszających smak, czy też wartość wypiekową. Z punktu widzenia żywieniowego korzystne jest wzbogacanie jasnych mąk pszennych w witaminy grupy B, z uwagi na straty zaistniałe podczas przemiału ziarna na mąkę. Inną metodą wzbogacania pieczywa jest również dodatek naturalnych produktów będących bogatym źródłem witamin, na przykład ziaren zbóż, soi, słonecznika, płatków zbożowych, a także mleka (11, 12, 13).

Pieczywo, wypieczone z mąk otrzymanych z dodatkiem mąki z nasion winogron może dostarczać wielu cennych składników odżywczych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Jest źródłem węglowodanów i białka, witamin z grupy B i składników mineralnych (Mg, F, Fe, Zn i Cu), a ponadto zawiera biologicznie aktywne flawonoidy (oligomeryczne procyanidyny) oznaczające się wysoką aktywnością antyoksydacyjną (14, 15, 16).

Winorośl jest jedną z najstarszych, obok zboża, uprawianych roślin, znaną od wielu tysięcy lat (17). Winogrona będące owocami winorośli, poza konsumpcją w postaci świeżej, są spożywane jako rodzynki, służą również do produkcji wina, napoju będącego składnikiem diet wielu narodów. Mniej popularnym, w naszym kraju, surowcem otrzymywanym z winorośli są liście i mąka z pestek winogron. Liście stosuje się jako produkt żywnościowy przeznaczony do bezpośredniego spożycia oraz jako suplement diety, w postaci tabletek, zawierających skoncentrowane źródło czynników aktywnych biologicznie. Nasiona i skórki winogron zawierają w swoim składzie bioflawonoidy a wśród nich procyanidyny, antocyjany i resveratrol, związki charakteryzujące się dużą aktywnością przeciwutleniającą. Taka mieszanina antyoksydantów ma zdolność oddziaływania na naczynia krwionośne poprzez swą aktywność przeciwutleniającą i wpływ na elastazę, kolagenazę, hialuronidazy – enzymy związane z degradacją kolagenu i elastyny. Przyjmuje się, że bioflawonoidy działając jako zmiatacze wolnych rodników zmniejszają ryzyko wystąpienia miażdżycy, w konsekwencji innych chorób degeneracyjnych (4, 14, 17, 18, 19).

Tabela III
Ocena dziennego pokrycia zapotrzebowania na witaminę B₁ i B₆ zalecanego dla osoby dorosłej (20)

Table III
Per cent realisation of vitamin B₁ and vitamin B₆ recommended daily allowance (RDA) for an adult person (20)

Nazwa produktu (100 g)	Witamina B ₁ % realizacji		Witamina B ₆ % realizacji	
	mężczyzna	kobieta	mężczyzna	kobieta
Mąka z pestek winogron	7,8	8,2	21,8	26,1
Bułka pszenna z 5% dodatkiem mąki z winogron	4,7	4,9	11,6	13,5
Bułka pszenna	4,1	4,3	6,7	8,0

Dokonano oceny przydatności analizowanego pieczywa w realizacji zapotrzebowania na badane witaminy (tab. III). Oszacowano stopień realizacji dziennego zapotrzebowania przyjmując jako wartości referencyjne normy zaproponowane przez Ziemiańskiego (20) dla mężczyzn i kobiet w wieku 19–25 lat o umiarkowanej aktywności fizycznej, na poziomie zalecanym. Porównując, w jakim stopniu badane pieczywo realizuje dzienne zapotrzebowanie na tiaminę można ocenić, że dla średnich wartości tej witaminy w analizowanych produktach są one podobne i realizują zapotrzebowanie w zakresie od 4,3% do 8,2% dla kobiet oraz od 4,1% do 7,8% dla mężczyzn. Realizacja zapotrzebowania na witaminę B₆ wynosi od 6,7% do 21,8% dla mężczyzn oraz od 6,7% do 26,1% dla kobiet.

Z przeprowadzonych badań wynika, że produkty piekarnicze z dodatkiem mąki z nasion winogron odznaczają się wyższą zawartością witamin grupy B niż odpowiadające im pieczywo wypiekane z mąk pszennych.

WNIOSKI

1. Zaprojektowany proces produkcji pieczywa z dodatkiem mąki z nasion winogron, umożliwia upieczenie pieczywa wzbogaconego w naturalne antyoksydanty, decydujące o prewencyjnym znaczeniu takiej żywności w chorobach naczyniowo-sercowych.

2. Pieczywo wypieczone z dodatkiem naturalnego ekstraktu z nasion czernych winogron może być dobrym źródłem witamin grupy B.

A. Lebedzińska, M. Marszałł, J. Sperra, P. Szefer

BREAD FORTIFIED WITH GRAPE SEED FLOUR AS A SOURCE OF VITAMINS B

Summary

The present study provides information about the concentrations of vitamins B in cereal products (flour and bread). Reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with a Coulchem II ESA and a DIONEX UV/VIS detectors was applied for the determinations. The results show that bread fortified with grape seed flour is a good source of thiamine and vitamin B₆.

PIŚMIENNICTWO

1. Brand-Miller J.C., Holt S.H.C., Pawlak D.B., McMillan J.: Glycemic index and obesity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002; 76 (suppl.): 281-285. – 2. Szostak W.B.: Żywnienie w profilaktyce metabolicznych chorób cywilizacyjnych. *Przem. Spoż.*, 2003; 11: 17-19. – 3. WHO – Global strategy on diet, physical activity and health. Fifty-seventh World Health Assembly; 2004. – 4. Kunachowicz H.: Żywność funkcjonalna – rola antyoksydantów. *Farm. Polska*, 2001; 57: 703-706. – 5. Zajac M.: Witaminy i mikroelementy. *Wyd. Kontekst, Poznań*, 2000. – 6. Gertig H., Przysławski J.: Tłuszcze pokarmowe a biosynteza eikozanoidów. *Żyw. Człow. Metab.*, 1995; 22: 272-286. – 7. Ziemiański Ś., Budzyńska-Topolowska J.: Rola izomerów trans kwasów tłuszczowych w metabolizmie lipidów ze szczególnym uwzględnieniem układu krążenia. *Czyn. Ryzyka*, 2001; 3/4: 5-18. – 8. Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej. Główny Urząd Statystyczny, Warszawa 2003. – 9. Lebedzińska A., Marszałł M., Czarnowski W., Szefer P.: Oznaczanie witamin B₁, B₆ oraz B₁₂ w żywności przy użyciu wysokiej wydajności chromatografii cieczowej. *Materiały XIX Zjazdu Naukowego PTFarm.*, Wrocław 2004. – 10. Marszałł M., Lebedzińska A., Czarnowski W., Szefer P.: High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A.*, 2005; 1094: 91-98.

11. *Lebiedzińska A., Wituszyńska B., Szefer P.*: Ocena zawartości witamin grupy B w wybranym pieczywie świeżym i chrupkim. *Żyw. Człow. Metab.*, 2003; 30(3/4): 992-997. – 12. *Przygoda B., Nadolna I.*: Charakterystyka wartości odżywczej pieczywa. *Przegląd Piekar. Cukiern.*, 1999; 1: 2-5. – 13. *Lebiedzińska A., Szefer P.*: Vitamins B in grain and cereal-grain food, soy products and seeds. *Food Chem.*, 2006; 95: 116-122. – 14. *Wawer I.*: Antocyjanidyny – struktura i działanie antyoksydacyjne. *Farm. Polska*, 2001; 57: 728-731. – 15. *Yamakoshi J., Saito M., Kataoka M., Kikuchi M.*: Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem. Toxicol.*, 2002; 40: 599-607. – 16. *Gawęcki J., Hryniewiecki L.*: Żywnienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004. – 17. *Bombardelli E., Morazzoni P.*: *Vitis vinifera* L. *Fitoterapia*, 1995; 64: 291-317. – 18. *Lutomski J., Mścisz A.*: Znaczenie prewencyjne związków polifenolowych zawartych w winogronach. *Postępy Fitoterapii*, 2003; 10: 1-5. – 19. *Quettier-Deleu Ch., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J.C., Bailleul F., Trotin F.*: Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.*, 2000; 72: 35-42. – 20. *Ziemiański Ś.*: Normy żywienia człowieka. Fizjologiczne podstawy, PZWL, Warszawa 2001.

Adres: 80-416 Gdańsk, Al. Gen. Hallera 107.

*Ewa Bartkowiak-Fludra, Aldona Jasińska-Stepniak,
Marek Gogolewski, Bogusz Delbowski*

ZMIANY SIŁY REDUKUJĄCEJ
I ZDOLNOŚCI WYGASZANIA WOLNYCH RODNIKÓW
W WYBRANYCH OLEJACH TŁOCZONYCH NA ZIMNO
W CZASIE ICH PRZECHOWYWANIA

Katedra Biochemii i Analizy Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. *J.R. Warchałewski*

W pracy badano rozkład substancji natywnych decydujących o stabilności oksydatywnej olejów – lnianego, konopnego i rzepakowego – tłoczonych na zimno. Próbki olejów przechowywano w temp. 20°C. Zaawansowanie autooksydacji określano liczbą nagromadzonych nadtlenuków w olejach. Oznaczano zawartość tokoferoli, siłę redukującą oraz liczbę zmiatanych rodników DPPH.*

Hasła kluczowe: oleje roślinne tłoczone na zimno, tokoferole, siła redukująca, wolne rodniki.

Key words: cold pressed vegetable oils, tocopherols, power reduction, free radicals.

Tłuszcze są nietrwałymi składnikami żywności ulegającymi różnym zmianom podczas przechowywania i obróbki termicznej (1). Oferta handlowa obejmuje wiele rodzajów olejów roślinnych, które zalecane są jako dodatki do potraw lub tłuszcze smażalnicze (2). O trwałości konsumpcyjnej i jakości oleju decyduje sposób jego produkcji. Rafinacja oleju surowego, w tym odśluzowanie, odkwaszanie, dezodoryzacja, a także uwodornienie mogą być przyczyną ubytku związków witamino-E aktywnych nawet do 40% ich początkowej zawartości, zmian izomeryzacyjnych kwasów polienasyconych (3).

Oleje roślinne uzyskane z nasion tłoczonych na zimno charakteryzują się krótszym okresem przydatności do spożycia, ale ich wartość odżywcza jest wyższa, a związki biologicznie czynne, w tym fosfolipidy, karotenoidy, tokoferole występują w większych ilościach (4, 5, 6).

Czynniki przyspieszające zmianę smaku i zapachu tłuszczu to m.in. enzymy obecne w surowcach i enzymy wytwarzane przez drobnoustroje, rozwijające się w produktach spożywczych, temperatura, światło, zanieczyszczenia śladowymi ilościami metali (żelaza, miedzi), barwniki – np. chlorofil, a także obecność wody (7).

Jełczenie oksydatywne (utlenianie kwasów tłuszczowych bez udziału enzymów) obejmuje przemiany tłuszczów wynikające z ich reakcji z tlenem atmosferycznym. Rozpoczęty proces autooksydacji jest trudny do zahamowania z uwagi na po-

wstające rodniki i nadtlutki kwasów tłuszczowych, które dalej ulegają rozpadowi (8).

W efekcie tych przemian obniża się wartość odżywcza tłuszczu, maleje ilość NNKT, prowitamin, witamin i związków biologicznie czynnych. Ponadto w wielu pracach wykazano szkodliwe działanie wolnych rodników na organizm człowieka, które może prowadzić do rozwoju nowotworów.

Badanie tłuszczów pod kątem obecności w nich produktów autooksydacji ma na celu określenie ich podatności na utlenianie podczas przechowywania.

Ustalenie odpowiedniego stężenia przeciwutleniaczy w próbce pozwala na skuteczną ochronę tłuszczu przed destrukcją. W tym celu przeprowadza się testy stabilności tłuszczu, oznacza procent zmiatania wolnych rodników 1,1-difenyl-2-pikrylohydrazylowych (DPPH⁺), a także siłę redukującą układu badanego (9, 10).

Najbardziej znanymi i szeroko stosowanymi przeciwutleniaczami są tokoferole, a także karotenoidy, kwas askorbinowy lub syntetyczny BHT i BHA (butylohydroksytoluen i butylohydroksyanizol) (11, 12, 13).

MATERIAŁ I METODY

Materiałem badawczym były oleje roślinne tłoczone na zimno firmy Gal – Specjalistyczne Przedsiębiorstwo Rolno-Przetwórcze, Poznań: olej lniany, konopny oraz rzepakowy. Użyte w pracy odczynniki chemiczne odpowiadały wymogom analitycznym stosowanych metod.

Próbki olejów termostatowano w temp. 20°C i okresowo badano liczbę nadtlenującą (ISO 3960).

Zawartość tokoferoli w olejach określano stosując wysokosprawną kolumnową chromatografię cieczową, po uprzednim zmydleniu prób (60% KOH, pirogalol, alkohol etylowy) i ekstrakcji eterem etylowym.

Aparat HPLC (Waters 600) wyposażony był w pompę gradientu fazy ruchomej i kolumnę LiChrosorb Si60 (250 × 5 mm; 5 μm). Fazę ruchomą stanowił *n*-heksan z 1,4 dioksanem (97 : 3 v/v) o szybkości przepływu 1,5 cm³/min. Stosowano detektor fluorymetryczny (Waters 474) przy wzbudzeniu λ = 290 nm i emisji λ = 330 nm. Zawartość poszczególnych homologów tokoferoli obliczono na podstawie krzywych kalibracji wykonanych dla standardów tokoferoli.

Oznaczanie zmiatania wolnych rodników DPPH⁺ wykonano wg metody, która polega na spektrofotometrycznym pomiarze zmiany intensywności barwy roztworu w zależności od ilości wolnych rodników DPPH⁺ (14).

Oznaczono siłę redukującą próbek olejów z zastosowaniem żelazicyjanku potasu, która polegała na spektrofotometrycznym pomiarze zmiany barwy roztworu, której intensywność jest proporcjonalna do siły redukującej badanego układu (wartość absorbancji mierzona przy λ = 700 nm) (15).

Badania prowadzono dla próbek olejów, których wartość liczby nadtlenującej wynosiła ok. 0, 2, 5 i 10.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W olejach okresowo oznaczano liczbę nadtlenującą (LOO) oraz zawartość tokoferoli (tab. I).

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że najbogatszy w związki witaminy E aktywne okazał się tłoczony na zimno olej rzepakowy, który zawierał w sumie ok. 64 mg/100 g (w tym 32,5 mg α-T, 26,7 mg γ-T i 4,45 mg δ-T), natomiast olej z nasion konopi ok. 56 mg/100 g (w tym 7,24 mg α-T, śladowe ilości homologu β, 45,04 mg γ-T i 3,59 mg δ-T), a z nasion lnu ponad 45 mg/100 g (w tym 28,4 mg γ-T i 17,10 mg δ-T).

Rozpad tokoferoli w czasie przechowywania olejów w temp. 20°C wzrastał znacznie po przekroczeniu wartości liczby nadtlenującej 2. Przy wartości LOO równej 10 rozpad poszczególnych homologów tokoferoli w przypadku oleju lnianego sięgał 90%, natomiast w oleju konopnym i rzepakowym zmiany degradacyjne kształtowały się na poziomie od 50 do 60%.

Tabela I
Rozpad tokoferoli w czasie przechowywania olejów w temp. 20°C

Table I
Disintegration of tocopherols during storage of oils at 20°C

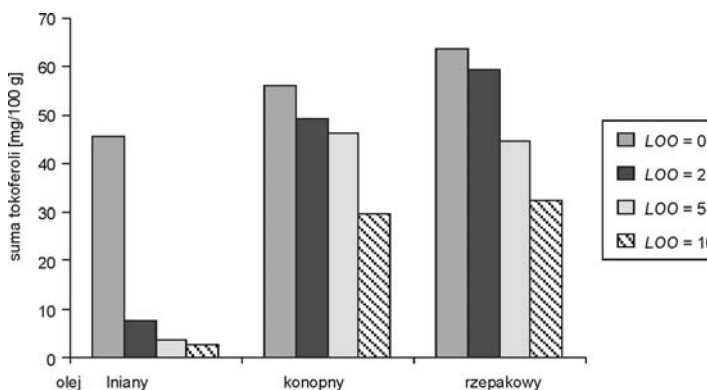
Olej	LOO	Tokoferol (mg/100 g)				% rozpadu tokoferolu				Suma	%
		α	%	β	%	γ	%	δ	%		
Olej z nasion lnu	0,55	-	-	-	-	28,40	0,00	17,10	0,00	45,50	0,00
	1,97	-	-	-	-	5,13	81,90	2,52	85,26	7,65	83,18
	5,08	-	-	-	-	2,28	91,90	1,39	91,87	3,67	91,93
	10,11	-	-	-	-	1,65	94,40	0,90	94,40	2,55	94,40
Olej z nasion konopi	0,47	7,24	0,00	-	-	45,04	0,00	3,59	0,00	55,97	0,00
	2,10	6,37	12,02	-	-	40,01	11,17	2,80	22,00	49,18	12,13
	4,90	6,23	13,95	-	-	38,20	15,19	1,90	47,07	46,33	17,22
	10,05	2,78	61,60	-	-	25,70	42,94	1,17	67,41	29,65	47,03
Olej z nasion rzepaku	0,33	32,50	0,00	-	-	26,70	0,00	4,45	0,00	63,65	0,00
	1,99	30,25	6,92	-	-	25,15	5,80	4,02	9,66	59,49	6,53
	5,06	22,71	30,12	-	-	18,24	31,68	3,54	20,45	44,49	30,19
	9,92	15,47	52,40	-	-	14,87	55,69	2,18	51,01	32,52	48,90

Oleje – konopny i rzepakowy charakteryzowały się podobnym czasem podatności na procesy autooksydacyjne. Liczbę nadtlenkową 10 osiągnęły w czasie ok. 80 dób za wyjątkiem próbek oleju z nasion lnu, które wartość tę uzyskały po dłuższym okresie czasu, tj. 94 dobach (z uwagi na skład homologiczny tokoferoli oraz kwasów tłuszczowych). Statystyczną korelację pomiędzy ilością tokoferoli, a wartością liczby nadtlenkowej podano w tab. II. Korelacja ta była istotna na poziomie $p < 0,01$ i wynosiła dla poszczególnych olejów ok. 0,9.

Tabela II
Statystyczna korelacja pomiędzy ilością tokoferoli (mg/100 g) a wartością liczby nadtlenkowej

Table II
Statistical correlation between tocopherol quantity of (mg/100 g) and peroxide value

Olej	Współczynnik determinacji r^2	Równanie regresji	Poziom istotności korelacyjnej
Z nasion lnu	0,8707	$y = 0,9988x^2 - 13,699x + 40,716$	$p < 0,01$
Z nasion konopi	0,9099	$y = -2,3854x + 55,466$	$p < 0,01$
Z nasion rzepaku	0,9685	$y = -3,5697x + 65,269$	$p < 0,01$



Ryc. 1. Zmiany zawartości tokoferoli w olejach w zależności od wartości liczby nadtlenkowej w czasie przechowywania prób.

Fig. 1. Changes in tocopherol concentrations in oils in relation to peroxide value.

Stwierdzono, że w zależności od indywidualnego składu przeciwutleniaczy w olejach siła zmiatania rodników DPPH⁺ była różna. Badano czas potrzebny do zmiatania 50% wolnych rodników. Najdłuższym czasem zmiatania charakteryzował się olej lniany (12 min.), natomiast olej z nasion rzepaku i konopi zmiatały 50% wolnych rodników w czasie odpowiednio 10 i 6 min. Porównanie dynamiki zmiatania rodników DPPH⁺ podano w tab. III, natomiast w tab. IV. podano statystyczną korelację pomiędzy zdolnością zmiatania wolnych rodników DPPH⁺, a wartością liczby nadtlenkowej.

Tabela III

Zmiany zdolności zmiatania wolnych rodników DPPH⁺ w zależności od wielkości liczby nadtlenkowej prób olejów

Table III

Changes in scavenging of DPPH⁺ free radicals in relation to peroxide value of sample oils

Olej	LOO	Czas zmiatania 50% DPPH ⁺ (min.)	Liczba zmiecionych rodników DPPH ⁺ (%)	Dynamizm zmian ilościowych DPPH ⁺ (%)
Z nasion lnny	0,55	12	52,3	100
	1,97		47,3	90,4
	5,08		41,6	79,5
	10,11		38,4	73,4
Z nasion konopi	0,47	6	51,4	100
	2,10		49,3	95,9
	4,90		43,0	83,6
	10,05		40,3	78,4
Z nasion rzepaku	0,33	10	60,0	100
	1,99		57,0	65,0
	5,06		56,0	93,3
	9,92		45,0	75,0

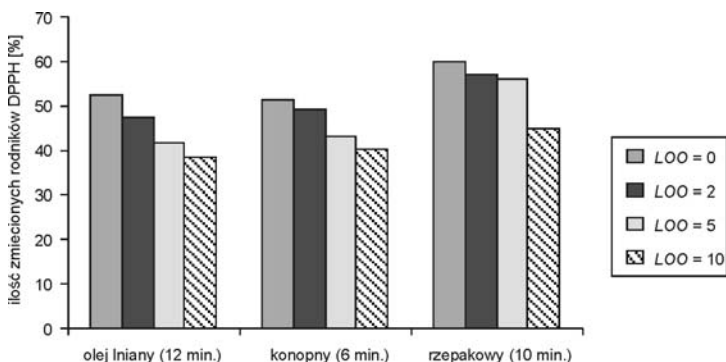
Tabela IV

Statystyczna korelacja pomiędzy zdolnością zmiatania wolnych rodników DPPH⁺ a wartością liczby nadtlenkowej

Table IV

Statistical correlation between scavenging of DPPH⁺ free radicals and peroxide value

Olej	Współczynnik determinacji r ²	Równanie regresji	Poziom istotności korelacyjnej
Z nasion lnny	0,8520	$y = -1,3227x + 49,976$	$p < 0,01$
Z nasion konopi	0,9341	$y = -1,1350x + 50,561$	$p < 0,01$
Z nasion rzepaku	0,9283	$y = -1,4282x + 60,645$	$p < 0,01$

Ryc. 2. Zmiany ilości zmiatania wolnych rodników DPPH⁺ w próbach olejów w zależności od wartości liczby nadtlenkowej.Fig. 2. Changes in the quantity of scavenged DPPH⁺ free radicals in relation to peroxide value of sample oils.

Analizując kolejny parametr – siłę redukującą układu – stwierdzono, że dla olejów świeżych jej wartość zmieniała się nieregularnie w czasie i nie korespondowała z wynikami zmiatania rodników DPPH⁺. W tab. V podano współczynniki korelacji ich istotność na poziomie $p < 0,01$ oraz równania krzywych korelacyjnych dla olejów świeżych zależnie od czasu zmian siły redukującej.

Stwierdzono, że dla olejów świeżych największą siłę redukującą posiadał olej konopny, dalej rzepakowy i lniany. Wraz z nasileniem procesów autooksydacyjnych wyrażonych poprzez wartość liczby nadtlenkowej siła redukująca układu obniżała się (tab. VI). Największy spadek potencjału redukcyjnego – poniżej 50% przy LOO ok. 10 zaobserwowano w oleju konopnym i z nasion lnu.

Tabela V
Statystyczna korelacja pomiędzy wielkością siły redukującej określonej dla przechowywanych prób a czasem jej zmian dla olejów świeżych

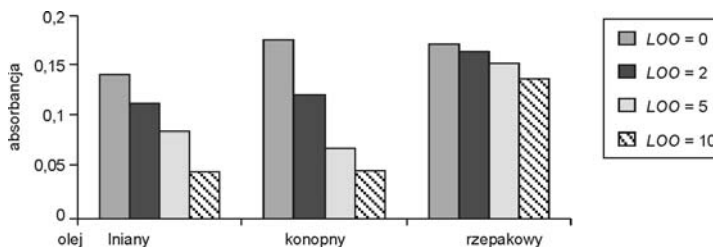
Table V
Statistical correlation between the reducing power determined for the stored samples and time to change for fresh oils

Olej	Współczynnik determinacji r^2	Równanie regresji	Poziom istotności korelacyjnej
Z nasion lnu	0,7348	$y = 0,0009x + 0,1320$	$p < 0,01$
Z nasion konopi	0,8862	$y = 0,0019x + 0,0975$	$p < 0,01$
Z nasion rzepaku	0,8216	$y = 0,0008x + 0,1790$	$p < 0,01$

Tabela VI
Wielkość siły redukującej w zależności od wartości liczby nadtlenkowej

Table VI
Reducing power in relation to peroxide value

Olej	LOO	Wartość absorbcjancji	Dynamizm zmian (%)
Z nasion lnu	0,55	0,141	100
	1,97	0,114	80,8
	5,08	0,084	59,6
	10,11	0,045	31,9
Z nasion konopi	0,47	0,121	100
	2,10	0,176	62,8
	4,90	0,069	57,0
	10,05	0,047	38,8
Z nasion rzepaku	0,33	0,172	100
	1,99	0,165	85,7
	5,06	0,151	78,6
	9,92	0,140	50,0



Ryc. 3. Zmiany siły redukującej w olejach mierzonej po 10 min. w zależności od wartości liczby nadtlenkowej.

Fig. 3. Changes in reducing power in the oils determined after 10 min. in relation to peroxide value.

Tabela VII
Statystyczna korelacja pomiędzy siłą redukującą a wartością liczby nadtlenkowej

Table VII
Statistical correlation between the power reducing and peroxide value

Olej	Współczynnik determinacji r^2	Równanie regresji	Poziom istotności korelacyjnej
Z nasion lnu	0,9442	$y = -0,0095x + 0,1316$	$p < 0,01$
Z nasion konopi	0,7137	$y = -0,0065x + 0,1045$	$p < 0,01$
Z nasion rzepaku	0,8789	$y = -0,0033x + 0,1697$	$p < 0,01$

W tab. VII przedstawiono współczynniki korelacji r , które były istotne na poziomie $p < 0,01$, a także równania korelacyjne pomiędzy zmiennymi obrazującymi stopień i wielkość siły redukującej w zależności od wartości liczby nadtlenkowej.

W aspekcie prowadzonych badań roślinnych olejów przechowywanych w temp. 20°C można stwierdzić, że najlepsze parametry stabilności oksydacyjnej wykazano dla próbek olejów z nasion rzepaku i z nasion konopi. Natomiast w przypadku oleju z nasion lnu zmiany oksydacyjne następowały szybciej, co związane jest ze składem kwasów tłuszczowych, gdzie dominującym jest kwas linolenowy, a także z ponad 80% rozpadem tokoferoli w próbkach, których w teście przechowalniczym wartość LOO wynosiła ok. 2.

Za właściwości przeciwutleniające oprócz związków witamino-E aktywnych odpowiada szereg innych związków naturalnie występujących w olejach, a wśród nich np. związki fenolowe, dlatego badane zmiany oksydacyjne olejów są wynikiem wypadkowej wszystkich substancji o charakterze antyoksydacyjnym.

WNIOSKI

1. Badano proces oksydacji trzech olejów roślinnych tłoczonych na zimno: z nasion lnu, konopi i rzepaku, które w teście przechowalniczym termostатовano w 20°C. Najbogatszy w związki witamino-E aktywne (najważniejsze natywne przeciwutleniacze triacylogliceroli) okazał się olej rzepakowy, następnie konopny i z nasion lnu.

2. Rozpad tokoferoli w czasie przechowywania prób olejów wzrastał znacznie po przekroczeniu wartości liczby nadtlenkowej 2. Podatność na procesy autooksydacyjne w przypadku oleju z nasion rzepaku i konopi była podobna, a dla oleju z nasion lnu (z uwagi na skład homologiczny tokoferoli) czas osiągnięcia przez próby liczby nadtlenkowej ok. 10 był dłuższy o 14 dób. Korelacja pomiędzy ilością tokoferoli, a wartością liczby nadtlenkowej była istotna na poziomie $p < 0,01$ i wynosiła dla poszczególnych olejów ok. 0,9.

3. Liczba zmiatania rodników DPPH⁺ w próbach olejów była różna w zależności od indywidualnych właściwości olejów oraz ilości przeciwutleniaczy i była statystycznie istotna ($p < 0,01$). Najdłuższym czasem zmiatania rodników DPPH⁺ charakteryzował się olej lniany (12 min.), natomiast olej z nasion rzepaku i konopi zmiatał 50% wolnych rodników w czasie odpowiednio 10 i 6 min.

4. Wykazano, że dla olejów świeżych największą siłą redukującą posiadał olej konopny, dalej rzepakowy i lniany. Wraz z nasileniem procesów autooksydacyjnych w przechowywanych próbach (LOO ok. 10) siła redukująca zmalała w przypadku oleju z nasion rzepaku do 50%, konopi 39%, a lnu 31%. Współczynniki korelacji pomiędzy zmiennymi obrazującymi stopień i wielkość siły redukującej były istotne na poziomie $p < 0,01$.

E. Bartkowiak-Fludra, A. Jasińska-Stepniak,
M. Gogolewski, B. Delbowski

CHANGES IN THE REDUCING POWER AND FREE-RADICAL SCAVENGING
ABILITY DURING STORAGE OF SELECTED
COLD-PRESSED VEGETABLE OILS

Summary

Distribution of native chemicals contributing to the oxidative stability of cold-pressed linseed, hempseed, and rapeseed oils was studied. Oil samples were stored at 20°C. The degree of autooxidation was expressed in terms of peroxide value. Tocopherols content, reducing power and the quantity of scavenged DPPH⁺ radicals were determined.

PIŚMIENNICTWO

1. *Niewiadomski H.*: Technologia tłuszczów jadalnych. WNT, Warszawa 1994. – 2. *Flaczyk E., Korczak J.*: Influence of selected factors on consumer behaviour on edible fats market. *Technologia Alimentaria*, 2002; 1(1): 113-120. – 3. *Gawęcki J.*: Prawda o tłuszczach. Instytut Danone – Fundacja Promocji Zdrowego Żywienia, Warszawa 1997. – 4. *Rotkiewicz D., Konopka I., Żylik S.*: Stan badań nad optymalizacją procesu przetwórstwa nasion rzepaku. *Rośliny Oleiste*, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Poznań 1999; 20(1): 150-158. – 5. *Krygier K., Wroniak M., Grzeszkowiak S., Obiedziński M.*: Badanie wpływu zawartości nasion uszkodzonych na jakość oleju rzepakowego tłoczonego na zimno. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, 2000; 21(2): 587-596. – 6. *Kania M., Michalak M., Gogolewski M., Hoffmann A.*: Antioxidative potential of substances contained in cold pressed soybean oil and after each phase of refining proces. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2004; 3(1), 113-121. – 7. *Warchalewski J.R.*: Enzymy w technologii żywności. Przeszłość, terażniejszość i przyszłość. Seria popularno-naukowa, PTTŻ – Oddział Wielkopolski, Poznań 1991; 1. – 8. *Bartosz G.*: Druga twarz tlenu. PWN, Warszawa 1995. – 9. *Espin J.C., Soler-Rivas C., Wichers H.J.*: Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.*, 2000; 48: 648-656. – 10. *Bondet V., Brand-Williams, Berset C.*: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] free radical method. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.* 1997; 30: 609-615.
11. *Han D., Yi O., Shin H.*: Solubilization of vitamin C in fish oil and synergistic effect with vitamin E in retarding oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1991; 68: 740-743. – 12. *Ho C.T., Chen C.W.*: Natural antioxidant from tea. In *Natural Antioxidant* AOCS Press Champaign, Illinois 1997; 213-223. – 13. *Lampi A.M., Kataja L., Eldin A.K., Vieno P.*: Antioxidant activities of α - and γ -tocopherols in the oxidation of rapeseed oil triacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999; 76: 749-755. – 14. *Yoshida T., Mori K., Hatano T., Okumara T., Komagoe K., Fujita Y., Okuda T.*: Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. Radical – scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* 1989; 37: 1919-1921. – 15. *Yen G.Ch., Chen H.Y.*: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutogenicity. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 27-32.

Adres: 60-623 Poznań, ul. Mazowiecka 48.

Urszula Skolimowska, Janusz Skolimowski¹⁾, Anna Wędzisz

**WPLYW KWERCETYNY
I KOMPLEKSU ETHOXYQUIN – KWERCETYNA
NA TRWAŁOŚĆ OLEJU WIESIOŁKOWEGO^{*)}**

Zakład Bromatologii Katedry Toksykologii i Bromatologii
Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. A. Wędzisz

¹⁾ Katedra Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. J. Zakrzewski

Prześlędzono wpływ ethoxyquinu (EQ), kwercetyny (Q) i kompleksu ethoxyquin-kwercetyna (EQ-Q) na proces utleniania oleju wiesiołkowego. Stwierdzono, że najskuteczniejszym przeciwutleniaczem spośród badanych jest kompleks EQ-Q.

Hasła kluczowe: olej wiesiołkowy, przeciwutleniacze, flawonoidy kwercetyna, ethoxyquin, peroksydacja lipidów.

Key words: oenothera paradoxa oil, antioxidants, quercetin, ethoxyquin, lipids peroxidation.

Flawonoidy to liczna grupa związków bardzo często spotykanych w świecie roślinnym. Z chemicznego punktu widzenia flawonoidy są pochodnymi 1,4-benzopironu. Różnią się one liczbą i położeniem podstawników w obydwu pierścieniach aromatycznych. Ponad sto flawonoidów oceniono jako związki o działaniu antymutagennym, przeciwzapalnym i przeciwnowotworowym. Wśród najlepiej zbadanych flawonoidów o działaniu antyrakowym znajduje się genisteina, norynginina, hesperydyna, nobiletyna, fisetyna, galangina, merycetyna, kamferol, chryzyna, apigenina, daidzeina i kwercetyna (1, 2, 3, 4).

Większość związków flawonoidowych występuje w roślinach w formie *O*-glikozydów, rzadziej *C*-glikozydów i ma część cukrową złożoną z 1 do 15 cząstek cukrów prostych. Składnikami cukrowymi mogą być: glukoza, galaktoza, ramnoza, arabinoza i kwas glukuronowy.

Kwercetyna jest najbardziej rozpowszechnionym flawonolem. Najczęściej spotykana jest w postaci glikozydów, choć często występuje również w postaci wolnej (5, 6).

U człowieka kwercetyna lepiej jest wchłaniania w postaci glikozydów niż jako sam aglikon (7). W testach *in vitro* łącznie z testem *Amesa* stwierdzono mutagenne właściwości kwercetyny, chociaż nie potwierdzono tego u myszy, nawet po

^{*)} Praca finansowana z funduszu prac statutowych 503-3045-2.

długotrwałym podawaniu tego związku (8). Kwercetyna poprzez hamowanie enzymu hialuronidazy, zmniejsza przepuszczalność naczyń krwionośnych. Hamuje enzym sulfatazę estronową, może więc działać antyestrogenie. Kwercetyna wykazuje również słabe działanie typu cytostatycznej winblastyny, tzn. hamuje polimeryzację mikrotubuli wrzeciona podziałowego komórki (9).

Kwercetyna zmniejsza stężenie lipidów w surowicy krwi, wywiera działanie łagodzące skutki napromieniowania stosowanego w leczeniu nowotworów. Wiele związków z tej grupy posiada właściwości antyoksydacyjne. Zalicza się do grupy tzw. „wymiataczy wolnych rodników”.

Korzystny wpływ kwercetyny na układ sercowo-naczyniowy wyraża się przeciwdziałaniem oksydacji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) przez wolne rodniki. LDL po oksydacji staje się prekursorem patologicznych zmian w ścianach tętnic, które są bezpośrednią przyczyną miażdżycy (10). Wykazuje też działanie antyagregacyjne, przeciwzapalne, hipoglikemiczne i ochronne dla wątroby, posiada zdolność do tworzenia kompleksów z metalami oraz skutecznie blokuje wolne rodniki nadtlenkowe (11, 12, 13).

Flawonoidy obecne w żywności należą do tych substancji nieodżywczych, które mogą działać prewencyjnie w stosunku do innych składników pożywienia, jak również profilaktycznie i leczniczo w niektórych chorobach, jak np. nowotwory, czy miażdżycę. Ochronne działanie flawonoidów na wit. C polega na zwiększeniu jej właściwości przeciwskorbutowych. Mechanizm tego działania wynika przypuszczalnie z antyoksydacyjnego charakteru flawonoidów, co przeciwdziała utlenieniu kwasu askorbinowego do kwasu szczawowego. Poprzez zdolność tworzenia chelatów z metalami stanowiącymi składniki enzymów rozkładających tę witaminę (głównie z miedzią), stabilizują jej zawartość w organizmie chroniąc przed działaniem wolnych rodników (14, 15, 16, 17).

W celu uzyskania związków o większej aktywności biologicznej od bioflawonoidów wprowadzono do podstawowego układu flawonu różne podstawniki pozwalające oczekiwać zwiększonych lub nowych efektów terapeutycznych.

Dla zabezpieczenia żywności przed utlenieniem i procesami peroksydacji w czasie przechowywania nie zawsze jednak wystarczy obecność naturalnych przeciwutleniaczy. Obok powszechnie używanych syntetycznych przeciwutleniaczy, jak butylohydroksyanizol (BHA) i butylohydroksytoluen (BHT) używany jest również ethoxyquin (EQ). EQ jest silnym inhibitorem peroksydacji lipidów i silnym antyoksydantem poprzez zdolność wymiatania wolnych rodników tlenowych. Jego ochronne działanie polega na zabezpieczeniu pokarmów przed zepsuciem, jęłczeniem i utratą zabarwienia (18, 19). Niestety ethoxyquin nie jest związkiem obojętnym dla zdrowia. Stosowany w większych ilościach może kumulować się w tkance tłuszczowej, wątrobie, nerkach powodując uszkodzenia DNA komórek (20, 21). Ponieważ ethoxyquin jest bardzo dobrym przeciwutleniaczem poszukiwane są wciąż nowe jego połączenia chemiczne o mniejszej toksyczności. Jednym z nich jest kompleks ethoxyquin-kwercetyna (EQ-Q).

Celem pracy było sprawdzenie właściwości przeciwutleniających nowego, nie opisanego w piśmiennictwie kompleksu ethoxyquin-kwercetyna (EQ-Q).

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły:

1. świeżo tłoczony olej z nasion wiesiołka – (Agropharm);
2. ethoxyquin (EQ) – (Fluka);
3. kwercetyna (Q) – (Merck);
4. kompleks ethoxyquin-kwercetyna (EQ-Q) zsyntetyzowany w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego.

Zakres badań analitycznych obejmował oznaczanie:

- liczby jodowej (L.J.) wg PN-70/A-86914;
- liczby nadtlencowej (L. Lea) wg PN-84/A-86918;
- liczby kwasowej (L.K.) wg PN-60/A-86921;
- liczby anizydynowej (L.A.) wg PN-93/A-86926;
- współczynnika Totox, jako $4 \cdot L. Lea + L.A.$;
- obecności aldehydu epihydrynowego (próba Kreisa) wg PN-60/A-86924.

Badano olej świeży oraz olej, do którego dodano EQ i Q w ilości 0,1% oraz EQ-Q w ilościach 0,01; 0,05 i 0,1%. Proces peroksydacji lipidów przyspieszono za pomocą promieni UV o dł. ~250 nm. Oznaczono parametry wskaźnikowe po 0, 3, 6, 9, 24 i 48 godz. naświetlania.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Olej wiesiołkowy ze względu na dużą zawartość kwasu linolowego ok. 70% i γ -linolenowego ok. 10% bardzo łatwo ulega procesowi utlenienia (22, 23).

W celu prześledzenia procesu jełczenia oleju oznaczano: liczbę jodową (L.J.), liczbę kwasową (L.K.), liczbę nadtlencową (L.Lea), liczbę anizydynową (L.A.), wskaźnik Totox oraz obecność aldehydu epihydrynowego.

Badany olej odznaczał się następującymi parametrami: L.J.-160; L.K.-1,4; L.Lea-5; L.A.-1,9; wskaźnik Totox-22; nie stwierdzono obecności aldehydu epihydrynowego (tab. I).

Próbki oleju czystego i z dodatkiem 0,1% EQ, 0,1% Q, 0,01% EQ-Q, 0,05% EQ-Q, 0,1% EQ-Q naświetlano promieniami UV o dł. 250 nm. Łączny czas naświetlania wynosił 48 godz. Badano olej świeży, nie naświetlany i po 3, 6, 9, 24, 48 godz. ekspozycji na promieniowanie UV (tab. II – IV).

Tabela I
Parametry wskaźnikowe dla oleju wiesiołkowego naświetlanego promieniami UV ($\bar{x} \pm SD$)

Table I
Indicator values for *Oenothera paradoxa* oil following UV irradiation ($\bar{x} \pm SD$)

Lp.	Czas naświetlania promieniami UV (godz.)	Liczba jodowa	Liczba kwasowa	Liczba Lea	Liczba anizydynowa	Wskaźnik Totox	Obecność aldehydu epihydrynowego
1	0	160±0,5	1,4±0,0	5,0±0,2	1,9±0,0	22	–
2	3	160±0,6	1,4±0,0	7,0±0,0	3,3±0,1	31	+/-
3	6	159±0,5	1,6±0,0	10,0±0,1	6,0±0,1	46	+
4	9	158±0,8	1,6±0,0	14,0±0,0	7,7±0,3	64	2+
5	24	155±0,3	1,7±0,0	32,0±0,6	24,0±0,2	152	3+
6	48	154±0,4	1,9±0,0	80,0±0,4	71,3±0,5	391	5+

Liczba jodowa w czasie naświetlania uległa nieznacznemu zmniejszeniu, najwięcej dla oleju czystego o 3,75%, najmniej dla oleju z 0,1% EQ-Q tj. o 1,2%.

Liczba kwasowa dla oleju czystego wzrosła po 48 godz. o 35,7%, najwięcej bo o 130% wzrosła dla oleju z 0,1% Q, a najmniej z dodatkiem 0,05 i 0,1% EQ-Q tj. o 13,3%.

Największy przyrost wartości liczby nadtlenkowej zaobserwowano dla oleju z kwercetyną – 30-krotny, dla oleju czystego – 18-krotny, a dla 0,1% EQ-Q i EQ – 4-krotny.

Zawartość aldehydu epihydrynowego kształtowała się podobnie w próbkach oleju czystego i z kwercetyną (+5 po 48 godz.). Nieco mniej przybywało go w próbkach z 0,01 i 0,05 EQ-Q (+3 po 48 godz.), następnie w oleju z 0,1EQ, a najmniej po 48 godz. było go w oleju z 0,1% EQ-Q, gdzie do 9 godz. naświetlania nie stwierdzono obecności aldehydu epihydrynowego.

Tabela II
Parametry wskaźnikowe dla oleju wiesiołkowego z dodatkiem 0,1% EQ
naświetlanego promieniami UV ($\bar{x} \pm SD$)

Table II
Indicator values for *Oenothera paradoxa* oil with added 0,1% EQ following UV irradiation ($\bar{x} \pm SD$)

Lp.	Czas naświetlania promieniami UV (godz.)	Liczba jodowa	Liczba kwasowa	Liczba Lea	Liczba anizydynowa	Wskaźnik Totox	Obecność aldehydu epihydrynowego
1	0	160±0,4	1,2±0,0	3,0±0,1	0,2±0,0	12	–
2	3	160±0,2	1,3±0,0	3,1±0,3	0,2±0,0	13	–
3	6	159±0,1	1,3±0,0	4,1±0,2	0,4±0,1	17	+/-
4	9	158±0,4	1,4±0,0	6,0±0,1	0,5±0,1	25	+/-
5	24	155±0,2	1,4±0,0	9,4±0,3	5,0±0,3	43	+
6	48	154±0,4	1,5±0,0	13,2±0,3	13,2±0,4	66	+

Biorąc pod uwagę liczbę anizydynową najlepsze właściwości przeciwutleniające stwierdzono w przypadku 0,1% EQ w oleju, dla którego wartość L.A. po 48 h naświetlania wynosiła 13,2, i 0,1% roztwór EQ-Q, dla którego wartość L.A. wynosiła 38,7. Największa wartość liczby anizydynowej 72,3, a więc największe zmiany wtórne prowadzące do rozkładu nadtlenków zaobserwowano po 48 godz. w oleju czystym.

Najmniejszą bezwzględną wartość wskaźnika Totox zaobserwowano po 48 godz. naświetlania dla oleju z zawartością 0,1% EQ-Q (56) i dla 0,1% EQ (65), największą dla oleju czystego (391) i z kwercetyną (405).

Tabela III
Parametry wskaźnikowe dla oleju wiesiołkowego z dodatkiem 0,1% Q
naświetlanego promieniami UV ($\bar{x} \pm SD$)

Table III
Indicator values for *Oenothera paradoxa* oil with added 0,1% Q following UV irradiation ($\bar{x} \pm SD$)

Lp.	Czas naświetlania promieniami UV (godz.)	Liczba jodowa	Liczba kwasowa	Liczba Lea	Liczba anizydynowa	Wskaźnik Totox	Obecność aldehydu epihydrynowego
1	0	157±0,3	1,0±0,0	3,0±0,0	5,3±0,1	17	–
2	3	157±0,5	1,2±0,0	8,1±0,1	6,4±0,2	38	+/-
3	6	157±0,3	1,7±0,0	9,0±0,2	8,8±0,2	45	+
4	9	157±0,2	1,9±0,0	10,1±0,2	10,0±0,4	50	2+
5	24	157±0,2	2,0±0,0	36,2±0,3	21,5±0,1	166	3+
6	48	152±0,2	2,3±0,0	88,9±0,2	49,4±0,3	405	5+

Z danych piśmiennictwa wiadomo, że kwercetyna pełni rolę przeciwutleniacza. Zastosowane stężenie 0,1% okazało się prooksydatywne. Jest to dowód, jak istotną sprawą jest dobór odpowiedniej ilości przeciwutleniacza.

Kompleks EQ-Q w stęż. 0,1% okazał się skutecznym przeciwutleniaczem. Czysty ethoxyquin bardzo łatwo utlenia się. W kompleksie z kwercetyną tworzy związek stabilniejszy. Kwercetyna, jako silny przeciwutleniacz hamuje powstawanie wolnych rodników. Ethoxyquin stabilizuje i konserwuje tłuszcz.

Tabela IV
Parametry wskaźnikowe dla oleju wiesiołkowego z dodatkiem EQ-Q naświetlanego promieniami UV ($\bar{x} \pm SD$)

Table IV
Indicator values for *Oenothera paradoxa* oil with added EQ-Q following UV irradiation ($\bar{x} \pm SD$)

Czas naświetlania promieniami UV (godz.)	Stężenie %	Liczba jodowa	Liczba kwasowa	Liczba Lea	Liczba anizydynowa	Wskaźnik Totox	Obecność aldehydu epihydrynowego
0	0,01	160±0,6	1,4±0,0	5,1±0,3	1,6±0,0	22	-
	0,05	160±0,4	1,5±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	15	-
	0,1	159±0,8	1,5±0,0	0,0±0,0	3,2±0,0	3	-
3	0,01	160±0,5	1,4±0,0	7,0±0,2	2,8±0,1	31	+/-
	0,05	160±0,5	1,5±0,0	3,0±0,1	5,1±0,2	17	+/-
	0,1	159±0,7	1,5±0,0	0,0±0,0	4,3±0,0	4	-
6	0,01	160±0,9	1,4±0,0	8,0±0,1	5,2±0,0	37	+
	0,05	160±0,4	1,5±0,0	4,2±0,1	6,4±0,1	23	+/-
	0,1	159±0,7	1,5±0,0	0,0±0,0	4,7±0,1	5	+/-
9	0,01	159±0,9	1,4±0,0	12,0±0,3	7,6±0,4	56	2+
	0,05	159±1,1	1,5±0,0	6,0±0,2	7,0±0,2	31	+
	0,1	159±0,3	1,5±0,0	0,4±0,0	5,0±0,1	7	+/-
24	0,01	155±0,5	1,5±0,0	32,2±0,3	24,0±0,2	152	3+
	0,05	158±0,6	1,6±0,0	23,0±0,2	12,1±0,2	104	2+
	0,1	159±0,8	1,7±0,0	3,2±0,2	10,2±0,2	23	+
48	0,01	154±0,7	1,6±0,0	80,0±0,7	62,1±0,4	382	3+
	0,05	158±0,8	1,7±0,0	75,0±0,9	35,6±0,2	335	3+
	0,1	158±0,5	1,7±0,0	4,2±0,5	38,7±0,7	56	+

Kwercetyna, która jest rozpuszczalna w wodzie i w etanolu, działa przede wszystkim w środowisku wodnym komórek i między komórkami poza substancjami tłuszczowymi błon komórkowych. W połączeniu kwercetyny z EQ – który jest związkiem bardzo dobrze rozpuszczalnym w tłuszczach może pełnić funkcje przeciwutleniające w środowisku lipidów.

Otrzymane wyniki zachęcają do dalszych badań nad EQ-Q. Stwierdzono jego dużą aktywność przeciwutleniającą.

U. Skolimowska, J. Skolimowski, A. Wędzisz

EFFECT OF COMPLEX ETHOXYQUIN-QUERCETIN ON THE STABILITY OF OENOTHERA PARADOXA OIL

Summary

The aim of this work was to assess the antioxidant activity of the complex ethoxyquin-querctin (EQ-Q) and to compare the activities of the ethoxyquin and quercetin. The tested material was the evening primrose oil. The peroxidation reaction was UV-stimulated. The intensity of the process of oil deterioration was assessed from the following indices: iodine, peroxide, anisidine and Totox values, epihydrene aldehyde content. The examined compounds were found to behave as antioxidants at concentration EQ and Q – 0,1%, EQ-Q 0,01 – 0,05 – 0,1%. The strongest effect was observed for the EQ-Q.

PIŚMIENNICTWO

1. *Ball S.*: Naturalne substancje przeciwnowotworowe. Medyk, Warszawa, 2000. – 2. *Calomme M., Pieters L., Vlietinck A., Vanden Berghe D.*: Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. *Planta Medica*, 1996; 62: 222-226. – 3. *Kuo S.M.*: Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett.*, 1996; 110: 41-48. – 4. *Tahara S., Ingham J.L.*: Simple flavones possessing complex biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2000; 22: 457-505. – 5. *Czczot H.*: Flawonoidy – naturalne oksydanty w naszej diecie. *Żyw. Człow. I Metabol.*, 2000; 27(4): 372-379. – 6. *Malińska D., Kiersztan A.*: Flawonoidy – charakterystyka i znaczenie w terapii. *Post. Bioch.*, 2004; 50(2): 182-196. – 7. *Williamson G., Plumb G.W., Uda Y., Price K.R., Rhodes M.*: Diatery quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinine reductase in Hepatic cells. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1385-2387. – 8. *Mitscher L.A., Telikepalli H., Mc Ghee E., Shankel D.M.*: Natural antimutagenic agents. *Mutat. Res.* 1996; 350: 143-152. – 9. *Takagi T., Tekekoshi S., Okabe T., Nagata H., Honda T., Watanabe K.*: Quercetin a flavonol, promotes disassembly of microtubules in prostate cancer cells: possible mechanism of its antitumor activity. *Acta Histochem. Cytochem.* 1998; 31: 435-445. – 10. *Grajek W.*: Rola przeciwutleniaczy w zmniejszaniu ryzyka wystąpienia nowotworów i chorób układu krążenia. *Żywność*, 2004; 1(38): 3-11.
11. *Frankel E.N.*: Ford antioxidants and phytochemicals: prezent and future perspectives. *Fett/Lipid* 1999; 101(12): 450-455. – 12. *Rietjes I.M.C.M., Boersma M.G., L. de Haan Spenkelink B., Awad H.M., Cnubben N.H.P., van Zanden J.J., van der Woude H., Alink G.M., Koeman J.H.*: The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2002; 11: 321-333. – 13. *Kaneko T., Baba N.*: Protective effect of flavonoids on endothelial cells against linoleic acid hydroperoxide induced toxicity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999; 63(2): 323-328. – 14. *Halliwel B.*: Antioxidants in human health and disease, *Annu. Rev. Nutr.* 1996, 16: 33-50. – 15. *Robak J., Gryglewski L.J.*: Bioactivity of flavonoids, *Pol. J. Pharmacol.*, 1996; 48: 555-564. – 16. *Arrora A., Nair M.*: Structure – activity relationship for antioxidant activities of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology & Medicine.*, 1988; 24 (9): 1355-1363. – 17. *Ishige K., Schubert D., Sagara Y.*: Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms: *Free Radical Biology & Medicine.*, 2001; 4(30): 433-446. – 18. <http://www.theaviary.com/ethoxy.shtml>. – 19. <http://www.avianweb.com/ethoxyquin.htm>. – 20. *Renner H.W.*: Antimutagenic effect of antioxidant in mammals. *Mutat Res.* 1984; 135: 125-129.
21. *Burka L., Sanders J.M., Matthews M.B.*: Comparative metabolism and disposition of ethoxyquin in rat and mouse. *II Metabolism. Xenobiotica*: 1996; 26 (6): 597-611. – 22. *Lamer-Zarawska E., Hojden B.*: Nasiona wiesiołka – morfologia, skład chemiczny i zastosowanie. *Wiadomości Zielarskie*, 1991; 4: 4. – 23. *Lamer-Zarawska E.*: Właściwości lecznicze oleju wiesiołkowego. *Wiadomości Zielarskie*, 1996; 2: 6-7.

Adres: 90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 1.

Jaroslawa Rutkowska, Anna Żbikowska¹⁾

ZMIANY OKSYDACYJNE ZACHODZĄCE W MARGARYNACH PŁYNNYCH PODCZAS PIECZENIA I PRZECHOWYWANIA ZAMROŻONYCH CIAST BISZKOPTOWO-TŁUSZCZOWYCH

Zakład Analizy i Oceny Jakości Żywności Szkoły Głównej
Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. inż. A. Stołyhwo

¹⁾ Zakład Technologii Tłuszczów i Koncentratów Szkoły Głównej
Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. K. Krygier

Celem pracy była ocena zmian oksydacyjnych zachodzących w wybranych margarynach płynnych oraz tłuszczach stałych stosowanych do produkcji ciast biszkoptowo-tłuszczowych przechowywanych w stanie zamrożenia. W tłuszczu świeżym oceniono również skład kwasów tłuszczowych oraz zawartość wody. Pieczenie i przechowywanie ciast biszkoptowo-tłuszczowych w stanie zamrożenia nie wpłynęło w znaczący sposób na wzrost pierwotnych produktów utlenienia oznaczanych metodą liczby nadtlenkowej. Stwierdzono zwiększenie zawartości liczby anizydynowej w tłuszczach wyekstrahowanych charakteryzujących się wyższymi zawartościami kwasu linolenowego.

Hasła kluczowe: margaryny płynne, ciasta biszkoptowo-tłuszczowe produkty utlenienia lipidów.

Key words: liquid margarines, sponge cakes, lipid peroxidation products.

Tłuszcze stanowią jeden z podstawowych składników w produkcji wyrobów ciastkarskich i ciast biszkoptowo-tłuszczowych. Wysoka zawartość tłuszczu w ciastach wpływa korzystnie na ich strukturę (1). Z tego powodu wyroby te są delikatniejsze od ciast kruchych, bardziej spoiste, a jednocześnie bardzo kruche, pulchne i rozsypujące się. Dodanie do biszkoptu tłuszczu nie tylko zwiększa wartość energetyczną wyrobów i poprawia smak, ale również hamuje procesy czerstwienia (2). W produkcji ciastkarskiej w tym produkcji ciast biszkoptowo-tłuszczowych stosowane są najczęściej tłuszcze stałe (3). Obok znanych zalet, mają również pewne niedoskonałości. Najpoważniejszą z nich jest to, że utwardzone tłuszcze roślinne stanowią najpoważniejsze źródło kontrowersyjnych izomerów *trans* (4, 5). W odróżnieniu od tłuszczów stałych, margaryny płynne są praktycznie pozbawione izomerów *trans* KT (6), ale z kolei zawierają znaczne ilości nienasyconych KT, które obniżają stabilność przeciwoksydacyjną tłuszczów płynnych. Tłuszcze należą do nietrwałych składników żywności. Podczas obróbki kulinarnej mogą ulegać różnym niekorzystnym zmianom takim, jak hydroliza triacylogliceroli oraz procesy utlenienia, polimeryzacji i cyklizacji nienasyconych kwasów tłuszczowych (7).

Celem pracy była ocena zmian oksydacyjnych zachodzących w wybranych margarynach płynnych oraz tłuszczach stałych zachodzących podczas pieczenia ciast biszkoptowo tłuszczowych oraz podczas przechowywania upieczonych wyrobów w stanie zamrożenia.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły tłuszcze świeże (przed wypiekiem) oraz tłuszcze wyekstrahowane z ciast biszkoptowo tłuszczowych (b-t). Były to margaryny płynne oznaczone jako L-1 (Rama Culinesse – Unilever), L-2 (Masmix Kulinary – Raisio), L-3 (Bolero – Olvit), L-4 (Jedyna – ZT Kruszwica). Porównawczo zastosowano również: masło (S-3) producenta Ciechanowska Spółdzielnia Mleczarska oraz cukiernicze produkty tłuszczowe przeznaczone do wypieku ciast „gąbczastych”: margaryna zwykła – S-1 i emulsja tłuszczowa Bułeczka – S-2 o obniżonej zawartości tłuszczu (40%) producenta ZT Kruszwica.

Ciasta b-t sporządzono wg metody tzw. „na zimno” (8). Proporcje zastosowanych składników wyglądały następująco: mąka pszenna 100 g, tłuszcz – 94 g, mąka ziemniaczana – 30 g, cukier puder – 90 g, jaja – 140 g, sok z cytryny – 10 g oraz proszek do pieczenia – 2 g. Ciasta pieczono w piekarniku konwekcyjnym (Electrolux AR 85). Metoda konwekcji wymuszona pozwoliła zarówno na skrócenie czasu wypieku do 45 min., jak i obniżenie temp. wypieku do 160°C. W metodzie tradycyjnej czas wypieku jest dłuższy o 15–20 min., a temp. wyższa o 10–15°C. Wykonano 7 serii pieczenia ciast. Po wypieku ciasta pakowano do folii polietylenowych i zamrożono. Ciasta przechowywano w czasie 8 mies. w temp. –24°C. Podczas wypieku przeprowadzono pomiar temperatury wewnątrz ciasta przy użyciu termopary.

Ekstrakcję tłuszczu z upieczonych i przechowywanych ciast przeprowadzono stosując mieszaninę: chloroform, metanol i wodę (1:2:0,8).

Do oceny stopnia oksydacji tłuszczów przed wypiekiem oraz tłuszczów wyekstrahowanych z przechowywanych ciast zastosowano następujące wskaźniki zawartości nadtlenuków wg PN-ISO 3960:1996 (23) oraz liczbę anizydynową wg PN-EN ISO – 6885:2001 (9, 24). Oznaczono również liczbę kwasową wg PN-ISO 660: 1998 (22). Oznaczenia w/w parametrów tłuszczów wykonano w trzech powtórzeniach.

Ponadto w tłuszczu przed wypiekiem oznaczono: zawartość substancji tłuszczowej (10). Przeprowadzono również analizę składu kwasów tłuszczowych (jakościową i ilościową) za pomocą chromatografii gazowej stosując chromatograf gazowy HP 6890. Estry metylowe przygotowano wg PN-ISO 5509 (11). Rozdział estrów przeprowadzono wg PN-ISO 5508 (12) na kolumnie kapilarnej dł. 100 m, pokrytej fazą stacjonarną CPO Sil 88 FAME (Chromapac, Anchem) średnicy wewnętrznej o grubości 0,25 µm. Gaz nośny – hel, przepływ stały 20 cm/s, temp. dozownika wynosiła 250°C. Detektor FID, całkowity czas analizy 64 min. Interpretację jakościową kwasów tłuszczowych przeprowadzono porównując czas retencji poszczególnych estrów metylowych kwasów tłuszczowych badanych próbek z czasami retencji estrów wzorcowych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

W tab. I przedstawiono grupy kwasów tłuszczowych w margarynach płynnych i tłuszczach stałych stosowanych do wypieku ciast.

W tłuszczach piekarskich ważną jest wysoka zawartość kwasów nasyconych – SFA zapewniająca im oporność na utlenianie. Największą zawartością SFA charakteryzowało się masło (60,83%). Również wysoką zawartością SFA wyróżniała się margaryna stała S-1 (49,28%). Natomiast margaryny płynne cechowała niższa zawartość SFA np. 9,25% (L-2), 9,32% (L-1) oraz 10,15% (L-4).

Jednakże w tłuszczach ciastkarskich oprócz zawartości tłuszczu ważny jest skład nasyconych kwasów tłuszczowych. Wysoka zawartość kwasu laurynowego (C 12:0) jest pożądana w tłuszczach ciastkarskich. Tłuszcze takie są odporne na utlenianie i dają dobre uwolnienie aromatów podczas topnienia (13). Analiza chromatograficzna skład KT margaryn płynnych wykazała śladowe ilości kwasu laurynowego tylko w margarynie L-3, pozostałe nie zawierały tego kwasu. Natomiast w tłuszczach stałych oznaczono odpowiednio: w S-1 7,79%, w S-2 2,19% oraz 2,85% w S-3 kwasu laurynowego (tab. I).

Tabela I
Zawartość wody i skład wybranych grup kwasów tłuszczowych w tłuszczach (%)

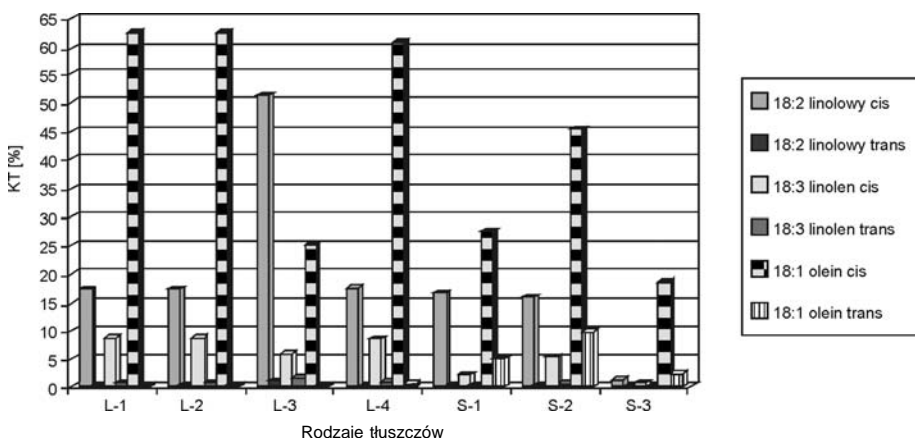
Table I
Water content and the proportions of selected fatty acid groups in the fats (%)

Rodzaj tłuszczu	Zaw. wody (%)	Kwasy tłuszczowe (%)			
		SFA	MUFA	PUFA	TRANS
Margaryny płynne					
L-1	19,00	9,32	65,11	25,57	1,11
L-2	16,44	9,25	65,13	25,62	1,18
L-3	29,53	17,89	25,56	56,55	2,75
L-4	29,12	10,15	64,19	25,66	1,24
Tłuszcze stałe					
S-1	20,00	44,60	24,20	18,51	5,44
S-2	60,02	25,60	13,20	20,99	10,31
S-3	17,50	69,60	25,10	2,75	2,55

Zawartość kwasów monoenowych – MUFA w tłuszczach roślinnych wynosiła od 26 do 65%. Wysoka zawartość kwasów MUFA jest raczej pożądana w tłuszczach piekarskich, ponieważ są one dość odporne na utlenianie (14).

Margaryny płynne wyróżniała wysoka zawartość kwasów polienowych – PUFA (di- i tri-nienasyconych: LA C18:2 i ALA C18:3) średnio ok. 25% (tab. I). W margarynie L-3 oznaczono aż 56,55% PUFA. Pozostałe stałe tłuszcze roślinne zawierały dość wysokie zawartości kwasów di- i tri-nienasyconych ok. 20%, masło charakteryzowało się najmniejszą zawartością PUFA – 2,75%. W trzech margarynach płynnych (L-1, L-2, L-4) oznaczono średnio 8,5% kwasu linolenowego – ALA. Zawartość tego kwasu istotnie różniła te tłuszcze od pozostałych tłuszczów stałych S-1, S-2, S-3 oraz margaryny płynnej L-3. Margarynę tę wyróżniała wysoka zawartość kwasu linolowego – LA (50,88%). W pozostałych tłuszczach roślinnych płynnych i stałych średnia zawartość kwasu C 18:2 wynosiła ok. 16% (ryc. 1).

Stwierdzono, że margaryny płynne zawierały znacznie mniej izomerów *trans* (TFA) niż tłuszcze stałe. Średnia zawartość TFA w margarynach płynnych wynosiła tylko 1,57% i w rozumieniu żywieniowym przemawiała na korzyść tych tłuszczów. Należy również zauważyć, że zawartość TFA w badanych roślinnych tłuszczach stałych była również niższa (5,44 i 10,31%) niż w roślinnych tłuszczach utwardzonych badanych przez innych autorów (4, 5). Izomery *trans* pochodziły głównie od kwasu



Ryc. 1. Zawartości izomerów cis i trans kwasów nienasyconych w badanych tłuszczach (%)

Fig. 1. Contents of unsaturated fatty acids cis and trans isomers in studied fats (%).

oleinowego (18:1 *trans*) (od 0,26 do 9,59%). Zawartość izomerów *trans* kwasu linolowego – LA była bardzo niska i wahała się od 0,20% (L-2) do 0,88% (L-3) (ryc. 1, tab. I).

Podsumowując skład KT badanych tłuszczów należy zauważyć, że margaryny płynne charakteryzowały się niższymi zawartościami nasyconych kwasów tłuszczowych. Trzy spośród czterech margaryn płynnych (L-1, L-2, L-4) w ogóle nie zawierały niekorzystnych żywieniowo kwasów: laurynowego i mirystynowego uznanych wraz z kwasem palmitynowym za hiperlipidemiczne, a mirystynowy za hipercholesterolemiczny (10, 15). Margaryny płynne charakteryzowały się wysoką zawartością MUFA, a w szczególności kwasu oleinowego – *cis* (ok. 61%). Jest to również aspekt pozytywny, ponieważ kwas oleinowy wykazuje korzystne działanie hipolipemiczne (obniża zarówno poziom cholesterolu, jak i LDL, natomiast nie obniża poziomu HDL) (10) oraz charakteryzuje się znacznie niższą podatnością na utlenianie niż kwasy polienowe (14). Niewątpliwą zaletą margaryn płynnych były najniższe zawartości kontrowersyjnych izomerów *trans* w porównaniu do badanych tłuszczów stałych.

Tabela II przedstawia wartości wskaźników utlenienia tłuszczów przed wypiekiem oraz tłuszczów wyekstrahowanych z ciast upieczonych i przechowywanych w stanie zmrożenia. Do wypieku zastosowano tłuszcze różniące się składem kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych, zawartością substancji tłuszczowej i w związku z tym o różnej podatności na zmiany oksydacyjne.

Tabela II
Wartości wskaźników utlenienia tłuszczów przed wypiekiem
oraz wyekstrahowanych z zamrożonych ciast

Table II
Values of the oxidation indices for fats before baking
and for the fats extracted after baking and refrigerated storage

Produkt	Liczba nadtlenkowa (mEq O/kg tłuszczu) $\bar{x} \pm SD$	Liczba anizydynowa $\bar{x} \pm SD$	Liczba kwasowa mg KOH/kg tłuszczu $\bar{x} \pm SD$
Margaryny płynne			
L-1	0,80±0,04	1,65±0,01	0,60±0,01
L-1 po wypieku	1,22±0,06	3,19±0,15	1,03±0,04
L-2	0,86±0,04	1,20±0,01	0,41±0,00
L-2 po wypieku	1,47±0,08	2,59±0,05	0,87±0,01
L-3	0,92±0,04	0,85±0,00	0,23±0,00
L-3 po wypieku	1,57±0,07	1,28±0,02	0,73±0,01
L-4	1,20±0,05	1,85±0,02	0,32±0,00
L-4 po wypieku	1,71±0,08	4,19±0,10	0,83±0,00
Tłuszcze stałe			
S-1	0,92±0,04	0,89±0,01	0,30±0,00
S-1 po wypieku	1,73±0,06	2,62±0,08	0,84±0,01
S-2	1,05±0,03	1,80±0,02	0,40±0,00
S-2 po wypieku	0,54±0,00	4,30±0,10	1,22±0,09
S-3	0,15±0,00	0,20±0,00	0,20±0,00
S-3 po wypieku	1,12±0,03	1,86±0,02	0,89±0,02

Temperatura mierzona we wnętrzu pieczonych ciast nie przekraczała 92°C. W tych warunkach spośród wielu procesów, jakie mogą zachodzić w tłuszczach ogrzewanych, ma miejsce autooksydacja (16). W procesach autooksydacji powstawać mogą związki o charakterze toksycznym. Związki te można podzielić na trzy grupy, tj. produkty utlenienia (np. nadtenki i hydronadtenki oraz aldehydy i ketony), produkty polimeryzacji oraz produkty cyklizacji (17).

Miernikiem pierwotnych produktów utlenienia tłuszczów jest liczba nadtlenkowa (LOO). Zawartość nadtenków w badanych margarynach płynnych przed wypiekiem oraz wyekstrahowanych z pieczonych

i mrożonych ciast mięciła się w zakresie od 0,80 do 1,71 mmoli tlenu aktywnego/kg tłuszczu (mEq O/kg) (tab. II).

Podobne niskie wartości liczby nadtlenkowej oznaczono w świeżych i wyekstrahowanych roślinnych tłuszczach stałych (S-1, S-2) od 0,54 do 1,73 mEq O/kg. Jednak najniższymi wartościami liczby nadtlenkowej charakteryzowało się masło (S-3). Liczby te nie przekraczały dopuszczalnych normami zawartości nadtlenków i wynoszących dla osnowy tłuszczowej margaryn nie więcej niż 4, a w maśle LOO nie może być większa od 10 mEq O/kg (18). Uzyskane w doświadczeniu wyniki pozwalają stwierdzić, podobnie jak w pracach innych autorów (16, 19), że zawartość pierwotnych produktów utlenienia zarówno w produkcji handlowym, jak i w tłuszczu wyekstrahowanym mięciła się w dopuszczalnych granicach (tab. II). Biorąc pod uwagę wyniki innych autorów (9, 16), którzy badali zawartość nadtlenków w produkcji świeżym i porównując je do uzyskanych w niniejszej pracy (produkt przechowywany), można stwierdzić, że przechowywanie ciasta biszkoptowo-tłuszczowego w temp. -24°C w czasie 8 mies. nie miało istotnego wpływu na wzrost liczby nadtlenkowej w produkcji przechowywanym (tab. II).

Wysoka temperatura podczas procesów kulinarnych przyspiesza rozkład nadtlenków i wodoronadtlenków nienasyconych KT. Liczba anizydynowa (AnV) jest stosowana do oceny stopnia utlenienia tłuszczu i określa zawartość wtórnych produktów oksydacji, głównie nienasyconych aldehydów, jako produktów rozkładu nadtlenków i hydronadtlenków (20). Liczba anizydynowa tłuszczu o dobrej jakości nie powinna przekraczać 3 (18). Stwierdzono podwyższone wartości liczby anizydynowej (LA) w aż trzech, spośród czterech badanych margaryn płynnych wyekstrahowanych z upieczonych i przechowywanych ciast: L-1 (3,19), L-2 (2,59) i L-4 (13, 21) oraz emulsji tłuszczowej S-2 (13). Te podwyższone wartości LA mogły być spowodowane wysoką zawartością PUFA nawet do 56% w tłuszczu wyjściowym, a w szczególności ALA-kwasu linolenowego. Zawartość ALA w tych tłuszczach wynosiła ok. 8,5%. Natomiast w tłuszczach roślinnych w których zawartość kwasu linolenowego była niższa (L-3 i S-1) nie stwierdzono tak dużego podwyższenia wartości AnV. Obserwacje te potwierdzają wcześniejsze badania nad mechanizmami utleniania poszczególnych kwasów tłuszczowych, które wykazały, że proces utleniania kwasów nienasyconych jest tym bardziej skomplikowany, im więcej wiązań podwójnych ma kwas (14). Stwierdzono, że wodoronadtlenki powstałe w wyniku utleniania kwasu linolenowego rozkładają się łatwiej niż te, które powstają przy utlenianiu kwasu oleinowego lub linolowego (7, 14), o czym świadczą podwyższone wartości AnV w pieczywach zawierających tłuszcze z większą ilością ALA. Stwierdzono, również podwyższenie wartości AnV w emulsji tłuszczowej S-2 (13), podczas gdy zawartość kwasu linolenowego była na średnim poziomie i wynosiła 5,24% (ryc. 1, tab. II).

W badanych tłuszczach stałych: masło i margaryny wartości te nie przekraczały 3.

Liczba kwasowa (LK) informuje o ilości wolnych kwasów tłuszczowych. Zgodnie z normą liczba kwasowa margaryn nie powinna przekraczać 1,5 mg KOH/kg produktu. We wszystkich świeżych tłuszczach roślinnych stałych i płynnych stosowanych do wypieku ciast nie stwierdzono przekroczenia tej wartości (0,23 do 0,84). Stwierdzono prawie dwukrotne podwyższenie wartości liczby kwasowej (od 0,73 do 1,03) w tłuszczach wyekstrahowanych z ciast pieczonych i przechowywanych charakteryzujących się zawartością wody od 16,44 do 29,53%. Zdecydowanie większy wzrost LK (z 0,40 do 1,42) stwierdzono w tłuszczu S-2 zawierającym najwięcej wody (60%) (tab. I i II). Stwierdzono, że procesy wypieku i przechowywania miały wpływ na podwyższenie wartości LK, szczególnie gdy dodatek tłuszczowy zawierał dużo wody.

WNIOSKI

1. Pieczenie i przechowywanie ciast biszkoptowo-tłuszczowych w stanie zamrożenia nie wpłynęło w znaczący sposób na wzrost pierwotnych produktów utlenienia.

2. Stwierdzono podwyższenie wtórnych produktów utlenienia w tłuszczach wyekstrahowanych z przechowywanych ciast charakteryzujących się wyższymi zawartościami kwasu linolenowego.

3. Margaryny płynne mogą być stosowane do wypieku ciast wysokotłuszczowych jakimi są ciasta biszkoptowo-tłuszczowe pod warunkiem, że w składzie kwasów tłuszczowych zawartość kwasu linolenowego będzie niska.

J. Rutkowska, A. Żbikowska

THE OXIDATIVE CHANGES IN LIQUID MARGARINES DURING BAKING
AND AFTER DEEP-FROZEN STORAGE OF SPONGE CAKES

Summary

The main objective of the work was the estimation of oxidative changes in liquid margarines and in selected solid fats during baking and after deep-frozen storage of sponge cakes. Fatty acid composition and water content of the fresh fats were assayed. Baking and deep-frozen storage processes did not significantly influence the up-growth of primary oxidation products as measured by the peroxide value. Higher anisidine values were found in the extracted fats containing higher levels of linolenic acid.

PIŚMIENNICTWO

1. *Rutkowska J., Neryng A.*: Wpływ zawartości fazy stałej i składu kwasów tłuszczowych margaryn na wybrane właściwości tekstury ciast biszkoptowo-tłuszczowych. *Inż. Roln.* 2001; 10(30). – 2. *Lewczuk J., Sobczyk M., Krygier K.*: Wykorzystanie margaryny płynnej w ciastkarstwie. *Przegl. Piek. Cuk.* 1998; 6: 22. – 3. *Krygier K.*: Podstawowa charakterystyka tłuszczów. *Przegl. Piek. Cuk.* 2003; 5: 6. – 4. *Balas J.*: Kwasy tłuszczowe w rynkowych produktach spożywczych. Cz. I. *Bezpieczna Żywność.* 2001; 1: 20-21. – 5. *Daniewski M., Mielniczuk E., Jacórzynski B., Pawlicka M., Balas J.*: Skład kwasów tłuszczowych w szczególności izomerów trans nienasyconych kwasów tłuszczowych w produktach spożywczych. *Żyw Człow. i Metab.* 1998; 2. – 6. *Krygier K.*: Ciekłe margaryny w produkcji ciastkarskiej i piekarskiej. *Przegl. Piek. Cuk.* 1998; 5: 20. – 7. *Frankel E.N.*: *Progress in lipid research* ed. Holman R. F. vol 19 Pergamon 1982 Press Oxford – New York. – 8. *Ambroziak Z.* (red.): *Ciastkarstwo także dla piekarzy. Receptury, normy, porady i przepisy prawne.* Wyd. Spółdzielcze, Warszawa, 1994; 25-27: 33, 45. – 9. *Drzewicka M., Biernat J.*: Ocena stopnia oksydacji i składu kwasów tłuszczowych w wyrobach ciastkarskich produkowanych przemysłowo. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2001; 2: 91-97. – 10. *Nestel P.*: Optimizing dietary fatty acids to prevent heart disease. *Proceedings of the 14th International Congress of Nutrition*, Seul 1989; 133.

11. PN-ISO 5509: Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych. 2000. – 12. PN-ISO 5508: Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej. 2000. – 13. *Bander R., Nauta J.*: Bakery fats and margarines. *Karlsruhams Technical Bulletins. Food Technology International Europe*, 1995; 97: 101. – 14. *Ziemiański Ś., Budzyńska-Topolowska J.*: Ocena żywieniowa tłuszczów utlenionych. *Przem. Spoż.* 1991; 4: 98-100. – 15. *Barytko-Pikielna N., Osucha A.*: Aktualne poglądy na żywieniową i profilaktyczną rolę kwasów tłuszczowych w żywieniu człowieka. *Przem. Spoż.*, 1990; 4: 88-91. – 16. *Regulska-Iłow B., Iłow R.*: Zmiany zachodzące w tłuszczach podczas pieczenia ciast drożdżowych metodą konwencjonalną i mikrofalową. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2000; 33(2): 119-124. – 17. *Gawęcki J., Hryniewiecki L.* (red): *Żywność Człowieka. Podstawy nauki o żywieniu.* Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 1998. – 18. PN-92A – 86907: Margaryna Wspólne wymagania i badania. – 19. *Drzewicka M.*: Zmiany oksydacyjne zachodzące w wybranych tłuszczach podczas pieczenia ciast kruchych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2001; 34: 199-203. – 20. *Jeżewska M.*: Wprowadzenie metody oznaczenia liczby anizydynowej i współczynnika Totox w olejach roślinnych i tłuszczach do krajowej praktyki laboratoryjnej. *Roczniki Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego.* 1991; 28: 108-117.

21. PN-A-86933. Tłuszcze roślinne jadalne. Metody badań. Określenie zawartości substancji tłuszczowej w margarynie. – 22. PN-ISO 660: Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce; 1998. Oznaczenie liczby kwasowej i kwasowości. – 23. PN-ISO 3960: Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczenie liczby nadlenkowej; 1996. – 24. EN ISO 6885 (2000). Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Oznaczenie liczby anizydynowej.

Adres: 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159 C.

*Anna Rzepecka-Stojko, Anna Kurek-Górecka,
Wojciech Kosiarski, Maria Wardas*

OCENA PROCESU STARZENIA SIĘ OLEJÓW JADALNYCH WZBOGACONYCH ANTYOKSYDANTAMI PODCZAS OBRÓBK TERMICZNEJ PRODUKTU WYSOKOBIAŁKOWEGO

Katedra i Zakład Żywności i Żywienia Wydziału Farmaceutycznego
Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
Kierownik: prof. dr hab. *M. Wardas*

Oceniano proces starzenia się wywołany działaniem przez określony czas podwyższonej temperatury w trzech olejach jadalnych: słonecznikowym, rzepakowym i oliwie z oliwek, suplementowanych β -karotenem oraz wpływ smażenia produktu bogatobiałkowego na zmiany zachodzące w tych olejach. Praca ta stanowi kontynuację badań dotyczących wpływu ogrzewania oraz smażenia produktu bogatobiałkowego na jakość wybranych olejów jadalnych.

Hasła kluczowe: oleje roślinne, β -karoten, utlenianie, ogrzewanie, smażenie.
Key words: vegetable oils, beta-carotene, oxidation, heating, frying.

Pojęciem tłuszczów określa się zarówno grupę produktów spożywczych, jak i składników pokarmowych. Do tłuszczów, jako produktów spożywczych należą oleje roślinne, szeroko wykorzystywane w dziedzinie kulinarnej preparatyki żywności (1, 2).

Oleje jadalne odznaczają się dużą zawartością tłuszczów prostych, zbudowanych z triacylogliceroli tj. estrów glicerolu i kwasów tłuszczowych (1). Wartość żywieniowa tłuszczów jadalnych uzależniona jest od składu występujących w nich kwasów tłuszczowych. Z punktu widzenia fizjologii żywienia najważniejszą rolę w organizmie człowieka pełnią wielonienasycone kwasy tłuszczowe, a zwłaszcza niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT), które nie są syntezowane w ustroju człowieka i muszą być dostarczone wraz z pożywieniem. Ze względu na konsekwencje działania niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych w organizmie człowieka odpowiednia ich podaż jest konieczna do rozwoju młodych organizmów, jak i utrzymania dobrego stanu zdrowia (2, 3, 4, 5).

Natomiast w żywności, różnorodność kwasów tłuszczowych, zarówno pod względem długości łańcucha, jak i stopnia nienasylenia w znacznym stopniu rzutuje na szybkość procesu psucia się tłuszczów (6, 7).

Kwasy tłuszczowe nienasycone mimo dużej wartości żywieniowej bardzo łatwo ulegają różnego rodzaju przemianom chemicznym, głównie procesom utleniania.

Proces utleniania przyspieszają i nasilają takie czynniki, jak: temperatura, światło, tlen atmosferyczny, jony niektórych metali i enzymy (6, 10).

Peroksydacja powoduje szereg niekorzystnych zmian, przyczyniając się do starzenia i pogorszenia właściwości odżywczych tłuszczów. Podczas tego procesu mogą powstawać związki toksyczne, zagrażające zdrowiu ludzi spożywających te produkty (7, 8, 9, 10).

Oleje jadalne są szeroko wykorzystywane w technologii żywności, głównie jako czynniki kontrolowanego przenoszenia ciepła w procesie smażenia (9).

Jakość tłuszczu smaźalniczego ma ogromne znaczenie żywieniowe, ulega on bowiem wchłanianiu przez produkt w nim obrabiany i jest z nim spożywany. Tłuszcz taki, powinien wykazywać się dużą trwałością, aby zmiany zachodzące w nim podczas obróbki termicznej produktu żywnościowego były niewielkie (11, 12).

Kluczową rolę w procesie autooksydacji tłuszczów odgrywa obecność przeciwutleniających.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania substancjami o właściwościach przeciwutleniających, zarówno naturalnymi, jak i syntetycznymi, które mogą hamować proces oksydacyjnego jełczenia tłuszczów. Na szczególną uwagę zasługują badania dotyczące zastosowania karotenoidów jako substancji przeciwutleniających.

Karotenoidy są pigmentami występującymi naturalnie w roślinach. Otrzymywane są również syntetycznie m.in. β -karoten i zostały dopuszczone do stosowania jako dodatek do żywności. Związki te, jako lipofilne antyoksydanty mogą wywierać wpływ na szybkość peroksydacji tłuszczów (13, 14). W produktach żywnościowych zawierających lipidy podatne na utlenianie, przemiany karotenoidów są związane z procesami utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Z uwagi na układ sprzężonych wiązań podwójnych występujący w β -karotenie, związek ten konkuruje w procesach utleniania z resztami wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. β -karoten wykazuje działanie antyoksydacyjne w tzw. pierwszej i drugiej linii obrony przed reaktywnymi formami tlenu. Hamuje on proces oksydacji zachodzący w kwasach tłuszczowych poprzez inaktywację tlenu singletowego, jak również wychwytuje wolne rodniki nadtlenkowe lipidów (13, 14, 15, 16).

Karotenoidy, wykazując właściwości antyoksydacyjne są związkami wrażliwymi na czynniki utleniające. Proces degradacji karotenoidów może prowadzić do powstania lotnych związków karbonylowych. Barwniki karotenoidowe uważane są jednak za względnie trwałe (10, 17, 18).

Celem badań była próba oceny procesu starzenia się wywołanego działaniem przez określony czas podwyższonej temperatury w wybranych trzech olejach jadalnych suplementowanych β -karotenem, jak również ocena wpływu smażenia produktu bogatobiałkowego na zmiany zachodzące w tych olejach.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły dostępne w handlu trzy rodzaje olejów roślinnych: olej słonecznikowy "Bartek" (rafinowany i wzbogacony witaminą E), olej rzepakowy „Kujawski” (rafinowany), oliwa z wytlóków oliwnych „Elisa”. Zakupione oleje zostały wzbogacone β -karotenem w roztworze olejowym. β -karoten otrzymano do badań z Zakładów Unilever Polska S.A. z Katowic. Oleje suplementowano dodając β -karoten w ilości 12 mg/100 g każdego oleju. Wszystkie badane oleje były w okresie przydatności do spożycia.

Analizę jakościową badanych olejów jadalnych przeprowadzono poprzez oznaczenie trzech parametrów: liczby kwasowej (LK), liczby nadtlenowej (LN), liczby jodowej (LJ).

Zakres badań obejmował:

- wykonanie oznaczeń wymienionych wyżej liczb w próbkach olejów nie poddanych działaniu temperatury, bezpośrednio po otwarciu pojemnika.
- wykonanie oznaczeń LK, LN, LJ w próbkach olejów suplementowanych β -karotenem nie poddanych działaniu temperatury.
- ogrzewanie w szklanych zlewkach w temp. 453°K przez okres 10, 30, 60 min. 300 cm³ próbek każdego z trzech rodzajów olejów suplementowanych β -karotenem i oznaczenie w nich LK, LN, LJ.
- smażenie do stanu jadalnego 20 g mięsa z kurczaka bez skórki w próbkach olejów suplementowanych β -karotenem, uprzednio ogrzewanych przez okres 10, 30, 60 min. i oznaczenie LK, LN, LJ.
- oznaczenie LK, LN, LJ w próbkach olejów suplementowanych β -karotenem ogrzewanych 60 min. i następnie przechowywanych przez 6 dni w temperaturze pokojowej.
- oznaczenie LK, LN, LJ w próbkach olejów suplementowanych β -karotenem, w których smażono 20 g mięsa z kurczaka bez skórki po uprzednim ogrzewaniu przez 60 min., które przechowywano przez 6 dni w temperaturze pokojowej.

Analizę jakościową każdego z olejów suplementowanych β -karotenem przeprowadzono na 3 próbkach, pobranych z 3 różnych pojemników, po jednej próbie z każdego pojemnika. Proces obróbki każdego oleju przeprowadzono 3-krotnie wykonując za każdym razem po trzy powtórzenia oznaczeń LK, LN, LJ. Przed oznaczeniem LK, LN, LJ próbki olejów były schładzane do temperatury pokojowej, w której wykonywano oznaczenia.

Liczbę kwasową (LK) oznaczono wg Farmakopei Polskiej V tom I 1990 r. Liczbę nadtlenkową (LN) oznaczano wg PN-ISO 3960 październik 1996. Liczbę jodową (LJ) oznaczano wg normy PN-60/A-86914 (19, 20, 21).

Ocenę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą testu *t*-Studenta i przedstawiono jako poziom istotności różnic *p*. Ustalono istotność statystyczną różnic uzyskanych wartości w kolejnych oznaczeniach względem próby kontrolnej. Uznano za istotne statystycznie różnice przy poziomie istotności *p* < 0,05.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wszystkie tłuszcze spożywcze, w tym oleje roślinne w czasie przechowywania i obróbki termicznej ulegają określonym zmianom, które doprowadzają do obniżenia ich wartości odżywczych. Niekorzystne zmiany są wynikiem zachodzących procesów hydrolizy, utleniania i polimeryzacji.

Obróbka termiczna produktów wysokobiałkowych w gorącym oleju odgrywa ważną rolę w dziedzinie kulinarnej preparatyki żywności. W zależności od czasu ogrzewania, temperatury, a także składu chemicznego tłuszczów i produktów w nich obrabianych, w tłuszczu zachodzą zmiany fizyczne i chemiczne. W wyniku tych zmian, zniszczeniu ulegają wartościowe składniki zawarte w tłuszczach takie, jak: NNKT i witaminy. Ponadto, tłuszcz zjełczały może oddziaływać negatywnie na składniki pokarmowe zawarte w produkcie, poddanym obróbce w tym tłuszczu. Produkty utleniania tłuszczu tworzą wiele trwałych, trudno strawnych połączeń z białkami. Tłuszcze utlenione reagując z białkami tworzą związki kompleksowe o charakterze polimerów. Wiadomo, że powstawanie związków kompleksowych tłuszczów utlenionych z białkami pociąga za sobą straty aminokwasów (22). Aby zapobiec tym zmianom, stosuje się substancje o działaniu antyoksydacyjnym.

W przypadku olejów jest to najczęściej witamina E, a w przypadku produktów powstałych z olejów utwardzonych jest to β -karoten.

Istotne wydaje się zatem prowadzenie badań mających na celu ocenę procesu starzenia się olejów suplementowanych β -karotenem pod wpływem ogrzewania i smażenia w nich produktów bogatobiałkowych.

W celu oceny wpływu β -karotenu na proces starzenia się olejów jadalnych podczas obróbki termicznej produktu wysokobiałkowego oznaczano wartości liczby kwasowej, liczby nadtlenowej i liczby jodowej dla olejów suplementowanych β -karotenem.

Ponadto oznaczano wartości liczby kwasowej, nadtlenkowej i jodowej w olejach bez dodatku β -karotenu nie poddanych obróbce termicznej i kulinarnej w celu określenia jakości olejów i przydatności ich do spożycia.

Tabela I
Średnie wartości liczby kwasowej w badanych olejach jadalnych suplementowanych β -karotenem oraz olejach bez β -karotenu

Table I
Mean acid values for the studied vegetable oils with and without β -carotene supplementation

Rodzaj obróbki termicznej i kulinarnej	Rodzaj badanego oleju jadalnego			
	olej słonecznikowy „Bartek” n = 27 $\bar{x} \pm SD$	olej rzepakowy „Kujawski” n = 27 $\bar{x} \pm SD$	oliwa z oliwek n = 27 $\bar{x} \pm SD$	
olej nie poddany obróbce, niesuplementowany β -karotenem	0,1662 (± 0)	0,1667 (± 0)	0,2913 (± 0)	
olej suplementowany β -karotenem	olej nie poddany obróbce	0,1112 ($\pm 0,0010$)	0,1122 ($\pm 0,0000$)	0,2522 ($\pm 0,0393$)
	ogrzewanie 10 min.	0,278 ($\pm 0,0043$)	0,3352 ($\pm 0,0009$)	0,6902 ($\pm 0,0371$)
	ogrzewanie 30 min.	0,2246 ($\pm 0,0003$)	0,3316 ($\pm 0,0004$)	0,28 ($\pm 0,0000$)
	ogrzewanie 60 min.	0,2811 ($\pm 0,0000$)	0,3912 ($\pm 0,0043$)	0,3373 ($\pm 0,0009$)
	ogrzewanie 10 min. i smażenie kurczaka	0,4457 ($\pm 0,0006$)	0,2204 ($\pm 0,0000$)	0,7462 ($\pm 0,0380$)
	ogrzewanie 30 min. i smażenie kurczaka	0,2251 ($\pm 0,0002$)	0,3892 ($\pm 0,0027$)	0,3366 ($\pm 0,0009$)
	ogrzewanie 60 min. i smażenie kurczaka	0,2242 ($\pm 0,0002$)	0,3896 ($\pm 0,0000$)	0,3658 ($\pm 0,0393$)
	ogrzewanie 60 min. oznaczenia wykonane po 6 dniach	0,2811 ($\pm 0,0008$)	0,2808 ($\pm 0,0003$)	0,337 ($\pm 0,0004$)
	ogrzewanie 60 min. i smażenie kurczaka oznaczenia wykonane po 6 dniach	0,2815 ($\pm 0,0013$)	0,3928 ($\pm 0,0011$)	0,3366 ($\pm 0,0009$)

n – liczba wykonywanych oznaczeń; \bar{x} – wartość średnia; SD – odchylenie standardowe; p < 0,05.

Wyniki dotyczące oznaczeń LK przedstawia tab. I.

Wartość LK wskazuje na stopień rozkładu hydrolitycznego tłuszczu. Stopień zhydrolizowania tłuszczu wpływa na procesy oksydacyjne, ponieważ uwolnione w procesie hydrolizy wolne kwasy tłuszczowe i monoacyloglicerole działają proutleniająco. LK olejów rafinowanych nie powinna przekraczać wartości 0,4, a pod koniec terminu ważności może wynosić 0,6. Dla olejów nierafinowanych norma ta jest wyższa i wynosi 4,0 (9, 23).

Przeprowadzone oznaczenia LK dla wszystkich trzech olejów suplementowanych β -karotenem wykazały nieznaczny wzrost liczby wolnych kwasów tłuszczowych wraz z wydłużaniem czasu ich ogrzewania. Należy pokreślić, że norma LK została przekroczona dla oliwy z oliwek w przypadku ogrzewania jej przez okres 10 min., jak również w próbce oliwy, w której smażyono kurczaka po 10 min. jej ogrzewaniu. Nieznacznie wartość LK została przekroczona dla oleju słonecznikowego, podczas ogrzewania tego oleju przez 10 min., a następnie smażenia w nim mięsa z kurczaka. Wartości LK oznaczone w pozostałych przypadkach po obróbce termicznej i kulinarnej w trzech badanych olejach mieściły się w granicach normy.

Wyniki dotyczące oznaczeń liczby nadtlenowej (LN) przedstawia tab. II.

Liczba nadtlenkowa jest wskaźnikiem procesu utleniania tłuszczów. Utlenianie może dotyczyć zarówno kwasów tłuszczowych wchodzących w skład triacylogliceroli, jak i tych, które zostały uwolnione z triacylogliceroli w trakcie hydrolizy. Raz zapoczątkowany proces utleniania tłuszczów samorzutnie przebiega dalej. Powstające w pierwszym etapie utleniania hydronadtlenki dalej ulegają przekształceniom. Na drodze skomplikowanych i wielokierunkowych przemian mogą powstawać wtórne produkty utleniania, które reagując ze sobą tworzą nowe związki, a także wchodzą w reakcję z składnikami odżywczymi produktów żywnościowych, poddanych obróbce kulinarnej (24).

Tabela II
Średnie wartości liczby nadtlenkowej w badanych olejach jadalnych suplementowanych β -karotenem oraz w olejach bez β -karotenu

Table II
Mean peroxide values for the studied vegetable oils with and without β -carotene supplementation

Rodzaj obróbki termicznej i kulinarnej	Rodzaj badanego oleju jadalnego		
	olej słonecznikowy „Bartek” n = 27 $\bar{x} \pm SD$	olej rzepakowy „Kujawski” n = 27 $\bar{x} \pm SD$	oliwa z oliwek n = 27 $\bar{x} \pm SD$
olej nie poddany obróbce, niesuplementowany β -karotenem	2,8775 ($\pm 0,1096$)	1,7935 ($\pm 0,0940$)	3,855 ($\pm 0,0353$)
olej nie poddany obróbce	2,515 ($\pm 0,1767$)	1,605 ($\pm 0,0636$)	4,295 ($\pm 0,1909$)
ogrzewanie 10 min.	0,9786 ($\pm 0,0765$)	1,4123 ($\pm 0,0128$)	1,6059 ($\pm 0,1887$)
ogrzewanie 30 min.	6,4377 ($\pm 0,1333$)	3,9591 ($\pm 0,0943$)	5,0498 ($\pm 0,0764$)
ogrzewanie 60 min.	4,7535 ($\pm 0,2830$)	0,8512 ($\pm 0,0255$)	2,9635 ($\pm 0,2474$)
ogrzewanie 10 min. i smażenie kurczaka	0,7733 ($\pm 0,0410$)	0,4871 ($\pm 0,0707$)	2,6711 ($\pm 0,0363$)
ogrzewanie 30 min. i smażenie kurczaka	3,8807 ($\pm 0,1378$)	2,217 ($\pm 0,1007$)	3,453 ($\pm 0,1935$)
ogrzewanie 60 min. i smażenie kurczaka	7,3664 ($\pm 0,1833$)	0,7696 ($\pm 0,1952$)	3,4226 ($\pm 0,2396$)
ogrzewanie 60 min. oznaczenia wykonane po 6 dniach	8,9649 ($\pm 0,1729$)	7,8318 ($\pm 0,0642$)	3,2017 ($\pm 0,0020$)
ogrzewanie 60 min. i smażenie kurczaka oznaczenia wykonane po 6 dniach	8,6215 ($\pm 0,0284$)	5,0405 ($\pm 0,2168$)	3,2506 ($\pm 0,0658$)

n – liczba wykonywanych oznaczeń; \bar{x} – wartość średnia; SD – odchylenie standardowe; $p < 0,05$.

Liczba nadtlenkowa dla oleju słonecznikowego wynosi od 3 do 5 (9). Na podstawie wyników oznaczeń LN stwierdzono, że wartość LN oznaczona dla oleju słonecznikowego z dodatkiem β -karotenu przekroczyła normę już po 30 min. ogrzewania. Norma LN została przekroczona również w przypadku oleju, w którym smażono kurczaka po uprzednim jego ogrzewaniu przez 60 min., a także w olejach przechowywanych przez 6 dni po wcześniejszym ogrzewaniu trwającym 60 min., jak i obróbce kulinarnej mięsa z kurczaka.

Wartość LN dla oleju rzepakowego powinna wahać się podobnie jak dla oleju słonecznikowego w granicach od 3 do 5. Wartość LN oznaczona dla oleju rzepakowego suplementowanego β -karotenem przekroczyła normę tylko w przypadku jego przechowywania przez 6 dni po uprzednim ogrzewaniu przez 60 min. (9).

Wartość LN oznaczona dla oliwy z oliwek suplementowanej β -karotenem we wszystkich przypadkach mieściła się w granicach normy, która dla tego rodzaju tłuszczu wynosi 8 do 12 (9).

Wyniki oznaczeń liczby jodowej (LJ) olejów suplementowanych β -karotenem przedstawia tab. III.

Na podstawie oznaczeń wartości LJ stwierdzono, że dodatek β -karotenu do oleju rzepakowego i oliwy z oliwek niepoddanych obróbce termicznej spowodował wzrost wartości LJ w stosunku do olejów niesuplementowanych. Wzrost ten można wytłumaczyć pojawieniem się kolejnych wiązań nienasyconych występujących w cząsteczce β -karotenu.

Pod wpływem obróbki termicznej i kulinarnej stwierdzono wzrost wartości LJ dla oleju słonecznikowego suplementowanego β -karotenem. Wzrastające wartości LJ w tym oleju mogą wskazywać na tworzenie się wtórnych produktów utleniania posiadających wiązania nienasycone. Olej słonecznikowy zawiera 65,27% kwasów wielonienasyconych, z czego 65% stanowi kwas linolowy. Wtórnymi

Tabela III
Średnie wartości liczby jodowej w badanych olejach jadalnych suplementowanych β -karotenem oraz w olejach bez β -karotenu

Table III
Mean iodine values for the studied vegetable oils with and without β -carotene supplementation

Rodzaj obróbki termicznej i kulinarnej	Rodzaj badanego oleju jadalnego			
	olej słonecznikowy „Bartek” n = 27 $\bar{x} \pm SD$	olej rzepakowy „Kujawski” n = 27 $\bar{x} \pm SD$	oliwa z oliwek n = 27 $\bar{x} \pm SD$	
olej nie poddany obróbce, niesuplementowany β -karotenem	131,87 ($\pm 1,4707$)	113,74 ($\pm 0,6788$)	85,037 ($\pm 0,8018$)	
olej suplementowany β -karotenem	olej nie poddany obróbce	126,164 ($\pm 1,4566$)	113,8385 ($\pm 2,0385$)	86,997 ($\pm 1,7324$)
	ogrzewanie 10 min.	129,8875 ($\pm 2,7294$)	112,1783 ($\pm 0,3638$)	86,5419 ($\pm 0,6686$)
	ogrzewanie 30 min.	137,8048 ($\pm 3,6774$)	112,4116 ($\pm 0,5108$)	87,6085 ($\pm 0,6351$)
	ogrzewanie 60 min.	138,3343 ($\pm 1,5109$)	113,3492 ($\pm 2,5052$)	84,7241 ($\pm 1,6667$)
	ogrzewanie 10 min. i smażenie kurczaka	138,7809 ($\pm 0,6585$)	110,752 ($\pm 1,9077$)	85,7592 ($\pm 0,2151$)
	ogrzewanie 30 min. i smażenie kurczaka	135,8036 ($\pm 0,7665$)	113,0654 ($\pm 1,7254$)	85,6391 ($\pm 0,3162$)
	ogrzewanie 60 min. i smażenie kurczaka	136,1482 ($\pm 2,7756$)	115,3557 ($\pm 0,0383$)	85,0525 ($\pm 0,3655$)
	ogrzewanie 60 min. oznaczenia wykonane po 6 dniach	134,9468 ($\pm 1,9943$)	111,5886 ($\pm 2,6043$)	88,323 ($\pm 2,2712$)
	ogrzewanie 60 min. i smażenie kurczaka oznaczenia wykonane po 6 dniach	125,3132 ($\pm 1,4836$)	113,15 ($\pm 1,1592$)	86,1109 ($\pm 0,4165$)

n – liczba wykonywanych oznaczeń; \bar{x} – wartość średnia; SD – odchylenie standardowe; p < 0,05.

produktami utleniania kwasu linolowego są jednonienasycone związki hydroksyepoksydowe, hydronadtlenki, ketony dwunienasycone, związki hydroksylowe o dwóch podwójnych wiązaniach i jednonienasycone związki dwu- i trójhydroksylowe (27).

W przypadku oliwy z oliwek zaobserwowano wzrost LJ tylko w próbce ogrzewanej 30 min. oraz w próbce przechowywanej przez 6 dni po wcześniejszym ogrzewaniu przez 60 min. Nieznaczna zmiana wartości LJ jest najprawdopodobniej konsekwencją faktu, że oliwa z oliwek zawiera znaczną liczbę kwasów jednonienasyconych, w tym kwasu oleinowego. Produkty utleniania kwasu oleinowego to m.in. ketony allilowe oraz jednonienasycone estry dwuhydroksylowe, które mogą powodować obserwowany nieznaczny wzrost wartości LJ oznaczanej w oliwie z oliwek (26).

LJ oznaczana w oleju rzepakowym przeznaczonym do badań niesuplementowanym β -karotenem nieznacznie przekraczała normę. Norma LJ dla tego rodzaju oleju waha się w granicach 94 do 106 (21). Dodatek β -karotenu nie wpłynął na zmianę wartości tej liczby. Obróbka termiczna, jak i kulinarna również nie spowodowała istotnych różnic w wartościach LJ oznaczonej dla tego oleju.

Porównując wyniki oznaczeń LK, LN, LJ dla wybranych olejów roślinnych suplementowanych β -karotenem można stwierdzić, że największe zmiany zostały zaobserwowane dla oleju słonecznikowego.

Podobny wpływ ogrzewania i obróbki kulinarnej zaobserwowano na podstawie badań przeprowadzonych przez nas wcześniej dla tych samych rodzajów olejów roślinnych niesuplementowanych β -karotenem (28).

Istotnym wydaje się fakt, że suplementacja β -karotenem badanych olejów w znacznym stopniu wpływa na ograniczenie procesów utleniania i hydrolizy zachodzących podczas ogrzewania i smażenia.

Przejawia się to w zauważalnych różnicach w wartościach oznaczanych liczb charakteryzujących jakość badanego tłuszczu po przeprowadzonej obróbce termicznej i kulinarnej, w odniesieniu do rezultatów badań przeprowadzonych wcześniej dla tych samych olejów niesuplementowanych β -karotenem (28).

Analizując uzyskane wartości: LK, LN, LJ dla oleju słonecznikowego suplementowanego β -karotenem i odnosząc je do wyników badań przeprowadzonych wcześniej dla tego samego rodzaju oleju bez dodatku β -karotenu (28), można stwierdzić pozytywny wpływ β -karotenu podczas obróbki termicznej i kulinarnej. Podniesienie oksydacyjnej i termicznej stabilności tego oleju podczas ogrzewania i smażenia mięsa z kurczaka może wynikać ze współdziałania antyoksydantów hydrofobowych: dodanego przez nas β -karotenu i tokoferolu, którym olej słonecznikowy był wzbogacony przez producenta. Wiadomo bowiem, że tokoferol może regenerować β -karoten, który w temp. 180°C ulega destrukcji (15). Pomimo ewidentnego, korzystnego wpływu β -karotenu na opóźnienie procesu jęlczenia, olej słonecznikowy okazał się najbardziej podatny na niekorzystne zmiany spowodowane ogrzewaniem i smażeniem produktu wysokobiałkowego ze wszystkich trzech badanych olejów.

Olej rzepakowy suplementowany β -karotenem wydaje się być bardziej opornym na proces jęlczenia oksydacyjnego w stosunku do oleju niesuplementowanego, o czym świadczą wartości LK utrzymujące się w normie zarówno po 10 min., jak i dłuższym okresie ogrzewania. Korzystny wpływ dodatku β -karotenu na ograniczenie procesu tworzenia się nadtlenków obrazują uzyskane wartości LN, zwłaszcza po 30 min. ogrzewaniu, a także smażeniu w tym oleju mięsa drobiowego w odniesieniu do wartości LN uzyskanych w badaniach przeprowadzonych wcześniej dla tego samego oleju niesuplementowanego β -karotenem (28).

W przypadku LJ nie obserwowano obniżenia jej wartości jak miało to miejsce w oleju niesuplementowanym.

Oliwa z oliwek wykazuje najwyższą stabilność oksydacyjną pod wpływem obróbki termicznej i kulinarnej. Wpływ suplementacji β -karotenem zaobserwowano wyraźnie w przypadku długotrwałego ogrzewania, trwającego 60 min.

Uzyskane wyniki wskazują wysoką oporność na proces starzenia się oliwy z oliwek. Wynika to zapewne z obecności w oliwie naturalnych antyoksydantów takich, jak: witamina E, witamina C, a także skwalen (26).

Dodatek β -karotenu powoduje, że tokoferol może współdziałać z askorbinianem, ale także z karotenoidem, chroniąc skutecznie olej przed utlenianiem. Ponadto, kwasy mononienasycone stanowią w oliwie z oliwek 80% wszystkich kwasów, a wiadomo że są one bardziej odporne na oksydację niż kwasy tłuszczowe wielonienasycone (13).

WNIOSKI

1. Suplementacja β -karotenem badanych olejów zwiększa stabilność oksydacyjną podczas obróbki termicznej i kulinarnej.
2. Korzystny wpływ β -karotenu zauważalny jest w olejach przechowywanych przez 6 dni, które poddano wcześniej ogrzewaniu i smażono w nich produkt wysokobiałkowy.
3. Olejem najbardziej podatnym na zmiany oksydacyjne jest olej słonecznikowy.

A. Rzepecka-Stojko, A. Kurek-Górecka, W. Kosiarski, M. Wardas

ASSESSMENT OF THE PROCESS OF DETERIORATION OF ANTIOXIDANT-ENRICHED EDIBLE OILS DURING HEATING OF PEPTIDE-RICH PRODUCTS

Summary

The effect of heating for different periods of time and influence of frying a peptide-rich product on the process of rancid deterioration of three β -carotene-enriched vegetable (sunflower, rape and olive) oils was investigated. This research is a continuation of a similar study on the same oils without β -carotene supplementation during heating and frying. Changes occurring in the oils were assessed by three

parameters: acid number, peroxide value, iodine value. Our current results show that the supplementation of edible oils with (β -carotene increased their oxidation stability when they were applied to heat or fry peptide-rich product and during the storage of the oils used earlier for heating or frying.

PIŚMIENNICTWO

1. *Gawecki J., Hryniewiecki L.*: Żywnienie człowieka – Podstawy nauki o żywieniu. PWN, Warszawa 2000; T.I: 152-175. – 2. *Ziemiański S.*: Rola tłuszczów w żywieniu człowieka. *Terapia* 1997; 5(7): 3-5. – 3. *Gertig H., Przysławski J.*: Rola tłuszczów w żywieniu człowieka. *Żyw. Człow.* 1994; 21(4): 375-388. – 4. *Ziemiański S.*: Rola tłuszczów w żywieniu człowieka. *Żyw. Człow. Metab.* 1997; 24(2): 35-37. – 5. *Ziemiański S., Budzyńska-Topolowska J.*: Współczesne poglądy na rolę fizjologiczną wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3. *Żyw. Człow. Metab.* 1992; 19: 100. – 6. *Ziemiański S., Budzyńska-Topolowska J.*: Ocena żywieniowa tłuszczów utlenionych. *Przem. Spoż.* 1991; 45(4): 98-100. – 7. *Budzyńska-Topolowska J., Ziemiański S.*: Zmiany zachodzące w tłuszczach i ich wpływ na wartość odżywczą. *Żyw. Człow. Metab.* 1992; 8: 2. – 8. *Wahrburg U.*: What are the health effects of fat? *Eur. J. Nutr.* 2004; 1: 6-11. – 9. *Regulska-Iłow B., Iłow R., Szymczak J.*: Wpływ ogrzewania konwencjonalnego oraz z wykorzystaniem mikrofal na procesy utleniania i degradacji tłuszczów pokarmowych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1998; 31(4): 375-380. – 10. *Sikorski Z.E.*: Chemia żywności – skład, przemiany i właściwości żywności. WNT, Warszawa 2000; 402-408.
11. *Daniewski M., Pawlička M., Filipek A.* i współpr.: Kontrola jakości tłuszczu smażalniczego przy smażeniu frytek za pomocą wybranych testów. *Żyw. Człow. Metab.* 2001; 26(2): 132-139. – 12. *Yang C.M., Grey A.A., Archer M.C., Bruce W.R.*: Rapid quantitation of thermal oxidation products in fats and oils by ¹H-NMR spectroscopy. *Nutr. Cancer* 1998; 30(1): 64-68. – 13. *Szukalska E.*: Przeciwutleniacze i ich rola w opóźnieniu niepożądanych przemian tłuszczów spowodowanych utlenianiem. *Żyw. Człow. Metab.* 1999; 26(1): 81-85. – 14. *Szpetnar M., Pasternak K.*: Wpływ karotenoidów na zdrowie człowieka. *Herb. Pol.* 2003; 49(3/4): 427-435. – 15. *Palozza P., Krinsky I.K.*: β -carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys* 1992; 297(1): 184-187. – 16. *Rutkowski M., Grzegorzczak K.*: Witaminy o działaniu antyoksydacyjnym – ogólna charakterystyka. *Cz. I. witamina A. Farmacja Polska* 1998; 54(16): 739-743. – 17. *Tsuchihashi H., Kigoshi M., Iwatsuki M.* i współpr.: Action of beta-carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 20: 323(1). – 18. *Mascio P., Murphy M., Sies H.*: Antioxidant defense system: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; 53: 1943. – 19. *Farmakopea Polska. PZWL, Warszawa, Wyd. V, T. I, 1990; 44-45: 89-91.* – 20. *PN-ISO 3960: Oznaczanie liczby nadtlenkowej.*
21. *PN-60/A-86914: Oznaczanie liczby jodowej.* – 22. *Pokorny J., Luan N.T., El-Zeany B.A.*: Development of autoxidized lipids with amino acids and protein. *Nahrung* 1976; 20(3): 279-9. – 23. *Goburdhun D., Seebun P., Rugio A.*: Effect of deep-fat frying of potato chips and chicken on the quality of soybean oil. *J. Consumer Studies & Home Economics.* 2000; 24(4): 223-233. – 24. *Smouse T.H., Chang S.S.*: A systematic characterization of the reversion flavor of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1967; 44: 509-514. – 25. *Przysławski J., Gertig H., Nowak K.*: Analiza składu kwasów tłuszczowych wybranych olejów roślinnych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1996; 29(4): 335- 342. – 26. *Kozłowski J.*: Oliwka europejska. *Wiad. Ziel.* 1986; (7/8): 11-12. – 27. *Gardner H.W.*: Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. Enzymic reactions compared with nonenzymic. *J. Agric. Food Chem.* 1975; 23: 129. – 28. *Rzepecka-Stojko A.* i współpr.: Wpływ ogrzewania oraz smażenia produktu wysokoskrobiowego i bogatobiałkowego na jakość wybranych olejów jadalnych. *Brom. Chem. Toksykol.* 2004; 38(3): 217-223.

Adres: 41-200 Sosnowiec, ul. Jagiellońska 4.

Wojciech Kolanowski, Wioletta Mówińska

OCENA JAKOŚCI ŻYWIENIOWEJ
SUPLEMENTÓW DŁUGOŁAŃCUCHOWYCH
WIELONIENASYCONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH OMEGA-3
OBECNYCH NA POLSKIM RYNKU FARMACEUTYCZNYM^{*)}

Zakład Analizy i Oceny Jakości Żywności Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. A. Stołyhwo

W pracy podjęto próbę oceny jakości żywieniowej i oszacowania wielkości rynku i trendów w sprzedaży suplementów diety zawierających długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 z oleju rybiego. Analizowano preparaty dostępne w okresie 2004–2006. Porównano zawartość kwasów omega-3, koszt kuracji i pokrycia minimalnego zalecanego spożycia. Stwierdzono obecność 48 suplementów o różnicowanej zawartości kwasów omega-3, cenie i wielkości sprzedaży. Sprzedaż tego rodzaju suplementów wzrasta, zwłaszcza w postaci kapsułek, wśród których przeważają trany. Główną przyczyną zakupu tych preparatów są zalecenia lekarskie. Poziom sprzedaż tych preparatów wykazuje sezonowość i mimo wzrostu jest wciąż stosunkowo niewielki.

Hasła kluczowe: wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3, olej rybi, suplementy diety.

Key words: polyunsaturated fatty acids omega-3, fish oil, supplements.

Zainteresowanie wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi omega-3 rozwinęło się w latach 70. głównie w wyniku badań *Dyerberga*, *Banga* i współpr. prowadzonych na grenlandzkich Eskimosach, wśród których, mimo diety bogatej w tłuszcz zwierzęcy i cholesterol częstość występowania choroby niedokrwiennej serca była znikoma (1). Efekt ten powiązano z wysokim spożyciem ryb i zwierząt morskich, które są najbogatszym źródłem długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 (1, 2). Długołańcuchowe kwasy omega-3 – kwas eikozapentaenowy (EPA C20:5) i dokozaheksaenowy (DHA C22:6) poza zmniejszaniem ryzyka chorób krążenia, wykazują także wpływ na hamowanie rozwoju niektórych postaci nowotworów oraz chorób o podłożu immunologicznym. Stwierdzono ponadto, że są one niezbędne do prawidłowego przebiegu ciąży i zrównoważonego rozwoju oraz funkcjonowania centralnego układu nerwowego i narządu wzroku także w wieku podeszłym (2, 3, 4, 5, 6).

^{*)} Podziękowania

Autorzy dziękują za współpracę kierownikom aptek, którzy wzięli udział w badaniu. Praca jest częścią międzynarodowego projektu badawczego: „Microencapsulation and stabilisation of omega-3 fatty acids and application in functional food” realizowanego w ramach programu DAAD/KBN i umowy między SGGW a Uniwersytetem w Bonn.

EPA jest prekursorem wielu substancji regulujących, tzw. hormonów tkanekowych (tj. prostaglandyny, prostacyliny, tromboksanu serii 3 i leukotrienów serii 5) wpływających korzystnie m.in. na funkcjonowanie układu krążenia, odpowiedź zapalną i alergiczną. Działają one w większości przeciwnie do tych syntetyzowanych z kwasów omega-6 (tj. serii 2 i 4 odpowiednio), których obecnie w przeciętnej diecie jest zbyt dużo w wyniku powszechnego zastosowania w technologii żywności tłuszczów roślinnych, będących głównym źródłem kwasów omega-6 w diecie (2, 3, 7, 8, 9). DHA jest elementem strukturotwórczym fosfolipidów błon komórek centralnego układu nerwowego i siatkówki, gdzie w warunkach prawidłowych stanowi ok. 60% masy wszystkich kwasów tłuszczowych (2, 10). Zachwianie fizjologicznej równowagi proporcji kwasów omega-6 do omega-3 w diecie (prawidłowa 4:1, obecna ok. 10:1) skutkuje zwiększonym ryzykiem rozwoju wielu chorób m.in. krążenia, nowotworowych i alergicznych. Z uwagi na to odpowiednia proporcja pomiędzy obiema grupami wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie, a tym samym w tkankach organizmu ludzkiego jest istotna dla zachowania zdrowia i prewencji wielu tzw. chorób cywilizacyjnych (2, 9, 11). Wysoki poziom kwasów omega-3 w diecie zwłaszcza DHA warunkuje prawidłowy rozwój płodu i przebieg ciąży (12, 13, 14, 15).

W większości krajach wysokorozwiniętych, gdzie dominuje tzw. dieta typu zachodniego, sposób odżywiania jest nieprawidłowy, także pod względem ilości i jakości tłuszczów w diecie. W krajach tych (także w Polsce) średni poziom długołańcuchowych kwasów tłuszczowych omega-3 jest poniżej zalecanych ilości minimalnych. Przyczyną tego jest głównie niskie spożycie ryb. W Polsce spożycie ryb od wielu lat kształtuje się na stałym poziomie, średnio 6 kg/osobę rocznie, tj. ok. 125 g tygodniowo, podczas gdy zaleca się spożycie co najmniej 300 g ryb tygodniowo (16, 17).

Zalecenia European Academy of Nutritional Science (EANS), czy British Nutrition Foundation wskazują, że spożycie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych omega-3 powinno wynosić nie mniej niż 200 mg dziennie (7, 18). International Society for the Study on Fatty Acids and Lipids (ISSFAL) zaleca jako minimum 440 mg EPA i DHA (po 220 mg każdy) dziennie, a dla kobiet w ciąży i karmiących – 600 mg (po 300 mg każdy) (11).

W przeciętnej polskiej diecie udział kwasów tłuszczowych omega-3 wynosi średnio zaledwie 110–150 mg EPA i DHA dziennie, na co wskazują wyniki analiz danych GUS o spożyciu żywności w Polsce oraz badań ankietowych (16, 17). Równie niski poziom spożycia tych kwasów tłuszczowych notuje się w wielu krajach, gdzie dominuje tzw. dieta typu zachodniego (7, 19). Podwyższenie spożycia długołańcuchowych kwasów omega-3 można osiągnąć przez częste spożywanie ryb lub suplementów, czy żywności wzbogaconej w preparaty oleju rybiego (20, 21, 22). Jednak zmiana nawyków żywieniowych jest bardzo trudna na szerszą skalę. Stwierdzono, że suplementacja diety długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi omega-3 w postaci oleju rybiego w kapsułkach, czy w płynie, wywołuje korzystne zdrowotne efekty oraz może być podstawą lub uzupełnieniem prewencji oraz leczenia wielu schorzeń z grupy tzw. chorób cywilizacyjnych (3, 5, 12). W UE suplementy te zalicza się do środków spożywczych specjalnego żywieniowego przeznaczenia, mających uzupełniać codzienną dietę.

Celem pracy była próba oceny jakości żywniowej i oszacowania wielkości rynku suplementów diety zawierających długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 pochodzące z oleju rybiego, obecnych w wybranych aptekach w Warszawie.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły obecne na rynku warszawskim suplementy diety zawierające wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 pochodzące z oleju rybiego. Dokonano obliczeń sprzedaży tych suplementów w 3 wybranych aptekach w Warszawie, w okresie od 01.2004 r. do 02.2006 r., tj. na przełomie przystąpienia Polski do UE. Wybrane do badania apteki korzystały z tej samej bazy danych i oprogramowania komputerowego Kamssoft. Apteki, z których zebrano dane, zaliczyć można do średniej wielkości – ok. 500 pacjentów dziennie każda (łącznie 1500 pacjentów dziennie, głównie po 50. roku życia), zlokalizowane były w centralnych miejscach 3 dzielnic Warszawy (Centrum, Praga Południe i Praga Północ). Były to tzw. apteki otwarte – z recepturą i lekami gotowymi. W ten sposób otrzymano dane ze sprzedaży ww. preparatów obejmujące łącznie ok. 1500 pacjentów dziennie w okresie 25 miesięcy (tj. łącznie ok. 1 000 000 wizyt pacjentów dokonujących zakupu w badanych aptekach, przy 25 dniach roboczych w miesiącu).

Dane dotyczące zawartości wielonienasyconych kwasów omega-3 w poszczególnych preparatach oszacowano na podstawie informacji od producentów oraz danych z Pharminindex (baza danych o lekach i suplementach zarejestrowanych w Polsce i aktualnie dostępnych na rynku). Suplementy znajdujące się w aptekach zostały porównane między sobą w zakresie zawartości kwasów omega-3, wielkości sprzedaży, ceny, kosztu kuracji proponowanej przez producenta oraz kosztu pokrycia zalecanego minimalnego dziennego spożycia. Dodatkowo, przeprowadzono wywiad z pacjentami aptek biorących udział w badaniu na temat znajomości suplementów kwasów omega-3, efektów ich działania oraz przyczyny zakupu (porady lekarzy, reklama itp.).

Wybrane suplementy zostały poddane analizie zawartości długołańcuchowych kwasów tłuszczowych omega-3 przy zastosowaniu techniki chromatografii gazowej. Otrzymane wyniki porównano z deklaracjami producentów. Do badań analitycznych zastosowano chromatograf Agilent 6890 GC System Plus (Agilent, Niemcy), podstawowe parametry pomiaru: kolumna kapilarna RTX dł. 100 m, z polarną fazą stałą, dozownik typu Split-Splitless, detektor płomieniowo-jonizacyjny FID. Analiza składu kwasów tłuszczowych prowadzona była przy następujących parametrach: temp. dozownika 235°C, temp. detektora 250°C, początkowa temp. kolumny 155°C przez 55 min., narost temp. 1,5°C min⁻¹, temp. końcowa 210°C. Jako gaz nośny stosowano wodór o przepływie 0,8 m min⁻¹. Próbki do analizy przygotowano poprzez wyizolowanie oleju z preparatu i przeprowadzenie metylacji kwasów tłuszczowych wg metodyki AOCS Official Method Ce 1b-89 (23). Chromatogramy rejestrowane były w Chem Station i przetwarzane przy użyciu programu HP-Chem (Hewlett Packard, Palo Alto, USA).

Wyniki interpretowano statystycznie z zastosowaniem programu komputerowego Statgraphics wersja 4.0, przy poziomie istotności $p < 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na rynku farmaceutycznym stwierdzono w badanym okresie obecność 48 suplementów zawierających długołańcuchowe kwasy tłuszczowe omega-3. Były to głównie preparaty zawierające tran (olej z rybich wątrób – dorsza lub rekina) lub tzw. olej rybi tkankowy. W większości, preparaty te były w postaci kapsułek, jedynie 2 preparaty posiadały formę oleju do picia. Rynek omawianych suplementów wykazywał znaczną dynamikę w badanym okresie – część preparatów dopiero pojawiała się na rynku, część zaś (niekiedy po krótkim czasie obecności) wycofano z uwagi na brak sprzedaży (popytu). Zmiany te wykazywały nieregularność i w wielu przypadkach sprzedaż nowych preparatów była na poziomie zerowym, nie były one także znane konsumentom. Na przestrzeni okresu badanego w 3 omawianych aptekach zarejestrowano obecność 35 preparatów, z których istotnej sprzedaży podlegało 25 preparatów. W przeważającej większości były to preparaty w formie kapsułek do codziennego stosowania *per os*. Preparaty o istotnej wielkości sprzedaży w badanym okresie przedstawiono w tab. I. Z 17 prezentowanych preparatów 10 zawierało olej z rybich wątrób (trany), 7 zaś olej rybi tkankowy.

Tabela I
Suplementy długołańcuchowych kwasów tłuszczowych omega-3
o istotnym poziomie sprzedaży w badanym okresie w 3 wybranych aptekach

Table I
Omega-3 of long chain polyunsaturated fatty acids formulations sold
at significant quantities in 3 selected drug stores during the test period

Preparat i zawartość substancji aktywnej w 1 kapsułce lub dawce	Producent	Liczba sprzedanych opakowań	Sprzedaż w m-cu styczniu 04/05/06, op.	Liczba kaps. lub cm ³ w 1 op./cena, zł
Iskial – 250 mg oleju z wątroby rekina w 1 kaps.	Naturell	524	15/29/36	120/24
Tran vitamex – 50 mg EPA i 70 mg DHA w 1 kaps.	Vitamex	450	32/34/36	60/13 120/18
Tran Gal – 30 mg EPA i 40 mg DHA w 1 kaps.	Gal	428	9/33/34	60/7 100/9 150/14
Ecomer – 250 mg oleju z rekina w 1 kapsułce	Exposan	218	25/21/28	60/40 120/72
Omega-3 Naturell – 90 mg EPA i 60 mg DHA w 1 kaps.	Naturell	252	3/15/22	120/25
Lysi tran w kapsułkach – 275 mg tranu w 1 kaps.	Lysi	113	5/11/4	120/12
Omega-3 forte – 180 mg EPA i 120 mg DHA w 1 kaps.	Hasco	110	3/6/9	60/18
Bio marine – 25 mg omega-3 w 1 kaps.	Marinex	93	5/7/8	90/71
Tran z olejem z wiesiołka – 175 mg oleju z wątroby dorsza i 175 mg oleju z wiesiołka w 1 kaps.	Gal	57	4/4/3	60/10
Mollers omega-3 – 150 mg EPA i 150 mg DHA w 1 kaps.	Mollers	74	0/4/5	100/48
Galomega – 63 mg EPA i 42 mg DHA w 1 kaps.	Gal	61	1/3/4	100/10 150/14 60/6
Lysi tran w płynie – 320 mg EPA i 460 mg DHA w 5 ml	Lysi	47	3/2/6	240 cm ³ /26
Doppel herz omega-3 – 144 mg EPA i 96mg DHA w 1 kaps.	Queisser Pharma	40	0/3/5	30/18
Selamer – 300 mg oleju z wątroby rekina w 1 kaps.	Tymofarm	39	1/4/2	60/40
Naturkaps tran z wątroby dorsza – 44 mg EPA i 55 mg DHA w 1 kaps.	Hasco	31	0/5/4	60/9
Trienyl – 90 mg EPA i 60 mg DHA w 1 kaps.	Lek	30	1/3/3	42/30
Bio-omega-3 plus – 500 mg oleju rybiego w 1 kaps.	Pharma Nord	12	1/0/2	60/40

Z powyższego zestawienia wynika, że największy poziom sprzedaży w badanym okresie cechował preparaty zawierające olej rybi wątrobowy (trany) – łącznie ok. 2000 opakowań, sprzedaż preparatów zawierających olej rybi tkankowy była istotnie niższa – ok. 579 opakowań. Dodatkowo przedstawiono poziom sprzedaży w miesiącu styczniu, który jest okresem największej sprzedaży tego rodzaju preparatów. Szczegółowa analiza wskazuje, że największy popyt wśród konsumentów odnotowano w przypadku preparatu Iskial – olej z wątroby rekina w kapsułkach a 250 mg (opakowanie 120 kapsułek). Drugie miejsce w kolejności największej sprzedaży przypadło na tran w kapsułkach Vitamex (opakowanie 60 i 120 kapsułek) zawierające w 1 kapsułce niewielką ilość kwasów omega-3 – 50 i 70 mg EPA i DHA odpowiednio. Trzeci to Tran z wątroby dorsza Gal w kapsułkach zawierający 30 mg EPA i 40 mg DHA (opakowania po 60, 100 i 150 kapsułek). Czwartym pod względem wielkości sprzedaży

był preparat Ecomer w kapsułkach a 250 mg oleju z wątroby rekina grenlandzkiego (opakowanie po 60 i 120 kapsulek). Piątym był preparat Omega-3 Naturell – Omega-3 olej z łososia w kapsułkach a 500 mg (opakowanie po 120 kapsulek). Istotną, acz niższą od ww. wielkość sprzedaży odnotowano także w przypadku preparatów: Tran Lysi, Omega-3 forte, Bio marine, Mollers, Galomega (tab. I).

Interesujące, że preparatami o największej wielkości sprzedaży były te, które na rynku pojawiły się przed akcesją Polski do UE mimo, że ilościowo asortyment dostępnych suplementów znacznie wzrósł po tej dacie. Świadczy to o pewnym przywiązaniu pacjentów do marki preparatu, która na rynku obecna była dłużej. Potwierdzają to wypowiedzi pacjentów, którzy na pytanie, dlaczego wybierają dany preparat najczęściej zgłaszali zalecenia lekarza. Zaznaczyć należy, że lekarze często przepisują powyższe suplementy na receptach (najczęściej obok leków obniżających poziom cholesterolu i zmniejszających ciśnienie krwi).

Zwraca uwagę ogólnie stosunkowo niewielka ilość sprzedanych preparatów. W trzech badanych aptekach, w okresie badanym (25 miesięcy) łącznie zakupiono zaledwie 2681 opakowań suplementów zawierających długołańcuchowe kwasy tłuszczowe omega-3 (suma ta obejmuje także preparaty nie wymienione w tab. I, których sprzedano zaledwie po kilka opakowań), tj. średnio 107 opakowań miesięcznie. Jedno opakowanie omawianych preparatów, zależnie od wielkości, wystarcza średnio na miesięczną kurację. Przy założeniu, że z badanych aptek korzystają w większości ci sami pacjenci (łącznie ok. 1500 osób dziennie w trzech aptekach), wielkość sprzedaży omawianych suplementów wynosiła średnio ok. 0,07 opakowania na osobę miesięcznie. Powyższe wskazuje w dużym przybliżeniu, że preparaty te stosuje regularnie poniżej 1% pacjentów. Nie wszystkie z dostępnych preparatów posiadają ponadto informację (na etykiecie lub ulotce) o zawartości kwasów omega-3 EPA i DHA. Dla części dostępnych preparatów (zwłaszcza tranów) podano jedynie zawartość oleju rybiego (wątrobowego) o bliżej nie określonym składzie z wyszczególnieniem jednak gatunku ryb, z których olej pozyskano (dorsz, rekin).

Do dalszej analizy wybrano preparaty o największym poziomie sprzedaży w badanym okresie, dla których podano na etykiecie lub ulotce zawartość kwasów tłuszczowych omega-3 EPA i DHA. Wzajemne proporcje oraz ogólna zawartość EPA i DHA znacznie różnicowała badane preparaty między sobą i wahała się między 50 a 300 mg w 1 kapsułce (tab. II). Istotne różnice zanotowano także w cenie za 1 kapsułkę. Najniższą ceną cechowały się preparaty o wysokim poziomie sprzedaży, tj. tran Vitamex i tran Gal.

Tabela II

Porównanie zawartości kwasów omega-3 EPA i DHA w 1 kapsułce wybranych preparatów

Table II

Comparison of the content of EPA and DHA omega-3 fatty acids in 1 capsule of the selected formulations

Preparat	Liczba mg oleju rybiego w 1 kaps.	Średnia cena 1 kapsułki, zł	EPA mg/kaps.	DHA mg/kaps.	EPA + DHA, mg
Tran vitamex	500	0,17	50	70	120
Tran Gal	350	0,08	30	40	70
Omega-3 Naturell	500	0,14	90	60	150
Bio marine	570	0,70	25	25	50
Omega-3 forte	1000	0,22	180	120	300
Trienyl	500	0,71	90	60	150
Galomega	350	0,10	63	42	105
Naturkaps tran	500	0,15	44	55	99
Doppel herz omega-3	800	0,60	144	96	240
Mollers omega-3	1000	0,45	150	150	300

Analiza deklarowanej zawartości długołańcuchowych kwasów omega-3 w badanych preparatach wskazuje, że najwyższy poziom EPA i DHA cechował preparaty Omega-3 forte – 300 mg (180 mg EPA i 120 mg DHA), Mollers omega-3 – 300 mg (po 150 mg EPA i 150 mg DHA) i Doppel herz omega-3 240 mg (144 mg EPA i 96 mg DHA), najniższy zaś preparat Biomarine 50 mg (25 mg EPA i 25 mg

DHA). Zwraca uwagę mniejsza zawartość kwasów EPA i DHA w preparatach zawierających olej rybi wąrobowy (tranu). Skład tranu w porównaniu z olejem tkankowym ryb cechuje się niższą zawartością kwasów EPA i DHA, jest on traktowany głównie jako źródło witaminy A, D, alkilogliceroli i skwalenu, w mniejszym zaś stopniu ww. kwasów tłuszczowych. Przepisuje się go (poniekąd słusznie) ogólnie w celu zwiększenia odporności organizmu, co też tłumaczy większy poziom sprzedaży tych preparatów w okresie jesiennym, zimowym i wiosną (co omówiono poniżej).

Przeprowadzone badania wskazują, że najczęściej kupowanymi suplementami zawierającymi długołańcuchowe kwasy omega-3 były trany. Trzeba zaznaczyć, że większość pacjentów знаła od dawna działanie tranu i jego korzystny wpływ na zdrowie, natomiast termin „kwasy omega-3” był dla nich obcy, jedynie nieliczni posiadali jakokolwiek wiedzę na ten temat. Trany są tymi suplementami, które na rynku polskim znajdują się najdłużej. Charakteryzują się również stosunkowo niską ceną i są najczęściej przepisywanymi przez lekarzy, głównie pediatrów i kardiologów, preparatami zawierającymi olej rybi.

Jedynym preparatem o nazwie omega-3 wyróżniającym się wśród pozostałych stosunkowo wysokim poziomem sprzedaży był Omega-3 Naturell. Preparat ten cechuje się dodatkowo stosunkowo niską ceną. Wszedł on jako pierwszy na krajowy rynek z szeroką kampanią reklamową w prasie i wśród środowiska lekarskiego, co może tłumaczyć jego stosunkowo wysoki poziom sprzedaży.

Zestawienie zalecaney przez producenta dobowej dawki badanych preparatów wskazuje, że różni się ona w zależności od preparatu. Zakres zalecaney przez producentów dobowych dawek kwasów tłuszczowych omega-3 EPA i DHA wynosi od 150 do 720 mg – w przeliczeniu na pojedyncze kapsułki – od 1 do 7 kapsułek dziennie (tab. III). Istotne zróżnicowanie w zawartości długołańcuchowych kwasów omega-3 w kapsułce poszczególnych preparatów powoduje, że np. w przypadku preparatu Omega-3 Mollers i Omega-3 Forte paradoksalnie najniższa zalecaney ilości kapsułek dziennie dostarcza największą dawkę kwasów omega-3 EPA i DHA.

Tabela III

Wielkość i koszt proponowanej przez producenta dawki dobowej badanych preparatów oraz koszt pokrycia zalecanego dziennego minimalnego spożycia kwasów EPA i DHA (t.j. 200 mg)

Table III

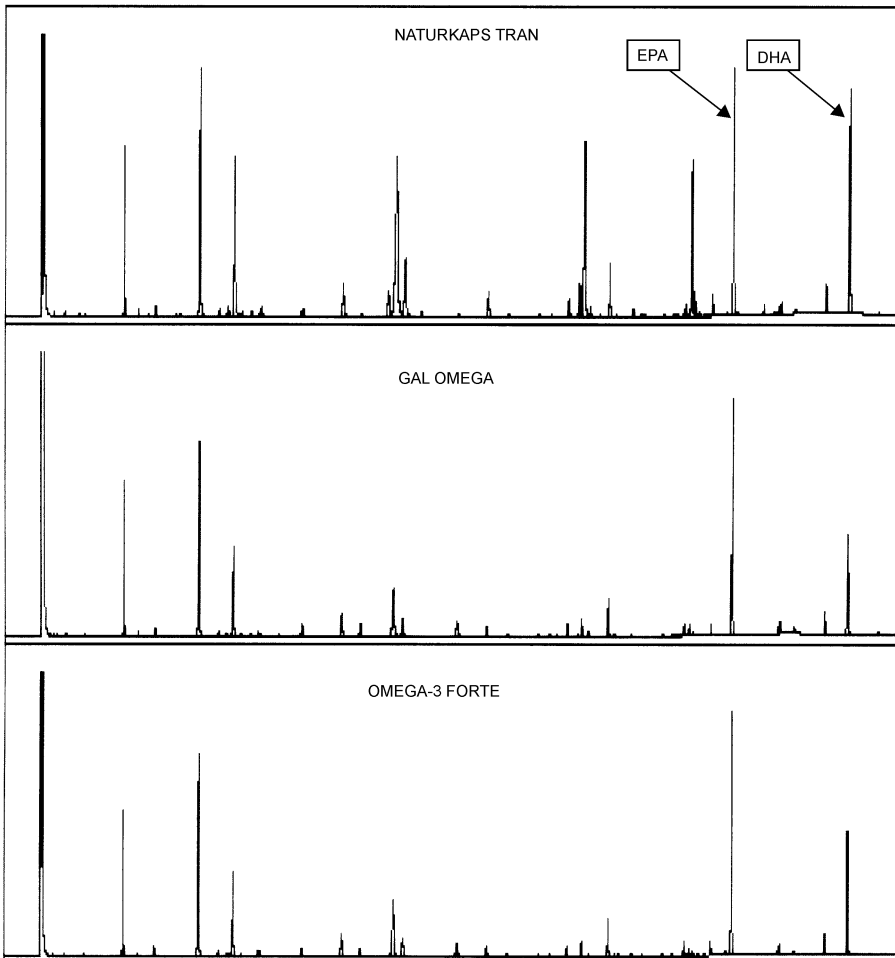
Amounts and prices of the daily doses of evaluated formulations suggested by the producers and the cost of satisfying the minimal recommended daily intakes of EPA and DHA (200 mg)

Preparat	Proponowana średnia dawka dobową, kaps.	Zawartość EPA i DHA w proponowanej dawce, mg	Koszt dobowy proponowanej kuracji, zł	Koszt pokrycia zalecanego minimalnego spożycia, zł
Tran vitamex	6	720	1,02	0,28
Tran Gal	5	350	0,40	0,22
Omega-3 Naturell	3	450	0,42	0,18
Bio marine	7	350	4,90	2,8
Omega-3 forte	2	600	0,44	0,14
Trienyl	3	450	2,10	1,0
Galomega	3	315	0,30	0,19
Naturkaps tran	4	400	0,60	0,30
Doppel herz omega-3	1	240	0,60	0,5
Mollers omega-3	2	600	0,90	0,30

W tab. III przedstawiano także zestawienie kosztu proponowanej przez producenta kuracji z wykorzystaniem omawianych preparatów w porównaniu do kosztu pokrycia zalecanego minimalnego dziennego spożycia (proponowanego przez EANS – 200 mg). Z poniższego zestawienia wynika, że zarówno koszt kuracji proponowanej przez producentów, jak i pokrycie zalecanego minimalnego spożycia długołańcuchowych kwasów omega-3 różniły się znacznie w zależności od preparatu i wynosiły odpowiednio od 0,3 do 4,9 zł/dobę i od 0,14 do 2,8 zł/dobę, przy czym obie wartości nie odnoszą się do tych samych preparatów. Preparat Galomega cechował się najniższym kosztem proponowanej dziennej kuracji – 0,3 zł, a pokrycie zalecanego spożycia długołańcuchowych kwasów omega-3 przy stosowaniu tego

preparatu wynosiło 0,19 zł. Najniższy koszt pokrycia zalecanego minimalnego dziennego spożycia – 0,14 zł, przy koszcie proponowanej dobowej kuracji – 0,44 zł, cechował preparat Omega-3 forte. W przeciwieństwie do tych preparatów preparat Biomarine cechował się najwyższą ceną za 1 kapsułkę oraz za kurację dobową (7 kapsułek) przy jednocześnie najwyższym koszcie pokrycia zalecanego minimalnego dziennego spożycia EPA i DHA – 2,8 zł, który był istotnie wyższy od pozostałych preparatów.

Porównanie danych z r. 2004, 2005 i 2006 wskazuje na istotny wzrost zainteresowania pacjentów suplementami zawierającymi olej rybi. Zaobserwowano także istotną tendencję sezonowości sprzedaży omawianych preparatów. W okresie maj – sierpień sprzedaż była najniższa i zależność ta dotyczyła wszystkich preparatów o istotnym poziomie sprzedaży. Istotnie wyższy poziom sprzedaży notowano na jesieni, zimą i wiosną. Najwyższą sprzedaż suplementów zawierających olej rybi odnotowano w m-cu styczniu. W 01.2004 sprzedano łącznie 132 opakowania, w 01.2005 – 200, a w 01.2006 – 210 opakowań.



Ryc. 1. Chromatogramy profilu kwasów tłuszczowych 3 wybranych suplementów, piki oznaczone strzałką wskazują na kwasy tłuszczowe omega-3 EPA i DHA.

Fig. 1. Chromatograms of fatty acids profile for 3 selected formulations; the peaks indicated by arrows show EPA and DHA omega-3 fatty acids.

Zależność ta dotyczyła głównie preparatów zawierających olej rybi wątrobowy – tranów, w mniejszym stopniu, lecz również preparatów zawierających olej rybi tkankowy. Obserwowana sezonowość wiąże się ściśle z okresami zmniejszonej odporności organizmu i większym narażeniem na infekcje, zjawisko to tłumaczy przyczynę zakupu ww. preparatów przez pacjentów badanych aptek, co jest zgodne z przeprowadzonym wśród nich wywiadem wskazującym na zalecenia lekarskie w tym kierunku.

Dla potrzeb niniejszej pracy wykonano dodatkowo oznaczenia analityczne zawartości długołańcuchowych kwasów tłuszczowych omega-3 (EPA i DHA) w wybranych 3 z omawianych preparatów, tj. Omega-3 Forte, Naturkaps Tran oraz Galomega (tab. IV i ryc. 1). Wyniki wskazują, że analizowane preparaty zawierały zgodny z deklarowanym poziom długołańcuchowych kwasów tłuszczowych omega-3.

Tabela IV

Zawartość kwasów tłuszczowych omega-3 EPA i DHA oznaczona analitycznie i deklarowana przez producenta w 1 g oleju wyodrębnionego z badanych preparatów

Table IV

Measured/producer-declared content of EPA and DHA omega-3 fatty acids in 1 g of oil extracted from evaluated formulations

Wyróżniki	Omega-3 forte	Galomega	Naturkaps tran
EPA oznaczona/deklarowana	188/180	178/168	88/88
DHA oznaczona/deklarowana	126/120	110/102	123/110
Łącznie kwasy omega-3 oznaczona/deklarowana	314/300	288/270	211/198
Udział EPA, %	18,8	17,8/18	8,8
Udział DHA, %	12,6	11/12	12,3

W badanym okresie pojawiały się nowe preparaty, niektóre dość intensywnie reklamowane w pismach farmaceutycznych, jednak ich dostępność w hurtowniach farmaceutycznych była znikoma, a tym samym sprzedaż niewielka. Z nowości wymienić należy preparaty zawierające olej z dyni i olej z wątroby rekina przeznaczone dla osób z dolegliwościami prostaty, preparaty wspomagające widzenie zawierające luteinę i DHA, preparaty dla kobiet w okresie menopauzy. Jednak ich sprzedaż wynosiła zaledwie kilka opakowań w ciągu pół roku (tj. od kiedy pojawiły się na rynku). Jako ciekawostkę zanotowano obecność na badanym rynku tylko jednego preparatu mlekozastępczego wzbogaconego w długołańcuchowe kwasy omega-3 (DHA) przeznaczonego dla niemowląt o nazwie Enfamil. Zawartość DHA w tym preparacie wynosiła 11,5 mg w 100 g pokarmu gotowego do spożycia. Na rynku obecny był także jeden preparat długołańcuchowych kwasów tłuszczowych omega-3 (EPA i DHA) do podawania dożylnego o nazwie Omegaven przeznaczony dla pacjentów, u których żywienie doustne i dojelitowe jest niemożliwe lub przeciwwskazane.

Niektórzy autorzy wskazują, że ze zdrowotno-żywnościowego punktu widzenia bardziej korzystne jest uzupełnianie niedoborów ważnych żywieniowo składników diety poprzez spożywanie produktów wzbogaconych niż stosowanie suplementów (24, 25). Jednak ta zasada nie dotyczy długołańcuchowych kwasów tłuszczowych omega-3, które ze względu na bardzo wysoki stopień nienasylenia są niezwykle podatne na utlenianie i muszą być po wyizolowaniu z tkanek rybich dokładnie chronione przed kontaktem z tlenem z powietrza i składnikami żywności katalizującymi reakcje utleniania. Suplementy w postaci żelatynowych kapsułek o grubych ścianach zapewniają taką ochronę w stopniu znacznie lepszym niż tradycyjne produkty spożywcze, które wzbogaca się dodatkiem oleju rybiego, zwłaszcza jeżeli przechowywane są z dostępem powietrza. Stabilizacja substancjami antyoksydacyjnymi przedłuża trwałość preparatów oleju rybiego i dlatego do większości suplementów producenci dodają zazwyczaj α -tokoferol (witaminę E), który z zasady ma zwiększać stabilność i trwałość tych preparatów. Stabilizację substancjami antyoksydacyjnymi stosuje się w przypadku wszystkich preparatów zawierających olej rybi (zarówno tkankowy jak i wątrobowy) obecnych na rynku farmaceutycznym w Polsce. Jednak coraz więcej doniesień wskazuje, że skuteczność tych zabiegów bywa różna.

WNIOSKI

Na rynku polskim znajduje się obecnie stosunkowo szeroka i ciekawa oferta suplementów zawierających długołańcuchowe kwasy tłuszczowe omega-3 EPA i DHA. Preparaty te cechują się znacznym zróżnicowaniem pod względem zawartości kwasów EPA i DHA. Także cena za dawkę dobową proponowanej kuracji oraz pokrywająca dzienne zalecane minimalne spożycie EPA i DHA istotnie różnicuje te preparaty. W okresie od 01.04 do 02.06 odnotowano istotny wzrost asortymentu i poziomu sprzedaży suplementów zawierających długołańcuchowe kwasy tłuszczowe omega-3 na rynku w postaci kapsułek. Główną przyczyną zakupu tych suplementów przez pacjentów są zalecenia lekarskie. Najwyższym poziomem sprzedaży cechuje preparaty zawierające olej rybi wątrobowy (trany), a pojęcie „kwasy omega-3” wśród pacjentów korzystających z badanych aptek jest nadal prawie nieznane. Wielkość sprzedaży suplementów zawierających długołańcuchowe kwasy omega-3 wykazuje ścisłą zależność od pory roku i jest wciąż stosunkowo niewielka.

W. Kolanowski, W. Mówińska

THE ASSESSMENT OF NUTRITIONAL QUALITY OF OMEGA-3
LONG CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACID FORMULATIONS AVAILABLE
ON POLISH PHARMACEUTICAL MARKET

Summary

The aim of this work was to assess the nutritional quality of, and the market for, formulations containing omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) in fish oil from 3 selected drug stores in Warsaw. A survey of the range of fish oil formulations as well as a comparison of omega-3 fatty acids content, prices of the proposed intakes and doses covering recommended daily minimal intake and the rate of sales during 2004–2006 were made. Forty eight formulations containing omega-3 PUFA from fish oil were found to be present on the market. The amounts of omega-3 PUFA, prices and rates of sales of these products varied widely. There was a growing tendency in the availability and sales of omega-3 formulations in the capsule form; fish liver oil were frequently purchased. The main motivation behind such purchases of the formulations were doctor's recommendations. However, the rate of sales of such formulations was largely dependent on the season of the year and, when compared to the number of customers in the analysed drug stores, continued to be very low.

PIŚMIENNICTWO

1. Dyerberg J., Bang H.O., Hjorne N.: Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1975; 28: 958-966. – 2. Simopoulos A.P.: Omega3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; 54: 438-447. – 3. Connor W.E.: Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71(S): 171-179. – 4. Jatoi A.: Omega-3 Fatty Acid supplements for cancer-associated weight loss. *Nutr Clin Pract.*, 2005; 20: 394-399. – 5. Ruxton C.H., Reed S.C., Simpson M.J., Millington K.J.: The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.*, 2004; 17: 449-459. – 6. Berbert A.A., Kondo C.R., Almendra C.L., Matsuo T., Dichi I.: Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition*, 2005; 21:131-136. – 7. Thautwein E.A.: n-3 fatty acids-physiological and technical aspects for their use in food. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2001; 103: 45-52. – 8. Banning M.: The role of omega-3-fatty acids in the prevention of cardiac events. *Br. J. Nurs.*, 2005; 25: 503-508. – 9. Kromhout D., Bosschieter E.B., Coulander C.: The inverse relation between fish

consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.*, 1985; 312: 1205-1209. – 10. *McCann J.C., Ames B.N.*: Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005; 82: 281-295.

11. *Simopoulos A.P., Leaf A., Salem N.*: Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann. Nutr. Metab.*, 1999; 43: 127-131. – 12. *Dunstan J.A., Prescott S.L.*: Does fish oil supplementation in pregnancy reduce the risk of allergic disease in infants? *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2005; 5: 215-221. – 13. *Facchinetti F., Fazio M., Venturini P.*: Polyunsaturated fatty acids and risk of preterm delivery. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2005; 9: 41-48. – 14. *Boris J., Jensen B., Salvig J.D., Secher N.J., Olsen S.F.*: A randomized controlled trial of the effect of fish oil supplementation in late pregnancy and early lactation on the n-3 fatty acid content in human breast milk. *Lipids*, 2004; 39: 1191-1196. – 15. *Olsen S.F.*: Is supplementation with marine omega-3 fatty acids during pregnancy a useful tool in the prevention of preterm birth? *Clin. Obstet. Gynecol.*, 2004; 47: 768-774. – 16. *Lis E., Świdorski F.*: Oszacowanie spożycia WKT n-3 i n-6 w przeciętnej polskiej racji pokarmowej. (w:) *Gutkowska K., Ozimek I.* (red.), *Konsument i jego zachowania na rynku żywności*. Wyd. SGGW, Warszawa, 2000. – 17. *Kolanowski W., Uchman Ż., Świdorski F.*: Oszacowanie poziomu długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie dorosłych mieszkańców Warszawy. *Bromatol. Chem. Toksyk.*, 2004; 37: 137-144. – 18. The British Nutrition Foundation's Task Force: Unsaturated fatty acids – nutritional and physiological significance. Chapman & Hall, New York, London 1999. – 19. *Sanders T.A.B.*: Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71 (S): 176-181. – 20. *Lovegrove J.A., Brooks C.N., Murphy M.C., Gould B.J., Williams C.M.*: Use of manufactured foods enriched with fish oil as a means of increasing longchain n3 polyunsaturated fatty acids intake. *Br. J. Nutr.*, 1997; 78: 233-238.

21. *Metcalfe R.G., James M.J., Mantzioris E., Cleland L.G.*: A practical approach to increasing intakes of n-3 polyunsaturated fatty acids: use of novel foods enriched with n-3 fats. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2003; 57: 1605-1612. – 22. *Kolanowski W., Laufenberg G.*: Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *Eur. Food Res. Technol.*, 2005; DOI: 10.1007/s00217-005-0089-8. – 23. American Oil Chemists' Society: *Ce 1b-89 Fatty Acid Composition by GLC – Marine Oils* (modified), Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, Fifth ed. AOCS, Champaign, IL, 1997. – 24. *Brzozowska A.*: Wzbogacanie żywności i suplementacja diety składnikami odżywczymi – korzyści i zagrożenia. *Żywność*, 2001; 29: 4, 16-28. – 25. *Kunachowicz H., Nadolna I., Wojtasik A., Przygoda B.*: *Żywność wzbogacana a zdrowie*. Wyd. IŻŻ, Warszawa 2004.

Adres: 02-774 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159c.

Skrajnowska Dorota

MLEKO KOBIECE – KORZYŚCI I ZAGROŻENIA DLA DZIECKA

Katedra i Zakład Bromatologii Akademii Medycznej w Warszawie
Kierownik: prof. ndzw. dr hab. A. Tokarz

Hasła kluczowe: składniki mleka kobiecego, karmienie piersią, zanieczyszczenia, wirusy.

Key words: components of human milk, breastfeeding, pollutants, viruses.

Pierwszym pokarmem, z jakim styka się człowiek jest najczęściej mleko matki. To jedyne w swoim rodzaju i najlepsze źródło wszystkich składników odżywczych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu i dalszego rozwoju zwłaszcza podczas pierwszych miesięcy życia. W skład pokarmu kobiecego wchodzi liczne i bardzo dobrze zbilansowane komponenty takie, jak: woda, białko (o odpowiednim stężeniu i składzie, stosunek białek kazeiny do białek serwatkowych 40:60, wysoki poziom tauryny, karnityny i cystyny oraz niski – fenyloalaniny, tyrozyny i metioniny sprzyja trawieniu tłuszczów, rozwojowi siatkówki i układu nerwowego), tłuszcze (równe proporcje kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych, z niewielką przewagą kwasów nienasyconych koniecznych do prawidłowego wzrostu i mielinizacji OUN), węglowodany (ponad 80% to laktoza – min. ułatwia przyswajanie wapnia, magnezu i żelaza, galaktoza – rozwój układu nerwowego, oligosacharydy i glikoproteidy – wiążą wit. B₁₂ i kwas foliowy), błonnik, składniki mineralne w ilości nie obciążającej nerki niemowlęcia (Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, P, Se, I, Cl), witaminy (A, D, E, K, C, kwas foliowy, kwas pantotenowy, witaminy z grupy B), biotyna – w ilościach pokrywających zapotrzebowanie dziecka). Kontrowersyjna wydaje się być jedynie zawartość witaminy D – w polskich warunkach klimatycznych konieczne jest jej suplementowanie (1, 2). Z innych składników należy również wziąć pod uwagę obecność czynników przeciwniekcyjnych (min. immunoglobulin g λ , IgA, w mniejszych ilościach IgG, IgM, IgD, IgE, cytokin, makrofagów, limfocytów T i B, neutrofilii, granulocytów, frakcji C₃ i C₄ dopełniacza), szeregu hormonów jak: prolaktyny, somatotropiny, somatostatyny, wpływających na rozwój dziecka. Poza tym mleko kobiece zawiera liczne czynniki wzrostowe, które zapewniają prawidłowy przebieg dojrzewania tkanki mózgowej, przewodu pokarmowego i skóry oraz enzymy (proteazy, antyproteazy, które niedopuszczają do trawienia białek odpornościowych, lipazę, laktazę) wreszcie laktoferynę umożliwiającą przyswajanie żelaza do 70% i zapobiegającą namnażaniu się bakterii, poza tym transferynę i nukleotydy (3). Należy podkreślić, że skład mleka kobiecego zmienia się przez cały okres laktacji w każdym indywidualnym przypadku nieco inaczej. Podobnie ilości produkowanego mleka są odpowiednie do masy ciała dziecka. Ludzkie mleko jest wyraźnie różne od krowiego zarówno pod względem zawartości składników odżywczych jak i ciał odpornościowych. Różnice w składzie mleka są powiązane z ich żywieniową ewolucją i dużą różnorodnością wśród zwierząt. Niemowlęta ludzkie rosną bardzo powoli w porównaniu do zwierzęcych. Poza tym należy wziąć pod uwagę inny typ przewodu pokarmowego, odmienną chorobę na jakie zapada człowiek i podstawowych mechanizmów odpornościowych, które są specyficzne gatunkowo. Różnice w składzie mleka kobiecego w porównaniu do mleka krowiego i modyfikowanych mieszanek dotyczą – rodzaju białek, ich proporcji zarówno ilościowych, jak i jakościowych, niebiałkowych frakcji azotowych oraz przede wszystkim zawartości i współczynnika absorpcji witamin i składników mineralnych, rodzaju i ilości kwasów tłuszczowych i immunoglobulin. Reakcja ze strony niemowląt na mleko matki i modyfikowane mieszanki różni się pod wieloma względami: w reakcji immunologicznej, nerkowej, ze strony przewodu pokarmowego, gruczołów dokrewnych i rozwoju fizycznego. Niemowlęta po 6 miesią-

cu życia, oprócz pokarmów uzupełniających nadal karmione piersią mają mniejsze problemy zdrowotne niż ich rówieśnicy, włączając tu zmniejszenie ryzyka astmy, zaburzeń oddechowych, cukrzycy typu I i nawet w przyszłości raka piersi (4, 5, 6).

Zgodnie z danymi literaturowymi na temat karmienia piersią niemowląt można stwierdzić, że są one chronione przed wieloma infekcjami (7) i wykazują lepszy rozwój poznawczy w stosunku do dzieci karmionych mlekiem modyfikowanym (8). Również biorąc pod uwagę historię wielu pokoleń i zdrowy rozsądek wydaje się być niepodważalnym stwierdzenie, że najlepszym pokarmem dla niemowląt zwłaszcza do końca 6 miesiąca życia, jest mleko ich matki. Jednak w związku ze współczesnym stylem życia, przemysłową działalnością człowieka, intensywnym rozwojem rolnictwa i przetwórstwa produktów spożywczych, a co za tym idzie znacznym skażeniem środowiska przez toksyczne odpady przemysłowe oraz celowo i świadomie stosowane sztuczne nawozy, pestycydy – pojawiają się pewne zastrzeżenia nieznanne poprzednim pokoleniom bądź nie tak nasilone i częste jak obecnie.

Szeroko pojęte zanieczyszczenie środowiska, ogromny wybór, powszechna dostępność i co za tym idzie nagminne stosowanie różnych leków, nałogi, wirusowe zakażenia – mogą negatywnie wpływać na rozwój dziecka karmionego pokarmem matki, który może zawierać szkodliwe związki. Substancje będące zanieczyszczeniami przemysłowymi mogą przedostawać się do pokarmu kobiecego z diety matki, ewentualnie z jej narażenia na zanieczyszczone powietrze. Z drugiej strony niektóre substancje szkodliwe mogą być sprawnie metabolizowane i usuwane z organizmu matki, dzięki czemu w bardzo niewielkim stopniu przenikają do mleka kobiecego i tym samym nie stwarzają zagrożenia dla dziecka.

Większość leków przyjmowanych przez matkę przechodzi do pokarmu kobiecego i może być przekazana do noworodka, ale tylko nieliczne wywierają działanie toksyczne na organizm dziecka (9). Najczęstszymi negatywnymi objawami są: biegunki po antybiotykach, senność po środkach uspokajających i pobudliwość po lekach antyhistaminowych. Są pewne grupy leków których stosowanie jest przeciwwskazane w czasie laktacji np.: cytostatyki, metronidazol, izotopy radioaktywne, jod, preparaty antykoagulacyjne. Oczywiście stężenie leku w mleku matki i tym samym jego negatywny wpływ na dziecko będzie zależało od wielu czynników, jak: dawka, budowa chemiczna leku, przebieg leczenia, dzienna ilość wytworzonego mleka, zdrowie matki, jej tolerancja na lek, wreszcie pora przyjmowanie leku (bezpośrednio po karmieniu czy nie). Jednak lekkomyślne przyjmowanie przez karmiące matki niektórych „popularnych” leków, może być niebezpieczne i powodować szereg zaburzeń np.: sulfonamidy (żółtaczka), salicylany (zaburzenia krzepnięcia krwi), paracetamol (methemoglobinemia), chloramfenikol (do mleka wydzielany jest w stosunkowo niskich stężeniach ale potencjalnie może wywołać supresję szpiku kostnego), barbiturany (senność), hormony sterydowe (żółtaczka, zaburzenia rozwoju kości) i inne (9, 10). Podobnie beztrzesko traktowane jest picie większych ilości kawy, alkoholu czy palenie papierosów. Zaobserwowano związek pomiędzy ilością wypijanego alkoholu w czasie ciąży oraz w czasie trzech miesięcy przed zajściem w ciążę, a występowaniem infekcji u niemowląt. U dzieci urodzonych przez kobiety spożywające 7 drinków i więcej tygodniowo w drugim tryestrze ciąży ryzyko wystąpienia infekcji wzrasta siedmiokrotnie (11). Kofeina jest popularnym składnikiem wielu leków oraz wchodzi w skład kawy, herbaty, napojów typu cola itp. Kofeina przechodzi do mleka kobiecego w ilości stanowiącej 1–10% matczynej dawki i już po 1 godz. osiąga maksymalne stężenie. Dzielne spożycie kofeiny przez matkę wypijającą ponad 5 filiżanek kawy (filiżanka kawy zawiera od 80–100 mg kofeiny) może doprowadzić do jej kumulacji w organizmie dziecka, co objawia się rozszerzeniem źrenic, rozdrażnieniem, niepokojem, trudnościami w zasypianiu (12). Podobnie działa teobromina występująca w kakao i czekoladzie. Dlatego lekarze pediatry sugerują aby przeprowadzając wywiad z matką dziecka nadmiernie pobudliwego pytać o wszystkie źródła kofeiny i teobrominy. Umiarkowane picie kawy (filiżanka dziennie) czy okazjonalnie w rozsądnej ilości spożywanie alkoholu, uważane jest przez niektórych badaczy, zwłaszcza pochodzących z krajów o tradycji spożywania napojów z małą zawartością alkoholu za niegroźne dla dziecka karmionego piersią (12, 13). Jednak zgodnie z aktualnym stanowiskiem American Academy of Pediatrics (4) kobieta karmiąca nie powinna pić alkoholu (hamuje laktację, działa szkodliwie na dziecko). Wyjątkowo dopuszcza się spożycie niewielkiej jego ilości podczas rzadkich, ważnych uroczystości i przez 2 godz. po jego wypiciu nie należy karmić piersią (4). Natomiast palenie papierosów powoduje narażenie dziecka na działanie kotyniny i nikotyny w dawkach powyżej 114 mg/dm³ (14). Zatrucie nikotyną w 3 i 4 dniu życia objawia się odmową ssania, wymiotami po karmieniu, szarą skórą i apatią. (15). W pracy *Schulte-Hobeina* i współpr. (16) przebadano 69 niemowląt, których matki paliły ponad 5 papierosów dziennie. Poziom kotyniny w moczu dzieci był porównywalny ze stężeniem w moczu dorosłych. Palenie papierosów wpływa również na dzienną ilość mleka (961 g/24 h a 693 g/24 h) i przyrost masy dziecka (550 g przez 4 dni – 340 g przez 4 dni) (17). Nikotyna i jej główny metabolit kotynina wpływają negatywnie na

rozwój płodu we wszystkich jego etapach. U kobiet palących w czasie ciąży występuje częściej ryzyko przedwczesnego odklejenia się łożyska, porodu i zespół nagłej śmierci noworodka (18).

Wieloletnie stosowanie insektycydów z grupy chlorowanych węglowodorów może być przyczyną najbardziej niebezpiecznego zanieczyszczenia mleka kobiecego przez – polichlorowane bifenyle (PCBs), polibromowane bifenyle (PBBs), dichlorodifenyltrichloroetan (DDT), i jego metabolit DDE (dichlorodifenildieldrin), izomery HCH (heksachlorocykloheksanu) (19). Od 1951 r. znany jest fakt występowania DDT w mleku kobiecym (20). W większości krajów wycofano DDT, ale w krajach rozwijających się nadal jest wykorzystywany. Związki te charakteryzują się dużą trwałością w środowisku, dzięki oporności na fizyczną degradację i biologiczny metabolizm oraz zdolność do biokumulowania się w tkance tłuszczowej i narządach ludzi oraz zwierząt. W praktyce oznacza to, że w organizmach stanowiących kolejne ogniwa łańcucha pokarmowego zachodzi narastanie zawartości związków chloroorganicznych. Biorąc pod uwagę ich stałą obecność, urozmaiconą dietę człowieka, długość życia i to że znajduje się on na szczycie piramidy pokarmowej, polichlorowane bifenyle będą w jego tkankach występować w najwyższych stężeniach. Stwarza dla ludzi realne zagrożenie w postaci przewlekłych zatruc. Występują wówczas następujące objawy: brak apetytu, wychudzenie, niedokrwistość, bóle głowy, wzmoczona pobudliwość nerwowa, zapalenia wielonerwowe, zaburzenia psychiczne czasem także uszkodzenia wątroby i nerek (21). Związki te są powoli wydalane z moczem, kałem i mlekiem matki w okresie laktacji. Dla matki jest to efektywna droga pozbycia się ich i tym samym poprawy stanu zdrowia, ale jest to jednocześnie obciążenie dla młodego organizmu dziecka (22). Przyjmując, że średni masa ciała dziecka w czasie karmienia to 5 kg, zaś dobowe zapotrzebowanie na mleko – 0,7 dm³ to zawartość DDT i pochodnych w mleku kobiecym nie może być wyższa niż 0,036 mg/dm³, aby zgodnie z decyzją WHO dopuszczalne dzienne pobranie (0,005 mg DDT/kg/dobę) nie zostało przekroczone (23). Wyniki badań w Polsce z lat 1975/76 wskazywały na bardzo duże (do kilkunastu razy) przekroczenie dopuszczalnego dziennego pobrania (zwłaszcza dotyczyło to kobiet mieszkających na wsi) (24). W badaniach pochodzących z roku 1996 stwierdzono niższe poziomy niż 20 lat wcześniej dla zawartości sumy pochodnych DDT w mleku kobiecym (jednak 4 razy został przekroczony poziom najwyższy dopuszczalnej pozostałości w żywności przeznaczonej dla niemowląt (25). Rozporządzenie MZiOS z dnia 19 XII 2002 podaje najwyższe dopuszczalne pozostałości (NDP) chemicznych środków ochrony roślin w środkach spożywczych dla niemowląt i małych dzieci, które wynoszą np. dla HCH 0,005 mg/kg produktu i dla sumy pochodnych DDT 0,01 mg/kg produktu (26). Najwyższe poziomy tych związków wykrywane są w pierwszych dniach laktacji (25, 27, 28). Również na świecie prowadzi się stały monitoring zawartości chlorowanych węglowodorów w mleku kobiecym, stąd wiadomo, że występują duże różnice w poziomie pozostałości chlorowanych węglowodorów w różnych krajach. Powstaje pytanie, czy pozostałości tych związków przedostające się z mlekiem matki mają istotny wpływ na rozwój noworodka dużo bardziej wrażliwego na działanie tych związków niż dorośli, zwłaszcza na niedotlenienie tkanki mózgowej. Wielu badaczy sądzi, że potomstwo jest bardziej narażone w czasie karmienia niż w czasie ciąży, zdarzają się też doniesienia o braku istotnego krótkoterminowego wpływu na wzrost czy zachorowalność dzieci (29,30). Podsumowując, karmienie mlekiem matki, które zawiera chlorowane węglowodory prowadzi do magazynowania tych związków na kolejne pokolenia. Tym samym trzeba brać pod uwagę możliwe efekty uboczne (zdrowotne), jak: zmiany w ilorazie inteligencji i długoterminowe liczne czynniki wywołujące nowotwory (przy narażeniu na PCB i PBB).

Mleko matki jest przypuszczalnie idealnym źródłem makro- i mikroelementów dla dziecka. Po wszechnie znanym jest fakt, że skład mleka zmienia się w czasie laktacji dostosowując się do wieku dziecka i jego zapotrzebowania. Wydzielanie pierwiastków do mleka również zmienia się w czasie. Biodostępność składników mineralnych z pokarmu kobiecego jest znacznie wyższa niż z mleka krowiego i modyfikowanego (31). Dla przykładu w pokarmie kobiecym zawartość żelaza jest niewielka ale jest ono bardzo dobrze przyswajalne aż w 50%, podczas gdy żelazo z mleka krowiego jest wykorzystywane jedynie w 5–10% (31). Noworodki wymagają większego stężenia niektórych pierwiastków w sianie, bowiem początkowo zarówno wytwarzanie mleka jak i zdolność do pobrania pokarmu jest niewielka w porównaniu do późniejszego okresu (32). Ilość składników mineralnych w mleku będzie również uzależniona od organizmu matki. Powodem różnic mogą być: pobieranie z pożywieniem, ich status w organizmie czyli stopień wysycenia ustroju a również wzrost i wiek matki, obszar zamieszkania, dochód, długość trwania ciąży i masa ciała dziecka (33, 34, 35). Należy podkreślić, że dane w piśmiennictwie dotyczące składników mineralnych w pokarmie kobiecym są bardzo różnorodne i często przeciwstawne. Nie są w pełni poznane mechanizmy regulujące wydzielanie pierwiastków do mleka kobiecego. Szczególnie istotne wydaje się ustalenie zawartości składników mineralnych podczas wczesnej laktacji i potem wytwarzania mlecznych substytutów tego pokarmu. Inną grupą pierwiastków

są tzw. pierwiastki toksyczne, głównie ołów i kadm, których podwyższona zawartość może być szkodliwa dla dziecka. Jak wiadomo metale ciężkie odgrywają negatywną rolę w rozwoju OUN dzieci. Wykazano, że nadmierne narażenie na ołów w podwyższonym stężeniu powoduje obniżenie IQ. Nie ma progu bezpiecznego, przyjęto, że jedyny bezpieczny poziom to poziom w granicach wykrywalności (36). Pierwiastek ten wpływa min. na funkcje ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Na ośrodkowy układ nerwowy dziecka, może także wpływać narażenie na ołów podczas życia płodowego, bowiem łożysko nie stanowi bariery dla ołowiu. W związku z tym stężenie ołowiu we krwi noworodka jest podobne do stężenia u matki (30). U dzieci, u których w okresie płodowym stężenie ołowiu we krwi wynosiło 10–25 $\mu\text{g}/10\text{ cm}^3$ stwierdzono zmniejszenie zdolności poznawczych w ciągu 24 mies. po urodzeniu w stosunku do grupy dzieci narażonych w mniejszym stopniu (30). Pokarm kobiecy zawiera niewielki procent ilości ołowiu przenikającego z krwi matki (37), ale w zjawisku tym zaznacza się pozytywna korelacja (38). Jak dotąd istnieje mało dowodów świadczących o występowaniu ołowiu w znacznych ilościach w mleku kobiecym. W Polsce maksymalny poziom zanieczyszczeń ołowiem produktów przeznaczonych dla niemowląt i dzieci do lat 3 wynosi 0,02 mg/kg produktu (39).

Mleko kobiece może stanowić dla niemowląt drogę narażenia na kadm, jeśli matka jest narażona na ten pierwiastek. Stwierdzono, że kobiety mieszkające na terenach przemysłowych mogą być bardziej narażone na oddziaływanie kadmu (40). Uważa się, że w czasie laktacji kadm jest przenoszony z surowicy matki do gruczołu sutkowego i wydzielany z mlekiem. Mimo, że kadm w mleku kobiecym jest głównym źródłem narażenia dla niemowląt to jednak wpływ kadmu na ich zdrowie nie został ustalony, bowiem poziom kadmu w mleku kobiecym jest niski. Wiadomo jednak, że kadm może wchodzić w interakcje z głównymi składnikami odżywczymi oraz pierwiastkami śladowymi w mleku kobiecym. Stwierdzono, że u ludzi ma on wpływ na metabolizm wapnia w kościach i nerkach. Badając wzajemne zależności pomiędzy makro- i mikrośkładnikami mleka wykazano, że wysoki poziom Cd w mleku jest czynnikiem nie tylko obciążającym dziecko, ale także obniżającym pobranie wapnia przez niemowlę a również wpływającym na wykorzystanie Zn, Fe, Cu i Se (41). Szereg prac wskazuje na to, że stężenie kadmu w mleku jest ściśle związane ze środowiskowym narażeniem na ten pierwiastek i że występuje odwrotna zależność pomiędzy ilością Cd i Ca w mleku kobiecym (42). Wapń w pokarmie kobiecym pochodzi głównie z kości (gęstość kości obniża się w czasie laktacji, a kości są też narządem krytycznym dla kadmu (42). Stwierdzono ponadto, że nawet przy narażeniu na śladowe ilości Cd dochodzi do obniżenia gęstości kości (43).

Narażenie na kadm w okresie noworodkowym może pochodzić z podawania innych płynów niż mleko kobiece oraz z dymu tytoniowego (44). Co ciekawe, wykazano występowanie wyższych stężeń kadmu w surowicy niemowląt żywionych sztucznie. Może to być spowodowane wodą używaną do sporządzenia mieszanek. W Polsce maksymalny poziom zanieczyszczeń kadmem produktów przeznaczonych dla niemowląt i dzieci do lat 3 wynosi 0,005 mg/kg produktu (39). W badaniach na zwierzętach wykazano wpływ kadmu na gęstość kości i funkcje nerek u ciężarnych i karmiących szczurów. Podawane ciężarnym samicom związki kadmu wywołują działanie embriotoksyczne i teratogenne. Wady wrodzone najczęściej występują w obrębie głowy i kończyn. Najczęściej stwierdzanymi patologiami były: przepuklina mózgowa, wodogłowie, brak oczu, rozszczep podniebienia, brak kości śródstopia, piszczelowej i ramieniowej (30). W 1993 r. kadm i jego związki zostały uznane przez Międzynarodową Agencję do Walki z Rakiem (IARC) za czynniki rakotwórcze u ludzi (30).

Narażenie na infekcje wirusowe stanowi również poważny problem zdrowotny dla dziecka. Chociaż jest wiele prac dotyczących ochronnego wpływu mleka kobiecego na zakażenia wirusowe dziecka, to trzeba też wziąć pod uwagę możliwe specyficzne zakażenia wirusowe podczas karmienia piersią, np. wirus cytomegalii (CMV) (45), wirus mononukleozy (EBV) (46). W obu przypadkach udowodniono, że wysoki procent dzieci zostaje zainfekowany podczas karmienia piersią. Wyraźnym przeciwwskazaniem do karmienia piersią jest wirusowe zapalenie wątroby A i C w formie objawowej oraz aktywna gruźlica. Wreszcie wirus HIV, jeśli matki zostały zainfekowane po porodzie – źródłem infekcji dla dziecka stanie się mleko (47). Zakażenie wirusem HIV może być również związane z przyjmowaniem narkotyków przez matkę przed, w trakcie i po porodzie, tak więc trudno jednoznacznie określić, na ile samo karmienie piersią zagraża infekcją u dziecka. Ale niewątpliwie zarówno opiaty, jak i kokaina, marihuana przedostają się do mleka i mają wpływ na rozwój dziecka. Bezpośredni wpływ amfetaminy na przebieg ciąży i porodu wiąże się ze zmniejszeniem naczyń krwionośnych i przedwczesnym odklejeniem łożyska, zahamowaniem wzrostu płodu i obumarciem. Objawy głodu narkotycznego obserwuje się u wielu noworodków, których matki przyjmowały w czasie ciąży narkotyki.

Od dawna zwraca się też szczególną uwagę na azotany(III i V) występujące w pokarmie kobiecym, wyjątkowo szkodliwe dla niemowląt i małych dzieci (48, 49, 50). Toksyczność azotanów(V) w środowi-

sku nie sprzyjającym redukcji do azotanów(III) jest stosunkowo niewielka, gdyż wydalane są szybko przez nerki. Wykazano, że azotany(V) ulegają łatwo redukcji pod wpływem reduktazy azotanowej pochodzenia bakteryjnego na przykład w przewodzie pokarmowym, w jamie ustnej, a także w czasie składowania żywności i przechowywania posiłków. Dlatego też problemy zdrowotne wynikające z obecności azotanów(III i V) w żywności i środowisku wiążą się ściśle z azotanami(III), ale należy je rozpatrywać łącznie, wychodząc z założenia, że azotany(V) są potencjalnymi azotanami(III), związkami o dużej toksyczności (51, 52). Znane są przypadki methemoglobinemii i niedokrwistości występującej u dzieci w wyniku spożywania posiłków przygotowanych z żywności i wody zawierającej znaczne ilości azotanów(V). Badania na szeroką skalę przeprowadzono na Węgrzech w latach 1987–1995 (52). Wśród 190 przypadków methemoglobinemii u dzieci poniżej 1 roku życia, w 174 z nich (91%) przyczyną zatrucia była woda do picia i przygotowywania posiłków, w 13 (7%) – żywność i tylko w 3 (2%) przypadkach nie rozpoznano przyczyny. Zgodnie z węgierską normą stężenie azotanów(V) w wodzie nie może przekraczać 40 mg/dm^3 , tymczasem średnia zawartość w wodzie wynosiła 298 mg/dm^3 ($0-980 \text{ mg/dm}^3$) i był przekroczony dopuszczalny poziom w 157 próbkach wody (99%) (53). Toksyczne działanie tych związków nie ogranicza się do wyżej wymienionych schorzeń. W badaniach na zwierzętach wykazano, że działają one niekorzystnie na przemianę witaminy A i tym samym na syntezę białka, na przemianę witamin z grupy B₁, na metabolizm jodu i na procesy wzrostu (52). Warto pamiętać również, że azotyny i tlenki azotu warunkują procesy nitrozowania, a więc syntezę C i N-nitrozopochodnych z substratów będących niejednokrotnie naturalnymi i podstawowymi składnikami prawidłowej żywności, zaś toksyczność oraz karcero- i mutagenność wielu nitrozopochodnych została udokumentowana w licznych badaniach na całym świecie. W pracy *Preston-Martina* i współpr. (54) stwierdzono związek pomiędzy spożywaniem w czasie ciąży przetworów mięsnych peklowanych NaNO₂ a częstością występowania guzów mózgu u dzieci. Jednoczesna suplementacja preparatami witaminowymi zawierającymi witaminy: C, A, E i kwas foliowy nieznacznie zmniejszała ryzyko wystąpienia guza. Zagadnienie występowania azotanów(III i V) w mleku kobiecym nie stanowiło dotychczas w Polsce przedmiotu szerszych opracowań. W latach osiemdziesiątych przebadano mleko od 100 zdrowych kobiet, mieszkankę Warszawy i okolic, stwierdzono, że średni poziom azotanów(V) wynosił – $2,29 \text{ mg/dm}^3$ a azotanów(III) – śladowe ilości (50). Badania *Karłowskiego* i współpr. (55) z tego okresu wykazały, że zawartość azotanów(V) w mleku sproszkowanym oraz w preparatach do żywienia niemowląt i dzieci wynosiła średnio $36,9 \text{ mg/kg}$, zaś azotanów(III) $1,6 \text{ mg}$. W 68% badanych próbek stwierdzono również N-nitrozodimetyloaminę ($0,1-0,8 \text{ }\mu\text{g/kg}$), co wprawdzie stanowi ilość niewielką, lecz wzbudza niepokój, jeśli weźmie się pod uwagę wrażliwość młodych organizmów na działanie substancji szkodliwych oraz ilość tych produktów spożytych przez dzieci, szczególnie w pierwszym okresie życia. Przyczyną skażenia przetworów mlecznych była duża zawartość KNO₃ w mleku krowim oraz wzrost poziomu azotanów(III i V) podczas procesów technologicznych takich, jak zagęszczanie i suszenie. Duże znaczenie miał również bardzo zły stan mikrobiologiczny mleka. W jednej z prac dotyczących sposobu karmienia niemowląt, porównano 3 grupy karmiących kobiet (48). Pierwsza grupa karmiła dzieci tylko piersią, druga stosowała karmienie mieszane, a trzecia tylko za pomocą preparatów do początkowego i dalszego żywienia niemowląt. Okazało się, że najwyższe stężenie NO wystąpiło w 4 dobie karmienia naturalnego i było istotnie statystycznie wyższe w grupie 1 niż w grupie 2 i 3. W grupie karmionej tylko preparatami do żywienia niemowląt poziom NO był najniższy. Wydaje się, że okresowe badania pokarmu kobiet pozwoliłyby ustalić, jaka zależność istnieje pomiędzy żywnością i wodą, a poziomem azotanów w pokarmie i tym samym zdrowiem i rozwojem młodego organizmu.

Karmienie piersią jest niewątpliwie najkorzystniejszym i najbardziej racjonalnym sposobem żywienia niemowląt. Mleko matki jest jedynym swoistym gatunkowo pokarmem dla niemowlęcia, gdyż jest dostosowane do możliwości trawienia, przyswajania i metabolizowania przez organizm dziecka. Zawiera wszystkie niezbędne składniki odżywcze i ochronne w odpowiednich ilościach i właściwym składzie, dostosowanym do potrzeb organizmu niemowlęcia i nie obciąża niedojrzałego jeszcze w pełni układu pokarmowego i wydalniczego. Pokarm kobiecy pokrywa całkowicie zapotrzebowanie na składniki pokarmowe przez pierwsze 6 miesięcy życia, oprócz witaminy D. Jednak rosnące uprzemysłowienie i chemizacja wielu dziedzin współczesnego życia, pogłębia także problem oddziaływania różnych związków chemicznych na organizm ludzki. Tym samym stwarza potencjalne niebezpieczeństwa związane z ewentualną obecnością toksycznych substancji w mleku kobiecym i wymusza podejmowanie działań mających na celu określenie stopnia zagrożenia.

D. Skrajnowska

HUMAN MILK: ADVANTAGES AND RISKS TO THE INFANT

PIŚMIENNICTWO

1. *Emmet P.M., Rogers I.S.*: Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. Early Human Development, 1997; 49: S7-S28. – 2. *Hasik J., Gawęcki J.*: Żywnienie człowieka zdrowego i chorego. PWN, Warszawa 2004; tom 2. – 3. *Donovan S.M., Odle J.*: Growth factors in milk as mediators of infant development. Ann. Rev. Nutr., 1994; 14: 147-167. – 4. American Academy of Pediatrics: Policy statement: breastfeeding and the use of human milk. Pediatrics, 2005; 115: 496-506. – 5. *Borch-Johnson K., Joner G., Mander-Poulsen T.*, et al.: Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet, 1984; 26: 1083-1086. – 6. *Byers T., Graham S., Rzepka E., Marshall J.*: Lactation and breast cancer. Evidence for a negative association in premenopausal women. Am. J. Epidemiol., 1985; 121: 664-674. – 7. *Golding J., Emmet P.M., Rogers I.S.*: Does breast feeding protect against non-gastric infections? Early Hum. Dev., 1997; 49: S105-S120. – 8. *Golding J., Emmet P.M., Rogers I.S.*: Association between breast feeding, child development and behaviour. Early Hum. Dev., 1997; 49: S175-S184. – 9. *Ito S., Blajchman A., Stephenson M.*, et al.: Prospective follow-up of adverse reactions in breast-fed infants exposed to maternal medication. Am. J. Obstet. Gynecol., 1993; 168: 1393-1399. – 10. *Taddio A., Ito S.*: Drug use during lactation, In: Corhin G., editor. Maternal-fetal toxicology, a clinicians guide. Second ed. New York: Dekker, 1994; 113-219.

11. *Gauthier T.W., Drews-Botsch C., Falek A., Coles C., Brown L.A.*: Maternal alcohol abuse and neonatal infection, Alcoholism and Experimental Research, 2005; 29(6): 1035-1043. – 12. *Berlin C.M., Denson H.M., Daniel C.H.*, et al.: Disposition of dietary caffeine in milk, saliva and plasma of lactating women. Pediatrics, 1984; 73: 59-63. – 13. *Little R.E., Anderson K.W., Ervin C.H.*, et al.: Maternal alcohol use during breast feeding and infant mental and motor development at one year. New Engl. J. Med., 1989; 321: 425-430. – 14. *Woodward A., Miles H., Grgurinovich N.*: Cotinine in urine of smokers' infants. Lancet 2, 1984; (8408): 935. – 15. *Majewski A.*: Clinical manifestation of nicotine intoxication in breast-fed infants Wiad. Lek., 1979; 32: 275-277. – 16. *Shulte-Hobein B., Schwartz-Bickenbach D., Abt S.*, et al.: Cigarette smoke exposure and development of infants throughout the first year of life: influence of passive smoking and nursing on cotinine levels in breast milk and infant's urine. Acta Paediatr., 1992; 81: 550-557. – 17. *Vio F., Salazar G., Infante C.*: Smoking during pregnancy and lactation and its effects on breast-milk volume. Am. J. Clin. Nutr., 1991; 54: 1011-1016. – 18. *Florek E., Piekoszewski W., Rybakowski Ł., Wrzosek J.*: Kotynina w ocenie aktywnego i biernego palenia tytoniu przez kobiety rodzące. Roczn. PZH, 2003; 54: S34-S36. – 19. *Gladen B.C., Rogan W.J.*: Effects of perinatal polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene on later development. J. Pediatr., 1991; 119: 58-63. – 20. *Laben R.C.*: DDT contamination of feed and residues in milk. J. Anim. Sci., 1968; 27 (6): 1643-1650.

21. *Gertig H., Duda G.*: Żywność a zdrowie i prawo. PZWL, Warszawa 2004. – 22. *Rogan W.J., Bagniewska A., Damstra T.*: Pollutants in breast milk. New Engl. J. Med., 1980; 302: 1450-1453. – 23. *Bronisz H., Ochynski J.*: Zawartość DDT i DDD w mleku kobiecym woj. Lubelskiego. Ped. Pol., 1973; 48(4): 445-451. – 24. *Pawlicki L., Jaworski J., Smoczyński S.*: Chlorowane węglowodory w tłuszczu mleka kobiecego kobiecego rejonu Olsztyna w latach 1975-1976. Problemy Lek., 1976; 24: 163-171. – 25. *Pietrzak-Fiecko R., Smoczyński S.*: Insektycydy chloroorganiczne w mleku kobiecym z Olsztyna w latach 1976, 1986, 1996. Roczn. PZH, 2001; 52: 55-59. – 26. Rozporządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 19 XII 2002 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości środków chemicznych stosowanych w uprawie roślin, które mogą znajdować się w środkach spożywczych lub na ich powierzchni bez szkody dla zdrowia lub życia człowieka (Dz. U. nr 21, poz. 177, Warszawa, dnia 10 II 2003 r.). – 27. *Pawlicki L., Jaworski J., Smoczyński S.*: Pozostałości chlorowanych węglowodorów węglowodorów w tłuszczu mleka kobiecego kobiecego okresie laktacji. Problemy Lek., 1985; 24: 173-178. – 28. *Rogan W.J., Gladen B.C.*: Study of human lactation for effects of environmental contaminants: The North Carolina Breast Milk and Formula Project and some other ideas. Environ. Health Perspect, 1985; 60: 215-221. – 29. *Rogan W.J., Gladen B.C., McKinney J.D.*, et al.: Polychlorinated biphenyls (PCBs), and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE) in human milk: effects on growth, morbidity and duration of lactation. Am. J. Public Health, 1987; 77: 1294-1297. – 30. *Seńczuk W.*: Toksykologia PZWL, Warszawa 2002.

31. *Ciborowska H., Rudnicka A.*: Dietetyka. Żywnienie zdrowego i chorego człowieka. PZWL, Warszawa 2000. – 32. *Ohtake M., Tamura T.*: Changes in zinc and copper concentrations in breast milk and blood of Japanese women during lactation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 1993; 39: 189-200. – 33. *Karra M.V., Kirksey A., Galal O.*, et al.: Zinc, calcium and magnesium concentrations in milk from American and Egyptian women throughout the first 6 months of lactation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1988; 47: 642-648. – 34. *Yoshinaga J., Li J.Z., Suzuki T.*, et al.: Trace elements in human transitory milk. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1991; 31: 159-170. – 35. *Parr R.M., DeMaeyer F.M., Iyengar V.G.*, et al.: Minor and trace elements in human milk from Guatemala, Hungary, Nigeria, Philippines and Zaire, *Biol. Trace Elem. Res.*, 1991; 29: 51-75. – 36. *Needelman H.L., Jackson R.J.*: Commentary: lead toxicity in the 21st century: will we still be treating it?, *Pediatrics*, 1992; 89: 678-680. – 37. *Moore M.P., Goldberg A., Pocock S.*, et al.: Some studies of maternal and infant lead exposure in Glasgow. *Scott Med. J.*, 1982; 27: 113-122. – 38. *Ong C.N., Phoon W.O., Law H.Y.*, et al.: Concentrations of lead in maternal blood, cord blood and breast milk. *Arch. Dis. Child*, 1985; 60: 756-759. – 39. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 stycznia 2003 r. w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń metalami szkodliwymi dla zdrowia (Dz. U. 37, Poz. 326, 4.III.2003). – 40. *Hallen I.P., Jorhem L., Lagerkvist B.J., Oskarsson A.*: Lead and cadmium levels in human milk and blood. *The Science of the Total Environment*, 1995; 166: 149-155.

41. *Honda R., Tawara K., Nishijo M., Nakagawa H., Tanebe K., Saito S.*: Cadmium exposure and trace elements in human breast milk. *Toxicology*, 2003; 186: 255-259. – 42. *Sower M., Corton G., Shapiro B.*, et al.: Changes in bone density with lactation. *J. Am. Med. Assoc.*, 1993; 269: 3130-3135. – 43. *Alfven T., Elinder C.G., Carlesson M.D.*, et al.: Low-level cadmium exposure and osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.*, 2000; 15: 1579-1586. – 44. *Hossny E., Mokhtar G., El-Awady M., Ali I., Morsy M., Dawood A.*: Environmental exposure of the pediatric age groups in Cairo City and its suburbs to cadmium pollution. *The Science of the Total Environment*, 2001; 273: 135-146. – 45. *Peckham C.S., Johnson C., Ades A.*, et al.: Early acquisition of cytomegalovirus infection. *Arch. Dis. Child*, 1987; 62: 780-785. – 46. *Junker A.K., Thomas E.E., Radcliffe A.*, et al.: Epstein-Bar virus shedding in breast milk. *Am. J. Med. Sci.*, 1991; 302: 220-223. – 47. *Ruff A., Coberly J., Halsey N.A.*, et al.: Prevalence of HIV-1 DNA and p24 antigen in breast milk and correlation with maternal factors. *J. AIDS*, 1994; 7: 68-73. – 48. *Akçay F., Aksoy H., Memisogullari R.*: Effect of breast-feeding on concentration of nitric oxide in breast milk. *Ann. Clin. Biochem.*, 2002; 39: 68-69. – 49. *Lizuka T., Sasaki M., Oishi K.*, et al.: Non-enzymatic nitric oxide generation in the stomach of breastfed neonates. *Acta Paediatr.*, 2002; 69: 57-64. – 50. *Miśkiewicz W., Ołędzka R., Kwiecińska K.*: Azotany i azotyny w pokarmie kobiet. *Farmacja Polska*, 1988; 5: 273-275.

51. *Klebanoff S.Y.*: Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: role of nitrite. *Free Radic. Biol. Med.*, 1993; 14: 3510360. – 52. *Drejewicz H.*: Oznaczanie azotynów i azotanów w mleku kobiecym. Praca magisterska, Katedra i Zakład Bromatologii AM w Warszawie, 1982. – 53. *Erzsebet Vegh M., Agocs and Csanady M.*: Methaemoglobinemia among children ≤ 1 year of age. Hungary, 1987–1995. *Journal of Clinical Epidemiology*, 1997; 50(1): 14S-15S. – 54. *Preston-Martin et al.*: Maternal consumption of cured meats and vitamins in relation to pediatric brain tumors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 1996; 5(8): 599-605. – 55. *Karłowski K., Bojewski J.*: N-Nitrozoaminy, azotany i azotyny w środkach spożywczych przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci. *Roczn. PZH*, 1986; 37(3): 179-184.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.

Marta Michalska, Justyna Kołodziejska¹⁾

WPŁYW SKŁADNIKÓW SUPLEMENTÓW DIETY – WAPNIA I MAGNEZU NA LEPKOŚĆ FIBRYNY NIEUSIECIEWANEJ

Zakład Biochemii Farmaceutycznej Katedry Chemii Farmaceutycznej i Biochemii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. R. Wierzbicki

¹⁾ Zakład Technologii Postaci Leku Katedry Farmacji Stosowanej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. n. farm. M. M. Zgoda

Stosowanie diet suplementacyjnych zawierających jony wapnia i magnezu wpływa na procesy biochemiczne, w tym na przebieg krzepnięcia krwi. Zaburzenia procesu krzepnięcia krwi wiążą się ze zmianami struktury fibryny nieusieciowanej (NXL), co można ocenić metodami reologicznymi. Wykazano progresję lepkości fibryny NXL pod wpływem chlorku wapnia i chlorku magnezu w stęż. 0,1–100 mmol/dm³. Chlorek wapnia i magnezu w stęż. 100 mmol/dm³ powodowały wzrost lepkości fibryny z wartości 3,09 odpowiednio do 12,07 i 19,13 mPa·s. Wykazano również zmiany przebiegu krzywej płynięcia układu pod wpływem wprowadzonych jonów.

Hasła kluczowe: magnez, wapń, fibryna, lepkość.

Key words: magnesium, calcium, fibrin, viscosity.

Magnez i wapń są pierwiastkami niezbędnymi dla organizmu, biorą udział w wielu biochemicznych i fizjologicznych procesach, są aktywatorami licznych enzymów (1), wapń katalizuje wewnątrz- i zewnątrzpochodny układ krzepnięcia krwi. Stężenia tych jonów zmieniają się w zależności od rodzaju tkanki oraz subfrakcji komórkowej.

W organizmie stale zachodzą interakcje jonów magnezu i wapnia z różnymi związkami. Zmiany w homeostazie tych metali mogą być spowodowane m. in. intoksykacją ołowiem, chromem czy kadmem (2, 3).

Często dochodzi do niedoborów tych pierwiastków w organizmie (4). Dlatego ważne jest, aby były one dostarczane w diecie lub uzupełniane odpowiednimi jej suplementami.

Obniżona zawartość magnezu wywołuje hipomagnezemia objawiające się zaburzeniami układu nerwowo-mięśniowego, osłabieniem układu kostnego, zmianami w funkcjonowaniu serca i układu krążenia, a także zmianami psychicznymi (5, 6). Na utrzymanie właściwego stężenia wapnia i magnezu w organizmie mają wpływ przyjmowane leki (7).

Chorzy przyjmujący przewlekłe glikokortykosteroidy i otrzymujący witaminę D (kalcitrol) oraz tiazydowe leki moczopędne są podatni na rozwój hiperkalcemii

i wymagają monitorowania stężenia wapnia w surowicy (8). Duże dawki mleczano-glukonianu wapnia podawane w preparatach: Satural, Calcium, Calcium 2000 nasilają działanie glikozydów nasercowych i mogą prowadzić do zaburzeń akcji serca.

Magnez i wapń regulują metabolizm tkanki kostnej, stężenie białka całkowitego w osoczu krwi oraz wpływają na obraz hematokrytu (9). Mikroelementy te powodują normalizację frakcji lipidowej (10). W wyniku suplementacji pacjentów preparatem Slow-Mag B₆ w dawce 320 mg dziennie stwierdza się w surowicy krwi podwyższenie cholesterolu frakcji HDL oraz zmniejszenie puli cholesterolu całkowitego i triglicerydów. Jony wapnia i magnezu mają wpływ na przepuszczalność błon komórkowych i obniżają szybkość przepływu jonów sodu (11). Magnez jest niezbędnym czynnikiem warunkującym przepływ sodu przez błony komórkowe oraz utrzymanie prawidłowego gradientu i potencjału przezbłonowego.

Jony wapnia są regulatorami procesu krzepnięcia. Podawane po leczeniu fibrynolitycznym regulują wskaźnik i czas protrombinowy, czas kaolinowo-kefalinowy, poziom fibrynogenu i liczbę płytek krwi (12). *Shen* i *Lorand* (13) wykazali, że jony wapnia wpływają na przyspieszenie odszczepiania fibrynopeptydów A i B z fibrynogenu. Prowadzi to do zwiększonej dynamiki wytwarzania skrzepu i powoduje zmiany struktury oraz właściwości fizykochemicznych wytworzonej fibryny (14, 15). W obecności czynnika sieciującego (XIII) dochodzi do wytworzenia w strukturze fibryny dodatkowych krzyżowych wiązań ϵ -(γ -glutamylolizynowych) (16, 17, 18). Dodatkowe wiązania pomiędzy łańcuchami γ prowadzą do wytworzenia γ -dimerów i γ -multimerów (19, 20), natomiast wiązania krzyżowe między łańcuchami α prowadzą do wytworzenia α -polimerów (21, 22).

Na strukturę wytworzonej fibryny może mieć wpływ stężenie fibrynogenu, trombiny, czynnika XIII, jonów wapnia, a także czynniki środowiskowe (23) lub podawane leki (8).

Duża różnorodność preparatów wapniowych i magnezowych, stosowanych obecnie jako suplementy diety, musi pozostawać pod kontrolą, gdyż ich nadmiar może m. in. powodować zmiany w strukturze fibryny i prowadzić do zaburzeń w procesie krzepnięcia krwi.

Zmiany zachodzące w strukturze skrzepu pod wpływem jonów wapnia i magnezu są możliwe do określenia po przeprowadzeniu badań fizykochemicznych, spośród których największe znaczenie mają metody reologiczne (24, 25).

Celem pracy była ocena zmian parametrów lepkościowych fibryny nieusieciowanej (NXL) pod wpływem chlorku wapnia i chlorku magnezu w stęż. 0,1–100 mmol/dm³, a także charakterystyka reologiczna wytworzonego skrzepu.

MATERIAŁ I METODY

Przygotowanie prób do badań. 250 mm³ roztworu fibrynogenu (firmy Kabi) o stęż. 3,2 mg/cm³ rozpuszczono w buforze PBS o stęż. 0,1 mol/dm³ i pH 7,3. Następnie dodawano roztwór chlorku wapnia lub chlorku magnezu osiągając stężenia mieszczące się w zakresie: 0,1–100 mmol/dm³ w próbce. Po inkubacji przez 1 min. w temperaturze pokojowej, do prób dodawano 250 mm³ roztworu trombiny (Biomed, Lublin) o stęż. 8 NIH/cm³ rozpuszczonej w 0,9% NaCl. Próby ponownie inkubowano w ciągu 5 min. w temperaturze pokojowej. Próby kontrolne nie zawierały chlorku wapnia lub chlorku magnezu.

Pomiary lepkościowe (13, 14). Badania lepkościowe przeprowadzono w temp. 37°C za pomocą reometru cyfrowego typu stożek-płytką firmy Brookfield, DV-III, wersja 3,0 połączonego z termostatem łaźniowym PGW E-1 firmy Medingen.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W tab. I zestawiono wartości lepkości fibryny nieusieciowanej (NXL) po dodaniu chlorku wapnia lub chlorku magnezu w stęż. 0,1–100 mmol/dm³.

Tabela I

Lepkość fibryny nieusieciowanej wyznaczona przy tej samej szybkości ścinania po dodaniu chlorku wapnia lub chlorku magnezu w stęż. 0,1–100 mmol/dm³

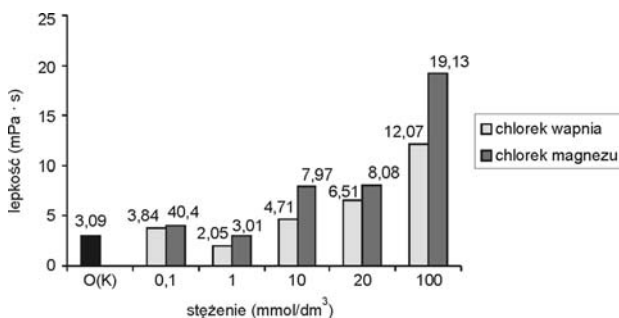
Table I

Viscosity of non-cross-link fibrin (NXL) determined at the same clotting time after addition of calcium chloride and magnesium chloride at 0,1–100 mmol/dm³

Stężenie CaCl ₂ (mol/dm ³)	Wartość lepkości $\bar{x} \pm SD$ (mPa · s)	Stężenie MgCl ₂ (mol/dm ³)	Wartość lepkości $\bar{x} \pm SD$ (mPa · s)
0,1	3,84 ± 0,03	0,1	4,04 ± 0,02
1	2,05 ± 0,03	1	3,01 ± 0,01
10	4,71 ± 0,01	10	7,97 ± 0,06
20	6,51 ± 0,01	20	8,08 ± 0,07
100	12,07 ± 0,06	100	19,13 ± 0,15

n = 5, $\bar{x} \pm SD$

Zmiany lepkości fibryny nieusieciowanej (NXL) po dodaniu chlorku wapnia lub chlorku magnezu w odniesieniu do próby kontrolnej przedstawiono na ryc. 1.

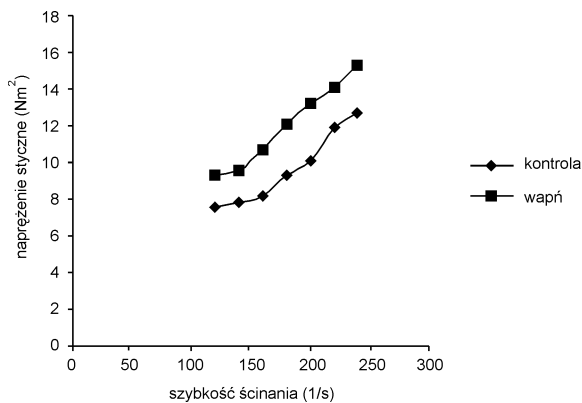


Ryc. 1. Zmiany lepkości fibryny nieusieciowanej (NXL) po dodaniu chlorku wapnia i chlorku magnezu w odniesieniu do próby kontrolnej.

Fig. 1. Changes in the viscosity of non-cross-link fibrin (NXL) after addition of calcium chloride and magnesium chloride at 0,1–100 mmol/dm³ vs. control.

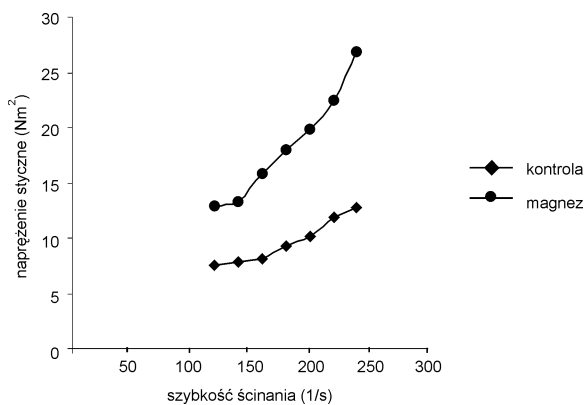
Wprowadzenie chlorku wapnia lub chlorku magnezu w stęż. 0,1–100 mmol/dm³ powoduje zmiany lepkości fibryny nieusieciowanej. Zastosowanie powyższych stężeń obydwu związków (z wyjątkiem stęż. 1 mmol/dm³) spowodowało statystyczny wzrost lepkości badanego układu (ryc. 1). Zaobserwowano silniejszy wpływ chlorku magnezu na lepkość fibryny w porównaniu z chlorkiem wapnia (tab. I). Lepkość próby kontrolnej wynosiła 3,09 mPa · s. Dodanie chlorku wapnia w stęż. 100 mmol/dm³ spowodowało wzrost lepkości do wartości 12,07 mPa · s, a chlorku magnezu – do wartości 19,13 mPa · s (ryc. 1).

Krzywe płynięcia (zależność naprężenia stycznego od szybkości ścinania) fibryny nieusieciowanej (NXL) po dodaniu chlorku wapnia i chlorku magnezu przedstawiono na ryc. 2 i 3.



Ryc. 2. Krzywa płynięcia fibryny nieusieciowanej (NXL) po dodaniu chlorku wapnia (100 mmol/dm³).

Fig. 2. NXL flow curve after addition of calcium chloride at 0,1–100 mmol/dm³.



Ryc. 3. Krzywa płynięcia fibryny nieusieciowanej (NXL) po dodaniu chlorku magnezu (100 mmol/dm³).

Fig. 3. NXL flow curve after addition of magnesium chloride at 0,1–100 mmol/dm³.

Fibryna nieusieciowana (NXL) ma charakter układu nieniutonowskiego, którego krzywa płynięcia nie jest linią prostą i nie przechodzi przez początek układu współrzędnych. Jest to płyn zagęszczany ścinaniem, dla którego naprężenie stycznne rośnie szybciej niż liniowo wraz ze zwiększaniem szybkości ścinania.

Po dodaniu chlorku wapnia lub chlorku magnezu fibryna zachowuje charakter układu zagęszczanego ścinaniem. Dla fibryny obciążonej chlorkiem wapnia uzyskano podobne zależności, jak dla próby kontrolnej (fibryna nieusieciowana), tzn. w całym zakresie szybkości ścinania obserwuje się łagodny wzrost naprężenia ścinającego. Po wprowadzeniu chlorku magnezu, łagodny wzrost naprężeń stycznych następuje tylko przy niższych szybkościach ścinania (450–600 1/s). Powyżej szybkości ścinania 600 1/s odnotowano znaczną progresję naprężenia ścinającego, co świadczy o większej dezintegracji struktury wewnętrznej skrzepu pod wpływem jonów magnezu.

WNIOSKI

1. Chlorek wapnia lub chlorek magnezu dodany do fibryny nieusieciowanej w stęż. 0,1 – 100 mmol/dm³ zwiększają jej lepkość i zmieniają przebieg krzywej płynięcia.

2. Chlorek magnezu wywiera silniejszy wpływ na strukturę badanego układu, niż chlorek wapnia.

3. Takie działanie jonów wapnia i magnezu może sugerować, że dieta suplementacyjna zawierająca te metale może prowadzić do zwiększonej krzepliwości krwi.

4. Fibryna nieusieciowana może być prostym i wygodnym modelem oceny wpływu leków i innych związków na układ krzepnięcia.

M. Michalska, J. Kołodziejska

THE EFFECT OF CALCIUM AND MAGNESIUM DIETARY SUPPLEMENTS
ON THE VISCOSITY OF NON-CROSS-LINK FIBRIN

Summary

Changes in the viscosity and flow curve for non-cross-link fibrin (NXL) due to calcium chloride or magnesium chloride added at 0.1 to 100 mmol/l are reported. Both calcium chloride and magnesium chloride added to NXL at 0.1 to 100 mmol/l act to increase NXL viscosity. Magnesium chloride was more effective: adding calcium chloride at 100 mmol/l increased NXL viscosity from 3.09 mPa·s to 12.07 mPa·s, while corresponding rise in the viscosity for magnesium chloride was 19.13 mPa·s. The shape of the NXL flow curve was shown to be affected by the addition of the ions, indicating a change in fibrin structure.

PIŚMIENNICTWO

1. *Abad C., Teppa-Garran A., Proverbio T.*: Effect of magnesium sulfate on the calcium – stimulated adenosine triphosphatase activity and lipid peroxydation of red blood cell membranes. *Biochem. Pharmacol.* 2005; 70(11): 1634-1641. – 2. *Sztanke M., Pasternak K.*: The influence of various metals on magnesium concentration in cellular subfractions of certain rat tissues. *Ann. UMCS. Sect.* 2003; 58: 285-289. – 3. *Majsnerowicz M., Steciwko A., Woźniak M.*: Ocena gospodarki magnezowej u chorych hemodializowanych. *Nefrol. Dializ. Pol.* 2004; 8: 22-27. – 4. *Kwiecińska A.*: Niedobór magnezu. *Porad. Lek. Prakt.* 2005; 6: 9-10. – 5. *Sikorski T., Marcinowska-Suchowierska E.*: Ocena metabolizmu Ca-P-Mg i gęstości mineralnej kości u mężczyzn i kobiet z nadżerkowym zapaleniem przełyku leczonych omeprazolem. *Endokr. Pol.* 2003; 54: 281-286. – 6. *Kabadere S., Ztopan P., Korkmaz S., Erol K., Uyar R.*: MgSO₄ and lazardol (U-83836E) partially protects glioma cells against glutamate toxicity in vitro. *Acta Neurobiol. Exp.* 2004; 64: 461-466. – 7. *Lygocka R., Buczkowska-Radlińska J., Jakubowska K., Kozak R., Lipski M., Chlubek D., Myśliwiec Z.*: Wpływ flawonoidów na zawartość wybranych pierwiastków w tkankach zmineralizowanych u szczurów eksponowanych na działanie fluorku sodu w wodzie pitnej. *Stom. Współcz.* 2004; 11: 14-17. – 8. *Skrętkowicz K., Skrętkowicz J.*: Mleczanoglukonian wapnia – często stosowana sól wapnia. *Farm. Pol.* 2002; 58: 67-71. – 9. *Tatałaj M.*: Zaburzenia homeostazy wapniowo-fosforanowo-magnezowej i metabolizmu tkanki kostnej w przewlekłej niewydolności nerek. *Post. Nauk Med.* 2000; 13, 46-50. – 10. *Kozielec T., Chlubek D., Kotkowska L., Michoń P., Noceń I.*: Blood magnesium in patients with dislipidemia and effect of oral magnesium supplementation (Slow-Mag B₆) of serum lipids. *J. Elem.* 2004; 9: 609-615.

11. *Kucharski W., Salomon P.*: Wpływ magnezu na wskaźniki szybkości przepływu sodu przez błony komórkowe limfocytów u chorych na nadciśnienie tętnicze. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1996; 96: 1-7. – 12. *Rekosz J.*: Magnez zapobiega nawrotom niedokrwienia po leczeniu fibrynolitycznym ostrego zawału

- serca. Kard. Pol. 1996; 45: 20-24. – 13. *Shen L., Lorand L.*: Contribution of fibrin stabilization to clot strength. J. Clin. Invest. 1983; 71: 1336-1341. – 14. *Ryan E.A., Mockros L.F., Weisel J.W., Lorand L.*: Structural origins of fibrin clot rheology. Biophys J. 1999; 77: 2813-2826. – 15. *McDermott M.K., Chen T., Williams C.M., Markley K.M., Payne G.F.*: Mechanical properties of biomimetic tissue adhesive based on the microbial transglutaminase – catalyzed crosslinking of gelatin. Biomacromolecules 2004; 5: 1270-1279. – 16. *Matacic S., Loewy A.G.*: The identification of isopeptide cross links in insoluble fibrin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968; 30: 356-362. – 17. *Mckee P.A., Mattock P., Hill R.L.*: Subunit structure of human fibrinogen, soluble fibrin and cross-linked insoluble fibrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1970; 66: 738-744. – 18. *Pisano J.J., Finlayson J.S., Peyton M.P.*: Cross-link in fibrin polymerized by factor XIII: ϵ -(γ -glutamyl) lysine. Science 1968; 160: 892-893. – 19. *Chen R., Doolittle R.F.*: γ - γ Cross – binding sites in human and bovine fibrin. Biochemistry 1971; 10: 4486-4491. – 20. *Doolittle R.P., Chen R., Lau F.*: Hybrid fibrin: proof of the intermolecular nature of γ - γ cross-linked units. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1971; 44: 94-100.
21. *Mosesson M.W., DiOrio J.P., Siebenlist K.R., Wall. J.S., Bainfel J.*: Evidence for a second type of fibril branch point in fibrin polymer networks, the trimolecular junction. 1993; 82: 1517-1521. – 22. *Gron B., Fillion- Myklebust C., Bennick A., Nieuwenhuizen W., Matsueda G.R., Brosstad F.*: Early cross-linked fibrin in human plasma α polymers with intact fibrinopeptide A. Blood Coagul. Fibrinolysis 1992; 3: 731-736. – 23. *Michalska M., Wierzbicki R.*: Plasma and platelet fibrin-stabilizing factor activity in rats intoxicated with phenylmercuric acetate. Pol. J. Pharmacol. Pharm. 1984; 36: 611-615. – 24. *Mockros L.F., Roberts W.W., Lorand L.*: Viscoelastic properties of ligation-inhibited fibrin clots. Biophys. Chem. 1974; 2: 164-169. – 25. *Nelb G.W., Gerth C., Ferry J.D.*: Rheology of fibrin clots. III. Shear creep and creep recovery of fine ligated and coarse unligated. Biophys. Chem. 1976; 5: 377-387.

Adres: 90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 1.

Agnieszka Dorosz, Jerzy Łukasiak,
Walenty Nyka¹⁾, Grzegorz Kozera¹⁾, Bartosz Karaszewski¹⁾

ZASTOSOWANIE ANALIZY PIERWIASTKOWEJ WŁOSÓW DO MONITOROWANIA SUPLEMENTACJI MAGNEZEM

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej z Pracownią Analizy Instrumentalnej
Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: prof. dr hab. J. Łukasiak

¹⁾ Klinika Neurologii Dorosłych Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: dr hab. med. W. Nyka

Badania dotyczyły oceny skuteczności suplementacji preparatami magnezu na podstawie analizy zawartości magnezu w próbkach włosów. Przeprowadzono badania zawartości magnezu w próbkach włosów 25 pacjentów z rozpoznaniem – stwardnienia rozsianego, przyjmujących preparaty magnezowe dostępne na polskim rynku farmaceutycznym oraz grupy kontrolnej (55 osób) nie przyjmujących takich preparatów. Stwierdzono statystycznie istotną, wyższą średnią zawartość magnezu we włosach osób suplementowanych preparatami magnezu, w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio 94,2 µg/g s.m. i 52,6 µg/g s.m.).

Hasła kluczowe: magnez, suplementacja, analiza włosów.

Key words: magnesium, supplementation, hair analysis.

Badania prowadzone w Polsce wskazują, że w naszej populacji istnieją niedobory biologiczne ważnych pierwiastków takich, jak: magnez, cynk, żelazo (1–6). Szczególnie powszechnym zjawiskiem jest niedobór magnezu, który, jak dowodzą obserwacje kliniczne, może mieć istotne znaczenie w patogenezie zaburzeń komorowych rytmu serca, stanów anafilaktycznych, nagłych zgonów niemowląt i dorosłych, zaburzeń przebiegu ciąży, a także przyczynia się do powikłań chorób społecznych np. cukrzycy i alkoholizmu.

Uzupełnianie niedoborów mineralnych, lub zapobieganie ich powstawaniu polega najczęściej na substytucji preparatami farmakologicznymi. Na rynku farmaceutycznym dostępnych jest wiele preparatów zawierających różne związki magnezu (asparginian, chlorek, cytrynian, glukonian, lewulinian, mleczan, siarczan, tlenek, węglan, wodorotlenek). Skład i postać leku mają ogromny wpływ na biodostępność magnezu z określonej formy leczniczej. Skuteczność suplementacji zależy także od czynników osobniczych takich, jak: pH soku żołądkowego, stosowana dieta i przyjmowane leki. To wszystko sprawia, że skuteczność suplementacji, wynikająca ze współistnienia wielu czynników decydujących o przyswajaniu biopierwiastków, powinna być monitorowana, szczególnie wówczas, gdy preparaty te stosowane są nieprzerwanie przez długi okres.

Diagnostyka stanu gospodarki magnezowej organizmu

Określenie aktualnego stanu gospodarki magnezowej organizmu nie jest łatwe (7). W praktyce laboratoryjnej przy oznaczaniu tego pierwiastka stosuje się głównie analizę płynów ustrojowych metodami kolorymetryczną i spektrometrii atomowo-absorpcyjnej, co pozwala określić stężenie magnezu całkowitego. Biologicznie aktywna postać jonowa tego pierwiastka analizowana jest metodą elektroanalityczną (elektrody jonoselektywne), rzadko stosowaną w praktyce klinicznej. Z powodu niemal całkowicie wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia magnezu (zaledwie ok. 1% występuje w płynach pozakomórkowych, 50–60% związane jest w kościach w postaci hydroksyapatytów, ok. 40% zlokalizowane jest wewnątrzkomórkowo, głównie w komórkach mięśni szkieletowych) możliwy jest niedobór tego jonu i niskie stężenie w komórce przy prawidłowym stężeniu w surowicy, dlatego analiza płynów ustrojowych nie jest dostatecznym miernikiem zawartości komórkowej i tkankowej tego kationu. Tym bardziej, że czynniki warunkujące homeostazę sprawiają, że stężenie pierwiastków we krwi może być prawidłowe nawet w stanach ich istotnego tkankowego niedoboru lub nadmiaru. Dlatego poziom magnezu oznacza się również w innych tkankach (w erytrocytach, w krwinkach białych, a także w tkankach uzyskanych w trakcie biopsji i zabiegów chirurgicznych), metody te mają jednak większe znaczenie w badaniach naukowych niż w praktyce klinicznej, ponieważ wymagają specjalnych technik izolacji materiału biologicznego oraz są stosunkowo czasochłonne, nie są więc stosowane do oznaczeń rutynowych. Za najlepszy wskaźnik stanu gospodarki magnezowej wielu autorów uznaje test dożylnego obciążenia magnezem (6), wykonywany wyłącznie w warunkach szpitalnych.

Wszystko to sprawia, że w poszukiwaniu nowych sposobów uzyskania informacji o stanie mineralnym organizmu, coraz większą uwagę przywiązuje się do analizy składu mineralnego włosów.

Badania naukowe wskazują na występowanie korelacji między stężeniem pierwiastków we włosach a ich zawartością w organizmie, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych (8–17).

Próbki włosów pobierane są metodą nieinwazyjną, bezpieczną dla pacjenta, stanowią trwały i stabilny materiał diagnostyczny, łatwy do przechowywania i transportu. Stężenia większości pierwiastków we włosach są znamienne wyższe niż we krwi i innych tkankach, co znacząco ułatwia analizę i zwiększa jej dokładność. W przeciwieństwie do krwi, włosy nie są wrażliwe na mechanizmy homeostatyczne, po okresie wzrostu pozostają wyłączone z przebiegu procesów metabolicznych. Włosy odzwierciedlają średnią dostępność określonego składnika na przestrzeni dłuższego okresu, zależnie bowiem od miejsca pobrania (odległości od skóry głowy), wyniki informują o stanie mineralnym organizmu z okresu ostatnich 6 miesięcy. Na podstawie wyników pierwiastkowej analizy włosów można wnioskować o stanie mineralnym organizmu, modyfikować dietę i ewentualnie dobierać właściwą suplementację witaminowo-mineralną, a także kontrolować skuteczność wprowadzanych zmian dietetycznych.

Celem badań było określenie średniej zawartości magnezu w próbkach włosów grupy osób długotrwale przyjmujących preparaty magnezu oraz grupy nie stosującej suplementacji.

MATERIAŁY I METODY

Badania objęły 25 osób stosujących suplementację magnezem (16 kobiet i 9 mężczyzn, wiek \bar{x} = 62 lata). Byli to pacjenci chorzy na stwardnienie rozsiane, zrzeszeni w Polskim Towarzystwie Stwardnienia Rozsianego Oddział w Gdańsku. Wybór do badań grupy z tym schorzeniem gwarantował rzetelność badań ankietowych, ponieważ pacjenci ci cechują się systematycznością oraz sumiennym przestrzeganiem zaleceń lekarza, co powoduje pożądaną ciągłość wszelkich kuracji. Założono, że kinetyka wchłaniania magnezu z przewodu pokarmowego u pacjentów z stwardnieniem rozsianym oraz jego metabolizm nie ulegają istotnym zmianom w zależności od postaci i fazy choroby (brak takich danych w dostępnej literaturze). Pacjenci przyjmowali następujące preparaty magnezowe: Aspargin, Asmag, Asmag forte, Magne-B₆, Magnefar B₆, Magnesol 150, Magnezin, Laktomag, Oximag. Grupę kontrolną stanowiło 55 osób (25 kobiet i 30 mężczyzn, wiek \bar{x} = 58 lat), które nie przyjmowały preparatów magnezu.

Do badań pobierano próbkę włosów o dł. 1–3 cm, nie poddanych poprzednio zabiegom fryzjerskim, z potylicznej części głowy. Próbki włosów rozdrabniano, myto acetonem i wodą redestylowaną. Mineralizację prowadzono na mokro, w mineralizatorze Digesdahl firmy Hach. Proces przebiegał ze wstępnym trawieniem za pomocą kwasu azotowego HNO₃ (65%) w temperaturze pokojowej, a następnie w temp. 310°C ± 5°C z udziałem H₂O₂ (30%) oraz HCl (37%).

Oznaczenia zawartości magnezu przeprowadzono za pomocą atomowej spektroskopii absorpcyjnej, techniką płomieniową, w płomieniu powietrze-acetylen, przy użyciu spektrometru AA 922 firmy Unicam. Oznaczenia wykonano względem próbek zerowych (n = 6, zawierających wodę destylowaną i reagenty mineralizacyjne), przygotowanych analogicznie jak próbki badane, co służyło ocenie stopnia zanieczyszczenia próbek w procesie mineralizacji. Stężenia analitu obliczano na podstawie równań regresji krzywych wzorcowych wykonanych na przygotowanych wzorcach wodnych.

Kryteria oceny metody analitycznej wyznaczono na podstawie 10 niezależnych pomiarów próbek materiału referencyjnego CRM No397.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zestawienie wyników średnich poziomów Mg w próbkach włosów grupy badanej i kontrolnej przedstawiono w tab. I. Wyliczono średnią arytmetyczną (\bar{x}) i odchylenie standardowe wyników poszczególnych grup (SD). Statystyczne opracowanie wyników przeprowadzono posługując się analizą wariancji, a następnie testem *t*-Studenta. W obliczeniach uwzględniono wyniki zawartości Mg w próbkach włosów w przeliczeniu na gram suchej masy.

Tabela I
Zestawienie wyników badań średnich poziomów Mg w próbkach włosów grupy badanej i kontrolnej

Table I
Mean Mg content in samples of hair from test subjects and controls

Średnia zawartość magnezu w próbkach włosów (μg/g s.m.) $\bar{x} \pm SD$ (przedział)			
grupa badana		grupa kontrolna	
94,2 ± 69,6 (19,3–234,5)		53,6 ± 53,8 (4,3–250,4)	
kobiety	mężczyźni	kobiety	mężczyźni
126,3 ± 68,1 (27,9–234,5)	37,1 ± 10,7 (19,3–54,1)	83,2 ± 65,1 (21,9–250,4)	28,1 ± 19,7 (4,3–86,7)

Stężenie magnezu w próbkach włosów osób suplementowanych magnezem było znacznie wyższe niż w grupie porównawczej i wynosiło odpowiednio: 94,2 mg/g ± 69,6 oraz 53,6 mg/g ± 53,8 (α = 0,0006).

Zaobserwowano znacząco wyższe stężenie magnezu w próbkach włosów kobiet w porównaniu z tym samym parametrem w próbkach włosów mężczyzn w przypadku obu badanych grup. W związku z tym

przeprowadzono wnioskowanie statystyczne w badanych grupach z podziałem na płeć probantów, osobno dla kobiet – grupy przyjmujących i nie przyjmujących preparaty magnezu i mężczyzn obu grup. Za różnice istotne statystycznie uznano te, dla których poziom istotności był mniejszy od 0,05 ($\alpha < 0,05$). W przypadku badanych kobiet wykazano istotną statystycznie różnicę zawartością magnezu we włosach obu porównywanych grup. Dostępna w badaniach grupa mężczyzn stosująca suplementację była zbyt mało liczna, aby można było przeprowadzić prawidłowe wnioskowanie statystyczne.

W społeczeństwie polskim we wszystkich grupach wiekowych obserwuje się obniżenie poziomu magnezu w porównaniu z wynikami uzyskanymi w innych krajach, a ilość magnezu spożywana w codziennej diecie statystycznego Polaka maleje. Wydaje się, że ustalone normy dziennego zapotrzebowania zdrowego człowieka na magnez (RDA recommended daily allowance 300–400 mg (18) są dziś niewystarczające, z powodu dominacji we współczesnej diecie czynników zmniejszających wchłanianie magnezu oraz rosnącego narażenia na stres. Wszystko to jest powodem, że coraz częściej stosowane są preparaty witaminowo-mineralne. Skuteczność przyswajania biopierwiastków z suplementu jest różna w zależności od indywidualnych cech pacjenta. Dlatego celowe wydaje się monitorowanie efektywności suplementacji, szczególnie podczas długotrwałego jej stosowania. Analiza pierwiastkowa włosów może znaleźć zastosowanie w tych badaniach. Badanie wykazało, że długotrwałe przyjmowanie preparatów magnezu może zwiększać stężenie tego pierwiastka w tkance włosa, wobec tego analiza składu mineralnego włosów służyć może ocenie skuteczności suplementacji.

Analiza włosów jest przydatnym narzędziem diagnostycznym, jednakże trudno prawidłowo interpretować wyniki tych badań, ponieważ nie zostały ustalone normy zawartości poszczególnych analityków we włosach. Jest to spowodowane szeroką gamą czynników wpływających na naturalną zmienność składu włosów i tempo ich wzrostu, do których należą: wiek, płeć, pochodzenie etniczne i geograficzne, kolor włosów, zwyczaje żywieniowe oraz inne czynniki (18, 19, 20). Nie jest wobec tego możliwa interpretacja wyników na podstawie porównania parametrów uzyskanych w badanej próbie z ustalonymi wartościami prawidłowymi. Jednocześnie w przypadku tych badań, podobnie jak zawsze przy porównywaniu grupy badanej z grupą kontrolną w analizach biologicznych, powstaje problem adekwatności. Dlatego najwłaściwszym postępowaniem wydaje się monitorowanie próbek pochodzących od konkretnego pacjenta na całym etapie kuracji. Ta prosta i bezpieczna dla pacjenta analiza, może decydować o zmianie stosowanych preparatów i doborze dawki. Skład mineralny włosów analizowany na początku leczenia, a następnie w trakcie procesu podawania preparatów mineralnych może stanowić podstawę oceny skuteczności suplementacji i zwiększyć efektywność kuracji.

A. Dorosz, J. Łukasiak, W. Nyka, G. Kozera, B. Karaszewski

ANALYSING ELEMENTS IN HUMAN HAIR TO MONITOR MAGNESIUM SUPPLEMENTATION THERAPY

Summary

The research was aimed to evaluate the effectiveness of supplementation with magnesium preparations from magnesium content in hair samples. Supplementation of mineral deficiencies or preventing occurrence of such deficiencies most often consists in substitution treatment with pharmacological formulations. There are many formulations including various magnesium compounds on the pharmaceutical market. Drug content and form, along with patient's individual characteristics, significantly influence magnesium bioavailability from a specific formulation. Thus, the effectiveness of supplementation treatment should be monitored, taking into account many co-existing factors affecting the assimilation of bioelements, particularly when these formulations are applied over a long period of time. The correlation between the elements content in hair and the systemic reserves of this element has been demonstrated and, therefore, more attention is paid to the analysis of hair mineral content treated as an indicator for the evaluation of body mineral management. Hair samples of patients who underwent the supplementation treatment (25 persons) and hair samples of a control group (55 persons) who did not take such formulations were analysed. Probandes were the citizens of the Pomeranian Region between 22 and 80 years of age. The concentrations of magnesium in hair tissue were determined by atomic absorption spectrometry (AAS) with flame atomisation. Statistically significant, higher mean mag-

nesium content in hair of magnesium-supplemented patients compared with the control group (94,2 µg/g dry wt. and 52,6 µg/g dry wt., respectively, $\alpha < 0,0006$) was determined. The tests showed the suitability of hair mineral analysis for the evaluation of magnesium formulations supplementation effectiveness. Mineral content of hair checked at the beginning of treatment and subsequently during supplementation treatment with magnesium formulations may help select optimum forms of supplements, doses and the time of therapy to be applied.

PIŚMIENNICTWO

1. *Karczewski J.K.*: Próba oceny środowiska człowieka w oparciu o zawartość magnezu w wybranych materiałach biologicznych. Zakład Higieny i Epidemiologii Akademii Medycznej w Białymstoku, 1996; Białystok. – 2. *Lukasiak J., Cajzer D., Dąbrowska E., Falkiewicz B.*: Zawartość wapnia, magnezu i cynku we włosach studentów Akademii Medycznej w Gdańsku. *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*. 1998; 25(1): 68-72. – 3. *Kozielec T., Drybańska-Kalita A., Kuczyński W., Sałacka A., Zalesny J.*: Występowanie wybranych biopierwiastków we włosach u dzieci w populacji szczecińskiej. *Biul. Magnezol.* 1992; 3(52): 14-28. – 4. *Kozielec T., Drybańska-Kalita A., Hornowska I., Sałacka A.*: Zawartość wapnia, magnezu, cynku, miedzi i żelaza we włosach u dzieci i młodzieży. *Pol. Merkuriusz Lek.* 1996; 1(2): 150-154. – 5. *Czapska D., Karczewski J., Ostrowska Z.*: Zawartość magnezu i cynku we włosach studentów Akademii Medycznej w Białymstoku. *Biul. Magnezol.* 1999; 4(2): 297-301. – 6. *Aleksandrowicz J., Radomska K., Graczyk A., Konarski J.*: Badania zawartości magnezu i wapnia w populacji polskiej na podstawie analizy włosów. *Biul. Magnezol. PTL*, 1991; 6: 23-25. – 7. *Najsnerowicz M., Anyszek T.*: Problemy metodyczne oznaczania magnezu w analityce klinicznej. *Diagnostyka Laboratoryjna*. 2000; 36(2): 209-218. – 8. *Bencko V.*: Use of human hair as a biomarker in the assessment of exposure to pollutants in occupational and environmental settings. *Toxicology*. 1995; 101: 29-39. – 9. *Klevay L.M., Bistrrian B.R., Fleming C.R., Neumann C.G.*: Hair analysis in clinical and experimental medicine. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987; 46: 233-236. – 10. *Bos A.J., van der Stap C.C., Valkovic V., Vis R.D., Verheul H.*: Incorporation routes of elements into human hair; implications for hair analysis used for monitoring. *Sci. Total Environ.* 1985; 42: 157-169.

11. *Hopps H.C.*: The biologic bases for using hair and nail for analyses of trace elements. *Sci. Total Environ.*, 1977; 7: 71-89. – 12. *Iyengar V., Woittiez J.*: Trace elements in human clinical specimens. *Clin. Chem.*, 1988; 34: 474-481. – 13. *MacPherson A., Bocso J.*: Relationship of hair calcium concentration to incidence of coronary heart disease. *Sci. Total. Environ.*, 2000; 255(1-3): 9-11. – 14. *Vance D.E., Ehmann W.D., Markesbery W.R.*: Trace element imbalances in hair and nails of Alzheimer's disease patients. *Neurotoxicology*. 1988; 9(2): 197-208. – 15. *İlhana A., Efsan Uzb., Sinem Kalia., Ahmet Varc.*: Serum and hair trace element levels in patients with epilepsy and healthy subjects: does the antiepileptic therapy affect the element concentrations of hair. *Eur. J. Neurol.*, 1999; 6(6): 705-709. – 16. *Klevay L.M., Christopherson D.M., Shuler T.R.*: Hair as a biopsy material: Trace element data on one man over two decades. *Eur. J.Clinic. Nutr.*, 2004; 58(10): 1359. – 17. *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride*. Washington, DC: National Academy Press. 1997. – 18. *Miekeley N., Dias Carneiro M.T.W., Porto da Silveira.*: How reliable are human hair reference intervals for trace elements. *Sci. Total Environ.*, 1998; 218: 9-17. – 19. *Dormandy T.L.*: Trace element analysis of hair. *B. Med. J.*, 1986; 293: 957-976. – 20. *Chatt A., Katz S.*: Hair analysis. Applications in the Biomedical and Environmental Sciences. New York 1988, Vach. Publishers.

Adres: 80-416 Gdańsk, Al. Gen. Hallera 107.

Magdalena Kwoczek, Eugeniusz Hać¹⁾, Piotr Szefer

ARSEN W OWOCACH MORZA

Katedra i Zakład Bromatologii Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: prof. dr hab. *P. Szefer*

¹⁾ Katedra i Zakład Toksykologii Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: prof. dr hab. *W. Czarnowski*

Oznaczono zawartość całkowitego arsenu w wybranych owocach morza dostępnych na polskim rynku. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że przebadane produkty nie przekraczają wartości PTWI, a tym samym spożycie ich nie stwarza zagrożenia zdrowotnego dla konsumentów.

Hasła kluczowe: arsen całkowity, owoce morza, PTWI.

Key words: total arsenic, seafood, PTWI.

Arsen jest czynnikiem kancerogennym, a także teratogennym. Arsen(III) jest bardziej toksyczny od arsenu(V), a jego nieorganiczne związki od organicznych. Do organizmu ludzkiego związki arsenu dostają się przede wszystkim z przewodu pokarmowego, a także poprzez drogi oddechowe i skórę. Arsen pobrany drogą głównie pokarmową jest metabolizowany, a następnie wydalany najczęściej w postaci związków metylowych odznaczających się mniejszą toksycznością (1, 2).

Już na początku dwudziestego wieku zaobserwowano, że ryby i owoce morza zawierają bardzo wysokie poziomy tego pierwiastka (3). Organizmy te, posiadają zdolność do przyswajania arsenu w ilości o trzy rzędy wielkości większej w porównaniu do jego zawartości w wodzie morskiej stanowiącej środowisko ich życia. Wykształciły one mechanizm obronny, dzięki któremu potrafią przekształcać nieorganiczne formy arsenu w organiczne. W żywności pochodzenia morskiego arsen występuje głównie w postaci nietoksycznej arsenobetainy (>90%) (3, 4).

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 1 października 2002 r. dotyczącym wymagań, jakim powinny odpowiadać morskie wody wewnętrzne i wody przybrzeżne będące środowiskiem życia skorupiaków i mięczaków, stężenie każdej substancji (w tym As) w mięsie tych organizmów powinno być kontrolowane co pół roku i tak ograniczone, aby zapewniona była wysoka jakość produktów z nich wytwarzanych (5). Ze względu na fakt, iż owoce morza, cieszące się coraz większą popularnością w naszym kraju, najczęściej są sprowadzane z krajów odznaczających się wysoką zawartością arsenu w wodzie (Bangladesz, Chile, Indie, Tajwan, Wietnam) (4), kontrola tych organizmów pod kątem zawartości w nich arsenu jest istotnym czynnikiem wpływającym na jakość zdrowotną tych produktów.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły dostępne na rynku krajowym owoce morza przedstawione w tab. I. Do grupy tej zalicza się małże, głownogi, skorupiaki, a także produkty surimi tj. przetwory z dodatkiem ryb.

W celu oznaczenia zawartości całkowitego arsenu wykorzystano procedurę opisaną przez Deaker i współpr. (6), w której zmodyfikowano proces mineralizacji i niektóre warunki analizy w piecu grafitowym.

Badane produkty rozmrażano, usuwano części niejadalne, wysuszono i homogenizowano. Naważki 0,08–0,20 g wysuszonego materiału poddawano procesowi mineralizacji z 4 cm³ 65% roztworu kwasu HNO₃ (Merck, Suprapur) i 1 cm³ 30% roztworu H₂O₂ (Merck, Suprapur) za pomocą mikrofalowego systemu do roztrzawiania próbek MLS – 1200 MEGA. 10 mm³ mineralizatu i 10 mm³ modyfikatora Pd i Mg (0,03 mg Pd(NO₃)₂ i 0,02 mg Mg(NO₃)₂ w 20 mm³ 10% HNO₃) наносono do kuwety pieca grafitowego i oznaczano zawartość całkowitego arsenu za pomocą absorpcyjnej spektroskopii atomowej (Awanta Σ, firmy GBC) z zastosowaniem elektrotermicznego wzbudzenia (ETAAS). Poprawność zastosowanej metodyki sprawdzono na podstawie analizy certyfikowanych materiałów odniesienia. Odzysk mieścił się w przedziale wartości 104% i 82,2%, a precyzja wynosiła 10,2% i 19,1% odpowiednio dla wątrobotrzuski homara TORT-2 i mała NCS ZC 78005.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Badaniami objęto produkty występujące w dwóch formach, tj. w postaci obranych, często wstępnie obgotowanych, nadających się bezpośrednio lub po niewielkiej obróbce kulinarnej do spożycia oraz takich, które przed konsumpcją należy pozbawić części niejadalnych. Do pierwszej grupy należą m.in. produkty surimi (paluszki z kraba, Kamaboko), krewetki koktajlowe, Torpedo lub kalmary pierścienie panierowane. Natomiast w skład drugiej grupy wchodzi ośmiornice, krewetki w pancerzykach, krab czy homar.

Wyniki analiz dotyczących zawartości całkowitego arsenu w badanych owocach morza przedstawiono w tab. I. Uzyskane rezultaty wskazują na znaczne zróżnicowanie wewnątrz i zewnątrzgatunkowe w zawartości całkowitego arsenu, w zależności od stopnia przetworzenia technologicznego, miejsca połowu, a także indywidualnych predyspozycji analizowanych organizmów.

Tabela I
Średnia zawartość arsenu z uwzględnieniem odchylenia standardowego i zakresu stężeń
w wybranych owocach morza (mg/100 g m.m.)

Table I
Values of mean arsenic concentration (+SD and range) in seafood (mg/100 g wet weight)

Produkt	Pochodzenie	As	Uwagi dotyczące produktu
Krewetka koktajlowa	Indie	<0,012	gotowana
Krewetka zimnowodna	Norwegia	1,67 ± 0,29 (1,37–1,95)	gotowana
Krewetka głębokowodna	Indie	<0,012	gotowana
Krewetka Black Tiger	Tajlandia	<0,012	gotowana
Krewetka Black Tiger	Tajlandia	<0,012	surowa
Krewetka grenlandzka w pancerzu	Norwegia	1,56 ± 0,25 (1,31–1,81)	gotowana
Krewetka koktajlowa zimnowodna	Norwegia	0,72 ± 0,14 (0,59–0,86)	gotowana
Krewetka Torpedo	Tajlandia	<0,012	panierowana
Langustynka	W.Brytania	0,23 ± 0,03 (0,21–0,26)	gotowana
Krab	W.Brytania	1,23 ± 0,03 (1,16–1,35)	gotowany; mięso ze szczypiec

Tabela I (cd.)

Produkt	Pochodzenie	As	Uwagi dotyczące produktu
Homar	Kanada	0,39 ± 0,05 (0,33–0,43)	gotowany
Ośmiornica „baby”	Tajlandia	0,05 ± 0,01 (0,05–0,06)	surowa
Ośmiornica śródziemnomorska	Hiszpania	0,87 ± 0,03 (0,84–0,91)	surowa; ramię
Ośmiornica filipińska	Filipiny	0,29 ± 0,02 (0,27–0,30)	surowa; ramię
Małże gotowane	Tajlandia	0,05 ± 0,01 (0,04–0,07)	gotowane
Małże w muszli	N. Zelandia	0,12 ± 0,02 (0,10–0,14)	surowe
Małże św. Jakuba	W. Brytania	0,02 ± 0,00 (0,02–0,02)	gotowane
Kalmary pierścienie	Hiszpania	< 0,012	surowe
Kalmary tuby	Hiszpania	< 0,012	surowe
Kalmary pierścienie panierowane	Hiszpania	< 0,012	panierowane
Paluszki z kraba, surimi	Tajlandia	< 0,012	przetworzony technologicznie
Kamaboko – panierowane mięso z kraba	Tajlandia	< 0,012	przetworzony technologicznie

Wśród przebadanych produktów, najwyższym stężeniem arsenu (0,72–1,67 mg/100 g m.m.) odznaczają się krewetki poławiane w wodach norweskich (krewetka zimnowodna, krewetka grenlandzka w pancerzu i krewetka koktajlowa – zimnowodna). Zawartość arsenu w pozostałych krewetkach, podobnie jak w kalmarach i produktach surimi, jest poniżej granicy wykrywalności zastosowanej metody. Podobne rezultaty uzyskali *Muñoz* i współpr. (7), wg których skorupiaki posiadają więcej arsenu niż mięczaki, a najwyższym stężeniem tego pierwiastka (2,62 mg/100 g m.m.) charakteryzuje się krewetka King Prawn. Natomiast *Schoof* i współpr. (8) oraz *Al Ramali* i współpr. (9) zaobserwowali dla różnych gatunków krewetek znacznie niższe stężenia arsenu – odpowiednio 0,05–0,28 mg/100 g m.m. i 0,01–0,03 mg/100 g m.m. Jak wynika z tab. I, wśród pozostałych skorupiaków istotnym poziomem tego pierwiastka (1,23 mg/100 g m.m.) odznacza się krab gotowany. Jest to wynik znacznie wyższy od rezultatów otrzymanych przez *Al-Mohanna* i współpr. (10), którzy w mięśniach kraba *Portunus pelagicus* oznaczyli arsen w zakresie stężeń od 0,04 do 0,09 mg/100 g m.m.

Wśród analizowanych mięczaków najwyższą zawartością arsenu charakteryzuje się ośmiornica filipińska, posiadająca trzykrotnie większą zawartość tego pierwiastka niż ośmiornica śródziemnomorska. Zawartość arsenu w niewielkich rozmiarów ośmiornicach „baby” jest znacznie niższa w odniesieniu do wspomnianych powyżej dwóch dużych ośmiornic. W porównaniu z rezultatami uzyskanymi przez *Muñoz* i współpr. (7) oraz *Airas* i współpr. (11), którzy odpowiednio zanotowali stężenia arsenu w zakresie 0,19–0,37 mg/100 g m.m. i 0,13–0,28 mg/100 g m.m., badane gatunki małży odznaczają się znacznie niższą zawartością tego pierwiastka (0,02–0,12 mg/100 g m.m.).

Według FAO/WHO norma PTWI (tymczasowo tolerowanego tygodniowego pobrania pierwiastków toksycznych) dla arsenu (formy nieorganicznej) wynosi 15,0 µg/kg m.c. dorosłej osoby, co w przeliczeniu na przeciętną masę człowieka (60 kg) stanowi 0,9 mg As. Jak wspomniano powyżej, arsen nieorganiczny stanowi ok. 10% całkowitej jego zawartości (3, 4) i dlatego tą wartością posłużono się w dalszych obliczeniach. Dla krewetek zimnowodnych, odznaczających się najwyższą zawartością tego pierwiastka, założono, że zawartość form nieorganicznych arsenu wynosi 1,67 mg/kg produktu. Tygodniowe pobranie pierwiastka na podstawie średniej konsumpcji produktów rybnych w Polsce (180 g/tydzień) dla krewetek zimnowodnych wynosi 33,4%. Natomiast bezpieczna masa tych skorupiaków, jaką można tygodniowo spożyć nie przekraczając PTWI stanowi 0,54 kg. Owoce morza odznaczają się również znaczącym poziomem Se, który z As tworzy słabo rozpuszczalne selenki, podlegające wyłączeniu ze szlaków biochemicznych. Stąd potencjalna toksyczność analizowanych produktów jest znacznie niższa (12).

WNIOSKI

W pracy przedstawiono pierwsze dane dotyczące zawartości As całkowitego w owocach morza dostępnych na polskim rynku. Ze względu na fakt, że w żywności pochodzenia morskiego nieorganiczne połączenia arsenu stanowią niewielką część jego całkowitej zawartości, a konsumpcja tych produktów w naszym kraju jest stosunkowo niska, praktycznie nie jest możliwe przekroczenie dawki PTWI, a tym samym nie istnieje zagrożenie zdrowotne dla konsumentów związane ze spożyciem owoców morza.

M. Kwoczek, E. Hać, P. Szefer

ARSENIC IN SEAFOOD

Summary

Samples of seafood from the Polish market (blue mussel; great scallop, pink, salad, fresh water and black tiger shrimp; crab; octopus; lobster; squid; and surimi products) were digested in an automatic microwave system and analysed by ETAAS for total arsenic concentration. Health risk to humans from arsenic intake with the food is discussed with reference to the estimated values of PTWI (Provisional Tolerable Weekly Intake).

PIŚMIENNICTWO

1. *Kabata-Pendias A., Pendias H.*: Biogeochemia pierwiastków śladowych. PWN, Warszawa, 1999.
- 2. *Villa-Lojo M.C., Alonso-Rodríguez E., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D.*: Coupled high performance liquid chromatography – microwave digestion – hydride generation – atomic absorption spectrometry for inorganic and organic arsenic speciation in fish tissue. *Talanta*, 2002; 57: 741-750.
- 3. *Clarkson T.W., Friberg L., Nordberg G.F., Sager P.R.*: Biological monitoring of toxic metals, Plenum Press, New York and London 1988.
- 4. *Das H.K., Mitra A.K., Sengputa P.K., Hossein A., Islam F., Rabhani G.H.*: Arsenic concentrations in rice, vegetables, and fish in Bangladesh: a preliminary study, *Environ. Intern.*, 2004; 30: 383-387.
- 5. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 października 2002 r. Dziennik Ustaw Nr 176.
- 6. *Deaker M., Maher W.*: Determination of arsenic in arsenic compounds and marine biological tissues using low volume microwave digestion and electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999; 14: 1193-1207.
- 7. *Muñoz O., Vélez D., Montoro R.*: Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As(III) + As(V)] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 1999; 124: 601-607.
- 8. *Schoof R.A., Yost L.J., Eickhoff J., Crecelius E.A., Cragin D.W., Macher D.M., Mendel D.B.*: A market basket survey of inorganic arsenic in food. *Food Chem. Toxicol.*, 1999; 37: 839-846.
- 9. *Al Ramali S.W., Hari P.I., Harrington C.F., Ayub M.*: A survey of arsenic in foodstuffs on sale in the United Kingdom and imported from Bangladesh. *Sci. Total Environ.*, 2005; 337: 23-30.
- 10. *Al-Mohanna S., Subrahmanyam M.N.V.*: Flux of heavy metal accumulation in various organs of the intertidal marine blue crab, *Portunus pelagicus* (L.) from the Kuwait coast after the Gulf War. *Environ. Intern.*, 2001; 27: 321-326.
11. *Airas S., Duinker A., Julshamn K.*: Copper, zinc, arsenic, cadmium, mercury and lead in blue mussels (*Mytilus edulis*) in the Bergen Harbor area, western Norway, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2004; 73: 76-284.
- 12. *Spallholz J.E., Boylan L.M., Palace V., Chen J., Smith I., Rahman M.M., Robertson J.D.*: Arsenic and selenium in human hair: a comparison of five countries with and without arsenicosis, *Biol. Trace Element Res.*, 2005; 106: 133-144.

Ryszard Amarowicz

ANALIZA HPLC ANTOCYJANIDYN
PO HYDROLIZIE PROANTOCYJANIDYN
GRYKI I KASZY GRYCZANEJ

Zakład Analizy Żywności Oddziału Nauki o Żywności
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
Kierownik: doc. dr hab. *R. Amarowicz*

*Z gryki oraz kaszy gryczanej prażonej uzyskano ekstrakt związków fenolowych stosując 80% aceton. Proantocyjanidyny obecne w ekstrakcie zhydrolizowano do antocyjanidyn roztworem *n*-butanol/HCl. Uwolnione antocyjanidyny analizowano za pomocą metody HPLC. Na chromatogramach zanotowano piki pochodzące od cyjanidyny oraz dwa dodatkowe piki pochodzące od nieznanymi antocyjanidyn, których widmo UV-VIS charakteryzowało się maksimami absorpcji przy 510, 421, 320 i 255 nm (związek A) oraz przy 510, 416, 324 i 254 nm (związek B). Zawartość sumy antocyjanidyn w ekstraktach wynosiła 3,26 mg/g (gryka) i 2,73 mg/g (kasza gryczana).*

Hasła kluczowe: gryka, kasza gryczana, antocyjanidyny, HPLC.

Key words: buckwheat, buckwheat groats, anthocyanidins, HPLC.

Gryka oraz kasza gryczana ze względu na wysoką wartość biologiczną białka (1), zawartość NNKT (2), związków mineralnych (3), oraz błonnika (1) są cennym składnikiem diety człowieka. Duża zawartość związków fenolowych sprawia, że gryka może być wartościowym surowcem przy wytwarzaniu żywności funkcjonalnej (4). Silne właściwości przeciwutleniające ekstraktów z gryki potwierdzone zostały w badaniach modelowych z wykorzystaniem różnych metod chemicznych (4–9). Do związków fenolowych generujących wysoki potencjał przeciwutleniający gryki zaliczyć należy fenolokwasy oraz flawonoidy (rutyna, witeksyna, izowiteksyna, orientyna, izoorientyna, kwercetyna, katechina) (10–15). Z własnych badań wynika, że za aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z gryki i z kaszy gryczanej w dużej mierze odpowiedzialne są skondensowane taniny (16).

Celem prezentowanej pracy było zastosowanie metody HPLC do analizy antocyjanidyn, które uwalniają się z proantocyjanidyn obecnych w ekstrakcie fenolowym z gryki i kaszy gryczanej w wyniku hydrolizy *n*-butanolem/HCl.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły orzeszki gryki oraz kasza gryczana: gryka odmiany *Panda* pochodziła z Ośrodka Hodowli Roślin w Olsztynie, kaszę gryczaną paloną zakupiono w miejscowym sklepie.

Zmieloną próbkę o masie 40 g przesypaną do kolby okrągłodennej obj. 500 cm³ zalano 80% (v/v) roztworem acetonu przy stosunku materiału stałego do solwentu 1:8 (w/v) (17). Następnie szczelnie

zamkniętą kolbę umieszczano w łaźni wodnej z wytrząsaniem. Ekstrakcję prowadzono przez 15 min. w temp. 60°C. Po schłodzeniu, acetonowy supernatant sączono przez bibułę *Whatman* 1. Pozostały na sączku materiał przenoszono z powrotem do kolbki. Ekstrakcję przeprowadzono trzykrotnie, a uzyskane przesącza łączono. Z tak uzyskanego materiału oddestylowano metanol w wyparce rotacyjnej w temp. 40°C, pozostałą zaś wodę usunięto na drodze liofilizacji.

Proces hydrolizy prantocyjanidyn do cyjanidyn prowadzono wg metody podanej przez *Portera* i współpr. (18). Do próbki obj. 10 cm³ z szczelnym zamknięciem odmierzano 6 cm³ odczynnika butanolowego (95 cm³ + 5 cm³ stęż. kwasu solnego), 1 cm³ wodnego roztworu badanego ekstraktu (stęż. 0,1%), 0,2 cm³ 2% roztworu NH₄Fe(SO₄)₂ w kwasie solnym o stęż. 2 mol/dm³, całość dokładnie mieszano, szczelnie zamknięto i ogrzewano przez 50 min. w wrzącej łaźni wodnej. Po schłodzeniu zawartość próbki przelano do kolby miarowej obj. 25 cm³, którą uzupełniano do kreski odczynnikiem butanolowy. Tak przygotowaną próbkę sączono przez filtr 0,45 μm i wstrzyknięto na kolumnę HPLC. Wyniki rozdzielania odniesiono do chromatogramu substancji wzorcowych: delfinidyny, cyjanidyny i malwinidyny, które zakupiono w firmie Extrasynthese (Genay Cedex, Francja).

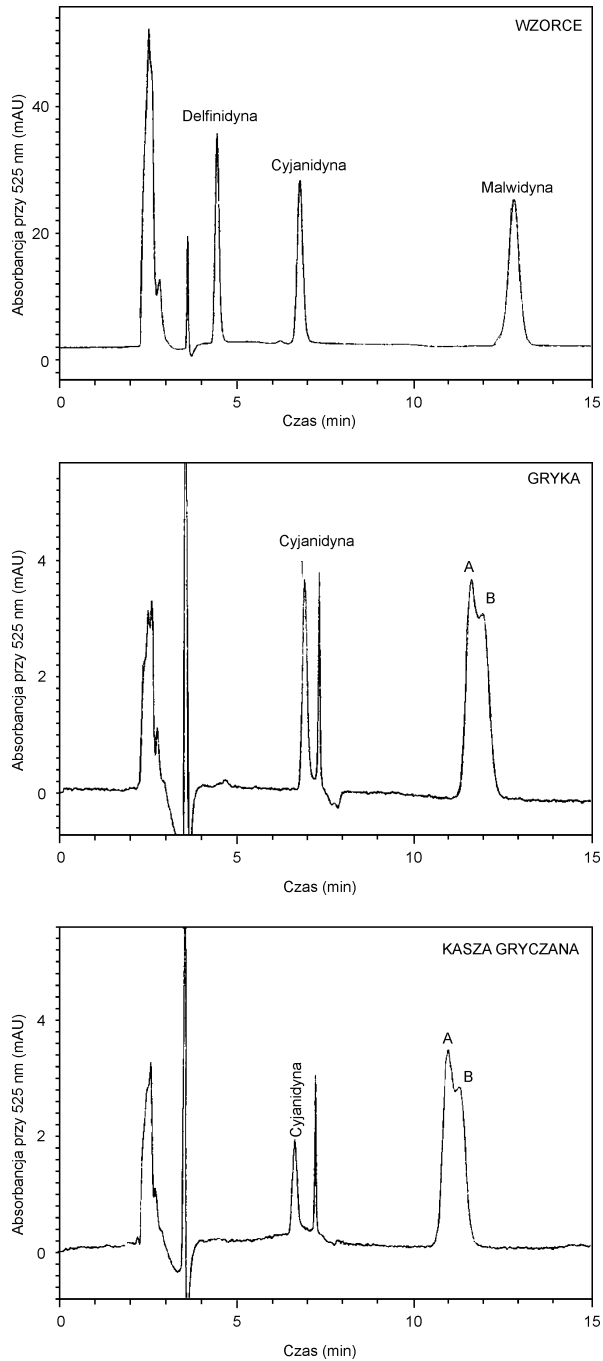
Warunki analizy HPLC: system chromatograficzny firmy Shimadzu składał się z pompy LC 10AD, detektora fotodiodowego SPD-M 10A, systemu kontrolującego SCTL 10A i kolumny LiChrospher 100 RP-18 (4 × 250 mm, 5 μm; Merck). Fazą ruchomą był układ 4% H₃PO₄-acetonitril 80:20 (v/v) (19). Prędkość przepływu wynosiła 1 cm³/min., objętość nanoszonej próbki 0,02 cm³, dł. fali przy detekcji 525 nm.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zastosowana w pracy metoda chromatograficzna pozwoliła selektywnie rozdzielić wzorcowe procyjanidyny (ryc. 1). Czasy retencji uzyskane dla delfinidyny, cyjanidyny i malwinidyny wynosiły odpowiednio 4,55; 6,84 i 12,78 min. Na chromatogramach z rozdzielców procyjanidyn zanotowano obecność 3 pików. W oparciu o czasy retencji i widma UV-VIS (ryc. 2) pierwszy związek zidentyfikowano jako cyjanidynę. Piki pochodzące od związku A (czas retencji 11,70 min.) i B (czas retencji 12,02 min.) w zastosowanych warunkach analizy nie dawały rozdzielania do linii bazowej, co świadczyć może o bardzo podobnej budowie chemicznej tych związków. Przemawia za tym również bardzo zbliżone ich widma UV-VIS. Porównując widma UV-VIS związków A i B z widmami substancji wzorcowych z dużą dozą prawdopodobieństwa przypisać im można strukturę chemiczną procyjanidyn. Widmo UV-VIS związku A i B w porównaniu z widmami delfinidyny, cyjanidyny i malwinidyny wykazywały nieznaczne przesunięcie w długości głównego pasma absorpcji w obszarze widzialnym (maksimum przy 510 nm) (ryc. 2). Dla obu związków zanotowano drugie maksimum w obszarze widzialnym (przy 421 nm dla związku A i przy 416 nm dla związku B). Maksimum w obszarze UV było w porównaniu z widmem standardów przesunięte w kierunku krótszej długości fali; przy 324 i 324 nm zanotowano wyraźne dodatkowe maksimum absorpcji.

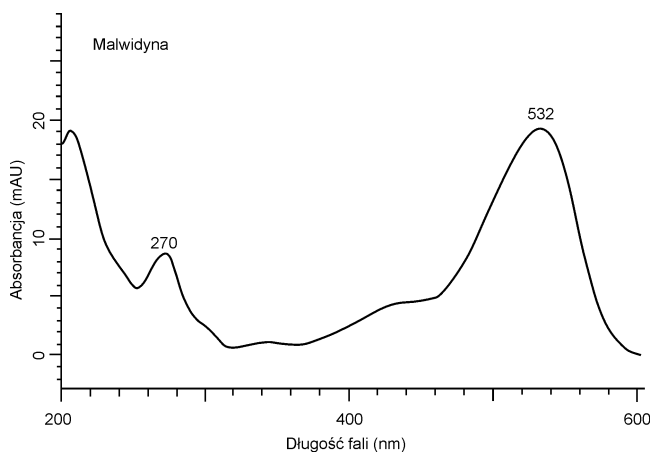
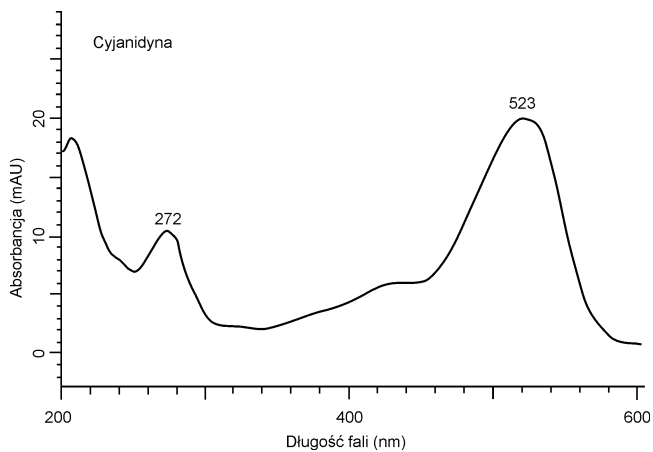
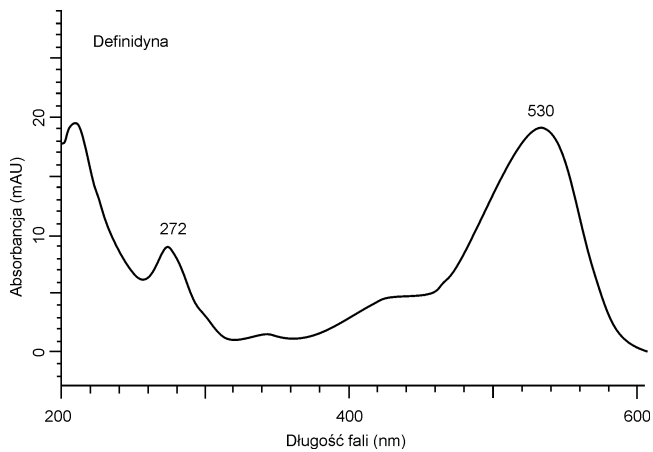
W oparciu o rozdzielanie HPLC wyliczono zawartość cyjanidyny w analizowanych próbach (tab. I). Wynosiła ona 0,60 mg/g (gryka) i 0,30 mg/g (kasza gryczana). Zawartość związku A i B (wyrażona w stosunku do wzorca cyjanidyny) wynosiła 1,42 i 1,35 mg/g (gryka) oraz 1,24 i 1,08 mg/g (kasza gryczana). Sumaryczne zawartości trzech antocyjanidyn w ekstrakcie z gryki i kaszy gryczanej były zbliżone i wynosiły 3,26 mg/g (gryka) i 2,73 mg/g (kasza gryczana). Uzyskane wyniki wskazują, że ekstrakty z gryki i kaszy gryczanej są bogatym źródłem proantocyjanidyn. Analizując ekstrakty z nasion roślin strączkowych, orzechów i migdałów stwierdzono, że podczas hydrolizy uwalniana jest delfinidyna (groch), cyjanidyna (fasola czerwona, fasola adzuki, orzechy włoskie) lub obydwa wymienione tu antocyjanidyny (bobik, bób, wyka, soczewica czerwona i zielona, orzechy laskowe, migdały) (20). Zawartość cyjanidyny uwalnianej w wyniku hydrolizy ekstraktu wynosiła od 0,38 mg/g (bób) do 7,53 mg/g (fasola adzuki). Sumaryczna zawartość antocyjanidyn wahała się od 0,22 mg/g (groch) do 7,53 mg/g (fasola adzuki) (20).

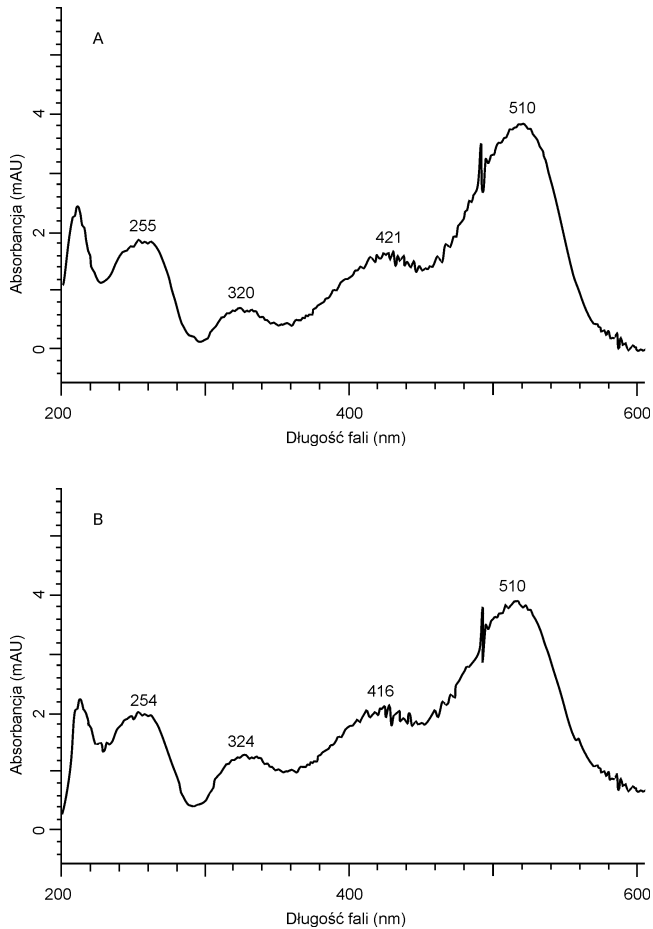
Ponieważ w niniejszej pracy kasza gryczana nie była wyprodukowana z badanej gryki, tylko została zakupiona w sklepie, trudno wnioskować o wpływie procesu prażenia na zawartość proantocyjanidyn w tym surowcu. Wyniki analizy HPLC wskazują jednak, że w procesie nie tworzą się produkty utlenione, które dawałyby barwne produkty po hydrolizie *n*-butanolem/HCL.



Ryc. 1. Chromatogramy rozdzielń HPLC standardów antocyjanidyn oraz związków z ekstraktu z gryki i kaszy gryczanej uwolnionych po hydrolizie *n*-butanolem/HCl.

Fig. 1. HPLC chromatograms of anthocyanidin standards and compounds released by *n*-butanol/HCl hydrolysis from the extracts of buckwheat seed and buckwheat groats.





Ryc. 2. Widma UV-VIS antocyjanidyn rozdzielonych metodą HPLC.

Fig. 2. UV-VIS spectra of anthocyanidins separated by HPLC.

Tabela I

Zawartość antocyjanidyn (mg/g) w ekstrakcie z gryki i kaszy gryczanej oznaczona metodą HPLC po hydrolizie *n*-butanolem/HCl

Table I

Anthocyanidin content in extract of buckwheat seed and buckwheat groats determined by HPLC after *n*-butanol/HCl hydrolysis

Materiał analizowany	Cyjanidyna	Związek A*	Związek B*	Cyjanidyna + A + B
Gryka	0,60	1,42	1,24	3,26
Kasza gryczana	0,30	1,35	1,08	2,73

* Wyrażona jako cyjanidyna.

WNIOSKI

Hydroliza *n*-butanolem/HCl uwalnia z proantocyjanidyn obecnych w gryce i kaszy gryczanej cyjanidynę oraz dwie inne antocyjanidyny różne od delphinidyny i malwinidyny. Zastosowana metoda może być stosowana w badaniach gryki i kaszy gryczanej jako składników żywności funkcjonalnej.

R. Amarowicz

HPLC ANALYSIS OF ANTHOCYANIDINS AFTER HYDROLYSIS
OF PROANTHOCYANIDINS FOUND IN EXTRACTS FROM BUCKWHEAT
AND BUCKWHEAT GROATS

Summary

Extracts of buckwheat seeds and roasted buckwheat groats were prepared using 80% acetone. Proanthocyanidins from the extracts were hydrolysed using *n*-butanol/HCl. The released anthocyanidins were analysed by HPLC. Peaks from cyanidin and two additional unknown compounds A and B were noted on the chromatograms. The spectra of the latter two were characterised by maxima at 510, 421, 320, 255 nm (compound A) and 510, 416, 324, 254 nm (compound B). The total contents of anthocyanidins in extracts of buckwheat seeds and buckwheat groats were 3.26 mg/g and 2.73 mg/g, respectively.

PIŚMIENNICTWO

1. Eggum B.O., Kreft I., Javornik B.: Chemical composition and protein quality of buckwheat. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 1981; 30: 175-179. – 2. Horbowicz M., Obendorf R.L.: Changes in sterols and fatty acids of buckwheat endosperm and embryo during seed development. *J. Agric. Food Chem.*, 1992; 40: 745-750. – 3. Steadman K., Burgon M.S., Lewis B.A., Edwardson S.E., Obendorf R.L.: Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions. *J. Sci. Food Agric.*, 2001; 81: 1094-1100. – 4. Holasova M., Fiedlerova V., Smrcinova H., Orsak M., Lachman J., Vavreinova S.: Buckwheat – the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res. Int.*, 2002; 35: 207-211. – 5. Przybylski R., Harris, L.J.: Antioxidant and radical-scavenging activities of buckwheat seed components. *J. Am. Oil Chem.*, 1998; 75: 1595-1601. – 6. Oomah B.D., Mazza G.: Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *J. Agric. Food Chem.*, 1996; 44: 1746-1750. – 7. Watanabe M., Sato A., Osawa R., Terao, J.: Antioxidative activity of buckwheat seed extracts and its rapid estimate for evaluation of breeding materials. *J. Jap. Sci. Food Sci. Technol.*, 1995; 42: 649-655. – 8. Zieliński H., Kozłowska H.: Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 2000; 48: 2008-2016. – 9. Bartoń H.J., Fołta M., Chłopicka J., Zachwieja Z., Gumul D.: Badania aktywności przeciwutleniającej nasion pięciu odmian gryki (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 38: S71-S74. – 10. Watanabe M., Ohshita Y., Tsubida T.: Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls. *J. Agric. Food Chem.*, 1997; 45: 1039-1044.
11. Watanabe M.: Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. *J. Agric. Food Chem.*, 1998; 46: 839-845. – 12. Hinneburg I., Neubert R.H.H.: Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb. *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53: 3-7. – 13. Dietrych-Szostak D., Oleszek W.: Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain. *J. Agric. Food Chem.*, 1999; 47: 4384-4387. – 14. Ohsawa R., Tsutsumi T.: Inter-varietal variations of rutin content in common buckwheat flour (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Euphytica*, 1995; 86:183-189. – 15. Oomah B.D., Campbell C.G., Mazza G.: Effects of cultivar and environment on phenolic acids in buckwheat. *Euphytica*, 1996; 90: 73-77. – 16. Amarowicz R., Troszyńska A., Karamać M.: Aktywność

przeciwutleniająca wysokotaninowych ekstraktów z surowców roślinnych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 38: S193-S195. – 17. *Amarowicz R., Piskula M., Honke J., Rudnicka B., Troszyńska A., Kozłowska H.*: Extraction of phenolic compounds from lentil (*Lens culinaris*) with various solvents. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1995; 45: 53-62. – 18. *Porter L.J., Hirstich L.N., Chan B.G.*: The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 1986; 25: 223-230. – 19. *Wang H., Nair M.G., Iezzoni A.F., Strasburg G.M., Booren A.M., Gray J.I.*: Quantification and characterization of anthocyanins in Balaton tart cherries. *J. Agric. Food Chem.*, 1997; 45: 2556-2560. – 20. *Amarowicz R.*: Correlation between the content of proanthocyanidins in plant extracts determined using a colourimetric assay and HPLC method – a short report. *Czech J. Food Sci.* (w druku).

Adres: 10-747 Olsztyn, ul. Tuwima 10.

Lech Rodziewicz, Iwona Zawadzka

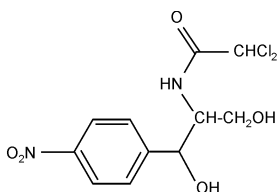
ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ – SPEKTROMETRII MAS DO OZNACZANIA POZOSTAŁOŚCI CHLORAMFENIKOLU W PRODUKTACH POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO

Pracownia Badań Chemicznych Środków Spożywczych
Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Białymstoku
Kierownik: dr L. Rodziewicz

Hasła kluczowe: chloramfenikol, pozostałości, wymagania analityczne, LC-MS, żywność.

Key words: chloramphenicol, residue, analytical requirements, LC-MS, food stuffs.

Chloramfenikol (CAP) jest jednym z najstarszych antybiotyków wytwarzanym zarówno na drodze biosyntezy, jak również syntezy chemicznej. Cząsteczka CAP składa się z: układu aromatycznego (pierścień p-nitrobenzenowy), części dichloroacetylowej (alifatyczny łańcuch boczny chloroacetylowy), oraz części 2-amino-2-propandiolu (ryc. 1).



Ryc. 1. Wzór strukturalny CAP.

Fig. 1. Structural formula of chloramphenicol (CAP).

CAP jest związkiem źle rozpuszczalnym w wodzie, dobrze wchłanianym z przewodu pokarmowego, przenikającym do płynu mózgowo-rdzeniowego, przez barierę łożyska oraz do mleka. Najwyższe stężenie stwierdza się w węzłach chłonnych, najniższe w mózgu. CAP wykazuje szeroki zakres działania bakteriostatycznego. Hamuje wzrost bakterii *Gram*-dodatnich i *Gram*-ujemnych oraz wirusów. Mechanizm jego działania polega na hamowaniu syntezy białka w komórce bakterii. Z uwagi na wysoką toksyczność CAP został on zakwalifikowany do grupy substancji A, co oznacza, że został skreślony z Rejestru Środków Farmaceutycznych i Materiałów Medycznych Stosowanych Wyłącznie u Zwierząt i jest zabroniony jako środek w leczeniu tych zwierząt, których produkty przeznaczone są do spożycia. Mimo to istnieją podejrzenia, że CAP może być nielegalnie wykorzystany w leczeniu zwierząt.

Potwierdzającym metodom ilościowym stosowanym w analizie CAP stawia się wysokie wymagania analityczne. Określono minimalne wymagania wartości granicznej wydajności metod analitycznych MRPL (ang. minimum required performance limit) stosowanych do oznaczania CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego. MRPL jest to najmniejsza zawartość analitu jaka może być wykryta, zidentyfikowana i potwierdzona za pomocą metody analitycznej.

Dyrektywa Unii Europejskiej 2003/181/WE obowiązująca od 13 marca 2003 r. wprowadziła MRPL dla CAP na poziomie 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dla mięsa, jaj, mleka, owoców morza (krewetki, kraby) i miodu (1). Wśród metod instrumentalnych układy GC-ECD, LC-UV, LC-DAD do oznaczania pozostałości CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego nie spełniają powyższego warunku, gdyż granice wykrywalności podawane przez różnych autorów są wyższe niż wymagany MRPL (2, 3, 4). Warunek ten spełniają metody, w których są stosowane układy GC-MS lub LC-MS. Oprócz tego metody potwierdzające stosowane dla grupy A, do której należy CAP muszą przekazywać informacje na temat struktury chemicznej analitu.

Porównując obie techniki oznaczania CAP wykazano, że metody oparte na stosowaniu układu LC-MS są prostsze niż GC-MS. W przypadku układu LC-MS można analizować CAP bez uprzedniego przeprowadzenia go w jego pochodną. Również kolumny stosowane w LC znacznie lepiej tolerują zanieczyszczenia niż kolumny kapilarnie w GC, których efektywność gwałtownie spada pod wpływem zanieczyszczeń. Ponadto metody jonizacji stosowane w LC-MS przy oznaczaniu CAP dla mas powyżej $m/z = 100$ nie powodują interferencji z tła. Dlatego też metody w których znalazły zastosowanie układy LC-MS okazały się najbardziej efektywne do identyfikacji i oznaczania ilościowego CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego (2, 5, 6, 7).

Dyrektywa 2002/657/WE z dnia 14 sierpnia 2002 r. wprowadza parametry wykonawcze jakie musi spełniać metoda potwierdzająca ilościowa. Oprócz takich parametrów jak: specyficzność, selektywność, liniowość, powtarzalność, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna, oporność (na niewielkie zmiany metody), wprowadza dwa nowe parametry: limit decyzyjny wartości granicznej ($CC\alpha$) oraz zdolności wykrywania ($CC\beta$) (8).

$CC\alpha$ jest to stężenie analitu w próbce przy i powyżej którego wynik analizy uznawany jest za niezgodny z prawdopodobieństwem $1 - \alpha$. Błąd α jest to prawdopodobieństwo uznania próbki za fałszywie dodatnią i wynosi on dla CAP (grupa A) 1%. $CC\beta$ jest to najniższe stężenie analitu, które może być wykryte, zidentyfikowane i oznaczone w próbce z prawdopodobieństwem $1 - \beta$. Błąd β jest to prawdopodobieństwo uznania próbki za fałszywie ujemną i wynosi on dla CAP 5%. Oba te parametry służą do jednoznacznej interpretacji wyników analiz pozostałości chemicznych w żywności pochodzenia zwierzęcego. Parametry te wyznacza się na podstawie krzywej kalibracji zgodnie z PN-ISO 11843-2 (9).

Wartości $CC\alpha$ i $CC\beta$ rozstrzygają ze znanym prawdopodobieństwem czy w próbce znajduje się oznaczany CAP, czy nie lub czy jego wartość przekracza wartość graniczną. Dla potwierdzającej metody ilościowej oznaczania CAP wyniki są zgodne jeżeli są poniżej wartości $CC\alpha$ wyznaczonej dla poszczególnych matryc. Przy metodzie przesiewowej potwierdzającej wyniki są zgodne jeśli zawarte są poniżej wartości $CC\beta$. Wyniki powyżej $CC\beta$ wymagają potwierdzenia.

Przygotowanie próbek do analizy. Procedura przygotowania próbek do MS jest podobna jak do LC. Klasyczna metoda polega na ekstrakcji wstępnej, czyli izolacji CAP z badanego materiału, usunięciu lipidów, oczyszczeniu i zateżeniu otrzymanego ekstraktu. Najczęściej stosowaną metodą ekstrakcji wstępnej CAP z tkanki mięśniowej zwierząt jest homogenizacja próbki w obecności rozpuszczalników lub buforów po czym następuje oddzielenie części stałych od roztworu w procesie wirowania. Do ekstrakcji CAP z próbek stosowano najczęściej octan etylu, acetonitryl, metanol oraz bufor fosforanowy i octanowy. Mało jest prac, w których porównywanym odzyski CAP w zależności od stosowanych do ekstrakcji rozpuszczalników. Przy zastosowaniu octanu etylu, acetonitrylu, metanolu do ekstrakcji z tkanki mięśniowej ryb otrzymano odzysk odpowiednio ok. 90, 80 i 75% ze względnym odchyleniem standardowym wynoszącym mniej niż 10%. W celu usunięcia lipidów stosowano heksan. Oczyszczanie prowadzono przeważnie techniką SPE przy zastosowaniu kolumniek wypełnionych fazą chemicznie związaną odwróconą oktadecyl C-18 oraz fazą adsorpcyjną żel krzemionkowy, tlenek glinu. Przy zastosowaniu kolumniek wypełnionych C-18 do analizy CAP w tkance ryb otrzymano odzysk ok. 90%, żelem krzemionkowym oraz tlenkiem glinu ok. 80% ze względnym odchyleniem standardowym wynoszącym mniej niż 5% (10). W niektórych przypadkach autorzy metod pomijali etap oczyszczania próbki z zastosowaniem kolumniek zastępując ją ekstrakcją ciecz-ciecz (11, 12, 13). Analizę próbek CAP prowadzono w obecności standardu wewnętrznego dodanego bezpośrednio do próbki przed homogenizacją. Jako standard wewnętrzny stosowano (IS) wzorzec deuterowy d_5 -CAP lub meta-CAP.

Do analizy w LC-MS stosowano krótkie kolumny chromatograficzne, które spełniały rolę wstępnego rozdzielania próbki. Stosowano przy tym kolumny standardowe o średnicy 3–5 mm oraz kolumny mikroborowe o średnicy 1–2 mm. Kolumny były wypełnione przeważnie fazą chemicznie odwróconą C-8 i C-18. Jako fazę ruchomą stosowano wodę, wodne roztwory kwasu mrówkowego oraz buforowy roztwór octanu amonowego w połączeniu z polarnymi rozpuszczalnikami acetonitrylem lub metanolem.

Stosowano układ faz z zastosowaniem zarówno elucji gradientowej, jak i izokratycznej. Próbkę analizowano stosując układ LC-MS lub LC-MS/MS. Dane chromatograficzne zbierano metodą przemieszczania (ang. scanning), Metodą SIM czyli monitorowania wybranego jonu (ang. selected ion monitoring) oraz metoda SRM monitorowania wybranych reakcji (ang. selected reaction monitoring).

Układ LC-MS. Zasada działania tego układu polega na wprowadzeniu po kolei rozdzielonych w chromatografii cieczowym składników próbki do komory jonizacyjnej spektrometru masowego, gdzie zachodzi jonizacja i fragmentacja analizowanych związków. Układ LC-MS ma mniejsze zastosowanie przy oznaczaniu CAP w porównaniu z LC-MS/MS. Jonizację CAP w MS prowadzono przeważnie metodą pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. atmospheric pressure ionization – API) czyli w układzie LC-API-MS, chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. atmospheric pressure chemical ionization – APCI) LC-APCI-MS oraz rozpylania w polu elektrycznym, czyli elektrosprej (ang. electrospray ionisation – ESI) LC-ESI-MS.

Układy LC-API-MS i LC-APCI-MS stosowano do identyfikacji oraz oznaczania ilościowego CAP w mięśniach ryb (12), zaś LC-ESI-MS w owocach morza (krewtka) (15). Analizę próbek prowadzono w obecności IS d_5 -CAP. Układy pracowały w trybie jonów ujemnych. Rozdzielenie wiązki jonów wg wartości stosunku m/z prowadzono z zastosowaniem pojedynczego analizatora kwadrupolowego. W celu identyfikacji CAP zbierano widmo mas (pełny skan) przy zastosowaniu metod jonizacji API, APCI i ESI w zakresie 100–350 m/z . Widmo mas przy zastosowaniu metody jonizacji API oraz APCI wykazało dominujący jon $(M-H)^-$, który zawierał jony izotopu o m/z 321 (^{35}Cl ^{37}Cl), 323 (^{35}Cl ^{37}Cl) i 325 (^{35}Cl ^{37}Cl). Podwyższenie napięcia fragmentacji dawało jon podstawowy o m/z 152 oraz jony o m/z 121 i 257. Nie stwierdzono istotnych różnic w widmie mas oraz stosunku szumu do sygnału przy każdym jonie diagnostycznym przy zastosowaniu różnych sposobów jonizacji. W analizie ilościowej CAP stosowano metodę SIM wybierając jon o m/z 321. $CC\alpha$ dla mięśni pochodzących od ryb wynosiła 0,1 $\mu g/kg$, zaś odzysk przy fortyfikacji w zakresie 0,1–2,0 ng/g 87,4–94,8% (12). W krewetkach $CC\alpha$ i $CC\beta$ wynosiło odpowiednio 0,02 i 0,2 ng/g . Średni odzysk przy fortyfikacji 0,2, 50 ng/g wyniósł odpowiednio 101 i 110% (15).

Układ LC-MS/MS. Najczęściej stosowanym układem do oznaczania CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego jest LC-MS/MS czyli bezpośrednie połączenie wysokosprawnego chromatografu cieczowego z dwoma spektrometrami mas (tzw. tandem spektrometrii mas).

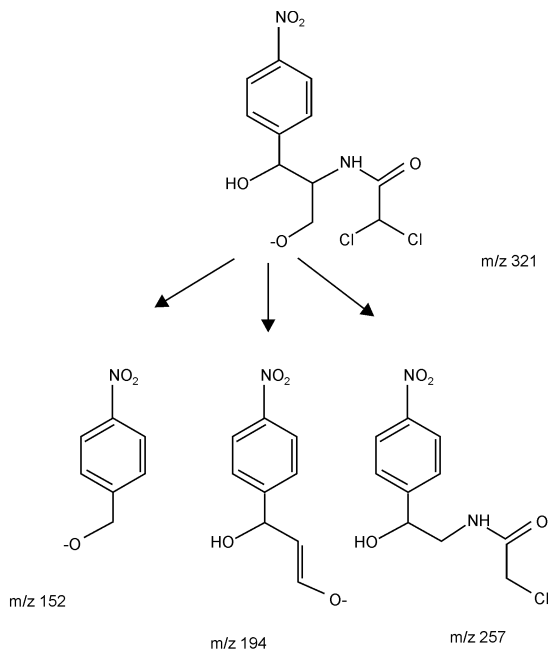
Zasada działania tego układu polega na wybraniu jonu molekularnego (macierzystego) w pierwszym spektrometrze i poddaniu go dalszej wtórnej fragmentacji w drugim spektrometrze dającym jony potomne czyli fragmentacyjne.

Jonizację CAP w pierwszym MS prowadzono przeważnie metodą ESI oraz APCI. W celu wywołania wtórnej fragmentacji w drugim MS stosowano przeważnie metodę wzbudzania jonów przez kolizję (ang. collision induced dissociation – CID). Rozdzielenie wiązki jonów wg wartości stosunku m/z prowadzono z zastosowaniem analizatora kwadrupolowego lub pułapki jonowej. Otrzymane widmo w dużej mierze było uzależnione od techniki jonizacji.

Na ryc. 2 przedstawiono schemat wtórnej fragmentacji CAP przy zastosowaniu układu LC-ESI-MS/MS-CID po wybraniu jonu macierzystego $[M-H]^-$ o m/z 321 (^{35}Cl) w pierwszym spektrometrze, poddaniu go CID i analizowaniu jonów potomnych w drugim spektrometrze. Otrzymano trzy podstawowe jony potomne $[M-H-(HCOCl)]^-$ m/z 257, $[M-H-(NH_2COCHCl_2)]^-$ m/z 194 oraz $[O_2N-C_6H_4-CHOH]^-$ m/z 152.

Powyższe układy oraz ww. przejścia znalazły zastosowanie przy identyfikacji i oznaczaniu ilościowym CAP w mięśniach zwierząt (2, 11, 14) krabach, krewetkach (6, 15, 16, 17), mleku (4) oraz w miodzie (11). Analizę próbek prowadzono w obecności IS d_5 -CAP. Układ pracował w trybie jonów ujemnych, który dawał największą czułość. Rozdzielenie wiązki jonów według wartości stosunku m/z prowadzono z zastosowaniem analizatora kwadrupolowego. Identyfikacje i oznaczanie ilościowe CAP prowadzono przeważnie w systemie monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów metastabilnych MRM – równoważnik SRM (ang. metastable reaction monitoring).

W celu identyfikacji CAP uwzględniano trzy podstawowe przejścia o m/z 321 → 257, 321 → 194, 321 → 152, zaś przy oznaczaniu ilościowym o m/z 321 → 152 oraz dla IS d_5 -CAP o m/z 326 → 157. Na ryc. 3 przedstawiono chromatogramy CAP i CAP- d_5 oraz widmo MRM próbki mięśni trzody wzmocnionej na poziomie 0,3 $\mu g/kg$ uzyskane przy zastosowaniu układu LC-ESI-MS/MS-CID. Zastosowano procedurę do badań przygotowano wg metody własnej polegającej na ekstrakcji CAP octanem etylu i oczyszczaniu ekstraktu ciecz-ciecz.



Ryc. 2. Schemat fragmentacji CAP.

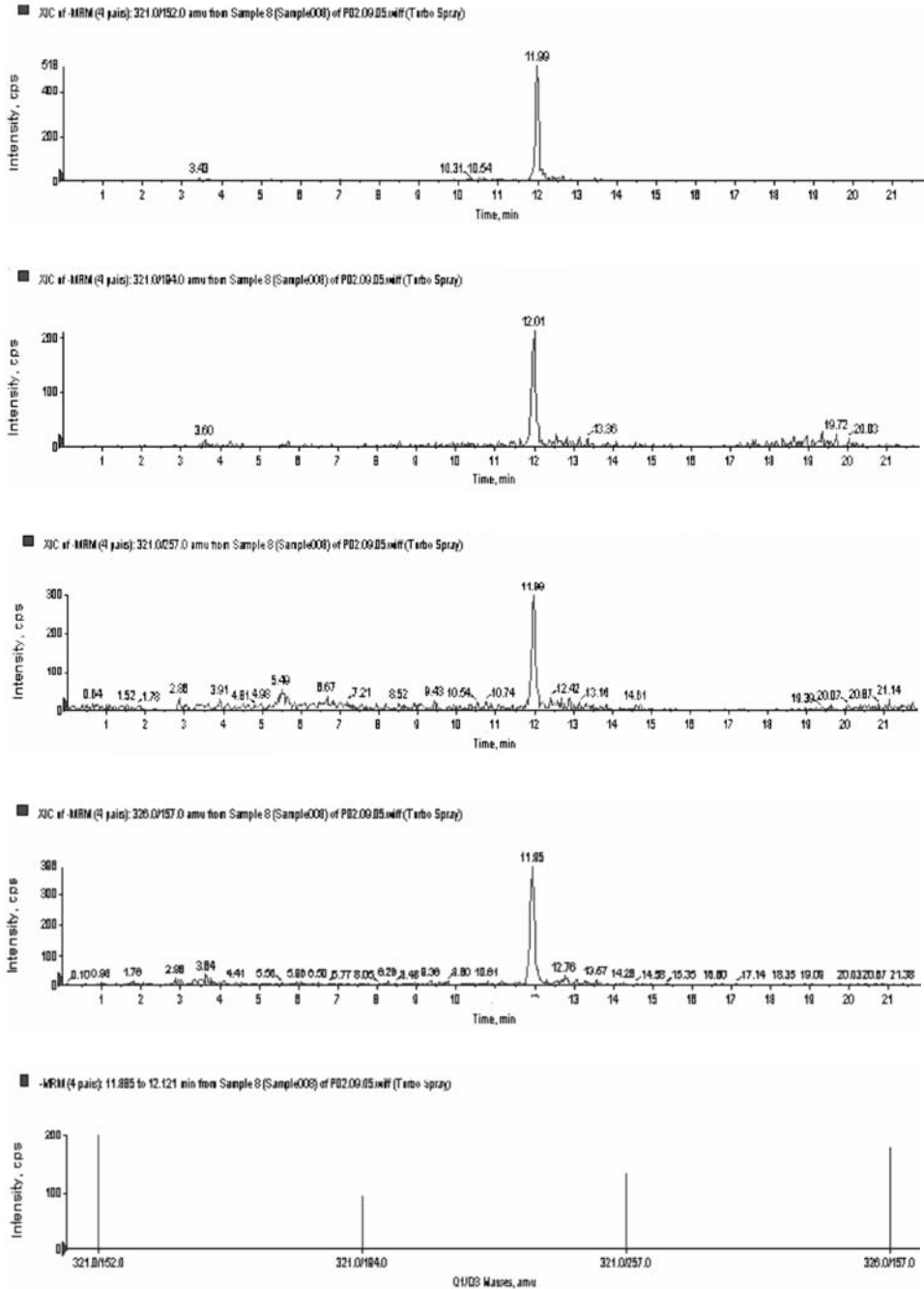
Fig. 2. Pattern of CAP fragmentation.

W celu uzyskania wykresu kalibracyjnego mierzono odpowiedzi spektrometru mas na różne ilości CAP o m/z 321 \rightarrow 152 względem odpowiedzi na stałą ilość IS d_5 -CAP o m/z 326 \rightarrow 157.

$CC\alpha$ i $CC\beta$ w mięśniach kurcząt przy zastosowaniu układu LC-ESI-MS/MS-CID wynosiła 0,1 i 0,2 ng/g, zaś w miodzie 0,05 i 0,1 ng/g. Odzysk dla tkanki w zakresie fortyfikacji 0,5–10 ng/g wynosił 45–50%, a dla miodu 60–69% (11). W mięśniach krabów $CC\alpha$, $CC\beta$ wynosiły odpowiednio 0,018 i 0,1 ng/g. Średni odzysk przy fortyfikacji na poziomie 0,1 ng/g wynosił ok. 95% (5).

Stosując układ LC-APCI-MS/MS-CID przy wykorzystaniu tych samych przejść $CC\alpha$ w mięśniach pochodzących od bydła i świń wynosiło 0,02 ng/g (2). Odzysk przy fortyfikacji w zakresie 2–4 ng/g wynosił 86–103% (6).

Niektórzy autorzy metod oznaczania CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego stosując układ LC-ESI-MS/MS-CID monitorowali dwa przejścia dla jonu ^{35}Cl , które wykorzystano do analizy ilościowej oraz dwa przejścia dla jonu ^{37}Cl w celu potwierdzenia zarówno dla CAP jak i IS d_5 -CAP. W celu doboru optymalnych warunków pracy MS stosowano układ LC-ESI-MS. Skanowano widmo w zakresie 300–340 m/z . Otrzymane widmo zawierało intensywne piki jonów CAP o m/z 321,1, 323,1 (^{35}Cl ^{37}Cl) oraz IS d_5 -CAP o m/z 326,1, 328,1 (^{35}Cl ^{37}Cl). Następnie CAP d_5 -CAP był analizowany układem LC-ESI-MS/MS-CID w trybie pracy ujemnej. Otrzymano po dwa przejścia dla CAP (^{35}Cl) o m/z 321 \rightarrow 257, 321 \rightarrow 152 i IS d_5 -CAP (^{35}Cl) o m/z 326 \rightarrow 262, 326 \rightarrow 157, które wykorzystano w analizie ilościowej oraz dwa przejścia CAP (^{37}Cl) o m/z 323 \rightarrow 357, 323 \rightarrow 152 i IS d_5 -CAP (^{37}Cl) o m/z 328 \rightarrow 262, 328 \rightarrow 157 wykorzystane w analizie potwierdzającej. Dane chromatograficzne zbierano w systemie MRM. Sporządzano dwa wykresy kalibracyjne mierząc odpowiedzi spektrometru mas na różne ilości CAP o m/z 321 \rightarrow 257 i 321 \rightarrow 152 względem odpowiedzi na stałą ilość IS d_5 -CAP o m/z 326 \rightarrow 262 i 326 \rightarrow 157. Przy zastosowaniu układu LC-ESI-MS/MS-CID oraz ww. przejść oznaczano jakościowo i ilościowo CAP w tkance mięśniowej zwierząt (bydło, trzoda, kurczak, indyk), rybach, owocach morza (kraby) oraz w mleku w proszku. Wyznaczono dla tkanek $CC\alpha$ oraz $CC\beta$ przy wykorzystaniu przejść CAP o m/z 321 \rightarrow 152, 321 \rightarrow 257. Wynoszą one dla tkanki 0,01 ng/g i 0,02 ng/g. Średni odzysk przy fortyfikacji w mięśniach kurczaka w zakresie 0,05–0,2 ng/g wynosił 101–118% (16). Dla mleka w proszku $CC\alpha$ i $CC\beta$ przy przejściach CAP o m/z 321 \rightarrow 152 wynoszą odpowiednio



Ryc. 3. Chromatogram LC-ESI-MS/MS z ekstraktu mięśni bydła, tryb pracy MRM, wzmacnienie matrycy CAP 0,3 ng/g.

Fig. 3. LC-ESI-MS/MS chromatograms of bovine muscle extract, MRM mode, 0.3 ng/g CAP spiked matrix.

0,02 i 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$, zaś przy m/z 321 \rightarrow 257 0,02 i 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Średni odzysk przy fortyfikacji w mleku w proszku w zakresie 0,1–0,5 ng/g wynosił 98–112% (18).

Inni autorzy metod do oznaczania CAP w krewetkach i krabach przy układzie LC-ESI-MS/MS-CID stosowali jako IS m-CAP (17). Układ pracował w trybie ujemnym. Dane chromatograficzne zbierano w systemie SRM. W pierwszym MS wybrano jon macierzysty dla CAP o m/z 321 i IS m-CAP $[\text{M}-\text{H}]^-$ o m/z 321, które poddano dalszej fragmentacji w drugim MS. Otrzymano widmo CAP o m/z 321 \rightarrow 257, 321 \rightarrow 194, 321 \rightarrow 176, 321 \rightarrow 152 i IS m-CAP o m/z 321 \rightarrow 257 i 321 \rightarrow 207. W analizie ilościowej wykorzystano przejście CAP o m/z 321 \rightarrow 152 i IS meta-CAP o m/z 321 \rightarrow 207. Wyznaczona granica oznaczania ilościowego metody w owocach morza wynosiła 0,1 ng/g. Odzysk przy fortyfikacji w krewetkach i krabach w zakresie 0,05–0,2 ng/g wynosił odpowiednio 87–95%, 76–106%.

W tab. I przedstawiono przykłady analitycznych technik oznaczania CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego przy zastosowaniu układu LC-MS i LC-MS/MS.

Tabela I

Przykłady analitycznych technik LC-MS i LC-MS/MS w oznaczaniu CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego

Table I

Some LC-MS and LC-MS/MS analytical techniques used to determine chloramphenicol (CAP) in animal food products

Stosowany układ	Matryca	Kolumna	Faza ruchoma	Piśmiennictwo
LC-APCI-MS LC-APPI-MS	Ryba	Zobax XDB C ₁₈ 5 μm , 150 \times 3 mm	Gradient metanol – 10 mmol/dm ³ octan amonu	12
LC-ESI-MS	Krewetki	Symmetry Shield RP8 5 μm , 150 \times 3,9 mm	Acetonitryl–woda (25:75 v/v)	15
LC-ESI-MS/MS	Bydło, trzoda, indyk, kurczak, ryba i krewetki	Symmetry Shield RP18 3,5 μm , 150 \times 2,1 mm	Gradient acetonitryl – woda	14
LC-ESI-MS/MS	Kurczak, krewetki, miód	Superspher RP18 4 μm , 125 \times 3 mm	Acetonitryl – 10 mmol/dm ³ mrowczan amonu pH = 3 (40:60 v/v)	11
LC-ESI-MS/MS	Krewetki	Genesis C ₁₈ 3 μm , 150 \times 2,1 mm	1% kwas octowy w metanolu – woda (55:45 v/v)	5
LC-APCI-MS/MS	Bydło, trzoda	Hypersil-BDS-C ₈ 5 μm , 50 \times 0,46 mm	Acetonitryl – 0,025 mol octan amonu w 0,3% kwasie mrowkowym (50:50 v/v)	2
LC-ESI-MS/MS	Mleko w proszku	Symmetry Shield RP18 3,5 μm , 150 \times 2,1 mm	Gradient acetonitryl – woda	18

PODSUMOWANIE

Przedstawione metody, w których mają zastosowanie układy LC-MS i LC-MS/MS spełniają wymagania dyrektywy 2002/657/WE WE. W przypadku układu LC-MS dyrektywa wymaga dla potwierdzenia w przypadku pełnego skanu rejestrację widma, w którym obecne są co najmniej cztery jony o względnym natężeniu $\geq 10\%$. Przy układzie LC-MS-MS przy wykorzystaniu zbierania danych w systemie MRM dyrektywa 2002/657/WE wymaga dla potwierdzenia co najmniej cztery punkty identyfikacyjne. Przedstawione metody do potwierdzenia CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego mają co najmniej jeden jon macierzysty i dwa jony potomne w pierwszej generacji lub dwa jony macierzyste każdy z jednym jonem potomnym pierwszej generacji. Pierwsza kombinacja daje cztery punkty identyfikacyjne, zaś druga pięć.

L. Rodziewicz, I. Zawadzka

LIQUID CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY USED TO DETERMINE
CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN ANIMAL PRODUCTS

PIŚMIENNICTWO

1. Decyzja Komisji z dnia 13 marca 2003 r. 2003/181/WE zmieniająca decyzję 2002/657/WE w odniesieniu do ustalenia minimalnych wymaganych wartości granicznych wydajności (MPRL) dla niektórych pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego. – 2. *Gantverg A., Shishani I., Hoffman M.*: Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine liquid chromatography – tandem mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2003; 483: 125-135. – 3. *Neuhaus B., Hurlbut J., Hammack W.*: LC/MS/MS Analysis of chloramphenicol in shrimp. *LIB* 2002; 18: 1-13. – 4. *Schenck F., Callery P.*: Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J. Chromatogr. A*. 1998; 812: 99-109. – 5. *Impens S., Reybroeck W., Vercammen J.*: Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS² and LC-MS². *Anal. Chim. Acta*. 2003; 483: 153-163. – 6. *Hoffmann E., Charette J., Stroobant V.*: Spektrofotometria mas. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne. Warszawa 1998. – 7. *Johnstone R., Rose M.*: Spektrometria mas. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2001. – 8. Decyzja Komisji z dnia 14 sierpnia 2002 r. 2002/657/WE wykonująca dyrektywę Rady 96/23 dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji. – 9. PN-ISO 11843-2: Zdolność wykrywania. Cz. 2: Metrologia w przypadku kalibracji liniowej. PKN, lipiec 2003; 19: 1-13. – 10. *Fedeniuk R., Shand P.*: Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices. *J. Chromatogr. A*. 1998; 812: 3-15.

11. *Bogusz M., Hassan H., Al-Enazi E.*: Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography – electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*. 2004; 807: 343-356. – 12. *Takino M., Daishima S., Nakahara T.*: Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography – atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2003; 1011: 67-75. – 13. *Balízs G., Hewitt A.*: Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2003; 492: 105-131. – 14. *Pascal M., Parisod V., Gremaud E.*: Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatography* 2003; 994: 75-84. – 15. *Ramos M., Munoz P., Aranda A.*: Determination of chloramphenicol residues in shrimps by liquid chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*. 2003; 791: 31-38. – 16. *Tunipseed S., Roybal J., Pfenning A.*: Use of ion-trap liquid chromatography – mass spectrometry to screen and confirm drug residues in aquacultured products. *Anal. Chim. Acta* 2003; 483: 373-386. – 17. *Storey J., Pfenning A., Turnipseed Sherri.*: Determination of chloramphenicol residues in shrimp and crab tissues by electrospray triple quadrupole LC/MS/MS. *LIB* 2003; 19: 1-13. – 18. *Gay P.A., Royer D., Mottier P.*: Quantitative determination of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatography* 2004; 1054: 365-371.

Adres: 15-959 Białystok, ul. Zwycięstwa 26A.

REGULAMIN OGŁASZANIA PRAC

1. Kwartalnik Bromatologia i Chemia Toksykologiczna zamieszcza nie publikowane prace oryginalne i pogładowe, listy do redakcji, notatki laboratoryjne, oceny podręczników i monografie naukowych, streszczenia z piśmiennictwa zagranicznego oraz sprawozdania ze zjazdów naukowych związanych z naukami reprezentowanymi w tytule.

2. Prace nadesłane do redakcji powinny być napisane na maszynie z interlinią (31 wierszy na stronie), jednostronnie z marginesem 4 cm z lewej strony arkusza. Prace powinny być nadesłane w 3 egzemplarzach opatrzonych podpisem autora z podaniem placówki naukowej. Łącznie z maszynopisem autor powinien przesłać zgodę pisemną kierownika placówki oraz oświadczenie, że praca nie została złożona do druku w innej redakcji. Objętość prac oryginalnych łącznie z wykazem piśmiennictwa, tabelami, rycinami i streszczeniami nie powinna przekraczać 9 stron maszynopisu, objętość prac poglądowych – 12 stron, innych – 2 strony maszynopisu. Pierwsza strona maszynopisu powinna zaczynać się na 2/3 wysokości (1/3 str. od góry należy zostawić wolną).

3. W maszynopisie obowiązuje następująca kolejność tekstu: pełne imię i nazwisko autora, tytuł pracy, nazwa katedry (zakładu), pierwsza litera imienia i nazwiska kierownika zakładu; krótkie streszczenie w języku artykułu tzw. „jaskółka”, hasła kluczowe (4-6) w j. polskim i angielskim; układ prac powinien w zasadzie składać się z czterech części: 1) krótkiego wstępu, 2) części doświadczalnej, 3) wyników, 4) wniosków.

4. Do pracy powinno być dołączone na oddzielnych arkuszach streszczenie w języku polskim oraz jego tłumaczenie na język angielski (po 3 egz.). Układ streszczenia powinien być następujący: pierwsza litera imienia i nazwisko autora, tytuł pracy, streszczenie, treść.

5. Wykaz piśmiennictwa powinien być napisany na oddzielnej stronie, ułożony chronologicznie z tekstem pracy i zblokowany po 10 pozycji. Każda pozycja piśmiennictwa powinna zawierać: liczbę porządkową, nazwisko(a) autora(ów) z inicjałami imion, dwukropek, tytuł cytowanego artykułu, przecinek, nazwę czasopisma w skrócie stosowanym w piśmiennictwie, przecinek, rok wydania, średnik, tom, ew. numer zeszytu w nawiasie – gdy nie ma ciągłości numeracji stron w tomie – dwukropek, pierwszą i ostatnią stronę artykułu, kropka, kreska. W przypadku cytowania pozycji książkowych należy podać: liczbę porządkową, nazwisko(a) z inicjałami imion autora(ów), tytuł opracowania (książki), nazwisko(a) z inicjałami wydawcy (edytora), nazwę i miejsce wydawnictwa, rok wydania, średnik, tom, dwukropek, pierwszą i ostatnią stronę artykułu bądź rozdziału, kropka, kreska. W wykazie piśmiennictwa nie należy umieszczać pozycji referatowych, a jedynie doniesienia oryginalne, z których autor istotnie korzystał w toku wydrukowanej pracy. Liczba cytowanych pozycji nie może przekraczać w oryginalnej pracy naukowej 30, w publikacjach poglądowych 40, w doniesieniach 12.

6. W maszynopisie listu do redakcji obowiązuje kolejność tekstu: tytuł, treść doniesienia, imię i nazwisko autora, nazwa i adres placówki naukowej. Listy do redakcji mogą być nadsyłane w języku angielskim.

7. W maszynopisie notatki laboratoryjnej obowiązują zasady ustalone w p. 2, 3 i 5 niniejszego regulaminu z tym, że nie należy umieszczać tzw. „jaskółki”.

8. Ryciny, wzory, itp. dołączone oddzielnie do prac, listów do redakcji i notatek laboratoryjnych powinny być wykonane starannie, czarnym tuszem, na oddzielnych kartkach kalki technicznej lub na odbitce na błyszczącym papierze fotograficznym w wymiarze przyszłej reprodukcji. Każda rycina itp. powinna być na odwrocie zaopatrzona w kolejny numer, oznaczenie: góra-dół, nazwisko autora i tytuł pracy. W maszynopisie musi być zaznaczone miejsce, gdzie rycina itp. ma się znajdować. Poza tym należy załączyć na oddzielnym arkuszu treść podpisów do poszczególnych rycin. Ryciny należy oznaczyć liczbami arabskimi, a tabele – rzymskimi. Każda tabela powinna być napisana maszynowo na oddzielnej kartce. Do maszynopisu należy dołączyć (na oddzielnej kartce) przetłumaczone na język angielski podpisy pod ryciny i nagłówki tabel.

9. Za prace ogłaszane w kwartalniku Autor nie otrzymuje honorarium, natomiast otrzyma odbitki. Fakt nadesłania tekstów jest równoznaczny z wyrażeniem zgody Autora (Autorów) na nieodpłatne przeniesienie na rzecz Wydawcy całości majątkowych praw autorskich przysługujących zgodnie z postanowieniami obowiązującego Prawa Autorskiego.

10. Rękopisy nadesłane niezgodnie z wymogami regulaminu będą odsyłane autorom.

11. Korektę podczas druku wykonuje redakcja na podstawie maszynopisu pracy zakwalifikowanej do druku w układzie uwzględniającym uwagi recenzenta i opracowanie redakcji, zaakceptowanym przez autorów.

12. Prace będą drukowane równomiernie w obydwu działach w kolejności ich napływu do redakcji. Jeśli praca była referowana na posiedzeniach naukowych Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, co powinno być poświadczane przez przewodniczącego Zarządu Sekcji, należy to zaznaczyć odnośnikiem na dole pierwszej strony maszynopisu; prace te, jak również prace będące podstawą przyznawania stopni naukowych będą miały pierwszeństwo druku.

BROMATOLOGIA I CHEMIA TOKSYKOLOGICZNA

Czasopismo poświęcone zagadnieniom badań ochrony
zdrowia i środowiska

TOM XXXIX

2006

Nr 2

TREŚĆ

G. Budryn, E. Nebesny: Fenolokwasy – ich właściwości, występowanie w surowcach roślinnych, wchłanianie i przemiany metaboliczne	103
H. Grajeta: Wpływ składników pokarmowych na wchłanianie żelaza	111
A. Lebedzińska, M. Marszał, J. Sperra, P. Szefer: Pieczywo wzbogacone mąką z nasion winogron źródłem witamin grupy B	121
E. Bartkowiak-Fludra, A. Jasińska-Stępnik, M. Gogolewski, B. Delbowski: Zmiany siły redukującej i zdolności wygaszania wolnych rodników w wybranych olejach tłoczonych na zimno w czasie ich przechowywania	127
U. Skolimowska, J. Skolimowski, A. Wędzisz: Wpływ kwercetyny i kompleksu ethoxyquin – kwercetyna na trwałość oleju wiesiołkowego	135
J. Rutkowska, A. Żbikowska: Zmiany oksydacyjne zachodzące w margarynach płynnych podczas pieczenia i przechowywania zamrożonych ciast biszkoptowo-tłuszczowych	141
A. Rzepecka-Stojko, A. Kurek-Górecka, W. Kosiarski, M. Wardas: Ocena procesu starzenia się olejów jadalnych wzbogaconych antyoksydantami podczas obróbki termicznej produktu wysokobiałkowego	147
W. Kolanowski, W. Mówińska: Ocena jakości żywieniowej suplementów długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 obecnych na polskim rynku farmaceutycznym	155
D. Skrajnowska: Mleko kobiece – korzyści i zagrożenia dla dziecka	165
M. Michalska J. Kołodziejka: Wpływ składników suplementów diety – wapnia i magnezu na lepkość fibryny nieusieciowanej	173
A. Dorosz, J. Łukasiak, W. Nyka, G. Kozera, B. Karaszewski: Zastosowanie analizy pierwiastkowej włosów do monitorowania suplementacji magnezem	179
M. Kwoczek, E. Hać, P. Szefer: Arsen w owocach morza	185
R. Amarowicz: Analiza HPLC antocyjanidyn po hydrolizie proantocyjanidyn gryki i kaszy gryczanej	189
L. Rodziewicz, I. Zawadzka: Zastosowanie chromatografii cieczowej – spektrometrii mas do oznaczania pozostałości chloramfenikolu w produktach pochodzenia zwierzęcego	197

CONTENS

G. Budryn, E. Nebesny: Phenolic acids – their properties, occurrence in plant materials, absorption and metabolism	103
H. Grajeta: The effect of foodstuffs on the absorption of iron	111
A. Lebedzińska, M. Marszall, J. Sperra, P. Szefer: Assessment of contents of vitamin N, and B ₆ in some sorts of bread fortified with extract from grape seeds	121
E. Bartkowiak-Fludra, A. Jasińska-Stępnik, M. Gogolewski, B. Delbowski: Changes in the reducing power and free-radical scavenging ability during storage of selected cold-pressed vegetable oils	127
U. Skolimowska, J. Skolimowski, A. Wędzisz: Effect of complex ethoxyquercetin on the stability of oenothera paradoxa oil	135
J. Rutkowska, A. Żbikowska: The oxidative changes in liquid margarines during baking and after deep-frozen storage of sponge cakes	141
A. Rzepecka-Stojko, A. Kurek-Górecka, W. Kosiarski, M. Wardas: Assessment of the proces of deterioration of antioxidant-enriched edible oils during heating of peptide-rich products	147
W. Kolanowski, W. Mówińska: The assessment of nutritional quality of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid formulations available on polish pharmaceutical market	155
D. Skrajnowska: Human milk: advantages and risks to the infant	165
M. Michalska, J. Kołodziejka: The effect of calcium and magnesium dietary supplements on the viscosity of non-cross-link fibrin	173
A. Dorosz, J. Łukasiak, W. Nyka, G. Kozera, B. Karaszewski: Analysing elements in human hair to monitor magnesium supplementation therapy	179
M. Kwoczek, E. Hać, P. Szefer: Arsenic in seafood	185
R. Amarowicz: HPLC analysis of anthocyanidins after hydrolysis of proanthocyanidins found in extracts from buckwheat and buckwheat groats	189
L. Rodzewicz, I. Zawadzka: Liquid chromatography – mass spectrometry used to determine chloramphenicol residues in animal products	197