

TOKSYKOLOGIA

TOKSYKOLOGIA

T3
T3



OZNACZANIE METABOLITÓW TIOGLIKOZYDÓW W WARZYWACH Z RODZINY KRZYŻOWYCH

WPROWADZENIE

Substancje antyodżywcze są to substancje występujące w żywności, które ograniczają lub uniemożliwiają wykorzystanie składników odżywczych ze spożywanych produktów. Substancjami antyodżywczymi nazywa się też substancje wywierające szkodliwy wpływ na organizm ludzki. Do takich substancji, które są obecne w produktach roślinnych i zwierzęcych, należą:

- związki pochodzenia naturalnego,
- związki toksyczne, które przenikają do żywności na skutek zanieczyszczenia środowiska, m.in. w wyniku zabiegów agrotechnicznych (pozostałości środków ochrony roślin) oraz procesów technologicznych,
- niektóre substancje celowo dodawane do żywności (dodatki do żywności).

Przykłady substancji antyodżywczych pochodzenia naturalnego:

- **Kwas fitynowy** – tworzy kompleksy z takimi pierwiastkami, jak: wapń, magnez, cynk i żelazo, przez co stają się one niedostępne dla organizmu. Kwas fitynowy jest obecny m.in. w pieczywie pełnoziarnistym, mąkach razowych, nasionach roślin strączkowych.
- **Kwas szczawiowy** – antyodżywcze działanie tego kwasu polega głównie na tym, że wiąże on wapń i magnez, co uniemożliwia wykorzystanie tych pierwiastków na potrzeby organizmu. Ponadto nadmiar kwasu szczawiowego w diecie prowadzi do rozwoju dny moczanowej (artretyzmu), tworzenia się kamieni nerkowych, a nawet zaburzeń pracy serca. Występuje w szczawiu, szpinaku, rabarbarze, botwinie, burakach, czekoladzie, kawie i mocnej herbacie.

- **Taniny** – związki roślinne zaliczane do polifenoli. Wykazują działanie antyoksydacyjne, jednak ze względu na zdolność do tworzenia trwałych kompleksów ze składnikami pożywienia (głównie składnikami mineralnymi oraz witaminą A i B12) zaliczane są do substancji antyodżywczych. Taniny nadają charakterystyczny cierpki (gorzkawy) smak produktom; bogatym źródłem tanin są: czerwone winogrona (głównie ich skórka), herbata, kawa, kakao.
- **Błonnik pokarmowy**(włókno pokarmowe, włókno roślinne)– swoisty kompleks substancji pochodzenia roślinnego, które są odporne na działanie enzymów trawiennych. Pod wspólną nazwą „błonnik” kryje się szereg związków o różnej budowie chemicznej i właściwościach fizycznych, które ze względu na swoje działanie zyskał rangę składnika o niezwykle cennych walorach zdrowotnych. Nadmiar błonnika w diecie może zmniejszyć przyswajanie składników mineralnych takich jak: magnez, wapń, żelazo.
- **Goitrogeny** – związki te (szczególnie ich metabolity) mogą wpływać na metabolizm jodu, prowadząc do obniżenia jego stężenia w organizmie, co prowadzi do zaburzenia syntezy hormonów tarczycy oraz przerostu gruczołu (wole – stąd też goitrogeny nazywa się substancjami wolotwórczymi). Występują głównie w roślinach z rodziny krzyżowych (*Cruciferae = Brassicaceae*): kapuście, brukselce, jarmużu, kalafiorze, rzepie, kalarepie, rzepaku (Tabela 1). Obecne są we wszystkich częściach roślin, ale w największym stężeniu w nasionach. Do organizmu człowieka trafiają przez bezpośrednie spożywanie wyżej wymienionych warzyw lub dostają się wraz z mlekiem pochodzącym od krów karmionych paszą zawierającą dużą ilość roślin krzyżowych.

Tabela 1. Zawartość tiocyjanianów w wybranych warzywach

Produkt	SCN⁻ (mg/100g świeżej masy)
Kapusta głowiasta	3-6
Jarmuż	3-25
Kapusta włoska	18-31
Brukselka	10
Kalafior	4-10
Kalarepa	2-3
Żółta rzepa	9
Rzepak	2,5
Sałata, szpinak, cebula, seler, rzodkiewka, pomidory	<1

Wymienione substancje uniemożliwiają wykorzystanie przez organizm składników mineralnych, gdyż w przewodzie pokarmowym tworzą z nimi trudno rozpuszczalne kompleksy. Jednak w pewnym stopniu można ograniczać ich niekorzystne oddziaływanie poprzez:

- zastosowanie najprostszych procesów technologicznych, takich jak: gotowanie, fermentacja, moczenie (np. suchych nasion roślin strączkowych: grochu, fasoli).
- nie łączenie niektórych produktów podczas tego samego posiłku w jedno danie.

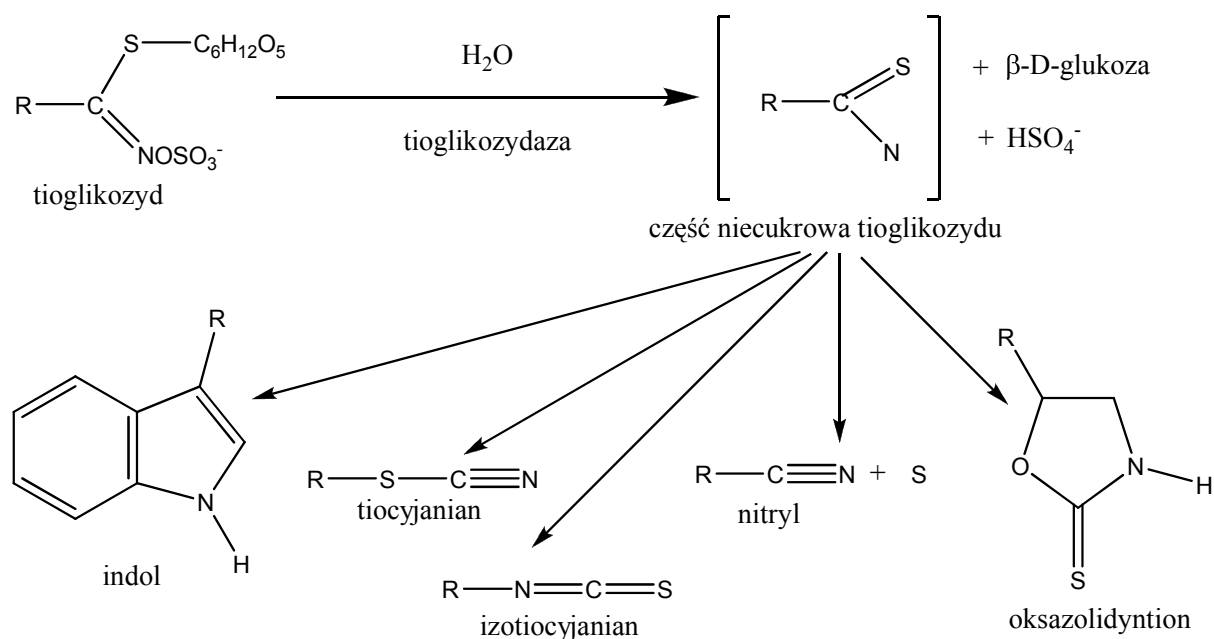
Na przykład:

- ✓ w świeżym ogórku, kabaczkach, patisonie, cukinii obecny jest enzym askorbinaza, który rozkłada witaminę C. W surówkach nie należy więc łączyć warzyw bogatych w witaminę C (papryka, pomidor) z surowymi ogórkami, można wykorzystać ogórki kiszane – w środowisku kwaśnym askorbinaza ulega zniszczeniu.
- ✓ w surowym mięsie ryb znajduje się tiaminaza – enzym, który powoduje rozkład tiaminy (witaminy B1). Tiaminaza jest wrażliwa na działanie temperatury, czyli obróbka termiczna niszczy enzym i chroni witaminę.
- zwiększanie przyswajalności składników odżywczych znajdujących się w pożywieniu.

Do naturalnych substancji wolotwórczych (goitrogenów) należą: tioglikozydy, glikozydy cyjanogenne, polifenole oraz hemaglutyniny.

Tioglikozydy (glukozynolany, GLS) są anionami organicznymi posiadającymi cząsteczkę β -D-glukozy, sulfonowany oksym i łańcuch boczny o strukturze alifatycznej lub aromatycznej. Różnorodność występujących kombinacji łańcucha bocznego sprawia, że w chwili obecnej znanych jest około 100 różnych związków, z czego w warzywach kapustnych występuje około 20 glukozynolanów (np. synigryna, progoitryna, glukonapina, glukoiberyna, neoglukobrassicyna). W roślinach glukozynolany występują w postaci glikozydowej i połączenia te nie wykazują toksyczności w stosunku do roślin, zwierząt jak i patogenów (istnieją jednak doniesienia, że GLS mogą wykazywać działanie allelopatyczne). Jednakże wszystkie rośliny zawierające glukozynolany posiadają również enzym mirozynazę (tioglikozydazę) zdolną do degradacji tych związków do form prostszych. Podczas hydrolizy enzymatycznej powstaje glukoza, jon siarczanowy

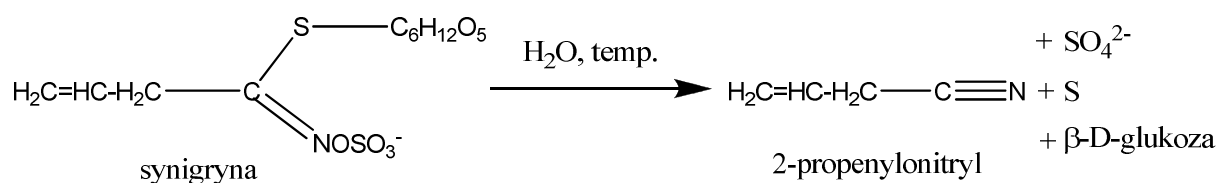
oraz w zależności od warunków, głównie od pH, szereg produktów degradacji, m.in. tiocyjaniany, izotiocyaniany, związki indolowe, nityle oraz oksazolidyntiony (rys. 1).



Rys.1. Enzymatyczna hydroliza tioglikozydów

Mirozyna składa się z trzech do czterech izoenzymów, występuje w roślinach krzyżowych, ale ponieważ występuje w komórkach, jej działanie jest możliwe dopiero po zmiążdżeniu tkanek i uwolnieniu z nich soku komórkowego. Działa w szerokim zakresie pH (od 3 do 8), w obecności wody. Enzymatyczny rozkład tioglikozydów ma miejsce w jamie ustnej w czasie żucia pokarmu, a także przy rozdrabnianiu warzyw podczas przygotowywania potraw. Dopiero jednak ekstrakcja wodą oraz gotowanie uwalnia większość aktywnych tioglikozydów. Temperatura 90°C powoduje denaturację mirozyny i hamuje jej działanie.

W czasie gotowania niektóre tioglikozydy ulegają destrukcji pod wpływem temperatury, z wytworzeniem nityli (rys.2).



Rys.2. Destrukcja tioglikozydów pod wpływem temperatury

Ponadto należy zaznaczyć, że większość tiocyjanianów jest lotna i podczas gotowania warzyw w otwartym naczyniu ulatnia się z parą wodną.

Produkty hydrolizy mogą wykazywać działanie toksyczne, mogą wpływać na zahamowanie wzrostu zwierząt, ograniczać ich reprodukcję, wywołać zaburzenia metabolizmu jodu, powodować uszkodzenia wątroby i nerek.

W ostatnich latach zwraca się również uwagę na korzystne aspekty aktywności biologicznej niektórych izotiocyjanianów pochodzących z warzyw krzyżowych na organizm ludzi i zwierząt. Wykazano mianowicie działanie antyoksydacyjne tych związków, aktywność inhibicyjną wobec procesów aktywacji prokancerogenów oraz indukujący wpływ na enzymy uczestniczące w detoksykacji substancji genotoksycznych.

Te tioglikozydy, które nie uległy hydrolizie podczas jedzenia czy przygotowywania potraw, trafiają do przewodu pokarmowego, gdzie w dalszych jego odcinkach ulegają hydrolizie pod wpływem tioglikozydazy bakteryjnej.

Kapusta zawiera cztery rodzaje glikozydów, w których część niecukrową, aktywną wolotwórczo stanowią tiocyjaniany (50 mg/kg), izotiocyjaniany (100 mg/kg), tiooksazolidyny (10 mg/kg) oraz antocyjany (związki z grupy polifenoli), występujące w dużych ilościach, na przykład w kapuście czerwonej.

Stosunek $SCN^-/I^- > 500$, jak np. w racji pokarmowej zawierającej około 500 g kapusty o zawartości około 100 mg tiocyjanianów i przy podaży jodu w granicach norm, to jest około 100 μ g, może stworzyć warunki dla przerostu tarczycy. Zaburzenie metabolizmu tarczycy można wywołać nie tylko przez spożywanie dużej ilości roślin krzyżowych, ale także manioku, soi, a nawet cebuli i czosnku. Wolotwórcze działanie wyżej wymienionych produktów jest zwykle tym silniejsze, im mniejsza jest podaż jodu. Występowanie wola endemicznego ma miejsce w środkowej i wschodniej Europie, w regionach oddalonych od morza, na skutek dużego spożycia kapusty i niedostatecznej ilości jodu w powietrzu i pożywieniu. Spożywanie większej ilości wyżej wymienionych produktów powoduje w pierwszym okresie spadek aktywności sekrecyjnej tarczycy przez zahamowanie syntezy tyroksyny. W konsekwencji następuje obniżenie we krwi poziomu trijodotyroniny (T_3) i tetrajodotyroniny (T_4 , tyroksyna), które są aktywnymi formami hormonu gruczołu tarczycy. W drugim etapie zmniejszony ich poziom w płynach ustrojowych powoduje wzrost aktywności tyreotropowej, przez zwiększoną sekrecję hormonu tyreotropiny (TSH) z przysadki mózgowej, co powoduje przerost masy tarczycy (wole). Sposób działania czynników goitrogennych jednak nie jest identyczny.

Tiocyaniany (SCN^-) z łatwością przenikają przez wszystkie błony komórkowe i konkurując z jonami jodu, powodują hamowanie ich transportu do tkanek, w tym gruczołu tarczycy (kompetencyjna inhibicja transportu I^-). Tiocyaniany przyspieszają ponadto wydalanie jodu przez nerki, inaktywują również peroksydazę tarczycową odpowiedzialną za utlenianie anionu I^- , tak zwaną organifikację jodu (konwersja jodu nieorganicznego w organiczny) i sprzęganie jodotyrozyn. W wyniku ich działania następuje spadek stężenia jodu w tarczycy, utrudnione jodowanie tyrozyny, gromadzenie się mono- i diiodotyrozyny, co powoduje wzrost masy gruczołu.

Tiocyaniany mogą być metabolizowane w różnych tkankach do cyjanianów i siarczanów. Obserwowano to zjawisko w gruczole mlecznym krów, gruczołach ślinowych myszy i szczura oraz w tarczycy szczura. Rozkład jonów tiocyanianowych może następować pod wpływem peroksydazy, której rolę może pełnić również hemoglobina.

Izotiocyaniany (NSC^-) są głównymi toksycznymi produktami powstającymi w wyniku działania mirozynazy na tioglikozydy. Izotiocyaniany i tiooksazolidyny hamują aktywność peroksydazy tarczycowej, wpływają przez to hamująco na syntezę hormonów tarczycy. Izotiocyaniany mogą przekształcać się w organizmiew tiocyaniany.

Nitryle są najbardziej toksycznymi produktami rozpadu tioglikozydów, ale głównie działają na nerki. Detoksykacja tych związków w organizmie jednak prowadzi do wytworzenia tiocyanianów.

Bardzo silną aktywność goitrogeną wykazują **tiooksazolidyny**. Hamują one syntezę tyroksyny oraz jej sekrecję do krwi. Dodatkowa podaż jodu w diecie tylko w nieznacznym stopniu łagodzi ich wolotwórcze działanie. Świadczy to o tym, że tiooksazolidyny zaburzają metabolizm tarczycy, ale nie dopływ i gromadzenie jodu przez tarczycę. Tiooksazolidyny przenikają przez łożysko i do mleka. Najlepiej poznanym przedstawicielem tej grupy substancji wolotwórczych jest progoitryna. Występuje ona w ziarnach żółtej rzepy i rzepaku. Jej aktywną częścią jest goitryna (5-winylo-2-tiooksazolidon).

Wykazano, że podawanie 10 μg goitryny królikom przez trzy tygodnie może zwiększyć znacznie masę tarczycy. U ludzi również stwierdzono, że niewielkie ilości tego tioglikozydu hamują wbudowywanie jodu do tarczycy.

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości tiocyjanianów w wybranych warzywach oraz wykazanie wpływu ogrzewania w środowisku wodnym na zachowanie tych związków w produkcji.

Odczynniki:

1. kwas trichlorooctowy (TCA), roztwór 5%
2. roztwór azotanu(V) żelaza(III) (rozpuścić 80 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (404 g/mol) w 250 mL 2-molowego kwasu azotowego(V), uzupełnić wodą do 500 mL)
3. roztwór A - roztwór podstawowy jonów SCN^- (rozpuścić 16,7 mg rodanku potasu (97 g/mol) w 100 mL 5% kwasu trichlorooctowego)

Sprzęt laboratoryjny:

Sprzęt do rozdrabniania warzyw (deska, nóż)

Zlewka o poj. 150 mL - 1 szt.

Moździerz porcelanowy o poj. 100 mL z pistelem - 1 szt.

Cylinder miarowy o poj. 50 mL - 1 szt

Lejek średni - 2 szt., mały - 1 szt.

Kolbka stożkowa o poj. 100 mL ze szlifem - 2 szt.

Bagietka - 1 szt.

Probówki zakręcane w statywie - 10 szt., szklane - 2 szt.

Pipeta o poj. 5 mL - 5 szt.

Bibuła filtracyjna - 2 sączi twarde

Strzykawki o poj. 5 mL z filtrami strzykawkowymi 0,45 μm - 2 szt.

Waga techniczna, elektryczna płyta grzejna, spektrofotometr, kuwety.

SPOSÓB WYKONANIA

1. Sporządzanie krzywej wzorcowej

10 mL roztworu A rozcieńczyć 5% roztworem TCA do 100 mL, uzyskując w ten sposób roztwór wzorcowy B, którego 1 mL zawiera 10 μg jonów SCN^- . Z tego roztworu przygotowuje się krzywą wzorcową według schematu podanego w tabeli 2, pobierając do kolejnych probówek od 0 do 5 mL roztworu wzorcowego B i uzupełniając do 5 mL 5% TCA.

Tabela 2. Ilości poszczególnych roztworów do przygotowania krzywej wzorcowej

Roztwór B (mL)	5% TCA (mL)	Roztwór Fe(NO ₃) ₃ (mL)	Stężenie SCN ⁻ (µg/mL)
0	5	5	0 (próba ślepa odczynnikowa)
1	4	5	2
2	3	5	4
3	2	5	6
4	1	5	8
5	0	5	10

Zmierzyć absorbancję wobec próby ślepej odczynnikowej przy długości fali 470 nm.

2. Oznaczenie tiocyjanianów w warzywach surowych i gotowanych

Z jednorodnej, rozdrobnionej próby badanego materiału przygotować dwie naważki po 5 g. Jedną z nich przenieść do zlewki 150 mL, dodać 50 mL wody i ogrzewać, utrzymując w lekkim wrzeniu przez 10 min.

Następnie surowy i gotowany (po odlaniu wody) materiał rozetrzeć dokładnie w moździerzu porcelanowym, przenieść ilościowo do kolb stożkowych ze szlifem o poj. 100 mL, dodać po 45 mL 5% kwasu trichlorooctowego (TCA) i wytrząsać przez 10 min. Próbki przesączyć przez twardy sączek, pobrać do strzykawkę i przefiltrować przez filtr 0,45 µm do szklanych probówek.

Z każdego przesączu pobrać po 4 mL do 2 probówek. Do jednej probówki dodać 4 mL wody, a do drugiej – 4 mL roztworu Fe(NO₃)₃ (od tej chwili przetrzymywać próby bez dostępu światła).

Zmierzyć absorbancję prób właściwych (zawierających Fe(NO₃)₃) wobec prób z wodą przy długości fali 470 nm w czasie nie dłuższym niż 5 min. od dodania azotanu(V) żelaza(III). Zmierzyć również absorbancję prób z wodą wobec próby ślepej odczynnikowej.

OPRACOWANIE WYNIKÓW

Stężenie tiocyjanianów w badanej próbce odczytać z krzywej wzorcowej, pomniejszając uzyskaną absorbancję o wartości odpowiednich absorbancji próbek z wodą wobec próby ślepej odczynnikowej. Wynik przeliczyć na naważkę i na 100 g

produktu. Na podstawie uzyskanych wyników omówić wpływ różnych czynników na zawartość tiocyjanianów w produktach roślinnych.

LITERATURA

1. Toksykologia żywności. Przewodnik do ćwiczeń, red. A. Brzozowska, Wyd. SGGW, Warszawa, 2010.
2. Ćwiczenia z toksykologii środowiska, B. Adomas, D. Murawa, Wyd. UW-M w Olsztynie, Olsztyn, 2006.
3. Glukozynolany – występowanie i znaczenie ekologiczne, W. Oleszek, Wiadomości Botaniczne, 39(1/2): 49-58, 1995.
4. Co to są substancje antyodżywcze?, E. Pałkowska, Polskie Towarzystwo Dietetyki, www.aktywniepozdrowie.pl

Opracowali: D. Szczukocki, B. Krawczyk, R. Dałkowski, R. Juszcak