

*Celina Pieszko, Agata Orzół*

## ZAWARTOŚĆ FENOLOKWASÓW W PRÓBKACH ŻYWNOSCI

Katedra Chemii Analitycznej Politechniki Śląskiej w Gliwicach  
Kierownik prof. dr hab. *I. Staneczko-Baranowska*

*Celem pracy była próba ujednoczenia procedury przygotowania próbek żywności do oznaczenia kwasów fenolowych oraz spektrofotometryczne oznaczenie tych związków w próbkach żywności z wykorzystaniem krzywej wzorcowej. Analiza ta została przeprowadzona za pomocą spektrofotometrii UV – Vis metodą Arnowa.*

Hasła kluczowe: fenolokwasy, spektrofotometria, żywność.

Key words: phenolic acids, spectrophotometry, food.

Kwasy fenolowe określa się mianem nutraceutyków (ang. nutraceuticals), czyli substancji wzbogacających o działaniu prozdrowotnym. Są to związki biologicznie aktywne, które mają wpływ na przebieg wielu procesów biologicznych, np. działań naprawczych oraz adaptacyjnych ustroju, do którego zostały wprowadzone wraz z pokarmem (1). Do produktów żywnościowych zawierających fenolokwasy zaliczamy: kawę, herbatę, wino, owoce i soki owocowe, warzywa i zboża (2). Kwasy fenolowe są związane z barwą, smakiem (zwykle gorzkim i kwaśnym) oraz odżywczymi i przeciwutleniającymi właściwościami żywności. Ta grupa związków pełni funkcje ochronne roślin, przede wszystkim w okresie wzrostu i dojrzewania ziaren oraz owoców, a w miarę osiągnięcia przez roślinę pełnej przydatności konsumpcyjnej ich zawartość zmniejsza się (2). Fenolokwasy będące pochodnymi kwasu cynamonowego są znacznie bardziej rozpowszechnione w królestwie roślin niż kwasy hydroksybenzoesowe i dominują w żywności. Związki te, są również bardziej efektywnymi przeciwutleniaczami niż pochodne hydroksybenzoesowe (3). Jednym z najczęściej występujących w roślinach kwasów hydroksycynamonowych jest kwas kawowy (często połączony z kwasem chinowym). Występuje w kawie, jabłkach, ziemniakach, szpinaku, sałacie, kapuście, oliwie z oliwek oraz winie (1). Największe znaczenie w tej grupie związków ma kwas galusowy oraz jego formy zestryfikowane. Może występować w postaci galotanin (np. w owocu mango), elagotanin (w czarnej porzeczkę, truskawkach, malinach) lub tworzyć galusan wraz z epikatechiną i galokatechiną w liściach zielonej herbaty (2).

Celem pracy jest oznaczenie fenolokwasów w produktach żywności za pomocą metody spektrofotometrycznej po opracowaniu procedury przygotowania próbek do analizy. Wybrane próbki stanowią składniki dwóch diet – diety bogatej w przeciwutleniacze, zalecanej w chorobach serca (dieta śródziemnomorska) oraz przykładowej standardowej diety polskiej (4, 5).

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki:

- owoców i warzyw (świeżych), zakupionych w lokalnym supermarkecie, takich jak: jagody, jabłka, pomidory, marchewki;
- warzyw gotowanych – ziemniaków, szpinaku i brokuł;
- przetworów domowych (dżem porzeczkowy) oraz przetworów przemysłowych (sok jabłkowy, sok marchewkowo-jabłkowo-bananowy);
- napojów alkoholowych, zakupionych w lokalnym supermarkecie, takich jak: wino i piwo;
- naparów herbaty oraz kawy (mielonej i rozpuszczalnej);
- miodu, pozyskanego z prywatnej pasieki;
- chleba żytniego z ziarnami, zakupionego w lokalnej piekarni.

Każdą z próbek poddano przygotowaniu i oznaczono zawartości fenolokwasów pięciokrotnie. Wykonano również statystyczną ocenę wyników obejmującą obliczenie odchylenia standardowego, współczynnika zmienności oraz przedziału ufności dla poziomu ufności  $p = 0,95$ . Sumę kwasów fenolowych przeliczano na kwas kawowy oznaczony za pomocą metody *Arnova* (6, 7).

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Jednym z podstawowych warunków prawidłowego żywienia jest zapewnienie odpowiedniej ilości przeciwutleniaczy w całodziennej racji pokarmowej. Głównym źródłem tych istotnych dla zdrowia związków są surowce i żywność pochodzenia roślinnego. Wybór próbek do analiz oraz porównanie zawartości fenolokwasów w dwóch dietach: bogatej w przeciwutleniacze i zwykłej pełnowartościowej (na przykładzie polskiej diety) dokonano w oparciu o przykładowe jadłospisy podane w tab. I.

Rozmaitość poddawanych analizie próbek żywności, a także różny stopień skomplikowania matrycy roślinnej wpłynął na etapy odpowiedniego ich przygotowania z zachowaniem warunków chroniących fenolokwasy przed degradacją oraz umożliwiających, w jak największym stopniu, przejście badanych związków z fazy stałej do ciekłej w procesie ekstrakcji. Dobór odpowiednich rozpuszczalników ekstrakcyjnych został dokonany na podstawie badań literaturowych – częstości stosowania danego rozpuszczalnika i wydajności ekstrakcji z jego użyciem. Najczęściej wykorzystywane rozpuszczalniki do ekstrakcji fenolokwasów z żywności to woda, etanol, metanol, aceton, eter dietylu oraz octan etylu. Gorącą wodę zastosowano do uzyskania ekstraktów ze świeżych liści herbaty, mieszaninę wody z etanolem do yerba mate. Autorzy opublikowanych prac stosowali uwodnionego metanolu do ekstrakcji kwasów fenolowych z czereśni, wielu warzyw, alg, kawy mielonej, jęczmienia, a także z miodu, a czystego metanolu do ekstrakcji z kawy rozpuszczalnej. Aceton stosowano w celu przygotowania próbek przecieru jabłkowego, jabłka i gruszki, a octan etylu lub jego mieszaninę z eterem do próbek pomidorów, brokuł (6) i soków z winogron i czereśni (8). W niektórych przypadkach ekstrakcja jest wspomagana poprzez mieszanie mieszałem magnetycznym (9, 10), wirowanie (11), a także poprzez ultrasonifikację (12, 13). Często przeprowadza się homogenizację próbki już z dodatkiem odpowiedniego

T a b e l a I. Przykładowy dzienny jadłospis diet śródziemnomorskiej i polskiej

T a b l e I. An exemplary daily menu of Mediterranean and Polish diets

Dieta śródziemnomorska	Dieta polska
<b>ŚNIADANIE</b>	<b>ŚNIADANIE</b>
2 kromki chleba żytniego z soją i słończnikiem z 2 łyżkami dżemu porzeczkowego	1 szklanka płatków śniadaniowych z 1 szklanką mleka
kawa	kromka chleba pszennego z 1 łyżką miodu
<b>DRUGIE ŚNIADANIE</b>	kawa
sałatka z sera feta light (100 g), 3 posiekanych łodyg selera naciowego, 2 pomidorów, żółtej papryki, 5 oliwek, przyprawiona oregano	<b>DRUGIE ŚNIADANIE</b>
szklanka soku marchwiowo-owocowego	serek homogenizowany
<b>OBIAD</b>	2 bułki z wędliną
100 g ryby z grilla posypanej ziołami	sok jabłkowy
3 łyżki gotowanych ziemniaków	<b>OBIAD</b>
½ szklanki ugotowanych brokułów, polanych sokiem z cytryny	250 cm <sup>3</sup> rosolu z makaronem
<b>PODWIECZOREK</b>	pieczeń wieprzowa (150 g) z 4 gotowanymi ziemniakami
1 szklanka mieszanych owoców jagodowych polanych ¼ szklanki beztłuszczowego jogurtu	szpinak (100 g)
herbata	<b>PODWIECZOREK</b>
<b>KOLACJA</b>	jabłko
250 g sałatki z tuńczyka i startej marchwi	kawa
150 cm <sup>3</sup> wina	<b>KOLACJA</b>
	2 jajka sadzone na wędlinie
	2 kromki chleba pszennego z masłem i serem żółtym
	500 cm <sup>3</sup> piwa

rozpuszczalnika jak w przypadku owoców egzotycznych (14). Wśród opublikowanych prac badawczych stosowana jest ekstrakcja dwuetapowa. Jako rozpuszczalnik, w pierwszym etapie, najczęściej stosowany jest alkohol lub jego mieszanina z wodą. W drugim etapie stosowane są rozpuszczalniki organiczne, takie jak: eter dietylu, octan etylu lub ich mieszanina. Na wydajność ekstrakcji wpływa także czas procesu. Najczęściej trwa on ok. 30 min. Podczas tego etapu konieczna jest ochrona fenolokwasów przed utlenianiem, dlatego do rozpuszczalników często dodawane są przeciwutleniacze takie, jak kwas askorbinowy (8, 9) i butylohydroksyanizol (BHA) (11, 12). Dodatkowo zabezpiecza się także fenolokwasy przed izomeracją pod wpływem promieni świetlnych, stosując ciemne szklane butelki lub przeprowadzanie ekstrakcji bez dostępu światła (9). Często w próbkach żywności znajdują się zarówno polifenole, jak i proste fenole. Najczęściej wykorzystywana technika do rozdzielania

tych związków oparta jest na kwasowości.  $pK_a$  wodoru fenolowego wynosi ok. 10, podczas, gdy proton fenolowego kwasu karboksylowego mieści się pomiędzy 4 a 5. W literaturze najczęściej opisywane jest obniżenie pH do 1,5–3 (10, 14).

Wobec powyższego w badaniach zastosowano procedurę wykorzystującą przygotowania próbek z różnych publikacji: ekstrakcję dwuetapową wspomaganą ultrasonifikacją (5 min.) (9). Do pierwszego etapu ekstrakcji wytypowano mieszaninę metanolu z wodą (1:1, v/v) (6), a jako drugi rozpuszczalnik ekstrakcyjny przyjęto mieszaninę eter dietylowy – octan etylu (1:1, v/v) (6, 12). Po przeprowadzeniu analitu z próbki do rozpuszczalnika usunięto części stałe poprzez wirowanie (10 min., 2000 obr./min.) (11). W procedurze dwuetapowej odparowanie rozpuszczalnika występuje dwukrotnie: w pierwszym etapie – odparowanie metanolu oraz w drugim – całkowite odparowanie fazy organicznej. W pracy zastosowano odparowanie rozpuszczalników pod próżnią w temp. 35°C i z dodatkiem przeciwutleniacza – kwasu askorbinoowego w ilości do 2 mg (9). Ekstrakcji drugiej poddawana była wodna pozostałość po odparowaniu metanolu, po uprzednim obniżeniu pH do wartości 2 (10).

W badanych próbkach żywności, przygotowanych zgodnie z opisaną metodą, suma fenolokwasów wahała się w granicach 1 do 76 (mg/100 cm<sup>3</sup> lub 100 g próbki) (tab. II). Wśród napojów największą zawartość fenolokwasów oznaczono w naparze kawy, najmniejszą zaś w piwie. W grupie próbek stałych, obejmującej warzywa, owoce i ich przetwory oraz miód i chleb, największą zawartością kwasów fenolowych odznaczały się pomidory oraz jagody, a najmniejszą marchew oraz miód. Warto zwrócić uwagę na różnice w zawartości fenolokwasów w kawie mielonej i rozpuszczalnej. Napar przyrządzony z kawy mielonej (naturalnej) zawiera znacznie więcej fenolokwasów niż ten przyrządzany z kawy rozpuszczalnej. Jest to związane z dodatkową obróbką kawy w celu otrzymania formy instant, podczas której część kwasów fenolowych może ulegać degradacji. Jagody, wyróżniające się w grupie badanych próbek żywności, są owocami o bardzo dużej zawartości przeciwutleniaczy, a kwasy fenolowe stanowią ok. 10% sumy tych związków (ok. 80–100 mg/100 g świeżego owocu) – otrzymany wynik oznaczenia jest zbliżony do zawartości podanej w literaturze (1). Wśród badanych próbek żywności należy zwrócić także uwagę na pomidory, należące do najczęściej konsumowanych warzyw w Polsce (15) o zawartości kwasów na poziomie 70 mg/100 g. Na trzecim miejscu pod względem zawartości badanych kwasów fenolowych znajduje się chleb żytni z ziarnami zbóż. Swoją pozycję zawdzięcza bogatej gamie fenolokwasów występujących w ziarnie żyta (ferulowy, synapinowy, wanilinowy, kawowy i *p*-kumarowy).

W pracy porównano ilość kwasów fenolowych przyjmowanych wraz z żywnością w ciągu jednego dnia (tab. III) wg jadłospisów dwóch diet – śródziemnomorskiej oraz polskiej. Zgodnie z przewidywaniami, dietą o większym potencjale przeciwutleniającym okazała się dieta śródziemnomorska. Zawdzięcza to dużej ilości warzyw i owoców, a także produktów pełnoziarnistych (w tym przypadku chleba z ziarnami) obecnych w diecie.

Mimo dużej ilości prac badawczych dotyczących tego tematu, dotychczas nie została opracowana wspólna, dla wielu różnorodnych surowców roślinnych, procedura przygotowania próbek do oznaczania fenolokwasów. Zaproponowana w pracy procedura przygotowania próbek została sprawdzona na różnych próbkach żywności pochodzenia roślinnego.

Tabela II. Zawartość fenolokwasów w próbkach żywności

Table II. Concentration of phenolic acids in food samples

Próbka	X mg/100 (cm <sup>3</sup> lub g)	SD mg/100 (cm <sup>3</sup> , g)	CV (%)	Przedział ufności
Kawa (mielona)	55,790	0,243	0,436	55,790 ± 0,064
Kawa (rozpuszczalna)	31,960	0,572	1,788	31,960 ± 0,201
Herbata	2,133	0,018	0,849	2,133 ± 0,025
Piwo	1,070	0,026	2,420	1,070 ± 0,051
Wino	1,321	0,001	0,085	1,321 ± 0,002
Sok marchewkowo-jabłkowo-bananowy	2,011	0,003	0,174	2,011 ± 0,005
Sok jabłkowy	5,194	0,003	0,053	5,194 ± 0,002
Ziemniaki	28,223	0,794	2,813	28,223 ± 0,294
Pomidor	75,843	0,469	0,619	75,843 ± 0,106
Brokuły	16,885	0,022	0,132	16,885 ± 0,011
Marchew	3,574	0,163	4,552	3,574 ± 0,184
Szpinak	10,275	0,038	0,368	10,275 ± 0,023
Chleb	51,547	2,019	3,917	51,547 ± 0,554
Miód	5,410	0,090	1,671	5,410 ± 0,079
Jabłko	25,070	0,256	1,019	25,070 ± 0,100
Jagody	74,502	0,611	0,820	74,502 ± 0,139
Dżem	17,996	0,183	1,018	17,996 ± 0,087

Tabela III. Zawartość fenolokwasów w zaproponowanych dietach

Table III. Concentrations of phenolic acids in proposed diets

Składnik diety	Ilość dostarczonych fenolokwasów (mg)	Składnik diety	Ilość dostarczonych fenolokwasów (mg)
Chleb żytni z ziarnami	41,2	Miód	1,4
Dżem porzeczkowy	6,4	Kawa	278,9
Kawa	139,4	Sok jabłkowy	12,9
Pomidor	197,2	Ziemniaki gotowane	79,1
Sok marchwiowo-owocowy	5,1	Szpinak	10,3
Gotowane ziemniaki	39,5	Jabłko	37,6
Gotowane brokuły	10,1	Piwo	5,4
Czarna jagoda	111,8		
Marchew	1,8		
Wino	1,9		
<b>SUMA</b>	<b>554,4</b>	<b>SUMA</b>	<b>425,6</b>

C. Pieszko, A. Orzoł

## CONTENT OF PHENOLIC ACIDS IN FOOD SAMPLES

## Summary

The aim of this work was to standardise the procedure of food sample preparation for the determination of phenolic acids by the Arnov's spectrophotometric method. The food samples were chosen from two diets: the antioxidant-rich (Mediterranean), and the Polish balanced diet. Phenolic acid contents in the studied samples ranged from 1 to 76 [mg/100 mL or 100 g of sample]. As anticipated, the antioxidant-rich (Mediterranean) diet proved to be characterised by higher antioxidative activity.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Gawlik-Dziki U.*: Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. *Żywność. Nauka. Technika. Jakość*, 2004; 4: 29-40. – 2. *Budrys G., Nebesny E.*: Fenolokwasy – ich właściwości, występowanie w surowcach roślinnych, wchłanianie i przemiany metaboliczne. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2006; 2: 103-110. – 3. Praca zbiorowa pod redakcją *Grajek W.*: Przeciwtleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne. Warszawa, WNT, 2007. – 4. *Chace D., Keane M.*: Dieta w chorobach serca. Warszawa, KDC, 2002. – 5. *Fisher H.V., Thomson C.*: Dieta śródziemnomorska chroni przed zawałem. *AMBER*, 2002. – 6. *Gawlik-Dziki U.*: Wpływ gotowania na skład i aktywność antyoksydacyjną kwasów fenolowych wyizolowanych z brokołu. *Annales UMCS*, 2004; 59: 1567-1575. – 7. *Dudek-Makuch M.*: Badania fotochemiczne *Aesculus Hippocastanum*. Praca doktorska Uniwersytetu Medycznego, Poznań, 2008. – 8. *Mattila P., Hellstrom J.*: Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *J. Food. Comp. Anal.*, 2007; 20: 152-160. – 9. *Mattila P., Kumpulainen J.*: Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection. *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50(3): 660-667. – 10. *Zhu J., Qi S., Li J., Chen X.*: Low-temperature bath/high-conductivity zone/tracking micellar electrokinetic chromatography for analysis of phenolic acids in coffee drink. *J. Chromatogr. A.*, 2008; 1212: 137-144.
11. *Shahrzad S., Bitsh I.*: Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1996; 741: 223-231. – 12. *Hakkinen S., Heinonen M., Karenlampi S., Mykkanen H., Ruuskanen J., Torronen R.*: Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Res. Int.*, 1999; 32: 345-353. – 13. *Amarowicz R., Weidner S.*: Content of Phenolic Acids In Rye Caryopses Determined using DAD-HPLC Method. *Czech. J. Food Sci.*, 2001; 19: 201-205. – 14. *Fuksji T.S., Tonin F.G., Tavares M.F.M.*: Optimization of a method for determination of phenolic acids in exotic fruits by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010; 51: 430-438. – 15. *Morkis G., Nosecka B., Seremank-Bulge J.*: Monitorowanie oraz analiza zmian polskiego łańcucha żywnościowego. Raport o spożyciu owoców i warzyw w Polsce. Raport Instytutu Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej, Warszawa, 2010.

Adres: 44-100 Gliwice, ul. Ks. M. Strzody 7.