

Paweł PISZCZ, Magdalena TOMASZEWSKA, Bronisław K. GŁÓD*

Zakład Chemii Analitycznej, Instytut Chemii, Wydział Nauk Ścisłych,
Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce

*Autor do korespondencji, e-mail: bkg@onet.eu

O możliwości zastosowania chromatografii cienkowarstwowej do oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego. Część II. Właściwości antyoksydacyjne mięsa.

Streszczenie: Antyoksydanty są związkami zapobiegającymi lub opóźniającymi utlenianie zachodzące w organizmie ludzkim i produktach spożywczych. Te, które występują w żywności, są korzystne dla naszego zdrowia, wspomagają leczenie i profilaktykę chorób. Do tej pory niewiele jest informacji na temat żywności pochodzenia zwierzęcego. W mięsie po uboju dochodzi do niekontrolowanych reakcji chemicznych, obniżenia pH oraz powstawania nowych antyoksydantów. W trakcie przygotowywania mięsa do spożycia następują zmiany w mikrostrukturze tkanki łącznej i włókien mięśniowych, które w efekcie powodują zmiany właściwości antyoksydacyjnych. Celem pracy było (i) zbadanie możliwości oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA), odniesionego do rodnika DPPH, za pomocą TLC; (ii) zastosowanie opracowanej metody do oznaczania CPA wyrobów mięsnych oraz (iii) zastosowanie TLC jako fingerprint (odcisk palca) właściwości antyoksydacyjnych mięs.

Słowa kluczowe: chromatografia cienkowarstwowa, TLC; 1,1-difenyl-2-pikrylohydrazyl, DPPH; antyoksydanty; całkowity potencjał antyoksydacyjny, CPA, mięso.

About the possibility of application of thin layer chromatography to the measurements of the total antioxidant potential. Part II. Antioxidant properties of the meat.

Abstract: Antioxidants are compounds which prevent or delay the oxidation occurring in the human body and/or food products. Those, occurring in the food are advantageous for our health; enhance treatment and prevention of diseases. So far, there is little information on food of animal origin. In the meat after slaughter occurs uncontrolled chemical reactions decreased pH and the formation of new antioxidants. During the meat preparation for consumption changes occur in the microstructure of connective tissue and muscle fibers that have the effect on changes in their antioxidant properties. The aim of this study was (i) examine the possibility of determining of total antioxidant capacity (CPA), referred to the DPPH, by TLC; (ii) the application of this method for the determination of the CPA of meat and (iii) the use of TLC as a fingerprint of antioxidant properties of meats.

Key words: thin layer chromatography, TLC; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH; antioxidants; total antioxidant potential, TAP, meat.

1. Wprowadzenie (Introduction)

Skład mięsa zależy od wieku, masy zwierzęcia, płci, gatunku i zmian jakie zachodzą w tuszy po uboju. Mięso zwierząt rzeźnych zawiera pełnowartościowe białka, niezbędne aminokwasy, które są potrzebne do budowy tkanek, a organizm człowieka nie jest w stanie sam sobie ich wytworzyć. Z żywieniowego punktu widzenia mięso jest także źródłem związków mineralnych oraz witamin. Ich zawartość waha się w zależności od poszczególnych mięśni i części tuszy ale także od sposobu żywienia i gatunku zwierzęcia. W ciągu 24 godzin ustala się glikogenoliza (rozkład glikogenu do glukozy lub glukozo-6-fosforanu) i końcowe pH (5,3-5,7). Poszczególne gatunki mięsa i ryb różnią się pomiędzy sobą barwą, wielkością i strukturą tkanki mięśniowej/tłuszczowej [1-3].

Istotną rolę w przeciwdziałaniu powstawania uszkodzeń wolnorodnikowych pełnią związki hamujące wytwarzanie rodników i/lub uczestniczące w przemianie ich w nieaktywne pochodne. Związki te, tworzą system antyoksydacyjny, a ze względu na mechanizm działania dzieli się je na enzymatyczne i nieenzymatyczne, niskocząsteczkowe (askorbinian, tokoferol, koenzym CoQ, glutation). Do antyoksydantów enzymatycznych zalicza się katalazę (CAT), peroksydazę glutationową (GPx) czy dysmutazę ponadtlenkową (SOD) [4-6]. Antyoksydanty dzielimy również na hydrofobowe (lipofilne), występujące w błonach komórkowych i lipoproteinach osocza, i hydrofilowe, występujące w cytoplazmie komórek i płynach pozakomórkowych [7]. Problemem analitycznym jest oznaczenie obu grup antyoksydantów.

2. Część Eksperymentalna **(Experimental)**

Aparatura *(Apparatus)*

Pomiary chromatograficzne techniką TLC wykonane zostały przy użyciu komór chromatograficznych typu DS II d (Chromdes, Lublin) o wymiarach 10 x 5 cm i 20 x 20 cm oraz płytek szklanych, pokrytych żelem krzemionkowym NP (Silicagel 60 i Silicagel 60 F_{254S}) lub pokrytych żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi (RP-18WF_{254S}) (Merck, Niemcy) o wymiarach 5 x 10 cm i grubości 0,25 mm. Rejestracji i przetwarzania danych dokonano za pomocą skanera HP Scanjet G210 oraz pakietu oprogramowania ScionImage oraz ImageJ [8].

Odczynniki chemiczne *(Chemicals/reagents)*

W trakcie badań wykorzystano odczynniki: n-heksan cz.d.a., etanol cz.d.a. 96,6 %, 2-propanol cz.d.a., wodorooortofosforan disodu, diwodorooortofosforan sodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska), aceton cz.d.a (Stanlab, Lublin), metanol HPLC grade (Honeywell, Niemcy), dichlorometan HPLC, 35 % kwas solny cz.d.a., kwas galusowy (POCh, Gliwice, Polska), acetonitryl Chromasolv, DPPH, 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (Sigma-Aldrich, Niemcy).

Materiał badawczy *(Materials)*

Jako materiał do badań zastosowano dwa rodzaje mięsa drobiowego (filet z indyka, filet z kurczaka), trzy rodzaje mięsa wołowego (szponder wołowy, cielęcinę, karkówkę wołową), trzy rodzaje mięsa wieprzowego (słoninę, schab wieprzowy, łopatkę wieprzową) oraz dwa gatunki ryb tłustych (łosoś wędzony, śledź). Mięso zostało zakupione w sklepach znajdujących się na terenie miasta Siedlce.

Przygotowywanie mięsa *(Meat preparation)*

Wszystkie roztwory wodne wykorzystane w badaniach przygotowano stosując wodę trójrotnie destylowaną z kwarcu. Ekstrakty mięsa o stężeniu 0,5 g/ml przygotowano przez rozpuszczenie 2 g rozmrożonego, zmielonego mięsa (60 sek.) w 4 ml rozpuszczalnika (metanol, heksan, aceton, acetonitryl, dichlorometan, woda trójrotnie destylowana, woda zakwaszona do pH 2). Ekstrakty mięsa umieszczano na płuczce ultradźwiękowej, sączono i odwirowano (3 min; 18000 obr./min). Tak przygotowany materiał do badań przechowywano szczelnie w folii aluminiowej w lodówce w temp. +5°C.

Oznaczania CPA w odniesieniu do rodnika DPPH *(Determination of CPA related to the DPPH radical)*

W pracy stosowano 1 mM metanolowy roztwór DPPH. Na wstępie badań opracowano metodę rozdzielania formy zredukowanej od utlenionej rodnika DPPH na płytkach zarówno w układzie faz prostych jak i odwróconych. Zbadano wpływ warunków chromatograficznych na rozdzielanie: komora wysyciona i niewysyciona, fazy NP i RP-18W, wpływ temperatury, skład fazy ruchomej oraz technika wielokrotnego rozwijania. Opracowaną metodę [9] zastosowano do oznaczania CPA mięsa.

Oznaczanie całkowitego stężenia polifenoli (Determination of the total polyphenols content)

W mięsach oznaczono całkowitą zawartość polifenoli wykorzystując metodę fotometryczną Folina – Ciocalteua (FC). Polifenole reagując z FCR wytwarzają niebiesko zabarwiony roztwór ($\lambda = 765 \text{ nm}$). Barwa ta powstaje w wyniku redukcji dwóch kwasów, fosfomolibdenowego oraz fosfowolframowego [8].

Do kolby o objętości 5 ml odpipetowano 0,5 ml ekstraktu wodnego mięsa i dodano 0,5 ml odczynnika Folina – Ciocalteua, odczekano 5 min., a następnie dodano 2 ml 20% Na_2CO_3 i uzupełniono wodą kolbę do kreski. Na 30 min. mieszaninę odstawił w ciemne miejsce. Pomiar wykonano w stosunku do ślepej próby przy 765 nm. Wykonano krzywą wzorcową kwasu galusowego (stężenie od 0 do 0,1 mg/ml). Wynik oznaczenia podano jako ekwiwalent kwasu galusowego w przeliczeniu na 1 g produktu.

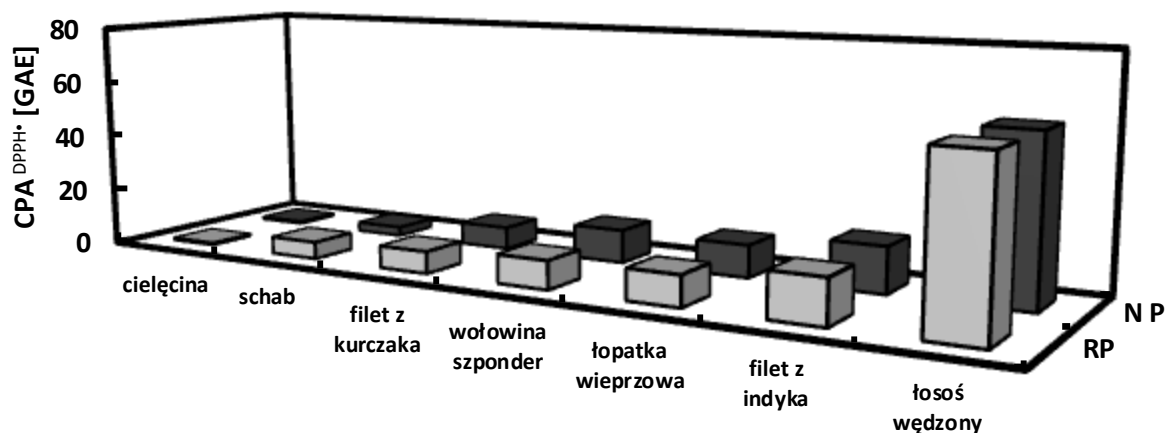
Pomiar CPA mięsa (Measurement of TAP of the meat)

Właściwości antyoksydacyjne mięsa oznaczano mierząc intensywność plamki fioletowej (formy utlenionej DPPH[•]). Po reakcji redukcji rodnik zmienia zabarwienie na jasno-żółte (DPPH-H). Oznaczanie rodnika przeprowadzono za pomocą TLC. Reakcje pomiędzy rodnikiem, a próbką mięsa przeprowadzono na płytkach NP i RP-18W w temperaturze +20°C, w komorze wysyczonej, w której fazą ruchomą był heksan/acetone (1:0,254 v/v). Jako próbę kontrolną zastosowano mieszaninę roztworu DPPH w metanolu [9]. Do próbki mięsa o objętości 200 μl dodano 100 μl 1 mM metanolowego roztworu DPPH. Pomiar chromatograficzny wykonano po 5 minutach. Po tym czasie zaobserwowano zmianę barwy roztworu. Badaną próbkę mięsa z DPPH[•] (5 μl) nanoszono na płytkę. Na rozwiniętej płytce zaobserwowano plamki pochodzące zarówno od formy utlenionej (fioletowa) jak i zredukowanej (żółta) rodnika DPPH oraz plamki pochodzące od antyoksydantów niereagujących z tym rodnikiem. Całkowitą zawartość antyoksydantów (CPA) w badanej próbce mięsa odczytano z krzywej wzorcowej wykonanej dla kwasu galusowego (w zakresie stężeń 0 ÷ 0,02 mg/ml). Wynik oznaczenia podano jako ekwiwalent tego kwasu w przeliczeniu na 1 g produktu.

3. Wyniki i dyskusja (Results and Discussion)

Dobór warunków pomiarowych (Measurement conditions)

Wartości CPA różnych mięs uzyskane na płytkach NP i RP-18W porównano na Rys. 1. Wynika z niego, że w obu przypadkach otrzymano, w granicach niepewności pomiarowych, te same wyniki. Do dalszych badań wybrano płytki RP ze względu na lepsze rozdzielanie obu form DPPH.

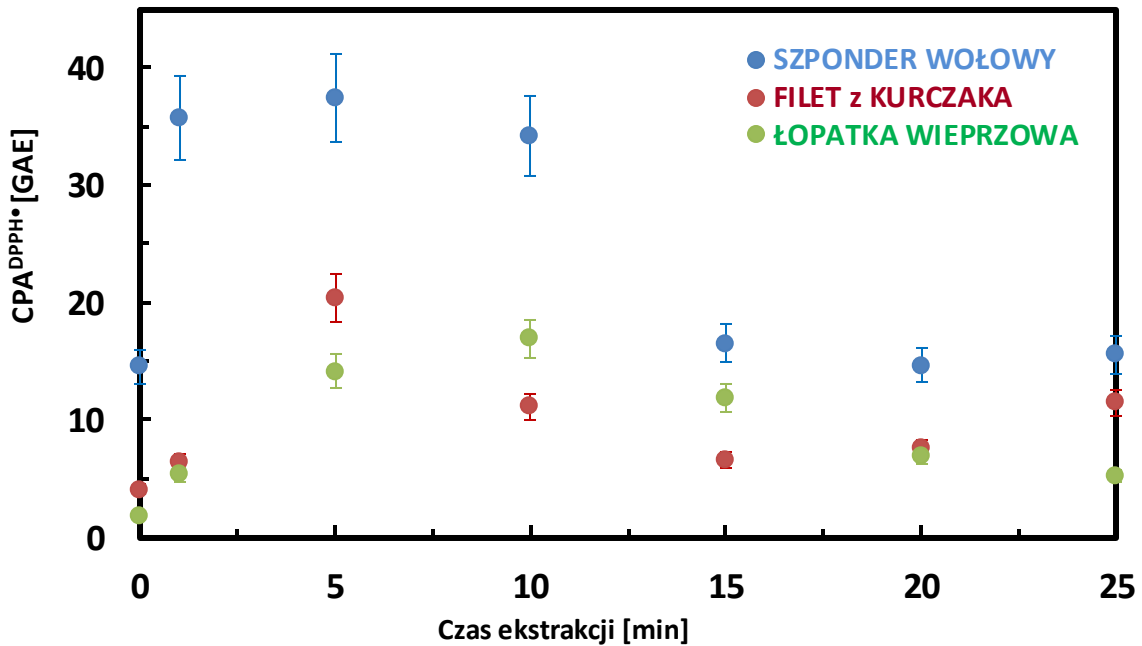


Rys. 1. CPA [GAE] mięs po 5 minutach ekstrakcji dichlorometanem. Warunki chromatograficzne: temperatura - 20°C, faza ruchoma - heksan/acetone (80:20% v/v), ilość naniesionej próbki - 5 μl .

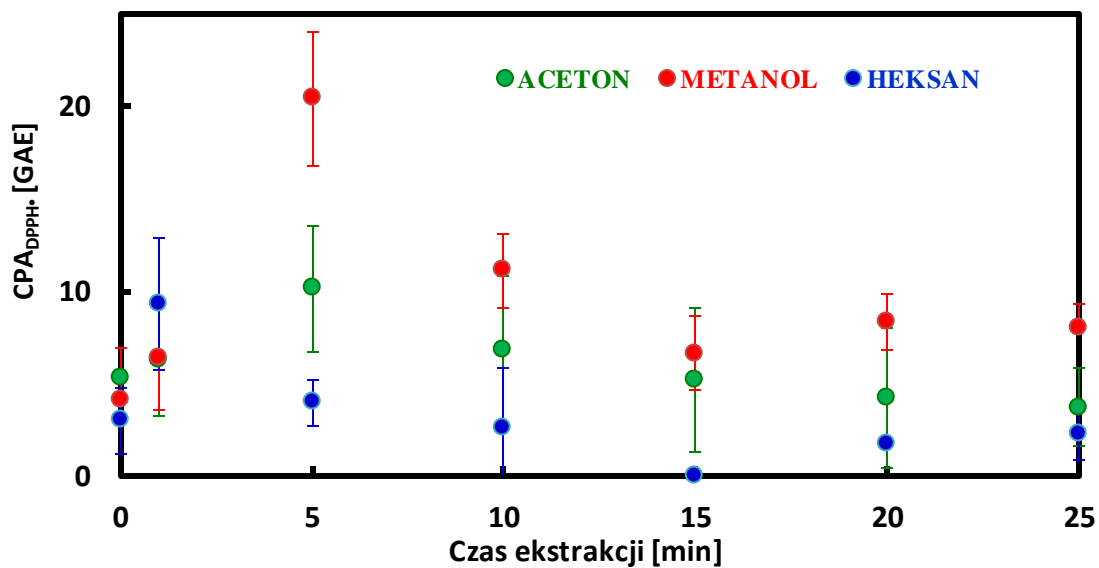
Fig. 1. TAP [GAE] of meat after 5 min. extraction with dichloromethane. Chromatographic conditions: temperature - 20°C, mobile phase - hexane/acetone (80:20% v/v), injection volume - 5 μl .

Właściwości antyoksydacyjne ekstraktów mięsnych (The antioxidant properties of the meat extracts)

Stężenie antyoksydantów (stąd CPA^{DPPH•}) zależy od czasu ekstrakcji (Rys. 2). Z jednej strony jego wydłużenie zwiększa współczynnik ekstrakcji, z drugiej zaś zwiększa prawdopodobieństwo utlenienia próbki. Dla różnych gatunków mięs uzyskano podobną zależność CPA od czasu ekstrakcji (Rys. 2) i od zastosowanego rozpuszczalnika (Rys. 3). Maksymalne wartości CPA uzyskano dla ok. 5 min. ekstrakcji. Powyżej 10 min. wartości CPA asymptotycznie dążą do stałej wartości. Największym CPA charakteryzuje się mięso wołowe (ok. 21 µg GA/1 g mięsa). Najślabszymi właściwościami antyoksydacyjnymi charakteryzował się metanolowy ekstrakt łopatki wieprzowej (ok. 8,9 µg GA/1 g mięsa). Większe wartości CPA otrzymano dla rozpuszczalników bardziej polarnych.



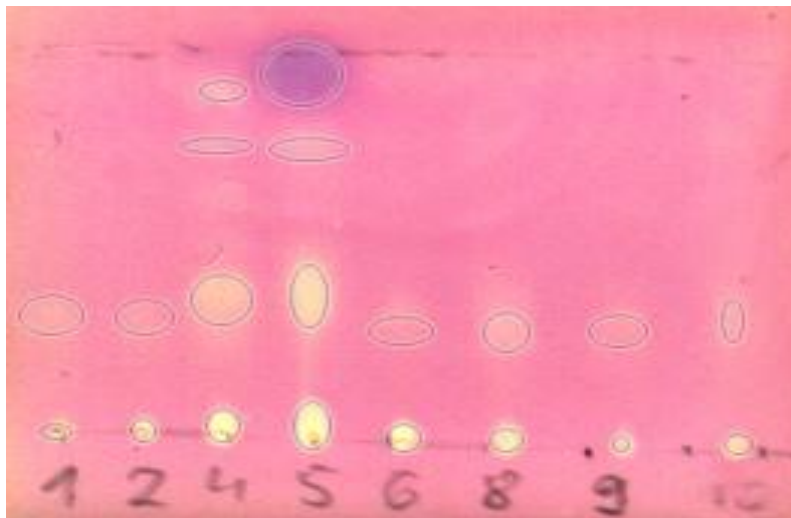
Rys. 2. Wpływ czasu ekstrakcji metanolem na płuczce ultradźwiękowej) na CPA^{DPPH} [GAE].
Fig. 2. The influence of extraction time (using methanol and ultrasonic bath) on TAP^{DPPH} [GAE].



Rys. 3. Wpływ czasu ekstrakcji na CPA^{DPPH} [GAE] filetu z kurczaka.
Fig. 3. The influence of time extraction on TAP^{DPPH} [GAE].

Wizualizacja za pomocą rodnika DPPH (Visualisation using the DPPH radical)

Wizualizację płytek przeprowadzono w układzie faz odwróconych. Fazą ruchomą była mieszanina dwuskładnikowa: metanol/woda o stosunku objętościowym (95:5, v/v). Zastosowana faza ruchoma wymywa takie związki jak, witaminy E (α , β , γ – tokoferole) oraz witaminę D [10]. Na płytkach RP-18W uzyskano najlepsze rozdzielanie tych właśnie związków. Na podstawie obecności i intensywności żółtych plamek można stwierdzić występowanie w badanych ekstraktach związków o właściwościach przeciwutleniających. Rodnik DPPH reaguje z antyoksydantami co powoduje odbarwienie fioletowego tła (Rys. 4). W metanolowych ekstraktach znajdują się zarówno polarne antyoksydanty ($R_f = 0,75$ i $0,86$ dla wołowiny i łososia), średnio polarne (mięso drobiowe - filet z kurczaka i indyka $R_f = 0,25$), jak i niepolarne ($R_f = 0$). Wołowina i łosoś wędzony charakteryzują się zbliżoną ilością i intensywnością plamek żółtych (Rys. 4) oraz wartością CPA^{DPPH}. Z otrzymanych wyników można wywnioskować, że każda próbka zawiera bardzo podobne antyoksydanty, średnio polarne.

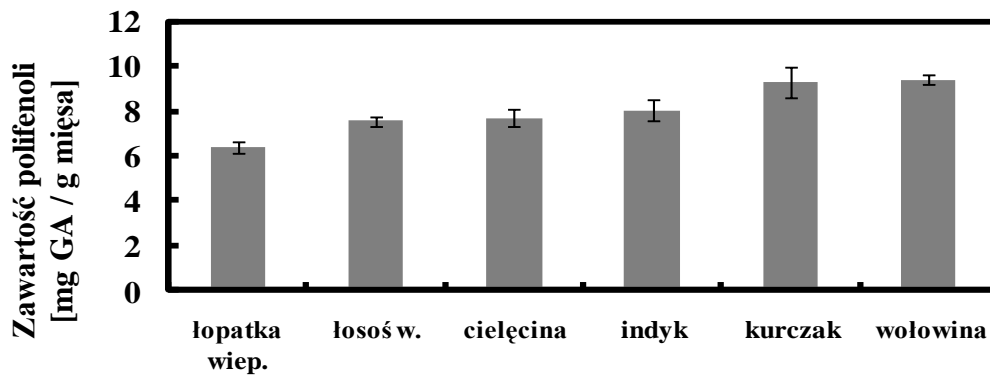


Rys. 4. TLC chromatogram uzyskany w wyniku wizualizacji metanolowym roztworem DPPH dla próbek mięsnych ekstrahowanych metanolem. Warunki chromatograficzne: płytka RP-18W, faza ruchoma - metanol/woda (95:0,5, v/v), wizualizacja - 1 mM DPPH. (1 – schab wieprzowy; 2 – filet z indyka; 4 – szponder wołowy; 5- łosoś wędzony; 6 – filet z kurczaka; 8 – łopatką wieprzowa; 9 – cielęcina wieprzowa i 10 - karkówka wieprzowa)

Fig. 4. TLC chromatogram obtained by visualization using methanolic solution of DPPH for meat samples extracted in methanol. Chromatographic conditions: plate - RP-18W, mobile phase - methanol/water (95:0,5, v/v), visualization - 1 mM DPPH. (1 - pork loin, 2 - turkey fillet, 4 - beef brisket, 5 - smoked salmon; 6 - chicken fillet; 8 - pork shoulder; 9 - veal and 10 - pork neck).

Wpływ rozpuszczalnika ekstrakcyjnego CPA próbek (The influence of solvents on TAP values)

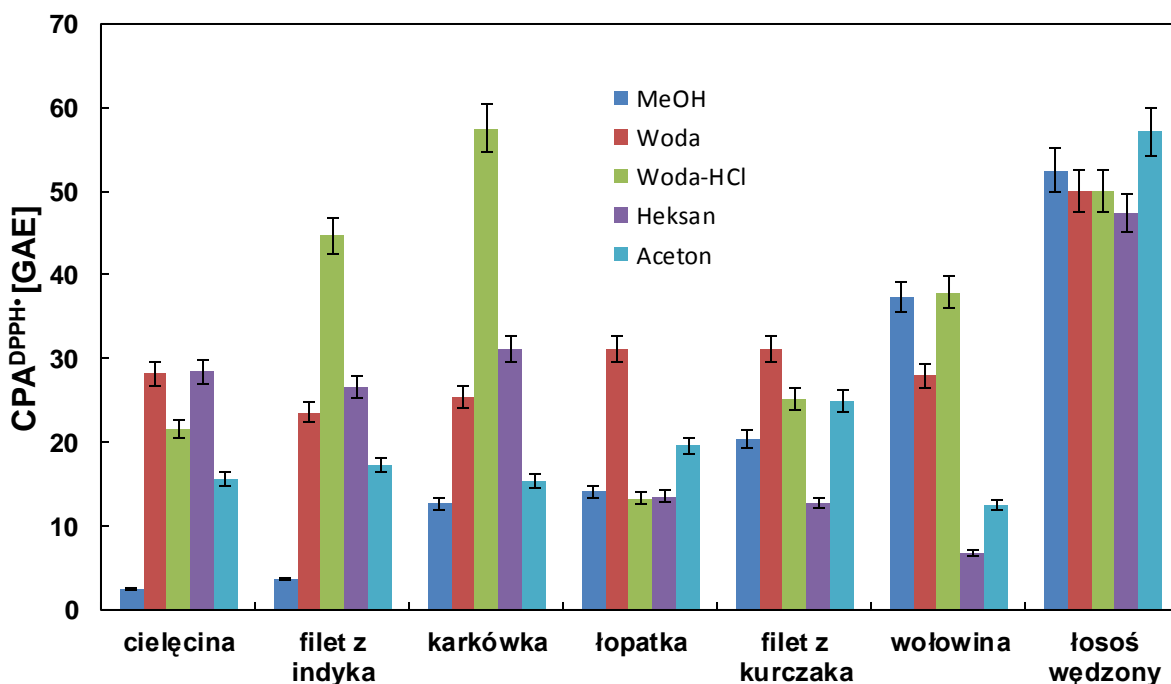
Za właściwości antyoksydacyjne próbek mięsnych odpowiedzialne są różne związki, które rozpuszczalne są w różnych rozpuszczalnikach. Dlatego niemożliwe jest uzyskanie informacji o pełnej aktywności antyoksydacyjnej próbki po ekstrakcji tylko jednym rozpuszczalnikiem [11]. Na Rys. 5 przedstawiono całkowite stężenie polifenoli w różnych gatunkach mięsa. Najniższa zawartość polifenoli występuje w karkówce wieprzowej (ok.6 GAE), a najwyższa zaś w wołowinie (szponder) – 9,38 GAE i filecie z kurczaka – 9,27 GAE. Oznacza to, że redukcja rodnika DPPH najprawdopodobniej spowodowana jest przez polifenole. Długotrwałe przechowywanie mięsa może wywołać chemiczne utlenienie polifenoli, a także niekontrolowane procesy enzymatyczne.



Rys. 5. Zawartość polifenoli w mięsach. Warunki pomiarowe: pomiar fotometryczny 765 nm, stężenie mięsa - 0,05 g/ml. Wyniki przedstawiają średnią z 3 pomiarów.

Fig. 5. The concentration of polyphenols in meats. Measuring conditions: photometric measurements at 765 nm, concentration of the meat - 0.05 g/ml. The results represent the average of 3 measurements.

CPA^{DPPH} różnych gatunków mięsa ekstrahowanych przez różne rozpuszczalniki przedstawiono na Rys. 6. Okazało się, że najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi charakteryzuje się mięso łosia wędzonego po ekstrakcji heksanem. Z drugiej strony najniższe CPA otrzymano dla cielęciny ekstrahowanej acetonem. Łosoś wędzony bez względu na użyty do ekstrakcji rozpuszczalnik zawsze (w granicach niepewności pomiarowej) charakteryzuje się bardzo silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Prawdopodobnie spowodowane jest to tym, że łosoś wędzony zawiera dym wędzarniczy, który ma działanie konserwujące i antybakteryjne. Substancjami czynnymi dymu są związki (pochodne gwajakolu i syringolu), które wykazują silne właściwości antyoksydacyjne [15]. W tym miejscu warto zauważyć, że CPA mięsa zależy od jego obróbki. Między innymi powstają tzw. MRPs (ang.: *Maillard Reaction Products*), czyli produkty reakcji Maillarda, tzn. reakcji między aminokwasami a cukrami. Obróbka może zwiększać aktywność antyoksydacyjną niektórych białek z powodu zmian jakie zachodzą w ich II i III rzędowej strukturze. Obróbka mięsa, zarówno do spożycia jak i do analizy może przyczynić się do utleniania antyoksydantów. W konsekwencji może dojść do degradacji endogennych antyoksydantów takich jak witamina C, E, polifenoli, tioli czy karotenoidów [12-14]. Zawartość antyoksydantów w różnych gatunkach mięs zależy od zastosowanego do ekstrakcji rozpuszczalnika. Najwięcej antyoksydantów zawiera mięso z łosia.



Rys. 6. CPA^{DPPH} [GAE] różnych gatunków. Warunki ekstrakcji i chromatograficzne jak na Rys. 5.

Rys. 6. TAP^{DPPH} [GAE] of different types of meat. Extraction and chromatographic conditions as on Fig. 5.

4. Literatura (Literature)

- [1] G.H. Zhou, X.L. Xu, Y. Liu, *Preservation technologies for fresh meat – A review*, Meat Science, 86, 119-128, 2010.
- [2] W. Migdał, D. Wojtysiak, K. Palka, M. Natonek-Wiśniewska, I. Duda, A. Nawocień, *Skład chemiczny i parametry tekstury wybranych mięśni tuczników rasy polskiej białej zwisłouchej ubijanych w różnym wieku*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 6 (55), 277-284, 2007.
- [3] T. Kołczak, *Jakość wołowiny*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 1 (56), 5-22, 2008.
- [4] B.K. Głód, P. Piszcz, I. Kiersztyn, A. Lamert, P. Zarzycki, *Zastosowanie HPLC do oznaczania wolnych rodników, antyoksydantów oraz całkowitego potencjału antyoksydacyjnego*, Postępy Chromatografii (Camera Separotria), 1, 41-66, 2009.
- [5] H. Puzanowska-Tarasiewicz, L. Kuźmicka, M. Tarasiewicz, *Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 43 (1), 9-14, 2010.
- [6] A.R. Ndhlala, M. Moyo, J.V. Staden, *Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules?* Molecules, 15, 6905-6930, 2010.
- [7] B. Gryszczyńska, M. Iskra, *Współdziałanie antyoksydantów egzogennych i endogennych w organizmie człowieka*, Nowiny Lekarskie, 77 (1), 50-55, 2008.
- [8] B.K. Głód, P.M. Wantusiak, P. Piszcz, E. Lewczuk, P.K. Zarzycki, *Application of micro-TLC to the total antioxidant potential (TAP) measurement*, Food Chemistry, 173, 749-754, 2015.
- [9] P. Piszcz, M. Tomaszewska, B.K. Głód, *O możliwości zastosowania chromatografii cienkowarstwowej do oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego. Część I. Dobór warunków chromatograficznych*, Camera Separatoria, 7 (1), 41-51, 2015.
- [10] M.M. Srivastava (Ed.), *High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.
- [11] D. Plus, *Praca doktorska, Pojemność przeciwutleniająca wybranych surowców pochodzenia zwierzęcego*, Akademia Rolnicza, Szczecin 2007.
- [12] A. Serpen, V. Gökmen, V. Fogliano, *Total antioxidant capacities of raw and cooked meat*, Meat Science 90, 60-65, 2012.
- [13] M. Heś, J. Korczak, *Wpływ produktów utleniania lipidów na wartość odżywczą białka*, Nauka Przyroda Technologie, 1 (1), 1-15, 2007.
- [14] A. Michalska, H. Zieliński, *Produkty reakcji Maillarda w żywności*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2 (51), 5-16, 2007.
- [15] A. Lebedzińska, *Łososie wędzone cennym źródłem składników odżywczych*, Magazyn Przemysłu Rybnego, 2 (50), 33-36, 2006.