

ALICJA JAWORSKA-PIASECKA, MAREK GOGOLEWSKI, JAN ZABIELSKI

BADANIA WPLYWU BETA-KAROTENU NA POZIOM TOKOFEROLI W PRÓBACH SMAŁCU WIEPRZOWEGO

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie wpływu β -karotenu na poziom α - i δ -tokoferoli w próbach, przy użyciu triacylogliceroli smalcu jako substratu. Dodatkowo zbadano skuteczność przeciwutleniającą tych związków. Stwierdzono, że rozkład tokoferoli w przechowywanym smalcu zależał nie tylko od ilości nadtlenków, ale był szybszy przy ich niższych stężeniach w substracie i większym dodatku β -karotenu.

Słowa kluczowe: przeciwutleniacz, β -karoten, α -tokoferol, δ -tokoferol.

Wstęp

W ostatnich latach zauważa się zwiększenie zachorowań na miażdżycę, raka i choroby serca, dlatego też zwiększyła się ilość badań z udziałem triad witaminowych, do których należy β -karoten jako prekursor witaminy A oraz witamina E [3, 4].

Substancje przeciwutleniające można podzielić na dwie grupy: przeciwutleniacze główne i przeciwutleniacze pomocnicze zwane inaczej synergistami. Przeciwutleniacze główne mają zdolność do reagowania z rodnikami substratu przerywając spontanicznie reakcje autooksydacji. Natomiast przeciwutleniacze pomocnicze zwiększają działanie przeciwutleniaczy głównych [5, 11]. Do nich zalicza się β -karoten. Mechanizm działania synergistycznego nie jest w pełni rozpoznany i różni się w zależności od typu przeciwutleniacza pomocniczego. Udowodniono, że substancje synergistyczne tokochromanoli kompensowane są przez jony metali, minimalizując ich prooksydacyjny wpływ; regenerują także przeciwutleniacz główny poprzez donorowanie wodoru oraz współdziałają przy inhibicji rozpadu nadtlenków [1, 6, 10].

Witamina E, która należy do przeciwutleniaczy głównych, w stężeniach przekraczających 0,1% sumy tokoferoli, charakteryzuje się inwersją właściwości z przeciw- na proutleniające [4, 5, 7, 8, 12]. Dlatego celem pracy była ocena ochronnego wpływu β -karotenu jako synergisty na poziom α - i δ -tokoferoli przy wykorzystaniu triacylogliceroli smalcu jako substratu. Ponadto określono skuteczność przeciwutleniającą α - i δ -tokoferolu.

Materiał i metody badań

Do badań wykorzystano α -tokoferol firmy Merck o czystości 99,9%, δ -tokoferol firmy SIGMA o czystości 90,0%, β -karoten firmy Biochemical o czystości 95,0% oraz smalec produkcji Zakładów Mięsnych Pozmeat S.A. w Poznaniu.

Doświadczenie wykonano w układzie modelowym, w którym do smalcu dodawano α i δ -tokoferol w ilościach 0,075% i 0,225% (ilości te oscylują między wartością 0,1%, która jest wyznacznikiem inwersji właściwości tokoferoli z przeciw- na proutleniające) oraz dodatkowo do tych samych ilości tokoferoli dodawano β -karoten 0,01% i 0,001%, natomiast próbą kontrolną był sam smalec. Próby termostatowano w 25°C bez dostępu światła. Następnie co dwie doby badano liczbę nadtlenkową i oznaczano zawartość tokoferoli w próbach.

Liczbę nadtlenkową oznaczano według normy [9], a wyniki obliczano w milirównoważnikach aktywnego tlenu na kilogram substratu. Tokoferole rozdzielano stosując chromatografię cienkowarstwową (TLC). Płytki powlekano żelem krzemionkowym G firmy Merck, warstwą o grubości 0,5 mm. Zawartość tokoferoli oznaczano metodą Emmerie i Engla [2], pomiar wykonywano w spektrofotometrze SPEKOL-11.

Właściwości przeciwutleniające opisano obliczając współczynnik odporności (WO), który wyraża stosunek czasu osiągnięcia 4 milirównoważników aktywnego tlenu/kg smalcu z dodatkami do czasu osiągnięcia 4 milirównoważników aktywnego tlenu/kg przez próbę kontrolną.

Wyniki i ich omówienie

Zmiany LOO (liczba nadtlenkowa) w funkcji czasu przechowywania wszystkich prób opisano krzywą logistyczną

$$y = a / [1 + b \cdot \exp(-c \cdot t)], \text{ gdzie:}$$

a – przewidywana maksymalna wartość LOO,

b – czas osiągnięcia największej wartości LOO,

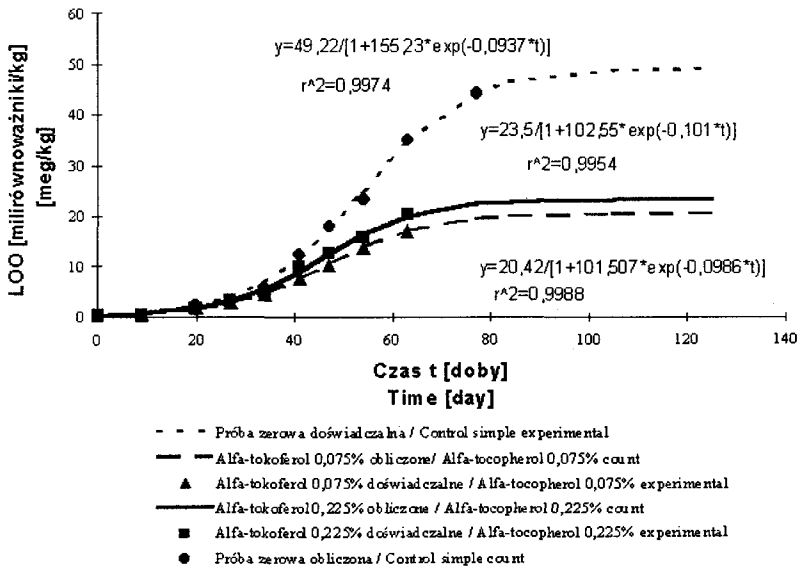
c – okres indukcji,

t – czas.

W przypadku próby kontrolnej wartość LOO zmieniła się bardzo szybko i przewidywana teoretyczna maksymalna wartość wyniosła $a = 49,22$. Wielkość ta wynika z

obliczeń matematycznych i ma charakter prognozy. Praktyczne wykorzystanie tej wartości polega na tym, że obliczając pochodną zmian liczby nadtlenkowej względem czasu dy/dt w połowie wysokości jej krzywej teoretycznej, uzyskać można informacje dotyczące dynamiki zmian LOO w próbie kontrolnej. Szybkość zmian LOO w próbie kontrolnej wynosiła 0,25 [milorównowników/kg·dzień].

Zmiany LOO w funkcji czasu przechowywania prób smalcu z dodatkiem α -tokoferolu oraz δ -tokoferolu w ilościach 0,075% i 0,225% przedstawiono na rys. 1. i 2. Przewidywana wartość maksymalna próby o zawartości 0,225% α -tokoferolu wynosi 23,5, a dynamika zmian 0,18 [milorównowników/kg·dzień]. Wzajemne relacje pomiędzy szybkością zmian LOO obrazują liczbowo wartość efektu hamującego utleniania. Dodatek α -tokoferolu w ilości 0,225% spowodował, że dynamika zmian LOO zmniejszyła się o 1,4 w stosunku do próby kontrolnej. Biorąc pod uwagę wartość współczynników z równań charakteryzujących poziom, do którego dąży ta funkcja, w przypadku α -tokoferolu w ilości 0,225% można oczekiwać, że najwyższa maksymalna wartość teoretyczna LOO zmniejszy się o 2,1 w stosunku do próby kontrolnej.



Rys. 1. Zmiana LOO w funkcji czasu przechowywania prób smalcu z dodatkiem α -tokoferolu.

Fig. 1. Changes of LOO as a function of storage time of lard with α -tocopherol addition.

Największą trwałością charakteryzowała się próba o zawartości 0,075% δ -tokoferolu (rys. 2).

Przeprowadzone obliczenia wykazały, że w przypadku próby z dodatkiem 0,075% δ -tokoferolu teoretyczna maksymalna wartość $a = 6,18$, a szybkość zmian

wynosiła 0,02 [milirównoważnika/kg-dzień]. Oznacza to, że efekt hamujący utleniania liczony w stosunku do próby kontrolnej zmniejszył się 13 razy, a oczekiwana wartość maksymalna LOO jest 8 razy mniejsza od próby kontrolnej. Stwierdzono też, że próby zawierające δ -tokoferol charakteryzowały się większą trwałością w porównaniu z próbami zawierającymi α -tokoferol.

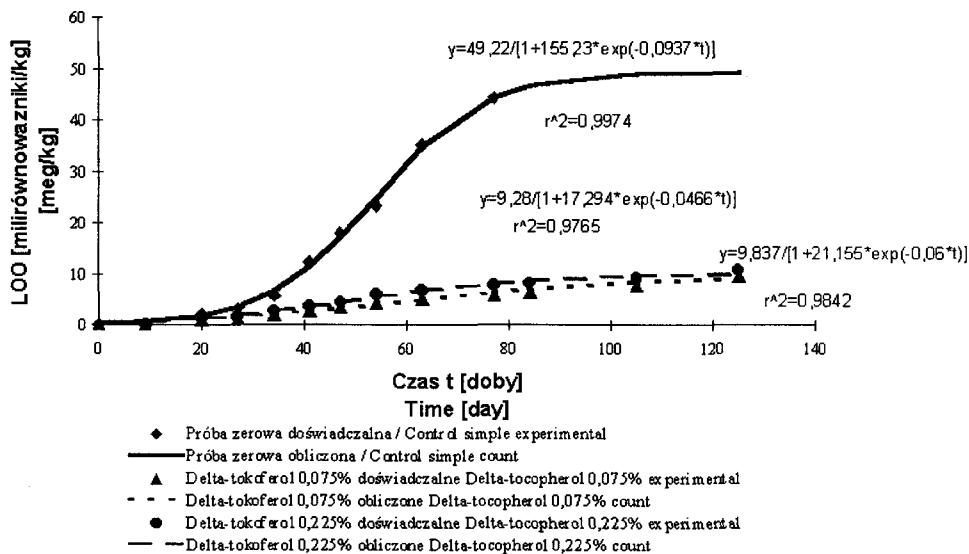


Fig. 2. Zmiana LOO w funkcji czasu przechowywania prób smalcu z dodatkiem δ -tokoferolu.

Fig. 2. Changes of LOO as a function of storage time of lard with δ -tocopherol addition.

Na rys. 3. i 4. przedstawiono zależność LOO od czasu przechowywania prób smalcu o zawartości 0,075% i 0,225% α -tokoferolu i δ -tokoferolu oraz z dodatkiem β -karotenu w ilości 0,001% i 0,01%.

Dodatek β -karotenu do prób w ilości 0,001% spowodował zwiększenie trwałości prób smalcu zawierających zarówno α i δ tokoferol.

Próba o zawartości 0,075% δ -tokoferolu i 0,001% β -karotenu charakteryzowała się największą trwałością. Jej przewidywana maksymalna wartość teoretyczna $a = 5,4$, a szybkość zmian LOO wynosiła 0,014 [milirównoważnika/kg-dzień], natomiast wartość efektu hamującego utleniania była 17,85 razy mniejsza od próby kontrolnej. Oczekiwana wartość maksymalna LOO zmniejszyła się 8,9 razy w stosunku do próby kontrolnej. Dodatek β -karotenu w ilości 0,01% spowodował obniżenie trwałości prób smalcu zarówno α jak i δ -tokoferolu.

Najmniejszą trwałością charakteryzowała się próba o zawartości 0,225% α -tokoferolu z dodatkiem 0,01% β -karotenu. Przewidywana wartość teoretyczna $a = 28$, a zmiana w połowie krzywej równała się 0,18 [milirównoważnika/kg-dzień], efekt

hamujący w stosunku do próby kontrolnej był 1,4 razy mniejszy, a maksymalna wartość teoretyczna LOO zmniejszyła się w odniesieniu do próby kontrolnej o 1,7 (rys. 3).

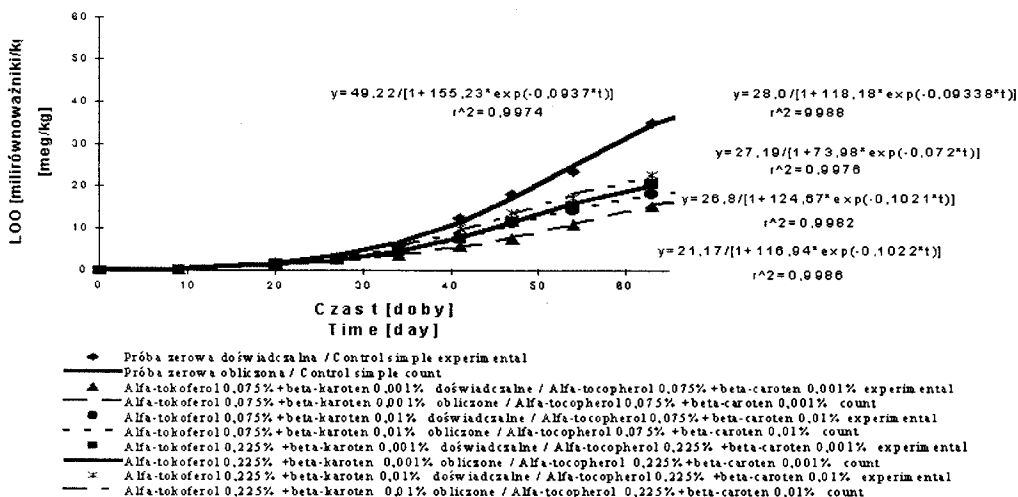


Fig. 3. Zmiana LOO w funkcji czasu przechowywania prób smalcu z dodatkiem α -tokoferolu i β -karotenu.

Fig. 3. Changes of LOO as a function of storage time of lard with α -tocopherol and β -caroten addition.

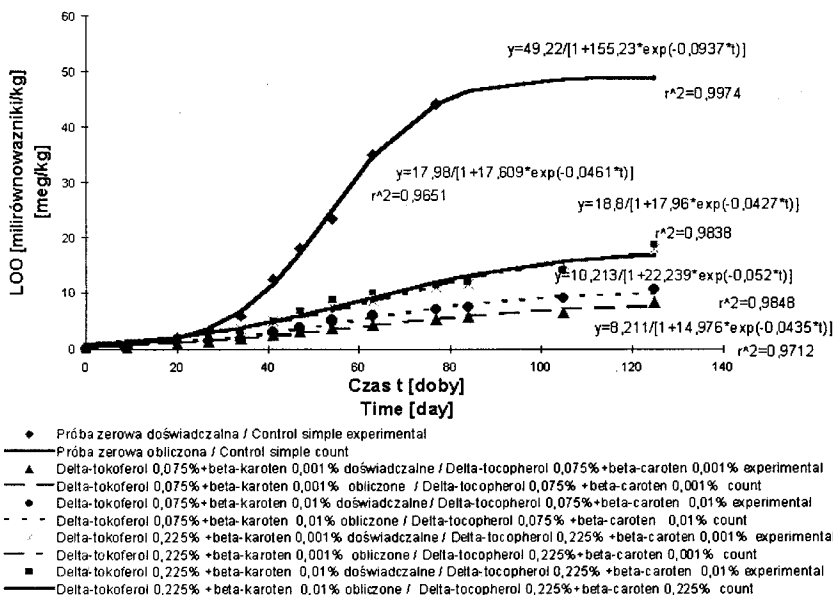


Fig. 4. Zmiana LOO w funkcji czasu przechowywania prób smalcu z dodatkiem δ -tokoferolu i β -karotenu.

Fig. 4. Changes of LOO as a function of storage time of lard with δ -tocopherol and β -caroten addition.

Tabela 1

Współczynnik odporności prób smalcu z dodatkiem α - i δ -tokoferolu oraz β -karotenu.

Resistance coefficient samples of lard with α - and δ -ticipherol and β -caroten

| Zawartość / Content [%] | | | Wartość WO prób smalcu / Resistance coefficient of samples of lard |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---|
| α -tokoferol / tocopherol | δ -tokoferol / tocopherol | β -karoten / carotene | |
| 0,075 | - | - | 1,13 |
| 0,225 | - | - | 1,07 |
| - | 0,075 | - | 1,79 |
| - | 0,225 | - | 1,62 |
| 0,225 | - | 0,001 | 1,10 |
| 0,225 | - | 0,01 | 1,02 |
| 0,075 | - | 0,001 | 1,21 |
| 0,075 | - | 0,01 | 1,08 |
| - | 0,225 | 0,001 | 1,51 |
| - | 0,225 | 0,01 | 2,13 |
| - | 0,075 | 0,001 | 2,59 |
| - | 0,075 | 0,01 | 1,69 |

Współczynnik odporności (WO) (tab. 1) prób o zawartości 0,075% α -tokoferolu wynosił 1,13 i był wyższy od prób z α -tokoferolem w ilości 0,225% w przypadku którego WO = 1,07. Wartość WO prób z δ -tokoferolem w ilości 0,075% równała się 1,76, a z dodatkiem 0,225% δ -tokoferolu WO wynosił 1,52. WO prób o zawartości zarówno 0,075% oraz 0,225% δ -tokoferolu był około 1,5 razy wyższy od α -tokoferolu dodanego w tej samej ilości do prób smalcu.

Największą wartość WO, wynoszącą 2,59, ze wszystkich badanych prób miała próba z δ -tokoferolem w ilości 0,075% i dodatkiem 0,001% β -karotenu. Natomiast najniższy WO, czyli najmniejszą trwałość miała próba smalcu o zawartości 0,225% α -tokoferolu i 0,01% β -karotenu (WO = 1,02).

Badania wykazały również, że dodatek do smalcu zarówno α - i δ -tokoferoli w ilości 0,225% powodował pogorszenie trwałości prób, co przypisać można inwersji właściwości z przeciw- na proutleniające.

W drugim etapie badań obliczono zawartość α i δ -tokoferoli przy liczbie nadtlenkowej (LOO) 4, 10, 20. Rozpad tokoferoli w funkcji czasu przechowywania prób przedstawia równanie reakcji pierwszo- lub pseudopierwszorzędowej

$$y = a \cdot e^{(-b \cdot t)} \text{ gdzie:}$$

a – przewidywana wielkość rozpadu,

b – charakteryzuje szybkość zmian.

Z równań można obliczyć czas połowicznego zaniku tokoferoli w próbce:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{-0,693}{-b}$$

Na rys. 5. przedstawiono zmiany zawartości α -tokoferolu w funkcji czasu przechowywania próbek smalcu.

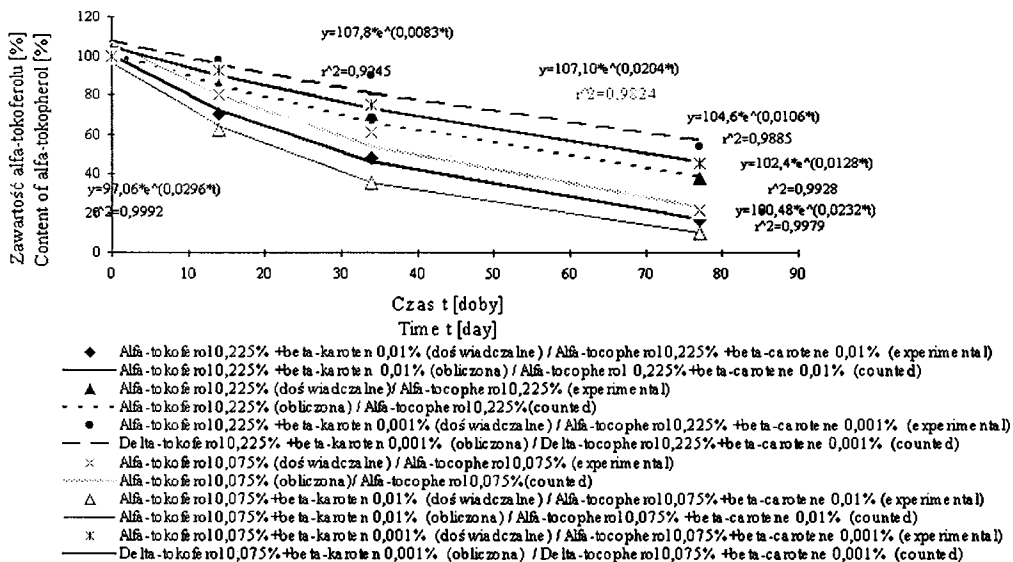


Fig. 5. Zmiana zawartości α -tokoferolu w próbkach smalcu w czasie przechowywania.

Fig. 5. Changes of α -tocopherol content in samples of lard during storage.

Najmniejszym rozpadem cechowała się próba o zawartości 0,225% α -tokoferolu z dodatkiem 0,001% β -karotenu, po 77 dniach tokoferol rozpadł się w 46% (rozpad o 67% nastąpi po 120 dniach). Natomiast największy rozpad zanotowano w próbce z α -tokoferolem w ilości 0,075% i dodatkiem 0,01% β -karotenu; po 77 dniach zostało tylko 10% α -tokoferolu w próbce smalcu. Rozpad o 67% nastąpił po 33 dniach.

Najmniejszym rozpadem charakteryzowała się próba z udziałem δ -tokoferolu w ilości 0,225% i 0,001% dodatkiem β -karotenu; WO wynosił 29,1% po 98 dniach. Rozpad o 67% nastąpi po 310 dniach, następnie w próbach o zawartości 0,075% δ -tokoferol i 0,001% dodatkiem β -karotenu po 212 dniach nastąpi rozpad w 67%. Natomiast najszybciej rozpadł się δ -tokoferol w próbach o zawartości 0,075% i dodatkiem 0,01% β -karotenu – po 98 dniach tokoferol rozpadł się już w 81,5%. Czas połowicznego rozpadu nastąpił po 59 dniach. Rozpad δ -tokoferoli w czasie przechowywania próbek przedstawiono na rys. 6.

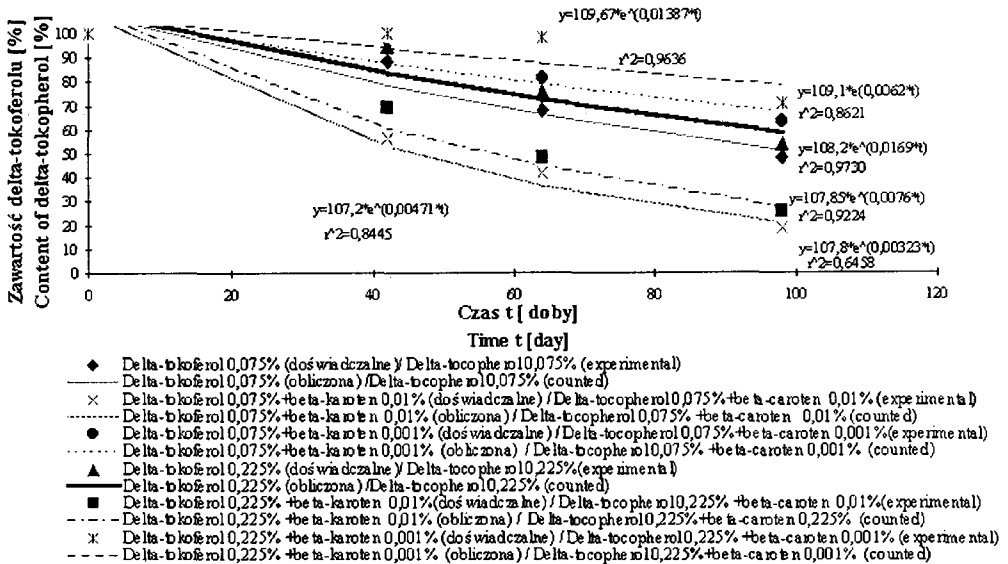


Fig. 6. Zmiana zawartości δ -tokoferolu w próbkach smalcu w czasie przechowywania.

Fig. 6. Changes of δ -tocopherol content in samples of lard during storage.

Przeprowadzone badania jednoznacznie wskazują na ochronny wpływ β -karotenu o zawartości 0,001% na tokoferole i odwrotne działanie dodatku 0,01% β -karotenu w próbkach smalcu, który hamował przeciwutleniające działanie tokoferoli. Związane jest to z faktem, że β -karoten należy do przeciwutleniaczy pomocniczych, które zwiększają działanie przeciwutleniaczy głównych [11].

Działanie β -karotenu jako synergisty wobec tokoferoli nie jest całkowicie wyjaśnione. Sądzi się, że substancje synergistyczne kompleksują jony metali ciężkich minimalizując ich peroksydatywny wpływ, regenerują przeciwutleniacz główny poprzez donorowanie wodoru, współdziałają przy inhibicji rozpadu nadtlenuków, których produkty degradacji propagują reakcje łańcuchową autooksydacji [14].

Należy zauważyć, że suplementacja dużych dawek β -karotenu jest szkodliwa. Zgodnie z badaniami fińskimi, suplementacja β -karotenu u palaczy i ludzi narażonych na stały kontakt z azbestem powoduje wzrost ryzyka zachorowania na nowotwory, szczególnie płuc [13].

Wnioski

- 0,001% dodatek β -karotenu do prób smalcu zwiększał skuteczność przeciwutleniającą zarówno α - i δ -tokoferoli dodanych do prób w ilości 0,075% i 0,225%, podczas gdy 0,01% dodatek β -karotenu przyspieszał proces autooksydacji smalcu.

2. Smalec z dodatkiem δ -tokoferolu w ilości 0,075% i 0,225% charakteryzował się 1,5 razy dłuższym czasem przydatności do spożycia niż z dodatkiem α -tokoferolu.
3. α - i δ -tokoferole były skuteczniejszymi przeciwutleniaczami, gdy ich zawartość w smalcu wynosiła 0,075%. Dodatek α i δ -tokoferoli w ilości 0,225% powodował inwersję właściwości z przeciw- na proutleniające.
4. Rozkład tokoferoli w przechowywanym smalcu zależał nie tylko od ilości nadtlenków, ale był szybszy przy ich niższych stężeniach w substracie i większym dodatku β -karotenu.

Literatura

- [1] Bohm F., Tdge R.: The Role of Ascorbic Acid in Oral Cancer and Carcinogenesis. *Oral Diseases*, 1998, **4**, 120-129.
- [2] Emmerie A., Engel C.: *Analysenmethode zur Bestimmung Vitamin E in Lebens und Futtermitteln*. Bern. 1953.
- [3] Greenberg R., Baron A.: Futher Coinformation on Effects of β -Carotene Supplementation. *Antioxidant Vitamins Newsletter*, 1996, **17**, 9.
- [4] Handelman J., Packer L., Cross E.: Destruction of Fat-Soluble Antioxidant by Cigarette Smoke. *Antioxidant Vitamins Newsletter*, 1996, **17**, 12.
- [5] Kączkowski J.: *Podstawy biochemii*. WNT, Warszawa 1995.
- [6] Kondor K., Kurihara M., Miyata N., Suzuki T., Toyoda M.: Mechanistic Studies of Catechins as Antioxidants Against Radical Oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, **362(1)**, 79-86.
- [7] McDowell L.R. Vitamins for Beef Cattle. In: T. J. Cunha (ed): *Vitamins in Animal Nutrition*. Academic Press, San Diego, 1994, **21**, 93.
- [8] Metodiewa D., Jaisaway A. K., Cenas N., Dickancaite, Segura-Aguita J.: Quercetin May Act as a Cytotoxic Pro-oxidant after its Metabolic Activation to Semiquinone and Quinoidal Product. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26(1-2)**, 107-116.
- [9] PN-ISO 3690: 1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej.
- [10] Shahidi F., Ho C.T.: *Phytochemicals and Phytopharmaceutical*. American Oil Chemists Society, 2000, Champaign, IL.
- [11] Sikorski Z.E.(red): *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności*. WNT, Warszawa 1996.
- [12] Ziemiański Ś., Budzińska-Topolska M.: *Tłuszcze pożywienia i lipidy ustrojowe*. PWN, Warszawa 1991.
- [13] Masoto M., Matsumoto S.: *J. Organic Chem.*, 1987, **52**, 3514-3520.
- [14] Omenn S., Baron A.: Results of Two Major Trials of β -Carotene Supplementation. *Antioxidant Vitamins Newsletter*, 1996, **17**, 14.

INFLUENCE OF β -CAROTENE AS A SYNERGIST ON TOCOPHEROL IN SAMPLES

S u m m a r y

The aim of the work was to examine β -carotene as a synergist added in two doses to α and δ -tocopherol. As well as determine its antioxidant activity. The experiment was performed using pork lard as a triaciloglycerol substrate. It was found that tocopherol disintegration in lard depends on quantity of peroxide and it is faster as its concentration in substrate is lower and higher amount of β -carotene is added.

Key words: antioxidant, β -carotene, α -tocopherol, δ -tocopherol. 