

MARIAN REMISZEWSKI, KRZYSZTOF PRZYGOŃSKI,
MAŁGORZATA KULCZAK, MARIA JEŻEWSKA

OPTIMALIZACJA UKŁADU EKSTRAKCYJNEGO I OCENA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCYCH NASION WYBRANYCH ROŚLIN STRĄCZKOWYCH

Streszczenie

Nasiona roślin strączkowych mogą być potencjalnym źródłem aktywnych biologicznie przeciwutleniaczy - polifenoli. Celem pracy było zoptymalizowanie układu ekstrakcyjnego oraz określenie aktywności przeciwutleniającej i składu flawonoidowego wybranych nasion roślin strączkowych. Do ekstrakcji zastosowano mieszaninę acetonu i wody w stosunku 7:3. W ekstraktach oznaczano zawartość sumy polifenoli w przeliczeniu na kwas galusowy. Wśród badanych grup nasion roślin strączkowych najwyższą zawartość sumy polifenoli stwierdzono w fasoli kolorowej 'Red Kidney' (5,35 mg/g s.m.), fasoli białej 'Jaś Karłowy' (1,08 mg/g s.m.) i w grochu 'Ramrod' (0,86 mg/g s.m.). Aktywność przeciwutleniającą badanych próbek określono metodami ABTS i DPPH. Wyniki tych dwóch metod wykazały, że fasola kolorowa odmiany 'Red Kidney' miała wyższą aktywność przeciwutleniającą niż fasola biała i groch (w przypadku ABTS – 8 razy wyższą, a w przypadku DPPH – 6 razy wyższą). Znaczącą ilość tanin stwierdzono tylko w nasionach fasoli kolorowej. W ekstraktach wybranych odmian oznaczono chromatograficznie obecność kwasu ferulowego, kwercetyny, luteoliny i kempferolu. W fasoli kolorowej 'Red Kidney' dominowała kwercetyna (245 µg/g s.m.), w fasoli białej 'Jaś Karłowy' luteolina (82 µg/g s.m.), a w grochu 'Ramrod' kempferol (85 µg/g s.m.). Wykazano, że fasola kolorowa jest bogatszym źródłem polifenoli niż fasola biała czy groch.

Słowa kluczowe: przeciwutleniacze, flawonoidy, aktywność przeciwutleniająca, HPLC, fasola kolorowa, fasola biała, groch

Wprowadzenie

Badania epidemiologiczne wskazują na korzystne, przeciwutleniające działanie ochronne polifenoli [8]. Przeciwutleniacze, działając ochronnie na układ krążenia, zmniejszają ilość wolnych rodników i ograniczają rozmiary uszkodzeń przez nie wywoływanych [1, 8, 10]. Jednakże nie zawsze działanie przeciwutleniaczy jest korzystne, szczególnie w wyższych stężeniach [18]. Podstawowym pomiarem w ocenie zawartości polifenoli jest oznaczenie ich sumy – pomiar spektrofotometryczny

Doc. dr inż. M. Remiszewski, dr inż. K. Przygoński, dr inż. M. Kulczak, mgr inż. M. Jeżewska, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie, Oddział Koncentratów w Poznaniu, ul. Starołęcka 40, 61-289 Poznań, e-mail: przygonski@ibprs.pl

produktów reakcji odczynnika Folina i Ciocalteu'a reagującego z fenolami [17]. Spotykane w literaturze modyfikacje polegały na zmianach w metodzie ekstrakcji, zastosowaniu różnych ekstrahentów oraz zróżnicowanej temperatury, co można wyjaśnić różnicami w podejściu do szerokiej gamy rozpatrywanych matryc roślinnych [7, 19, 21]. Aktywność przeciwutleniającą można oznaczać na podstawie pomiaru wychwytywania generowanych w sposób kontrolowany wolnych rodników przez ekstrakty polifenolowe, wyodrębnione z badanej matrycy roślinnej [3, 11, 14].

Wysokosprawna chromatografia cieczowa umożliwia rozdział wszystkich podstawowych grup polifenoli w izolowanych z matrycy ekstraktach [9, 15, 16]. W roślinach niektóre polifenole występują jako glikozydy i aby oznaczyć łatwiejszą w detekcji formę aglikonową stosuje się hydrolizę, uwzględniającą w oznaczaniu także glikozydy o niskiej koncentracji [4, 6]. Hertog i wsp. [5] do oceny poprawności rozdziału chromatograficznego wykorzystali dwa różne eluenty i potwierdzili czystość oraz rozpoznanie pików przy użyciu detektora skanującego widmo absorpcyjne.

Źródłem polifenoli są również rośliny strączkowe, w tym nasiona fasoli i grochu, będące przedmiotem zainteresowania w niniejszej pracy. W nasionach strączkowych dominującymi polifenolami są taniny oraz należące do flawonoli: kwercetyna i kempferol. Zawartość ich uzależniona jest od wielu czynników: odmiany, miejsca uprawy roślin, rodzaju gleby [13]. Polifenole w roślinach strączkowych zgromadzone są przede wszystkim w okrywkach nasiennych [11, 20]. Dotychczas mało jest danych na temat składu związków fenolowych w nasionach roślin strączkowych.

Pierwszym celem pracy był wybór optymalnego układu ekstrakcyjnego na podstawie wyznaczania sumarycznej zawartości polifenoli w ekstrakcie. Drugim celem pracy było określenie aktywności przeciwutleniającej i składu polifenoli wybranych nasion roślin strączkowych po zastosowaniu zoptymalizowanego układu ekstrakcyjnego.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły 3 grupy suchych nasion roślin strączkowych: groch (4 odmiany), fasola biała (6 odmian) i fasola kolorowa (5 odmian) o zawartości wody od 9,1 do 14,0%. Nasiona mielono, uzyskując drobną granulację.

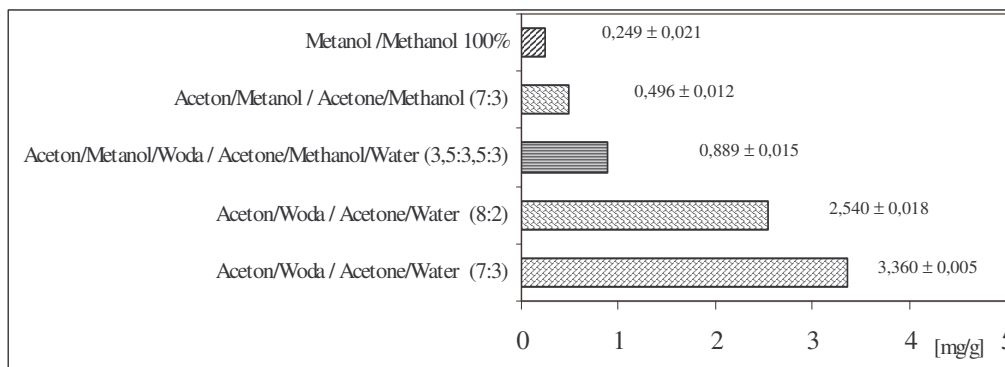
Do badań optymalizujących ekstrakcję zastosowano pięć mieszanin ekstrakcyjnych (metanol 100%; aceton : metanol – 7:3; aceton : metanol : woda – 3,5:3,5:3; aceton : woda – 8:2; aceton : woda – 7:3). Do probówek ze szczelną zakrętką odważano 0,5 g fasoli kolorowej „Rawela” i odmierzano pipetą po 10 cm³ mieszanin ekstrakcyjnych. Przeprowadzano jednokrotną ekstrakcję przez wytrząsanie 60 min i odwirowywano przez 5 min przy 4000 obr./min. Klarowny roztwór z nad osadu poddawano analizom na zawartość sumy polifenoli. Polifenole oznaczano z odczynnikiem Folina i Ciocalteu'a według metody Singletona i Rossiego [17]. Na podstawie zawartości sumy polifenoli dokonano wyboru optymalnego układu ekstrakcyjnego.

Rozdrobnione nasiona roślin strączkowych odważano do probówek w ilości 0,5 g, ekstrahowano jednokrotnie optymalną mieszaniną ekstrakcyjną w dwóch równoległych

powtórzeniach i oznaczano sumę polifenoli [17]. Do dalszych badań wytypowano z każdej grupy nasion roślin strączkowych jedną odmianę o największej zawartości sumy polifenoli. W ekstraktach wytypowanych nasion roślin strączkowych wyznaczano pojemności przeciwutleniające w przeliczeniu na Trolox metodami DPPH [3, 12] i ABTS [14], oznaczano zawartości tanin skondensowanych w przeliczeniu na katechinę [2] oraz wykonywano analizę chromatograficzną związków fenolowych [5, 16] po hydrolizie ekstraktu 1,2 N kwasem solnym w temp 90°C przez 2 godz. Hydrolizat rozdzielano chromatograficznie przy użyciu kolumny z odwróconą fazą firmy Thermo Elec. Co. Hypersil Gold, 250×4,6 mm, złożę 5 µm. Fazę ruchomą o przepływie 1ml/min, stanowił dwuskładnikowy układ gradientowy, A – 0,1 % kwas mrówkowy w wodzie; B – 0,1 % kwas mrówkowy w metanolu.

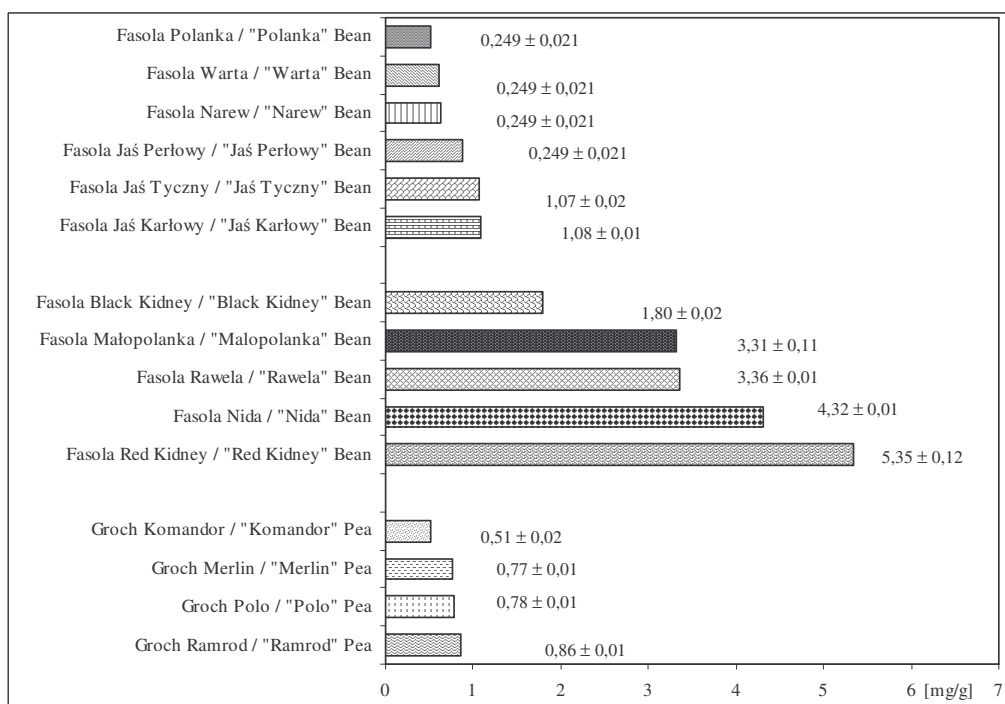
Wyniki badań i dyskusja

Etapem decydującym o oznaczeniu zawartości związków fenolowych, jak i aktywności przeciwutleniającej jest ekstrakcja, a szczególnie istotnym jej elementem dobór odczynników ekstrahujących. Szybkość i łatwość ekstrakcji jest zależna od wielu czynników: rodzaju matrycy, jej struktury, podatności na wnikanie ekstrahentów, powierzchni kontaktu, rodzaju związków fenolowych znajdujących się w matrycy, temperatury. Nasiona roślin strączkowych stanowią matrycę o wyrównanych cechach fizycznych i prawdopodobnie zbliżonym składzie związków fenolowych, co umożliwi dobór najbardziej efektywnej mieszaniny ekstrakcyjnej. W przeprowadzonych badaniach nasiona roślin strączkowych poddano identycznej obróbce mechanicznej, celem zwiększenia powierzchni kontaktu z mieszaniną ekstrakcyjną. Ekstrakcję porównywano, oznaczając sumę polifenoli w przeliczeniu na kwas galusowy (rys. 1), uzyskując najwyższą jego zawartość w mieszaninie acetonu z wodą (7:3). Rezultat ten można wyjaśnić matrycą na jakiej przeprowadzono badania, którą była fasola kolorowa, zawierająca znaczące ilości tanin i flawonoidów, łatwo rozpuszczalnych w acetonie [2]. Wybór mieszaniny acetonu z wodą w stosunku (7:3) jako optymalnej do ekstrakcji polifenoli z nasion roślin strączkowych potwierdziły badania Troszyńskiej i wsp. [19], w których zastosowano identyczną mieszaninę ekstrakcyjną do izolacji polifenoli z okryw nasion grochu. Wyniki zawartości polifenoli w przeliczeniu na kwas galusowy na gram suchej substancji [g/s.m.] przedstawiono na rys 2. Spośród badanych grup surowców, najwyższą zawartość sumy polifenoli stwierdzono w: fasoli kolorowej 'Red Kidney' (5,35 mg/g s.m.), fasoli białej 'Jaś Karłowy' (1,08 mg/g s.m.) i w grochu 'Ramrod' (0,86 mg/g s.m.) (rys. 2). Wyniki aktywności przeciwutleniającej i zawartości tanin przedstawiono na rys. 3.



Rys. 1. Zawartość sumy polifenoli w fasoli kolorowej 'Rawela', w zależności od użytej mieszaniny ekstrakcyjnej [mg/GAE/g s.m.].

Fig. 1. Content of polyphenols' in total in the 'Rawela' coloured beans depending on the kind of extractive mixture applied [mg GAE/g dry matter].

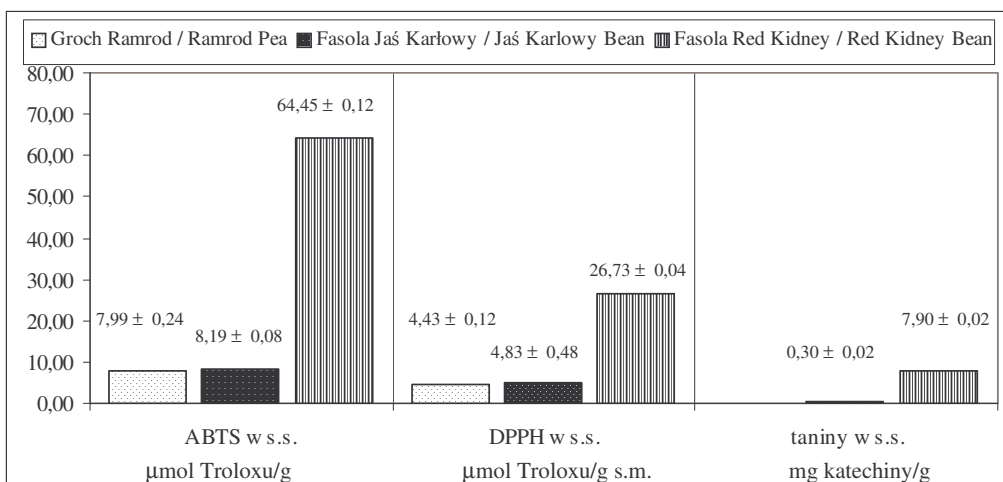


Rys. 2. Zawartość sumy polifenoli w nasionach roślin strączkowych [mg GAE/g s.m.].

Fig. 2. Content of polyphenols in total in the seeds of leguminous plants [mg GAE/g dry matter].

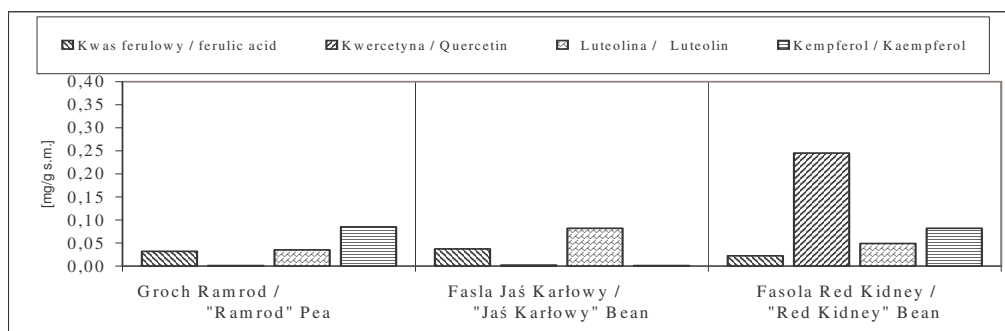
Fasola kolorowa ('Red Kidney') wykazała 8-krotnie wyższą aktywność przeciwutleniającą oznaczaną metodą ABTS i 6-krotnie wyższą aktywność oznaczaną metodą DPPH, w porównaniu z aktywnością ekstraktów z fasoli białej i grochu. Znaczącą ilość tanin oznaczono tylko w nasionach fasoli kolorowej.

W nasionach roślin strączkowych stwierdzono obecność kwasu ferulowego (detekcja przy 280 nm) oraz kwercetyny, luteoliny i kempferolu (detekcja przy 380 nm). Identyfikację potwierdzono przez porównanie czasu retencji oraz widma absorpcyjnego z substancjami wzorcowymi. Hydroliza kwaśna w zastosowanej metodyce spowodowała znaczące straty kwasu ferulowego (odzysk 20,2%), co koresponduje z wynikami przedstawionymi przez Luthria i Pastor-Corrales [9]. Odzyski kwercetyny, luteoliny i kempferolu były znacznie wyższe i wyniosły odpowiednio 99,5; 97,2 i 99,9%. Przedstawione na rys. 4. wartości dotyczą sumarycznej ilości poszczególnych flawonoidów (wolnych i uwolnionych z połączeń glikozydowych). W fasoli kolorowej ‘Red Kidney’ dominowała kwercetyna (245 $\mu\text{g/g}$ s.m.), w fasoli białej ‘Jaś Karłowy’ – luteolina (82 $\mu\text{g/g}$ s.m.), a w grochu ‘Ramrod’ – kempferol (85 $\mu\text{g/g}$ s.m.). Wyższa aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z nasion fasoli kolorowej (‘Red Kidney’) wynikała z większej zawartości tanin (rys. 3) oraz flawonoidów, szczególnie kwercetyny, co potwierdziły wyniki analiz chromatograficznych (rys. 4, 5).



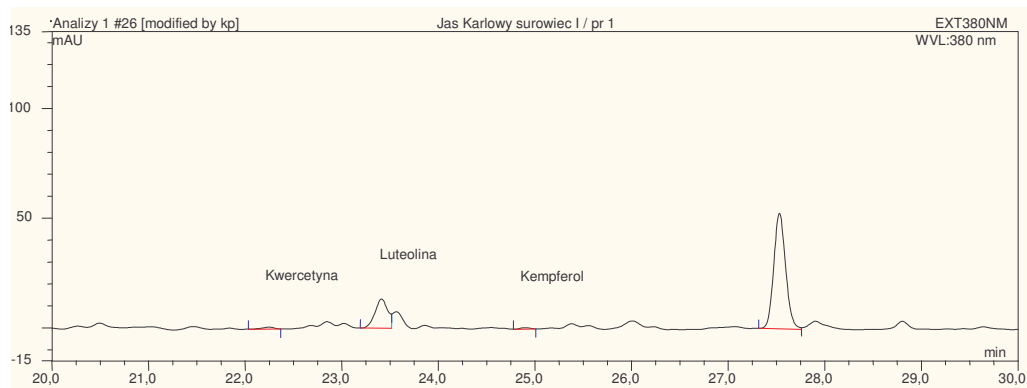
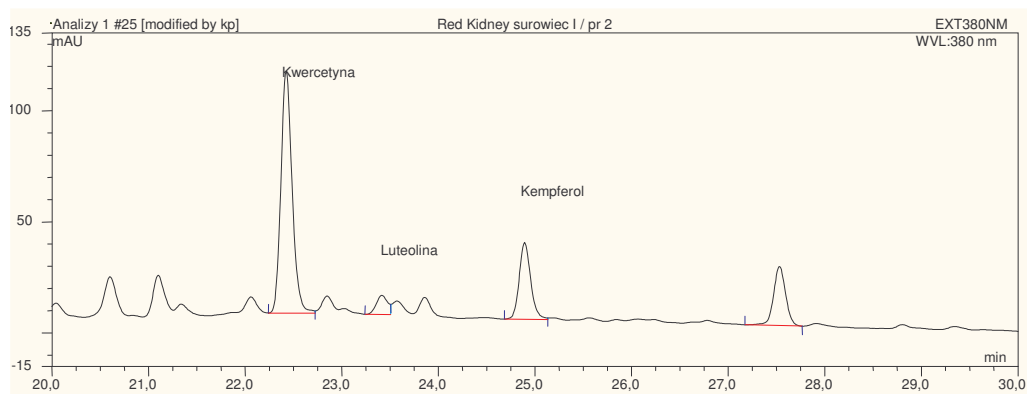
Rys. 3. Aktywność przeciwutleniająca i zawartość tanin w trzech wytypowanych odmianach nasion roślin strączkowych.

Fig. 3. Antioxidant activity and content of tannins in three selected varieties of the seeds of leguminous plants.



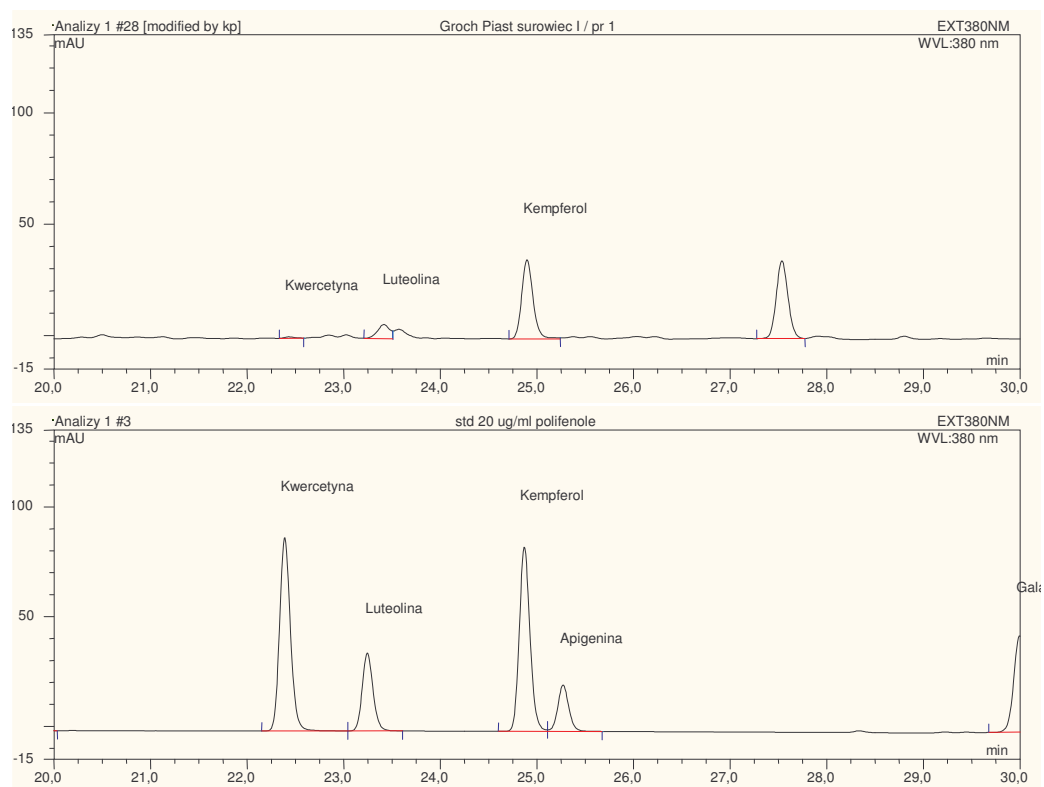
Rys. 4. Skład związków fenolowych w trzech wytypowanych odmianach nasion roślin strączkowych.

Fig. 4. Composition of phenolic compounds in three selected varieties of the seeds of leguminous plants.



Rys. 5 a. Chromatogramy ekstraktów fasoli 'Red Kidney' i fasoli 'Jaś Karłowy'.

Fig. 5 a. HPLC chromatograms of the extracts of the 'Red Kidney' beans and 'Jaś Karłowy' beans.



Rys. 5 b. Chromatogramy ekstraktów grochu 'Ramrod' i wzorców flawonoidów.

Fig. 5 b. HPLC chromatograms of the extracts of the 'Ramrod' peas, and of the standards of flavonoids.

Wnioski

1. Wśród badanych odmian nasion: fasoli białej, kolorowej i grochu, największą zawartość sumy polifenoli wykazała fasola kolorowa 'Red Kidney' (5,35 mg/g s.m.), fasola biała 'Jaś Karłowy' (1,08 mg/g s.m.) i groch 'Ramrod' (0,86 mg/g s.m.).
2. Fasola kolorowa 'Red Kidney' charakteryzowała się 8-krotnie wyższą aktywnością przeciwutleniającą oznaczaną metodą ABTS i 6-krotnie wyższą aktywnością oznaczaną metodą DPPH w porównaniu z aktywnością ekstraktów fasoli białej i grochu.
3. W fasoli kolorowej 'Red Kidney' dominowała kwercetyna (245 $\mu\text{g/g}$ s.m.), w fasoli białej 'Jaś Karłowy' – luteolina (82 $\mu\text{g/g}$ s.m.), a w grochu 'Ramrod' – kempferol (85 $\mu\text{g/g}$ s.m.).
4. Uzyskane wyniki wskazują na fasole kolorowe jako bogatsze źródło polifenoli niż fasole białe i grochy.

Praca naukowa finansowana ze środków Ministra Nauki w latach 2004-2006 jako projekt badawczy zamawiany PBZ-KBN-094/P06/2003

Literatura

- [1] Aruoma O.I.: Free radicals, oxidation stress and antioxidation (in human health and disease). *JAOCS*, 1998, **75**, (2), 199-212.
- [2] Broadhurst R.B., Jones W.J.: Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.*, 1978, **29**, 788 – 792.
- [3] Chu Y.H., Chang C.L., Hsu H.F.: Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 561 – 566.
- [4] Ewald C., Fjellkner-Modig S., Johansson K., Sjöholm I., Åkesson B.: Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry*, 1999, **64**, 231-235.
- [5] Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Venema D.P.: Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anti-carcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 1591 – 1598.
- [6] Hollman P.C.H., Hertog M.G.L., Katan M.B.: Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.*, 1996, **57** (1), 43 – 46.
- [7] Kahkonen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J-P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M.: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3954 – 3962.
- [8] Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A.: Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, **76**(3), 560-568.
- [9] Luthria D.L., Pastor-Corrales M.A.: Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J. Food Comp. Anal.*, 2006, **19**, 205–211.
- [10] Mennen, L. I., Sapinho, D., de Bree, A., Arnault, N., Bertrais, S., Galan, P., Hercberg, S.: Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreased cardiovascular risk in apparently healthy French women. *J. Nutr.*, 2004, **134** (4), 923-926.
- [11] Mikołajczak A., Drużyńska B.: Antyoksydacyjne właściwości polifenoli okryw nasiennych fasoli kolorowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1999, **3** (20) Supl., 112-117.
- [12] Nuutila A. M., Puupponen-Pimia R., Aarni M., Oksman-Caldentey K-M.: Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chem.*, 2003, **81**, 485-493.
- [13] Price K.R., Colquhoun I.J., Barnes K.A., Rhodes M.J.C.: Composition and content of flavonol glycosides in green beans and their fate during processing. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 4898-4903.
- [14] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology And Medicin*, 1999, **26**, 1231-1237.
- [15] Robbins R.J.: Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 2866 – 2887.
- [16] Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K.: Simultaneous determination of all poly-phenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 571-581.
- [17] Singleton V.L., Rossi J.A. Jr.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, **16**, 144-158.
- [18] Skibola, C. F., Smith, M. T.: Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **29** (3-4), 375-383.
- [19] Troszyńska A., Estrella I., M. Luisa López-Amóres L., Hernández T.: Antioxidant activity of pea (*Pisum sativum* L.) seed coat acetone extract. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 2002, **35**, 158-164.
- [20] Troszyńska A., Bednarska A., Łatosz A., Kozłowska H.: Polyphenolic compounds in the seed coat of legume seeds. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1997, **6** (47), 3, 37-45.

- [21] Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D.: Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 4113-4117.

THE OPTIMIZATION OF EXTRACTIVE SYSTEM AND THE ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT QUALITIES OF SEEDS OF SOME SELECTED LEGUMINOUS PLANTS

S u m m a r y

Seeds of leguminous plants can be a potential source of biologically active antioxidants – polyphenols. The objective of this paper was to optimize the extractive system, as well as to determine the antioxidant activity and the flavonoid composition in some selected seeds of leguminous plants. A mixture of acetone and water, their ratio being 7:3, was used for the extraction. In the extracts, the content of polyphenols in total (converted into gallic acid) was determined. The highest contents of polyphenols in total were noted in the ‘Red Kidney’ coloured beans (5.35 mg/g s.s.), white beans (1.08 mg/g s.s.), and ‘Ramrod’ peas (0.86 mg/g s.s.). The antioxidant activity of samples investigated was investigated using ABTS and DPPH methods. The results of the two methods evidenced that the coloured bean of the ‘Red Kidney’ cultivar had a higher antioxidant activity than the white bean and pea (in the case of ABTS – 8 times higher, and of DPPH - 6 times higher). A significant quantity of tannins was noted only in seeds of the coloured beans. The occurrence of ferulic acid, quercetin, luteolin, and kaempferol (determined using HPLC) were found in extracts of the selected varieties of seeds. The quercetin (245 mg/g s.s.) predominated in the ‘Red Kidney’ coloured beans, the luteolin (82 mg/g s.s.) - in the ‘Jaś Karłowy’ white beans, and the kaempferol (85 mg/g s.s.) - in the ‘Ramrod’ peas. It was proved that the coloured beans were a richer source of polyphenols than the white beans and peas.

Key words: antioxidants, flavonoids, antioxidants activity, HPLC, coloured beans, white beans, peas ☒