

EWA SOSIŃSKA, RAFAŁ WOŁOSIAK

AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA KOENZYMU Q₁₀, FITOSTEROLI ORAZ GLUTATIONU W REAKCJI AUTOOKSYDACJI EMULSJI TŁUSZCZU ROŚLINNEGO

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było określenie aktywności przeciwutleniającej koenzymu Q₁₀, fitosteroli oraz glutationu, której miarą było hamowanie tworzenia się wtórnych lotnych produktów utleniania, w następstwie oksydacji kwasów tłuszczowych zawartych w oleju słonecznikowym, zemułgowanym w środowisku typowym dla emulsji spożywczych. Substancje dodawano w jednakowym stężeniu (5 mg%), a utlenianie katalizowano dodatkiem jonów Fe(II) w temp. 37°C. Oznaczenie obecności głównego, wtórnego, lotnego produktu utleniania – heksanal – dokonano, stosując chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS), poprzedzonej mikroekstrakcją do fazy stałej związków lotnych z warstwy nadpowierzchniowej emulsji (HS-SPME). Izolację fitosteroli przeprowadzono z kondensatu, pozostałości przy odwanianiu olejów roślinnych, i scharakteryzowano skład otrzymanego preparatu fitosteroli za pomocą techniki GC-MS.

Stwierdzono aktywność prooksydacyjną glutationu (do -105%) oraz fitosteroli (do -41%) przez cały okres utleniania emulsji. Natomiast koenzym Q₁₀ do 3. dnia utleniania emulsji wykazywał efekt przeciwutleniający (do 18%), potem od 7. dnia efekt prooksydacyjny (do -41%). Aktywność przeciwutleniającą (do 33%) stwierdzono przy dodatku do emulsji koenzymu Q₁₀, fitosteroli oraz glutationu przez cały okres utleniania, stąd można sądzić o wystąpieniu synergizmu między badanymi substancjami. Tempo przyrostu ilości heksanal przez cały okres utleniania wszystkich emulsji było podobne, jedynie w emulsji z dodatkiem koenzymu Q₁₀ odnotowano szybsze jego powstawanie.

Słowa kluczowe: aktywność przeciwutleniająca, koenzym Q₁₀, fitosterole, glutation, heksanal

Wprowadzenie

Jednym z głównych procesów ograniczających trwałość przechowywanej żywności są reakcje utleniania tłuszczów, które można opóźnić m.in. poprzez dodatek substancji przeciwutleniających. Najbardziej pożądane, z punktu widzenia konsumenta, są przeciwutleniacze naturalne, pochodzenia roślinnego, wykazujące korzystne oddziaływanie na organizm człowieka. Żywność to często skomplikowany,

heterofazowy układ, stąd szczególnie korzystne może być zastosowanie przeciwutleniaczy różniących się polarnością czy oddziaływujących synergistycznie, co może wielokrotnie zwiększyć efektywność ich działania. Na podstawie wymienionych kryteriów wybrano trzy substancje: koenzym Q₁₀, fitosterole oraz glutation. Koenzym Q₁₀ (ubichinon) to powszechnie występujący w świecie zarówno zwierzęcym, jak i roślinnym lipofilowy przeciwutleniacz. Działa on synergistycznie z witaminą E przez regenerację rodnika tokoferoksylowego do tokoferolu [1]. Jako naturalny składnik diety występuje w znacznych ilościach w produktach pochodzenia zwierzęcego, a także w orzeszkach ziemnych i warzywach (brokuły, ziemniaki i kalafior) [2]. Fitosterole to grupa roślinnych steroidowych alkoholi o zbliżonej budowie do cholesterolu. Spośród fitosteroli, najbardziej rozpowszechnione są: β -sitosterol, stigmasterol czy brassicasterol. Doniesienia o właściwościach przeciwutleniających dotyczą głównie γ -oryzanolu oraz Δ^5 -avenasterolu [3, 4]. Dostarczane z pożywieniem fitosterole i ich uwodornione pochodne – fitostanole - są istotnym czynnikiem obniżającym stężenie frakcji LDL cholesterolu we krwi. Naturalnym źródłem fitosteroli są produkty takie jak oleje (np. ryżowy), zboża, owoce, warzywa i soja, ponadto zawarte są w produktach wzbogacanych, jak margaryna czy produkty piekarskie [5]. Glutation jest jedną z najważniejszych niskocząsteczkowych substancji przeciwutleniających m.in. utrzymuje inne niskocząsteczkowe przeciwutleniacze (witaminę C i E) w formie zredukowanej [6]. Jako główne jego źródła wymienić należy: mięso, orzechy włoskie, owoce (awokado) i warzywa (szparagi, szpinak) [7].

Celem niniejszej pracy było określenie aktywności przeciwutleniającej koenzymu Q₁₀, fitosteroli oraz glutationu, jako inhibicji utleniania kwasów tłuszczowych zawartych w oleju słonecznikowym, której miarą było tworzenie się wtórnego produktu – heksanal. Olej słonecznikowy emulgowany był w środowisku typowym dla produktów spożywczych.

Materiał i metody badań

Preparat fitosteroli

Przeprowadzono izolację fitosteroli, jako substancji niezmydlających, z kondensatu uzyskanego przy przemysłowym odwanianiu olejów roślinnych (m.in. rzepakowego) [8]. Próbę 50 g kondensatu zmydlano za pomocą 112,5 ml roztworu KOH w etanolu (13,6 M KOH/etanol 1:8, v/v) przez 2 h w temp. 70°C pod chłodnicą zwrotną. Po ostudzeniu próbkę przenoszono do rozdzielacza, dodawano 112,5 ml mieszaniny *n*-heksan:octan etylu (1:5, v/v) i mieszano. Warstwę wodną przemywano dwukrotnie mieszaniną *n*-heksan:octan etylu. Do zebranych warstw organicznych dodawano 50 ml 0,5 M roztworu KOH, ponownie dodawano *n*-heksan:octan etylu i mieszano. Po rozdzieleniu się faz, warstwę rozpuszczalnika organicznego odparowywano w 45°C w obrotowej wyparce Büchi przy obniżonym ciśnieniu. W celu

wyzolowania fitosteroli, z pozostałości po zmydłaniu, dodawano 50 ml mieszaniny *n*-heksan:aceton:metanol: woda (49,3:34:15,1:1,6, v/v), po czym preparat zagęszczano. Krystalizacja przebiegała pod strumieniem azotu na sączku, a otrzymane kryształy fitosteroli rozpuszczano w dichlorometanie.

Scharakteryzowano skład otrzymanego preparatu fitosteroli, stosując chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas przy użyciu aparatu GCMS-QP 2010 Shimadzu. Uprzednio fitosterole upochodniano do eterów trimetylosililowych za pomocą TMCS/BSFTA (Supleco 3-3148), ich ilość określano na podstawie standardu wewnętrznego – cholesterolu (Supleco 47127-U); związki identyfikowano na podstawie biblioteki widm masowych. Warunki analizy - parametry GC: kolumna kapilarna, niepolarna DB-5 MS (30 m x 0,50 μm x 0,25 μm); gaz nośny - hel, przepływ 1,3 ml/min; temperatura nastrzyku (splitless): 260°C; program temperaturowy: od 50°C zmiana temp. 10°C/min, od 230°C do 250°C zmiana temp. 4,5°C/min, utrzymanie temperatury końcowej przez 20 min. Parametry MS: temp. źródła jonów 250°C; zakres przemieszczania: 100-500 m/z; jonizacja elektronowa o energii 70 eV; napięcie detektora 0,8 kV.

Przygotowanie emulsji oleju słonecznikowego (pH 4,5)

Przygotowywano 100 ml emulsji, naważając 1 g emulgatora Tween 40. Roztwory koenzymu Q₁₀ oraz preparatu fitosteroli dodawano w dichlorometanie, rozpuszczalnik odparowywano. Następnie dodawano 10 g oleju słonecznikowego (dostępnego na rynku, skład kwasów tłuszczowych – oznaczony za pomocą techniki GC-FID - kwas linolowy C_{18:2} 63,6%, oleinowy C_{18:1} 23%, palmitynowy C₁₆ 9,3%, stearynowy C₁₈, 4,1%, [Matias - dane niepublikowane]) oraz 85 ml 0,1 M buforu octanowego i homogenizowano przez 1 min przy 20500 obr./min. Glutation dodawano w postaci wodnego roztworu. Jako katalizator utleniania stosowano roztwór chlorku żelaza(II) - stężenie katalizatora w emulsji: 0,4 mg%. Stężenie badanych substancji w emulsji wynosiło po 5 mg%, zawartość mieszaniny tokoferoli (α-tokoferol 67%, suma β- i γ-tokoferoli 33%, zawartość oznaczona za pomocą techniki GC-MS [Wołosiak – dane niepublikowane] naturalnie obecnej w oleju słonecznikowym to 2,3 mg%. Emulsje przygotowywano równolegle, w dwóch powtórzeniach, następnie badano obecność lotnych wtórnych produktów utleniania kwasów tłuszczowych po 1, 3, 7, 10 i 14 dniach termostatowania w temp. 37°C, bez dostępu światła, w zamkniętych butelkach o poj. 250 ml, grubość warstwy emulsji ok. 5 cm). Poszczególne parametry układu modelowego (ilość żelaza, substancji przeciwutleniających) ustalane były we wcześniejszych etapach badań m.in. przy określaniu aktywności przeciwutleniającej wobec nadtlenków kwasów tłuszczowych oleju słonecznikowego.

Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej

Analizę wykonywano metodą nadpowierzchniowej mikroekstrakcji do fazy stałej, stosując chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (HS-SPME-GC-MS) przy użyciu aparatu GCMS-QP 2010 Shimadzu. Oznaczenie polegało na adsorpcji

związków lotnych, znajdujących się nad próbką, na włóknie (przez 30 min, w temp. 37°C) i desorpcji (przez 2 min) na kolumnę chromatografu gazowego. Parametry analizy: włókno SPME, średniopolarne 50/30 µm, DVB/Karboksen/PDMS. Parametry GC: kolumna kapilarna, niepolarna DB -5 MS: 30 m x 0,50 µm x 0,25 µm; gaz nośny - hel, przepływ 1,0 ml/min; temp. nastrzyku (split): 200°C; program temperaturowy: 3 min w 40°C, wzrost temp. 5°C/min do 180°C, utrzymanie temp. końcowej przez 10 min. Parametry MS: temp. źródła jonów 175°C; zakres przemieszczania: 30-350 m/z; jonizacja elektronowa o energii 70 eV; napięcie detektora 0,8 kV.

Jako próbkę zerową traktowano analizę składu lotnych wtórnych produktów utlenienia emulsji jedynie z mieszaniną tokoferoli zawartych naturalnie w oleju słonecznikowym, oznaczoną natychmiast po przygotowaniu emulsji, jako próbki kontrolne - wyniki analizy składu atmosfery nad powierzchnią tego układu dyspersyjnego po całkowitym okresie utleniania. Obliczeń aktywności przeciwutleniającej, wyrażonej jako inhibicja powstawania głównego wtórnego produktu utleniania kwasów tłuszczowych – heksanal - po wybranych dniach termostatowania, dokonywano według wzoru [9]:

$$A = [(P_K - P_{W1}) / P_K] \cdot 100 [\%]$$

gdzie: A - aktywność przeciwutleniająca,

P_K – pole powierzchni pod pikiem [j.u] heksanal - po danym dniu utleniania w próbce kontrolnej (z uwzględnieniem próbki zerowej),

P_{W1} – pole powierzchni pod pikiem [j.u] heksanal - po danym dniu utleniania w próbce właściwej – z dodatkiem badanych substancji (z uwzględnieniem próbki zerowej).

Wyniki i dyskusja

Charakterystyka preparatu fitosteroli

Otrzymano następującą mieszaninę fitosteroli: β -sitosterol 43,8%; kampesterol 32,3%; brassicasterol 20,8% oraz stigmasterol 3,1%. Czystość preparatu wyniosła 97,9%; zanieczyszczenia: tymol i kwas palmitynowy.

Aktywność przeciwutleniająca

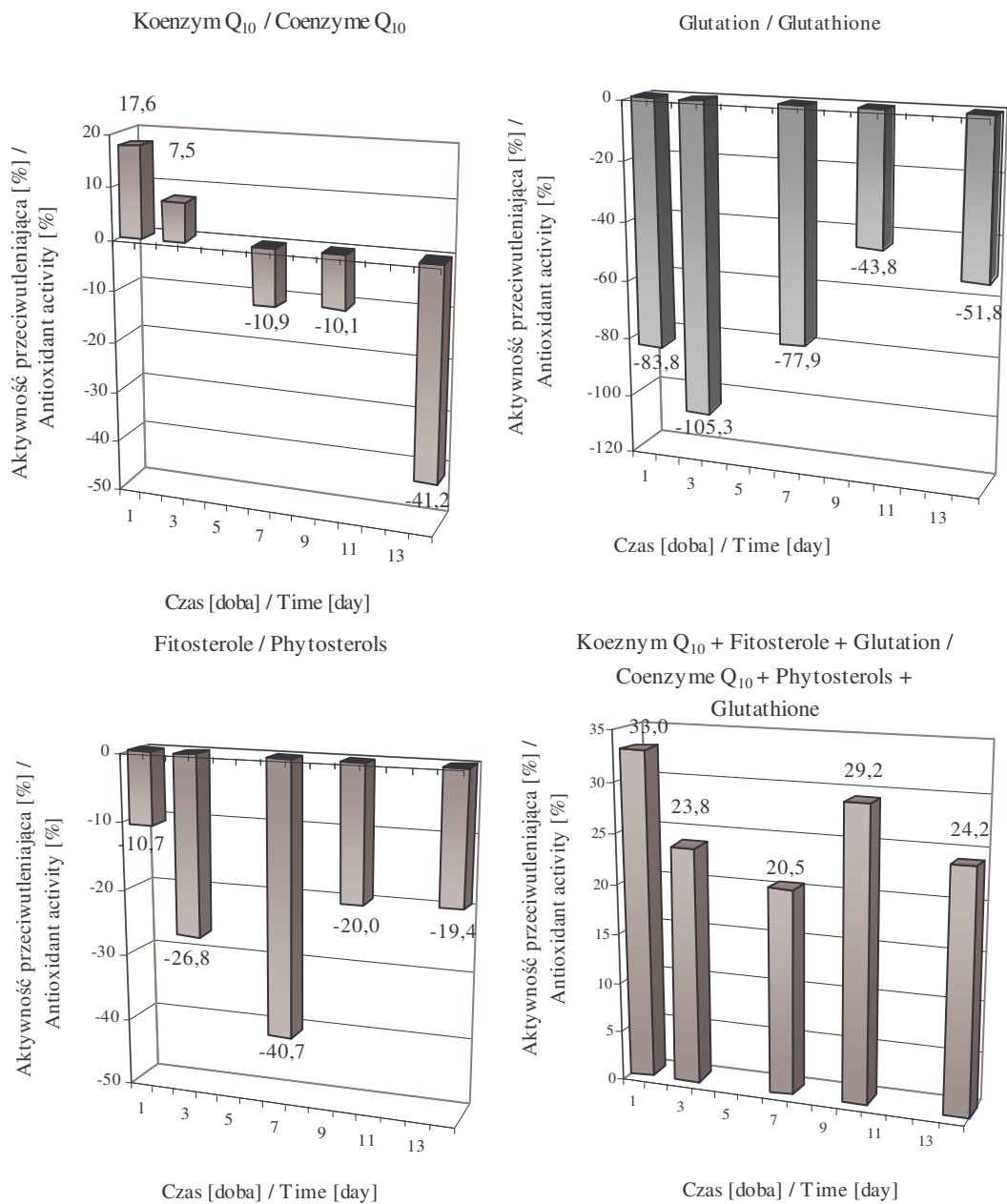
Heksanal jest uznawany za marker zmian oksydacyjnych tłuszczu, a ponieważ stwierdzono jego najwyższą zawartość spośród lotnych wtórnych produktów utleniania w badanych układach dyspersyjnych (jego ilość wyrażona była jako pole powierzchni po pikem w jednostkach umownych integratora) został wybrany jako wskaźnik właściwości przeciwutleniających badanych substancji w czasie utleniania emulsji - od 1 do 14 dni. Dodatek skutecznych przeciwutleniaczy do produktów zawierających tłuszcz zmniejsza ilość powstającego heksanal - [9]. Metoda mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) od kilkunastu lat stosowana jest do analizowania związków lotnych różnych produktów żywnościowych, przede wszystkim olejów i serów; a ostatnio

także emulsji spożywczych, ze względu na jej prostotę, szybkość wykonania oraz brak stosowania rozpuszczalników [9, 10, 11, 12].

Stwierdzono aktywność prooksydacyjną glutationu (do -105%) oraz fitosteroli (do -41%) przez cały okres utleniania emulsji (rys. 1). Natomiast koenzym Q₁₀ do 3. dnia utleniania emulsji wykazywał efekt przeciwutleniający (do 18%), a od 7. dnia efekt prooksydacyjny (do -41%), co mogło być wynikiem wyczerpania formy zredukowanej ubichinonu. W emulsji typu o/w polarne przeciwutleniacze (glutation) są mniej skuteczne niż niepolarne – ze względu na powinowactwo do „chronionego” substratu, natomiast z każdej z tych substancji w reakcji z rodnikiem powstaje ich mniej stabilna forma (semi-ubichinon czy rodnik disulfidu glutationu), która może inicjować powstanie kolejnych rodników – stąd działanie prooksydacyjne.

Aktywność przeciwutleniającą (do 33%) stwierdzono w mieszaninie: koenzymu Q₁₀, fitosteroli oraz glutationu przez cały okres utleniania emulsji. Pomimo właściwości prooksydacyjnych większości oddzielnie stosowanych substancji, po ich połączeniu uzyskano efekt przeciwutleniający, co może świadczyć o możliwej regeneracji, jaka wystąpiła między badanymi substancjami. W literaturze opisano wiele przykładów hamowania utleniania kwasów tłuszczowych wyrażonych zmniejszonym powstawaniem heksanal, m.in. Stashenko i wsp. [9] stwierdzili aktywność przeciwutleniającą witaminy E czy olejków eterycznych w emulsji oleju słonecznikowego.

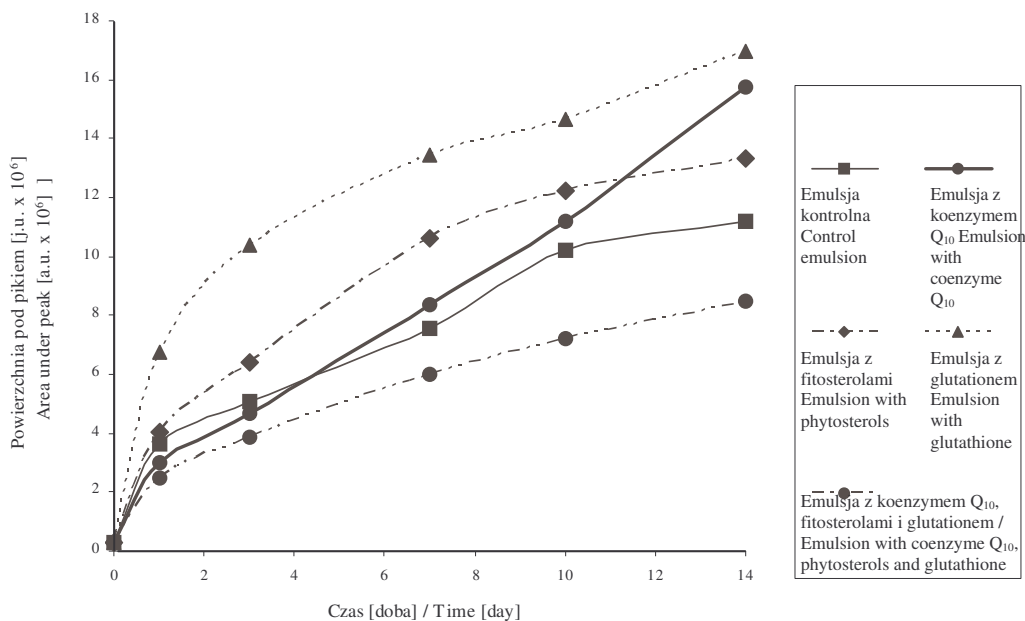
Aktywność przeciwutleniająca wyrażona jako inhibicja utleniania kwasów tłuszczowych, skutkująca pojawieniem się heksanal, to wypadkowa stopnia utlenienia emulsji kontrolnej (bez dodatku badanych substancji biologicznie aktywnych) i emulsji właściwej (zawierającej dodatek ww. substancji), w związku z tym przeanalizowaliśmy zmiany ilości heksanal (wyrażone jako pole powierzchni pod pikiem [j.u.]) we wszystkich emulsjach (rys. 2.). W początkowym okresie ilość heksanal była podobna w przypadku badanych emulsji, poza tą z dodatkiem glutationu, która charakteryzowała się największą zawartością tego aldehydu już od pierwszych dni termostatowania. Przyrost zawartości heksanal w emulsjach przez cały okres utleniania był podobny, ale wzajemne relacje między ilością tego aldehydu w emulsji właściwej i kontrolnej nie były jednakowe po danym okresie utleniania, stąd różnice w aktywności przeciwutleniającej (rys. 1.). Jedynie w emulsji z dodatkiem koenzymu Q₁₀ stwierdzono jego szybsze powstawanie, mimo że ilość tego aldehydu była mniejsza niż w emulsji kontrolnej do 3. dnia utleniania - co wskazywało



Rys. 1. Aktywność przeciwutleniająca badanych substancji i ich mieszaniny, wyrażona jako efektywność hamowania tworzenia się [-] heksanal, po 1, 3, 7, 10 i 14 dniach utleniania emulsji oleju słonecznikowego.

Fig. 1. Antioxidant activity of the tested substances and their mixtures represented as an effectiveness of inhibition of formation of hexanal, after 1, 3, 7, 10 and 14 days of oxidation of sunflower's oil emulsion.

na przeciwutleniające działanie koenzymu. Natomiast w emulsji, do której dodano wszystkie badane substancje: koenzym Q₁₀, fitosterole oraz glutation przez cały czas utleniania obserwowano najmniejszą ilość heksanal.



Rys. 2. Ilość wytworzonego heksanal po 1, 3, 7, 10 i 14 dniach utleniania emulsji oleju słonecznikowego z dodatkiem badanych substancji.

Fig. 2. Amount of produced hexanal after 1, 3, 7, 10 and 14 days of sunflower oil emulsion oxidation with addition of the tested substances.

Wnioski

1. Stosowane oddzielnie badane substancje wykazały efekt prooksydacyjny (z wyjątkiem koenzymu Q₁₀) wobec głównego wtórnego lotnego produktu reakcji utleniania - heksanal przez cały okres utleniania oleju słonecznikowego, w układzie modelowym zbliżonym do emulsji spożywczych (pH 4,5).
2. Efekt odwrócenia aktywności stwierdzono przy mieszaninie złożonej z koenzymu Q₁₀, fitosterolu i glutationu - oddzielnie wykazujących działanie prooksydacyjne w emulsji oleju słonecznikowego - skutkujący zmianą aktywności na przeciwutleniającą.

Literatura

- [1] Chaudière J., Ferrari-Iloiu R.: Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxic.*, 1999, **37**, 949-962.
- [2] Pirjo-Mattila P., Kumpulainen J.: Coenzymes Q₉ and Q₁₀: Contents in foods and dietary intake. *J. Food. Comp. Anal.*, 2001, **14**, 409-417.
- [3] Piironen K., Lindsay D.G., Miettinen T.A., Toivo J., Lampi A-M.): Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 939-966.

- [4] Moreau R.A., Whitaker B.D., Hicks K.B.: Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 2002, **41**, 457–500.
- [5] Winter J.: Sterols: the key to heart health. *Functional Foods & Nutraceuticals*, 2004, **11**, 40-44.
- [6] Jacob R.A.: The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.*, 1995, **15 (5)**, 755-766.
- [7] Czczot H.: Antyoksydacyjne działanie glutationu. *Farmacja Polska*, 2003, **59 Supl.**, 4-9.
- [8] Dias A.C.P., Fernandes P., Cabral J.M.S., Pinheiro H.M.: Isolation of a biodegradable sterol-rich fraction from industrial wastes. *Bioresource Technol.*, 2002, **82**, 253-260.
- [9] Stashenko E.E., Puertas M.A., Martinez J.R.: SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of in-vitro antioxidant activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **373**, 70-74.
- [10] Arthur C.L., Pawliszyn J.: Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 2145-2148.
- [11] Beltran G., Paz-Aguilera M., Gordon M.H.: Solid phase microextraction of volatile oxidation compounds in oil-in-water emulsions. *Food Chem.*, 2005, **92**, 401-406.
- [12] Guillén M.D., Cabo N., Ibargoitia M.L., Ruiz A.: Study of both sunflower oil and its headspace throughout the oxidation process. Occurrence in the headspace of toxic oxygenated aldehydes. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **54(4)**, 1093-1101.

ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF COENZYME Q₁₀, PHYTOSTEROLS AND GLUTATHIONE IN AUTOXIDATION REACTION OF PLANT FAT EMULSION

S u m m a r y

The aim of this study was the evaluation of antioxidative properties of coenzyme Q₁₀, phytosterols and glutathione, represented as inhibition of formation of secondary oxidation products as a result of oxidation of fatty acids - present in sunflower oil which is emulsified in typical food products conditions. The tested substances were added in concentration 5 mg%, the oxidation was catalyzed by Fe(II) ions addition at 37°C. Evaluation of the main oxidation secondary product (hexanal) occurrence was performed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) after headspace solid phase microextraction of volatile compounds (HS-SPME). Moreover, the isolation of phytosterols from plant oils deodorization distillate was carried and characterization of the phytosterols mixture was done using GC-MS.

The prooxidant activity of glutathione (up to -105%) and phytosterols (up to -41%) was observed, whereas coenzyme Q₁₀ up to third day of emulsion oxidation acted as antioxidant (up to 18%), but from 7th day acted as prooxidant (up to -41%). The antioxidant activity (up to 33%) of combination: coenzyme Q₁₀, phytosterols and glutathione was observed, therefore there can be assumed that synergetic effect occurred. The increase rate of hexanal quantity during oxidation period for all the emulsions was similar, only in emulsion with coenzyme Q₁₀ its faster formation was observed.

Key words: antioxidant activity, coenzyme Q₁₀, phytosterols, glutathione, hexanal ☒