

BARBARA BARANIAK, ANNA KRZEPIŁKO, MAŁGORZATA STRYJECKA

AKTYWNOŚĆ ANTYUTLENIAJĄCA ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH EKSTRAHOWANYCH RÓŻNYMI ROZPUSZCZALNIKAMI Z KALAFIORA

Streszczenie

Związki fenolowe ekstrahowano z handlowego, mrożonego kalafiora firmy Hortex. Zastosowano cztery układy rozpuszczalników: aceton-woda, etanol-woda, metanol-woda (4:1v/v) oraz metanol-woda (1:1 v/v), w czasie 15, 30, 45 i 60 min. Zawartość związków fenolowych zależna była od zastosowanego w procesie ekstrakcji układu rozpuszczalników i czasu jej trwania.

Wszystkie ekstrakty wykazały najwyższą aktywność antyutleniającą po dwudziestoczworgodzinnej inkubacji z kwasem linolowym. Nie znaleziono prostej zależności pomiędzy poziomem związków fenolowych w ekstraktach a ich aktywnością antyoksydacyjną.

Wstęp

Żywność pochodzenia roślinnego, obok podstawowych składników energetycznych, witamin i związków mineralnych, dostarcza organizmowi wielu metabolitów wtórnych. Wśród nich znajdują się związki fenolowe. W ostatnich latach uwaga badaczy zwrócona jest na specyficzne oddziaływania tych związków, a szczególnie oznaczanie ich właściwości antyutleniających [1, 3, 13, 16, 17, 22, 23]. Organizm człowieka narażony jest bowiem na działanie wolnych rodników pochodzących ze źródeł wewnętrznych (oddychanie komórkowe) i zewnętrznych – promieniowanie ultrafioletowe i jonizujące, zanieczyszczenia powietrza, niektóre leki czy niewłaściwie przetwarzane lub przechowywane produkty żywnościowe. Podstawowy enzymatyczny system obronny organizmu, do którego zaliczamy dysmutazę ponadtlenkową SOD (E.C.1.15.1.1), katalazę (E.C.1.11.1.6) i peroksydazy: glutationową (E.C.1.11.1.9) i askorbinianową (E.C.1.11.1.11), jest wspomagany działaniem przeciwutleniaczy nie-

enzymatycznych takich jak: tokoferole, karotenoidy, kwas askorbinowy, polifenole. Substancje te mogą podobnie jak enzymy spełniać rolę inhibitorów zapobiegawczych, głównie poprzez chelatowanie jonów metali przejściowych lub przerywać reakcję łańcuchową poprzez dezaktywację aktywnych wolnych rodników.

Celem niniejszej pracy było zbadanie efektywności czterech różnych układów rozpuszczalników w procesie ekstrakcji związków fenolowych z kalafiora i oznaczenie właściwości antyutleniających wyizolowanych związków.

Materiał i metody badań

Materiałem do badań był handlowy mrożony kalafior firmy „Hortex”. Po dokładnym rozdrobieniu surowca i uzyskaniu średniej próby sporządzano 3g naważki, z których ekstrahowano związki fenolowe czterema układami rozpuszczalników: aceton-woda, etanol-woda, metanol-woda (4:1v/v) oraz metanol-woda (1:1 v/v), w czasie 15, 30, 45 i 60 min. Proces przeprowadzano trzykrotnie w wytrząsarce, w temperaturze pokojowej, osad każdorazowo odwirowywano (10 min, 3000 obr./min). Uzyskane ekstrakty łączono i uzupełniano do objętości 100 ml. Poziom związków fenolowych oznaczano spektrofotometrycznie z odczynnikiem Folin-Ciocalteau [18], stosując jako wzorzec kwas chlorogenowy.

Właściwości antyutleniające oznaczano metodą Lingherta i wsp. [11] wobec kwasu linolowego, prowadząc inkubację przez 6, 12, 18, 24 i 30 godzin.

Aktywność antyutleniającą (AOA) obliczano z równania:

$$AOA = [\Delta A_{234(k)} - \Delta A_{234(p)}] / \Delta A_{234(k)}$$

gdzie:

$\Delta A_{234(k)}$ – wzrost absorpcji podczas inkubacji w próbce kontrolnej,

$\Delta A_{234(p)}$ – wzrost absorpcji próby badanej.

Wyniki i dyskusja

Zawartość związków fenolowych wahała się w granicach od 113 do 192 mg/100g świeżej masy i uzależniona była od czasu trwania procesu i zastosowanego do ekstrakcji układu rozpuszczalników (tab. 1). Najwięcej związków fenolowych uzyskano stosując etanol z wodą, po trzydziestu minutach trwania procesu. W przypadku stosowania acetonu z wodą już po piętnastu minutowej ekstrakcji wyizolowano maksymalną ilość związków fenolowych, natomiast w przypadku stosowania układów zawierających metanol, poziom związków fenolowych w otrzymanych ekstraktach wzrastał, wraz z wydłużaniem czasu trwania procesu. Liczne dane literaturowe potwierdzają fakt, że poziom związków fenolowych uzależniony jest od gatunku rośliny, fazy jej rozwoju i metody hodowli [1, 4, 8, 26]. Mało jest natomiast danych o skuteczności stosowania zmiennych układów ekstrakcyjnych – w większości badań do izolowania

związków fenolowych stosowany jest układ metanol-woda 1:1, natomiast do wyodrębniania związków o właściwościach przeciwutleniających aceton-woda 4:1. Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy stwierdzono, że najlepszym układem do izolowania związków fenolowych z kalafiora był etanol z wodą 4:1.

Tabela 1

Zawartość związków fenolowych (mg/100g świeżej masy) wyekstrahowanych z kalafiora różnymi układami rozpuszczalników.

The content of phenol compounds (mg/100g fresh matter) extracted from cauliflower by different solvent systems.

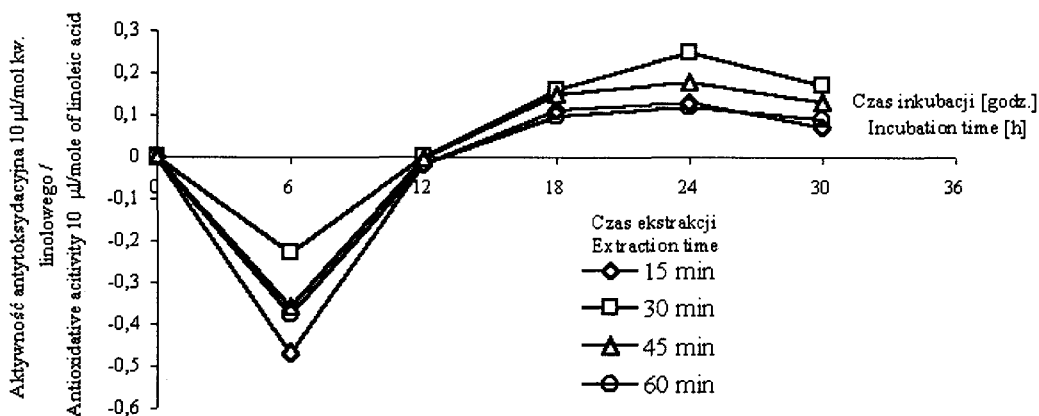
Układ rozpuszczalników Solvent system	Zawartość związków fenolowych / Phenol compounds content Czas ekstrakcji / Extraction time			
	15 min	30 min	45 min	60 min
Aceton-woda 4:1 Acetone-water 4:1	125	117	115	113
Etanol-woda 4:1 Ethanol-water 4:1	180	192	187	167
Metanol- woda 4:1 Methanol-water 4:1	144	164	178	178
Metanol-woda 1:1 Methanol-water 1:1	127	152	158	181

Natomiast Amarowicz i wsp. [2], analizując skuteczność różnych ekstrahentów w procesie izolowania związków fenolowych z nasion soczewicy, otrzymali ponad dwukrotnie wyższą ich zawartość w ekstraktach po zastosowaniu układu aceton-woda (8:2 v/v) niż w ekstraktach po użyciu w tym samym stosunku objętościowym mieszanin metanol-woda i etanol-woda. Cytowane dane i wyniki tej pracy dowodzą, jak ważnym czynnikiem z analitycznego punktu widzenia jest dobór odpowiednich układów rozpuszczalników do prowadzenia ekstrakcji. Istotne znaczenie ma również czas jej trwania – w przypadku najefektywniej działających układów (roztwory acetonu i etanolu), czas potrzebny do wyizolowania maksymalnej ilości związków fenolowych był o połowę krótszy, niż po zastosowaniu roztworów metanolu. Spadek zawartości fenoli wraz z wydłużaniem czasu ekstrakcji mógł być spowodowany ich częściową koprecypitacją.

Związki fenolowe występujące w żywności pochodzenia roślinnego przez wiele lat uważane były za substancje przeciwżywniowe, z uwagi na ich łatwość utleniania do chinonów, które z kolei polimeryzują do związków wielkocząsteczkowych, a w obecności amin ulegają przemianom do melanin. Niekorzystna jest również możliwość tworzenia kompleksowych połączeń fenoli z białkami, gdyż przez tę zdolność polifenole mogą inaktywować działanie enzymów [15]. Te same cechy polifenoli, które są podstawą ich ujemnych oddziaływań, a szczególnie włączanie się do reakcji redoks i

reagowanie z rodnikami, stanowią podstawę do stosowania związków fenolowych jako przeciwutleniaczy.

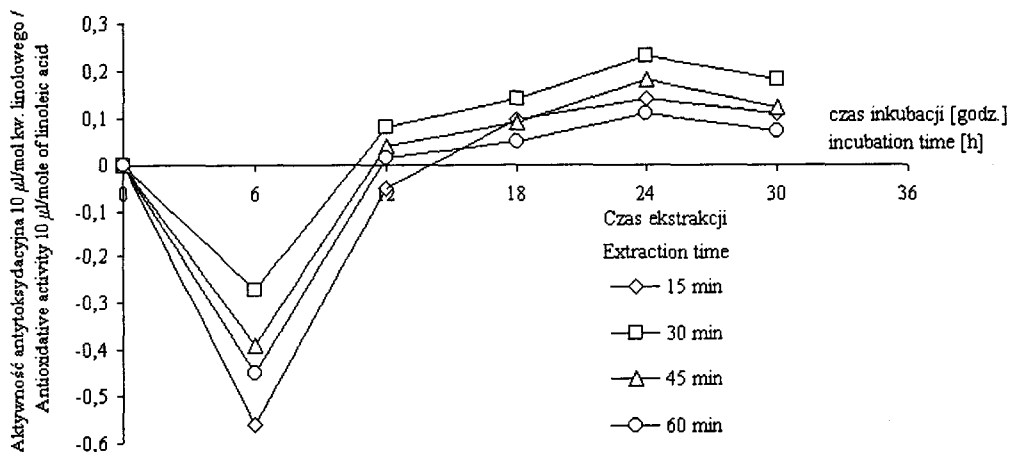
Otrzymane wielkości aktywności antyutleniającej uzależnione były od czasu inkubacji z kwasem linolowym. Po kilkugodzinnym procesie, niezależnie od układu ekstrahującego, nie otrzymano żadnych efektów antyutleniających. Właściwości takie uzyskano dopiero po dwudziestoczerogodzinnej inkubacji z kwasem linolowym (rys. 1-4). Mało jest w literaturze danych o poziomie związków aktywnych biologicznie w kalafiorze. Zarówno wyniki uzyskane w tej pracy, jak i wcześniejsze badania [5], dotyczące analizowania aktywności inhibitorów enzymów proteolitycznych izolowanych z wybranych warzyw, wskazują na obecność w kalafiorze związków o specyficznym oddziaływaniu. W cytowanej pracy, ekstrakty inhibitorów proteaz wyizolowane z kalafiora hamowały działanie trypsyny i pepsyny, natomiast w przypadku pankreatyny wykazały odwrotną zależność – zamiast inaktywować ten enzym powodowały wzrost jego aktywności. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy (działanie prooksydacyjne po krótszych czasach inkubacji) również wskazały na potrzebę izolowania z kalafiora i określania właściwości związków odpowiedzialnych za te specyficzne oddziaływania.



Rys.1. Wpływ czasu inkubacji na właściwości antyutleniające związków fenolowych kalafiora wyekstrahowanych układem rozpuszczalników aceton-woda 4 : 1

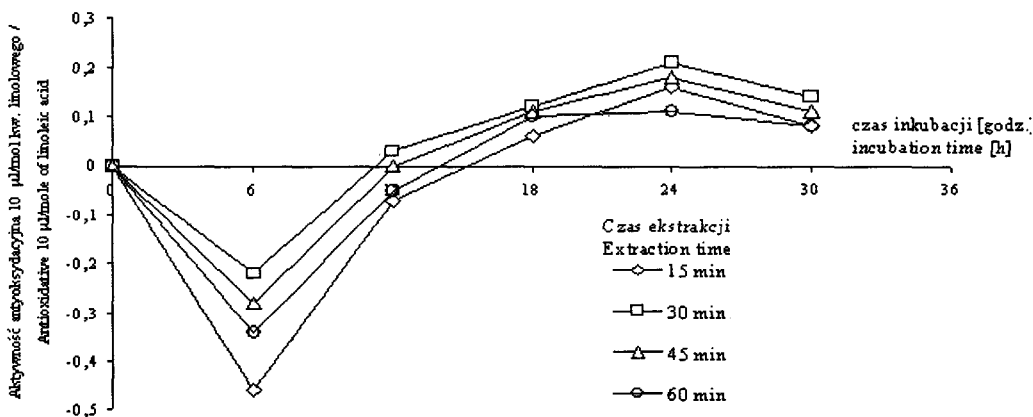
Fig.1. The effect of incubation time on antioxidative activity (AOA) of cauliflower phenol compounds extracted acetone –water solvent system 4:1.

Otrzymane wartości liczbowe efektów antyutleniających trudno jest porównywać z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, gdyż w badaniach stosowane są różnorodne surowce i różne metody analityczne. Aktywność antyutleniająca oznaczana jest w oparciu o hamowanie reakcji samoutlenienia kwasu linolowego w układzie alkohol-woda [21, 25], utlenianie kwasu linolowego nadtlakiem wodoru i badanie wpływu otrzymanych produktów na szybkość degradacji β -karotenu [1, 3, 22, 24], hamowanie



Rys. 2. Wpływ czasu inkubacji na właściwości antyutleniające związków fenolowych kalafiora wyekstrahowanych układem rozpuszczalników etanol-woda 4 : 1.

Fig. 2. The effect of incubation time on antioxidative activity (AOA) of cauliflower phenol compounds extracted ethanol-water solvent system 4:1.

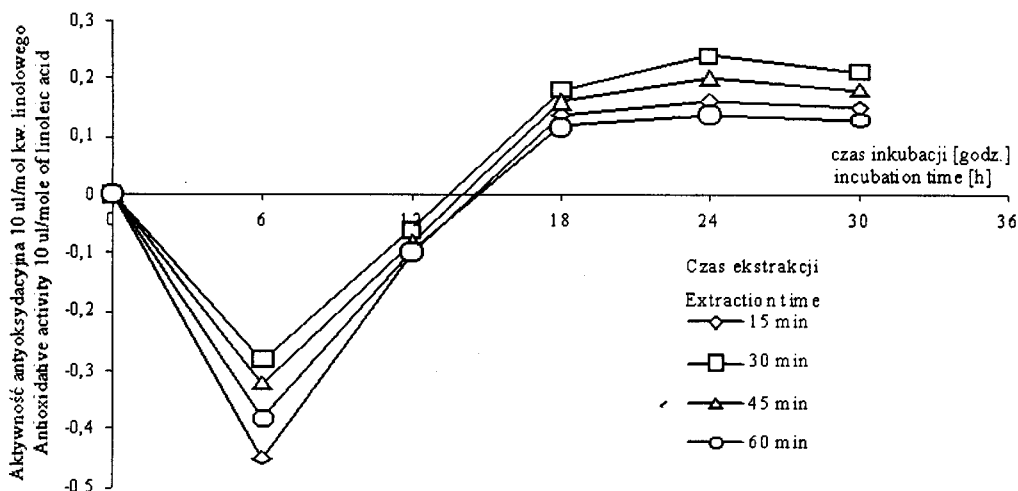


Rys. 3. Wpływ czasu inkubacji na właściwości antyutleniające związków fenolowych kalafiora wyekstrahowanych układem rozpuszczalników metanol-woda 4 : 1.

Fig. 3. The effect of incubation time on antioxidative activity (AOA) of cauliflower phenol compounds extracted methanol-water solvent system 4:1.

fotoutleniania kwasu linolowego w obecności sensybilizatorów [6, 10], utlenianie estrów kwasu linolowego przez wolne rodniki wytwarzane w wyniku rozpadu 2,2'-azobis (2,4-dimetylowaleronitrylu) [6, 13, 20]. Stosowana jest także metoda utleniania fosfatydylocholiny przez jony żelaza i kwas askorbinowy [14]. Określane jest również

hamowanie procesu utleniania lipoprotein jonami miedzi czy żelaza i kwasem askorbinowym [7, 23]. Często badana jest zdolność „zmiatania” wolnych rodników, generowanych z kwasu 2,2'-azobis-(3-etylobenzotiazolo-6sulfonowego) [19, 27] lub z 1,1 difenylo-1-pikrylohydrazylu [6, 12, 24, 28]. Właściwości antyoksydacyjne są oznaczane również poprzez pomiar efektywności inhibitowania aktywowanej chemiluminescencji wolnych rodników [6, 16, 17].



Rys. 4. Wpływ czasu inkubacji na właściwości antyutleniające związków fenolowych kalafiora wyekstrahowanych układem rozpuszczalników metanol-woda 1 : 1

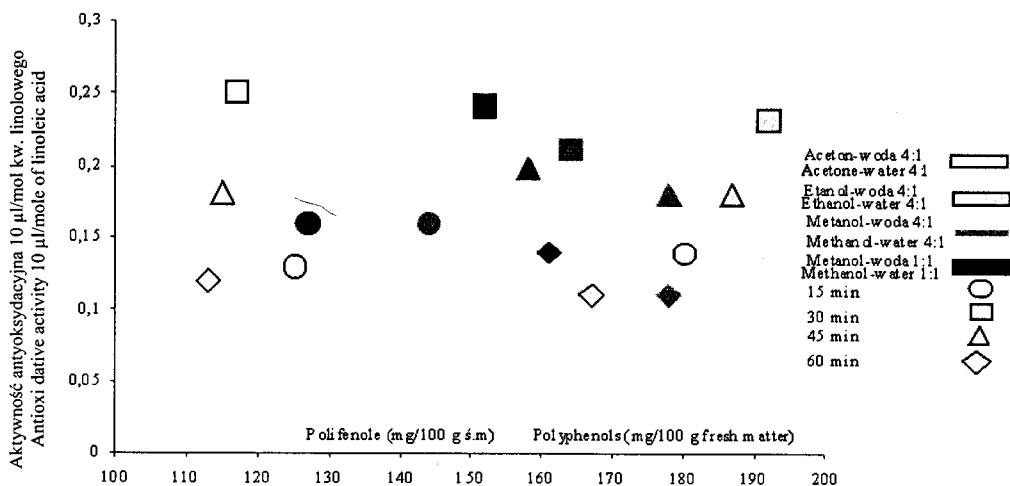
Fig. 4. The effect of incubation time on antioxidative activity (AOA) of cauliflower phenol compounds extracted methanol -water system 1:1

Ta różnorodność metod oznaczania właściwości antyutleniających wynika z różnych mechanizmów działania czynników utleniających, do których zaliczamy wolne rodniki (hydroksylowy, anion nadtlenkowy, tlenek azotu, rodniki lipidowe), tlen singletowy, nadtlenek wodoru czy kwas podchlorawy. Najaktywniejsze w działaniu są formy wolnorodnikowe, niemniej jednak i inne połączenia tlenu łatwo ulegają reakcjom, w wyniku których powstają bardzo aktywne rodniki. Również aktywność antyutleniaczy warunkowana jest ich strukturą i interakcjami z innymi składnikami. Dowodzą tego porównania efektów antyutleniających oznaczonych tą samą metodą w ekstraktach uzyskanych z tego samego surowca, ale innym układem rozpuszczalników otrzymane w niniejszej pracy, jak również rezultaty otrzymane przez innych badaczy [10, 19].

Powszechnie uważa się, że za właściwości antyutleniające ekstraktów izolowanych z surowców roślinnych rozpuszczalnikami organicznymi odpowiedzialne są w głównej mierze związki fenolowe. Thushida i wsp. [22], analizując ekstrakty z czter-

dziestu trzech gatunków warzyw, stwierdzili wyższą aktywność antyutleniającą warzyw o większej zawartości związków fenolowych. Podobne rezultaty otrzymali Luga si i wsp. [12] oraz Drużyńska [9].

W niniejszej pracy nie znaleziono takich zależności (rys. 5). Tylko po zastosowaniu acetonu z wodą ekstrakt najzasobniejszy w związki fenolowe wykazał największą aktywność antyutleniającą po dwudziestoczerogodzinnej inkubacji z kwasem linolowym. Podobnie Amarowicz i wsp. [3], porównując aktywność antyoksydacyjną acetonowych ekstraktów z nasion różnych roślin strączkowych, również nie znaleźli jej prostej zależności od poziomu związków fenolowych.



Rys. 5. Zależność pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną ekstraktów a zawartością związków fenolowych wyekstrahowanych w zróżnicowanych warunkach z kalafiora (czas inkubacji 24 godz.).

Fig. 5. The relationship between antioxidative activity of extracts and the content of polyphenols extracted various conditions from cauliflower (incubation time 24 h).

Wnioski

1. Ilość wyekstrahowanych związków fenolowych była zależna od zastosowanego układu rozpuszczalników i czasu trwania ekstrakcji.
2. Ekstrakt otrzymany mieszaniną metanol-woda (1:1 v/v) charakteryzował najniższy poziom związków fenolowych.
3. Największą aktywność antyutleniającą wykazały ekstrakty otrzymane po trzydziestominutowej ekstrakcji i dwudziestoczerogodzinnej inkubacji z kwasem linolowym w odniesieniu do wszystkich testowanych układów rozpuszczalników.

4. Aktywność antyutleniająca ekstraktów z kalafiora nie była uzależniona od poziomu związków fenolowych i pozostałych substratów reakcji z odczynnikiem Folin-Ciocalteu.

Literatura

- [1] Al-Saikhan M.S., Howard L.R., Miller J.C.jr.: Antioxidant activity and total phenolic compounds in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Food Sci.*, **2** (60), 1995, 34.
- [2] Amarowicz R., Piskula M., Honke J., Rudnicka B., Troszyńska A., Kozłowska H.: Extraction of phenolic compounds from lentil seeds (*Lens culinaris*) with various solvents. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **4/45** (3), 1995, 53.
- [3] Amarowicz R., Troszyńska A., Karmać M., Kozłowska H.: Antioxidative properties of legume seed extracts. In: *Agri-Food Quality*, ed. G.R. Fenwick, C.Hedley, R.L. Richards, S. Khokhar, The Royal Society of Chemistry, 1996, s. 376.
- [4] Baraniak B., Bubicz M., Niezabitowska M.: Ocena jakości ziarna różnych odmian jęczmienia jarego uprawianego w zmiennych warunkach. *Bromat. Chem. Toksykol.*, **2** (31), 1998, 147.
- [5] Baraniak B., Bubicz M., Niezabitowska M.: Proteinase inhibitors in string bean, green pea and cauliflower. In: *Bioactive substance in food of plant origin*. ed.. H. Kozłowska, J. Fornal and Z. Zduńczyk. Centre for Agrotechnology and Veterinary Sciences, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland, **1**, 1994, 244.
- [6] Chen H.M, Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K., Nokihara K.: Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, **1** (46), 1998, 49.
- [7] Dekker M., Verkerk R., van der Sluis A.A., Khokhar S., Jongen W.M.F.: Analysing the antioxidant activity of food products: Processing and matrix effects. *Toxicology in Vitro*, **13**, 1999, 797.
- [8] Dimberg L.H., Molteberg E.L., Solheim R., Frølich W.: Variation in oat groats due to variety, storage and heat treatment. I. Phenolic compounds. *J. Cereal Sci.*, **24**, 1996, 263.
- [9] Drużyńska B.: The use of fluorometric method to study the antioxidative properties of legume seeds. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **9/50** (2), 2000, 47.
- [10] Jung M.Y., Kim J.P., Kim S.Y.: Methanolic extract of *Coptis japonica* Makino reduces photosensitized oxidation of oils. *Food Chem.*, **67**, 1999, 261.
- [11] Lingnert H., Vallentin K.V., Eriksson C.E.: Measurement of antioxidative effect in model system. *J. Food Proc. Preserv.*, **3**, 1979, 87.
- [12] Lugasi A., Dworschak E., Hovari J.: Antioxidant property of polyphenolic compounds of culinary herbs and medicinal plants. In: *Agri-Food Quality*, ed. G.R. Fenwick, C. Hedley, R.L. 1996, s. 372.
- [13] Maoka T., Ito Y., Sakushima A., Ohno K., Coskun M., Nishibe S.: Comparison of antioxidative activity of phenolic compounds in *Boreava orientalis* and their related compound. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **11** (46), 1997, 1399.
- [14] Murase H., Nagao A., Terao J.: Antioxidant and emulsifying activity of N-(Long-chain-acyl) histidine nad N-(Long-chain-acyl) carnosine. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1993, 1601.
- [15] Quesada C., Bartolomé B., Nieto O., Gómez-Cordovés C., Hernández T., Estrella I.: Phenolic inhibitors of α -amylase and trypsin enzymes by extracts from pears, lentils, and cocoa. *J. Food Protec.*, **2** (59), 1995, 185.
- [16] Raab B., Hempel J., Bohm H.: Antioxidative and antigenotoxic properties of flavonoids prevailing in vegetable. In: *Agri-Food Quality*, ed. G.R. Fenwick, C. Hedley, R.L. Richards, S. Khokhar, The Royal Society of Chemistry, 1996, s. 368.

- [17] Sawa T., Nakao M., Akaike T., Ono K., Maeda H.: Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **2** (47), 1999, 397.
- [18] Swain T., Hillis W.E.: The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.: The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 1959, 63.
- [19] Sz wajgier D., Targoński Z.: Comparison of *in vitro* antioxidant activities of malt, hops, worts and lager type beer. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **9/50** (4), 2000, 53.
- [20] Terao J., Karasawa H., Arai H., Nagao A., Suzuki T., Takama K.: Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acids and its related phenolic compounds in solution. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **7** (57), 1993, 1204-1205.
- [21] Tsuda T., Watanabe M., Oshima K., Norinobu S., Choi S.W., Kawakishi S., Osawa T.: Antioxidative activity of the anthocyanin pigment cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1994, 2407-2410.
- [22] Tsushida T., Suzuki M., Kurogi M.: Evaluation of antioxidant activity of vegetable extracts and determination of some active compounds. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **9** (41), 1994, 611-618.
- [23] Vinson J.A., Jang J., Dabbagh Y.A., Serry M.M., Cai S.: Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995a, 2798-2799.
- [24] Von Gadow A., Joubert E., Hansmann C.F.: Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, **3** (45), 1997, 632-638.
- [25] Wang C.K., Wu M.J.: The separation of phenolic from *Piper betle* leaf and the effect on the mutagenicity of arecoline. *J. Chinese Agric. Chem. Soc.*, **5** (34), 1996, 638-647.
- [26] Wilska-Jeszka J., Stasiak A.: Polyphenol compounds in grain legumes. In: Bioactive substance in food of plant origin. ed. H. Kozłowska, J. Fornal and Z. Zduńczyk. Centre for Agrotechnology and Veterinary Sciences, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland, **1**, 1994, 126-130.
- [27] Wołosiak R., Worobiej E.: Aktywność antyoksydacyjna izolatu i hydrolizatów białek grochu. *Żywność. Nauka, Technol., Jakość*, **3** (20) Supl., 1999, 105-111.
- [28] Xiong Q., Kadota S., Tani T., Namba T.: Antioxidative effects of phenylthianthridinoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.*, **12** (19), 1996, 1580-1585.

ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF PHENOL COMPOUNDS EXTRACTED BY DIFFERENT SOLVENT SYSTEMS FROM CAULIFLOWER

S u m m a r y

Phenol compounds were extracted from commercial frozen cauliflower (Hortex company) using acetone-water, ethanol-water, methanol-water (4:1 v/v) and methanol-water (1:1 v/v) solvent system. The amount of phenol compounds was depended on the solvent system used in extraction process and on the extraction time.

The antioxidant activity of all extracts was the highest after 24-hour incubation with linoleic acid. The results do not confirm the correlation between the phenol content in obtained extracts and their antioxidant activity. ❀