

URSZULA GAWLIK-DZIKI, DARIUSZ KOWALCZYK

WPLYW WARUNKÓW EKSTRAKCJI NA AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCĄ EKSTRAKTÓW Z KIEŁKÓW RZODKIEWKI

Streszczenie

Z kielków rzodkiewki odmiany Lucynka wyekstrahowano związki fenolowe, stosując 50% aceton i 50% metanol. Nie stwierdzono wpływu rozpuszczalnika zastosowanego do ekstrakcji na zawartość związków fenolowych ogółem. Skuteczniejszym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji flawonoidów okazał się 50% metanol, natomiast stosując 50% aceton wyekstrahowano więcej fenolokwasów. Ekstrakty w kielków rzodkiewki wykazywały znaczącą aktywność przeciwrodnikową (54,33% w przypadku ekstraktu acetonowego i 56,08% w przypadku ekstraktu metanolowego), jednak była ona znacznie niższa od aktywności syntetycznych przeciwutleniaczy. Badane próby skutecznie neutralizowały H₂O₂, przy czym wyższą aktywnością (59,48%) charakteryzował się ekstrakt metanolowy niż acetonowy (53,84%). Ekstrakt acetonowy wykazywał wyższą zdolność do chelatowania jonów Fe(II) niż ekstrakt metanolowy (odpowiednio 45,33 i 32,24%). W obu przypadkach aktywność badanych prób była zdecydowanie wyższa niż aktywność przeciwutleniaczy syntetycznych.

Słowa kluczowe: kielki rzodkiewki, związki fenolowe, aktywność przeciwutleniająca

Wprowadzenie

Związek między dietą a zdrowiem człowieka dostrzegany jest od bardzo dawna, jednak świadome wykorzystywanie składników żywności w prewencji i leczeniu schorzeń datuje się dopiero od I połowy XX wieku, to jest od czasu odkrycia witamin i niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu składników mineralnych. W odpowiedzi na nowe potrzeby żywieniowe konsumentów powstają grupy produktów spożywczych o najwyższej jakości żywieniowej, świeżych, naturalnych, nisko przetworzonych, wygodnych, ekologicznych i wolnych od dodatków chemicznych. Wszystkie te kryteria spełniają kielki. Szczególnie popularne wśród konsumentów są kielki fasoli mung, brukułu, rzodkiewki, rzeżuchy, soczewicy. Badania marketingowe

wykazały, że konsumenci preferują na ogół kiełki rzodkiewki – aż 76% badanych spożywało ten rodzaj kiełków. Kiełki rzodkiewki dzięki dużej zawartości witaminy C podnoszą odporność organizmu, wpływają korzystnie na stan skóry, pobudzają apetyt, działają przeciwgrzybicznie [10].

Żywność pochodzenia roślinnego stanowi bogate źródło naturalnych związków biologicznie aktywnych, których właściwości profilaktyczne i chemioprewencyjne są związane z aktywnością przeciwutleniającą. Jest ona obecnie najważniejszą cechą fenoli występujących w żywności. Związki fenolowe stanowią główną grupę roślinnych substancji odgrywających istotną rolę w wiązaniu wolnych rodników. Cennym ich źródłem są warzywa kapustne z rodziny krzyżowych. Liczne dane literaturowe potwierdzają fakt, że poziom związków fenolowych uzależniony jest od gatunku rośliny, fazy jej rozwoju i metody hodowli.

W literaturze przedmiotu nieliczne są informacje o skuteczności stosowania zmiennych układów rozpuszczalników do ekstrakcji polifenoli. Covan [3] podaje, że etanol jest najczęściej stosowanym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji tanin i flawonoli, natomiast użycie metanolu pozwala na wyizolowanie antocyjanin, tanin, flawonów i innych związków polifenolowych, aceton zaś stosowany jest do ekstrakcji flawonoli.

Celem pracy było porównanie skuteczności dwóch różnych układów ekstrakcyjnych do izolowania związków fenolowych z kiełków rzodkiewki oraz określenie ich zdolności przeciwutleniającej i zdolności do chelatowania metali.

Material i metody badań

Materiałem do badań były kiełki rzodkiewki (*Raphanus sativus* L.) odmiany Lucynka wyhodowane z nasion dostępnych w obrocie handlowym. Sześciodniowe kiełki uzyskano kiełkując nasiona w temperaturze pokojowej ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

Do ekstrakcji związków o charakterze przeciwutleniającym zastosowano roztwory wodne: 50% metanol oraz 50% aceton. W ekstraktach oznaczano zawartość związków fenolowych ogółem [14], zawartość flawonoidów [1] oraz fenolokwasów [4]. Określano zdolność do neutralizacji wolnych rodników DPPH [2], usuwania H_2O_2 [8] oraz zdolność do chelatowania jonów Fe(II) [6]. Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Porównując skład ekstraktów z kiełków rzodkiewki stwierdzono, że ekstrakt acetonowy zawierał więcej fenolokwasów, a ekstrakt metanolowy flawonoidów przy zbliżonej zawartości związków fenolowych ogółem (tab. 1).

T a b e l a 1

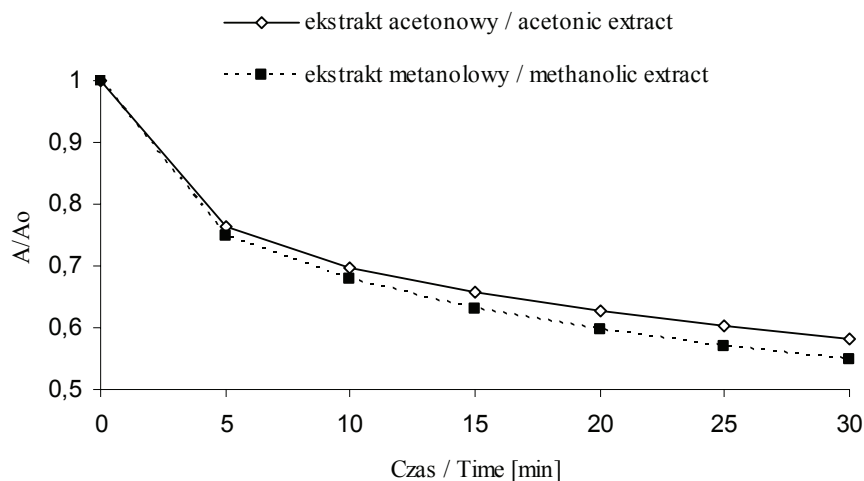
Zawartość związków fenolowych ogółem, flawonoidów i fenolokwasów w ekstraktach z kiełków rzodkiewki.

Total phenolics, flavonoids and phenolic acids content in the extracts from radish sprouts.

Próba Sample	Zawartość związków fenolowych ogółem Total phenolics content [mg/ml]	Zawartość flawonoidów Flavonoids content [μg/ml]	Zawartość fenolokwasów Phenolic acids content [μg/ml]
Ekstrakt acetonowy Acetonic extract	0,13	37,93	20,65
Ekstrakt metanolowy Methanolic extract	0,14	40,76	18,16

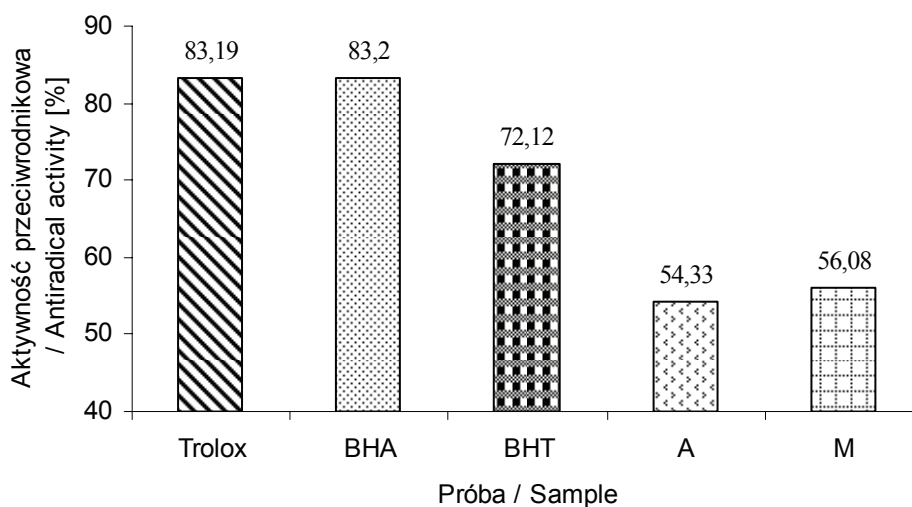
Utlenianie związków organicznych przebiega głównie z udziałem rodników alkiłowych R° i nadtlenkowych RO_2° . Można je opóźnić poprzez przerwanie reakcji łańcuchowych, stosując akceptor wolnych rodników. Jeżeli głównym inicjatorem reakcji jest utworzony wodoronadtlenek $ROOH$, to proces utleniania można opóźnić przez wprowadzenie związków chemicznych zdolnych do rozkładu wodoronadtlenku bez tworzenia rodników. Wielofunkcyjne inhibitory reakcji utleniania mogą wykazywać wielokierunkowe działanie, uczestnicząc jednocześnie w różnych reakcjach hamowania. Podobnie może działać mieszanina inhibitorów [15]. Neutralizacja reaktywnych form tlenu i azotu, szczególnie wolnych rodników, jest jednym z głównych mechanizmów ochrony przeciwutleniającej, wykazywanych przez roślinne prozdrowotne związki fenolowe. W pracy porównano aktywność przeciwrodnikową badanych ekstraktów z aktywnością syntetycznych przeciwutleniaczy: Troloxu, BHT i BHA. Aktywność przeciwrodnikowa badanych ekstraktów była zbliżona i wzrastała wraz z upływem czasu inkubacji (rys. 1).

Skuteczność przeciwutleniająca zależy nie tylko od struktury związków czynnych, ale również od innych czynników, takich jak: stężenie, temperatura, światło, typ substratu i właściwości fizyczne układu oraz oddziaływania prooksydacyjne lub synergistyczne związków czynnych [13]. Być może indukowane przez obecność wody i temperaturę chemiczne reakcje mogą również zmieniać aktywność układu kompleksowego, jakim jest ekstrakt zawierający liczne związki o odmiennych właściwościach chemicznych i fizycznych. Porównując aktywność przeciwrodnikową ekstraktów z kiełków rzodkiewki i 3 mM roztworów syntetycznych przeciwutleniaczy stwierdzono, że badane próby wykazały niższą zdolność do neutralizacji wolnych rodników (rys. 2).



Rys. 1. Wpływ czasu inkubacji na aktywność przeciwrodnikową ekstraktów z kiełków rzodkiewki.

Fig. 1. Influence of incubation time on antiradical activity of extracts from radish sprouts.

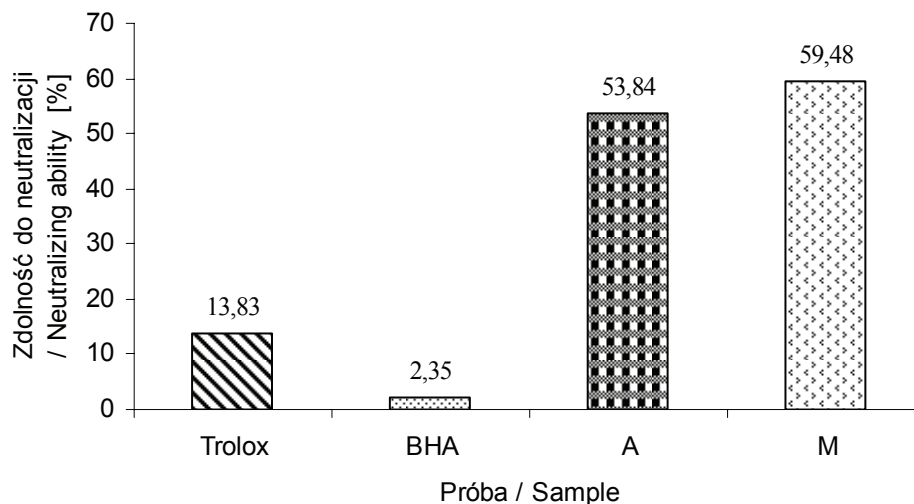


Rys. 2. Porównanie aktywności przeciwrodnikowej syntetycznych przeciwutleniaczy i ekstraktów z kiełków rzodkiewki (A – ekstrakt acetonowy, M – ekstrakt metanолоwy).

Fig. 2. Comparison of the antiradical activity of synthetic antioxidants and radish sprouts extracts (A – acetonic extract, M – methanolic extract).

Ważnym aspektem ochrony przeciwutleniającej jest usuwanie H_2O_2 . Nadtlenek wodoru może być toksyczny dla komórek poprzez stymulowanie powstawania rodników hydroksylowych [7]. Badania zdolności do neutralizacji H_2O_2 przez związki fenolowe wyizolowane z kiełków rzodkiewki i roztwory syntetycznych przeciwutleniaczy

wykazały, że badane próby charakteryzowały się wysoką aktywnością, przy czym nieznacznie wyższą skuteczność wykazał ekstrakt metanolowy (rys. 3). Reakcja z BHT nie była możliwa w warunkach metody.



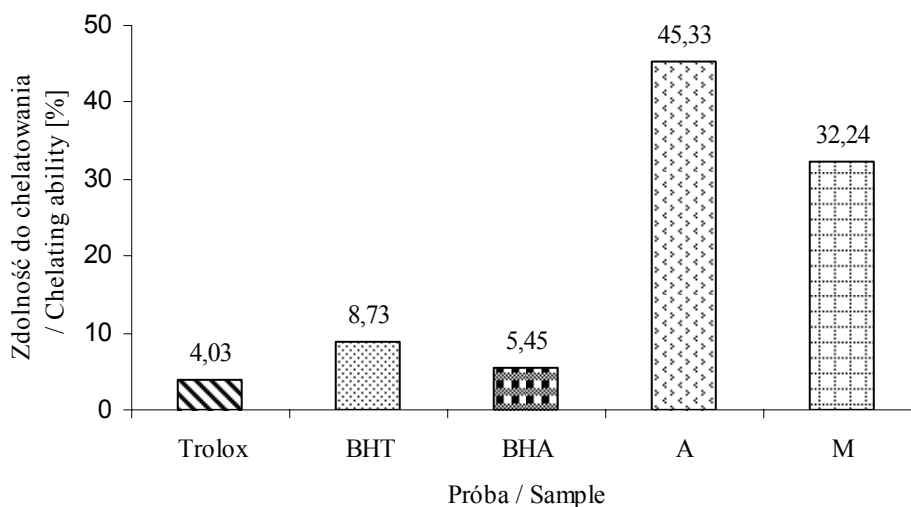
Rys. 3. Zdolność do neutralizacji H_2O_2 przez ekstrakty z kiełków rzodkiewki i roztwory syntetycznych przeciwutleniaczy (A-ekstrakt acetonowy, M – ekstrakt metanolowy).

Fig. 3. Ability to H_2O_2 scavenge by radish sprouts extracts and synthetic antioxidants solutions (A – acetic extract, M – methanolic extract).

Obecność jonów metali przejściowych odgrywa znaczącą rolę w katalizie procesów oksydacyjnych prowadzących do powstawania rodników hydroksylowych i peroksylowych podczas reakcji Fentona. Procesy te można opóźnić poprzez chelatowanie i deaktywację jonów żelaza. Ekstrakty z kiełków rzodkiewki charakteryzowały się zdecydowanie lepszymi właściwościami chelatującymi niż roztwory syntetycznych przeciwutleniaczy, przy czym wyższą zdolność do chelatowania jonów Fe (II) wykazywał ekstrakt acetonowy (rys. 4).

Poszukiwanie niedrogich, odnawialnych i zasobnych źródeł przeciwutleniaczy budzi zainteresowanie badaczy na całym świecie. Prowadzone są intensywne badania nad optymalizacją procesów ekstrakcji, poznaniem mechanizmów działania *in vivo* i asymilacji naturalnych związków przeciwutleniających. Ekstrakty z warzyw wykazują właściwości przeciwutleniające w pewnych przypadkach porównywalne z aktywnością przeciwutleniaczy syntetycznych. Według Moure [8], zastosowanie naturalnych przeciwutleniaczy jako dodatków do żywności może być korzystne mimo niższej aktywności w porównaniu z przeciwutleniaczami syntetycznymi. Istnieje wiele wiarygodnych danych o synergistycznym działaniu rozmaitych klas związków fenolowych. Rodriguez de Sotillo i wsp. [11] wykazali, że oksydację oleju słonecznikowego silniej hamował ekstrakt ze skórek ziemniaków niż roztwory syntetycznych, pojedynczych

związków. Synergizm pomiędzy różnymi klasami związków fenolowych czerwonego wina został opisany przez Ghiselli i wsp. [5]. Korzyści płynące z użycia mieszaniny związków o właściwościach przeciwutleniających zostały podsumowane przez Sherwina [12]. Stwierdził on, że stosowanie mieszanin pozwala na wzajemne uzupełnianie się różnorodnych mechanizmów działania poszczególnych przeciwutleniaczy, zminimalizowanie problemów metodycznych wynikających z różnej rozpuszczalności lub barwy wykazywanej przez pojedyncze związki, co pozwala także zwiększyć precyzję badań i uzyskiwać bardziej wiarygodne wyniki.



Rys. 4. Porównanie zdolności do chelatowania syntetycznych przeciwutleniaczy i ekstraktów z kiełków rzodkiewki (A – ekstrakt acetonowy, M – ekstrakt metanolowy).

Fig. 4. Comparison of the ability to chelating of synthetic antioxidants and radish sprouts extracts (A – acetonic extract, M – methanolic extract).

Wnioski

1. Nie stwierdzono wpływu rozpuszczalnika zastosowanego do ekstrakcji na zawartość związków fenolowych ogółem. Skuteczniejszym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji flawonoidów okazał się 50% metanol, natomiast 50% aceton w większym stopniu ekstrahował fenolokwasy.
2. Ekstrakty z kiełków rzodkiewki wykazywały znaczącą zdolność do neutralizacji wolnych rodników, jednak była ona istotnie niższa od aktywności syntetycznych przeciwutleniaczy. Nieznacznie wyższą aktywnością charakteryzował się ekstrakt metanolowy.
3. Ekstrakty z kiełków rzodkiewki skutecznie neutralizowały H_2O_2 , przy czym wyższą aktywnością charakteryzował się ekstrakt metanolowy. Aktywność badanych prób była znacznie wyższa niż aktywność syntetycznych przeciwutleniaczy.

4. Ekstrakt acetonowy wykazywał wyższą zdolność do chelatowania jonów Fe(II) niż ekstrakt metanolowy. Aktywność obydwu prób była zdecydowanie wyższa niż aktywność przeciwutleniaczy syntetycznych.

Praca była prezentowana podczas XXXVII Ogólnopolskiej Sesji Komitetu Nauk o Żywności PAN, Gdynia, 26 – 27.IX.2006.

Literatura

- [1] Bahoron T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J-C., Pinkas M.: Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 1996, 46(II), **11**, 1086-1089.
- [2] Brand-Williams W., Cuvelier E., Berset C.M.: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 1995, **28**, 25-30.
- [3] Covan. M.: Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Micr. Rev.*, 1999, 12, **4**, 564-582
- [4] Farmakopea Polska, t. V, P. T. Farm., Warszawa 1999.
- [5] Ghiselli A., Nardini M., Baldi A.: Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from Italian red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 361-367.
- [6] Guo J-T., Lee H-L., Chiang S-H., Lin H-I., Chang C-Y.: Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan. *J. Food Drug Anal.*, 2001, **9/2**, 96-101.
- [7] Halliwell B.: Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.*, 1991, **91**, 14-22.
- [8] Moure A., Cruz J.M., Franco D.: Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 2001, **72**, 145-171
- [9] Oktay, M., Gulcin I., Kufrevioglu I.: Determination of In vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebens.-Wiss. U.-Technol.*, 2003, **36**, 263-271.
- [10] Piesiewicz H., Mielcarz M.: Kielki w żywieniu człowieka. *Przeegl. Piek. Cuk.* 2001, **3**, 10-14.
- [11] Rodriguez de Sotillo Rodriguez de Sotillo D., Hadley M., Holm E. T.: Potato peel waste, stability and antioxidant activity of a freeze-dried extract. *J. Food Sci.*, 1994, **59**, 1031-1033.
- [12] Sherwin E.R. Antioxidants. In A. L. Braner, P. M. Davidson and S. Salminen. *Food antioxidants*. New York: Marcel Dekker Inc. 1990.
- [13] Singh G., Marimuthu P., de Heluani C.S., Catalan C.: Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *J. Sci Food Agric.*, 2005, **85**, 2297-2306.
- [14] Singleton V.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Etnol. Vitic.* 1965, **16**, 144-158.
- [15] Szymusiak H., *Badania efektywności wybranych przeciwutleniaczy występujących w produktach spożywczych. Praca habilitacyjna*, Wyd. AE w Poznaniu, Poznań 2002.

**INFLUENCE OF EXTRACTION CONDITIONS ON ANTIOXIDANT ACTIVITY
OF EXTRACTS FROM RADISH SPROUTS**

S u m m a r y

Phenolic compounds were extracted from radish (*Raphanus sativus* L. cv. Lucynka) sprouts using 50% acetone and 50% methanol. Used solvents didn't have an influence on total phenolic compounds content. 50% MeOH was better solvent for flavonoids extraction. However when 50% acetone was used most of the phenolic acids were extracted. Radish sprouts extracts showed significant antiradical activity (54,33% for acetone extract and 56,08% for methanol extract), but this activity was significantly lower than those of synthetic antioxidants. Analyzed samples showed the ability to neutralize H₂O₂. Higher activity was obtained for methanolic extract (59,48%) then for acetone extract (53,84%). Acetone extract showed higher metal-chelating ability than methanol extract (45,33% and 32,24% respectively). In both cases activity of analyzed samples were higher than activity of synthetic antioxidants.

Key words: radish sprouts, phenolic compounds, antioxidant activity 