

URSZULA GAWLIK-DZIKI

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCE ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH UWALNIANYCH W PROCESIE TRAWIENIA *IN VITRO* BROKUŁÓW

Streszczenie

Gotowane brokuły świeże i mrożone oraz brokuły świeże surowe poddano procesowi hydrolizy symulowanym płynem gastrycznym w warunkach *in vitro*. W otrzymanych ekstraktach oznaczono zawartość związków fenolowych i fenolokwasów oraz oznaczono ich właściwości przeciwutleniające czterema metodami analitycznymi. Najwyższe stężenie kwasów fenolowych (0,063 $\mu\text{g/ml}$) stwierdzono w płynie po trawieniu *in vitro* gotowanych brokułów mrożonych. Fenolokwasy zawarte w badanych próbach wykazywały znaczną aktywność antyrodnikową (24-34%) i skutecznie hamowały autooksydację kwasu linolowego. Zdolność hamowania degradacji emulsji β - karotenowej nie była skorelowana z zawartością związków fenolowych i stężeniem kwasów fenolowych w badanych próbach ($r = 0,89$). Stwierdzono natomiast istotne korelacje pomiędzy zawartością związków fenolowych i stężeniem fenolokwasów a zdolnością do hamowania autooksydacji kwasu linolowego. Zdolność do neutralizacji wolnych rodników była skorelowana z zawartością kwasów fenolowych ($r = 0,85$).

Słowa kluczowe: brokuły, kwasy fenolowe, aktywność przeciwutleniająca.

Wstęp

Prozdrowotne właściwości roślinnych przeciwutleniaczy są przedmiotem wielu opracowań. Większość z nich główny nacisk kładzie na znaczenie witamin E i C oraz β -karotenu, podczas gdy znaczącą rolę może również odgrywać obecność fenolowych przeciwutleniaczy. Polifenole, szczególnie flawonoidy oraz fenylopropanoidy, są efektywnymi donorami atomów wodoru. Ich potencjał przeciwutleniający jest uzależniony od ilości i wzajemnego rozmieszczenia grup hydroksylowych, struktury związku, jak również obecności podstawników [14]. Ważnymi składnikami (fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi) roślinnych ścian komórkowych oraz większości żywności po-

chodzenia roślinnego są pochodne kwasów hydroksycynamonowych. Budzą one coraz większe zainteresowanie jako związki wzbogacające jakość surowca przy produkcji tzw. żywności funkcjonalnej [10].

Z uwagi na wielorakie oddziaływanie związków polifenolowych na organizm człowieka konieczne jest wzbogacanie codziennej diety w produkty o dużej zawartości tych naturalnych substancji prozdrowotnych. Doskonałym ich źródłem jest niewątpliwie brokuł włoski, należący do grupy warzyw o wysokiej aktywności przeciwutleniającej [9]. Niewiele jest doniesień na temat biodostępności związków polifenolowych dla człowieka. Ponieważ biologiczne funkcje polifenoli zależą od struktury chemicznej powstałych metabolitów, konieczne są szczegółowe badania na temat ich przemian w ludzkim przewodzie pokarmowym. Dlatego też w niniejszej pracy podjęto próbę określenia biodostępności i aktywności przeciwutleniającej związków fenolowych obecnych w brokułach nieprzetworzonych oraz poddanych obróbce hydrotermicznej.

Material i metody badań

Materiałem do badań były mrożone brokuły firmy „Hortex” oraz brokuły świeże dostępne w handlu. Surowiec poddawano gotowaniu w 100 ml wody destylowanej. Czas obróbki hydrotermicznej brokułów mrożonych wynosił 5 min, a świeżych 10 min.

W celu określenia biodostępności związków fenolowych obecnych w brokułach prowadzono proces trawienia *in vitro* (gotowanych brokułów mrożonych i brokułów świeżych surowych i gotowanych) symulowanym płynem gastrycznym (SGF). Proces trawienia *in vitro* prowadzono przy użyciu symulowanego płynu gastrycznego (0,32% roztwór pepsyny w 0,03 M NaCl o pH = 1,2), wytrząsając 2 h w temp. 38°C. Po 2 h hydrolizę przerywano zobojętniając środowisko reakcji 1M NaOH.

W ekstraktach oznaczano całkowitą zawartość związków fenolowych z odczynikiem Folina-Ciocalteu [18] oraz sumę kwasów fenolowych (w przeliczeniu na kwas kawowy) metodą Arnova [4]. Stężenie związków fenolowych (w przeliczeniu na kwas chlorogenowy) odczytywano z krzywej wzorcowej.

Z płynów pozostałych po trawieniu *in vitro* ekstrahowano kwasy fenolowe metodą opisaną przez Hatcher i Kruger [6]. Ekstrakty odłuszczano eterem naftowym, następnie z fazy wodnej ekstrahowano kwasy fenolowe mieszaniną eter dietylowy: octan etylu (1:1). Ekstrakcję prowadzono przez pięciokrotne wytrząsanie. Frakcje eterowe zbierano i łączono. Ekstrakt ten, zawierający wolne kwasy fenolowe osuszano bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Rozpuszczalniki organiczne odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczano w 10 ml czystego metanolu.

Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej kwasów fenolowych wobec DPPH[•] (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) prowadzono według Brand-Williams i wsp. [1]. Pomiarów absorbancji dokonywano przy długości fali 515 nm.

Aktywność przeciwutleniającą wyrażano jako % inhibicji według równania podanego przez von Gadowa i wsp. [20]:

$$\text{Inhibicja} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100, [\%] \quad (1)$$

gdzie:

$A_{C(0)}$ – absorbancja próby kontrolnej w czasie 0,

$A_{A(t)}$ – absorbancja próby badanej po 30 min inkubacji.

Oznaczano także zdolność do hamowania degradacji emulsji β -karotenu z kwasem linolowym [11]. W celu przygotowania emulsji, 5 mg β -karotenu rozpuszczano w 50 ml chloroformu. Do kolby zawierającej 120 μ l 60% roztworu kwasu linolowego i 1200 μ l preparatu Tween 40 dodawano 6 ml chloroformowego roztworu β -karotenu. Chloroform odparowywano w temp. 40°C. Do otrzymanej w ten sposób emulsji β -karotenu dodawano 200 ml 30% roztworu nadtlenku wodoru i mieszano.

Do próbek pobierano po 6 ml utlenionej emulsji wprowadzając równocześnie po 80 μ l badanego ekstraktu. Probówki natychmiast umieszczano w termostacie i inkubowano w temp. 50°C. Utlenienie emulsji β -karotenu rejestrowano spektrofotometrycznie przy długości fali 470 nm. Absorbancję próbek mierzono w czasie 0, a następnie co 15 min przez 2 h. Do próby kontrolnej użyto 80 μ l czystego metanolu zamiast przygotowanego ekstraktu i 6 ml utlenionej emulsji β -karotenu. Aktywność przeciwutleniającą określano jako AAC według równania podanego przez von Gadowa i wsp. [20]:

$$\text{AAC} = [(A_{A(t)} - (A_{C(t)})) / ((A_{C(0)} - (A_{C(t)}))] \times 1000 \quad (2)$$

gdzie:

$A_{C(0)}$ – absorbancja próby kontrolnej w czasie 0,

$A_{C(t)}$ – absorbancja próby kontrolnej mierzona co 15 min przez 2 h,

$A_{A(t)}$ – absorbancja próby badanej mierzona co 15 min przez 2 h.

Właściwości przeciwutleniające określano także jako zdolność do hamowania autooksydacji kwasu linolowego metodą Lingnerta i wsp. [12]. Probki inkubowano w temp. 37°C w czasie 24 h. Efekt przeciwutleniający obliczano z równania:

$$\text{AAC} = (\Delta A_{234 \text{ nm}(C)} - \Delta A_{234 \text{ nm}}) / \Delta A_{234 \text{ nm}(C)} \quad (3)$$

gdzie:

$\Delta A_{234 \text{ nm}}$ – wzrost absorbancji próby badanej przy długości fali 234 nm,

$\Delta A_{234 \text{ nm}(C)}$ – odpowiadający wzrost absorbancji próby kontrolnej.

Zdolność do hamowania autooksydacji kwasu linolowego określano również metodą rodankową [13]. Absorbancję mierzono przy długości fali 500 nm wobec 75% metanolu w czasie 0 oraz po 24 h inkubacji. Efekt przeciwutleniający obliczano z równania:

$$AAC = (\Delta A_{500\text{ nm}(C)} - \Delta A_{500\text{ nm}}) / \Delta A_{500\text{ nm}(C)} \quad (4)$$

gdzie:

$\Delta A_{500\text{ nm}}$ – wzrost absorbancji próby badanej przy długości fali 500 nm,

$\Delta A_{500\text{ nm}(C)}$ – odpowiadający wzrost absorbancji próby kontrolnej.

Oznaczenia wykonano w pięciu powtórzeniach w przypadku każdej z trzech badanych prób. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Przeprowadzono analizę wariancji oraz określono istotność różnic między średnimi stosując test Tuckey'a. Wyznaczono także współczynniki korelacji liniowej Pearsona pomiędzy określanymi cechami.

Wyniki i dyskusja

Płyn po trawieniu *in vitro* brokułów świeżych surowych zawierał najwięcej związków fenolowych ogółem (0,163 mg/ml), natomiast najwyższą zawartość kwasów fenolowych (0,063 µg/ml) stwierdzono w płynie po trawieniu *in vitro* gotowanych brokułów mrożonych (tab. 1). W dostępnej literaturze brak jest danych na temat zawartości związków fenolowych w płynach pozostałych po trawieniu *in vitro* żywności pochodzenia roślinnego.

Tabela 1

Całkowita zawartość związków fenolowych oraz fenolokwasów wyekstrahowanych z płynów pozostałych po trawieniu *in vitro* brokułów świeżych i mrożonych.

Total content of phenolics and phenolic acids content extracted from fluids after *in vitro* digestion of fresh and frozen broccoli.

Próba Sample	Całkowita zawartość związków fenolowych Total phenolics content [mg/ml]	Zawartość kwasów fenolowych Total phenolic acids content [µg/ml]
T1	0,100 ^a	0,027 ^a
T2	0,163 ^b	0,059 ^b
T3	0,140 ^c	0,063 ^b

T1 – Płyn po trawieniu brokułów świeżych gotowanych / Fluid left after digestion of boiled fresh broccoli,

T2 – Płyn po trawieniu brokułów świeżych surowych / Fluid left after digestion of raw fresh broccoli,

T3 – Płyn po trawieniu brokułów mrożonych gotowanych / Fluid left after digestion of boiled frozen broccoli,

a, b, c – wartości średnie oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / means followed by the same letter are not significantly different at the level $p \leq 0.05$.

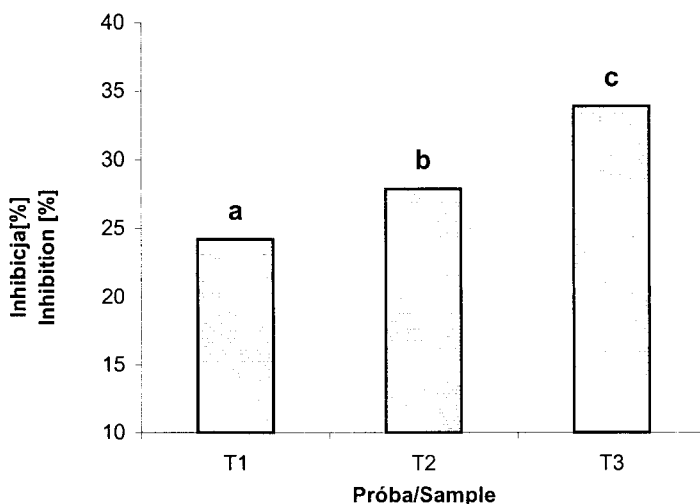
W przypadku brokułów świeżych wcześniejsze gotowanie spowodowało spadek zawartości związków fenolowych ogółem i zawartości kwasów fenolowych w płynach pozostałych po trawieniu. Najwyższe stężenie tych związków wystąpiło w płynie po trawieniu brokułów surowych. Próba otrzymana z gotowanych brokułów mrożonych zawierała najwięcej kwasów fenolowych. Przyczyną była prawdopodobnie degradacja struktur komórkowych podczas obróbki hydrotermicznej. Wyższą zawartość związków fenolowych w fasoli moczzonej i gotowanej niż w surowej stwierdzili Villavicencio i wsp. [21]. Zjawisko to wytłumaczono lepszą podatnością na ekstrakcję, wynikającą ze zmian w strukturze związków budujących ścianę komórkową, zachodzących pod wpływem wysokiej temperatury lub uwalnianiem związków fenolowych z ich nierozpuszczalnych kompleksowych połączeń. Prawdopodobnie z tego powodu najwyższe stężenie kwasów fenolowych stwierdzono w płynie po trawieniu *in vitro* gotowanych brokułów mrożonych.

Badania składu płynu pozostałego po trawieniu *in vitro* brokułów dowiodły, że podczas kwaśnej hydrolizy, pod wpływem symulowanego płynu gastrycznego, do środowiska reakcji uwolniły się związki mające znaczenie jako potencjalne chemoprewentery. Kanner i Lapidot [8] sugerują, że płyn gastryczny człowieka jest środowiskiem wzmagającym peroksydację lipidów i innych związków pochodzących z żywności. Autorzy ci wskazują na bardzo korzystny wpływ włączania do codziennej diety żywności pochodzenia roślinnego zawierającej przeciwutleniacze.

W niniejszej pracy wolne rodniki DPPH[•] najskuteczniej neutralizowały kwasy fenolowe wyizolowane z płynu po trawieniu brokułów mrożonych gotowanych (34% inhibicji). Nieco niższą aktywność wykazały kwasy fenolowe wyekstrahowane z płynu po trawieniu brokułów świeżych surowych i kwasy fenolowe wyekstrahowane z płynu po trawieniu brokułów świeżych gotowanych (odpowiednio 28 i 24%). Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 1.

Wszystkie badane próby wykazywały bardzo niską aktywność przeciwutleniającą, określoną jako zdolność do hamowania degradacji emulsji β -karotenu. Najwyższą aktywność (11%) wykazywały kwasy fenolowe obecne w płynie po trawieniu *in vitro* gotowanych brokułów mrożonych. Aktywność pozostałych prób była zbliżona i kształtowała się na poziomie 8%. Być może jest to uzależnione od polarności mieszaniny reakcyjnej. Wielu badaczy wskazuje na to, że istnieje silna zależność pomiędzy aktywnością przeciwutleniaczy a metodą używaną do jej oznaczenia. Wcześniejsze badania [15] dowiodły istnienia zjawiska określanego jako „polar paradox” – przeciwutleniacze hydrofilowe są bardziej efektywne od lipofilowych w fazie hydrofobowej, natomiast związki o charakterze lipofilowym wykazują wyższą aktywność w stosunku do emulsji. Zjawisko takie opisano w przypadku α -tokoferolu, Troloxu (wodny odpowiednik witaminy E), kwasu askorbinowego, jak również związków fenolowych obecnych w ekstrakcie z rozmarynu [15]. Peterson i wsp. [16] badając aktywność

przeciwutleniającą kaszy owsianej wykazali, że stosując do oznaczeń metodę z β -karotenem uzyskuje się dużą zmienność wyników w porównaniu z metodą z DPPH, przy zastosowaniu której rozrzut wyników jest mniejszy. Von Gadow i wsp. [20] zaobserwowali prooksydacyjne działanie kwasu kawowego w stosunku do emulsji β -karotenu, podczas gdy związek ten wykazywał silne właściwości antyoksydacyjne wobec DPPH oraz inhibitował oksydację smalcu.



Rys. 1. Aktywność antyrodnikowa kwasów fenolowych wyekstrahowanych z płynów pozostałych po trawieniu *in vitro* brokułów świeżych i mrożonych.

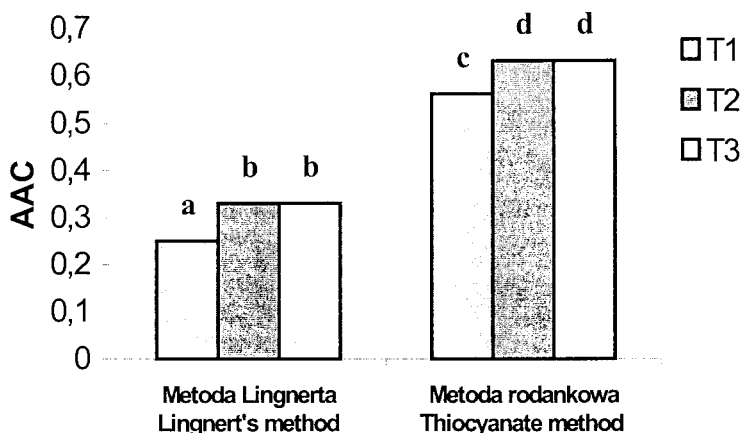
Fig. 1. Antiradical activity of phenolic acids extracted from fluids after *in vitro* digestion of fresh and frozen broccoli.

Objaśnienia jak w tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Najniższą zdolnością do hamowania samoutleniania kwasu linolowego charakteryzowały się kwasy fenolowe wyizolowane z płynu pozostałego po trawieniu brokułów świeżych gotowanych (AAC = 0,25). Podobne właściwości przeciwutleniające wykazywały kwasy fenolowe wyizolowane z płynu pozostałego po trawieniu brokułów świeżych surowych i brokułów mrożonych gotowanych (AAC = 0,33). Zależności te potwierdziły obydwie metody zastosowane do oznaczeń, z tym, że wyższe wartości AAC uzyskano stosując do oznaczeń metodę rodankową (rys. 2).

W literaturze brak jest opracowań na temat składu i właściwości przeciwutleniających kwasów fenolowych uwalnianych podczas hydrolizy pożywienia pochodzenia roślinnego w żołądku. Analizując właściwości przeciwutleniające kwasów fenolowych wyizolowanych z płynu pozostałego po trawieniu stwierdzono, że skutecznie hamują one samoutlenianie kwasu linolowego. Według Kaura i Kapoora [9], niektóre warzywa, w tym brokuły, brukselka i pomidory, charakteryzujące się umiarkowaną lub niską

zawartością związków fenolowych, wykazują wysoką aktywność przeciwutleniającą. Można to tłumaczyć właściwościami poszczególnych związków fenolowych, które mogą być skutecznymi przeciwutleniaczami, niż wysoką ich zawartością ogółem. W związku z tym badacze ci uważają za bardziej uzasadnione określanie właściwości przeciwutleniających warzyw przy zastosowaniu rozmaitych metod, niż bazowanie na rezultatach uzyskanych przy zastosowaniu tylko jednego sposobu ich określania. Na podstawie uzyskanych w pracy wyników wykazano, że często trudne jest porównanie wartości uzyskanych różnymi metodami, niemniej jednak wskazują one na różnorodność mechanizmów działania przeciwutleniaczy zawartych w badanym surowcu.



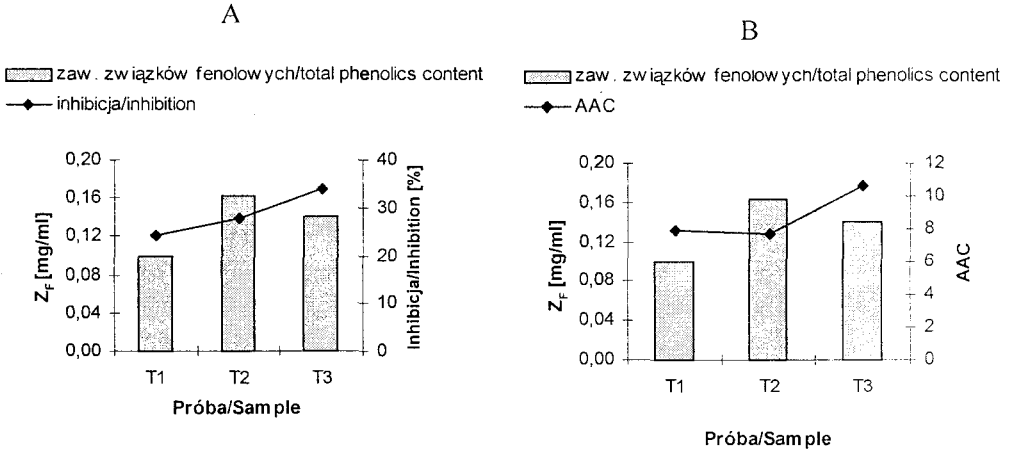
Rys. 2. Aktywność przeciwutleniająca (AAC) kwasów fenolowych wyizolowanych z płynów pozostałych po trawieniu *in vitro* brokułów świeżych i mrożonych.

Fig. 2. Antioxidant activity (AAC) of phenolic acids extracted from fluids after *in vitro* digestion of fresh and frozen broccoli.

Objaśnienia jak w tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy aktywnością antyrodnikową (oznaczenie z DPPH) a zawartością związków fenolowych w badanych ekstraktach. Również zdolność do hamowania współutleniania β -karotenu i kwasu linolowego nie była uzależniona od poziomu związków fenolowych (rys. 3).

Wykazano natomiast istotną korelację pomiędzy zawartością związków fenolowych a hamowaniem samoutleniania kwasu linolowego. Przy oznaczeniu metodą Lingnerta współczynnik korelacji wynosił 0,89, a przy zastosowaniu do oznaczeń metody rodankowej 0,74 (rys. 4).

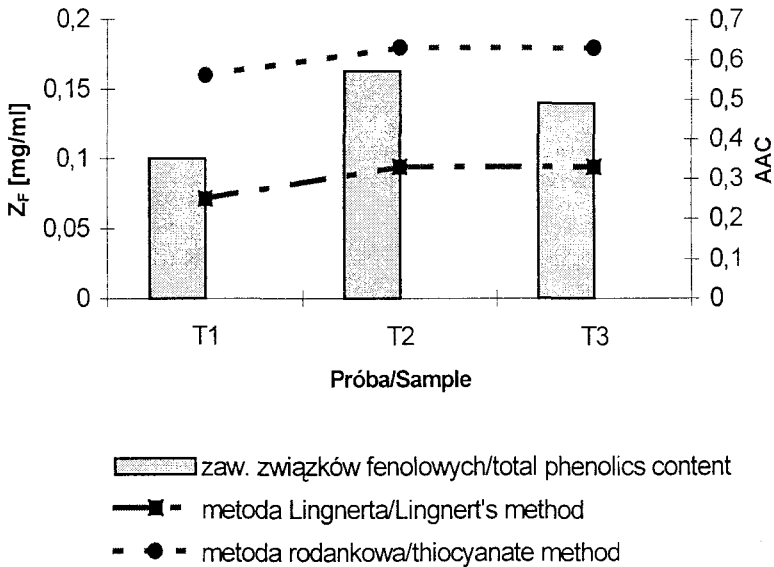


Rys. 3. Zależność aktywności przeciwutleniającej (AAC) od całkowitej zawartości związków fenolowych (Z_F) w płynach pozostałych po trawieniu *in vitro* brokołów świeżych i mrożonych. A) oznaczenie wobec DPPH, B) oznaczenie wobec β-karotenu.

Fig. 3. Relationship between antioxidant activity and total phenolic content (Z_F) in fluids after *in vitro* digestion of fresh and frozen broccoli.

A) DPPH test, B) β-carotene bleaching method.

Objaśnienia jak w tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

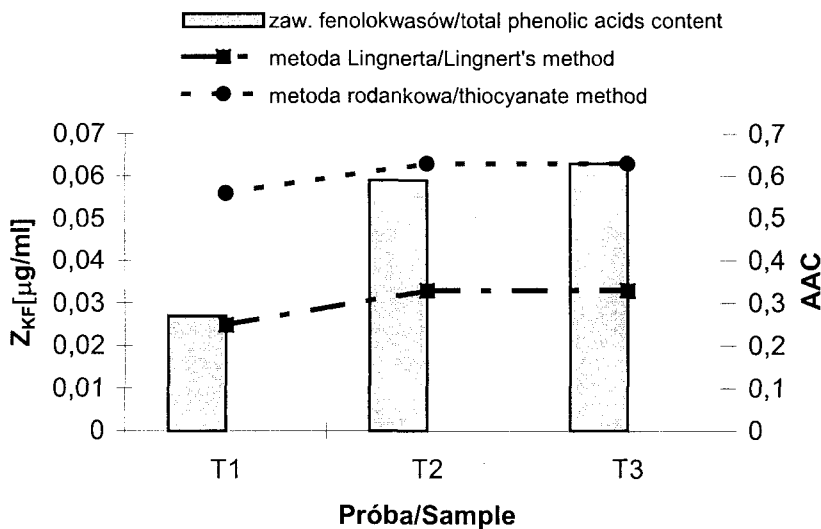


Rys. 4. Zależność aktywności przeciwutleniającej (AAC) od całkowitej zawartości związków fenolowych (Z_F) w płynach pozostałych po trawieniu *in vitro* brokołów świeżych i mrożonych.

Fig. 4. Relationship between antioxidant activity and total phenolic content (Z_F) in fluids after *in vitro* digestion of fresh and frozen broccoli.

Objaśnienia jak w tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Uzyskane niejednoznaczne zależności pomiędzy stężeniem związków fenolowych a aktywnością przeciwutleniającą ekstraktów znajdują odzwierciedlenie w badaniach Gazzani i wsp. [5] oraz Kähkönen i wsp. [7]. Cytowani autorzy nie stwierdzili żadnej korelacji pomiędzy zawartością związków fenolowych a aktywnością przeciwutleniającą ekstraktów z roślin. Według nich, z różnych związków fenolowych zachodzą odmienne reakcje przy oznaczaniu metodą Folina-Ciocalteu, więc aktywność przeciwutleniająca danego ekstraktu nie powinna być określana na podstawie całkowitej zawartości związków fenolowych, lecz wymaga ilościowego określenia każdego ich rodzaju przy zastosowaniu właściwych metod [9]. Natomiast Deighton i wsp. [3] oraz Velioglu i wsp. [19] wykazali liniową zależność pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą a zawartością związków fenolowych w roślinach z gatunku *Rubus*. Potencjał przeciwutleniający mogą różnicować metody jego określania oraz, w obrębie samej metody, różnice w polarności medium, bowiem interakcje przeciwutleniaczy z innymi związkami chemicznymi odgrywają główną rolę w ich aktywności [15]. Obserwowano drastyczne rozbieżności, kiedy badany związek wykazywał wysoką aktywność antyoksydacyjną według jednej, a prooksydacyjną według drugiej metody oznaczania [14].



Rys.5. Zależność aktywności przeciwutleniającej od całkowitej zawartości kwasów fenolowych (Z_{KF}) w płynach pozostałych po trawieniu *in vitro* brokułów świeżych i mrożonych.

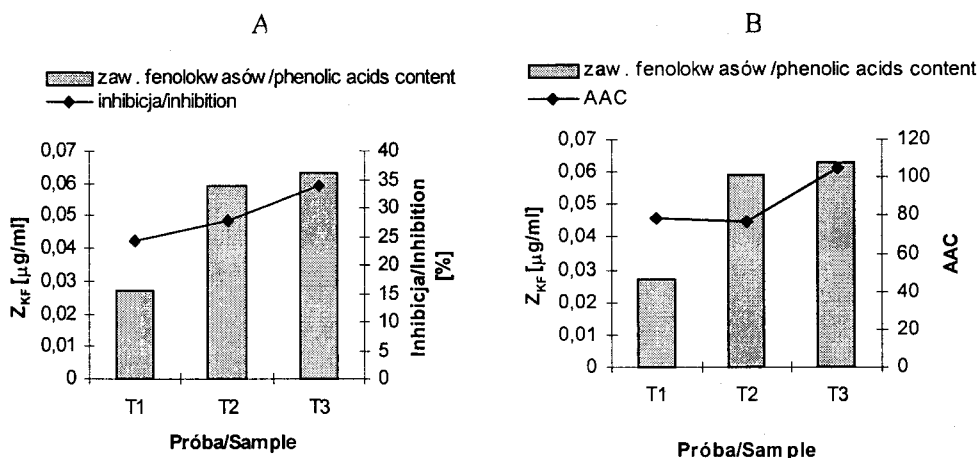
Fig. 5. Relationship between antioxidant activity and total phenolic acids content (Z_{KF}) in fluids after *in vitro* digestion of fresh and frozen broccoli.

Objaśnienia jak w tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

W celu określenia potencjału przeciwutleniającego konieczne jest więc, oprócz zastosowania wielu metod oznaczania aktywności przeciwutleniającej badanego surowca, uwzględnienie zawartości i rodzaju związków fenolowych. Badania własne wykazały, że zdolność do hamowania samoutleniania kwasu linolowego była istotnie skorelowana z zawartością kwasów fenolowych (rys. 5). Współczynnik korelacji przy zastosowaniu metody Lingnerta wyniósł 0,89, natomiast w przypadku zastosowania metody rodankowej 0,91.

Stwierdzono również korelację pomiędzy aktywnością antyrodnikową (oznaczenie wobec DPPH) a zawartością fenolokwasów. Współczynnik korelacji wyniósł 0,85. Natomiast zdolność do hamowania degradacji emulsji β -karotenowej nie była uzależniona od zawartości fenolokwasów (rys. 6).

W celu określenia korelacji pomiędzy strukturą związków fenolowych i aktywnością przeciwutleniającą wykonano wiele prac [2, 17], ale z uwagi na różnorodność stosowanych metod oznaczania tej aktywności zależności nie zostały w pełni wyjaśnione. Ponadto niezbędne są dodatkowe informacje na temat ich biodostępności z pożywienia pochodzenia roślinnego i wpływu stosowanych zabiegów technologicznych na ich zawartość i zmiany strukturalne.



Rys.6. Zależność aktywności przeciwutleniającej od całkowitej zawartości kwasów fenolowych (Z_{KF}) w płynach pozostałych po trawieniu *in vitro* brokołów świeżych i mrożonych.

A) oznaczenie z DPPH, B) oznaczenie wobec β -karotenu.

Fig. 6. Relationship between antioxidant activity and total phenolic acids content (Z_{KF}) in fluids after *in vitro* digestion of fresh and frozen broccoli.

A) DPPH test, B) β -carotene bleaching method.

Objaśnienia jak w tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Z przeprowadzonych badań wynika, że proces zamrażania brokułów nie spowodował spadku właściwości przeciwutleniających – mrożonki tego warzywa zawierają przeciwutleniacze o aktywności porównywalnej do związków pochodzących z warzyw świeżych.

Kroon i Williamson [10], bazując na badaniach *in vitro*, sugerują, że kwasy hydroksycynamonowe mogą stanowić główną grupę przeciwutleniaczy w żywności pochodzenia roślinnego. Jednak aktywność przeciwutleniająca tych związków nie musi być koniecznie odzwierciedlona efektem prozdrowotnym, bowiem o biodostępności związków decyduje zaabsorbowanie ich w jelicie. Badania nad biodostępnością kwasów hydroksycynamonowych są rzadkie, ale wstępne wyniki otrzymane w różnych laboratoriach sugerują, że związki te są absorbowane w przewodzie pokarmowym. Przeprowadzone badania potwierdzają, że związki te są uwalniane do płynu gastrycznego i wykazują znaczące właściwości przeciwutleniające.

Kierunkiem dalszych badań powinno być pełne wyjaśnienie kwestii biodostępności pochodnych kwasów hydroksycynamonowych i zbadanie, na ile ich właściwości przeciwutleniające znajdują odzwierciedlenie w ochronie zdrowia.

Wnioski

1. Ilość uwolnionych, podczas trawienia *in vitro* brokułów, związków fenolowych uzależniona jest od obróbki hydrotermicznej, którym warzywo było poddane. Stosowane zabiegi technologiczne różnicują również właściwości kwasów fenolowych izolowanych z płynów otrzymanych po trawieniu *in vitro*.
2. Kwasy fenolowe wyizolowane z płynów pozostałych po trawieniu *in vitro* brokułów wykazywały znaczną aktywność antyrodnikową i skutecznie hamowały samoutlenianie kwasu linolowego, natomiast w niewielkim stopniu hamowały degradację emulsji β -karotenowej.
3. Zdolność do neutralizacji wolnych rodników DPPH była dodatnio skorelowana z całkowitą zawartością kwasów fenolowych w badanych próbach. Nie stwierdzono natomiast korelacji pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą oznaczaną wobec DPPH a całkowitą zawartością związków fenolowych.
4. Zdolność do hamowania degradacji emulsji β -karotenowej nie była skorelowana z całkowitą zawartością związków fenolowych i sumą kwasów fenolowych w badanych próbach.
5. Niezależnie od zastosowanej do oznaczeń metody, zdolność do hamowania samoutleniania kwasu linolowego uzależniona była od stężenia związków fenolowych i zawartości fenolokwasów w badanych próbach.

Literatura

- [1] 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.
- [2] Cuvelier M.E., Rihard H., Berset C.: Comparison of the antioxidative activity of some-acid-phenols-structure activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1992, **56**, 324.
- [3] Deighton N., Brennan R., Finn C., Davies H.V.: Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 1307-1313.
- [4] Farmakopea Polska, t. V, P.T. Farm., Warszawa 1999.
- [5] Gazzani G., Papetti A., Massolini G., Daglia M.: Anti- and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and effect of thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 4118-4122.
- [6] Hatcher D.W., Kruger J.E.: Simple phenolic acids in flours prepared from Canadian wheat: relationship to ash content, color and polyphenol oxidase activity. *Cereal Chem.*, 1997, **74** (3), 337-343.
- [7] Kähkönen M.P., Hopia A.T., 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] Kanner J., Lapidot T.: The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*, 2001, **31** (11), 1388-1395.
- [9] Kaur C., Kapoor H.C.: Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International J. Food Sci. Tech.*, 2002, **37**, 153-161.
- [10] Kroon P. A., Williamson G.: Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.*, 1999, **79**, 335-361.
- [11] Lee Y., Howard L.R., Villalón B.: Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J. Food Sci.*, 1995, **60** (3), 473-476.
- [12] Lingnert H., Vallentinn K., Eriksson C.E.: Measurement of antioxidative effect in model system. *J. Food Proces. Preserv.*, 1979, **3/87**, 103.
- [13] Masuda T., Jitoe A.: Antioxidative and antiinflammatory compounds from activities of cassumunins A,B, and C, new complex curcuminoids from *Zingber cassumunar*. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1850-1856.
- [14] Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez J. M., Sineiro J., Dominguez H., Núñez M. J., Parajó J. C.: Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, 2001, **72**, 145-171.
- [15] Pekkarinen S.S., Stöckmann, Schwarz K., Heinonen M., Hopia A.I.: Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47/8**, 3036-3043.
- [16] Peterson D.M., Emons C.L., Hibbs A.: Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. *J. Cereal Sci.*, 2001, **25**, 97-103.
- [17] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, 1996, **20** (7), 933-956.
- [18] Singleton V.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Etnol. Vitic.* 1965, **16**, 144-158.
- [19] Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomach B.D.: Antioxidative activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 4113-4117.
- [20] 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 -tocopherols, BHT and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45** (3), 632-638.

- [21] Villavicencio A., Mancini-Filho J., Declincee H., Greiner R.: Effect of irradiation on antinutrients (total phenolics, tannins and phytate) in Brazilian beans. *Rad. Phys. Chem.*, 2000, **57**, 289-293.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC ACIDS OBTAINED AFTER BROCCOLI *IN VITRO* DIGESTION

S u m m a r y

Boiled fresh and frozen broccoli and raw fresh broccoli was hydrolyzed *in vitro* by simulated gastric fluid. The total phenolics and phenolic acids content of the extracts was determined. Four analytical methods were used for evaluation of the antioxidant activity. The highest content of phenolic acids (0,063 $\mu\text{g/ml}$) was obtained in fluid after *in vitro* digestion of boiled frozen broccoli. The phenolic acids of analyzed samples showed significant antiradical activity (24–34%) and effectively inhibited autooxidation of linoleic acid. Inhibition of β -carotene bleaching was not correlated with total phenolics and phenolic acids content in analyzed samples. Significant correlations ($r = 0,89$) between total phenolics and phenolic acids content and ability of inhibiting linoleic acid autooxidation was found. The neutralization ability of free radical DPPH was correlated with total phenolic acids content ($r = 0,85$).

Key words: broccoli, phenolic acids, antioxidant activity. ☒