

BEATA DRUŻYŃSKA, AGNIESZKA JEŻAK

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCE POLIFENOLI ZAWARTYCH W OKRYWIE NASIENNEJ NASION BOBU

Streszczenie

Celem pracy było określenie właściwości przeciwutleniających preparatów polifenoli uzyskanych z okrywy nasiennej nasion bobu dwóch odmian: Windsor Biały i Bartom. Preparaty otrzymano przez ekstrakcję polifenoli 0,5% roztworem HCl w metanolu, zagęszczanie pod próżnią i liofilizację.

Charakterystyka chemiczna otrzymanych preparatów polegała na określeniu zawartości polifenoli ogółem, tanin skondensowanych i antocyjanów. W badaniach właściwości przeciwutleniających preparatów polifenoli oznaczano zdolności preparatów do unieczynniania stabilnych, syntetycznych rodników DPPH i rodników wodorotlenowych. Zbadano również zdolność preparatów do chelatowania jonów żelaza II.

Stwierdzono, że badane preparaty wykazywały aktywność przeciwrodnikową zarówno wobec rodników wodorotlenowych (od 48 do 50%), jak i rodników DPPH (od 65 do 70%). Badane preparaty chelatowały również jony żelaza II. Większą aktywnością charakteryzował się preparat z bobu odmiany Windsor Biały, co spowodowane było prawdopodobnie większą zawartością polifenoli w tym preparacie.

Słowa kluczowe: nasiona bobu, polifenole, właściwości przeciwutleniające, rodniki wodorotlenowe, rodniki DPPH

Wprowadzenie

Jednym z najważniejszych kierunków badań w technologii żywności jest poszukiwanie nowych metod zabezpieczania produktów przed zachodzeniem niekorzystnych zmian zarówno podczas produkcji, jak i przechowywania żywności. Do najbardziej niekorzystnych zmian w produktach żywnościowych zalicza się reakcje utleniania. Powodują one zarówno obniżenie wartości żywieniowej, jak i pogorszenie smaku oraz powstawanie toksycznych produktów reakcji, do których zalicza się wolne rodniki i produkty ich rozpadu [7]. Naukowcy ciągle poszukują naturalnych przeciwutleniaczy, uważanych za bezpieczne, a jednocześnie dobrze akceptowanych przez konsumentów.

Dr inż. B. Drużyńska, mgr inż. A. Jeżak, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

Najliczniejszą grupą wśród naturalnych przeciwutleniaczy są polifenole. Związki te należą do wtórnych metabolitów roślinnych. Są potrzebne do prawidłowego wzrostu i reprodukcji roślin. Występują powszechnie w owocach, warzywach, zbożach, a także w roślinach strączkowych [3, 18]. Ich przeciwutleniające właściwości (zwłaszcza flawonoidów i kwasów fenolowych) są w literaturze dobrze udokumentowane [1, 4]. Wśród roślin strączkowych dotyczy to przede wszystkim polifenoli zawartych w nasionach soi [20]. Niewiele jest prac opisujących działanie przeciwutleniające polifenoli występujących w krajowych nasionach roślin strączkowych, a szczególnie w nasionach bobu.

Celem niniejszej pracy było określenie składu i właściwości przeciwutleniających polifenoli zawartych w okrywie nasiennej bobu.

Material i metody badań

Materiałem badawczym były preparaty otrzymane z okrywy nasiennej dwóch odmian nasion bobu: Windsor Biały i Bartom. Nasiona bobu moczone w wodzie przez 24 godz., a następnie ręcznie obłuszczano. Okrywę suszono w temperaturze pokojowej i mielono. Polifenole ekstrahowano 0,5% roztworem kwasu solnego w metanolu, wytrząsając przez 24 godz. w temperaturze pokojowej. Otrzymany ekstrakt zagęszczano pod próżnią w temp. 50°C i poddawano liofilizacji [17]. Przed każdym oznaczeniem odpowiednią naważkę preparatu rozpuszczano w metanolu.

Charakterystyka chemiczna otrzymanych preparatów obejmowała określenie zawartości: polifenoli ogółem [13], tanin skondensowanych [5] i antocyjanów [15]. Polifenole ogółem oznaczano na podstawie reakcji barwnej zachodzącej pod wpływem dodania odczynnika Folina-Ciocalteu'a i węgla sodu. Absorbancję barwnego kompleksu mierzono przy $\lambda = 700$ nm w spektrofotometrze Shimadzu UV-160A w 1 cm kuwetach. Wynik wyrażano w przeliczeniu na kwas galusowy.

Taniny skondensowane oznaczano na podstawie reakcji z odczynnikiem wanilinowym. Odczynnik ten otrzymywano przez zmieszanie w stosunku 50 : 50 roztworów: 1% waniliny w metanolu i 8% HCl w metanolu. Absorbancję mierzono przy $\lambda = 500$ nm w spektrofotometrze Shimadzu UV-160A w 1 cm kuwetach. Wynik wyrażano w przeliczeniu na (+)katechinę.

Antocyjany oznaczano metodą Sodheimera-Kertesza w modyfikacji Swaina i Hillisa, stosując 1,5 M roztwór HCl i bufor cytrynianowy (pH 3,4). Absorbancję mierzono przy $\lambda = 520$ nm w spektrofotometrze UV-160A w 1 cm kuwetach. Zawartość antocyjanów obliczano na podstawie krzywej wzorcowej, do wykonania której użyto czerwieni kongo.

Właściwości przeciwutleniające preparatów polifenoli oznaczano przez pomiar ich zdolności do unieczynniania stabilnych, syntetycznych rodników DPPH. Metoda polega na dodaniu związków przeciwrodnikowych do metanolowego roztworu DPPH[•],

który w formie rodnikowej wykazuje absorpcję przy $\lambda = 517$ nm. Wartość tej absorpcji obniża się po dodaniu związku antyrodnikowego [14]. Dla porównania dokonano pomiaru inhibicji tych rodników przez syntetyczny przeciwutleniacz BHT. Aktywność przeciwutleniającą wobec DPPH obliczano z równania:

$$A = [(A_K - A_{W1}) / A_K] \times 100\%,$$

gdzie: A – aktywność przeciwrodnikowa [%], A_K – absorpcja próby kontrolnej, A_{W1} – absorpcja próby właściwej.

Przeciwrodnikowe właściwości polifenolowych preparatów oznaczano również przez pomiar fluorescencji wywołanej formowaniem rodników wodorotlenowych generowanych z nadtlenku wodoru i benzoesu sodu w obecności jonów miedzi (II) i DTET (dithioerytrol) w buforze fosforanowym o pH 7,2. DTET stosowano w celu przyspieszenia reakcji rodnikowej. Fluorescencję pochodnych hydroksylowych mierzono spektrofotometrycznie [2]. Aktywność przeciwrodnikową (A) obliczano z równania:

$$A = [(F_K - F_{W1}) / F_K] \times 100\%,$$

gdzie: F_K – absorpcja próby kontrolnej, F_{W1} – absorpcja próby właściwej.

Badanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II) przez polifenole prowadzono w wodnych roztworach preparatów polifenoli, dodając chlorek żelaza(II) i ferrozynę. Absorbancję barwnego kompleksu mierzono po 10 min od dodania ferrozyny przy długości fali 562 nm w spektrofotometrze Shimadzu UV-160A [6]. Zdolność preparatów do chelatowania jonów żelaza II (CH) obliczano z równania:

$$CH = [(A_K - A_{W1}) / A_K] \times 100\%,$$

gdzie: A_K – absorpcja próby kontrolnej, A_{W1} – absorpcja próby właściwej

Wszystkie oznaczenia wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Wartości średnich i odchyłeń standardowych obliczano korzystając z programu Microsoft Office Excel 2003. Analizę statystyczną doświadczenia dwuczynnikowego oraz współczynniki korelacji wyliczano za pomocą programu Statgraphics Plus 4.1.

Wyniki i dyskusja

W preparacie z bobu odmiany Windsor Biały stwierdzono więcej polifenoli ogółem (71,2 mg/100 mg s.m.) niż w preparacie z okrywy nasion bobu 'Bartom' (60,3 mg/100 mg s.m.) (tab. 1).

W obu preparatach stwierdzono dużą zawartość tanin skondensowanych w stosunku do polifenoli ogółem (tab. 1). Większą ich zawartością (61,2 mg/100 mg s.m.) charakteryzował się preparat z nasion 'Windsor Biały'. Zawartość tanin skondensowanych w preparacie otrzymanym z okrywy bobu 'Bartom' była mniejsza i wynosiła 54,6 mg/100 mg s.m. Należy jednak zauważyć, że zawartość tanin skondensowanych

zależy w dużym stopniu od sposobu ekstrakcji (temperatury, czasu, rodzaju rozpuszczalnika) oraz od odmiany nasion [10, 11]. Zastosowany w pracy sposób ekstrakcji według Tsudy i wsp. [17] powinien zapewniać efektywną izolację związków polifenolowych z roślin strączkowych. Według Siddhuraju i Beckera [12], którzy porównywali skuteczność ekstrakcji różnych mieszanin (woda, etanol-woda, metanol-woda, metanol-kwas solny, aceton-woda), największą wydajność procesu ekstrakcji uzyskuje się za pomocą mieszaniny metanolu z 1% kwasem solnym w przypadku izolowania polifenoli z roślin strączkowych i zbóż. Podobną metodę ekstrakcji zastosowano również w pracy Duenas i wsp. [1] do ekstrakcji polifenoli z okrywy nasiennych groszku.

Tabela 1

Zawartość polifenoli ogółem, antocyjanów i tanin skondensowanych w preparatach z okrywy nasion bobu. The content of total polyphenols, anthocyanins and condensed tannins in the preparations made of the broad bean seed coat.

Preparat Preparation	Polifenole ogółem Total polyphenols [mg/100 g s.m.] [mg/100 g d.m.]	Antocyjany Anthocyanins [mg/100 g s.m.] [mg/100 g d.m.]	Taniny skondensowane Condensed tannins [mg/100 g s.m.] [mg/100 g d.m.]
Windsor Biały	71,2 ± 0,1 b*	0,9 ± 0,6 a	61,2 ± 0,3 b
Bartom	60,3 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1 a	54,6 ± 0,2 a

Objaśnienia: / Explanatory notes:

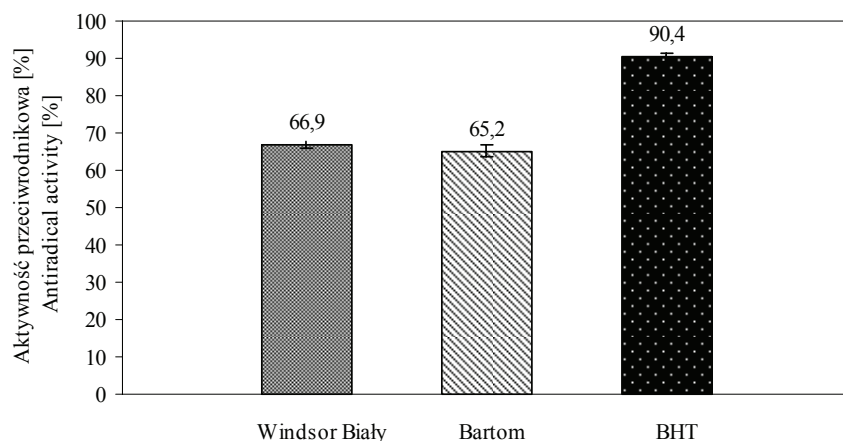
W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / In the Table, mean values ± standard deviations are shown.

* - wartości średnie w tej samej kolumnie oznaczone różnymi indeksami różnią się statystycznie istotnie między sobą ($\alpha = 0,05$) / mean values in the same column, which are denoted by different superscripts, differ statistically significant among each other ($\alpha = 0.05$).

Zawartość tanin skondensowanych oznaczana metodami chemicznymi może być często obarczona błędem, co spowodowane jest chociażby ich stopniem polimeryzacji. Z tego względu należy zachować dużą ostrożność przy porównywaniu ogólnej zawartości tanin skondensowanych oznaczanych różnymi metodami chemicznymi, podawanych przez różnych autorów [19].

Antocyjany występowały w małej ilości w preparatach z obu odmian bobu. Nieco więcej antocyjanów stwierdzono w preparacie z odmiany Windsor Biały (0,9 mg/100 mg s.m.). Tak mała zawartość tych związków wynika z niewielkiej intensywności zabarwienia okrywy nasiennej.

Najwyższą zdolność do inhibicji rodników DPPH (90%) uzyskał przeciwutleniacz syntetyczny (BHT), natomiast aktywność przeciwrodnikowa preparatów zawierała się w granicach od 65 do 70% (rys. 1). Oba preparaty charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwrodnikową i dezaktywowały ponad 50% rodników DPPH, przy czym większą zdolnością do inaktywacji syntetycznych rodników DPPH charakteryzował się preparat otrzymany z okryw nasiennych bobu odmiany Windsor Biały (66,9%).



Rys. 1. Aktywność przeciwrodnikowa preparatów z nasion bobu wobec stabilnych rodników DPPH.
Fig. 1. Antiradical activity of preparations made of broad bean seeds against the stable DPPH radicals.

W pracy stwierdzono dobrą korelację pomiędzy zawartością tanin skondensowanych a zdolnością preparatów okryw nasiennych bobu do wygaszania rodników DPPH (współczynniki korelacji powyżej $r = 0,96$). Można więc sądzić, że związki te mają silne działanie inhibycyjne wobec rodników DPPH. Wniosek ten znajduje potwierdzenie także w badaniach innych autorów. Rocha-Guzman i wsp. [8] również stwierdzili wysoką korelację między zawartością tanin skondensowanych a inaktywacją rodników DPPH w fasoli zwykłej. Badania Saint-Cricq de Gaulejac i wsp. [9] również dowiodły, że taniny skondensowane najskuteczniej wiążą rodniki DPPH. Cytowani autorzy prowadzili badania z okrywkami czerwonych winogron, identyfikując polifenole za pomocą rezonansu paramagnetycznego i stwierdzili, że to właśnie taniny są odpowiedzialne za efekt wygaszania stabilnych rodników DPPH w tym materiale roślinnym.

Otrzymane w niniejszej pracy preparaty dezaktywowały również rodniki hydroksylowe, jedne z najbardziej reaktywnych form tlenu. Tworzą się one zarówno w organizmie, jak i w żywności [16].

Podobnie, jak w przypadku rodników DPPH, stwierdzono, że wyższą aktywnością wobec rodników wodorotlenowych charakteryzował się preparat z okryw bobu odmiany Windsor Biały (50,4%). Aktywność drugiego preparatu była nieznacznie

niższa (49,8%). Polifenole zawarte w preparatach wykazywały aktywność przeciwutleniającą wobec rodników hydroksylowych zaraz po zapoczątkowaniu reakcji, a także po 10, 20 i 30 min jej trwania (tab. 2). W przypadku obu preparatów stwierdzono najwyższą aktywność po 30 min reakcji. Aktywność ta malała po dalszym przedłużeniu czasu reakcji. Z przedstawionych danych wynika, że w pierwszym okresie pomiarów inaktywacja rodników wodorotlenowych zachodziła w największym stopniu, natomiast w miarę upływu czasu reakcje te zachodziły coraz wolniej. Po 30 min inkubacji próbka bez dodatku preparatu osiągnęła maksymalną wartość fluorescencji.

W pracy stwierdzono nieznacznie lepszą efektywność przeciwutleniającą preparatu z okrywy nasiennej bobu 'Windsor Biały'. Można sądzić, że ma to związek z wyższą zawartością tanin skondensowanych w tym preparacie. W literaturze mało jest danych dotyczących zdolności naturalnych przeciwutleniaczy do wygaszania rodników wodorotlenowych. Saint-Cricq de Gaulejac i wsp. [9] wykazali, że w etanolowych ekstraktach z winogron zdolność do inaktywacji rodników wodorotlenowych związana jest ściśle z zawartością tanin skondensowanych. W niniejszej pracy nie stwierdzono takiej korelacji.

Tabela 2

Zdolność polifenoli zawartych w preparatach z nasion bobu do inibicji rodników wodorotlenowych.
The ability of polyphenols contained in the preparations made of broad bean seeds to inhibit hydroxyl radicals.

Mieszanina reakcyjna Reaction mixture	Fluorescencja w jedn. umownych Fluorescence in conventional units			
	0 min	10 min	20 min	30 min
H ₂ O ₂ /Cu ⁺² /DTET	398,55 ± 7,72	516,67 ± 2,82	901,87 ± 1,31	1003 ± 0,00
H ₂ O ₂ /Cu ⁺² /DTET + Windsor Biały	267,54 ± 5,45	367,56 ± 7,66	489,05 ± 8,45	505,47 ± 7,42
H ₂ O ₂ /Cu ⁺² /DTET + Bartom	299,15 ± 7,92	349,24 ± 4,23	491,10 ± 4,74	499,89 ± 8,67

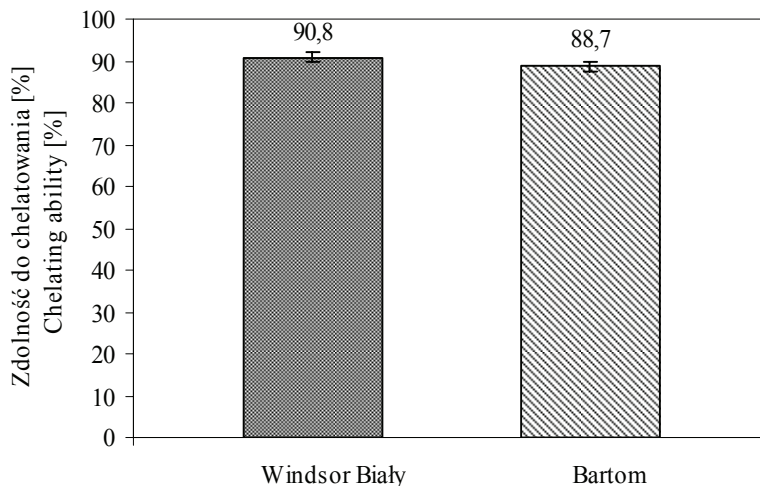
Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / In the Table, mean values ± standard deviations are shown.

Właściwości wiązania jonów metali przejściowych mają duży udział w aktywności przeciwutleniającej polifenoli, dlatego w pracy oznaczono zdolność preparatów z okryw nasion bobu do chelatowania jonów żelaza (II) (rys. 2).

Preparat z okrywy nasion bobu odmiany Windsor Biały wykazywał nieco większą zdolność do chelatowania jonów żelaza (ok. 91%). W preparacie tym stwierdzono również większą zawartość tanin skondensowanych. Z przeprowadzonej analizy regresji wynika, że współczynnik korelacji pomiędzy zawartością tanin skondensowanych a aktywnością preparatów do chelatowania jonów żelaza wynosi $r = 0,86$. Korelacja

okazała się statystycznie istotna ($\alpha = 0,05$). Podobną korelację uzyskał Siddhuraju [11], oznaczając zdolność do chelatowania jonów żelaza przez ekstrakty uzyskane z nasion fasoli (*Phaseolus aconitifolius*).



Rys. 2. Zdolność do chelatowania jonów żelaza(II) przez polifenole zawarte w preparatach z nasion bobu.

Fig. 2. The ability of polyphenols contained in the preparations made of broad bean seeds to chelate the Fe(II) ions.

Wnioski

1. Preparaty polifenoli otrzymane z okrywy nasion bobu 'Windsor Biały' i 'Bartom' wykazywały właściwości przeciwutleniające w badanych układach modelowych.
2. Preparaty otrzymane z okrywy nasion bobu 'Windsor Biały' wykazywały lepszą zdolność do dezaktywacji rodników niż preparat z okrywy nasion odmiany Bartom. Było to prawdopodobnie związane z większą zawartością w nim polifenoli ogółem i tanin skondensowanych.

Praca była prezentowana podczas XII Ogólnopolskiej Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Lublin, 23–24 maja 2007 r.

Literatura

- [1] Duenas M., Estrella I., Hernandez T.: Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). *Eur Food Res Technol.*, 2004, **219**, 116-123.
- [2] Hunt J.V., Simpson J.A., Dean R.T.: Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins. *Biochem. J.*, 1988, **250**, 87-93.
- [3] Karakaya S.: Bioavailability of phenolic compounds. *Food Sci.*, 2004, **44**, 453-464.

- [4] 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.
- [5] Price M.L., Van Scoyoc S., Butler L.G.: A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J. Agric. Food Chem., 1978, **26**, 1214-1218.
- [6] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS^{•+} radical cation decolorization assay. Free Rad. Biol. Med, 1999, **26**, 1231-1237.
- [7] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Panganga G.: Trends in plant sciences. Reviews., 1997, **2**, 152-159.
- [8] Rocha_Guzman N.E., Gonzalez-Laredo R.F., Ibarra-Perez F.J., Berumen C.A., Gallegos-Infante J-A.: Effect of pressure cooking on the antioxidant activity of extracts from three common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. Food Chem., 2007, **100**, 31-35.
- [9] Saint-Cricq de Gaulejac N., Provost C., Vivas N.: Comparative Study of Polyphenol Scavenging Activities Assessed by Different Methods. J. Agric. Food Chem., 1999, **47**, 425-431.
- [10] Shahidi F., Naczk M.: Effect of processing on the content of condensed tannins in rapeseed meals. J. Food Sci., 1989, **4**, 1082-1083.
- [11] Siddhuraju P.: The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) Marechal seed extracts. Food Chem., 2006, **99**, 149-157.
- [12] Siddhuraju P., Becker K.: Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera*) leaves. J. Agric. Food Chem., 2003, **51**, 2144-2155.
- [13] Slinkard K., Singleton V.L.: Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. Am. J. Enol. Vitic., 1977, **28**, 49-55.
- [14] Song T.T., Hendrich S., Murphy P.A.: Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. J. Agric. Food Chem., 1999, **47**, 1607-1610.
- [15] Swain T., Hillis W.: The phenolic constituents of *Prunus domestica*. J. Sci. Food Agric., 1959, **1**, 63-68.
- [16] Thomas M.J.: The role of free radicals and antioxidant. Nutr., 2000, **16**, 716-718.
- [17] Tsuda T., Ohshima K., Kawakishi S., Osawa T.: Antyoxydative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. J. Agric. Food Chem., 1994, **42**, 248-251.
- [18] Wang S.Y., Lin H-S.: Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivars and developmental stage. J. Agric. Food Chem., 2000, **48**, 140-146.
- [19] Wilska-Jeszka J.: Struktura i właściwości antyoksydacyjne polifenoli. II Konf. Nauk. „Żywność a Zdrowie”, Łódź, 1999, s. 27-36.
- [20] Wilska-Jeszka J., Stasiak A.: Polyphenol compounds in grain legumes. Bioactive substances in food of plant origin – Materials of the International Euro Food Tox IV Conference, Olsztyn 1994, **1**, 126-130.

ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF POLYPHENOLS CONTAINED IN THE SEED COATS OF BROAD BEAN

S u m m a r y

The objective of this thesis was to determine the antioxidative properties of the polyphenol preparations obtained from the seed coats of broad bean ('Windsor Biały' and 'Bartom'). The preparations were prepared by extracting polyphenols using a 0.5% HCl solution in methanol, condensing them under the vacuum conditions, and lyophilizing them.

In order to provide a chemical profile of the preparations obtained, the content of total polyphenols, condensed tannins, and anthocyanins were determined. While determining the antioxidative properties of the polyphenol preparations, their capacities to deactivate stable, synthetic DPPH radicals and hydroxyl radicals were identified and estimated. Additionally, the ability of the preparations produced to chelate the ions of iron II was studied.

It was found that the preparations studied exhibited antiradical activity both against the DPPH radicals (65-70%) and the hydroxyl radicals (48-50%). The preparations investigated also chelated the ions of iron (II). The preparation extracted from Windsor Biały was characterized by a stronger antiradical activity, and this could be probably caused by the higher content of polyphenols in this preparation.

Key words: seeds of broad bean, polyphenols, antioxidative properties, hydroxyl radicals, DPPH radicals 