

EWA SOSIŃSKA, MIECZYSLAW W. OBIEDZIŃSKI

BADANIA NAD BIOAKTYWNYMI GLUKOZYNOLANAMI W WYBRANYCH ODMIANACH WARZYW KRZYŻOWYCH TECHNIKĄ HPLC

Streszczenie

Celem pracy było określenie zawartości glukozynolanów w wybranych odmianach brokuła i kalafiora. Analizę jakościową i ilościową desulfoglukozynolanów wykonano przy użyciu chromatografu cieczowego zaopatrzonego w detektor UV. Glukozynolany ekstrahowano ze zliofilizowanych próbek gorącym meta-nolem, ekstrakty oczyszczano w kolumnkach z żywicą jonowymienną i przeprowadzano desulfatację. Stosowano glukotropeolinę jako standard wewnętrzny, a zawartość poszczególnych glukozynolanów przeliczano, uwzględniając współczynniki korekcyjne. Analizy confirmacyjne glukozynolanów przeprowadzano techniką LC-ESI/MS.

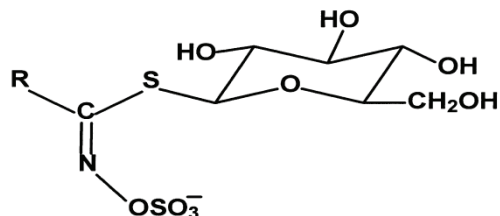
Spośród zidentyfikowanych w wybranych warzywach glukozynolanów dominowały: glukorafanina, glukobrassylicyna oraz neoglukobrassylicyna. Poszczególne odmiany brokułów (Cezar, Tiburon, Milady oraz Chevalier) i kalafiorów, pochodzące z pól uprawnych Wydziału Ogrodniczego SGGW, zbieranych między lipcem a październikiem 2006 r. różniły się między sobą zarówno pod względem profilu, jak i ilości glukozynolanów. Stwierdzono różnice zawartości i składu glukozynolanów w odmianie wysianej i zbieranej w różnym okresie czasu, a także pomiędzy poszczególnymi częściami morfologicznymi tej samej rośliny np. szczytu róży oraz łodygi.

Słowa kluczowe: brokuł, kalafior, glukozynolany, HPLC, identyfikacja

Wprowadzenie

Glukozynolany to roślinne siarkowe glikozydy, zawierające cząsteczkę glukozy (wiązaną β -D-tioglukozydowo), siarkę oraz łańcuch boczny, pochodną aminokwasową (rys. 1) [2, 6]. Glukozynolany można podzielić na trzy podstawowe grupy, w których łańcuch boczny pochodzi od następujących aminokwasów: alifatyczne – metionina, alanina, walina, leucyna i izoleucyna; aromatyczne – tyrozyna i fenyloalanina oraz indolowe – tryptofan.

Mgr inż. E. Sosińska, prof. dr hab. M. Obiedziński, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa



Rys. 1. Ogólna struktura glukozynolanów (R – boczny łańcuch, pochodna aminokwasu).

Fig. 1. Basic structure of glucosinolates (R – side chain, aminoacid's derivative).

Spośród roślin zawierających glukozynolany największe znaczenie w żywieniu mają: kapusta biała, czerwona, włoska, pekińska, brukselska, rzepak, rzepik oraz kalafior, brokuł, rzodkiew, rzodkiewka, kalarepa, jarmuż, rzeżucha, rukola, rukiew, gorczyca i chrzan, należące do rodziny *Brassicaceae* [2, 6].

Uważa się, że występowanie glukozynolanów w żywności nadaje jej funkcjonalny, prozdrowotny charakter, a warzywa kapustne uzyskały status żywności wspomagającej walkę z nowotworami. Wynika to z faktu, że glukozynolany ulegając degradacji enzymatycznej (przy udziale myrozynazy), termicznej lub przy udziale mikroflory jelitowej są prekursorami szerokiej gamy związków, które mogą wykazywać wielokierunkowe przeciwnowotworowe oddziaływanie. Profil glukozynolanów, a także ich zawartość jest różna w poszczególnych roślinach i ich odmianach. Ponadto na zawartość glukozynolanów mają wpływ warunki uprawy m.in. dostępność składników odżywczych, klimat czy termin zbioru [6].

Glukozynolany stanowią czynnik obronny roślin przed trawożnymi zwierzętami, patogenami i insektami, stąd nazywane są naturalnymi pestycydami [4, 5]. Niektóre z produktów ich hydrolizy wykazują działanie przeciwwirusowe, przeciwgrzybiczne oraz przeciwbakteryjne w odniesieniu do wielu ludzkich patogenów np. przeciwko *Helicobacter pylori*, zwiększającej ryzyko wystąpienia nowotworów żołądka [2, 8, 9].

Dieta odgrywa ogromną rolę w profilaktyce nowotworowej. Modyfikacja diety człowieka, prowadząca do dostarczenia związków biologicznie czynnych indukujących odpowiedni poziom ochrony, staje się najbardziej obiecującą strategią w tej profilaktyce. Stąd uwzględnianie w diecie roślin zawierających glukozynolany jest wskazane.

Celem pracy było określenie zawartości glukozynolanów w wybranych odmianach brokuła i kalafiora.

Material i metody badań

Materiał do badań stanowiły warzywa pochodzące z upraw Wydziału Ogrodniczego SGGW w Warszawie; zebrane w okresie lipiec - październik 2006 r. w stadium dojrzałości konsumpcyjnej. Wybrano następujące odmiany brokuła: Cezar – zbiór lipiec oraz październik, Tiburon i Chevalier – zbiór sierpień, Milady – zbiór wrzesień.

Analizowane też odmiany kalafiora: zielony Amfora – zbiór sierpień i październik, pomarańczowy – zbiór październik. Cyfrą rzymską, podawaną za nazwą odmiany, oznaczono miesiąc zbioru. Oznaczenia wykonywano w trzech powtórzeniach, wyniki podano jako wartości uśrednione.

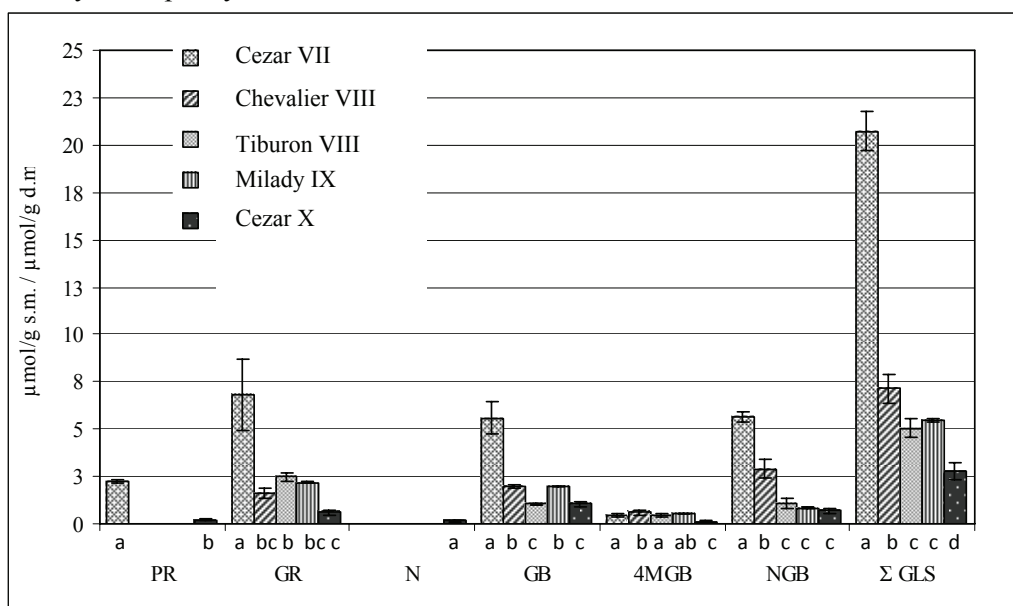
Podczas oznaczeń kierowano się zaleceniami zawartymi w PN-EN ISO 9167-1 [7]. Materiał do badań zamrażano, następnie liofilizowano i rozdrabniano. Glukozynolany ekstrahowano ze zliofilizowanych próbek gorącym 70% metanolem (75°C) po uprzednim dodatku standardu wewnętrznego – glukotropeoliny. Ekstrakty oczyszczano w kolumnkach z żywicą jonowymienną (Sephadex DEAE A25), przeprowadzano desulfatację, a desulfoglukozynolany wymywano wodą. Oznaczenie wykonywano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), stosując chromatograf cieczowy firmy Shimadzu z detektorem UV, współpracujący z programem obróbki danych LCMS Solution. Rozdział prowadzono w układzie faz odwróconych, kolumna Hypersil 5 μm C18 (10 mm x 4,6 mm) w temp. 30°C. Zastosowano elucję gradientową: woda (rozpuszczalnik A) oraz acetonitryl:woda (20:80) (rozpuszczalnik B) przy przepływie 0,5 ml/min. Program gradientowy: warunki początkowe 100% A do 1,5 min, zmniejszanie jego udziału do 60% do 8 min, a następnie do 40% do 10 min, natomiast w 18 min osiągnięto 100% B, utrzymując ten stan do 25 min, po czym stabilizowano układ w warunkach początkowych. Spektrofotometryczne oznaczenie desulfoglukozynolanów prowadzono przy długości fali $\lambda = 229$ nm. Identyfikację desulfoglukozynolanów prowadzono na podstawie porównania czasu ich retencji z wzorcami, a zawartość obliczano, wykorzystując standard wewnętrzny oraz uwzględniając przeliczniki korekcyjne. W obliczeniach uwzględniano jedynie te glukozynolany, których powierzchnia pod pikiem przekraczała 1% sumarycznej powierzchni wszystkich pików w badanej próbce. Dodatkowo prowadzono analizy confirmacyjne glukozynolanów za pomocą techniki LC-ESI/MS z zachowaniem warunków chromatografowania jak opisano wyżej, stosując dodatek octanu amonu (0,1%, v/v) do fazy ruchomej. Analizę statystyczną wyników wykonano za pomocą programu Statgraphics 4.1., testem LSD, przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

W badanych odmianach brokuła i kalafiora zidentyfikowano następujące glukozynolany alifatyczne: glucoiberyna (GI), progoitryna (PR), sinigryna (S), glukorafanina (GR), napoleiferyna (N), glukobrassicapina (GBN) oraz indolowe: 4-hydroksyglukobrassicyna (4HGB), glukobrassicyna (GB), 4-metoksyglukobrassicyna (4MGB) i neoglukobrassicyna (NB).

Spośród poszczególnych odmian brokuła największą, sumaryczną zawartością glukozynolanów charakteryzował się Cezar (20,7 $\mu\text{mol/g}$ s.m.), zbierany pod koniec lipca, natomiast najmniejszą Cezar X (2,8 $\mu\text{mol/g}$ s.m.), przy obserwowanym zróżnicowaniu glukozynolanów w brokułach (rys. 2). W przypadku pozostałych odmian bro-

kuła, które uzyskały dojrzałość konsumpcyjną w sierpniu i wrześniu, zawartość sumaryczna glukozyzolanów kształtowała się na poziomie ok. 5-7 $\mu\text{mol/g s.m.}$ Powyższe obserwacje są zgodne z innymi badaniami wykazującymi, że odmiana czy warunki uprawy mogą mieć wpływ na zawartość składników biologicznie aktywnych, w tym również glukozyzolanów [1, 3, 4]. Jak wykazano (na przykładzie odmian brokułów Cezar VII i Cezar X), większy wpływ na zawartość tych glukozydów miały warunki klimatyczne uprawy niż odmiana.



Objaśnienia: PR – progoitryna, GR – glukorafanina, N – napoleiferyna, GB – glukobrassycyna, 4MGB - 4-metoksyglukobrassycyna, NGB – neoglukobrassycyna, Σ GLS – sumaryczna zawartość glukozyzolanów. a, b, c, d – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w obrębie danego glukozyzolanu nie różnią się statystycznie istotnie. Cyfry rzymskie po nazwie odmiany oznaczają miesiąc zbioru w 2006 r.

Explanatory notes: PR – progoitrin, GR – glucoraphanin, N – napoleiferin, GB – glucobrassicin, 4MGB - 4-methoxyglucobrassicin, NGB – neoglucobrassicin, Σ GLS – total glucosinolates content. a, b, c, d – mean values marked with the same letter for particular glucosinolate indicate lack of statistical significant differences. Roman numeral after name of variety means the month of harvest in 2006.

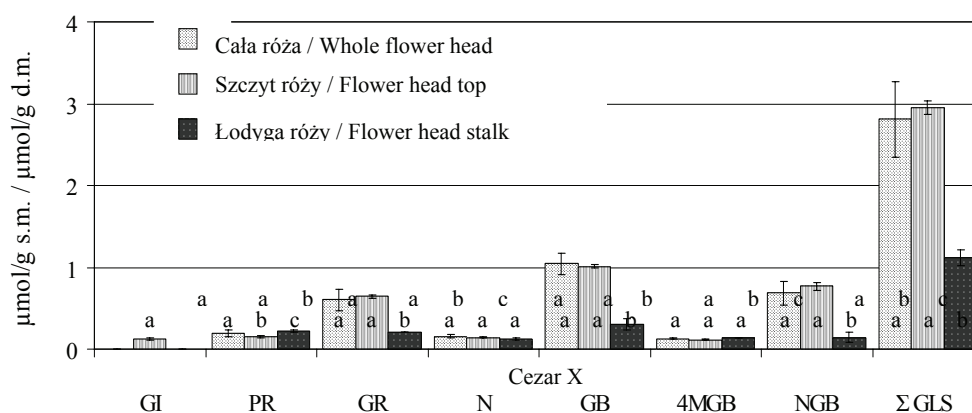
Rys. 2. Zawartość glukozyzolanów: poszczególnych i ogółem w badanych odmianach brokuła.

Fig. 2. Individual and total glucosinolates content in tested broccoli varieties.

Najbardziej pożądanymi glukozyzolanami w warzywach kapustnych są glukorafanina oraz glukobrassycyna, prekursorzy odpowiednio sulforafanu oraz indolo-3-karbinolu. Tym produktom rozpadu przypisywana jest największa aktywność w zmniejszaniu ryzyka wystąpienia nowotworów [8]. Wśród badanych brokułów po-

nad połowę glukozynolanów stanowiły właśnie glukorafanina i glukobrassycyna, od 51% w odmianie Chevalier VIII do ponad 75% w przypadku Milady IX.

Wykazano wyższą sumaryczną zawartość glukozynolanów w szczycie róży niż w jej łodydze w odmianach brokuła Chevalier VIII oraz Cezar X, stąd nasuwa się wniosek, że poszczególne odmienne morfologicznie części rośliny produkują i/lub kumulują glukozynolany w różny sposób (rys. 3). Statystycznie istotne różnice między zawartością poszczególnych glukozynolanów stwierdzono we wszystkich przypadkach między szczytem róży a łodygą (oprócz napoleiferyny oraz 4-metoksyglukograssycyny w brokule odmiany Cezar X).



Objaśnienia: jak pod rys. 2 oraz GI – glucoiberyna.
Explanatory notes: as in Fig. 2 and GI – glucoiberin.

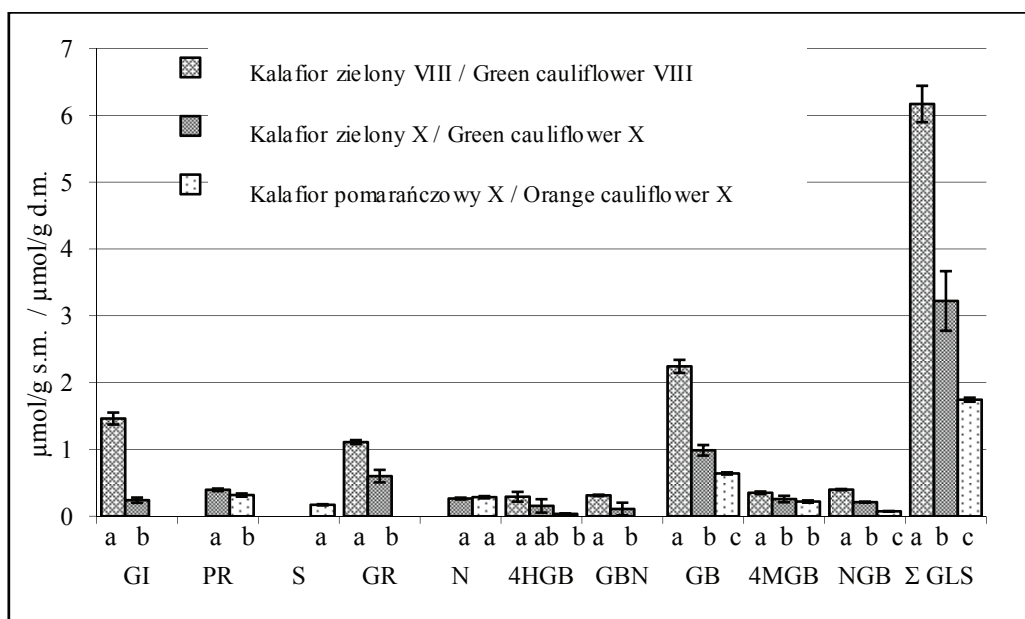
Rys. 3. Zawartość glukozynolanów, poszczególnych i ogółem, w różnych morfologicznie częściach dwóch odmian brokuła.

Fig. 3. Individual and total glucosinolates content in different morphological part in two broccoli varieties

Profil glukozynolanów badanych odmian kalafiora był bogatszy niż odmian brokuła (rys. 2 i 4). Wśród badanych odmian najbardziej zróżnicowany pod względem profilu glukozynolanów był kalafior zielony, który osiągnął dojrzałość w październiku, natomiast najmniej – pomarańczowy X, który charakteryzował się również najmniejszą ich zawartością (1,7 μmol/g s.m.) (rys. 4). Największą sumaryczną zawartość glukozynolanów oznaczono w kalafiorze zielonym VIII (6,2 μmol/g s.m.). Glukobrassycyna we wszystkich badanych odmianach stanowiła ponad 30% sumarycznej zawartości glukozynolanów.

Porównując zawartość sumaryczną glukozynolanów we wszystkich badanych warzywach można wnioskować, że zarówno odmiana, warunki uprawy, jak i część morfologiczna rośliny determinują nie tylko zawartość glukozynolanów, ale także ich profil.

Ponadto w przypadku brokuła ‘Cezar’ oraz zielonego kalafiora zaobserwowano, że warzywa wysiane na wiosnę i zbierane w lecie charakteryzowały się wyższą zawartością glukozynolanów, od tych wysianych latem, osiągających dojrzałość jesienią (rys. 2 i 4). Niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań dotyczących nie tylko zmienności zawartości glukozynolanów, ale także ich wzajemnych relacji z innymi składnikami warzyw.



Objaśnienia: jak pod rys. 2 i 3 oraz S – sinigrina, 4HGB – 4-hydroksyglukobrassicyna, GBN – glukobras-sicanapina.

Explanatory notes: as in fig. 2 and 3, and S – sinigrin, 4HGB – 4-hydroxyglucobrassicin, GBN – glucobrassicinapina.

Rys. 4. Zawartość glukozynolanów, poszczególnych i ogółem, w odmianach kalafiora.

Fig. 4. Individual and total glucosinolates content in cauliflower varieties.

Wnioski

1. Spośród zidentyfikowanych glukozynolanów, w brokułach i kalafiorach domino-wały: glukorafanina, glukobrassicyna oraz neoglukobrassicyna.
2. Poszczególne odmiany brokułów czy kalafiorów zbieranych między lipcem a październikiem 2006 r. różniły się między sobą zarówno pod względem profilu, jak i zawartości glukozynolanów. Największą zawartością glukozynolanów charakteryzował się brokuł odmiany Cezar zebrany w lipcu.

3. W przypadku brokuła 'Cezar' oraz zielonego kalafiora stwierdzono, że warzywa wysiane na wiosnę i zbierane w lecie charakteryzowały się większą zawartością glukozynolanów niż wysiane latem, a osiągające dojrzałość jesienią.
4. Zaobserwowano większą zawartość glukozynolanów w szczycie róży niż w jej łodydze w odmianach brokuła: Chevalier, który dojrzałość konsumpcyjną osiągnął w sierpniu, oraz Cezar, którego zbiór przypadł na październik.

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

Literatura

- [1] Van Doorn J.E., van der Kruk G.C., van Holst G.J., Schoofs M., Broer J.B., de Nijs J.J.M.: Quantitative inheritance of progoitrin and sinigrin content in Brussels sprouts. *Euphytica*, 1999, **108**, 41-52.
- [2] Fahey J.W., Zalcmann A.T., Talalay P.: The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 2001, **56**, 5-51.
- [3] Heaney R.K., Fenwick G.R.: Glucosinolates in Brassica vegetables: analysis of 22 varieties of Brussels sprouts. *J. Sci. F. Agri.*, 1980, **31**, 785-793.
- [4] McNaughton S.A., Marks G.C.: Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables. *Br. J. Nutr.*, 2003, **90**, 687-697.
- [5] Mikkelsen M.D., Petersen B.L., Olsen C.E., Halkier B.A.: Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. Review Article. *Amino Acids*, 2002, **22**, 279-295.
- [6] Mithen R.F., Dekker M., Verkerk R., Rabot S., Johnson I.T.: The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *J. Sci. F. Agric.*, 2000, **80**, 967-984.
- [7] PN-EN ISO 9167-1. Nasiona rzepaku. Oznaczanie zawartości glukozynolanów. Metoda z zastosowaniem wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej.
- [8] Vaughn S.F., Berhow M.A.: Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Crops and Products*, 2005, **21** (2), 193-202.
- [9] Verhoeven D.T.H., Verhagen H., Goldbohm R.A., van den Brandt P.A., van Poppel G.: A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by Brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions*, 1997, **103**, 79-129.

INVESTIGATION ON BIOACTIVE GLUCOSINOLATES IN CHOSEN CRUCIFEROUS VEGETABLES VARIETIES BY HPLC

S u m m a r y

The aim of this paper was the determination of glucosinolates in chosen broccoli and cauliflower varieties. Qualitative and quantitative analysis has been carried using liquid chromatograph with UV detector. Glucosinolates were extracted from lyophilized samples with hot methanol, extracts were purified on ion exchange columns and desulfation was carried. Glucotropaeolin was used as an internal standard, and content of individual glucosinolate has been calculated taking into consideration relative response factor. Confirmation of glucosinolates were conducted using LC-ESI/MS.

Among identified glucosinolates in chosen vegetables most abundant were: glucoraphanin, glucobrassicin and neoglucobrassicin. Each broccoli varieties (Cezar, Tiburon, Milady and Chevalier) as cauliflower varieties, cultivated on Horticultural Faculty of Warsaw Agricultural University fields, harvested between July and October 2006, were different both profile as content of glucosinolates. The differences were in glucosinolates' content and composition for the same variety sew and harvested in varied time period, moreover differences between particular morphological parts of the same plant as flower head top or stalk.

Key words: broccoli, cauliflower, glucosinolates, HPLC, identification 