

ALICJA SKRZYPEK, EWA MAKARSKA, WANDA KOCIUBA,
MAREK STUDZIŃSKI

AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA I ZAWARTOŚĆ LIPIDÓW REZORCYNOLOWYCH W ZIARNIE MIESZAŃCOWYCH RODÓW PSZENŻYTA OZIMEGO

Streszczenie

Materiał badawczy stanowiły ziarniaki 5 nowych rodów mieszańcowych pszenżyta ozimego oraz ich formy rodzicielskie. Technika TLC i spektrometrią UV-VIS potwierdzono obecność alkilorezorcynoli w otrzymanych z ziarna ekstraktach i oznaczono ich zawartość. Poziom alkilorezorcynoli w 3 rodach mieszańcowych był istotnie niższy, w porównaniu z obu formami rodzicielskimi, a w 2 pozostałych przewyższał te formy. W ekstraktach lipidów rezorcynolowych określono aktywność przeciwutleniającą metodą neutralizacji wolnych rodników wobec DPPH• (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl). Ekstrakty alkilorezorcynoli mieszańców charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwutleniającą w porównaniu z ekstraktami otrzymanymi z ich form matecznych, ale niższą niż form ojcowskich.

Słowa kluczowe: alkilorezorcynole, aktywność przeciwutleniająca, pszenżyto, ziarniaki mieszańców

Wprowadzenie

W ziarnach zbóż obok składników odżywczych występują związki, które mają negatywny wpływ na zdrowie i rozwój zwierząt. Jest to dość liczna grupa związków, do której zalicza się m.in.: inhibitory proteaz, nieskrobiowe polisacharydy oraz lipidy rezorcynolowe [7].

Biologiczna rola tych ostatnich jest ciągle poddawana badaniom. Dzięki swym właściwościom amfifilowym oddziałują z błonami biologicznymi, wpływając na zmianę ich struktury i funkcji [7]. Charakter amfifilowy tych związków sprawia, że mogą hamować reakcje indukowane wolnymi rodnikami zarówno w środowisku hydrofobowym, jak i hydrofilowym. Badania wykazujące efekty inhibicyjne alkilorezorcynoli w stosunku do lipooksygenaz oraz wykazane ich właściwości przeciwutleniające sugerują możliwość wykorzystania tych związków w żywieniu człowieka, dietetyce czy

Mgr A. Skrzypek, prof. dr hab. E. Makarska, mgr M. Studziński, Katedra Chemii, dr hab. prof. W. Kociuba, Instytut Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza, ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

w terapii [5, 7, 8, 17]. Chronią organizm ludzki przed chorobami, w tym nowotworowymi i układu krążenia. Odgrywają również istotną rolę w procesach przemian kwasów tłuszczowych i fosfolipidów [2, 17].

Lipidy rezorcynolowe są grupą związków będących długołańcuchowymi pochodnymi 1,3-dwuhydroksy-5-alk(en)ylbenzenu, są więc homologami orcyny. Wykazano, że praktycznie wszystkie obecne w ziarnie zbóż alkilorezorcynole są zawarte w zewnętrznej kutikuli. Ziarniaki duże w porównaniu z małymi są uboższe w te związki [11, 16]. Charakterystyczną cechą lipidów alkilorezorcynolowych jest występowanie w nich wielu homologów łańcuchowych. Wyodrębniono homologi nasycone, jednonienasycone, a także dwunienasycone. W każdej z tych grup występują homologi mające nieparzystą liczbę atomów węgla w łańcuchach alifatycznych – w ziarniakach pszenżyta dominują homologi od C_{15} do C_{22} [6].

W procesie hodowli nowych odmian pszenżyta istotna jest jak najwcześniejsza selekcja pod względem wartości odżywczej oraz poziomu związków przeciwżywniowych. Obecność genetycznie uwarunkowanych różnic zawartości alkilorezorcynoli w ziarnie pszenżyta w dużym stopniu determinuje wartość żywieniową pasz otrzymanych po przemiale. Według danych literaturowych, alkilorezorcynole współdziałają z innymi związkami obecnymi w ziarnie, wpływając na zmniejszenie przyrostu masy ciała zwierząt. Podawanie syntetycznych pochodnych rezorcyny nie daje tak niekorzystnych efektów, jakie powodują naturalne składniki zbóż. Skarmianie ziarnem zbóż, z którego wyekstrahowano alkilorezorcynole podwyższa efekty produkcyjne zwierząt [13].

Celem podjętych badań było określenie zawartości alkilorezorcynoli w ziarniakach mieszańców pszenżyta ozimego i w ich formach rodzicielskich oraz określenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktów ww. związków metodą neutralizacji wolnych rodników DPPH^{*}.

Material i metody badań

Material badawczy stanowiły ziarniaki 5 mieszańcowych rodów pszenżyta oraz ich formy rodzicielskie (tab. 1) ustalone morfologicznie i wyselekcjonowane w Instytucie Genetyki i Hodowli Roślin AR w Lublinie. Celem krzyżowania była poprawa cech jakościowych ziarna przy utrzymaniu wysokich cech plonotwórczych.

Ekstrakcję alkilorezorcynoli z ziaren pszenżyta przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Tłuscika i wsp. [16]. Całe ziarna ekstrahowano acetonem (25 ml) przez 24 h w temperaturze pokojowej. Ekstrakty sączono przy użyciu pompy próżniowej, przemywając niewielką ilością acetonu. Ziarna ponownie poddawano ekstrakcji w acetonie (25 ml) przez kolejne 24 h; wyciągi łączono.

T a b e l a 1

Materiał badawczy.
The study material.

Lp No	Ród / Odmiana pszenżyta ozimego Strain / Variety of winter triticale
1	Forma mateczna / Maternal form = IGS 5101
2	Forma mateczna / Maternal form = FDT 975
3	Forma mateczna / Maternal form = Alzo
4	Forma ojcowska / Paternal form = LAD 122
5	Forma ojcowska / Paternal form = F 8063
6	Mieszaniec / Hybrid IGS 5101 × LAD 122
7	Mieszaniec / Hybrid IGS 5101 × F 8063
8	Mieszaniec / Hybrid FDT 975 × LAD 122
9	Mieszaniec / Hybrid Alzo × LAD 122
10	Mieszaniec / Hybrid Alzo × F 8063

Zawartość alkilorezorcynoli oznaczano z ekstraktów acetonowych, tworząc barwny kompleks z dwuazowaną p-nitroaniliną. Oznaczenie spektrofotometryczne prowadzono przy użyciu spektrofotometru Cary 50 Bio przy długości fali $\lambda = 435$ nm. Do sporządzenia krzywej wzorcowej zastosowano orcynol (5-metylo-1,3-dihydroksobenzen) firmy Sigma. Sprawdzono czy wyekstrahowane związki wywołują widmo UV charakterystyczne dla 5-n-alkilowych pochodnych rezorcyny. W tym celu z ekstraktów acetonowych odparowywano aceton w wyparce próżniowej, a otrzymaną pozostałość tzw. olej acetonowy rozpuszczano w metanolu (4 ml). Absorbancję olejków acetonowych i orcynolu w roztworach metanolowych mierzono w zakresie 240-400 nm. Obecność lipidów rezorcynolowych w uzyskanych ekstraktach analizowano również stosując chromatografię cienkowarstwową [16]. Do badań zastosowano płytki pokryte żelem krzemionkowym Si 60 firmy Merck z czynnikiem fluorescencyjnym. Ekstrakty nanoszono na płytki i rozwijano w układzie chloroform – aceton (95:5) na długości 8 cm. Wysuszoną płytkę wywoływano przez spryskanie jej roztworem Fast Blue B firmy Aldrich. Detekcję prowadzono w świetle widzialnym za pomocą wideokamery Camag Reprostar 3. Ewaluację otrzymanych obrazów cyfrowych wykonywano za pomocą programu Camag VideoScan v 1.01.

Aktywność przeciwutleniającą ekstraktów alkilorezorcynoli z pszenżyta oznaczano wobec rodnika DPPH[•] (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl), firmy Sigma, stosując metodę opisaną przez Brand-Williamsa i wsp. [1] oraz Sanchez-Moreno i wsp. [15]. Do 0,1 ml ekstraktu dodawano 3,9 ml rodnika o stężeniu 6×10^{-5} mol·dm⁻³ i mierzono war-

tość absorbancji przy długości fali $\lambda = 515$ nm w 5-minutowych odstępach. Aktywność przeciwutleniającą wyrażoną jako procent inhibicji obliczano z równania:

$$[\%] \text{ inhibicji} = [(Ac(0) - Aa(t)) / Ac(0)] \times 100$$

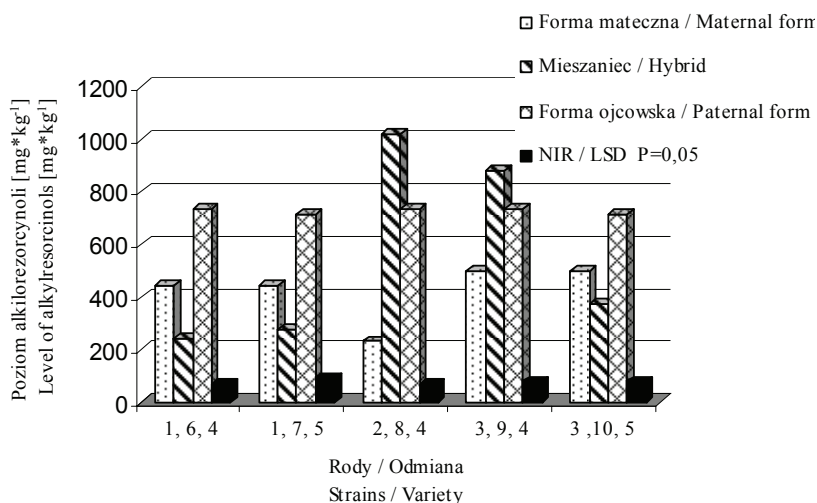
Ac(0) – absorbancja próby kontrolnej w czasie $t = 0$

Aa(t) – absorbancja badanej próby mierzona co 5 min.

Wyniki badań zawartości alkilorezorcynoli oceniono metodą analizy wariancji jednoczynnikowej z zastosowaniem testu Tukeya, wyznaczając najmniejszą istotną różnicę (NIR) przy poziomie ufności $P = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Zawartość alkilorezorcynoli w ziarniakach badanych mieszańców i ich form rodzicielskich pszenżyta ozimego wahała się w granicach od 242 do 1021 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ ziarna (rys. 1). Stwierdzono, że formy ojcowskie, w porównaniu z formami matecznymi, odznaczały się istotnie większą zawartością tych związków. Nie stwierdzono jednak proporcjonalnej zależności pomiędzy zawartością alkilorezorcynoli w mieszańcach a ich ilością w odpowiednich formach rodzicielskich.



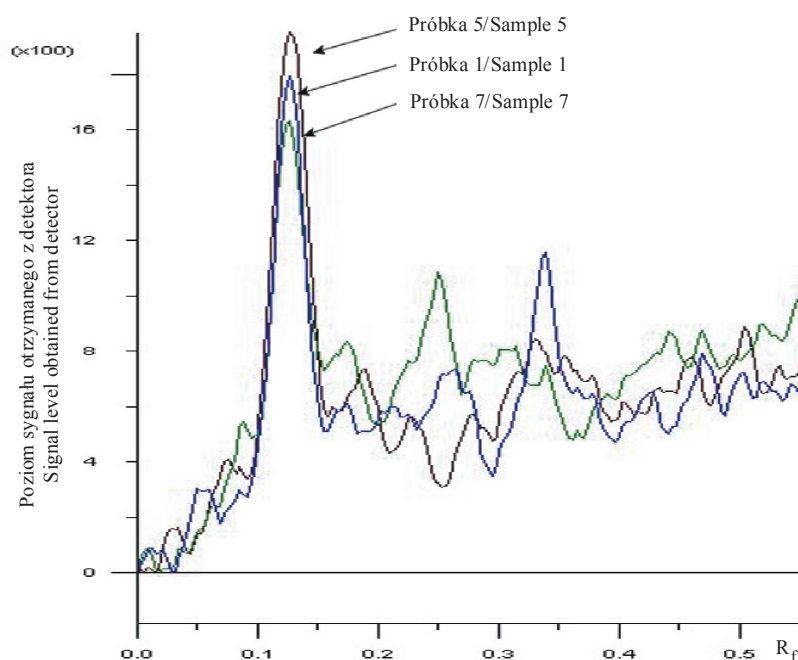
Rys. 1. Zawartość alkilorezorcynoli w ziarnie pszenżyta ozimego [$\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$].

Fig. 1. Alkylresorcinols content in winter triticale grain [$\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$].

Poziom alkilorezorcynoli w trzech rodach mieszańcowych tj. nr 6, 7, 10 (rys. 1) był istotnie niższy w odniesieniu do obu form rodzicielskich i wahał się między 242 a 375 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ ziarna. Pozostałe dwa rody mieszańcowe tj. 8 i 9 wykazywały istotnie wyższy poziom lipidów rezorcynolowych w porównaniu z komponentami rodzicielskimi. Badania oceniające różnice zawartości lipidów rezorcynolowych w ziarniakach

mieszańcowych i formach rodzicielskich, zwłaszcza we wczesnych pokoleniach, są ważne, gdyż pozwalają na selekcję genotypów o niskim poziomie tych związków [9, 10].

W celu dokumentacji wyników wykonano zestawienie widm UV metanolowych olejków alkilorezorcynoli uzyskanych z form rodzicielskich i mieszańców oraz widmo orcynolu. Widma olejków alkilorezorcynoli wykazywały dwa maksima przy długości fali 276 i 282 nm charakterystyczne dla orcynolu. Ekstrakty zawierające lipidy rezorcynolowe analizowano również techniką chromatografii cienkowarstwowej. Otrzymane chromatogramy plamkowe próbek (1÷10) wykazywały swoistą fioletowoczerwoną barwę. Po obróbce densytometrycznej chromatogramów próbek nr 1, 5 i 7 otrzymano charakterystyczne dla tych związków piki przy wartościach R_f ok. 1,2 (rys. 2).



1- forma mateczna (IGS 5101), 5 - forma ojcowska (F 8063), 7 - mieszańiec (IGS 5101×F 8063) pszenżyta ozimego / maternal form (IGS 5101), 5 - paternal form (F 8063), 7 – hybrid (IGS 5101×F 8063) – of winter triticale

Rys. 2. Densytogram ekstraktów uzyskanych z ziarna pszenżyta ozimego.

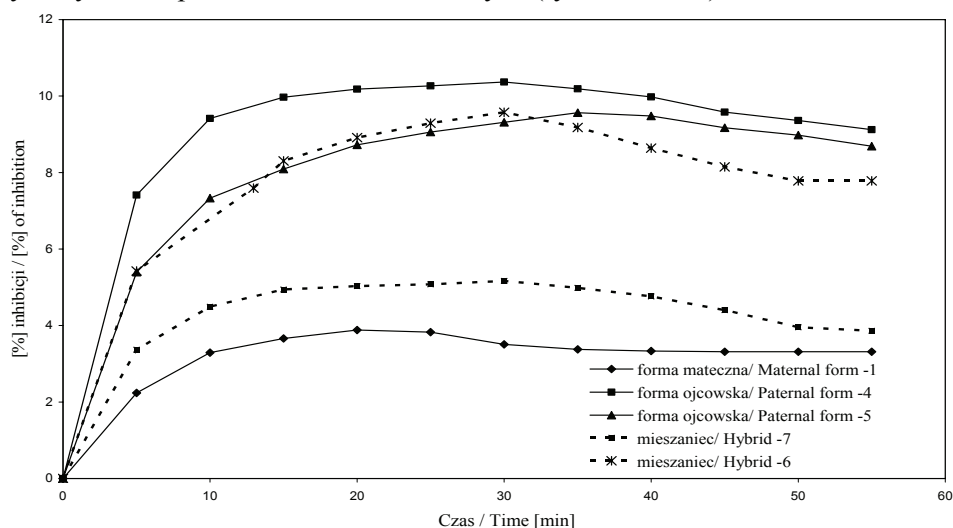
Fig. 2. The densitogram of extracts gained from winter triticale grain.

Całkowita aktywność przeciwutleniająca danego układu jest efektem współdziałania obecnych antyoksydantów i prooksydantów [3]. W niniejszej pracy zbadano zmiany absorbancji zachodzące podczas redukcji stabilnego wolnego rodnika DPPH[•]

przez bioaktywne lipidy rezorcynolowe obecne w metanолоwych ekstraktach z pszenżyta.

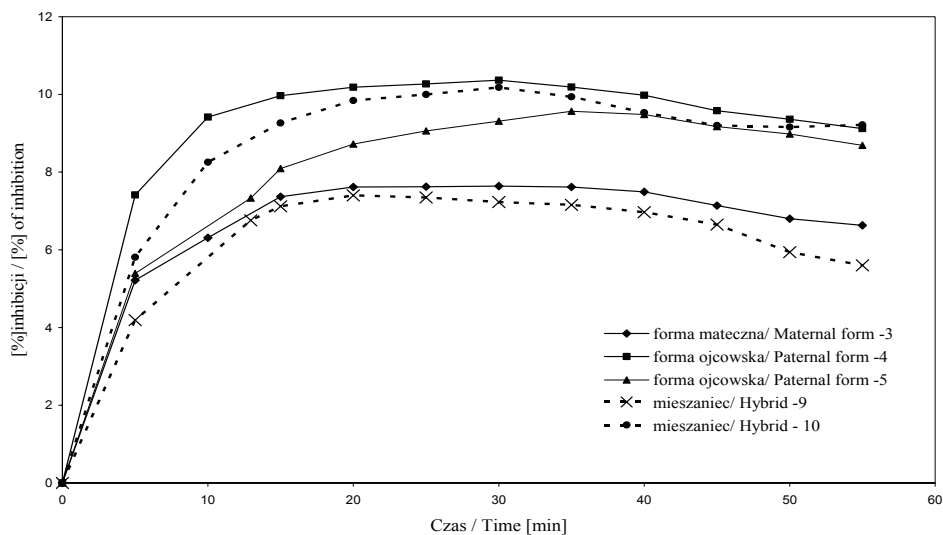
W czasie godzinnej inkubacji z DPPH[•] metanолоwe ekstrakty alkilorezorcynoli wykazywały zdolność do hamowania reakcji rodnikowej w czasie pierwszych 30 min, kiedy stwierdzono zmniejszenie stężenia rodników DPPH[•]. Odpowiadał temu wzrost aktywności przeciwutleniającej (jako procent inhibicji) od 3,7 do 10,4% (rys. 3a, 3b, 3c). Wyniki te potwierdzają badania innych autorów [12] wykazujące, że obniżenie koncentracji DPPH[•] wobec roślinnych przeciwutleniaczy dobrze charakteryzuje początkowe tempo reakcji.

Aktywność przeciwutleniająca badanych ekstraktów alkilorezorcynoli była niska (ok. 10% inhibicji). Otrzymane wyniki potwierdzają badania Kamal-Eldina i wsp. [5], którzy stwierdzili, że alkilorezorcynole wykazują stosunkowo niewielki efekt antyrodnikowy wobec DPPH[•]. Ekstrakty alkilorezorcynoli otrzymane z form mieszańców wykazywały zwykle wyższą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu z ekstraktami otrzymanymi z odpowiednich form matecznych (rys. 3a, 3b, 3c).



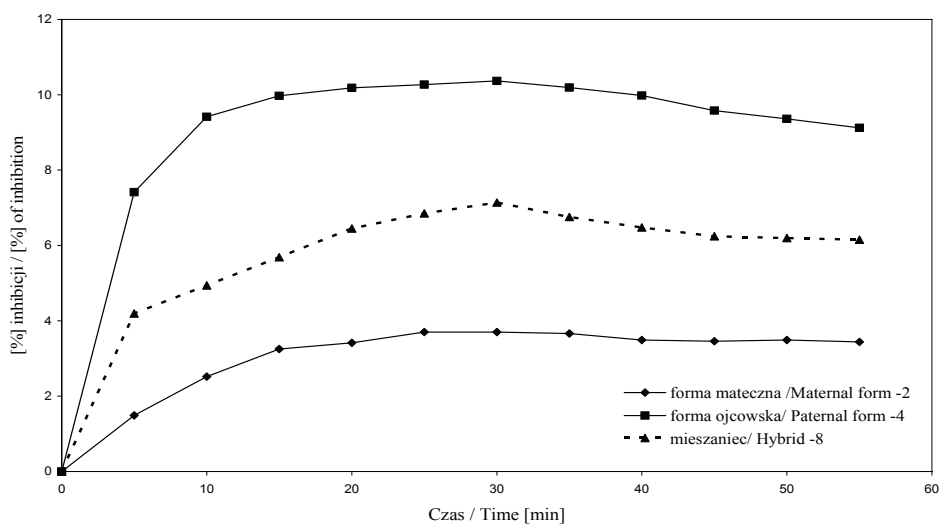
Rys. 3 a. Wpływ czasu inkubacji na aktywność przeciwutleniającą ekstraktów metanолоwych alkilorezorcynoli próbek nr 1, 4, 5, 6, 7 wobec DPPH[•] [% inhibicji].

Fig. 3 a. Influence of incubation time on antioxidant activity of methanolic extracts of alkylresorcinols samples 1, 4, 5, 6, 7 against DPPH[•] [% of inhibition].



Rys. 3b. Wpływ czasu inkubacji na aktywność przeciwutleniającą ekstraktów metanolowych alkilrezorcynoli próbek nr 3, 4, 5, 9, 10 wobec DPPH* [% inhibicji].

Fig. 3b. Influence of incubation time on antioxidant activity of methanolic extracts of alkylresorcinols samples 3, 4, 5, 9, 10 against DPPH* [% of inhibition].



Rys. 3c. Wpływ czasu inkubacji na aktywność przeciwutleniającą ekstraktów metanolowych alkilrezorcynoli próbek nr 2, 4, 8 wobec DPPH* [% inhibicji].

Fig. 3c. Influence of incubation time on antioxidant activity of methanolic extracts of alkylresorcinols samples 2, 4, 8 against DPPH* [% of inhibition].

Wyjątek stanowił ród mieszańca nr 9 (Alzo×LAD 122), który wykazywał zdolność do neutralizacji wolnych rodników DPPH niższą niż u obu form rodzicielskich (rys. 3b).

Ekstrakty uzyskane z ziaren form ojcowskich pszenżyta charakteryzowały się najwyższym efektem przeciwutleniającym. Nie stwierdzono proporcjonalnej zależności pomiędzy zawartością alkilorezorcynoli w ekstraktach, a ich zdolnością przeciwutleniającą. Emmons i Peterson [4] badając poziom związków fenolowych i ich aktywność przeciwutleniającą w ziarniakach owsa stwierdzili, że odmiana i miejsce uprawy ma istotny wpływ na zawartość pochodnych fenoli, ale nie ma wpływu na ich właściwości przeciwutleniające.

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

Wnioski

0. Poziom alkilorezorcynoli w ziarniakach ocenianych rodów mieszańcowych był zróżnicowany, niezależnie od ich zawartości w formach rodzicielskich.
0. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów alkilorezorcynoli wyizolowanych z ziarniaków mieszańcowych była zwykle pośrednia, w porównaniu z odpowiednimi komponentami rodzicielskimi; najwyższą aktywnością charakteryzowały się formy ojcowskie.
0. Nie stwierdzono proporcjonalnej zależności pomiędzy zawartością lipidów rezorcynolowych w ekstraktach z ziarna badanych rodów a ich aktywnością przeciwutleniającą.

Literatura

- [1] Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C.: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.*, 1995, **28**, 25-30.
- [2] Baublis A.J., Clydesdale F.M., Decker E.A.: Antioxidants in wheat-based breakfast cereals. *Cereal Food World*, 2000, 45 (21), 71-74.
- [3] Emmons C.L., Peterson D.M., Paul G.L.: Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) Extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 4894-4898.
- [4] Emmons C.L., Peterson D.: Antioxidant activity and phenolic content of oat as affected by cultivar and location. *Crop Sci.*, 2001, **41**, 1676-1681.
- [5] Kamal-Eldin A., Pour A., Eliasson Ch., Aman P.: Alkylresorcinols as antioxidants: hydrogen donation and peroxy radical-scavenging effects. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **81**, 353-356.
- [6] Kozubek A.: Thin-layer chromatographic mapping of 5-n-alk(en)ylresorcinol homologues from cereal grains. *J. Chromatogr.*, 1984, **295**, 304-307.
- [7] Kozubek A.: Interaction of alkylresorcinols with proteins. *Acta Bioch. Pol.*, 1995, **42** (2), 241-246.

- [8] Kozubek A., Tyman J. H.: Resorcinolic lipids, the natural nonisoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 1-25.
- [9] Makarska E., Gruszecka D.: Antitrypsin activity and level of alkylresorcinols in hybrid kernels of x triticosecale wittmack with *Agrotriticum* and in parental forms. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1998, **7/48 (3)**, 431-435.
- [10] Makarska E., Gruszecka D., Wojciechowska M.: Biologicznie aktywne nieodżywcze składniki ziarniaków pszenżyta oraz mieszańców pszenżyta z kozięcami. *Biul. IHAR*, 1999, **211**, 177-183.
- [11] Mejbbaum-Katzenellenbogen W., Tłuścik F., Kozubek A.: Alkylresorcinols of rye (*Secale cereale* L.) caryopses. *Acta Soc. Bot. Polon.*, 1978, **47 (4)**, 379-389.
- [12] Peterson D. M., Hahn M. J., Emmons Ch. L.: Oat avenanthramides exhibit antioxidants activities in vitro. *Food Chemistry*, 2002, **79**, 473-478.
- [13] Rakowska M.: Wartość pokarmowa polskich odmian pszenżyta ozimego i jarego. *Mat. Symp. Nauk.*, "Agrotechnika i spożytkowanie pszenżyta", Warszawa 2002.
- [14] Struski Z., Kozubek A.: Cereal grain alk(en)ylresorcinols protect lipids against ferrous ions-included peroxidation. *Z. Naturforsch.*, 1992, **10**, 47-50.
- [15] Sanchez-Moreno C., Larrauri J., Saura-Calixto F.: A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 1998, **76**, 270-276.
- [16] Tłuścik F.: Localization of the alkylresorcinols in rye and wheat caryopses. *Acta Soc. Bot. Polon.*, 1978, **44 (4)**, 211-218.
- [17] Zubik L., Kozubek A.: Przeciwiutleniające właściwości lipidów rezorcynolowych – badania eksperymentalne i modelowe. *Mat.*, XXXII Zjazdu P. T. Bioch., Kraków 1996, s. 214.

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CONTENT OF RESORCINOL OF LIPIDS IN HYBRIDS STRAIN OF WINTER TRITICALE

S u m m a r y

The grains of 5 new strains hybrid of winter triticale and their parental forms were the material for the study. The samples was analyzed by thin-layer chromatography and spectrometry UV -VIS. The level of alkylresorcinols in the 3 strains hybrids the greater part was significantly less in compare with the both parental forms, and in the 2 others was higher than that forms. The antioxidant properties of alkylresorcinols were examined using free radical scavenging method against stable 2,2 - diphenyl - 1- picrylhydrazyl radical (DPPH^{*}). The hybrids displayed higher antioxidant activity as compared to the triticale maternal components, but lower than paternal forms.

Key words: alkylresorcinols, antioxidant activity, triticale, hybrid kernels 