

ANETA JAROSŁAWSKA, ANNA SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, JAN OSZMIAŃSKI

STABILIZACJA EMULSJI OLEJOWYCH ANTYOKSYDANTAMI NATURALNYMI

Streszczenie

Porównano aktywność przeciwutleniającą naturalnych związków polifenolowych z tarczycy bajkałskiej, głogu oraz sosny z właściwościami przeciwutleniającymi α -tokoferolu, β -karotenu, kwasu askorbinowego oraz kwasu cytrynowego w emulsji olejowej. Stwierdzono, że preparaty pochodzenia roślinnego wykazują większą zdolność do hamowania niekorzystnych przemian w roztworach emulsyjnych niż użyte witaminy oraz kwas cytrynowy.

Wstęp

Jednym z najtańszych sposobów hamowania przemian oksydacyjnych w żywności jest stosowanie przeciwutleniaczy syntetycznych tj.: BHT (di-tert-butylohydroksytoluen), BHA (mono-tert-butylohydroksyanizol), TBHQ (tert-butylohydrochinon), galusany. Jednak bezpieczeństwo stosowania syntetycznych antyoksydantów do żywności jest obecnie kwestionowane z racji wyników badań toksykologicznych [1, 12, 15]. Coraz większego znaczenia nabierają związki naturalne występujące w surowcach roślinnych [20] oraz witaminy antyoksydacyjne wykazujące właściwości inhibitujące utlenianie lipidów.

Polifenole, które występują tylko w surowcach roślinnych, gromadzone są między innymi w owocach, kwiatach, korzeniach, liściach, częściach zdrewniałych, nasionach i korze. Aktywność przeciwutleniającą wykazują flawonoidy (katechiny, flawony, izoflawony, flawanony, flawonole) i fenolokwasy. Polifenole roślinne oddziałują jako antyoksydanty na drodze tworzenia kompleksów z jonami metali katalizującymi reakcje utleniania. Zapobiegają one reakcjom wywołanym przez aktywny atom tlenu, unieczynnijają wolne rodniki, hamują aktywność enzymów utleniających np.: lipook-

sygenaz [17]. Swoje właściwości antyoksydacyjne zawdzięczają obecności grup hydroksylowych w pierścieniu benzenowym, które ulegając utlenieniu wykazują zdolność oddania atomu wodoru grupy hydroksylowej, działając jako przeciwutleniacze.

Do poznanych witamin antyutleniających należą: witamina E (tokoferol), witamina C (kwas askorbinowy), beta-karoten (prowitamina A) [19]. Do przeciwutleniaczy również zaliczany jest kwas cytrynowy. Witaminy te oraz kwas cytrynowy posiadają zdolność neutralizacji szkodliwego działania wolnych rodników i nadtlenków lipidowych. Stosując je jako dodatki, nie tylko ochramiamy żywność przed niekorzystnymi zmianami, ale dodatkowo wzbogacamy ją w składniki odżywcze.

Celem badań było porównanie aktywności przeciwutleniającej naturalnych związków polifenolowych tj.: flawonów z tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria baicalensis*, Georgi), procyanidyn otrzymanych z kory głogu (*Crataegus oxyacantha*) oraz sosny (*Pinus sylvestris* L.) z właściwościami przeciwutleniającymi α -tokoferolu, β -karotenu, kwasu askorbinowego oraz kwasu cytrynowego.

Material i metody badań

Material do badań stanowił olej słonecznikowy zakupiony w handlu detalicznym oczyszczony z naturalnych polifenoli metodą podaną przez Chimi i wsp. [5]. Do otrzymania preparatu procyanidyn z głogu i sosny zastosowano metodę Oszmiańskiego [16]. Użyta do badań kora głogu i sosny pochodziła z pędów jednorocznych. Preparat flawonów tarczycy bajkalskiej zakupiono w firmie Wimex Beijng. Pozostałe związki pochodziły z Sigmay.

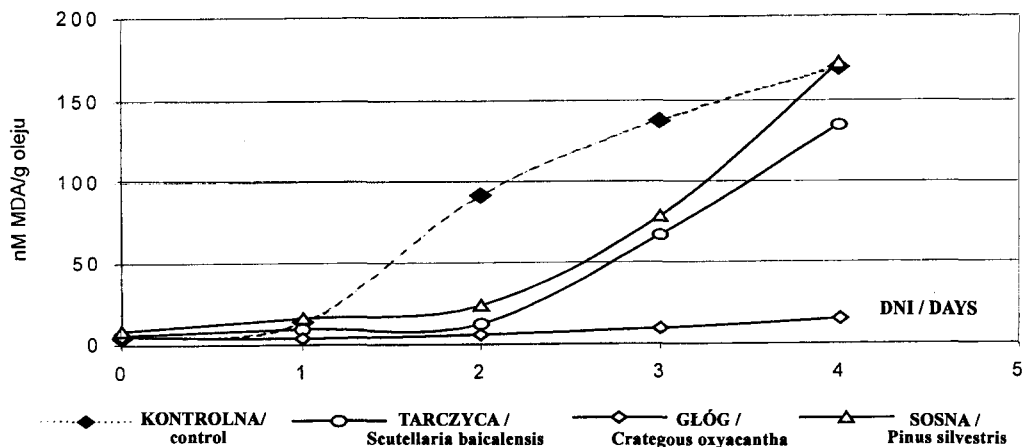
Sporządzono emulsję olejową (3 g oleju słonecznikowego) na bazie 0,05 M buforu TRIS:HCL o pH 7,54, wymieszanego z 3% Tweenu 20 i dodatkiem preparatów o stężeniu 100 ppm. Emulsję olejową przechowywano przez okres 5 dni w termostacie, w temperaturze 50°C i oświetleniu 3600–3900 Lux. W dniu wykonywania analiz emulsję mieszano homogenizatorem Heidolph DIAX 900 przez 1,5 min.

W próbkach oleju oznaczano zawartość hydronadtlenków metodą TBARS [2] oraz liczbę nadttlenkową metodą tiocyjanianową wg Haraguchi i wsp. [7] na spektrofotometrze UV-2401 PC firmy Shimadzu. Wynik analizy substancji reagujących z kwasem 2-tiobarbiturowym podano jako ilość aldehydu malonowego (MDA)/g oleju, wyliczona na podstawie krzywej wzorcowej.

Wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu Statgrafics. Przeprowadzono analizę wariancji i wyznaczono grupy jednorodne testem Duncana przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Użyte w badaniach naturalne preparaty polifenolowe, procyanidyny z kory głogu, sosny oraz flawony z tarczycy bajkalskiej wykazały w stosunku do oleju efekt ochronny (rys. 1).



Rys. 1. Tworzenie się aldehydu dimalonowego (MDA) w emulsji olejowej z dodatkiem 100 ppm naturalnych przeciwutleniaczy.

Fig. 1. Forming of MDA in oil emulsion with 100 ppm addition of natural antioxidants.

Tabela 1

Wpływ naturalnych przeciwutleniaczy na hamowanie reakcji utleniania [%] emulsji olejowych.
Influence of natural antioxidants on the inhibition of oxidative processes [%] in oil emulsions.

Rodzaj preparatu / Origin of preparation	Metoda tiocyjanianowa [1] / Thiocyanin Method				Metoda TBARS [2] / TBARS Method			
	Dni / Days							
	2	3	4	*	2	3	4	*
Głóg / <i>Crategous oxycantha</i>	80	86	83	b	99	97	94	c
Tarczyca bajkalska / <i>Scutellaria baicalensis</i>	77	51	25	ab	93	54	22	b
Sosna / <i>Pinus silvestris</i>	32	36	24	ab	81	49	9	ab

* Literami oznaczono grupy statystycznie jednorodne

*Groups statistically the same

W grupie naturalnych polifenoli procyanidyny z kory głogu okazały się mocniejszymi przeciwutleniaczami od procyanidyn sosny i flawonów tarczycy, na co wskazuje długi okres indukcji próbki. Ilość wytworzonego aldehydu dimalonowego (MDA), wtórnego produktu powstającego z rozpadu wielonienasyconych kwasów tłuszczo-

wych [8], przy zastosowaniu tarczycy bajkalskiej była już znaczna w drugim dniu utleniania. Hamowanie utleniania próbek przez flawony tarczycy w badanym okresie wynosiło od 77 do 25%, sosny 81–9%, a w przypadku preparatu z głogu od 99 do 94% w stosunku do próbki kontrolnej (tab. 1).

Różnice te wynikają z odmiennego składu chemicznego, a tym samym budowy strukturalnej tych związków (tab. 2).

Tabela 2

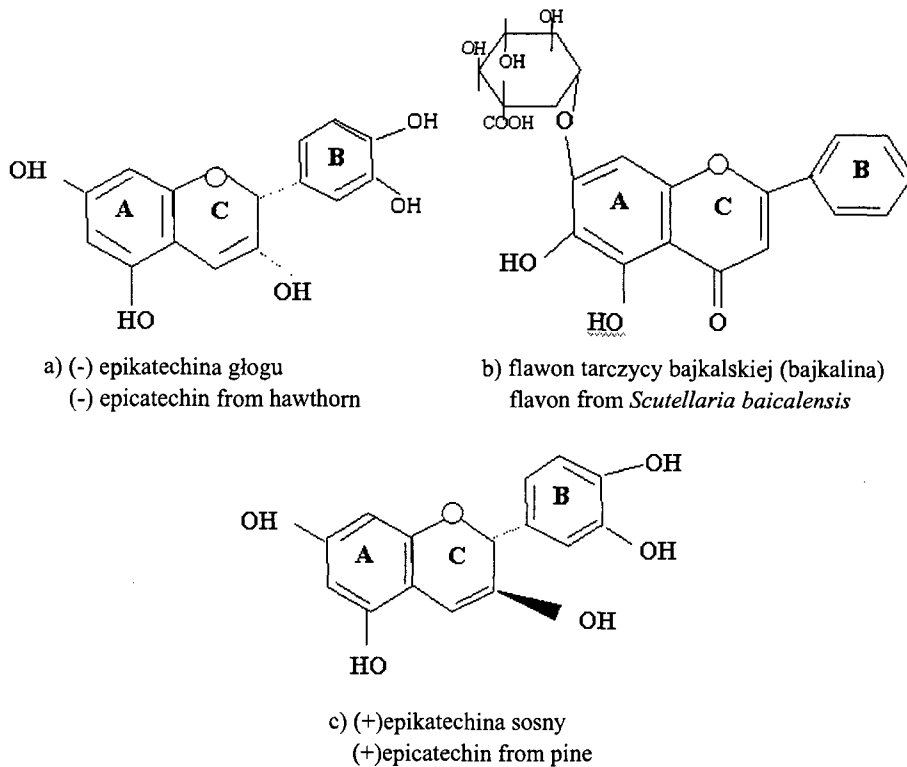
Skład preparatów roślinnych z kory głogu i sosny.

Composition of vegetable preparations from hawthorn and pine barks.

Rodzaj preparatu / Origin of preparation	Skład preparatu / Composition of preparation
Kora głogu / Hawthorn bark	(-) epikatechina procyjanidyna B2, B3, B4
Kora sosny / Pine bark	(+) epikatechina procyjanidyna B2, B3, B4

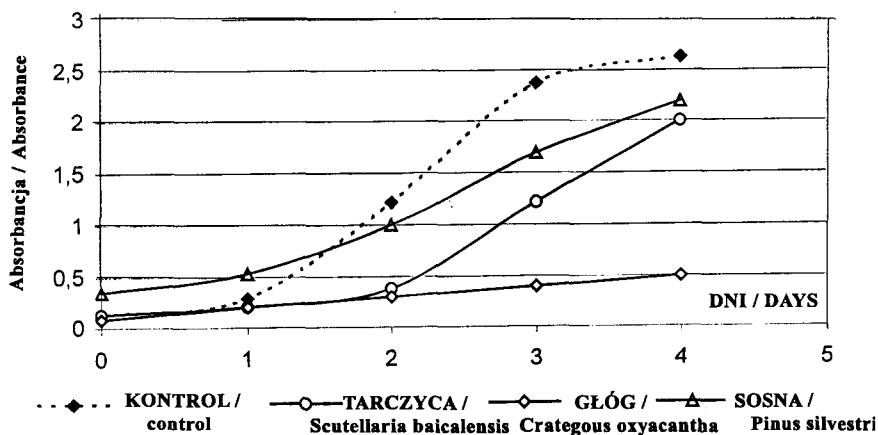
Najbardziej korzystna jest obecność w pierścieniu B dwóch grup hydroksylowych w pozycji „orto-”. Aktywność wykazują także formy „para-” difenoli, natomiast nie posiadają jej formy „meta-” [4, 13, 18, 22]. Dodatkowa grupa hydroksylowa w pierścieniu B w pozycji 5' zwiększa aktywność przeciwutleniającą. Przykładem takich związków są pochodne (-)epikatechiny (rys. 2a), zawarte w preparatach z głogu oraz (+)epikatechiny sosny (rys. 2c). Natomiast grupy wodorotlenowe w pozycji 5, 7, w pierścieniu A, mają minimalny wpływ na tę aktywność, co potwierdzają otrzymane wyniki zastosowanego w badaniach preparatu flawonów tarczycy bajkalskiej. Preparat ten zawierał 98% bajkaliny, pozostałość stanowiła bajkaleina i wogonina (dane producenta) (rys. 2b).

Również oznaczenie nadtlenków metodą tiocyjanianową potwierdziło powyższe wyniki (rys. 3). Efekt hamowania tworzenia nadtlenków przez zastosowany preparat głogu był wyższy (80–83%) niż przy preparacie z tarczycy bajkalskiej (77–25%) oraz sosny (32–24%).



Rys. 2. Chemiczna struktura flawonu i katechin.

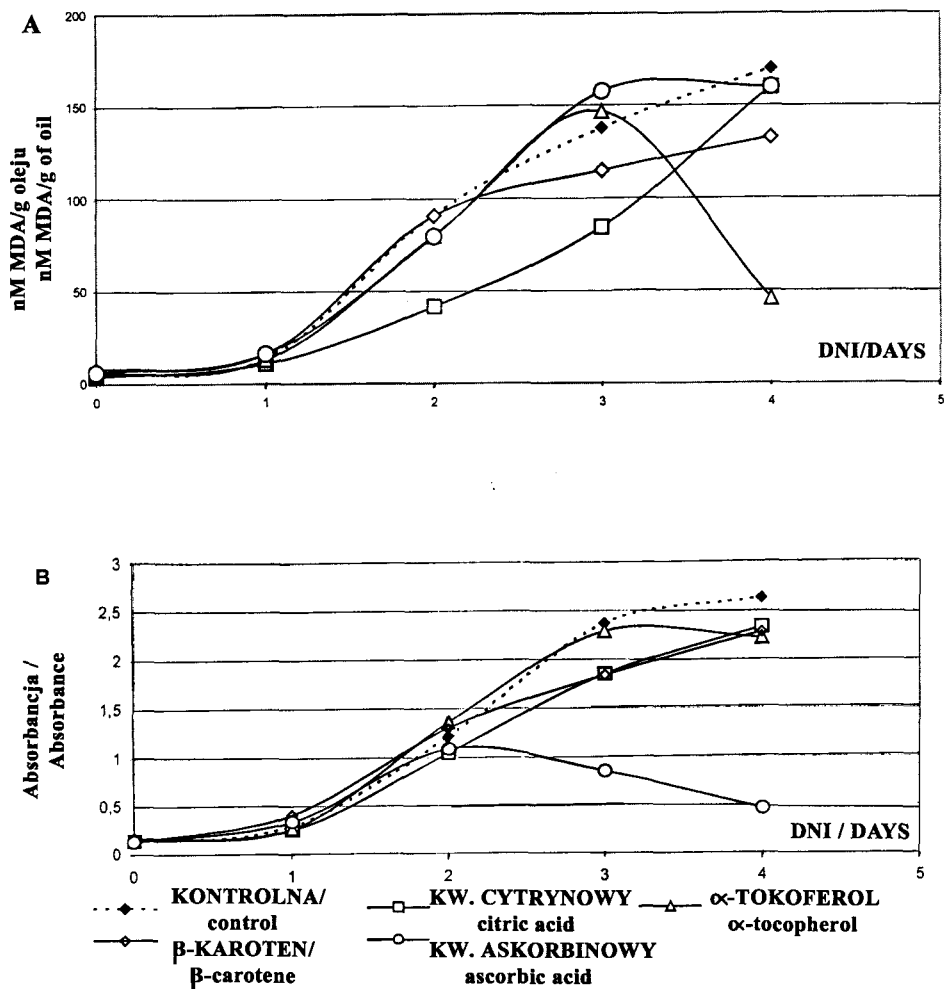
Fig. 2. Chemical structures of flavon and catechins.



Rys. 3. Zmiany wartości liczby nadtlenkowej podczas przechowywania emulsji olejowej z dodatkiem 100 ppm naturalnych przeciwutleniaczy.

Fig. 3. Changes of the peroxide values of emulsion oil with added 100 ppm natural antioxidant during storage.

W przeprowadzonym doświadczeniu, do stabilizacji oleju słonecznikowego użyto również witamin antyoksydacyjnych oraz kwasu cytrynowego. Związki te wykazały się niższą zdolnością hamowania niepożądanych przemian oksydacyjnych od przeciwutleniaczy roślinnych. Najczęściej stosowanym przeciwutleniaczem do stabilizacji produktów spożywczych jest witamina E [2, 10] oraz C. Używane są one nie tylko jako stabilizatory, do olejów, soków ale także traktowane są jako komponenty wzbo- gacające żywność w składniki odżywcze.



Rys. 4. Wpływ dodatku 100 ppm witamin antyoksydacyjnych i kwasu cytrynowego na utlenianie emulsji olejowej metodą TBARS [A] oraz metodą tiocyjanianową [B].

Fig. 4. Influence of added 100 ppm vitamin antioxidant and citric acid on oxidation emulsion oil in method TBARS [A] and peroxide value [B].

Tokoferole, witaminy grupy E, stanowią naturalny aktywny układ oksydacyjny w produktach olejowych [6, 23]. Największą biologiczną aktywnością odznacza się α -tokoferol zdolny do wygaszania tlenu singletowego, wychwytywania rodników ponadtlenkowych i hydroksylowych, zapobiegania łańcuchowej peroksydacji lipidów [21]. Na stopień aktywności antyutleniacza wpływa bardzo wiele parametrów, do których należą: temperatura, pH oraz dawka substancji ochraniającej. α -tokoferol, który skutecznie chroni tłuszcze, gdyż jest naturalnym składnikiem olejów roślinnych [6], w zastosowanych warunkach doświadczalnych (50°C, pH 7,54, światło 3500–3900 LUX) okazał się mało stabilnym przeciwutleniaczem (rys. 4).

Hamowanie tworzenia MDA przez α -tokoferol osiągnęło maksymalną wartość 33% w trzecim dniu utleniania (tab. 3). Efekt powstrzymywania ilości wytworzonych nadtlenków był niższy i kształtował się na poziomie 9–17%.

Tabela 3

Wpływ kwasu askorbinowego i cytrynowego oraz α -tokoferolu i β -karotenu na hamowanie reakcji utleniania emulsji olejowych [%].

Influence of ascorbic and citric acids as well as α -tocopherol and β -carotene on the inhibition of oxidative processes [%] in oil emulsions.

Preparaty / Preparation	Metoda tiocyjanianowa [1] / Thiocyanin Method				Metoda TBARS [2] / TBARS Method			
	Dni / Days							
	2	3	4	*	2	3	4	*
Kwas cytrynowy / citric acid	17	24	12	a	5	6	7	a
α -tokoferol / α -tocopherol	9	19	17	a	20	33	31	ab
β -karoten / β -carotene	33	61	2	ab	7	21	17	a
Kwas askorbinowy / ascorbic acid	31	21	8	ab	16	14	43	ab

* Literami oznaczono grupy statystycznie jednorodne

* Groups statistically the same

Drugim powszechnie stosowanym antyutleniaczem jest witamina C. Kwas askorbinowy wykazuje zdolność do neutralizacji szeregu wolnych rodników tj.: O_2^- , OH_2^- oraz tlenu singletowego. Efekt powstrzymywania utleniania próbek oleju, wśród tej grupy antyoksydantów, wynosił od 14 do 43% (tab. 3). Podobne wyniki uzyskał Hraš i wsp. [10].

Kwas cytrynowy używany jest do stabilizacji żywności przede wszystkim jako synergent. Mechanizm działania tego typu związków polega na tym, że same utleniają

się bardzo szybko na początku procesu, chroniąc i przedłużając w ten sposób aktywność właściwego antyoksydanta [20]. Kwas cytrynowy chelatuje jony metali pomiędzy metalem a grupą karboksylową lub hydroksylową. Liczne badania wykazały, że kwas cytrynowy jest dobrym opóźniaczem oksydacji w żywności zawierającej lipidy, ale w połączeniu z innymi związkami np.: α -tokoferolem, ekstraktem rozmarynu [9, 10]. Dlatego związek ten jako samodzielny antyutleniacz nie wykazał dużego efektu stabilizującego emulsji olejowej. Zdolność do hamowania tworzenia substancji reagujących z kwasem 2-tiobarbituowym wynosiła 5–7%, natomiast zmniejszenie ilości wytworzonych nadtlenków równało się 17% w drugim dniu utleniania, następnie zwiększyło się do 24% i zmniejszyło się do 12% w czwartym dniu.

W ostatnich latach wzrosło również zainteresowanie wpływem karotenoidów na zdrowie ludzi oraz ich rolą w procesach peroksydacyjnych [3]. Krinsky [11] oraz Mortensen i wsp. [14] dowiedli, że β -karoten wychwytuje obok tlenu singletowego również inne aktywne formy tlenu, w obecności światła zmniejsza również peroksydację n-6 nienasyconych kwasów tłuszczowych. Mierząc ilość wytworzonych nadtlenków zaobserwowano duże wahania w stabilizacji emulsji olejowej. Zdolność hamowania w drugim dniu utleniania osiągnęła swoje maksimum na poziomie 61% (z 33%), natomiast w czwartym dniu spadła do 2%. Podobnym wahaniom ulegała ilość wytworzonych MDA (7–21%) w roztworach emulsyjnych.

Wnioski

1. Stabilność emulsji olejowych była dwukrotnie wyższa po dodaniu naturalnych polifenoli niż witamin E, C i β -karotenu oraz kwasu cytrynowego.
2. Najsilniejszym przeciwutleniaczem były procyjanidyny z kory głogu, które hamowały niekorzystne przemiany w emulsjach olejowych powyżej 80%.
3. Kwas askorbinowy okazał się lepszym stabilizatorem emulsji niż, α -tokoferol, β -karoten i kwas cytrynowy.
4. Kwas cytrynowy w niewielkim stopniu hamował utlenianie emulsji olejowej (7 i 12% w 4. dniu utleniania).

Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 5 P06G 020 19

Literatura

- [1] Barlow S.M.: Toxicological aspect of antioxidants as food additives. In: Food Antioxidants. Elsev. Sci. Pub. LTD, New York 1990, 253.
- [2] Beddows C.G., Charanjit J., Kelly M.J.: Effect of ascorbyl palmitate on the preservation of α -tocopherol in sunflower oil, alone and with herbs and spices. Food Chem., **73**, 2001, 255-261.
- [3] Burton G., W., Ingold K.V.: β -carotene an unusual type of lipid antioxidant. Science, **224**, 1984, 569-573.

- [4] Chen Z.,Y., Chan P.T., Ho K.Y., Fung K.P., Wang J.: Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids.*, **79**, 1996, 157-163.
- [5] Chimi H., Cillard J., Cillard P.: Autooxidation de l'huile d'argan *Argania spinosa* L. du Maroc. *Sciences De Aliments*, **14**, 1994, 1.
- [6] Gordon M.N.: Oils and fats: taint or flavour? *Chemistry in Britain*, November, 1991, 1020-1022.
- [7] Haraguchi H., Hashimoto K., Yagi A.: Antioxidative Substances in Leaves of *Polygonum hydro-piper*. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1992,1349-1351.
- [8] Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K.: Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, **207**, 1999, 604-611.
- [9] Hopia A.I., Huang S.W., Schwarz K., German J., Frankel E.N.: Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1996, 2030-2036.
- [10] Hraš A.R., Hadolin M., Knez Ž., Bauman D.: Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem.*, **71**, 2000, 229-233.
- [11] Krinsky N.: Actions of carotenoids in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.*, **13**, 1993, 561.
- [12] Kovatcheva E.G., Koleva I.J., Ilieva M., Pavlov A., Mincheva M., Konushlieva M.: Antioxidant activity of extracts from *Lavandula vera* MM cell cultures. *Food Chem.* **72**, 2001, 295-300.
- [13] Larson R.A.: The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* **27**, 4, 1988, 969-978.
- [14] Mortensen A., Skibsted L.H.: Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 2970-2977.
- [15] Nieto S., Garrido A., Sanhueza J.: Flavonoids as stabilizers of fish oil: an alternative to synthetic antioxidants. *JACOS*, **70**, 1993, 773-22.
- [16] Oszmiański J., Lee C.Y.: Inhibitory effect of phenolics on carotene bleaching in vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1990, 688-690.
- [17] Oszmiański J.: Polifenole jako naturalne przeciwutleniacze w żywności. *Przem. Spoż.*, **49** (3), 1995, 94-96.
- [18] Oszmiański J.; 1996. Sposób otrzymywania aktywnych biologicznie oligomerów proantocyjanidyn z surowców roślinnych. Patent PL 169082 B1.
- [19] Sies H., Stahl W.: Vitamins E, and C, β -caroten and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 1995, 1315 S.
- [20] Sokół-Lętowska A., Oszmiański J.: Właściwości przeciwutleniające naturalnych polifenoli.: *Zesz. Nauk. AR Wrocław*: **328**, 1998, 73-85.
- [21] Wartanowicz M., Ś. Ziemiański.: Stres oksydacyjny oraz mechanizmy obronne. *Żyw. Człow. i Metab.*, **XXVI**, 1999, 1.
- [22] Wilska-Jeszka J.: Współczesne poglądy na występowanie i rolę bioflawonoidów. *Przem. Spoż.*, **2**, 1989, 39-41.
- [23] Wong J., W., Hashimoto K., Shibamoto T.: Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. *J. Agric. Food Chem.*, **43** (10), 1995, 2707.

STABILIZATION OF OIL EMULSION WITH NATURAL ANTIOXIDANTS

S u m m a r y

The antioxidant activities of selected compounds added to oil emulsions were determined. The polyphenolic compounds from barks of hawthorn and pine and *Scutellaria baicalensis* as well as α -tocopherol, β -carotene, vitamin C and citric acid were tested. The results obtained showed that the natural compounds of vegetable origin decreased unfavorable transformations in oil emulsions to the higher extent than the antioxidant vitamins and citric acid. ☒