

AKTYWNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA I PRZECIWRODNIKOWA PRZECIWUTLENIACZY W OLEJU Z NASION CZARNEJ PORZECZKI I ŻMIJOWCOWYM

Karol Mińkowski¹, Katarzyna Zawada²

¹Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
ul. Jubilerska 4, 04-190 Warszawa

Karol.Minkowski@ibprs.pl

²Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, Zakład Chemii Fizycznej
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Streszczenie

Celem pracy było porównanie skuteczności działania przeciwutleniaczy w rafinowanym oleju z nasion czarnej porzeczki (*Ribes nigrum*) oraz tłoczonym na zimno oleju żmijowcowym (*Echium vulgare*). W badaniach stosowano 4 przeciwutleniacze: ekstrakt z rozmarynu, mieszaninę tokoferoli, palmitynian askorbylu i mieszaninę palmitynianu askorbylu, α -tokoferolu i lecytyny. Skuteczność ich działania oceniano za pomocą testu przyśpieszonego utleniania Rancimat i metodą DPPH-EPR. Stwierdzono, że efektywność przeciwutleniaczy zależała od rodzaju oleju i zastosowanej dawki. Największą aktywność antyoksydacyjną w oleju z nasion czarnej porzeczki wykazywał palmitynian askorbylu (WO 110%), a w oleju żmijowcowym ekstrakt z rozmarynu (WO 130%). Najwyższą aktywność przeciwrodnikową w oleju z nasion czarnej porzeczki wykazywał palmitynian askorbylu (55,5%), a w oleju żmijowcowym mieszanina tokoferoli (38,6%). Przeprowadzone badania wskazują, że właściwości przeciwrodnikowe oleju z nasion czarnej porzeczki wynikają głównie z obecności związków lipofilnych, podczas gdy w oleju żmijowcowym związane są zarówno z frakcją lipofilną, jak i polarną, wyekstrahowaną metanolem. Stwierdzono istnienie bardzo wysokiej dodatniej korelacji pomiędzy czasem indukcji procesu autooksydacji wyznaczonym w teście przyśpieszonego utleniania Rancimat a aktywnością przeciwrodnikową przeciwutleniaczy, określoną poprzez siłę zmiatania rodnika DPPH metodą EPR.

Słowa kluczowe: olej z nasion czarnej porzeczki, olej żmijowcowy, przeciwutleniacze, stabilność oksydacyjna, aktywność przeciwrodnikowa, EPR

ANTIOXIDATIVE AND ANTIRADICAL ACTIVITY OF ANTIOXIDANTS IN BLACKCURRANT SEED OIL AND BLUEWEED OIL

Summary

The aim of this work was to compare the effectiveness of different antioxidants in the inhibition of the autoxidation of refined blackcurrant (*Ribes nigrum*) seeds oil and cold-pressed blueweed (*Echium vulgare*) oil. Four antioxidant preparations were used: rosemary extract, mix of tocopherols, ascorbyl palmitate and the mixture of ascorbyl palmitate, α -tocopherol and lecithin, in doses from 100 to 600 mg·kg⁻¹. To determine the oxidative stability and radical scavenging activity of the studied oils, the Rancimat method and the DPPH-EPR test were used. The total effectiveness of added antioxidant preparations was dose-dependent and varied due to the variety of oil. The highest antioxidant activity towards blackcurrant seed oil was shown by ascorbyl palmitate (protection factor 110%), and towards blueweed oil by rosemary extract (protection factor 130%). The best scavenging properties were observed for blackcurrant seed oil with ascorbyl palmitate (55.5%), and for blueweed oil with tocopherol mixture (38.6%). Conducted studies indicate, that antiradical properties of blackcurrant seed oil mainly result of presence of lipophilic components whereas in blueweed oil they are connected with lipophilic fraction as well as with polar fraction, extracted by methanol. There was a strong correlation between the induction time value in the Rancimat test and DPPH radical scavenging activity of oils determined by EPR spectroscopy.

Key words: blackcurrant seed oil, blueweed oil, antioxidants, oxidative stability, radical scavenging activity, EPR

WSTĘP

Olej z nasion czarnej porzeczki oraz olej zmięwczy, ze względu na swe cenne walory żywieniowe i zdrowotne, mogą stanowić ważne uzupełnienie diety człowieka [Tahvonen i in. 2005; Guil-Guerrero 2007]. Ograniczeniem w szerszym ich stosowaniu jest niska stabilność, zwłaszcza podatność na utlenianie. Wiadomo, że autooksydacja lipidów ma charakter wolnorodnikowy, a powstające rodniki cechują się wysoką i niespecyficzną reaktywnością. Ich nadmiar jest szkodliwy dla zdrowia człowieka, przyspiesza proces starzenia się organizmu i jest przyczyną wielu chorób [Pham-Huy i in. 2008]. Jednym ze sposobów ograniczenia procesu autooksydacji jest zastosowanie przeciwutleniaczy. Mogą one przerywać reakcję łańcuchową przez konwersję rodników do bardziej stabilnych związków bądź też opóźnić utlenianie w wyniku innych procesów [Szukalska 2003]. Zdolność do dezaktywacji wolnych rodników wykazują między innymi tokoferole, karotenoidy i związki fenolowe [Kamal-Eldin 2006; Siger i in. 2005], a wśród pozostałych ważne miejsce zajmuje kwas askorbinowy i jego

lipofilowa pochodna – palmitynian askorbylu [Beddows i in. 2001]. Do określenia skuteczności działania przeciwutleniaczy służą między innymi testy stabilności oksydacyjnej [Ratusz i in. 2005] oraz ocena aktywności przeciwrodnikowej wobec trwałych rodników metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego – EPR [Giuffrida i in. 2007].

Celem pracy było porównanie skuteczności działania wybranych przeciwutleniaczy w rafinowanym oleju z nasion czarnej porzeczki oraz tłoczonym na zimno oleju żmijowcowym.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

W badaniach porównano dostępne oleje rynkowe – rafinowany olej z nasion czarnej porzeczki (olej tłoczony na zimno nie jest produkowany ze względu na niską wydajność tłoczenia) oraz tłoczony na zimno olej żmijowcowy (z uwagi na wyjątkową niską stabilność nie powinien on podlegać żadnym zabiegom rafinacyjnym). Badano świeże oleje dostarczone przez producentów: rafinowany olej z nasion czarnej porzeczki (H. Lamotte GmbH, Hamburg) oraz tłoczony na zimno olej żmijowcowy (SGNiP SemCo, Śmiłowo). Oleje w trakcie badań przechowywano w temperaturze $-18^{\circ}\text{C} \div 22^{\circ}\text{C}$, bez dostępu światła. W celu określenia wpływu frakcji nietriacyloglicerolowej na stabilność olejów przygotowano ich ekstrakty metanolowe. Otrzymywano je według następującej procedury: olej (3 g) rozpuszczano w 15 cm^3 heksanu i ekstrahowano związki hydrofilne za pomocą metanolu ($3 \times 5\text{ cm}^3$) przez wytrząsanie po 2 min przy każdej ekstrakcji. Połączone ekstrakty pozostawiano na 16 h w temperaturze 6°C bez dostępu światła. Po rozdzieleniu frakcję metanolową przemywano 25 cm^3 heksanu w celu usunięcia resztek oleju [Haiyan i in. 2007].

Stosowano cztery rodzaje przeciwutleniaczy naturalnych i identycznych z naturalnymi, które dla uproszczenia opisów oznaczono symbolami: ekstrakt z rozmarynu – ER – preparat handlowy Stabiloton OS (Raps), mieszanina tokoferoli – mixT – Mixed Tocopherols 95 (DSM Nutritional Products), mieszanina α -tokoferolu, palmitynianu askorbylu i lecytyny sojowej – T-PA-L – Ronoxan A (DSM Nutritional Products), palmitynian askorbylu na nośniku emulgatorowym – PA – Grindox 1014 (Danisco Cultor). Dodatek przeciwutleniaczy do olejów wynosił: 100, 150, 200, 400 i $600\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Próbkę przygotowano przez dodanie do oleju roztworów przeciwutleniaczy w heksanie bądź acetonie (ekstrakt z rozmarynu), po czym rozpuszczalnik usuwano przez przedmuchiwanie azotem.

Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych wykonywano metodą chromatografii gazowej według PN-EN ISO 5508:1996. Stosowano chromatograf gazowy HP 6890 II

wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny. Stabilność oksydacyjną olejów określano, wykorzystując test przyspieszonego utleniania Rancimat, według PN-ISO 6886:2009, w aparacie Metrohm typ 743. Badania prowadzono w temperaturze 100°C przy przepływie powietrza 20 dm³·h⁻¹. Wyznaczony okres indukcji wyrażano w godzinach [h]. Oznaczenia stabilności wykonywano w 3 powtórzeniach. Właściwości antyoksydacyjne przeciwutleniaczy oceniano poprzez określenie wartości współczynnika ochronnego WO, który wyliczano za pomocą następującego równania:

$$WO = \frac{OI_A - OI_K}{OI_K} \times 100\% \quad (1)$$

gdzie: OI_A – okres indukcji próby z dodatkiem przeciwutleniacza, OI_K – okres indukcji próby kontrolnej.

Aktywność antyrodnikową próbek olejów i dodanych do nich przeciwutleniaczy oraz ekstraktów metanolowych określono poprzez badanie ich zdolności do zmiatania rodnika DPPH metodą spektrometrii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Porównawczą zdolność zmiatania rodnika DPPH (Z_p) określono według wzoru:

$$Z_p = \frac{I_o - I}{I_o} \times 100\% \quad (2)$$

gdzie: I – intensywność sygnału rodnika DPPH z próbki badanej (przy badaniu olejów: olej + rodnik, przy badaniu przeciwutleniaczy: olej + przeciwutleniacz + rodnik, przy badaniu ekstraktów: ekstrakt metanolowy + rodnik), I_o – intensywność sygnału rodnika DPPH z próbki przyjętej za wzorzec (przy badaniu olejów: roztwór rodnika, przy badaniu przeciwutleniaczy: olej + rodnik, przy badaniu ekstraktów metanol + rodnik).

Sposób przygotowania próbki do badań – do 0,5 cm³ próbki badanego oleju dodawano 2,5 cm³ acetonowego roztworu DPPH o stężeniu 0,004 mol·dm⁻³. Do pomiaru pobierano 0,35 cm³ powstałego w ten sposób roztworu. Pomiaru przeprowadzano po 70 minutach od dodania roztworu DPPH. Oznaczenia wykonywano w 3 powtórzeniach. Pomiaru i rejestrację widm EPR wykonano na spektrometrze EPR RADIOPAN EPR/SE/X (9,3 GHz) firmy Radiopan/Radiofan z Poznania sprzężonym z cyfrowym detektorem fazowym (Lock-in). Stosowano następujące parametry pracy spektrometru: prąd diody – 50%, tłumienie – 15 dB, stała czasowa – 0,3 s, faza – 270°, czas przemiatania – 60 s, amplituda modulacji – 0,4, indukcja magnetyczna w centrum zakresu przemiatania – B = 336 mT, szerokość przemiatania – ΔB = 10 mT. Do całkowania widm EPR stosowano program WinEPR firmy Bruker.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu komputerowego STATGRAPHICS Plus for Windows, wersja 4.0 Statistical Graphics Corp. 1999. Dla oceny zależności pomiędzy wybranymi zmiennymi wykorzystano analizę regresji prostej liniowej.

WYNIKI I DYSKUSJA

Interpretacja wyników ma charakter analizy porównawczej. Materiał badawczy scharakteryzowano, analizując skład kwasów tłuszczowych. Uzyskane rezultaty zamieszczono w tabeli 1. Oba oleje cechowała wysoka zawartość ważnych pod względem żywieniowym polienowych kwasów tłuszczowych. Są one źródłem rzadko występujących kwasów tłuszczowych, pierwszy – γ -linolenowego (13,1%), drugi – stearydonowego (12,4%).

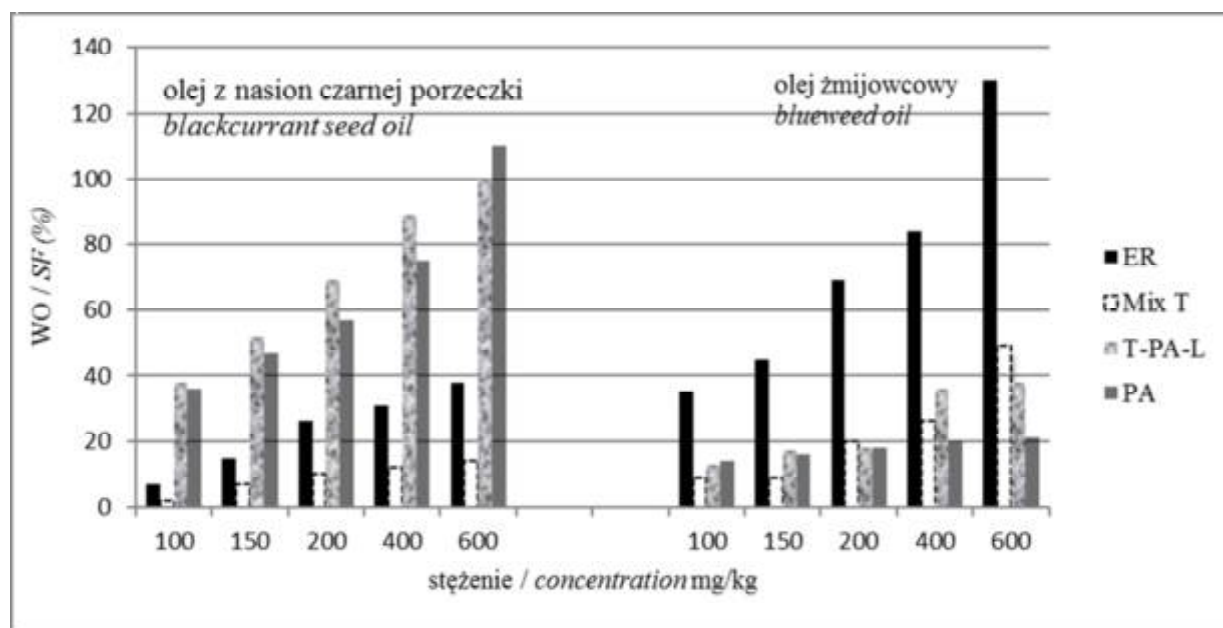
Tabela 1. Skład kwasów tłuszczowych (% m/m)

Profile of fatty acids (% w/w)

Kwasy tłuszczowe <i>Fatty acids</i>	Rodzaj oleju – <i>Kind of oil</i>	
	z nasion czarnej porzeczki <i>blackcurrant</i>	żmijowcowy <i>bluweed</i>
C16:0	6,2±0,2	6,9±0,2
C16:1	0,1±0,0	0,3±0,1
C18:0	1,5±0,1	3,1±0,1
C18:1	13,3±0,3	16,5±0,4
C18:2 <i>n-6</i>	49,1±1,2	17,6±0,4
C18:3 <i>n-6</i>	13,1±0,3	10,7±0,2
C18:3 <i>n-3</i>	13,0±0,2	31,6±1,1
C18:4 <i>n-3</i>	2,4±0,1	12,4±0,3
Inne/ <i>Other</i>	1,3	0,9

n = 6

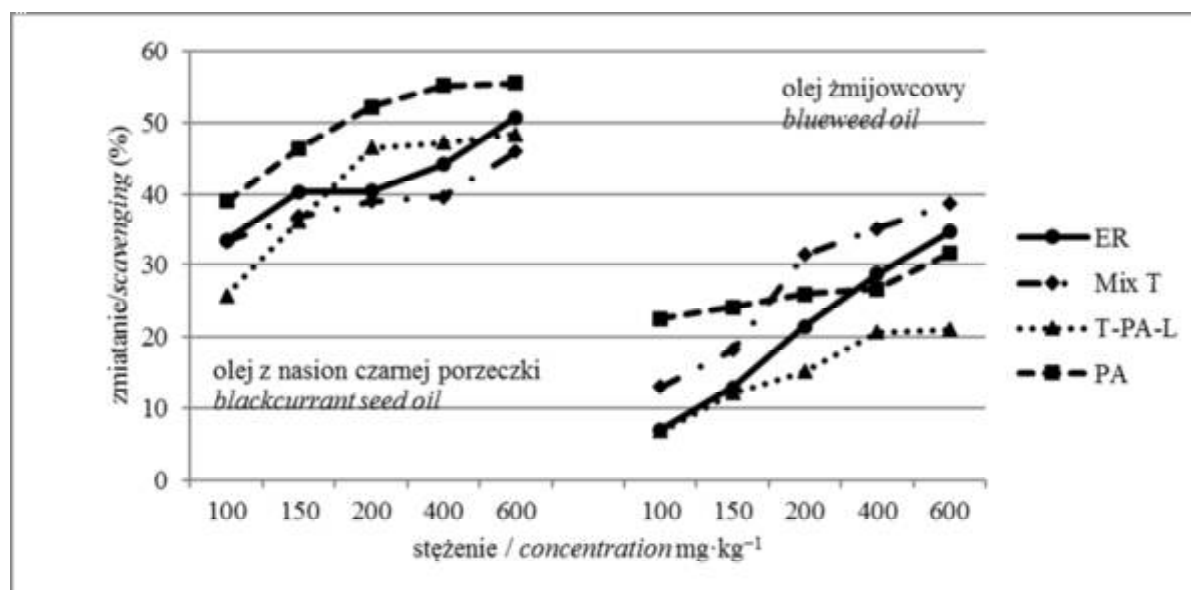
Oleje wyjściowe oraz po dodaniu przeciwutleniaczy poddano testowi Rancimat, a uzyskane rezultaty zaprezentowano na rysunku 1.



Rysunek 1. Współczynniki ochronne (WO) olejów po dodatku przeciwutleniaczy
Protection factors (PF) for antioxidants in oils

Olej z nasion czarnej porzeczki najlepiej był chroniony przez palmitynian askorbylu oraz mieszaninę T-PA-L przy dawkach $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (WO max. 110 i 100%). Nikłe efekty ochronne uzyskano, stosując dodatek ER i mixT (WO max. 36% i 14%). Tak duża aktywność PA wynikać może między innymi z jego zdolności do wychwytywania jonów żelaza i miedzi przez bazę emulgatorową, w której skład wchodzi między innymi estry kwasu cytrynowego mono- i diacylogliceroli kwasów tłuszczowych, wykazujące te zdolności. PA cechuje silny efekt synergistyczny z naturalnymi tokoferolami obecnymi w olejach roślinnych [Hras i in. 2000]. Olej żmijowcowy najlepiej był chroniony przez ekstrakt z rozmarynu przy dawce $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (WO max. 130%). Jak podają Wroniak i Ratusz [2011], dobry efekt przeciwutleniający wykazuje także oleożywica z rozmarynu.

Na rysunku 2. zamieszczono wyniki dotyczące zmiatania rodnika DPPH przez przeciwutleniacze w olejach. W oleju z nasion czarnej porzeczki najefektywniej zmiatał rodnik DPPH palmitynian askorbylu (55,5%) przy dawce $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. W oleju żmijowcowym najskuteczniej działała mieszanina tokoferoli (38,6%). Aktywność pozostałych preparatów kształtowała się następująco: ER > PA > T-PA-L. Najlepsze rezultaty, podobnie jak w oleju z nasion czarnej porzeczki, uzyskano przy dawce $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

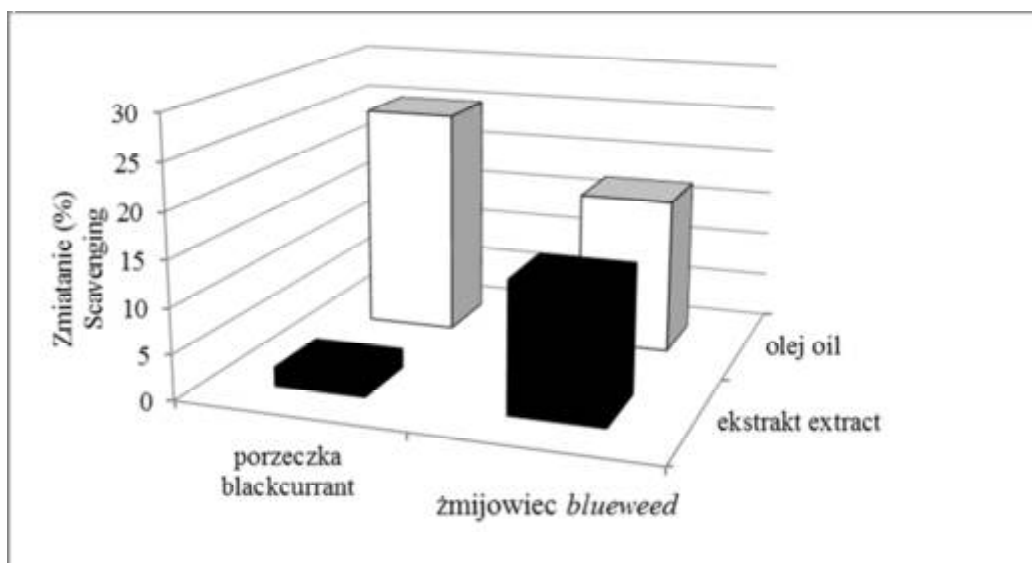


Rysunek 2. Zmiatanie rodnika DPPH (%) w zależności od rodzaju i dawki przeciwutleniacza (względem oleju wyjściowego)

Scavenging of DPPH radical (%) in dependence on kind and dose of antioxidant (relative to parent oil)

Stabilność olejów jest wynikiem zarówno aktywności dodanych antyoksydantów, jak i naturalnych nietriacyloglicerolowych substancji występujących w olejach. W pracy oceniono wpływ dwóch grup tych substancji, jednej o charakterze lipofilnym, drugiej mającej cechy hydrofilności. W tym celu badaniom poddano oleje wyjściowe oraz uzyskane z nich ekstrakty metanolowe. Wyniki zamieszczono na rysunku 3. Siła zmiatania rodnika DPPH^{*} przez oleje oraz ich ekstrakty metanolowe była bardzo zróżnicowana. Olej z nasion czarnej porzeczki zmiatał rodnik DPPH o 40% silniej niż olej zmirowcowy, ale jego ekstrakt metanolowy siedmiokrotnie słabiej niż ekstrakt metanolowy oleju zmirowcowego. Odmienna aktywność przeciwrodnikowa olejów może wynikać ze znacznych różnic w stopniu ich nienasylenia oraz oczyszczenia (rafinowany, tłoczony na zimno). W przypadku oleju z nasion czarnej porzeczki należy przypuszczać, że o jego zdolnościach do zmiatania rodnika DPPH oprócz obecnych w oleju nienasyconych kwasów tłuszczowych decydowały przede wszystkim tokoferole i karotenoidy [Pieszka i in. 2015] rozpuszczalne w oleju, ale nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach polarnych. Do roztworu metanolowego mogą natomiast przechodzić związki fenolowe, ale sądząc po wyniku siły zmiatania przez ekstrakt to ilości minimalne. Olej z nasion czarnej porzeczki był olejem rafinowanym, a jak wskazują wyniki badań Sigera i in. [2005], proces rafinacji może je całkowicie usuwać. Duża siła

zmiana ekstraktu metanolowego z oleju zmiłowcowego sugeruje obecność w nim związków o charakterze hydrofilnym, prawdopodobnie polifenoli.



Rysunek 3. Porównanie siły zmiatania rodnika DPPH[•] przez olej z nasion czarnej porzeczki i zmiłowcowy oraz ich ekstrakty metanolowe
Comparison of scavenging of DPPH[•] radical by blackcurrant seed oil and blueweed oil and their methanolic extracts

Na ścisły związek pomiędzy zdolnością zmiatania rodnika DPPH a zawartością tokoferoli i związków fenolowych w olejach wskazują wyniki badań Papadimitriou i in [2006]. Bazując na uzyskanych wynikach, określono współzależność pomiędzy stabilnością oksydacyjną w teście Rancimat wyrażoną okresem indukcji (h) a siłą zmiatania rodnika DPPH (%), określoną metodą EPR, w olejach z dodatkiem przeciwutleniaczy. Stwierdzono istnienie bardzo wysokiej korelacji liniowej wyników uzyskanych obiema metodami dla badanych przeciwutleniaczy, a współczynniki korelacji w zależności od oleju wynosiły pomiędzy 0,92 i 0,96 (z wyjątkiem PA w oleju z czarnej porzeczki) i były zbliżone do podawanych w literaturze [Papadimitriou i in. 2006]. Jak podają Kruszewski i in. [2013], silna korelacja występuje także pomiędzy testem Rancimat a zdolnością do absorpcji rodników tlenowych, określoną w teście ORAC. Według Naik i in. [2014], metoda spektroskopii EPR jest przydatna do przewidywania stabilności olejów w szerokim zakresie wartości.

WNIOSKI

1. Efektywność działania przeciwutleniaczy zależała od rodzaju oleju i zastosowanej dawki antyoksydanta. Największą aktywność antyoksydacyjną w oleju z nasion czarnej

porzeczki wykazywał palmitynian askorbylu, a w oleju zmirowcowym ekstrakt z rozmarynu w dawkach $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Najwyższą aktywność przeciwrodnikową w oleju z nasion czarnej porzeczki wykazywał palmitynian askorbylu, natomiast w oleju zmirowcowym mieszanina tokoferoli w dawkach $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

2. Przeprowadzone badania wskazują, że właściwości przeciwrodnikowe oleju z nasion czarnej porzeczki wynikają głównie z obecności związków lipofilnych, podczas gdy w oleju zmirowcowym związane są zarówno z frakcją lipofilną, jak i polarną, wyekstrahowaną metanolem.
3. Stwierdzono istnienie bardzo wysokiej dodatniej korelacji pomiędzy czasem indukcji procesu autooksydacji w teście przyspieszonego utleniania Rancimat a aktywnością przeciwrodnikową przeciwutleniaczy, określoną poprzez względną siłę zmiatania rodnika DPPH metodą EPR.

PIŚMIENNICTWO

1. AOCS Recommended Practice Cd-1c-85. 1997. Calculated iodine value
2. Beddows C. G., Jagait C., Kelly M. J. (2001). Effect of ascorbyl palmitate on the preservation of α -tocopherol in sunflower oil, alone and with herbs and spices. *Food Chem.*, 73, 255-261
3. Giuffrida F., Destailats F., Egart M. H., Hug B., Golay P. A., Skibsted L. H., Dionisi F. (2007). Activity and thermal stability of antioxidants by differential scanning calorimetry and electron spin resonance spectroscopy. *Food Chem.*, 101, 1108-1114
4. Guil-Guerrero J. L. (2007). Stearidonic acid (18:4n -3): metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109, 1226-1236
5. Haiyan Z., Bedgood D. R., Bishop A. G., Prenzler P. D., Robards K. (2007). Endogenous biophenyl, fatty acid and volatile profiles of selected oils. *Food Chem.*, 100, 1544-1551
6. Hraš A. R., Hadolin M., Knez Ž., Bauman D. (2000). Comparison of antioxidant and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem.*, 71, 229-233
7. Kamal-Eldin A. (2006). Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108, 1051-1061
8. Kruszewski B., Fąfara P., Ratusz K., Obiedziński M. (2013). Ocena pojemności przeciwutleniającej i stabilności oksydatywnej wybranych olejów roślinnych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 572, 43-52

9. Naik A., Meda V., Lele S. S. (2014). Application of EPR spectroscopy and DSC for oxidative stability studies of *nigella sativa* and *lepidium sativa* seed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 91 (6), 935-941
10. Papadimitriou V., Sotiroidis T. G., Xenakis A., Sofikiti N., Stavyiannoudaki V., Chaniotakis N. A. (2006). Oxidative stability and radical scavenging activity of extra virgin olive oils: An elektron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Anal. Chim. Acta*, 573-574, 453-458
11. Pham-Huy L. A., He H., Pham-Huy C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed Sci.*, 4 (2), 89-96
12. Pieszka M., Migdał W., Gąsior R., Rudzińska M., Bederska-Łojewska D., Pieszka M., Szczurek P. (2015) Native oils from apple, black currant and strawberry seeds as a source of polyenoic fatty acids tocochromanols: a health implication. *J. Chem.*, 2015, ID 659541
13. PN-EN ISO 5508:1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej
14. PN-ISO 6886:2009. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie stabilności oksydacyjnej (Test przyspieszonego utleniania)
15. Ratusz K., Kowalski B., Wirkowska M. (2005). Monitorowanie autooksydacji olejów rafinowanych metodą pomiarów czasów indukcji utleniania. *Rośliny Oleiste*, 26, 211-220
16. Siger A., Nogala-Kałucka M., Lampart-Szczapa E., Hoffman A. (2005). Antioxidant activity of phenolic compounds of selected cold-pressed and refined plant oils. *Rośliny Oleiste*, 26, 549-559
17. Szukalska E. (2003). Wybrane zagadnienia utleniania tłuszczów. *Tłuszcze Jadalne*, 38, 42-61
18. Tahvonen R. L., Schwab U. S., Linderborg K. M., Mykkänen H. M., Kallio H. O. (2005). Blackcurrent seed oil supplements differ in their effects on fatty acid profiles of plasma lipids, and concentrations of serum total and lipoprotein lipids, plasma glucose and insulin. *J. Nutr. Bioch.*, 16, 353-359
19. Wroniak M., Ratusz K. (2011). Wpływ dodatku oleożywic rozmarynu i oregano na zmiany oksydacyjne olejów tłoczonych na zimno w teście termostatowym i teście Rancimat. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 558, 301-309