
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. LX

SECTIO E

2005

Katedra Chemii, Akademia Rolnicza w Lublinie
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, Poland

Ewa Makarska, Monika Michalak

*Aktywność przeciwutleniająca kwasów fenolowych
jęczmienia jarego*

Antioxidant activity of phenolic acids of spring barley

ABSTRACT. The grains of three cultivars of spring barley (Rodos, Rambo, Start) were examined. In these grains phenolic acids were identified and their content – ferulic, vanillic, p-cumaric and caffeic – was determined too. The antioxidant properties of phenolic acids were examined using free radical scavenging method against stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]). Antiradical efficiency of phenolic acids depended on time of reaction and genotype properties. Results of phenolic acids content in the studied cultivars grains correlated with their extracts activity. Kernels of Start and Rodos cv. with higher content of ferulic, p-coumaric and caffeic acids were also characterized by higher antioxidant activity as compared to Rambo cv.

KEY WORDS: antioxidant activity, phenolic acids, spring barley.

Związki fenolowe stanowią szeroko rozpowszechnioną w świecie roślin grupę metabolitów wtórnych mających pozytywny wpływ na ludzkie zdrowie. Na szczególną uwagę zasługują funkcje biologiczne tych związków, wyrażające się aktywnością antyoksydacyjną i antyrodnikową, dlatego też wraz z karotenoidami, tokoferolami i witaminą C zaliczane są one do naturalnych składników żywności o charakterze przeciwutleniaczy [Peterson 2001]. Właściwości antyoksydacyjne tych związków polegają na eliminowaniu reaktywnych form tlenu, blokowaniu (zmiataniu) wolnych rodników (najczęściej nadtlenkowych, hydroksy-

lowych i hydroksynadtlenkowych), inhibicji enzymów z grupy oksydaz oraz chelatowaniu jonów metali (żelaza, miedzi). Przeciwutleniacze chronią w ten sposób organizm człowieka przed stresem oksydacyjnym i zapobiegają rozwojowi chorób, m.in. miażdżycy naczyń, oraz zmianom nowotworowym [Zieliński, Kozłowska 2000; Hollman 2001; Rosicka-Kaczmarek 2004]. Ziarno zbóż bogate jest w związki fenolowe, głównie kwasy fenolowe, tj. kwas ferulowy, waniliny, p-kumarowy oraz kawowy [Kähkönen i in. 1999; Peterson 2001]. Spośród kwasów fenolowych w największej ilości występuje kwas ferulowy, połączony za pomocą wiązania estrowego z resztą α -L-arabinozy łańcucha arabinoksyalanowego roślinnej ściany komórkowej [Zupfer i in. 1998]. Większość polifenoli, w tym kwasy fenolowe, występuje w zewnętrznej warstwie ziarniaka [Maillard, Berset 1995; Zupfer i in. 1998; Peterson i in. 2001]. Podczas procesów technologicznych zostaje ona usunięta wraz z łuską, powodując obniżenie potencjalnych właściwości antyoksydacyjnych końcowego produktu przemiału [Wołoch, Pisulewski 2003].

Celem podjętych badań była identyfikacja i analiza ilościowa kwasów fenolowych wyizolowanych z ziarna wybranych odmian jęczmienia jarego oraz określenie aktywności antyutleniającej ekstraktów tych związków z wykorzystaniem odczynnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (rodnik DPPH^{*}).

METODY

Materiał do badań stanowiły ziarniaki trzech oplewionych odmian jęczmienia jarego (Rodos, Rambo, Start), pochodzących z doświadczenia polowego zlokalizowanego w GD Czesławice, należącym do AR w Lublinie. Uprawę roli prowadzono w sposób typowy. Nawożenie w kg czystego składnika na 1 ha wynosiło: N – 60, P – 31, K – 75, raz na trzy lata stosowano obornik w ilości 30 t/ha. Ziarno przed siewem zaprawiono preparatem Funaben T (200 g/100 kg nasion). W ochronie chemicznej zastosowano: Aminopielik D (3 l/ha), Flordimex TH (2,5 l/ha), Decis 25 EC (0,25 l/ha), Tilt (0,5 l/ha), Alert (1 l/ha).

Ekstrakcję i hydrolizę związanych estrowo kwasów fenolowych w analizowanym ziarnie jęczmienia jarego przeprowadzono zgodnie z metodą podaną przez Maillard i Berset [1995]. Naważki mąki 0,5 g hydrolizowano z 2 mol NaOH w temperaturze pokojowej przez cztery godziny. Mieszaninę zakwaszono 2 mol HCl i ekstrahowano 3-krotnie octanem etylu. Zgromadzony ekstrakt odparowano do sucha w temperaturze 40°C. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczono w metanolu. Ekstrakt oczyszczono, stosując nylonowy filtr (0,45 μ m). Jedną część ekstraktu wykorzystano do badań właściwości antyoksydacyjnych, a drugą analizowano pod względem ilościowym i jakościowym za pomocą me-

tody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na aparacie firmy Knauer WellChrom z detektorem UV – VIS (detekcja 280 nm). Do identyfikacji stosowano wzorce kwasów fenolowych firmy Sigma.

Aktywność przeciwutleniającą ekstraktów kwasów fenolowych oznaczono metodą z rodnikiem DPPH[•] (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) firmy Sigma, opierając się na metodzie opisanej przez Sanchez-Moreno i in. [1998].

Do 0,1 ml ekstraktu dodawano 3,9 ml rodnika o stężeniu $6 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ (roztwór wyjściowy) i mierzono wartość absorbancji przy długości fali $\lambda=515$ nm w 5-minutowych odstępach.

Na podstawie przygotowanych roztworów DPPH[•] o stężeniach od $1 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ do $6 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ sporządzono krzywą wzorcową. Aktywność antyoksydacyjną wyrażoną jako procent inhibicji, obliczono wg wzoru:

$$\text{Inhibicja \%} = [(A_{Co} - A_{At}) / A_{Co}] \cdot 100$$

A_{Co} – absorbancja próby kontrolnej w czasie 0; A_{At} – absorbancja badanej próby mierzona co 5 minut przez 40 minut. Powyższe oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

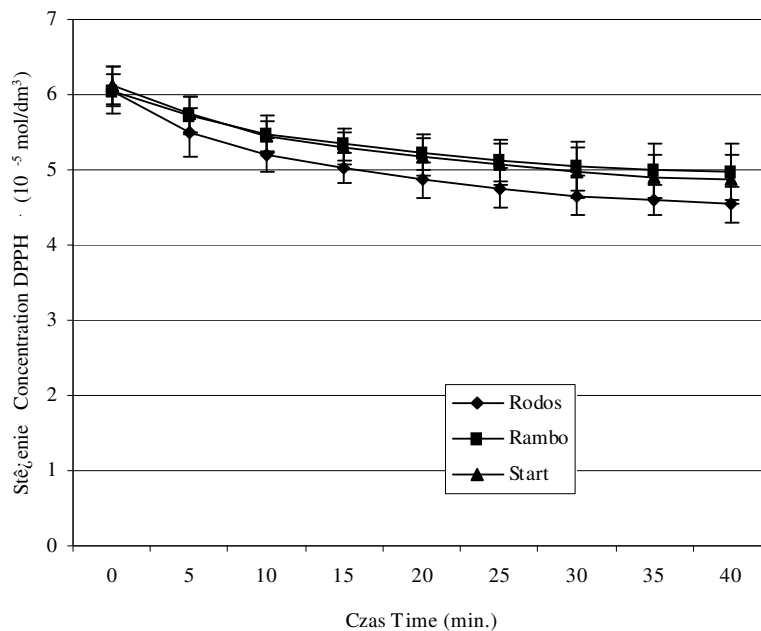
WYNIKI

Ze względu na skalę spożycia znaczącym źródłem antyoksydantów mogą być produkty zbożowe, bogate m.in. w kwasy fenolowe [Kähkönen i in. 1999; Zieliński, Kozłowska 2000; Peterson i in. 2001]. Na koncentracje tych związków mogą wpływać właściwości odmianowe, rok zbioru, a także lokalizacja uprawy [Lempereur i in. 1997; Zupfer i in. 1998; Emmons, Peterson 2001].

Antyoksydacyjne właściwości kwasów fenolowych oznaczano metodą polegającą na badaniu spadku wartości absorbancji zachodzących podczas reakcji redukcji stabilnego wolnego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH[•]) przez ekstrakty kwasów wyizolowanych z ziarna [Sanchez-Moreno i wsp. 1998].

Wyizolowane z ziarna trzech odmian jęczmienia kwasy fenolowe wykazywały zróżnicowaną zdolność do neutralizowania wolnych rodników, przy czym najwyższą aktywnością cechowała się odmiana Rodos (ryc. 1). Aktywność antyoksydacyjna kwasów fenolowych tej odmiany wyrażona jako % inhibicji była najwyższa i w końcowym czasie inkubacji wynosiła 24,5 % (ryc. 2).

Podczas całego okresu inkubacji kwasów fenolowych z DPPH[•] zdolność do hamowania reakcji rodnikowej była intensywniejsza w ciągu pierwszych 20 minut, kiedy stwierdzono wyraźne obniżenie stężenia DPPH[•] (ryc. 1). Odpowiadał temu wzrost aktywności antyutleniającej (jako procent inhibicji) od 5,5 do 19,6 % (ryc. 2). Wyniki te potwierdzają badania innych autorów, wykazujące, że

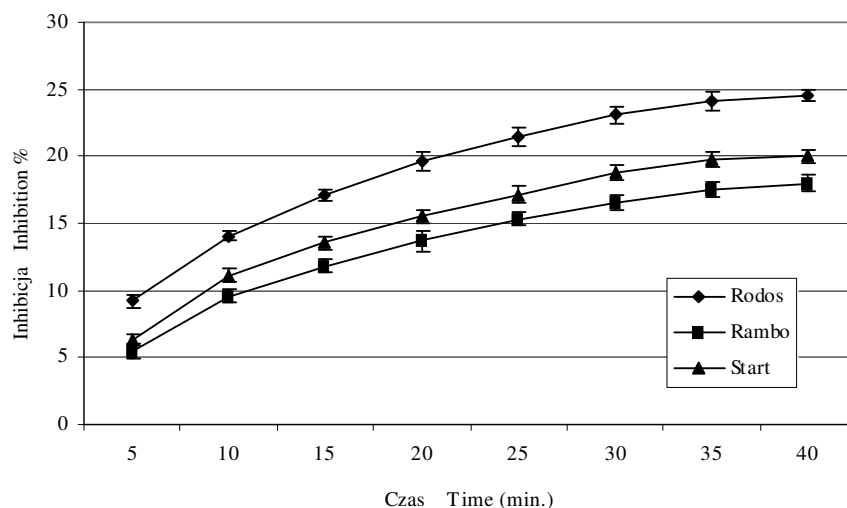


Rycina 1. Wpływ ekstraktów metanolowych kwasów fenolowych z ziarna 3 odmian jęczmienia jarego na stężenie DPPH* w czasie reakcji (\pm odchylenie standardowe $n=3$)
 Figure 1. Influence of methanolic extracts of phenolic acids from the grains of 3 cultivars of spring barley on DPPH concentration in the time of reaction (\pm standard deviation $n=3$)

obniżenie stężenia DPPH* wobec roślinnych antyoksydantów dobrze charakteryzuje zwłaszcza początkowe tempo reakcji [Peterson i in. 2002].

Po hydrolizie alkalicznej kwasów fenolowych z formy estrowej przeprowadzono jakościową i ilościową analizę ekstraktów tych kwasów metodą HPLC. Zawartość zidentyfikowanych kwasów fenolowych przedstawia tabela 1. Spośród kwasów fenolowych w największej ilości wystąpił kwas ferulowy, którego stężenie w badanych odmianach jęczmienia jarego było zróżnicowane i mieściło się w zakresie od 382,4 mg (Rambo) do 481,2 mg w 1 kg ziarna w odmianie Start. Zbliżone wyniki przedstawili Zupfer i in. [1998], oznaczając średnią zawartość tego kwasu w kilku odmianach jęczmienia na poziomie 477,5 mg/kg ziarna oraz Klepacka i in. [2001], uzyskując 401,2 mg kwasu ferulowego w kilogramie ziarna pszenicy. Z badań Lempereur i in. [1997] wynika, że zawartość tego kwasu w połączeniach estrowych kształtuje się na poziomie 870 mg/kg ziarna. Różnice w zawartości kwasu ferulowego w cytowanych pracach mogą być uwarunkowane czynnikami genetycznymi, środowiskowymi oraz różnymi

procedurami analitycznymi. Spośród odmian jęczmienia analizowanych w niniejszej pracy Start wyróżniała się najwyższą zawartością kwasu ferulowego, wanilinowego i kumarowego w ziarnie, natomiast najniższą zawartością zidentyfikowanych kwasów, z wyjątkiem wanilinowego, odznaczała się odmiana Rambo (tab. 1). Wyniki zawartości kwasów fenolowych w ziarnie badanych odmian korelowały z aktywnością antyutleniającą ich ekstraktów. Ziarniaki odmian Start i Rodos o wyższej zawartości kwasów: ferulowego, p-kumarowego i kawowego w porównaniu z odmianą Rambo wykazywały także wyższy efekt antyoksydacyjny tych związków.



Rycina 2. Wpływ czasu inkubacji na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów kwasów fenolowych z ziarna 3 odmian jęczmienia jarego wobec DPPH• (\pm odchylenie standardowe $n = 3$)
Figure 2. Influence of incubation time on antioxidant activity of extracts of phenolic acids from the grain of 3 cultivars of spring barley against DPPH• (\pm standard deviation, $n = 3$)

Wyniki uzyskane w niniejszym opracowaniu potwierdzają badania innych autorów, wykazujące dodatnią korelację aktywności przeciwutleniającej związków fenolowych zbóż z ich zawartością [Maillard i in. 1996; Zieliński, Kozłowska 2000].

Ze względu na złożony mechanizm neutralizowania wolnych rodników w różnych surowcach roślinnych nie zawsze potwierdza się jednak korelacja pomiędzy zawartością kwasów fenolowych a ich aktywnością antyutleniającą [Brand-Williams i in. 1995; Tagashiro i in. 1995].

Tabela 1. Zawartość kwasów fenolowych w ziarnie 3 odmian jęczmienia jarego
(± odchylenie standardowe n=3)
Table 1. Content of phenolic acids in grain of 3 cultivars of spring barley
(± standard deviation. n=3)

Kwasy fenolowe Phenolic acids (mg/kg)	Odmiany Cultivars		
	Rodos	Rambo	Start
Kwas ferulowy Ferulic acid	455,4±13,8	382,4±19,7	481,2±10,1
Kwas wanilinowy Vanillic acid	56,6±0,3	57,4±0,4	65,6±0,1
Kwas p-kumarowy P-cumaric acid	30,9±0,7	27,2±1,8	35,1±2,6
Kwas kawowy Caffeic acid	13,3±1,4	10,6±3,2	11,3±1,4

W badaniach nad zawartością i aktywnością antyutleniającą związków fenolowych owsa Emmons i Peterson [2001] stwierdzili istotny wpływ odmiany oraz miejsca uprawy na poziom kwasów fenolowych. Podobne wnioski wyciągnęli Lempereur i in. [1997] w przypadku kwasu ferulowego w pszenicy. Wymienieni autorzy nie odnotowali natomiast istotnego wpływu tych czynników na właściwości antyoksydacyjne analizowanych związków.

WNIOSKI

1. Badane ziarniaki jęczmienia charakteryzował zróżnicowany poziom zidentyfikowanych kwasów fenolowych, zależny od właściwości odmianowych.
2. Właściwości antyutleniające kwasów fenolowych zależały od czasu trwania reakcji oraz cech genotypowych jęczmienia jarego.
3. Ziarniaki odmian Start i Rodos, o wyższej zawartości kwasów: ferulowego, p-kumarowego i kawowego w porównaniu z odmianą Rambo, wykazywały także wyższą aktywność antyoksydacyjną ekstraktów tych związków.

PIŚMIENNICTWO

- Brand-Williams W., Cuvelier E., Berset C.M. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 28, 25–30.
- Emmons C.L., Peterson D. 2001. Antioxidant activity and phenolic content of oat as affected by cultivar and location. *Crop Sci.* 41, 1676–1681.

- Hollman P.C.H. 2001. Evidence for health benefits of plant phenols, local or systemic affects? J. Sci. Food Agric. 81, 842–852.
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vourela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, J. Agric. Food Chem. 47, 3954–3962.
- Klepacka J., Fornal Ł., Kuncewicz A. 2001. Zawartość kwasu ferulowego w okrywie nasiennej ziarna pszenicy, a wielkość ziarniaków. Materiały Konf. XXXII Sesja Naukowa KTiChŻ PAN, 120.
- Lempereur I., Rouau X., Abecassis J. 1997. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its millin fractions. J. Cereal Sci. 25, 103–110.
- Maillard M.N., Berset C. 1995. Evolution of antioxidant activity during kilning, Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. J. Agric. Food Chem. 43, 1789–1793.
- Maillard M.N., Soum M.H., Boivin P., Berset C. 1996. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. Lebensm. Wiss. U. Technol. 29, 238–244.
- Peterson D.M. 2001. Oat antioxidants. J. Cereal Sci. 33, 115–129.
- Peterson D.M., Emmons C.L., Hibbs A.H. 2001. Phenolic antioxidant and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. J. Cereal Sci. 33, 97–103.
- Peterson D.M., Hahn M.J., Emmons C.L. 2002. Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities *in vitro*. Food Chem. 79, 473–478.
- Rosicka-Kaczmarek J. 2004. Polifenole jako naturalne antyoksydanty w żywności. Przegl. Piek. Cukier. 6, 12–16.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Food Agric. 76, 270–276.
- Tagashira M., Watanabe M., Uemitsu N. 1995. Antioxidative activity of hopbitter acid and their analogues. Biosci. Biotech. Biochem. 59, 740–742.
- Wołoch R., Pisulewski P. 2003. Wpływ procesów technologicznych na właściwości antyoksydacyjne ziarna nieoplewionych i oplewionych form jęczmienia i owsa. Żywność 2, 42–49.
- Zieliński H., Kozłowska H. 2000. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. J. Agric. Food Chem. 48, 2008–2016.
- Zupfer J.M., Churchill K.E., Rasmusson D.C., Fulcher R.G. 1998. Variation in ferulic acid concentration among diverse barley cultivars measured by HPLC and microspectrophotometry. J. Agric. Food Chem. 46, 1350–1354.