

Urszula Gawlik-Dziki

**Wpływ gotowania na skład i aktywność antyoksydacyjną kwasów  
fenolowych wyizolowanych z brokołu**

---

The effect of cooking on composition and antioxidant activity of phenolic acids isolated  
from broccoli

ABSTRACT. The aim of the paper was to evaluate the effect of hydrothermal treatment on total content and antioxidant activity of phenolic acids isolated from broccoli. The polyphenol compounds were extracted from fresh and frozen broccoli (before and after boiling) with 50% methanol. After removing the solvent under reduced pressure the phenolic acids were extracted with diethyl ether:ethyl acetate (1:1) mixture from water extract. The obtained extracts were chromatographed on a Sephadex LH 20 column. The total phenolic acids content and their ability of inhibiting linoleic acid autooxidation was determined. A similar analysis was conducted of the water residue after boiling. In the extract obtained from raw fresh broccoli the synapic, ferulic, caffeic and syringic acids were identified. All phenolic acids were identified in the extracts from boiled broccoli and in the water residue. The raw frozen broccoli include synapic, ferulic, caffeic and syringic acid. All phenolic acids were identified in water residue, whereas the boiled frozen broccoli included only ferulic and syringic acid. The phenolic acids content decreased (80%) after cooking raw unfrozen broccoli. The water residue from fresh broccoli had a higher the phenolic acids content than the water residue from frozen vegetable. Samples obtained from raw broccoli were characterized by a lower ability of inhibiting linoleic acid autooxidation than samples obtained from boiled unfrozen vegetable. A reverse dependence was observed for samples obtained from frozen broccoli. The water residue from unfrozen broccoli was characterized by the highest antioxidant activity.

KEY WORDS: phenolic acids, antioxidant activity, broccoli, cooking

Żywność pochodzenia roślinnego stanowi bogate źródło naturalnych związków biologicznie aktywnych, których właściwości profilaktyczne i chemioprewencyjne są uwarunkowane przez aktywność przeciwutleniającą. W USA oraz w Wielkiej Brytanii substancje wzbogacające o działanie prozdrowotnym często określa się jako nutraceutyki [Janicki 2001]. Uczestniczą one w procesach naprawczych i adaptacyjnych ustroju, mogą działać profilaktycznie, a niekiedy leczniczo w różnych chorobach, nawet tych najgroźniejszych, jak miażdżycza czy nowotwory. Właściwości takie posiadają niektóre kwasy fenolowe – kwas kawowy, ferulowy, galusowy, elagowy [Lamer-Zarawska, Oszmiański 1998]. Badania epidemiologiczne wykazały, że poprawnie skomponowana dieta, dostarczająca kalorii głównie ze źródeł roślinnych, może zapobiegać rozwojowi pewnych chorób, np. nowotworów lub arteriosklerozy [Keys 1995]. Brokuły zdobywają coraz większe zainteresowanie jako ważne źródło różnorodnych klas biologicznie aktywnych związków. Należą do nich kwasy hydroksycynamonowe, stanowiące ze względu na działanie ochronne przed chorobami degeneracyjnymi bardzo interesującą grupę związków [Price i in. 1997]. O zawartości związków fenolowych decyduje gatunek rośliny i sposób jej uprawy, a w przypadku produktów żywnościowych również procesy technologiczne stosowane w trakcie obróbki surowca. Rosnąca popularność brokułów na naszym rynku skłania do badań nad przemianami zachodzącymi w tym warzywie podczas przetwarzania. Dotychczasowe badania w niewielkim stopniu dotyczą wpływu gotowania na poziom i właściwości antyoksydacyjne kwasów fenolowych obecnych w brokułach oraz w wywarze, dlatego też zagadnienie to stanowi przedmiot niniejszej pracy.

#### METODY

Materiałem do badań była handlowa mrożonka brokułów firmy „Hortex” oraz brokuły świeże, dostępne w handlu. Surowiec poddawano gotowaniu w 100 ml wody destylowanej w czasie 5 minut (brokuły mrożone) i 10 minut (brokuły świeże). Wywar zachowywano do dalszych badań.

1. Ekstrakcja kwasów fenolowych. Brokuły surowe lub gotowane homogenizowano i przenoszono ilościowo do kolby stożkowej. Ekstrakcję prowadzono 50% MeOH  $3 \times 1$  h w temperaturze pokojowej. Metanol odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem, nie przekraczając temperatury 50°C. Pozostałość wodną wymywano gorącą wodą, a po osiągnięciu temperatury pokojowej chłodzono w lodówce 24 h. Po tym czasie ekstrakt wodny przesączano, odrzucając wytrącone związki balastowe. Wodną pozostałość trzykrotnie odfuszczano eterem naftowym, następnie z fazy wodnej ekstrahowano kwasy fenolowe miesza-

niną eter dietylowy : octan etylu (1:1). Frakcje eterowe zbierano i łączono, po czym osuszano bezwodnym siarczanem sodu. Rozpuszczalniki organiczne odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczano w 10 ml czystego metanolu.

2. Rozdział metodą chromatografii kolumnowej [Strumeyer, Malin 1975]. Do badań pobierano 3 ml ekstraktu i наносono na kolumnę szklaną (o średnicy 2,6 cm i wysokości 39 cm) wypełnioną żelą Sephadex LH-20. Elucję prowadzono czystym metanolem, zbierając 5 ml frakcje (65–70 frakcji). Zawartość związków fenolowych monitorowano przez pomiar absorbancji przy długości fali 280 nm przy użyciu spektrofotometru Lambda 40 firmy Perkin-Elmer.

3. Oznaczanie zawartości kwasów fenolowych metodą Arnova [Farmakopea Polska, V, Warszawa 1999]. Do 5 ml wody destylowanej dodawano 1 ml badanego ekstraktu, 1 ml 0,5 mol HCl, 1 ml odczynnika Arnova, 1 ml 1 mol NaOH i uzupełniano wodą destylowaną do objętości 10 ml. Próbę wzorcową wykonano używając czystego metanolu zamiast przygotowanego ekstraktu. Absorbancję roztworów mierzono wobec wzorca przy długości fali 490 nm. Zawartość kwasów fenolowych (w przeliczeniu na kwas kawowy) obliczano według wzoru (FP V):  $X = 0,35087A / m$ , gdzie: A – absorbancja, m – masa naważki (g).

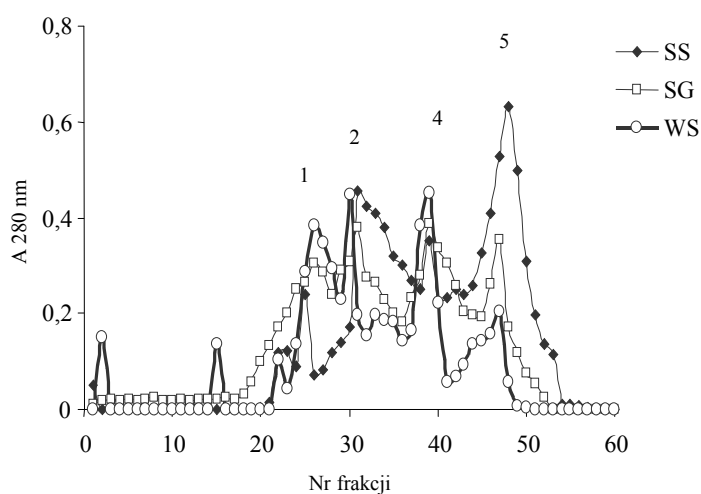
4. Oznaczanie aktywności antyutleniającej metodą Lingnerta [Lingnert i in. 1979]. Do próbek odmierzone po 2 ml emulsji 60% kwasu linolowego i preparatu Tween 20 w 0,1 molowym buforze fosforanowym o pH 6,5 oraz 0,2 ml badanego ekstraktu (kontrola – 0,2 ml wody destylowanej). Próbki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Następnie pobierano 0,2 ml inkubowanej próby, dodawano 6 ml 60% metanolu i 2 ml absolutnego metanolu. Absorbancję mierzono natychmiast przy długości fali 234 nm wobec 60% metanolu. Aktywność antyoksydacyjną określono według wzoru:  $AAC = (\Delta A_{234 \text{ nm}(C)} - \Delta A_{234 \text{ nm}}) / \Delta A_{234 \text{ nm}(C)}$ , gdzie:  $\Delta A_{234 \text{ nm}}$  – wzrost absorbancji badanej próbki przy długości fali 234 nm,  $\Delta A_{234 \text{ nm}(C)}$  – odpowiadający wzrost absorbancji próby kontrolnej.

5. Oznaczanie aktywności antyutleniającej metodą rodankową [Masuda i in. 1994]. Przygotowano mieszaninę 60% kwasu linolowego w 96% etanolu. Pobierano 1 ml sporządzonej mieszaniny i wprowadzano kolejno 1 ml 0,05 M buforu fosforanowego o pH 7, 0,2 ml badanego ekstraktu i 0,3 ml wody destylowanej uzyskując w ten sposób mieszaninę inkubacyjną. Do próby kontrolnej użyto 0,2 ml wody destylowanej. Próbki inkubowano w ciemności w temperaturze 40°C. Po tym czasie odmierzano do próbek po 0,1 ml mieszaniny inkubacyjnej, 9,7 ml 75% metanolu, 0,1 ml 30% rodanku amonu oraz 0,1 ml 0,02 M FeCl<sub>3</sub> w 3,5% HCl. Absorbancję mierzono przy długości fali 500 nm wobec 75% metanolu natychmiast oraz po 24 godzinach inkubacji. Aktywność antyoksydacyjną

określano według wzoru:  $AAC = (\Delta A_{500\text{ nm}(C)} - \Delta A_{500\text{ nm}}) / \Delta A_{500\text{ nm}(C)}$ , gdzie:  $\Delta A_{500\text{ nm}}$  – wzrost absorbancji badanej próbki przy długości fali 500 nm,  $\Delta A_{500\text{ nm}(C)}$  – odpowiadający wzrost absorbancji próby kontrolnej.

#### WYNIKI

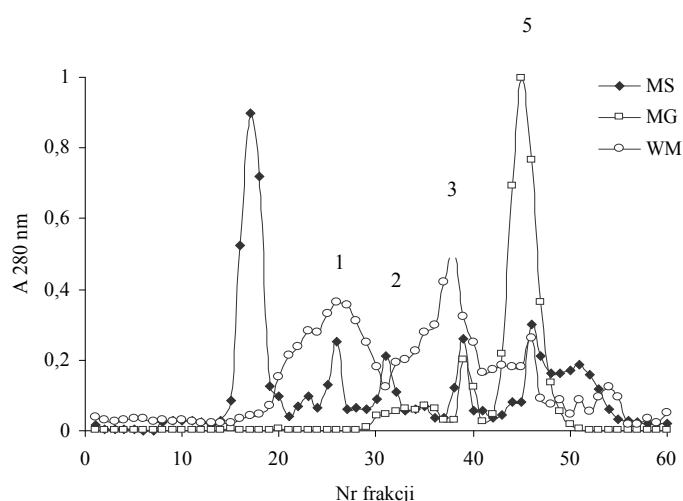
Po przeprowadzeniu rozdziału ekstraktu z brokułów świeżych surowych na żelu Sephadex LH-20 uzyskano cztery główne piki, które zinterpretowano jako odpowiadające kwasom: synapinowemu, kawowemu, ferulowemu i syringowemu. Te same kwasy fenolowe zidentyfikowano w próbce otrzymanej z brokułów świeżych gotowanych. Wszystkie fenolokwasy przeszły do wywaru (ryc. 1).



Rycina 1. Chromatogram kwasów fenolowych wyizolowanych z brokułów świeżych surowych (SS) i gotowanych (SG) oraz z wywaru (WS): 1 – kwas synapinowy, 2 – kwas kawowy, 3 – kwas ferulowy, 4 – kwas syringowy

Figure 1. Chromatogram of phenolic acids isolated from raw (SS) and boiled broccoli (SG) and water residue (WS): 1 – synapic acid, 2 – caffeic acid, 3 – ferulic acid, 4 – syringic acid

Po przeprowadzeniu rozdziału kwasów fenolowych wyizolowanych z brokułów mrożonych surowych uzyskano pięć głównych pików, z których cztery zidentyfikowano jako odpowiadające następującym wzorcom kwasów: synapinowemu, kawowemu, ferulowemu i syringowemu. Wszystkie wymienione związki przeszły do wywaru, natomiast w próbce zawierającej kwasy fenolowe wyizolowane z mrożonych brokułów gotowanych zidentyfikowano tylko dwa fenolokwasy – ferulowy i syringowy (ryc. 2). Beveridge i in. [2000] zidentyfi-

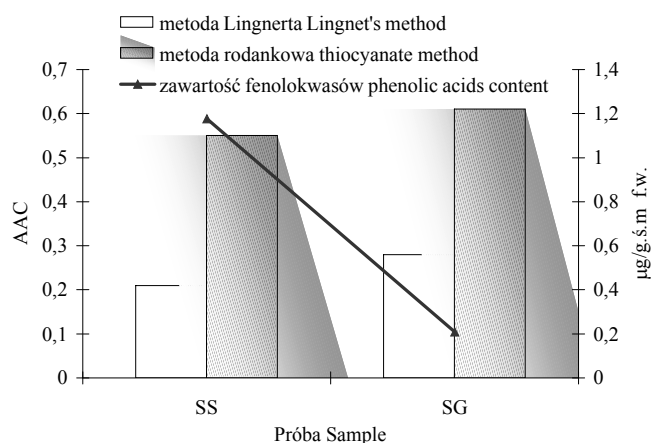


Rycina 2. Chromatogram kwasów fenolowych wyizolowanych z brokułów mrożonych surowych (MS) i gotowanych (MG) oraz z wywaru (WM): 1 – kwas synapinowy, 2 – kwas kawowy, 3 – kwas ferulowy, 4 – kwas syringowy

Figure 2. The chromatogram of phenolic acids isolated from raw frozen broccoli (MS) and boiled broccoli (MG) and water residue (WM): 1 – synapic acid, 2 – caffeic acid, 3 – ferulic acid, 4 – syringic acid

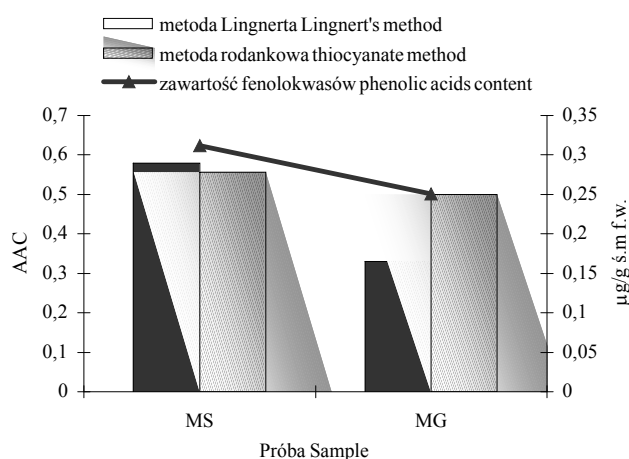
kowali w materiale ze ścian komórkowych brokułów kwas p-kumarowy i benzoowy. W warzywach z rodziny *Brassicaceae* opisano obecność kwasu chlorogenowego, p-kumarolilochinowego, i feruolilochinowego. Związki te występują w liściach jarmużu, kapusty i brukselce na poziomie od 6 do 120 mg/kg. Brokuły zawierają około 60 mg/kg kwasu chlorogenowego, około 20 mg/kg glikozydów. Ostatnie badania wykazały, że niektóre róże brokułów zawierają mieszaninę różnych feruolilosynapoliloestrów z gentobiozą w ilości powyżej 300 mg/kg. Róże brokułów i liście warzyw z rodziny krzyżowych są dobrym źródłem glikozydów kwasu synapinowego – róże brokułów dostarczają powyżej 10 mg/100 g związanego kwasu synapinowego [Clifford 1999].

Badanie aktywności antyoksydacyjnej kwasów fenolowych wyizolowanych z brokułów świeżych i mrożonych oraz z wywarów wykazały, że wykazują one wysoką aktywność antyoksydacyjną, jednak trudne jest jednoznaczne określenie wpływu ich zawartości na aktywność antyoksydacyjną badanych prób. W przypadku brokułów świeżych samoutlenianie kwasu linolowego efektywniej hamowały próby o niższej zawartości fenolokwasów, uzyskane z brokułów gotowanych (ryc. 3). Odwrotne zależności zaobserwowano w przypadku prób otrzymanych z brokułów mrożonych (ryc. 4).



Rycina 3. Aktywność przeciwutleniająca (AAC) oraz zawartość fenolokwasów w ekstraktach z brokułów świeżych surowych (SS) i gotowanych (SG)

Figure 3. Antioxidant activity (AAC) and total phenolic acids content in extracts obtained from raw (SS) and boiled broccoli (SG)



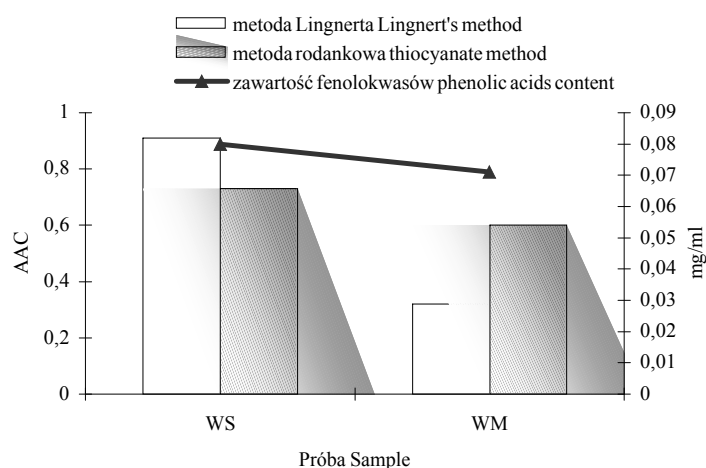
Rycina 4. Aktywność przeciwutleniająca (AAC) oraz zawartość fenolokwasów w ekstraktach brokułów mrożonych surowych (MS) i gotowanych (MG)

Figure 4. Antioxidant activity (AAC) and total phenolic acids content in extracts obtained from raw frozen (MS) and boiled broccoli (MG)

Brak jest jednoznacznych danych na temat zmian zawartości kwasów fenolowych podczas gotowania brokułów. Wyniki badań własnych wykazują stratę około 20% początkowej zawartości kwasów fenolowych w brokułach mrożo-

nych. W przypadku gotowania brokułów świeżych straty kwasów fenolowych są większe i sięgają do 80%. Wydaje się to uzależnione od czasu gotowania – brokuły mrożone są gotowe do spożycia po 5 minutach gotowania, brokuły świeże – po 10 minutach. W przypadku gotowania w wodzie świeżych warzyw straty kwasu chlorogenowego sięgają nawet do około 96% [de Maria i in. 1998]. Straty te uzależnione są od gatunku warzywa, temperatury i czasu gotowania. Cytowani autorzy stwierdzili straty 72% początkowej zawartości kwasu chlorogenowego w ziemniakach i 48% w marchwi, poddając warzywa uprzednio zblanszowane parą wodną procesowi gotowania przez 5 minut.

Obróbka hydrotermiczna ma istotny wpływ na zmiany zawartości kwasów fenolowych w ziarnach zbóż. Następuje wzrost zawartości wolnych kwasów i ich estrów, wyjątkiem są kwasy synapinowy i kawowy, które nie zostały wykryte w ziarnie poddanym procesom hydrotermicznym. Zjawisko to można wyjaśnić jako skutek wzajemnych przekształceń kwasów fenolowych i ich pochodnych, zachodzących podczas procesów technologicznych [Zieliński i in. 2001].



Rycina 5. Aktywność przeciwutleniająca (AAC) oraz zawartość fenolokwasów w wywarze z brokułów świeżych (WS) i mrożonych (WM)

Figure 5. Antioxidant activity (AAC) and total phenolic acids content in the water residue after boiling fresh (WS) and frozen (WM) broccoli

Podczas gotowania kwasy fenolowe dyfundowały do wody – otrzymany wywar wykazywał właściwości antyoksydacyjne niezależnie od metody oznaczenia (ryc. 5). W literaturze brak jest opracowań dotyczących właściwości przeciwutleniających wywaru pozostałego po gotowaniu warzyw. Niezależnie od metody zastosowanej do oznaczeń wyższą aktywność antyoksydacyjną wykazywał wywar z brokułów świeżych (ryc. 5).

## WNIOSKI

1. W ekstrakcie z brokułów świeżych surowych zidentyfikowano kwas synapinowy, ferulowy, kawowy i syryngowy. Te same fenolokwasy znajdowały się w ekstrakcie z brokułów gotowanych i w wywarze.

2. Surowe brokuły mrożone zawierały kwas synapinowy, kawowy, ferulowy i syryngowy. Wszystkie fenolokwasy przeszły do wywaru, natomiast w brokułach mrożonych po gotowaniu stwierdzono obecność tylko kwasu ferulowego i syryngowego.

3. Najwyższa zawartość fenolokwasów charakteryzowała ekstrakt ze świeżych brokułów surowych. Po gotowaniu straty fenolokwasów sięgały 80% wartości początkowej. W przypadku brokułów mrożonych zawartość fenolokwasów była niższa niż w warzywie świeżym. Po gotowaniu nastąpiła utrata około 20% początkowej ich zawartości.

4. Gotowanie nie wywarło wpływu na aktywność przeciwutleniającą brokułów świeżych.

5. Wysoką aktywnością przeciwutleniającą cechował się ekstrakt z surowych brokułów mrożonych. Aktywność antyoksydacyjna malała po gotowaniu niezależnie od metody stosowanej do oznaczeń, a wartości AAC różniły się w zależności od metody zastosowanej do ich oznaczania.

6. Wywar z brokułów świeżych charakteryzowała wyższa zdolność do hamowania samoutleniania kwasu linolowego niż wywar z warzywa mrożonego. Wartości AAC były uzależnione od metody zastosowanej do oznaczeń.

7. Nie stwierdzono jednoznacznej zależności pomiędzy zawartością fenolokwasów a aktywnością przeciwutleniającą badanych prób.

## PIŚMIENNICTWO

- Beveridge T., Loubert E., Harrison J.E. 2000. Simple measurement of phenolic esters in plant cell walls. *Food Res. Inter.* 33, 775–783.
- Clifford M.N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 79, 362–372.
- De Maria C.A.B., Trugo L.C., De Mariz e Miranda L.S. 1999. The content of individual caffeoylquinic acids in edible vegetables. *J. Food Comp. Annal.* 12, 289–292.
- Janicki A. 2001. Żywność funkcjonalna – potrzeba żywieniowa czy promocja nowych wyrobów. *Bezpieczna Żywność* 1, 5–8.
- Keys A. 1995. Mediterranean diet and public health: personal reflection. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 1321–1323.
- Lamer-Zarawska E., Oszmiański J. 1998. Rola niektórych substancji roślinnych w profilaktyce przeciwnowotworowej. *Wiadomości Zielarskie* 5, 1–4.



- Lingnert H., Vallentinn K., Eriksson C.E. 1979. Measurement of antioxidative effect in model system. *J. Food Process. Preserv.* 3, 87, 103.
- Masuda T., Jitoe A. 1994. Antioxidative and antiinflammatory compounds from activities of cassumunins A,B, and C, new complex curcuminoids from *Zingiber cassumunar*. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1850–1856.
- Price K.R., Casascelli F., Colquhoun I.J., Rhodes M.J.C. 1997. Hydroxycinnamic acid esters from broccoli florets. *Phytochemistry* 45, 8, 1683–1687.
- Strumeyer D.H., Malin M.J. 1975. Condensed tannins in grain sorghum: isolation, fractionation, and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 23, 909–914.
- Zieliński H., Kozłowska H., Lewczuk B. 2001. Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2, 159–169.

