

*Krzysztof Tambor, Jarosława Rutkowska, Seweryn Perajski*

## ANALIZA GC/MS FAZY NADPOWIERZCHNIOWEJ EKSTRAKTU Z SUSZONEGO BROKUŁU (*Brassica oleracea L. var. Italica*) OTRZYMANEGO PRZY WYKORZYSTANIU DITLENKU WĘGLA W STANIE PODKRYTYCZNYM

Zakład Analizy i Oceny Jakości Żywności  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Kierownik: dr J. Rutkowska

*Dokonano analizy GC/MS fazy nadpowierzchniowej (HS) ekstraktu LCO<sub>2</sub> (ditlenku węgla w stanie podkrytycznym) suszonego brokułu. Do izolacji związków lotnych z HS wykorzystano technikę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME). Identyfikację analizowanych związków uzyskano w oparciu o bazy danych widm masowych (MS) oraz potwierdzono tam gdzie było to możliwe metodą indeksów retencji (LRI). W badanym ekstrakcie spośród 159 uzyskanych pików chromatograficznych zidentyfikowano 29 związków chemicznych, co stanowi ilościowo 46,4% analizowanej mieszaniny.*

Hasła kluczowe: brokuł, GC/MS, warstwa nadpowierzchniowa, ekstrakcja dwutlenkiem węgla w stanie podkrytycznym.

Key words: broccoli, GC/MS, headspace, subcritical carbon dioxide extraction.

Brokuły zalicza się do najbardziej wartościowych warzyw ze względu na duże walory smakowe oraz właściwości odżywcze i zdrowotne. Brokuł jest doskonałym źródłem wielu witamin i mikro- oraz makroelementów, takich jak witamina C,  $\beta$ -karoten, witaminy z grupy B, wapń, magnez, żelazo, fosfor, potas (1). Charakteryzuje go również aktywność przeciwnowotworowa oraz działanie antyoksydacyjne (2, 3, 4, 5, 6, 7). Do najbardziej znanych biologicznie czynnych związków brokułu należą: glikozylozany, karotenoidy ( $\beta$ -karoten), sulforafan, związki indolowe i flawonoidy. Działanie prozdrowotne tych związków było przedmiotem wielu prac badawczych, (2, 3, 8, 9, 10). Wskazuje to na potrzebę prawidłowego i wydajnego ich pozyskiwania (ekstrahowania) z surowca. Ekstrakcje zwykle przeprowadza się z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych, jednakże do tego celu można z powodzeniem wykorzystać nietoksyczny dwutlenek węgla. Z punktu widzenia technologii żywności nie wymaga usuwania z ekstrahowanego materiału. Jest niepalny, posiada relatywnie niską temperaturę i ciśnienie krytyczne. Ekstrakcja ditlenkiem węgla znalazła więc szerokie zastosowanie do otrzymywania wyciągów z różnych roślin jadalnych lub ziół zawierających związki bioaktywne, np. gingerol z imbiru, związki aromatyczne z cebuli lub karotenoidy z papryki (8). Jak podaje *Herrero* i współpr. (9), ekstrakty otrzymywane przy zastosowaniu ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym są bogatsze w składniki bioaktywne oraz wykazują wyższą

aktywność antyoksydacyjną od ekstraktów uzyskanych z wykorzystaniem tradycyjnych metod ekstrakcji.

W celu identyfikacji oraz ilościowego oznaczenia związków brokołu, najczęściej wykorzystywana jest chromatografia cieczowa (HPLC) przy wykorzystaniu detektora DAD (Dioda Array Detector) lub kosztownego zestawu LC/MS (Liquid Chromatography/Mass Spektrometry) (8, 13). Natomiast wykorzystując bardziej dostępną niż LC/MS chromatografię gazową sprzęgniętą ze spektrometrią masową (GC/MS), można stosunkowo szybko wykonać analizę warstwy nadpowierzchniowej (Headspace) ekstraktu, identyfikując potencjalnie występujące tam lotne związki bioaktywne oraz te, które odpowiadają za charakterystyczny zapach warzywa.

Celem pracy była analiza GC/MS fazy nadpowierzchniowej ekstraktu z brokołu, otrzymanego przy zastosowaniu ciekłego ditlenku węgla w stanie podkrytycznym.

## MATERIAŁ I METODY

Materiałem badawczym był ekstrakt brokołu otrzymany w wyniku ekstrakcji dwutlenkiem węgla w stanie podkrytycznym (LCO<sub>2</sub>) w temperaturze -6°C Surowcem do ekstrakcji był brokuł (*Brassica oleracea L.*) klasy I. Proces ekstrakcji wykonano na eksperymentalnej aparaturze skonstruowanej przez prof. dr hab. *Andrzeja Stołyhwo* (14).

Do izolacji związków lotnych z fazy nadpowierzchniowej wykorzystano technikę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej – SPME (Solid Phase Microextraction). Ekstrakcja lotnych związków z warstwy nadpowierzchniowej została przeprowadzona przy wykorzystaniu włókna absorpcyjnego typu PDMS/DVB (polidimetylosiloksan/divinylobenzen, 65 μm). Przed każdą analizą włókno SPME było kondycjonowane w dozowniku chromatografu gazowego (GC) w temperaturze 250°C.

Próbkę ekstraktu LCO<sub>2</sub> z brokołu o masie 7 g umieszczono w fiolce o pojemności 20 ml, zamkniętej nakrętką z uszczelką silikonowo-teflonową. Fiolkę podgrzewano do temperatury 50°C przez 2 h, w celu ustabilizowania się stężeń substancji lotnych w warstwie nadpowierzchniowej. Następnie włókno SPME wprowadzono do warstwy nad powierzchnią ekstraktu na 45 minut, w trakcie których następowała absorpcja substancji lotnych na powierzchni włókna. Po upływie 45 minut włókno wyjęto z fiolki i szybko przeniesiono na 5 minut do dozownika chromatografu gazowego działającego w trybie „splitless” w temperaturze 230°C, celem desorpcji substancji osadzonych na włóknie.

Do badania składu substancji zdesorbowanych z włókna SPME wykorzystano GC Agilent 6890, połączony z kwadrupolowym spektrometrem masowym (MS) Agilent 5795 (Agilent Technologies).

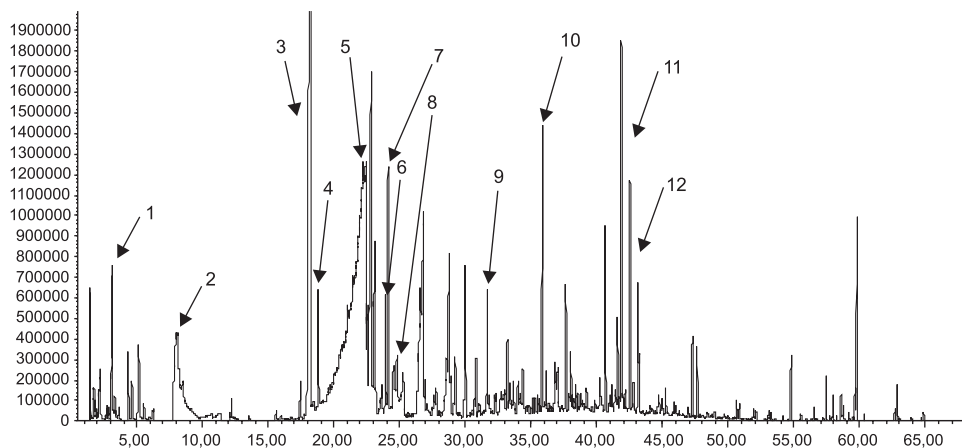
Zdesorbowane z włókna SPME substancje zostały rozdzielone na kolumnie HP-5MS (5%-difenilo-95%-dimetylpolisiloksan) przy prędkości przepływu gazu nośnego – 0,9 ml. Termostat GC zaprogramowano następująco: temperatura początkowa – 40°C przez 5 minut, następnie narost temperatury przy prędkości 3°C/min, aż do osiągnięcia temperatury końcowej 250°C. Widma masowe zostały uzyskane w trybie EI (Electron Ionisation) przy potencjale 70eV i w zakresie prędkości 20–350 m/z (a.m.u). Temperatury źródła jonów oraz analizatora masowego wynosiły odpowiednio 230°C oraz 150°C.

Otrzymane widma masowe poddano następnie analizie przy użyciu programu Enhanced ChemStation Data Analysis, oraz baz danych widm masowych NIST.05 (US National Institute of Standards and Technology) oraz Wiley.7n. Jako poprawną uznawano identyfikację na podstawie porównania widm masowych o trafności minimum 90%. Identyfikacje związków dokonane w oparciu o bazy danych poddano następnie weryfikacji (tam gdzie było to możliwe) metodą indeksów retencji (Linear Retention Index, LRI). W celu kalibracji LRI wykorzystano mix węglowodorów: „Alkane standard solution-C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>” (Fluka). Jako bazę danych indeksów retencji wykorzystano NIST.05.

Pięć jednostek LRI przyjęto jako maksymalną różnicę między wartością wyliczoną a tą z bazy danych.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W badanym ekstrakcie spośród 159 uzyskanych pików chromatograficznych zidentyfikowano 29 związków chemicznych.



Ryc. 1. Chromatogram SPME/GC/MS związków lotnych z warstwy nadpowierzchniowej ekstraktu LCO<sub>2</sub> brokołu.

Fig. 1. Chromatogram SPME/GC/MS of volatile compounds of broccoli LCO<sub>2</sub> extract.

1. 1-Penten-3-ol, 2. Dimetylosulfotlenek, 3. 2,4-heptadienal (E,Z), 4. 2,4-heptadienal (E,E), 5. Kwas heksanowy, 6. Linalol, 7. Nonanal, 8. Alkohol fenyletylowy, 9. Octan linalilu, 10. Octan  $\alpha$ -terpinenyłu, 11. Walencen, 12.  $\alpha$ -Farnezen

Większość zidentyfikowanych substancji to znane związki aromatyczne tworzące razem charakterystyczny aromat brokołu. Metanetiol (0,015%) ma charakterystyczny kapuściany, siarkowy zapach, heptanal (0,132%) z kolei specyficzny tłuszczowotrawiasty aromat (15). Natomiast linalol (0,865%) podobnie jak nonanal (1,634%) charakteryzuje się cytrusowym i kwiecistym aromatem (15).

W największej ilości (25,4%) zidentyfikowano kwas heksanowy (kapronowy), będący znanym nasyconym kwasem tłuszczowym o nieprzyjemnym zapachu oraz

2,4-heptadienal (E,E) (8%) wraz z jego stereoisomerem 2,4-heptadienalem (E,Z) o zapachu określanym jako tłuszczowy, orzechowy (15). W dużej ilości zidentyfikowano także sulfotlenek dimetylowy (DMSO). Związek ten prawdopodobnie powstaje w wyniku przemian glukozylanów naturalnie występujących w brokule. W smaku charakteryzowany jest jako „garlic-like” czyli czosnkowy. Związek ten znany jest medycynie jako środek przeciwbólowy, przeciwzapalny, oraz antyoksydant, jednakże ma on także właściwości toksyczne bowiem powoduje rozpad czerwonych ciałek krwi. Na uwagę zasługuje również zidentyfikowany dimetylosulfon (0,042%), będący metabolitem DMSO oraz związkiem strukturalnie do niego podobnym. W niektórych krajach (USA) jest on sprzedawany jako suplement diety, pomagający między innymi przy zapaleniu stawów. W sumie zidentyfikowane związki stanowią ilościowo 46,4% analizowanej mieszaniny.

Tabela I. Związki lotne zidentyfikowane w badanej próbce ekstraktu z brokołu

Table I. Identified volatile compounds in the sample of broccoli extract

Nr	Nazwa związku	Wzór sumaryczny	RT śr.	LRI obl.	LRI b.d.	ID	Względna procentowa zawartość
1	Metanetiol	CH <sub>4</sub> S	1,619	–	–	MS	0,015
2	1,3-Pentadien	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>	1,858	–	–	MS	0,050
3	Propanal, 2-metylo-	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O	1,948	–	–	MS	0,034
4	Kwas octowy	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	2,026– –2,295	–	–	MS	0,692
5	2-Butenal	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O	2,659	–	–	MS	0,012
6	1-Penten-3-ol	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	3,054	–	–	MS	1,233
7	2-Pentenal	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	4,371	–	–	MS	0,375
8	Dimetylosulfotlenek	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	7,771– –9,803	826	829,2	MS LRI	5,079
9	Kwas butanowy, 3-metylo-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	10,687	870	875	MS LRI	0,370
10	Kwas butanowy, 2-metylo-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	11,250	880	878	MS LRI	0,257
11	Heptanal	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	12,215	901,5	901	MS LRI	0,132
12	Dimetylosulfon	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	13,501	921,5	924	MS, LRI	0,042
13	2-heptenal	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	15,596	956,5	954	MS, LRI	0,071
14	2,3-oktanodion	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	17,444	987	984	MS, LRI	0,262
15	2,4-heptadienal (E,Z)	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O	18,185	999	1000	MS, LRI	0,700
16	2,4-heptadienal (E,E)	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O	18,811	1010	1010	MS, LRI	8,036
17	Kwas heksanowy	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	19,508– –22,427	–	–	MS	25,383
18	Linalol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	23,936	1101	1101	MS, LRI	0,865
19	Nonanal	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	24,124	1105	1103	MS, LRI	1,634
20	Alkohol fenylotylowy	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	24,538	1114	1117	MS, LRI	0,722
21	Dekanal	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	29,236	1206	1206	MS, LRI	0,432

Nr	Nazwa związku	Wzór sumaryczny	RT śr.	LRI obl.	LRI b.d.	ID	Względna procentowa zawartość
22	Benzenopropanonitryl	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N	30,807	1241	1246	MS, LRI	0,408
23	Octan linalilu	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	31,663	1258	1256	MS, LRI	0,804
24	Octan α-terpinenyli	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	35,849	1350,5	1352	MS	1,749
25	Tetradekan	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	38,0321	1400	1400	MS, LRI	0,393
26	Walencen	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	41,861	1493	1490	MS, LRI	2,457
27	α-Farnezen	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	42,524	1510	1508	MS, LRI	1,481
28	Kwas heksadekanowy, ester metylowy	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	57,454	1928,5	1928	MS, LRI	0,252
29	Kwas linolenowy, ester metylowy	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	62,852	2098	2099	MS	0,209
30	Niezidentyfikowane związki						53,604

Wyjaśnienie: Związki lotne zidentyfikowane w badanej próbce ekstraktu z brokołu, przedstawione jako procent powierzchni wszystkich pików na chromatogramie (względna procentowa zawartość).

RT – średni czas retencji, LRI obl. – obliczony indeks retencji, LRI b.d. – indeks retencji pozyskany z bazy danych, ID – metoda identyfikacji: MS – identyfikacja w oparciu o bazy danych MS, LRI – identyfikacja w oparciu o indeksy retencji

## WNIOSKI

Analiza GC/MS ekstraktów z brokołu wykazała oprócz typowych lotnych związków zapachowych, obecność związków, które mogą pochodzić z rozkładu glukozy-nolanów i być charakterystycznymi dla rodziny: *Brassica oleracea L. var. Italica*.

K. Tambor, J. Rutkowska, S. Perajski

GC/MS HEADSPACE ANALYSIS OF DRIED BROCCOLI (*Brassica oleracea L. var. Italica*) EXTRACT OBTAINED BY SUBCRITICAL CARBON DIOXIDE

### Summary

The aim of this work was GC/MS headspace analysis of air-dried broccoli LCO<sub>2</sub> extract. Solid Phase Microextraction (SPME) was used as a volatile isolation technique. The identification of the analyzed volatile compounds was achieved by using mass spectra libraries (MS). Identifications were confirmed where it was possible, by use of linear retention indices (LRI). Out of 159 obtained chromatographic peaks 29 compounds were identified, which represents quantitatively 46,4% of analyzed headspace mixture.

### PIŚMIENNICTWO

1. Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda B., Iwanow K.: Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych, Wyd. IŻŻ, Warszawa, 1998; 358. – 2. Zalewska-Korona M.: Zawartość wybranych związków biologicznie aktywnych w różnych odmianach brokułów (*Brassica oleracea var Italica*). Annal. Univers. Maria Curie-Skłodowska Lublin, Sec. E, 2004; 2033-2038. – 3. Steinmetz K. A., Potter J. D.: Vegetables, fruit and cancer prevention: A review. J. Am. Diet. Assoc., 1996; 96, 1027-1039. – 4. Cohen J. H., Kristal A. R., Stanford J. L.: Fruit and vegetables intakes and prostate cancer risk, J. Nat. Cancer Inst., 2000; 92 (1), 61-68. – 5. Le Marchand L., Yoshizawa C. N., Kolonel L. N., Hankin J. M., Goodman M. T.:

Vegetables consumption and lung cancer risk: population-based case-control study in Hawaii, *J. Nat. Cancer Inst.*, 1989; 81 (15), 1158-1164. – 6. *Olsen G. W., Mandel J. S., Gibson R. W., Wattenberg L. W., Schuman L. M.*: A case-control study of pancreatic cancer and cigarettes, alcohol, coffee and diet. *Am. J. Publ. Health*, 1989; 79 (8), 1016-1019. – 7. *Benito E., Obrador A., Stiggelbout A., Bosch F. X., Mutel M., Munoz N., Kaldor A.*: A population-based case-control study of colorectal cancer in Majorca. I. Dietary factors. *Int. J. Cancer*, 1990; 45 (1), 69-76. – 8. *Liang H., Yuan Q. P., Dong H. R., Liu Y. M.*: Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *J. Food Comp. Anal.*, 2006; 19, 473-476. – 9. *Szustakowska-Chojnacka M.*: 100 roślin w twojej kuchni: Wykorzystaj moc natury! Wyd. Lek. PZWL, 2007, Warszawa, 82-95. – 10. *Galan M. V., Kishan A. A., Silverman A. L.*: Oral Broccoli Sprouts from the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: A Preliminary Report. *Digestive Diseases and Sciences*, 2004; 49 (7-8), 1088-1090.

11. *Reverchon E., De Marco I.*: Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluids*, 2006; 38, 146-166. – 12. *Herrero M., Cifuentes A., Ibañez E.*: Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae a review. *Food Chem.* 2006; 98, 136-148. – 13. *Vallejo F., Tomás-Barberán F. A., Ferreres F.*: Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography – UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromat. A*, 2004; 1054, 181-193. – 14. *Rutkowska J., Stolyhwo A.*: Application of carbon dioxide in subcritical state (LCO<sub>2</sub>) for extraction/fractionation of carotenoids from red paprika, *Food Chem.* 2009; 115, 745-752. – 15. [www.odour.org.uk](http://www.odour.org.uk) (29.03.2009).

Adres: 02-787 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166.