

*Rafał Wołosiak, Gabriela Głowacka, Dorota Derewiaka, Małgorzata Piecyk,  
Beata Drużyńska, Elwira Worobiej*

## SKŁADNIKI PRZECIWUTLENIAJĄCE W WYBRANYCH ORZECHACH

Zakład Oceny Jakości Żywności i Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności  
Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Kierownik: prof. dr hab. *M. Obiedziński*

*W pracy oznaczano zawartość wybranych składników przeciwutleniających (związki fenolowe, aminowe, sterole i tokoferole) w najpopularniejszych orzechach (ziemnych, włoskich, laskowych i pistacjowych), a także aktywność zawierających je ekstraktów wobec rodników DPPH oraz nadtlenków kwasu linolowego. Stwierdzono, że największą aktywność przeciwrodnikową miały ekstrakty związków fenolowych (ze szczególnym znaczeniem tanin). W efekcie największą aktywność wobec nadtlenków kwasu linolowego miały orzechy włoskie o wyrażnie największej zawartości tanin.*

Hasła kluczowe: orzechy, taniny, katechiny, tokoferole, sterole, białka, aktywność przeciwutleniająca.

Keywords: nuts, tannins, catechins, tocopherols, sterols, proteins, antioxidant activity.

Organizmy wyższe, wykorzystując tlen w procesach oddychania komórkowego, zyskują bogate źródło energii. Niesie to jednak skutki uboczne w postaci występowania reaktywnych form tlenu, niebezpiecznych dla składników komórek niezbędnych do ich przeżycia i prawidłowego funkcjonowania (kwasów nukleinowych, enzymów itd.), może też inicjować reakcje oksydacyjne innych substancji, np. nienasyconych kwasów tłuszczowych. Organizm zapewnia sobie przetrwanie poprzez utrzymywanie odpowiedniej równowagi oksydoredukcyjnej dzięki zarówno mechanizmom enzymatycznym, jak i obecności drobnocząsteczkowych przeciwutleniaczy (1). Ważne jest zatem dostarczanie odpowiedniej ilości tych związków z pożywieniem. Do bardzo interesujących z żywieniowego punktu widzenia składników diety należą orzechy, zawierające wiele substancji aktywnych biologicznie, odżywczych i nieodżywczych. Dlatego celem niniejszej pracy było oznaczenie zawartości tych związków w orzechach, które potencjalnie mogą wykazywać działanie przeciwutleniające oraz określenie ich aktywności w modelowych układach oksydacyjnych.

### MATERIAŁ I METODY

Przeciwutleniacze rozpuszczalne w tłuszczach ekstrahowano n-heksanem, związki fenolowe – 70% acetonem, zaś rozpuszczalne w wodzie – 0,05 M buforem fosforanowym o pH 6,0, wytrąsając mieszaninę zmielonych orzechów i odpowiedniego

rozpuszczalnika (1:10 m/v) przez 1 h. Ekstrakty uzyskane przy użyciu acetonu i buforu fosforanowego odtłuszczano przy pomocy odpowiednio n-heksanu i chloroformu, po czym wirowano.

Zawartość steroli i tokoferoli oznaczano za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas po zmydleniu ekstraktu 2 M KOH w metanolu. Próbkę upochođniano w mieszaninie odczynnika silylującego i pirydyny, dodawano 1 ml heksanu i nastrzykiwano na kolumnę (ZB-5ms) 1  $\mu$ l mieszaniny (2). Rozdzielone substancje zidentyfikowano przy pomocy bibliotek widm masowych i określano ich zawartość przy pomocy wzorców ( $\alpha$ -tokoferolu i standardu wewnętrznego).

W ekstrakcie acetonowym oznaczono spektrofotometrycznie zawartość tanin skondensowanych ogółem metodą wanilinową (3) i katechin ogółem (4).

Zawartość białka ogółem w orzechach oraz białka rozpuszczalnego w buforze fosforanowym oznaczano metodą *Kjeldahla* stosując przelicznik azotu na białko wynoszący 6,25. Masy cząsteczkowe i udział poszczególnych frakcji białek rozpuszczalnych oznaczano przy pomocy chromatografii wykluczania w aparacie HPLC. Zastosowano kolumnę Supradex 200 HR 10/30 kalibrowaną przy pomocy białek o znanych masach cząsteczkowych w zakresie 12,5–540 kDa. Do określenia objętości martwej kolumny zastosowano Blue Dextran (2000 kDa). Detekcję prowadzono przy 280 nm, a fazę ruchomą stanowił 0,05 M bufor fosforanowy o pH 7 zawierający 0,15 M NaCl. Masy cząsteczkowe określano na podstawie równania podanego przez *Andrewsa* (5).

Zdolność składników orzechów do dezaktywacji wolnych rodników oznaczono w stosunku do stabilnych rodników DPPH (6) w chloroformie lub metanolu poprzez zmieszanie z 1 ml ekstraktu, odpowiednio w heksanie lub w pozostałych rozpuszczalnikach. Po 30 min reakcji mierzono absorbancję próbek przy 517 nm. Na podstawie uzyskanych absorbancji obliczano aktywność przeciwrodnikową wyrażoną jako procent zdezaktywowanych rodników.

Ponadto w pracy zbadano aktywność wszystkich składników poszczególnych orzechów w układzie emulsyjnym, wobec kwasu linolowego poddanemu autooksydacji katalizowanej dodatkiem hemoglobiny (7). Zawartość poszczególnych składników o potencjalnym działaniu przeciwutleniającym odtwarzano proporcjonalnie w emulsji w następujący sposób: naważano 112 mg kwasu linolowego i 50 mg Tween 20, po czym dodawano ekstrakt przygotowany w 70% acetonie i odpowiednią ilość roztworów  $\alpha$ -tokoferolu i  $\beta$ -sitosterolu w n-heksanie. Ten pierwszy był zdecydowanie dominującym związkiem rozpuszczalnym w tłuszczach, a przy pomocy dostępnego standardu  $\alpha$ -tokoferolu odwzorowano zawartość tokoferoli w orzechach. Dodawano je w postaci standardów, aby uniknąć wprowadzania innych składników tłuszczu surowego (w tym nienasyconych kwasów tłuszczowych) ekstrahowanych heksanem. Następnie rozpuszczalniki odparowywano strumieniem azotu, dodawano 0,05 M bufor fosforanowy o pH 7 i ekstrakt związków rozpuszczalnych w buforze fosforanowym, po czym całość homogenizowano przy 20500  $\text{min}^{-1}$  przez 30 s. Pobierano po 380  $\mu$ l emulsji i po dodaniu 20  $\mu$ l 0,035% roztworu hemoglobiny prowadzono reakcję utleniania w 37°C przez 10 min, po czym zatrzymywano ją dodając 5 ml HCl w etanolu. Zawartość nadtlenków oznaczano spektrofotometryczną metodą z tycyjanianem żelaza ( $\lambda=480$  nm). Aktywność wyrażano jako procent zawartości nadtlenków (w stosunku do próbki kontrolnej), których powstawanie hamowała obecność przeciwutleniaczy.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

We wszystkich badanych orzechach wśród analizowanych substancji rozpuszczalnych w tłuszczach dominował  $\beta$ -sitosterol (tab. I). Spośród steroli jedynie w orzechu ziemnym oznaczono także dziesięciokrotnie mniejszą zawartość stigmasterolu. Wykazano także obecność tokoferoli ( $\alpha$ - lub  $\gamma$ -), których zawartość była na podobnym do stigmasterolu rzędzie wielkości. Bardzo wyrównany był poziom katechin w badanych orzechach, z kolei zawartość tanin skondensowanych różniła się znacznie w poszczególnych próbkach – od 0,003 (ziemne) do 5,4% s.m. (włoskie). Analizowane orzechy były bogate w białko (24–33% s.m.), lecz jego rozpuszczalność była bardzo zróżnicowana – od 5–6% (włoskie, ziemne) do 35% (laskowe). Było to spowodowane faktem, że w przypadku tych pierwszych ekstrakcji ulegały prawie wyłącznie polipeptydy, a wchodzące w ich skład białka nie były (z jednym wyjątkiem) rozpuszczalne w zastosowanych warunkach (tab. II). W orzechach laskowych i pistacjowych wyraźnie zaznaczała się obecność frakcji białkowych, także dużych białek o masach kilkuset kDa oraz – choć w bardzo niewielkiej ilości – bardzo dużych białek wykluczanych z porów kolumny. W badanych ekstraktach występowała także bardzo niewielka ilość obu form witaminy C (oznaczenie HPLC – poniżej granicy oznaczalności).

Tab e l a I. Zawartość związków przeciwutleniających w badanych orzechach ( $\beta$ -s –  $\beta$ -sitosterol, st – stigmasterol,  $\alpha$ -t –  $\alpha$ -tokoferol,  $\gamma$ -t –  $\gamma$ -tokoferol)

Tab l e I. Content of antioxidant substances in studied nuts

Oznaczenie	Rodzaj orzechów			
	ziemne	laskowe	pistacjowe	włoskie
Skład frakcji niezmydl. się lipidów (mg/100 g s.m.)	150±6 $\beta$ -s 15±1 st 9±0 $\alpha$ -t	133±3 $\beta$ -s  35±5 $\alpha$ -t	410±15 $\beta$ -s  9±1 $\gamma$ -t	158±3 $\beta$ -s  22±3 $\gamma$ -t
Taniny ogółem (mg/100 g s.m.)	3±0	935±23	4062±35	5415±152
Katechiny ogółem (mg/100 g s.m.)	161±8	205±7	157±5	157±7
Białko ogółem (g/100 g s.m.)	32,8±0,2	27,8±0,7	27,5±0,4	23,6±0,1
Białko rozpuszczalne (g/100 g s.m.)	2,0±0,0	9,8±0,2	6,2±0,1	1,1±0,0

Aktywność przeciwnadrodnikowa ekstraktów heksanowych była bardzo podobna w przypadku orzechów laskowych i włoskich, a prawie nie występowała w ekstrakcie orzechów ziemnych (tab. III). Jest ona najwyraźniej przede wszystkim powiązana z występowaniem tokoferoli, a w mniejszym stopniu zależy od zawartości steroli (przede wszystkim  $\beta$ -sitosterolu). W badaniach ekstraktów przeciwutleniaczy aminowych (w buforze fosforanowym) jedynie orzechy ziemne okazały się źródłem aktywnych wobec rodników związków rozpuszczalnych. Ta aktywność nie była uzależniona od zawartości azotu w ekstrakcie (ekstrakt orzechów pistacjowych za-

Tabela II. Skład rozpuszczalnych frakcji białek i polipeptydów

Table II. Composition of soluble fractions of proteins and peptides

Rodzaj frakcji	Orzechy ziemne		Orzechy laskowe		Orzechy pistacjowe		Orzechy włoskie	
	(kDa)	% udziału	(kDa)	% udziału	(kDa)	% udziału	(kDa)	% udziału
Frakcje wykluczane	–	n.w.*	–	1,1	–	0,6	–	n.w.
Białka	17,7	10,3	~800	1,6	~700	2,4	49,6	0,7
	10,2	2,4	330	56,2	292	18,2	–	–
	–	–	138	3,3	15,5	13,5	–	–
	–	–	11,7	9,9	–	–	–	–
Peptydy	~3,5	16,9	~4,1	16,3	~4	50,1	~4,5	99,3
	~1,8	70,4	~1,8	8,0	~1,8	13,9	–	–
	–	–	~0,4	1,1	~0,1	1,4	–	–
	–	–	~0,2	2,5	–	–	–	–

\* n.w. – nie wykryto

Tabela III. Aktywność przeciwutleniająca badanych składników orzechów

Table III. Antioxidant activity of the studied ingredients of nuts

Rodzaj orzechów	Aktywność wobec DPPH* (%)			Aktywność wobec nadtlenuków (%)
	ekstrakcja heksanem	ekstrakcja 70% acetonem	ekstrakcja buforem	
Ziemne	3,3±1,1	8,2±0,2	13,2±0,5	40,8±2,6
Laskowe	12,1±1,3	15,3±0,3	n-o.*	36,6±4,8
Pistacjowe	8,0±0,1	7,9±0,3	1,8±0,8	45,3±2,9
Włoskie	11,9±0,9	7,9±0,4	3,5±1,4	75,8±1,1

\* n-o. – nieoznaczalne

wierał go trzykrotnie więcej), ani od formy jego występowania (białkowej lub peptydowej – ekstrakt orzechów włoskich zawierał prawie wyłącznie azot niebiałkowy, a pistacjowych większe niż ziemnych zawartości frakcji białkowych). Z danych literaturowych wiadomo, że zarówno skład aminokwasowy, jak i sekwencja aminokwasów mają tu kluczowe znaczenie (8), a białka roślin strączkowych (do których należą orzechy ziemne) są znane ze swoich dobrych właściwości przeciwutleniających (9). W bardzo bogatym w azot ekstrakcie orzechów laskowych (ze znacznie przeważającymi frakcjami białkowymi i szczególnie dużym udziale frakcji wielkocząsteczkowej o masie 330 kDa) nie udało się oznaczyć aktywności przeciwrodnikowej ze względu na wytrącanie się białek w warunkach oznaczenia. Zdecydowanie wyróżniającą się aktywnością charakteryzowały się ekstrakty przeciwutleniaczy fenolowych (ekstrahowane 70% acetonem), zawierające m.in. taniny i katechiny. Uzyskane wartości leżały w granicach 8–15%, lecz ekstrakty w celu uzyskania aktywności porównywalnych z pozostałymi zostały rozcieńczone: 10-krotnie w przy-

padku orzechów ziemnych i laskowych, 200-krotnie pistacji, a orzechów włoskich – 2500-krotnie. Te różnice wynikały przede wszystkim z niejednakowej zawartości tanin, przy wyrównanym poziomie katechin. Obecność frakcji tych związków o różnej aktywności oraz możliwe występowanie innych niż oznaczone substancji przeciwutleniających spowodowały, że zaobserwowane aktywności nie są całkiem proporcjonalne do zawartości tanin w ekstraktach.

Duża zawartość tanin była także najprawdopodobniej przyczyną największej aktywności połączonych przeciwutleniaczy orzechów włoskich wobec kwasu linolowego poddanego utlenianiu w układzie emulsyjnym w pewnym stopniu odtwarzającym warunki panujące w organizmie człowieka (oznaczenie powstających nadtlenków, tab. III). W tym układzie różnice w aktywności nie były już jednak tak duże, a pozostałe próbki wykazały podobne działanie (aktywność w granicach 37–45%).

R. Wołosiak, G. Głowacka, D. Derewiaka, M. Piecyk,  
B. Drużyńska, E. Worobiej

#### ANTIOXIDANT CONSTITUENTS OF CHOSEN NUTS

##### Summary

Chosen antioxidants content (amine and phenolic compounds, sterols and tocopherols) in popular nuts (peanuts, hazelnuts, walnuts, pistachio) and the activity of their extracts against DPPH radicals and linoleic acid peroxides were determined in the study. It was stated that the highest antiradical activity exhibited phenolic compounds (with special importance of tannins). As a consequence the highest activity against linoleic acid peroxides was observed in case of walnuts, of clearly highest tannin content.

#### PIŚMIENNICTWO

1. *Bartosz G.*: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003. – 2. *Cunha S.S., Fernandes J.O., Oliveira M.B.P.P.*: Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom. A*, 2006; 1128: 220-227. – 3. *Price M.L., van Scoyoc S., Butler L.G.*: A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 1978; 26: 1214-1218. – 4. *Swain T., Hillis W.*: The phenolic constituents of *Prunus Domestica*. *J. Sci. Food Agric.*, 1959; 1: 63-68. – 5. *Andrews P.*: Estimation of molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *J. Biochem.*, 1964; 91: 222-233. – 6. *Yen G.-Ch., Chen H.-Y.*: Antioxidant activity of various tea extract in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 1995; 43: 27-32. – 7. *Kuo J.M., Yeh D.B., SunPan B.*: Rapid photometric assay evaluating activity in edible plant material. *J. Agric. Food Chem.*, 1999; 47: 3206-3209. – 8. *Chen H.-M., Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K.*: Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, 1996; 44: 2619-2623. – 9. *Wołosiak R., Worobiej E.*: Aktywność antyoksydacyjna izolatu i hydrolizatów białek grochu. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 1999; 20: 105-111.

Adres: 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159 C.