

*Dorota Ogrodowska, Sylwester Czaplicki, Ryszard Zadernowski*

## SUBSTANCJE BIOLOGICZNIE AKTYWNE NATURALNIE WYSTĘPUJĄCE W OLEJU AMARANTUSOWYM

Katedra Przetwórstwa i Chemii Surowców Roślinnych Wydziału Nauki o Żywności  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Kierownik: prof. dr hab. *E. J. Borowska*

*Ciągle aktualne jest poszukiwanie nowych źródeł bioaktywnych składników żywności. Niewątpliwie surowcem ciekawym pod tym względem jest amarantus z bogatym w bioaktywne składniki olejem pozyskiwanym z jego nasion. Celem pracy było określenie zawartości związków biologicznie aktywnych (tokoferole, skwalen), naturalnie występujących w oleju amarantusowym. Podjęto się także próby ustalenia, w jakim stopniu miejsce uprawy oraz wielkość nasion decydują o zawartości tych składników. Stwierdzono, że nasiona amarantusa charakteryzują się dużą jednorodnością bez względu na rok i lokalizację uprawy. Przeprowadzone analizy wykazały, że olej amarantusowy jest bogatym źródłem skwalenu oraz tokoferoli, wśród których dominowały  $\alpha$ - i  $\beta$ - tokoferol. Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu lokalizacji lub roku uprawy na zawartość tokoferoli w olejach z nasion amarantusa.*

Hasła kluczowe: *Amaranthus cruentus*, skwalen, tokoferole, naturalne przeciwutleniacze.

Key words: *Amaranthus cruentus*, squalen, tocopherols, natural antioxidants.

Ze względu na walory odżywcze oraz wysoką zawartość składników biologicznie aktywnych amarantus jest coraz szerzej wykorzystywany do produkcji artykułów spożywczych. Na szczególną uwagę zasługuje olej amarantusowy, którego unikalną cechą jest zawarty we frakcji niezmylejającej skwalen. Właściwości przeciwutleniające skwalen zawdzięcza swej budowie, w której występuje 6 wiązań podwójnych o konfiguracji trans (1, 2). Związek ten otrzymywany jest głównie z oleju z wątroby rekina. Aspekt ekologiczny, tj. ochrona zwierząt morskich, przemawia za wykorzystaniem szarlatu jako źródła skwalenu (3, 4). W organizmie człowieka skwalen wchodzi w skład naturalnych lipidów kutikularnych, chroniących skórę przed działaniem agresywnych czynników zewnętrznych (2). Stosowany jest jako składnik maści farmaceutycznych oraz kosmetyków (5). Substancja ta wraz z tokotrienolami wymieniana jest jako inhibitor enzymu, który bierze udział w biosyntezie cholesterolu w wątrobie, tj. reduktazy HMG-CoA (hydroksymetyloglutarylo koenzymu A) (6, 7). W przyrodzie tokoferole i tokotrienole tworzą grupę ośmiu związków izomerycznych o różnej aktywności

biologicznej (8). Tokoferole szczególnie silnie hamują utlenianie lipidów głównie przez skuteczną eliminację rodników nadtlenkowych ( $RO_2^{\cdot}$ ) zanim te zdążą uszkodzić cząsteczki kwasów tłuszczowych lub składniki ścian. Aktywność przeciwutleniająca tych związków zależy m.in. od ich stężenia, składu triacylogliceroli w substracie, oraz obecności substancji, z którymi mogą one oddziaływać synergistycznie lub proutleniająco (9). *Malecka* (7) twierdzi, że najskuteczniejsze właściwości przeciwutleniające wykazują  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferol, nieznacznie gorsze  $\beta$ -tokoferol, a najgorsze  $\alpha$ -tokoferol, który to z kolei wykazuje największą aktywność witaminową. Prace *Leon-Camacho* i współpr. (4) dotyczące związków lipidowych oleju amarantusowego potwierdziły występowanie w nim trzech izomerycznych form tokoferoli.

Celem pracy było określenie zawartości związków biologicznie aktywnych (tokoferole, skwalen), naturalnie występujących w oleju amarantusowym oraz ustalenie, w jakim stopniu miejsce uprawy oraz wielkość nasion decydują o zawartości tych składników.

## MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto nasion *Amarantus cruentus* odmiany Aztek ze zbiorów w latach 2006 i 2007. Nasiona uprawiano na plantacjach zlokalizowanych w województwach lubelskim, małopolskim oraz dolnośląskim.

Partie nasion z różnych pól poddano analizie sitowej na zestawie sit laboratoryjnych firmy EKO-LAB. Komplet składał się pokrywy, dna oraz sit ułożonych jedno na drugim o coraz mniejszej średnicy oczek, mianowicie: 1,5; 1,4; 1,25; 1,18; 1,0 oraz 0,8 mm. Olej z nasion amarantusa pozyskiwano techniką tłoczenia na prasie ślimakowej Komet typ CA59G (Niemcy), a następnie oczyszczano z cząstek stałych na wirówce MLW-T24D firmy Janetzki (Niemcy).

Oznaczenie zawartości skwalenu w oleju przeprowadzono z zastosowaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC) według zmodyfikowanej metody opisanej przez *Czaplickiego* i współpr. (10). Analizę przeprowadzono przy użyciu systemu HPLC serii 1200 firmy Agilent Technologies wyposażonego w detektor fotodiodowy (PDA). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie LiChrospher RP-18, 250 × 4,6 mm, 5  $\mu$ m, w temperaturze 30°C. Zastosowano gradient rozpuszczalników: acetonitryl, izopropanol, heksan, przy natężeniu przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min. Detekcję prowadzono przy długości fali 218 nm. Analizę ilościową przeprowadzono w oparciu o krzywą kalibracyjną sporządzoną dla standardu skwalenu zakupionego w firmie Sigma-Aldrich.

Analizę zawartości tokoferoli w oleju przeprowadzono z zastosowaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC) wg metody opisanej przez *Paterson* i *Qureshi* (11). Analizę przeprowadzono przy użyciu systemu HPLC serii 1200 firmy Agilent Technologies wyposażonego w detektor fluorescencyjny (FLD). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie LiChrospher Si 60,5  $\mu$ m,

250 mm × 4 mm firmy Merck w temperaturze 25°C. Fazę ruchomą stanowił 0,7 % roztwór izopropanolu w heksanie.

Identyfikację poszczególnych składników mieszaniny dokonano na podstawie ich czasów retencji. Analizę ilościową przeprowadzono w oparciu o krzywą kalibracyjną sporządzoną dla wzorców  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - oraz  $\delta$ -tokoferolu firmy Merck.

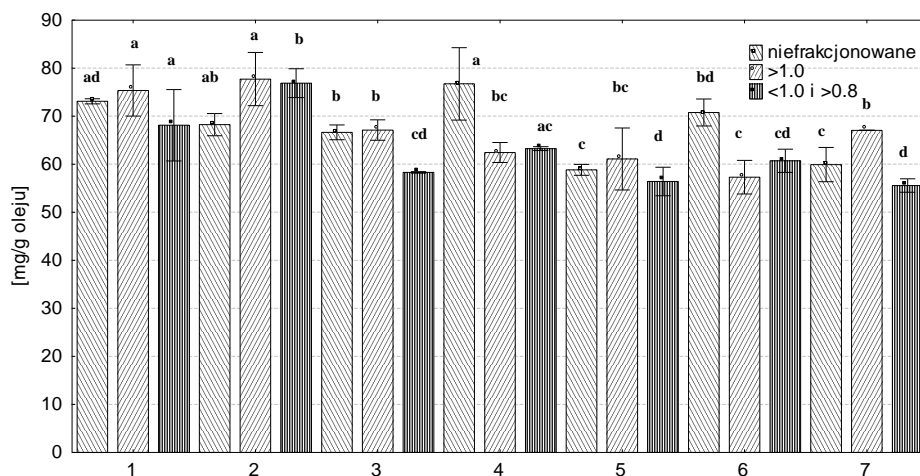
Na podstawie zawartości poszczególnych form tokoferoli obliczono ich aktywność biologiczną. Zastosowano wzór podany przez *Elmadfa* i *Bosse* (12):

$$1 \text{ mg } \alpha\text{-TE} = \alpha\text{-tokoferol} + 0,5 \cdot \beta\text{-tokoferolu} + 0,25 \cdot \gamma\text{-tokoferolu} + 0,01 \cdot \delta\text{-tokoferolu}$$

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Badane nasiona amarantusa charakteryzowały się dużą jednorodnością pod względem wielkości nasion. Zdecydowana większość podzielona była między dwie frakcje zebrane na sitach o wielkości oczek 1,0 mm x 1,0 mm i 0,8 mm x 0,8 mm. Otrzymano również frakcję stanowiącą odsiew na sicie o średnicy oczek 1,18 mm, jednakże nasiona o tych wymiarach stanowiły jedynie ułamek procenta całej przesiewanej partii, z tego powodu wprowadzono je do frakcji nasion o średnicy >1,0 mm. Frakcja stanowiąca przesiew przez sito o oczkach 0,8 mm składająca się głównie z zanieczyszczeń użytecznych i nieużytecznych i została odrzucona.

Zawartość skwalenu (ryc. 1) w próbkach olejów ze zbiorów 2007 r. była zróżnicowana. W nasionach nie poddanych frakcjonowaniu jego zawartość wynosiła w zależności od miejsca uprawy od 58,8 mg/g oleju w przypadku nasion uprawianych w okolicach Lublina (próbka 5) do 76,7 mg/g w olejach pozyskanych z nasion uprawianych w Oleśnicy (próbka 4). W oleju pozyskanym z nasion frakcjonowanych nie zaobserwowano wyraźnych zależności pomiędzy zawartością tego składnika a wielkością analizowanych nasion. W oleju pozyskanym z nasion frakcji >0,8 i <1,0 mm zawartość skwalenu wahała się od 56,4 mg/g do 76,9 mg/g odpowiednio dla nasion uprawianych w okolicach Lublina (próbka 5) i na plantacji w Łaziskach (próbka 2). Nasiona z plantacji w Łaziskach charakteryzowały się jednocześnie najwyższą zawartością skwalenu we frakcji nasion >1,0 mm, gdzie stwierdzono 77,7 mg tego składnika w przeliczeniu na jeden gram oleju. Olej z nasion uprawianych w 2006 roku na plantacji w Nowym Gaju (próbka 7) charakteryzował się niską zawartością skwalenu. W przypadku nasion niefrakcjonowanych jego zawartość sięgała 59,9 mg/g oleju. Po frakcjonowaniu nasion stwierdzono, że we frakcji nasion mniejszych od 1 mm a większych niż 0,8 mm zawartość skwalenu była najniższa spośród wszystkich badanych próbek (55,6 mg/g). W oleju z nasion frakcji >1,0 zawartość skwalenu sięgała 67,1 mg/g oleju, co stanowi wartość średnią na tle pozostałych lokalizacji. Porównywalne zawartości skwalenu w oleju z *Amarantus cruentus* uzyskali *Gamel* i współpr. (13) – 4,9%, oraz *Leon Camacho* i współpr. (14) – 65,6 mg/g.



Ryc 1. Zawartość skwalenu w oleju amarantusowym.

Fig. 1. Squalene content of amaranth oil.

Wyniki oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie istotności  $p < 0,05$  (test Duncan'a).

Próbka 1 - 2007 r., Hebdów, woj. małopolskie; próbka 2 - 2007 r., Łaziska, woj. lubelskie; próbka 3 - 2007 r., Piaski, woj. lubelskie; próbka 4 - 2007 r., Oleśnica, woj. dolnośląskie; próbka 5 - 2007 r., ok. Lublina, woj. lubelskie; próbka 6 - 2007 r., Nowy Gaj, woj. lubelskie; próbka 7 - 2006 r., Piaski Górne, woj. Lubelskie.

Wśród wielu substancji występujących w olejach roślinnych niezmiennie duże zainteresowanie budzą tokoferole (tab. I). Związki te są jednocześnie ich najważniejszymi i najlepiej poznanymi przeciwutleniaczami (7, 14). W analizowanych wariantach oleju amarantusowego zidentyfikowano  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferol, przy czym na podobnym poziomie kształtowała się zawartość izomerów  $\alpha$ - i  $\beta$ -, nieco mniejsza izomeru  $\delta$ -, zaś najmniejsza  $\gamma$ -tokoferolu. Spośród olejów wyłoczonych z nasion 2007 r., nie poddanych frakcjonowaniu, największą ogólną zawartością tokoferoli charakteryzowała się próbka 6 (1200 mg/kg), z frakcji 0,8-1,0 mm, próbka 2 (1281 mg/kg), a w olejach frakcji  $>1,0$  mm próbka 3 (1172 mg/kg). Oleje z nasion zebranych w roku 2006 i przechowywanych przez rok (próbka 7) stwierdzono ogólną zawartość tokoferoli na średnim poziomie w stosunku do nasion uprawianych w roku 2007. W zależności od wielkości nasion wartości te mieściły się w granicach 1155 mg/kg (olej z nasion  $>1,0$  mm) do 1246 mg/kg (olej z nasion  $>0,8$  i  $<1,0$  mm). Leon-Camacho i współpr. (4) badając olej amarantusowy uzyskali inne wartości poszczególnych form tokoferolu, mianowicie:  $\alpha$ -tokoferolu - 248 mg/kg,  $\beta$ - 546 mg/kg,  $\delta$ - 8 mg/kg, natomiast nie stwierdzili obecności  $\gamma$ -tokoferolu.

Tabela 1. Zawartość tokoferoli w oleju amarantusowym [mg/kg oleju]

Table 1. Tocopherols content of amaranth oil [mg/kg of oil]

Próbka	$\alpha$ - tokoferol	$\beta$ - tokoferol	$\gamma$ - tokoferol	$\delta$ - tokoferol	suma tokoferoli
Nasiona niefrakcjonowane					
1	426 ± 5,5 a	421 ± 22,9 ac	81 ± 8,7 a	238 ± 7,6 ac	1166 ± 44,8 a
2	405 ± 4,1 b	398 ± 2,0 b	97 ± 4,0 b	263 ± 2,6 b	1163 ± 12,7 a
3	421 ± 2,3 a	418 ± 11,8 ad	89 ± 3,3 bc	239 ± 6,2 a	1168 ± 23,5 a
4	428 ± 2,0 a	428 ± 3,6 ac	97 ± 1,9 b	226 ± 4,1 ac	1180 ± 11,7 a
5	448 ± 3,7 c	413 ± 2,6 ab	88 ± 7,4 ac	241 ± 10,7 a	1190 ± 24,4 a
6	448 ± 3,1 c	435 ± 4,6 c	90 ± 1,6 abc	228 ± 3,0 ac	1200 ± 12,3 a
7	426 ± 5,8 a	432 ± 12,6 cd	85 ± 4,9 ac	223 ± 22,3 c	1165 ± 45,4 a
Frakcja nasion > 1,0 mm					
1	408 ± 2,6 a	417 ± 17,1 a	90 ± 0,1 a	247 ± 3,4 a	1162 ± 17,9 a
2	380 ± 1,6 b	389 ± 3,6 b	98 ± 1,5 b	266 ± 5,2 b	1133 ± 11,9 a
3	414 ± 8,2 ae	424 ± 6,3 a	90 ± 1,2 a	245 ± 5,5 ad	1172 ± 21,1 a
4	396 ± 4,2 c	418 ± 9,7 a	97 ± 3,4 b	231 ± 9,4 ce	1141 ± 26,7 a
5	427 ± 13,8 d	389 ± 7,6 b	86 ± 5,2 a	236 ± 5,8 cd	1138 ± 32,4 a
6	422 ± 0,7 de	410 ± 0,9 a	89 ± 0,4 a	223 ± 2,4 e	1144 ± 4,4 a
7	403 ± 2,6 ac	423 ± 11,3 a	84 ± 5,2 a	244 ± 6,4 ad	1155 ± 25,4 a
Frakcja nasion > 0,8 mm i <1,0mm					
1	460 ± 19,0 a	445 ± 14,5 a	89 ± 2,6 a	246 ± 7,9 a	1239 ± 28,1 a
2	438 ± 7,5 b	406 ± 2,4 b	104 ± 3,0 b	265 ± 5,3 b	1213 ± 18,2 ac
3	469 ± 2,0 ad	461 ± 1,9 c	96 ± 1,1 c	255 ± 5,1 ab	1281 ± 10,2 b
4	469 ± 2,1 ad	425 ± 14,2 d	88 ± 3,8 a	216 ± 11,6 c	1197 ± 31,8 c
5	468 ± 2,0 ad	442 ± 1,3 a	97 ± 1,0 c	255 ± 3,2 ab	1263 ± 7,6 ab
6	495 ± 3,8 c	448 ± 4,0 ac	84 ± 1,8 a	225 ± 2,7 c	1251 ± 12,3 ab
7	479 ± 1,2 d	454 ± 5,0 ac	88 ± 3,6 a	225 ± 13,1 c	1246 ± 20,5 ab

Wyniki oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie istotności  $p < 0,05$  (test Duncan'a).

Results followed by the same letter are not significantly different at  $p < 0,05$  (Duncan's test).

Próbka 1 - 2007 r., Hebdów, woj. małopolskie; próbka 2 - 2007 r., Łaziska, woj. lubelskie; próbka 3 - 2007 r., Piaski, woj. lubelskie; próbka 4 - 2007 r., Oleśnica, woj. dolnośląskie; próbka 5 - 2007 r., ok. Lublina, woj. lubelskie; próbka 6 - 2007 r., Nowy Gaj, woj. lubelskie; próbka 7 - 2006 r., Piaski Górne, woj. lubelskie.

Oznaczenie zawartości poszczególnych homologów tokoferoli w badanych próbkach oleju amarantusowego posłużyło do obliczenia ich aktywności biologicznej. Z uwagi na najwyższą aktywność biologiczną  $\alpha$ -tokoferolu spośród wszystkich form tokoferoli, określanie aktywności biologicznej odnosi się do wyliczenia zawartości poszczególnych homologów o różnej aktywności witaminowej, a ich efektywność podaje się w ekwiwalentach  $\alpha$ -tokoferolu (14). Najwyższe aktywności biologiczne stwierdzono w olejach z frakcji nasion większych (>1,0 mm), a najniższe w olejach z frakcji nasion drobniejszych (0,8-1,0 mm). W przypadku olejów z nasion 2007 r. niefrakcjonowanych najwyższą aktywność biologiczną wyrażoną w mg  $\alpha$ -TE/kg, stwierdzono w próbce 6 (711). W olejach z frakcji nasion 0,8-1,0 mm, również próbka 6 odznaczała się najwyższą aktywnością biologiczną (762 mg  $\alpha$ -TE), a we frakcji >1,0 mm była to próbka 3 (672 mg  $\alpha$ -TE). W próbce 7 (2006r.) wartości te wynosiły odpowiednio dla oleju z

nasion: niefrakcjonowanych 685 mg  $\alpha$ -TE, frakcji 0,8-1,0 mm 751 mg  $\alpha$ -TE, oraz frakcji >1,0 mm - 660 mg  $\alpha$ -TE.

## WNIOSKI

1. Amaranthus charakteryzuje się dużą jednorodnością pod względem wielkości nasion bez względu na rok i lokalizację uprawy,
2. Olej amarantusowy jest bogatym źródłem skwalenu oraz tokoferoli.
3. Lokalizacja uprawy nie wpływa statystycznie istotnie na zawartość tokoferoli w olejach z nasion amarantusa.
4. Dominującymi tokoferolami oleju amarantusowego są  $\alpha$ - i  $\beta$ - tokoferol.

D. Ogrodowska, S. Czaplicki, R. Zadernowski

## BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES NATURALLY OCCURRING IN AMARANTH OIL

### Summary

The search of new sources of bioactive compounds which can be used in food supplements is still valid. Undoubtedly interesting material in this respect is amaranthus which is rich in bioactive compounds oil obtained from their seeds. The aim of this study was to determine the biologically active compounds (tocopherols and squalene) naturally occurring in amaranth oil content. Efforts were also undertaken to establish the extent the place of cultivation and seed size influence the content of these components. It was found that amaranth seeds have a high uniformity regardless of the year and location of cultivation. Studies have shown that amaranth oil is a rich source of squalene and tocopherols, among which alpha and beta tocopherol were dominant. There was no statistically significant effect of location or the year of cultivation on the content of tocopherols in amaranth oil.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Grajeta H.*: Wartość odżywcza i wykorzystanie szarlatu. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1997; 30 (1): 17-23.– 2. *Rutkowska J.*: Amaranthus – roślina przyjazna człowiekowi. *Przegl. Piek. Cukier.*, 2006; 1: 6-10.– 3. *Sun H., Wiesenborn D., Tostenson K., Gillespie J., Rayas-Duarte P.*: Fractionation of Squalene from Amaranth Seed Oil. *JAOCS*, 1997; 74 (4): 413-417.– 4. *León-Camacho M., García-González D. L., Aparicio R.*: A detailed and comprehensive study of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) oil fatty profile. *Eur. Food Res. Technol.*, 2001; 213 (4-5): 349-355.– 5. *Piesiewicz H.*: Co nieco o skwalenie. *Przegl. Piek. Cukier.*, 2006; 2: 8-10.– 6. *Paško P., Bednarczyk M.*: Szarłat (*Amaranthus* sp.) – możliwości wykorzystania w medycynie. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2007; 2: 217-222.– 7. *Malecka M.*: Składniki frakcji nieglicerydowej olejów roślinnych jako przeciwutleniacze. *Tłuszcze Jadalne*, 1995; 30: 123-130.– 8. *Sikorski Z. E.* (red.): *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności*. WNT, Warszawa, 1994; 381-383.– 9. *Grajek W.*: *Przeciwutleniacze w żywności – aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne*. WNT, Warszawa, 2007; 177-185.– 10. *Czaplicki, S., Zadernowski, R., Ogrodowska, D.*: Triacylglycerols from viper bugloss (*Echium vulgare* L.) seeds. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2009; 111: 1266-1269.
11. *Peterson D.M., Qureshi A.A.*: Genotype and Environment effects on tocols of barley and oats. *Cereal Chem.*, 1993; 70: 157-162.– 12. *Elmadfa I., Bosse W.*: *Vitamin E*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. 1985.– 13. *Gamel T., H., Mesallam A., S., Damir A., A., Shekib L., A., Linszen J., P.*: Characterization of amaranth seed oils. *J. Food Lipids*, 2007; 14: 323-334.– 14. *Nogala-Kałucka M., Gogolewski M., Lampart-Szczapa E., Jaworek M., Singel A., Szulczewska A.*: Determination of vitamin E active compounds as biological antioxidant occurring in rapeseeds of the selected varieties. *Rośliny Oleiste*, 2003; 24 (2): 577-586.

Adres: 10-957 Olsztyn, Pl. Cieszyński 1.