

*Aleksandra Karmańska, Irena Bąk-Sypień, Magdalena Panek,
Bolesław Karwowski*

BADANIE ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH ORAZ AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ SZPINAKU (*SPINACIA OLERACEA* L.)*

Zakład Bromatologii Katedry Bromatologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: dr hab. prof. nadzw. B. Karwowski

Oznaczono zawartość związków polifenolowych za pomocą odczynnika Foli-na-Ciocalteu'a oraz aktywność przeciwutleniającą z odczynnikami DPPH i ABTS w wyciągach wodno-etanolowych szpinaku. Najwięcej polifenoli i najwyższą aktywność przeciwutleniającą oznaczono w ekstraktach ze szpinaku świeżego wyhodowanego w Zgierzu i Bełchatowie. Proces blanszowania szpinaku miał wpływ na zmniejszenie potencjału antyoksydacyjnego i poziom polifenoli.

Hasła kluczowe: szpinak, polifenole, aktywność przeciwutleniająca – DPPH, ABTS.
Key words: spinach, polyphenols, antioxidant activity – DPPH, ABTS.

Warzywa są ważnym składnikiem naszej codziennej diety. Obok witamin i składników mineralnych dostarczają substancji o działaniu przeciwutleniającym. Są to przede wszystkim polifenole, witaminy A, C, E, karotenoidy, selen, cynk. Spożycie owoców i warzyw odgrywa ważną rolę w profilaktyce wielu chorób. Wśród warzyw wysoką aktywność przeciwutleniającą wykazują: pomidory (likopen), cebula (allina i allicyna), jarmuż, szpinak, brokuły (polifenole). Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zaleca spożywanie od 4 do 13 100 g porcji warzyw i owoców w ciągu dnia (1, 2). Szpinak (*Spinacia oleracea* L.) jest jednoroczną rośliną z rodziny Szarłatowatych (*Amaranthaceae*). Obejmuje 3 gatunki, z czego najbardziej znanym, powszechnie uprawianym jest szpinak warzywny (*Spinacia oleracea* L.). Można go spożywać zarówno w postaci surowej, w sałatkach, smoothies, jak i gotowany, duszony lub pieczony. Jest bogatym źródłem witamin i składników mineralnych. W 100 g świeżego szpinaku znajduje się 53 mg magnezu, 235 mg potasu, 93 mg wapnia, 29 mg fosforu oraz β -karoten (4243 μ g), witamina A (707 mg), witamina C (67,8 mg), witamina E (1,88 mg) (3).

Bunea i współpr. (4) oznaczyli zawartość karotenoidów i polifenoli w świeżym szpinaku. Głównymi karotenoidami zidentyfikowanymi w analizie HPLC były: luteina (37–53 mg/kg), β -karoten (18–31 mg/kg), wosaksantyna (9–23 mg/kg) i neoksantyna (10–22 mg/kg). Całkowita zawartość polifenoli w świeżym szpinaku wyniosła

* Praca finansowana z działalności statutowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Nr 503/3-045-02/503-01)

2088 mg GAE/kg. Po analizie LC-MS zidentyfikowano trzy kwasy fenolowe. Są to kwas orto-kumarowy (28–60 mg/kg), kwas ferulowy (10–35 mg/kg) i kwas p-kumarylowy (1–30 mg/kg).

Istotny wpływ na wartość odżywczą żywności mają procesy kulinarne. W zależności od rodzaju zastosowanej obróbki termicznej oraz czasu jej trwania, następuje zwiększenie lub zmniejszenie zawartości polifenoli, flawonoidów, co wpływa na wzrost lub spadek potencjału antyoksydacyjnego. Zmniejszenie poziomu przeciwutleniaczy może spowodować zwiększenie aktywności przeciwutleniającej, spowodowanej rozpadem ścian komórkowych i lepszą dostępnością innych związków. Czynniki obniżające potencjał przeciwutleniający podczas obróbki kulinarnej to utlenienie antyoksydanta, kompleksowanie z innymi związkami znajdującymi się w żywności, czy przejście w formę proutleniającą. Największe straty dotyczą witamin antyoksydacyjnych zwłaszcza witaminy C. Pierwszym etapem, gdzie może dojść do obniżenia potencjału antyoksydacyjnego jest obróbka wstępna (spadek aktywności o 20 do 60% w porównaniu do produktu wyjściowego) (1, 5). *Turkmen* i współpr. (6) badali zawartość związków fenolowych w różnych warzywach, które poddane zostały zabiegom kulinarnym, jak: gotowanie w wodzie i na parze w porównaniu z produktami świeżymi. Proces gotowania szpinaku w wodzie spowodował wzrost poziomu polifenoli o 101%, na parze o 103%. Gotowanie może wpływać również na zawartość karotenoidów. Najbardziej stabilna jest luteina, następnie β -karoten, podczas gdy wiolaksantyna bardziej polarna i rozpuszczalna, w największym stopniu podatna jest na degradację (7). Zmiany zawartości polifenoli w warzywach powoduje również ogrzewanie mikrofalowe (wzrost polifenoli w szpinaku o 109%) (6). Szpinak występuje w sprzedaży przez cały rok w formie świeżej, baby, mrożonej. Celem pracy było oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktów etanolowo-wodnych szpinaku świeżego i poddanego blanszowaniu.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły świeże liście szpinaku wyhodowane z nasion w ogródku w Zgierzu i Bełchatowie, młode liście szpinaku Baby dwóch producentów oraz mrożone jednego producenta, dostępne w handlu detalicznym. Z rozdrobnionych liści przygotowano ekstrakty etanolowo-wodne (80:20, v/v). Badano liście świeże, mrożone i poddane procesowi blanszowania (ogrzewanie przez 3 min temp. 100°C).

Całkowitą zawartość polifenoli oznaczono z zastosowaniem metody z odczynnikiem *Folina-Ciocalteu'a* wg *Singelton* (8). Na podstawie krzywej kalibracyjnej dla polifenoli ogółem wynik podano w przeliczeniu na kwas galusowy (mg/100 g produktu). Właściwości antyoksydacyjne ekstraktów badano metodą pomiaru zdolności wygaszania rodnika DPPH• (1,1-difenyl-2-pikrylohydrazyl, Sigma) i ABTS (2,2'-azynobis-3-etylobenzenotiazolino-6-sulfonionian diaminowy). Aktywność przeciwutleniającą oznaczono za pomocą parametru IC₅₀ (mg/ś.m.), określającego stężenie przeciwutleniacza powodujące spadek początkowego stężenia rodnika o 50% (9).

Wszystkie oznaczenia wykonano w 3 powtórzeniach. Wartości średnich i odchyłeń standardowych oraz równania regresji dla krzywych standardowych wyliczono

w programie Microsoft Office Excel 2013. Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu STATISTICA 9,0, stosując test Studenta. Różnice statystycznie istotne pomiędzy ekstraktami wodno-etanolowymi szpinaku świeżego, baby i mrożonego a szpinakami poddanymi procesowi blanszowania w obrębie jednej odmiany weryfikowano przy poziomie istotności $p \leq 0,001$ za pomocą testu Anova. Odmienne litery występujące w tabeli wskazują na różnice pomiędzy szpinakami świeżymi a blanszowanymi w obrębie jednej odmiany (a, b).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Całkowitą zawartość związków fenolowych oznaczono metodą z odczynnikiem *Folina-Ciocalteu* w przeliczeniu na kwas galusowy. Czynniki przedzbiorcze i uprawowe: warunki klimatyczne, stopień dojrzałości, okres zbioru wpływają na zawartość związków polifenolowych w warzywach. Najwięcej polifenoli oznaczono w ekstraktach ze szpinaku świeżego wyhodowanego w Zgierzu (284,3 mg \pm 2,34 mg GAE/100 g produktu) i Bełchatowie (280,5 mg GAE/100 g produktu). Niższe wartości podaje *Bunea* i współpr. (4) – 208,8 mg GAE/100 g produktu, stosując jednak inne rozpuszczalniki do ekstrakcji. Szpinak Baby jest odmianą cechującą się dużą wartością odżywczą. Zawartość polifenoli była jednak niższa w porównaniu ze świeżym szpinakiem (172,5 \pm 2,12 mg GAE szpinak Green Factory i 168,4 \pm 3,64 mg GAE/100 g produktu). Na zmiany aktywności przeciwutleniającej obok obróbki kulinarnej ma wpływ przechowywanie żywności pochodzenia roślinnego. Wielkość tych zmian zależna jest od pH, temperatury, zawartości tlenu oraz rodzaju produktu. Poziom polifenoli w szpinaku mrożonym wynosi 130,0 \pm 5,45 mg GAE/100 g produktu. *Bunea* i współpr. (4) podają, że po przechowywaniu szpinaku w różnych temperaturach przez 72 h (4°C lub -18°C) ilość wszystkich związków fenolowych zmniejszyła się o ok. 20%. *Bajcan* i współpr. (10) oznaczali poziom polifenoli w szpinaku mrożonym w temp. -18°C, który przechowywany był przez 10 miesięcy. Stwierdzili, że zawartość polifenoli zmniejszyła się o 43,1%. Proces blanszowania szpinaku w wodzie wpływa na spadek polifenoli. *Ismail* i współpr. (11) podają, że straty podczas 1 min blanszowania szpinaku wynoszą ok. 14%. Przeprowadzone badania wykazały, że 3 min blanszowanie spowodowało spadek poziomu związków fenolowych ok. 52% szpinak hodowany w Zgierzu i Bełchatowie, ok. 38% szpinak Baby Green Factory, i szpinak Baby Lidl oraz ok. 30% liście szpinaku mrożonego.

Właściwości przeciwutleniające wyznaczono na podstawie zdolności do wygaszania rodnika DPPH[•]. Wyznaczono IC₅₀ – jest to stężenie antyoksydantu powodujące spadek początkowego stężenia rodnika DPPH[•] o 50%, im mniejsza jego wartość tym bardziej reaktywny jest antyoksydant. Najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne oznaczono w wyciągu przygotowanym ze świeżego szpinaku wyhodowanego w Zgierzu (IC₅₀ 4,1 \pm 0,16 mg/ś.m.) i Bełchatowie (IC₅₀ 3,9 \pm 0,09 mg/ś.m.). Mniejszą aktywność wykazuje szpinak Baby Green Factory i Baby Ryneczek Lidla. Najmniejszym potencjałem oksydacyjnym cechował się ekstrakt ze szpinaku mrożonego Hortex (IC₅₀ 3,9 \pm 0,09 mg/ś.m.). *Bajcan* i współpr. (10) stwierdzili spadek aktywności oksydacyjnej mrożonego szpinaku po 10 miesiącach o 79,4%. Badany

szpinak poddano procesowi blanszowania. Blanszowanie żywności pochodzenia roślinnego wymywa składniki, ale z drugiej strony powoduje inaktywację enzymów powodujących utlenianie enzymatyczne związków przeciwutleniających. Aktywność przeciwutleniająca wszystkich blanszowanych próbek zmniejszyła się o ok. 28% szpinak hodowany w Zgierzu i Bełchatowie, szpinak Baby i o 10% szpinak mrożony Hortex.

Tab e l a I. Zawartość polifenoli w ekstraktach szpinaku (mg GAE/100 g świeżego produktu)

Tab l e I. Contents of total phenols in extracts of spinach (mg GAE/100g crude weight)

Rodzaj szpinaku/miejsce zakupu	Zawartość polifenoli w mg GAE/100 g świeżego szpinaku	
	szpinak świeży	szpinak poddany procesowi blanszowania
Szpinak świeży hodowany w Zgierzu	284,3±2,34 ^a	140,25±1,78 ^b
Szpinak świeży hodowany w Bełchatowie	280,5±3,12 ^a	136,45±5,23 ^b
Szpinak Baby Green Factory	172,5±2,12 ^a	106,25±2,78 ^b
Szpinak Baby Ryneček Lidla	168,4±3,64 ^a	110,50±3,05 ^b
Szpinak liście Hortex	130,0±5,45 ^a	91,30±5,73 ^b

Wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe, n=3

(a, b) – różnice statystycznie istotne w obrębie jednego rodzaju

Drugą metodą określającą pomiar zdolności antyoksydacyjnych jest reakcja z rodnikiem ABTS^{•+}. Najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne stwierdzono w ekstrakcie szpinaku świeżego wyhodowanego w Zgierzu i Bełchatowie (3,8± 0,12 mg/ś.m i 4,0±0,09 mg/ś.m). Najmniejsze właściwości miał wyciąg z mrożonego szpinaku IC₅₀ (6,6±0,06 mg/ś.m). Pod wpływem procesu blanszowania potencjał antyoksydacyjny zmalał o 38% szpinak wyhodowany w Zgierzu i Bełchatowie, 30% szpinak Baby i 12% szpinak mrożony Hortex.

Tab e l a II. Stopień wymiatania rodnika DPPH (IC₅₀) oraz kationorodnika ABTS (IC₅₀) mg/ś.m.

Tab l e II. The degree of scavenging DPPH (IC₅₀) and ABTS (IC₅₀) mg of crude weight

Rodzaj szpinaku/miejsce zakupu	IC ₅₀ – DPPH mg/ś.m.		IC ₅₀ – ABTS mg/ś.m.	
	szpinak świeży	szpinak poddany procesowi blanszowania	szpinak świeży	szpinak poddany procesowi blanszowania
Szpinak świeży hodowany w Zgierzu	4,1±0,16 ^a	5,6±0,12 ^b	3,8±0,12 ^a	6,1±0,10 ^b
Szpinak świeży hodowany w Bełchatowie	3,9±0,09 ^a	5,4±0,09 ^b	4,0±0,09 ^a	5,9±0,05 ^b
Szpinak Baby Green Factory	4,8±0,10 ^a	6,7±0,06 ^b	4,6±0,06 ^a	6,5±0,06 ^b
Szpinak Baby Ryneček Lidla	4,7±0,06 ^a	6,5±0,05 ^b	4,6±0,05 ^a	6,3±0,04 ^b
Szpinak liście Hortex	6,7±0,08 ^a	7,4±0,06 ^b	6,6±0,06 ^a	7,5±0,09 ^b

Wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe, n=3

(a, b) – różnice statystycznie istotne w obrębie jednego rodzaju

WNIOSKI

1. Badane szpinaki odznaczają się zróżnicowaną zawartością związków fenolowych ogółem oraz aktywnością przeciwutleniającą. Najwyższą zawartość polifenoli i aktywność przeciwutleniającą posiada szpinak wyhodowany w ogródku, najmniejszą szpinak mrożony.
2. Istnieje zależność pomiędzy poziomem związków fenolowych a zdolnością antyoksydacyjną badanych szpinaków
3. Proces blanszowania (obróbka termiczno-wodna) zmniejsza potencjał antyoksydacyjny i poziom polifenoli wszystkich rodzajów szpinaku.

A. Karmańska, I. Bąk-Sypień, M. Panek, B. Karwowski

STUDY OF POLYPHENOLS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SPINACH
(*SPINACIA OLERACEA* L.).

Summary

Increased consumption of fresh vegetables with high level of polyphenols is associated with a reduced risk of oxidative stress-induced disease. One of the vegetables we can include in our diet is spinach. Antioxidant activity of the spinach was determined by DPPH and ABTS reagent, total contents of polyphenols were determined using Folin-Ciocalteu reagent. The strongest oxidative properties were found in the extract of fresh spinach bred in Zgierz and Bełchatów, the smallest one in frozen spinach produced by Hortex. The blanching proces of spinach reduced the level of polyphenols and antioxidant activity.

PIŚMIENNICTWO

1. Gumul D., Korus J., Achremowicz B.: Wpływ procesów przetwórczych na aktywność przeciwutleniającą surowców pochodzenia roślinnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2005; 4(45): 41-48. – 2. Borowska J.: Owoce i warzywa jako źródło naturalnych przeciwutleniaczy. *Przem. Ferm. i Owoc.-Warzyw.* 2003; 5: 11-12, 6: 29-30. – 3. Kunachowicz H., Nadolna I., Iwanow K., Przygoda B.: Tabele składu i wartości odżywczej żywności. PZWL 2017. – 4. Różańska D., Regulska-Iłow B., Iłow R., Turło J.: Wpływ wybranych procesów kulinarnych na potencjał antyoksydacyjny i zawartość polifenoli. *Probl. Hig. Epidemiol.* 2014; 95(2): 215-222. – 5. Bunea A., Andjelkovic M., Socaciu C., Bobis O., Neacsu M., Verhe R., et al.: Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinaciaoleracea* L.). *Food Chem.* 2008; 108: 649-56. – 6. Turkmen N., Sari F., & Velioglu Y.S.: The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry.* 2005; 93(4): 713-718. – 7. Kidmose U., Knuthsen P., Edelenbos M., Justesen U., & Hegelund E.: Carotenoids and flavonoids in organically grown spinach (*Spinaciaoleracea* L.) genotypes after deep frozen storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2001; 81(9): 918-923. – 8. Singleton V.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 1965. – 9. Carmona-Jiménez Y., M. García-Moreno V., Igartuburu J.M., Barroso C.G.: Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chem.* 2014; 165: 198-204. – 10. Bajčan D., Tomáš J., Uhlířová G., Árvay J., Trebichalský P., Stanovič R., Šimanský V.: Antioxidant potential of spinach, peas, and sweet corn in relation to freezing period. *Czech J. Food Sci.* 2013; 31: 613-618.
11. Ismail A., Marjan Z.M., & Foong C.W.: Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry.* 2004; 87(4): 581-586.