

*Sylwester Czaplicki, Ryszard Zadernowski, Halina Nowak-Polakowska*

## ZWIĄZKI FENOLOWE NASION ŻMIJOWCA ZWYCZAJNEGO (*ECHIMUM VULGARE L.*)

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

*Nasiona żmijowca są surowcem do pozyskiwania biooleju bogatego w kwasy  $\gamma$ -linolenowy i stearydonowy. Skład kwasów tłuszczowych żmijowca jest niespotykany w innych surowcach roślinnych ale olej z nasion żmijowca jest bardziej podatny na zjawisko utleniania tłuszczu. W pracy tej podjęto się określenia ilości oraz właściwości związków fenolowych nasion żmijowca w aspekcie ich wpływu na wartość żywieniową biooleju żmijowcowego oraz możliwości ich wykorzystania w suplementowaniu żywności w naturalne antyoksydanty. Wyodrębnione związki fenolowe poddano ocenie jakościowej dzieląc je na grupy wykorzystując technikę ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Przeprowadzono także analizę kwasów fenolowych występujących zarówno w formie wolnej jak i związanej. Stwierdzono, że nasiona żmijowca są bogatym źródłem związków fenolowych co wyróżnia je od innych nasion oleistych. Wyzolowane polifenole to w 56% związki o charakterze hydrofobowym, których niemal połowę stanowi mieszanina 15 kwasów fenolowych. Kwas kawowy, salicylowy, *p*-OH-fenylloctowy, *p*-OH-benzoosowy i 3,4-di-OH-benzoosowy występowały zarówno w formie wolnej jak i związanej estrowo i glikozydowo*

Hasła kluczowe: żmijowiec zwyczajny, polifenole, kwasy fenolowe, naturalne przeciwutleniacze.

Key words: blueweed, polyphenols, phenolic acids, natural antioxidants.

Różni autorzy poświęcili wiele pracy w poszukiwaniu źródeł efektywnych naturalnych związków aktywnych biologicznie. Badania te zaowocowały poszerzeniem wiedzy na temat cennych składników jakie można pozyskać z owoców, warzyw, ziarna zbóż, nasion, ziół, przypraw, herbat, olejów. Prowadzone badania na ogół koncentrują się na kwasie askorbinowym, tokoferolach i karotenoidach, ale również brane są pod uwagę fitosterole oraz ekstrakty roślinne bogate w naturalne przeciwutleniacze takie jak: flawonoidy, katechiny, kwasy fenolowe oraz inne fenole (1-4).

Związki fenolowe produkowane przez organizmy roślinne stanowią pod względem chemicznym bogatą i bardzo zróżnicowaną grupę. Ich występowanie stwierdzono w różnych częściach morfologicznych: kwiatach, owocach, liściach, nasionach, korzeniach, oraz w korze i częściach zdrewniałych roślin (5-9).

Żmijowiec zwyczajny (*Echium vulgare*) jest rośliną dwuletnią należącą do rodziny szorstkolistnych – *Boraginaceae*. W pierwszym roku wegetacji pojawia się rozетка liści, natomiast dopiero w drugim roku są produkowane nasiona. Owocem żmijowca jest czterodzielna rozłupka, rozpadająca się na cztery brunatne jajowato trójkanciaste orzeszki. Roślina rocznie wytwarza od 500 do 2000 nasion (10, 11). Lipidy żmijowca, ze względu na wysoką zawartość kwasów wielonienasyconych są podatne na działanie substancji indukujących procesy ich psucia np. tlen, aktywne metale (Fe, Cu), światło itp. W środowisku naturalnym, jakim są nasiona żmijowca lipidy chronione są przed utlenieniem przez różnorodne substancje chemiczne o właściwościach przeciwutleniających. Ten skomplikowany układ ochronny tworzą substancje rozpuszczalne w wodzie (hydrofilne), do których zaliczane są głównie związki fenolowe oraz rozpuszczalne w tłuszczach (lipofilne) takie jak: sterole, tokoferole, karotenoidy i niektóre formy kwasów fenolowych. Analizując system ochronny (przeciwutleniający) nasion żmijowca, za istotne uznano zarówno substancje biologicznie aktywne frakcji hydrofilnej, skumulowane przede wszystkim w okrywie nasiennej, jak również substancje lipofilne, występujące głównie w tłuszczowcach (12-15).

olej pozyskany z nasion żmijowca stanowi unikalne roślinne źródło kwasu stearydonowego (C<sub>18:4</sub>). Zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych sięga w nim 70 %. Dzięki temu jest on niezwykle cenny ale również niezwykle podatny na utlenianie. W nasionach żmijowca obok oleju stwierdza się obecność związków biologicznie aktywnych, w tym również związków fenolowych. Aby można było otrzymać pożądaną jakości olej dziewiczy z nasion żmijowca należy dysponować materiałem, który w naturalny sposób nie będzie podatny na zmiany oksydacyjne. Związki fenolowe obecne w nasionach żmijowca pełnią m.in. rolę naturalnych przeciwutleniaczy.

W pracy tej podjęto się określenia ilości oraz właściwości polifenoli nasion żmijowca w aspekcie ich wpływu na wartość żywnościową biooleju żmijowcowego oraz możliwości ich wykorzystania w suplementowaniu żywności w naturalne antyoksydanty.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły nasiona żmijowca zwyczajnego zakupione w prywatnej firmie zielarskiej. Przed analizą nasiona rozdrobiono a następnie poddano odtłuszczeniu eterem naftowym w aparacie *Soxhleta*. Związki fenolowe ekstrahowano stosując trzykrotną ekstrakcję 80% metanolem. Połączone wyciągi alkoholowe po zagęszczeniu (na wyparce próżniowej w temperaturze nie przekraczającej 50 °C) były materiałem do dalszych badań.

Otrzymane substancje rozpuszczalne w 80% alkoholu rozdzielono na związki o charakterze hydro- i lipofilnym. W tym celu wyciąg alkoholowy otrzymany z 5 g śrutu rozpuszczono w 50 mL mieszaniny wodno - butanolowej (woda : alkohol n-butylowy, 1:1 (v/v)), kilkakrotnie wytrząsano i przenoszono do rozdzielacza w celu

oddzielenia fazy wodnej od n-butyłowej. Po dokładnym rozdzielaniu obydwie fazy zagęszczano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce próżniowej w temperaturze nie przekraczającej 50 °C i określano masę otrzymanej frakcji oraz zawartość związków fenolowych.

Fracjonowanie związków fenolowych przeprowadzono według metody opisanej przez *Oszmiańskiego* i współpracowników (16). W tym celu wydzielone związki o charakterze hydro- i lipofilnym poddano rozdzielaniu techniką ekstrakcji do fazy stałej na kolumnach BAKERBOND spe<sup>TM</sup> z wypełnieniem - oktadecyl C<sub>18</sub>. W wyniku opisanego toku postępowania związki fenolowe rozdzielono na 5 frakcji: fenolakwasów (I), związków niskocząsteczkowych kwaśnych (Ia), katechin, procjanidyn (II), flawonoli (III) oraz krótko łańcuchowych polimerów (IV). Poszczególne frakcje analizowano w kierunku oznaczenia zawartości związków fenolowych.

Analizę ilości związków fenolowych przeprowadzono stosując metodę kolorymetryczną używając do wywołania reakcji barwnej odczynnik *Folin-Ciocalteu* (17); zawarte związki przeliczano na ekwiwalent wzorca katechiny (+) (catechin hydrat 98%, firmy Aldrich Chemical).

W wyciągu alkoholowym skład kwasów fenolowych występujących w formie wolnej, jak również w postaci estrów i glikozydów oznaczano według metody opisanej przez *Zadernowskiego* (18). Rozdziału dokonano przy użyciu chromatografu gazowego HP 6890 firmy Hewlett Packard wyposażonego w detektor masowy MSD 5972 na kolumnie RTX-1 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm) firmy Restek. Identyfikację kwasów dokonano na podstawie ich widm masowych.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W niniejszej pracy odtłuszczoną śrutę nasion żmijowca ekstrahowano 80% alkoholem metylowym. Ilość wyodrębnionych składników organicznych sięgała 82,15 mg/g sm .

Tabela 1. Zawartość związków fenolowych oraz substancji wyekstrahowanej 80%-owym metanolem z odtłuszczonej mąki z nasion żmijowca.

Table 1. Content of phenolic compounds and substances extracted with 80% methanolic solution from defatted viper bugloss seeds flour.

Zawartość związków fenolowych w nasionach żmijowca (mg D-katechiny/g smb)	Zawartość związków fenolowych w wyciągu alkoholowym (mg/g sm)		Ilość wyciągu alkoholowego (mg/g sm)	
13.65 ± 0.54	166.19 ± 0.48		82,15 ± 1.10	
	rozpuszczalne w: wodzie	alkoholu n-butyłowym	W tym: faza wodna	faza n-butyłowa
	43,66 %	56,34 %	59,71 ± 1,20 (72,69%)	22,44 ± 1,40 (27,31%)

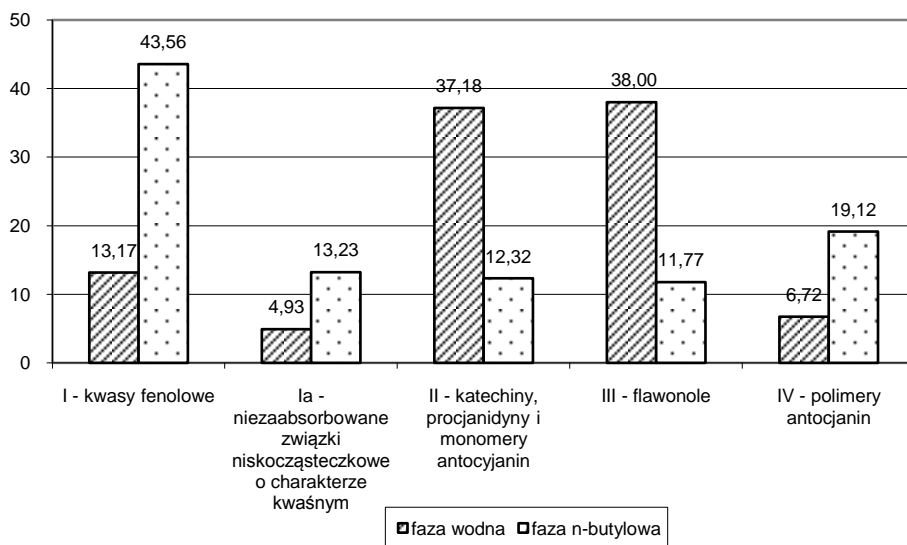
Ustalono, że 1 g odtłuszczonych nasion żmijowca zawiera 13,65 mg związków fenolowych w przeliczeniu na D-katechinę. W toku badań z 1 g śruty uzyskano ok. 82,15 mg wyciągu alkoholowego, z czego 72% stanowiły związki o charakterze hydrofilnym (rozpuszczalne w wodzie), a pozostałe ok. 27% związki lipofilne, rozpuszczalne w alkoholu n-butylovym.

Podobny udział składników organicznych, rozdzielanych na podstawie ich powinowactwa do fazy wodnej, stwierdzili *Zadernowski* i współpr. (7) w nasionach winogron, ogórecznika i czarnej porzeczki, z tą różnicą, że ogólna ilość otrzymanego przez nich wyciągu alkoholowego była nieco wyższa.

Zawartość związków fenolowych w badanych nasionach zamieszczono w tabeli I. W wyciągu wyodrębnionym z 1 g śruty żmijowcowej znajdowało się 166 mg związków fenolowych, wśród których właściwościami hydrofobowymi charakteryzowało się 56,34% związków, a hydrofilnymi pozostałe 43,66%. Porównując otrzymane dane liczbowe z wynikami prezentowanymi w literaturze, można stwierdzić, że nasiona żmijowca przewyższają pod tym względem ilości polifenoli nasion innych roślin oleistych. *Zadernowski* i współpr. (7) ustalili, że spośród sześciu gatunków badanych nasion, najwięcej związków fenolowych występowało w nasionach rzepaku (25,7 mg/g w smb.). Nasiona wiesiołka zawierały ich około 10 mg/g smb., a nasiona ogórecznika i winogron ok. 7 mg/g smb. Najuboższe pod tym względem okazały się być nasiona czarnej porzeczki i pigwy. W odtłuszczonej mące z tych nasion stwierdzono poniżej 3 mg/g smb. związków fenolowych.

Charakteryzując związki fenolowe nasion żmijowca wyodrębniono ich mieszaninę a następnie podzielono na frakcje techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Procentowy udział poszczególnych grup związków fenolowych frakcji hydro- i lipofilnej przedstawiono na rycinie 1. Z zestawionych danych wynika, że związki o właściwościach hydrofilnych stanowiły ponad 60% sumy związków fenolowych. Składały się na nie dwie grupy polifenoli, frakcja II, którą stanowią katechiny i procyjanidyny oraz flawonole stanowiące frakcję III. Pozostały udział procentowy przypadał na fenolokwasy i ich niskocząsteczkowe pochodne stanowiące odpowiednio 13,17% i 13,23% oraz polimery tanin (6,72%). Związki fenolowe o właściwościach hydrofobowych były mieszaniną fenolokwasów (43,56%) i ich niskocząsteczkowych pochodnych ( $\Sigma = 56,79\%$ ). Udział procentowy pozostałych grup związków przypadał w 12,32% na katechiny i procyjanidyny, 11,77% flawanole i 19,22% polimery tanin.

Chromatogramy uzyskane podczas analizy fenolokwasów występujących w postaci wolnej i związanej estrowo lub glikozydowo z innymi komponentami nasion przedstawiono w tabeli II. W grupie pięciu kwasów fenolowych występujących w postaci wolnej dominowały trzy: p-OH-benzoesowy, 3,4-di-OH-benzoesowy i kawowy. Wśród trzynastu kwasów fenolowych uwolnionych z połączeń estrowych dominowały dwa kawowy i p-kumarowy, a dziewięciu uwolnionych z połączeń glikozydowych o-OH-fenylooctowy i p-OH-benzoesowy przeważały ilościowo nad pozostałymi.



Ryc. 1. Udział procentowy poszczególnych grup związków fenolowych frakcji wodnej i n- butylowej.

Fig. 1. Percentage of each phenolic group in water and n-butanolic fractions.

Tabela II. Kwasy fenolowe nasion żmijowca

Table II. Viper bugloss seeds phenolic acids

	o-kumarowy	p-kumarowy	ferulowy	kawowy	sinapowy	benzoesowy	salicylowy	α-OH-fenylloctowy	o-OH-fenylloctowy	p-OH-fenylloctowy	3-fenylomlekowy	p-OH-fenylomlekowy	p-OH-benzoesowy	vanilinowy	3,4-diOH-benzoesowy
wolne	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
uwolnione z połączeń estrowych	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
uwolnione z połączeń glikozydowych	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

## WNIOSKI

1. Nasiona żmijowca stanowią bogate źródło związków fenolowych co wyróżnia je od innych nasion oleistych, w ponad 56% są związki o charakterze hydrofobowym.

2. Związki fenolowe nasion żmijowca charakteryzujące się właściwościami hydrofobowymi to w 43,56% kwasy fenolowe.

3. Kwasy fenolowe nasion żmijowca to mieszanina 15 związków, z których kwas kawowy, salicylowy, p-OH-fenylooctowy, p-OH-benzoowy i 3,4-di-OH-benzoowy występowały zarówno w formie wolnej jak i związanej estrowo i glikozydowo.

4. Nasiona żmijowca mogą stanowić źródło związków fenolowych stanowiących ochronę dla podatnych na utlenianie WNKT oleju żmijowcowego. Jednocześnie mogą być wykorzystane jako źródło związków bioaktywnych w suplementach żywności.

S. Czaplicki, R. Zadernowski, H. Nowak-Polakowska

PHENOLIC COMPOUNDS OF BLUEWEED (*ECHIUM VULGARE* L.) SEEDS

## Summary

Blueweed seeds are source of bio-oil rich in  $\gamma$ -linolenic and stearidonic acids. Their fatty acid composition is different from other plant sources and oil obtained from blueweed seeds is more susceptible to lipid oxidation. In this study phenolic compounds of defatted blueweed seeds in quantity and their affinity to lipid fraction was characterized. The extracted phenolic compounds were assessed qualitatively by dividing them into fractions using the solid phase extraction (SPE) technique. Free and bound phenolic acids were also analyzed. It was found that blueweed seeds are a good source of phenolic compounds which distinguishes them from others oilseeds. Isolated polyphenols are in 56% of hydrophobic compounds, of which almost half is a mixture of 15 phenolic acids. Caffeic, salicylic, p-OH-phenylacetic, p-OH-benzoic and 3,4-di-OH-benzoic acids appeared both free and ester and glycoside bound.

## PIŚMIENNICTWO

1. Pratt D.E.: Natural antioxidants from plant material. Chapter 5 in: Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants and Cancer Prevention. Huang M-T., Ho C-T., Lee C.Y. (eds). ACS Symposium Series, Washington 1992. USA: 54-71. – 2. Okuda T., Yoshida T., Hatano T.: Antioxidant effects of tannins and related polyphenols. Chapter 7 in: Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants and Cancer Prevention. Huang M-T., Ho C-T., Lee C.Y. (eds). ACS Symposium Series, Washington 1992. USA: 87-113. – 3. Farag R.S., El-Baroty G.S., Basuny A.M.: The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cv. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. Int. J. Food Sci. Tech., 2003; 38: 81-87. – 4. Yanishlieva N.V., Marinova E.M.: Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. Eur. J. Lipid Sci. Tech., 2001; 103 (11): 752-767. – 5. Oszmiański J.: Polifenole jako naturalne przeciwutleniacze w żywności. Przem. Spoż., 1995; 3: 94-96. – 6. Moszczyński P.: Rola polifenoli roślinnych we współczesnym żywieniu. Zdr. Żywn. - Zdr. Styl Życia, 1997; 2, (36): 8-11. – 7. Zadernowski R., Nowak-Polakowska H., Lossow B.: Naturalne przeciwutleniacze tłuszczu w nasionach wybranych gatunków roślin. Acta Acad. Agricult. Tech. Olst. Technologia Alimentorum, 1995; 27: 107-118, – 8. Zadernowski R., Nowak-Polakowska H.,

*Rashed A.A.A.M.*: Substancje biologicznie aktywne bioolejów roślinnych. cz. 1. Substancje niezmydlająca jako naturalne antyoksydanty, w: Zbiór prac III sympozjum n.t. „Olej z nasion wiesiołka i inne oleje, zawierające kwasy tłuszczowe n-6 lub n-3 w profilaktyce i terapii”, Stołyhwo A. (red), Sulejów, 15-16 maja 1998: 156-161. – 9. *Shalkevich M., Czaplicki S., Zadernowski R.*: Contents of L-ascorbic acid, phenolic substances and antioxidant properties of hydrophilic fractions of Sea-Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.). Fruit-Growing, 2004; 15: 331-335. – 10. *Diane N., Hilger H.H., Gottschling M.*: Transfer cells in the seeds of Boraginales. Bot. J. Linnean Society, 2002; 140: 155-164.

11. *Izmailow R., Biskup A.*: Reproduction of *Echium vulgare* L. (*Boraginaceae*) at contaminated sites. Acta Biol. Crac. Ser. Bot. 2003; 45 (1): 69-75. – 12. *Guil-Guerrero J.L., García-Maroto F., Vilches-Ferrón M.A., López-Alonso D.*: Gamma-linolenic acid from fourteen boraginaceae species., Industr. Crops Prod. 2003; 18, 85-89. – 13. *López-Martínez J.C., Campra-Madrid P., Guil-Guerrero J.L.*:  $\gamma$ -linolenic acid enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* seed oils and fatty acids by low temperature crystallization. J. Biosci. Bioeng. 2004; 97 (5): 294–298. – 14. *Surette M.E., Edens M., Chilton F.H., Tramosch K.M., Koumenis I.*: An open-Label study to evaluate the hypotriglyceridemic properties of echium oil. 94th AOCS Annual Meeting & Expo. May 4-7 2003, Kansas City, Kansas USA. – 15. *Coupland K., Hebard A.*: Stearidonic acid containing plant-seed oils: their potential for use in healthy foods. 93rd AOCS Annual Meeting & Expo Abstracts. May 5-8 2002, Montréal, Québec, Canada. – 16. *Oszmiański J., Ramos T., Bourzeix M.*: Fractionation of phenolic compounds in red wine. Am. J. Enol. Vitin., 1988; 3: 259-262. – 17. AOAC (Assotiation of the Official Analytical Chemists), Official Methods of Analysis, Washington DC 1974, 9. 110. – 18. *Zadernowski R.*: Studia nad związkami fenolowymi mąk rzepakowych i rzepikowych. Acta Acad. Agricult. Techn. Ols., Technologia Alimentorum, 1987; 21, Supl F.

Adres: 10-726 Olsztyn, Pl. Cieszyński 1.