

KAROL MIŃKOWSKI, KATARZYNA ZAWADA, STANISŁAW PTASZNIK,  
ARTUR KALINOWSKI

## WPLYW ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH NASION NA STABILNOŚĆ OKSYDACYJNĄ I AKTYWNOŚĆ ANTYRODNIKOWĄ WYTŁOCZONYCH Z NICH OLEJÓW BOGATYCH W PUFA n-3

### Streszczenie

Celem pracy było wykazanie, czy i w jakim stopniu naturalne związki fenolowe występujące w nasionach stanowią barierę przeciwutleniającą dla wytłoczonych z nich na zimno olejów, bogatych w polienowe kwasy tłuszczowe z rodziny n-3.

Materiał do badań stanowiły nasiona lnu, lnianki, konopi i żmijowca. Badaniom poddano oleje wytłoczone na zimno, oleje pozbawione natywnych związków fenolowych oraz oleje wzbogacone w hydrofobową frakcję związków fenolowych wyizolowanych z odolejonych nasion. Związki fenolowe ekstrahowano 70 % etanolem na gorąco, a surowy ekstrakt oczyszczano w układzie rozpuszczalników polarnych i niepolarnych.

Nasiona charakteryzowały się zróżnicowaną zawartością związków fenolowych, które w niewielkich ilościach przenikały do oleju podczas tłoczenia na zimno. Usunięcie związków fenolowych z olejów skutkowało wyraźnym obniżeniem ich stabilności oksydacyjnej w teście Rancimat oraz aktywności antyrodnikowej względem rodnika DPPH. Dodatek hydrofobowych związków fenolowych wyizolowanych z nasion poprawiał stabilność oksydacyjną i potencjał antyrodnikowy wytłoczonych z nich olejów. Siła ochronna i antyrodnikowa polifenoli nie była jednak duża. Skuteczność działania tych związków była zróżnicowana w zależności od rodzaju oleju i stosowanej dawki. Najwyższy współczynnik ochronny (0,52) uzyskano w przypadku oleju żmijowcowego, przy zastosowaniu maksymalnej dawki 1500 ppm. Największy wzrost aktywności antyrodnikowej względem rodnika DPPH miał miejsce w oleju lniankowym.

**Słowa kluczowe:** związki fenolowe, nasiona oleiste, oleje tłoczone na zimno, stabilność oksydacyjna, aktywność antyrodnikowa, PUFA n-3

---

*Dr hab. K. Mińkowski, prof. IBPRS, dr inż. S. Ptasznik, mgr inż. A. Kalinowski, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Oddział Technologii Mięsa i Tłuszczu, ul. Jubilerska 4, 04-190 Warszawa, dr K. Zawada, Zakład Chemii Fizycznej, Wydz. Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa*

## Wprowadzenie

Oleje roślinne bogate w polienowe kwasy tłuszczowe z rodziny n-3 (PUFA n-3) stanowią ważną pod względem żywieniowym grupę produktów tłuszczowych. PUFA n-3 pełnią istotną funkcję w profilaktyce niezakaźnych chorób przewlekłych, tzw. cywilizacyjnych chorób metabolicznych. Nie są syntetyzowane w organizmie człowieka i muszą być dostarczone wraz z pożywieniem. Ich wadą jest niska trwałość, a zwłaszcza podatność na procesy oksydacyjne. Oksydacja lipidów w żywności prowadzi do szeregu niekorzystnych zmian sensorycznych, wartości żywieniowej oraz akumulacji składników, które mogą być szkodliwe dla zdrowia konsumentów [28]. Procesy te w olejach tłoczonych na zimno są hamowane przez natywne przeciwutleniacze, głównie lipofilne, takie jak: tokoferole, karotenoidy, skwalen [3, 7, 14], a także przez związki fenolowe przedostające się w niewielkich ilościach do oleju podczas tłoczenia z nasion [22]. Są one obecne tylko w olejach tłoczonych na zimno. Oleje rafinowane praktycznie nie zawierają polifenoli, gdyż są one usuwane na etapie neutralizacji [11].

Wspólną cechą polifenoli jest łatwość włączania się do reakcji redox. Dzięki zdolności do przenoszenia protonów i elektronów nie tylko same łatwo ulegają utlenianiu do chinonów, ale mogą także pośredniczyć w utlenianiu innych związków nie-reagujących bezpośrednio z tlenem [30]. Skuteczność działania związków fenolowych wynika z ich silnej aktywności antyoksydacyjnej [25], a szczególnie antyrodnikowej [10]. Siger i wsp. [22], a także Papadimitriou i wsp. [16] stwierdzili istnienie korelacji pomiędzy zawartością polifenoli w olejach a ich stabilnością oksydacyjną i zdolnością do wygaszania wolnych rodników. Z kolei Espin i wsp. [8] po przebadaniu wygaszania rodnika DPPH<sup>•</sup> przez frakcję polarną (rozpuszczalną w metanolu i zawierającą związki fenolowe) szeregu olejów roślinnych wykazali, że tylko część z nich ma te właściwości. Spośród czynników wpływających na aktywność antyoksydacyjną związków fenolowych wymienia się pozycję i ilość grup hydroksylowych w strukturze cząsteczek, polarność, rozpuszczalność a także ich stabilność w czasie przerobu [6]. Związki te, powszechnie występujące w żywności pochodzenia roślinnego [30], są także obecne w surowcach oleistych, w których obok prostych rozpuszczalnych form występują formy spolimeryzowane – taniny oraz nierozpuszczalne – ligniny. Naturalne polifenole obecne w surowcach oleistych wykazują znaczącą aktywność antyoksydacyjną po ich wyodrębnieniu, która zależy od polarności stosowanego ekstrahenta i surowca, z którego pochodzą [13, 21, 29].

Celem pracy było wykazanie, czy i w jakim stopniu naturalne związki fenolowe występujące w nasionach stanowią barierę przeciwutleniającą dla wytłoczonych z nich na zimno olejów bogatych w polienowe kwasy tłuszczowe z rodziny n-3.

## Material i metody badań

Material wyjściowy stanowiły nasiona: lnu (*Linum usitatissimum L.*), lnianki (*Camelina sativa L.*), konopi (*Cannabis sativa L.*) i żmijowca pospolitego (*Echium vulgare L.*). Nasiona lnu, lnianki i konopi pochodziły z Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, a nasiona żmijowca ze Specjalistycznego Gospodarstwa Nasiennego i Przetwórczego SemCo ze Śmiłowa. Badaniom poddano tłoczone na zimno z nasion oleje: lniany, lniankowy, konopny i żmijowcowy. Tłoczenie oleju prowadzono w warunkach laboratoryjnych (w temp. nieprzekraczającej 45 °C) za pomocą prasy ślimakowej Farnet, typ UNO SE, produkcji czeskiej, stosując dyszę o średnicy 8 mm. Oleje w trakcie prowadzenia badań przechowywano w temp.  $-20 \pm 2$  °C.

### *Ekstrakcja związków fenolowych z nasion*

Nasiona wstępnie odtłuszczano poprzez ekstrakcję n-heksanem w aparacie Soxhleta w ciągu 6 h. Związki fenolowe z odtłuszczonych próbek ekstrahowano trzykrotnie za pomocą 80 % metanolu [15]. Próbki mieszano z rozpuszczalnikiem (w proporcji 1 : 3) i wytrząsano przez 30 min, po czym całość filtrowano i odparowywano rozpuszczalnik w temp. nieprzekraczającej 50 °C, przy obniżonym ciśnieniu. Pozostałość rozpuszczano w 80 % metanolu.

### *Ekstrakcja związków fenolowych z olejów*

Olej (3 g) rozpuszczano w 15 ml heksanu i ekstrahowano związki fenolowe za pomocą metanolu (3 × 5 ml) przez wytrząsanie po 2 min przy każdej ekstrakcji [9]. Połączone ekstrakty zostawiano na 16 h. Po rozdziale frakcję metanolową przemywano 25 ml heksanu w celu usunięcia resztek oleju.

### *Otrzymywanie preparatu związków fenolowych z wytlóków*

Nasiona poddawano tłoczeniu na zimno za pomocą prasy ślimakowej. Otrzymane wytloki po rozdrobieniu w młynku udarowym odtłuszczano za pomocą eteru naftowego w aparacie Soxhleta w ciągu 6 h. Odolejone wytloki zalewano 70 % etanolem (1 : 8), po czym prowadzono ekstrakcję związków fenolowych w reaktorze (poj. 1 l) z płaszczem grzejnym, pod chłodnicą zwrotną, z zastosowaniem mieszania mechanicznego (50 obr./min) w temp. 50 °C, w ciągu 1 h. Po sklarowaniu (16 h) wyciąg alkoholowy dodatkowo poddawano wirowaniu (3500 obr./min, 10 min). Z wyciągu usuwano rozpuszczalnik w wyparce pod obniżonym ciśnieniem, w temp. poniżej 50 °C. Resztki wody usuwano za pomocą suszarki próżniowej, w temp. poniżej 50 °C i otrzymywano surowy ekstrakt związków fenolowych.

Surowy ekstrakt oczyszczano za pomocą rozpuszczalników polarnych i niepolarnych [32]. Po rozpuszczeniu ekstraktu w mieszaninie chloroformu, metanolu oraz wody (1 : 1 : 1) i rozdziale faz odrzucano frakcję chloroformową, a z frakcji metanolowo-

wodnej usuwano metanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Z pozostałości ekstrahowano związki fenolowe za pomocą eteru etylowego. Następnie usuwano rozpuszczalnik i ważono uzyskane związki fenolowe. Otrzymany preparat po rozpuszczeniu w eterze etylowym dodawano do odpowiednich olejów, po czym usuwano rozpuszczalnik przy obniżonym ciśnieniu w wyparce z przedmuchem azotu. Stosowano trzy poziomy dodatki preparatu do oleju: 600, 1000 i 1500 ppm.

#### *Oznaczanie zawartości związków fenolowych ogółem w nasionach i olejach*

Oznaczenie zawartości związków fenolowych ogółem wykonywano metodą z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu'a [23]. Próbki metanolowego ekstraktu nasion (0,025 ml) lub olejów (0,2 ml) przenoszono do kolbki pojemności 10 ml, do której dodawano 0,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteu'a. Całość wytrząsano i zostawiano na 3 min. Następnie dodawano 1 ml nasyconego roztworu węgla sodu i uzupełniano wodą destylowaną do 10 ml. Po 1 h mierzono absorbancję roztworu przy długości fali  $\lambda = 725$  nm w odniesieniu do próby kontrolnej, z zastosowaniem spektrofotometru U-2900 prod. Hitachi High-Tech, Tokio, Japonia. Całkowitą zawartość związków fenolowych określano z krzywej kalibracyjnej, jako ekwiwalent kwasu ferulowego (FAE).

#### *Oznaczenie zawartości wody w nasionach i olejach*

Oznaczenie zawartości wody w nasionach wykonywano metodą grawimetryczną wg PN-EN ISO 665:2004 [18], natomiast w olejach wg PN-EN ISO 662:2001. Metoda A [17].

Oznaczanie stabilności oksydacyjnej wykonywano wg PN-EN ISO 6886:2009 [20]. Test przyspieszonego utleniania prowadzono w aparacie Rancimat 679 firmy Metrohm, Szwajcaria. Stosowano następujące parametry testu: temperatura –  $100 \pm 0,1$  °C, przepływ powietrza – 20 l/h, masa próbki oleju – 2,5 g, objętość wody w naczyniu konduktometrycznym – 60 ml.

Właściwości antyoksydacyjne preparatów związków fenolowych wyrażano za pomocą współczynnika ochronnego  $W_o$ , który wyliczano z równania:

$$W_o = \frac{OI_A - OI_K}{OI_K}$$

gdzie:

$OI_A$  – okres indukcji próby z dodatkiem preparatu [h],

$OI_K$  – okres indukcji próby kontrolnej [h].

Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych wykonywano metodą GC wg PN-EN ISO 5508:1996 [19], z wykorzystaniem chromatografu HP 6890 II z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym. Do rozdzielania estrów stosowano wysokopolarną kolumnę kapilarną BPX 70 (60 m  $\times$  0,25 mm, 25  $\mu$ m). Warunki analizy: temp. kolumny pro-

gramowana w zakresie 140 - 210 °C, temp. dozownika 210 °C, temp. detektora 250 °C, gaz nośny hel.

Oznaczenie aktywności antyrodnikowej wykonywano metodą spektrometrii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) [27]. Badania wykonywano metodą pośrednią, obserwując zmniejszanie się intensywności sygnału pochodzącego od dodanego do próbki wolnego trwałego rodnika DPPH (1,1 difenylo-2 pikrylohydrazyl) w wyniku działania substancji antyrodnikowej. Porównawczą zdolność wygaszania rodnika DPPH ( $Z_p$ ) określano z równania:

$$Z_p = \frac{I_o - I}{I_o} 100 \%$$

gdzie:

$I$  – intensywność sygnału rodnika DPPH z próbki badanej (olej wyjściowy + roztwór rodnika lub olej bez związków fenolowych + roztwór rodnika, lub olej wyjściowy + preparat + roztwór rodnika),

$I_o$  – intensywność sygnału rodnika DPPH z próbki przyjętej za wzorzec (odpowiednio: roztwór rodnika, roztwór rodnika, olej wyjściowy + roztwór rodnika).

Do próbki (0,5 ml) dodawano 2,5 ml acetonowego roztworu DPPH o stężeniu 0,004 mol/dm<sup>3</sup>. Do pomiaru pobierano 0,35 ml powstałego w ten sposób roztworu. Pomiar przeprowadzano po 70 min od dodania roztworu DPPH za pomocą spektrometru EPR model MiniScope 200, firmy Magnettech GmbH, Berlin, Niemcy. Stosowane parametry: prąd diody – 50 %, tłumienie – 8 dB, stała czasowa – 0,1 s, faza – 180°, czas przemiatania – 30 s, amplituda modulacji – 0,4 mT, indukcja magnetyczna w centrum zakresu przemiatania –  $B = 334$  mT, szerokość przemiatania –  $DB = 7,7$  mT. Do całkowania widm EPR stosowano program Analysis firmy Magnettech.

#### *Ocena wpływu związków fenolowych na stabilność oksydacyjną i aktywność antyrodnikową olejów tłoczonych na zimno*

Ocenę tę przeprowadzano poprzez porównanie stabilności oksydacyjnej za pomocą testu Rancimat oraz aktywności antyrodnikowej, w odniesieniu do rodnika DPPH metodą EPR, olejów wyjściowych oraz po usunięciu z nich związków fenolowych.

Przygotowanie oleju wolnego od związków fenolowych. Olej (20 g) rozpuszczano w heksanie (1 : 10), po czym związki fenolowe ekstrahowano trzykrotnie za pomocą metanolu (10 : 2, heksan/metanol) w temp. pokojowej [1]. Ekstrakt metanolowy przemywano heksanem (1 : 1). Pozostały po ekstrakcji roztwór heksanowy oleju łączono wraz z heksanem użytym do przemywania roztworu metanolowego. Heksan usuwano pod obniżonym ciśnieniem z użyciem azotu. Przed dalszymi analizami otrzymany olej przechowywano w temp.  $20 \pm 2$  °C.

*Ocena aktywności antyoksydacyjnej i antyrodnikowej związków fenolowych wyizolowanych z poszczególnych gatunków nasion*

Ocenę tę przeprowadzano poprzez porównanie stabilności oksydacyjnej, za pomocą testu Rancimat, oraz aktywności antyrodnikowej, w odniesieniu do rodnika DPPH metodą EPR, olejów wyjściowych oraz po dodaniu do nich preparatu związków fenolowych wyizolowanych z odpowiadających im nasion.

Analizę statystyczną wyników prowadzono za pomocą programu komputerowego Statgraphics Plus for Windows, wersja 4.0, Statistical Graphics Corp., na poziomie istotności  $p = 0,05$ . Do oceny zależności pomiędzy wybranymi zmiennymi wykorzystano analizę regresji prostej.

### Wyniki i dyskusja

Wyniki dotyczące zawartości natywnych związków fenolowych w badanym materiale zamieszczono w tab. 1.

Tabela 1

Zawartość związków fenolowych ogółem w nasionach i olejach.  
Content of total phenolic compounds in seeds and oils.

Rodzaj surowca Variety of raw material	Zawartość związków fenolowych ogółem* Total content of phenolic compounds*	
	nasiona [mg/100 g smb.] seeds [mg/100 g ddm.]	oleje [mg/100 g] oils [mg/100g]
Len / Flax	989 <sup>a</sup> ± 48	1,17 <sup>a</sup> ± 0,05
Lnianka / Camelina	1107 <sup>b</sup> ± 56	3,95 <sup>b</sup> ± 0,13
Konopie / Hemp	831 <sup>c</sup> ± 41	4,11 <sup>c</sup> ± 0,14
Żmijowiec / Echium	1540 <sup>d</sup> ± 61	3,56 <sup>d</sup> ± 0,09

Objaśnienia: / Explanatory notes:

wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation;  $n = 6 (3 \times 2)$ ;

\* zawartość związków fenolowych ogółem wyrażona jako ekwiwalent kwasu ferulowego / total content of phenolic compounds expressed as equivalent of ferulic acid;

smb. – sucha masa beztluszczowa / ddm. – dry defatted matter;

wartości średnie z różnymi indeksami w kolumnach różnią się statystycznie istotnie ( $p \leq 0,05$ ) / mean values with different indexes in columns differ statistically significantly ( $p \leq 0.05$ ).

Zawartość związków fenolowych ogółem w nasionach zależała od ich rodzaju i wynosiła od 831 mg/100 g smb w nasionach konopi do 1540 mg/100 g smb w nasionach żmijowca. Są to ilości zbieżne z danymi literaturowymi [2, 5, 26]. Spośród nasion oleistych szczególnie bogate w związki fenolowe są nasionach rzepaku [32]. Przy po-

równywaniu wyników należy mieć na uwadze istotny wpływ, jaki wywiera rodzaj stosowanego rozpuszczalnika i sposób ekstrakcji [2], a także niespecyficzność powszechnie stosowanej metody oznaczania zawartości związków fenolowych ogółem z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu'a [24]. W próbce mogą występować również inne składniki wykazujące właściwości redukujące, takie jak aminokwasy (alanina, cysteina, glicyna, tryptofan) czy cukry (fruktoza, glukoza, sacharoza) reagujące z odczynnikiem.

Wśród olejów najwięcej związków fenolowych zawierał olej konopny (4,11 mg/100 g), w oleju lniankowym i żmijowcowym było ich nieznacznie mniej, natomiast w oleju lnianym aż 4-krotnie mniej. W literaturze publikowane są zbliżone [11, 23], ale też wyraźnie wyższe dane [4].

Podczas tłoczenia naturalne antyoksydanty zawarte w nasionach ulegają rozdzielności na frakcję rozpuszczalną w tłuszczach (głównie tokoferole, karotenoidy, sterole), przechodzącą do oleju oraz frakcję hydrofilną (głównie polarne związki polifenolowe) pozostającą w wytlókach. Niektóre ze związków polifenolowych o średniej polarności wykazują pewne cechy lipofilności [5, 12] i mogą także znajdować się w fazie olejowej. Według Czapllickiego [5] powyżej 50 % związków fenolowych nasion żmijowca stanowią związki o charakterze hydrofobowym.

W wyniku tłoczenia do olejów przechodzą z nasion niewielkie ilości wody (tab. 2), w której mogą się rozpuszczać związki polifenolowe o wyższej polarności. Ich ilość zależy od rodzaju obróbki surowca przed tłoczeniem (temperatura, wilgotność, rozdrobnienie) a także warunków samego tłoczenia [3].

Tabela 2

Zawartość wody w nasionach i olejach.

Content of water in seeds and oils.

Rodzaj surowca Variety of raw material	Zawartość wody / Content of water [%]	
	nasiona / seeds	oleje / oils
Len / Flax	7,7 ± 0,1	0,41 ± 0,02
Lnianka / Camelina	7,8 ± 0,1	0,42 ± 0,02
Konopie / Hemp	7,3 ± 0,1	0,38 ± 0,03
Żmijowiec / Echium	7,6 ± 0,1	0,39 ± 0,01

Objaśnienia: / Explanatory notes:

wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation; n = 6 (3 × 2).

Nasiona będące przedmiotem badań charakteryzowały się typową, niezbyt zróżnicowaną wilgotnością. Proces tłoczenia prowadzono w porównywalnych warunkach, a zawartość wody w poszczególnych olejach była zbliżona. Można na tej podstawie

przyjąć, że o zawartości związków fenolowych w olejach decydowały przede wszystkim cechy gatunkowe nasion.

Wpływ natywnych związków fenolowych na stabilność oksydacyjną olejów określono poprzez porównanie okresów indukcji procesu autooksydacji olejów w teście Rancimat przed oraz po usunięciu z nich związków fenolowych. Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 3.

Tabela 3

Okres indukcji autooksydacji olejów przed oraz po usunięciu związków fenolowych.  
Induction time of auto-oxidation of oils before and after removal of polyphenols compounds.

Rodzaj oleju Oil type	Okres indukcji / Induction time [h]			
	lniany flax	lniankowy camelina	konopny hemp	zmijowcowy echium
Wyjściowy / Initial	4,35 <sup>a</sup> ± 0,19	10,26 <sup>b</sup> ± 0,26	6,10 <sup>c</sup> ± 0,21	3,90 <sup>d</sup> ± 0,14
Po usunięciu polifenoli After removal of polyphenols	3,41 <sup>a</sup> ± 0,12	8,43 <sup>b</sup> ± 0,25	4,72 <sup>c</sup> ± 0,14	2,90 <sup>d</sup> ± 0,10

Objaśnienia: / Explanatory notes:

wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation; n = 6 (3 × 2);

wartości średnie z różnymi indeksami w rzędach różnią się statystycznie istotnie (p ≤ 0,05) / mean values with different indexes in the rows differ statistically significantly (p ≤ 0.05).

Czasy indukcji procesu autooksydacji, zarówno w grupie olejów wyjściowych, jak i olejów po usunięciu polifenoli były zróżnicowane w sposób statystycznie istotny. Najbardziej labilny wśród olejów wyjściowych był olej zmijowcowy (3,90 h), a stabilność innych wzrastała w następującej kolejności: lniany < konopny < lniankowy. Czynnikiem decydującym o trwałości olejów jest przede wszystkim skład kwasów tłuszczowych oraz obecność naturalnych przeciwutleniaczy. Wśród kwasów tłuszczowych szczególnie ważna jest zawartość polienowych kwasów tłuszczowych o budowie dienowej, trienowej i tetraenowej, bardzo pożądanym, ale jednocześnie mało stabilnym. Spośród nich trieny utleniają się 2 - 4 razy szybciej niż dieny, a tetraeny szybciej niż trieny [7]. Najmniej stabilny olej zmijowcowy charakteryzował się jednocześnie najwyższą zawartością trienów i tetraenów (tab. 4).

Olej konopny pomimo mniejszej zawartości trienów i tetraenów okazał się mniej stabilny niż olej lniankowy, gdyż zawierał kilkakrotnie więcej dienów. Uzyskane wyniki są zbliżone do publikowanych w tym zakresie w literaturze [1, 14]. W porównaniu z takimi olejami, jak rzepakowy czy oliwkowy materiał badawczy był wyjątkowo nietrwały [31].



Tabela 4

Zawartość polienowych kwasów tłuszczowych (PUFA) w olejach [%].  
Content of polyenic fatty acids (PUFA) in oils [%].

Kwasy tłuszczowe Fatty acids	Rodzaj oleju / Oil type			
	lniany flax	lniankowy camelina	konopny hemp	zmijowcowy echium
C18:2 n-6	16,2 ± 0,6	15,6 ± 0,3	52,0 ± 1,5	17,6 ± 0,6
C 18:3 n-6	0,0	0,0	3,8 ± 0,3	10,6 ± 0,4
C18:3 n-3	52,8 ± 1,7	36,1 ± 1,2	21,8 ± 0,7	31,2 ± 1,2
C18:4 n-3	0,0	0,0	1,9 ± 0,1	12,4 ± 0,2
Suma / Sum	69,0	51,7	79,5	71,8

Objaśnienia: / Explanatory notes:

wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation; n = 6 (3 × 2).

Usunięcie niewielkich ilości związków fenolowych skutkowało skróceniem czasów indukcji olejów w granicach od 17,8 do 25,6 %, czyli wyraźnym zmniejszeniem stabilności oksydacyjnej. Świadczy to o wysokiej aktywności antyoksydacyjnej tych związków. Obserwacje te są zbieżne z ustaleniami Terpinca i wsp. [26], według których związki fenolowe obecne w oleju lniankowym tłoczonym na zimno charakteryzują się wyższą aktywnością antyoksydacyjną niż związki wyodrębnione z nasion bądź wytłoków. Usunięcie związków fenolowych eliminuje je z roli synergenta w odniesieniu do tokoferoli, co dodatkowo zmniejsza stabilność olejów. Współczynnik korelacji pomiędzy skróceniem czasu indukcji w teście Rancimat (y) a ilością usuniętych związków fenolowych (x) wynosił  $r = 0,6443$  przy poziomie istotności  $p = 0,36$ . Równanie prostej regresji tych zmiennych miało postać:

$$y = 0,666 + 0,0195 x$$

Wpływ natywnych związków fenolowych na aktywność antyrodnikową olejów określono poprzez porównanie siły wygaszania rodnika DPPH przez oleje przed oraz po usunięciu z nich związków fenolowych. Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 5. Skuteczność wygaszania rodnika DPPH przez oleje wyjściowe była dość zróżnicowana, a olej lniankowy wygaszał rodnik blisko dwukrotnie silniej niż olej lniany. Jeszcze większe zróżnicowanie występuje pomiędzy takimi olejami, jak: rzepakowy, słonecznikowy i sojowy [22]. W olejach roślinnych związkami unieczynnającymi wolne rodniki są tokoferole, tokotrienole, karotenoidy, niektóre sterole a także związki fenolowe [14]. Usunięcie związków fenolowych w przypadku każdego z olejów skutkowało zmniejszeniem siły wygaszania rodnika DPPH. W największym stopniu nastąpiło ono w oleju lniankowym (17,1 %), a w pozostałych kształtowało się następująco:

Tabela 5

Zdolność wygaszania rodnika DPPH przez oleje przed oraz po usunięciu związków fenolowych.  
Scavenging ability of DPPH radical before and after removal of phenolic compounds.

Rodzaj oleju Oil type	Wygaszanie / Scavenging [%]			
	lniany flax	lniankowy camelina	konopny hemp	zmijowcowy echium
Wyjściowy / Initial	16,8 <sup>a</sup> ± 0,2	29,3 <sup>b</sup> ± 0,3	27,0 <sup>c</sup> ± 0,2	24,7 <sup>d</sup> ± 0,3
Po usunięciu polifenoli After removal of polyphenols	14,7 <sup>a</sup> ± 0,1	24,3 <sup>b</sup> ± 0,2	22,9 <sup>c</sup> ± 0,2	22,8 <sup>d</sup> ± 0,2

Objaśnienia: / Explanatory notes:

wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation; n = 6 (3 × 2);

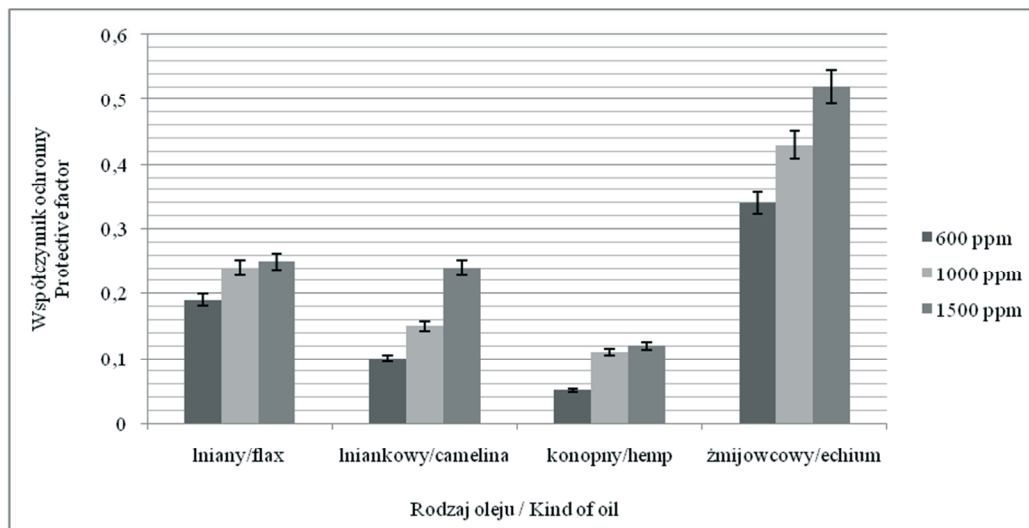
wartości średnie z różnymi indeksami w rzędach różnią się statystycznie istotnie (p ≤ 0,05) / mean values with different indexes in the rows differ statistically significantly (p ≤ 0.05).

konopny > lniany > zmijowcowy. Zmniejszenie siły wygaszania rodnika DPPH (y) było skorelowane z ilością usuniętych związków fenolowych (x). Współczynnik korelacji liniowej pomiędzy tymi zmiennymi wynosił r = 0,6294 przy poziomie istotności p = 0,37. Równanie prostej regresji tych zmiennych miało postać:

$$y = 0,629 + 0,070 x$$

Według Abyzaytoun i Shahidi [1] ekstrakty metanolowe związków fenolowych z oleju konopnego mają większą siłę wygaszania rodnika DPPH niż ekstrakty z oleju lnianego. Espin i wsp. [8] w badaniach wygaszania rodnika DPPH przez frakcję polarną (rozpuszczalną w metanolu i zawierającą związki fenolowe) szeregu olejów roślinnych wykazali, że tylko część z nich ma te właściwości.

Dodatek preparatów związków fenolowych o charakterze hydrofobowym do olejów powodował zróżnicowane wydłużenie okresu indukcji, zależne od rodzaju oleju i zastosowanej dawki. Największe wydłużenie okresu indukcji stwierdzono w przypadku oleju zmijowcowego, najslabiej reagował olej konopny. Na podstawie czasów indukcji, przed i po dodatku preparatów, wyliczono współczynniki ochronne olejów, a ich zależność od zastosowanej dawki przedstawiono na rys. 1.



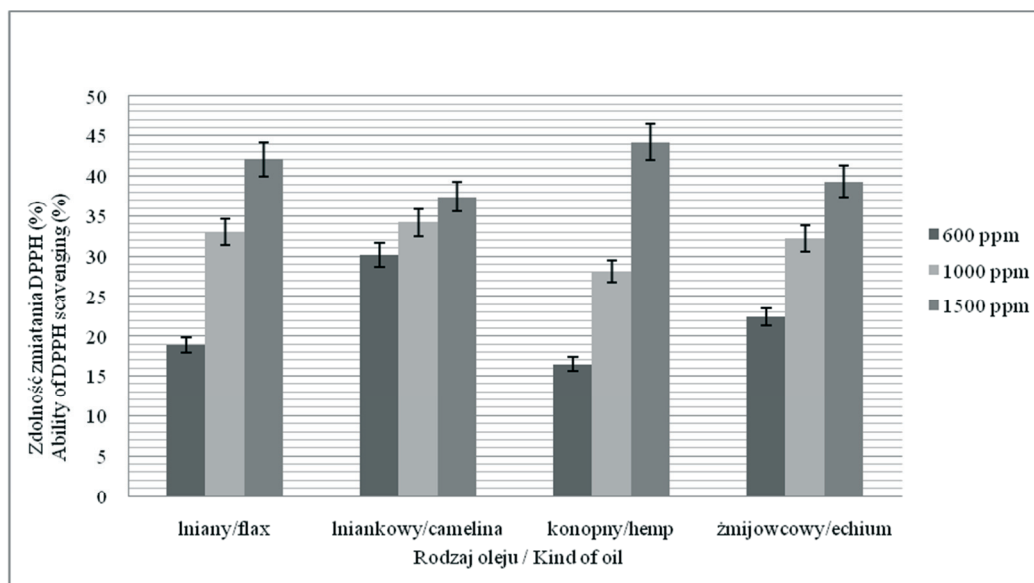
Objaśnienia: / Explanatory notes:  
 n = 6 (3 × 2)

Rys. 1. Aktywność antyoksydacyjna preparatów związków fenolowych w olejach wyznaczona testem Rancimat.

Fig. 1. Antioxidant activity of preparations of phenolic compounds in oils as determined by Rancimat test.

Siła ochronna stosowanych preparatów nie była zbyt wysoka. Maksymalny współczynnik ochronny (0,52) uzyskano w przypadku oleju żmijowcowego przy dawce 1500 ppm. Olej ten okazał się także najbardziej wrażliwy na stosowaną dawkę. Aktywność przeciwutleniająca preparatu związków fenolowych wyizolowanych z nasion żmijowca była dwukrotnie niższa niż handlowego preparatu związków fenolowych wyizolowanych z rozmarynu przy ich dodatku do oleju żmijowcowego [14]. Pozostałe oleje reagowały na dodatki preparatów jeszcze słabiej, a maksymalne współczynniki ochronne kształtowały się następująco: lniany – 0,25, lniankowy – 0,24, konopny – 0,12. Tak niskie współczynniki ochronne świadczą o niskiej aktywności antyoksydacyjnej dodawanych związków fenolowych o charakterze hydrofobowym, wyraźnie słabszej od tych, które przedostają się z nasion do oleju podczas tłoczenia, mających charakter zarówno litofilny, jak i hydrofilny. O niższej aktywności antyoksydacyjnej związków fenolowych izolowanych z nasion lnianki a także z wycieków, w porównaniu z aktywnością związków izolowanych z oleju tłoczonego na zimno, informują Terpinc i wsp. [26]. Badane oleje prawdopodobnie zawierały układ natywnych antyoksydantów bliski optymalnemu i dlatego słabo reagowały na dodatkowe ilości związków fenolowych.

Dodatek preparatów związków fenolowych o charakterze hydrofobowym do olejów każdorazowo powodował wzrost zdolności wygaszania rodnika DPPH, ale skuteczność ich działania nie była duża. Wpływ dodatku preparatów w poszczególnych olejach przedstawiono na rys. 2.



Objaśnienia: / Explanatory notes: n = 6 (3 × 2)

Rys. 2. Zdolność wygaszania rodnika DPPH przez preparaty związków fenolowych w olejach.

Fig. 2. Ability of scavenging of DPPH radical by preparations of phenolic compounds in oils.

Maksymalny przyrost siły wygaszania rodnika DPPH nastąpił w oleju konopnym (44 %), a w pozostałych kształtował się następująco: lniany > żmijowcowy > lniankowy. Badane oleje w zróżnicowany sposób reagowały na stosowane dawki preparatów. Najsilniej reagował olej lniany, a najmniej wrażliwy był olej lniankowy, w którym przy 2,5-krotnym zwiększeniu dawki z 600 do 1500 ppm nastąpił przyrost siły wygaszania rodnika DPPH tylko o 7,3 %.

W badaniach prowadzonych na ekstraktach związków fenolowych otrzymanych z pozostałości po odolejeniu 8 różnych tradycyjnych surowców oleistych [14] nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy zawartością związków fenolowych ogółem a zdolnością wygaszania rodnika DPPH. Według autora wynikało to ze znacznych różnic w aktywności antyoksydacyjnej poszczególnych związków fenolowych. Antyrodnikowa aktywność ekstraktów związków fenolowych może się także zmieniać w zależności od rodzaju rodnika stosowanego do badań [29]. Na działanie związków fenolowych dodawanych do olejów może się nakładać aktywność naturalnych nietria-

cyloglicerolowych substancji obecnych w oleju, takich jak: fosfolipidy, tokoferole, tokotrienole, barwniki (chlorofile, karotenoidy), sterole, stanole, wolne kwasy tłuszczowe, mono- i diacyloglicerole, woski, skwalen i inne węglowodory, a także synergizm i antagonizm pomiędzy nimi samymi oraz dodawanymi związkami polifenolowymi. Szczególnie dotyczy to środowiska olejów tłoczonych na zimno, w których zawartość składników nietriacyloglicerolowych może dochodzić do 5 %. Dlatego też jednoznaczna interpretacja uzyskanych wyników jest utrudniona.

### Wnioski

1. Związki fenolowe ogółem stanowiące 0,8 - 1,5 % suchej masy beztłuszczowej nasion lnu, lnianki, konopi i żmijowca tylko w niewielkich ilościach (1,2 - 4,1 mg/100 g) przenikają do tłoczonych z nich na zimno olejów bogatych w PUFA n-3.
2. Obecność związków fenolowych w olejach korzystnie wpływa na ich stabilność oksydacyjną i potencjał antyrodnikowy. Ich usunięcie powodowało wyraźne skrócenie okresu indukcji w teście Rancimat oraz zmniejszenie aktywności antyrodnikowej względem rodnika DPPH.
3. Dodatek związków fenolowych wyizolowanych z nasion zwiększa stabilność oksydacyjną i potencjał antyrodnikowy wytłoczonych z nich na zimno olejów bogatych w PUFA n-3. Ich siła ochronna i antyrodnikowa nie była jednak wysoka.
4. Skuteczność działania związków fenolowych była zróżnicowana w zależności od rodzaju oleju i stosowanej dawki. Najwyższym współczynnikiem ochronnym (0,52) charakteryzował się olej żmijowcowy przy zastosowaniu maksymalnej dawki 1500 ppm. Największy wzrost aktywności antyrodnikowej względem rodnika DPPH miał miejsce w oleju lniankowym.

*Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2010 - 2011 jako projekt badawczy nr N N312 130038 pt. Wykorzystanie naturalnych przeciwutleniaczy nasion do podwyższenia stabilności oksydacyjnej i aktywności przeciwrodnikowej olejów bogatych w polienowe kwasy tłuszczowe z rodziny n-3.*

### Literatura

- [1] Abyzaytoun R., Shahidi F.: Oxidative stability of flax and hemp oils. J. Am. Oil Chem. Soc., 2006, **83**, 855-861.
- [2] Anwar F., Przybylski R.: Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum L.*). Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 2012, **11 (3)**, 293-301.
- [3] Boskou D.: Olive oil composition. In: Olive Oil. Chemistry and Technology. Ed. Boskou D., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 1996, pp. 52-83.

- [4] Choo W.S., Birch J., Dufour J.P.: Physicochemical and characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *J. Food Comp. Anal.*, 2006, **20**, 202-211.
- [5] Czaplicki S., Zadernowski R., Nowak-Polakowska H.: Związki fenolowe żmijowca zwyczajnego (*Echium vulgare L.*). *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011, **XLIV (3)**, 815-821.
- [6] Decker E.A.: Antioxidant mechanism. In: *Food Lipids (C.C/ Akoh and D.B. Mini eds.)* Marcel Decker, New York, N.Y., 1998, pp. 397-421.
- [7] Drozdowski B.: Lipidy. Charakterystyka ogólna tłuszczów jadalnych. W: *Chemia żywności. Sacharydy, lipidy, białka*. Red. Z.E. Sikorski, Wyd. 5. WNT, Warszawa 2007, ss. 73-164.
- [8] Espin J.C., Soler-Rivas C., Wichers H.J.: Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 648-656.
- [9] Haiyan Z., Bedgood D.R., Bishop A.G., Prenzler P.D., Robards K.: Endogenous biophenyl, fatty acid and volatile profiles of selected oils. *Food Chem.*, 2007, **100**, 1544-1551.
- [10] Karamać M., Kosińska A., Pegg R.B.: Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **14/55**, 165-170.
- [11] Koski A., Pekkarinen S., Hopia A., Wähälä K., Heinonen M.: Processing of rapeseed oil: effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *Eur. Food Res. Technol.*, 2003, **217**, 110-114.
- [12] Materska M.: Evaluation of the lipophilicity and stability of phenolic compounds in herbal extracts. *Acta. Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2010, **9 (1)**, 61-69.
- [13] Matthäus B.: Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agric. Food Chem.* 2001, **50**, 3444-3452.
- [14] Mińkowski K.: Studia nad stabilnością oksydacyjną olejów roślinnych bogatych w polienowe kwasy tłuszczowe o budowie trienowej. *Rozpr. hab. Roczn. Inst. Przem. Mięś. i Tł.*, 2008, **46**, 1-121.
- [15] Nogala-Kalucka M., Rudzińska M., Zadernowski R., Siger A., Krzyzostaniak I.: Phytochemical content and antioxidant properties of seeds of unconventional oil plants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2010, **87**, 1481-1487.
- [16] Papadimitriou V., Sotiroudis T.G., Xenakis A., Sofikiti N., Stavyiannoudaki V., Chaniotakis N.A.: Oxidative stability and free radical scavenging activity of extra virgin olive oils: An electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Anal. Chim. Act.*, 2006, **573**, 453-458.
- [17] PN-EN ISO 662:2001. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości wody i substancji lotnych.
- [18] PN-EN ISO 665:2004. Nasiona oleiste. Oznaczanie wilgotności i zawartości substancji lotnych.
- [19] PN-EN ISO 5508:1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.
- [20] PN-EN ISO 6886:2009. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie stabilności oksydacyjnej (test przyspieszonego utleniania).
- [21] Schmidt S., Pokorny J.: Potential application of oilseeds as sources of antioxidants for food lipids. *Czech. J. Food Sci.*, 2006, **23 (3)**, 93-102.
- [22] Siger A., Nogala-Kalucka M., Lampart-Szczapa E., Hoffman A.: Antioxidant activity of phenolic compounds of selected cold-pressed and refined plant oils. *Rośliny Oleiste*, 2005, **26**, 549-559.
- [23] Siger A., Nogala-Kalucka M., Lampart-Szczapa E.: The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J. Food Lipids*, 2008, **15**, 137-149.
- [24] Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M.: Analysis of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 1999, **288**, 152-178.
- [25] Sz wajgier D., Pielecki J., Targoński Z.: Antioxidant activities of cinnamic and benzoil acid derivatives - *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2005, **4 (2)**, 129-142.

- [26] Terpinic P., Polak T., Makuc D., Poklar Ulrich N., Abramovič H.: The occurrence and characterization of phenolic compounds in *Camelina sativa* seeds, cake and oil. *Food Chem.*, 2011, **131** (2), 580-589.
- [27] Wasek M., Nartowska J., Wawer I., Tudruj T.: Electron spin resonance assessment of the antioxidant potential of medicinal plants. P.1. Contribution of anthocyanosides and flavonoids to the radical scavenging ability of fruit and herbal teas. *Acta Pol. Pharm.*, 2001, **58**, 283-288.
- [28] Wąsowicz E., Gramza A., Heś M., Jeleń H., Korczak J., Małecka M., Mildner-Szkudlarz S., Rudzińska M., Samotyja U., Zawirska-Wojtasiak R.: Oxidation of lipids in food. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2004, **13/54**, 87-100.
- [29] Wettasinghe M., Shahidi F.: Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chem.*, 2000, **70**, 17-26.
- [30] Wilska-Jeszka J.: Polifenole, glukozytolany i inne związki prozdrowotne i antyżywniowe. W: *Chemia żywności. Składniki żywności*. Red. Z.E. Sikorski, Wyd. 5. WNT, Warszawa 2007, ss. 203-226
- [31] Wroniak M., Kwiatkowska M., Krygier K.: Charakterystyka wybranych olejów tłoczonych na zimno. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2** (47), 46-58.
- [32] Zadernowski R., Nowak H., Kozłowska H.: Charakterystyka substancji przeciwutleniających izolowanych z nasion rzepaku. *Zesz. Probl. IHAR. Rośliny Oleiste. Wyniki badań za rok 1990*. 1991., (I), 165-168.

#### **EFFECT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN SEEDS ON OXIDATIVE STABILITY AND ANTIRADICAL ACTIVITY OF n-3-PUFA-RICH OILS PRESSED FROM THEM**

##### **S u m m a r y**

The objective of the study was to prove if and how far the natural phenolic compounds in seeds constitute an antioxidant barrier for oils extruded from them and rich in polyenic fatty acids from an n-3 family.

The research materials were seeds of flax, camelina, hemp, and echium. Investigated were cold pressed oils, oils with native phenolic compounds removed, and oils enriched with hydrophobic fraction of phenolic compounds that were isolated from de-oiled seeds. Phenolic compounds were hot extracted by 70 % ethanol, and a raw extract was purified in a system of polar and non-polar solvents.

The seeds were characterized by differentiated contents of phenolic compounds, the small quantities of which passed into oils during the cold pressure process. The effect of having removed phenolic compounds from oils was an express decrease in their oxidative stability in a Rancimat test and a clear decrease in their antiradical activity towards the DPPH radical. The addition of phenolic compounds, isolated from the seeds, improved the oxidative stability and antiradical potential of oils pressed from those seeds. However, the protecting and antiradical power of polyphenols was not high. The effectiveness of the activity of those compounds depended on the kind of oil and dose applied. The highest protection factor (0.52) was obtained in the case of echium oil with the maximal dose of 1500 ppm used. The greatest increase in the antiradical activity towards the DPPH radical occurred in the camelina oil.

**Key words:** phenolic compounds, oilseeds, cold pressed oils, oxidative stability, antiradical activity, n-3 PUFA 