

MAŁGORZATA MATERSKA

WPLYW WARUNKÓW EKSTRAKCJI NA ZAWARTOŚĆ O-GLIKOZYDÓW KWERCETYNY W PREPARATACH Z OWOCÓW PAPRYKI

Streszczenie

W pracy określono wpływ polarności sorbentów w ekstrakcji do fazy stałej na zawartość fenylopropenoidów w preparatach uzyskanych z owocni papryki. Badano trzy typy sorbentów: żel krzemionkowy modyfikowany oktadecylem (C18), etylofenylem (Phe) oraz cyjanopropylem (CN), ale w każdym przypadku stosowano ten sam układ rozpuszczalników. Oznaczono wydajność ekstrakcji, wykorzystując jako wzorce trzy pochodne kwercetyny, które wyizolowano z owocni papryki w toku wcześniejszych analiz. Wzorcami były: 3-*O*-ramnozyd-7-*O*-glukozyd kwercetyny, 3-*O*-glukozyd kwercetyny oraz 3-*O*-ramnozyd kwercetyny. Następnie wyizolowano frakcje związków fenolowych z owocni papryki przy użyciu wymienionych sorbentów. W otrzymanych preparatach oznaczono ilościowo zawartość pochodnych kwercetyny metodą HPLC i z wykorzystaniem krzywych wzorcowych każdego związku. Oznaczono również sumę związków fenolowych metodą Folina-Ciocalteu oraz ich aktywność antyrodnikową w układzie z rodnikiem DPPH.

Spośród wzorców największą wydajnością ekstrakcji odznaczał się 3-*O*-glukozyd kwercetyny, który charakteryzował się pośrednią polarnością, a wśród badanych sorbentów najefektywniejszy okazał się żel krzemionkowy modyfikowany cyjanopropylem. Również w przypadku frakcji związków fenolowych obecnych w papryce największą wydajność ekstrakcji uzyskano przy zastosowaniu tego samego żelu. Potwierdziły to wyniki sumy związków fenolowych oraz aktywności antyrodnikowej.

Słowa kluczowe: *Capsicum annuum*, ekstrakcja do fazy stałej, sorbenty, związki fenolowe, *O*-glikozydy kwercetyny

Wprowadzenie

Popularność diety owocowo-warzywnej wynika z jej korzystnego wpływu na zdrowie. Wiele badań epidemiologicznych potwierdza, że obecność w codziennej diecie składników pochodzenia roślinnego zmniejsza ryzyko wystąpienia tzw. chorób cywilizacyjnych, m.in. chorób serca, cukrzycy, chorób nowotworowych [3, 6]. Owoce

i warzywa dostarczają, obok składników odżywczych, takich jak białka, węglowodany i tłuszcze, wielu związków o charakterze antyoksydantów. Należą do nich: rozpuszczalna w wodzie witamina C, rozpuszczalna w tłuszczach witamina E oraz związki polifenolowe, które w zależności od budowy cząsteczki mogą wykazywać właściwości od hydrofilowych, poprzez pośrednie, po typowo lipofilowe [6, 7].

Antyoksydanty obecne w żywności hamują procesy utleniania zawartych w niej składników, zatem przyczyniają się do zwiększenia trwałości żywności i wpływają na poprawę jej jakości. Z kolei, dostarczane do organizmu spowalniają procesy oksydoredukcyjne i zmniejszają ilość powstających wolnych rodników na szlakach metabolizmu komórkowego [7]. Stwierdzono, że pod względem zdrowotnym szczególnie ważna jest różnorodność antyoksydantów obecnych w diecie. Występując w mieszaninie, wykazują działanie synergistycznie, wspomagają wzajemne procesy regeneracyjne lub jedno stanowią ochronę antyoksydacyjną dla drugich lub [3, 4, 7]. Szczególne znaczenie mają związki polifenolowe, które określa się mianem związków drugiej bariery antyoksydacyjnej. Należą do nich kwasy fenylokarboksylowe (np. galusowy, wanilinowy, elagowy), kwasy fenylopropanowe (np. kawowy, ferulowy, synapinowy), a także flawonoidy i stilbeny. Wspólną cechą polifenoli jest obecność jednego lub kilku pierścieni aromatycznych z przyłączonymi grupami hydroksylowymi, które decydują o ich potencjale antyoksydacyjnym [1, 18].

Znaczenie związków polifenolowych w puli antyoksydantów obecnych w żywności wynika z ich właściwości hydro- i lipofilowych. Wolne kwasy fenolowe są typowo hydrofilowe, wolne flawonoidy – lipofilowe, jednak najbardziej interesującą grupę związków, zarówno pod względem budowy chemicznej, jak i właściwości, stanowią ich pochodne, występujące jako estry lub glikozydy z cząsteczkami cukrów. Pochodne te wykazują przeważnie właściwości pośrednie pomiędzy hydro- i lipofilnymi. Właśnie ta częściowa rozpuszczalność w wodzie i częściowa w tłuszczach czyni je uniwersalnymi antyoksydantami. Obecne w fazie wodnej wspomagają regenerację witaminy C, a w fazie lipidowej chronią fosfolipidy błon komórkowych przed utlenianiem przez wolne rodniki [1, 7, 18]. O znaczeniu polifenoli w diecie i ich wpływie na zdrowie człowieka świadczą liczne badania na świecie koncentrujące się na tej grupie związków.

Coraz częściej pojawiają się na rynku preparaty związków fenolowych, które otrzymywane są z jednej rośliny lub z mieszaniny kilku roślin, które stosowane są głównie w medycynie, kosmetologii oraz jako suplementy diety [14]. Przykładowo, ekstrakt z grejpfruta zalecany jako suplement diety zawiera ponad 19 % mieszaniny flawonoidów [14]. W ostatnich latach podejmowane są próby zastępowania syntetycznych konserwantów żywności naturalnymi preparatami roślinnymi zawierającymi mieszaninę antyoksydantów z grupy polifenoli [9, 20, 22, 23].

Wśród owoców i warzyw dobrze scharakteryzowanych pod względem zawartości związków fenolowych, jak i innych antyoksydantów jest papryka. Jest to wartościowa roślina, której owoce zawierają szereg związków zaliczanych do antyoksydantów: witaminy C i E, karotenoidy oraz ksantofile [5, 10, 19]. Ostre odmiany papryki zawierają alkaloid – kapsaicynę, który nadaje im specyficzny smak [15]. Pulę antyoksydantów obecnych w owocach papryki uzupełniają związki fenolowe, występujące w większości w połączeniach z cukrami jako estry kwasów ferulowego i synapinowego oraz glikozydy flawonoidów kwercetyny i luteoliny [10, 12]. Ze względu na to, że owoce papryki stanowią bogate źródło różnorodnych pochodnych kwasów fenolowych i flawonoidów, wykorzystuje się je do pozyskiwania tych związków na skalę preparatywną [10, 13]. Jednak zbliżone właściwości hydro- i lipofilowe związków fenolowych stwarzają wiele trudności w ich analizie i wyodrębnianiu, gdyż często eluują się one w grupie, którą trudno rozdzielić [11]. Czasami niewielkie zmiany takich parametrów, jak pH, skład rozpuszczalnika czy rodzaj sorbentu mogą zdecydowanie zmieniać ich profil w otrzymanych preparatach.

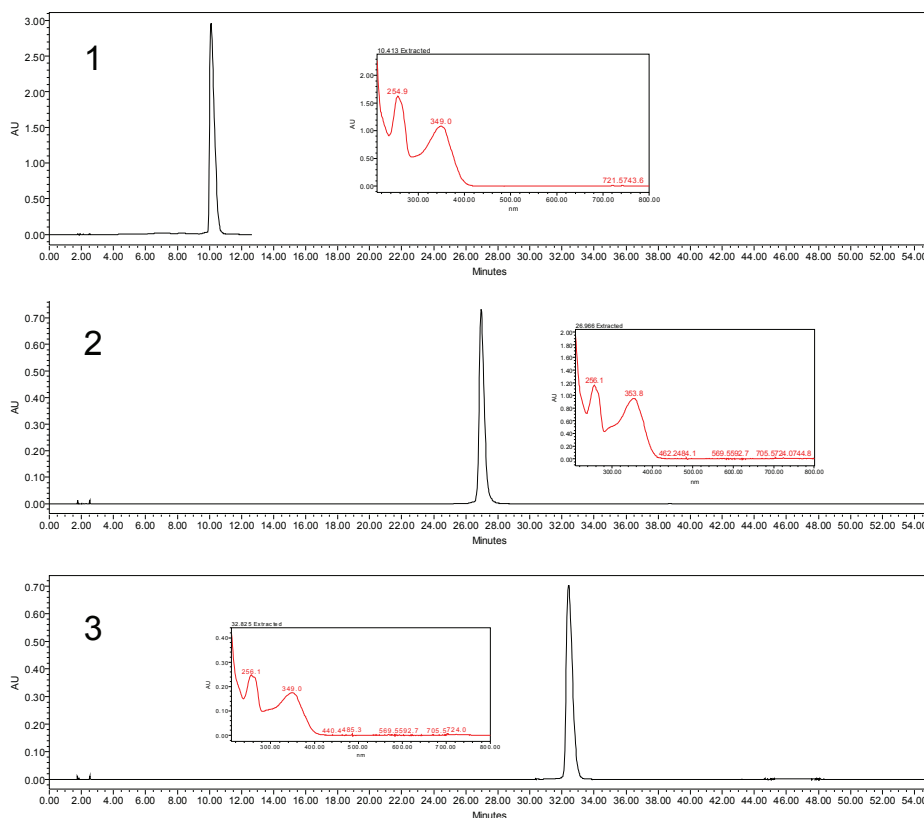
Przedstawione badania miały na celu określenie wpływu rodzaju sorbentu wykorzystywanego na etapie wyodrębniania frakcji związków fenolowych z etanolowego ekstraktu z papryki przed finalną analizą HPLC na wynik oznaczania pochodnych kwercetyny w otrzymanych preparatach.

Material i metody badań

Material roślinny stanowiły owoce papryki ostrej odmiany Capel Hot w fazie pełnej dojrzałości. Owoce papryki pochodziły z gospodarstwa nasiennego Seminis k/Lublina i bezpośrednio po zbiorze dostarczane były do laboratorium, gdzie poddawano je dalszej procedurze. Z dziesięciu w pełni ukształtowanych i nieuszkodzonych owoców, po ich umyciu i osuszeniu, wykrawano po połowie perykarpu, który następnie krojono w kostkę i uśredniano. Uśrednione próbki badano na zawartość suchej masy metodą suszarkową oraz poddawano procesowi liofilizacji. Przygotowane liofilizaty przechowywano w temp -20 °C przed dalszą analizą. Liofilizowane owocnie papryki (1,2 g) homogenizowano w wodnym roztworze etanolu (80 %) przy użyciu homogenizatora Diax 900. Otrzymaną zawiesinę wirowano (12000 rpm, 5 min) i zbierano roztwór nad osadu do kolby miarowej, a osad poddawano powtórnej homogenizacji. Czynność tę powtarzano trzykrotnie, a otrzymane ekstrakty łączono. Procedurę homogenizacji w połączeniu z ekstrakcją prowadzono w taki sposób, aby końcowa objętość ekstraktu wynosiła 100 ml.

Izolację frakcji związków fenolowych prowadzono w kolumnkach SPE (firmy Baker) wypełnionych trzema rodzajami sorbentów: żelem krzemionkowym modyfikowanym oktadecylem (C18), etylofenylem (Phe) i cyjanopropylem (CN). Związkami wzorcowymi w przedstawionych badaniach były obecne w papryce: 1: 3-O-ramnozyd-

7-*O*-glukozyd kwercetyny, **2**: 3-*O*-glukozyd kwercetyny oraz **3**: 3-*O*-ramnozyd kwercetyny. Związki te izolowano z owocni papryki metodą preparatywnej cieczonej chromatografii średniociśnieniowej, a ich czystość sprawdzano metodą spektrometrii masowej [12, 13]. Chromatogramy wymienionych związków oraz ich widma UV-Vis przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Chromatogramy pochodnych kwercetyny stosowanych jako substancje wzorcowe oraz ich widma UV-Vis zarejestrowane na detektorze DAD, związek **1**: 3-*O*-ramnozyd-7-*O*-glukozyd kwercetyny, **2**: 3-*O*-glukozyd kwercetyny, **3**: 3-*O*-ramnozyd kwercetyny.

Fig. 1. HPLC chromatograms and DAD-UV-Vis spectra of quercetin derivatives used as standard compounds; compound **1**: quercetin 3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucoside, **2**: quercetin 3-*O*-glucoside, **3**: quercetin 3-*O*-rhamnoside.

Z przygotowanych ekstraktów etanolowych pobierano po 10 ml i odparowywano do sucha w wyparce obrotowej pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze 40 °C. Suche ekstrakty rozpuszczano w 5 ml wody i nanoszono na szczyt kolumnienek SPE, które przed użyciem kondycjonowano, przemywając je 100-procentowym metanolem (5 ml),

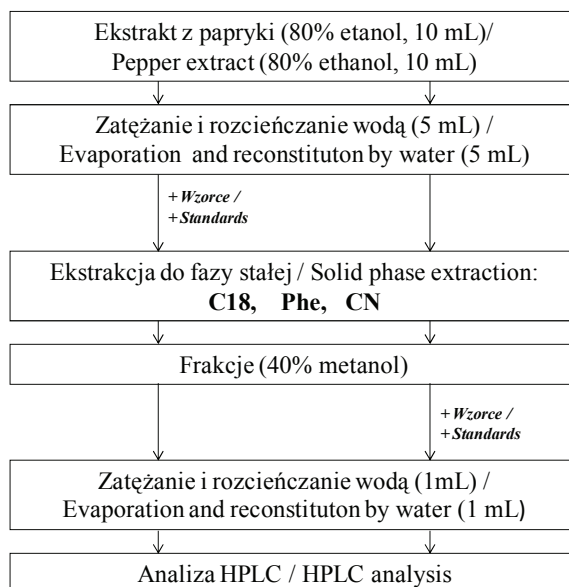
a następnie wodą (10 ml). Po nałożeniu próbki związki hydrofilowe wmywano 5 ml wody, a następnie zbierano frakcje związków fenolowych, używając 40-procentowego roztworu metanolu (3 ml). Otrzymane frakcje odparowywano do sucha w wyparce obrotowej pod obniżonym ciśnieniem w temp. 40 °C. Suchą pozostałość rozpuszczano 100-procentowym metanolem do objętości 1 ml. Równolegle przygotowywano trzy ekstrakty etanolowe z owocni papryki, a z każdego ekstraktu pobierano po trzy próbki (powtórzenia) dla jednego rodzaju sorbentu. Otrzymane preparaty analizowano metodą HPLC oraz oznaczano w nich sumę związków fenolowych i ich aktywność antyrodnikową.

Analizę chromatograficzną frakcji związków fenolowych otrzymanej metodą ekstrakcji do fazy stałej wykonywano przy użyciu chromatografu Empower Pro firmy Waters z kolumną analityczną Atlantis T3 wypełnioną żelazem krzemionkowym C₁₈ o średnicy porów 3 µm, szerokości 4,6 mm i długości 150 mm. Aparat wyposażony był w pompę firmy Waters M600 o maksymalnym ciśnieniu 6000 psi. Szybkość przepływu wynosiła 1 ml·min⁻¹. Używano detektora spektralnego DAD UV-Vis firmy Waters M2998. Pomiary wykonywano przy długości fali λ = 330 nm oraz λ = 250 nm. Zastosowano gradientową metodę rozdzielania przy wykorzystaniu dwuskładnikowej fazy ruchomej, rozpuszczalnik A stanowił 1-procentowy H₃PO₄ w wodzie, a rozpuszczalnik B 40-procentowy CH₃CN w rozpuszczalniku A. Ilościowe oznaczanie zawartości O-glikozydów kwercetyny we frakcjach związków fenolowych wyodrębnionych na trzech typach sorbentów wykonywano metodą krzywej wzorcowej wyznaczonej dla poszczególnych związków oraz równań regresji liniowej (tab. 1).

Sumę zawartości związków fenolowych analizowano metodą Folina-Ciocalteu, z wykorzystaniem krzywej wzorcowej kwasu chlorogenowego [5]. Aktywność antyrodnikową badano wobec rodnika DPPH· (1,1-difenylo-2-pikrylo-hydrazylu) i wyrażano ją jako procent inhibicji odbarwienia rodnika [12].

W celu oznaczenia odzysku pochodnych kwercetyny w procedurze izolacji metodą SPE przygotowywano roztwory startowe wzorców o stężeniu 0,5 g·l⁻¹. Z roztworów startowych sporządzano roztwory robocze o stężeniach: 0,25; 0,05 oraz 0,01 g·l⁻¹, zawierające mieszaninę trzech analizowanych substancji. Z oddzielnie przygotowanego ekstraktu etanolowego z papryki (400 ml) dla każdego stężenia mieszaniny wzorców pobierano po dwanaście prób (po cztery przy użyciu jednego sorbentu), każda po 10 ml. Następnie do sześciu ekstraktów dodawano po 90 µl mieszaniny wzorców i wszystkie próby poddawano opisanej wyżej procedurze izolacji związków fenolowych metodą SPE. Tym sposobem dla każdego sorbentu przygotowano po dwie próbki bez dodatku wzorców i dwie z ich dodatkiem. Następnie przed końcowym zatężaniem frakcji uzyskanych z kolumnienek SPE, do próbek bez dodatku wzorców dodawano po 90 µl mieszaniny analizowanych substancji. Wszystkie próbki po odparowaniu do sucha i rozpuszczeniu do objętości 1 ml analizowano metodą HPLC zgodnie z wyżej

opisaną procedurą. Odzysk pochodnych kwercetyny [%] obliczano na podstawie pól powierzchni pików substancji wzorcowych, zgodnie z regułą: (powierzchnia pików z SPE/powierzchnia pików bez SPE) \times 100. Schemat procedury oznaczania odzysku pochodnych kwercetyny w kolumnach SPE przedstawiono na rys 2.



Rys. 2. Schemat oznaczania odzysku *O*-glikozydów kwercetyny na trzech typach sorbentów w metodzie ekstrakcji do fazy stałej.

Fig. 2. Diagram of recovery analysis of quercetin *O*-glycosides on three types of sorbents in solid phase extraction method.

Walidację metody HPLC do oznaczeń ilościowych pochodnych kwercetyny przeprowadzono z uwzględnieniem wymienionych wcześniej trzech substancji wzorcowych. W tym celu z roztworów startowych wzorców przygotowywano serie rozcieńczeń uzyskując stężenia od 0,5 do 0,01 g·l⁻¹. Następnie wykonywano analizę HPLC, zgodnie z opisaną wyżej procedurą. Na podstawie pól powierzchni pików (*y*) badanych stężeń roztworów (*x*) wykreślono krzywe kalibracyjne $y = f(x)$. Zakres stężeń wzorców, przy których krzywe miały charakter liniowy określano na podstawie wartości R^2 , która była co najmniej rzędu 0,999. Limit detekcji (LOD) oraz granicę oznaczalności (LOQ) w przeprowadzonych warunkach chromatograficznych i w zakresie liniowości wyrażano jako stężenie związku, dla którego wielkości sygnału do wielkości szumów wynosiły odpowiednio 3 : 1 i 10 : 1 [8]. Wartości zakresu liniowości oraz równania krzywych przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Zakres stężeń wzorców glikozydów kwercetyny, przy których krzywe kalibracji mają przebieg liniowy oraz czułość metody HPLC-DAD.

Concentration range of quercetin glycosides standards at which calibration curves are linear, and sensitivity of HPLC-DAD method.

Związek Compound	Zakres stężeń [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] Concentration range ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Równanie regresji liniowej Linear regression equation	R^2	LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]
1	2,5 - 500	$y=932149x+31214$	0,9998	0,149	0,497
2	2,5 - 100	$y=201402x+6414,9$	0,9993	0,051	0,168
3	0,25 - 500	$y=2E+06x+52995$	0,9999	0,003	0,010

Objaśnienia: / Explanatory notes:

1 – 3-*O*-ramnozyd-7-*O*-glukozyd kwercetyny / Quercetin 3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucoside; **2** – 3-*O*-glukozyd kwercetyny / Quercetin 3-*O*-glucoside; **3** – 3-*O*-ramnozyd kwercetyny / Quercetin 3-*O*-rhamnoside.

Wyniki przedstawione jako wartości średnie z trzech powtórzeń poddano analizie statystycznej. Istotność różnic między wartościami średnimi określano za pomocą testu Tuckeya na poziomie istotności $p = 0,05$. Analizy wykonywano w programie Statgraphic Centurion XVI.

Wyniki i dyskusja

Zastosowane sorbenty różniły się polarnością. Najbardziej polarny był żel krzemionkowy modyfikowany etylofenylem (Phe), a najmniej – modyfikowany oktedecylem (C18) [21, 26]. Ze względu na swoją pośrednią polarność sorbenty z fazami etylofenylową czy cyjanopropylową mogą działać zarówno w normalnym, jak i w odwróconym układzie rozpuszczalników, w zależności od sposobu kondycjonowania oraz od rodzaju stosowanych eluentów. Z kolei żel modyfikowany oktadecylem to typowy sorbent niepolarny, działający w odwróconym układzie faz [21, 26]. W przedstawionej pracy do wszystkich sorbentów zastosowano odwrócony układ rozpuszczalników, w którym jako eluent zastosowano 40-procentowy wodny roztwór metanolu, oraz tę samą procedurę analityczną. W ten sposób wyeliminowano wpływ mocy eluentu na wydajność ekstrakcji. Wyboru 40-procentowego roztworu metanolu jako rozpuszczalnika do wyodrębniania frakcji związków fenolowych dokonano na podstawie danych literaturowych [16, 24] i badań własnych (wyniki niepublikowane). Przy tym stężeniu metanolu uzyskiwano bowiem najwyższą efektywność wyodrębniania pochodnych kwasów fenolowych i flawonoidów na żelu C18.

W pierwszym etapie badań oznaczono odzysk *O*-glikozydów kwercetyny na badanych sorbentach, analizując wielkość sygnału wzorców po etapie ekstrakcji do fazy stałej oraz z wykluczeniem tego etapu. Schemat procedury oznaczania odzysku przedstawiono na rys. 2., a wyniki badań przedstawiono w tab. 2. Wydajność ekstrakcji *O*-glikozydów kwercetyny zależała od dwóch czynników: polarności badanego związku oraz polarności sorbentu. Wśród badanych związków najwyższą polarność charakteryzował się oznaczony numerem **1**: 3-*O*-ramnozyd-7-*O*-glukozyd kwercetyny, a najniższą oznaczony numerem **3**: 3-*O*-ramnozyd kwercetyny (rys. 1). Otrzymane wydajności ekstrakcji pokrywają się z polarnośćią badanych związków oraz użytych faz stacjonarnych. Największą wydajność ekstrakcji uzyskano w przypadku związku **2**, czyli 3-*O*-glukozydu kwercetyny, który charakteryzował się pośrednią polarnośćią, wynosiła ona średnio dla trzech faz 86,6 %. Wśród badanych sorbentów najefektywniejszy okazał się żel krzemionkowy modyfikowany cyjanopropylem, czyli również ten o pośredniej polarnośći, przy którym średnia wydajność ekstrakcji trzech związków wynosiła 92,7 % (tab. 2).

Tabela 2

Odzysk glikozydów kwercetyny w ekstrakcji do fazy stałej [%].
Recovery of quercetin glycosides in solid phase extraction [%].

Związek Compound	Stężenie [g·l ⁻¹] Concentration [g·l ⁻¹]	Rodzaj sorbentu / Sorbent type ($\bar{x} \pm s / SD$)		
		C18*	Phe	CN
1	0,25	73,3 ± 0,94**	90,7 ± 2,77	78,3 ± 1,65
	0,05	77,4 ± 0,95	95,5 ± 0,97	83,8 ± 1,05
	0,01	86,2 ± 1,1	101,5 ± 1,49	86,3 ± 1,85
	\bar{x}	78,9 ± 5,86	95,9 ± 4,96	82,8 ± 3,77
2	0,25	85,7 ± 0,68	65,8 ± 1,29	90,0 ± 0,53
	0,05	89,5 ± 0,56	74,8 ± 0,98	92,9 ± 1,66
	0,01	98,7 ± 1,03	82,9 ± 0,67	99,2 ± 0,52
	\bar{x}	91,3 ± 5,82	74,4 ± 7,43	94,0 ± 4,17
3	0,25	46,4 ± 0,36	91,0 ± 3,74	97,8 ± 1,11
	0,05	51,3 ± 0,80	96,1 ± 1,04	101,4 ± 1,65
	0,01	54,2 ± 0,10	103,0 ± 1,57	104,4 ± 1,88
	\bar{x}	50,6 ± 3,44	96,7 ± 5,59	101,2 ± 3,20

Objaśnienia: / Explanatory notes:

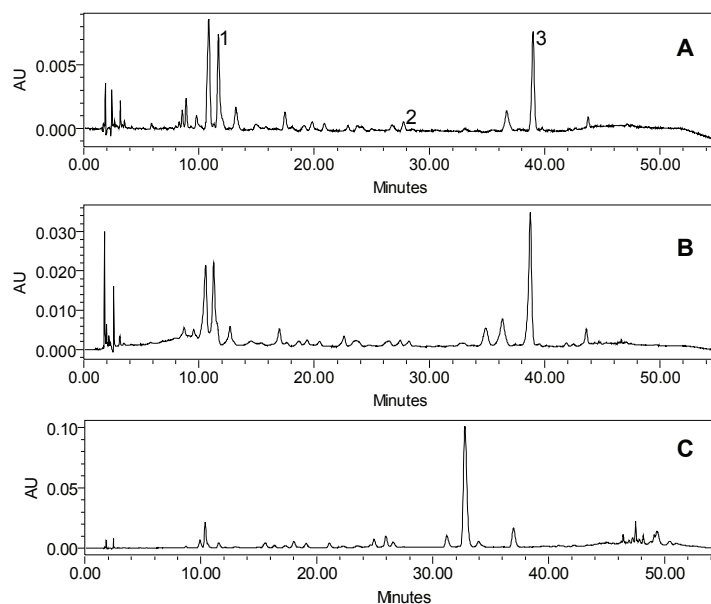
1, 2, 3 – numery i nazwy związków jak w tab. 1 / Numbers and names of compounds as in Tab. 1;

C18 – modyfikowany żel krzemionkowy C18: oktadecylem / silica gel modified with C18: octadecyl; Phe – etylofenylem / elhylophenyl; CN – cyjanopropylem / cyanopropyl;

$\bar{x} \pm s / SD$ – wartość średnia ± odchylenie standardowe / mean value ± standard deviation; n = 4.

Naturalne ekstrakty roślinne stanowią skomplikowaną matrycę i nie można jednoznacznie odnieść uzyskanych wyników do wszystkich układów roślinnych. W niniejszej pracy materiał doświadczalny stanowiły owoce papryki i z nich wyodrębniono

wzorce wykorzystane w badaniach. Z tego względu kolejnym etapem badań było oznaczenie stężenia tych związków w preparatach z papryki przygotowanych na trzech rodzajach sorbentów. Chromatogramy frakcji związków fenolowych wyodrębnionych na wymienionych sorbentach przedstawiono na rys. 3.



Rys. 3. Chromatogramy frakcji związków fenolowych z owoców papryki izolowanych na sorbentach: A - C18, B - Phe, C - CN. Związki oznaczane ilościowo: 1: 3-*O*-ramnozyd-7-*O*-glukozyd kwercetyny, 2: 3-*O*-glukozyd kwercetyny, 3: 3-*O*-ramnozyd kwercetyny.

Fig. 3. Chromatogram of phenolic compounds fraction from pepper fruit obtained on sorbents: A - C18, B - Phe, C - CN. Compounds quantitatively analysed: 1: quercetin 3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucoside, 2: quercetin 3-*O*-glucoside, 3: quercetin 3-*O*-rhamnoside.

Po porównaniu profili frakcji stwierdzono różnice ilościowe oraz jakościowe w ich składzie. Spośród *O*-glikozydów kwercetyny wykorzystywanych jako wzorce dominowały związki 1 i 3, natomiast związek 2 występował w śladowych ilościach. Potwierdziła to analiza ilościowa wykonana metodą krzywej wzorcowej trzech badanych związków w zakresie ich liniowości (tab. 3). Z uwagi na to, że analizowane frakcje związków fenolowych wyodrębnione z owocni papryki zawierały szereg substancji, których nie uwzględniono w analizie ilościowej, przeprowadzono równoległe oznaczenie sumy związków fenolowych omawianych frakcji metodą Folina-Ciocalteu oraz badania ich aktywności antyrodnikowej w układzie z rodnikiem DPPH. Uzyskane wyniki w pełni pokrywają się otrzymanymi wydajnościami ekstrakcji. Największą zawartość sumy związków fenolowych, jak i najwyższą aktywność antyrodnikową stwier-

dzono we frakcji wyodrębnionej na żelu modyfikowanym cyjanopropylem (tab. 3). W wielu wcześniejszych badaniach stwierdzono wysokie korelacje pomiędzy aktywnością antyrodnikową frakcji związków fenolowych mierzona w układzie z rodnikiem DPPH a sumą związków fenolowych [2, 25]. Uzyskane w przedstawionej pracy wyniki są zgodne z danymi literaturowymi. Współczynniki korelacji pomiędzy aktywnością antyrodnikową a sumą związków fenolowych w ekstraktach z papryki wynosiły odpowiednio dla fazy C18: $r = 0,94$, cyjanowej: $r = 0,99$, a fenyłowej: $r = 0,94$. Wyniki wydajności ekstrakcji papryki potwierdzają informacje podane przez Rodrigueza i wsp. [21], którzy stwierdzili, że w przypadku związków fenolowych większe wydajności ekstrakcji uzyskuje się na sorbentach cykloheksylowym i fenyłowym niż na C18.

Tabela 3

Zawartość *O*-glikozydów kwercetyny, suma związków fenolowych oraz aktywność antyrodnikowa frakcji ekstrahowanych na trzech typach sorbentów.

Content of quercetin *O*-glycosides, total of phenolic compounds, and antiradical activity of fractions extracted on three types of sorbents.

Rodzaj sorbentu Sorbent type	<i>O</i> -glikozydy kwercetyny / Quercetin <i>O</i> -glycosides [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ekstraktu] / [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of extract]				Zawartość zw. fenolowych* Content of phenolic compounds	Aktywność antyrodnikowa (DPPH) Antiradical activity [%]
	1	2	3	Suma Total		
C18	0,15 ^b $\pm 0,002^5$	-	0,25 ^b $\pm 0,012$	0,4	1,73 ^b $\pm 0,028$	27,68 ^b $\pm 1,023$
Phe	0,50 ^a $\pm 0,015$	0,28 ^b $\pm 0,019$	1,10 ^a $\pm 0,042$	1,88	1,68 ^b $\pm 0,014$	18,13 ^c $\pm 0,033$
CN	0,41 ^a $\pm 0,031$	1,05 ^a $\pm 0,009$	0,80 ^a $\pm 0,011$	2,26	2,39 ^a $\pm 0,051$	42,13 ^a $\pm 0,048$

Objaśnienia: / Explanatory notes:

1, 2, 3 – numery i nazwy związków jak w tab. 1. / Numbers and names of compounds as in Tab. 1;

* – [mg kwasu chlorogenowego·ml⁻¹ ekstraktu] / [mg of chlorogenic acid·ml⁻¹ of extract];

wartości oznaczone w kolumnach tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / values in the column and denoted with the same letter do not differ statistically significantly ($p \leq 0,05$); $n = 3$.

Wnioski

1. Wynik oznaczania zawartości pochodnych kwercetyny w preparatach otrzymanych z papryki zależał od rodzaju sorbentu użytego na etapie wyodrębniania frakcji związków fenolowych z ekstraktów etanolowych.
2. Najefektywniejszym sorbentem w opisanej procedurze był żel krzemionkowy modyfikowany cyjanopropylem (CN), który charakteryzował się pośrednią lipofilnością.

3. Spośród analizowanych trzech pochodnych kwercetyny największą wydajność ekstrakcji uzyskano w przypadku 3-O-glukozydu kwercetyny.

Literatura

- [1] Aherne S.A., O'Brien N.M.: Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 2002, **18**, 1, 75-81.
- [2] Alvarez-Parrilla E., De La Rosa L., Amarowicz R., Shahidi, F.: Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeno and Serrano peppers. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 163-173.
- [3] Chen Z.Y., Jiao R., Ma K.Y.: Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 8761-8773.
- [4] Halliwell B.: Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.*, 1996, **16**, 39-50.
- [5] Howard L.R., Talcott S.T., Brenes C.H., Villalon B.: Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 1713-1720.
- [6] Janeczko Z.: Owoce i warzywa jako źródło prozdrowotnych substancji o właściwościach antyoksydacyjnych. *Folia Horticulturae*, 2003, **1**, 23-25.
- [7] Kaur Ch., Kapoor H.C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2001, **36**, 703-725.
- [8] Konieczka P., Namieśnik J.: Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych. WNT, Warszawa 2007.
- [9] Kopjar M., Pilizota V., Subaric D., Babic J.: Prevention of thermal degradation of red currant juice anthocyanins by phenolic compounds addition. *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 2009, **1** (1), 24-30.
- [10] Marin A., Ferreres F., Tomas-Barberan F.A., Gil M.I.: Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 3861-3869.
- [11] Materska M.: The scavenging effect and flavonoid glycosides content in fractions from fruits of hot pepper *Capsicum annuum* L. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2012, **11** (4), 363-371.
- [12] Materska M., Perucka I.: Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 1750-1756.
- [13] Materska M., Piacente S., Stochmal A., Pizza C., Oleszek W., Perucka I.: Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry*, 2003, **63**, 893-898.
- [14] Miller E., Malinowska K., Gałęcka E., Mrowiska M., Kędziora J.: Rola flawonoidów jako przeciwutleniaczy w organizmie człowieka. *Pol. Merk. Lek.*, 2008, XXIV, **144**, 556-560.
- [15] Nowaczyk L.: Ocena jakości i przydatności technologicznej papryki (*Capsicum spp.*) linii miękkomięszkowej (soft-flesh). *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **3** (82), 179-186.
- [16] Olas B., Wachowicz B., Stochmal A., Oleszek W.: Inhibition of oxidative stress in blond platelets by different phenolics from *Yucca schidigera* Roetzl. *Bark. Nutr.*, 2003, **19**, 633-640.
- [17] Perucka I., Materska M., Jachacz L.: Ocena jakości preparatów otrzymanych z wysuszonych owoców papryki (*Capsicum annuum* L.). *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **1** (68), 30-39.
- [18] Prior R.L.: Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, **78**, 570-578.
- [19] Palevitch D., Craker L.E.: Nutritional and medical importance of red pepper (*Capsicum* spp.). *J. Herbs, Spices Med. Plants*, 1995, **3**, 55-83.
- [20] Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Hartmann-Schmidlin S., Kahkonen M., Heinonen M., Maatta-Riihinen K., Oksman-Caldetey K.M.: Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **98**, 991-1000.

- [21] Rodriguez I., Llompart M.P., Cela R.: Solid phase extraction of phenols. *J. Chrom. A.*, 2000, **885**, 291-304.
- [22] Sanitas J., Pilar Almajano M., Carbo R. Onion.: A natural alternative to artificial food preservatives. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 2010, **21** (5), 44-46.
- [23] Seetaramaiah K., Smith A.A., Murali R., Manavalan R.: Preservatives in food products-review. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.*, 2011, **2** (2), 583-599.
- [24] Stochmal A., Piacente S., Pizza C., De Riccardid F., Leitz R. Oleszek W.: Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 753-758.
- [25] Wu R., Frei B., Kennedy J.A., Zhao Y.: Effects of refrigerated storage and processing technologies on the bioactive compounds and antioxidant capacities of Marion and Evergreen blackberries. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2010, **43**, 1253-1264.
- [26] Żwir-Ferenc A., Biziuk M.: Solid phase extraction technique-trends, Opportunities and applications. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2006, **15** (5), 677-690.

EFFECT OF EXTRACTION CONDITIONS ON CONTENT OF QUERCETIN O-GLYCOSIDES IN EXTRACTS FROM PEPPER FRUIT

S u m m a r y

In the paper as presented, the effect was determined of the polarity of sorbents in solid phase extraction on the contents of phenylpropanoids in extracts obtained from a pepper pericarp. Three types of sorbents were analyzed: silica gel modified with octadecyl (C18), ethylphenyl (Phe), and cyanopropyl (CN), and, in every case, the same system of solvents was applied. The extraction yield was determined using three derivatives of quercetin as the standards; those derivatives were isolated from the pepper pericarp during the preceding studies. The standards comprised: quercetin 3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-glucoside, and quercetin-3-*O*-rhamnoside. Next, the fractions of phenolic compounds were isolated from the pepper pericarp with the use of the three above indicated sorbents. In the fractions obtained, the content of quercetin derivatives was quantitatively determined by a HPLC method and with the use of the standard curves for each compound. Additionally, there were determined the total of phenolic compounds by a Folin-Ciocalteu method and their antiradical activity in the system with DPPH radical.

Of the three standards applied, the quercetin-3-*O*-glucoside was recognized for its highest extraction yield; it was characterized by an intermediate polarity. Among the sorbents analyzed, the most effective sorbent was the silica gel modified with cyanopropyl. Also in the case of the fraction of phenolic compounds present in the pepper fruits, the highest extraction efficiency was obtained for the same gel used. This fact was confirmed by the results of total phenolic compounds and antiradical activity.

Key words: *Capsicum annum*, solid phase extraction, phenolic compounds, quercetin *O*-glycosides 