

TOMASZ TARKO, DOROTA SEMIK, ALEKSANDRA DUDA-CHODAK,
PAWEŁ SATORA, PAWEŁ SROKA

PRZEMIANY ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH W SYMULOWANYM PRZEWODZIE POKARMOWYM CZŁOWIEKA

Streszczenie

Biologiczna aktywność związków polifenolowych po ich spożyciu zależy głównie od przemian w przewodzie pokarmowym oraz od struktury powstałych metabolitów. Celem pracy było określenie przemian wybranych związków polifenolowych, zachodzących podczas ich trawienia *in vitro*. Do badań użyto roztworów kwasów ferulowego i p-kumarowego oraz (+)katechiny, kwercetyny, hesperetyny i hesperydyny. Zostały one poddane symulowanemu procesowi trawienia, przy czym w wybranych etapach określano aktywność przeciwrodnikową (metodą spektrofotometryczną z kationorodnikiem ABTS^{•+}) i oznaczano zawartość badanych związków przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Wśród analizowanych związków najwyższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowała się kwercetyna (234 g Troloxu/100 g). Hesperetyna (aglikon) wykazywała wyższą aktywność przeciwrodnikową niż jej rutynozyd (hesperydyna). Trawienie większości badanych polifenoli rozpoczynało się w żołądku i dwunastnicy, a powstałe pochodne wykazywały wysoki potencjał przeciwutleniający. Najbardziej podatne na trawienie w tej części przewodu pokarmowego były kwasy fenolowe. Obserwowano również znaczny rozkład glikozydów (hesperydyny) pod wpływem kwasu żołądkowego i enzymów dwunastnicy. Badane polifenole charakteryzowały się różnym stopniem migracji przez membrany dializacyjne. Fenolokwasy łatwiej przenikały przez membrany niż flawonoidy, co mogło się wiązać z mniejszym rozmiarem cząsteczek kwasów. Bakterie jelitowe użyte w doświadczeniu oddziaływały na wszystkie polifenole, w tym w dużej mierze wpłynęły na trawienie flawonoidów, szczególnie kwercetyny i hesperetyny. Związki te były w niewielkim stopniu metabolizowane w żołądku i dwunastnicy. Mniejsze było natomiast oddziaływanie mikroflory jelitowej na kwasy fenolowe.

Słowa kluczowe: związki polifenolowe, trawienie *in vitro*, aktywność przeciwutleniająca, mikroflora jelitowa

*Dr hab. inż. T. Tarko, mgr inż. D. Semik, dr hab. A. Duda-Chodak, dr hab. inż. P. Satora, dr P. Sroka, Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków.
Kontakt: t.tarko@ur.krakow.pl*

Wprowadzenie

Wolne rodniki łatwo reagują ze składnikami komórek, działając na nie destrukcyjnie. Są przyczyną wielu schorzeń, określanych mianem przewlekłych chorób niezakaźnych, np. chorób układu sercowo-naczyniowego, nowotworów czy dysfunkcji neurologicznych [5]. Przeciwutleniacze pochodzące z diety odgrywają ważną rolę, gdyż wspomagają czynniki wewnątrzustrojowe przy neutralizacji wolnych rodników. Do egzogennych przeciwutleniaczy zalicza się m.in. witaminy E i C, niektóre karotenoidy oraz związki polifenolowe. Właściwości przeciwutleniające związków polifenolowych wynikają m.in. z ich zdolności do chelatowania metali, wygaszania wolnych rodników i przeciwdziałania reakcji Fentona i Habera-Weissa. Zapobiega to np. peroksydacji tłuszczów. Reagują one również z produktami pośrednimi powstającymi w trakcie peroksydacji i prowadzą do zakończenia procesu wolnorodnikowego [8, 21].

Do polifenoli wykazujących właściwości przeciwutleniające należą przede wszystkim kwasy fenolowe oraz flawonoidy. Właściwości te w dużej mierze zależą od budowy cząsteczki, głównie od ilości i rozmieszczenia grup hydroksylowych [9].

Zarówno metabolizm, jak i wchłanianie związków polifenolowych z układu pokarmowego mają wpływ na sposób i stopień ich oddziaływania na organizm ludzki. Efektywność wchłaniania polifenoli w przewodzie pokarmowym jest pochodną wielu czynników, m.in. masy cząsteczkowej, pH środowiska, hydrofilowości związku, stopnia jego polimeryzacji czy rodzaju cukru w cząsteczce. Niektóre aglikony przenikają przez błony biologiczne na zasadzie dyfuzji prostej [13], jednak większość flawonoidów występuje w postaci glikozydów, które przed wchłonięciem muszą ulec hydrolizie [18].

Celem pracy było określenie przemian wybranych związków polifenolowych, zachodzących podczas trawienia *in vitro*.

Material i metody badań

Materiałem do badań były polifenole: kwas ferulowy i kwas p-kumarowy, (+)katechyna, hesperetyna i hesperydyna (7-rutynozyd hesperetyny) oraz kwercetyna (Sigma-Aldrich, USA). Ze związków tych przygotowywano roztwory o stężeniu 1 g/100 ml rozpuszczalnika, przy czym trzy pierwsze związki rozpuszczano w 96-procentowym (obj.) etanolu, hesperetynę i hesperydynę – w dimetylosulfotlenku, DMSO (Chempur, Polska), a kwercetynę – w mieszaninie etanolu i DMSO (1 : 1).

Metoda trawienia in vitro

Do zakręczanych probówek odmierzano po 0,5 ml roztworu polifenoli i zakwaszono do pH = 2 za pomocą roztworu HCl o stężeniu 0,5 M. Następnie dodawano 0,75 ml wodnego roztworu pepsyny o aktywności 3440 U/mg (Sigma-Aldrich, USA) i dopełniano wodą redestylowaną do objętości 3 ml. Próbkę inkubowano 2 h w temp. 37 °C,

po czym neutralizowano za pomocą NaHCO_3 do uzyskania $\text{pH} = 7$. Następnie dodawano po 0,375 ml roztworu pankreatyny i żółci, sporządzonego z 66,7 mg pankreatyny o aktywności $8 \times \text{USP}$ (Sigma-Aldrich, USA) i 833,3 mg żółci (Sigma-Aldrich, USA) rozpuszczonych w 10 ml 0,1 M NaHCO_3 , po czym uzupełniano wodą redestylowaną do objętości 5 ml. Próbki ponownie inkubowano w łaźni wodnej (temp. 37°C , 4 h) i wirowano ($1380 \times \text{g}$, 10 min). Supernatanty zlewano, a pozostałości przepłukiwano dwa razy trzema mililitrami wody redestylowanej, za każdym razem mieszając je i wirując. Pozostałości po wirowaniu (osad) używano do symulacji trawienia w jelicie grubym. Uzyskane supernatanty łączono natychmiast i przenoszono do worków dializacyjnych (Sigma-Aldrich, USA), po czym poddawano dializie wobec 50 ml buforu fosforanowego (PBS) w łaźni wodnej z wytrząsaniem (85 obr./min, temp. 37°C , 3 h). Zawartość worków dializacyjnych (retentat) łączono z osadem pozostałym po wirowaniu na wcześniejszym etapie trawienia, alkalizowano do $\text{pH} = 8$ (za pomocą 1 M NaOH) i zaszczipiano mieszaniną bakterii jelitowych (*Bacteroides galacturonicus*, *Enterococcus caccae*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Ruminococcus gauvreauii*, *Lactobacillus sp.*, *Escherichia coli*) (DSMZ, Niemcy), symulując procesy fermentacyjne w jelicie grubym. Początkowa liczba bakterii w próbce poddawanej fermentacji wynosiła 10^9 jtk/ml. Całość wysycano gazem obojętnym (CO_2) i inkubowano (temp. 37°C , 16 h) w warunkach anaerobowych, a następnie wirowano ($1380 \times \text{g}$, 10 min). W wyniku przeprowadzonego procesu trawienia uzyskano następujące frakcje:

- supernatant – frakcja rozpuszczalna związków polifenolowych powstała po odwirowaniu próbki poddanej symulowanemu trawieniu enzymatycznemu w żołądku i dwunastnicy,
- osad – frakcja nierozpuszczalna związków polifenolowych poddanych symulowanemu trawieniu w żołądku i dwunastnicy, pozostałość po odwirowaniu próbki poddanej trawieniu enzymatycznemu,
- retentat – pozostałość po dializie, frakcja rozpuszczalna związków polifenolowych, które nie podlegają migracji przez membranę dializacyjną,
- permeat – bufor PBS (roztwór soli fizjologicznej) zawierający składniki, które przeniknęły przez membrany dializacyjne, frakcja rozpuszczalna związków polifenolowych wchłoniętych przez nabłonek jelita cienkiego,
- pozostałość po fermentacji – frakcja związków polifenolowych, która pozostała po trawieniu bakteryjnym osadu i retentatu w symulowanym jelicie grubym.

Określanie aktywności przeciwrodnikowej

Określenie aktywności przeciwrodnikowej wykonywano zgodnie z procedurą opisaną przez Tarko i wsp. [22], z wykorzystaniem aktywnego kationorodnika $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian, Sigma-Aldrich, USA). Rodnik $\text{ABTS}^{\cdot+}$ był generowany w reakcji chemicznej między wodnym roztworem soli diamo-

nowej (2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu, Sigma-Aldrich, USA) o stężeniu 7 mM a perokso-disiarczanem(VI) potasu ($K_2S_2O_8$, POCh, Gliwice) o stężeniu 2,45 mM. Roztwór rodnika przetrzymywano przez 18 h w ciemności, w temp. 20 ± 2 °C, celem zakończenia reakcji i ustabilizowania kationorodnika $ABTS^{+\cdot}$. Stężony roztwór rodnika rozcieńczano do analiz buforem fosforanowym o pH 7,4 w taki sposób, aby jego końcowa absorbancja, mierzona przy $\lambda = 734$ nm, wynosiła $A = 0,70 \pm 0,02$ ($ABTS^{+\cdot}_{0,7}$). Do pomiaru używano spektrofotometru Beckman DU 650 (Beckman Instruments, USA). Do 1 ml $ABTS^{+\cdot}_{0,7}$ dodawano 100 μ l odpowiednio rozcieńczonej próbki i po 6 min od wymieszania składników mierzono absorbancję. Zdolność przeciwutleniającą próbek obliczano na podstawie krzywej wzorcowej, wykonywanej każdorazowo z roztworów syntetycznej witaminy E (Trolox – kwas (\pm)-6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy, Sigma-Aldrich, USA), o stężeniach od 0 do 10 mg/100 ml.

Oznaczanie profilu związków polifenolowych metodą HPLC

Analizę związków polifenolowych wykonywano przy użyciu chromatografu Flexar z detektorem UV-Vis (Perkin-Elmer, USA). Rozdział prowadzono w kolumnie Synergi Fusion RP-80A $200 \times 4,6$ mm (4 μ m) Phenomenex (Torrance, USA), termostatowanej w temp. 30 °C. Fazę ruchomą stanowiły roztwór A (2,5-procentowy kwas octowy) i roztwór B (acetonitryl).

Podczas oznaczania (+)katechiny, hesperetyny i hesperydyny (przy przepływie 0,5 ml/min) stosowano programy elucji: gradientowy – liniowo od 5 % B do 20 % B w ciągu 30 min, następnie liniowo 20 % B do 100 % B w ciągu 3 min, a w dalszym ciągu izokratyczny – przez 7 min 100 % B i liniowo do 5 % B w ciągu 4 min. Kolumnę przemywano 5 % roztworu B.

Podczas oznaczania kwasu p-kumarowego i ferulowego (przy przepływie 0,5 ml/min) stosowano procedurę elucji: izokratycznie 20 % B (15 min), liniowo od 20 % B do 100 % B w ciągu 30 min, izokratycznie 100 % B przez 4 min, liniowo do 20 % B w ciągu 3 min. Kolumnę przemywano 20 % roztworu B.

W przypadku kwercetyny (przy przepływie 1 ml/min) stosowano program elucji: gradientowy – liniowo od 5 % B do 20 % B w ciągu 20 min, następnie liniowo 20 % B do 100 % B w ciągu 10 min, izokratycznie 100 % B przez 3 min i liniowo do 5 % B w ciągu 4 min. Kolumnę przemywano 5 % roztworu B.

Detekcję prowadzono przy długościach fali: (+)katechyna, hesperetyna i hesperydyna – $\lambda = 280$ nm, kwas ferulowy i p-kumarowy – $\lambda = 325$ nm; kwercetyna – $\lambda = 360$ nm. Do ilościowych oznaczeń stosowano krzywe wzorcowe sporządzone z odpowiednich standardów: kwasu ferulowego, kwasu p-kumarowego, (+)katechiny, kwercetyny, hesperetyny i hesperydyny (Sigma-Aldrich, USA).

Analiza statystyczna wyników

Oznaczenia wykonywano w minimum trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną wyników wykonano za pomocą programu InStat v. 3.01 (GraphPad Software Inc., USA). W celu określenia istotności różnic między średnimi przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukeya. Normalność rozkładu określono za pomocą testu Kołgomorowa-Smirnowa.

Wyniki i dyskusja

Doświadczenia rozpoczęto od określenia aktywności przeciwutleniającej wybranych związków, należących do różnych grup polifenoli, a następnie ich aktywności na poszczególnych etapach trawienia w symulowanych warunkach (tab. 1).

Tabela 1. Aktywność przeciwutleniająca polifenoli na poszczególnych etapach trawienia
Table 1. Antioxidant activity of polyphenols at different stages of digestion

Wyszczególnienie Specification	Aktywność przeciwutleniająca [g Troloksu/100 g] Antioxidant activity [g Trolox/100 g]					
	Polifenol Polyphenol	Supernatant Supernatant	Osad Sediment	Retentat Retentate	Permeat Permeate	Pozostałość po fermentacji Fermentation residue
Kwas ferulowy Ferulic acid	83,9 ^a ± 4,6	4,2 ^b ± 0,7	12,9 ^c ± 0,3	1,2 ^d ± 0,2	6,6 ^e ± 0,9	2,5 ^d ± 0,3
Kwas p-kumarowy p-Coumaric acid	106,3 ^a ± 2,4	10,5 ^b ± 0,8	16,0 ^c ± 0,2	1,6 ^d ± 0,1	8,2 ^b ± 0,6	5,0 ^e ± 0,2
(+)Katechina (+)Catechin	96,6 ^a ± 2,6	9,8 ^b ± 0,5	12,0 ^c ± 1,0	1,1 ^d ± 0,2	8,0 ^e ± 0,2	2,6 ^f ± 0,3
Kwercetyna Quercetin	234,4 ^a ± 5,3	1,3 ^b ± 0,2	96,3 ^c ± 2,0	0,1 ^d ± 0,0	2,0 ^e ± 0,2	0,7 ^f ± 0,0
Hesperetyna Hesperetin	42,6 ^a ± 1,6	1,7 ^b ± 0,0	25,4 ^c ± 0,7	0,1 ^d ± 0,0	2,1 ^e ± 0,1	0,8 ^f ± 0,1
Hesperydyna Hesperidin	33,2 ^a ± 0,4	4,2 ^b ± 0,2	6,4 ^c ± 0,0	0,3 ^d ± 0,1	2,4 ^e ± 0,1	2,8 ^e ± 0,1

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; n = 3;

a - f – wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszach (w obrębie analizowanego związku) różnią się statystycznie istotnie (p < 0,05) / mean values in rows (within compound analyzed) and denoted using different letters differ statistically significantly (p < 0.05).

Najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazała kwercetyna, najniższą zaś – hesperydyna. Podobne zależności przedstawili Robards i wsp. [17]. Właściwości przeciwutleniające flawonoidów są ściśle związane z pozycją i stopniem hydroksylacji cząsteczki, głównie pierścienia B. Hesperetyna, która ma tylko jedną grupę hydroksylową w pierścieniu B, wykazuje niską aktywność. Natomiast flawonoidy z ugrupowaniem katecholowym charakteryzują się dużą zdolnością przeciwutleniającą. Kwercetyna, oprócz ugrupowania katecholowego, ma również wiązanie podwójne między węglami C2 i C3, co dodatkowo zwiększa jej właściwości przeciwutleniające [17]. Wśród badanych fenolokwasów najwyższą aktywnością charakteryzował się kwas p-kumarowy. Z danych literaturowych [11, 23] wynika, że glikozylacja flawonoidów wpływa na obniżenie ich aktywności przeciwutleniającej w stosunku do aglikonów, co potwierdzono na przykładzie hesperydyny i hesperetyny (tab. 1).

Po wybranych etapach symulowanego procesu trawienia oceniano zmiany zawartości poszczególnych związków (HPLC). Wyniki przedstawiono jako procent początkowej zawartości polifenoli (tab. 2).

Tabela 2. Zawartość związków polifenolowych na poszczególnych etapach trawienia
Table 2. Content of polyphenol compounds at different stages of digestion

Wyszczególnienie Specification	Zawartość związków polifenolowych [% początkowej zawartości] Content of polyphenol compounds [% of initial content]				
	Supernatant Supernatant	Osad Sediment	Retentat Retentate	Permeat Permeate	Pozostałość po fermentacji Fermentation residue
Kwas ferulowy Ferulic acid	8,2 ^a ± 0,1	35,1 ^b ± 0,1	1,0 ^c ± 0,0	3,8 ^d ± 0,2	19,5 ^e ± 0,3
Kwas p-kumarowy p-Coumaric acid	2,3 ^a ± 0,0	47,3 ^b ± 0,5	0,0 ^c ± 0,0	0,2 ^c ± 0,0	17,0 ^d ± 0,3
(+)Katechina (+)Catechin	1,5 ^a ± 0,1	27,5 ^b ± 0,4	0,0 ^c ± 0,0	1,1 ^a ± 0,0	5,2 ^d ± 0,1
Kwercetyna Quercetin	0,2 ^a ± 0,0	96,4 ^b ± 0,2	0,0 ^a ± 0,0	0,0 ^a ± 0,0	0,0 ^a ± 0,0
Hesperetyna Hesperetin	1,8 ^a ± 0,1	90,8 ^b ± 0,2	0,1 ^c ± 0,0	0,0 ^c ± 0,0	0,2 ^d ± 0,0
Hesperydyna Hesperidin	0,5 ^a ± 0,0	2,2 ^b ± 0,0	0,0 ^c ± 0,0	0,0 ^c ± 0,0	1,2 ^d ± 0,2

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; n = 3;

a - e – wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszach (w obrębie analizowanego związku) różnią się statystycznie istotnie (p < 0,05) / mean values in rows (within compounds analyzed) and denoted using different letters differ statistically significantly (p < 0.05).

Supernatant uzyskany po pierwszym etapie trawienia kwasu ferulowego zawierał jedynie 8,2 % dawki początkowej, natomiast w osadzie (frakcja nierozpuszczalna) było go 35 %. Może to świadczyć o częściowym rozkładzie tego związku w żołądku i dwunastnicy. Po etapie symulującym migrację bierną w jelicie cienkim, w retentacie pozostało tylko ok. 1 % początkowej ilości kwasu ferulowego poddanego procesowi trawienia, podczas gdy do permeatu przeszło blisko 4 %, co pozwala przypuszczać, że kwas ferulowy w postaci niezmienionej może być biernie transportowany do organizmu. W pozostałości po fermentacji stwierdzono blisko 20 % początkowej zawartości badanego związku, co oznacza, że niemal połowa ilości poddanej fermentacji (łącznie zawartość w osadzie i retentacie) uległa rozkładowi pod wpływem enzymów bakteryjnych. Można zatem stwierdzić, że pewna część kwasu ferulowego podlega trawieniu dopiero pod wpływem mikroflory jelitowej w jelicie grubym. Wyniki te znajdują potwierdzenie w pomiarach aktywności przeciwutleniającej roztworów na poszczególnych etapach trawienia. Potencjał przeciwutleniający kwasu ferulowego przed trawieniem wynosił 84 g Troloxu/100 g (tab. 1). Aktywność przeciwutleniająca frakcji nierozpuszczalnej (osad) po symulacji trawienia w żołądku i dwunastnicy była stosunkowo niska (13 g Troloxu/100 g), co odpowiadało zaledwie 15 % początkowej aktywności kwasu ferulowego, poddanego trawieniu. Tak niska aktywność wskazywałaby na rozpad kwasu ferulowego do pochodnych o niższej zdolności wygaszania rodnika ABTS^{•+}. Z drugiej strony wykazano, że potencjał przeciwutleniający supernatantu był wyższy niż by to wynikało z oznaczonej w nim zawartości kwasu ferulowego. Potwierdza to, że na etapie trawienia w żołądku i dwunastnicy powstają prawdopodobnie pochodne dobrze rozpuszczalne i o wyższej aktywności przeciwutleniającej niż trawiony substrat. Na uwagę zasługuje również bardzo niski potencjał wygaszania wolnych rodników, obserwowany w próbie po trawieniu z udziałem mikroflory jelitowej. Z literatury wiadomo, że bakterie jelitowe rozkładają kwas ferulowy np. do kwasu 4-hydrokso-3-metoksyhipurowego (wanilinowego) lub kwasu 3-hydrokso-3-metoksyhipurowego [4]. Są to pochodne o znacznie słabszym potencjale przeciwutleniającym od kwasu ferulowego [12]. Ich znaczna ilość, powstała na skutek metabolizmu bakteryjnego, wpłynęła na bardzo niski potencjał przeciwutleniający pozostałości po trawieniu (na poziomie niecałych 3 % potencjału początkowego), przy równoczesnej zawartości kwasu ferulowego równej 19,5 % ilości początkowej.

Podobne zależności wykazano w przypadku drugiego z badanych fenolokwasów. Zawartość kwasu p-kumarowego w supernatancie wynosiła zaledwie 2,3 % ilości początkowej, ale aktywność przeciwutleniająca tej frakcji odpowiadała aż 10 % aktywności roztworu kwasu przed trawieniem (tab. 1 i 2). Ponownie zatem, pod wpływem trawienia w żołądku i dwunastnicy, z kwasu powstały pochodne rozpuszczalne, które przeszły do supernatantu o potencjale wygaszania rodnika ABTS^{•+} wyższym od początkowego kwasu. Z kolei w osadzie (frakcja nierozpuszczalna powstała po tym eta-

pie trawienia) zawartość kwasu p-kumarowego zmniejszyła się do 47,3 %, zaś aktywność przeciwutleniająca do 15 %, co oznacza, że powstałe nierozpuszczalne pochodne charakteryzowały się znacząco niższą aktywnością. Zawartość badanego kwasu w pozostałości po fermentacji była mniejsza o ok. 64 % niż w osadzie po trawieniu i charakteryzowała się niską aktywnością przeciwutleniającą. Można zatem wnioskować, że bakterie jelita grubego także metabolizują kwas p-kumarowy do pochodnych o niższym potencjale przeciwutleniającym.

Przyswajalność kwasów fenolowych zależy głównie od formy, w jakiej dostają się do układu pokarmowego. W badaniach [15, 16, 26] potwierdza się, że ze względu na małą masę cząsteczkową kwasy ferulowy i p-kumarowy są częściowo wchłaniane z przewodu pokarmowego w niezmienionej postaci. Mogą być transportowane z żołądka, gdyż niskie pH żołądka ułatwia transport tych związków w formie niezdysocjowanej poprzez mechanizm dyfuzji biernej. Z kolei w środowisku jelita cienkiego pochodne kwasu cynamonowego występują w formie jonowej i jako takie mogą być aktywnie pobierane przez komórki nabłonka jelitowego dzięki transporterom błonowym [15, 27]. W przypadku fenolokwasów po pierwszym etapie trawienia zaobserwowano wyższą aktywność przeciwutleniającą osadów niż supernatantów, co związane było z większą zawartością tych związków we frakcjach nierozpuszczalnych. Jednak również potencjał przeciwutleniający zebranych supernatantów był stosunkowo wysoki, co świadczy o rozkładzie badanych kwasów fenolowych w trakcie symulowanego trawienia w żołądku i dwunastnicy do bardziej aktywnych, rozpuszczalnych pochodnych. Wykazano [4], że kwasy fenolowe w jelicie cienkim nie są całkowicie absorbowane. Mogą więc docierać do jelita grubego, gdzie wywołują liczne efekty fizjologiczne lub ulegać dalszym przemianom pod wpływem rezydującej tam mikroflory. Po etapie inkubacji z bakteriami jelitowymi, w próbkach zaobserwowano zmniejszenie zawartości tych związków, w porównaniu z osadem po pierwszym etapie trawienia. Kwasy fenolowe są zatem w pewnym stopniu metabolizowane przez mikroflorę jelitową.

Trawienie flawonoidów i ich biodostępność różniły się istotnie ($p < 0,05$) w porównaniu z fenolokwasami (tab. 2). W przypadku (+)katechiny zaobserwowano znaczne zmniejszenie zawartości tego związku po pierwszym etapie trawienia. Pozostająca w osadzie (+)katechina stanowiła prawie 28 % dawki poddanej procesowi trawienia, zaś w supernatancie było jej jedynie 1,5 % początkowej zawartości. Mimo tak małej ilości związku oznaczanego w supernatancie (tab. 2) frakcja ta wykazywała umiarkowany potencjał przeciwutleniający (tab. 1) na poziomie ok. 10 % potencjału (+)katechiny przed trawieniem. Według Spencera [19] monomeryczne flawan-3-ole, do których zalicza się (+)katechinę, są stabilne w środowisku żołądka. Jednak w płynie jelitowym, wraz z coraz bardziej alkalicznym odczynem, związki te są łatwo utleniane i mogą tworzyć dimery, zwykle o silniejszym potencjale przeciwrodnikowym. Czą-

steczka (+)katechiny zawiera 5 grup hydroksylowych, a jej biodostępność jest stosunkowo niewielka ze względu na duży rozmiar. Za potencjał przeciwutleniający permeatu odpowiadają prawdopodobnie produkty rozpadu katechiny, które były w stanie przeniknąć przez membranę. Blisko 1/3 katechiny poddanej trawieniu dociera do jelita grubego, w którym ulega działaniu bakterii jelitowych. Z badań Donovan i wsp. [6] wynika, że w jelicie zachodzi glukuronidacja i metylacja (+)katechiny. Enzymy bakteryjne degradują też katechiny do prostszych cząsteczek, głównie do niskocząsteczkowych kwasów fenolowych. Związki te również wykazują właściwości przeciwutleniające i korzystnie działają na organizm [25]. Udział mikroflory w metabolizmie katechin został potwierdzony także przez inkubację *in vitro* z zawiesiną ludzkich lub zwierzęcych ekskrementów [1]. Z badań własnych wynika, że po fermentacji z bakteriami jelitowymi zawartość (+)katechiny zmniejszyła się pięciokrotnie w stosunku do jej ilości w osadzie, co potwierdza jej mikrobiologiczną degradację.

Znacznie większą odpornością na trawienie w żołądku i dwunastnicy odznaczała się kwercetyna – aż 96,4 % ilości poddanej symulowanemu trawieniu przechodziło do osadu (tab. 2). Osad charakteryzował się także wysokim potencjałem przeciwutleniającym (tab. 1). Pozostałe frakcje (supernatant, retentat, permeat i pozostałość po fermentacji) nie zawierały w ogóle kwercetyny, a ich aktywność przeciwutleniająca była bliska zeru. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o tym, że kwercetyna, która dociera do jelita grubego, jest w nim całkowicie degradowana przez bakterie. Spencer i wsp. [20] stwierdzili, że kwercetyna jest metabolizowana do tego stopnia, że w krwioobiegu nie występuje w postaci wolnej. Kwercetyna występuje w tkankach niemal wyłącznie w formie glukuronidowej, sulfonowej i metylowej, co sugeruje, że w warunkach *in vivo* jej aktywność biologiczna zależy głównie od metabolitów tego związku [10]. Według Walle'a [24] glukuronidy i siarczany kwercetyny zachowują aktywność przeciwutleniającą. Wykazano, że kwercetyna i inne flawonoidy podlegają metabolicznej konwersji podczas wchłaniania w komórkach nabłonka jelita przed dotarciem do wątroby [14]. Graf i wsp. [10] badali zawartość kwercetyny w tkankach przewodu pokarmowego. Wykazali oni, że żołądek, jelito cienkie i grube zawierają zarówno wolną kwercetynę, jak i różne jej metabolity, co dowodzi, że może ona być wchłaniana i aktywnie metabolizowana w przewodzie pokarmowym. Należy wziąć pod uwagę, że kwercetyna w żywności najczęściej występuje w formie glikozydów. Jej aktywność przeciwutleniająca zależy więc od pozycji oraz rodzaju grupy cukrowej dołączonej do podstawowej struktury [14]. Enzymy produkowane przez bakterie przewodu pokarmowego hydrolizują niektóre flawonoidy i ich glikozydy. Prowadzą zatem do rozszczepienia pierścienia i powstania produktów, takich jak kwasy hydroksyfenylooctowy i hydroksyfenylopropionowy, które prawdopodobnie ulegają wchłanianiu [7].

W wyniku trawienia *in vitro* do osadu przechodziło ponad 90 % początkowej ilości hesperetyny. Odmienne wyniki uzyskano w przypadku hesperydyny, czyli 7-O-

rutynozylu hesperetyny, gdyż w osadzie znajdowało się jedynie 2 % ilości poddanej procesowi trawienia. Wyniki te wskazują, że hesperydyna ulega hydrolizie w żołądku i jelicie cienkim, podczas gdy hesperetyna jest metabolizowana tylko w niewielkim stopniu. W permeacie uzyskanym po dializie hesperetyny nie wykryto jej obecności, natomiast w retencie były śladowe ilości tego związku. Hesperydyna nie występowała w żadnej z tych frakcji. Podkreślić należy bardzo duży ubytek hesperetyny (o 99 %) na skutek aktywności mikroflory jelitowej. Bardzo zmalał również potencjał przeciwutleniający osadu poddanego działaniu bakterii. Dowodzi to, że metabolity powstające w jelicie grubym pod wpływem rezydującej w nim mikroflory charakteryzują się mniejszymi zdolnościami do wygaszania wolnych rodników niż badany flawanon. Odmienne wyniki uzyskano w przypadku hesperydyny. Zarówno supernatant, jak i osad, charakteryzowały się zbliżoną zdolnością do wygaszania wolnych rodników. Potwierdza to, że hesperydyna w kwaśnym środowisku żołądka i przy udziale enzymów trawiennych była rozkładana do bardziej aktywnych pochodnych, z których część przeniknęła przez membrany dializacyjne. Na skutek metabolizmu mikroflory jelitowej aktywność przeciwutleniająca frakcji hesperydynowej obniżyła się dwukrotnie, wskazując na jej udział w trawieniu i wchłanianiu hesperydyny. Reszta cukrowa jest głównym wyznacznikiem miejsca wchłaniania i biodostępności flawonoidów, przy czym biodostępność aglikonów jest kilkakrotnie wyższa niż glikozydów [2, 3].

Uzyskane wyniki można wykorzystać na przykład podczas opracowywania przeciwutleniających suplementów diety. Zastosowanie kwasów fenolowych umożliwia ich metabolizm i wchłanianie już na początkowych odcinkach przewodu pokarmowego. Flawonoidy, szczególnie w postaci aglikonów, są metabolizowane głównie przy udziale mikroflory jelitowej. Dlatego takie suplementy nie powinny być adresowane do osób ze schorzeniami okrężnicy. Wnioski z badań własnych mogłyby być również wskazówką podczas planowania diet dla osób z różnymi schorzeniami układu pokarmowego. Wprawdzie metabolizm czystych polifenoli różni się od metabolizmu tych komponentów związanych z matrycą żywieniową, ale owoce i warzywa bogate w kwasy fenolowe będą szybciej dostarczały do krwiobiegu składników przeciwutleniających niż dania zasobne we flawonoidy.

Wnioski

1. Trawienie większości wybranych związków polifenolowych rozpoczynało się na etapie żołądka i dwunastnicy, a powstałe pochodne wykazywały wysoki potencjał przeciwutleniający. Kwasy fenolowe i glikozydy były łatwo metabolizowane w górnych odcinkach przewodu pokarmowego.
2. Badane polifenole w różnym stopniu były biernie transportowane przez membrany dializacyjne. Najłatwiej migrowały kwasy fenolowe, przypuszczalnie ze względu na małe rozmiary cząsteczek.

3. Mikroflora jelitowa odgrywała istotną rolę podczas trawienia związków polifenolowych, głównie kwercetyny i hesperetyny, które w nieznacznym stopniu były hydrolizowane przez kwas żołądkowy i enzymy dwunastnicy.
4. Wiedza o miejscu trawienia polifenoli w przewodzie pokarmowym umożliwi prawidłowe projektowanie suplementów diety oraz opracowywanie diet dla osób ze schorzeniami gastrycznymi.

Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/01/B/NZ9/00218.

Literatura

- [1] Aura A.M., Mattila I., Seppanen-Laakso T., Miettinen J., Oksman-Caldentey K.M., Oresic M.: Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota: Comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method. *Phytochem. Letters*, 2008, **1**, 18-22.
- [2] Brand W., van der Wel P.A.I., Rein M.J., Barron D., Williamson G., van Bladeren P.J., Rietjens I.M.C.M.: Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. *Drug Met. Dispos.*, 2008, **36** (9), 1794-1802.
- [3] Bredsdorff L., Nielsen I.L.F., Rasmussen S.E., Cornett C., Barron D., Bouisset F., Offord E., Williamson G.: Absorption, conjugation and excretion of the flavanones, naringenin and hesperetin from α -rhamnosidase-treated orange juice in human subjects. *Brit. J. Nutr.*, 2010, **103**, 1602-1609.
- [4] Budryn G., Nebesny E.: Fenolokwasy – ich właściwości, występowanie w surowcach roślinnych, wchłanianie i przemiany metaboliczne. *Bromat. Chem. Toksyk.*, 2006, **2**, 103-110.
- [5] Czajka A.: Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu. *Nowiny Lek.*, 2006, **75** (6), 582-586.
- [6] Donovan J.L., Crespy V., Manach C., Morand C., Besson C., Scalbert A., Remesy C.: Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J. Nutr.*, 2001, **131**, 1753-1757.
- [7] Erlund I.: Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.*, 2004, **24**, 851-874.
- [8] Gałecka E., Mrowicka M., Malinowska K., Gałecki P.: Wybrane substancje nieenzymatyczne uczestniczące w procesie obrony przed nadmiernym wytwarzaniem wolnych rodników. *Pol. Merk. Lek.*, 2008, **147**, 269-272.
- [9] Gawlik-Dziki U.: Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **41** (4), 29-40.
- [10] Graf B.A., Ameho C., Dolnikowski G.G., Milbury P.E., Chen C.Y., Blumberg J.B.: Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *J. Nutr.*, 2006, **136**, 39-44.
- [11] Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J.: Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 2002, **13**, 572-584.
- [12] Karamać M., Kosińska A., Pegg R.B.: Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **2**, 165-170.
- [13] Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L.: Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 727-747.
- [14] Murota K., Terao J.: Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch. Biochem. Bioph.*, 2003, **417**, 12-17.

- [15] Olthof M.R., Hollman P.C.H., Katan M.B.: Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.*, 2001, **131** (1), 66-71.
- [16] Poquet M., Clifford M.N., Williamson G.: Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Met. Disposit.*, 2008, **36**, 190-197.
- [17] Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W.: Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, 1999, **66**, 401-436.
- [18] Scalbert A., Williamson G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 2000, **130** (8), 2073-2085.
- [19] Spencer J.P.E.: Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.*, 2003, **133**, 3255-3261.
- [20] Spencer J.P.E., Kuhlne G.G.C., Williams R.J., Rice-Evans C.: Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem. J.*, 2003, **372**, 173-181.
- [21] Sroka Z., Gamian A., Cisowski W.: Niskocząsteczkowe związki przeciwutleniające pochodzenia naturalnego. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005, **59**, 34-41.
- [22] Tarko T., Duda-Chodak A., Tuszyński T.: The influence of microwaves and selected manufacturing parameters on apple chip quality and antioxidant activity. *J. Food Process. Pres.*, 2009, **33**, 676-690.
- [23] Van Acker S.A., van der Berg D.J., Tromp M.N., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J., Bast A.: Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.*, 1996, **20** (3), 331-342.
- [24] Walle T.: Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.*, 2004, **36** (7), 829-837.
- [25] Yashin A., Nemzer B., Yashin Y.: Bioavailability of tea components. *J. Food Res.*, 2012, **2** (1), 281-290.
- [26] Zhang Y., Tie X., Bao B., Wu X., Zhang Y.: Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. *Brit. J. Nutr.*, 2007, **97**, 484-494.
- [27] Zhao Z., Moghadasian M.H.: Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem.*, 2008, **109**, 691-702.

TRANSFORMATIONS OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN SIMULATED HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT

Summary

Bioactivity of polyphenolic compounds after intake depends mainly on transformations in the gastrointestinal tract and the structure of the metabolites produced. The objective of the research study was to determine the transformations of some selected polyphenolic compounds occurring during in vitro digestion thereof. For the experiment, solutions of ferulic and p-coumaric acids, (+)catechin, quercetin, hesperidin and hesperetin were used. They underwent a simulated digestive process, and, at some selected stages, the antioxidant activity (using a spectrophotometric method with ABTS^{•+} radical cation) was determined and the contents were assayed of the compounds (with the use of a HPLC high-performance liquid chromatography). Of the analyzed compounds, quercetin was characterized by the highest antioxidant activity (234 g Trolox/g). Hesperetin (aglycone) showed a higher antiradical activity than hesperidin, its rutinoside. The digestion of the majority of polyphenols analyzed started in the stomach and duodenum, and the derivatives produced had a high antioxidant potential. Phenolic acids were most digestion-prone in this part of the gastrointestinal tract. Also, it was found that the glycosides (hesperidin) were significantly decomposed by the gastric acid and duodenal enzymes. The polyphenols tested were characterized by a varying degree of migration through the dialysis membranes. The phenolic acids passed more easily through the membranes than the flavonoids; this fact could be related to a smaller size of the acid mole-

cules. The intestinal bacteria used in the experiment impacted all the polyphenols analyzed and they significantly affected the digestion of flavonoids, especially quercetin and hesperetin. In the stomach and duodenum, those compounds were metabolized to a limited extent. On the other hand, the intestinal microbiota affected the phenolic acids to a lesser extent.

Key words: polyphenolic compounds, in vitro digestion, antioxidant activity, intestinal microflora ☒