

Politechnika Gdańska  
Wydział Chemiczny  
Katedra Chemii Analitycznej

Rozprawa doktorska

**WPLYW OBRÓBKI KULINARNEJ NA ZAWARTOŚĆ SUBSTANCJI BIOAKTYWNYCH  
W KAPUŚCIE BIAŁEJ (*BRASSICA OLERACEA VAR CAPITATA F. ALBA*)**

Barbara Kusznierewicz

Promotor rozprawy: prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

Gdańsk 05.12.2007

## SPIS TREŚCI

<b>SPIS TREŚCI.....</b>	<b>1</b>
<b>WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW .....</b>	<b>4</b>
<b>WSTĘP .....</b>	<b>5</b>
<b>I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA .....</b>	<b>7</b>
1. KLASYFIKACJA WARZYW KRZYŻOWYCH .....	7
2. SPOŻYCIE WARZYW KRZYŻOWYCH NA ŚWIECIE .....	11
3. ZWIĄZKI BIOAKTYWNE WYSTĘPUJĄCE W WARZYWACH KRZYŻOWYCH .....	14
3.1 <i>Glukozynolany, izotiocyjaniany, indole</i> .....	14
3.1.1 Biosynteza związków z grupy GLS .....	16
3.1.2 Hydroliza glukozynolanów - powstawanie izotiocyjanianów .....	17
3.1.3 Hydroliza glukozynolanów - powstawanie indoli .....	19
3.1.4 Czynniki wpływające na stężenie związków z grupy GLS w warzywach krzyżowych .....	20
3.1.4.1 Abiotyczne i biotyczne czynniki środowiskowe .....	21
3.1.4.2 Przechowywanie, obróbka kulinarna .....	22
3.1.5 Metabolizm produktów rozpadu glukozynolanów .....	23
3.1.5.1 Metabolizm izotiocyjanianów .....	23
3.1.5.2 Metabolizm pochodnych indolowych .....	24
3.1.6 Metodyki oznaczania glukozynolanów i produktów ich rozpadu .....	25
3.1.6.1 Metodyki oznaczania związków z grupy GLS w próbkach materiału roślinnego .....	25
3.1.6.2 Metodyki oznaczania izotiocyjanianów w próbkach materiału roślinnego .....	27
3.1.6.3 Metodyki oznaczania pochodnych indolowych w próbkach materiału roślinnego .....	30
3.2 <i>Przeciwutleniacze w warzywach krzyżowych</i> .....	31
3.2.1 Przeciwutleniacze o właściwościach hydrofilowych .....	32
3.2.1.1 Witamina C .....	32
3.2.1.2 Związki polifenolowe .....	33
3.2.2 Przeciwutleniacze o charakterze lipofilowym .....	35
3.2.2.1 Karotenoidy .....	35
3.2.2.2 Witamina E .....	36
3.2.3 Trwałość przeciwutleniaczy podczas obróbki i przechowywania warzyw krzyżowych .....	37
3.2.4 Właściwości przeciwutleniające warzyw krzyżowych surowych i poddanych obróbce .....	40
<b>II. CEL I ZAKRES PRACY .....</b>	<b>42</b>
<b>III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA .....</b>	<b>43</b>
1. APARATURA I ODCZYNNIKI .....	43
1.1 <i>Odczynniki chemiczne i biochemiczne</i> .....	43
1.2 <i>Badane próbki</i> .....	44
1.3 <i>Aparatura</i> .....	44
2. OPIS STOSOWANYCH PROCEDUR ANALITYCZNYCH .....	44
2.1 <i>Przygotowanie próbek kapusty do badań</i> .....	45
2.2 <i>Oznaczanie substancji bioaktywnych w kapuście</i> .....	45

2.2.1 Techniki i metodyki stosowane do oznaczania substancji bioaktywnych w kapuście.....	45
2.2.1.1 Metodyki oznaczania właściwości przeciwutleniającej próbek kapusty .....	45
2.2.1.2 Wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej (TLC) do monitorowania profilu przeciwutleniaczy .....	50
2.2.1.3 Oznaczanie zawartości glukozynolanów w próbkach kapusty przy użyciu chromatografii cieczowej (wg PPN-EN ISO 9167 – 1 : 1999) .....	51
2.2.1.4 Oznaczanie indolowych produktów rozpadu GLS w próbkach kapusty .....	59
2.2.2. Opis doświadczeń wykonywanych na etapie oznaczania substancji bioaktywnych w kapuście .....	61
2.2.2.1 Porównanie właściwości przeciwutleniających ekstraktów kapusty białej pochodzącej z różnych upraw przy użyciu testów ABTS i DPPH .....	61
2.2.2.2 Porównanie profili glukozynolanów kapusty białej pochodzącej z różnych upraw przy użyciu techniki HPLC-DAD .....	61
2.2.2.3 Badanie wpływu okresu fermentacji na właściwości przeciwutleniające kapusty .....	62
2.2.2.4 Badanie wpływu temperatury na właściwości przeciwutleniające świeżej i kiszzonej kapusty .....	62
2.2.2.5 Badanie wpływu fermentacji na zawartość glukozynolanów w próbkach kapusty .....	63
2.2.2.6 Badanie wpływu wysokiej temperatury na zawartość glukozynolanów w próbkach kapusty.....	63
2.2.2.7 Badanie wpływu fermentacji i ogrzewania na zawartość indolowych produktów rozpadu glukozynolanów w próbkach kapusty .....	63
2.3 <i>Procedury wykorzystywane na etapie izolacji i identyfikacji substancji powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty</i> .....	64
2.3.1 Zastosowanie preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) na etapie izolacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty .....	64
2.3.2 Zastosowanie zestawu HPLC-NP sprzężonego z kolektorem frakcji na etapie izolacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty .....	64
2.3.3. Wykorzystanie wysokorozdzielczej spektroskopii mas do identyfikacji bioaktywnych związków powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty .....	65
2.3.4 Zastosowanie testu Salkowskiego do stwierdzenia obecności steroli w badanych próbkach.....	66
3 WYNIKI I WNIOSKI .....	66
3.1 <i>Porównanie zawartości GLS i właściwości przeciwutleniających kapusty białej pochodzącej z różnych rejonów Europy</i> .....	66
3.2 <i>Wpływ procesu fermentacji i obróbki termicznej na zawartość substancji bioaktywnych w kapuście</i> .....	71
3.2.1 Właściwości przeciwutleniające .....	71
3.2.2 Zawartość glukozynolanów.....	87
3.2.3 Zawartość indolowych produktów rozpadu glukozynolanów .....	100
3.3 <i>Próba izolacji i identyfikacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty</i> .....	105
3.3.1 Zastosowanie preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) na etapie izolacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas kulinarnej obróbki kapusty .....	106

---

3.3.2 Próba identyfikacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty wyizolowanych za pomocą techniki PTLC .....	107
3.3.3 Zastosowanie zestawu HPLC-NP sprzężonego z kolektorem frakcji na etapie izolacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty .....	112
3.3.4 Zastosowanie techniki NMR na etapie identyfikacji bioaktywnych substancji powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty wyizolowanych dzięki zastosowaniu układu HPLC-DAD-KF.....	118
<b>IV PODSUMOWANIE .....</b>	<b>122</b>
<b>V STRESZCZENIE .....</b>	<b>126</b>
<b>VI SUMMARY .....</b>	<b>127</b>
<b>VII CYTOWANA LITERATURA .....</b>	<b>128</b>
<b>DOROBEK NAUKOWY ZWIĄZANY Z REALIZACJĄ PRACY DOKTORSKIEJ .</b>	<b>146</b>

## WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

Akronim/skrót	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
<b>4OHGBS</b>	<i>4-hydroxy-glucobrassicin</i>	4-hydroksy-glukobrassycyna
<b>ABTS</b>	<i>2,2'-azynobis(3-ethylbenzotiazoline-6-sulofonic acid</i>	Kwas 2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulofonowy
<b>AT</b>	<i>Acetylo-transferase</i>	N-acetylotransferaza
<b>BFP</b>	<i>Brown Pigment Formation</i>	Powstawanie brunatnego pigmentu
<b>CG</b>	<i>Cysteine glicinase</i>	Cysteinoglicynaza
<b>CGT</b>	<i>Glutamyl transpepdidase</i>	Transpeptydaza $\gamma$ -glutamylowa;
<b>CRP</b>	<i>C-reactive protein</i>	Białka C-reaktywne
<b>DAD</b>	<i>Diode Array Detector</i>	Detektor z matrycą fotodiodową
<b>DHA</b>	<i>Dehydroascorbic acid</i>	Kwas dehydroaskorbinowy
<b>DIM</b>	<i>3,3'-diindolemethan</i>	3,3'-diindolometan
<b>DPPH</b>	<i>2,2-diphenyl-1-picrylohydrazyl</i>	2,2-difenyl-1-pikrylohydrazyl
<b>DS-GLS</b>	<i>Desulfo-glucosinolates</i>	Desulfo-glukozyzyny
<b>ESI</b>	<i>Electrospray Ionization</i>	Jonizacja przez elektrorozpraszanie
<b>FID</b>	<i>Flame Ionization Detector</i>	Detektor jonizacji płomieniowej
<b>FPD</b>	<i>Flame Photometric Detector</i>	Detektor płomieniowo fotometryczny
<b>GBS</b>	<i>Glucobrassicin</i>	Glukobrassycyna
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i>	Chromatografia gazowa
<b>GGT</b>	<i>Glutamyl transpepdidase</i>	Transpeptydaza $\gamma$ -glutamylowa;
<b>GIB</b>	<i>Glucoiberin</i>	Glukoiberyna
<b>GLS</b>	<i>Glucosinolates</i>	Glukozyzyny
<b>GNP</b>	<i>Gluconapin</i>	Glukonapina
<b>GSH</b>	<i>Glutathione</i>	Glutation
<b>GST</b>	<i>Glutathion S-transferase</i>	S-transferaza glutationowa
<b>GTL</b>	<i>Glukotropaolin</i>	Glukotropaolina
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
<b>HR-MS</b>	<i>High Resolution Mass Spectroscopy</i>	Wysokorozdzielcza spektrometria mas
<b>HS</b>	<i>Head Space</i>	Analiza fazy nadpowierzchniowej
<b>SPME</b>	<i>Solid Phase Microextraction</i>	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
<b>I3AA</b>	<i>Indolo-3-acetic acid</i>	Kwas indolo-3-octowy
<b>I3ACN</b>	<i>Indolo-3-acetonitrile</i>	Indolo-3-acetonitryl
<b>I3C</b>	<i>Indolo-3-carbinol</i>	Indolo-3-karbinol
<b>IS</b>	<i>Internal Standard</i>	Wzorzec wewnętrzny
<b>ITC</b>	<i>Isotiocyanians</i>	Izotiocyjaniany
<b>EI</b>	<i>Elektron ionization</i>	Jonizacja elektronami
<b>KF</b>	<i>Fraction collector</i>	Kolektor frakcji
<b>LDL</b>	<i>Low density Lipoprotein</i>	Lipoproteiny o małej gęstości
<b>MeOHGBS</b>	<i>4-metoxy-glucobrassicin</i>	4-metoksy-glukobrassycyna
<b>MRPs</b>	<i>Maillard Reaction Products</i>	Produkty reakcji Maillarda
<b>MS</b>	<i>Mass spectrometry</i>	Spektrometria mas
<b>NeoGBS</b>	<i>Neo-glucobrassicin</i>	Neo-glukobrassycyna
<b>NIRS</b>	<i>Near-Infrared Spectroscopy</i>	Spektroskopia w niskiej podczerwieni
<b>NMR</b>	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
<b>NP</b>	<i>Normal Phase</i>	Układ faz normalnych
<b>PCL</b>	<i>Photochemiluminescence</i>	Fotochemiluminescencja
<b>PFK</b>	<i>Perfluorokerosene</i>	Perfluorokerozen
<b>PTLC</b>	<i>Preparative Thin Layer Chromatography</i>	Preparatywna chromatografia cienkowarstwowa
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i>	Reaktywne Formy Tlenu
<b>RP</b>	<i>Reversed Phase</i>	Układ faz odwróconych
<b>RPF</b>	<i>Relative Proportionality Factor</i>	Współczynnik odpowiedzi
<b>SFC</b>	<i>Superfluid Chromatography</i>	Chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym
<b>TLC</b>	<i>Thin Layer Chromatography</i>	Chromatografia cienkowarstwowa
<b>UV</b>	<i>Ultra Violet</i>	Ultrafiolet

## WSTĘP

Badania prowadzone w ciągu ostatniego ćwierćwiecza dostarczyły nowych danych na temat skuteczności diety bogatej w owoce i warzywa w zapobieganiu chorobom cywilizacyjnym takim jak miażdżyca i nowotwory. Na podstawie szeregu badań epidemiologicznych wykazano, że warzywa o największej sile działania przeciwrakotwórczego to rośliny należące do rodziny krzyżowych. Uzyskane wyniki przedstawiają ujemną zależność pomiędzy spożyciem warzyw krzyżowych a ryzykiem zachorowań na raka piersi, płuc, trzustki, pęcherza, prostaty, tarczycy, skóry, żołądka i okrężnicy (1, 2).

Choć do dnia dzisiejszego chemoprewencyjny mechanizm działania warzyw z rodziny krzyżowych nie jest do końca poznany, to jednak wyniki badań z udziałem zarówno zwierząt jak i ludzi dowodzi, że składniki w nich obecne aktywują enzymy I i II fazy odtruwania. Większość badaczy jest zgodna, że głównymi chemoprewencyjnymi składnikami warzyw krzyżowych są glukozynolany (GLS), należące do grupy wtórnych metabolitów roślin (3-6). Produkty rozpadu glukozynolanów charakteryzują się dwoma typami działania przeciwnowotworowego a mianowicie wpływają na:

- hamowanie aktywacji metabolicznej kancerogenów chemicznych poprzez inhibicję cytochromu P450;
- aktywację enzymów II fazy odtruwania, takie jak transferaza glutationowa i reduktaza chinonowa.

Niewątpliwie na chemoprewencyjny potencjał roślin krzyżowych wpływają również obecne w nich przeciwutleniacze tj. witaminy antyoksydacyjne czy też polifenole. Dostarczane w diecie wspomagają i wzmacniają naturalną obronę ustroju przed reaktywnymi formami tlenu (ROS). W przeciwieństwie do GLS, skład polifenoli w warzywach z grupy krzyżowych jest bardzo słabo poznany.

Identyfikacja związków biologicznie aktywnych ma fundamentalne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów chemoprewencji, a ponadto pozwala na prowadzenie skutecznej kontroli poziomu składnika aktywnego w produkcie rynkowym jakim jest warzywo (kontrola jakości) a szczególnie istotna staje się ona w przypadku opracowywania suplementów diety. Większość danych na temat rodzaju i poziomu występowania składników bioaktywnych dotyczy jedynie surowych roślin. W rzeczywistości jedynie niewielka część warzyw spożywana jest w postaci surowej, w większości przypadków wymagany jest jednak odpowiedni proces obróbki produktu przed spożyciem ze względu na:

- bezpieczeństwo;
- zachowanie jakości;
- powody ekonomiczne.

Ocena wpływu obróbki żywności stanowi kluczowy czynnik w ustaleniu warunków technologicznych umożliwiających zabezpieczenie bądź też ulepszenie oryginalnej aktywności i biodostępności składników, które w niej występują naturalnie. Zrozumienie w jaki sposób przetwarzanie żywności zmienia skład substancji bioaktywnych jest jednym z najważniejszych etapów prawidłowej interpretacji badań nad wpływem żywienia oraz nawyków żywieniowych na ludzkie zdrowie.

## I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

### 1. Klasyfikacja warzyw krzyżowych

Warzywa krzyżowe należą do botanicznej rodziny kapustnych (łac. *Brassicaceae*) w rzędzie kaparowców (łac. *Capparales*). Kapustne stanowią liczną rodzinę zawierającą około trzech tysięcy gatunków w obrębie 350 rodzajów. Rośliny te zostały określone mianem krzyżowych za względu na charakterystyczne ułożenie płatków kwiatów przedstawicieli tej rodziny. Warzywa te mogą być roślinami jednorocznymi, dwuletnimi lub wieloletnimi. Pomimo dużej różnorodności tylko przedstawiciele kilku rodzajów należą do roślin jadalnych. Najczęściej spożywane warzywa krzyżowe należą do rodzaju *Brassica*, wśród nich największą popularnością cieszy się kilka odmian gatunku *B. oleracea* tj. kapusta, kalafior, brokuły czy brukselka. Do innych jadalnych gatunków z rodzaju *Brassica* należą *B. rapa* oraz *B. napus*, których przedstawicielami są odpowiednio kapusta chińska oraz rzepak. Pozostałe warzywa krzyżowe stosowane w ludzkiej diecie tj. rzodkiewka czy rzeżucha są przedstawicielami innych rodzajów rodziny *Brassicaceae*. Listę głównych przedstawicieli warzyw krzyżowych wraz z ich botaniczną klasyfikacją zestawiono w tabeli 1.

**Tabela 1** Klasyfikacja warzyw należących do rodziny krzyżowych występujących w ludzkiej diecie.



Rodzina	Gatunek i odmiana	Nazwa zwyczajowa	Główne składniki bioaktywne	Wygląd
<i>Brassica</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Kalafior (ang. <i>Cauliflower</i> )	- sinigryna; - progoitryna; -glukobrasycyna; - glukonapina; - allylo izotiocyjanian; - indolo-3-karbinol.	
	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Biała kapusta (ang. <i>White cabbage</i> )	- glukobrasycyna; - sinigryna; - indolo-3-karbinol; - 3,3'-diindolometan; - askorbigen; - allylo izotiocyjanian; -fenyloetylo izotiocyjanian.	



Tabela 1 c.d.








Rodzina	Gatunek i odmiana	Nazwa zwyczajowa	Główne składniki bioaktywne	Zdjęcie
Brassica	<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	Brukselka (ang. <i>Brussels sprouts</i> )	- sinigryna; - glukoiberyna; - glukonapina; - glukorafanina; - progoitryna; - glukobrassycyna; - neoglukobrassycyna.	
	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongyloides</i>	Kalarepa (ang. <i>Kohlrabi</i> )	- sinigryna; - glukoiberyna; - glukonapina; - glukorafanina.	
	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Brokuły (ang. <i>Broccoli</i> )	- glukoiberyna; - glukorafanina; - glukobrassycyna; - neoglukobrassycyna; - sulforafan; - erucyna; - iberyna.	
	<i>B. oleracea</i> var. <i>rubra</i>	Czerwona kapusta (ang. <i>Red cabbage</i> )	- glukoiberyna; - sinigryna; - glukonapina; - 4hydroksyglukobrassycyna; - glukobrassycyna; - metoksyglukobrassycyna; - progoitryna.	
	<i>B. oleracea</i> var. <i>sabauda</i>	Kapusta włoska (ang. <i>Savoy cabbage</i> )	- sinigryna; - glukoiberyna; - glukobrassycyna; - metoksyglukobrassycyna.	
	<i>B. oleracea</i> var. <i>sabellica</i>	Jarmuż, kapusta bezgłowa (ang. <i>Curly kale</i> )	- sinigryna; - glukonapina; - glukobrassycyna.	
	<i>B. oleracea</i> var. <i>viridis</i>	Kapusta bezgłowa ozdobna (ang. <i>Kale</i> )	- glukoiberyna; - sinigryna; - glukonapina; - 4hydroksyglukobrassycyna; - glukobrassycyna.	

Tabela 1 c.d.








Rodzina	Gatunek i odmiana	Nazwa zwyczajowa	Główne składniki bioaktywne	Zdjęcie
Brassica	<i>B. rapa</i> var. <i>chinensis</i>	Kapusta chińska (ang. <i>Chinese cabbage, pak-choi</i> )	- sinigryna - glukoiberyna - glukonapina - neoglukobrassycyna	
	<i>B. rapa</i> var. <i>oleifera</i>	Rzepa olejna - rzepik (ang. <i>Turnip rape</i> )	- progoitryna; - napoleferina; - glukonapina; - glukobrassykonapina; - hydroksyglukobrassycyna.	
	<i>B. rapa</i> var. <i>pekinensis</i>	Kapusta pekińska ( <i>pe-tsai</i> )	- sinigryna; - glukoiberyna; - glukorafanina; - progoitryna; - glukobrassycyna.	
	<i>B. rapa</i> var. <i>rapa</i>	Rzepa jadalna (ang. <i>Turnip</i> )	- glukonapina; - glukorafanina; - progoitryna.	
	<i>B. rapa</i> var. <i>parachinensis</i>	Kapusta chińska ( <i>Choi sum</i> )	- sinigryna; - glukoiberyna; - glukonapina; - glukorafanina; - progoitryna; - neoglukobrassycyna.	
Brassica	<i>B. napus</i> var. <i>napobrassica</i>	Brukiew, karpień (ang. <i>Swede, rutabaga</i> )	- glukonapina - glukobrassykanapina - glukotrapeolina	
	<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i>	Rzepak (ang. <i>Rape, canola, colza</i> )	- glukonapina - glukobrassykonapina - glukotrapeolina; - napoleferina.	

Tabela 1 c.d.








Rodzina	Gatunek i odmiana	Nazwa zwyczajowa	Główne składniki bioaktywne	Zdjęcie
Brassica	<i>B. juncea</i>	Gorzycza sarepska (ang. <i>Indian mustard</i> , <i>brown mustard</i> )	- glukonapina; - glukobrassykonapina.	
	<i>B. juncea</i> var. <i>rugosa</i>	Kapusta chińska ( <i>Kai choi</i> )	- glukobrassycyna; - sinigryna.	
	<i>B. nigra</i>	Gorzycza czarna (ang. <i>Black mustard</i> )	- sinigryna	
<i>Raphanus</i>	<i>R. sativus</i>	Rzodkiew zwyczajna (ang. <i>Radish</i> )	- glukorafazatyna; - glukorafenina.	
<i>Armoracia</i>	<i>A. rusticana</i>	Chrzan (ang. <i>Horseradish</i> )	- glukorafazatyna; - glukorafenina; - sinigryna.	
<i>Nasturtium</i>	<i>N. officinalis</i>	Rukiew wodna (ang. <i>Water cress</i> )	- sinigryna - benzyloizotiocyjanian; - fenyloetyloizotiocyjanian.	
<i>Lepidium</i>	<i>L. sativus</i>	Pieprzyca siewna, rzeżucha ogrodowa (ang. <i>Cress</i> )	- sinigryna; - glukorafazatyna; - glukorafenina.	

Tabela 1 c.d.

Rodzina	Gatunek i odmiana	Nazwa zwyczajowa	Główne składniki bioaktywne	Zdjęcie
<i>Wasabia</i>	<i>W. japonica</i>	Wasabi	- sinigryna; - allyloizotiocyjanian; - fenyloetyloizotiocyjanian.	
<i>Beta</i>	<i>B. vulgaris flavescens</i>	Boćwina (ang. <i>Swiss chard</i> )	-glukorafanina; - betalainy.	

## 2. Spożycie warzyw krzyżowych na świecie

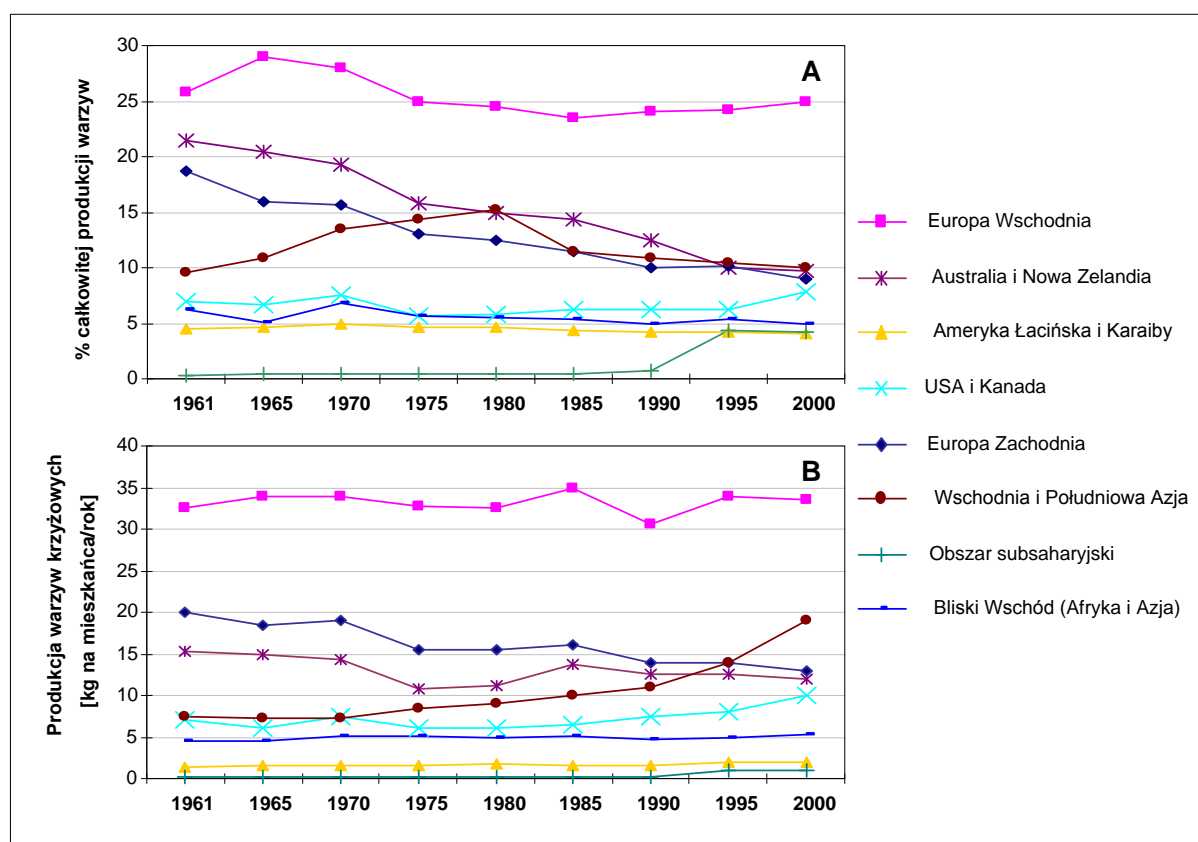
Najwyższe spożycie warzyw krzyżowych odnotowuje się wśród dorosłych mieszkańców Chin, i wynosił ono ponad 100 g na dzień (7). Inne populacje ludności azjatyckiej charakteryzowały się również względnie wysoką konsumpcją warzyw krzyżowych mieszczącą się w granicach 40 - 80 g dziennie (8-11). Na terenie Północnej Ameryki odnotowano średnie spożycie warzyw krzyżowych wynoszące 25 - 30 g na dzień (12, 13). Spożycie warzyw z rodziny *Brassicaceae* (w przeliczeniu na osobę) na terenie Europy charakteryzuje się dużą rozrzutem i tak np. w niektórych krajach środkowej i północnej Europy spożycia sięga ponad 30 g na dzień, natomiast w kilku krajach południowoeuropejskich wynosiło mniej niż 15 g na dzień (8, 14). Te znaczne rozbieżności wynikają głównie z różnic w konsumpcji wszystkich warzyw ogółem, która wzrasta w kierunku od południowego do północnego obszaru Europy. Względnie niskim spożyciem warzyw krzyżowych, wynoszącym mniej niż 15 g na dzień, charakteryzuje się obszar subsaharyjski i niektóre kraje południowej Ameryki (15). Spożycie mniejsze niż 20 g dziennie odnotowano również w Indiach (16). W tabeli 2 przedstawiono dane liczbowe odnośnie wartości spożycia warzyw krzyżowych oraz ich procentowy udział w konsumpcji warzyw ogółem w różnych rejonach geograficznych świata.

**Tabela 2** Informacje na temat spożycia warzyw krzyżowych (na osobę) oraz ich procentowy udział w konsumpcji warzyw ogółem w różnych rejonach geograficznych świata.

	Kraj	Warzywa	Spożycie [g/dzień]	% konsumpcji warzyw ogółem	Literatura
Azja	Japonia	Brokuły, kapusta, rzodkiewka, rzepa	83,5	21,2	(8)
	Kuwejt	Brokuły, brukselka, kapusta, kalafior	59,8	-	(9)
	Singapur	Chińska kapusta, rzeżucha, kapusta pekińska, brokuły, kalafior	42,7	-	(10)
	Chiny	Kapusta chińska, kapusta, kalafior	102,1	24,3	(7)
	Indie	Krzyżowe - nieokreślone	46,3	-	(16)
	Tajlandia	Krzyżowe - nieokreślone			(11)
Ameryka Północna	Kalifornia Pd.	Brokuły, brukselka, kapusta, jarmuż, kalafior, gorczyca, boćwina	40	11,7	(17)
	Los Angeles	Brokuły, kapusta, brukselka, kalarepa, jarmuż, gorczyca, rzepa	29,7	-	(18)
	Seattle	Brokuły, kapusta, kiszona kapusta, brukselka, kalafior	20,5	9,6	(19)
	Boston	Brokuły, kapusta, kiszona kapusta, kalafior, brukselka, jarmuż, gorczyca, boćwina	32	14,3	(20)
	USA	Brokuły, kalafior, jarmuż, brukselka	16	5,6	(21)
	Kanada i USA	Brokuły, brukselka, <i>kai-choi</i> , kapusta, <i>pak-choi</i> , czerwona kapusta, rzepa, rzeżucha, <i>won-bok</i>	29	15,4	(22)
	USA	Brokuły, brukselka, kalafior, kapusta, rzepa, brukiew	30,8	-	(23)
	Minnesota USA	Krzyżowe - nieokreślone	26,4	8,9	(24)
	Texas USA	Brokuły, kalafior, brukselka, kapusta, kiszona, kapusta, <i>kai-choi</i> , rzepa, jarmuż	29,1	-	(25)
	USA	Krzyżowe - nieokreślone	23,6	8,9	(26)
	Hawaje USA	Brokuły, kapusta, chińska kapusta, kalafior, brukselka, rzepa, boćwina, <i>kai-choi</i> , brukiew	33,2	14,8	(8)
	Iowa USA	Kapusta, kalafior, brokuły	27,5	12,1	(27)
	Ameryka Południowa	Argentyna	Brokuły	2,43	-
	Chile	Kapusta, kalafior, brokuły, brukselka	12,7	5,8	(13)
Australia	Australia	Brokuły, kalafior, kapusta, brukselka	49,6	13,1	(28)
Europa	Szwecja	Kapusta, brokuły, brukselka, kalafior	11,5	14,7	(8)
	Norwegia	Kapusta, brokuły, brukselka, kalafior	17,2	23,1	(8)
	Włochy	Krzyżowe - nieokreślone	11,5	6,9	(8)
	Szwajcaria	Krzyżowe - nieokreślone	11,5	6,7	(8)
	Grecja	Brokuły, kalafior	5,7	7,8	(8)
	Szwecja	Kapusta, chińska kapusta, brokuły, kalafior	28,5	-	(14)
	Finlandia	Brokuły, kalafior, kapusta, brukselka, brukiew	9,7	9,8	(29)
	Holandia	Brukselka, jarmuż, kalafior	32,2	17	(30)
Afryka Południowa	Afryka Południowa	Krzyżowe - nieokreślone	15	16,5	(15)



Ogólnie rzecz biorąc, można stwierdzić, że średnia ilość spożywanych warzyw krzyżowych stanowi około 10 - 15% wszystkich konsumowanych warzyw. W roku 2000 produkcja warzyw krzyżowych stanowiła odpowiednio 25% produkcji wszystkich warzyw na terenie wschodniej Europy, 10% na terenie Australii, wschodniej i południowo wschodniej Azji oraz zachodniej Europy. Produkcję warzyw krzyżowych mniejszą niż 10 % ogółu odnotowano w pozostałych krajach. Pomiędzy rokiem 1962 a 2002 odnotowano spadek w produkcji warzyw krzyżowych na terenie Australii, Nowej Zelandii oraz zachodniej Europy (Rys. 1).



**Rys. 1** Produkcja warzyw krzyżowych w wybranych rejonach świata: (a) udział w produkcji wszystkich warzyw [%]; (b) roczna produkcja w przeliczeniu na mieszkańca [kg].

Źródło FAOSTAT (2000);

Europa Wschodnia: Albania, Bośnia i Hercegowina, Bułgaria, Chorwacja, Czechy, Węgry, Macedonia, Polska, Rumunia, Serbia Czarnogóra, Słowacja, Jugosławia.

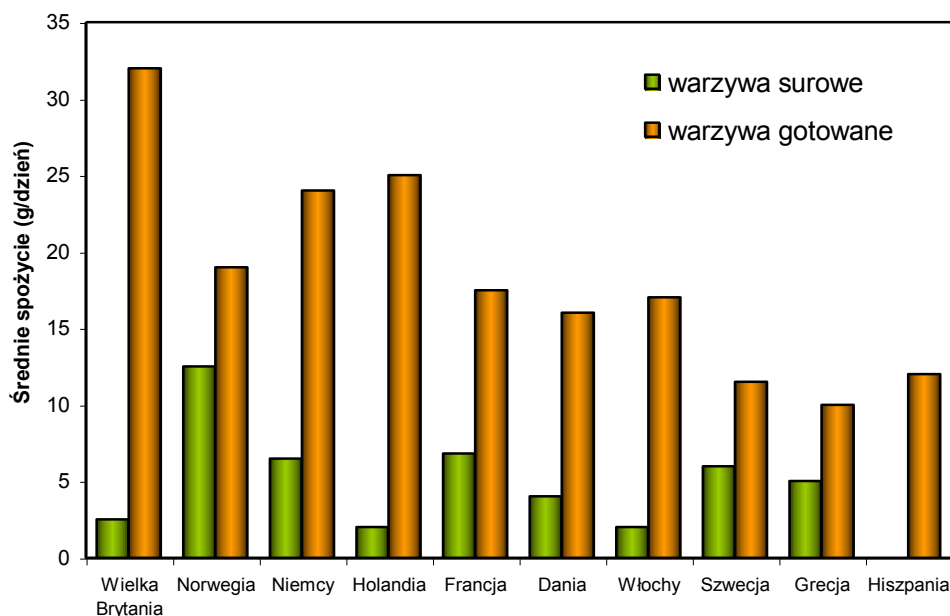
Europa Zachodnia: Austria, Belgia, Dania, Finlandia, Francja, Niemcy, Grecja, Islandia, Irlandia, Włochy, Luksemburg, Malta, Holandia, Norwegia, Portugalia, Hiszpania, Szwecja, Szwajcaria, Wielka Brytania.

Bliki Wschód: Algieria, Afganistan, Azerbejdżan, Bahrajn, Cypr, Egipt, Gruzja, Palestyna, Iran, Irak, Izrael, Jordan, Kuwejt, Libia, Liban, Maroko, Oman, Katar, Arabia Saudyjska, Syria, Tunezja, Turcja, Zjednoczone Emiraty Arabskie.

Obszar subsaharyjski: kraje afrykańskie leżące na południe od Sahary z wyjątkiem Południowej Afryki, Zachodniej Sahary i Sudanu.

Wschodnia i Południowa Azja: Brunei Darussalam, Kambodża, Chiny, Korea, Indonezja, Japonia, Malezja, Mongolia, Myanmar, Filipiny, Singapur, Tajlandia, Timor Wschodni, Wietnam.

Według badań przeprowadzonych na terenie dziesięciu państw europejskich około 80% warzyw krzyżowych poddawane jest obróbce termicznej przed spożyciem (Rys. 2). Spożycie warzyw w postaci surowej sięga zaledwie 30-40% ogólnej ilości konsumowanych warzyw krzyżowych na terenie Grecji, Norwegii i Szwecji oraz stanowi mniej niż 10% całości warzyw w pozostałych objętych badaniami państwach.



**Rys. 2** Poziom spożycia surowych i poddanych obróbce termicznej warzyw krzyżowych na terenie 10 krajów europejskich.

### 3. Związki bioaktywne występujące w warzywach krzyżowych

#### 3.1 Glukozynolany, izotiocyjaniany, indole

Glikozydy siarkowe (GLS) zostały zidentyfikowane jako charakterystyczna grupa związków dla roślin należących do rzędu Kaparowców, tym samym także dla największej z tego rzędu rodziny - Kapustnych. Izotiocyjaniany (ITC) i związki indolowe pochodzące z roślin krzyżowych, pomimo że pod względem struktury wydają się być niezależne, powstają wspólnie z glukozynolanów.

Cząsteczka glukozynolanu (GLS) zawiera jednostkę cukrową oraz łańcuch aglikonowy pochodzący od jednego lub kilku aminokwasów. Izotiocyjaniany (ITC) formowane są podczas degradacji GLS posiadających w swej cząsteczce zarówno alifatyczne jak i aromatyczne fragmenty pochodzące odpowiednio z metioniny oraz fenyloalaniny. Związki indolowe powstają natomiast w trakcie rozpadu GLS posiadających indolową część

pochodzącą od tryptofanu. Informacje o poziomach stężeń oraz formach występowania GLS w najczęściej spożywanych warzywach krzyżowych zestawiono w tabeli 3.

**Tabela 3** Poziomy stężeń i formy występowania związków z grupy GLS w najczęściej spożywanych warzywach krzyżowych.

Warzywa krzyżowe	Część glukozynalowa	Zawartość ( $\mu\text{mol}/100 \text{ g } \acute{\text{s.m}}$ )
Brokuły ( <i>B. Oleracea</i> var. <i>italica</i> )	3-Metylosulfinylopropyl	0-330
	4-Metylosulfinylobutyl	29-190
	Indolo-3-metyl	42-100
	1-Metoksyindolo-3-metyl	2-18
Brukselka ( <i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> )	2-Propenyl	4-390
	3-Metylosulfinylopropyl	0-150
	3-Butenyl	0-220
	4-Metylosulfinylobutyl	0-23
	2-Hydroksy-3-butenyl	1-300
	Indolo-3-metyl	45-470
	1-Metoksyindolo-3-metyl	2-34
Kalańior ( <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> )	2-Propenyl	1-160
	3-Metylosulfinylopropyl	0-330
	4-Metylosulfinylobutyl	2-190
	Indolo-3-metyl	14-160
Kapusta ( <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> )	1-Metoksyindolo-3-metyl	1-32
	2-Propenyl	4-160
	3-Metylosulfinylopropyl	5-280
Jarmuż ( <i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> )	Indolylometyl	9-200
	2-Propenyl	62-200
	3-Metylosulfinylopropyl	0-50
	3-Butenyl	6-38
	2-Hydroksy-3-butenyl	17-130
Rzepak ( <i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> )	Indolo-3-metyl	67-160
	3-Butenyl	38-290
	4-Pentenyl	20-150

Związki z grupy ITC są odpowiedzialne za charakterystyczny ostry oraz cierpki smak i zapach warzyw krzyżowych. Indolowe produkty rozpadu GLS nie wpływają natomiast na cechy organoleptyczne tych warzyw. Wiele biologicznych i fizykochemicznych właściwości ITC (np. lotność, niepolarność) determinowanych jest przez chemiczną strukturę łańcucha izotiocyanianowego. Bioaktywność tych składników w organizmie człowieka zależy od chemicznej struktury oraz stężenia izotiocyanianów.

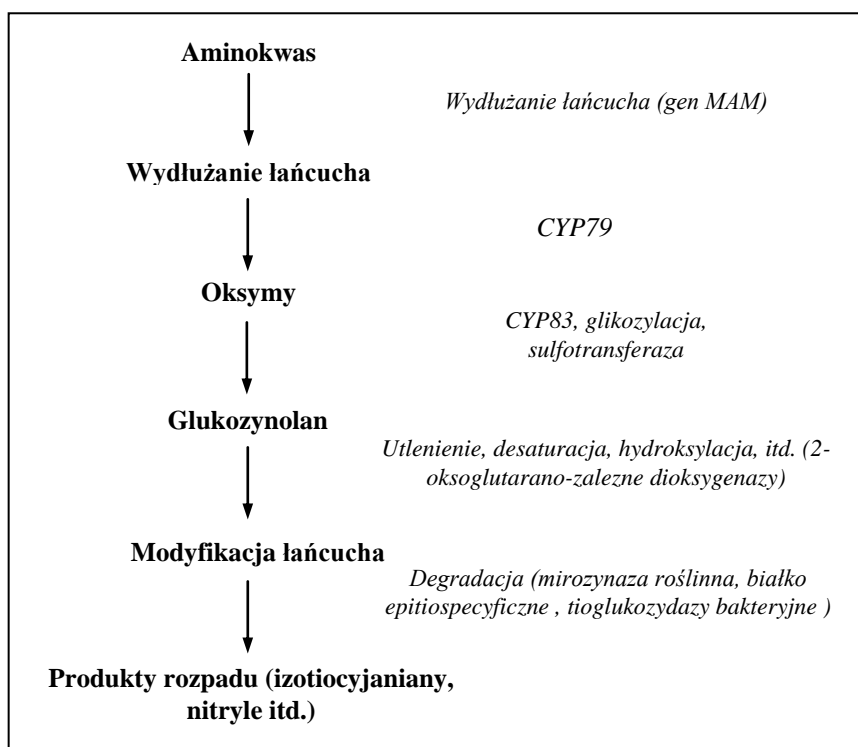


### 3.1.1 Biosynteza związków z grupy GLS

W grupie znanych GLS można zidentyfikować ponad 115 różnych struktur chemicznych powstających z jednego do ośmiu aminokwasów (alanina, walina, leucyna, izoleucyna, fenyloalanina, metionina, tyrozyna i tryptofan). Hydroliza większości związków z grupy GLS prowadzi do powstania alifatycznych i aromatycznych izotiocyjanianów, wyjątek stanowią glukozynolany powstające z przemian tryptofanu dające początek związkom indolowym. Biosyntezę glukozynolanów, zarówno prekursorów związków z grupy ITC, jak i pochodnych indolowych można podzielić na cztery etapy (Rys. 3):

- wydłużanie łańcucha aminokwasów,
- biosynteza rdzenia glukozynolanów,
- modyfikacja łańcucha,
- powstawanie izotiocyjanianów i indoli.

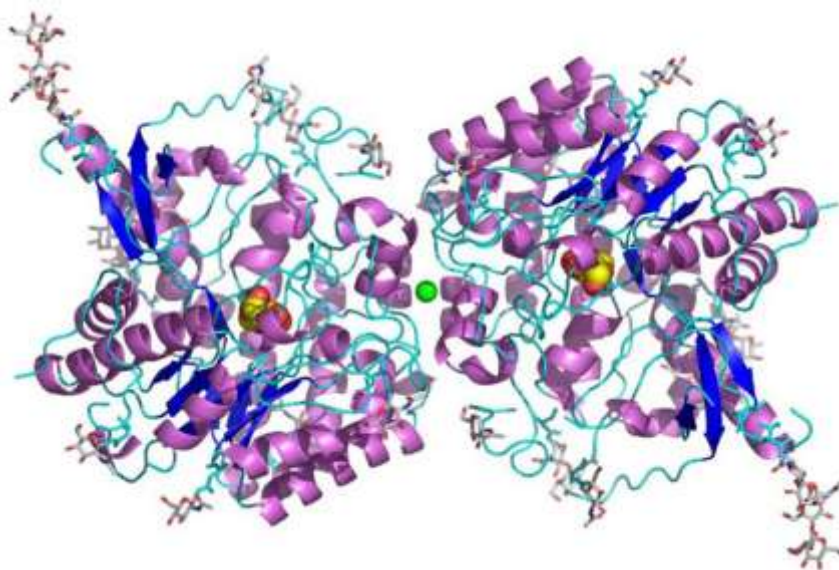
Struktura cząsteczek związków z grupy GLS w każdym z genotypów roślin podlega swoistej kontroli genetycznej, natomiast poziom występowania tych związków uzależniony jest od czynników środowiskowych oddziałujących na dany genotyp (31, 32).



**Rys. 3** Schemat procesu biosyntezy glukozynolanów.

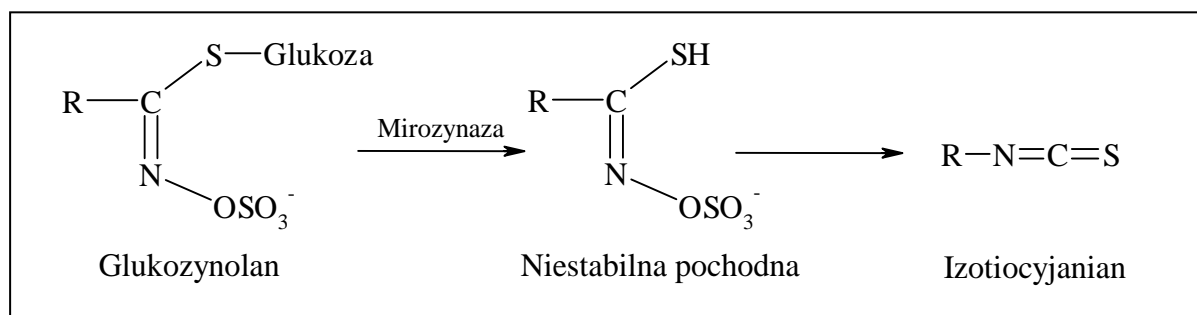
### 3.1.2 Hydroliza glukozynolanów - powstawanie izotiocyjanianów

Proces degradacji glukozynolanów zachodzący w tkankach roślin spowodowany jest głównie działaniem tioglukozydazy czyli tzw. mirozynyzy (Rys. 4). W roślinach zawierających związki z grupy GLS zidentyfikowano wiele rodzajów izoenzymów mirozynyzy. Aktywność tioglukozydazy zaobserwowano również w organizmach niektórych owadów, grzybów oraz bakterii. W roślinach ekspresja tych izoenzymów zależy zarówno od gatunku rośliny jak i od konkretnej części danego okazu (33).



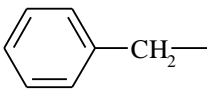
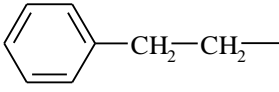
**Rys. 4** Ogólny obraz struktury mirozynyzy przedstawiający dimer zespolony za pomocą atomu cynku (zielony), fluoroglukozy (żółty) oraz cukrów (pałeczki) (34).

W wyniku uszkodzenia tkanki roślinnej, endogenna roślinna mirozynaza zostaje uwolniona ze ścianek komórkowych i powoduje rozerwanie wiązania tioglukozowego, dając początek niestabilnej formie tiohydroksylo-O-sulfonianu (Rys. 5)



**Rys. 5** Schemat powstawania izotiocyjanianu podczas procesu hydrolizy glukozynolanu.

Powstały aglikon może podlegać samorzutnym przemianom (najczęściej Lossena), prowadzącym w kilku etapach do powstawania izotiocyjanianów. Jeżeli cząsteczka glukozynolanu posiada w swej strukturze wiązanie podwójne, wówczas w obecności epitospecyficznych białek, powstające ITC mogą ulegać przemianie w epitionitryle.

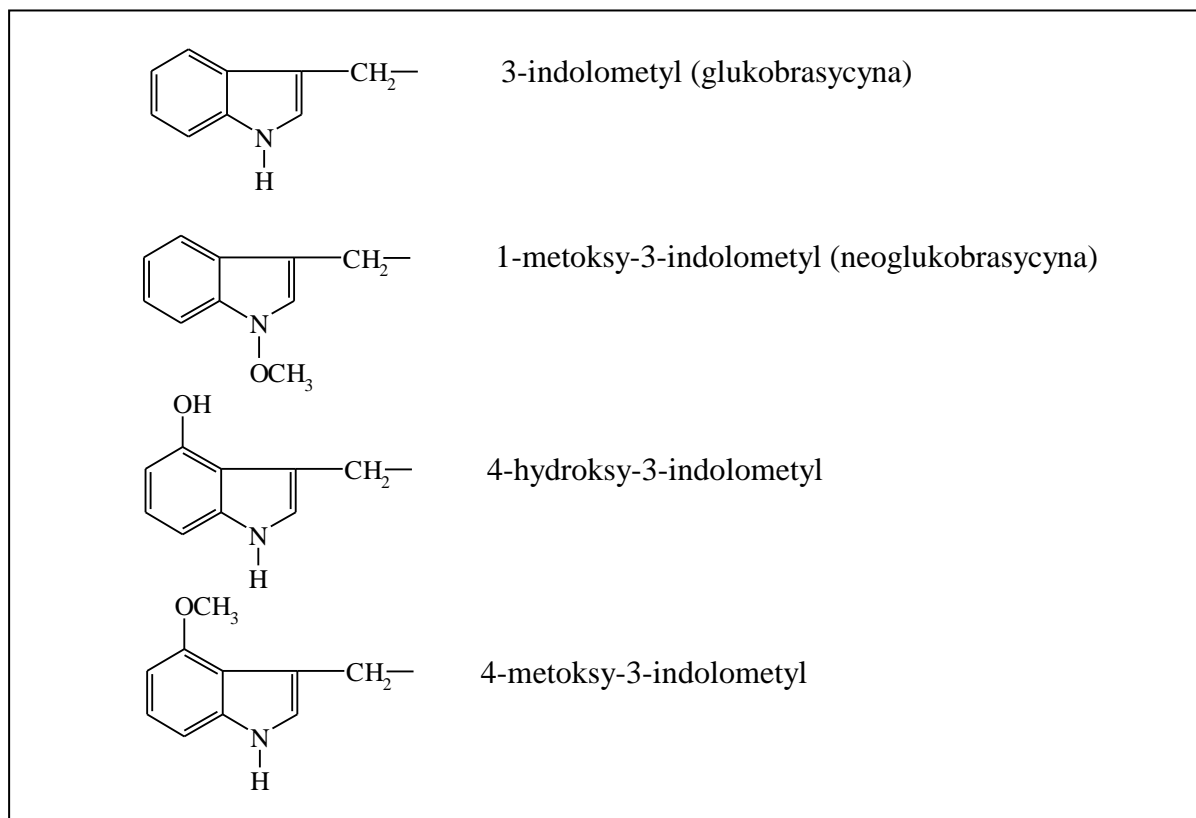
<b>R-N=C=S</b>	
<b>R-</b>	<b>Nazwa chemiczna: warzywo</b>
$\text{CH}_3\text{---S---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}$	3-metylotiopropyl: kapusta
$\text{CH}_3\text{---S---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}$	4-metylotiobutyl: rukola
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{---S---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---} \\    \\ \text{O} \end{array}$	3-metylosulfinylopropyl (iberyna): brokuły, brukselka, kapusta
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{---S---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---} \\    \\ \text{O} \end{array}$	4-metylosulfinylobutyl (sulforafan): brokuły
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{---S---[CH}_2\text{]}_6\text{---} \\    \\ \text{O} \end{array}$	6-metylosulfinyloheksyl: wasabi
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{---S---[CH}_2\text{]}_7\text{---} \\    \\ \text{O} \end{array}$	7-metylosulfinyloheptyl: rukiew wodna
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{---S---[CH}_2\text{]}_8\text{---} \\    \\ \text{O} \end{array}$	8-metylosulfinylooctyl: rukiew wodna
$\text{CH}_2\text{=CH---CH}_2\text{---}$	2-allil: gorczyca, kapusta, brukselka
$\text{CH}_2\text{=CH---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}$	3-butenyl: brukselka, kapusta chińska, pak-choi, rzepa
$\text{CH}_2\text{=CH---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}$	4-pentenyl: kapusta chińska, pak-choi
$\text{SH---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}$	4-merkaptanobutyl: rukola
	benzyl: rzeżucha
	2-fenyletyl: rukiew wodna, rzodkiewka, rzepa

**Rys. 6** Wzory izotiocyjanianów najczęściej występujących w warzywach krzyżowych.

Epitiospecyficzne białko zostało po raz pierwszy opisane w latach siedemdziesiątych (35), a wyizolowane około 30 lat później z rzepaku (36, 37). Białko to nie ma zdolności do oddziaływania na związki z grupy GLS, reaguje ono jedynie z niestabilną formą tiohydroksylo-O-sulfonianu powstałego na skutek działania mirozyny. Jeżeli w strukturze GLS brak jest wiązań podwójnych, wówczas po utracie siarki mogą powstawać nityle. Nielicznie GLS posiadają zdolność tworzenia tiocyjanianów, jednak mechanizm tych przemian nie jest do końca poznany. Struktury chemiczne izotiocyjanianów najczęściej występujących w warzywach krzyżowych przedstawiono na rysunku 6.

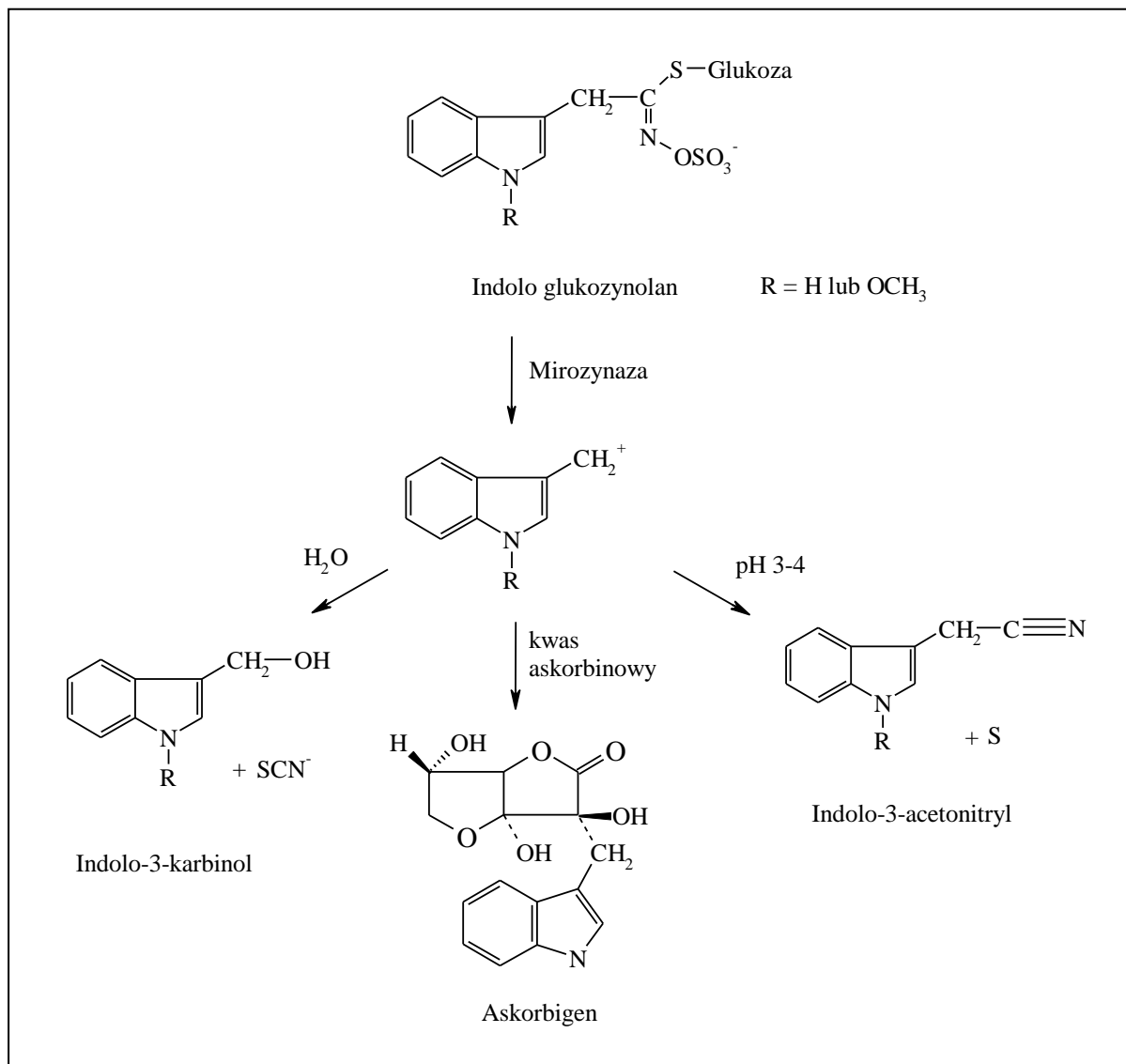
### 3.1.3 Hydroliza glukozynolanów - powstawanie indoli

Powstawanie indoli z indolowych GLS zostało szczegółowo opisane przez duńskich naukowców (38). Mirozyna uwolniona z komórek na skutek uszkodzenia tkanki roślinnej powoduje rozerwanie wiązania tioglukozowego w strukturze indolowych glukozynolanów (tak jak i w pozostałych związkach z grupy GLS). Powstałe izotiocyjaniany ze względu na swój nietrwały charakter ulegają rozpadowi tworząc odpowiadające im alkohole (Rys. 7, 8).



**Rys. 7** Wzory chemiczne indolowych produktów rozpadu glukozynolanów najczęściej występujących w warzywach krzyżowych.

Powstałe alkohole mogą następnie ulegać kondensacji tworząc 3,3'-diindolometany (DIM). Ponadto kwaśne środowisko żołądka może sprzyjać reakcjom kondensacji indolo-3-karbinolu (I3C) oraz innych indolowych pochodnych, dając w rezultacie co najmniej 15 różnych oligomerów (39). Indolo-3-karbinol może również reagować z kwasem askorbinowym tworząc askorbigen (40, 41).



**Rys. 8** Schemat przemian indolowych glukozynolanów występujących w warzywach krzyżowych.

### 3.1.4 Czynniki wpływające na stężenie związków z grupy GLS w warzywach krzyżowych

Rodzaj wtórnych metabolitów jest z reguły charakterystyczny i jednaki w obrębie danego gatunku roślin. Wynika to głównie z uwarunkowań genetycznych rośliny. Poziomy stężen czy też proporcje występowania poszczególnych związków mogą jednak znacznie się

różnić wśród przedstawicieli tego samego gatunku. Przyczyną tych różnic są głównie warunki uprawy, środowisko bytowania rośliny oraz rodzaj ich przechowywania i obróbki kulinarnej.

#### 3.1.4.1 Abiotyczne i biotyczne czynniki środowiskowe

Proporcje występowania poszczególnych GLS w obrębie konkretnej klasy (np. wywodzących się z metioniny) uważa się za relatywnie stałe i niezależne od wpływu środowiska. Jednak całkowita zawartość tych związków w roślinach uzależniona jest od wpływu kilku czynników środowiskowych:

- żyzności gleby;
- poziomu nawodnienia;
- temperatury;
- obecności owadów i patogenów.

Jakość gleby jest najprawdopodobniej najważniejszym czynnikiem wpływającym na poziom zawartości glukozynolanów w roślinach. Zasilanie gleby siarką i azotem może wpływać znacząco na stężenie tych związków np. w nasionach rzepaku (42). Uważa się, że wpływ siarki na poziom związków z grupy GLS w roślinach jest silnie zależny od zawartości azotu w glebie. Na przykład, użyźnianie gleby samą siarką wcale albo w bardzo małym stopniu wpływa na zawartość glukozynolanów w brokułach (43, 44). Natomiast zastosowanie kombinacji siarki i azotu w przypadku tego warzywa w dużym stopniu wpływa na ogólne stężenie tych związków (45). W przypadku kapusty *pak-choi* już zasilanie gleby samym azotem powodowało znaczny wzrost poziomu GLS (46). Zaobserwowano również, że stres wodny indukuje powstawanie glukozynolanów w rzepaku (47, 48). Zjawisko to najprawdopodobniej jest charakterystyczne dla wszystkich warzyw z rodziny krzyżowych.

Wpływ temperatury na ogólną zawartość związków z grupy GLS w roślinach nie był dotychczas szczegółowo badany. Temperatura, jednak tak jak i inne czynniki środowiskowe, wpływa na ogólne parametry wzrostu rośliny. W przypadku brokułów obserwowano większe stężenie glukozynolanów dla kiełków rosnących w wyższej temperaturze niż dla tych rosnących w niższej (49).

Nie tylko abiotyczne czynniki środowiska wpływają na zawartość glukozynolanów w roślinach, również obecność owadów oraz patogenów indukuje akumulację tych związków (głównie indolowych) w tkankach roślin krzyżowych (46, 50).

### 3.1.4.2 Przechowywanie, obróbka kulinarna

Warunki transportu, przechowywania oraz obróbki kulinarnej mają ogromny wpływ na poziom zawartości glukozynolanów w warzywach krzyżowych. Odnotowano około 70-80% utratę tych związków w warzywach podczas przechowywania i transportu (43). Przechowywanie poszatkowanej kapusty powoduje obniżenie stężenia wywodzących się z metioniny glukozynolanów oraz wzrost zawartości indolowych pochodnych tych związków (51). Przechowywanie brokułów również powoduje wzrost indolowych związków z grupy GLS (52).

Podczas obróbki kulinarnej, w trakcie rozdrabniania surowych warzyw znaczna część (około 80%) glukozynolanów wywodzących się z metioniny może ulec przemianie w nitryle oraz równolegle w izotiocyaniany. Proporcje między powstającymi nitrylami i związkami z grupy ITC zależą od genotypu roślin (45). Podczas gotowania zarówno mirozynaza jak i epitiospecyficzne białka ulegają degradacji. Łagodne warunki gotowania np. brokułów na parze przez mniej niż 3 minuty powoduje denaturację epitiospecyficznych białek. W tych warunkach pozostają jednak w nienaruszonej formie niewielkie ilości endogennej mirozynazy przyczyniającej się do proporcjonalnego zwiększenia ilości izotiocyanianów. Dalsze gotowanie bądź ogrzewanie brokułów przez kolejne 10 lub 20 minut powoduje stopniową denaturację pozostałej mirozynazy, zapobiegając tym samym degradacji glukozynolanów i powstawaniu izotiocyanianów. Podsumowując, warunki termicznej obróbki warzyw mogą znacząco wpływać na ilość związków z grupy ITC dostarczanych do przewodu pokarmowego wraz z porcją pożywienia. Można przy tym przedstawić następujące wnioski:

- konsumpcja surowych warzyw może skutkować wystawieniem organizmu na działanie wysokiego stężenia nitryli;
- łagodne gotowanie warzyw przed spożyciem powoduje zwiększenie ilości izotiocyanianów działających na górne odcinki przewodu pokarmowego na wysokim, pod względem biologicznym, poziomie stężeń;
- bardziej intensywne gotowanie warzyw zapobiega tworzeniu się izotiocyanianów i umożliwia konsumpcję glukozynolanów w nienaruszonej formie, które mogą podlegać wskutek działania flory bakteryjnej w jelicie grubym degradacji do związków z grupy ITC lub innych produktów.

Glukobrasycyna (GBS) jako prekursor indolowych pochodnych jest chemicznie i termicznie stabilna. Nie zaobserwowano rozpadu tego związku nawet po 2 godzinach inkubacji w wodnych roztworach charakteryzujących się pH w zakresie od 2 do 11. Natomiast GBS ulega

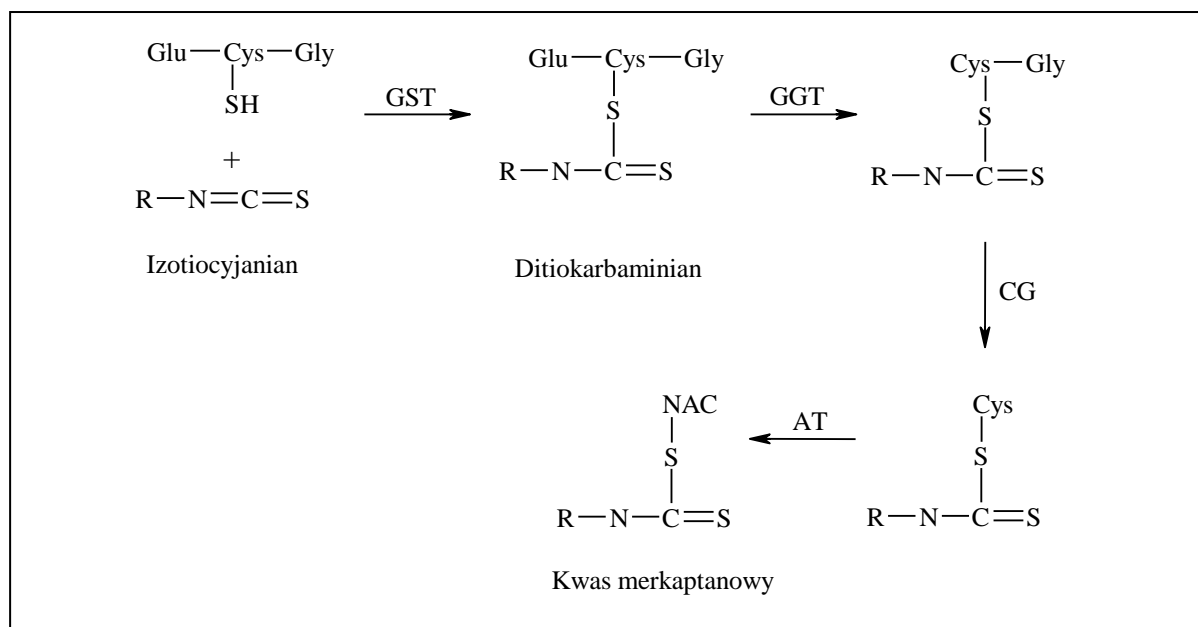
częściowej degradacji pod wpływem wysokiej temperatury; obserwowano - około 10 % ubytek tego związku w trakcie 1 godz. ogrzewania.

### 3.1.5 Metabolizm produktów rozpadu glukozynolanów

Poznanie szlaków przemian produktów rozpadu glukozynolanów w organizmie człowieka niewątpliwie jest jednym z głównych założeń badań epidemiologicznych prowadzących do poznania zależności między spożyciem warzyw krzyżowych a chemoprewencją.

#### 3.1.5.1 Metabolizm izotiocyjanianów

Grupa  $-N=C=S$  większości izotiocyjanianów charakteryzuje się właściwościami elektrofilowymi i może reagować z wieloma cząsteczkami nukleofilowymi, np. z tiolami. Badania przeprowadzone zarówno u ludzi jak i na zwierzętach wykazały, że izotiocyjaniany podczas procesów metabolicznych ulegają przemianie głównie w szlaku merkaptylowym w różnego rodzaju ditiokarbaminiany. Wstępne sprzężenie związków z grupy ITC z glutationem (GSH), zachodzące przy udziale S-transferazy glutationowej (GST), prowadzi do powstawania koniugatów cysteinoglicyny, cysteiny oraz N-acetylocysteiny wydalanych z moczem (53) (Rys. 9).

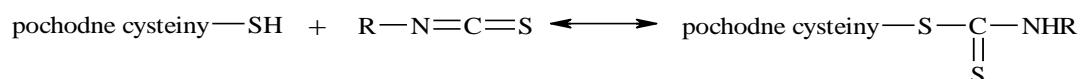


**Rys. 9** Schemat przemian koniugatów izotiocyjanianów z glutationem.

(GST- S-transferaza glutationowa; GGT- transpeptydaza  $\gamma$ -glutamylowa; CG – cysteinoglicinaza; AT- N-acetylotransferaza)



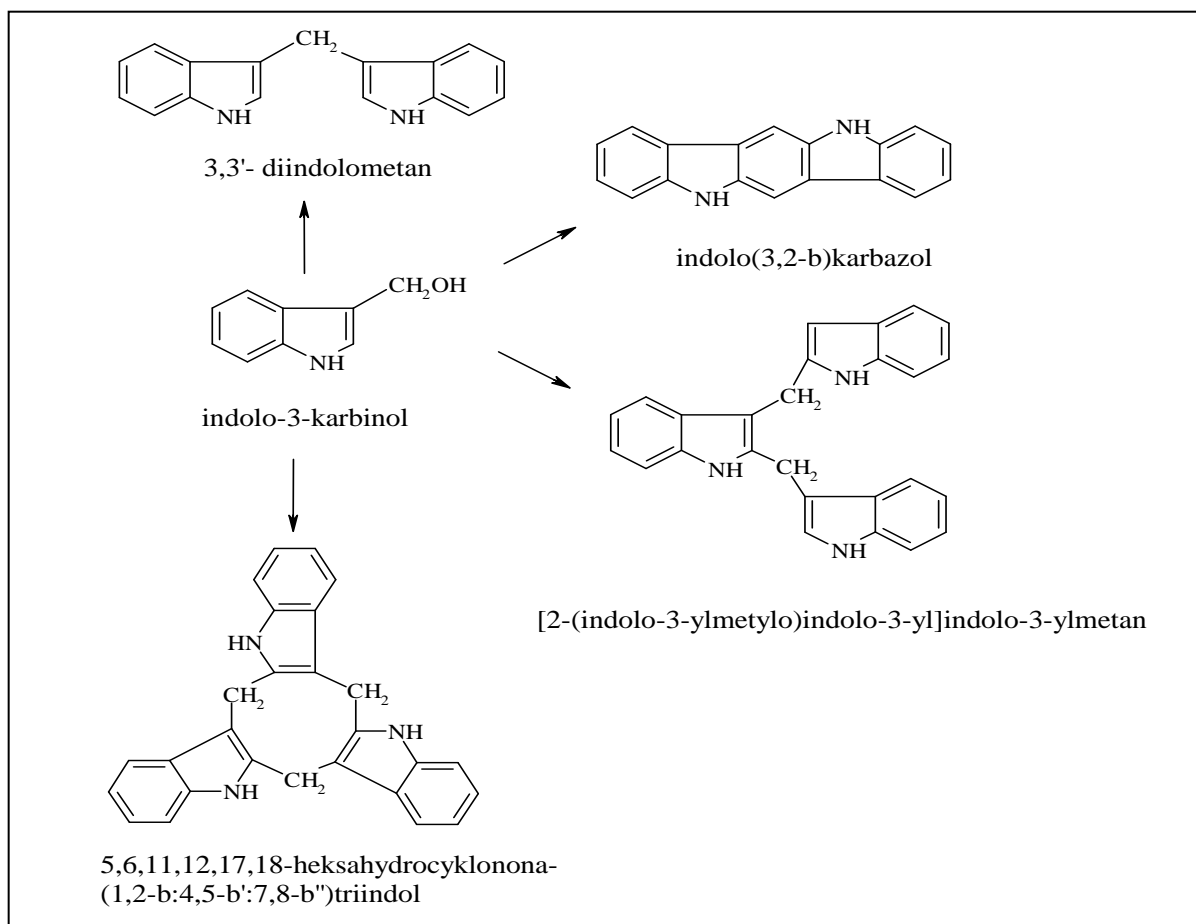
Izotiocyjaniany mogą również samorzutnie reagować odwracalnie z pochodnymi cysteiny tworząc ditiokarbaminiany (54) (Rys. 10). Grupy –SH występują w białkach, a zatem izotiocyjaniany mogą również wchodzić z nimi w reakcję.



**Rys. 10** Schemat reakcji izotiocyjanianów z pochodnymi cysteiny zachodzącej podczas procesów metabolicznych.

### 3.1.5.2 Metabolizm pochodnych indolowych

Kwaśne środowisko żołądka człowieka indukuje przemiany chemiczne indolo-3-karbinolu powodując jego dehydratację i przekształcanie w aktywne pochodne (55). Głównymi produktami tych reakcji chemicznych są: 3,3'-diindolometan, triindolometan oraz indolo[3,2-b]karbazol (Rys. 11).



**Rys. 11** Schemat reakcji przemian indolo-3-karbinolu zachodzących w kwaśnym środowisku.

Podczas badań procesu metabolizmu związków indolowych stwierdzono obecność wielu innych pochodnych I3C w organizmach zwierząt eksperymentalnych (39, 56). Najwięcej informacji na temat kondensacji związków indolowych w przewodzie pokarmowym pochodzi z badań *in vitro* nie uwzględniających obecności kwasu askorbinowego. Tymczasem podczas degradacji glukobrasycyny oraz neoglukobrasycyny w obecności kwasu askorbinowego powstaje kilka form askorbigeny (Rys. 8). Oszacowano, że w zależności od pH środowiska znaczna część (20 - 60%) indolowych GLS ulega konwersji do askorbigeny (41, 57). Askorbigen jest niestabilny w środowisku kwaśnym (takim jak w żołądku) i ulega przemianie w indolo[3,2-b]karbazol. Stwierdzono, że około 20 razy częściej indolo[3,2-b]karbazol powstawał podczas inkubacji indolo-3-karbinolu z askorbigenem niż podczas inkubacji w identycznych warunkach samego I3C. Głównym produktem kondensacji indolo-3-karbinolu zidentyfikowanym w plazmie i moczu ochotników był 3,3'-diindolo-metan (58).

### 3.1.6 Metodyki oznaczania glukozynolanów i produktów ich rozpadu

W ostatnim dziesięcioleciu oznaczanie zawartości glukozynolanów oraz ich produktów rozpadu w szczególności izotiocyjanianów i indoli stały się przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków badawczych nie tylko ze względu na ich właściwości chemoprewencyjne ale też ze względu na ich aktywność biopestycydów. Z tych powodów identyfikacja oraz ilościowe oznaczenie zawartości tych związków w tkankach roślin nabrały szczególnego znaczenia.

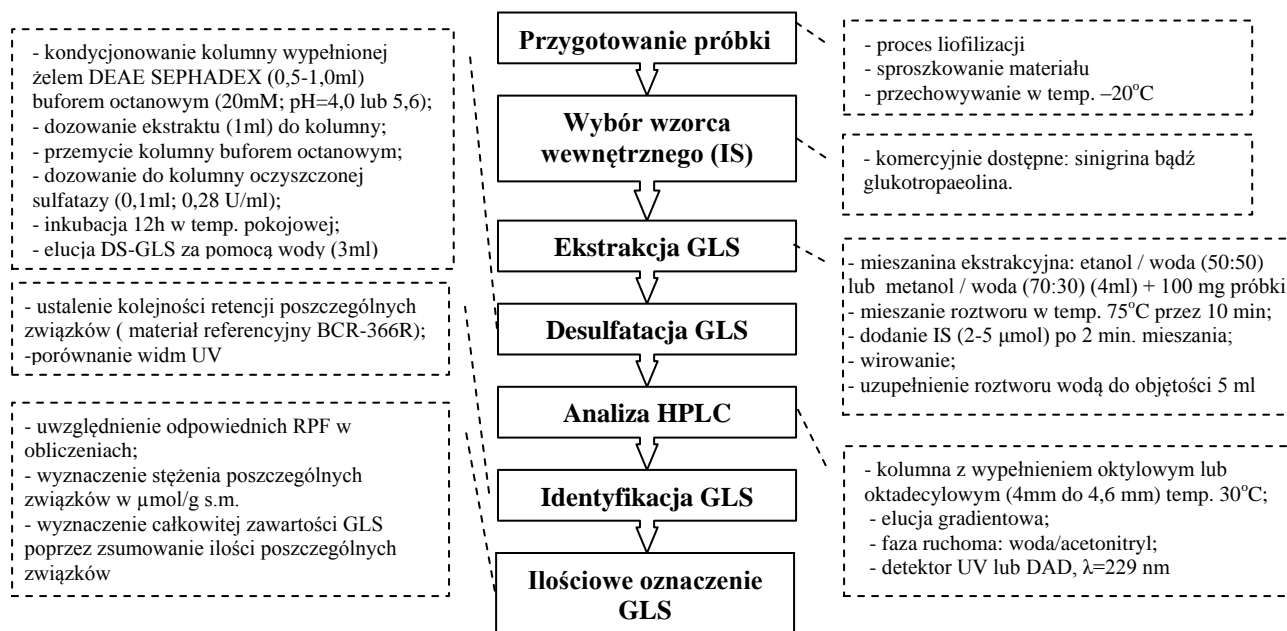
#### 3.1.6.1 Metodyki oznaczania związków z grupy GLS w próbkach materiału roślinnego

Od czasu ukazania się w latach pięćdziesiątych prac amerykańskich naukowców, w których opisano po raz pierwszy metodę oznaczania glukozynolanów (59, 60) rozpoczęły się usilne poszukiwania najbardziej efektywnych metod izolacji i identyfikacji glukozynolanów. W pierwszych publikacjach poświęconych tej tematyce opisano metodę opartą na wykorzystaniu techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (61). Do oznaczenia zawartości glukozynolanów w próbkach warzyw stosowano metodyki oparte na zastosowaniu na różnych etapach odpowiednich procedur analitycznych takich jak:

- destylacja parą wodną i miareczkowanie lotnych izotiocyjanianów;
- spektroskopia UV oksazolidionów;
- chromatografia gazowa lotnych izotiocyjanianów;
- spektroskopia UV tiomocznikowych pochodnych izotiocyjanianów;
- chromatografia gazowa pochodnych trimetylosilanowych glukozynolanów.

Rozdzielenie złożonych mieszanin związków chemicznych w celu izolacji glukozynolanów przeprowadzano również stosując technikę chromatografii gazowej z ciekłą fazą stacjonarną. Anality (GLS) przed etapem oznaczeń końcowych poddawano wówczas derywatywacji za pomocą trimetylosilanu oraz procesowi desulfatacji (62, 63).

Ponad 15 lat temu po raz pierwszy przeprowadzono analizę próbek nasion około 300 gatunków dziko żyjących roślin pod kątem oznaczenia zawartości produktów hydrolizy desulfo-GLS przy zastosowaniu chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas (64). W 1984 roku po raz pierwszy w celu ilościowego oznaczenia desulfo-GLS zastosowano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z układem faz odwróconych (65). W przypadku tej metodyki proponuje się zastosowanie procesu enzymatycznej desulfatacji ekstraktów roślin w kolumnie z żywicą jonowymienną. Modyfikacje tego sposobu przygotowania próbki opartego na desulfatacji glukozynolanów za pomocą sulfohydrolazy do analizy z wykorzystaniem techniki HPLC sprawiła, że do dziś stała się ona najczęściej wykorzystywaną metodyką ilościowego oznaczania glukozynolanów w próbkach ekstraktów roślinnych i została opisana w normie ISO 9167-1, 1992 (66, 67). Metodyka ta jednak stale dostarcza wielu trudności związanych z interpretacją wpływu pH, czasu działania i stężenia enzymu na produkty glukozynolanów podczas procesu desulfatacji.



**Rys. 12** Schemat procedury oznaczania desulfo-glukozynolanów w próbkach ekstraktów roślinnych z wykorzystaniem techniki HPLC na etapie rozdzielania i oznaczeń końcowych.

Ciągle trwają badania nad ulepszeniem efektywności tej metodyki, w szczególności zwraca się uwagę na takie etapy jak:

- przygotowanie próbki,
- enzymatyczna desulfatacja,
- identyfikacja pików;
- wyznaczanie współczynników odpowiedzi (RPF) poszczególnych związków.

W celu ujednoczenia oraz optymalizacji metodyki grupa włoskich naukowców zaproponowała konkretne zasady działania na poszczególnych etapach procedury (68) (Rys. 12 ). Informacje o możliwości zastosowania innych metodyk do oznaczenia GLS w próbkach roślinnych zestawiono w tabeli 4.

**Tabela 4** Przykłady technik wykorzystywanych do ilościowego i jakościowego oznaczania glukozynolanów w próbkach ekstraktów roślinnych.

Warzywa	Techniki analityczne	Przygotowanie próbki	Literatura
Brokuły	LC – ESI-MS/MS	Dwukrotna ekstrakcja sproszkowanego liofilizatu (1g) za pomocą metanolu (3ml)	(69)
Brokuły	LC-UV-ESI-MS	Ekstrakcja liofilizatu mieszaniną dimetylosulfoksydu / dimetyloformamidu / actotnitylu (1:1:1).Po odwirowaniu i ekstrakcji odparowano nadmiar rozpuszczalnika.	(70)
Gorzycza	Spektroskopia w niskiej podczerwieni (NIRS)	Nasiona gorzycy umieszczano bezpośrednio w celce pomiarowej NIRS (¾ objętości)	(71)
Krzyżowe	LC-APCI-MS	Ekstrakcja liści za pomocą dichlorometanu. Kolejna ekstrakcja liści za pomocą metanolu. Odparowanie nadmiaru rozpuszczalnika	(72)
<i>Thlaspi caerulescens</i>	LC-APCI-MS	Ekstrakcja liofilizatu (100mg) za pomocą wrzącego metanolu (70%). Desulfatacja na żywicy jonowymiennej.	(73)

### 3.1.6.2 Metodyki oznaczania izotiocyjanianów w próbkach materiału roślinnego

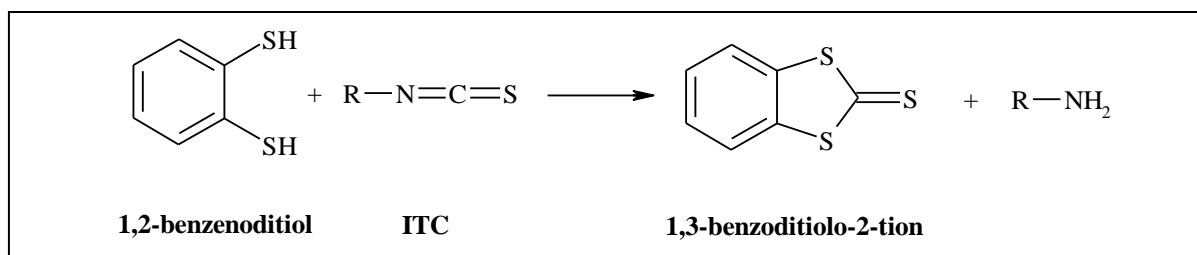
Separacji oraz identyfikacji ITC w ekstraktach roślinnych dokonywano stosując najczęściej techniki chromatografii gazowej lub cieczonej. Informacje na temat najczęściej stosowanych technik analitycznych przedstawiono w tabeli 5.

**Tabela 5** Informacje na temat technik analitycznych stosowanych do oznaczania zawartości izotiocyanianów w próbkach ekstraktów roślinnych.

Warzywa	Technika analityczna	Przygotowanie próbki	Literatura
Rzodkiewka	FID-GC	Ekstrakcja 500g zmielonego materiału za pomocą metanolu (100 ml). Dodanie 20 ml 1M HCl w celu zahamowania degradacji ITC. Odparowanie nadmiaru rozpuszczalnika. Ekstrakcja pozostałej fazy wodnej za pomocą heksanu (200 ml).	(74)
Rzeżucha	GC-MS	HS-SPME soków wyciśniętych z rzeżuchy.	(75)
Brokuły	LC – ESI-MS/MS	Derywatywacja ITC poprzez zmieszanie świeżych warzyw (250 mg) z amoniakiem w roztworze izopropanolu (2M; 0,25 ml). Odparowanie nadmiaru rozpuszczalnika.	(69)
Rzodkiewnik pospolity	GC-MS	Zastosowanie automatycznego dozownika do zbierania fazy nadpowierzchniowej z nad świeżej rośliny.	(76)
Kapusta	GC-MS	Homogenizacja liści (50g) z wodą (50ml). Ekstrakcja za pomocą chlorku metylu (50 ml). Filtracja i odparowanie nadmiaru rozpuszczalnika.	(77)
Wasabi	GC-FPD; GC-MS	Homogenizacja świeżego materiału (4 g) z wodą (7ml) i dichlorometanem (5ml). Po 2 h mieszania zebrano warstwę dichlorometanu.	(78)
Krzyżowe	HPLC-UV (reakcja cyklokondensacji)	Ugotowane warzywa poddawano homogenizacji z wodą. Po odsączeniu, do wody (100µl) dodawano benzenoditiolu w 2- propanolu (10mM; 600µl) oraz buforu fosforanowego (pH=8,5; 600µl). Przed analizą chromatograficzną próbki poddawano inkubacji (2h, 65°C).	(79)

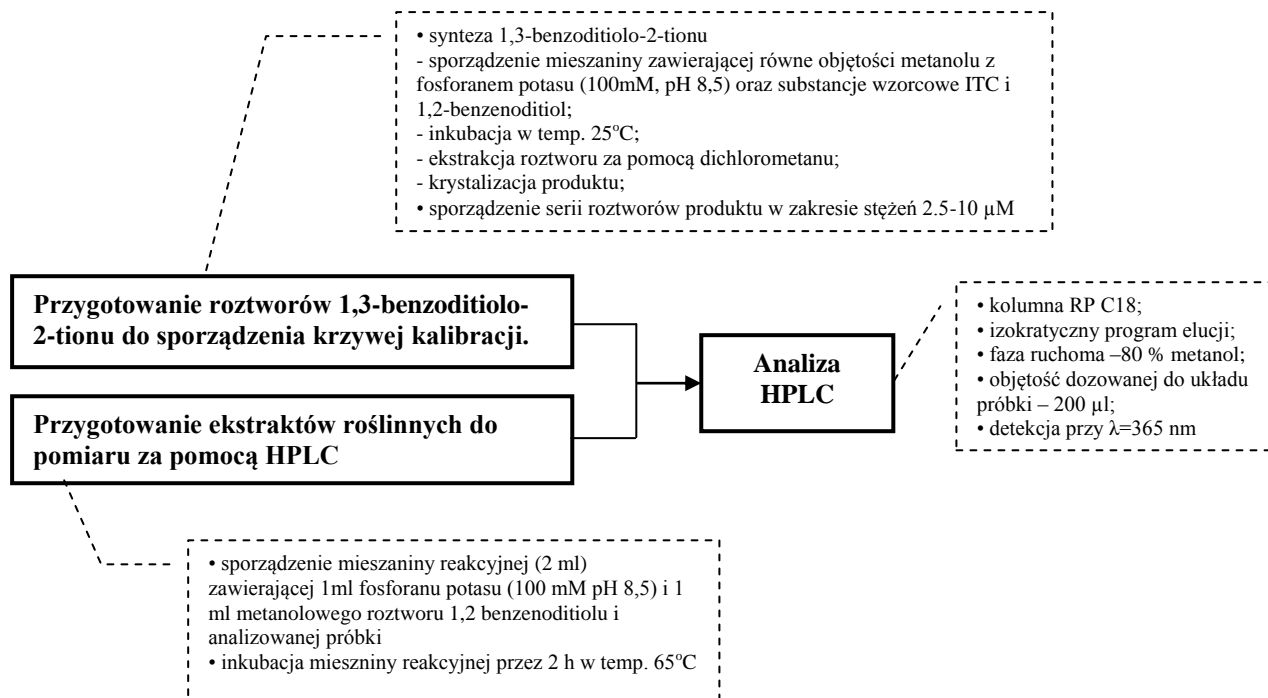
Najbardziej czułą pod kątem oznaczeń ilościowych ogólnej zawartości izotiocyanianów w próbkach roślinnych okazało się postępowanie analityczne oparte na wykorzystaniu reakcji cyklokondensacji. Zasada tej metody opiera się na zdolności izotiocyanianów do ilościowego reagowania z 1,2-benzenoditiolem dając w rezultacie cykliczny tiokarbonyl oraz wolne aminy (Rys. 13). Związki takie jak: tiocyjaniany, izocyjaniany, i cyjaniany nie powodują interferencji podczas reakcji cyklokondensacji. Wyboru 1,2-benzenoditiolu jako reagenta ditiolowego dokonano ze względu na:

- dostępność;
- zdolność szybkiego i ilościowego reagowania z prawie wszystkimi izotiocyanianami;
- stabilność produktu kondensacji ze związkami z grupy izotiocyanianów.



**Rys.13** Schemat reakcji cyklokondensacji izotiocyanianów z 1,2-benzenoditiolem.

Powstający tiokarbonyl czyli 1,3-benzenoditiolo-2-tion, ze względu na swój bardzo wysoki współczynnik ekstynkcji w zakresie fal typowych dla ultrafioletu umożliwia ilościowy pomiar za pomocą technik spektrofotometrycznych. Pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 365 nm ekstraktów roślinnych poddanych działaniu 1,2-benzenoditiolu umożliwił oznaczenie sumy związków z grupy ITC na poziomie rzędu 1 nmola (80). Przystosowanie tej metody do analiz przy użyciu techniki HPLC spowodowało wzrost czułości pomiaru zawartości izotiocyanianów do poziomu 10 pikomoli (81). Na rysunku 14 przedstawiono najważniejsze etapy i parametry oznaczania ITC z zastosowaniem reakcji cyklokondensacji oraz techniki HPLC podczas rozdzielania i oznaczania poszczególnych analitów.



**Rys. 14** Schemat procedury oznaczania sumy izotiocyanianów w próbkach ekstraktów roślinnych z zastosowaniem techniki HPLC.

### 3.1.6.3 Metodyki oznaczania pochodnych indolowych w próbkach materiału roślinnego

Dostępna jest niewielka ilość danych literaturowych na temat metodyk oznaczania indolowych pochodnych glukozynolanów w próbkach pochodzenia roślinnego. Większość opisywanych procedur zakłada zastosowanie głównie technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV (Tab. 6).

**Tabela 6** Informacje literaturowe o technikach analitycznych wykorzystywanych na etapie oznaczania indolowych produktów rozpadu glukozynolanów w ekstraktach uzyskanych z próbek materiału roślinnego.

Warzywa	Techniki analityczne	Przygotowanie próbki	Literatura
Krzyżowe	HPLC-UV	Homogenizacja świeżych warzyw (100 g) z wodą (200 ml) i acetonitrylem (30ml). Oczyszczanie ekstraktu za pomocą techniki SPE.	(82)
Krzyżowe	HPLC-UV	Homogenizacja świeżych warzyw (500 g) z wodą (500 ml). Mieszanie zawiesiny (50 ml) przez 2 h z acetonem (200ml). Odparowanie acetonu. Ekstrakcja pozostałości octanem etylu (3x35ml).	(41)
Krzyżowe	SFC-UV	Homogenizacja świeżych warzyw (500 mg) z wodą (10 ml). Ekstrakcja za pomocą octanu etylu (3x10 ml). Zebranie warstwy octanu etylu. Odparowanie nadmiaru rozpuszczalnika.	(57)
Kapusta	HPLC-UV	Homogenizacja materiału (50 g) z NaCl. Ekstrakcja za pomocą acetonu (2x50 ml). Odparowanie nadmiaru rozpuszczalnika. Ekstrakcja za pomocą octanu etylu.	(74)

Etap przygotowania próbek do analizy oparty jest najczęściej na ekstrakcji rozdrobnionego materiału roślinnego za pomocą wody i acetonu. Po odparowaniu acetonu faza wodna poddawana jest ekstrakcji typu ciecz-ciecz za pomocą octanu etylu. Ekstrakt przed etapem analizy chromatograficznej jest odparowywany do sucha i ponownie rozcieńczany w roztworze stanowiącym fazę ruchomą. Analiza chromatograficzna prowadzona jest głównie w układzie faz odwróconych według gradientowego programu elucji. Jako faza ruchoma używana jest najczęściej mieszanina acetonitrylu z buforem amonowym bądź fosforanowym o pH 5,7 - 7.

Najczęściej występujące wśród warzyw krzyżowych indolowe produkty rozpadu glukozynolanów tj. indolo-3-karbinol, indolo-3-acetonitryl oraz kwas indolo-3-octowy są

komercyjnie dostępne w postaci substancji wzorcowych. Niestety użycie jako wzorców innych pochodnych indolowych głównie produktów kondensacji indolo-3-karbinolu oraz askorbigeny jest utrudnione, bo jest związane z koniecznością przeprowadzenia syntezy tych związków.

### 3.2 Przeciwutleniacze w warzywach krzyżowych

Głównymi przeciwutleniaczami występującymi w warzywach krzyżowych są witamina C, witamina E, karotenoidy oraz polifenole. Wymienione antyoksydanty posiadają zdolności wyłapywania rodników hamując etap inicjacji rodnikowych reakcji łańcuchowych bądź też przerywając propagację łańcucha (druga linia obrony). Witamina E oraz karotenoidy dzięki zdolność wygaszania tlenu singletowego wspomagają głównie pierwszą linię obrony organizmu przeciwko stresowi oksydacyjnemu (83, 84). Zarówno związki flawonoidowe jak i witamina C wykazują ochronne właściwości w stosunku do  $\alpha$ -tokoferolu obecnego w cholesterolowej frakcji LDL, posiadają również zdolność regenerowania witaminy E z rodnika  $\alpha$ -chromanowego (85, 86).

Składniki pokarmowe o właściwościach przeciwutleniających, synergistycznie współdziałając ze sobą mogą efektywniej redukować poziom reaktywnych form tlenu (RFT) niż pojedynczy przeciwutleniacz (87-90). Dodatkowo mieszanina zawierająca przeciwutleniacze zarówno o charakterze hydrofilowym jak i hydrofobowym umożliwia proces neutralizacji wolnych rodników zarówno w fazie wodnej jak i lipidowej (91). Stosując metodę opartą na utlenieniu liposomów wykazano, że aktywność kombinacji kwercetyny lub katechiny z  $\alpha$ -tokoferolem jest zdecydowanie wyższa niż suma aktywności zmierzona osobno dla poszczególnych związków (92). Kombinacja  $\alpha$ -tokoferolu lub witaminy C ze związkami polifenolowymi również powoduje synergistyczny efekt w błonach erytrocytów człowieka oraz w fosfadylocholinowych systemach liposomowych (93).

Różnice w zawartości przeciwutleniaczy w warzywach krzyżowych zależą od kilku czynników (94-98). Do najważniejszych należą:

- gatunek rośliny;
- dojrzałość i okres zbioru;
- warunki uprawy;
- jakość gleby;
- warunki przechowywania, transportu oraz obróbki kulinarnej.



### 3.2.1 Przeciwutleniacze o właściwościach hydrofilowych

#### 3.2.1.1 Witamina C

Witamina C czyli kwas askorbinowy oraz jego produkt utlenienia - kwas dehydroaskorbinowy wykazują różnorodne aktywności biologiczne w ludzkim organizmie. Witamina C posiada zdolność redukcji poziomu białek C-reaktywnych (CRP) zwiastujących stany zapalne oraz choroby serca. Ponad 85 % witaminy C zawartej w ludzkiej diecie dostarczane jest z owocami i warzywami (85, 99). Kwas L-askorbinowy może spełniać następujące funkcje biologiczne (85):

- być kofaktorem enzymów;
- wyłapywać wolne rodniki;
- posiadać zdolność donora/akceptora w transporcie elektronowym przez błony;
- regenerować  $\alpha$ -tokoferol.

**Tabela 7** Zawartość witaminy C w najczęściej spożywanym warzywach krzyżowych

Rodzaj warzywa	Zawartość witaminy C [mg/100g ś.m.]	Literatura
Brokuły	34-93	(100)
	41-64	(101)
	74,8	(102)
	75	(103)
	84	(41)
	93	(104)
	103	(105)
	112	(106)
	113	(85)
	54-120	(95)
Brukselka	43-146	(97)
	76	(107)
	87-109	(85)
Jarmuż	192	(108)
	92,6	(107)
Kalafior	186	(85)
	17,2	(107)
	40-44	(95)
	49,9	(102)
	64	(41)
	64-78	(85)
Kapusta biała	81	(109)
	18,8	(102)
	25,6	(110)
	28,2	(107)
	23-33	(95)
	32	(104)
	43	(109)
	44	(41)
46-47	(85)	

Występują znaczne różnice międzygatunkowe w zawartości witaminy C w warzywach krzyżowych (Tabela 7). Rozbieżności te wynikają głównie z różnic w genotypach (95, 97) oraz w warunkach klimatycznych upraw (111). Generalnie najniższym poziomem witaminy C spośród wymienionych warzyw krzyżowych charakteryzuje się biała kapusta, mylnie uważana od lat w Polsce za bogate źródło tego związku.

Kwas dehydroaskorbinowy (DHA) jest niestabilny w środowisku fizjologicznego pH i na drodze enzymatycznych przemian spontanicznie przechodzi w kwas 2,3-diketogulonowy (85). Według danych literaturowych kwas dehydroaskorbinowy stanowił dominującą formę witaminy C w kapuście występując w stężeniu około 4 razy większym niż stężenie kwasu askorbinowego (110). Inna grupa naukowców odnotowała natomiast udział formy DHA rzędu odpowiednio 14% i 8% całkowitej zawartości witaminy C w kalafiorze i brokułach (112).

### 3.2.1.2 Związki polifenolowe

Związki fenolowe stanowią bardzo liczną grupę wtórnych metabolitów roślin. Ze względu na strukturę zostały one sklasyfikowane na kilka grup w obrębie których, podzielono je w zależności od liczby i pozycji grup hydroksylowych oraz obecności innych podstawników. Związki polifenolowe, w szczególności flawonoidy charakteryzują się różnorodną aktywnością biologiczną (113-116). Do najważniejszych z nich można zaliczyć:

- właściwości przeciwutleniające;
- ochronne właściwości w stosunku do naczyń włosowatych;
- zdolność hamowania wzrostu guza w kilku stadiach.

Związki fenolowe posiadają zdolność do wychwytywania reaktywnych form tlenu ze względu na swój charakter elektrono-donorowy. Ich właściwości przeciwutleniające zależą zarówno od stabilności w różnych warunkach jak i od liczby oraz położenia grup hydroksylowych w cząsteczce. W wyniku wielu badań *in vitro* stwierdzono, że związki fenolowe charakteryzują się wyższym potencjałem przeciwutleniającym niż witaminy antyoksydacyjne oraz karotenoidy (117, 118).

Badania nad profilem związków polifenolowych występujących w warzywach krzyżowych skupiały się głównie na kwiatach brokułów, najbardziej popularnych w krajach zachodniej Europy oraz USA. Brokuły stanowią źródło flawonoli oraz pochodnych kwasu hydroksycynamonowego. Za główne flawonole występujące w brokułach uznano kwercetynę oraz 3-O-soforozydokamferol (119). Dominujące pochodne kwasu hydroksycynamonowego w brokułach stanowią (43):

- 1-synapo-2-ferulogentobioza,
- 1,2'-disynapo-2-ferulogentobioza,
- 1,2,2'-trisynapogentobioza oraz kwas neochlorogenowy.

Całkowita zawartość estrów ferulosynapowych gentobiozy oraz kwasu kofeinowego wśród 14 odmian brokułów mieści się w przedziale zawartości odpowiednio od 0 do 8,25 mg/100g oraz od 0 do 3,82/100g.

W próbkach białej kapusty zidentyfikowano siedem różnych 3-O-soforozydo-7-O-glukozydów kamferolu i kwercetyny acylowanych bądź nieacylowanych kwasem hydroksycynamonowym (120). Dodatkowo w liściach kapusty stwierdzono również obecność niezmodyfikowanego tetraglukozydu kamferolu oraz jego pochodnych acylowanych kwasem synapowym, ferulowym bądź też kofeinowym (121).

Purpurowe zabarwienie czerwonej kapusty spowodowane jest obecnością związków antocyjanowych w liściach. Czerwona kapusta zawiera ponad 15 różnych antocyjanów, które są acyloglikozydami cyjanidyn (122). Oszacowano całkowitą zawartość antocyjanów w czerwonej kapuście na poziomie stężeń rzędu 25 mg/100 g (123). Po procesie hydrolizy ilość uwolnionych antocyjanów sięgała 44,4 - 51,2 mg/100 g (101).

Zawartość polifenoli podobnie jak i innych fitozwiązków w warzywach zależy od wielu czynników takich jak: gatunek, warunki klimatyczne, warunki uprawy oraz przechowywania. W przypadku polifenoli bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na poziom zawartości są warunki obróbki kulinarnej. W tabeli 8 zestawiono informacje o poziomach stężeń polifenoli w próbkach najpopularniejszych warzywach krzyżowych.

Polifenole mogą występować w roślinach zarówno w formie rozpuszczonej jak i związanej ze składnikami ściany komórkowej. Szacuje się, że udział związanych postaci polifenoli w całkowitej ilości polifenoli wynosi od 20,5 % dla brokułów do 32,9 % dla białej kapusty (104). Polifenole w warzywach występują zarówno w formie związanej z cukrami jak i też w formie aglikonów. Generalnie w surowych warzywach występują glukozydy flawonoidów natomiast ich aglikony mogą się pojawić w wyniku obróbki kulinarnej. Zazwyczaj w trakcie badań mających na celu określenie poziomu flawonoidów oznaczano głównie stężenie aglikonów powstałych wskutek hydrolizy kwasowej, ponieważ oznaczenie poszczególnych glukozydów flawonoidowych jest zadaniem trudnym ze względu na brak odpowiednich wzorców. Wyniki analiz próbek ekstraktów z roślin krzyżowych z zastosowaniem techniki HPLC są podstawą do stwierdzenia, że podstawowym aglikonem flawonoidowym jest kwercetyna (102, 124). Potwierdzono również obecność pochodnych kamferolu i mirecytyny w większości badanych próbek warzyw krzyżowych. Nie

stwierdzono natomiast obecności mirecytyny i to zarówno w brokułach, kalafiorze jak i w białej i czerwonej kapuście. Innymi aglikonami flawonoidów odnalezionymi wśród warzyw krzyżowych była apigenina i luteolina (124).

**Tabela 8** Stwierdzone poziomy stężenie związków polifenolowych w warzywach krzyżowych (wyrażone w postaci mg równoważników kwasu galusowego /100 g ś.m)

Pochodzenie warzyw	Rodzaj rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji	Rodzaj warzywa	Całkowita zawartość polifenoli	Literatura
Mauritius	Aceton/woda (70:30 v/v)	Brokuły Kalafior Kapusta chińska Kapusta biała	82,2±8,9 27,8±1,5 118,9±12,5 15,3±2,1	(102)
Stany Zjednoczone	Aceton/woda (80:20 v/v)	Brokuły Kapusta	80,8±1,2 36,7±6,9	(104)
Stany Zjednoczone	Aceton/woda/kwas octowy (70:29;5:0,5 v/v/v)	Brokuły Kalafior Kapusta biała Kapusta czerwona	337±62 274 203±31 254±18	(125)
Japonia	Metanol/woda (80/20 v/v)	Brokuły	34,5±1,0	(105)

### 3.2.2 Przeciwnutleniacze o charakterze lipofilowym

#### 3.2.2.1 Karotenoidy

Związki z grupy karotenoidów (karoteny i ksantofile) stanowią żółte, pomarańczowe i czerwone barwniki, które są obecne w tkankach wielu owoców i warzyw. Kilka z nich uważanych jest za prekursorów witaminy A (np.  $\beta$ -karoten,  $\gamma$ -karoten i  $\beta$ -kryptoksantyna), które względu na obecność sprzężonych wiązań podwójnych posiada zdolność zarówno wychwytywania rodników jak i wygaszania tlenu singletowego. Niski poziom  $\beta$ -karotenu w osoczu może się przyczyniać do rozwoju nowotworów i chorób serca oraz powodować wzrost ryzyka zawału wśród palaczy tytoniu (126).

Spośród próbek 22 gatunków warzyw poddanych badaniom na zawartość karotenoidów najwyższym poziomem stężeń tych związków rzędu ponad 10 mg/100 g charakteryzowały się: jarmuż, czerwona papryka, natka pietruszki, szpinak, marchew i pomidory (127). W badaniach tych na 11 miejscu pod względem poziomu zawartości karotenoidów znalazła się brukselka (6,1 mg/100g) na 16 brokuły (1,6 mg/100g) czerwona kapusta na 20 miejscu ( 0,43 mg/ 100g ) i na przedostatnim (21) biała kapusta (0,26 mg

/100g). W tabeli 9 przedstawiono zakresy zawartości karotenoidów w próbkach najpopularniejszych warzyw krzyżowych.

**Tabela 9** Zawartość karotenoidów w próbkach najpopularniejszych warzyw należących do rodziny krzyżowych [mg/100 g ś.m].

Warzywo	$\alpha$ -karoten	$\beta$ -karoten	Luteina+zeaksantyna	Literatura
Brokuły	0,001	0,78	2,45	(128)
	0	0,28	0,80	(127)
	ślady	1,00	1,80	(129)
	0-0,07	0,37-2,42	-	(95)
	-	1,24-1,92	2,42-3,50	(130)
	0	0,55	0,78	(131)
Brukselka	-	0,63	1,05	(105)
	0,006	0,45	1,59	(128)
	0,05	0,63	2,71	(127)
	-	0,43	0,92	(129)
Jarmuż	0-0,01	0,77-1,02	-	(95)
	0	9,23	39,55	(128)
	0,15	7,28	18,63	(127)
	0,05-0,07	3,65-6,08	-	(95)
Kalafior	-	2,84-4,38	3,04-5,26	(130)
	0	<0,01	0,02	(127)
	-	0,01	0,03	(129)
	ślady	0,07-0,08	-	(95)
Kapusta biała	0	0,07	0,31	(128)
	0	0,02	0,08	(127)
	ślady	0,07	0,15	(129)
	<0,01	0,01-0,13	-	(95)
	0	0,41	0,45	(131)
Kapusta czerwona	0	0,05	0,15	(127)
	ślady	0,02	0,03	(129)

### 3.2.2.2 Witamina E

Do związków wykazujących biologiczną aktywność witaminy E należą tokoferole oraz tokotrienole. Dominującą reakcją odpowiedzialną za aktywność przeciwutleniającą tokoferoli jest przekazanie atomu wodoru i tworzenie rodnika tokoferoksyłowego. Witamina E wykazuje właściwości profilaktyczne w chorobach serca poprzez zdolność hamowania utleniania frakcji cholesterolowej LDL (132). Całkowita zawartość tokoferoli oraz tokotrienoli w warzywach krzyżowych jest dosyć niska i w przeliczeniu na 100 g wynosi (133):

- 0,82 mg dla brokułów;
- 0,40 mg dla brukselki;
- 0,35 mg dla kalafiora;
- 0,05 mg dla czerwonej kapusty
- 0,04 mg dla białej kapusty.

Wyniki innych badań wskazują na podobną kolejność tych warzyw pod względem zawartości witaminy E, jednak oznaczone poziomy zawartości są dwukrotnie wyższe (95). Różnice w poziomach stężeń wynikają najprawdopodobniej z różnic w warunkach klimatycznych poszczególnych upraw. Stwierdzono, że najbogatszym źródłem lipofilowych przeciwutleniaczy są takie warzywa jak jarmuż oraz brokuły, natomiast najniższymi poziomami zawartości tych związków charakteryzują się kapusta oraz kalafior.

### *3.2.3 Trwałość przeciwutleniaczy podczas obróbki i przechowywania warzyw krzyżowych*

Witamina C ze względu na swój hydrofilowy charakter i niską stabilność podczas ogrzewania, uważana jest za wskaźnik jakości procesu obróbki żywności. Warzywa krzyżowe po zbiorze są najczęściej przechowywane w temperaturze otoczenia, rzadziej w warunkach chłodniczych. Zwykle w warzywach przechowywanych w temperaturze otoczenia następuje gwałtowny spadek kwasu askorbinowego. Odnotowano stałą utratę tego związku w brokułach przechowywanych w temperaturze 20°C (odpowiednio o 56% - po tygodniu i o 72% po dwóch tygodniach) (100). Jednak podczas przechowywania brokułów w temperaturze 4°C po upływie 7 dni nie zaobserwowano spadku zawartości witaminy C dopiero po kolejnych 14 dniach początkowa wartość kwasu askorbinowego spadała o 20%. Przechowywanie brokułów w workach foliowych powoduje również zahamowanie spadku zawartości witaminy C (134). Brokuły, kalafior oraz brukselka najczęściej dostępne są na rynku w postaci mrożonek. Przed zamrożeniem warzywa poddawane są procesowi mycia, rozdrabniania oraz blanszowania (rodzaj obróbki cieplnej żywności polegającej na zanurzeniu na kilkadziesiąt sekund we wrzątku lub włożeniu do zimnej wody, doprowadzeniu do stanu wrzenia i wyjęciu) w celu inaktywacji enzymów oksydacyjnych. Spadek zawartości witaminy C w trakcie procesu blanszowania zależy w dużym stopniu od gatunku warzyw. Po procesie blanszowania trwającym 3 minuty odnotowano spadek zawartości witaminy C (o 16% i 30%) odpowiednio w próbkach kalafiora i kapusty (109). Blanszowanie brokułów na parze powodowało spadek wyjściowego stężenia kwasu askorbinowego o 30% (111). Proces zamrażania nie powodował znaczącego spadku zawartości witaminy C. Stwierdzono również, że podczas 12 miesięcy przechowywania w temperaturze -20°C zawartość witaminy C spadła o 3-18% w przypadku

brokułów i o 6-13% w przypadku kalafiora (100). Stwierdzono znacznie wyższy spadek zawartości witaminy C (sięgający 30% pierwotnej zawartości) w przypadku białej kapusty przechowywanej w podobnych warunkach (109).

Spadek zawartości witaminy C w przypadku brukselki w dużym stopniu zależy od warunków gotowania. Najmniejszą utratę tej witaminy (w granicach od 3,7% do 10,6%) zaobserwowano podczas gotowania brukselki w szybkowarze i w garnku akutermicznym (108). Zawartość kwasu askorbinowego natomiast dramatycznie spadała w przypadku brokułów gotowanych zarówno w konwencjonalny sposób jak i w kuchence mikrofalowej (105). Autorzy tych badań doszli do wniosku, że o wiele większy wpływ na zawartość witaminy C w brokułach ma czas gotowania niż sam sposób gotowania. Biorąc pod uwagę poziom zawartości witaminy C, puszkowanie warzyw krzyżowych wydaje się być najmniej odpowiednim sposobem ich przechowywania. Blanszowanie i puszkowanie brukselki powoduje spadek zawartości kwasu askorbinowego (rzędu 66%). Spadek poziomu zawartości tego związku jest więc 2 razy większy niż w przypadku blanszowania i zamrażania (108).

W trakcie okresu 7 dni przechowywania brokułów w temperaturze 1°C odnotowano około 2-3 razy wyższy spadek zawartości związków fenolowych niż witaminy C (43). Zawartość początkowa flawonoidów w tych warunkach spadała aż o 61%. Wyniki uzyskane w trakcie innych badań wskazują na odwrotną zależność, polifenole podczas tygodniowego przechowywania brokułów w temperaturze 5°C wykazały się wyższą trwałością (134). Nie odnotowano również spadku stężenia tych związków w brokułach przechowywanych w opakowaniach foliowych.

W przypadku brokułów przechowywanych bez opakowania zaobserwowano znaczny wzrost (26,7%) zawartości polifenoli prawdopodobnie spowodowany utratą masy i wzrostem ich stężenia w komórkach. Wzrost stężenia polifenoli podczas przechowywania warzyw w temperaturze otoczenia w porównaniu z warzywami przechowywanymi w chłodni również potwierdzałoby tę tezę. W tabeli 10 zestawiono informacje obrazujące wpływ operacji gotowania na zawartość fenoli w brokułach. Spadek zawartości polifenoli podczas procesu blanszowania i zamrażania wahała się w granicach od 12% (dla jarmużu i kalafiora) do 58% (dla brokułów) (109, 135, 136).

Wyniki badań dotyczące trwałości karotenoidów podczas obróbki warzyw są sprzeczne. Autorzy niektórych prac sugerują, że są podstawy do stwierdzenia, że występuje spadek całkowitej zawartości karotenoidów (o 23%) podczas konwencjonalnego i mikrofalowego gotowania brokułów (105). W wyniku analizy odpowiednich próbek odnotowano spadek poziomu  $\beta$ -karotenu i wiolaksantyny oraz wzrost stężenia luteiny. Inni

autorzy obserwują natomiast wzrost poziomu karotenoidów spowodowany obróbką termiczną warzyw. Podczas procesu gotowania brokułów oraz kapusty odnotowano wzrost stężenia karotenoidów (o 31%) (137). W przypadku brokułów nastąpił wyższy wzrost stężenia  $\beta$ -karotenu niż luteiny natomiast w przypadku kapusty zaobserwowano odwrotną zależność. Gotowanie zamrożonej brukselki w wodzie przez 15 minut nie wpływa znacząco na całkowitą zawartość karotenoidów, natomiast wzrasta wówczas stężenie *cis*- $\beta$ -karotenu (o 28%) oraz luteiny (o 2%) maleje natomiast stężenie  $\beta$ -karotenu (o 7%).

**Tabela 10** Informacje literaturowe obrazujące wpływ procesu gotowania na zawartość polifenoli w brokułach.

Proces gotowania	Stosunek ilości brokułów do wody	Czas gotowania [min]	Związek	Spadek zawartości [%]	Literatura
Konwencjonalny	0,5g/10ml	0,5		31,6	
		1,5	Polifenole	53,0	(105)
		5,0		71,9	
Konwencjonalny	3g/10ml	15,0	Glukozydy flawonoidowe	82,0	(119)
			3-O-soforozydo kwercetyna	72,0	
			3-O-soforozydo kamferol	86,0	
			Izokwercytrina	85,0	
			3-O-glukozydo kamferol	76,0	
			Diglukozydo kamferol	81,0	
Konwencjonalny	10g/10ml	5,0	Flawonoidy	80,9	(43)
			Pochodne kofeino-chinonowe	60,1	
			Pochodne synapowe i ferulowe	50,7	
Mikrofale	10g/10ml	5,0	Flawonoidy	97,2	(43)
			Pochodne kofeino-chinonowe	87,4	
			Pochodne synapowe i ferulowe	76,2	
Na parze	10g/10ml	3,5	Flawonoidy	11,1	(43)
			Pochodne kofeino-chinonowe	8,1	
			Pochodne synapowe i ferulowe	0,3	
Wysokie ciśnienie	10g/10ml	3,0	Flawonoidy	53,4	(43)
			Pochodne kofeino-chinonowe	49,3	
			Pochodne synapowe i ferulowe	41,9	

Podsumowując, można stwierdzić, że podczas procesu obróbki warzyw obecne w nich przeciwutleniacze mogą ulegać wielu przemianom tj. rozpad termiczny, zmiany jakościowe, wypłukiwanie do otaczającej wody. Wszystkie te procesy w znaczący sposób mogą wpływać



na całkowitą aktywność przeciwutleniającą warzyw krzyżowych przeznaczonych do konsumpcji.

### 3.2.4 Właściwości przeciwutleniające warzyw krzyżowych surowych i poddanych obróbce

Próbki ekstraktów warzyw krzyżowych były poddawane analizie z wykorzystaniem różnych technik pomiaru potencjału przeciwutleniającego (104, 125, 138-142). Szczegółowy opis najczęściej stosowanych metodyk wykorzystywanych do oznaczania właściwości przeciwutleniających próbek żywności umieszczono w pracy przeglądowej i opracowaniu książkowym (143, 144).

Wyniki badań z wykorzystaniem metodyki ORAC mogą stanowić podstawy do uszeregowania najpopularniejszych warzyw krzyżowych pod kątem aktywności przeciwutleniającej w następującej kolejności: jarmuż, brukselka, brokuły, kalafior i kapusta (139) (Tab. 11).

**Tabela 11** Wyniki badań aktywności przeciwutleniającej niektórych warzyw krzyżowych uzyskane w wyniku zastosowania metodyki ORAC.

Przygotowanie próbki	Warzywa	ORAC <sub>ROO*</sub> (μmol Trolox/g)	Literatura
Ekstrakcja za pomocą wody + ekstrakcja za pomocą acetonu	Jarmuż	17,7	(139)
	Brukselka	9,8	
	Brokuły	8,9	
	Kalafior	3,8	
	Kapusta	3,0	
Ekstrakcja za pomocą mieszaniny aceton/woda (50:50 v/v)	Brokuły	23-208	(141)
	Kalafior	62-152	
	Kapusta biała	23-146	
Ekstrakcja za pomocą wody + ekstrakcja za pomocą heksanu	Brokuły	42-137	(145)
Ekstrakcja za pomocą mieszaniny heksan/dichlorometan (1:1 v/v) + ekstrakcja za pomocą mieszaniny aceton/woda/kwas octowy (70:29,5:0,5 v/v/v)	Brokuły	15,9	(125)
	Kalafior	6,5	
	Kapusta biała	13,6	
	Kapusta czerwona	22,5	

Podobne wyniki uzyskano podczas badań potencjału przeciwutleniającego z wykorzystaniem metodyki pomiaru zdolności ekstraktów warzyw do inhibicji peroksydacji lipidów (138). Analizując wyniki tych badań można stwierdzić, że spośród badanych warzyw krzyżowych najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym charakteryzowała się brukselka, brokuły i czerwona kapusta. Ogólnie rzecz biorąc biała kapusta charakteryzowała się najniższą

aktywność przeciwutleniającą, tylko w niektórych przypadkach wartość ta była porównywalna z aktywnością przeciwutleniającą brokułów (125, 141).

Oznaczona całkowita zdolność przeciwutleniająca warzyw zależy między innymi od rodzaju przeprowadzonej ekstrakcji oraz od typu przeciwutleniaczy obecnych w ekstrakcie (138, 139). Zaobserwowano również znaczne różnice w aktywności przeciwutleniającej wśród ekstraktów uzyskanych z 8 genotypów brokułów (145). Różnica pomiędzy najwyższą i najniższą wartością liczbową parametru określającego zdolność przeciwutleniającą była trzykrotna. W trakcie badań mających na celu określenie zdolności przeciwutleniającej warzyw należy brać pod uwagę aktywność zarówno hydrofilowych jak i hydrofobowych przeciwutleniaczy. W przypadku brokułów hydrofilowe ekstrakty uzyskane z warzyw, zawierające witaminę C i polifenole odpowiedzialne były za spadek (rzędu 80 - 95%) całkowitej aktywności przeciwutleniającej wyznaczonej w wyniku zastosowania metodyki ORAC (145). W innych warzywach krzyżowych zaobserwowano podobną zależność, w tym przypadku przeciwutleniacze o charakterze przeciwutleniaczy hydrofilowych były odpowiedzialne za całkowitą aktywność przeciwutleniającą (89%) (125).

Można więc stwierdzić, że termiczna obróbka warzyw krzyżowych zdecydowanie wpływa na poziom ich aktywności przeciwutleniającej. W większości przypadków działanie wysokiej temperatury skutkowało obniżeniem całkowitego potencjału przeciwutleniającego warzyw. Zauważono, że zarówno w trakcie konwencjonalnego jak i mikrofalowego gotowania kalafiora w ciągu 5 minut odnotowano 65% ubytek właściwości przeciwutleniających (105). Podobny efekt zaobserwowano w przypadku gotowania brokułów gdzie nastąpił 21% spadek aktywności przeciwutleniającej (125). Inne badania pokazały z jednej strony spadek aktywności antyoksydacyjnej kalafiora podczas blanszowania (23%), jednak w przypadku kapusty białej odnotowano 9% wzrost tych właściwości (109).

Pomimo, że przeprowadzono do tej pory wiele badań dotyczących obróbki termicznej żywności pochodzenia roślinnego, wciąż mało wiadomo na temat wpływu tego procesu na zawartość składników bioaktywnych. W większości eksperymentów stosowane czasy obróbki termicznej często mają mało wspólnego z faktycznymi warunkami przetwórstwa stosowanymi czy to w domu czy też w przemyśle.

## II. CEL I ZAKRES PRACY

Zasadniczym celem pracy doktorskiej, realizowanej w ramach Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym, było określenie wpływu typowej obróbki kulinarnej na zawartość substancji bioaktywnych w kapuście białej.

Założeniem wykonanych badań było dostarczenie naukowych podstaw rekomendacjom żywieniowym mającym na celu zmniejszenie zagrożenia chorobami nowotworowymi oraz promocję kapusty jako cennego składnika tradycyjnej polskiej diety.

Program badawczy będący przedmiotem niniejszej rozprawy związany jest z realizacją następujących zadań:

- Porównanie właściwości przeciwutleniających, oraz profilu glukozynolanów polskiej kapusty na tle warzyw pochodzących z różnych rejonów Europy, a także w kapuście pochodzącej ze standardowej oraz ekologicznej uprawy.
- Ocena zmian aktywności przeciwutleniającej oraz profilu przeciwutleniaczy podczas obróbki termicznej i procesu fermentacji kapusty.
- Ocena wpływu obróbki kulinarnej na skład glukozynolanów oraz indolowych pochodnych w kapuście.
- Opracowanie procedury izolacji składników bioaktywnych uwalnianych podczas obróbki kulinarnej kapusty.
- Zastosowanie zaawansowanych technik spektroskopowych w celu identyfikacji struktur związków bioaktywnych powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty.

### III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

#### 1. Aparatura i odczynniki

##### 1.1 Odczynniki chemiczne i biochemiczne

- Metanol (cz.d.a.), *POCH S.A.*;
- Metanol (Chromasolv do gradientowej elucji HPLC 99,9%), *Sigma Aldrich*;
- Woda demineralizowana – Millipore, Q<sub>PLUS</sub>185;
- Chloroform (cz.d.a.), *Merck*;
- Chloroform (do chromatografii HPLC 99,9%), *Aldrich*;
- Acetonitryl (do chromatografii HPLC 99,9%), *Merck*;
- Octan etylu (cz.d.a), *Merck*;
- Witamina C (99%) *Sigma*;
- Glukotropeolina (99%) *AppliChem*;
- Trolox - kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochrmomano-2-karboksyłowy (97%) *Sigma*;
- Wzorce DS-GLS: desulfoglukoiberyna, desulfosinigryna, desulfoglukotropoaeolina, desulfoglukobrassycyna *CRA Włochy*;
- Indolo-3-karbinol (98%), *Sigma*;
- Indolo-3-acetonitryl (do syntezy; 98%), *Merck*;
- Kwas indolo-3-octowy (99%), *Merck*;
- Odczynnik Folina-Ciocalteu *Merck*;
- ABTS - 2,2'azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulofonian) (98%) *Sigma*;
- DPPH – 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl *Sigma*;
- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> – odczynnik otrzymany z Katedry Chemii Nieorganicznej;
- Kwas octowy (98%) *POCH S.A.*;
- Kwas siarkowy (98%) *POCH S.A.*;
- Kwas mrówkowy (98%) *Merck*;
- Octan sodu (99%) *Merck*;
- Imidazol (99%) *Merck*;
- Sulfataza z *Helix pomatia* typ H1 *Sigma*;
- Bufor fosforanowy (5mM; pH=7);
- Filtry Centricon YM-3 *Millipore*;
- Żel krzemionkowy *Baker*;
- Żywica jonowymienna DEAE Sephadex *Sigma Aldrich*;

- Płytki do analitycznej chromatografii cienkowarstwowej - żel krzemionkowy 60 F<sub>254</sub>, grubość warstwy 0,25 mm, 10 x 20 i 20 x 20 cm, *Merck*;
- Płytki preparatywne do chromatografii cienkowarstwowej PLC – żel krzemionkowy 60 F<sub>254</sub>, grubość warstwy 1 mm, 20 x 20 cm, *Merck*.

### **1.2 Badane próbki**

kapusta zakupiona w okresie wiosennym tzw. młoda kapusta na terenie Polski (Gdańsk);

kapusta zakupiona w okresie jesiennym na terenie Polski (Gdańsk);

- kapusta zakupiona w okresie jesiennym (Gdańsk) pochodząca z gospodarstwa ekologicznego „Fohat” (uprawy ekologiczne- uprawy bez użycia nawozów sztucznych i pestycydów, przy zachowaniu żyzności gleby oraz bioróżnorodności);
- kapusta zakupiona w okresie jesiennym na terenie Anglii (Leeds);
- kapusta zakupiona w okresie jesiennym na terenie Belgii (Bruksela);
- zakupiona w okresie jesiennym na terenie Niemiec (Hamburg);
- czerwona kiszona kapusta zakupiona w lokalnym sklepie z warzywami (Gdańsk).

### **1.3 Aparatura**

- Termoblok *IVElectronic*;
- Liofilizator model Alpha-2-4 *Christ*;
- Spektrofotometr UV/VIS model 6300 *Jenway*;
- Wyparka obrotowa model Laborota 4000 *Heidolph*;
- Chromatograf cieczowy model 1100 *Agilent* wyposażony w detektor DAD oraz MS;
- Chromatograf cieczowy model 1200 *Agilent* wyposażony w detektor DAD oraz kolektor frakcji\*;
  - Kolumna chromatograficzna 125 x 3 mm z wypełnieniem *LiChrosphere* RP-18e o średnicy ziaren  $d_p=5\mu\text{m}$ ;
  - Kolumna chromatograficzna *Zorbax* RX-Sil 4,6 mm ID x 250 mm (5  $\mu\text{m}$ ).
- Spektrometr mas MAT 95 firmy *Finnigan* MAT GmbH (Brema, Niemcy)

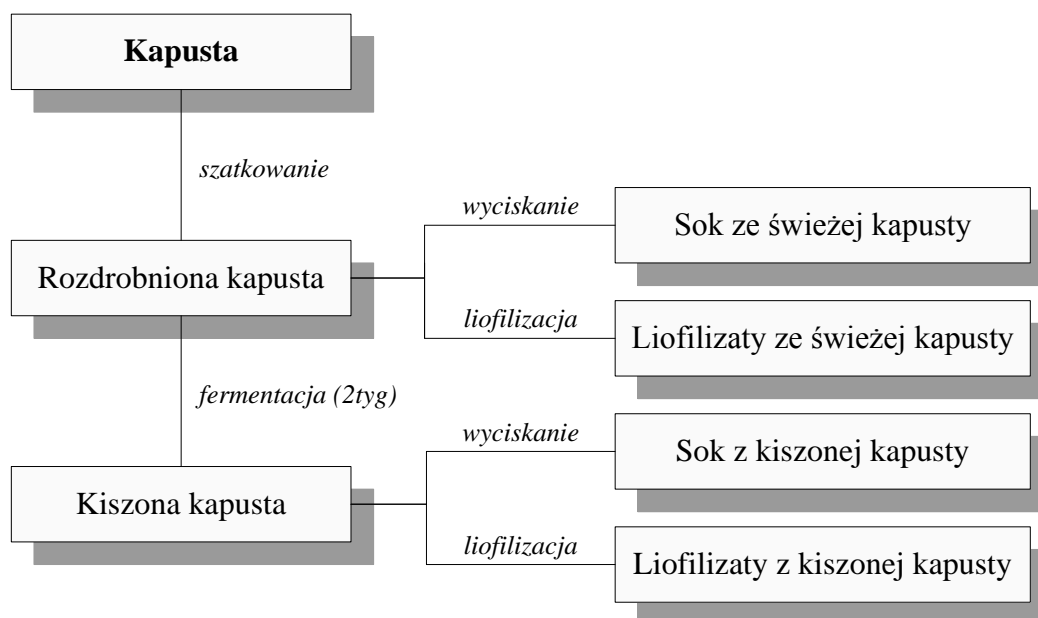
## **2. Opis stosowanych procedur analitycznych**

---

\* Centrum Doskonałości – Chem-Bio-Farm, Wydział Chemiczny PG

## 2.1 Przygotowanie próbek kapusty do badań

Próbki młodej kapusty oraz kapusty pochodzącej z Anglii, Belgii i Niemiec po rozdrobieniu poddano procesowi liofilizacji. Próbki polskiej kapusty pochodzącej ze standardowej i ekologicznej uprawy poddano obróbce, której etapy przedstawiono schematycznie na rysunku 1. Do procesu fermentacji poszatkowaną kapustę pochodzącą ze standardowej i ekologicznej uprawy mieszano z NaCl (20 g/kg) i umieszczono w oddzielnych glinianych naczyniach. Proces fermentacji prowadzono przez 2 tygodnie. W trakcie fermentacji pobierano próbki kapusty, z których otrzymywano soki oraz liofilizaty (w 4, 7, 11 i 14 dniu procesu dla kapusty z uprawy standardowej oraz w 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13 i 14 dniu fermentacji dla kapusty z uprawy ekologicznej).



**Rys. 1** Schemat przygotowania do dalszych analiz próbek kapusty pochodzącej ze standardowej i ekologicznej upraw.

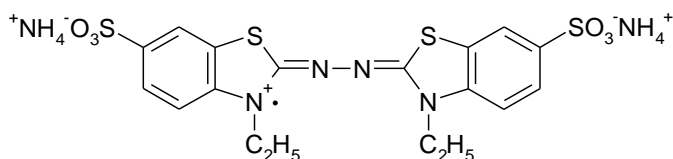
## 2.2 Oznaczenie substancji bioaktywnych w kapuście

### 2.2.1 Techniki i metodyki stosowane do oznaczania substancji bioaktywnych w kapuście

#### 2.2.1.1 Metodyki oznaczania właściwości przeciwutleniającej próbek kapusty

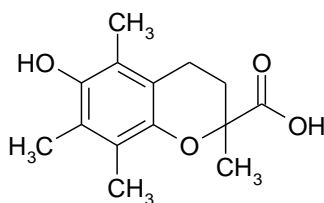
##### - Test ABTS

Zasada tej techniki analitycznej polega na spektrofotometrycznym pomiarze spadku wartości absorbancji rodnika ABTS (Rys. 2) wywołanego przez działanie przeciwutleniacza. Na etapie wytwarzania kationorodnika ABTS wykorzystywano nadsiarcezan sodu. Związek ABTS reaguje z nadsiarcezanem sodu w stosunku stechiometrycznym (1:0,5). Zazwyczaj stosuje się jednak nadmiar tego związku w celu uniknięcia jego całkowitego utlenienia. Utlenienie związku ABTS następuje natychmiast, jednak maksymalną wartość absorbancji i pełną stabilność rodnik uzyskuje po upływie 6 godzin dlatego roztwór kationorodnika sporządzano 24 godziny przed rozpoczęciem pomiarów.



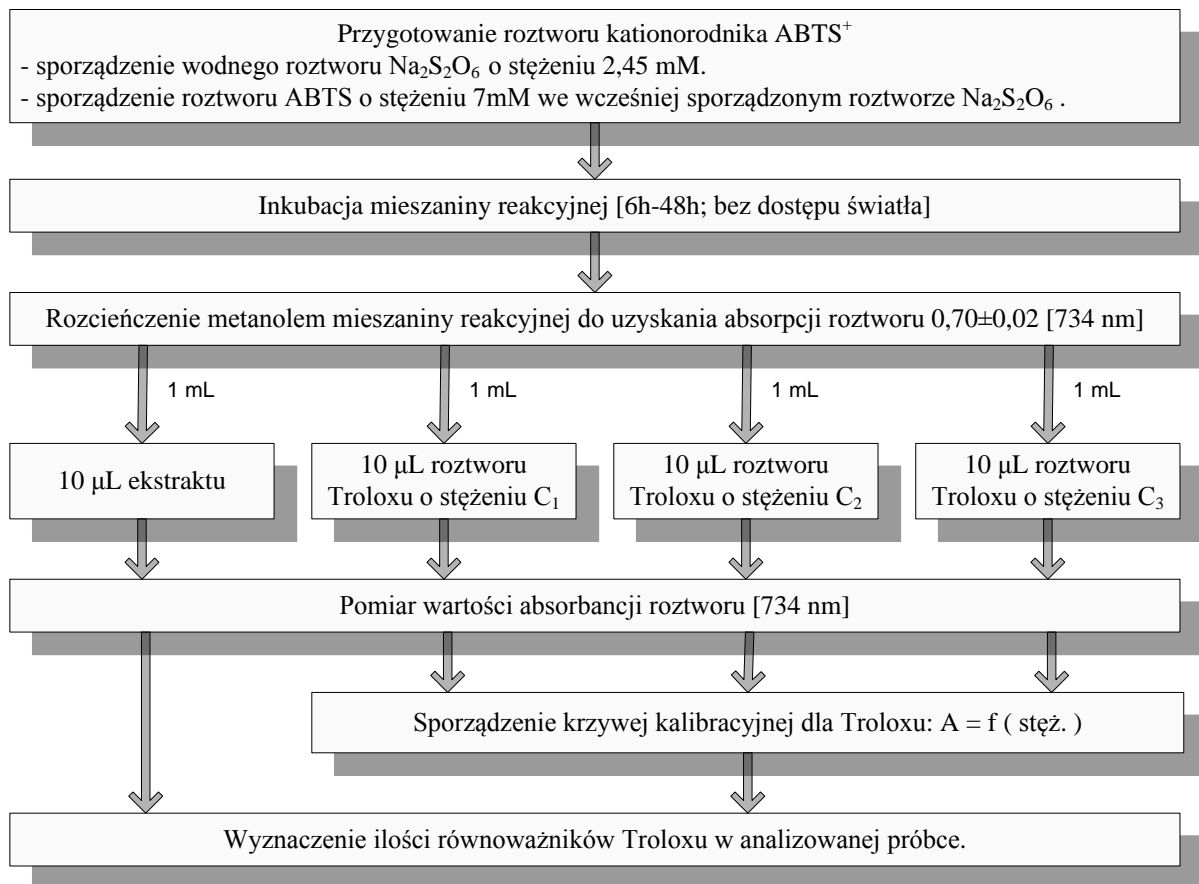
**Rys. 2** Struktura kationorodnika ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulofonian)].

Pomiaru wartości absorbancji poszczególnych ekstraktów inkubowanych z roztworem rodnika ABTS dokonywano przy długości fali 734 nm. Zdolność przeciwutleniającą poszczególnych próbek ekstraktów bądź soków przeliczano na ilość równoważników Troloxu przypadających na próbkę liofilizatu kapusty o masie 1 g (sucha masa) bądź na 1mL soku. (Trolox jest to syntetyczna substancja wzorcowa będąca hydrofilową pochodną witaminy E wykazująca silną aktywność przeciwutleniającą – patrz. rys.3).

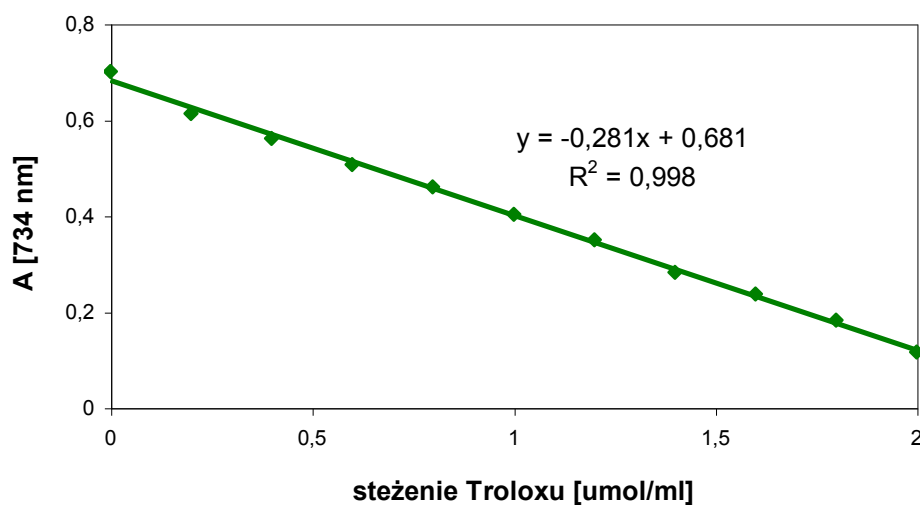


**Rys. 3** Struktura Troloxu (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksyłowy).

Na schemacie (Rys. 4) przedstawiono poszczególne etapy stosowanej procedury analitycznej. Wartość potencjału przeciwutleniającego analizowanych próbek przeliczano na ilość równoważników Troloxu korzystając z równań odpowiednich krzywych kalibracyjnych (Rys. 5).



**Rys. 4** Schemat postępowania stosowany podczas pomiaru zdolności przeciwutleniającej próbek ekstraktów rozpuszczalnych bądź soków przy użyciu testu ABTS.

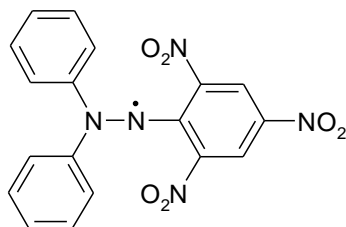




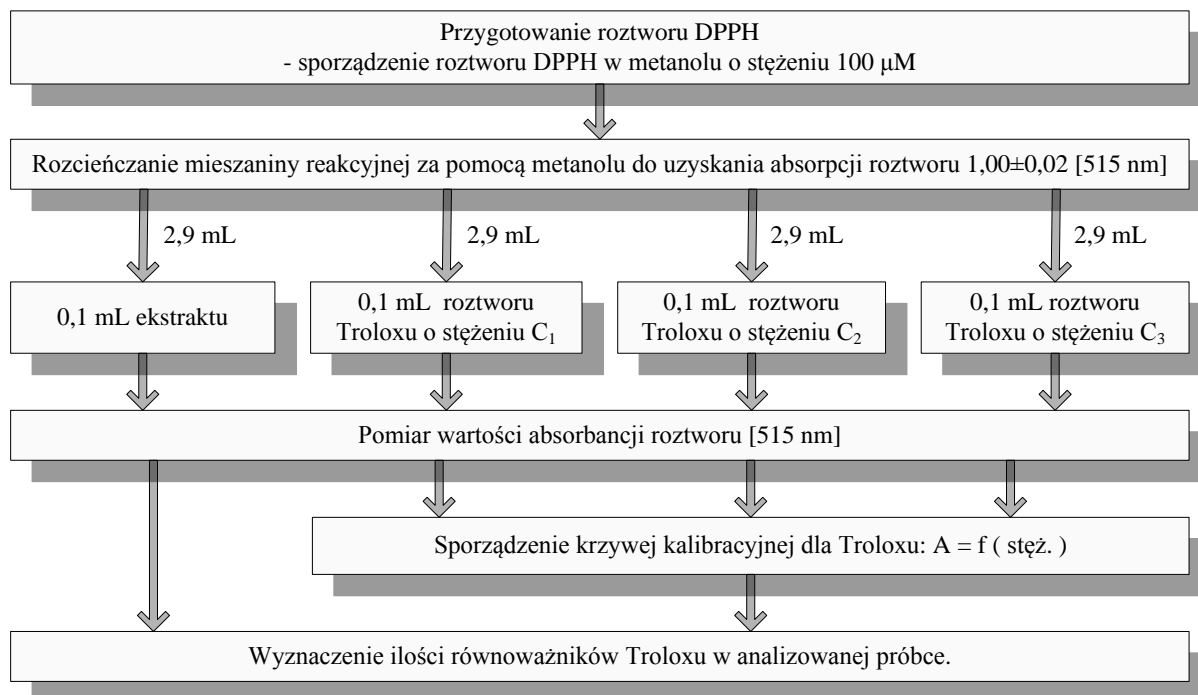
**Rys. 5** Krzywa kalibracyjna dla metanoleowego roztworu Troloxu uzyskana w wyniku zastosowania testu ABTS.

### - Test DPPH

Związek DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) - (Rys. 6) jest jednym z kilku stabilnych i komercyjnie dostępnych rodników azowych. Roztwory wodne tego związku charakteryzują się purpurową barwą z maksimum absorpcji przy długości fali 515 nm. W trakcie reakcji redukcji pod wpływem aktywności przeciwutleniaczy barwa roztworu zanika; postęp reakcji można monitorować spektrofotometrycznie przy długości fali równej 515 nm. Na schemacie (Rys. 7) przedstawiono poszczególne etapy odpowiedniej procedury analitycznej.

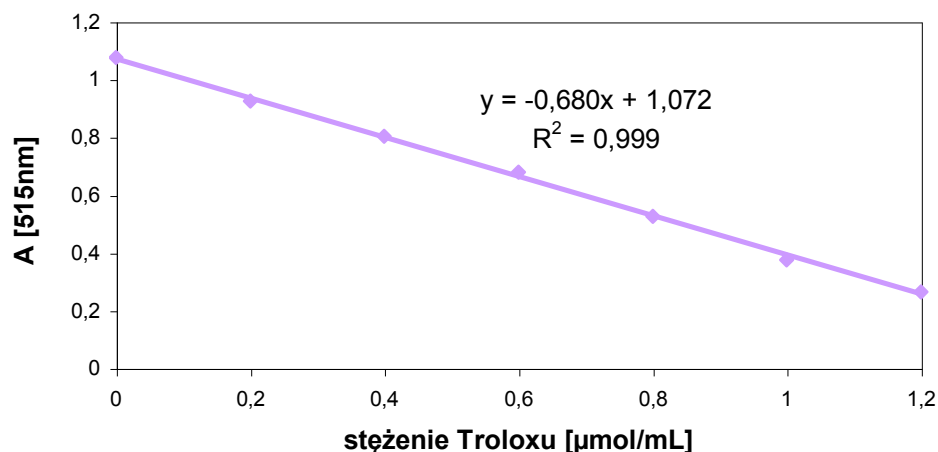


**Rys. 6** Struktura chemiczna rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl).



**Rys. 7** Schemat postępowania wykorzystywany podczas pomiaru zdolności przeciwutleniającej próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych przy użyciu testu DPPH.

Wartość potencjału przeciwutleniającego analizowanych próbek przeliczano na ilość równoważników Troloxu korzystając z równań odpowiednich krzywych kalibracyjnych (Rys. 8).



**Rys. 8** Krzywa kalibracyjna dla metanolowego roztworu Troloxu uzyskana w wyniku zastosowania testu DPPH.

#### - Test PCL

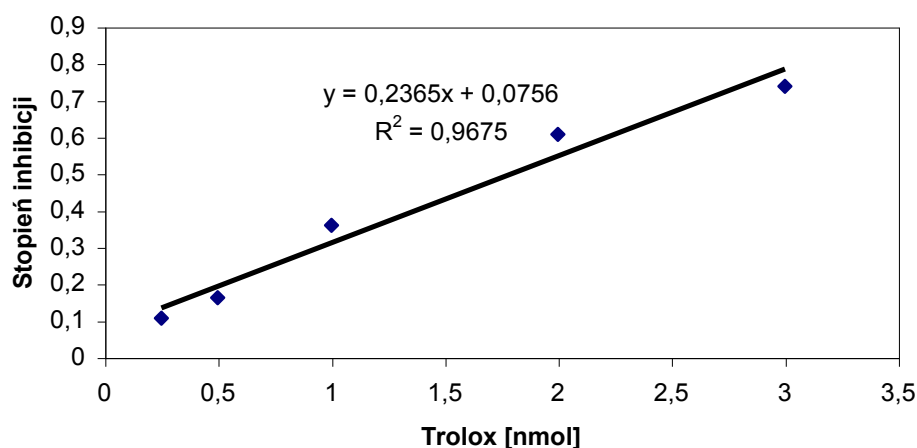
Badanie aktywności przeciwutleniającej z zastosowaniem metody chemiluminescencyjnej wykonano dzięki uprzejmości i pomocy pracowników Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie.

Zdolność przeciwutleniająca lipofilowych antyoksydantów oznaczono dzięki zastosowaniu zestawu ACL-kit (*AnalytikJena, Jena, Niemcy*). Zasada tego testu oparta jest na wykorzystaniu wzbudzonych z odpowiedniego znacznika form emitujących chemiluminescencję w wyniku reakcji z rodnikami tlenowymi. Każdy związek, który ma zdolność reagowania z rodnikami tlenowymi będzie hamował promieniowanie. W zastosowanym teście rodniki generowane były w systemie poprzez wzbudzenie fotochemiczne. Jako znacznika użyto luminol, którego zadanie polega na reakcji z utleniaczami w celu zamieniania ich słabej emisji na emisję intensywną, długotrwałą i stabilną. Ilościowo zdolność przeciwutleniająca przeliczano na ilość równoważników Troloxu korzystając z równań odpowiednich krzywych kalibracyjnych (Rys. 9).

Do kuwety reakcyjnej odmierzano:

- metanol (2,3 mL);
- roztwór buforowy (200  $\mu\text{L}$ );
- sensybilizator - reagent detekcyjny (25  $\mu\text{L}$ );
- roztwór przeciwutleniacza – w tym przypadku odpowiednio rozcieńczony za pomocą metanolu sok z kapusty (20  $\mu\text{L}$ ).

Po wymieszaniu roztwór poddawano analizie. Czas rejestracji krzywej emisji światła wynosił 180 s.



**Rys. 9** Krzywa kalibracyjna dla metanolowego roztworu Troloxu uzyskana w wyniku zastosowania testu PCL.

#### 2.2.1.2 Wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej (TLC) do monitorowania profilu przeciwutleniaczy

Próbki ekstraktów rozpuszczalnikowych nakładano za pomocą szklanej kapilary punktowo na płytki do TLC pokryte warstwą żelu krzemionkowego. Czynność tą powtarzano kilkakrotnie za każdym razem susząc miejsce dozowania próbek. Chromatogramy rozwijano stosując jako fazę ruchomą mieszaninę chloroform/metanol w stosunku 9:1 (v/v). Wizualizacji rozdzielonych związków dokonywano spryskując płytki (z rozwiniętym chromatogramem) za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteu* (146) bądź też za pomocą metanolowych roztworów rodników ABTS i DPPH (0,2 %) (147, 148) Wysuszone chromatogramy dokumentowano za pomocą skanera laserowego.

### 2.2.1.3 Oznaczanie zawartości glukozynolanów w próbkach kapusty przy użyciu chromatografii cieczowej (wg PPN-EN ISO 9167 – 1 : 1999)

Glukozynolany są ekstrahowane za pomocą metanolu, a następnie oczyszczone i poddawane enzymatycznej desulfatacji na żywicy jonowymiennej. Oznaczanie zawartości glukozynolanów wykonuje się korzystając z wysokosprawnego chromatografu cieczowego wyposażonego w detektor UV z zastosowaniem kolumn do pracy w odwróconym układzie faz (RP) i elucji gradientowej.

#### **I. Przygotowanie i oczyszczanie roztworu sulfatazy**

##### Przygotowanie wodnego roztworu mrówczanu imidazolu o stężeniu 6M

Rozpuszczono 204 g imidazolu w 113 mL kwasu mrówkowego w kolbie miarowej o pojemności 500 mL. Roztwór uzupełniono wodą do kreski.

##### Przygotowanie wymiennicza jonowego

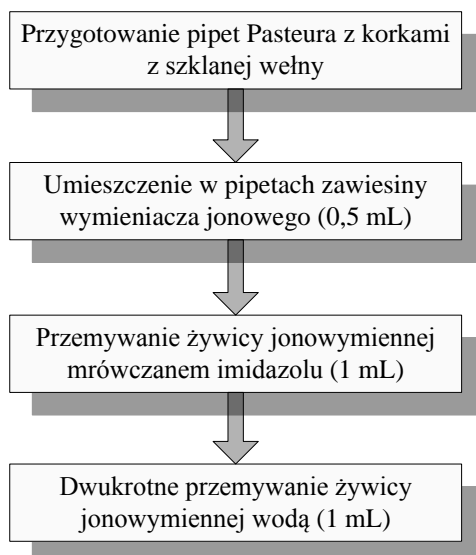
Zmieszano 10 g żelu DEAE Sephadex A25 kwasem octowym (5 mL) o stężeniu 2 M. Zawiesinę pozostawiono do opadnięcia poczym dodawano dalej roztwór kwasu do momentu, w którym jego objętość przekroczyła dwukrotnie objętość osadu.

##### Preparatyka kolumn jonowymiennych

Szyjki pipet Pasteura zatykano korkami z wełny szklanej. Pipety umieszczano w statywie i do każdej wlewano odpowiednią porcję wymiennicza jonowego, tak by po odcieknięciu wody pozostało około 0,5 mL żywicy.

Do każdej pipety wlewano po 1 mL roztworu mrówczanu imidazolu, a następnie kolumny przemywano dwukrotnie 1 mL wody.

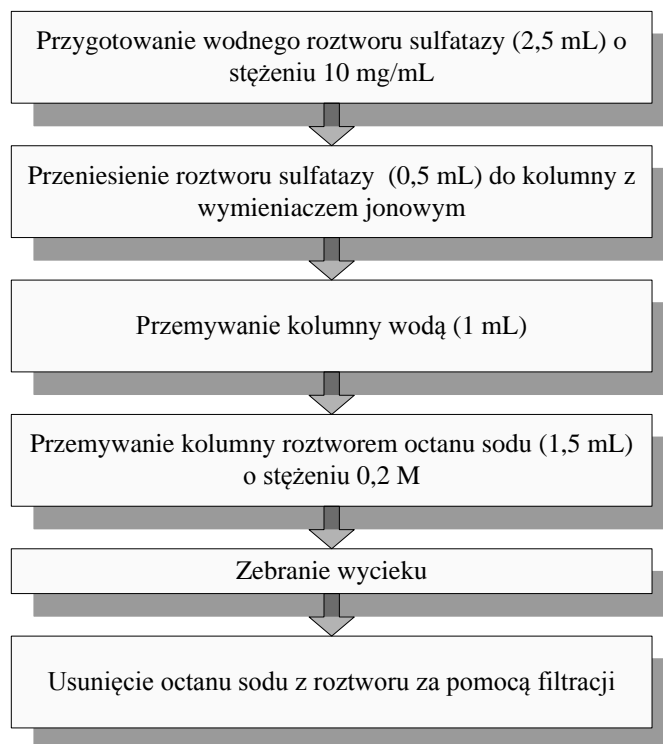
Poszczególne etapy procedury wykorzystywanej podczas tego fragmentu badań przedstawiono na schemacie (Rys. 10).



**Rys. 10** Schemat postępowania wykorzystywany na etapie przygotowywania kolumn jonowymiennych stosowanych do procesu oczyszczania sulfatazy.

### Oczyszczanie sulfatazy

Schemat postępowania wykorzystywany na tym etapie badań przedstawiono na rysunku 11.



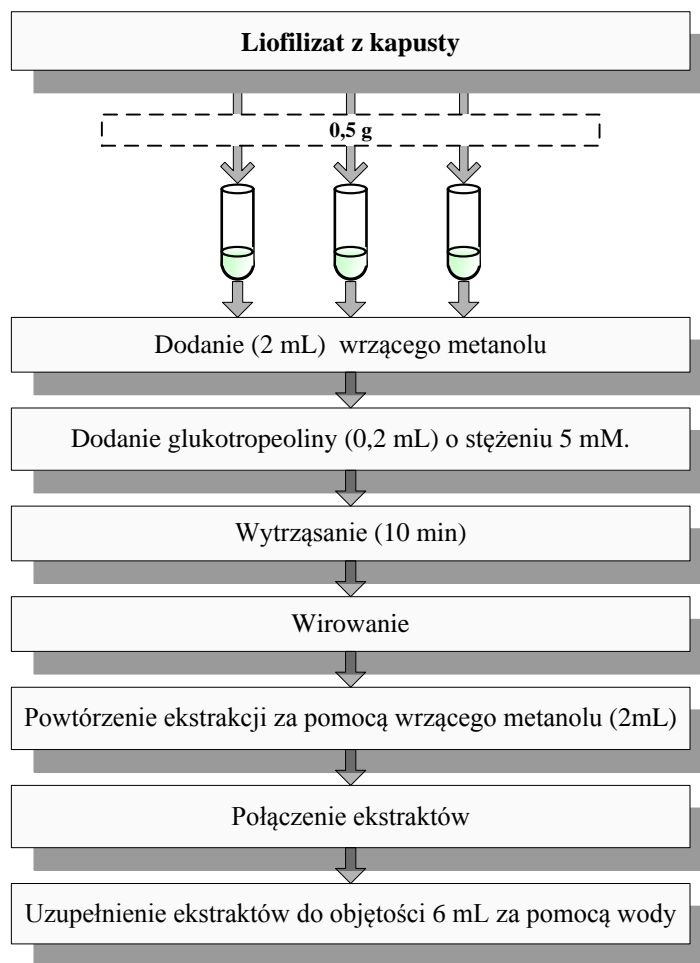
**Rys. 11** Schemat postępowania wykorzystywany do procesu oczyszczania sulfatazy za pomocą kolumn jonowymiennych.

### Rozcieńczanie roztworu sulfatazy

Za pomocą pipety przenoszono próbkę oczyszczonej sulfatazy (1 mL) do kolby pomiarowej o pojemności 10 mL. Roztwór dopełniano wodą do kreski. Rozcieńczony roztwór sulfatazy przenoszono do fiolek o objętości 1 mL i przechowywano do momentu analizy w temperaturze  $-18^{\circ}\text{C}$ .

## **II. Ekstrakcja glukozyolanów z liofilizatów otrzymanych z kapusty**

Schemat postępowania wykorzystywany podczas ekstrakcji glukozyolanów z próbek liofilizatów przedstawiono na schemacie (Rys. 12).



**Rys. 12** Schemat postępowania wykorzystywany na etapie ekstrakcji glukozyolanów z próbek liofilizatu z kapusty.

### III. Oczyszczanie i desulfatacja

#### Przygotowanie kolumn jonowymiennych

Dla każdego z otrzymanych ekstraktów przygotowano po jednej pipecie Pasteura zatkniętej korkiem z szklanej wełny. Pipety umieszczano pionowo w statywie po czym w każdej z nich umieszczano odpowiednią ilość (0,5 mL) dobrze wymieszanej żywicy jonowymiennej. Po jej opadnięciu, każdą z pipet przemywano za pomocą roztworu mrówczanu imidazolu (2 mL) a następnie dwukrotnie za pomocą wody (1 mL).

#### Oczyszczanie i desulfatacja

Do tak przygotowanych kolumniek ekstrakcyjnych наносzono próbki ekstraktów (w taki sposób by nie zaburzyć powierzchni żywicy) i pozostawiano aż do momentu odcieknięcia. Wtedy do kolumniek wprowadzano roztwór oczyszczonej sulfatazy (75  $\mu$ L). Tak

przygotowane kolumnienki poddawano inkubacji w temperaturze pokojowej (przez 12 h). Otrzymane desulfoglukozytolany wmywano z kolumnienek dwukrotnie za pomocą wody (1 mL), pozwalając po każdorazowym dodaniu wody na jej odcieknięcie.

#### IV. Analiza próbek desulfoglukozytolanów z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD

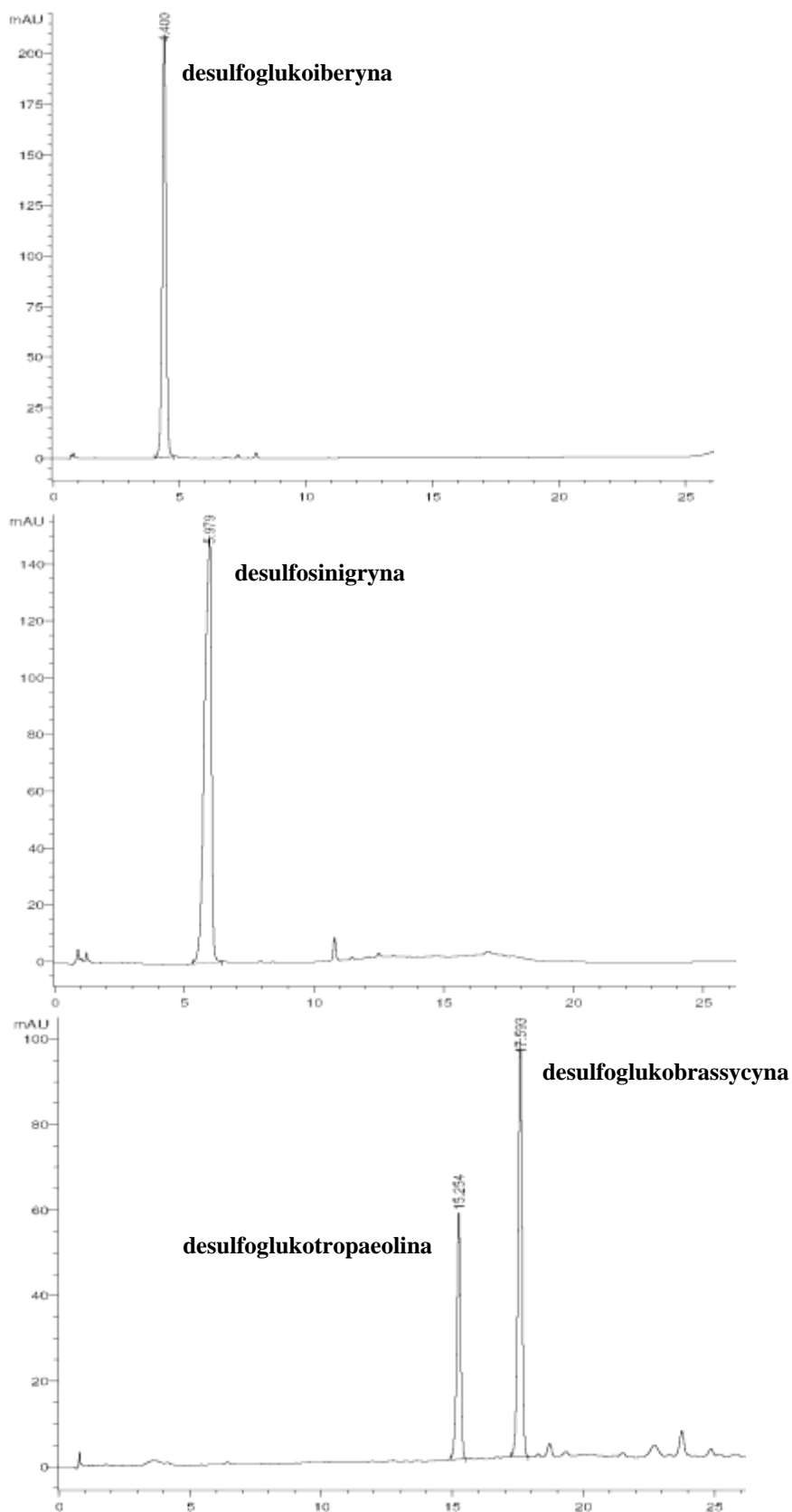
W tabeli 1 zestawiono parametry toku postępowania oraz parametry pracy układu HPLC-DAD-MS w trakcie prowadzenia badań próbek ekstraktów zawierających desulfoglukozytolany.

**Tabela 1** Podstawowe parametry toku postępowania analitycznego na etapie chromatograficznego oznaczania desulfoglukozytolanów w próbkach ekstraktów z kapusty.

Parametr	Wartość
Objętość dozowanych próbek	50 $\mu$ L
Skład fazy ruchomej	<b>A</b> – woda, <b>B</b> – 20% acetonitryl
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	1 mL/min
Program elucji	0 min $\rightarrow$ 100% składnika A; 1min-25min $\rightarrow$ 0-100% składnika B
Temperatura kolumny	30°C
Długość fali	229 nm
Sposób jonizacji	API-ES
Tryb pracy detektora MS	negatywny
Fragmentacja	m/z=60-1000
Przepływ gazu suszącego (azot)	12 L/min
Ciśnienie gazu w nebulizerze	50 psi
Temperatura gazu suszącego	350°C
Temperatura kwadrupola	99°C

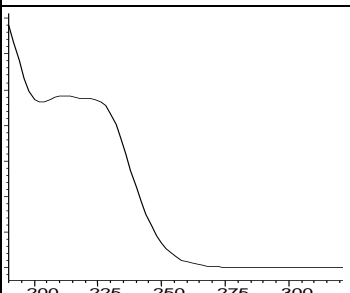
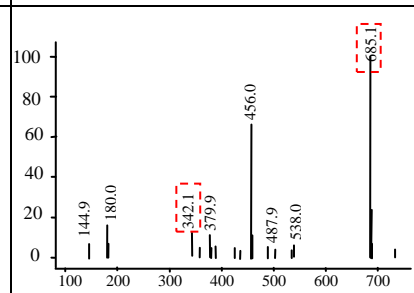
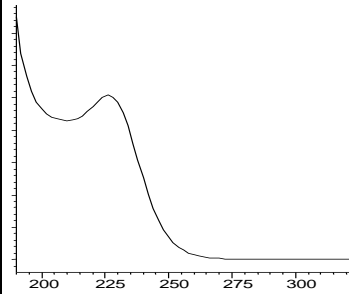
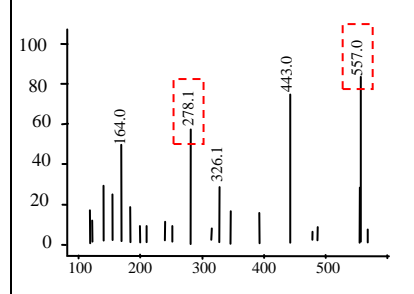
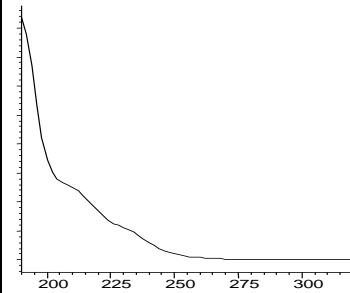
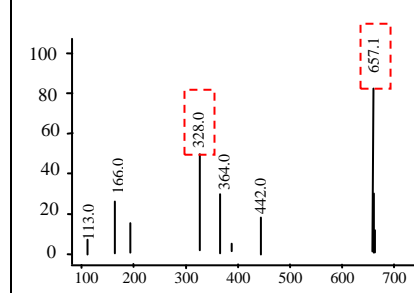
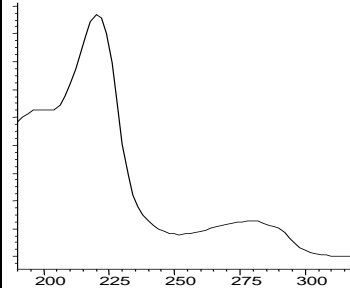
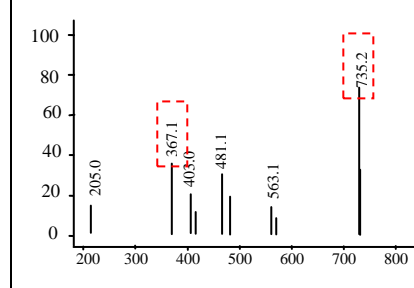
Na podstawie parametrów wyznaczonych dla substancji wzorcowych (desulfoglukoiberyny, desulfosinigryny, desulfoglukobrassyliny i desulfoglukotrapeoliny) (Rys. 13), (Tabela 2) oraz posługując się informacjami dotyczącymi kolejności elucji poszczególnych DS-GLS zawartymi w normie (149) zidentyfikowano glukozytolany głównie występujące w próbkach ekstraktów z kapusty (Rys. 14), (Tabela 3).



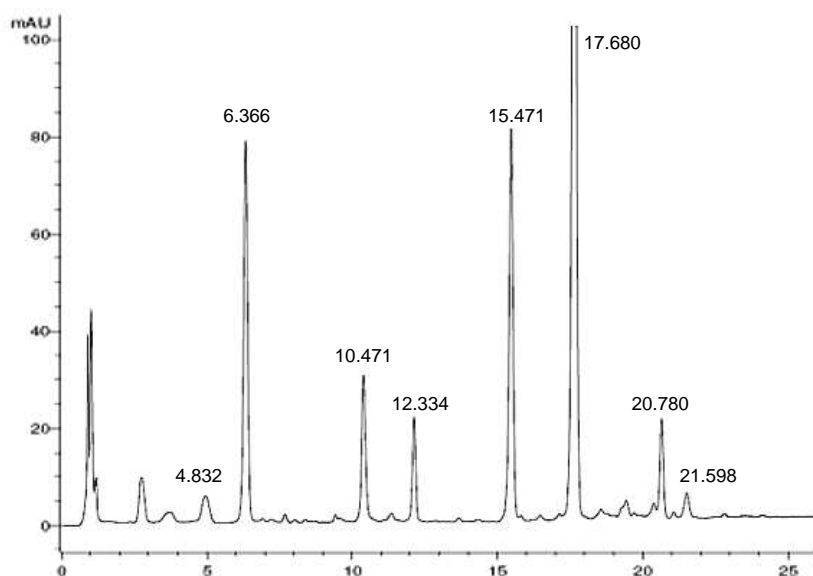


**Rys. 13** Chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek roztworów wzorcowych DS-GLS (DS-GIB; DS-SIN, DS-GTL; DS-GBS) przy użyciu techniki HPLC-DAD ( $\lambda=229$  nm).

**Tabela 2** Parametry charakteryzujące substancje wzorcowe desulfoglukozynolanów poddane analizie z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD-MS

DS-GLS/czas retencji	Masa molowa	Widmo UV	Widmo MS
DS-GIB / tr=4,8 min	343		
DS-SIN / tr=6,4 min	279		
DS-GTL tr= 15,5 min	329		
DS-GBS tr=17,7 min	368		

DS-GIB - desulfoglukoiberyna; DS-SIN – desulfosinigryna; DS-GTL - desulfoglukotropaeolina- wzorec wewnętrzny; DS-GBS - desulfoglukobrassycyna.



**Rys. 14** Przykładowy chromatogram przedstawiający profil desulfoglukozynolanów charakterystyczny dla kapusty białej otrzymany w wyniku zastosowania techniki HPLC-DAD (badania przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w normie PPN-EN ISO 9167–1:1999).

**Tabela 3** Parametry charakteryzujące desulfoglukozynolany zidentyfikowane podczas analizy próbek ekstraktów z kapusty białej przy użyciu techniki HPLC-DAD-MS.

GLS	Masa molowa GLS	Masa molowa DS-GLS	Współczynnik korekcyjny Kg	Czas retencji [min]	Charakterystyczne jony
<b>GIB</b>	422	343	1,07	4,8	342, 685
<b>SIN</b>	358	279	1,00	6,4	278, 557
<b>GNP</b>	372	293	1,00	10,5	292, 585
<b>4OHGBS</b>	463	384	0,28	12,3	383, 767
<b>GBS</b>	447	368	0,29	17,7	367, 735
<b>MeOHGBS</b>	477	398	0,25	20,8	397, 795
<b>NeoGBS</b>	477	398	0,20	21,6	397, 795

GIB- glukoiberyna, SIN- sinigrina; GNP- glukonapina; 4OHGBS- hydroksyglukobrassycyna; GTL- glukotropaeolina- wzorzec wewnętrzny; GBS- glukobrassycyna; MeOHGBS- metoksyglukobrassycyna; NeoGBS- neoglukobrassycyna)

Jako wzorzec wewnętrzny wybrano glukotropaeolinę ponieważ wcześniej nie stwierdzono występowania tego glukozyolanu w próbkach kapusty (77). Zawartość każdego z glukozyolanów (wyrażoną w mikromolach na gram suchej masy) produktu obliczano korzystając z poniższej zależności:

$$x = \frac{A_g}{A_s} \cdot \frac{n}{m} \cdot K_g \quad /1$$

gdzie:

$A_g$ - powierzchnia pików chromatograficznych odpowiadająca danemu analitowi [j.u.p];

$A_s$ - powierzchnia pików chromatograficznych odpowiadająca desulfoglukotropaeolinie [j.u.p];

$K_g$ - współczynnik korekcyjny desulfoglukozyolanu,

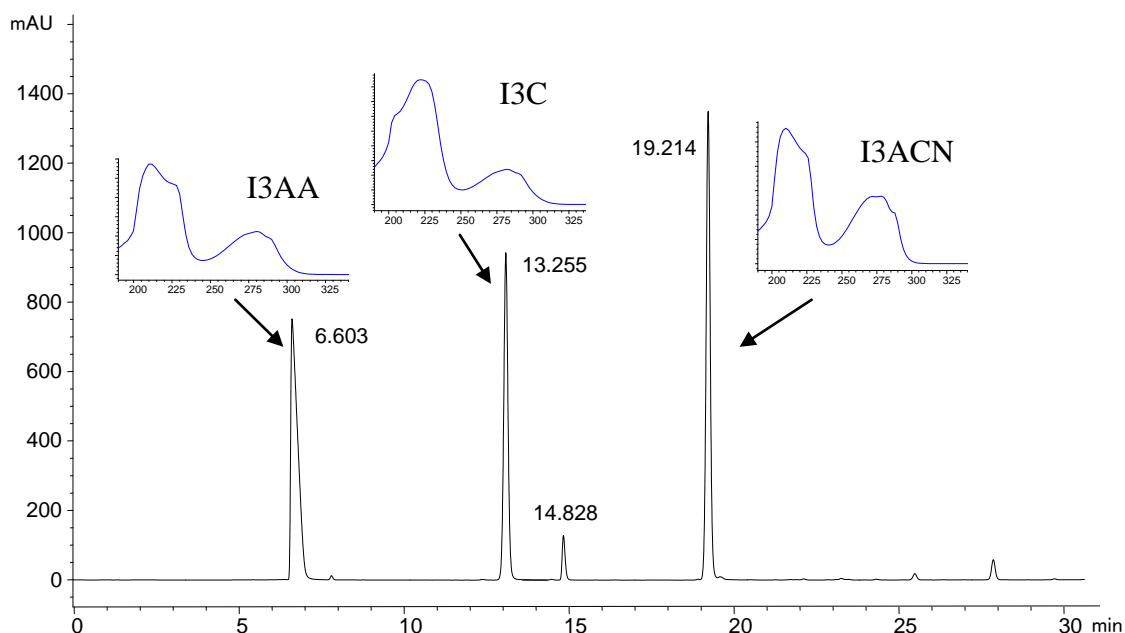
$m$ - masa próbki [g];

$n$ - ilość wzorca wewnętrznego dodanego do próbki [mikromole];

$x$ - zawartość odpowiedniego glukozynolanu [ $\mu\text{mol/g s.m}$ ].

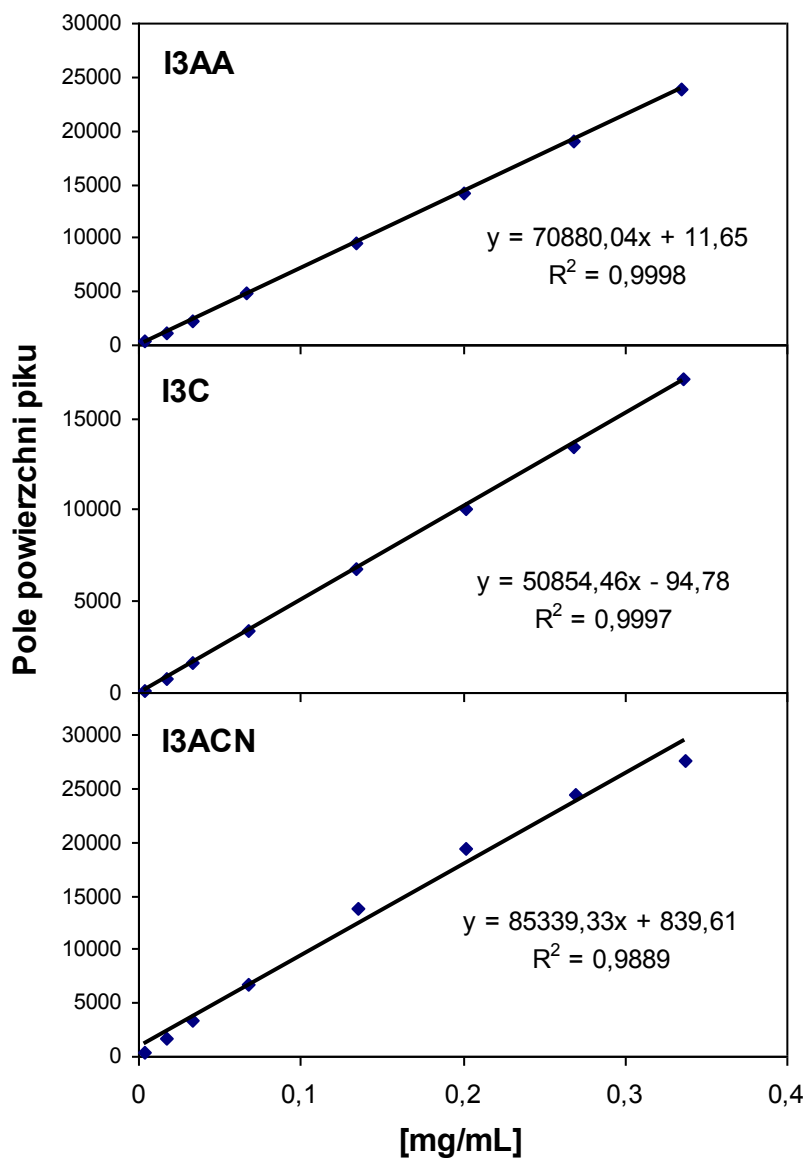
#### 2.2.1.4 Oznaczenie indolowych produktów rozpadu GLS w próbkach kapusty

Indolowe produkty rozpadu glukozynolanów ekstrahowano z soków kapusty (10 mL) za pomocą 3 porcji octanu etylu (5 mL). Połączone ekstrakty odparowywano przy zastosowaniu wyparki obrotowej. Suchą pozostałość rozpuszczano ponownie w mieszaninie acetonitrylu i buforu fosforanowego (1:1 v/v; 1 mL; pH=7). Tak przygotowane ekstrakty poddawano następnie analizie przy użyciu techniki HPLC-DAD. Identyfikacji najważniejszych indolowych produktów rozpadu glukozynolanów dokonywano na podstawie czasów retencji oraz widm UV substancji wzorcowych: kwasu indolo-3-octowego (I3AA), indolo-3-karbinolu (I3C) oraz indolo-3-acetonitrylu (I3ACN) (Rys. 15).



**Rys. 15** Chromatogram oraz widma UV substancji wzorcowych indolowych produktów rozpadu glukozynolanów (I3AA; I3C; I3ACN) uzyskany w wyniku analizy odpowiednich próbek przy użyciu techniki HPLC-DAD.

Korzystając z równań krzywych kalibracyjnych wyznaczonych na podstawie wyników analizy próbek metanolowych roztworów substancji wzorcowych (zakres stężeń: 3-300  $\mu\text{g/mL}$ ) obliczano zawartość I3AA, I3C i I3ACN w poszczególnych ekstraktach uzyskanych z soków z kapusty (Rys. 16).



**Rys. 16** Krzywe kalibracyjne uzyskane w wyniku analizy odpowiednich próbek metanolowych roztworów indolowych produktów rozpadu glukozynolanów (I3AA; I3C; I3ACN) w wyniku zastosowania techniki HPLC-DAD.

Podczas analizy chromatograficznej próbek ekstraktów z kapusty oraz roztworów substancji wzorcowych indolowych produktów rozpadu glukozynolanów zastosowano następujące warunki:

- objętość próbek dozowanych do układu chromatograficznego była równa 30  $\mu\text{L}$ ;
- natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej wynosiło 1 mL/min;
- fazę ruchomą stanowiła mieszanina roztworów: **A** – bufor fosforanowy (5mM, pH=7), **B** – 80% acetonitryl w buforze fosforanowym (5mM, pH=7).
- temperatura kolumny wynosiła 30°C;
- chromatogramy rejestrowano przy długości fali równej 280 nm.

Parametry stosowanego programu gradientowego przedstawiono w tabeli 4.

**Tabela 4** Program elucji stosowany w trakcie analizy próbek indolowych produktów rozpadu glukozynolanów z wykorzystaniem techniki HPLC - DAD.

Czas [min]	Udział składnika A w fazie ruchomej [%]	Udział składnika B w fazie ruchomej [%]
0	100	0
35	0	100

2.2.2. *Opis doświadczeń wykonywanych na etapie oznaczania substancji bioaktywnych w kapuście*

2.2.2.1 Porównanie właściwości przeciwutleniających ekstraktów kapusty białej pochodzącej z różnych upraw przy użyciu testów ABTS i DPPH

Przygotowano próbki liofilizatów z kapusty pochodzącej z kilku krajów Europy (Anglia, Belgia, Niemcy, Polska), kapusty młodej- zebranej wiosną oraz kapusty pochodzącej z uprawy ekologicznej. Z liofilizatów uzyskanych z każdego rodzaju kapusty odważano po 3 próbki o masie około 1 g. Próbki poddawano następnie ekstrakcji za pomocą metanolu (8 mL). Zebrane ekstrakty poddawano badaniom przy użyciu testów ABTS i DPPH.

2.2.2.2 Porównanie profili glukozynolanów kapusty białej pochodzącej z różnych upraw przy użyciu techniki HPLC-DAD

Przygotowano próbki liofilizatów z kapusty pochodzącej z kilku krajów Europy (Anglia, Belgia, Niemcy, Polska), kapusty młodej- zebranej wiosną oraz kapusty pochodzącej z uprawy ekologicznej. Z liofilizatów uzyskanych z każdego rodzaju kapusty odważano po 3 próbki o masie około 0,5 g. W celu oznaczenia glukozynolanów próbki poddawano następnie obróbce zgodnie ze schematem opisanym w punkcie 2.2.1.3.

### 2.2.2.3 Badanie wpływu okresu fermentacji na właściwości przeciwutleniające kapusty

#### **- Soki**

Próbki soków z kapusty pochodzącej ze standardowej uprawy zebrane w 4, 7, 11 i 14 dniu fermentacji oraz próbki soków z kapusty pochodzącej z ekologicznej uprawy zebrane w 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13 i 14 dniu procesu poddawano badaniom przy użyciu testów ABTS i DPPH. Dodatkowo próbki soku o objętości 1 mL liofilizowano, ekstrahowano za pomocą metanolu (0,5 mL) i poddawano analizie z wykorzystaniem techniki TLC. Uzyskane chromatogramy wizualizowano korzystając z odczynnika *Folina-Ciocalteu*.

#### **- Liofilizaty**

Próbki kapusty pochodzącej ze standardowej uprawy pobrane w 4, 7, 11 i 14 dniu fermentacji oraz próbki kapusty pochodzącej z ekologicznej uprawy zebrane w 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13 i 14 dniu procesu poddawano procesowi liofilizacji. Każdą z próbek (o masie 1g) poddawano ekstrakcji za pomocą metanolu (4 mL). Po zebraniu ekstraktów (8 mL) dla każdego z roztworów dokonywano pomiaru absorbancji w wyniku zastosowania testów ABTS i DPPH. Jednocześnie ekstrakty poddawano analizie za pomocą techniki TLC. Uzyskane chromatogramy wizualizowano korzystając z odczynnika *Folina-Ciocalteu* oraz roztworów rodników ABTS i DPPH.

### 2.2.2.4 Badanie wpływu temperatury na właściwości przeciwutleniające świeżej i kiszzonej kapusty

#### **- Soki**

Próbki soków (4mL) ze świeżej i kiszzonej (przez okres 2 tygodni) kapusty ze standardowej i ekologicznej uprawy umieszczano w szklanych fiolkach o objętości 11 mL. Po zakorkowaniu umieszczano je w termoreaktorze nastawionym na temperaturę 100°C. W przypadku próbek soków kapusty pochodzącej ze standardowej uprawy ogrzewanie prowadzono przez 15 godzin natomiast dla soków z kapusty ekologicznej proces ten prowadzono przez 24 godziny. Co godzinę wyjmowano po trzy fiołki zawierające próbki soków ze świeżej i kiszzonej kapusty pochodzącej ze standardowej i ekologicznej uprawy. Dla każdego z roztworów dokonywano pomiaru absorbancji wykorzystując do tego testy ABTS i DPPH. Dodatkowo z każdej fiołki pobierano próbki soku (o objętości 1 mL), który po liofilizacji i ekstrakcji za pomocą metanolu (0,5 mL) poddawano analizie z wykorzystaniem techniki TLC. Uzyskane chromatogramy wizualizowano korzystając z odczynnika *Folina-Ciocalteu*.

### **- Liofilizaty**

Liofilizaty (1g) ze świeżej i kiszanej przez 2 tygodnie kapusty ze standardowej i ekologicznej uprawy umieszczano w szklanych fiolkach (o objętości 11 mL). Po zakorkowaniu wstawiano je do termoreaktora nastawionego na temperaturę 100°C. Prażenie prowadzono przez 80 minut. Co 10 minut wyjmowano po trzy fiołki zawierające liofilizaty z kiszanej i świeżej kapusty pochodzącej ze standardowej i ekologicznej uprawy. Każdą z próbek poddawano dwukrotnej ekstrakcji za pomocą metanolu (4 mL). Po zebraniu ekstraktów (8 mL) dla każdego z roztworów dokonywano pomiaru absorbancji z wykorzystaniem testów ABTS i DPPH. Jednocześnie ekstrakty poddawano analizie za pomocą techniki TLC. Uzyskane chromatogramy wizualizowano korzystając z odczynnika *Folina-Ciocalteu* oraz roztworów rodników ABTS i DPPH.

#### 2.2.2.5 Badanie wpływu fermentacji na zawartość glukozynolanów w próbkach kapusty

Próbki kapusty pochodzącej ze standardowej uprawy pobrane w 4, 7, 11 i 14 dniu fermentacji oraz próbki kapusty pochodzącej z ekologicznej uprawy zebrane w 4, 7, 8, 11 i 14 dniu procesu poddawano procesowi liofilizacji. Z liofilizatów uzyskanych z każdego rodzaju kapusty odważano po 3 próbki o masie około 0,5 g. W celu oznaczenia glukozynolanów próbki poddawano następnie obróbce zgodnie ze schematem opisanym w punkcie 2.2.1.3.

#### 2.2.2.6 Badanie wpływu wysokiej temperatury na zawartość glukozynolanów w próbkach kapusty

Liofilizaty (0,5 g) ze świeżej i kiszanej przez 2 tygodnie kapusty ze standardowej i ekologicznej uprawy umieszczano w szklanych fiolkach (o objętości 11 mL). Po zakorkowaniu wstawiano je do termoreaktora nastawionego na temperaturę 100°C. Prażenie prowadzono przez 80 minut. Co 20 minut wyjmowano po trzy fiołki zawierające liofilizaty z kiszanej i świeżej kapusty pochodzącej ze standardowej i ekologicznej uprawy. W celu oznaczenia glukozynolanów próbki poddawano następnie obróbce zgodnie ze schematem opisanym w punkcie 2.2.3.

#### 2.2.2.7 Badanie wpływu fermentacji i ogrzewania na zawartość indolowych produktów rozpadu glukozynolanów w próbkach kapusty

Próbki soków z kapusty pochodzącej ze standardowej uprawy zebrane w 4, 7, 11 i 14 dniu fermentacji oraz próbki soków z kapusty pochodzącej z ekologicznej uprawy zebrane w 4, 5, 7, 11, i 14 dniu procesu poddawano etapom opisanym w punkcie 2.2.1.4. Dodatkowo tej samej



procedurze poddawano próbki soków świeżej i kiszonej (14 dni) kapusty pochodzącej zarówno ze standardowej jak i ekologicznej uprawy, ogrzewane przez 4, 8, 12, 16 i 20 godzin w termoreaktorze nastawionym na temperaturę 100°C.

### ***2.3 Procedury wykorzystywane na etapie izolacji i identyfikacji substancji powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty***

#### *2.3.1 Zastosowanie preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) na etapie izolacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty*

Próbki liofilizatów (ok. 2g) z kiszonej kapusty oraz liofilizatów z świeżej kapusty prażonych przez 80 min w termoreaktorze nastawionym na 100°C poddawano ekstrakcji za pomocą metanolu (15 mL). Nadmiar rozpuszczalnika (około 10 ml) usuwano w strumieniu gazu obojętnego. W celu przeprowadzenia procesu izolacji pożądanej frakcji na płytki do preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej dozowano próbki stężonego ekstraktu metanolowego o objętości 5 mL. Za pomocą szklanej kapilary umieszczano próbkę w postaci plamek jedna obok drugiej tworząc pasmo na całej długości płytki. Chromatogram rozwijano stosując jako fazę ruchomą mieszaninę chloroform/metanol w stosunku 9:1 (v/v). Wizualizacji chromatogramu dokonywano za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteua* spryskując jedynie fragment (szerokości około 1 cm) wzdłuż płytki.

Charakterystyczną strefę sorbentu występującą na obszarze płytki nie potraktowanym za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteua* izolowano i trzykrotnie ekstrahowano. Do ekstrakcji analitu z żelu krzemionkowego używano metanolu (4 mL). Ekstrakcję powtarzano trzykrotnie wspomagając ją za każdym razem ultradźwiękami (5 min). W celu usunięcia pozostałości żelu krzemionkowego ekstrakt sączono przez teflonowe filtry (0,45 µm). Próbki ekstraktów odparowywano do sucha w strumieniu gazu obojętnego.

#### *2.3.2 Zastosowanie zestawu HPLC-NP sprzężonego z kolektorem frakcji na etapie izolacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty*

Próbki liofilizatów (ok. 2 g) z kiszonej kapusty oraz liofilizatów z świeżej kapusty prażonych przez 80 min w termoreaktorze nastawionym na 100°C poddawano ekstrakcji za pomocą metanolu (15 mL). Nadmiar rozpuszczalnika (około 10 mL) usuwano w strumieniu gazu obojętnego. Otrzymane ekstrakty mieszano z żelem krzemionkowym w stosunku 1:1.

Rozpuszczalnik odparowywano z żelu pod strumieniem azotu. Po wysuszeniu żel ekstrahowano za pomocą mieszaniny chloroform:metanol (8:1 v/v; 6 mL). Próbkę tak oczyszczonych ekstraktów poddawano dalszej analizie chromatograficznej.

Analizę chromatograficzną przeprowadzano w układzie faz normalnych. Zastosowano kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym - Zorbax Rx-SIL. Zastosowano elucję izokratyczną przy składzie fazy ruchomej 5% metanolu w chloroformie. Badania prowadzono przy natężeniu przepływu strumienia fazy ruchomej wynoszącym 1 mL/min. Chromatogramy rejestrowano przy długości fali  $\lambda=254$  nm.

### 2.3.3. Wykorzystanie wysokorozdzielczej spektroskopii mas do identyfikacji bioaktywnych związków powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty

Próbki ekstraktów zawierające anality, które udało się wyizolować z próbek kapusty z wykorzystaniem techniki PTLC, odparowane do sucha, wprowadzono bezpośrednio do źródła jonów spektrometru mas. W trakcie ogrzewania próbki od 30 do 300°C, rejestrowano kolejne widma mas. Parametry pracy spektrometru mas podczas rejestrowania widm zestawiono w tabeli 5.

**Tabela 5** Parametry spektrometru mas w trakcie rejestracji widm EI.

Parametr	Wartość
Temperatura źródła jonów	250°C
Napięcie przyspieszające	4,8 kV
Energia elektronów	70 eV
Szybkość skanowania	10 s/dekadę
Rozdzielczość spektrometru	Minimum 1000

Pomiar dokładnej wartości liczbowej stosunku  $m/z$  został przeprowadzony korzystając z techniki dopasowania piku (*peak matching*) przy zastosowaniu wzorca wewnętrznego – PFK. Próbkę była wprowadzana bezpośrednio do źródła jonów i ogrzewana do temperatury, w której uzyskiwano prąd jonowy odpowiedni do pomiarów. Parametry tego procesu zestawiono w tabeli 6.

**Tabela 6** Parametry charakteryzujące sposób pomiaru dokładnej wartości liczbowej stosunku  $m/z$  (*peak matching*)

Technika jonizacji	Jonizacja elektronowa (EI)
Temperatura źródła jonów	250°C
Energia elektronów	70 eV
Prąd emisji	0,7 mA
Napięcie przyspieszające	4,8 kV

#### 2.3.4 Zastosowanie testu Salkowskiego do stwierdzenia obecności steroli w badanych próbkach

Test Salkowskiego polega na zmieszaniu równych objętości ekstraktu chloroformowego zawierającego związki z grupy steroli ze stężonym kwasem siarkowym. Jeżeli w badanym roztworze obecne są sterole mieszanina powinna przyjąć barwę różową. Test ten zastosowano do badań chloroformowego roztworu frakcji, która powinna zawierać składnik aktywny charakterystyczny dla kiszzonej kapusty wyizolowanej za pomocą techniki PLC. Próbkę suchej pozostałości (o masie ok. 1 g) rozpuszczono w chloroformie (1 mL) a następnie do fiolki dodawano stężony kwas siarkowy (1 mL).

### 3 Wyniki i wnioski

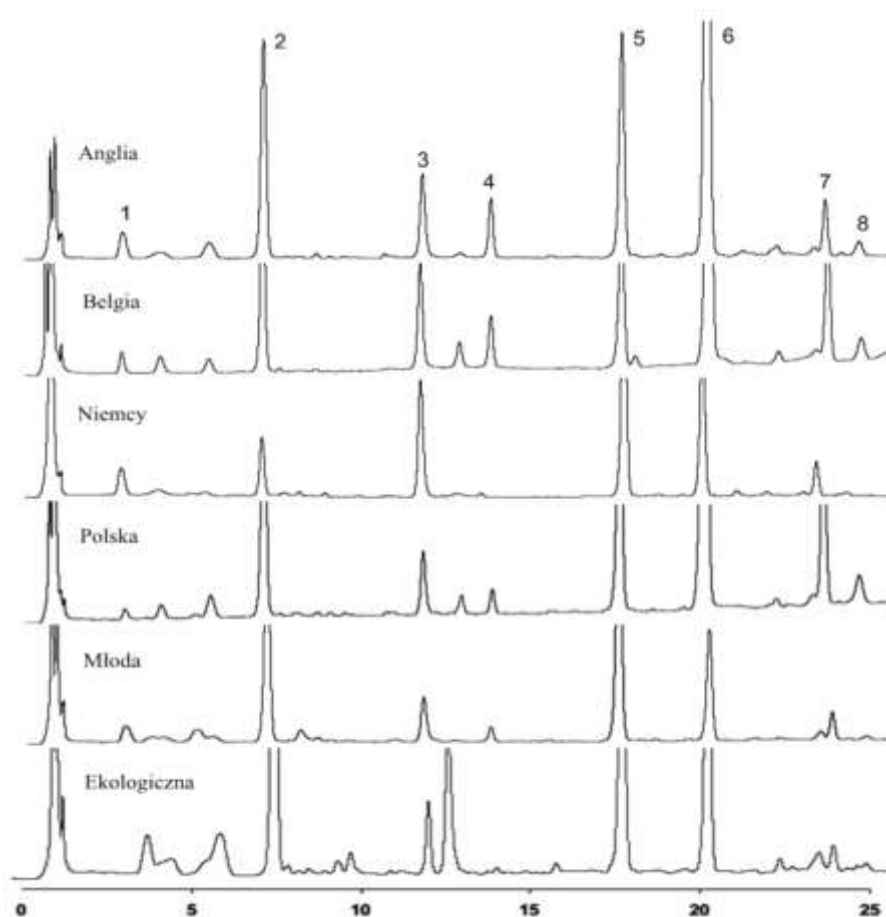
#### 3.1 Porównanie zawartości GLS i właściwości przeciwutleniających kapusty białej pochodzącej z różnych rejonów Europy

Rodzaj wtórnych metabolitów jest z reguły charakterystyczny i jednakowy w obrębie danego gatunku roślin. Wynika to głównie z uwarunkowań genetycznych rośliny. Poziomy stężeń czy też proporcje występowania poszczególnych związków mogą jednak znacznie się różnić wśród przedstawicieli tego samego gatunku. Przyczyną tych różnic są głównie warunki uprawy i środowisko bytowania rośliny.

W celu oceny materiału do badań pod kątem zawartości substancji bioaktywnych porównano profil, ogólną zawartość glukozyolanów oraz aktywność przeciwutleniającą polskiej kapusty w stosunków do tych właściwości warzyw tego samego gatunku pochodzących z różnych rejonów Europy. Przedmiotem badań były próbki kapusty białej zebranej w okresie jesiennym zakupionej w lokalnych sklepach na terenie Anglii (Leeds),

Belgii (Bruksela), Niemiec (Hamburg) oraz Polski (Gdańsk). Dodatkowo zawartość GLS i właściwości przeciwutleniające oznaczono dla próbek polskiej kapusty białej zebranej w okresie wiosennym (tzw. młoda kapusta) oraz kapusty pochodzącej z uprawy ekologicznej.

Chromatogramy, na których widoczne są piki odpowiadające desulfo-glukozynolanom uzyskane w wyniku analizy próbek odpowiednich ekstraktów uzyskanych z różnych kapust przedstawiono na rysunku 17.



**Rys. 17** Profil glukozynolanów charakterystyczny dla kapusty białej. Chromatogramy typu „odcisk palca” uzyskano w wyniku przeprowadzonej analizy ekstraktów z próbek kapusty pochodzącej z różnych upraw przy użyciu techniki HPLC (przeprowadzonej wg normy PPN-EN ISO 9167 – 1 : 1999).

(1- desulfoglukoiberyna; 2- desulfosinigrina; 3- desulfoglukonapina; 4- desulfo-4-hydroksyglukobrassyca; 5- desulfoglukotropaeolina- wzorzec wewnętrzny; 6- desulfoglukobrassyca; 7- desulfometoksyglukobrassyca; 8- desulfoneoglukobrassyca)

Wszystkie badane próbki kapusty charakteryzowały się zbliżonym profilem glukozynolanów. Związki występujące w badanych próbkach na najwyższym poziomie stężeń to sinigrina i glukobrassyca (Tabela 7).

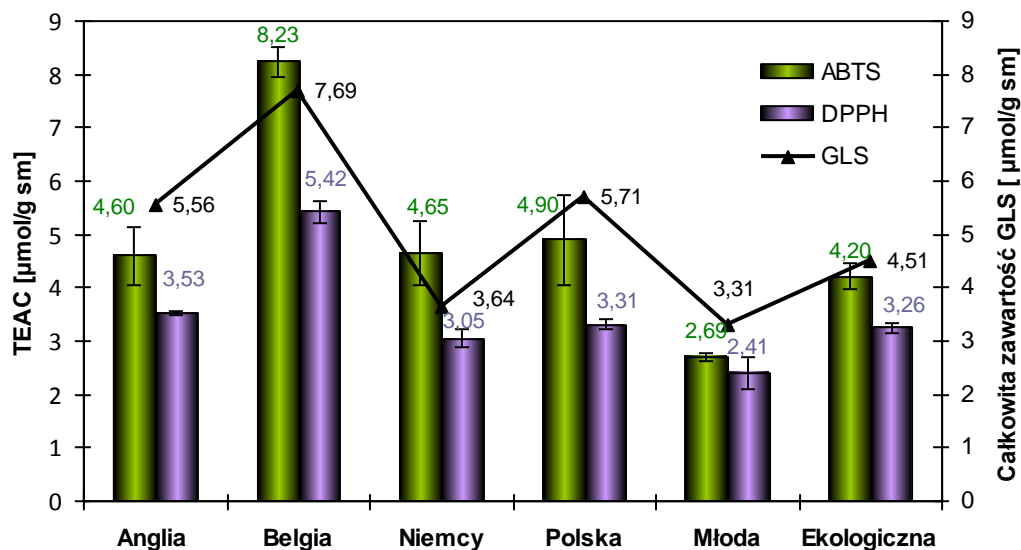
**Tabela 7** Zawartość najważniejszych glukozyzolanów w próbkach kapusty określona na podstawie analizy chromatograficznej próbek ekstraktów [ $\mu\text{mol/g sm}$ ].

GLS	Anglia	Belgia	Niemcy	Polska	Młoda	Ekologiczna
<b>GIB</b>	0,262±0,021	0,31±0,19	0,54±0,11	0,075±0,011	0,173±0,026	0,263±0,015
<b>SIN</b>	1,54±0,15	1,81±0,21	0,59±0,13	2,011±0,092	1,559±0,077	1,573±0,071
<b>GNP</b>	0,723±0,015	1,437±0,032	1,25±0,21	0,431±0,015	0,634±0,022	0,739±0,015
<b>4OHGBS</b>	0,0243±0,0011	0,084±0,012	0,0437±0,0012	0,035±0,011	0,0124±0,0013	0,151±0,012
<b>GBS</b>	1,82±0,41	2,11±0,17	0,397±0,045	1,717±0,011	0,215±0,015	0,371±0,011
<b>MeOHGBS</b>	0,117±0,025	0,360±0,048	0,074±0,011	0,296±0,012	0,0464±0,0081	0,132±0,011
<b>NeoGBS</b>	0,068±0,034	0,114±0,013	0,0276±0,0061	0,0577±0,0011	0,0147±0,0012	0,054±0,011

(GIB- glukoiberyna, SIN- sinigryna; GNP- glukonapina; 4OHGBS- hydroksyglukobrassycyna; GBS- glukobrassycyna; MeOHGBS- metoksyglukobrassycyna; NeoGBS- neoglukobrassycyna)

W zależności od pochodzenia kapusty te dwie substancje stanowiły od 30% do 70% całkowitej zawartości glukozyzolanów. Najwyższą całkowitą zawartość GLS odnotowano w próbkach kapusty pochodzącej z Belgii (7,7  $\mu\text{mol/g sm}$ ). W opublikowanych pracach (66) można znaleźć informacje o podobnych stężeniach GLS (mieszczących się w granicach od 6,4 do 16,3  $\mu\text{mol/g sm}$ ) oznaczonych w próbkach białej kapusty. Nieco wyższe stężenia tych związków w kapuście zostały zaobserwowane przez amerykańskich i szwedzkich naukowców (150, 151). Różnice w oznaczonych zawartościach mogą wynikać nie tylko z odmiennego pochodzenia materiału do badań, istotne znaczenie w tym przypadku może mieć również sam sposób przygotowania próbki. Rozdrobnienie materiału do badań np. poprzez szatkowanie przed procesem liofilizacji może powodować częściową degradację glukozyzolanów na skutek działania endogenego enzymu mirozynyzy.

Do oceny aktywności przeciwutleniającej próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych poszczególnych rodzajów kapust zastosowano najbardziej popularne testy spektrofotometryczne oparte na wykorzystaniu rodników ABTS i DPPH. Te dwa stabilne chromogeny (DPPH o zabarwieniu fioletowym i ABTS o zabarwieniu zielonym) charakteryzują się łatwością zastosowania, gwarantują wysoką czułość oraz umożliwiają analizę wielu próbek w krótkim czasie. Na rysunku 18 przedstawiono poziom aktywności przeciwutleniającej łącznie z informacją o całkowitej zawartości glukozyzolanów w badanych próbkach kapusty.

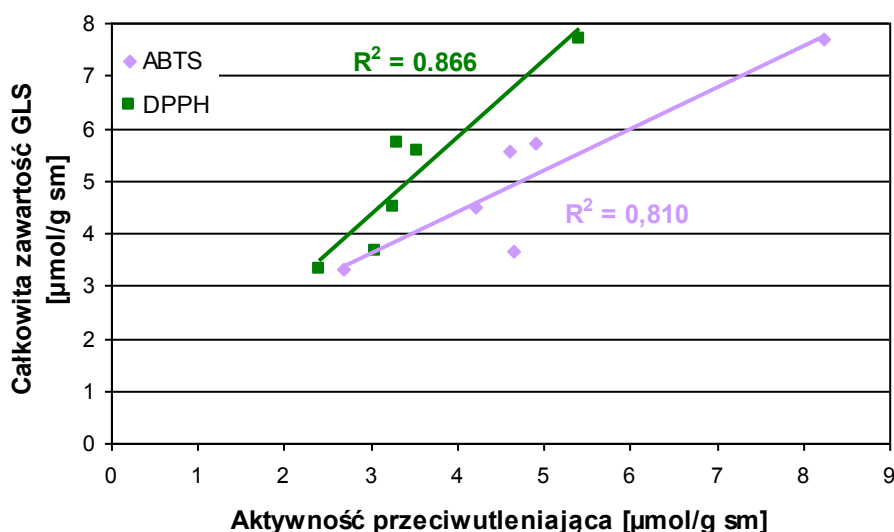


**Rys. 18** Poziom aktywności przeciwutleniającej (TEAC  $\mu\text{mol/g sm}$ ) wyznaczony za pomocą testów ABTS i DPPH oraz całkowita zawartość glukozynolanów ( $\mu\text{mol/g sm}$ ) w próbkach kapusty określona dzięki zastosowaniu techniki HPLC.

Poziomy aktywności przeciwutleniającej dla tych samych próbek ekstraktów metanolowych z kapusty mierzone przy pomocy testu ABTS charakteryzują się wyższymi wartościami niż w przypadku testu DPPH. Ilość równoważników Troloxu dla próbek kapusty w przypadku wykorzystania testu ABTS mieści się w granicach od 2,7 do 8,2 ( $\mu\text{mol/g sm}$ ) natomiast w przypadku zastosowania testu DPPH w zakresie między 2,4 i 5,4 ( $\mu\text{mol/g sm}$ ). Oszacowane poziomy pojemności przeciwutleniającej kapusty białej przedstawiają wartości zbliżone do danych dostępnych w literaturze (152). Podobnie jak w przypadku glukozynolanów najwyższymi właściwościami przeciwutleniającymi, które zostały określone za pomocą obu testów, charakteryzowały się próbki kapusty pochodzące z Belgii. Istotnych różnic wartości tego parametru nie odnotowano dla próbek pochodzących z Anglii, Niemiec i Polski. Najmniejsze ilości glukozynolanów jak i poziomy aktywności przeciwutleniającej były charakterystyczne dla próbek młodej kapusty zebranej w okresie wiosennym. Niższy poziom zawartości substancji bioaktywnych w młodej kapuście mógł wynikać z krótszego okresu wegetacji w porównaniu z warzywami zebranymi w okresie jesiennym. Kapusta jesienna czyli kapusta zebrana po okresie letnim przez dłuższy czas była wystawiona na działanie słońca, co bez wątpienia ma duży wpływ na proces syntezy fitozwiązków w roślinach. W przypadku flawonoidów zaobserwowano od trzech do pięciu razy wyższe stężenie tych substancji w warzywach liściastych zebranych w okresie letnim w porównaniu ze uprawami

zebranych w ciągu innych sezonów (153). Proces akumulacji polifenoli w tkankach roślin ulega intensyfikacji w odpowiedzi na wzrost ekspozycji na światło, szczególnie promieniowanie UV-B (154). Zaobserwowano również, że stres wodny (podczas okresu wegetacyjnego) powoduje wzrost intensywności akumulacji glukozyzolanów w roślinach (48). Uważa się, że gorące i suche warunki uprawy bądź też deficyt wody mogą wzmacniać syntezę aminokwasów i cukrów będących prekursorami w biosyntezie glukozyzolanów. Oznacza to, że okres zbioru i związane z tym warunki klimatyczne uprawy mogą mieć duży wpływ na zawartość substancji bioaktywnych w kapuście.

Podczas analizy otrzymanych danych pomiarowych zaobserwowano wysoką korelację pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą a całkowitą zawartością glukozyzolanów (Rys. 19).



**Rys. 19** Zależność pomiędzy wartościami aktywności przeciwutleniającej próbek kapusty (wyznaczonymi za pomocą testów ABTS i DPPH) a całkowitą zawartością glukozyzolanów w tych próbkach (oznaczoną za pomocą techniki HPLC).

Podobne zjawisko zostało również odnotowane przez innych naukowców zarówno dla próbek kapusty jak i kalafiora (66). W przypadku kapusty współczynnik korelacji między aktywnością przeciwutleniającą a całkowitą zawartością glukozyzolanów wynosił 0,81. Prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska może być teza, że poziom składników bioaktywnych w konkretnej roślinie wiąże się i zależy od warunków uprawy, które determinują ich biosyntezę. Wysoka korelacja pomiędzy zawartością glukozyzolanów a pomiarem aktywności przeciwutleniającej w przypadku wszystkich badanych próbek może

również sugerować podobieństwo szlaków biochemicznych powstawania tych związków. Oznacza to, że wysokiej zawartości związków z grupy GLS może towarzyszyć wysokie stężenie przeciwutleniaczy i również prawdopodobnie innych fitozwiązków. Takie stwierdzenie może stanowić podstawę do wniosku, że pojedyncze oznaczenie np. aktywności przeciwutleniającej umożliwiłoby standaryzację próbek roślinnych pochodzących z różnych upraw bez potrzeby przeprowadzania innych analiz pod kątem składu chemicznego.

### ***3.2 Wpływ procesu fermentacji i obróbki termicznej na zawartość substancji bioaktywnych w kapuście.***

Właściwości prozdrowotne warzyw i owoców są silnie uzależnione od kolejnych procesów, którym poddawany jest surowiec zanim trafi do organizmu człowieka. Ten aspekt jest często ignorowany bądź nieuwzględniany w badaniach epidemiologicznych i żywieniowych. Większość dostępnych danych na temat rodzaju i poziomu występowania składników bioaktywnych dotyczy jedynie surowych roślin. W rzeczywistości jedynie niewielka część warzyw spożywana jest w postaci surowej, w większości przypadków wymagany jest proces obróbki ze względów:

- bezpieczeństwa;
- zachowania jakości;
- ekonomicznych.

Dlatego też wyniki badań wpływu obróbki kulinarnej na zawartość składników bioaktywnych w kapuście stanowiłyby niewątpliwie istotną wartość z punktu widzenia chemoprewencji żywieniowej.

W tradycyjnej polskiej diecie kapusta spożywana jest najczęściej w postaci surowej, kiszanej lub gotowanej. W badaniach podjęto, więc próbę oszacowania wpływu procesu fermentacji oraz obróbki termicznej kapusty na zawartość substancji o najwyższym potencjale chemoprewencyjnym, do których należą przeciwutleniacze, glukozynolany oraz indolowe produkty rozpadu glukozynolanów.

#### ***3.2.1 Właściwości przeciwutleniające***

Kiszona kapusta stanowi popularny składnik diety nie tylko w Polsce, z chęcią i w dużych ilościach spożywana jest również przez mieszkańców Niemiec i Austrii. Cieszy się uznaniem choć w nieco mniejszym stopniu również w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i Rosji. Pomimo, iż stanowi tak ważny składnik diety, dane na temat wpływu fermentacji na właściwości przeciwutleniające kapusty są nadal bardzo ograniczone. Niewiele jest również

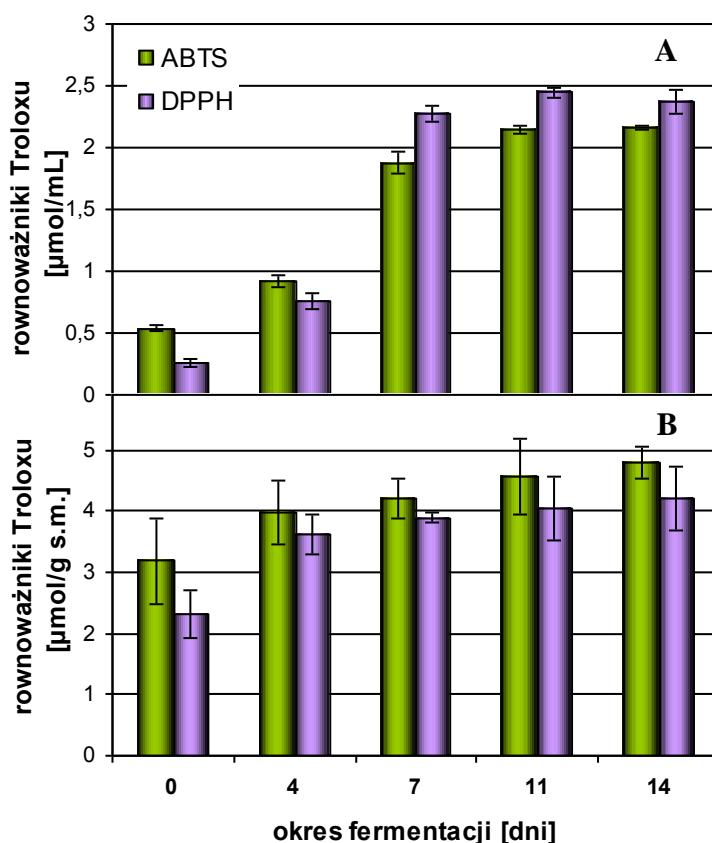


informacji dotyczących wpływu obróbki termicznej na właściwość przeciwutleniającą kapusty. Istniejące dane dotyczą najczęściej pomiarów pojemności przeciwutleniającej próbek kapusty po procesie blanszowania (109, 155). Pomimo, że długotrwałe gotowanie jest typowym sposobem przygotowania potraw zawierających kapustę, brakuje danych na temat aktywności przeciwutleniającej tego warzywa ogrzewanego przez okres dłuższy niż 15 minut.

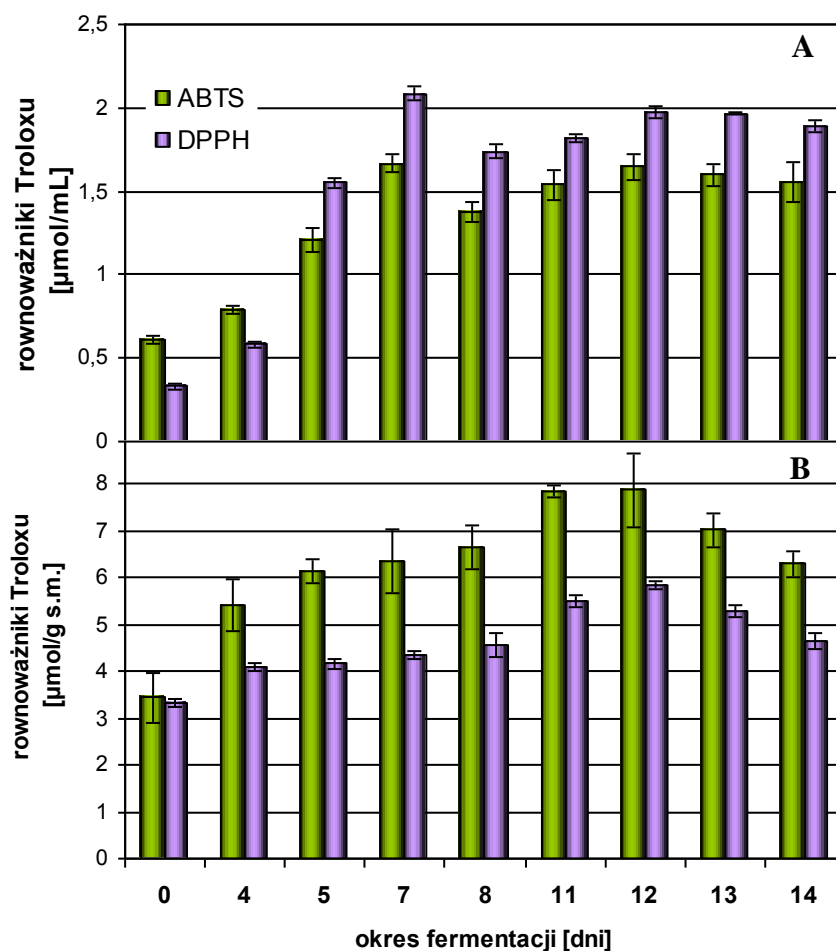
Głównym celem na tym etapie badań było określenie zmian w aktywności przeciwutleniającej próbek soków i ekstraktów z kapusty pochodzącej ze standardowej oraz ekologicznej uprawy podczas długotrwałego ogrzewania oraz dwutygodniowego procesu fermentacji.

### - Proces fermentacji

Zmiany w poziomie całkowitej aktywności przeciwutleniającej próbek soków oraz ekstraktów metanolowych liofilizatów z kapusty podczas dwutygodniowego okresu trwania procesu fermentacji przedstawiono na rysunku 20 i 21.



**Rys. 20** Całkowita aktywność przeciwutleniająca próbek (A) soków (TE  $\mu\text{mol/mL}$ ) i (B) metanolowych ekstraktów (TE  $\mu\text{mol/g s.m.}$ ) kapusty pochodzącej ze standardowej uprawy oznaczona za pomocą testów ABTS i DPPH.



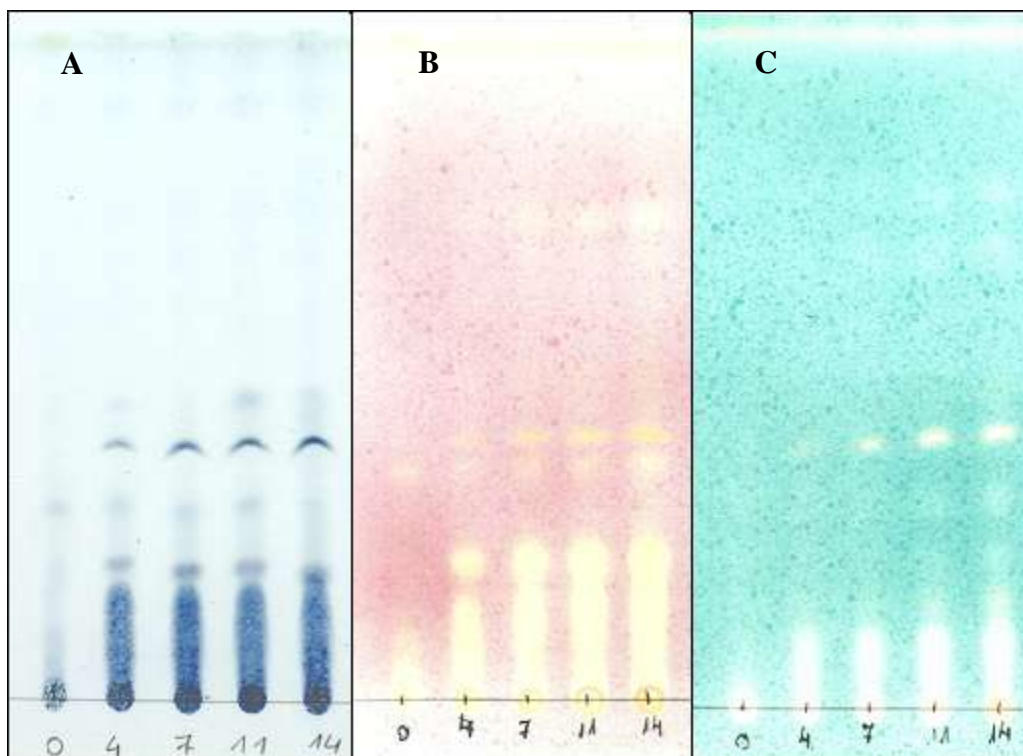
**Rys. 21** Całkowita aktywność przeciwutleniająca próbek (A) soków (TE  $\mu\text{mol/mL}$ ) i (B) metanolowych ekstraktów (TE  $\mu\text{mol/g s.m.}$ ) uzyskanych z ekologicznej kapusty oznaczona za pomocą testów ABTS i DPPH.

Wyniki uzyskane w trakcie badań próbek soków i ekstraktów z kapusty (z zastosowaniem testów ABTS i DPPH) wskazują, że podczas spontanicznej fermentacji właściwości przeciwutleniające stopniowo wzrastają zarówno w przypadku kapusty ze standardowej jak i kapusty pochodzącej z ekologicznej uprawy. Po około 11 dniach fermentacji poziom aktywności przeciwutleniającej próbek kapusty ulega stabilizacji. Jedynie w przypadku ekstraktów metanolowych liofilizatów z ekologicznej kapusty można zaobserwować spadek tego parametru w 13 i 14 dniu procesu kiszenia. Według niektórych naukowców aktywność przeciwutleniająca kapusty może wzrastać podczas procesu rozdrabniania liści (156). W trakcie naszych badań kapustę przed procesem fermentacji poddano szatkowaniu, co mogło być jedną z przyczyn początkowego wzrostu aktywności przeciwutleniającej tego warzywa.

We wszystkich eksperymentach dotyczących kapusty prowadzonych w ciągu kilku lat na Wydziale Chemicznym PG, obserwowano za każdym razem ewidentny wzrost aktywności przeciwutleniającej tego warzywa po spontanicznej fermentacji bez względu na okres kiszenia oraz pochodzenia materiału wyjściowego (157, 158). Jednak jak wskazują wyniki badań prowadzonych w innych ośrodkach naukowych warunki fermentacji kapusty mogą mieć znaczący wpływ na jej właściwości prozdrowotne. Zarówno dane uzyskane przez badaczy fińskich (159) jak i polskich (160) wskazują, że bezpośrednio kontrolowana fermentacja inicjowana za pomocą wyizolowanych szczepów bakteryjnych nie powoduje znaczących zmian w aktywności przeciwutleniającej kapusty.

Z reguły aktywność przeciwutleniająca wyznaczana za pomocą testu ABTS dla próbek soków i ekstraktów z kapusty była nieco wyższa niż ta wyznaczona dla tych samych próbek w wyniku zastosowania testu DPPH. W przypadku próbek soków z kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej jak i z ekologicznej (po około 5 dniach fermentacji) zależność ta ulegała zmianie. Powodem tego zjawiska może być wzrost w trakcie procesu fermentacji kapusty zawartości witaminy C w sokach. Wartość liczbowa parametru  $EC_{50}$  dla kwasu askorbinowego oznaczona w wyniku zastosowania testu DPPH jest mniejsza (0,12 mg/mL) niż ta oznaczona w wyniku zastosowania testu ABTS (0,22 mg/mL). Oznacza to, że witamina C efektywniej wychwytuje rodnik DPPH niż rodnik ABTS co w konsekwencji prowadzi do silniejszego odbarwienia roztworu i tym samym może świadczyć o wyższej aktywności przeciwutleniającej badanej próbki.

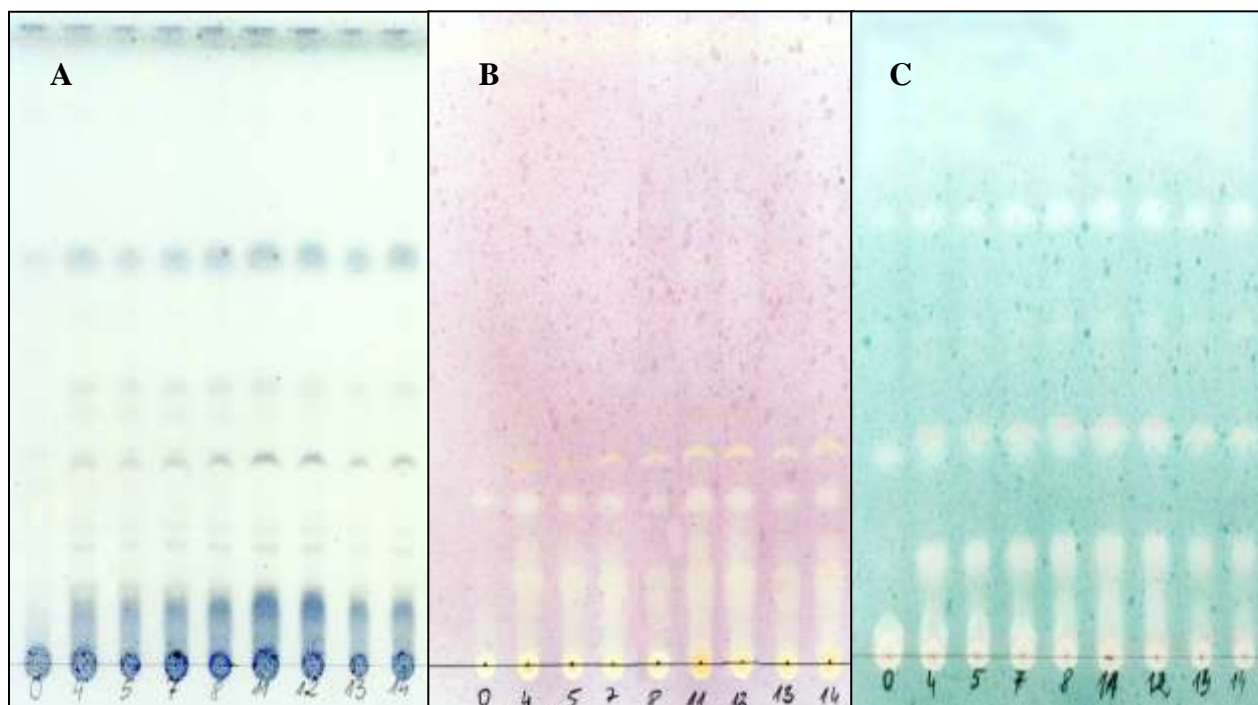
Wzrost zawartości witaminy C w kapuście podczas fermentacji niewątpliwie może stanowić przyczynę wzrostu jej aktywności przeciwutleniającej. Dlatego też w celu sprawdzenia czy podczas kiszenia mogłyby powstawać inne składniki o zdolności wychwytywania wolnych rodników próbki ekstraktów z kapusty poddano analizie z wykorzystaniem techniki TLC. Analizie poddano próbki ekstraktów metanolowych z liofilizatów kapusty pochodzących zarówno z uprawy standardowej jak i ekologicznej. Do wizualizacji profilu przeciwutleniaczy otrzymane chromatogramy TLC spryskiwano za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteu* oraz za pomocą roztworów barwnych rodników ABTS i DPPH (Rys. 22, 23).



**Rys. 22** Chromatogramy próbek ekstraktów metanolowych z liofilizatów kapusty pochodzącej z uprawy standardowej uzyskane przy użyciu techniki TLC wizualizowane za pomocą (A)-odczynnika *Folina-Ciocalteua*; (B)- roztworu rodnika DPPH; (C)- roztworu rodnika ABTS.

(Numery 0, 4, 7, 11, 14 na chromatogramach oznaczają czas trwania procesu fermentacji [dni]).

Odczynnik *Folia-Ciocalteua* przez wiele lat używany był do oznaczania całkowitej zawartości polifenoli w produktach pochodzenia roślinnego. Jednak ze względu na fakt, że odczynnik ten działa na zasadzie utleniania i redukcji może on również reagować z wieloma substancjami o właściwościach przeciwutleniających (161). Zastosowanie tego odczynnika do wizualizacji chromatogramów TLC umożliwia, więc uzyskanie w postaci niebieskich plamek nie tyle profilu polifenoli co profilu przeciwutleniaczy obecnych w analizowanej próbce. Wywoływanie chromatogramów za pomocą roztworów rodników umożliwia natomiast zaobserwowanie obecności w próbce ewentualnych przeciwutleniaczy, w postaci odbarwionych plamek na barwnym tle (odpowiednio zielonym w przypadku rodnika ABTS oraz fioletowym w przypadku rodnika DPPH).



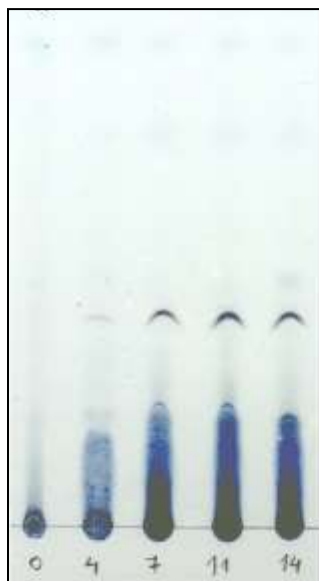
**Rys. 23** Chromatogramy próbek ekstraktów metanolowych z liofilizatów kapusty pochodzącej z ekologicznej uprawy uzyskane przy użyciu techniki TLC wizualizowane za pomocą: (A)-odczynnika *Folina-Ciocalteu*; (B)- roztworu rodnika DPPH; (C)- roztworu rodnika ABTS.

(Numery 0, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14 na chromatogramach oznaczają czas trwania procesu fermentacji [dni]).

Otrzymane wyniki prezentowane na rysunkach 22 i 23 sugerują, że podczas fermentacji są uwalniane inne niż witamina C składniki o aktywności przeciwutleniającej (witamina C nie ulega rozdzielaniu w stosowanych warunkach chromatograficznych).

W celu sprawdzenia czy podobne zjawisko występuje również w przypadku soków badanie powtórzono dla próbek fermentowanych soków z kapusty pochodzącej z uprawy standardowej (po procesie liofilizacji) i poddanych ekstrakcji (za pomocą metanolu). Otrzymany chromatogram poddany wizualizacji za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteu* przedstawiono na rysunku 24.

Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki tak otrzymanego ekstraktu ma podobny wygląd jak chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek ekstraktów z liofilizatów kapusty. We wszystkich przypadkach zaobserwować można powstawanie podczas fermentacji substancji o właściwościach przeciwutleniających nieobecnych w próbkach świeżej kapusty.



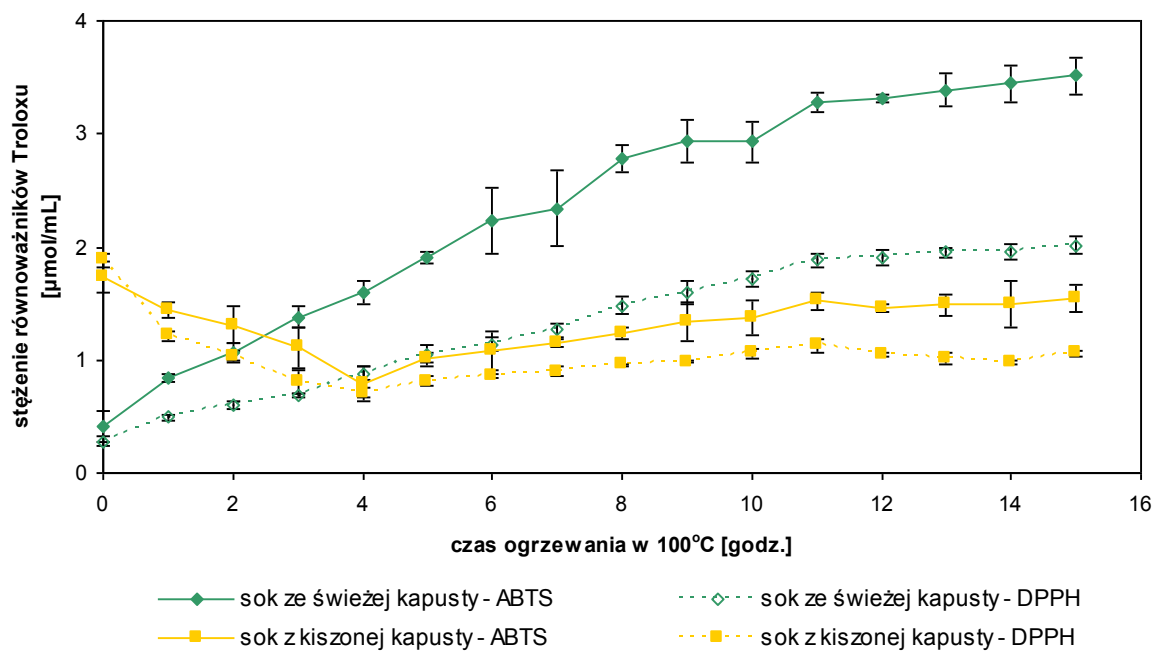
**Rys. 24** Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbek ekstraktów metanolowych z liofilizatów soków z kapusty pochodzącej ze standardowej uprawy otrzymany przy użyciu techniki TLC (wizualizowany za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteua*).

(Numery 0, 4, 7, 11, 14 na chromatogramach oznaczają czas trwania procesu fermentacji [dni])

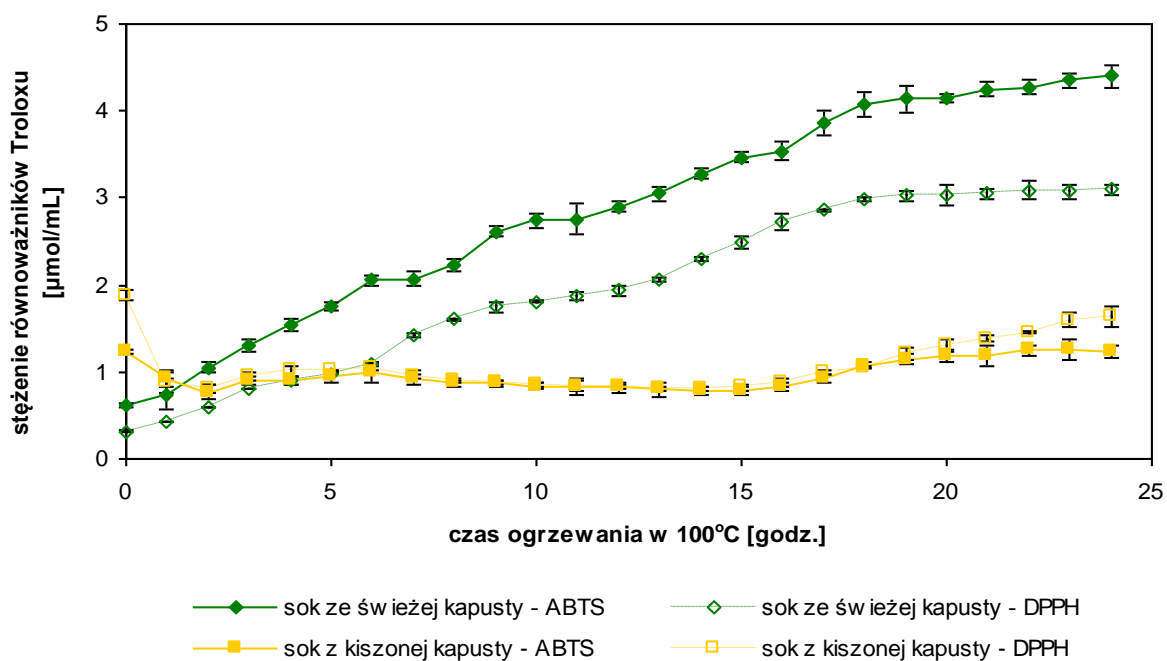
#### - Proces obróbki termicznej

Zarówno tradycyjne polskie dania jak i inne narodowe przysmaki popularne w Europie Centralnej (Niemcy, Czechy, Austria) obfitują w potrawy przyrządzane z kapusty lub też z dodatkiem kapusty. Niektóre z najbardziej popularnych dań przygotowywane są na bazie świeżej lub kiszzonej kapusty albo też z ich mieszanki w procesie kilkugodzinnego duszenia (najczęściej z dodatkiem mięsa). Podjęto próbę określenia jak taki typ obróbki termicznej może wpływać na aktywność przeciwutleniającą tego warzywa. Jest to dosyć ważne zagadnienie z dietycznego punktu widzenia bo zarówno białko jak i tłuszcz obecny w mięsie w prosty sposób ulegają procesowi utlenienia podczas ogrzewania co prowadzi do tworzenia się toksycznych substancji obniżających wartość żywieniową mięsa.

Właściwości przeciwutleniające soku ze świeżej i kiszzonej kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej jak i ekologicznej, ogrzewanej w temperaturze 100°C przez 15 i 24 godziny oznaczono ilościowo na podstawie pomiaru zdolności próbek do wychwytywania rodników przy użyciu testów ABTS i DPPH. Wartość potencjału przeciwutleniającego ogrzewanych próbek soków z kapusty (wyrażone jako ilość równoważników Troloxu) przedstawiono graficznie na rysunku 25 i 26.



**Rys. 25** Wpływ czasu ogrzewania na właściwości przeciwutleniające soku ze świeżej i kiszonej kapusty pochodzącej z uprawy standardowej (wyznaczone za pomocą testu ABTS i DPPH [TE  $\mu\text{mol/mL}$ ]).



**Rys. 26** Wpływ czasu ogrzewania na właściwości przeciwutleniające soku ze świeżej i kiszonej kapusty pochodzącej z uprawy ekologicznej (wyznaczone za pomocą testu ABTS i DPPH [TE  $\mu\text{mol/mL}$ ]).

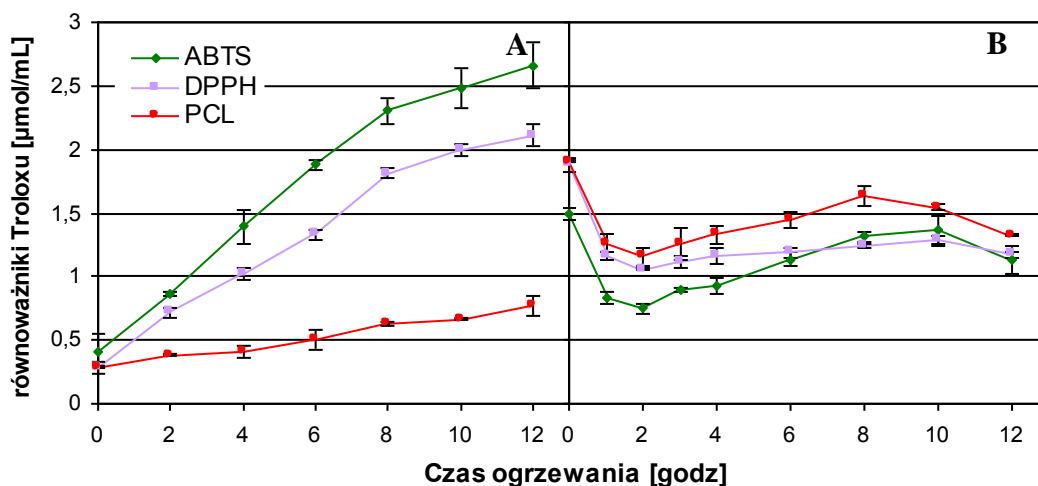
Otrzymane wyniki wskazują, że w przypadku wszystkich analizowanych soków ogrzewanie znacząco wpływa na ich zdolność do wychwytywania rodników ABTS i DPPH. W przypadku soków ze świeżej kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej jak i ekologicznej następuje ewidentny wzrost aktywności przeciwutleniającej utrzymujący się podczas całego okresu ogrzewania (15 h– dla kapusty ze standardowej uprawy; 24 h- dla kapusty ekologicznej). Po 15 godzinach ogrzewania w przypadku soku ze świeżej kapusty ze standardowej uprawy nastąpił ponad 8- krotny wzrost aktywności przeciwutleniającej oznaczonej za pomocą testu ABTS oraz 7- krotny wzrost tego parametru wyznaczonego za pomocą testu DPPH (Rys. 25). W przypadku soków z świeżej kapusty uprawy ekologicznej po tym samym czasie (15 h) początkowa wartość pojemności przeciwutleniającej wyznaczona za pomocą testu ABTS wzrosła około 6 razy natomiast wartość tego parametru oznaczona za pomocą testu DPPH 3 razy (Rys. 26). Podobne zjawisko zaobserwowali włoscy naukowcy w przypadku pomidorów (162). Próbkę pomidorów ogrzewane przez 15 godzin lub dłużej, wykazywały wyższą aktywność przeciwutleniającą niż te, które nie były poddawane obróbce termicznej.

W przypadku soku z kiszanej kapusty pochodzącej z uprawy standardowej można zaobserwować dwie fazy zmian aktywności przeciwutleniającej (Rys. 25). Pierwszą fazą jest spadek potencjału przeciwutleniającego w ciągu początkowych 4 godzin ogrzewania. Nie jest to zjawisko niespodziewane, gdyż naturalne, rozpuszczalne w wodzie przeciwutleniacze obecne w soku kiszanej kapusty, głównie kwas askorbinowy mogą ulegać termicznej degradacji i/lub konsumpcji w reakcji *Maillarda* (163). Włoscy naukowcy zaobserwowali około 90% spadek zawartości witaminy C podczas 4 godzin ogrzewania próbek pomidorów (162). W przypadku soku z kiszanej ekologicznej kapusty największy spadek aktywności przeciwutleniającej nastąpił już po 2 godzinach ogrzewania (Rys. 26). Druga faza zmian aktywności przeciwutleniającej w przypadku soków z kiszanej kapusty (po 2 godzinach dla kapusty „ekologicznej” i po 4 godzinach dla kapusty pochodzącej z uprawy standardowej) charakteryzowała się umiarkowaną stabilnością z lekką tendencją wzrostową. Jednak w przypadku soku z kiszanej kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej jak i ekologicznej wielogodzinne ogrzewanie nie powodowało wzrostu wartości aktywności przeciwutleniającej ponad poziom początkowego potencjału przeciwutleniającego badanych próbek.

Rodniki ABTS i DPPH należą do grupy rodników azowych, które nie występują naturalnie w środowisku. Dlatego w celu sprawdzenia czy wzrost zdolności wychwytywania rodników próbek kapusty podczas procesu ogrzewania dotyczy również rodników naturalnie



występujących w środowisku, przeprowadzono (dzięki uprzejmości Instytutu Badań Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie) analizę aktywności przeciwutleniającej próbek soków za pomocą techniki chemilumiscencyjnej, w której wykorzystuje się rodnik nadtlenkowy. Przed wykonaniem tej analizy dla tych samych próbek ogrzewanych soków oznaczono zdolność wychwytywania rodników ABTS i DPPH. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 27.

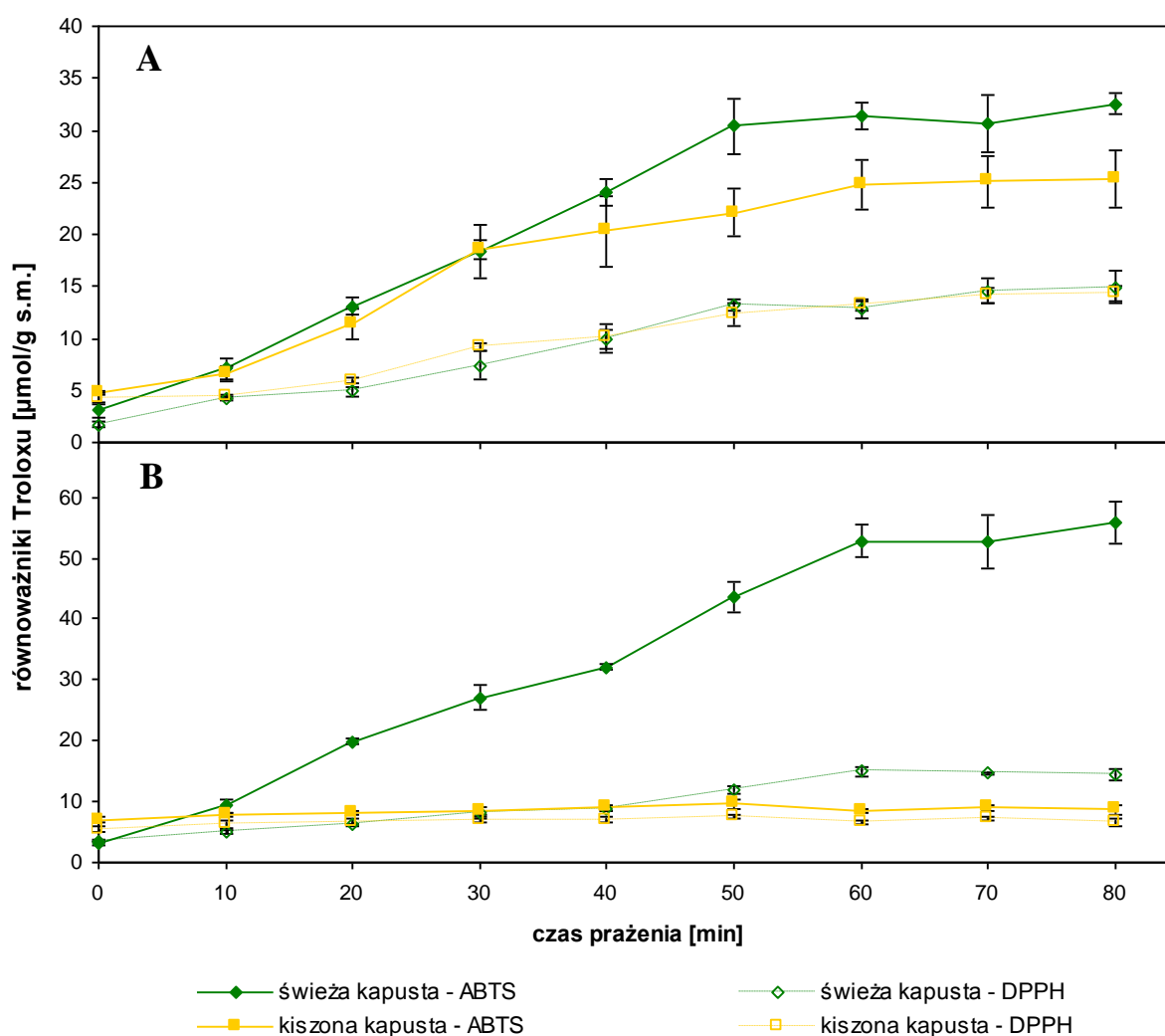


**Rys. 27** Wpływ czasu ogrzewania na właściwości przeciwutleniające soku ze (A) świeżej i (B) kiszonej kapusty pochodzącej z uprawy standardowej wyznaczone za pomocą testu ABTS, DPPH i ACL [TE  $\mu\text{mol/mL}$ ].

Uzyskane wyniki wskazują na podobną kinetykę zmian zdolności do wychwytywania rodnika do tej, która została wyznaczona w wyniku zastosowania testów ABTS i DPPH. Niewątpliwie interesującym zjawiskiem jest silniejsze oddziaływanie rodnika nadtlenkowego z przeciwutleniaczami obecnymi w próbkach soku z kiszonej kapusty niż ze składnikami świeżej kapusty. W przypadku rodników azowych (ABTS i DPPH) zależność ta była odwrotna. W związku z tym uzasadniony wydaje się wniosek, że różne składniki próbki mogą reagować w różnorodny sposób z różnymi typami rodników.

W celu sprawdzenia czy wysoka temperatura wpływa również na aktywność przeciwutleniającą składników kapusty w środowisku bezwodnym, zbadano poziom aktywności przeciwutleniającej ekstraktów metanolowych z liofilizatów kiszonej i świeżej kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej jak i ekologicznej poddanych procesowi prażenia (Rys. 28). Poziom potencjału przeciwutleniającego badanych próbek oszacowane w wyniku zastosowania testów ABTS i DPPH przeliczano na zawartość

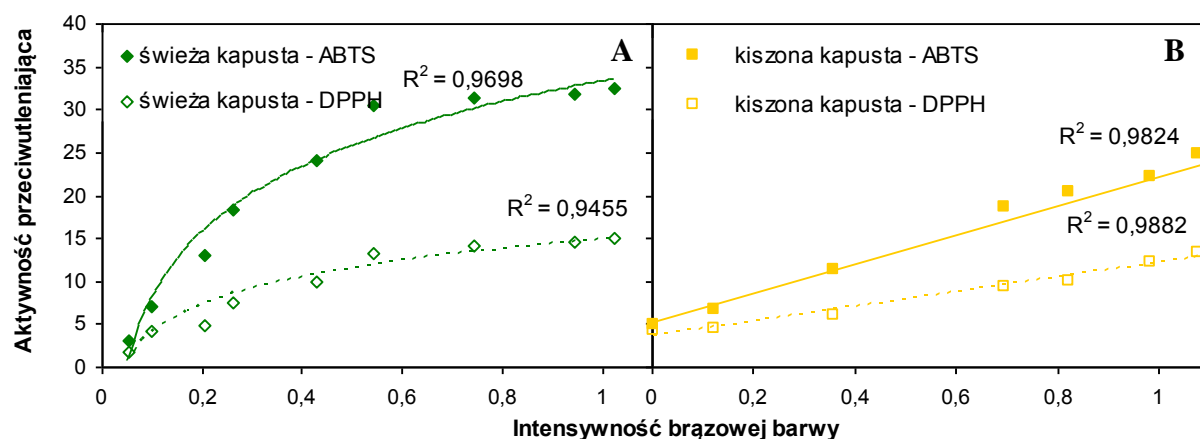
równoważników Troloxu przypadającą na gram suchej masy liofilizatu [TE  $\mu\text{mol/g s.m.}$ ]. Prażenie próbek liofilizatów kapusty przeprowadzono w temperaturze  $100^{\circ}\text{C}$  przez okres 80 minut. Zdolność wychwytywania rodników ABTS i DPPH przez składniki próbek ekstraktów zarówno ze świeżej jak i z kiszonej kapusty pochodzącej za standardowej uprawy zdecydowanie wzrastała wraz z długością okresu prażenia (Rys. 28-A). W przypadku ekstraktów uzyskanych z „ekologicznej” kapusty ewidentny wzrost aktywności przeciwutleniającej podczas prażenia widoczny był jedynie dla próbek świeżej kapusty (w ciągu 30 min. około 8 razy w wyniku zastosowania testu ABTS oraz 2 razy w wyniku zastosowania testu DPPH) (Rys. 28-B).



**Rys. 28** Wpływ czasu prażenia na właściwości przeciwutleniające liofilizatów ze świeżej i kiszonej kapusty pochodzącej z uprawy standardowej (A) i ekologicznej (B) wyznaczone za pomocą testów ABTS i DPPH [TE  $\mu\text{mol/g s.m.}$ ].

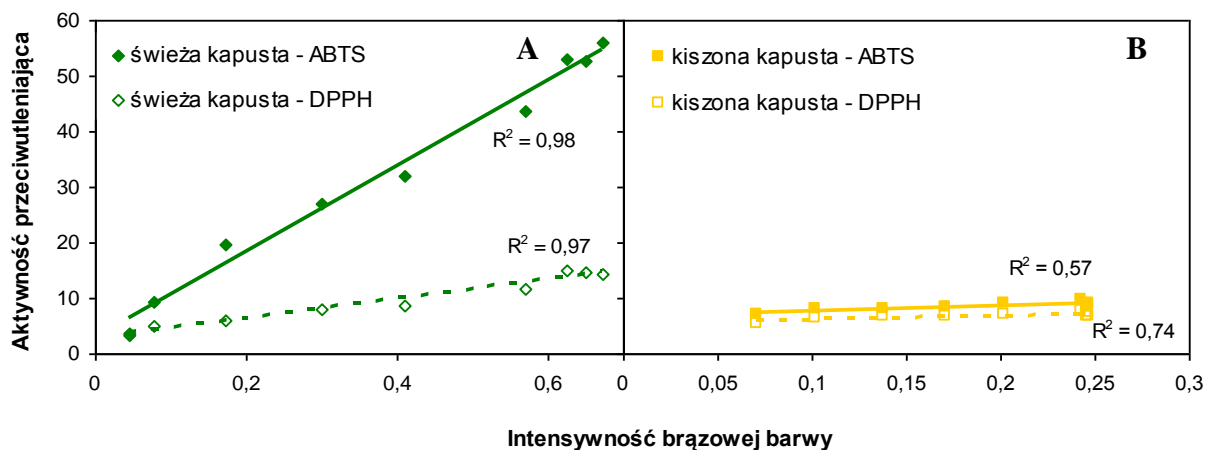
Wzrost aktywności przeciwutleniającej analizowanych próbek wystawionych na działanie wysokiej temperatury najprawdopodobniej mógł być spowodowany uwalnianiem się i/lub tworzeniem związków wykazujących zdolność do wychwytywania wolnych rodników. Takimi składnikami o właściwościach redukcyjnych mogą być pochodne reakcji Maillarda (MRPs) (164). Pozytywną korelację pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą a intensywnością barwy (BPF) wynikającą z tworzenia się produktów reakcji Maillarda o brązowym zabarwieniu zaobserwowano zarówno w układach modelowych jak i w produktach żywnościowych (162, 165, 166).

Na rysunku 29 i 30 przedstawiono zmiany aktywności przeciwutleniającej oraz intensywności barwy (BPF) metanolowych ekstraktów otrzymanych ze zliofilizowanych próbek ze świeżej oraz kiszonej kapusty prażonych przez różne okresy czasu w temperaturze 100°C.



**Rys. 29** Związek pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą (wyznaczoną za pomocą testu ABTS i DPPH - TE  $\mu\text{mol/g s.m.}$ ) oraz intensywnością barwy (absorbancja mierzona przy  $\lambda=420$  nm) metanolowych ekstraktów z prażonych liofilizatów (A) próbek świeżej i (B) kiszonej kapusty pochodzącej z uprawy standardowej.

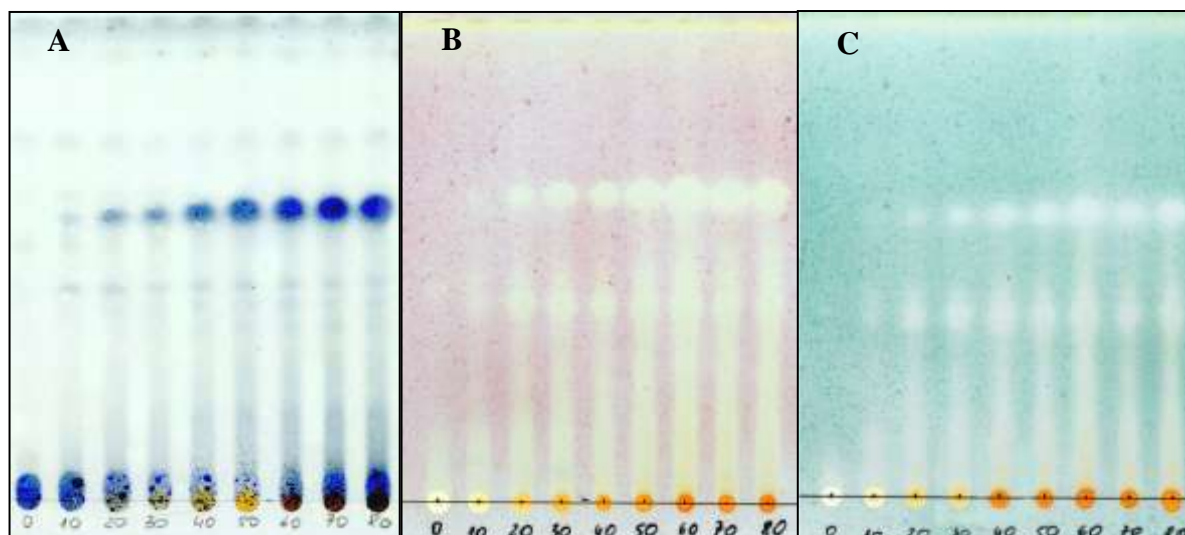
Wysokie wartości liczbowe współczynników korelacji pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą próbek a ich intensywnością barwy (BPF) wskazują na silną zależność pomiędzy tymi dwoma parametrami. Jedynie w przypadku próbek ekstraktów z prażonych liofilizatów kiszonej, ekologicznej kapusty stwierdzono występowanie słabej korelacji pomiędzy tymi parametrami co znajduje swoje potwierdzenie w wartościach liczbowych współczynników korelacji (odpowiednio 0,57 i 0,74 dla testów ABTS i DPPH) (Rys. 30– B).



**Rys. 30** Związek pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą (wyznaczoną za pomocą testu ABTS i DPPH - TE  $\mu\text{mol/g s.m.}$ ) oraz intensywnością barwy (absorbancja mierzona przy  $\lambda=420$  nm) metanolowych ekstraktów z prażonych liofilizatów (A) próbek świeżej i (B) kiszzonej kapusty pochodzącej z ekologicznej uprawy.

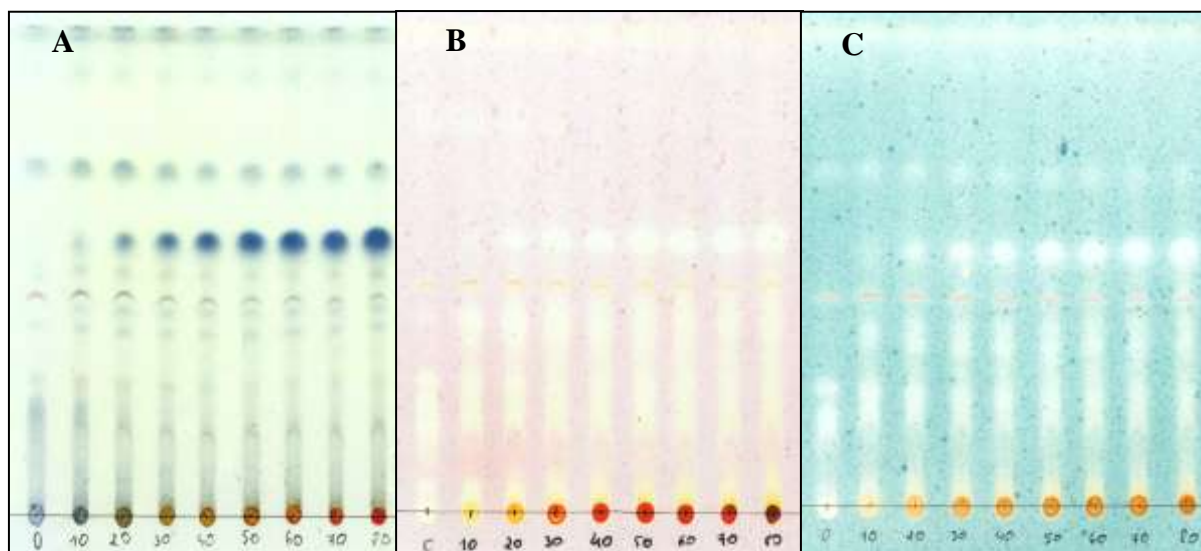
Jednak wszystkim pozostałym analizowanym próbkom (Rys. 29 - A, B i Rys. 30 - A) wzrostowi aktywności przeciwutleniającej towarzyszył wzrost intensywności barwy wywołany tworzeniem się produktów reakcji *Maillarda* (MRPS). W większości przypadków aktywność przeciwutleniająca próbek wzrastała liniowo ze wzrostem ich intensywności barwy, jedynie w przypadku świeżej kapusty pochodzącej z uprawy standardowej zależność ta miała charakter zależności logarytmicznej (Rys. 29 - A). W opublikowanych pracach badawczych brak jest danych na temat związku właściwości przeciwutleniających ze zmianą barwy podczas ogrzewania kapusty. Jednak w przypadku próbek soków z pomidorów zaobserwowano w trakcie 30 godzinowego okresu ogrzewania w temperaturze  $95^{\circ}\text{C}$  wzrost potencjału przeciwutleniającego oraz wzrost gęstości optycznej próbek (162). Podobną zależność zauważono również w przypadku próbek miodu gdzie wzrostowi czasu lub temperatury ogrzewania towarzyszył jednocześnie wzrost potencjału przeciwutleniającego oraz wzrost intensywności zbrunatnienia próbek (165).

W celu obserwacji zmian profilu przeciwutleniaczy ekstraktów metanolowych z liofilizatów kapusty podczas prażenia zastosowano technikę TLC z wizualizacją chromatogramów za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteu* oraz roztworów rodników ABTS i DPPH. Uzyskane chromatogramy (Rys. 31, 32, 33) wskazują na znaczne jakościowe i ilościowe różnice w składzie przeciwutleniaczy pomiędzy próbkami, które były poddawane podgrzewaniu i próbkami, które nie były poddawane temu zabiegowi.



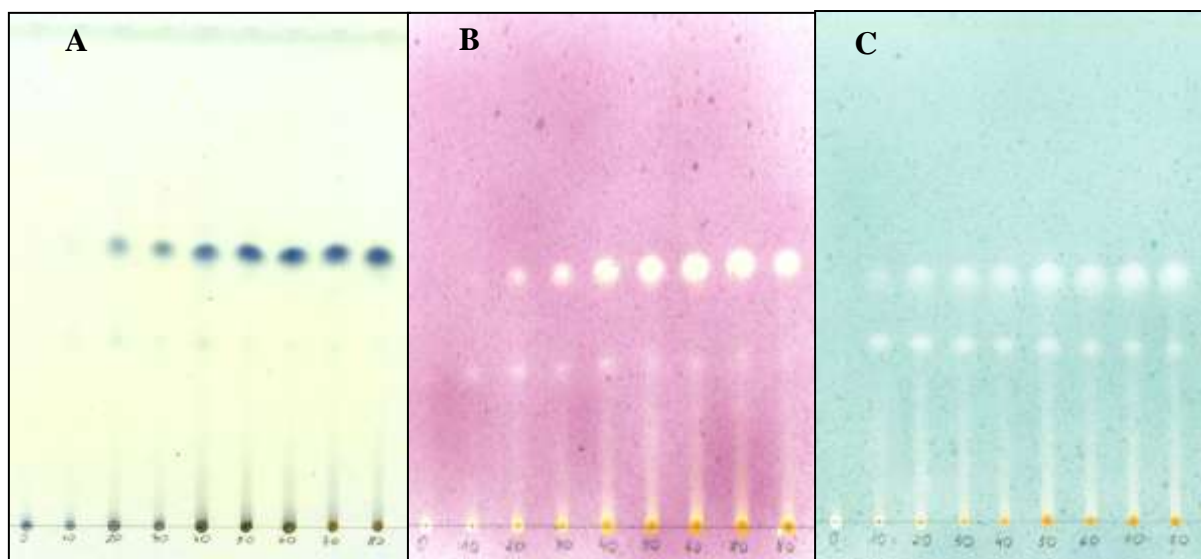
**Rys. 31** Chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek ekstraktów metanolowych z liofilizatów świeżej kapusty pochodzącej z uprawy standardowej otrzymane w wyniku zastosowania techniki TLC i wizualizowane za pomocą (A)-odczynnika *Folina-Ciocalteu*; (B)- roztworu rodnika DPPH; (C)- roztworu rodnika ABTS.

(Numery 0 – 80 na chromatogramach oznaczają czas prażenia liofilizatów [min]).



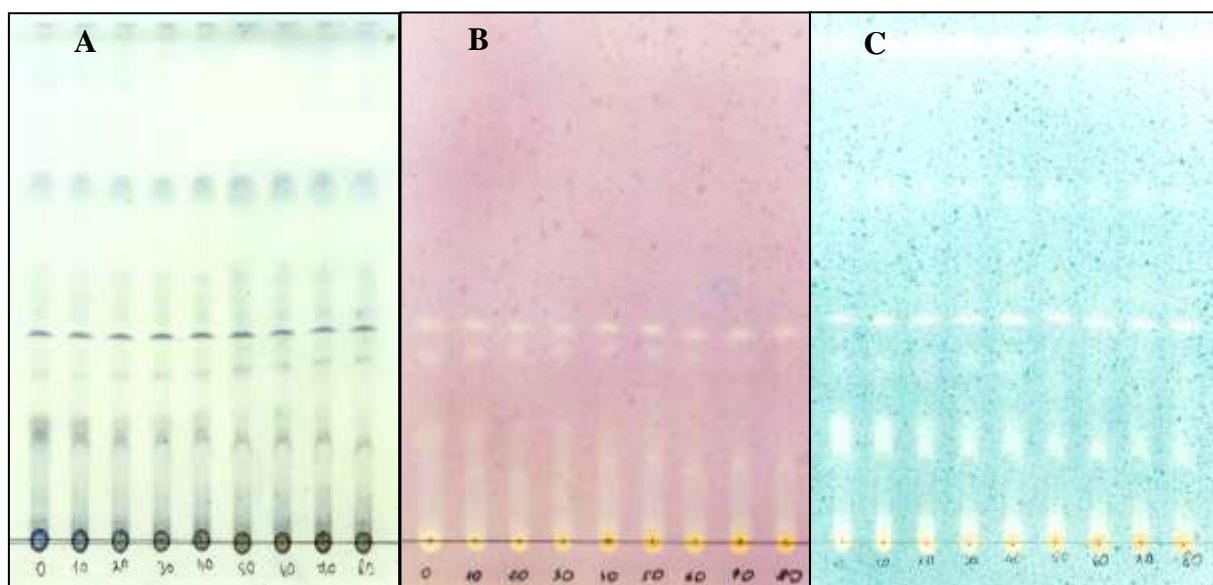
**Rys. 32** Chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek ekstraktów metanolowych z liofilizatów kiszzonej kapusty pochodzącej z uprawy standardowej otrzymane w wyniku zastosowania techniki TLC i wizualizowane za pomocą (A)-odczynnika *Folina-Ciocalteu*; (B)- roztworu rodnika DPPH; (C)- roztworu rodnika ABTS.

(Numery 0 – 80 na chromatogramach oznaczają czas prażenia liofilizatów [min]).



**Rys. 33** Chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek ekstraktów metanolowych z liofilizatów świeżej kapusty pochodzącej z uprawy ekologicznej otrzymane w wyniku zastosowania techniki TLC i wizualizowane za pomocą (A)-odczynnika *Folina-Ciocalteua*; (B)- roztworu rodnika DPPH; (C)- roztworu rodnika ABTS.

(Numery 0 – 80 na chromatogramach oznaczają czas prażenia liofilizatów [min]).



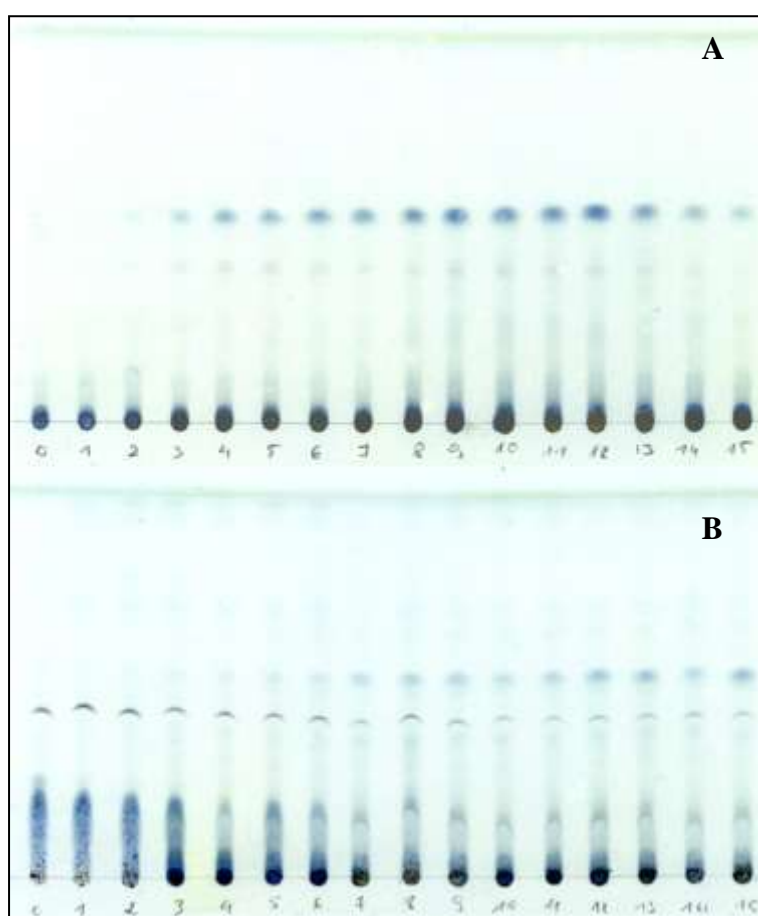
**Rys. 34** Chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek ekstraktów metanolowych z liofilizatów kiszzonej kapusty pochodzącej z uprawy ekologicznej otrzymane w wyniku zastosowania techniki TLC i wizualizowane za pomocą (A)-odczynnika *Folina-Ciocalteua*; (B)- roztworu rodnika DPPH; (C)- roztworu rodnika ABTS.

(Numery 0 – 80 na chromatogramach oznaczają czas prażenia liofilizatów [min]).



Takich różnic nie zaobserwowano jedynie dla próbek kiszzonej kapusty pochodzącej z uprawy ekologicznej (Rys. 34). Dla wszystkich próbek ekstraktów, dla których wzrost aktywności przeciwutleniającej wyznaczonej w wyniku zastosowania testów ABTS i DPPH podczas procesu prażenia wydaje się oczywisty na chromatogramach TLC stwierdzono obecność nowych związków (Rys. 31-33).

Uzyskane wyniki te sugerują więc, że w trakcie ogrzewania kapusty uwalniane są składniki o właściwościach przeciwutleniających. Wzrost aktywności przeciwutleniającej oraz wyższe stężenie niektórych bioaktywnych związków takich jak flawonole czy sterole zostało odnotowano również podczas procesu blanszowania kapusty (109).



**Rys. 35** Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek ekstraktów metanolowych uzyskanych z liofilizatów soków (A) świeżej i (B) kiszzonej kapusty pochodzącej ze standardowej uprawy z wykorzystaniem techniki TLC i wizualizowane za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteua*; (Numery 0 – 15 na chromatogramach oznaczają czas ogrzewania soków [godz]).

W celu sprawdzenia czy nowe związki o aktywności przeciwutleniającej powstają również w przypadku ogrzewania soków z kapusty, taki sam cykl badań przeprowadzono również dla próbek soków z kapusty po liofilizacji i ekstrakcji za pomocą metanolu. Otrzymane chromatogramy poddane wizualizacji za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteu* przedstawiono na rysunku 35.

Sposoby obróbki kulinarnej są z reguły uważane jako czynniki odpowiedzialne za degradację przeciwutleniaczy naturalnie występujących w żywności. Ostatnie doniesienia polskiej grupy naukowców (167) wskazują, że rodzaj obróbki może mieć istotny wpływ na zachowanie początkowej aktywności przeciwutleniającej produktu. Wykazano, że mętne soki jabłkowe są bogatszym źródłem przeciwutleniaczy niż te same soki poddane procesowi klarowania. Konsekwentnie, można się więc spodziewać, że poddane obróbce owoce i warzywa będą posiadać niższy od świeżych produktów potencjał przeciwutleniający. Taka zależność ma jednak miejsce głównie w odniesieniu do niestabilnych przeciwutleniaczy np. kwasu askorbinowego, który uznawano często za wskaźnik strat jakości produktu podczas obróbki. Wiadomo jednak, że obróbka żywności może mieć różnorodny wpływ na produkt, i nie zawsze konsekwencją tego jest jego utrata prozdrowotnych właściwości czy też jakości. W niektórych przypadkach obróbka kulinarna może powodować utratę naturalnie występujących antyoksydantów lub też w ogóle nie mieć wpływu na potencjał przeciwutleniający produktu (85, 109, 155, 167, 168). Czasami jednak przetwarzanie żywności może prowadzić do powstawania nowych substancji o właściwościach przeciwutleniających (165, 169-173). Zjawisko to szczególnie jest ważne w przypadku produktów zawierających dużą ilość tłuszczu, gdzie powstawanie przeciwutleniaczy podczas przetwarzania umożliwiłoby przeciwdziałanie niekorzystnym procesom utleniania.

### 3.2.2 Zawartość glukozyzolanów

Badanie wpływu sposobu obróbki kulinarnej na zawartość glukozyzolanów w warzywach krzyżowych oraz określenie wartości liczbowych parametrów fizykochemicznych wpływających na kierunek hydrolizy tych związków odgrywa znaczącą rolę w uzupełnianiu badań epidemiologicznych ukierunkowanych na wykrycie zależności pomiędzy spożyciem warzyw krzyżowych i chemoprewencją. Poznanie przemian fizycznych jak i biochemicznych tych związków zachodzących podczas procesów obróbki warzyw, jeszcze przed ich spożyciem ułatwiłoby zrozumienie metabolicznych przemian glukozyzolanów obserwowanych w trakcie badań eksperymentalnych z udziałem ludzi i zwierząt.



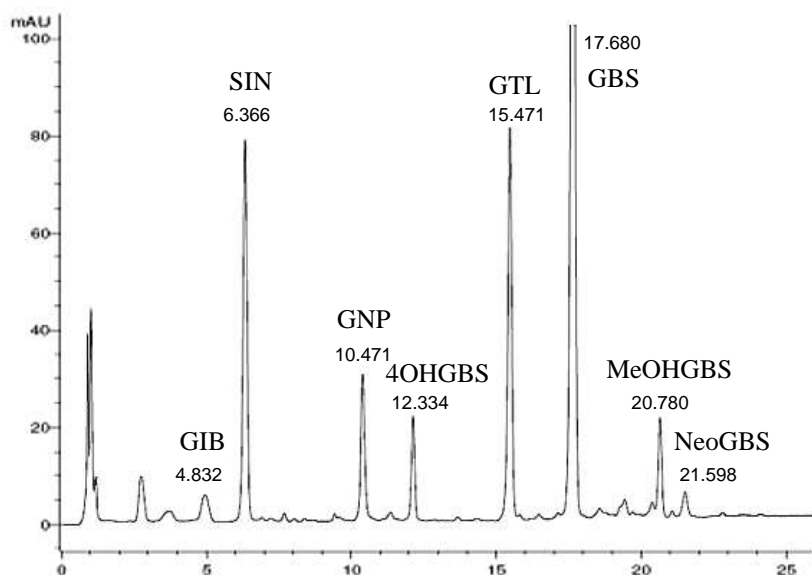
Umożliwiłyby również sformułowanie strategii dietetycznej w celu optymalizacji dawkowania bioaktywnych produktów rozpadu glukozynolanów do organizmu.

W trakcie procesów obróbki kulinarnej typowych dla warzyw krzyżowych tj. zamrażanie, rozdrabnianie, blanszowanie czy też gotowanie glukozynolany w zależności od warunków procesu mogą ulegać enzymatycznej hydrolizie bądź też termicznej degradacji. Celem opisywanego etapu badań jest oszacowanie efektu fermentacji na ilość i proporcje pomiędzy glukozanami występującymi w kapuście. Dodatkowo postanowiono określić wpływ wysokiej temperatury na glukozynolany zawarte w kapuście podczas badań modelowych przeprowadzonych w warunkach bezwodnych.

### **- Proces fermentacji**

Głównymi przejawami zmian składu chemicznego zachodzącymi podczas procesu fermentacji kapusty jest przekształcenie węglowodanów do kwasu mlekowego oraz octowego oraz alkoholu etylowego, mannitolu, dekstranu oraz ditlenku węgla. Fermentacja wpływa także na białka, lipidy, glukozydy oraz inne składniki kapusty, co skutkuje zmianami właściwości chemicznych oraz fizycznych produktu. Wpływ procesu fermentacji na glukozynolany jak dotąd do końca nie został poznany. Dostępne dane literaturowe dotyczą zazwyczaj wyników analizy próbek na zawartość GLS w próbkach kapusty po co najmniej 2 tygodniowym procesie fermentacji. W opisywanych badaniach postanowiono monitorować zawartość głównie występujących w kapuście białej glukozynolanów w kilkudniowych odstępach czasu od momentu rozpoczęcia fermentacji do momentu jej zakończenia (2 tygodnie). Do badań użyto kapustę pochodzącą zarówno z uprawy standardowej jak i ekologicznej.

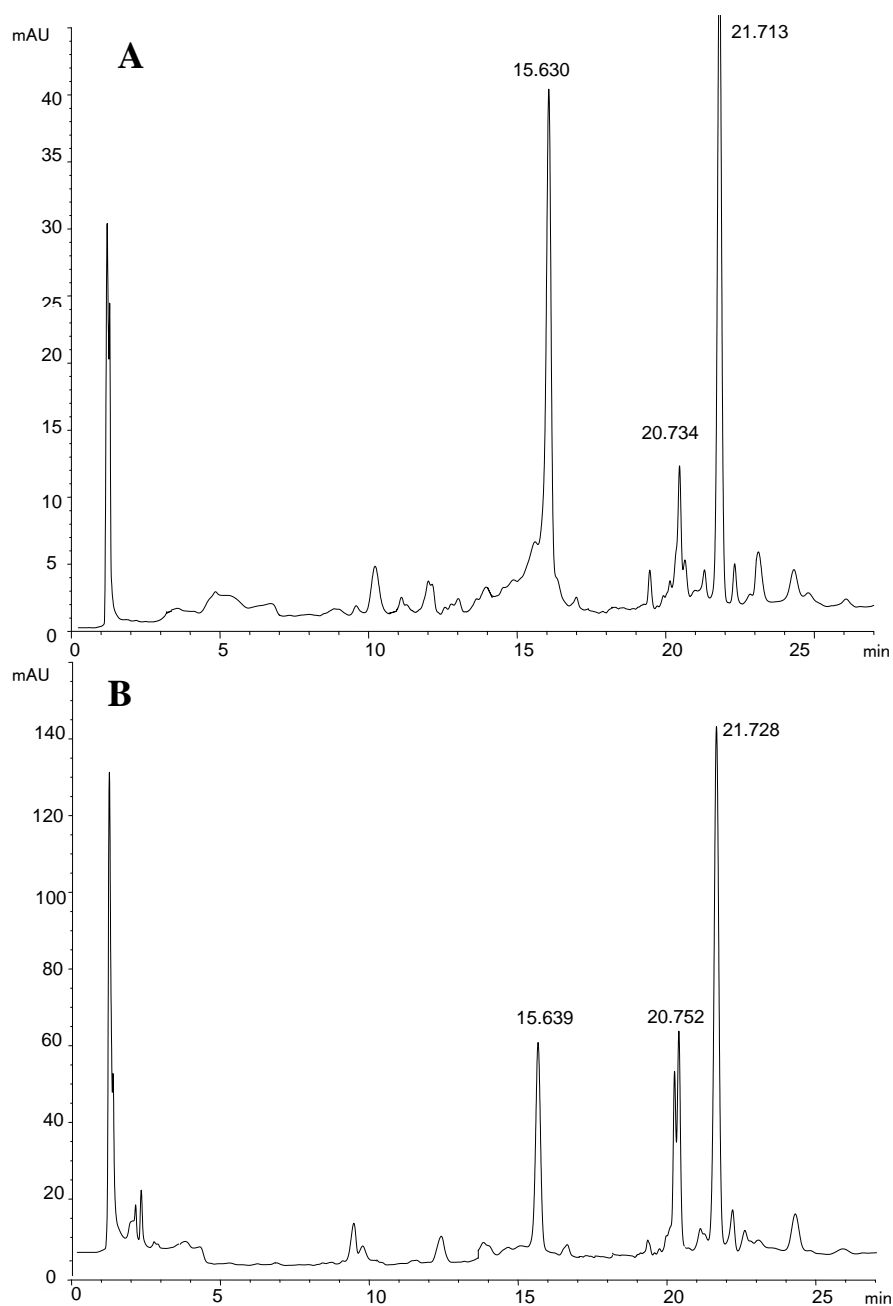
Ogólny profil oraz zawartość glukozynolanów dla próbek świeżej kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej jak i ekologicznej jest bardzo zbliżona. Na rysunku 36 przedstawiono przykładowy chromatogram obrazujący obecność desulfoglukozynolanów w analizowanych próbkach ekstraktów uzyskanych ze świeżej białej kapusty. Natomiast na rysunku 37 przedstawiono chromatogramy (na których widoczne są piki odpowiadające desulfoglukozynolanom) uzyskane w wyniku analizy próbek kapusty poddanej dwutygodniowej fermentacji pochodzącej zarówno z uprawy standardowej (37-A) jak i ekologicznej (37-B).



**Rys. 36** Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbek ekstraktów metanolowych uzyskanych ze świeżej kapusty białej na zawartość desulfoglukozynolanów z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD ( $\lambda=229$  nm).

(GIB- glukoiberyna, SIN- sinigrina; GNP- glukonapina; 4OHGBS- hydroksyglukobrassycyna; GTL- glukotropaeolina- wzorzec wewnętrzny; GBS- glukobrassycyna; MeOHGBS- metoksyglukobrassycyna; NeoGBS- neoglukobrassycyna)

Z danych literaturowych wynika, że dwutygodniowy okres fermentacji powoduje całkowitą degradację wszystkich glukozynolanów obecnych w kapuście (77). Wyniki uzyskane w trakcie prowadzonych badań wskazują na degradację prawie wszystkich glukozynolanów obecnych w próbkach kapusty. Jednocześnie odnotowano (w przypadku obu badanych próbek kapusty) wzrost stężenia dwóch glukozynolanów charakteryzujących się czasami retencji około 20,7 min i 21,7 min. W tabeli 8 i 9 przedstawiono informacje odnośnie zmian zawartości poszczególnych glukozynolanów wyznaczone dla próbek kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej jak i „ekologicznej” pobieranych w różnych etapach procesu fermentacji. Jednocześnie w tabelach zestawiono widma UV i MS poszczególnych związków zarejestrowane podczas analizy próbek kapusty przy użyciu techniki LC-DAD-MS.

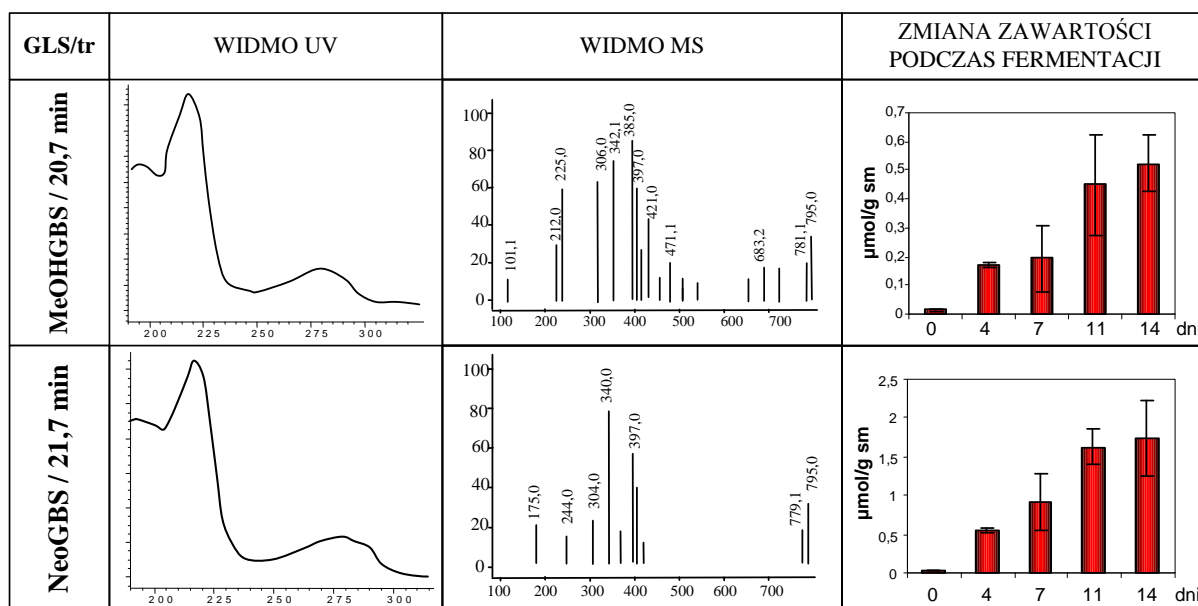


**Rys. 37** Chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek ekstraktów uzyskanych z kiszanej kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej (**A**) jak i ekologicznej (**B**) z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD ( $\lambda=229$  nm).

**Tabela 8** Zmiany zawartości poszczególnych glukozynolanów w próbkach kapusty pochodzącej z uprawy standardowej w trakcie procesu fermentacji wyznaczone w wyniku zastosowania techniki HPLC-DAD-MS na etapie analizy próbek odpowiednich ekstraktów rozpuszczalnikowych.

GLS/tr	WIDMO UV	WIDMO MS	ZMIANA ZAWARTOŚCI PODCZAS FERMENTACJI
<b>GIB / 4,8 min</b>			
<b>SIN / 6,4 min</b>			
<b>GNP / 10,5 min</b>			
<b>4OHGBS / 12,3 min</b>			
<b>GBS / 17,7 min</b>			

Tabela 8 c.d.



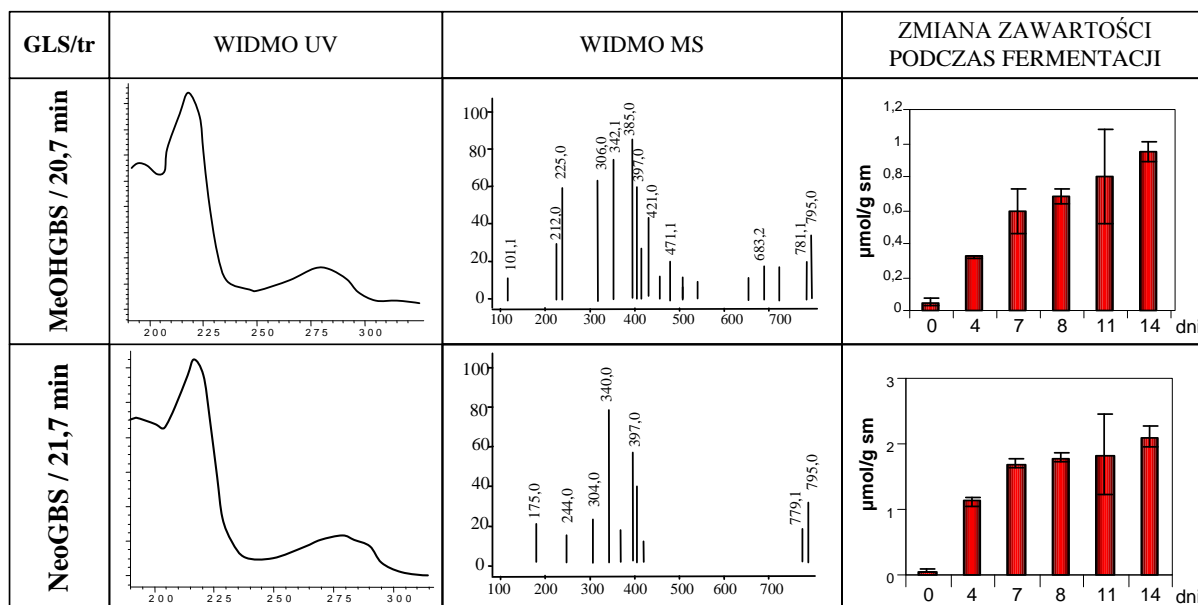
(GIB- glukoiberyna, SIN- sinigryna; GNP- glukonapina; 4OHGBS- hydroksyglukobrassycyna; GTL- glukotropaeolina- wzorzec wewnętrzny; GBS- glukobrassycyna; MeOHGBS- metoksyglukobrassycyna; NeoGBS- neoglukobrassycyna)

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że w przypadku obu rodzajów kapusty zachodzi proces szybkiej (w ciągu maksymalnie 7 dni procesu) degradacji glukozyolanów alifatycznych czyli glukoiberyny, sinigryny i glukonapiny. Bardziej stabilne w warunkach fermentacji kapusty okazały się być glukozyolany indolowe. Trudnym do potwierdzenia zjawiskiem okazał się wzrost stężenia związków, które wykazują się czasami retencji charakterystycznymi dla desulfo-metoksyglukobrassycyny (MeOHGBS) i desulfo-neoglukobrassycyny (NeoGBS). Po 14 dniach fermentacji w przypadku kapusty pochodzącej z uprawy standardowej odnotowano 37- krotny wzrost stężenia związku o czasie retencji zbliżonym do związku MeOHGBS oraz aż 58- krotny wzrost stężenia związku o czasie retencji podobnym jak czas retencji związku NeoGBS. W przypadku kapusty „ekologicznej” stężenia tych związków wzrosły odpowiednio 19 i 33 razy. Widma UV tych związków zarejestrowane w trakcie badań jednoznacznie wskazywały na obecność grupy indolowej w ich strukturze. Jednak widma MS oprócz jonów charakterystycznych dla MeOHGBS i NeoGBS (397, 795 m/z) zawierały jeszcze inne jony charakteryzujące się masami np. 779 lub 781 m/z. Trudności w interpretacji widm MS tych substancji uniemożliwiają jednoznaczne stwierdzenie, że powstającymi związkami są na pewno związki MeOHGBS i NeoGBS.

**Tabela 9** Zmiany zawartości poszczególnych glukozynolanów w próbkach kapusty pochodzącej z uprawy ekologicznej w trakcie procesu fermentacji wyznaczone w wyniku zastosowania techniki HPLC-DAD-MS na etapie analizy próbek odpowiednich ekstraktów rozpuszczalnikowych.

GLS/tr	WIDMO UV	WIDMO MS	ZMIANA ZAWARTOŚCI PODCZAS FERMENTACJI
<b>GIB / 4,8 min</b>			
<b>SIN / 6,4 min</b>			
<b>GNP / 10,5 min</b>			
<b>4OHGBS / 12,3 min</b>			
<b>GBS / 17,7 min</b>			

Tabela 9 c.d.



(GIB- glukoiberyina, SIN- sinigrina; GNP- glukonapina; 4OHGBS- hydroksyglukobrassyca; GTL- glukotropaeolina- wzorzec wewnętrzny; GBS- glukobrassyca; MeOHGBS- metoksyglukobrassyca; NeoGBS- neoglukobrassyca)

W dostępnych danych literaturowych dotyczących oznaczania glukozynolanów w próbkach kiszzonej kapusty można jedynie znaleźć informację o procesie degradacji tych związków spowodowaną działalnością mirozynazy (77, 174-176). Niestety brak jest danych na temat ewentualnego wzrostu stężenia, któregoś z obecnych w kapuście glukozynolanów, bądź też powstawania nowych form tych związków.

### - Proces obróbki termicznej

Poza fermentacją, warzywa krzyżowe bardzo często poddawane są procesowi obróbki termicznej. Podczas gotowania mogą zachodzić różne procesy w wyniku których zachodzą takie zjawiska jak:

- częściowa lub całkowita inaktywacja mirozynazy,
- utrata kofaktorów enzymu,
- degradacja bądź przechodzenie glukozynolanów do medium, w którym warzywa są gotowane,
- termiczna degradacja bądź też ulatnianie się powstających metabolitów GLS.

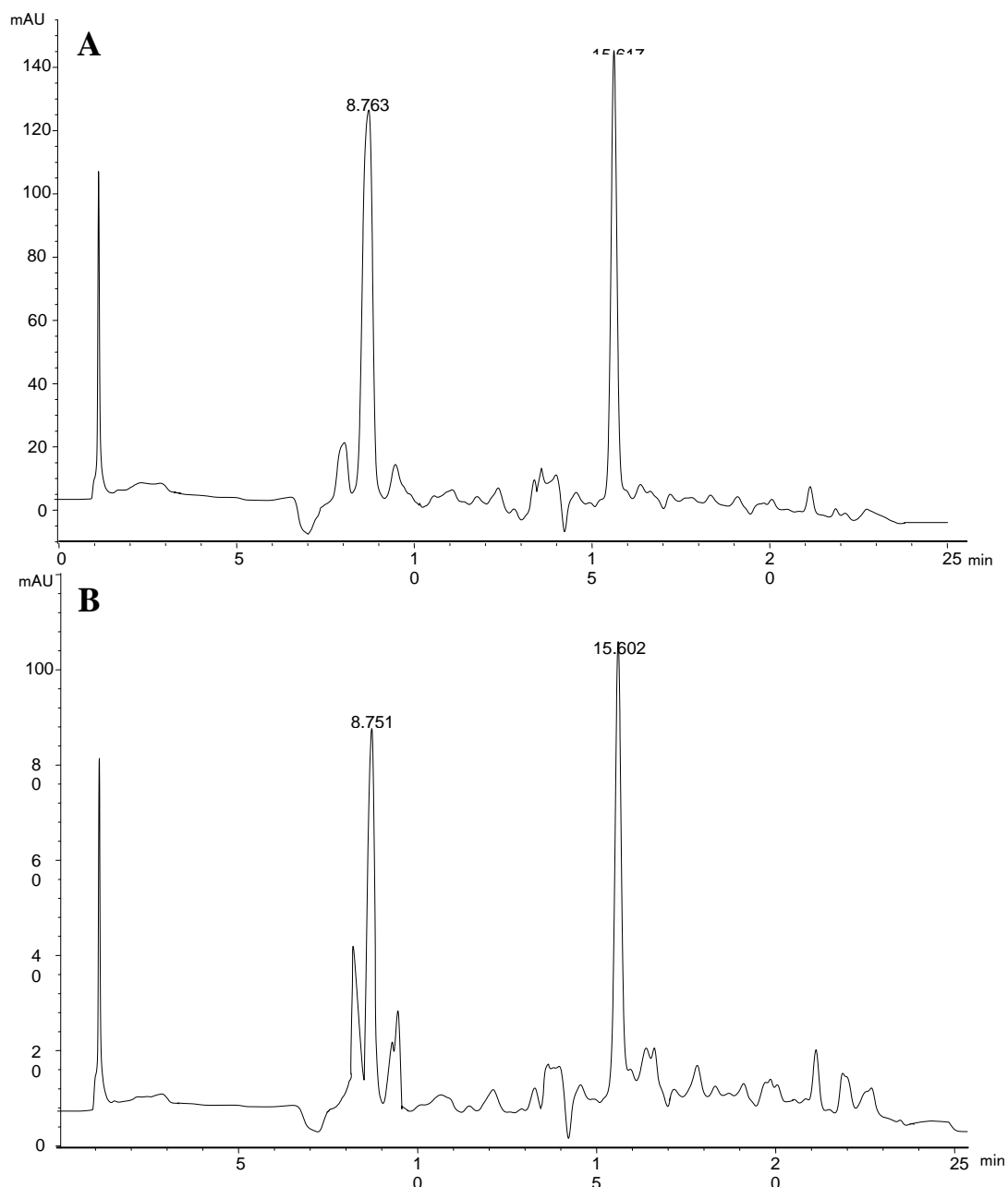
Zmiany te w dużej mierze zależą od czasu oraz sposobu gotowania, rodzaju gotowanego warzywa, od stopnia jego rozdrobnienia, a także od struktury chemicznej prekursorów glukozynolanów.

Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem utraty związków z grupy GLS w gotowanych warzywach jest ich wypłukanie do wody po lizie komórek. Utrata GLS może być częściowo związana ze stopniem poszatkowania warzyw. Podobnie jak w przypadku degradacji enzymatycznej dane dotyczące przebiegu procesu termicznej degradacji glukozynolanów nie są jednoznaczne. W celu oszacowania wpływu wysokiej temperatury na zawartość glukozynolanów w kapuście wykonano modelowe badania polegające na oznaczeniu poziomu zawartości tych związków w próbkach liofilizatów uzyskanych z kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej jak i ekologicznej, poddawanych procesowi prażenia w warunkach bezwodnych przez różny okres czasu.

Na rysunku 38 przedstawiono chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek ekstraktów z kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej (Rys. 38-A) jak i z ekologicznej (Rys. 38-B) prażonej w 100°C przez 1 godzinę. Uzyskane wyniki wskazują na całkowitą degradację glukozynolanów obecnych w próbkach liofilizatów obu rodzajów kapusty podczas prażenia trwającego 60 minut. W tabeli 10 i 11 przedstawiono natomiast zmiany zawartości poszczególnych glukozynolanów wyznaczone dla próbek kapusty pochodzącej ze standardowej i ekologicznej uprawy pobieranych co 10 minut podczas procesu prażenia. Jednocześnie w tabelach zestawiono widma UV i MS poszczególnych związków zarejestrowane w trakcie badań ekstraktów z kapusty przy użyciu techniki LC-DAD-MS.

Większość danych literaturowych na temat degradacji glukozynolanów pod wpływem wysokiej temperatury dotyczy gotowanych bądź blanszowanych próbek kapusty. Wyniki uzyskane przez autorów tych prac pozwalają wyciągnąć wniosek, że poziom indolowych GLS w trakcie gotowania zmniejsza się szybciej niż poziom alifatycznych GLS (177, 178). Podobną zależność można zaobserwować w przypadku próbek kapusty pochodzącej z uprawy standardowej, gdzie całkowity zanik glukozynolanów indolowych następuje już po 20 minutach prażenia natomiast pozostałości glukozynolanów alifatycznych ulegają rozkładowi dopiero po 60 minutach procesu (Tab. 10). Informacje zawarte w literaturze wskazują, że podczas gotowania kapusty najbardziej niestabilna spośród alifatycznych GLS okazała się glucoiberyna (GIB), natomiast spośród indolowych GLS najbardziej wrażliwe na działanie wyższych temperatur były związki: GBS oraz MeOHGBS (178, 179).





**Rys. 38** Chromatogramy uzyskane w trakcie analizy z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD ekstraktów uzyskanych z kapusty pochodzącej z uprawy standardowej (A) i ekologicznej (B) prażonej w temperaturze 100°C przez 1 godzinę.

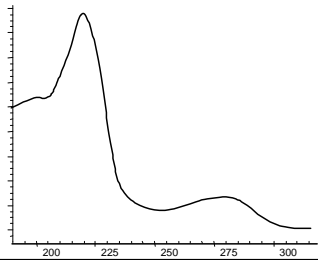
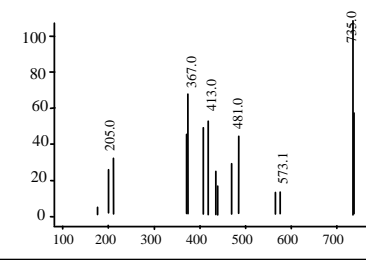
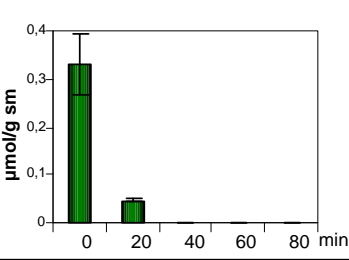
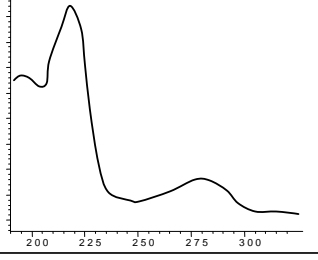
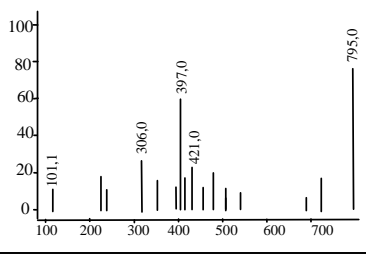
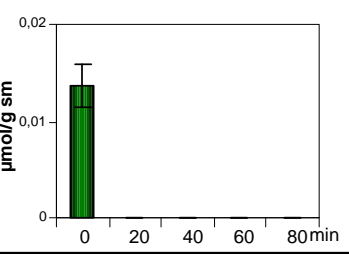
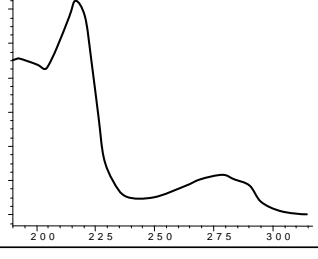
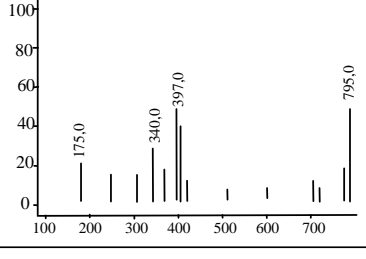
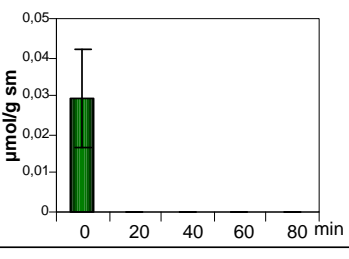
W badaniach prowadzonych w ramach pracy doktorskiej za najbardziej niestabilny alifatyczny GLS uznano również GIB, natomiast spośród indolowych GLS najszybciej degradacji ulegały 4OHGBS, MeOHGBS oraz NeoGBS. Generalnie alifatyczne glukozynolany są bardziej stabilne w porównaniu z indolowymi, jednak stabilność poszczególnych związków z grupy GLS zależy od struktury chemicznej każdego z nich.

Ponadto względna termostabilność konkretnych glukozynolanów różni się w zależności od temperatury ogrzewania (180).

**Tabela 10** Zmiany zawartości poszczególnych glukozynolanów w próbkach kapusty pochodzącej z uprawy standardowej w trakcie procesu prażenia wyznaczone w wyniku zastosowania techniki HPLC-DAD-MS na etapie analizy próbek odpowiednich ekstraktów rozpuszczalnikowych.

GLS/tr	WIDMO UV	WIDMO MS	ZMIANA ZAWARTOŚCI PODCZAS OGRZEWANIA
<b>GIB / 4,8 min</b>			
<b>SIN / 6,4 min</b>			
<b>? / 8,7 min</b>			
<b>GNP / 10,5 min</b>			
<b>4OHGBS / 12,3 min</b>			

Tabela 10 c.d.

GLS	WIDMO UV	WIDMO MS	ZMIANA ZAWARTOŚCI PODCZAS OGRZEWANIA
GBS / 17,7 min			
MeOHGBS / 20,7 min			
NeoGBS / 21,7 min			

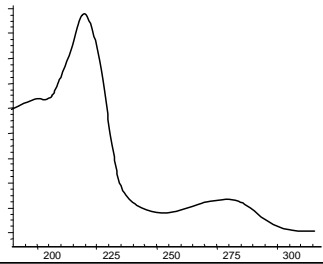
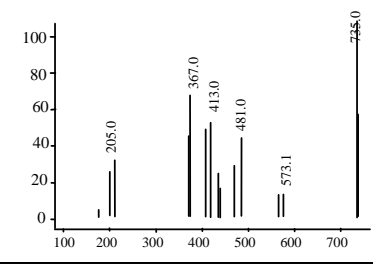
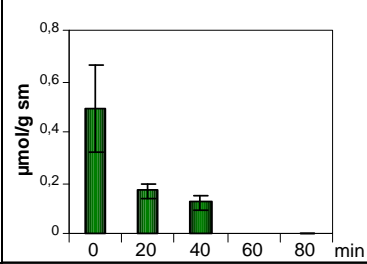
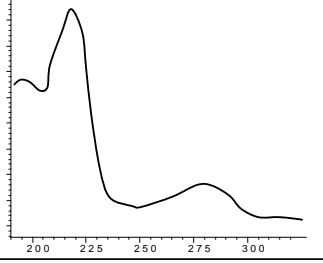
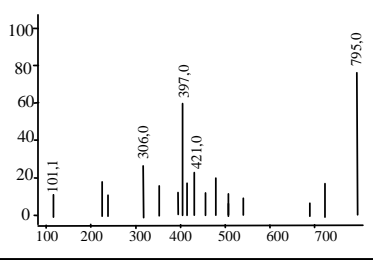
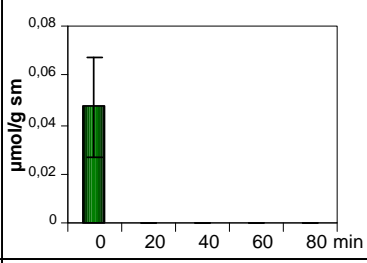
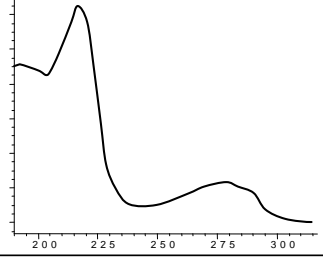
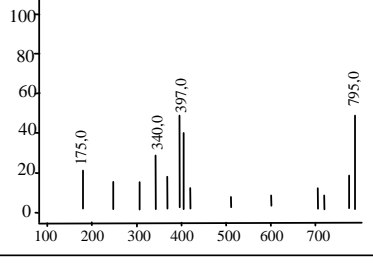
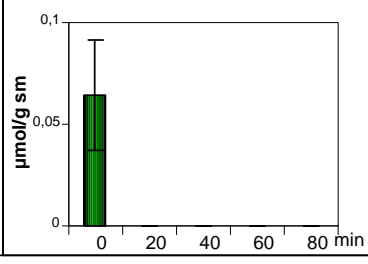
(GIB- glukoiberyna, SIN- sinigryna; GNP- glukonapina; 4OHGBS- hydroksyglukobrassyryna; GTL- glukotropaeolina- wzorzec wewnętrzny; GBS- glukobrassyryna; MeOHGBS- metoksyglukobrassyryna; NeoGBS- neoglukobrassyryna)

Podczas analizy próbek obu rodzajów kapusty na chromatogramach (Rys. 38 A, B) zaobserwowano wzrost stężenia jednego ze związków ( $t_r=8,7$  min), postępujący w miarę wydłużania czasu trwania procesu prażenia (Tab. 10, 11). Widma UV i MS tej substancji zarejestrowane podczas analiz nie były zbliżone do żadnego z glukozynolanów charakterystycznych dla warzyw krzyżowych. Wyniki badań prowadzonych w innych ośrodkach wskazują, że podczas procesu termicznego może zachodzić wiele różnych przemian glukozynolanów w szczególności GLS indolowych (181, 182). Mogą się tworzyć inne pochodne istniejących glukozynolanów lub też kumulować produkty rozpadu tych związków. Jednoznaczne zidentyfikowanie struktury związku powstającego podczas prażenia próbek kapusty na tym etapie badań nie jest możliwe i wymaga zastosowania zaawansowanych technik identyfikacyjnych takich jak techniki spektroskopowe.

**Tabela 11** Zmiany zawartości poszczególnych glukozynolanów w próbkach kapusty pochodzącej z uprawy ekologicznej w trakcie procesu prażenia wyznaczona w wyniku zastosowania techniki HPLC-DAD-MS na etapie analizy próbek odpowiednich ekstraktów rozpuszczalnikowych.

GLS/tr	WIDMO UV	WIDMO MS	ZMIANA ZAWARTOŚCI PODCZAS OGRZEWANIA
<b>GIB / 4,8 min</b>			
<b>SIN / 6,4 min</b>			
<b>? / 8,7 min</b>			
<b>GNP / 10,5 min</b>			
<b>4OHGBS / 12,3 min</b>			

Tabela 11 c.d.

GLS/tr	WIDMO UV	WIDMO MS	ZMIANA ZAWARTOŚCI PODCZAS OGRZEWANIA
GBS / 17,7 min			
MeOHGBS / 20,7 min			
NeoGBS / 21,7 min			

(GIB- glukoiberylna, SIN- sinigryna; GNP- glukonapina; 4OHGBS- hydroksyglukobrassylna; GTL- glukotropaeolina- wzorzec wewntrznny; GBS- glukobrassylna; MeOHGBS- metoksyglukobrassylna; NeoGBS- neoglukobrassylna)

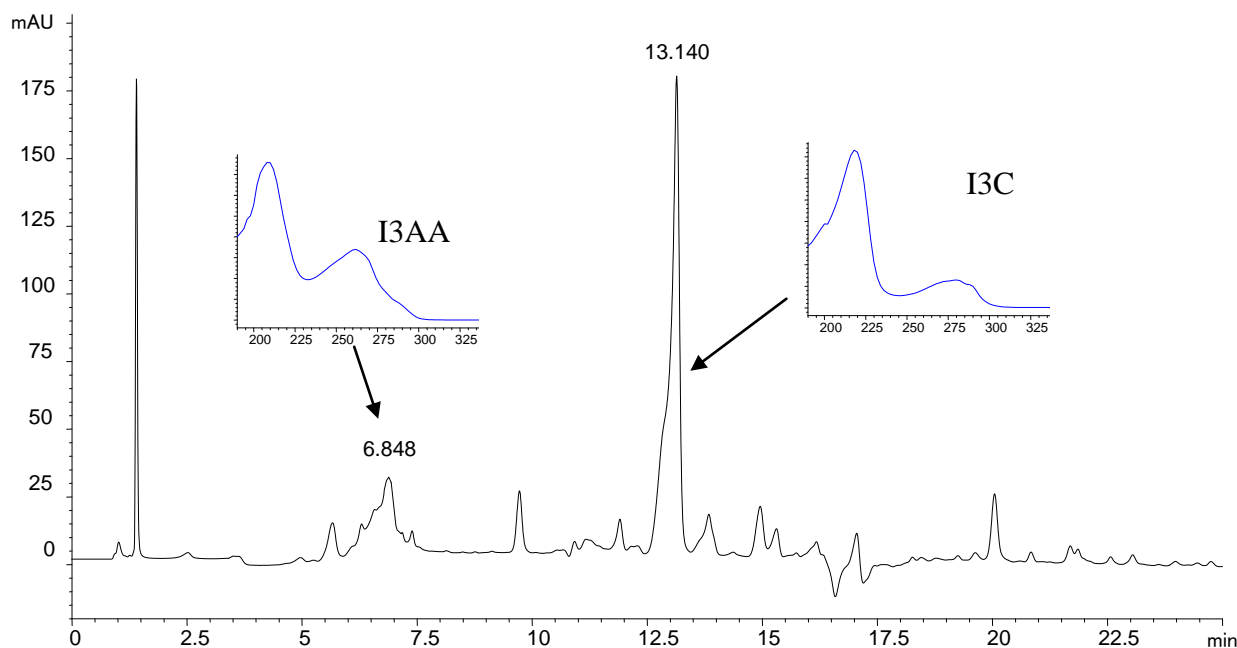
### 3.2.3 Zawartość indolowych produktów rozpadu glukozynolanów

Spośród indolowych produktów rozpadu glukozynolanów najlepiej poznanymi są produkty rozpadu glukobrassylny: indolo-3-karbinol (I3C) oraz 3,3'-diindolometan (DIM). Indolo-3-karbinol jest najważniejszą pochodną o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, którą wyizolowano z roślin krzyżowych. Związek ten jest niezwykle obiecującą substancją w zakresie profilaktyki nowotworów i równowagi gospodarki hormonalnej. Zapobiega powstawaniu nowotworów, szczególnie piersi, szyjki macicy oraz odbytnicy. Indolo-3-karbinol odgrywa szczególną rolę w zapobieganiu nowotworom piersi, ze względu na swoje działanie polegające na zwiększaniu konwersji estrogenu z form przyczyniających się do powstawania raka w nietoksyczne produkty rozkładu.

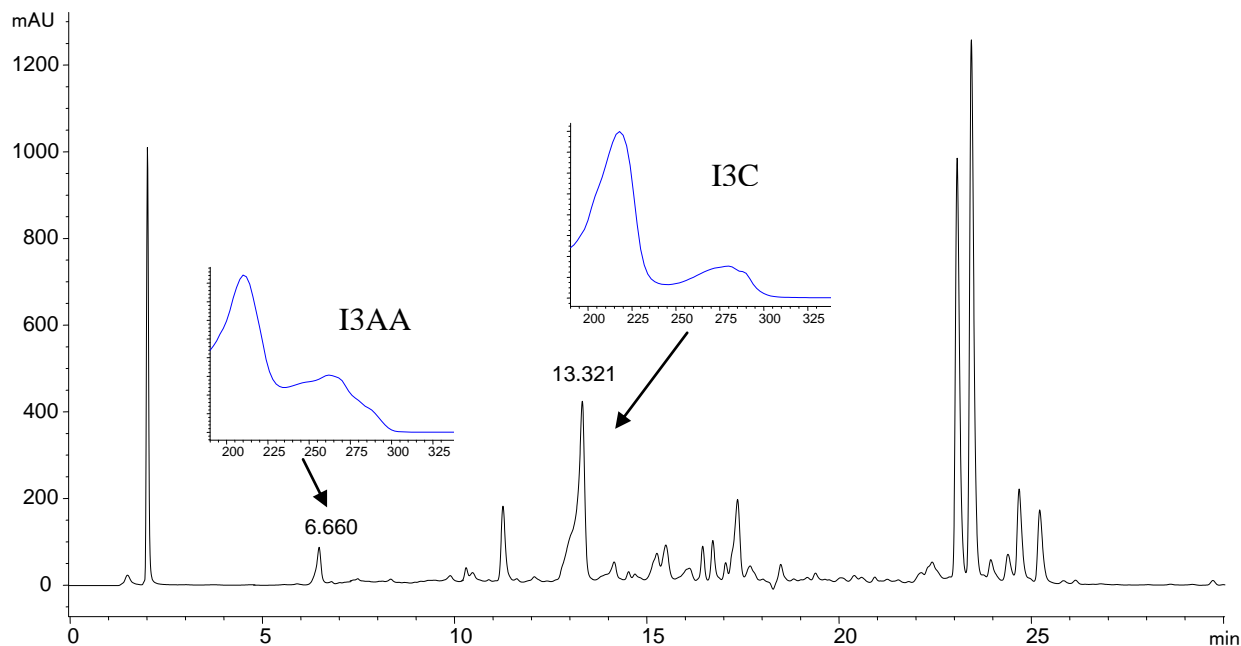
Badania biologiczne ekstraktów z fermentowanej kapusty wykazały wysoką aktywność w stosunku do estrogeno-zależnych nowotworów (183). Przyczyną zahamowania rozwoju i

wzrostu tego typu nowotworów najprawdopodobniej są powstające podczas procesu fermentacji kapusty indolowe produkty rozpadu glukobrassicyny. Dane na temat zmian w poziomach stężeń tych związków w kapuście podczas obróbki kulinarnej są jednak nadal ograniczone.

Celem kolejnego etapu badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było oznaczenie trzech indolowych produktów rozpadu glukobrassicyny: kwasu indolo-3-octowego (I3AA), indolo-3-karbinolu (I3C) oraz indolo-3-acteonitrylu (I3ACN) w próbkach soków z kapusty (pochodzącej ze standardowej i ekologicznej uprawy) fermentowanych oraz ogrzewanych przez różne okresy czasu. Ekstrakcję i analizę indolowych produktów rozpadu związków z GLS przeprowadzono według częściowo zmodyfikowanej metody opisanej w literaturze (77). Na rysunkach 39 i 40 przedstawiono chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych otrzymanych z soków ze świeżej kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej jak i ekologicznej, które zostały otrzymane dzięki zastosowaniu techniki HPLC-DAD.



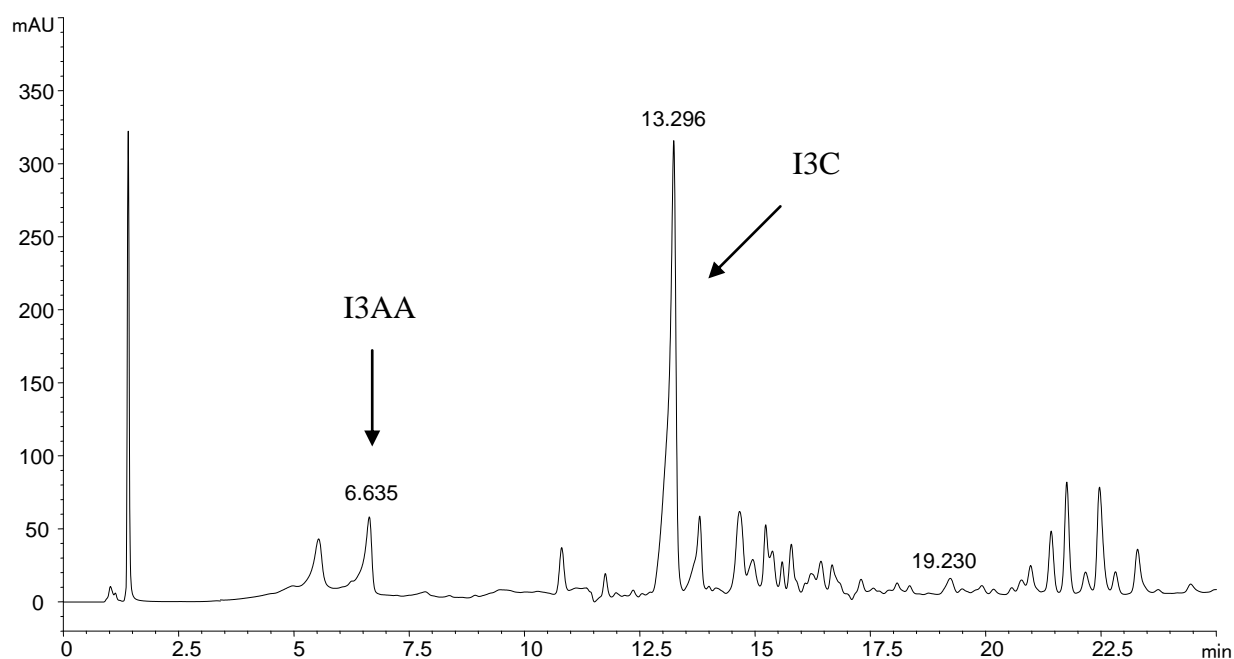
**Rys. 39** Chromatogram uzyskany podczas analizy próbek ekstraktów z soków świeżej kapusty pochodzącej ze standardowej uprawy przy użyciu techniki HPLC-DAD ( $\lambda=280$  nm). (I3AA- kwas indolo-3-octowy; I3C- indolo-3-karbinol)



**Rys. 40** Chromatogram uzyskany przy podczas analizy próbek ekstraktów z soków świeżej kapusty pochodzącej z ekologicznej uprawy użyciu techniki HPLC-DAD ( $\lambda=280$  nm).

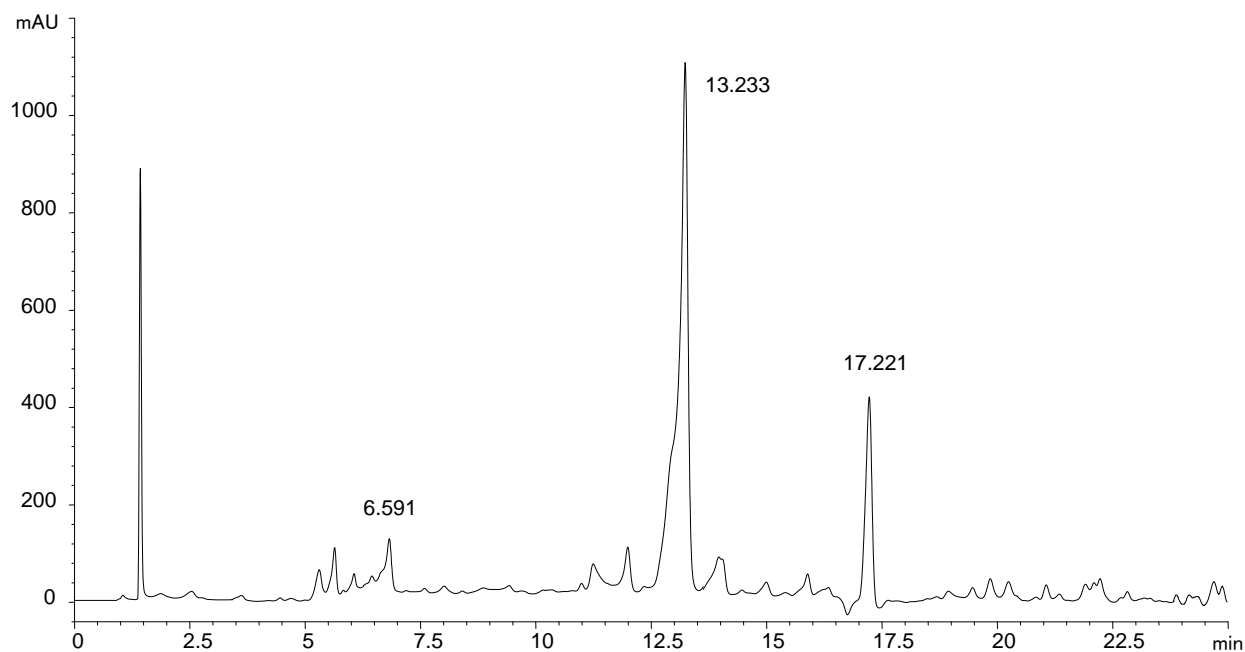
(I3AA- kwas indolo-3-octowy; I3C- indolo-3-karbinol)

Na rysunkach 41 i 42 przedstawiono natomiast chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek ekstraktów z soków kapusty pobranych po 11 dniach fermentacji. Uzyskane wyniki wskazują na obecność we wszystkich badanych próbkach dwóch z trzech oznaczanych produktów rozpadu GBS tzn. I3AA i I3C. Śladowe ilości I3ACN zaobserwowano jedynie w próbkach ekstraktów uzyskanych ze świeżej kapusty pochodzącej ze standardowej uprawy. Na rysunku 40 przedstawiono zmiany stężeń kwasu indolo-3-octowego oraz indolo-3-karbinolu zaobserwowane podczas procesu fermentacji kapusty pochodzącej z uprawy standardowej i ekologicznej. Proces fermentacji w przypadku obydwu rodzajów kapust powodował wzrost stężenia kwasu indolo-3-octowego i indolo-3-karbinolu. Kapusta ekologiczna po 14 dniach fermentacji charakteryzowała się wyższym stężeniem indolo-3-karbinolu, natomiast w przypadku kapusty pochodzącej ze standardowej uprawy po zakończeniu procesu kiszenia na wyższym poziomie stężeń występował kwas indolo-3-octowy. Według danych dostępnych w literaturze podczas procesu fermentacji kapusty głównymi indolowymi produktami rozpadu związków z grupy GLS były indolo-3-karbinol (1,5  $\mu\text{mol}/100$  g), indolo-3-acetonitryl (0,1  $\mu\text{mol}/100$  g) oraz askorbigen (14  $\mu\text{mol}/100$  g) (77, 176). Inna grupa naukowców po 124 godzinach fermentacji kapusty odnalazła jedynie śladowe ilości I3C (174).



**Rys. 41** Chromatogram uzyskany podczas analizy próbek ekstraktów z soków kapusty fermentowanej przez 11 dni pochodzącej ze standardowej uprawy przy użyciu techniki HPLC-DAD ( $\lambda=280$  nm).

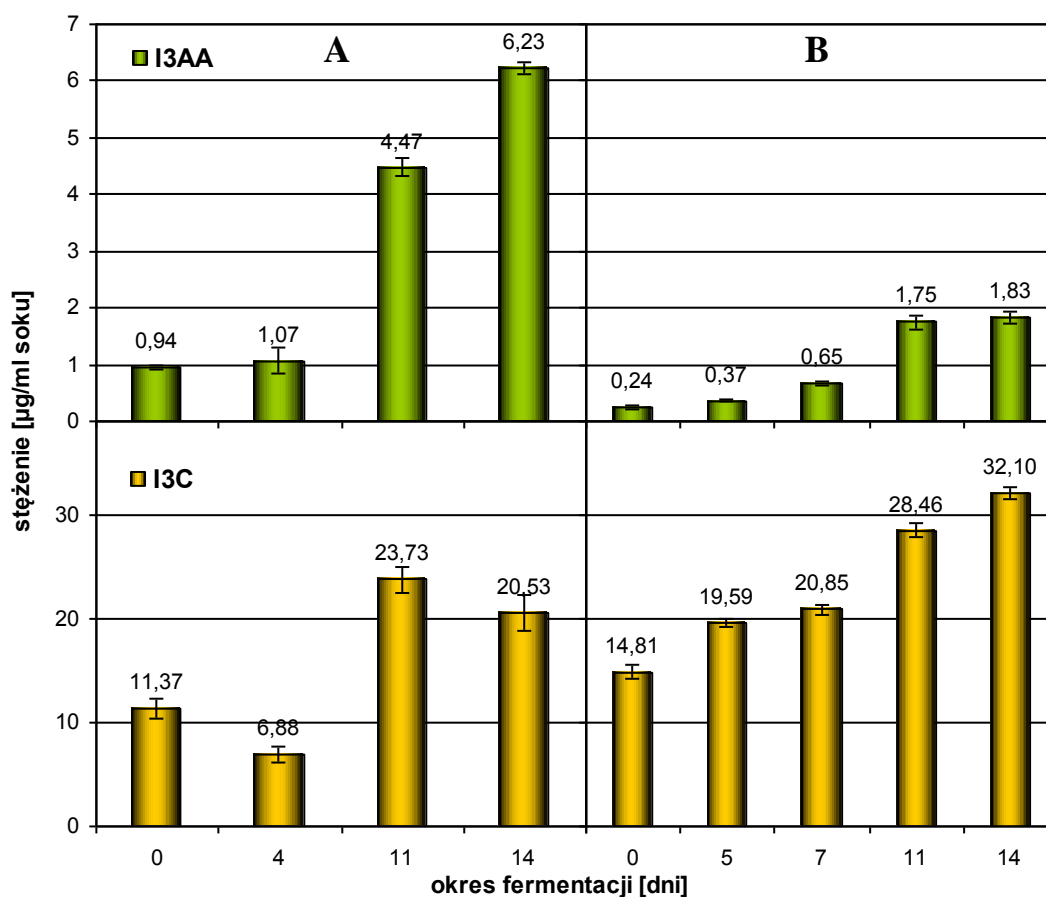
(I3AA- kwas indolo-3-octowy; I3C- indolo-3-karbinol)



**Rys. 42** Chromatogram uzyskany podczas analizy próbek ekstraktów z soków kapusty fermentowanej przez 11 dni pochodzącej z uprawy ekologicznej przy użyciu techniki HPLC-DAD ( $\lambda=280$  nm).

(I3AA- kwas indolo-3-octowy; I3C- indolo-3-karbinol)



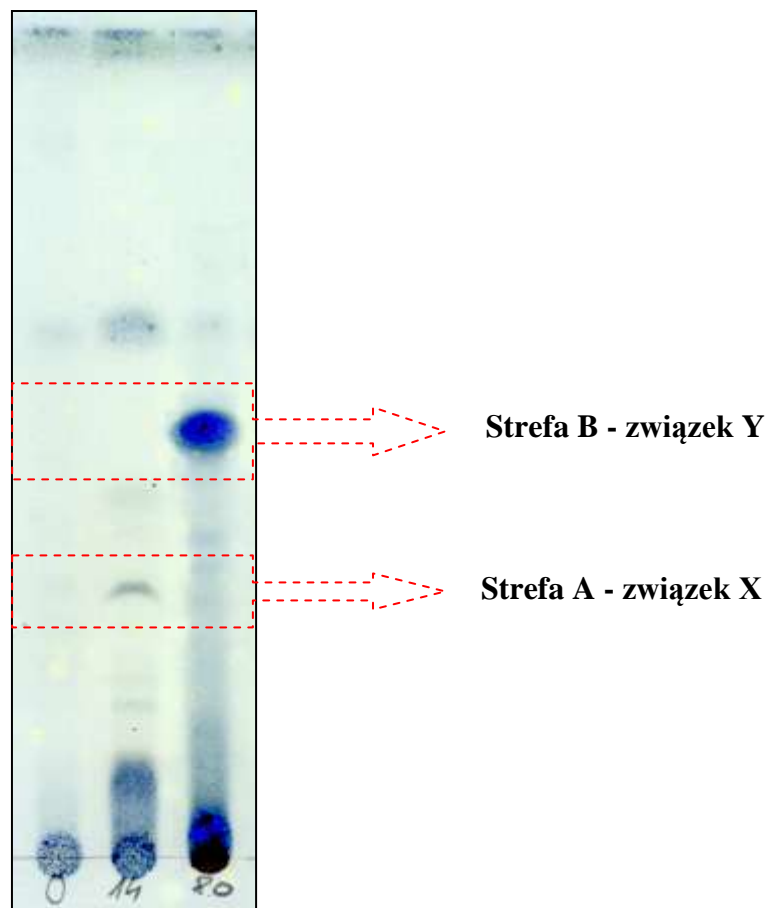


**Rys. 43** Wpływ procesu fermentacji na zawartość kwasu indolo-3-octowego (I3AA) oraz indolo-3-karbinolu (I3C) w ekstraktach rozpuszczalnikowych z soków z kapusty pochodzącej ze standardowej (A) i ekologicznej (B) uprawy wyznaczoną dzięki zastosowaniu techniki HPLC-DAD [ $\mu\text{g}/\text{mL}$  soku].

Podczas analizy próbek ekstraktów ogrzewanych soków uzyskanych z kapusty pochodzącej zarówno z uprawy standardowej jak i ekologicznej nie odnotowano obecności związków I3AA, I3C oraz I3ACN. Już 4 godzinne ogrzewanie soków powodowało całkowitą degradację obecnych w próbkach indolowych produktów rozpadu glukozynolanów. Odmienne rezultaty otrzymały inne grupy naukowców, które podczas ogrzewania kapusty, brokułów, kalafiora i brukselki zaobserwowały wzrost stężenia związku I3C oraz I3ACN (181). Rozbieżność wyników może być spowodowana różnym okresem ogrzewania próbek, w przypadku tej konkretnej pracy (181) próbki były ogrzewane przez okres nie dłuższy niż 50 minut.

### 3.3 Próba izolacji i identyfikacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty

Podczas badań wpływu obróbki kulinarnej zaobserwowano (dzięki zastosowaniu techniki TLC) znaczne różnice w profilu przeciwutleniaczy obecnych w próbkach świeżej, kiszzonej i ogrzewanej kapusty (Rys. 44).



**Rys. 44** Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbek ekstraktów metanolowych z liofilizatów świeżej, kiszzonej i ogrzewanej kapusty otrzymany przy użyciu techniki TLC (wizualizowany za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteua*)

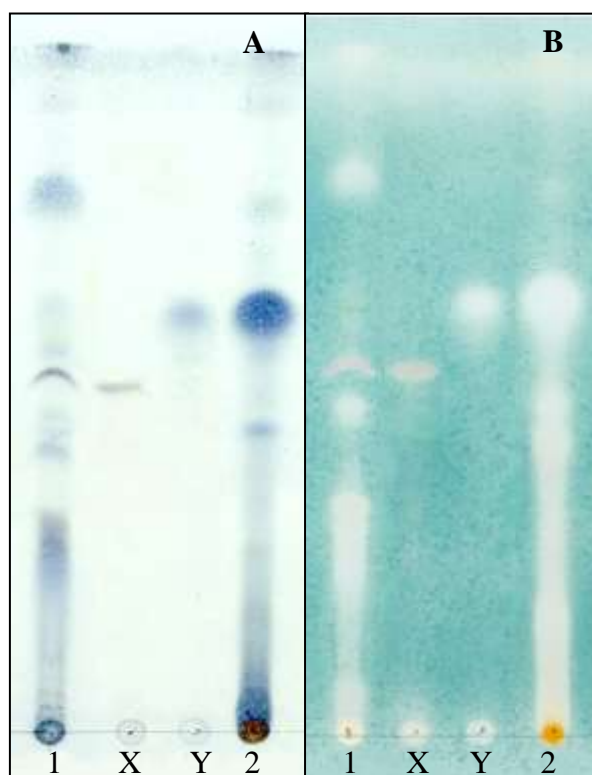
(0-kapusta bez obróbki; 14- kapusta po 14 dniach fermentacji; 80- kapusta ogrzewana przez 80 min)

Najbardziej znaczące różnice w chromatogramach między kapustą świeżą a kiszoną i ogrzewaną pojawiają się w strefie A i B płytki chromatograficznej (Rys. 44). W tych strefach żaden ze związków pochodzących z kapusty świeżej nie reaguje z odczynnikiem *Folina-Ciocalteua* natomiast w przypadku próbki kapusty kiszzonej i ogrzewanej w tym miejscu widoczne są wyraźne, intensywne plamki. Z tego względu celem kolejnych etapów badań

stała się próba izolacji i identyfikacji składników pojawiających się w kapuście w trakcie procesu fermentacji (substancja X) oraz procesu obróbki termicznej (substancja Y).

### 3.3.1 Zastosowanie preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) na etapie izolacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas kulinarnej obróbki kapusty

W pierwszym etapie badań nad izolacją substancji powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty postanowiono zastosować technikę preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC). Z płytek chromatograficznych, na które dozowano próbki ekstraktu metanolowego z liofilizatu kiszzonej kapusty oraz prażonego liofilizatu kapusty surowej wyizolowano dwie charakterystyczne frakcje. W celu sprawdzenia parametru  $R_f$  wyizolowanych związków X i Y otrzymane techniką PTLC frakcje poddano analizie z wykorzystaniem techniki TLC (Rys. 45).



**Rys. 45** Chromatogramy uzyskane w wyniku analiz próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych z wykorzystaniem techniki TLC z wizualizacją przy użyciu odczynnika *Folina-Ciocalteu* (A) oraz roztworu DPPH (B).

(1- próbki ekstraktu metanolowego z liofilizatu kiszzonej kapusty; X- frakcja wyizolowana z kiszzonej kapusty za pomocą techniki PTLC; Y- frakcja wyizolowana z prażonej kapusty za pomocą techniki PTLC; 2- próbka ekstraktu metanolowego z liofilizatu prażonej kapusty)

Etap izolacji substancji X i Y za pomocą techniki PTLC powtórzono kilkakrotnie w celu zebrania jak największej ilości ekstraktu niezbędnego do dalszych badań nad identyfikacją struktury tych związków.

### *3.3.2 Próba identyfikacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty wyizolowanych za pomocą techniki PTLC*

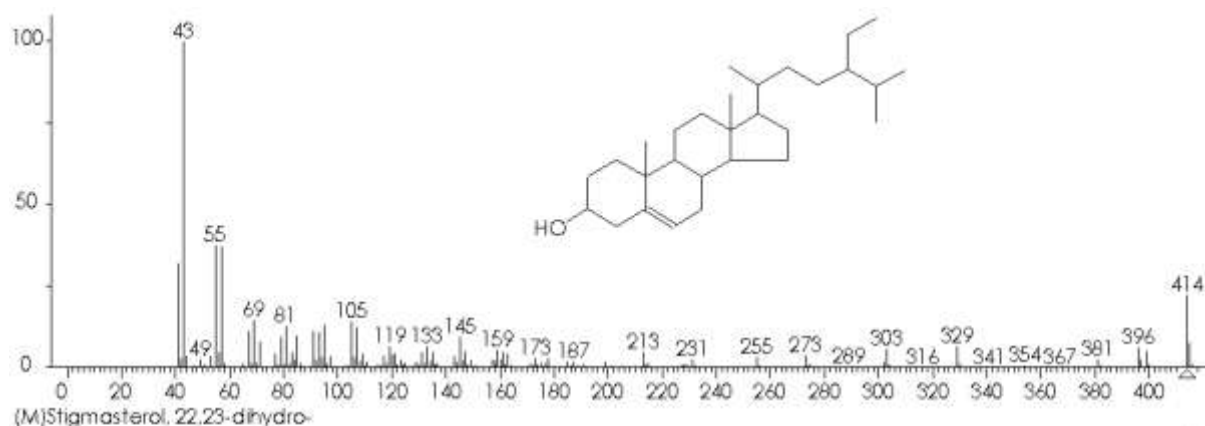
W celu identyfikacji odparowane do sucha frakcje z substancjami X i Y wyizolowanymi przy użyciu metody PTLC poddano analizie za pomocą technik spektroskopowych: HR-MS oraz NMR. Próbę identyfikacji struktur związków X i Y przy pomocy techniki wysokorozdzielczej spektroskopii mas wykonano w Centrum Badań Mikromolekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Natomiast widma protonowe NMR wykonano w Międzyuczelnianym Laboratorium NMR przy Politechnice Gdańskiej oraz Narodowym Centrum Metabolomiki Roślin i Drobnoustrojów w Anglii. Widma uzyskane w trakcie przeprowadzonych badań NMR ze względu na występowanie we frakcjach więcej niż jednego związku oraz znaczne zanieczyszczenie próbek pozostałościami po poszczególnych etapach ekstrakcji stały się niemożliwe do interpretacji tym samym udaremniając próbę określenia struktury chemicznej substancji charakterystycznych dla kiszzonej i ogrzewanej kapusty.

Jedynie wyniki analiz (wykonanych dzięki zastosowaniu techniki HR-MS) frakcji ze związkiem X- charakterystycznym dla kiszzonej kapusty dostarczyły informacji na temat struktur ewentualnych związków obecnych w próbce. W badanej próbce stwierdzono występowanie głównie dwóch związków:

1. związek o składzie elementarnym  $C_{29}H_{48}$  wykazujący 6 stopni nienasycenia,
2. związek o składzie elementarnym  $C_{29}H_{50}O$  wykazujący 5 stopni nienasycenia.

Na podstawie tych informacji oraz uzyskanego widma MS rozpoczęto poszukiwania w dostępnej literaturze oraz bibliotece widm związku o wyżej podanym składzie elementarnym oraz podobnym rozkładzie jonów.

Podczas poszukiwań zauważono duże podobieństwo widma związku, którego obecność stwierdzono w wyniku zastosowania techniki HR-MS z widmami dostępnymi w bibliotece charakterystycznymi dla grupy związków steroli. Szczególnie wysoki poziom zgodności składu elementarnego oraz układu pików jonowych na widmie mas stwierdzono dla związku o nazwie  $\beta$ - sitosterol (22,23-dihydrostigmasterol) (Rys.46).



**Rys. 46** Widmo mas  $\beta$ -sitosterolu (184).

Na podstawie tego porównania można wnioskować, że związek obecny w badanej frakcji posiada szkielet węglowy steroidów, jednak dokładne określenie jaki jest to izomer nie jest możliwe. W posiadanej przez nas bibliotece odnaleziono dodatkowo dziesięć związków, których widma są najbardziej zbliżone do widma badanego związku (Tabela 6).

**Tabela 12** Zestawienie związków o widmie mas zbliżonym do widma związku obecnego w badanej frakcji wyizolowanej z kiszonej kapusty za pomocą techniki PTLC (z wykorzystaniem techniki HR-MS).

Nazwa związku	CAS	Masa cząsteczkowa	Wzór sumaryczny
$\beta$ -Sitosterol	83-47-6	414	$C_{29}H_{50}O$
(3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,24S)-Stigmast-7-en-3-ol	18525-35-4	414	$C_{29}H_{50}O$
Stigmast-8(14)-en-3 $\beta$ -ol	18069-99-3	414	$C_{29}H_{50}O$
14-metylo-(3 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-Ergost-8-en-3-ol	33860-48-9	414	$C_{29}H_{50}O$
(3 $\beta$ )-Ergost-5-en-3-ol	4651-51-8	400	$C_{28}H_{48}O$
(3 $\beta$ )-Ergost-8(14)-en-3-ol	30365-65-2	400	$C_{28}H_{48}O$
2,2-dimetylo-(3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-Cholest-8(14)-en-3-ol	64519-14-8	414	$C_{29}H_{50}O$
4,4-dimetylo-(3 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-Cholest-8(14)-en-3-ol	14772-51-1	414	$C_{29}H_{50}O$
3-etoksylo-(3 $\beta$ )-Cholest-5-en	986-19-6	414	$C_{29}H_{50}O$
(3 $\beta$ )-Ergost-7-en-3-ol	26047-31-4	400	$C_{28}H_{48}O$

Z nazw kilku z wymienionych związków wynika, że położenie grupy hydroksylowej może być różne, przy czym widma są praktycznie nierozróżnialne. W sprawozdaniu z badań przeprowadzonych w CBMM PAN w Łodzi znajduje się założenie, że pik o  $m/z$  396 może pochodzić od innego związku, jednak różnica 18 jednostek mas ( $414 - 396$ ) może również świadczyć o tworzeniu jonu o  $m/z$  396 z jonu opisywanego za pomocą parametru  $m/z$  414. Taka wartość parametru  $m/z$  jest charakterystyczna dla związków o szkielecie steroidowym i inicjowana jest termicznie jak i w wyniku jonizacji elektronowej.

W celu potwierdzenia ewentualnej obecności steroli w frakcji wyizolowanej z kapusty kiszonej zastosowano test Salkowskiego (185). Na rysunku 47 przedstawiono wyniki przeprowadzonego testu (ekstrakt - fiolka środkowa). Roztwór zawierający frakcję wyizolowaną z kiszonej kapusty zabarwił się na różowo co potwierdzałoby wcześniejsze przypuszczenia dotyczące obecności steroli w próbce.

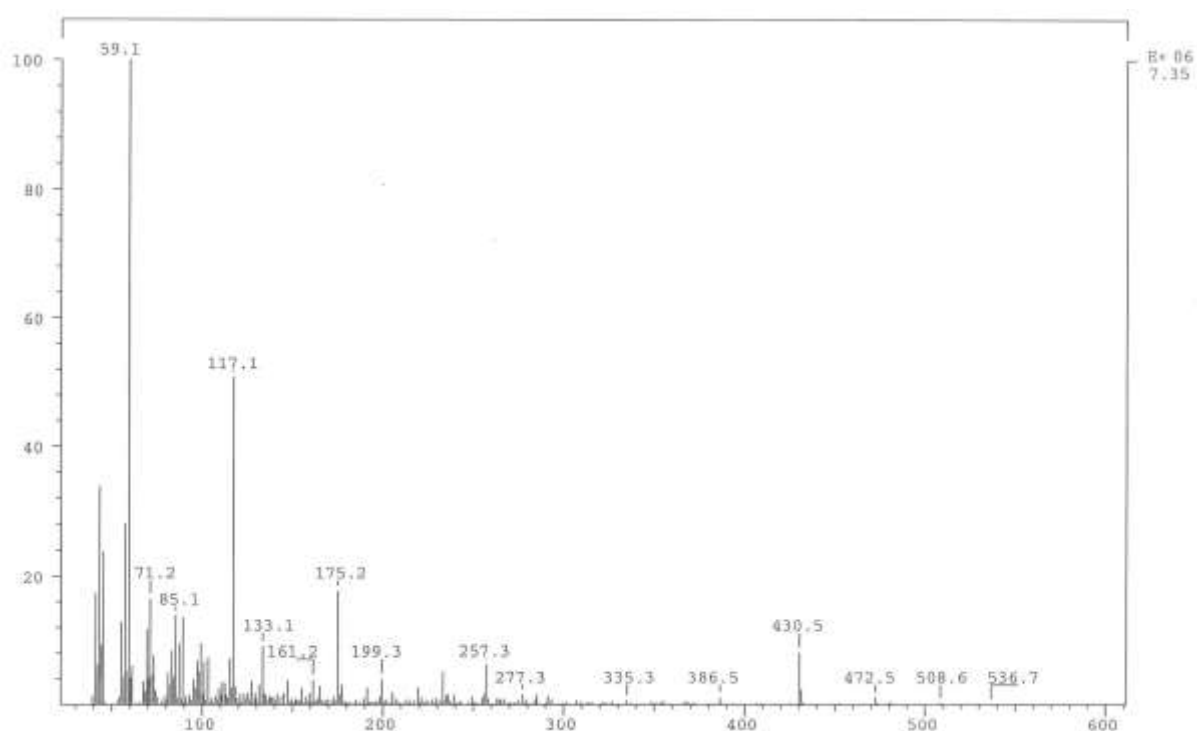


**Rys. 47** Fiolki z roztworami wykorzystywanymi w trakcie testu Salkowskiego (fiolka środkowa- badany ekstrakt zawierający związek X wyizolowany z kiszonej kapusty, fiolki zewnętrzne- ślepa próba).

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych dzięki zastosowaniu techniki HR-MS, próbki frakcji X i Y ponownie wyizolowano za pomocą metody PTLC i wysłano do CBMM PAN w Łodzi.

W trakcie analizy próbki X zaobserwowano dwa maksima prądu jonowego. Widma zarejestrowane w obrębie pierwszego maksimum wykazywały piki przy  $m/z=59, 117, 175$  i  $430$ . W celu ustalenia składu elementarnego (wzoru cząsteczkowego) jonu o  $m/z=430$  wykonano pomiar jego dokładnej masy. Na etapie oznaczania składu elementarnego Na

etapie oznaczania składu elementarnego nieznanego związku założono że, poza atomami węgla i wodoru, obecnych może być do 6 atomów tlenu, 2 atomów azotu i 1 atom siarki, a różnica pomiędzy masą zmierzoną i obliczoną nie może przekraczać 10 ppm. Dla jonu o zmierzonym  $m/z=430,3807$ , przy powyższych założeniach ustalono możliwy skład jako  $C_{29}H_{50}O_2$ . Związek o takim składzie elementarnym posiada 5 stopni nienasyceń (jeden stopień nienasyceń odpowiada podwójnemu wiązaniu lub układowi pierścieniowemu). Porównanie zarejestrowanego widma (Rys. 48) z widmami znalezionymi w bibliotece NIST (ok. 64 tys. widm EI) wskazywało na pochodne cholestanu (Tabela 13), jednak stopień zgodności nie był zbyt wysoki.



**Rys. 48** Widmo mas zarejestrowane podczas analizy frakcji wyizolowanej z kiszanej kapusty z wykorzystaniem techniki HR-MS.

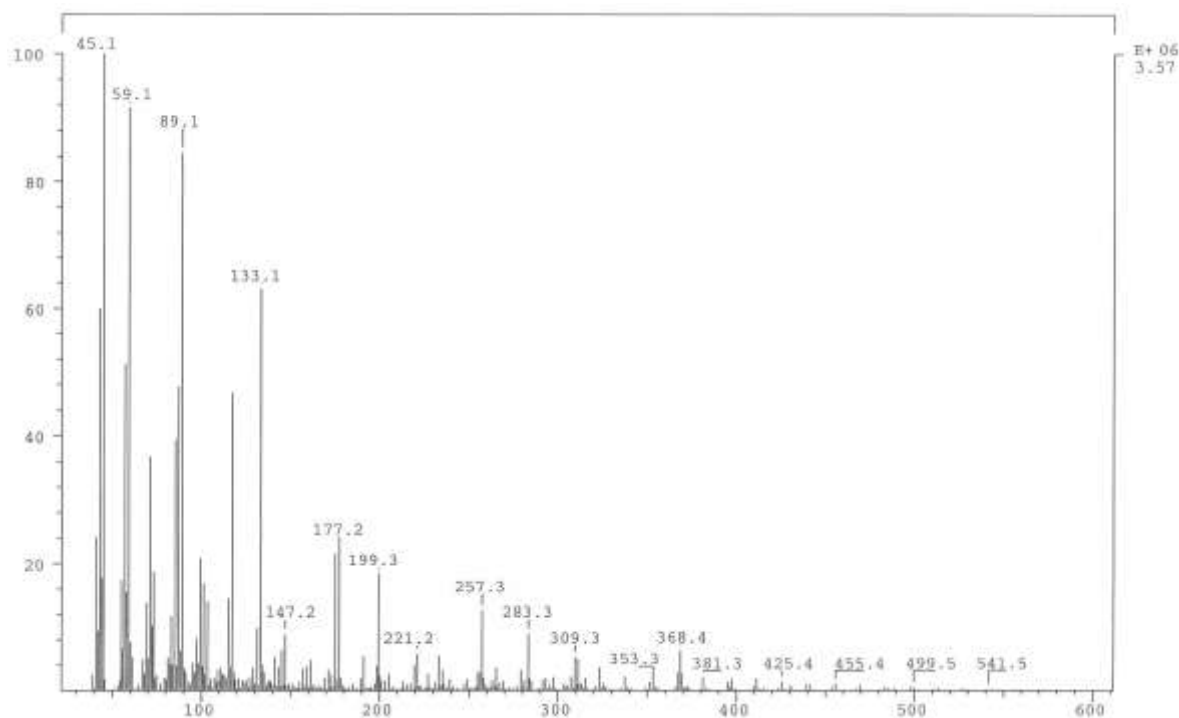
W widmach znalezionych bibliotece stwierdzono brak pików odpowiadających jonom charakteryzującym się wartościami parametru  $m/z=59$ , 117 i 175. Tak więc zarejestrowane widmo nie jest na tyle zgodne z widmami bibliotecznymi, aby jednoznacznie uznać, że odpowiada ono związkowi o znanej strukturze.

Widma w obszarze drugiego maksimum prądu zarejestrowane podczas analizy frakcji wyizolowanej z kiszanej kapusty zawierały pik charakteryzujący się wartością parametru

$m/z=368$ , który odpowiadał jonowi o dokładnej masie 368,3424 i składzie cząsteczkowym  $C_{27}H_{44}$ .

**Tabela 13** Zestawienie związków o widmie mas zbliżonym do widma związku o masie 430 obecnego w badanej frakcji wyizolowanej z kiszzonej kapusty za pomocą techniki PTLC (z wykorzystaniem techniki HR-MS).

Nazwa związku	CAS	Masa cząsteczkowa	Dopasowanie	Wzór sumaryczny
Cholestan-3-on	1858-14-6	430	622	$C_{29}H_{50}O_2$
Witamina E	59-02-9	430	600	$C_{29}H_{50}O_2$
Cholestan-3-on	25328-53-4	430	588	$C_{29}H_{50}O_2$
Cholestan-3-on	54498-52-1	430	469	$C_{29}H_{50}O_2$
22,26-epitio-furost-5-en-3-ol	55028-76-7	430	430	$C_{27}H_{42}O_2S$
Octan cholestano-3-olu	1255-88-5	430	263	$C_{29}H_{50}O_2$



**Rys. 49** Widmo mas zarejestrowane podczas analizy frakcji wyizolowanej z kiszzonej kapusty z wykorzystaniem techniki HR-MS.



Porównanie zarejestrowanego widma (Rys. 49) z widmami z biblioteki widm dawało w odpowiedzi widma związków cholestadienowych o wysokiej zgodności z widmem uzyskanym w trakcie przeprowadzonych badań (Tabela 14), jednak dokładne określenie izomeru, jakiemu ono odpowiada było również niemożliwe.

**Tabela 14** Zestawienie związków o widmie mas zbliżonym do widma związku o masie 368 obecnego w badanej frakcji wyizolowanej z kiszanej kapusty za pomocą techniki PTLC (z wykorzystaniem techniki HR-MS).

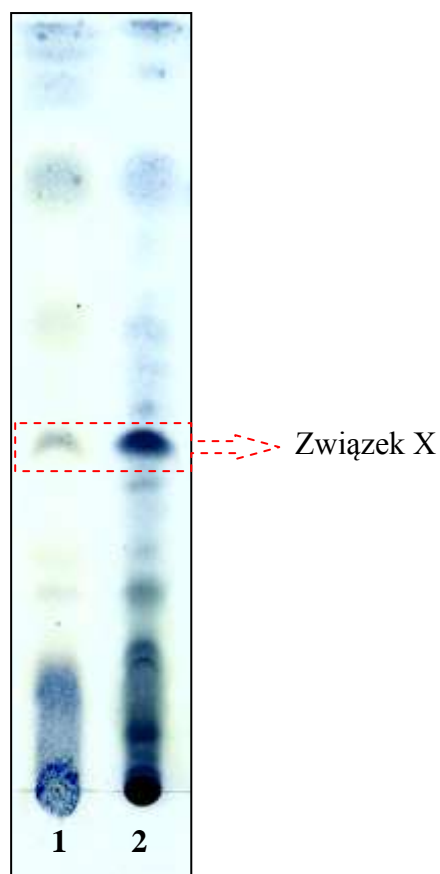
Nazwa związku	CAS	Masa cząsteczkowa	Dopasowanie	Wzór sumaryczny
2,4-Cholestadien	434-16-2	368	766	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub>
Cholesta-3,5-dien	747-90-0	368	856	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub>
Cholesta-7,14-dien	54482-39-2	368	730	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub>
Cholesta-2,4-dien	4117-50-4	368	359	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub>

Analiza frakcji zawierającej związek Y (wyizolowanej za pomocą techniki PTLC) ze względu na niedostateczną czystość okazała się niemożliwa.

### 3.3.3 Zastosowanie zestawu HPLC-NP sprzężonego z kolektorem frakcji na etapie izolacji substancji o właściwościach przeciwutleniających powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty

Brak jednoznacznej identyfikacji substancji powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty, która jest spowodowana niedostateczną czystością analizowanych próbek sprawiła, że kolejnym etapem stała się próba uzyskania ekstraktów o podwyższonej zawartości analitu. Wykorzystano do tego celu układ chromatografu cieczowego sprzężonego z detektorem DAD oraz kolektorem frakcji (HPLC-DAD-KF).

Jedną z przyczyn niepowodzenia identyfikacji struktury związków wyizolowanych we wcześniejszym etapie była ich niewystarczająca ilość. Niski poziom stężeń szczególnie substancji X w ekstraktach z kiszanej kapusty stał się powodem do poszukiwań innego źródła tej substancji. Alternatywnym źródłem substancji X powstającej podczas kiszenia kapusty białej okazała się kiszona czerwona kapusta. Na rysunku 50 przedstawiono chromatogram uzyskany w trakcie analizy próbek ekstraktów otrzymanych z kiszanej białej i czerwonej kapusty uzyskany dzięki zastosowaniu techniki TLC.



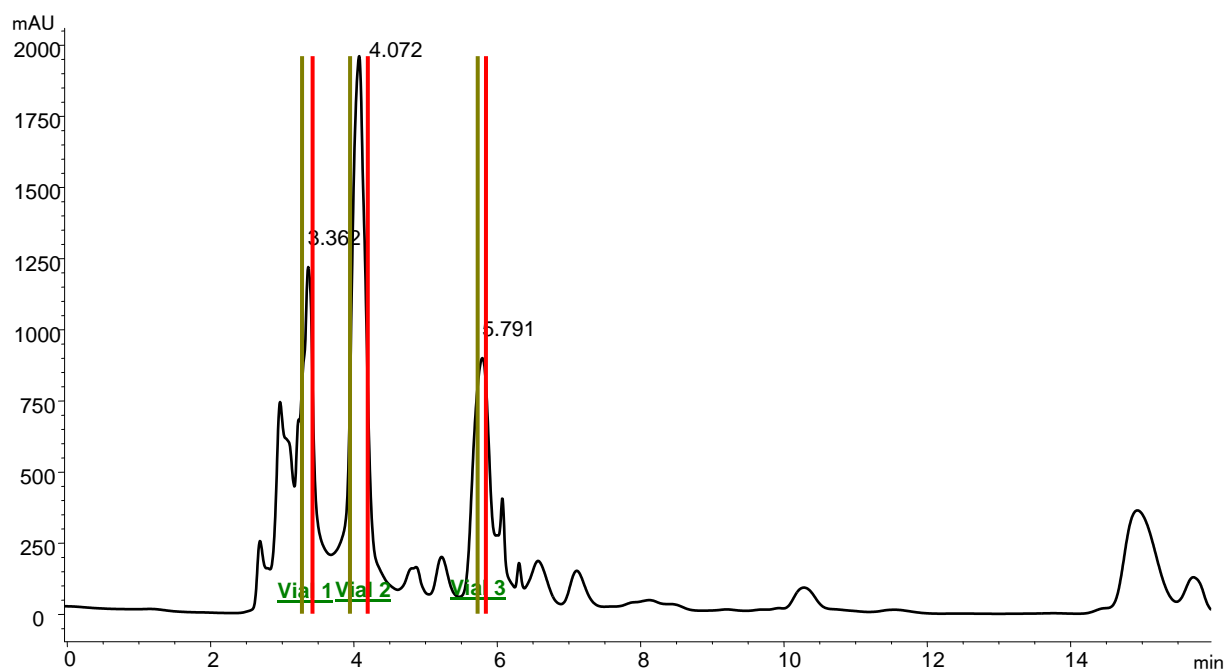
**Rys. 50** Chromatogram uzyskany w wyniku analiz próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych z liofilizatu kiszanej białej kapusty - **1** oraz z liofilizatu kiszanej czerwonej kapusty – **2** przy wykorzystaniu techniki TLC z wizualizacją za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteu*

Otrzymane wyniki wskazywały na występowanie związku X w próbkach kiszanej czerwonej kapusty na wyższym poziomie stężeń niż w próbkach kiszanej białej kapusty. Z tego względu na etapie frakcjonowania posługiwano się ekstraktami z kiszanej czerwonej kapusty.

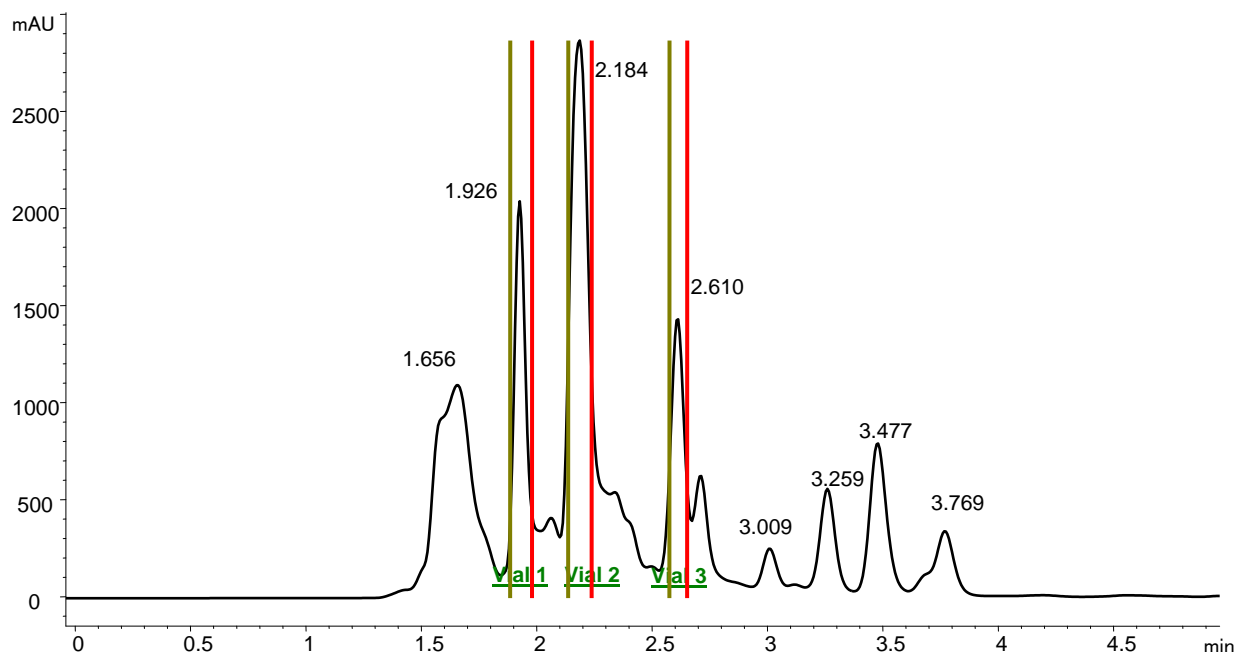
Frakcjonowanie próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych uzyskanych z kiszanej i prażonej kapusty postanowiono prowadzić w układzie faz normalnych. Zastosowanie jako fazy ruchomej jedynie rozpuszczalników organicznych np. chloroformu i metanolu umożliwia ich łatwiejsze pozbycie się z zebranych frakcji np. poprzez odparowanie w strumieniu azotu. Przed frakcjonowaniem próbki ekstraktów metanolowych z liofilizatów poddano wstępnemu oczyszczaniu. Z ekstraktów metanolowych liofilizatów postanowiono pozbyć się najbardziej polarnych substancji, które mogłyby w trakcie analizy chromatograficznej nie ulegać procesowi rozdzielania i trwale adsorbować się na kolumnie wypełnionej żelem

krzemionkowym. W tym celu próbki ekstraktów mieszano z żelem krzemionkowym i odparowywano do sucha w strumieniu gazu obojętnego. Tak przygotowane próbki ekstrahowano następnie mieszaniną rozpuszczalników chloroform:metanol (2:8). Ekstrakt oddzielony od żelu z zaadsorbowanymi polarnymi substancjami poddawano w pierwszej kolejności analizie przy zastosowaniu techniki TLC a następnie procesowi frakcjonowania przy wykorzystaniu techniki HPLC-DAD-KF.

W trakcie analizy chromatograficznej próbek ekstraktów otrzymanych z kiszzonej czerwonej kapusty oraz ekstraktu z ogrzewanej białej kapusty zbierano do oddzielnych fiolek po trzy główne frakcje (Rys. 51, 52). W przypadku ekstraktu z kiszzonej czerwonej kapusty były to frakcje zawierające związki o czasach retencji: 3,4; 4,1 i 5,8 min (Rys. 51), natomiast w przypadku ekstraktu z ogrzewanej białej kapusty były to frakcje ze związkami o czasach retencji: 1,9; 2,2 i 2,6 min (Rys. 52).



**Rys. 51** Chromatogram uzyskany podczas procesu frakcjonowania próbek oczyszczonych ekstraktów rozpuszczalnikowych z liofilizatu kiszzonej czerwonej kapusty uzyskany dzięki zastosowaniu układu HPLC-DAD-KF.

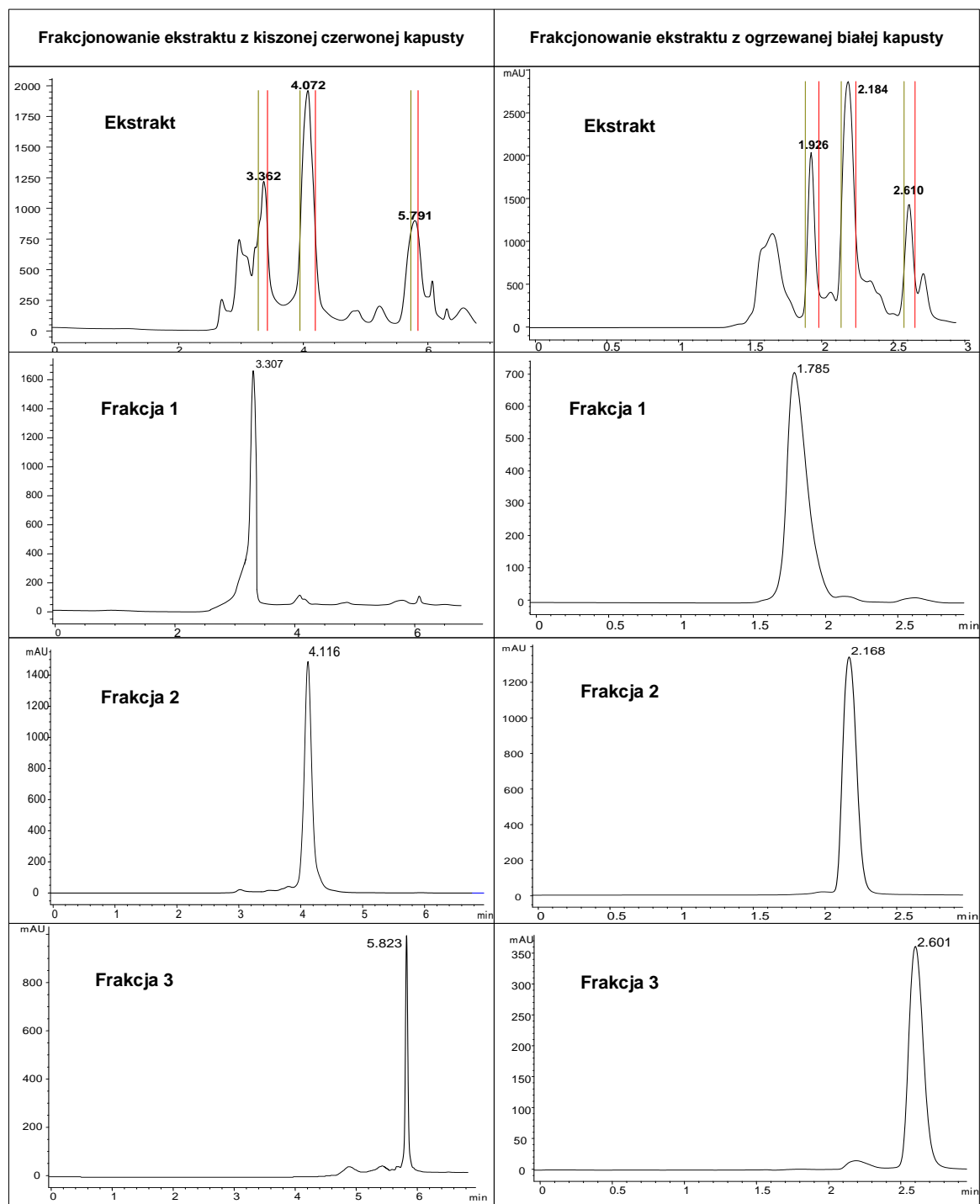


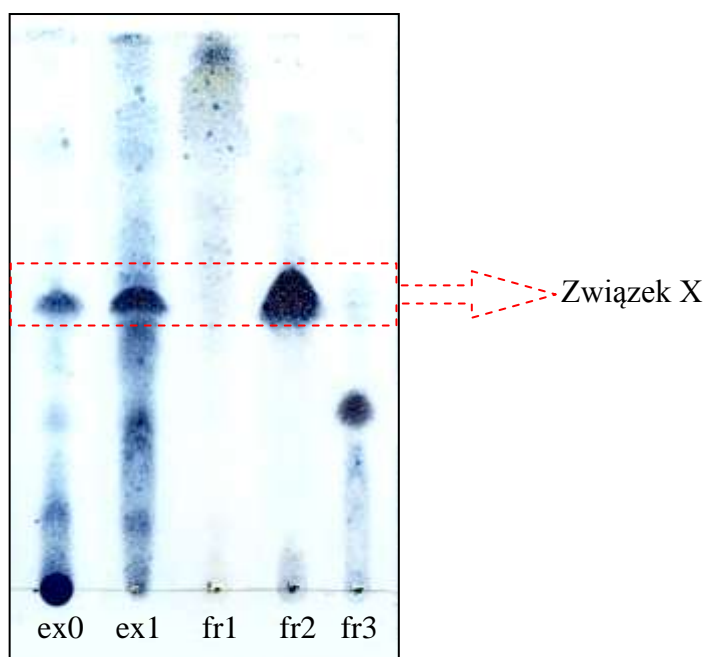
**Rys. 52** Chromatogram uzyskany podczas procesu frakcjonowania próbek oczyszczonych ekstraktów rozpuszczalnikowych z liofilizatu ogrzewanej białej kapusty uzyskany dzięki zastosowaniu układu HPLC-DAD-KF.

Zebrane frakcje w celu sprawdzenia czystości poddano analizie chromatograficznej stosując te same warunki co podczas procesu frakcjonowania. Uzyskane chromatogramy poszczególnych frakcji zestawiono w tabeli 15. Chromatogramy poszczególnych frakcji wskazują na obecność w każdej z nich jednej głównej substancji.

W celu zidentyfikowania frakcji zawierających interesujące nas związki X i Y zebrane próbki poddano analizie przy użyciu techniki TLC z wizualizacją chromatogramów za pomocą odczynnika *Folina-Ciocalteu*. Na rysunku 53 i 54 przedstawiono chromatogramy uzyskane na tym etapie badań. Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, że we frakcji 2 wyodrębnionej z ekstraktu pochodzącego z kiszzonej czerwonej kapusty znajduje się substancja X, natomiast związek Y zidentyfikowano w 2 frakcji pochodzącej z ekstraktu ogrzewanej białej kapusty. W celu zebrania jak największej ilości frakcji z substancjami X i Y proces frakcjonowania powtórzono kilkadziesiąt razy zbierając tylko frakcje 2 zarówno podczas analizy ekstraktu z czerwonej kiszzonej kapusty jak i białej ogrzewanej kapusty. Po zebraniu frakcji, próbki przygotowano do analizy NMR odparowując w strumieniu gazu obojętnego nadmiar rozpuszczalnika

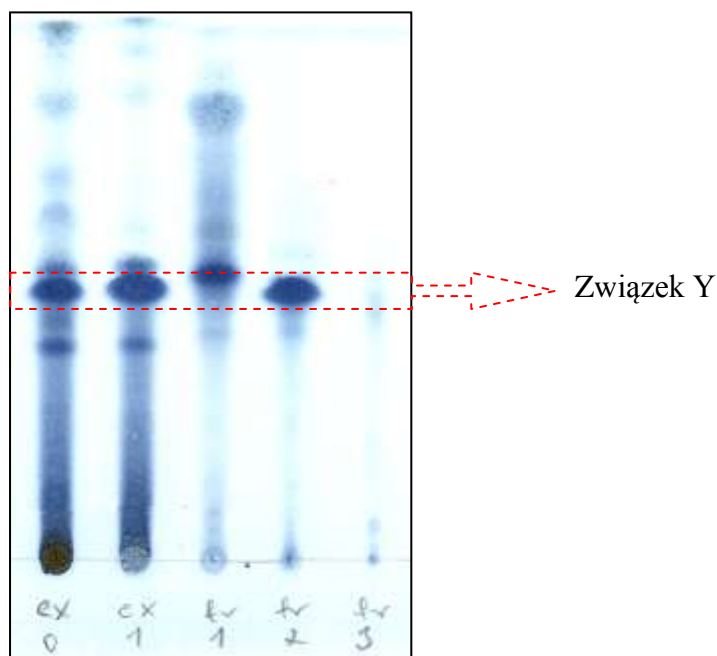
**Tabela 15** Zestawienie chromatogramów próbek ekstraktów wyjściowych z kapusty kiszzonej i ogrzewanej oraz poszczególnych wyodrębnionych z nich frakcji otrzymanych dzięki zastosowaniu techniki HPLC.





**Rys. 53** Chromatogram uzyskany w trakcie analizy próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych z wykorzystaniem techniki TLC.

(ex0-ekstrakt z liofilizatu kiszzonej czerwonej kapusty; ex1-oczyszczony i wzbogacony ekstrakt z kiszzonej kapusty-ekstrakt wyjściowy do frakcjonowania; fr1, fr2, fr3-fracje zebrane dzięki zastosowaniu techniki HPLC)



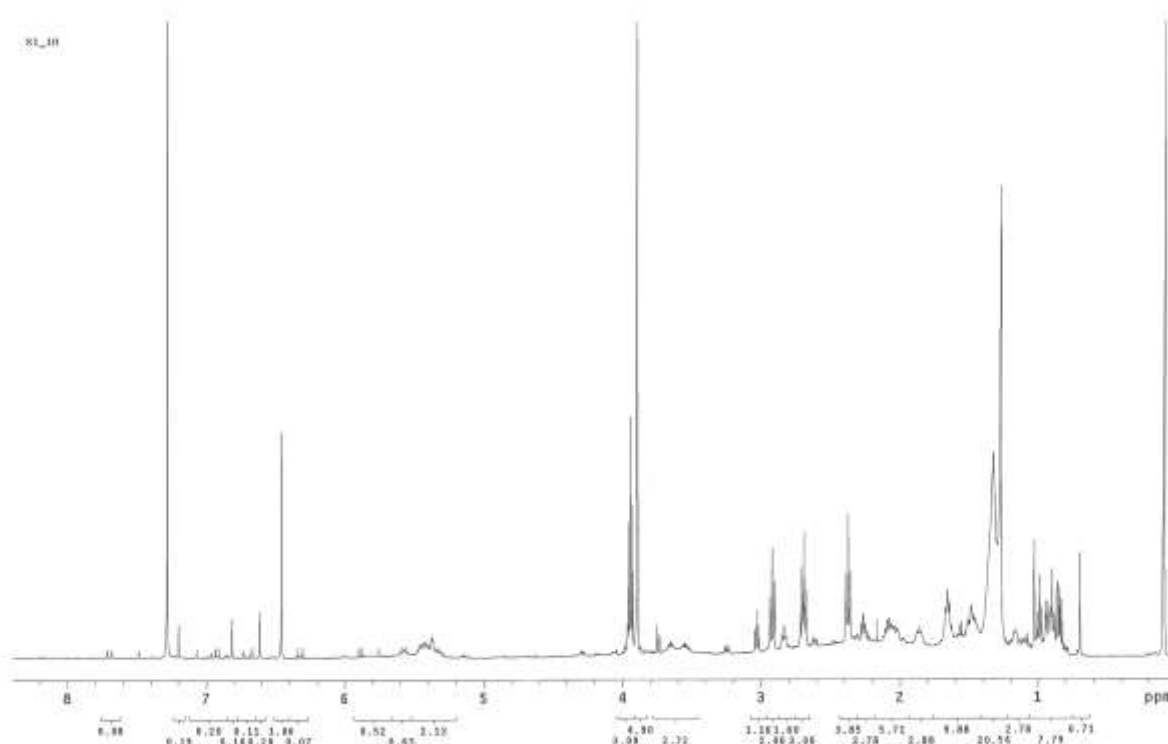
**Rys. 54** Chromatogram uzyskany w trakcie analizy próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych z wykorzystaniem techniki TLC.

(ex0-ekstrakt z liofilizatu ogrzewanej białej kapusty; ex1-oczyszczony i wzbogacony ekstrakt z ogrzewanej kapusty-ekstrakt wyjściowy do frakcjonowania; fr1, fr2, fr3-fracje zebrane dzięki zastosowaniu techniki HPLC)

### 3.3.4 Zastosowanie techniki NMR na etapie identyfikacji bioaktywnych substancji powstających podczas obróbki kulinarnej kapusty wyizolowanych dzięki zastosowaniu układu HPLC-DAD-KF

Fracje wyizolowane z kiszanej czerwonej kapusty oraz z ogrzewanej białej kapusty, zawierające odpowiednio związek X i związek Y poddano analizie z wykorzystaniem techniki NMR. Ze względu na niewielką ilość ekstraktów (około 1,5 mg s.m) możliwe było wykonanie jedynie widm protonowych tych frakcji.

Widmo NMR uzyskane dla frakcji wyizolowanej z kiszanej, czerwonej kapusty wskazywało niestety na obecność w ekstrakcie więcej niż jednej substancji (Rys. 55).

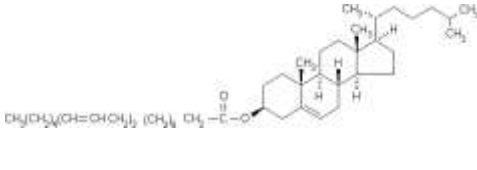
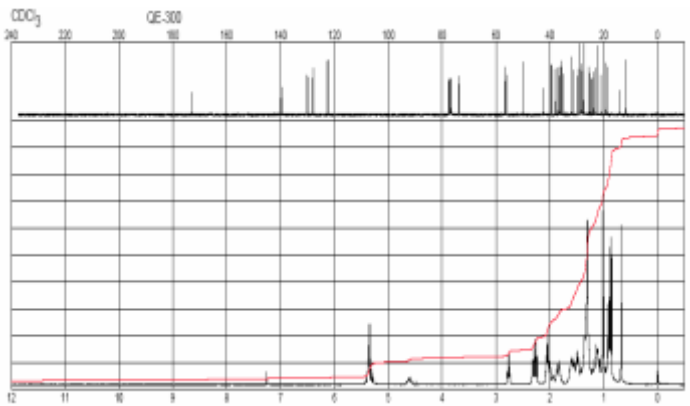
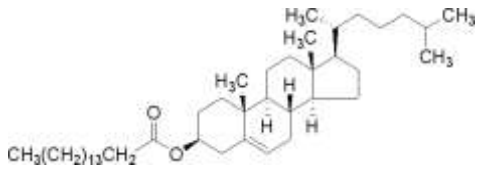
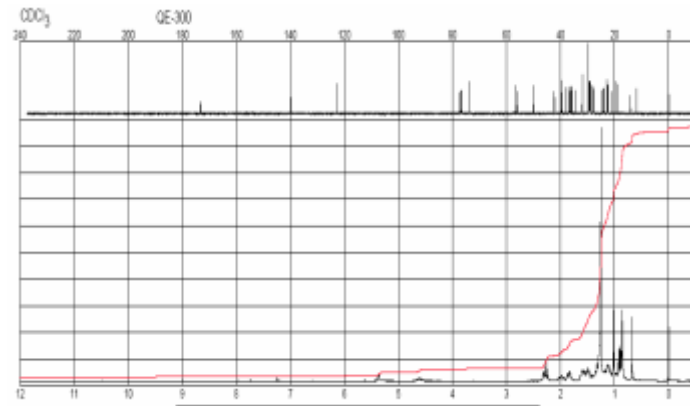
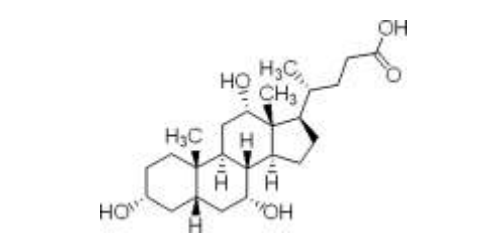
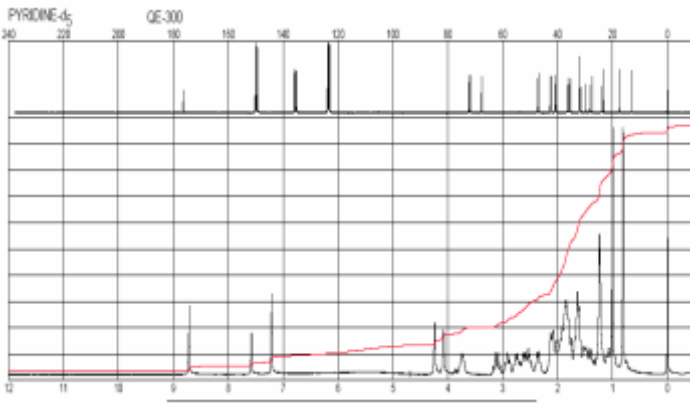
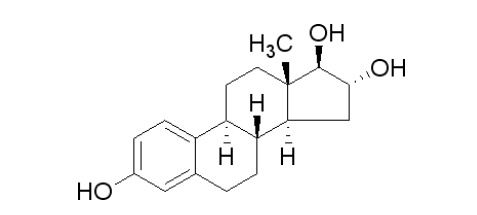
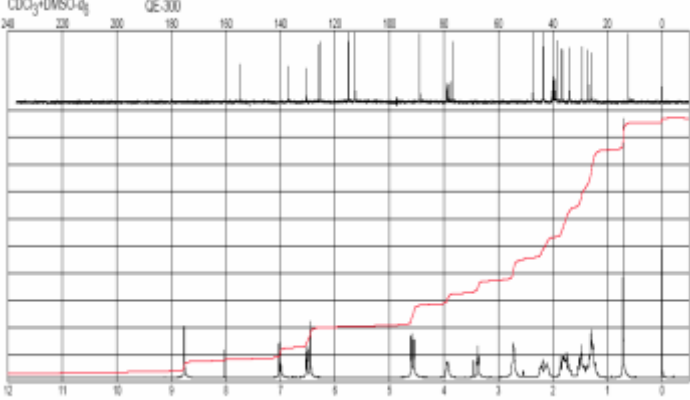


**Rys. 55** Widmo protonowe frakcji zawierającej związek X (wyizolowanej z kiszanej czerwonej kapusty) otrzymane dzięki zastosowaniu techniki NMR.

Można stąd wnioskować, że podczas zbierania frakcji za pomocą techniki HPLC-DAD-KF w trakcie rozdzielania substancji X zachodziła koelucja innych związków.

Trudności w interpretacji uzyskanego widma NMR uniemożliwiły więc jednoznaczne ustalenie struktury substancji powstającej podczas procesu fermentacji kapusty - związku X.

**Tabela 16** Widma NMR przykładowych związków należących do grupy steroli.

<p>Linoleinian cholesterylu</p> <p>Wzór sumaryczny: <math>C_{45}H_{76}O_2</math> Mw=649,08</p> 	
<p>Palmitynian cholesterylu</p> <p>Wzór sumaryczny: <math>C_{43}H_{76}O_2</math> Mw=625,06</p> 	
<p>Kwas cholowy</p> <p>Wzór sumaryczny: <math>C_{24}H_{40}O_5</math> Mw=408,57</p> 	
<p>Estriol</p> <p>Wzór sumaryczny: <math>C_{18}H_{24}O_3</math> Mw=288,38</p> 	

(źródło-biblioteka widm NMR Sigmy Aldrich)



Jedynie porównanie uzyskanego widma z widmami dostępnymi w bibliotece umożliwiły zidentyfikowanie w analizowanej frakcji obecności związku należącego do grupy steroli. W tabeli 16 przedstawiono kilka przykładowych widm NMR przedstawicieli tej grupy związków.

Zakwalifikowanie związku X do grupy substancji o strukturze steroli potwierdzałyby wcześniejsze wyniki analiz wykonanych za pomocą techniki HR-MS.

Sterole roślinne (fitosterole) są mało poznaną grupą związków wiadomo jednak, że posiadają zdolność obniżania cholesterolu we krwi poprzez hamowanie jego absorpcji. Stąd wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem ich do wzbogacania żywności funkcjonalnej. Niestety w dostępnych danych literaturowych niewiele jest wiadomo na temat zawartości steroli w kapuście, tym bardziej brak jest danych dotyczących poziomu występowania tych związków w kapuście poddanej procesowi fermentacji. Do tej pory wysoką aktywność biologiczną kapusty tłumaczono obecnością produktów rozpadu glukozynolanów, mniej uwagi przywiązywano pozostałym związkom tworzącym fitokompleks tego warzywa. Kontynuowanie badań pod kątem identyfikacji steroli stanowiło by niewątpliwie istotną wartość z punktu widzenia rekomendacji żywieniowych mogących się przyczynić do zmniejszenia ryzyka chorób cywilizacyjnych.

Drugą frakcją poddaną analizie z wykorzystaniem techniki NMR był ekstrakt zawierający substancję powstającą podczas ogrzewania kapusty - związek Y. Uzyskane na tym etapie badań widmo protonowe przedstawiono na rysunku 56. Na podstawie zarejestrowanego widma stwierdzono obecność w próbce związku o strukturze furfuralu. Porównanie otrzymanego widma z widmami NMR dostępnymi w bibliotece wskazały na wysoką zgodność ze związkiem: 5-hydroksymetylo-furfural. Na rysunku 57 przedstawiono widmo protonowe oraz wzór strukturalny tego związku.

Hydroksymetylofurfural (HMF) jest jednym ze produktów reakcji Maillarda. Związek ten jest często uważany za wskaźnik postępu reakcji nieenzymatycznego brunatnienia bogatej w cukier żywności w trakcie obróbki termicznej (186,187). Podczas pieczenia chleba tworzenie się związku HMF powoduje powstawanie chrupiącej, brązowej skórki (188). Związek ten oraz kilka innych lotnych substancji odpowiedzialny jest również za bukiet zapachowy powstający podczas procesu dojrzewania wina (189).

Udowodniono, że niektóre lotne produkty reakcji Maillarda posiadają właściwości przeciwutleniające (190). Pochodne furfuralu mają również zdolność wychwytywania rodnika  $\text{OH}\cdot$  (191).



#### IV PODSUMOWANIE

W krajach półkuli północnej, w tym także w Polsce, choroby nowotworowe stają się obecnie najbardziej znaczącym elementem kosztów leczenia społeczeństw oraz główną przyczyną przedwczesnych zgonów. Stąd też ogromne zainteresowanie profilaktyką nowotworową. Prowadzone w wielu instytucjach naukowych badania eksperymentalne mają na celu sprawdzenie mechanizmu przeciwrakotwórczego działania zarówno wybranych produktów żywnościowych, jak i substancji izolowanych z jadalnych roślin. Chodzi o opracowanie takich rekomendacji dietetycznych, które pozwolą na zmniejszenie zagrożenia chorobami nowotworowymi.

*Konsumenci XXI wieku, jak to trafnie podkreśla G. Hardy (192) w swoim artykule poświęconym funkcjonalnej żywności, potrzebują rekomendacji żywieniowych ze strony wykwalifikowanych dietetyków i farmakologów. I jak kontynuuje wspomniany autor, jeżeli ta potrzeba nie zostanie zaspokojona to niewykwalifikowani „znawcy“ będą mogli wypełnić tę lukę i na pewno to zrobią.*

Badania prowadzone na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej (we współpracy z innymi ośrodkami) miały na celu wyjście na przeciw wspomnianym społecznym potrzebom. Głównym obiektem naszych zainteresowań jest świeża i kiszona kapusta, ponieważ była i jest ona w tej części Europy warzywem spożywanym w największych ilościach przez cały rok, a więc przekonanie społeczeństwa do jej konsumpcji nie powinno spotkać się z oporem jakiego nie sposób uniknąć np. w przypadku zalecania zielonej herbaty jako podstawowego napoju. Szczególnie gdy wiadomo będzie, że kapusta zawiera liczne substancje, dla których wykazano ważne z punktu widzenia chemioprotekcyjnej aktywności biologicznej. Obserwuje się obecnie ogromne zmiany w preferencjach dietetycznych społeczeństwa wraz z nadejściem restauracji typu „fast food“ i popularyzacji kuchni egzotycznych, dlatego ważne stają się uzasadnione wynikami badawczymi rekomendowanie tradycyjnych, a sprzyjających zdrowiu produktów

Kapusta (świeża i kiszona) zawiera liczne wtórne metabolity, których przydatność z punktu widzenia chemoprotekcyjnej aktywności biologicznej została udokumentowana w przypadku innych roślinnych składników żywności. Można w tym miejscu wymienić następujące przejawy aktywności biologicznej:

- właściwości przeciwutleniające wynikające z obecności witamin C oraz E, karotenoidów i polifenoli;

- właściwości przeciwmutagenne wynikające z obecności przeciwutleniaczy, a także związków siarkoorganicznych;
- zdolność indukowania enzymów detoksykacyjnych (tzw. enzymów II fazy), w tym przede wszystkim transferaz glutationowych, głównie przez izotiocyjaniany i indole będące produktami metabolizmu glukozynolanów (193);
- wpływ na ekspresję genów odpowiedzialnych za rozrost nowotworowy poprzez modulowanie komórkowej homeostazy redoks przez izotiocyjaniany i antyoksydanty (194-196);
- działanie indoli oraz być może także fitosteroli jako modulatorów receptorów estrogenowych (197).

Te potencjalnie cenne zalety kapusty z punktu widzenia profilaktyki nowotworowej spowodowały podjęcie na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej wielokierunkowych badań nad przeciwrakotwórczymi właściwościami kapusty. W obrębie trzech katedr stworzono zespół badawczy, prowadzący badania ukierunkowane na ocenę i praktyczne wykorzystanie przeciwrakotwórczych właściwości kapusty. Działalność prowadzona w Katedrze Chemii Analitycznej ukierunkowana jest głównie na aspekty analityczne badań prowadzonych przez zespół międzykatedralny i jest przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej.

Większość prozdrowotnych właściwości warzyw i owoców jest silnie uzależniona od kolejnych procesów, którym poddawany jest surowiec zanim trafi do organizmu człowieka. Ten aspekt jest często ignorowany bądź nieuwzględniany w wielu badaniach epidemiologicznych i żywieniowych. Większość dostępnych danych na temat rodzaju i poziomu występowania składników bioaktywnych dotyczy jedynie surowych roślin. W rzeczywistości jedynie niewielka część warzyw spożywana jest w postaci surowej, większość z nich potrzebuje procesu obróbki niezbędnego ze względów bezpieczeństwa, zachowania jakości czy też z powodów ekonomicznych. Dlatego też rezultaty badań wpływu obróbki kulinarnej na zawartość składników bioaktywnych w kapuście stanowią niewątpliwie istotną wartość z punktu widzenia chemoprewencji żywieniowej.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji procesu badawczego będące przedmiotem rozprawy doktorskiej pozwoliły między innymi na porównanie zawartości bioaktywnych składników w kapustach pochodzących z różnych rejonów Europy co umożliwiło zaobserwowanie wysokiej korelacji pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą a całkowitą

zawartością glukozynolanów w tych warzywach. Można wnioskować stąd, że zawartość substancji aktywnych w kapuście jest silnie uzależniona od warunków uprawy i klimatu wpływających na biosyntezę tych związków. Podczas badań zaobserwowano również, że kapusta świeża, kiszona i gotowana charakteryzują się odmiennymi profilami związków o charakterze przeciwutleniaczy. Generalnie istnieje pogląd, że obróbka kulinarna odpowiedzialna jest za degradację naturalnie występujących przeciwutleniaczy w owocach i warzywach. Wbrew tej opinii w przypadku próbek soków z kapusty obserwowano około czterokrotny wzrost aktywności przeciwutleniającej już po 7 dniach fermentacji oraz około ośmiokrotny wzrost tych właściwości w ciągu 10 godzin ogrzewania.

Podczas badań odnotowano również powstawanie znacznych ilości indolowych produktów rozpadu glukozynolanów, głównie indolo-3-karbinolu (I3C) podczas procesu fermentacji. Związek ten należy do tzw. bifunkcyjnych czynników chemoprewencyjnych indukujących zarówno enzymy I jak i II fazy metabolizmu ksenobiotyków, ma także właściwości estrogenne. Cenną cechą kapusty białej jest uwalnianie substancji o charakterze przeciwutleniaczy w trakcie procesu fermentacji oraz obróbki termicznej. Wyizolowane za pomocą technik ekstrakcyjnych i chromatograficznych dwie głównie powstające podczas obróbki substancje wykazują wysoką, aktywność przeciwutleniającą. Badania struktury tych substancji wskazują na skład elementarny oraz widma masowe zbliżone do związków z grupy steroli oraz hydroksymetylofurfuralu.

Kapusta uchodzi za pospolite warzywo, będące podstawą diety ludzi ubogich i jej zalety nie są doceniane przez konsumentów. Badacze zajmujący się prozdrowotnymi składnikami żywności dopiero w ostatnich kilku latach zwrócili uwagę na jej potencjalną użyteczność w ochronie zdrowia ludzkiego. Poznanie powiązań pomiędzy aktywnościami biochemicznymi i biologicznymi a składem chemicznym kapusty świeżej i poddanej obróbce kulinarnej jest niezbędnym krokiem do stworzenia rekomendacji żywieniowych mogących się przyczynić do zmniejszenia ryzyka chorób nowotworowych.

Wyniki badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej mogą się okazać użyteczne dla trzech grup odbiorców. Po pierwsze technologów żywności, którzy mogą wykorzystać walory fitozwiązków kapusty do zaprojektowania zdrowszych produktów spożywczych. Taka możliwość już znalazła praktyczną realizację polegającą na opracowaniu technologii produkcji wyrobów mięsnych, uważanych za zwiększające ryzyko nowotworowe, wzbogaconych w przeciwrakotwórcze składniki kapusty, które takiemu zagrożeniu przeciwdziałają (zgłoszenie patentowe). Ponadto identyfikacja związków bioaktywnych ma

fundamentalne znaczenie dla prowadzenia skutecznej kontroli ich poziomu w produkcji rynkowej. To z kolei wymaga opracowania odpowiednich narzędzi analitycznych. Na to zagadnienie ukierunkowane są badania zrealizowane w ramach pracy doktorskiej.

Druga grupa odbiorców to konsumenci, w przypadku których naukowa weryfikacja walorów kapusty jako cennego, tradycyjnego składnika diety powinna zaowocować tym, że będą po nią sięgać ze świadomego wyboru, a nie tylko ekonomicznej konieczności.

Trzecia potencjalna grupa konsumentów to osoby o podwyższonym ryzyku chorób nowotworowych. Rekomendacje żywieniowe w tym przypadku wymagają dogłębnego poznania mechanizmów chemoprewencji i ich związku ze składem bioaktywnych substancji. We wszystkich trzech przypadkach niezbędna jest wiedza na temat wpływu obróbki na zabezpieczenie bądź też ulepszenie naturalnej aktywności i biodostępności naturalnych składników spożywanych warzyw.

## V STRESZCZENIE

W krajach rozwiniętych choroby nowotworowe stają się obecnie najbardziej znaczącym elementem kosztów leczenia społeczeństw oraz główną przyczyną przedwczesnych zgonów. Stąd też ogromne zainteresowanie profilaktyką przeciwnowotworową, które nabrało szczególnego rozmachu po stwierdzeniu w wyniku badań epidemiologicznych, że żywność pochodzenia roślinnego zawiera liczne substancje przeciwdziałające powstawaniu nowotworów. Szczególnie cenne wydają się być warzywa krzyżowe, w przypadku których obserwowano najwyraźniejszą korelację pomiędzy poziomem spożycia, a obniżoną zapadalnością na nowotwory piersi, jelita grubego i płuc. W Europie Środkowej najważniejszym warzywem z rodziny krzyżowych jest kapusta biała (*Brassica oleracea* var. *capitata*), stanowiąca tradycyjny element diety krajów tego regionu. Ze względu na wysokie spożycie i dostępność przez cały rok, warzywo to potencjalnie może być znaczącym elementem chemoprewencji nowotworowej. Z tą myślą podjęto prace mające na celu ocenę zawartości substancji bioaktywnych oraz przeciwutleniających właściwości kapusty, tak świeżej jak i poddanej obróbce kulinarnej.

Porównanie zawartości bioaktywnych składników w kapustach pochodzących z różnych rejonów Europy co umożliwiło zaobserwowanie wysokiej korelacji pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą a całkowitą zawartością glukozynolanów w tych warzywach. Kapusta świeża, kiszona i gotowana charakteryzują się odmiennymi profilami związków o charakterze przeciwutleniaczy. Podczas badań odnotowano również powstawanie znacznych ilości indolowych produktów rozpadu glukozynolanów, głównie indolo-3-karbinolu (I3C) podczas procesu fermentacji. Cenną cechą kapusty białej jest uwalnianie substancji o charakterze przeciwutleniaczy w trakcie procesu fermentacji oraz obróbki termicznej. Wyizolowane za pomocą technik ekstrakcyjnych i chromatograficznych dwie głównie powstające podczas obróbki substancje wykazują aktywność przeciwutleniającą. Badania struktury tych substancji wskazują na skład elementarny oraz widma masowe zbliżone do związków z grupy steroli oraz hydroksymetylofurfuralu.

## VI SUMMARY

Nutritional factors are widely considered to be critical for human health. This is not only due to nutritional components, but also owing to non-nutrients displaying different health promoting activities present mainly in plantborne foods. The latter has been confirmed by epidemiological studies indicating that diets rich in fruits and vegetables are associated with lower risk of several degenerative diseases including cancer. We took different approach and concentrated our interest on the vegetable which is the major ingredient of Central European diet – white cabbage. Since processing may affect content, activity and bioavailability of bioactive compounds, the impact of processing on composition and activity of cabbage phytochemicals is in the centre of our investigations.

Cabbage belongs to cruciferous vegetables whose consumption was shown to be more strongly associated with cancer protection than vegetable consumption in general. Despite being so common, little is known about the composition of its bioactive compounds except for glucosinolates, even less on how cultivation and processing influences the cabbage phytochemical complex. Therefore, the main aim of our study is to determine their influence on cabbage phytochemicals such as antioxidants, glucosinolates and their breakdown products. Initially, we compared cabbages from different countries and cultivations and found that antioxidative potential is correlated with glucosinolate contents, thus the occurrence of different bioactive components seems to be influenced by the same environmental factors. In the next stage, we determined the antioxidant potential of juices obtained from cabbage submitted to culinary processing: traditional fermentation and cooking. In contrast to the expected loss of natural antioxidants during processing, especially cooking, both fermentation and heat treatment turned out to increase the initial antioxidant capacity of cabbage. The chromatographic analysis revealed that during culinary processes some substances with antioxidant activity, were released. With the aid of chromatographic and spectrophotometric techniques, we have undertaken isolation and identification of compounds characteristic for heated and fermented cabbage. The structural studies are in progress, but initial results indicate that the isolated compounds may possess structures similar to sterols or furfurals.



## VII CYTOWANA LITERATURA

1. Verhoeven, D. T.; Golbohm, R. A.; Poppel, G.; Verhagen, H.; Brandt, P. A., Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 1996, 5, 733-748.
2. Rijken, P. J.; Timmer, W. G.; Kooij, A. J., Effect of vegetable and carotenoid consumption on aberrant crypt multiplicity, a surrogate end-point marker for colorectal cancer in azoxymethane-induced rats. *Carcinogenesis* 1999, 20, 2267-2272.
3. Keck, A. S.; Finley, J. W., Cruciferous Vegetables: Cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integrative Cancer Therapies* 2004, 3, 5-12.
4. Giovannucci, E.; Rimm, E. B.; Liu, Y. S., M. J.; Willett, W. C., A prospective study of cruciferous vegetables and prostate cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2003, 12, 1403-1409.
5. Smith, T. K.; Mithen, R.; Johnson, T., Effects of Brassica vegetable juice on the induction of apoptosis and aberrant crypt foci in rat colonic mucosal crypts in vivo. *Carcinogenesis* 2003, 24, 491-495.
6. Murillo, G.; Mehta, R. G., Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutrition and cancer* 2001, 41, 17-28.
7. Chiu, B. C.; Ji, B. T.; Dai, O.; Gridley, G.; McLaughlin, J. K.; Gao, Y. T.; Fraumeni, J. F.; Chow, W. H., Dietary factors and risk of colon cancer in Shanghai, China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2003, 12, 201-208.
8. Bosetti, C.; Negri, E.; Kolonel, L.; Ron, E.; Franceschi, S.; Preston-Martin, S.; McTiernan, A.; Dal Maso, L.; Mark, S. D.; Mabuchi, K.; Land, C.; Jin, F.; Wingren, G.; Galanti, M. R.; Hallquist, A.; Glatte, E.; Lund, E.; Levi, F.; Linos, D.; La Vecchia, C., A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. VII. Cruciferous and other vegetables (international). *Cancer Causes Control* 2002, 13, 765-775.
9. Memon, A.; Varghese, A.; Suresh, A., Benign thyroid disease and dietary factors in thyroid cancer: A case-control study in Kuwait. *British Journal of Cancer* 2002, 86, 1745-1750.
10. Seow, A.; Yuan, J. M.; Sun, C. L.; Van Den Berg, D.; Lee, H. P.; Yu, M. C., Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis* 2002, 23, 2055-2061.
11. Shannon, J.; Thomas, D. B.; Ray, R. M.; Kestin, M.; Koetsawang, A.; Koetsawang, S.; Chitnarong, K.; Kiviat, N.; Kuypers, J., Dietary risk factors for invasive and in-situ cervical carcinomas in Bangkok, Thailand. *Cancer Causes Control* 2002, 13, 691-699.

12. Pacin, A.; Martinez, E.; Martin de Portela, M. L.; Neira, M. S., Food consumption and ingestion of various nutrients in the population of the National University of Lujan, Argentina. *Archivos Latinoamericanos De Nutrition* 1999, 49, 31-39.
13. Atalah, E.; Urteaga, C.; Rebolledo, A., Dietary behaviour and risk for the most common cancers in Chile. *Revista Chilena De Nutricion* 2001, 28, 277-283.
14. Terry, P.; Vainio, H.; Wolk, A.; Weiderpass, E., Dietary factors in relation to endometrial cancer: A nationwide case-control study in Sweden. *Nutrition and Cancer* 2002, 42, 25-32.
15. Steyn, N. P.; Nel, J. H.; Casey, A., Secondary data analyses of dietary surveys undertaken in South Africa to determine usual food consumption of the population. *Public Health Nutrition* 2003, 6, 631-644.
16. Rajkumar, T.; Sridhar, H.; Balaram, P.; Vaccarella, S.; Gajalakshmi, V.; Nadakumar, A.; Ramdas, K.; Jayshree, R.; Munoz, N.; Herrero, R.; Franceschi, S.; Weiderpass, E., Oral cancer in southern India: The influence of body size, diet, infection and sexual practices. *European Journal of Cancer Prevention* 2003, 12, 135-143.
17. Lin, H. J.; Probst-Hensch, N. M.; Louie, A. D.; Kau, I. H.; Witte, J. S.; Ingles, S. A.; Frankl, H. D.; Lee, E. R.; Haile, R. W., Glutathione transferase mull genotyp, broccoli, and lower prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 1998, 7, 647-652.
18. Yuan, J. M.; Gago-Dominguez, M.; Castelao, J. E.; Hankin, J. H.; Ross, R. K.; Yu, M. C., Cruciferous vegetables in relation to renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 1998, 77, 211-216.
19. Cohen, J. H.; Kristal, A. R.; Stanford, J. L., Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 2000, 92, 61-68.
20. Feskanich, D.; Ziegler, R. G.; Michaud, D. S.; Giovannucci, E. L.; Speizer, F. E.; Willet, W. C.; Colditz, G. A., Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *Journal of the National Cancer Institute* 2000, 92, 1812-1823.
21. Johnston, C. S.; Taylor, C. A.; Hampl, J. S., More Americans are eating '5 a day' but intakes of dark green and cruciferous vegetable remain low. *Journal of Nutrition* 2000, 130, 3063-3067.
22. Kolonel, L. N.; Hankin, J. H.; Whittemore, A. S.; Wu, A. H.; Gallagher, R. P.; Wilkens, L. R.; John, E. M.; Howe, G. R.; Dreon, D. M.; West, D. W.; Paffenbarger, R. S., Vegetables, fruit, legumes and prostate cancer: A multiethnic case-control study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2000, 9, 795-804.
23. Slattery, M. L.; Kampman, E.; Samowitz, W.; Caan, B. J.; Potter, J. D., Interplay between dietary inducers of GST and the *GSTM-1* genotype in colon cancer. *International Journal of Cancer* 2000, 87, 728-733.

24. Smith-Warner, S. A.; Elmer, P. J.; Tharp, T. M.; Fosdick, L.; Randall, B.; Gross, M.; Wood, J.; Potter, J. D., Increasing vegetable and fruit intake: Randomized intervention and monitoring in an at-risk population. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2000, 9, 307-317.
25. Spitz, M. R.; Duphorne, C. M.; Detry, M. A.; Pillow, P. C.; Amos, C. I.; Lei, L.; de Andrade, M.; Gu, X.; Hong, W. K.; Wu, X., Dietary intake of isothiocyanates: Evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2000, 9, (1017-1020).
26. Lanza, E.; Schatzkin, A.; Daston, C.; Corle, D.; Freedman, L.; Ballard-Barbash, R.; Caan, B.; Lance, P.; Marshall, J.; Iber, F.; Shike, M.; Weissfeld, J.; Slaterry, M. L.; Paskett, E.; Mateski, D.; Albert, P.; Group, P. S., Implementation of 4-y, high-fiber, high-fruit-and-vegetable, low fat dietary intervention: Results of dietary changes in the Polyp Prevention Trial. *American Journal of Clinical Nutrition* 2001, 74, 387-401.
27. Smith-Warner, S. A.; Elmer, P. J.; Fosdick, L.; Randall, B.; Bostick, R. M.; Grandits, G.; Grambsch, P.; Louis, T. A.; Wood, J. R.; Potter, J. D., Fruits, vegetables, and adenomatous polyps: The Minnesota Cancer Prevention Research Unit case-control study. *American Journal of Epidemiology* 2002, 155, 1104-1113.
28. Nagle, C. M.; Purdie, D. M.; Webb, P. M.; Green, A.; Harvey, P. W.; Bain, C. J., Dietary influences on survival after ovarian cancer. *International Journal of Cancer* 2003, 106, 264-269.
29. Michaud, D. S.; Pietinen, P.; Taylor, P. R.; Virtanen, M.; Virtamo, J.; Albanes, D., Intakes of fruits and vegetables, carotenoids and vitamins A, E, C in relation to the risk of bladder cancer in the ATBC cohort study. *British Journal of Cancer* 2002, 87, 960-965.
30. Voorrips, L. E.; Goldbohm, R. A.; van Poppel, G.; Strumans, F.; Hermus, R. J.; van der Brandt, P. A., Vegetable and fruit consumption and risks of colon and rectal cancer in a prospective cohort study: The Netherlands cohort study on diet and cancer. *American Journal of Epidemiology* 2000, 152, 1081-1092.
31. Halkier, B. A.; Du, L. C., The biosynthesis of glucosinolates. *Trends in Plant Science* 1997, 2, 425-431.
32. Mithen, R., Glucosinolates – biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regulation* 2001, 34, 91-103.
33. Lenman, M.; Falk, A.; Rodin, J.; Hoglund, A. S.; Ek, B.; Rask, L., Differential expression of myrosinase gene families. *Plant Physiology* 1993, 103, 703-711.
34. Bones, A. M.; Rossiter, J. T., The enzymatic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* 2006, 67, 1053-1067.

35. Tookey, H. L., Crambe thioglucoside glucohydrolase (EC 3.2.3.1): Separation of a protein required for epitihobutane formation. *Canadian Journal of Biochemistry* 1973, 51, 1654-1660.
36. Bernardi, R.; Negri, A.; Ronchi, S.; Palmieri, S., Isolation of the epthiospecifier protein from oil-rape (*Brassica napus* spp.oleifera) seed and its characterization. *FEBS Letters* 2000, 467, 296-298.
37. Foo, H. L.; Gronning, L. M.; Goodenough, L.; Bones, A. M.; Danielsen, B.; Whiting, D. A.; Rossiter, J. T., Purification and characterisation of epthiospecifier protein from *Brassica napus*: Enzymatic intramolecular sulphur addition within alkenyl glucosinolate hydrolysis. *FEBS Letters* 2000, 468, 243-246.
38. Vang, O.; Dragsted, L., *Naturally Occurring Antitumorogens. Indoles*. Nordic Council of Ministers: Copenhagen, 1996.
39. Anderton, M. J.; Jukes, R.; Lamb, J. H.; Manson, M. M.; Gescher, A.; Steward, W. P.; Williams, M. L., Liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of indole-3-carbinol and its acid condensation products in plasma. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2003, 787, 281-291.
40. Piironen, E.; Virtanen, A. I., The synthesis of ascorbigen from ascorbic acid and 3-hydroxymethylindoles. *Acta Chemica Scandinavica* 1962, 16, 1286-1287.
41. Hrcirik, K.; Valusek, J.; Velisek, J., Investigation of ascorbigen as a breakdown product of glucobrassicin autolysis in *Brassica* vegetables. *European Food Research and Technology* 2001, 212, 576-581.
42. Zhao, F. J.; Evans, E. J.; Bilsborrow, P. E.; Syers, J. K., Influence of nitrogen and sulfur on the glucosinolate profile of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1994, 64, 295-304.
43. Vallejo, F.; Tomas-Barberan, F. A.; Garcia-Viguera, C., Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2003, 51, 3029-3034.
44. Vallejo, F.; Tomas-Barberan, F. A.; Benavente-Garcia, A. G.; Garcia-Viguera, C., Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown under various climatic and fertilisation condition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2003, 83, 307-313.
45. Mithen, R.; Faulkner, K.; Magrath, R.; Rose, P.; Williamson, G.; Marquez, J., Development of isothiocyanate-enriched broccoli, and its enhanced ability to induce phase 2 detoxification enzymes in mammalian cells. *Theoretical and Applied Genetics* 2003, 106, 724-734.

46. Shattuck, V. I.; Wang, W., Growth stress induces glucosinolates changes in pakchoy (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*). *Canadian Journal of Plant Science* 1994, 74, 595-601.
47. Bouchereau, A.; Clossais-Besnard, N.; Bensaoud, A.; Leport, L.; Rebard, M., Water stress effects on rapeseed quality. *European Journal of Agronomy* 1996, 5, 19-30.
48. Jensen, C. R.; Mogensen, V. O.; Mortensen, G.; Fieldsend, J. K.; Milford, G. F.; Andersen, M. N.; Thage, J. H., Seed glucosinolate, oil and protein contents of field-grown rape (*Brassica napus* L.) affected by soil drying and evaporative demand. *Field Crops Research* 1996, 47, 93-105.
49. Pereira, F. M.; Rosa, E.; Fahey, J. W.; Stephenson, K. K.; Carvalho, R.; Aires, A., Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002, 50, 6239-6244.
50. Birch, A. N.; Griffiths, D. W.; Hopkins, R. J.; Smith, W. H.; McKinlay, R. G., Glucosinolate responses of swede, kale, forage and oilseed rape to root damage by turnip root fly (*Delia floralis*) larvae. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1992, 60, 1-9.
51. Ruud Verkerk, M. D. W. M F. J., Post-harvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of *Brassica* vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2001, 81, (9), 953-958.
52. Hansen, M.; Moller, P.; Sorensen, H., Glucosinolates in broccoli stored under controlled atmosphere. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 1995, 120, 1069-1074.
53. Brusewitz, G.; Cameron, B. D.; Chasseaud, L. F.; Gorler, K.; Hawkins, D. R.; Koch, H.; Mennicke, W. H., The metabolism of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate. *Biochemical Journal* 1977, 162, 99-107.
54. Xu, K.; Thornally, P. J., Studies on the mechanism of the inhibition of human leukaemia cell growth by dietary isothiocyanates and their cysteine adducts in vitro. *Biochemical Pharmacology* 2000, 60, 221-231.
55. Grose, K. R.; Bjeldanes, L. F., Oligomerisation of indole-3-carbinol in aqueous acid. *Chemical Research in Toxicology* 1992, 5, 188-193.
56. Stresser, D. M.; Williams, D. E.; Griffin, D. A.; Bailey, G. S., Mechanisms of tumor modulation by indole-3-carbinol. Disposition and excretion in male Fischer 344 rats. *Drug Metabolism and Disposition* 1995, 23, (9), 965-975.

57. Buskov, S.; Hansen, L. B.; Olsen, C. E.; Sorensen, J. C.; Sorensen, H.; Sorensen, S., Determination of Ascorbigens in Autolysates of Various Brassica Species Using Supercritical Fluid Chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2000, 48, (7), 2693-2701.
58. Sepkovic, D. W.; Bradlow, H. L.; Ball, M., Quantitative determination of 3,3'-diindolylmethane in urine of individuals receiving indole-3-carbinol. *Nutrition and Cancer* 2001, 41, 57-63.
59. Ettliger, M. G.; Lundeen, A. J., The structures of sinigrin and sinalbin: an enzymatic rearrangement. *Journal of the American Chemical Society* 1956, 78, 4172-4173.
60. Ettliger, M. G.; Lundeen, A. J., First synthesis of a mustard oil glucoside: the enzymatic Lossen rearrangement. *Journal of the American Chemical Society* 1957, 79, 1764-1765.
61. Danielak, R.; Borkowski, B., *Biologically active compounds in seeds of crucifers Part III. Chromatographical search for glucosinolates*. 1969; Vol. 21, p 563-575.
62. Underhill, E. W.; Kirkland, D. F., L-2-Amino-4-phenylbutyric acid and 2-phenethylglucosinolate, precursors of 2-hydroxy-2-phenyl-ethyl glucosinolate. *Phytochemistry* 1972, 11, 1973-1979.
63. Chistensen, B. W.; Kjaer, A.; Ogaard-Madsen, J.; Olsen, C. E.; Olsen, O.; Sorensen, H., Mass-spectrometric characteristics of some pertrimethyl-silylated desulfoglucosinolates. *Tetrahedron* 1982, 38, 353-357.
64. Daxenbichler, M. E.; Spencer, G. F.; Carlson, D. G.; Rose, G. B.; Brinker, A. M.; Powell, R. G., Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. *Phytochemistry* 1991, 30, 2623-2638.
65. Spinks, E. A.; Sones, K.; Fenwick, G. R., The quantitative analysis of glucosinolates in cruciferous vegetables, oilseeds and forages using high performance liquid chromatography. *Fette Seifen Anstrichmittel* 1984, 86, 228-231.
66. Nilsson, J.; Olsson, K.; Engqvist, G.; Ekvall, J.; Olsson, M.; Nyman, M.; Akesson, B., Variation in the content of glucosinolates, hydroxycinnamic acids, carotenoids, total antioxidant capacity and low-molecular-weight carbohydrates in *Brassica* vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006, 86, (528-538).
67. Oerlemans, K.; Barrett, D. M.; Suades, C. B.; Verkerk, R.; Dekker, M., Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage. *Food Chemistry* 2006, 95, 19-29.
68. Wathelet, J.-P.; Iori, R.; Leoni, O.; Rollin, P.; Quinsac, A.; Palmieri, S., Guidelines for glucosinolate analysis in green tissues used for biofumigation. *Agroindustria* 2004, 3, 257-266.

69. Song, L.; Morrison, J. J.; Botting, N. P.; Thornalley, P. J., Analysis of glucosinolates, isothiocyanates, and amine degradation products in vegetable extracts and blood plasma by LC-MS/MS. *Analytical Biochemistry* 2005, 347, 234-243.
70. West, L.; Tsui, I.; Haas, G., Single column approach for the liquid chromatographic separation of polar and non-polar glucosinolates from broccoli sprouts and seeds. *Journal of Chromatography A* 2002, 966, 227-232.
71. Font, R.; Del Rio, M.; Fernandez-Martinez, J. M.; de Haro-Bailon, A., Use of near-infrared spectroscopy for screening the individual and total glucosinolate contents in indian mustard seed (*Brassica juncea* L. Czern. & Coss.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2004, 52, 3563-3569.
72. Griffiths, D. W.; Deighton, N.; Birch, A. N. E.; Patrian, B.; Baur, R.; Stadler, E., Identification of glucosinolates on the leaf surface of plants from the Cruciferae and other closely related species. *Phytochemistry* 2001, 57, 693-700.
73. Tolra, R. P.; Alonso, R.; Poschenrieder, C.; Barcelo, D.; Barcelo, J., Determination of glucosinolates in rapeseed and *Thlaspi caerulescens* plants by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2000, 889, 75-81.
74. Seok-Jong, S.; Sung-Kwon, M.; Cheorl-Ho, K., Raphanus sativus and its isothiocyanates inhibit vascular smooth muscle cells proliferation and induce G1 cell cycle arrest. *International Immunopharmacology* 2006, 6, 854-861.
75. Kassie, F.; Laky, B.; Gminski, R.; Mersch-Sundermann, V.; Scharf, G.; Lhoste, E.; Kansmuller, S., Effects of garden and water cress juices and their constituents, benzyl and phenethyl isothiocyanates, towards benzo(a)pyrene-induced DNA damage: a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. *Chemico-Biological Interactions* 2003, 142, 285-296.
76. Vercammen, J.; Pham-Tuan, H.; Arickx, I.; Van der Straeten, D.; Sandraa, P., Monitoring of isothiocyanates emanating from *Arabidopsis thaliana* upon paraquat spraying. *Journal of Chromatography A* 2001, 912, 127-134.
77. Ciska, E.; Pathak, D. R., Glucosinolate derivatives in stored fermented cabbage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2004, 52, 7938-7943.
78. Sultana, T.; Porter, N. G.; Savage, G. P.; McNeils, D. L., Comparison of isothiocyanate yield from wasabi rhizome tissues grown in soil or water. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2003, 51, 3586-3591.

79. Jiao, D.; Yu, M. C.; Hankin, J. H.; Low, S. H.; Chung, F. L., Total isothiocyanate contents in cooked vegetables frequently consumed in Singapore. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1998, 46, (3), 1055-1058.
80. Zhang, Y.; Cho, C. G.; Posner, G. H.; Talalay, P., Spectroscopic quantitation of organic isothiocyanates by cyclocondensation with vicinal dithiols. *Analytical Biochemistry* 1992, 205, 100-107.
81. Zhang, Y.; Wade, K. L.; Prester, T.; Talalay, P., Quantitative determination of isothiocyanates, dithiocarbamates, carbon disulfide, and related thiocarbonyl compounds by cyclocondensation with 1,2-benzenedithiol. *Analytical Biochemistry* 1996, 239, 160-167.
82. Bradfield, C. A.; Bjeldanes, L. F., High performance liquid chromatographic analysis of anticarcinogenic indoles in Brassica oleracea. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1987, 35, 46-49.
83. Krinsky, N. I., Carotenoids as antioxidants. *Nutrition* 2001, 17, 815-817.
84. Shi, H.; Noguchi, N.; Niki, E., Natural Antioxidants. In *Antioxidant in food-Practical application*, Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M., Eds. Cambridge: CRC Press Woodhead Publishing Ltd.: 2001.
85. Davey, M. W.; van Montagu, M.; Inze, D.; Sanmartin, M.; Kanellis, A.; Smirnoff, N., Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, 80, 825-860.
86. Zhu, Q. Y.; Huang, Y.; Chen, Z.-Y., Interaction between flavonoids and a-tocopherol in human low density lipoprotein. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2000, 11, 14-21.
87. Eberhardt, M. V.; Lee, C. Y.; Liu, R. H., Nutrition-Antioxidant activity of fresh apple. *Nature* 2000, 405, 903-904.
88. Ohr, L. M., Dietary antioxidants. *Food Technology* 2004, 58, 67-74.
89. Rossetto, M.; Vanzani, P.; Mattivi, F.; Lunelli, M.; Scarpa, M.; Rigo, A., Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002, 408, 239-245.
90. Trombino, S.; Serini, S.; Di Nicuolo, F.; Celleno, L.; Ando, S.; Picci, N., Antioxidant effect of ferulic acid in isolated membranes and intact cells: Synergistic interactions with b-tocopherol, b-caroten, and ascorbic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2004, 52, 2411-2420.



91. Chen, H.; Tappel, A., Protection by multiple antioxidants against lipid peroxidation in rat liver homogenates. *Lipids* 1996, 31, 47-50.
92. Murakami, M.; Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T., Effects of ascorbic acid and b-tocopherol on antioxidant activity of polyphenolic compounds. *Journal of Food Science* 2003, 68, 1622-1625.
93. Liao, K.-I.; Yin, M.-C., Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: Importance of the partition coefficient. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2000, 48, 2266-2270.
94. Jeffery, E. H.; Brown, A. F.; Kurilich, A. C.; A.S., K.; Matusheski, N.; Klein, B. P., Variation in content of bioactive components in broccoli. Study review. *Journal of Food Composition and Analysis* 2003, 16, 323-330.
95. Kurilich, A. C.; Tsau, G. J.; Brown, A.; Howard, L.; Klein, B. P.; Jeffery, E. H., Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of *Brassica oleracea*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1999, 47, 1576-1581.
96. Lisiewska, Z.; Kmiecik, W., Effects of level of nitrogen fertilizer, processing conditions and period of storage of frozen broccoli and cauliflower on vitamin C retention. *Food Chemistry* 1996, 57, 267-270.
97. Vallejo, F.; Tomas-Barberan, F. A.; Garcia-Viguera, C., Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2002, 82, 1293-1297.
98. Van der Berg, H.; Faulks, R.; Granado, F. H.; Hirschberg, J.; Olmedilla, B.; Sandmann, G., The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, 80, 880-912.
99. Lee, S. K.; Kader, A. A., Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology* 2000, 20, 207-220.
100. Favell, D., A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry* 1998, 62, 59-64.
101. Franke, A. A.; Custer, L. J.; Arakaki, C.; Murphy, S. P., Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis* 2004, 17, 1-35.
102. Bahorun, T.; Luximon-Ramma, A.; Crozier, A.; Aruoma, O. I., Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2004, 84, 1553-1561.

103. Hussein, A.; Odumeru, J. A.; Ayanbadejo, T.; Faulkner, H.; McNab, W. B.; Hager, H., Effect of processing and packaging on vitamin C and b-carotene content of ready-to-use (RTU) vegetables. *Food Research International* 2000, 33, 131-136.
104. Chu, Y.-F.; Sun, J.; Wu, X.; Liu, R. H., Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002, 50, 6910-6916.
105. Zhang, D.; Hamauzu, Y., Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microvawe cooking. *Food Chemistry* 2004, 88, 503-509.
106. Murcia, M. A.; Lopez-Ayerra, B.; Martinez-Tome, M.; Vera, A. M.; Garcia-Carmona, F., Evolution of ascorbic acid and peroxidase during industrial processing of broccoli. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, 80, 1882-1886.
107. Pfindt, L. B.; Vukasinovic, V. L.; Blagojevic, N. Z.; Radojevic, M. P., Second order derivative spectrophotometric method for determination of vitamin C content in fruits, vegetables and fruit juices. *European Food Research and Technology* 2003, 217, 269-272.
108. Czarniecka-Skubina, E., Effect of the material form, storage and cooking methods on the quality of Brussels sprouts. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 2002, 11/52, 75-82.
109. Puupponen-Pimia, R.; Hakkinen, S. T.; Aarni, M.; Suortti, T.; Lampi, A. M.; Eurola, M., Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2003, 83, 1389-1402.
110. Gokmen, V.; Kahraman, N.; Demir, N.; Acar, J., Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* 2000, 881, 309-316.
111. Howard, L. A.; Wong, A. D.; Perry, A. K.; Klein, B. P., b-carotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables. *Journal of Food Science* 1999, 64, 929-936.
112. Vanderslice, J. T.; Higgs, D. J.; Hayes, J. M.; Block, G., Ascorbic acid and dehydroascorbic acid content of food-as-eaten. *Journal of Food Composition and Analysis* 1990, 3, 105-118.
113. Cook, N. C.; Samman, S., Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* 1996, 7, 66-76.
114. Czczot, H., Biological activities of flavonoids-A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 2000, 950, 3-13.

115. Hollman, P. C. H.; Hertog, M. G. L.; Katan, M. B., Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry* 1996, 57, 43-46.
116. Kuntz, S.; Wenzel, U.; Daniel, H., Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition* 1999, 38, 133-142.
117. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free radical Biology & Medicine* 1999, 26, 1231-1237.
118. Vinson, J. A.; Dabbagh, Y. A.; Serry, M. M.; Jang, J., Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1995, 43, 2800-2802.
119. Price, K. R.; Casascelli, F.; Colquhoun, I. J.; Rhodes, M. J. C., Composition and content of flavonol glycosides in broccoli florets (*Brassica oleracea*) and their fate during cooking. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1998, 77, 468-472.
120. Nielsen, J. K.; Olsen, C. E.; Petersen, M. K., Acylated flavonol glycosides from cabbage leaves. *Phytochemistry* 1993, 49, 2171-2176.
121. Nielsen, J. K.; Norbek, R.; Olsen, C. E., Kaempferol tetraglucosides from cabbage leaves. *Phytochemistry* 1998, 34, 539-544.
122. Dyrby, M.; Westergaard, N.; Stapelfeldt, H., Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink medel systems. *Food Chemistry* 2001, 72, 431-437.
123. Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L., Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1997, 45, 304-309.
124. Chu, Y.-H.; Chang, C.-L.; Hsu, H.-F., Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, 80, 561-566.
125. Wu, X.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Gebhardt, S. E.; Prior, R. L., Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2004, 52, 4026-4037.
126. Rice-Evans, C.; Sampson, J.; Bramley, P. M.; Holloway, D. E., Why do we expect carotenoids to be antioxidant in vivo. *Free Radical Research* 1997, 26, 381-398.

127. Muller, H., Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1997, 204, 88-94.
128. Holden, J. M.; Eldridge, A. L.; Beecher, G. R.; Buzzard, I. M.; Bhagwat, S.; Davis, C. S., Carotenoid content of US foods: An update of the database. *Journal of Food Composition and Analysis* 1999, 12, 169-196.
129. Heinonen, M. I.; Ollilainen, V.; Linkola, E. K.; Varo, P. T.; Koivistoinen, P. E., Carotenoids in Finnish foods: Vegetables, fruits and berries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1989, 37, 655-659.
130. De Sa, M. C.; Rodriguez-Amaya, D. B., Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables-Comparison of analytical and calculated data. *Journal of Food Composition and Analysis* 2004, 17, 37-51.
131. Murkovic, M.; Gams, K.; Draxl, S.; Pfannhauser, W., Development of an Austrian carotenoid database. *Journal of Food Composition and Analysis* 2000, 13, 435-440.
132. Stampfer, M. J.; Rimm, E. B., Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 1995, 62, 1365-1369.
133. Piironen, V.; Syvaioja, E.-L.; Varo, P. T.; Salminen, K.; Koivistoinen, P. E., Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods: Vegetables, fruits and berries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1986, 34, 742-746.
134. Leja, M.; Mareczek, A.; Starzyńska, A.; Rożek, S., Antioxidant ability of broccoli flower buds during short-term storage. *Food Chemistry* 2001, 72, 219-222.
135. Ismail, A.; Marjam, Z. M.; Foong, C. W., Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry* 2004, 87, 581-586.
136. Ninfali, P.; Bacchiocca, M., Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2003, 51, 2222-2226.
137. Hart, D. J.; Scott, K. J., Development and the evaluation of an HPLC method for analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry* 1995, 54, 101-111.
138. Azuma, K.; Ippoushi, K.; Ito, H.; Higashio, H.; Terao, J., Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999, 79, 2010-2016.

139. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L., Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1996, 44, 3426-3431.
140. Honer, K.; Cervellati, R., Measurements of the antioxidant capacity of fruits and vegetables using BR reaction method. *European Food Research and Technology* 2002, 215, 437-442.
141. Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Deemer, E. K., Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002, 50, 3122-3128.
142. Roberts, W. G.; Gordon, M. H., Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2003, 51, 1486-1493.
143. Kusznierewicz, B.; Wolska, L.; Bartoszek, A.; Namieśnik, J., Metody oznaczania in vitro właściwości przeciwutleniających próbek żywności, Część I. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 2006, XXXIX, 251-260.
144. Kusznierewicz, B.; Wolska, L.; Bartoszek, A.; Namieśnik, J., Metody oznaczania in vitro właściwości przeciwutleniających próbek żywności, Część II. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 2006, XXXIX, 261-270.
145. Kurilich, A. C.; Jeffery, E. H.; Juvik, J. A.; Wallig, M. A.; Klein, B. P., Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002, 50, 5053-5057.
146. Kanner, J.; Frankel, E.; Granit, R.; German, B.; Kinsella, J. E., Natural antioxidant in grapes and wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1994, 42, 64-69.
147. Galvez, M.; Martin-Cordero, C.; Houghton, P.; Ayuso, M. J., Antioxidant activity of methanol extracts obtained from plantago species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2005, 53, 1927-1933.
148. Cavin, A.; Hostettmann, K.; Dyatmyko, W.; Potterat, O., Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispus*. *Planta Medica* 1998, 64, 393-396.
149. 1999; N. P.-E. I., Nasiona rzepaku- oznaczanie zawartości glukozyolanów. Metoda z zastosowaniem wysokociśnieniowej chromatografii ciekłowej.

150. Wennberg, M.; Ekvall, J.; Olsson, K.; Nyman, M., Changes in carbohydrate and glucosinolate composition in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) during blanching and treatment with acetic acid. *Food Chemistry* 2006, 95, 226-236.
151. Kushad, M. M.; Brown, A. F.; Kurilich, A. C.; Juvik, J. A.; Klein, B. P.; Wallig, M. A.; Jeffery, E. H., Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1999, 47, 1541-1548.
152. Stratil, P.; Klejdus, B.; Kuban, V., Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables-Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2006, 54, (3), 607-616.
153. Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B., Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1992, 40, 2379-2383.
154. Stewart, A. J.; Bozonnet, S.; Mullen, W.; Jenkins, G. I.; Lean, M. E. J.; Crozier, A., Occurrence of Flavonols in Tomatoes and Tomato-Based Products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2000, 48, (7), 2663-2669.
155. Amin, I.; Lee, W. Y., Effect of different blanching times on antioxidant properties in selected cruciferous vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2005, 85, (13), 2314-2320.
156. Reyes, L. F.; Villarreal, J. E.; Cisneros-Zevallos, L., The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry* 2007, 101, 1254-1262.
157. Kusznierevich, B.; Wolska, L.; Bartoszek, A.; Namieśnik, J., The attempt of isolation of antioxidative compounds from cabbage. In *Proceedings of the 11th International Symposium on Separation Sciences* (pp. 263) 2005.
158. Bartoszek, A.; Forc, A.; Grzeskowiak, J., Antioxidative properties of some vegetable products traditional for diets in Central Europe - Short Report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 2002, 11, 67-70.
159. Tolonen, M.; Rajaniemi, S.; Pihlava, J. M.; Johansson, T.; Saris, P. E. J.; Ryhanen, E. L., Formation of nisin, plant-derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut. *Food Microbiology* 2004, 21, 167-179.
160. Skąpska, S.; Halasinska, A.; Owczarek, L.; Jasińska, U.; Lipowski, J.; Danielczuk, J., Wpływ procesów przetwórczych na zawartość związków fenolowych i pojemność przeciwutleniającą jabłek i białej kapusty. W *Materiałach: Naturalne przeciwutleniacze od surowca do organizmu*, Poznan, Poland 2007.

161. Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2005, 53, 4290-4302.
162. Anese, M.; Manzocco, L.; Nicoli, M. C.; Lericci, C. R., Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999, 79, 750-754.
163. Davies, C. G. A.; Wedzicha, B. L., Ascorbic acid browning: the incorporation of C1 from ascorbic acid into melanoidins. *Food Chemistry* 1994, 49, 165-167.
164. Hodge, J. E., Chemistry of browning in model system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1953, 928-943.
165. Turkmen, N.; Sari, F.; Poyrazoglu, E. S.; Velioglu, Y. S., Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry* 2006, 95, 653-657.
166. Manzocco, L.; Calligaris, S.; Mastrocola, D.; Nicoli, M. C.; Lericci, C. R., Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science and Technology* 2001, 11, 340-346.
167. Oszmiański, J.; Wolniak, M.; Wojdyło, A.; I., W., Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2007, 87, 573-579.
168. Hong, Y. J.; Barrett, D. M.; Mitchell, A. E., Liquid chromatography/mass spectrometry investigation of the impact of thermal processing and storage on peach procyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2004, 52, 2366-2371.
169. Turkmen, N.; Sari, F.; Velioglu, Y. S., The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry* 2005, 93, 713-718.
170. Nicoli, M. C.; Anese, M.; Parpinel, M. T.; Franceschi, S.; Lericci, C. R., Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Letters* 1997, 114, 71-74.
171. Durmaz, G.; Alpaslan, M., Antioxidant properties of roasted apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel. *Food Chemistry* 2007, 100, 1177-1181.
172. Dewanto, V.; Wu, X.; Liu, R. H., Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002, 50, 4959-4696.

173. Dewanto, V.; Adom, X. W. K.; Liu, R., Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002, 50, 3010-3014.
174. Tolonen, M.; Taipale, M.; Viander, B.; Pihlava, J. M.; Korhonen, H.; Ryhanen, E. L., Plant-derived biomolecules in fermented cabbage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002, 50, (23), 6798-6803.
175. Daxenbichler, M. E.; VanEtten, C. H.; Williams, P. H., Glucosinolate products in commercial sauerkraut. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1980, 28, 809-811.
176. Aleksandrova, L. G.; Korolev, A. M.; Preobrazhenskaya, M. N., Study of natural ascorbigen and related compounds by HPLC. *Food Chemistry* 1992, 45, 61-69.
177. Vallejo, F.; Tomas-Barberan, F. A.; Garcia-Viguera, C., Glucosinolates and vitamin C content in edible parts of broccoli florets after domestic cooking. *European Food Research and Technology* 2002, 215, 310-316.
178. Ciska, E.; Kozłowska, H., The effect of cooking on the glucosinolates content in white cabbage. *European Food Research and Technology* 2001, 212, 582-587.
179. Rosa, E. A. S.; Heaney, R. K., The effect of cooking and processing on the glucosinolate content : studies on four varieties of Portuguse cabbage and hybrid white cabbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1993, 62, 259-265.
180. Rungapamestrya, V.; Duncana, A. J.; Fullera, Z.; Ratcliffea, B., Effect of cooking brassica vegetables on the subsequent hydrolysis and metabolic fate of glucosinolates. *Proceedings of the Nutrition Society* 2007, 66, (69-81).
181. Slominski, B. A.; Campbell, L. D., Formation of indole glucosinolate breakdown products in autolyzed, steamed, and cooked *Brassica* vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1989, 37, 1297-1302.
182. Chevolleau, S.; Gasc, N.; Rollin, P.; Tulliez, J., Enzymatic, chemical, and thermal breakdown of 3H-labeled glucobrassicin, the parent indole glucosinolate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1997, 45, 4290-4296.
183. Ju, Y. H.; Carlson, K. E.; Sun, J.; Pathak, D.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A.; Helferich, W. G., Estrogenic effects of extracts from cabbage, fermented cabbage, and acidified Brussels Sprouts on growth and gene expression of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) Cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2000, 48, (10), 4628-4634.
184. Biblioteka widm MS - NIST 98 P/M FM 101106



185. Ellis, M. T., Contributions to our knowledge of the plant sterols. Part I. The sterol content of wheat (*Triticum Sativum*). *Food Chemistry* 2000, 68, 239-245.
186. Garcia-Villanova, B., Guerra-Hernandez, E., Martinez-Gomez, E., Montille, J., Liquid chromatography for the determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in breakfast cereals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1993, 41, 1254-1255.
187. Hidalgo, A., Pompei, C., Zambuto, R., Heat damage evaluation during tomato products processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1998, 46, 4387-4390.
188. Linko, Y. Y., Johnson, J. A., Changes in amino acids and formation of carbonyl compounds during baking. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1963.
189. Spillman, P. J., Pollnitz, A. P., Liacopoulos, D., Paralou, K. H., Sefton, M. A., Formation and degradation of furfuryl alcohol, 5-methylfurfuryl alcohol, vanillyl alcohol, and their ethyl ethers in barrel-aged wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1998, 46, 657-663.
190. Eisenrich, J. P., Macku, C., Shibamoto, T., Volatile antioxidants formed from L-cysteine/D-glucose Maillard model system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1992, 40, 1982-1988.
191. D'Angelantonio, M., Emmi, S. S., Poggi, G., Beggiato, G., Reaction of the OH radical with furfural. Spectral and kinetic investigation by pulse radiolysis and by ab initio and semiempirical methods. *Journal of Physical Chemistry* 1999, 103, 858-864.
192. Hardy, G., Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition* 2000, 1, 688-689.
193. IARC Handbooks of cancer prevention. Część 9: Cruciferous vegetables, isothiocyanates and indoles. IARC Press, Lyon, Francja 2004.
194. Loo, G., Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (Review). *Journal of Nutritional Biochemistry* 2003, 14, 64-73.
195. Eberhardt, M. V.; Jeffery, E. H., When dietary antioxidants perturb the thiol redox. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006, 86, 1996-1998.
196. Collins, A. R., Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *European Journal of Cancer* 2005, 41, 1923-1930.
197. Yu, Y. H.; Carlson, K. E.; Sun, J.; Pathak, D.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A.; G., H. W., Estrogenic effects of extracts from cabbage, fermented cabbage, and acidified Brussels sprouts on growth and

gene expression of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2000, 48, 4628-4634.

**Dorobek naukowy związany z realizacją pracy doktorskiej****Publikacje:**

- 1) **Barbara Kusznierevicz**, Lidia Wolska, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Charakterystyka flawonoidów: występowanie, właściwości, przegląd metodyk analitycznych, *Bromat. Chem. Toksykol.*, XXXVIII, 81-92 (2005).
- 2) **Barbara Kusznierevicz**, Lidia Wolska, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Metody oznaczania *in vitro* właściwości przeciwutleniających próbek żywności, Część I, *Bromat. Chem. Toksykol.*, XXXIX, 251-260 (2006).
- 3) **Barbara Kusznierevicz**, Lidia Wolska, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Metody oznaczania *in vitro* właściwości przeciwutleniających próbek żywności, Część II, *Bromat. Chem. Toksykol.*, XXXIX, 261-270 (2006).
- 4) **Barbara Kusznierevicz**, Agnieszka Bartoszek, Lidia Wolska, Jerzy Drzewiecki, Shela Gorinstein, Jacek Namieśnik, Partial characterization of white cabbages (*Brassica oleracea var. capitata f. alba*) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins. *J. Food Sci. Technol.*, 2007, (w druku, doi:10.1016/j.lwt.2007.02.007)
- 5) Anna Śmiechowska, **Barbara Kusznierevicz**, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Badania właściwości przeciwutleniających związków pochodzących z najczęściej spożywanych owoców i warzyw. *Analityka* (w druku)
- 6) **Barbara Kusznierevicz**, Anna Śmiechowska, Agnieszka Bartoszek, Lidia Wolska, Jacek Namieśnik, The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. (po recenzjach *Food Chemistry*).
- 7) **Barbara Kusznierevicz**, Anita Piasek, Joanna Lewandowska, Anna Śmiechowska, Agnieszka Bartoszek, Właściwości przeciwrakotwórcze kapusty białej. (złożone w redakcji kwartalnika *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*).
- 8) **Barbara Kusznierevicz**, Joanna Lewandowska, Agnieszka Kruszyna, Anita Piasek, Anna Śmiechowska, Jacek Namieśnik, Agnieszka Bartoszek, The antioxidative properties of white cabbage (*Brassica oleracea var. capitata f. alba*) fresh and submitted to culinary processing (po recenzjach *Nutrition and Cancer*)

**Opracowania książkowe:**

- 1) **Barbara Kusznierewicz**, Lidia Wolska, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Metody oznaczania właściwości przeciwutleniających próbek żywności, w Przeciwutleniacze w żywności: aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne (praca zbiorowa pod redakcją Włodzimierza Grajka) WNT, Warszawa, 2007.

**Referaty, komunikaty i postery:**

- 1) Lidia Wolska, **Barbara Kusznierewicz**, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, The influence of fermentation processes on antioxidant properties of white cabbage and sauerkraut: an attempt to identify phenolic compounds involved. Materiały ICMAA-VIII Eighth International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis. Pisa, Italy, 4-8 October 2003 (CD-rom).
- 2) **Barbara Kusznierewicz**, Agata Kot-Wasik, Lidia Wolska, Bogumiła Makuch, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, An attempt to identify flavonoids in white cabbage by GC-MS i LC-MS. Materiały 27th International Symposium on Capillary Chromatography. Riva del Garda, Italy, May 31-June 4, 2004 (CD-rom)
- 3) Lidia Wolska, **Barbara Kusznierewicz**, Agnieszka Bartoszek, Joanna Grześkowiak, Jacek Namieśnik, The influence of fermentation processes on antioxidant properties of white cabbage and sauerkraut: an attempt to identify phenolic compounds involved. Materiały 12th International Symposium Advances and Applications of Chromatography in Industry AACI 2004. Bratislava, Slovak Republic, June 29 - July 1, 2004 (CD-rom)
- 4) **Barbara Kusznierewicz**, Lidia Wolska, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Próba izolacji i identyfikacji związków o właściwościach przeciwutleniających występujących w soku z kiszonej kapusty. Materiały VII Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej, Toruń czerwiec –2005 (P-16 str.379)
- 5) **Barbara Kusznierewicz**, Lidia Wolska, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Healthy food – the attempt of isolation and identification of antioxidants in fermented cabbage. Materiały 6th Balaton Symposium On High - Performance Separation Methods, September 7-9, 2005, Siófok, Hungary

- 6) **Barbara Kusznierewicz**, Lidia Wolska, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, The attempt of isolation of antioxidative compounds from cabbage. Materiały ISSS 2005 September 12 – 14, 2005, Pardubice, Czech Republic.
- 7) **Barbara Kusznierewicz**, Lidia Wolska, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Próba oznaczenia substancji biologicznie aktywnych w kapuście, Materiały XLIX PTChem i SITPChem, 18 – 22, 2006, Gdańsk, Polska (S8-P149 str. 233).
- 8) **Barbara Kusznierewicz**, Agnieszka Kruszyna, Anita Piasek, Lidia, Wolska, Jacek Namieśnik, Agnieszka Bartoszek, Comparison of chemopreventive properties of white cabbage (*Brassica oleracea*) from non - organic and organic farming, Materiały COST 926/927 Conference: Molecular and physiological effects of bioactive food compounds October 11-14, 2006 ,Vienna, Austria, (S. 26.)
- 9) **Barbara Kusznierewicz**, Joanna Lewandowska, Agnieszka Kruszyna, Piasek Anita, Anna Śmiechowska, Lidia Wolska, Namieśnik Jacek, Agnieszka Bartoszek, Badania potencjału przeciwutleniającego kapusty białej przed i po obróbce kulinarnej oraz jej zdolności do indukowania komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych, Materiały: Konferencja Naukowa "Naturalne przeciwutleniacze - od surowca do organizmu", 29-30 stycznia 2007, Poznań, (S. 61-62, P47)
- 10) **Barbara Kusznierewicz**, Anna Śmiechowska, Agnieszka Bartoszek Lidia Wolska, Jacek Namieśnik, Partial characterization of white cabbages from different regions by glucosinolates and total antioxidant activities, Materiały: 13th International Symposium on Separation Sciences & 13th Advances and Applications of Chromatography in Industry, June 27-29, 2007, Štrbské Pleso, High Tatras, Slovak Republic,(K06).
- 11) **Barbara Kusznierewicz**, Anna Śmiechowska, Lidia Wolska, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, The influence of culinary processes on content of bioactive compounds in white cabbage from non-organic and organic farming, Materiały: 50 Jubileuszowy Zjazd PTChem oraz SITPChem "Chemistry, Environment & Human Activity in Civilization Development", 9-12 wrzesień, 2007, Toruń, (S. 203 ; SJ.7PS1-15).
- 12) Anna Śmiechowska, **Barbara Kusznierewicz**, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Anita Piasek, Cancer chemopreventive agents, glucosinolates and products produced from glucosinolates contained in the cabbage, Materiały: 50

Jubileuszowy Zjazd PTChem oraz SITPChem "Chemistry, Environment & Human Activity in Civilization Development", 9-12 wrzesień, 2007, Toruń, (S7.9-PS2-66).

- 13) Anna Śmiechowska, **Barbara Kusznierevicz**, Lidia Wolska, Agnieszka Bartoszek, Anita Piasek, Jacek Namieśnik, Charakterystyka warzyw kapustnych pod kątem obecnych w nich biologicznie aktywnych składników, Materiały: XXXVIII Sesja Naukowa Komitetu Nauki o Żywności PAN, z Seminarium Szkoleniowym dla asystentów i doktorantów "Żywność a jakość życia -Uwarunkowania technologiczne, higieniczne, żywieniowe i kulturowe" : streszczenia wykładów i komunikatów, 20-21 września 2007, Olsztyn, (s 83).

#### Wystąpienia ustne:

- 1) **Barbara Kusznierevicz**, Próba identyfikacji związków o właściwościach przeciwutleniających składników polskiej kuchni. Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Gdańsk, 23-24.09.2004.
- 2) **Barbara Kusznierevicz**, Agnieszka Bartoszek, Lidia Wolska, Jacek Namieśnik, The attempt of isolation and identification of antioxidative compound in sauerkraut juice. Seminar for Young Scientists working in the area of analytical chemistry - New achievements in separation sciences, Sobieszewo, Poland 14-15 April, 2005.
- 3) **Barbara Kusznierevicz**, Próba izolacji i identyfikacji związków o właściwościach przeciwutleniających występujących w kapuście. Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Gdańsk, 23-24.09.2005.
- 4) **Barbara Kusznierevicz**, Wpływ tradycyjnej obróbki kulinarnej na właściwości przeciwutleniające kapusty białej. XXXVII Sesja naukowa komitetu nauk o żywności PAN. Gdynia, 26-27.09.2006.

#### Nagrody i wyróżnienia:

- 1) **Barbara Kusznierevicz**, Lidia Wolska, Agnieszka Bartoszek, Jacek Namieśnik, Próba oznaczenia substancji biologicznie aktywnych w kapuście- Poster nagrodzony na XLIX PTChem i SITPChem, 18 – 22, 2006, Gdańsk, Polska.

**Wniosek patentowy**

Tytuł zgłoszenia patentowego: Wykorzystanie przeciwrakotwórczych właściwości kapusty (*Brassica oleraceae var capitata f. alba*) do produkcji prozdrowotnych wyrobów mięsnych o znamionach żywności funkcjonalnej wzbogaconych w naturalne substancje przeciwrakotwórcze. Zgłoszenie patentowe RP 13/24, listopad 2006.