

ANNA CIOŁEK
EWA MAKARSKA
Katedra Chemii
Akademia Rolnicza w Lublinie

Wpływ chemicznej ochrony na aktywność antyoksydacyjną polifenoli i frakcji tokoferoli ziarniaków pszenicy twardej (*Triticum durum* Desf.)

The influence of chemical protection on antioxidant activity of polyphenols and tocopherols in hard wheat (*Triticum durum* Desf.) grains

Materiał badań stanowiły ziarniaki 4 linii jarej pszenicy twardej (*Triticum durum* Desf.) oraz odmiany pszenicy zwyczajnej Sigma. Analizowano zawartość polifenoli i frakcji tokoferoli — związków posiadających właściwości antyoksydacyjne. W uprawie pszenicy zastosowano minimalną i intensywną ochronę chemiczną. W ekstraktach polifenoli i frakcji tokoferoli określono aktywność antyutleniającą metodą „wyłapywania” wolnych rodników wobec DPPH• (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl). Przeprowadzono również analizę aktywności antyutleniającej dla wzorców: kwasu ferulowego, BHT i α -tokoferolu. Skuteczność neutralizowania rodników DPPH• przez ekstrakty polifenoli i frakcji tokoferoli zależała w zróżnicowanym stopniu od: czasu trwania reakcji, właściwości genotypu oraz poziomu i rodzaju zastosowanych środków ochrony chemicznej.

Słowa kluczowe: aktywność antyoksydacyjna, polifenole, *Triticum durum*, ziarno, tokoferole

The grains of 4 lines of hard wheat (*Triticum durum* Desf.) and of common wheat variety Sigma were examined. The content of phenolic compound and tocopherols that exhibit antioxidant activity was determined. Wheat plants were cultivated at two levels of chemical protection. The antioxidant properties of polyphenols and tocopherols were examined using free radical scavenging method against stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•). Moreover, the antioxidant activity of standard compounds, like ferulic acid, BHT and α -tocopherol was evaluated. Antiradical efficiency of polyphenols and tocopherols depended on time of reaction, genotype properties and level of chemical protection.

Key words: antioxidant activity, *durum* wheat, grains, polyphenols, tocopherols

WSTĘP

W ostatnich latach wyraźnie zmienia się podejście do roli żywności w kształtowaniu zdrowia człowieka. Szczególne zainteresowanie budzi rola i oddziaływanie bioaktywnych składników żywności pochodzenia roślinnego w procesach metabolicznych człowieka. Związki te, dzięki swej aktywności przeciwutleniającej, chronią organizm ludzki przed chorobami, w tym nowotworowymi i chorobami układu krążenia (Zieliński i in.; 1998; Andlauer i Fürst, 1999; Baublis i in., 2000).

Do naturalnych antyoksydantów występujących w żywności pochodzenia roślinnego zaliczamy witaminę E, witaminę C, flawonoidy oraz inne polifenole, karotenoidy (Peterson, 2001). Ich źródłem są zboża, owoce i warzywa (Kähkönen i in., 1999; Zielinski i Kozłowska, 2000). W zbożach występuje szeroka grupa antyoksydantów, ponadto produkty zbożowe (pieczywo, makarony) są podstawą diety wielu populacji żyjących na świecie. Miller i wsp. (2000) badając zawartość antyoksydantów w składnikach płatków śniadaniowych (gotowych do spożycia) stwierdzili, że wszystkie występujące w nich zboża charakteryzują się wyższą zawartością antyoksydantów niż warzywa czy owoce. Ziarno zbóż bogate jest w związki fenolowe, głównie w kwasy fenolowe, tj. kwas ferulowy, wanilinowy, p-kumarynowy oraz kawowy (Onyeneho i Hettiarachchy, 1992; Kähkönen i in., 1999; Yang i Basu, 2001), ponadto zawiera takie fitochemikalia jak fitosterole, saponiny, fitoestrogeny, flawonoidy, jest też głównym źródłem lignin niezbędnych w codziennej diecie (Zielinski i Kozłowska, 2000). Właściwości antyoksydacyjne roślinnych polifenoli uzależnione są od ich struktury chemicznej i determinowane m.in. obecnością, położeniem i efektem indukcyjnym grup hydroksylowych w pierścieniach tych związków (Cook i in., 1996; Wilska-Jeszka, 1999).

Wraz z intensyfikacją upraw roślin zbożowych w celu zwiększenia plonów, niezbędne jest stosowanie chemicznych środków ochrony roślin. Poziom chemizacji uprawy może mieć wpływ nie tylko na zwiększenie produktywności, ale na jakość plonów, a więc skład chemiczny i aktywność biokomponentów ziarna (Korbas i Kubiak, 1998).

Celem podjętych badań było określenie zawartości polifenoli i frakcji tokoferoli w ziarniakach kilku linii pszenicy twardej w zależności od stopnia zastosowanej ochrony chemicznej oraz określenie aktywności antyutleniającej ekstraktów ww. związków metodą „wyłapywania” wolnych rodników DPPH•.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiły ziarniaki 4 linii jarej pszenicy twardej — (*Triticum durum* Desf.) — (LGR 899/62a, LGR 1359/8, LGR 896/23, LGR 899/17a) ustalone morfologicznie i wyselekcjonowane z kilku populacji mieszańców w Instytucie Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Lublinie.

W ścisłym doświadczeniu polowym (zbiór z 2001 roku) stosowano zróżnicowaną ochronę chemiczną: minimalną (zaprawa — Baytan Universal 19,5; herbicyd — Aminopielik D 450 SL — 3 l·ha⁻¹) oraz intensywną (zaprawa — Baytan Universal 19,5; herbicyd — Aminopielik D 450 SL — 3 l·ha⁻¹, w fazie krzewienia; fungicyd Tilt CB 37,5

WP — 1 kg·ha⁻¹, w fazie kłoszenia; insektycyd — Karate 023 EC — 0,2 l·ha⁻¹, w pełni kłoszenia; retardant — Antywylegacz 674 SL — 2 l·ha⁻¹, w fazie strzelania w źdźbło). Nawożenie azotowe w formie saletry amonowej stosowano w ilości 90 kg N·ha⁻¹. Porównawczo wykorzystano ziarno pszenicy zwyczajnej odmiany Sigma, uprawianej w tych samych warunkach nawożenia i ochrony.

W ziarnie po 3 miesięcznym leżakowaniu wykonano oznaczenie zawartości polifenoli i witaminy E. Oznaczono również aktywność przeciwutleniającą bioaktywnych związków zawartych w ziarnie (przy użyciu rodnika DPPH[•]).

Zawartość polifenoli

Oznaczenie zawartości polifenoli, w przeliczeniu na kwas chlorogenowy, przeprowadzono w oparciu o metodę z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu zgodnie z metodą opisaną przez Shahidi i Naczk (1995). Związki fenolowe ekstrahowano roztworem metanolu (metanol: woda 1:1 o pH 4, w obecności 0,1 M HCl). Całość wytrząsano 2 godziny, następnie za pomocą pompy próżniowej sączone przemywając niewielką ilością metanolu. Przesącz przemieszczono ilościowo do kolbki na 50 ml. Następnie do 0,5 ml roztworu dodano 0,5 ml wody i 2 ml roztworu Folina-Ciocalteu. (1:5 H₂O). Po upływie 3 minut dodano 10 ml 10% roztworu Na₂CO₃ (Na₂CO₃ krystaliczny) i energicznie wytrząsano. Oznaczenie spektrofotometryczne zawartości polifenoli przeprowadzono, po upływie 30 minut na spektrofotometrze Shimadzu UV-160A przy długości fali $\lambda = 725$ nm.

Zawartość witaminy E

Oznaczenie zawartości witaminy E przeprowadzono metodą chromatografii cienkowarstwowej oraz spektrofotometrycznie, zgodnie z procedurą opisaną w Normie Polskiej PN-92/R-64756 w przeliczeniu na α - tokoferol (firmy Sigma, stosowany jako wzorzec). Ekstrakcję, w połączeniu z hydrolizą alkaliczną, przeprowadzano w obecności kwasu askorbinowego. Mieszaninę 20 g rozdrobnionego ziarna, 80 ml alkoholu etylowego 96%, 20 ml wody, 15 ml roztworu wodorotlenku potasowego 50% oraz 0,5 g kwasu askorbinowego przez 30 minut ogrzewano pod chłodnicą zwrotną we wrzącej łaźni wodnej. Następnie przeprowadzono 3-krotną ekstrakcję badanych związków n-heksanem. Zebrane warstwy heksanowe przemywano wodą do odczynu obojętnego wobec fenoloftaleiny, a następnie przesączono przez warstwę bezwodnego siarczanu sodu do kolby miarowej zawierającej około 0,2 g BHT (butylohydroksytoluen). Ekstrakt heksanowy po odparowaniu do sucha rozpuszczono w 10 ml alkoholu etylowego.

Oznaczenie metodą chromatografii cienkowarstwowej przeprowadzono na płytkach z żelalem krzemionkowym 60 F₂₅₄ (firmy Merck) — układ rozwijający: chloroform. Miejsca występowania prążków zlokalizowano używając lampy UV firmy Camag przy długości fali świetlnej 254 nm oraz przez spryskanie roztworem α -dwupirydyli i FeCl₃ (1:1). Oznaczenie spektrofotometryczne zawartości witaminy E przeprowadzono na spektrofotometrze Shimadzu UV-160A przy długości fali 520 nm.

Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej z odczynnikiem DPPH[•]

W celu oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów polifenoli i frakcji tokoferoli z pszenicy zastosowano metodę z rodnikiem DPPH[•] (2,2-difenylo-1-pikrylhydrazyl) firmy Sigma w oparciu o metodę opisaną przez Brand-Wiliams i wsp. (1995)

oraz Sanchez-Moreno i wsp. (1998). Metoda ta opisana jest jako jedna z alternatywnych, użyteczna do oznaczania aktywności antyutleniającej kwasów fenolowych, a także stosowana wobec ekstraktów tokoferoli (Guo i in., 2001; Peterson i in., 2002).

Do 0,1 ml ekstraktu dodawano 3,9 ml rodnika o stężeniu 6×10^{-5} mol/ dm³ (roztwór wyjściowy) i mierzono wartość absorbancji przy długości fali $\lambda = 515$ nm w 15 minutowych odstępach.

Na podstawie przygotowanych roztworów DPPH o stężeniach od 1×10^{-5} mol/ dm³ do 6×10^{-5} mol/ dm³ sporządzono krzywą wzorcową. Aktywność antyoksydacyjną wyrażoną jako procent inhibicji obliczono zgodnie ze wzorem:

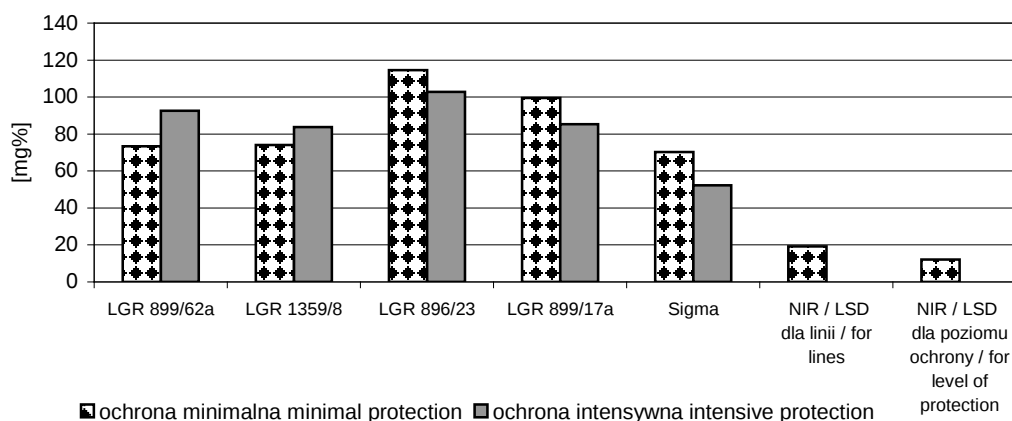
$$\% \text{ inhibicji} = [(AC(0) - AA(t)) / AC(0)] \times 100\%$$

AC(0) — absorbancja próby kontrolnej w czasie 0;

AA(t) — absorbancja badanej próby mierzona co 15 minut przez 1 godzinę.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badania dowodzą, iż główna grupa związków odpowiedzialna za aktywność antyoksydacyjną ziarna zbóż to związki fenolowe (Miller i in., 2000; Peterson, 2001; Yu i in., 2002). Na koncentrację tych składników mogą wpływać właściwości odmianowe, rok zbioru, a także lokalizacja uprawy (Emmons i Peterson, 2001). Porównując poziom polifenoli w ziarniakach 4 linii pszenicy twardej i zwyczajnej u odmiany Sigma stwierdzono istotnie wyższą zawartość tych związków (z wyjątkiem linii LGR 1359/8) w ziarniakach pszenicy twardej (rys. 1). Uzyskane wyniki wykazały również zróżnicowanie zawartości tych składników zależne od genotypu (tab. 1).



Rys. 1. Zawartość polifenoli w ziarniakach 4 linii pszenicy twardej i pszenicy zwyczajnej odm. Sigma
Fig. 1. Content of polyphenolic compounds in grain of 4 lines of hard wheat and in soft wheat var. Sigma

Tabela 1

Zawartość polifenoli i tokoferoli w ziarnie 4 linii pszenicy twardej i pszenicy zwyczajnej Sigma w zależności od ochrony chemicznej

Content of polyphenols and tocopherols in grain of 4 lines of hard wheat and in soft wheat Sigma, depending on chemical protection

Linie Lines	Polifenole (mg%) Polyphenols (mg%)	Tokoferole (mg/100g) Tocopherols (mg/100g)
LGR 899/62 a	82,96 ^b	3,935 ^a
LGR 1359/8	78,93 ^{a,b}	4,821 ^b
LGR 896/23	108,66 ^c	5,059 ^b
LGR 899/17 a	92,36 ^b	5,474 ^b
Sigma	61,27 ^a	6,278 ^c
NIR _{0,05} dla linii LSD _{0,05} for lines	19,26	0,786
Ochrona minimalna Minimal protection	86,35 ^a	4,915 ^a
Ochrona intensywna Intensive protection	83,33 ^a	5,312 ^a
NIR _{0,05} dla poziomu ochrony LSD _{0,05} for level of protection	12,18	0,502

Wartości średnie w tej samej kolumnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie
Means in columns marked with the same letters do not differ significantly

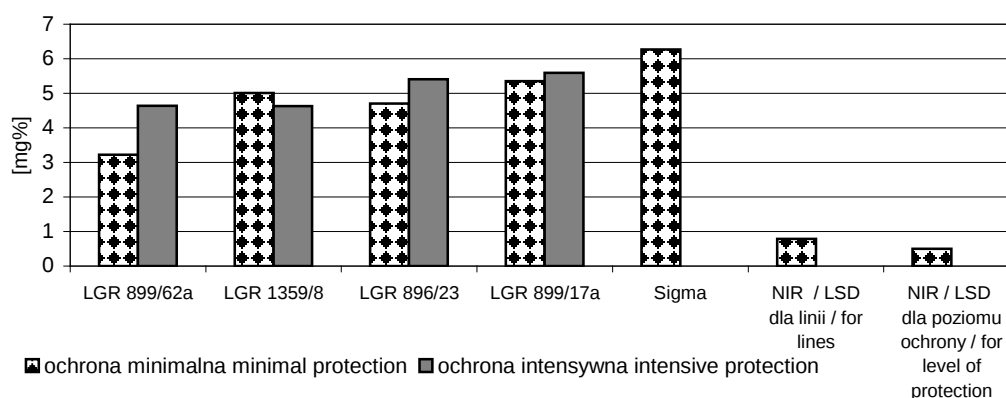
Reakcja roślin na zróżnicowanie poziomów ochrony chemicznej zależała także od indywidualnych cech odmianowych badanych linii. W przypadku linii LGR 896/23 i LGR 899/17a oraz pszenicy zwyczajnej stwierdzono wyższy poziom polifenoli przy zastosowaniu chemicznej ochrony minimalnej. Ziarniaki ww. linii, z obiektów na których stosowano tylko herbicyd, charakteryzowały się najwyższą zawartością polifenoli, odpowiednio 114,5 mg% i 99,46 mg% (rys. 1).

Natomiast w przypadku linii LGR 899/62a i LGR 1359/8 wyższą zawartością polifenoli wyróżniały się ziarniaki z obiektów z ochroną intensywną. Dla LGR 899/62a różnice były statystycznie istotne. Ziarniaki w/w linii uprawiane przy zastosowaniu ochrony minimalnej miały najniższy poziom polifenoli ze wszystkich badanych obiektów pszenicy twardej, ale i tak wyższy niż ziarniaki pszenicy zwyczajnej.

Grupą związków obecną w zbożach i posiadającą zdolności antyutleniające są tokoferole i tokotrienole wykazujące aktywność witaminy E. Tokoferole odgrywają ważną rolę w „zmiataniu” wolnych rodników, chociaż ich aktywność zależy od ich reaktywności i stężenia oraz dostępności współreagentów, tj. kwasu askorbinowego, β -karotenu, czy selenu (Guo i in., 2001; Yang i in., 2001). Ziarno zbóż jest wymieniane jako jedno z istotnych źródeł tokoli (Bartnikowska, 1995, Yang i in., 2001), dlatego ważna z genetycznego i hodowlanego punktu widzenia jest ocena zawartości frakcji tokoferoli w nowych liniach pszenicy twardej.

Analiza poziomu frakcji tokoferoli w ziarniakach badanych pszenic, wykazała, że pszenica twarda ma istotnie niższą zawartość tych związków w porównaniu do zwyczajnej (tab. 1, rys. 2). W obrębie badanych linii pszenicy twardej najwyższym poziomem tokoferoli charakteryzowała się linia LGR 899/17a, zaś istotnie najniższą zawartość stwierdzono w ziarnie linii LGR 899/62a z obiektów z ochroną minimalną. Zawartość frakcji tokoferoli mieściła się w granicach 3,2–5,3 mg/100g ziarna przy zastosowaniu

minimalnej ochrony chemicznej oraz 4,7–5,6 mg/100g ziarna z obiektów z ochroną intensywną (tab. 1).



Rys. 2. Zawartość witaminy E (suma tokoferoli) w ziarniakach 4 linii pszenicy twardej i pszenicy zwyczajnej — Sigma

Fig. 2. Vitamin E (tocopherols) content in grain of 4 lines of hard wheat and in soft wheat var. Sigma

Zastosowanie intensywnej ochrony chemicznej ujawniło się istotnym wzrostem stężenia tokoferoli (LGR 899/62a i LGR 896/23) lub tendencjami do wzrostu poziomu tej frakcji (LGR 899/17a) w ziarniakach porównywanych linii, z wyjątkiem linii LGR 1359/8.

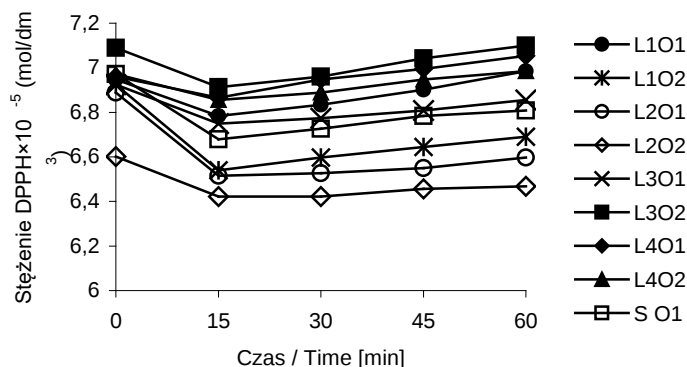
Badanie aktywności antyoksydacyjnej

Całkowita aktywność antyoksydacyjna badanego układu jest wynikiem współdziałania obecnych antyoksydantów i prooksydantów (Emmons i in., 1999). Zastosowana w niniejszej pracy metoda polega na badaniu zmian absorbancji zachodzących podczas reakcji redukcji stabilnego wolnego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylhydrazyl (DPPH*) przez bioaktywne związki (głównie kwasy fenolowe) obecne w metanolowych ekstraktach (Sanchez-Moreno, 1998).

Podczas godzinnej inkubacji z DPPH ekstrakty polifenoli w 50% metanolu w obecności HCl przy pH 4 wykazywały zdolność do hamowania reakcji rodnikowej w czasie pierwszych 15 minut, kiedy stwierdzono spadek stężenia stabilnych rodników DPPH (rys. 3). Odpowiadał temu wzrost aktywności antyutleniającej (jako procent inhibicji) od 1,76 do 9,96% (rys. 4). Wyniki te potwierdzają badania innych autorów, wykazujące, że obniżenie koncentracji DPPH wobec roślinnych antyoksydantów dobrze charakteryzuje początkowe tempo reakcji (Peterson i in., 2002).

Ekstrakty polifenoli otrzymane z pszenicy twardej linii LGR 899/62a i LGR 1359/8 wykazują wyższą aktywność antyutleniającą w porównaniu do otrzymanych z pszenicy zwyczajnej. Wartość pojemności antyoksydacyjnej pozostałych linii kształtowała się na niższym poziomie (rys. 3). Nie stwierdzono dodatniej zależności pomiędzy zawartością polifenoli w ekstraktach, a ich zdolnością antyutleniającą. Nie stwierdzono także jednokierunkowego wpływu zastosowanych pestycydów na aktywność antyoksydacyjną

ekstraktów polifenoli, choć wykazano zróżnicowaną reakcję genotypów na ochronę chemiczną.



Linie / Lines:

L1 — LGR 899/62a

L2 — LGR 1359/8

L3 — LGR 896/23

L4 — LGR 899/17a

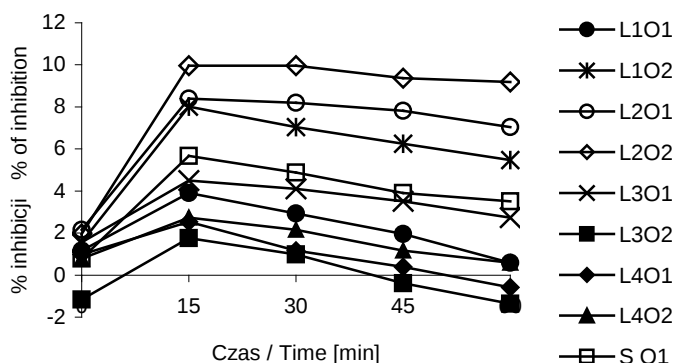
S — Sigma

Ochrona:

O1 — Ochrona minimalna; Minimal protection O2 — Ochrona intensywna; Intensive protection

Rys. 3. Wpływ ekstraktów metanolowych polifenoli (1:1; pH 4) na zmiany stężenia DPPH w czasie reakcji

Fig. 3 Influence of methanolic extracts of polyphenols (1:1; pH 4) on changes in DPPH concentration during reaction



Linie / Lines:

L1 — LGR 899/62a

L2 — LGR 1359/8

L3 — LGR 896/23

L4 — LGR 899/17a

S — Sigma

Ochrona:

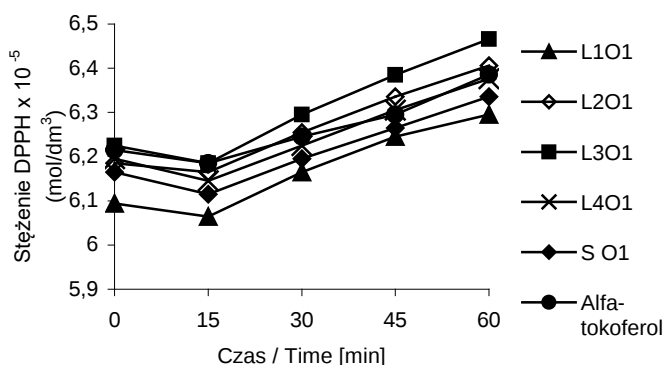
O1 — Ochrona minimalna; Minimal protection O2 — Ochrona intensywna; Intensive protection

Rys. 4. Wpływ czasu inkubacji na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów metanolowych (1:1; pH 4) wobec DPPH (jako % inhibicji)

Fig. 4. Influence of incubation time on antioxidant activity of methanolic extracts of polyphenols (1:1; pH 4) against DPPH (as % of inhibition)

W badaniach Emonsa i Petersona (2001) nad zawartością i aktywnością antyutleniającą związków fenolowych w owsie stwierdzono istotny wpływ odmiany i miejsca uprawy jedynie na poziom kwasów fenolowych. Natomiast brak było istotnego wpływu tych czynników na właściwości antyoksydacyjne badanych związków.

Z analizy kinetyki aktywności przeciwutleniającej frakcji tokoferoli wynika, że poziom ochrony chemicznej nie wpływał na działanie antyoksydacyjne tych związków. Natomiast zwraca uwagę mniejszy efekt antyutleniający tokoferoli w porównaniu z ekstraktami polifenoli. Stwierdzono niewielkie zróżnicowanie między genotypami w odniesieniu do spadku stężenia niezredukowanych stabilnych rodników DPPH przez ekstrakty tokoferoli — w czasie pierwszych 15 minut (rys. 5).



Linie / Lines:

L1 — LGR 899/62a

L2 — LGR 1359/8

L3 — LGR 896/23

L4 — LGR 899/17a

S — Sigma

Ochrona:

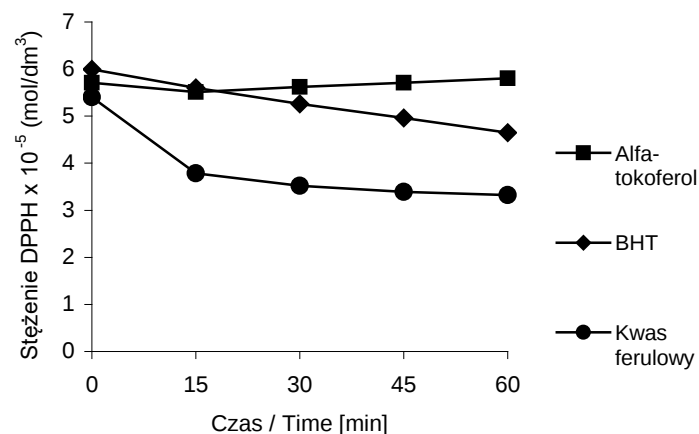
O1 — Ochrona minimalna; Minimal protection O2 — Ochrona intensywna; Intensive protection

Rys. 5. Wpływ ekstraktów tokoferoli i wzorca na zmiany stężenia DPPH w czasie reakcji

Fig. 5. Influence of tocopherols and standard compound on changes in DPPH concentration during the reaction

Ocena aktywności antyutleniającej wzorców wskazywała na odmienną kinetykę wyłapywania wolnych rodników, co jest związane z różną strukturą chemiczną zastosowanych związków (rys. 6). Podczas godzinnej inkubacji z DPPH, stężenie stabilnych rodników w reakcji z kwasem ferulowym bardzo szybko uległo obniżeniu w czasie pierwszych 15 minut z poziomu $5,401 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ do $3,783 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$. Związek ten najwyższą aktywność wykazuje w pierwszym okresie działania, a podczas dalszej reakcji jego siła antyutleniająca słabnie aż do osiągnięcia plateau.

Przebieg krzywej stężenia DPPH w funkcji czasu w przypadku α -tokoferolu (rys. 6) pokazuje, że wzorec ten przez pierwsze 15 minut zmniejszał stężenie rodnika ze stanu początkowego $5,712 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ do $5,511 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, a przez następne 45 minut następował wzrost stężenia rodników DPPH do wartości $5,803 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, co wskazywałoby na działanie prooksydacyjne.



Rys. 6. Wpływ α -tokoferolu, kwasu ferulowego i BHT na zmiany stężenia DPPH w czasie reakcji.
Fig. 6. Influence of α -tocopherol, ferrulic acid and BHT on changes in DPPH concentration during reaction

Syntetyczny przeciwutleniacz BHT wykazał najsilniejsze właściwości przeciwutleniające, gdyż prostoliniowo zmniejszał stężenie stabilnych rodników DPPH (rys. 6). Podczas godzinnej inkubacji nastąpił spadek stężenia niezredukowanej formy rodnika z poziomu $0,493 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ do $0,359 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, któremu odpowiadało obniżenie mierzonej absorbancji, oraz wzrost aktywności antyutleniającej (jako procent inhibicji) od 5,374 do 31,094. Świadczy to o wyraźnej stabilności antyoksydacyjnej wzorca w funkcji czasu wynikającej z obecności w jego strukturze chemicznej podstawnika o dużej objętości (di-tert-butyłowego), który hamuje reakcje rodnikowe (Wilska-Jeszka, 1999).

WNIOSKI

1. Ziarniaki badanych linii pszenicy twardej charakteryzowały się istotnie wyższym poziomem polifenoli w porównaniu z pszenicą zwyczajną.
2. Badania nad zawartością tokoferoli w ziarnie wykazały, że pszenica zwyczajna uprawiana w tych samych warunkach nawożenia i ochrony chemicznej charakteryzowała się wyższą zawartością tych związków niż pszenica *T. durum*.
3. Nie stwierdzono proporcjonalnej zależności pomiędzy zawartością tokoferoli i polifenoli w ekstraktach z ziarna badanych pszenic, a ich aktywnością przeciwutleniającą.
4. Aktywność antyutleniająca ekstraktów polifenoli zależała od: czasu trwania reakcji oraz poziomu i rodzaju środków ochrony chemicznej zastosowanych w doświadczeniu polowym. Zastosowane pestycydy nie wpływały na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów tokoferoli z badanych pszenic.
5. Aktywność antyoksydacyjna zastosowanych wzorców (BHT, α -tokoferolu, kwasu ferulowego) uzależniona była od ich budowy chemicznej i czasu trwania inkubacji.

LITERATURA

- Andlauer W., Furst P. 1998. Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. *Cereal Foods World* 43 (5): 356 — 360.
- Andlauer W., Furst P. 1999. Does cereal reduce the risk of cancer? *Cereal Food World* 44 (2): 76 — 78.
- Bartnikowska E. 1995. Health benefits of dietary antioxidant. *Pol. J. Nutr. Sci.* 4/45 (4): 3 — 22.
- Baublis A. J., Clydesdale F. M., Decker E. A. 2000. Antioxidants in wheat-based breakfast cereals. *Cereal Foods World* 45 (2): 71 — 74.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28 (1): 25 — 30.
- Cook N. C., Samman S. 1996. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr.Bioch.* 7 (2): 66 — 76.
- Emmons C. L., Peterson D. M., Paul G. L. 1999. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) Extracts. 2. *In vitro* antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4894 — 4898.
- Emmons C. L., Peterson D. 2001. Antioxidant activity and phenolic content of oat as affected by cultivar and location. *Crop Sci.* 41. 1676 — 1681.
- Guo J-T., Lee H-L., Chiang S-H., H-I., Chang C-Y. 2001. Antioxidant properties of the extracts from different part of broccoli in Taiwan. *J. Food and Drug Analysis.* 9 (2): 96 — 101.
- Kähkönen M. P., Hopia I., Vuorela H. J., Rauha J-P., Pihlaja K., Kujala T., Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. 47: 3954 — 3962.
- Korbas M., Kubiak K. 1998. Chemiczna ochrona jęczmienia jarego i pszenicy ozimej przed chorobami, a niektóre cechy plonu ziarna wpływające na jego jakość. *Progress in Plant Production.* 38 (2): 473 — 476.
- Miller H. E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A., Kanter M. 2000. Whole-grain products and antioxidants. *Cereal Foods World* 45 (2): 59 — 63.
- Onyeneho S. N., Hettiarachchy N. S. 1992. Antioxidant activity of durum wheat bran. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1496 — 1500.
- Peterson D. M. 2001. Oat antioxidants. *J. Cereal Sci.* 33: 115 — 129.
- Peterson D. M., Hahn M. J., Emmons Ch. L. 2002. Food Chemistry. Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities *in vitro*. 79: 473 — 478.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J., Saura-Calixto F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76: 270 — 276.
- Shahidi F., Naczek M. 1995. Methods of analysis and quantification of phenolic compounds. *Food phenolic: sources, chemistry, effects and applications.* Technomic Publishing Company, Inc.: Lancaster: 287 — 293.
- Wilska-Jeszka J. 1999. Struktura i właściwości antyoksydacyjne polifenoli. *Konferencja Nauk. "Żywność a zdrowie", Łódź:* 27 — 35.
- Yang F., Basu T. K., Ooraikul B. 2001. Studies on germination and antioxidant contents of wheat grain. *International Journal of Food Science and Nutrition* 52: 319 — 330.
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J., Qian M. 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1619 — 1624.
- Zielinski H., Kozłowska H. 2000. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2008 — 2016.
- Zieliński H., Honke J., Łatosz A., Troszyńska A., Ciska E., Waszczuk K., Szawara-Nowak D., Kozłowska H. 1998. A rapid method for measurement of total antioxidant status of selected cereal grains — short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 7/48 (3): 533 — 538.