

Woltamperometria cykliczna jako metoda oznaczania aktywności antyoksydacyjnej wybranych związków niskocząsteczkowych

Barbara LASKOWSKA, Kamil K. KURLETO – Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska, Kraków

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2011, **65**, 10, 1059-1062

Wstęp

Organizmy aerobowe do podtrzymania czynności życiowych potrzebują tlenu. Bez pożywienia człowiek jest w stanie przeżyć kilka tygodni, bez wody kilka dni, natomiast bez tlenu organizm umiera w przeciągu kilku minut. Tlen z płuc przechodzi do krwi i jest rozprowadzany do wszystkich komórek w organizmie ludzkim, by uczestniczyć w serii procesów biochemicznych, w rezultacie których jest on przekształcany w energię niezbędną do poniesienia kosztów energetycznych innych reakcji metabolicznych. Jednak tlen zachowuje się jak miecz obosieczny. Z jednej strony pozwala komórkom uzyskać (poprzez oddychanie) większe ilości energii, ale z drugiej – reaguje z liczną grupą związków jednoelektronowych, tworząc Reaktywne Formy Tlenu [1].

Reaktywne Formy Tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species* – ROS), to indywiduala chemiczne, które uczestniczą w procesach biochemicznych i fizjologicznych zachodzących w organizmach żywych. W zdrowym organizmie zachowana jest równowaga między wytwarzaniem, a usuwaniem wolnych rodników. Istnieje jednak wiele czynników, które zaburzają tę równowagę, co skutkuje tym, że powstawanie wolnych rodników i innych reaktywnych form tlenu jest uprzywilejowane. Należą do nich: zanieczyszczenie środowiska, promieniowanie jonizujące, nadmierna ekspozycja na działanie promieni UV, palenie tytoniu, produkty spożywcze zawierające pestycydy, herbicydy oraz chemiczne konserwanty, metale ciężkie, kosmetyki i leki zawierające substancje szkodliwe dla zdrowia (np.: glin w kosmetykach przeciwpotowych), stany zapalne organizmu, a także stres. Wzrost stężenia reaktywnych form tlenu w organizmie, spowodowany wymienionymi czynnikami, może prowadzić z kolei do występowania stresu oksydacyjnego [3, 6]. RFT w odpowiednio dużych dawkach uszkadzają komórki, a nawet mogą prowadzić do ich śmierci [1].

Formą obrony żywej komórki przed nadmiarem RFT są związki należące do grupy niskocząsteczkowych antyoksydantów. Są to substancje, które występując w małych stężeniach w porównaniu ze stężeniem substancji ulegającej utlenieniu, opóźniają lub zapobiegają utlenieniu tej substancji, wchodząc w reakcje redoks z czynnikami utleniającymi [3, 4]. Ich prosta budowa sprawia, że niskocząsteczkowe antyoksydanty stanowią dogodne modele do badań mających na celu wyjaśnienie procesów neutralizacji RFT. Poprzez neutralizację reaktywnych form tlenu, antyoksydanty zmniejszają uszkodzenia komórek i biocząsteczek, chronią przed uszkodzeniem naczyń krwionośnych, czynnikami kancerogennymi, obniżają ryzyko choroby wieńcowej i Alzheimer'a. Bogatym źródłem antyoksydantów może być odpowiednia dieta, obejmująca owoce, warzywa, rośliny zbożowe, ryby. Możemy je również dostarczać do organizmu w postaci suplementów diety. Antyoksydanty znajdują także szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym – zapobiegają utlenieniu nietrwałych składników [2, 3, 5].

Celem wykonywanych badań było określenie aktywności przeciwutleniającej wybranej grupy niskocząsteczkowych antyoksydantów oraz porównanie ich mocy antyoksydacyjnej.

Część eksperymentalna

Do badań elektrochemicznych zastosowano analizator elektrochemiczny BAS 100B/W firmy Bioanalytical Systems (USA).

Procesy elektrochemiczne prowadzono w trójelektrodowym naczynku elektrolitycznym. Jako elektrodę pracującą zastosowano elektrodę z węgla szklistego (GC) firmy Mineral (Polska), elektrodą pomocniczą była elektroda platynowa w postaci drutu, a elektrodą odniesienia – elektroda chlorosrebrowa Ag/AgCl wypełniona 3 molowym roztworem NaCl. Elektrodę GC przed każdym pomiarem czyszczono, polerując ją wodną zawiesiną tlenku glinu (Al_2O_3 , 0,05 μm) na filcu polerskim. Następnie elektrodę płukano w wodzie destylowanej i suszono. Badania prowadzono w środowisku buforu fosforanowego o stałym pH (6,5-6,6), w atmosferze powietrza oraz czystego argonu (firmy Linde).

Badania przeprowadzono w zakresie potencjałów od 1,0 do -1,1 V, przy szybkościach polaryzacji od 0,05 do 1 V/s; najczęściej rejestrowano woltamogramy przy 0,1 V/s. Przed pomiarem właściwym roztwór buforu argonowano w naczynku elektrolitycznym w celu rejestracji tła. Po pomiarze w atmosferze argonu układ był nasycony powietrzem. Następnie dodawano porcjami roztwór odpowiedniego związku rozpuszczonego w buforze. Stężenie dodawanego związku wynosiło 0,1 lub 0,5 mM. Po każdorazowym zwiększeniu stężenia badanej substancji rejestrowano woltamogram.

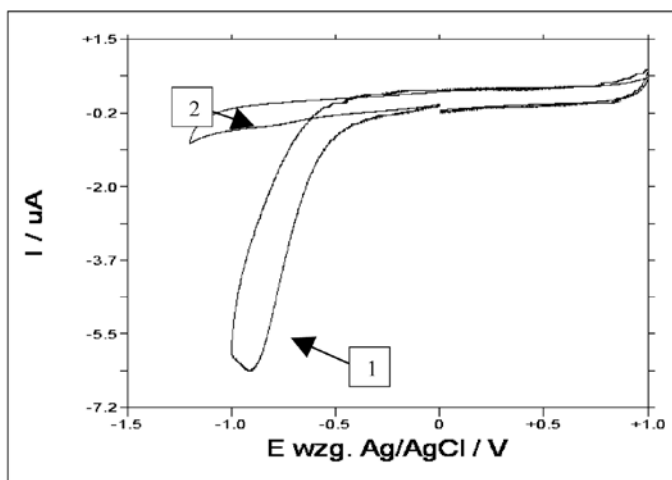
Do badań użyto następujących związków o czystości analitycznej (cz.d.a.): kwas askorbinowy, kwas kofeiny, resveratrol. Pozostałe badane substancje, to: witamina C200 (tabletki powlekane) firmy Teva, zielona herbata firmy Yunan, kawa Nescafe Classic firmy Nestle oraz czerwone wino Pinot Noir 2007 (producent St. Andrea, Węgry). W przypadku kwasu askorbinowego, kwasu kofeiny, resveratrolu oraz witaminy C200, sporządzono roztwory o stężeniu 0,5 mM. Dla witaminy C200 odważona taką ilość, by zawartość substancji czynnej po rozpuszczeniu odpowiadała stężeniu 0,5 mM. Roztwory zielonej herbaty i kawy sporządzono z 1 g substancji rozpuszczonej w 40 cm³ wody destylowanej o temperaturze – dla zielonej herbaty – 80°C i – dla kawy – 100°C. Po 4 minutach napary przesączono. Próbkę czerwonego wina pobierano do badań bez dodatkowych rozcieńczeń.

W przypadku pomiarów rejestrowanych dla resveratrolu, zielonej herbaty oraz czerwonego wina i kawy, po każdorazowej rejestracji woltamogramu, elektrodę pracującą czyszczono na filcu polerskim, ze względu na adsorbowanie się na powierzchni elektrody związków polifenolowych.

Omówienie wyników

Źródłem RFT w przyrodzie jest głównie tlen, a organizmy aerobowe bronią się przed ich nadmiarem za pomocą rozmaitych związków antyoksydacyjnych. W związku z tym, przeprowadzono badania elektrochemiczne, których wyniki przedstawiono poniżej.

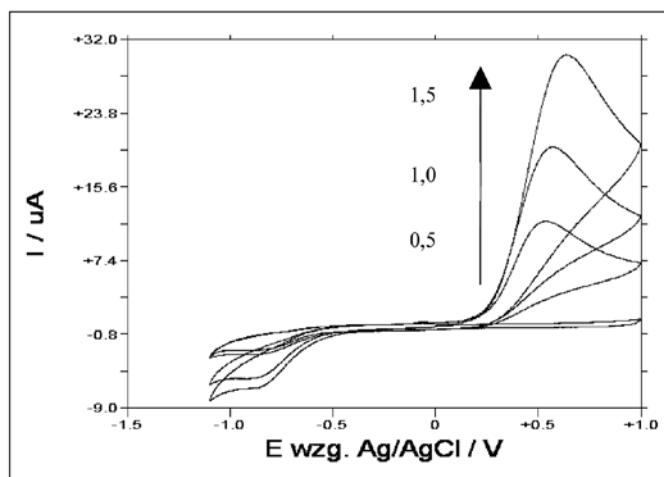
Na Rysunku 1 przedstawiono woltamogram zarejestrowany dla procesu redukcji tlenu (1). Woltamogram (2) zarejestrowano dla układu zaargonowanego.



Rys. 1. Voltamogram przedstawiający redukcję tlenu. CV zarejestrowano na elektrodzie GC względem elektrody Ag/AgCl, przy szybkości polaryzacji 0,1 V/s

Zaobserwowano, że proces redukcji tlenu rozpoczyna się przy potencjale -330 mV, mierzonym względem elektrody chlorosrebrowej. Maksimum pików zostaje osiągnięte przy potencjale -910 mV. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi w pracy A. Cournet et al. [7]. Fala ta jest charakterystyczna dla elektrochemicznej dwuelektroновой redukcji tlenu prowadzącej do powstania nadtlenu wodoru ($O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2$).

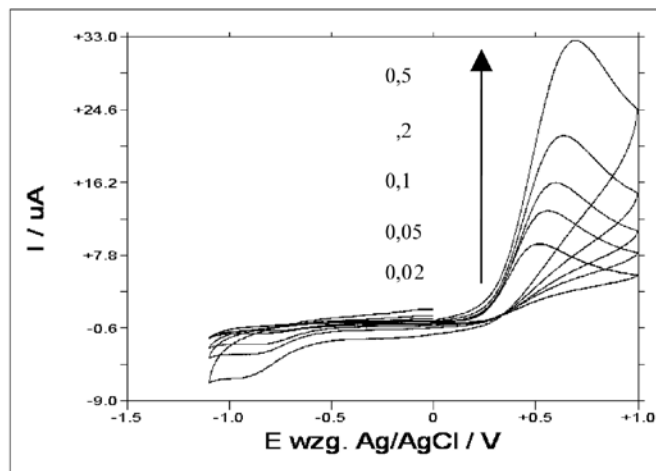
Jak widać na Rysunku 2, wraz ze wzrostem stężenia antyoksydanta, następuje wzrost piku fali utlenienia.



Rys. 2. Voltamogram redukcji tlenu przed dodaniem (krzywa 1) oraz voltamogramy po dodaniu kwasu askorbinowego o stężeniu odpowiednio: 0,5; 1,0; 1,5 mM kwasu. CV zarejestrowano na elektrodzie GC względem elektrody Ag/AgCl, przy szybkości polaryzacji 0,1 V/s

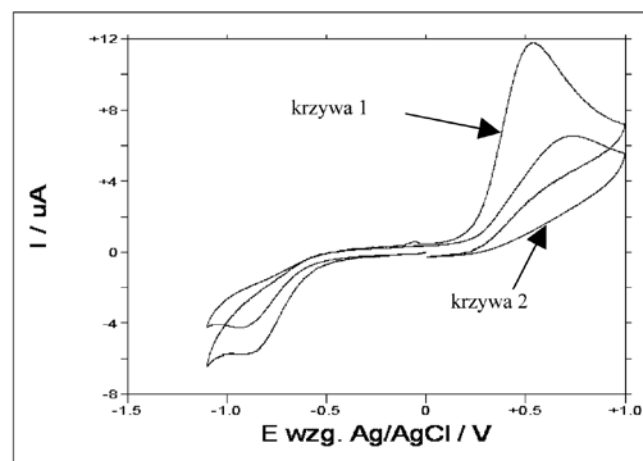
Proces utleniania kwasu rozpoczyna się niezależnie od stężenia przy potencjale +142 mV. Nie zaobserwowano natomiast piku redukcji w pobliżu potencjału utleniania, świadczącym o odwracalności procesu. Proces prowadzono w szerszym zakresie potencjałów, obejmujących wartość potencjału redukcji tlenu. Zaobserwowano, że w miarę wzrostu stężenia kwasu askorbinowego w roztworze, następuje zmniejszenie prądu redukcji, co wskazuje na udział zredukowanego tlenu w procesie utleniania kwasu askorbinowego.

Rysunek 3 przedstawia proces utleniania kwasu askorbinowego zarejestrowany dla jednego stężenia kwasu ($c = 0,5$ mM), przy różnych szybkościach polaryzacji. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem szybkości polaryzacji, wzrasta prąd piku utlenienia. Następuje również lekkie przesunięcie wartości potencjału w kierunku potencjałów bardziej anodowych



Rys. 3. Voltamogram redukcji tlenu w obecności 0,1 mM kwasu askorbinowego. CV zarejestrowano na elektrodzie GC względem elektrody Ag/AgCl, przy szybkościach polaryzacji wynoszących odpowiednio: 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 V/s

Na Rysunku 4 przedstawiono voltamogramy otrzymane dla czystego kwasu askorbinowego i tabletki witaminy C.

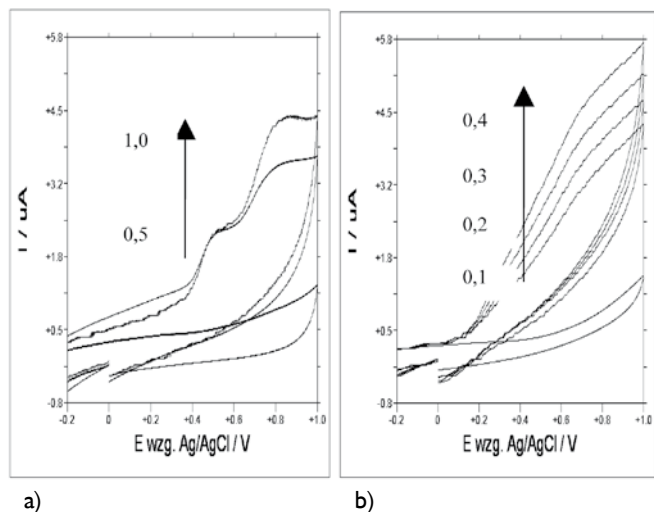


Rys. 4. Voltamogram redukcji tlenu po dodaniu kwasu askorbinowego (krzywa 1) oraz po dodaniu witaminy C200 (krzywa 2). Stężenia substancji aktywnych były równe i wynosiły 0,5 mM. CV zarejestrowano na elektrodzie GC względem elektrody Ag/AgCl, przy szybkości polaryzacji 0,1 V/s

W obu przypadkach stężenie kwasu askorbinowego było porównywalne ($c = 0,5$ mM). Jak można zaobserwować, prąd piku utlenienia jest dużo mniejszy w przypadku tabletki niż czystego kwasu. Zaobserwowano również przesunięcie potencjału fali w kierunku bardziej anodowym oraz wyraźne rozmycie piku. Najprawdopodobniej jest to związane z obecnością substancji pomocniczych obecnych w tabletkach, które mogą osłabiać działanie kwasu askorbinowego.

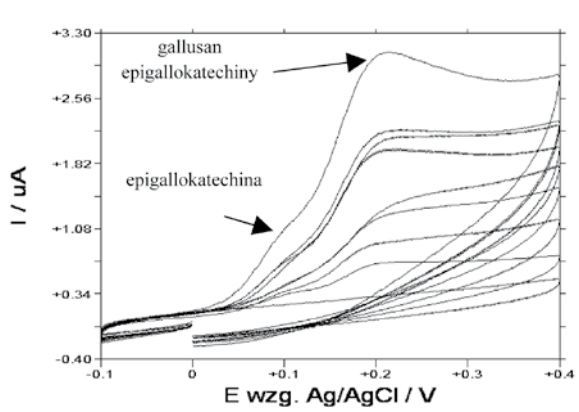
Na Rysunku 5 przedstawiono voltamogramy zarejestrowane dla różnych stężeń: a) resweratrolu i b) czerwonego wina. Porównanie obu voltamogramów jest nieprzypadkowe ze względu na to, że resweratrol jest obecny w winogronach i wielu gatunkach win.

W obu przypadkach można zauważyć (podobnie jak dla wcześniejszych związków) wzrost prądu piku fali utlenienia wraz ze wzrostem stężenia badanego związku. W przypadku voltamogramów zarejestrowanych po dodaniu wina, nie zaobserwowano występowania drugiego piku utleniania, który jest widoczny na voltamogramach przedstawiających utlenianie resweratrolu. W tym przypadku większy wzrost obserwujemy dla piku drugiego (przy potencjale bardziej anodowym). W przypadku czerwonego wina fala anodowa jest niewykształcona i rozmyta (związane jest to z występowaniem efektu synergicznego pomiędzy resweratrolem i innymi związkami o charakterze antyoksydacyjnym zawartymi w winie), chociaż proces utleniania rozpoczyna się już przy potencjale +45 mV.



Rys. 5. CV zarejestrowany dla zwiększającego się stężenia: a) resveratrolu o stężeniach odpowiednio: 0,5; 1,0 mM; b) czerwonego wina o objętościach odpowiednio: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ml. CV zarejestrowano na elektrodzie GC względem elektrody Ag/AgCl, przy szybkości polaryzacji 0,1 V/s

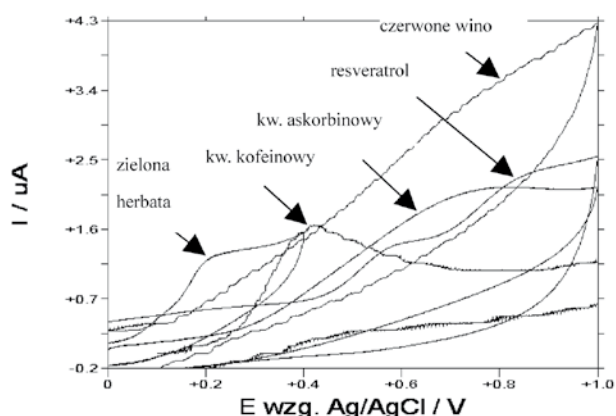
Rysunek 6 przedstawia woltamogramy zarejestrowane dla procesu utleniania antyoksydantów obecnych w zielonej herbacie.



Rys. 6. Woltamogram zarejestrowany w obecności zielonej herbaty. CV zarejestrowano na elektrodzie GC względem elektrody Ag/AgCl, przy szybkości polaryzacji 0,1 V/s

Proces utleniania rozpoczyna się przy niskim potencjale +25 mV. Obserwowane jest powstanie dwóch pików anodowych. Wyniki analizy można porównać z wynikami uzyskanymi w pracy Kilmarina P. et al. [8]. Pozwala to na potwierdzenie obecności epigallokatechiny oraz galusanu epigallokatechiny w naparze zielonej herbaty. Badania przeprowadzono w zakresie potencjałów od -100 do +400 mV.

Na rysunku 7 przedstawiono zbiorcze zestawienie woltamogramów zarejestrowanych dla badanych antyoksydantów.



Rys. 7. Woltamogram zarejestrowany w obecności: kwasu askorbinowego; kwasu kofeinowego; resveratrolu; czerwonego wina; zielonej herbaty. CV zarejestrowano na elektrodzie GC względem elektrody Ag/AgCl, przy szybkości polaryzacji 0,1 V/s

Woltamogramy zarejestrowano przy stałym stężeniu antyoksydanta, wynoszącym 0,1 mM, dla: kwasu askorbinowego, kwasu kofeinowego, resveratrolu. W przypadku zielonej herbaty i czerwonego wina znano tylko objętość dodanego związku. Wartości zarejestrowanych prądów fali anodowych dla wszystkich związków są porównywalne, co może świadczyć o tym, że w objętości 0,1 ml zielonej herbaty i wina znajduje się około 0,1 mM związków antyutleniających.

Proces utlenienia rozpoczyna się najszybciej w przypadku zielonej herbaty (+25 mV), następnie resveratrolu (+30 mV) oraz czerwonego wina (+45 mV). +140 mV, to potencjał przy którym rozpoczyna się utlenienie kwasu askorbinowego, a +175 mV odpowiada rozpoczęciu procesu dla kwasu kofeinowego. W przypadku potencjału charakterystycznego maksimum prądu zaobserwowano trochę inną kolejność.

W Tabelcy I przedstawiono zestawienie wartości potencjałów i natężenie prądu dla przebadanych związków.

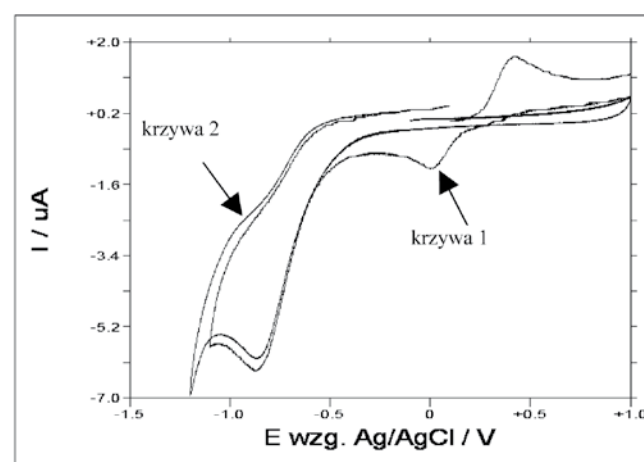
Tabelca I

Wartości potencjałów i natężenia prądu dla fali utlenienia przebadanych związków

Nazwa	Szybkość polaryzacji, V/s	Potencjał pików 1, mV	Prąd pików 1, A	Potencjał pików 2, mV	Prąd pików 2, A
Kwas askorbinowy	0,1	765,5	2,143e ⁻⁵	-	-
Kwas kofeinowy	0,1	398,8	2,05e ⁻⁶	-	-
Resveratrol	0,1	584,4	1,387e ⁻⁶	857,7	2,295e ⁻⁶
Zielona herbata	0,1	96,5	0,4175e ⁻⁶	203,5	1,206e ⁻⁶
Wino	0,1	704	3,109e ⁻⁶	-	-

Analiza danych z Tabelcy I pozwala wnioskować, że najsilniejszym antyutleniaczem jest związek występujący w zielonej herbacie – galusan epigallokatechiny, następnie kwas kofeinowy, resveratrol, czerwone wino i kwas askorbinowy.

Z wszystkich przebadanych związków, tylko w przypadku kwasu kofeinowego można zaobserwować powstanie pików redukcji w zakresie potencjałów dodatnich. Jest on wynikiem redukcji chinonu z powrotem do kwasu kofeinowego. Jak można zaobserwować na Rysunku 8, proces ten nie jest jednak procesem odwracalnym.

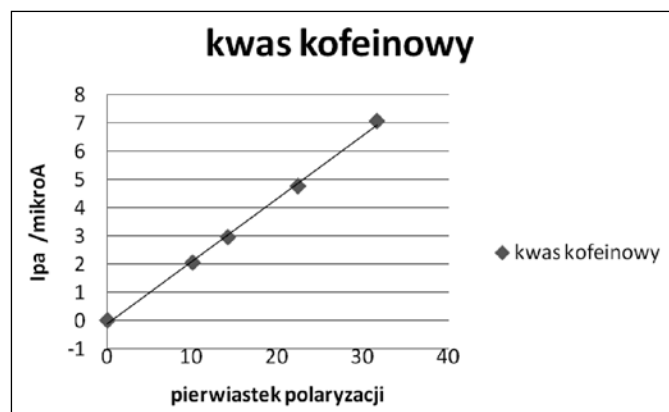


Rys. 8. Woltamogram redukcji tlenu przed dodaniem (krzywa 1) oraz woltamogram po dodaniu kwasu kofeinowego o stężeniu 0,1 mM. CV zarejestrowano na elektrodzie GC względem elektrody Ag/AgCl, przy szybkości polaryzacji 0,1 V/s

Różnica pomiędzy potencjałami utlenienia i redukcji wynosi $\Delta E = 417$ mV, a także wartość prądu anodowego w stosunku do prądu

katodowego wynosi $I_a/I_c = 1,4$, czyli jest większa od 1. Uzyskanie fali redukcyjnej w powrotnym skanie powoduje dodatkowo obniżenie fali charakterystycznej dla procesu redukcji tlenu. Wartość, o którą następuje jej zwiększenie, związana jest z prądem dyfuzyjnym.

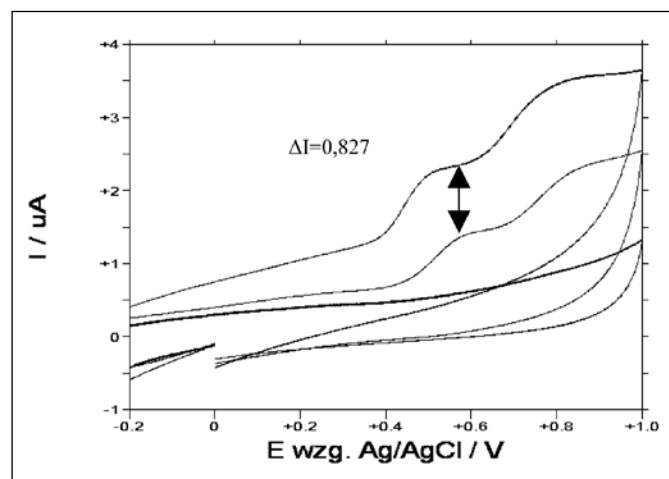
Procesy utleniania antyoksydantów są procesami kontrolowanymi przez dyfuzję. Rysunek 9 przedstawia zależność prądu pikowego utleniania kwasu kofeiny od pierwiastka z szybkości polaryzacji.



Rys. 9. Zależność pomiędzy natężeniem prądu pikowego przedfali I_{pa} i pierwiastkiem z szybkości polaryzacji

Jak widać (Rys. 9), uzyskana zależność jest liniowa i przechodzi przez początek układu współrzędnych, co wskazuje na to, że proces jest kontrolowany przez dyfuzję.

Woltamperometria cykliczna jest metodą, która pozwala w sposób bardzo precyzyjny określić potencjał utlenienia oraz stężenie badanego antyoksydanta. Jednak w przypadku badań nad związkami fenolowymi, podstawową trudnością była ich adsorpcja na powierzchni elektrody [9]. Po każdorazowym zarejestrowaniu woltamogramu należało przečystić elektrodę, gdyż adsorbowana warstwa polifenoli uniemożliwiała dalszy pomiar.



Rys. 10. Woltamogramy zarejestrowane przed dodatkiem (krzywa 1) i po dodaniu resveratrolu: krzywa (2) po oczyszczeniu elektrody; krzywa (3) – bez czyszczenia elektrody GC. CV zarejestrowano na elektrodzie GC względem elektrody Ag/AgCl, przy szybkości polaryzacji 0,1 V/s

Wykonując kilka skanów bez czyszczenia elektrody, obserwowano obniżenie prądu rejestrowanego pikowego (Rys. 10), a także przesunięcie potencjału utleniania w kierunku bardziej anodowym. Było to dużym utrudnieniem w wykonaniu pracy, gdyż niejednokrotnie trzeba było kilka, a nawet kilkanaście razy, czyścić powierzchnię elektrody w celu uzyskania powtarzalnych wyników.

Podsumowanie i wnioski

Metoda woltamperometrii cyklicznej może być stosowana do oznaczenia aktywności antyoksydantów. Pozwala ona, w sposób

dokładny i czuły, na wyznaczenie potencjału utlenienia, który może służyć za parametr charakterystyczny do określenia aktywności danego antyutleniaacza.

Na podstawie wykonanych badań i analizy woltamogramów, najsilniejsze właściwości przeciwoutleniające stwierdzono dla związków obecnych w zielonej herbacie, a najsłabsze dla kwasu askorbinowego.

W przypadku prowadzenia analizy dla kwasu kofeiny, zielonej herbaty, kawy, resveratrolu i czerwonego wina, zaobserwowano adsorbowanie się na powierzchni elektrody substancji aktywnych, co przeszkadzało w prawidłowym przeprowadzeniu analizy; konieczne było dokładne czyszczenie elektrody pracującej przed każdym pomiarem.

Analizując wykres zależności natężenia prądu od pierwiastka z szybkości polaryzacji stwierdzono, że proces utleniania antyoksydantów jest procesem kontrolowanym przez dyfuzję.

Literatura

1. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
2. Sroka Z., Gamin A., Cisowski W.: *Niskocząsteczkowe związki przeciwutleniające pochodzenia naturalnego*. (online – dostęp: 14 kwietnia 2010). Dostępny w internecie: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7041.pdf.
3. Kisała J.: *Antyutleniające pochodzenia roślinnego i syntetycznego – ich rola i właściwości*. Zeszyty Naukowe, Zeszyt 11, Rzeszów 2009.
4. Małyszko J., Karbarz M.: *Spektrofotometryczne i elektrochemiczne metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej*. Wiadomości Chemiczne 63.
5. Leja M., Mareczek A., Nanaszko B.: *Antyoksydacyjne właściwości owoców wybranych gatunków dziko rosnących drzew i krzewów*. Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu – CCCLXXXIII. Wydawnictwo AR im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań 2007.
6. Prieto-Simon B., Cortina M., Campas M., Calas-Blanchard C.: *Electrochemical biosensors as a tool for antioxidant capacity assessment*. (online – dostęp: 14 kwietnia 2010). Dostępny w internecie: <http://www.sciencedirect.com>.
7. Cournet A., Berge M., Roques C., Bergel A., Delia M.: *Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by Pseudomonas aeruginosa*, *Electrochimica Acta* 55 (2010). (online – dostęp: 9 stycznia 2011). Dostępny w Internecie: <http://elsevier.com/locate/electacta>.
8. Kilmartin P. A., Hsu Ch. F.: *Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry*. *Food Chemistry* 2003, 82. (online – dostęp: 14 kwietnia 2010). Dostępny w Internecie: <http://elsevier.com/locate/foodchem>.
9. Makhotkina O., Kilmartin P. A.: *The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide*. *Analytica Chimica Acta* 2010, 668. (online – dostęp: 9 stycznia 2011). Dostępny w Internecie: <http://elsevier.com/locate/electacta>

Dr Barbara LASKOWSKA jest absolwentką Wydziału Chemii na Uniwersytecie Jagiellońskim (1995). Doktorat w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej na Politechnice Krakowskiej (2007), gdzie aktualnie pracuje.

Inż. Kamil KURLETO w latach 2006-2011 studiował na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej, na specjalności Lekka Technologia Organiczna. W 2011 r. uzyskał tytuł inżyniera. Obecnie kontynuuje studia II stopnia na Wydziale ITCh PK.