

Paweł PISZCZ, Bronisław K. Głód*

Zakład Chemii Analitycznej, Instytut Chemii, Wydział Nauk Ścisłych,
Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce.

*Autor do korespondencji, e-mail: bkgl@onet.eu

Właściwości antyoksydacyjne ziół zbadane różnymi metodami

Streszczenie: Celem pracy było oszacowanie wartości całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA) wodnych ekstraktów ziół za pomocą różnych technik analitycznych. W metodzie odniesionej do rodników hydroksylowych rodniki te były generowane w reakcji Fentona. Produkt ich reakcji z kwasem *p*-hydroksybenzoesowym oznaczany był za pomocą HPLC/UV. Drugim celem było zbadanie możliwości oszacowania wartości CPA ekstraktów za pomocą HPLC z detekcją elektrochemiczną (ED). W tym przypadku oczekuje się, że próg wykrywalności metody będzie znacznie niższy od metod elektrochemicznych. W stosunku do metod opartych na generacji różnych rodników (w tym do opisanych w literaturze chromatograficznej) jej zaletą było możliwość odniesienia CPA do antyoksydantów różnej mocy poprzez zmianę potencjału elektrody pracującej. Wyniki skorelowane zostały z wartościami CPA odniesionymi do rodnika DPPH oraz całkowitą zawartością polifenoli w próbce.

Słowa kluczowe: ekstrakty ziół, całkowity potencjał antyoksydacyjny, HPLC, DPPH, polifenole

The antioxidative properties of herbs estimated using various assays

Abstract: The aim of the paper was the estimation of total antioxidant potential (TAP) of aqueous extracts of herbs using various analytical assays. In the assay related to the hydroxyl radicals they were generated by Fenton's reaction. The product of their reaction with *p*-hydroxybenzoic acid was determined using HPLC/UV. The second aim was to investigate the possibility to estimate of TAP values of extracts by HPLC with the electrochemical detection (ED). In this case, it is expected much lower detection limit than that observed in the classical electrochemical methods. In comparison to the methods based on the generation of various radicals (including these described in the chromatographic literature) the advantage of the described assay was its ability to relate TAP to various antioxidants by changing the potential of the working electrode. The results were correlated with the TAPs values related to the DPPH radicals as well as to the total polyphenols content in the sample.

Key words: herbal extracts, total antioxidant potential, HPLC, DPPH, polyphenols

1. Wstęp (Introduction)

Nie wiemy dlaczego się starzejemy i umieramy. Nie istnieje żadna teoria tłumacząca te procesy. Wśród wielu hipotez ważną jest wolnorodnikowa. Rodniki są też istotne w olbrzymiej większości chorób jako przyczyna, skutek bądź efekt uboczny [1]. Odgrywają one też pozytywną rolę ale ich nadmiar jest zdecydowanie negatywny dla człowieka. W toku ewolucji organizmy żywe nauczyły się je usuwać wytwarzając zmiatacze wolnych rodników (czasami utożsamiane z antyoksydantami) [9]. Niedomiar tych ostatnich może być podawany z pożywieniem [13]. W szczególności wiele antyoksydantów występuje w ziołach [17, 8].

Od dawna człowiek poszukiwał środków leczniczych do zwalczania gnębiących go chorób, utrzymania dobrej kondycji, poprawy swego wyglądu, również w celu zwiększenia odporności organizmu i przedłużenia życia. Tymi środkami były przede wszystkim różnorodne zioła rosnące w jego najbliższym otoczeniu. W ziołach występują między innymi naturalne przeciwutleniacze takie jak polifenole, a w szczególności flawonoidy i antocyjany, które mają zdolność do zmiatania reaktywnych form tlenu [22].

W badaniach *in vitro* dowiedziono, że flawonoidy występujące w liściach miłorzębu zabezpieczają komórki hipokampa przed tworzeniem polipeptydu β -amyloidu odpowiedzialnego za rozwój choroby Alzheimera. W leczeniu Alzheimera można zastosować również liście szalwii, której składniki działają antyoksydacyjnie, przeciwzapalnie i sedatywnie [14]. Właściwości zdrowotne niektórych powszechnie stosowanych ziół znane są już od stuleci, ich aktywność zależy przede wszystkim od ilości składników bioaktywnych. Zioła takie jak majeranek, czosnek, tymianek czy rozmaryn są szeroko używane do przygotowania wielu potraw w kuchni europejskiej. Ponadto zioła stosowane jako składniki diety, zaliczane są do bardzo ważnych czynników prewencyjnych niektórych chorób.

Antyoksydanty mogą być oznaczane wieloma technikami analitycznymi [16, 12, 7]. Często jest to utrudnione lub niemożliwe gdy skład próbki jest nieznan albo gdy antyoksydanty reagują ze sobą lub współdziałają. Wówczas oznaczana jest sumaryczna wielkość, całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA), zależna od sumy ze stężeń wszystkich antyoksydantów przemnożonych przez ich stałe szybkości reakcji z rodnikami. W literaturze stosuje się wiele nazw tej wielkości [4]. Ponieważ wiele antyoksydantów działa na podobnej zasadzie dlatego nie jest istotne stężenie poszczególnych z nich co jest dodatkową zaletą stosowania pomiarów CPA. W pracy przedstawione zostaną próby zastosowania do oznaczeń CPA ziół trzech opracowanych lub opracowywanych jeszcze przez nas nowych metod, (i) CPA odniesionego do rodnika hydroksylowego [11], (ii) mierzone jako sumaryczne pole powierzchni wszystkich pików chromatograficznych utlenianych na elektrodzie detektora elektrochemicznego [19] oraz (iii) jako pole powierzchni pików różnicowej woltometrii pulsowej, w której potencjał odniesiony jest do rodnika hydroksylowego i występuje w funkcji eksponencjalnej [2, 10]. Wyniki skorelowane zostaną z klasyczną metodą odniesioną do rodnika DPPH oraz z całkowitym stężeniem polifenoli w próbce.

2. Materiał i metody badań (*Materials and methods*)

2.1. Aparatura (*Apparatus*)

Pomiary chromatograficzne przeprowadzono na zestawie HPLC z dwoma detektorami, fotometrycznym i elektrochemicznym. W jego skład (Knauer, Berlin, Niemcy) wchodzi system naboru danych (Smartline Menager 5000) z wbudowanym degazerem, podstawka na zbiorniki eluentu, mieszadło eluentu (Dynamic Mixing Chamber), gradientowa pompa HPLC Smartline-1000, detektor spektrofotometryczny (DAD) Smartline-2600, detektor amperometryczny (Recipe, Berlin, Niemcy) ClinLab EC3000 (elektroda pracująca: elektroda z węgla szklanego, GC; elektroda odniesienia: Ag/AgCl; elektroda pomocnicza: Pt), autosampler Smartline-3900, termostat powietrzny kolumn Smartline-4000, kolumna Eurospier RP-18 5 μm , 250 x 4 mm I.D. (Knauer), oprogramowanie do naboru i obróbki danych chromatograficznych – ClarityChrom i EuroChrom.

pH roztworów mierzono na pH-metrze OP-208/1 firmy RADELKIS (Budapeszt, Węgry). Pomiary kolorymetryczne prowadzono na fotometrze firmy Thermo Spectronic, model - Helios Epsilon (USA) oraz spektrofotometrze Beckam DU68.

Pomiary woltamperometryczne prowadzono na potencjostacie AUTOLAB PGSTAT 12, firmy ECO Chemie B.V. (Utrecht, Holandia) sterowanym programem GPES 4,9 z układem trójelektrodowym (elektroda pracująca z węgla szklanego (GC); chlorosrebrowa elektroda odniesienia oraz elektroda pomocnicza wykonana z drutu platynowego).

2.2. Odczynniki (*Reagents*)

W pracy wykorzystano kwas p-hydroksybenzoowy (p-HBA), 3,4-dihydroksybenzoowy (3,4-DHBA) oraz 3,4,5-trihydroksybenzoowy (galusowy, 3,4,5-THBA), siarczan (VI) żelaza (II), metanol, DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, kwas kamfosulfonowy (Sigma – Aldrich), 95% kwas siarkowy (VI); kwas askorbinowy, brom, wolframian sodowy, molibdenian sodowy, bezwodny węglan sodowy, kwas ortofosforowy, siarczan litu (POCh, Gliwice, Polska), wodorotlenek sodu, etanol, wodorofosforan sodu, diwodorofosforan sodu, nadtlenuk wodoru (Chempur, Piekary Śląskie, Polska).

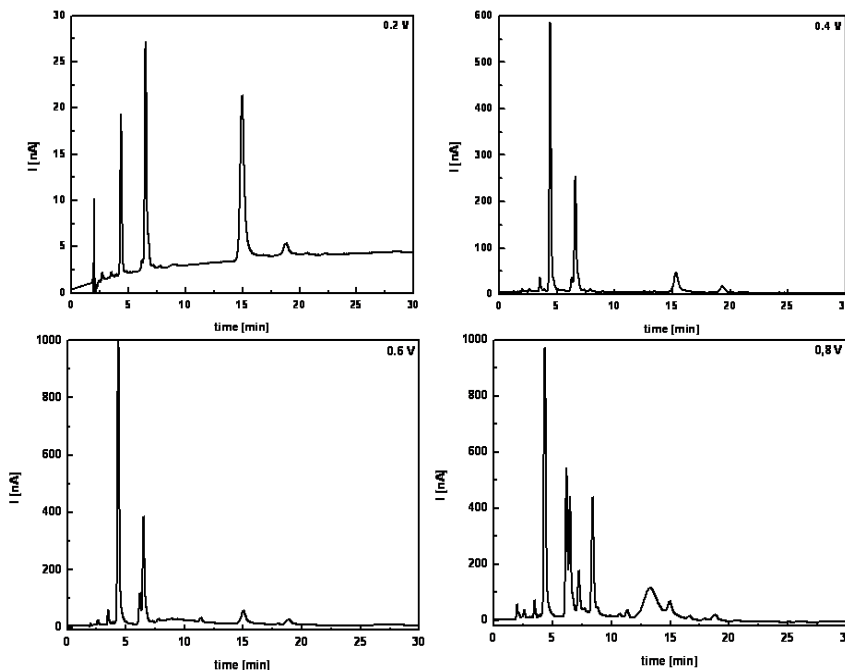
Wszystkie badane zioła oprócz kwiatu bławatka i malwy czarnej zostały zebrane na Podlasiu w okresie od maja do lipca 2009 r. Kwiat malwy czarnej został zakupiony w zakładzie zielarskim KAWON-HURT, Krajewice 119, Gostyń, a kwiat bławatka w sklepie Dary Natury, Mirosław Angielczyk, Koryciny 73, Grodzisk. Ekstrakty pozyskano z następujących ziół: chaber, kwiat bławatka (*Centaurea cyanus*), babka (zwyczajna) lancetowata szerokolistna (*Plantago major*), babka lancetowata wąskolistna (*Plantago lanceolata*), herbata (*Herba thea*), drapacz lekarski (*Chnicus benedictus*), dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum*), hyzop lekarski (*Hyssopus officinalis*), lawenda lekarska (wąskolistna) (*Lavandula angustifolia*), lebiódka pospolita (oregano) (*Origanum vulgare*), lipa szerokolistna (*Tilia platyphyllos*), majeranek (*Origanum majorana*), malwa czarna (*Alcea rosea*), melisa lekarska (*Melissa officinalis*), mięta polna (*Mentha arvensis*), mięta meksykańska (*Agastache mexicana*), mięta pieprzowa (*Mentha piperita*), miłorząb japoński, dwukłapowy (*Ginkgo biloba*), nagietek lekarski (*Calendula officinalis*), nostrzyk żółty (*Melilotus officinalis*), oregano, lebiódka pospolita (*Origanum vulgare*), podbiał pospolity (*Tussilago farfara*), pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica*), poziomka pospolita (*Fragaria vesca*), rdest ptasi (*Polygonum aviculare*), skrzyp

askorbinowy), które redukuje jony Fe(III) do Fe(II) zwiększając stężenie rodników hydroksylowych lub (ii) kompleksujących żelazo. Oznacza to, że pomiarów CPA odniesionych do rodnika hydroksylowego nie można zastosować do badania ziół. Podobne ograniczenie zaobserwowano w przypadku pomiaru CPA osocza i/lub surowicy krwi [9] w tym przypadku spowodowane jest to dużym stężeniem jonów żelaza powstających w wyniku lizy erytrocytów.

3.2. CPA mierzone za pomocą HPLC z detekcją elektrochemiczną (ED) (TAP measured by HPLC with electrochemical detection (HPLC-ED))

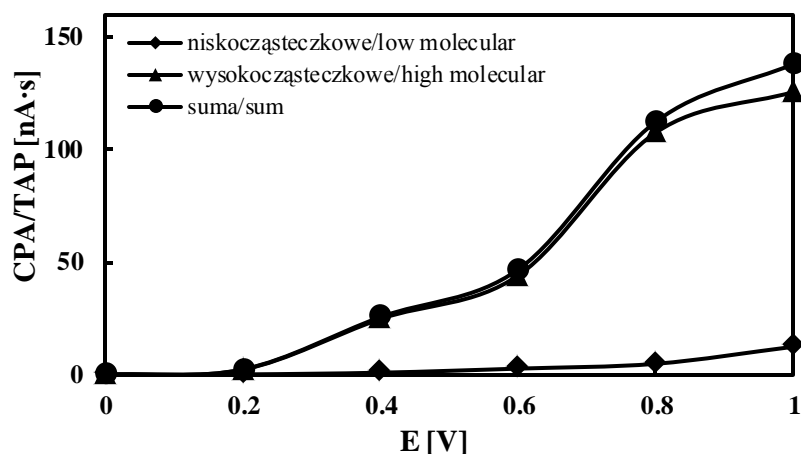
CPA ekstraktów ziół mierzone za pomocą HPLC/ED polegał na analizie chromatograficznej badanej próbki. Jeśli potencjał elektrody pracującej ustawimy tak aby uzyskać dodatnie piki chromatograficzne to oznaczamy wówczas te składniki próbki, które ulegają utlenianiu, czyli antyoksydanty. Miarą CPA jest sumaryczne pole powierzchni pod wszystkimi pikami chromatograficznymi. Pomiar taki można by było wykonać bez kolumny chromatograficznej (FIA). Wadą tego byłby wpływ objętości martwej układu na pomiar CPA. Zastosowanie HPLC ma tę dodatkową zaletę, że można wyznaczyć CPA poszczególnych związków lub grup związków rozdzielanych chromatograficznie. Pomiar można wykonywać przy różnych potencjałach elektrody pracującej, tzn. odnosić CPA do różnych rodników. Przy niskich potencjałach oznaczane są tylko mocne antyoksydanty, przy wysokich – jednocześnie silne i słabe antyoksydanty. Pomiar wykonany przy różnych potencjałach umożliwia uzyskanie hydrodynamicznych woltamogramów, znacznie bardziej czułych (z powodu bardzo dużych prądów konwekcyjnych i minimalnych prądów pojemnościowych) niż uzyskiwanych klasycznymi metodami woltametrycznymi [19]. Wadą tej metody jest to, że próbki rzeczywiste mogą zanieczyszczać elektrodę pracującą i wskazane jest jej czyszczenie mechaniczne po każdym użyciu.

Przykładowe chromatogramy HPLC uzyskane przy różnych potencjałach elektrody pracującej przedstawiono na rysunku 1. Okazało się, że optymalną wartością potencjału wybraną do oznaczeń był 0,6 V. Przy niższym potencjale oznaczane piki były niskie, ich pola powierzchni obciążone były dużą niepewnością pomiaru. Przy wyższych potencjałach nie zaobserwowano pojawiania się nowych pików na chromatogramach (pochodzących od słabszych antyoksydantów), a jedynie wzrost ich całkowitego pola powierzchni, natomiast potencjał elektrody pracującej był mniej odtwarzalny i elektroda częściej się „zatrzała” co wymagało jej czyszczenia niemal po każdym pomiarze. Z otrzymanych hydrodynamicznych woltamogramów (rys. 2) wynika, że CPA, można odnieść do niskocząsteczkowych, polarnych związków, wymywanych w pobliżu objętości martwej kolumny (do 4 min.) oraz bardziej niepolarnych, dużych związków organicznych. W przypadku mięty pieprzowej większy udział w CPA mają związki charakteryzujące się większą retencją, a więc prawdopodobnie o większych cząsteczkach i mniej polarne, np. flawonoidy. W przypadku mięty pieprzowej związki wysokocząsteczkowe stanowią ok. 96% sumarycznego pola powierzchni dla niższych i ok. 93% dla wyższych potencjałów. Odpowiedzialne są one za drugą falę utleniania. Dla innych ziół związki wysokocząsteczkowe stanowią dużo mniejszy procent sumarycznego pola powierzchni piku.



Rys. 1. HPLC chromatogramy, mięty pieprzowej o stężeniu 0,02 g/ml. Warunki chromatograficzne: kolumna - Eurospher C18, 5 μ m, 250 x 4 mm (Knauer); temperatura 20 °C; faza ruchoma - bufor fosforanowy (pH 6,6); - szybkość przepływu: 1 ml/min, detekcja elektrochemiczna ($E = 0,2 \text{ V} \div 0,8 \text{ V vs Ag/AgCl}$).

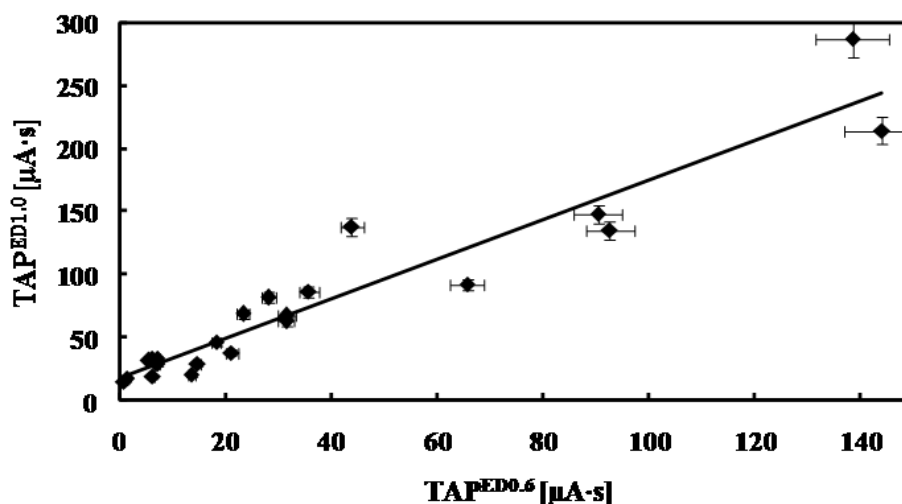
Fig. 1. HPLC chromatograms of 0.02 g/mL peppermint. Experimental conditions: column – Eurospher C18, 5 μ m, 250 x 4 mm (Knauer); temperature – 20°C; mobile phase – phosphate buffer (pH 6.6); flow rate – 1 mL/min, electrochemical detection ($E = 0.2 \text{ V} \div 0.8 \text{ V vs Ag/AgCl}$).



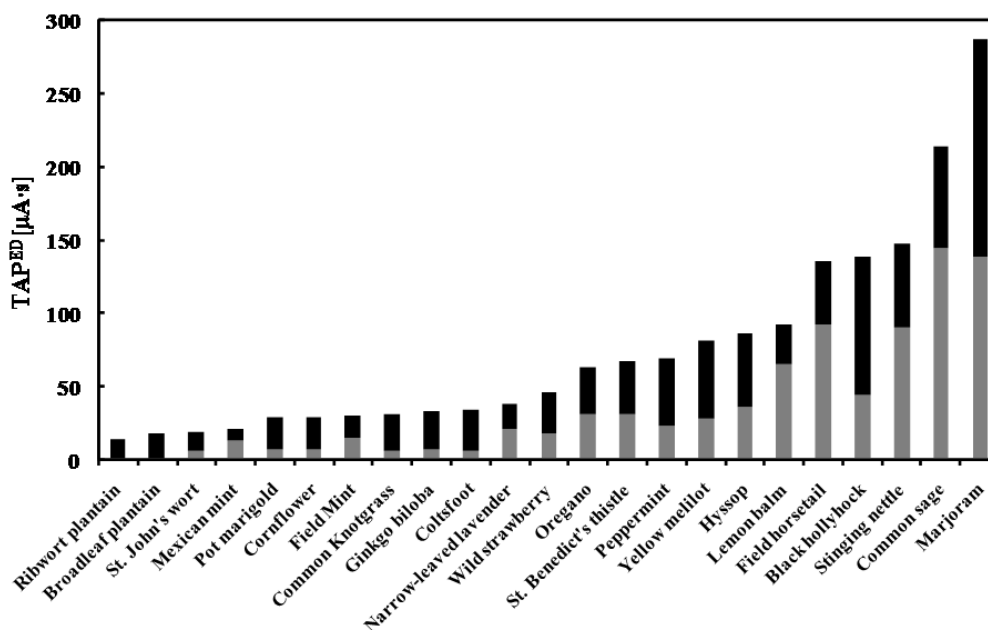
Rys. 2. Hydrodynamiczny woltamogram mięty pieprzowej o stężeniu 0,02 g/ml. Warunki chromatograficzne: kolumna - Eurospher C18 250 x 4 mm (Knauer); temp. – 20 °C; faza ruchoma - bufor fosforanowy (pH=6,6); szybkość przepływu - 1 ml/min, detektor elektrochemiczny ($E = 0,0 \text{ V} \div 1,0 \text{ V}$ vs Ag/AgCl).

Fig. 2. Hydrodynamic voltammogram of 0.02 g/ml peppermint. Experimental conditions: column - Eurospher C18 250 x 4 mm (Knauer); temp. – 20 °C; mobile phase – phosphate buffer (pH 6.6); flow rate - 1 ml/min, electrochemical detection ($E = 0,0 \text{ V} \div 1,0 \text{ V}$ vs Ag/AgCl).

Wartości CPA^{ED} badanych ziół, uzyskane dla potencjałów 0,6 V i 1 V, zostały zestawione w tabeli 1. Okazało się, że najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi charakteryzuje się majeranek, a następnie szalwia drobnolistna i pokrzywa. Najmniejszą wartość CPA^{ED} uzyskano dla babki lancetowatej wąskolistnej, babki zwyczajnej i dziurawca. Wartość natężenia prądu wzrasta wraz ze wzrostem potencjału. Ta zależność jest liniowa. Dlatego należy spodziewać się korelacji między wartościami CPA^{ED} wyznaczonymi przy różnych potencjałach, ale nie należy oczekiwać, że będzie ona wprost proporcjonalna. Dlatego korelacja pomiędzy wartością CPA^{ED} i potencjałem jest nieliniowa (rys. 2). Ze wzrostem potencjału obserwuje się nieliniowy wzrost prądu. Niemniej jednak, okazało się, że istnieje dość dobra korelacja pomiędzy wartościami CPA^{ED} uzyskanymi przy dwóch różnych wartościach potencjału elektrody pracującej (rysunek 3). Przecięcie korelacji z osią wartości CPA^{ED1.0} na rysunku 3 jest większe od zera, co oznacza, że niektóre przeciwutleniacze można zaobserwować jedynie przy przyłożeniu napięcia 1,0 V do elektrody pracującej. Podział pomiędzy silne i słabe przeciwutleniacze układa się w różny sposób dla różnych ziół (rysunek 4).

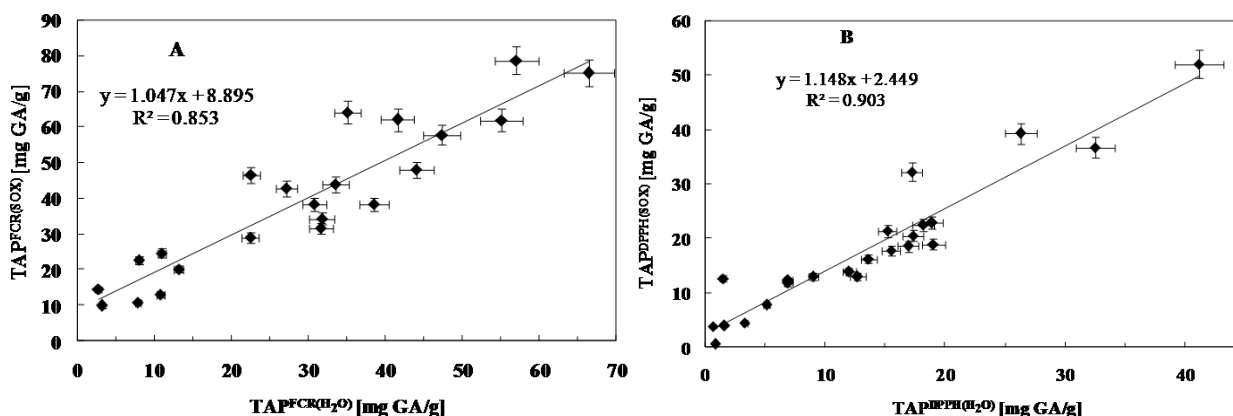


Rys. 3. Korelacja pomiędzy wartościami CPA^{ED0.6} i CPA^{ED1.0}.
Fig. 3. Correlation between TAP^{ED0.6} and TAP^{ED1.0}.



Rys. 4. Wartości CPA^{ED0.6} (szare słupki) oraz CPA^{ED1.0} (suma szarych i czarnych) ziół.
 Fig. 4. TAP^{ED0.6} (gray bars) and TAP^{ED1.0} (sum of gray and black bars) values of various herbs.

Zaobserwowano również dość dobrą korelację między wartościami CPA^{DPPH} i CPA^{FCR} uzyskanymi stosując parzenie i ekstrakcję w aparacie Soxhleta jako sposoby przygotowania próbek. Dla obu zależności regresja była zbliżona do jednego. Linia trendu przecina oś odpowiednio w wartościach 8,9 i 2,5 GAE dla CPA^{FCR(SOX)} (rysunek 5a) i CPA^{DPPH(SOX)} (rysunek 5b). Oznacza to, że ekstrakcja za pomocą aparatu Soxhleta jest bardziej skuteczna niż parzenie w procesie przygotowania próbki.



Rys. 5. Korelacja wartości (A): CPA^{FCR} i (B): CPA^{DPPH} próbek uzyskanych stosując parzenie i ekstrakcję w aparacie Soxhleta.

Fig. 5. Correlation between (A): TAP^{FCR} and (B): TAP^{DPPH} values of samples obtained using infusion and extraction in a Soxhlet apparatus.

3.3. Elektrochemiczny pomiar CPA (Voltammetric measurements (TAP^{DPV}))

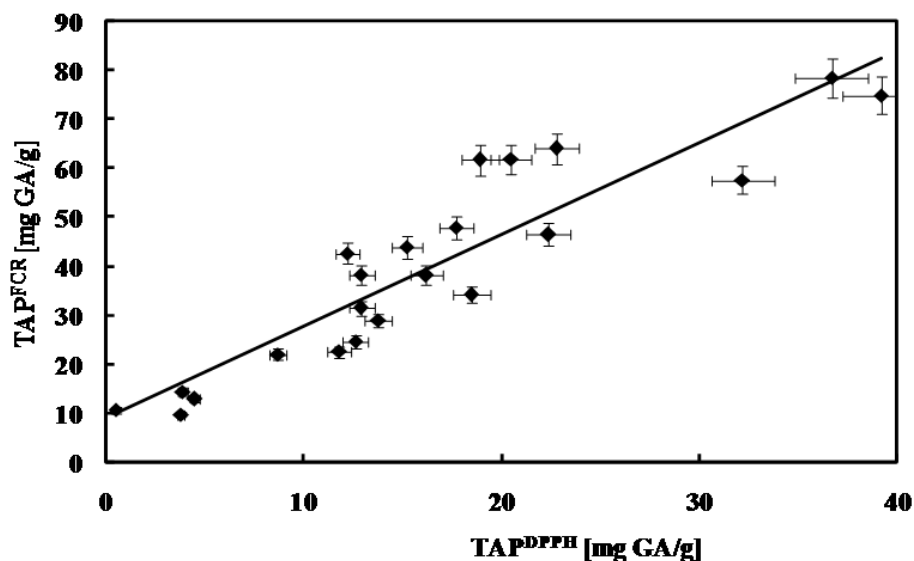
Z chemicznego punktu widzenia antyoksydanty są reduktorami. Dlatego możliwe jest ich oznaczanie metodami elektrochemicznymi, a zwłaszcza technikami woltamperometrycznymi. Analiza danych dostarcza tu dwóch ważnych parametrów: potencjału piku anodowego utleniania oraz natężenia prądu piku.

Wykorzystanie tych dwóch parametrów do oceny antyoksydantów zaproponowali po raz pierwszy Chevion i in. [6]. Potencjał pikowy jest bezpośrednio związany z potencjałem formalnym układu redoks, E° , do którego należy antyoksydant, co pozwala ocenić, czy zajdzie reakcja z danym odczynnikiem utleniającym. Potencjał formalny można zatem uznać za miarę mocy antyoksydacyjnej. Posługując się tym kryterium, Blasco i in. [3] wyróżnili antyoksydanty o dużej ($E^{\circ} = 0,3 \text{ V}$) i średniej mocy ($E^{\circ} = 0,5 \text{ V}$). Yang i in. [21] zaproponowali ocenę mocy antyoksydacyjnej flawonoidów na podstawie wartości potencjału pikowego anodowego utleniania. Niezależnie od nich, Kilmartin i in. wykorzystali potencjały pierwszego pikowego anodowego w voltamperometrii cyklicznej do charakterystyki polifenoli występujących w winach oraz w naparach herbaty i kawy [15]. Opisaną metodę można zastosować do tych próbek, w których jeden lub dwa silne antyoksydanty występują w dużym stężeniu. W przypadku skomplikowanych próbek zaproponowana przez nas została metoda polegająca na oznaczaniu pola powierzchni pod krzywą voltametryczną w której oś potencjałowa została zamieniona na eksponent z potencjału mierzonego w stosunku do rodnika hydroksylowego [2, 10].

3.4. Korelacja różnych CPA (Correlation between various TAPs)

CPA w odniesieniu do rodnika DPPH wyznaczono dla wodnych ekstraktów uzyskanych w aparacie Soxhleta. Wyniki zestawiono w tabeli 1. Dla naparów wodnych wyekstrahowanych w aparacie Soxhleta najwyższe wartości CPA miały melisa, dziurawiec, oregano i skrzyp. Zdolności oksydacyjne nagietka, miłorzębu japońskiego oraz bławatka były małe.

Zaobserwowano dobrą, wprost proporcjonalną zależność między CPA odniesione do rodnika DPPH, a całkowitym stężeniem polifenoli (rys. 6) oraz między CPA wyznaczonym za pomocą HPLC/ED przy różnych potencjałach elektrody pracującej (tabela 1). Technika ta jest bardzo przydatna w oszacowywaniu właściwości antyoksydacyjnych, ponieważ możemy oznaczać mocne bądź, równie ważne, słabe antyoksydanty w zależności od ustawionego potencjału elektrody pracującej. Nie stwierdzono natomiast korelacji pomiędzy CPA wyznaczonym elektrochemicznie (DPV), a innymi metodami (DPPH, ED, FC), które znacznie różnią się od siebie. Metody oparte na słabych rodnikach, jakim jest DPPH, są czułe na próbki zawierające tylko silne przeciwutleniacze.



Rys. 6. Korelacja pomiędzy CPA^{DPPH} i CPA^{FCR}
Fig. 6. Correlation between TAP^{DPPH} and TAP^{FCR} .

Tabela 1. CPA ziół zbadanych różnymi technikami.
Table 1. TAP of herbs obtained using different assays.

Examined herbs	TAP ^{FCR}		TAP ^{DPPH}		TAP ^{DPV}	TAP ^{ED0.2V}	TAP ^{ED0.6V}	TAP ^{ED1.0V}
	H ₂ O	H ₂ O ^{SOX}	H ₂ O	H ₂ O ^{SOX}				
<i>Ribwort plantain</i>	31.7	34.2	16.9	18.5	-	0.02	0.9	14.7
<i>Broadleaf plantain</i>	22.5	46.5	18.2	22.4	-	1.3	1.5	18.4
<i>St. John's wort</i>	66.4	75.0	26.3	39.2	-	0.2	6.4	19.2
<i>Mexican mint</i>	27.1	42.7	6.9	12.2	-	3.3	13.7	20.8
<i>Pot marigold</i>	7.8	10.7	0.8	0.5	0.16	0.5	6.9	29.0
<i>Cornflower</i>	3.1	9.8	0.6	3.8	0.26	0.2	7.3	29.7
<i>Field Mint</i>	33.5	43.9	15.2	21.3	1.31	3.6	14.8	29.8
<i>Common Knotgrass</i>	10.9	24.6	1.5	12.6	-	0.9	5.7	31.6
<i>Ginkgo biloba</i>	2.7	14.5	1.6	3.9	0.37	0.8	7.1	33.6
<i>Coltsfoot</i>	31.6	31.5	12.7	12.9	0.92	1.0	6.1	33.9
<i>Narrow-leaved lavender</i>	22.4	29.0	12.0	13.8	-	3.6	22.3	38.1
<i>Wild strawberry</i>	35.0	64.1	18.9	22.8	1.87	0.4	18.3	46.3
<i>Oregano</i>	57.0	78.5	32.5	36.7	-	4.2	31.5	63.0
<i>St. Benedict's thistle</i>	7.9	22.6	6.9	11.8	-	23.4	31.7	67.5
<i>Peppermint</i>	41.5	61.9	17.3	20.5	-	1.2	23.4	69.0
<i>Yellow melilot</i>	10.7	12.9	3.3	4.5	0.11	2.9	28.3	81.9
<i>Hyssop</i>	44.0	47.9	15.5	17.7	0.92	0.5	35.8	86.8
<i>Lemon balm</i>	114.2	124.5	41.2	52.0	2.81	1.9	65.7	92.3
<i>Field horsetail</i>	47.3	57.7	17.2	32.2	1.96	5.2	92.7	135.4
<i>Black hollyhock</i>	38.5	38.2	13.6	16.2	1.16	5.3	43.9	138.5
<i>Stinging nettle</i>	13.1	20.1	5.1	7.7	0.87	34.9	90.4	148
<i>Common sage</i>	30.7	38.3	9.0	12.9	1.11	10.6	144.2	214.2
<i>Marjoram</i>	55.1	61.8	19.0	18.9	1.42	7.7	138.6	287.0

Explanatory notes:

TAP^{DPV} – total surface area under the DPV curve ($\cdot 10^{-6}$), TAP^{ED} [$\mu\text{A}\cdot\text{s}$] - total surface area of all chromatographic peaks recorded at 0.2, 0.6 or 1.0 V, TAP^{DPPH} [GAE] - total antioxidant potential related to the DPPH radicals and TAP^{FCR} [GAE] - the total content of polyphenol estimated using, Folin-Ciocalteu reagent. For all experiments, RSD was < 5%.

Objaśnienia:

CPA^{DPV} – pole powierzchni pod krzywą DPV ($\cdot 10^{-6}$), CPA^{ED} ($\mu\text{A}\cdot\text{s}$) – całkowite pole powierzchni wszystkich pików zarejestrowanych na chromatogramie względem potencjału elektrody pracującej (0,6 lub 1 V), CPA^{DPPH} (GAE) – całkowity potencjał antyoksydacyjny względem rodnika DPPH oraz FC (GAE) – całkowita zawartość polifenoli, odczynnik Folina-Ciocalteua. RSD < 5 % dla wszystkich pomiarów.

4. Wnioski

CPA odniesione do rodników hydroksylowych nie można zastosować do badania ziół. Pomiar CPA za pomocą HPLC/ED umożliwi oznaczanie antyoksydantów o różnej mocy. Wartości CPA ziół wyznaczone przez pomiar całkowitego pola powierzchni pików zarejestrowanych na detektorze amperometrycznym odzwierciedlają sumaryczną zawartość w nich antyoksydantów. Dobrą korelację zaobserwowano dla CPA^{ED0.6V}; CPA^{ED1V} oraz DPPH i FCR.

5. Literatura

- [1] Benzi G., Moretti A.: Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging*, 1995, 16 (4), 661-674.

- [2] Biernacka I.A., Kiersztyn I., Głód B.K., Piszcz P., Wantusiak P.M.: Metody woltametryczne w wyznaczaniu całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w emulsjach. *Cam. Sep.*, 2013, 5s, 37.
- [3] Blasco A.J., Rogerio M.C., Gonzalez M.C., Escarpa A.: Electrochemical index as a screening method to determine total polyphenolics in foods: a proposal. *Anal. Chim. Acta*, 2005, 539 (1-2), 237-244.
- [4] Chen R., Stenken J.A.: An in vitro hydroxyl radical assay for microdialysis sampling calibration. *Anal. Biochem.*, 2002, 306 (1), 40-49.
- [5] Cheung L.M., Cheung P.C., Ooi V.E.C.: Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.*, 2003, 81 (2), 249-255.
- [6] Chevion S., Roberts M.A., Chevion M.: The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Rad. Biol. Med.*, 2000, 28 (6), 860-870.
- [7] Cybul M., Nowak R.: Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. *Herba Polonica*, 2008, 54 (1), 68-78.
- [8] Dimitrios B.: Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci. Tech.*, 2006, 17 (9), 505-512.
- [9] Gil R., Głód B.K., Kulawik T., Woźniak A.: Changes of the total antioxidant potential in blood serum of acute myocardial infarction patients treated by fibrinolysis or angioplasty. *J. Vascular Res.*, 2004, 41 (S2), 45.
- [10] Głód B.K., Kiersztyn I., Wantusiak P.M., Piszcz P.: Various electroanalytical assays used for the determination of total antioxidant potential (TAP) in food. *Cam. Sep.*, 2013, 5s, 39.
- [11] Głód B.K., Piszcz P., Czajka K., Zarzycki P.K.: A new total antioxidant potential measurements using RP-HPLC assay with fluorescence detection. *J. Chromatogr. Sci.*, 2011, 49 (5), 401-404.
- [12] Głód B.K., Piszcz P., Kiersztyn I., Lamert A., Zarzycki P.K.: Application of HPLC assay to the measurements of total antioxidant potential, free radicals and antioxidants. *Cam. Sep.*, 2009, 1, 41-66.
- [13] Grajek W.: Rola przeciwutleniaczy w zmniejszaniu ryzyka wystąpienia nowotworów i chorób układu krążenia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, 1 (38), 3-11.
- [14] Halliwell B.: The antioxidant paradox. *Lancet*, 2000, 355 (9210), 1179-1180.
- [15] Kilmartin P.A., Hsu C.F.: Characterization of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chem.*, 2003, 82 (4), 501-512.
- [16] Prior R.L., Cao G.: In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biol. Med.* 1999, 27 (11-12), 1173-1181.
- [17] Sroka Z., Żukowski P., Cisowski W.: Badanie aktywności przeciwutleniającej wyciągów uzyskanych z liści buka (*Fagi folium*) i z ziela dziurawca (*Hyperici herba*). *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2003, 12 (3), 273-280.
- [18] Wantusiak P.M., Głód B.K.: Application of UV detection in HPLC in the total antioxidant potential assay. *Cent. Eur. J. Chem.*, 2012, 10 (8), 1788-1790.
- [19] Wantusiak P.M., Piszcz P., Głód B.K.: A fast and simple method for the measurement of total antioxidant potential and a fingerprint of antioxidants. *J. Chromatogr. Sci.*, 2012, 50 (10), 909-913.
- [20] Winterbourn Ch.C.: Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.*, 1995, 82/83, 969-974.
- [21] Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F.: Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Anal. Sci.*, 2001, 17 (5), 599-604.
- [22] Ziemiański Ś., Wartanowicz M.: Rola antyoksydantów żywieniowych w stanie zdrowia i choroby. *Ped. Współ. Gastr., Hepat. i Żyw. Dziecka*, 1999, 1 (2-3), 97-105.