

Iwona Zych i Anna Krzepińko

Katedra Biochemii i Chemii Środowiskowej
Wydział Nauk Rolniczych w Zamościu
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Szczepkowska 102, 22-400 Zamość
tel. 84 627 27 20 lub 84 627 27 24
email: iwona.zych@interia.eu

POMIAR CAŁKOWITEJ ZDOLNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ WYBRANYCH ANTYOKSYDANTÓW I NAPARÓW METODĄ REDUKCJI RODNIKA DPPH

MEASUREMENT OF TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF SELECTED ANTIOXIDANTS AND INFUSIONS USING DPPH RADICAL REDUCTION

Abstrakt: Antyoksydanty są obecne w wielu produktach żywnościowych. Są one niezmiernie ważne dla zdrowia i dobrego samopoczucia. Występują m.in. w ziołach, kawie, herbacie oraz innych produktach pochodzenia roślinnego. W prezentowanej pracy opisana została metoda DPPH badania zdolności antyoksydacyjnej. Stosując tę metodę, porównano właściwości antyoksydacyjne: kwasu galusowego, kwasu kawowego, kwasu askorbinowego, palmitynianu kwasu askorbinowego, glutationu zredukowanego, L-cysteiny, α -tokoferolu, troloksu oraz handlowych herbat ziołowych: melisy, rumianku, mięty, lipy, herbaty czarnej, herbaty zielonej oraz kawy mielonej i kawy rozpuszczalnej. Przedstawiona metoda może zostać wykorzystana jako ćwiczenie laboratoryjne dla studentów różnych kierunków studiów przyrodniczych. Celem takich ćwiczeń jest zapoznanie z metodyką pomiaru zdolności antyoksydacyjnych metodą DPPH, poznanie skuteczności antyoksydacyjnej wybranych związków w tej reakcji oraz oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej. Stwierdzono, że badane antyoksydanty i napary charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Najlepsze właściwości antyoksydacyjne z przebadanych przeciwutleniaczy wykazuje kwas galusowy, natomiast spośród naparów - zielona herbata.

Słowa kluczowe: całkowita zdolność antyoksydacyjna, DPPH, antyoksydanty, herbata, kawa

Abstract: Antioxidants, which are present in many food products, are extremely important for human health. They occur in herbs, coffee, tea, and other products of vegetable origin. This paper describes the DPPH method for testing antioxidant capacity. The method was used to compare the antioxidant properties of gallic acid, caffeic acid, ascorbic acid, ascorbyl palmitate, reduced glutathione, L-cysteine, α -tocopherol, and trolox, as well as black tea, green tea, ground coffee, instant coffee, and commercial herbal teas: lemon balm, chamomile, peppermint, and lime blossom. The experiments described in the paper can be used as laboratory exercises for students in various fields of the natural sciences. The goal of such exercises is to learn how to measure antioxidant capacities using the DPPH method, to assess the antioxidant effectiveness of selected compounds in this reaction, and to determine the total antioxidant capacity of infusions. The antioxidants and infusions tested were shown to have varying antioxidant properties. Gallic acid exhibited the highest antioxidant capacity among the antioxidants tested, while green tea had the highest capacity among the infusions.

Keywords: total antioxidant activity, DPPH, antioxidant, tea, coffee

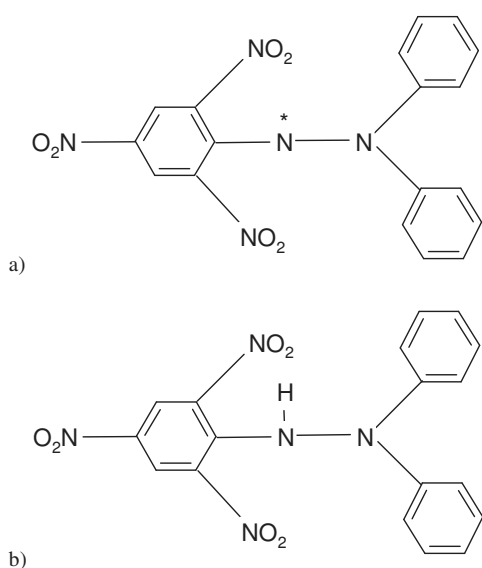
Wstęp

W ostatnich latach znacznie wzrosło zastosowanie produktów roślinnych w dietetyce, pielęgnacji i profilaktyce wielu schorzeń [1]. Substancje roślinne, niemające wartości odżywczej (non-nutritive phytochemicals), charakteryzują się różnorodnością budowy chemicznej i zaliczane są do witamin, terpenoidów, polifenoli, alkaloidów, glikozydów, saponin i in. [2]. Ich biologiczna aktywność często wiąże się

ze zdolnością antyoksydacyjną. Wiele z tych związków nie jest syntetyzowanych przez organizm człowieka, więc dostarczenie ich z pożywieniem ma znaczenie prewencyjne, zwłaszcza w ochronie przed wolnymi rodnikami. Antyoksydanty to związki, które w niewielkich stężeniach ochraniają przed utlenianiem lub znacząco opóźniają utlenianie substratu [3].

Produkty roślinne zawierają różne antyoksydanty, chroniące przed reakcjami z udziałem już utworzonych wolnych rodników, to m.in. antyoksydanty hydrofilowe: glutation i witamina C, antyoksydanty hydrofobowe: witamina E, karotenoidy, ksantofile i zredukowany koenzym Q10 oraz antocyjaniny, flawonoidy, fitoestrogeny [4].

Największą grupą związków pochodzenia roślinnego, będących naturalnymi przeciwutleniaczami, są polifenole. Ze względu na budowę szkieletu węglowego wyróżniamy kilka grup polifenoli: kwasy hydroksybenzoesowe, kwasy hydroksycynamonowe i kumaryny, naftochinony, ksantony, stilbeny i flawonoidy [2]. Związki te dzięki zdolności do przenoszenia protonów i elektronów mogą łatwo ulegać utlenieniu oraz mogą pośredniczyć w utlenianiu substratów niereagujących z tlenem. Występują w łodygach, liściach i owocach prawie wszystkich roślin w różnej ilości i stężeniu, najczęściej w połączeniu z cukrami. Szczególne znaczenie profilaktyczne pełnią flawonoidy ze względu na różnorodność budowy i wielokierunkowość aktywności biologicznej. Obecność flawonoidów stwierdzono m.in. w owocach, warzywach, roślinach strączkowych, a także w licznych roślinach leczniczych [5]. Flawonoidy wykazują silne właściwości antyoksydacyjne, związane jest to z obecnością w molekułe kilku grup hydroksylowych. Zdolności antyoksydacyjne flawonoidów zależą od położenia i liczby grup hydroksylowych, większa liczba grup hydroksylowych nasila ich właściwości przeciwutleniające [6].



Rys. 1. DPPH: a) wolny rodnik, b) forma zredukowana

Fig. 1. DPPH: a) free radical, b) reduced form

W badaniach nad skutecznością antyoksydantów wykorzystano ich zdolność do dezaktywacji wolnych rodników. Jedną z częściej stosowanych metod jest metoda z użyciem odczynnika DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylohydrazyl), który jest stabilnym wolnym rodnikiem, ma on niesparowany elektron na powłoce walencyjnej na jednym z atomów azotu tworzących mostek azotowy

(rys. 1a). Ze względu na delokalizację niesparowanego elektronu molekuly DPPH nie tworzą dimerów [7].

DPPH tworzy stabilny kationorodnik, roztwór ma ciemnofioletową barwę o maksimum absorbancji w roztworze etanolowym przy długości fali $\lambda = 517$ nm. W reakcji z substancją, która może oddać atom wodoru, tworzy formę zredukowaną DPPH (rys. 1b) i wówczas zanika fioletowe zabarwienie roztworu. Spadek absorbancji jest proporcjonalny do ilości formy utlenionej DPPH, jaka pozostaje w roztworze.

W prezentowanej pracy porównano właściwości antyoksydacyjne wybranych antyoksydantów i naparów. Praca ma charakter konspektu ćwiczeń laboratoryjnych i może być wykorzystana na zajęciach z biochemii, analizy żywności i innych. Celem takich ćwiczeń jest zapoznanie z metodyką pomiaru zdolności antyoksydacyjnych metodą DPPH, poznanie skuteczności antyoksydacyjnej wybranych związków w tej reakcji oraz oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej.

Materiał i metody

Odczynniki: Materiał badawczy stanowiły antyoksydanty: kwas galusowy (Sigma), kwas askorbinowy (Sigma), glutation zredukowany (Fluka), L-cysteina (Roanal), palmitynian kwasu askorbinowego (Sigma), α -tokoferol 95% (Sigma), kwas kawowy (Sigma), trolox (Sigma), handlowe herbaty ziołowe: melisa (Sir Roger), rumianek (Sir Roger), mięta (Sir Roger), lipa (Herbapol), herbata czarna (Bartek), herbata zielona (Herbapol) oraz kawa mielona (Jacobs Kronung) i kawa rozpuszczalna (Tchibo Family Classic).

Sprzęt: Pomiar absorbancji przeprowadzono na spektrofotometrze VIS Helios Epsilon.

Wykonanie oznaczenia: W doświadczeniu zastosowano 1 mM wodne roztwory kwasu galusowego, kwasu askorbinowego, glutationu zredukowanego, L-cysteiny i troloksu oraz 1 mM etanolowe roztwory palmitynianu kwasu askorbinowego, α -tokoferolu i kwasu kawowego. W celu przygotowania roztworów odważono odpowiednio: 3,40 mg kwasu galusowego ($M = 170 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$); 3,52 mg kwasu askorbinowego ($M = 176,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$); 6,14 mg glutationu zredukowanego ($M = 307,33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$); 2,42 mg L-cysteiny ($M = 121,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) i 5 mg troloksu ($M = 250,29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) i rozpuszczono w 20 cm^3 wody oraz 8,30 mg palmitynianu kwasu askorbinowego ($M = 414,54 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$); 9,00 mg α -tokoferolu ($M = 430,72 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) i 3,6 mg kwasu kawowego ($M = 180,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) i rozpuszczono w 20 cm^3 alkoholu.

Napary przygotowano, zalewając 1 g badanego materiału 100 cm^3 wody (90°C). Po upływie 8 minut napar sączono przez sączek średni i chłodzono do temperatury pokojowej [8]. Ekstrakty rozcieńczono wodą w stosunku 1:1.

Postępowanie w przypadku roztworów barwnych: W przypadku roztworów barwnych kalibrację spektrofotometru należy przeprowadzić, dodając do kuwety $1,5 \text{ cm}^3$ etanolu i 20 mm^3 badanego barwnego roztworu.

Aktywność antyoksydacyjną oznaczano według zmodyfikowanej metody Branda-Wiliamsa i współprac. z użyciem syntetycznego rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl, Sigma) [9]. Absorbancję roztworów mierzono przy długości fali $\lambda = 517$ nm. 0,5 mM alkoholowy roztwór DPPH przygotowano, rozpuszczając 19,71 mg DPPH ($M = 394.32$ g/mol) w 100 cm^3 etanolu. Otrzymany roztwór rozcieńczono tak, aby jego absorbancja przy długości fali $\lambda = 517$ nm wynosiła ok. 0,9. Roztwór przechowywano w ciemności.

Kalibrację spektrofotometru przeprowadzono, używając etanolu. Zmierzono absorbancję A_0 roztworu rodnika DPPH, dodając do $1,5 \text{ cm}^3$ roztworu DPPH i 20 mm^3 etanolu. Próba badana zawierała $1,5 \text{ cm}^3$ roztworu DPPH i 20 mm^3 badanego roztworu antyoksydantu lub ekstraktu, po 30 minutach od zainicjowania reakcji mierzono absorbancję (A). Każdy pomiar wykonano trzykrotnie i obliczono średnią wartość absorbancji (A_{sr}) dla danego roztworu.

Obliczenia: W pierwszym etapie doświadczenia zmierzono absorbancję roztworu rodnika DPPH (A_0), wynosiła ona odpowiednio dla trzech próbek: 0,927; 0,932; 0,928. Średnia wartość absorbancji (A_0) obliczona z trzech pomiarów wynosiła 0,929. Zdolność badanego antyoksydantu do przeciwdziałania reakcji utleniania obliczano ze wzoru [7]:

$$\% \text{ inhibicji} = 100 (A_0 - A_{sr})/A_0$$

gdzie:

A_{sr} - średnia wartość absorbancji badanego roztworu zawierającego antyoksydant,

A_0 - absorbancja roztworu rodnika DPPH.

Przykładowe obliczenia dla kwasu galusowego: absorbancja roztworu kwasu galusowego z DPPH (A) po 30 minutach od czasu zainicjowania reakcji wynosiła odpowiednio dla trzech próbek: 0,217; 0,230; 0,221. Średnia wartość absorbancji (A_{sr}) wynosiła 0,223. Procent inhibicji obliczono następująco:

$$\% \text{ inhibicji} = 100 (0,929 - 0,223)/0,929 = 76,00$$

Wyniki

W prezentowanej pracy porównano skuteczność różnych antyoksydantów do reagowania z rodnikiem DPPH. Badane antyoksydanty należą do różnych typów związków chemicznych. Mają też różną zdolność do reagowania z rodnikiem DPPH, w opisywanej metodzie duży procent inhibicji wskazuje na silne właściwość antyoksydacyjną związku i oznacza małą pozostałość nieprzereagowanego rodnika DPPH w próbce. W prezentowanej metodzie porównano właściwości antyoksydacyjne jednakowych ilości 1 mM roztworów antyoksydantów. Kwas askorbinowy i jego pochodna palmitynian askorbinianu charakteryzowały się podobnymi właściwościami antyoksydacyjnymi i hamowały reakcję indykatorową w około 30%. Glutation, naturalny trójpeptyd, dzięki wolnej grupie tiolowej, reaguje z czynnikami elektrofilowymi i funkcjonuje w komórkach jako składnik buforu oksydoredukcyjnego, chroniącego grupy -SH białek przed utlenieniem [4]. W oznaczeniu

z DPPH charakteryzował się mniejszą zdolnością antyoksydacyjną niż witamina C i jej pochodna. małowymolekularnym antyoksydantem obecnym w komórkach i płynach ustrojowych jest aminokwas L-cysteina, zawierający w łańcuchu bocznym grupę tiolową, który podobnie jak glutation chroni komórki przed działaniem wolnych rodników. Spośród analizowanych substancji ma ona najmniejszą zdolność do reagowania z rodnikiem DPPH.

Tabela 1. Porównanie zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów

Table 1. Comparison of antioxidant capacity of selected antioxidants and infusions

Badany roztwór	Średnia wartość absorbancji (A_{sr})	[%] inhibicji
Kwas galusowy	0,223	76,00 ($\pm 0,72$)
Kwas kawowy	0,525	43,49 ($\pm 3,77$)
Kwas askorbinowy	0,655	29,49 ($\pm 0,88$)
Palmitynian kwasu askorbinowego	0,618	33,51 ($\pm 4,15$)
Glutation zredukowany	0,777	16,40 ($\pm 0,38$)
L-cysteina	0,889	4,34 ($\pm 0,12$)
α -tokoferol	0,536	42,27 ($\pm 3,09$)
Trolox	0,567	39,00 ($\pm 2,18$)
Melisa	0,759	18,34 ($\pm 0,63$)
Rumianek	0,927	0,25 ($\pm 0,12$)
Mięta	0,838	9,76 ($\pm 0,78$)
Lipa	0,468	49,66 ($\pm 2,27$)
Herbata czarna	0,511	45,03 ($\pm 1,25$)
Herbata zielona	0,094	89,92 ($\pm 0,53$)
Kawa mielona	0,607	34,66 ($\pm 1,61$)
Kawa rozpuszczalna	0,175	81,13 ($\pm 0,45$)

Trolox jest rozpuszczalnym w wodzie analogiem tokoferolu, stosowanym często jako standard antyoksydantu w różnych metodach oznaczeniach całkowitej zdolności antyoksydacyjnej [1]. Tokoferol jest naturalnym antyoksydantem, chroniącym lipidy błon plazmatycznych przed peroksydacją [4]. W prezentowanej metodzie oba analizowane związki charakteryzowały się podobną zdolnością do redukcji rodnika DPPH. Największą zdolność antyoksydacyjną wykazywał kwas galusowy, związek z grupy polifenoli. Związek ten występuje naturalnie w roślinach, w dużych ilościach w herbacie. Oprócz właściwości antyoksydacyjnych polifenole zmniejszają ryzyko chorób naczyniowych, cukrzycy typu 2, choroby Alzheimera, mają też właściwości antybakteryjne i przeciwnzapalne [10].

Dużą zdolność do redukcji rodnika DPPH wykazywał również kwas kawowy. Jest on jednym z najpowszechniejszych kwasów fenolowych, występującym m.in. w kawie, jabłkach, ziemniakach i sałacie [11]. Wykazuje on zdolność do blokowania kancerogenów powstających na drodze metabolicznych przemian niektórych substancji rakotwórczych [11, 12]. Z polifenoli występujących w kawie, oprócz kwasu kawowego znaczną ilość stanowi kwas chlorogenowy (ester kwasu chinowego i kwasu kawowego). Filizanka kawy zawiera 70÷350 mg kwasu chlorogenowego [13].

Rośliny o działaniu dietetycznym lub leczniczym są źródłem witamin i metabolitów wtórnych, wspomagają naturalną obronę antyoksydacyjną organizmu i przeciwdziałają szkodliwemu działaniu wolnych rodników [14].

Szereg metod badawczych znalazło zastosowanie do oceny potencjału przeciwutleniającego ekstraktów z roślin. Metoda oceny z DPPH zastosowana w prezentowanej pracy do porównania właściwości ekstraktów z roślin jest powtarzalna i mniej kosztowna w porównaniu z tradycyjnymi metodami *in vivo*. Inni autorzy również zwracają uwagę na zalety testów pomiaru całkowitej zdolności antyoksydacyjnej *in vitro*, ponieważ pozwalają zaoszczędzić czas, zmniejszyć koszty oraz wyeliminować wiele czynników wpływających na powstawanie błędów przy pomiarach *in vivo* [15]. Spośród badanych ekstraktów największą zdolnością antyoksydacyjną charakteryzował się ekstrakt z zielonej herbaty i kawy rozpuszczalnej. Napar z zielonej herbaty jest bogaty w antyoksydanty, zawiera aż 30÷42% katechiny, 5÷10% flawonoli, kwasy fenolowe, kofeinę, teobrominę i teofilinę, kwas chinonowy [16]. Napar z herbaty czarnej ma mniejszą zdolność do redukcji rodnika DPPH, gdyż ma mniej związków antyoksydacyjnych. Jak podaje literatura, otrzymanie czarnej herbaty wymaga procesu utleniania oraz fermentacji, w czasie których zachodzi kondensacja związków fenolowych. Utlenianiu ulega około 75% katechin zawartych w liściach herbaty. Średni skład naparu z czarnej herbaty zawiera 10÷12% katechiny [16].

Prezentowana metoda pomiaru zdolności antyoksydacyjnej z zastosowaniem odczynnika DPPH jest stosowana do porównywania właściwości antyoksydacyjnych naturalnych surowców [17]. Jej zalety to dostępność stabilnego, handlowego rodnika DPPH, dokładność i powtarzalność pomiaru, a otrzymane wyniki są porównywalne z wartościami uzyskanymi podczas badań

wykonanych innymi metodami pomiaru właściwości antyoksydacyjnych [18].

Wnioski

Z przeprowadzonych badań wynika, że najlepsze właściwości antyoksydacyjne wśród przebadanych antyoksydantów wykazuje kwas galusowy.

W przypadku naparów największą aktywność antyoksydacyjną wykazują zielona herbata i kawa rozpuszczalna. Natomiast rumianek praktycznie nie wykazuje właściwości antyoksydacyjnych.

Literatura

- [1] Aruoma O.I.: *Mutat. Res.*, 2003, **523-524**, 9-20.
- [2] Sikorski Z.: *Chemia żywności*. WNT, Warszawa 2002.
- [3] Ball S.: *Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka*. Medyk, Warszawa 2001.
- [4] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. WN PWN, Warszawa 2003.
- [5] Krasowska A. i Łukaszewicz M.: *Aura*, 2003, (2), 20-21.
- [6] Rice-Evans C.A., Miller N.J. i Paganga G.: *Free Rad. Biol. Med.*, 1996, **20**(7), 933-956.
- [7] Molyneux P.: *J. Sci. Technol.*, 2004, **26**, 211-219.
- [8] Wołosiak R., Rudny M., Skrobek E., Worobiej E. i Drużyńska B.: *Żywn. Nauk. Techn. Jakość.*, 2007, **3**(52), 109-118.
- [9] Brand-Williams W., Cuvelier M.E. i Berset C.: *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie (Food Sci. Technol.)*, 1995, **28**, 25-30.
- [10] Farah A., Monteiro M., Donangelo C.M. i Lafay S.: *J. Nutr.*, 2008, **138**(12), 2309-2315.
- [11] Gawlik-Dziki U.: *Żywn. Nauk. Techn. Jakość.*, 2004, **4**(41), 29-40.
- [12] Lamer-Zarawska E. i Oszmiański J.: *Wiad. Ziel.*, 1998, **5**, 1-4.
- [13] Clifford M.N.: *J. Sci. Food Agric.*, 1999, **79**, 362-372.
- [14] Huang D., Ou B. i Prior R.L.: *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**(6), 1841-1856.
- [15] Cybul M. i Nowak R.: *Herba Polon.*, 2008, **54**(1), 69-80.
- [16] Ostrowska J.: *Gazeta farmaceutyczna*, 2008, **1**, 46-50.
- [17] Nenadis N. i Tsimidou M.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 2002, **79**, 1191-1195.
- [18] Sanchez-Moreno C.: *Food Sci. Technol. Int.*, 2002, **8**, 121-137.