

Paweł PISZCZ, Izabela GRZYBOWSKA, 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: bkglod@onet.eu

Właściwości antyoksydacyjne naparów wodnych wybranych roślin leczniczych

Streszczenie: Wolne rodniki są to atomy, cząsteczki lub jony posiadające przynajmniej jeden niesparowany elektron. Zazwyczaj są one bardzo reaktywne. Wolne rodniki i antyoksydanty odgrywają istotną rolę w prawie każdej jednostce chorobowej, dlatego tak istotne jest ich oznaczanie. W literaturze opisanych jest wiele sposobów oznaczania wolnych rodników jak i antyoksydantów. Często jednak sumaryczna wielkość całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA) dostarcza więcej informacji o badanym układzie niż stężenia poszczególnych antyoksydantów i/lub rodników. Celem pracy było oznaczenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA) wodnych naparów wybranych roślin leczniczych. Materiał badawczy stanowiły próbki miłorzębu japońskiego, catuaby, sarsaparilli, diabelskiego pazura oraz macy. W celu zbadania CPA zastosowano metody spektrofotometryczne (z zastosowaniem rodników DPPH i peroksydowych oraz oznaczanie całkowitego stężenia polifenoli metodą FC), a także wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją elektrochemiczną (HPLC/ED). Wyniki CPA przedstawiono w przeliczeniu na ekwiwalent kwasu galusowego oraz wzajemnie ze sobą skorelowano.

Słowa kluczowe: antyoksydanty, całkowity potencjał antyoksydacyjny, wolne rodniki, rośliny lecznicze, napary wodne

Antioxidative properties of water infusions of selected medicinal plants

Abstract: Free radicals are atoms, compounds or ions with the odd numbers of electrons. They are usually more reactive than other chemical species and harmful to biological cells and the whole living organisms, like human beings. They are implicated in the pathogenesis of many diseases including, e.g., cancer, Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, and Parkinson's disease. Free radicals are inactivated by the free radicals scavengers and/or antioxidants. Sometimes, both terms are used convertible. Usually, the antioxidants are also identified with the sample antiradical activity because free radicals or, more generally, reactive oxidant species (ROS) are main oxidants occurred in the biological samples. Total antioxidant potential (TAP) is proportional to the products of concentrations of all antioxidants in the sample and their antioxidant powers (rate constants). Due to components interaction in the sample, tap frequently better describes the antioxidant properties of the complex biological samples, such as herbal extracts. The aim of the study was to determine the total antioxidant potential of water infusions of selected medicinal plants. In order to investigate the TAP we used spectrophotometric and chromatographic methods. The results were correlated with the TAPs values related to the DPPH and peroxy radicals as well as to the total polyphenols content in the sample.

Key words: antioxidants; total antioxidant potential, free radicals, medicinal plants, herbs

1. Wstęp (Introduction)

Antyoksydanty (przeciwutleniacze) są związkami chemicznymi pochodzenia naturalnego lub syntetycznego powstrzymujące lub opóźniające procesy utleniania. Z chemicznego punktu widzenia są to reduktory, które same utleniając się, redukują dany związek. Ich charakterystyczną właściwością jest zdolność do neutralizowania wolnych rodników. Antyoksydanty na różne sposoby eliminują wolne rodniki z naszego organizmu. Przede wszystkim poprzez reakcję redukcji prowadzącą do powstania ich stabilnych i niereaktywnych form. Ponadto przeciwutleniacze mogą zapobiegać powstawaniu wolnych rodników na skutek hamowania enzymów odpowiedzialnych za ich tworzenie (np. lipooksygenazy i oksydazy ksantynowej). Często kompleksują metale dające początek reakcjom wolnorodnikowym.

Antyoksydanty znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym ze względu na swoje właściwości. Jako związki wydłużające trwałość produktów przetworzonych stosuje się kwasy takie jak: askorbinowy, mlekowy, cytrynowy oraz witaminę E (α -, β -, γ -, δ -tokoferole) [1].

Rośliny lecznicze, które są przedmiotem badań w tej pracy, posiadają w swoim składzie wiele naturalnych antyoksydantów. Najliczniejszą grupę stanowią polifenole, czyli związki takie jak kwasy fenolowe, flawonoidy itp. Polifenole zbudowane są z sześciocząsteczkowego pierścienia aromatycznego i przynajmniej dwóch grup –OH, które są do niego przyłączone. Związki te charakteryzują się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi, neutralizują wolne rodniki, a wytworzony wolny rodnik fenolowy cechuje się znaczną trwałością. Efekt rezonansowy stabilizuje powstały rodnik, dlatego jest on bardzo słabo reaktywny, a więc niegroźny dla organizmu [1-3].

Dużą grupę związków fenolowych stanowią flawonoidy. Substancje te znajdują się głównie w roślinach, stąd często spotykane w literaturze określenie fitochemiczne. Powierzchniowe części roślin są najbogatsze we flawonoidy. Dużą ilość tych związków znajdziemy w napojach takich jak zielona herbata czy czerwone wino. Podstawowa jednostka z jakiej zbudowane są flawonoidy to dwa pierścienie benzenowe, które nie są ze sobą bezpośrednio połączone, oddziela je kolejny pierścień – piranowy. Różnorodność połączeń i podstawień w tychże pierścieniach powoduje, iż istnieje szeroka gama flawonoidów.

Grupą związków, o której także warto wspomnieć, są antocyjany. Kation flawyliowy jest ich podstawową jednostką budulcową. Antocyjany to przede wszystkim barwniki, które znajdują się najczęściej w barwnych częściach roślin (liściach, owocach, kwiatach). Intensywny, ciemny kolor owoców takich jak jagoda, czarna porzeczka, aronia jest gwarantem występowania w nich antocyjanów [4, 5].

Pojęcie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego jest istotne, gdy chcemy określić np. właściwości lecznicze roślin bądź ich preparatów. Oznaczanie właściwości antyoksydacyjnych poszczególnych składników osobno jest skomplikowane, a ponadto nie oddaje rzeczywistego działania preparatu. W roślinach znajduje się szereg różnorodnych antyoksydantów, które mogą ze sobą reagować, wzajemnie wzmacniając bądź osłabiając swoje działanie. Wieloletnie próby podejmowane przez naukowców w celu opracowania sposobu oznaczania całkowitej zdolności antyoksydacyjnej doprowadziły do powstania różnorodnych metod ich oznaczania.

Celem prezentowanej pracy było oznaczenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA) wodnych naparów wybranych roślin leczniczych (miłorzębu japońskiego, catuaby, sarsaparilli, diabelskiego pazura oraz macy). CPA zbadano stosując metody spektrofotometryczne (w odniesieniu do rodników DPPH i peroksydowych oraz oznaczanie całkowitego stężenia polifenoli metodą Folina-Ciocalteu'a, FC). Do pomiarów CPA wykorzystano również wysokosprawną chromatografię ciekłą z detekcją elektrochemiczną (HPLC/ED) [6-8].

2. Część eksperymentalna (Experimental)

W badaniach użyto następujących odczynników chemicznych: woda trójrotnie destylowana (otrzymana w laboratorium z wykorzystaniem aparatu kwarcowego wody, Heraeus Quarzglas, Destamat, Niemcy), metanol (99,9% czysty do HPLC), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy), DPPH (2,2-difenylo-1-picrylohydrazyl), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy), AAPH (2,2-diazobis-(2-amidnopropano)-dihydrochlorek), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy), odczynnik Folina-Ciocalteu'a, kwas galusowy, diwodorooortofosforan sodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska), wodorooortofosforan disodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska), bufor fosforanowy w tabletkach o pH 7,4, PBS (phosphate buffered saline), DCFH – dihydrodichloro fluoresceina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy).

Korzystano również z następującej aparatury: wysokosprawny chromatograf ciekłowy (HPLC) firmy Knauer (Berlin, Niemcy) (składający się z: interfejsu Smartline Manager 5000 z wbudowanym degazerem, dwutłokowej pompy Smartline 1000 o przepływie fazy ruchomej w granicach 0,001 – 50 ml/min, kolumny analitycznej Eurospher 5 C18, 4 x 150 mm, autosamplera Smartline 3800, detektora amperometrycznego EC3000 (układ trójelektrodowy: elektroda pracująca - węgiel szklisty, elektroda pomocnicza - Pt, elektroda odniesienia - Ag/AgCl), komputera z oprogramowaniem do rejestracji i obróbki danych ClarityChrom).

Pomiary spektrofotometryczne wykonano na spektrofotometrze mikro płytkowym Epoch™ (BioTek Instruments, Inc. USA) sterowanym za pomocą programu Gen5 (wszystkie pomiary zostały wykonane z wykorzystaniem płytek 96-dokłowych). Korzystano także z wirówki laboratoryjnej Centrifuge MPW - 251 (MPW Med. Instruments, Polska), wagi analitycznej (RADWAG, WAA 100/C/1, Radom, Polska) o dokładności 10^{-4} g, wagi analitycznej (Sartorius, Werke GmbH, Göttingen, Niemcy) o dokładności 10^{-6} g oraz łaźni ultradźwiękowej (Sonorex RK 250H, Bandelin, Niemcy).

Materiał badawczy stanowiło pięć preparatów roślinnych (Tabela 1). Do pomiarów spektrofotometrycznych, na wadze analitycznej odważono próbki o masie 0,2 g. Następnie z naważek sporządzono napar. Do każdej próbki użyto 20 ml wody destylowanej o temperaturze 95°C. Materiał badawczy parzono przez 5 minut pod przykryciem. Kolejnym krokiem było odwirowanie gotowych naparów oraz sączenie przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 μ m. Gotowe próbki, o stężeniu 10 mg/ml,

poddano pomiarom oznaczania CPA metodami spektrofotometrycznymi. W pomiarach chromatograficznych zwiększono stężenie próbek do 50 mg/ml.

Tabela 1 Materiał badawczy.
Table 1 Research material.

Nazwa preparatu	Nazwa łacińska
Miłorząd japoński	<i>Ginkgo biloba L.</i>
Sarsaparilla	<i>Smilax officinalis</i>
Diabelski pazur	<i>Harpagophytum procumbens</i>
Catuaba	<i>Erythroxylum catuaba</i>
Maca	<i>Lepidium meyeri</i>

Oznaczanie CPA metodą DPPH (Determination of TAP using DPPH assay)

Oznaczanie CPA badanych próbek względem rodnika DPPH wykonywano spektrofotometrycznie przy 517 nm. Badanie kinetyki reakcji trwało 10 minut, z częstotliwością dwóch odczytów na minutę. Proporcje między reagentem DPPH•, a próbką zostały tak dopasowane, aby reakcja między nimi przebiegła z umiarkowaną szybkością i żeby możliwe było zaobserwowanie zmian absorbancji podczas reakcji. Wszystkie próbki (o stężeniu 10 mg/ml) odmierzono do dołków w objętości 30 μ l, a następnie dodano 270 μ l 0,2 mM roztworu DPPH•. Te same końcowe stężenia próbek pozwalają na łatwe i szybkie porównanie CPA różnych preparatów roślinnych. CPA wyliczono po upływie 5 minut od rozpoczęcia pomiaru. Próbę kontrolną stanowił metanolowy roztwór DPPH•.

CPA przeliczono na ekwiwalent kwasu galusowego (GAE = mg GA/ 1 g próbki) w oparciu o równanie wyznaczone z krzywej kalibracyjnej ($C_{GA} = A/0,2391$; gdzie: A - absorbancja, a C_{GA} - stężenie kwasu galusowego). Krzywą wykonano dla kwasu galusowego w zakresie stężeń 0,00 ÷ 5,00 [mg/l].

Oznaczanie całkowitego stężenia polifenoli (Determination of total polyphenols concentration)

Na płytkę o wymiarach 8 x 12 dołków odmierzono jako pierwsze napary roślinne (10 mg/ml) w objętości 25 μ l, następnie dodano identyczną objętość reagenta FC. Oczekano trzy minuty i odpipetowano kolejno po 100 μ l 20% Na_2CO_3 oraz 100 μ l trzykrotnie destylowanej wody do każdego (częściowo wypełnionego) dołka w płytce. Po około 0,5 godziny przechowywania płytki w ciemnym miejscu dokonano pomiaru. W próbie kontrolnej napary roślinne zmieniono na wodę trzykrotnie destylowaną. Pomiaru dokonywano przy długości fali równej 765 nm (wykonano 3 powtórzenia dla każdej próbki).

CPA przeliczono na GAE w oparciu o równanie wyznaczone z krzywej kalibracyjnej ($C_{GA} = A/0,1007$). Krzywą wykonano dla kwasu galusowego w zakresie stężeń 0 ÷ 10 [mg/l].

Oznaczanie CPA metodą AAPH (Determination of TAP using AAPH assay)

Odpipetowano, do oddzielnych dołków w płytce, po 30 μ l wodnych naparów próbek (10 mg/ml), następnie 70 μ l buforu PBS. Kolejnym dodawanym odczynnikiem był DCFH•DA (150 μ M) w objętości 100 μ l oraz AAPH (0,6 M) (w identycznej objętości). Pomiar spektrofotometryczny trwał 4 godziny, przy długości fali równej 504 nm. Tak jak w każdej wcześniej opisanym metodzie, tak i w tej, niezbędna jest próbka kontrolna, która pełni funkcję odnośnika. Warunki dla owej próbki pozostają niezmiennie (te same reagenty, w tych samych objętościach), jedynie napar wodny poddany badaniom został wymieniony na wodę trójrotnie destylowaną.

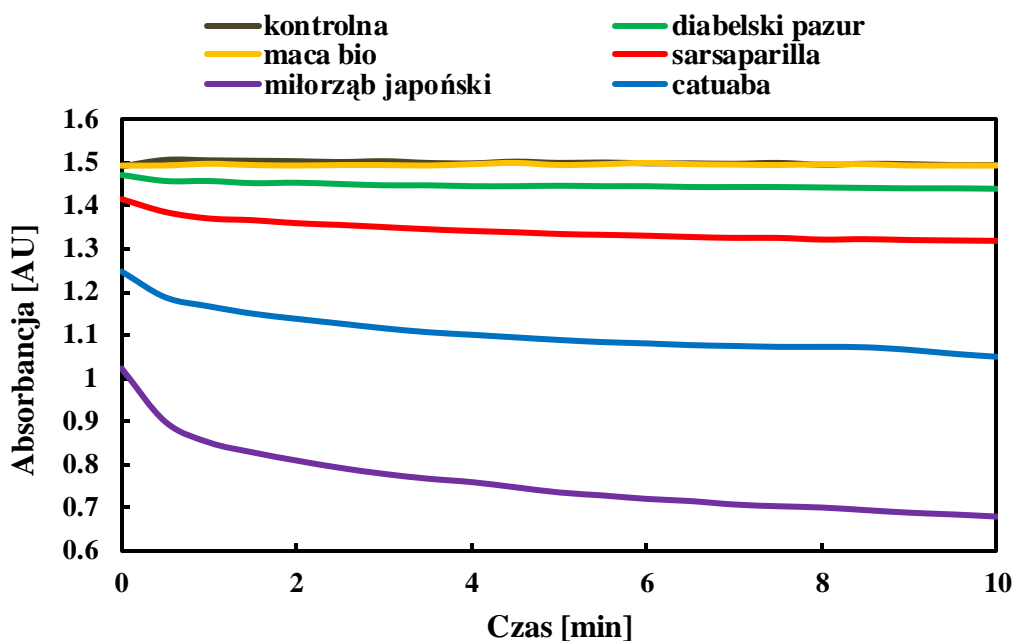
CPA przeliczono na ekwiwalent kwasu galusowego (krzywa kalibracyjna GA: $C_{GA} = A/3,7938$, w zakresie stężeń 0 ÷ 10 [mg/l]).

CPA mierzone za pomocą HPLC/ED (TAP measured by HPLC with electrochemical detection)

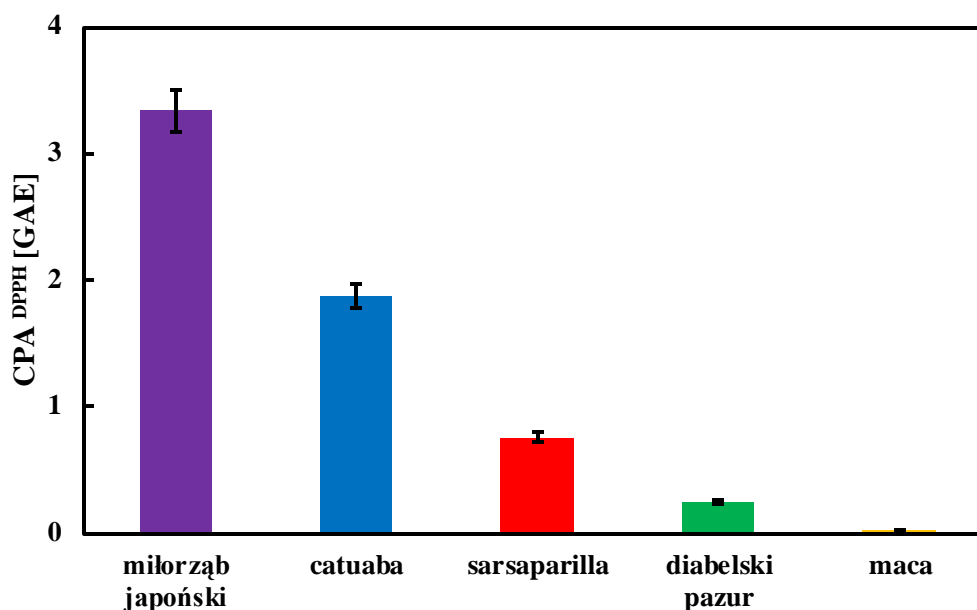
Pomiar chromatograficzny prowadzono na niepolarnej fazie stacjonarnej C18. Jako fazę ruchomą zastosowano bufor fosforanowy o pH = 5,8. Pomiary prowadzono przy szybkości przepływu 1 ml/min, a objętości próbek (o stężeniu 50 mg/ml) wynosiły 0,02 ml. Chromatografowanie każdej próbki trwało około 60 min w zakresie potencjałów od 0,0 V do 1,0 V. Całkowity potencjał antyoksydacyjny w tej metodzie wyznaczono z sumy pól powierzchni wszystkich pików, które pojawiły się na chromatogramie w trakcie trwania pomiaru (czas analizy, 60 min). CPA różnych naparów porównano między sobą, w celu ustalenia, który z nich charakteryzuje się silniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi.

3. Wyniki i ich dyskusja (Results and discussion)

Zmianę absorbancji w czasie trwania reakcji rodników DPPH z badanymi próbkami przedstawiono na Rys. 1. Wyniki pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że największą mocą antyoksydacyjną charakteryzuje się miłorząb japoński. Z rodnikami DPPH praktycznie nie reagują składniki macy (porównywalnie z próbą kontrolną). Całkowity potencjał antyoksydacyjny przedstawiono w przeliczeniu na ekwiwalent kwasu galusowego (rys. 2). Wartości CPA dla wszystkich naparów wodnych są niewielkie, 1 g miłorzębu japońskiego wykazuje takie same zdolności do zmiatania rodników DPPH jak 3,34 mg kwasu galusowego, natomiast na 1 g naparu z diabelskiego pazura przypada jedynie 0,25 mg GA. Niskie wartości CPA^{DPPH} mogą oznaczać, że badane próbki zawierają niewielkie stężenia silnych antyoksydantów lub szereg słabych przeciwutleniaczy wolno reagujących z DPPH•.

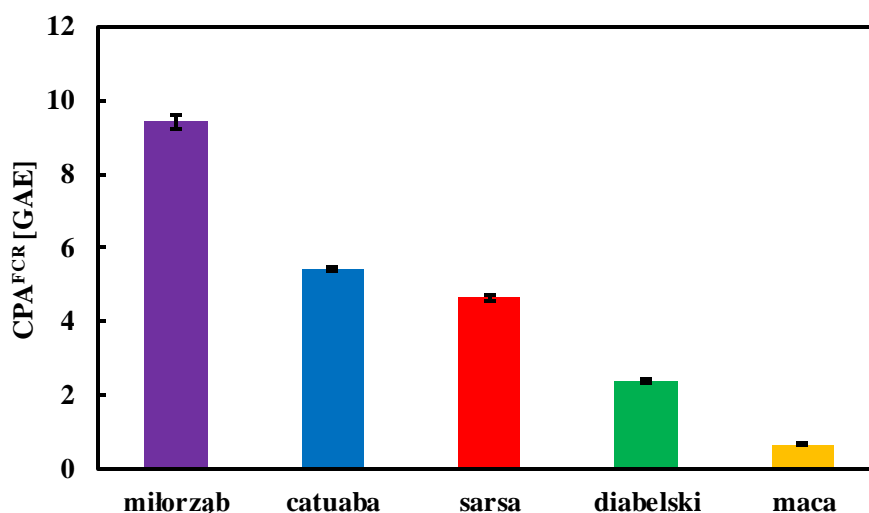


Rys. 1. Zmiany absorbancji w metodzie DPPH.
Fig. 1. Change of absorbance in DPPH method.



Rys. 2. CPA^{DPPH} badanych próbek.
Fig. 2. TAP^{DPPH} of tested samples.

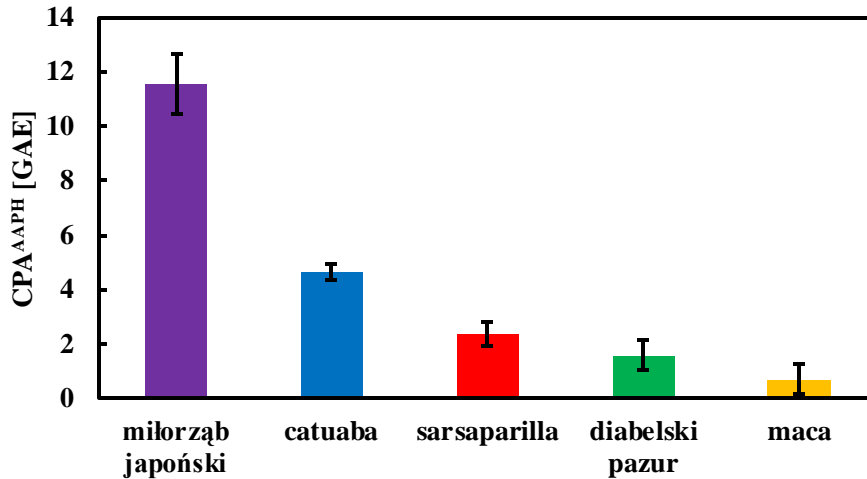
Oznaczono także w badanych próbkach całkowite stężenie polifenoli. Z uzyskanych rezultatów, przedstawionych na rys. 3, wynika, iż największe stężenie związków fenolowych w swoim składzie posiada miorzab japoński, a najmniej maca. W naparach catuaby oraz sarsaparilli stężenie związków fenolowych jest porównywalne. Całkowity potencjał antyoksydacyjny pozostałych roślin leczniczych ułożył się w analogicznej kolejności jak w przypadku oznaczeń z rodnikiem DPPH. Z otrzymanych rezultatów wynika, że w badanych próbkach (oprócz macy) znajduje się stosunkowo duże stężenie polifenoli.



Rys. 3. CPA^{FCR} badanych próbek.
Fig. 3. TAP^{FCR} of tested samples.

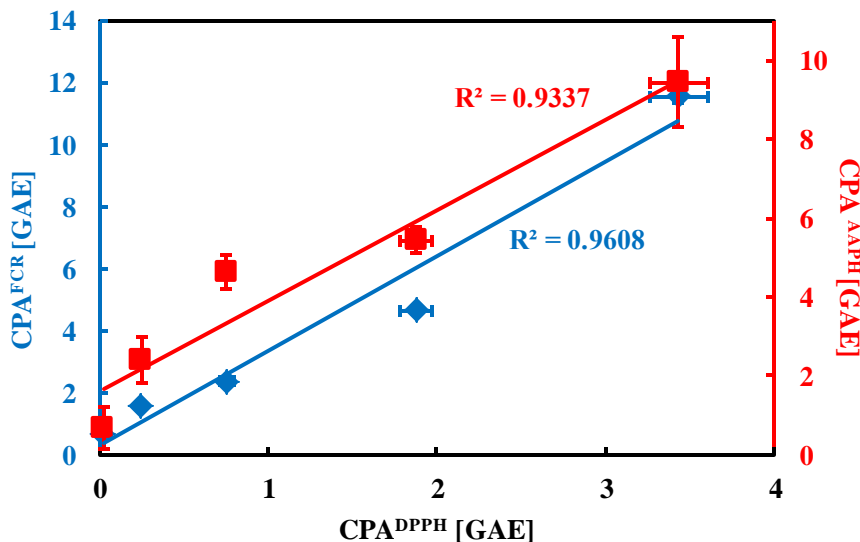
W metodzie wykorzystującej rodniki peroksylove z rozpadu AAPH, całkowity potencjał antyoksydacyjny można wyznaczyć na trzy sposoby: wyliczając pole powierzchni pod krzywą kinetyczną, odczytując czas indukcji lub czas przegięcia krzywej (do oznaczenia CPA skorzystano z ostatniej z wymienionych). Wyniki CPA naparów wodnych roślin leczniczych przedstawiono na rys. 4. Podobnie jak CPA^{FC} tak i w tej metodzie największe właściwości antyoksydacyjne posiada miorzab japoński (11,5 GAE), a najniższe wykazuje maca (0,7 GAE). Napary catuaby, sarsaparilli oraz diabelskiego pazura wykazują

zbliżone wartości CPA. Otrzymane wartości CPA naparów sarsaparilli i diabelskiego pazura są prawie identyczne (mieszczą się w granicach niepewności pomiarowej).



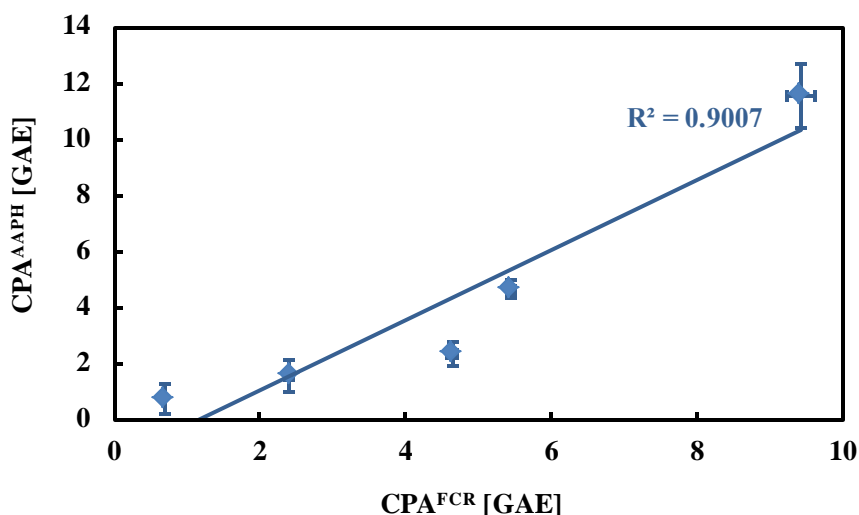
Rys. 4. CPA^{AAPH} badanych próbek.
Fig. 4. TAP^{AAPH} of tested samples.

Wartości CPA wyznaczone trzema metodami spektrofotometrycznymi skorelowano na rys. 5. Otrzymano stosunkowo dobre korelacje pomiędzy tymi metodami ($R^2 > 0,9$). Wartości CPA otrzymane w odniesieniu do rodników DPPH są niższe niż względem rodników peroksydowych. Najprawdopodobniej w próbkach zawarte jest niewielkie stężenie silnych antyoksydantów, stąd niskie wartości CPA^{DPPH}. Mimo niższych wartości CPA względem rodnika DPPH w stosunku do CPA^{FCR}, zachowana jest dość dobra korelacja. DPPH• jest słabym wolnym rodnikiem. Niskie wartości CPA^{DPPH} mogą wynikać z zawartości w próbkach polifenoli o słabym charakterze antyoksydacyjnym, które nie wchodzi z nim w reakcję. Innym powodem, dla którego porównywane wartości wykazują znaczne różnice, może być niespecyficzność odczynnika FC, który reaguje nie tylko ze związkami o charakterze antyoksydacyjnym [9].



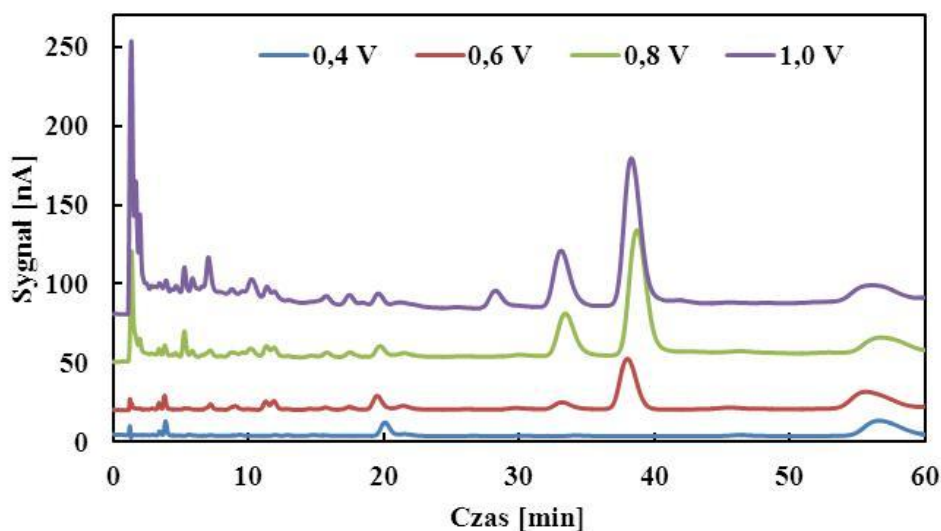
Rys. 5. Korelacja CPA^{DPPH} pomiędzy CPA^{FCR} i CPA^{AAPH} badanych próbek.
Fig. 5. Correlation TAP^{DPPH} between TAP^{FCR} and TAP^{AAPH} of tested samples.

Korelacja metod FC oraz AAPH przedstawiona na rys. 6 jest bliska zależności liniowej ($R^2 = 0,9007$). Zbliżone wartości CPA zbadanych naparów w obydwu metodach (nieznacznie wyższe wskazania CPA^{FCR}) sugerują, iż antyoksydantami przeważającymi w próbkach są związki polifenolowe o zróżnicowanej mocy antyoksydacyjnej.



Rys. 6. Korelacja pomiędzy CPA^{AAPH} oraz CPA^{FCR} badanych próbek.
 Fig. 6. Correlation between TAP^{AAPH} and TAP^{FCR} of tested samples.

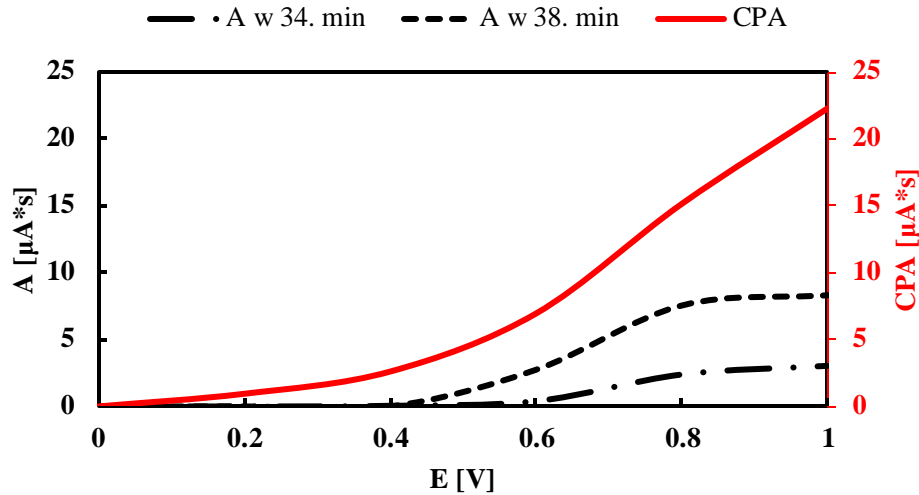
CPA wyznaczono także metodą HPLC z detekcją elektrochemiczną [10]. Chromatogramy wykonane dla wodnego naparu diabelskiego pazura w zakresie potencjałów 0,4 ÷ 1,0 V przedstawiono na rys. 7. Przy potencjale równym 0,4 V zaobserwowano piki o czasie retencji równym 21 oraz 56 min. Oznacza to, iż antyoksydanty eluowane z kolumny w tych czasach retencji są mocnymi reduktorami (posiadają duże właściwości antyoksydacyjne). Wraz ze wzrostem potencjału na chromatogramie pojawiło się więcej pików. Najintensywniejsze pojawiły się w 34 oraz 38 minucie. Wyższy potencjał spowodował utlenienie większej ilości związków, które wykazują słabsze właściwości antyoksydacyjne. Podwyższenie potencjału kolejno do 0,8 i 1,0 V spowodowało wzrost intensywności wcześniej widocznych pików i analogiczne zwiększenie ich pól powierzchni. Jedynie związek o czasie retencji 56 minut nie zwiększał znacząco swojego pola powierzchni mimo wzrostu potencjału.



Rys. 7. HPLC/ED chromatogramy wodnego naparu diabelskiego pazura (*Harpagophytum procumbens*) o stężeniu 50 mg/ml. Warunki chromatograficzne: kolumna - Eurospher C18, 5 μ m, 150 x 4 mm (Knauer); temperatura 20 °C; faza ruchoma - bufor fosforanowy (pH 5,8); - szybkość przepływu: 1 ml/min, detekcja elektrochemiczna (E = 0,4 - 1,0 V vs Ag/AgCl).

Fig. 7. HPLC/ED chromatograms of grapple plant (*Harpagophytum procumbens*) (50 mg/ml). Experimental conditions: column - Eurospher C18, 5 μ m, 150 x 4 mm (Knauer); temperature - 20°C; mobile phase - phosphate buffer (pH 5,8); flow rate - 1 ml/min, electrochemical detection (E=0.4 - 1,0 V vs Ag/AgCl).

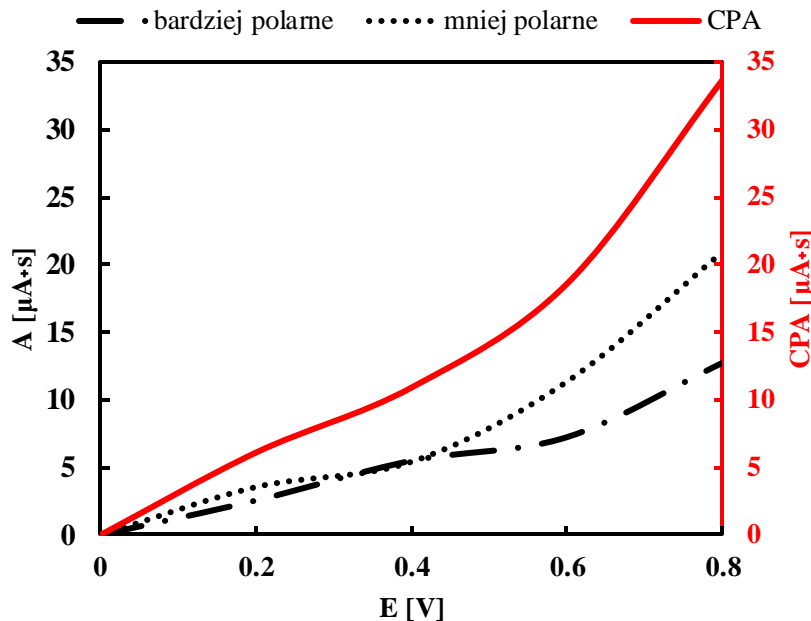
Sporządzono hydrodynamiczny voltamogram (rys. 8), który przedstawia zależność pól powierzchni pików eluowanych w 34 oraz 38 minucie od wartości potencjału przyłożonego do elektrody pracującej (w zakresie 0 ÷ 1 V). Z przedstawionego rysunku wynika, że sygnały przy potencjale 0,4 V są znikome, oscylują w granicach zera. Ich obecność jest wyraźnie widoczna dopiero od potencjału 0,5 V.



Rys. 8. Hydrodynamiczny woltamogram 10 mg/ml naparu diabelskiego pazura (*Harpagophytum procumbens*). Warunki chromatograficzne jak na rys 7.

Fig. 8. Hydrodynamic voltammogram of 10 mg/ml of grapple plant (*Harpagophytum procumbens*). Experimental conditions the same as on fig. 7.

Sporządzono również hydrodynamiczny woltamogram wodnego naparu miłorzębu japońskiego (rys. 9). Przedstawiono udział związków polarnych (eluowanych w ciągu pierwszych pięciu minut pomiaru z kolumny C18) oraz mniej polarnych (eluowanych po 5 minutach) w CPA, w zakresie potencjałów 0 ÷ 0,8 V. Wraz ze wzrostem potencjału rośnie udział związków o niższej polarności, gwałtowny wzrost obserwujemy przy potencjale 0,5 V. Dla potencjału ok. 0,4 V udział procentowy obydwu grup związków jest zbliżony do 50% w wodnym naparze miłorzębu japońskiego.

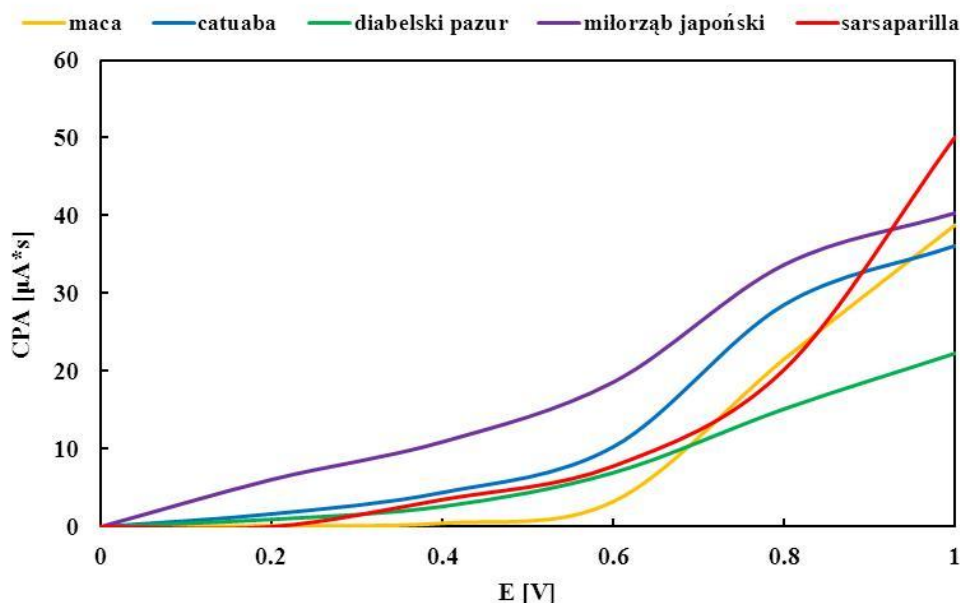


Rys. 9. Hydrodynamiczny woltamogram 50 mg/ml naparu miłorzębu japońskiego. Warunki chromat. jak na rys. 7.

Fig. 9. Hydrodynamic voltammogram of 50 mg/ml of ginkgo biloba. Experimental conditions the same as on fig. 7.

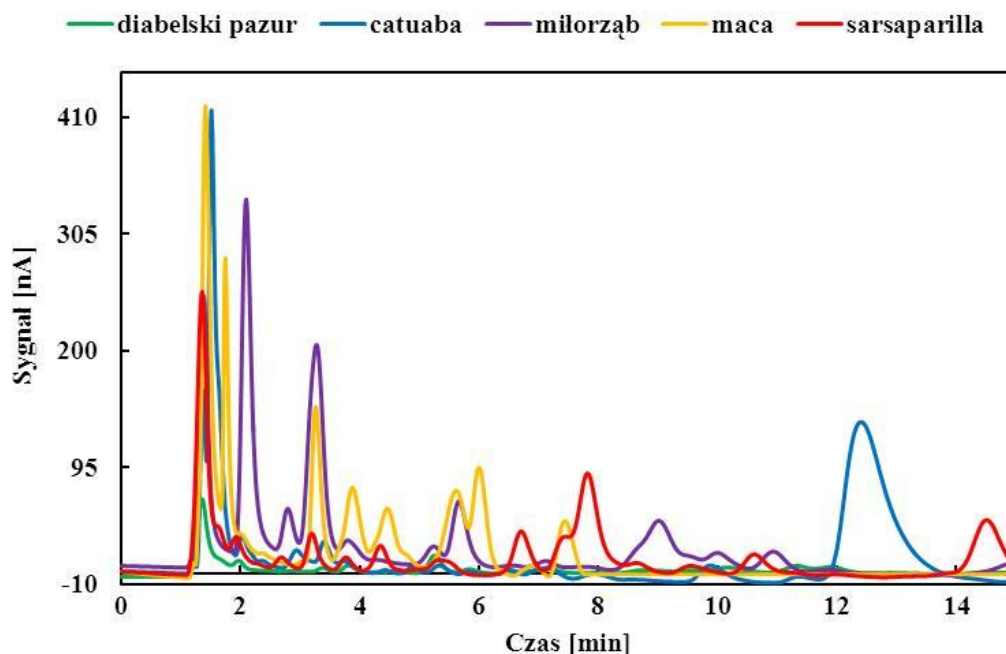
Hydrodynamiczne woltamogramy wodnych naparów wszystkich badanych roślin leczniczych przedstawiono na rys. 10. Najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi charakteryzuje się napar miłorzębu japońskiego, którego składniki dają sygnał na detektorze ED już przy potencjale 0,1 V. Dla pozostałych naparów zauważalne sygnały na chromatogramie pojawiają się dopiero przy potencjale 0,4 V, z wyłączeniem próbki macy, która zawiera słabe antyoksydanty (piki pojawiają się dopiero przy potencjale 0,6 V). Wraz z podwyższeniem potencjału zaobserwowano wzrost CPA dla każdej z badanych próbek. Dla naparów sarsaparilli oraz macy zauważono gwałtowny wzrost CPA powyżej potencjału 0,8 V. Można

wynioskować, iż w wodnych naparach tych roślin przeważają związki o bardzo słabych właściwościach antyoksydacyjnych.



Rys. 10. Hydrodynamiczne woltamogramy badanych próbek (50 mg/ml). Warunki chromatograficzne jak na rys 7.
Fig. 10. Hydrodynamic voltammograms of tested samples (50 mg/ml). Experimental conditions the same as on fig. 7.

Chromatogramy wodnych naparów roślin leczniczych (wykonane przy tym samym potencjale – 0,8 V) przedstawiono na rys. 11. Zauważono, iż niektóre piki dla różnych próbek charakteryzują się zbliżonymi, bądź takimi samymi czasami retencji. Możliwe jest więc, że w badanych próbkach zawierają się częściowo te same związki. Dostrzeżono również, mimo pewnych podobieństw, duże zróżnicowanie poszczególnych próbek pod względem składu chemicznego. Jest to zapewne wynikiem różnic w budowie oraz występowaniu badanych roślin.



Rys. 11. HPLC/ED chromatogramy badanych próbek (50 mg/ml). Warunki chromatograficzne: kolumna - Eurospher C18, 5 µm, 150 x 4 mm (Knauer); temperatura 20 °C; faza ruchoma - bufor fosforanowy (pH 5,8); - szybkość przepływu: 1 ml/min, detekcja elektrochemiczna (E = 0,8 V vs Ag/AgCl).

Fig. 11. HPLC/ED chromatograms of tested samples (50 mg/ml). Experimental conditions: column – Eurospher C18, 5 µm, 150 x 4 mm (Knauer); temperature – 20°C; mobile phase – phosphate buffer (pH 5,8); flow rate – 1 ml/min, electrochemical detection (E=0.8 V vs Ag/AgCl).

4. **WNIOSKI** **(CONCLUSIONS)**

Zaprezentowane w pracy metody pomiaru CPA można zastosować do badania właściwości antyoksydacyjnych ziół. Wartości CPA wodnych naparów roślin leczniczych otrzymane metodami spektrofotometrycznymi wykazują dobre korelacje. Właściwości antyoksydacyjne wodnych naparów wybranych roślin leczniczych nie są jednakowe. Najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi charakteryzuje się ekstrakt miłorzębu japońskiego, a najsłabszymi maca.

5. **Literatura** **(Literature)**

1. G. Bartosz, Druga twarz tlenu-wolne rodniki w przyrodzie, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 2003.
2. B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Löliger, O. I. Aruoma, The characterization of antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 33 (1995) 601-617.
3. B. Halliwell, J. C. Gutteridge, The definition and measurement of antioxidants in biological systems, *Free Radical Biology & Medicine*, 18 (1995) 125-6.
4. E. Piątkowska, A. Kopeć, T. Leszczyńska, Antocyjany - charakterystyka, występowanie i oddziaływanie na organizm człowieka, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Kraków 2011.
5. P. Piszcz, B.K. Głód, Właściwości antyoksydacyjne ziół zbadane różnymi metodami, *Camera Separatoria*, 8 (2016) 23-31.
6. R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, K. Güçlü, Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 85 (2013) 957-998.
7. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (1999) 1231-1237.
8. P. Ionita, Is DPPH stable free radical a good scavenger for oxygen active species? *Chemical Papers*, 59 (2005) 11-16.
9. J.D. Everette, Q.M. Bryant, A.M. Green, Y.A. Abbey, G.W. Wangila, R.B. Walker, Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 8139-8144.
10. P.M. Wantusiak, P. Piszcz, B.K. Głód, A fast and simple method for the measurement of total antioxidant potential and a fingerprint of antioxidants, *Journal of Chromatographic Science*, 50 (2012) 909-913.