

**Paweł PISZCZ, Paulina BOGUSZEWSKA, Bronisław K. GŁÓD\***

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

\*Autor do korespondencji, e-mail: [bk@onet.eu](mailto:bk@onet.eu)

## Właściwości antyoksydacyjne wybranych preparatów roślinnych

**Streszczenie:** Wolne rodniki i antyoksydanty odgrywają istotną rolę w prawie każdej jednostce chorobowej, dlatego tak istotne jest ich oznaczenie. W literaturze opisanych jest wiele sposobów oznaczania antyoksydantów. Często jednak sumaryczna wielkość całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA) dostarcza więcej informacji o badanym układzie niż stężenia poszczególnych antyoksydantów. Celem pracy było oznaczenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA) wodnych ekstraktów wybranych preparatów roślinnych. Materiał badawczy stanowiły próbki kudzu, guarany, żeńszenia oraz napoju herbacianego "Ekoland". 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, rośliny lecznicze, zioła

## Antioxidative properties of selected plants

**Abstract:** Free radicals and antioxidants play an important role in almost every disease, so it is important to their determination. In the literature described many methods for determining antioxidants. Often however, the total antioxidant potential (TAP) provides more information about the system than the determination individual antioxidant concentrations. The aim of the study was to determine the total antioxidant potential of water extract of selected plants (panax ginseng, pueraria montana, guarana and "Ekoland" tea). 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.

**Keywords:** antioxidants; total antioxidant potential, medicinal plants, herbs

### 1. Wstęp (Introduction)

Antyoksydanty (znane też pod nazwą przeciwutleniaczy) są to związki, które posiadają zdolność powstrzymywania lub opóźniania procesów utleniania. Z chemicznego punktu widzenia antyoksydanty są reduktorami, które przez samoutlenienie redukują inny związek. Antyoksydanty posiadają charakterystyczną zdolność do zmiatania/neutralizacji wolnych rodników.

Podobnie jak wolne rodniki antyoksydanty można podzielić na egzogenne i endogenne. Antyoksydanty endogenne są wytwarzane przez organizm. Występują one w każdej komórce, a na ich poziom nie mamy dużego wpływu ze względu na to, że zależy on w głównej mierze od wieku i uwarunkowania genetycznego. Do tej grupy należy m. in. glutation, kwas moczowy, melatonina, koenzym Q10. Antyoksydanty egzogenne są dostarczane do organizmu głównie z pożywieniem, ale również w postaci suplementów diety i witamin. Zatem na ich ilość mamy duży wpływ. Są to m.in. karotenoidy, witaminy A, C, E oraz polifenole (głównie flawonoidy i kwasy fenolowe) [1].

Antyoksydanty na różne sposoby eliminują wolne rodniki z naszego organizmu. Przede wszystkim poprzez reakcję redukcji prowadzącą do powstania ich stabilnych i niereaktywnych form. Ponadto 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 [1, 2].

Głównym źródłem antyoksydantów w pożywieniu są owoce i warzywa. Owoce, które powinniśmy wprowadzać do codziennej diety to te o ciemnym, czerwonym i fioletowym zabarwieniu. Zawierają one dużo antocyjanów np. czarne porzeczki, aronia, czerwone winogrona, granaty, borówki amerykańskie, wiśnie. Korzystne są również cytrusy obfite w flawonoidy. Z kolei warzywa, których powinno być dużo w naszym jadłospisie to buraki, czerwona kapusta, szpinak, papryka, brokuły, rośliny strączkowe, pomidory. Wskazane jest stosowanie również świeżych ziół i przypraw np. bazylii, oregano, goździki. Duża ilość antyoksydantów znajduje się w czerwonej i zielonej herbacie oraz czerwonym winie, w którym zawarta jest spora ilość resweratrolu należącego do flawonoidów. Odpowiednia dieta, aktywność fizyczna, rezygnacja z używek oraz niewielka ilość stresu powinny zapewnić nam zapas antyoksydantów [3, 11, 12].

Zbadanie właściwości antyoksydacyjnych czystych związków nie jest zbyt wymagające. Problem pojawia się, gdy badanym obiektem jest próbka rzeczywista. Główną przeszkodą jest jej skład, który bardzo często nie jest znany. Dlatego ciężko jest oznaczać moc antyoksydacyjną indywidualnych antyoksydantów. Kolejnym problemem jest zjawisko synergizmu. Polega ono na wzajemnym oddziaływaniu na siebie antyoksydantów. Stąd też pomiar może być zaburzony, ponieważ obecność tych oddziaływań doprowadza do osłabienia lub wzmocnienia efektu antyoksydacyjnego. Dlatego dobrym rozwiązaniem jest określanie zdolności antyoksydacyjnej wszystkich związków obecnych w próbce. Zastosowanie sumarycznej informacji o tych właściwościach jest w wielu przypadkach uzasadnione. W prezentowanych wynikach dla każdej z próbek badany był jej całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA) [4].

Celem pracy było zbadanie właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów znanych preparatów roślinnych (kudzu, guarana, żeń-szeń) oraz napoju herbacianego "Ekoland". W tym celu wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczą z detekcją elektrochemiczną oraz spektrofotometryczne metody oznaczania właściwości antyoksydacyjnych (DPPH, AAPH, FC) [10].

Kudzu znany jest jako *ołownik łatkowaty* lub *pueraria lobata*. Należy do rodziny bobowatych. Jest rośliną jadalną. Występuje naturalnie w południowo - wschodniej Azji, Japonii i wyspach Oceanii. Roślina składa się z pnącza o drewnianej, owłosionej w górnej części łodydze, dużych trójlistkowych liści, dużego bulwiastego korzenia, kwiatów koloru purpurowego wyrastających z kątów liści oraz owocu będącego owłosionym strąkiem zawierającym nasiona. Nieocenioną częścią rośliny jest korzeń i strąk. W medycynie chińskiej jest to jedno z 50 stosowanych ziół. Jego korzeń służy do leczenia migreny, grypy, nadciśnienia, biegunek, niewydolności naczyń wieńcowych. Wyciąg z kudzu zwiększa w mózgu stężenie dwóch bardzo ważnych hormonów – dopaminy i serotoniny, co ma bardzo duże znaczenie u osób cierpiących na zaburzenia nerwicowe i depresje. Posiada również właściwości antyoksydacyjne ze względu na dużą zawartość izoflawonów, których obecność w błonie komórkowej stanowi solidną barierę przeciw wolnym rodnikom. Izoflawony dzięki swej budowie chemicznej (obecność podwójnych wiązań) przechwytyują reaktywne formy tlenu, tym samym zapobiegając utlenianiu struktur komórkowych. Większość izoflawonów, obecnych w kudzu, stanowią pueraryny, które zmniejszają potrzebę spożywania alkoholu, pomagają w stabilizacji emocji oraz wspomagają neutralizację toksyn, dlatego też kudzu znalazł zastosowanie w terapii osób uzależnionych od alkoholu [5].

Guarana (inaczej nazywana *paullinia cupana* lub *cierniopląt*) należy do rodziny mydleńcowatych. Występuje naturalnie w Brazylii w dorzeczu Amazonki i Pary. Roślinę tworzy pnącze wspinające się lub płożące, kwiatostany groniaste o białych, drobnych i pachnących płatkach, parzystopierzaste liście oraz czerwony, gruszkowaty owoc, w którym znajdują się czarne nasiona. Najcenniejszą częścią rośliny są nasiona, które zawierają kofeinę, flawonoidy tj. katechiny, epikatechiny oraz procyjanidyny. Guarana zawiera cztery razy więcej kofeiny niż ziarna kawowca, przy czym warto wspomnieć, iż jest to kofeina niezawierająca zanieczyszczeń doprowadzających do zakwaszenia organizmu oraz przyswajająca się wolniej niż ta zawarta w kawie, stąd jej działanie utrzymuje się nieco dłużej. Działa zatem pobudzająco, znosi zmęczenie, ułatwia myślenie. Pobudza ośrodkowy układ nerwowy oraz ośrodki wegetatywne. Zwiększa również wydolność fizyczną i psychiczną poprzez wydzielanie hormonów i neuroprzekazników. Ponadto guarana stosowana jest często przy produkcji energetyków, piwa, leków i preparatów do odchudzania. Jest pomocna przy takich dolegliwościach jak migreny, niskie ciśnienie czy zatrucia alkoholowe. Guarana charakteryzuje się również właściwościami antyoksydacyjnymi. Często nazywana jest naturalnym źródłem energii [6].

Żeń-szeń inaczej nazywany jest *panaxginsengiem* lub *wszechlekiem*. Należy do rodziny araliowatych. Rośnie dziko w górskich lasach Półwyspu Koreańskiego, północno-wschodnich Chin, na Wyspach Japońskich i w północno-wschodniej Syberii na luźnych, dobrze uwodnionych glebach. Wiek rośliny różnicuje ją pod względem budowy, na którą składa się korzeń w kolorze białym lub beżowym stanowiący palowe kłącze oraz drobne kwiaty seledynowe lub białoróżowe ułożone w baldy. W pierwszym roku życia pojawia się jeden trójpalczasty liść zaś w kolejnych latach pięciopalczasty, a po 10 roku życia rozeta liści oraz czerwony owoc będący pestkowcem zawierający dwa zrośnięte nasiona i łodygę. Nieocenioną częścią rośliny jest korzeń, który w tradycyjnej medycynie Dalekiego Wschodu wykorzystywany jest od kilku tysięcy lat. Przede wszystkim wykazuje on działanie wzmacniające podczas wycieńczenia fizycznego i psychicznego organizmu oraz zwiększa odporność na stres poprzez zwiększanie zdolności hemoglobiny do przyłączania tlenu. Żeń-szeń obniża poziom cholesterolu we krwi oraz działa przeciwzakrzepowo na płytki krwi. Zaobserwowano również korzystne jego działanie w leczeniu cukrzycy. Okazuje się, że obniża on poziom cukru we krwi oraz może mieć bardzo duże znaczenie przy regulacji produkcji insuliny.

Przyjmowanie żeń-szenia wzmacnia utlenianie alkoholu w wątrobie i pomaga odbudować jej komórki, co znajduje zastosowanie w stanach po spożyciu alkoholu. Ponadto poprawia pamięć, przemianę materii, ułatwia gojenie ran, łagodzi uszkodzenia komórek spowodowanych przez promieniowanie, reguluje ciśnienie tętnicze krwi, korzystnie działa na potencję. Istnieją również doniesienia o jego znaczącej roli w zwalczaniu nowotworów. Posiada również właściwości antyoksydacyjne i odmładzające stąd często stosowany jest jako dodatek do różnego rodzaju kosmetyków. Prozdrowotne własności żeń-szeń zawdzięcza zawartości takich związków jak: węglowodany, flawonoidy, fenolokwasy, peptydoglikany, związki acetylenowe oraz najważniejsze saponozydy, nazwane ginszenozydami. Korzeń żeń-szenia ze względu na tak liczne spektrum działania, szczególnie lecznicze, jest nieustannym obiektem badań naukowców [7].

## 2. Część eksperymentalna (*Experimental*)

W badaniach CPA użyto następujących odczynników chemicznych: AAPH [dichlorowodorek 2,2'-diazobis-(2-amidynopropan)], bufor fosforanowy w postaci tabletki (PBS) o pH 7,4, DCFH•DA (dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny), DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyli), metanol (99,9% HPLC grade) – Sigma - Aldrich, Steinheim, Niemcy; diwodorooortofosforan sodu, wodorooortofosforan sodu, węglan sodu – POCh, Gliwice, Polska; kwas galusowy, odczynnik Folina-Ciocalteu'a, woda trójкратно destylowana (otrzymana w laboratorium z wykorzystaniem aparatu kwarcowego wody, Heraeus Quarzglas, Destamat, Niemcy).

Korzystano również z następującej aparatury: wysokosprawy chromatograf cieczerw (HPLC) firmy Knauer (Berlin, Niemcy) (składający się z: interfejsu Smartline Manager 5000 z wbudowanym degazerem, dwufunkcyjnej 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 mikroplótkowym Epoch™ (BioTek Instruments, Inc. USA) sterowanym za pomocą programu Gen5 (wszystkie pomiary zostały wykonane z wykorzystaniem plótek 96-dółkowych). 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 stanowiły trzy próbki ekstraktów roślinnych (kudzu, guarana, żeń-szeń) oraz napój herbaciany „Ekoland”. Ekstrakty zostały zakupione w sklepie internetowym „Magiczny Ogród”. Mają postać drobno utartego proszku i znajdują się w szczelnie zamkniętych opakowaniach. Rozpuszczalny w wodzie napój herbaciany ma postać niewielkich granulek. W pomiarach spektrofotometrycznych przygotowane roztwory ekstraktów miały stężenie 1 mg/ml. Przygotowanie ich polegało na odważeniu po 10 mg próbek, przeniesieniu ilościowo do kolb miarowych o pojemności 10 ml i uzupełnieniu wodą destylowaną do kreski. Do pomiarów chromatograficznych stężenia ekstraktów były czterokrotnie zwiększone i przygotowane poprzez odważenie 20 mg próbek i rozpuszczenie w 5 ml wody destylowanej (4 mg/ml).

### Oznaczenie CPA metodą DPPH (*Determination of TAP using DPPH assay*)

Pomiary prowadzone były przy długości fali równej 517 nm. Na 96 - dółkową plótkę odmierzone po 30 µl próbki i 270 µl DPPH o stężeniu 0,2 mM. Przy takich proporcjach próbki i rodnika można porównać ze sobą wszystkie badane preparaty oraz dla każdego zarejestrować zmianę absorbancji. Próbkę kontrolną stanowiła mieszanina metanolu z rodnikiem DPPH w identycznych proporcjach. Czas analizy wynosił 20 min natomiast czas, w którym wyznaczono wartość CPA - 10 min. Następnie wykonano krzywą kalibracyjną dla kwasu galusowego ( $C_{GA} = A/0,2391$ ; gdzie: A - absorbancja, a  $C_{GA}$  - stężenie kwasu galusowego;  $r^2 = 0,9998$ ). Krzywa została sporządzona z czterech różnych stężeń po trzy powtórzenia dla każdego z nich (0,00 ÷ 5,00 [mg/l] GA). Wszystkie otrzymane wyniki zostały przeliczone na ekwiwalent kwas galusowy GAE [mg GA/g próbki].

### Oznaczenie całkowitego stężenia polifenoli (*Determination of total polyphenols concentration*)

W celu wykonania pomiaru absorbancji na 96 - dółkową plótkę odmierzone po 25 µl badanej próbki, 25 µl odczynnika FC, 100 µl 20% węglanu sodu oraz 100 µl wody destylowanej. Całość odstawiono na pół godziny w ciemne miejsce. Po tym czasie zmierzono absorbancje. W próbce kontrolnej próbka została zastąpiona wodą. Pomiar był prowadzony przy długości fali równej 765 nm. Wartości CPA zostały podane w ekwiwalentach kwasu galusowego. W tym celu sporządzono krzywą kalibracyjną dla stężeń kwasu galusowego od 0 do 25 µg/ml (równanie prostej:  $A = 0,1007 C_{GA}$ ,  $r^2 = 0,999$ ).

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

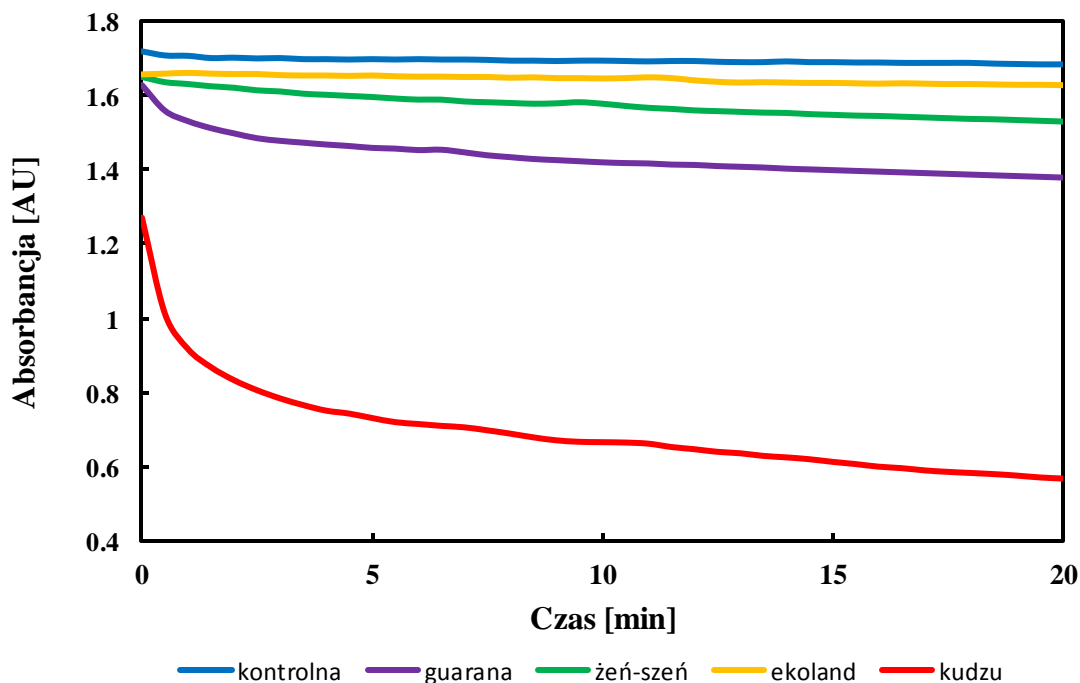
W celu przeprowadzenia pomiaru na 96 - dołkową płytkę odmierzone po 30  $\mu$ l próbki, 70  $\mu$ l buforu, 100  $\mu$ l DCFH oraz 100  $\mu$ l AAPH. W próbie kontrolnej próbkę zastąpiono wodą. Pomiar był prowadzony przez cztery godziny, a dane rejestrowane co minutę. W tej metodzie właściwości antyoksydacyjne można wyznaczyć jako: czas przegięcia krzywej, pole powierzchni pod nad krzywą kinetyczną wyliczone w stosunku do próby kontrolnej oraz czas indukcji. Wykorzystano wszystkie trzy metody i dla każdej z nich sporządzono krzywą wzorcową kwasu galusowego w zakresie stężeń 0-10  $\mu$ g/ml, czas przegięcia krzywej: równanie prostej  $A = 3,793 C_{GA}$ ,  $R^2=0,998$ , pole powierzchni pod nad krzywą: równanie prostej:  $A = 372,7 C_{GA}$ ,  $R^2=0,996$ , czas indukcji: równanie prostej:  $A = 3,808 C_{GA}$ ,  $R^2=0,988$ . CPA przeliczono na ekwiwalent kwasu galusowego.

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

Wszystkie próbki chromatografowane były w odwróconym układzie faz: niepolarna faza stacjonarna (C18) i polarna faza ruchoma (bufor fosforanowy o pH 5,8). Na kolumnę wstrzykiwano próbki za pomocą autosamplera o objętości 20  $\mu$ l i stężeniu 4 mg/ml. Pomiarzy wykonane były w temperaturze 20°C, na detektorze elektrochemicznym w układzie trójelektrodowym, elektroda pracująca – węglowa w zakresie potencjałów 0,2 ÷ 1,2 V. Czas analizy ustalono na 60 minut. Miarą CPA było pole powierzchni pod wszystkimi pikami na chromatogramie [8].

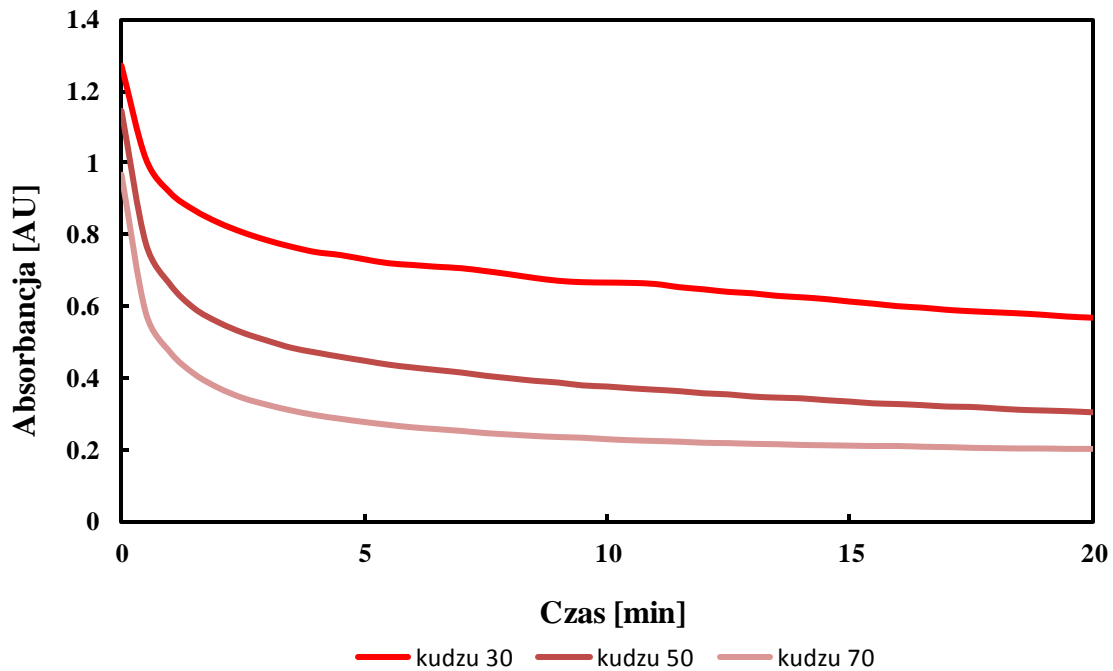
### 3. Wyniki i ich dyskusja (Results and discussion)

Podczas spektrofotometrycznego oznaczenia CPA<sup>DPPH</sup> zarejestrowano krzywe przedstawione na rysunku 1. Okazało się, że najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne posiadał ekstrakt z kudzu, a najsłabsze ekoland. Oznacza to, że 1 g ekstraktu z kudzu odpowiada 43 mg kwasu galusowego, a 1 g ekstraktu ekolandu odpowiada tylko 2 mg GA. CPA<sup>DPPH</sup> dla wszystkich próbek przedstawiono na rysunku 3.

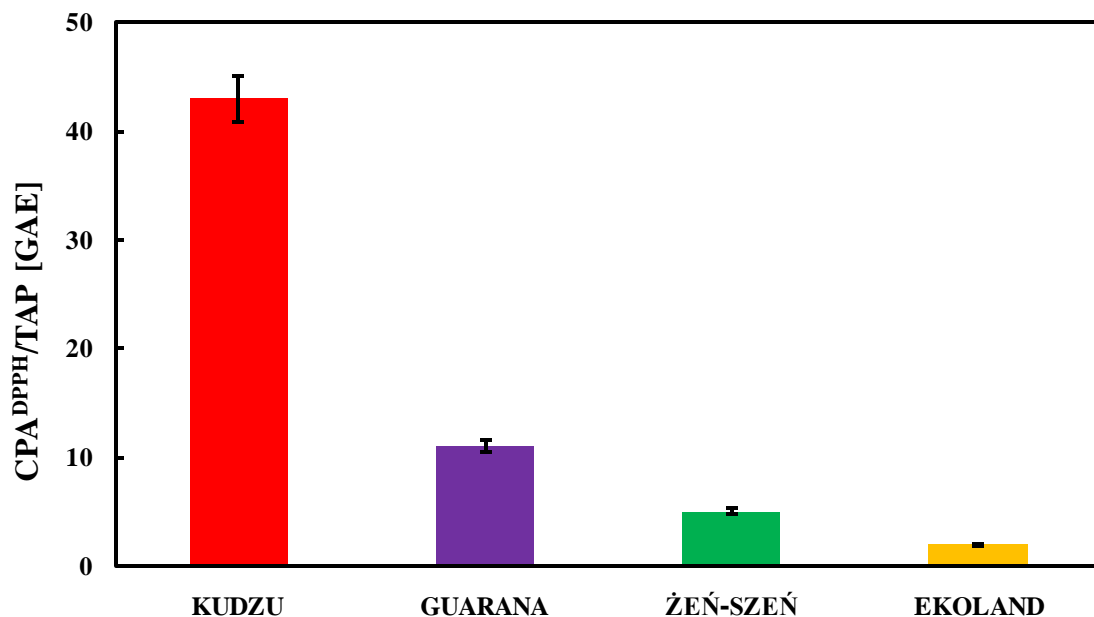


Rys. 1. Zmiany absorbancji w metodzie DPPH.  
Fig. 1. Change of absorbance in DPPH method.

Wykonano również pomiary przy różnych stężeniach objętościowych próbek ekstraktu kudzu tj. 30, 50 oraz 70  $\mu\text{l}$  (co odpowiada: 0,1; 0,167; 0,233 mg/ml ekstraktu). Okazało się, że optymalne wyniki dostarcza pomiar przy objętości próbki równej 30  $\mu\text{l}$ . Przy większych stężeniach próbka kudzu reaguje zbyt szybko. Po upływie około dwóch minut ekstrakt z kudzu praktycznie w 100% przereagował z rodnikami DPPH (rys. 2).

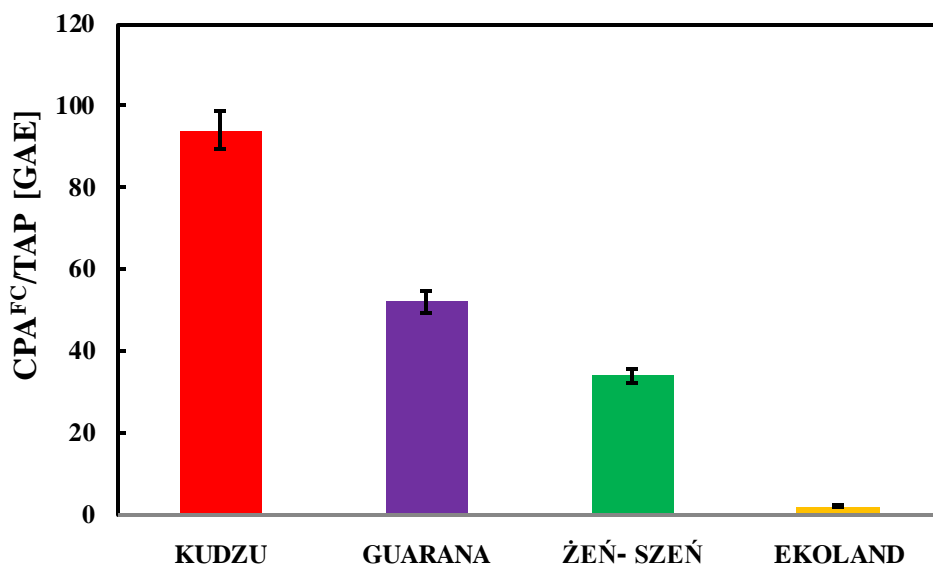


Rys. 2. Zmiany absorbancji w metodzie DPPH.  
Fig. 2. Change of absorbance in DPPH method.



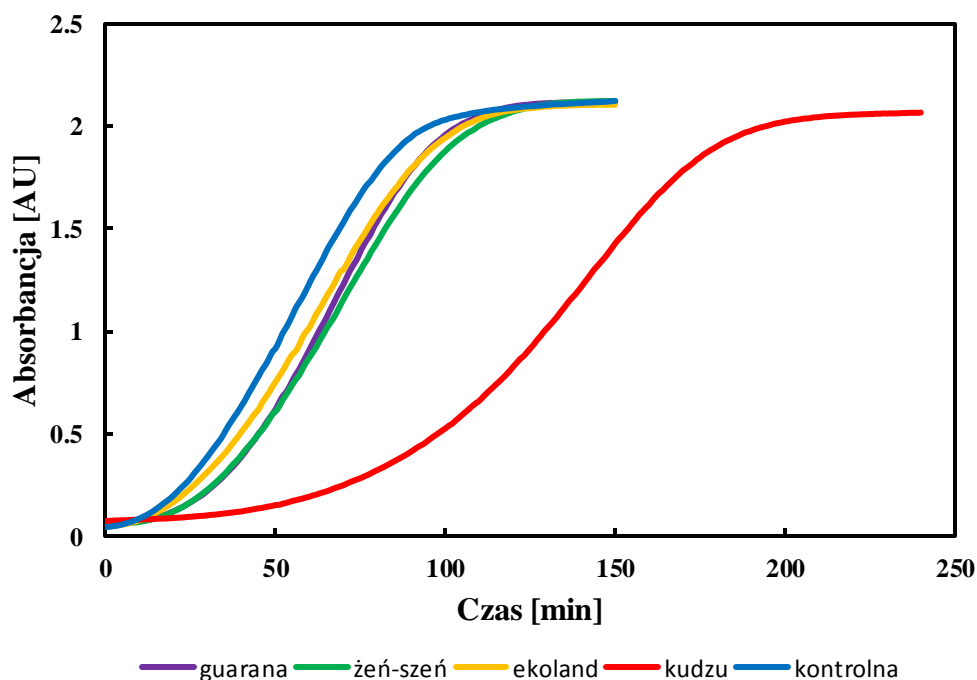
Rys. 3. CPA<sup>DPPH</sup> badanych próbek.  
Fig. 3. TAP<sup>DPPH</sup> of tested samples.

Oznaczono także w badanych próbkach całkowite stężenie polifenoli. Okazało się, że najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi (największe stężenie polifenoli) charakteryzuje się ekstrakt z kudzu, zaś najsłabszymi ekoland, analogicznie jak w metodzie DPPH. W przeliczeniu na kwas galusowy wartości CPA są wyższe niż w przypadku DPPH, z wyjątkiem ekolandu, dla którego wartość CPA się nie zmienia. Pozostałe ekstrakty zawierają w swoim składzie duże stężenie związków fenolowych (najwięcej ekstrakt z kudzu), co przedstawiono na rysunku 4.



Rys. 4. CPA<sup>FCR</sup> badanych próbek.  
Fig. 4. TAP<sup>FCR</sup> of tested samples.

Wynikiem monitorowania spektrofotometrycznego reakcji ekstraktów badanych próbek z rodnikami peroksyłowymi (rozpad AAPH) są krzywe przedstawione na rysunku 5. Okazało się, że najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne wykazuje ekstrakt z kudzu, a najsłabsze ekoland. Ekstrakty z guarany i żeń-szenia z rodnikami peroksyłowymi reagują podobnie. W poprzednio opisanych metodach (CPA<sup>DPPH</sup> i CPA<sup>FC</sup>) guarana wykazywała większe wartości CPA niż żeń-szeń.



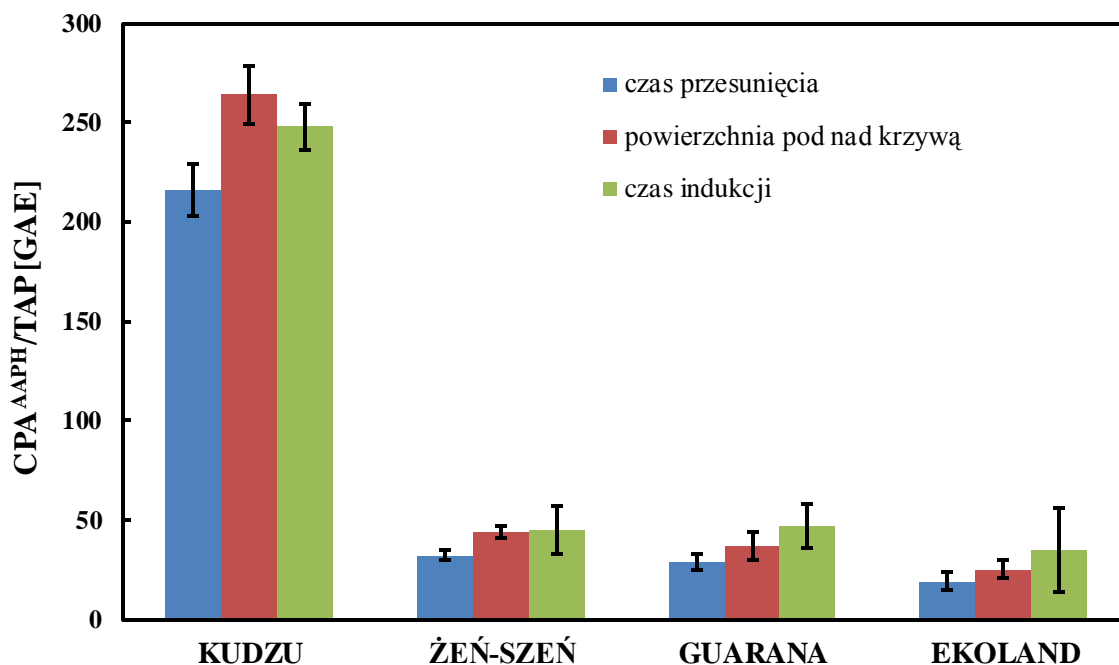
Rys. 5. Zmiany absorbancji w metodzie AAPH.  
Fig. 5. Change of absorbance in AAPH method.

Pomiar absorbancji próbki kontrolnej, guarany, żeń-szenia oraz ekolandu prowadzono przez 150 minut. Po tym czasie wszystkie krzywe uległy wypłaszczeniu, czyli reakcja z rodnikami zakończyła się. Stąd w kolejnych minutach pomiaru krzywe nie ulegają zmianie (rys. 5). W tych samych warunkach pomiarowych znacznie później wypłaszcza się krzywa obrazująca reakcję kudzu z rodnikami. Ekstrakt z kudzu charakteryzuje się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi, gdyż reakcja rodników peroksyłowych z

sensosem (DCFH) znacznie się opóźnia, co spowodowane jest obecnością wielu różnych antyoksydantów. Na rysunku 5 możemy zaobserwować, że krzywa zmian absorbancji dla ekstraktu z kudzu różni się kształtem od pozostałych. Krzywe zmian absorbancji guarany, żeń-szenia i ekolandu są równoległe przesunięte względem krzywej kontrolnej, zaś krzywa absorbancji kudzu jest bardziej wypłaszczona co wskazuje na złożony charakter reakcji składników ekstraktu kudzu z rodnikami peroksyłowymi.

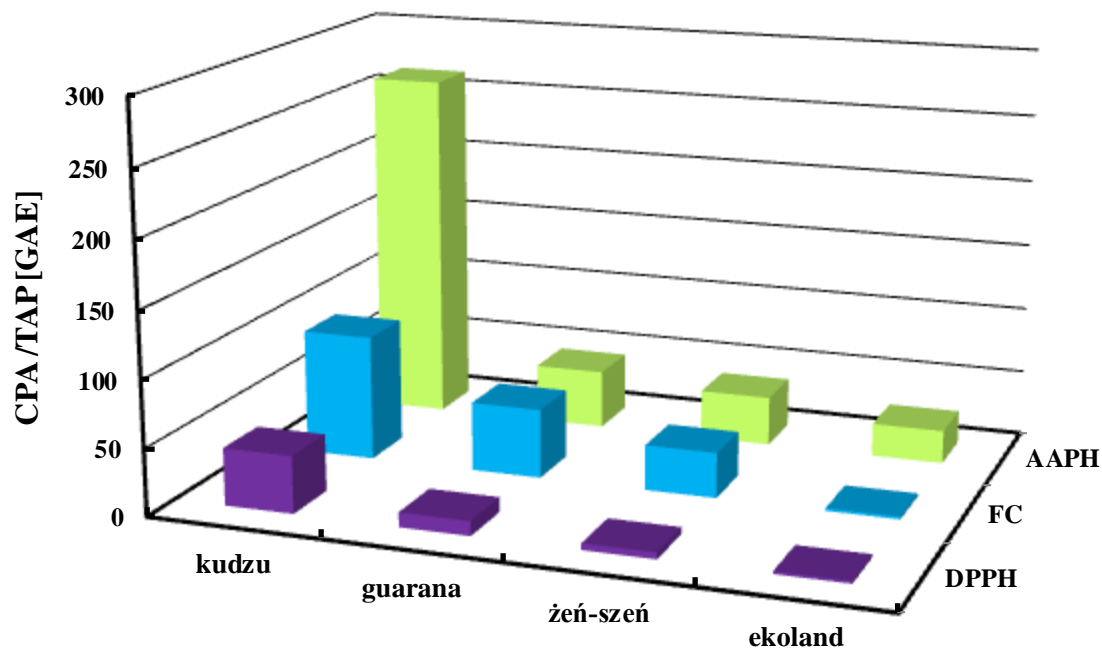
Na rysunku 6 zestawiono wyniki CPA<sup>AAPH</sup> w przeliczeniu na GAE, wykonane trzema metodami opisanymi w części eksperymentalnej. Z przedstawionego wykresu wynika, że ekstrakt z kudzu znacznie odbiega wartościami CPA<sup>AAPH</sup> od pozostałych próbek, co wskazuje na to, że charakteryzują się bardzo dużą zawartością antyoksydantów. Guaranę i żeń-szenia charakteryzują porównywalne właściwości antyoksydacyjne. Ekoland zawiera niewiele bądź nieduże stężenie przeciwutleniaczy.

Otrzymane wartości CPA<sup>AAPH</sup> guarany i żeń-szenia są liczbowo porównywalne z wartościami CPA otrzymanymi w metodzie z wykorzystaniem odczynnika FC. Kudzu wykazuje znacznie większe wartości CPA<sup>AAPH</sup> niż CPA<sup>FC</sup> i CPA<sup>DPPH</sup>. Wartości CPA<sup>AAPH</sup> ekolandu są znacznie większe niż te uzyskane w poprzednich metodach. Ponadto w wartościach CPA<sup>AAPH</sup> wyznaczonych trzema metodami dla ekstraktów z guarany, żeń-szenia i ekolandu widać pewną prawidłowość. Dla każdej z tych próbek wartości CPA<sup>AAPH</sup> liczone z czasu indukcji są największe, zaś z czasu przesunięcia krzywej najmniejsze. Dla kudzu, gdzie krzywa nie jest przesunięta równoległe, jak w przypadku pozostałych próbek, takiej prawidłowości nie ma. Największa wartość CPA<sup>AAPH</sup> ekstraktu z kudzu została wyliczona z pola powierzchni pod krzywą, a najmniejsza z czasu przesunięcia krzywej kinetycznej.



Rys. 6. CPA<sup>AAPH</sup> badanych próbek.  
Fig. 6. TAP<sup>AAPH</sup> of tested samples.

Wartości CPA ekstraktów wyznaczone trzema metodami spektrofotometrycznymi zestawiono na rys. 7. Wynika z niego dobra korelacja pomiędzy zastosowanymi metodami pomiarowymi. W każdej z zastosowanych metod ekstrakt z kudzu charakteryzuje się największymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Otrzymane wartości CPA<sup>FC</sup> oraz CPA<sup>AAPH</sup> są wyższe od wartości CPA<sup>DPPH</sup>. Powodem jest najprawdopodobniej większa reaktywność odczynnika Folina-Ciocalteu'a. Reaguje on nie tylko z silnymi przeciwutleniaczami, ale również z tymi słabszymi. (odczynnik FC nie jest specyficzny i wchodzi w reakcje również z innymi związkami oprócz polifenoli). DPPH jest bardzo słabym rodnikiem. Prawdopodobnie fenole zawarte w próbkach charakteryzują się słabymi właściwościami antyoksydacyjnymi i nie wszystkie reagują z rodnikami DPPH.

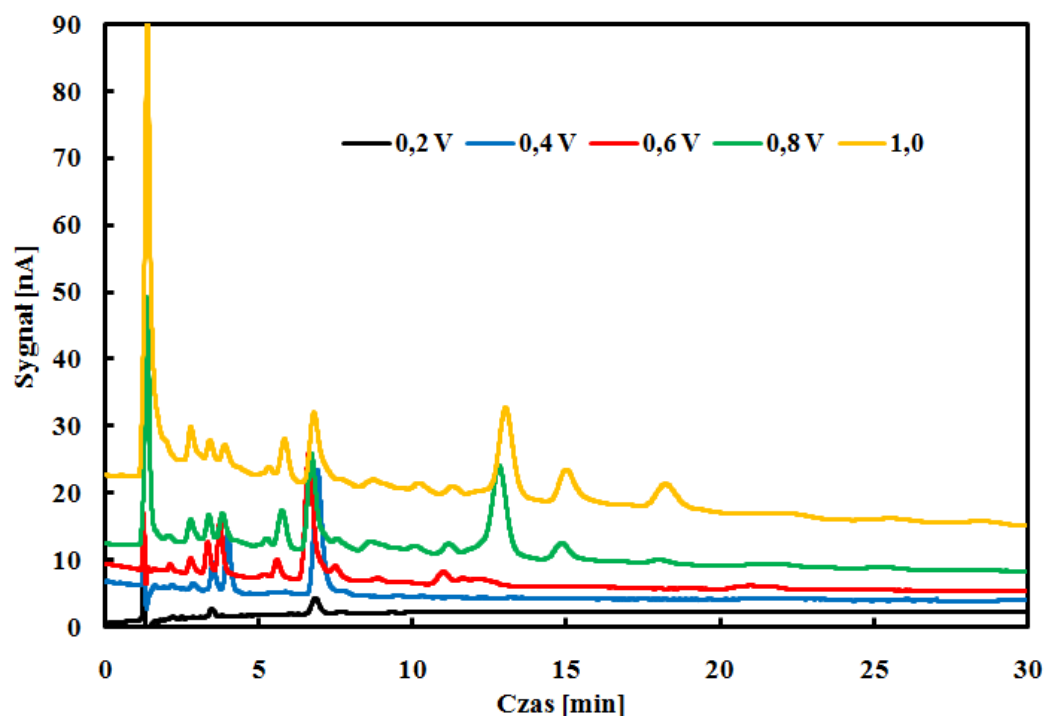


Rys. 7. Korelacje  $CPA^{DPPH}$ ,  $CPA^{FCR}$  i  $CPA^{AAPH}$  badanych próbek.  
 Fig. 7. Correlation  $TAP^{DPPH}$ ,  $TAP^{FCR}$  and  $TAP^{AAPH}$  of tested samples.

CPA wyznaczono także metodą HPLC z detekcją elektrochemiczną [8]. Chromatogramy próbki ekstraktu żeń-szenia wykonane przy różnych wartościach potencjałów elektrody pracującej zostały przedstawione na rysunku 8. Wynika z niego, że niektóre piki (np. czas retencji około 13 i 15 min.) pojawiają się dopiero przy wyższych wartościach potencjałów. Są to piki pochodzące od słabych antyoksydantów, np. w ok. 18 min. pomiaru pojawia się pik dopiero przy potencjale  $E = 0,8$  V. Natomiast piki, które pojawiają się na chromatogramie już przy niskich wartościach potencjałów elektrody pracującej pochodzą od silnych reduktorów, zatem są to silne antyoksydanty, np. pik pochodzący od związku dającego sygnał w ok. 7 minucie pomiaru już przy potencjale  $E = 0,2$  V.

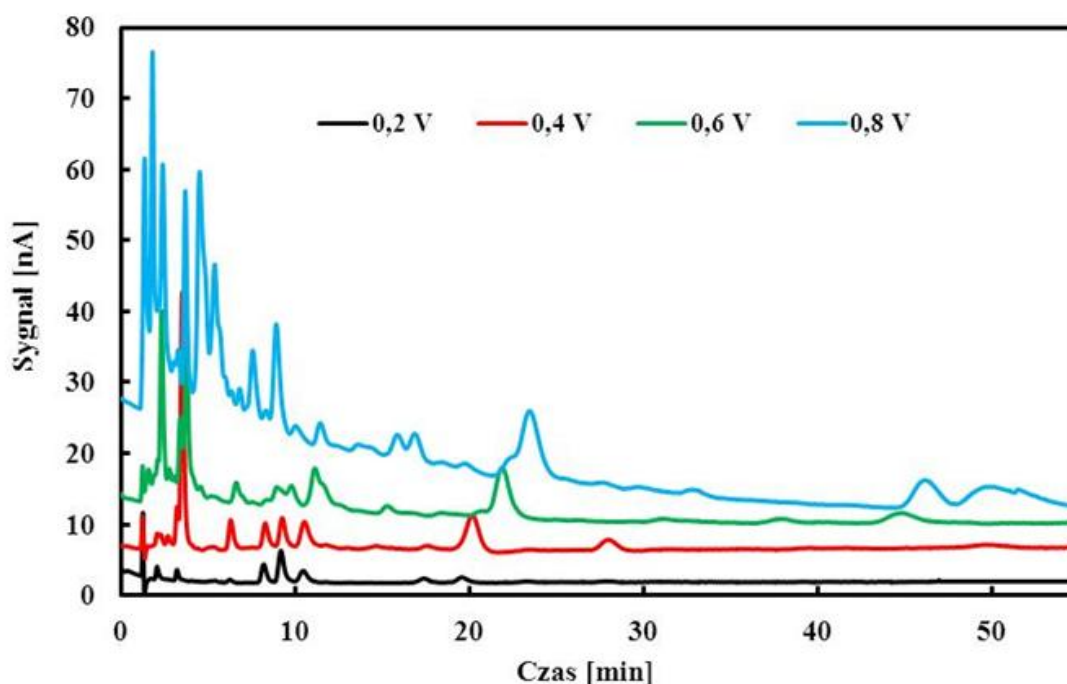
Analogiczna sytuacja ma miejsce dla ekstraktu kudzu (rys. 9). W 46 minucie pomiaru pojawia się pik przy potencjale  $E = 0,6$  V. Przy niższej wartości potencjału nie jest on widoczny. Jest to pik pochodzący od związku charakteryzującego się słabymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Natomiast piki o czasach retencji ok. 3, 10 i 21 min. są widoczne na chromatogramie, gdy analizę prowadzi się w całym zakresie potencjałów tj.  $0,2 \div 0,8$  V. Są to związki charakteryzujące się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi.





Rys. 8. HPLC/ED chromatogramy ekstraktu z żeń-szenia o stężeniu 4 mg/ml. Warunki chromatograficzne: kolumna - Eurospher C18, 5  $\mu$ 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. 8. HPLC/ED chromatograms of panax ginseng extract (4 mg/ml). Experimental conditions: column - Eurospher C18, 5  $\mu$ 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).



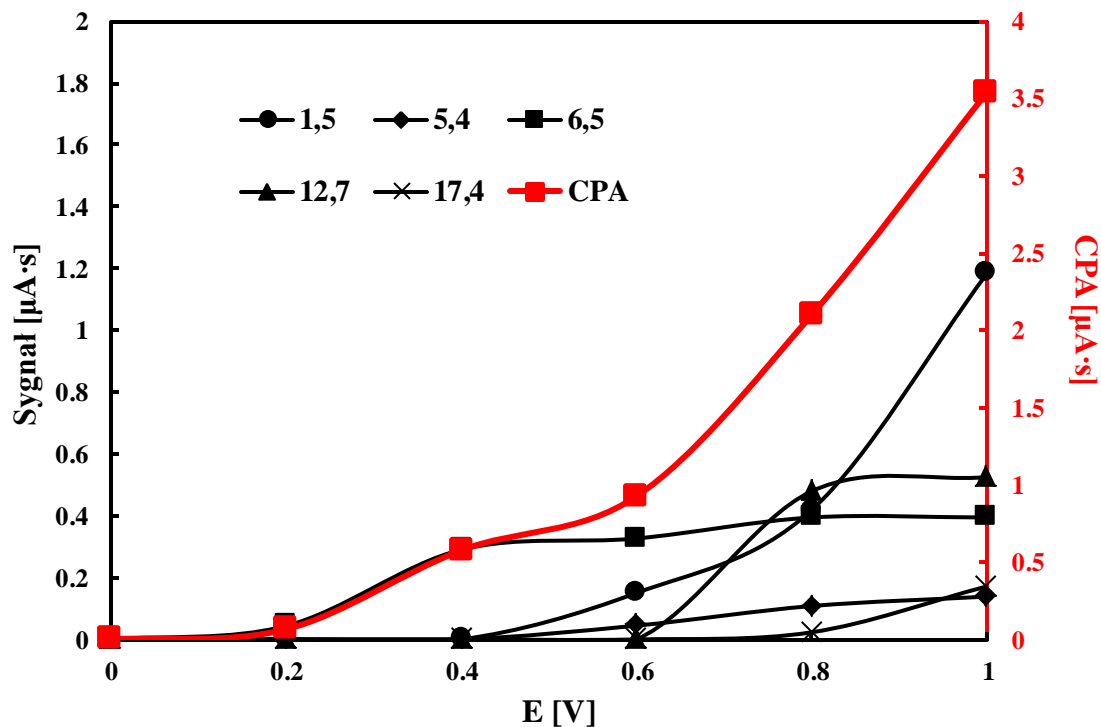
Rys. 9. HPLC/ED chromatogramy ekstraktu z kudzu o stężeniu 4 mg/ml. Warunki chromatograficzne jak na rys. 8.

Fig. 9. HPLC/ED chromatograms of pueraria montana extract (4 mg/ml). Experimental conditions the same as on fig. 8.

CPA<sup>HPLC/ED</sup> żeń-szenia oraz pola powierzchni wybranych pików, pochodzących od związków charakteryzujących się dużymi właściwościami antyoksydacyjnymi wchodzących w skład ekstraktu żeń-szenia przedstawiono na rysunku 10. W zakresie potencjałów 0,2 ÷ 0,6 V największy (praktycznie 100% dla potencjałów 0,2 V i 0,4 V) udział w CPA ma związek eluowany w czasie retencji ok. 6,5 min. Zaś dla potencjałów 0,8 V i 1,0 V jest to związek o czasie retencji ok. 1,5 min. Ponadto kształt hydrodynamicznej

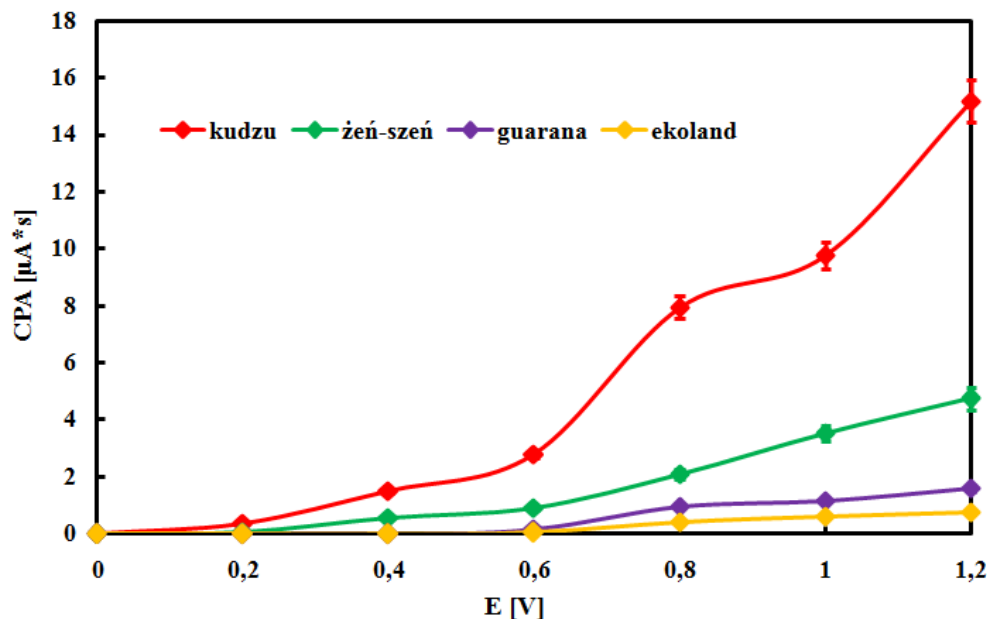
krzywej przedstawiającej CPA żeń-szenia (widoczne dwie fale, czerwona linia), wskazuje na złożoność reakcji utleniania składników ekstraktu zachodzących na węglowej elektrodzie pracującej.

Hydrodynamiczne voltamogramy badanych ekstraktów roślinnych zostały przedstawione na rysunku 11. Okazało się, że najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi charakteryzuje się ekstrakt z kudzu (piki pojawiają się już przy niskich wartościach potencjałów), a najslabszymi ekoland. Ponadto kształt krzywej kudzu (podobnie jak w przypadku żeń-szenia, rys. 10) wskazuje na złożoność reakcji utleniania zachodzącej na elektrodzie. Na chromatogramie analizowanej próbki ekolandu, w zastosowanych warunkach chromatograficznych obserwujemy pojedyncze, o małej intensywności piki dopiero przy potencjale  $> 0,8$  V. Wskazuje to na jej słabe właściwości antyoksydacyjne.



Rys. 10. Hydrodynamiczne voltamogramy ekstraktu żeń-szenia o stężeniu 4 mg/ml. Warunki chromatograficzne jak na rys. 8.

Fig. 10. Hydrodynamic voltammograms of panax ginseng extract (4 mg/ml). Experimental conditions the same as on fig. 8.

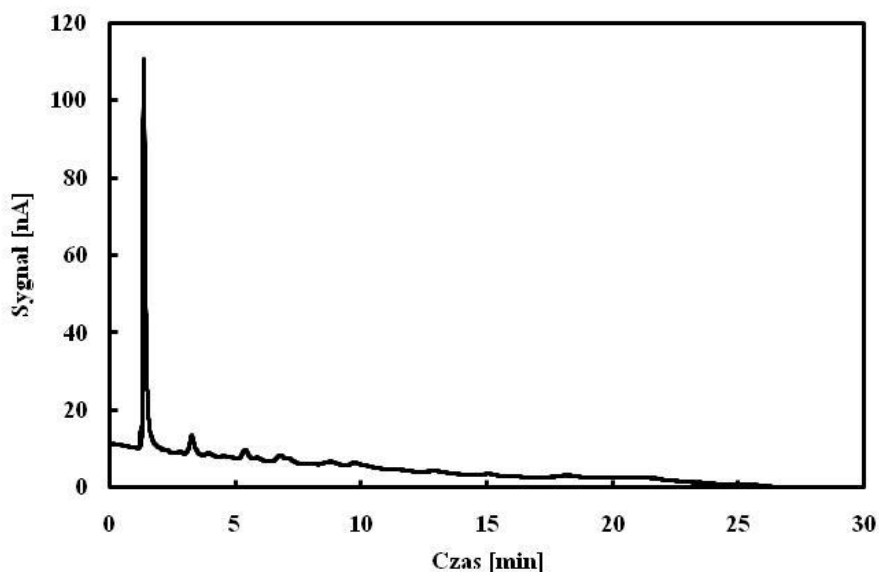


Rys. 11. Hydrodynamiczne voltamogramy badanych ekstraktów o stężeniu 4 mg/ml. Warunki chromatograficzne jak na rys. 8.

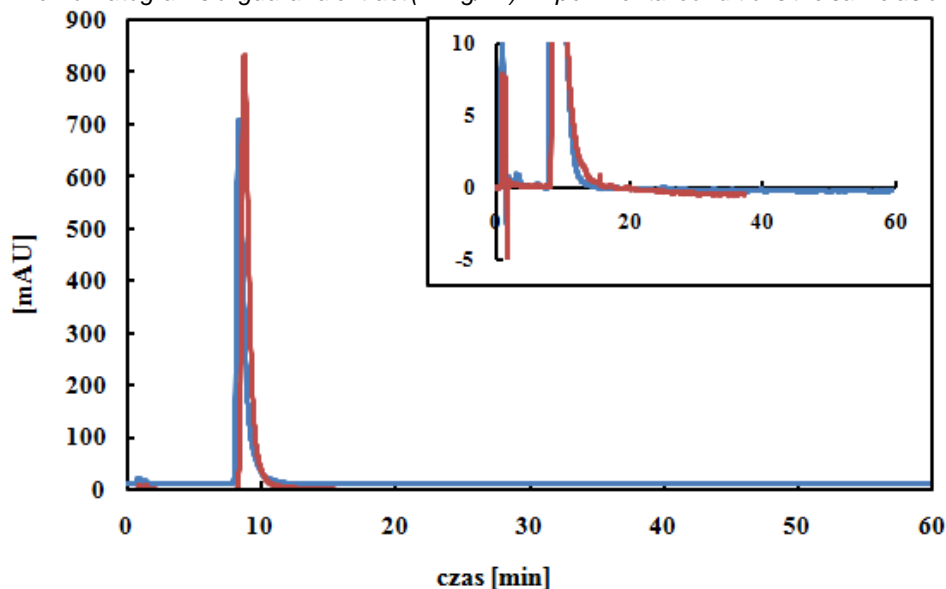
Fig. 11. Hydrodynamic voltammograms of tested extracts (4 mg/ml). Experimental conditions the same as on fig. 8.

Okazało się, że ekstrakt z guarany (podobnie jak z ekolandu) daje niewielkie sygnały przy wyższej wartości potencjału (rys. 12), a przy niższej nie pojawiają się na chromatogramie żadne piki. Pomiar spektrofotometryczny wykazały, że guarana charakteryzuje się dużymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Jak wspomniano wcześniej, guarana zawiera w składzie bardzo dużą ilość kofeiny, która z kolei nie ulega reakcji utleniania na elektrodzie detektora ED, stąd też brak sygnału charakterystycznego dla kofeiny. W celu sprawdzenia, czy zakupiony ekstrakt z guarany zawiera znaczną ilość kofeiny wykonano pomiar wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową z detektorem DAD (rys. 13).

Okazało się, że ekstrakt z guarany w swoim składzie zawiera bardzo duże stężenie kofeiny (rys. 13). Na chromatogramie ekstraktu pojawił się niewielki pik o czasie retencji ok. 5 min. Zadane warunki chromatograficzne nie wykazały obecności innych związków. Z danych literaturowych [9] wynika, że ekstrakt z guarany zawiera saponiny, witaminy A, E, jednak w przeprowadzonych analizach chromatograficznych nie zostało to potwierdzone. Będzie to przedmiotem dalszych prac, gdyż w celu zbadania obecności np. witaminy E należałoby w inny sposób przygotować próbkę do analizy (np. przeprowadzić proces zmydlania).



Rys. 12. HPLC/ED chromatogramy ekstraktu z guarany o stężeniu 4 mg/ml. Warunki chromatograficzne jak na rys. 8.  
Fig. 12. HPLC/ED chromatograms of guarana extract (4 mg/ml). Experimental conditions the same as on fig. 8.



Rys. 13. HPLC/DAD chromatogramy ekstraktu guarany o stężeniu 4 mg/ml (niebieska linia) i wzorca kofeiny o stężeniu 0,4 mg/ml (czerwona linia). Warunki chromatograficzne: kolumna chromatograficzna – 5  $\mu$ m C18, 4 x 100 mm (Eurospher, Knauer), faza ruchoma – metanol:woda, (30:70 v/v), detektor DAD, 274 nm, szybkość przepływu fazy ruchomej – 1,0 ml/min, objętość nastrzyku – 20  $\mu$ l.

Fig. 13. HPLC/DAD chromatograms of guarana extract 4 mg/ml (blue line) and a 0.4 mg/ml caffeine standard (red line). Experimental conditions: column – Eurospher C18, 5  $\mu$ m, 100 x 4 mm (Knauer); mobile phase – methanol:water (30:70 v/v); flow rate – 1 ml/min, DAD detection, 274 nm, injection volume - 20  $\mu$ l.

#### 4. Wnioski (Conclusions)

Zaprezentowane w pracy metody pomiaru całkowitego potencjału antyoksydacyjnego można zastosować do badania właściwości antyoksydacyjnych różnych ziół. Zbadane ekstrakty różnią się właściwościami antyoksydacyjnymi. Najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi, potwierdzonymi wszystkimi technikami zastosowanymi w pracy, charakteryzują się ekstrakty z kudzu oraz żeń-szenia. Napój herbaciany *Ekoland*, mimo że zawiera w swym składzie witaminy A, C i E wykazał w badaniach niewielkie właściwości antyoksydacyjne. Ekstrakt z guarany zawiera duże stężenie kofeiny. Wartości CPA wodnych naparów roślin leczniczych otrzymane metodami spektrofotometrycznymi wykazują dobre korelacje.

#### 5. Literatura (Literature)

1. G. Bartosz, Druga twarz tlenu-wolne rodniki w przyrodzie, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 2003.
2. H. Puzanowska - Tarasiewicz, L. Kuźmicka, M. Tarasiewicz, Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 43 (2010) 9-14.
3. P. Piszcz, B.K. Głód, Właściwości antyoksydacyjne ziół zbadane różnymi metodami, *Camera Separatoria*, 8 (2016) 23-31.
4. B.K. Głód, P. Piszcz, J. Czajka, P.K. Zarzycki, Evaluation of total antioxidant potential of selected biogenic polyamines, non-alcoholic drinks and alcoholic beverages using improved RP-HPLC assay involving fluorescence detection, *Food Chemistry*, 131 (2012) 1026-1029.
5. B. Waszkiewicz-Robak, Kudzu Root życie wolne od używek, "Medycyna i zdrowie", 1, 2010.
6. Z. Podbielkowski, Słownik roślin użytkowych, Wydawnictwo PWRiL, Warszawa 1989.
7. B. Karłowicz-Bodalska, Żeń-szeń – wszechlek Dalekiego Wschodu, *Postępy Fitoterapii* 4 (2004) 183-188.
8. 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.
9. R. Mattei, R.F. Dias, E.B. Espínola, E.A. Carlini, S.B.M. Barros, Guarana (*Paullinacupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro, *Journal of Ethnopharmacology* 60 (1998) 111–116.
10. 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.
11. R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 4290-4302.
12. J. Valls, S. Millána, M.P. Martí, E. Borrás, L. Arolab, Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 7143-7172.