

Paweł PISZCZ, Joanna OBRYCKA, Bronisław 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: bkg@onet.eu

Badanie właściwości antyoksydacyjnych za pomocą DPPH stosując chromatograficzne rozdzielanie różnych jego form

Streszczenie: W pracy przedstawiono wyniki badań nad możliwością zastosowania rodnika DPPH do oznaczania właściwości antyoksydacyjnych, stosując chromatograficzne rozdzielanie różnych jego form. Pomiarów wykonywano w układzie faz odwróconych HPLC z detekcją UV-DAD. Zbadano CPA związków o właściwościach przeciwutleniających – flawonoidów, jak również całkowity potencjał antyoksydacyjny wybranych naparów z ziół. Wyniki otrzymane za pomocą RP-HPLC-UV skorelowane zostały z wynikami otrzymanymi w pomiarze fotometrycznym.

Słowa kluczowe: antyoksydanty, całkowity potencjał antyoksydacyjny, DPPH, HPLC

Study of antioxidant properties using DPPH with chromatographic separation of its various forms

Abstract: The paper presents the results of the possibility of using the DPPH radical to determine antioxidant properties using chromatographic separation of its various forms. The measurements were performed in the RP-HPLC with UV-DAD detection. The TAP values were tested for antioxidants - flavonoids, as well as the total antioxidant potential of selected herbs. The results obtained with RP-HPLC-UV were correlated with the results obtained using photometric measurement.

Keywords: antioxidants; total antioxidant potential, DPPH, HPLC

1. Wstęp (Introduction)

DPPH• (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl, 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl, α,α' -di-fenylo- β -pikrylohydrazyl) został odkryty w 1922 roku przez Goldschmidta i Renna [1]. Występuje on w postaci drobnokrystalicznego proszku nierozpuszczalnego w wodzie, natomiast bardzo dobrze rozpuszczalnego w metanolu. Metanolowy roztwór DPPH, charakteryzuje się intensywną fioletową barwą o silnej absorpcji przy długości fali 517 nm. DPPH• należy do stabilnych rodników, o czym świadczy delokalizacja niesparowanego elektronu oraz struktury rezonansowe. Jego struktura świadczy o tym, że może on reagować z innymi wolnymi rodnikami na kilka różnych sposobów: a) poprzez przyłączenie do centralnego, azotowego rodnika, b) poprzez przyłączenie do pierścienia fenyloвого w pozycji para, c) przez przyłączenie do ugrupowania pikrylowego. Doświadczalne dane wskazują, że głównym centrum rodnikowym jest pozycja para jednego z pierścieni fenyloowych [1].

DPPH• ze względu na swą stabilność znalazł zastosowanie przy pomiarach właściwości antyoksydacyjnych [10-12]. Rodnik DPPH w reakcji z antyoksydantem redukuje się do 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyny (DPPH-H). Redukcja może zachodzić poprzez przyłączenie atomu wodoru lub elektronu do centrum rodnikowego. Charakterystyczna dla reakcji jest zmiana barwy z fioletowej (DPPH•) na żółtą (DPPH-H). Spektrofotometryczny pomiar zaniku fioletowej barwy dokonywany jest przy długości fali $\lambda=517$ nm. Miarą mocy antyoksydacyjnej jest różnica absorpcji roztworu DPPH• przed i po reakcji z antyoksydantem. Metoda ta jest stosunkowo niedroga, prosta i szybka, przez co jest często wykorzystywana. Dużym ograniczeniem tej metody jest m.in. brak możliwości pomiaru próbek barwnych, ponieważ występują zakłócenia wywołane przez kolorowe pigmenty próbki, co może być przyczyną fałszowania wyniku [2, 3, 10, 11].

W celu uniknięcia błędów spowodowanych wpływem próbek barwnych opracowano metodę redukcji rodnika DPPH połączoną z wysokosprawną chromatografią cieczą (DPPH-HPLC). Metoda ta jest oparta na redukcji DPPH• podobnie jak w metodzie spektrofotometrycznej. Niesparowany elektron rodnika wiąże się z donorem wodoru, czyli antyoksydantem, zmiataczem wolnych rodników, absorpcja zmniejsza się, w rezultacie zmiana barwy jest stechiometryczna do ilości przechwyconych elektronów. Analizę chromatograficzną przeprowadzono układzie faz odwróconych. Poddano analizie czysty DPPH•, który zawiera również niewielkie stężenie formy zredukowanej, rozpuszczony w etanolu oraz próbkę po reakcji z antyoksydantem. Po rozdzieleniu otrzymano chromatogramy czystego DPPH• i po reakcji z antyoksydantem. Jako antyoksydant został użyty Trolox, czyli kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksylowy (rozpuszczalna w wodzie pochodna witaminy E). Wcześniejsze badania przedstawiały miarę zdolności antyoksydacyjnych jako różnicę pola powierzchni pików formy rodnikowej przed i po reakcji [3, 4]. Ostatnie badania dowiodły, że miarą zdolności antyoksydacyjnych może być również wzrost stężenia formy zredukowanej. Fazę ruchomą stanowił acetonitryl / 10 mM cytrynian amonu o pH = 6,8 (70:30, v/v) z detekcją przy długości fali 330 nm [5].

Głównym celem prezentowanej pracy było udoskonalenie pomiarów nad właściwościami antyoksydacyjnymi za pomocą rodnika DPPH poprzez chromatograficzny rozdział różnych jego form. Pomiar wykonywane były w układzie faz odwróconych RP-HPLC z detekcją UV-DAD.

Przebadano zarówno aktywność antyoksydacyjną związków o właściwościach przeciwutleniających – flawonoidów, jak również całkowity potencjał antyoksydacyjny wybranych naparów z ziół. Wyniki otrzymane za pomocą RP-HPLC-UV skorelowane zostały z wynikami otrzymanymi poprzez pomiar fotometryczny.

2. Część eksperymentalna (Experimental)

W badaniach CPA użyto następujących odczynników chemicznych: DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl), metanol (99,9% HPLC grade) – Sigma - Aldrich, Steinheim, Niemcy; woda trójrotnie destylowana (otrzymana w laboratorium z wykorzystaniem aparatu kwarcowego wody, Heraeus Quarzglas, Destamat, Niemcy).

Korzystano również z następującej aparatury: wysokosprawny chromatograf cieczowy (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 - COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Waters (4,6 x 150 mm, 5 μm), autosamplera Smartline 3800, detektora Smartline PDA 2800 z matrycą diodową DAD (zakres pracy lampy 190-1020 nm), termostatu kolumn Smartline 4000 z zakresem temperatur 5 ÷ 85°C, komputera z oprogramowaniem do rejestracji i obróbki danych ClarityChrom).

Pomiary spektrofotometryczne wykonano na spektrofotometrze firmy ThermoSpectronic, model: Helios Epsilon (USA). 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, a także łaźni ultradźwiękowej (Sonorex RK 250H, Bandelin, Niemcy).

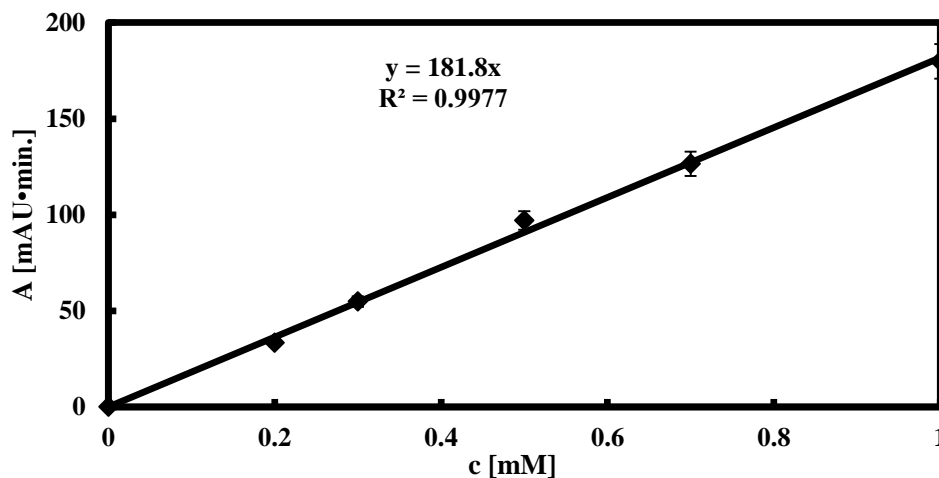
Przedmiotem badań całkowitego potencjału antyoksydacyjnego były próbki naparów ziół oraz próbki związków flawonowych. Materiał badawczy stanowiły zioła (lawenda lekarska, malwa czarna, nostrzyk żółty, mięta pieprzowa, mięta dzika, podbiał pospolity, pokrzywa zwyczajna, rdest ptasi, skrzyp polny) zebrane na łąkach i działkach w okolicach Siedlec, a następnie suszone oraz związki flawonowe ((-)epikatechina, (+)katechina, (+/-)katechina, 2'-hydroksyflawanon, 4'-hydroksyflawanon, 6-hydroksyflawanon, 6'-metoksyflawanon, 7,8-benzoflawon, biochanina A, flawanon, genisteina, hesperetyna, hesperydyna, kwercetyna, naringenina, naringina, neohesperydyna, rutyna).

Napary ziół o stężeniu 0,05 g/ml otrzymano przez odważenie 0,5 g zmielonego zioła i parzenie w 10 ml wody destylowanej przez 20 min. Otrzymany roztwór odwirowywano na wirówce, a następnie sączono przez sączek nylonowy o średnicy porów 0,45 μm (Millipore, USA). Roztwory flawonoidów o stężeniu 1 mM otrzymano przez odważenie próbki flawonoidu i rozpuszczenie go w 2 ml metanolu. Roztwór podstawowy DPPH o stężeniu 1 mM otrzymano przez odważenie 1,97mg DPPH i rozpuszczenie w metanolu w kolbie miarowej o objętości 5ml. Tak otrzymany roztwór przechowywano w zaciemnieniu w zamrażarce o temperaturze -20 °C.

Oznaczenie CPA za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej polegało na wykonaniu chromatogramów czystego DPPH oraz rodnika DPPH po reakcji z próbką w układzie faz odwróconych z detekcją UV przy długości fali 517nm. Miarą CPA^{UV} była różnica w polu powierzchni pików formy rodnikowej DPPH przed reakcją i po reakcji z próbką po czasie t (t_{ziola}=15 minut, t_{flawonoidy}=10 minut). Obliczana była według równania: %CPA = $\frac{P_0 - P_t}{P_0} \cdot 100\%$,

gdzie: P_0 – pole powierzchni pików metanolowego roztworu DPPH przed reakcją, P_t – pole powierzchni pików DPPH po reakcji z badaną próbką po czasie t .

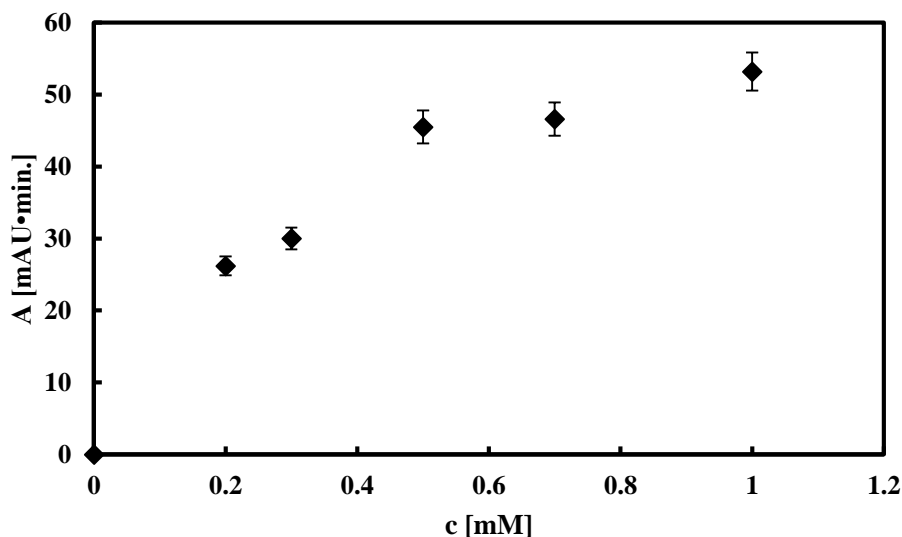
Zależność pola powierzchni pików formy rodnikowej DPPH od stężenia przedstawiono na Rys. 1. Oznaczenia CPA prowadzono przy maksimum absorbancji dla fioletu – 517 nm, stosując roztwór DPPH o wyjściowym stężeniu 1 mM. Z krzywej można wyznaczyć stężenie rodnika DPPH.



Rys. 1. Zależność pola powierzchni pików formy rodnikowej DPPH od jego stężenia. Warunki chromatograficzne: kolumna - COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Waters (4,6 x 150 mm, 5 μ m), faza ruchoma - metanol/woda (70:30, v/v), detektor UV-Vis – 517 nm, prędkość przepływu – 1 ml/min, temperatura - 20°C.

Fig. 1. Dependence of the peak area of the DPPH radical on its concentration. Chromatographic conditions: column - COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Waters (4.6 x 150 mm, 5 μ m), mobile phase - methanol/water (70:30, v/v), UV-Vis detector – 517 nm, flow rate – 1 ml/min, temperature - 20°C.

Zależność pola powierzchni pików formy zredukowanej DPPH-H od stężenia całkowitego przedstawiono na Rys. 2. Oznaczenia CPA prowadzono przy maksimum absorbancji dla barwy żółtej – 326 nm, stosując roztwór DPPH o wyjściowym stężeniu 1 mM. Z krzywej można wyznaczyć stężenie formy zredukowanej DPPH-H.



Rys. 2. Zależność pola powierzchni pików formy zredukowanej DPPH-H od stężenia. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 1, detektor UV-Vis – 326 nm.

Fig. 2. Dependence of the peak area of the DPPH-H (reduced form) on its concentration. Chromatographic conditions the same as on Fig. 1, UV-Vis detector – 326 nm.

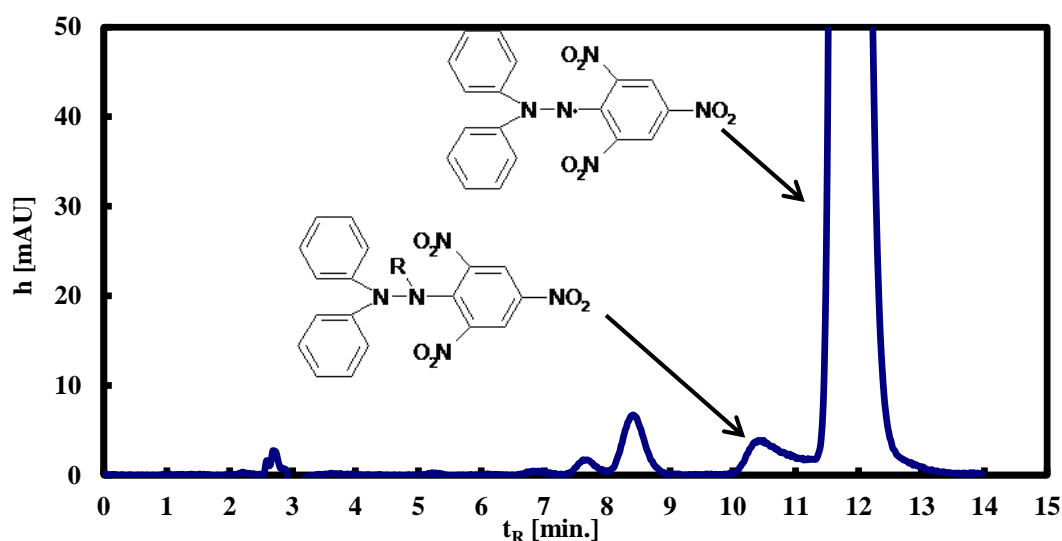
Oznaczanie CPA za pomocą metody fotometrycznej opiera się na pomiarze absorbancji/transmitancji roztworu odniesienia (rodnik DPPH rozpuszczony w metanolu) oraz roztworu DPPH po reakcji z próbką. Roztworem zerowym był metanol.

W przypadku ziół roztwór odniesienia przygotowany został przez zmieszanie 500 μ l 1 mM roztworu DPPH i 20 μ l metanolu, próbki pomiarowe: 500 μ l 1 mM roztworu DPPH i 20 μ l 0,05 g/ml naparu z zioła. Roztwór odniesienia jak i próbki pomiarowe były rozcieńczone 10-krotnie. Pomiar absorbancji/transmitancji roztworów wykonywany był po czasie 15 minut.

W przypadku flawonoidów roztwór odniesienia przygotowany został przez zmieszanie 500 μl 1 mM roztworu DPPH i 100 μl metanolu, próbki flawonoidów przygotowane przez zmieszanie 500 μl 1 mM roztworu DPPH i 100 μl 1 mM roztworu flawonoidu (kwercetyna, (-)epikatechina, (+)katechina, (+/-)katechina, rutyna) oraz dla pozostałych w stosunku 200 μl DPPH i 200 μl flawonoidu. Pomiar absorbancji/transmitancji roztworów dziesięciokrotnie rozcieńczonych odbywał się po czasie 10 minut. Miarą CPA była różnica absorbancji roztworu DPPH oraz roztworu po reakcji z próbką po czasie i obliczano ją według równania $\%CPA = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \cdot 100\%$, w którym: A_0 – absorbancja metanolowego roztworu rodnika DPPH, A_t – absorbancja metanolowego roztworu DPPH z próbką po czasie t.

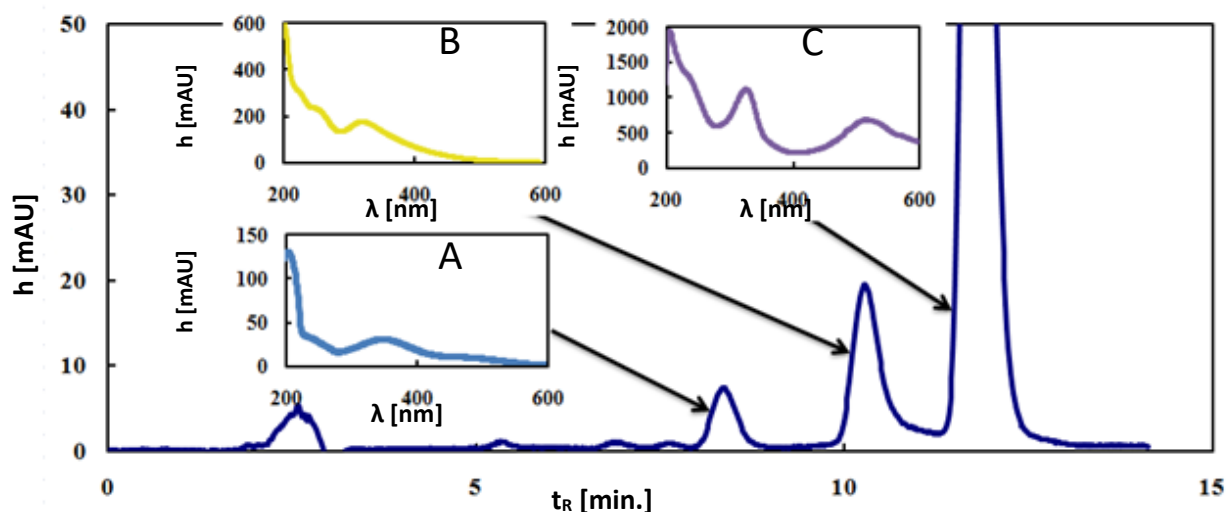
3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

Komercyjnie dostępny rodnik DPPH zawiera zanieczyszczenia, najprawdopodobniej postać zredukowaną, co widoczne jest w postaci małego pikę o czasie retencji 10,6 min. (Rys. 3). Wysoki o czasie 11,7 min. pochodzi od formy rodnikowej DPPH. Na chromatogramie widoczny jest również pik występujący przy 8,5 min., pochodzący od nieznanego związku. Podjęto się próby jego identyfikacji.



Rys. 3. Chromatogram 1 mM DPPH. Warunki chromatograficzne: kolumna - COSMOSIL 5C18-AR-II Waters (4,6 x 150 mm, 5 μm), faza ruchoma - metanol/woda (80:20, v/v), prędkość przepływu – 1ml/min, detektor UV-Vis – 517 nm, temperatura - 5°C.

Fig. 3. Chromatogram of 1 mM DPPH. Chromatographic conditions: column - COSMOSIL 5C18-AR-II Waters (4.6 x 150 mm, 5 μm), mobile phase - methanol/water (80:20, v/v), flow rate - 1ml/min, UV-Vis detector – 517 nm, temperature - 5°C.



Rys. 4. Chromatogram 1 mM DPPH zredukowanego kwasem galusowym. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3.

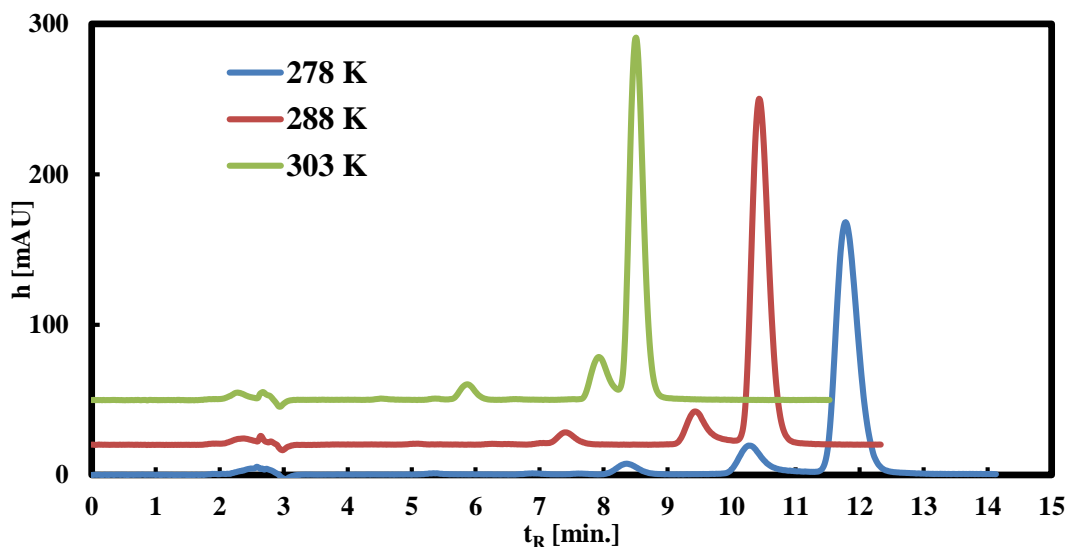
Fig. 4. Chromatogram of 1 mM DPPH reduced by gallic acid. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3.

Na Rys. 4. Przedstawiono chromatogram rozdzielonych form DPPH z widmami trzech związków, które zostały oznaczone symbolami A, B, C. Symbolem C zostało oznaczone widmo rodnika DPPH z charakterystycznym pasmem przy 517 nm, symbolem B zostało oznaczone widmo formy zredukowanej DPPH-H z charakterystycznym pasmem przy 320 nm oraz widmo A przypisane do związku niezidentyfikowanego – pasmo charakterystyczne przy 360 nm.

Początkowym etapem pracy był dobór odpowiednich warunków pomiarowych tak, aby piki rozdzielanych substancji znajdowały się w zakresie współczynników retencji pomiędzy 2-10. W tym zakresie współczynników retencji otrzymuje się optymalną sprawność rozdzielania i czas analizy. Z rozdzielaniem chromatograficznym mamy do czynienia wtedy, gdy współczynnik selektywności (α) jest większy od jedności. Współczynnik ten jest wielkością termodynamiczną, co przedstawia wzór:

$$-RT \ln \alpha = \Delta(\Delta G).$$

Rysunek 5 przedstawia temperaturową zmienność stałej podziału rodnika DPPH. Zależność ta jest zwana funkcją van't Hoffa. W zakresie badanych temperatur wykres jest liniowy, świadczy to o stałym mechanizmie retencji, wynikającym z ustalenia procesu równowagi podziału rodnika DPPH pomiędzy fazę stacjonarną i ruchomą.



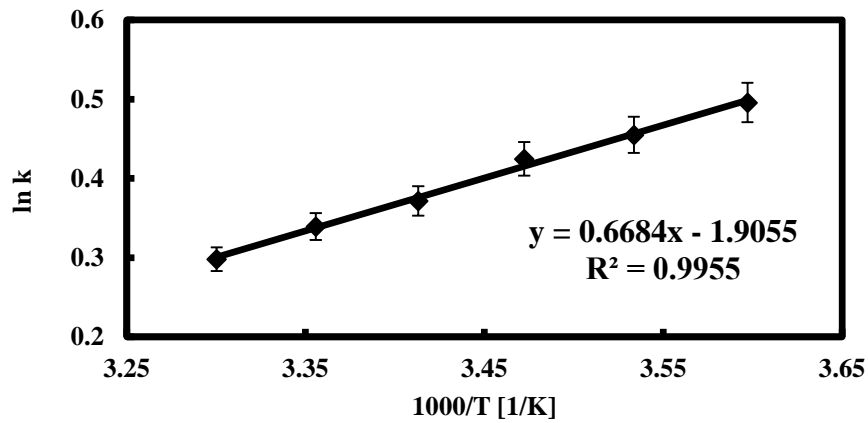
Rys. 5. Chromatogramy 1 mM DPPH zredukowanego kwasem galusowym w różnych temperaturach. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3, temperatura - 5, 15 i 30°C.

Fig. 5. Chromatograms of 1 mM DPPH reduced by gallic acid at various temperatures. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3, temperature - 5, 15 and 30°C.

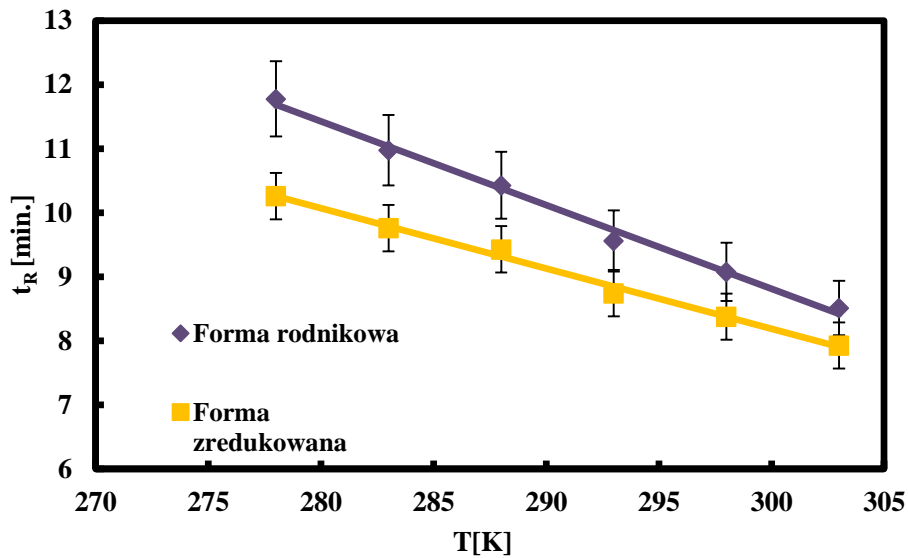
Tabela 1. Czasy retencji form rodnika DPPH oraz ich rozdzielczości (R_s) i selektywności (α) zależne od temperatury. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3.

Table 1. The retention times of DPPH radical forms and their resolutions (R_s) and selectivities (α) dependent on temperature. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3.

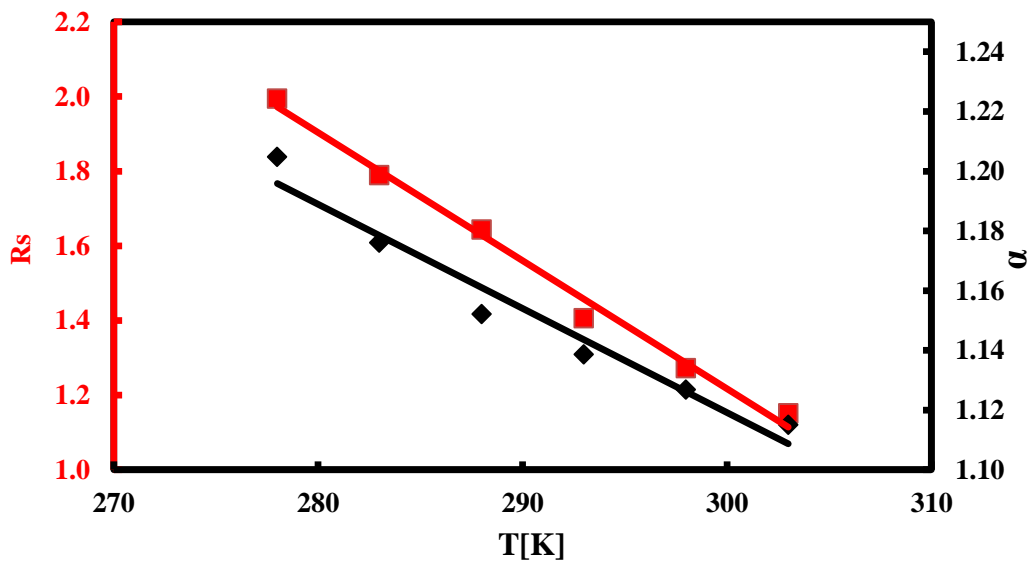
Temperatura [°C]	t_{R1} (DPPH-H) [min]	t_{R2} (DPPH') [min]	R_s	α
5	10,26	11,78	1,99	1,20
10	9,76	10,98	1,79	1,18
15	9,43	10,43	1,64	1,15
20	8,74	9,56	1,41	1,14
25	8,38	9,08	1,27	1,13
30	7,93	8,51	1,15	1,12



Rys. 6. Zależność $\ln k$ od $(1/T)$ dla 1 mM roztworu DPPH (wykres van't Hoffa). Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3.
 Fig. 6. Dependence of $\ln k$ from $(1/T)$ for 1 mM DPPH solution (van't Hoff graph). Chromatographic conditions the same as on Fig. 3.



Rys. 7. Zależność czasu retencji od temperatury. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3.
 Fig. 7. Dependence of retention time on temperature. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3.

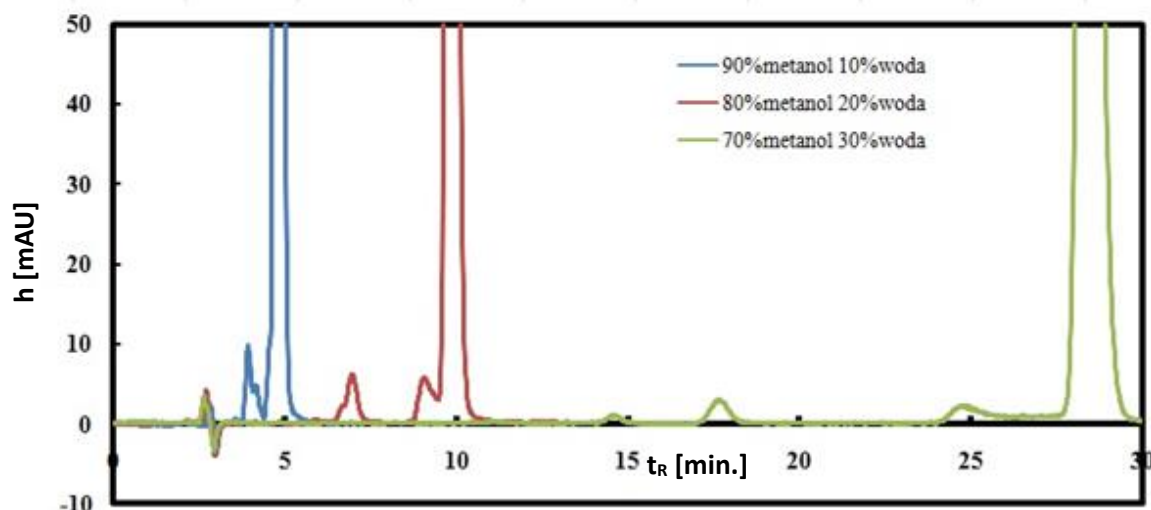


Rys. 8. Zależność selektywności i rozdzielczości od temperatury. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3.
 Fig. 8. Dependence of selectivity and resolution on temperature. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3.

Z uzyskanych wyników możemy odczytać, że obniżenie temperatury zwiększa selektywność jak i wartość rozdzielczości (Rys. 8) oraz rozdzielenie formy rodnikowej od zredukowanej DPPH (Rys. 7). Z drugiej jednak strony obniżenie temperatury ma wpływ na lepkość cieczy stanowiącej fazę ruchomą, przez co wydłuża się czas retencji oraz pogarsza się sprawność układu (Rys. 6). W cieczach wzrost temperatury wpływa na obniżenie lepkości ze względu na zwiększenie odległości pomiędzy cząsteczkami. Lepkość eluentów ma wpływ na wysokość ciśnienia stosowanego w celu uzyskania przepływu rozpuszczalnika przez kolumnę. Zależność temperatury od lepkości podaje przekształcone równanie Arrheniusa – Guzmanna:

$$\eta = Ae^{\frac{E}{RT}}$$

w którym: E – energia aktywacji przepływu lepkiego, A – wielkość charakterystyczna dla danej cieczy zależna od ciężaru cząsteczkowego i objętości molowej [6].



Rys. 9. Chromatogramy 1 mM DPPH o różnym składzie fazy ruchomej. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3, temperatura - 20°C.

Fig. 9. Chromatograms of 1 mM DPPH with different composition of the mobile phase. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3., temperature - 20°C.

Tabela 2. Wybrane parametry fizykochemiczne metanolu i wody [7, 8].

Table 2. Selected physicochemical parameters of methanol and water [7, 8].

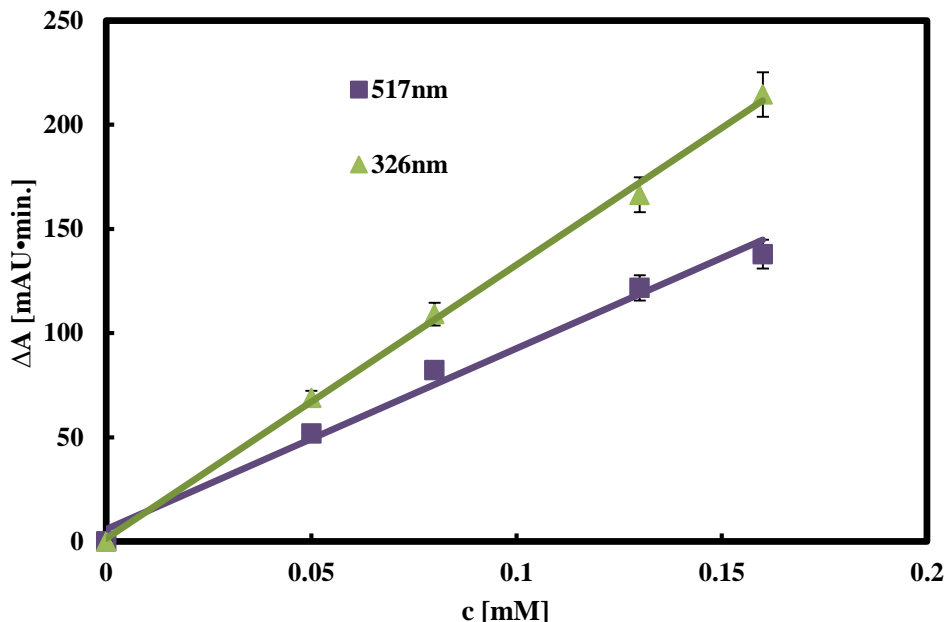
Rozpuszczalnik	Gęstość ρ [g/ml]	Lepkość η [cP] w temp.		Parametr rozpuszczalności Hildenbranda δ [$1/(\text{cal}^{1/2} \text{cm}^{-3/2})$]	Index polarności P'	Graniczna długość pochłanianej fali UV [nm]
		0°C	20°C			
Metanol	0,80	0,820	0,597	60,8	6,6	205
Woda	1,00	1,792	1,005	98,2	9,0	170

Okazało się, że faza ruchoma metanol/woda 70:30 (v/v) spowodowała znaczne wydłużenie czasu retencji dwóch form DPPH, co pozwoliło na uzyskanie najlepszego rozdzielania (Rys. 9). W celu skrócenia czasu analizy bardziej korzystne było zastosowanie fazy ruchomej metanol/woda 80:20 (v/v) w temperaturze 20°C. Aby odpowiednio ustalić skład fazy ruchomej należy uwzględnić moc elucyjną zastosowanych rozpuszczalników oraz ich parametry rozpuszczalności Hildenbranda (Tabela 2). Wielkością opisującą moc elucyjną rozpuszczalników jest indeks polarności (P'), który uwzględnia oddziaływania pomiędzy cząsteczkami rozpuszczalnika oraz oddziaływania cząsteczek rozpuszczalnika z cząsteczkami rozdzielanych związków [9]. Parametr Hildenbranda opisuje wypadkową specyficznych oddziaływań międzymolekularnych: dyspersyjnych Londona, dipolowych i specyficznych (protonodonorowych i protonoakceptorowych). Rozpuszczalniki polarne posiadają cechują się dużymi wartościami parametru rozpuszczalności.

Wartość całkowitego potencjału antyoksydacyjnego dostarcza nam wielu cennych informacji w przypadku gdy badana próbka posiada nieznaną skład. Pomiar CPA jest korzystniejszy w przypadku złożonych próbek biologicznych, gdyż nie ma konieczności wyodrębniania poszczególnych składników próbki. Suma aktywności antyoksydacyjnej pojedynczych składników próbki może się różnić od jej

całkowitego potencjału antyoksydacyjnego, ponieważ CPA uwzględnia również reakcje zachodzące pomiędzy antyoksydantami zawartymi w próbce, czy też ich synergizm.

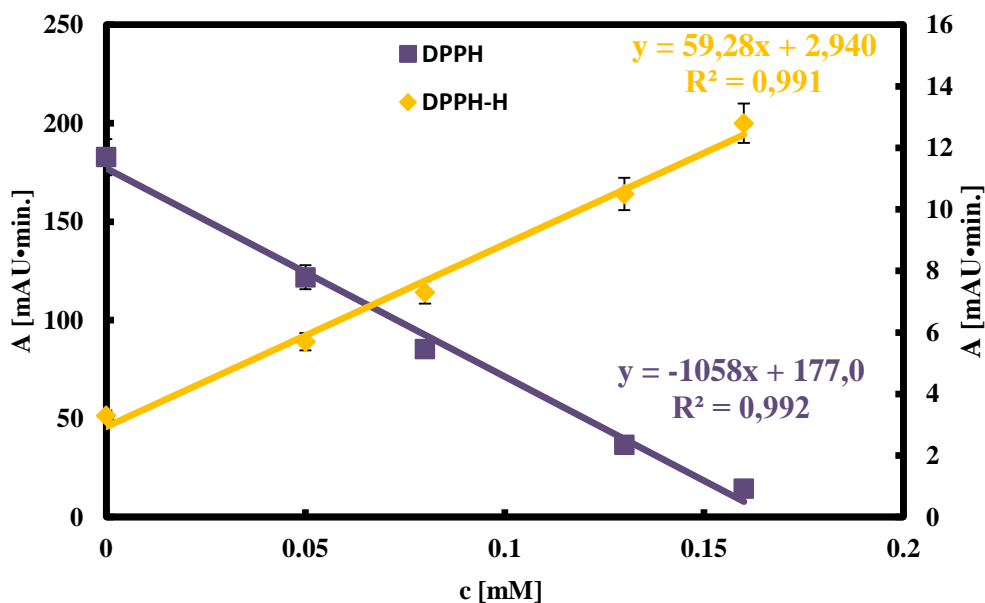
Na Rys. 10 przedstawiono różnicę w polu powierzchni pików czystego rodnika DPPH i po reakcji z kwercetyną w zależności od stężenia kwercetyny przy dwóch długościach fal 517 i 326 nm. Wartość różnicy w polu powierzchni pików wzrasta proporcjonalnie wraz ze wzrostem stężenia antyoksydanta i wykazuje liniową zależność zarówno przy długości fali absorbującej barwę fioletową – 517 nm (spadek stężenia formy rodnikowej po reakcji z kwercetyną) jak i przy długości absorbancji barwy żółtej – 326 nm (wzrost stężenia formy zredukowanej po reakcji z kwercetyną).



Rys. 10. Różnice pola powierzchni pików DPPH przed i po reakcji z kwercetyną uzyskane dla różnych jej stężeń przy 517 i 326 nm. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3.

Fig. 10. Differences of the areas of the DPPH peaks before and after its reaction with quercetin obtained at various concentrations at 517 and 326 nm. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3.

Na Rys. 11 przedstawiono zależność zmiany pola powierzchni pików formy rodnikowej i zredukowanej DPPH od stężenia kwercetyny. Zależności te mają przebieg liniowy zarówno w przypadku stężenia formy rodnikowej (linia fioletowa) jak i wzrostu stężenia formy zredukowanej (linia żółta).



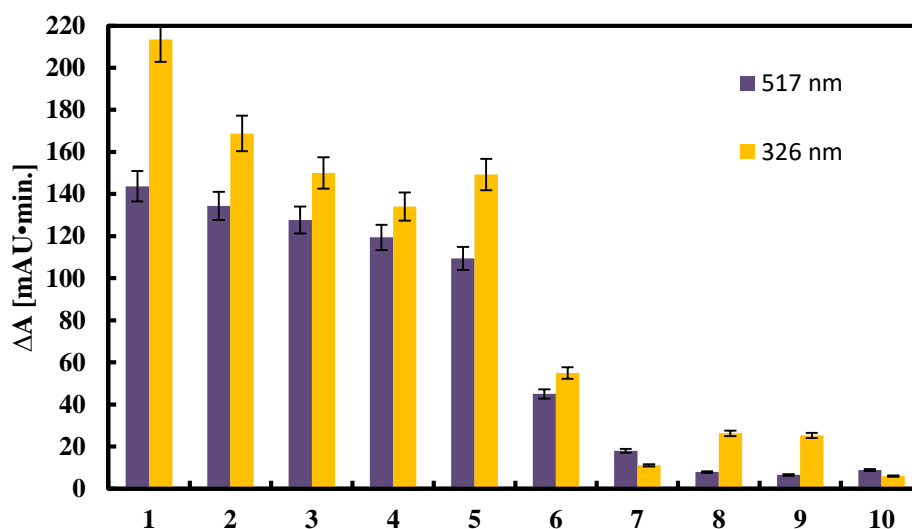
Rys. 11. Zależność pola powierzchni pików formy rodnikowej i zredukowanej DPPH od stężenia kwercetyny. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3.

Fig. 11. Dependence of the peak area of the radical and reduced forms of DPPH on the concentration of quercetin. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3.

Tabela 3. Flawonoidy uszeregowane w zależności od mocy antyoksydacyjnej (1 - najsilniejszy, 10 - najslabszy).

Table 3. Flavonoids ranked according to the antioxidative power (1 - the strongest, 10 - the weakest).

1	kwercetyna	6	hesperetyna
2	(-) epikatechina	7	flawanon
3	(+) katechina	8	neohesperidyna
4	(+/-) katechina	9	hesperedyna
5	rutyna	10	biochanina

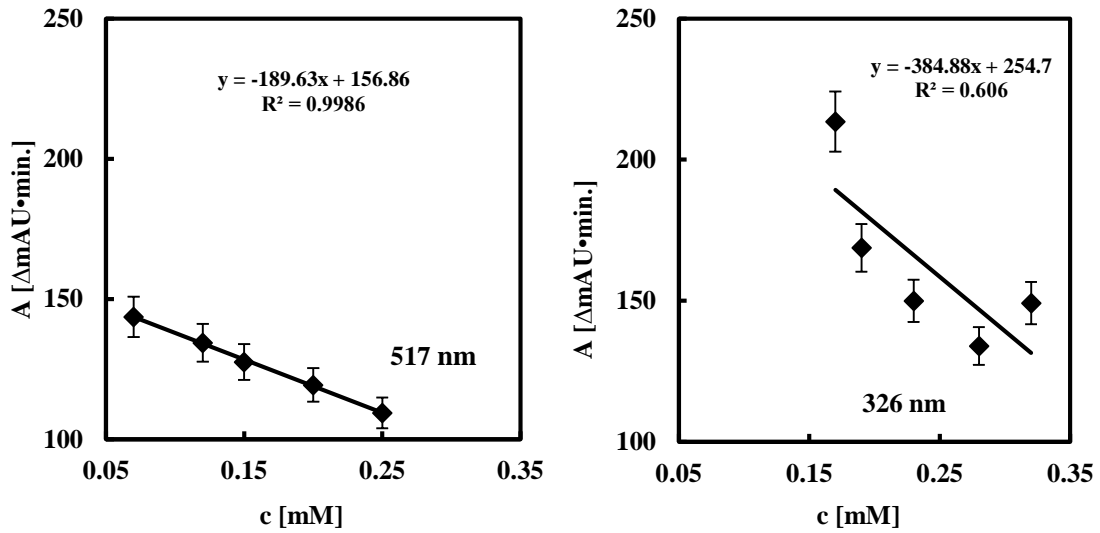


Rys. 12. Różnice w polu powierzchni pików DPPH i DPPH po reakcji z flawonoidami uzyskane metodą RP-HPLC-UV przy długościach fal 517 i 326 nm. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3.

Fig. 12. Differences of the peak areas of DPPH and DPPH after reaction with various flavonoids (see Table 3) obtained by RP-HPLC-UV at 517 and 326 nm. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3.

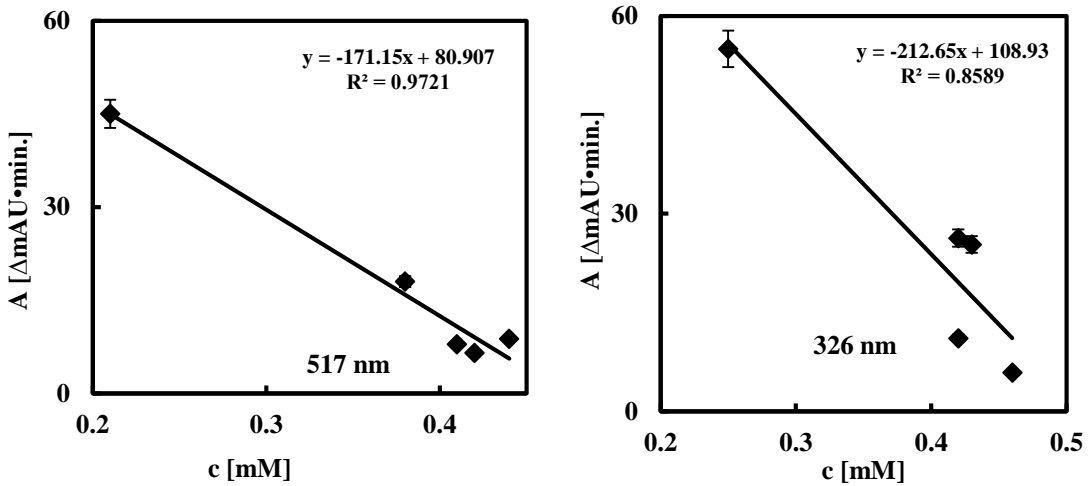
Wartość całkowitego potencjału antyoksydacyjnego możemy wyznaczyć zarówno za pomocą spadku wysokości/pola powierzchni pików formy rodnikowej (517 nm) jak i za pomocą wzrostu wysokości/pola powierzchni pików formy zredukowanej DPPH (326 nm). Na rysunku 12 przedstawiono różnice w polu powierzchni pików czystego DPPH i po reakcji z flawonoidem. Wyniki uzyskane przy dwóch długościach fal wykazują dobrą korelację (Rys. 13 i 14).

Wartości CPA flawonoidów metodą HPLC potwierdzone zostały wynikami otrzymanymi metodą fotometryczną (Rys. 15). Metoda HPLC-DPPH posiada wiele zalet w stosunku do metody fotometrycznej m.in.: możliwość rozdzielenia dwóch form DPPH: rodnikowej (fioletowej) i zredukowanej (żółtej), otrzymanie widm przy różnych długościach fal, badanie próbek barwnych. Najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne wykazuje kwercetyna. Występuje ona w postaci aglikonu, posiada 5 grup -OH (w pozycji 3, 5, 7, 3', 4'). W jej budowie obecne jest wiązanie podwójne przy atomach węgla C2 i C3 oraz grupa karbonylowa przy C4. Te elementy struktury kwercetyny mają wpływ na jej zdolność do zmiatania wolnych rodników.



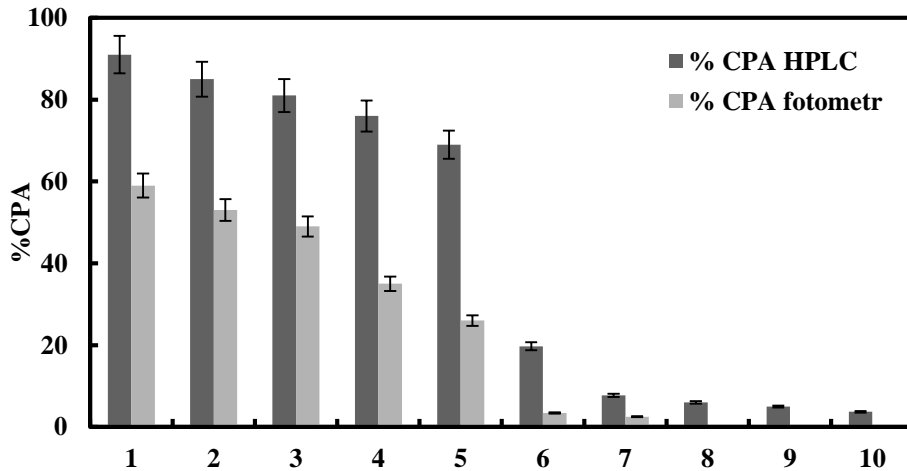
Rys. 13. Zależność CPA od stężenia DPPH, stężenie flawonoidów – 0,2 mM. Badane flawonoidy (według spadku wartości CPA): kwercetyna, (-)epikatechina, (+)katechina, (+/-)katechina, rutyna.

Fig. 13. Dependence of TAP value on DPPH concentration after its reaction with the flavonoid at concentration 0.2 mM. Tested flavonoids (according to the drop TAP values): quercetin, (-)epicatechin, (+)catechin, (+/-)catechin, rutin.



Rys. 14. Zależność CPA od stężenia DPPH, stężenie flawonoidów – 0,5 mM. Badane flawonoidy (według spadku wartości CPA): hesperetyna, flawanon, neohesperetyna, hesperedyna, biochanina.

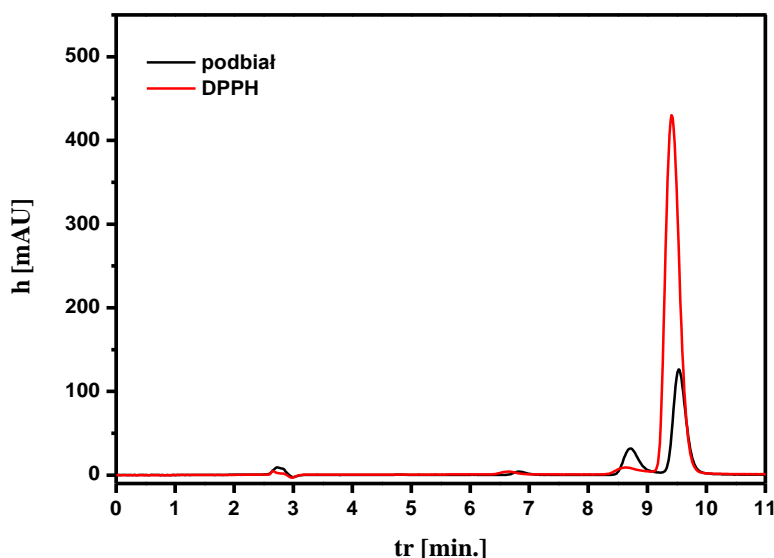
Fig. 14. Dependence of TAP value on DPPH concentration after its reaction with the flavonoid at concentration 0.5 mM. Tested flavonoids (according to the drop in TAP values): hesperetin, flavanone, neohesperetin, hesperadin, biochanin.



Rys. 15. Wartości CPA flawonoidów uzyskane metodą RP-HPLC-UV i fotometryczną. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3.

Fig. 15. Comparison of TAP values of various flavonoids obtained by RP-HPLC-UV and photometric methods. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3.

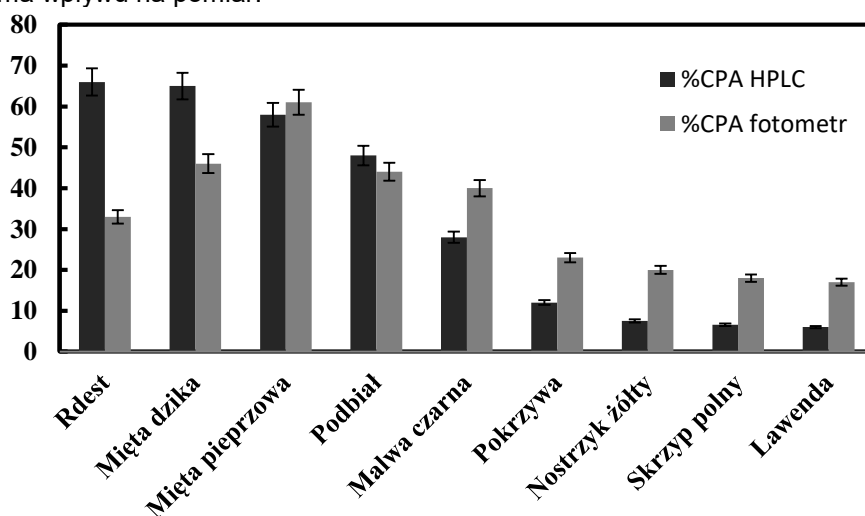
Na Rys. 16 przedstawiono chromatogramy czystego rodnika DPPH i po jego reakcji z naparem z podbiału. Jak widzimy pod wpływem antyoksydantów zawartych w naparze z podbiału zmniejsza się wysokość/pole powierzchni pików formy rodnikowej DPPH na korzyść formy zredukowanej DPPH-H. Miarą zdolności do zmiatania wolnych rodników przez daną próbkę jest różnica w polu powierzchni bądź wysokości pików.



Rys. 16. Chromatogramy 1 mM DPPH i DPPH po reakcji z naparem z podbiału 0,05 g/ml. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3.

Fig. 16. Chromatograms of 1 mM DPPH and DPPH after its reaction with coltsfoot at concentration of 0.05 g/ml. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3.

Na wykresie (Rys. 17) przedstawiono oszacowane wartości CPA dla wybranych naparów z ziół uzyskane za pomocą dwóch metod: RP-HPLC-UV i fotometrycznej. Widzimy, że wartości oszacowane dwiema metodami w przypadku ziół o silnych właściwościach antyoksydacyjnych różnią się. W HPLC właściwości antyoksydacyjne naparów ziół ułożone są w następującej kolejności począwszy od najsilniejszego: rdest ptasi> dzika mięta> mięta pieprzowa> podbiał> malwa czarna> pokrzywa> nostryk żółty> skrzyp polny> lawenda, natomiast w metodzie fotometrycznej kolejność jest następująca: mięta pieprzowa> dzika mięta> podbiał> rdest ptasi> malwa czarna> pokrzywa> nostryk żółty> skrzyp polny> lawenda. Przyczyną powstawania tych różnic mogą być zakłócenia spowodowane barwą naparów z ziół. Intensywne pomarańczowe i zbliżone zabarwienie naparów z mięty i podbiału mogło być przyczyną fałszowania wyników w metodzie fotometrycznej. Metoda HPLC daje bardziej wiarygodne wyniki, ponieważ barwa próbki nie ma wpływu na pomiar.



Rys. 17. Wartości CPA badanych ziół uzyskane metodami RP-HPLC-UV i fotometryczną. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 3.

Fig. 17. Comparison of TAP values of various herbs obtained by RP-HPLC-UV and photometric methods. Chromatographic conditions the same as on Fig. 3.

4. Wnioski (Conclusions)

Metodę HPLC można stosować do rozdzielania formy rodnikowej DPPH od zredukowanej DPPH-H. Wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych z detekcją UV może być stosowana do pomiaru całkowitego potencjału antyoksydacyjnego naparów ziół oraz flawonoidów. Wykorzystując reakcję rodnika DPPH z antyoksydantem oraz chromatograficzne rozdzielanie różnych form DPPH możemy oszacować całkowitą zdolność antyoksydacyjną badanych próbek naparów z ziół oraz flawonoidów poprzez spadek stężenia formy rodnikowej DPPH lub wzrost stężenia formy zredukowanej DPPH-H po reakcji z próbką. Wyniki otrzymane za pomocą HPLC są porównywalne z otrzymanymi metodą fotometryczną dla ekstraktów ziół słabo zabarwionych, natomiast dla silnie zabarwionych uzyskano wyższą selektywność metodą chromatograficzną. Metoda DPPH-HPLC pozwala w sposób szybki i prosty na oszacowanie CPA próbek kolorowych. Jest metodą lepszą od metody fotometrycznej, ponieważ nie występują w niej zakłócenia spowodowane barwą próbki.

5. Literatura (Literature)

1. P. Ionita, *Is DPPH stable free radical a good scavenger for oxygen active species?*, Chem. Pap., 59 (2005) 11-16.
2. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Use a free radical method to evaluate antioxidant activity*, LWT-Food, Sci. Technol., 28 (1995) 25-30.
3. T. Yamaguchi, H. Takamura, T. Matoba, J. Terao, *HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 62 (1998) 1201-1204.
4. D. Chandrasekar, K. Madhusudhana, S. Ramakrishna, P.V. Diwan, *Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: a sensitive screening method for polyherbal formulations*, J. Pharm. Biomed. Anal., 40 (2006) 460-464.
5. A. Boudier, J. Tournebize, G. Bartosz, S. El Hani, R. Bengueddour, A. Sapin-Minet, P. Leroy, *High performance liquid chromatographic method to evaluate the hydrogen atom transfer during reaction between 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical and antioxidants*, Anal. Chim. Acta, 711 (2012) 97-106.
6. P.W. Atkins, *Podstawy chemii fizycznej*, PWN, Warszawa 2001.
7. H. Burrell, *The challenge of the solubility parameter concept*, J. Paint Technol., 40 (1968) 197-208.
8. A. Jędrzejczuk, K. Góralczyk, K. Czaja, P. Struciński, J.K. Ludwicki, *Wysokosprawna chromatografia cieczowa – jej zastosowanie w analizie pozostałości pestycydów*, Roczniki PZH, 2 (2001) 127-138.
9. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, *Introduction to modern liquid chromatography*, John Wiley & Sons, United States of America, (1976) 250.
10. K. Mishra, H. Ojha, N.K. Chaudhury, *Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH• assay: a critical review and results*, Food Chem., 130 (2012) 1036-1043.
11. A.M. Osman, *Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between (DPPH•) and the oxidized form of the polyphenol*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 412 (2011) 473-478.
12. S. Milardović, D. Ivekovic, B.S. Grabarić, *A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical*, Bioelectrochem., 68 (2006) 175-180.