

Pomiar zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH

1. Rola przeciwutleniaczy w organizmach żywych

Szczególne znaczenie w utrzymaniu prawidłowej równowagi potencjału utleniająco-redukującego w organizmie człowieka ma żywność. Człowiek w czasie swojego życia spożywa ok. 300 ton pokarmów i napojów. Ta ilość różnorodnych substancji chemicznych podlega złożonemu metabolizmowi w przemianach o charakterze katabolicznym i analitycznym. Wśród czynnych substancji zawartych w pożywieniach ważną funkcję pełnią grupa związków określonych mianem przeciwutleniaczy. Związki te nie są syntezowane przez organizm człowieka, więc, zapewnianie prawidłowej ilości dostarczania organizmowi tych związków w całodziennej racji pokarmowej jest uważane za jeden z podstawowych warunków prawidłowego żywienia i utrzymania dobrego zdrowia.

W ostatnich latach znacznie wzrosło zastosowanie roślinnych produktów w dietetyce, pielęgnacji i profilaktyce wielu schorzeń. Substancje roślinne, niemające wartości odżywczej, charakteryzują się różnorodnością budowy chemicznej i zaliczane są m.in. do witamin. Ich biologiczna aktywność często wiąże się ze zdolnością antyoksydacyjną. Wiele związków nie jest syntetyzowanych przez organizm człowieka, więc dostarczanie ich ma duże znaczenie, zwłaszcza w ochronie przed wolnymi rodnikami.

Odpowiedni poziom witamin C i E skutecznie obniża ryzyko zachorowania na zawał serca, a wprowadzenie zwiększonej dawki beta – karotenu zmniejsza prawdopodobieństwo wylewu. Przeciwutleniacze wzmacniają także układ odpornościowy. Regularne podawanie dzieciom witaminy A znacznie zmniejsza liczbę zachorowań na zakażenia układu oddechowego. Ponadto przeciwutleniacze zwiększają płodność i zmniejszają stan zapalny w zapaleniu stawów. Mają duży wpływ na zdrowie. Z przeprowadzonych badań wynika, iż niski poziom witaminy A i E wiąże się z chorobą Alzheimera. U osób starszych mających niską zawartość witaminy C we krwi, ryzyko zachorowania na zaćmę jest jedenaście razy większe, niż u osób mających wysoki poziom tej witaminy. U chorych na raka płuc stwierdzano niski poziom witaminy A.

1.1. Przeciwutleniacze roślinne i ich podział

Głównym źródłem przeciwutleniaczy są produkty i surowce pochodzenia roślinnego. Dlatego nasza codzienna dieta powinna być szczególnie wzbogacana w owoce i warzywa. Związki te ze względu na różnorodność ich występowania, różnice w budowie czy mechanizmie działania podzielono na wiele sposobów. Wśród związków natywnie występujących w żywności

i charakteryzujących się aktywnością antyoksydacyjną należy wymienić następujące klasy związków :

- ✓ karotenoidy (likopen, luteina) występujące w szpinaku, pomarańczach, brokułach, pomidorach itd.;
- ✓ bioflawonoidy (flawony, flawonole, moryna, flawanony, izoflawony) występują w herbacie, czerwone wino, warzywa, owoce, fasola, brokuły, jabłka itd.;
- ✓ fitosterole (sitosterol) występują w olejach roślinnych: słonecznikowy, rzepakowy;
- ✓ taniny (katechiny) obecne w herbacie zielonej, czerwonym winie, winogronach,
- ✓ chlorofile (chlorofil A, chlorofiliny), których bogatym źródłem są zielone części roślin;
- ✓ terpeny (olejki eteryczne) obecne w pomarańczach (limonen), cytrynach (limonen, cytral);
- ✓ związki allilowe (siarczek diallilu) występuje w warzywach cebulowych;
- ✓ pochodne indolowe (alkaloidy indolowe), których źródłem są brukselka, kalafior, kapusta, brokuł.

2. Metody badań skuteczności antyoksydantów

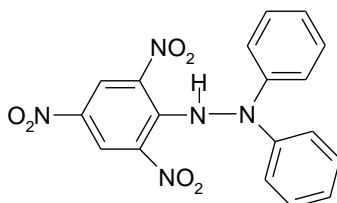
Przeciwutleniacze charakteryzuje zdolność do dezaktywacji rodników, zgodnie z dwoma podstawowymi mechanizmami reakcji: (1) mechanizm przeniesienia atomu wodoru, tzw. HAT oraz (2) mechanizm przeniesienia pojedynczego elektronu, tzw. SET. Oba te mechanizmy mogą występować równolegle, natomiast mechanizm dominujący jest zależny od: rozpuszczalności, współczynnika podziału, właściwości przeciwutleniacza oraz układu stosowanych rozpuszczalników.

Metody oznaczenia zdolności przeciwutleniających można podzielić na addycyjne oraz postaddycyjne, uwzględniając zastosowany system pomiarowy.

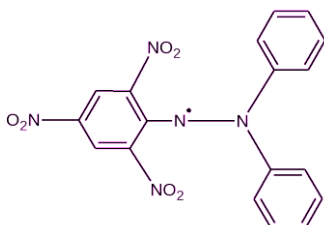
W metodach addycyjnych aktywność jest oznaczana jako opóźnienie procesu rozpoczęcia działania dodanego oksydanta na antyoksydant wskaźnikowy, w wyniku łatwiejszego, a zatem wcześniejszego utleniania w tym procesie antyoksydantów z badanej próbki. W metodach postaddycyjnych aktywność jest oznaczenia poprzez pomiar zmiany stężenia testowego reagenta lub produktu (np. $\text{ABTS}^{•+}$, DPPH^{\bullet} , Cu^{+2} , Fe^{+2}) w wyniku bezpośredniej reakcji chemicznej lub rodnikowej odczynnika i antyoksydantów obecnych w próbce.

2.1. Metoda z zastosowaniem odczynnika DPPH

Związek 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH), (rys.2) jest jednym z kilku stabilnych i komercyjnie dostępnych rodników azotowych. Roztwory tego związku mają barwę purpurową z maksimum absorpcji przy długości fali 515nm. W czasie reakcji redukcji barwa roztworu zanika; postęp można monitorować spektrofotometrycznie.



Rys.2. Forma zredukowana 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH)



Rys.3. Forma rodnikowa 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH)

Ograniczeniem tej metody jest fakt, że DPPH rozpuszcza się jedynie w rozpuszczalnikach organicznych i nie pozwala na oznaczenie antyoksydantów hydrofilowych. Zaletą tej metody jest jej szybkość i dokładność, a otrzymane wyniki są odtwarzalne i porównywalne z wartościami uzyskanymi podczas innych badań opartych na zdolności zmiatania wolnych rodników.

2.2. Metoda z zastosowaniem odczynnika ABTS

Inną metodą, która również jest często wykorzystywana do badań jest test, w którym wolnym rodnikiem jest [2,2-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)]. Zastosowanie odczynnika ABTS umożliwia pomiar całkowitej aktywności antyoksydacyjnej próbek, w tym płynów ustrojowych i próbek żywności. Rodniki ABTS tworzą się podczas reakcji chemicznej. Utlenianie ABTS następuje natychmiast, jednak maksymalną wartość absorpcji i pełną stabilność rodnik uzyskuje po upływie 6 godzin. Rodniki generowane podczas reakcji mają barwę niebieskozieloną.

Stosunkowo prosty sposób wykonania oznaczeń w metodzie ABTS sprawia, że jest to analiza rutynowo używana do oznaczenia zdolności antyoksydacyjnych próbek przeciwutleniaczy zarówno hydrofobowych jak i hydrofilowych. Dodatkowymi zaletami są duża szybkość reakcji karborodnika ABTS z przeciwutleniaczami oraz rozpuszczalność ABTS zarówno w wodnych, jak i organicznych rozpuszczalnikach.

2.3. Metoda z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocaltea

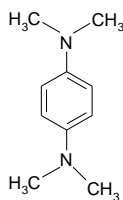
Do oznaczeń potencjału przeciwutleniającego używa się również metody z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteau (F-C). Metoda ta służy do analizy całkowitej zawartości fenoli. Oparta jest na barwnej reakcji między polifenolami a odczynnikiem. Jej zaletą jest duża prostota i użyteczność do standaryzacji materiałów biologicznych, wadą zaś mała specyficzność.

Odczynnik F-C jest przygotowywany przez zmieszanie wolframianu sodu (Na_2WO_4), molibdenianu sodu (Na_2MoO_4), siarczanu litu (Li_2SO_4), wody bromowej oraz stężonych kwasów solnego i fosforowego. Nie określono dokładnej struktury związku powstającego w czasie przygotowania tego odczynnika. Przypuszczalnie jest to heteropolifosfowolframian molibdenu. Daje on, w wyniku odwracalnej reakcji jedno- lub dwuelektronowej redukcji, niebiesko zabarwiony związek $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$. Molibden Mo(VI) przyjmuje elektron i redukowany jest do Mo(V). Związki fenolowe reagują z odczynnikiem F-C jedynie w środowisku alkalicznym (pH 10). Tylko w tych warunkach powstaje anion fenolowy, który redukuje odczynnik F-C. Mechanizm reakcji opiera się na przenoszeniu elektronu, a tworzenie niebieskiego barwnika w reakcji związków fenolowych z odczynnikiem F-C jest niezależne od struktury fenoli.

Powyższa metoda znajduje zastosowanie w analizie ekstraktów roślinnych, żywności, a także leków, których elementami są grupy fenolowe, jak np. salbutamol i morfina.

2.4. Metoda z użyciem odczynnika DMPD

Metoda z zastosowaniem odczynnika dichlorowodorekdimetylo-p-fenylendiaminy (DMPD) jest również zaliczana do metod opartych na pomiarze stopnia odbarwienia roztworu odczynnika. Źródłem rodników w tym teście jest DMPD.



Rys.4. Dichlorowodorekdimetylo-p-fenylendiaminy (DMPD)

W środowisku kwasowym i w obecności utleniaczy DMPD tworzy stabilny, barwny kationodnik

2.5. Metoda oznaczenia zdolności redukowania jonów żelaza – FRAP

Metoda FRAP używana jest do oznaczania zdolności przeciwutleniającej komórek i tkanek. Służy także do pomiaru stresu oksydacyjnego i jego skutków w organizmie. Dostarcza informacji na temat oporu stawianego uszkodzeniom spowodowanym przez utleniacze. Stosowano ją przede wszystkim do oznaczenia siły redukcyjnej płynów ustrojowych

Metoda oznaczeń zdolności redukowania jonów żelaza (FRAP) pozwala na bezpośrednie określenie redukujących zdolności czystego związku, mieszaniny substancji, czy też próbki materiału biologicznego. Zasada działania tej metody opiera się na pomiarze redukcji związku TPTZ (kompleks żelazowo-2,4,6-tripirydylo-S-tiazyny) pod wpływem działania antyoksydantu. Obserwuje się zmianę zabarwienia substratu. Z bezbarwnego odczynnika powstaje intensywnie niebieski produkt.

Metoda ta jest tania, reagenty łatwo przygotować, a otrzymane wyniki są powtarzalne. Dodatkową zaletą jest szybki przebieg analizy.

Wariantem metody FRAP jest metoda oznaczania zdolności redukowania miedzi(II) (CRA). Różnica polega na tym, że zamiast żelaza redukowane są jony miedzi. Pod wpływem działania przeciwutleniaczy obecnych w próbce kompleks Cu(II) jest redukowany do barwnego kompleksu miedzi Cu(I). W metodzie tej wykorzystuje się pomiar wartości absorpcji tego barwnego produktu. Istnieją dwie opcje tej metody. Pierwsza z nich wykorzystuje związek o nazwie bathokuproina (2,9-dimetylo-4,7-difenylo-1,10-fenantrolina), który tworzy pomarańczowy kompleks z miedzią Cu(I), będący chromoforem.

2.6. Metody wykorzystujące mechanizm reakcji przeniesienia atomu wodoru-HAT

Metody korzystające z mechanizmu reakcji przeniesienia atomu wodoru – HAT poleca się do pomiaru dezaktywacji wolnych rodników, zachodzącej w wyniku oddania atomu wodoru przez antyoksydant. Przeciwutleniacz obecny w analizowanej próbce i modelowy przeciwutleniacz o znanym stężeniu, zwany „sondą molekularną” konkurują ze sobą o możliwość reakcji z rodnikiem nadtlenkowym.

Do analiz opierających się na mechanizmie HAT zaliczamy metodę oznaczenia zdolności absorpcji rodników tlenowych (ang. *oxygenradicalabsorbancecapacity* ORAC). Test ten opiera się na pomiarze spadku fluorescencji tzw. sondy molekularnej spowodowanym uszkodzeniem

chemicznym wywołanym działaniem wolnych rodników. Metoda ta jest bardziej czuła niż metoda FRAP. Sonda molekularna w wyniku reakcji z termicznie generowanymi rodnikami nadtlenkowymi ulega przekształceniu w produkt pozbawiony właściwości fluorescencyjnych.

Ćwiczenie

Pomiar zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH

Cel ćwiczenia: Zapoznanie z metodyką pomiaru zdolności antyoksydacyjnych metodą DPPH, poznanie skuteczności antyoksydacyjnej wybranych związków.

1. Materiał badawczy: herbata zielona, herbata czarna, herbata czerwona, bratek, mięta, liść brzozy, ziele skrzypu, kwiatu bzu czarnego, kwiatostan głogu, kawa mielona, kawa rozpuszczalna, kwas askorbinowy, kwas kawowy, kwercetyna

2. Odczynniki:

- metanol
- DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl),

3 Sprzęt:

- spektrometr Jasco UV-VIS_NIR V670,
- waga techniczna WPT 2, RADWAG,
- waga analityczna AS 220/C/2, RADWAG,
- drobny sprzęt laboratoryjny (zlewki, kolba miarowa, pipety, lejki, szalki Petriego, cylinder miarowy).

4 Wykonanie oznaczenia:

W celu sporządzenia roztworu rodnika DPPH odważyć na wadze analitycznej 9,8 mg DPPH i rozpuścić w 50 cm³ metanolu. Roztwór mieszać na mieszadle magnetycznym przez 1h, aż do

całkowitego rozpuszczenia barwnika. Następnie roztwór przenieść do butelki z ciemnego szkła i przechowywać w ciemności.

Uwaga: Do dalszych pomiarów należy przygotować rozcieńczenie roztworu DPPH. W tym celu: przenieść ilościowo 25 ml wyjściowego roztworu DPPH do kolby miarowej na 100 ml, dopełnić kolbę do kreski metanolem. Wymieszać aż kolor roztworu będzie jednolity. Przebrać roztwór do butelki z ciemnego szkła. Absorbancja tak przygotowanego roztworu przy długości fali 515 nm powinna wynosić 0,9.

Przygotowanie roztworów i naparów antyoksydantów.

- ✓ Przygotować 1% napary: 1 g badanego oksydantu zalać 100 ml wody o temperaturze 90 °C. Po upływie odpowiednio 1, 5, 15 minut napar przesączyć i ochłodzić do temperatury pokojowej. Ekstrakty rozcieńczyć wodą w stosunku 1:1.
- ✓ 1 mM wodny roztwór kwasu askorbinowego ($M = 176,12 \text{ g/mol}$)
- ✓ 1 mM metanolowe roztwory kwasu kawowego ($M = 180,16 \text{ g/mol}$) i kwercetyny ($M = 338,27 \text{ g/mol}$)

Ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej

Do kuwety dodać 2 cm³ świeżo przygotowanego roztworu rodnika DPPH oraz 200 μl badanego roztworu. Po 5 minutach zmierzyć absorbancję próby badanej względem próby ślepej (2 cm³ metanolu i 200 μl wody) przy długości fali 515 nm. Jako próbę kontrolną należy przygotować 2 cm³ roztworu rodnika DPPH i 200 μl wody. Dla każdego roztworu badanego wykonać 3-krotny pomiar absorbancji.

Dla próbek kwercetyny i kwasu kawowego ślepą próbą jest sam metanol, a próbą kontrolną 2 cm³ roztworu rodnika DPPH i 200 μl metanolu.

Obliczenia

Zdolność badanego antyoksydantu obliczyć ze wzoru:

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

A_0 – absorbancja rodnika DPPH

A – średnia wartość absorbancji badanego roztworu zawierającego antyoksydant

Na podstawie uzyskanych wyników sporządzić tabelkę, podając w kolumnach średnią wartość absorpcji i % inhibicji dla badanych roztworów oraz wyciągnąć wnioski odnośnie ich zdolności antyoksydacyjnej.

BIBLIOGRAFIA

Grajka W., *Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne*, Wydawnictwo Naukowo- Techniczne, Warszawa 2005; 50-80, 120-150, 532-560.

Bartosz G., *Druga twarz tlen. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003; 54-98.

Le Cren F., *Przeciwutleniacze. Rewolucja w medycynie XXI wieku*, Wydawnictwo Klub dla Ciebie 2006

Ball S., *Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka*, Warszawa 2001.

Bartoń HJ., Folta M., Zachwieja Z., *Zastosowanie metod FRAP, ABTS i DPPH w badaniu aktywności antyoksydacyjnej produktów spożywczych*. Nowiny Lek 2005; 510-513.