

KAMIL SIERŻANT, KATARZYNA PYRKOSZ-BIARDZKA,  
JANINA GABRIELSKA

## WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCE NATURALNYCH EKSTRAKTÓW POLIFENOLOWYCH Z WYBRANYCH ROŚLIN W UKŁADACH MODELOWYCH

### Streszczenie

Celem pracy było określenie właściwości przeciwutleniających wybranych ekstraktów roślinnych (dziurawca, gryki, głogu i kocanki) oraz ich ważnych składników polifenolowych w stosunku do błon liposomów fosfatydylocholinowych (PC) utlenianych promieniowaniem UVC. Określono także właściwości przeciwrodnikowe tych substancji w stosunku do wolnego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH<sup>•</sup>) oraz stałe asocjacji z błoną z zastosowaniem sondy DPH (1,6-difenylo-1,3,5-heksatrienu). Wykazano następującą relację aktywności przeciwutleniającej ekstraktów wyrażoną parametrem IC<sub>50</sub><sup>PC</sup>: głóg – kora (21,69 mg/l) > dziurawiec (25,45 mg/l) > gryka – łuski (30,33 mg/l) > głóg – liście (32,52 mg/l) > gryka – łęciny (37,47 mg/l) > kocanka (115,06 mg/l). Aktywność przeciwutleniająca wybranych składników polifenolowych zmieniała się natomiast w następujący sposób: kwercetyna (0,53 mg/l) > epikatechina (29,19 mg/l) > kwas chlorogenowy (62,59 mg/l) > rutyna (78,97 mg/l). Dodatnia korelacja aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów oraz związków fenolowych z aktywnością przeciwrodnikową ( $r \geq 0,94$ ) wskazuje, że mechanizm ich przeciwutleniającego działania polega na neutralizowaniu wolnych rodników. Kwercetyna spośród badanych flawonoidów wykazywała najwyższą aktywność przeciwutleniającą, wysoką aktywność przeciwrodnikową (IC<sub>50</sub><sup>DPPH<sup>•</sup></sup> = 2,51 mg/l) oraz wysoką stałą asocjacji z błoną liposomów ( $K_a = 11,23 \cdot 10^3$  l/mg). Możliwość głębokiego zakotwiczenia się molekuł kwercetyny w błonie liposomów fosfolipidowych ogranicza wnikanie wolnych rodników do wnętrza błony co wzmacnia jej skuteczność przeciwutleniającą.

**Słowa kluczowe:** ekstrakty polifenolowe, flawonoidy, wolne rodniki, liposomy fosfolipidowe, utlenianie lipidów, stała asocjacji

---

*Mgr K. Sierżant, Katedra Żywności Zwierząt i Paszoznawstwa, Wydz. Biologii i Hodowli Zwierząt, ul. Chelmońskiego 38C, 51-630 Wrocław, mgr inż. K. Pyrkosz-Biardzka, prof. dr hab. J. Gabrielska, Katedra Fizyki i Biofizyki, Wydz. Przyrodniczo-Technologiczny, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu ul. C.K. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław*

## Wprowadzenie

Procesy utleniania wywołane działaniem wolnych rodników powodują w organizmach, w warunkach stresu oksydacyjnego, powstawanie stanów zapalnych, będących przyczyną różnych chorób oraz procesu starzenia się [6, 7, 10]. Zrównoważona dieta również zawiera produkty bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz cholesterol podlegające utlenianiu. Proces peroksydacji lipidów obniża wartość odżywczą, a tym samym zdrowotną żywności [5, 39]. Koniecznym i skutecznym sposobem przedłużania trwałości produktów żywnościowych podlegających autooksydacji jest stosowanie przeciwutleniaczy, w tym syntetycznych, które nie zawsze są korzystne dla organizmu człowieka [4, 15]. Z tego względu prowadzone są intensywne badania w poszukiwaniu skutecznych naturalnych przeciwutleniaczy, zarówno w postaci ekstraktów polifenolowych, jak i wysoko oczyszczonych komponentów, np. flawonoidów. Ich funkcją jest ochrona produktów żywnościowych o wysokiej zawartości tłuszczu przed utlenianiem (np. mięso i jego produkty, wysokotłuszczowe sery, wyroby cukiernicze).

Stosunkowo niewiele jest informacji w literaturze na temat zastosowania polifenoli do żywności pochodzenia zwierzęcego. Prace w tym zakresie dotyczą głównie zastosowania zielonej herbaty oraz roślin przyprawowych (rozmarynu, tymianku, oregano, szalwii) w technologii mięsa [2, 11, 26, 38]. Nie ma także zbyt wielu badań nad sposobem aplikacji naturalnych przeciwutleniaczy polifenolowych zwiększających ich skuteczność, w szczególności do świeżej żywności zawierającej tłuszcz [20]. Badania aktywności przeciwutleniającej ekstraktów w warunkach *in vitro* prowadzone są w układach modelowych, m.in. w stosunku do lipidowych błon liposomowych utlenianych różnymi czynnikami [8, 9, 35, 36] oraz wobec wzorcowych stabilnych wolnych rodników, takich jak DPPH<sup>•</sup> [22].

Celem niniejszej pracy było określenie właściwości przeciwutleniających ekstraktów o potencjalnym zastosowaniu w przemyśle spożywczym, otrzymanych z surowców uprawianych w Polsce bądź dziko rosnących, w stosunku do błon liposomów fosfatydylocholinowych, poddanych działaniu promieniowania UVC.

## Material i metody badań

Material do badań stanowiły:

- ziele dziurawca (*Hypericum perforatum* L.), liście i kora głogu (*Crataegus* L.) oraz kwiatostany kocanki (*Helichrysum arenarium* L. Möench), które pozyskano z Ogrodu Roślin Leczniczych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu;
- łęciny oraz łuski z nasion gryki (*Fagopyrum esculentum* Möench);
- ekstrakty z wymienionych surowców, otrzymane metodą opracowaną w Zakładzie Technologii Owoców i Warzyw Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu [21];

- związki polifenolowe (odpowiedniki najważniejszych składników badanych ekstraktów): kwercetyna (3,3',4',5,7-penta-hydroksyflawon), rutyna (kwercetyno-3-rutozyd), epikatechina (3,3',4',5,7-pentoflawan) oraz kwas chlorogenowy (kwas 3-(3,4-dihydroksycynamonowy). Rutynę, kwercetynę oraz kwas chlorogenowy zakupiono w firmie Sigma Aldrich, Deisehoffen, natomiast epikatechinę w Carl Roth GmbH, Karlsruhe.

Odczynniki: 2-difenylopikrylhydrazyl, 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien, kwas trichlorooctowy ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , TCA), kwas tribarbiturowy (4,6-dihydroksypyrimidyn-2-tiol, TBA) otrzymano z firmy Sigma Aldrich, Deisehoffen. Fosfatydylocholinę jajeczną (PC) zakupiono w Lipid Product. Alkohol metylowy, alkohol etylowy oraz kwas chlorowodorowy otrzymano z firmy Archem, Wrocław, natomiast tris(hydroksymetylo)aminometan (TRIS) pochodził z firmy CHEMPUR, Piekary Śląskie.

W celu określenia prawdopodobnego mechanizmu przeciwutleniającego działania badanych substancji analizowano ich właściwości przeciwrodnikowe w stosunku do wolnego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH<sup>•</sup>) oraz hydrofobowość z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrienu (DPH).

### ***Formowanie liposomów fosfatydylocholinowych***

#### *Otrzymywanie liposomów do badań utleniania błon*

Odmierzoną (300  $\mu\text{l}$ ) objętość chloroformowego roztworu fosfatydylocholiny (100 mg/ml) odparowywano w atmosferze azotu, a następnie przez 30 min w próżni. Suchy film lipidowy hydratowano buforem Tris HCl (pH = 7,4) oraz sonikowano 5 min w temp. 0 °C. Stężenie fosfatydylocholiny w tak uzyskanej próbce wynosiło 1,5 mg/ml.

#### *Otrzymywanie liposomów do badań stopnia wiązania polifenoli*

Mieszanie 30  $\mu\text{l}$  PC z 11  $\mu\text{l}$  sondy DPH odparowywano w atmosferze azotu, a następnie inkubowano w próżni przez 30 min. Po dodaniu 3 ml buforu fosforanowego (pH = 7,4) sonikowano przez 10 min w temp. kąpieli 0 °C. Stężenie PC w próbce wynosiło 0,12 mg/ml, natomiast stężenie DPH – 0,05 %.

#### *Oznaczenie poziomu utlenienia liposomów fosfatydylocholinowych*

Poziom utleniania liposomów PC oznaczano testem TBARS, polegającym na ilościowym oznaczeniu zawartości dialdehydu malonowego (MDA), produktu utleniania lipidów [24].

Do 2,9 ml zawiesiny liposomów (1,5 mg/ml PC) dodawano badany przeciwutleniacz oraz uzupełniano buforem Tris HCl do stałej objętości 3 ml. Stężenia tych sub-

stancji ustalano we wstępnych badaniach w zakresie poniżej i powyżej wartości  $IC_{50}^{PC}$ . Zawiesinę liposomów inkubowano 15 min, a następnie pobierano dwie 0,5 ml próby do oznaczenia poziomu kontrolnego utlenienia. Pozostałą objętość zawiesiny liposomów naświetlano przez 30 min promieniowaniem UVC (natężenie promieniowania UVC wynosiło  $3,5 \text{ mW/cm}^2$ ) i pobierano dwie kolejne próby po 0,5 ml każda. Dodawano do nich po 1 ml TCA i TBA, inkubowano przez 15 min w temp. 90 - 100 °C, a następnie wirowano 15 min z szybkością 2500 obr./min (wirówka Multifuge 3L-R). Pomiaru absorbancji przy  $\lambda = 535 \text{ nm}$  dokonywano w spektrofotometrze Cary 300 Bio firmy Varian z wykorzystaniem oprogramowania Cary WinUV „Simple Reads v.3.00(182). Aparat zerowano w obecności próby odczynnikowej. Procent inhibicji utlenienia prób obliczano z równania:

$$\text{Inhibicja [\%]} = [(\Delta A_0 - \Delta A_A) / \Delta A_0] \cdot 100 \%,$$

gdzie:  $\Delta A_A$  – wzrost absorbancji po 30 min w obecności przeciwutleniacza;  $\Delta A_0$  – wzrost absorbancji po 30 min bez dodatku przeciwutleniacza. Parametr  $IC_{50}^{PC}$  (stężenie przeciwutleniacza powodujące 50 % inhibicję utleniania błon liposomów PC) wyliczono na podstawie wykresu zależności procentu inhibicji od stężenia ekstraktu, zgodnie z równaniem:  $y = ax + b$ . Analizy wykonano w trzech powtórzeniach.

### ***Oznaczenie neutralizowania wolnego rodnika DPPH***

Metoda bazuje na stabilnym wolnym rodniku 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu [3] i polega na kolorymetrycznym oznaczeniu zdolności do neutralizowania wolnych rodników przez badane substancje [27, 30].

Naważkę 2,8 mg rodnika DPPH<sup>\*</sup> rozpuszczano w 100 ml metanolu. Próbę stanowiło 3 ml roztworu DPPH<sup>\*</sup> z dodatkiem przeciwutleniacza (próba kontrolna nie zawierała przeciwutleniacza). Podobnie, jak w teście TBARS, zakres stężeń ustalano we wstępnych doświadczeniach. Próby inkubowano przez 15 min w ciemności z użyciem mieszadła magnetycznego. Pomiaru absorbancji przy  $\lambda = 516 \text{ nm}$  dokonywano w spektrofotometrze Cary 300 Bio, na początku i na końcu 15-minutowego okresu inkubacji. Procent redukcji wolnego rodnika DPPH<sup>\*</sup> obliczano z równania:

$$\text{Inhibicja [\%]} = [(\Delta A_0 - \Delta A_A) / \Delta A_0] \cdot 100 \%$$

gdzie:  $\Delta A_A$  – absorbancja po 15 min w obecności przeciwutleniacza;  $\Delta A_0$  – absorbancja po 15 min bez dodatku przeciwutleniacza. Parametr  $IC_{50}^{DPPH^*}$  (stężenie przeciwutleniacza powodujące 50 % redukcję wolnego rodnika DPPH<sup>\*</sup>) wyznaczano na podstawie wykresu zależności procentu redukcji wolnego rodnika DPPH<sup>\*</sup> od stężenia przeciwutleniacza, zgodnie z równaniem:  $y = ax + b$ .

### **Wyznaczanie stałej wiązania $K_a$**

Sonda fluorescencyjna DPH jest markerem stosowanym m.in. do badań zmian płynności hydrofobowego rejonu błony [17]. Zmiana fluorescencji sondy DPH obecnej w błonie mierzona np. pod wpływem substancji wiążącej się z błoną jest wynikiem zmian jej mikrootoczenia, co stanowi czuły wskaźnik tego procesu [34].

Próbkę o objętości 2,5 ml stanowiło 0,3 ml liposomów PC z sondą fluorescencyjną DPH oraz 2,2 ml buforu fosforanowego (pH = 7,4). Intensywność fluorescencji mierzono fluorymetrem SFM25, firmy Kontron Instruments, przy długości fali pobudzenia i emisji, odpowiednio  $\lambda_{\text{ex}} = 360$  nm i  $\lambda_{\text{em}} = 425$  nm. Po odczytaniu wartości  $F_0$ , odczytu  $F_x$  dokonywano co 60 s, po każdorazowym dodaniu kolejnej porcji przeciwutleniacza. Stałą asocjacji wyznaczano metodą Sterna-Volmera [34], zgodnie z równaniem ( $y = ax + b$ );

$$\frac{1}{\left(\frac{F_0}{F_x}\right) - 1} = \frac{K_D}{[PC]} \cdot \frac{1}{[s]} + \frac{1}{[PC]}$$

gdzie:  $[F_0/F_x]$  – względna fluorescencja sondy DPH;  $K_D$  – stała dysocjacji;  $[s]$  – stężenie przeciwutleniacza w próbce;  $[PC]$  – stężenie fosfatydylocholiny w próbce (0,12 mg/ml). Stałe: asocjacji  $K_a$  i dysocjacji  $K_D$  stanowiły odwrotnie proporcjonalną zależność ( $K_a = 1/K_D$ ) [28, 37].

### **Analiza statystyczna**

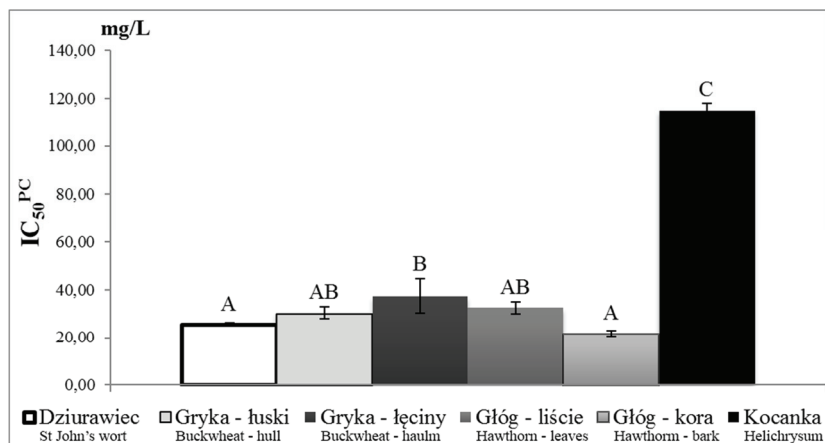
Wyniki badań aktywności przeciwutleniającej ( $IC_{50}^{PC}$ ), przeciwrodnikowej ( $IC_{50}^{DPPH^{\bullet}}$ ) oraz stałej wiązania ( $K_a$ ) poddano 1-czynnikowej analizie statystycznej ANOVA z wykorzystaniem pakietu Statistica [31], oceniając różnice międzygrupowe za pomocą testu Duncana, przy  $p \leq 0,01$ . Współczynniki korelacji pomiędzy  $IC_{50}^{PC}$  i  $IC_{50}^{DPPH^{\bullet}}$  oraz pomiędzy  $IC_{50}^{PC}$  i  $K_a$  określano w programie Statistica [31].

### **Wyniki i dyskusja**

Badane ekstrakty roślinne z: dziurawca, gryki, głogu i kocanki zawierały między innymi mieszaninę polifenoli, spośród których ważną frakcję stanowiły flawonoidy. Na podstawie wstępnej analizy HPLC ustalono, że dziurawiec zawierał kwercetynę i rutynę, głóg – epikatechinę, gryka – rutynę, natomiast kocanka – kwercetynę i kwas chlorogenowy.

Zdolność przeciwutleniająca ekstraktów zmniejszała się zgodnie z następującą sekwencją: głóg (kora) > dziurawiec > gryka (łuski) > głóg (liście) > gryka (łęczyny) > kocanka (rys. 1). Stwierdzono istotnie wyższą aktywność przeciwutleniającą ekstraktu z dziurawca (25,45 mg/l) oraz z kory głogu (21,69 mg/l) w stosunku do łęcin gryki

(37,47 mg/l) oraz kocanki (115,06 mg/l). Wartości  $IC_{50}^{PC}$  badanych ekstraktów w odniesieniu do ich ważnych odpowiedników polifenolowych przedstawiono w tab. 1.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

A, B, C – różne litery oznaczają różnice statystycznie istotne przy  $p \leq 0,01$  / different letters denote statistically significant differences at  $p \leq 0.01$  /  $n = 4$ .

Rys. 1. Aktywność przeciwutleniająca ( $IC_{50}^{PC}$ ) badanych ekstraktów.

Fig. 1. Antioxidant activity of extracts studied.

Wyniki badań nie potwierdziły istotności różnic pomiędzy wartościami parametru  $IC_{50}^{PC}$  ekstraktów z liści i kory głogu w porównaniu z epikatechiną. Zbliżone właściwości przeciwutleniające tych ekstraktów można wiązać z dużą zawartością w nich katechin [25, 29]. W przypadku ekstraktów dziurawca, łusek oraz łęcin gryki uzyskano wyższą aktywność przeciwutleniającą ( $p \leq 0,01$ ) aniżeli rutyny, co wskazuje na możliwy synergizm działania pozostałych polifenoli obecnych w ekstraktach [13]. Mieszanka polifenoli ekstraktu dziurawca wykazała ponad 3-krotnie wyższą inhibicję utleniania liposomów PC w porównaniu z rutyną, podczas gdy w ekstraktach z łusek oraz łęcin gryki stwierdzono efektywność działania odpowiednio 2,6- oraz ponad 2-krotnie wyższą. Öztürk i wsp. [23] dowiedli, że właściwości ochronne ekstraktów dziurawca wobec oliwy z oliwek inkubowanej w temperaturze 110 °C są skorelowane z koncentracją składników fenolowych oraz ich składem jakościowym (głównie flawonoidy i kwasy fenolowe). Ponadto autorzy ci wykazali, że pojemność przeciwutleniającą ekstraktów *Hypericum sp.* warunkuje odmiana, organ surowca (kwiaty, liście) oraz rozpuszczalnik użyty w procesie ekstrakcji (woda, metanol, octan etylu). Także określona w pracy zdolność ochronna ekstraktów łusek i łęcin gryki w stosunku do liposomów PC utlenianych promieniowaniem UVC różniła się między sobą (tab. 1). Różnice

Tabela 1

Aktywność przeciwutleniająca ( $IC_{50}^{PC}$ ), przeciwrodnikowa ( $IC_{50}^{DPPH^{\bullet}}$ ) oraz stała asocjacji ( $K_a$ ) badanych ekstraktów oraz wybranych związków fenolowych obecnych w ekstraktach.

Antioxidant activity ( $IC_{50}^{PC}$ ) and antiradical activity ( $IC_{50}^{DPPH^{\bullet}}$ ) of, and association constants ( $K_a$ ) for extracts studied, as well as for selected phenolic compounds present therein.

Ekstrakt plus główny składnik Extract plus major compounds	$IC_{50}^{PC} \pm s / SD$ [mg/l] / n = 4		$IC_{50}^{DPPH^{\bullet}} \pm s / SD$ [mg/l] / n = 4		$K_a \pm s / SD$ [l/mg] / n = 3	
<b>Dziurawiec / St John's wort</b>	25,45 ± 0,72	A	3,51 ± 0,22	A	7,10 · 10 <sup>2</sup> ± 30	A
Rutyna / Rutin	78,97 ± 9,17	B	5,35 ± 0,07	B	4,40 · 10 <sup>2</sup> ± 48	A
Kwercetyna / Quercetin	0,53 ± 0,04	C	2,51 ± 0,12	C	1,23 · 10 <sup>4</sup> ± 843	B
<b>Gryka – łuski / Buckwheat – hull</b>	30,33 ± 2,48	A	7,43 ± 0,30	A	3,92 · 10 <sup>2</sup> ± 36	-
<b>Gryka – łęciny / Buckwheat – haulm</b>	37,47 ± 7,13	A	6,96 ± 0,28	A	0,29 · 10 <sup>2</sup> ± 62	-
Rutyna / Rutin	78,97 ± 9,17	B	5,35 ± 0,07	B	4,4 · 10 <sup>2</sup> ± 48	-
<b>Głóg – liście / Hawthorn – leaves</b>	32,52 ± 2,55	A	2,76 ± 0,12		0,35 · 10 <sup>2</sup> ± 18	-
<b>Głóg – kora / Hawthorn – bark</b>	21,69 ± 1,31	B	3,06 ± 0,08	A	0,36 · 10 <sup>2</sup> ± 130	-
Epikatechina / Epicatechin	29,19 ± 5,26	-	2,17 ± 0,04	B	0,14 · 10 <sup>2</sup> ± 40	-
<b>Kocanka / Helichrysum</b>	115,06 ± 2,84	A	34,08 ± 0,88	A	1 · 10 <sup>3</sup> ± 26	A
Kwas chlorogenowy / Chlorogenic acid	62,59 ± 7,77	B	5,21 ± 0,05	B	1,66 · 10 <sup>2</sup> ± 9	B
Kwercetyna / Quercetin	0,53 ± 0,04	C	2,51 ± 0,12	C	1,23 · 10 <sup>4</sup> ± 843	C

Objaśnienia: / Explanatory notes:

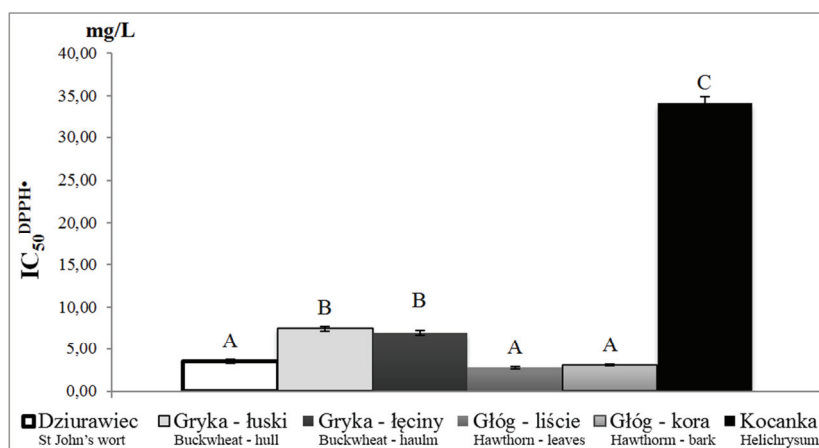
s – odchylenie standardowe / SD – standard deviation;

A, B, C – różne litery oznaczają różnice statystycznie istotne przy  $p \leq 0,01$  / different letters denote statistically significant differences at  $p \leq 0.01$ ; (-) – brak różnic statystycznie istotnych / no statistically significant differences.

te mogą wynikać z wysokiej zmienności udziału rutyny w surowcu gryczanym. Zawartość rutozydu w całkowitej puli związków fenolowych gryki waha się od ok. 5 % (ziarniaki) do 59 % (liście) [12]. Najśłabsze właściwości ochronne wobec liposomów PC utlenianych promieniowaniem UVC wykazał ekstrakt kocanki ( $IC_{50}^{PC} = 115,06$  mg/l). Aktywność przeciwutleniająca tego ekstraktu była ponad 200-krotnie niższa od wartości wyznaczonej w obecności kwercetyny ( $IC_{50}^{PC} = 0,53$  mg/l), stanowiącej substancję odniesienia (tab. 1). Według Özgen i wsp. [22] wodny ekstrakt kocanki piaskowej (*Helichrysum earenarium*) wykazuje silne właściwości ochronne w stosunku do liposomów otrzymanych z fosfatydylocholiny wyekstrahowanej z mózgow szczyrzy, utlenianych  $FeCl_3$ . Niewykluczone, że brak zgodności rezultatów badań własnych z przedstawionymi przez tych autorów jest związany z zastosowaniem różnych czynników utleniających błony liposomów.



Wyniki aktywności przeciwrodnikowej badanych ekstraktów przedstawiono na rys. 2. oraz w tab. 1, gdzie zestawiono wartości parametru  $IC_{50}^{DPPH^{\bullet}}$  także z polifenolami odniesienia. Najwyższą zdolność wygaszania rodnika  $DPPH^{\bullet}$  wykazały ekstrakty liści i kory głógu, natomiast najniższą ekstrakt kocanki. Ekstrakty z gryki słabiej neutralizowały wolny rodnik  $DPPH^{\bullet}$  w porównaniu z rutyną, co nie koresponduje z podanymi wyżej danymi aktywności przeciwutleniającej omawianych substancji w stosunku do liposomów PC utlenianych promieniowaniem UVC.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

A, B, C – różne litery oznaczają różnice statystycznie istotne przy  $p \leq 0,01$  / different letters denote statistically significant differences at  $p \leq 0.01$ ;  $n = 4$ .

Rys. 2. Aktywność przeciwrodnikowa ( $IC_{50}^{DPPH^{\bullet}}$ ) badanych ekstraktów.

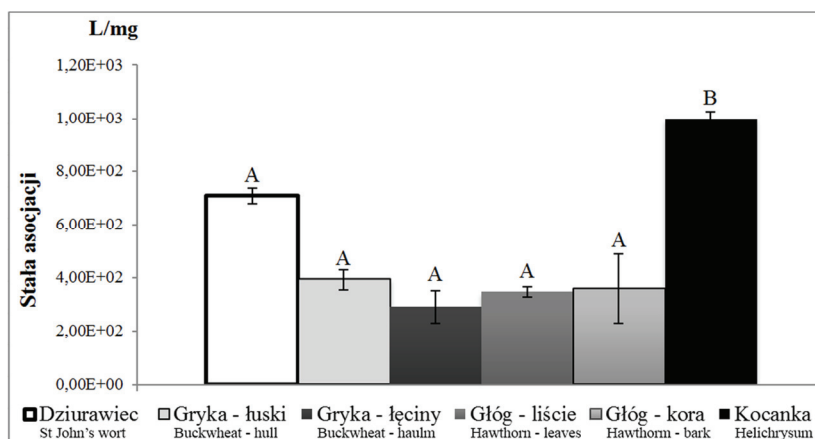
Fig 2. Antiradical activity of extracts studied.

Może to wynikać z faktu, że ochronne działanie składników ekstraktu w stosunku do błon liposomów utlenianych promieniowaniem UVC wiąże się m.in. z wychwytywaniem bardzo reaktywnych rodników hydroksyloowych generowanych pod jego wpływem. Wolny rodnik  $DPPH^{\bullet}$  jest natomiast molekułą stabilną, jedynie imitującą w warunkach modelowych zachowanie się reaktywnych form tlenu *in vivo*. Wyniki badań dowodzą istnienia dodatniej korelacji pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą i przeciwrodnikową badanych ekstraktów ( $r = 0,97$ ) oraz ich substancji odniesienia ( $r = 0,94$ ), istotnej na poziomie  $p \leq 0,01$ . Na tej podstawie można sądzić, że zdolność do neutralizowania wolnych rodników przez badane ekstrakty jest prawdopodobnie podstawowym mechanizmem ich przeciwutleniającego działania.

Wartości stałej asocjacji pomiędzy ekstraktami przedstawiono na rys. 3. oraz w tab. 1., gdzie zestawiono wartości parametru  $K_a$  z substancjami odniesienia. Warto-



ści stałej wiązania badanych związków fenolowych i ekstraktów zmieniały się w przedziale od  $1,40 \cdot 10^2$  l/mg do ok.  $1 \cdot 10^3$  l/mg, natomiast w obecności kwercetyny wartość  $K_a$  była najwyższa i wyniosła  $1,23 \cdot 10^4$  l/mg (tab. 1).



Objaśnienia: / Explanatory notes:

A, B, C – różne litery oznaczają różnice statystycznie istotne przy  $p \leq 0,01$  / different letters denote statistically significant differences at  $p \leq 0,01$ ;  $n = 3$ .

Rys. 3. Wartości stałej asocjacji ( $K_a$ ) badanych ekstraktów.

Fig. 3. Value of association constant ( $K_a$ ) of extracts studied.

Nie wykazano istotnych różnic stałej wiązania między ekstraktami z dziurawca, gryki oraz głogu. Ekstrakt z kocanki, jako drugi po kwercetynie, najsilniej wiązał się z błonami liposomów PC ( $p \leq 0,01$ ), co można tłumaczyć lipofilnym charakterem izosalipurpozydu obecnego w tym ekstrakcie [14, 16]. Özgen i wsp. [22] sugerują, że o wartościach potencjału przeciwutleniającego substancji mogą decydować (obok składu i warunków prowadzenia procesu) również inne czynniki. Jednym z nich może być zdolność związków polifenolowych do tworzenia kompleksów z dwuwarstwą lipidową błon liposomów PC. Bardzo wysoka aktywność przeciwutleniająca kwercetyny była wysoko ujemnie skorelowana z oznaczoną stałą asocjacji ( $r = -0,990$ ). Może to oznaczać, że silne wiązanie molekuł tego przeciwutleniacza z błoną liposomów chroni ją przed peroksydacją. Kwercetyna, w przeciwieństwie do glikolizowanej formy tego flawonoidu – rutyny, ma płaską strukturę cząsteczki [33], która może ułatwiać jej wnikanie w głąb dwuwarstwy lipidowej [19]. Taką strategiczną lokalizację kwercetyny w błonie liposomów fosfolipidowych potwierdziła jej około 28-krotnie wyższa wartość stałej asocjacji w porównaniu z rutyną. Rutyna wykazywała przy tym około 150-krotnie niższą efektywność inhibicji peroksydacji lipidów, co jest rezultatem zbliżonym do wyników badań innych autorów [1]. Dużo niższa aktywność przeciwutleniają-

ca rutozydu względem kwercetyny jest najprawdopodobniej efektem występowania przeszkód sterycznych związanych z podstawnikami cukrowymi w tej cząsteczce [18]. Mogą one znacząco ograniczać zdolność rutyny do wnikania w głąb błony i w konsekwencji w dużym stopniu obniżać zdolności chroniące błonę przed penetracją wolnych rodników. Verstraeten i wsp. [35, 36] podają, że epikatechina oraz jej polimery (procyjanidyny) wykazują znaczną i zależną od długości łańcucha procyjanidynowego adsorpcję molekuł w rejon polarny błony. W niniejszej pracy nie potwierdzono jednak istotności korelacji pomiędzy oznaczoną aktywnością przeciwutleniającą a wartościami stałej wiązania epikatechiny oraz ekstraktów polifenolowych i pozostałych związków fenolowych (za wyjątkiem kwercetyny). Najniższa wartość stałej asocjacji epikatechiny ( $K_a = 1,40 \cdot 10^2$  l/mg) może natomiast oznaczać jedynie jej powierzchniową lokalizację w błonie liposomów, która nie sprzyja niwelacji tlenków i nadtlenków lipidów oraz skutecznej ochronie błon.

### Wnioski

1. Ekstrakty polifenolowe dziurawca, gryki oraz głogu wykazały wysoką aktywność przeciwutleniającą w stosunku do błon liposomów PC utlenianych promieniowaniem UVC.
2. Właściwości przeciwrodnikowe w stosunku do wolnego rodnika DPPH<sup>•</sup> badanych ekstraktów oraz wysoki współczynnik korelacji ( $r = 0,97$ ) pomiędzy aktywnościami przeciwutleniającą i przeciwrodnikową wskazują, że neutralizowanie wolnych rodników przez badane ekstrakty jest podstawowym mechanizmem ich przeciwutleniającego działania.
3. Możliwość głębokiego zakotwiczenia molekuł kwercetyny w błonie liposomów PC wzmacnia jej efektywność przeciwutleniającą poprzez skuteczniejsze wychwytywanie wolnych rodników atakujących błonę.
4. Wyniki badań z zastosowaniem liposomów fosfolipidowych wskazują na możliwe ochronne działanie naturalnych polifenoli wobec procesów peroksydacji lipidów błon komórkowych.

*Praca naukowa współfinansowana przez Katedrę Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa oraz ze środków przyznanych przez MNiSW na badania w latach 2011-2013, grant nr NN312 26363.*

*Dr inż. Małgorzacie Korzeniowskiej z Katedry Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu dziękujemy za udostępnienie surowca gryki.*

### Literatura

- [1] Becker E.M., Ntouma G., Skibsted L.H.: Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organization. *Food Chem.*, 2007, **103**, 1288-1296.
- [2] Botsoglou N.A., Christaki E., Fletouris D.J., Florou-Paneri P., Spais A.B.: The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Sci.*, 2002, **62**, 259-265.
- [3] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 1995, **28**, 25-30.
- [4] Chen Ch., Pearson A.M., Gray J.I.: Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chem.*, 1992, **43**, 177-183.
- [5] Dunlavy K.A., Lamkey J.W.: Dextrose level and holding time affects on warmed-overflavor of beef top roundroasts. *Anim. Sci. Res. Report*, 1993, **77**; 73-77.
- [6] Evans P., Halliwell B.: Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 1999, **884**, 19-40.
- [7] Ferrari C.K.B., Torres E.A.F.S.: Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed. Biopharmacother.*, 2003, **57**, 251-260.
- [8] Gabrielska J., Korzeniowska M., Wojdyło A.: Antioxidative effect of plant extracts and flavones on liposome and erythrocyte membranes. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2007, **4**, 145-150.
- [9] Gutiérrez M.E., García A.F., Africa de Madariaga M, Sagrista M.L., Casadó F.J., Mora M.: Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life Sci.*, 2003, **72**, 2337-2360.
- [10] Halliwell B.: Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc. Res.*, 2000, **47**, 410-418.
- [11] Heś M., Jeżewska M., Szymandera-Buszkka K., Gramza-Michałowska A.: Wpływ dodatków przeciwutleniających na wybrane wskaźniki wartości odżywczej mięsa suszonego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **5 (78)**, 94-106.
- [12] Holasova M., Fiedlerova V., Smrcinova H., Orsak M., Lachman J., Vavreinoava S.: Buckwheat - the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res. Int.*, 2002, **35**, 207-211.
- [13] Iacopini P., Baldi M., Storchi P., Sebastiani L.: Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J. Food Comp. Anal.*, 2008, **21**, 589-598.
- [14] Kohlmünzer S.: *Farmakognozja*. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 1998, ss. 168-169.
- [15] Lanigan R.S., Yamarik T.A.: Final report on the safety assessment of BHT. *Int. J. Tox.*, 2002, **21**, 19-94.
- [16] Lemberkovics É., Czinner E., Szentmihályi K., Balázs A., Szóke É.: Comparative evaluation of *Helichrysi flos* herbal extracts as dietary sources of plant polyphenols, and macro- and microelements. *Food Chem.*, 2002, **(78)**, 119-127.
- [17] Lentz, B.R., Barenholz Y., Thomson T.E.: Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. 1. Single Component phosphatidylcholine liposomes. *Biochem.*, 1976, **15 (20)**, 4521-4528.
- [18] López M., Martínez F., Del Valle C., Ferrit M., Luque R.: Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. *Talanta*, 2003, **60**, 609-616.
- [19] Mavileanu L., Neagoe I., Flonta M.L.: Interaction of antioxidant quercetin with planar lipid bilayer. *Int. J. Pharm.*, 2000, **205**, 135-146.
- [20] Muszyńska A., Pyrkosz-Biardzka K., Korzeniowska M., Gabrielska J., Kopeć W.: Polyphenols in emulsion and liposomes as effective protectors of meat products against oxidation. *New Concept in*

- Food Evaluation. Nutraceuticals – Analyses – Consumer., ed. by T. Trziszka, M. Oziembłowski. 2009, pp. 154-163. Wyd. Uniw. Przyrod. we Wrocławiu, Wrocław 2009.
- [21] Oszmiański J.: Sposób otrzymywania aktywnych biologicznie proantocyjanidyn z owoców roślinnych. Patent PL 169082 B1, 1996.
- [22] Özgen U., Mavi A., Terzi Z., Maksut Coşkun, Yıldıırım A.: Antioxidant activities and total phenolic compounds amount of some asteraceae species. *Turkish J. Pharm. Sci.*, 2004, **1**, 203-216.
- [23] Öztürk N., Tunçel M., Potoğlu-Erkara İ.: Phenolic compounds and antioxidant activities of some *Hypericum* species: A comparative study with *H. perforatum*. *Pharm. Biol.*, 2009, **47**, 120-127.
- [24] Rey A.I., Kerry J.P., Lynch P.B., Lopez-Bote C.J., Buckley D.J., Morrissey P.A.: Effect of dietary oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation on lipid (TBARS) and cholesterol oxidation in cooked pork. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 1201-1208.
- [25] Rohr G.E., Meier B., Sticher O.: Quantitative reserved-phase high performance liquid chromatography of procyanidins in *Crataegus* leaves and flowers. *J. Chrom. A.*, 1999, **835**, 59-65.
- [26] Salejda A.M., Krasnowska G., Tril U.: Próba wykorzystania przeciwutleniających właściwości ekstraktu zielonej herbaty w produkcji modelowych przetworów mięsnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **5 (78)**, 107-118.
- [27] Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F.: A Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 1998, **76**, 270-276.
- [28] Sharma V.K., Bajaj H., Kalonia D.S.: Reversible self-association of pharmaceutical proteins: characterization and case studies. In: *Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals*, Ed. by F. Jameel., S. Hershenson. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2010, p. 431.
- [29] Sokół-Łętowska A., Oszmiański J., Wojdyło A.: Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Chem.*, 2007, **103**, 853-859.
- [30] Spiel J.A., Pliszka M.A., Borowski J., Gutkowska A.: Skład chemiczny, cechy sensoryczne i właściwości przeciwutleniające sękacza mazurskiego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **6 (79)**, 119-131.
- [31] Statistica (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com. StatSoft, Inc.: 2011.
- [32] Tepe B., Sokmen M., Akpulat A.H., Sokmen A.: *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chem.*, 2005, **90**, 685-689.
- [33] Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.-J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J.F., Bast A.: Structural aspects of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.*, 1996, **20**, 331-342.
- [34] Verkman A.S.: The Quenching of an intermembrane fluorescent probe phloreti through bilayers, *Bioch. Biophys. Acta*, 1979, **599**, 370-379.
- [35] Verstraeten S.V., Keen C.L., Schmitz H.H., Fraga C.G., Oteiza P.I.: Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biol. Med.*, 2003, **(1) 34**, 84-92.
- [36] Verstraeten S.V., Oteiza P.I., Fraga C.G.: Membrane effects of Cocoa procyanidins in liposomes and Jurkat T Cells. *Biol. Res.*, 2004, **37**, 293-300.
- [37] Vijayanathan V., Thomas T., Sigal L.H., Thomas T.J.: Direct measurement of the association constant of Her2/neu antisense oligonucleotide to its target RNA sequence using a molecular beacon. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.*, 2002, **12**, 225-233.
- [38] Waszkowiak K., Dolata W.: The application of collagen preparations as carriers of rosemary extract in the production of processed meat. *Meat Sci.*, 2007, **75**, 178-183.
- [39] Yun-Ching Ch., Kai-Xun H., An-Chung H., Yung-Chyuan H., Chau-Jong W.: Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. *Food Chem. Tox.*, 2006, **44**, 1015-1016.

**ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NATURAL POLYPHENOLIC EXTRACTS  
FROM SELECTED PLANTS IN MODEL SYSTEMS****S u m m a r y**

The objective of the study was to determine the antioxidant properties of selected plant extracts from St John's wort, buckwheat, hawthorn, helichrysum, as well as their important polyphenol constituents towards phosphatidylcholine liposome membranes (PC) oxidized with UVC radiation. Also, there were determined the antiradical properties of those substances towards the free radical 2,2-diphenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) and the membrane association constants using a DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrien) probe. There was confirmed the following relation of the antioxidant activities of the extracts, expressed as an  $IC_{50}^{PC}$  parameter: hawthorn – bark (21.69 mg/l) > St John's wort (25.45 mg/l) > buckwheat – hull (30.33 mg/l) > hawthorn – leaves (32.52 mg/l) > buckwheat – haulm (37.47 mg/l) > helichrysum (115.06 mg/l). The antioxidant activity of selected polyphenol components changed as follows: quercetin (0.53 mg/l) > epicatechin (29.19 mg/l) > chlorogenic acid (62.59 mg/l) > rutin (78.97 mg/l). The positive correlation between the antioxidant activity of the extracts studied and phenolic compounds, and the antiradical activity ( $r \geq 0.94$ ) indicates that the mechanism of their antioxidant activity consists in neutralizing free radicals. From among the flavonoids studied, the quercetin showed the highest antioxidant activity, a high antiradical activity ( $IC_{50}^{DPPH^{\bullet}} = 2.51$  mg/l), and a high association constant towards the liposome membrane ( $K_a = 11.23 \cdot 10^3$  l/mg). The quercetin molecules may deeply anchor into the liposome membrane, therefore, free radicals are obstructed when penetrating into the inside of the membrane; for that reason, the antioxidant effectiveness of the liposome membrane is enhanced.

**Key words:** polyphenol extracts, flavonoids, free radicals, phospholipid liposomes, lipid oxidation, association constant 