

DOROTA BONARSKA-KUJAWA, SYLWIA CYBORAN, JAN OSZMIAŃSKI,
HALINA KLESZCZYŃSKA

AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA EKSTRAKTÓW POLIFENOLOWYCH Z OWOCÓW CZERWONEJ PORZECZKI I ŻURAWINY W ODNIESIENIU DO BŁONY ERYTROCYTÓW

Streszczenie

Celem podjętych badań było określenie aktywności przeciwutleniającej wodnych ekstraktów z czerwonej porzeczki i żurawiny w odniesieniu do błony erytrocytów oraz mechanizmu odpowiedzialnego za tę aktywność. Oznaczono skład polifenolowy ekstraktów z zastosowaniem metody chromatografii cieczowej z detektorem diodowym i masowym (UPLC-DAD-MS). Spektrofotometrycznie określono współczynnik podziału związków zawartych w ekstraktach pomiędzy fazę organiczną i wodną. Aktywność przeciwutleniającą ekstraktów wobec błony erytrocytów zbadano metodą fluorymetryczną na podstawie stopnia gaszenia fluorescencji sondy DPH-PA, indukując utlenianie błon erytrocytów związkiem AAPH. Fluorymetrycznie określono również lokalizację w błonie erytrocytów związków polifenolowych zawartych w ekstraktach.

Stwierdzono, że owoce czerwonej porzeczki i żurawiny są bogate w związki polifenolowe, szczególnie w antocyjany i procyanidyny. Wykazano, po zastosowaniu sond fluorescencyjnych, że polifenole zawarte w ekstraktach nie przenikają do części hydrofobowej błony, na co wskazuje brak zmian w anizotropii fluorescencji. Łączą się natomiast z regionem główek polarnych na powierzchni błony, zmieniając ich upakowanie, na co wskazuje zmniejszenie uogólnionej polaryzacji. Dowiedziono, że związki polifenolowe zawarte w ekstraktach skutecznie chronią błonę erytrocytów przed szkodliwym działaniem wolnych rodników indukowanych związkiem AAPH w środowisku wodnym. Ponadto wykazano, że aktywność przeciwutleniająca ekstraktu z czerwonej porzeczki ($IC_{50} = 4,59 \mu\text{g/ml}$) jest zbliżona do aktywności standardowego przeciwutleniacza, jakim jest Trolox ($IC_{50} = 3,9 \mu\text{g/ml}$), oraz że jest ona wyższa od aktywności ekstraktu żurawiny ($IC_{50} = 12,02 \mu\text{g/ml}$).

Słowa kluczowe: ekstrakty polifenolowe, owoce czerwonej porzeczki i żurawiny, błona erytrocytów, płynność błony, aktywność przeciwutleniająca ekstraktów

Dr inż. D. Bonarska-Kujawa, dr inż. S. Cyboran, prof. dr hab. H. Kleszczyńska, Katedra Fizyki i Biofizyki, Wydz. Przyrodniczo-Technologiczny, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław, prof. dr hab. inż. J. Oszmiański, Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż, Wydz. Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. J. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław. Kontakt: dorota.bonarska-kujawa@up.wroc.pl

Wprowadzenie

Owoce żurawiny (*Vaccinium macrocarpon*) i czerwonej porzeczki (*Ribes rubrum* L.) są znane z walorów smakowych i właściwości prozdrowotnych. Spożywanie tych owoców może przyczynić się do łagodzenia przebiegu chorób układu nerwowego, pokarmowego, krwionośnego, a także wspomagać terapię nowotworów. Właściwości prozdrowotne tych owoców są związane przede wszystkim z ich właściwościami przeciwutleniającymi i przeciwzapalnymi związków wchodzących w skład ekstraktów. Owoce żurawiny są stosowane jako środek wspomagający leczenie w bakteryjnych infekcjach układu moczowego [12, 28], a owoce czerwonej porzeczki wykazują właściwości przeciwutleniające [15, 20]. Wymienione owoce, są bogatym źródłem wielu składników odżywczych [26], w tym związków polifenolowych.

Uważa się, że właściwości przeciwutleniające polifenoli są głównie odpowiedzialne za prozdrowotny wpływ ekstraktów roślinnych na organizm człowieka, zatem mają one zastosowanie w profilaktyce i leczeniu wielu chorób wywołanych stresem oksydacyjnym [23]. Na podstawie skutków oddziaływania tych substancji z błoną biologiczną, która jest pierwszym miejscem kontaktu różnych czynników fizykochemicznych z organizmami [1, 2, 11], będzie można określić prawdopodobny molekularny mechanizmu odpowiedzialny za te skutki. Ten mechanizm nie został dotąd w pełni wyjaśniony.

Celem badań było określenie aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z żurawiny i czerwonej porzeczki w odniesieniu do błony erytrocytów, traktowanej jako przykład i model błony biologicznej.

Material i metody badań

Acetonitryl, kwas mrówkowy, metanol i induktor utleniania 2,2'-diazobis(2-amidinopropan) dichlorowodoru (AAPH) zakupiono w firmie Sigma-Aldrich®. Standardowe polifenole: kwercetyno-3-*O*-glukozyd, kwercetyno-3-*O*-galaktozyd, kwercetyno-3-*O*-ksylozyd, (-) epikatechinę, (+) katechinę, procyanidynę B2, viteksin, cyanidyno-3-*O*-galaktozyd, mirecetynę i kwercetynę zakupiono w firmie Extrasynthese®. Sondy fluorescencyjne 6-dodekanoil-2-dimetylaminaftalen (Laurdan), 1,6-difenyl-1,3,5-heksatrien (DPH) i kwas propionowy (3-(p-(6-fenyl)-1,3,5-heksatrienyl) (DPH-PA) zakupiono w firmie Molecular Probes®.

Błony erytrocytów (cienie) uzyskano ze świeżej heparynowanej krwi świni, według metody Dodge'a i wsp. [10], stężenie białka w próbkach wynoszące 100 µg/ml określano metodą opisaną przez Bradforda [8].

Owoce żurawiny zbierano w Ogrodzie Roślin Leczniczych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, a owoce czerwonej porzeczki – w Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Zybiszowie. Materiał badawczy stanowiły liofilizaty wymienionych

owoców. Stosowano procedurę ekstrakcji polifenoli wg Gąsiorowskiego i wsp. [13]. Polifenole izolowano z owoców poprzez ekstrakcję wodą zawierającą 200 ppm SO₂, a stosunek rozpuszczalnika do owoców wynosił 3 : 1. Związki polifenolowe uzyskiwano z użyciem kolumny Purolite AP 400 (*PuroliteInt. Ltd UK*). Zawartość polifenoli w preparatach oznaczano za pomocą ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC-DAD-MS). Identyfikację polifenoli prowadzono według Oszmiańskiego i wsp. [19] oraz Teleszko i wsp. [25]. Przy identyfikacji związków bazowano na wcześniej opublikowanych analizach ekstraktów z żurawiny [17, 22, 27] i czerwonej porzeczki [14]. Nie identyfikowano natomiast pozostałych składników ekstraktów.

Współczynnik podziału pomiędzy oktanol i bufor fosforanowy wyznaczano w celu oznaczenia hydrofilowości ekstraktów [18]. Przy użyciu spektrofotometru Cary 300 (Varian) w zakresie 200 ÷ 380 nm (UV) rejestrowano widma roztworów badanych związków w fazie organicznej, reprezentowanej przez oktanol przed inkubacją ekstraktów z roztworem fosforanowym i po niej. Maksimum absorbancji (A_0) i widma roztworów odpowiadały stężeniu badanych substancji w fazie organicznej, natomiast A_x – stężeniu badanych substancji, jakie pozostały w tej fazie, po 30 min inkubacji z buforem fosforanowym (A_x) [4]. Współczynnik podziału P obliczano z równania podanego przez Nenadisa i wsp. [18]:

$$P = \frac{A_x}{A_0 - A_x}$$

W celu ustalenia lokalizacji składników ekstraktów w błonie erytrocytów prowadzono badania określające wpływ tych związków na właściwości fizyczne hydrofilowego i hydrofobowego obszaru błony przy użyciu metody fluorymetrycznej. Zastosowano sondy fluorescencyjne DPH i Laurdan, które lokują się na różnych głębokościach błony. Sonda DPH emituje fluorescencję z obszaru łańcuchów węglowodorowych lipidów, natomiast chromofor sondy Laurdan jest zlokalizowany w obszarze glicerolu lipidów błonowych. Na podstawie zmian anizotropii fluorescencji sondy DPH i uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan, określono wpływ użytych ekstraktów na płynność hydrofobowego obszaru błony i uporządkowanie główek polarnych lipidów. Zmiany tych parametrów fizycznych świadczą o obecności użytych związków w badanych obszarach błon.

Próba kontrolna zawierała zawiesinę błon erytrocytów (0,1 mg/ml) i sondy fluorescencyjnej (10 μM), a do 3 ml próbek badanych dodawano odpowiednie ilości ekstraktów tak, aby ich stężenia wynosiły od 0,005 do 0,05 mg/ml. Intensywność fluorescencji była mierzona w temp. 37 °C dla dwóch sond Laurdan i DPH. Pomiar intensywności fluorescencji wykonywano przy użyciu fluorymetru CARY Eclipse, (Varian). Na podstawie zmierzonych wartości intensywności fluorescencji obliczano

wartości anizotropii fluorescencji sondy DPH i uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan według równań Lakowicza [16].

Aktywność przeciwutleniającą ekstraktów oznaczano metodą fluorymetryczną, według Bonarskiej-Kujawy i wsp. [6]. Wykorzystano w niej zależność intensywności fluorescencji sondy DPH-PA od stężenia wolnych rodników obecnych w roztworze. Do próbek z zawiesiną błon erytrocytów i sondy oraz odpowiednią ilością badanych ekstraktów dodawano związek AAPH, którego homolityczny rozpad prowadzi do powstania wolnych rodników. Za miarę stopnia utlenienia lipidów przyjęto względną intensywność fluorescencji (F/F_0), czyli stosunek fluorescencji badanej próbki utleniającej induktorem AAPH do początkowej fluorescencji tej próbki. Na podstawie otrzymanych wyników określono kinetyki utleniania lipidów błonowych w obecności ekstraktów użytych w 5 różnych stężeniach. Względne zmniejszenie intensywności fluorescencji (F/F_0 , gdzie F_0 – fluorescencja początkowa, F – fluorescencja po 30 min utleniania) przyjęto jako miarę stopnia utlenienia błon.

Statystyczną analizę wyników wykonano w programie Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa). Zastosowano analizę wariancji przy użyciu jednostronnego testu Dunnetta ($p = 0,05$), a wyniki pomiarów przedstawiono w postaci wartości średnich i odchyłeń standardowych. Każdy eksperyment wykonano w 5 powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

W ekstrakcie z czerwonej porzeczki zidentyfikowano 12 związków polifenolowych, w tym kwasy fenolowe, glikozydy kwercetyny oraz antocyjany, w szczególności cyjanidyny (tab. 1). Antocyjany były największą grupą związków fenolowych zawartych w ekstrakcie z czerwonej porzeczki i stanowiły 85 % jego frakcji polifenolowej. Wśród zidentyfikowanych antocyjanin najwięcej było cyjanidyno-3-*O*-kwylozylrutynozydu (ok. 65 %). Pozostałe związki polifenolowe, jak kwasy hydroksycynamonowe i pochodne flawonoli, stanowiły ok. 15 % frakcji polifenolowej tego ekstraktu.

W ekstrakcie z owoców żurawiny zidentyfikowano 22 związki polifenolowe w tym flawanole, flawonole, antocyjany oraz kwasy fenolowe (tab. 1). Procyjanidyny polimerowe stanowiły największą grupę związków fenolowych w owocach żurawiny i wynosiły 89,5 % s.m. zidentyfikowanej frakcji polifenolowej ekstraktu (tab. 1).

Współczynniki podziału ekstraktów pomiędzy oktanol i bufor fosforanowy wyrażono jako $\log P$. Ze wzrostem ujemnych wartości $\log P$ zwiększa się hydrofilowy charakter związków zawartych w ekstraktach. Dodatnie wartości parametru $\log P$ świadczą o hydrofobowym charakterze związków. Uzyskane wartości współczynnika podziału wskazują na hydrofilowy charakter polifenolowych składników ekstraktów z czerwonej porzeczki i żurawiny, przy czym bardziej hydrofilowe były składniki ekstraktu z czerwonej porzeczki (tab. 2).

Tabela 1. Zawartość i charakterystyka związków fenolowych w ekstraktach z owoców żurawiny i czerwonej porzeczki

Table 1. Content and profile of phenolic compounds in extracts from cranberry and red currant fruits

Ekstrakty Extracts	Żurawina Cranberry [mg/g]	Czerwona porzeczka Red currant [mg/g]	Rt [min]	λ_{\max} [nm]	[MS-]
Kwas neochlorogenowy Neochlorogenic acid	1,00	4,3	2,36	320	353
Dimer procyanidyny typu B B-type PA-dimer	4,18		2,66	280	577
Heksozyd kwasu kawowego / Caffeoyl-hexose		6,2	2,72	320	341
(+) katechina / (+)-catechin	6,82		3,16	280	289
Heksozyd kwasu kawowego Caffeoyl-hexose		2,1	3,40	320	341
Kwas chlorogenowy / Chlorogenic acid	2,10		3,53	320	353
Kwas kawowy / Caffeic acid	1,76		3,73	320	179
Procyanidyna B2 / Procyanidin B2	3,62		3,93	280	577
p-Kumaryloheksozyd / p-Coumaroyl-hexose		2,3	4,05	312	324
Trimer procyanidyny typu B B-type PA-trimer	1,20		4,48	280	865
(-) epikatechina / (-)-epicatechin	6,33		4,71	280	289
Cyjanidyno-heksozo-pentozyd (cyjanidyno-3-O-sambubiozyd) Cyanidin hexose-pentoside (cyanidin 3-O-sambubioside)		13,6	4,82	514	581
Cyjanidyno-3-O-galaktozyd Cyanidin-3-O-galactoside	5,36		4,83	515	449
Cyjanidyno (heksoza + pentoza)- deoksyheksozyd (cyjanidyno 3-O-(2G-ksylorutynozyd)) Cyanidin (hexose + pentose)-deoxyhexoside (cyanidin 3-O-(2G-xylosylrutinoside))		133,3	4,95	514	727
Cyjanidyno heksozo-deoksyheksozyd (cyjanidyno-3-O-rutynozyd) Cyanidinhexose-deoxyhexoside (cyanidin 3-O-rutinoside)		24,6	5,15	516	595
Cyjanidyno-3-O-arabinozyd Cyanidin-3-O-arabinoside	0,16		5,16	515	419
Kwercetyno-heksozo-deoksyheksozo- deoksyheksozyd / Quercetinhexose- deoxyhexose-deoxyhexoside		5,2	6,20	355	757
Procyanidyna C1 Procyanidin C1	2,82		5,20	280	865

Miryctyno-3- <i>O</i> -galaktozyd Myricetin-3- <i>O</i> -galactoside	0,26		5,83	355	479
Peonidyno-3- <i>O</i> -galaktozyd Peonidin-3- <i>O</i> -galactoside	0,29		6,06	515	463
Malwidyno-3- <i>O</i> -arabinozyd Malvidin-3- <i>O</i> -arabinoside	0,05		6,43	520	463
Kwercetyno-heksozo-deoksyheksozyd Quercetin-hexose-deoxyhexose		2,8	6,60	355	611
Miryctyno-3- <i>O</i> -arabinozyd Myricetin-3- <i>O</i> -arabinoside	0,15		6,75	355	449
Kwercetyno-3- <i>O</i> -galaktozyd Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside	0,08		7,12	355	463
Dimer procyanidyny typu B B-type PA-dimer	0,5		7,21	280	577
Kwercetyno-3- <i>O</i> -rutynozyd Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside		5,7	7,22	355	611
Kwercetyno-3- <i>O</i> -glukozyd Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	0,12		7,38	350	463
Kwercetyno-3- <i>O</i> -ksylozyd Quercetin-3- <i>O</i> -xyloside	0,16		7,95	350	433
Kwercetyno-3- <i>O</i> -glukozyd Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside		3,2	8,00	355	465
Kwas dikawowo-chinowy Di-caffeoyl quinic acid	0,22		8,26	320	515
Miryctyna / Myricetin	0,16		8,64	360	317
Kwercetyna / Quercetin	0,76		11,09	345	301
Polimery procyanidyny / Procyanidin polymers	285,61				
W sumie / Total	323,71	203,3			

Objaśnienie: / Explanatory notes:

Identyfikacja związków na podstawie: długości fali przy maksimum absorpcji (λ_{\max}), czasu retencji (Rt) i jonów ujemnych.(MS-) / Identification of compounds on the basis of: wavelength at maximum absorption (λ_{\max}), retention time (Rt), and negative ions (MS-)

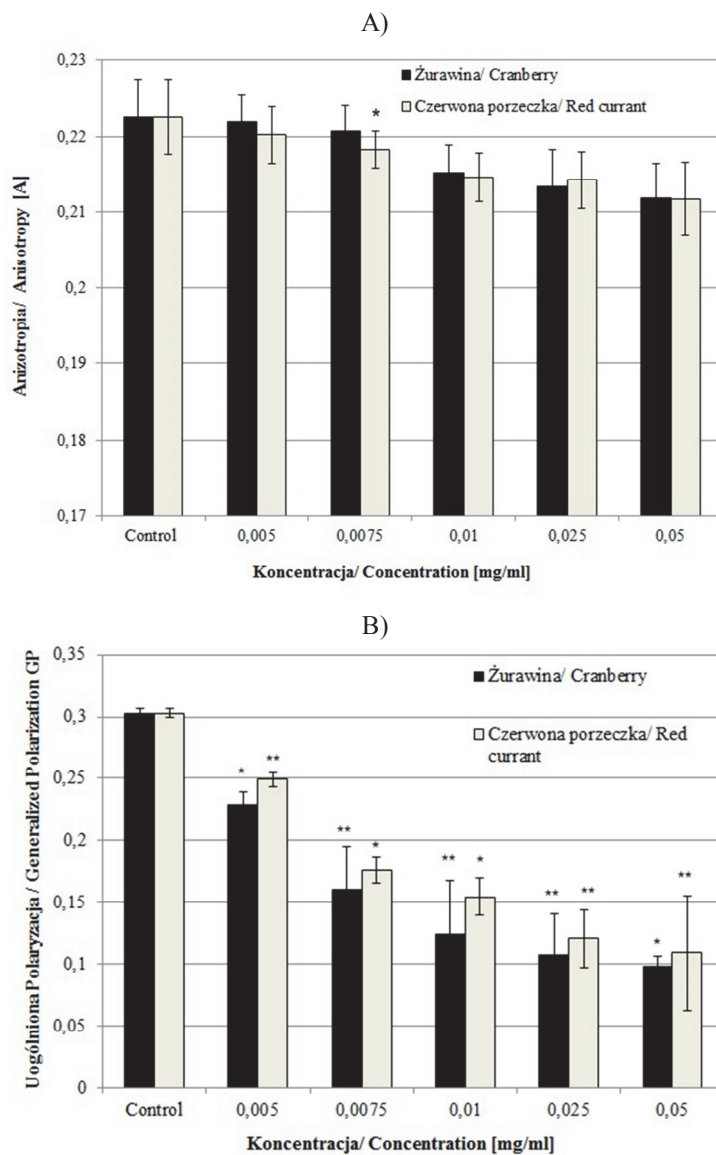
Tabela 2. Wartości współczynnika podziału oktanol / bufor fosforanowy ekstraktów z czerwonej porzeczki i żurawiny oraz standardowego przeciwutleniacza – Trolox[®]

Table 2. Values of octanol-phosphate buffer partition coefficient for cranberry and red currant extracts and standard antioxidant: Trolox[®]

Ekstrakt / Extract	log P (\bar{x})	s / SD
Żurawina / Cranberry	-0,611	0,048
Czerwona porzeczka / Red currant	-0,831	0,035
Trolox [®]	-0,805	0,044

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\bar{x} – wartość średnia / mean value; s – odchylenie standardowe / SD – standard deviation; n = 5



Objaśnienia: / Explanatory notes:

n = 5; * – różnice statystycznie istotne na poziomie $p = 0,01$ / statistically significant differences at $p = 0.01$;

** – różnice statystycznie istotne na poziomie $p = 0,05$ / statistically significant differences at $p = 0.05$.

Rys. 1. Wartość anizotropii (A) sondy DPH i uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan (B) dla błon erytrocytów modyfikowanych ekstraktami z owoców żurawiny i czerwonej porzeczki o różnych stężeniach w temp. 37 °C

Fig. 1. Values of (A) anisotropy of DPH probe and generalized polarization (GP) of Laurdan probe (B) for erythrocytes membranes modified using cranberry and red currant fruit extracts at different concentration rates, at 37 °C

Płynność błon w obszarze hydrofobowym, tj. na poziomie łańcuchów lipidów błonowych określono na podstawie anizotropii fluorescencji (A) sondy DPH, która lokuje się w tym obszarze błon. Nie wykazano istotnych zmian płynności błony erytrocytów pod wpływem badanych ekstraktów, co dowodzi, że związki obecne w ekstraktach pozostają na powierzchni błony, nie wnikając głęboko do obszaru hydrofobowego (rys.1A).

Zmiany zachodzące w części hydrofilowej błon pod wpływem badanych ekstraktów określone zostały na podstawie wartości uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan, rejestrującej zmiany parametru uporządkowania główek polarnych lipidów w błonie. Wyniki tych badań wskazują, że związki zawarte w ekstraktach zmieniły parametr uporządkowania lipidów, co przemawia za ich lokalizacją w tej części błon (rys. 1B). W obecności obydwu badanych ekstraktów nastąpiło wyraźne zmniejszenie uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan, który zależało od stężenia ekstraktów w roztworze.

Uzyskane wyniki badań z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych pozwalają sądzić, że obecne w ekstraktach polifenole koncentrują się głównie w obszarze hydrofilowym błon erytrocytów, natomiast nie wnikają do obszaru hydrofobowego dwuwarstwy lipidowej błony. Podobne spostrzeżenia w przypadku innych ekstraktów roślinnych, przy użyciu takich samych technik badawczych, przedstawiono w pracach [3, 24].

Tabela 3. Wartości stężeń IC_{50} ekstraktu z czerwonej porzeczki i żurawiny, określone metodą fluorymetryczną

Table 3. Values of IC_{50} concentration rates of cranberry and red currant extracts as determined using fluorescence method

Ekstrakt / Extract	Aktywność przeciwutleniająca Antioxidant activity IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]
Żurawina / Cranberry	$12,02 \pm 2,17$
Czerwona porzeczka / Red currant	$4,59 \pm 0,42$
Trolox®	$3,90 \pm 0,30$

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie \pm odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; $n = 5$

Stopień ochrony błon przed utlenieniem przez związki polifenolowe zawarte w ekstraktach określono fluorymetrycznie na podstawie stopnia gaszenia fluorescencji sondy DPH-PA przez wolne rodniki powstałe w wyniku rozpadu związku AAPH. Na podstawie uzyskanych kinetyk utleniania przy różnych stężeniach badanych ekstraktów wyznaczono wartości stężenia IC_{50} odpowiedzialnego za 50-procentową inhibicję stopnia utlenienia lipidów błonowych. Wykazano dobre właściwości przeciwutleniają-

ce użytych ekstraktów wobec lipidów błonowych, które porównano z aktywnością standardowego przeciwutleniacza, jakim jest Trolox[®]. Aktywność ekstraktu z czerwonej porzeczki była porównywalna z aktywnością Troloxu[®], zaś aktywność ekstraktu z żurawiny była mniejsza (tab. 3).

Wyniki aktywności przeciwutleniającej ekstraktów można powiązać z hydrofilowością ich ekstraktów. Hydrofilowość ekstraktu z żurawiny okazała się mniejsza, wykazywał on również mniejszą aktywność przeciwutleniającą. Jak wiadomo, hydrofilowość ekstraktów jest uwarunkowana ich składem polifenolowym. Antocyjany, w tym glukozydy cyjanidyny, które są głównymi składnikami polifenolowymi ekstraktu z czerwonej porzeczki, jak wykazano wcześniej [5], charakteryzują się dużą aktywnością przeciwutleniającą wobec błon erytrocytów oraz mają hydrofilowy charakter. Cyjanidyny dominują również w ekstrakcie z owoców aronii, czarnej porzeczki i jagody kamczackiej. Ekstrakty te chronią błony erytrocytów utleniane związkami AAPH w podobnym stopniu, jak ekstrakt z czerwonej porzeczki [4, 9]. Za aktywność przeciwutleniającą składników ekstraktu z żurawiny prawdopodobnie odpowiadają głównie zawarte w nim procyjanidyny, które ze względu na swoje duże rozmiary osłaniają grupy hydroksylowe innych związków zawartych w ekstrakcie, przez co ograniczają ich aktywność przeciwutleniającą. Potwierdziły to uzyskane wyniki – aktywność przeciwutleniająca ekstraktu z żurawiny była niższa od ekstraktu z czerwonej porzeczki, który zawiera mniej związków polifenolowych (ok. 40 %). Ponadto uważa się [7, 26], że za aktywność przeciwutleniającą ekstraktu z żurawiny odpowiadają przede wszystkim antocyjany, a następnie flawanole i flawonole. Mniejsza zawartość antocyjanów w ekstrakcie z żurawiny może wyjaśniać jego mniejszą aktywność przeciwutleniającą wobec błon erytrocytów niż ekstraktu z czerwonej porzeczki.

Wnioski

1. Stwierdzono, że ekstrakty z owoców czerwonej porzeczki i żurawiny są bogatym źródłem związków polifenolowych, w szczególności antocyjanów i procyjanidyn.
2. Związki polifenolowe zawarte w tych ekstraktach nie były obecne w hydrofobowym wnętrzu błony erytrocytów, ponieważ praktycznie nie zmieniały płynności błony w tym obszarze. Indukowały natomiast zmiany w części hydrofilowej błon erytrocytów, lokując się prawdopodobnie na ich powierzchni.
3. Ekstrakt z czerwonej porzeczki charakteryzował się wysoką aktywnością przeciwutleniającą, porównywalną z aktywnością Troloxu[®], dzięki dużej zawartości antocyjanów. Niższą aktywność przeciwutleniającą wykazywał ekstrakt z żurawiny, co prawdopodobnie było związane z obecnością w jego składzie procyjanidyn o dużym stężeniu.
4. Ochrona błony przed utlenianiem przez wolne rodniki obecne w roztworze była związana z obecnością na powierzchni błony związków polifenolowych zawartych

w ekstraktach. Taka lokalizacja polifenoli sprawia, że stanowią one barierę chroniącą błony biologiczne przed destrukcyjnym działaniem wolnych rodników.

Praca została sfinansowana ze środków statutowych Katedry Fizyki i Biofizyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Literatura

- [1] Arbos K.A., Claro M.L., Borges L., Santos C.A.M., Weffort-Santos A.M.: Human erythrocyte as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutr. Res.*, 2008, **28**, 457-463.
- [2] Arora A., Byren T.M., Nair M.G., Strasburg G.M.: Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, **1** (373), 102-109.
- [3] Bonarska-Kujawa D., Cyboran S., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H.: Biological activity of blackcurrant extracts (*Ribesnigrum* L.) in relation to erythrocyte membranes. *BioMed Res. Inter.*, 2014, Article ID 783059, DOI: 10.1155/2014/783059.
- [4] Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Cyboran S., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H.: Biophysical mechanism of the protective effect of the polyphenols extracts from blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast.) against lipid peroxidation of erythrocyte and lipid membranes. *J. Membrane Biol.*, 2014, **247**, 611-625.
- [5] Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Kleszczyńska H.: Interaction of selected antocyanins with erythrocytes membrane and liposomes membranes. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2012, **17**, 289-308.
- [6] Bonarska-Kujawa D., Sarapuk J., Bielecki K., Oszmiański J., Kleszczyńska H.: Antioxidant properties of extracts from apple, chokeberry and strawberry. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2012, **4** (62), 229-234.
- [7] Borges G., Degeneve A., Mullen W., Crozier A.: Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants and cranberries. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 3901-3909.
- [8] Bradford M.: Rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- [9] Cyboran S., Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H.: Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. *Food Res. Int.*, 2014, DOI: 10.1016/j.foodres.2014.05.037.
- [10] Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of erythrocytes. *Arch. Biochem.*, 1963, **100**, 119-130.
- [11] Duchnowicz P., Bors M., Podsędek A., Koter-Michalak M., Broncel M.: Effect of polyphenols extracts from *Brassica* vegetables on erythrocyte membranes (*in vitro* study). *Environ. Toxic. Pharmacol.*, 2012, **34**, 783-790.
- [12] Duthie S.J., Jenkinson A.M.E., Crozier A., Mullen W., Pirie L., Kyle J., Yap L. S., Christenm P., Duthie G.G.: The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relation to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur. J. Nutr.*, 2006, **45**, 113-122.
- [13] Gąsiorowski K., Szyba K., Brokos B., Kozaczyńska B., Jankowiak W.M., Oszmiański J.: Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *Cancer Lett.*, 1997, **119**, 37-46.
- [14] Goiffon J.P., Mouly P.P., Gaydou E.M.: Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 1999, **382**, 39-50.
- [15] Konic-Ristic A., Savikin K., Zdunic G., Jankovic T., Juranic Z., Menkovic N., Stankovic I.: Biological activity and chemical composition of different berry juice. *Food Chem.*, 2011, **125**, 1412-1417.

- [16] Lakowicz J.R.: Fluorescence anisotropy. In: Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rdedn. Springer, New York 2006, pp. 353-382.
- [17] Maatta-Rihinein K.R., Kamal-Eldin A., Mattila P.H., Gonzales-Paramas A.M., Torronen A.R.: Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. J. Agric. Food Chem., 2004, **52**, 4477-4486.
- [18] Nenadis N., Boyle S., Bakalbassis E.G., Tsimidou M.: An experimental approach to structure-activity relationships of caffeic and dihydrocaffeic acids and related monophenols. J. Am. Oil Chem. Soc., 2003, **5** (80), 451-458.
- [19] Oszmiański J., Wojdyło A., Gorzelny J., Kapusta I.: Identification and characterization of low molecular weight polyphenols in berry leaf extracts by HPLC-DAD and LC-ESI/MS. J. Agric. Food Chem., 2011, **59**, 12830-12835.
- [20] Pantelidis G.E., Vasilakakis M., Manganaris G.A., Diamantidis G.: Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currant, gooseberries and Cornelian cherries. Food Chem., 2007, **102**, 777-783.
- [21] Parasassi T., Krasnowska E.K., Bagatolli L., Gratton E.: Laurdan and prodan as polarity-sensitive fluorescent membrane probes. J. Fluorescence 1998, **4** (8), 365-373.
- [22] Prior R.L., Lazarus S.A., Cao G., Muccitelli H., Hammerstone J.F.: Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium spp.*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., 2001, **49**, 1270-1276.
- [23] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.: Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci., 1997, **2** (4), 152-159.
- [24] Suwalsky M., Oyarce K., Avello M., Villena F., Sotomayor C.P.: Human erythrocytes and molecular models of cell membranes are affected in vitro by *Balbisia peduncularis* (Amancay) extracts. Chem.-Biol. Interact., 2009, **179**, 413-418.
- [25] Teleszko M., Wojdyło A., Oszmiański J.: Zawartość kwasu elagowego i spolimeryzowanych proantocyjanidyn w pseudoowocach wybranych gatunków róż. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2012, **5** (84), 37-46.
- [26] Teleszko M.: Żurawina wielkoowocowa – możliwości wykorzystania do produkcji biożywności. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2011, **6** (79), 132-141.
- [27] Flvendenskaya I.O., Rosen R.T., Guido J.E., Russell D.J., Mills K.A., Vorsa N.: Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. J. Agric. Food Chem., 2004, **52**, 188-195.
- [28] Wojnicz D., Sych Z., Walkowski S., Gabrielska J., Włoch A., Kucharska A., Sokół-Łętowska A., Hendrich A.B.: Study on the influence of cranberry extract Żuravit S.O.S[®] on the properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains, their ability to form biofilm and its antioxidant properties. Phytomed., 2012, **19**, 506-514.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM RED CURRENT AND CRANBERRY FRUITS WITH REGARD TO ERYTHROCYTES MEMBRANE

Summary

The objective of the research study was to determine the antioxidant activity of aqueous solutions of extracts from red current and cranberry with regard to the erythrocytes membrane, and the mechanism responsible for that activity. The polyphenolic composition of the extracts was determined using an ultra-performance liquid chromatography method with diode array detection and mass analysis (UPLC-DAD-MS). Spectrophotometrically was determined a partition coefficient for compounds contained in extracts between the organic and aqueous phases. The antioxidant activity of extracts towards the erythrocytes

membrane was analyzed using a fluorescence method on the basis of a quenching degree of DPH-PA probe fluorescence, whereas the oxidation of the erythrocytes membranes was induced by an AAPH compound. The fluorescence spectroscopy was also used to determine the location of phenolic compounds, contained in the extracts, in the erythrocyte membrane.

It was found that the red currant and cranberry fruits were rich in polyphenols, in particular in anthocyanins and procyanidins. With the use of fluorescence probes, it was proved that polyphenolic compounds contained in the extracts did not penetrate into the hydrophobic region of the membrane; the absence of any changes in the fluorescence anisotropy confirmed it. However, they bound to the region of polar heads on the membrane surface and changed their packing as evidenced by the decrease in the generalized polarization. It was proved that the polyphenols in the extracts efficiently protected the erythrocytes membrane against harmful activity of free radicals induced by the AAPH compound in the aqueous environment. Furthermore, it was proved that the antioxidant activity of red currant extract ($IC_{50} = 4.59 \mu\text{g/ml}$) was comparable to that of a standard antioxidant, i.e. of Trolox[®] ($IC_{50} = 3.9 \mu\text{g/ml}$) and that it was better than the activity of cranberry extracts ($IC_{50} = 12.02 \mu\text{g/ml}$).

Key words: polyphenolic extracts, red currant and cranberry fruits, erythrocyte membrane, fluidity of membrane, antioxidant activity of extracts ☒