

Oznaczanie składu i weryfikacja składu podanego przez producenta wszelkich produktów w tym też produktów kosmetycznych jest niezwykle istotna i potrzebna. Wskazuje na to fakt, że analiza tylko dziewięciu kosmetyków pozwoliła wyodrębnić te produkty, których skład faktyczny jest różny od deklarowanego przez producenta. Niektóre związki wymienione w składzie nie występują w produkcie lub znajdują się w nieoznaczalnym stężeniu, a inne, mimo, że nie są deklarowane, mogą zostać wykryte.

Wiadomo też, że na datę ważności (przydatności) ma wpływ nie tylko ilość różnych konserwantów w kosmetykach, ale także ich stężenie w próbkach oraz obecność innych składników aktywnych, np. związków polifenolowych czy witamin.

Literatura

- [1] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych.
- [2] Malinka W., Zarys Chemii Kosmetycznej, Volumed, Wrocław 1999.
- [3] Lamer-Zarawska E., Chwała C., Gwardys A., Rośliny w kosmetyce i kosmetologii przeciwstarzeniowej, Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2015.
- [4] Pawlik A., Niewęgłowska-Wilk M., Kalicińska J., Śpiewak R., Kosmetyki „naturalne”, „biologiczne” i „ekologiczne”. Gwarancja bezpieczeństwa czy marketing? *Kosmetologia Estetyczna*, 2017, 2, s. 125-127.
- [5] *Kosmetologia i farmakologia skóry*, red. Martini M.-C., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008.
- [6] Bojarowicz H., Wojciechowska M., Gocki J., Substancje konserwujące stosowane w kosmetykach oraz ich działania niepożądane, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2008, 89(1), s. 30-33.
- [7] Marwicka J., Niemyska K., Wiczorek M., Parabeny jako substancje konserwujące stosowane w preparatach kosmetycznych oraz ich wpływ na apoptozę fibroblastów skóry człowieka, *Kosmetologia Estetyczna*, 2017, 6, s. 561-568.
- [8] Bojarowicz H., Wnuk M., Buciński A., Efektywność i bezpieczeństwo stosowania parabenów, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2012, 93(4), s. 647-653.
- [9] Dréno B., Zuberbier T., Gelmetti C., Gontijo G., Marinovich M. Safety review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2019, 33, s. 15-24.
- [10] Kosmetyki – bioaktywne składniki: praca zbiorowa, red. Schroeder G., *Cursiva*, [Kostrzyn] 2012.
- [11] Dziennik Urzędowy Uni Europejskiej dot. produktów kosmetycznych, 22.12.2009; I 342/59
- [12] Nair B., Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and Sodium Benzoate, *International Journal of Toxicology*, 2001, 20, s. 23-50.

Do cytowania:

Głaszczka I., Paradowska K., Ocena możliwości zastosowania magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) w jakościowej analizie wybranych konserwantów obecnych w kosmetykach, *Herbalism*, 2022 1(8), s. 27-44.

Synergistyczne i antagonistyczne działanie przeciwutleniające w dwuskładnikowych mieszaninach wybranych polifenoli i kwasu L-askorbinowego

Synergistic and antagonistic antioxidant effects in two-component mixtures of selected polyphenols and L-ascorbic acid

Marta Głowacka, Agnieszka Zielińska*

Zakład Chemii Organicznej i Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, e-mail: agnieszka.zielinska@wum.edu.pl

Słowa kluczowe: kwas L-askorbinowy, polifenole, synergizm, antagonizm, właściwości antyoksydacyjne

Key words: L-ascorbic acid, polyphenols, synergism, antagonism, antioxidant properties

Streszczenie

Witaminy, związki fenolowe i karotenoidy są najczęściej występującymi w owocach i warzywach naturalnymi substancjami antyoksydacyjnymi. Przeciwutleniacze chronią komórki przed oksydacyjnym uszkodzeniem przez reaktywne formy tlenu i inne rodniki. Pomiędzy tymi składnikami mogą zachodzić interakcje zarówno wzmacniające efekt antyoksydacyjny, jaki i go osłabiający. Przykładami tych interakcji są: synergizm, charakteryzujący się tym, że efekty wywoływane przez składniki w mieszaninie są wyższe, a antagonizm, gdy efekty są niższe, niż wynikałoby to z sumy działania poszczególnych składników stosowanych oddzielnie. Jeśli pomiędzy poszczególnymi badanymi substancjami interakcje nie zachodzą, a wartość oczekiwana i obserwowana nie różnią się istotnie od siebie, możemy zaobserwować efekt addytywny. Ze względu na zwiększające się zainteresowanie naturalnymi antyoksydantami, są one szeroko stosowane w suplementach diety oraz kosmetykach. Dzięki wiedzy na temat możliwych interakcji można tworzyć produkty handlowe o lepszych właściwościach przeciwutleniających, jednocześnie optymalizując proces ich powstawania. W publikacji przedstawiono wyniki badań interakcji pomiędzy kwasem askorbinowym a wybranymi kwasami fenolowymi, flawonoidami i kumarynami. Właściwości antyoksydacyjne oznaczono metodami FRAP, ABTS, Folina-Ciocalteu'a oraz DPPH. Na podstawie pomiarów określono działania antagonistyczne, synergistyczne lub addytywne mieszanin w porównaniu do czystych związków.

Summary

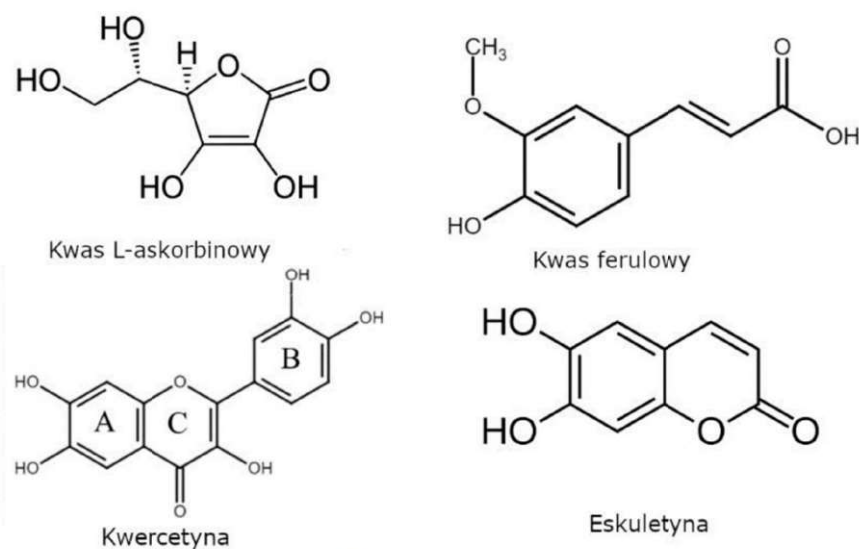
Vitamins, phenolic compounds and carotenoids are the most common natural antioxidant substances found in fruits and vegetables. Antioxidants protect cells from oxidative damage by reactive oxygen species and other radicals. There may be interactions between these components, both enhancing the antioxidant effect and weakening it. The synergistic effect is characterized by the fact that the theoretical sum of the effects of the individual components in a mixture is lower than the observed value, and antagonistic when the expected sum of effects is higher than their observed value. If there are no interactions between the individual substances tested, and the expected and observed values do not differ significantly from each other, we can observe an additive effect. Due to the growing interest in natural antioxidants, we can observe their increasing use in dietary supplements and cosmetics. Thanks to the knowledge about possible interactions, we can create commercial products with better antioxidant properties, while optimizing their composition. The publication presents the results of the interaction studies between ascorbic acid and selected phenolic acids, flavonoids and coumarins. Antioxidant properties were determined by FRAP, ABTS, Folin-Ciocalteu and DPPH methods. The antagonistic, synergistic or additive effects of the mixtures were determined in comparison to the pure compounds.

Wstęp

Kwas L-askorbinowy ze względu na swój hydrofilowy charakter jest rozpuszczalny w wodzie oraz rozcieńczonych alkoholach. Związek ten (Rysunek 1.) jest najbardziej trwały w stanie stałym, natomiast w roztworach wodnych ulega rozkładowi pod wpływem podwyższonej temperatury, obecności tlenu, żelaza i miedzi, a jego roztwory, ze względu na kwasowy charakter cząsteczki, wykazują najlepszą trwałość w pH 4-6 [1, 2]. Kwas L-askorbinowy wykazuje silne właściwości antyoksydacyjne. W stosunkowo niskim stężeniu może być donorem wodoru (mechanizm HAT z ang. *hydrogen atom transfer*) lub elektronów (mechanizm SET, z ang. *single electron transfer*). Oddając elektron przekształca się w rodnik askorbylowy, a następnie w kwas L-dehydroaskorbinowy (DHA) (utleniona forma kwasu askorbinowego). Zarówno rodnik askorbylowy jak i kwas L-dehydroaskorbinowy są odwracalnie przekształcane do kwasu askorbinowego. Obie formy (utleniona i zredukowana) chronią białka, węglowodany, lipidy oraz kwasy nukleinowe przed oksydacyjnym uszkodzeniem poprzez reaktywne formy tlenu i inne rodniki (m.in. rodniki ponadtlenkowe, rodnik hydroksylowy, tlen singletowy, nadtlenek wodoru). Kwas L-askorbinowy jest obecny w wysokich stężeniach w organach posiadających wysoką aktywność metaboliczną np. w wątrobie, nadnerczach, mózgu, gruczołach śluzowych, trzustce, żołądku oraz płucach, odgrywa znaczącą rolę w zapobieganiu uszkodzeniom mózgu przez rodniki [2].

Kwas L-askorbinowy może być stosowany miejscowo w celu neutralizacji rodników powstałych przez ekspozycję na promieniowanie nadfioletowe i inne czynniki środowiskowe, takie jak dym papierosowy czy zanieczyszczenia [3]. Zastosowanie 10% roztworu kwasu wykazuje zmniejszenie się oparzeń słonecznych o 40-60% oraz rumienia o 52% [4]. Kwas L-askorbinowy bierze udział w procesach syntezy kolagenu (poprzez interakcję z jonami metali przejściowych, głównie miedzi i żelaza), karnityny, kwasu foliowego, hormonów katecholaminowych (adrenaliny, noradrenaliny), aminowanych hormonów peptydowych (wazopresyny) oraz regeneruje witaminę E [5].

W suplementach diety kwas L-askorbinowy lub jego pochodne często łączone są z ekstraktami roślinnymi. Ich ważnym składnikiem są kwasy fenolowe (Rysunek 1) – pochodne kwasu hydroksycynamonowego i kwasu hydroksybenzoowego. Najbardziej znane kwasy hydroksycynamonowe to kwas kawowy, ferulowy, synapowy i p-kumarowy. W roślinach grupa ta występuje przeważnie jako pochodne glikozydów, amidów i estrów glukozy lub kwasu chinowego. Przykładem może być kwas chlorogenowy, który jest połączeniem kwasu kawowego i chinowego [6, 7]. Kwasy fenolowe wykazują właściwości przeciwutleniające, mogą działać jako donory wodoru i reagować z reaktywnym tlenem oraz azotem, doprowadzając w ten sposób do reakcji terminacji, która przerywa łańcuchowe reakcje rodnikowe. Wykazują zdolność do chelatowania jonów metali enzymów biorących udział w reakcjach oksydacyjnych. Zdolności przeciwutleniające kwasów fenolowych polegają także na stabilizacji rodników, powstających w reakcjach utlenienia przez ich uwodornienie lub kompleksowanie [7].



Rysunek 1. Kwas L-askorbinowy i przykładowe związki użyte w badaniach.

Figure 1. L-ascorbic acid and examples of compounds used in the research

Flawonoidy charakteryzują się 15-węglowym szkieletem, składającym się z dwóch pierścieni aromatycznych (Rysunek 1). Różnią się poszczególnymi podstawnikami, stopniem nasycenia i utlenieniem pierścienia. Naturalnie najczęściej

występują w postaci glikozydów. Są one bardziej stabilne niż wolna postać flawonoidów, chociaż mają dość niską biodostępność, dlatego często wymagają hydrolizy do aglikonu. W postaci aglikonu naturalnie występują flawony i flawonole [8]. Flawonoidy wykazują wiele właściwości, między innymi działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwzakrzepowe, wzmacniające i uszczelniające ściany naczyń krwionośnych [9]. Związki te działają antyoksydacyjne poprzez chelatowanie jonów metali oraz inhibicję niektórych enzymów wytwarzających rodniki. Ze względu na wysoką reaktywność grupy hydroksylowej, flawonoidy reagują z rodnikiem tworząc mało aktywne, krótko żyjące rodniki, które bardzo szybko ulegają rekombinacji. Najsilniejsze działanie przeciwutleniające wykazują flawony i flawonole [10]. Strukturami wpływającymi na działanie przeciwutleniające są ułożenie w pozycji orto grup hydroksylowych w pierścieniu B (Rysunek 1), obecność grup hydroksylowych, wiązanie nienasycone między węglami C2 i C3 w sąsiedztwie z grupą karbonylową w pierścieniu C oraz O-metylacja [11].

Kolejną grupą związków wykazujących działanie antyoksydacyjne są kumaryny, o strukturze benzo- α -pironu, podobne chemicznie do flawonoidów. Najczęściej występują jako cząsteczki lub aglikony w glikozydach [9]. Kumaryny wykazują działanie przeciwzapalne, przeciwskurczowe, przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, przeciwzakrzepowe, antybakteryjne i przeciwwirusowe [12, 13]. Główną właściwością kumaryn jest działanie przeciwutleniające, które polega na hamowaniu wytwarzania reaktywnych form tlenu RFT oraz ich wychwytywaniu. Aktywność antyoksydacyjna może dotyczyć różnych mechanizmów, w zależności od struktury chemicznej kumaryn. Efekt przeciwutleniający jest skorelowany z miejscem przyłączenia i liczbą elektrodonorowych grup hydroksylowych. Inną metodą hamowania powstawania rodników przez kumaryny jest chelatowanie jonów metali przejściowych, takich jak żelazo czy miedź [9, 14].

Na rynku spotykane są suplementy zawierające mieszanki witaminy C w postaci kwasu L-askorbinowego lub jego pochodnych oraz polifenoli. Większość z nich ma za zadanie wspomagać układ odpornościowy, pozostałe działania związane są z aktywnością przeciwutleniającą wybranych związków. Przykładowo dodawany jest kwas ferulowy, witamina E, kwercetyna, rutyna, hesperydyna, naryngenina, a także wiele ekstraktów roślinnych, np. z: korzenia kurkumy, czarnego bzu, dzikiej róży, czarnej porzeczki, owoców cytrusowych.

Analizując właściwości antyoksydacyjne stwierdzono, że efekty synergistyczne występują, gdy połączenie dwóch lub więcej substancji wykazuje silniejszy efekt antyoksydacyjny niż suma działania każdego z nich oddzielnie. Synergistyczne działanie antyoksydacyjne nie jest do końca wyjaśnione. Przykładowe hipotezy mechanizmu synergistycznego to: powstawanie dimerów i adduktów oraz nowych substancji fenolowych, które posiadają silniejszą aktywność przeciwutleniającą

od substratów reakcji; antyoksydant o niższym potencjale redukuje antyoksydant o wyższym potencjale redukcyjnym; tworzenie kompleksów międzycząsteczkowych pomiędzy antyoksydantami, wykazującymi silniejsze właściwości przeciwutleniające niż związki macierzyste; nieokreślone reakcje między substancjami; inna rozpuszczalność przeciwutleniaczy, powodująca różnice w rozkładzie związków między fazami [15, 16].

Antagonizm to zjawisko, w którym połączenie dwóch lub więcej związków wykazuje słabszy efekt antyoksydacyjny, w porównaniu do sumy matematycznej ich działania oddzielnie. Mechanizm interakcji antagonistycznej, można spróbować wyjaśnić poprzez: powstawanie adduktów i kompleksów pomiędzy antyoksydantami; redukcja słabszego antyoksydantu poprzez silniejszy przeciwutleniacz; polimeryzacja antyoksydantów; nieodwracalne reakcje rodników, prowadzące do ich zneutralizowania; nieprzewidywalne reakcje między substancjami [15, 16]. Z kolei efekt addytywny to zjawisko, gdy przeciwutleniacze w złożonej mieszaninie mają takie same właściwości antyoksydacyjne, jak suma matematyczna ich działania oddzielnie. Efekt ten zakłada brak interakcji lub nieprzewidywalne reakcje między antyoksydantami w mieszaninie [15].

Stosunkowo dużo poświęcono uwagi badaniu wpływu kwasu L-askorbinowego na właściwości antyoksydacyjne kwercetyny [17]. Zdolność zmiatania rodnika ABTS przez kwercetynę, niezależnie od stosunku składników mieszaniny, można przedstawić jako addytywną. Jednak przy użyciu testu z rodnikiem DPPH proporcje badanej mieszaniny mają wpływ na wyniki doświadczenia. Stosunek wagowy 3:1, 2:1, 1:1 kwercetyny do kwasu L-askorbinowego wykazuje właściwości addytywne obu składników mieszaniny, ale przy nadmiarze kwasu (1:2, 1:3) wykazano ich antagonizm względem rodnika DPPH. Podane różnice mogą wynikać z środowiska obu reakcji. W teście TEAC (reakcja z rodnikiem ABTS) był to bufor o pH 7,4, a w teście DPPH metanol [17]. Wyniki pomiarów TEAC właściwości antyoksydacyjnych kwasu askorbinowego i kwercetyny w różnym pH były stałe dla kwasu w całym zakresie, jednak dla kwercetyny wzrastały one wraz ze wzrostem pH [18]. W celu wyjaśnienia antagonistycznego oddziaływania kwercetyny z kwasem L-askorbinowym w zależności od stosunku składników mieszaniny, zaproponowano mechanizm działania polegający na tworzeniu kompleksu molekularnego połączonego wiązaniem wodorowym pomiędzy grupą C4'-OH cząsteczki flawonoidu, a grupą C2-OH i karbonylowym atomem tlenu cząsteczki kwasu. Zablokowanie reaktywnej grupy C4'-OH flawonoidu, powoduje obniżenie jej dostępności dla rodników oraz zmniejszenie jej zdolności do oddawania elektronów [18]. Kwercetyna (jak i rutyna) posiada w swoich cząsteczkach grupy hydroksylowe przy atomach węgla 3' i 4' w pierścieniu B, grupę 3-hydroksy-4-karbonylową oraz pierścień γ -pirolowy. Dzięki temu oprócz wiązania jonów metali np. miedzi, nie tylko hamuje powstawanie RFT, ale również inhibituje konwersję kwasu askorbinowego do kwasu dehydroaskorbinowego [19].

W badaniach nad wpływem pH środowiska na właściwości antyoksydacyjne, wykazano, że kwas L-askorbinowy stabilizuje katechiny, które są nietrwałe w środowisku obojętnym i zasadowym [20]. W doświadczeniach nad interakcjami tego kwasu z kwercetyną i rutyną wykazano, że typ interakcji może się zmieniać w zależności od pH środowiska, proporcji składników w mieszaninie oraz ich rodzaju [18, 21].

Aktywność przeciwutleniającą mieszaniny kwasu L-askorbinowego i kwasu ferulowego, badaną metodą DPPH można określić jako oddziaływanie antagonistyczne obu substancji. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tego zjawiska jest degradacja do związku mniej reaktywnego [15]. Wyjaśnieniem działania antagonistycznego może być również to, że silniejszy przeciwutleniacz szybko zmniejsza stężenie kationowych rodników (np. DPPH czy ABTS), zmniejszając w ten sposób szybkość reakcji pomiędzy słabszym antyoksydantem a rodnikiem, ze względu na zmniejszenie się ilości kationorodników. Takie obserwacje mogą prowadzić do wniosku, że obserwowany efekt antagonistyczny w mieszaninach zależy nie tylko od stężenia antyoksydantów czy środowiska reakcji, ale również od stężenia rodników kationowych [22]. Natomiast właściwości antyoksydacyjne mieszaniny kwasu kawowego i witaminy C mierzone przy pomocy metody ORAC (z ang. oxygen radical absorbance capacity – zdolność wiązania rodników tlenowych), wskazują na efekt synergistyczny [15].

Interakcje polifenoli i kwasu L-askorbinowego nie zawsze są addytywne, co może wpływać na właściwości suplementów diety oraz produktów leczniczych. Skutki działania fizjologicznego między tymi związkami wymagają badań *in vivo*. Jednak na podstawie przedstawionych wyników testów *in vitro*, można przewidzieć wpływ wielu czynników, np. pH, na właściwości antyoksydacyjne przeciwutleniaczy. Celem pracy było zbadanie efektów synergistycznych i antagonistycznych w mieszaninach dwuskładnikowych wybranych flawonoidów i kwasu L-askorbinowego.

Materiał i metody

Do badań oddziaływań z kwasem L-askorbinowym (CAS 50-81-7) wybrano związki z najważniejszych grup polifenoli, dobranych pod względem różnic strukturalnych, głównie ilości grup OH, ale także w przypadku flawonoidów, pozycją pierścienia B: a) kwasy fenolowe: kawowy (CAS 331-39-5), trans-ferulowy (CAS 537-98-4), cynamonowy (CAS 140-10-3), p-kumarowy (501-98-4), chlorogenowy (CAS 327-97-9), b) flawonoidy: flawonole: chryzyna (CAS 480-40-0), kwercetyna (CAS 117-39-5), rutyna (CAS 153-18-4), flawanony: naryngenina (CAS 480-41-1), (-) epikatechina (CAS 490-46-0), izoflawonoid: daidzeina (CAS 490-46-0), kumaryny: umbeliferon (CAS 93-35-6), eskuletyna (CAS 305-01-1) i jej glikozyd: eskulina (CAS 531-75-9). Przygotowano 1 mM roztwory substancji wzorcowych w 70% etanolu. Wszystkie użyte w badaniach substancje chemiczne zostały zakupione

w Sigma-Aldrich i Avantor. Badania UV/VIS wykonano na spektrofotometrze EVOLUTION 60S Thermo Fisher Scientific. Wszystkie pomiary były powtarzane trzykrotnie. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy MS Excel® i Statistica® 13.

Metody badania właściwości przeciwutleniających

Aktywność przeciwutleniającą metodą FRAP (*Ferric reducing ability of plasma*) wyznaczono zgodnie z metodyką Gliszczyńskiej-Świągło oraz Prior i in. [17, 23]. Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali 593 nm. Wykonano pomiary dla czystych substancji i mieszanin z kwasem askorbinowym w stosunku 1:1. Wyniki FRAP uzyskano na podstawie krzywej wzorcowej dla sporządzonej dla Troloxu i przedstawiono jako wartość FRAP wyrażone jako równoważniki Troloxu TE na μmol związku [$\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$].

Wyznaczenie zdolności zmiatania rodnika ABTS wykonano metodą opisaną przez Tyrakowską i in. [24]. Badania wykonano dla tych samych próbek jak powyżej. Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali 734 nm. Zdolność zmiatania rodnika ABTS dla badanych roztworów, wyrażone jako równoważniki Troloxu [$\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ związku], odczytano z krzywej wzorcowej.

Pomiary całkowitej zawartości polifenoli metodą Folina-Ciocalteu'a wykonano zgodnie z Singleton i Rossi [25]. Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali 765 nm.

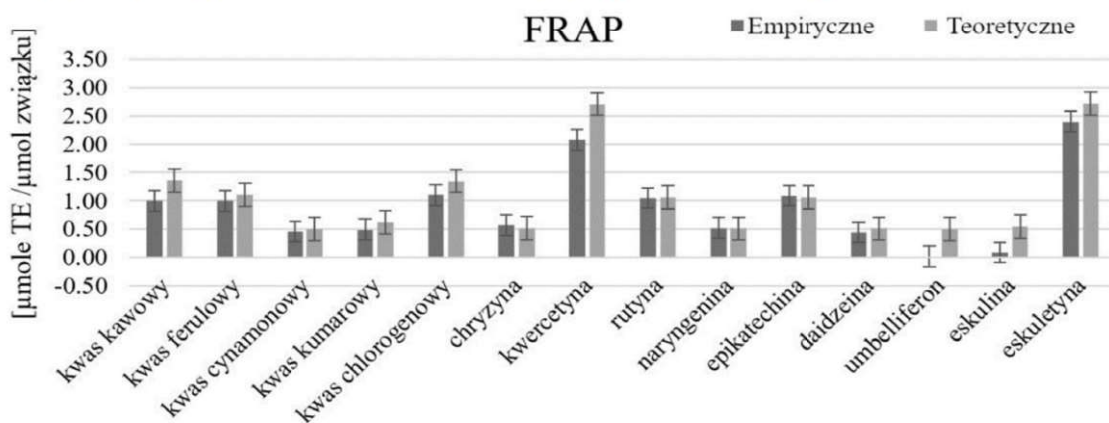
Całkowitą zawartość polifenoli dla badanych roztworów, wyrażoną jako równoważniki kwasu galusowego [$\mu\text{g GAE}/\mu\text{mol}$ związku], odczytano z krzywej wzorcowej.

Wyznaczenie zdolności zmiatania rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrylu) wykonano metodą na podstawie Branda-Williamsa [26] dostosowaną do pomiarów techniką EPR. Pomiary wykonano za pomocą spektrometru EPR Magnetech MiniScope MS200. Widma EPR zarejestrowano trzykrotnie dla każdej próbki. W oparciu o intensywność widm obliczono zdolność zmiatania rodnika DPPH, którą przedstawiono w postaci: [$\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ związku].

Wyniki i dyskusja

W celu potwierdzenia addytywnego, synergistycznego lub antagonistycznego działania wybranych związków w mieszaninie z witaminą C, dla wszystkich metod policzono teoretyczną aktywność przeciwutleniającą mieszaniny, sumując indywidualne efekty jej składników i porównano ją z aktywnością zmierzoną dla badanej mieszaniny. Jako istotne różnice między wartością empiryczną a teoretyczną przyjęto $p < 0,05$. Wyniki pomiarów dla metody FRAP przedstawiono na Rysunku 2. Chryzyna, naryngenina, daidzeina i umbeliferon stosowane samodzielnie nie wykazały działania antyoksydacyjnego mierzonego za pomocą metody FRAP, za efekt przeciwrodnikowy w mieszaninie odpowiadał kwas L-askorbinowy. Oddziaływania

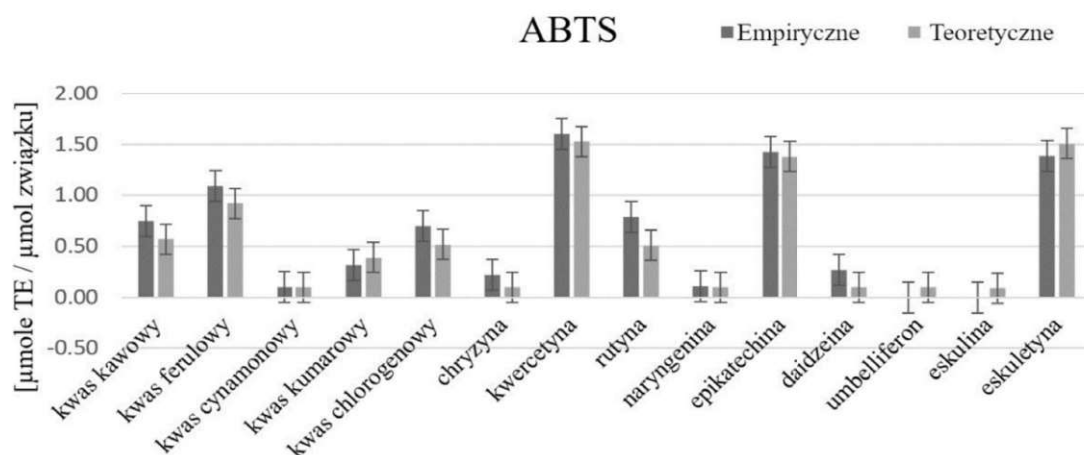
antagonistyczne wykazały mieszaniny z kwasem kawowym, kwercetyną i eskuletyną. W przypadku pozostałych związków stwierdzono efekt addytywny kwasu L-askorbinowego z rutyną, naryngeniną oraz epikatechiną obserwowany jest efekt addytywny. Jedynie w mieszaninie z chryzyną stwierdzono synergizm.



Rysunek 2. Wartości FRAP empiryczne i teoretyczne dwuskładnikowych mieszanin polifenoli z kwasem L-askorbinowym.

Figure 2. FRAP values measured and theoretical for binary mixtures of polyphenols with L-ascorbic acid.

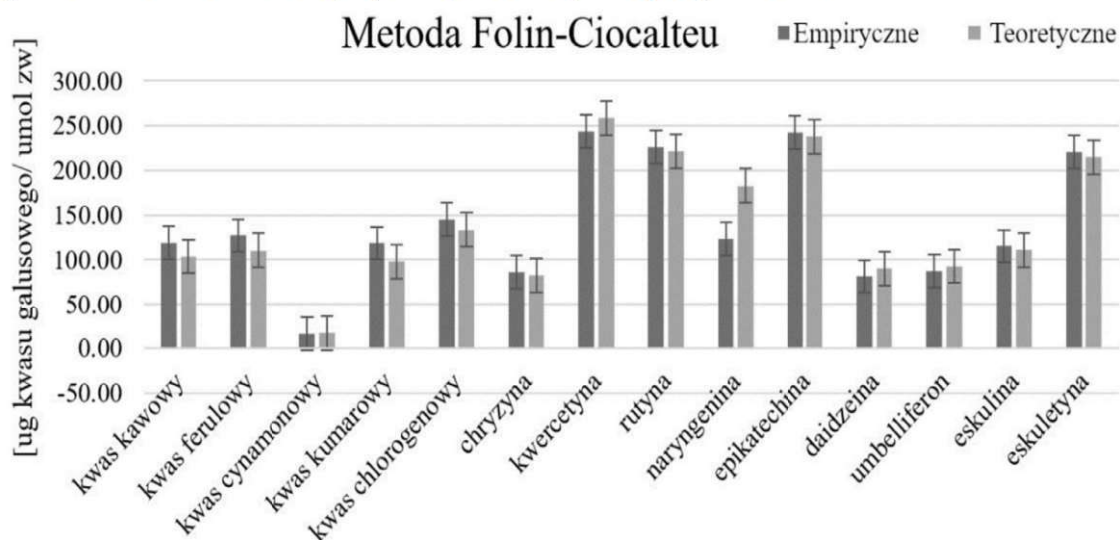
Inne wyniki uzyskano z pomiarów metodą z użyciem rodnika ABTS. Oddziaływanie antagonistyczne odnotowano w mieszaninach kwasu askorbinowego z kwasem kumarowym, umbelliferonem, eskuliną i eskuletyną. Natomiast efekt synergistyczny wykazywały mieszaniny witaminy C z kwasem kawowym, ferulowym, chlorogenowym, chryzyną, rutyną i daidzeiną. Pozostałe mieszaniny związków polifenolowych z kwasem askorbinowym przedstawiały efekt addytywny (Rysunek 3).



Rysunek 3. Zdolność zmiatania rodnika ABTS – wartości empiryczne i teoretyczne dwuskładnikowych mieszanin polifenoli z kwasem L-askorbinowym.

Figure 3. ABTS radical scavenging ability – measured and theoretical values of binary mixtures of polyphenols with L-ascorbic acid.

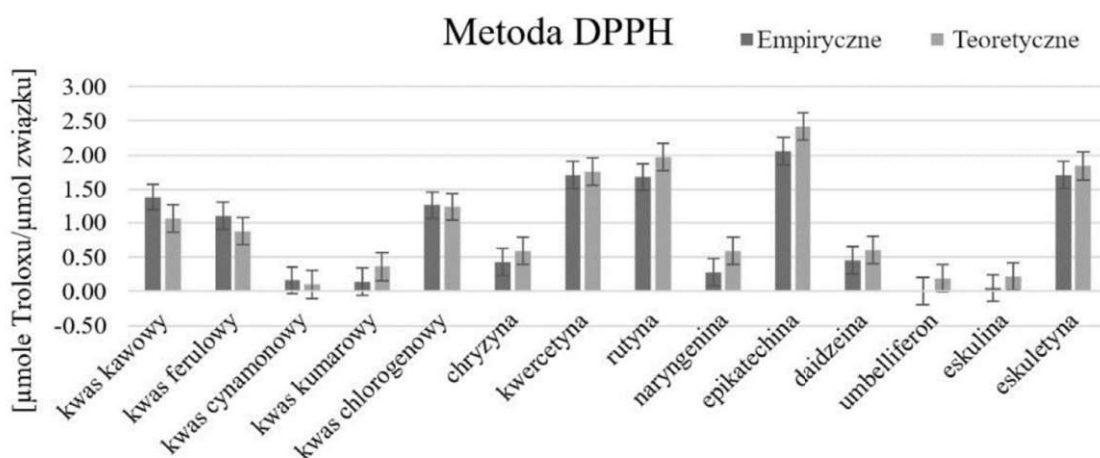
W przypadku pomiaru całkowitej zawartości polifenoli metodą Folin-Ciocalteu (która również należy do metod antyoksydacyjnych, wykorzystując mechanizm redoks, obu typów: HAT i SET [23]), istotne różnice między wartością empiryczną i teoretyczną, uznawane jako antagonistyczne stwierdzono dla mieszaniny kwasu L-askorbinowego z kwercetyną, naryngeniną, daidzeiną i umbeliferonem. Natomiast efekt synergistyczny odnotowano w mieszaninach z kwasem kawowym, ferulowym, kumarowym i chlorogenowym. Pozostałe mieszaniny związków polifenolowych z kwasem L-askorbinowym nie wykazywały znaczących różnic wartości empirycznej i teoretycznej (Rysunek 4).



Rysunek 4. Wyniki oznaczania całkowitej zawartości polifenoli (metoda Folin-Ciocalteu) empiryczne i teoretyczne dwuskładnikowych mieszanin polifenoli z kwasem L-askorbinowym.

Figure 4. Results of the determination of total polyphenols (Folin-Ciocalteu method), measured and theoretical for binary mixtures of polyphenols with L-ascorbic acid.

Pomiary zdolności zmiatania rodnika DPPH wykazały efekt synergistyczny w mieszaninach z kwasem kawowym, ferulowym i cynamonowym, natomiast antagonistyczny w mieszaninach z kwasem kumarowym, chryzyną, rutyną, naryngeniną, epikatechiną, daidzeiną, umbeliferonem, eskuliną i eskuletyną. Pozostałe mieszaniny związków polifenolowych z kwasem L-askorbinowym wykazywały efekt addytywny (Rysunek 5).



Rysunek 5. Zdolność zmiatania rodnika DPPH – wartości empiryczne i teoretyczne dwuskładnikowych mieszanin polifenoli z kwasem L-askorbinowym.

Figure 5. DPPH radical scavenging capacity – measured and theoretical values of two-component mixtures of polyphenols with L-ascorbic acid.

Porównanie wyników pomiarów metodą FRAP, ABTS, Folin-Ciocalteu i DPPH

Tabela 1. Porównanie wyników interakcji między wybranymi polifenolami i z kwasem L-askorbinowym.

Table 1. Comparison of the results of interactions between selected polyphenols and L-ascorbic acid.

Mieszanka z kwasem L-askorbinowym	Wynik interakcji wybranych związków badanych metodami:			
	DPPH	ABTS	FRAP	Folin-Ciocalteu
Kwas kawowy	Synergistyczne	Synergistyczne	Antagonistyczne	Synergistyczne
Kwas ferulowy	Synergistyczne	Synergistyczne	Antagonistyczne	Synergistyczne
Kwas cynamonowy	Synergistyczne	Addytywne	Antagonistyczne	Addytywne
Kwas kumarowy	Antagonistyczne	Antagonistyczne	Antagonistyczne	Synergistyczne
Kwas chlorogenowy	Addytywne	Synergistyczne	Antagonistyczne	Synergistyczne
Chryzyna	Antagonistyczne	Synergistyczne	Synergistyczne	Addytywne
Kwercetyna	Addytywne	Addytywne	Antagonistyczne	Antagonistyczne
Rutyna	Antagonistyczne	Synergistyczne	Addytywne	Addytywne
Naryngenina	Antagonistyczne	Addytywne	Addytywne	Antagonistyczne
Epikatechina	Antagonistyczne	Addytywne	Addytywne	Addytywne
Daidzeina	Antagonistyczne	Synergistyczne	Antagonistyczne	Antagonistyczne
Umbelliferon	Antagonistyczne	Antagonistyczne	Antagonistyczne	Antagonistyczne
Eskulina	Antagonistyczne	Antagonistyczne	Antagonistyczne	Addytywne
Eskuletyna	Antagonistyczne	Antagonistyczne	Antagonistyczne	Addytywne

Zarówno kwas kawowy jak i ferulowy w połączeniu z kwasem L-askorbinowym wykazywały efekt synergistyczny, badany za pomocą metod DPPH, ABTS oraz Folin-Ciocalteu. Jednak podczas badania tych mieszanin metodą FRAP, stwierdzono efekt antagonistyczny. Potencjał redukcyjny kwasu kawowego jest równy 0,54 V, a kwasu L-askorbinowego 0,28 V. Witamina C redukuje związek o wyższym potencjale redukcyjnym (rodnik kwasu kawowego do kwasu kawowego), co może wyjaśniać synergistyczny efekt badanej mieszaniny [27, 28]. Mieszaniny kwercetyny z kwasem L-askorbinowym badane przy pomocy metod DPPH oraz ABTS wskazują na addytywną zależność między podanymi związkami. Natomiast przy użyciu metody FRAP i Folin-Ciocalteu jest to ponownie efekt antagonistyczny. Wyniki oddziaływania kwercetyny i kwasu L-askorbinowego w mieszaninie są zgodne z przedstawionymi badaniami w literaturze [18]. Rutyna z kwasem L-askorbinowym w stosunku molowym 1:1 wykazywała addytywne oddziaływanie mierzone metodami FRAP oraz Folin-Ciocalteu. Jednak przy zastosowaniu rodnika DPPH był to efekt antagonistyczny, a z rodnikiem ABTS synergistyczny. Wyniki rodzaju interakcji z tych metod nie pokrywają się z wynikami przedstawionymi w literaturze (ABTS – efekt antagonistyczny, DPPH – efekt addytywny) [21]. W przedstawionych powyżej badaniach różnice w wynikach mogą być spowodowane zastosowaniem różnego środowiska reakcji. W pracy Gliszczyńskiej-Świątło [21] podczas badania właściwości przeciwutleniających metodą ABTS zastosowano bufor o pH 7,4. W powyższej pracy jako środowisko reakcji można uznać etanol. Natomiast efekt antagonistyczny przy metodzie DPPH może być spowodowany mniejszą dostępnością steryczną, ze względu na budowę rutyny, która składa się z rutynozy połączonej wiązaniem glikozydowym z kwercetyną [29].

Antagonistyczne oddziaływania kwercetyny i rutyny mogą być wytłumaczone poprzez tworzenie kompleksu z kwasem L-askorbinowym, blokującego grupę C4'-OH flawonoidów [17]. Powoduje to obniżenie ich możliwości oddawania elektronów, czyli mechanizmu SET, będącego mechanizmem, dzięki któremu zachodzą głównie metoda FRAP oraz Folin-Ciocalteu (efekt antagonistyczny w tych testach można stwierdzić dla kwercetyny i kwasu askorbinowego). Również zablokowana grupa C4'-OH będzie brała mniejszy udział w reakcjach rodnikowych (oddziaływanie antagonistyczne mieszaniny rutyny i witaminy C przy użyciu metody DPPH).

Największe różnice w wynikach oznaczeń odnotowano przy zastosowaniu metody FRAP. Prawdopodobnie jest to spowodowane charakterem reakcji, opierającym się na redukcji wybranych cząsteczek oraz wykryciu jedynie mechanizmu SET działania przeciwutleniającego. Metody DPPH i ABTS wykorzystują reakcje rodnikowe, przy zastosowaniu zarówno mechanizmu SET jak i HAT. Poza tym wartość pH reakcji FRAP równa 3,6 nie jest podobna do pH fizjologicznego i znacząco różni się od pozostałych metod.

Badanie kwasu p-kumarowego wraz z kwasem L-askorbinowym, za pomocą metody ABTS, DPPH oraz FRAP opisywane jest jako antagonistyczne. Może to być spowodowane utlenianiem kwasu askorbinowego [30]. Natomiast wyniki uzyskane metodą z odczynnikiem Folin-Ciocalteu sugerują efekt synergistyczny.

Kwas chlorogenowy w dwuskładnikowej mieszaninie z kwasem askorbinowym przy użyciu metod ABTS oraz Folin-Ciocalteu wykazuje działanie synergistyczne. Jednak, gdy zastosowano metodę z wykorzystaniem rodnika DPPH, to efekt był addytywny, a wyniki metody FRAP wskazują na działanie antagonistyczne podanych związków. Kwas chlorogenowy jest estrem kwasu (-) – chinowego i kawowego, do którego wykazuje podobieństwo w metodzie FRAP, Folin-Ciocalteu oraz ABTS. Możliwe, że ze względu na przeszkodę steryczną podczas badania DPPH, mieszanina wykazywała efekt addytywny.

Działanie mieszaniny epikatechiny i kwasu L-askorbinowego przy zastosowaniu metod ABTS, FRAP oraz Folin-Ciocalteu było addytywne, co jest zgodne z literaturą [28]. Jednak przy zastosowaniu metody DPPH występował efekt antagonistyczny. Eskuletyna z kwasem L-askorbinowym przy użyciu testów DPPH, ABTS oraz FRAP wskazywały na oddziaływanie antagonistyczne obu składników. Jednak w metodzie Folin-Ciocalteu był (stwierdzono) to efekt addytywny.

Podsumowanie

Interakcje między kwasem L-askorbinowym i wybranymi flawonoidami wpływają na ich właściwości antyoksydacyjne. W zależności od zastosowanej metody stwierdzono w niektórych przypadkach zarówno efekt synergistyczny jak i antagonistyczny. Różnice w wynikach pomiędzy podanymi testami mogą wynikać z niejednorodnego środowiska (wodne, etanolowe), pH, rodzaju reakcji (rodnikowy – ABTS, DPPH lub redoks – FRAP oraz Folin-Ciocalteu) czy wykrywanego mechanizmu HAT lub SET. Dzięki wiedzy na temat możliwych interakcji pomiędzy związkami o działaniu antyoksydacyjnym można zoptymalizować produkcję kosmetyków, suplementów diety oraz produktów leczniczych. Jeśli składniki wykazują razem działanie synergistyczne, potrzebujemy mniejszej ich ilości, aby stworzyć produkt handlowy o bardzo dobrych właściwościach przeciwrodnikowych przy niskich kosztach produkcji. Na podstawie wyników powyższych badań, można stwierdzić wpływ środowiska czy charakteru reakcji na właściwości przeciwutleniające.

Literatura

- [1] Pappenberger G., Hohmann H.P., Industrial production of L-ascorbic acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid, *Biotechnology of Food and Feed Additives*, 2013, s. 143-188.
- [2] Janda K., Kasprzak M., Wolska J., Witamina C – budowa, właściwości, funkcje i występowanie, *Pomeranian Journal of Life Sciences*, 2015, 61(4), s. 419-425.
- [3] Caritá A.C., Fonseca-Santos B., Jemima Daniela Shultz J.D., Michniak-Kohn B., Chorilli M., Leonardi G.R., Vitamin C: One compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2020, 24, s. 102117.
- [4] Telang P.S., Vitamin C in dermatology, *Indian Dermatology Online Journal*, 2013, 4(2), s. 143.
- [5] Carr A.C., Maggini S., Vitamin C and immune function, *Nutrients*, 2017, 9(11), s. 1211.
- [6] Kumar N., Goel N., Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications, *Biotechnology Reports*, 2019, 24, s. e00370.
- [7] Parus A., Przeciwutleniające i farmakologiczne właściwości kwasów fenolowych, *Postępy Fitoterapii*, 2013, 1, s. 48-53.
- [8] Panch A.N., Diwan A.D., Chandra S.R., Flavonoids: an overview, *Journal of Nutritional Science*, 2016, 5, s. 1-15.
- [9] Borges Bubols G., da Rocha Vianna D., Medina-Remon A., Gilsane V.P., Lamuela-Raventos R.M., Eifler-Limab V.L., Garcia S.C., The antioxidant activity of coumarins and flavonoids, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2013, 13(3), s. 318-334.
- [10] Florkowska K., Duchnik W., Muzykiewicz A., Zielonka-Brzezicka J., Klimowicz A., Flawonoidy w profilaktyce i leczeniu miażdżycy, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 2017, 98(3), s. 217-225.
- [11] Banjarnahor S.D., Artanti N., Antioxidant properties of flavonoids, *Medical Journal of Indonesia*, 2014, 23(4), s. 239-44.
- [12] Kostova, I., Bhatia S., Grigorov P., Balkansky S, Parmar V.S, Prasad A.K, Saso L. Coumarins as antioxidants, *Current Medicinal Chemistry*, 2011, 18(25), s. 3929-3951.
- [13] Pudo A., Kamińska I., Ortyl J., Pochodne kumaryny jako molekularne sensory fluorescencyjne stosowane do monitorowania procesów fotopolimeryzacji, *Technical Issues*, 2015, 1, s. 47-53.
- [14] Malinowska M., Bielawska K., Metabolizm i właściwości antyoksydacyjne kumaryn, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2013, 46(3), s. 393-403.
- [15] Olszowy-Tomczyk, M., Synergistic, antagonistic and additive antioxidant effects in the binary mixtures, *Phytochemistry Reviews*, 2020, 19(1), s. 63-103.
- [16] Tavadyan L.A., Minasyan S.H., Synergistic and antagonistic co-antioxidant effects of flavonoids with trolox or ascorbic acid in a binary mixture, *Journal of Chemical Sciences*, 2019, 131(5), s. 1-11.
- [17] Gliszczyńska-Świągło A., Przeciwutleniające i proutleniające właściwości wybranych składników żywności jako wyróżniki jej jakości. Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, Poznań, 2010, s. 17-20, 40-48, 133-153.
- [18] Gliszczynska-Swiągło A., Szymusiak H., Interakcje między składnikami suplementów diety na przykładzie kwercetyny i witaminy C, *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 2009, 16(4), s. 17-20, 40-48, 133-153.

- [19] Hughes R., Wilson H., 6 Flavonoids: Some Physiological and Nutritional Consideration, *Progress in Medicinal Chemistry*, 1977, 14, s. 285-301.
- [20] Chen, H., Zhang Y., Lu X., Zhishuang Q, Comparative studies on the physicochemical and antioxidant properties of different tea extracts, *Journal of Food Science and Technology*, 2012, 49(3). s. 356-361.
- [21] Gliszczyńska-Świgło A., Wpływ kwasu askorbinowego na aktywność przeciwrodnikową wybranych flawonoidów, *Zeszyty Naukowe/Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*, 2010, 162, s. 55-65.
- [22] Olszowy M., Dawidowicz A.L., Józwiak-Dolęba M., Are mutual interactions between antioxidants the only factors responsible for antagonistic antioxidant effect of their mixtures? Additive and antagonistic antioxidant effects in mixtures of gallic, ferulic and caffeic acids, *European Food Research and Technology*, 2019, 245(7), s. 1473-1485.
- [23] Prior R.L., Wu X., Schaich K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(10), s. 4290-4302.
- [24] Tyrakowska B., Soffers A.E., Szymusiak H., Boeren S., Boersma M. G., Lemańska K., Vervoort J., Rietjens I.M., TEAC antioxidant activity of 4-hydroxybenzoates, *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 27(11-12), s. 1427-1436.
- [25] Singleton V.L., Rossi J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16(3), s. 144-158.
- [26] Brand-Williams W., Cuvelier M.-E., Berset C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT – Food Science and Technology*, 1995, 28(1), s. 25-30.
- [27] Laranjinha J., Cadenas E., Redox cycles of caffeic acid, alpha-tocopherol, and ascorbate: Implications for protection of low-density lipoproteins against oxidation, *IUBMB Life*, 1999, 48(1), s. 57-65.
- [28] Yeomans V.C., Linseisen J., Wolfram G., Interactive effects of polyphenols, tocopherol and ascorbic acid on the Cu²⁺-mediated oxidative modification of human low density lipoproteins, *European Journal of Nutrition*, 2005, 44(7), s. 422-428.
- [29] Samaszko-Fiartek J., Roguszczyk P., Dmochowska B., Ślusarz R., Madaj J., Rutyna: budowa, właściwości, *Wiadomości Chemiczne*, 2016, 7-8(70), s. 435-453.
- [30] Satō M., The conversion of phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid, *Phytochemistry*, 1969, 8(2), s. 353-362.

Do cytowania:

Głowacka M., Agnieszka Zielińska A Synergistyczne i antagonistyczne działanie przeciwutleniające w dwuskładnikowych mieszaninach wybranych polifenoli i kwasu L-askorbinowego, *Herbalism*, 2022 1(8), s. 45-58.

Porównanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II) i zmiatania wolnego rodnika DPPH przez ekstrakty z mchów

Comparison of the capacity of moss extracts to chelate iron (II) ions and scavenge the free radical DPPH

Sara Janowska

Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Katedra i Zakład Chemii Organicznej, ul. Chodźki 4A, Lublin 20-093
e-mail: sara.janowska@wp.pl

Słowa kluczowe: mszaki, aktywność antyoksydacyjna, wolne rodniki

Key words: bryophytes, antioxidant, free radical

Streszczenie

W ostatnich latach związki o właściwościach antyoksydacyjnych występujące w roślinach – ze względu na ich zdolność neutralizacji wolnych rodników – cieszą się dużym zainteresowaniem naukowców. Zakłada się, że wolne rodniki mogą uczestniczyć w powstawaniu wielu chorób, zwłaszcza cywilizacyjnych, których liczba drastycznie rośnie. Mszaki stanowią wciąż słabo przebadaną grupę roślin, przez co są ciekawym obiektem badań fitochemicznych. Celem pracy było określenie potencjału antyoksydacyjnego ekstraktów z dwudziestu gatunków mchów. Badaniom poddano ekstrakty etanolowe z gametofitofitów dwudziestu gatunków mchów. W pracy wykorzystano następujące metody: metodę pomiaru zdolności zmiatania syntetycznego rodnika DPPH, metodę pomiaru zdolności chelatowania jonów żelaza (II). Na podstawie wyników uzyskanych z wykorzystaniem powyższych metod można stwierdzić, że ekstrakty ze wszystkich gatunków użytych w badaniach wykazują zdolność zmiatania wolnych rodników oraz zdolność do wiązania jonów żelaza (II). Najniższą aktywność antyoksydacyjną w próbach z wykorzystaniem metody zmiatania syntetycznego rodnika DPPH wykazały ekstrakty z gatunków: *Polustriella commutata* ($IC_{50} = 264,52$ mg/ml), *Sphanum fimbriatum* ($IC_{50} = 154,66$ mg/ml) oraz *Pleurozium schreberi* ($IC_{50} = 126,81$ mg/ml). Najwyższą zdolność chelatacji jonów żelaza wykazują ekstrakty: *Hypnum cupressiforme* ($IC_{50} = 0,32$ mg/ml) oraz *Rhytidiadelphus triquetrus* ($IC_{50} = 0,50$ mg/ml). Przeprowadzone badania wykazały potencjał antyoksydacyjny 20 gatunków mchów. Najwyższy potencjał neutralizacji wolnego rodnika DPPH wykazały mchy z rodziny *Polytrichopsida*.