

Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych

MARTA CYBUL, RENATA NOWAK*

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej
Akademia Medyczna
ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin

*autor, do którego należy kierować korespondencję: tel.: +4881 7423703,
e-mail: renata.nowak@am.lublin.pl

Streszczenie

Wolne rodniki są wysoce reaktywnymi i niebezpiecznymi cząstkami, którym ostatnio przypisuje się kluczową rolę w patogenezie tzw. chorób cywilizacyjnych. Ich wszechobecność powoduje, że żyjemy w chronicznym stresie oksydacyjnym, który jest przyczyną przeciążenia i nieskuteczności naturalnych systemów obronnych organizmów. Wtórne metabolity roślinne obecne w diecie i ekstraktach z roślin leczniczych często wykazują silne właściwości antyoksydacyjne. Istnieje szereg metod pomiaru tej aktywności. Najbardziej rozpowszechnione jest stosowanie tzw. metod *in vitro* (np. DPPH, ABTS, F-C, DMPD). Artykuł dokonuje przeglądu tych metod oraz zwraca uwagę na potrzebę ich standaryzacji.

Słowa kluczowe: właściwości antyoksydacyjne, ekstrakty roślinne, wolne rodniki, TEAC, DPPH, ABTS

WSTĘP

Zmiany środowiskowe, niewłaściwy styl życia, złe nawyki żywieniowe, brak ruchu, nadmierny stres są czynnikami prowadzącymi do rozwoju ciężkich zespołów chorobowych, które przyjęło się nazywać chorobami cywilizacyjnymi. Są to m.in. cukrzyca, otyłość, nadciśnienie, miażdżyca i nowotwory. Badania naukowe dowodzą, że w patogenezie tych chorób (a także wielu innych) istotną rolę odgrywają wolne rodniki. Nie sposób uniknąć kontaktu z nimi, gdyż, poza przemysłem i zjawiskami atmosferycznymi, ich źródłem są także podstawowe procesy fizjologiczne, jak np. oddychanie komórkowe [1]. Choć pełnią one czasem rolę obrońców organizmu, są bronią niebezpieczną, która bardzo łatwo może powodować zniszczenia prowadzące do rozwoju przewlekłych schorzeń.

Wiedza na temat szkodliwości wolnych rodników skłania do poszukiwania substancji wspomagających naturalną obronę antyoksydacyjną organizmu. Kierunkiem budzącym szczególne zainteresowanie są badania wtórnych metabolitów pozyskiwanych z roślin o uznanym działaniu dietetycznym lub leczniczym. Dotychczas opracowano szereg metod badawczych, które pozwalają określać potencjał przeciwutleniający ekstraktów z roślin. Podobnie jak w przypadku innych analiz dotyczących aktywności biologicznej, można tu wyróżnić zarówno testy wykonywane *in vivo*, jak i *in vitro*. Systemy *in vitro* są łatwiejsze do przeprowadzenia, szybsze i mniej kosztowne w porównaniu z tradycyjnymi metodami *in vivo*. Bywają więc częściej stosowane, ponieważ pozwalają zaoszczędzić czas, zmniejszyć koszty oraz wyeliminować wiele czynników wpływających na powstawanie błędów przy pomiarach *in vivo* [2].

Przed przystąpieniem do właściwego badania każdą próbkę należy przygotować w sposób określony w monografii danej metody. Związki o właściwościach antyoksydacyjnych są labilne, a w świeżym surowcu łatwo utleniane przez endogenne enzymy. Dlatego też surowiec należy poddać starannej obróbce w warunkach, które zminimalizują straty związków biologicznie czynnych. Do niezbędnych procesów technologicznych poprzedzających badanie należy ekstrakcja surowca. Stosowana bywa także hydroliza kwasowa, zasadowa lub enzymatyczna ułatwiająca identyfikację występujących w surowcach roślinnych związków przeciwutleniających w połączeniach z cukrami i innymi substancjami [3].

Testy *in vitro*

W badaniach prowadzonych poza organizmami żywymi wykorzystywana jest zdolność antyoksydantów do dezaktywacji wolnych rodników. Reakcje te mogą przebiegać według dwóch mechanizmów:

- 1) mechanizmu przeniesienia atomu wodoru, tzw. HAT (ang. *hydrogen atom transfer*);
- 2) mechanizmu przeniesienia pojedynczego elektronu, tzw. SET (ang. *single electron transfer*).

Uwzględniając zastosowany system pomiarowy, metody oznaczania właściwości przeciwutleniających można podzielić na addycyjne oraz postaddycyjne.

Używając metod addycyjnych, oznacza się opóźnienie procesu rozpoczęcia działania oksydantu na antyoksydant wskaźnikowy. Opóźnienie jest spowodowane wcześniejszym, łatwiejszym, konkurencyjnym utlenieniem antyoksydantów z badanej próbki. Wielkość opóźnienia jest wskaźnikiem wielkości aktywności przeciwrodnikowej. Metody te naśladują procesy ochronne zachodzące w organizmach żywych. Z kolei metody postaddycyjne opierają się na oznaczaniu aktywności poprzez pomiar zmiany stężenia testowego reagenta lub produktu w wyniku bezpośredniej reakcji chemicznej lub rodnikowej utleniacza (cząsteczkowego lub rodnikowego) i antyoksydantów obecnych w próbce [4].

W metodach z zastosowaniem mechanizmu typu SET mieszaninę reakcyjną stanowią przeciwutleniacz i oksydant zmieniający barwę wskutek redukcji, czyli przeniesienia elektronu z antyoksydantu na utleniacz. Zmiana wartości absorbancji (ΔA) w funkcji stężenia przeciwutleniacza w próbce jest zależnością liniową, natomiast nachylenie prostej odzwierciedla zdolność redukcji przeciwutleniacza znajdującego się w próbce. Uzyskane wyniki przelicza się często na równoważniki Troloksu, TEAC (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). W analizach tych troloks, który jest syntetyczną, rozpuszczalną w roztworach wodnych pochodną witaminy E o wysokiej aktywności przeciwutleniającej, pełni funkcję materiału odniesienia [5].

Jedną z częściej wykorzystywanych metod jest metoda z użyciem roztworu DPPH. DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) jest wolnym rodnikiem o stosunkowo dużej trwałości i z tego powodu można go łatwo przygotować do badań. Najczęściej stosuje się alkoholowe roztwory DPPH. Mają one barwę purpurową z maksimum absorbancji przy długości fali 515 nm. W czasie reakcji redukcji barwa roztworu zmienia się na żółtą. Zmianę tę można monitorować spektrofotometrycznie ($\lambda=515$ nm) [4]. W celu ułatwienia interpretacji wyników wprowadzono parametr EC_{50} (ang. *efficient concentration*). Określa on stężenie antyoksydantu powodujące spadek początkowego stężenia rodnika DPPH o 50%. Parametr ten bywa także oznaczany skrótem IC_{50} . Ma wadę, iż jest tym mniejszy, im bardziej reaktywny jest antyoksydant. Bywa to niewygodne, kiedy chcemy zaprezentować wyniki w formie graficznej, np. w postaci wykresów słupkowych [6]. Procentowa zawartość pozostałego niezredukowanego rodnika DPPH jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia przeciwutleniacza w próbce. Czas potrzebny na redukcję wartości początkowego stężenia rodnika DPPH o 50% jest natomiast wyznaczany graficznie z krzywej kinetyki reakcji i określany jako parametr T_{EC50} [7, 8]. Podczas przeprowadzania pomiarów należy ograniczyć dostęp światła i tlenu do próbki, a także starannie dobrać pH i rozpuszczalnik, ponieważ wszystkie te czynniki powodują spadek absorbancji roztworu DPPH [9]. Ograniczeniem tej metody jest fakt, że DPPH rozpuszcza się jedynie w rozpuszczalnikach organicznych i nie pozwala na oznaczenia antyoksydantów hydrofilowych [10].

Metoda z zastosowaniem odczynnika DPPH jest szeroko stosowana do pomiarów zdolności antyoksydacyjnej naturalnych surowców: owoców, soków, wyciągów roślinnych, żywności. Szczególnie często używa się jej przy określaniu właściwości przeciwutleniających związków fenolowych [11]. Jest szybka i dokładna, a otrzymane wyniki są odtwarzalne i porównywalne z wartościami uzyskanymi podczas innych badań opartych na zdolności zmiatania wolnych rodników [12].

Kolejną, równie chętnie wykorzystywaną metodą jest test, w którym wolnym rodnikiem jest związek ABTS. Zastosowanie odczynnika ABTS [2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)] umożliwia pomiar całkowitej aktywności antyoksydacyjnej próbek, w tym płynów ustrojowych oraz próbek żywności. Rodniki ABTS tworzone są podczas reakcji chemicznych (np. z ditlenkiem manganu, związkiem ABAP oraz nadsiarczynem potasu), elektrochemicznych lub enzymatycznych (np.

z metmioglobina, hemoglobina lub peroksydazą) [13]. Utlenienie ABTS następuje natychmiast, jednak maksymalną wartość absorbancji i pełną stabilność rodnik uzyskuje po upływie 6 godzin. Rodniki generowane podczas reakcji mają barwę niebieskozieloną i wykazują maksimum absorbancji przy kilku długościach fal: 417, 645, 734 i 815 nm [4]. Antyoksydanty powodują redukcję kationorodnika w stopniu zależnym od czasu trwania reakcji, stężenia przeciwutleniacza oraz jego aktywności. Następuje zanik barwy roztworu, przy czym spadek intensywności zabarwienia jest proporcjonalny do zawartości przeciwutleniaczy w roztworze. Zawartość przeciwutleniaczy w analizowanych próbkach wyrażana jest zwykle jako ilość równoważników Troloksu na jednostkę objętości bądź masy próbki (TEAC). Metoda ta umożliwia także pomiar kinetyki reakcji na podstawie pomiaru tzw. czasu indukcji (ang. *lag time*). Jest to czas opóźnienia rozpoczęcia reakcji utleniania rodnika ABTS przez dodatek antyoksydantu [15]. Długość czasu indukcji jest proporcjonalna do stężenia badanego przeciwutleniacza.

Stosunkowo prosty sposób wykonania oznaczeń w metodzie ABTS sprawia, że jest to analiza rutynowo używana do oznaczania zdolności antyoksydacyjnych próbek przeciwutleniaczy zarówno hydrofobowych, jak i hydrofilowych. Dodatkowymi zaletami są duża szybkość reakcji kationorodnika ABTS z przeciwutleniaczami (zwykle w ciągu 30 min) oraz rozpuszczalność ABTS zarówno w wodnych, jak i organicznych rozpuszczalnikach.

Wykazano, że podczas reakcji ABTS z flawonoidami powstają produkty o silniejszych właściwościach antyoksydacyjnych i szybciej reagujące z rodnikiem niż związki macierzyste. Wartość TEAC jest w tej sytuacji sumą aktywności substancji badanej i produktów jej reakcji z rodnikiem. To może się stać powodem zafałszowania wyników analiz wskutek zawyżenia wartości właściwości antyoksydacyjnych [5].

Do oznaczania potencjału przeciwutleniającego używa się również metody z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu (F-C). Metoda ta służy do analizy całkowitej zawartości fenoli. Oparta jest na barwnej reakcji między polifenolami a odczynnikiem [16]. Jej zaletą jest duża prostota i użyteczność do standaryzacji materiałów biologicznych, wadą zaś mała specyficzność [17]. Odczynnik F-C jest przygotowywany przez zmieszanie wolframianu sodu (Na_2WO_4), molibdenianu sodu (Na_2MoO_4), siarczanu litu (Li_2SO_4), wody bromowej oraz stężonych kwasów solnego i fosforowego. Nie określono dokładnej struktury związku powstającego w czasie przygotowania tego odczynnika. Przypuszczalnie jest to heteropolifosfowolframian molibdenu. Daje on, w wyniku odwracalnej reakcji jedno- lub dwuelektronowej redukcji, niebiesko zabarwiony związek $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$. Molibdenian Mo(VI) przyjmuje elektron i zredukowany jest do Mo(V). Związki fenolowe reagują z odczynnikiem F-C jedynie w środowisku alkalicznym (pH 10). Tylko w tych warunkach powstaje anion fenolowy, który redukuje odczynnik F-C. Mechanizm reakcji opiera się na przenoszeniu elektronu, a tworzenie niebieskiego barwnika w reakcji związków fenolowych z odczynnikiem F-C jest niezależne od struktury fenoli [4].

Powyższa metoda znajduje zastosowanie w analizie ekstraktów roślinnych, żywności, a także leków, których elementami są grupy fenolowe, jak np. salbutamol i morfina [18].

Metoda z zastosowaniem odczynnika DMPD jest również zaliczana do tzw. decoloration methods, czyli metod opartych na pomiarze stopnia odbarwienia roztworu odczynnika. Źródłem rodników w tym teście jest dichlorowodorek dimetylo-*p*-fenylenodiaminy (DMPD). W środowisku kwasowym i w obecności utleniaczy DMPD tworzy stabilny, barwny kationorodnik o maksimum absorpcji przy długości fali 505 nm. Proponowane wyjściowe stężenie roztworu DMPD 1 mM z wartościami absorpcji w granicach 0,8–1,0 gwarantuje wysoką czułość pomiarów, a także optymalny zakres zahamowania utleniacza [4]. Analizowana próbka jest dodawana po utworzeniu się wolnego rodnika [19]. Antyoksydanty powodują odbarwienie roztworu. Zmiana koloru jest proporcjonalna do zawartości i aktywności przeciwutleniaczy w próbce. Podobnie jak we wcześniej omawianych metodach, najczęściej zdolność przeciwutleniającą analizowanych próbek wyraża się jako stężenie równoważników Troloksu.

Metoda oznaczania zdolności redukcji jonów żelaza (ang. *ferric ion reducing antioxidant parameter* – FRAP) pozwala na bezpośrednie określenie redukujących zdolności czystego związku, mieszaniny substancji, czy też próbki materiału biologicznego [21]. Zasada działania tej metody opiera się na pomiarze redukcji związku TPTZ (kompleks żelazowo-2,4,6-tripirydylo-*S*-tiazyny) pod wpływem działania antyoksydantu. Następuje zmiana zabarwienia substratu. Z bezbarwnego odczynnika powstaje intensywnie niebieski produkt z maksimum absorpcji przy długości fali 593-595 nm. Zdolność antyoksydacyjną próbki określa się przez porównanie zmian absorpcji ΔA analizowanej próbki z wartością ΔA roztworu wzorcowego Fe(II). Absorbancja w szerokim zakresie zmienia się liniowo. Wyznaczona wartość ΔA próbki jest wprost proporcjonalna do stężenia przeciwutleniacza. Przyjęto, że jednostka FRAP określa zdolność redukcji 1 mola żelaza(III) do żelaza(II).

Metoda ta jest tania, reagenty łatwo przygotować, a otrzymane wyniki są wysoce powtarzalne. Dodatkową zaletą jest szybki przebieg analizy. Metoda FRAP może służyć do analizy substancji o potencjale redoks mniejszym niż 0,7 V (potencjał redoks Fe³⁺: TPTZ=0,7 V), dlatego też używana jest do oznaczania zdolności przeciwutleniającej komórek i tkanek. Służy także do pomiaru stresu oksydacyjnego i jego skutków w organizmie. Dostarcza informacji na temat oporu stawianego uszkodzeniom spowodowanym przez utleniacze. Stosowano ją przede wszystkim do oznaczania siły redukcyjnej płynów ustrojowych [22]. Ostatnio została przystosowana także do badań przeciwutleniaczy pochodzenia roślinnego.

Wariantem metody FRAP jest metoda oznaczania zdolności redukcji miedzi(II) (ang. *copper reduction assay*, CRA). Różnica polega na tym, że zamiast żelaza redukowane są jony miedzi. Pod wpływem działania przeciwutleniaczy obecnych w próbce kompleks Cu(II) jest redukowany do barwnego kompleksu miedzi Cu(I). W metodzie tej wykorzystuje się pomiar wartości absorpcji tego barwnego produktu. Istnieją dwie opcje tej metody. Pierwsza z nich wykorzystuje związek

o nazwie bathokuproina (2,9-dimetylo-4,7-difenylo-1,10-fenantrolina), który tworzy pomarańczowy kompleks z miedzią Cu(I), będący chromoforem z maksimum absorpcji przy długości fali 490 nm [23]. W drugiej opcji stosuje się pokrewny związek: neokuproinę (2,9-dimetylo-1,10-fenantrolina), tworzącą pomarańczowo-żółty kompleks z Cu(I) z maksimum absorpcji przy długości fali 450 nm. Zdolność przeciwutleniającą wyraża się w odniesieniu do ilości tzw. równoważników kwasu moczowego w próbce. W tym celu sporządza się wykres zależności wartości absorpcji kompleksu z Cu(I), który w zakresie stężeń kwasu moczowego 0,05-2 mM ma przebieg prostoliniowy [24].

Metody korzystające z mechanizmu reakcji przeniesienia atomu wodoru –HAT poleca się do pomiaru dezaktywacji wolnych rodników, zachodzącej w wyniku oddania atomu wodoru przez antyoksydant. Przeciwutleniacz obecny w analizowanej próbce i modelowy przeciwutleniacz o znanym stężeniu, zwany „sondą molekularną” konkurują ze sobą o możliwość reakcji z rodnikiem nadtlenkowym. Pomiar aktywności antyoksydacyjnej opiera się w tych metodach na monitorowaniu przebiegu tych konkurencyjnych reakcji [4].

Do analiz opierających się na mechanizmie HAT zaliczamy metodę oznaczania zdolności absorpcji rodników tlenowych (ang. *oxygen radical absorbance capacity*, ORAC). Test ten opiera się na pomiarze spadku fluorescencji tzw. sondy molekularnej spowodowanym uszkodzeniem chemicznym wywołanym działaniem wolnych rodników. Metoda ta jest bardziej czuła niż metoda FRAP [25]. Sonda molekularna w wyniku reakcji z termicznie generowanymi rodnikami nadtlenkowymi ulega przekształceniu w produkt pozbawiony właściwości fluorescencyjnych. Spadek fluorescencji przebiega liniowo. Obecność antyoksydantu w roztworze reakcyjnym powoduje spadek rozkładu fluoresceiny, wydłużenie czasu indukcji (ang. *lag time*) i/lub spadek stałej szybkości reakcji. Przebieg reakcji jest porównywany z reakcją zachodzącą w obecności wzorcowego antyoksydantu (troloksu) [26].

Jako sondę fluorescencyjną stosowano niegdyś białko o nazwie B-fikoerytryna (B-PE) wyizolowane z algi purpurowej *Porphyridium cruentum*. Obecnie w metodzie ORAC stosowane są substancje fluorescencyjne o bardziej stabilnym i mniej reaktywnym charakterze: fluoresceina –FL (3',6'-dihydroksypiro[izobenzofuran-1[3H]9'[9H]-ksanten]-3-on) lub dichlorofluoresceina – H₂DCF-dA (dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny). Oszacowanie zdolności przeciwutleniającej wymaga integracji pól powierzchni oznaczanych jako AUC (ang. *area under curve*) pod krzywymi fluorescencji dla próbki badanej i dla próby odniesienia [27].

Kolejnym testem jest oznaczanie całkowitej zdolności wychwytywania wolnych rodników (ang. *total radical trapping antioxidant parameter*, TRAP). Analizuje się tu spadek fluorescencji białka R-fikoerytryny (R-PE), który spowodowany jest przez rodniki nadtlenkowe produkowane na drodze termicznego rozkładu związku azowego AAPH. Dodatek antyoksydantów do mieszaniny reakcyjnej powoduje opóźnienie procesu zanikania fluorescencji roztworu. Opóźnienie jest proporcjonalne do potencjału antyoksydacyjnego przeciwutleniacza. Przeciwutleniacze reagują ok. 100 razy szybciej z rodnikami niż R-PE. Ta właściwość leży u podstaw ich

zdolności do przerywania łańcucha reakcji wolnorodnikowych. Gdy okres indukcji reakcji dobiegnie końca, czyli w momencie całkowitego przereagowania przeciwutleniaczy, białko R-PE zaczyna być utleniane i obserwuje się stopniowy spadek fluorescencji mieszaniny [4]. Ilościowe wyznaczenie aktywności przeciwutleniającej analizowanej próbki polega na wyznaczeniu podczas reakcji utleniania czasu indukcji dla próbki, a następnie dla znanej ilości troloksu [30].

Przy określaniu aktywności antyoksydacyjnej znajduje także zastosowanie metoda oznaczenia zdolności inhibicji utleniania lipidów. Test ten opiera się na oszacowaniu możliwości inhibicji produktów peroksydacji modelowych lipidów frakcji LDL-cholesterolu lub kwasu linolowego przez przeciwutleniacze zawarte w próbce. Przebieg reakcji utleniania jest monitorowany spektrofotometrycznie przy długości fali 234 nm. W czasie zmian wartości absorpcji można zaobserwować występowanie trzech faz: indukcji, propagacji i terminacji reakcji. Podczas fazy indukcji kwas linolowy lub wielonienasycone kwasy tłuszczowe frakcji LDL są chronione przed utlenianiem przez przeciwutleniacze obecne w badanej próbce. Po ich przereagowaniu proces peroksydacji przechodzi w fazę propagacji. Oprócz spektrofotometru UV-VIS stosuje się także chromatografy cieczerwowe bądź gazowe [4].

Krocyna jest pochodną karotenoidową naturalnie występującą w krokusach, ulegającą odbarwieniu wyłącznie wskutek utleniania rodnikowego. Tę właściwość wykorzystuje się w metodzie CBA (ang. *crocin bleaching assay*). Pierwszym etapem jest przygotowanie buforu fosforanowego zawierającego krocynę i odpowiednią ilość analizowanej próbki przeciwutleniaczy. W celu zapoczątkowania reakcji rodnikowej dodaje się związek azowy AAPH lub ABAP. Przebieg procesu utleniania próbek zarówno tych z dodatkiem, jak i bez dodatku antyoksydantu monitorowany jest zwykle przez 10 min spektrofotometrycznie przy długości fali 443nm [4, 31].

Metoda ta służy do pomiaru aktywności przeciwutleniaczy hydrofilowych i jest jedną z najczęściej stosowanych do ilościowej analizy ekstraktów z owoców i warzyw [28], a także pojedynczych związków oraz płynów ustrojowych [29]. Wymienia się ją jako odpowiednią do analizy próbek złożonych, zawierających wiele składników, szybko oraz wolno działających antyoksydantów.

Istnieją także badania, które nie opierają się ani na mechanizmie SET, ani na mechanizmie HAT. Zaliczamy do nich między innymi metodę oznaczania całkowitej zdolności wychwytywania rodników tlenowych (ang. *total oxidant scavenging capacity*, TOSC). Zaletą tej metody jest możliwość badania czystego roztworu antyoksydantu, jak również złożonych próbek biologicznych (płyny, tkanki). Stosowana bywa do oznaczania antyoksydantów rozpuszczalnych w wodzie oraz tych rozpuszczalnych w lipidach. Pozwala ona oznaczyć zdolność badanego roztworu do inhibicji trzech silnych utleniaczy, tj. rodników hydroksylowych, rodników nadtlenkowych i nadtlenoazotynowych. Wolne rodniki reagują z dodawanym kwasem α -keto- γ -metiolobutanowym (KMBA) i utleniają go do etylenu. Czas tworzenia etylenu jest śledzony za pomocą chromatografu gazowego. Właściwości

antyoksydacyjne próbki są tym większe, im większa jest zdolność obecnych w niej przeciwutleniaczy do inhibicji reakcji tworzenia się etylenu. Analiza przeprowadzana jest dla badanej próby, a także dla próby kontrolnej nie zawierającej przeciwutleniaczy [32].

Warto wspomnieć także o tzw. metodzie chemiluminescencyjnej (CL). W wyniku reakcji rodników tlenowych z odpowiednim znacznikiem powstają wzbudzone formy emitujące chemiluminescencję. Przeciwutleniacze zawarte w próbce, mające zdolność reagowania z rodnikami hamują emisję promieniowania. Utleniaczami są rodniki nadtlenkowe powstające z nadtlenku wodoru pod wpływem peroksydazy chranowej lub heminy jako katalizatorów. Znacznik, którym najczęściej jest luminol, reaguje z utleniaczami i zmienia ich słabą emisję na emisję intensywną, długotrwałą i stabilną. Stosuje się także lucygeninę czy bioluminescencyjne białko Pholasin. Aktywność antyoksydacyjna próbki jest wyznaczana poprzez porównanie kinetyki reakcji próby kontrolnej (bez substancji tłumiących chemiluminescencję) z analizą zawierającą antyoksydanty [4]. Do zalet metody chemiluminescencyjnej należy bardzo niski próg wykrywalności antyoksydantów, szeroki zakres liniowości i szybkość, która jest większa niż przy standardowych metodach. Stosuje się ją często do określania zawartości reaktywnych form tlenu w różnych systemach biologicznych, a także jako metodę pośrednią analizy właściwości antyoksydacyjnych [33].

Metody *in vivo*

Do oceny aktywności antyoksydacyjnej *in vivo* w reakcjach utleniania w systemach naśladujących rzeczywiste warunki wewnątrz organizmu znajdują zastosowanie liposomy i mikrosomy, z uwagi na podobieństwo do składu błon biologicznych. Jako miarę aktywności przeciwutleniacza wykorzystuje się także zahamowanie utleniania lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) w plazmie krwi zwierząt doświadczalnych i u ludzi po doustnym podaniu mieszaniny polifenoli. Obok lipidów do oszacowania aktywności wykorzystuje się również stopień zahamowania uszkodzeń DNA, które zdarzają się w systemach biologicznych (załamanie pojedynczej nici, rozerwanie helisy lub zaburzenia chromosomowe). Stosuje się pomiary peroksydacji lipidów błon liposomowych narażonych na promieniowanie UV, utleniania mitochondriów z komórek wątroby szczura, utleniania lipidów w lecytynowych mikrosomach jaja kurzego, peroksydacji indukowanej przez układ NADPH/żelazo w mikrosomach wątrobowych, zdolności ludzkiej krwi do zmiatania wolnych rodników, utleniania ludzkiego LDL indukowanego przez miedź lub rodniki z rozpadu 2,2'-azobis (2-amidynopropanu) (AAPH), oznaczanie utleniania i fragmentacji DNA, zdolności antyoksydacyjnej plazmy krwi szczura z indukowanym tworzeniem wodoronadtlenków estrów cholesterolu, inhibicji utleniania indukującego apoptozę żywych komórek ludzkich [34].

Na uwagę zasługuje fakt, iż pomimo istnienia szeregu metod służących do oceny właściwości antyoksydacyjnych nie ma standaryzacji uzyskiwanych wyników.

Często istnieje wiele wariantów danej metody, które różnią się warunkami pomiarów na tyle, że porównanie rezultatów jest niemożliwe. Trudno także wskazać metodę najlepszą, obarczoną najmniejszymi błędami, pozbawioną niedociągnięć. Wiele jest nadal niedopracowanych metod zaniedbujących szereg czynników mających wpływ na uzyskane wyniki.

Dopóki wszystkie te wątpliwości i czynniki nie zostaną wzięte pod uwagę, nie będziemy mogli poprawnie oceniać aktywności antyoksydacyjnej [35].

PIŚMIENNICTWO

1. Ball S. Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka. Warszawa 2001.
2. Mello L, Hernandez S, Marrazza G, Mascini M, Tatsuo Kubota L. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. *Biosens Bioelectron* 2005; 21:1374-82.
3. Lee HS. HPLC analysis of phenolic compounds. W: L.M. Nollet (red.) *Food analysis by HPLC*. New York 2000.
4. Grajek W. *Przeciwutleniacze w żywności*. Warszawa 2007.
5. Arts MJ, Haenen GR, Voss HP, Bast A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food Chem Toxicol* 2004; 42:45-9.
6. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol* 2004; 26:211-19.
7. Bartoń HJ, Fołta M, Zachwieja Z. Zastosowanie metod FRAP, ABTS, i DPPH w badaniu aktywności antyoksydacyjnej produktów spożywczych. *Nowiny Lek* 2005; 74:510-13.
8. Bartoń HJ, Fołta M. New approach in the analysis of antioxidant activity of coloured biological samples: a modification of the method of DPPH radical scavenging. W: *Molecular and Physiological Aspects of the Regulatory Processes of the Organism*. Proceeding of the XV International Symposium of the Polish Network of Molecular and Cellular Biology UNESCO/PAN. Kraków 2006.
9. Ozyurt D, Demirata B, Apak R. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement. *Talanta* 2006; 71:115-65.
10. Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Technol* 2000; 11:419-21.
11. Nenadis N, Tsimidou M. Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) tests. *J Am Chem Soc* 2002; 79: 1191-5.
12. Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Technol Int* 2002; 8:121-37.
13. Osman AM, Wong KKY, Fernyhough A. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346:321-9.
14. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37:277-85.
15. Mariken JT, Arts J, Dallinga S, Voss HP, Haenen G, Bast A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem* 2004; 88:567-70.
16. Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis DA, Barrow CJ. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J Appl Physiol* 2006; 18:445-50.
17. Yu Z, Dahlgren RA. Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. *Analyst* 2000; 26:98-113.
18. Sadler NP, Jacobs H. Application of the Folin-Ciocalteu reagent to the determination of salbutamol in pharmaceutical preparations. *Talanta* 1995, 42:1385-8.
19. Fernández-Pachón MS., Villaño D, García-Parrilla MC. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal Chim Acta* 2004, 513:113-18.
20. Al-Abachi MQ, Haddi H, Al-Abachi AM. Spectrofotometric determination of amoxicilin by reaction with *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine and potassium hexacyanoferrate (III). *Anal Chim Acta* 2005, 554:184-9.

21. Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R, Marrosu G, Saso L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1721:174-84.
22. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239:70-6.
23. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE, Altun M. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: The CUPRAC method. *J Agric Food Chem* 2004; 52:7970-81.
24. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE, Altun M. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. *Free Radic Res* 2005; 39:949-61.
25. Price JA, Sanny ChG, Shevlin D. Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high throughput assay of "total" antioxidant activity of drugs and natural products. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2006; 54:56-61.
26. Huang D, Ou B, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53:1841-56.
27. Prior RL, Cao G. *In vivo* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:1173-81.
28. Caldwell C, Charles R. A device for the semiautomatic determination of oxygen-radical absorbance capacity. *Anal Biochem* 2000; 287:226-33.
29. Ninfali P, Bacchiocca M, Biagotti E, Servili M, Montedoro G. Validation of the Oxygen Radical Absorbance Capacity(ORAC) parameter as a new index of quality and stability of virgin olive oil. *J Am Chem Soc* 2002; 79:977-82.
30. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:29-36.
31. Ordoudi SA, Tsimidou MZ. Crocin bleaching assay (CBA) in structure-radical scavenging activity studies of selected phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2006; 54 9347-56.
32. Lichtenthaler R, Marx F, Kind OM. Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay. *Eur Food Res Technol* 2003; 216:166-73.
33. Atanassova D, Kefalas P, Psillakis E. Measuring the antioxidant activity of olive oil mill Wastewater using chemiluminescence. *Analyst* 2002; 127:183-98.
34. Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Siniero J, Nunez MJ, Parajo JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 2001; 72:145-71.
35. Niki E. Antioxidant activity: Are we measuring it correctly? *Nutrition* 2002; 18:524-5.

REVIEW OF THE METHODS APPLIED TO MEASURING OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS

MARTA CYBUL, RENATA NOWAK*

Chair and Department of Pharmaceutical Botany
Medical University
Chodźki 1
20-093 Lublin, Poland

*correspondingthor: phone: +4881 7423703, e-mail:renata.nowak@am.lublin.pl
S u m m a r y

Free radicals are highly reactive and dangerous species that can cause a wide spectrum of cell damage. The organisms possess an antioxidant defense which helps to keep oxidative-antioxidative balance. Chronic oxidative stress is responsible for some diseases (e.g. diabetes, arteriosclerosis) development. A great number of medicinal plants contain compounds which are potential antioxidants. Free radical scavenging activity of plant extracts is determined by using different techniques. The most common are *in vitro* methods (e.g. DPPH, ABTS, F-C, DMPD) but *in vivo* assays are also known. Although an increasing interest in the studies on antioxidant activity is observed, there is no standardization of most analytical methods.

Key words: antioxidant activity, plant extracts, free radicals, TEAC, DPPH, ABTS