



# **AKADEMIA MEDYCZNA WARSZAWA**

**WYDZIAŁ FARMACJI ZAKŁAD CHEMII  
FIZYCZNEJ**

02-057 Warszawa, ul. Banacha 1

**BADANIE ANTYUTLENIAJĄCYCH  
WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH  
DODATKÓW DO ŻYWNOSCI**

M. Wasek, L.M. Krześniak, I. Wawer

# BADANIE ANTYUTLENIAJĄCYCH WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH DODATKÓW DO ŻYWNOSCI

M. Wasek, L.M. Krześniak, L Wawer

Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Warszawie, Zakład Chemii Fizycznej  
02-057 Warszawa, ul Banacha 1

## WSTĘP

Jeszcze kilkadziesiąt lat temu, tlen był uważany wyłącznie za pierwiastek niezbędny do życia. Nikt nie przypuszczał, że w stężeniu większym niż występuje w warunkach naturalnych, niektóre jego formy mogą być czynnikiem niszczącym życie. Odkrycie toksyczności tlenu było związane z wykryciem w zdrowych organizmach wolnych rodników tlenowych (WRT). Powodują one uszkodzenia komórek i są szczególnie niebezpieczne dla jądra komórkowego i mitochondriów. Jest wiele prac udowadniających, że rak, arterioskleroza, choroba Alzheimera czy Parkinsona są związane z malejącą odpornością na działanie rodników w komórkach. Antyoksydanty (przeciwutleniacze) eliminują wolne rodniki. Bardzo ważne jest więc stosowanie diety bogatej w antyutleniacze takie jak witamina C i E, karoteny, a również związki typu polifenoli [1,2,3]. Związki polifenolowe takie jak: flawonoidy, antocyjany czy taniny wykazują właściwości antyutleniające, neutralizują powstające w tkankach wolne rodniki. Surowce lecznicze zawierające polifenole są często głównym składnikiem wielu mieszanek ziołowych, herbat ziołowych oraz preparatów leczniczych naturalnego pochodzenia, które spełniają rolę aktywnych biologicznie dodatków do żywności.

Celem pracy było zbadanie efektywności działania różnych antyutleniaczy z grupy biologicznie aktywnych dodatków do żywności.

## BADANE MATERIAŁY

Do badania antyutleniających właściwości wybrano następujące, biologicznie aktywne, dodatki do żywności firmy Arkopharma (Francja):

Antiox, Lifepack Multiwitamina, Lifepack Antiox, Lifepack Multimineral, Lifepack Junior, Detox, Chromvital, Svelfform, Detox + Selen, Pax, Nutrimax, Millenium-żel.

Grupę kontrolną stanowiły następujące preparaty biologicznie aktywne: Rose-ox (Herbalife), Nutrilite Daily (Nutrilite A Division of Amway Corp., USA), Citrosept (Cintmanti International AS, Norwegia), Centrum Silver (Wyeth-Ayerst, Canada), Bilobil (KRKA, d.d., Slovenia), Vilcacora (Andean Medicine Centre, London, Wielka Brytania).

Dodatkowo w celu porównawczym do badanych materiałów dołączono preparaty powszechnie dostępne i uważane za bardzo silne antyoksydanty: zielona herbata, zmielone i wysuszone nasiona winogron oraz tabletki French Paradox.

## SKŁAD WYBRANYCH MATERIAŁÓW FIRMY ARKOPHARMA

Do badania wybrano nie tylko uznawane za wymiatacze wolnych rodników, lecz także o innym przeznaczeniu terapeutycznym (np. Pax, Nutrimax, Millenium-żel). Skład wybranych materiałów firmy Arkopharma przeznaczonych do badań przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1**

Nazwa preparatu	Skład i forma preparatu (zawartość składników w mg)
Antiox *	Żelatynowe kapsułki po 390 mg: Wyciąg wytkoków winogron (150); Miłorząb dwuklapowy – <i>Ginkgo biloba</i> (26,5); Witamina C (65); Witamina E (10); Beta-karoten (5); Drożdże z selenem (50) – odpowiada zawartości 50 µg selenu; Tlenek cynku (18,5) - odpowiada zawartości 15 mg cynku.
Detox *	Uncaria tomentosa – żelatynowe kapsułki po 38,5 mg: Uncaria tomentosa (380).
Lifepack Multivitamina*	Bezbarwna przezroczysta kapsułka z proszkiem o barwie żółtej z szarym odcieniem (450mg): Witamina C (66); Witamina PP (18); Witamina E - <i>octan tokoferolu</i> (10); Witamina B5 (6); Beta-karoten (2,5); Witamina B6 (1,65); Witamina B2 (1,6); Witamina B5 (1,15); Witamina B9 (0,2); Witamina H (0,15); Witamina D3 (5 µg); Witamina B12 (1 µg).
Chromvital * Spirulina maxima	Żelatynowe kapsułki po 410 mg: Cierniopląt guarana - Osmęta – Paullinia Cupana (72); Spirulina – <i>Spirulina maxima</i> (75); Kolcosił – <i>Eleutherococcus senticosus</i> (175); Kola – <i>Cola niti-da</i> (20); Drożdże z chromem (25) – odpowiada zawartości 50 µg chromu; Witamina C (33).
Lifepack Junior	Tabletki po 740 mg: Witamina C (12,5); Witamina PP (3); Witamina E (2,5); Beta-karoten (0,75); Witamina B6 (0,325); Witamina B2 (0,325); Witamina B1 (0,25); Witamina B9 (0,03); Witamina B12 (0,5 µg); Witamina D3 (0,25) – odpowiada zawartości 25j cholecalciferolu; Fosforan wapnia (22) – odpowiada zawartości 5,0 mg wapnia i 4,0 mg fosforu; Trójfosforan sodu (4) – odpowiada zawartości 1,0 mg fosforu; Siarczan miedzi (0,23) – odpowiada zawartości 50 µg miedzi; Ortofosforan chromu (13,5µg) – odpowiada zawartości 1 µg chromu; Glukonian żelaza (0,246) – odpowiada zawartości 0,03 mg żelaza; Fluorek wapnia (97 µg) – odpowiada zawartości 37 µg fluoru; Węglan magnezu (4,3) – odpowiada zawartości 1 mg magnezu; Węglan manganu (0,23) – odpowiada zawartości 0,1 mg manganu; Selenian sodu (2,2 µg) – odpowiada zawartości 1 µg selenu; Tlenek cynku (0,54) – odpowiada zawartości 0,375 mg cynku; Dekstroza, kakao, sacharoza (do 740 mg).
Sveltform * <i>Fucus vesteriosus L.</i>	Żelatynowe kapsułki po 405 mg: Garcinia cambogia (200); Camelia sinensis (70); Morszczyń pęcherzykowaty (70); Witamina C (32); Drożdże z chromem (25) – odpowiada zawartości 50 µg chromu.
Nutrimax * <i>Arcostaphylos Uva-ursi</i>	Żelatynowe kapsułki po 400mg: Dzięgiel chiński - <i>Angelica sinensis</i> (31); Orzech wirginijski – <i>Hamamelis virginiana</i> (31); Mącznica lekarska – <i>Arcostaphylos uva-ursi</i> (31); Witamina PP (18); Witamina B5 (6); Witamina B6 (1,65); Witamina B2 (1,6); Witamina B1 (1,15); Witamina B9 (0,2); Witamina B12 (1 µg); Witamina D3 (5 µg); Uwodniony fosforan wapnia (112,5) - odpowiada zawartości 26 mg wapnia; Węglan magnezu (100) – odpowiada zawartości 26 mg magnezu; Glukonian żelaza (55) – odpowiada zawartości 7 mg żelaza.
Pax * Melisa lekarska	Żelatynowe kapsułki po 405 mg: Melisa lekarska – <i>Melissa officinalis</i> (50); Lawenda wąskolistna – <i>Lavandula angustifolia</i> (50); Mak polny – <i>Papaver rhoeas</i> (50); Witamina PP (18); Witamina B5 (6); Witamina B6 (1,65); Witamina B2 (1,6); Witamina B1 (1,15); Witamina B9 (0,2); Witamina B12 (1 µg); Witamina D3 (5 µg); Uwodniony fosforan wapnia (112,25) – odpowiada zawartości 26 mg wapnia; Węglan magnezu (100) – odpowiada zawartości 26 mg magnezu.

## IDEA METODY

Najczulszą metodą badania wolnych rodników jest elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR). Ponieważ rodniki powstające w organizmach żywych mają na ogół czas rzędu ułamków sekundy, więc są trudne do bezpośredniego zarejestrowania. Z tego powodu przetestowanie właściwości utleniających badanych surowców "in vivo" jest niemożliwe. W1989 roku Hatano i inni [4] zaproponowali testowanie zdolności antyutleniających tanin w stosunku do trwałego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylo-hy-drazylu (DPPH). Zdolność wymiatania rodnika określano poprzez porównanie intensywności sygnałów wzorca DPPH (10) z sygnałem tego rodnika po dodaniu badanego materiału (I). Za zdolność wymiatania wolnych rodników przyjęto wielkość opisaną następującym wzorem:

$$Z(\%) = \frac{I_0 - I}{I_0} \cdot 100$$

Zgodnie z przyjętą konwencją im większa wielkość Z, tym lepsza zdolność wymiatania wolnych rodników.

## PRZYGOTOWANIE PRÓBEK I WZORCÓW

### *Przygotowanie roztworu rodnika DPPH*

0,1 g DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazidu) odważono do kolby miarowej o pojemności 100cm<sup>3</sup> i uzupełniono do kreski acetonem. Stężenie wzorcowego roztworu wynosiło 0,0025 mol/dm<sup>3</sup>.

### *Przygotowanie próbki*

0,5 g każdego badanego materiału rozpuszczano w 50 ml wody destylowanej w temperaturze pokojowej. W ten sposób otrzymany roztwór w ilości 200 µl dodawano do 1 ml roztworu trwałego rodnika DPPH.

### *Przygotowanie wzorca*

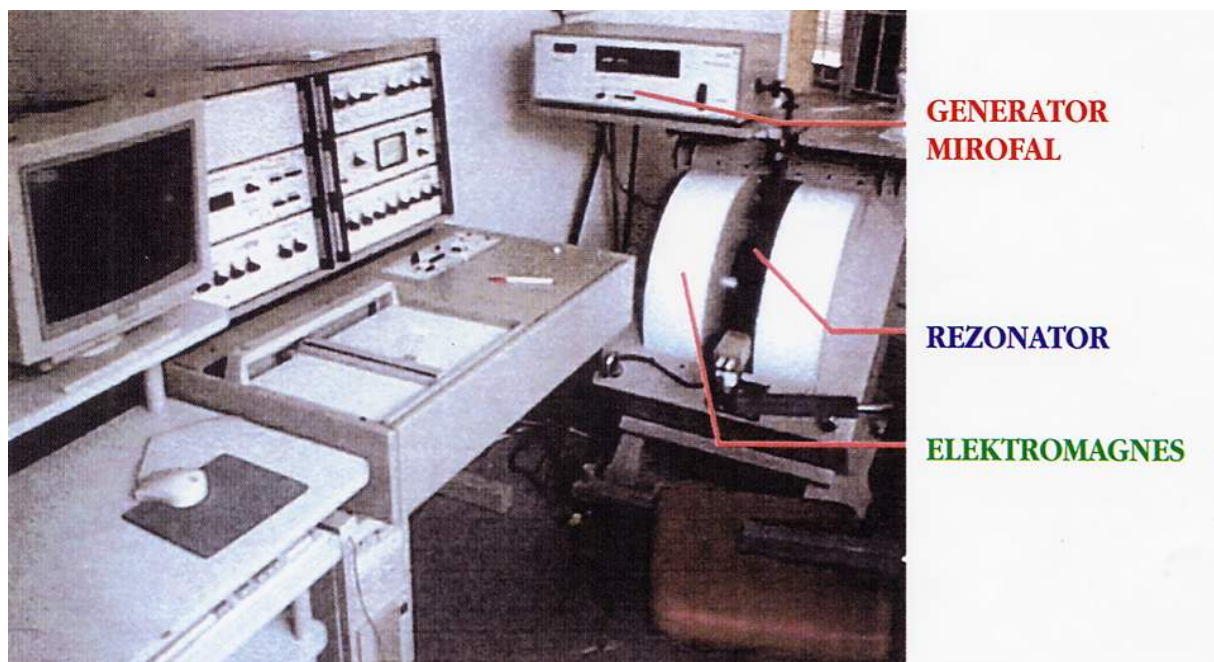
Do 1 ml roztworu rodnika DPPH dodawano 200 µl wody destylowanej.

Roztwór wzorcowy i próbki umieszczano w rurkach EPR (średnica wewnętrzna 4 mm) tak, aby wypełniały ją szczelnie w całym obszarze wnęki rezonansowej spektrometru.

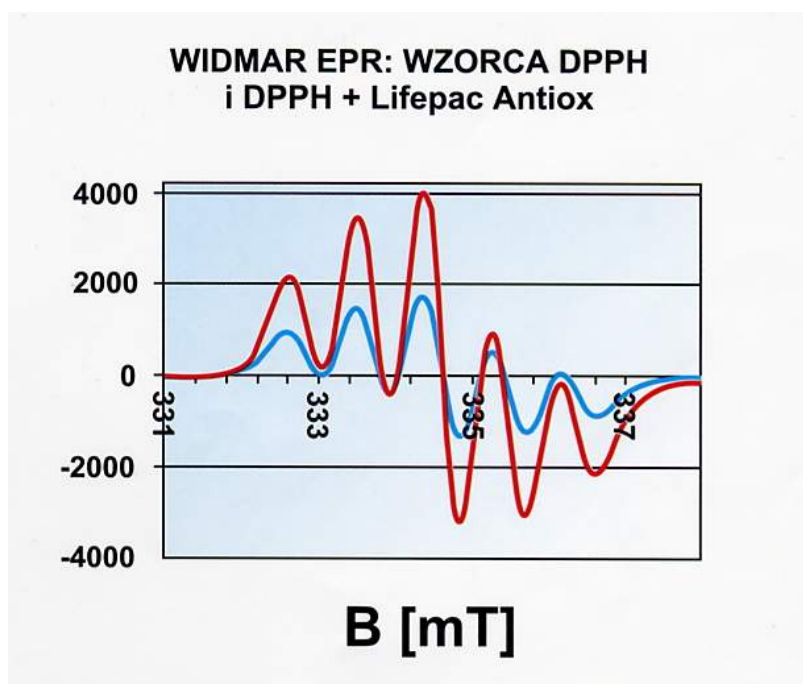
## APARATURA

Urządzenia do rejestrowania widm EPR nazywane są magnetycznymi spektrometrami mikrofalowymi. W elektronowym rezonansie paramagnetycznym widmo standartowe uzyskuje się przez przemiatanie próbki zmiennym polem magnetycznym przy stałej częstotliwości promieniowania. Stosuje się do tego celu promieniowanie mikrofalowe, co odpowiada dla rodników organicznych wartościom pola w zakresie 300 -400mT. Promieniowanie mikrofalowe generowane jest przez klistron i doprowadzane do rezonatora falowodami. Podstawowe części spektrometru EPR wykorzystywanego na Wydziale Farmacji AM w Warszawie przedstawiono na fotografii 1.

Pomiędzy biegunami silnego pola magnetycznego znajduje się wnęka rezonansowa – w tym miejscu umieszczana jest badana próbka lub wzorzec. Promieniowanie mikrofalowe generowane przez klistron (częstotliwość 9,3 GHz – pasmo X) dociera falowodami do rezonatora i po przejściu przez próbkę (lub wzorzec) trafia do detektora krzemowego, z którego sygnał elektryczny, po wzmocnieniu, podawany jest na rejestrator sprzężony z komputerem. Aby zwiększyć czułość, w spektrometrach EPR stosowana jest modulacja dodatkowym promieniowaniem (w naszym przypadku o częstotliwości 100 kHz). Zastosowanie modulacji zmienia kształt widma absorpcji EPR, które jest wówczas zapisywane w postaci pierwszej pochodnej absorpcji w funkcji indukcji. W celu obliczenia integralnej intensywności sygnału próbki (I) i wzorca (I<sub>0</sub>) należy zatem stosować dwukrotne całkowanie widma. Przykładowe widmo absorpcji EPR dla rodnika DPPH (wzorca) i rodnika DPPH po dodaniu próbki Lifepack Antiox przedstawiono na Rys. 1.



Fotografia 1. Układ pomiarowy spektrometru EPR stosowany w niniejszej pracy



Rysunek 1. Widma EPR rodnika DPPH – wzorca (kolor czerwony) i rodnika DPPH po dodaniu próbki Lifepack Antiox (kolor granatowy)

## POMIARY I REJESTRACJA WIDM EPR

Pomiary przeprowadzono na spektrometrze EPR/SE/X (9,3 GHz) firmy Radiopan / Radiofan z Poznania sprzężonym z cyfrowym detektorem fazowym (Lock-in) zainstalowanym w komputerze. Rejestracji widm dokonano przy następujących parametrach spektrometru:

Prąd diody: 60%

Stałą czasowa: 0,1 s

Faza: 90°

Czas przemiataania: 2 minuty

Amplituda modulacji: od  $0,1 \cdot 10^4$  do  $0,5 \cdot 10^6$

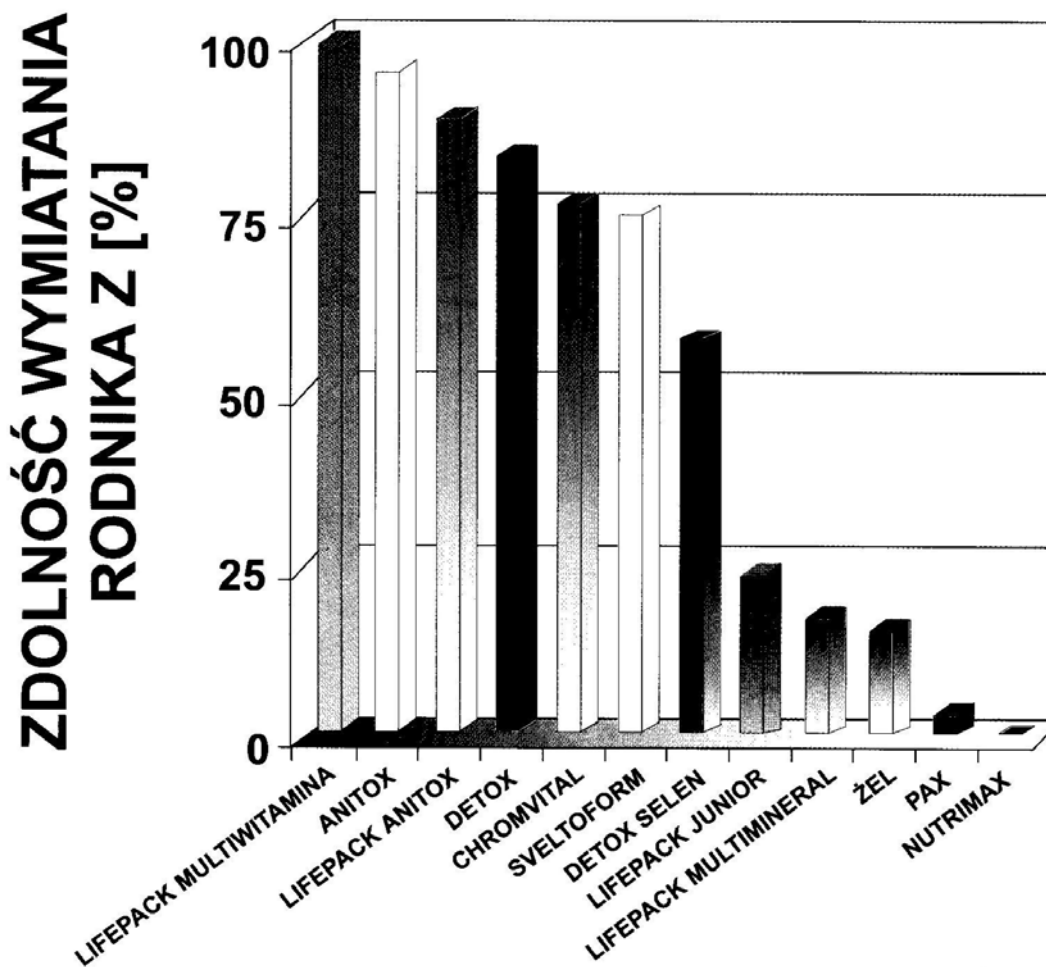
Indukcja magnetyczna:  $B_0 = 334$  mT

Szerokość przemiataania:  $\Delta B_U = 10$  mT

Do całkowania widm EPR stosowano program WIN-EPR firmy Bruker.

## WYNIKI I WNIOSKI KOŃCOWE

Zdolność wymiatania wolnych rodników Z (patrz wzór I.), uzyskana przez zbadane materiały firmy Arkopharma przedstawiono na rys. 2. Najlepszą skuteczność antyoksydacyjną, bliską 100%, posiadają: preparat c "zwie Lifepack Multiwitamina.



Rysunek 2: Zdolność antyutleniająca biologicznie aktywnych dodatków do żywności firmy Arkopharma.

Zbadane preparaty można podzielić na trzy grupy:

**1. Bardzo silnych wymiataczy wolnych rodników (Z >75%)**

Do grupy tej zaliczyć można następujące preparaty:  
Lifepack Multiwitamina, Antiox Lifepack Antiox i Detox

**2. Silnych wymiataczy (25% < Z < 75%)**

Do grupy tej należą następujące preparaty:  
Chromvital, Sveltform i Detox + Selen

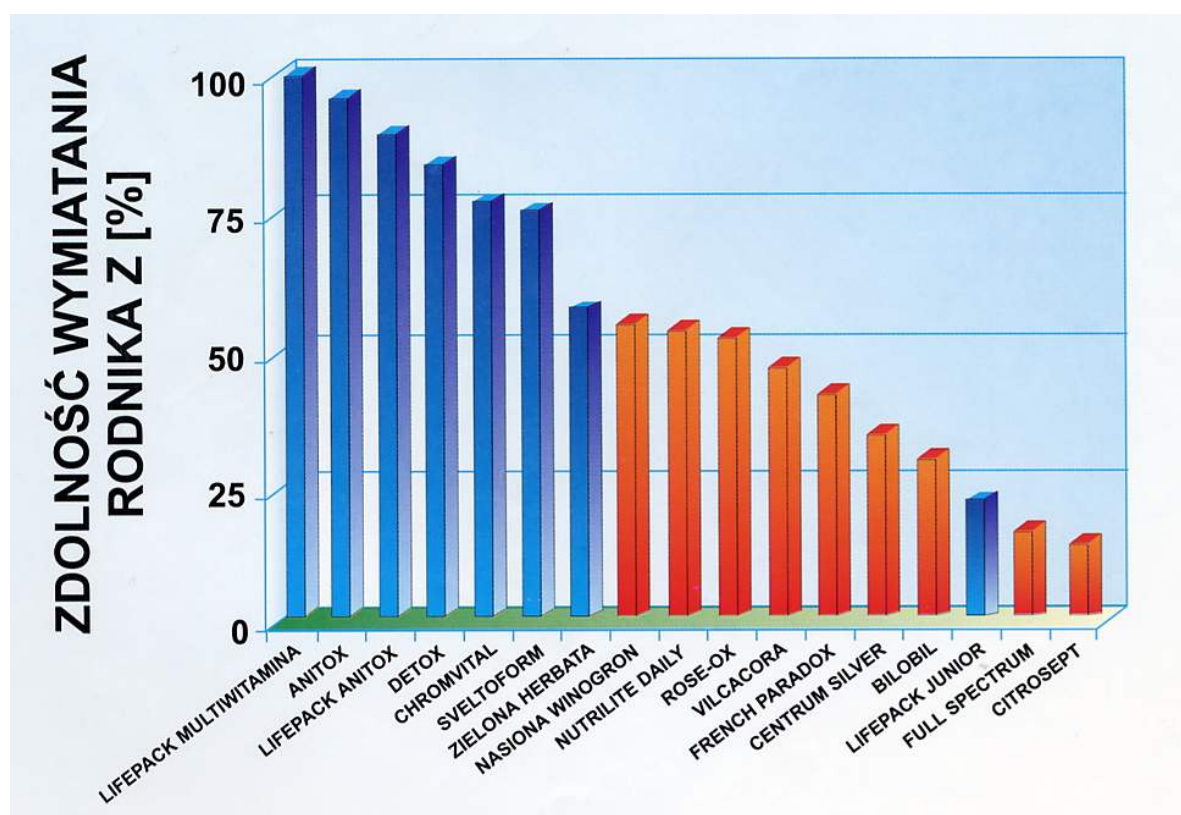
**3. Słabych wymiataczy (Z < 25%)**

Do grupy tej należą następujące preparaty:  
Lifepack Junior, Lifepack Multimineral. Millenium - żel, Pax oraz Nutrimax.

W tym miejscu należy podkreślić, że materiały z grupy 3 – pomimo innego przeznaczenia terapeutycznego – wykazywały zdolność wymiatającą wolne rodniki (Lifepack Multimineral i Lifepack Junior).

Bardzo silne właściwości przeciwutleniające preparatów firmy Arkopharma uwidaczniają się, gdy porówna się je z preparatami innych firm dostępnymi na rynku polskim. Porównanie to przedstawiono na rys 3.

Wyniki uzyskane dla preparatów firmy Arkopharma przedstawione są kolorem niebieskim, natomiast dla preparatów innych firm kolorem czerwonym. Dodatkowo dla celów porównawczych na wykresie umieszczono zdolności wymiatania wolnych rodników uzyskane przez herbatę zieloną, nasiona winogron oraz tabletki French Paradox. Jak widać z tego porównania, preparaty firmy Arkopharma nie mają wśród innych preparatów odpowiednika o podobnych właściwościach antyutleniających.



Rysunek 3: Zdolność antyutleniająca biologicznie aktywnych dodatków do żywności firmy Arkopharma w porównaniu z preparatami innych firm.

## LITERATURA

1. Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Mlarjanovic B. and Simic M. G. "Flavonoids as antioxidant", J.Am. Chem. Soc. ,116 (1994) 4846 - 4851
2. Van Acker S.A.B.E., van den Berg d.J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J.F. and Bast. "Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids", Free Rad.Biol.Med., 20(1996) 331-342
3. Wasek M., Wawer I., Krzeńskiak L.M. "Radical-scavenging effects of medicinal plants and complex plant formulations", 5th Symposium Free Radicals in Biology and Medicine, Łódź,7-10 June 2000
4. Hatano T., Edamatsu R. Hiramatsu M., Fukita Y., Yoshida T., Okuda T. "Effects of the interaction of tannins with co-existing substances", Chem. Pharm. Bull. 37 (1989) 2016-2021

AKADEMIA MEDYCZNA  
Wydział Farmaceutyczny  
Zakład Chemii Fizycznej  
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa  
tel. 823-62-97, kod. FW-28