

Mgr Anna Julia Pękal
Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski
Pracownia Analizy Przepływowej i Chromatografii

Autoreferat rozprawy doktorskiej

***„Wpływ doboru procedury analitycznej na wyznaczenie właściwości
antyutleniających próbek żywności”***

Promotor: prof. dr hab. Krystyna Pyrzyńska

Wolne rodniki i inne reaktywne formy tlenu (RFT) oraz azotu uczestniczą w procesach biochemicznych i fizjologicznych zachodzących w organizmach żywych. W zdrowym organizmie zachowana jest równowaga między wytwarzaniem a usuwaniem tych reaktywnych form. Naruszenie tej równowagi powoduje tzw. stres oksydacyjny mogący prowadzić do szeregu chorób.

Organizmy żywe bronią się przed nadmiarem wolnych rodników za pomocą mechanizmów antyoksydacyjnych. Ochrona antyoksydacyjna żywej komórki wykorzystuje wiele różnych związków, między innymi antyoksydanty (przeciwutleniacze). Ich działanie opiera się głównie na eliminowaniu RFT, przerywaniu kaskady reakcji wolnorodnikowych prowadzących do peroksydacji lipidów, inhibicji enzymów z grupy oksydaz, ochranianiu innych antyoksydantów oraz chelatowaniu jonów metali, które spełniają rolę promotora w reakcjach powstawania wolnych rodników, np. w reakcji Fentona.

Antyutleniacze endogenne wytwarzane są przez organizm ludzki. Należą do nich m. in. glutation, dysmutaza ponadtlenkowa czy koenzym Q₁₀. Antyoksydanty egzogenne natomiast dostarczane są z żywnością lub w postaci suplementów (jako nutraceutyki). Zaliczamy do nich związki polifenolowe, karotenoidy, tokoferole czy kwas askorbinowy.

Flawonoidy to obszerna grupa polifenoli roślinnych charakteryzująca się występowaniem w cząsteczce układu złożonego z dwóch pierścieni benzenowych połączonych trójwęglowym łańcuchem lub pierścieniem heterocyklicznym. Ich ogromna różnorodność wynika z faktu, że atomy węgla w pierścieniach mogą ulegać hydroksylacji, metoksyacji oraz glikolizacji w różnych pozycjach. Aktywność antyutleniająca flawonoidów wiąże się z pierścieniową budową cząsteczki mającej sprzężone wiązania podwójne, jak i z obecnością grup hydroksylowych podstawionych w pierścieniach aromatycznych. Polifenole współdziałają również z innymi antyoksydantami. Przykładem mogą być kwercetyna i rutyna, które pełnią funkcję antyutleniacza w stosunku do witaminy C, spowalniając przekształcanie askorbinianu w dehydroaskorbinian, zaś kwas askorbinowy przedłuża działanie ochronne flawonoidów i hamuje ich utlenianie.

Producenci żywności w celu zareklamowania danego produktu często podają informacje, że zawiera on składniki o zdolnościach antyutleniających, a więc takie, które zmniejszają ryzyko zachorowania na przewlekłe choroby czy też opóźniają procesy starzenia naszych komórek. Miarodajny pomiar zdolności antyutleniających jest w związku z tym potrzebny np. w celu porównania tych właściwości pomiędzy produktami.

W literaturze opisano i stosowano szereg metod służących określeniu zdolności antyutleniających poszczególnych związków oraz próbek żywności. Jednak autorzy prac stosują różne warunki chemiczne proponowanych procedur analitycznych. Poza tym występuje duża swoboda w prezentowaniu otrzymywanych wyników, stąd porównanie rezultatów jest bardzo trudne. W rozprawie doktorskiej badałam wpływ różnych parametrów analitycznych na oznaczanie zdolności antyutleniających najczęściej stosowanymi metodami.

W metodzie DPPH, polegającej na spektrofotometrycznej detekcji reakcji neutralizacji syntetycznego rodnika (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) przez antyutleniacze wykazałam, że ze wzrostem pH środowiska reakcji, wzrasta jej efektywność aż do osiągnięcia stanu *plateau*. Im niższą wartość pH ma badana próbka, tym większy jest jego wpływ na wyniki otrzymane w reakcji z metanolemowym roztworem DPPH[•]. Na wynik w tej metodzie wpływa zatem zawartość naturalnych kwasów organicznych w próbkach żywności, takich jak kwas cytrynowy, jabłkowy czy malonowy. Obecność jonów metali ma także wpływ na otrzymane wyniki. Zmiany w efektywności neutralizacji rodnika przez modelowe związki polifenolowe zależą zarówno od rodzaju, jak i od stężenia jonów metali. W pracy podjęłam próby usunięcia z badanych próbek jonów metali poprzez dodatek silnego kompleksonu oraz zastosowanie techniki ekstrakcji do fazy stałej. Druga metoda umożliwiła analizę wpływu jonów metali na wyniki, jednak ze względu na wydłużenie etapu przygotowania próbki, postępowania takiego nie zaproponowano jako potencjalnie rutynowego. Należy jednak pamiętać, że jony metali znajdują się w każdej naturalnej próbce żywności, a ich stężenie zależy od rodzaju próbki i sposobu ekstrakcji. W pomiarach neutralizacji rodnika DPPH[•] wykazałam też, że najczęściej podawane w literaturze parametr EC₅₀ i procent neutralizacji DPPH[•], zależą od początkowego stężenia rodników. By uniknąć tego wpływu, zaproponowałam przedstawianie wyniku w postaci równoważnika molowego troloksu (rozpuszczalna w wodzie pochodna witaminy E) wyznaczonego z zależności różnicy początkowej i końcowej wartości absorbancji roztworu DPPH[•]. Związek ten charakteryzuje się szerokim zakresem stężeń, dla których wynik nie zależy od początkowego stężenia rodnika, a czułość metody jest wysoka.

Metoda Folina-Ciocalteu (FC) określana jest w literaturze metodą oznaczania całkowitej zawartości polifenoli. Oparta jest na utlenianiu grup fenolowych związkami molibdenu(VI), a więc faktycznie wyznacza całkowitą zdolność redukującą próbki. W pracy wykazałam, że zarówno jony Fe(II), jak i kwas askorbinowy, niektóre witaminy, glutation czy aminokwas tryptofan mają zdolność do redukcji odczynnika FC. Obecność jonów metali wpływa znacznie słabiej na wyniki uzyskane metodą FC, niż metodą DPPH. Po serii

eksperymentów zaproponowałam kwas galusowy jako związek względem którego należy określać zdolności antyutleniające, wyznaczone tą metodą.

Następną stosowaną przeze mnie metodą była metoda wykorzystująca reakcję redukcji jonów Cu(II) do Cu(I) związanych w kompleks z batokuproiną (2,9-dimetylo-4,7-difenylo-1,10-fenantrolina) lub neokuproiną (2,9-dimetylo-1,10-fenantrolina) – metoda CUPRAC. Wykazałam, że badając tą metodą właściwości antyutleniające próbek żywności niezbędna jest inkubacja układu pomiarowego w podwyższonej temperaturze. Stwierdziłam wysoką addytywność wyników otrzymanych dla badanych związków polifenolowych, co świadczy o braku interakcji pomiędzy składnikami badanych mieszanin w reakcji ze stosowanym odczynnikiem. Zdolności redukujące złożonych próbek, będących mieszaniną wielu antyutleniaczy są zatem wypadkową sumą zdolności redukujących poszczególnych składników, mierzonych metodą CUPRAC. Nie stwierdziłam wpływu obecności jonów metali na otrzymane wyniki.

Zarejestrowałam także woltamperogramy modelowych antyutleniaczy oraz ekstraktów badanych próbek herbat. W przypadku próbek naturalnych wyznaczenie wartości potencjału pikowego jest problematyczne. Sygnał na woltamperogramie jest wypadkową potencjałów utlenienia dla wielu polifenoli, stąd brak wyraźnego pikowego anodowego. Wyznaczenie pola powierzchni, które odzwierciedla zdolności antyutleniające próbek jest subiektywne, przez co obarczone dużym błędem. Podobnie jest z metodą potencjometryczną. W pracy zbadałam własności redukujące ekstraktów herbat metodami elektrochemicznymi i porównałam je. Nie zauważyłam jednak zależności o wyraźnej tendencji pomiędzy wynikami uzyskanymi obiema metodami elektrochemicznymi.

Wyniki uzyskane wszystkimi stosowanymi metodami wykazały słabą korelację liniową między sobą. Analiza skupień wykazała, że wyniki uzyskane metodą potencjometryczną znacząco różnią się od wyników otrzymanych pozostałymi metodami. Najśłabszą korelację liniową uzyskałam dla wyników otrzymanych metodą z rodnikiem DPPH[•] oraz metodą CUPRAC. Metoda CUPRAC i FC mimo, że oparte na właściwościach redukujących badanych próbek, różnią się potencjałem formalnym zredukowanego układu, a także warunkami reakcji. Oczywistym powodem różnic w wynikach pomiędzy stosowanymi metodami może być także środowisko reakcji wpływające na formę związków aktywnych, w szczególności kwasowość roztworu. Jednak jak wykazano w pracy, wyniki otrzymane różnymi metodami różnią się między sobą również dlatego, że w niektórych metodach wykazano znaczący wpływ składników matrycy (m. in. jonów metali). Poza tym w próbce o złożonym składzie mogą wystąpić zarówno efekty synergistyczne jak i antagonistyczne, uwidaczniane różnie dla różnych metod.

W pracy podważyłam skuteczność metody z jonami Al(III) w oznaczeniu całkowitej zawartości flawonoidów. W literaturze stosuje się głównie dwie procedury: (1) bez dodatku NaNO₂, w której związku odniesienia jest najczęściej kwercetyna oraz (2) z dodatkiem NaNO₂ w środowisku alkalicznym, w której katechina służy, jako związek standardowy. W związku z różnorodnością stosowanych procedur sprawdzono wpływ rodzaju i stężenia soli glinu oraz rodzaju użytego rozpuszczalnika, dodatku roztworu NaNO₂

oraz środowiska reakcji. Ponadto położenie maksimum absorpcji dla różnych próbek ulega przesunięciu, ze względu na to, że sygnał jest wypadkową sygnału pochodzącego od kompleksów utworzonych przez różne związki, będące składnikami próbki. Obie stosowane procedury mierzą sygnał pochodzący od różnych grup związków polifenolowych, np. przy zastosowaniu procedury 1 najwyższy wynik otrzymano dla ekstraktu z dziurawca, a przy zastosowaniu procedury 2 – dla ekstraktu z herbaty zielonej. Wyniki te są zgodne z wynikami oznaczenia poszczególnych polifenoli metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC-MS).

Wyniki dotyczące pracy doktorskiej zostały opublikowane w 10 pracach oryginalnych, 2 popularnonaukowych i 4 rozdziałach w monografiach tematycznych.