

Jolanta Enko

Wpływ interakcji kwasu askorbinowego
i wybranych ekstraktów roślinnych na ich
aktywność przeciwutleniającą
i przeciwdrobnoustrojową

The influence of interactions between ascorbic
acid and selected plant extracts
on their antioxidant and antimicrobial activity

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. inż. Anna Gliszczyńska-Świgło

Pracę przyjęto dnia

podpis Promotora

Wydział: Towaroznawstwa

Katedra: Technologii i Analizy Instrumentalnej

Dedykuję

Rodzicom,

prof. dr hab. inż. Annie Gliszczyńskiej-Świgło,

oraz wszystkim z Katedry Technologii i Analizy Instrumentalnej

w podziękowaniu za pomoc i wsparcie

Spis treści

Wykaz zastosowanych skrótów	5
STRESZCZENIE	6
SUMMARY	9
WSTĘP	11
CZĘŚĆ LITERATUROWA	13
1. Jakość produktów spożywczych i kosmetycznych	13
2. Żywność funkcjonalna i suplementy diety	14
2.1. Rynek witamin i suplementów diety w Polsce.....	17
3. Dodatki do żywności i kosmetyków.....	19
3.1. Przeciwutleniacze w produktach spożywczych i kosmetycznych.....	22
3.1.1. Mechanizm działania substancji przeciwutleniających	22
3.1.2. Przeciwutleniacze jako składniki produktów spożywczych i kosmetycznych.....	25
3.2. Stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych w żywności i kosmetykach	36
3.3. Roślinne związki fenolowe jako substancje o działaniu przeciwutleniającym i przeciwdrobnoustrojowym.....	38
3.3.1. Właściwości związków polifenolowych zawartych w liściach herbaty.....	39
3.3.2. Właściwości związków polifenolowych zawartych w ekstraktach z zielonej kawy i pestek winogron	45
4. Interakcje pomiędzy substancjami o działaniu przeciwutleniającym	47
4.1. Interakcje pomiędzy polifenolami roślinnymi a kwasem askorbinowym.....	48
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	53
5. Cel pracy i hipotezy badawcze.....	53
6. Zakres pracy	53
7. Materiał badawczy, odczynniki i aparatura laboratoryjna.....	55
8. Metodyka badawcza	58
8.1. Przygotowanie wodnego ekstraktu z herbat i zielonej kawy	58
8.2. Przygotowanie mieszanin ekstraktów i kwasu askorbinowego	58
8.3. Przygotowanie próbek oleju z dodatkiem ekstraktu z zielonej herbaty, kwasu askorbinowego oraz ich mieszanin	58
8.4. Oznaczanie związków fenolowych w badanych ekstraktach metodą HPLC.....	59
8.5. Oznaczanie zawartości tokoferoli metodą HPLC.....	60
8.6. Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej	61
8.7. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą TEAC z kationorodnikiem ABTS ⁺⁺	61
8.8. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą FRAP	62

8.9. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą z rodnikiem DPPH'	63
8.10. Oznaczanie liczby nadtlenkowej	63
8.11. Oznaczanie liczby anizydynowej	64
8.12. Wskaźnik TOTOX	65
8.13. Oznaczanie wartości K_{232} i K_{268}	65
8.14. Wyznaczanie stabilności oksydacyjnej emulsji kosmetycznej	66
8.15. Oznaczanie właściwości przeciwbakteryjnych metodą dwukrotnych rozcieńczeń na mikropłytkach	67
9. Analiza interakcji	67
9.1. Metoda izobologramów i współczynniki interakcji	67
9.2. Analiza interakcji ekstraktów i kwasu askorbinowego przez sumowanie indywidualnych efektów	69
10. Analiza statystyczna wyników	71
11. Wyniki badań i ich dyskusja	72
11.1. Zawartość związków polifenolowych w badanych ekstraktach	72
11.2. Właściwości przeciwutleniające badanych ekstraktów, kwasu askorbinowego i ich mieszanin	78
11.3. Interakcje pomiędzy badanymi ekstraktami i kwasem askorbinowym mierzone w teście TEAC, FRAP i DPPH	84
11.4. Interakcje pomiędzy ekstraktami z herbat a kwasem askorbinowym w zależności od pH	94
11.5. Interakcje między kwasem askorbinowym a ekstraktem z zielonej herbaty w hamowaniu utleniania oleju sezamowego	106
11.5.1. Utlenianie oleju sezamowego w obecności ekstraktu z zielonej herbaty, kwasu askorbinowego oraz ich mieszanin	108
11.5.2. Interakcje pomiędzy kwasem askorbinowym a ekstraktem z zielonej herbaty w oleju sezamowym	113
11.5.3. Zawartość tokoferoli w oleju sezamowym z dodatkiem kwasu askorbinowego i ekstraktu z zielonej herbaty oraz ich mieszanin	118
11.6. Stabilność oksydacyjna emulsji kosmetycznej z dodatkiem badanych ekstraktów, kwasu askorbinowego oraz ich mieszanin	119
11.7. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe badanych ekstraktów, kwasu askorbinowego oraz ich mieszanin	131
PODSUMOWANIE WYNIKÓW	140
WNIOSKI	143
BIBLIOGRAFIA	147
WYKAZ TABEL I WYKRESÓW	162

Wykaz zastosowanych skrótów

- ABTS** 2,2'-azynobis-3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian
- ABTS⁺** kationorodnik 2,2'-azynobis-3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu
- BHT** butylohydroksytoluen
- C** (+)-katechina (ang. (+)-*catechin*)
- DPPH** 2,2'-difenylo-1-pikrylohydrazyl
- DPPH[•]** rodnik 2,2'-difenylo-1-pikrylohydrazylu
- EC** (-)-epikatechina (ang. (-)-*epicatechin*)
- ECG** (-)-galusan epikatechiny (ang. (-)-*epicatechin gallate*)
- EGC** (-)-epigalokatechina (ang. (-)-*epigallocatechin*)
- EGCG** (-)-galusan epigalokatechiny (ang. (-)-*epigallocatechin gallate*)
- FRAP** zdolność redukcji żelaza (III) w kompleksie z tripirydylotriazyną (Fe(III)-TPTZ) do Fe(II)-TPTZ (ang. *Ferric Reducing Ability of Plasma* lub *Ferric Reducing Antioxidant Power*)
- GA** kwas galusowy (ang. *gallic acid*)
- GC** (+)-galokatechina (ang. (+)-*gallocatechin*)
- GCG** (-)-galusan galokatechiny (ang. (-)-*gallocatechin gallate*)
- IC₅₀** stężenie przeciwutleniacza powodujące obniżenie stężenia rodnika o 50%
- KA** kwas askorbinowy
- LA** liczba anizydynowa
- LN** liczba nadtlenkowa
- HPLC** wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Performance Liquid Chromatography*)
- MP8** mikroperoksydaza 8
- TEAC** równoważnik potencjału przeciwutleniającego troloksu (ang. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)
- TPTZ** 2,4,6-tripirydylo-s-triazyna

STRESZCZENIE

Produkty spożywcze i kosmetyczne są złożonymi matrycami, zawierającymi związki o różnych właściwościach. Poszczególne substancje mogą wchodzić ze sobą w interakcje (antagonizm lub synergizm), co istotnie wpływa na niektóre właściwości produktu. Do substancji, które mogą wchodzić ze sobą w interakcje należą np. te o działaniu przeciwutleniającym i przeciwdrobnoustrojowym. Można tu wymienić między innymi kwas askorbinowy czy α -tokoferol oraz ekstrakty z herbat, owoców, warzyw i ziół. W przypadku ekstraktów roślinnych na rodzaj i wielkość interakcji może wpływać obecność wszystkich substancji zawartych w ekstraktach. Ważne jest więc badanie zarówno oddziaływań pomiędzy pojedynczymi substancjami, jak i pomiędzy ekstraktami i innymi przeciwutleniaczami czy związkami przeciwdrobnoustrojowymi. Badania nad interakcjami pomiędzy substancjami mają istotne znaczenie praktyczne, gdyż znajomość możliwych interakcji może ułatwić projektowanie żywności lub kosmetyków o korzystniejszych właściwościach.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu interakcji pomiędzy kwasem askorbinowym i wybranymi ekstraktami roślinnymi na ich właściwości przeciwutleniające i przeciwdrobnoustrojowe. Do badań wytypowano ekstrakty z herbat (zielonej, czarnej, białej oraz czerwonej), z zielonej kawy i z pestek winogron.

W pierwszym etapie badań oznaczono skład związków polifenolowych badanych ekstraktów metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej w celu powiązania ewentualnych interakcji z ich składem polifenolowym. Aktywność przeciwutleniającą badanych ekstraktów oraz ich mieszanin z kwasem askorbinowym w różnych stosunkach wagowych (10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10) oznaczano za pomocą metod spektrofotometrycznych (TEAC, FRAP i DPPH). Oznaczono także aktywność ekstraktów z herbat i ich mieszanin z kwasem askorbinowym w pH 2-9 za pomocą zmodyfikowanego testu TEAC. Na podstawie wyników aktywności przeciwutleniającej obliczono współczynniki interakcji pozwalające określić, czy pomiędzy składnikami mieszaniny zachodzi interakcja i jaki jest jej typ. Dla różnych ekstraktów, środowiska (wodne, metanolowe), pH i stosunków wagowych obserwowano zarówno oddziaływania antagonistyczne, jak i synergistyczne, a także addytywność.

W kolejnym etapie określono wpływ mieszaniny niestandardyzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i kwasu askorbinowego w stosunku wagowym 2:1 i 1:2 na stabilność oksydacyjną oleju sezamowego. Dla oleju sezamowego z dodatkiem ekstraktu z zielonej

herbaty i kwasu askorbinowego, przechowywanego przez 17 tygodni, oznaczano liczbę nadtlenkową oraz anizydynową, wartości K_{232} i K_{268} (stężenie skoniugowanych dienów i trienów) oraz obliczono wartości TOTOX. Mieszanina ekstraktu z zielonej herbaty i kwasu askorbinowego w obu stosunkach wagowych poprawiała stabilność oksydacyjną oleju sezamowego, ale obserwowano efekt antagonistyczny pomiędzy badanymi przeciwutleniaczami.

Zbadano także skuteczność badanych ekstraktów i ich mieszanin z kwasem askorbinowym w stosunku wagowym 2:1 i 1:2 w ochronie przed utlenieniem emulsji typu olej w wodzie (40/60) na bazie oleju żurawinowego. Pozwoliło to na oznaczenie interakcji między badanymi ekstraktami i kwasem askorbinowym w odniesieniu do ich zdolności hamowania utleniania emulsji. Najsilniejszy synergizm pomiędzy ekstraktem i kwasem askorbinowym obserwowano w przypadku ekstraktu z zielonej kawy w mieszaninach z kwasem askorbinowym w obu stosunkach wagowych. Dla pozostałych mieszanin ekstraktów i kwasu askorbinowego, w zależności od rodzaju ekstraktu i stosunku wagowego, obserwowano synergizm, antagonizm, addytywność lub efekt proutleniający.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań stwierdzono, że właściwości przeciwutleniające lub proutleniające mieszanin ekstraktów i kwasu askorbinowego oraz typ interakcji między przeciwutleniaczami zależą od rodzaju ekstraktu (jego składu polifenolowego), stosunku wagowego składników mieszaniny, a także pH i rodzaju środowiska reakcji (wodne, metanolowe, tłuszczowe lub wodno-tłuszczowe).

W ostatnim etapie badań określono właściwości przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów i kwasu askorbinowego względem *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. Zaobserwowano, że badane ekstrakty roślinne i ich mieszaniny z kwasem askorbinowym mogą zarówno hamować, jak i stymulować wzrost badanych drobnoustrojów. W większości przypadków, w których możliwe było określenie typu interakcji, obserwowano oddziaływanie antagonistyczne między ekstraktami a kwasem askorbinowym. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że właściwości przeciwdrobnoustrojowe mieszanin ekstraktów roślinnych i kwasu askorbinowego zależą od rodzaju ekstraktu, zastosowanego stężenia ekstraktu i kwasu askorbinowego w mieszaninie oraz ich stosunku wagowego, a także rodzaju drobnoustroju, wobec którego stosuje się badane substancje.

Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że wiele czynników wpływa na rodzaj i siłę interakcji pomiędzy substancjami o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych. Wiedza o możliwych interakcjach i czynnikach

wpływających na całkowitą aktywność przeciwutleniającą lub przeciwdrobnoustrojową mieszanin ekstraktów roślinnych i kwasu askorbinowego może być przydatna przy projektowaniu produktów zawierających tego typu składniki.

SUMMARY

Food and cosmetic products are complex matrices, containing substances with various properties. These compounds may interact with each other (antagonistically or synergistically) and significantly influence some properties of the product. Among such substances are antioxidants and antimicrobials, e.g. ascorbic acid, α -tocopherol and extracts from teas, fruits, vegetables and herbs. In case of plant extracts, the type and magnitude of interaction may be affected by all substances present in the extracts, so it is important to examine the interactions between single compounds as well as between extracts and other antioxidants or antimicrobials. Research on interactions are of a practical importance, as knowledge about possible interactions may facilitate designing food and cosmetics with more desirable properties.

The aim of this study was to determine the influence of interactions between ascorbic acid and selected plant extracts on their antioxidant and antimicrobial properties. For this purpose, extracts from teas (green, black, white and red), green coffee and grape seeds were chosen.

In the first stage of the study, polyphenol content of plant extracts was determined with high performance liquid chromatography method to relate the possible interactions to polyphenol composition. Antioxidant activity of extracts and their mixtures with ascorbic acid in various weight ratios (10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10) was determined by spectrophotometric methods (TEAC, FRAP and DPPH). The antioxidant activity in the pH range from 2 to 9 was also determined by modified TEAC method. Interaction indexes were calculated based on the antioxidant activity results to determine the type of interaction. Various interactions (antagonistic or synergistic) as well as additivity were observed depending on extract type, medium (aqueous, methanol), pH and weight ratios.

In the next part of the study, the influence of non-standardized green tea extract and its mixtures with ascorbic acid, in weight ratios of 2:1 and 1:2, on oxidative stability of sesame oil was determined. Oil samples with green tea extract and ascorbic acid were stored for 17 weeks and the peroxide value, anisidine value, K_{232} and K_{268} values (concentration of conjugated diens and triens) were measured. The TOTOX values were also calculated. The mixture of green tea and ascorbic acid in both weight ratios improved oxidative stability of sesame oil, but the type of interaction was antagonistic.

The effectiveness of plant extracts and their mixtures with ascorbic acid in weight ratios of 2:1 and 1:2 to protect against oxidation of oil-in-water (40/60) emulsion based

on cranberry oil was also investigated. Interaction types between extracts and ascorbic acid with respect to their ability to inhibit the oxidation of emulsion were determined. The strongest synergistic interaction was observed between green coffee extract and ascorbic acid in both weight ratios. For other extracts, antagonism, synergism, additivism or pro-oxidant effect were found depending on extract type and weight ratio with ascorbic acid.

The results of the study revealed that the antioxidant or pro-oxidant properties of mixtures of extracts and ascorbic acid and the type of interactions between antioxidants depend on the type of plant extract (its polyphenol composition and content), weight ratio of mixture compounds, pH and the type of the medium (aqueous, methanol, lipid or water-lipid).

In the last stage of the study, antimicrobial properties of extracts and their mixtures with ascorbic acid were determined against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. It was observed that the plant extracts and their mixtures with ascorbic acid may both inhibit and stimulate the growth of tested microorganisms. In most cases where interaction type was possible to determine, antagonism between extracts and ascorbic acid was observed. On the basis of the results obtained it was concluded that the antimicrobial properties of extract-ascorbic acid mixtures depend on the type of plant extract (its polyphenol composition and content), weight ratio of mixture compounds, mixture concentration and the type of microorganism.

Altogether, the results of the study show that many factors influence the type and magnitude of interactions between substances with antioxidant and antimicrobial properties. Knowledge about the possible interactions and factors influencing the total antioxidant or antimicrobial activity of mixtures of plant extracts and ascorbic acid may be useful in designing products containing such components.

WSTĘP

Jakość produktów spożywczych i kosmetycznych wynika z takich cech jak trwałość, bezpieczeństwo, cechy sensoryczne, wartość odżywcza (w przypadku produktów spożywczych) i skuteczność (dla produktów kosmetycznych). Substancje o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych, chroniąc przed wolnymi rodnikami i rozwojem niepożądanego mikroflory, zwiększają bezpieczeństwo, trwałość lub skuteczność produktu. Obecnie obserwuje się wyraźny trend stosowania w przemyśle spożywczym i kosmetycznym naturalnych dodatków o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych, które skutecznie mogą zastąpić syntetyczne przeciwutleniacze i konserwanty postrzegane przez konsumentów jako mniej bezpieczne. Do takich dodatków należą ekstrakty z herbat, owoców, warzyw, ziół, i takie naturalne przeciwutleniacze jak kwas askorbinowy (witamina C) czy α -tokoferol (witamina E). Należy jednak pamiętać, że w skład produktów spożywczych i kosmetycznych wchodzi wiele składników o zróżnicowanych właściwościach i funkcjach. Między tymi składnikami, w tym pomiędzy dodatkami o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych, może dochodzić do interakcji, które zmieniając właściwości składników wpłyną na właściwości produktu. Wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje interakcji: antagonizm, gdy suma efektów pojedynczych substancji jest mniejsza niż teoretycznie przewidywana na podstawie właściwości tychże substancji, oraz synergizm, gdy suma efektów jest większa niż teoretycznie przewidywana. Sytuację, w której interakcje nie zachodzą, a suma efektów jest taka jak teoretycznie przewidziano, nazywamy efektem addytywnym.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy miały na celu sprawdzenie, czy zachodzą interakcje pomiędzy takimi naturalnymi dodatkami do żywności i kosmetyków jak kwas askorbinowy i wybrane ekstrakty roślinne: z herbat (zielonej, czarnej, białej oraz czerwonej), z zielonej kawy i z pestek winogron oraz określenie typu tych interakcji. Znajomość możliwych interakcji pomiędzy dodatkami o działaniu przeciwutleniającym i przeciwdrobnoustrojowym może ułatwić projektowanie żywności lub kosmetyków o korzystniejszych właściwościach. Interakcje mogą wpływać również na koszty produkcji. W przypadku efektu antagonistycznego konieczne jest użycie większych ilości dodatków (co zwiększa koszt produkcji), by uzyskać zamierzony efekt ich działania. W przypadku synergizmu – można zastosować mniejsze ilości składników, co obniża koszty

produkcji. W przypadku ekstraktów roślinnych na rodzaj i wielkość interakcji może wpływać obecność wszystkich substancji zawartych w ekstraktach. Z tego powodu ważne jest badanie oddziaływań nie tylko pomiędzy pojedynczymi substancjami przeciwutleniającymi lub przeciwdrobnoustrojowymi, ale również określenie rodzaju interakcji pomiędzy wszystkimi związkami wchodzącymi w skład ekstraktu a innymi przeciwutleniaczami czy związkami przeciwdrobnoustrojowymi. Niniejsza praca wpisuje się w nurt badań dotyczących interakcji pomiędzy kwasem askorbinowym a ekstraktami roślinnymi o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych mogącymi wchodzić w skład produktów spożywczych i kosmetycznych.

CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Jakość produktów spożywczych i kosmetycznych

Jakość definiowana jest na wiele sposobów. Jedną z możliwych definicji, według normy PN-ISO-8402:1996, brzmi: „jakość jest to ogół cech i właściwości wyrobu lub usługi, decydujących o zdolności wyrobu lub usługi do zaspokojenia stwierdzonych lub przewidywanych potrzeb”. Zatem na jakość produktu składają się wszystkie jego cechy, które wiążą się ze zdolnością zaspokojenia stwierdzonych i przewidywanych potrzeb konsumenta.

Cechy te można w przypadku produktów spożywczych i kosmetycznych podzielić na trzy rodzaje:

- odnoszące się do wartości zdrowotnej produktu (bezpieczeństwo, wartość odżywcza, wartość kaloryczna, wartość dietetyczna – dla produktów spożywczych; bezpieczeństwo, korzystny wpływ na stan skóry i/lub włosów – dla produktów kosmetycznych),
- odnoszące się do jakości organoleptycznej (smak – w przypadku produktów spożywczych, zapach, wygląd zewnętrzny, barwa i konsystencja – w przypadku produktów spożywczych i kosmetycznych),
- odnoszące się do dyspozycyjności (rozpoznawalność rodzaju, wielkość jednostkowa, trwałość, dla niektórych produktów również łatwość przygotowania).

Właściwości związane z bezpieczeństwem produktu spożywczego są regulowane prawnie. Reguluje to Ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywienia z 25 sierpnia 2006 roku wraz z późniejszymi zmianami. W przypadku produktów kosmetycznych jest to Ustawa o kosmetykach (Dz.U.2001 nr 42 poz. 473 ze zm.) a także regulacje Unii Europejskiej: Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 roku dotyczące produktów kosmetycznych.

O stosowaniu substancji poprawiających jakość produktów spożywczych i kosmetycznych, w tym zwiększających jego trwałość i podnoszących jakość zdrowotną, decyduje głównie aspekt ekonomiczny. Producent, nie chcąc dopuścić do strat związanych ze zbyt szybkim psuciem się produktów, stosuje dodatek substancji przedłużających

trwałość produktu. Istnieje więc potrzeba poszukiwania dodatków, które są jednocześnie skuteczne i nieszkodliwe, ale również niedrogie, aby ich stosowanie przynosiło korzyść zarówno producentowi, jak i konsumentowi (Świdorski, 2003).

2. Żywność funkcjonalna i suplementy diety

Żywność funkcjonalna jest odpowiedzią na zapotrzebowanie konsumentów na produkty spożywcze o ukierunkowanym, pożądanym działaniu na organizm człowieka. Rynek żywności funkcjonalnej w ostatnich latach dynamicznie się rozwija. Jest on najbardziej rozwinięty w krajach wysokorozwiniętych, zwłaszcza w Japonii, gdzie powstała koncepcja żywności funkcjonalnej i gdzie po raz pierwszy, w latach 80. XX wieku, rozpoczęto jej produkcję na skalę masową. Firmy produkujące żywność funkcjonalną współpracują z ośrodkami naukowymi przy projektowaniu i wdrażaniu nowych rodzajów żywności funkcjonalnej.

Jak dotąd nie ma jednej, powszechnie obowiązującej, definicji żywności funkcjonalnej, a jej stan prawny nie jest do końca uregulowany. Program badawczy FUFOSSE (*Functional Food Science in Europe*), rozpoczęty w 1996 roku i finansowany przez Komisję Europejską, miał na celu opracowanie naukowych podstaw pojęcia żywności funkcjonalnej, a także kryteriów i kierunków opracowywania i wdrażania takiej żywności na rynku europejskim (Świdorski, 2003). Definicja przyjęta przez program (według dokumentu końcowego z 1999 roku) mówi, iż „żywność może być uznana za funkcjonalną, jeśli udowodniono jej korzystny wpływ na jedną lub więcej funkcji organizmu ponad efekt odżywczy, który to wpływ polega na poprawie stanu zdrowia oraz samopoczucia i/lub zmniejszaniu ryzyka chorób. Żywność funkcjonalna musi przypominać postacią żywność konwencjonalną i wykazywać korzystne oddziaływanie w ilościach, które oczekuje się, że będą normalnie spożywane z dietą – nie są to tabletki ani kapsułki, ale część składowa prawdziwej diety” (za: Özen, del Mar Bibiloni, Pons i Tur, 2014; Świdorski, 2003). Może to być niezmodyfikowany, naturalny produkt lub produkt wzbogacony poprzez specjalne warunki przygotowania (uprawy, hodowli lub z użyciem środków biotechnologicznych), a także przez dodanie składników o pożądanym działaniu, bądź usunięcie tych o działaniu niekorzystnym (Śmigielka, 2016). Surowce do produkcji żywności funkcjonalnej często otrzymywane są ze specjalnych upraw lub ze specjalnie selekcionowanych odmian i ras (w tym modyfikowanych biotechnologicznie i genetycznie). W wyniku dodatkowych działań uzyskuje się optymalną zawartość

składników pożądaných i redukuje się zawartość zanieczyszczeń, zastępuje się substancje niepożądane innymi oraz zwiększa biodostępność składników. Równocześnie produkt musi zachować pożądane właściwości organoleptyczne oraz stabilność i trwałość w czasie przechowywania (Świdorski, 2003).

Żywność funkcjonalna może wywierać korzystny efekt na organizm człowieka poprzez: (1) działanie lecznicze i hamowanie niepożądanych zmian w organizmie, (2) dostarczanie większej ilości potrzebnych składników odżywczych, (3) dostarczanie składników odżywczych szczególnie ważnych w danych stanach chorobowych oraz (4) poprawę samopoczucia i sprawności psychofizycznej organizmu. Aby potwierdzić prozdrowotny wpływ żywności funkcjonalnej wymagane są badania z udziałem ludzi, do których diety został włączony dany produkt (Rivera, Bocanegra-Garcia i Mongec, 2010; Świdorski, 2003).

Jakość zdrowotna żywności funkcjonalnej wynika głównie z zawartości substancji bioaktywnych. Przykładem takich substancji są między innymi witaminy i substancje fitochemiczne, ale również błonnik pokarmowy, oligosacharydy, poliole, aminokwasy, peptydy, białka, wielonienasycone kwasy tłuszczowe, składniki mineralne, cholina i lecytyna oraz bakterie fermentacji mlekowej i inne probiotyki. Nośnikiem tych substancji są zwykle grupy produktów często spożywanych, np. przetwory mleczne i zbożowe czy napoje owocowe (Abuajah, Ogbonna i Osuji, 2015; Świdorski, 2003). Według efektów działania, substancje bioaktywne zawarte w żywności funkcjonalnej można podzielić na:

- wspomagające pracę serca i układu krążenia: wielonienasycone kwasy tłuszczowe, składniki mineralne takie jak cynk, selen i magnez, substancje o działaniu przeciwutleniającym, np. karotenoidy, witamina C, tokoferole, koenzym Q10, flawonoidy, niektóre naturalne ekstrakty roślinne, np. ekstrakt z zielonej herbaty;
- poprawiające gospodarkę lipidową organizmu: preparaty błonnikowe, substancje prebiotyczne, wielonienasycone kwasy tłuszczowe, ekstrakty roślinne, np. z czosnku i żeń-szenia;
- wspomagające układ pokarmowy i ułatwiające utrzymanie właściwej masy ciała: preparaty błonnikowe, substancje prebiotyczne i probiotyczne, ekstrakty roślinne zawierające fitosterole, glikozydy, katechiny, taniny itp.;

- podwyższające naturalną odporność organizmu: immunomodulatory, np. beta-glukany, substancje fitochemiczne, niektóre witaminy i składniki mineralne, ekstrakty roślinne, np. z jeżówki (*Echinacea*) i żeń-szenia;
- poprawiające stan kości i zębów: podwyższona ilość białka, wapnia, magnezu, witaminy B₈ (inozytol) i witaminy D₃ (cholekalcyferol);
- poprawiające stan włosów, skóry i paznokci: krzem, cynk, selen i niektóre ekstrakty roślinne, np. z pokrzywy, skrzypu polnego i brzozy;
- podnoszące sprawność fizyczną i umysłową organizmu: kofeina, tauryna, lecytyna, ekstrakty roślinne poprawiające zapamiętywanie i koncentrację, np. ekstrakt z miłorzębu japońskiego (*Ginkgo biloba* L.) (Abuajah i in., 2015; Świdorski, 2003).

Zbliżonym terminem do żywności funkcjonalnej jest pojęcie „nutraceutyk” (ang. *nutraceutical*, z połączenia *nutrition* i *pharmaceutical*). Mianem nutraceutyku można określić „każdą substancję, która może być uważana za żywność lub część żywności, której spożycie przynosi korzyści terapeutyczne i zdrowotne, włączając zapobieganie i leczenie chorób (Gliszczyńska-Świąło, 2010b). Do nutraceutyków zaliczyć można zatem zarówno żywność funkcjonalną, jak i suplementy diety.

Według Ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia z 25 sierpnia 2006 roku, suplement diety to „środek spożywczy, którego celem jest uzupełnienie normalnej diety, będący skoncentrowanym źródłem witamin lub składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny, pojedynczy lub złożony, wprowadzany do obrotu w formie umożliwiającej dawkowanie, w postaci: kapsułek, tabletek, drażetek i w innych podobnych postaciach, saszetek z proszkiem, ampułek z płynem, butelek z kroplomierzem i w innych podobnych postaciach płynów i proszków przeznaczonych do spożywania w małych, odmierzonych ilościach jednostkowych, z wyłączeniem produktów posiadających właściwości produktu leczniczego w rozumieniu przepisów prawa farmaceutycznego”. Suplementy diety mogą zawierać w swoim składzie witaminy i składniki mineralne, które naturalnie występują w żywności i spożywane są jako jej część, oraz inne substancje wykazujące efekt odżywczy lub inny efekt fizjologiczny, jak np. błonnik. Pojęcie „suplement diety” musi być obecne na opakowaniu i nie może być zastąpione nazwą handlową. Ponadto, oznakowanie, prezentacja i reklama suplementów diety nie mogą zawierać informacji

stwierdzających lub sugerujących, że zbilansowana i zróżnicowana dieta nie może dostarczyć wystarczających dla organizmu ilości składników odżywczych (Ustawa z 25 sierpnia 2006).

Rynek żywności funkcjonalnej, nutraceutyków i suplementów diety, również w Polsce, stale się rozwija. Suplementy diety, zgodnie z definicją podaną w Ustawie o bezpieczeństwie żywności i żywienia z 25 sierpnia 2006 roku, nie są lekami i ich oferta jest skierowana raczej do ludzi zdrowych. Konsumenci są coraz bardziej zainteresowani substancjami, które pozwolą na zmniejszenie ryzyka chorób cywilizacyjnych, jak choroby układu sercowo-naczyniowego i choroby nowotworowe, opóźnienie procesów starzenia oraz poprawę stanu cery czy włosów. Preparaty i produkty zawierające witaminy, składniki mineralne i substancje fitochemiczne, w tym te o właściwościach przeciwutleniających, są odpowiedzią na to zapotrzebowanie. Część z tych substancji ma również zastosowanie w produkcji kosmetyków. Zainteresowanie żywnością funkcjonalną okazuje się być zróżnicowane w różnych krajach. Konsumenci w Stanach Zjednoczonych wydają się bardziej otwarci na tego rodzaju produkty niż w Europie. Ponadto występują duże różnice pomiędzy krajami europejskimi. Polska należy do tych krajów, w których żywność funkcjonalna cieszy się stosunkowo dużym zainteresowaniem (Özen i in., 2014).

2.1. Rynek witamin i suplementów diety w Polsce

Zainteresowanie konsumentów produktami spożywczymi, suplementami diety i kosmetykami zawierającymi witaminy i roślinne polifenole rośnie, co wynika z większej świadomości wpływu tych związków na zdrowie. Szacuje się, że suplementy diety są stosowane przez 30% kobiet w Polsce i 46% osób dorosłych w Stanach Zjednoczonych (Gliszczyńska-Świąło, 2010b). Z badań TNS OBOP z 2008 roku wynika, że suplementy diety stosuje co piąty Polak. Z badań przeprowadzonych przez Regułę, Gramzę-Michałowską i Stachowiak (2011) wśród 220 osób w wieku 30-59 lat wynika, że 43% kobiet i 11% mężczyzn stosuje suplementy diety. Przyjmowanie suplementów diety deklarowało również 61% studentów dietetyki i 47% studentów psychologii (Krejpcio, Staniek i Chmielewska, 2013). Według prognoz dynamika rynku suplementów diety w Polsce przyspieszy w ciągu najbliższych lat do około 8% rocznie (PMR 2015).

Według raportu „Vitamins and Dietary Supplements – Poland” wartość sprzedaży detalicznej witamin i suplementów w Polsce wyniosła 2,4 mld złotych w roku 2015,

co stanowi wzrost o 4% w porównaniu z poprzednimi latami. Wskaźnik wzrostu dla rynku witamin i suplementów diety określany jest na poziomie 3% CAGR (ang. *compound annual growth rate* – roczna składowa stopa wzrostu), co przy założeniu o stałych cenach z 2015 roku, da wartość rynku 2,8 mld złotych w roku 2020. Najbardziej dynamiczny wzrost sprzedaży (10%) zaobserwowano dla preparatów witaminy D, co przypisuje się ich krótkiej obecności na rynku, który nie jest jeszcze nasycony. Na polskim rynku witamin i suplementów diety obecni są zarówno producenci polscy, jak i zagraniczni. Konsumentów są stosunkowo mocno przywiązani do marek znanych i często reklamowanych (Euromonitor International, 2015).

Wzrost sprzedaży witamin i suplementów diety na polskim rynku jest efektem wzrastającej świadomości zdrowotnej Polaków, szczególnie młodych ludzi, a także intensywnych zabiegów marketingowych. Również styl życia sprzyja popytowi na suplementy diety i preparaty witaminowe stosowane jako uzupełnienie posiłków przygotowywanych często w pośpiechu i z półproduktów. Z kolei głównym czynnikiem hamującym wzrost sprzedaży tych produktów są zarobki Polaków (Euromonitor International, 2015).

Wśród preparatów witaminowych, największą kategorią w 2015 roku były preparaty multiwitaminowe, podobnie jak w poprzednich latach, stanowiąc 58% wartości sprzedaży wszystkich witamin, choć w porównaniu z rokiem, 2008 (62%) odnotowano spadek. Najpopularniejsze są preparaty multiwitaminowe przeznaczone dla kobiet w ciąży (25%) i osób starszych (20%). Spośród suplementów diety większość rynku stanowią preparaty nieziołowe, szczególnie mineralne (wartość sprzedaży 440 mln zł). Procentowy udział ziołowych suplementów diety w ogólnym rynku suplementów obniżył się z 10,8% w 2010 roku do 10,3% w 2015 roku. Wiedza Polaków o suplementach diety jest mniejsza niż o witaminach, stąd większy wpływ zabiegów marketingowych na sprzedaż suplementów niż witamin. Największą popularnością cieszą się preparaty złożone, oceniane często przez konsumentów jako mające większy wpływ na zdrowie niż w rzeczywistości. Najczęściej kupowane są preparaty reklamowane jako ogólnie wspierające zdrowie (29%), poprawiające stan kości (17%) i funkcjonowanie układu odpornościowego (8%). Wzrasta popyt na preparaty wspierające pracę wątroby, a także sprawność seksualną oraz przeznaczone dla kobiet. Rozwija się również rynek witamin i suplementów diety adresowanych do dzieci (Euromonitor International, 2015). W suplementach diety stosuje się wiele ekstraktów roślinnych. Do najpopularniejszych należą m.in. ekstrakty z zielonej

herbaty, rokitnika, żurawiny, dzikiej róży, a także miłorzębu, żeń-szenia i jeżówki. Popularne są również napoje funkcjonalne zawierające witaminy, składniki mineralne oraz ekstrakty roślinne. Napoje te są reklamowane jako podnoszące energię i wytrzymałość organizmu, a także sprzyjające zdrowiu. Najczęściej napoje energetyczne zawierają ekstrakty z żeń-szenia, yerba mate, miłorzębu i zielonego jęczmienia. Soki zawierające naturalne substancje o właściwościach funkcjonalnych (np. z kaktusa, trawy cytrynowej i brzozy) są dodawane również w celach smakowych. Według badań, konsumenci postrzegają napoje funkcjonalne jako zdrowszą alternatywę dla tradycyjnych napojów (Euromonitor International, 2017a).

3. Dodatki do żywności i kosmetyków

Dodatki do żywności są stosowane powszechnie w celu poprawy jakości produktu poprzez ulepszenie lub zachowanie jego właściwości organoleptycznych (barwa, konsystencja, smak, zapach), co przekłada się na jego smakowitość i ogólną atrakcyjność sensoryczną. Obecność dodatków do żywności może przedłużyć trwałość i bezpieczeństwo produktu (Rutkowski, 2004).

Dodatek do żywności jest definiowany w art. 3 ust. 2 Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r., w sprawie dodatków do żywności jako: „każda substancja, która w normalnych warunkach ani nie jest spożywana sama jako żywność, ani nie jest stosowana jako charakterystyczny składnik żywności, bez względu na swoją ewentualną wartość odżywczą, której celowe dodanie, ze względów technologicznych, do żywności w trakcie jej produkcji, przetwarzania, przygotowywania, obróbki, pakowania, przewozu lub przechowywania powoduje, lub można spodziewać się zasadnie, że powoduje, iż substancja ta lub jej produkty pochodne stają się bezpośrednio lub pośrednio składnikiem tej żywności”.

Dodatki do żywności mogą być stosowane w określonych ustawowo maksymalnych dawkach w przeliczeniu na jednostkę masy produktu, bądź są stosowane zgodnie z zasadą *quantum satis* („dostateczna ilość”), czyli zgodnie z dobrą praktyką produkcyjną, w ilości nie większej niż potrzebna do osiągnięcia zamierzonego efektu i pod warunkiem, że konsument nie zostaje wprowadzony w błąd co do rzeczywistej jakości produktu.

Załącznik I do w/w rozporządzenia wymienia rodzaje i funkcje dodatków do żywności. Ze względu na pełnione funkcje dodatki do żywności dzieli się na:

- 1) substancje słodzące,
- 2) barwniki,
- 3) substancje konserwujące,
- 4) przeciwutleniacze,
- 5) nośniki,
- 6) kwasy,
- 7) regulatory kwasowości,
- 8) substancje przeciwzbrylające,
- 9) substancje przeciwpieniące,
- 10) substancje wypełniające,
- 11) emulgatory,
- 12) sole emulgujące,
- 13) substancje wiążące,
- 14) wzmacniacze smaku,
- 15) substancje pianotwórcze,
- 16) substancje żelujące,
- 17) substancje glazurujące,
- 18) substancje utrzymujące wilgoć,
- 19) skrobie modyfikowane,
- 20) gazy do pakowania,
- 21) gazy nośne,
- 22) substancje spulchniające,
- 23) sekwestranty,
- 24) stabilizatory,
- 25) substancje zagęszczające,
- 26) środki do przetwarzania mąki (polepszacze).

Ze względu na tematykę pracy, w dalszej części zostaną omówione wyłącznie wybrane przeciwutleniacze i substancje o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

Substancje naturalne, stosowane jako dodatki do żywności, mogą być pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego. International Organization of the Flavour Industry określa

naturalne substancje dodatkowe jako „substancje chemiczne nieprzewidziane do spożycia, lecz przydatne do spożycia w odpowiednich dawkach. Są otrzymywane procesami fizycznymi, mikrobiologicznymi lub enzymatycznymi z artykułów spożywczych lub materiałów pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, albo otrzymane w czasie przetwórstwa żywności. Zalicza się do nich sole naturalnych substancji smakowo-zapachowych z następującymi anionami: Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} ”. Z kolei syntetyczne substancje dodatkowe są otrzymywane na drodze syntezy chemicznej i nie mają chemicznie identycznych odpowiedników naturalnych pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego. Trzecia kategoria to substancje syntetyczne identyczne z naturalnymi, które są otrzymywane również na drodze syntezy chemicznej, jednak nie różnią się chemicznie od swoich odpowiedników pochodzenia naturalnego (Rutkowski, 2005).

Inaczej niż w przypadku dodatków do żywności, nie istnieje pełna lista substancji dopuszczonych do użycia w produktach kosmetycznych. Prawne zagadnienia związane z produktami kosmetycznymi i ich bezpieczeństwem zawiera Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. Załączniki do tego rozporządzenia zawierają wykaz substancji niedozwolonych do stosowania w kosmetykach, substancji podlegających ograniczeniom, barwników dopuszczonych do stosowania w kosmetykach, substancji konserwujących dozwolonych w produktach kosmetycznych oraz substancji promieniochronnych – filtrów UV dozwolonych w produktach kosmetycznych.

Kosmeceutyki lub dermokosmetyki od kosmetyków różni zawartość substancji czynnych o działaniu leczniczym. Termin „kosmeceutyk” wprowadził w 1990 roku Albert Klingman, dermatolog. Określenie to funkcjonuje na rynku kosmetyków, ale w sensie prawnym taka kategoria produktów kosmetycznych nie istnieje, więc kosmeceutyki podlegają tym samym regulacjom, co kosmetyki (Choi i Berson, 2006; Kumar, 2005).

Wraz ze zwiększającą się świadomością zagrożeń ekologicznych, konsumenci coraz chętniej nabywają produkty kosmetyczne oznaczone jako „naturalne” bądź zawierające składniki pochodzenia naturalnego. Równocześnie rośnie liczba tego typu produktów na rynku (Kumar, 2005). Wiele składników zawartych w kosmetykach jest pochodzenia roślinnego, choć nie jest to reguła. W opinii konsumenta może to oznaczać, że produkt jest całkowicie bezpieczny, jednak w rzeczywistości również naturalne produkty wymagają testów pod kątem czystości chemicznej i mikrobiologicznej, skuteczności i działań

niepożądanych. Bywa, że działanie kosmetyku wynika wyłącznie z np. właściwości nawilżających, a nie z oddziaływania właściwej substancji czynnej (Choi i Berson, 2006). W Polsce rynek kosmetyków naturalnych, z dodatkiem ekstraktów roślinnych, jest wciąż stosunkowo nowym trendem. Kosmetyki te zawierają, oprócz ekstraktów roślinnych, witaminy i substancje mineralne, natomiast zawartość sztucznych barwników i aromatów jest w nich ograniczona do minimum. Producentami tych kosmetyków są w większości niewielkie przedsiębiorstwa, skoncentrowane na naturalnych produktach pielęgnacyjnych, najczęściej sprzedające je za pośrednictwem Internetu. Obserwuje się wzrost zainteresowania konsumentów w Polsce takimi właśnie naturalnymi kosmetykami (Euromonitor International, 2017b).

Substancje czynne zawarte w kosmetykach to między innymi przeciwutleniacze i substancje przeciwdziałające nadmiernej pigmentacji skóry, takie jak niektóre witaminy, roślinne polifenole, w tym izoflawony (Choi i Berson, 2006). Wykorzystuje się szeroką gamę tych związków zarówno syntetycznych, jak i pochodzenia naturalnego. Stosowane są między innymi w preparatach przeciwko starzeniu się skóry, naturalnemu jak i spowodowanemu czynnikami zewnętrznymi, w tym przede wszystkim spowodowanemu promieniowaniem słonecznym (tzw. fotostarzenie się skóry) (Kumar, 2005).

3.1. Przeciwutleniacze w produktach spożywczych i kosmetycznych

3.1.1. Mechanizm działania substancji przeciwutleniających

Przeciwutleniacze (antyoksydanty) to substancje, które w stosunkowo niewielkich stężeniach, w porównaniu z substancją utlenianą, hamują bądź opóźniają jej utlenianie. Reagując z czynnikami utleniającymi i wolnymi rodnikami, chronią składniki produktów lub komórek organizmu, takie jak białka, lipidy i kwasy nukleinowe (Bartosz, 2004). Ich działanie może być wzmacniane tzw. sekwestrantami, czyli związkami, które kompleksują jony metali katalizujące proces autooksydacji (np. niektóre kwasy organiczne i ich sole) (Rutkowski, 2004; Świdorski, 2003).

Substancje o właściwościach przeciwutleniających chronią organizm człowieka przed szkodliwym wpływem reaktywnych form tlenu, w tym wolnych rodników. Wolnym rodnikiem nazywa się cząsteczkę, która będąc zdolna do samodzielnego istnienia, posiada jeden lub więcej niesparowanych elektronów. Niesparowany elektron jest powodem wysokiej reaktywności cząsteczki, dlatego wolne rodniki przyczyniają się do uszkodzenia

takich makrocząsteczek, jak lipidy, białka i kwasy nukleinowe, co może prowadzić do psucia się produktów lub, w organizmach żywych, do uszkodzenia komórki. Reaktywne formy tlenu powstają np. na drodze niepełnej redukcji cząsteczki tlenu. Produktem pełnej, czteroelektronowej redukcji tlenu jest cząsteczka wody. Redukcja jednoelektronowa tlenu prowadzi do powstania anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), dwuelektronowa – nadtlenuku wodoru (H_2O_2), redukcja z udziałem trzech elektronów – rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$). Do reaktywnych form tlenu zaliczane są także: tlen singletowy (1O_2), ozon (O_3), tlenek azotu (NO^{\cdot}), ditlenek azotu (NO_2^{\cdot}) i nadlenoazotyn ($ONOO^{\cdot-}$). Wolne rodniki powstają również w reakcjach reaktywnych form tlenu z cząsteczkami organicznymi. Organiczne wolne rodniki to między innymi rodniki nadtlenukowe (ROO^{\cdot}), rodniki alkoksylowe (RO^{\cdot}), rodniki aryloksylowe (ArO^{\cdot}), nadtlenuki ($ROOH$) i epoksydy. Niesparowany elektron w tych cząsteczkach może znajdować się na atomie węgla, azotu, tlenu lub innego pierwiastka (Bartosz, 2004).

Reakcja przeciwutleniacza z wolnym rodnikiem może przebiegać według różnych mechanizmów, zależnie od właściwości obu cząsteczek, a także środowiska reakcji. Przewutleniacz oddaje cząsteczce rodnika atom wodoru (mechanizm HAT – ang. *hydrogen atom transfer*) lub elektron (mechanizm SET – ang. *single electron transfer*). Zdolność przeciwutleniacza do oddania atomu wodoru określona jest przez wartość energii dysocjacji wiązania (BDE, ang. *bond dissociation energy*). Jest to wartość energii potrzebnej do oderwania wodoru od cząsteczki przeciwutleniacza. Reakcja jest możliwa, gdy przeciwutleniacz charakteryzuje się niższym BDE niż zredukowana forma rodnika. Im niższe BDE, tym silniejsze właściwości przeciwutleniające ma dany związek. Należy pamiętać, że ten mechanizm jest bardziej prawdopodobny w środowisku niepolarnym, bowiem polarne rozpuszczalniki mogą tworzyć z przeciwutleniaczem wiązania wodorowe, co hamuje oderwanie atomu wodoru. W środowisku polarnym bardziej prawdopodobny jest mechanizm oparty na przekazaniu elektronu. Po oddaniu elektronu, rodnik staje się anionem, zaś cząsteczka przeciwutleniacza kationorodnikiem. Zdolność przeciwutleniacza do oddania elektronu jest określona przez wartość potencjału jonizacji (IP, ang. *ionization potential*), określającą energię, jaka musi być dostarczona, by oderwać elektron od cząsteczki. Niższy potencjał jonizacji cząsteczki wskazuje na lepsze właściwości przeciwutleniające substancji. Możliwe są również mieszane mechanizmy reakcji rodników z przeciwutleniaczami, takie jak przeniesienie elektronu sprzężone z przeniesieniem protonu (*Proton-Coupled Electron-Transfer*, PCET),

przeniesienie elektronu poprzedzone deprotonacją (*Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*, SPLET) oraz przeniesienie protonu poprzedzone przeniesieniem elektronu (*Electron Transfer – Proton Transfer*, ET-PT) (Gliszczyńska-Świgło, 2010b).

W organizmach żywych funkcjonują różne systemy obrony przed reaktywnymi formami tlenu, w tym układy enzymatyczne (m.in. dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa), białka wiążące jony metali, a także przeciwutleniacze niskocząsteczkowe. Do tych ostatnich należą: kwas askorbinowy (hydrofilowy) i tokoferole (hydrofobowe) (Bartosz, 2004). Wśród przeciwutleniaczy można wyróżnić tzw. przeciwutleniacze pierwotne i wtórne. Pierwotne przeciwutleniacze zmiatają wolne rodniki, same przyjmując formę rodnikową. Rodnik przeciwutleniacza jest wystarczająco stabilny, by nie reagować z makrocząsteczkami i nie stwarzać niebezpieczeństwa dla komórek. Do tego typu przeciwutleniaczy należą między innymi polifenole roślinne. Z kolei wtórne przeciwutleniacze chronią przed wolnymi rodnikami pośrednio, przykładowo wiążąc wolne jony metali, pochłaniając promieniowanie UV lub regenerując pierwotne przeciwutleniacze do ich nierodnikowej formy (Rice-Evans, 1996; Bartosz, 2004; Gramza i Korczak, 2005).

Substancje przeciwutleniające można również podzielić według mechanizmu ich działania na:

- przeciwutleniacze właściwe, przerywające łańcuch oksydacyjny poprzez wygaszanie wolnych rodników; do tej grupy należą m.in. tokoferole i kwas askorbinowy;
- synergenty, wzmacniające działanie substancji będących przeciwutleniaczami właściwymi; do tej grupy należą m.in. kwas askorbinowy, izoaskorbinowy i ich sole, a także inne kwasy organiczne;
- substancje mające zdolność dezaktywacji hydronadtlenków bez tworzenia wolnych rodników; chelatory metali, mające zdolność kompleksowania jonów metali katalizujących powstawanie rodników; do tej grupy należą m.in. EDTA i kwas cytrynowy;

- wygaszacze tlenu singletowego, dezaktywujące tę formę tlenu aktywnego do tlenu trypletowego; do tej grupy należą m.in. karotenoidy i kwas askorbinowy (Czapski i Górecka, 2014).

Działanie substancji przeciwutleniających jest w dużej mierze zależne od właściwości produktu, np. od jego pH. Obserwuje się również synergistyczne działanie przeciwutleniaczy w układach mieszanych (Rutkowski, 2004).

3.1.2. Przeciwutleniacze jako składniki produktów spożywczych i kosmetycznych

Obserwuje się wzrastające zainteresowanie wykorzystaniem naturalnych przeciwutleniaczy w przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Produkty zawierające naturalne dodatki, w tym naturalne przeciwutleniacze, są zwykle postrzegane przez konsumentów jako bezpieczniejsze niż te, które zawierają substancje syntetyczne, jak np. butylohydroksyanizol (BHA), butylohydroksytoluen (BHT), wersenian wapniowo-sodowy (EDTA) czy galusany, które potencjalnie mogą powodować problemy zdrowotne (Shibamoto i Bjeldanes, 2009). Naturalne przeciwutleniacze, poza przedłużaniem trwałości produktu, mogą dodatkowo wywierać działanie prozdrowotne na organizm człowieka. Do tej grupy zaliczyć można kwas askorbinowy oraz niektóre bogate w polifenole ekstrakty roślinne, które mogą być używane jako bezpieczne przeciwutleniacze w produktach spożywczych i kosmetycznych.

Wiele przeciwutleniaczy dopuszczonych do stosowania w przemyśle spożywczym i kosmetycznym to wciąż dodatki syntetyczne. Zwiększa to potrzebę badań nad możliwymi korzyściami wynikającymi ze stosowania przeciwutleniaczy naturalnych. Przeciwutleniacze syntetyczne, jak BHA czy galusany, są dopuszczone do użycia w produktach spożywczych i kosmetycznych tylko w niewielkiej dawce z uwagi na ich potencjalne szkodliwe działanie. Poszukuje się więc nowych, naturalnych przeciwutleniaczy, które mogłyby być obecne w produkcie w większej dawce i wywierać korzystny efekt zarówno na produkt, jak i na organizm człowieka przy braku negatywnych skutków ubocznych. Należy jednak podkreślić, że bezpieczeństwo naturalnych przeciwutleniaczy musi być potwierdzone badaniami podobnie jak w przypadku przeciwutleniaczy syntetycznych (Zawirska-Wojtasiak, 2005). Obecnie jedynie ekstrakt z rozmarynu i ekstrakt z zielonej herbaty są w Polsce dopuszczone do użycia jako dodatki

do żywności (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 z 16 grudnia 2008).

Działanie przeciwutleniających dodatków do żywności i kosmetyków ma na celu zapobieganie zmianom spowodowanym przez procesy utleniania (Rutkowski, 2004). Procesy utleniania są wynikiem działania tlenu, światła i jonów niektórych metali. Reakcje utleniania odpowiadają m.in. za ciemnienie produktów takich jak przekrojone owoce, warzywa i mięso. Ciemnienie owoców i warzyw jest wynikiem enzymatycznego utleniania substancji nietłuszczowych tlenem z powietrza, najczęściej przy udziale enzymów zawartych w surowcu (np. oksydaz). Obróbka termiczna, unieczynniająca enzymy (np. blanszowanie owoców), nie zawsze jest jednak możliwa. Procesy utleniania to również jęczenie tłuszczów, czyli przemiana cząsteczek nienasyconych kwasów tłuszczowych w wodoronadtlenki poprzez reakcję z tlenem atmosferycznym. Autokatalityczny rozkład tych nadtlenków prowadzi do wytworzenia aldehydów i ketonów, które odpowiadają za pogorszenie cech organoleptycznych, odżywczych i zdrowotnych produktu. Również podczas smażenia, zwłaszcza w wysokich temperaturach, w wyniku procesu utleniania obniża się zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, a także wytwarzane są polimery, odpowiadające za ciemnienie tłuszczu i zwiększenie jego lepkości. Dodatkowo, związki powstałe podczas utleniania tłuszczu mogą reagować ze sobą, jak i z pozostałymi substancjami obecnymi w produkcie, co dodatkowo obniża wartość sensoryczną i odżywczą żywności. Produktami najbardziej narażonymi na niekorzystne reakcje utleniania są oleje, tłuszcze stałe i niektóre związki lotne. Również produkty o niewielkiej ilości tłuszczu, ale o dużym stopniu rozdrobnienia, jak mąki, do których dostęp tlenu jest łatwy, ulegają utlenianiu. Fizyczne ograniczanie dostępu tlenu do produktów, np. poprzez pakowanie próżniowe lub w atmosferze gazów obojętnych, nie zawsze jest możliwe lub wystarczająco skuteczne. Konieczne jest zatem stosowanie substancji przeciwutleniających (Rutkowski, Gwiazda i Dąbrowski, 2003).

Do substancji przeciwutleniających stosowanych w przemyśle spożywczym należą między innymi:

- BHA,
- BHT,
- galusany,
- EDTA,

- kwas askorbinowy i jego sole: sodowa i wapniowa,
- kwas cytrynowy i jego sole,
- kwas izoaskorbinowy i jego sól sodowa,
- estry kwasów tłuszczowych i kwasu askorbinowego,
- tokoferole: α , γ , δ - i ich mieszaniny,
- lecytyny,
- sole kwasu mlekowego (Rutkowski, 2004).

Przeciwutleniacze najczęściej stosowane w żywności można podzielić na dwie grupy: kwasy oraz ich sole i estry, które są wykorzystywane częściej jako dodatki zapobiegające zmianom barwy mięs, owoców i warzyw, oraz związki fenolowe (syntetyczne i naturalne), które są częściej stosowane w celu zapobiegania niekorzystnym zmianom w tłuszczach, np. BHT, BHA oraz tokoferole (Rutkowski, 2004; Świdorski, 2003). Przeciwutleniacze powinny być dodane do produktu przed lub w początkowym okresie utleniania, w ilości specyficznej dla każdego produktu (Świdorski, 2003).

Do przeciwutleniaczy stosowanych w przemyśle spożywczym należą tokoferole (α , γ , δ -tokoferole; witamina E), występujące naturalnie bądź otrzymywane syntetycznie. Najwyższą wartość biologiczną ma α -tokoferol, ale najsilniejsze działanie przeciwutleniające spośród nich wykazuje δ -tokoferol. Innymi naturalnymi przeciwutleniaczami są polifenole roślinne, w tym flawonoidy. Wiele roślin stosowanych jako przyprawy, np. szałwia, rozmaryn, goździk, oregano, tymianek, papryka i inne zawiera znaczne ilości związków o aktywności przeciwutleniającej (Rutkowski, Gwiazda i Dąbrowski, 2003). Również groch, zielony groszek, fasola, jabłka, pomidory, czosnek, zboża, brokuły, kapusta, kalafior, a także winogrona i zielona herbata zawierają dużo przeciwutleniaczy (Zawirska-Wojtasiak, 2005). Ponadto, związki o charakterze przeciwutleniającym mogą powstawać w niektórych procesach przetwórczych, np. podczas wędzenia (polifenole), peklowania (*S*-nitrozocysteina) oraz jako wynik tzw. reakcji Maillarda (produkty nieenzymatycznego brunatnienia) (Rutkowski, Gwiazda i Dąbrowski, 2003). Substancje przeciwutleniające izoluje się z produktów naturalnych, aby wykorzystać je jako dodatki do innych produktów, co jednak grozi obniżeniem lub utratą ich aktywności. Wyizolowany związek może np. mieć gorsze właściwości niż w obecności innych substancji zawartych w surowcu. Z nasion roślin oleistych otrzymuje się, w formie ekstraktów, tokoferole, a z nasion zbóż – estry fenolokwasów. Można

wykorzystywać również ekstrakty z przypraw, ziół, owoców i warzyw lub herbat. Ekstrakty te mogą jednak zmieniać cechy organoleptyczne produktów, np. zapach (Zawirska-Wojtasiak, 2005).

Kwas askorbinowy stosowany jest jako dodatek do żywności (E300) i pełni funkcję przeciwutleniacza, regulatora kwasowości i stabilizatora. Ponieważ dobrze rozpuszcza się w wodzie, można go stosować w środowisku uwodnionym w przeciwieństwie do wielu innych przeciwutleniaczy. Dzięki silnym właściwościom redukującym utrwała barwę wielu produktów żywnościowych oraz surowców, a także zapobiega zmianie zapachu napojów, soków, konserw i mrożonek. Przyspiesza proces peklowania mięsa, co pozwala na ograniczenie stosowania azotynów oraz stabilizuje tłuszcze w mrożonych farszach i przetworach rybnych oraz w produktach nietłuszczowych, takich jak mąka i pieczywo, przetwory zbożowe, proszek mleczny i mrożone potrawy. Kwas askorbinowy używany jest też do wzbogacania produktów w witaminę C. Jednak w wysokich temperaturach oraz z upływem czasu, kwas askorbinowy może wykazywać niekorzystne działanie proutleniające. Jako dodatki do żywności stosuje się również sole: askorbinian sodu (E301), askorbinian wapnia (E302) i askorbinian potasu (E303); estry kwasu askorbinowego z kwasami tłuszczowymi (palmitynian i stearynian askorbylu E304); kwas izoaskorbinowy (E315) oraz izoaskorbinian sodu (E316) (Rutkowski, Gwiazda i Dąbrowski, 2003).

Kwas askorbinowy posiada silne właściwości redukujące, które decydują o jego zdolności do bycia przeciwutleniaczem. Jest reaktywny m.in. wobec tlenu singletowego, nadtlenu wodoru, rodnika hydroksylowego i rodników nadtlenkowych. Ponieważ pK_a kwasu askorbinowego wynosi 4,2, w płynach ustrojowych (krew, limfa, płyn międzykomórkowy) jest on całkowicie zdysocjowany. Kwas askorbinowy jest najistotniejszym antyoksydantem płynów pozakomórkowych oraz jednym z antyoksydantów wewnątrzkomórkowych. Organizm człowieka nie może syntezować kwasu askorbinowego z uwagi na brak oksydazy L-gulonolaktonowej, końcowego enzymu szlaku syntezy, stąd konieczność jego dostarczania wraz z żywnością (Bartosz, 2004). Dieta zawierająca dużo owoców i warzyw, a więc i dużo witaminy C, chroni przed chorobami układu krążenia i niektórymi chorobami nowotworowymi (Rice-Evans, Miller i Paganga, 1996).

W reakcji z utleniaczami, kwas askorbinowy tworzy wolny rodnik askorbylowy (stosunkowo niereaktywny) na drodze redukcji jednoelektronowej lub kwas dehydroaskorbinowy poprzez redukcję dwuelektronową. Dehydroaskorbinian może być z kolei zregenerowany do askorbinianu przez glutation lub przez odpowiednie enzymy, np. tiotransferazę lub izomerazę disulfidów białek, co zapobiega jego niekorzystnemu oddziaływaniu (liza erytrocytów, hamowanie różnych reakcji metabolicznych, inaktywacja białek poprzez oddziaływanie z ich grupami tiolowymi) (Bartosz, 2004).

Kwas askorbinowy nie zawsze jednak pełni rolę przeciwutleniacza. W badaniach *in vitro*, stwierdzono, że w małych stężeniach, może wykazywać właściwości proutleniające i stymulować reakcje wolnorodnikowe w obecności jonów metali przejściowych (np. żelaza, niklu, kobaltu). Kwas askorbinowy może redukować jony żelaza (III) do jonów żelaza (II), które z kolei mogą redukować tlen, a powstałe reaktywne formy tlenu, w tym niezwykle reaktywny rodnik hydroksylowy, wchodzi w kolejne reakcje rodnikowe. Są jednak wątpliwości, czy w warunkach *in vivo* może pojawić się wystarczające stężenie jonów metali przejściowych, by umożliwić tę reakcję (Bartosz, 2004).

Przeciwutleniacze zawarte w produktach spożywczych mogą wywierać korzystny wpływ na zdrowie konsumentów. Zapobiegając działaniu reaktywnych form tlenu i azotu, bronią organizm przed efektami uszkodzeń ważnych dla organizmu makromolekuł takich, jak białka, lipidy i kwasy nukleinowe. Reaktywne formy tlenu są naturalnym produktem reakcji endogennych zachodzących przy udziale tlenu, ale również mogą dostać się do organizmu człowieka ze środowiska zewnętrznego, ponieważ są obecne np. w dymie papierosowym czy spalinach samochodowych. Uszkodzenia makrocząsteczek mogą prowadzić do mutacji, są również uważane za jedną z przyczyn takich chorób cywilizacyjnych jak choroby nowotworowe, choroby układu krążenia, choroba Alzheimera i inne (Bartosz, 2004).

Z kolei dodatek przeciwutleniaczy do kosmetyków ma na celu przede wszystkim ochronę skóry przed fotouszkodzeniami oraz opóźnianie starzenia się skóry. Wolne rodniki przyczyniają się do powstawania fotouszkodzeń, stanów zapalnych i nowotworów (Choi i Berson, 2006). Jak wspomniano wcześniej, przeciwutleniacze obecne w organizmie chronią zarówno przed endogennym stresem oksydacyjnym (skutek oddychania komórkowego), jak i egzogennym (wynik oddziaływania promieniowania UV

i ksenobiotyków) (Choi i Berson, 2006). Przeciwutleniacze znajdują się między innymi w żywności i wraz z nią mogą wpływać na stan skóry. Niektóre z nich ulegają w organizmie biotransformacji i tracą część swojej aktywności. Podanie ich bezpośrednio na skórę zapewnia zwykle zachowanie ich właściwości (Zhang, Al-Suwayeh, Hsiegh i Fang, 2010).

Do antyoksydantów stosowanych w kosmetykach należą między innymi witaminy A, C i E, niektóre witaminy z grupy B, kwas liponowy, koenzym Q10 i jego syntetyczny analog idebenon, polifenole i roślinny hormon kinetyna. Związki te różnią się mechanizmem działania i skutecznością w zapobieganiu poszczególnym efektom działania wolnych rodników (Choi i Berson, 2006).

Witamina A, czyli retinol ma zdolność zapobiegania fotouszkodzeniom. Tretynoina, metabolit retinolu, jest wykorzystywana jako lek w dermatologii. Retinol charakteryzuje się niższą aktywnością za to wykazuje słabsze działania niepożądane (tretynoina może wywoływać podrażnienia skóry) (Choi i Berson, 2006). W badaniach klinicznych wykazano, że witamina A zwiększa produkcję kolagenu, a także redukuje zmarszczki. Prawdopodobnie chroni też przed zmianami nowotworowymi skóry (Zussman, Ahdout i Kim, 2010).

Witaminy z grupy B wykorzystywane w kosmetykach to między innymi niacynamid (witamina B₃) oraz pantenol (prowitamina B₅). Oprócz licznych korzystnych oddziaływań na skórę, niacynamid jest prekursorem NAD(P) oraz NAD(P)H, które są silnymi przeciwutleniaczami. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że niacynamid wykazywał zdolność hamowania fotokarcynogenezy wywołanej promieniowaniem UVB. Przeciwdziałał też żółknięciu cery przez zapobieganie oksydacyjnemu (nieenzymatycznemu) przyłączaniu się grup cukrowych do wolnych grup aminowych białek (Choi i Berson, 2006). Zussman i in. (2010) stwierdzili w badaniach *in vitro*, że witamina B₃ zwiększała produkcję kolagenu, zaś w badaniach klinicznych redukowała nadmierną pigmentację skóry. Stwierdzono również, że niacynamid z reguły nie wywołuje podrażnień (Choi i Berson, 2006).

Witamina C, czyli kwas askorbinowy, jak wspomniano wcześniej, jest uznawany za najistotniejszy antyoksydant w płynach pozakomórkowych, odgrywający ważną rolę również wewnątrz komórek. Ma silne właściwości redukujące i reaguje z różnymi

rodzajami wolnych rodników, w tym z rodnikiem hydroksylowym, anionorodnikiem ponadtlenkowym, rodnikami nadtlenkowymi i tlenem singletowym. Jest kofaktorem w reakcjach hydroksylacji podczas biosyntezy kolagenu (Bartosz, 2004). Zwiększając produkcję kolagenu powoduje wygładzanie zmarszczek (Bissett, 2009). Chroni przed fotouszkodzeniami i łagodzi objawy już powstałych uszkodzeń. Stwierdzono, że roztwór 10%-owego kwasu askorbinowego skutecznie opóźnia procesy fotostarzenia się skóry policzków oraz ma właściwości antyzapalne (Choi i Berson, 2006). Kwas askorbinowy z uwagi na swoje właściwości przeciwutleniające i zdolność inhibicji tyrozynazy służy do rozjaśniania karnacji skóry. Bissett (2009) wykazał, że kwas askorbinowy, aplikowany na skórę w dawce od 3 do 17%, opóźniał starzenie się skóry: 3% kwas askorbinowy, po tygodniu stosowania, powodował znaczącą redukcję skutków procesów utleniania indukowanych przez promieniowanie UVA, w ciągu 12 tygodni – redukował zmarszczki. Kwas askorbinowy w stężeniu od 5 do 17% aplikowany na skórę przez 12 tygodni do 6 miesięcy, łagodził procesy fotostarzenia się skóry oraz zwiększał zawartość kolagenu i elastyny w skórze (Bissett, 2009).

Stosowanie kwasu askorbinowego w kosmetykach wiąże się jednak z trudnościami wynikającymi z jego niskiej stabilności. Połowa zawartości tej substancji ulega rozkładowi w ciągu miesiąca, co często skutkuje zmianą jakości sensorycznej (żółknięcie) produktu. Stosowane metody stabilizacji obejmują zapewnienie beztlenowego środowiska na niektórych etapach produkcji, stosowanie opakowania niepozwalającego na dostęp tlenu do produktu, zapewnienie niskiego pH oraz dodatek innych antyoksydantów. Stosowane metody nie zawsze jednak są skuteczne. Ponadto, niektóre sposoby zwiększania stabilności kwasu askorbinowego, jak niskie pH, mogą mieć niekorzystny wpływ na skórę. Sole magnezowe i sodowe kwasu askorbinowego są trwalsze, jednak zmieniają konsystencję produktu, natomiast inne pochodne witaminy C, choć stabilniejsze, są jednocześnie dużo droższe. Innym wyzwaniem jest słabe wchłanianie się przez skórę hydrofilowego kwasu askorbinowego. Pochodne fosforanowe wchłaniają się jeszcze słabiej. Pochodne niezjonizowane wchłaniają się lepiej, jednak skuteczność preparatu zależy od ich hydrolizy do aktywnego kwasu askorbinowego po wchłonięciu przez skórę (Bissett, 2009).

Witamina E (tokoferol) neutralizuje wolne rodniki i łagodzi szkodliwe efekty promieniowania UV (Choi i Berson, 2006). Często stosowana jest octanowa pochodna tokoferolu, w mniejszym stopniu pochodne fosforanowe, nikotynowe, linolowe,

palmitynowe i bursztynowe. Tokoferole występują w postaci czterech izomerów różniących się aktywnością: α -, β -, γ - i δ -tokoferolu. Jak wspomniano wcześniej, najwyższą aktywnością biologiczną cechuje się α -tokoferol, natomiast γ - i δ -tokoferol wykazują najlepsze właściwości przeciwutleniające (Choi i Berson, 2006).

Witamina E jest przeciwutleniaczem rozpuszczalnym w tłuszczach, co zwiększa jej wchłanianie przez skórę. Dzięki temu może zmiatać wolne rodniki w samej skórze, ma więc zdolność zapobiegania bądź łagodzenia negatywnych skutków promieniowania UV, jak oparzenia słoneczne, fotostarzenie się skóry i hiperpigmentacja. Właściwości te zostały potwierdzone w wielu badaniach *in vitro*, badań *in vivo* jest mniej. Stwierdzono, że witamina E w stężeniu 2% redukowała zaczerwienienie wywołane ekspozycją na promieniowanie UV o, 20%. Jego aplikacja na skórę twarzy, przez 4 miesiące w stężeniu 5%, powodowała częściowe wygładzenie zmarszczek wokół oczu i redukcję podrażnienia wywołanego promieniowaniem UV (Bissett, 2009).

Ponieważ tokoferol i jego pochodne rozpuszczają się w tłuszczach, a nie w wodzie, problemem jest takie opracowanie kosmetyku, aby nie był zbyt tłusty, a jednocześnie zapewniał dobre rozpuszczenie się witaminy E. Pochodna octanowa tokoferolu jest często używana w kosmetykach z uwagi na jej większą stabilność, ale ponieważ jej hydroliza do aktywnego biologicznie tokoferolu jest powolna, to efektywność witaminy E w produkcie jest mniejsza (Bissett, 2009).

Podsumowując rolę witamin, należy wskazać witaminy A, C, B₃ i E jako skuteczne środki w zapobieganiu fotostarzeniu się skóry. Skuteczność witamin K i D w tym zakresie nie została potwierdzona (Zussman i in., 2010).

Kwas α -liponowy, lipoamid syntezowany w mitochondriach roślin i zwierząt, jest zmiataczem wolnych rodników i chelatorem metali. Ma zdolność regeneracji antyoksydantów takich jak witamina C i E, glutation i ubikwinol. Rozpuszcza się zarówno w wodzie, jak i w tłuszczach, co pozwala na łatwe przenikanie przez błony lipidowe komórki. Zapobiega utlenianiu lipidów, ma również właściwości antyzapalne. Stwierdzono, że roztwór 5%-owego kwasu α -liponowego, aplikowany na skórę dwa razy dziennie przez okres 12 tygodni, obniża szorstkość skóry, łagodzi plamy soczewicowate i zmarszczki. Kwas liponowy nie chroni jednak przed rumieniem powodowanym promieniowaniem UV (Choi i Berson, 2006).

Koenzym Q10 jest przeciwutleniaczem rozpuszczalnym w tłuszczach, niezbędnym w oddychaniu komórkowym. Przeciwdziała również peroksydacji lipidów. Wyniki badań *in vitro* pokazują, że koenzym Q10 może łagodzić zmarszczki. Idebenon, syntetyczny analog koenzymu Q10, ma silniejsze właściwości przeciwzapalne i fotoprotekcyjne niż antyoksydanty takie jak kwas liponowy, tokoferol, kinetyna i kwas askorbinowy. Skutecznie może przeciwdziałać suchości i szorstkości skóry oraz zmarszczkom (Choi i Berson, 2006).

Metale obecne w kosmetykach również mogą pełnić rolę antyoksydantów. Przykładowo cynk, oprócz innych biologicznych funkcji, jest niezbędny do funkcjonowania białek antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej i metalotioneiny. Tlenek cynku jako składnik kosmetyków jest potencjalnym źródłem tego metalu. Z kolei selen jest kofaktorem innego enzymu antyoksydacyjnego – peroksydazy glutationowej. Inne białko zawierające selen, selenometionina, aplikowana bezpośrednio na skórę przeciwdziała rumieniowi wywołanemu promieniowaniem UV i prawdopodobnie wspomaga wygładzanie zmarszczek (Bissett, 2009).

Problematyczne jednak może okazać się zabarwienie niektórych metali i ich kompleksów, co wpływa na właściwości organoleptyczne produktu. Sole metali zmieniają nie tylko barwę, ale również konsystencję kosmetyku, co wymaga zmian w formule produktu. Przykładowo, obecność cynku w produkcie zawierającym awobenzon (częsty składnik kosmetyków chroniących przed promieniowaniem słonecznym) powoduje krystalizację i wytrącanie się awobenzonu, żółknięcie produktu i znaczące obniżenie jego efektywności (Bissett, 2009).

Popularność antyoksydantów pochodzenia roślinnego w ostatnich latach znacząco wzrosła, ale ich stosowanie jako skutecznych składników kosmetyków wymaga dalszych badań. Do grupy przeciwutleniaczy roślinnych należą karotenoidy i polifenole, w tym flawonoidy. Roślinne preparaty aplikowane na skórę mogą skutecznie przeciwdziałać procesom fotostarzenia (Mukherjee, Maity, Nema i Sarkar, 2011).

Polifenole są roślinnymi antyoksydantami o działaniu przeciwzapalnym, fotoprotekcyjnym i przeciwnowotworowym. Podgrupą polifenoli, popularną jako składnik kosmetyków, są flawonoidy. W produkcji kosmetyków wykorzystywane są między innymi

ekstrakty z nasion winogron i z zielonej herbaty, które są bogate we flawonoidy (Choi i Berson, 2006).

Z badań przeprowadzonych przez Choi i Bersona (2006) wynika, że ekstrakt z zielonej herbaty łagodził uszkodzenia wywołane promieniowaniem UVB, uszkodzenia DNA, oparzenia słoneczne i rumień. Krem przeciwsłoneczny z dodatkiem ekstraktu z zielonej herbaty (2-5%) również skutecznie chronił przed negatywnymi zmianami wywołanymi promieniowaniem UV. W innych badaniach stwierdzono, że jednoczesne stosowanie kremu z 10%-owym dodatkiem ekstraktu z zielonej herbaty i ustnie przyjmowanych suplementów z zielonej herbaty przez 8 tygodni nie przyniosło znaczącej poprawy jeśli chodzi o uszkodzenia skóry wywołane promieniowaniem, niemniej jednak zaobserwowano wzrost elastyczności skóry. Być może potrzebny był dłuższy czas, by obserwować istotne efekty (Choi i Berson, 2006, Mukherjee i in., 2011). W kolejnym badaniu stwierdzono, że katechiny zawarte w zielonej herbacie skutecznie chroniły skórę przed szkodliwym wpływem promieniowania UV: podrażnieniem, stresem oksydacyjnym, uszkodzeniami DNA, zmniejszając również ryzyko powstania nowotworów (Mukherjee i in., 2011). Również ekstrakt z czerwonoekstraktu (rooibos) jest wykorzystywany w kremach łagodzących efekty starzenia się skóry (Gaspar, Camargo, Gianeti i Campos, 2008).

Ekstrakt z winorośli właściwej (*Vitis vinifera* L.) wykazywał silniejsze właściwości przeciwutleniające niż witamina C i witamina E, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Badania dermatologiczne pokazały, że ekstrakt zawarty w preparacie aplikowanym na skórę skutecznie może łagodzić podstawowe kliniczne objawy starzenia się skóry (Mukherjee i in., 2011).

Pomarańcza chińska (*Citrus sinensis* L.) jest źródłem kwasu askorbinowego i polifenoli takich jak antocyjany, flawanony i kwas hydroksycynamonowy. Ekstrakt może potencjalnie mieć właściwości fotoprotekcyjne i z powodzeniem być stosowany w dermatologii (Mukherjee i in., 2011).

Kinetyna, roślinny hormon wzrostu, syntezowany sztucznie, może mieć właściwości przeciwutleniające. W 24-tygodniowych badaniach wykazano, że aplikacja na skórę 0,1% kinetyny łagodziła zmarszczki oraz poprawiała kolor skóry (Choi i Berson, 2006).

Allantoina otrzymywana z korzenia żywokostu, a obecnie również syntezowana sztucznie, jest przeciwutleniaczem i ma własności przeciwzapalne. Wspomaga naprawę

fotouszkodzeń i redukuje zapalenie wywołane promieniowaniem UV (Choi i Berson, 2006).

Kurkumina zawarta w ostryżu (*Curcuma domestica*) jest przeciwutleniaczem, posiada również właściwości przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i antybakteryjne. Ewentualny pozytywny wpływ kurkuminy na fotostarzenie się skóry nie został jednak udowodniony (Choi i Berson, 2006).

Innymi roślinami, potencjalnie użytecznymi jako składniki kosmetyków z uwagi na zawarte przeciwutleniacze są: pieprz betelowy (*Piper betel* L.), migdałowiec pospolity (*Prunus dulcis* L.), kakaowiec (*Theobroma cacao* L.) i borówka bagienna (*Vaccinium uliginosum* L.) (Mukherjee i in., 2011).

Kwas ferulowy jest roślinnym związkami fenolowym, który wykazuje silne właściwości przeciwutleniające i wraz z pochodnymi związkami może być wykorzystany do zapobiegania kancerogenezie i uszkodzeniom wynikającym z ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe. Badania Zhanga i in. (2010) wskazują, że aplikacja kwasu ferulowego na skórę nie powoduje niepożądanych skutków ubocznych i jest w miarę efektywnym sposobem podawania tego związku, choć pożądane byłoby zwiększenie jego wchłaniania. Kolejne badania pokazały, że kwas ferulowy skutecznie chroni skórę przed podrażnieniami wywołanymi promieniowaniem UV (Zhang i in., 2010).

Innym dodatkiem do kosmetyków jest ekstrakt z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, który przeciwdziała stresowi oksydacyjnemu, a także nawilża skórę i wspomaga jej regenerację. Komórki *S. cerevisiae* wykazują adaptacyjną odpowiedź na obecność wolnych rodników, produkując niskocząsteczkowe antyoksydanty i witaminy. Odpowiednio przygotowany ekstrakt cechuje się bardzo wysoką aktywnością przeciwutleniającą, zmiatając rodnik hydroksylowy skuteczniej niż większość produktów spożywczych zawierających przeciwutleniacze. Oprócz tego ma także właściwości immunomodulatorowe. Wszystko to składa się na duży potencjał wykorzystania ekstraktu z *S. cerevisiae* w zapobieganiu chorobom związanym ze stresem oksydacyjnym, w tym fotostarzeniu się skóry. Praktyczne zastosowanie wymaga jednak dokładnego sprawdzenia preparatów pod kątem ewentualnych skutków niepożądanych takich, jak podrażnienia

skóry, gdyż badania wskazują, że wiele mieszanin, mimo doskonałych właściwości przeciwutleniających i nawilżających, takie skutki powoduje (Gaspar i in., 2008).

Przy wyborze dodatku do kosmetyku należy pamiętać o możliwych efektach fototoksycznych niektórych preparatów. Niebezpieczeństwo fototoksycznego efektu dotyczy wielu ekstraktów roślinnych używanych w przemyśle kosmetycznym. Można tu wymienić m.in. rośliny należące do rodzin *Rutaceae* (m.in. cytryna) i *Fabaceae* (m.in. soja), a także winogrona zawierające furokumarynę (Antignac, Nohynek, Re, Clouzeau i Toutain, 2010). Zjawisko fototoksyczności polega na zwiększaniu przez składnik kosmetyku negatywnej reakcji skóry na promieniowanie UV. Dotyczyć może leków i kosmetyków, stąd opracowane zostały testy wykrywające fototoksyczność przed dopuszczeniem produktu do obrotu. Jest to tym ważniejsza kwestia, że dotyczy zarówno składników naturalnych, jak i syntetycznych. Dawniej testy takie prowadzono na zwierzętach (obecnie testowanie składników kosmetyków i kosmetyków na zwierzętach jest zabronione), dziś opracowuje się odpowiednie testy *in vitro* z użyciem linii komórkowych fibroblastów bądź kolonii bakteryjnych. Testy wykonywane z użyciem kolonii bakteryjnych mogą być czulsze, jako że bakterie mają słabiej rozwinięte systemy obrony przed promieniowaniem UV niż eukarionty (Verma, Agrawal, Misra, Farooq i Hans, 2007).

3.2. Stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych w żywności i kosmetykach

Jakość produktów spożywczych i kosmetycznych w dużej mierze zależy od ich czystości chemicznej i mikrobiologicznej oraz trwałości. Zanieczyszczenia i rozwój mikroorganizmów sprawiają, że produkt może stać się zagrożeniem dla zdrowia konsumentów, stąd niezwykle istotne jest zapewnienie bezpieczeństwa i trwałości tych produktów.

Substancje dodawane do produktów spożywczych i kosmetycznych, których zadaniem jest konserwacja produktu, muszą być bezpieczne dla konsumenta, a ponadto nie zmieniać w istotny sposób właściwości samego produktu. Najczęściej wykorzystuje się substancje syntetyczne, jednak coraz popularniejsze stają się substancje naturalne, w tym pochodzenia roślinnego.

Zgodnie z definicją FDA (ang. *Food and Drug Administration*), chemiczne substancje konserwujące są to wszystkie substancje chemiczne, które dodane do żywności

przyczyniają się do zahamowania bądź spowolnienia niekorzystnych procesów, głównie mikrobiologicznych i enzymatycznych, powodujących psucie się i obniżanie jakości żywności. Sól kuchenna, cukier, ocet, przyprawy i wyekstrahowane z nich olejki oraz substancje wprowadzone do żywności z dymem wędzarniczym, mają właściwości konserwujące, ale nie są zaliczane do konserwantów chemicznych. Chemiczne substancje konserwujące są skuteczne już przy niewielkich dawkach, nieprzekraczających 0,1-0,2% i powinny być stosowane w minimalnej niezbędnej dawce. Warunkiem dopuszczenia danego konserwantu do użycia jest bezpieczeństwo konsumenta. Ustala się dla nich również wartość ADI (ang. *Acceptable Daily Intake* – dopuszczalna dzienna dawka). Na opakowaniach produktów spożywczych, zawierających konserwanty chemiczne, musi znaleźć się odpowiednia informacja, w tym nazwa konserwantu lub jego symbol E (Świdorski, 2003).

Idealny konserwant powinien łatwo ulegać metabolizmowi w organizmie do neutralnych biologicznie pochodnych, nie powinien też odkładać się w tkance tłuszczowej. Już w niewielkiej dawce powinien skutecznie ograniczać rozwój bakterii, drożdży i pleśni. Powinien być dobrze rozpuszczalny w wodzie, gdyż mikroorganizmy rozwijają się w fazie wodnej produktu, obojętny chemicznie wobec innych składników produktu, odporny na procesy technologiczne, którym poddawany jest produkt i nie zmieniać cech organoleptycznych produktu. Wszystkich wymagań jednocześnie nie spełnia żaden ze stosowanych związków. Efektywność działania konserwantów zależy również od pH środowiska, temperatury, interakcji z innymi substancjami, a także rodzaju i ilości obecnych drobnoustrojów. Podstawowymi konserwantami stosowanymi w przemyśle spożywczym są kwas sorbowy i jego sole, kwas benzoesowy i benzoesan sodu, estry kwasu *p*-hydroksybenzoesowego, dwutlenek siarki i sole kwasu siarkowego (IV), nizyna, a także azotany i azotyny. Właściwościami przeciwbakteryjnymi cechuje się przede wszystkim kwas benzoesowy i jego sole oraz sole kwasu siarkowego (IV), zaś przeciwgrzybiczymi: kwas sorbowy, kwas benzoesowy i jego estry, a także sole sodowe i potasowe tych kwasów. Mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego polegać może na uszkodzeniu ściany bądź błony komórkowej, uszkodzeniu DNA, inaktywacji enzymów lub innych niezbędnych dla drobnoustrojów substancji (Świdorski, 2003).

W przypadku produktów kosmetycznych, podobnie jak w przypadku żywności, podstawowym warunkiem dopuszczenia substancji konserwującej do użycia jest

bezpieczeństwo konsumentów i efektywność działania. Chemiczne substancje konserwujące działają wobec szerokiego spektrum drobnoustrojów: bakterii i grzybów, co jest szczególnie ważne w produktach zawierających wodę i składniki organiczne. Konserwant nie powinien wchłaniać się przez skórę ani błony śluzowe, powinien być nietoksyczny, stabilny w szerokim zakresie pH i temperatury, a także skuteczny przy niewielkich stężeniach. Nie powinien również zakłócać naturalnej flory bakteryjnej skóry człowieka, wchodzić w interakcje z innymi składnikami produktu bądź opakowania ani też zmieniać jego cech sensorycznych. Chemiczne konserwanty stosowane w kosmetykach mogą jednak stanowić istotny czynnik wywołujący alergie. Prawdopodobieństwo wystąpienia alergii zwiększa się przy stosowaniu w produkcie mieszaniny konserwantów w celu zwiększenia ich spektrum działania i skuteczności. Jako potencjalne alergeny wskazuje się np. parabeny (estry kwasu *p*-hydroksybenzoesowego), tiomersal, formalinę i Kathon CG (mieszanina metyloizotiazolinonu i metylochloizotiazolinonu) (Bojarowicz, Wojciechowska i Gocki, 2008).

Wciąż poszukuje się nowych konserwantów – dodatków naturalnych o mniejszej liczbie efektów ubocznych oraz potencjalnie nietoksycznych. Wiele naturalnych substancji i ich mieszanin o właściwościach przeciwutleniających wykazuje jednocześnie właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Należą do nich ekstrakty roślinne zawierające związki polifenolowe. Również kwas askorbinowy posiada właściwości bakteriostatyczne: w stężeniach od 100 do 1000 μM istotnie hamuje wzrost mikroorganizmów *in vitro*. Ponadto wpływa pozytywnie na pracę makrofagów, tym samym poprawiając odpowiedź immunologiczną organizmu (Oudemans van Straaten, Spoelstra de Man i de Ward, 2014).

3.3. Roślinne związki fenolowe jako substancje o działaniu przeciwutleniającym i przeciwdrobnoustrojowym

Roślinne związki fenolowe, należące do tzw. naturalnych przeciwutleniaczy, są składnikami wielu surowców roślinnych, gotowych produktów spożywczych, suplementów diety i kosmetyków. Są to jedne z ważniejszych przeciwutleniaczy w diecie człowieka. Najczęściej występują w mieszaninie, zarówno w surowcach roślinnych, jak i w produktach dostępnych na rynku. Przykładem wykorzystania roślinnych związków fenolowych mogą być suplementy diety na bazie żurawiny i witaminy C, stosowane ochronnie lub wspomagająco w leczeniu chorób układu moczowego, flawonoidy z owoców cytrusowych i kwercetyna z kwasem askorbinowym, działające wzmacniająco

na układ odpornościowy, a także hesperydyna i rutyna wraz z witaminą C, wzmacniające naczynia krwionośne (Gliszczyńska-Świągło, 2010b).

Do roślinnych związków fenolowych należą flawonoidy. Jest to najliczniejsza podgrupa związków fenolowych. Pod względem chemicznym flawonoidy to układ difenylopropanu (C₆-C₃-C₆) z centralnym pierścieniem piranowym o różnych stopniach utlenienia. Do flawonoidów należą między innymi flawonole, flawony, izoflawony, flawan-3-ole (katechiny), flawanony, antocyjany oraz chalkony, różniące się między sobą strukturą chemiczną (Rice-Evans, Miller i Paganga, 1996; Gliszczyńska-Świągło, 2010b).

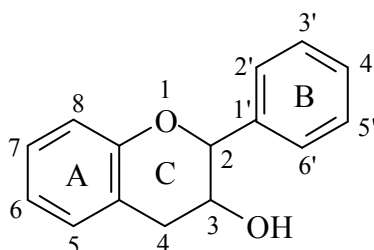
Flawonoidy obecne są przede wszystkim w warzywach i owocach, np. flawanony w owocach cytrusowych, kempferol w brokułach i rzodkiewce, kwercetyna w żurawinie, jagodach, oliwkach i skórce jabłka, mirycetyna w żurawinie i winogronach, antocyjany w wiśniach, truskawkach, malinach, jagodach i winogronach, katechiny w czekoladzie, kakao i herbacie, a także w czerwonym i białym winie (m.in. antocyjany i katechiny) (Rice-Evans i in., 1996).

Dzienne spożycie flawonoidów szacowane jest na, 20 mg do 1 g. Dieta bogata we flawonoidy jest wiązana z mniejszym ryzykiem m.in. chorób układu krążenia i chorób nowotworowych. Flawonoidy, podobnie jak inne polifenole roślinne, oprócz właściwości przeciwutleniających, posiadają właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, antyalergiczne, a także zdolność stymulowania układu immunologicznego oraz rozszerzania naczyń krwionośnych (Rice-Evans i in., 1996; Manach, Williamson, Morand, Scalbert i Remesy, 2005).

3.3.1. Właściwości związków polifenolowych zawartych w liściach herbaty

Herbata jest drugim, po wodzie, najczęściej spożywanym napojem na świecie, choć jej spożycie jest bardzo zróżnicowane pod względem geograficznym (Graham, 1992). Liście herbaty (*Camellia sinensis*) są dobrym źródłem polifenoli, głównie katechin (flawan-3-oli), związków o opisanej, wysokiej aktywności przeciwutleniającej (Cabrera, Artach i Jimenez, 2006; Muzolf-Panek, Gliszczyńska-Świągło, Szymusiak i Tyrakowska, 2012). W suchej masie liści może znajdować się nawet 30% katechin, ponadto obecne są również flawonole, proantocyjanidyny, kwas chlorogenowy, kwas *p*-kumarylochinowy oraz teogalina (kwas 3-gallochinowy, unikalny dla herbat) (Graham, 1992).

Katechiny herbaty występują głównie jako epimery *cis* (z przedrostkiem *epi-*). W cząsteczkach katechin (Rysunek 1) występują charakterystyczne ugrupowania: katecholowe (dwie grupy OH w pozycjach C3' i C4' pierścienia B) lub pirogalolowe (trzy grupy OH w pozycjach C3', C4' i C5' pierścienia B). Te ostatnie nazywane są galokatechinami. W odróżnieniu od innych flawonoidów katechiny nie tworzą glikozydów, mogą natomiast występować w postaci galusanów, czyli estrów katechin z kwasem galusowym związanym poprzez grupę OH przy węglu C3 pierścienia C katechin. Katechiny są substancjami bezbarwnymi, dobrze rozpuszczalnymi w wodzie. Poszczególne katechiny różnią się między sobą potencjałem oksydacyjnym, ale wszystkie łatwo ulegają utlenieniu. Chinony katechin są niezbędne do powstania wielu lotnych substancji zapachowych gotowych herbat (Graham, 1992).



Rysunek 1. Podstawowa struktura chemiczna katechin

Najważniejsze katechiny zawarte w liściach herbaty, to:

- (+)-katechina (C): 1-2% suchej masy,
- (-)-epikatechina (EC): 1-3%,
- (-)-galusan epikatechiny (ECG): 3-6%,
- (-)-galusan katechiny (CG): 1-3%,
- (-)-epigalokatechina (EGC): 3-6%,
- (-)-galusan epigalokatechiny (EGCG): 7-13% (Graham, 1992).

Galokatechiny i galusany katechin nadają herbacie cierpki smak. Wolne katechiny z kolei mają smak mniej cierpki, a nawet słodki. Zawartość katechin ściśle zależy od wieku liści. Pączki i młode liście zawierają najwięcej EGCG, a także największą ilość enzymów potrzebnych do wytworzenia katechin. Dodatkowo wpływ mają klimat, pora roku i sposób uprawy. Ocenia się, że najwięcej katechin zawierają liście zbierane w sierpniu, kiedy słońce jest najmocniejsze, gdyż aktywność enzymów zaangażowanych w produkcję

catechin zależy od stopnia oświetlenia rośliny. Również temperatura zwiększa ilość catechin w roślinie. Po zsyntezowaniu, catechiny magazynowane są w wakuolach, gdzie zasadniczo nie podlegają dalszym przemianom (Graham, 1992; Hara, 2001).

W liściach herbaty występuje również kofeina. Jej zawartość wynosi średnio 3%, obecne są również w mniejszej ilości inne metyloksantyny, np. teobromina (0,1%) i teofilina (0,02%). Zależnie od gleby, na której jest uprawiana, herbata może kumulować pierwiastki, takie jak mangan, glin, potas, wapń, magnez i fluor. Obecne w liściach związki lotne odpowiadają za charakterystyczny zapach herbaty. Liście herbaty zawierają także enzymy roślinne, z których część ma istotne znaczenie w produkcji różnych gatunków herbat (Graham, 1992).

Różne gatunki herbat, dzięki odmiennemu procesowi ich produkcji, znacznie różnią się zawartością catechin i innych flawonoidów. Zieloną herbatę przetwarza się tak, by nie dopuścić do utleniania polifenoli. Jest to herbata niepoddana procesowi fermentacji, stąd skład catechin w zielonej herbacie jest podobny do tego w świeżych liściach. W procesie produkcyjnym enzymy utleniające catechiny są szybko dezaktywowane wysoką temperaturą (Graham, 1992).

W żywej roślinie enzymy odpowiedzialne za utlenianie catechin, takie jak oksydaza polifenolowa, oraz catechiny znajdują się w oddzielnych częściach komórki. Podczas produkcji czarnej herbaty zostają uwolnione poprzez obróbkę mechaniczną liści i odpowiadają za powstawanie szeregu produktów kondensacji catechin, takich jak czerwono-pomarańczowe teaflawiny, brązowe tearubiginy i bezbarwne biflwanole. Większość tych związków łatwo tworzy nierozpuszczalne kompleksy z kofeiną. Tearubiginy są najliczniejszymi związkami polifenolowymi w ekstraktach z czarnej herbaty. Procentowa zawartość różnych polifenoli może się istotnie zmieniać w zależności od sposobu produkcji herbaty i przygotowywania naparu czy też ekstraktu. Około 5-10% catechin obecnych w świeżych liściach nie podlega przemianom podczas produkcji czarnej herbaty (Graham, 1992; Reachner i in., 2002; Zuo, Chen i Deng, 2012).

Herbata biała produkowana jest z młodych liści i pączków liściowych zbieranych wczesną wiosną. Podobnie jak w przypadku zielonej herbaty, proces utleniania polifenoli przerywany jest na początku obróbki za pomocą wysokiej temperatury. Liście są następnie

suszone. Ze wszystkich gatunków herbat, herbata zielona, a następnie biała są najmniej przetworzone (Rusak, Komes, Likić, Horzić i Kovac, 2008).

Herbata czerwona (tak zwana pu-erh) należy do herbat półfermentowanych (Kłódka, Bońkowski i Telesiński, 2008). Pochodzi z regionu Pu'er w prowincji Junnan w Chinach. Przechodzi dodatkową fermentację z użyciem mikroorganizmów takich jak *Aspergillus* sp., stąd jej skład polifenolowy może się znacznie różnić od składu innych gatunków herbat (Zhang i in., 2012).

Aktywność katechin w danym układzie zależy od wielu czynników: od ich potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, zdolności chelatowania metali, rozpuszczalności, pH środowiska, a w przypadku działania w organizmie również od biodostępności i stabilności w tkankach i komórkach (Gramza i Korczak, 2005). Wartość pH środowiska może wpływać również na zawartość katechin w końcowym produkcie, gdyż stabilność tych związków zależy od pH (Zhu, Zhang, Tsang, Huang i Chen, 1997). Ponadto aktywność przeciwutleniająca katechin jest większa w wyższych wartościach pH, gdyż po deprotonacji wykazują większą zdolność oddawania elektronu (Muzolf, Szymusiak, Gliszczyńska-Świgło, Rietjens i Tyrakowska, 2008). Mogą również powstrzymywać reakcje wolnorodnikowe poprzez chelatowanie jonów metali takich jak żelazo (Mandel, Amit, Reznichenko, Weinreb i Youdim, 2006). Stwierdzono, że zawartość katechin w herbacie dodatnio koreluje z jej właściwościami przeciwutleniającymi (Muzolf-Panek, 2009). Związki te wykazują również właściwości przeciwdrobnoustrojowe (Hara, 2001).

Polifenole roślinne są substancjami naturalnymi i stosunkowo bezpiecznymi, jednakże w dużych dawkach (np. przy przyjmowaniu dużych ilości suplementów diety) mogą działać proutleniająco. W obecności jonów metali przejściowych, takich jak żelazo i miedź, mogą powodować powstawanie reaktywnych form tlenu i wolnych rodników (Sakihama, Cohen, Grace i Yamasaki, 2002).

Katechiny herbaty mogą być używane jako dodatki do produktów zarówno spożywczych, jak i kosmetycznych. Opóźniają jęłczenie tłuszczów oraz zmiatają niektóre reaktywne formy tlenu skuteczniej niż witaminy C i E (Graham, 1992; Hara, 2001). Niektóre katechiny zapobiegają utlenianiu kwasu linolenowego z podobną skutecznością co BHA. Ich właściwości przeciwutleniające wiązane są głównie z dużą liczbą grup hydroksylowych w cząsteczce, przy czym ważne jest ich rozmieszczenie. Hydroksylacja

w pierścieniu A nie wpływa znacząco na właściwości przeciwutleniające katechin, natomiast istotny jest stopień i miejsce hydroksylacji w pierścieniu B. Katechiny posiadające grupę pirogalolową mają większy potencjał przeciwutleniający niż katechiny z grupą katecholową. Reszta kwasu galusowego w pozycji C3 zwiększa aktywność przeciwutleniającą katechin podobnie lub jeszcze bardziej niż grupa pirogalolowa (Gramza i Korczak, 2005; Muzolf, 2009).

Wysokie spożycie polifenoli, w tym katechin, jest związane z obniżonym ryzykiem wystąpienia takich chorób cywilizacyjnych, jak choroby nowotworowe i choroby układu krążenia. Prozdrowotne właściwości katechin wynikają między innymi z ich właściwości przeciwutleniających (Barbosa, 2007; Cabrera i in., 2006; Cooper, Morré i Morré, 2005).

Właściwości przeciwnowotworowe katechin herbaty potwierdzono w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* na zwierzętach, a także w badaniach epidemiologicznych u ludzi. Z badań *in vitro* wynika, że katechiny herbaty działają hamująco na różnych etapach rozwoju nowotworu: inicjacji, promocji i progresji (Dufresne i Farnworth, 2001). Stwierdzono, że (-)-EGC zapobiegała mutacjom w genomie *Bacillus subtilis*. Z kolei EGCG zapobiegał pojawianiu się aberracji chromosomowych u myszy i hamował przekształcanie się komórek w liniach komórkowych w komórki nowotworowe. Katechiny zielonej herbaty podawane z pokarmem hamowały wzrost nowotworów u myszy, a także hamowały tworzenie się przerzutów nowotworu płuc. Dodatkowo, katechiny zielonej herbaty indukowały apoptozę ludzkich komórek nowotworowych białaczki limfoidalnej oraz nowotworu żołądka w badaniach *in vitro* (Hara, 2001).

W badaniach wśród ludzi występuje wiele zmiennych zakłócających, które sprawiają, że trudniej wyciągać jednoznaczne wnioski, co do wpływu przeciwutleniaczy na zmiany nowotworowe. Badania sugerują jednak ochronny efekt zielonej herbaty wobec nowotworów jelita grubego, pęcherza moczowego, trzustki i przełyku (Dufresne i Farnworth, 2001). Badania epidemiologiczne wskazują też na niższą częstość zapadania na nowotwory żołądka osób, które piją duże ilości zielonej herbaty. Ponadto stwierdzono, że katechiny mają silne działanie przeciwbakteryjne wobec *Helicobacter pylori* (Hara, 2001).

Katechiny, po przekształceniu w chinony, mogą też indukować ekspresję genów kodujących oksydoreduktazę NAD(P)H: chinon 1 (NQO1; EC 1.6.99.2), która bierze

udział w procesach detoksykacyjnych, przekształcając chinony do bardziej stabilnych hydrochinonów, zapobiegając tym samym powstawaniu szkodliwych, potencjalnie kancerogennych, wolnych rodników. Podobne działanie wykazuje również kwercetyna (Muzolf-Panek, Gliszczyńska-Świgło i in., 2008; Lee-Hilz i in., 2006; Lee-Hilz, Stolaki, van Berkel, Aarts i Rietjens, 2008). Ich aktywność prooksydacyjna, wynikająca ze zdolności tych związków do tworzenia chinonów, może być zatem rozpatrywana jako korzystna.

Oprócz właściwości przeciwnowotworowych, katechiny herbaty obniżają poziom cholesterolu LDL we krwi, co zmniejsza ryzyko odkładania się blaszek miażdżycowych, a więc i niedokrwiennej choroby serca oraz zwężenia tętnic. Katechiny zielonej herbaty podawane szczurom na diecie wysokotłuszczowej obniżały znacząco poziom cholesterolu LDL w porównaniu z grupą kontrolną, zwiększały też wydalanie tłuszczów z kałem. Działania tego nie obserwowano w przypadku diety z normalną zawartością tłuszczu. Z kolei szczury, którym podawano katechiny herbaty wraz z normalną dietą przez całe życie, pod koniec życia (19 miesięcy) wykazywały niższe poziomy lipidów (triglicerydów, cholesterolu i fosfolipidów) we krwi niż grupa kontrolna, która nie otrzymywała katechin (Hara, 2001). U ludzi pijących siedem filiżanek herbaty oolong przez sześć tygodni obserwowano zwiększenie cholesterolu HDL przy zachowaniu tego samego poziomu całkowitego cholesterolu. Ponadto wykazano, że katechiny zielonej herbaty, podobnie jak polifenole obecne w czerwonym winie, mają zdolność hamowania utleniania cholesterolu LDL, co również obniża ryzyko zmian miażdżycowych. Katechiny zielonej herbaty obniżają również poziom glukozy we krwi poprzez hamowanie enzymatycznego rozkładu skrobi i sacharozy, co potencjalnie może obniżać ryzyko nadwagi i otyłości (Hara, 2001). Stwierdzono również, że zielona herbata obniżała zawartość produktów utleniania lipidów w surowicy osób pijących litr tego napoju przez cztery tygodnie (Coimbra i in., 2006).

Katechiny herbaty zapobiegają miażdżycowym zmianom w naczyniach krwionośnych również przez obniżanie ciśnienia krwi. Wysokie ciśnienie krwi sprzyja uszkodzeniom naczyń i odkładaniu się blaszek miażdżycowych. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że EGCG miał zdolność łączenia się z enzymem konwertującym angiotensynę I w angiotensynę II, zapobiegając powstawaniu podnoszącej ciśnienie krwi angiotensyny II. W badaniach na szczurach z nadciśnieniem stwierdzono, że obecność w diecie katechin zielonej herbaty nieznacznie obniżała ciśnienie krwi w porównaniu z grupą kontrolną oraz opóźniała wystąpienie udaru mózgu o 15%. Również badania epidemiologiczne wskazują

na mniejsze ryzyko udaru wśród osób pijących kilka filiżanek herbaty dziennie niż u osób niepijących herbaty (Hara, 2001). Katechiny herbaty przypuszczalnie przyczyniają się do zmniejszenia ryzyka tzw. zespołu metabolicznego, który zwiększa ryzyko choroby niedokrwiennej serca (Thielecke i Boschmann, 2009).

Katechiny herbaty wykazują także własności przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciwzapalne. Przykładowo hamują wzrost przetrwalników *Clostridium botulinum*, które mogą rozwijać się w zamkniętych hermetycznie produktach spożywczych. Wrażliwy na działanie katechin jest również odporny na metycylinę szczep *Staphylococcus aureus* (MRSA, ang. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Badania pokazały, że EGCG hamuje wzrost *S. aureus* już w stężeniu 32-64 µg/ml. Stężenie katechin w naparze zielonej herbaty wynosi około 500-1000 µg/ml, z czego połowa to EGCG, zatem herbata taka, jak zazwyczaj spożywana, ma działanie przeciwbakteryjne. Badania wskazują również na hamujące działanie EGCG wobec wirusa grypy, wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) oraz niektórych wirusów roślinnych i zwierzęcych (Hara, 2001). Przeciwdrobnoustrojowe działanie ekstraktów z herbat potwierdziły też badania Almajano, Carbo, Jimenez i Gordon, (2008), Zakira i in. (2015), Li i in. (2015), Yi i in. (2014) oraz Becerril, Gomez-Lus i Nerin (2011) omówione w części doświadczalnej pracy.

3.3.2. Właściwości związków polifenolowych zawartych w ekstraktach z zielonej kawy i pestek winogron

Zielona kawa oferowana jest na rynku jako ziarna całe lub zmielone, a także jako ekstrakt będący suplementem diety, m.in. wspomagający odchudzanie. Zawiera do 10% polifenoli, głównie kwas chlorogenowy i kwas kawowy oraz ich pochodne (Budryn, Nebesny i Rachwał, 2014). W porównaniu do prażonych ziaren kawy, ziarna zielone mogą, zależnie od gatunku, wykazywać wyższą bądź niższą aktywność przeciwutleniającą. Wynika to najprawdopodobniej z odmiennego składu polifenoli w różnych gatunkach kawy (Priftis i in., 2015). Zawarty w zielonej kawie kwas chlorogenowy może w pewnych warunkach wykazywać również właściwości proutleniające, podobnie jak inne przeciwutleniacze (Glei, Kirmse, Habermann, Persin i Pool-Zobel, 2006).

Polifenole kawy, zarówno zielonej, jak i palonej, posiadają właściwości przeciwnowotworowe. Według Glei i in. (2006), wodna zawiesina chleba z dodatkiem

ekstraktu z zielonej kawy hamowała rozwój ludzkich komórek nowotworowych raka okrężnicy i raka wątroby.

Ekstrakt z zielonej kawy ma również pozytywny wpływ na produkty spożywcze. Dodatek ekstraktu z zielonej kawy do czekoladek i ciastek hamował utlenianie zawartego w nich tłuszczu wydłużając czas przydatności do spożycia (Budryn i Nebesny, 2013).

Ekstrakt z pestek winogron oferowany jest na rynku jako suplement diety o silnych właściwościach przeciwutleniających. Pestki winogron, podobnie jak herbaty, zawierają katechiny (C, EC, GC, ECG), oraz znaczne ilości proantocyjanidyn (głównie procyjanidynę B1, a także B2 i C) (Hajati, Hassanabadi, Golian, Nassiri-Moghaddam i Nassiri, 2014; Shi, Yu, Pohorly i Kakuda, 2003), hydrochinon, pirokatechol, kwas kawowy, kwas ferulowy, kwas *p*-kumarowy, kwas galusowy, kwas elagowy i resweratrol. Antocyjany z kolei zawarte są głównie w skórcie winogron czerwonych (Al-Habib, Al-Saleh, Safer i Afzal, 2010). Pomiędzy różnymi odmianami winogron, podobnie jak w przypadku różnych rodzajów herbaty, obserwuje się różnice w zawartości poszczególnych związków. Całkowita zawartość polifenoli w pestkach winogron wynosi 5-8% zależnie od odmiany (Shi i in., 2003). W badaniach Yilmaz i Toledo (2004) zawartość kwasu galusowego wynosiła 99, 15 lub 10 mg/100 g suchej masy odpowiednio w odmianach Muscadine, Chardonnay i Merlot. Zawartość katechiny wynosiła 12, 358 i 127 mg/100 g suchej masy, natomiast EC – 96, 421 i 115 mg/100 g suchej masy. Te trzy substancje odpowiadały za mniej niż 26% aktywności przeciwutleniającej (mierzonej testem ORAC) ekstraktów pestek i skórek winogron, stąd autorzy sugerują, że za znaczną część aktywności przeciwutleniającej odpowiadają dimery, trimery, oligomery i polimery procyjanidyn. Według Yilmaz i Toledo (2004), aktywność polifenoli zawartych w skórcie i pestkach winogron względem rodnika peroksylogowego można uszeregować następująco: resweratrol > C > EC = GC > kwas galusowy = kwas elagowy.

Ekstrakt z pestek winogron, podobnie jak same winogrona i produkty spożywcze je zawierające, ma działanie prozdrowotne, ochronne wobec szkodliwego działania wolnych rodników. Opóźnia starzenie się skóry, chroni przed promieniowaniem UV, korzystnie wpływa na wzrok, poprawia elastyczność tkanek (w tym naczyń krwionośnych) (Shi i in., 2003). Metaanaliza danych literaturowych pokazała, że ekstrakt z pestek winogron obniża tętno oraz skurczowe ciśnienie krwi u ludzi (Feringa, Laskey, Dickson i Coleman, 2011), wykazuje działanie przeciwbakteryjne wobec *Streptococcus aureus*

odpornego na metycylinę (MRSA) (Al-Habib i in., 2010). Do suplementów diety na bazie ekstraktu z pestek winogron, często dodawana jest witamina C.

4. Interakcje pomiędzy substancjami o działaniu przeciwtleniającym

Jak wspomniano wcześniej, naturalne przeciwtleniacze najczęściej występują w mieszaninie, zarówno w organizmach żywych, w surowcach roślinnych, jak i w produktach dostępnych na rynku, do których są dodawane np. w formie ekstraktów (np. ekstrakty z zielonej herbaty i rozmarynu stosowane jako dodatki do żywności oraz inne ekstrakty jako składniki kosmetyków), lub pojedynczych związków (np. witaminy C i E w kosmetykach). Potrzebne są zatem badania nie tylko pojedynczych związków, lecz również wieloskładnikowych ekstraktów dodawanych do żywności bądź kosmetyków. Mieszanina przeciwtleniaczy może działać skuteczniej niż pojedyncze przeciwtleniacze dodawane do produktów, może też działać słabiej, jeśli jej składniki działają wobec siebie antagonistycznie. W przypadku obniżenia aktywności przez interakcje, konieczne jest użycie większych ilości składników, by osiągnąć zamierzony efekt, co ma wpływ na aspekt ekonomiczny produkcji. Z drugiej strony, jeśli ostateczna aktywność jest wyższa niż oczekiwana, wystarczy zastosować mniejsze ilości składników, co pozwala obniżyć koszt produkcji i cenę produktu. Wobec coraz powszechniejszego wykorzystywania naturalnych przeciwtleniaczy przez przemysł spożywczy, kosmetyczny i farmaceutyczny, jako składników wielu produktów, istotne jest badanie zmian ich aktywności przeciwtleniającej w zależności od ich zawartości w mieszaninie. Interakcje związków o właściwościach przeciwtleniających mają wpływ na właściwości żywności i kosmetyków, w których występują, a więc pośrednio również na organizm ludzki.

Mechanizmy odpowiedzialne za interakcje pomiędzy naturalnymi przeciwtleniaczami oraz wpływ różnych czynników, np. składu mieszaniny, rodzaju środowiska reakcji oraz jego pH, rodzaju wolnych rodników wchodzących w reakcje z przeciwtleniaczami, nie są dotychczas wystarczająco poznane. Proporcje składników w mieszaninie mogą zmieniać się w zależności od produktu, stąd ważne jest zbadanie różnych możliwych proporcji. Należy również pamiętać, że przeciwtleniacze mogą wchodzić w interakcję także z innymi składnikami produktu, do którego są dodawane. Dla uzyskania optymalnego efektu i jak najkorzystniejszych właściwości wyrobu, w projektowaniu nowych produktów spożywczych (szczególnie żywności funkcjonalnej) oraz kosmetycznych konieczna jest wiedza na temat aktywności dodawanych przeciwtleniaczy i rodzaju ich interakcji.

4.1. Interakcje pomiędzy polifenolami roślinnymi a kwasem askorbinowym

Zarówno ekstrakty z herbat, zielonej kawy oraz pestek winogron, jak i kwas askorbinowy są składnikami wielu suplementów diety, napojów (np. typu ice-tea), żywności funkcjonalnej i kosmetyków. Są dodawane w celu przedłużenia stabilności oksydacyjnej tych produktów oraz ze względu na ich właściwości prozdrowotne. Polifenole wymienionych ekstraktów i kwas askorbinowy prawdopodobnie wchodzi z sobą w interakcje, co może zmieniać przewidywaną aktywność przeciwutleniającą i przeciwdrobnoustrojową mieszaniny w porównaniu z aktywnością pojedynczych składników. Interakcje między związkami obecnymi w ekstraktach a kwasem askorbinowym, obecnym lub dodawanym do różnych produktów, mogą mieć wpływ na jakość tych produktów i zdrowie konsumentów.

Dane literaturowe dostarczają niewiele informacji na temat oddziaływań roślinnych związków polifenolowych z biologicznymi przeciwutleniaczami, w tym z kwasem askorbinowym. Większość publikacji dotyczy oddziaływań polifenoli z białkami, lipidami, węglowodanami i jonami metali przejściowych, takich jak żelazo i miedź, oraz interakcji pomiędzy różnymi związkami polifenolowymi. Niniejsza praca jest odpowiedzią na potrzebę badań nad oddziaływaniem polifenoli roślinnych z witaminami, na przykładzie kwasu askorbinowego, i wpływem tychże oddziaływań na aktywność przeciwutleniającą lub przeciwdrobnoustrojową związków i ich mieszanin, również w złożonych matrycach biologicznych.

Dotychczasowe wyniki badań nad interakcjami związków o właściwościach przeciwutleniających sugerują, że interakcje są zjawiskiem częstym i wymagającym dokładnego poznania. Dostępne dane literaturowe wskazują na możliwość interakcji między związkami polifenolowymi i innymi przeciwutleniaczami, a także między różnymi związkami polifenolowymi, które powodują, że wypadkowa aktywność przeciwutleniająca nie jest jedynie sumą aktywności poszczególnych składników. Do obserwowanych interakcji należy synergizm między tokoferolem (witaminą E) i mirycetyną w zapobieganiu utlenianiu triacylogliceroli oleju słonecznikowego (Marinova, Toneva i Yanishlieve, 2008), antagonizm tokoferolu i kwercetyny w podobnych warunkach, ale synergizm tych związków w emulsjach i liposomach (Becker, Ntouma i Skibsted, 2007), addytywne bądź synergistyczne oddziaływania hesperydyny, katechiny, kwercetyny i kwasu ferulowego w opóźnianiu procesów wolnorodnikowych w ludzkich LDL (metoda

TBARS) (Circo i Omaye, 2006) oraz synergizm ekstraktu z rozmarynu oraz kwasu askorbinowego, tokoferolu i BHA w teście z rodnikiem DPPH^{*} (Romano, Abadi, Repetto, Vojnov i Moreno, 2009). Synergizm często zachodzi między składnikami ekstraktów roślinnych, co wykazano na przykładzie 5-*O*-glukozydu luteoliny i werbaskozydu z liści *Halleria lucida*, L. względem rodnika DPPH^{*} (Frum, Viljoen i Van Heerden, 2007) oraz czterech fenolowych składników mango odmiany Ataulfo: kwasu chlorogenowego, galusowego, protokatechowego i wanilinowego, również w teście z rodnikiem DPPH^{*}, gdzie obserwowano antagonizm i addytywność zależnie od kombinacji związków w mieszaninie (Palafox-Carlos i in., 2012). Synergizm i antagonizm obserwowano również w mieszaninach dwóch i trzech fenolowych związków występujących w truskawkach (Reber, Eggett i Parker, 2011). Obserwowano także synergizm pomiędzy kwasem izoferulowym a kalikozyną wyizolowanymi z roślin leczniczych: traganka (*Astragalus sp.*) i pluskwicy (*Cimicifuga foetida* L.) (Wang, Zhao, Li, Zhang i Qu, 2014).

Dane literaturowe dostarczają też przykładów interakcji między przeciwutleniaczami, w tym ekstraktami roślinnymi, w odniesieniu do ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Z badań Romano i in. (2009) wynika, że ekstrakt z rozmarynu oddziałuje synergistycznie z BHA w hamowaniu wzrostu bakterii *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Z kolei teaflawiny i epikatechina wykazują synergizm hamując wzrost *Stenothropomonas maltophilia* i *Acinetobacter baumani* (Betts, Kelly i Haswell, 2011).

W literaturze można znaleźć niewiele danych na temat interakcji kwasu askorbinowego z polifenolami herbat. Intra i Kuo (2007) obserwowali, że fizjologiczne stężenia katechin herbaty podnoszą aktywność przeciwutleniającą witaminy C i E w komórkach linii Caco-2. Również kumulacja EGC, EGCG i ECG przez komórki Caco-2 była znacząco wyższa, jeśli katechiny zostały dostarczone w mieszaninie z sacharozą i kwasem askorbinowym. Retencja katechin w komórkach była z kolei wyższa w obecności kwasu askorbinowego, co sugeruje, że sacharoza i kwas askorbinowy mogą poprawiać biodostępność katechin przyjmowanych z pokarmem (Peters, Green, Janle i Ferruzzi, 2010). W dostępnej literaturze nie znaleziono natomiast badań nad interakcjami między witaminą C a ekstraktami herbat, wpływającymi na ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

Z badań Majchrzak, Mitter i Elmadfa (2004) wynika, że dodatek witaminy C do ekstraktu z zielonej herbaty liniowo zwiększa jej aktywność przeciwutleniającą (mierzoną jako

wartość TEAC z wykorzystaniem kationorodnika ABTS^{•+}) w zakresie do 30 mg kwasu askorbinowego na 100 ml mieszaniny z ekstraktem z zielonej herbaty. W przypadku herbaty czarnej taki sam wpływ zaobserwowano w przedziale 5-20 mg kwasu askorbinowego na 100 ml mieszaniny z ekstraktem z czarnej herbaty (Majchrzak i in., 2004). Podobny wzrost aktywności mieszaniny kwasu askorbinowego i naparu bądź ekstraktu z zielonej herbaty zaobserwowali odpowiednio Alexandropoulo, Komaitis i Kapsokefalou (2006) oraz Gliszczyńska-Świągło (2010b).

Większość dotychczasowych badań nie uwzględnia wpływu pH środowiska na aktywność przeciwutleniającą związków występujących w mieszaninie i nie określa rodzaju oddziaływań pomiędzy związkami. Do związków nietrwałych w środowisku obojętnym i zasadowym należą np. katechiny. Chen, Zhu, Wong, Zhang i Chung (1998) wykazali, że kwas askorbinowy stabilizuje katechiny (szczególnie EGCG i EGC) w środowisku obojętnym i zasadowym. Dodatek kwasu askorbinowego do produktów zawierających katechiny zwiększałby więc właściwości przeciwutleniające mieszaniny, szczególnie tam, gdzie katechiny mogłyby okazać się niestabilne. Badania przeprowadzone przez Gliszczyńską-Świągło (2010a, 2010b) nad interakcjami kwasu askorbinowego z polifenolami takimi jak kwercetyna, cyjanidyno-3-*O*- β -glukozyd, rutyna, naryngina i hesperydyna sugerują, że typ interakcji między związkami polifenolowymi i innymi związkami może zmieniać się zależnie od proporcji składników w mieszaninie oraz rodzaju i pH środowiska. Stwierdzono, że aktywność przeciwutleniająca flawonoidów, wyrażona jako wartość TEAC, wzrasta wraz z wartością pH środowiska, podczas gdy aktywność TEAC kwasu askorbinowego jest niezależna od pH. Jego obecność w mieszaninie, np. z kwercetyną lub rutyną istotnie zmienia aktywność przeciwutleniającą mieszaniny (Gliszczyńska-Świągło i Szymusiak, 2009; Gliszczyńska-Świągło, 2010a, 2010b). Altunkaya, Becker, Gokmen i Skibsted (2009) wykazali, że α -tokoferol oraz kwercetyna działają synergistycznie z ekstraktem z sałaty, opóźniając powstawanie skoniugowanych dienów w liposomach. Mieszanina kwasu askorbinowego z ekstraktem z sałaty dawała jednak efekt podobny do tego, jaki obserwowano w przypadku samego kwasu askorbinowego. Kwas askorbinowy wykazywał też synergizm z polifenolami skórki migdałów w opóźnianiu utleniania LDL (Chen, Milbury, Chung i Blumberg, 2007). Badania pokazały również zdolność procyanidyn zawartych w winogronach do regeneracji α -tokoferolu oraz opóźniania rozkładu kwasu askorbinowego (Iglesias, Pazos, Torres i Medina, 2012). Z badań Murakami, Yamaguchi,

Takamury

i Matoba (2003) wynika, że wpływ polifenoli na aktywność przeciwutleniającą witamin E i C zależy od zastosowanego testu: mieszanina polifenoli i witamin wykazywała efekt addytywny w teście z rodnikiem DPPH^{*}, ale synergistyczny w przeciwdziałaniu utlenianiu liposomów. Potwierdza to hipotezę o istotnym wpływie środowiska reakcji na wynik interakcji. Określenie wpływu wyżej wymienionych czynników oraz rodzaju ekstraktu i wzajemnych proporcji ekstraktów i kwasu askorbinowego w mieszaninie wymaga przeprowadzenia szeregu badań laboratoryjnych.

Według Dai, Chen i Zhou (2008), którzy zaobserwowali synergizm mieszaniny witamin E i C oraz polifenoli zielonej herbaty w zapobieganiu utlenianiu lipidów, możliwym mechanizmem interakcji polifenoli roślinnych i kwasu askorbinowego jest regeneracja polifenoli z ich rodnikowej formy przez witaminę C, natomiast utleniona witamina E byłaby regenerowana przez polifenole. Obserwowana efektywność była najwyższa dla kwasu galusowego, następnie dla EC, EGC, ECG i EGCG. Niektóre polifenole, zawierające w swojej strukturze ugrupowanie katecholowe w pierścieniu B oraz podwójne wiązanie między węglem C2 i C3, posiadając potencjał redoks wyższy niż potencjał kwasu askorbinowego, mogą utleniać kwas askorbinowy do rodnika askorbylowego (Bors i in. 1995). Ten mechanizm reakcji sugerują również badania Yeomansa, Linseisena i Wolframa (2005), w których kwas askorbinowy w mieszaninie z EC, a także w mieszaninie z kwercetyną, opóźniał utlenianie LDL w porównaniu do efektu przewidywanego na podstawie właściwości kwasu askorbinowego i EC mierzonych osobno.

Niewiele wiadomo również o molekularnych mechanizmach interakcji pomiędzy naturalnymi przeciwutleniaczami. Jest to ważny obszar badań, gdyż pozwala lepiej zrozumieć i przewidywać kierunki zmian właściwości przeciwutleniających, nie poprzestając na samej obserwacji interakcji. Mechanizmy interakcji pomiędzy przeciwutleniaczami mogą być z kolei różne w różnych środowiskach (a więc w różnych miejscach organizmu człowieka, czy różnych produktach), np. w środowisku kwaśnym i zasadowym, wodnym i tłuszczowym, podobnie jak różne mogą być mechanizmy działania przeciwutleniającego danej substancji w różnych warunkach. W odniesieniu do interakcji między kwercetyną a kwasem askorbinowym został zaproponowany mechanizm polegający na tworzeniu się kompleksów molekularnych tych związków. Wyniki obliczeń kwantowo-chemicznych wskazują, że związanie się cząsteczki

kwercetyny z kwasem askorbinowym powoduje obniżenie zdolności kwercetyny do oddawania elektronu, a najbardziej reaktywna grupa C4'-OH staje się mniej dostępna dla reakcji wolnorodnikowych. W efekcie obserwuje się obniżenie aktywności przeciwutleniającej TEAC mieszaniny tych związków (Gliszczyńska-Świąło i Szymusiak, 2009). Możliwe jest, że polifenole herbat, zielonej kawy i winogron oddziałują z kwasem askorbinowym w podobny sposób.

Powyższe dane pozwalają sądzić, że interakcje między kwasem askorbinowym i polifenolami nie zawsze są addytywne, a wpływ na nie ma wiele czynników. Interakcje te mogą wpływać na właściwości produktów spożywczych i kosmetycznych, a także oddziaływać na organizm człowieka spożywającego czy stosującego produkty zawierające kwas askorbinowy i polifenole. Możliwe skutki fizjologiczne interakcji pomiędzy związkami o właściwościach przeciwutleniających wymagają badań *in vivo*. Jednak na podstawie wyników badań *in vitro* można wstępnie przewidywać możliwe oddziaływania i wpływ środowiska reakcji, w tym pH, na aktywność naturalnych przeciwutleniaczy, tym bardziej, że pH produktów spożywczych, do których dodaje się polifenole i witaminę C, zmienia się w szerokim zakresie.

Z uwagi na fakt, że do produktów dodaje się ekstrakty roślinne, a nie ich poszczególne składniki o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych, konieczne jest zbadanie interakcji kwasu askorbinowego przede wszystkim z ekstraktami jako złożoną matrycą biologiczną. W niniejszej pracy podjęto zatem próbę określenia typów interakcji pomiędzy kwasem askorbinowym a wybranymi ekstraktami roślinnymi. Interakcje te mogą wpływać na całkowitą aktywność przeciwutleniającą lub właściwości przeciwdrobnoustrojowe produktów, w których występują.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

5. Cel pracy i hipotezy badawcze

Głównym celem pracy było określenie wpływu interakcji pomiędzy kwasem askorbinowym i wybranymi ekstraktami roślinnymi na ich właściwości przeciwutleniające i przeciwdrobnoustrojowe.

Na podstawie analizy danych literaturowych oraz badań wstępnych, sformułowano następujące hipotezy:

1. Interakcje między kwasem askorbinowym i ekstraktami roślinnymi wpływają na ich właściwości przeciwutleniające.
2. Interakcje między kwasem askorbinowym i ekstraktami roślinnymi wpływają na ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

6. Zakres pracy

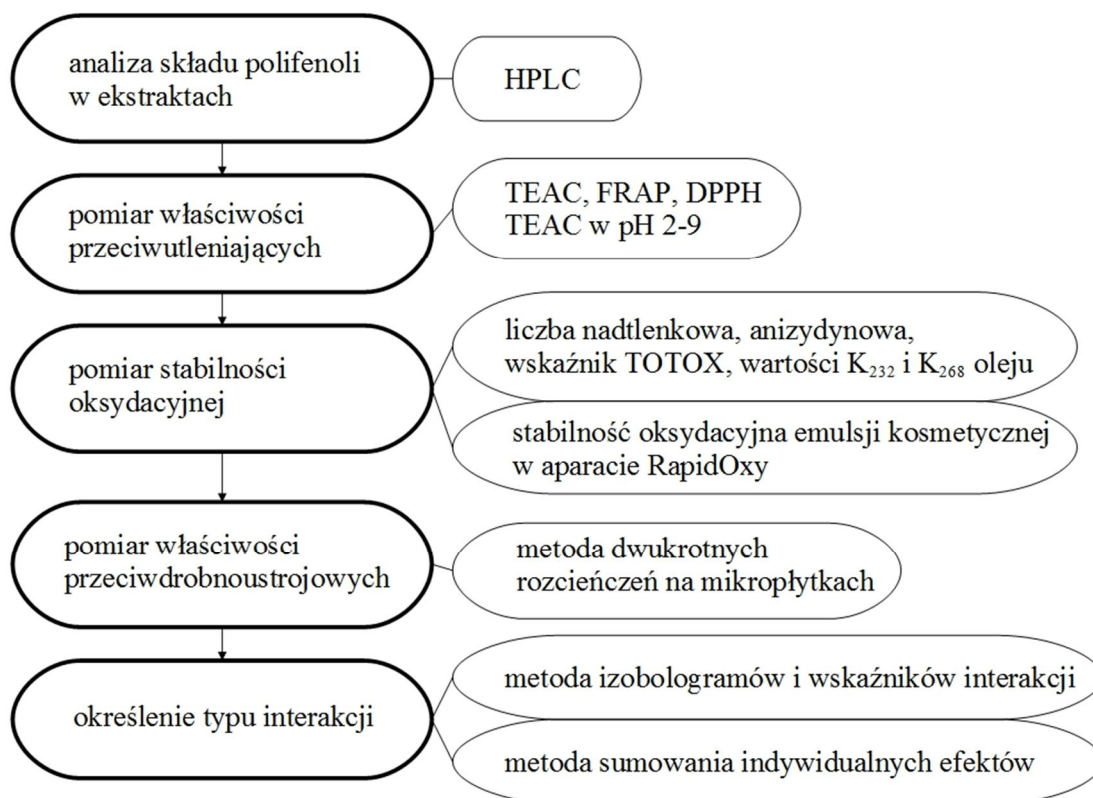
Aby zrealizować cel rozprawy i zweryfikować przyjęte hipotezy, przeprowadzono następujące badania:

1. Oznaczenie składu polifenoli w badanych ekstraktach metodą HPLC.
2. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów i ich mieszanin z kwasem askorbinowym w różnych stosunkach wagowych:
 - a. metodą TEAC z kationorodnikiem ABTS^{•+},
 - b. metodą FRAP,
 - c. metodą z rodnikiem DPPH[•].
3. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą TEAC ekstraktów z herbat: zielonej, czarnej, czerwonej i białej i ich mieszanin z kwasem askorbinowym w różnych stosunkach wagowych w zależności od pH środowiska.
4. Określenie zdolności ekstraktu z zielonej herbaty i jego mieszanin z kwasem askorbinowym w różnych stosunkach wagowych do ochrony oleju sezamowego przed utlenianiem na podstawie:
 - a) liczby nadtlenkowej,
 - b) liczby anizydynowej,
 - c) wartości TOTOX,
 - d) wartości K₂₃₂ i K₂₆₈.

5. Oznaczenie stabilności oksydacyjnej emulsji kosmetycznej z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy za pomocą aparatu RapidOxy.
6. Oznaczenie właściwości przeciwbakteryjnych badanych przeciwutleniaczy i ich mieszanin w różnych stosunkach wagowych metodą dwukrotnych rozcieńczeń na mikropłytkach.

Na podstawie uzyskanych wyników określono, czy zachodzą interakcje pomiędzy badanymi ekstraktami i kwasem askorbinowym. Do tego celu wykorzystano metodę izobologramów lub metodę sumowania indywidualnych efektów.

Na Rysunku 2 przedstawiono schemat przeprowadzonych badań.



Rysunek 2. Schemat przeprowadzonych badań

7. Materiał badawczy, odczynniki i aparatura laboratoryjna

Materiał badawczy

Ekstrakty z zielonej, czarnej, czerwonej i białej herbaty oraz z zielonej kawy przygotowano z produktów dostępnych w handlu. Wszystkie herbaty pochodziły z prowincji Junnan.

- Herbata zielona (liściasta, firmy Oscar).
- Herbata czarna (liściasta, firmy Oscar).
- Herbata czerwona (liściasta, firmy Oscar).
- Herbata biała (liściasta, firmy Sir Roger).
- Kawa zielona (firmy Cafe Creator, rok zbioru., 2012/2013).

Standaryzowany ekstrakt z zielonej herbaty kupiono w firmie C.E. Roeper GmbH (Hamburg, Niemcy). Standaryzowany ekstrakt z pestek winogron kupiono w firmie Martin Bauer Group (Vestenbergsgreuth, Niemcy).

Olej sezamowy zakupiony został w firmie Oleofarm sp. z o.o. (Wrocław, Polska), natomiast olej żurawinowy (tłoczony na zimno, nierafinowany) w sklepie Zielony Klub prowadzonym przez firmę Greenaction.

Kwas askorbinowy i butylohydroksytoluen (BHT) zakupiono w firmie Merck (Darmstadt, Niemcy).

Wzorce i rozpuszczalniki do HPLC

- Wzorce katechin oraz kwasu galusowego, kwasu chlorogenowego, γ - i δ -tokoferolu kupiono w firmie Sigma (St.Louis, USA). Wzorzec α -tokoferolu zakupiono w firmie Aldrich (Steinheim, Niemcy). Wzorzec procyjanidyny B2 kupiono w firmie Extrasynthese (Genay, Francja),
- rozpuszczalniki o czystości „do chromatografii HPLC” pochodziły z firmy Chempur (Piekary Śląskie, Polska).

Związki wykorzystane w metodzie TEAC z kationorodnikiem ABTS^{•+}

- ABTS (2,2'-azynobis-3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian diamonowy), firmy Roche (Manheim, Niemcy),
- enzym mikroperoksydaza-8 (MP8), firmy Sigma (Steinheim, Niemcy),
- nadtlenek wodoru 30% (H₂O₂), firmy Merck (Darmstadt, Niemcy),
- związki do przygotowania roztworów buforowych: chlorek sodu, chlorek potasu, kwas octowy, octan sodu, diwodorofosforan (V) potasu, wodorofosforan (V) potasu, kwas solny (35-38%), wodorotlenek sodu, firmy Merck (Darmstadt, Niemcy),
- troloks (kwas 6-hydroksy-2,3,7,8-tetrametylochromano-2-karboksyłowy), firmy Sigma (Steinheim, Niemcy).

Związki wykorzystane w metodzie FRAP

- FeSO₄, firmy Merck (Darmstadt, Niemcy),
- 2,4,6-tris(2-pirydylo)-s-triazyna, firmy Fluka (Steinheim, Niemcy),
- FeCl₃ x 6 H₂O, firmy Aldrich (Steinheim, Niemcy),
- lodowaty kwas octowy, firmy Chempur (Polska),
- octan sodu bezwodny, firmy Polskie Odczynniki Chemiczne (Polska).

Związki wykorzystane w metodzie z rodnikiem DPPH[•]

- DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl), firmy Sigma (Steinheim, Niemcy),
- metanol, firmy Stanlab (Polska).

Związki wykorzystane przy oznaczaniu liczby nadtlenkowej

- Chloroform, firmy Stanlab (Polska),
- kwas octowy, firmy Chempur (Polska),
- jodek potasu, firmy Aktyn (Polska),
- tiosiarczan sodu, firmy Chempur (Polska),
- etanol (96%), firmy Polskie Odczynniki Chemiczne (Polska).

Związki wykorzystane przy oznaczaniu liczby anizydynowej

- Izooktan, firmy Polskie Odczynniki Chemiczne (Polska),
- *p*-anizydyna (Steinheim, Niemcy),
- kwas octowy, firmy Chempur (Polska).

Związki wykorzystane przy oznaczaniu wartości K_{232} i K_{268}

- 2-Propanol (izopropanol), firmy Chempur (Polska),
- cykloheksan, firmy Chempur (Polska).

Związki wykorzystane przy oznaczaniu stabilności oksydacyjnej emulsji

- Tween, 20, firmy Fluka (Steinheim, Niemcy).

Pożywka wykorzystana przy oznaczaniu właściwości przeciwdrobnoustrojowych

- Pożywka Müllera-Hintona, firmy Oxoid (UK).

Aparatura i sprzęt laboratoryjny

W celu przeprowadzenia zaplanowanych badań wykorzystano następującą aparaturę i sprzęt laboratoryjny:

- spektrofotometr UV-VIS SPECTRONIC GENESIS 2, firmy Milton Roy (USA),
- wysokosprawny chromatograf cieczowy (HPLC) z detektorem typu fotodiodowego (PDA) 996 i fluorescencyjnym 747, firmy Waters (Milford, MA, USA),
- spektrofotometr mikroplótkowy Power-Wave XS 2, firmy Bio-Tek (Winooski, VT, USA),
- aparat do badania stabilności oksydacyjnej RapidOxy, firmy Anton Paar (Niemcy),
- homogenizator SilentCrusher S, firmy Heindolph (Niemcy),
- pehametr Delta 350, firmy Metter Toledo (Wielka Brytania),
- wagi analityczne firmy Sartorius-Werke (Niemcy) i RadWag (Polska),
- worteks, firmy Julabo (Niemcy),
- wirówka Mini Spin, firmy Eppendorf (Niemcy),
- liofilizator Alpha 1-2 LD firmy Martin Christ (Niemcy).

8. Metodyka badawcza

8.1. Przygotowanie wodnego ekstraktu z herbat i zielonej kawy

Wodne ekstrakty z herbat zostały przygotowane zgodnie z normą PN-ISO 3130. Odważono, 20 g liściastej herbaty, którą parzono przez 6 minut w 300 ml demineralizowanej wody w temperaturze 90°C. Napary dwukrotnie przefiltrowano a następnie zliofilizowano. Otrzymane ekstrakty przechowywano w temperaturze 4-6°C.

Ekstrakt z zielonej kawy przygotowano z handlowo dostępnych zmielonych ziaren. Odważkę zmielonych ziaren kawy parzono w demineralizowanej wodzie w 90°C przez 10 minut. Stosunek odważki kawy do wody wynosił 1:6 (m/v). Otrzymany napar został dwukrotnie przefiltrowany i zliofilizowany. Zliofilizowany ekstrakt przechowywano w temperaturze 4-6°C.

8.2. Przygotowanie mieszanin ekstraktów i kwasu askorbinowego

Badany ekstrakt (0,0010 g) rozpuszczono w 5 ml wodnego roztworu kwasu askorbinowego (KA). Stężenie KA było inne dla każdego stosunku wagowego ekstraktu do KA. Zostały przygotowane mieszaniny o następujących stosunkach wagowych: 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, oraz 1:10. Dla każdego ekstraktu i każdego stosunku wagowego przygotowano co najmniej trzy niezależne próbki. Wszystkie mieszaniny były przygotowywane bezpośrednio przed pomiarem.

8.3. Przygotowanie próbek oleju z dodatkiem ekstraktu z zielonej herbaty, kwasu askorbinowego oraz ich mieszanin

Do badań wybrano olej sezamowy zimnotłoczony z uwagi na jego zastosowanie zarówno w przemyśle spożywczym, jak i kosmetycznym. Przygotowano osiem różnych wariantów próbek, każdy wariant w dwóch powtórzeniach:

1. Próbką kontrolna 1 – 28,5 ml oleju sezamowego z dodatkiem 1,5 ml 96% etanolu.
2. Kwas askorbinowy 1 – 28,5 ml oleju sezamowego z dodatkiem 0,5 ml roztworu kwasu askorbinowego (0,005 g/ml EtOH) i 1 ml 96% etanolu.
3. Kwas askorbinowy 2 – 28,5 ml oleju sezamowego z dodatkiem 1 ml roztworu kwasu askorbinowego (0,005 g/ml EtOH) i 0,5 ml 96% etanolu.

4. Ekstrakt 1 – 28,5 ml oleju sezamowego z dodatkiem 0,5 ml roztworu ekstraktu z zielonej herbaty (0,005 g/ml EtOH) i 1 ml 96% etanolu.
5. Ekstrakt 2 – 28,5 ml oleju sezamowego z dodatkiem 1 ml roztworu ekstraktu z zielonej herbaty (0,005 g/ml EtOH) i 0,5 ml 96% etanolu.
6. BHT – 28,5 ml oleju sezamowego z dodatkiem 1 ml roztworu BHT (0,003 g/ml EtOH) i 0,5 ml 96% etanolu.
7. Stosunek wagowy KA do ekstraktu 2:1 – 28,5 ml oleju sezamowego z dodatkiem 1 ml roztworu kwasu askorbinowego (0,005 g/ml EtOH) oraz 0,5 ml roztworu ekstraktu z zielonej herbaty (0,005 g/ml EtOH).
8. Stosunek wagowy KA do ekstraktu 1:2 – 28,5 ml oleju sezamowego z dodatkiem 0,5 ml roztworu kwasu askorbinowego (0,005 g/ml EtOH) oraz 1 ml roztworu ekstraktu z zielonej herbaty (0,005 g/ml EtOH).

Stosunki wagowe 2:1 i 1:2 ekstraktu do KA zostały wybrane na podstawie wcześniejszych wyników testów TEAC, FRAP i DPPH wodnych roztworów mieszanin ekstraktów z herbat i KA. Próbki przechowywane były w szklanych kolbach stożkowych z zamknięciem na szlif, w temperaturze pokojowej, przy dostępie światła. Pomiary liczby nadtlenkowej, liczby anizydynowej, stężenia skoniugowanych dienów i trienów oraz zawartości tokoferoli zostały wykonane dla próbek nieprzechowywanych oraz po 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 oraz 17 tygodniach.

8.4. Oznaczanie związków fenolowych w badanych ekstraktach metodą HPLC

Zawartość związków fenolowych w badanych ekstraktach została oznaczona za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) z użyciem chromatografu firmy Waters (Milford, MA, USA), na kolumnie Waters Symmetry C18 (150 x 3,9 mm, 5 μ m) z prekolumną Waters μ Bondapack C18. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu (A) i 0,1% (v/v) kwasu trifluorooctowego (B), a jej prędkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Przepływ fazy ruchomej miał charakter gradientowy. Objętość próbki nanoszonej na kolumnę wynosiła, 20 μ l. Detekcji analizowanych związków dokonano przy użyciu detektora PDA (ang. *photodiode-array*) przy długości fali 280 nm (kwas galusowy, katechiny i procyanidyna B2), 310 nm (kwas *p*-kumarowy) lub 320 nm (kwas chlorogenowy i jego pochodne).

W przypadku ekstraktów z herbat zastosowano następujący gradient fazy ruchomej: wzrost liniowy A od 1 do 5% w czasie 0-17 min, następnie wzrost liniowy od 5% do 35% A w ciągu jednej minuty i liniowy wzrost do 50% A w czasie kolejnych 11 minut. Kolumna została przepłukana z użyciem 100% A w czasie 1 minuty, po czym nastąpił powrót do 1% A w ciągu kolejnej minuty i utrzymanie tych warunków przez dodatkowe 9 minut (Enko i Gliszczyńska-Świgło, 2015).

Gradient fazy ruchomej zastosowany przy oznaczaniu związków fenolowych w ekstraktach z zielonej kawy i pestek winogron został opracowany przez dr hab. inż. Annę Gliszczyńską-Świgło, prof. nadzw. UEP i był następujący: wzrost liniowy A od 10% do 20% w czasie 0-20 minut, następnie wzrost liniowy od 20% do 60% A w ciągu kolejnych 10 minut. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,7 ml/min. Następnie zastosowano liniowy wzrost stężenia A do 80% i prędkości fazy ruchomej do 1,0 ml/min w ciągu 2 minut. Powrót do warunków początkowych (10% A): liniowo w ciągu 1 minuty, a następnie utrzymano te warunki przez dodatkowe 9 minut. Przed kolejnym nastrzykiem zmniejszono liniowo prędkość fazy ruchomej do 0,7 ml/min w ciągu 2 minut.

Identyfikacja badanych związków polegała na porównaniu ich czasów retencji oraz widm UV z czasami retencji i widmami UV wzorców. Analiza ilościowa zidentyfikowanych składników została wykonana metodą kalibracji bezwzględnej (wzorca zewnętrznego). Dla każdego ekstraktu przeprowadzono co najmniej trzy niezależne oznaczenia.

8.5. Oznaczanie zawartości tokoferoli metodą HPLC

Zawartość tokoferoli w próbkach oleju z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy oznaczano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) przy użyciu wysokosprawnego chromatografu cieczowego Waters 600 (Waters, Millford, MA, USA). Oznaczenia zostały wykonane w temperaturze pokojowej na kolumnie Waters Symmetry C18 (150 x 3,9 mm, 5 µm) z prekolumną Waters µBondapak C18. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i metanolu w stosunku 1:1, a prędkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Objętość próbki oleju rozpuszczonego w 2-propranolu, nanoszonej na kolumnę wynosiła 10 µl lub, 20 µl. Detekcji analizowanych związków dokonano przy użyciu detektora fluorescencyjnego Waters 474 przy długości fali wzbudzenia 295 nm i długości fali emisji 325 nm. Szerokość szczeliny monochromatora wynosiła 10 nm, wzmocnienie 100, a atenuacja sygnału 1. Identyfikacja tokoferoli polegała na porównaniu

ich czasów retencji z czasami retencji wzorców. Analiza ilościowa α -, (β + γ)- oraz δ -tokoferolu została wykonana metodą kalibracji bezwzględnej (wzorca zewnętrznego) wykorzystując wzorce α -, γ - i δ -tokoferolu (Gliszczyńska-Świgło i Sikorska, 2004). Dla każdego ekstraktu przeprowadzono co najmniej trzy niezależne oznaczenia.

8.6. Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej

Zawartość kwasów tłuszczowych w oleju sezamowym została oznaczona za pomocą chromatografii gazowej (GC) w Katedrze Technologii Żywności Człowieka Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

8.7. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą TEAC z kationorodnikiem ABTS^{•+}

Wartość TEAC (ang. *trolox equivalent antioxidant capacity*) oznaczono według metody opracowanej przez Rice-Evans i Millera (1994) z modyfikacjami wprowadzonymi przez Tyrakowską i in. (1999). Modyfikacja metody polegała na generowaniu kationorodnika ABTS^{•+} za pomocą MP8 zamiast metmioglobiny. Kationorodnik był generowany w buforze PBS (pH 7,4), a reakcja była zapoczątkowana przez dodanie nadtlenu wodoru (Tyrakowska i in. 1999). Roztwór podstawowy buforu PBS przygotowany został przez rozpuszczenie, 20,45 g NaCl, 0,68 g KH₂PO₄, 3,56 g Na₂HPO₄ oraz 0,373 g KCl w 250 ml demineralizowanej wody. Roztwór PBS wykorzystany w badaniach został przygotowany przez 10-krotne rozcieńczenie roztworu podstawowego. Roztwór kationorodnika ABTS^{•+} przygotowany został przez rozpuszczenie 0,0741 g ABTS w 45 ml buforu PBS i dodanie 60 μ l 150 μ M MP8 oraz 120 μ l 50 mM nadtlenu wodoru. Tak przygotowany roztwór inkubowany był w łaźni wodnej w temperaturze 30°C przez 60 minut.

Dla każdego ekstraktu lub mieszaniny przygotowano po sześć różnych stężeń w trzech powtórzeniach. Stężenie ekstraktu, KA lub ich mieszanin w kuwecie pomiarowej stanowiło 1% (v/v) stężenia roztworu podstawowego. Do pomiaru aktywności przeciwutleniającej próbek wykorzystano spektrofotometr UV-VIS Spectronic Genesis 2. Spadek absorbancji roztworu kationorodnika ABTS^{•+}, zmierzony przy 734 nm po 6 minutach, odzwierciedla zdolność próbki do zmiatania kationorodnika ABTS^{•+}. Zależność pomiędzy spadkiem absorbancji a rosnącym stężeniem badanych substancji była liniowa i pozwalała przyjąć, że spadek absorbancji roztworu kationorodnika ABTS^{•+} wynika wyłącznie z reakcji badanych substancji z kationorodnikiem (Tyrakowska i in.

1999). Wartość TEAC została obliczona jako stosunek nachylenia prostej obrazującej zależność między zmianą absorbancji kationorodnika ABTS^{•+} a stężeniem przeciwutleniacza w badanej próbce do nachylenia prostej obrazującej zależność między zmianą absorbancji kationorodnika a stężeniem troloksu wykorzystanego jako wzorzec. Aktywność ekstraktów, KA i ich mieszanin została wyrażona w mmolach troloksu na gram przeciwutleniacza. Wartość TEAC równa jest mmolom troloksu wykazującym taki sam efekt przeciwutleniający, jak gram badanej substancji/mieszaniny. Wynik stanowi średnią arytmetyczną wyników uzyskanych z co najmniej trzech niezależnych oznaczeń.

Zmodyfikowana metoda TEAC pozwala na pomiary aktywności przeciwutleniającej w szerokim zakresie pH. W pracy mierzono wartość TEAC w przedziale 2–9 jednostki pH. Aby uzyskać środowisko reakcji o pożądanej wartości pH, mieszano roztwór kationorodnika ABTS^{•+} z 0,2 M buforami fosforanowymi w stosunku 1:1. Bufory fosforanowe przygotowane zostały poprzez zmieszanie 0,2 M KH₂PO₄ z 4 N HCl (bufory pozwalające osiągnąć pH roztworów ABTS^{•+} w przedziale 2–5,5), 0,2 M KH₂PO₄ z 0,2 M K₂HPO₄ (bufory pozwalające osiągnąć pH roztworów ABTS^{•+} w przedziale 6,5–8), 0,2 M K₂HPO₄ z 0,2 N NaOH (bufory pozwalające osiągnąć pH roztworów ABTS^{•+} około 9). Do przygotowania roztworu roboczego ABTS^{•+} o pH 5,5 wykorzystano 0,2 M roztwór KH₂PO₄, a do przygotowania roztworu o pH 8,5 – 0,2 M K₂HPO₄. Wartości pH buforowanego roztworu kationorodnika ABTS^{•+} mierzono bezpośrednio przed dodaniem próbek badanych przeciwutleniaczy. Prezentowane zależności wartości TEAC od pH stanowią średnią arytmetyczną dwóch niezależnych wyników.

8.8. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą FRAP

Metoda FRAP (*ang. ferric reducing ability of plasma lub ferric reducing antioxidant power*) została wykorzystana zgodnie z opisem podanym przez Benzie'ego i Strain'a (1996) z modyfikacjami wprowadzonymi przez Gliszczyńską-Świąło (2007). Oznaczenie polega na redukcji żelaza (III) w kompleksie TPTZ (2,4,6-tripirydylo-s-tiazyną) do żelaza (II), co powoduje wzrost absorbancji przy długości fali 593 nm, mierzony po upływie 8 minut od momentu zmieszania reagentów. Do pomiaru zdolności redukcji żelaza przez badane próbki wykorzystano spektrofotometr UV-VIS Spectronic Genesis 2. Odczynnik FRAP przygotowany został przez zmieszanie 10 mM roztworu TPTZ w 40 mM kwasie solnym z, 20 mM wodnym roztworem FeCl₃ i buforem octanowym w stosunku 1:1:10. Bufor octanowy (pH 3,4) przygotowany został przez rozpuszczenie 3,1 g

triwodnego octanu sodu i 16 ml lodowatego kwasu octowego w 1 litrze demineralizowanej wody. Dla każdego ekstraktu lub mieszaniny przygotowano po sześć różnych stężeń w trzech powtórzeniach. Stężenie ekstraktu, KA i ich mieszanin w kuwetach pomiarowych stanowiło 1% (v/v) stężenia roztworu podstawowego. Wartość FRAP jest równa stosunkowi nachylenia prostej obrazującej zależność wzrostu absorbancji od stężenia badanych próbek do nachylenia prostej obrazującej zależność zmian absorbancji od stężenia FeSO_4 stanowiącego wzorzec. Wartość FRAP oznacza ilość mmoli żelaza (III) zredukowanego do żelaza (II) przez 1 gram badanej substancji/mieszaniny. Wynik stanowi średnią arytmetyczną wyników uzyskanych z co najmniej trzech oznaczeń.

8.9. Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej metodą z rodnikiem DPPH^{*}

Metoda z rodnikiem DPPH^{*} (Brandt-Williams, Cuvelier i Berset, 1995) wykorzystuje zdolność badanego przeciwutleniacza do zmiatania wolnego rodnika DPPH^{*} (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) w środowisku metanolem. Reakcja badanego przeciwutleniacza z rodnikiem DPPH^{*} mierzona jest poprzez pomiar spadku absorbancji przy długości fali 517 nm po 30 min inkubacji. Do pomiaru aktywności przeciwutleniającej próbek wykorzystano spektrofotometr UV-VIS Spectronic Genesis 2. Roztwór roboczy rodnika DPPH^{*} przygotowano przez rozpuszczenie 0,0016 g rodnika w 40 ml metanolu. Dla każdego ekstraktu lub mieszaniny przygotowano po sześć różnych stężeń w trzech powtórzeniach. Stężenie ekstraktu, KA i ich mieszanin w kuwetach pomiarowych stanowiło 1% (v/v) roztworu podstawowego. Aktywność przeciwutleniająca badanych ekstraktów, KA lub ich mieszanin została wyrażona jako wartość IC_{50} , czyli jako stężenie przeciwutleniacza (w $\mu\text{g/ml}$), które zmniejsza stężenie rodnika o 50%. Wartość IC_{50} obliczono metodą regresji liniowej (Gliszczyńska-Świągło, 2007). Wynik stanowi średnią arytmetyczną wyników uzyskanych z co najmniej trzech oznaczeń.

8.10. Oznaczanie liczby nadtlenkowej

Liczba nadtlenkowa (LN) oleju sezamowego z dodatkiem ekstraktu z zielonej herbaty, KA lub ich mieszanin została oznaczona zgodnie z normą PN-ISO 3960:1996. Próbkę oleju (około 1 g) odważono do kolb stożkowych z dokładnością do 0,001 g, następnie dodawano chloroform (10 ml), lodowaty kwas octowy (15 ml) i jodek potasu (1 ml, roztwór nasycony). Kolbę zamknięto i wytrząsano przez minutę, po czym pozostawiono w ciemności, w temperaturze pokojowej na 5 minut. Po upływie tego czasu dodano 75 ml

demineralizowanej wody oraz kilka kropli 2% roztworu skrobi. Mieszaninę miareczkowano tiosiarczanem sodu (0,002 N lub 0,01 N zależnie od spodziewanej wartości liczby nadtlenkowej). Próbka ślepa była przygotowana identycznie jak próbki do badań, nie zawierała jednak oleju ani jego mieszanin z przeciwutleniaczami. Wyniki wyrażono jako milirównoważniki aktywnego tlenu w kilogramie próbki. Wartość liczby nadtlenkowej (LN) obliczano według wzoru:

$$LN = (V_1 - V_0) \cdot T \cdot 1000/m,$$

w którym:

V_1 – objętość (ml) roztworu tiosiarczanu sodu użytego w oznaczaniu LN próbki właściwej,

V_0 – objętość (ml) roztworu tiosiarczanu sodu użytego w oznaczaniu LN próbki ślepej,

T – normalność użytego roztworu tiosiarczanu sodu,

m – masa (g) próbki analitycznej.

Wynik stanowi średnią arytmetyczną z co najmniej trzech oznaczeń.

8.11. Oznaczanie liczby anizydynowej

Liczba anizydynowa oleju sezamowego z dodatkiem ekstraktu z zielonej herbaty, kwasu askorbinowego lub ich mieszanin została oznaczona zgodnie z normą PN-EN ISO 6885:2008. Próbki oleju (około 1 g) odważano do kolb stożkowych z dokładnością do 0,001 g, a następnie rozpuszczano w izooktanie (25 ml). Odmierzano 5 ml roztworu, przenoszono go do próbki, do której dodano 1 ml odczynnika anizydynowego (roztwór 0,125 g *p*-anizydyny w 50 ml lodowatego kwasu octowego). Probówki zamykano korkiem, mieszano, pozostawiano na 8 minut w ciemności w temperaturze pokojowej, a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 350 nm. W taki sam sposób przygotowano nieprzereagowany roztwór z tym, że zamiast odczynnika anizydynowego dodawano 1 ml lodowatego kwasu octowego. Próbkę ślepa przygotowano przez dodanie 1 ml odczynnika anizydynowego do 5 ml kwasu octowego. Każda próbka została oznaczona w czterech powtórzeniach.

Liczbę anizydynową (LA) próbek wyznaczono za pomocą następującego wzoru:

$$LA = 100 \cdot Q \cdot V \cdot (1,2 \cdot (A_1 - A_2 - A_0)) / m,$$

w którym:

Q – zawartość próbki w zmierzonym roztworze, na podstawie której wyrażana jest liczba anizydynowa, w gramach na mililitr ($Q = 0,01$ g/ml),

V – objętość, w jakiej próbka do badań została rozpuszczona, w mililitrach ($V = 25$ ml),

m – masa próbki analitycznej, w gramach,

A_1 – absorbancja nieprzereagowanego roztworu do badań,

A_2 – absorbancja przereagowanego roztworu do badań,

A_0 – absorbancja próbki ślepej.

8.12. Wskaźnik TOTOX

Na podstawie wartości liczby nadtlenkowej i liczby anizydynowej obliczano wskaźnik TOTOX (całkowity wskaźnik utleniania), według następującego wzoru:

$$TOTOX = 2 \cdot LN + LA.$$

8.13. Oznaczanie wartości K_{232} i K_{268}

Absorbancję w nadfiolecie, wyrażoną jako ekstynkcja właściwa w świetle UV (wartości K_{232} i K_{268}), w próbkach oleju sezamowego z dodatkiem ekstraktu z zielonej herbaty, kwasu askorbinowego lub ich mieszanin oznaczono według normy PN-EN ISO 3656:2002. Wartości K_{232} i K_{268} wskazują na zawartość w próbce odpowiednio skoniugowanych dienów i trienów. Próbkę (około 0,08 g) odważono z dokładnością do 0,0001 g. Odważkę oleju rozpuszczono w 1 ml 2-propanolu. Z roztworu pobrano 10 μ l i przeniesiono do kwarcowej kuwety zawierającej 990 μ l cykloheksanu. Próbkę wymieszano i zmierzono jej absorbancję przy długościach fali 232 nm oraz 268 nm względem cykloheksanu jako odnośnika. Dla każdej próbki wykonano trzy niezależne oznaczenia.

Wartości K_{232} i K_{268} wyznaczano według wzoru:

$$K = A \cdot f / w,$$

w którym:

A – absorbancja przy danej długości fali,

f – współczynnik rozcieńczenia,

w – stężenie próbki w roztworze do badań, w g/100 ml.

8.14. Wyznaczanie stabilności oksydacyjnej emulsji kosmetycznej

Stabilność oksydacyjną emulsji kosmetycznych na bazie oleju żurawinowego oznaczono z wykorzystaniem aparatu do badania stabilności oksydacyjnej RapidOxy. Emulsje olej w wodzie (40/60) przygotowano poprzez zmieszanie 1,6 g oleju żurawinowego oraz 2,12-2,20 g wody, z dodatkiem badanych ekstraktów i KA (0,04 – 0,12 g) oraz stabilizatora Tween, 20 (0,16 g). Tak przygotowaną próbkę (4,00 g) homogenizowano przez 2 minuty. Do oznaczania stabilności oksydacyjnej odważano 3,00 g emulsji, którą umieszczono w teflonowym naczynku. Każdą emulsję badano w temperaturze 70°C pod ciśnieniem 700 kPa. Wynik wyrażono jako czas (w minutach) potrzebny na zużycie 5% początkowej zawartości tlenu obecnego w komorze pomiarowej przez 3 gramy próbki. Ponadto obliczono współczynnik ochronny W_o , który stanowi stosunek czasu uzyskanego przez próbkę z dodatkiem przeciwutleniacza do czasu dla próbki kontrolnej. Wartość W_o powyżej 1 oznacza aktywność przeciwutleniającą, natomiast poniżej 1 – proutleniającą.

Próbki emulsji przygotowywane były bezpośrednio przed pomiarem. Dla każdego typu ekstraktu przygotowano następujące warianty próbek, każdy wariant w co najmniej dwóch powtórzeniach:

1. Próbka kontrolna, niezawierająca przeciwutleniaczy.
2. Próbka zawierająca dodatek 0,08 g kwasu askorbinowego w 4 g emulsji.
3. Próbka zawierająca dodatek 0,04 g kwasu askorbinowego w 4 g emulsji.
4. Próbka zawierająca dodatek 0,08 g ekstraktu w 4 g emulsji.
5. Próbka zawierająca dodatek 0,04 g ekstraktu w 4 g emulsji.
6. Stosunek wagowy KA do ekstraktu 2:1 – próbka zawierająca dodatek 0,08 g kwasu askorbinowego oraz 0,04 g ekstraktu w 4 g emulsji.
7. Stosunek wagowy KA do ekstraktu 1:2 – próbka zawierająca dodatek 0,04 g kwasu askorbinowego oraz 0,08 g ekstraktu w 4 g emulsji.

8.15. Oznaczanie właściwości przeciwbakteryjnych metodą dwukrotnych rozcieńczeń na mikroplytkach

Właściwości przeciwbakteryjne badanych substancji oznaczano poprzez pomiar gęstości optycznej zawiesiny bakteryjnej z dodatkiem ekstraktów, KA i ich mieszanin w różnych stosunkach wagowych przy długości fali 600 nm po 24 godzinach inkubacji w 37°C. Pomiaru gęstości optycznej dokonano za pomocą spektrofotometru mikroplytkowego.

Roztwory podstawowe ekstraktów, KA i ich mieszanin przygotowywane były w stężeniach 0,02 g/ml, 0,002 g/ml, 0,0004 g/ml (dla *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*) oraz 0,00004 g/ml (dla *Staphylococcus aureus*), a następnie dodawane do zawiesiny bakteryjnej w 96-dołkowej mikroplytce w rozcieńczeniach 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,0125%, 0,00625% oraz 0,003125% (v/v). Zmierzono również gęstość optyczną samej pożywki oraz zawiesiny bakteryjnej w pożywce bez dodatku substancji badanych. Ponadto, zmierzono absorbancję przy 600 nm roztworów badanych ekstraktów o takich samych stężeniach, jakie zastosowano w plytkach z badanymi mikroorganizmami. Każda mikroplytka przygotowana została w dwóch powtórzeniach.

Do badań użyto czterech mikroorganizmów: *Escherichia coli* (nr katalogowy: ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (nr katalogowy: ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (nr katalogowy: ATCC 6538) oraz *Candida albicans* (nr katalogowy: ATCC 10231). Mikroorganizmy pochodziły ze zbiorów Pracowni Biochemii i Mikrobiologii Katedry Przyrodniczych Podstaw Jakości Wydziału Towaroznawstwa Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. Zawiesina drobnoustrojów przygotowywana była na pożywce Müllera-Hintona. Gęstość optyczna przygotowanej zawiesiny wynosiła 0,6 w skali McFarlanda.

9. Analiza interakcji

9.1. Metoda izobologramów i współczynniki interakcji

Metoda izobologramów jest szeroko wykorzystywana w biochemii i farmacji do określania interakcji pomiędzy składnikami mieszanin. Izobologram pozwala na graficzne przedstawienie interakcji pomiędzy dwoma składnikami. Obliczenie

współczynników interakcji jest komplementarne do izobogramu. Metoda ta pozwala na wiarygodne określenie interakcji (synergizmu lub antagonizmu) również wtedy, gdy zależność dawka-efekt jest nieliniowa, podczas gdy sumowanie indywidualnych efektów i porównywanie ich z efektem działania mieszaniny jest możliwe do zastosowania wyłącznie w przypadku zależności liniowych (Berenbaum, 1977; Tallarida, 2006).

Stężenia lub dawki składników mieszaniny są oznaczane na osiach izobogramu. Punkty przecięcia z osiami reprezentują stężenia lub dawki czystych substancji A i B wykazujących określony dla izobogramu efekt (wybrany arbitralnie, np. dawka dająca 50% maksymalnego efektu). Linia łącząca te dwa punkty, zwana izobolą, reprezentuje teoretyczne pary dawek lub stężeń substancji A i B łącznie dające wybrany efekt. Punkty z pomiaru aktywności mieszanin o różnej zawartości substancji A i B, dających wybrany efekt, są nanoszone na izobogram. W przypadku zależności addytywnej, punkty te układają się na izoboli. W przypadku antagonizmu, układają się powyżej, gdyż potrzebne są większe dawki/stężenia, by uzyskać ten sam efekt. W przypadku synergizmu jest odwrotnie, potrzeba mniejszych dawek/stężeń, a punkty układają się poniżej izoboli (Tallarida, 2006).

Wartość IC_{50} oznacza stężenie przeciwutleniacza potrzebne do unieczynnienia 50% rodnika DPPH^{*}, stąd cząstkowe wartości IC_{50} mogą być bezpośrednio oznaczone na osiach izobogramu jako cząstkowe stężenia dwóch badanych substancji. W przypadku wartości TEAC i FRAP konieczne jest obliczenie ich odwrotności. Odwrotne wartości TEAC i FRAP pokazują stężenie badanych przeciwutleniaczy wykazujące efekt równy efektowi 1 mmola troloksu, bądź stężenia przeciwutleniaczy redukujące 1 mmol żelaza (III) do żelaza (II) – są to wybrane efekty, dla których skonstruowane zostały izobogramy odnoszące się odpowiednio do wartości TEAC i FRAP.

Obliczone współczynniki interakcji pozwalają na dokładniejsze określenie obserwowanych interakcji. Współczynnik interakcji równy 1 oznacza, że zależność między składnikami mieszaniny jest addytywna. W przypadku antagonizmu współczynnik jest większy niż 1, w przypadku synergizmu, mniejszy od 1 (Frum i in., 2007; Tallarida, 2006). W pracy przyjęto, że współczynniki niższe niż 0,9 oznaczają synergizm, a wyższe od 1,1 – antagonizm (za: Santiesteban-Lopez, Palou, Lopez i Malo, 2007). Dodatkowo, za pomocą nieparametrycznego testu Manna-Whitneya, sprawdzono istotność różnic między teoretycznie obliczonymi dawkami oraz dawkami, dla których wykonano pomiary.

Współczynniki interakcji (I) obliczono w następujący sposób:

$$I = S_A + S_B,$$

w którym:

S_A – stosunek stężenia substancji A w mieszaninie do stężenia substancji A dającej ten sam efekt co cała mieszanina,

S_B – stosunek stężenia substancji B w mieszaninie do stężenia substancji B dającej ten sam efekt co cała mieszanina (Tallarida, 2006).

9.2. Analiza interakcji ekstraktów i kwasu askorbinowego przez sumowanie indywidualnych efektów

W przypadku badań dotyczących ochrony olejów przed utlenianiem (oznaczenie liczby nadtlenkowej oraz wartości K_{232} i K_{268}) oraz stabilności oksydacyjnej emulsji kosmetycznych, rodzaj interakcji pomiędzy badanymi substancjami określono za pomocą sumowania indywidualnych efektów. Przyjęto, że zależność między stężeniem przeciwutleniacza a obserwowanym efektem jest liniowa. Metodę sumowania indywidualnych efektów zastosowano z uwagi na związaną z użytymi metodami pomiaru trudność w określeniu dawek przeciwutleniaczy dających określony z góry poziom efektu, czego wymagałaby metoda izobologramów.

Obliczono teoretyczne (na podstawie próbek zawierających wyłącznie KA lub wyłącznie ekstrakt) i zmierzone (dla próbek zawierających zarówno KA, jak i ekstrakt) stopnie hamowania utleniania oleju w odniesieniu do próbki kontrolnej (nie zawierającej przeciwutleniaczy) na podstawie pomiaru liczby nadtlenkowej, wartości K_{232} i K_{268} oraz stabilności emulsji kosmetycznych.

Na podstawie teoretycznych (TSH) i mierzonych (MSH) stopni hamowania możliwe było określenie czy dodane do oleju lub emulsji substancje wykazują synergizm, antagonizm czy efekt addytywny. Synergizm lub antagonizm obserwować można zarówno w odniesieniu do przeciwutleniającego, jak i proutleniającego działania ekstraktów, KA i ich mieszanin. O przeciwutleniającym działaniu mówić można w przypadku, gdy utlenienie zachodzi wolniej w próbce z dodatkiem danej substancji niż w próbce kontrolnej.

Im wyższe wyniki liczby nadtlenkowej oraz wartości K_{232} i K_{268} , tym słabsze hamowanie utleniania w danej próbce. Mierzony stopień hamowania (MSH) dla pomiarów liczby nadtlenkowej, wartości K_{232} i K_{268} , obliczano według wzoru:

$$\text{MSH} = 100\% - [(\text{wynik próbki}/\text{wynik próbki kontrolnej}) \cdot 100\%]$$

Teoretyczny stopień hamowania (TSH) dla próbek zawierających mieszaninę ekstraktu i KA obliczano sumując MSH odpowiednich próbek z dodatkiem pojedynczych przeciwutleniaczy.

W przypadku pomiarów stabilności oksydacyjnej emulsji, miarą stabilności jest czas potrzebny do zużycia przez próbkę 5% tlenu w komorze pomiarowej, a więc wyższy wynik oznacza silniejsze hamowanie utleniania. Stopień hamowania utleniania emulsji obliczano według wzoru:

$$\text{MSH} = [(\text{wynik próbki}/\text{wynik próbki kontrolnej}) \cdot 100\%] - 100\%$$

Dodatni znak wartości MSH i TSH wskazuje na przeciwutleniające działanie ekstraktów i KA, podczas gdy znak ujemny wskazuje na działanie proutleniające (utlenianie oleju w próbce badanej zachodzi szybciej niż w próbce kontrolnej). MSH i TSH mogą również różnić się znakami, np. gdy pomiar wskazuje na proutleniające właściwości mieszaniny (ujemny MSH) wbrew przewidywanym przeciwutleniającym właściwościom (dodatni TSH).

W przypadku dodatnich MSH i TSH danej próbki (działanie przeciwutleniające):

- TSH większy niż MSH oznacza silniejsze przewidywane hamowanie utleniania niż mierzone, a więc antagonizm w odniesieniu do działania przeciwutleniającego;
- TSH mniejszy niż MSH oznacza słabsze przewidywane hamowanie utleniania niż mierzone, a więc synergizm w odniesieniu do działania przeciwutleniającego.

W przypadku ujemnych MSH i TSH (działanie proutleniające):

- TSH większy niż MSH (np. TSH = -1 i MSH = -2) oznacza słabsze przewidywane utlenianie niż mierzone, a więc synergizm w odniesieniu do działania prooksydacyjnego;

- TSH mniejszy niż MSH oznacza silniejsze przewidywane utlenianie niż mierzone, a więc antagonizm w odniesieniu do działania prooksydacyjnego.

Brak znaczących różnic między MSH i TSH wskazywał na addytywność.

10. Analiza statystyczna wyników

Istotność różnic pomiędzy właściwościami przeciwutleniającymi mieszanin badanych przeciwutleniaczy o różnych stosunkach wagowych określono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z planowanymi kontrastami. Za pomocą nieparametrycznego testu Manna-Whitneya stwierdzono istotność różnic pomiędzy teoretycznie obliczonymi dawkami/stężeniami oraz dawkami/stężeniami, dla których wykonano pomiary. Różnice na poziomie $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotne.

W celu sprawdzenia jednostronnej korelacji pomiędzy zawartością związków polifenolowych i wartościami TEAC, FRAP i DPPH badanych ekstraktów obliczono współczynniki korelacji liniowej Pearsona.

Obliczenia wykonano za pomocą pakietu statystycznego IBM SPSS Statistics 20 oraz pakietu statystycznego R.

11. Wyniki badań i ich dyskusja

11.1. Zawartość związków polifenolowych w badanych ekstraktach

W celu powiązania typu interakcji między ekstraktami z różnych herbat, zielonej kawy i pestek winogron z ich składem polifenolowym, oznaczono w nich zawartość głównych polifenoli. Należy wziąć pod uwagę, że zawartość polifenoli w dużej mierze zależy od rodzaju rośliny, czy marki herbaty lub kawy. Dwie różne próbki herbat lub kaw tego samego typu, np. zielonych, mogą wykazywać odmienny skład polifenolowy, zależnie od warunków uprawy, wieku rośliny i innych czynników (Graham, 1992; Henning i in., 2003; Jeszka-Skowron, Sentkowska, Pyrzyńska i Paz De Peña, 2016). Ta sama roślina w różnych okresach zbioru będzie również wykazywać różnice w ilości tych związków (Graham, 1992). Wykonanie oznaczenia składu związków polifenolowych danego ekstraktu było konieczne, by móc wyciągać wstępne wnioski na temat udziału poszczególnych związków w interakcjach z innymi przeciwutleniaczami.

Tabela 1 przedstawia zawartość kwasu galusowego oraz katechin w badanych ekstraktach z herbat, oznaczoną metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Zgodnie z przewidywaniami, stwierdzono znaczne różnice w składzie i zawartości polifenoli pomiędzy różnymi rodzajami herbat, a także pomiędzy dwoma ekstraktami z zielonej herbaty. Zawartość wszystkich oznaczonych związków polifenolowych mieściła się w zakresie od $41,6 \pm 1,9$ mg/g dla ekstraktu z czarnej herbaty do $283,0 \pm 10,7$ mg/g dla niestandardyzowanego ekstraktu z zielonej herbaty. Są to wyniki zbliżone do wyników ogólnej zawartości polifenoli w herbatach zielonych i czarnych oznaczonych metodą HPLC opublikowanych w literaturze (Almajano i in., 2008; Budryn, Żyzelewicz, Nebesny, Oracz i Krysiak, 2013; Cadiz-Gurrea, Fernandez-Arroyo i Segura-Carretero, 2014; Chen, Zhang, Lu i Qu, 2012; Gadow, Joubert i Hansmann, 1997; Graham, 1992; Muzolf-Panek, 2009). Największe ilości zidentyfikowanych katechin stwierdzono w ekstraktach z zielonej herbaty, najmniej – w ekstrakcie z czarnej herbaty. Czarna herbata zawiera znacznie mniej wolnych katechin niż herbata zielona, jej podstawowymi związkami polifenolowymi są teaflawiny i tearubiginy będące produktami kondensacji katechin (Graham, 1992). Teaflawiny i tearubiginy nie były oznaczane w niniejszej pracy.

Wpływ na ilość poszczególnych katechin w ekstrakcie ma nie tylko rodzaj herbaty, pochodzenie i inne czynniki związane z samym surowcem, ale również sposób ekstrakcji

związków polifenolowych. Im wyższa temperatura, w której prowadzona jest ekstrakcja tym większa zawartość katechin w ekstrakcie (Horzić, i in., 2009). Z badań Gramzy, Pawlak-Lemańskiej, Korczaka, Wąsowicz i Rudzinskiej (2005) wynika, że ekstrakcja za pomocą etanolu jest dwukrotnie wydajniejsza niż za pomocą wody. Ekstrakt z zielonej herbaty po ekstrakcji alkoholem zawierał ponad 800 mg katechin w gramie ekstraktu, podczas gdy ekstrahowany wodą zawierał mniej niż 400 mg/g ekstraktu. W przypadku czarnej herbaty, zawartość katechin wynosiła odpowiednio 600 mg/g ekstraktu i 300 mg/g ekstraktu. Oznaczenie zawartości polifenoli wykonano metodą HPLC.

Tabela 1. Zawartość kwasu galusowego oraz katechin (mg/g ekstraktu) w wodnych ekstraktach z herbat

	Zawartość polifenoli (mg/g)				
	z zielonej herbaty	z czerwonej herbaty	z czarnej herbaty	z białej herbaty	z zielonej herbaty (standaryzowany)
GA	1,4±0,1	37,2±0,5	4,6±0,2	5,0±0,2	2,8±0,0
GC	11,5±0,6	5,1±0,1	n.w.	n.w.	7,7±0,1
EGC	67,6±1,6	8,6±0,3	16,6±0,9	42,5±2,9	55,4±3,2
C	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
EC	32,0±1,3	3,4±0,1	4,2±0,2	6,4±0,3	15,8±0,8
EGCG	90,1±3,6	0,3±0,0	7,1±0,2	47,1±1,9	136,9±5,3
GCG	9,0±0,4	n.w.	0,7±0,0	0,8±0,1	9,8±0,2
ECG	71,5±3,1	n.w.	8,4±0,6	9,7±0,1	30,7±1,1
Suma katechin	283,0±10,7 ¹	54,6±0,3	43,1±1,9 ¹	111,5±5,3	259,1±9,8
oraz kwasu galusowego					

n.w. – nie wykryto

¹Źródło: na podstawie Enko i Gliszczyńska-Świgło (2015)

W wodnych ekstraktach z zielonej herbaty, badanych przez Budryn i in. (2013), zawartość polifenoli oznaczona metodą HPLC wynosiła 41% (410 mg/g), a zatem kształtowała się na wyższym poziomie, niż w badaniach własnych prezentowanych w niniejszej pracy. Rozbieżności mogą wynikać zarówno z właściwości samych herbat, jak i ze sposobu przygotowywania ekstraktu, tzn. czasu i temperatury ekstrakcji. W innych badaniach, całkowita zawartość polifenoli (w przeliczeniu na kwas galusowy (GA)

oznaczona metodą Folina-Ciocalteu, w wodnym ekstrakcie z zielonej herbaty wynosiła 34,9% (349 mg GA/g rozpuszczalnych substancji stałych), oolong 24,9% (249 mg GA/g rozpuszczalnych substancji stałych), a w ekstrakcie z herbaty czarnej 33,9% (339 mg GA/g rozpuszczalnych substancji stałych) (Gadow i in. 1997).

W badaniach Chena i in. (2012), całkowita zawartość polifenoli mierzona metodą kolorymetryczną w ekstrakcie z zielonej herbaty wynosiła 381,1 mg GA/g, a w ekstrakcie z herbaty czarnej – 300,1 mg GA/g ekstraktu. Gramza-Michałowska, Korczak i Hęś (2007) porównywali zawartość polifenoli w ekstraktach z herbaty zielonej oczyszczonych różnymi metodami w celu otrzymania preparatu bez charakterystycznego smaku, zapachu czy koloru. Ekstrakt oczyszczony za pomocą węgla aktywnego zawierał polifenole w ilości $422 \pm 0,01$ mg GA/g ekstraktu, oczyszczony za pomocą ziemi bielącej $442 \pm 0,01$ mg GA/g ekstraktu, oczyszczony za pomocą mieszaniny rozpuszczalników zawierającej heksan $357 \pm 0,01$ mg GA/g ekstraktu, za pomocą mieszaniny rozpuszczalników bez heksanu $377 \pm 0,01$ mg GA/g ekstraktu, natomiast ekstrakt nieoczyszczony zawierał $837 \pm 6,03$ mg polifenoli w gramie ekstraktu. Również w przypadku naparów z herbat obserwuje się różnice pod względem zawartości polifenoli. Przykładowo, całkowita zawartość polifenoli w badaniach Almajano i in. (2008), oznaczona metodą z odczynnikiem Folina-Ciocalteu wynosiła: w naparach z czarnej herbaty 1844 ± 16 mg GA w litrze naparu, z czerwonej – 825 ± 117 mg GA/l, z zielonej – 2083 ± 51 mg GA/l, natomiast z białej – 2180 ± 162 mg GA/l naparu. W innych badaniach, całkowita zawartość polifenoli w naparze z zielonej herbaty wynosiła, podobnie jak w badaniach Almajano i in. (2008), 835 ± 50 mg GA/l naparu (Cadiz-Gurrea i in., 2014).

Kolorymetryczna metoda z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu, mimo że budzi wiele zastrzeżeń, jest powszechnie stosowana do oznaczania ogólnej zawartości związków fenolowych. Wyniki oznaczeń tą metodą są zwykle zawyżone w porównaniu z wynikami uzyskiwanymi metodami chromatografii cieczowej, gdyż odczynnik Folina-Ciocalteu reaguje nie tylko z fenolami, ale także z innymi związkami redukującymi takimi jak: cukrowce, aminokwasy i kwas askorbinowy.

Skład polifenoli oznaczony w niniejszej pracy był różny dla różnych ekstraktów (Tabela 1). W przypadku obu ekstraktów z zielonej herbaty dominowały EGCG i EGC oraz ECG, przy czym zawartość EGCG była wyższa w ekstrakcie standaryzowanym. Całkowita ilość polifenoli, oznaczona metodą HPLC, była jednak nieco wyższa w ekstrakcie

niestandardyzowanym. Dane literaturowe potwierdzają, że katechiny obecne w największej ilości w naparach i ekstraktach z zielonej herbaty to: EGCG, EGC, ECG i EC (Horzić i in., 2009; Muzolf-Panek, 2009; Seeram i in., 2006; Wei i in., 2012; Zuo i in., 2002). Ekstrakty z zielonej herbaty wykorzystane w badaniach przez Muzolf-Panek (2009) zawierały w największej ilości EGCG (od $62,1 \pm 1,9$ do $128,5 \pm 6,2$ mg/g ekstraktu), następnie EGC (od $50,4 \pm 1,7$ do $122,2 \pm 4,5$ mg/g ekstraktu), ECG (od $17,2 \pm 0,2$ do $63,1 \pm 1,9$ mg/g ekstraktu), EC (od $15,8 \pm 0,3$ do $44,5 \pm 0,6$ mg/g ekstraktu), GC (od $4,4 \pm 0,0$ do $18,7 \pm 0,4$ mg/g ekstraktu), GCG (od $1,2 \pm 0,1$ do $7,6 \pm 0,3$ mg/g ekstraktu) i C (od 0 do $24,2 \pm 0,6$ mg/g ekstraktu), natomiast suma katechin wynosiła od $153,9 \pm 4,6$ do $346,1 \pm 2,9$ mg/g ekstraktu.

W ekstrakcie z białej herbaty, badanym w niniejszej pracy, dominował EGCG, jednak jego zawartość była o około połowę niższa ($47,1 \pm 1,9$ mg/g) niż w ekstraktach z zielonych herbat. Zawartość EGC w tym ekstrakcie ($42,5 \pm 2,9$ mg/g) była zbliżona do zawartości tego związku w ekstraktach z zielonej herbaty. ECG występował w ilości $9,7 \pm 0,1$ mg/g, kilkukrotnie mniejszej niż w ekstraktach z herbat zielonych. Według danych literaturowych biała herbata może zawierać wielokrotnie mniej katechin niż herbata zielona, a dominującą katechiną jest EGCG (Horzić i in., 2009).

Ekstrakt z czerwonej herbaty zawierał EGCG w minimalnej ilości (0,3 mg/g) i nie zawierał C, GCG oraz ECG, zawierał natomiast wielokrotnie więcej GA ($37,2 \pm 0,5$ mg/g ekstraktu) niż pozostałe ekstrakty (1,4 – 5,0 mg/g ekstraktu). W badaniach Zuo i in. (2002), herbata czerwona (pu-erh) zawierała pięciokrotnie mniej katechin (12,78 mg/g ekstraktu) niż w obecnych badaniach. Podobnie jednak jak w obecnych oznaczeniach, czerwona herbata zawierała najwięcej GA spośród wszystkich rodzajów badanych herbat (Zuo i in., 2002).

Ekstrakt z czarnej herbaty zawierał niewiele EGCG ($7,1 \pm 0,2$ mg/g), dominującymi katechinami, chociaż również występującymi w niewielkich ilościach, były EGC ($16,6 \pm 0,9$ mg/g) i ECG ($8,4 \pm 0,6$ mg/g). Dane literaturowe wskazują jednak, że czarna herbata może zawierać znaczne ilości EGCG, choć mniejsze niż w przypadku herbat zielonych (Horzić i in., 2009). Zawiera również znaczne ilości tearubigin i teaflawin (Graham 1992; Rechner i in., 2002; Zuo i in., 2002).

Według danych literaturowych, aktywność przeciwutleniająca EGCG oraz ECG, mierzona w testach TEAC i DPPH, jest najwyższa spośród katechin (Nanjo i in. 1996; Rice-Evans i in., 1996; Muzolf, Szymusiak i in. 2008; Muzolf-Panek i in., 2012). Można zatem przypuszczać, że ekstrakty zawierające najwięcej tych związków również będą wykazywały najlepsze właściwości przeciwutleniające.

Ekstrakt z zielonej kawy (Tabela 2) zawierał przede wszystkim kwas chlorogenowy ($110,3 \pm 2,3$ mg/g ekstraktu), a w mniejszych ilościach jego pochodne ($48,4 \pm 1,5$ mg/g ekstraktu) oraz izomer kwasu chlorogenowego – kwas neochlorogenowy ($17,7 \pm 0,4$ mg/g ekstraktu). Całkowita zawartość oznaczonych polifenoli w ekstrakcie z zielonej kawy wynosiła $176,3 \pm 4,2$ mg/g ekstraktu.

Tabela 2. Zawartość kwasów chlorogenowych w wodnym ekstrakcie z zielonej kawy (mg/g ekstraktu)

Związek	Zawartość (mg/g)
Kwas chlorogenowy	110,3±2,3
Kwas neochlorogenowy	17,7±0,4
Pochodne kwasu chlorogenowego	48,4±1,5
Suma kwasów chlorogenowych	176,3±4,2

W badaniach Jeszki-Skowron, Sentkowskiej, Pyrzyńskiej i Paz De Peña (2016) zawartość kwasów chlorogenowych w ekstraktach z zielonych kaw była podobna jak w obecnym badaniu. Ekstrakty z zielonej kawy odmiany Robusta zawierały kwasy chlorogenowe w ilości 159-221 mg/g ekstraktu, natomiast z kawy Arabica – 132-160 mg/g ekstraktu (zawartość oznaczona metodą HPLC) (Jeszka-Skowron i in., 2016). W badaniach Budryn i Nebesny (2013), ekstrakt z ziaren zielonej kawy zawierał 30% (300 mg/g) polifenoli. W kolejnych badaniach Budryn i in. (2013), zawartość polifenoli w ekstrakcie z zielonej kawy wynosiła 41% (410 mg/g) (oznaczenie wykonano techniką ultrasprawną chromatografię cieczową).

Ekstrakt z pestek winogron (Tabela 3) zawierał przede wszystkim C ($37,6 \pm 0,8$ mg/g ekstraktu), EC ($23,5 \pm 0,6$ mg/g ekstraktu) oraz EGC ($24,5 \pm 0,1$ mg/g ekstraktu). Zawierał również niewielką ilość procyjanidyny B1 ($5,6 \pm 0,1$ mg/g ekstraktu). Całkowita zawartość

katechin i procyjanidyn wynosiła około 10% masy ekstraktu i była porównywalna z zawartością katechin w ekstrakcie z herbaty białej.

Dane literaturowe wskazują, że zawartość poszczególnych przeciwutleniaczy w ekstraktach z pestek winogron może znacząco się różnić. W badaniach Grases i in. (2015) zawartość katechin w ekstrakcie handlowym wynosiła 17,46 mg/100 mg ekstraktu (17,5%; 174,6 mg/g ekstraktu). W badaniach Wenkui, Fong, Singletary i Ftzloff (2002), zawartość (+)-C kształtowała się na poziomie 4,48% (44,8 mg/g ekstraktu), EC 3,08% (30,8 mg/g ekstraktu), natomiast ECG – 0,63% (6,3 mg/g ekstraktu). W badaniach Hajati i in. (2014) zawartość katechin i procyjanidyn łącznie wynosiła około 4500 mg w 100 g suchej masy ekstraktu (4,5%; 45 mg/g ekstraktu). Procyjanidyny stanowiły około 2% suchej masy ekstraktu (Hajati i in., 2014).

Tabela 3. Zawartość kwasu galusowego, katechin i procyjanidyny B1 (mg/g ekstraktu) w wodnym ekstrakcie z pestek winogron

Związek	Zawartość (mg/g)
GA	2,0±0,02
GC	2,7±0,03
EGC	24,5±0,01
C	37,6±0,8
EC	23,5±0,6
EGCG	0,5±0,02
GCG	6,7±0,1
ECG	n.w.
Procyjanidyna B1	5,6±0,1
Suma wszystkich związków	103,1±1,4

n.w. – nie wykryto

Jak wspomniano wcześniej, aktywność przeciwutleniająca zależy również od właściwości środowiska i rodzaju wolnych rodników, z jakimi reagują przeciwutleniacze. W kolejnych częściach pracy zostaną omówione wyniki pomiarów aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów w różnych środowiskach, a także ich działanie przeciwutleniające w mieszaninie z KA.

11.2. Właściwości przeciwutleniające badanych ekstraktów, kwasu askorbinowego i ich mieszanin

Proporcje ekstraktów z roślin do KA w produktach spożywczych, np. napojach bezalkoholowych, słodyczach i suplementach diety mogą się wahać od 1:4 do 20:1. W przemyśle kosmetycznym producenci rekomendują stosowanie ekstraktów roślinnych i KA w znacznie większych stężeniach niż w przemyśle spożywczym. Zawartości ekstraktów roślinnych i KA w kosmetykach wynoszą odpowiednio 1-5% i 5-15%, a zatem proporcje ekstraktów do KA mogą wahać się od 1:1 do 1:15. W niniejszej pracy przygotowano mieszaniny ekstraktów z KA w proporcjach 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 celem prześledzenia wpływu proporcji składników na aktywność przeciwutleniającą mieszaniny. Tabele 4-6. przedstawiają wartości TEAC, FRAP oraz DPPH (IC₅₀) zmierzone dla KA, ekstraktów z zielonej, czarnej, czerwonej i białej herbaty oraz ekstraktów z winogron i zielonej kawy.

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów jest zależna od zawartości w nich polifenoli. Dane literaturowe w tym zakresie odnoszą się głównie do herbat zielonych. Aktywność przeciwutleniająca wodnego ekstraktu z zielonej herbaty, mierzona w teście TEAC, może wahać się od 1,27 do 12,62 mmol troloksu/g ekstraktu (Cadiz-Guerra i in., 2014; Gliszczyńska-Świgło, 2010b; Seeram i in., 2006). Fermentacja liści herbaty skutkuje obniżeniem całkowitej zawartości polifenoli i obniżeniem aktywności przeciwutleniającej, stąd ekstrakty z czarnej herbaty są zwykle mniej skutecznymi przeciwutleniaczami niż z zielonej (Mello, Alves, Macedo i Kubota, 2005). Są jednak dane literaturowe wskazujące, że ekstrakty z czarnej herbaty, mimo niższej zawartości katechin, mogą mieć wyższą aktywność przeciwutleniającą niż ekstrakty z zielonej herbaty (Kim, Kang i Kang, 2007), prawdopodobnie ze względu na zawartość dodatkowych substancji, np. tanin (Gramza i in., 2005). W odniesieniu do pozostałych typów herbat, dane literaturowe są skąpe. Napary z herbaty białej mogą osiągać niższy lub podobny wynik w teście TEAC, jak napary z herbaty zielonej. Czerwona herbata charakteryzuje się z kolei słabszą aktywnością przeciwutleniającą niż pozostałe rodzaje herbat. W badaniach porównujących aktywność przeciwutleniającą różnych herbat w teście TEAC dla herbaty zielonej uzyskano wynik 1772 ± 321 $\mu\text{mola troloksu/g}$ ($1,77 \pm 0,32$ mmol/g), dla czarnej herbaty 1328 ± 209 $\mu\text{mola troloksu/g}$ ($1,33 \pm 0,21$ mg/g), dla białej herbaty 1742 ± 332 $\mu\text{mola troloksu/g}$ ($1,74 \pm 0,33$ mmol/g), natomiast dla herbaty pu-erh 494 ± 116 $\mu\text{mola troloksu/g}$ ($0,49 \pm 0,12$ mmol/g) (Rusaczonek, Świdorski i Waszkiewicz-Robak, 2010).

Tabela 4. Właściwości przeciwutleniające ekstraktów (E) oraz ich mieszanin z kwasem askorbinowym (KA) w różnych stosunkach wagowych w teście TEAC

Stosunek wagowy (E:KA)	TEAC (mmol/g)						
	Herbata zielona (ekstrakt niestandardyzowany) ¹	Herbata zielona (ekstrakt standardyzowany)	Herbata biała	Herbata czerwona	Herbata czarna ¹	Kawa zielona	Pestki winogron (ekstrakt standardyzowany)
E	4,18 ± 0,08	2,96 ± 0,29	1,77 ± 0,13 ^a	2,38 ± 0,22	1,71 ± 0,06	1,04 ± 0,09	4,11 ± 0,19
10:1	4,18 ± 0,24 ^a	3,06 ± 0,11 ^a	2,13 ± 0,16	2,43 ± 0,22 ^a	2,13 ± 0,29 ^a	1,24 ± 0,14 ^a	4,25 ± 0,12 ^a
5:1	4,34 ± 0,39 ^a	3,78 ± 0,23	2,36 ± 0,19	2,73 ± 0,23 ^a	2,53 ± 0,13	1,74 ± 0,13	4,33 ± 0,24 ^a
2:1	4,47 ± 0,36 ^a	4,00 ± 0,28	3,05 ± 0,35	3,12 ± 0,27	3,14 ± 0,12	2,34 ± 0,10	4,39 ± 0,40 ^a
1:1	4,80 ± 0,31 ^a	4,17 ± 0,14	3,46 ± 0,11	3,94 ± 0,13	3,79 ± 0,19	3,02 ± 0,19	4,73 ± 0,09
1:2	5,11 ± 0,19	4,63 ± 0,07	4,22 ± 0,05	4,19 ± 0,09	4,16 ± 0,17	3,82 ± 0,09	4,82 ± 0,07
1:5	5,55 ± 0,24 ^b	4,83 ± 0,21	4,74 ± 0,07	4,88 ± 0,24	5,09 ± 0,25	4,79 ± 0,08	5,51 ± 0,17 ^b
1:10	5,75 ± 0,08 ^b	5,17 ± 0,10	5,16 ± 0,30	5,14 ± 0,23	5,53 ± 0,30 ^b	5,32 ± 0,06	5,76 ± 0,21 ^b
KA	5,74 ± 0,13						

^a nie różni się istotnie w porównaniu do ekstraktu; ^b nie różni się istotnie w porównaniu do KA ($p < 0.05$)

¹Źródło: na podstawie Enko i Gliszczyńska-Świągło (2015)

Tabela 5. Właściwości przeciwutleniające ekstraktów (E) oraz ich mieszanin z kwasem askorbinowym (KA) w różnych stosunkach wagowych w teście FRAP

Stosunek wagowy (E:KA)	FRAP (mmol/g)						
	Herbata zielona (ekstrakt niestandardyzowany) ¹	Herbata zielona (ekstrakt standaryzowany)	Herbata biała	Herbata czerwona	Herbata czarna ¹	Kawa zielona	Pestki winogron (ekstrakt standaryzowany)
E	5,29 ± 0,27	3,68 ± 0,24	2,18 ± 0,30	2,52 ± 0,28	2,14 ± 0,16	1,80 ± 0,22	4,65 ± 0,18
10:1	5,21 ± 0,16 ^a	3,70 ± 0,21 ^a	2,38 ± 0,23 ^a	3,06 ± 0,13	2,43 ± 0,20 ^a	2,29 ± 0,20	4,99 ± 0,18 ^a
5:1	5,39 ± 0,38 ^a	4,23 ± 0,11 ^a	2,88 ± 0,14	4,16 ± 0,23	2,88 ± 0,33	3,17 ± 0,29	5,06 ± 0,36 ^a
2:1	5,75 ± 0,16 ^a	5,55 ± 0,13	4,63 ± 0,08	4,86 ± 0,28	4,46 ± 0,34	4,16 ± 0,14	6,14 ± 0,19
1:1	6,93 ± 0,35	7,19 ± 0,39	5,84 ± 0,10	6,37 ± 0,19	5,80 ± 0,24	5,56 ± 0,30	7,54 ± 0,33
1:2	8,35 ± 0,15	7,46 ± 0,50	7,32 ± 0,12	7,35 ± 0,15	7,09 ± 0,20	7,47 ± 0,06	7,80 ± 0,34
1:5	9,42 ± 0,28	8,51 ± 0,53	8,56 ± 0,06	8,83 ± 0,26	8,64 ± 0,22	8,21 ± 0,18	9,08 ± 0,97
1:10	10,40 ± 0,44 ^b	9,67 ± 0,30	9,50 ± 0,21	10,69 ± 0,18 ^b	9,56 ± 0,09	10,69 ± 0,22 ^b	10,14 ± 0,28 ^b
KA	10,69 ± 0,35						

^a nie różni się istotnie w porównaniu do ekstraktu; ^b nie różni się istotnie w porównaniu do KA ($p < 0.05$)

¹Źródło: na podstawie Enko i Gliszczyńska-Świąło (2015)

Tabela 6. Właściwości przeciwutleniające ekstraktów (E) oraz ich mieszanin z kwasem askorbinowym (KA) w różnych stosunkach wagowych w teście DPPH (IC₅₀)

Stosunek wagowy (E:KA)	DPPH (IC ₅₀) (µg/ml)						
	Herbata zielona (ekstrakt niestandardyzowany) ¹	Herbata zielona (ekstrakt standardyzowany)	Herbata biała	Herbata czerwona	Herbata czarna ¹	Kawa zielona	Pestki winogron (ekstrakt standardyzowany)
E	6,50 ± 0,34	8,99 ± 0,85	11,97 ± 1,07	12,46 ± 0,05	13,59 ± 0,58	20,81 ± 3,56	6,69 ± 0,29
10:1	5,87 ± 0,34	6,76 ± 0,53	9,68 ± 0,41	11,71 ± 0,93 ^a	12,30 ± 0,56	12,33 ± 0,66 ^a	6,57 ± 0,13 ^a
5:1	5,14 ± 0,06	5,55 ± 0,14	9,79 ± 0,33	7,83 ± 0,61	11,44 ± 0,56	10,98 ± 0,97	5,82 ± 0,50
2:1	4,93 ± 0,30	4,95 ± 0,11	7,04 ± 0,29	6,24 ± 0,57	8,12 ± 0,40	9,38 ± 0,87	5,45 ± 0,29
1:1	4,81 ± 0,16	4,88 ± 0,74	6,18 ± 0,14	5,42 ± 0,24	6,44 ± 0,23	6,58 ± 0,73	5,03 ± 0,07
1:2	4,59 ± 0,08	4,67 ± 0,30	5,46 ± 0,11	4,58 ± 0,08	5,22 ± 0,21	4,91 ± 0,39 ^b	5,08 ± 0,30
1:5	4,22 ± 0,15	4,26 ± 0,52 ^b	4,52 ± 0,16	4,43 ± 0,07 ^b	4,77 ± 0,18	4,50 ± 0,05 ^b	4,67 ± 0,12
1:10	3,94 ± 0,13 ^b	4,00 ± 0,03 ^b	4,07 ± 0,12 ^b	3,93 ± 0,11 ^b	3,95 ± 0,13 ^b	4,24 ± 0,22 ^b	4,56 ± 0,19
KA	3,59 ± 0,25						

^a nie różni się istotnie w porównaniu do ekstraktu; ^b nie różni się istotnie w porównaniu do KA ($p < 0.05$)

¹Źródło: na podstawie Enko i Gliszczyńska-Świąło (2015)

W przypadku ekstraktu niestandardyzowanego z zielonej herbaty (Tabela 4) wartości TEAC wahały się od $4,18 \pm 0,08$ mmol/g (dla ekstraktu) do $5,75 \pm 0,08$ mmol/g (dla mieszaniny ekstraktu z KA w stosunku 1:10). Wartość TEAC KA wynosiła $5,74 \pm 0,13$ mmol/g. W porównaniu z pozostałymi ekstraktami, ekstrakt niestandardyzowany z zielonej herbaty miał najwyższą wartość TEAC, porównywalną tylko z wartością TEAC dla ekstraktu z pestek winogron ($4,11 \pm 0,19$ mmol/g). Wszystkie ekstrakty można uszeregować pod względem aktywności przeciwutleniającej, wyrażonej jako wartość TEAC, od najbardziej do najmniej aktywnego w następujący sposób: ekstrakt niestandardyzowany z zielonej herbaty ($4,18 \pm 0,08$ mmol/g) \approx ekstrakt z pestek winogron ($4,11 \pm 0,19$ mmol/g) $>$ ekstrakt standaryzowany z zielonej herbaty ($2,96 \pm 0,29$ mmol/g) $>$ ekstrakt z czerwonej herbaty ($2,38 \pm 0,22$ mmol/g) $>$ ekstrakt z białej herbaty ($1,77 \pm 0,13$ mmol/g) \approx ekstrakt z czarnej herbaty ($1,71 \pm 0,06$ mmol/g) $>$ ekstrakt z zielonej kawy ($1,04 \pm 0,09$ mmol/g).

Zaobserwowano, że aktywność przeciwutleniająca mieszanin ekstraktów i KA wzrastała wraz z zawartością KA, aczkolwiek wzrost ten nie był liniowy. Wyniki testów post hoc wskazują, że mieszaniny z wysoką zawartością ekstraktów lub KA mają bardzo podobną aktywność odpowiednio do ekstraktów lub KA. Podobny efekt zaobserwowano w badaniach Majchrzak i in. (2004), w których pokazano liniowy wzrost aktywności przeciwutleniającej mierzonej wartością TEAC wraz ze zwiększającą się zawartością KA w mieszaninie. W przypadku ekstraktu z czarnej herbaty był to dodatek 5-20 mg KA na 100 ml roztworu ekstraktu herbaty, zaś w przypadku ekstraktu z herbaty zielonej efekt można było obserwować do 30 mg KA na 100 ml roztworu ekstraktu z herbaty. Również w badaniach Gliszczyńskiej-Świągło (2010b) zwiększenie proporcji KA w mieszaninie z ekstraktem z zielonej lub czarnej herbaty powodowało liniowy wzrost wartości TEAC mieszaniny tylko w określonym zakresie stężenia KA w mieszaninach.

W teście FRAP (Tabela 5) najwyższą aktywność przeciwutleniającą ponownie miał ekstrakt niestandardyzowany z zielonej herbaty ($5,29 \pm 0,27$ mmol/g). Wartość FRAP dla ekstraktu z zielonej herbaty według danych literaturowych może wynosić nawet około 8,5 mmol/g ekstraktu (Cadiz-Guerra i in., 2014). Pod względem wartości FRAP badane ekstrakty można uszeregować następująco: niestandardyzowany ekstrakt z zielonej herbaty ($5,29 \pm 0,27$ mmol/g) $>$ ekstrakt z pestek winogron ($4,65 \pm 0,18$ mmol/g) $>$ standaryzowany ekstrakt z zielonej herbaty ($3,68 \pm 0,24$ mmol/g) $>$ ekstrakt z czerwonej herbaty ($2,52 \pm 0,28$ mmol/g) \approx ekstrakt z białej herbaty ($2,18 \pm 0,30$ mmol/g) \approx ekstrakt

z czarnej herbaty ($2,14 \pm 0,16$ mmol/g) \approx ekstrakt z zielonej kawy $1,80 \pm 0,22$ mmol/g. Wartość FRAP dla KA wynosiła $10,69 \pm 0,35$ mmol/g. Jest to wartość ponad dwukrotnie wyższa niż wyniki uzyskane dla badanych ekstraktów. Również w przypadku testu FRAP można było zaobserwować wzrost aktywności przeciwutleniającej mieszanin wraz z rosnącą zawartością KA oraz podobną aktywność mieszanin z wysoką zawartością niektórych ekstraktów lub KA do aktywności odpowiednio ekstraktów lub KA (Tabela 5).

Wartość IC_{50} (Tabela 6) ekstraktu niestandardyzowanego z zielonej herbaty, wyznaczona w teście DPPH, wynosiła $6,50 \pm 0,34$ μ g/ml i jest to aktywność przeciwutleniająca zbliżona do wartości IC_{50} dla ekstraktu z pestek winogron ($6,69 \pm 0,29$ μ g/ml). Są to wyniki wskazujące na najwyższą aktywność przeciwutleniającą wśród wszystkich badanych ekstraktów. Wszystkie ekstrakty można uszeregować następująco: ekstrakt z pestek winogron ($6,69 \pm 0,29$ μ g/ml) \approx niestandardyzowany ekstrakt z zielonej herbaty ($6,50 \pm 0,34$ μ g/ml) $>$ ekstrakt standaryzowany z zielonej herbaty ($8,99 \pm 0,85$ μ g/ml) $>$ ekstrakt z białej herbaty ($11,97 \pm 1,07$ μ g/ml) \approx ekstrakt z czerwonej herbaty ($12,46 \pm 0,05$ μ g/ml) $>$ ekstrakt z czarnej herbaty ($13,59 \pm 0,58$ μ g/ml) $>$ ekstrakt z zielonej kawy $20,81 \pm 3,56$ μ g/ml. KA w teście DPPH uzyskał wartość IC_{50} równą $3,59 \pm 0,25$ μ g/ml, znacznie niższą (wskazującą na najlepsze właściwości przeciwutleniające) niż ekstrakty roślinne. Mieszaniny ekstraktów i KA wykazywały tym silniejsze właściwości przeciwutleniające im większa była w nich zawartość KA. Podobnie jak w przypadku aktywności mierzonej za pomocą testu TEAC i FRAP, część mieszanin o nadmiarze ekstraktów bądź KA nie różniła się istotnie pod względem wartości IC_{50} od czystych ekstraktów lub KA (Tabela 6).

Wartość IC_{50} uzyskana przez ekstrakty herbat w teście DPPH może wahać się między 1,7 a 40 μ g/ml (Chen i in., 2012; Gliszczyńska-Świgło, 2010b; Saito i in., 2007; Unachukwu, Ahmed, Kavalier, Lyles i Kennelly, 2010). Wartości te zależą zarówno od rodzaju herbaty, jak i sposobu przygotowywania próbek (Unachukwu i in., 2010). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zatem zgodne z przedstawionymi danymi literaturowymi.

Ekstrakt z zielonej kawy charakteryzował się najsłabszymi właściwościami przeciwutleniającymi spośród wszystkich badanych ekstraktów. Jego wartość TEAC, FRAP i IC_{50} wynosiła odpowiednio $1,04 \pm 0,09$ mmol/g, $1,80 \pm 0,22$ mmol/g i $20,81 \pm 3,56$ μ g/ml. Mieszaniny ekstraktu z zielonej kawy z KA, podobnie jak w przypadku innych

ekstraktów, wykazywały wzrost aktywności przeciwutleniającej wraz ze wzrostem zawartości w nich KA.

Wartości TEAC, FRAP i IC₅₀, określające aktywność przeciwutleniającą ekstraktów i ich mieszanin z KA, są tylko częściowo zgodne z przewidywaniami dokonanymi na podstawie zawartości polifenoli. Korelacje jednostronne pomiędzy zawartością polifenoli a wartościami TEAC, FRAP oraz IC₅₀ są istotne jedynie wówczas, gdy z analizy wyłączy się wyniki dla ekstraktów z pestek winogron i zielonej kawy. Ekstrakty te charakteryzują się odmiennym składem polifenoli niż ekstrakty z herbat. W przypadku herbat korelacja między wartościami TEAC a zawartością polifenoli jest istotna na poziomie $\alpha = 0,05$, a współczynnik korelacji Pearsona wynosi 0,858. Dla wartości FRAP współczynnik korelacji Pearsona wynosi 0,897 (wynik istotny na poziomie $\alpha = 0,05$), natomiast dla wartości IC₅₀ jest to -0,965 (wynik istotny na poziomie $\alpha = 0,01$).

Ekstrakt niestandardyzowany z zielonej herbaty charakteryzował się najwyższą aktywnością przeciwutleniającą, co odpowiada najwyższej zawartości polifenoli (Tabela 1). Ekstrakt standardyzowany z zielonej herbaty zawierał znaczną ilość polifenoli, ale jego wartości TEAC, FRAP i IC₅₀ (DPPH) były znacznie niższe niż można było przewidywać na podstawie zawartości polifenoli. Z kolei wartości TEAC, FRAP i IC₅₀ ekstraktu z pestek winogron były wyższe niż dla ekstraktu z herbaty białej o porównywalnej zawartości polifenoli, ale porównywalne z wynikami dla ekstraktu niestandardyzowanego z herbaty zielonej. Wskazuje to na wpływ wszystkich składników ekstraktu oraz interakcji między nimi na całkowitą aktywność przeciwutleniającą ekstraktu, a nie poszczególnych związków polifenolowych.

11.3. Interakcje pomiędzy badanymi ekstraktami i kwasem askorbinowym mierzone w teście TEAC, FRAP i DPPH

Jak wspomniano wcześniej, dane literaturowe dotyczące interakcji pomiędzy polifenolami roślinnymi, zwłaszcza polifenolami herbat, a kwasem askorbinowym są skąpe. Majchrzak i in. (2004) pokazali wpływ kwasu askorbinowego na całkowitą aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z czarnej i zielonej herbaty, jednak typ interakcji pomiędzy składnikami mieszaniny nie został określony. Aleksandropoulo i in. (2006) wykazali, że kwas askorbinowy zwiększa aktywność przeciwutleniającą naparu z zielonej herbaty w teście FRAP, jednak ponownie nie określono typu ani mechanizmu interakcji.

W obecnym badaniu, aktywności przeciwutleniające ekstraktów, KA i ich mieszanin w różnych stosunkach wagowych, wyznaczone za pomocą testu TEAC, FRAP i DPPH, zostały wykorzystane do obliczenia współczynników interakcji między ekstraktami a KA celem sprawdzenia, czy zachodzą interakcje (antagonizm lub synergizm) między tymi przeciwutleniaczami.

Różnice w obserwowanych interakcjach w zależności od metody (TEAC, FRAP lub DPPH) najprawdopodobniej są wynikiem m.in. różnic we właściwościach środowiska reakcji. Wartość pH środowiska reakcji w teście TEAC wynosi 7,4, w teście FRAP 3,6, natomiast oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą z rodnikiem DPPH[•] odbywa się w metanolu. Z dotychczasowych badań wynika natomiast, że aktywność przeciwutleniająca związków polifenolowych, np. flawonoidów jest zależna od pH środowiska i wzrasta wraz ze wzrostem wartości pH (Borkowski, Szymusiak, Gliszczyńska-Świgło, Rietjens i Tyrakowska, 2005; Lemańska i in., 2001, 2004; Muzolf, Szymusiak i in., 2008; Muzolf-Panek i in., 2012).

Tabele 7-9 przedstawiają wartości współczynników interakcji dla mieszanin badanych ekstraktów z KA. Dla wszystkich stosunków wagowych zostały obliczone teoretyczne addytywne dawki KA i ekstraktów, następnie porównane ze zmierzonymi (w przypadku testów TEAC i FRAP zastosowano odwrotności wartości TEAC i FRAP). Nieparametryczny test Manna-Whitneya został użyty do określenia istotności różnic pomiędzy teoretycznie obliczonymi dawkami przeciwutleniaczy oraz dawkami, dla których wykonano pomiary lub pomiędzy obliczonymi współczynnikami interakcji oraz współczynnikami interakcji uzyskanymi na podstawie danych doświadczalnych. Kryterium Santiesteban-Lopez i in. (2007), polegające na uznaniu wartości współczynników interakcji niższych niż 0,9 oraz wyższych od 1,1 za wskazujące odpowiednio synergizm i antagonizm, w większości przypadków było spójne z wynikami testu Manna-Whitneya. Rozbieżności natomiast mogą wciąż sugerować trend w kierunku synergizmu lub antagonizmu.

Tabela 7. Współczynniki interakcji dla mieszanin ekstraktów (E) z kwasem askorbinowym (KA) w teście TEAC

Stosunek wagowy (E:KA)	TEAC						
	Herbata zielona (ekstrakt niestandardyzowany) ¹	Herbata zielona (ekstrakt standardyzowany)	Herbata biała	Herbata czerwona	Herbata czarna ¹	Kawa zielona	Pestki winogron (ekstrakt standardyzowany)
10:1	1,04	1,05	1,00	1,11	0,98	1,18 ^a	1,00
5:1	1,02	0,90	1,03	1,08	0,94	1,04	1,01
2:1	1,05	0,97	1,01	1,12 ^a	0,97	1,11 ^a	1,06
1:1	1,03	1,04	1,09 ^a	1,03	0,98	1,12 ^a	1,04 ^a
1:2	1,02	1,04	1,05 ^a	1,10 ^a	1,06 ^a	1,09 ^a	1,08 ^a
1:5	0,99	1,09 ^a	1,07 ^a	1,06 ^a	1,00	1,04	0,99
1:10	0,97 ^a	1,06 ^a	1,04	1,06 ^a	0,97	1,00	0,97

^a statystycznie istotna różnica między zmierzoną a teoretyczną wartością (test Manna-Whitneya, $p < 0,05$).

¹Źródło: na podstawie Enko i Gliszczyńska-Świągło (2015)

Tabela 8. Współczynniki interakcji dla mieszanin ekstraktów (E) z kwasem askorbinowym (KA) w teście FRAP

FRAP							
Stosunek wagowy (E:KA)	Herbata zielona (ekstrakt niestandardyzowany) ¹	Herbata zielona (ekstrakt standardyzowany)	Herbata biała	Herbata czerwona	Herbata czarna ¹	Kawa zielona	Pestki winogron (ekstrakt standardyzowany)
10:1	1,11 ^a	1,17 ^a	1,24 ^a	1,07	1,20 ^a	1,14	1,04
5:1	1,15 ^a	1,15 ^a	1,25 ^a	0,93	1,24 ^a	1,04	1,12 ^a
2:1	1,23 ^a	1,08 ^a	1,08 ^a	1,08	1,12 ^a	1,15 ^a	1,09 ^a
1:1	1,15 ^a	1,00	1,10 ^a	1,04	1,11 ^a	1,12 ^a	1,02
1:2	1,06 ^a	1,12 ^a	1,07	1,08 ^a	1,11 ^a	1,03	1,11 ^a
1:5	1,04	1,12 ^a	1,08 ^a	1,06	1,07 ^a	1,12 ^a	1,07
1:10	0,98	1,04	1,04	1,06	1,04	1,05	1,00

^a statystycznie istotna różnica między zmierzoną a teoretyczną wartością (test Manna-Whitneya, $p < 0,05$).

¹Źródło: na podstawie Enko i Gliszczyńska-Świgło (2015)

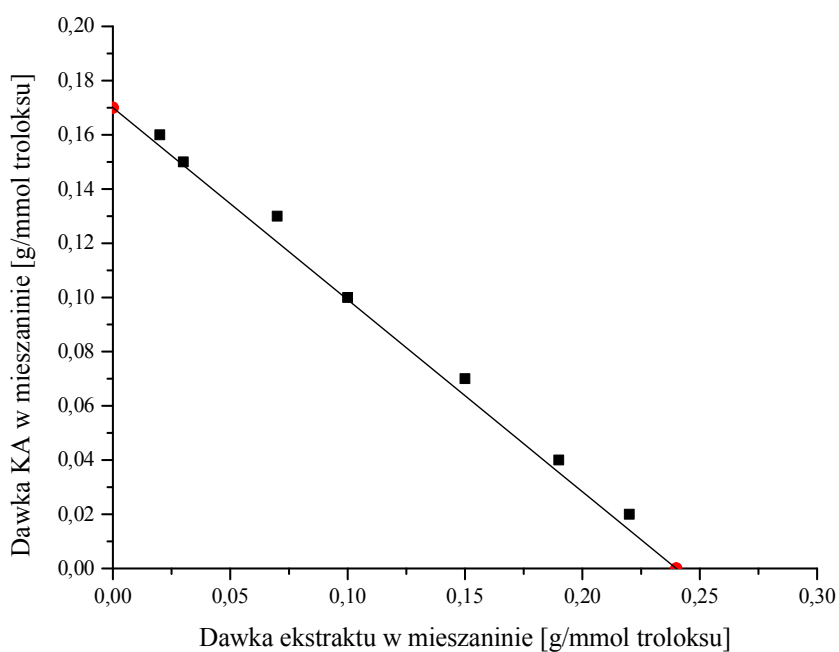
Tabela 9. Współczynniki interakcji dla mieszanin ekstraktów (E) z kwasem askorbinowym (KA) w teście DPPH (IC₅₀)

Stosunek wagowy (E:KA)	DPPH (IC ₅₀)						
	Herbata zielona (ekstrakt niestandardyzowany) ¹	Herbata zielona (ekstrakt standardyzowany)	Herbata biała	Herbata czerwona	Herbata czarna ¹	Kawa zielona	Pestki winogron (ekstrakt standardyzowany)
10:1	0,93	0,86 ^a	0,98	1,15 ^a	1,13 ^a	0,85 ^a	1,06 ^a
5:1	0,90 ^a	0,78 ^a	1,14 ^a	0,89 ^a	1,23 ^a	0,96	1,00
2:1	0,96	0,78 ^a	1,05	0,91 ^a	1,15 ^a	1,18 ^a	1,05
1:1	1,04	0,96	1,12 ^a	0,97 ^a	1,14 ^a	1,09	1,08 ^a
1:2	1,09 ^a	1,05	1,17 ^a	0,97 ^a	1,10 ^a	1,00	1,12
1:5	1,09 ^a	1,08	1,11 ^a	1,09	1,17 ^a	1,09 ^a	1,21 ^a
1:10	1,05	1,06	1,06	1,02 ^a	1,03	1,10	1,23 ^a

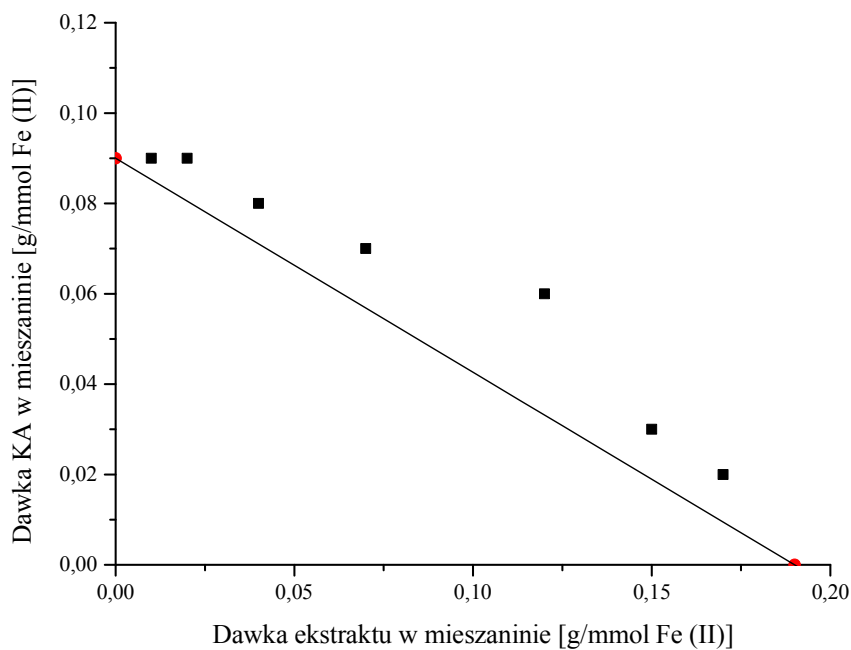
^a statystycznie istotna różnica między zmierzoną a teoretyczną wartością (test Manna-Whitneya, $p < 0,05$).

¹Źródło: na podstawie Enko i Gliszczyńska-Świąło (2015)

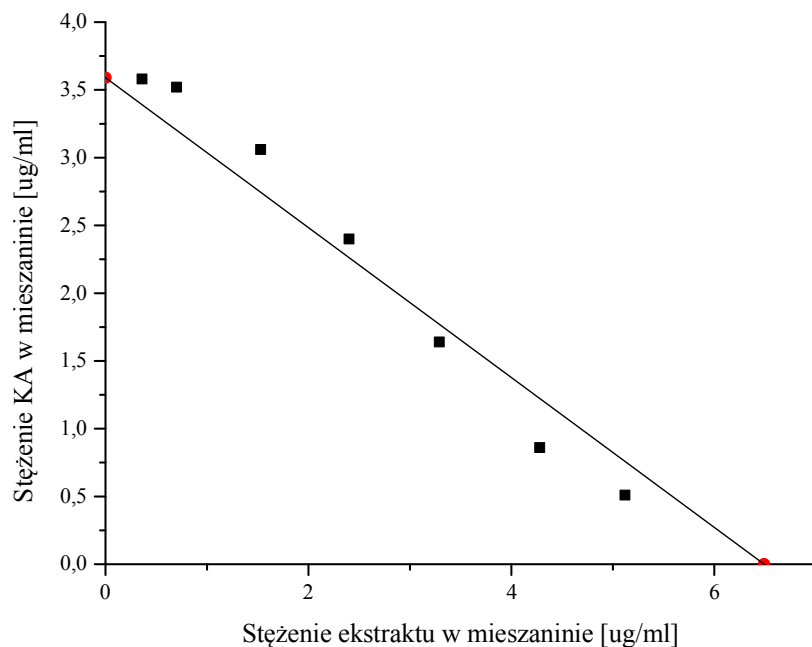
Wykresy 1–3 przedstawiają izobologramy odpowiadające współczynnikom interakcji dla mieszanin niestandardyzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i KA, w różnych stosunkach wagowych, dla wartości TEAC, FRAP i IC₅₀ (DPPH). Izobologramy dla wszystkich badanych ekstraktów zamieszczone zostały w załączniku 1.



Wykres 1. Izobologram dla wartości TEAC mieszaniny niestandardyzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i KA



Wykres 2. Izobologram dla wartości FRAP mieszanki niestandardyzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i KA



Wykres 3. Izobologram dla wartości IC₅₀ (DPPH) mieszanki niestandardyzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i KA

Jak wspomniano wcześniej, test TEAC jest przeprowadzany w środowisku wodnym, w pH 7,4. Wartość TEAC określa zdolność substancji badanej do zmiatania kationorodnika ABTS^{•+} w porównaniu do troloksu. Zarówno standaryzowany, jak i niestandaryzowany ekstrakt z zielonej herbaty wykazywały w teście TEAC addytywność w mieszaninie z KA niemal we wszystkich stosunkach wagowych (Tabela 7). Jedynie dla mieszanin o dużym nadmiarze KA (1:5 oraz 1:10) w przypadku ekstraktu standaryzowanego obserwowano antagonizm (współczynnik interakcji równy odpowiednio 1,09 i 1,06), natomiast w przypadku ekstraktu niestandaryzowanego obserwowano trend w kierunku synergizmu dla mieszaniny o największej zawartości KA (współczynnik interakcji 0,97 dla stosunku wagowego 1:10, wynik istotny statystycznie w teście Manna-Whitneya). Może to wynikać z różnic w zawartości poszczególnych katechin w badanych ekstraktach. Jak zostało pokazane wcześniej (Tabela 1), ekstrakt standaryzowany zawierał o 30% więcej EGCG niż ekstrakt niestandaryzowany (136,9±5,3 vs 90,1±3,6 mg/g ekstraktu) oraz o połowę mniej ECG (30,7±1,1 vs 71,5±3,1mg/g ekstraktu), mimo że całkowita zawartość katechin była na podobnym poziomie (259,1±9,8 vs 283,0±10,7 mg/g ekstraktu).

W przypadku ekstraktu z czarnej herbaty, w teście TEAC, obserwowano addytywność działania ekstraktu i KA. Jedynie dla stosunku wagowego 1:2 ekstraktu do KA obserwowano antagonizm (współczynnik interakcji 1,06, istotny statystycznie w teście Manna-Whitneya). Z kolei ekstrakt z pestek winogron wykazywał antagonizm z KA przy stosunku wagowym 1:1 oraz 1:2 (współczynniki interakcji 1,04 oraz 1,08, istotne statystycznie w teście Manna-Whitneya). Ekstrakt z herbaty białej wykazywał antagonizm z KA dla mieszanin z równym udziałem obu substancji oraz z nadmiarem KA. W przypadku mieszanin z nadmiarem ekstraktu obserwowano addytywność. Dla ekstraktów z czerwonej herbaty w teście TEAC obserwowano głównie antagonizm z KA lub trend w kierunku antagonizmu (współczynniki interakcji wyższe od 1,0, jednak nieistotne statystycznie w teście Manna-Whitneya).

Test FRAP wykorzystuje zdolność badanych substancji do redukcji żelaza III do żelaza II związanego w kompleksie z TPTZ. Środowisko reakcji jest wodne, o pH 3,6. Oba ekstrakty z zielonej herbaty wykazywały antagonistyczne oddziaływanie z KA w większości stosunków wagowych. Jedynie dla mieszanin o największym nadmiarze KA (1:5 oraz 1:10 dla ekstraktu niestandaryzowanego, 1:10 dla ekstraktu standaryzowanego)

a także w stosunku wagowym 1:1 dla ekstraktu standaryzowanego obserwowano addytywność. Również w przypadku ekstraktów z czarnej herbaty i białej herbaty, obserwowano antagonistyczne oddziaływanie z KA dla wszystkich stosunków wagowych z wyjątkiem tego o największym nadmiarze KA (1:10; addytywność). Ekstrakt z zielonej kawy wykazywał antagonistyczne oddziaływanie z KA w stosunkach wagowych 2:1 (współczynnik interakcji 1,15), 1:1 (1,12) oraz 1:5 (1,12). Przy pozostałych stosunkach wagowych obserwowano addytywność. Ekstrakt z pestek winogron wykazywał antagonistyczne oddziaływanie w stosunkach wagowych 5:1, 2:1 oraz 1:2. Dla pozostałych stosunków wagowych obserwowano addytywność. Ekstrakt z czerwonej herbaty wykazywał w teście FRAP efekt addytywny z KA w większości stosunków wagowych, jedynie w stosunku wagowym 1:2 ekstraktu do KA obserwowano antagonizm (współczynnik oddziaływania 1,08, istotny statystycznie w teście Manna-Whitneya).

Test DPPH pozwala określić stopień, w jakim badane substancje są zdolne unieczynnić rodnik DPPH[•]. Środowisko testu jest metanolowe. W przypadku ekstraktów z zielonych herbat obserwowano synergizm w mieszaninach o nadmiarze ekstraktu, szczególnie w przypadku ekstraktu standaryzowanego (stosunki wagowe 10:1, 5:1, 2:1 o współczynnikach oddziaływania odpowiednio 0,86, 0,78, 0,78). Dla ekstraktu niestandaryzowanego efekt synergistyczny był widoczny, choć słabszy (współczynniki oddziaływania odpowiednio 0,93, 0,90 przy stosunkach wagowych 10:1 i 5:1). Synergizm obserwowano również w teście DPPH w przypadku ekstraktu z czerwonej herbaty w stosunkach wagowych z KA 5:1, 2:1, 1:1 oraz 1:2 (współczynniki interakcji 0,89, 0,91, 0,97, 0,97, istotne statystycznie w teście Manna-Whitneya). Dla mieszaniny o stosunku wagowym 10:1 obserwowano antagonizm, a dla mieszanin o stosunku wagowym 1:5 i 1:10 addytywność, ale z trendem w kierunku antagonizmu. W przypadku ekstraktów z czarnej i białej herbaty oraz ekstraktu z pestek winogron, dominowały oddziaływania antagonistyczne, z wyjątkiem pojedynczych stosunków wagowych, w których obserwowano efekt addytywny, szczególnie w mieszaninach o dużym nadmiarze ekstraktu lub KA. W przypadku ekstraktu z zielonej kawy obserwowano synergizm dla stosunku wagowego 10:1 ekstraktu do KA, natomiast wszystkie pozostałe mieszaniny wykazywały oddziaływanie antagonistyczne lub addytywność.

Analizując współczynniki interakcji i izobologramy w odniesieniu do zawartości związków polifenolowych oraz właściwości przeciwutleniających badanych ekstraktów, można wskazać na kilka zależności. Ekstrakty o podobnej zawartości poszczególnych

polifenoli wykazywały podobne interakcje z KA. Oba ekstrakty z zielonej herbaty wykazywały z KA efekt addytywny dla większości stosunków wagowych w teście TEAC (z wyjątkiem 1:10 E:KA dla ekstraktu niestandardyzowanego – efekt antagonistyczny, oraz 5:1 – efekt synergistyczny, 1:5 i 1:10 – efekt antagonistyczny dla ekstraktu standardyzowanego), efekt antagonistyczny w teście FRAP i efekt synergistyczny w teście DPPH dla mieszanin o dużym nadmiarze ekstraktu oraz addytywny dla pozostałych mieszanin.

Wszystkie ekstrakty z herbat, z wyjątkiem ekstraktu z czerwonej herbaty, wykazywały wyraźny antagonizm z KA w teście FRAP. Podobny efekt stwierdzono również dla ekstraktu z pestek winogron i z zielonej kawy, mimo ich odmiennego składu. Natomiast ekstrakt z czerwonej herbaty, zawierający dużo kwasu galusowego, lecz mało katechin, wykazywał w teście FRAP efekt addytywny.

Podsumowując można stwierdzić, że:

- w teście TEAC, antagonistyczne oddziaływanie z KA wykazywały ekstrakty: z czerwonej herbaty oraz z zielonej kawy (w większości stosunków wagowych), a także standardyzowany ekstrakt z herbaty zielonej oraz białej przy nadmiarze KA (stosunek wagowy 1:10 E:KA w przypadku herbaty zielonej oraz stosunki 1:1, 1:2 i 1:5 w przypadku herbaty białej); ekstrakt z pestek winogron wykazywał antagonizm (stosunki wagowe 5:1, 2:1 i 1:2) lub addytywność (pozostałe stosunki wagowe) z KA;
- w teście FRAP, antagonistyczne oddziaływanie z KA wykazywały ekstrakty: z herbat czarnej, białej, zielonej (standardyzowany i niestandardyzowany), z zielonej kawy (w większości stosunków wagowych), ekstrakt z pestek winogron wykazywał działanie addytywne lub antagonistyczne z KA (antagonistyczne dla stosunków wagowych 5:1, 2:1 oraz 1:2), natomiast ekstrakt z czerwonej herbaty wykazywał głównie addytywność z KA;
- w teście DPPH, antagonistyczne oddziaływanie z KA wykazywały ekstrakty: z czarnej i białej herbaty oraz z pestek winogron (w większości stosunków wagowych), a także z herbaty czerwonej (ekstrakty z dużym nadmiarem KA lub ekstraktu – stosunki wagowe 1:10 i 10:1); oddziaływanie synergistyczne: ekstrakty z zielonej herbaty (standardyzowany i niestandardyzowany) oraz z zielonej kawy dla stosunków wagowych z nadmiarem ekstraktu, a także z herbaty czerwonej dla większości stosunków wagowych.

11.4. Interakcje pomiędzy ekstraktami z herbat a kwasem askorbinowym w zależności od pH

Dane literaturowe wskazują, że wartość pH środowiska jest istotnym czynnikiem warunkującym aktywność przeciwutleniającą związków polifenolowych. Dla wielu flawonoidów wykazano, że ich aktywność przeciwutleniająca, wyrażona jako wartość TEAC, wzrasta wraz ze wzrostem pH środowiska (Borkowski i in., 2005; Lemańska i in., 2001, 2004; Muzolf, Szymusiak i in. 2008; Muzolf i in., 2012; Tyrakowska i in. 1999). Wartość pH produktów spożywczych i kosmetycznych może być inna niż ta, w którym wykonywane są powszechnie stosowane oznaczenia aktywności przeciwutleniającej – przykładowo pH mięsa wynosi około 5-6, masła 4,5-6,9 (Muzolf, 2009), piwa 4,0-4,8, niektórych kosmetyków 5,0-6,0. Odczyn pH płynów ustrojowych oraz w narządach i tkankach organizmu człowieka jest również zmienny i wynosi około 6,7 w ślinie, 1-2 w żołądku, 6,5 w jelicie cienkim, 8 w soku trzustkowym, 7,4 w osoczu krwi tętniczej (około 7,2 w krwi żyłnej). Wartość pH moczu waha się między 4,5 a 8. W środowisku wewnątrzkomórkowym pH wynosi około 7,2 (Ganong, 2009). Wiedza na temat zależności aktywności przeciwutleniającej od pH, z uwzględnieniem możliwości zachodzenia różnych interakcji między przeciwutleniaczami przy różnych wartościach pH, może pomóc w projektowaniu produktów o jak najwyższej aktywności przeciwutleniającej.

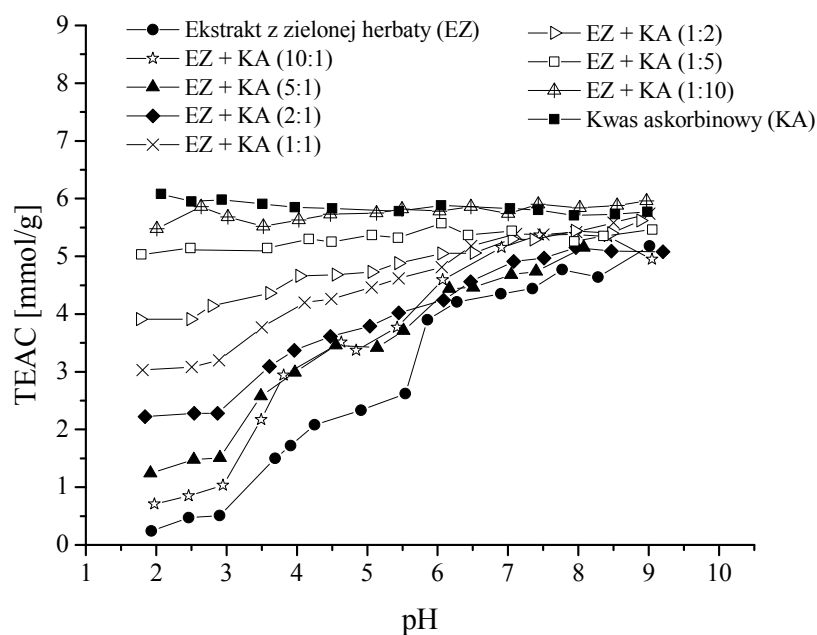
Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej w teście TEAC z kationorodnikiem ABTS⁺, opisane przez Rice-Evans i Millera (1994), wykonuje się w środowisku o pH 7,4. Metodę tę jednak zmodyfikowano tak, by możliwe były pomiary w pH od 2 do 9,5 (powyżej tych wartości kationorodnik ABTS⁺ nie jest wystarczająco trwały) (Tyrakowska i in. 1999). Z badań Muzolf i in. (2012) wynika, że aktywność przeciwutleniająca katechin zielonych herbat zmienia się w zakresie pH 2,0-9,5. Przy niskich wartościach pH, katechiny wykazują słabą aktywność przeciwutleniającą, wraz ze wzrostem pH środowiska aktywność ta rośnie aż do wartości TEAC sięgających nawet 6 mmol/l. Wzrost aktywności przeciwutleniającej wraz z pH jest tłumaczony deprotonacją najbardziej kwasowych grup hydroksylowych i zwiększeniem zdolności katechin do oddawania elektronu w wyższym pH (Muzolf, Szymusiak i in., 2008; Muzolf i in., 2012). Podobną zależność między właściwościami przeciwutleniającymi i pH środowiska wykazano np. dla kwasów hydroksybenzoesowych (Tyrakowska i in. 1999), hydroksyflawonów (Lemańska i in., 2001) oraz antocyjanów (Borkowski i in., 2005).

Z badań przeprowadzonych przez Chen i in. (1998) wynika, że katechiny zielonej herbaty są w pH poniżej 4 stabilne, natomiast w pH 4–7 ich stabilność maleje wraz ze wzrostem pH i po czasie około 2 godzin rozkładowi ulega około 50% katechin. W pH powyżej 7 katechiny ulegają rozkładowi w ciągu kilku minut. Stwierdzono również, że w pH 7,42 kwas askorbinowy, obniżając pH mieszaniny zaledwie do 7,38 (0,2 mg/ml kwasu askorbinowego na 0,5 mg/ml katechin zielonej herbaty w buforze fosforanowym), stabilizuje katechiny, znacząco spowalniając ich rozkład. Dla porównania, kwas cytrynowy dodawany w tej samej ilości nie wykazywał działania stabilizującego. Autorzy wyciągnęli wniosek, że kwas askorbinowy działa stabilizująco na katechiny nie przez obniżanie pH mieszaniny, lecz przez pełnienie roli reduktora i regenerację katechin z ich formy rodnikowej.

W niniejszych badaniach określono zależność właściwości przeciwutleniających (mierzonych wartością TEAC względem kationorodnika ABTS^{•+}) od pH w zakresie 2-9 dla ekstraktów z zielonej (niestandardyzowanej), czarnej, czerwonej i białej herbaty oraz ich mieszanin z KA. Określono również rodzaj interakcji pomiędzy składnikami mieszanin w zależności od pH i stosunku wagowego.

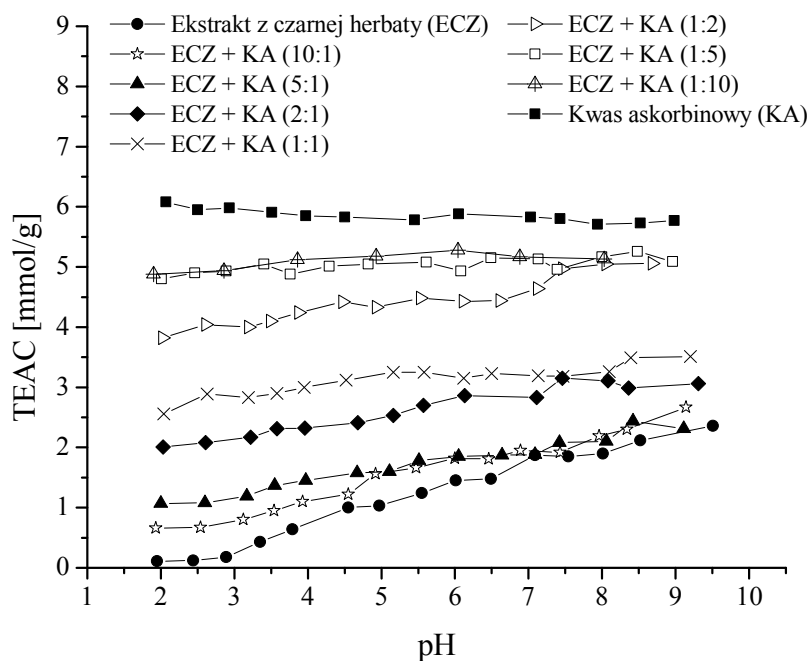
Wykresy 4–7 ilustrują zależność wartości TEAC od pH dla odpowiedniego ekstraktu z herbaty, KA i ich mieszanin z KA. Wyniki badań potwierdziły wcześniejsze obserwacje (Gliszczyńska-Świgło i Muzolf, 2007), że KA nie wykazuje zależności wartości TEAC od pH. Stwierdzono, że aktywność przeciwutleniająca badanych ekstraktów była najniższa w pH 2-3 i rosła wraz ze wzrostem wartości pH środowiska.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że aktywność przeciwutleniająca mieszanin dla danej wartości pH była tym wyższa im wyższy był stosunek zawartości KA do ekstraktów. Wpływ pH na wzrost wartości TEAC zmniejszał się wraz ze wzrostem udziału KA w mieszaninie. Największy wpływ pH na wartość TEAC stwierdzono w przypadku niestandardyzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i jego mieszanin z KA (Wykres 4).



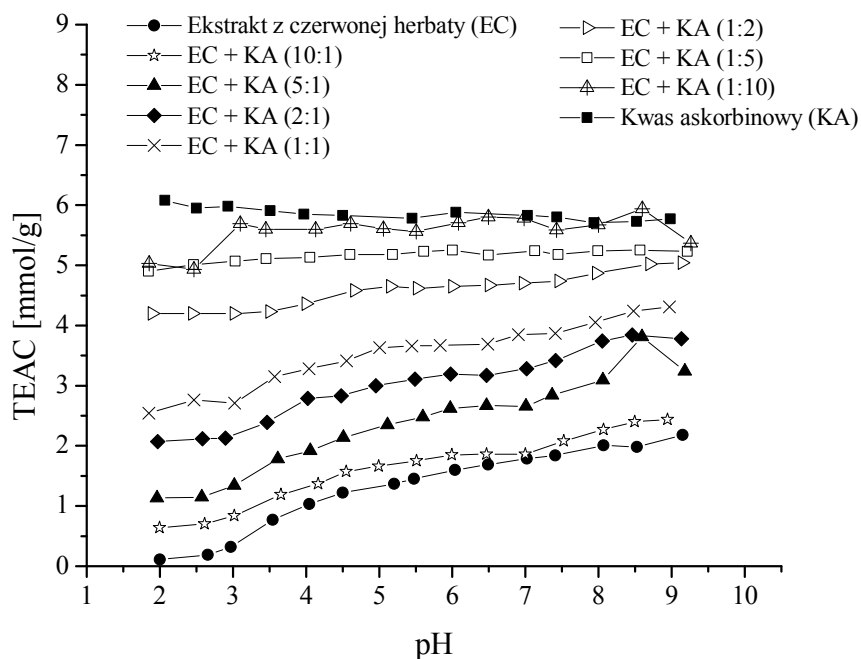
Wykres 4. Zależność wartości TEAC od pH dla ekstraktu z zielonej herbaty, KA i ich mieszanin w różnych stosunkach wagowych

Źródło: Enko i Gliszczyńska-Świgło (2014)

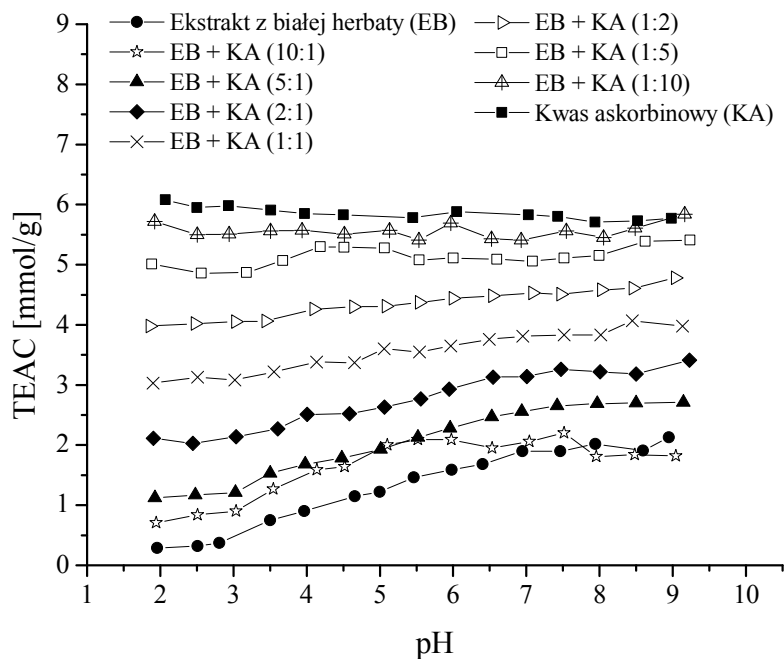


Wykres 5. Zależność wartości TEAC od pH dla ekstraktu z czarnej herbaty, KA i ich mieszanin w różnych stosunkach wagowych

Źródło: Enko i Gliszczyńska-Świgło (2014)



Wykres 6. Zależność wartości TEAC od pH dla ekstraktu z czerwonej herbaty, KA i ich mieszanin w różnych stosunkach wagowych



Wykres 7. Zależność wartości TEAC od pH dla ekstraktu z białej herbaty, KA i ich mieszanin w różnych stosunkach wagowych

Zakres wartości pH, zmienny zarówno w organizmie człowieka, jak i dla różnych produktów, może potencjalnie wpływać na typ interakcji. Opisano już odmienne oddziaływanie na siebie dwóch substancji o właściwościach pro- lub przeciwutleniających w zależności od pH. Paiva-Martins i Gordon (2002) zaobserwowali, że dwa związki polifenolowe oliwy (oleuropeina i hydroksytyrozol) zwiększały prooksydacyjny efekt (w odniesieniu do utleniania lipidów) chlorku żelaza (III) w emulsji olej-woda (prawdopodobnie poprzez jego redukcję). Efekt ten występował tylko w pH 3,5 oraz 5,5, ale nie w pH 7,4.

Biorąc pod uwagę różne wartości pKa dla katechin i KA, można również spodziewać się odmiennych interakcji pomiędzy ekstraktami z herbat i KA przy różnych wartościach pH. Wartości pKa₁ różnych katechin wynoszą:

- (+)-C – 8,64
- (–)-EC – 8,72
- (–)-GC – 8,41
- (–)-EGC – 7,73
- (–)-GCG – 7,65
- (–)-EGCG – 7,68
- (–)-ECG – 7,76 (Muzolf-Panek i in., 2012).

Wartość pKa₁ dla kwasu askorbinowego wynosi 4,17 (pKa₂ wynosi 11,6, poza badanym zakresem pH) (Gliszczyńska-Świgło, 2010b).

W niniejszych badaniach, na podstawie wartości TEAC dla badanych ekstraktów i ich mieszanin z KA, oznaczonych przy różnych wartościach pH, obliczono współczynniki interakcji w celu określenia, czy oddziaływania (antagonizm, synergizm) są zależne od pH środowiska.

Tabele 10–13 przedstawiają współczynniki interakcji dla mieszanin badanych ekstraktów z KA w wybranych wartościach pH z zakresu 2-9.

Tabela 10. Wartości współczynników interakcji przy różnych wartościach pH dla mieszanin ekstraktu (E) z zielonej herbaty i KA w różnych stosunkach wagowych

Stosunek wagowy(E:KA)	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
10:1	1,05	0,96	0,71	0,78	0,89	0,87	0,88	1,06
5:1	0,94	0,92	0,80	0,85	0,95	0,98	0,94	1,00
2:1	0,94	0,99	0,91	0,92	1,07	0,98	0,97	1,06
1:1	0,99	0,98	0,89	0,91	1,00	0,94	0,96	0,95
1:2	1,00	0,97	0,94	0,97	1,01	1,00	0,99	0,99
1:5	0,96	0,97	0,96	0,96	0,98	1,01	1,06	1,03
1:10	0,96	0,93	0,96	0,95	0,96	0,98	0,97	0,96

Źródło: Enko i Gliszczyńska-Świgło (2014)

Tabela 11. Wartości współczynników interakcji przy różnych wartościach pH dla mieszanin ekstraktu (E) z czarnej herbaty i KA w różnych stosunkach wagowych

Stosunek wagowy(E:KA)	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
10:1	0,94	0,86	1,00	0,93	1,01	1,14	1,03	1,00
5:1	0,98	0,93	1,03	1,13	1,17	1,34	1,21	1,27
2:1	0,99	0,94	1,01	1,03	1,01	1,11	1,02	1,14
1:1	1,14	1,05	1,07	1,04	1,14	1,19	1,17	1,15
1:2	1,01	0,97	0,95	0,96	0,97	0,96	0,88	1,10
1:5	1,00	0,98	1,00	0,98	1,02	0,99	0,99	1,02
1:10	1,07	1,06	1,03	1,02	1,01	1,04	1,05	0,92

Źródło: Enko i Gliszczyńska-Świgło (2014)

Tabela 12. Wartości współczynników interakcji przy różnych wartościach pH dla mieszanin ekstraktu (E) z czerwonej herbaty i KA w różnych stosunkach wagowych

Stosunek wagowy(E:KA)	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
10:1	0,97	0,97	1,06	1,06	1,07	1,16	1,03	1,03
5:1	0,93	0,91	0,95	0,89	0,87	0,92	0,85	0,86
2:1	0,96	1,00	0,93	0,94	0,93	0,95	0,87	0,89
1:1	1,15	1,12	1,03	0,98	1,00	0,98	0,96	0,92
1:2	0,92	0,94	0,96	0,92	0,94	0,94	0,92	0,90
1:5	0,98	0,95	0,97	0,97	0,96	0,97	0,98	0,98
1:10	1,04	0,92	0,95	0,95	0,94	0,93	0,95	1,01

Tabela 13. Wartości współczynników interakcji przy różnych wartościach pH dla mieszanin ekstraktu (E) z białej herbaty i KA w różnych stosunkach wagowych

Stosunek wagowy(E:KA)	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
10:1	1,10	0,95	0,84	0,82	0,94	1,09	1,30	1,35
5:1	1,07	1,05	1,02	1,02	1,00	0,99	0,98	1,01
2:1	1,00	1,01	1,00	1,04	1,01	1,01	1,01	0,98
1:1	1,00	0,99	0,98	0,97	1,01	1,00	1,01	0,99
1:2	0,99	0,97	0,97	0,98	0,98	0,98	0,98	0,95
1:5	0,97	1,00	0,93	0,95	0,99	0,01	0,99	0,95
1:10	0,96	0,95	0,95	0,96	0,94	1,00	0,99	0,93

Obserwowano synergizm pomiędzy niestandardyzowanym ekstraktem z zielonej herbaty i KA (Tabela 10) dla mieszanin o nadmiarze ekstraktu lub o równej zawartości składników w pH 4. W pH 5 synergizm był widoczny dla stosunków wagowych o dużym nadmiarze ekstraktu (10:1 oraz 5:1). W pH 6-8 synergizm obserwowano tylko dla stosunku wagowego 10:1. W pozostałych przypadkach obserwowano addytywność ekstraktu i KA.

W przypadku mieszanin ekstraktu z czarnej herbaty i KA (Tabela 11) obserwowano antagonizm w pH wyższym niż 6 dla mieszanin o nadmiarze ekstraktu bądź z równą zawartością ekstraktu i KA. W pH 2-5 obserwowano addytywność dla większości mieszanin lub antagonizm (pH 2-3, stosunek wagowy 1:10 E:KA).

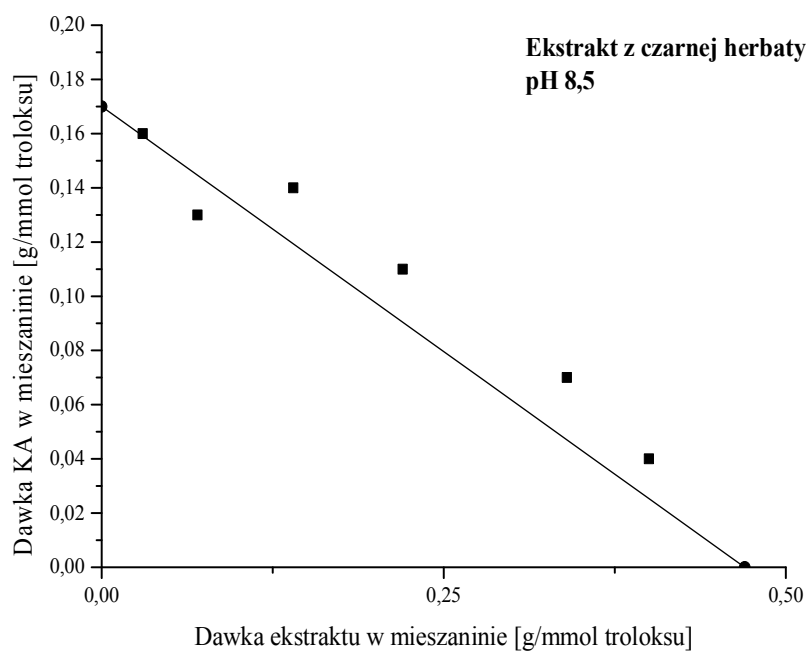
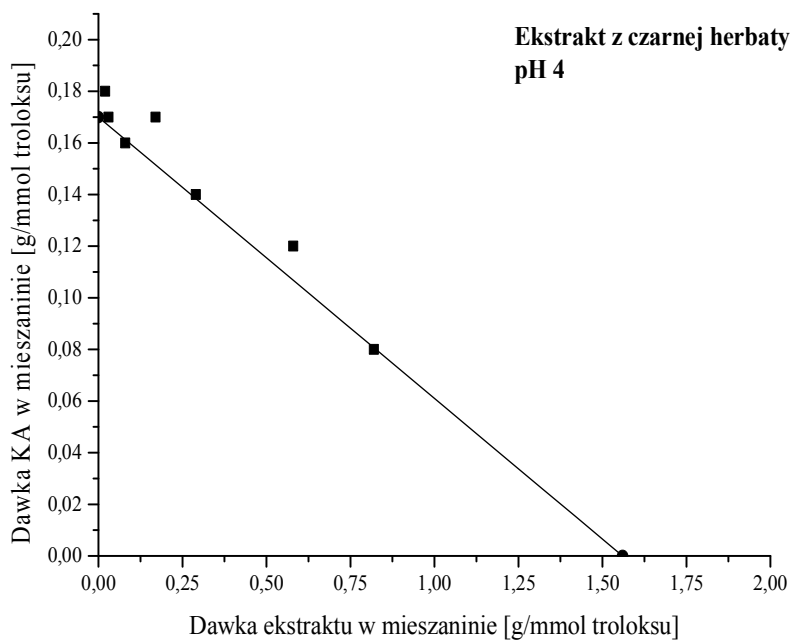
Dla mieszanin ekstraktu z czerwonej herbaty i KA (Tabela 12) obserwowano trend w kierunku synergizmu w pH 5 i wyższym dla mieszanin o nadmiarze ekstraktu (stosunki wagowe 5:1 i 2:1). Mieszaniny o stosunku wagowym ekstraktu do KA 10:1 wykazywały jednak addytywność lub antagonizm (w pH 7). Antagonizm zaobserwowano również w pH 2 i pH 3 dla mieszanin o równej zawartości składników. W przypadku mieszanin z nadmiarem KA lub ekstraktu obserwowano addytywność. Addytywność obserwowano również w pH 4.

Ekstrakt z białej herbaty z KA (Tabela 13) w mieszaninie o stosunku wagowym 10:1 wykazywał synergizm w pH 4 i 5. Z kolei w pH 8 i 9 w tym samym stosunku wagowym wykazywał antagonizm. W pozostałych wartościach pH dla pozostałych stosunków wagowych obserwowano addytywność.

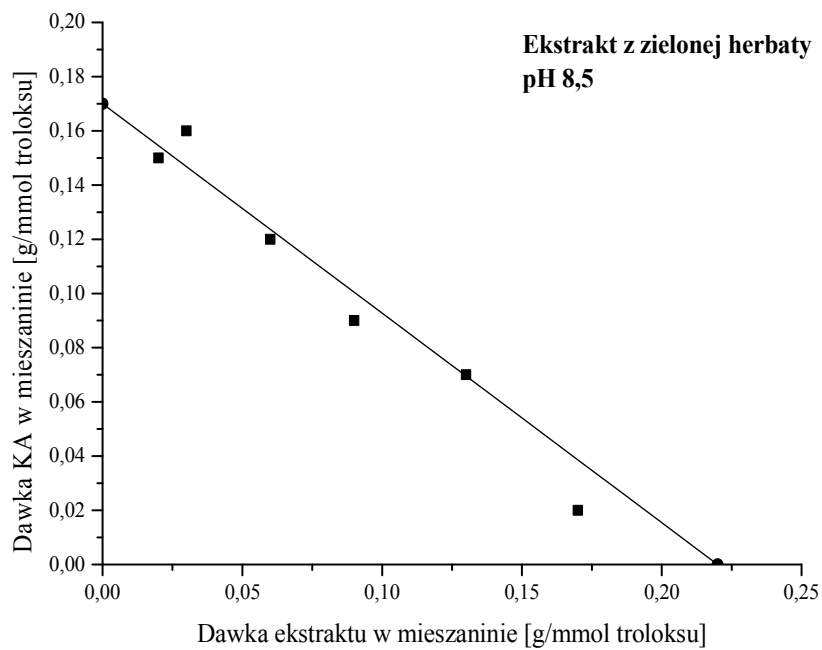
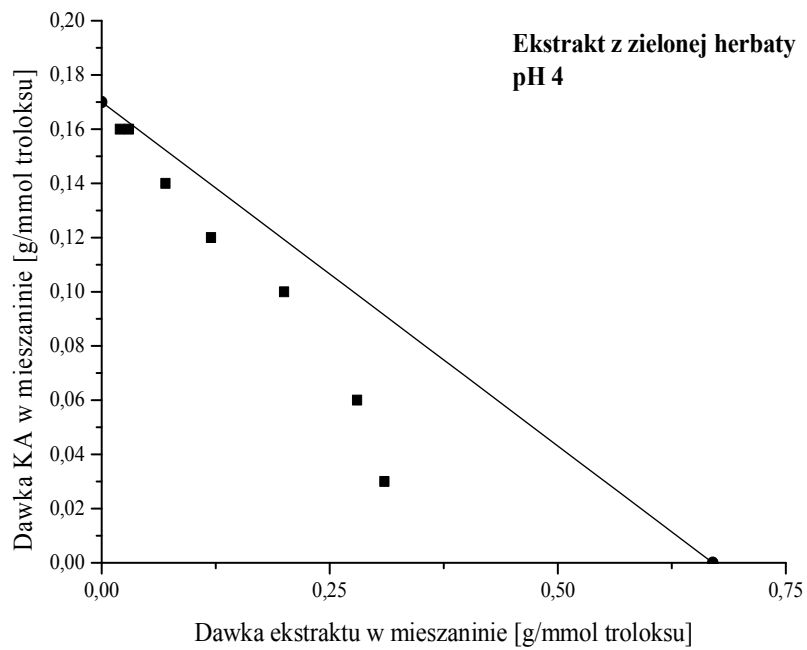
Tendencja do braku interakcji i wyników addytywnych w niższych pH (2-3) może wynikać z faktu, że większość katechin przy niskich wartościach pH wykazuje niską aktywność przeciwutleniającą (Muzolf, Szymusiak i in., 2008). Jak wspomniano wcześniej, niestandardyzowany ekstrakt z zielonej herbaty charakteryzował się największą zawartością katechin spośród badanych ekstraktów z herbat. Obserwowany w pH około 4,0 najsilniejszy efekt synergizmu ekstraktu z KA w mieszaninie o dużym nadmiarze ekstraktu do KA (10:1 i 5:1) może wynikać ze znacznej aktywności przeciwutleniającej ekstraktu (wartość TEAC około 1,8; Wykres 4) i stabilności katechin w tym pH.

Wykresy 8–11 przedstawiają izobologramy dla wybranych wartości pH (4,0 oraz 8,5) dla ekstraktów z czarnej, zielonej, czerwonej i białej herbaty. Wszystkie izobologramy dla

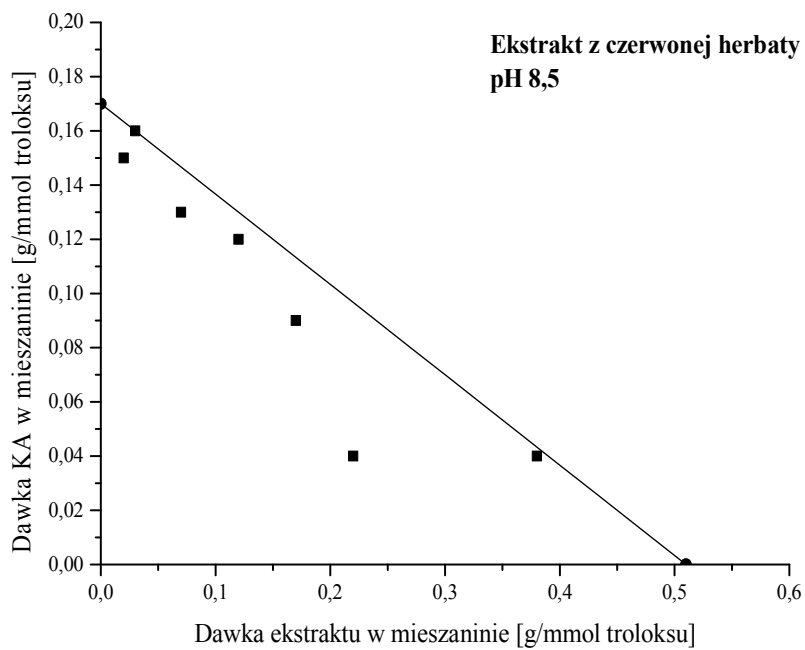
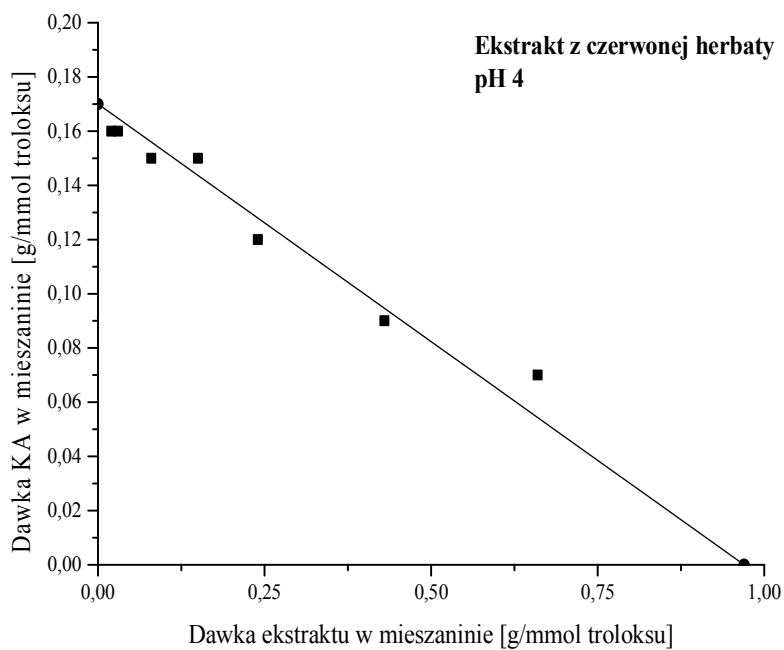
interakcji ekstraktów z kwasem askorbinowym w różnych wartościach pH zostały zamieszczone w załączniku 2.



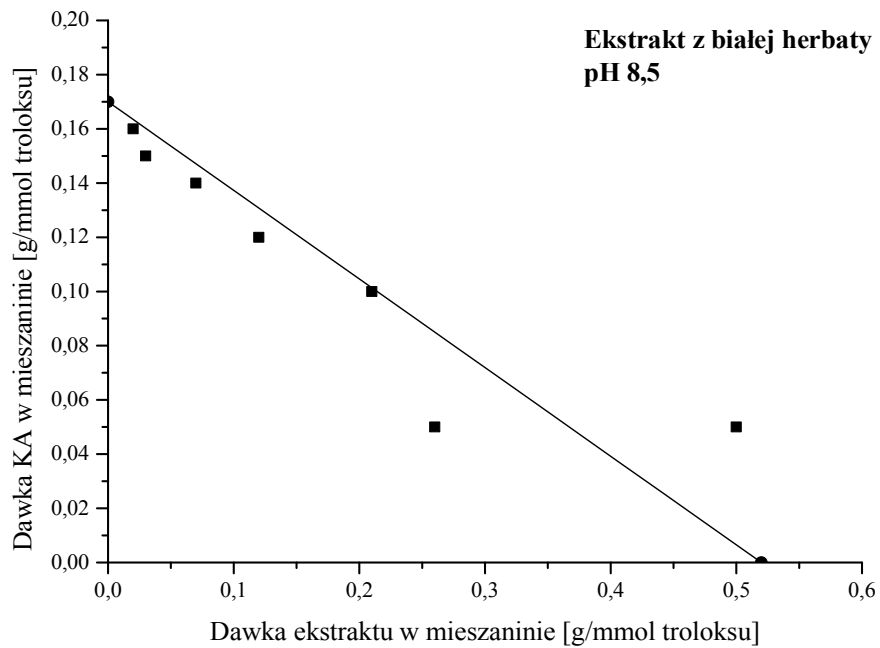
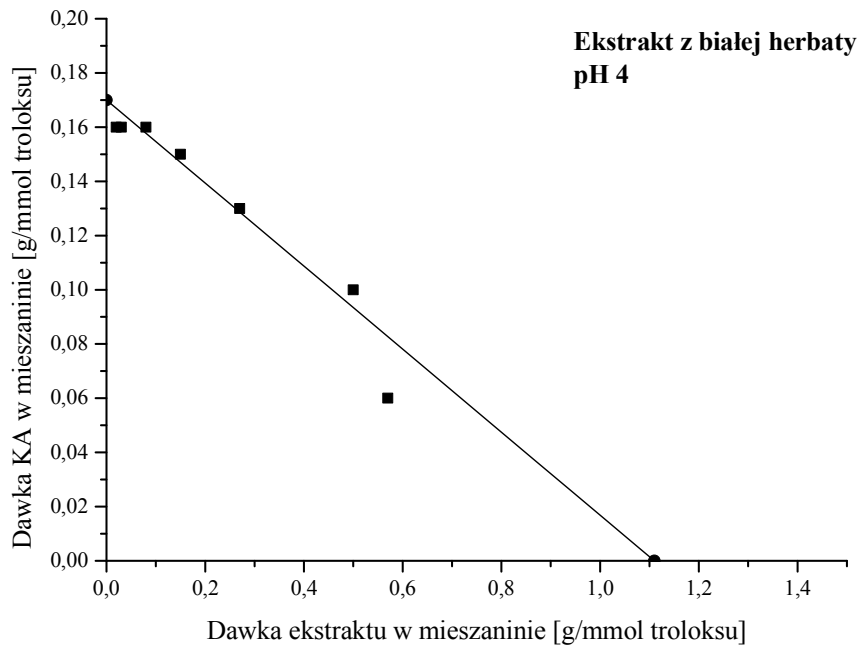
Wykres 8. Izoblogramy dla mieszanin ekstraktu z czarnej herbaty i KA (pH 4,0 i 8,5)



Wykres 9. Izoblogramy dla mieszanin ekstraktu z zielonej herbaty i KA (pH 4,0 i 8,5)



Wykres 10. Izobologramy dla mieszanin ekstraktu z czerwonej herbaty i KA (pH 4,0 i 8,5)



Wykres 11. Izobologramy dla mieszanin ekstraktu z białej herbaty i KA (pH 4,0 i 8,5)

11.5. Interakcje między kwasem askorbinowym a ekstraktem z zielonej herbaty w hamowaniu utleniania oleju sezamowego

Przeciwutleniacze są powszechnie stosowane w celu zapobiegania niekorzystnym zmianom oksydacyjnym w jadalnych tłuszczach oraz innych produktach spożywczych, a także w produktach kosmetycznych z bazą tłuszczową. Stosowane są przeciwutleniacze syntetyczne, np. BHT oraz BHA, a także naturalne, które są postrzegane przez konsumentów jako bezpieczniejsze niż syntetyczne.

Utlenianie lipidów jest wolnorodnikową reakcją łańcuchową, w wyniku której powstają nadtlenki (stąd również termin „peroksydacja”). Szczególnie wrażliwe są kwasy tłuszczowe nienasycone, przy czym im więcej jest wiązań podwójnych w cząsteczce kwasu tłuszczowego, tym łatwiejsze utlenienie. Podobnie jak inne procesy wolnorodnikowe, reakcja ta składa się z etapów inicjacji (oderwania atomu wodoru od cząsteczki lipidu, zwykle od atomu węgla przy wiązaniu podwójnym), propagacji (reakcja rodników alkilowych z tlenem, powstawanie nadtlenków lipidów; cykl może się powtarzać wielokrotnie) i terminacji (poprzez reagowanie ze sobą dwóch rodników i powstanie nieaktywnych cząsteczek). Produkty peroksydacji mogą wchodzić w kolejne reakcje, np. ulegać procesowi reinicjacji, który polega na rozpadzie nadtlenków do form wolnorodnikowych w obecności jonów metali przejściowych. Dalsze przemiany prowadzą do rozpadu reszt kwasów tłuszczowych do kilu- i kilkunastowęglowych produktów, do których należy m.in. dialdehyd malonowy (Bartosz, 2004). Reakcje utleniania lipidów są przyspieszane przez temperaturę, światło i obecność jonów metali przejściowych. O ile można do pewnego stopnia ograniczyć utlenianie lipidów przez odpowiednie warunki przechowywania produktów, o tyle powszechne i zasadne jest również użycie dodatków o właściwościach przeciwutleniających. Mogą to być substancje wygaszające wolne rodniki przez wchodzenie z nimi w reakcję (do takich należą polifenole roślinne, a także tokoferole) lub takie, które ograniczają reakcje wolnorodnikowe na inne sposoby, np. kompleksując jony metali, pochłaniając promieniowanie UV lub regenerując inne przeciwutleniacze. Ponieważ nie wszystkie przeciwutleniacze są tak samo skuteczne w danym środowisku (a nawet mogą wykazywać właściwości prooksydacyjne), ważny jest wybór odpowiednich przeciwutleniaczy do danego produktu zawierającego tłuszcz. Muszą to być substancje rozpuszczalne w tłuszczach, odporne na podwyższoną temperaturę i światło. Dodatkowo nie powinny wpływać na właściwości sensoryczne produktu (Gramza i Korczak, 2005).

Polifenole, w tym te zawarte w herbacie, kawie lub pestkach winogron, potencjalnie mogłyby zostać wykorzystane jako przeciwutleniacze w produktach spożywczych i kosmetycznych zawierających tłuszcze. Z badań Gramzy i Korczaka (2005) wynika, że ekstrakty z herbat zastosowane w różnych układach modelowych zawierających lipidy, wykazywały silne działanie przeciwutleniające, przy czym ekstrakt z zielonej herbaty wyróżniał się najwyższą aktywnością.

Liczne badania pokazały skuteczność katechin herbaty w ochronie tłuszczu przed utlenianiem. Ekstrakty z zielonej herbaty, zwłaszcza etanolowe, chroniły olej słonecznikowy i smalec przed utlenieniem, przy czym aktywność przeciwutleniająca była największa dla ekstraktów zawierających duże ilości ECG, EC i C (Gramza i in., 2006). W badaniach Wanasundara i Shahidi (1996), olej rybny z dodatkiem katechin wykazywał wyższą stabilność oksydacyjną niż oleje z dodatkiem α -tokoferolu, BHT i BHA. Najskuteczniej działającą katechiną był ECG, następnie EGCG, EGC i EC. Autorzy postawili hipotezę, że liczba grup hydroksylowych i ich rozmieszczenie w cząsteczce znacząco wpływają na aktywność przeciwutleniającą katechin (za: Gramza i Korczak, 2006). W badaniach Chen, Chang, Ma, Fung i Wang (1996) ekstrakty etanolowe z zielonej herbaty wykazywały znaczącą aktywność przeciwutleniającą w oleju rzepakowym, a ekstrakty z herbaty oolong średnią w porównaniu do BHT, natomiast ekstrakt z czarnej herbaty nie wykazywał znaczącej aktywności przeciwutleniającej. Również w przypadku oleju sojowego, oleju z wątroby dorsza oraz smalcu, wodny ekstrakt z zielonej herbaty wykazywał wyższą aktywność przeciwutleniającą niż BHT i α -tokoferol (Koketsu i Satoh 1997, za: Gramza i Korczak, 2006). Olej z nasion szałwii hiszpańskiej (zwanej chia) również był skutecznie stabilizowany poprzez dodatek ekstraktu z zielonej herbaty, chociaż palmitynian askorbylu i ekstrakt z rozmarynu były bardziej skuteczne (Ixtaina, Nolasco i Toma, 2012). Ochronne działanie katechin herbaty było obserwowane również w przypadku mięsa (czerwonego, drobiu i ryb) w czasie dziesięciu dni przechowywania w temperaturze 4°C. Aktywność przeciwutleniająca katechin herbaty okazała się dwa do czterech razy wyższa niż α -tokoferolu, przy czym najsłabsze działanie obserwowano w przypadku mięsa wieprzowego, z kurcząt i z kaczek (Tang, Sheehan, Buckley, Morrissey i Kerry, 2001).

Obserwowano również interakcje przeciwutleniaczy w tłuszczach. Kombinacja α -tokoferolu z ekstraktem z zielonej herbaty, z (-)-EC lub z (+)-C była badana w różnych

układach lipidowych, w tym w oleju słonecznikowym w masie metodą Rancimat (Yin, Becker, Andersen i Skibsted, 2012). EC i (+)-C wykazywały oddziaływanie antagonistyczne (w stosunku wagowym 1:2 tokoferolu do EC bądź C) lub efekt addytywny (w stosunku wagowym 2:1), z kolei ekstrakt z zielonej herbaty wykazywał oddziaływanie synergistyczne z tokoferolem. Synergizm ten może być spowodowany działaniem innych katechin herbaty (np. EGCG), które mogą opóźniać rozkład tokoferolu lub regenerować jego rodnikową formę (Yin i in., 2012). Podobnie regenerować tokoferole może inny polifenol, kwercetyna (Skibsted, 2012). Konieczne są szersze badania w celu określenia różnic w mechanizmie interakcji ekstraktu lub pojedynczych polifenoli z α -tokoferolem bądź kwasem askorbinowym. Można jednak przypuszczać, że jednym z czynników powodujących odmienne rodzaje interakcji jest hydrofilowość kwasu askorbinowego w porównaniu do hydrofobowego tokoferolu.

11.5.1. Utlenianie oleju sezamowego w obecności ekstraktu z zielonej herbaty, kwasu askorbinowego oraz ich mieszanin

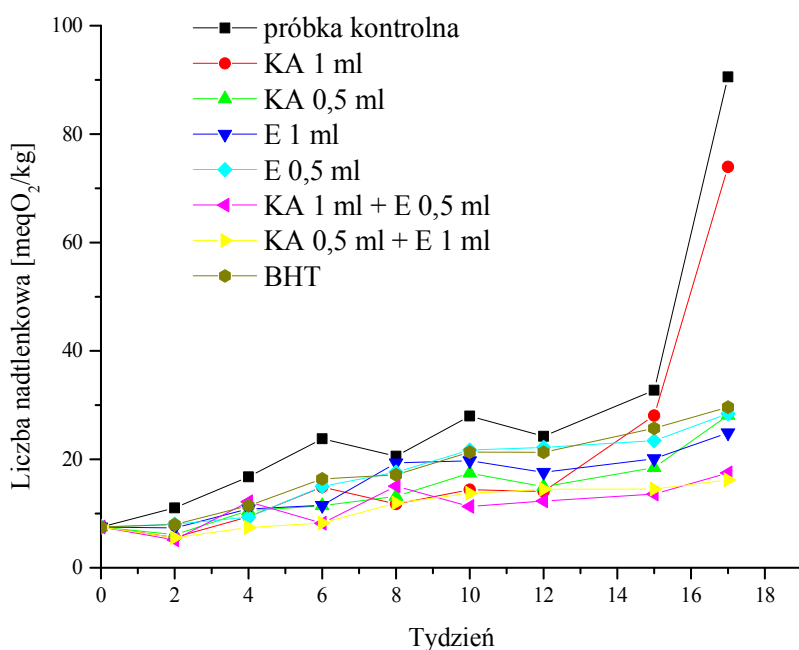
W celu zbadania zdolności ekstraktów roślinnych do hamowania utleniania olejów wybrano niestandardyzowany ekstrakt z zielonej herbaty. Spośród badanych ekstraktów charakteryzował się on największą zawartością związków polifenolowych ($283,0 \pm 10,7$ mg/g ekstraktu; Tabela 1). Aktywność tego ekstraktu w oleju porównano do aktywności BHT. W badaniach wykorzystano olej sezamowy, który stosowany jest zarówno w celach spożywczych, jak i kosmetycznych. Oleje roślinne nie zawierają witaminy C, co pozwala na obserwację efektu działania kwasu askorbinowego dodanego w trakcie badania.

Według danych literaturowych, olej sezamowy zawiera około 14% nasyconych, 39% jednonienasyconych i 41% wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (Konsoula i Liakopoulo-Kyriakides, 2010). Wyniki badań własnych są z tymi danymi zgodne (Tabela 1 w załączniku 3). Olej sezamowy zawiera również substancje o właściwościach przeciwutleniających – tokoferole, lignany (sezamina i sezamolina) oraz związki fenolowe (sezamol), dzięki którym jest stosunkowo odporny na procesy utleniania (Konsoula i Liakopoulo-Kyriakides, 2010).

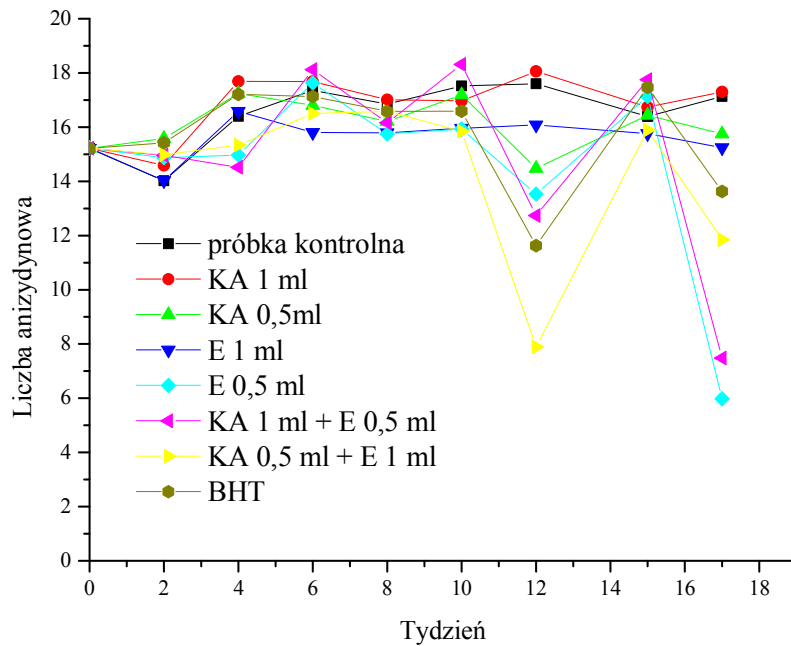
Pomiar liczby nadtlenkowej i liczby anizydynowej prowadzony był osiem razy w okresie 17 tygodni. Wartości liczb nadtlenkowej i anizydynowej w kolejnych tygodniach dla wszystkich wariantów próbek oraz wartości TOTOX znajdują się w załączniku 3

(Tabele 2, 3 i 4). W badanych próbkach oleju sezamowego monitorowano zawartość tokoferoli w celu sprawdzenia, czy obserwowane interakcje mogą mieć związek z ewentualną zmianą ich zawartości.

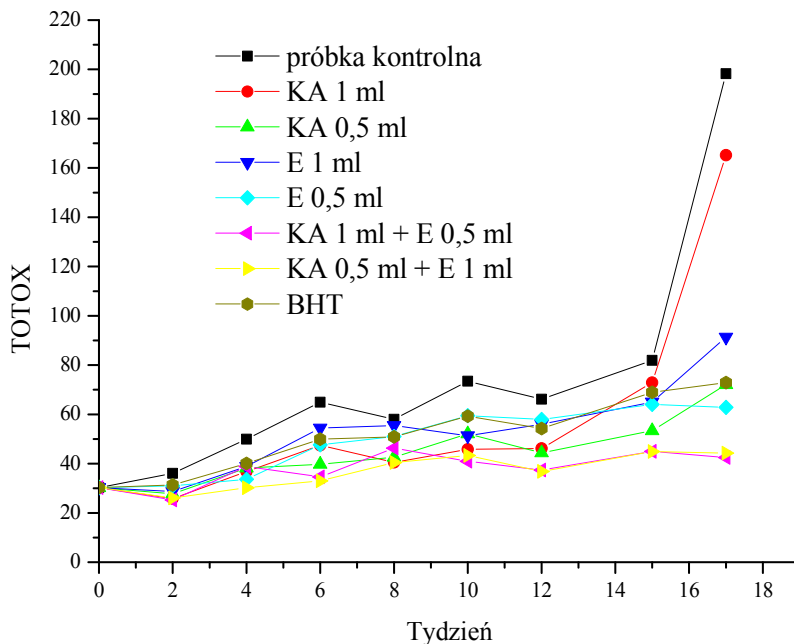
Zmiany wartości liczby nadtlenkowej, anizydynowej i wartości TOTOX ilustrują Wykresy 12-14.



Wykres 12. Zmiany wartości liczby nadtlenkowej próbek oleju sezamowego z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy i ich mieszanin



Wykres 13. Zmiany wartości liczby anizydynowej próbek oleju sezamowego z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy



Wykres 14. Zmiany wartości TOTOX próbek oleju sezamowego z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy

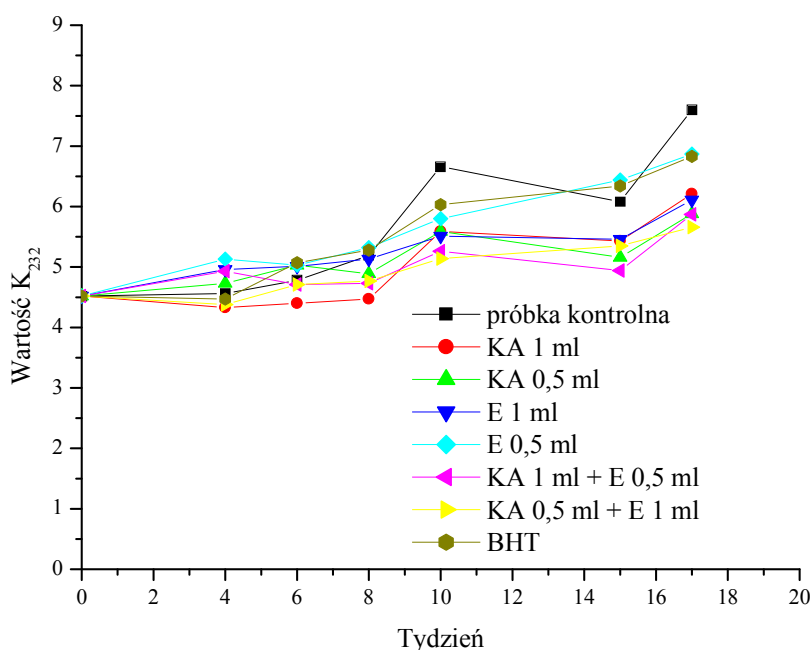
Wartości liczby nadtlenkowej (Wykres 12), wskazującej na zawartość pierwotnych produktów utleniania lipidów, wzrastały znacząco dla wszystkich rodzajów próbek. Najbardziej gwałtowny wzrost wartości liczby nadtlenkowej, z 7,52 do 90 meq O₂/kg po 17 tygodniach, zaobserwowano dla próbki kontrolnej. W porównaniu z danymi literaturowymi są to wartości stosunkowo wysokie. W badaniu Wu i in. (2013), oleje sezamowe przechowywano w temperaturze pokojowej przez 7 miesięcy. Dla oleju sezamowego tłoczonego na zimno, liczba nadtlenkowa po 4 miesiącach (16 tygodniach) wzrosła z $1,61 \pm 0,89$ do $3,32 \pm 0,21$ meq O₂/kg, a po 7 miesiącach wynosiła $6,79 \pm 0,01$ meq O₂/kg. Dla oleju rafinowanego liczba nadtlenkowa wzrosła z $3,28 \pm 0,36$ do $18,08 \pm 1,62$ meq O₂/kg po 7 miesiącach. W badaniach Wu i in. (2013) próbki były przechowywane w ciemności, co wpływa na szybkość procesu utleniania. Próbki oliwy z oliwek przechowywane w ciemności w temperaturze pokojowej przez 4 tygodnie mogą mieć liczbę nadtlenkową dwa razy niższą niż identyczne przechowywane na świetle (Asensio, Nepote i Grosso, 2011). Większość badań nad stabilnością olejów, w tym oleju sezamowego, wykorzystuje testy przyspieszone (użycie wysokiej temperatury). Bardziej wiarygodnym pomiarem wydaje się jednak pomiar stopnia utlenienia oleju przechowywanego w warunkach odpowiadających jego zwykłemu użytkowaniu.

Wartości liczby anizydynowej (Wykres 13), służącej do określania zawartości wtórnych produktów utleniania, nie zmieniały się znacząco. Wyjątek stanowią próbki zawierające mieszaniny badanych antyoksydantów, ekstrakt w ilości 0,5 ml i oraz BHT, przechowywane przez 12 i 17 tygodni, dla których zaobserwowano spadek ilości wtórnych produktów utlenienia.

Wartość TOTOX wzrastała dla wszystkich badanych próbek, najszybciej dla próbki kontrolnej (Wykres 14). Po 17 tygodniach przechowywania, najwyższe wartości TOTOX stwierdzono dla próbki kontrolnej (198,3), a następnie dla próbki zawierającej 1 ml KA (165,2). Dla pozostałych próbek wartość TOTOX wynosiła od 42,5 do 91,3.

Dodatek BHT, ekstraktu z zielonej herbaty, KA oraz ich mieszanin w stosunku wagowym 2:1 lub 1:2 poprawiał stabilność oksydacyjną badanego oleju (Wykresy 12 i 14). Najwyższą stabilnością (najniższą liczbą nadtlenkową, a także wartością TOTOX), niższą również od próbek z dodatkiem BHT, charakteryzowały się próbki z dodatkiem mieszanin ekstraktu z zielonej herbaty i KA w obu stosunkach wagowych.

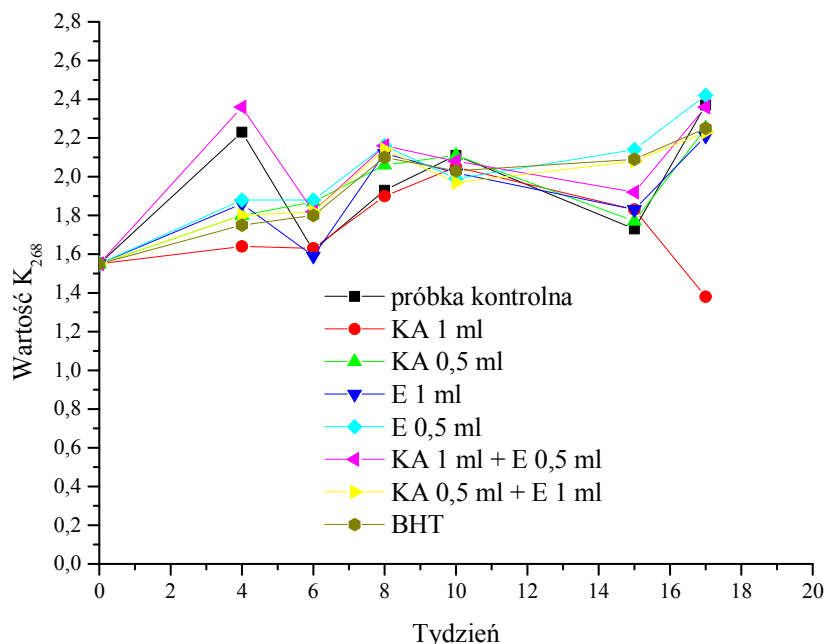
Dla badanych próbek oleju sezamowego oznaczono również wartości K_{232} i K_{268} jako dodatkową miarę stopnia utlenienia (Deepam i in., 2011). Wartości K_{232} i K_{268} wskazują na zawartość odpowiednio skoniugowanych dienów i skoniugowanych trienów. Wyniki przedstawione zostały na Wykresach 15 i 16. Wartości K_{232} i K_{268} badanych próbek wzrastały w ciągu 17 tygodni. Podobnie jak w przypadku liczb nadtlenkowej i anizydynowej oraz wartości TOTOX, większość danych literaturowych odnosi się do testów przyspieszonych. Wyniki obecnego badania są jednak porównywalne z danymi literaturowymi dla oliwy z oliwek (Asensio i in., 2011), gdzie wartość K_{232} wzrastała o około 0,5 w ciągu miesiąca, zarówno dla próbek przechowywanych na świetle, jak i w ciemności.



Wykres 15. Zmiany wartości K_{232} w próbkach oleju sezamowego z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy

Początkowa wartość K_{232} dla badanych próbek wynosiła $4,52 \pm 0,79$ (Wykres 15, Tabela 5 w załączniku 3). W ciągu 17 tygodni przechowywania zaobserwowano wzrost do $7,60 \pm 0,39$ dla próbki kontrolnej (najwyższa wartość) i $5,66 \pm 0,17$ dla mieszanki KA i ekstraktu z zielonej herbaty w stosunku 1:2 oraz $5,87 \pm 0,23$ dla mieszanki KA i ekstraktu z zielonej herbaty w stosunku 2:1 (najniższe wartości). Wartość K_{268} wynosiła początkowo $1,55 \pm 0,05$ (Wykres 16, Tabela 6 w załączniku 3). Obserwowano wzrost tej wartości do około 2,20-2,40 po 17 dniach przechowywania we wszystkich próbkach

z wyjątkiem próbki zawierającej KA w ilości 1 ml, dla której zaobserwowano spadek wartości K_{268} do około $1,38 \pm 0,12$.



Wykres 16. Zmiany wartości K_{268} w próbkach oleju sezamowego z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy

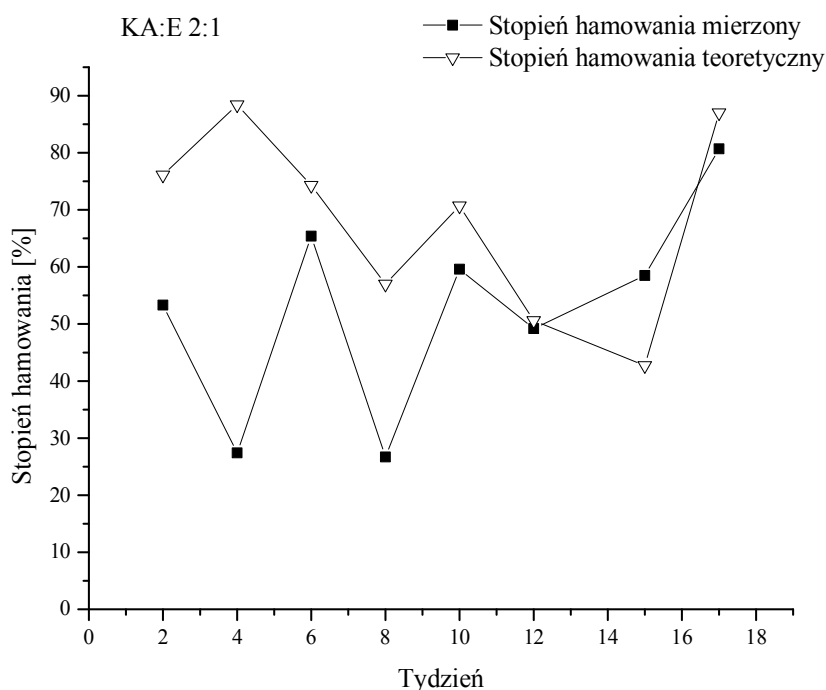
11.5.2. Interakcje pomiędzy kwasem askorbinowym a ekstraktem z zielonej herbaty w oleju sezamowym

Typ interakcji pomiędzy ekstraktem z zielonej herbaty i KA w odniesieniu do przeciwdziałania utlenianiu oleju sezamowego określono metodą sumowania indywidualnych efektów. Na podstawie wartości liczby nadtlenkowej obliczono teoretyczne (na podstawie próbek zawierających wyłącznie KA lub wyłącznie ekstrakt) i mierzone (dla próbek zawierających zarówno KA, jak i ekstrakt) stopnie hamowania utleniania oleju w odniesieniu do próbki kontrolnej (niezawierającej przeciwutleniaczy). Wartości stopni hamowania przedstawione są w tabeli 7, w załączniku 3.

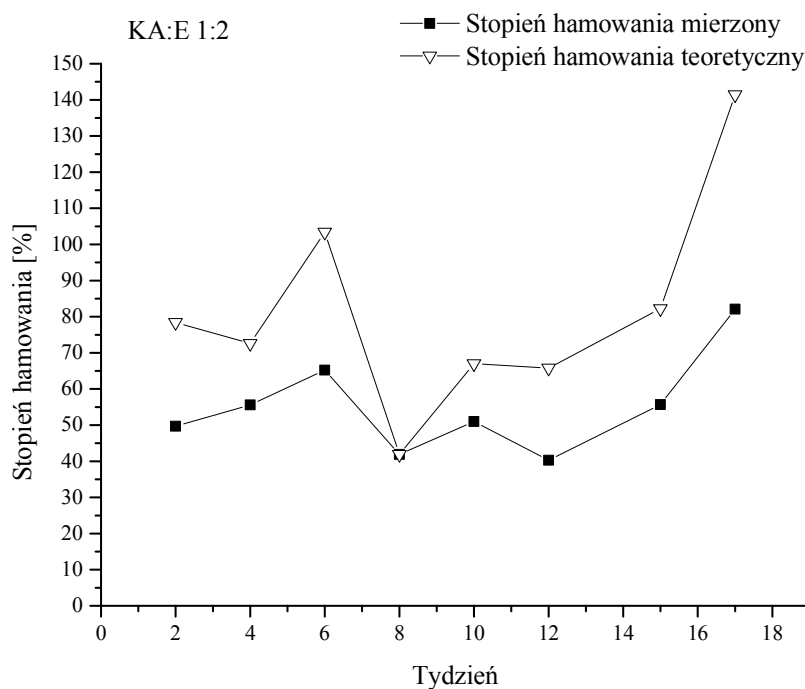
O antagonizmie świadczyła sytuacja, w której teoretycznie obliczony stopień hamowania utleniania oleju przez mieszaninę był wyższy niż zmierzony. W przypadku synergizmu zmierzony stopień hamowania utleniania oleju przez mieszaninę był wyższy od teoretycznego. Brak istotnych różnic wskazywał na addytywność. Dodatni znak wartości mierzonych stopni hamowania wskazuje na przeciwutleniające działanie

ekstraktów i kwasu askorbinowego, podczas gdy znak ujemny wskazuje na działanie proutleniające (utlenianie oleju w próbce z przeciwutleniaczem zachodzi szybciej niż w próbce kontrolnej).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono hamowanie utleniania oleju sezamowego przez zarówno ekstrakt z zielonej herbaty, jak i KA. Zaobserwowano również, że ich mieszaniny o stosunku wagowym 2:1 i 1:2 hamowały utlenianie oleju w większym stopniu niż pojedyncze substancje dodawane w stężeniach cząstkowych. Stwierdzono jednak antagonizm między ekstraktem z zielonej herbaty a KA w hamowaniu utleniania oleju sezamowego, gdyż przy obu stosunkach wagowych teoretyczne stopnie hamowania były wyższe niż mierzone. Wyjątek stanowią próbki oleju (stosunek wagowy 2:1) w 12 tygodniu, w którym zaobserwowano efekt addytywny i 15 tygodniu, w którym zaobserwowano efekt synergistyczny (Wykres 17). Również w przypadku stosunku wagowego 1:2 w 8 tygodniu obserwowano addytywność (Wykres 18). Trudno jest wyjaśnić obserwowane odstępstwa od ogólnego trendu, zatem można stwierdzić, że generalnie KA i ekstrakt z zielonej herbaty działają antagonistycznie w hamowaniu utleniania oleju sezamowego.



Wykres 17. Stopnie hamowania utleniania oleju sezamowego z dodatkiem mieszanin KA i ekstraktu z zielonej herbaty w stosunku wagowym 2:1 (obliczone na podstawie liczby nadtlenkowej)

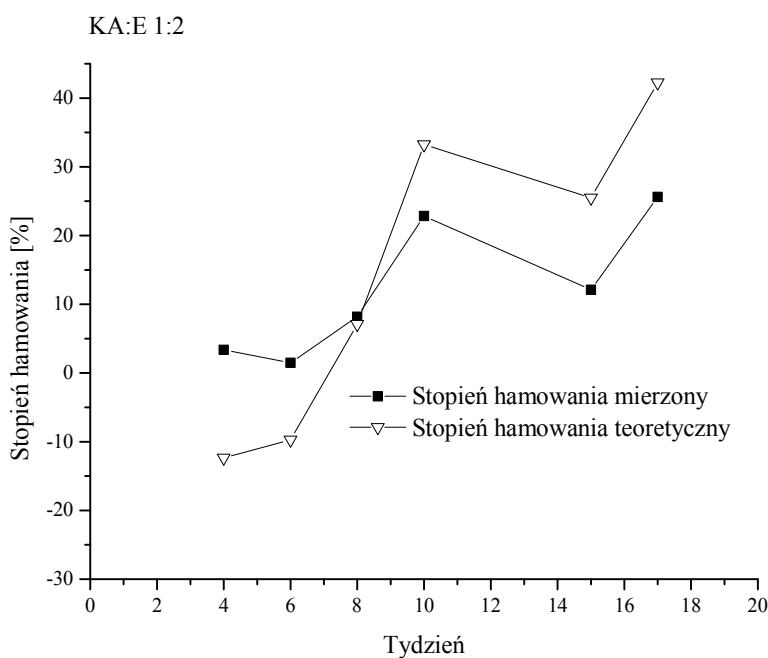
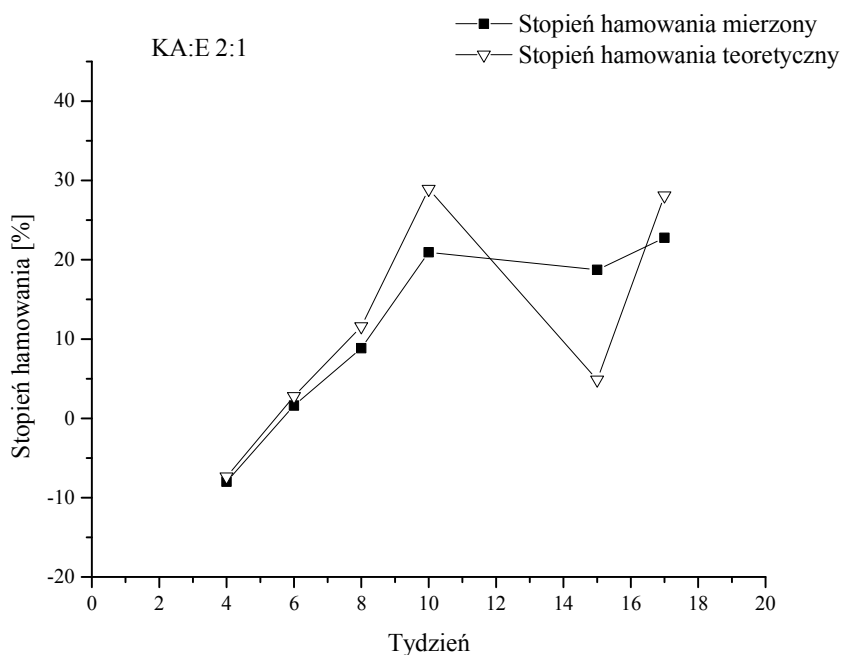


Wykres 18. Stopnie hamowania utleniania oleju sezamowego z dodatkiem mieszanin KA i ekstraktu z zielonej herbaty w stosunku wagowym 1:2 (obliczone na podstawie liczby nadtlenkowej)

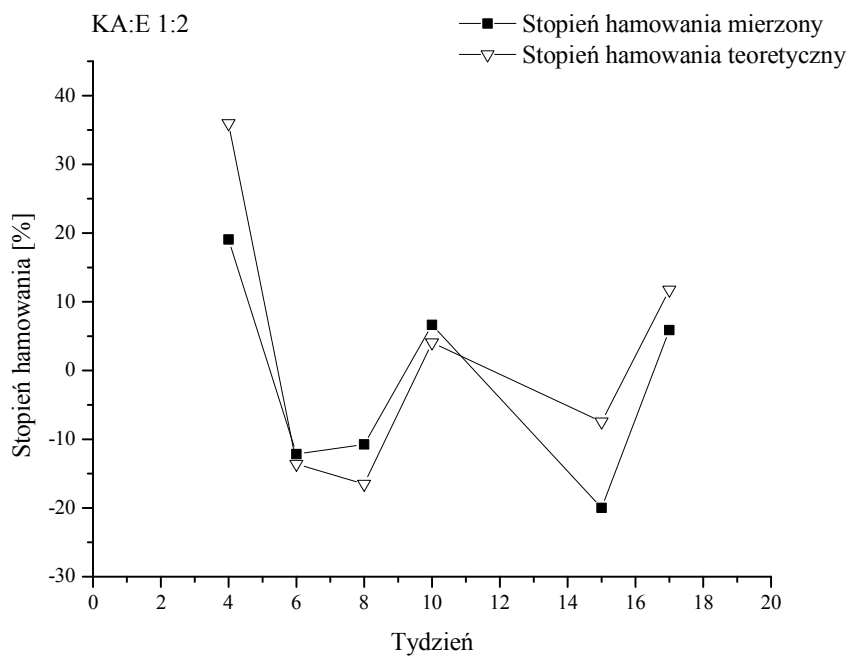
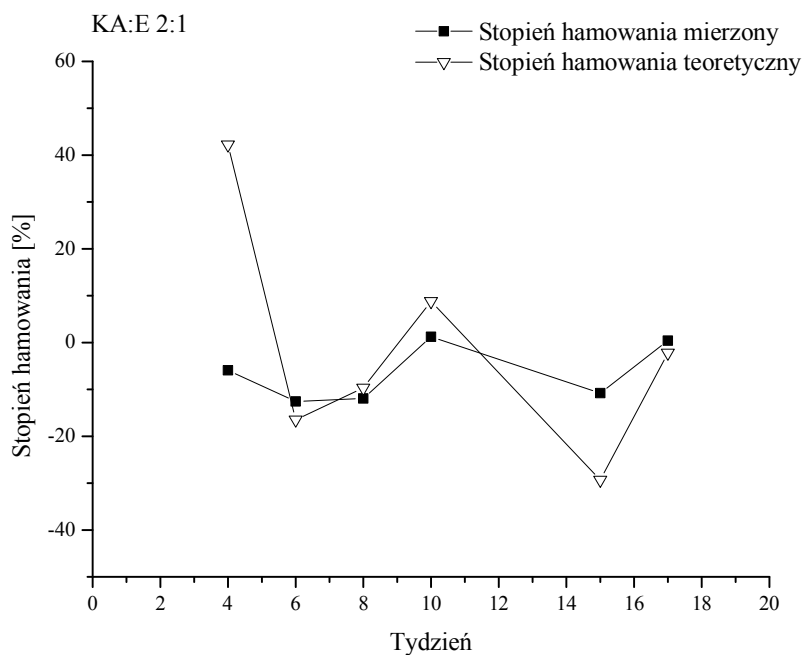
Na podstawie wartości K_{232} i K_{268} również obliczono teoretyczne i zmierzone stopnie hamowania utleniania próbek oleju sezamowego z dodatkiem przeciwutleniaczy w porównaniu do próbki kontrolnej.

Podobnie jak w przypadku badania interakcji na podstawie liczby nadtlenkowej, na podstawie wartości K_{232} i K_{268} stwierdzono hamowanie utleniania oleju sezamowego przez ekstrakt z zielonej herbaty i KA. Na podstawie zmian wartości K_{232} (Wykres 19) zaobserwowano również, że ich mieszaniny o stosunku wagowym 2:1 i 1:2 hamowały utlenianie oleju w większym stopniu niż pojedyncze substancje dodawane w stężeniach cząstkowych, ale uzyskane wyniki wskazują na trend w kierunku antagonizmu w próbkach z mieszaniną KA i ekstraktu z zielonej herbaty zarówno przy stosunku wagowym 1:2, jak i 2:1 (Wykres 19). Podobnie jak w przypadku liczby nadtlenkowej, wyjątek stanowi próbka oleju w 15 tygodniu (z dodatkiem ekstraktu i KA w stosunku 2:1), dla której obserwowano synergizm (Wykres 19 i 20). Synergizm obserwowano również w przypadku stosunku wagowego 1:2 do 6 tygodnia dla wartości K_{232} (Wykres 19) oraz słaby synergizm dla stosunku 2:1 w 6, 15 i 17 tygodniu dla wartości K_{268} (Wykres, 20). Po 10 tygodniu przechowywania dla stosunku wagowego 1:2 i wartości K_{268} obserwowano antagonizm

(Wykres, 20). Tabele przedstawiające teoretyczne stopnie hamowania obliczone na podstawie wartości K_{232} i K_{268} zawarte są w załączniku 3 (Tabele 8 i 9).



Wykres 19. Stopnie hamowania utleniania oleju sezamowego z dodatkiem mieszanin KA i ekstraktu z zielonej herbaty (obliczone na podstawie wartości K_{232})



Wykres, 20. Stopnie hamowania utleniania oleju sezamowego z dodatkiem mieszanin KA i ekstraktu z zielonej herbaty (obliczone na podstawie wartości K_{268})

11.5.3. Zawartość tokoferoli w oleju sezamowym z dodatkiem kwasu askorbinowego i ekstraktu z zielonej herbaty oraz ich mieszanin

W badanych próbkach oleju monitorowano zawartość tokoferoli, które posiadając właściwości przeciwutleniające mogłyby wpływać na stabilność oksydacyjną próbki, a także wchodzić w interakcje z kwasem askorbinowym i ekstraktem z herbat. W literaturze opisano synergizm pomiędzy kwasem askorbinowym, tokoferolami i kwercetyną w zapobieganiu utlenianiu LDL (Murakami i in., 2003) oraz między tokoferolem i mirycetyną w zapobieganiu utlenianiu triacylogliceroli oleju słonecznikowego (Marinova i in., 2008). Becker i in. (2007) zaobserwowali z kolei antagonizm pomiędzy tokoferolem i kwercetyną w oleju słonecznikowym.

Oznaczono skład tokoferoli w badanym oleju sezamowym. Zawartość poszczególnych tokoferoli wynosiła:

- $5,1 \pm 0,1$ mg α -tokoferolu/100 g oleju,
- $33,2 \pm 0,4$ mg ($\beta + \gamma$)-tokoferolu/100 g oleju,
- $2,0 \pm 0,6$ mg δ -tokoferolu/100 g oleju.

Całkowita zawartość tokoferoli w oleju sezamowym użytym w niniejszych badaniach wynosiła $40,3 \pm 0,9$ mg/100 g i była zgodna z danymi literaturowymi. W badaniach Rangkadilok i in. (2010) zawartość tokoferoli w oleju sezamowym wynosiła 30,4–64,7 mg/100 g oleju. Z kolei w badaniach Aued-Pimentel, Takemoto, Antoniassi i Gastaldo Badolato (2006) zawartość tokoferoli w różnych komercyjnych olejach sezamowych wynosiła około 50 mg/100 g oleju, z czego większość (zwykle prawie 100%) stanowił γ -tokoferol.

Wyniki pomiaru zawartości tokoferoli wskazują na brak istotnych zmian w ich poziomie w czasie 17 tygodni przechowywania próbek oleju (Tabela 10 w załączniku 3), co sugeruje, że obecność tokoferoli nie wpływała na obserwowane różnice w wartościach liczby nadtlencowej oraz anizydynowej, wartości TOTOX, K_{232} i K_{268} badanych próbek.

11.6. Stabilność oksydacyjna emulsji kosmetycznej z dodatkiem badanych ekstraktów, kwasu askorbinowego oraz ich mieszanin

Ekstrakty różnych rodzajów herbat różnią się między sobą znacząco pod względem zdolności do hamowania utleniania emulsji. W badaniach Gramzy, Hęś i Korczaka (2008) zbadano wpływ ekstraktów wodnych i etanolowych z herbaty zielonej, czarnej, żółtej, białej i oolong na stabilność emulsji kwasu linolenowego. Najlepszymi właściwościami ochronnymi charakteryzował się ekstrakt etanolowy z żółtej herbaty, przy czym jego działanie było porównywalne z działaniem ekstraktów z rozmarynu i BHT. W badaniach Liu i Yang'a (2008) ekstrakt z zielonej herbaty i kwas askorbinowy dodane w stężeniu 100 ppm (0,01%) do emulsji olej w wodzie zawierającej kwas linolenowy wykazywały właściwości przeciwutleniające, przy czym silniejszy efekt wywierał ekstrakt z herbaty niż kwas askorbinowy. Zbadano również działanie poszczególnych katechin herbaty w stężeniu 100 ppm (0,01%). Najwyższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się EGCG i ECG, natomiast GCG wykazywał słabą aktywność. EC, EGC i GCG nie wykazywały żadnej aktywności w stężeniu 50 ppm (0,005%), podczas gdy EGCG i ECG były w tym stężeniu aktywne (Liu i Yang, 2008). Ekstrakt z zielonej herbaty stabilizował również emulsję typu woda w oleju, ale słabiej niż ekstrakt z oliwy z oliwek (Mosca, Diantom, Lopez, Ambrosone i Ceglie, 2013). Skuteczność ekstraktu z zielonej herbaty była również niższa niż α -tokoferolu w hamowaniu utleniania emulsji zawierającej kwasy tłuszczowe omega-3 (Dwyer, O'Beirne, Eidhin i O'Kennedy, 2012).

Sorensen i in. (2011) stwierdzili, że kwas askorbinowy wykazuje działanie przeciwutleniające w emulsjach woda w oleju i olej w wodzie. W emulsji typu woda w oleju kwas askorbinowy skuteczniej hamował utlenianie na początku okresu przechowywania emulsji, co autorzy tłumaczą większym stężeniem hydrofilowego kwasu askorbinowego w fazie wodnej. W emulsji typu olej w wodzie kwas askorbinowy również skutecznie przeciwdziałał utlenianiu na początku okresu przechowywania, lecz działał prooksydacyjnie na końcu tego okresu (po 15 dniach) (Sorensen i in., 2011).

Dane literaturowe sugerują też, że możliwe są interakcje między ekstraktami z herbat a innymi przeciwutleniaczami dodanymi do emulsji. Ekstrakt z zielonej herbaty i α -tokoferol wykazywały silne działanie synergistyczne w emulsji typu olej w wodzie zawierającej linolenian metylu, podczas gdy w liposomach działanie to było jedynie addytywne. α -Tokoferol w mieszaninie z EC lub C wykazywał synergizm zarówno

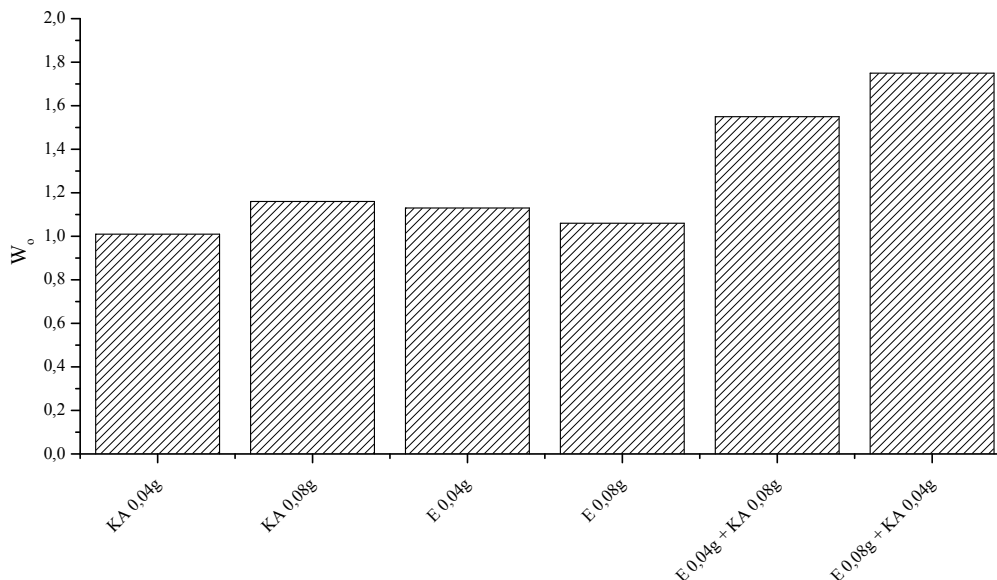
w emulsji, jak i w liposomach. Jako możliwy mechanizm działania synergistycznego autorzy wskazali na opóźnianie rozkładu i regenerację tokoferolu przez katechiny (Yin i in., 2012).

W niniejszej pracy zbadano stabilność oksydacyjną emulsji olej w wodzie. Do badań wybrano olej żurawinowy, stosowany jako składnik kosmetyków. Oznaczenie wykonano w aparacie RapidOxy do badania stabilności oksydacyjnej próbek żywnościowych i nieżywnościowych.

Z badań Van Hoed i in. (2009) wynika, że kwas oleinowy może stanowić około 25,3%, linolowy 37,7%, a linolenowy 30,1% ogółu kwasów tłuszczowych zawartych w oleju żurawinowym. Podobny udział tych kwasów stwierdzono w oleju żurawinowym zastosowanym w niniejszej pracy (około 24,3% kwasu oleinowego, 38,1% kwasu linolowego i 30,8% kwasu linolenowego). W oleju żurawinowym użytym w niniejszych badaniach oznaczono również zawartość tokoferoli. Całkowita zawartość tokoferoli wynosiła $8,93 \pm 0,07$ mg/100 g oleju, w tym $2,67 \pm 0,07$ mg α -tokoferolu/100 g oleju, $5,89 \pm 0,14$ mg ($\beta + \gamma$)-tokoferolu/100 g oleju oraz $0,37 \pm 0,01$ mg δ -tokoferolu/100 g oleju. Jest to porównywalna ilość do tej z badań Van Hoed i in. (2009), w których oznaczono całkowitą zawartość tokoferoli w oleju żurawinowym na poziomie 13,9 mg/100 g oleju.

Tabela przedstawiająca czas potrzebny próbkom emulsji kosmetycznej do zużycia 5% tlenu w komorze pomiarowej oraz obliczone na tej podstawie współczynniki ochronne (W_o) znajduje się w załączniku 3 (Tabela 11). W_o jest stosunkiem czasu potrzebnego do zużycia 5% tlenu w komorze pomiarowej dla próbki z dodatkiem przeciwutleniacza do czasu potrzebnego do zużycia 5% tlenu w komorze pomiarowej dla próbki kontrolnej (emulsja bez przeciwutleniaczy). Dla większości badanych przeciwutleniaczy uzyskano wartości W_o większe niż 1, co oznacza efekt ochronny (przeciwutleniający). Najskuteczniejszym działaniem ochronnym wobec zastosowanej emulsji charakteryzowały się mieszaniny KA i ekstraktu z zielonej kawy (zawierającego kwasy chlorogenowe). W_o mieszaniny ekstraktu z KA w stosunku wagowym 1:2 wynosił 1,55, natomiast przy stosunku wagowym 2:1 wynosił 1,75. Efekt ochronny samego ekstraktu był znacznie słabszy niż jego mieszaniny z KA i wynosił 1,13 dla dodatku 0,04 g ekstraktu i 1,06 dla dodatku 0,08 g ekstraktu (Wykres 21). Ekstrakt ten charakteryzował się słabym działaniem przeciwutleniającym w testach TEAC, FRAP (środowisko wodne) i DPPH (środowisko

metanolowe), co pokazuje jak bardzo właściwości przeciwutleniające zależą od środowiska reakcji.

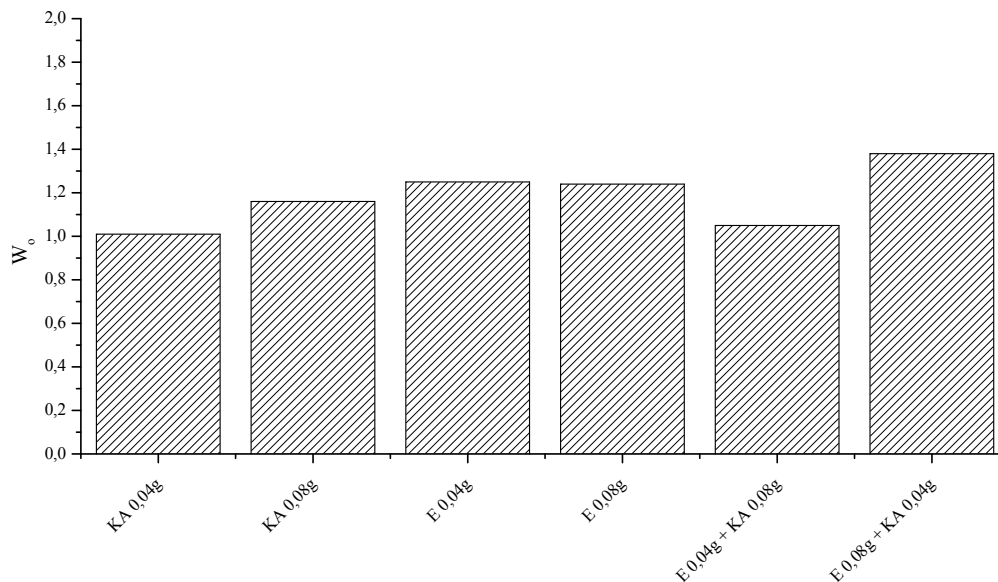


Wykres 21. W_0 dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z zielonej kawy i KA

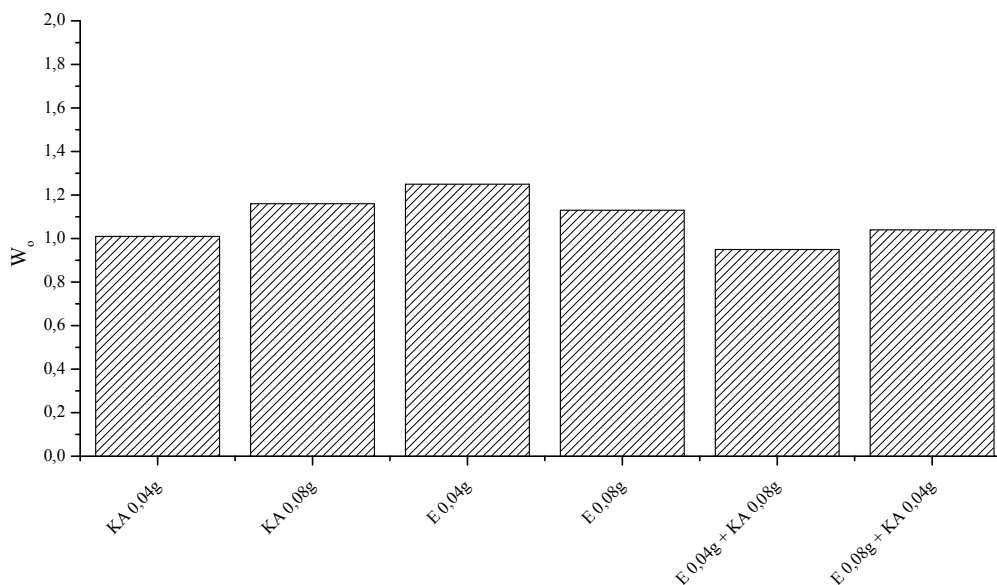
Wysokie wartości W_0 stwierdzono również w przypadku emulsji z dodatkiem ekstraktu z pestek winogron (1,25 dla dodatku 0,04 g ekstraktu i 1,24 dla dodatku 0,08 g ekstraktu) oraz emulsji z dodatkiem ekstraktu i KA w stosunku 2:1 ($W_0 = 1,38$). Przy stosunku 1:2 wartość W_0 wynosiła jedynie 1,05 (Wykres 22).

Spośród emulsji z dodatkiem ekstraktów z herbat najwyższą wartością W_0 charakteryzowała się emulsja z ekstraktem z białej herbaty ($W_0 = 1,25$ przy dodatku 0,04 g ekstraktu i $W_0 = 1,13$ przy dodatku 0,08 g ekstraktu), ale efekt ochronny jego mieszaniny z KA w stosunku 2:1 wynosił jedynie 1,04. W przypadku mieszaniny 1:2 stwierdzono słaby efekt protleniający ($W_0 = 0,95$; Wykres 23). Podobne wartości W_0 , jak w przypadku emulsji z dodatkiem ekstraktu z białej herbaty, stwierdzono w przypadku emulsji z dodatkiem niestandardyzowanego ekstraktu z zielonej herbaty ($W_0 = 1,22$ i $W_0 = 1,11$ odpowiednio dla dodatku 0,04 g i 0,08 g). Obecność w emulsji dodatkowo KA nie wpłynęła na zwiększenie stabilności oksydacyjnej emulsji w przypadku mieszaniny ekstraktu i KA w stosunku 1:2 ($W_0 = 1,22$), natomiast znacząco wydłużyła stabilność

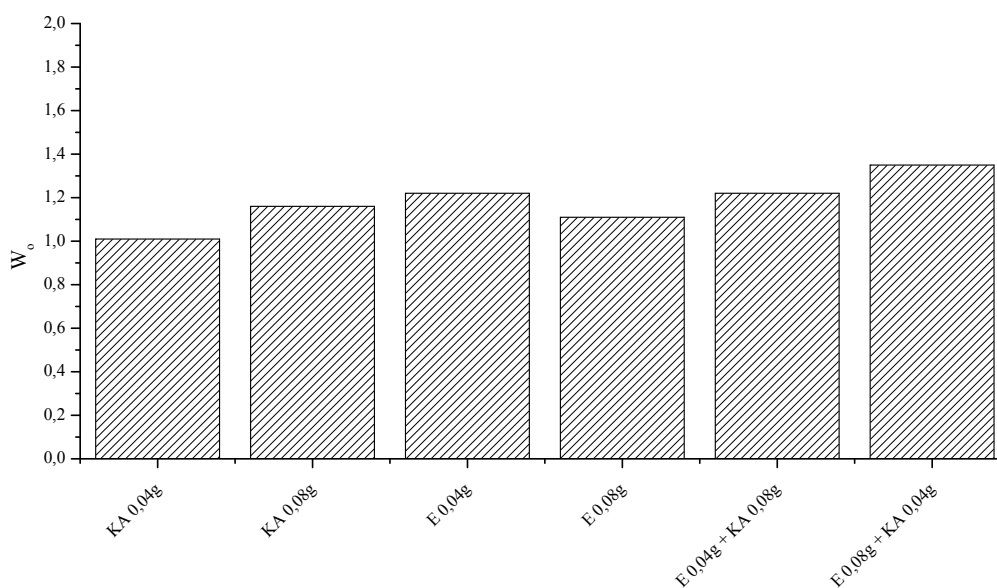
oksydacyjną emulsji zawierającej ekstrakt i KA w stosunku 2:1 ($W_0 = 1,35$; Wykres 24). Ekstrakt ten charakteryzował się największą ilością polifenoli (patrz Tabela 1).



Wykres 22. W_0 dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z pestek winogron i KA

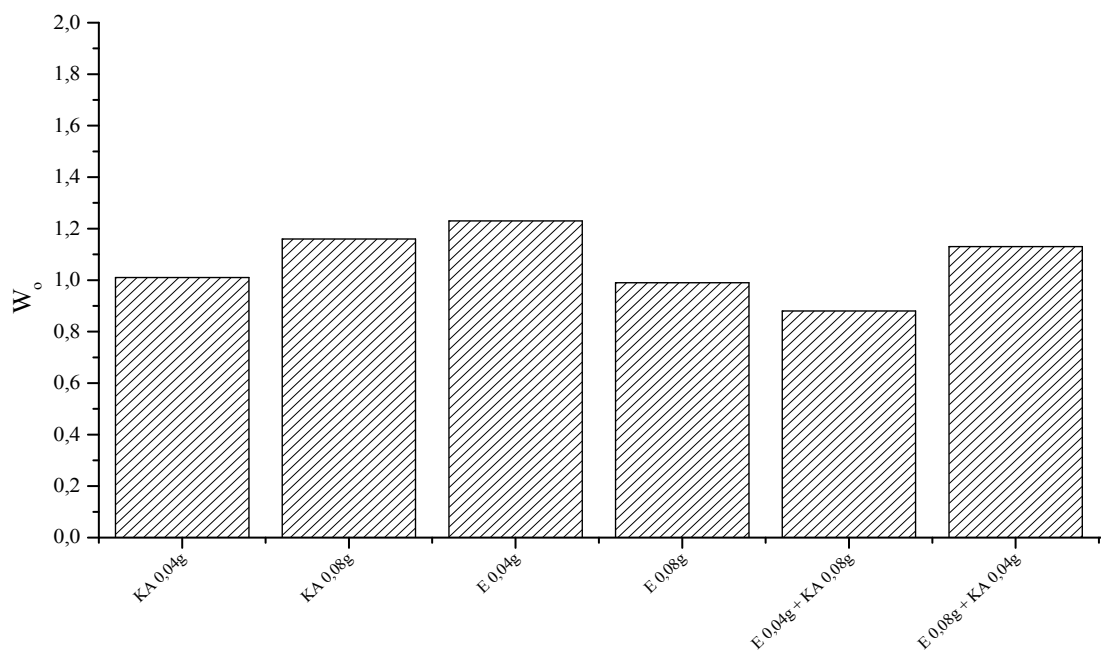


Wykres 23. W_0 dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z białej herbaty i KA



Wykres 24. W_o dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu niestandardyzowanego z zielonej herbaty i KA

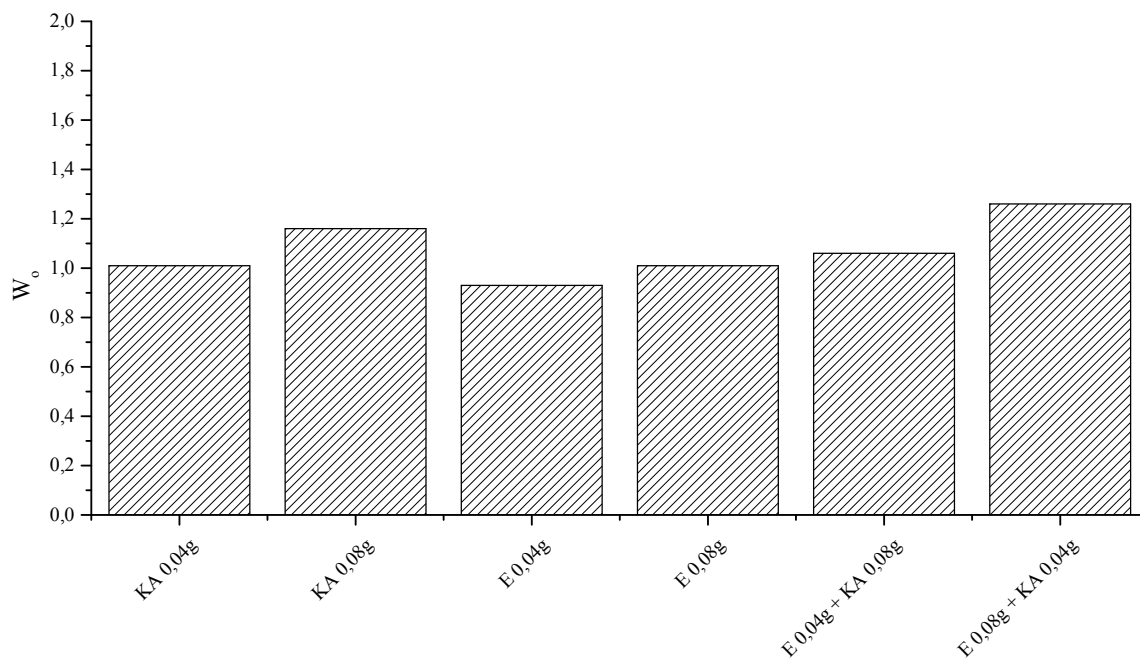
W przypadku standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty, dodanego w ilości 0,04 g, stwierdzono efekt ochronny ($W_o = 1,23$) w stosunku do emulsji, natomiast 0,08 g ekstraktu nie wpłynęło na zmianę stabilności oksydacyjnej emulsji ($W_o = 0,99$) w porównaniu z próbką kontrolną (Wykres 25). Ekstrakt z czerwonej herbaty w ilości 0,04 g działał w emulsji prooksydacyjnie ($W_o = 0,93$), natomiast w ilości 0,08 g nie wpłynął na zmianę stabilności oksydacyjnej emulsji ($W_o = 1,01$). Obecność KA w mieszaninie z tym ekstraktem wydłużyła stabilność oksydacyjną emulsji ($W_o = 1,06$ przy stosunku 1:2 i $W_o = 1,26$ przy stosunku 2:1; Wykres 26).



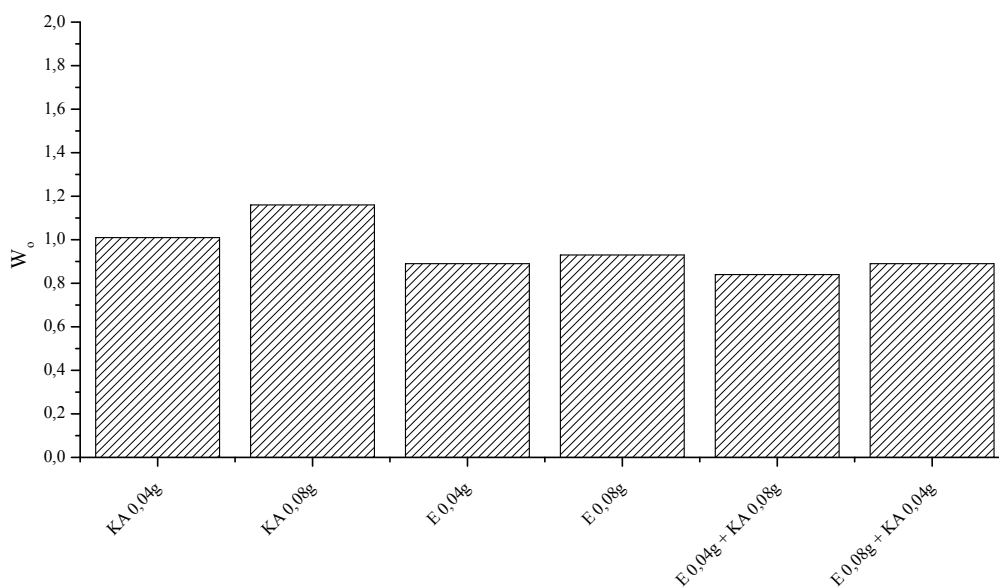
Wykres 25. W₀ dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu standaryzowanego z zielonej herbaty i KA

Ekstrakt z czarnej herbaty, charakteryzujący się najniższą zawartością polifenoli (Tabela 1) działał w emulsji prooksydacyjnie (W₀ poniżej 1,0; Wykres 27).

KA działał w badanej emulsji przeciwutleniająco (W₀ = 1,16) dla dodatku 0,08 g bądź addytywnie (W₀ = 1,01 dla dodatku 0,04 g).



Wykres 26. W_0 dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z czerwonej herbaty i KA



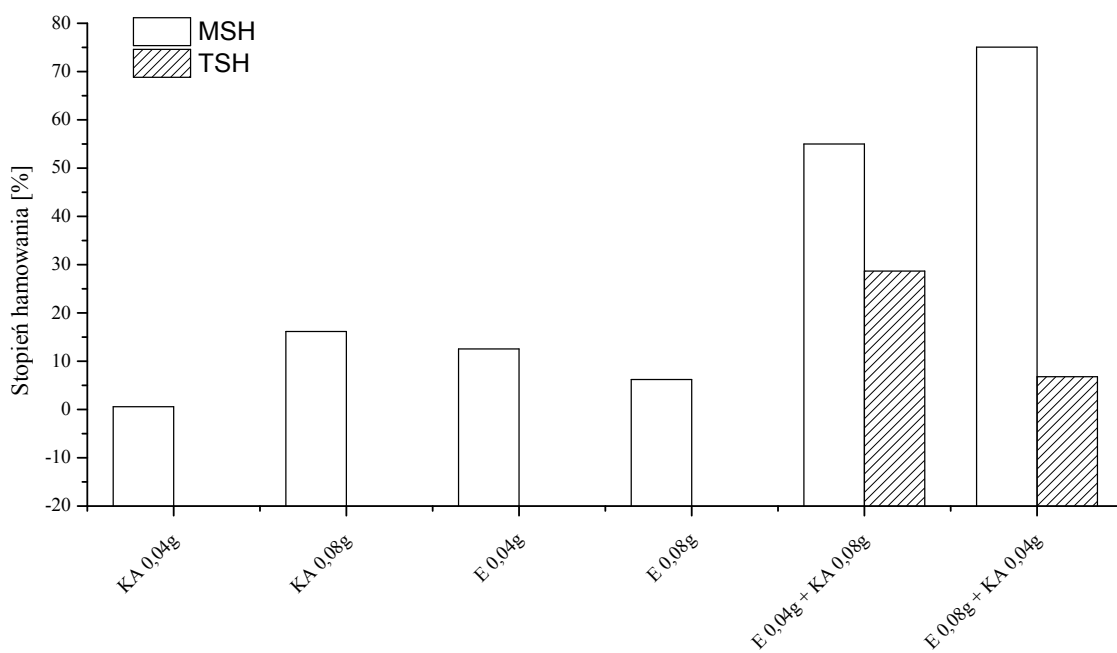
Wykres 27. W_0 dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z czarnej herbaty i KA

Interakcje pomiędzy ekstraktami z herbat, zielonej kawy i pestek winogron oraz KA, podobnie jak w przypadku ochrony oleju sezamowego przed utlenianiem, określono metodą sumowania indywidualnych efektów. Na podstawie pomiaru czasu potrzebnego, aby próbka emulsji z dodatkiem przeciwutleniaczy zużyła 5% tlenu w komorze pomiarowej, obliczono teoretyczne (TSH; na podstawie próbek zawierających wyłącznie KA i wyłącznie ekstrakt) i zmierzone (MSH; dla próbek zawierających zarówno KA, jak i ekstrakt) stopnie hamowania utleniania emulsji w odniesieniu do próbki kontrolnej (niezawierającej przeciwutleniaczy). Tabela przedstawiająca TSH i MSH dla próbek emulsji z dodatkiem mieszaniny ekstraktów i KA została zamieszczona w załączniku 3 (Tabela 12).

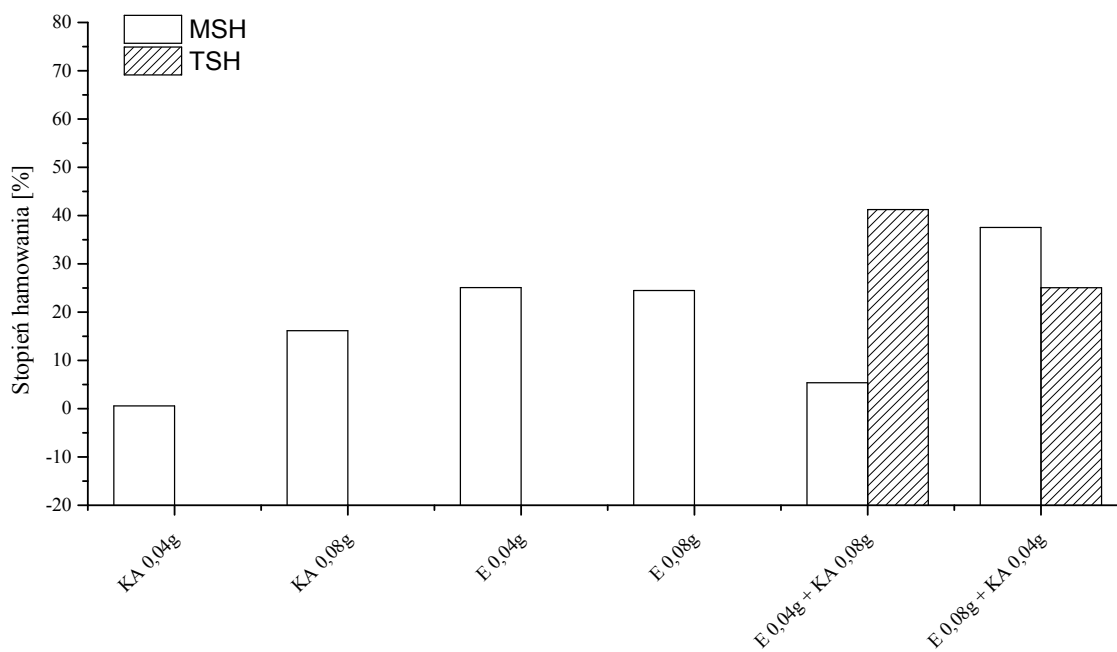
O antagonizmie świadczyła sytuacja, w której TSH dla mieszaniny przeciwutleniaczy był wyższy niż MSH. W przypadku synergizmu MSH dla mieszaniny przeciwutleniaczy był wyższy od teoretycznego. Zbliżone wartości TSH i MSH wskazywały na addytywność. Dodatni znak wartości MSH wskazuje na przeciwutleniające działanie ekstraktów i KA, podczas gdy znak ujemny wskazuje na działanie proutleniające (utlenianie w próbce badanej zachodzi szybciej niż w próbce kontrolnej).

Na podstawie uzyskanych wyników (Wykresy 28-34) stwierdzono zarówno synergizm, jak i antagonizm pomiędzy KA i badanymi ekstraktami, w zależności od rodzaju ekstraktu i stosunku wagowego składników. Ekstrakt z zielonej kawy (Wykres 28) wykazywał najsilniejszy synergizm z KA, w obu badanych stosunkach wagowych (2:1 oraz 1:2).

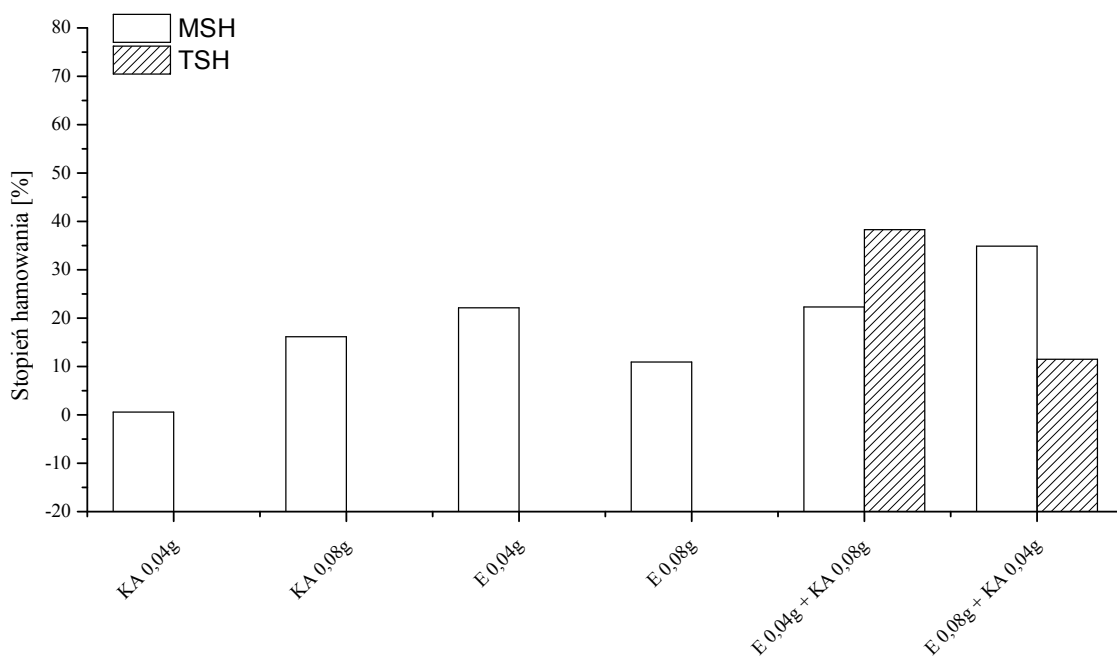
Ekstrakty z pestek winogron (Wykres 29), niestandardyzowany z zielonej herbaty (Wykres 30) oraz z czerwonej herbaty (Wykres 31) wykazywały synergizm w działaniu przeciwutleniającym, gdy były dodane w stosunku 2:1 z KA, natomiast antagonizm w stosunku wagowym 1:2.



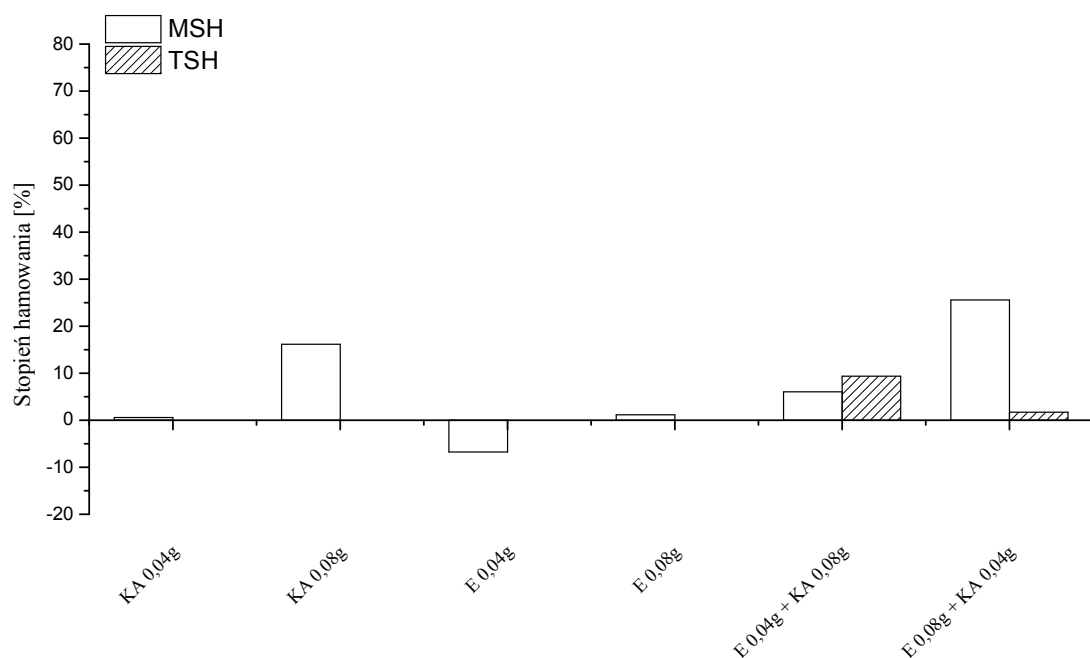
Wykres 28. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z zielonej kawy i KA



Wykres 29. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z pestek winogron i KA



Wykres 30. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu niestandardyzowanego z zielonej herbaty i KA

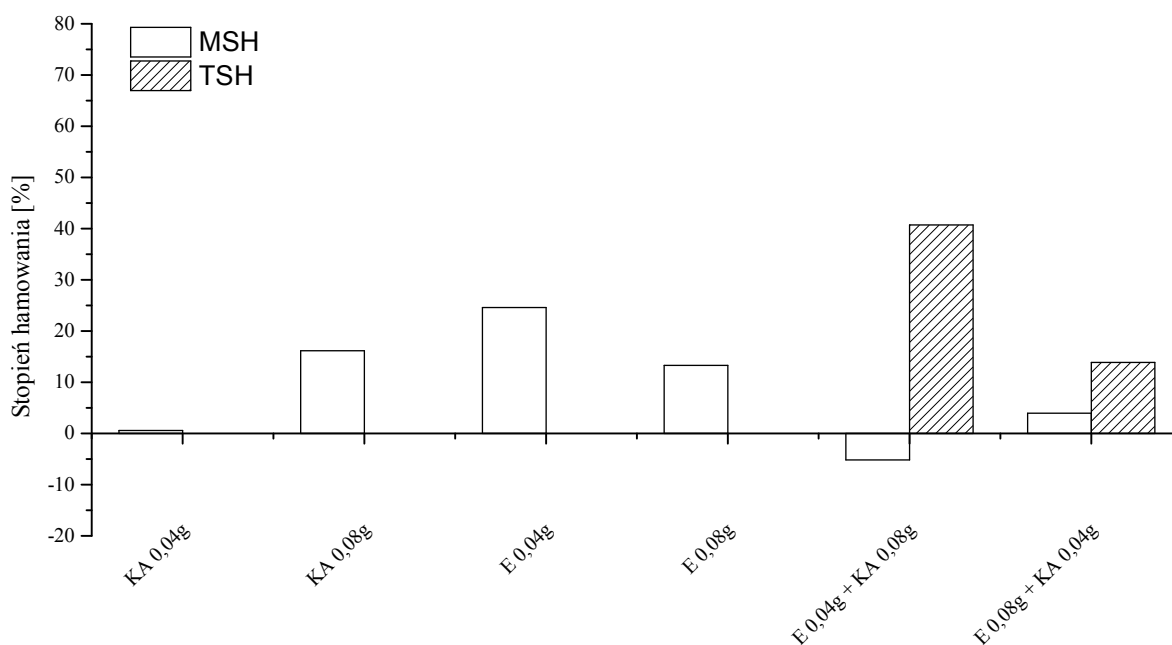


Wykres 31. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z czerwonej herbaty i KA

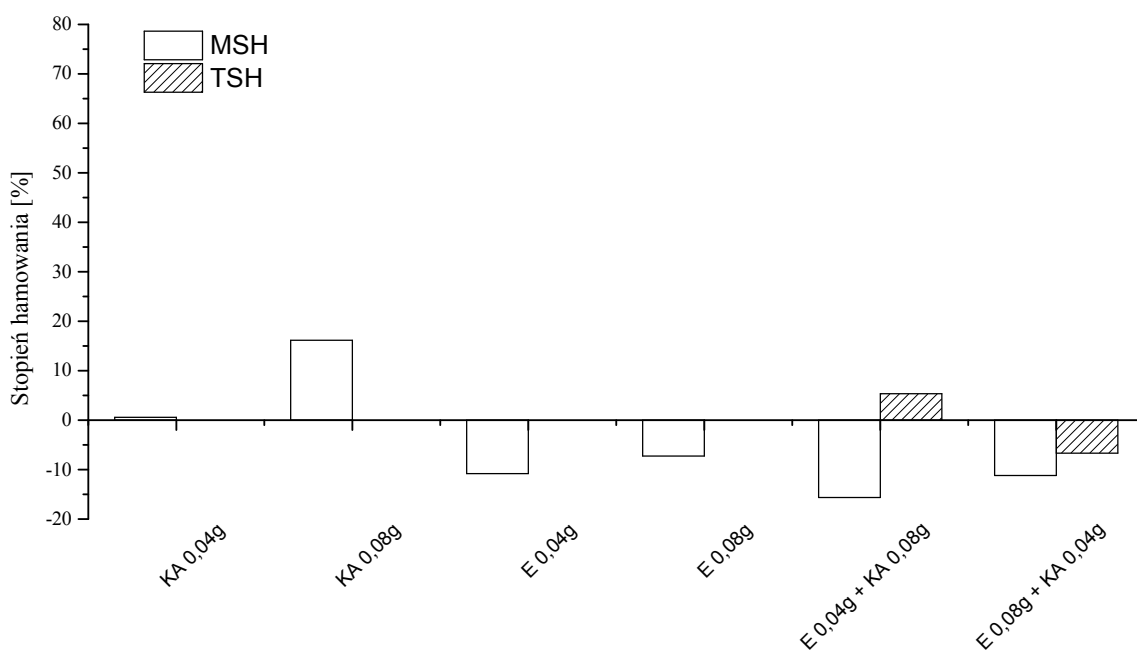
Ekstrakt z białej herbaty (Wykres 32) wykazywał z KA antagonizm w stosunku 2:1. W przypadku stosunku wagowego 1:2 przewidywano działanie przeciwutleniające mieszaniny (dodatni TSH) natomiast obserwowano działanie proutleniające (ujemny MSH).

Ekstrakt z czarnej herbaty (Wykres 33) wykazywał w stosunku wagowym 2:1 z KA synergizm w działaniu proutleniającym (TSH = -6,7, MSH = -11,2). W stosunku wagowym 1:2 przewidywano działanie przeciwutleniające (TSH = 5,4) jednak obserwowano efekt proutleniający (MSH = -15,6).

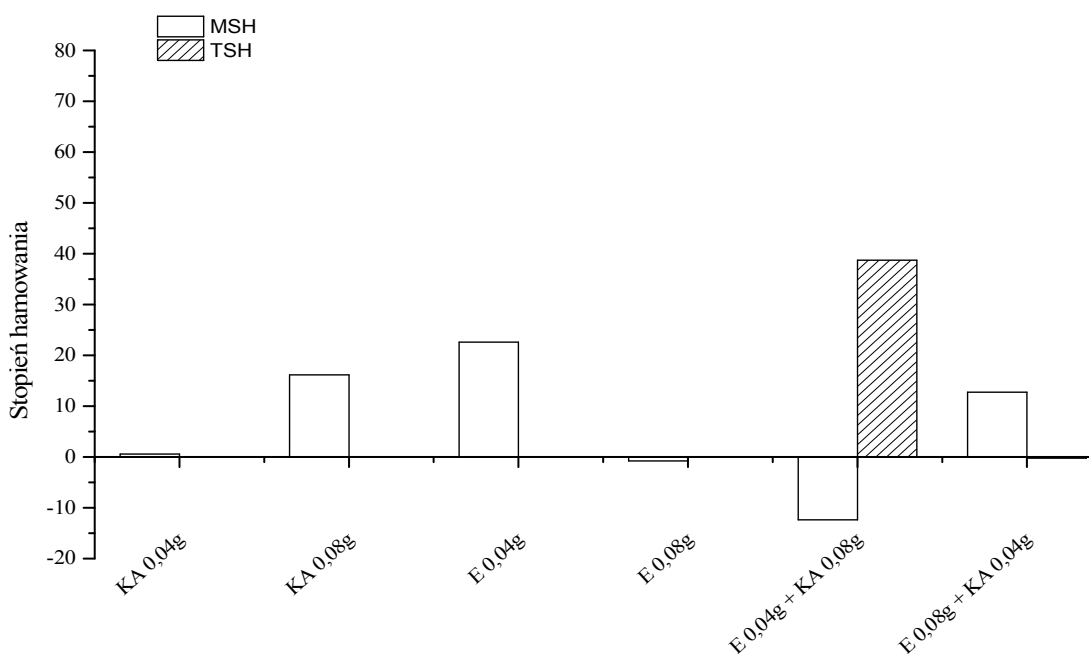
Przewidywano, że w stosunku wagowym 2:1 ekstrakt standaryzowany z zielonej herbaty i KA (Wykres 34) będą działać proutleniająco (lub nie będą wywierały żadnego efektu, TSH = -0,2), jednak MSH = 12,7 wskazuje na efekt przeciwutleniający. W stosunku wagowym 1:2 spodziewano się działania przeciwutleniającego mieszaniny (TSH = 38,7), natomiast obserwowano działanie proutleniające (MSH = -12,4).



Wykres 32. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z białej herbaty i KA



Wykres 33. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z czarnej herbaty i KA



Wykres 34. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu standaryzowanego z zielonej herbaty i KA

Ekstrakt z zielonej kawy, wykazujący najsilniejszy synergizm z KA, zawierał głównie kwas chlorogenowy. Dalsze badania mogłyby koncentrować się na interakcjach i możliwym wykorzystaniu samego kwasu chlorogenowego w mieszaninie z KA jako przeciwutleniacza stosowanego w różnych typach emulsji. Ekstrakty z zielonej kawy, z zielonej i czerwonej herbaty oraz ekstrakt z pestek winogron w mieszaninie z KA (0,08 g ekstraktu i 0,004 g KA w 4 g emulsji) działając synergistycznie mogą okazać się skutecznymi przeciwutleniaczami, np. w emulsjach kosmetycznych.

11.7. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe badanych ekstraktów, kwasu askorbinowego oraz ich mieszanin

Ekstrakty z herbat i KA, z uwagi na swoje właściwości przeciwdrobnoustrojowe, mogą być wykorzystywane do poprawy jakości i trwałości mikrobiologicznej produktów spożywczych i kosmetycznych. Almajano i in. (2008) sprawdzili wpływ naparów herbat: zielonej, czarnej, czerwonej i białej oraz mieszanek herbat i naparu z rooibos na rozwój *Bacillus cereus* (bakteria Gram-dodatnia), *Micrococcus luteus* (Gram-dodatnia), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-ujemna), *Escherichia coli* (Gram-ujemna), *Lactobacillus acidophilus* (Gram-dodatnia) i *Candida albicans* (grzyb z rzędu drożdżaków). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa herbat korelowała z ich aktywnością przeciwutleniającą (wartościami TEAC), jednak słabiej z zawartością polifenoli, co sugeruje, że nie wszystkie polifenole herbat wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową. Herbaty niefermentowane, a więc zielone, zawierające największe ilości EGCG oraz EGC, wykazywały lepsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe niż półfermentowane i fermentowane. Najbardziej wrażliwe na badane ekstrakty okazały się *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, a następnie *Pseudomonas aeruginosa*. Z kolei *Escherichia coli* wykazywała stosunkowo dużą odporność na działanie polifenoli herbat – słaby efekt obserwowano tylko w przypadku białej i zielonej herbaty oraz jednej z mieszanek. Ponadto zaobserwowano, że wzrost bakterii rozwijających się w żywności był hamowany silniej niż wzrost bakterii należących do flory jelitowej. Drożdże *Candida albicans* były również hamowane przez napary z zielonej i białej herbaty, ale wykazywały większą odporność na polifenole herbat niż bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

W badaniach Wu i in. (2005) wodne ekstrakty z herbat: zielonej, czarnej, czerwonej i oolong, a także EC i kofeina hamowały rozwój *Staphylococcus aureus* oraz *Bacillus subtilis* (obie bakterie Gram-dodatnie), nie wpływały jednak na rozwój *Escherichia coli*.

Przeciwdrobnoustrojowe właściwości ekstraktów z herbat zostały również wykazane w badaniach Zakira i in. (2015) (wobec *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*), Li i in. (2015) (wobec *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas granulosum*), Yi i in. (2014) (wobec *Serratia marcescens*) oraz Becerril, Gomez-Lus i Nerin (2011) (wobec *Listeria innocua* powodującej psucie się produktów spożywczych). Jak wspomniano w części literaturowej, ekstrakt z pestek winogron hamował rozwój *Staphylococcus aureus* odpornego na metycylinę (MRSA) (Al-Habib i in., 2010).

W literaturze można znaleźć także przykłady interakcji pomiędzy polifenolami w odniesieniu do działania przeciwdrobnoustrojowego. Romano i in. (2009) obserwowali synergizm ekstraktu z rozmarynu i BHA w hamowaniu wzrostu bakterii *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Betts, Kelly i Haswell (2011) opisali synergizm teaflawin i EC w hamowaniu wzrostu *Stenothropomonas maltophilia* i *Acinetobacter baumannii*. Jest zatem możliwe, że również polifenole herbat, zielonej kawy i pestek winogron wchodzą w interakcje z innymi przeciwutleniaczami o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, na przykład z kwasem askorbinowym. Opisano również synergizm kwasu galusowego, werbaskozydu, tyrozolu i hydroksytyrozolu wobec *Streptococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes* (Tafesh i in., 2011). Również kwas askorbinowy posiada właściwości przeciwdrobnoustrojowe. W zakresie stężeń od 100 do 1000 μM istotnie hamuje wzrost niektórych mikroorganizmów *in vitro* (Oudemans van Straaten, Spoelstra de Man i de Ward, 2014).

W pracy zbadano wpływ wybranych ekstraktów, KA i ich mieszanin na wzrost następujących mikroorganizmów: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. Wybór drobnoustrojów do badań wynikał z powszechności ich występowania, a także z ich odmiennych charakterystyk. *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* mogą rozwijać się w psujących się produktach spożywczych (Almajano i in., 2008). *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans* to mikroorganizmy stanowiące częste zanieczyszczenie kosmetyków, wskazywane jako testowe w testach konserwacji (Rodewald, 2013).

Tabele 14–17 przedstawiają wpływ różnych stężeń badanych ekstraktów i ich mieszanin z KA na rozwój czterech mikroorganizmów. Podane wyniki są uśrednieniem wyników dla wszystkich stosunków wagowych. Obliczono stopnie hamowania wzrostu

drobnoustrojów przez KA, ekstrakty i ich mieszaniny. W pracy przyjęto następujący sposób opisu efektów:

Stopień hamowania	Efekt
>50%	hamowanie
od 10 do 49%	słabe hamowanie
od -10 do 9%	brak efektu
od -50 do -11%	słaba stymulacja
<-50%	stymulacja

W początkowym etapie badań zbadano właściwości przeciwdrobnoustrojowe wszystkich ekstraktów i ich mieszanin z KA w zakresie stężeń 62,5–2000 µg mieszaniny/ml (Tabela 14). Stężenia te okazały się jednak zbyt wysokie, aby można było zaobserwować liniową zależność stężenia mieszanin i ich efektu przeciwdrobnoustrojowego. Tabela 15 przedstawia wyniki dla zakresu stężeń na poziomie 6,25-200 µg mieszaniny/ml dla *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*. W badaniu pilotażowym z wykorzystaniem mieszanin ekstraktu standaryzowanego z zielonej herbaty i KA w stężeniach 1-40 µg mieszaniny przeciwutleniaczy/ml (Tabela 16) dla tych drobnoustrojów nie obserwowano efektu (*Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*) przy stężeniu 1-40 µg mieszaniny/ml lub obserwowano bardzo słaby efekt (*Escherichia coli*). *Staphylococcus aureus* okazał się bardzo wrażliwy, więc dla tego mikroorganizmu dobrano zakres stężeń 0,1-4,0 µg mieszaniny/ml. Ekstrakty lub ich mieszaniny z KA, w zakresie stężeń 0,1-4,0 µg/ml (Tabela 17), stymulowały wzrost *Staphylococcus aureus*. Dla pozostałych mikroorganizmów ten zakres stężeń mieszanin przeciwutleniaczy był zbyt niski, aby móc zaobserwować interakcje w zakresie działania przeciwdrobnoustrojowego.

Tabela 14. Wpływ ekstraktów i ich mieszanin badanych ekstraktów i kwasu askorbinowego dla zakresu stężeń 62,5–2000 µg mieszaniny/ml.

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Ekstrakt z zielonej herbaty + KA	hamuje	hamuje	hamuje	słabo hamuje
Ekstrakt z zielonej herbaty (stand.) + KA	bez efektu	hamuje	słabo hamuje	słabo hamuje
Ekstrakt z białej herbaty + KA	hamuje	hamuje	hamuje	słabo hamuje
Ekstrakt z czarnej herbaty + KA	bez efektu	słabo hamuje	słabo hamuje	słabo hamuje
Ekstrakt z czerwonej herbaty + KA	słabo stymuluje	słabo hamuje	słabo hamuje	słabo stymuluje
Ekstrakt z winogron + KA	stymuluje	słabo hamuje	słabo hamuje	słabo hamuje
Ekstrakt z zielonej kawy + KA	słabo stymuluje	słabo stymuluje	słabo stymuluje	stymuluje

Podane wyniki są uśrednieniem wyników dla wszystkich stosunków wagowych.

KA hamował wzrost drobnoustrojów we wszystkich badanych zakresach stężeń. W zakresie stężeń 62,5–2000 µg/ml (Tabela 14) ekstrakt niestandardyzowany z zielonej herbaty (oraz jego mieszaniny z KA) działały hamująco na rozwój wszystkich badanych mikroorganizmów, podobnie ekstrakt standardyzowany z zielonej herbaty za wyjątkiem *Escherichia coli*. Ekstrakt z białej herbaty i jego mieszaniny z KA również hamowały rozwój wszystkich badanych mikroorganizmów. Warto zaznaczyć, że były to ekstrakty o największej zawartości katechin i o najsilniejszych właściwościach przeciwutleniających (Tabela 1). Ekstrakt z czarnej herbaty i jego mieszaniny z KA hamowały rozwój trzech z czterech badanych mikroorganizmów (z wyjątkiem *Escherichia coli*). Podobne wyniki uzyskano dla ekstraktu z pestek winogron i jego mieszanin z KA z tym, że ekstrakt ten stymulował rozwój *Escherichia coli*. Ekstrakt z czerwonej herbaty i jego mieszaniny z KA działały stymulująco na rozwój *Escherichia coli* oraz *Candida. albicans*, natomiast słabo hamował wzrost *Pseudomonas. aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Ekstrakt z zielonej kawy i jego mieszaniny z KA stymulowały rozwój wszystkich drobnoustrojów.

W zakresie stężeń 6,25-200 µg mieszaniny/ml (Tabela 15), obserwowano słabe hamowanie wzrostu *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* oraz stymulację wzrostu *Candida albicans* przez ekstrakt niestandardyzowany z zielonej herbaty (o największej zawartości polifenoli, patrz: Tabela 1) i jego mieszaniny z KA. Ekstrakt standaryzowany z zielonej herbaty i jego mieszaniny z KA słabo hamowały wzrost *Escherichia coli* i nie wywierał wpływu na wzrost *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*. Ekstrakt z białej herbaty i jego mieszaniny z KA, kolejny pod względem zawartości polifenoli, hamował jedynie wzrost *Candida albicans*, ale w niewielkim stopniu. Ekstrakt z pestek winogron (zawierający prócz katechin również procyanidyny) hamował w słabym stopniu wszystkie trzy badane drobnoustroje. Ekstrakt z czarnej herbaty słabo hamował rozwój *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*, natomiast nie hamował wzrostu *Escherichia coli*. Ekstrakty z czerwonej herbaty i zielonej kawy hamowały w słabym stopniu wzrost *Escherichia coli* i *Candida albicans*, nie wywierając wpływu na rozwój *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 15. Wpływ ekstraktów i ich mieszanin badanych ekstraktów i kwasu askorbinowego dla zakresu stężeń 6,25–200 µg mieszaniny/ml.

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Ekstrakt z zielonej herbaty + KA	słabo hamuje	słabo hamuje	stymuluje
Ekstrakt z zielonej herbaty (stand.) + KA	słabo hamuje	bez efektu	bez efektu
Ekstrakt z białej herbaty + KA	bez efektu	bez efektu	słabo hamuje
Ekstrakt z czarnej herbaty + KA	bez efektu	słabo hamuje	słabo hamuje
Ekstrakt z czerwonej herbaty + KA	słabo hamuje	bez efektu	słabo hamuje
Ekstrakt z winogron + KA	słabo hamuje	słabo hamuje	słabo hamuje
Ekstrakt z zielonej kawy + KA	słabo hamuje	bez efektu	słabo hamuje

Podane wyniki są uśrednieniem wyników dla wszystkich stosunków wagowych.

Tabela 16. Wpływ ekstraktów i ich mieszanin standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i kwasu askorbinowego dla zakresu stężeń 1-40 µg mieszaniny/ml.

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Ekstrakt z zielonej herbaty (stand.) + KA	słabo hamuje	bez efektu	hamuje	bez efektu

Podane wyniki są uśrednieniem wyników dla wszystkich stosunków wagowych.

Tabela 17. Wpływ ekstraktów i ich mieszanin badanych ekstraktów i kwasu askorbinowego na wzrost *S. aureus* dla zakresu stężeń 0,1-4,0 µg mieszaniny/ml.

	<i>S. aureus</i>
Ekstrakt z zielonej herbaty + KA	stymuluje
Ekstrakt z zielonej herbaty (stand.) + KA	stymuluje
Ekstrakt z białej herbaty + KA	stymuluje
Ekstrakt z czarnej herbaty + KA	stymuluje
Ekstrakt z czerwonej herbaty + KA	stymuluje
Ekstrakt z winogron + KA	stymuluje
Ekstrakt z zielonej kawy + KA	stymuluje

Podane wyniki są uśrednieniem wyników dla wszystkich stosunków wagowych.

Podsumowując, największą skutecznością w hamowaniu wzrostu drobnoustrojów charakteryzowały się mieszaniny KA z ekstraktami o największej zawartości polifenoli (szczególnie EGCG i EGC), tj. z ekstraktami z zielonej i białej herbaty. Jest to spójne z badaniami Almajano i in. (2008), z których wynika, że herbaty zielone (niefermentowane, zawierające największe ilości EGCG oraz EGC) wykazywały najsilniejsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Przy najwyższym użytym zakresie stężeń (62,5-2000 µg/ml) wzrost wszystkich badanych drobnoustrojów hamowała mieszanina KA z ekstraktem niestandaryzowanym z zielonej herbaty, który charakteryzował się najwyższą zawartością polifenoli, oraz mieszanina KA z ekstraktem z białej herbaty. Mieszanina KA z ekstraktem standaryzowanym z zielonej herbaty hamowała wzrost wszystkich drobnoustrojów z wyjątkiem *Escherichia coli*. Najbardziej wrażliwym drobnoustrojem na badane ekstrakty i ich mieszaniny z KA okazał się *Staphylococcus aureus*, a najbardziej odpornym *Escherichia coli*, co jest zgodne z wynikami badań Wu i in. (2005). Dla części ekstraktów i ich mieszanin można było obserwować efekt stymulacji wzrostu bakterii. Nie we wszystkich przypadkach udało się zaobserwować jednoznaczny wpływ stężenia przeciwutleniaczy na wzrost drobnoustrojów.

Działanie hamujące bądź stymulujące wzrost bakterii może różnić się dla tego samego związku lub mieszaniny w zależności od stężenia. Potwierdzają to dane literaturowe. W badaniach Gwiazdowskiej, Jusia, Jasnowskiej-Małeckiej i Kluczyńskiej (2015) polifenole takie jak rutyna (w stężeniu 100 µg/ml), kwercetyna (2 i 20 µg/ml), naryngenina (20 i 100 µg/ml) i hesperydyna (2 µg/ml) stymulowały wzrost bakterii *Bifidobacterium bifidum*, natomiast w stężeniu 100 µg/ml kwercetyna i hesperydyna hamowały wzrost bakterii. Stymulację wzrostu bakterii obserwowano również w przypadku ekstraktu z lubczyka (o niskiej zawartości polifenoli), w przeciwieństwie do ekstraktów z żurawiny i rozmarynu, które hamowały rozwój bakterii (Jałosińska i Wilczak, 2007). Dane literaturowe wskazują, że polifenole mogą stymulować wzrost bakterii niechorobotwórczych jednocześnie hamując rozwój patogennych. Przykładowo, wzrost bakterii takich jak *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* i *Bacteroides spp.* był istotnie hamowany przez polifenole herbaty, podczas gdy wpływ polifenoli na mikroorganizmy komensalne jak *Clostridium spp.* i *Bifidobacterium spp.* oraz *Lactobacillus spp.* był znacznie słabszy (Duda-Chodak, Tarko, Satora i Sroka, 2015).

Określono rodzaj interakcji dla wybranych stężeń ekstraktów i KA. Oznaczenie typu interakcji metodą sumowania efektów było możliwe, jeśli zarówno ekstrakt, jak i KA hamowały wzrost drobnoustrojów, a zależność stopnia hamowania od stężenia ekstraktu i KA była liniowa. Określenie rodzaju interakcji było możliwe jedynie dla stosunku 1:1 KA i ekstraktu w mieszaninie.

W zakresie stężeń 0,1–4,0 µg/ml (Tabela 17) dodanych ekstraktów i KA obserwowano stymulację wzrostu *Staphylococcus aureus*, ale zależność efektu od stężenia dodanych substancji była nieliniowa, stąd nie wyznaczano rodzaju interakcji.

W zakresie stężeń 1–40 µg/ml (Tabela 16) ekstraktu z zielonej herbaty (standaryzowanego) i KA obserwowano hamowanie wzrostu *Escherichia coli*, przy czym ekstrakt i KA działały wobec siebie antagonistycznie. W przypadku pozostałych mikroorganizmów zależność efektu od stężenia ekstraktu i KA była nieliniowa, stąd nie wyznaczano rodzaju interakcji.

W zakresie stężeń 6,25–200 µg/ml (Tabela 15) obserwowano słabe hamowanie wzrostu *Escherichia coli* przez ekstrakty z zielonej herbaty (standaryzowany i niestandaryzowany) oraz ekstrakty z czerwonej herbaty, winogron i zielonej kawy.

We wszystkich przypadkach obserwowano antagonizm pomiędzy ekstraktami i KA. Ekstrakty z białej i czarnej herbaty nie hamowały wzrostu *Escherichia coli*, zatem nie wyznaczano w tym przypadku rodzaju interakcji. W tym samym zakresie stężeń obserwowano hamowanie wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* przez ekstrakty z winogron, czarnej herbaty i zielonej herbaty (niestandardyzowany). Dla ekstraktu z zielonej herbaty obserwowano antagonizm przy stężeniach ekstraktu i KA 25-50 µg/ml i addytywność dla stężeń 100-200 µg/ml, a dla ekstraktu z czarnej herbaty addytywność przy stężeniach ekstraktu i KA 25-50 µg/ml i trend w kierunku synergizmu dla stężeń 100-200 µg/ml. Trend ten jest interesujący biorąc pod uwagę, że ekstrakt z czarnej herbaty charakteryzował się niską aktywnością przeciwutleniającą. W przypadku ekstraktu z winogron zależność efektu od stężenia ekstraktu i KA była nieliniowa, zatem nie wyznaczano rodzaju interakcji. Nie było też możliwe wyznaczenie interakcji w przypadku *Candida albicans*, z uwagi na nieliniową zależność efektu od stężenia ekstraktu i KA, a także fakt, że ekstrakt z zielonej herbaty (niestandardyzowany) stymulował wzrost *Candida albicans* w tym zakresie stężeń.

W zakresie stężeń 62,5–2000 µg/ml (Tabela 14) zależność efektu od stężenia ekstraktów i KA była w większości przypadków nieliniowa lub ekstrakt stymulował wzrost bakterii. Oznaczenie interakcji między ekstraktem a KA możliwe było jedynie dla ekstraktu z białej herbaty. Obserwowano antagonizm między tym ekstraktem i KA w hamowaniu wszystkich czterech rodzajów mikroorganizmów.

Podsumowanie obserwowanych interakcji przedstawia Tabela 18.

Tabela 18. Interakcje pomiędzy wybranymi ekstraktami i KA w zakresie hamowania wzrostu mikroorganizmów

Zakres stężeń 6,25–200 µg/ml

E. coli:

Antagonizm z KA: mieszanina KA i ekstraktu z zielonej herbaty (standaryzowanego i niestandaryzowanego), z czerwonej herbaty, z pestek winogron i z zielonej kawy

P. aeruginosa:

Antagonizm z KA: mieszanina KA i ekstraktu z zielonej herbaty (niestandaryzowanego) w stężeniu 25-50 µg/ml

Addytywność z KA: mieszanina KA i ekstraktu z zielonej herbaty (niestandaryzowanego) w stężeniu 100-200 µg/ml, ekstrakt z czarnej herbaty w stężeniu 25-50 µg/ml

Synergizm z KA: mieszanina KA i ekstraktu z czarnej herbaty w stężeniu 100-200 µg/ml

Zakres stężeń 62,5–2000 µg/ml

Antagonizm z KA: mieszanina KA i ekstraktu z herbaty białej dla wszystkich badanych mikroorganizmów

PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu interakcji pomiędzy kwasem askorbinowym i wybranymi ekstraktami roślinnymi na ich właściwości przeciwutleniające i przeciwdrobnoustrojowe. Aby ten cel zrealizować, przeprowadzono szereg badań, w tym oznaczenie składu związków polifenolowych i aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów oraz ich mieszanin z kwasem askorbinowym w różnych stosunkach wagowych (10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10). Do badań wybrano ekstrakt z zielonej herbaty (standaryzowany i niestandaryzowany) oraz niestandaryzowane ekstrakty z czarnej, czerwonej i białej herbaty, z zielonej kawy i z pestek winogron. Zawartość związków polifenolowych w badanych ekstraktach oznaczono metodą HPLC. Aktywność przeciwutleniającą oznaczano za pomocą metod spektrofotometrycznych (TEAC, FRAP i DPPH). Użycie trzech metod pozwala na pomiar aktywności przeciwutleniającej w oparciu o różne mechanizmy reakcji i w różnych środowiskach. Oznaczono także aktywność ekstraktów z herbat i ich mieszanin z kwasem askorbinowym w pH 2-9 za pomocą zmodyfikowanego testu TEAC. Na podstawie wyników aktywności przeciwutleniającej obliczono współczynniki interakcji, pozwalające określić, czy pomiędzy składnikami mieszaniny zachodzi interakcja i jaki jest jej typ.

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu mieszaniny niestandaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i KA w stosunku wagowym 2:1 i 1:2 na stabilność oksydacyjną oleju sezamowego oraz określenie typu interakcji między badanymi przeciwutleniaczami. Dla oleju sezamowego z dodatkiem ekstraktu z zielonej herbaty i KA, przechowywanego przez 17 tygodni, oznaczano liczbę nadtlenkową oraz anizydynową, stężenia skoniugowanych dienów i trienów (wartości K_{232} i K_{268}) a także obliczono wartości TOTOX. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono teoretyczne i rzeczywiste stopnie hamowania utleniania oleju, co pozwoliło określić, czy zachodzi interakcja pomiędzy ekstraktem z zielonej herbaty a KA.

Zbadano skuteczność badanych ekstraktów i ich mieszanin z KA w stosunku wagowym 2:1 i 1:2 w ochronie emulsji typu olej w wodzie na bazie oleju żurawinowego. Pozwoliło to na oznaczanie interakcji między badanymi ekstraktami i KA w odniesieniu do ich zdolności hamowania utleniania emulsji.

Określono też właściwości przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów względem *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. Wyniki te pozwoliły na określenie, czy badane przeciwutleniacze wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe i czy zachodzą interakcje pomiędzy ekstraktami a KA.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na sformułowanie wniosków na temat interakcji zachodzących między ekstraktami z herbat, zielonej kawy oraz z pestek winogron a KA, w różnych układach i środowiskach, w odniesieniu do ich właściwości przeciwutleniających lub proutleniających. Wyniki badań wskazują, że interakcje pomiędzy KA i ekstraktami roślinnymi wpływają na właściwości przeciwutleniające lub proutleniające ich mieszanin. Właściwości przeciwutleniające lub proutleniające mieszanin oraz typ interakcji między przeciwutleniaczami zależą od rodzaju ekstraktu (jego składu polifenolowego), stosunku wagowego składników mieszaniny, a także pH i rodzaju środowiska reakcji (wodne, metanolowe, tłuszczowe lub wodno-tłuszczowe).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że właściwości przeciwdrobnoustrojowe mieszanin ekstraktów roślinnych i KA zależą od rodzaju ekstraktu, zastosowanego stężenia ekstraktu i KA oraz ich stosunku wagowego, a także rodzaju drobnoustroju, wobec którego stosuje się badane substancje. Z przeprowadzonych badań wynika, że ekstrakty roślinne i ich mieszaniny z KA mogą zarówno hamować, jak i stymulować wzrost badanych drobnoustrojów.

Określenie interakcji pomiędzy KA i badanymi ekstraktami w zakresie hamowania wzrostu drobnoustrojów było możliwe jedynie w przypadku wybranych ekstraktów i drobnoustrojów oraz dla określonych stężeń badanych substancji. W większości przypadków obserwowano oddziaływania antagonistyczne między ekstraktami a KA.

Tematyka pracy wynika z licznych danych literaturowych wskazujących na możliwości występowania interakcji (synergizmu lub antagonizmu) pomiędzy związkami o właściwościach przeciwutleniających lub przeciwdrobnoustrojowych. W literaturze jest jednak stosunkowo niewiele danych na temat interakcji związków polifenolowych, w tym ekstraktów roślinnych bogatych w te związki, z kwasem askorbinowym. Są to przeciwutleniacze obecne w surowcach roślinnych lub dodawane do wielu produktów spożywczych i kosmetycznych w procesie ich wytwarzania. Wiedza

na temat interakcji może umożliwić projektowanie produktów o lepszych właściwościach, przy niższych kosztach produkcji. Produkty spożywcze i kosmetyczne są układami złożonymi, zatem problem możliwych interakcji jest istotny i wymaga dalszych badań.

Konsumenci zwykle uważają naturalne dodatki do produktów spożywczych i kosmetycznych za bezpieczniejsze niż dodatki syntetyczne. Producenci, idąc za tym trendem, często używają mieszanin naturalnych substancji o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych w miejsce syntetycznych. Stąd badania nad interakcjami między dodatkami stanowią nie tylko nowość naukową, ale mają również istotne znaczenie praktyczne.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na potwierdzenie obu hipotez postawionych w niniejszej pracy:

1. Interakcje między kwasem askorbinowym i ekstraktami roślinnymi wpływają na ich właściwości przeciwutleniające.
2. Interakcje między kwasem askorbinowym i ekstraktami roślinnymi wpływają na ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Interakcje pomiędzy kwasem askorbinowym (KA) i ekstraktami roślinnymi wpływały na właściwości przeciwutleniające lub proutleniające ich mieszanin. Właściwości przeciwutleniające lub proutleniające mieszanin KA i ekstraktów roślinnych zależały od:
 - rodzaju ekstraktu (składu polifenoli),
 - stosunku wagowego składników mieszaniny,
 - pH i rodzaju środowiska reakcji.
2. Efekt antagonistyczny w odniesieniu do właściwości przeciwutleniających, mierzonych w teście TEAC w pH 7,4, występował pomiędzy standaryzowanym ekstraktem z zielonej oraz białej herbaty i KA dla mieszanin o nadmiarze ekstraktu, a także pomiędzy ekstraktami z czerwonej herbaty lub zielonej kawy i KA w większości stosunków wagowych oraz ekstraktem z pestek winogron i KA (stosunki wagowe 5:1, 2:1 i 1:2). W pozostałych przypadkach obserwowano addytywność. W przypadku własności przeciwutleniających mierzonych jako wartość FRAP efekt antagonistyczny z KA występował w mieszaninach ekstraktów z herbat czarnej, białej, zielonej (ekstrakt standaryzowany i niestandaryzowany) oraz z zielonej kawy (w większości stosunków wagowych); ekstrakt z pestek winogron wykazywał działanie addytywne (lub antagonistyczne z KA dla stosunków wagowych 5:1, 2:1 oraz 1:2), natomiast ekstrakt z czerwonej herbaty wykazywał głównie addytywność z KA. W odniesieniu do właściwości przeciwutleniających, mierzonych jako wartość IC_{50} względem rodnika DPPH^{*} w układzie zawierającym metanol, występował efekt synergistyczny pomiędzy KA w niskim stężeniu a ekstraktami o wysokiej zawartości polifenoli (oba ekstrakty z zielonej herbaty i ekstrakt z białej herbaty) w mieszaninach

o nadmiarze ekstraktu, natomiast antagonistyczny lub addytywny przy nadmiarze KA. Podobny efekt obserwowano dla mieszanin ekstraktu z czerwonej herbaty, z wyjątkiem mieszaniny o największym nadmiarze ekstraktu (10:1), gdzie obserwowano antagonizm. W przypadku małej ilości KA w stosunku do badanych ekstraktów o niskiej zawartości polifenoli (ekstrakt z czarnej herbaty) występował efekt antagonistyczny. Antagonistyczne oddziaływanie z KA wykazywał również ekstrakt z pestek winogron (w większości stosunków wagowych). W pozostałych przypadkach obserwowano efekt addytywny. Nie obserwowano synergizmu dla mieszanin tego ekstraktu z KA.

3. W odniesieniu do właściwości przeciwutleniających mierzonych w teście TEAC w różnych wartościach pH środowiska, obserwowano synergizm pomiędzy badanymi ekstraktami a KA w pH 4-8 w przypadku ekstraktu niestandardyzowanego z zielonej herbaty w mieszaninach o bardzo dużym nadmiarze ekstraktu (10:1) oraz w pH 4-5 przy stosunku wagowym 5:1 dla tego samego ekstraktu. Przy tych wartościach pH katechiny herbaty wykazują znaczną stabilność oraz wyższe właściwości przeciwutleniające niż w pH poniżej 4. Dla mieszanin ekstraktu z czarnej herbaty i KA obserwowano antagonizm w pH wyższym niż 6 przy nadmiarze lub równej zawartości ekstraktu i KA. Dla mieszanin ekstraktu z czerwonej herbaty i KA obserwowano trend w kierunku synergizmu w pH 5 i wyższym dla mieszanin o nadmiarze ekstraktu (stosunki wagowe 5:1 i 2:1). Antagonizm zaobserwowano w pH 2 i pH 3 dla mieszanin o równej zawartości składników. Dla ekstraktu z białej herbaty w mieszaninie z KA o stosunku wagowym 10:1 obserwowano synergizm w pH 4 i 5. Z kolei w pH 8 i 9, w tym samym stosunku wagowym, obserwowano antagonizm. W pozostałych przypadkach, dla wszystkich badanych ekstraktów, obserwowano addytywność.
4. Dodatek ekstraktu z zielonej herbaty lub KA poprawiał stabilność oksydacyjną oleju sezamowego (mierzoną liczbą nadtlenkową oraz zawartością skoniugowanych dienów i trienów). Mieszanina ekstraktu z zielonej herbaty i KA w stosunkach wagowych 2:1 i 1:2 również poprawiała stabilność oksydacyjną oleju sezamowego, ale obserwowano efekt antagonistyczny pomiędzy badanymi przeciwutleniaczami.
5. Mieszaniny badanych ekstraktów i KA w stosunku wagowym 1:2 i 2:1 poprawiały stabilność oksydacyjną emulsji typu olej w wodzie na bazie oleju żurawinowego. Badane ekstrakty można uszeregować pod względem ich działania

przeciwutleniającego w emulsji następująco: ekstrakt z pestek winogron > z białej herbaty > oba ekstrakty z zielonej herbaty > ekstrakt z zielonej kawy. Ekstrakt z czerwonej herbaty wykazywał efekt proutleniający (przy niższym stężeniu) lub słaby efekt przeciwutleniający (przy wyższym stężeniu), ale jego mieszaniny z KA działały przeciwutleniająco. Dla ekstraktu z czarnej herbaty i jego mieszanin z KA obserwowano efekt proutleniający. W przypadku mieszanin pozostałych ekstraktów z KA, najwyższe współczynniki ochronne obserwowano w przypadku ekstraktu z zielonej kawy z KA w obu stosunkach wagowych (2:1 i 1:2), a następnie mieszanin ekstraktu niestandardyzowanego z zielonej herbaty (2:1) oraz ekstraktu z pestek winogron (2:1). Najsilniejszy synergizm pomiędzy ekstraktem i KA obserwowano w przypadku ekstraktu z zielonej kawy. Synergizm wykazywały też mieszaniny ekstraktu z pestek winogron z KA (2:1), niestandardyzowanego oraz standardyzowanego ekstraktu z zielonej herbaty (w obu przypadkach w stosunku wagowym 2:1) oraz ekstraktu z czerwonej herbaty z KA (2:1). Najsilniejszy antagonizm z KA obserwowano w przypadku ekstraktu z białej herbaty (2:1), ekstraktu z pestek winogron (1:2) oraz ekstraktu niestandardyzowanego z zielonej herbaty (1:2). W przypadku mieszaniny ekstraktu z czarnej herbaty z KA obserwowano synergizm, ale w odniesieniu do właściwości proutleniających. Wskazuje to na konieczność kontrolowania interakcji między składnikami dodawanymi do emulsji zarówno w przypadku produktów spożywczych, jak i kosmetycznych oraz na fakt, że typ interakcji zależy nie tylko od rodzaju składników, ale również ich stosunku wagowego.

6. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe mieszanin badanych ekstraktów roślinnych i KA zależały od:
 - rodzaju ekstraktu,
 - stężenia ekstraktu i KA oraz ich stosunku wagowego,
 - rodzaju drobnoustroju.
7. Ekstrakty roślinne i ich mieszaniny z KA wykazywały zarówno działanie hamujące (ekstrakty z zielonych herbat), jak i stymulujące (ekstrakty z zielonej kawy i czerwonej herbaty) wzrost badanych drobnoustrojów (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*). Obserwowano głównie antagonistyczne oddziaływania między KA i wybranymi ekstraktami z herbat w zakresie hamowania wzrostu drobnoustrojów.

8. Znajomość możliwych interakcji pomiędzy substancjami o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych jest ważne w projektowaniu produktów takich jak napoje, szczególnie napoje funkcjonalne, suplementy diety i kosmetyki. Wiele czynników wpływa na rodzaj i siłę interakcji, stąd konieczność brania pod uwagę takich czynników jak właściwości substancji i stosunek wagowy, w jakim są dodawane, możliwy wpływ pozostałych substancji obecnych w produkcie, pH środowiska itp. Synergizm pomiędzy przeciwutleniaczami pozwolić może na zaprojektowanie produktu o dobrych właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych przy stosunkowo niskich kosztach.

BIBLIOGRAFIA

- Abuajah, C.I., Ogbonna, A.C. i Osuji, C.M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2522–2529.
- Aleksandropoulo, I., Komaitis, M. i Kapsokefalou, M. (2006). Effects of iron, ascorbate, meat and casein on the antioxidant capacity of green tea under conditions of in vitro digestion. *Food Chemistry* 96, 359-365.
- Al-Habib, A., Al-Saleh, E., Safer, A.-B. i Afzal., M. (2010). Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *The Journal of Toxicological Sciences*, 35(3), 357-364.
- Almajano, M.P., Carbo R., Jimenez, J.A.L. i Gordon, M.H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108, 55-63.
- Altunkaya, A., Becker, M.E., Gokmen, V. i Skibsted, L.H. (2009). Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 115(1), 163-168.
- Antignac, E., Nohynek, G.J., Re, T., Clouzeau, J. i Toutain, H. (2010). Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 324-341.
- Asensio, C.M., Nepote, V. i Grosso, N.R. (2011). Chemical stability of extra-virgin olive oil added with oregano essential oil. *Journal of Food Science*, 76(7), 445-450.
- Aued-Pimentel, S., Takemoto, E., Antoniassi, R. i Gastaldo Badolato, E.S. (2006). Composition of tocopherols in sesame seed oil: an indicative of adulteration. *Grasas Y Aceites*, 57(2), 205-210.
- Barbosa, D.S. (2007). Green tea polyphenolic compounds and human health. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection And Food Safety*, 2, 407-413.
- Bartosz, G. (2006). *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Warszawa: Wyd. Nauk. PWN.
- Becerril, R., Gomez-Lus, R. i Nerin, C. (2011). Antimicrobial activity of decaffeinated green tea extract, green tea antioxidant extract and lauramide argine ethyl ester. *Italian Journal of Food Science, Supplement*, 174-177.

- Becker, E.M., Ntouma, G. i Skibsted, L.H. (2007). Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organization. *Food Chemistry*, 103, 1288-1296.
- Benzie, I. F. F. i Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Berenbaum, M.C. (1977). Synergism, additivism and antagonism in immunosuppression, a critical review. *Clinical & Experimental Immunology*, 28, 1-18.
- Betts, J.W., Kelly, S.M. i Haswell, S.J. (2011). Antibacterial effects of theaflavin and synergy with epicatechin against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(5), 421-425.
- Bissett, D.L. (2009). Common cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology*, 27, 435-445.
- Bojarowicz, H., Wojciechowska, M. i Gocki, J. (2008). Substancje konserwujące stosowane w kosmetykach i ich działania niepożądane. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 89(1), 30-33.
- Borkowski, T., Szymusiak, H., Gliszczyńska-Świgło, A., Rietjens, I.M.C.M. i Tyrakowska, B. (2005). Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5526-5534.
- Bors, W., Michel, C. i Schikora, S. (1995). Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Radical Biology and Medicine*, 19, 45-52.
- Brandt-Williams W., Cuvelier M. E. i Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30.
- Budryn, G. i Nebesny, E. (2013). Effect of green and roasted coffee antioxidants on quality and shelf life of cookies and chocolates. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, 835-845.
- Budryn, G., Żyzelewicz, D., Nebesny, E., Oracz, J. i Krysiak, W. (2013). Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products. *Food Research International*, 50, 149-160.
- Budryn, G., Nebesny, E. i Rachwał, D. (2014). Pepsin digestibility and antioxidant activity of egg white protein in model systems with green coffee extract. *International Journal of Food Properties*, 17, 1529-1546.

- Cabrera, C., Artach, R. i Jimenez, R. (2006). Beneficial effects of green tea – a review. *Journal Of The American College Of Nutrition*, 25, 79-99.
- Cádiz-Gurrea, M.L., Fernández-Arroyo, S. i Segura-Carretero, A. (2014). Pine bark and green tea concentrated extracts: antioxidant activity and comprehensive characterization of bioactive compounds by HPLC–ESI-QTOF-MS. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 20382-20402.
- Chen, Z.Y., Chan, P.T., Ma, H.M., Fung, K.P. i Wang, J. (1996). Antioxidative effect of ethanol tea extracts on oxidation of canola oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(3), 375-380.
- Chen, Z.Y., Zhu, Q.Y., Wong, Y.F., Zhang, Z. i Chung, H.Y. (1998). Stabilizing Effect of Ascorbic Acid on Green Tea Catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2512-2516.
- Chen, C.Y., Milbury, P.E., Chung, S.K. i Blumberg, J. (2007). Effect of almond skin polyphenolics and quercetin on human LDL and apolipoprotein B-100 oxidation and conformation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(12), 785-94.
- Chen, H., Zhang, Y., Lu, X. i Qu, Z. (2012). Comparative studies on the physicochemical and antioxidant properties of different tea extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 49(3), 356–361.
- Choi, C.M. i Berson, D. S. (2006). Cosmeceuticals. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 25, 163-168.
- Circo, T.L. i Omaye, S.T. (2006). Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 510-516.
- Coimbra, S., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Rebelo, I., Rocha, S. i Santos-Silva, A. (2006). The effect of green tea in oxidative stress. *Clinical Nutrition*, 25, 790–796.
- Cooper, R., Morré, J. i Morré, D. (2005). Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 5, 521-528.
- Czapski, J. i Górecka, D. (2014). *Żywność prozdrowotna – składniki i technologia*. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.
- Dai, F., Chen, W. i Zhou, B. (2008). Antioxidant synergism of green tea polyphenols with a-tocopherol and L-ascorbic acid in SDS micelles. *Biochimie*, 90, 1499-1505.

- Deepam, L.S.A., Sundaresan, A. i Arumugan, C. (2011). stability of rice bran oil in terms of oryzanol, tocopherols, tocotrienols and sterols. *Journal of The American Oil Chemists' Society*, 88, 1001-1009.
- Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., i Sroka, P. (2015). Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *European Journal of Nutrition*, 54, 325-341.
- Dufresne, C.J. i Farnworth, E.R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 404-421.
- Dwyer, S.P., O'Beirne, D., Ni Eidhin, D. i O'Kennedy, B.T. (2012). Effects of green tea extract and α -tocopherol on the lipid oxidation rate of omega-3 oils, incorporated into table spreads, prepared using multiple emulsion technology. *Journal of Food Science*, 77(12), 58-65.
- Enko, J. i Gliszczyńska-Świgło, A. (2014). Interactions of tea (*Camellia sinensis*) extracts with ascorbic acid and their effect on the antioxidant activity at various pH values. *Towaroznawcze Problemy Jakości*, 3, 85-93.
- Enko, J. i Gliszczyńska-Świgło, A. (2015). Influence of the interactions between tea (*Camellia sinensis*) extracts and ascorbic acid on their antioxidant activity: analysis with interaction indexes and isobolograms. *Food Additives and Contaminants, Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 32(8), 1234-1242.
- Euromonitor International. (2015). *Vitamins and Dietary Supplements – Poland*. Global Market Information Database: www.portal.euromonitor.com
- Euromonitor International. (2017a). *Fortified/Functional Beverages in Poland*. Global Market Information Database: www.portal.euromonitor.com
- Euromonitor International. (2017b). *Skin Care in Poland*. Global Market Information Database: www.portal.euromonitor.com
- Feringa, H.H.H., Laskey, D.A., Dickson, J.E. i Coleman, C.I. (2011). The effect of grape seed extract on cardiovascular risk markers: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics Society*, 11(8), 1173-1181.
- Frum, Y., Viljoen, A.M. i Van Heerden, F.R. (2007). Verbascoside and luteolin-5-O-B-D-glucoside isolated from *Halleria lucida*, L. exhibit antagonistic anti-oxidant properties in vitro. *South African Journal of Botany*, 73, 583-587.

- von Gadow A., Joubert E. i Hansmann, C.F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*, 60, 73-77.
- Ganong, W., Lange, J., i Lange, D. (2009). *Fizjologia*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- Gaspar, L.R., Camargo Jr., F.B., Gianeti, M.D. i Campos, P.M.B.G.M. (2008). Evaluation of dermatological effects of cosmetics formulations containing *Saccharomyces cerevisiae* extract and vitamins. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3493-3500.
- Glei, M., Kirmse, A., Habermann, N., Persin, C. i Pool-Zobel, B.L. (2006). bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and atigenotoxic activities in human cells. *Nutrition and Cancer*, 56, 182-192.
- Gliszczyńska-Świgło, A. i Sikorska, E. (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A*, 1048, 195-198.
- Gliszczyńska-Świgło, A. (2007). Folates as antioxidants. *Food Chemistry*, 101, 1497-1500.
- Gliszczyńska-Świgło, A. i Muzolf, M. (2007). pH-dependent radical scavenging activity of folates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8237-242.
- Gliszczyńska-Świgło, A. i Szymusiak, H. (2009). Interakcje między składnikami suplementów diety na przykładzie kwercetyny i witaminy C. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość (Food. Science. Technology. Quality)*, 65, 278-285.
- Gliszczyńska-Świgło, A. (2010a). Wpływ kwasu askorbinowego na aktywność przeciwrodnikową wybranych flawonoidów. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu*, 162, 55-65.
- Gliszczyńska-Świgło, A. (2010b). *Przeciwutleniające i proutleniające właściwości wybranych składników żywności jako wyróżniki jej jakości*. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu.
- Grases, F., Prieto, R.M., Fernandez-Cabot, R.A., Costa-Bauza, A., Sanchez, A.M. i Prodanov, M. (2015). Effect of consuming a grape seed supplement with abundant phenolic compounds on the oxidative status of healthy human volunteers. *Nutrition Journal*, 14, 94.
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21, 334-350.

- Gramza, A. i Korczak, J. (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 351-358.
- Gramza, A., Pawlak-Lemanska, K., Korczak, J., Wąsowicz, E. i Rudzinska, M. (2005). Tea extracts as free radical scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(6), 861-867.
- Gramza, A., Khokhar, S., Yoko, S., Gliszczynska-Swiglo, A., Hes, M. i Korczak, J. (2006). Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 351-362.
- Gramza-Michałowska, A., Korczak, J. i Heś, M. (2007). Purification process influence on green tea extracts' polyphenol content and antioxidant activity. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(2), 41-48.
- Gramza-Michałowska, A., Heś, M. i Korczak, J. (2008). Tea extracts antioxidative potential in emulsified lipid systems. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 7(3), 29-34.
- Gwiazdowska, D., Juś, K., Jasnowska-Małecka, J. i Kluczyńska, K. (2015). The impact of polyphenols on *Bifidobacterium* growth. *Acta Biochimica Polonica*, 64(4), 895-901.
- Hajati, H., Hassanabadi, A., Golian, A., Nassiri-Moghaddam, H. i Nassiri, M.R. (2014). The effect of in ovo injection of grape seed extract and vitamin C on hatchability, antioxidant activity, yolk sac absorption, performance and ileal micro flora of broiler chickens. *Research Opinions In Animal & Veterinary Sciences*, 4(12), 633-638.
- Hara, Y. (2001). *Green tea: health benefits and applications*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Henning, S. M., Fajardo-Lira, C., Lee, H. W., Youssefian, A. A., Go, V. L. W. i Heber, D. (2003). Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutrition and Cancer*, 45(2), 226-235.
- Horzić, D., Komes, D., Belscak, A., Kovacević Ganić, K., Iveković, D. i Karlovic, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115, 441-448.
- Iglesias, J., Pazos, M., Torres, J.L. i Medina, I. (2012). Antioxidant mechanism of grape procyanidins in muscle tissues: Redox interactions with endogenous ascorbic acid and a-tocopherol. *Food Chemistry*, 134(4), 1767-1774.

- Intra, J. i Kuo, S.-M. (2007). Physiological levels of tea catechins increase cellular lipid antioxidant activity of vitamin C and vitamin E in human intestinal Caco-2 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 169, 91–99.
- Ixtaina, V.Y., Nolasco, S.M. i Toma, M.C. (2012). Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil: Effect of antioxidants and storage conditions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89, 1077–1090.
- Jałosińska, M. i Wilczak, J. (2009). Influence of plant extracts on the microbiological shelf life of the meat product. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 59(4), 303-308.
- Jeszka-Skowron, M., Sentkowska, A., Pyrzyńska, K. i Paz De Peña, M. (2016). Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1403–1409.
- Kijowski, J. i Sikora, T. (red.). (2003). *Zarządzanie jakością i bezpieczeństwem żywności. Integracja i informatyzacja systemów*. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne.
- Kim, J.L., Kang, Y.H. i Kang, J.S. (2007). Study on antioxidant potency of green tea by DPPH method. *FASEB*, 21(5), 726-727.
- Kłódka, D., Bońkowski, M. i Telesiński, A. (2008). Zawartość wybranych metyloksantyn i związków fenolowych w naparach różnych rodzajów herbat rozdrobnionych (dust i fannings) w zależności od czasu parzenia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 56, 103-113.
- Konsoula, Z. i Liakopoulou-Kyriakides, M. (2010). Effect of endogenous antioxidants of sesame seeds and sesame oil to the thermal stability of edible vegetable oils. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1379 – 1386.
- Krejpcio, Z., Staniek, H. i Chmielewska, A. (2013). Ocena powszechności spożycia suplementów diety w wybranych grupach studentów. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 94(3), 622-625.
- Kumar, S. (2005). Exploratory analysis of global cosmetic industry: major players, technology and market trends. *Technovation*, 25, 1263-1272.
- Lee-Hilz, Y.Y., Boerboom, A.M., Westphal, A.H., Berkel, W.J., Aarts, J.M. i Rietjens, I.M. (2006). Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chemical Research in Toxicology*, 19(11), 1499-505.

- Lee-Hilz, Y.Y., Stolaki, M., van Berkel, W.J., Aarts, J.M. i Rietjens, I.M. (2008). Activation of EpRE-mediated gene transcription by quercetin glucuronides depends on their deconjugation. *Food and Chemical Toxicology*, 46(6), 2128-34.
- Lemańska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zieliński, R., Soffers, E.M.F. i Rietjens, I.M.C.M. (2001). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(7), 869–881.
- Lemańska, K., van der Woude, H., Szymusiak, H., Boersma, M.G., Gliszczynska-Świgło, A., Rietjens, I.M.C.M. i Tyrakowska, B. (2004). The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristic of quercetin and luteolin - a mechanistic insight. *Free Radical Research*, 38, 639-647.
- Li, Z., Summanen, P.H., Downes, J., Corbett, K., Komoriya, T., Henning, S.M., Kim, J. i Finegold, S.M. (2015). Antimicrobial activity of pomegranate and green tea extract on *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Drugs in Dermatology*, 14(6), 574-578.
- Liu, T.-T. i Yang, T.-S. (2008). Effects of water-soluble natural antioxidants on photosensitized oxidation of conjugated linoleic acid in an oil-in-water emulsion system. *Journal of Food Science*, 73(4), 256-261.
- Majchrzak, D., Mitter, S. i Elmadfa, I. (2004). The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas. *Food Chemistry*, 88, 447-451.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert A. i Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. W: Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230-242.
- Mandel, S., Amit, T., Reznichenko, L., Weinreb, O. i Youdim, M.B. (2006). Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(2), 229-34.
- Marinova, E., Toneva, A. i Yanishlieve, N. (2008). Synergistic antioxidant effect of α -tocopherol and myricetin on the autooxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food Chemistry*, 106, 628-633.

- Mello, L.D., Alves, A.A., Macedo, D.V. i Kubota, L.T. (2005). Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea. *Food Chemistry*, 92, 515–519.
- Mosca, M., Diantom, A., Lopez, F., Ambrosone, F. i Ceglie, A. (2013). Impact of antioxidants dispersions on the stability and oxidation of water-in-olive-oil emulsions. *European Food Research & Technology*, 236(2), 319-328.
- Mukherjee, P.K., Maity, N., Nema, N.K. i Sarkar, B.K. (2011). Bioactive compounds from natural resurces against skin-aging. *Phytomedicine*, 19, 64-73.
- Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H. i Matoba, T. (2003). Effects of ascorbic acid and a-tocopherol on antioxidant activity of poliphenolic compounds. *Food Chemistry and Toxicology*, 68, 1622-1625.
- Muzolf, M., Szymusiak, H., Gliszczyńska-Świgło, A., Rietjens, I. M. C. M. i Tyrakowska, B. (2008). pH-Dependent radical scavenging capacity of green tea catechins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 816-823.
- Muzolf, M., Gliszczyńska-Swigło, A., de Haan, L., Aarts, J.M., Szymusiak, H., Vervoort, J.M., Tyrakowska, B. i Rietjens, I.M. (2008). Role of catechin quinones in the induction of EpRE-mediated gene expression. *Chemical Research in Toxicology*, 21(12), 2352-60.
- Muzolf-Panek, M. (2009). *Aktywność przeciwutleniająca i proutleniająca katechin występujących w herbacie zielonej*. (Niepublikowana praca doktorska). Poznań: Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu.
- Muzolf-Panek, M., Gliszczyńska-Świgło, A., Szymusiak, H. i Tyrakowska, B. (2012). The influence of stereochemistry on the antioxidant properties of catechin epimers. *European Food Research and Technology*, 235, 1001-1009.
- Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M. i Hara, Y. (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radicals Biology and Medicine*, 21, 895-902.
- Oudemans van Straaten, H.M., Spoelstra de Man, A.M.E. i de Ward, M.C. (2014). Vitamin C revisited. *Critical Care*, 18, 460.
- Özen, A.E., del Mar Bibiloni, M., Pons, A. i Tur, J.A. (2014). Consumption of functional foods in Europe; a systematic review. *Nutrition Hospitalaria*, 29(3), 470-478.
- Paiva-Martins, F. i Gordon, M.H. (2002). Effects of pH and ferric ions on the antioxidant activity of olive polyphenols in oil-in-water emulsions. *Journal Of The American Oil Chemists Society*, 79, 571–576.

- Palafox-Carlos, H., Gil-Chavez, J., Sotelo-Mundo, R.R., Namiesnik, J., Gorinstein, S. i Gonzalez-Aguilar, G.A. (2012). Antioxidant interaction between major phenolic compounds found in 'Ataulfo' mango pulp: chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids. *Molecules*, *17*, 12657-12664.
- Peters, C.M., Green, R.J., Janle, E.M. i Ferruzzi, M.G. (2010). Formulation with ascorbic acid and sucrose modulates catechin bioavailability from green tea. *Food Research International*, *43*, 95–102.
- Piotrowski, J.K. (red.). (2004). *Podstawy toksykologii*. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne.
- Piotrowski, J.K. (red.). (1984). *Materiały do ćwiczeń z toksykologii II, Skrypt*. Łódź: Akademia Medyczna w Łodzi.
- PMR (2015). *Rynek suplementów diety w Polsce, 2015. Prognozy rozwoju na lata, 2015-2020*.
- PN-ISO 3103:1996. *Herbata. Przygotowanie naparu do badań sensorycznych*.
- PN-EN ISO 3656:2002. *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Oznaczanie absorpcji w nadfiolecie wyrażonej jako ekstynkcyjność właściwa w świetle UV*.
- PN-EN ISO 6885:2008. *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby anizydynowej*.
- PN-ISO 3960:1996. *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej*.
- Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D.A., Tsatsakis, A.M., Tzatzarakis, M.N. i Kouretas, D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, *2*(5), 7293-7302.
- Rangkadilok, N., Pholphana, N., Mahidol, C., Wongyai, W., Saengsooksree, K., Nookabkaew, S. i Satayavivad, J. (2010). Variation of sesamin, sesamol and tocopherols in sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds and oil products in Thailand. *Food Chemistry*, *122*, 724-730.
- Reber, J.D., Eggett, D.L. i Parker, T.L. (2011). Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries. *International Journal Of Food Sciences And Nutrition*, *62*, 445–452.
- Rechner, A.E., Wagner, E., Van Buren, L., Van de Put, F., Wiseman, S. i Rice-Evans, C.A. (2001). Black tea represents a major source of dietary phenolics among regular tea drinkers. *Free Radical Research*, *36*(10), 1127–1135.

- Reguła, J., Gramza-Michałowska, A. i Stachowiak, B. (2011). Udział suplementów diety w żywieniu osób dorosłych. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 92(3), 614-616.
- Rice-Evans, C. A. i Miller N. J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234, 279-293.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. i Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radicals Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Rivera, G., Bocanegra-Garcia, V. i Mongec, A. (2010). Traditional plants as source of functional foods: a review. Plantas tradicionales como fuente de alimentos funcionales: una revision. *CyTA – Journal of Food*, 8(2), 159–167.
- Rodewald, D. (2013). *Ocena trwałości mikrobiologicznej preparatów mikrobiologicznych w opakowaniach polimerowych modyfikowanych nanosrebrem.* (Niepublikowana praca doktorska). Poznań: Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu.
- Romano, C.S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A.A. i Moreno, S. (2009). Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry*, 115, 456–461.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia, 2008 r. w sprawie dodatków do żywności.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada, 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych.
- Rusaczonek, A., Świdorski, F. i Waszkiewicz-Robak, B. (2010). Antioxidant properties of tea and herbal infusions – A short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(1), 33-35.
- Rusak G., Komes D., Likić S., Horzić D. i Kovac M. (2008). Phenolic content and antioxidant capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and solvent used. *Food Chemistry*, 110, 852-858.
- Rutkowski, A., Gwiazda, S. i Dąbrowski, K. (2003). *Kompendium dodatków do żywności.* Konin: Hortimex.
- Rutkowski, A. (2004). *Stosowanie dozwolonych substancji dodatkowych w przetwórstwie mięsa, drobiu i ryb.* Konin: Hortimex.

- Rutkowski, A. (2005). Naturalne a syntetyczne substancje dodatkowe. W: Rutkowski, A. (red.), *Naturalne dodatki do żywności*. Konin: Polska Izba Dodatków do Żywności.
- Saito, S., Gosmann, G., Saffi, J., Presser, M., Richter, M.F. i Bergold, M.F. (2007). Characterization of the constituents and antioxidant activity of brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 Cultivar) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9409–9414.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C. i Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, 67–80.
- Santiesteban-Lopez A., Palou E., Lopez I. i Malo A. (2007). Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 486-497.
- Seeram, N.P., Henning, S.M., Niu, Y., Lee, R., Scheuller, H.S. i Hener, D. (2006). Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1599-603.
- Seńczuk, W. (red.). (2002). *Toksykologia*. Warszawa: Wyd. Nauk. PWN.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E. i Kakuda, Y. (2003). Polyphenolics in grape seeds- biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food*, 6(4), 291-299.
- Shibamoto T. i Bjeldanes L. (2009). *Introduction to Food Toxicology*. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Skibsted, L.H. (2012). Vitamin and non-vitamin antioxidants and their interaction in food. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20, suppl. 1, 355-358.
- Sorensen, A.-D. M., Nielsen, N.S., Decker, E.A., Let, M.B., Xu, X. i Jacobsen, C. (2011). The efficacy of compounds with different polarities as antioxidants in emulsions with omega-3 lipids. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88, 489–502.
- Śmigielska, H. (2016). *Innowacyjne produkty spożywcze na rynku żywności funkcjonalnej zawierające wzbogaconą skrobię*. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu.
- Świdorski, F. (red.). (2003). *Żywność wygodna i żywność funkcjonalna*. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne.

- Tallarida, R.J. (2006). An overview of drug combination analysis with isobolograms. *Perspectives in Pharmacology*, 319, 1-7.
- Tafesh, A., Najami, N., Jadoun, J., Halahlih, F., Riepl, H. i Azaizeh, H. (2011). Synergistic antibacterial effect of polyphenolic compounds from olive mill wastewater. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine. doi: 10.1155/2011/431021.
- Tang, S., Sheehan, D., Buckley, D.J., Morrissey, P.A. i Kerry, J.P. (2001). Anti-oxidant activity of added tea catechins on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 685-692.
- Thielecke, F. i Boschmann, M. (2009). The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome – A review. *Phytochemistry*, 70, 11–24.
- Tyrakowska, B., Soffers, A. E. M. F., Szymusiak, H., Boeren, S., Boersma, M. G, Lemanska, K., Vervoort, J. i Rietjen, I. M. C. M. (1999). TEAC antioxidant activity of 4-hydrobenzoates. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 1427-1436.
- Unachukwu, U.J., Ahmed, S., Kavalier, A., Lyles, J.T. i Kennelly, E.J. (2010). White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles. *Journal of Food Science*, 75(6), 541-548.
- Ustawa z 25 sierpnia, 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz. U., nr 171).
- Van Hoed, V., de Clercq, N., Echimi, C., Andjelkovic, M., Leber, E., Dewettinck, K. i Verhe, R. (2009). Berry seeds: a source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value. *Journal of Food Lipids*, 16, 33–49.
- Verma, K., Agrawal, N., Misra, R.B., Farooq, M. i Hans, R.K. (2007). Phototoxicity assessment of drugs and cosmetic products using *E. coli*. *Toxicology in vitro*, 22, 249-253.
- Wang, F., Zhao, S., Li, F., Zhang, B. i Qu, Y. (2014). Investigation of antioxidant interactions between *Radix astragali* and *Cimicifuga foetida* and identification of synergistic antioxidant compounds. *PLoS ONE*, 9(1), e87221. doi:10.1371/journal.pone.0087221
- Wei, K., Wang, L.-Y., Zhou, J., He, W., Zeng, J.-M., Jiang, Y.-W. i Cheng, H. (2012). Comparison of catechins and purine alkaloids in albino and normal green tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) by HPLC. *Food Chemistry*, 130, 720–724.

- Wenkui, L., Fong, H.H.S., Singletary, K.W. i Ftzloff, J.F. (2002). Determination of catechins in commercial grape seed extract. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 25(3), 397–407.
- Wu, S.-C., Yen, G.-C., Wang, B.-S., Chiud, C.-K., Yend, W.J., Chang, L.-W. i Duhd, P.-D. (2007). Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT Food Science and Technology*, 40, 506–512.
- Wu, S., Wang, L., Shu, F., Cao, W., Chen, F. i Wang, X. (2013). Effect of refining on the lignan content and oxidative stability of oil pressed from roasted sesame seedInternational. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 1187–1192.
- Yeomans, V.C., Linseisen, J. i Wolfram, G. (2005). Interactive effects of polyphenols, tocopherol and ascorbic acid on the Cu²⁺-mediated oxidative modification of humal low density lipoproteins. *European Journal of Nutrition*, 44, 422-428.
- Yi, S., Xu, Y., Li, X., He, Y., Sun, T., Bai, F., Wang, W., Li, J. i Zhu, J. (2014). Antimicrobial effect and membrane-active mechanism of tea polyphenols against *Serratia marcescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 451-460.
- Yilmaz, Y. i Toledo, R.T. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 255–260.
- Yin, J., Becker, E.M., Andersen, M.L. i Skibsted, L.H. (2012). Green tea extract as food antioxidant. Synergism and antagonism with α -tocopherol in vegetable oils and their colloidal systems. *Food Chemistry*, 135, 2195–2202.
- Zakir, M., Sultan, K.B., Khan, H., Ihsaanullah, Khan, M.A., Fazal, H. i Rauf, A. (2015). Antimicrobial activity of different tea varieties available in Pakistan. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(6), 2091-2094.
- Zawirska-Wojtasiak, R. (2005). Naturalne a syntetyczne aromaty, barwniki i konserwanty (stan i perspektywy). W: Rutkowski, A. (red.), *Naturalne dodatki do żywności*. Konin: Polska Izba Dodatków do Żywności.
- Zhang, L.-W., Al-Suwayeh, S.A., Hsieh, P.-W. i Fang, J.-Y. (2010). A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives. Evaluation of their efficacy and safety. *International Journal of Pharmaceutics*, 399, 44-51.
- Zhang, H.M., Wang, C.F., Shen, S.M., Wang, G.L., Liu, P., Liu, Z.M., Wang, Y.Y., Du, S.S., Liu, Z.L. i Deng, Z.W. (2012). Antioxidant phenolic compounds from pu-erh tea. *Molecules*, 17, 14037-14045.

Bibliografia

- Zhu, Q.Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y. i Chen, Z.Y. (1997). Stability of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4624-4628.
- Zussman, J., Ahdout, J. i Kim, J. (2010). Vitamins and photoageing: Do scientific data support their use? *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63, 507-525.
- Zuo, Y., Chen, H. i Deng, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57, 307–316.

WYKAZ TABEL I WYKRESÓW

Tabele

- Tabela 1. Zawartość kwasu galusowego oraz katechin (mg/g ekstraktu) w wodnych ekstraktach herbat
- Tabela 2. Zawartość kwasów chlorogenowych w wodnym ekstrakcie z zielonej kawy (mg/g ekstraktu)
- Tabela 3. Zawartość kwasu galusowego, katechin i procyanidyny B1 (mg/g ekstraktu) w wodnym ekstrakcie z pestek winogron
- Tabela 4. Właściwości przeciwutleniające ekstraktów (E) oraz ich mieszanin z kwasem askorbinowym (KA) w różnych stosunkach wagowych w teście TEAC
- Tabela 5. Właściwości przeciwutleniające ekstraktów (E) oraz ich mieszanin z kwasem askorbinowym (KA) w różnych stosunkach wagowych w teście FRAP
- Tabela 6. Właściwości przeciwutleniające ekstraktów (E) oraz ich mieszanin z kwasem askorbinowym (KA) w różnych stosunkach wagowych w teście DPPH (IC50)
- Tabela 7. Współczynniki interakcji dla mieszanin ekstraktów (E) z kwasem askorbinowym (KA) dla testu TEAC
- Tabela 8. Współczynniki interakcji dla mieszanin ekstraktów (E) z kwasem askorbinowym (KA) dla testu FRAP
- Tabela 9. Współczynniki interakcji dla mieszanin ekstraktów (E) z kwasem askorbinowym (KA) dla testu DPPH (IC50)
- Tabela 10. Wartości współczynników interakcji przy różnych wartościach pH dla mieszanin ekstraktu z zielonej herbaty i kwasu askorbinowego w różnych stosunkach wagowych
- Tabela 11. Wartości współczynników interakcji przy różnych wartościach pH dla mieszanin ekstraktu z czarnej herbaty i kwasu askorbinowego w różnych stosunkach wagowych
- Tabela 12. Wartości współczynników interakcji przy różnych wartościach pH dla mieszanin ekstraktu z czerwonej herbaty i kwasu askorbinowego w różnych stosunkach wagowych
- Tabela 13. Wartości współczynników interakcji przy różnych wartościach pH dla mieszanin ekstraktu z białej herbaty i kwasu askorbinowego w różnych stosunkach wagowych

- Tabela 14. Wpływ ekstraktów i ich mieszanin badanych ekstraktów i kwasu askorbinowego dla zakresu stężeń 62,5–2000 µg mieszaniny/ml.
- Tabela 15. Wpływ ekstraktów i ich mieszanin badanych ekstraktów i kwasu askorbinowego dla zakresu stężeń 6,25–200 µg mieszaniny/ml.
- Tabela 16. Wpływ ekstraktów i ich mieszanin standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i kwasu askorbinowego dla zakresu stężeń 1-40 µg mieszaniny/ml.
- Tabela 17. Wpływ ekstraktów i ich mieszanin badanych ekstraktów i kwasu askorbinowego na wzrost *S. aureus* dla zakresu stężeń 0,1-4,0 µg mieszaniny/ml.
- Tabela 18. Interakcje pomiędzy wybranymi ekstraktami i KA w zakresie hamowania wzrostu mikroorganizmów

Wykresy

- Wykres 1. Izobologram dla mieszaniny niestandaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i kwasu askorbinowego (test TEAC)
- Wykres 2. Izobologram dla mieszaniny niestandaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i kwasu askorbinowego (test FRAP)
- Wykres 3. Izobologram dla mieszaniny niestandaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty i kwasu askorbinowego (test DPPH)
- Wykres 4. Zależność wartości TEAC od pH dla mieszanin ekstraktu z czarnej herbaty z kwasem askorbinowym
- Wykres 5. Zależność wartości TEAC od pH dla mieszanin ekstraktu z zielonej herbaty z kwasem askorbinowym
- Wykres 6. Zależność wartości TEAC od pH dla mieszanin ekstraktu z czerwonej herbaty z kwasem askorbinowym
- Wykres 7. Zależność wartości TEAC od pH dla mieszanin ekstraktu z białej herbaty z kwasem askorbinowym
- Wykres 8. Izobologramy dla mieszanin ekstraktu z czarnej herbaty i kwasu askorbinowego (pH 3 i 8)
- Wykres 9. Izobologramy dla mieszanin ekstraktu z zielonej herbaty i kwasu askorbinowego (pH 3 i 8)
- Wykres 10. Izobologramy dla mieszanin ekstraktu z czerwonej herbaty i kwasu askorbinowego (pH 3 i 8)

- Wykres 11. Izobogramy dla mieszanin ekstraktu z białej herbaty i kwasu askorbinowego (pH 3 i 8)
- Wykres 12. Zmiany wartości liczby nadtlenkowej próbek oleju sezamowego z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy
- Wykres 13. Zmiany wartości liczby anizydynowej próbek oleju sezamowego z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy
- Wykres 14. Zmiany wartości TOTOX próbek oleju sezamowego z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy
- Wykres 15. Zmiany stężenia skoniugowanych dienów w próbkach oleju sezamowego z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy
- Wykres 16. Zmiany stężenia skoniugowanych trienów w próbkach oleju sezamowego z dodatkiem badanych przeciwutleniaczy
- Wykres 17. Stopnie hamowania dla oleju sezamowego z dodatkiem mieszanin KA i ekstraktu z zielonej herbaty w stosunku wagowym 2:1.
- Wykres 18. Stopnie hamowania dla oleju sezamowego z dodatkiem mieszanin KA i ekstraktu z zielonej herbaty w stosunku wagowym 1:2.
- Wykres 19. Stopnie hamowania dla oleju sezamowego z dodatkiem mieszanin KA i ekstraktu z zielonej herbaty (skoniugowane dieny).
- Wykres, 20. Stopnie hamowania dla oleju sezamowego z dodatkiem mieszanin KA i ekstraktu z zielonej herbaty (skoniugowane trieny).
- Wykres 21. Wo dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z zielonej kawy i KA
- Wykres 22. Wo dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z pestek winogron i KA
- Wykres 23. Wo dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z białej herbaty i KA
- Wykres 24. Wo dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu niestandardyzowanego z zielonej herbaty i KA
- Wykres 25. Wo dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu standaryzowanego z zielonej herbaty i KA
- Wykres 26. Wo dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z czerwonej herbaty i KA
- Wykres 27. Wo dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z czarnej herbaty i KA
- Wykres 28. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z zielonej kawy i KA
- Wykres 29. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z pestek winogron i KA

Wykres 30. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu niestandardyzowanego z zielonej herbaty i KA

Wykres 31. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z czerwonej herbaty i KA

Wykres 32. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z białej herbaty i KA

Wykres 33. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu z czarnej herbaty i KA

Wykres 34. Stopnie hamowania dla emulsji kosmetycznych z dodatkiem ekstraktu standaryzowanego z zielonej herbaty i KA

ZAŁĄCZNIK/ Elektroniczny załącznik (płyta CD).

Załącznik 1. Izobologramy dla oznaczeń TEAC, FRAP i DPPH badanych ekstraktów i ich mieszanin z kwasem askorbinowym.

Załącznik 2. Izobologramy dla oznaczeń TEAC w zakresie pH 2-9 badanych ekstraktów herbat i ich mieszanin z kwasem askorbinowym.

Załącznik 3. Tabele wyników dla oznaczeń hamowania utleniania oleju sezamowego z dodatkiem ekstraktu z zielonej herbaty i dla oznaczeń stabilności oksydacyjnej emulsji kosmetycznej z dodatkiem badanych ekstraktów

Załącznik 4. Tabele zależności stopnia hamowania wzrostu drobnoustrojów w zależności od stężenia badanych ekstraktów i ich mieszanin z kwasem askorbinowym.