

\*Anna Gawron-Gzella

# Aktywność antyoksydacyjna popularnych przypraw

## Antioxidant activity of popular spices

Katedra i Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. farm. Judyta Cielecka-Piontek

### SUMMARY

**Introduction.** Some of the medicinal plants, which are also spices, show multidirectional pharmacological activity resulting from the presence of numerous active compounds, including polyphenols. Spice extracts often have antioxidant properties, and when used to improve the taste of dishes, they also contribute to the prevention and treatment of many civilization diseases. Plants with a potential antioxidant activity are popular spices: cinnamon, ginger, turmeric, nutmeg and cardamom.

**Aim.** Comparison of water and alcohol extracts from 5 spices in terms of the total phenolic content and antioxidant activity.

**Material and methods.** The water and methanol extracts from 5 spices derived from 3 producers were analysed. The total phenolic content in the extracts was determined by the colorimetric method with the use of the Folin-Ciocalteu (FC). The antioxidant activity was determined by methods with the ABTS<sup>•+</sup> radical cation and the reduction of iron (III) ions (FRAP).

**Results.** The total phenolic content in the examined extracts, ranged from 0.74 to 39.32%, expressed as gallic acid. The highest total polyphenol content was determined in cinnamon extracts (29.72-39.32%). The antioxidant properties of the examined extracts were as follows: the IC<sub>50</sub> parameter (for the method with the ABTS<sup>•+</sup> radical cation) was from 245.94 to 1.148 (mg/ml), and the IC<sub>0.5</sub> parameter (for the FRAP method) from 91.67 to 0.70 (mg/ml).

**Conclusions.** The content of polyphenolic compounds in the tested extracts differed depending on the type of spice and the preparation of the extract. The highest antioxidant activity was shown by cinnamon extract, followed by ginger, nutmeg and turmeric, while cardamom turned out to be the least free radical scavenger.

**Keywords:** cinnamon, ginger, turmeric, nutmeg, cardamom, total phenol content, antioxidant activity

### STRESZCZENIE

**Wstęp.** Niektóre z roślin leczniczych, będące jednocześnie przyprawami, wykazują wielokierunkową aktywność farmakologiczną, wynikającą z obecności licznych związków czynnych, w tym polifenoli. Ekstrakty z przypraw często posiadają właściwości przeciwutleniające, a stosowane jako poprawiające walory smakowe potraw, jednocześnie mają udział w zapobieganiu i leczeniu wielu chorób cywilizacyjnych. Do roślin o pewnym potencjale antyoksydacyjnym zaliczają się popularne przyprawy: cynamon, imbir, kurkuma, gałka muszkatolowa i kardamon.

**Cel pracy.** Porównanie 5 przypraw pod kątem zawartości sumy związków polifenolowych w wyciągach wodnych i alkoholowych oraz ich aktywności antyoksydacyjnej.

**Materiał i metody.** Badaniom poddano wyciągi wodne i metanolowe z 5 przypraw pochodzących od 3 producentów. Do oznaczenia sumy polifenoli w wyciągach wykorzystano metodę kolorymetryczną z użyciem odczynnika Folin-Ciocalteu (FC). Badanie aktywności antyoksydacyjnej przeprowadzono metodą z kationorodnikiem ABTS<sup>•+</sup> oraz metodą redukcji jonów żelaza (III) (FRAP).

**Wyniki.** Suma polifenoli w przeliczeniu na kwas galusowy w badanych wyciągach wyniosła od 0,74 do 39,32%. Najwięcej polifenoli oznaczono w ekstraktach z cynamonu (29,72-39,32%). Właściwości antyoksydacyjne badanych wyciągów kształtowały się następująco: parametr IC<sub>50</sub> (dla metody z kationorodnikiem ABTS<sup>•+</sup>) wyniósł od 245,94 do 1,148 (mg/ml), a parametr IC<sub>0,5</sub> (dla metody FRAP) od 91,67 do 0,70 (mg/ml).

**Wnioski.** Zawartości związków polifenolowych w badanych wyciągach różniły się w zależności od rodzaju przyprawy oraz przygotowania wyciągu. Najwyższą aktywność antyoksydacyjną wykazywał wyciąg z cynamonu, następnie imbir, gałka muszkatolowa i kurkuma, natomiast najslabiej zmiatającym wolne rodniki okazał się kardamon.

**Słowa kluczowe:** cynamon, imbir, kurkuma, gałka muszkatolowa, kardamon, suma polifenoli, aktywność antyoksydacyjna

## Wprowadzenie

Rośliny lecznicze zawierają liczne związki biologicznie czynne, którym zawdzięczają wielokierunkową

aktywność farmakologiczną. Niektóre z nich, będące przyprawami, są wykorzystywane dwukierunkowo – jako działające leczniczo oraz poprawiające walory sensoryczne potraw i przetworów. Wiele z roślin

przyprawowych posiada monografie ESCOP, EMA czy WHO dokumentujące ich działanie lecznicze, a także monografie farmakopealne określające metody ich badania.

Podstawowym kryterium oceny przypraw jest ich aromat, czyli smak odbierany za pomocą receptorów smakowych w nabolku języka oraz zapach wyczuwany dzięki receptorom w błonie śluzowej nosa. Z kolei dla oceny działania leczniczego ważne są właściwości, które można potwierdzić między innymi badaniami *in vitro*. Prezentowane badania dotyczą aktywności antyoksydacyjnej 5 przypraw: kurkumy, imbiru, kardamonu, cynamonu oraz gałki muszkatołowej.

Kurkuma – przyprawę stanowi zmielone kłącze ostrzyżu długiego (*Curcuma longa*), zawierające 3,0-5,4% kurkuminoidów, głównie kurkuminy (FPXI n.m.n. 2% kurkuminy) i 4-6% olejku eterycznego (FPXI n.m.n. 25 ml/kg) z  $\alpha$ - i  $\beta$ -turmeronem, kurkumenem i zingiberenem oraz liczne węglowodany, w tym skrobię. Kurkuma pobudza wydzielanie żółci, a działając rozkurczająco na mięśnie gładkie przewodu pokarmowego, przywraca prawidłową kurczliwość pęcherzyka i dróg żółciowych, ułatwia przepływ oraz zapobiega objawom zastojów żółci i tworzeniu się kamieni żółciowych, głównie cholesterolowych. Zwiększa wydzielanie soku żołądkowego i trzustkowego oraz działa przeciwzapalnie w obrębie przewodu pokarmowego. Za działanie kurkumy odpowiada głównie kurkumina, która wykazuje silne właściwości przeciwzapalne poprzez obniżanie poziomu cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-1 $\beta$ ), enzymów zapalnych i czynników transkrypcyjnych. Kurkumina dzięki silnym właściwościom przeciwutleniającym (10 razy większym niż witamina E) zwiększa antyoksydacyjną obronę komórkową, ponieważ aktywuje enzymy przeciwutleniające, zwiększa działanie przeciwutleniaczy (GST, GSH, SOD i GPx), hamuje peroksydację lipidów oraz eliminuje reaktywne formy tlenu, będące skutkiem hiperglikemii. Ze względu na liczne badania potwierdzające skuteczność działania, kurkuma ma szerokie zastosowanie w zaburzeniach trawiennych (niewydolności wątroby, niestrawności, wzdęciach) oraz w stanach zapalnych wątroby i dróg żółciowych, a nawet uszkodzeniach jej mięszu, a także odgrywa ważną rolę w zapobieganiu i leczeniu innych chorób, w tym nowotworów, chorób autoimmunologicznych, a nawet neurologicznych (1-5).

Imbir – przyprawą jest kłącze imbiru lekarskiego (*Zingiber officinale*), które zawiera 1-4% olejku eterycznego (FPXI n.m.n. 15 ml/kg) bogatego w seskwiterpeny (główny nośnik zapachu – zingiberol oraz  $\alpha$ -zingiberen,  $\beta$ -seskwifellandren,  $\beta$ -bisabolen) i odpowiadającą za działanie lecznicze surowca żywicę

(5-8%), którą stanowią fenyloalkany – gingerole i szogaole. Podczas suszenia i przechowywania kłącze gingerole (determinujące ostry smak imbiru) ulegają dehydratacji do szogaoli. Znane są liczne właściwości lecznicze kłącza imbiru: działanie przeciwwymiotne, pobudzające wydzielanie śliny, soku żołądkowego, trzustkowego i żółci oraz wzmagające perystaltykę jelit. Imbir działa też przeciwzapalnie (hamuje COX-2, 5-LOX, zmniejsza syntezę TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , białka CRP oraz obniża peroksydację lipidów) i przeciwutleniająco, dzięki czemu m.in. usprawnia transport glukozy, poprawia jej tolerancję i zmniejsza insulinooporność. Działa antyagregacyjnie i ochronnie na serce, a także hipolipemizująco i neuroprotekcynie. Kłącze imbiru jest stosowane w zaburzeniach trawiennych oraz w profilaktyce wymiotów, zwłaszcza w chorobie lokomocyjnej, po narkozie, chemioterapii, a nawet w wymiotach u kobiet w ciąży. Skuteczność w hamowaniu rozwoju stanu zapalnego i syntezy jego mediatorów pozwala na stosowanie imbiru w schorzeniach reumatycznych, a wyniki nowych badań wskazują także na wpływ na układ immunologiczny, działanie ochronne na wątrobę, zwiększanie wrażliwości na insulinę oraz znaczenie w chemioprewencji nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych (5-10).

Cynamon – jest przyprawą otrzymywaną z kory młodych gałązek różnych gatunków cynamonowca, głównie cejlońskiego (*Cinnamomum zeylanicum*) i chińskiego (*Cinnamomum cassia*). Kora cynamonowca jest aromatycznym surowcem, zawierającym 0,5-4,0% olejku eterycznego (FPXI n.m.n. 12 ml/kg) bogatego w aldehyd cynamonowy (65-75%), octan cynamylu, eugenol i  $\beta$ -kariofilen. Ponadto w korze występują oligomeryczne proantocyjanidyny, pentacykliczne diterpeny, polisacharydy, kumaryny, witaminy i związki mineralne. Wyniki wielu badań potwierdzają działanie hipoglikemiczne cynamonu, polegające na łagodzeniu glikemii poposiłkowej (hamuje  $\alpha$ -glukozydazę) oraz poprawie działania insuliny, przez zwiększanie wychwytu glukozy i wzmacnianie szlaku sygnalizacji insuliny w mięśniach szkieletowych. Cynamon posiada wysoki potencjał przeciwutleniający, dzięki czemu poprawia profil lipidowy krwi – działa hipolipemicznie, hipotensyjnie i ułatwia redukcję masy ciała, ma też właściwości przeciwzapalne oraz przeciwdrobnoustrojowe (5, 11-15).

Kardamon – całe lub sproszkowane nasiona kardamonu malabarskiego (*Elettaria cardamomum*) są jedną z najstarszych przypraw na świecie. Aromat zawdzięczają obecności olejku eterycznego, w którego składzie znajdują się: 1,8-cyneol, octan  $\alpha$ -terpinylu, sabinen i linalol. Ponadto kardamon zawiera dużą ilość związków fenolowych (flawonoidów i tanin) oraz

terpenów, a także liczne sole mineralne. Kardamon jest stosowany głównie w dolegliwościach układu pokarmowego (niestrawność, kolki, brak apetytu) oraz w schorzeniach dróg oddechowych. Działa też przeciwzapalnie, przeciwbakteryjnie, a blokując kanały wapniowe, pośredniczy w rozszerzaniu oskrzeli, co stanowi uzasadnienie jego skuteczności w astmie (16-19).

Gałka muszkatołowa – jest przyprawą pozyskiwaną z nasion muszkatołowca korzennego (*Myristica fragrans*). Stanowi bogate źródło olejku eterycznego (do 16%, głównymi składnikami są eugenol i mirystycyna) oraz różnego rodzaju związków fenolowych i terpenowych. Gałka muszkatołowa jest stosowana głównie we wzdęciach i niestrawności jako środek ułatwiający trawienie, a także w przeziębieniach ze względu na działanie przeciwdrobnoustrojowe. W najnowszych badaniach potwierdzono również jej działanie przeciwzapalne, wynikające z obniżania poziomu prozapalnych prostaglandyn, oraz działanie przeciwbólowe, które uzasadnia miejscowe stosowanie olejku z gałki muszkatołowej w schorzeniach reumatycznych. Znane jest także działanie przeciwmiażdżycowe wynikające z obecności lignanów. Wewnętrzne stosowanie lecznicze tego surowca ogranicza jednak psychoaktywne działanie metabolitu mirystycyny. Gałka muszkatołowa od wieków uważana jest także za jeden z najsukutekniejszych afrodyzjaków (20-24).

### Cel pracy

Celem przeprowadzonych badań było porównanie 5 przypraw pod kątem zawartości sumy związków polifenolowych w wyciągach wodnych i alkoholowych oraz aktywności antyoksydacyjnej tych wyciągów.

### Materiał i metody

#### Materiał roślinny

Materiał do badań stanowiło 5 popularnych przypraw: kurkuma, imbir, kardamon, cynamon i gałka muszkatołowa, pochodzących od trzech popularnych na polskim rynku producentów (oznaczonych w pracy jako P-1, P-2 oraz P-3), które zakupiono w 2019 roku w jednej z sieci handlowych w Poznaniu.

Odczynniki użyte do badań, o stopniu czystości cz.d.a., pochodziły z firm: odczynnik Folina-Ciocalteu i sześciowodny chlorek żelaza (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) – Merck (Darmstadt, Niemcy); kwas galusowy – Carl Roth GmbH Co. (Niemcy); BHA (butylowany hydroksyanizol) – Fluka (Francja); ABTS [2,2-azyno-bis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)], troloks (kwas 6-hydrokso-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksylowy) i TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyna) –

Sigma Aldrich (USA); trójwodny octan sodu ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) i witamina C (kwas askorbiny) z firmy Pol-Aura (Polska), natomiast kwas octowy 99,5%, kwas solny 36%, węglan sodu bezwodny, metanol, nadsiarżan potasu ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) i sześciowodny chlorek żelaza (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) z firmy POCh Gliwice (Polska).

#### Sprzęt

Pomiaru absorbancji do oznaczania sumy polifenoli i aktywności antyoksydacyjnej dokonywano na spektrofotometrze Thermo Scientific Multiscan Go 1510, przy użyciu 96-dołkowych płytek mikrotitracyjnych.

#### Przygotowanie wyciągów do badań

Z każdej przyprawy (od trzech producentów) przygotowano wyciągi wodne (napary) i alkoholowe (metanolowe). Wszystkie oznaczenia prowadzono na tych samych wyciągach z danej przyprawy (wyciągi po przygotowaniu zamrażano, a przed oznaczeniami rozmrażano odpowiednie ich ilości, maksymalny czas przechowywania zamrożonych ekstraktów wynosił 2 miesiące).

Wyciągi wodne – surowce zalewano wrzącą wodą destylowaną, pozostawiono na 30 minut, następnie sączono i uzupełniano wodą destylowaną do określonej objętości.

Wyciągi alkoholowe – surowce zalewano metanolem i prowadzono dwukrotną ekstrakcję na łaźni ultradźwiękowej (temp. 35°C, 30 minut). Uzyskane wyciągi po przesączeniu zagęszczano do sucha (wyparka próżniowa, temp. 50°C). Suchą pozostałość rozpuszczano w wodzie destylowanej. Stężenie wyciągów wodnych i alkoholowych, przygotowanych do badań, wynosiło 10 mg suchego surowca/1 ml wyciągu.

#### Oznaczanie zawartości sumy polifenoli (TPC)

Sumę polifenoli oznaczono metodą spektrofotometryczną z użyciem odczynnika Folin-Ciocalteu (FC). Związki fenolowe w alkalicznym środowisku (20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) wywołują redukcję molibdenu (VI), obecnego w odczynniku Folin-Ciocalteu, do Mo(V), czego efektem jest zmiana zabarwienia kompleksu z żółtego na niebieski. Intensywność zabarwienia roztworu jest proporcjonalna do zawartości związków fenolowych, reagujących z odczynnikiem FC (25, 26).

Do dołków płytki mikrotitracyjnej, owiniętej folią aluminiową, odmierzano kolejno: 0,195 ml wody destylowanej, 0,030 ml analizowanych wyciągów (lub roztworu kwasu galusowego o określonych stężeniach – dla wykreślenia krzywej kalibracyjnej), następnie do każdego dołka dodawano 0,015 ml odczynnika FC, a po 1 minucie 0,060 ml 20% roztworu węglanu

sodu. Równolegle przygotowano próbę ślepa (wyciąg lub roztwór kwasu galusowego zastąpiono wodą destylowaną). Po 30 minutach inkubacji prób (temp. pokojowa, bez dostępu światła) mierzono wartość absorbancji przy długości fali  $\lambda_{\max} = 760 \text{ nm}$  wobec próby ślepej.

W celu oznaczenia sumy polifenoli wykonano krzywą kalibracyjną dla wzorcowego kwasu galusowego (zakres stężeń 6,25-200  $\mu\text{g/ml}$ ), a następnie na podstawie wyznaczonego równania  $y = 0,2532x + 0,0037$ ;  $R^2 = 0,9991$  obliczono całkowitą zawartość polifenoli w poszczególnych wyciągach. Wyniki oznaczeń TPC wyrażone w mg kwasu galusowego na g badanej przyprawy (mg GAE/g) zostały zamieszczone w tabeli 1.

#### Badanie aktywności antyoksydacyjnej (AA)

Aktywność antyoksydacyjną wyciągów z badanych przypraw oznaczono dwiema metodami: z użyciem kationorodnika ABTS<sup>•+</sup> oraz metodą FRAP – redukcji jonów żelaza (III).

Oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej metodą z kationorodnikiem ABTS<sup>•+</sup>

W metodzie wykorzystana jest reakcja badanych prób z kationorodnikami ABTS<sup>•+</sup> [2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)]. Niebieskozielona barwa, wygenerowanego przed pomiarem (utlenienie za pomocą  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) kationorodnika ABTS<sup>•+</sup>, zanika w zależności od stężenia i aktywności przeciwutleniacza oraz czasu trwania reakcji. Pomiaru intensywności zabarwienia próbek dokonuje się przy długości fali  $\lambda_{\max} = 734 \text{ nm}$  (27).

#### Przygotowanie roztworu kationorodników ABTS<sup>•+</sup>

Do kolby miarowej o poj. 25 ml odważono 0,09602 g ABTS i rozpuszczono w 2,45 mM roztworze nadsiarczanu potasu ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), uzyskując 7,0 mM roztwór podstawowy kationorodników ABTS<sup>•+</sup>, który inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemnym miejscu, przez 24 godziny. Do badań roztwór podstawowy rozcieńczano wodą dejonizowaną, tak aby osiągnąć absorbancję  $\sim 0,77$ , mierzoną przy długości fali  $\lambda = 734 \text{ nm}$ .

#### Przygotowanie roztworów do badań

Z podstawowych wyciągów wodnych i alkoholowych o stężeniu 10 mg suchego surowca/1 ml wyciągu przygotowano 6 kolejnych stężeń w zakresie 80,0-0,3125 mg/ml. Analogiczne badania wykonano dla 6 stężeń wzorcowych antyoksydantów: BHA (butylovanego hydroksyanizolu) w zakresie stężeń 0,125-0,008 mg/ml oraz troloksu (kwasu 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksyłowego) w stężeniach 0,313-0,020 mg/ml.

#### Badanie aktywności antyoksydacyjnej

Do dołków płytki mikrotitracyjnej, owiniętej folią aluminiową, odmierzano 0,01 ml wyciągów lub roztworów wzorcowych antyoksydantów o określonym stężeniu oraz 0,20 ml roztworu kationorodnika ABTS<sup>•+</sup>. Równolegle przygotowano próbę zerową, w której badane roztwory zastąpiono wodą destylowaną. Po 10 minutach mierzono absorbancję prób przy długości fali  $\lambda = 734 \text{ nm}$  wobec wody jako próby odniesienia. AA (aktywność antyoksydacyjną = stopień zmiatania kationorodników ABTS<sup>•+</sup>) badanych prób obliczano z równania:

**Tab. 1.** Suma polifenoli (TPC) w wyciągach z badanych przypraw (mg GAE/g)

Producent	Cynamon		Imbir		Gałka muszkatołowa		Kurkuma		Kardamon	
	WW	WM	WW	WM	WW	WM	WW	WM	WW	WM
P-1	321,24 ± 0,01	312,12 ± 0,04	67,82 ± 0,04	48,85 ± 0,02	35,78 ± 0,01	30,88 ± 0,01	30,24 ± 0,01	12,81 ± 0,01	25,89 ± 0,004	16,01 ± 0,03
	WW/WM = 1,03		WW/WM = 1,39		WW/WM = 1,16		WW/WM = 2,36		WW/WM = 1,62	
P-2	364,09 ± 0,02	393,22 ± 0,04	72,28 ± 0,01	54,53 ± 0,01	45,71 ± 0,02	67,07 ± 0,02	32,23 ± 0,004	15,07 ± 0,02	12,29 ± 0,02	7,81 ± 0,02
	WW/WM = 0,93		WW/WM = 1,33		WW/WM = 0,68		WW/WM = 2,13		WW/WM = 1,59	
P-3	297,16 ± 0,02	349,77 ± 0,04	61,67 ± 0,03	61,89 ± 0,02	35,64 ± 0,01	75,53 ± 0,02	35,89 ± 0,01	15,91 ± 0,01	10,71 ± 0,01	7,39 ± 0,02
	WW/WM = 0,85		WW/WM = 1,00		WW/WM = 0,47		WW/WM = 2,23		WW/WM = 1,46	

WW – wyciąg wodny; WM – wyciąg metanolowy



$$AA (\%) = \frac{A_{ABTS^{+}} - A_x}{A_{ABTS^{+}}} \times 100$$

gdzie:  $A_x$  – średnia absorbancja próbki;  $A_{ABTS^{+}}$  – średnia absorbancja roztworu kationorodników  $ABTS^{+}$  (próbki zerowej).

W celu porównania aktywności antyoksydacyjnej wyciągów z badanych przypraw z roztworami substancji referencyjnych wyznaczono parametr  $IC_{50}$  (ilość antyoksydantu potrzebna do neutralizacji 50%  $ABTS^{+}$ ). Wartości  $IC_{50}$  były obliczane na podstawie wyznaczonych równań prostych

$$y = a \times \ln(x) + b,$$

gdzie:  $y$  – aktywność antyoksydacyjna,  $x$  – stężenie antyoksydantu (badanego wyciągu, BHA lub troloksu),  $a$  – współczynnik kierunkowy prostej,  $b$  – wyraz wolny. Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 2.

Oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej metodą FRAP

Badanie całkowitej aktywności oksydacyjnej metodą FRAP przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Tiveron i wsp. (28). Metoda FRAP jest oparta na redukcji kompleksu żelaza  $Fe^{3+}$  z 2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyną ( $Fe^{3+}$ -TPTZ) pod wpływem przeciwutleniaacza do intensywnie niebieskiego produktu ( $Fe^{2+}$ -TPTZ), który wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali  $\lambda_{max} = 593$  nm. Trwałość powstałego kompleksu zależy od niskiego pH środowiska reakcji – optymalne warunki uzyskuje się przez dodanie buforu octanowego do uzyskania  $pH = 3,6$  (28, 29).

*Mieszanka odczynników do oznaczeń metodą FRAP*

Zmieszano 25 ml buforu octanowego ( $pH = 3,6$ ) z 2,5 ml 10 ml roztworu TPTZ oraz 2,5 ml 20 ml wodnego roztworu  $FeCl_3$ .

*Przygotowanie roztworów do badań*

Z podstawowych wyciągów wodnych i alkoholowych o stężeniu 10 mg/ml przygotowano 6 kolejnych stężeń w zakresie: 40,0-0,15625 mg suchego surowca/1 ml wyciągu. Równolegle wykonano analogiczne oznaczenia dla 5 stężeń wzorcowych antyoksydantów: BHA (0,125-0,008 mg/ml), troloksu (0,313-0,020 mg/ml) i witaminy C (0,031-0,002 mg/ml).

*Badanie aktywności antyoksydacyjnej*

Do dołków płytki mikrotitracyjnej, owiniętej folią aluminiową, odmierzano 0,025 ml wyciągów lub roztworów wzorcowych antyoksydantów o określonym stężeniu, a następnie dodawano po 0,175 ml mieszaniny odczynników FRAP. Próby inkubowano w temperaturze  $37^{\circ}C$  przez 30 min, następnie mierzono ich absorbancję przy długości fali  $\lambda_{max} = 593$  nm. Pomiarów

dokonywano wobec próby ślepej, w której zamiast badanego wyciągu znajdowała się woda destylowana. W celu porównania zdolności przeciwutleniającej wyciągów z badanych przypraw i roztworów substancji referencyjnych wyznaczono parametr  $IC_{0,5}$  (stężenie, przy którym wartość absorbancji próby wynosi 0,5), który obliczono na podstawie wyznaczonych równań prostych ( $y = ax + b$ , zależności absorbancji badanych próbek od stężenia wyciągów/substancji wzorcowych). Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 3.

## Wyniki i dyskusja

Przeprowadzono oznaczenia zawartości sumy związków polifenolowych i aktywności antyoksydacyjnej 5 przypraw popularnych na polskim rynku, każda od 3 różnych producentów. Uzyskane wyniki podano w tabelach 1-3, natomiast na rycinie 1 zamieszczono graficzne porównanie aktywności antyoksydacyjnej i zawartości sumy związków polifenolowych w wyciągach z badanych przypraw.

### Suma polifenoli

W analizowanych przyprawach nie obserwowano zdecydowanych różnic w zawartości sumy polifenoli (tab. 1) pomiędzy tymi samymi przyprawami, ale pochodzącymi od różnych producentów. Dla porównania wyciągów wodnych i alkoholowych z analogicznych przypraw obliczono stosunek zawartości TPC w wyciągach wodnych do tej zawartości w wyciągach metanolowych WW/MM. Wyciągi wodne charakteryzowały się najczęściej wyższą zawartością związków polifenolowych niż wyciągi metanolowe z analogicznych przypraw, np. kurkuma wszystkich producentów zawierała dwukrotnie więcej polifenoli w wyciągach wodnych niż alkoholowych, podobnie ok. 1,5 raza więcej kardamon i imbir z firmy P-1 i P-2. W gałce muszkatołowej pochodzącej od dwóch producentów (P-2 i P-3) niemal 2-krotnie więcej polifenoli znajdowało się w wyciągach metanolowych, podobnie jak w badaniach Gupta i wsp., w których zauważono, iż skuteczniejszym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji związków fenolowych obecnych w gałce muszkatołowej są alkohole niż woda (30). Najwyższą ilość polifenoli oznaczono w wyciągach z cynamonu (393,23-297,16 mg GAE/g), około pięciokrotnie mniej z imbiru (67,82-48,85 mg GAE/g) – co pokrywa się z wcześniejszymi badaniami Dudonne i wsp. (31). W wyciągach z gałki muszkatołowej oznaczono 75,53-30,88 mg GAE/g polifenoli, z kurkumy 35,89-12,81 mg GAE/g, podobnie jak Aktera i wsp. (32), natomiast ok. 15-krotnie mniej TPC niż w wyciągach z cynamonu, oznaczono w ekstraktach z kardamonu 25,89-7,39 mg GAE/g.

Tab. 2. Aktywność antyoksydacyjna (AA) wyciągów z badanych przypraw i wzorcowych antyoksydantów – oznaczona metodą ABTS

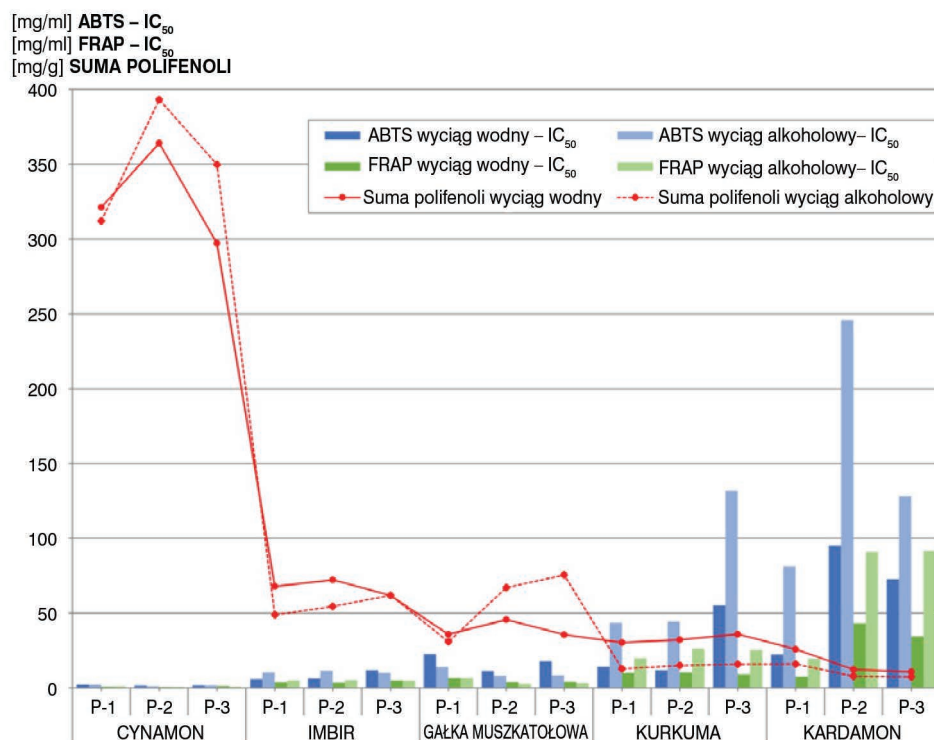
Producent	Cynamon		Imbir		Gałka muskatowa		Kurkuma		Kardamon		
	WW	WM	WW	WM	WW	WM	WW	WM	WW	WM	
P-1	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	2,110	2,104	10,226	22,594	13,865	43,518	22,351	81,154		
	równanie prostej	$y = 27,192\ln(x) + 29,697$	$y = 27,051\ln(x) + 29,876$	$y = 24,833\ln(x) + 6,0884$	$y = 19,742\ln(x) - 11,549$	$y = 23,859\ln(x) - 12,734$	$y = 23,794\ln(x) - 11,696$	$y = 15,693\ln(x) - 9,2124$	$y = 24,305\ln(x) - 25,513$	$y = 16,029\ln(x) - 20,469$	
P-2	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	1,431	1,148	11,567	11,264	8,153	44,407	95,155	245,937		
	równanie prostej	$y = 24,963\ln(x) + 41,058$	$y = 29,289\ln(x) + 45,962$	$y = 24,925\ln(x) + 4,2511$	$y = 24,795\ln(x) - 9,9574$	$y = 26,733\ln(x) - 6,0952$	$y = 22,224\ln(x) - 4,9758$	$y = 22,224\ln(x) - 4,9758$	$y = 15,827\ln(x) - 22,1$	$y = 11,626\ln(x) - 14,002$	
P-3	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	1,512	1,569	10,090	17,875	8,437	131,829	72,752	128,230		
	równanie prostej	$y = 29,445\ln(x) + 37,835$	$y = 28,968\ln(x) + 35,334$	$y = 19,648\ln(x) + 1,5048$	$y = 21,302\ln(x) - 11,422$	$y = 25,985\ln(x) - 5,4162$	$y = 13,802\ln(x) - 5,3423$	$y = 11,324\ln(x) - 5,2782$	$y = 16,648\ln(x) - 21,371$	$y = 15,434\ln(x) - 24,914$	
IC <sub>50</sub> (mg/ml)	Trolaks										
równanie prostej	BHA										
			0,053				0,158				
		$y = 25,798\ln(x) + 125,55$					$y = 24,419\ln(x) + 95,112$				

WW – wyciąg wodny; WM – wyciąg metanolowy

Tab. 3. Aktywność antyoksydacyjna (AA) wyciągów z badanych przypraw i wzorcowych antyoksydantów – oznaczona metodą FRAP

Producent	Cynamon		Imbir		Gałka muszkatołowa		Kurkuma		Kardamon		
	WW	WM	WW	WM	WW	WM	WW	WM	WW	WM	
P-1	IC <sub>0,5</sub> [mg/ml]	0,942	1,107	3,796	5,114	6,577	8,060	10,100	19,906	7,579	19,557
	równanie prostej	$y = 0,4921x + 0,0363$	$y = 0,4379x + 0,0151$	$y = 0,1176x + 0,0536$	$y = 0,0956x + 0,0111$	$y = 0,073x + 0,0199$	$y = 0,0464x + 0,126$	$y = 0,0468x + 0,0322$	$y = 0,0232x + 0,0165$	$y = 0,0617x + 0,0377$	$y = 0,0253x - 0,0052$
P-2	IC <sub>0,5</sub> [mg/ml]	0,697	0,788	3,522	5,252	3,983	2,581	10,293	26,168	43,145	90,963
	równanie prostej	$y = 0,5805x + 0,0956$	$y = 0,5336x + 0,0797$	$y = 0,1316x + 0,0365$	$y = 0,1018x - 0,0347$	$y = 0,0922x + 0,1328$	$y = 0,115x + 0,2032$	$y = 0,0461x + 0,0255$	$y = 0,0191x + 0,002$	$y = 0,0117x - 0,0048$	$y = 0,0054x + 0,0088$
P-3	IC <sub>0,5</sub> [mg/ml]	1,182	0,936	5,112	5,004	4,187	3,197	9,016	25,342	34,425	91,667
	równanie prostej	$y = 0,3901x + 0,0389$	$y = 0,4959x - 0,0356$	$y = 0,1116x - 0,0705$	$y = 0,1007x - 0,0039$	$y = 0,0884x + 0,1299$	$y = 0,1516x + 0,0154$	$y = 0,0509x + 0,0411$	$y = 0,0196x + 0,0033$	$y = 0,0146x - 0,0026$	$y = 0,005x + 0,0071$
		Troloks			BHA		Witamina C				
IC <sub>0,5</sub> [mg/ml]		0,0482	0,0245						0,0195		
równanie prostej		$y = 9,6889x + 0,033$	$y = 19,302x + 0,0269$						$y = 27,265x - 0,0318$		

WW – wyciąg wodny; WM – wyciąg metanolowy



Ryc. 1. Porównanie zawartości sumy polifenoli i aktywności antyoksydacyjnej wyciągów z badanych przypraw

### Aktywność antyoksydacyjna

Do określenia potencjału antyoksydacyjnego badanych przypraw zastosowano dwie metody. W metodzie ABTS stopień inhibicji kationorodnika ABTS<sup>•+</sup> przez badane przyprawy wyrażono jako wartości IC<sub>50</sub> (w mg/ml) charakterystyczne dla analizowanych wyciągów (tab. 2). W metodzie FRAP oznaczana zdolność przypraw do redukcji jonów żelaza (III) została wyrażona w postaci współczynnika IC<sub>0,5</sub>, którego wartości wyznaczone dla badanych wyciągów zamieszczono w tabeli 3.

Najwyższą aktywność antyoksydacyjną (najniższe wartości parametru IC<sub>50</sub> – metodą ABTS oraz parametru IC<sub>0,5</sub> – metodą FRAP) oznaczono dla wszystkich wyciągów z cynamonu (IC<sub>50</sub> 1,438-2,110 mg/ml i IC<sub>0,5</sub> 0,697-1,182 mg/ml), co pokrywa się z najwyższą w nich zawartością sumy polifenoli. Aktywność tej przyprawy jest słabsza od wzorcowych antyoksydantów: troloksu 10-20-krotnie i BHA ok. 30-krotnie w obu metodach oraz ok. 50-krotnie od witaminy C w metodzie FRAP. Takie wyniki są spójne z wynikami innych badaczy, którzy potwierdzali działanie antyoksydacyjne kory cynamonowca, dzięki zawartości znacznych ilości aldehydu cynamonowego oraz eugenolu. Silniejsze właściwości posiada

otrzymywany z cynamonowca (zwłaszcza z liści) olejek eteryczny i jego główne składniki, szczególnie eugenol (12, 33).

Słabszym antyoksydantem od cynamonu (od 3 do 5 razy – w zależności od producenta przyprawy i rodzaju badanego wyciągu) okazał się imbir. Oznaczone wartości IC<sub>50</sub> mieściły się w zakresie 5,861-11,801, natomiast IC<sub>0,5</sub> w zakresie 3,796-5,252. Saranya i wsp. w badaniach na różnych wyciągach m.in. z cynamonu i imbiru obserwowali podobną zależność między tymi dwiema przyprawami (33).

Gałka muszkatołowa także posiadała słabsze od cynamonu właściwości antyoksydacyjne – metodą ABTS oznaczono ok. 10-krotnie słabszą aktywność (IC<sub>50</sub> w zależności od wyciągu w zakresie 8,153-22,594), natomiast wyniki uzyskane metodą FRAP były zbliżone do wyników dla imbiru (IC<sub>0,5</sub> w zakresie 2,581-8,060).

Mniejszy potencjał antyoksydacyjny od cynamonu posiadały również wyciągi z kurkumy. Oznaczona metodą FRAP aktywność była ok. 10-krotnie słabsza dla wyciągów wodnych i 20-krotnie słabsza dla wyciągów metanolowych, natomiast w metodzie ABTS różnice dotyczyły nie tylko rodzaju wyciągu, ale także próbek od różnych producentów przypraw (IC<sub>50</sub> w zakresie 11,866-131,829). Uzyskane niższe wyniki



dla kurkumy mogą wynikać ze słabej rozpuszczalności składników tej przyprawy w wodzie (zdecydowanie lepiej przechodzą do rozpuszczalników niepolarnych). Zgodnie z metodyką oznaczeń zarówno pierwotny wyciąg wodny, jak i metanolowy w toku oznaczeń były zagęszczane do sucha, następnie rozpuszczane w wodzie i na rozcieńczeniach wodnych dokonywano oznaczeń. Potwierdzeniem tego spostrzeżenia mogą być badania Saranya i wsp., którzy badając aktywność antyoksydacyjną metodą FRAP m.in. wyciągów metanolowych i chloroformowych z cynamonu i kurkumy, zauważyli, że wyciąg chloroformowy z kurkumy posiadał porównywalną aktywność do wyciągu metanolowego z cynamonu, zaś wyciąg metanolowy z kurkumy był ok. 3,5 raza słabszy i zawierał też o tyle mniej polifenoli (33).

Zdecydowanie najsłabszą siłę działania antyoksydacyjnego oznaczono dla wyciągów z kardamonu, różną w zależności od producenta. Wyciągi z przyprawy producenta P-1 posiadały aktywność antyoksydacyjną oznaczoną obiema metodami zbliżoną lub trochę słabszą od wyciągów z kurkumy, natomiast produkty firmy P-2 i P-3 działały ok. 5-krotnie słabiej od tych z firmy P-1.

Aktywność antyoksydacyjna badanych przypraw koreluje z zawartością w nich sumy związków polifenolowych – im więcej polifenoli w wyciągach, tym silniejsza jest ich aktywność antyoksydacyjna. Porównanie aktywności antyoksydacyjnej i zawartości sumy polifenoli w wyciągach z badanych przypraw przedstawiono na rycinie 1.

## Wnioski

1. Spośród analizowanych wyciągów wodnych i metanolowych z 5 przypraw produkowanych przez 3 popularnych w Polsce producentów, wyciągi wodne posiadały wyższą zawartość związków polifenolowych niż wyciągi metanolowe z analogicznych przypraw.
2. Analiza właściwości przeciwutleniających badanych wyciągów wykazała aktywność przeciwrodnikową w metodzie z kationorodnikiem ABTS<sup>•+</sup> oraz skuteczną redukcję jonów Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> w metodzie FRAP. Najwyższy spośród badanych przypraw potencjał antyoksydacyjny posiadały wyciągi z cynamonu, następnie z imbiru, gałki muszkatołowej i kurkumy, natomiast najsłabiej zmiatającym wolne rodniki okazał się kardamon.
3. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z przypraw korelowała z całkowitą zawartością polifenoli w wyciągach.
4. Przeprowadzone badania potwierdzają działanie antyoksydacyjne popularnych przypraw, zwłaszcza cynamonu i imbiru, chroniące przed aktywnością wolnych rodników, które przyczyniają się do powstawania chorób cywilizacyjnych, takich jak miażdżyca, cukrzyca, nowotwory, a także przedwczesnego starzenia się organizmu. Dlatego związki zawarte w przyprawach, mogące zmiatać wolne rodniki, mają potencjał w zapobieganiu chorobom, ale też degradacji oksydacyjnej przetworzonej żywności.

## Piśmiennictwo

1. Kocaadam B, Sanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health (Review). *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57(13):2889-95.
2. Rahaman M, Rakib A, Mitra S i wsp. The genus *Curcuma* and inflammation: Overview of the pharmacological perspectives. *Plants* 2021; 10(1):63-82.
3. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G i wsp. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J Clin Pharmacol* 2017; 174:1325-48.
4. EMA – European Medicines Agency: Assessment report on *Curcuma longa* L., rhizome. Doc. Ref.: EMA/HMPC/329745/2017 (data dostępu: 29.06.2021).
5. Farmakopea Polska XI. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa 2017.
6. EMA – European Medicines Agency: Assessment report on *Zingiber officinale* Roscoe, rhizome. Doc. Ref.: EMA/HMPC/577856/2010 (data dostępu: 29.06.2021).
7. Liu Y, Liu J, Zhang Y. Research progress on chemical constituents of *Zingiber officinale* Roscoe. *BioMed Res Intern* 2019; (6):1-21.
8. Łażewska D, Miętewska K, Studzińska-Sroka E. Imbir lekarski – roślina o właściwościach neuroochronnych. *Post Fitoter* 2019; 20(4):268-76.
9. Kulczyński B, Gramza-Michałowska A. Znaczenie żywieniowe imbiru. *Bromat Chem Toksykol* 2016; 49(1):57-63.
10. Kania-Dobrowolska M, Baraniak J, Górka A i wsp. Imbir i czosnek – surowce roślinne obniżające poziom cholesterolu i glukozy. *Post Fitoter* 2020; 21(3):169-76.
11. EMA – European Medicines Agency: Assessment report on *Cinnamomum verum* J.S. Presl, cortex and corticis aetheroleum. Doc. Ref.: EMA/HMPC/246773/2009 (data dostępu: 29.06.2021).
12. Jayaprakasha GK, Rao JM. Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011; 51(6):547-62.
13. Dorri M, Hashemitabar S, Hosseinzadeh H. Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as an antidote or a protective agent against natural or chemical toxicities: a review. *Drug Chem Toxicol* 2018; 41(3):338-51.
14. Czapska-Pietrzak I, Studzińska-Sroka E, Byłka W. Ocena aktywności biologicznej cynamonu w badaniach *in vivo*. *Post Fitoter* 2020; 21(1):28-34.

15. Ranasinghe P, Perera S, Gunatilake M i wsp. Effects of *Cinnamomum zeylanicum* (Ceylon cinnamon) on blood glucose and lipids in a diabetic and healthy rat model. *Pharmacognosy Res* 2012; 4(2):73-9.
16. Masoumi-Ardakani Y, Mandegary A, Esmaeilpour K i wsp. Chemical composition, anticonvulsant activity, and toxicity of essential oil and methanolic extract of *Elettaria cardamomum*. *Planta Med* 2016; 82(17):1482-6.
17. Khan A, Khan QJ, Gilani A. Pharmacological basis for the medicinal use of cardamom in asthma. *Bangladesh J Pharm* 2011; 6(1):34-7.
18. Kandikattu HK, Rachitha P, Jayashree GV i wsp. Anti-inflammatory and anti-oxidant effects of Cardamom (*Elettaria repens* (Sonn.) Baill) and its phytochemical analysis by 4D GCXGC TOF-MS. *Biomed Pharmacother* 2017; 91:191-201.
19. Nair KP. Pharmacological properties of Cardamom. W: *The Geography of Cardamom (Elettaria cardamomum M.)*. Springer Nature Switzerland AG. 2020: 227-43.
20. Asgarpanah J, Kazemivash N. Phytochemistry and pharmacologic properties of *Myristica fragrans* Hoyutt.: A review. *Afr J Biotechnol* 2012; 11(65):12787-93.
21. Abourashed EA, El-Alfy AT. Chemical diversity and pharmacological significance of the secondary metabolites of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). *Phytochem Rev* 2016; 15(6):1035-56.
22. Rahman N, Xin TB, Kamilah H i wsp. Effects of osmotic dehydration treatment on volatile compound (Myristicin) content and antioxidants property of nutmeg (*Myristica fragrans*) pericarp. *J Food Sci Technol* 2018; 55(1):183-9.
23. Adiani V, Gupta S, Chatterjee S i wsp. Activity guided characterization of antioxidant components from essential oil of Nutmeg (*Myristica fragrans*). *J Food Sci Technol* 2015; 52(1):221-30.
24. Wahab SMA, Sivasothy Y, Liew SY i wsp. Natural cholinesterase inhibitors from *Myristica cinnamomea* King. *Bioorg Med Chem Lett* 2016; 26(15):3785-92.
25. Agbor GA, Vinson JA, Donnelly PE. Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay. *Int J Food Sci Nutr Diet* 2014; 3(8):147-56.
26. Gawron-Gzella A, Królikowska A, Pietrzak M. Antioxidant activity of teas obtained from leaves of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze in course of various production processes available on Polish market *Herba Pol* 2018; 64(2):60-7.
27. Floegel A, Kim D, Chung S i wsp. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal* 2011; 24:1043-8.
28. Tiveron AP, Melo PS, Bergamaschi KB i wsp. Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. *Int J Mol Sci* 2012; 13:8943-57.
29. Kusznierevicz L, Wolska L, Bartoszek A i wsp. Metody oznaczania *in vitro* właściwości przeciwutleniających próbek żywności. Cz. I. *Bromat Chem Toksykol* 2006; 39(3):251-60.
30. Gupta AD, Bansal VK, Babu V i wsp. Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). *J Genet Eng Biotechnol* 2013; 11(1):25-31.
31. Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P i wsp. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS. *J Agric Food Chem* 2009; 57:1768-74.
32. Akter J, Hossain A, Takara K i wsp. Antioxidant activity of different species and varieties of turmeric (*Curcuma* spp.): Isolation of active compounds. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2019; 215:9-17.
33. Saranya B, Sulfikarali T, Chindhu S i wsp. Turmeric and cinnamon dominate in antioxidant potential among four major spices. *J Spices Aromatic Crops* 2017; 26(1):27-32.

**Konflikt interesów**

**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 08.07.2021

zaakceptowano/accepted: 12.10.2021

Adres/address:

\*dr n. farm. Anna Gawron-Gzella

Katedra i Zakład Farmakognozji

Uniwersytet Medyczny

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Świecickiego 4, 60-781Poznań

tel.: +48 (61) 854-67-05

e-mail: aggzella@ump.edu.pl