

*Urszula Skolimowska, Janusz Skolimowski<sup>1)</sup>, Anna Wędzisz*

## BADANIE WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCYCH N-TERT-BUTYLO- $\alpha$ -FENYLONITRONU (PBN)\*<sup>1)</sup>

Zakład Bromatologii Katedry Toksykologii i Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Kierownik: prof. dr hab. *A. Wędzisz*

<sup>1)</sup> Katedra Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi  
Kierownik: prof. dr hab. *J. Zakrzewski*

*Prześledzono wpływ N-tert-butylo- $\alpha$ -fenylnitronu (PBN) na proces utleniania oleju wiesiołkowego. Stwierdzono, że jest on skutecznym przeciwutleniaczem już w stęż. 0,01%.*

Hasła kluczowe: olej wiesiołkowy, przeciwutleniacze, *N*-tert-butylo- $\alpha$ -fenylnitron (PBN), peroksydacja lipidów.

Key words: *Oenothera paradoxa* oil, antioxidants,  $\alpha$ -phenyl-*N*-tert-butyl-nitron, lipid peroxidation.

Przeciwutleniacze są związkami, które zwalczają wolne rodniki będące bardzo aktywnymi cząsteczkami, uszkadzającymi komórki i tkanki. Powstają one w organizmie, jako uboczne produkty przemiany materii. Komórki są zaopatrzone w naturalne systemy neutralizacji wolnych rodników, ale zdarza się, że nie nadążają z ich dezaktywacją. Wówczas, tkanki zaczynają się szybciej starzeć i może dojść do rozwoju wielu poważnych schorzeń.

Wolne rodniki atakują w organizmie człowieka głównie związki posiadające w cząsteczkach wiązania podwójne, jak: białka, DNA lub nienasycone kwasy tłuszczowe wchodzące w skład błon komórkowych, polisacharydy, lipidy w tym także cholesterol znajdujący się we krwi.

Wolne rodniki powstają w organizmie w wyniku reakcji metabolicznych, a zwłaszcza w procesach spalania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Wolne rodniki twarzą się w wielu produktach spożywczych. Dotyczy to szczególnie tłuszczów zawierających wielonienasycone kwasy tłuszczowe, które bardzo łatwo ulegają utlenieniu.

Do czynników zewnętrznych, które zwiększają wytwarzanie wolnych rodników należą: skażone powietrze, dym, żywność, alkohol, niewłaściwa dieta, zakażenia bakteryjne i wirusowe, stres, a także niektóre leki.

---

\*<sup>1)</sup> Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi (statuty 503-3045-2). W badaniach uczestniczyła *K. Andrzejczak*.

Wolne rodniki powstają również w wyniku działania promieniowania nadfioletowego i jonizującego (rentgenowskiego i pierwiastków promieniotwórczych) oraz podczas spalania substancji organicznych. Ważnym źródłem rodników jest też wiele toksyn, np. dym papierosowy czy herbicydy stosowane powszechnie w rolnictwie. Ponadto, mogą one występować jako związki zanieczyszczające środowisko, powstałe w wyniku wielu procesów chemicznych, np. wskutek reakcji tlenu z paliwem napędowym podczas pracy silników samochodowych, w czasie tworzenia się smogów, przy wytwarzaniu wielu powszechnie stosowanych mas plastycznych, a także wskutek jełczenia tłuszczu (1).

W organizmie żywym, utlenianie tłuszczów związane jest z faktem, że wolne rodniki powstają głównie w miejscach występowania w większej ilości fosfolipidów i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, czyli w błonach komórkowych, głównie lizosomalnych i mitochondrialnych. Proces ten przebiega jak reakcja łańcuchowa – rozpoczęty w jednym miejscu, rozprzestrzenia się obejmując coraz większe fragmenty błony. Powstałe w ten sposób nadtlenki lipidowe w toku dalszych przemian są rozkładane do aldehydów. Te po połączeniu z białkami, kwasami nukleinowymi i lipidami wywołują uszkodzenia komórek i tkanek ustroju (2).

Nagromadzenie wolnych rodników może doprowadzić do poważnych uszkodzeń. Może nastąpić wymiana zasad lub nawet pęknięcie chromosomów, czego odzwierciedleniem jest zmiana ekspresji genów, czy w konsekwencji rearanżacja materiału genetycznego. W odpowiednich warunkach może to być sygnał do patologicznego rozrostu komórek i rozpoczęcia procesu nowotworzenia.

Z oksydacją tłuszczów związana jest także zmiana struktury błonowej. Dotyczy to przepuszczalności, spójności i płynności. Zakłócona zostaje praca różnych białek, które zlokalizowane są w błonie komórkowej, np. enzymów białek transportowych, przez co upośledzona zostaje wymiana substancji odżywczych w komórkach. Może też dojść do zakłócenia działania białek antygenowych. Komórki własnego organizmu są wtedy przez układ odpornościowy rozpoznawane jako niepożądane, obce i są niszczone.

Utlenianie lipidów należy rozpatrywać jako dwa procesy przebiegające wg różnych mechanizmów, czyli autooksydację (samoutlenianie) i utlenianie fotosensybilizowane, zachodzące pod wpływem światła (3).

Fotooksydacja (utlenianie fotosensybilizowane) może też zachodzić równocześnie z autooksydacją. Polega ona na przyłączeniu tlenu singletowego do węgla, który znajduje się przy wiązaniu podwójnym przy udziale światła i sensybilizatora (uczulacza). Następuje przemieszczenie podwójnego wiązania i dochodzi do zmiany jego konformacji z *cis* na *trans*.

Rola sensybilizatorów (ryboflawina, chlorofil, pochodne porfirynowe) polega na przekształcaniu tlenu cząsteczkowego w tlen singletowy, który jest bardziej reaktywny (3, 4, 5).

Fotooksydacja może zapoczątkować autooksydację, gdyż wytworzone w czasie fotooksydacji wodoronadtlenki rozpadają się tworząc rodniki, a te mogą zainicjować autooksydacyjną reakcję łańcuchową. Fotooksydacja kwasów tłuszczowych zachodzi szybciej niż autooksydacja.

W warunkach fizjologicznych powstawanie wolnych rodników jest kontrolowane i równoważone przez mechanizmy obronne. Jednak w stanach chorobowych (in-

fekcja, stan zapalny, niedotlenienie, spadek liczby naturalnych antyoksydantów) homeostaza może zostać zburzona, co wynika ze zwiększonej produkcji wolnych rodników. Zjawisko takie określamy mianem „stresu oksydacyjnego” (6).

Oprócz przeciwutleniaczy, które hamują procesy oksydacyjne zachodzące w organizmie istnieje jeszcze grupa związków chemicznych, które dodawane są do produktów żywnościowych, zwłaszcza tłuszczowych by zahamować ich psucie. Podstawą ich stosowania jest ogólnie przyjęta teoria przerywania rodnikowych reakcji łańcuchowych podczas fazy indukcyjnej jęlczenia tłuszczów, która prowadzi do zmiany barwy, zapachu i smaku psującego się tłuszczu (7).

W pracy postanowiono zbadać właściwości przeciwutleniające *N*-tert-butylo- $\alpha$ -fenylnitronu (PBN).

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły:

- świeżo tłoczony olej z nasion wiesiołka (Agropharm);
- związek: *N*-tert-butylo- $\alpha$ -fenylnitron (PBN) zsyntetyzowany w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego.

Zakres badań analitycznych obejmował oznaczanie:

- liczby jodowej (L.J.) wg PN-70/A-86914;
- liczby nadtlenkowej (L. *Lea*) wg PN-84/A-86918;
- liczby kwasowej (L.K.) wg PN-60/A-86921;
- liczby anizydynowej (L.A.) wg PN-93/A-86926;
- współczynnika Totox, jako  $4 \cdot L. \textit{Lea} + L.A.$ ;
- obecność aldehydu epihydrynowego (próba *Kreisa*) wg PN-60/A-86924.

Badano olej świeży oraz olej do którego dodano PBN w ilości 0,1 i 0,01%. Proces peroksydacji lipidów przyspieszano za pomocą promieni UV o dł.  $\sim$  250 nm. Oznaczano parametry wskaźnikowe po 0, 3, 6, 9, 48, 72 godz. naświetlania.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na szybkość procesu jęlczenia tłuszczu, oprócz czynników fizykochemicznych i biologicznych, wpływa także obecność związków o działaniu protleniającym (karoteny, chlorofile) oraz substancji przeciwutleniających, czyli antyoksydantów. Działają one przez reakcję z pierwotnymi produktami utleniania i wytwarzają mało reaktywne rodniki, hamując w ten sposób powstawanie toksycznych alkoholi, ketonów, aldehydów i kwasów. W pracy zbadano właściwości przeciwutleniające nowego, związku *N*-tert-butylo- $\alpha$ -fenylnitronu (PBN) w łatwo utleniającym się oleju wiesiołkowym.

PBN jest związkiem, który w ostatnich latach znalazł zastosowanie w badaniach biologicznych, jako pułapka spinowa wolnych rodników (8, 9, 10, 11, 12). Dlatego też postanowiono sprawdzić czy PBN i w jakim stopniu może zabezpieczyć olej przed procesem peroksydacji. W badaniach zastosowano olej wiesiołkowy, który jest nośnikiem kwasów wielonienasyconych i szybko ulega procesowi jęlczenia.

W celu przyspieszenia procesu peroksydacji olej naświetlano promieniami UV o dł. 250 nm. Badano olej bez dodatków i olej, do którego dodano 0,01 i 0,1% PBN. Parametry wskaźnikowe oznaczano przed naświetlaniem oraz po 3, 6, 9, 24, 48 i 72 godz. naświetlania. Oznaczano liczbę jodową (L.J.), nadtlenkową (jako L. *Lea*), kwasową (L.K.), anizydynową (L.A.), wskaźnik Totox oraz zawartość aldehydu epihydrynowego (jako próba *Kreisa*).

Czysty świeży olej odznaczał się następującymi parametrami: L.J. – 162, L.K. – 1,2; L. *Lea* – 3,7; L.A. – 1,4; Totox – 16; bez śladu aldehydu epihydrynowego. Parametry jakości tłuszczu zmieniały się na niekorzystne wraz z upływem czasu naświetlania (tab. I). Wartość liczby jodowej uległa zmniejszeniu i po 72 godz. dla oleju czystego wynosiła 146, dla oleju z 0,01% dodatkiem PBN – 149, a dla 0,1% PBN – 153 (tab. II, III). Liczba kwasowa największym zmianom uległa dla oleju czystego i po 72 godz. wynosiła 1,8 a dla oleju z 0,01 i 0,1% PBN – 1,4.

Tabela I. Parametry wskaźnikowe dla oleju wiesiołkowego bez dodatku antyoksydanta

Table I. Indices for UV-irradiated *Oenothera* oil

Lp.	Czas naświetlania promieniami UV (h)	Liczba jodowa	Liczba kwasowa	Liczba Lea	Liczba anizydynowa	Wskaźnik Totox	Obecność aldehydu epihydrynowego
1.	0	162±1,2	1,2±0,0	3,7±0,4	1,4±0,5	16	–
2.	3	158±1,5	1,3±0,0	6,6±0,3	3,9±0,6	30	+/-
3.	6	154±1,5	1,3±0,0	12,0±0,2	5,2±0,4	53	+
4.	9	153±0,8	1,3±0,0	17,2±0,5	8,3±0,5	77	2+
5.	24	152±1,1	1,4±0,0	46,1±0,6	24,9±0,5	210	3+
6.	48	149±1,0	1,5±0,0	96,8±0,6	62,5±1,0	450	5+
7.	72	146±0,6	1,8±0,0	214,7±1,2	127,7±1,2	986	7+

Tabela II. Parametry wskaźnikowe dla oleju wiesiołkowego z 0,1% dodatkiem PBN

Table II. Indices for *Oenothera* oil with 0,1% PBN added

L.p.	Czas naświetlania promieniami UV (h)	Liczba jodowa	Liczba kwasowa	Liczba Lea	Liczba anizydynowa	Wskaźnik Totox	Obecność aldehydu epihydrynowego
1.	0	157 ±0,4	1,3±0,0	3,5±0,2	1,8±0,2	16	–
2.	3	156 ±0,1	1,3±0,0	4,0±0,2	3,1±0,4	19	–
3.	6	156±0,1	1,3±0,0	6,0 ±0,1	3,2±0,4	27	–
4.	9	156±1,2	1,3±0,0	6,9 ±0,1	3,5±0,3	32	+/-
5.	24	155±1,1	1,4±0,0	10,5±0,1	3,6±0,3	46	+
6.	48	155±0,6	1,4±0,0	28,6±0,4	10,8±0,2	133	2+
7.	72	153 ±0,5	1,4±0,0	31,6±0,4	17,7±0,5	144	4+

Tabela III. Parametry wskaźnikowe dla oleju wiesiołkowego z 0,01% dodatkiem PBN

Table III. Indices for *Oenothera* oil with 0,01% PBN added

L.p.	Czas naswietlania promieniami UV [h]	Liczba jodowa	Liczba kwasowa	Liczba Lea	Liczba anizydynowa	Wskaźnik Totox	Obecność aldehydu epihydrynowego
1.	0	156±0,5	1,3±0,0	4,4±0,2	1,5±0,2	19	–
2.	3	156±1,5	1,3±0,0	5,4±0,4	2,7±0,3	24	–
3.	6	156±1,5	1,3±0,0	6,2±0,6	2,9±0,6	28	+/-
4.	9	155±1,3	1,3±0,0	7,6±0,2	3,5±0,8	34	+
5.	24	154±1,5	1,4±0,0	10,0±0,8	9,0±0,9	49	2+
6.	48	152±1,3	1,4±0,0	41,4±0,1	17,5±0,4	183	3+
7.	72	149±1,1	1,4±0,0	50,8±0,9	18,3±0,4	222	5+

Wraz z upływem czasu wzrastała liczba nadtlenuków. Po 72 godz. najwięcej ich było w oleju czystym – L. Lea – 215. W oleju z 0,01% PBN – L. Lea – 51, a w oleju z 0,1% PBN – L. Lea – 38. Również liczba anizydynowa, która określa wtórne produkty utleniania, wzrastała w badanych olejach podobnie jak L. Lea. Dla oleju czystego po 72 godz. L.A. wynosiła 128, dla oleju z 0,01 i 0,1% PBN L.A. wynosiła 18.

Wartość wskaźnika Totox po 72 godz. dla oleju czystego 986, dla 0,01% PBN – 222, a dla 0,1% zawartości PBN – 144 świadczy o tym, iż PBN jest bardzo aktywnym przeciwutleniaczem już w stężeniu 0,01%. Aldehyd epihydrynowy w oleju czystym stwierdzono już po 3 godz., w oleju z 0,01% PBN po 6 godz., a w oleju z 0,1% PBN po 9 godz. naświetlania.

Z przeprowadzonych badań wynika, że PBN, który jako pułapka spinowa coraz częściej stosowany jest w badaniach nad wychwytywaniem rodników w komórkach, może znaleźć zastosowanie jako przeciwutleniacz w żywności. Musi to być jednak potwierdzone wieloma badaniami w kierunku toksyczności i teratogenności tego związku.

U. Skolimowska, J. Skolimowski, A. Wędzisz

DETERMINATION OF THE ANTIOXIDATIVE CHARACTERISTICS  
OF  $\alpha$ -PHENYL-*N*-TERT-BUTYL-NITRON (PBN)

Summary

During recent few years,  $\alpha$ -phenyl-*N*-tert-butyl-nitron (PBN) has been extensively used in biological research as free-radical spin trap. In this work, PBN has been shown to protect *Oenothera paradoxa* oil from oxidation at concentrations as low as 0.01%. However, extensive testing of PBN for its possible toxic and teratogenic effects is necessary to confirm the feasibility of using it as an antioxidant in food.

## PIŚMIENNICTWO

1. Ziemiański S.: Niebezpieczne rodniki. Wiadomości Zielarskie, 1993; 2: 18-19. – 2. Ball S.: Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka. Medyk Warszawa, 2001. – 3. Ćwiertniewski K., Polak E.: Zastosowanie naturalnych antyoksydantów żywności w chłodzonych i mrożonych produktach mięsnych. Przemysł Spożywczy, 2007; 5: 545-47. – 4. Porter A., Caldwell E. and Mills A.: Mechanisms of Free Radical Oxidation of Unsaturated Lipids. Lipids, 1995; 30(4): 277-289. – 5. Kozłowska-Wojciechowska M.: Antyoksydanty – sprzymierzeńcy zdrowia. Wiadomości Zielarskie, 2002; 5: 8-9. – 6. Bover C.K., Hietala K.A., Oliveira A.C., Wu T.H.: Stabilizing oils from smoked pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). J. Food Sci., 2009 Apr, 74(3): C248-57. – 7. Szukalska E.: Przeciwwutleniacze i ich rola w opóźnianiu niepożądanych przemian tłuszczów spowodowanych utlenianiem. Żywnienie Człowieka, 1999; 26(1): 81-86. – 8. Panfil J., Solecka J., Chmielewski M.: Journal of Carbohydrate Chemistry, 2006; 25(8-9): 673-684. – 9. Allouch A., Roubaut V., Lauricella R., Bouteiller J.C., Tuccio B.: Preparation and use as spin trapping agents of new ester – nitrones. Org. Biomol. Chem., 2003; 1: 593-598. – 10. Floyd R.A.: Nitrones as therapeutic agents in age – related diseases. Agging Cell, 2006; 5: 51-57.
11. <http://www.springerlink.com/content/q57n0512vu2h7x8j/>. – 12. Li PA, He QP, Nakamura L., Csiszar K.: Free radical spin trap alpha-phenyl-N-tert-butyl-nitron inhibits caspase-3 activation and reduces brain damage following a severe forebrain ischemic injury. Free Radic Biol. Med. 2001 Nov 15; 31(10): 1191-7.

Adres: 90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 1.