



Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział
Farmaceutyczny, Zakład Chemii Fizycznej,
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa,
tel/fax: (22) 5720-950

Warszawa, dn. 14.03.2008

Badanie pojemności antyoksydacyjnej preparatu „Padma Basic” metodą EPR (test DPPH) oraz metodą fluorymetryczną (test ORAC-FL)

Prof.dr hab. Iwona Wawer, dr Katarzyna Zawada

I. Preparat „Padma Basic”

1. Skład preparatu

Mieszanka ziół (głównie tybetańskich): korzeń costusa (*Costi amari rad.*), mech islandzki (*Lichen islandicus*), owoc miodli indyjskiej (*Meliae toosendan fruct.*), owoc kardamonu (*Cardamoni fruct.*), owoc migdałeczніка (*Myrobalani fruct.*), czerwone drewno sandałowe (*Santali rubr. lign.*), owoc korzennika (*Amomi fruct.*), owoc aegle sepia (*Aegle sepiar fruct.*), ziele orlika (*Aquilegiae vulgaris herba*), korzeń lukrecji (*Liquiritiae rad.*), ziele babki (*Plantaginis lanc. herba*), ziele rdestu (*Polygoni avicularis herba*), ziele pięciornika (*Potentillae aureae herba*), kwiat goździka (*Caryophylli flos.*), kłącze hedychii (*Hedychii spic. rhiz.*), ziele sida cordifolia (*Sidae cordifoliae herba*), korzeń waleriany (*Valerianae rad.*), liść sałaty (*Lactucae sativae fol.*), kwiat nagietka (*Calendulae flos.*), kamfora naturalna (*Camphora naturalis*) i siarczan wapnia.

2. Substancje czynne

To głównie związki należące do grupy flawonoidów, tanin oraz terpenów i saponin¹.

Owoc myrobalani (*Terminalia cebula*) jest używany w medycynie ludowej do utrzymania homeostazy organizmu, ma hydrolizujące taniny o działaniu antyoksydacyjnym, a ekstrakt silnie wymiata rodniki DPPH². Owoce *Aegle* (złote jabłka) mają dużo umbelliferonu (naturalnego antyoksydantu z grupy kumaryn). Owoce *Amomi* mają olejek bogaty w kamforę. Pomarańczowy kwiat nagietka to znane źródło glikozydów flawonoidowych i karotenoidów. Ziele babki to surowiec zawierający flawonoidy, irydoidy i ponad 6% garbników. Korzeń *costusa* (*Saussurea lappa*) ma glikozydy flawonoidowe o działaniu przeciwgrzybicznym. Korzeń waleriany – jeden z najczęściej stosowanych surowców o działaniu uspokajającym. Korzeń lukrecji ma dużo saponin triterpenowych ze słodkim kwasem glicyryzynowym i flawonoidy, kiedyś był to charakterystyczny składnik cukierków. Oprócz lukrecji, także kardamon i goździki to popularne przyprawy, o korzystnym działaniu na system trawienny.

3. Znane działania terapeutyczne

Dostępne w literaturze naukowej informacje dotyczą w większości preparatu „Padma 28”, zawierającego, w odróżnieniu od preparatu „Padma Basic”, również korzeń tojadu mocnego (*Aconitum napellus* L.). Padma 28 była stosowana w Europie od lat 60-tych XX wieku jako środek wspomagający leczenie zaburzeń krążenia, w tym zarostowej choroby tętnic obwodowych i związanego z nią chromania przestankowego (wyraźne złagodzenie objawów w łagodnym i średnio zaawansowanym przebiegu choroby)^{3, 4} oraz miażdżycy⁵.

Inne stwierdzone kierunki działania preparatu ziołowego Padma to wspomaganie leczenia w przypadku takich chorób, jak: stwardnienie rozsiane⁶, przewlekłe zapalenie wątroby^{7, 8}, marskość wątroby⁹, reumatyczne zapalenie stawów¹⁰ czy powtarzające się infekcje dróg oddechowych u dzieci^{11, 12, 13}, a zatem w chorobach o podłożu zapalnym, a do tego nawracających lub o przebiegu przewlekłym.

W badaniach *in vitro* wykazano, że preparat Padma 28 zmniejsza rozmiar cytolizy zachodzącej pod wpływem rodników, lizyn i proteaz, działa hamująco na utlenianie lipidów¹⁴, chroni DNA przed uszkodzeniami wynikającymi ze stresu oksydacyjnego¹⁵.

II. Przeprowadzone badania

1. Otrzymanie ekstraktu

Wszystkie testy wykonano dla ekstraktu otrzymanego zgodnie z poniższą procedurą:

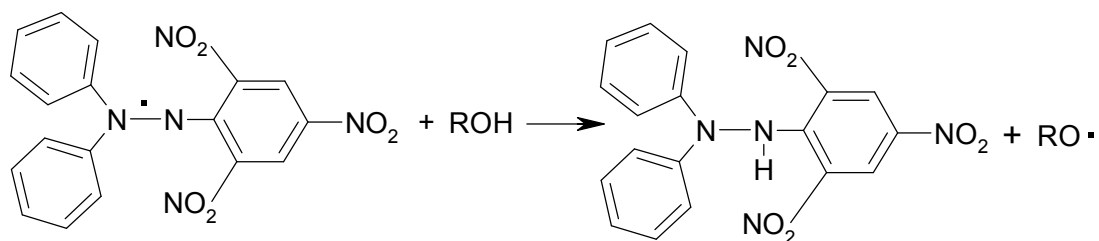
Zawartość dwóch kapsułek (1000mg) zalano 100 ml wody destylowanej w kolbie szklanej, przykryto kolbę folią aluminiową i zostawiono na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie przeniesiono kolbę (zakrytą w dalszym ciągu folią) do łaźni glicerynowej (100 °C) na 15 minut. Po przestygnięciu roztwór przesączono i do badań stosowano przesącz w porcjach rozmrażanych jednorazowo. Przyjęto, że stężenie ekstraktu wynosi: 1000 µg preparatu Padma Basic w 100 µl.

2. Test na zdolność zmiatania rodnika DPPH metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR

2.1. Opis stosowanej metody badania zdolności zmiatania rodników.

Rodnik 1, 1 - difenylo-2-pikrylohydryzylowy DPPH od wielu lat wykorzystywany jest w technice EPR, głównie jako wzorzec zewnętrzny do wyznaczenia współczynnika rozszczepienia spektroskopowego badanego rodnika oraz do cechowania skali intensywności. DPPH w roztworze; jest odporny na działanie powietrza, światła i podwyższonej temperatury oraz jest trwały w wielu rozpuszczalnikach (m.in. w wodzie, etanolu, acetonie, benzenie).

Do badania właściwości antyutleniających po raz pierwszy zastosowali rodnik DPPH naukowcy japońscy: T. Hatano, R. Edamatsu¹⁶. Określali oni zdolność zmiatania DPPH m.in. przez taniny hydrolizujące (związki glukozy i kwasu galusowego) i taniny skondensowane (katechiny) występujące np. w zielonej herbacie. Rodnik DPPH okazał się bardzo dobrym testerem właściwości antyutleniających, zwłaszcza polifenoli. W przypadku występowania w próbce innego typu związków test DPPH może dawać zaniżoną wartość pojemności antyoksydacyjnej, służąc jednak jako szybka wstępna metoda określenia istnienia działania przeciwrodnikowego. DPPH w wyniku reakcji ze związkami zawierającymi wiązania C-H, N-H, O-H, S-H występuje jako akceptor wodoru i przekształca się w difenylopi krylohydrazynę (Rys.1). Do tej pory ukazało się bardzo wiele prac



1,1- Difenilo - 2 - pikrylohydrazyl
wykorzystujących ten rodnik.

Hydrazyna

2.2. Wykonanie pomiarów

Technika pomiaru EPR

W elektronowym rezonansie paramagnetycznym widmo standardowo uzyskuje się przez przemiatanie zmienną indukcją pola magnetycznego przy stałej częstotliwości promieniowania mikrofalowego. W spektrometrze EPR na Wydziale Farmacji AM stosuje się promieniowanie o częstotliwości 9.3 GHz (pasmo X).

Charakterystyka pomiaru:

Pomiar wykonano na spektrometrze Miniscope MS200 firmy Magnettech.

Parametry pomiaru:

- czas pomiaru: 20 s
- $B_0 = 333,34$ mT
- $\Delta B = 7,5$ mT
- temp. pokojowa: 19°C

Preparatyka:

roztwór DPPH (Aldrich Chemie) w acetonie 0,566 mg/ml

- do wyznaczenia współczynnika RPF przygotowano roztwory acetonowe badanego preparatu. Do 100 μ l roztworu dodano 200 μ l roztworu DPPH. Próbkę szczelnie zamknięto i pozostawiono na 60 min. Następnie wykonano pomiary EPR. Pomiary powtórzono 3-krotnie dla każdej z badanych próbek.

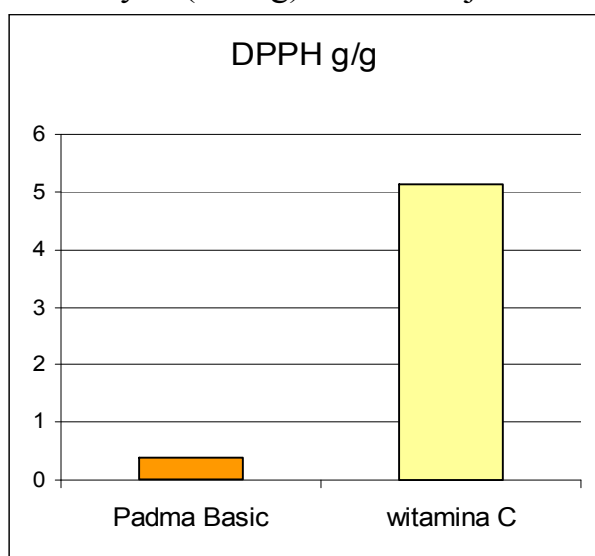
2.3. Wyniki

Obliczono wartości współczynnika RPF (Radical Protection Factor) w przeliczeniu na 1 gram próbki wg publikacji¹⁷ i wyznaczono wartość średnią. Współczynnik RPF określa, jaka ilość rodnika testowego (w tym przypadku DPPH) przereagowała z 1 gramem preparatu. Większa wartość RPF oznacza większą zdolność zmiatania rodnika.

Preparat „Padma Basic”: RPF $1,4 \cdot 10^{20}$

Pojemność antyoksydacyjna: 0,23 mmol DPPH/1 g preparatu.

W przeliczeniu na 1 kapsułkę preparatu (500 mg) odpowiada to 0,185 mmol DPPH, co odpowiada 0,48 pojemności antyoksydacyjnej dziennej dawki witaminy C (75 mg) zmierzonej testem DPPH.



Porównanie pojemności antyoksydacyjnej preparatu Padma Basic i witaminy C – wyniki testu DPPH

3. Test na zdolność zmiatania rodnika ROO· metodą ORAC-FL

3.1. Opis stosowanej metody badania zdolności zmiatania rodników.

W metodzie ORAC-FL mierzony jest zanik fluorescencji fluoresceiny w wyniku reakcji z rodnikami generowanymi w wyniku rozkładu termicznego azoinicjatora AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride). Obecność antyoksydantu chroni fluoresceinę przed utlenianiem, opóźniając tym samym zanik fluorescencji¹⁸. Zaletą metody jest uwzględnienie zarówno stopnia, jak i czasu inhibicji utleniania substancji modelowej (fluoresceina) przez rodniki, a także wykorzystanie rodników nadtlenkowych, jakie występują w organizmach żywych.

Intensywność fluorescencji jest rejestrowana w funkcji czasu w obecności antyoksydantu i bez jego dodania, a różnica pola powierzchni pod oboma krzywymi jest miarą pojemności antyoksydacyjnej próbki. Wartości ORAC wyraża się w odniesieniu do standardu, jakim jest Trolox (rozpuszczalny w wodzie analog witaminy E) – określane są one na podstawie krzywej wzorcowej, sporządzonej dla różnych stężeń Troloxu, i wyrażone w ekwiwalentach

(równoważnikach) Troloxu (TE), zwykle w mikromolach Troloxu na gram suchej masy lub litr w przypadku próbek ciekłych. Obecnie zgromadzono dane dla wielu rodzajów produktów żywnościowych (owoce, warzywa, zioła, przyprawy i inne)^{19,20}.

3.2. Wykonanie pomiarów

Charakterystyka pomiaru

Pomiary wykonano na spektrometrze luminescencyjno-fluorescencyjnym Perkin-Elmer LS 55, parametry pomiaru:

- Długość fali promieniowania wzbudzającego: 485 nm
- Długość fali mierzonego promieniowania emitowanego: 520 nm
- Całkowity czas pomiaru: 90 minut
- Odstęp między pojedynczymi pomiarami: 1 minuta
- Temperatura pomiaru: 37°C

Preparatyka:

Przygotowano świeże roztwory fluoresceiny (80 nM) i AAPH (40 nM) w buforze PBS o pH 7,4. Do kuwety do pomiarów fluorescencyjnych pobrano 1800 µl roztworu fluoresceiny i 300 µl buforu (do pomiaru krzywej odniesienia, bez dodatku antyoksydantu) lub nadsącza preparatu Padma Basic rozcieńczonego buforem PBS 250-krotnie. Po 10 minutach termostatowania w temperaturze 37 °C dodano 900 µl roztworu AAPH i rozpoczęto pomiary fluorescencji.

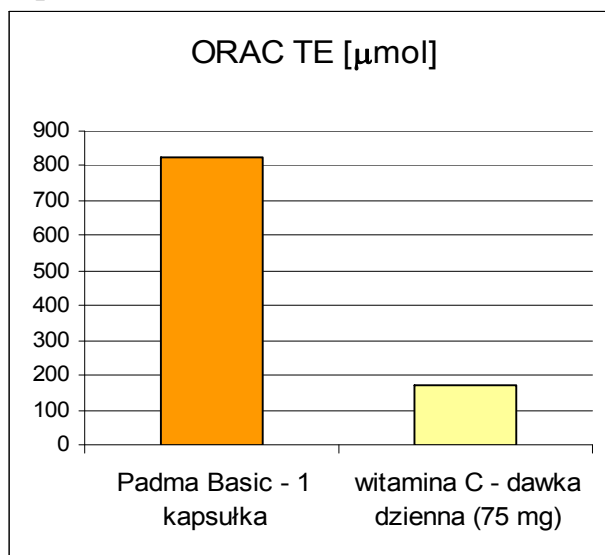
Pomiar powtórzono czterokrotnie.

3.3. Wyniki

Pole powierzchni pod krzywą zaniku fluorescencji zostało obliczone z wykorzystaniem programu MS Excel. Różnica między polem pod krzywą zarejestrowaną w obecności badanego preparatu i krzywej odniesienia została porównana do odpowiednich pomiarów dla substancji wzorcowych.

Preparat „Padma Basic”: wartość ORAC-FL: 1650 TE (µmol/g).

W przeliczeniu na 1 kapsułkę preparatu (500 mg) odpowiada to 825 TE, co odpowiada 4,8 wartości ORAC - FL dziennej dawki witaminy C (75 mg).



4. Podsumowanie

PADMA zawiera antyoksydanty likwidujące trwałe, syntetyczny rodnik DPPH oraz krótko żyjące rodniki nadtlenkowe powstające w organizmie. Możliwości likwidacji (pojemność antyoksydacyjna) rodnika DPPH przez 1 kapsułkę PADMYY odpowiadają efektowi prawie 1/2 dziennej dawki witaminy C. Bardziej skuteczne okazały się antyoksydanty PADMYY wobec rodnika nadtlenkowego. Jedna kapsułka preparatu likwiduje tyle rodników co 360 mg witaminy C, czyli prawie 5 dziennych dawek.

W 1994 r., w dyskusji panelowej na II konferencji „Phytotherapy, antioxidants and food” w Lucernie zwrócono uwagę, że mniejsza liczba zawałów serca u wegetarian może mieć związek nie tyle z małym spożyciem tłuszczów zwierzęcych, ale z dobroczynnym wpływem fitochemikaliów. Jest logiczne, że na kaskadę wolnych rodników powstających w organizmie w wyniku przemian metabolicznych trzeba odpowiedzieć kaskadą antyoksydantów. Związki te muszą być dostarczane z roślinnym pożywieniem. Wszystkie cywilizacje miały typowe jadalne rośliny, owoce i zioła, które zapewniały ich odpowiednią porcję w codziennie spożywanych daniach. Cennym źródłem antyoksydantów (flawonoidów, tanin) uzupełniającym ich pulę w diecie może być PADMA, mieszanka ziół i owoców z Dalekiego Wschodu.

Piśmiennictwo

¹ Saller R, Kristof O, Reichling J. Padma 28—ein traditionelles und modernes Phytotherapeutikum [Padma 28—a traditional and modern phytotherapeutic]. Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin 1999;11:28–37.

² [Lee HS](#), [Won NH](#), [Kim KH](#), [Lee H](#), [Jun W](#), [Lee KW](#). Antioxidant effects of aqueous extract of Terminalia chebula in vivo and in vitro. [Biol Pharm Bull](#). 2005; 28(9):1639-44

³ Melzer J. et al. Treating intermittent claudication with Tibetan medicine Padma 28: Does it work? Atherosclerosis 189 (2006) 39–46

⁴ Sallon, S, et al. The efficacy of PADMA 28, an herbal preparation, in the treatment of intermittent claudication: a controlled double-blind pilot study with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. J Vasc Invest 1998; 4:129-136.

⁵ Stampfli S, et al. The antioxidative and anti-inflammatory properties of PADMA 28. Schweiz Zschr GanzheitsMed 2001; 13:242-245

⁶ Korwin-Piotrowska T, et al. Experience of Padma 28 in Multiple Sclerosis. Phytother. Research 1992; 6:133-136

⁷ Gladysz A, et al. Influence of PADMA 28 on patients with Chronic Active Hepatitis B. Phytother. Research I 1993; 7: 244-247

⁸ Brzosko WJ, Jankowski A. Padma 28 in patients with Chronic Hepatitis B: clinical and immunological effects. Schweiz. Zschr. für GanzheitsMed. 1992; 4(1):13-14

⁹ Hryniewiecki L, et al. Treatment of patients with active liver cirrhosis with PADMA 28. Lecture at the International Symposium "Chronic Disease Processes: Pathogenesis and

Treatment, the Perspective of Herbal Multi-Compound Preparations", University Roskilde/Denmark, Sep 1997

- ¹⁰ Bernacka K, et al. Padma 28 in the therapy of rheumatoid arthritis: a 6 month clinical and laboratory study. Abstract: Fourth Interscience World Conference on Inflammation, Geneva, April 1991
- ¹¹ Jankowski S, et al. Influence of PADMA 28 on the spontaneous bacteriocidal activity of blood serum in children suffering from recurrent infections of the respiratory tract. *Phytother. Research* 1991; 5: 120-123
- ¹² Jankowski A, et al. Treatment with PADMA 28 of children with recurrent infections of the respiratory tract. *Therapiewoche Schweiz* 1986; 2: 25-32
- ¹³ Prusek W, et al. Immunostimulation in recurrent respiratory tract infections therapy in children. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 1987; 35:289-302.
- ¹⁴ Ginsberg I, et al. PADMA 28, a traditional Tibetan herbal preparation inhibits the respiratory burst in human neutrophils, the killing of epithelial cells by mixtures of oxidants and pro-inflammatory agonists and peroxidation of lipids. *Inflammopharmacology* 1999; 7(1):47-62
- ¹⁵ Suter M, Richter C. Anti- and pro-oxidative properties of PADMA 28, a Tibetan herbal formulation. *Redox Report* 2000; 5/1:17-22
- ¹⁶ T. Hatano, R. Edumatsu, Effects of the interaction of tannins with co-existing substances, p.VI, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 37(8), 2016, 1989
- ¹⁷ T. Herrling, L. Zastarow, N. Groth "Classification of cosmetic products – The Radical Protection Factor (RPF)", *SOFW*, 1998, 124, nr 5, str. 282-284, opracowanie w jęz. pol.: G. Działa, "Klasyfikacja wyrobów kosmetycznych – Współczynnik Ochrony przed Rodnikami (Radical Protection Factor - RPF)".
- ¹⁸ Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior RL (2001) Development and validation of an improved Oxygen Radical Capacity Assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49; 4619-4626
- ¹⁹ X. Wu et al. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal of Food Composition and Analysis* 17 (2004) 407–422
- ²⁰ Oxygen Radical Absorbance Capacity of Selected Foods - 2007; Nutrient Data Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Nov. 2007