



Effects of storage conditions on formation of free radicals in soybean extract – an EPR spectroscopy study

Wpływ warunków przechowywania wyciągu z nasion soi na generowanie wolnych rodników – badania z zastosowaniem spektroskopii EPR

Sylvia Jarco

Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

ABSTRACT

OBJECTIVE: Soybean extract is a valuable food supplement used for the prevention of cancer and other purposes. The role of free radicals in carcinogenesis has been proven. Studies have also confirmed the effect of storage conditions on the formation of free radicals in natural medicinal products. The study presents an attempt to optimize the storage conditions of soybean extract to prevent the formation of free radicals.

AIM OF THE STUDY: The aim of the study was to determine the effect of temperature and UV radiation on the formation of free radicals in soybean extract during storage.

MATERIAL AND METHODS: Samples of soybean extract were heated to temperatures of 30, 40 and 50°C. Subsequent samples were exposed to UV radiation (wavelengths 315–400 nm) for 30 and 60 minutes. EPR (electron paramagnetic resonance) spectroscopy was used to analyse the amplitude and linewidth of the EPR signal and to calculate the concentration of free radicals in the samples.

RESULTS: At a room temperature of 25°C and in the absence of light, no EPR signal was recorded for the tested samples. Heating and exposure to UV light caused the formation of free radicals in the samples. The highest concentration of free radicals was found in the sample exposed to UV light for 60 minutes, while the lowest was in the sample heated to 30°C.

CONCLUSIONS: The use of EPR spectroscopy enabled the identification of optimal storage conditions for soybean extract, i.e. 25°C and darkness.

KEY WORDS

soybean extract, free radicals, EPR spectroscopy

Received: 27.09.2016

Revised: 26.10.2016

Accepted: 20.12.2016

Published online: 09.06.2017

Address for correspondence: Mgr Sylvia Jarco, Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, tel. +48 32 364 11 64, e-mail: sylvia.jarco@med.sum.edu.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
www.annales.sum.edu.pl

**STRESZCZENIE**

WSTĘP: Cennym uzupełnieniem diety jest wyciąg z nasion soi, wykorzystywany między innymi w profilaktyce nowotworów. Udział wolnych rodników w procesach karcynogenezy został udowodniony. Badania potwierdzają wpływ warunków przechowywania naturalnych środków leczniczych na zachodzące w nich zjawiska wolnorodnikowe. W pracy podjęto próbę optymalizacji warunków przechowywania wyciągu z nasion soi, aby zapobiec powstawaniu w nim wolnych rodników.

CEL PRACY: Celem pracy było określenie wpływu temperatury i promieniowania UV na generowanie wolnych rodników w wyciągu z nasion soi w trakcie przechowywania.

MATERIAŁ I METODY: Próbkę z wyciągiem z nasion soi ogrzewano w temperaturach 30, 40 i 50°C. Kolejne próbki naświetlano promieniowaniem UV (długość fali 315–400 nm) przez 30 i 60 minut. Wykorzystano spektroskopię EPR (*elektron paramagnetic resonance*), analizując amplitudę i szerokość linii EPR oraz obliczając koncentrację wolnych rodników w próbkach.

WYNIKI: W temperaturze pokojowej 25°C oraz przy braku dostępu światła nie rejestrowano sygnału EPR dla testowanych próbek. Ogrzewanie próbek oraz ekspozycja na promieniowanie UV powodowały pojawienie się w nich wolnych rodników. Największą koncentrację wolnych rodników stwierdzono w próbce naświetlanej UV przez 60 minut, najniższe zaś w próbce ogrzewanej do 30°C.

WNIOSKI: Wykorzystanie spektroskopii EPR pozwoliło na ustalenie optymalnych warunków przechowywania wyciągu z nasion soi, którymi są temperatura 25°C oraz brak dostępu światła.

SŁOWA KLUCZOWE

wyciąg z nasion soi, wolne rodniki, spektroskopia EPR

INTRODUCTION

Interest in the prevention of cancer has been stimulated by the fact that cancer is the second most common cause of death after cardiovascular diseases [1]. It has been shown that diet plays an important role in the epidemiology of cancer [2,3]. The positive effects of natural substances on human health have been demonstrated [2,3].

Soy is one of the most valuable plants in terms of nutrition and medicinal properties [4]. Soybeans, due to the content of isoflavonoids, proteins, lipids and minerals (including potassium, calcium and phosphorus) are used in the prevention of cancer, cardiovascular disease and the alleviation of menopausal symptoms [4]. Studies have shown a correlation between soy consumption and a reduced risk of breast cancer and prostate cancer [4]. Isoflavones are also candidate substances to be used for the prevention of thyroid, head and neck cancer [5]. Isoflavones exhibit anti-tumour activity, which relies on inhibiting angiogenesis, i.e. the formation of new blood vessels promoting tumour growth [4]. Genistein from soybeans inhibits tyrosine kinase, which affects cell division in cancer cells, for example in prostate, breast and colon cancer [4,6].

The involvement of free radicals, i.e. highly chemically reactive paramagnetic molecules or atoms with an unpaired valence electron, in carcinogenesis has been proven [1]. Free radicals, by damaging the DNA struc-

WSTĘP

Zainteresowanie profilaktyką chorób nowotworowych wynika z tego, iż są zaraz po chorobach układu krążenia najczęstszą przyczyną zgonów [1]. Udowodniono, że w epidemiologii nowotworów dieta odgrywa znaczącą rolę [2,3]. Wykazano pozytywny wpływ substancji pochodzenia naturalnego na zdrowie człowieka [2,3].

Jedną z najbardziej wartościowych roślin pod względem żywieniowym i leczniczym jest soja [4]. Z uwagi na obecność w nasionach izoflawonoidów, białek, lipidów oraz składników mineralnych (m.in. potas, wapń czy fosfor), soja stosowana jest w profilaktyce nowotworów, menopauzy oraz chorób sercowo-naczyniowych [4]. Badania wykazały, że istnieją korelacje pomiędzy spożywaniem soi a obniżeniem ryzyka raka piersi oraz raka prostaty [4]. Rozważa się również możliwość wykorzystania izoflawonów w profilaktyce raka tarczycy, szyi i głowy [5]. Działanie przeciwnowotworowe, polegające na hamowaniu angiogenezy, czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych niezbędnych do rozrostu tkanki nowotworowej, wykazują izoflawonoidy [4]. Genisteina z soi hamuje kinazę tyrozynową mającą wpływ na podziały komórkowe w komórkach nowotworowych m.in. prostaty, sutka oraz jelita grubego [4,6].

Udział wolnych rodników, czyli wysoce reaktywnych chemicznie paramagnetycznych cząsteczek lub atomów posiadających w swej budowie niesparowane elektrony,



ture, can initiate carcinogenic cell changes. A disturbed redox balance and exposure to external factors trigger the overproduction of free radicals in the human body. Factors responsible for the formation of free radicals include UV light, ionizing and gamma radiation, high temperature, and environmental pollution (exhaust gases, tobacco smoke, organic solvents) [1].

Studies employing electron paramagnetic resonance (EPR) for the analysis of medicinal substances of natural origin, such as herbs, honey, herbal honey, tea, or soybean extract have shown that storage conditions influence the formation of free radicals in these products. Therefore, there is a need to determine the optimal storage conditions that can ensure stable product quality.

Changes in chemical structures can affect the properties of soybean extract, leading to the formation and growth of new cancer cells. The study was carried out to answer the following research questions:

- What are the optimal storage conditions for soybean extract to preserve its valuable properties?
- Can EPR spectroscopy, as a highly sensitive method, be useful in determining optimal soybean storage conditions?

AIM OF THE STUDY

The aim of the study was to determine the effects of temperature and UV radiation on the formation of free radicals in soybean extract during storage, and to determine the optimal storage conditions for this product.

MATERIAL AND METHODS

Analyses were carried out for ready-to-use soybean extracts (*glycine semen extractum siccum*) in the form of a powdered substance. Extract samples were heated for 60 minutes in a thermal steriliser from Memmert (Germany) to temperatures of 30, 40 and 50°C. Subsequent samples were exposed to UV radiation ($\lambda = 315\text{--}400$ nm) generated by a 40W Medisun 250 UV lamp (Germany) for 30 and 60 minutes.

The study employed the EPR spectroscopy method. This method is only suitable for analysing systems that contain unpaired electrons [7,8,9]. When a paramagnetic sample is placed in the magnetic field, the energy levels of the unpaired electrons split in the process called the Zeeman interaction [9]. Energy adjusted to the difference between the energy levels supplied to the electron system is absorbed through resonance by the unpaired electrons, which are excited to the higher energy levels [9].

w procesach karcynogenezy został już udowodniony [1]. Wolne rodniki poprzez uszkodzenie struktury DNA mogą inicjować zmiany nowotworowe komórek. Zaburzenie równowagi redoks oraz działanie czynników zewnętrznych generuje nadmiar wolnych rodników w organizmie człowieka. Za ich powstawanie odpowiadają promieniowanie UV, jonizujące, gamma, wysoka temperatura, zanieczyszczenie środowiska (spaliny, dym tytoniowy, rozpuszczalniki organiczne) [1].

Przeprowadzone z wykorzystaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR – *electron paramagnetic resonance*) badania substancji leczniczych pochodzenia naturalnego, jak zioła, miody, ziołomiody, herbaty czy w tym przypadku ekstrakt soi, wykazały wpływ warunków przechowywania na zachodzące w nich zjawiska wolnorodnikowe. Spowodowało to potrzebę określenia optymalnych warunków ich przechowywania, które gwarantują zachowanie jakości.

Zmiana struktur chemicznych ekstraktu soi może wpływać na jego właściwości, prowadząc do powstania i rozwoju nowych komórek w procesie nowotworzenia. W przedstawionej pracy postawiono następujące problemy badawcze:

1. Jakie warunki przechowywania soi będą optymalne do zachowania jej cennych właściwości?
2. Czy spektroskopię EPR, ze względu na czułość przeprowadzania badania, można zaproponować jako metodę przydatną w określeniu optymalnych warunków przechowywania soi?

CEL PRACY

Celem pracy było określenie wpływu temperatury i promieniowania UV na generowanie wolnych rodników w wyciągu z nasion soi w trakcie jego przechowywania oraz określenie optymalnych warunków przechowywania ekstraktu.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano gotowe preparaty wyciągu z nasion soi (*glycine semen extractum siccum*) w postaci sproszkowanego ciała stałego. Próbkę ekstraktu ogrzewano przez 60 minut w sterylizatorze termicznym firmy Memmert (Niemcy) w temperaturach: 30, 40 i 50°C. Kolejne próbki poddano ekspozycji na promieniowanie UV ($\lambda = 315\text{--}400$ nm) za pomocą lampy UV Medisun 250 (Niemcy) o mocy 40 W w czasie 30 i 60 minut.

W badaniu wykorzystano metodę spektroskopii EPR. Zjawisko to zachodzi jedynie w układach, które zawierają



The study was carried out using an EPR spectrometer from Radiopan (Poznań, Poland) integrated with a Rapid Scan Unit – a numerical data acquisition system from Jagmar (Kraków, Poland). Spin traps were not used. Stable free radicals were analysed in the tested samples. X-band microwave frequency (9.3 GHz) was measured with a MCM 101 meter from Eprad (Poznań, Poland). The total microwave power was 70 mW. Magnetic induction was measured with a nuclear magnetometer from Eprad (Poznań, Poland). Spectroscopic analysis was conducted using computer programs from Jagmar (Kraków, Poland) and LabView8.5 National Instruments (USA).

EPR spectra were recorded as the first derivative of the signal. The following parameters were analysed: EPR signal amplitude – A [relative unit], EPR linewidth – ΔB_{pp} [mT], integral intensity of the EPR signal – I [relative unit]. The concentration of free radicals (number of free radicals in 1 gram of sample) was calculated using ultramarine and ruby crystals as paramagnetic reference materials. The following equation was used to calculate the concentration:

$$N = N_u [(I_p/I_u)] \times [(W_u A_{ru}) / (W_p A_{rp} m_p)] \text{ [spin/gram]}$$

where: N_u – the number of paramagnetic centres in ultramarine; I_p , I_u – the integral intensities of the EPR signal for the tested sample and ultramarine; A_{rp} , A_{ru} – EPR signal amplitude of the ruby crystal for the tested sample and ultramarine in the resonator; W_p , W_u – EPR signal receiver gain for the tested sample and ultramarine; m_p – mass of the tested sample.

An increase in amplitude (A) of the EPR signal is positively correlated with increases in the number of unpaired electrons in the sample [9]. The same relationship is found for integral intensity (I), which is measured by the area under the absorption curve [9]. The EPR line width (ΔB_{pp}) depends on the magnetic interactions in the sample [9].

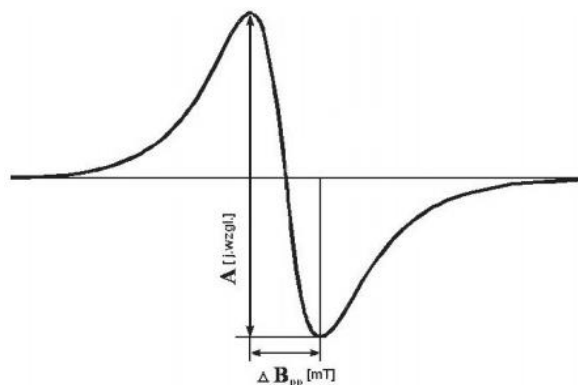


Fig. 1. Analysed parameters of EPR signal: amplitude A , linewidth ΔB_{pp} .
Ryc. 1. Analizowane parametry linii EPR – amplituda A , szerokość ΔB_{pp} .

zawierają niesparowane elektrony [7,8,9]. Umieszczenie paramagnetycznej próbki w polu magnetycznym powoduje, że poziomy energetyczne niesparowanych elektronów, na skutek zjawiska Zeemana, rozszczepiają się [9]. Po dostarczeniu do układu elektronów energii dopasowanej do różnicy między poziomami energetycznymi w postaci mikrofal następuje jej rezonansowa absorpcja przez niesparowane elektrony, które przechodzą na wyższe poziomy energetyczne [9]. Energię dostarczamy w postaci promieniowania mikrofalowego [9]. Rejestrowane jest wówczas widmo absorpcji mikrofalowej, nazywane również linią EPR. W wyniku procesów relaksacji elektrony oddają energię, przechodząc ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego [7,8,9]. Badanie przeprowadzono wykorzystując spektrometr EPR firmy Radiopan (Poznań) oraz połączone z nim urządzenie Rapid Scan Unit – system numerycznej akwizycji danych firmy Jagmar (Kraków). Nie stosowano pułapek spinowych. Zbadano stabilne wolne rodniki w testowanych próbkach. Częstotliwość mikrofal z pasma X (9.3 GHz) mierzono miernikiem MCM 101 firmy Eprad (Poznań). Całkowita moc promieniowania mikrofalowego wynosiła 70 mW. Indukcję magnetyczną mierzono magnetometrem jądrowym firmy Eprad (Poznań). Spektroskopową analizę prowadzono, korzystając z programów komputerowych firmy Jagmar (Kraków) oraz LabView8.5 National Instrument (USA).

Widma EPR rejestrowano w postaci pierwszej pochodnej absorpcji. Analizie poddano następujące parametry: amplitudę linii EPR – A [j.wzgl.], szerokość linii EPR – ΔB_{pp} [mT], intensywność integralną linii EPR – I [j.wzgl.]. Obliczono koncentrację wolnych rodników (liczba wolnych rodników w 1 gramie próbki), wykorzystując ultramarynę i kryształ rubinu jako paramagnetyczne wzorce. Zastosowano następujący wzór na koncentrację:

$$N = N_u [(I_p/I_u)] \times [(W_u A_{ru}) / (W_p A_{rp} m_p)] \text{ [spin/gram]}$$

gdzie: N_u – ilość centrów paramagnetycznych w ultramarynie; I_p , I_u – intensywność integralna linii EPR próbki i ultramaryny; A_{rp} , A_{ru} – amplituda linii EPR kryształu rubinu dla próbki i ultramaryny w rezonatorze; W_p , W_u – wzmocnienia sygnału EPR dla próbki i ultramaryny; m_p – masa próbki.

Wartość amplitudy (A) linii EPR rośnie wraz ze wzrostem liczby niesparowanych elektronów w próbce [9]. Taką samą zależność stwierdza się w przypadku intensywności integralnej (I), której miarą jest pole powierzchni pod krzywą absorpcji [9]. Wartość szerokości (ΔB_{pp}) linii EPR zależy od oddziaływań magnetycznych w próbce [9].



RESULTS

No EPR spectra were detected for the samples of soybean extract stored at room temperature (25°C). An EPR signal was recorded from the samples heated to the temperature of 30°C. Figure 2 presents the EPR amplitude values (A) (Fig. 2a), EPR linewidth (ΔB_{pp}) (Fig. 2b) and free radical concentration (N) (Fig. 2c) 15 minutes after heating. Figures 2a–c present the measurements taken at room temperature.

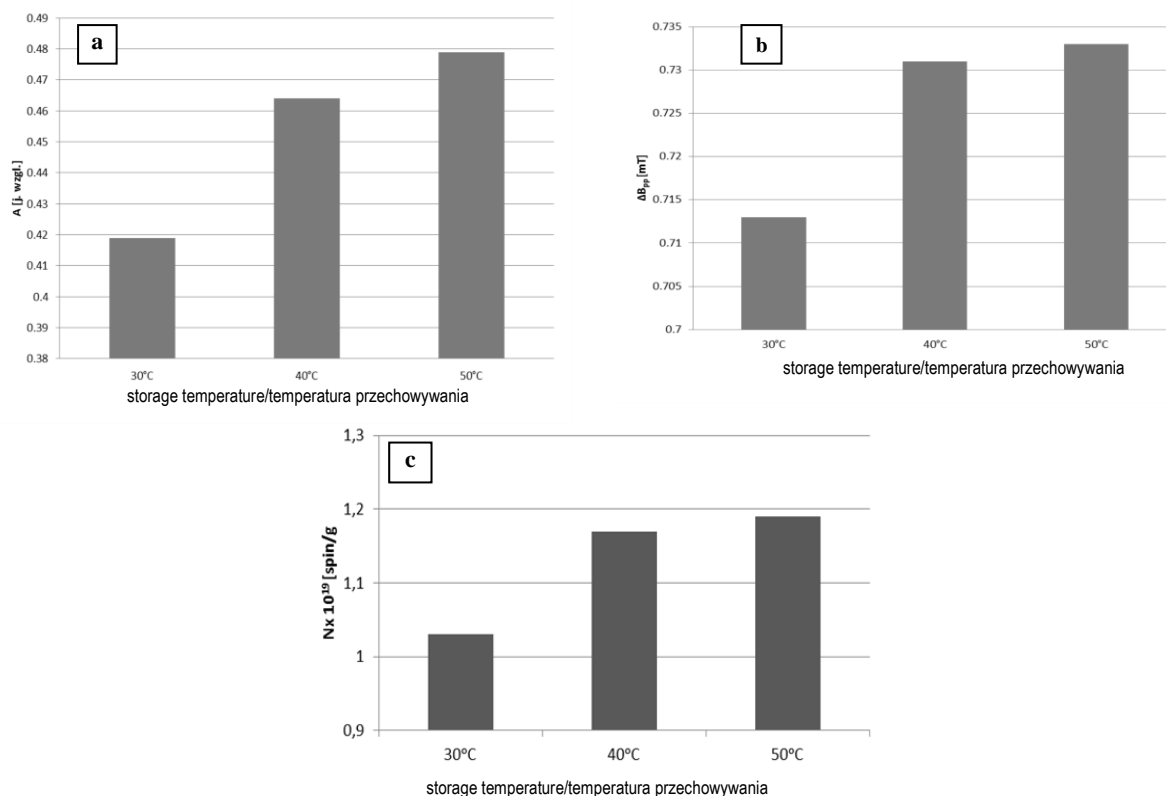


Fig. 2. Effect of storage temperature of soybean extract on: a) EPR signal amplitude (A) [± 0.01 relative units], b) EPR linewidth (ΔB_{pp}) [± 0.02 mT], c) free radical concentration (N) [$\pm 1 \times 10^{18}$ spin/g]. Data for EPR spectra recorded 15 minutes after end of heating, at room temperature using microwave power of 2.2 mW and 15 dB attenuation.

Ryc. 2. Wpływ temperatury przechowywania wyciągu z nasion soi na: a) amplitudę (A) [$\pm 0,01$ j.wzgl.] linii EPR, b) szerokość (ΔB_{pp}) [$\pm 0,02$ mT] linii EPR, c) koncentrację (N) [$\pm 1 \times 10^{18}$ spin/g] wolnych rodników. Dane dla widm EPR zarejestrowanych 15 minut po ustaniu działania czynnika termicznego, w temperaturze pokojowej, przy mocy mikrofalowej 2,2 mW oraz przy tłumieniu 15 dB.

There was an increase in the amplitude (A) of the EPR signal during the heating of a sample to gradually higher temperatures (Fig. 2a). The highest EPR signal amplitude was found at 50°C. EPR linewidth (ΔB_{pp}) increased alongside the temperature increase (Fig. 2b). The change in EPR line width (ΔB_{pp}) at 40 and 50°C was not significant considering the accuracy of (ΔB_{pp}) values [± 0.02 mT] (Fig. 2b). The concentration of free radicals (N) changed with temperature, and it was

Dla próbek z wyciągiem z nasion soi, które pozostały w temperaturze pokojowej (25°C), nie obserwowano widm EPR. Stwierdzono, że ogrzanie próbek już do temperatury 30°C powodowało pojawienie się sygnału EPR. Na rycinie 2 porównano wartości amplitudy (A) (ryc. 2a) i szerokości (ΔB_{pp}) linii EPR (ryc. 2b) oraz koncentracji (N) (ryc. 2c) po 15 minutach od zadziałania czynnika termicznego. Wyniki zaprezentowane na rycinach 2a–c dotyczą pomiarów wykonanych w temperaturze pokojowej.

WYNIKI

Zaobserwowano wzrost wartości amplitudy (A) linii EPR podczas ogrzewania próbki do coraz wyższej temperatury (ryc. 2a). Najwyższe wartości amplitudy linii EPR stwierdzono w temperaturze 50°C. Szerokość (ΔB_{pp}) linii EPR rosła wraz ze wzrostem temperatury (ryc. 2b). Biorąc pod uwagę dokładność wartości (ΔB_{pp}) [$\pm 0,02$ mT] w temperaturach 40 i 50°C różnica szerokości (ΔB_{pp}) linii zwiększyła się mało istotnie (ryc. 2b). Zaobserwowano wpływ temperatury



the lowest in the sample heated to 30°C, and the highest at 50°C (Fig. 2c).

No EPR signal was recorded for the samples of soybean extract that were not exposed to UV radiation, but an EPR signal was obtained for the samples exposed to UV light for 30 minutes. Figure 3 presents an example EPR spectra recorded 15 minutes after exposure to UV.

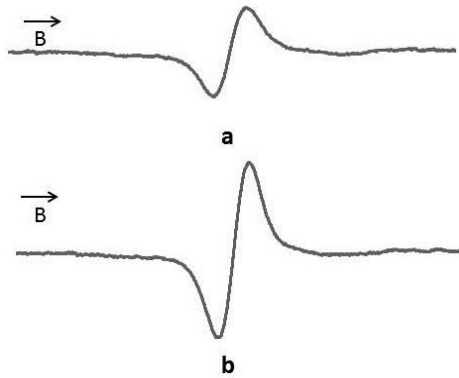


Fig. 3. EPR spectra for soybean extract exposed to UV radiation during storage for: a) 30 minutes and b) 60 minutes. Spectra were measured 15 minutes after end of exposure to UV radiation using 15 dB attenuation and microwave power of 2.2 mW.

Ryc. 3. Widma EPR wyciągu z nasion soi przechowywanych w obecności promieniowania UV przez: a) 30 minut oraz b) 60 minut. Pomiar widm wykonano po 15 minutach ekspozycji na promieniowanie UV, stosując tłumienie 15 dB i moc mikrofalową wynoszącą 2.2 mW.

na koncentrację (N) wolnych rodników. Ich najmniejsza koncentracja wystąpiła w próbce ogrzewanej w 30°C, a największa w temperaturze 50°C (ryc. 2c).

Dla próbek z wyciągiem z nasion soi, których nie poddano naświetlaniu promieniowaniem UV, nie rejestrowano widma EPR. Ekspozycja na promieniowanie UV przez 30 minut spowodowała pojawienie się sygnału EPR. Na rycinie 3 przedstawiono przykładowe widmo linii EPR rejestrowane 15 minut po ekspozycji na promieniowanie UV.

Stwierdzono, że parametry linii EPR próbek wyciągu z nasion soi poddanych ekspozycji na promieniowanie UV zmieniają się w zależności od czasu naświetlania. Zależności te pokazano na wykresach (ryc. 4a–c), które dotyczą widm EPR rejestrowanych w temperaturze pokojowej po 15 minutach od ekspozycji na promieniowanie UV.

Stwierdzono, że amplituda (A) linii EPR próbki wyciągu z nasion soi po 60-minutowej ekspozycji wzrosła prawie dwukrotnie (ryc. 4a). Wartość szerokości (ΔB_{pp}) [$\pm 0,02$ mT] linii EPR próbki naświetlanej przez 30 minut jest mało istotnie większa (o 0,03 mT) od próbki naświetlanej przez 60 minut (ryc. 4b). Zaobserwowano wzrost koncentracji (N) wolnych rodników w próbkach wraz z wydłużaniem czasu naświetlania (ryc. 4c).

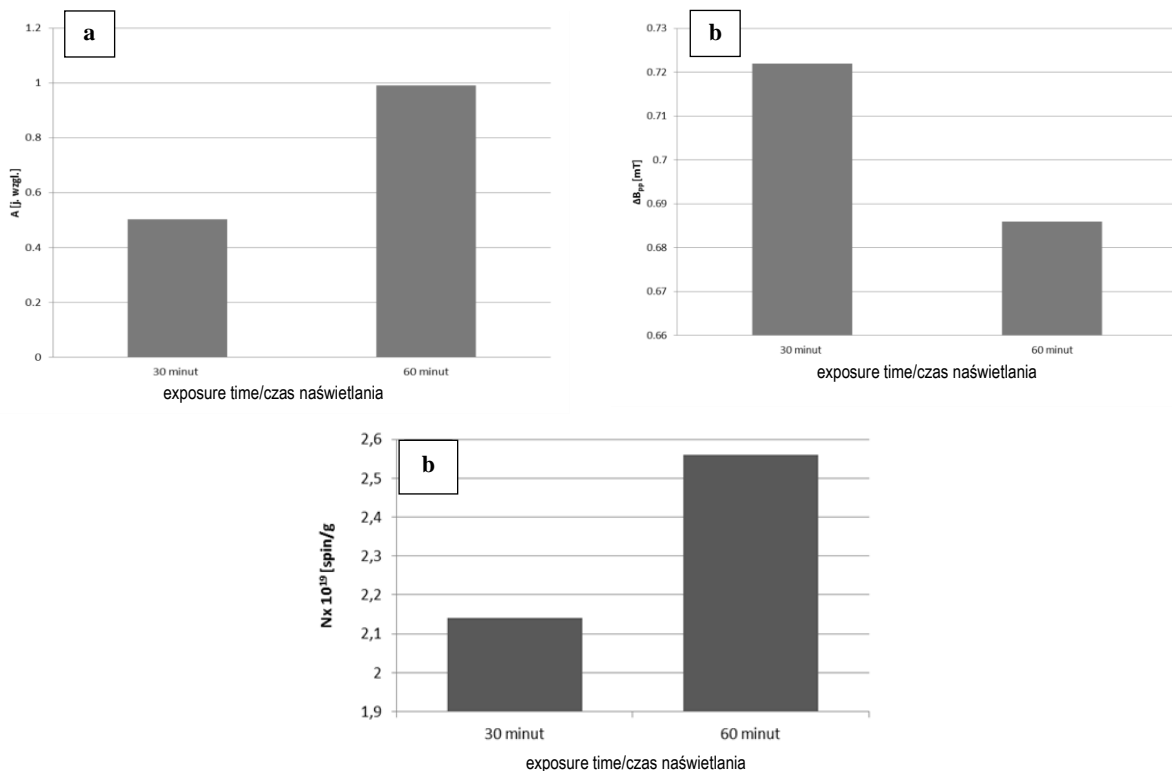


Fig. 4. Effect of UV radiation on: a) EPR signal amplitude (A) [± 0.01 relative units], b) EPR linewidth (ΔB_{pp}) [± 0.02 mT], and c) free radical concentration (N) [$\pm 1 \times 10^{18}$ spin/g] in soybean extract.

Ryc. 4. Wpływ promieniowania UV na: a) amplitudę (A) [$\pm 0,01$ j.wzgl.] linii EPR, b) szerokość (ΔB_{pp}) [$\pm 0,02$ mT] linii EPR oraz c) koncentrację (N) [$\pm 1 \times 10^{18}$ spin/g] wolnych rodników w wyciągu z nasion soi.



The study found that the parameters of the EPR signal for the samples of soybean extract exposed to UV radiation changed depending on exposure time. This relationship is presented in Figures 4a–c, showing EPR spectra recorded at room temperature 15 minutes after exposure to UV radiation.

DISCUSSION

The presented novel study confirmed the effect of storage conditions on the concentration of free radicals in soybean extract. The formation of free radicals in soybean extract stored at 25, 40 and 50°C, and exposed to UV radiation, has not been investigated by other authors so far.

Soybean extract stored at 25°C did not contain free radicals, as evidenced by the lack of an EPR signal. The formation of free radicals was observed at temperatures of 40 and 50°C, which may correspond to real-life storage conditions (Fig. 3).

The natural light of a wavelength of 315–400 nm is another factor inducing the formation of free radicals in the tested samples. An EPR signal was recorded for each of the selected experimental parameters. This supports the theory on the generation of free radicals in various materials exposed to environmental factors [10]. As a result of these factors, chemical bonds in the tested material break off and unpaired electrons appear in the reaction system. Because of their presence, molecules increase their chemical activity and can either accept or donate an unpaired electron [10,11]. This process is highly unwanted, especially in the case of medicinal products. Numerous studies have demonstrated that the exposure of pharmaceuticals and natural medicinal products to high temperatures or UV radiation results in the formation of free radicals and loss of the products' antioxidant properties [12,13,14,15]. Unpaired electrons present in the sample are detected by the EPR spectrometer, as they only absorb the supplied microwave radiation in the process of paramagnetic resonance, thus enabling recording of the EPR signal [9]. EPR spectroscopy was chosen since it can directly help identify unpaired electrons in the tested sample. This method also enabled the registration of changes in the level of absorbed radiation depending on changes in temperature or UV exposure time. The findings from the study can help optimize conditions at which soybean products should be stored. Their therapeutic effect and chemical structure should remain stable when stored in a dark place at room temperature (25°C). Changes in these storage parameters increase the concentration of free radicals, which can have a negative effect on the human body.

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania potwierdziły wpływ warunków przechowywania na właściwości wolnorodnikowe wyciągu z nasion soi. Badania te mają charakter nowatorski. Wolne rodniki w wyciągu z nasion soi przechowywanym w temperaturach 30, 40 i 50°C oraz w wyciągu poddanym ekspozycji na promieniowanie UV nie były przedmiotem badań innych autorów.

Soja przechowywana w temperaturze 25°C w swojej budowie nie posiadała wolnych rodników, czego dowodem był brak sygnału EPR. W temperaturach 30, 40 i 50°C, które mogą odpowiadać temperaturom utrzymującym się w warunkach przechowywania, obserwujemy powstawanie wolnych rodników (ryc. 3).

Światło dzienne o długości fali 315–400 nm także jest przyczyną pojawiania się w badanych próbkach wolnych rodników. W każdym z wybranych warunków doświadczalnych rejestrowano linię EPR. Potwierdza to teorię generowania wolnych rodników pod wpływem czynników zewnętrznych w różnych rodzajach materiałów [10]. W wyniku ich działania wiązania chemiczne struktury próbki ulegają zerwaniu i w układzie pojawiają się niesparowane elektrony. Ich obecność powoduje wysoką aktywność chemiczną molekuł, które będą dążyć do przyjęcia lub oddania niesparowanego elektronu [10,11]. Jest to wysoce niekorzystne zjawisko, zwłaszcza w przypadku środków stosowanych w terapii medycznej. Przeprowadzono liczne badania potwierdzające obecność wolnych rodników w lekach i środkach leczniczych pochodzenia naturalnego, które pod wpływem wysokiej temperatury czy promieniowania UV zawierają wolne rodniki oraz tracą swoje właściwości antyoksydacyjne [12,13,14,15]. Obecność niesparowanych elektronów w próbce wykrywana jest przez spektrometr EPR, gdyż tylko one pochłaniają dostarczane promieniowanie mikrofalowe, w wyniku zjawiska elektronowego rezonansu paramagnetycznego, skutkiem czego można zarejestrować linię EPR [9]. Spektroskopię EPR wybrano ze względu na możliwość uzyskania bezpośredniej odpowiedzi na pytanie, czy badana próbka zawiera niesparowane elektrony. Metoda ta pozwoliła także na rejestrację zmian absorpcji promieniowania w zależności od zmian warunków temperaturowych czy czasu naświetlania próbek promieniowaniem UV. Otrzymane wyniki badań pozwalają na optymalizację warunków, w jakich należy przechowywać preparaty z nasion soi. Ich lecznicze działanie powinno być zachowane, jeśli nie zmieni się ich struktura, co zapewniają warunki bez dostępu światła oraz temperatura pokojowa (25°C). Zmiana tych parametrów powoduje wzrost koncentracji wolnych rodników, które mogą mieć negatywne działanie na organizm człowieka.

**CONCLUSIONS**

1. The study confirmed that EPR spectroscopy is a highly sensitive method suitable for determining optimal storage conditions for soybean extracts.
2. The use of EPR spectroscopy enabled identification of the optimal storage conditions for soybean extract, i.e. temperature of 25°C and darkness.
3. Free radicals are not present in samples stored at room temperature (25°C) and in darkness. No EPR spectra were recorded for such samples.
4. The study revealed that storage at elevated temperatures (30–50°C) and exposure to UV radiation induces the formation of free radicals in the tested samples ($\sim 10^{19}$ spin/g) for which EPR spectra were recorded. The concentration of free radicals in the tested samples depends on the storage temperature and exposure time to UV radiation.

These studies were financially supported by Medical University of Silesia in Katowice.

WNIOSKI

1. Potwierdzono, że spektroskopię EPR, ze względu na jej czułość, można zaproponować jako technikę przydatną do określenia optymalnych warunków przechowywania wyciągów z nasion soi.
2. Wykorzystanie spektroskopii EPR pozwoliło określić optymalne warunki przechowywania wyciągu z nasion soi, którymi są temperatura przechowywania 25°C oraz brak dostępu światła.
3. Wolne rodniki nie występują w próbkach przechowywanych w temperaturze pokojowej (25°C) i w warunkach braku dostępu do światła. Dla tych próbek nie rejestrowano widm EPR.
4. Wykazano, że przechowywanie w warunkach podwyższonej temperatury (30–50°C) oraz przy dostępie promieniowania UV prowadzi do generowania wolnych rodników ($\sim 10^{19}$ spin/g) w badanych próbkach, dla których rejestrowano widma EPR. Koncentracja wolnych rodników w badanych próbkach zależy od temperatury przechowywania i ekspozycji na promieniowanie UV.

Badania zostały finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

REFERENCES

1. Gonet B. Wolne rodniki i antyoksydanty w zdrowym i chorym organizmie. W: Jaroszyk F. Biofizyka. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2011; s. 810–825.
2. Pawłęga J. Zachorowalność na nowotwory, czynniki ryzyka, nowotwory dziedziczne. W: Pawlicki M. Elementy diagnostyki nowotworów złośliwych. alfa-medica press. Bielsko-Biała 2001, s. 9–15.
3. Spaczyński M. Onkologia ginekologiczna. Urban & Partner. Wrocław 1997, s. 9–16.
4. Nowak A. Nasiona soi zwyczajnej – cenny surowiec dietetyczny i leczniczy. Kosmos Probl. Nauk. Przyr. 2011; 60: 179–187.
5. Majewska M., Czeczot H. Flawonoidy w profilaktyce i terapii. Farm. Pol. 2009; 65: 369–377.
6. Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M. Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu. Bromat. Chem. Toksykol. 2010; 1: 9–14.
7. Kroh J. Wolne rodniki w chemii radiacyjnej. PWN. Warszawa 1967, s. 70–86.
8. Ramos P., Pilawa B., Adamski M. Zastosowanie spektroskopii EPR do badania wolnych rodników generowanych termicznie w drotawerynie. Ann. Acad. Med. Siles. 2014; 68: 28–37.
9. Stankowski J., Hilczer W. Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2005.
10. Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2013.
11. Ramos P., Pilawa B. Application of EPR spectroscopy to examine free radicals evolution during storage of the thermally sterilized Ungentum ophthalmicum. Pharm. Dev. Technol. 2016; 1–4.
12. Jarco S., Pilawa B., Ramos P. Badania metodą EPR oddziaływań ekstraktów z *Matricaria chamomilla*. II Seminarium Naukowe Zielone Idee 21. Wieku. Materiały konferencyjne. Poznań 2015, s. 96.
13. Jarco S., Pilawa B., Ramos P. Wpływ promieniowania UV na właściwości antyoksydacyjne ekstraktu z *Matricaria chamomilla*. II Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESCULAP. Książka Abstraktów. Lublin 2015, s. 129–130.
14. Jarco S., Szymański E., Pilawa B., Ramos P. Badania ziółomiodów z regionu górnośląskiego z zastosowaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego. III Pszczelarska Konferencja Młodych Naukowców. Książka Abstraktów. Zgorzelec 2016, s. 12–13.
15. Jarco S., Szymański E., Pilawa B., Ramos P. Wpływ promieniowania UV na właściwości wolnorodnikowe ziółomiodów z regionu górnośląskiego. III Pszczelarska Konferencja Młodych Naukowców. Książka Abstraktów. Zgorzelec 2016, s. 25–26.