

*Monika Majewska, Hanna Czeczot, Michał Skrzycki, Małgorzata Podsiad*

## AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA FLAWONOIDÓW WOBEC ANIONORODNIKA PONADTLENKOWEGO W UKŁADZIE MODELOWYM *IN VITRO*

Katedra i Zakład Biochemii I Wydziału Lekarskiego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: prof. dr hab. *A. Barańczyk-Kuźma*

*Oznaczono właściwości przeciwutleniające wybranych flawonoidów (flawonoli: kwercetyny, ramnetyny, izoramnetyny i flawonów: apigeniny, luteoliny) wobec anionorodnika ponadtlenkowego w układzie modelowym in vitro. Wykorzystano metody spektrofotometryczne: metodę redukcji NBT (nitro blue tetrazolium) i metodę redukcji INT ((2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyl-tetrazolium chloride).*

Hasła kluczowe: flawonoidy, anionorodnik ponadtlenkowy, właściwości przeciwutleniające.

Key words: flavonoids, superoxide anion radical, antioxidant activity.

Flawonoidy to duża grupa biologicznie aktywnych fitozwiązków o szerokim spektrum biologicznego działania (1, 2). Te naturalnie występujące w roślinach związki wykazują działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, antyagregacyjne, przeciwmiażdżycowe, hipotensyjne, przeciwnowotworowe i inne (3, 4). Ponieważ są one obecne w produktach pochodzenia roślinnego (warzywa np.: cebula, pomidory, papryka; owoce np.: jagody, porzeczki, owoce cytrusowe; a także przyprawy, czerwone wino, herbata, kakao czy czekolada) stanowią ważny element codziennej diety człowieka (5, 6).

Ze względu na powszechność występowania oraz aktywność biologiczną flawonoidy mogą być wykorzystane w profilaktyce i terapii wielu chorób cywilizacyjnych: miażdżycy, cukrzycy, alergii, chorobach neurodegeneracyjnych czy nowotworach (7, 8, 9).

Najważniejsze spośród aktywności biologicznych są ich właściwości przeciwutleniające (10, 11, 12). Flawonoidy jako antyoksydanty mogą działać w różny sposób, między innymi poprzez hamowanie powstawania reaktywnych form tlenu (RFT), chelatowanie oraz redukowanie jonów metali przejściowych, wychwytywanie RFT (anionorodnika ponadtlenkowego, rodników hydroksylowych), wygaszanie tlenu singletowego, przerywanie kaskady reakcji wolnorodnikowych (wychwytywanie rodników lipidowych oraz alkoksylowych) prowadzących do peroksydacji lipidów oraz ochranianie drobnocząsteczkowych antyoksydantów (np.: askorbinianu) (13, 14).

Celem podjętych badań jest określenie zdolności wybranych flawonoidów do unieczynniania anionorodnika ponadtlenkowego – prekursora wszystkich RFT.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły flawonoidy z dwóch klas: flawonole (kwercetyna, ramnetyna, izoramnetyna) i flawony (apigenina, luteolina) różniące się między sobą liczbą grup hydroksylowych. Rozpuszczone w DMSO (dimetylosulfotlenku) związki badano w zakresie stężeń od 0,1 do 50 µg/próbkę. Jako kontroli pozytywnych użyto witaminę C rozpuszczoną w wodzie i syntetyczny analog witaminy E – Trolox (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksyłowy) rozpuszczony w DMSO w tych samych stężeniach co badane związki flawonoidowe.

Właściwości przeciwutleniające badanych flawonoidów określano na podstawie ich zdolności do unieczynnienia/zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego. Do tego celu wykorzystano metodę redukcji NBT (nitro blue tetrazolium) i metodę redukcji INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride). Zasada obu metod polega na określeniu stopnia redukcji błękitu metylotetrazoliowego (metoda redukcji NBT) lub chlorku 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenolo)-5-fenylotetrazoliowego (metoda redukcji INT) do barwnych formazanów przez anionorodnik ponadtlenkowy  $O_2^{\cdot -}$  wytworzony z ksantyny, w reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową.

Aktywność przeciwutleniającą flawonoidów obliczono jako % unieczynnienia / zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego wg wzoru:

$$(\Delta A_{PK} - \Delta A_{PB}) / \Delta A_{PK} \times 100\%$$

$\Delta A_{PK}$  – różnica absorbancji próbki ślepej po 3 min i w czasie 0;

$\Delta A_{PB}$  – różnica absorbancji próbki badanej po 3 min i w czasie 0.

Analizy dla każdego stężenia badanych związków wykonano w trzech powtórzeniach (n = 6). Wyniki przedstawiono jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe (SD) wykonane za pomocą programu Statistica 6.0 programme (StatSoft 6.0).

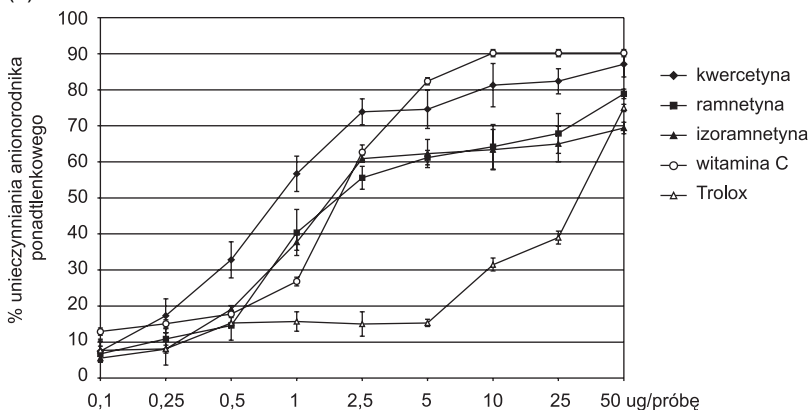
## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Badania zdolności flawonoli do unieczynniania anionorodnika ponadtlenkowego metodą redukcji NBT wykazały, że najwyższą aktywność przeciwutleniającą posiada kwercetyna. Ramnetyna i izoramnetyna odznaczają się podobną siłą unieczynnienia  $O_2^{\cdot -}$ . Wszystkie flawonole wykazują zdecydowanie większą zdolność do zmiatania  $O_2^{\cdot -}$  niż Trolox (analog witaminy E), o czym świadczy wyższy procent unieczynnionego rodnika przez te związki. Flawonole w niższych stężeniach są również silniejszymi przeciwutleniaczami wobec  $O_2^{\cdot -}$  niż witamina C. Witamina C dopiero w wyższym stężeniu od 2,5 do 50 µg/próbkę w stosunku do ramnetyny i izoramnetyny oraz 5–50 µg/próbkę w przypadku kwercetyny ma większą zdolność unieczynnienia anionorodnika ponadtlenkowego niż badane flawonole (ryc. 1A).

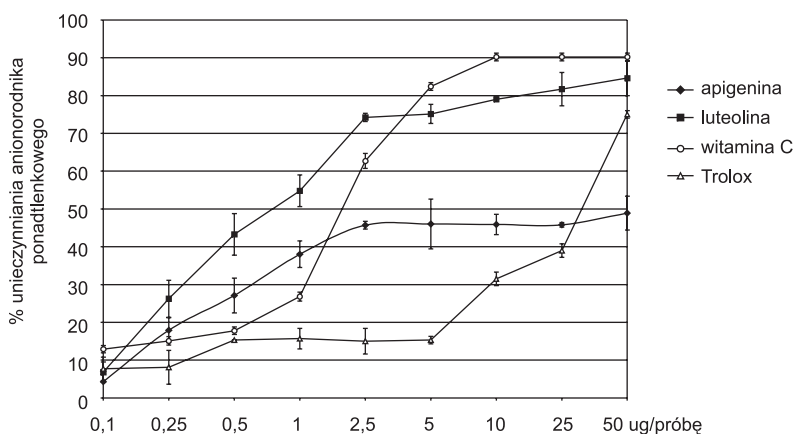
Wśród wszystkich badanych związków można stwierdzić zależność dawka – efekt. Im większa ilość badanego związku tym silniejsze właściwości przeciwutleniające.

Wyniki uzyskane dla flawonów w tej metodzie pozwalają stwierdzić, że luteolina jest silniejszym przeciwutleniaczem niż apigenina. Jej zdolność do unieczynniania anionorodnika ponadtlenkowego jest prawie dwukrotnie wyższa w porównaniu do apigeniny. Właściwości przeciwutleniające luteoliny są zbliżone do witaminy C i kilkakrotnie wyższe od Troloxu. Apigenina ma niższy potencjał antyoksydacyjny niż witamina C, jednak wyższy niż Trolox (ryc. 1B).

(A) Flawonole



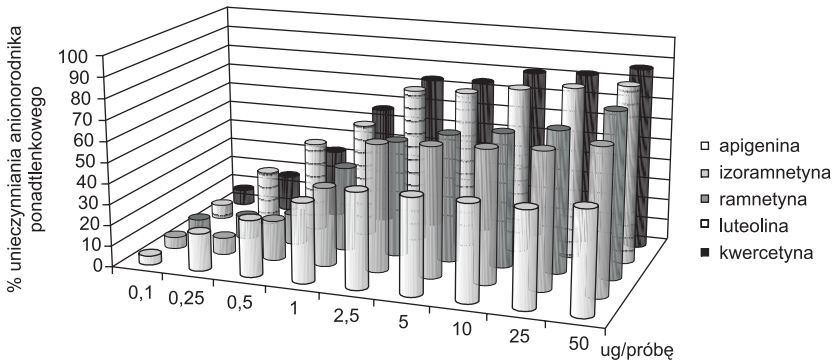
(B) Flawony



Ryc. 1. Zdolność wybranych flawonoli (A) i flawonów (B) do unieczynniania anionorodnika ponadtlenkowego z wykorzystaniem metody redukcji NBT.

Fig. 1. Ability of tested flavonols (A) and flavones (B) to inactivate superoxide radical anion generated in vitro by NBT reduction method.

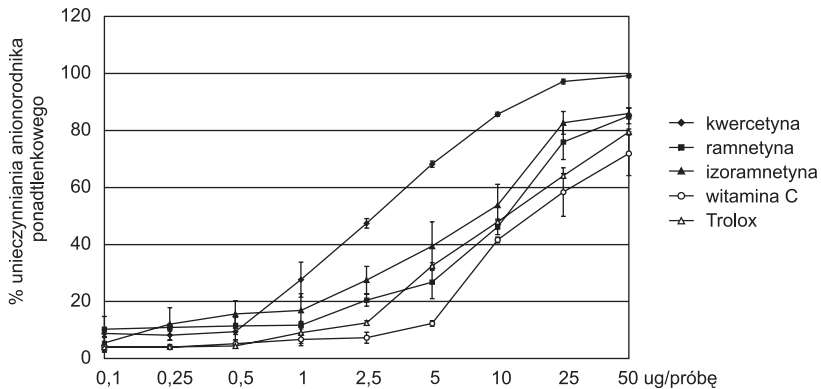
Porównując aktywność przeciwutleniającą wszystkich badanych flawonoidów z oznaczoną metodą redukcji NBT można stwierdzić, że najwyższy potencjał antyoksydacyjny wykazuje kwercetyna i luteolina, w następnej kolejności ramnetyna, izoramnetyna i apigenina (ryc. 2).



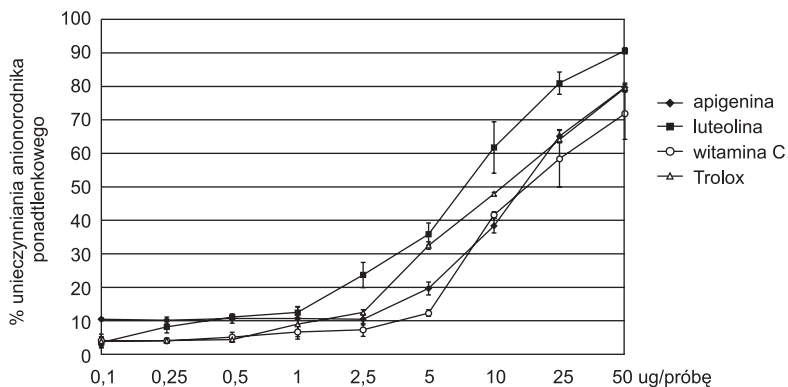
Ryc. 2. Profil aktywności przeciwnadtleńkowej flawonoidów w metodzie redukcji NBT.

Fig. 2. Profile of antiradical activity of flavonoids in NBT reduction method.

(A) Flawonole



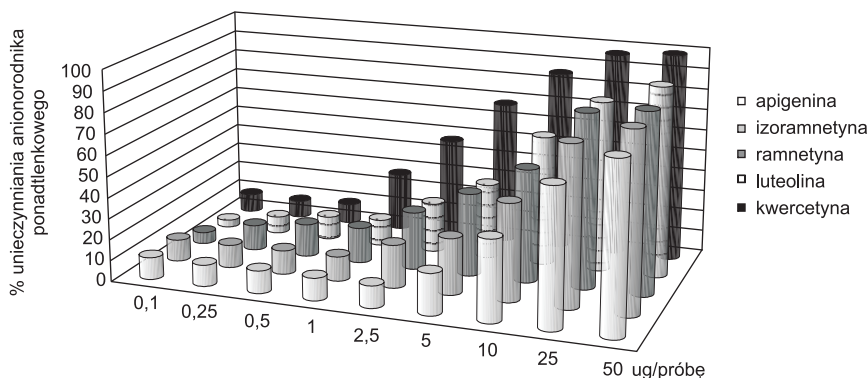
(B) Flawony



Ryc. 3A. Zdolność wybranych flawonoli (A) i flawonów (B) do unieczynniania anionorodnika ponadtleńkowego z wykorzystaniem metody redukcji INT.

Ryc. 3A. Ability of tested flavonols (A) and flavones (B) to inactivate superoxide radical anion generated in vitro by INT reduction method.

Również, wyniki uzyskane dla flawonoli metodą redukcji INT wskazują, że badane związki (kwercetyna, ramnetyna, izoramnetyna) mają zróżnicowaną aktywność przeciwutleniającą wobec anionorodnika ponadtlenkowego. Wraz ze wzrostem stężenia tych związków w próbce rośnie ich aktywność antyoksydacyjna. Wyraźnie zaznaczona jest zależność dawka – efekt. W metodzie tej, podobnie jak w metodzie redukcji NBT najsilniejsze działanie antyoksydacyjne spośród badanych flawonoli wykazuje kwercetyna. Zdolność do unieczynnienia anionorodnika ponadtlenkowego przez izoramnetynę jest nieznacznie wyższa niż ramnetyny. Kwercetyna i izoramnetyna mają większą aktywność przeciwutleniającą wobec  $O_2^{\cdot-}$  niż witamina C i analog syntetyczny witaminy E – Trolox – ryc. 3A. Natomiast zdolność ramnetyny do unieczynnienia  $O_2^{\cdot-}$  (zwłaszcza w wyższych stężeniach (powyżej 1  $\mu\text{g}/\text{próbkę}$ ) jest podobna do Troloxu i większa od witaminy C. W przypadku flawonów, luteolina odznacza się najwyższą aktywnością antyoksydacyjną w porównaniu do apigeniny oraz witaminy C i Troloxu. Zdolność apigeniny do unieczynnienia anionorodnika ponadtlenkowego jest podobna do witaminy C i Troloxu – ryc. 3B. Uzyskane w pracy wyniki wskazują na istnienie różnic w sile unieczynnienia/wymiatania  $O_2^{\cdot-}$  przez badane związki flawonoidowe. Najwyższą aktywność przeciwutleniającą wobec anionorodnika ponadtlenkowego w metodzie INT wykazuje kwercetyna, następnie w kolejności luteolina, izoramnetyna, ramnetyna i apigenina – ryc. 4.



Ryc. 4. Profil aktywności przeciwrodnikowej flawonoidów w metodzie redukcji INT.

Ryc. 4. Profile of antiradical activity of flavonoids in INT reduction method.

Wykazana w obu metodach aktywność przeciwutleniająca badanych flawonoidów wskazuje, że zdolność tych związków do wymiatania anionorodnika ponadtlenkowego jest związana z ich strukturą chemiczną. Według wielu autorów za właściwości antyoksydacyjne flawonoidów odpowiada w strukturze obecność takich elementów, jak podwójne wiązanie w pozycji C-2 i C-3, grupa karbonylowa w pozycji C-4 i grupy hydroksylowe (głównie w pozycjach: C-3, C-5, C-7, C-3', C-4') oraz, że potencjał antyoksydacyjny tych związków zależy od liczby grup hydroksylowych w ich strukturze (im więcej grup hydroksylowych tym większe właściwości przeciwutleniające) (15, 16, 17, 18, 19, 20).

Wszystkie badane w pracy flawonoidy spełniały dwa kryteria odpowiedzialne za właściwości przeciwutleniające (posiadały w budowie chemicznej wiązanie podwójne w pozycji C-2 i C-3 i grupę karbonylową w pozycji C-4), różniły się liczbą i położeniem grup hydroksylowych. Uzyskane wyniki potwierdzają założenie, że im więcej grup hydroksylowych tym większa aktywność antyoksydacyjna. W obu zastosowanych metodach kwercetyna, która posiada o jedną grupę hydroksylową więcej od luteoliny (dodatkowa grupa –OH w pozycji C-3) miała większą zdolność do unieczynniania/wymiatania anionorodnika ponadtlenkowego niż luteolina. Natomiast apigenina pozbawiona dwóch grup hydroksylowych (w pozycji C-3 i C-3') wykazała w obu metodach najniższą aktywność przeciwutleniającą wobec anionorodnika ponadtlenkowego. Zmetylowane pochodne kwercetyny (ramnetyna i izoramnetyna) mają podobne właściwości antyoksydacyjne, ale niższe niż kwercetyna. Ich zdolność do unieczynniania anionorodnika ponadtlenkowego jest jednak wyższa od apigeniny. Może to wskazywać na to, że grupa hydroksylowa w pozycji C-3' jest niezbędna do posiadania silniejszych właściwości antyoksydacyjnych (ryc. 2 i 4).

## WNIOSKI

Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że:

1. Wszystkie badane flawonoidy (kwercetyna, ramnetyna, izoramnetyna, luteolina i apigenina) wykazują właściwości przeciwutleniające wobec anionorodnika ponadtlenkowego.

2. Najwyższą aktywność antyoksydacyjną posiadają w kolejności kwercetyna > luteolina > izoramnetyna > ramnetyna > apigenina.

3. Zróżnicowany potencjał antyoksydacyjny flawonoidów w unieczynnianiu anionorodnika ponadtlenkowego zależy od ich struktury chemicznej. O sile działania antyoksydacyjnego flawonoidów decyduje liczba i położenie grup hydroksylowych oraz obecność grup metoksylowych w cząsteczce.

M. Majewska, H. Czeczot, M. Skrzycki, M. Podsiad

### ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLAVONOIDS AGAINST SUPEROXIDE ANION RADICAL IN THE IN VITRO MODEL SYSTEMS

#### Summary

The aim of this study was to determine the antioxidant activities of selected flavonoids to the superoxide anion radical in *in vitro* model system. Two classes of flavonoids were tested: flavonols (quercetin, rhamnetin, isorhamnetin) and flavones (apigenin, luteolin). The spectrophotometric methods used as a source of superoxide anion radical included: reduction of NBT (nitro blue tetrazolium) and reduction of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride). The results indicate that all studied flavonoids show an antioxidant activity against the superoxide anion radical. The flavonoids in their antioxidant activity depend on the number and the location of their hydroxyl and methoxy groups.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F.*: Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, 1999; 65(4): 337-53. – 2. *Harborne J.B., Williams C.A.*: Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000; 55: 481-504. – 3. *Czeczot H.*: Biological activities of flavonoids – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2000; 9/50(4): 3-13. – 4. *Ostrowska J., Skrzydlewska E.*: Aktywność biologiczna flawonoidów. *Postępy Fitoterapii*, 2005; 16: 3-4. – 5. *Beecher G.R.*: Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature. Occurrence and Intake. *J. Nutr.*, 2003; 133: 3248S-3254S. – 6. *Wiczkowski W., Piskula M.K.*: Food flavonoids. *Pol. J. Food Nutr. Sciences*, 2004; 13(54): 101-114. – 7. *Havsteen B.H.*: The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 2002; 96: 67-202. – 8. *Miller A.L.*: Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alt Med. Rev.*, 1996; 1: 103-111. – 9. *Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R., Krishna D.R.*: Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian. Pharmacol.*, 2001; 33: 2-16. – 10. *Gupta V.K., Kumria R., Garg M., Gupta M.*: Recent updates on free radicals scavenging flavonoids: An overview. *Asian J. Plant. Sci.*, 2010; 9: 108-117.
11. *Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M.G.*: Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994; 116(11): 4846-4851. – 12. *Cotelle N.*: Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2001; 1: 569-590. – 13. *Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A.*: Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001; 74(4): 418-25. – 14. *Pietta P.G.*: Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 2000; 63: 1035-1042. – 15. *Cao G., Sofic E., Perior R.L.*: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radic., Biol. Med.*, 1997; 22: 749-760. – 16. *Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J.*: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 2002; 13(10): 572-584. – 17. *Silva M.M., Santos M.R., Caroco G., Roch R., Justino G., Mira L.*: Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination, *Free Radical Research*, 2002; 36(11): 1219-1222. – 18. *Lemańska K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Zieliński R., Soffers A.E.M.F., Rietjens I.M.C.M.*: The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001; 31(7): 869-881. – 19. *Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.*: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical. Biol. Med.*, 1996; 20(7): 933-956. – 20. *Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K.*: Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 2006; 67: 2058-2070.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.