

*Dorota Kusztal, Cecylia Mielczarek*

## CHELATOWANIE JONÓW ŻELAZA (II) JAKO METODA BADANIA WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNYCH HERBATY\*

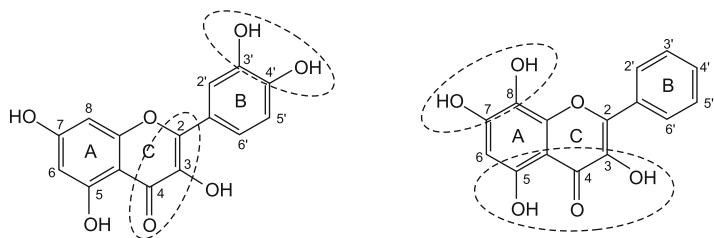
Zakład Chemii Analitycznej Katedra Chemii Medycznej  
Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Kierownik: prof. dr hab. *E. Brzezińska*

*Celem pracy było badanie wyciągów z zielonej herbaty (EHZ) otrzymanych na bazie 50% i 80% roztworu 1,2-propanodiolu w wodzie w różnych temperaturach i różnych czasach prowadzenia ekstrakcji. Właściwości antyoksydacyjne otrzymanych ekstraktów badano spektrofotometrycznie wykorzystujących zdolność do chelatowania jonów żelaza(II). Na podstawie otrzymanych wyników określono jak skład rozpuszczalnika, czas i temperatura ekstrakcji mają wpływ na zdolność ekstraktów herbaty do chelatowania żelaza.*

Hasła kluczowe: zielona herbata, właściwości przeciwutleniające (antyoksydacyjne), chelatowanie żelaza (II).

Key words: green tea, antioxidant properties, chelating of iron,

Składnikami herbaty odpowiadającymi za działanie antyoksydacyjne są flawonoidy. Właściwości antyoksydacyjne są ściśle związane z budową chemiczną polifenoli. Jakościowe (SAR) i ilościowe (QSAR) badania zależności pomiędzy strukturą i aktywnością dokładnie określają, które fragmenty cząsteczki flawonoidów mają znaczenie dla działania przeciwutleniającego. Aktywność antyoksydacyjna flawonoidów zależy od liczby i miejsca podstawienia grup –OH w pierścieniu A i B ( ryc. 1 i tab. I) (1, 2).



Ryc. 1. Elementy struktury flawonoidów wpływające na aktywność antyoksydacyjną (1).

Fig. 1. Elements of flavonoid structure responsible for the antioxidant activity.

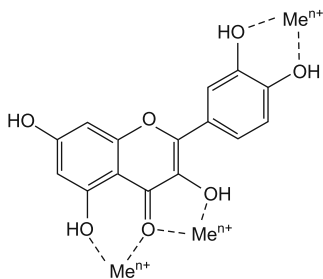
\* Pracę wykonano w ramach badań statutowych UM w Łodzi 503/3-016-03/503-01

Tabela 1. Zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna flawonoidów (1, 2)

Table 1. The relationship between the structure and antioxidant activity of flavonoids

Element budowy chemicznej flawonoidów	Skutek dla aktywności antyoksydacyjnej
Podstawnik 3',4'-diOH w pierścieniu B	Nadaje wysoką stabilność flawonoidowych fenoksylowych rodników na drodze zetknięcia z wodorem lub wzmożonej delokalizacji elektronu
Brak podstawnika 3',4'-diOH w pierścieniu B	Podstawniki – OH w pierścieniu A (struktura katecholu) mogą rekompensować ten brak i powodować większą zdolność przeciwrodnikową
Wiązanie podwójne C2-C3 (sprężenie z podstawnikiem karbonylowym)	Zwiększa aktywność wymiatającą poprzez delokalizację elektronów z pierścienia B
Podstawnik –OH w pozycji C3, C5 i C7	Zapewnia wysoką aktywność wymiatającą

Flawonoidy herbaty i ich metabolity mogą redukować stres oksydacyjny na drodze kilku mechanizmów, które zależą od ich struktury chemicznej. Jednym z mechanizmów jest chelatowanie jonów metali (np. żelaza lub miedzi). W normalnych warunkach żelazo jest transportowane i magazynowane przez specyficzne białka (transferyna, ferrytyna). Zapobiega to reakcji wolnych jonów żelaza z reaktywnymi formami tlenu (ROS) (3). Jony żelaza uczestnicząc w reakcji *Fentona* generują  $\bullet\text{OH}$ . Te z kolei łatwo reagują z lipidami powodując ich peroksydację. Może to być jedną z przyczyn rozwoju wielu chorób sercowo-naczyniowych. Dlatego też, istotne jest poszukiwanie substancji posiadających zdolność chelatowania jonów metali (4).



Ryc. 2. Miejsca kompleksowania jonów metali w cząsteczce flawonoidu (1).

Fig. 2. Metal ion complexing loci in flavonoid molecule.

O-3',4'-diOH w pierścieniu B, grupy –OH w pozycjach C3 i C5 oraz grupa karbonylowa (5) (ryc. 2). Dowiedziono, że związki kompleksujące są skutecznymi antyoksydantami, ponieważ redukują potencjał red-oks i tym samym stabilizują utlenioną formę jonu metalu (6). Utlenianie galusanu epigallokatechiny (EGCG) w środowisku jelita cienkiego prowadzi do powstania produktów dimerycznych. Związki te wykazują znaczną aktywność chelatowania jonów żelaza (7).

## MATERIAŁY I METODY

Ekstrakty z zielonej herbaty wykonano zgodnie z przepisami podanymi w literaturze (8).

W pracy zastosowano 1,2-propanodiol jako rozpuszczalnik w stęż. 50% i 80% (roztwory wodne, v/v). Dla każdego stężenia rozpuszczalnika ekstrakcję prowadzono

w dwóch temp.:  $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (temperatura pokojowa) i  $60 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . W każdej temperaturze ekstrakcja prowadzona była w czterech różnych czasach ekstrakcji (tab. II).

Tab e l a II. Zestawienie warunków ekstrakcji zielonej herbaty stosowanych w pracy

Tab l e II. Conditions of green tea extraction used in the experiment

Surowiec roślinny	Rodzaj rozpuszczalnika	Stężenie rozpuszczalnika	Temperatura ekstrakcji	Czas ekstrakcji w min
„Herbaty z daleka” – Zielona herbata z Azji Południowej	1,2-propanodiol	50% (roztwór wodny, v/v)	24°C	15; 30; 60; 120
			60°C	15; 30; 60; 120
		80% (roztwór wodny, v/v)	24°C	15; 30; 60; 120
			60°C	15; 30; 60; 120

W kolbie okrągłodennej umieszczano 5 g sproszkowanej zielonej herbaty i zalewano  $100\text{ cm}^3$  roztworu 1,2-propanodiolu (wodny roztwór, v/v). Ekstrakcje prowadzono w określonych temperaturach przez 15, 30, 60 i 120 min. Po zakończeniu ekstrakcji, ciecz sączono przez sączek karbowany do kolby miarowej o poj.  $100\text{ cm}^3$ . Gotowe wyciągi były przechowywane w temp.  $-18 \pm 0,5^\circ\text{C}$  w warunkach ograniczonego dostępu powietrza i światła.

W celu sprawdzenia, czy otrzymane EZH wchodzi w reakcję z jonami  $\text{Fe}^{2+}$  wykonano widma barwnych mieszanin EZH- $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozyna w zakresie UV/VIS z użyciem spektrofotometru UV4 UNICAM, porównując trzy elementy widma:

- absorbancję każdego EZH,
- absorbancję kompleksu  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozyna,
- absorbancję mieszaniny EZH- $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozyna.

Wartością, która odzwierciedlała zdolność chelatowania badanych EZH, była absorbancja barwnego kompleksu  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozyna mierzona przy dł. fali  $\lambda = 564\text{ nm}$  (próbka badana). Próbkę kontrolną stanowiła mieszanina 50% lub 80% glikolu propylenowego, roztworu  $\text{FeCl}_2$  i ferrozyny w odpowiednim stosunku. Pomiar wykonywano w kuwetach o grubości warstwy  $l = 0,2\text{ cm}$ .

Ilości poszczególnych reagentów oraz wartości absorbancji dla poszczególnych próbek przy dł. fali  $\lambda = 564\text{ nm}$  zestawiono w tab. III. Otrzymane widma w zakresie UV/VIS wykorzystano do obliczeń. Przykładowe widma przedstawiono na ryc. 3.

Niższa wartość absorbancji mieszaniny reakcyjnej wskazuje na większą zdolność chelatowania jonów  $\text{Fe}^{2+}$ . Efekt chelatowania żelaza(II) obliczono w procentach wg wzoru:

$$\text{efekt chelatowania (\%)} = \left[ 1 - \frac{A_{\text{próbki badanej}}}{A_{\text{próby kontrolnej}}} \right] \times 100$$

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zdolność chelatowania oznaczano spektrofotometrycznie. Do tego badania wykorzystano roztwory chlorku żelaza(II) i związku o nazwie ferrozyna – znanego z silnych właściwości wiązania jonów  $\text{Fe}^{2+}$ .

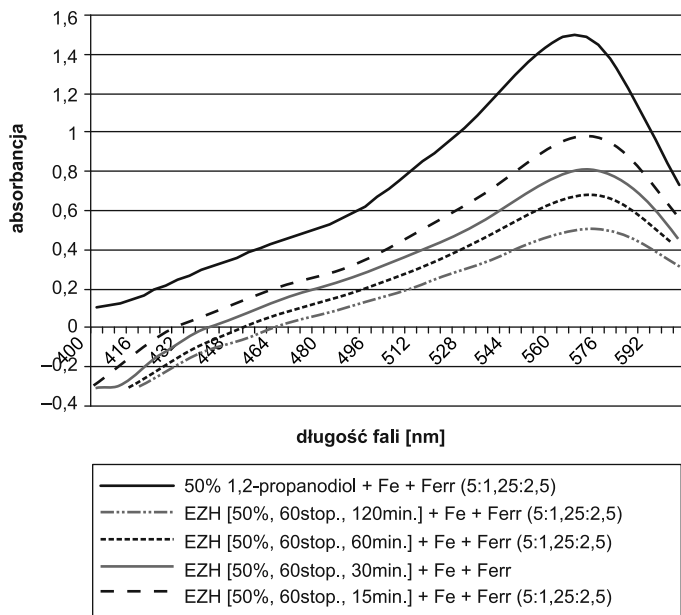
Każdy z badanych EZH (np. 50%, 24°C, 15, 30, 60 i 120 min.) w ilości po 5 cm<sup>3</sup> zmieszano z 1,0 cm<sup>3</sup> roztworu FeCl<sub>2</sub> o stęż. 2 mmol/dm<sup>3</sup> i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie do każdej z czterech próbek dodano po 2,0 cm<sup>3</sup> roztworu ferrozyny o stężeniu 5 mmol/dm<sup>3</sup>, mieszaninę reakcyjną zmieszano i pozostawiono na 10 min w temperaturze pokojowej.

Tab e l a III. Dane do obliczenia właściwości chelatujących badanych EZH

Tab l e III. Data for calculating the chelating activity of examined green tea extracts

Rodzaj ekstraktu	Stosunek EZH:Fe <sup>2+</sup> : ferrozyna	Absorbancja próbki badanej przy dł. fali $\lambda = 564\text{nm}$	Absorbancja próby kontrolnej przy dł. fali $\lambda = 564\text{nm}$
EZH (50%, 24°C, 15 min)	5,0 : 1,0 : 2,0	0,811	1,324
EZH (50%, 24°C, 30 min)		0,615	
EZH (50%, 24°C, 60 min)		0,618	
EZH (50%, 24°C, 120 min)		0,450	
EZH (50%, 60°C, 15 min)	5,0 : 1,25 : 2,5	0,981	1,499
EZH (50%, 60°C, 30 min)		0,806	
EZH (50%, 60°C, 60 min)		0,678	
EZH (50%, 60°C, 120 min)		0,502	
EZH (80%, 24°C, 15 min)	5,0 : 0,5 : 1,0	0,435	0,746
EZH (80%, 24°C, 30 min)		0,404	
EZH (80%, 24°C, 60 min)		0,397	
EZH (80%, 24°C, 120 min)		0,315	
EZH (80%, 60°C, 15 min)	5,0 : 1,0 : 2,0	1,088	1,324
EZH (80%, 60°C, 30 min)		0,968	
EZH (80%, 60°C, 60 min)		0,633	
EZH (80%, 60°C, 120 min)		0,456	

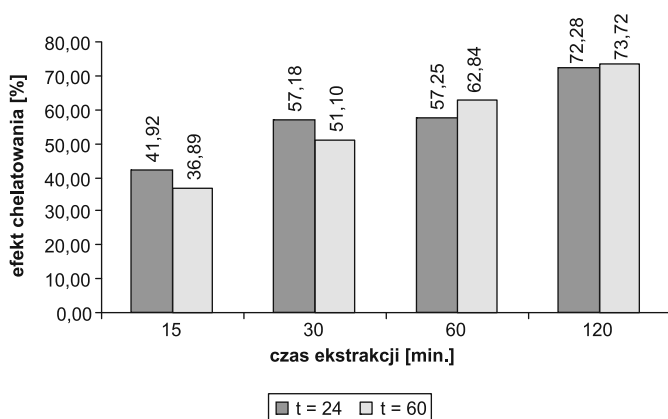
Przykładowe spektrofotometryczne wyniki przedstawiono poniżej.



Ryc. 3. Zestawienie widm mieszanin EZH (50%, 60°C) + Fe + Ferr (5:1,25:2,5)  $\lambda = 564$  nm.

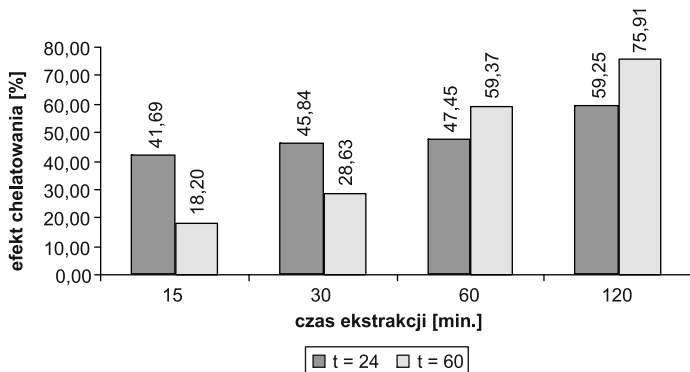
Fig. 3. Spectra of green tea extract mixtures (50%, 60°C) + Fe + Ferr (5:1,25:2,5)  $\lambda = 564$  nm.

Efekty chelatowania badanych EZH przedstawiono graficznie na wykresach. Zebrano osobno dane dla różnych stężeń rozpuszczalnika. Porównano efekt chelatowania dla 50% i 80% rozpuszczalnika w zależności od czasów i temperatury ekstrakowania zielonej herbaty (ryc. 4 i 5).



Ryc. 4. Porównanie efektów chelatowania EZH wykonanych z 50% 1,2-propanodiolu w dwóch temp.: 24°C i 60°C.

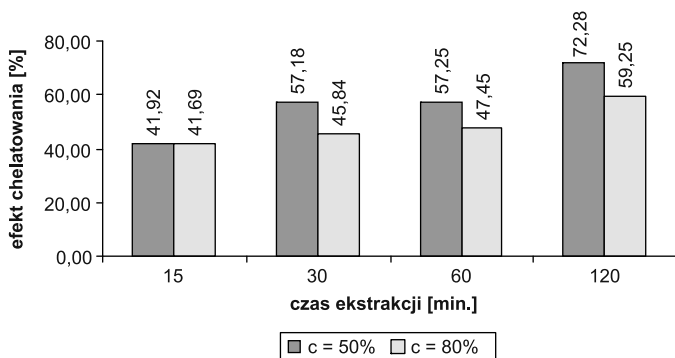
Fig. 4. Chelating of green tea extracts prepared from 50% 1,2-propanediol at two temperatures: 24°C and 60°C.



Ryc. 5. Porównanie efektów chelatowania EZH wykonanych z 80% 1,2-propanodiolu w dwóch temp.: 24°C i 60°C.

Fig. 5. Chelating of green tea extracts prepared from 80% 1,2-propanediol at two temperatures: 24°C and 60°C.

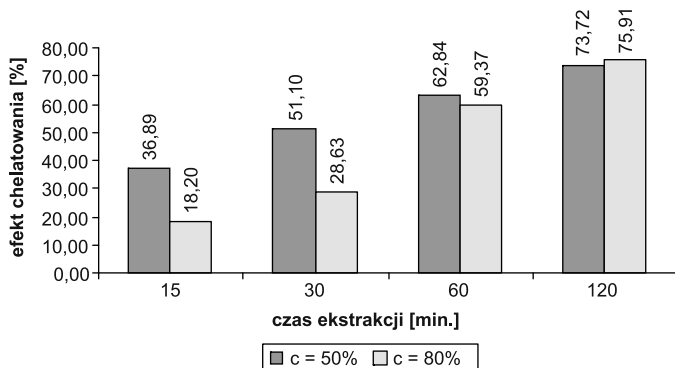
Porównano również zdolność chelatowania EZH wykonanych z rozpuszczalników o różnych stężeniach w odpowiednich temp. – w temperaturze pokojowej i w 60°C (ryc. 6 i 7).



Ryc. 6. Porównanie efektów chelatowania EZH wykonanych z 50% i 80% 1,2-propanodiolu w temp. 24°C.

Fig. 6. Chelating of green tea extracts prepared from 80% 1,2-propanediol at two temperatures: 24°C and 60°C.

Oznaczenie zdolności chelatowania EZH polegało na pomiarze ilości jonów  $\text{Fe}^{2+}$  związanych przez nie. Jony  $\text{Fe}(\text{II})$  nie związane przez ekstrakt zielonej herbaty, wychwytywane były przez ferrozynę. Wartością, która odzwierciedlała zdolność chelatowania jonów żelaza(II) przez EZH była absorbancja barwnego kompleksu  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozyna. Im mniejsza absorbancja kompleksu, tym większa zdolność chelatowania jonów żelaza(II) przez EZH, a tym samym większe właściwości antyoksydacyjne wyciągów.



Ryc. 7. Porównanie efektów chelatowania EZH wykonanych z 50% i 80% 1,2-propanodiolu w temp. 60°C.

Fig. 7. Chelating of green tea extracts prepared from 50% and 80% 1,2-propanediol at 60°C.

Najniższą zdolność chelatowania wykazywał EZH (80%, 60°C, 15 min.); natomiast największą – EZH (80%, 60°C, 120 min.).

Z badań wynika, że zdolność chelatowania EZH jest proporcjonalna do czasu prowadzenia ekstrakcji – jest ona najmniejsza w najkrótszych czasach (15 i 30 min) i największa w najdłuższych czasach (60 i 120 min). Jest to widoczne zarówno w przypadku EZH (50%, 24°C lub 60°C), jak i EZH (80%, 24°C lub 60°C).

Z analizy wpływu temperatury ekstrakcji na efekt chelatowania otrzymanych wyciągów wynika, że ekstrakcja prowadzona w temp. 60°C jest tym większa im dłuższy czas ekstrakcji: (60 i 120 min) i skutkuje otrzymaniem wyciągów o wyższej zdolności chelatowania. Zależność ta jest właściwa dla obu stężeń rozpuszczalnika. Natomiast ekstrakty wykonywane w temperaturze pokojowej wykazują większą zdolność chelatowania w krótkich czasach ekstrakcji (15 i 30 min).

Biorąc pod uwagę wpływ stężenia rozpuszczalnika na efektywność ekstrakcji i zdolność chelatowania stwierdzić można, że większa zawartość wody sprzyja ekstrakcji składników odpowiedzialnych za właściwości antyoksydacyjne wyciągów z zielonej herbaty. Oznacza to, że EZH (50%, 24°C lub 60°C) posiadają większą zdolność chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  niż EZH (80%, 24°C lub 60°C).

Wyniki otrzymane w pracy pokrywają się z danymi zamieszczonymi w piśmiennictwie, gdzie badano wpływ kilku rozpuszczalników, temperatury i czasu ekstrakcji na efekt chelatowania wyciągów z zielonej herbaty (8). Zdolności chelatowania otrzymanych EZH (80%, 24°C) jest mniejsza niż wyciągów na bazie 80% acetonu. Jednakże znacznie przewyższają zdolności wyciągów etanolowych czy metanolowych.

Porównując wartości efektów chelatowania wyciągów otrzymanych w pracy z danymi literaturowymi (8) można ocenić, że mieszanina 1,2-propanodiolu z wodą stanowi jeden z lepszych rozpuszczalników do ekstrakcji flawonoidów z zielonej herbaty. Dodać należy, że 1,2-propanediol, w porównaniu z acetonem, nie jest klasyfikowany jako substancja niebezpieczna.

D. Kusztal, C. Mielczarek

CHELATION OF IRON IONS (II) AS THE METHOD FOR TESTING  
OF THE ANTIOXIDANT PROPERTIES

Summary

The aim of this work was to test extracts obtained from green tea using 50% and 80% solutions of 1,2-propanediol in water at different temperatures and times of extraction. Antioxidant properties of the resultant extracts were checked by spectrophotometry through testing their ability to chelate iron ions. The results show that solvent composition, extraction time and temperature affect the ability of the tea extracts to chelate iron.

PIŚMIENNICTWO

1. *Amič D., Davidović-Amič D., Belo D., Rastija V., Luič B., Trinajstić N.*: SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr Med. Chem.*, 2007; 14: 827-845. – 2. *Middleton E. Jr, Kandaswami C., Theoharides T.C.*: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 2000; 52: 673-751. – 3. *Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M.*: Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*, 1997; 416: 123-129. – 4. *Frei B., Higdon J.V.*: Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: evidence from animal studies. *J. Nutr.* 2003; 133: 3275-3284. – 5. *Higdon V.J., Frei B.*: Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003; 43: 89-143. – 6. *Erba D., Risa P., Kolombo A., Testolin G.*: Supplementation of Jurkat T cells with green tea extract decreases oxidative damage due to iron treatment. *J. Nutr.*, 1999; 129: 2130-2134. – 7. *Spencer J.P.E.*: Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.*, 2003; 133: 3255S-3261S. – 8. *Drużyńska B., Stepniewska A., Wołosiak R.*: The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Sci. Pol., Techno. Aliment.*, 2007; 6: 27-36.

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