Különböző teák alumíniumtartalmának vizsgálata

Fogarasi Erzsébet¹, Fülöp Ibolya^{1*}, Berecz Zsuzsa¹, Márton Kincső², Croitoru Mircea Dumitru¹

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Toxikológia és biofarmácia tanszék, Marosvásárhely, Románia

²"Bolyai Farkas" Elméleti Líceum, X. B. természettudományok-intenzív angol osztály, Marosvásárhely, Románia

AUTHOR AFFILIATION

¹University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Tîrgu Mureş, Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology and Biopharmacy, Târgu Mureş, Romania

²Theoretical Lyceum "Bolyai Farkas", X.B. class Natural science and intensiv English, Târgu Mureş, Romania

CORRESPONDING AUTHOR

Fülöp Ibolya

University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Tîrgu Mureş, Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology and Biopharmacy Gheorghe Marinescu, 38, Târgu Mureş, 540139, Romania
fulop.ibolya@umftgm.ro vagy fulopibolya@yahoo.com

ARTICLE HISTORY

Received: 27-Feb-2019

Accepted: 2-Apr-2019

DOI: 10.2478/orvtudert-2019-0003

Aluminium contamination of several types of tea

ABSTRACT

Introduction: Camellia sinensis, a widely used plant, optimally grows in a low pH soil that in most cases contains high amounts of aluminum. Objectives: The aluminum content of the tea obtained from Camellia sinensis and other plants was compared. The influence of pH on the aluminum content of the tea was also measured. Materials and methods: The aluminum content of 48 samples was measured using a colorimetric method. The method is based on the ability of aluminum to form a stable complex with xylenol orange at low pH; this complex has an absorption maximum of 555 nm. Results: The method was validated for tea obtained with water and for tea obtained with water containing citric acid. The method proved linear over the range of 0.7 – 7 µg/ml, coefficient of variation ranged between 2.6 – 7.68% (was dependent on the pH of the solution used to obtain the tea), accuracy was suitable for quantitative measurement (92.39-102.92%) and the complex proved to be stable for at least 1 hour. The following concentrations were measured: green tea (1.59 - 7.70 µg/ml), black tea (1.39 - 5.60 µg/ml), fruit tea (1.01 - 5.63 µg/ml) and herbal tea (1.03 - 5.24 µg/ml). Conclusion: The method proved useful and easily applicable for screening aluminum content of plants used for tea brewing. Camellia sinensis both green and black types had significantly higher aluminum contents than other type of teas. Adding citric acid, as would result from use of lemon juice, significantly increased the aluminum extraction from the plants used for tea brewing.

Keywords: tea, aluminum, colorimetric method, citric acid

KIVONAT

Bevezető: Közismert tény, hogy a Camellia sinensis optimális növekedéséhez savas talajra van szükség, amely legtöbb esetben magas alumíniumtartalommal rendelkezik. Célkitűzés: Munkánk célja a teafa leveléből, illetve más növényből készült tea alumínium tartalmának összehasonlítása. Ugyanakkor vizsgálni szeretnénk citromsav hiányában, illetve jelenlétében elkészített teák alumíniumtartalmának változásait. Anyag és módszer: 48 tea alumínium-tartalmát vizsgáltuk spektrofotometriás módszer segítségével. Savas közegben az Al³⁺ xilenolnarancs (XO) jelenlétében egy stabil Al³⁺-XO komplexet képez, amely abszorbancia maximuma 555 nm. Eredmények: A módszer validálását elvégeztük mind citromsavat nem tartalmazó, mind citromsavat tartalmazó próbák esetében is. A módszer linearitási tartománya 0,7 – 7 µg/ml, precizitása 2,6 – 7,68%, illetve pontossága 92,39 – 102,92% volt. Az Al³⁺-XO komplex stabilnak bizonyult 1 órán keresztül. A vizsgált teák alumíniumtartalma a következő értékek között volt – zöldtea: 1,59 - 7,70 µg/ml,

feketetea: 1,39 - 5,60 µg/ml, gyümölcstea: 1,01 - 5,63 µg/ml, gyógynövénytea: 1,03 - 5,24 µg/ml. Következtetés: Jelen spektrofotometriás módszer alkalmazható az alumínium teákból való meghatározására. *Camellia sinensis*-ből készült teák (zöld, illetve feketetea) szignifikánsan nagyobb Al^{3+} tar-

talommal rendelkeznek, mint a gyümölcs, illetve gyógynövényekből készült teák. A citromsav szignifikánsan megnöveli a Al^{3+} teákba való kioldódását

Kulcsszavak: tea, alumínium, spektrofotometria, citromsav

Bevezető

A tea világszerte az egyik legkedveltebb, alkoholt nem tartalmazó ital. A legrégebbi időktől fennmaradt receptek *Camellia sinensis*-t használva állították elő ezt a közkedvelt italt. Napjainkban gyógynövényeket, illetve szárított gyümölcsöket is felhasználnak különböző ízű és hatású teák előállítására.

A termőtalaj, illetve a felszíni vizek folyamatos elvasodása maga után vonta az alumínium szint fokozatos emelkedését ezeken a helyeken [1]. Az emelkedett alumíniumszint mind a növényi, mind az állati vagy emberi szervezetre negatív hatással van. A káros hatásokhoz vezető mechanizmusok a Ca^{2+} jelzési útvonal gátlása, valamint reaktív oxigén vegyület termelése. Ezen negatív hatások következményei lehetnek a gyökérzet gátolt növekedése (növények) vagy neurodegeneratív betegségek megjelenése (emberek) [2,3,4].

A talajban az alumínium $AlFx$ formában van jelen, amely alacsony pH mellett Al^{3+} -ra és F^- -ra bomlik. Az Al^{3+} a teafa gyökérzetének felszínén található foszfát csoportokkal szerkezetileg semleges molekulát hozhat létre ($AlPx$), amely legtöbbször passzív transzporttal szívódik fel. A gyökér szintjén található almasav az alumíniumot megkötve a fiatal levelekhez szállítja azt. Fölös alumínium mennyiség esetén, az Al^{3+} szerves savakkal, illetve polifenolokkal stabil komplexet képezve az idősebb levelekben raktározódik [4].

Emberek esetében az alumínium szájon keresztül felszívódása kismértékű, ami függ az egyéntől, illetve az alumíniumot tartalmazó vegyület kémiai szerkezetétől. Több irodalmi adat is rámutatott arra, hogy citromsav jelenlétében növekedhet az abszorbeálódott alumínium-mennyiség [5]. Néhány kutatási eredmény azt is igazolta, hogy a citromsav segíti az alumínium vér-agy gáton való átjutását, ami neurodegeneratív betegségek, illetve az Alzheimer-kór megjelenéséhez vezethet [6,7,8].

Toxikus hatásai miatt több törvényi előírás is létezik az alumínium napi bevitele, illetve a víz és táplálékok alumínium-tartalmára vonatkozóan. Ezek a szabályzatok előírják, hogy az ivóvíz maximális alumínium tartalma 0,2 mg/l lehet, míg a napi bevétel egy felnőtt számára maximum 5 mg lehet (WHO, 1997) [9]. Az Európai

Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) legújabb (2008) szabályzata szerint a heti alumínium bevitel nem haladhatja meg az 1 mg/ttkg/hét, ami magába foglalja az ivóvízből, élelmiszerekből, környezetből emberi szervezetbe kerülő összalumínium-mennyiséget [10].

Célkitűzés

Jelen munkánk célkitűzése a kereskedelembe megvásárolható teák alumíniumtartalmának vizsgálata egy egyszerű spektrofotometriás módszer segítségével. Ugyanakkor, mivel az alacsony pH érték elősegítheti az Al^{3+} tea-füvekből történő kioldódását, illetve az emberi szervezetben való felszívódását, vizsgálni akartuk a savas közeg hatását az elkészített teák alumínium tartalmára.

Anyag és módszer

Méréseinket a szakirodalomban ismert spektrofotometriás módszer alapján végeztük [11], kis változtatásokkal. Általunk hozott újítás a módszer fontosabb validálási paramétereinek ellenőrzése.

A meghatározás alapelve, hogy a xilenolnarancs Al^{3+} -ionokkal, glutamát puffer oldat (pH=3) jelenlétében, vörös színű komplexet képez, amelynek 555 nm-en abszorpciós csúcsa van.

Eszközök és reagensok: Specord 210 spektrofotométer (Analytik Jena, Németország), analitikai mérleg (AB54S, Mettler-Toledo, Svájc), digitális pH-mérő (MP225, Mettler-Toledo, Svájc), $AlCl_3 \cdot 12 H_2O$ (Merck, Németország), glutamát sav (Merck, Németország), xilenolnarancs (XO) (Merck, Németország), citromsav (Chimopar, Bukarest), kénsav (Merck, Németország), tisztított víz (Millipore Direct-QTM S), 48 féle filteres vagy ömlesztett tea (17 zöldtea, 14 feketetea, 10 gyógynövénytea: a.) homoktövis, b.) menta-1, c.) menta-2, d.) menta-3, e.) citromfű-1, f.) citromfű-2, g.) csipkebogyó, h.) orbáncfű, i.) körömvirág, j.) menta-zsálya-kamilla-kakukkfű-bodza, 7 gyümölcstea: a.) alma-fekete ribizli-kivi-citrusfélék, b.) eper, c.) alma-fahéj, d.) eper-málna, e.) barack-mangó-1, f.) barack-mangó-2, g.) eper-kivi).

1. táblázat. Módszer validálási paraméterei

Koncentráció ($\mu\text{g/ml}$)	Precizitás (RSD %)		Pontosság (visszanyerhetőség %)	
	Citromsav nélkül	Citromsavval	Citromsav nélkül	Citromsavval
1	3,92	2,60	92,39	96,58
3	5,38	3,21	95,18	91,05
7	7,68	3,16	102,92	101,46

Oldatok elkészítése: az 50 mM-os, pH=3 glutamát puffer oldat pH-ját híg H_2SO_4 segítségével állítottuk be. A 0,42 mM-os XO oldatot tisztított vízzel készítettük el. A $20 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$ standard oldat elkészítésénél tisztított vizet használtunk, éppúgy, mint a minták elkészítésénél.

Próbák elkészítése: a vizsgált tea 5 g-ját mozsárban homogenizáltuk, majd ebből 1 g-t felhasználva 250 ml forrásban lévő tisztított vízzel infúziót készítettünk (10 perc áztatási idő), majd szűrőpapíron átszűrtük. A citromsav jelenlétében készített tea esetén, 250 ml próbához 2 g citromsavat adtunk (kb. $\frac{1}{2}$ citromban található citromsav mennyiségnek felel meg), majd 10 perc áztatás után szűrtük, éppúgy, mint első esetben. Az így elkészített próbákat -20°C -on tároltuk a mérés időpontjáig.

Reakcióelegy elkészítése: 1 ml próbához 3 ml 50 mM-os glutamát puffer oldatot (pH=3), illetve 1 ml 0,42 mM-os XO oldatot adunk. Az így nyert reakcióelegyet 2 percig forrásban lévő vízfürdőn melegítettük, majd 30 perc szobahőmérsékleten való hűtés után 555 nm-en olvastuk le az oldat abszorbanciáját. Mindenik próba esetén készítettünk egy kontroll mintát, amely 1 ml tea próbát, 1 ml tisztított vizet, illetve 3 ml 50 mM-os glutamát puffer tartalmazott, amely oldat abszorbanciáját levontuk a próba esetén mért abszorbanciából. Minden esetben (vizsgált minta illetve kontrol minta) az abszorbanciát a vak mintával (1 ml tisztított víz, 3 ml glutamát puffer és 1 ml XO) szemben olvastuk le.

Kalibrációs görbe elkészítése: $20 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{ml}$ standard oldatból különböző mennyiségeket (8,75 – 12,5 – 25 – 37,5 – 62,5 – 87,5 ml/250 ml tisztított víz) adtunk a kimért teafüvekhez, majd a korábban leírt recept alapján elkészítettük a próbákat (1 g teafű/250 ml), így végül a próbák Al^{3+} koncentrációja 0,7 – 1 – 2 – 3 – 5 – 7 $\mu\text{g/ml}$ volt.

Eredmények

Módszer validálási paramétereinek ellenőrzése

A módszer linearitását 0,7 – 7 $\mu\text{g/ml}$ értékek között vizsgáltuk, minden próba háromszoros elkészítésével. Citromsav nélkül, illetve citromsav jelenlétében a korrelációs koeficiens (R^2) 0,9942, illetve 0,9946 volt. A relatív standard deviációk (RSD%) 1,01 – 2,36% között voltak.

Három különböző koncentráción vizsgáltuk a módszer precizitását illetve pontosságát (százalékos visszanyerhetőség). Mind a citromsav nélküli, mind a citromsavval készített próbáknál az oldatokat ötszöri ismétléssel állítottuk elő. A validálási paramétereket a 1. táblázat tartalmazza.

Az Al^{3+} -XO komplex stabilitásának vizsgálata érdekében 1 órán keresztül követtük az abszorbancia változást 3 különböző koncentráció esetében. Az 1. és 2. ábra ezeket az időbeli változásokat mutatja, mindkét esetben.

Teák vizsgálata

Minden esetben meghatároztuk a teák pH értékét, amelyek 3,27 – 6,29 között mozogtak.

A teák alumíniumtartalmának meghatározása az „Anyag és módszer” fejezetben leírtak szerint történt.

1. ábra. Al^{3+} -XO komplex stabilitásának vizsgálata citromsav nélkül

2. ábra. Al³⁺-XO komplex stabilitásának vizsgálata citromsav jelenlétében

GraphPad Prism 5 software programot használva, egyoldali, páros t-tesztet alkalmazva, szignifikánsan nagyobb értékeket mértünk a zöld, illetve a feketeteák esetében, a gyümölcs-, illetve a gyógynövényteákhoz képest (3. és 4. ábra.).

A citromsav jelenlétében elkészített teák alumínium-tartalma szignifikánsan nagyobb értékeket mutatott, mint ugyanabból a teából, de citromsav nélkül elkészített próbáké.

Megbeszélés

A módszer validálását elvégeztük mind citromsav nélkül, mind pedig citromsav jelenlétében. Erre azért volt szükség, mert a XO sav-bázis indikátorként is működhet. Így

3. ábra. Különböző típusú teák alumínium tartalma

4. ábra. Citromsav hiányában, illetve jelenlétében elkészített teák alumínium tartalma

ki tudtuk zárni annak lehetőségét, hogy a különböző pH értékek befolyásolják méréseinket, illetve az abból levont következtetéseket.

A teáknak színük van. Főleg a gyümölcsteák tartalmazhatnak olyan színyanyagokat (antocianinokat vagy más polifenolokat) amelyek fényt nyelnek el 555 nm-en. Ezért minden próbának elkészítettük a XO-t nem tartalmazó párját, aminek abszorbanciáját levontuk a vizsgált minta abszorbanciájából, így kizárva a tea színéből adódó hibalehetőséget.

Az Al³⁺-XO komplex stabilitásának vizsgálatára azért volt szükség, mert méréseink során abszorbanciaváltozást észleltünk ugyanazon minta többszöri lemerése esetén. Követve az abszorbanciaváltozást 60 percen keresztül, az abszorbancia ingadozás 15-20 percig volt számottevő, utána a fényelnyelés érték állandó maradt. Ez alátámasztotta a szakirodalomban is megtalálható ajánlást, hogy az abszorbancia leolvasása 30 perc után kell történjen [11].

Az elkészített teák savasságát megvizsgálva a legtöbb próba pH értéke 5,00 – 5,87 között volt. Kivételt képeztek ez alól a gyümölcsteák és a homoktövis tea, amelyek pH-ja a 3,28 – 3,29 között volt. Ugyanakkor, magas pH értékeket (6,04 – 6,29) mutattak a mentából, illetve citromfűből készült próbák.

A teák alumíniumtartalmának meghatározásából kapott eredmények megegyeznek a szakirodalomban találtakal [12]. A *Camellia sinensis*-ből készült infúziókból szignifikánsan nagyobb mennyiségű alumínium mutatható ki mint más termékekből. Ez magyarázható azzal a ténnyel, hogy mivel a teafa főleg savas táptalajban életképes, nagy a valószínűsége, hogy ilyen körülmények között már eleve a termőföldben nagyobb az alumínium-

tartalom. Ugyanakkor születtek olyan elméletek is, hogy maga a *Camellia sinensis* hordja magában azt a tulajdonságot, hogy alumíniumot képes felhalmozni főleg idősebb leveleiben. Mindkét állítás elfogadható magyarázat a zöld, illetve feketeteák magasabb alumíniumtartalmára.

A természetben leggyakrabban előforduló alumínium vegyületek (Al_2O_3 , illetve $\text{Al}(\text{OH})_3$) vízben gyakorlatilag oldhatatlanok. A citromsav jelenlétében keletkezett alumínium-citrát az egyik legnagyobb oldékonysággal rendelkező alumínium vegyület. Ezzel magyarázható a citromsavval készített teák magasabb alumínium tartalma [13,14,15]. Kísérleti állatokon végzett tanulmányok bebizonyították, hogy 100 mg alumínium /ttkg Al-citrát formájában adagolva, jóval nagyobb alumínium koncentrációt hoz létre az agykéreg szintjén, mint az $\text{Al}(\text{OH})_3$ formában adott, ugyanolyan mennyiségű alumínium. Az Al-citrát a vér-agy gát szintjén specifikus transzporter rendszereken keresztül juthat be [8,16]. Tehát a citromsav nem csak az alumínium tealevelekből való kioldódását segíti elő, hanem ugyanakkor a központi idegrendszerben való bejutását is fokozhatja [8].

Következtetés

Az általunk használt spektrofotometriás módszer paramétereinek ellenőrzése során bebizonyosodott, hogy a jelen módszer használható mind a savas mind a sav nélkül elkészített teák alumíniumtartalmának meghatározására. A módszer specificitását nem sikerült leellenőriznünk, mivel nem állt rendelkezésünkre, más, szelektívebb alumínium meghatározására alkalmas módszer. Mivel a XO más fémekkel is reagálhat (pl.: Fe, Cd, Zn), lehetséges hogy kapott eredményeinket többé kevésbé befolyásolta más fémek jelenléte. Ugyanakkor, adataink megegyeznek a szakirodalomban előforduló számértékekkel, ebből következtethetünk arra a tényre, hogy a módszer más fémekkel való interferálása minimális volt. Az Al^{3+} -XO komplex vizsgálata kimutatta, hogy az illető komplex mennyiségét az első 60 percben megőrzi. A vizsgált zöld, illetve feketeteák szignifikánsan nagyobb mennyiségű alumíniumot tartalmaztak, mint a gyümölcs-, illetve gyógynövényteák. Ugyanakkor, egyértelművé vált, hogy a citromsav nagymértékben megnöveli az alumínium kioldódását a teákból, nagyobb koncentrációkat eredményezve a citromsavval vagy citrommal készített teákban.

Köszönetnyilvánítás

Jelen munkát támogatta az Erdélyi Múzeum-Egyesület Orvos- és Gyógyszerésztudományi Szakosztálya és a Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kara, a 20.4/2018/P.2/EMEÖGYSZ iktatószámú pályázaton keresztül.

Irodalom

1. Gruba J, Mulder B. Relationship between Aluminum in Soils and Soil Water in Mineral Horizons of a Range of Acid Forest Soils. *Soil Sci Soc Am J.* 2008;72:1150-1157
2. Rengel Z, Zhang WH. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium toxicity syndrome. *New Phytol.* 2003;159:295-314
3. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Chem.* 2002;91:9-18
4. Wong MH, Fung KF, Carr HP. Aluminium and fluoride contents of tea, with emphasis on brick tea and their health implications. *Tox Lett.* 2003;137:111-120
5. Wu X, Li J, Hu JN, Deng ZY. The effects of glutamate and citrate on absorption and distribution of aluminum in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2012;148(1):83-90
6. Slanina P, Falkeborn Y, Frech W, Cedergren A. Aluminium concentrations in the brain and bone of rats fed citric acid, aluminium citrate or aluminium hydroxide. *Food Chem Toxicol.* 1984;22:391-397
7. Flaten TP. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res Bull.* 2001;55(2):187-96
8. Wang L. Entry and Deposit of Aluminum in the Brain. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1091:39-51
9. World Health Organization. Environmental Health Criteria 194. In: Aluminium. Geneva, 1997, 136. Elérhető: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc194.htm>
10. European Food Safety Authority. Safety of aluminium from dietary intake. *The EFSA Journal* 754, 1-34, 2008. Elérhető: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2008.754>
11. Carpani I, Scavetta E, Tonelli D. Spectrophotometric determination of aluminium and nickel. *Annali di Chimica.* 2004;94(5):365-372
12. Carr HP, Lombi E, Küpper H, McGrath SP, Wong MH. Accumulation and distribution of aluminium and other elements in tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Agronomie* 2003;23:705-710
13. PubChem. Aluminu. Elérhető: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/aluminum#section=Top>
14. PubChem. Aluminu citrate. Elérhető: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aluminium%20citrate#section=Top>
15. Princeton University, Ceramic materials laboratory. Research: Aluminum Solubility in the Presence of Citric Acid. Elérhető: https://www.princeton.edu/~cml/html/research/aluminum_remediation.html
16. Rengel Z. Aluminium cycling in the soil-plant-animal-human continuum. *Biometals.* 2004 Dec;17(6):669-89