

ANALÝZA ANTIOXIDAČNEJ AKTIVITY POLYFENOLOVÝCH ZLÚČENÍN LIŠAJNÍKOV A PEČEŇOVIEK METÓDOU CHROMATOGRAFIE NA TENKEJ VRSTVE S DETEKCIOU 2,2-DIFENYL-1-PIKRYLHYDRAZYLOM

SAMUEL VARÉNYI, SOŇA CHRENOVÁ
a MILOŠ LUKÁČ

*Katedra chemickej teórie liečiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava
lukac@fpharm.uniba.sk*

Došlo 19.3.18, prepracované 14.9.18, prijaté 16.9.18.

Kľúčové slová: antioxidačná aktivita, flavonoidy, lišajníkové kyseliny, marchantín, metóda TLC-DPPH

Úvod

Polyfenolové zlúčeniny sú rastlinné sekundárne metabolity s významnými biologickými účinkami. Jedným z nich je aj ochranná funkcia. Polyfenoly chránia rastliny pred infekciami, škodcami, chladom, mechanickým poškodením, ale aj vplyvom reaktívnych foriem kyslíka (dusíka). Tým, že hydroxylová skupina interaguje s π -elektrónmi benzénového kruhu, sú takéto zlúčeniny schopné eliminovať negatívny vplyv chemicky reaktívnych molekúl, ako sú singletový kyslík, hydroxylový radikál, superoxid, peroxidy a i., a tak pôsobiť ako antioxidanty. Tento proces je v biologických systémoch veľmi dôležitý, keďže v nich dochádza k neustálej tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (dusíka), ktoré ich ohrozujú^{1,2}.

V lišajníkoch (trieda Lecanoromycetes) sú polyfenolové zlúčeniny najčastejšími sekundárnymi metabolitmi. Obr. 1 ilustruje, že ide o rôznorodú skupinu zlúčenín reprezentovanú depsidmi, depsidónmi, dibenzofuránmi alebo antrachinónmi³. Podobne ako pri lišajníkoch, tak aj pri pečeňovkách (oddelenie *Marchantiophyta*) je variabilita polyfenolových zlúčenín veľká. Sú reprezentované dihydrostilbenoidmi a ich dimérnymi makrocyclickými derivátmi, C-glykozylovanými flavanónmi alebo flavonoidmi (obr. 1)⁴.

Najčastejšie sa antiradikálová aktivita polyfenolových zlúčenín nachádzajúcich v lišajníkoch a pečeňovkách stanovuje s použitím 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH). Metóda stanovenia je založená na reakcii radikálu so zlúčeninou, ktorá je schopná prijať radikál. V prípade polyfenolových zlúčenín je to schopnosť odovzdať vodík z hydroxylovej skupiny. DPPH prijatím vodíka stráca svo-

je fialové zafarbenie a mení sa na žltozafarbený 1,1-difenylypikrylhydrazín. Miera farebnej zmeny sa najčastejšie stanovuje spektrofotometricky. Na to aby bolo možné stanoviť hodnotu antioxidačnej aktivity konkrétnej zlúčeniny, je ju potrebné izolovať. Potrebu separácie zlúčenín možno vyriešiť chromatografickými metódami. Preto boli vyvinuté analýzy antioxidačnej aktivity metódami HPLC-DPPH (vysokoučinná kvapalinová chromatografia – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) alebo TLC-DPPH (chromatografia na tenkej vrstve – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). TLC-DPPH metóda je veľmi rýchla a nenáročná⁵. Prvýkrát bola použitá na analýzu antioxidačnej aktivity lišajníkových extraktov autormi Batharrai a spol⁶. TLC-platne boli však vyvíjané v elučných zmesiach neumožňujúcich analýzu antioxidačnej aktivity konkrétnych lišajníkových kyselín.

Cieľom tejto práce bolo vyvinutie TLC-DPPH metódy použiteľnej na analýzu antioxidačnej aktivity polyfenolových zlúčenín nachádzajúcich sa v lišajníkoch a pečeňovkách. Metódy, ktorá umožňuje rýchly a finančne nenáročný skríning rôznorodej skupiny zlúčenín obsiahnutých v stielkach týchto organizmov. Zároveň táto metóda bola modifikovaná do tej miery, aby bola použiteľná aj vo vyučovacom procese na stredných školách.

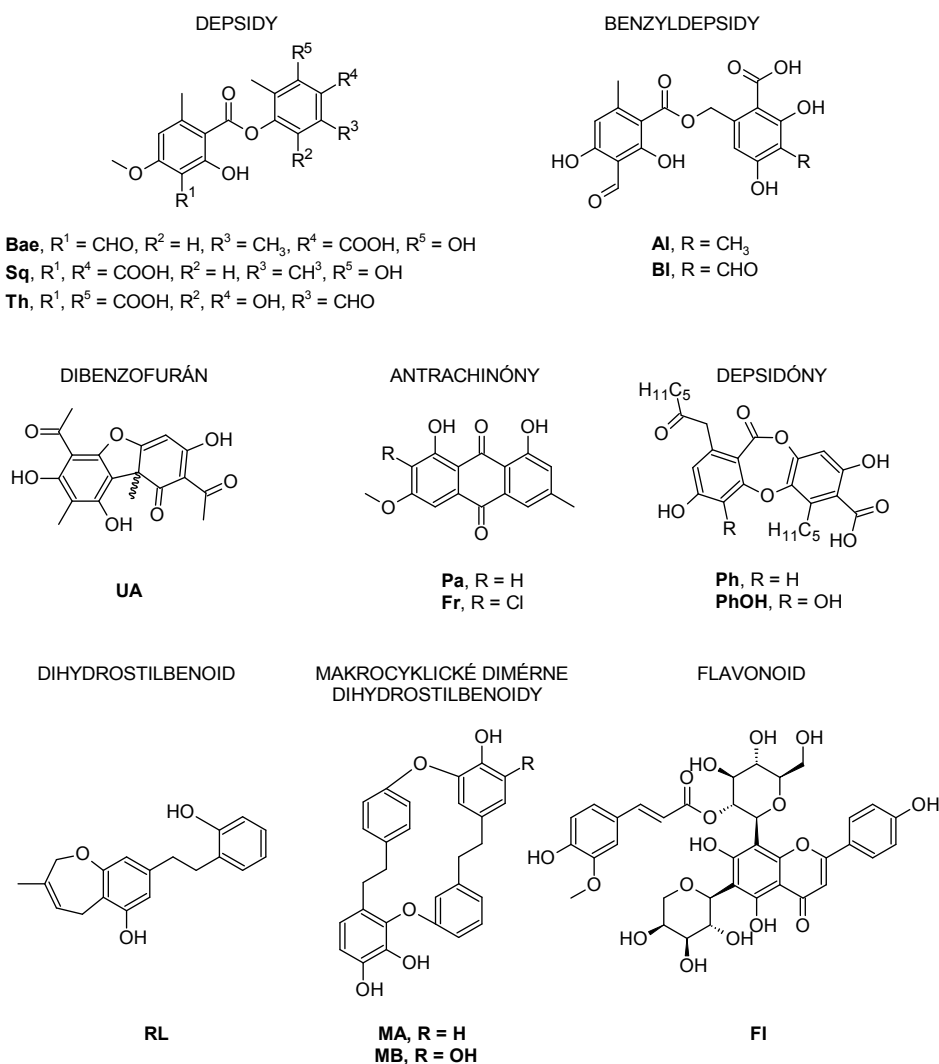
Experimentálna časť

Použité chemikálie a materiál

Všetky použité rozpúšťadlá boli čistoty p.a. okrem 96% denaturovaného etanolu. V experimentoch boli použité nasledovné organické kyseliny: kyselina mravčia (99,7%, Lachema), řadová kyselina octová (99,7%, CentralChem). Ako štandardy boli použité: rutin (Chemapol), kyselina (+)-usnová (98%, Sigma-Aldrich). Zoznam použitých lišajníkov a pečeňoviek a v nich obsiahnutých sekundárných metabolitoch a ich skratiek uvádzajú tabuľky I a II. Pečeňovky a lišajníky boli zbierané a určené posledným autorom podľa kľúčov^{7–9} a literatúry^{10,11}. Marchantíny A a B boli z *Marchantia polymorpha* extrahované metanolom a následne izolované podľa literatúry¹². Na chromatografiu boli použité: TLC Silica gel 60 F₂₅₄, DC-Alufolien Cellulose, DC-Alufolien Polyamid 11 F 254 a filtračný papier PN – 80 g m⁻², Papírna Perštejn s.r.o. Na izoláciu marchantínov boli použité stacionárne fázy: Silica gel 60 (0,040–0,063 mm, 230–400 mesh ASTM) pre kolónovú chromatografiu (Merck) a Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich).

TLC experimenty

Prítomnosť lišajníkových kyselín bola určená štandardizovanou TLC metódou^{3,13}. Polyfenolové zlúčeniny pečeňoviek boli charakterizované na silikagelových TLC platniach¹⁴ a celulózoých TLC platniach¹⁵. Antioxidačná aktivita polyfenolových zlúčenín bola analyzovaná za podmienok: TLC1: silikagel – benzén : dioxán : kyselina octová (180 : 45 : 5, v/v/v; 230 ml)¹³; TLC2: silikagel – hexán :



Obr. 1. Príklady niektorých polyfenolových zlúčenín nachádzajúcich sa v lišajníkoch a pečienkách. Al – kyselina alektorialová, Bae – kyselina baeomycézová, Bl – kyselina barbatolová, FI – ferulylizoschaftozid, Fr – fragilín, MA – marchantín A, MB – marchantín B, Pa – parietín, Ph – kyselina fyzódová, PhOH – kyselina 3-hydroxyfyzódová, RL – radulanín L, Sq – kyselina skavamatová, Th – kyselina tamnolová, UA – kyselina usnová

etyl-acetát (40 : 10, v/v; 50 ml)¹⁴; TLC3: silikagel – petrol-éter : acetón (30 : 20, v/v; 50 ml); TLC4: silikagel – etyl-acetát : kyselina mravčia : kyselina octová : voda (100 : 11 : 11 : 26, v/v/v/v; 148 ml); TLC5: celulóza – butanol : kyselina octová : voda (40 : 10 : 50, v/v/v; 100 ml – horná vrstva)¹⁵; TLC6: celulóza – kyselina octová : voda (40 : 60, v/v; 100 ml); TLC7: polyamid 11 – metanol : voda (80 : 20, v/v; 100 ml). Extrakcia zlúčenín nachádzajúcich sa v lišajníkoch resp. pečienkách bola uskutočnená acetónom resp. metanolom pri laboratórnej teplote. Pomer rozpúšťadla ku stielke bol 20 : 1 (μl : mg). Po vyvinutí a osušení TLC platní bola detekcia uskutočnená postrekom 0,05% metanolovým roztokom DPPH. Intenzita škvŕn na TLC platniach bola pozorovaná 10 min po nanosení detekčného činidla.

Analýza antioxidačnej aktivity marchantínov a flavonoidov na filtračnom papieri

Asi 25 μl 80% vodno-etanolového (denaturovaný 96% etanol) roztoku extraktu *Marchantia polymorpha* (50 mg stielky sa cez noc macerovo v 2 ml etanolového roztoku) sa nanieslo na prúžok (4 × 14 cm) filtračného papiera 2 cm od spodného okraja a prúžok sa horným okrajom lepiacou páskou nalepil na Petriho misku. TLC platňa sa nechala vyvíjať vo vyvíjacej komore (kadička prikrytá Petriho miskou) 1 h. Ako elučná zmes sa použil 15% roztok kyseliny octovej vo vode (kyselina octová – voda 7,5 : 50, v/v; 50 ml). Po vybratí chromatogramu a jeho osušení sa detegoval 0,05% roztokom DPPH v denaturovanom 96% etanole.

Výsledky a diskusia

Antioxidačnú aktivitu lišajníkov a pečeňoviek sme analyzovali metódou TLC-DPPH. V experimentoch sme použili acetónové (lišajníky) alebo metanolové (pečeňovky) extrakty stielok. Relatívnu antioxidačnú aktivitu sme určili voči izolovanému marchantínu A a mieru antioxidačnej aktivity sme určili na základe intenzity farebných zmien podľa Batharrai a spol⁶. Ich označenie je uvedené v tab. I a II. Takémuto skúmaniu sme podrobili desať lišajníkov a päť pečeňoviek. Výber druhov bol založený na prítomnosti obsahových látok. Všetky skúmané druhy sa vyznačujú prítomnosťou polyfenolových zlúčenín, pri ktorých sa dá predpokladať antioxidačnú aktivitu. Výsledky aktivít zhŕňajú tab. I a II.

Zo skúmaných desiatich lišajníkov a v nich 20 obsiahnutých polyfenoloch sa ako antioxidačne účinné ukázali byť kyseliny 3-hydroxypyrozóvová (*H. physodes*), alektoriová (*B. capillaris*), barbatolová (*B. capillaris*) a tamnolová (*U. subfloridana*). Ostatné lišajníkové polyfenolové zlúčeniny možno považovať za antioxidačne veľmi slabo účinné alebo neúčinné. Ich nízka aktivita je pravdepodobne spôsobená prítomnosťou silných intramolekulových vodíkových väzieb. Hydroxylové skupiny potom len obmedzene interagujú s radikálom DPPH. Najvyššia aktivita kyseliny 3-hydroxypyrozóvej je sprostredkovaná prítomnosťou dvoch hydroxylových skupín na jednom

z fenylových jadier vo vzájomnej polohe 3 a 4 (obr. 1). Antioxidačné aktivity benzyldepsidov a kyseliny tamnolovej, aj keď nižšej v porovnaní s kyselinou 3-hydroxypyrozóvou, možno pripísať na vrub prítomnosti 2,6-di-hydroxybenzaldehydovému skeletu (obr. 1).

Metóda TLC-DPPH bola použitá aj na analýzu antioxidačnej aktivity polyfenolových zlúčenín obsiahnutých v pečeňovkách. Pre tieto stielkaté organizmy nie sú vyvinuté štandardizované metódy na detekciu polyfenolových zlúčenín, preto sme uskutočnili niekoľko TLC experimentov s použitím elučných zmesí pre menej polárne dihydrostilbenoidy a makrocyclické dimérne dihydrostilbenoidy (TLC2, TLC3) a polárne flavonoidy (TLC4–TLC7). Okrem TLC platní so silikagelovou stacionárnou fázou (TLC2–TLC4) sme v týchto experimentoch použili aj celulózoové (TLC5, TLC6) a polyamidové TLC platne (TLC7).

Najvyššia antioxidačná aktivita bola zaznamenaná pre polyfenolové zlúčeniny nachádzajúce sa v *Marchantia polymorpha*. Išlo o marchantín A a flavonoidy s apigenínovým alebo luteolínovým aglykónom¹⁶. V porastnici sa nám okrem MA a flavonoidov podarilo identifikovať aj MB. Izolovaný MB mal porovnateľnú antioxidačnú aktivitu ako MA. V prípade extraktu zo stielky sa jeho antioxidačná aktivita prejavila len veľmi slabo. Bolo to spôsobené jeho nízkym obsahom v stielke. V porovnaní s MA sa vyskytoval asi v 45 násobne nižšej

Tabuľka I

Retenčné faktory a miera antioxidačnej aktivity polyfenolových zlúčenín nachádzajúcich sa v acetónových extraktoch lišajníkov

Druh	Polyfenolové zlúčeniny (TLC1)
<i>Fulgensia fulgens</i>	0,80#; 0,74# (Pa, Fr); 0,62#, 0,51#
<i>Xanthoria parietina</i>	0,80#; 0,74# (Pa)
<i>Bryoria capillaris</i>	0,55*; 0,48** (Al); 0,15** (Bl); 0*
<i>Bryoria vrangiana</i>	0,74# (At); 0,37* (Gy)
<i>Thamnotia vermicularis</i> subsp. <i>subuliformis</i>	0,49*(Bae); 0,2* (Sq); 0**
<i>Hypogymnia physodes</i>	0,74* (At, CAAt); 0,44* (Ph); 0,32**** (PhOH); 0,23# (PhCHO); 0,05# (Pr); 0**
<i>Alectoria sarmentosa</i>	0,71# (UA); 0,46* (Alt)
<i>Usnea subfloridana</i>	0,71# (UA); 0,09*** (Th)
<i>Usnea rubicunda</i>	0,49# (Nr); 0,18* (Sa); 0*
<i>Usnea flamma</i>	0,71# (UA); 0,49# (Nr); 0,42# (St); 0,35# (Lo); 0,24# (CrSt); 0,10# (CSt)
Štandardy	0,71# (UA); 0,56**** (MA)

* – veľmi slabá antioxidačná aktivita, ** – slabá antioxidačná aktivita, *** – stredne silná antioxidačná aktivita, **** – silná antioxidačná aktivita, # – antioxidačná aktivita nebola pozorovaná, Al – kyselina alektoriová, At – atranorín, Bae – kyselina baeomycézová, Bl – kyselina barbatolová, CAAt – chlóratanorín, CrSt – kyselina kryptostyktová, CSt – kyselina konstiktová, Fr – fragilin, Gy – kyselina gyroforová, Lo – kyselina lobarová, MA – marchantín A, Nr – kyselina norstiktová, Pa – parietín, Ph – kyselina fyzódová, PhCHO – kyselina fyzodalová, PhOH – kyselina 3-hydroxypyrozóvová, Pr – kyselina protocetrarová, Sq – kyselina skvamatová, St – kyselina stiktová, UA – kyselina usnová, Th – kyselina tamnolová

Tabuľka II

Retenčné faktory a miera antioxidantnej aktivity polyfenolových zlúčenín nachádzajúcich sa v metanolových extraktoch pečeňoviek

Druh	TLC2	TLC3	TLC4
<i>Marchantia polymorpha</i>	0,29*; 0,07***** (MA + MB); 0*****	0,93*; 0,69***** (MA); 0,37*(MB); 0*****	1**** (MA + MB); 0,42*****
<i>Marchantia quadrata</i>	0,29**; 0,26*; 0**	0,93**; 0**	1***
<i>Radula complanata</i>	0,47**; 0,17*; 0,11**; 0**	1**, 0,96**; 0,92*; 0*	–
<i>Metzgeria furcata</i>	0**	0**	–
<i>Metzgeria conjugata</i>	0***	0***	0,26**; 1**
Štandardy	0***** (MA)	0,69***** (MA)	1**** (MA); 0,36 (Ru)

* – veľmi slabá antioxidantná aktivita, ** – slabá antioxidantná aktivita, *** – stredne silná antioxidantná aktivita, **** – silná antioxidantná aktivita, MA – marchantín A, MB – marchantín B, Ru – rutín

koncentrácií.

Zaujímavú antioxidantnú aktivitu ešte vykazovala *Metzgeria conjugata*, pre ktorú je charakteristický výskyt feruloylizoschaftozidu (obr. 1), C-glykozylovaného flavanónu¹⁷.

Metóda analýzy antioxidantnej aktivity polyfenolových zlúčenín metódou TLC-DPPH je aplikovateľná aj na papierovú chromatografiu. Použitím obyčajného filtračného papiera ako stacionárnej fázy a 15% roztoku kyseliny octovej ako mobilnej fázy možno veľmi jednoduchým a lacným spôsobom oddeliť marchantíny ($R_f = 0,07$) od flavonoidov ($R_f = 0,75$). Ich aktivita je následne analyzovaná detekciou roztokom DPPH. Táto metóda môže byť použiteľná aj v stredoškolskom vyučovacom procese v predmetoch chémia alebo biológia. Jednoduchým spôsobom demonštruje prítomnosť antioxidantných zlúčenín v machoraste porastníci mnohotvarej a zároveň je názornou ukážkou chromatografických metód. Veľkou výhodou tejto metódy je aj to, že okrem detekčného činidla sú všetky ostatné použité chemikálie netoxické.

Záver

Z výsledkov experimentov vyplýva, že metóda TLC-DPPH je veľmi vhodnou na analýzu antioxidantnej aktivity polyfenolových zlúčenín nachádzajúcich sa v stielkach lišajníkov a pečeňoviek. Táto metóda síce neumožňuje stanoviť presnú hodnotu EC_{50} , ale je veľmi dobrým ukazovateľom antioxidantného potenciálu zlúčenín obsiahnutých v týchto rastlinách. Tým, že sú polyfenoly najprv separované na TLC-platniach, je možné analyzovať účinnosť konkrétnych zlúčenín. V rámci tejto práce sme vyvinuli aj veľmi jednoduchú a lacnú metódu analýzy antioxidantnej aktivity marchantínov a flavonoidov nachádzajúcich sa v *M. polymorpha*. Metóda uskutočnená na filtračnom papieri je použiteľná aj v rámci experimentálnych cvičení na stredných školách.

LITERATÚRA

- Pšeničnaja O., Kotíková Z., Hejtmánková A., Lachman J., Pivec V., Střalková R., Dědina M.: Chem. Listy 111, 381 (2017).
- Fialová S., Rendeková K., Mučaji P., Slobodníková L.: Curr. Org. Chem. 21, 1875 (2017).
- Huneck S., Yoshimura I.: *Identification of Lichen Substances*. SpringerVerlag, Berlin 1996.
- Asakawa Y.: *Phytochemistry* 65, 623 (2004).
- Kedare S. B., Singh R. P.: *J. Food Sci. Technol.* 48, 412 (2011).
- Bhattarai H. D., Paudel B., Hong S. G., Lee H. K., Yim J. H.: *J. Nat. Med.* 62, 481 (2008).
- Černohorský Z., Nadvorník J., Servít M.: *Klíč k určení lišejníků ČSR*. Nakladatelství ČSAV, Praha 1956.
- Randlane T., Tõrra T., Saag A., Saag L.: *Bibl. Lichenol.* 100, 419 (2009).
- Váňa J.: <http://botanika.bf.jcu.cz/bryoweb/klic/klic.html>, stiahnute 10. 3. 2018.
- Clerc P.: *Lichenologist* 38, 191 (2006).
- Velmala S., Myllys L., Goward T., Holien H., Halonen P.: *Ann. Bot. Fennici* 51, 345 (2014).
- Niu C., Qu J. B., Luo H. X.: *Chem. Biodiversity* 3, 34 (2006).
- Culbertson C. F.: *J. Chromatogr.* 72, 113 (1972).
- Asakawa Y., Hashimoto T., Takikawa K., Tori M., Ogawa S.: *Phytochemistry* 30, 235 (1991).
- Theodor R., Zinsmeister H. D., Mues R., Markham K. R.: *Phytochemistry* 19, 1695 (1980).
- Markham K. R., Porter L. J.: *Phytochemistry* 13, 1937 (1974).
- Theodor R., Zinsmeister H. D., Mues R., Markham K. R.: *Phytochemistry* 20, 1851 (1981).

S. Varényi, S. Chrenová, and M. Lukáč
(*Department of Chemical Theory of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava*): **Analysis of Antioxidant Activity of Polyphenolic Compounds of Lichens and Liverworts Using Thin Layer Chromatography with Detection by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl**

This paper deals with the analysis of antioxidant activities of polyphenolic compounds by TLC-DPPH method. Polyphenolic compounds are represented by lichen acids (depsides, benzyldepsides, depsidones, dibenzofuranes and antraquinones) and dihydrostilbenoids, macrocy-

clie dimeric dihydrostilbenoids, flavonoids occurring in liverworts. The highest antioxidant activity was observed in the case of 3-hydroxyphysodic acid from *Hypogymnia physodes*, marchantin A and flavonoids from *Marchantia polymorpha*. The assessment of the TLC-DPPH method shows that it is suitable for an easy and fast analysis of the antioxidant potential of the polyphenolic compounds occurring in the thalus of lichens and liverworts. The filter paper modification of this method is also discussed.

Keywords: antioxidant activity, flavonoids, lichen acids, marchantin, TLC-DPPH method