

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Barbora Jirásková

STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY LIŠEJNÍKŮ

Determination of antioxidant activity of lichens

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....
Barbora Jirásková

Poděkování

Děkuji RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a nebeskou trpělivost, stejně tak celé laboratoři č. 112. Dále bych chtěla zmínit své přátele a rodinu, kteří mi byli oporou a podporou nejen při sepisování této práce, ale i po celou dobu mého studia.

Klíčová slova

lišejníky

antioxidanty

cyklická voltametrie

průtoková injekční analýza

elektroda ze skelného uhlíku

uhlíková pastová elektroda

Folin-Ciocalteu

metoda redukční síly

metoda DPPH

Key words

lichens

antioxidants

cyclic voltammetry

flow injection analysis

glassy carbon electrode

carbon paste electrode

Folin-Ciocalteu

Reducing power method

DPPH method

Abstrakt

V této práci byly studovány antioxidační vlastnosti lišejníků na sedmi zástupcích rodu *Cladonia* metodou DPPH, metodou redukční síly, metodou Folin-Ciocalteu a dvěma elektrochemickými metodami: cyklickou voltametrií a průtokovou injekční analýzou s amperometrickou detekcí.

Obě elektrochemické metody byly prováděny na elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) a na elektrodě z uhlíkové pasty (CPE), FIA i CV byly vyhodnocovány při potenciálu $E = 1,2 \text{ V}$. Elektroda z uhlíkové pasty se ukázala jako nevhodná pro tento typ stanovování, pravděpodobně kvůli blíže nezjistitelným interakcím mezi uhlíkovou pastou a analyzovaným extraktem. Nevhodnost se projevovala převážně na velmi špatné až skoro žádné korelaci s ostatními metodami.

Po vyhodnocení naměřených dat lze usuzovat, že studované lišejníky rodu *Cladonia* skutečně obsahují látky s antioxidačními vlastnostmi, z nichž většina bude pravděpodobně fenolického charakteru.

Abstract

Antioxidant properties were studied on seven members of the Cladonia lichen family using the DPPH method, Reducing Power method, Folin-Ciocalteu method and two electrochemical methods: cyclic voltammetry (CV) and flow injection analysis (FIA) with amperometric detection. Both electrochemical methods were carried out with the use of glassy carbon electrode (GCE) and carbon paste electrode (CPE), FIA and CV were evaluated on the potential of $E = 1,2 \text{ V}$.

The carbon paste electrode turned out not to be ideal for these kinds of measurements, possibly for unknown interactions between the carbon paste and the analysed extract.

The inapplicability of the electrode took shape of low to zero correlation between this and most of the other methods.

Evaluation of the measured data could infer that the studied Cladonia family lichens really contain substances with antioxidant properties, of which the most would probably be of phenolic type.

Seznam použitých zkratek a symbolů

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina
Arb	dutohlávka lesní (<i>Cladonia arbuscula</i>)
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluen
Cil	dutohlávka brvitá (<i>Cladonia ciliata</i>)
CPE	uhlíková pastová elektroda (carbon paste electrode)
CV	cyklická voltametrie (cyclic voltammetry)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E</i>	potenciál
FIA	průtoková injekční analýza (flow injection analysis)
FRAP	(ferric reducing antioxidant power)
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (glassy carbon electrode)
Gra	dutohlávka štíhlá (<i>Cladonia gracilis</i>)
h_p	výška píku
<i>I</i>	proud
Mit	<i>Cladonia mitis</i>
ORAC	(oxygen radical absorbance capacity)
p. a.	pro analýzu (per analysis)
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
R^2	korelační koeficient
Ran	dutohlávka sobí (<i>Cladonia rangiferina</i>)
RP	redukční síla (reducing power)
Sty	dutohlávka temná (<i>Cladonia stygia</i>)
tBHQ	terciární butylhydrochinon

TEAC

(Trolox equivalent antioxidant capacity)

Unc

dutohlávka hvězdovitá(*Cladonia uncialis*)

λ

vlnová délka

Obsah

1	Úvod.....	10
1.1	Cíle práce.....	10
2	Teoretická část.....	11
2.1	Antioxidanty.....	11
2.2	Lišejníky.....	12
2.3	Analytické metody stanovování antioxidační aktivity.....	14
2.3.1	Metody založené na eliminaci radikálů.....	15
2.3.2	Metody založené na zkoumání redoxního potenciálu.....	16
3	Experimentální část.....	18
3.1	Instrumentace.....	18
3.1.1.	Spektrální metody.....	18
3.1.2	Elektrochemické metody.....	18
3.1.3	Další použité vybavení.....	18
3.2	Seznam použitých chemikálií.....	19
3.3	Příprava extraktů.....	19
3.4	Pracovní postupy jednotlivých metod.....	20
3.4.1	Metoda DPPH.....	20
3.4.2	Metoda Folin-Ciocalteu.....	20
3.4.3	Redukční síla.....	21
3.5	Elektrochemické metody.....	21
3.5.1	Příprava pastové elektrody.....	21
3.5.2	Cyklická voltametrie.....	21
3.5.3	Průtoková injekční analýza.....	22
4	Výsledky a diskuse.....	23
4.1	Optimalizace elektrochemických metod.....	23
4.2	Elektrochemické stanovení.....	25
4.3	Porovnání výsledků.....	27
5	Závěr.....	32
6	Seznam použité literatury.....	33

1 Úvod

1.1 Cíle práce

V této práci bylo hlavním cílem vyzkoušet a vzájemně porovnat vybrané metody stanovení antioxidační aktivity extraktů lišejníků. Pro měření bylo vybráno 7 zástupců lišejníků rodu *Cladonia*, a to *C. arbuscula*, *C. ciliata*, *C. gracilis*, *C. mitis*, *C. rangiferina*, *C. stygia* a *C. uncialis*.

Použity budou spektrofotometrické metody, konkrétně metoda DPPH, metoda stanovení redukční síly (RP) a metoda Folin-Ciocalteuova, a metody elektrochemické, jmenovitě cyklická voltametrie a průtoková injekční analýza s amperometrickou detekcí. U obou těchto elektrochemických metod budou použity dvě různé elektrody: elektroda ze skelného uhlíku (GCE) a uhlíková pastová elektroda (CPE).

Získaná data budou statisticky vyhodnocena, aby byla zjištěna vzájemná korelace mezi metodami.

2 Teoretická část

2.1 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které zpomalují nebo zastavují oxidativní procesy, které jsou zapříčiněny přítomností volných radikálů [1]. Běžně se přidávají do potravin a farmaceutických výrobků, převážně pro zamezení nebo zpomalení oxidace těchto výrobků nebo jejich předčasnému rozpadu a rozkladu, při nichž mohou vznikat i nežádoucí látky s možným toxickým či jiným závadným účinkem. U živých organismů mohou volné radikály napadat DNA, proteiny a jinak narušovat správný chod životních procesů buněk. Takto poškozené buňky mohou přerůst v rakovinné bujení, což je také jedním z důvodů, proč se s antioxidanty spojuje i antikarcinogenní působení a dále i protizánětlivé a antibakteriální účinky [2, 3, 4]. V malém množství volné radikály ovšem nepůsobí negativně, naopak napomáhají přirozeným buněčným procesům, jakým je např. fagocytóza nebo správné buněčné signalizace [5]. Antioxidanty se obohacují i krmiva pro zvířata užitková a jateční, jelikož oxidační stres může trvalým poškozením buněk ovlivnit kupříkladu kvalitu masa či mléčných výrobků [6].

Vedle přírodních antioxidantů existují i antioxidanty syntetické, např.: BHT, TBHQ či BHA. Syntetické antioxidanty jsou levnější než přírodní antioxidanty, ovšem mohou mít vedlejší účinky a mohou působit karcinogenně [4,6,7].

Mezi antioxidanty patří látky typu fenolů, fytosterolů, karotenoidů, tokoferoly, tokotrienoly apod. [8]. Fenolické látky jsou coby sekundární metabolity přítomny ve všech rostlinách a zároveň tvoří velký podíl přírodních antioxidantů [1,2].

2.2 Lišejníky

Lišejníky jsou symbiotické organismy sestávající z houby (mykobionta) a fotosyntetického symbionta (fytobionta), jímž jsou nejčastěji zelené řasy nebo cyanobakterie [9]. Lišejníky jsou velmi přizpůsobivé druhy, což dokazuje jejich výskyt ve všech podnebných pásmech. Existují i druhy rostoucí na Antarktidě endoliticky, v tropech na listech rostlin nebo druhy, které je možné nalézt v korytech potoků či přílivových zónách. Ovšem nejčastěji je možné se s lišejníky setkat v mírném a subarktickém pásmu [19-11].

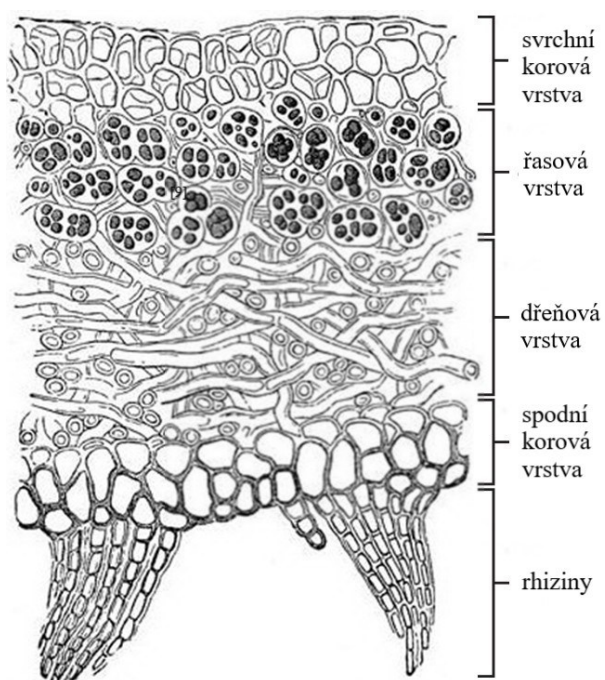
Nejčastěji mají lišejníky tzv. heteromerickou stélku (Obr. 1). K těmto lišejníkům patří i druhy, se kterými bylo zacházeno v této práci.

Na povrchu heteromerické stélky je svrchní korová vrstva sloužící primárně jako ochranná vrstva a k rozmnožování. Následuje řasová vrstva zajišťující fotosyntézu, dřevná vrstva tvořená převážně mykobiontem, která stélce napomáhá zadržovat vodu a konečně spodní korová vrstva s průduchy a s rhiziny, které lišejník ukotvují na místě růstu [10-12].

V řasové a dřevné vrstvě vznikají veškeré metabolické produkty, které se dají rozdělit na hlavní dvě podskupiny, a to intracelulární (primární) metabolity a extracelulární (sekundární) metabolity. Mezi nejčastější primární metabolity patří proteiny, aminokyseliny, polyalkoholy, karotenoidy, polysacharidy a vitaminy, které se vážou na buněčnou stěnu a protoplasty. Tyto látky jsou často rozpustné ve vodě [10].

Oproti tomu sekundární metabolity, kterých je v celkovém počtu látek vytvářených lišejníky většina, jsou vylučovány na povrch buněk, kde krystalizují a kumulují se ve vrstvě svrchní kůry. Tyto látky jsou většinou ve vodě nerozpustné a jsou extrahovatelné jen organickými rozpouštědly. Příkladem sekundárních metabolitů jsou fenolické látky, které mohou mít antibiotické účinky, mohou zastávat funkci, pigmentů, toxinů, inhibitorů enzymů, apod. Kromě fenolických látek lišejníky vytváří kupříkladu látky ze skupiny esterů, terpenů, steroidů či kyselin.

Právě díky obsahu sekundárních metabolitů a jejich antioxidačním a antibakteriálním vlastnostem byly různé druhy lišejníků, jimiž se zabývá i tato práce, v průběhu věků v různých částech světa využívány pro přírodní a lidové léčení [13,14].



Obr. 1 – Řez heteromerickou stélkou. Převzato a upraveno z [12].

2.3 Analytické metody stanovení antioxidační aktivity

Soupis všech analytických metod, včetně jejich vzájemných kombinací, které by se daly použít na stanovení antioxidantů, by měl desítky, ne-li stovky položek. I přesto se dá rozdělit na dvě hlavní podskupiny, a to metody založené na eliminaci radikálů nebo metody studující redoxní potenciál, v nichž se využívá jak chemických, tak elektrochemických reakcí. Další metody zahrnují studium antioxidačních účinků na bakteriální kultuře, nejčastěji na gram-pozitivních bakteriích, např.: *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus*, méně často na gram-negativních bakteriích jako je např.: *Escherichia coli* nebo *Helicobacter pylori* [2,15].

Většina rostlinných antioxidantů je stanovitelná spektrofotometricky, avšak je zde riziko interference s reagenциemi či maskování v případě barevných extraktů. Proto se při spektrofotometrickém stanovení roztok vzorků doplňují látkami pro vytvoření měřitelné barevné změny. [8].

Kromě metod výše zmíněných existují i metody enzymatického charakteru, které jsou vhodnější k použití *in vivo*. Mohou sloužit ke sledování zánětlivých procesů, působení xenobiotik v organismu či jiných, pro organismus většinou zhoubných, procesů.

Takto využívanými enzymy, případně jejich produkty, jsou např. katalasa, lipidperoxidasa nebo glutathionreduktasa. [16]

Metody stanovení *in vivo* většinou spočívají v testování na pokusném zvířeti, tj. králík, myš, potkan apod., které je následně usmrceno, je vyňat příslušný orgán a může být zkoumána požadovaná problematika.

Zde uváděn přehled nečastějších a nejdůležitějších metod:

2.3.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Metoda využívající DPPH

DPPH se využívá z důvodu stability tohoto volného radikálu. Volný elektron je delokalisován po celé struktuře a zároveň nedochází k vytváření dimerů, jako tomu bývá u jiných volných radikálů [1]. Výsledky reakce antioxidantů s DPPH jsou měřeny nejběžněji spektrofotometricky a často vyjadřovány jako ekvivalent např. kyseliny askorbové, gallové nebo jiné kyseliny s antioxidačními vlastnostmi [5,17-19].

Metoda využívající ABTS (Metoda TEAC)

Tato metoda sleduje schopnost studovaných látek zhaset kation-radikál ABTS^{•+}. Jelikož je často tato vlastnost studované látky udávána jako ekvivalent syntetické, antiradikálově působící sloučeniny s názvem Trolox, lze se setkat i s alternativním označením metody, a to *Trolox equivalent antioxidant capacity*, zkráceně TEAC [20]. Trolox je využíván i u jiných metod jako standard [17].

Metoda ORAC

Metoda ORAC sleduje schopnost látky zpomalovat či zastavovat radikálovou reakci s generovanými radikály kyslíku. Úbytek radikálů se sleduje pomocí snížení fluorescence fluoresceinu nebo β -fykoerytrinu. Hodnota absorpční kapacity studované látky se udává v ekvivalentech Troloxu. [20, 21].

2.3.2 Metody založené na zkoumání redoxního potenciálu

Metoda Ferric Reducing-Antioxidant Power (FRAP)

Tato metoda je založena na měření schopnosti antioxidantů při nízkých pH redukovat železité ionty na železnaté. Spektrofotometricky se měří absorbance při $\lambda = 593$ nm. Tato metoda nejčastěji uplatňuje v potravinářském průmyslu [5].

Redukční síla (RP)

Redukční síla látky je sledována měřením absorbance po proběhnutí sledu reakcí, kdy dochází stejně jako u FRAP k redukci železitých iontů, které jsou na počátku v nadbytku, a následně dochází k vytváření spektrofotometricky měřitelného barevného komplexu. Čím vyšší je naměřena absorbance reakční směsi, tím větší redukční sílu studovaná látka má [5].

Cyklická voltametrie

Pomocí cyklické voltametrie, tedy měření závislosti proudu na vkládaném potenciálu, lze sledovat redoxní aktivitu směsi látek. Základní výhodou stanovování pomocí cyklické voltametrie je možnost ovlivnit, jak silné antioxidanty budou ve výsledku zahrnuty, volbou potenciálu, do kterého je křivka měřena [22].

Průtoková injekční analýza s amperometrickou detekcí

Při průtokové injekční analýze je vstřikován malý objem vzorku do nosného roztoku. Amperometrická detekce přitom využívá podobných vlastností látek jako cyklická voltametrie, ale měří se za konstantního napětí. Výhodou této metody je úspora vzorku, rychlost měření a absence nutnosti promývání reakční cely [23].

Folin-Ciocalteu

Není přímo určena na stanovování antioxidantů, používá se ke zjišťování celkového obsahu fenolických látek ve studovaném vzorku, ale vzhledem k tomu, že velké množství antioxidantů je fenolické povahy, její výsledky často s antioxidační kapacitou souvisejí. Není vhodná pro příliš zředěné vzorky [19]. Spektrofotometricky se měří absorbance vzorku po proběhlé reakci s Folin-Ciocalteuovým fenolovým činidlem, vyjadřuje se v ekvivalentech standardu.

3 Experimentální část

3.1 Instrumentace

3.1.1. Spektrální metody

Spektrofotometrická měření probíhala na spektrofotometru Specord 210 PLUS (Analytik Jena, Německo) ovládaným softwarem WinASPECT PLUS. Použity byly křemenné kyvety o optické dráze 1,000 cm.

3.1.2 Elektrochemické metody

K voltametrickým měřením bylo použito tříelektrodové zapojení na přístroji PalmSens 2 (PalmSens, Nizozemí) ovládaným softwarem PSTrace 3.0. Byly použity dva druhy pracovních elektrod, a to elektroda ze skelného uhlíku (GCE) o průměru 3 mm (Metrohm, Švýcarsko) a uhlíková pastová elektroda (CPE) o průměru 2 mm. Dále byly použity referentní argentchloridová (3M KCl) a pomocná platinová elektroda.

Pro průtokovou injekční analýzu bylo využito sestavy složené z vysokotlaké pumpy HPP 5601 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika), kdy k dávkování vzorků sloužil šesticestný dávkovací ventil (Ecom, Česká republika) se smyčkou o objemu 100 μ L. Použité elektrody i software byly stejné jako u cyklické voltametrie. Pracovní elektroda byla umístěna přímo proti výtoku kapiláry nesoucí směs mobilní fáze a dávkovaného vzorku a referentní i pomocná elektroda byly spolu s pracovní elektrodou v přepadové nádobce obsahující mobilní fázi.

3.1.3 Další použité vybavení

- Magnetická míchačka
- Analytické váhy Sartorius 2004 MP (Sartalex, Česká republika)

3.2 Seznam použitých chemikálií

- Mikrokrystalický grafit CR2 995 (Graphite Týn, Česká republika)
- Minerální olej (Fluka Biochemika, Švýcarsko)
- Rutin, trihydrát (analytický standard, Sigma-Aldrich, USA)
- BHT ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol p. a. (Lach-Ner, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan sodný p. a., dihydrát (Lachema, Česká republika)
- Uhličitan sodný (Lachema, Česká republika)
- Chlorid železitý (Lachema, Česká republika)
- Kyselina gallová ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- Ferrikyanid (Lachema, Česká republika)
- DPPH (Sigma-Aldrich, USA)
- Folin – Ciocalteuovo fenolové činidlo (2M, Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina trichloroctová (Fluorochem, UK)
- Hydroxid sodný (8M, Fluka Biochemika, Švýcarsko)
- Kyselina octová p.a. (99%, Lach-Ner, Česká republika)

3.3 Příprava extraktů

Ke zkoumání antioxidačních vlastností lišejníků byly v této práci vybráni zástupci rodu dutohlávka (*Cladonia*), a to: dutohlávka lesní (*Cladonia arbuscula*), dutohlávka brvitá (*Cladonia ciliata*), dutohlávka štíhlá (*Cladonia gracilis*), *Cladonia mitis*, dutohlávka sobí (*Cladonia rangiferina*), dutohlávka temná (*Cladonia stygia*) a dutohlávka hvězdovitá (*Cladonia uncialis*).

Všechny vzorky byly nasbírány v přírodní rezervaci Fajmanovy skály, Brdy, dne 20. 12. 2016.

Zásobní roztoky extraktů lišejníků byly připravovány z homogenisované sušiny v poměru 0,25 g na 10 ml methanolu. Extrakty byly připravovány po 50 mL. Vzorky lišejníků byly nadále extrahovány po dobu 24 hodin za stálého míchání na magnetické míchačce. Po uplynulých 24 hodinách byly extrakty filtrovány přes skládaný filtr do uzavíratelných nádob.

Takto připravované extrakty byly poté uchovávány v mrazničce z důvodu krátké trvanlivosti těchto extraktů. Extrakt ponechaný při laboratorní teplotě vykazoval již po týdnu barevné změny a rozpad látek v něm obsažených. Hodnoty naměřené v tomto extraktu byly zhruba poloviční oproti extraktům uchovávaných v mrazničce.

Extrakce byla u každého druhu provedena třikrát.

3.4 Pracovní postupy jednotlivých metod

3.4.1 Metoda DPPH

Byly připraveny 3 ml vzorku v ředění 0x, 2x, 4x a 8x, ke kterým bylo přidáno po 1 ml roztoku DPPH ($c = 126,8 \mu\text{M}$). Po 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě byly vzorky měřeny proti methanolu při vlnové délce $\lambda = 516 \text{ nm}$. Všechna měření byla provedena třikrát. Absorbance pro jednotlivé kalibrační řady vzorků byly proloženy logaritmickou závislostí a z rovnice této závislosti bylo vypočítáno množství extraktu odpovídající poklesu absorbance roztoku DPPH o 50 %.

3.4.2 Metoda Folin-Ciocalteu

Nejprve byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové (0, 200, 400, 600, 800 a 1000 μl) ze zásobního roztoku o koncentraci 1 g/l 1 destilované vody. Po přidavku 0,25 ml Folin-Ciocalteuova fenolového činidla byly roztoky inkubovány po 10 minut při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 2,5 ml uhličitanu sodného a do 5,25 ml doplněno destilovanou vodou. Po další inkubaci 30 minut byla měřena spektra. Odečítaná vlnová délka byla $\lambda = 768 \text{ nm}$.

Stejným způsobem byly připraveny roztoky extraktů, kdy extrakty byly pipetovány v objemu 250 μ l. Výsledky byly přepočítány na ekvivalent koncentrace kyseliny gallové.

Všechna měření roztoků extraktů byla provedena třikrát.

3.4.3 Redukční síla

Extrakty lišejníku o objemu byly 250 μ l doplněny vodou na objem 1 ml a slepý vzorek byl připraven jako 250 μ l methanolu, opět doplněných do 1 ml destilovanou vodou. Jako kontrolní standard byl použit rutin (roztok připravený doplněním 2 ml methanolového roztoku rutinu o koncentraci 1 mg/ml do 10 ml destilovanou vodou) a BHT (1mM roztok v methanolu) ředěné vodou obdobným způsobem.

K takto získaným roztokům bylo připipetováno 2,5 ml fosfátového pufru (0,2 M, pH = 6,6) a 2,5 ml 1% roztoku ferrikyanidu.

Roztoky byly dále inkubovány ve vodní lázni o teplotě 50 °C po dobu $t = 20$ min. Po inkubaci bylo z každého roztoku odpipetováno 2,5 ml do již připraveného roztoku sestávajícího z 0,5 ml 0,1% roztoku chloridu železitého a 2,5 ml destilované vody.

Absorbance byla měřena při vlnové délce $\lambda = 700$ nm.

3.5 Elektrochemické metody

3.5.1 Příprava pastové elektrody

Uhlíková pasta byla připravena jako směs v poměru 250 mg grafitu na 100 μ l minerálního oleje. Tato směs byla homogenisována v třecí misce a následně jí byla naplněno tělo elektrody.

3.5.2 Cyklická voltametrie

Roztoky extraktů byly namíchány v poměru 0,60 ml extraktu na 1,80 ml methanolu a 0,60 ml acetátového pufru (0,2 M, pH = 4,5). Měření probíhalo při rychlosti 100 mV/s od počátečního napětí 0 mV do 1400 mV.

Po každém měření byly pracovní elektrody obnovovány. Elektroda ze skelného uhlíku byla obrušována krouživými pohyby na alumině, pastová elektroda byla otírána vlhkým filtračním papírem.

Všechna měření proběhla třikrát.

3.5.3 Průtoková injekční analýza

Roztoky extraktů byly připraveny v poměru 200 μ l extraktu na 7,80 ml methanolu a 2,00 ml acetátového pufru (0,2 M, pH = 4,5). Měření probíhalo za konstantního potenciálu $E = 1,2$ V v intervalu měření $t = 0,01$ s. Roztoky extraktů byly dávkovány dávkovacím ventilem se smyčkou o objemu 100 μ l do nosného roztoku o složení methanol:acetátový pufr v poměru 4:1 při rychlosti průtoku tohoto roztoku $1,0$ ml.min⁻¹.

Byly prováděny série 3 nástřiků pro každý roztok extraktu. Po každé sérii měření byly obnovovány pracovní elektrody jako v případě cyklické voltametrie.

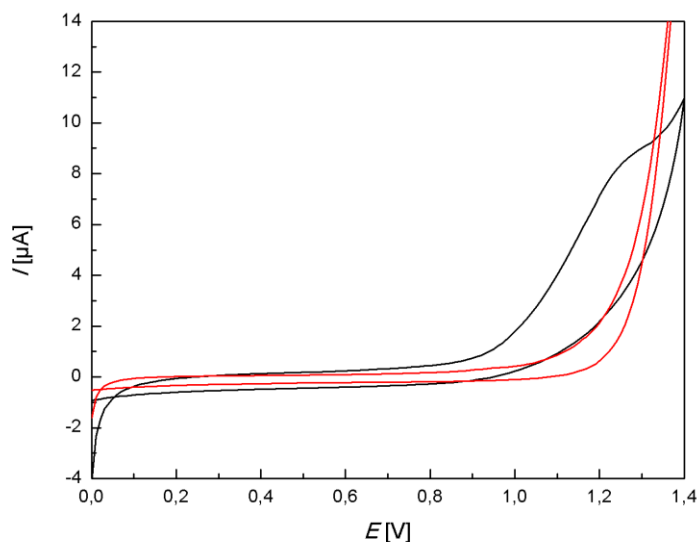
4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace elektrochemických metod

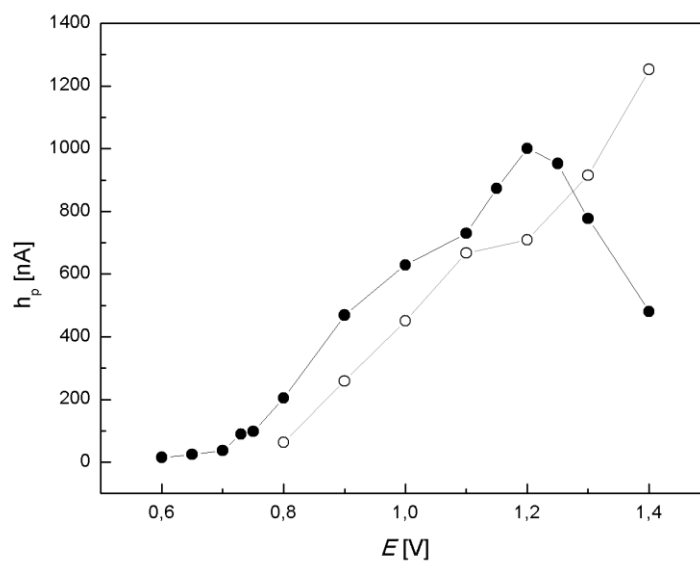
Pro orientaci, jak budou vypadat odezvy elektrochemických detektorů, byla provedena série pokusných měření. Pro CV byl změřen slepý vzorek a následně byl vybrán jeden z extraktů, který byl proměřen v rozmezí potenciálů 0 – 1400 mV. Výsledné křivky jsou znázorněny na Obr. 2. Reakce většiny látek v extraktu jsou ireverzibilní, protože není možné pozorovat signál během zpětného skenu.

Naměřená data ukazují poměrně vysoký potenciál, potřebný k reakci významnějšího množství látek v extraktu. Závislost proudové odezvy na vloženém potenciálu byla sledována i pomocí FIA (Obr. 3). V tomto případě je slabou odezvu možné pozorovat již při potenciálu 0,8 V. Nicméně k relevantnímu nárůstu dochází až v okolí hodnoty potenciálu 1,0 V.

Vzhledem k těmto průběhům jsme se rozhodli použít jako detekční potenciál u FIA i horní mez potenciálu odečítaného z cyklických voltamogramů hodnotu 1,2 V.



Obr. 2 – Cyklický voltamogram extraktu (černá křivka) a slepého vzorku (červená křivka) naměřený pomocí GCE metodou CV v prostředí methanolu a acetátového pufru (pH = 4,5)

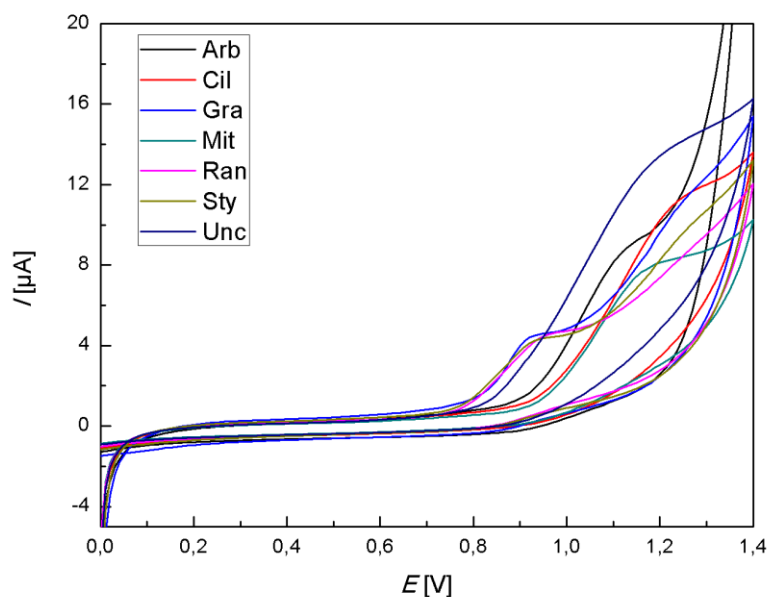


Obr. 3 – Graf závislosti výšky píků na vloženém potenciálu na elektrodu: GCE (prázdné symboly) a CPE (plné symboly), naměřeno metodou FIA s amperometrickou detekcí v prostředí methanolu a acetátového pufru (pH = 4,5)

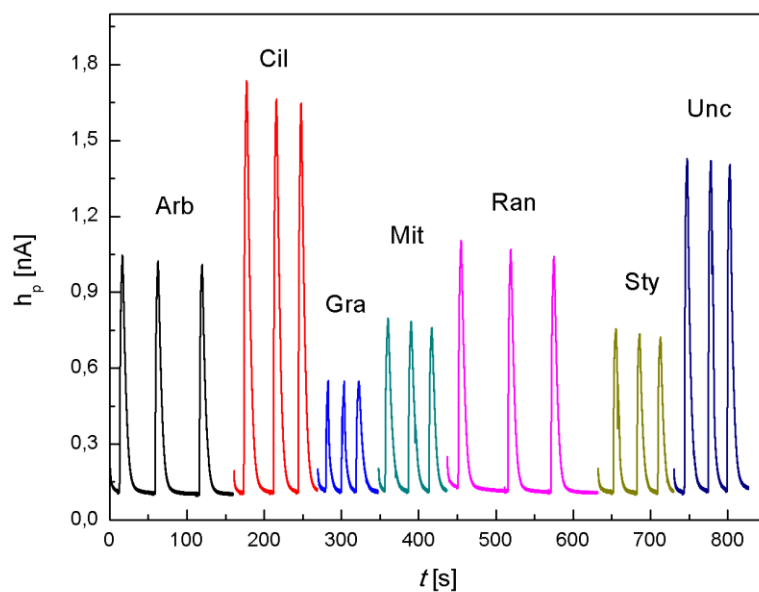
4.2 Elektrochemické stanovení

Za zvolených podmínek, tedy v pětinasobně zředěném extraktu a v roztoku obsahujícím 80 % methanolu a 20 % acetátového pufru (0,2 M, pH = 4,5), byly změřeny voltamogramy extraktů jednotlivých lišejníků. Měření probíhalo při rychlosti 100 mV/s od počátečního napětí 0 mV do 1400 mV. Během měření se ukázalo, že při opakovaných skenech na neobnověném povrchu elektrody dochází k rychlému poklesu odezvy, proto byl povrch elektrody obnovován leštěním nebo otřením pasty po každém skenu. Na získaných záznamech (Obr. 4 ukazuje výsledky získané na GCE) je patrný různý charakter křivek – některé, konkrétně *C. gracilis*, *C. rangiferina* a *C. stygia*, poskytují odezvu už při nižších signálech, obsahují tedy látky s většími antioxidačními účinky, zatímco u ostatních extraktů nacházíme větší odezvu až při vyšších potenciálech.

Záznamy měření jednotlivých extraktů získané pomocí FIA s amperometrickou detekcí na GCE jsou ukázány na Obr. 5. I v tomto případě se při delším měření projevoval pokles odezvy, proto byly elektrody obnovovány po každé sérii tří nástřiků jednoho extraktu.



Obr. 4 – Cyklický voltamogram extraktů naměřený pomocí GCE metodou CV v prostředí methanolu a acetátového pufru (pH = 4,5)



Obr. 5 – Série píků extraktů lišejníků naměřená metodou FIA s amperometrickou detekcí při konstantním potenciálu $E = 1,2$ V v prostředí methanolu a acetátového pufru (pH = 4,5)

4.3 Porovnání výsledků

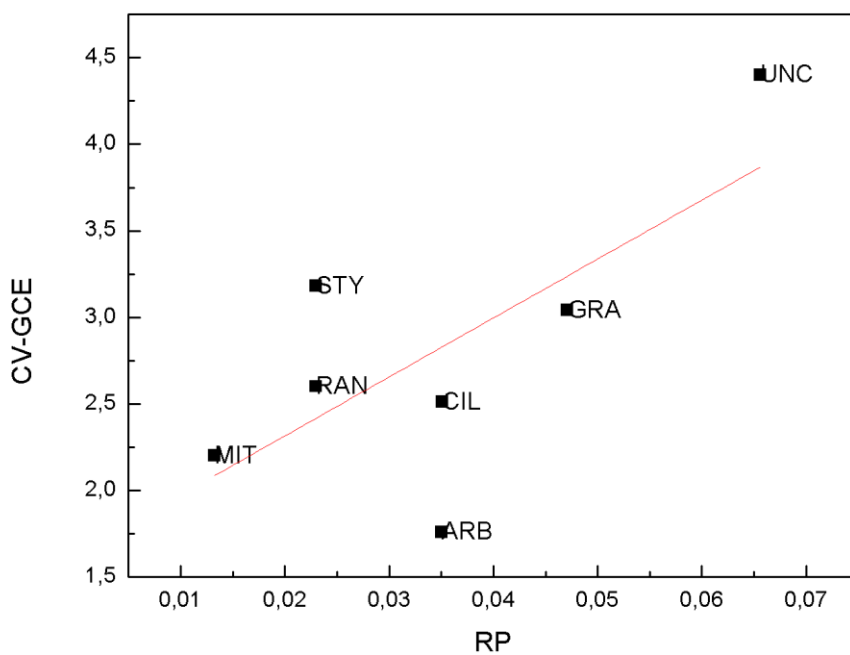
Výsledné hodnoty antioxidační aktivity získané z vyhodnocení jednotlivých metod jsou shrnuté v Tab. 1. Z výsledků je patrný značný rozptyl mezi opakovanými stanoveními pro jednotlivé druhy lišejníků, způsobený zřejmě nedostatečně reprodukovatelnými podmínkami extrakce. Tento faktor se, spolu s vzájemným malým rozptylem výsledků, zřejmě podepsal na výsledcích v další části, kdy byly výsledky jednotlivých metod vzájemně prokombinovány a proloženy lineární závislostí, z níž byl zjištěn korelační koeficient (viz Tab. 2). Korelace mezi výsledky jednotlivých metod je obecně poměrně špatná, přesto si lze povšimnout, že metody zahrnující měření pomocí CPE vykazují obecně horší korelaci s ostatními metodami ve srovnání s GCE. Grafická znázornění korelací mezi spektrofotometrickými a elektrochemickými metodami s pomocí GCE jsou znázorněna na Obr. 6–12.

Tab. 1 – Souhrn výsledků jednotlivých metod.

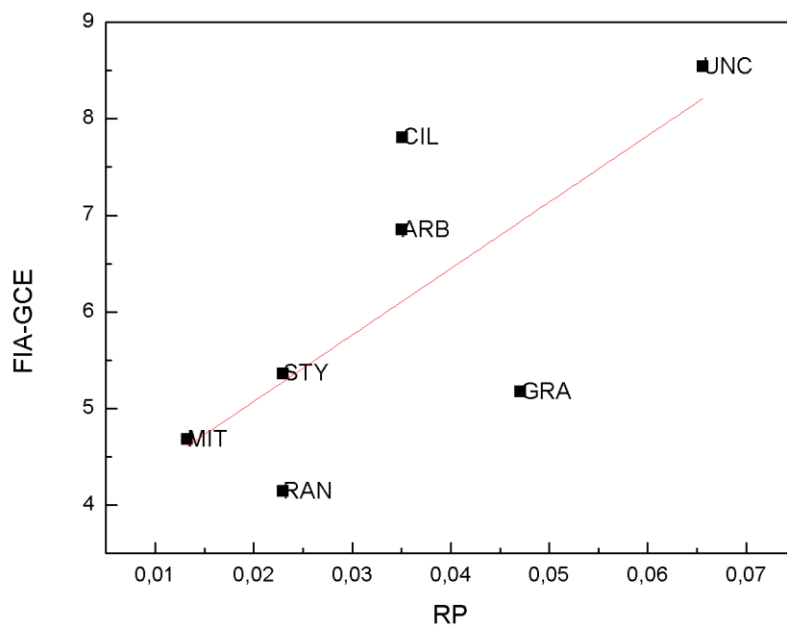
	DPPH koncentrace extraktu odpovídající 50% úbytku DPPH [mg.ml ⁻¹]	RP absorbance	Folin-Ciocalteu koncentrace odpovídající ekvivalentu koncentrace kyseliny gallové [mg.ml ⁻¹]	CV-GCE [μVs]	FIA-GCE [μAs]
Arb	0,1805 ± 0,038 %	0,0350 ± 0,015 %	0,6696 ± 0,041 %	1,76 ± 0,465 %	6,85 ± 0,698 %
Cil	0,1755 ± 0,046 %	0,0351 ± 0,022 %	0,5377 ± 0,023 %	2,51 ± 0,712 %	7,80 ± 0,951 %
Gra	0,1841 ± 0,018 %	0,0471 ± 0,020 %	0,5206 ± 0,104 %	3,04 ± 0,496 %	5,17 ± 1,329 %
Mit	0,1162 ± 0,012 %	0,0132 ± 0,027 %	0,3780 ± 0,061 %	2,2 ± 0,706 %	4,68 ± 0,299 %
Ran	0,1450 ± 0,037 %	0,023 ± 0,0158 %	0,6900 ± 0,031 %	2,6 ± 0,511 %	4,14 ± 1,305 %
Sty	0,1609 ± 0,018 %	0,023 ± 0,0067 %	0,5772 ± 0,047 %	3,18 ± 0,509 %	5,36 ± 1,048 %
Unc	0,1802 ± 0,025 %	0,0656 ± 0,0070 %	1,1930 ± 0,059 %	4,4 ± 0,736 %	8,54 ± 0,385 %

Tab. 2 – Korelační koeficienty (R) jednotlivých kombinací prováděných metod

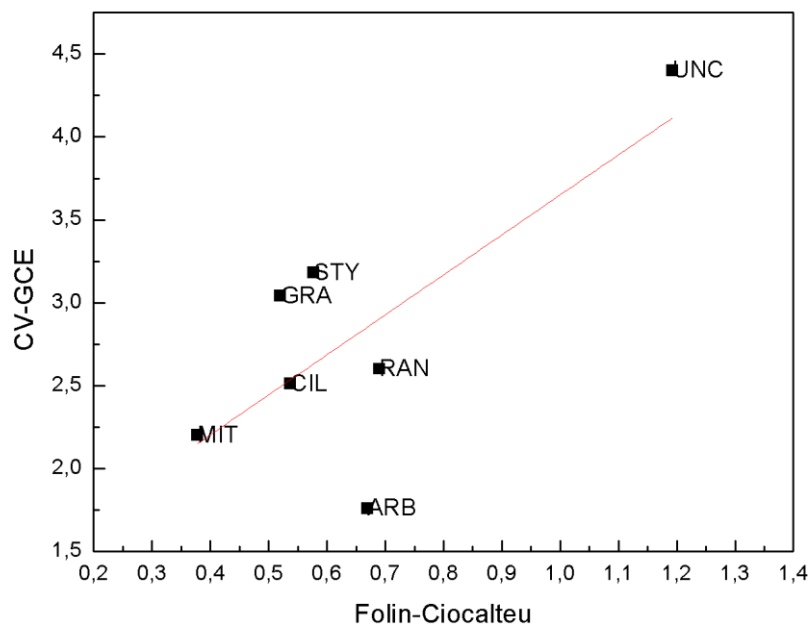
	DPPH	Folin-Ciocalteu	RP	CV-CPE	CV-GCE	FIA-GCE
FIA-CPE	-0,1723	0,03467	-0,0062	0,45783	-0,15876	0,63721
FIA-GCE	0,2961	0,39286	0,42808	0,48918	-0,01088	
CV-GCE	-0,0708	0,54446	0,39194	-0,14088		
CV-CPE	0,0972	-0,1943	-0,1164			
RP	0,53123	0,61047				
Folin-Ciocalteu	0,20801					



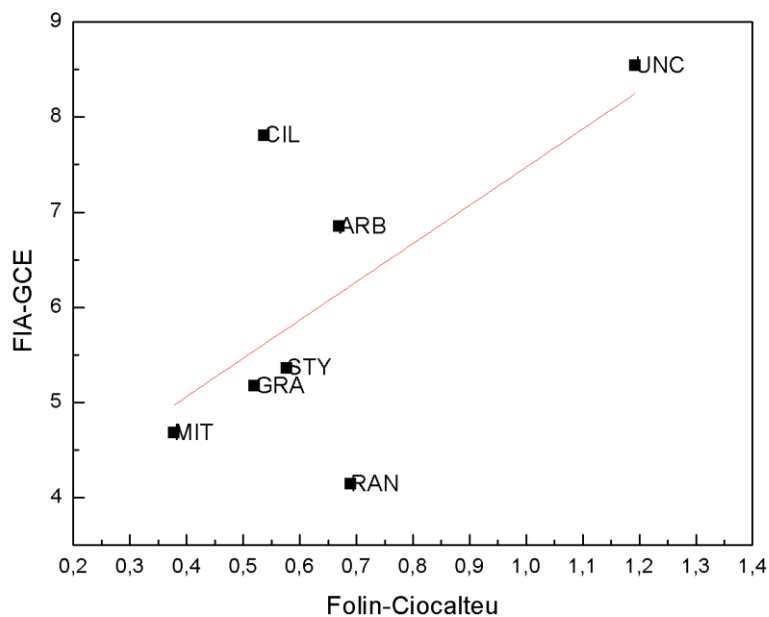
Obr. 6 – Vzájemná korelace ploch píků měřených metodou CV s pomocí GCE v prostředí methanolu a acetátového pufru (pH = 4,5) a absorbcí naměřených metodou RP



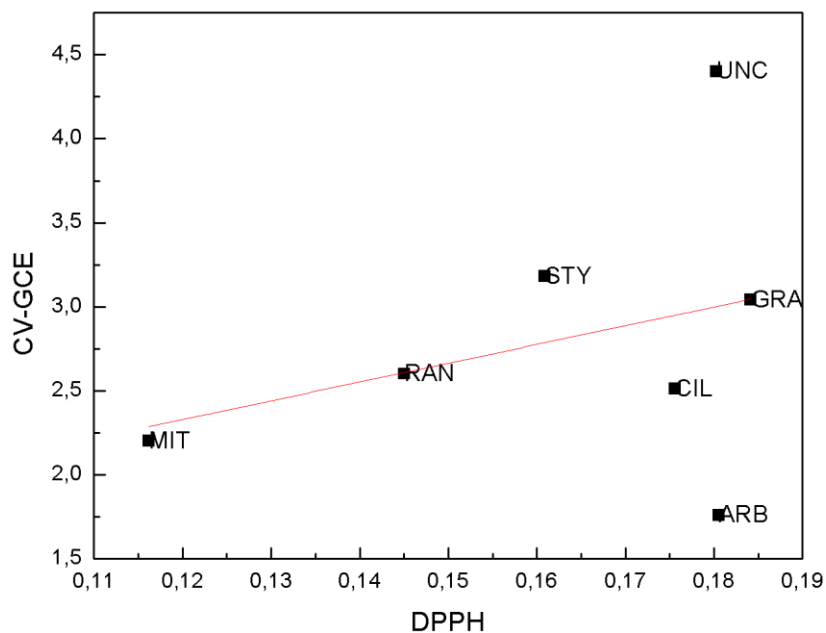
Obr. 7 – Vzájemná korelace ploch píků měřených metodou FIA s amperometrickou detekcí při konstantním potenciálu $E = 1,2$ V s pomocí GCE v prostředí methanolu a acetátového pufru (pH = 4,5) a absorbancí naměřených metodou RP



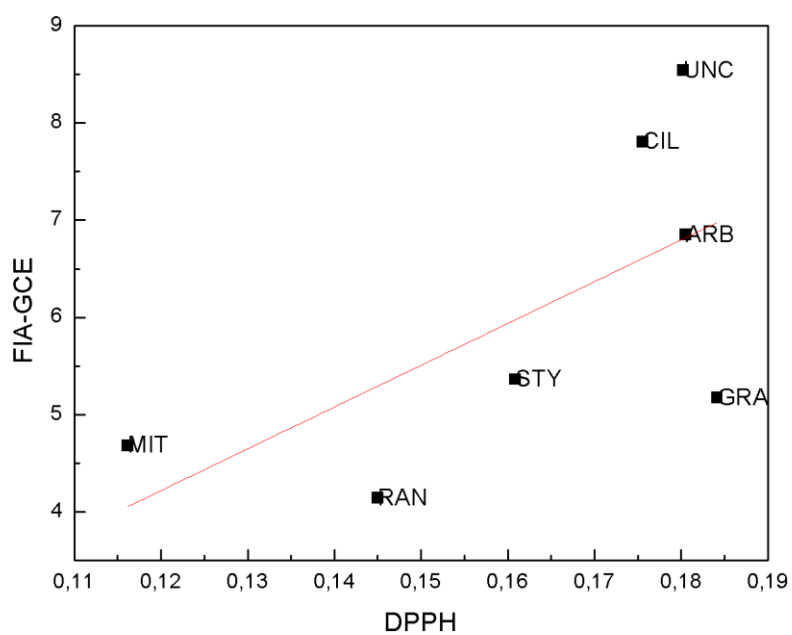
Obr. 8 – Vzájemná korelace ploch píků měřených metodou CV s pomocí GCE v prostředí methanolu a acetátového pufru (pH = 4,5) a koncentračních ekvivalentů kyseliny gallové vypočítaných z kalibrační závislosti hodnot naměřených metodou Folin-Ciocalteu



Obr. 9 – Vzájemná korelace ploch píků měřených metodou CV s pomocí GCE v prostředí methanolu a acetátového pufru (pH = 4,5) a koncentračních ekvivalentů kyseliny gallové vypočítaných z kalibrační závislosti hodnot naměřených metodou Folin-Ciocalteu



Obr. 10 – Vzájemná korelace ploch píků měřených metodou CV s pomocí GCE v prostředí methanolu a acetátového pufru (pH = 4,5) a koncentrací extraktů odpovídajících poklesu absorbance DPPH o 50 %



Obr. 11 – Vzájemná korelace ploch píků měřených metodou FIA s amperometrickou detekcí při konstantním potenciálu $E = 1,2$ V s pomocí GCE v prostředí methanolu a acetátového pufru ($\text{pH} = 4,5$) a koncentrací extraktů odpovídajících poklesu absorbance DPPH o 50 %

5 Závěr

Byly měřeny antioxidační vlastnosti vybraných sedmi zástupců lišejníků z rodu *Cladonia* cyklickou voltametrií, průtokovou injekční analýzou s amperometrickou detekcí, metodou DPPH, metodou Folin-Ciocalteu a metodou redukční síly.

Pro elektrochemické stanovení byly používány dvě elektrody: elektroda ze skelného uhlíku (GCE) a elektroda z uhlíkové pasty (CPE), kdy CPE se ukázala jako nevhodná pro tento typ měření. Uhlíková pasta pravděpodobně blíže nezjištěným způsobem interagovala s látkami v analyzovaných vzorcích extraktů. Nekompatibilita se nejvíce projevila na nízké korelaci s většinou ostatních metod, převážně spektrálních. Proto metody, při nichž byla používána CPE, nebyly zahrnuty do dalšího vyhodnocování.

Dle získaných dat z ostatních metod lze prohlásit, že zkoumané druhy lišejníků skutečně látky s antioxidačními vlastnostmi obsahují, z nichž velké procento bude mít fenolický charakter, jak napovídají výsledky metody Folin-Ciocalteu. Ovšem to nemusí nutně znamenat, že všechny fenolické látky naměřené v extraktech budou mít antioxidační vlastnosti. Pokud by tomu tak bylo, docházelo by pravděpodobně k vyšší korelaci mezi jednotlivými metodami.

Pro bližší zjištění, kolik přesně a jaké látky s antioxidačními vlastnostmi se v lišejnících nachází, by se musely využít i jiné metody, jako např. HPLC s hmotnostní detekcí.

6 Seznam použité literatury

- [1] Sagar B. Kedare; Singh R. P.: *Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay*, J Food Sci Technol (July – August 2011) 48(4): 412 – 422
- [2] Moure A.; Cruz J. M.; et al.: *Natural antioxidants from residual sources*, Food Chemistry 72 (2001) 145–171
- [3] Oroian M.; Escriche I.: *Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis*, Food Research International 74 (2015) 10–36
- [4] Kosanić M.; Ranković B.; et al.: *Cladonia lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents*, LWT - Food Science and Technology 59 (2014) 518–525
- [5] Kosanić M.; Ranković B.; Vukojević J.: *Antioxidant properties of some lichen species*, J Food Sci Technol (September – October 2011) 48(5): 584–590
- [6] Falowo A. B.; Fayemi P. O.; Muchenje V.: *Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review*, Food Research International 64 (2014) 171–181
- [7] Özen T.; Kinalioglu K.: *Determination of antioxidant activity of various extracts of Parmelia saxatilis*, Biologia 63/2 (2008) 211–216
- [8] Xu, Z.; Howard, L. R.: *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*, Wiley 2012
- [9] Lutzoni F.; Miadlikowska J.: *Lichens*, Current Biology, Vol. 19, No. 13
- [10] Thomas H. Nash III (Ed.): *Lichen Biology*, 2nd ed., Cambridge University Press, 2008, p. 1, 104 – 105

- [11] Ranković B. (Ed.): *Lichen Secondary Metabolites*, Springer 2015, p. 181 – 182
- [12] <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/lichens/> (cit. 15. 8. 2018)
- [13] Gülcin I.; et al.: *Determination of antioxidant activity of lichen Cetraria islandica (L) Ach*, *Journal of Ethnopharmacology* 79 (2002) 325–329
- [14] Luo H.; et al.: *Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from Umbilicaria antarctica in maritime Antarctica (King George Island)*, *Polar Biol* (2009) 32:1033–1040
- [15] Amaral da Silva R.; Liberio S. A.; et al.: *Antimicrobial and Antioxidant Activity of Anacardium occidentale L. Flowers in Comparison to Bark and Leaves Extracts*, *Journal of Biosciences and Medicines* (2016), 4, 87–99
- [16] Alam N.; Bristi N. J.; Rafiquzzaman: *Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity*, *Saudi Pharmaceutical Journal* (2013) 21, 143 – 152
- [17] Gil E. S.; Couto R. O.: *Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications*, *Brazilian Journal of Pharmacognosy* (May/June 2013), 23(3): 542-558
- [18] Cuartero, M.; et al.: *Voltammetric behaviour and square-wave voltammetric determination of the potent antioxidant and anticarcinogenic agent ellagic acid in foodstuffs*, *Food Chemistry* (2011), 128(2): 549-554
- [19] Buratti, S.; et al.: *Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis*, *Talanta* (2007), 71(3): 1387-1392.
- [20] Paulová H.; Bochořáková H.; Táborská E.: *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro*, *Chem. Listy* 98, 174 – 179 (2004)

[22] Cuartero M.; et al.: *Voltammetric behaviour and square-wave voltammetric determination of the potent antioxidant and anticarcinogenic agent ellagic acid in foodstuffs*, Food Chemistry 128 (2011) 549–554

[23] Cosio M. S.; Buratti S.; Mannino.; Benedetti S.: *Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family*, Food Chemistry (2006), 97(4): 725-731