

**Porównanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II)
i zmiatania wolnego rodnika DPPH przez ekstrakty z mchów**
**Comparison of the capacity of moss extracts to chelate iron (II)
ions and scavenge the free radical DPPH**

Sara Janowska

Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki
Medycznej, Katedra i Zakład Chemii Organicznej, ul. Chodźki 4A, Lublin 20-093
e-mail: sara.janowska@wp.pl

Słowa kluczowe: mszaki, aktywność antyoksydacyjna, wolne rodniki

Key words: bryophytes, antioxidant, free radical

Streszczenie

W ostatnich latach związki o właściwościach antyoksydacyjnych występujące w roślinach – ze względu na ich zdolność neutralizacji wolnych rodników – cieszą się dużym zainteresowaniem naukowców. Zakłada się, że wolne rodniki mogą uczestniczyć w powstawaniu wielu chorób, zwłaszcza cywilizacyjnych, których liczba drastycznie rośnie. Mszaki stanowią wciąż słabo przebadaną grupę roślin, przez co są ciekawym obiektem badań fitochemicznych. Celem pracy było określenie potencjału antyoksydacyjnego ekstraktów z dwudziestu gatunków mchów. Badaniom poddano ekstrakty etanolowe z gametofitofitów dwudziestu gatunków mchów. W pracy wykorzystano następujące metody: metodę pomiaru zdolności zmiatania syntetycznego rodnika DPPH, metodę pomiaru zdolności chelatowania jonów żelaza (II). Na podstawie wyników uzyskanych z wykorzystaniem powyższych metod można stwierdzić, że ekstrakty ze wszystkich gatunków użytych w badaniach wykazują zdolność zmiatania wolnych rodników oraz zdolność do wiązania jonów żelaza (II). Najniższą aktywność antyoksydacyjną w próbach z wykorzystaniem metody zmiatania syntetycznego rodnika DPPH wykazały ekstrakty z gatunków: *Polustriella commutata* ($IC_{50} = 264,52$ mg/ml), *Sphanum fimbriatum* ($IC_{50} = 154,66$ mg/ml) oraz *Pleurozium schreberi* ($IC_{50} = 126,81$ mg/ml). Najwyższą zdolność chelatacji jonów żelaza wykazują ekstrakty: *Hypnum cupressiforme* ($IC_{50} = 0,32$ mg/ml) oraz *Rhytidiadelphus triquetrus* ($IC_{50} = 0,50$ mg/ml). Przeprowadzone badania wykazały potencjał antyoksydacyjny 20 gatunków mchów. Najwyższy potencjał neutralizacji wolnego rodnika DPPH wykazały mchy z rodziny *Polytrichopsida*.

Summary

In recent years, compounds with antioxidant properties occurring in plants are very popular among scientists due to their ability to neutralize free radicals. It is assumed that free radicals may participate in the formation of many diseases, especially civilization diseases, the number of which is growing drastically. Bryophytes are still a poorly studied group of plants, which makes them an interesting object of phytochemical research. Determination of the antioxidative potential of extracts from twenty moss species. The ethanol extracts from gametophytes of twenty moss species were tested. The following methods were used in the work: method of measuring the scavenging ability of a synthetic DPPH radical, the method of measurement of iron (II) ions chelating ability. Based on the results obtained using the above methods, it can be concluded that the extracts of all species used in the studies show the ability to scavenge free radicals and the ability to bind iron (II) ions. Extracts from the following species showed the lowest antioxidant activity in the samples using the method of scavenging the synthetic DPPH radical: *Polustriella commutata* ($IC_{50} = 264.5$ mg/ml), *Sphanum fimbriatum* ($IC_{50} = 154.66$ mg/ml) and *Pleurozium schreberi* ($IC_{50} = 126.81$ mg/ml). The highest iron chelation capacity is presented by *Hypnum cupressiforme* ($IC_{50} = 0.32$ mg/ml.) and *Rhytidiadelphus triquetrus* ($IC_{50} = 0.50$ mg/ml) extracts. The studies have shown the antioxidant potential of 20 species of mosses. The highest potential for the free radical scavenging of DPPH has been demonstrated by mosses from the Polytrichopsida family.

Wprowadzenie

W ostatnich latach trwają intensywne naukowe poszukiwania roślinnych związków posiadających właściwości antyoksydacyjne. Kwestie związane z oksydacją i wolnymi rodnikami znajdują się w centrum uwagi dietetyków i farmaceutów. Zakłada się, że wolne rodniki odgrywają główną rolę w patogenezie wielu chorób. Istotny jest też fakt, że procesy oksydacyjne mogą zmniejszać stabilność chemiczną leków i pokarmów [1].

Działanie zarówno ksenobiotyków, promieniowania ultrafioletowego, jak również ultradźwięków, może prowadzić do powstawania wolnych rodników. Jeżeli związki te wejdą w oddziaływanie z makrocząsteczkami występującymi w komórkach, mogą wywoływać uszkodzenia o różnorodnym charakterze. Kontakt wolnych rodników z DNA w ludzkich komórkach prowadzi do: rozerwania nici, powstania mutacji punktowych oraz aberracji chromosomalnych. Konsekwencją takich uszkodzeń są między innymi choroby nowotworowe. Jeżeli w organizmie panuje homeostaza, wolne rodniki tlenowe są degradowane lub dezaktywowane w łańcuchu przemian biochemicznych [2]. Badania naukowe dowodzą, że wolne rodniki

mogą mieć znaczący wpływ na rozwój chorób cywilizacyjnych. Ich powszechna obecność prowadzi do stałego stresu oksydacyjnego w organizmie współczesnego człowieka, co prowadzi do spadku skuteczności naturalnych procesów odpornościowych. Uniknięcie kontaktu z wolnymi rodnikami jest niemożliwe, ponieważ są one dostarczane zarówno z zewnątrz, jak i w wyniku procesów komórkowych zachodzących w naszych ciałach. Potencjalnym wsparciem są rośliny zawierające metabolity wtórne o silnych właściwościach antyoksydacyjnych [3].

Podczas, gdy rośliny wyższe zostały dość dokładnie przebadane pod względem składu fitochemicznego, rośliny niższe stanowią nadal pewną tajemnicę dla naukowców. Należące do tej grupy mszaki występują powszechnie na całym świecie. Ze względu na łatwą dostępność mogą stanowić cenny przedmiot wielokierunkowych badań fitochemicznych i fitobiologicznych [4]. Celem niniejszej pracy było zbadanie, czy ekstrakty z mchów mają zdolność neutralizacji wolnego rodnika DPPH oraz chelatowania jonów żelaza II. W trakcie prac badawczych otrzymano ekstrakty z 20 gatunków mchów pochodzących z trzech różnych klas, a następnie określono ich potencjał pod względem aktywności antyoksydacyjnej.

Materiały i metody

Surowiec roślinny, będący materiałem do badań, stanowiły gametofity 20 gatunków mchów zebranych w lasach liściastych Wyżyny Śląskiej. Materiał został zebrany w 2015 roku w czasie lata i oznaczony przez prof. dr hab. Adama Szebla ze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

Ekstrakty użyte w pracy doświadczalnej wykonano z suszonej w przepływie powietrza substancji roślinnej 20 różnych gatunków mchów występujących na terenie Polski. Na początku pracy wysuszone mchy rozdrobniono przy użyciu młynka elektrycznego. Następnie z każdego gatunku odważono naważki po ok. 30 g. Odważony, zmielony surowiec roślinny poddano 24-godzinnej maceracji w kolbach stożkowych przy użyciu 80% alkoholu etylowego w ilości 600 ml. Wyjątkiem był gatunek *Sphagnum palustre*, który – z uwagi na jego większą chłonność – poddany był maceracji w objętości 1050 ml. Następnie zawartość kolb poddano ekstrakcji wspomaganą przez 15 minut łaźnią ultradźwiękową w temperaturze pokojowej.

Ekstrakt przesączono przez karbowane sączi bibułowe. Substancję roślinną, która pozostała po pierwszej ekstrakcji zalano 300 ml (*Sphagnum palustre* – 200 ml) alkoholu etylowego 80%. Zawartość kolb poddano ponownej ekstrakcji z użyciem ultradźwięków trwającej 15 minut. Płyn z nad substancji roślinnej przesączono, używając tych samych sączków bibułowych, co przy pierwszej ekstrakcji. Do pozostałej w kolbach substancji roślinnej dodano kolejną porcję etanolu 80% o objętości 200 ml i przeprowadzono kolejną ekstrakcję w tych samych warunkach.

Ekstrakty przesączono przez sączi bibułowe. Z połączonych ekstraktów odmierzono 1/3 objętości odpowiadającej 10 gramom surowca roślinnego. Przy użyciu wyparki próżniowej w łaźni wodnej o temperaturze 40°C odparowano rozpuszczalnik. Kolbki wyparne z pozostałością z ekstraktów po odparowaniu rozpuszczalnika poddano liofilizacji. Następnie suche ekstrakty rozpuszczono w etanolu. Do każdej próbki użyto takiej ilości etanolu, aby uzyskać stężenie ekstraktu 40 mg/ml. Z tych roztworów bazowych przygotowano metodą rozcieńczeń roztwory etanolowe o stężeniu 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 1; 0,5 oraz 0,25 mg/ml. Otrzymane roztwory przechowywano w szczelnie zamkniętych plastikowych flakonach do dalszych oznaczeń. Ekstrakty zostały w trakcie przechowywania zabezpieczone przed promieniowaniem słonecznym.

Tabela 1. Gatunki mchów użyte w pracy badawczej.

Table 1. Moss species used in the research work.

| Lp. | Nazwa gatunkowa | Nazwa zwyczajowa |
|-----|-----------------------------------|------------------------|
| 1 | <i>Hypnum lindbergii</i> | Rokiet krzywolistny |
| 2 | <i>Sphanum teres</i> | Torfowiec obły |
| 3 | <i>Climacium dendroides</i> | Drabik drzewkowaty |
| 4 | <i>Orthodicranum montanum</i> | Prostożąbek górski |
| 5 | <i>Eurhynchium striatum</i> | Dzióbkowiec bruzdowany |
| 6 | <i>Sanionia uncinata</i> | Sanionia haczykowata |
| 7 | <i>Thuidium philibertii</i> | Tujowiec włoskolistny |
| 8 | <i>Politrichum juniperinum</i> | Płonnik jałowcowaty |
| 9 | <i>Polustriella commutata</i> | Źródlikowiec zmienny |
| 10 | <i>Politrichastum formosum</i> | Złotowłos strojny |
| 11 | <i>Polytrichum commune</i> | Płonnik pospolity |
| 12 | <i>Rhytidiadelphus triquetrus</i> | Fałdownik trzyrzędowy |
| 13 | <i>Pseudoscleropodium purum</i> | Brodawkowiec czysty |
| 14 | <i>Rhytidiadelphus squarrosus</i> | Fałdownik nastroszony |
| 15 | <i>Sphagnum fimbriatum</i> | Torfowiec frędzlowany |
| 16 | <i>Dicranum scoparium</i> | Widłożąb miotłowy |
| 17 | <i>Sphagnum palustre</i> | Torfowiec błotny |
| 18 | <i>Plagiomnium undulatum</i> | Płożymeżyk falisty |
| 19 | <i>Pleurozium schreberi</i> | Rokietnik pospolity |
| 20 | <i>Hypnum cupressiforme</i> | Rokiet cyprysowy |

- 1. Badanie właściwości antyoksydacyjnych z użyciem rodnika DPPH:** metoda badawcza polega na szacowaniu zdolności przeciwutleniaczy zawartych w ekstraktach do zmiatania syntetycznego wolnego rodnika DPPH. W wyniku reakcji odczynnika z antyoksydantami następuje zmiana zabarwienia z purpurowo-fioletowego na żółte. Dochodzi do zmiany absorbancji badanych roztworów, co jest mierzone spektrofotometrycznie przy długości fali 515 nm. Metoda została opracowana przez Brand-Williamsa oraz jego współpracowników [5]. W badaniu jako substancję o charakterze wolnorodnikowym wykorzystano etanolowy roztwór DPPH o stężeniu 0,06 mM. Oznaczenie wykonywano dla rozcieńczeń 40, 20, 10, 5 i 1 mg/ml. Próbkę wykonywano w trzech powtórzeniach. Dla ekstraktów 10 i 11 wykonano dodatkową serię z użyciem rozcieńczeń: 0,5; 1; 2,5; 5 i 10 mg/ml. Do 40 µl dodano 1,96 ml etanolowego roztworu DPPH. Po upływie 30 minut przy użyciu spektrofotometru UV-VIS NICOLET-EVOLUTION 3000 wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 515 nm. Przed każdą serią wykonano próbę kontrolną, mierząc absorbancję czystego odczynnika przy długości fal 515 nm. W celu porównania wyników wykonano pomiary dla kwasu askorbinowego w stężeniach: 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 i 0,05 mg/ml. Zdolność antyoksydacyjną badanych ekstraktów obliczono, korzystając ze wzoru:

$$\text{Redukcja rodnika DPPH [\%]} = [(A_k - A_b)/A_k] * 100,$$

gdzie:

A_k – absorbancja próby kontrolnej,

A_b – absorbancja próby badanej po 30 minutach.

Na podstawie sporządzonych krzywych zależności % inhibicji rodnika DPPH od stężenia ekstraktu, oznaczono IC₅₀, który wyznacza takie stężenie antyoksydantu, dla którego stężenie początkowe wolnego rodnika spada o 50%.

- 2. Metoda pomiaru właściwości chelatowania jonów żelaza (II):** metoda wykorzystuje zdolność badanej próbki do chelatowania jonów żelaza (II). W trakcie wykonywania badania do próbki ekstraktu dodaje się roztwór chlorku żelaza, a następnie wytrząsa. W celu oznaczenia żelaza, które nie uległo chelatowaniu, dodaje się roztwór ferrozyny, która z nieprzereagowanymi jonami żelaza tworzy czerwony kompleks. Próbkę bada się metodą spektrofotometryczną przy długości 562 nm. Próbka wykazująca większe właściwości chelatujące, posiada mniej intensywnej barwę powstałego kompleksu, a mierzona absorbancja osiąga niskie wartości. Metoda została opracowana przez Deczera i Welcha [6]. Do badania przygotowano próbki ekstraktów o stężeniach: 0,25; 0,5; 1; 1,25 oraz 2,5 mg/ml. W celu przeprowadzenia oznaczenia do 0,2 ml

badanego ekstraktu dodano 0,1 ml 2 mM roztworu chlorku żelaza (II), po czym wytrząsano. Następnie do próbki dodano 0,4 ml 0,25 mM ferrozyny. Próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po tym czasie zmierzono absorbancję przy długości fal 562 nm. Równolegle przeprowadzono próbę kontrolną, w której ekstrakt zastąpiono 0,2 ml wody destylowanej [7]. Do obliczeń mających na celu określenie zdolności chelatowania jonów żelaza (II) przez badane ekstrakty użyto wzoru:

$$\text{Zdolność chelatowania [\%]} = [1 - (A_p/A_k)] * 100$$

gdzie:

A_p – absorbancja próby badanej,

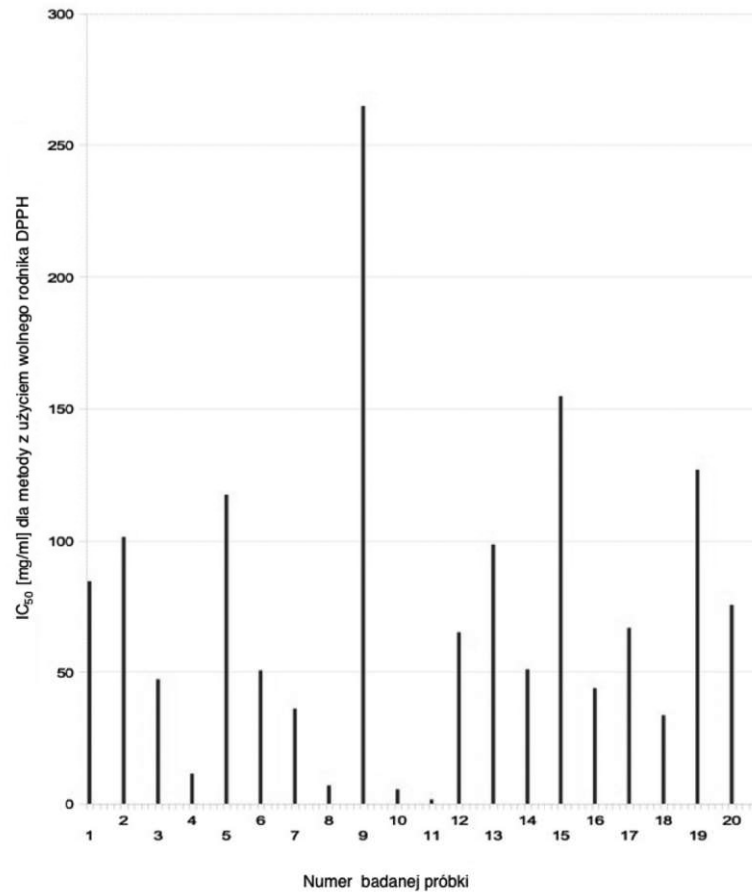
A_k – absorbancja próby kontrolnej.

Na podstawie sporządzonych krzywych zależności % zdolność badanego ekstraktu do chelatowania jonów żelaza (II) od stężenia, wyznaczono parametr IC₅₀, wyznaczający takie stężenie antyoksydantu, które wiąże 50% jonów Fe²⁺.

Wyniki

Na podstawie wyników uzyskanych z wykorzystaniem tej metody można stwierdzić, że ekstrakty ze wszystkich gatunków użytych w badaniach wykazują zdolność zmiatania wolnych rodników. Wartości IC₅₀ liczone z krzywych liniowych zawierają się w zakresie: od 1,56 mg/ml do 264,52 mg/ml. Biorąc pod uwagę także obliczenia na podstawie z krzywych logarytmicznych wartości IC₅₀ są zawarte w zakresie od 0,32 mg/ml do 954,43 mg/ml. Spośród przebadanych gatunków najlepszymi właściwościami do neutralizacji wolnego rodnika DPPH charakteryzują się mchy z rodziny *Polytrichopsida* (płonniki). Ekstrakty z gametofitów mchów pochodzących z tej rodziny uzyskały najniższe wyniki IC₅₀: *Politrichum juniperinum* 6,91 mg/ml, *Politrichastum formosum* 5,47 mg/ml, *Polytrichum commune* 1,56 mg/ml. Wyższą od pozostałych mchów aktywność wykazał również *Orthodicranum montanum* 11,27 mg/ml z rodziny *Dicranaceae*. Najniższą aktywność antyoksydacyjną wykazały ekstrakty z gatunków: *Polustriella commutata* (IC₅₀ = 264,52 mg/ml), *Sphanum fimbriatum* (IC₅₀ = 154,66 mg/ml) oraz *Pleurozium schreberi* (IC₅₀ = 126,81 mg/ml). Dla porównania wartość IC₅₀ dla kwasu askorbinowego wyliczona z krzywej logarytmicznej wynosi 0,1398 [mg/ml].

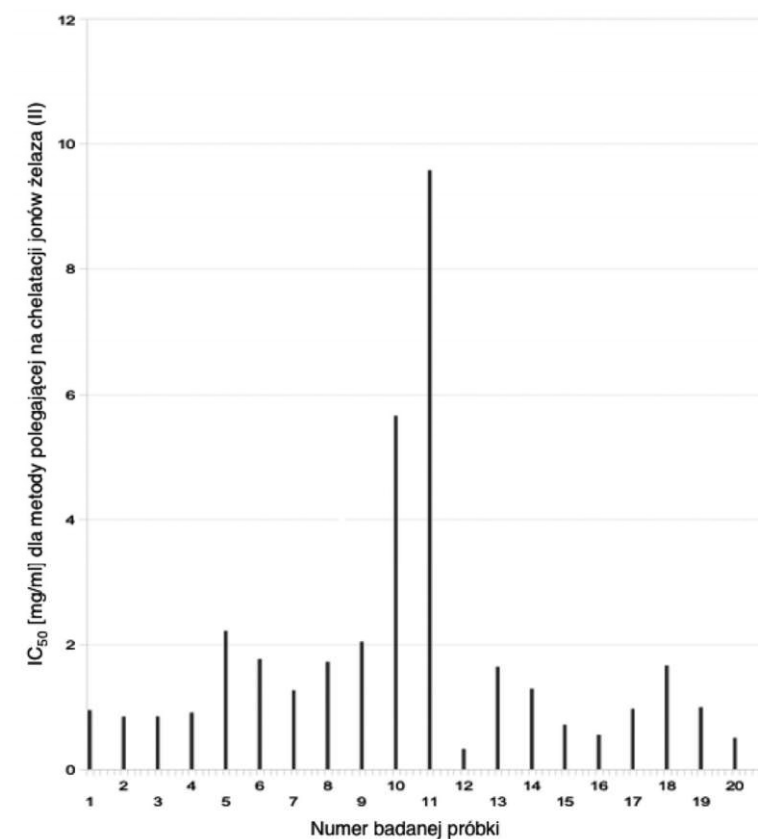
Porównanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II) i zmiatania wolnego...



Wykres 1. Aktywność antyoksydacyjna wyrażona w IC_{50} [mg/ml] określona z wykorzystaniem metody z użyciem wolnego rodnika DPPH.

Figure 1. Antioxidant activity expressed in IC_{50} [mg/ml] determined using the DPPH free radical method.

Na podstawie wyników uzyskanych z wykorzystaniem tej metody można stwierdzić, że ekstrakty ze wszystkich gatunków użytych w badaniach zawierają związki chemiczne zdolne do wiązania jonów żelaza (II). Wartości IC_{50} liczone z krzywych liniowych są niskie i zawierają się w zakresie: od 0,32 mg/ml do 9,57 mg/ml. Najwyższy potencjał do chelatacji jonów żelaza wykazują ekstrakty: *Hypnum cupressiforme* oraz *Rhytidiadelphus triquetrus*, których IC_{50} wynoszą odpowiednio 0,50 mg/ml i 0,32 mg/ml. Ekstrakty z *Polustriella commutata* ($IC_{50} = 9,57$ mg/ml) oraz z *Politrichastum formosum* ($IC_{50} = 5,65$ mg/ml) wykazały najniższą aktywność ze wszystkich przebadanych ekstraktów.



Wykres 2. Zdolność wiązania jonów metali wyrażona w IC_{50} [mg/ml] dla metody polegającej na chelatacji jonów żelaza (II).

Figure 2. Metal ion binding capacity expressed in IC_{50} [mg/ml] for the method of chelation of iron (II) ions.

Dyskusja

W pracy badawczej wykorzystano mchy należące do trzech klas: torfowców, prątników oraz płonników. W testach przeprowadzonych z wykorzystaniem metody polegającej na zmiataniu wolnego rodnika DPPH, najniższe wyniki IC_{50} , tak więc najwyższą aktywność antyoksydacyjną, wykazały gatunki należące do klasy płonników. Ekstrakty etanolowe z gatunków należących do tej klasy przejawiały wyższą aktywność niż wszystkie pozostałe gatunki użyte w badaniach. Zakres IC_{50} dla przedstawicieli tej klasy leży w przedziale od 1,56 mg/ml do 6,91 mg/ml. Spośród nich najwyższą aktywność wykazuje ekstrakt z *Polytrichum commune* (płonnik pospolity).

Porównanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II) i zmiatania wolnego...

Wszystkie ekstrakty z mchów należących do klasy torfowców wykazują znacznie niższą aktywność neutralizacji wolnego rodnika DPPH. Wyniki IC_{50} dla tych gatunków mieszczą się w zakresie od 66,54 mg/ml do 154,66 mg/ml. Najwyższą aktywność w obrębie tej klasy przejawia ekstrakt z *Sphagnum palustre* (torfowiec błotny). Gatunki, które wykazały najwyższą aktywność w badaniach z wykorzystaniem metody polegającej na chelatowaniu jonów żelaza (II) należą do klasy prątników. Nie wszystkie mchy należące do tej klasy cechują się wysoką aktywnością. Niektóre z nich wykazują dość niski potencjał antyoksydacyjny na tle wszystkich przebadanych gatunków. Zakres wyników IC_{50} dla tej klasy w badaniach z wykorzystaniem metody z użyciem jonów żelaza (II) mieści się w przedziale od 0,32 mg/ml do 2,03 mg/ml. Najwyższą aktywność wśród prątników w testach za pomocą tej metody wykazał *Rhytidiadelphus triquetrus* (fałdownik szeleszczący).

Wszystkie gatunki należące do torfowców przejawiają dość wysoką aktywność antyoksydacyjną w testach z wykorzystaniem jonów żelaza (II) na tle wszystkich przebadanych gatunków, jednak niższą niż najbardziej aktywne mchy należące do prątników. Zakres wyników IC_{50} dla klasy torfowców w badaniach z wykorzystaniem tej metody mieści się w przedziale od 0,71 mg/ml do 0,96 mg/ml. Gatunkiem wykazującym najwyższą aktywność antyoksydacyjną wśród torfowców w testach polegających na chelatowaniu jonów żelaza jest *Sphagnum fimbriatum* (torfowiec frędzlowany). Najniższą aktywnością w testach z wykorzystaniem jonów żelaza (II) na tle innych mchów wykorzystanych w badaniach cechują się płonniki. Zakres wyników IC_{50} dla klasy płonników w badaniach z wykorzystaniem tej metody mieści się w przedziale od 1,71 mg/ml do 9,57 mg/ml. Gatunkiem wykazującym najwyższą aktywność antyoksydacyjną w tej klasie w testach polegających na chelatowaniu jonów żelaza jest *Polytrichum juniperinum* (płonnik jałowcowaty).

Zastanawiający jest fakt, że wyniki uzyskane z wykorzystaniem metody polegającej na zmiataniu wolnego rodnika DPPH nie przekładają się na wyniki otrzymane w testach z użyciem jonów żelaza (II). Gatunki należące do płonników cechowały się bardzo wysoką aktywnością w testach z wolnym rodnikiem DPPH, jednocześnie wykazując najniższe aktywności spośród przebadanych gatunków w testach polegających na chelatowaniu jonów żelaza (II). Torfowce natomiast przejawiały dość wysoką aktywność w testach z jonami żelaza, przy niskim potencjale w testach polegających na zmiataniu wolnego rodnika DPPH. Z otrzymanych danych wynika, że ekstrakty, które wykazują wybitny potencjał antyoksydacyjny w testach z użyciem DPPH w porównaniu z innymi, posiadają najniższą zdolność redukcji jonów żelaza (II). Przykładowo *Polytrichum commune* (płonnik pospolity) wykazał najwyższą aktywność spośród wszystkich 20 gatunków w badaniach zdolności zmiatania wolnego rodnika DPPH ($IC_{50} = 1,56$ mg/ml), jednocześnie cechując się najniższym potencjałem w pomiarach potencjału chelatowania jonów żelaza ($IC_{50} = 9,57$ mg/ml).

Badania przeprowadzone w 2008 r. na Uniwersytecie Wiedeńskim w Department of Chemical Ecology and Ecosystem Research wykazały aktywność antyoksydacyjną czterech gatunków mchów, w tym *Polytrichum formosum* oraz *Pleurozium schreberi*. Do określenia potencjału antyoksydacyjnego wykorzystano metody spektrofotometryczne: redukcję jonów żelaza (III) do żelaza (II), testy zdolności neutralizacji tlenku azotu (NO), NSSOH (Nonsite-specific Hydroxyl radical-mediated 2-deoxy-d-ribose Degradation) oraz SSOH (Site-specific Hydroxyl Radical-mediated 2-deoxy-d-ribose Degradation). Oprócz testów spektrofotometrycznych zastosowano cykliczną woltarometrię. Wyniki testów dotyczących *Polytrichum formosum* oraz *Pleurozium schreberi* prezentują się następująco:

Tabela 2. Porównanie wyników badań ekstraktów etanolowych z *Polytrichum formosum* i *Pleurozium schreberi* przeprowadzonych pięcioma różnymi metodami w 2008 r. na Uniwersytecie Wiedeńskim w Department of Chemical Ecology and Ecosystem Research.

| | IRP [mg/g] | CV [mg/g] | NO [mg/ml] | NSSOH [mg/ml] | SSOH [mg/ml] |
|-----------------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>Polytrichum formosum</i> | 48,859 +/-12,086 | 7,553 +/-1,688 | 0,029 +/-0,001 | >2000 | 0,065 +/-0,006 |
| <i>Pleurozium schreberi</i> | 2,061 +/-0,352 | 6,808 +/-1,576 | 0,728 +/-0,158 | 0,845 +/-1,316 | 0,439 +/-0,203 |

Etanolowe ekstrakty z *Polytrichum formosum* wykazały wysoką aktywność na tle innych ekstraktów wykorzystanych w badaniach. *Pleurozium schreberi* cechował się niską aktywnością na tle pozostałych gatunków użytych w badaniach [1]. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy potwierdzają potencjał antyoksydacyjny *Polytrichum formosum* oraz *Pleurozium schreberi* wykazany w badaniach z 2008 roku. Otrzymane wartości IC_{50} potwierdzają również wyższą aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z *Polytrichum formosum* od ekstraktów z *Pleurozium schreberi*.

W roku 2014 w Katedrze i Zakładzie Botaniki na Uniwersytecie Medycznym w Lublinie przeprowadzono badania dotyczące właściwości antyoksydacyjnych mchów występujących w Polsce, w tym gatunków *Hypnum cupressiforme* oraz *Polytrichum formosum*. W pracach wykorzystano ekstrakty metanolowe, które poddano testom z wykorzystaniem wolnego rodnika DPPH oraz jonów żelaza (II). Do badań użyto surowiec pozyskany w okresie wiosennym, letnim i jesiennym. Wszystkie przeprowadzone badania potwierdziły właściwości antyoksydacyjne *Hypnum cupressiforme* oraz *Polytrichum formosum*. We wszystkich testach *Polytrichum formosum* wykazywał wyższy potencjał antyoksydacyjny niż *Hypnum cupressiforme* [8, 9]. Ponieważ testy zdolności neutralizacji wolnego rodnika DPPH w niniejszej pracy przeprowadzono metodą identyczną z wykorzystaną w 2014 roku, istnieje możliwość porównania otrzymanych wartości IC_{50} :

Porównanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II) i zmiatania wolnego...

Tabela 3. Porównanie wartości IC_{50} uzyskanych w testach zdolności neutralizacji wolnego rodnika DPPH w 2014 roku w Katedrze i Zakładzie Botaniki Uniwersytetu Medycznego w Lublinie z wartościami IC_{50} przedstawionymi w niniejszej pracy.

| | Ekstrakt metanolowy z mchów wiosennych (2014) | Ekstrakt metanolowy z mchów letnich (2014) | Ekstrakt metanolowy z mchów jesiennych (2014) | Ekstrakt etanolowy z mchów letnich (2016) |
|-----------------------------|---|--|---|---|
| <i>Polytrichum formosum</i> | 12,82 mg/ml | 15,32 mg/ml | – | 5,47 mg/ml |
| <i>Hypnum cupressiforme</i> | 84,99 mg/ml | 169,12 mg/ml | 62,51 mg/ml | 75,27 mg/ml |

Warto zwrócić uwagę na fakt, że ekstrakty etanolowe użyte w tej pracy (2016), wykonane z surowca zebranego w okresie letnim, wykazują wyższy potencjał antyoksydacyjny niż ekstrakty metanolowe z tego samego okresu w badaniach przeprowadzonych w 2014 r. Może to świadczyć o tym, że użycie etanolu jako rozpuszczalnika w trakcie ekstrakcji zwiększa stężenie substancji o charakterze antyutleniającym w ekstrakcie, w stosunku do zastosowania metanolu. Istnieje możliwość, że różnice w aktywności ekstraktów wynikają z tego, że surowiec był pozyskany w różnych latach, różniących się, np. warunkami atmosferycznymi. Wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem metody polegającej na chelatowaniu jonów żelaza (II) są trudne do porównania, ponieważ w pracach z 2014 roku użyto innych proporcji odczynników i ekstraktu niż w tej pracy. Wartości IC_{50} otrzymane w badaniach z 2014 r. prezentują się następująco:

Tabela 4. Porównanie wartości IC_{50} uzyskanych w testach zdolności chelatowania jonów żelaza (II) w 2014 roku w Katedrze i Zakładzie Botaniki Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

| | Ekstrakt metanolowy z mchów wiosennych (2014) | Ekstrakt metanolowy z mchów letnich (2014) | Ekstrakt metanolowy z mchów jesiennych (2014) |
|-----------------------------|---|--|---|
| <i>Polytrichum formosum</i> | 6,70 mg/ml | 19,20 mg/ml | – |
| <i>Hypnum cupressiforme</i> | – | 106,51 mg/ml | 40,52 mg/ml |

Wartości IC_{50} przedstawione w niniejszej pracy dla testów z wykorzystaniem metody opartej na chelatowaniu jonów żelaza (II) wynoszą 5,65 mg/ml dla ekstraktu etanolowego *Polytrichum formosum* oraz 0,50 mg/ml dla ekstraktu etanolowego *Hypnum cupressiforme*. Mimo różnic w przeprowadzonych testach, analizując

procedurę przeprowadzonych badań oraz otrzymane wyniki, możemy stwierdzić, że ekstrakty etanolowe z *Polytrichum formosum* i *Hypnum cupressiforme* badane w 2016 roku wykazały wyższą aktywność od ekstraktów metanolowych z tych samych mchów badanych w 2014 roku. Wyniki testów chelatowania jonów żelaza (II) przez ekstrakty metanolowe z mchów przeprowadzonych w 2014 roku sugerują wyższą aktywność *Polytrichum formosum* od *Hypnum cupressiforme*. Wartości IC_{50} uzyskane przy użyciu tej metody, przedstawione w niniejszej pracy, nie potwierdzają tej zależności: ekstrakty etanolowe z *Hypnum cupressiforme* wykazały wyższą aktywność od ekstraktów z *Polytrichum formosum*. Wyniki przedstawione w tej pracy potwierdzają właściwości antyoksydacyjne wykazane w badaniach przeprowadzonych 2014 r. w Katedrze i Zakładzie Botaniki na Uniwersytecie Medycznym w Lublinie. Wartości IC_{50} przedstawione w tej pracy, zarówno dla metody z wykorzystaniem wolnego rodnika DPPH, jak i jonów żelaza (II), wskazują na wyższy potencjał antyoksydacyjny *Polytrichum formosum* i *Hypnum cupressiforme* niż wyniki z 2014 roku. Być może za różnice w wynikach odpowiada inna metoda ekstrakcji: w tej pracy wykorzystano ekstrakty etanolowe, w poprzednich zaś metanolowe.

W ostatnich latach w czasopismach naukowych opublikowano szereg badań dotyczących potencjału biologicznego ekstraktów z różnych gatunków mchów, w tym ich aktywności antyoksydacyjnej [10-15]. W 2018 roku zespół badawczy pod kierownictwem Mohandasa opublikował pracę badawczą opisującą wykazane właściwości mchu *Thuidium tamariscellum*. W celu określenia aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z tej rośliny, podobnie jak w przeprowadzonych przez autorkę tej pracy badaniach, wykorzystano test DPPH oraz określono ich zdolność do chelatowania metali. Potencjał antyoksydacyjny badanych próbek był porównywalny z syntetycznym askorbinianem zastosowanym jako próba kontrolna. Określono również poziom terpenoidów w *Thuidium tamariscellum*, który okazał się bardzo wysoki. Z tą właśnie grupą substancji fitochemicznych powiązano aktywność antyoksydacyjną ekstraktów [13]. Zespół pod kierownictwem Mandića w 2021 roku przeprowadził badania dotyczące składu fitochemicznego mchu *Hedwigia ciliata*. W trakcie testów został również określony ich potencjał przeciwutleniający. Ekstrakty z badanej rośliny przygotowano przy użyciu rozpuszczalników o różnej polarności. Charakterystyka chemiczna ekstraktów wykazała obecność związków fenolowych i flawonoidowych oraz triterpenoidowych. Znaczące właściwości przeciwutleniające wszystkich ekstraktów wykazano w teście z wykorzystaniem β -karotenu. Największą aktywność stwierdzono dla ekstraktu woda:etanol, ze współczynnikiem inhibicji na poziomie 96% [14]. W 2022 roku grupa badaczy pod kierownictwem Ondera przebadala skład fitochemiczny oraz aktywność przeciwutleniającą ekstraktów eterowych z mchów *Plagiomnium ellipticum* oraz *Antitrichia californica*. Ekstrakty z *P. ellipticum* zawierały najwyższą zawartość flawonoidów

Porównanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II) i zmiatania wolnego...

($52,41 \pm 0,52$, ekwiwalent rutyny- mg RE/g ekstraktu), natomiast z *A. californica* cechowały się wyższą całkowitą zawartością fenoli ($25,84 \pm 0,23$, ekwiwalent kwasu galusowego- mg GAE/g ekstraktu). Próbki z gatunku *A. californica* wykazały największą zdolność chelatowania metali z wartościami $51,46 \pm 0,26$ (mg EDTA/g ekstraktu) [15]. Zebrane dane literaturowe, w kontekście przeprowadzonych przez autorkę pracy badań, wskazują na duży, słabo obecnie poznany potencjał fitochemicznych mchów. Celowe jest przeprowadzenie badań dotyczących zależności pomiędzy rodzajem użytego do ekstrakcji rozpuszczalnika, a potencjałem antyoksydacyjnym ekstraktów z mchów.

Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały potencjał antyoksydacyjny 20 gatunków mchów. Wszystkie ekstrakty odznaczały się zarówno zdolnością do neutralizacji wolnego rodnika DPPH, jak i wiązania jonów żelaza (II). Najwyższy potencjał neutralizacji wolnego rodnika DPPH wykazały mchy z rodziny *Polytrichopsida*: *Politrichum juniperinum*, *Politrichastum formosum*, *Polytrichum commune*. Najwyższą aktywnością pod względem chelatowania jonów żelaza cechowały się ekstrakty z *Hypnum cupressiforme* oraz *Rhytidiadelphus triquetrus*. W testach nie zaobserwowano zbieżności aktywności wolnego rodnika z aktywnością do chelatowania jonów żelaza (II) dla badanych gatunków.

Podziękowania

Chciałabym podziękować za wsparcie merytoryczne prof. Helenie Smolarz – promotorce pracy magisterskiej, na podstawie której powstał artykuł badawczy.

Literatura

- [1] Chobot V., Kubicova L., Nabbout S., Jahoda r L., Hadacek F., Evaluation of Antioxidant Activity of Some Common Mosses, *Z. Naturforsch*, 2008, 63, s. 476-482.
- [2] Wawrzyniak A., Krotki M., Stoparczyk B., Właściwości antyoksydacyjne owoców i warzyw, *Medycyna Rodzinna*, 2011, 1, s. 19-23.
- [3] Cybul M., Nowak R., Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych, *Herba Polonica*, 2008, 54(1), s. 68-69.
- [4] Pląśek V., Mszaki w lasach. Przewodnik terenowy dla leśników i taksatorów, Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa 2013.
- [5] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 1995, 28, s. 25-30.
- [6] Decker E., Welch B., Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38, s. 674.

- [7] Chai T., Mohan M., Ong H., Wong F., Antyoxydant, Iron-chelating and Anti-glucosidase Activities of *Typha domingensis* Pers (Typhaceae), *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2013, 13(1), s. 67-72.
- [8] Młynarska J., Właściwości antyoksydacyjne wybranych gatunków roślin niższych. Praca magisterska UM Lublin 2014.
- [9] Trylowski M., Wpływ terminu zbioru na właściwości antyoksydacyjne mszaków. Praca magisterska UM Lublin 2014.
- [10] Hieu H.V., Tatipamula V.B., Killari K.N., Koneru S.T., Srilakshmi N., Ranajith S.K., HPTLC analysis, antioxidant and antidiabetic activities of ethanol extract of moss *Fissidens grandiflora*, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 82(3), s. 449-455.
- [11] Valenzuela-Cobos J.D., Rodríguez-Grimón R.O., Zied D.C., Grijalva-Endara A., Garcés-Moncayo M.F., Garín-Aguilar M.E., Del Toro G.V., Chemical composition and biological properties of *Pleurotus spp.* cultivated on peat moss and wheat straw, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2019, s. 830-836.
- [12] Lunić T.M., Mandić M.R., Oalde Pavlović M.M., Sabovljević A.D., Sabovljević M.S., Božić Nedeljković B.Đ., Božić B.Đ., The Influence of Seasonality on Secondary Metabolite Profiles and Neuroprotective Activities of Moss *Hypnum cupressiforme* Extracts: *In Vitro* and *In Silico* Study, *Plants*, 2022, 11(1), s. 123.
- [13] Mohandas G.G., Kumaraswamy, M., Antioxidant activities of terpenoids from *Thuidium tamariscellum* (C. Muell.) Bosch. and Sande-Lac. a Moss, *Pharmacognosy Journal*, 2018, 10(4), s. 645-649.
- [14] Mandić M.R., Oalde M.M., Lunić T.M., Sabovljević A.D., Sabovljević M.S., Gašić U.M., Božić Nedeljković B.D., Chemical characterization and *in vitro* immunomodulatory effects of different extracts of moss *Hedwigia ciliata* (Hedw.) P. Beauv. from the Vršacke Planine Mts., Serbia, *PloS One*, 2021, 16(2), e0246810.
- [15] Onder A., Yıldız A., Cinar A.S., Zengin G., Ak G., Ozenoğlu H., The comparison of the phytochemical composition, antioxidant and enzyme inhibition activity of two moss species: *Plagiomnium ellipticum* (Brid.) T. Kop. and *Antitrichia californica* Sull., from south-west ecological region in Turkey, *Natural Product Research*, 2022, 36(10), s. 2660-2665.

Do cytowania:

Janowska S., Porównanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II) i zmiatania wolnego rodnika DPPH przez ekstrakty z mchów, *Herbalism*, 2022 1(8), s. 59-72.