

ANTIOXIDAČNÝ POTENCIÁL A ANALÝZA SILÍC RÔZNYCH DRUHOV RODU *Mentha* L.

SILVIA FIALOVÁ^a, VIERA OČKOVÁ^a, ANTON
ŤAŽKÝ^{b,c}, DANIELA TEKELOVÁ^a a DANIEL
GRANČAI^a

^a Katedra farmakognózie a botaniky, ^b Toxikologické a
antidopingové centrum, ^c Katedra farmaceutickej analýzy
a nukleárnej farmácie, Farmaceutická fakulta Univerzity
Komenského v Bratislave, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava
fialova@fpharm.uniba.sk

Došlo 12.11.13, prijaté 5.4.14.

Kľúčové slová: *Mentha*, silica, antioxidačná aktivita
(DPPH)

Úvod

Rod *Mentha* L. z čeľade Lamiaceae a podčeľade Nepetoideae je jedným z najvýznamnejších rodov liečivých rastlín, nakoľko zahŕňa množstvo taxónov s obsahom cennej silice. Máty dnes patria medzi ekonomicky najvýznamnejšie silicové rastliny a pre svoje terapeutické účinky sa využívajú viac než 2000 rokov. Sú súčasťou každej tradičnej medicíny a nachádzajú sa na všetkých kontinentoch.

Hlavnou účinnou zložkou je silica, ktorá je objektom skúmania mnohých výskumných prác. Silica je významnou komerčnou zložkou vo viacerých odvetviach priemyslu. Na ekonomické účely sa využívajú najmä silice s vysokým obsahom mentolu, karvónu a linalolu. Rod *Mentha* je genotypovo variabilný, fenotypovo plastický s vysokým stupňom hybridizácie. Súčasný taxonomický rozdelenie rodu zahŕňa 18 druhov a približne 11 krížencov rozdelených do 4 sekcií^{1,2}. Mätové silice sú zložené z monoterpénov a seskviterpénov, pričom dominuje obsah monoterpénových zložiek. Zloženie silice kolíše od druhu k druhu. Zložky silice v mätách môžu pochádzať z jednej z troch biosyntetických ciest: lúnia acyklických monoterpénov, lúnia 6-oxidovaných cyklických monoterpénov a lúnia 3-oxidovaných cyklických monoterpénov. Príkladom jednej z nich je linalol z máty s prívlastkom „citrónová“ resp. „bergamotová“, preto možno túto cestu označiť ako linalolovú cestu. Vysoký obsah karvónu v mäte klasnatej je príkladom 6-oxidovaných cyklických monoterpénov, ide o tzv. karvónový typ. Mentón a mentol z máty piepornej predstavujú 3-oxidované cyklické monoterpény (mentolový typ). Na základe prevládajúcej zložky silice jedného z uvedených typov a komerčného využitia možno máty rozdeliť do troch kategórií (tab. I). Mentolový typ predstavuje najmä „pepermintová“ silica (*M. × piperita*) bohatá na mentol, mentón, mentofurán. Linalolový typ predstavuje „bergamotová“ silica (*M. × piperita* var. *citrata*) bohatá na linalol a linalylacetát. Karvónový typ predstavuje „spearmintová“ silica (*M. spicata*) bohatá na karvón, dihydrokarvón, karveol^{3,4}.

Okrem silice je v mätách prítomné veľké množstvo fenolových látok, prevažne polárneho charakteru (fenolové

Tabuľka I

Rozdelenie taxónov rodu *Mentha* L. podľa prevládajúcej zložky v silici⁴

MENTOLOVÝ TYP	KARVÓNOVÝ TYP
<i>M. aquatica</i> L.	<i>M. × dalmatica</i> Tausch
<i>M. arvensis</i> L.	<i>M. × smithiana</i> R. Graham
<i>M. canadensis</i> L.	<i>M. suaveolens</i> Ehrh. (syn. <i>M. × rotundifolia</i> L.)
<i>M. dahurica</i> Fisch. ex. Benth.	<i>M. spicata</i> L.
<i>M. diemenica</i> Spreng.	<i>M. × villosa</i> Huds.
<i>M. × dumetorum</i> Schultes	LINALOLOVÝ TYP
<i>M. gattefossei</i> Maire	<i>M. aquatica</i> var. <i>citrata</i> (Ehrh.) Frensen.
<i>M. × gracilis</i> Sole	<i>M. longifolia</i> (L.) L. var. <i>lavanduliodora</i> ined.
<i>M. longifolia</i> (L.) L.	<i>M. × piperita</i> var. <i>citrata</i> (Ehrh.)
<i>M. × maximiliana</i> F.W.Schultz	<i>M. × piperita</i> L. var. <i>lavanduliodora</i> ined.
<i>M. × piperita</i> (L.) Huds.	Doposiaľ neštudované zloženie silice
<i>M. pulegium</i> L.	<i>M. australis</i> R. Br.
<i>M. repens</i> (Hook. f.) Briq	<i>M. laxiflora</i> Benth.
<i>M. requienii</i> Benth.	<i>M. × carinthiaca</i> Host
<i>M. satureoides</i> R. Br.	
<i>M. × verticillata</i> L.	

kyseliny, flavonoidné glykozidy)⁵. Máty sú známe pre množstvo biologických aktivít, ktorých indikačná oblasť je široká. V minulosti boli potvrdené antimikrobiálne, antifungálne, protizápalové, choleretické, cholekinetické, expektoračné, bolesť uvoľňujúce a iné účinky. Viaceré z týchto účinkov sa pripisujú prítomnosti monoterpenov v silici, najmä mentolu, karvónu, karvakraolu, tymolu a β -linalolu^{6,7}.

Druhy rodu *Mentha* L. sú vďaka svojim obsahovým látkam považované za významné prírodné antioxidanty. Látky s týmito vlastnosťami sa využívajú pri poruchách organizmu, ktoré sú spôsobené oxidačným stresom – porušením rovnováhy medzi vznikom a odstraňovaním reaktívnych foriem kyslíka a dusíka, teda voľných radikálov. Redoxný stres sa v organizme podieľa na patogenéze vážnych chronických ochorení vrátane aterosklerózy, artritídy, rakoviny, či neurodegeneratívnych porúch. Antioxidanty na syntetickej báze neprinášajú také benefity ako antioxidanty prírodné, ktorým sa v súčasnom výskume venuje veľká pozornosť. Máty a silice získané z nich sú často súčasťou bežnej stravy vo viacerých krajinách sveta. Počas niekoľkoročných výskumov sa ukázali ako sľubný agent v prevencii viacerých ochorení, vrátane ťažkostí spojených s redoxnou nerovnováhou v organizme⁸.

Preto jedným z cieľov tejto práce bolo stanovenie antioxidantnej aktivity silíc 5 druhov máty (*M. spicata*, *M. × piperita* cv. 'Perpeta', *M. × villosa*, *M. spicata* var. *crispa*, *M. longifolia* var. *lavanduliodora*) s použitím DPPH radikálu. Uvedené druhy sa pestovali v klimatických podmienkach juhozápadného Slovenska. Súčasne sa analyzovali zložky silíc pomocou GC-MS.

Materiál a metódy

Rastlinný materiál

M. × piperita cv. 'Perpeta' (MP, mäta pieporná), *M. spicata* ssp. *spicata* (MS, mäta klasnatá), *M. spicata* var. *crispa* (MSC, mäta kučeravá), *M. × villosa* (MV, mäta huňatá), *M. longifolia* var. *lavanduliodora* (MLL, mäta dlholistá levanduľová) pochádzali zo Záhrady liečivých rastlín Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Kultúry sa pestovali v ľahkej piesočnatohlinitej pôde na slnečnom mieste. Zber sa uskutočnil v júli 2010, vo fáze nástupu kvitnutia, v 4. roku vegetácie. Rastliny sa sušili pri teplote do 32 °C. Pre experimentálne úče-

ly sa z usušených vňatí ručne oddelili a analyzovali len listy. Vzorky sa uchovávali v papierových obaloch, uložené na tmavom mieste. Silica sa destilovala po 3 mesiacoch skladovania. Herbárové položky sú uložené na Katedre farmakognózie a botaniky Farmaceutickej fakulty UK v Bratislave.

Metódy

Izolácia silice

Na izoláciu silice sa použila destilácia s vodou v Clevangerovej aparatúre. 30,0 g rozdrobenej listovej drogy sa v 500ml banke zalialo 200 ml destilovanej vody ako destilačnej kvapaliny. Destilovalo sa 2 hodiny rýchlosťou 3 až 4 ml min⁻¹ (cit.⁹). Silica sa analyzovala pomocou GC-MS ihneď po destilácii.

GC-MS analýza

Zložky silice sa analyzovali pomocou GC-MS (GC: Trace GC; MS: Trace DSQ), (Thermo Finnigan, USA). Na analýzu sa použila kapilárna kolóna typu HP-20M Carbowax (0,20 μ m hrúbka, 25 m dĺžka, vrstva vnútorného priemeru 0,20 μ m). Teplota kolóny bola 40 °C a separácia zložiek vzorky sa uskutočnila pri programovane meniacej teplote kolóny. Nosným plynom bolo hélium s konštantným prietokom 0,5 ml min⁻¹. Objem nástreku bol 1 μ l silice. Teplota injektora bola 240 °C. Vzorka sa priamo dávkovala v režime delenia vzorky (split injection). Teplota ionového zdroja detektora bola 200 °C. Pre separáciu iónov sa použil kvadrupólový hmotnostný filter. Hmotnostné spektrá sa zaznamenávali v rozsahu od 20 do 300 *m/z*. Kvalitatívne hodnotenie sa vykonalo na základe získaných hmotnostných spektier, ktoré sa identifikovali pomocou databázy spektier NIST.

DPPH test

Antiradikálová aktivita silíc sa testovala použitím DPPH (2,2-difenylyl-pikrylhydrazyl) voľného radikálu. Z jednotlivých čerstvo destilovaných silíc sa zriedením s etanolom pripravili roztoky s rôznou koncentráciou. K 100 μ l takto pripravených etanolových roztokov silíc sa pridalo 900 μ l roztoku DPPH (55 μ mol l⁻¹). Po 30 min sa merala absorbanca pri $\lambda = 517$ nm oproti porovnávaciemu roztoku (metanol). Antioxidantná aktivita sa vyjadrila ako hodnota SC₅₀ (μ l ml⁻¹), t.j. koncentrácia roztoku, pri ktorej dochádza k 50% poklesu absorbancie oproti referenčnému

Tabuľka II

Obsah silice vybraných druhov máty po destilácii z 30 g drogy

Vzorka	Objem silice [ml]	Obsah silice [% V/m]
<i>M. spicata</i> (MS)	0,62	2,07
<i>M. × piperita</i> cv. 'Perpeta' (MP)	0,84	2,80
<i>M. × villosa</i> (MV)	0,72	2,40
<i>M. spicata</i> var. <i>crispa</i> (MSC)	0,92	3,07
<i>M. longifolia</i> var. <i>lavanduliodora</i> (MLL)	0,72	2,40

Tabuľka III
Zastúpenie jednotlivých zložiek silíc (%) na základe GC-MS analýzy

Zložka	RT [min]	MS	MP	MV	MSC	MLL
1R- α -Pinén	4,36		0,6	0,51	0,53	
3-Tujén	4,39	3,49				
(-)-Kampfén	4,96	0,03				
β -Terpinén	5,96		0,33	0,38	0,53	0,14
(1S)-(-)- β -Pinén	5,71	1,58	0,77	0,65	0,79	
β -Felandrén	5,94	1,32				
β -Pinén	6,87	1,71	0,11	0,43	1,72	
Terpinolén	7,17	1,58	0,17			
D-Limonén	7,57			14,59	16,84	
1,8-Cineol	7,66	24,6	6,81			0,62
β - <i>trans</i> -Ocimén	8,4	0,54		0,15	0,36	0,5
3-Karén	8,41		0,15			
γ -Terpinén	8,61	7,02	0,36		0,05	0,28
<i>p</i> -Cymén	8,89	8,92	0,2			0,12
<i>allo</i> -Ocimén	9,5		0,07			
2-Metylbutyl ester kyseliny valérovej	9,98		0,05			
3-Oktyl acetát	10,95			0,14		0,23
3-Oktanol	11,79	1,05	0,29	0,71	0,25	0,34
<i>cis</i> -2-Mentenol	13,55	0,98				
Mentón	13,6		28,29	0,98		
<i>trans</i> -Mentón	14,24		5,14			
4-Terpinyl acetát	14,27					0,34
<i>cis</i> -3-Hexenyl izovalerát	15,03					0,19
Dihydroedulan I	15,09	0,31		0,12	0,07	0,26
(<i>Z</i>)-Sabinén hydrát	15,7	0,13			1,48	2,21
<i>cis</i> -2-Mentenol	15,75					0,11
β -Linalol	16	0,23	0,41		0,28	87,00
β -Burbonén	16,47		0,15	1,75	1,4	
Linanol ester kyseliny octovej	16,7					0,75
Mentol acetát	16,86		1,61			
(<i>E</i>)-Dihydrokarvón	17,22			1,58	1,85	
(1 <i>R</i>)-(+)-Izomentol	17,23		5,04			
Terpinén-4-ol	17,23	0,88				0,86
γ -Kadinén	17,85			0,14		
Ylangén	17,9				0,13	
β -Elemén	18,05			0,12		
(+)-Neomentol	18,05		0,64			
Karyofylén	18,24	1,84		5,19	1,13	2,78
Mentol	18,36		44,01			
(<i>E</i>)-3(10)-Karén-4-ol	19,33	0,03				

^a RT – retenčný čas, MS – *M. spicata*; MP – *M. × piperita* cv. 'Perpeta'; MV – *M. × villosa*; MSC – *M. spicata* var. *crispa*; MLL – *M. longifolia* var. *lavanduliodora*

Tabuľka III
pokračovanie

Zložka	RT [min]	MS	MP	MV	MSC	MLL
α -Kubebén	19,38			0,32		
α -Amorfén	19,45				0,1	
Dihydrokarvyl acetát	19,53			0,62	0,4	
α -Terpineol	19,74	1,9	0,11	0,28	0,08	0,06
Borneol	19,77				0,43	
α -Karyofylén	19,96			0,12		
Piperitón	20,2		0,52	2,1		
(Z)- β -Farnezen	20,35		0,28			
Karvón	20,43	0,38		56,39	63,36	0,07
β -Kubebén	20,99	1,73	2,31	9,2	2,87	2,41
Dihydrokarveol	21,15				3,51	
γ -Elemén	21,6	0,07	0,23	0,29	0,54	0,67
3,7-Dimethyl- 2-oktén-1-ol	21,84	0,04				
Karvyl acetát	21,98			0,38	0,06	
Kalamén	23,82			0,43		
Linalol format	23,87	0,08				
(Z)-Karveol	24,03			0,32	0,29	
<i>cis</i> -Jasmón	25,76	0,05			0,16	
Germakrén D-4-ol	28,78			0,16		
Kubenol	29			0,25		
Viridiflorol	29,46	0,37	0,8	1,39		
Spatulenol	30,32				0,25	
Tymol	31,73	13,17				
Karvakrol	32,27	25,25				
α -Kadinol	32,76			0,3		
Spolu [%]		99,28	99,45	99,99	99,46	99,94

^a RT – retenčný čas, MS – *M. spicata*; MP – *M. × piperita* cv. 'Perpeta'; MV – *M. × villosa*; MSC – *M. spicata* var. *crispa*; MLL – *M. longifolia* var. *lavanduliodora*

roztoku¹⁰.

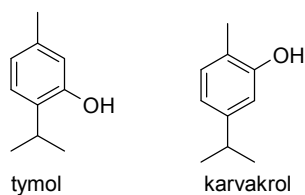
Merania sa uskutočnili v 3 paralelných stanoveniach a obsah silice sa vzťahoval na vysušenú drogu.

Výsledky a diskusia

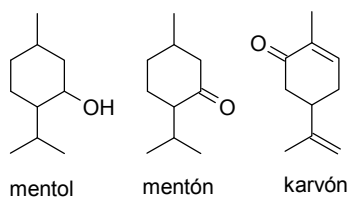
Silice sú heterogénne zmesi lipofilných prchavých látok. Druhy rodu *Mentha* sa vyznačujú vysokou variabilitou v zložení silice, čo potvrdzuje i naša práca. Silice piatich taxónov boli izolované destiláciou s vodou (tab. II) a ich zloženie analyzované plynovou chromatografiou prepojenou s hmotnostnou spektrometriou. Jednotlivé vzorky boli identifikované na základe retenčných časov a hmotnostného spektra. Zloženie silíc je uvedené v tab. III. Analýzou zložiek silice sa potvrdila prítomnosť

všetkých troch typov mäťových silíc na základe majoritnej zložky (MS, MV, MSC – karvónový typ, MP – mentolový typ, MLL – linalolový typ).

Jedným zo skúmaných druhov je mäta klasnatá (*M. spicata*). Všeobecne je pre silicu tohto druhu typický majoritný obsah karvónu. Odvolávajú sa naň viaceré publikácie⁴. I keď silicu mäty klasnatej možno zaradiť do karvónovej línie, ide v našom prípade o tzv. karvakrol-tymolový chemotyp. A práve tieto zložky, ako je vysvetlené ďalej, môžu byť kľúčové v schopnosti zhasania voľných radikálov silicami. Preto možno považovať tento chemotyp *M. spicata* za veľmi cenný. Spomedzi všetkých skúšaných vzoriek to bola práve silica *M. spicata*, u ktorej sa zaznamenala najvyššia antioxidačná aktivita ($SC_{50} = 0,02 \mu\text{l ml}^{-1}$).



Obr. 1. Štruktúra tymolu a karvakrolu

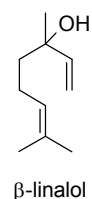


Obr. 2. Štruktúra mentolu, mentónu a karvónu

Antioxidačná aktivita silice skúmaného druhu *M. spicata* je pravdepodobne viazaná na hlavné zložky tejto silice, na karvakrol (32,3 %) a tymol (13,3 %). V oboch prípadoch ide o monocyklické monoterpény s aromatickým kruhom a voľnými hydroxylovými skupinami (obr. 1). Práve u týchto látok sa v porovnaní s ostatnými zložkami silice predpokladá vyššia antioxidačná aktivita. Kulevanova a Kadifkova Panovska¹¹ uvádzajú, že silice s obsahom karvakrolu a tymolu vykazujú vysokú antioxidačnú aktivitu. V prípade uvedených monoterpénov sa zistilo, že antioxidačná aktivita klesá v poradí karvakrol > tymol + karvakrol > tymol. Naopak v štúdiu antioxidačnej aktivity tymolu a karvakrolu v dvoch lipidových systémoch sa ako silnejší antioxidant potvrdil tymol¹². Možno preto predpokladať, že antioxidačná aktivita oboch cyklických monoterpénov bude vyrovnaná, vzhľadom na podobnú štruktúru a to prítomnosť dvoch aklylových skupín v *p*-polohe a OH skupinou v *o*- resp. *m*-polohe⁶.

Nižšiu antioxidačnú aktivitu sme zaznamenali u silíc druhov *M. × piperita* cv. 'Perpeta' ($SC_{50} = 3,8 \mu\text{l ml}^{-1}$), *M. spicata* var. *crispa* ($SC_{50} = 6,6 \mu\text{l ml}^{-1}$) a *M. × villosa* ($SC_{50} = 2,4 \mu\text{l ml}^{-1}$). Silica mäty piepornej je bohatá na cyklické monoterpény ako sú mentol (44,1 %), mentón (28,4 %) a 1,8-cineol (6,9 %). Chromatografická analýza s hmotnostnou spektrometriou potvrdila karvón ako hlavnú zložku silice mäty kučeravej (63,4 %) ako aj mäty huňatej (56,4 %). Spomenuté monoterpény sa vyznačujú podobnou štruktúrou, ktorej základným uhlíkovým je *p*-mentán (obr. 2).

Ako najslabšie antioxidačne účinná silica spomedzi skúmaných druhov bola vyhodnotená silica *M. longifolia*

Obr. 3. Štruktúra β -linalolu

var. *lavanduliodora* ($SC_{50} = 63,3 \mu\text{l ml}^{-1}$). Dôvodom je pravdepodobne vysoký obsah acyklického monoterpénu β -linalolu (87,0 %) (obr. 3).

Záver

Na základe získaných výsledkov možno predpokladať, že intenzita antioxidačnej aktivity silíc druhov rodu *Mentha* L. sa dá hodnotiť podľa majoritných zložiek silice, pričom najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazujú silice bohaté na monoterpény fenolového charakteru.

Práca vznikla s podporou grantu VEGA 1/0059/11.

LITERATÚRA

- Bertová L. a kol.: *Flóra Slovenska V/1* str. 375, SAV, Bratislava 1993.
- Tucker A. O., Naczi R.F.C., v knihe: *Mint. The genus Mentha. Medical and Aromatic Plants – Industrial Profiles*. Vol. 44, str. 3. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton 2007.
- Schalk M., Croteau R.: *PNAS* 97, 11948 (2000).
- Lawrence B. M.: *Mint. The genus Mentha. Medical and Aromatic Plants – Industrial Profiles*. Vol. 44, str. 325, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2007.
- Mimica-Dukić N., Bozin B.: *Curr. Pharm. Design* 14, 3141 (2008).
- Ali H. M., Abo-Shady A., Sharaf Eldeen H. A., Soror H. A., Shousha W. G., Abdel-Barry O. A., Saleh A. M.: *Chem. Cent. J.* 7, 53 (2013).
- Mimica-Dukić N., Bozin B., Soković M., Mihajlović B., Matavulj M.: *Planta Med.* 69, 413 (2003).
- Kumar A., Chatopadhyay S.: *Food Chem.* 100, 1377 (2007).
- Council of Europe. *European Pharmacopoeia*. 7th ed., str. 1212, Strasbourg 2010.
- Fialová, S., Tekeľová, D., Mrlianová, M., Grančai, D.: *Acta Facult. Pharm. Univ. Comeniana* 55, 96 (2008).
- Kulevanova S., Kadifkova Panovska T.: *Bull. Chem. Technol. Macedonia* 20, 61 (2001).
- Yanishlievaa N. V., Marinova E. M., Gordon M. H., Ranevaa V. G.: *Food Chem.* 64, 59 (1999).

S. Fialová^a, V. Očková^a, A. Ťažký^{b,c}, D. Tekeřová^a, and D. Grančai^a (^a*Department of Pharmacognosy and Botany,* ^b*Toxicology and Anti-doping Center,* ^c*Department of Pharmaceutical Analysis and Nuclear Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava*): **Analysis and Antioxidant Potential and Analysis of Essential Oils of Different *Mentha* Species**

The genus *Mentha* of the family Lamiaceae has great importance due to the essential oils content and their com-

mercial utilization. The antioxidant activities of essential oil of five *Mentha* species were estimated spectrophotometrically using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH). The analysis of essential oils was performed by GC-MS. The most active was essential oil of *M. spicata* rich in carvacrol and thymol. Lowest activity was detected in *M. longifolia* var. *lavanduliodora*, rich in β -linalool.