

Extracts from selected herbs as a bioactive source of antioxidants and enzymatic inhibitors in terms of industrial applications

Ekstrakty z wybranych ziół jako bioaktywne źródło przeciwutleniaczy i inhibitorów enzymatycznych w aspekcie zastosowań w przemyśle



Dried plant samples from the *Lamiaceae*, *Apiaceae*, and *Poaceae* families were ground and extracted with water or 70% ethanol by shaking. The extracts were analyzed spectrophotometrically for total phenolic compound (TPC) content using the Folin-Ciocalteu reagent. The antioxidant activity of the extracts was detd. based on their ability to neutralize the DPPH radical, and their inhibitory potential against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) was assessed using the modified Ellman method. A correlation was obsd. between TPC and DPPH activity, whereas no correlation was obsd. between high TPC content and anticholinesterase activity of the extracts.

Keywords: plant extracts, antioxidant activity, cholinesterase inhibitors, natural additives

Wysuszone próbki roślin z rodzin *Lamiaceae*, *Apiaceae* i *Poaceae* zmielono i ekstrahowano wodą lub 70-proc. etanolem poprzez wytrząsanie. Ekstrakty analizowano spektrofotometrycznie pod kątem całkowitej zawartości związków fenolowych (TPC) za pomocą odczynnika Folina i Ciocalteu. Aktywność przeciwutleniającą ekstraktów określono na podstawie ich zdolności do neutralizacji rodnika DPPH, a ich potencjał hamujący wobec acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BChE) oceniono zmodyfikowaną metodą Ellmana. Obserwowano korelację pomiędzy zawartością TPC a aktywnością DPPH, natomiast nie stwierdzono korelacji między wysoką zawartością TPC a aktywnością antycholinoesterazową ekstraktów.

Słowa kluczowe: ekstrakty roślinne, działanie przeciwutleniające, inhibitory cholinoesterazy, naturalne dodatki

Ekstrakty roślinne zawierają liczne związki bioaktywne, takie jak polifenole, terpeny, kumaryny i fitosterole. Są dzięki temu ważnym źródłem wielofunkcyjnych dodatków dla nowoczesnego przemysłu chemicznego, co jest szczególnie istotne w kontekście zasad zrównoważonego rozwoju i zielonej chemii. Potencjał zastosowania metabolitów zawartych w ekstraktach wynika przede wszystkim z ich właściwości przeciwutleniających i zdolności do selektywnego hamowania enzymów. Dla przykładu wyciągi z rozmarynu i szalwii są stosowane jako naturalne stabilizatory biopaliw. Zawarte w nich związki fenolowe (np. kwas karnozowy, tymol) przerywają łańcuchowe reakcje utleniania poprzez neutralizację wolnych rodników odpowiedzialnych za rozkład chemiczny paliwa. Ponadto te bioaktywne związki dezaktywują jony metali, które katalizują proces degradacji. Ten podwójny mechanizm skutecznie przedłuża żywotność biopaliw i chroni silniki, stanowiąc alternatywę dla dodatków syntetycznych¹.

Znaczenie technologiczne ma również udokumentowany wpływ tych ekstraktów na aktywność cholinoesteraz: acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BChE). Molekularny mechanizm hamowania przypisuje się przede wszystkim obecności monoterpenów, takich jak 1,8-cyneol, karwakrol i linalol. Stwarza to możliwości ich wykorzystania w opracowywaniu ekologicznych środków ochrony roślin oraz jako enzymatycznych biosensorów do monitorowania neurotoksycznych pestycydów. Na przestrzeni ostatnich lat zauważalny jest dynamiczny rozwój koncepcji zielonej chemii oraz gospodarki o obiegu zamkniętym. To z przyczyn oczywistych wymusza na przemyśle chemicznym zmianę kierunku badań i poszukiwanie ekologicznie bezpiecznych surowców zdolnych do zastąpienia syntetycznych odpowiedników²). Fitoskładniki, a w szczególności skoncentrowane ekstrakty z roślin zielarskich, stają się przedmiotem intensywnych badań jako wielofunkcyjne dodatki nowej generacji. W badaniach

Dr Alicja SKRZYPEK (ORCID: 0000-0002-6740-7142) w roku 2004 ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W 2013 r. uzyskała stopień doktora nauk chemicznych na tym samym wydziale. Obecnie pracuje w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Specjalność – chemia związków bioaktywnych.

Dr Paweł MUSZYŃSKI (ORCID: 0000-0001-5514-0623) w roku 1996 ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Obecnie pracuje jako adiunkt w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Specjalność – chemia środowiskowa.

naukowych obserwuje się wyraźny zwrot w percepcji tych naturalnych matryc z zastosowań w medycynie i żywności^{3, 4)} w kierunku zaawansowanych aplikacji materiałowych i procesowych^{5, 6)}.

Podstawą bioaktywności ekstraktów ziołowych jest zarówno ilość, jak i różnorodność metabolitów wtórnych. Zalicza się do nich głównie związki polifenolowe, takie jak kwasy fenolowe (np. kwas galusowy, rozmarynowy, kawowy) i flawonoidy (np. katechiny, kwercetyna, apigenina), a także terpenoidy (np. tymol, karnozol, kwas ursolowy)⁷⁾. Z chemicznego punktu widzenia ich potencjał antyoksydacyjny opiera się na kilku spójnych i złożonych mechanizmach. Kluczowy jest mechanizm przeniesienia atomu wodoru HAT (*hydrogen atom transfer*), w którym grupa hydroksylowa występująca w polifenolach oddaje atom wodoru do rodnika, przerywając łańcuch reakcji autooksydacji. Równie istotny jest mechanizm przeniesienia pojedynczego elektronu SET (*single electron transfer*), a także zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych. Wymienione jony poprzez katalizowanie reakcji Fentona oraz Habera i Weissa są kluczowymi inicjatorami generowania reaktywnych form tlenu. Zdolność polifenoli do tworzenia stabilnych kompleksów z tymi jonami skutecznie dezaktywuje ich prooksydacyjny potencjał, co ma fundamentalne znaczenie w aplikacjach przemysłowych⁸⁻¹⁰⁾.

Specyficzną właściwością ekstraktów ziołowych jest także ich selektywna zdolność do inhibicji aktywności enzymatycznej. Mechanizm tego działania jest złożony i zależy od struktury inhibitora oraz budowy centrum aktywnego lub allosterycznego enzymu. Związki fenolowe mogą działać jako inhibitory kompetycyjne, niekompetycyjne lub mieszane. Łącząc się z białkiem enzymatycznym poprzez wiązania wodorowe, hydrofobowe lub koordynacyjne, tworzą odwracalne lub nieodwracalne kompleksy, co z kolei prowadzi do zmiany konformacji enzymu i utraty jego funkcji katalitycznej. Ta właściwość może zostać wykorzystana do projektowania „inteligentnych” materiałów, w których będzie kontrolowana niepożądana aktywność biochemiczna^{11, 12)}.

W kontekście zastosowań bioaktywnych połączeń chemicznych w przemyśle paliwowym należy wskazać ich rolę jako komponentów warunkujących trwałość biopaliw. Niestabilność oksydacyjna stanowi jedno z kluczowych wyzwań technologicznych ograniczających długoterminowe magazynowanie i powszechne stosowanie biopaliw, w szczególności biodiesla, gdzie elementem składowym są estry metylowe wyższych kwasów tłuszczowych FAME

(*fatty acid methyl esters*). Procesy autokatalitycznego utleniania, inicjowane przez obecność tlenu, światła, podwyższonej temperatury oraz jonów metali (np. Cu^{2+} , Fe^{2+}), prowadzą do ich degradacji. W odpowiedzi na te problemy ekstrakty z roślin rodziny *Lamiaceae* (np. rozmarynu, szalwii, tymianku) stanowią ekonomicznie uzasadnioną i ekologiczną alternatywę dla syntetycznych antyoksydantów. Związki fenolowe obecne w ekstraktach przekazują proton z grupy hydroksylowej ($-\text{OH}$) do reaktywnych rodników peroksylogowych (ROO^{\cdot}) i alkoksylogowych (RO^{\cdot}), przekształcając je w stabilne hydroksyperoksydy (ROOH) i alkohole (ROH). Powstały w tej reakcji rodnik jest stabilizowany przez rezonans w obrębie pierścienia aromatycznego, co uniemożliwia mu inicjowanie kolejnych etapów reakcji propagacji. W ten sposób cykl autooksydacji zostaje przerywany, co w sposób mierzalny wydłuża okres utleniania biopaliwa^{13, 14)}.

Ponadto niekorzystne działanie na stabilność biopaliw mają jony metali, które pochodzą z procesów produkcyjnych lub kontaktu paliwa z metalowymi elementami zbiorników i instalacji. Są one silnymi katalizatorami utleniania i przyspieszają rozkład hydroksyperoksydów do wysoce reaktywnych rodników. Dodatek naturalnych roślinnych polifenoli, które zawierają grupy hydroksylowe i mają dzięki temu zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych wydaje się być przyszłościowym rozwiązaniem. Tworzące się stabilne kompleksy z jonami miedzi(II) lub żelaza(II) dezaktywują ich katalityczny potencjał, co stanowi prewencyjną linię obrony przed inicjacją procesów degradacyjnych. Ekonomiczny aspekt stosowania ekstraktów roślinnych pozyskiwanych z produktów ubocznych lub odpadów przemysłu zielarskiego wpisuje się w założenia gospodarki o obiegu zamkniętym (*circular economy*). Efektywność zastosowania w połączeniu z ich biodegradowalnością czyni je rozwiązaniem zgodnym z założeniami zrównoważonego rozwoju i czystej chemii¹⁵⁾.

Ekstrakty zawierające wtórne metabolity roślinne mogą być bezpiecznie używane w zwalczaniu szkodników i chorób roślin uprawnych ze względu na ich skuteczność i zdolność do szybkiej degradacji. Jednak pomimo powszechnego stosowania biopestycydów opartych na tych substancjach, ich aplikacja w praktykach rolniczych często odbywa się bez pełnego zrozumienia molekularnych mechanizmów działania. Najnowsze badania rzucają światło na owadobójcze właściwości ekstraktów roślinnych, identyfikując różnorodne szlaki metaboliczno-fizjologiczne, na które oddziałują one w organizmach docelowych¹⁶⁻¹⁸⁾.

Celem przeprowadzonych badań było określenie właściwości przeciwutleniających i hamujących cholinesterazy (AChE i BChE) wodnych i alkoholowych ekstraktów z wybranych roślin, w celu oceny ich potencjalnego zastosowania w różnych sektorach przemysłowych jako naturalnych stabilizatorów, modyfikatorów procesów lub składników nowoczesnych materiałów.

Dr Anna CIOŁEK (ORCID: 0000-0002-3248-9967) w roku 1999 ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W 2004 r. uzyskała stopień doktora. Obecnie pracuje w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Specjalność – chemia związków bioaktywnych.

* Adres do korespondencji:

Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, tel. (81) 445-65-56, e-mail: anna.ciolek@up.lublin.pl

Część doświadczalna

Surowce

Materiał badawczy stanowiły handlowe próbki suszonych ziół przyprawowych zakupione w lokalnej sieci detalicznej na terenie Lublina (majeranek, bazylia, tymianek, oregano, rozmaryn, cząber, kolendra, lubczyk, nać pietruszki i trawa cytrynowa). Użyto produktów znanej firmy w oryginalnych, nienaruszonych opakowaniach. Do badań wykorzystano zioła z jednej partii produkcyjnej, aby zapewnić powtarzalność i spójność wyników. Próbkę przechowywano zgodnie z zaleceniami producenta, w suchym i zacienionym miejscu, w temperaturze pokojowej. Surowce użyto do analiz bezpośrednio po otwarciu opakowań, bez dalszego przygotowania lub oczyszczenia, w terminie ich przydatności do spożycia. Materiał badawczy stanowiło 10 gatunków ziół z 3 rodzin, które przedstawiono w tabeli 1.

Do badania potencjału inhibicyjnego ekstraktów stosowano acetylocholinoesterazę (AChE, EC3.1.1.7, Sigma Aldrich) i butyrylocholinoesterazę (BChE, EC 3.1.1.8, Sigma Aldrich).

Metodyka badań

Wszystkie surowce w postaci suszu zostały poddane procesowi rozdrabniania w młynku laboratoryjnym do uzyskania jednorodnego proszku. W celu przygotowania ekstraktów odważone porcje (1,0 g) każdego surowca zalano 10 mL rozpuszczalnika (w stosunku 1:10 mas.), wykorzystując wodę dejonizowaną (ekstrakty wodne) oraz 70-proc. (obj.) wodny roztwór etanolu (ekstrakty etanolowe). Proces ekstrakcji prowadzono przez 60 min w temp. 40°C z wykorzystaniem wytrząsarki laboratoryjnej (150 rpm). Następnie mieszaniny odwirowano (4500 rpm, 15 min, 20°C), a uzyskane supernatanty przesączono przez filtry strzykawkowe Millex-GS o średnicy porów 0,45 µm w celu uzyskania klarownych roztworów. Przygotowane ekstrakty przechowywano w temp. -20°C do czasu wykonania analiz.

Metody analityczne

Sumaryczną zawartość związków fenolowych TPC (*total phenolic content*) w przygotowanych ekstraktach oznaczono metodą spektrofotometryczną za pomocą odczynnika Folina i Ciocâlteu, zgodnie z procedurą opisaną przez Singleton i Rossi¹⁹⁾ z niewielkimi modyfikacjami. Jako wzorzec stosowano kwas galusowy, na podstawie którego sporządzono krzywą kalibracyjną. Całkowitą zawartość polifenoli wyrażono jako miligramy ekwiwalentu kwasu galusowego na 1 g s.m. surowca (mg GAE/g s.m.).

Aktywność przeciwutleniającą ekstraktów oceniono na podstawie ich zdolności do neutralizacji rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowego (DPPH), opierając się na metodzie opisanej przez Sanchez-Moreno²⁰⁾. Zdolność do zmiatania wolnych rodników mierzono jako spadek absorbancji przy długości fali $\lambda = 517$ nm.

Table 1. Research material

Tabela 1. Materiał do badań

| Rodzina | Nazwa surowca (nazwa łacińska) |
|----------------------------------|--|
| Jasnotowate (<i>Lamiaceae</i>) | bazylia (<i>Ocimum basilicum</i> L.) |
| | majeranek (<i>Origanum majorana</i> L.) |
| | oregano (<i>Origanum vulgare</i> L.) |
| | tymianek (<i>Thymus vulgaris</i> L.) |
| | rozmaryn (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) |
| | cząber (<i>Satureja hortensis</i> L.) |
| Selerowate (<i>Apiaceae</i>) | kolendra (<i>Coriandrum sativum</i> L.) |
| | lubczyk (<i>Levisticum officinale</i> Koch) |
| | pietruszka nać (<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Fuss) |
| Wiechlinowate (<i>Poaceae</i>) | trawa cytrynowa (<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf) |

Aktywność antyoksydacyjną, wyrażoną jako procent inhibicji, obliczono wg wzoru (1):

$$I = [1 - A_1/A_0] \cdot 100 \quad (1)$$

w którym I oznacza zdolność wychwytywania rodnika DPPH, %, A_0 absorbancję próby kontrolnej w czasie $t = 0$, a A_1 absorbancję roztworu z badaną próbą po czasie $t = 30$ min.

Potencjał inhibicyjny ekstraktów wobec acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy zbadano za pomocą zmodyfikowanej metody spektrofotometrycznej Ellmana²¹⁾. Reakcja enzymatyczna polega na hydrolizie substratów, jodku acetylotiocholiny (ATChI) dla AChE lub jodku butyrylotiocholiny (BTChI) dla BChE, do tiocholiny, która reaguje z odczynnikiem Ellmana (DTNB). Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda = 412$ nm. Jako kontrolę pozytywną zastosowano fizostygminę.

Wyznaczono stopień inhibicji, korzystając ze wzoru (2):

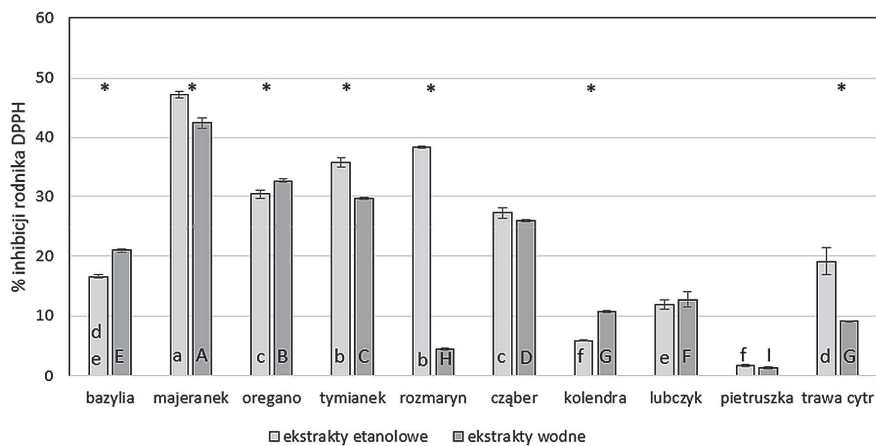
$$\% \text{ inhibicji} = [1 - A_1/A_0] \cdot 100 \quad (2)$$

w którym A_0 oznacza absorbancję próby kontrolnej, a A_1 absorbancję roztworu z badaną próbą.

Wszystkie oznaczenia wykonano w 3 niezależnych powtórzeniach ($n = 3$). Uzyskane wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm odchylenie standardowe (SD). Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Statistica 13. W celu oceny istotności różnic między średnimi zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem *post-hoc* Tukeya. Różnice uznano za statystycznie istotne przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki badań i ich omówienie

Całkowitą zawartość związków fenolowych, oznaczoną metodą Folina i Ciocâlteu, przyjmuje się za wskaźnik ogólnego potencjału redukującego ekstraktów roślinnych. W przypadku większości prób zaobserwowano istotne statystycznie różnice w zawartości związków fenolowych w przypadku zastosowania 70-proc. obj. wodnego roztworu etanolu niż wody jako ekstrahenta (tabela 2). Był to wynik odmiennej polarności rozpuszczalnika, opisywanej



Wartości oznaczone różnymi literami (a, b, c... – ekstrakty wodne, A, B... – ekstrakty etanolowe) różnią się istotnie statystycznie ($\alpha = 0,05$); wartości oznaczone gwiazdką (*) (porównanie ekstraktu etanolowego i wodnego danego surowca) różnią się istotnie statystycznie ($\alpha = 0,05$)

Figure. Antioxidant activity as percentage of DPPH radical inhibition (mean with standard deviations) of ethanolic and aqueous extracts of herbs

Rysunek. Aktywność przeciwutleniająca jako procent inhibicji rodnika DPPH (średnia z odchyleniami standardowymi) etanolowych i wodnych ekstraktów ziół

przez stałą dielektryczną (ϵ). Woda (ϵ ok. 80) efektywnie ekstrahowała związki silnie polarne. Mieszanka wodno-etanolowa (70-proc. obj.) charakteryzowała się natomiast pośrednią stałą dielektryczną, która była optymalna do rozpuszczania i ekstrakcji szerokiego zakresu związków o zróżnicowanej polarności, od glikozydów flawonoidowych po wolne kwasy fenolowe i aglikony, które występują w badanych ziołach²².

Najwyższa wartość TPC dla majeranku (56,89 mg GAE/g) była odzwierciedleniem jego profilu chemicznego. Badania za pomocą HPLC-MS²³ wykazały, że majeranek jest bogaty w kwas rozmarynowy, ester kwasu kawowego i kwasu 3,4-dihydroksyfenylomlekowego. Jego struktura, zawierająca 2 jednostki katecholowe (1,2-dihydroksybenzen), czyni go związkiem o wyjątkowo wysokim potencjale redukującym. Analogiczną zależność można wykazać dla innych ziół z rodziny *Lamiaceae*. Wysokie zawartości TPC w ekstraktach etanolowych dla tymianku (43,04 mg GAE/g) i oregano (38,05 mg GAE/g) były konsekwencją obecności w nich tymolu i karwakrolu, monoterpenu fenolowych z grupą hydroksylową przy pierścieniu aromatycznym²⁴. W przypadku rozmarynu (39,51 mg GAE/g) badania przeprowadzone przez Leselliera i współpracowników²⁵ wykazały duże zawartości kwasu karnozowego i karnozolu, czyli diterpenów fenolowych o strukturze katecholowej, które są jednymi z najsilniejszych naturalnych antyoksydantów lipofilnych.

Trawa cytrynowa (21,41 mg GAE/g) jest surowcem roślinnym cenionym za swoje właściwości sensoryczne i biologiczne, natomiast wyniki oznaczenia TPC wskazały małą koncentrację tych związków w porównaniu z ekstraktami innych ziół. Profil polifenolowy trawy cytrynowej jest zdominowany przez 2 główne klasy związków: flawonoidy (luteolina i apigenina i ich C-glikozydy: izoorientyna i orientyna) i kwasy fenolowe (kwas chlorogenowy oraz kwas kawowy)²⁶. Obecność tych związków, o potwierdzonych

właściwościach antyoksydacyjnych i przeciwzapalnych, stanowi o potencjale biologicznym ekstraktów z trawy cytrynowej niezależnie od ogólnej wartości TPC.

Analiza całkowitej zawartości związków fenolowych w ekstraktach wybranych ziół z rodziny *Apiaceae* (nać pietruszki, liść kolendry, lubczyk) wskazała na ich małą ogólną zawartość, co mogłoby sugerować ich niewielki potencjał jako źródeł związków fenolowych. Jednakże, jak potwierdzają badania²⁷, taka ilościowa ocena jest niepełna i nie oddaje ich ważnej wartości biologicznej. Aktywność tych ziół nie wynika z ogólnej, lecz specyficznej zawartości konkretnych, biologicznie aktywnych połączeń. Przykładem jest nać pietruszki, która, mimo małej wartości TPC (16,65 mg GAE/g) jest uznawana za jedno z najbogatszych naturalnych źródeł flawonu apigeniny, głównie w postaci jej glikozydu

apiiny. Podobną zależność obserwowano w przypadku liści kolendry, gdzie również wartość TPC nie odzwierciedlała faktu, że jest ona cennym źródłem flawonoli: kwercetyny i kemferolu oraz ich glikozydów. Związki te wraz z kwasami fenolowymi (np. kwasem kawowym) decydują o potencjale antyoksydacyjnym. Lubczyk ogrodowy ma jeszcze bardziej złożony profil chemiczny. Badania innych autorów^{28, 29} wykazały obecność furanokumaryn (m.in. psoralen), związków o silnym działaniu biologicznym wykazujących działanie fotouczulające. Oznacza to, że zwiększają wrażliwość skóry na światło słoneczne i dlatego są stosowane w leczeniu chorób skóry (łuszczyca i bielactwo) oraz mogą być składnikiem leków pobudzających repigmentację skóry w bielactwie.

Aktywność przeciwutleniającą (rysunek) oceniono na podstawie testu neutralizacji stabilnego azotowego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH). Badane ekstrakty alkoholowe charakteryzowały się wartościami stopnia inhibicji w zakresie 1,82–47,21%, natomiast ekstrakty wodne nieznacznie niższymi, 1,42–42,46%. Reakcja wygaszania stabilnego rodnika DPPH zazwyczaj przebiega wg 2 głównych mechanizmów: transferu atomu wodoru HAT (*hydrogen atom transfer*) lub sekwencyjnego transferu elektronu i protonu SET-PT (*sequential electron transfer-proton transfer*). Kluczowym czynnikiem determinującym zdolność związku fenolowego do działania antyoksydacyjnego jest entalpia dysocjacji wiązania O–H BDE (*bond dissociation enthalpy*) oraz stabilizacja rezonansowa powstającego rodnika fenoksylogo. W uzyskanych wynikach obserwowano silną korelację między TPC a aktywnością DPPH, co jest chemicznie uzasadnione. Zioła z rodziny *Lamiaceae*, które charakteryzowały się wysoką zawartością TPC (tabela 2), okazały się również najsukuteczniejszymi antyoksydantami. Było to zgodne z zasadami zależności struktura-aktywność dla antyoksydantów fenolowych, gdyż związki zawierające

Table 2. Total phenolic content in ethanol and aqueous herbal extracts

Tabela 2. Zawartość związków fenolowych w etanolowych i wodnych ekstraktach ziół

| Ekstrakt | Suma związków fenolowych, mg/g | |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | ekstrakt etanolowy | ekstrakt wodny |
| Bazylija | 22,98±0,58 ^{A, d} | 24,64±0,25 ^{B, d} |
| Majeranek | 56,89±2,6 ^{A, a} | 50,14±3,47 ^{A, a} |
| Oregano | 38,05±1,06 ^{A, c} | 35,92±0,5 ^{B, b} |
| Tymianek | 43,04±1,75 ^{A, b} | 34,75±0,68 ^{B, b} |
| Rozmaryn | 39,51±0,68 ^{A, c} | 11,82±0,37 ^{B, g} |
| Cząber | 36,97±0,97 ^{A, c} | 30,87±0,62 ^{B, c} |
| Kolendra | 14,87±0,24 ^{A, c} | 18,73±0,15 ^{B, c, f} |
| Lubczyk | 20,01±0,54 ^{A, d, c} | 19,77±0,08 ^{A, c} |
| Pietruszka | 16,65±0,23 ^{A, c} | 15,81±0,1 ^{B, f} |
| Trawa cytrynowa | 21,41±1,29 ^{A, d} | 16,03±0,08 ^{B, f} |

Srednia ± odchylenie standardowe; ^{A, B} – wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($\alpha = 0,05$); ^{a, b, c, ...} – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($\alpha = 0,05$)

ugrupowania katecholowe (kwas rozmarynowy, kwas karnozowy) wykazują znacznie większą aktywność niż fenole z pojedynczą grupą –OH. Dwie grupy –OH w pozycji *orto* obniżają BDE pierwszego wiązania O–H i stabilizują powstały rodnik poprzez tworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego. Istotne pod względem aktywności antyrodnikowej są również podstawniki przy pierścieniu aromatycznym. Grupy alkilowe zwiększają gęstość elektronową na pierścieniu i stabilizują rodnik, wzmacniając aktywność, jak to jest obserwowane w przypadku tymolu i karwakrolu, połączeń obecnych w ekstrakcie z tymianku³⁰. Ekstrakty z majeranku, tymianku i cząbrku, zawierające w swoim składzie związki spełniające powyższe zależności strukturalne, silnie redukowały rodnik DPPH, odpowiednio 47,21, 35,86 i 27,24% inhibicji. Ich potencjał antyoksydacyjny wynikał bezpośrednio z obecności specyficznych farmakoforów o działaniu przeciwrodnikowym. Znacząca różnica w aktywności przeciwrodnikowej, mierzona jako procent inhibicji wolnego rodnika DPPH, pomiędzy etanolowym (70-proc. obj.) a wodnym ekstraktem z rozmarynu to prawdopodobnie efekt odmiennej zdolności tych rozpuszczalników do ekstrakcji kluczowych związków bioaktywnych. Większa aktywność antyoksydacyjna ekstraktu etanolowego (38,4%) w porównaniu z wodnym (4,49%) była konsekwencją jego zoptymalizowanej polarności, która umożliwia efektywniejsze pozyskanie szerokiego spektrum związków fenolowych odpowiedzialnych za zdolność wygaszania reaktywnych form tlenu. Należy zaakcentować, że bardzo mały potencjał przeciwutleniający ekstraktu wodnego z rozmarynu w porównaniu z ekstraktem etanolowym wynikał w głównej mierze z obecności diterpenów fenolowych (kwas karnozowy i karnozol) oraz kwasów fenolowych, z kwasem rozmarynowym na czele. Związki te zawierają w swojej strukturze grupy hydroksylowe (–OH) przyłączone do pierścienia aromatycznego, które są zdolne do donacji atomu wodoru, neutralizując w ten sposób DPPH. Procent inhibicji

obserwowany w przeprowadzonym teście był wprost proporcjonalny do stężenia tych związków w analizowanym ekstrakcie. Dlatego należy podkreślić rolę zastosowanego rozpuszczalnika ekstrakcyjnego. Woda jako rozpuszczalnik silnie polarny efektywnie ekstrahowała kwas rozmarynowy. Kluczowe w kontekście aktywności przeciwrodnikowej były jednak zdecydowanie mniej polarne diterpeny fenolowe, słabo rozpuszczalne w wodzie. W rezultacie ekstrakt wodny zawierał relatywnie małe stężenie tych połączeń, co przekładało się na jego małą zdolność do inhibicji rodnika DPPH. Zastosowanie 70-proc. roztworu etanolu w wodzie tworzyło układ rozpuszczalnika o pośredniej polarności, co pozwoliło na efektywną ekstrakcję z materiału roślinnego zarówno związków bardziej polarnych (kwas rozmarynowy), jak i tych o mniejszej polarności (kwas karnozowy i karnozol). W efekcie ekstrakt etanolowo-wodny był znacznie bogatszy w całkowitą zawartość związków fenolowych, obejmując szersze spektrum cząsteczek o działaniu antyoksydacyjnym.

Otrzymane wyniki testu inhibicji cholinesteraz (tabela 3) wskazały na złożone mechanizmy będące podstawą tych reakcji. Obserwowany brak korelacji między wysokim TPC a aktywnością antycholinesterazową dla poszczególnych ekstraktów pokazuje, że mechanizmy antyoksydacyjne i inhibicji enzymatycznej były warunkowane przez całkowicie odmienne cechy strukturalne. Centrum aktywne acetylocholinoesterazy (AChE) to głęboka i wąska kieszeń, na której dnie znajduje się triada katalityczna. Kluczową rolę odgrywa również peryferyjne miejsce anionowe (PAS), które uczestniczy w wychwycie substratu (acetylocholino) ³¹. Skuteczny inhibitor musi charakteryzować się odpowiednim rozmiarem, kształtem i rozkładem ładunku. Najsilniejszymi inhibitorami okazały się być trawa cytrynowa (AChE 40,11%; BChE 20,93%) i bazylija (AChE 38,59%; BChE 26,18%). Ich aktywność mogła wynikać z obecności monoterpenuoidów. Trawa cytrynowa zawiera cytral, aldehyd α , β -nienasycony, którego grupa

Table 3. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) activity of ethanolic herbal extracts

Tabela 3. Inhibicja aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BChE) przez etanolowe ekstrakty ziół

| Ekstrakt | % inhibicji AChE | % inhibicji BChE |
|-----------------|------------------|------------------|
| Bazylija | 38,59±0,14 | 26,18±0,01 |
| Majeranek | 10,30±0,00 | 8,07±0,08 |
| Oregano | 29,06±0,12 | 14,75±0,45 |
| Tymianek | 9,74±0,01 | 9,29±0,02 |
| Rozmaryn | 13,26±0,47 | 8,24±0,01 |
| Cząber | 11,48±0,08 | n.d. |
| Kolendra | 18,87±0,15 | n.d. |
| Lubczyk | 19,31±1,31 | 17,05±0,17 |
| Nać pietruszki | 33,43±0,00 | 3,22±0,04 |
| Trawa cytrynowa | 40,11±0,02 | 20,93±0,19 |

Srednia ± odchylenie standardowe; n.d. – nie oznaczono

karbonylowa ($-C=O$) może działać jako akceptor wiązania wodorowego lub tworzyć odwracalny hemiacetal z grupą $-OH$ seryny w triadzie katalitycznej, blokując w ten sposób enzym. W ekstrakcie z bazylii obecny jest linalol, trzeciorzędowy alkohol monoterpenny³²). Mechanizm inhibicji polegał najprawdopodobniej na niekowalencyjnych oddziaływaniach hydrofobowych i van der Waalsa wewnątrz miejsca katalitycznego. Jego zdolność do inhibicji zarówno AChE, jak i BChE czyni go interesującym inhibitorem podwójnym. Słabą aktywność ekstraktów z majeranku (AChE 10,30%; BChE 8,07%) i tymianku (AChE 9,74%; BChE 9,29%), mimo ich bogactwa w połączenia fenolowe, można tłumaczyć wynikiem obecności dużych i polarnych cząsteczek, takich jak np. kwas rozmarynowy, co uniemożliwiało efektywne dopasowanie i związanie w wąskiej kieszeni katalitycznej AChE. Grupa karboksylowa kwasu rozmarynowego w badanych warunkach była zdeprotonowana, nadając całej cząsteczce ładunek ujemny. Centrum aktywne AChE, a zwłaszcza jego miejsca anionowe (CAS i PAS), były przystosowane do wiązania dodatnio naładowanej czwartorzędowej grupy amoniowej acetylocholino ($N^+(CH_3)_3$). Dlatego ujemnie naładowany jon tego kwasu był odpychany elektrostatycznie od kluczowych rejonów wiążących enzymu, co skutecznie uniemożliwiało jego prawidłowe dokowanie³³).

Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania wskazują, że ocena potencjału biologicznego surowców roślinnych wymaga podejścia wielokierunkowego, gdyż różne aktywności są warunkowane przez odmienne klasy związków chemicznych o specyficznych cechach strukturalnych. Potwierdzono, że zioła z rodziny *Lamiaceae* (majeranek, tymianek, rozmaryn, oregano) są ważnym źródłem fenolowych antyoksydantów, których aktywność wynika z obecności ugrupowań katecholowych i specyficznych podstawników przy pierścieniu aromatycznym. Z drugiej strony potencjał neuroprotektynny, rozumiany jako inhibicja cholinesteraz, jest w badanych surowcach związany nie z obecnością polifenoli, lecz prawdopodobnie z obecnością małych cząsteczkowych, umiarkowanie lipofilnych terpenoidów (cytral, linalol), które wchodzi w interakcję z centrum aktywnym enzymu. Poziom TPC, mimo że jest często stosowanym wskaźnikiem do określenia aktywności antyoksydacyjnej, może być wstępnie wykorzystywanym parametrem do przewidywania aktywności antycholinesterazowej. Dalsze badania powinny zmierzać w kierunku izolacji poszczególnych związków z najaktywniejszych ekstraktów w procesie frakcjonowania kierowanego testem biologicznym (*bio-guided fractiona-*

tion), aby jednoznacznie zidentyfikować cząsteczki o najwyższym potencjale terapeutycznym i zbadać ich dokładny mechanizm molekularny.

Otrzymano: 03-10-2025

Zrecenzowano: 12-10-2025

Zaakceptowano: 16-10-2025

Opublikowano: 18-11-2025

LITERATURA

- [1] T.L. Chen, H. Kim, S.Y. Pan, P.C. Tseng, Y.P. Lin, P.C. Chiang, *Sci. Total Environ.* 2020, **716**, 136998.
- [2] U.P. Ogado, O.O. Abosedo, *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* 2025, **26**, nr 1, 1.
- [3] B. Ahad, W. Shahri, H. Rasool, Z.A. Reshi, S. Rasool, T. Hussain, *Medicinal and aromatic plants: healthcare and industrial applications*, Springer, 2021.
- [4] S.A. Hussain, N.R. Panjagari, R.R. Singh, G.R. Patil, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015, **55**, nr 1, 94.
- [5] K.K. Ilavenil, V. Senthilkumar, A. Kasthuri, *Dis. Cat.* 2025, **2**, nr 1, 3.
- [6] Y. Mariappan, V. Viswanathan, V. Baskaralingam, [w:] *Fundamentals of bionanomaterials micro and nano technologies* (red. A. Barhoum, J. Jeevanandam, M.K. Danquah), Elsevier, Amsterdam 2022.
- [7] C. Jain, S. Khatana, R. Vijayvergia, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2019, **10**, nr 2, 494.
- [8] R. Rohman, R. Nath, R. Kar, *Comput. Theor. Chem.* 2023, **1223**, 114097.
- [9] J. Tremel, K. Šmejkal, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016, **15**, nr 4, 720.
- [10] Z. Sabahi, F. Soltani, M. Moein, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2018, **8**, nr 2, 120.
- [11] M. Mihailović, S. Dinić, J. Arambašić, A. Uskoković, N. Grdović, M. Vidaković, *Antioxidants* 2021, **10**, nr 3, 480.
- [12] X. Guo, W. Luo, L. Wu, L. Zhang, Y. Chen, T. Li, *Adv. Sci.* 2024, **11**, nr 35, 2403388.
- [13] L. Longanesi, A.P. Pereira, N. Johnston, C.J. Chuck, *Biofuels Bioprod. Bioref.* 2022, **16**, nr 1, 265.
- [14] M.A. Clemente, G.G. Marcheafave, I.G. Branco, E.A. Canesin, A.C. Mantovani, D. Borsato, *Biofuels* 2023, **14**, nr 9, 951.
- [15] E. Yuliarita, N.A. Fathurrahman, L. Aisyah, N. Hermawan, R. Anggarani, *In IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 2019, **494**, nr 1, 12030.
- [16] A. El Khetabi, R. Lahlali, S. Ezrari, N. Radouane, L. Nadia, H. Banani, *Trends Food Sci. Technol.* 2022, **120**, 402.
- [17] F.J. Álvarez-Martínez, E. Barrajón-Catalán, M. Herranz-López, V. Micol, *Phytomedicine* 2021, **90**, 153626.
- [18] Z.J. Ni, X. Wang, Y. Shen, K. Thakur, J. Han, J.G. Zhang, *Trends Food Sci. Technol.* 2021, **110**, 78.
- [19] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, *Methods Enzymol.* 1999, **299**, 152.
- [20] C. Sánchez-Moreno, *Food Sci. Technol. Int.* 2002, **8**, nr 3, 121.
- [21] G. Elluman, D. Courtney, A. Valentino, R. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* 1961, **7**, 88.
- [22] Y. Nakayama, *J. Colloid Interface Sci.* 2023, **646**, 354.
- [23] A. Vallverdú-Queralt, J. Regueiro, J.F. Alvarenga, M. Martínez-Huelamo, L.N. Leal, R.M. Lamuela-Raventós, *Food Sci. Technol. Campinas* 2015, **35**, 189.
- [24] I. Stefanis, D. Hadjipavlou-Litina, A.R. Bilia, A. Karioti, *Planta Med.* 2019, **85**, nr 11, 941.
- [25] E. Lesellier, T. Lefebvre, E. Destandau, *Trends Anal. Chem.* 2021, **135**, 116158.
- [26] A. Tazi, S. Moujahed, N. Jaouad, H. Saghrouchni, I. Al-Ashkar, L. Liu, F. Errachidi, *Molecules* 2024, **29**, nr 17, 3982.
- [27] M. Punoševac, J. Radović, A. Leković, T. Kundaković-Vasović, *Arch. Pharm.* 2021, **71**, nr 3, 177.
- [28] A. Kumar, D. Chutia, S. Ambala, S. Kumar, A.M. Das, *Chem. Select.* 2025, **10**, nr 7, 5469.
- [29] M. Miran, *Int. J. Pharm. Clin. Res.* 2022, **2**, nr 3, 73.
- [30] A.S. Mohajeri, S. Asemani, *J. Mol. Struc.* 2009, **930**, nr 1–3, 15.
- [31] I. Silman, J.L. Sussman, *J. Neurochem.* 2017, **142**, 19.
- [32] A. Szumny, M. Adamski, K. Wińska, A.Z. Kucharska, A. Sokół-Łętowska, A. Biesiada, A.A. Carbonell-Barrachina, *Przem. Chem.* 2012, **91**, nr 5, 1020.
- [33] J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* 1991, **253**, nr 5022, 872.