

KATARZYNA GAWEL-BĘBEN, KAMIŁA RYBCZYŃSKA, TOMASZ BUJAK,
MONIKA KARAŚ, ANNA JAKUBCZYK, ZOFIA NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA

**WPLYW RODZAJU ROZPUSZCZALNIKA NA WYBRANE
BIOLOGICZNE WŁAŚCIWOŚCI EKSTRAKTÓW Z LIŚCI
PIETRUSZKI ZWYCZAJNEJ *PETROSELINUM CRISPUM* (MILL)**

Streszczenie

Pietruszka zwyczajna (*Petroselinum crispum* Mill) jest wykorzystywana jako surowiec w przemyśle spożywczym m.in. ze względu na dużą zawartość związków fenolowych. W niniejszej pracy badano wpływ rozpuszczalników na skład oraz wybrane biologiczne właściwości ekstraktów z liści *P. crispum*. Porównano ekstrakty: wodny (W), etanolowy (ET), glikolowo-wodny (GLW) i glicerolowo-wodny (GCW). Największą zawartość związków fenolowych ogółem oznaczono w ekstraktach GLW ($2,63 \pm 0,03$ mg/g s.m.) i GCW ($2,12 \pm 0,08$ mg/g s.m.), natomiast najwięcej flawonoidów zawierał ekstrakt ET ($0,86 \pm 0,02$ mg/g s.m.). Głównymi związkami fenolowymi ekstraktu wodnego były: epikatechina, katechina i jej pochodne, ekstraktu etanolowego – kwasy fenolowe (np. rozmarynowy), ekstraktu GLW – apigenina, natomiast ekstraktu GCW – daidzeina, naryngenina i pochodne. Oprócz znacznych różnic w składzie ilościowym i jakościowym badanych ekstraktów wykazywały one także zróżnicowaną aktywność przeciwrodnikową. Ekstrakt GCW w największym stopniu neutralizował rodnik DPPH[•] ($IC_{50} = 6,89 \pm 0,56$ µg/ml), natomiast ekstrakt W – kationorodnik ABTS^{•+} ($IC_{50} = 31,44 \pm 4,11$ µg/ml). Wszystkie ekstrakty wykazywały porównywalną zdolność do chelatowania jonów Fe²⁺. W badaniu cytotoksyczności ekstraktów w warunkach *in vitro* w stosunku do ludzkiej linii komórkowej BJ (ATCC CRL-2522) wykazano najwyższą cytotoksyczność ekstraktów ET i W. Cytotoksyczność ekstraktów GLW i GCW była porównywalna z cytotoksycznością samych rozpuszczalników. Dowiedziono wpływu rozpuszczalników na skład, właściwości przeciwutleniające oraz cytotoksyczność ekstraktów z *P. crispum*, wskazując równocześnie na możliwość zastosowania tych ekstraktów w przemyśle spożywczym.

Słowa kluczowe: pietruszka zwyczajna (*Petroselinum crispum* Mill.), przeciwutleniacze, związki fenolowe, flawonoidy, cytotoksyczność

Dr K. Gawel-Bęben, Katedra Zdrowia Publicznego, Dietetyki i Chorób Cywilizacyjnych, mgr T. Bujak, dr inż. Z. Nizioł-Lukaszewska, Katedra Kosmetologii, Wydz. Medyczny, Wyższa Szkoła Informatyki i Zarządzania, ul. Sucharskiego 2, 35-225 Rzeszów, dr inż. K. Rybczyńska, Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Wydz. Agrobiotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin, dr M. Karaś, dr A. Jakubczyk, Katedra Biochemii i Chemii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin.
Kontakt: kagawel@wsiz.rzeszow.pl

Wprowadzenie

Pietruszka zwyczajna (*Petroselinum crispum* Mill.) jest dwuletnią rośliną pochodzącą z regionu śródziemnomorskiego. Powszechnie uprawiana jest w wielu regionach świata ze względu na swoje walory kulinarne. Ponadto związki bioaktywne zawarte w ekstraktach z *P. crispum* wykazują działanie przeciwutleniające, hepatoprotekcyjne, neuroprotekcyjne, przeciwcukrzycowe, diuretyczne, przeciwzakrzepowe oraz przeciwdrobnoustrojowe. Prozdrowotne właściwości pietruszki wynikają z zawartości biologicznie czynnych substancji, takich jak: olejki eteryczne (mirystycyna i apiol), karotenoidy, witamina C oraz furanokumaryny [18]. Psoralen i oksypeucedanina zaliczane do tej ostatniej grupy mogą wywoływać reakcje fotouczulające u niektórych zwierząt [7]. Ważnym składnikiem liści *P. crispum* są związki fenolowe, wśród których dominują flawonoidy: apigenina, luteolina i kwercetyna [18]. Związki fenolowe wykazują silne właściwości przeciwutleniające wynikające z ich budowy chemicznej, w tym z występowania w cząsteczkach grup hydroksylowych [11]. Właściwości te przejawiają się w różnorodnych mechanizmach działania, do których zalicza się m.in. neutralizowanie wolnych rodników poprzez stabilizację lub delokalizację niesparowanego elektronu lub chelatowanie jonów metali przejściowych, takich jak Fe^{2+} i Cu^{2+} , katalizujących reakcje powstawania reaktywnych form tlenu [2]. Obecność związków fenolowych w diecie może chronić przed skutkami stresu oksydacyjnego i zapobiegać rozwojowi chorób, m.in. nowotworów czy miażdżycy tętnic [8, 12, 13, 21, 24]. Związki fenolowe i ich pochodne są wykorzystywane do produkcji żywności jako prekursorzy substancji smakowych i zapachowych, mogą również pełnić funkcję naturalnych zamienników syntetycznych przeciwutleniaczy, zapobiegając procesom utleniania i rozkładu zachodzącym w przetworzonej i przechowywanej żywności [11]. Związki fenolowe pozyskuje się zarówno ze świeżego materiału, jak i z suszonych lub liofilizowanych fragmentów roślin w procesie ekstrakcji, z użyciem różnych rozpuszczalników. Ilość wyekstrahowanych związków zależy od polarności użytego rozpuszczalnika, czasu i temperatury ekstrakcji, proporcji materiału roślinnego do ilości użytego rozpuszczalnika, jak również od składu jakościowego i ilościowego materiału roślinnego. W materiale roślinnym mogą być obecne zarówno proste związki fenolowe, takie jak kwasy fenolowe czy antocyjany, jak również związki o dużym stopniu złożoności, jak taniny. Wiele związków fenolowych występuje w roślinach w kompleksach z białkami lub węglowodanami, co znacznie zmienia ich właściwości chemiczne i biologiczne [6]. Dobór warunków procesu ekstrakcji zależy także od przeznaczenia przygotowywanego ekstraktu. Nie istnieje jedna uniwersalna metoda ekstrakcji związków fenolowych z materiału roślinnego.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu czterech rozpuszczalników: wody, 96-procentowego etanolu oraz mieszanin woda : glikol (1 : 4, v/v) i woda : glicerol (1 : 4, v/v), użytych do ekstrakcji suszonych liści pietruszki zwyczajnej (*Petroselinum*

crispum Mill), na jakościowy i ilościowy skład związków fenolowych otrzymanych ekstraktów. Porównano także właściwości przeciwutleniające oraz cytotoksyczność *in vitro* tych ekstraktów.

Material i metody badań

Przygotowanie ekstraktów z P. crispum Mill.

Suszone liście pietruszki zakupiono u dystrybutora (PPHU „PAK” Mirosław Nieczaja, Krępiec, Polska). Ekstrakty z pietruszki otrzymywano metodą turboekstrakcji rozpuszczalnikowej. Jako rozpuszczalniki stosowano: wodę destylowaną (W), 96-procentowy alkohol etylowy (Honeywell, USA) (ET), mieszaninę wody z glikolem propylenowym (Chempur, Polska) (1 : 4, v/v) (GLW) oraz mieszaninę wody z glicerolem (Chempur, Polska) (1 : 4, v/v) (GCW). Suszone liście w ilości 5 g umieszczano w moździerzu i ucierano z 20 ml ekstrahenta. Zawartość moździerza przenoszono do zlewki z 80 ml ekstrahenta i mieszano przy użyciu mieszadła mechanicznego przez 3 h, bez dostępu światła. Ekstrakty dekantowano i filtrowano pod zmniejszonym ciśnieniem przez filtr bibułowy. Ekstrakty przechowywano w butelkach z ciemnego szkła w temp. 4 °C.

Zawartość związków fenolowych ogółem i flawonoidów

Zawartość związków fenolowych ogółem w ekstraktach oznaczano spektrofotometrycznie w spektrofotometrze UV-Vis Aqua-Mate (ThermoScientific, USA), stosując odczynnik Folina-Ciocalteu'a (Sigma-Aldrich, Niemcy), zgodnie z metodą opisaną przez Singletona i Rossiego [22], w modyfikacji Bozina i wsp. [3]. Zawartość związków fenolowych wyrażano w mg kwasu galusowego (GA) na g s.m. liści *P. crispum*.

Zawartość flawonoidów oznaczano przy użyciu spektrofotometru UV-Vis Aqua-Mate (ThermoScientific, USA), metodą opracowaną przez Woiskiego i Salationo [27]. Zawartość flawonoidów wyrażano w mg kwercetyny na g s.m. liści.

Jakościowa i ilościowa analiza związków fenolowych

Zawartość poszczególnych związków fenolowych w ekstraktach z liści pietruszki oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), przy użyciu chromatografu VarianProStar (Varian, USA) wyposażonego w kolumnę Varian-CromSpher C18 (250 mm × 4,6 mm) i detektor ProStar DAD. Fazę ruchomą stanowił 4,5-procentowy kwas octowy i 50-procentowy acetonitryl. Rozdział prowadzono z prędkością przepływu 0,8 ml/min. Elucję prowadzono w gradiencie kwasu octowego według następującego schematu: 0 min, 92 %; 30 min, 70 %; 45 min, 60 %; 80 min, 60 %; 82 min, 0 %; 85 min, 0 %; 86 min, 92 % i 90 min, 92 %, w temp. 40 °C. Analizę związków fenolowych prowadzono na podstawie pomiarów absorbancji przy $\lambda = 270$ nm oraz $\lambda = 370$ nm i porównania czasów retencji badanych związków z odpo-

wiednimi związkami standardowymi. Analizę ilościową wykonywano na podstawie krzywych standardowych [23]. Ilość związków fenolowych wyrażano w $\mu\text{g/g}$ s.m.

*Neutralizacja wolnego rodnika DPPH**

Zdolność ekstraktów pietruszki do neutralizacji wolnych rodników DPPH* (1,1-difenylo-2- pikrylohydrazyl) (Sigma-Aldrich, USA) mierzono zgodnie z metodą opisaną przez Branda-Williamsa i wsp. [4]. Etanolewy roztwór DPPH* (25 mM) mieszało w stosunku 1 : 1 z badanymi ekstraktami [mg/ml]: 0,40, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 i inkubowano w temp. 20 ± 2 °C przez 30 min, bez dostępu światła. Do próbki kontrolnej dodawano równą objętość odpowiedniego rozpuszczalnika. Po tym czasie wykonywano pomiar absorbancji przy $\lambda = 515$ nm za pomocą spektrofotometru UV-Vis Aqua-Mate (ThermoScientific, USA). Stopień neutralizacji DPPH* [%] obliczano z równania:

$$[\%] \text{ neutralizacji DPPH}^* = (1 - A_{\text{próby}} / A_{\text{kontroli}}) \times 100$$

Neutralizacja wolnego kationorodnika ABTS⁺

Analizę neutralizacji kationorodnika ABTS⁺ (2,2-azynobis-3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian) wykonywano zgodnie z metodą Re i wsp. [18], w modyfikacji Bartosza [2]. ABTS⁺ (Sigma-Aldrich, USA) rozpuszczano w buforze fosforanowym o pH = 7,4 i inkubowano bez dostępu światła przez 16 h. Przed pomiarem roztwór ABTS⁺ rozcieńczano tak, aby wartość absorbancji przy $\lambda = 734$ nm wynosiła ok. 1. Następnie do 0,98 ml roztworu ABTS⁺ dodawano 0,02 ml rozcieńczonych ekstraktów [mg/ml]: 1,56, 3,12, 6,25, 12,5 i 25. Po 10 min inkubacji w temp. 20 ± 2 °C mierzono absorbancję przy $\lambda = 734$ nm. Stopień neutralizacji kationorodnika [%] obliczano z równania:

$$[\%] \text{ neutralizacji ABTS}^{+} = (1 - A_{\text{próby}} / A_{\text{kontroli}}) \times 100$$

Chelatowanie jonów żelaza(II)

Zdolność ekstraktów do chelatowania jonów żelaza(II) określano na podstawie absorbancji kompleksu Fe^{2+} – ferrozyny według metody opisanej przez Torres-Fuentes i wsp. [25]. Do 0,5 ml badanych ekstraktów [mg/ml]: 3,12, 6,25, 12,5 i 50 dodawano 3,7 ml H_2O oraz 0,1 ml 1 mM roztworu FeCl_2 (Sigma-Aldrich, USA). Reakcję inicjowano przez dodanie do mieszaniny 0,2 ml 5 mM ferrozyny (Sigma-Aldrich, USA). Po 10-minutowej inkubacji w temp. 20 ± 2 °C mierzono absorbancję przy $\lambda = 562$ nm. Stopień chelatowania jonów Fe^{2+} określano z równania:

$$[\%] \text{ chelatowania Fe}^{2+} = (1 - A_{\text{próby}} / A_{\text{kontroli}}) \times 100$$

Wyznaczanie wartości IC_{50} (ang. *half maximal inhibitory concentration*)

Wartość IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$] każdego ekstraktu obliczano na podstawie równania regresji liniowej, odnosząc stopień neutralizacji rodników (DPPH \cdot , ABTS $^{+\cdot}$) lub zdolność chelatowania jonów Fe^{2+} do zawartości związków fenolowych.

Cytotoksyczność ekstraktów *in vitro*

Cytotoksyczność ekstraktów badano na modelu ludzkich fibroblastów skórnych BJ (ATCC CRL-2522, LGC Standards, Wielka Brytania). Komórki hodowano w EMEM (ang. *Eagle's Minimum Essential Medium*, minimalna niezbędna pożywka Eagle'a) (ATCC, LGC Standards, Wielka Brytania) z dodatkiem 10 % FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*, bydlęca surowica płodowa) (Invitrogen, USA) w temp. 37 °C, w atmosferze 5 % CO_2 . W celu określenia cytotoksyczności ekstraktów stosowano metodę z czerwieni obojętną [21]. Komórki umieszczano w 96-dołkowych płytkach i hodowano przez 48 h. Po tym czasie medium hodowlane zastępowano pożywką EMEM + 1 % FBS, z dodatkiem ekstraktów z pietruszki lub rozpuszczalników (10 - 0,625 %). Komórki kontrolne hodowano w pożywce EMEM + 1 % FBS. Po 48 h hodowli fibroblasty inkubowano przez 2 h z 33 $\mu\text{g/ml}$ roztworu czerwieni obojętnej (Sigma-Aldrich, USA) w pożywce EMEM + 1 % FBS. Komórki płukano jednokrotnie buforem DPBS (ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, izotoniczny bufor fosforanowy Dulbecco) (Sigma-Aldrich, USA) i inkubowano z roztworem odbarwiającym, zawierającym 50 % etanolu (Honeywell, USA) i 1 % kwasu octowego (Honeywell, USA). Absorbancję czerwieni obojętnej, uwolnionej z komórek, mierzono przy $\lambda = 540 \text{ nm}$, wykorzystując czytnik mikropłytek FilterMax F5 (Molecular Devices, USA). Średnią wartość absorbancji komórek kontrolnych ustalano jako 100 % i obliczano procent żywych komórek w pozostałych warunkach eksperymentalnych.

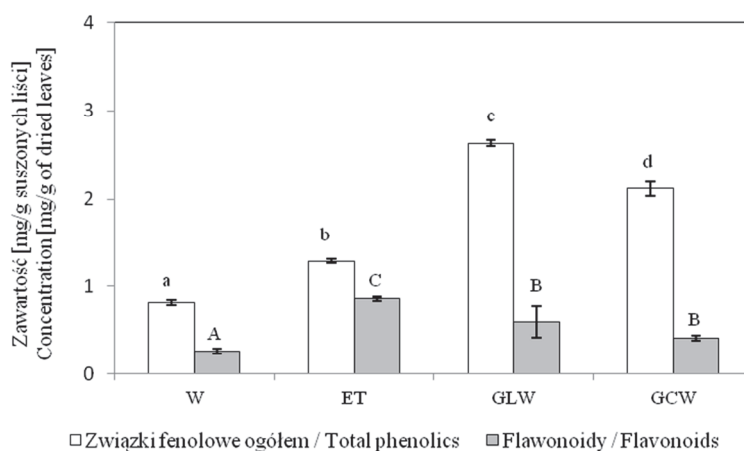
Analiza statystyczna

Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną wykonano w programie GraphPad Prism 5.0. Dla porównania wartości IC_{50} , charakteryzującej zdolność do neutralizowania rodników DPPH \cdot i ABTS $^{+\cdot}$ oraz chelatowania jonów Fe^{2+} przez badane ekstrakty, a także cytotoksyczność względem ludzkich fibroblastów zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test Tukeya (testowanie prowadzono na poziomie istotności $p < 0,05$).

Wyniki i dyskusja

W ekstraktach z liści pietruszki (*P. crispum*), przygotowanych z zastosowaniem różnych rozpuszczalników, oznaczono zawartość związków fenolowych ogółem oraz flawonoidów (rys. 1). Największą ilość związków fenolowych wyekstrahowano przy użyciu mieszaniny wody z glikolem (GLW) oraz wody z glicerolem (GCW). W tych

ekstraktach zawartość związków fenolowych wynosiła odpowiednio: $2,63 \pm 0,03$ i $2,12 \pm 0,08$ mg/g s.m. liści, czyli prawie dwukrotnie więcej niż oznaczono w ekstraktach wodnym (W) i etanolowym (ET). Zastosowanie mieszaniny woda : glikol (1 : 4, v/v) do ekstrakcji związków fenolowych okazało się skuteczne także w przypadku innych roślin zielnych, np. *Stevia rebaudiana*. W ekstrakcie GLW tej rośliny zawartość związków fenolowych była znacznie większa niż w ekstraktach W i ET [10]. W badaniach własnych najwięcej flawonoidów oznaczono w ekstrakcie *P. crispum* sporządzonym przy użyciu etanolu ($0,86 \pm 0,02$ mg/g s.m. liści).



Objaśnienia: / Explanatory notes:

Małe i duże litery oznaczają odpowiednio grupy homogenne pod względem zawartości związków fenolowych ogółem i flawonoidów ($p = 0,05$) / Small and capital letters denote homogenic groups as regards their contents of total phenolics and flavonoids ($p = 0.05$); $n = 3$.

Rys. 1. Zawartość związków fenolowych ogółem oraz flawonoidów w wodnym (W), etanolowym (ET), glikolowo-wodnym (GLW) oraz glicerolowo-wodnym (GCW) ekstrakcie z liści *P. crispum* (w przeliczeniu na s.m. liści)

Fig.1. Content of total phenolics and flavonoids in aqueous (W), ethanolic (ET), glycolic-aqueous (GLW), and glycerinic-aqueous (GCW) *P. crispum* leaf extracts

Wykazano, że pomiędzy badanymi ekstraktami *P. crispum* wystąpiły znaczące różnice pod względem składu i zawartości poszczególnych kwasów fenolowych i flawonoidów (tab. 1). Największa różnorodność związków fenolowych występowała w ekstraktach GLW oraz GCW. Ponadto ekstrakty GLW i GCW zawierały liczne związki z grupy flawonoidów (apigeninę, daidzeinę, a także luteolinę, narygeninę, rutynę i ich pochodne), których nie oznaczono w ekstraktach W i ET. Z kolei ekstrakty W i ET były bogate w kwasy fenolowe (rozmarynowy, salicylowy, syringowy), których nie wykryto w ekstraktach GLW i GCW.

Tabela 1. Zawartość związków fenolowych w wodnym (W), etanolowym (ET), glikolowo-wodnym (GLW) oraz glicerolowo-wodnym (GCW) ekstrakcie z liści *P. crispum* (w przeliczeniu na s.m. liści)

Table 1. Content of phenolics in aqueous (W), ethanolic (ET), glycolic-aqueous (GLW), and glycerinic-aqueous (GCW) *P. crispum* leaf extract (expressed as dry matter of leaves)

Związki fenolowe / Phenolics [$\mu\text{g/g}$ s.m. liści / of dry matter of leaves]				
Składnik / Component	W	ET	GLW	GCW
Kwasy fenolowe / Phenolic acids				
Kwas benzoesowy / Benzoic acid	nw	47,20 ^e \pm 6,13	110,90 ^f \pm 4,67	117,98 ^h \pm 3,21
Pochodne kwasu benzoesowego Benzoic acid derivates	28,31 ^g \pm 0,94	99,10 ^{c,d} \pm 7,65	nw	nw
Kwas galusowy / Gallic acid	36,00 ^f \pm 2,55	nw	24,20 ^h \pm 3,03	26,20 ^j \pm 1,10
Kwas homowanilinowy Homovanillic acid	84,00 ^e \pm 8,19	nw	244,56 ^d \pm 6,28	294,24 ^f \pm 6,65
Pochodne kwasu o-kumarowego O-coumaric acid derivates	nw	93,65 ^d \pm 1,29	nw	nw
Kwas rozmarynowy Rosmarinic acid	nw	213,25 ^a \pm 2,48	nw	nw
Kwas salicylowy / Salicylic acid	nw	15,77 \pm 0,98	nw	nw
Pochodne kwasu salicylowego Salicylic acid derivates	nw	43,28 ^e \pm 4,75	nw	nw
Kwas syringowy / Syringic acid	123,84 ^d \pm 3,07	nw	nw	nw
Pochodne kwasu syringowego Syringic acid derivates	283,4 ^b \pm 5,12	nw	nw	nw
Flawonoidy / Flavonoids				
Apigenina / Apigenin	nw	nw	842,41 ^a \pm 5,13	nw
Pochodne apigeniny Apigenin derivates	nw	139,62 ^b \pm 1,31	nw	nw
Epikatechina / Epicatechin	511,80 ^a \pm 5,11	nw	294,60 ^c \pm 5,67	nw
Daidzeina / Daidzein	nw	nw	Nw	1159,09 ^a \pm 8,43
Katechnia / Catechin	181,60 ^c \pm 4,55	102,57 ^c \pm 3,25	50,44 ^g \pm 6,59	nw
Pochodne katechiny Catechin derivates	92,48 ^e \pm 3,64	nw	nw	405,92 ^d \pm 3,30
Luteolina / Luteolin	nw	nw	44,60 ^g \pm 7,08	11,64 ^k \pm 1,37
Pochodne luteoliny Luteolin derivates	nw	nw	nw	640,88 ^b \pm 7,05
Naryngenina / Naringenin	nw	nw	324,33 ^b \pm 4,10	98,00 ⁱ \pm 4,95
Pochodne naryngeniny Naringenin derivates	nw	nw	nw	480,30 ^c \pm 5,87
Rutyna / Rutin	nw	nw	159,87 ^c \pm 3,53	163,72 ^g \pm 3,14
Pochodne rutyny Rutin derivates	nw	nw	nw	347,19 ^e \pm 5,10
Zawartość ogółem Total content	1341,46	754,46	2095,93	3745,19

Objaśnienia / Explanatory notes:

s.m. – sucha masa / dry matter; n = 3; nw – nie występowały / not present.

Wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) / Mean values in rows, and denoted by different letters, differ statistically significantly ($p \leq 0.05$).

Głównymi składnikami ekstraktu W były epikatechina ($511,8 \pm 5,11 \mu\text{g/g s.m.}$), katechina i jej pochodne (łącznie $274,00 \pm 8,19 \mu\text{g/g s.m.}$). W ekstrakcie ET oznaczono mało flawonoidów i stosunkowo dużo kwasów fenolowych, szczególnie kwasu rozmarynowego ($213,25 \pm 2,48 \mu\text{g/g s.m.}$). Dominującym składnikiem ekstraktu GLW była apigenina ($842,41 \pm 5,13 \mu\text{g/g s.m.}$), uważana za flawonoid *P. crispum* o najsilniejszym działaniu przeciwutleniającym [15]. Ekstrakt GCW charakteryzował się dużą zawartością daidzeiny ($1159,09 \pm 8,43 \mu\text{g/g sm}$) oraz pochodnych naryngeniny, której obecność oznaczono także w ekstrakcie GLW. Ze względu na podobieństwo chemiczne do cząsteczek żeńskich hormonów płciowych daidzenia, naryngenina i jej pochodne zaliczane są do tzw. fitoestrogenów [5, 13].

Polifenole roślinne są efektywnymi przeciwutleniaczami, silniejszymi niż witaminy C, E oraz karotenoidy [20]. Przeciwutleniające działanie związków zawartych w wodnych i etanolowych ekstraktach z liści pietruszki potwierdziły badania *in vitro*, w których oznaczano m.in. zdolność do neutralizowania stabilnego wolnego rodnika DPPH[•] oraz stopień peroksydacji lipidów [9, 17, 28]. W badaniach własnych porównano neutralizowanie stabilnych wolnych rodników DPPH[•] i ABTS^{•+}, aby określić przeciwutleniające właściwości ekstraktów z liści pietruszki. Zdolność do neutralizacji wolnych rodników przez poszczególne ekstrakty porównano następnie z zawartością związków fenolowych, wyznaczając wartości IC₅₀ (tab. 2). Najniższą wartością IC₅₀, wskazującą na wysoką zdolność do neutralizacji rodnika DPPH[•], charakteryzował się ekstrakt GLW (IC₅₀ = $6,89 \pm 0,56 \mu\text{g/ml}$). Najwyższą zdolność do neutralizacji ABTS^{•+} wykazywał ekstrakt W (IC₅₀ = $31,44 \pm 4,11 \mu\text{g/ml}$), natomiast najniższą – ekstrakt GCW (IC₅₀ = $57,54 \pm 4,53 \mu\text{g/ml}$). Potencjał przeciwutleniający ekstraktów z liści pietruszki porównano również w badaniu ich zdolności do chelatowania jonów żelaza Fe²⁺. Wartości współczynnika IC₅₀ wskazują, że wszystkie badane ekstrakty w porównywalnym stopniu chelatują jony Fe²⁺ (tab. 2).

Stosowanie ekstraktów roślinnych zamiast oczyszczonych substancji roślinnych w przemyśle spożywczym ma zarówno zalety, jak i wady. Wiele biologicznie aktywnych związków, także związków fenolowych, wykazuje działanie synergistyczne [29]. Jednocześnie w procesie ekstrakcji uwalniane są nie tylko substancje o pożądanym biologicznym właściwościach, ale także inne związki, których obecność nawet w niewielkich ilościach może działać toksycznie lub drażniąco. W takich przypadkach ekstrakty wymagają dodatkowego procesu oczyszczania, co jednak znacząco zwiększa koszt ich produkcji. Toksyczność ekstraktów z liści pietruszki była badana zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. W badaniach *in vitro* sprawdzano wpływ wodnego ekstraktu z liści *P. crispum* na przeżywalność ludzkiej linii komórek neuroblastoma SH-SY5Y. Hodowla 12-godzinna w obecności badanego ekstraktu w stężeniach $0,01 \div 2 \text{ mg/ml}$ nie wywołała efektu cytotoksycznego [14]. W badaniach toksykologicznych na szczurach karmionych przez 8 tygodni etanolowym ekstraktem z liści pietruszki wykazano, że

ekstrakt ten wykazuje niewielką hepatotoksyczność i neurotoksyczność dopiero w dawkach powyżej 1000 mg/kg masy ciała na dzień [1]. W niniejszej pracy badano wpływ ekstraktów z liści pietruszki na przeżywalność ludzkiej linii fibroblastów skórnych BJ (rys. 2). Cytotoksyczność ekstraktów porównywano z cytotoksycznością rozpuszczalników użytych do sporządzenia poszczególnych ekstraktów. Spośród badanych ekstraktów najwyższą cytotoksyczność wykazywał ekstrakt etanolowy (rys. 2 B), który powodował znaczące zmniejszenie liczby żywych komórek już w stężeniu 0,63 %, w porównaniu z komórkami traktowanymi tym samym stężeniem etanolu. Znaczącą cytotoksyczność zaobserwowano także w przypadku ekstraktu wodnego (rys. 2 A), który w stężeniu 2,5 % powodował zmniejszenie liczby żywych komórek o ok. 25 %. Hodowla fibroblastów w obecności 10-procentowego wodnego ekstraktu z liści pietruszki przyczyniła się do ograniczenia ich przeżywalności do zaledwie 16 %. Po analizie przeżywalności fibroblastów hodowanych w obecności ekstraktów glikolowo-wodnego (rys. 2 C) i glicerolowo-wodnego (rys. 2 D) stwierdzono, że mimo dużej zawartości związków fenolowych i znaczących właściwości przeciwutleniających ekstrakty te nie są bardziej cytotoksyczne niż same rozpuszczalniki. Mimo oczywistych ograniczeń wynikających z badania cytotoksyczności w warunkach *in vitro*, otrzymane wyniki wskazują, że glikolowo-wodny i glicerolowo-wodny ekstrakt z *P. crispum* mogą być cennym surowcem, ale np. w przemyśle kosmetycznym. Zastosowanie ich w przemyśle spożywczym wymagałoby usunięcia rozpuszczalników.

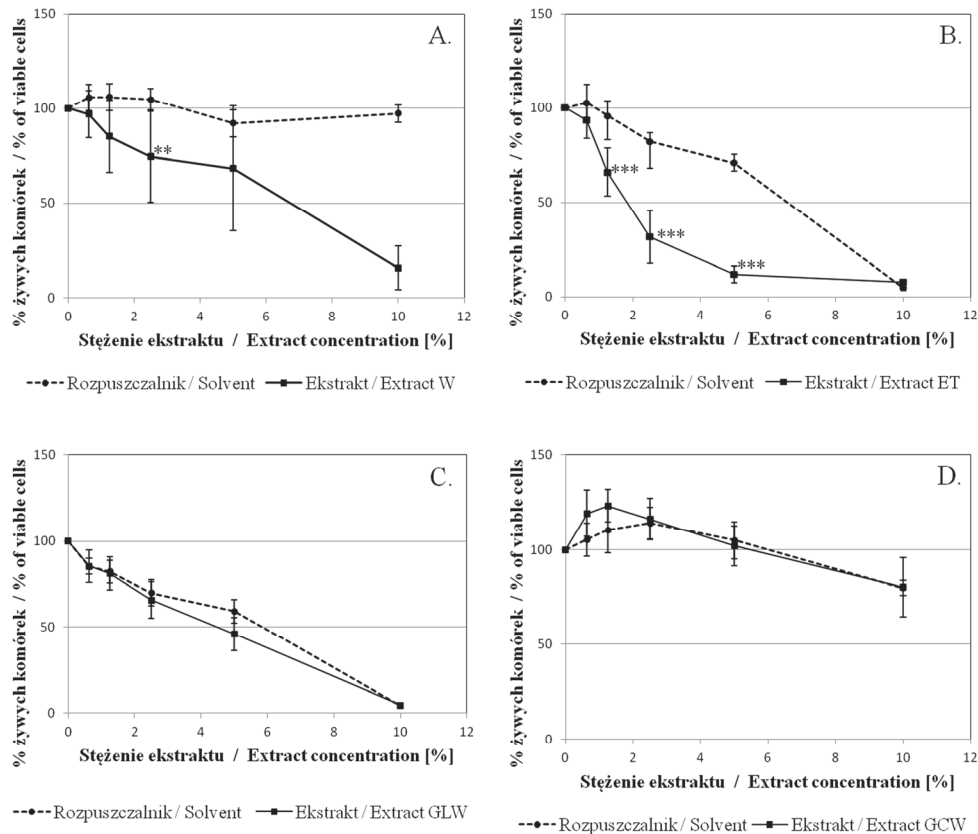
Tabela 2. Średnie wartości IC_{50} właściwości przeciwrodnikowych (DPPH[•] i ABTS^{•+}) i zdolności chelatowania jonów Fe^{2+} przez wodny (W), etanolowy (ET), glikolowo-wodny (GLW) oraz glicerolowo-wodny (GCW) ekstrakt z liści *P. crispum*

Table 2. Mean IC_{50} values of properties of aqueous (W), ethanolic (ET), glycolic-aqueous (GLW), and glycerinic-aqueous (GCW) *P. crispum* leaf extracts to scavenge radicals (DPPH[•] and ABTS^{•+}) and their ability to chelate Fe^{2+} ions

Ekstrakt / Extract <i>Petroselinum crispum</i>	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	Fe^{2+}
	IC_{50} [μ g/ml]		
W	29,17 ^c ± 0,77	31,44 ^a ± 4,11	76,13 ^{a,b} ± 8,24
ET	25,65 ^b ± 0,99	42,08 ^b ± 5,20	88,95 ^b ± 15,32
GLW	31,41 ^d ± 1,43	53,46 ^c ± 4,45	77,84 ^{a,b} ± 6,88
GCW	6,89 ^a ± 0,56	57,54 ^c ± 4,53	76,13 ^{a,b} ± 8,24

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; te same litery zamieszczone w kolumnie oznaczają grupy homogenne (p = 0,05) / the same letters in column denote homogenic groups (p = 0.05).



Rys. 2. Cytotoksyczność *in vitro* wodnego (A), etanolowego (B), glikolowo-wodnego (C) i glicerolowo-wodnego (D) ekstraktu z liści *P. crispum* względem ludzkich fibroblastów skórnych

Fig. 2. Cytotoxicity of aqueous (A), ethanolic (B), glycolic-aqueous (C) and glycerinic-aqueous (D) *P. crispum* leaf extracts against human skin fibroblasts *in vitro*

Wnioski

1. W ekstraktach glikolowo-wodnym (GLW) i glicerolowo-wodnym (GCW) z suszonych liści pietruszki oznaczono najwięcej związków fenolowych ogółem, a najwięcej flawonoidów było w ekstrakcie etanolowym (ET).
2. Każdy z ekstraktów charakteryzował się innym składem kwasów fenolowych i flawonoidów.
3. Najsilniejsze działanie przeciwutleniające wykazywały ekstrakty GCW (wobec rodnika DPPH[•]) i ET (wobec rodnika ABTS^{•+}). Wszystkie ekstrakty w podobnym stopniu chelatowały jony Fe²⁺.

4. Największą cytotoksycznością *in vitro* cechowały się ekstrakty ET i wodny (W). Ekstrakty GLW i GCW charakteryzowały się podobną cytotoksycznością jak użyte do ich przygotowania rozpuszczalniki.

Literatura

- [1] Awe E.O., Banjoko S.O.: Biochemical and haematological assessment of toxic effects of the leaf ethanol extract of *Petroselinum crispum* (Mill) Nyman ex A.W. Hill (Parsley) in rats. BMC Complem. Altern. M., 2013, **13**, 75.
- [2] Bartosz G.: The second face of oxygen. Free radicals in nature. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2009.
- [3] Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igc R.: Phenolics as antioxidants in garlic (*Alium sativum* L., Alliaceae). Food Chem., 2008, **111**, 925-929.
- [4] Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Sci. Technol., 1995, **28** (1), 25-30.
- [5] Czerpak R., Pietryczuk A., Jabłońska-Trypuć A., Obrębska K.: Aktywność biologiczna izoflawonoidów i ich znaczenie terapeutyczne i kosmetyczne. Post. Fitoter., 2009, **2**, 113-121.
- [6] Dai J., Mumper R.J.: Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 2010, **15** (10), 7313-7352.
- [7] Farzaei M.H., Abbasabadi Z., Ardekani M.R., Rahimi R., Farzaei F.: Parsley: A review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. J. Trad. Chin. Med., 2013, **33** (6), 815-826.
- [8] Fecka I., Mazur A., Cisowski W.: Kwas rozmarynowy, ważny składnik terapeutyczny niektórych surowców roślinnych. Post. Fitoter., 2002, **8** (1-2), 20-25.
- [9] Fejes S., Blázovics A., Lemberkovics E., Petri G., Sz"oke E., Kéry A.: Free radical scavenging and membrane protective effects of methanol extracts from *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.) and *Petroselinum crispum* (Mill.) nym. ex A.W. Hill. Phytother. Res., 2000, **14** (5), 362-365.
- [10] Gawel-Bęben K., Bujak T., Nizioł-Lukaszewska Z., Antosiewicz B., Jakubczyk A., Karaś M., Rybczyńska K.: *Stevia rebaudiana* Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. Molecules, 2015, **20** (4), 5468-5486.
- [11] Gawlik-Dziki U.: Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2004, **41** (4) Supl., 29-40.
- [12] Kozłowska A., Szostak-Węgierek D.: Flavonoids – food sources and health benefits. Roczn. PZH, 2014, **65** (2), 79-85.
- [13] Kwiatkowska E.: Fitoestrogeny – rola prozdrowotna i zawartość w produktach. Post. Fitoter., 2009, **2**, 107-112.
- [14] Lantto T.A., Colucci M., Zavadová V., Hiltunen R., Raasmaja A.: Cytotoxicity of curcumin, resveratrol and plant extracts from basil, juniper, laurel and parsley in SH-SY5Y and CV1-P cells. Food Chem., 2009, **117** (3), 405-411.
- [15] Nielsen S.E., Young J.F., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Knuthsen P., Sandström B., Dragsted L.O.: Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. Brit. J. Nutr., 1999, **81** (6), 447-455.
- [16] Ozsoy-Sacan O., Yanardag R., Orak H., Ozgey Y., Yarat A., Tunali T.: Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) extract versus glibornuride on the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. J. Ethnopharmacol., 2006, **104** (1-2), 175-81.
- [17] Popović M., Kaurinović B., Jakovljević V., Mimica-Dukic N., Bursać M.: Effect of parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A.W. Hill, Apiaceae) extracts on some biochemical parameters of oxidative stress in mice treated with CCl(4). Phytother. Res., 2007, **21** (8), 717-723.

- [18] Re R., Pellegrini A., Proteggente A., Pannala M., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.*, 1999, **26** (9-10), 1231-1237.
- [19] Repetto G., Del Peso A., Zurita J.L.: Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.*, 2008, **3**, 1125-1131.
- [20] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 1996, **20** (7), 933-956.
- [21] Shukla S., Gupta S.: Apigenin: A promising molecule for cancer prevention. *Pharm. Res.*, 2010, **27** (6), 962-978.
- [22] Singleton V.L., Rossi J.A. Jr.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, **16** (3), 144-158.
- [23] Świeca M., Baraniak B.: Nutritional and antioxidant potential of lentil sprouts affected by elicitation with temperature stress. *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**, 3306-3313.
- [24] Szymanowska U., Złotek U., Karaś M., Baraniak B.: Anti-inflammatory and anti-oxidative activity of anthocyanins from purple basil leaves induced by selected abiotic elicitors. *Food Chem.*, 2015, **172**, 71-77.
- [25] Torres-Fuentes C., Alaiz M., Vioque J.: Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chem.*, 2011, **129** (2), 485-490.
- [26] Vora S.R., Patil R.B., Pillai M.M.: Protective effects of *Petroselinum crispum* (Mill) Nyman ex A. W. Hill leaf extract on D-galactose-induced oxidative stress in mouse brain. *Indian J. Exp. Biol.*, 2009, **47** (5), 338-342.
- [27] Woisky R., Salatino A.: Analysis of propolis: Some parameters and procedure for chemical quality control. *J. Apic. Res.*, 2008, **37**, 99-105.
- [28] Wong P.Y.Y., Kitts D.D.: Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chem.*, 2006, **97** (3), 505-515.
- [29] Yeh C.T., Shih P.H., Yen G.C.: Synergistic effect of antioxidant phenolic acids on human phenol-sulfotransferase activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52** (13), 4139-4143.

IMPACT OF SOLVENT TYPE ON SOME SELECTED BIOLOGICAL PROPERTIES OF PARSLEY *PETROSELINUM CRISPUM* (MILL) LEAF EXTRACTS

S u m m a r y

Parsley (*Petroselinum crispum* Mill) is used as a raw material in the food industry because it has, among other things, a high content of phenolics. Under the research study presented, the impact of solvents on the content and some selected biological properties of *P. crispum* extracts was studied. The following extracts were compared: aqueous (W), ethanolic (ET), aqueous-glycolic (GLW), and aqueous-glycerinic (GCW). The highest concentration of total phenolics was determined in the GLW (2.63 ± 0.03 mg/g sm) and GCW (2.12 ± 0.08 mg/g sm) extracts, while the ET extract contained the highest amount of flavonoids (0.86 ± 0.02 mg/g sm). In the W extract, epicatechin, catechin and its derivatives were the main phenolic compounds, in the ET extract: phenolic acids (e.g. rosmarinic acid), in the GLW extract: apigenin, and in the GCW extract: daidzein, naringenin, and the derivatives. In addition to significant differences in the quantitative and qualitative composition of the extracts analysed, their antioxidant activity was highly differentiated. The GCW extract neutralized the DPPH' radical to the greatest extent ($IC_{50} = 6.89 \pm 0.56$ µg/ml) and the W extract: the ABTS⁺⁺ radical ($IC_{50} = 31.44 \pm 4.11$ µg/ml). All the extracts had

a comparable ability to chelate Fe²⁺ ions. The *in vitro* analysis of cytotoxicity of the extracts against the BJ human cell line (ATCC CRL-2522) demonstrated that the ET and W extracts were the most cytotoxic ones. The cytotoxicity of GLW and GCW extracts was comparable to the cytotoxicity of that of the solvents. The impact was proved of the solvents on the content, antioxidant properties, and cytotoxicity of *P. crispum* leaf extracts, and, at the same time, it was suggested that it would be possible to use those extracts in the food, pharmaceutical, and cosmetic industry.

Key words: *Petroselinum crispum*, antioxidants, phenolics, flavonoids, cytotoxicity ☒