

MAŁGORZATA WOŹNIAK, KATARZYNA OSTROWSKA,
ŁUKASZ SZYMAŃSKI, KATARZYNA WYBIERALSKA, RYSZARD ZIELIŃSKI

AKTYWNOŚĆ PRZECIWRODNIKOWA EKSTRAKTÓW SZALWII I ROZMARYNU

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań aktywności przeciwrodnikowej ekstraktów otrzymanych z szalwii i rozmarynu. Aktywność przeciwrodnikową określono na podstawie pomiaru kinetyki procesu wygaszania rodnika DPPH• w roztworach wodno-metanolowych otrzymanych ekstraktów. Stwierdzono, że obserwowana doświadczalnie aktywność przeciwrodnikową zależy głównie od rodzaju zastosowanego ekstrahentu i maleje w następującej kolejności: heksan > octan etylu > woda > metanol > aceton.

Słowa kluczowe: szalwia, rozmaryn, aktywność przeciwrodnikowa, DPPH, kinetyka

Wprowadzenie

Wysoka aktywność marketingowa zachęcają nas do kupowania produktów spożywczych oraz preparatów farmaceutycznych bogatych w substancje ziołowe. Jednym z ziół właściwości farmakologiczne są produkty wykorzystujące szalwię. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat szalwia a także rozmaryn były przedmiotem intensywnych badań ze względu na zawartość składników o działaniu przeciwutleniającym, do których zalicza się związki diterpenowe, związki triterpenowe, olejki eteryczne i flawonoidy. Z tego powodu ekstrakty szalwii znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle leczniczym, spożywczym i kosmetycznym.

Z żywnościowego oraz zdrowotnego punktu widzenia oprócz zawartości mikroelementów i makroelementów a także substancji aromatycznych lub biologicznie czynnych w produktach ziołowych jest wysoka zawartość substancji o właściwościach

przeciwutleniających. Rozmaryn i szalwia są bardzo podobne do siebie pod względem obecnych w nich substancji przeciwutleniających.

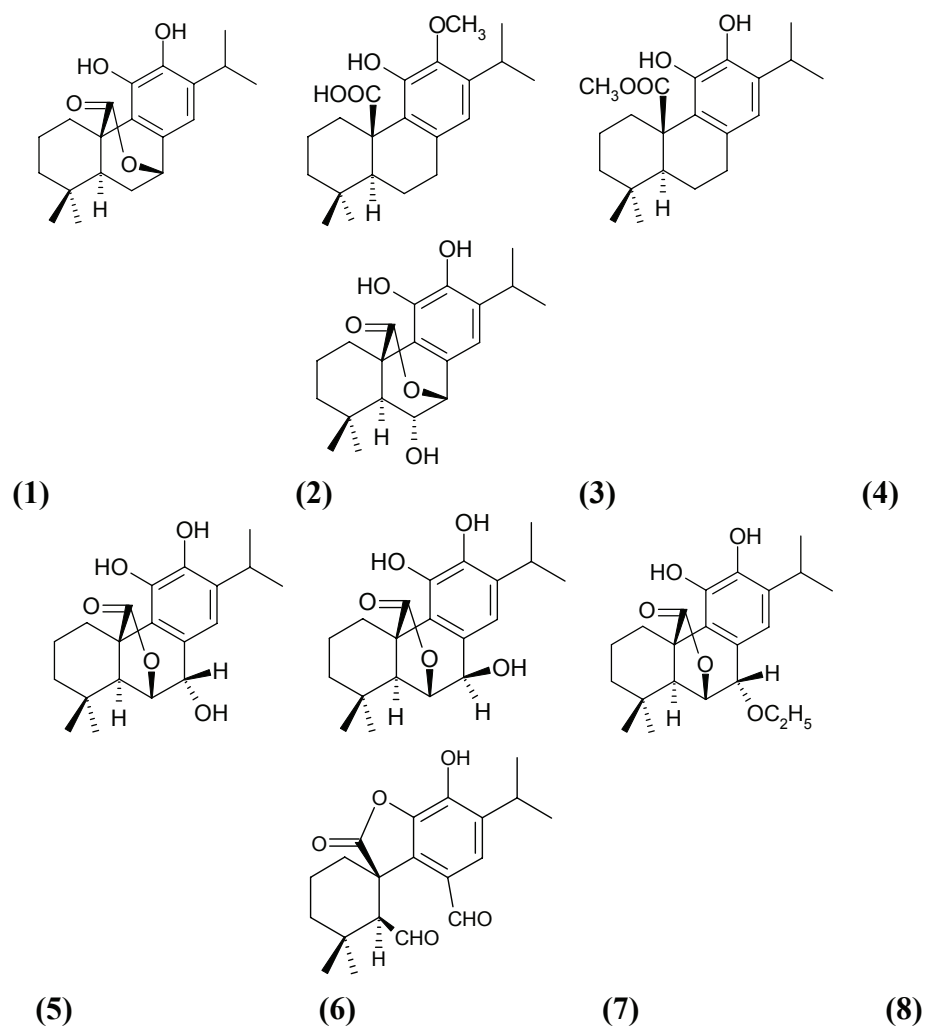
Wśród najsilniej działających aktywnych składników ekstraktu z szalwii i rozmarynu zidentyfikowano karnozol i kwas karnozynowy. Związki te aż w 90% są odpowiedzialne za właściwości przeciwutleniające preparatów ziołowych. Odgrywają ważną rolę w hamowaniu peroksydacji lipidów, oraz znacznie redukują stężenie różnych aminoglikozydów. Wykazują działania przeciwbakteryjne, przeciwalergiczne, przeciwwirusowe, przeciwbólowe. Zmniejszają ryzyko powstawania nowotworów, miażdżycy, cukrzycy oraz stymulują krążenie krwi oraz uszkodzony DNA. Wykorzystuje się je również w walce z artretyzmem i reumatyzmem i ogólnym osłabieniem organizmu [1, 2].

Do innych równie ważnych związków przeciwutleniających obecnych zarówno w rozmarynie jak i w szalwii są: karnozol, kwas karnozowy i jego pochodne, rosmanol, epirosmanol, rosmanal oraz rosmandial [3 - 8]. Ponadto, w rozmarynie znaleziono 9-etylorosmanol. Struktury najważniejszych z tych związków przedstawiono na rys. 1.

Wśród najsilniej działających aktywnych składników ekstraktu z szalwii i rozmarynu zidentyfikowano karnozol i kwas karnozynowy. Związki te aż w 90% są odpowiedzialne za właściwości przeciwutleniające preparatów ziołowych. Odgrywają ważną rolę w hamowaniu peroksydacji lipidów, oraz znacznie redukują stężenie różnych aminoglikozydów. Wykazują działania przeciwbakteryjne, przeciwalergiczne, przeciwwirusowe, przeciwbólowe. Zmniejszają ryzyko powstawania nowotworów, miażdżycy, cukrzycy oraz stymulują krążenie krwi oraz uszkodzony DNA. Wykorzystuje się je również w walce z artretyzmem i reumatyzmem i ogólnym osłabieniem organizmu [1, 2].

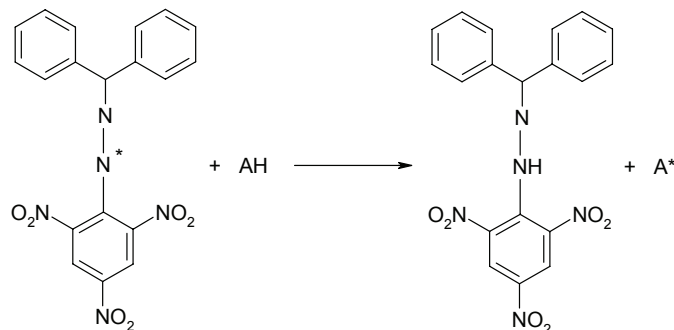
Wśród wielu dostępnych doświadczalnych metod oceny aktywności przeciwoxidacyjnej tego rodzaju produktów szczególnie przydatna wydaje się metoda kinetyczna z zastosowaniem rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylowego (DPPH•). Metoda ta była stosowana w badaniach szybkości zmiatania wolnych rodników przez flawonoidy oraz ich kompleksy z metalami [9].

W niniejszej pracy właściwości przeciwoxidacyjne ekstraktów z szalwii i rozmarynu wyznaczono na podstawie spektrofotometrycznego pomiaru szybkości zmiatania rodnika DPPH• przez porównanie natężenia absorpcji tego rodnika z natężeniem absorpcji mierzonym po określonym czasie w obecności stałej ilości kwercetyny zastosowanej jako układ porównawczy. W układzie tym wolny elektron rodnika DPPH• po sparowaniu z elektronem pochodzącym od przeciwutleniacza AH (np. kwercetyny lub składnika ekstraktu) i tworzy formę zredukowaną (rys. 2).



Rys. 1. Budowa głównych przeciwutleniaczy obecnych w szalwii i rozmarynie: (1) karnozol, (2) kwas 12-metoksykarnozynowy, (3) karnozynian metylu, (4) izorosmanol, (5) rozmanol, (6) epirosmanol, (7) 7-etoksyrozmanol, (8) rosmadial.

Fig. 1. Structures of the main antioxidants present in sage and rosemary: (1) carnosol, (2) 12-methoxycarnosic acid, (3) methyl carnosate, (4) isorosmanol, (5) rosmanol, (6) epirosmanol, (7) 7-ethoxyrosmanol, (8) rosmadial.



Rys. 2. Schemat reakcji rodnika DPPH• z przeciwutleniaczem AH
 Fig. 2. Scheme of DPPH• radical reaction with antioxidant AH

Material i metody badań

Rozmaryn lekarski (*Rosmarinus officinalis L.*) i szalwia lekarska (*Salvia officinalis L.*) stanowiły produkty handlowe prod. firmy Kamis. Rozpuszczalniki: n-heksan, metanol i octan etylu wszystkie o czystości analitycznej (prod. POCh Gliwice) destylowano bezpośrednio przed przygotowaniem roztworów. Wodę stosowaną w badaniach przygotowano stosując wodę dejonizowaną, która przed użyciem została dodatkowo oczyszczona na drodze destylacji z układu zawierającego NaOH i KMnO_4 , a następnie redestylowana. Badania kinetyczne prowadzono w układzie metanol-woda 8:1 (v/v).

Napary przygotowano z 10g powietrznie suchych liści szalwii lub rozmarynu oraz 100 cm^3 wrzącej wody. Po ochłodzeniu napary sączone i uzupełniano wodą redestylowaną do 100 cm^3 . W celu oznaczenia aktywności przeciwutleniającej pobierano od 0,5 do 2,0 cm^3 tak otrzymanych naparów, uzupełniano wodą do łącznej objętości 2 cm^3 , dodawano 2 cm^3 metanolu oraz 6 cm^3 metanolowego roztworu DPPH.

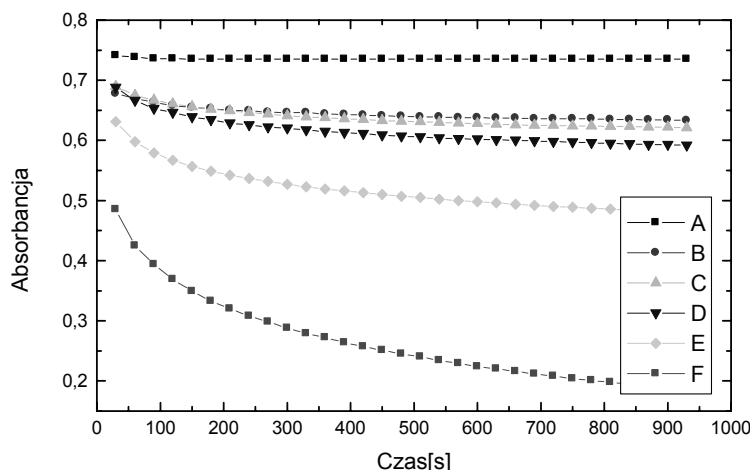
Ekstrakty przygotowano na drodze ekstrakcji 20 g powietrznie suchych liści szalwii lub rozmarynu w aparacie Soxhleta w temperaturze wrzenia stosowanych rozpuszczalników w ciągu 4 godzin, a otrzymane produkty zatężano pod próżnią w temperaturze poniżej 40°C do całkowitego usunięcia stosowanego rozpuszczalnika. Suchą pozostałość rozpuszczano w 50 cm^3 metanolu, a następnie pobierano określoną ilość z przygotowanego roztworu i rozcieńczano w 10ml metanolu. Dokonywano kolejnych rozcieńczeń w celu ustalenia określonego stężenia roztworu, potrzebnego przeprowadzenia badań kinetyki wygaszania rodnika DPPH.

Napary otrzymano przez zalanie odważki rozdrobnionego rozmarynu lub szalwii przy użyciu stałej ilości wrzącej wody redestylowanej. Otrzymane mieszaniny utrzymywano w stanie łagodnego wrzenia przez 15 minut a następnie schłodzono do temperatury pokojowej i rozcieńczono wodą redestylowaną do stałej objętości. Badania kine-

tyki procesu zaniku rodnika DPPH• w obecności zmiennych objętości badanych ekstraktów przeprowadzono metodą spektrofotometryczną przy długości fali 515 nm (maksimum absorpcji rodnika DPPH•). Pomiary wykonywano przy użyciu spektrofotometru Genesis II firmy Milton Roy połączonego z komputerem klasy PC poprzez interfejs RS232.

Wyniki i dyskusja

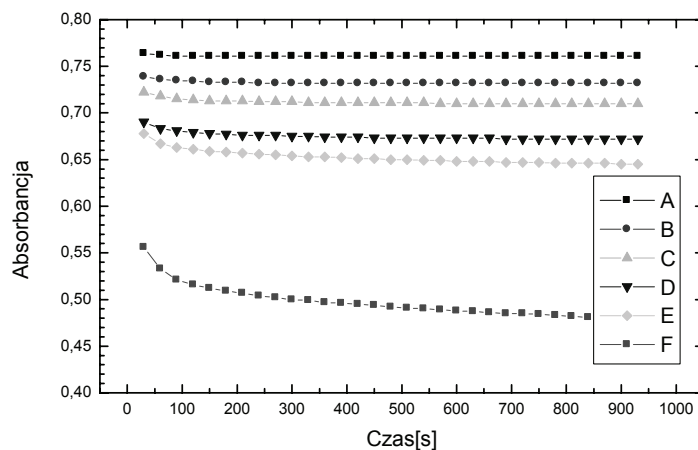
W celu doświadczalnego określenia aktywności przeciwrodnikowej ekstraktów (lub naparów) przygotowanych z badanych roślin wykorzystano pomiar szybkości procesu wygaszania rodnika DPPH• w roztworach wodno-metanolowych. Na rys. 3. i 4. przedstawiono przykładowe wyniki badań kinetyki procesu wygaszania rodnika DPPH• przy zastosowaniu różnych stężeń ekstraktów szalwii.



Rys. 3. Kinetyka zmian absorbancji roztworów rodnika DPPH• w obecności różnych ilości metanolowego ekstraktu szalwii (S). DPPH• = 0,107 mM. Stężenie ekstraktu szalwii [$\text{mg}/10 \text{ cm}^3$]: A – 0,2; B – 0,6; C – 0,8; D – 1,0; E – 1,4; F – 3,0.

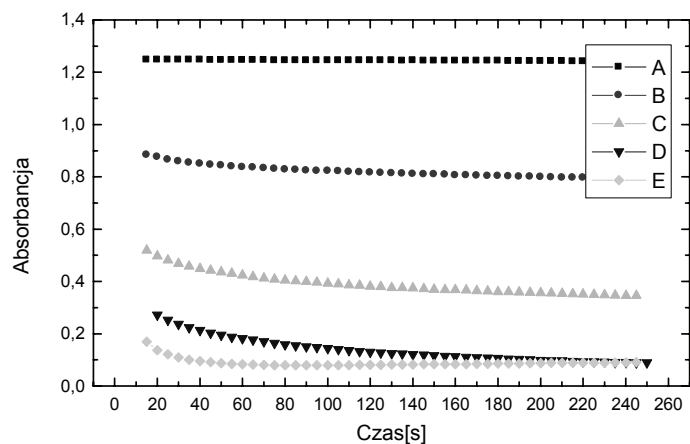
Fig. 3. Kinetics of the absorbance changes for DPPH• solutions in the presence of various quantities of methanol extract of sage (S). DPPH• = 0.107 mM. Sage extract concentration [$\text{mg}/10 \text{ cm}^3$]: A – 0.2; B – 0.6; C – 0.8; D – 1.0; E – 1.4; F – 3.0.

Rys. 5 stanowi typowy przykład badań kinetycznych aktywności przeciwutleniającej ekstraktów rozmarynu. Przedstawia on wyniki badań kinetyki procesu wygaszania rodnika DPPH przy zastosowaniu różnych ekstraktów metanolowych.



Rys. 4. Kinetyka zmian absorbancji roztworów rodnika DPPH• w obecności różnych ilości acetonowego ekstraktu szaławii (S). DPPH• = 0,107 mM. Stężenie ekstraktu szaławii [$\text{mg}/10 \text{ cm}^3$]: A – 0,2; B – 0,6; C – 0,8; D – 1,0; E – 1,4; F – 3,0.

Fig. 4. Kinetics of the absorbance changes for DPPH• solutions in the presence of various quantities of acetone extract of sage (S). DPPH• = 0.107 mM. Sage extract concentration [$\text{mg}/10 \text{ cm}^3$]: A – 0.2; B – 0.6; C – 0.8; D – 1.0; E – 1.4; F – 3.0.



Rys. 5. Kinetyka zmian absorbancji roztworów rodnika DPPH• w obecności różnych ilości metanolowego ekstraktu rozmarynu (R). DPPH• = 0,107 mM. Stężenie ekstraktu rozmarynu [$\text{mg}/10 \text{ cm}^3$]: A – 0,2; B – 0,6; C – 0,8; D – 1,0; E – 1,4.

Fig. 5. Kinetics of the absorbance changes for DPPH• solutions in the presence of various quantities of methanol extract of rosemary (R). DPPH• = 0.107 mM. Rosemary extract concentration [$\text{mg}/10 \text{ cm}^3$]: A – 0.2; B – 0.6; C – 0.8; D – 1.0; E – 1.4.

Jak wynika z przedstawionych danych przedstawionych na rys. 3-5 szybkość zaniku rodnika DPPH• w znaczący sposób zależy zarówno od stężenia użytego ekstraktu szalwii lub rozmarynu a także od rodzaju rozpuszczalnika zastosowanego w procesie ekstrakcji tych surowców roślinnych. Już wyniki badań wstępnych wykazały, że pod względem kinetycznym badany proces jest złożony. Jednak bliższa analiza danych doświadczalnych wskazuje, że w początkowym okresie przebiegu reakcji w układzie DPPH• – ekstrakt (lub napar) wyniki doświadczalne można z dobrym przybliżeniem opisać równaniem kinetycznym I-rzędu:

$$A = A_{\infty} + (A_0 - A_{\infty}) \cdot e^{-kt}$$

gdzie: A_0 – absorbancja roztworu w czasie zerowym, A_{∞} – absorbancja roztworu w czasie nieskończenie długim, k – stała szybkości procesu pierwszorzędowego.

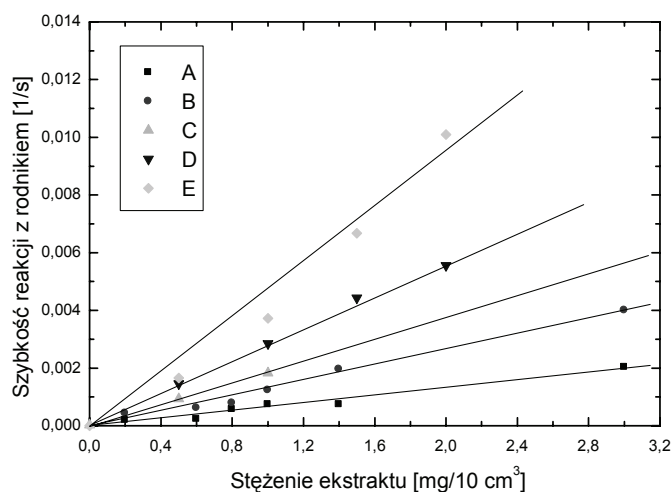
Wartości parametrów A_0 , A_{∞} oraz k wyznaczono przy użyciu nieliniowej metody najmniejszych kwadratów z wykorzystaniem algorytmu Levenberga-Marquardta. Początkową szybkość badanego procesu dezaktywacji rodnika DPPH•, r_0 , przez ekstrakty w układach zawierających zmienne ilości ekstraktów wyznaczono na podstawie granicznej wartości szybkości zmian absorbancji roztworów odniesionej do absorbancji początkowej. Tak zdefiniowana początkowa szybkość procesu przyjmuje postać:

$$r_0 = \lim_{t \rightarrow 0} \frac{1}{A_0} \frac{dA}{dt} = k \frac{A_0 - A_n}{A_0}$$

Błędy dopasowania analizowanej funkcji oszacowano z wykorzystaniem makropolecenia X-Numbers ver. 5.6 [10] zaimplementowanego w arkuszu kalkulacyjnym MS Excel 2007.

Na rys. 6 przedstawiono wyniki badań wpływu objętości ekstraktu szalwii na wartość początkowej szybkości zaniku rodnika DPPH•, r_0 , w roztworach. W przypadku badanych ekstraktów rozmarynu i szalwii proces wygaszania rodnika DPPH• przez te ekstrakty jest procesem pseudopierwszorzędowym.

Wykazano, że dodatek niewielkich ilości badanych ekstraktów zwiększa szybkość procesu wygaszania rodnika DPPH• w stosunku do układów bez tych dodatków. Zauważono także, że rodzaj rozpuszczalnika zastosowanego w procesie ekstrakcji zarówno szalwii jak i rozmarynu w sposób znaczący wpływa na szybkość procesu dezaktywacji rodnika DPPH•. Wynik ten w sposób jednoznaczny wskazuje na istotne różnice w zarówno w rodzaju jak i zawartości substancji przeciwutleniających ekstrahowanych z badanych roślin przy użyciu różnych ekstrahentów.



Rys. 6. Wpływ stężenia ekstraktu z szałwii na początkową szybkość wygaszania rodnika DPPH•. Symbole: A – aceton, B – metanol, C – woda, D – octan etylu, E – heksan.

Fig. 6. Effect of sage extract concentration on the initial rate of DPPH• radical quenching. Symbols: A – acetone, B – methanol, C – water, D – ethyl acetate, E – hexane.

Wnioski

1. Stwierdzono, że aktywność przeciwrodnikowa badanych ekstraktów szałwii zależy głównie od rodzaju zastosowanego ekstrahentu i maleje ona w następującej kolejności: heksan > octan etylu > woda > metanol > aceton. Podobną kolejność rozpuszczalników ustalono także dla ekstraktów rozmarynu. Oznacza to, że wysoką aktywność przeciwutleniającą wykazują ekstrakty uzyskane przy zastosowaniu rozpuszczalników o niższej polarności.
2. Zaobserwowana tendencja wydaje się potwierdzać stosowany w polskiej kuchni zwyczaj dodatku rozmarynu jako substancji przedłużającej trwałość substancji tłuszczowych. Przykładowo, szałwię stosuje się jako dodatek do potraw z roślin strączkowych i tłustych mięs, podczas gdy smak i aromat rozmarynu dobrze harmonizuje z niektórymi potrawami mięsnymi (np. baranina, dziczyzna) oraz rybami.

Literatura

- [1] Oszmiański J.: Polifenole jako naturalne przeciwutleniacze w żywności. *Przem. Spoż.*, 1995 (3), 94-96.
- [2] Ball S.: *Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka*. Medyk Warszawa 2001.
- [3] Taga M.S., Miller E.E., Pratt D.E.: Chia seeds as source of natural lipid antioxidants, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1984, 61, 928-931.

- [4] Cuvelier M.E., Berset C., Richard H.: Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). J. Agric. Food Chem., 1994, 42, 665-669.
- [5] Cuvelier M.E., Richard H., Berset C.: Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. J. Amer. Oil Chem. Soc., 1996, 73, 645-652.
- [6] Inatani R., Nakatani N., Fuwa H., Seto H.: Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*). Agric. Biol. Chem., 1982, 46, 1661-1666.
- [7] Richeimer S.L., Bernart M.W., King G.A., Kent M.C., Bailey D.T.: Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. J. Amer. Oil Chem. Soc., 1996, 73, 507-514.
- [8] Velickvic D., Randjelovic N., Ristic M., Smelcerovic A., Velickvic A.: Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *Salvia pratensis L.*, *S. glutinosa L.* and *S. aethionis L.* J. Serb. Chem., 2002, 67, 639-646.
- [9] Wybieralska K.: Wpływ jonów kadmu(II) na aktywność przeciwutleniającą flawonoidów. Towaroznawcze Problemy Jakości, 2006, 2 (7), 84-93.
- [10] Volpi L.: X-Numbers. Multi-Precision Floating Point Arithmetic and Numerical Methods for Excel. Ver. 5.6. Foxes Team. Italy, 2008. <http://digilander.libero.it/foxes>.

ANTIRADICAL ACTIVITY OF SAGE AND ROSEMARY EXTRACTS

Summary

Results of experimental work on antiradical activity of extracts from sage and rosemary are presented. Antiradical activity was determined based on kinetics of the quenching of DPPH• radical in the aqueous-solutions of resulting extracts. It was found that the experimentally observed antiradical activity mainly depends on extractant used and it decreases in the following order: hexane > ethyl acetate > water > methanol > acetone.

Key words: sage, rosemary, antiradical activity, DPPH, kinetics ☒