Zmiany właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów z liści werbeny cytrynowej (*Lippia citriodora* (Palau) Kunth) w trakcie przechowywania

Changes in antioxidant properties of lemon verbena leaf extracts (*Lippia citriodora* (Palau) Kunth) during storage

*Małgorzata Stryjecka, **Anna Kiełtyka-Dadasiewicz

*Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Chełmie, Instytut Nauk Rolniczych, ul. Wojsławicka 8b, 22-100 Chełm, e-mail: malgorzatazs@interia.pl; ** Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Technologii Produkcji Roślinnej i Towaroznawstwa, 20-950 Lublin, ul. Akademicka 15

Słowa kluczowe: werbena cytrynowa, polifenole, właściwości przeciwutleniające

Keywords: lemon verbena, polyphenols, antioxidant properties

Streszczenie

Oznaczono zmiany zawartości polifenoli ogółem i aktywność antyoksydacyjną metodą z DPPH oraz FRAP ekstraktów: metanolowych, etanolowych, wodnych oraz acetonowych, otrzymanych z werbeny cytrynowej (*Lippia citriodora* (Palau) Kunth.) w czasie ich przechowywania (3, 6, 9 i 12 miesięcy). Największą zawartość polifenoli ogółem zanotowano w ekstrakcie metanolowym, najniższą zaś w wyciągu acetonowym. Ekstrakt metanolowy charakteryzował się największą aktywnością antyoksydacyjną, oznaczoną zarówno metodą z DPPH, jak i FRAP. Wydłużenie czasu przechowywania wszystkich ekstraktów, niezależnie od czynnika ekstrahującego, powodowało spadek zarówno zawartości polifenoli ogółem, jak i aktywności antyoksydacyjnej.

Summary

The changes of total polyphenol content and antioxidant activity by DPPH and FRAP extracts from methanol, ethanol, aqueous and acetone extract obtained from lemon verbena (*Lippia citriodora* (Palau) Kunth) were stored during storage (3, 6, 9 and 12 months). The highest content of polyphenols was recorded in the methanol extract and lowest in the acetone extract. The methanol extract was characterized by the highest antioxidant activity, both by DPPH and FRAP. Extending the storage time of all extracts, irrespective of the extractor, resulted in a decrease in both total polyphenol content and antioxidant activity.

Wstęp

Werbena cytrynowa (*Lippia citriodora* (Palau) Kunth.) pochodzi z Ameryki Południowej, uprawiana jest również w południowej Francji i Hiszpanii. W Polsce ze względu na niską mrozoodporność można ją uprawiać pod

osłonami lub jako roślinę jednoroczną. Wytwarza lancetowato-wydłużone liście koloru zielonoseledynowego, zawierające od 0,8 do 1,2% olejku eterycznego. Głównym składnikiem olejku jest cytral (do 70%), pozostałe to: limonen, mircen, geraniol, nerol, neral i werbenal. Werbena cytrynowa ma zastosowanie w kosmetyce (perfumy, wody kolońskie) oraz ze względu na przyjemny słodkocytrusowy zapach i smak jest stosowana jako aromatyzujący dodatek do herbat ziołowych [1, 2, 3]. Liście zawierają także kwasy fenolowe i flawonoidy, co sprawia, że ekstrakty z nich pozyskiwane wykazują właściwości antyoksydacyjne [3, 4]. Dlatego też za cel niniejszej pracy postawiono określenie zmian zawartości polifenoli ogółem oraz właściwości przeciwutleniających (metodą DPPH i FRAP) różnych ekstraktów otrzymanych z liści werbeny cytrynowej w trakcie przechowywania.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły wysuszone liście werbeny cytrynowej (*Lippia citriodora* (Palau) Kunth). Surowiec pochodził z roślin uprawianych na glebie piaszczysto-gliniastej w Ogrodzie Roślin i Surowców Kosmetycznych Centrum Innowacji Badań i Nauki (CIBIN), zlokalizowanym w miejscowości Wola Zadybska w województwie lubelskim (51°44'49"N 21°50'38"E). Bezpośrednio po zbiorze liście suszono konwekcyjnie w suszarce (Memmert UF160) z wymuszonym obiegiem powietrza w temperaturze 35°C, w czasie 20 minut. Otrzymany materiał zmielono za pomocą młynka laboratoryjnego IKA M20 (producent: IKA WERKE GmbH) i poddano ekstrakcji różnymi rozpuszczalnikami: wodą, 70% etanolem, metanolem oraz acetonem. Przygotowanie ekstraktów polegało na poddaniu 2g próbek suszonych liści werbeny cytrynowej (odważonych z dokładnością do 0,01g) 10-minutowej ekstrakcji w automatycznym ekstraktorze Soxhleta (firma: BÜCHI Labortechnik AG) za pomocą 30 ml wody o temperaturze 100°C oraz 100 ml rozpuszczalnika (70% etanol, metanol, aceton).

Ogólną zawartość polifenoli oraz właściwości przeciwutleniające analizowanych ekstraktów określono bezpośrednio po ekstrakcji oraz po: 3, 6, 9 i 12 miesiącach przechowywania w temperaturze -18°C. Do oznaczenia zawartości związków polifenolowych ogółem użyto odczynnika Folina-Ciocalteu'a, pomiar miał miejsce przy długości fali 765 nm, a uzyskany wynik został przeliczony na kwas galusowy. Właściwości przeciwutleniające zostały oznaczone metodą opisaną przez Branda-Williams i wsp. [5] przy użyciu DPPH (1,1-difenylo-2-picryl-hydrazyl). Absorbancję badanych próbek mierzono przy długości

fali 515 nm, po 30 minutach inkubacji, przy użyciu spektrofotometru UV-VIS firmy Shimadzu. Została również oznaczona całkowita aktywność oksydacyjna metodą FRAP. Metoda ta polega na określeniu zdolności redukcji jonów Fe^{3+} do jonów Fe^{2+} , które są kompleksowane przez TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyn) z wytworzeniem bardzo intensywnego, niebieskiego zabarwienia o maksimum absorbancji przy długości fali 593 nm [6]. Wszystkie analizy zostały wykonane w trzech powtórzeniach. Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań obejmowała obliczenie wartości średnich oraz odchylenia standardowego, przy użyciu arkusza kalkulacyjnego Excel 7.0.

Wyniki i dyskusja

Największą zawartością związków fenolowych ogółem charakteryzował się ekstrakt metanolowy ($47,9 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.m}$), nieco niższe wyniki uzyskano dla ekstraktu etanolowego ($44,1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.m}$), zaś najniższą zawartością polifenoli ogółem charakteryzował się ekstrakt acetonowy ($28,9 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.m}$) – Tabela 1. W trakcie przechowywania wszystkich analizowanych ekstraktów zanotowano spadek ogólnej zawartości związków fenolowych. Największy spadek zanotowano po 12 miesiącach przechowywania dla ekstraktu wodnego i wynosił on 39%. Natomiast najmniejszym spadkiem zawartości polifenoli ogółem w trakcie 12-miesięcznego przechowywania charakteryzował się ekstrakt etanolowy (16,3%).

Tabela 1. Zawartość polifenoli ogółem w ekstraktach wodnych, etanolowych, metanolowych i acetonowych z liści werbeny cytrynowej w trakcie przechowywania

Table 1. Total polyphenol content in aqueous, ethanol, methanol, acetone extracts from lemon verbena leaves during storage

Czas przechowywania [miesiące] Storage time [months]	Średnia zawartość polifenoli ogółem w ekstraktach z liści werbeny cytrynowej, średnia $\pm$ SD [$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.m}$] Mean total polyphenol content in lemon verbena leaf extract mean $\pm$ SD [$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ DM}$]			
	ekstrakt / extract			
	wodny aqueous	etanolowy ethanol	metanolowy methanol	acetonowy acetone
0	33,2 $\pm$ 0,17	44,1 $\pm$ 0,12	47,9 $\pm$ 0,4	28,9 $\pm$ 0,42
3	30,1 $\pm$ 0,12	42,8 $\pm$ 0,24	46,8 $\pm$ 0,34	27,2 $\pm$ 0,15
6	28,2 $\pm$ 0,17	40,2 $\pm$ 0,19	44,2 $\pm$ 0,19	26,2 $\pm$ 0,17
9	25,1 $\pm$ 0,12	38,4 $\pm$ 0,19	42,3 $\pm$ 2,32	25,1 $\pm$ 0,12
12	20,1 $\pm$ 0,14	37,1 $\pm$ 0,12	40,1 $\pm$ 0,12	22,1 $\pm$ 0,12

SD – odchylenie standardowe, SD – standard deviation

Vinha i wsp. [7] w swoich badania uzyskali zawartość polifenoli w ekstrakcie etanolemowym z werbeny cytrynowej na poziomie $41,6 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ [7], natomiast Choupani i wsp. $23,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.m}$ [8]. Badania przeprowadzone przez Shahi i wsp. [9] wykazały że zawartość tych związków jest znacznie niższa i mieściła się w zakresie od 5,9 ppm do 17,2 ppm w zależności od stężenia ekstraktu, czyli po przeliczeniu od $0,59$ do $1,72 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ s.m}$.

Analizowane ekstrakty otrzymane z liści werbeny cytrynowej wykazały aktywność przeciwutleniającą na poziomie 29,8 do 48,7% niezredukowanego rodnika DPPH (Tabela 2). Najsilniejszymi właściwościami przeciwutleniającymi charakteryzował się ekstrakt metanolemowy, najslabszymi zaś ekstrakt wodny.

Tabela 2. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z liści werbeny cytrynowej wyrażona jako zdolność do wygaszania rodnika DPPH [%] $\pm$ SD w trakcie przechowywania

Table 2. Antioxidant properties of extracts from lemon verbena leaves as ability to quench DPPH radical [%] during storage

Czas przechowywania [miesiące] Storage time [months]	Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z liści werbeny cytrynowej wyrażona jako zdolność do wygaszania rodnika DPPH* [%] $\pm$ SD w trakcie przechowywania Antioxidant properties of extracts from lemon verbena leaves as ability to quench DPPH* radical [%] during storage			
	ekstrakt / extract			
	wodny aqueous	etanolemowy ethanol	metanolemowy methanol	acetonowy acetone
0	29,8 $\pm$ 0,20	46,4 $\pm$ 0,41	48,7 $\pm$ 0,70	31,1 $\pm$ 0,14
3	28,2 $\pm$ 0,19	45,8 $\pm$ 0,28	47,1 $\pm$ 0,12	31,0 $\pm$ 0,45
6	27,2 $\pm$ 0,22	44,1 $\pm$ 0,12	45,2 $\pm$ 0,17	29,9 $\pm$ 0,30
9	26,1 $\pm$ 0,14	43,2 $\pm$ 0,15	44,4 $\pm$ 0,37	28,4 $\pm$ 0,12
12	25,2 $\pm$ 0,15	42,1 $\pm$ 0,40	42,9 $\pm$ 0,11	26,1 $\pm$ 0,12

SD – odchylenie standardowe, SD – standard deviation

Siłę redukującą FRAP badanych ekstraktów wyznaczoną na podstawie ich zdolności do redukcji związku Fe^{+3} -TPTZ do Fe^{+2} -TPTZ przedstawiono w Tabeli 3. Im wyższą wartość FRAP posiada dany przeciwutleniacz, tym wyższa jest jego siła redukująca. Wartość FRAP dla analizowanych ekstraktów wynosiła od 18,9 do 30,9 $\text{mmol Fe}^{+2} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.m}$. Największą ak-

tywnością antyoksydacyjną oznaczoną metodą FRAP charakteryzował się ekstrakt metanolowy, najniższą zaś wodny. Podczas przechowywania ekstrakty niezależnie od rodzaju ekstrahenta oraz metody oznaczania (DPPH i FRAP), sukcesywnie traciły swoje właściwości przeciwutleniające.

Tabela 3. Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z liści werbeny cytrynowej FRAP [mM Fe⁺²·100 g⁻¹ s.m] w trakcie przechowywania

Table 3. Antioxidant properties of extracts from lemon verbena leaves as FRAP [mM Fe⁺²·100 g⁻¹ DM] during storage

Czas przechowywania [miesiące] Storage time [months]	Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z liści werbeny cytrynowej FRAP [mM Fe ⁺² ·100 g ⁻¹ s.m] ± SD Antioxidant properties of extracts from lemon verbena leaves as FRAP [mM Fe ⁺² ·100 g ⁻¹ DM] ± SD			
	ekstrakt / extract			
	wodny aqueous	etanolowy ethanol	metanolowy methanol	acetonowy acetone
0	18,9±0,2	29,5±0,50	31,0±0,25	19,8±0,20
3	17,9±0,2	29,1±0,10	29,9±0,10	19,7±0,20
6	17,3±0,3	28,0±0,04	28,7±0,20	19,0±0,45
9	16,6±0,1	27,4±0,43	28,2±0,20	18,1±0,06
12	16,0±0,2	26,8±0,27	27,3±0,20	16,6±0,60

SD – odchylenie standardowe, SD - standard deviation

Wnioski

Badania ekstraktów wodnych, etanolowych, metanolowych i acetonowych otrzymanych z wysuszonych liści werbeny cytrynowej (*Lippia citriodora* (Palau) Kunth) pozwalają na wysnucie następujących wniosków:

1. Każdy z ekstraktów charakteryzował się inną zawartością polifenoli ogółem.
2. Najsilniejsze działanie przeciwutleniające, oznaczone metodą DPPH i FRAP, wykazały ekstrakty metanolowe, zaś najsłabsze ekstrakty wodne.
3. Przechowywanie spowodowało sukcesywny spadek zawartości polifenoli oraz aktywności antyoksydacyjnych wszystkich badanych ekstraktów.

Literatura

- [1] Newerli-Guz J., M. Śmiechowska, J. Piotrkowska., Substancje aromatyzujące jako składnik herbatek ziołowo-owocowych, Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej w Gdyni, nr 61: Bezpieczeństwo Środków Spożywczych, Wydawnictwo Akademii Medycznej w Gdyni, 2009, s. 19–32.
- [2] Escobar P., Leal S., Herrera L., Martinez J., Stashenko E., Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia Spp* essential oils and their major components, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010, 105, s. 2.
- [3] Kiełtyka-Dadasiewicz A., Kubat-Sikorska A., Roślinne surowce kosmetyczne o zapachu cytrynowym, Rośliny w nowoczesnej kosmetologii. Monografia Naukowa, Lublin, 2016, s. 41–52.
- [4] El-Hawary S.S., Yousif M.F., Motaal A., Abd-Hameed L.M., Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt, *Bulletin of Faculty of Pharmacy*, 2011, 50, s.1–6
- [5] Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Science and Technology*, 1995, 1 (28), s. 25–30.
- [6] Bartoń H.J., Fołta M., Zachwieja Z., Zastosowanie metod FRAP, ABTS i DPPH w badaniu aktywności antyoksydacyjnej produktów spożywczych, *Nowiny Lekarskie*, 2005, 74(4), s. 510–513.
- [7] Vinha A.F., Barreira S.V.P, Castro A., Machado M., Comparison between the phytochemical and antioxidant properties of plants used in plant infusions for medicinal purposes, *Journal of Agricultural Science*, 2013, Vol. 5, No. 11, s. 11–19.
- [8] Choupani M., Arabshahi-Delouee S., Alami M., Antioxidant properties of various solvent extracts of lemon verbena (*Lippia Citriodora*) leaves. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2014, 2 (4), s. 1340–1346.
- [9] Shahi M.M.N., Rad A.H.E., Nia A.P., Shahi N.N., Study of antioxidant activity and free radical scavenging ability of lemon verbena (*Lippia Citriodora*), *Advances in Natural and Applied Sciences*, 2014, 8(10) s. 59–63.

Do cytowania:

Stryjecka M., Kiełtyka-Dadasiewicz A., Zmiany właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów z liści werbeny cytrynowej), *Herbalism*, 2017, 1(3), s. 119–124