



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Farmaceutyczny

Milena Połumackanycz

**Ocena ilościowa i jakościowa składników wybranych surowców
roślinnych i ich handlowych produktów**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Agnieszka Viapiana

Gdańsk 2023 r.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	3
STRESZCZENIE.....	5
WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	9
WYKAZ POZOSTAŁYCH PUBLIKACJI W DOROBKU NAUKOWYM.....	10
WYKAZ STRESZCZEŃ ZJAZDOWYCH	11
WSTĘP.....	12
CELE NAUKOWE	16
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	17
OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	22
Publikacja D.1.....	22
Publikacja D.2.....	26
Publikacja D.3.....	28
Publikacja D.4.....	33
Publikacja D.5.....	37
WNIOSKI	42
BIBLIOGRAFIA	44

WYKAZ SKRÓTÓW

AAS	absorpcyjna spektrometria atomowa	<i>atomic absorption spectrometry</i>
ABTS	2,2'-azynobis-(3- etylobenzotiazolino-6-sulfonian)	<i>2,2'-azinobis-(3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>
AChE	acetylocholinoesteraza	<i>acetylcholinesterase</i>
AES	emisyjna spektrometria atomowa	<i>atomic emission spectrometry</i>
ASA	kwask L(+)-askorbinowy	<i>ascorbic acid</i>
BChE	butyrylocholinoesteraza	<i>butyrylcholinesterase</i>
CA	kwask kawowy	<i>caffeic acid</i>
CAT	katechina	<i>catechin</i>
CGA	kwask chlorogenowy	<i>chlorogenic acid</i>
CNA	kwask cynamonowy	<i>cinnamic acid</i>
CUPRAC	metoda oznaczania zdolności do redukowania jonów miedzi (II)	<i>cupric reducing antioxidant capacity</i>
DPPH	2,2'-difenyl-1-pirylohydrazyl	<i>2,2'-diphenyl-1- picrylhydrazyl</i>
FA	kwask ferulowy	<i>ferulic acid</i>
FRAP	metoda oznaczania zdolności do redukowania jonów żelaza Fe (III)	<i>ferric reducing antioxidant power</i>
GA	kwask galusowy	<i>gallic acid</i>
GC	chromatografia gazowa	<i>gas chromatography</i>
HCA	hierarchiczna analiza skupień	<i>hierarchical cluster analysis</i>
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HPLC-UV/Vis	wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem UV/Vis	<i>high-performance liquid chromatography coupled with UV/Vis detector</i>

HPLC-DAD/ESI/MS	wysokosprawna chromatografia cieczowa z matrycą diodową i detektorem spektrometrii mas z jonizacją poprzez elektrozpraszanie	<i>high performance liquid chromatography equipped with photodiode array detection-mass</i>
MYR	mirycetyna	<i>myricetin</i>
NAR	naryngenina	<i>naringenin</i>
pCA	kwask p-kumarowy	<i>p-coumaric acid</i>
PCA	analiza głównych składowych	<i>principal component analysis</i>
pCAT	kwask protokatechinowy	<i>protocatechuic acid</i>
Q	kwercetyna	<i>quercetin</i>
RA	kwask rozmarynowy	<i>rosmarinic acid</i>
RNS	reaktywne formy azotu	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	reaktywne formy tlenu	<i>reactive oxygen species</i>
RUT	rutyna	<i>rutin</i>
SA	kwask syringowy	<i>siringic acid</i>
SNA	kwask synapinowy	<i>sinapic acid</i>
TFC	całkowita zawartość flawonoidów	<i>total flavonoid content</i>
TPAC	całkowita zawartość kwasów fenolowych	<i>total phenolic acid content</i>
TPC	całkowita zawartość polifenoli	<i>total phenolic content</i>
UPLC	ultrasprawna chromatografia cieczowa	<i>ultra-performance liquid chromatography</i>
VA	kwask wanilinowy	<i>vanillic acid</i>

STRESZCZENIE

Ziołolecznictwo jest obecne w życiu człowieka od zarania dziejów. Współczesna medycyna znajduje naukowe potwierdzenie uzasadniające działanie prozdrowotne surowców roślinnych. Coraz większa ilość przebadanych roślin oraz odkrywanie coraz to nowych potencjalnych zastosowań dodatkowo wzmacnia zainteresowanie preparatami roślinnymi. Wszystkie te czynniki powodują, że pacjenci coraz częściej sięgają po naturalne medykamenty w celu leczenia oraz wspomaganie terapii różnych jednostek chorobowych. Szczególnie dużym zainteresowaniem cieszą się preparaty o właściwościach antyoksydacyjnych.

Tematem niniejszej pracy doktorskiej była ocena ilościowa i jakościowa składników wybranych surowców roślinnych i ich handlowych produktów. Oceny dokonywano na podstawie składu chemicznego i właściwości biologicznych handlowych preparatów roślinnych bądź surowców pochodzących ze zbioru naturalnego. Wybór materiału roślinnego podyktowany był popularnością medykamentów wśród pacjentów. W cyklu pracy doktorskiej analizie poddano dziką różę (liście oraz owoce), liście morwy białej i czarnej, korzeń różenia górskiego, liście werbeny cytrynowej i lekarskiej oraz korzeń ashwagandhy. Analizowane surowce pochodziły ze zbioru naturalnego, bądź stanowiły preparaty dostępne na rynku (kapsułki, tabletki, herbaty, susz roślinny). Przeprowadzone badania skupiały się przede wszystkim na badaniu profilu fenolowego, aktywności antyoksydacyjnej, przeciwbakteryjnej i enzymatycznej, a także wartościach odżywczych.

Pierwsza publikacja w cyklu (D.1.) dotyczyła dzikiej róży. Otrzymane wyniki dostarczyły cennych informacji na temat tej rośliny. Udowodniono, iż jej preparaty oraz surowce ze zbioru naturalnego charakteryzują się bogatym składem polifenolowym, wysoką zawartością kwasu askorbinowego, a także wysoką aktywnością antyoksydacyjną. Interesującym odkryciem był fakt, iż to liście okazały się bogatsze w polifenole, wykazywały większą aktywność przeciwutleniającą oraz silniejsze działanie przeciwbakteryjne w porównaniu z owocami dzikiej róży. Jest to intrygujące, ponieważ na rynku można kupić jedynie owoce tego surowca.

W przypadku drugiej publikacji (D.2.) analizie zostały poddane liście morwy białej i czarnej. Przeprowadzone badania dowiodły, że także i w tym przypadku liście są cennym źródłem antyoksydantów. Wprawdzie większe ilości TFC i TPC odnotowano dla morwy czarnej, mimo to nie ulega wątpliwości, że napary z obu surowców są cennym źródłem bioaktywnych związków o właściwościach przeciwutleniających.

Trzecia publikacja w cyklu (D.3.) dotyczyła analizy handlowych preparatów różenia górskiego. Jest to bardzo popularny adaptogen szczególnie polecany na stany przemęczenia, stres i napady lęku. Prowadzone badania wykazały, że są to produkty roślinne o wysokiej zawartości związków fenolowych i aktywności antyoksydacyjnej, wykazujące aktywność hamującą w stosunku do AChE i BChE, co świadczy o tym, że złoty korzeń może być stosowany jako środek wspomagający w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

Werbena lekarska i cytrynowa, ze względu na swoje właściwości prozdrowotne, cieszą się dużą popularnością wśród pacjentów. Zwłaszcza ta druga jest bardzo popularna w krajach arabskich, gdzie pije się ją w formie naparu. Surowce te stanowiły analizowany materiał w czwartej publikacji (D.4.) w cyklu. Otrzymane wyniki wykazały, iż to właśnie werbena cytrynowa jest bogatszym źródłem polifenoli i charakteryzuje się wyższą aktywnością antyoksydacyjną w porównaniu z werbeną lekarską. Jednak mimo to, oba gatunki stanowią źródło związków o właściwościach antyutleniających i są polecane zwłaszcza w formie naparów.

Zyskanie popularności przez preparaty zawierające ashwagandhę, ze względu na jej właściwości antyoksydacyjne oraz pozytywny wpływ na układ nerwowy, znajduje potwierdzenie w naszych badaniach (publikacja D.5.). Dowiedziono, iż ekstrakty tego surowca nie tylko charakteryzują się wysoką aktywnością antyoksydacyjną i są bogate w polifenole, ale również wykazują działanie przeciwbakteryjne oraz aktywność hamującą w stosunku do AChE i BChE.

Podsumowując, każdy z analizowanych surowców roślinnych okazał się być bogatym źródłem polifenoli o wysokiej aktywności biologicznej. Zebrane wyniki pokazały także istniejące na różnym poziomie korelacje pomiędzy profilem fenolowym a właściwościami biologicznymi, zwłaszcza aktywnością przeciwutleniającą. Biorąc pod uwagę powyższe, badane preparaty mogą być z powodzeniem stosowane jako źródło antyoksydantów.

SUMMARY

Herbal medicine has been present in human life since the beginning of history. Contemporary medicine is finding scientific evidence to justify the health-promoting effects of plant raw materials. The increasing number of researched plants and the discovery of more and more new potential uses for them, further increases interest in plant preparations. All these factors contribute to the fact that patients are increasingly turning to natural remedies for the treatment and support of therapy of various diseases. Preparations with antioxidant properties are of particular interest.

The topic of our research was the quantitative and qualitative assessment of the constituents of selected plant raw materials and their commercial products. The assessment was based on the chemical composition and biological properties of commercial plant products or raw plant materials from natural harvest. The selection of plant material was based on their popularity among patients in the pharmacy. Wild rose (leaves and fruits), white and black mulberry leaves, golden root, lemon and common verbena leaves and ashwagandha roots were analyzed in our research. The analyzed raw plant materials were harvested in natural environment and/or were commercially available products in the form of capsules, tablets, teas or dried plants. The studies focused especially on the phenolic profile, antioxidant activity, as well as antimicrobial and enzymatic activity, and nutritional value.

The first publication in the series (D.1.) refers to fruits and leaves of rosehip. The results obtained in this work provided valuable information on this plant. It was proven that its preparations and raw material from the natural harvest are characterized by a rich polyphenolic composition, a high ascorbic acid content and high antioxidant activity. An interesting observation was that the leaves were found to be richer in polyphenols, demonstrated greater antioxidant activity and antimicrobial activity compared to fruits. This is intriguing because only fruits of rosehip are available on the market.

In the second publication (D.2.), leaves of white and black mulberry were analyzed. The results obtained in this work indicated that the leaves are a precious source of antioxidants. Although higher amounts of TFC and TPC in black mulberry, infusions of mulberry leaves are a valuable source of bioactive compounds with high antioxidant properties.

The third publication in the series (D.3.) focused on the analysis of commercial preparations of golden root. This is a very well-known adaptogen that is particularly recommended for the fatigue, stress and anxiety attacks. The results showed that these products are rich in phenolic compounds and have high antioxidant activity. In addition, the

analyzed golden root products showed inhibitory activity against AChE and BChE, indicating that this plant can be used in the treatment of neurodegenerative diseases.

Common and lemon verbena, due to their health-promoting properties, are very popular among patients. Especially the second one is very popular in Arab countries, where it is consumed in the form of infusion. These raw plant materials were the analyzed material in our fourth publication (D.4.). The results obtained in the research indicated that lemon verbena is richer in polyphenols and shows higher antioxidant activity compared to common verbena. However, both species are a source of compounds with antioxidant properties and are recommended especially in the form of infusions.

The growing popularity of ashwaganda preparations due to their antioxidant properties and positive effects on the nervous system is confirmed by our study (publication D.5.). It has been proven that its commercial samples not only characterized by high antioxidant activity and are rich in polyphenols, but also showed inhibitory activity against AChE, BChE and antimicrobial activity.

In conclusion, each of the analyzed plants proved to be a rich source of polyphenols with significant biological activity. The results obtained in our studies also showed correlations between the phenolic profile and biological properties, especially antioxidant activity. Considering the above, the studied plants can be successfully used as a source of antioxidants.

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Poniżej przedstawiono spis publikacji będących postawą rozprawy doktorskiej pt. „Ocena ilościowa i jakościowa składników wybranych surowców roślinnych i ich handlowych produktów”

D.1. Polumackanycz M, Kaszuba M, Konopacka A, Marzec-Wroblewska U, Wesolowski M, Waleron K, Bucinski A, Viapiana, A. Phenolic composition and biological properties of wild and commercial dog rose fruits and leaves. *Molecules* 2020, 25, 5272. (IF: 4.412; MEiN: 140)

D.2. Polumackanycz M, Wesolowski M, Viapiana A. *Morus alba* L. and *Morus nigra* L. leaves as a promising food source of phenolic compounds with antioxidant activity. *Plant Foods for Human Nutrition* 2021, 76, 458-465. (IF: 4.124; MEiN: 100)

D.3. Polumackanycz M, Konieczynski P, Orhan IE, Abaci N, Viapiana A. Chemical composition, antioxidant and anti-enzymatic activity of golden root (*Rhodiola rosea* L.) commercial samples. *Antioxidants* 2022, 11, 919. (IF: 7.675; MEiN: 100)

D.4. Polumackanycz M, Petropoulos SA, Añibarro-Ortega M, Pinela, Barros L, Plenis A, Viapiana A. Chemical composition and antioxidant properties of common and lemon verbena. *Antioxidants* 2022, 11, 2247. (IF: 7.675; MEiN: 100)

D.5. Polumackanycz M, Petropoulos SA, Śledziński T, Goyke E, Konopacka A, Plenis A, Viapiana A. *Withania somnifera* L.: phenolic compounds composition and biological activity of commercial samples and its aqueous and hydromethanolic extracts. *Antioxidants* 2023, 12, 550. (IF: 7.675; MEiN: 100)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor (IF) publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej wynosi 31.561, zaś punkty MNiSW - 540.

WYKAZ POZOSTAŁYCH PUBLIKACJI W DOROBKU NAUKOWYM

Publikacje w języku angielskim

1. **Polumackanycz M**, Sledzinski T, Goyke E, Wesolowski M, Viapiana, A. A comparative study on the phenolic composition and biological activities of *Morus alba* L. commercial samples. *Molecules* 2019, 24, 3082. (IF: 3.267; MEiN: 140)

Publikacje w języku polskim

1. **Polumackanycz M**, Forencewicz A, Wesolowski M, Viapiana A. Ashwagandha (*Withania somnifera* L.) – roślina o udokumentowanych właściwościach prozdrowotnych. *Farmacja Polska* 2020, 76, 442-447. (MEiN: 70)

2. **Polumackanycz M**, Wesolowski M, Viapiana A. Właściwości prozdrowotne melisy lekarskiej (*Melissa officinalis* L.). *Farmacja Polska* 2019, 75, 659-663. (MEiN: 70)

WYKAZ STRESZCZEŃ ZJAZDOWYCH

Związanych z tematem rozprawy doktorskiej

1. PREZENTACJA USTNA: Polumackanycz M*, Kaszuba M, Konopacka A, Marzec-Wróblewska U, Wesolowski M, Waleron K, Buciuński A, Viapiana A. Skład chemiczny i właściwości biologiczne owoców i liści dzikiej róży. XXVI KONFERENCJA NAUKOWA WYDZIAŁU FARMACEUTYCZNEGO 28 – 29 stycznia 2021 r., Gdańsk.

2. POSTER: Polumackanycz M, Konieczynski P, Orhan IE, Abaci N, Viapiana A*. Chemical composition, antioxidant and anti-enzymatic activity of golden root (*Rhodiola rosea* L.) commercial samples. XVII Congress of The Italian Society of Phytochemistry. 3rd International Congress on Edible, Medicinal and Aromatic Plants (ICEMAP 2022), 22-24 June 2022, Bari, Italy.

Związanych z pozostałymi tematami prowadzonych badań

1. PREZENTACJA USTNA: Polumackanycz M*, Sledzinski T, Goyke E, Wesolowski M, Viapiana A. A comparative study on the phenolic composition and biological activities of *Morus alba* L. commercial samples. CECE 2019: 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, 24-26th September 2019, Gdańsk, Poland.

*osoba prezentująca

WSTĘP

Podstawą dobrze zbilansowanej diety człowieka są produkty pochodzenia roślinnego. Jednak nie tylko owoce i warzywa dostarczają cennych składników odżywczych, ale również zioła. Ze względu na bogaty skład surowców roślinnych wykazują one szereg działań prozdrowotnych. Skutkuje to ich dużą popularnością nie tylko jako środków wspomagających leczenie, lecz także jako dodatków do produktów spożywczych. Już w starożytności wykorzystywano ich właściwości przedłużające trwałość produktów spożywczych. Współcześnie także stosuje się je jako dodatki do mięs (np. salami), nabiału (sery dojrzewające lub aromatyczne masła) czy jako składnik sosów i marynat. [1].

Badania naukowe dowodzą, że spożywanie surowców roślinnych zmniejsza ryzyko wystąpienia chorób, z którymi coraz częściej mierzy się nasza cywilizacja [2]. Jednym z głównych czynników, mających pozytywny wpływ na organizm człowieka są zawarte w roślinach związki o właściwościach przeciwutleniających. Ich działanie jest związane nie tylko ze zmniejszeniem stresu oksydacyjnego, ale także z korzystnym wpływem na mikrobiotę jelitową, której skład jest konieczny do zachowania homeostazy w organizmie [3].

Antyoksydanty, zarówno pochodzenia naturalnego jak i syntetycznego, są skuteczne w kontrolowaniu ilości wolnych rodników w organizmie oraz wspomaganiu mechanizmów przeciwutleniających organizmu [4,5]. Stanowią one szeroką grupę związków chemicznych. Wśród nich wyróżniamy te, które mają zdolność chelatowania metali lub neutralizowania ROS i RNS, posiadające zdolność zmiatania wolnych rodników, a także niektóre leki, analogi substancji występujących w roślinach, jak również dodatki do żywności o pochodzeniu syntetycznym [6]. Mają zdolność pozbywania się wolnych rodników, przez co wspomagają utrzymanie homeostazy w organizmie. Przeciwutleniacze mogą również pomóc w walce z wirusami, bakteriami, działać przeciwzapalnie oraz zapobiegać nowotworom [7]. Różnorodność zastosowań wynikających z ich właściwości antyoksydacyjnych znajduje potwierdzenie w wielu badaniach naukowych.

Jedną z grup związków pochodzenia naturalnego o właściwościach przeciwutleniających są związki fenolowe występujące w owocach, warzywach i surowcach roślinnych [8]. Do grupy tych związków należą m.in. flawonoidy. Występują w roślinach jako metabolity wtórne. Odgrywają one istotną rolę w odpowiedzi na biologiczne i niebiologiczne czynniki środowiskowe. Wpływają na wygląd i smak owoców, chronią przed bakteriami czy grzybami, stąd tak liczne występowanie tych związków w roślinach [9]. Flawonoidy mają korzystny wpływ także na organizm człowieka. Wykazują szereg działań, m.in. przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwcukrzycowe czy przeciwnowotworowe [10,11].

Związki te mogą być pomocne we wspomaganie leczenia, m.in. białaczki, sepsy, łuszczycy, astmy, czy też zapaleń reumatoidalnych [11]. Główną aktywnością biologiczną flawonoidów, będącą przedmiotem intensywnych badań, jest ich aktywność przeciwutleniająca. Dzięki niej możliwe jest zapobieganie uszkodzeniom powodowanym przez wolne rodniki, wychwytywanie reaktywnych form tlenu (ROS), czy hamowanie oksydaz (np. cyklooksygenazy, lipoksygenazy) [12].

Z uwagi na fakt, że część flawonoidów może być produkowana w odpowiedzi na infekcje bakteryjne posiadają one aktywność przeciwbakteryjną. Odbywa się to poprzez kilka mechanizmów - hamowanie syntezy otoczki komórkowej lub kwasów nukleinowych, indukcję rozerwania błony bakteryjnej bądź też uniemożliwienie wytwarzania ATP [13]. Przykładem takiego działania jest kwercetyna. Ze względu na swoją budowę jest bardzo aktywnym przeciwutleniaczem, a według Hanasaki [14] najaktywniejszym flawonoidem z całej ich grupy. Ponadto wykazuje dużą aktywność przeciwbakteryjną, przy czym efekt ten jest silniejszy dla bakterii gram dodatnich niż gram ujemnych. Działa bakteriostatycznie na takie szczepy bakterii, jak m.in. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica Typhimurium*, zaś bakteriobójczo na *Staphylococcus aureus* [15]. Odbayar i in. [16] dowiedli, iż kwercetyna zwiększa ekspresję transferazy glutationowej, przy czym siła efektu jest współmierna do zastosowanej dawki. Indukuje także szlak apoptozy komórek nowotworowych [17] oraz zwiększa uwalnianie białka p53, co skutkuje zatrzymaniem rozrostu komórek raka piersi [18]. Flawonoidy mogą działać kardioprotekcyjnie poprzez kontrolowanie stresu oksydacyjnego (zapobieganie utlenianiu lipoprotein o niskiej gęstości) oraz poprzez indukowanie rozszerzania naczyń krwionośnych i regulację procesów apoptotycznych w śródbłonku [19]. Wpływają także na metabolizm lipidów i zmniejszają agregację płytek krwi, zapobiegając w ten sposób chorobom sercowo-naczyniowym [20]. Ponadto badania wykazały, że kwercetyna, naryngenina i hesperetyna mają właściwości rozszerzające naczynia krwionośne, a naryngenina dodatkowo obniża ciśnienie krwi i rozluźnia mięśnie gładkie naczyń krwionośnych [19]. Z kolei rutyna działa korzystnie na układ sercowo-naczyniowy [21] oraz wspomaga walkę z kardiomiopatią cukrzycową. Jest to groźne powikłanie, które charakteryzuje się m.in. zmianami w strukturze oraz w funkcjonowaniu serca. Ważną rolę w jego rozwoju odgrywają: stan zapalny, zbyt wysoki poziom cukru we krwi oraz stres oksydacyjny. Saklani i in. [22] korzystając z modelu szczurzego dowiedli, że rutyna, ze względu na swoje właściwości, chroni przed zmianami zwyrodnieniowymi w sercu. Skutkuje to lepszymi wynikami w EKG oraz ogólnie lepszą kondycją grupy badanej w stosunku do pacjentów, którym nie była podawana. Wykazuje

także działanie przeciwnowotworowe. Lin i in. [23] dowiedli, że przyjmowanie rutyny w dawce 120 mg/kg masy ciała może wspomagać leczenie białaczki.

Flawonoidy wykazują także działanie przeciwwirusowe. Mogą blokować wiązanie i przenikanie wirusów do komórek, zakłócać ich replikację bądź translację, oraz zapobiegać jego wnikanii do komórki [24]. W badaniach *in vitro* wykazano, że apigenina jest aktywna wobec *Herpes Simplex* typu 1 i 2, wirusa zapalenia wątroby typu B i C oraz afrykańskiego wirusa pomoru świń, działając poprzez hamowanie syntezy białek wirusowych [25]. Jedną z częściej występujących chorób cywilizacyjnych jest cukrzyca, która powoduje szereg powikłań. Jednym z nich jest hiperalgezia, czyli zwiększone odczuwanie bólu spowodowane uszkodzeniem nerwów obwodowych. Wykazano, iż stosowanie kwercetyny w połączeniu z sodem może zmniejszać nadmierne odczuwanie bólu [26].

Flawonoidy mają pozytywny wpływ na układ nerwowy. AChE jest enzymem, którego aktywność jest kluczowa dla prawidłowego działania centralnego układu nerwowego. Badania *in vitro* wykazały, iż m.in. rutyna i kwercetyna hamują aktywność AChE oraz BChE [27].

Powyższe przykłady pokazują, że rośliny dostarczają mnóstwo związków biologicznie czynnych o szerokim spektrum działania. Obecny wśród pacjentów trend leczenia naturalnymi sposobami, coraz większa ilość przebadanych surowców oraz poszukiwanie nowych leków, w tym o pochodzeniu roślinnym, powoduje wzrost popularności ziołolecznictwa. Współczesna nauka potwierdza stosowanie wielu surowców w medycynie ludowej. Przykładem może być ostropest plamisty używany jako lek na zatrucia wątrobowe. Wiadomo, że charakteryzuje się on silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi, chroni wątrobę, wspomaga walkę z zatruciem alkoholem, lekami czy toksycznymi substancjami [28].

Dzika róża, werbena, lipa, czarny bez czy morwa – to surowce od dawna znane i stosowane w rejonie Europy Środkowej. Dawniej ludzie sami zbierali surowce, suszyli oraz wytwarzali z nich różnorakie przetwory – soki, kompoty czy nalewki, które później były stosowane jako lekarstwo, bądź po prostu jako pokarm. Obecnie, w większości przypadków, pacjent najpierw kieruje się do apteki czy do sklepu zielarskiego, żeby zdobyć interesujący go preparat lub zasięgnąć porady medycznej. Na miejscu czeka go ogromny wybór tabletek, kapsułek, syropów, nalewek czy herbatek sporządzonych z różnych ziół. W tej sytuacji ważna jest informacja o kontroli jakościowej tych medykamentów, oraz ich formie, która będzie najbardziej efektywna.

Zróżnicowanie pomiędzy składem chemicznym roślin nawet w obrębie jednego gatunku jest podyktowane kilkoma czynnikami. To, co ma wpływ na wzrost i rozwój rośliny będzie też oddziaływało na jej metabolizm, a co za tym idzie na związki, które będzie wytwarzać czy przyswajać. Dostępność słońca, wody, klimat, wilgotność, rodzaj gleby – każdy z wymienionych czynników będzie wpływał na to, w jaki sposób roślina spożytkuje energię oraz jak będzie się rozwijać [10,29]. Dlatego tak ważne są badania mające na celu ocenę jakości produktów roślinnych.

Pomimo rosnącej ilości przebadanych roślin leczniczych wskazanie związków odpowiedzialnych za ich bioaktywność, czy znajomość mechanizmów działania nadal wymagają dalszych badań. Dokładne dawki terapeutyczne oraz profilaktyczne, synergizm czy antagonizm występujące zarówno w obrębie rośliny, jak i pomiędzy związkami pochodzącymi od różnych gatunków roślin wymagają przebadania. W tym celu potrzebne są nie tylko badania *in vitro*, które dominują w tej dziedzinie, ale też *in vivo*.

CELE NAUKOWE

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena ilościowa i jakościowa składników aktywnych wybranych surowców roślinnych i ich handlowych produktów. Badania ukierunkowane były głównie na związki polifenolowe, takie jak flawonoidy i kwasy fenolowe. Ponadto oznaczano aktywność biologiczną wybranych surowców roślinnych, a zwłaszcza aktywność antyoksydacyjną, ściśle powiązaną z oznaczanymi związkami bioaktywnymi.

Szczegółowe cele badań:

- oznaczenie zawartości wybranych związków polifenolowych w surowcach roślinnych ze zbioru naturalnego oraz handlowych produktach roślinnych z wykorzystaniem uprzednio zoptymalizowanej i zwalidowanej techniki HPLC (publikacje D.1.-D.5.);
- ocena właściwości biologicznych surowców roślinnych pochodzących ze zbioru naturalnego i roślinnych produktów handlowych:
 - ✓ aktywności przeciwutleniającej (publikacje D.1.-D.5.)
 - ✓ aktywności przeciwbakteryjnej (publikacje D.1. i D.5.)
 - ✓ hamowania aktywności cholinoesterazy (publikacje D.3. i D.5.)

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. *Materiał do badań*

Analizowany materiał stanowiły surowce, które są szczególnie popularne wśród pacjentów aptek i sklepów zielarskich. Są to: dzika róża (próbki handlowe owoców oraz ze zbioru naturalnego liście i owoce), morwa biała i czarna (liście ze zbioru naturalnego), różeniec górski (próbki handlowe korzeni), werbena lekarska i cytrynowa (liście ze zbioru naturalnego) oraz ashwagandha (próbki handlowe korzeni i kłączy). Handlowe próbki analizowanych roślin występowały w formie tabletek, kapsułek, herbatek oraz suszu roślinnego.

Materiał roślinny do badań zmielono, a następnie przygotowano ekstrakty przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika. Wodno-metanolowe ekstrakty przygotowano ekstrahując próbki na łaźni ultradźwiękowej, nalewki (etanolowe ekstrakty) przygotowano zalewając materiał roślinny etanolem, natomiast wodne ekstrakty psporządzono zgodnie z opisem na opakowaniu producenta zalewając surowiec roślinny wrzącą wodą i zaparzając go pod przykryciem (napary), lub zalewając surowiec roślinny zimną wodą, a następnie całość gotując w ściśle określonym czasie (odwary). Rodzaj wykonanego ekstraktu, w zależności od analizowanego surowca roślinnego, został przedstawiony w Tabeli 1.

Tabela 1. Rodzaj wykonanych ekstraktów w zależności od surowca roślinnego.

Nr publikacji	Surowiec roślinny	Ekstrakty			
		wodno-metanolowe	nalewki	napary	odwary
D.1.	dzika róża	✓		✓	✓
D.2.	morwa biała i czarna	✓	✓	✓	✓
D.3.	różeniec górski	✓		✓	
D.4.	werbena lekarska i cytrynowa	✓		✓	✓
D.5.	ashwagandha	✓		✓	

2. *Metodyka*

a) analiza jakościowa i ilościowa

Analiza jakościowa i ilościowa została przeprowadzona przy użyciu metody HPLC-UV/Vis (publikacje D.2., D.3., D.4. i D.5.) oraz HPLC-DAD/ESI/MS (publikacja D.1.). W

przypadku zastosowania techniki HPLC-UV/Vis identyfikację oznaczanych związków fenolowych oparto na porównaniu czasu retencji do czasu retencji ich substancji standardowych. Ponadto do wybranej próbki ekstraktu dodawano odpowiednią ilość związku standardowego i próbkę poddawano jeszcze raz analizie.

Całkowitą zawartość związków fenolowych oznaczono metodą Folina-Ciocalteu [30], a otrzymane wyniki wyrażono w mg równoważnika kwasu galusowego na gram suchej masy próbki (mg GAE/g s.m.). Całkowitą zawartość flawonoidów oznaczono zgodnie z procedurą opisaną w Farmakopei Europejskiej [31], zaś wyniki wyrażono w μg bądź mg równoważnika kwercetyny na gram suchej masy próbki (μg bądź mg QE/g s.m.). Procedurę opisaną w Farmakopei Polskiej VI [32] zastosowano do oznaczania całkowitej zawartości kwasów fenolowych. W metodzie tej zastosowano odczynnik Arnov'a, natomiast wyniki wyrażono w μg bądź mg równoważnika kwasu kawowego na gram suchej masy próbki (μg bądź mg CAE/g s.m.). Do oznaczania ilościowego kwasu askorbinowego zastosowano zmodyfikowaną metodę Abdelmageeda [33], a wyniki wyrażono w mg kwasu askorbinowego na gram suchej masy próbki (mg ASA/g s.m.).

b) aktywność antyoksydacyjna

Analizę *in vitro* aktywności antyoksydacyjnej badanych surowców roślinnych i ich preparatów przeprowadzono z wykorzystaniem czterech metod, tj. ABTS, FRAP, DPPH i CUPRAC.

Test DPPH przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Tuberoso i in. [34], a wyniki wyrażono jako ekwiwalent troloksu w mg na gram suchej masy próbki (mg TE/g s.m.). W przypadku testu ABTS procedura była przeprowadzona według metody Arnao i in. [35] z niewielkimi modyfikacjami, natomiast wyniki wyrażono jako ekwiwalent troloksu w mg na gram suchej masy próbki (mg TE/g s.m.). Test FRAP przeprowadzono metodą zaproponowaną przez Benzie i Straina, a wyniki wyrażono w mmol bądź $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suchej masy próbki (mmol bądź $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ s.m.) [36], natomiast test CUPRAC przeprowadzono według metody Apaka i in. [37] z niewielką modyfikacją, zaś wyniki wyrażono w ilości równoważników kwasu askorbinowego w mg na gram suchej masy próbki (mg AA/g s.m.).

c) aktywność hamująca w stosunku do AChE i BChE

Aktywność enzymatyczną *in vitro* analizowanych preparatów w stosunku do AChE i BChE oznaczono stosując zmodyfikowaną metodę Ellmana [38] z wykorzystaniem płytek 96-dolkowych. Badania były możliwe do przeprowadzenia dzięki współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej GUMedu oraz Katedrą Farmakognozji Uniwersytetu Gazi w Ankarze.

d) analiza mikrobiologiczna

Analiza mikrobiologiczna *in vitro* była prowadzona zgodnie z wytycznymi i procedurami zawartymi w EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) oraz CLSI (Institute of Clinical and Laboratory Standards). W toku badań zostały użyte bakterie gram dodatnie (*S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* MRSA 18532, *S. aureus* MRSA 43300, *S. epidermidis* ATCC 14990, β -hemolizujący *Streptococcus*) oraz gram ujemne (*E.coli* ATCC 8739, *P. aeruginosae* ATCC 9027). Badania były możliwe do przeprowadzenia dzięki współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej GUMedu.

e) analiza biopierwiastków

Zawartość makro- i mikroelementów oszacowano za pomocą spektrometru absorpcyjno-emisyjnego. Mg i Fe były oznaczone za pomocą absorpcyjnej spektrometrii atomowej, natomiast K, Na i Ca oznaczono metodą emisyjnej spektrometrii atomowej. Odpowiednie analityczne długości fal dla pierwiastków wynosiły: 285,2 nm (Mg), 422,7 nm (Ca), 248,0 nm (Fe), 589,0 nm (Na) i 766,5 nm (K).

f) analiza wartości odżywczych

Właściwości odżywcze próbek werbeny pospolitej i cytrynowej przeprowadzono przy współpracy z Uniwersytetem Thessali w Grecji oraz Instituto Politécnico de Bragança w Portugalii. W ramach tych badań zawartość białka, tłuszczu, popiołu i błonnika pokarmowego oznaczono zgodnie z metodą Stowarzyszenia Oficjalnych Chemików Analitycznych (AOAC) [39].

3. Zestawienie przeprowadzonych badań

W Tabeli 2 przedstawiono metody i techniki, które zastosowano podczas przeprowadzania badań.

Tabela 2. Zestawienie przeprowadzonych badań.

Publikacja D.1.	<p>Analiza spektrofotometryczna:</p> <ul style="list-style-type: none">• związków fenolowych (TPC, TFC, TPAC) oraz kwasu askorbinowego• aktywności antyoksydacyjnej przy użyciu metod DPPH oraz FRAP <p>Analiza przy użyciu techniki HPLC-DAD/ESI/MS związków fenolowych – kwasów fenolowych (GA, CGA, CNA, VA, SA, pCA, pCAT, SNA, FA, RA) oraz flawonoidów Q, RUT – we współpracy z Katedrą Biofarmacji Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy</p> <p>Ocena aktywności przeciwbakteryjnej – we współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej GUMed</p>
Publikacja D.2.	<p>Analiza spektrofotometryczna:</p> <ul style="list-style-type: none">• związków fenolowych (TPC, TFC, TPAC) oraz kwasu askorbinowego• aktywności antyoksydacyjnej przy użyciu metod DPPH oraz FRAP <p>Analiza techniką HPLC-UV/Vis związków fenolowych – kwasów fenolowych (GA, CGA, RA, CA, pCA, FA, SNA) oraz flawonoidów (RUT, MYR, NAR)</p>
Publikacja D.3.	<p>Analiza spektrofotometryczna:</p> <ul style="list-style-type: none">• związków fenolowych (TPC, TFC, TPAC) oraz kwasu askorbinowego• aktywności antyoksydacyjnej przy użyciu metod DPPH, FRAP, ABTS i CUPRAC <p>Analiza techniką HPLC-UV/Vis związków fenolowych – kwasów fenolowych (GA, pCAT, CAT, VA, CNA, CA, pCA, FA, SNA) oraz flawonoidów (RUT, Q)</p> <p>Analiza zawartości pierwiastków metalicznych technikami ASA/AES - Mg, Ca, Fe, K i Na</p>

Pomiar aktywności hamującej w stosunku do AChE i BChE – we współpracy z Katedrą Farmakognozji Uniwersytetu Gazi w Ankarze (Turcja)

Publikacja

D.4.

Analiza spektrofotometryczna:

- związków fenolowych (TPC, TFC, TPAC) oraz kwasu askorbinowego
- aktywności antyoksydacyjnej przy użyciu metod DPPH, FRAP, ABTS i CUPRAC

Analiza techniką HPLC-UV/Vis związków fenolowych – kwasów fenolowych (GA, SA, pCA, FA, SNA, CNA, pCAT) i flawonoidów (RUT, Q)

Ocena wartości odżywczych – cukry, kwasy organiczne i kwasy tłuszczowe, tokoferole - we współpracy z Uniwersytetem Thessali w Grecji oraz Instituto Politécnico de Bragança w Portugalii

Publikacja

D.5.

Analiza spektrofotometryczna:

- związków fenolowych (TPC, TFC, TPAC) oraz kwasu askorbinowego
- aktywności antyoksydacyjnej przy użyciu metod DPPH, FRAP i ABTS

Analiza techniką HPLC-UV/Vis związków fenolowych – kwasów fenolowych (GA, CAT, VA, CA, FA, SNA, pCA) oraz flawonoidów (RUT, Q, NAR)

Pomiar aktywności hamującej w stosunku do AChE i BChE - we współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej GUMed

Ocena aktywności przeciwbakteryjnej – we współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej GUMed

OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

W skład publikacji, które są przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej wchodzi pięć publikacji naukowych opisujących wyniki badań uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Publikacja D.1.

Polumackanycz M, Kaszuba M, Konopacka A, Marzec-Wroblewska U, Wesolowski M, Waleron K, Bucinski A, Viapiana A. Phenolic composition and biological properties of wild and commercial dog rose fruits and leaves. *Molecules* 2020, 25, 5272.

Wprowadzenie i cel pracy

Dzika róża (*Rosa canina* L.) jest rośliną popularnie występującą w Polsce. Jej owoce mogą być wykorzystywane w leczeniu przeziębień, infekcji, stanów zapalnych czy problemów żołądkowo-jelitowych [40]. Mają również działanie przeciwcukrzycowe, przeciwbólowe, przeciwwrzodowe, antyproliferacyjne oraz przeciwdziałają otyłości [41–43]. Owoce są szeroko stosowane w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym jako źródło witaminy C oraz składnik tabletek, suplementów diety, preparatów oraz herbatek ziołowych. Spożywanie ich w postaci tradycyjnych herbatek, marmolad, galaretek, dżemów, zup, suplementów diety, nektarów czy wina jest powszechne w wielu krajach europejskich [41,44]. Herbaty z owoców dzikiej róży mają łagodne działanie przeczyszczające i moczopędne oraz pomagają regulować cykl menstruacyjny, natomiast płatki dzikiej róży działają kojąco na skórę oraz mogą pomóc w leczeniu wysypek i otarć. Z kolei liście dzikiej róży mają właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne. Stąd w medycynie tureckiej stosuje się je w leczeniu przeziębień, grypy, śwιάdu, egzemy i kaszlu [45]. Najczęściej stosuje się je w postaci naparów. Badania naukowe dotyczące liści dzikiej róży są niewystarczające. Dostarczają niewiele danych na temat ich składu fenolowego i aktywności biologicznej. Mając na uwadze powyższe, celem pracy było porównanie składu fenolowego i właściwości biologicznych ekstraktów wodnych i wodno-metanolowych sporządzonych z handlowych próbek owoców oraz owoców i liści dzikiej róży pochodzących ze zbioru naturalnego.

Analizowany materiał roślinny

Analizie poddano dwadzieścia próbek dzikiej róży (*Rosa canina* L.), w tym sześć próbek owoców zakupiono w aptekach i lokalnych supermarketach, natomiast dziewięć próbek owoców i pięć próbek liści zebrano w okresie październik-listopad 2018 r. w północnej części Polski. Większość handlowych próbek dzikiej róży miała postać herbatek w torebkach, a tylko jedna z nich była w formie sypkiej. Ponadto dwie próbki handlowe owoców zawierały również inny surowiec roślinny.

Metodyka

Zmielone próbki zostały poddane ekstrakcji. Wodno-metanolowe ekstrakty dzikiej róży otrzymano przy użyciu łaźni ultradźwiękowej, natomiast ekstrakty wodne (napary) przygotowano, podobnie jak herbatki ziołowe, poprzez zalanie materiału roślinnego wrzącą wodą i jego zaparzanie w określonym czasie. Do analizy jakościowej i ilościowej związków fenolowych zastosowano technikę LC-DAD/ESI/MS. Badania te przeprowadzono we współpracy z Katedrą Biofarmacji Collegium Biomedicum w Bydgoszczy. W toku tej analizy oznaczono dwanaście związków fenolowych, w tym dziesięć kwasów fenolowych (GA, CGA, CNA, VA, SA, pCA, pCAT, SNA, FA i RA) oraz dwa flawonoidy (Q i RUT). Ponadto oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych, flawonoiów i kwasów fenolowych, oraz zawartość kwasu L(+)-askorbinowego przy pomocy techniki spektrofotometrycznej. Technika ta została także użyta do pomiaru aktywności antyoksydacyjnej metodami DPPH i FRAP. Dodatkowo, we współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Wydziału Farmaceutycznego GUMed, zbadano aktywność przeciwbakteryjną ekstraktów dzikiej róży. Badania przeprowadzono zgodnie z procedurami i wytycznymi EUCAST (Europejskiego Komitetu ds. Testowania Wrażliwości Mikroorganizmów) oraz CLSI (Instytut Standardów Laboratoryjnych i Klinicznych). Działanie przeciwbakteryjne badano przy użyciu szczepów bakterii gram dodatnich, takich jak: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* MRSA 18532, *Staphylococcus aureus* MRSA 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATCC14990, grupa A β -hemolityczny Streptococcus, oraz gram ujemnych: *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Pseudomonas aeruginosae* ATCC 9027. Wstępne badanie przeprowadzono za pomocą testu dyfuzyjnego w studni agarowej. Zastosowano tu następujące szczepy bakterii: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Pseudomonas aeruginosae* ATCC 9027. Następnie dla ekstraktów wykazujących strefę zahamowania wzrostu w studni agarowej określono wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) i minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC).

Do analizy danych statystycznych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test Duncana. Obliczono współczynniki korelacji Pearsona między poszczególnymi składnikami fenolowymi, TPC, TFC, TPAC i ASA, a aktywnością przeciwutleniającą. Obliczenia przeprowadzono przy 95% poziomie ufności. Analiza głównych składników (PCA) i hierarchiczna analiza skupień (HCA) zostały przeprowadzone w celu klasyfikacji próbek dzikiej róży.

Wyniki

Za pomocą techniki LC-DAD/ESI/MS zidentyfikowano i oznaczono ilościowo dwanaście związków fenolowych. Różnice w zawartości tych związków w naparach i wodno-metanolowych ekstraktach dzikiej róży były statystycznie istotne. Napary z owoców charakteryzowały się najwyższą zawartością CNA i Q, zaś w naparach z liści dzikiej róży dominowały CGA i CNA. Szczególnie wysoką zawartością CNA, RUT i Q odznaczały się napary wykonane z próbek handlowych, które zawierały jako dodatek hibiskus. Jednakże w przypadku tych dwóch próbek połączenie owoców dzikiej róży i hibiskusa nie zwiększyło istotnie aktywności antyoksydacyjnej naparów. Może to być spowodowane małą ilością hibiskusa lub jego złą jakością. W przypadku wodno-metanolowych ekstraktów, owoce dzikiej róży były bogatsze w RUT, zaś liście charakteryzowały się wysoką zawartością GA i CNA. Poza tym zawartość kwasów fenolowych, takich jak: pCA, SNA, FA i RA, znajdowała się poniżej granicy oznaczalności. Porównanie wyników uzyskanych podczas analizy TPC, TPAC oraz TFC, dowiodło, iż napary charakteryzowały się większą zawartością kwasów fenolowych i flawonoidów w porównaniu z wodno-metanolowymi ekstraktami, natomiast biorąc pod uwagę część morfologiczną rośliny, to liście okazały się być znacznie bogatsze w związki fenolowe niż owoce. Ponadto nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic w zawartości kwasu L(+)-askorbinowego w obu typach ekstraktów. Porównując próbki dzikiej róży pod kątem pochodzenia surowca, tzn. owoców ze zbioru naturalnego i tych handlowych, nie zauważono istotnych różnic w ich składzie fenolowym.

Podobnie jak w przypadku związków fenolowych, wyższą aktywnością antyoksydacyjną charakteryzowały się napary dzikiej róży. Ekstrakty sporządzone z jej liści wykazywały najwyższą aktywność przeciwutleniającą, natomiast wartości DPPH i FRAP dla handlowych próbek owoców i tych ze zbioru naturalnego były na tym samym poziomie.

Badania mikrobiologiczne wykazały, że analizowane próbki różniły się w znaczący sposób pod względem aktywności przeciwbakteryjnej. Część z nich w ogóle nie posiadała aktywności, zaś te które ją wykazywały wzięto do dalszych badań. Na podstawie uzyskanych

wyników stwierdzono, że najlepszą aktywnością przeciwbakteryjną charakteryzują się napary z liści dzikiej róży w stosunku do szczepu *S. aureus* ze strefą zahamowania wzrostu w zakresie 11-22 mm. Ponadto napary te wykazywały lepszą aktywność wobec szczepów bakterii gram dodatnich, natomiast ich działanie na szczepy bakterii gram ujemnych było istotnie słabsze niż oczekiwano na podstawie testu dyfuzyjnego. Nawet próbki, dla których uzyskano strefy zahamowania wzrostu o średnicy 20–22 mm, miały istotnie niższe wartości MIC w porównaniu z analogicznymi badaniami na szczepach bakterii gram dodatnich. W przypadku ekstraktów wodno-metanolowych najniższe wartości MIC uzyskano dla szczepów bakterii gram dodatnich, zwłaszcza dla szczepu *S. aureus*. Największą aktywnością wobec bakterii gram ujemnych charakteryzowały się ekstrakty wodno-metanolowe (MIC w zakresie od 32 do 128).

Analiza korelacji wykazała wysokie dodatnie zależności między zawartością związków fenolowych, a aktywnością przeciwutleniającą w naparach dla następujących par: TPC-FRAP (0,86), TPAC-FRAP (0,79), ASA-DPPH (0,75) i TFC-DPPH (0,68). Nie stwierdzono istotnej korelacji między TPC, TFC, TPAC i ASA, a aktywnością przeciwutleniającą ekstraktów wodno-metanolowych. Można to wytłumaczyć obecnością innych składników bioaktywnych o różnej budowie chemicznej niż związki fenolowe, oraz interakcjami zachodzącymi między tymi związkami [46]. W przypadku naparów stwierdzono silne korelacje ($r > 0.7$) między VA-DPPH, pCAT-DPPH, GA-DPPH i GA-FRAP, podczas gdy w ekstraktach wodno-metanolowych wykryto siedem dodatnich korelacji, oraz jedną ujemną korelację między pCAT a DPPH. Wartości DPPH i FRAP również były skorelowane, uzyskano umiarkowane dodatnie korelacje zarówno dla naparów, jak i ekstraktów wodno-metanolowych.

W niniejszej pracy PCA zastosowano do interpretacji danych otrzymanych z badań nad zawartością związków fenolowych oraz właściwościami przeciwutleniającymi w wodno-metanolowych i wodnych ekstraktach dzikiej róży. Na wartość pierwszej głównej składowej (PC1), opisującej 42,46% całkowitej wariancji, największy wpływ wywierały CNA, SYR, pCAT, RA, Q, RUT i TFC, zaś na wartość drugiej głównej składowej (PC2), opisującej 11,50% całkowitej i wariancji - FRAP, TPC i TPAC.

Wnioski

Analiza profilu fenolowego i aktywności biologicznej naparów i ekstraktów wodno-metanolowych sporządzonych z owoców handlowych oraz owoców i liści pochodzących ze zbioru naturalnego dzikiej róży wykazały, że napary są bogatsze w skład fenolowy i mają

wyższy potencjał antyoksydacyjny niż ekstrakty wodno-metanolowe. Spośród oznaczonych związków fenolowych Q i RUT oznaczono w większych ilościach w naparach, natomiast GA, CGA i CNA w ekstraktach wodno-metanolowych. Badania pokazują także, iż nie tylko owoce, ale także liście zasługują na uwagę. To właśnie ekstrakty sporządzone z liści dzikiej róży charakteryzowały się większą zawartością związków fenolowych i aktywnością biologiczną, natomiast w grupie owoców: tych ze zbioru naturalnego oraz handlowych nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy nimi. Na podstawie analizy korelacji stwierdzono silną zależność pomiędzy związkami fenolowymi a aktywnością przeciwutleniającą, natomiast analiza PCA i HCA wykazały znaczące różnice w profilu chemicznym i aktywności biologicznej między ekstraktami przygotowanymi z liści i owoców dzikiej róży. Uzyskane dane wskazują, że liście i owoce dzikiej róży zawierają znaczne ilości związków fenolowych, które korzystnie wpływają na zdrowie człowieka. Ponadto dane uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają, że nie tylko owoce dzikiej róży, ale także jej liście powinny być wykorzystywane jako potencjalne źródło antyoksydantów, a w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym jako bogate źródło związków bioaktywnych.

Publikacja D.2.

Polumackanycz M, Wesolowski M, Viapiana A. *Morus alba* L. and *Morus nigra* L. leaves as a promising food source of phenolic compounds with antioxidant activity. *Plant Foods for Human Nutrition* 2021, 76, 458-465.

Wprowadzenie i cel pracy

Morwa jest szeroko uprawiana w Turcji, Europie Południowej, Azji Środkowej i Południowo-Zachodniej [47]. Zdecydowanie najbardziej popularne są jej owoce, ale nie tylko, gdyż także liście są często spożywane pod różną postacią. I tak, w Korei Południowej liście morwy są jednym ze składników lodów, w Indiach są pożywnym, nietoksycznym i niedrogim składnikiem pożywienia do paratha, tradycyjnego posiłku na śniadanie i kolację w indyjskiej diecie [48], natomiast w Japonii pacjenci z cukrzycą spożywają liście morwy jako suplement przeciwhiperlikemiczny [49]. Ponadto wykazano, że liście morwy skutecznie przeciwdziałają nadciśnieniu oraz zapobiegają infekcjom gardła i stanom zapalnym o różnej etiologii.

W ciągu ostatnich dziesięcioleci znacznie wzrosło spożycie herbaty z morwy. Pacjenci włączają ją do swojej diety głównie ze względu na działanie hipoglikemiczne, przeciwdepresyjne, przeciwutleniające i hepatoprotekcyjne [50]. Obecnie liście morwy są opisywane jako surowiec o wysokiej zawartości białka, węglowodanów, witamin, mikroelementów i błonnika pokarmowego. Poza tym, niektóre doniesienia naukowe wskazują, że są bogate we flawonoidy, alkaloidy i kwas γ -aminomasłowy (GABA) [51]. Te bioaktywne związki wykazują właściwości przeciwko wirusowi HIV, przeciwutleniające, hipotensyjne, cytotoksyczne [52], hipoglikemiczne, hepatoprotekcyjne [53,54], neuroprotekcyjne [55] oraz przeciwzapalne [56]. Co więcej, znalazły również zastosowanie w kuracjach przeciwbakteryjnych [50,57] i jako środek przeciw otyłości [58]. Niestety pomimo tytułu właściwości prozdrowotnych liści morwy niewiele jest doniesień na temat ich składu chemicznego i aktywności antyoksydacyjnej, dlatego też w niniejszej pracy scharakteryzowano i porównano liście dwóch gatunków morwy (*Morus alba* L. i *Morus nigra* L.) pod kątem ich składu fenolowego i aktywności przeciwutleniającej, mając na celu waloryzację ekstraktów z liści morwy, które można włączyć do diety.

Analizowany materiał roślinny

Analizie poddano próbki liści morwy białej (*Morus alba* L.) i czarnej (*Morus nigra* L.), zebrane w sierpniu 2018 r. w Bari, we Włoszech. Zebrany materiał roślinny został uwierzytelniony przez Profesor Pinarosę Avato z Dipartimento di Farmacia-Scienze del Farmaco, Universita degli Studi di Bari (Włochy).

Metodyka

Po wysuszeniu i zmieleniu zebranych liści morwy poddano je ekstrakcji. Sporządzono wodne (napary i odwary) i alkoholowe (wodno-metanolowe i nalewki) ekstrakty, w których następnie, za pomocą techniki HPLC UV/Vis, oznaczono jedenaście związków fenolowych: siedem kwasów fenolowych (GA, CGA, RA, CA, pCA, FA, SNA) i trzy flawonoidy (RUT, MYR, NAR). Ponadto wykorzystując metodę spektrofotometryczną oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych, flawonoidów i kwasów fenolowych, oraz zawartość kwasu L(+)-askorbinowego, a także aktywność antyutleniającą metodami DPPH i FRAP.

Otrzymane wyniki analizowano za pomocą testu jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testu Tukeya. Zbadano również zależność pomiędzy związkami fenolowymi ekstraktów z morwy, a ich aktywnością przeciwutleniającą za pomocą analizy korelacji Pearsona.

Wyniki

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono istotne różnice między zawartością związków fenolowych w ekstraktach z morwy białej i czarnej. Większe ilości kwasów fenolowych i flawonoidów oznaczono w ekstraktach sporządzonych z morwy białej niż tych z morwy czarnej. Ponadto ekstrakty wodne obu gatunków morwy były bogatsze w związki fenolowe w porównaniu z ekstraktami alkoholowymi. GA był związkiem występującym w najwyższym stężeniu we wszystkich ekstraktach. RA i RUT stwierdzono w wyższych stężeniach w ekstraktach z morwy białej, podczas gdy CA dominował w ekstraktach z morwy czarnej. pCA oznaczono w najmniejszych ilościach w większości ekstraktów z morwy, natomiast CGA nie wykryto w odwarach i ekstraktach wodno-metanolowych sporządzonych z liści morwy białej.

W przypadku analizy TPC, TFC, TPAC i ASA w liściach morwy białej i czarnej wykazano, że ekstrakty sporządzone z morwy czarnej były bogatsze w TFC i TPAC w porównaniu z ekstraktami z morwy białej, natomiast wartość TPAC w ekstraktach wodno-alkoholowych z morwy czarnej była kilkakrotnie wyższa niż w ekstraktach z morwy białej. Ponadto ekstrakty wodne sporządzone z morwy białej i czarnej były bogatsze w związki fenolowe niż nalewki i ekstrakty wodno-metanolowe tych surowców roślinnych. W przypadku zawartości ASA nie stwierdzono istotnych różnic ($p < 0,05$) między liśćmi morwy białej i czarnej, z wyłączeniem ich odwarów. Zgodnie z najlepszą wiedzą autorów, jest to pierwsze doniesienie dotyczące zawartości TPAC i ASA w wodnych i wodno-alkoholowych ekstraktach morwy czarnej.

Biorąc pod uwagę aktywność antyoksydacyjną próbki morwy białej charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwutleniającą w porównaniu z próbkami morwy czarnej. Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic ($p < 0,05$) między aktywnością przeciwutleniającą ekstraktów alkoholowych z morwy białej i czarnej.

Współczynniki korelacji między poziomami poszczególnych związków fenolowych w badanych ekstraktach z morwy wykazały, że ich wartości są istotne statystycznie ($p < 0,05$) dla odpowiednio 14 i 11 par składników w ekstraktach z morwy białej i czarnej. Najwyższe współczynniki korelacji stwierdzono dla par GA-pCA, CA-RUT, SA-CGA, CGA-RUT w ekstraktach z morwy białej, oraz dla par GA-FA, GA-MYR i MYR-NAR w ekstraktach z morwy czarnej. Poza tym w ekstraktach z morwy białej zawartość FA i RA była silnie skorelowana z TPAC ($r > 0,92$). W ekstraktach z morwy czarnej GA, FA, MYR i NAR były skorelowane z TPC i TFC oraz RA z ASA. Ponadto we wszystkich analizowanych ekstraktach z morwy stwierdzono silną korelację pomiędzy TPC i TFC.

Wnioski

Morwa biała i czarna to rośliny opisywane jako żywność o wielu właściwościach prozdrowotnych. Ich bioaktywność jest głównie związana z owocami, podczas gdy badania odnośnie liści są ograniczone. Dlatego też w niniejszej pracy scharakteryzowano i porównano liście dwóch gatunków morwy (*Morus alba* L. i *Morus nigra* L.) pod kątem składu fenolowego i aktywności przeciwutleniającej. Uzyskane wyniki wykazały, że liście morwy czarnej były bogatsze w TFC i TPAC, podczas gdy ekstrakty wodne z liści morwy białej zawierały wyższe stężenie większości analizowanych związków fenolowych. Pomiar wykazały, że ekstrakty wodne otrzymane z liści obu gatunków morwy były bogatsze w składniki fenolowe i charakteryzowały się wyższą zawartością TPC, TFC, TPAC oraz ASA, niż ich ekstrakty alkoholowe. Wśród poszczególnych składników fenolowych, GA występował w najwyższych stężeniach we wszystkich ekstraktach z liści, podczas gdy CGA nie wykryto w ekstraktach alkoholowych z morwy białej. Ponadto analiza korelacji wykazała istotne zależności pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną a TPC i TFC w ekstraktach z morwy białej i czarnej. Fakt ten sugeruje kluczową rolę związków fenolowych jako przeciwutleniaczy w liściach morwy białej i czarnej. Dane uzyskane w niniejszej pracy wykazały, iż spożywanie liści morwy w postaci herbatek lub innych napojów może mieć korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Ponadto, ze względu na swój szczególny skład fenolowy można je uznać za obiecujące źródło związków fitochemicznych o udowodnionym działaniu biologicznym. Liście mogą być również wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym jako źródło nowych i bezpieczniejszych związków bioaktywnych.

Publikacja D.3.

Polumackanycz M, Konieczynski P, Orhan IE, Abaci N, Viapiana A. Chemical composition, antioxidant and anti-enzymatic activity of golden root (*Rhodiola rosea* L.) commercial samples. *Antioxidants* 2022, *11*, 919.

Wprowadzenie i cel pracy

Rodzaj *Rhodiola* L. (Crassulaceae) obejmuje blisko 200 gatunków, z których około 20 stosuje się w tradycyjnej medycynie azjatyckiej [59,60]. Jednym z nich jest *Rhodiola rosea* L., znany jako różeniec górski, złoty korzeń lub korzeń arktyczny. Kłęczą tej rośliny od wieków stanowią ważny surowiec w medycynie ludowej Skandynawii, Rosji, Mongolii i

Chin jako suplement stymulujący układ nerwowy, poprawiający wydolność fizyczną i umysłową, łagodzący uczucie zmęczenia, stres psychiczny, depresję, impotencję i zapobiegający chorobie wysokościowej [61,62]. Poza tym kłącza i korzenie złotego korzenia wykazują właściwości antystresowe, kardioprotekcyjne, hepatoprotekcyjne, immunomodulujące, przeciwnowotworowe, stymulują ośrodkowy układ nerwowy, a także zwiększają funkcje poznawcze [61–64]. Wiele produktów handlowych, takich jak dodatki do żywności, preparaty farmaceutyczne, suplementy diety i napoje sprzedawane na całym świecie zawiera wyciągi tego surowca [65,66]. Pomimo właściwości prozdrowotnych i szerokiego zastosowania różenca górskiego niewiele jest publikacji naukowych dotyczących jego składników bioaktywnych oraz aktywności biologicznej. Dlatego celem niniejszej pracy było porównanie składu chemicznego i aktywności biologicznej wodno-metanolowych i wodnych ekstraktów przygotowanych z handlowych produktów różenca górskiego. W ramach badań zastosowano technikę HPLC-UV/Vis, dzięki której oznaczono ilościowo związki fenolowe, oraz techniki AAS/AES za pomocą których oznaczono makro- i mikroelementy. Poza tym oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych, flawonoidów i kwasów fenolowych, oraz zawartość kwasu L(+)-askorbinowego. W celu oceny aktywności antyoksydacyjnej zastosowano cztery metody, tj. DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC. Dla ekstraktów etanolowych określono także aktywność hamującą w stosunku do AChE i BChE.

Analizowany materiał roślinny

Materiał do badań stanowiło piętnaście handlowych produktów *R. rosea* zakupionych w lokalnych supermarketach i aptekach na terenie Gdańska. Większość próbek była w formie sproszkowanego lub pokrojonego surowca, dwie próbki miały postać tabletek, a jedna - kapsułki.

Metodyka

W celu oznaczenia profilu fenolowego próbek handlowych różenca górskiego zastosowano metodę HPLC-UV/Vis. Technikę tę zwalidowano i następnie oznaczono dziesięć związków fenolowych. GA, pCAT, CAT, VA i CNA oznaczano przy długości fali 280 nm, dla CA, pCA, FA i SNA zastosowano długość fali 320 nm, natomiast dla RUT i Q $\lambda = 370$ nm. Identyfikację oznaczanych związków fenolowych oparto na porównaniu czasu retencji do czasu retencji ich substancji standardowych. Ponadto do wybranej próbki ekstraktu dodawano odpowiednią ilość związku standardowego i próbkę poddawano jeszcze raz analizie. Oznaczono także całkowitą zawartość związków fenolowych, flawonoidów i kwasów

fenolowych, oraz zawartość kwasu L(+)-askorbinowego. W celu oceny aktywności antyoksydacyjnej zastosowano cztery metody, tj. DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC. Dla ekstraktów etanolowych określono także aktywność hamującą w stosunku do AChE i BChE stosując metodę Ellmana. Zawartość makro- i mikroelementów była możliwa dzięki zastosowaniu technik AAS/AES. Do analizy otrzymanych w pracy wyników zastosowano metodę jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA) i test Duncana, natomiast do badania zależności pomiędzy składem chemicznym, a aktywnością biologiczną wykorzystano analizę korelacji Pearsona.

Wyniki

Do oznaczania związków fenolowych w próbkach handlowych *R. rosea* opracowano prostą i niezawodną procedurę HPLC. Wodno-metanolowe ekstrakty charakteryzowały się największą zawartością GA i pCA, zaś pozostałe związki fenolowe oznaczono w znacznie mniejszych ilościach. Co więcej, spośród piętnastu analizowanych produktów handlowych różenia górskiego VA oznaczono tylko w jedenastu próbkach, CA w dziewięciu próbkach, RUT w czternastu próbkach, CNA w dziesięciu próbkach, a Q w dwunastu próbkach. VA i CAT znajdowały się na najniższym stężeniu, odpowiednio 64,20 i 18,25 $\mu\text{g/g}$ s.m. W przypadku wodnych ekstraktów nie wszystkie analizowane związki fenolowe oznaczono. I tak, SNA i pCA okazały się być w najwyższych stężeniach i oznaczono je w trzynastu próbkach. Także pCAT oznaczono w trzynastu próbkach, jednak na niskim poziomie, 12,81 $\mu\text{g/g}$ s.m. GA i CAT wykryto w jedenastu próbkach, RUT w ośmiu próbkach, FA w siedmiu próbkach, VA i CA w pięciu próbkach, CNA tylko w dwóch próbkach i Q tylko w jednej próbce *R. rosea*. Różnice w zawartości tych związków można przypisać warunkom klimatycznym i czasie zbiorów, a także procedurze ekstrakcji, co może prowadzić do utraty związków bioaktywnych w roślinach [67,68].

W przypadku zawartości TPC, TFC i ASA była ona istotnie statystycznie wyższa ($p < 0,05$) w ekstraktach wodno-metanolowych niż w ekstraktach wodnych złotego korzenia, podczas gdy w obu ekstraktach stwierdzono ilości TPAC na tym samym poziomie. Co więcej, ekstrakty sporządzone z próbki handlowej niewiadomego pochodzenia charakteryzują się najniższą zawartością TPC, TFC, TPAC i ASA, podczas gdy próbka pochodząca z Rosji była najbogatsza w analizowane związki, zwłaszcza w ASA.

W niniejsze pracy po raz pierwszy oznaczono mikro-i makroelementy w próbkach różenia górskiego. Na podstawie analizy pierwiastków wykazano, że ekstrakty wodne były bogatsze w Mg, Ca, Fe i K niż ekstrakty wodno-metanolowe. Biorąc pod uwagę te ostatnie,

pierwiastkiem o najwyższym stężeniu był Na (3,5 mg/g s.m.), następnie K (0,74 mg/g s.m.), Ca (158,83 µg/g s.m.), Mg (148,43 µg/g suchej masy) i Fe (0,12 µg/g suchej masy), przy czym Fe oznaczono tylko w pięciu próbkach.

W przypadku aktywności antyoksydacyjnej, wyższe wartości ABTS, FRAP i CUPRAC uzyskano dla ekstraktów wodno-metanowych niż dla ekstraktów wodnych. Może to być związane z wyższymi poziomami związków fenolowych w ekstraktach wodno-metanowych. Ponadto związki o silniejszym działaniu przeciwutleniającym w próbkach *R. rosea* wydają się być rozpuszczalne w alkoholu. Wartości DPPH dla obu ekstraktów były na tym samym poziomie.

Na podstawie badań dotyczących hamowania aktywności cholinesterazy przez ekstrakty złotego korzenia wykazano, iż wszystkie one wykazywały aktywność, jednakże w różnym stopniu. Można było przypuszczać, że aktywność ta była związana z obecnością związków fenolowych w surowcu. Z literatury wiadomo, że np. Q hamuje aktywność AChE i BChE w wielu surowcach roślinnych [69]. Analiza korelacji przeprowadzona w tym badaniu również potwierdziła zależność pomiędzy BChE a Q, oraz BChE a RUT i BChE a CNA.

Analiza korelacji wykazała 26 istotnych statystycznie zależności ($p < 0,05$) dla ekstraktów wodno-metanowych, a najwyższe korelacje uzyskano dla par FRAP-ABTS (0,74) oraz TFC-Q (0,75). Dla wodnych ekstraktów wykryto 14 istotnych statystycznie zależności, natomiast najwyższą korelację (0,81) uzyskano dla pary TPC-TPAC. Ponadto w ekstraktach wodno-metanowych wartości DPPH były skorelowane z wartościami FRAP, zaś w ekstraktach wodnych zależność wartości DPPH z wartościami ABTS. Ponadto stwierdzono istotne korelacje pomiędzy TPAC i ABTS, TFC i CUPRAC oraz TPC i FRAP dla wodno-metanowych ekstraktów, a także pomiędzy TPC i DPPH dla naparów złotego korzenia. Te istotne zależności między właściwościami przeciwutleniającymi a związkami fenolowymi sugerują, że TPC i TPAC są jednymi z głównych czynników odpowiedzialnych za przeciwutleniający potencjał surowca roślinnego.

Współczynniki korelacji między oznaczonymi związkami fenolowymi wskazały na odpowiednio 6 i 4 istotne statystycznie korelacje ($p < 0,05$) odpowiednio dla wodno-metanowych i wodnych ekstraktów. Najwyższe współczynniki korelacji ($r > 0,6$) stwierdzono dla par pCA-GA, Q-RUT i FA-VA w ekstraktach wodno-metanowych oraz dla par pCA-CAT i CA-CAT w ekstraktach wodnych. Poza tym, w tych ostatnich wykryto wysoką zależność pomiędzy pCA i CAT, a ASA. W ekstraktach wodno-metanowych korelacje pomiędzy GA i pCA z TFC były umiarkowanie ujemne, podczas gdy zależności między GA i pCA z TPAC były umiarkowanie dodatnie i wynosiły odpowiednio 0,67 i 0,56.

Ponadto RUT była skorelowana z TPC i TFC, podczas gdy CA było skorelowane z AA w ekstraktach hydrometanolowych. Wysoka korelacja dla pary TPC-TPAC została wykryta we wszystkich analizowanych ekstraktach różniaka górskiego.

Współczynniki korelacji między pierwiastkami a związkami fenolowymi wykazały najwyższą wartość dla pary Fe-CA (0,70) w ekstraktach wodno-metanolowych oraz dla par Fe-TFC (0,81) oraz Q-VA (0,71) w naparach. Ponadto stwierdzono wysokie dodatnie zależności również dla par: Mg-TPC, Q-TPC, Q-TFC i Q-RUT w wodno-metanolowych ekstraktach, oraz w naparach dla par: Mg-CA, Ca-TPAC, Ca-CA, Na-TFC i Q-FA. Korelacje pomiędzy Mg-SNA i Ca-SNA były umiarkowanie ujemne w obu ekstraktach. Poza tym, w ekstraktach wodnych stwierdzono korelacje umiarkowanie dodatnie między Mg-CUPRAC i Ca-CUPRAC. Wykazano również dodatnią korelację pomiędzy BChE-TPAC, BChE-TPC i BChE-DPPH dla ekstraktów wodnych, podczas gdy AChE była ujemnie skorelowana z TFC, VA i CA.

Wnioski

R. rosea L. jest popularnym surowcem roślinnym o właściwościach adaptogennych. W niniejszej pracy oznaczono profil fenolowy i właściwości biologiczne handlowych próbek tego surowca. Analiza wykazała, że ekstrakty wodno-metanolowe charakteryzowały się wyższą zawartością związków fenolowych w porównaniu z ekstraktami wodnymi. Te ostatnie natomiast okazały się być bogatsze w mikro- i makroelementy. GA i pCA występowały w najwyższym stężeniu w ekstraktach wodno-metanolowych, zaś SNA i pCA w ekstraktach wodnych. Ponadto ekstrakty wodno-metanolowe odznaczały się wyższą aktywnością antyoksydacyjną. Korelacje pomiędzy oznaczanymi związkami fenolowymi a aktywnością biologiczną w obu ekstraktach wskazują na kluczową rolę związków fenolowych związaną z tą aktywnością w ekstraktach *R. rosea*. Przeprowadzone badania wykazały bogaty skład fenolowy i wysoki potencjał biologiczny handlowych produktów *R. rosea*.

Publikacja D.4.

Polumackanycz M, Petropoulos SA, Añibarro-Ortega M, Pinela, Barros L, Plenis A, Viapiana A. Chemical composition and antioxidant properties of common and lemon verbena. *Antioxidants* 2022, 11, 2247.

Wprowadzenie i cel pracy

Rodzina Verbenaceae obejmuje ponad 100 rodzajów i około 2000 gatunków surowców występujących m. in. w regionach tropikalnych, subtropikalnych i umiarkowanych [70]. Najnowsze badania nad gatunkami należącymi do Verbenaceae wykazały dużą różnorodność działania farmakologicznego, w tym właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, przeciwgrzybicze, antyproliferacyjne, przeciwbólowe, owadobójcze i gastroprotektoryjne [71,72]. Do tej rodziny zalicza się m.in. *Verbena officinalis* L. zwana potocznie werbeną pospolitą, która używana jest od wielu lat jako suplement diety w ziołolecznictwie [73]. Jest ona tradycyjnie stosowana w leczeniu zaburzeń układu nerwowego, takich jak depresja, bezsenność i niepokój. Może być także używana we wspomaganie leczenia chorób wątroby i pęcherzyka żółciowego, w zaburzeniach miesiączkowania i u matek karmiących piersią w celu stymulacji laktacji [74]. Roślina ta jest również znana ze swoich właściwości moczopędnych oraz w niektórych krajach podawana jest chorym z gorączką towarzyszącą przeziębieniu, jak również w malarii i reumatyzmie [74,75]. Drugą rośliną należącą do Verbenaceae jest *Aloysia citrodora* Paláu (syn. *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton), powszechnie znana jak werbena cytrynowa. Jest to roślina jednoroczna, która pochodzi z Ameryki Południowej i jest uprawiana w całym basenie Morza Śródziemnego i Afryce Północnej [76]. Tradycyjnie spożywana jest w formie naparu w celu wspomaganie leczenia przeziębienia i gorączki, grypy, kolki, biegunki, astmy, lęku, bezsenności i niestrawności [77,78]. Badania nad *A. citrodora* wykazały jej silne właściwości biologiczne, takie jak przeciwutleniające, przeciwgrzybicze, przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe [79,80]. Ponadto liście werbeny cytrynowej są wysoko cenione ze względu na cytrynowy zapach i są powszechnie stosowane w wielu przetworach spożywczych, jako dressingi do sałatek, dżemy, puddingi, czy napoje i sorbety [81].

W literaturze można znaleźć doniesienia naukowe na temat składu chemicznego werbeny pospolitej i cytrynowej, oraz ich właściwości biologicznych, jednakże brak jest informacji na temat składu wodnych ekstraktów sporządzonych z tych surowców oraz ich aktywności przeciwutleniającej. Biorąc pod uwagę szerokie zastosowanie naparów i odwarów tych surowców roślinnych, celem badań było scharakteryzowanie i porównanie składu fenolowego wodnych (naparów i odwarów) i wodno-metanolowych ekstraktów sporządzonych z werbeny pospolitej i cytrynowej, oznaczenie ich właściwości odżywczych i aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem metod DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC.

Analizowany materiał roślinny

Liście werbeny pospolitej i cytrynowej zakupiono w lutym 2021 r. od lokalnej polskiej firmy NATUR-VIT w postaci suszonych ziół. Próbkę surowców rozdrobniono i przygotowano do dalszych badań.

Metodyka

Właściwości odżywcze werbeny pospolitej i cytrynowej przeprowadzono we współpracy z Uniwersytetem Thessali w Grecji oraz Instituto Politécnico de Bragança w Portugalii. W ramach tych badań zawartość białka, tłuszczu, popiołu i błonnika pokarmowego określono zgodnie z metodą AOAC [39]. Zawartość białka oszacowano metodą Kjeldahla, a zawartość tłuszczu oznaczono metodą ekstrakcji Soxhleta. Zawartość popiołu oznaczono przez spalenie próbki w piecu muflowym w temperaturze 550 ± 15 °C, całkowitą zawartość błonnika określono metodą enzymatyczno-grawimetryczną, natomiast węglowodany oszacowano na podstawie różnic. Wartość energetyczną obliczono stosując następujące przeliczniki: 9 kcal/g dla tłuszczu, 4 kcal/g dla białka i węglowodanów oraz 2 kcal/g dla błonnika, a wyniki wyrażono wówczas w kcal na 100 g materiału roślinnego.

W przypadku cukrów oznaczano je techniką HPLC sprzężony z detektorem pomiaru współczynnika załamania światła, a wyniki wyrażono w g na 100 g materiału roślinnego. Kwasy organiczne analizowano techniką UPLC sprzężoną z detektorem z matrycą fotodiodową, zaś wyniki wyrażono w g na 100 g materiału roślinnego. Ponadto kwasy tłuszczowe analizowano techniką GC wyposażoną w detektor płomieniowo-jonizacyjny, tokoferole natomiast analizowano techniką HPLC sprzężoną z detektorem fluorescencyjnym.

W celu określenia profilu fenolowego zastosowano technikę HPLC-UV/Vis. Za jej pomocą zidentyfikowano oraz oznaczono dziewięć związków fenolowych: GA, SA, pCA, FA, SNA, CNA, pCAT, RUT i Q. Ponadto w pracy oznaczono także TPC, TFC, TPAC oraz ASA, a także zmierzono aktywność antyoksydacyjną przy użyciu czterech metod - ABTS, FRAP, DPPH i CUPRAC.

Wyniki

Na podstawie wyników analizy poszczególnych kwasów fenolowych i flawonoidów techniką HPLC-UV/Vis, *Aloysia citrodora* charakteryzowała się ich wyższą zawartością, przy czym ekstrakty wodne były bogatsze w te związki w porównaniu z ekstraktami wodno-metanolowymi. Ponadto SNA nie został oznaczony w żadnej próbce, nie stwierdzono obecności Q w naparach, a pCA został oznaczony tylko w ekstraktach sporządzonych z

werbeny cytrynowej. Te różnice mogą wynikać m.in. ze sposobu zbioru, rodzaju ekstrakcji i mogą znacząco wpływać na skład jakościowy i ilościowy surowca roślinnego [82]. Również w przypadku badania zawartości TPC, TFC i TPAC werbena lekarska okazała się być bogatsza w te związki, oraz ponownie to wodne ekstrakty obu surowców roślinnych charakteryzowały się wyższą ich zawartością w porównaniu z ich wodno-metanolowymi ekstraktami.

W badaniach nad aktywnością antyutleniającą otrzymano podobne wyniki jak przy zawartości związków fenolowych, tzn. werbena cytrynowa odznaczała się wyższą aktywnością antyutleniającą w porównaniu z werbeną pospolitą, oraz wodne ekstrakty obu surowców również charakteryzowały się wyższą aktywnością niż ekstrakty wodno-metanolowe.

Jako, że werbena jest wykorzystywana także jako dodatek do żywności zbadano jej wartości odżywcze. Ilość tłuszczu, protein i popiołu była wyższa dla werbeny cytrynowej, przy czym w przypadku błonnika sytuacja wyglądała odwrotnie – 70g/100 g s.m. dla werbeny lekarskiej w stosunku do 57,1g/100g s.m. dla werbeny cytrynowej. Wyniki otrzymane przy oznaczeniu węglowodanów dla obydwu roślin były na bardzo zbliżonym poziomie. W przypadku mono- i disacharydów te różnice były większe. Fruktaza, glukoza oraz sacharoza występowały w większej ilości w werbenie lekarskiej, przy czym tą ostatnią oznaczono w najmniejszej ilości. Mierząc natomiast wartość kaloryczną analizowanych preparatów zaobserwowano, iż różnica w tej wartości jest nieznaczna (256 vs. 244kcal/100 s.m.) z przewagą dla werbeny cytrynowej. Wyniki dotyczące kwasów organicznych wykazały zmienność pomiędzy *Verbena officinalis* L. a *Aloysia citrodora*. Większość kwasów występowała w wyższym stężeniu w werbenie cytrynowej, a wyjątkiem okazały się jedynie kwas cytrynowy i chinowy. W przypadku tokoferoli ich zawartość była na tym samym poziomie dla surowców werbeny, z wyjątkiem β -tokoferolu, którego nie oznaczono w liściach werbeny cytrynowej. Ilość poszczególnych kwasów wykazywała zmienność w zależności od rośliny, przy czym w większości *Aloysia citrodora* była w nie bogatsza. Co ciekawe, zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych była także większa dla tego gatunku, natomiast wielonienasyconych kwasów tłuszczowych było więcej w werbenie lekarskiej.

W pracy zastosowano również analizę korelacji, która wykazała 6 i 12 korelacji istotnych statystycznie ($p < 0,05$) odpowiednio dla ekstraktów z werbeny pospolitej i cytrynowej. W ekstraktach z werbeny pospolitej TPA był dodatnio skorelowany z wartościami DPPH i ABTS. Ponadto FRAP był dodatnio skorelowany z TPC, podczas gdy wartości DPPH

i ABTS były silnie skorelowana na poziomie $r = 0,99$. Z drugiej strony, w ekstraktach z werbeny cytrynowej wartości ABTS były silnie skorelowane z GA, pCA i FA, natomiast wartości FRAP były skorelowane z pCA i ABTS.

Wnioski

Werbena zwyczajna i cytrynowa to popularne rośliny o szerokim spektrum działania farmakologicznego. Przeprowadzone w pracy badania dotyczące wartości odżywczych, składu fenolowego i aktywności przeciwutleniającej wodno-metanolowych i wodnych (odwarów i naparów) ekstraktów liści tych surowców, wykazały różnice pod względem wartości odżywczych, składu chemicznego i aktywności przeciwutleniającej między dwoma gatunkami werbeny. Ponadto stwierdzono istotną, dodatnią korelację między wykrytymi związkami fenolowymi a aktywnością biologiczną ekstraktów, sugerując kluczową rolę składników fenolowych jako związków przeciwutleniających w wodnych ekstraktach z werbeny pospolitej i cytrynowej. Podsumowując, oba gatunki werbeny wykazały obiecujące wyniki pod względem wartości odżywczej, składu chemicznego i działania przeciwutleniającego, które były dodatnio skorelowane z zawartością związków fenolowych, przy czym ekstrakty wodne były bogatsze w oznaczane związki i aktywność antyoksydacyjną niż ekstrakty wodno-metanolowe werbeny .

Publikacja D.5.

Polumackanycz M, Petropoulos SA, Śledziński T, Goyke E, Konopacka A, Plenis A, Viapiana A. *Withania somnifera* L.: Phenolic compounds composition and biological activity of commercial samples and its aqueous and hydromethanolic extracts. *Antioxidants* 2023, 12, 550.

Wprowadzenie i cel pracy

Withania somnifera (L.) Dunal (Ashwagandha) pochodzi z północno-zachodnich i środkowych Indii oraz regionów Morza Śródziemnego i Północnej Afryki [83]. Jest ważnym składnikiem wielu preparatów ajurwedyjskich, które są obecnie komercjalizowane w Indiach i innych krajach świata [84]. Większość produktów *W. somnifera* jest sprzedawanych jako suplementy diety w postaci proszków, syropów, naparów, maści, tabletek oraz kapsułek [85]. W systemach medycyny ajurwedyjskiej wszystkie części morfologiczne rośliny są wykorzystywane do celów terapeutycznych [86], jednakże korzenie są najbardziej popularne.

Preparaty sporządzone z korzeni są powszechnie spożywane jako żywność funkcjonalna dla promowania witalności i męskości. Według badań z etnobotaniki są również stosowane jako środek nasenny w alkoholizmie i duszności rozedmowej. Ponadto *W. somnifera* ma wiele innych właściwości leczniczych, w tym immunomodulujące [87], przeciwcukrzycowe i neuroprotektoryjne [84], przeciwnowotworowe [88] i przeciwzapalne [89]. Dodatkowo jest też użyteczna jako antybiotyk, przeciwutleniacz, środek odtruwający, afrodyzjak, środek moczopędny i uspokajający [84,90]. Badania fitochemiczne *W. somnifera* wykazały obecność takich związków, jak m.in. witanolidy, alkaloidy, związki fenolowe czy saponiny zawierające dodatkową grupę acylową [91–94]. Istnieje wiele doniesień na temat witanolidów i alkaloidów, ale tylko kilka dostępnych badań na temat składu fenolowego i aktywności przeciwutleniającej *W. somnifera* [95–97]. Z tego powodu celem pracy była ocena składu fenolowego naparów i wodno-metanolowych ekstraktów sporządzonych z handlowych produktów ashwagandhy i ich ocena pod względem aktywności przeciwutleniającej, przeciwbakteryjnej i hamującej aktywność acetylocholinoesterazy. Wyniki tych badań mogą dostarczyć nowych i ważnych informacji na temat składu fenolowego i właściwości biologicznych dostępnych na rynku produktów ashwagandhy.

Analizowany materiał roślinny

Do badań zakupiono osiemnaście próbek handlowych *Withania somnifera* L. (Dunal) w lokalnych supermarketach, sklepach zielarskich i w gdańskich aptekach. Większość próbek pochodziła z Indii i zawierała korzenie ashwagandhy. Tylko dwie próbki zawierały kłącza i całe ziele. Ponadto osiem próbek miało postać kapsułek, dwie próbki miały postać tabletek, a osiem próbek było w postaci proszku.

Metodyka

Próbki ashwagandhy sproszkowano, a następnie poddano procesowi ekstrakcji, otrzymując wodno-metanolowe i wodne (napary) ekstrakty. Analizę jakościową i ilościową związków fenolowych przeprowadzono przy użyciu techniki HPLC-UV/Vis, stosując odpowiednią analityczną długość fali. I tak, przy $\lambda = 280$ nm oznaczono GA, VA, CAT, NAR, przy $\lambda = 320$ nm oznaczono CA, FA, pCA, SNA, natomiast RUT i Q oznaczono przy $\lambda = 370$ nm. Ponadto metodą spektrofotometryczną oznaczono TPC, TFC, TPAC i ASA, oraz aktywność antyutleniającą ekstraktów ashwagandhy za pomocą testów DPPH, ABTS i FRAP.

Analizę aktywności przeciwbakteryjnej naparów ashwagandhy przeprowadzono zgodnie z protokołami EUCAST i CLSI, przy współpracy z Katedrą i Zakładem

Mikrobiologii Farmaceutycznej GUMedu. Aktywność przeciwbakteryjną badano stosując następujące szczepy bakterii: gram dodatnie - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, MRSA (18582, 6347, N315, 12673), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Corynebacterium diphtheriae*, grupa A β -hemolityczna *Streptococcus* i *Streptococcus pneumoniae*, oraz gram ujemne - *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Test dyfuzji w studni agarowej zastosowano jako wstępne badanie aktywności przy użyciu następujących szczepów: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) badano stosując technikę mikrorozcieńczeń, natomiast aktywność hamującą w stosunku do AChE i BChE oznaczano metodą Ellmana przy współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej GUMedu.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i następnie porównanie średnich z testem HSD Tukeya ($p < 0,05$) i testem t Studenta ($p < 0,05$) odpowiednio dla średnich tej samej metody ekstrakcji i tej samej próbki. Analizę korelacji Pearsona zastosowano do zbadania zależności między składem fenolowym, a aktywnością biologiczną ekstraktów *W. somnifera*. W pracy przeprowadzono także PCA mając na celu sklasyfikowanie badanych próbek na podstawie ich profilu chemicznego.

Wyniki

Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane techniką HPLC-UV/Vis, wodno-metanolowe ekstrakty ashwagandhy charakteryzowały się wyższą zawartością kwasów fenolowych i flawonoidów w porównaniu z jej naparami. W ekstraktach wodno-metanolowych oznaczono jedynie pięć związków fenolowych (GA, CAT, Q, CA i RUT) we wszystkich analizowanych próbkach. Zawartość SNA oznaczono tylko w czterech próbkach, pCA w sześciu próbkach, VA w ośmiu próbkach, NAR w dwunastu próbkach i FA w jedenastu próbkach ashwagandhy. Ponadto, CAT i Q oznaczono w największych ilościach w ekstraktach alkoholowych, odpowiednio 1,96 i 1,35 mg/g s.m., podczas gdy zawartość SNA i VA oznaczono w najniższym stężeniu, odpowiednio 135 i odpowiednio 108,99 $\mu\text{g/g}$ s.m. W przypadku ekstraktów wodnych we wszystkich próbkach oznaczono tylko zawartość CAT, która razem z GA i Q występowała w największych ilościach. Ponadto zawartość SNA oznaczono tylko w trzech próbkach i był to związek o najniższym stężeniu w naparach.

Zawartość TPC, TFC, TPAC i ASA przedstawiała się zupełnie odwrotnie, gdyż ekstrakty wodne była bogatsze w te związki niż ekstrakty wodno-metanolowe *W. somnifera*.

Podobne wyniki otrzymano dla aktywności przeciwutleniającej, którą oznaczono trzema metodami. Większą aktywność przeciwutleniającą wodnych ekstraktów można wytłumaczyć wyższą zawartością związków fenolowych, gdyż jak wiadomo ich zawartość jest ściśle skorelowana z aktywnością przeciwutleniającą [98].

Testy antybakteryjne wykonano metodą dyfuzyjno-agarową. Początkowo kontroli poddane zostały wszystkie napary ashwagandhy w celu sprawdzenia ich działania wobec trzech szczepów bakterii (*S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739 i *P. aeruginosa* ATCC 9027), po czym dziesięć próbek, które wykazywały znaczącą aktywność, poddano dalszym badaniom mikrobiologicznym. Oznaczono dla nich wartości MIC i MBC. Zakresy wartości MIC i MBC naparów wynosiły odpowiednio 0,25–32 i 1–32 mg/ml. Najniższą wartość MIC (0,25 mg/ml) zanotowano wobec *S. pyogenes* i *C. diphtheria*. Ponadto *S. pyogenes* był najbardziej wrażliwym szczepem bakteryjnym, z wartościami MIC w zakresie od 0,25 do 4 mg/ml. Wartości MBC były znacznie wyższe w porównaniu z wartościami MIC, tym samym potwierdzając, że ekstrakty wodne z *W. somnifera* mogą mieć działanie bakteriobójcze w wysokich i działanie bakteriostatyczne w niższych stężeniach.

Na podstawie danych otrzymanych dla aktywności hamującej w stosunku do AChE i BChE wodno-metanolowych i wodnych ekstraktów *W. somnifera* L. i porównując średnią tej aktywności w stosunku do AChE dla wszystkich ekstraktów wodnych ze średnią aktywności dla wodno-metanolowych ekstraktów, te pierwsze charakteryzują się niższą wartością aktywności hamującej (64%) w porównaniu do 76% dla ekstraktów wodno-metanolowych. W przypadku BChE, ekstrakty wodno-metanolowe miały niższą aktywność hamującą w stosunku do BChE (40%) w porównaniu do 78% dla ekstraktów wodnych.

W niniejszej pracy zastosowano także analizę korelacji, która wykazała 48 istotnych statystycznie korelacji ($p < 0,05$) dla ekstraktów wodno-metanolowych. Najwyższe korelacje ($r > 0,8$) uzyskano dla par TPC-FRAP, TPC-TPA i TPA-SNA. Ponadto korelacje między DPPH a TFC, ASA, GA, NAR, pCA i RUT były ujemne, co wskazuje, że związki te nie tylko nie przyczyniają się do potencjału antyoksydacyjnego badanych ekstraktów, ale także, że mogą mieć negatywny wpływ na aktywność oznaczoną testem DPPH. Dla wodnych ekstraktów stwierdzono 38 statystycznie istotnych korelacji, a najwyższą zależność uzyskano pomiędzy RUT a TPAC. Ponadto w tych ekstraktach korelacje pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną a TPAC, GA, SNA i pCA były umiarkowanie dodatnie, podczas gdy zależność między FRAP i Q była umiarkowanie ujemna. Dodatkowo wartości AChE były istotnie skorelowane z VA. Uzyskane wyniki wskazują na kluczową rolę związków

fenolowych w aktywności antyutleniającej dla *W. somnifera*, przyczyniając się w ten sposób do ogólnych właściwości bioaktywnych badanych handlowych próbek tego surowca.

Dodatkowo zastosowano PCA, której celem w było zidentyfikowanie próbek wykazujących podobieństwa pod względem składu związków fenolowych i aktywności przeciwutleniającej, oraz w zależności od typu ekstrakcji. Wyodrębniono pięć głównych składowych (PC), przy czym PC1 odpowiadała za 39,7%, PC2 za 18,2%, PC3 za 8,5%, PC4 za 8,0% i PC5 za 5,4%. Ponadto PC1 było dodatnio skorelowane z TFC, ASA, CAT i DPPH oraz ujemnie skorelowane z GA, NAR, RUT i AChE, podczas gdy PC2 było dodatnio skorelowane z Q i ujemnie skorelowane z TPAC, FA, CAT, pCA, ABTS, i FRAP. Wreszcie PC3 był dodatnio skorelowany z TPAC, VA, RUT, FA, NAR i CA oraz ujemnie skorelowane z Q i SNA.

Wnioski

Analizowane próbki handlowe *Withania somnifera* L. wykazały zmienność w składzie chemicznym związaną z różnym pochodzeniem surowców, a także z różnym sposobem ekstrakcji. Wodne ekstrakty ashwagandhy charakteryzowały się wyższą zawartością związków fenolowych oraz wykazywały wyższą aktywność przeciwutleniającą (zwłaszcza w przypadku testu DPPH) w porównaniu z wodno-metanolowymi ekstraktami. Podobnie, ekstrakty wodne charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwbakteryjną niż ekstrakty wodno-metanolowe, chociaż te drugie wykazywały wyższą aktywność hamującą w stosunku do AChE, jednak niższą w stosunku do BChE dla ekstraktów wodnych. Analiza korelacji wykazała zależności pomiędzy zawartością związków fenolowych, a aktywnością biologiczną zakupionych handlowych próbek ashwagandhy. Zyskanie popularności preparatów zawierających ten surowiec roślinny ze względu na jej właściwości antyoksydacyjne oraz pozytywny wpływ na układ nerwowy znajduje potwierdzenie w powyżej przedstawionych badaniach. Stosowanie *W. somnifera* wiąże się z korzystnymi efektami zdrowotnymi, jednak wymagane są kolejne badania zarówno nad samym surowcem, jak i jego preparatami handlowymi.

WNIOSKI

Nadrzędnym celem niniejszej pracy była ocena ilościowa i jakościowa bioaktywnych składników, zwłaszcza związków polifenolowych, oraz oznaczenie właściwości biologicznych wybranych surowców roślinnych i ich handlowych produktów. Rodzaj analizowanych surowców roślinnych podyktowany był ich dużą popularnością na rynku. Większość analizowanych surowców jest od dawna znana i stosowana w naszym regionie, jak np. morwa, werbena czy dzika róża. Część z nich, jak np. ashwagandha przybyła do nas aż z Indii, czy różeniec górski z Syberii. Coraz szybszy styl życia ludzi powoduje przemęczenie, wiele sytuacji stresowych oraz lękowych, stąd na rynku bardzo popularne są obecnie surowce o działaniu adaptogennym, takie jak ashwagandha czy różeniec górski. Badania przeprowadzone w trakcie doktoratu miały na celu dostarczenie nowych informacji na temat jakości tych preparatów. Każdy z analizowanych surowców roślinnych okazał się bogatym źródłem polifenoli o wysokiej aktywności antyoksydacyjnej. Zebrane wyniki pokazały także istniejące na różnym poziomie korelacje pomiędzy zawartością związków fenolowych a właściwościami biologicznymi, zwłaszcza aktywnością przeciwutleniającą. Fakt ten wskazuje, iż badane surowce i ich preparaty handlowe stanowią cenne źródło antyoksydantów.

Dokonując przeglądu literaturowego natrafiono na dużą ilość informacji wiążących różeniec górski oraz ashwagandhę z ich korzystnym wpływem na układ nerwowy. Badania aktywności hamującej w stosunku do AChE i BChE dowiodły, iż analizowane preparaty tych roślin wykazywały aktywność wobec tych enzymów. Sugeruje to, iż mogą być potencjalnymi surowcami wspomagającymi leczenie chorób neurodegeneracyjnych, przy czym należy zaznaczyć, że konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w tym kierunku.

Badania mikrobiologiczne oceniły aktywność przeciwbakteryjną analizowanych surowców roślinnych. Na uwagę zasługują szczególnie liście dzikiej róży, które wykazywały największą aktywność spośród analizowanych preparatów (szczególnie wobec szczepu bakterii *S.epidermidis*).

Biorąc pod uwagę fakt, że duża część analizowanych preparatów roślinnych występowała w formie herbatek bądź suszu, oraz jest to najczęstsza forma stosowania ich przez pacjentów, do badań zostały włączone także wodne ekstrakty tych surowców. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dla większości analizowanych surowców roślinnych (liście morwy białej i czarnej, liście i owoce dzikiej róży, liście werbeny lekarskiej i cytrynowej, korzeń ashwagandhy) to woda okazała się lepszym ekstrahentem. Napary sporządzone z tych surowców charakteryzowały się wyższą zawartością związków

fenolowych oraz wyższą aktywnością antyoksydacyjną niż ich wodno-metanolowe ekstrakty czy nalewki. Jest to dobra informacja dla miłośników herbatek sporządzonych z tych surowców, ponieważ przyjmując taką formę ekstraktu, zapewniają sobie dobre źródło antyoksydantów, korzystając w ten sposób z ich dobroczynnego wpływu na organizm.

Podsumowując, przeprowadzone badania dowiodły, iż analizowane w pracach surowce roślinne są bogatym źródłem związków fenolowych o dużej aktywności antyoksydacyjnej, oraz wykazują właściwości przeciwbakteryjne i aktywność hamującą w stosunku do AChE i BChE. Mimo wszystko warto podkreślić, że konieczne jest przeprowadzenie kolejnych testów *in vitro* i *in vivo*, które pozwolą na lepsze poznanie analizowanych surowców. Rosnący popyt na roślinne medykamenty oraz coraz większa ilość badań naukowych, które donoszą o coraz to nowych medycznych zastosowaniach roślin pokazuje, że ta gałąź nauki ma dużą przyszłość.

BIBLIOGRAFIA

1. Alirezalu, K.; Pateiro, M.; Yaghoubi, M.; Alirezalu, A.; Peighambardoust, S.H.; Lorenzo, J.M. Phytochemical Constituents, Advanced Extraction Technologies and Techno-Functional Properties of Selected Mediterranean Plants for Use in Meat Products. A Comprehensive Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *100*, 292–306, doi:10.1016/J.TIFS.2020.04.010.
2. Boeing, H.; Bechthold, A.; Bub, A.; Ellinger, S.; Haller, D.; Kroke, A.; Leschik-Bonnet, E.; Müller, M.J.; Oberritter, H.; Schulze, M.; et al. Critical Review: Vegetables and Fruit in the Prevention of Chronic Diseases. *Eur. J. Nutr.* **2012**, *51*, 637–663, doi:10.1007/s00394-012-0380-y.
3. Etxeberria, U.; Fernández-Quintela, A.; Milagro, F.I.; Aguirre, L.; Martínez, J.A.; Portillo, M.P. Impact of Polyphenols and Polyphenol-Rich Dietary Sources on Gut Microbiota Composition. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 9517–9533, doi:10.1021/JF402506C/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2013-02506C_0002.GIF.
4. Kapravelou, G.; Martínez, R.; Andrade, A.M.; López Chaves, C.; López-Jurado, M.; Aranda, P.; Arrebola, F.; Cañizares, F.J.; Galisteo, M.; Porres, J.M. Improvement of the Antioxidant and Hypolipidaemic Effects of Cowpea Flours (*Vigna Unguiculata*) by Fermentation: Results of in Vitro and in Vivo Experiments. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 1207–1216, doi:10.1002/JSFA.6809.
5. Holst, B.; Williamson, G. Nutrients and Phytochemicals: From Bioavailability to Bioefficacy beyond Antioxidants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 73–82, doi:10.1016/J.COPBIO.2008.03.003.
6. Bartosz, G. Uszkodzenie Składników Komórek Przez Reaktywne Formy Tlenu. *Druga twarz tlenu Woln. Rod. w Przym.* 2009, 99–119.
7. Cos, P.; Calomme, M.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Vanden Berghe, D. Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Antioxidant and Pro-Oxidant Compounds. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2000**, *22*, 307–341, doi:10.1016/S1572-5995(00)80029-0.
8. Mandim, F.; Dias, M.I.; Pinela, J.; Barracosa, P.; Ivanov, M.; Stojković, D.; Soković, M.; Santos-Buelga, C.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Chemical Composition and in Vitro Biological Activities of Cardoon (*Cynara Cardunculus* L. Var. *Altilis* DC.) Seeds as Influenced by Viability. *Food Chem.* **2020**, *323*, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2020.126838.
9. Czerwonka, M.; Szterk, A.; Waszkiewicz-Robak, B. Ocena Właściwości *Postępy Tech. Przetwórstwa Spożywczego* **2010**, nr 2, 20–24.

10. Vessal, M.; Hemmati, M.; Vasei, M. Antidiabetic Effects of Quercetin in Streptozocin-Induced Diabetic Rats. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **2003**, *135*, 357–364, doi:10.1016/S1532-0456(03)00140-6.
11. Prithviraj Karak Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2019**, *10*, 1567–1574, doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1567-74.
12. Williamson, G.; Kay, C.D.; Crozier, A. The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. *Compr. Rev. food Sci. food Saf.* **2018**, *17*, 1054–1112, doi:10.1111/1541-4337.12351.
13. Rafał, I.G.; Króliczewski, B.J.; Górnjak, I.; Bartoszewski, R.; Króliczewski, A.J. Comprehensive Review of Antimicrobial Activities of Plant Flavonoids. *Phytochem. Rev. 2018 181* **2018**, *18*, 241–272, doi:10.1007/S11101-018-9591-Z.
14. Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S. The Correlation between Active Oxygens Scavenging and Antioxidative Effects of Flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *16*, 845–850, doi:10.1016/0891-5849(94)90202-X.
15. Wang, S.; Yao, J.; Zhou, B.; Yang, J.; Chaudry, M.T.; Wang, M.; Xiao, F.; Li, Y.; Yin, W. Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. *J. Food Prot.* **2018**, *81*, 68–78, doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-214.
16. Odbayar, T.O.; Kimura, T.; Tsushida, T.; Ide, T. Isoenzyme-Specific up-Regulation of Glutathione Transferase and Aldo-Keto Reductase mRNA Expression by Dietary Quercetin in Rat Liver. *Mol. Cell. Biochem.* **2009**, *325*, 121–130, doi:10.1007/S11010-009-0026-4.
17. Granato, M.; Rizzello, C.; Montani, M.S.G.; Cuomo, L.; Vitillo, M.; Santarelli, R.; Gonnella, R.; D’Orazi, G.; Faggioni, A.; Cirone, M. Quercetin Induces Apoptosis and Autophagy in Primary Effusion Lymphoma Cells by Inhibiting PI3K/AKT/MTOR and STAT3 Signaling Pathways. *J. Nutr. Biochem.* **2017**, *41*, 124–136, doi:10.1016/J.JNUTBIO.2016.12.011.
18. Chou, C.C.; Yang, J.S.; Lu, H.F.; Ip, S.W.; Lo, C.; Wu, C.C.; Lin, J.P.; Tang, N.Y.; Chung, J.G.; Chou, M.J.; et al. Quercetin-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Involving Activation of a Caspase Cascade through the Mitochondrial Pathway in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33*, 1181–1191, doi:10.1007/S12272-010-0808-Y.
19. Ciumărnean, L.; Milaciu, M.V.; Runcan, O.; Vesa, S.C.; Răchisan, A.L.; Negrean, V.; Perné, M.G.; Donca, V.I.; Alexescu, T.G.; Para, I.; et al. The Effects of Flavonoids in

- Cardiovascular Diseases. *Mol.* 2020, Vol. 25, Page 4320 **2020**, 25, 4320, doi:10.3390/MOLECULES25184320.
20. Rolnik, A.; Żuchowski, J.; Stochmal, A.; Olas, B. Quercetin and Kaempferol Derivatives Isolated from Aerial Parts of *Lens Culinaris Medik* as Modulators of Blood Platelet Functions. *Ind. Crops Prod.* **2020**, 152, 112536, doi:10.1016/J.INDCROP.2020.112536.
 21. Kalgaonkar, S.; Gross, H.B.; Yokoyama, W.; Keen, C.L. Effects of a Flavonol-Rich Diet on Select Cardiovascular Parameters in a Golden Syrian Hamster Model. <https://home.liebertpub.com/jmf> **2010**, 13, 108–115, doi:10.1089/JMF.2008.0295.
 22. Saklani, R.; Gupta, S.K.; Mohanty, I.R.; Kumar, B.; Srivastava, S.; Mathur, R. Cardioprotective Effects of Rutin via Alteration in TNF- α , CRP, and BNP Levels Coupled with Antioxidant Effect in STZ-Induced Diabetic Rats. *Mol. Cell. Biochem.* **2016**, 420, 65–72, doi:10.1007/S11010-016-2767-1/METRICS.
 23. Lin, J.P.; Yang, J.S.; Lin, J.J.; Lai, K.C.; Lu, H.F.; Ma, C.Y.; Sai-Chuen Wu, R.; Wu, K.C.; Chueh, F.S.; Gibson Wood, W.; et al. Rutin Inhibits Human Leukemia Tumor Growth in a Murine Xenograft Model in Vivo. *Environ. Toxicol.* **2012**, 27, 480–484, doi:10.1002/TOX.20662.
 24. Lalani, S.; Poh, C.L. Flavonoids as Antiviral Agents for Enterovirus A71 (EV-A71). *Viruses* **2020**, 12, doi:10.3390/V12020184.
 25. Visintini Jaime, M.F.; Redko, F.; Muschietti, L. V.; Campos, R.H.; Martino, V.S.; Cavallaro, L. V. In Vitro Antiviral Activity of Plant Extracts from Asteraceae Medicinal Plants. *Virol. J.* **2013**, 10, 1–10, doi:10.1186/1743-422X-10-245/FIGURES/6.
 26. Narenjkar, J.; Roghani, M.; Alambeygi, H.; Sedaghati, F. The Effect of the Flavonoid Quercetin on Pain Sensation in Diabetic Rats. *Basic Clin. Neurosci.* **2011**, 2, 51–57.
 27. Khan, M.T.H.; Orhan, I.; Şenol, F.S.; Kartal, M.; Şener, B.; Dvorská, M.; Šmejkal, K.; Šlapetová, T. Cholinesterase Inhibitory Activities of Some Flavonoid Derivatives and Chosen Xanthone and Their Molecular Docking Studies. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, 181, 383–389, doi:10.1016/J.CBI.2009.06.024.
 28. Niwano, Y.; Saito, K.; Yoshizaki, F.; Kohno, M.; Ozawa, T. Extensive Screening for Herbal Extracts with Potent Antioxidant Properties. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2011**, 48, 78, doi:10.3164/JCBN.11-013FR.
 29. Li, Y.; Kong, D.; Fu, Y.; Sussman, M.R.; Wu, H. The Effect of Developmental and Environmental Factors on Secondary Metabolites in Medicinal Plants. *Plant Physiol.*

- Biochem.* **2020**, *148*, 80–89, doi:10.1016/J.PLAPHY.2020.01.006.
30. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158, doi:10.5344/AJEV.1965.16.3.144.
 31. Birkenblätter. *Betulae Herba* 4.00. In European Pharmacopoeia; Council of Europe: Strasbourg, France, **2002**; p. 1308.
 32. Polish Pharmaceutical Society. Polish Pharmacopoeia VI; Polish Pharmaceutical Society: Warszawa, Poland, **2002**; p. 150.
 33. Abdelmageed, O.H.; Khashaba, P.Y.; Askal, H.F.; Saleh, G.A.; Refaat, I.H. Selective Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid in Drugs and Foods. *Talanta* **1995**, *42*, 573–579, doi:10.1016/0039-9140(95)01449-L.
 34. Tuberoso, C.I.G.; Rosa, A.; Bifulco, E.; Melis, M.P.; Atzeri, A.; Pirisi, F.M.; Dessì, M.A. Chemical Composition and Antioxidant Activities of Myrtus Communis L. Berries Extracts. *Food Chem.* **2010**, *123*, 1242–1251, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2010.05.094.
 35. Arnao, M.B.; Cano, A.; Acosta, M. The Hydrophilic and Lipophilic Contribution to Total Antioxidant Activity. *Food Chem.* **2001**, *73*, 239–244, doi:10.1016/S0308-8146(00)00324-1.
 36. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76, doi:10.1006/ABIO.1996.0292.
 37. Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S.E.; Bektaşoğlu, B.; Berker, K.I.; Özyurt, D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Mol.* **2007**, *12*, Pages 1496-1547 **2007**, *12*, 1496–1547, doi:10.3390/12071496.
 38. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95, doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9.
 39. Horwitz, W.; Latimer, G. (Eds.) AOAC Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists Intern1. In AOAC Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International; AOAC Inter.: Gaithersburg, MD, USA, **2016**; ISBN 0935584773
 40. Ercisli, S. Chemical Composition of Fruits in Some Rose (*Rosa* Spp.) Species. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1379–1384, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2007.01.053.

41. Nybom, H.; Werlemark, G. Realizing the Potential of Health-Promoting Rosehips from Dogroses (*Rosa Sect. Caninae*). *Curr. Bioact. Compd.* **2016**, *13*, 3–17, doi:10.2174/1573407212666160607090635.
42. Lattanzio, F.; Greco, E.; Carretta, D.; Cervellati, R.; Govoni, P.; Speroni, E. In Vivo Anti-Inflammatory Effect of *Rosa Canina* L. Extract. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 880–885, doi:10.1016/J.JEP.2011.07.006.
43. Cunja, V.; Mikulic-Petkovsek, M.; Zupan, A.; Stampar, F.; Schmitzer, V. Frost Decreases Content of Sugars, Ascorbic Acid and Some Quercetin Glycosides but Stimulates Selected Carotenes in *Rosa Canina* Hips. *J. Plant Physiol.* **2015**, *178*, 55–63, doi:10.1016/J.JPLPH.2015.01.014.
44. Yıldız, O.; Alpaslan, M. Properties of Rose Hip Marmalades. *Food Technol. Biotechnol.* **2012**.
45. Kültür, Ş. Medicinal Plants Used in Kırklareli Province (Turkey). *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 341–364, doi:10.1016/J.JEP.2006.11.035.
46. Barros, L.; Carvalho, A.M.; Morais, J.S.; Ferreira, I.C.F.R. Strawberry-Tree, Blackthorn and Rose Fruits: Detailed Characterisation in Nutrients and Phytochemicals with Antioxidant Properties. *Food Chem.* **2010**, *120*, 247–254, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2009.10.016.
47. Ercisli, S.; Orhan, E. Some Physico-Chemical Characteristics of Black Mulberry (*Morus Nigra* L.) Genotypes from Northeast Anatolia Region of Turkey. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2008**, *116*, 41–46, doi:10.1016/J.SCIENTA.2007.10.021.
48. Kim, S.Y.; Gao, J.J.; Lee, W.C.; Ryu, K.S.; Lee, K.R.; Kim, Y.C. Antioxidative Flavonoids from the Leaves of *Morus Alba*. *Arch. Pharm. Res.* **1999**, *22*, 81–85, doi:10.1007/BF02976442.
49. Chan, E.W.C.; Lye, P.Y.; Wong, S.K. Phytochemistry, Pharmacology, and Clinical Trials of *Morus Alba*. *Chin. J. Nat. Med.* **2016**, *14*, 17–30, doi:10.3724/SP.J.1009.2016.00017.
50. Cui, H.; Lu, T.; Wang, M.; Zou, X.; Zhang, Y.; Yang, X.; Dong, Y.; Zhou, H. Flavonoids from *Morus Alba* L. Leaves: Optimization of Extraction by Response Surface Methodology and Comprehensive Evaluation of Their Antioxidant, Antimicrobial, and Inhibition of α -Amylase Activities through Analytical Hierarchy Process. *Mol.* **2019**, *Vol. 24*, *Page 2398* **2019**, *24*, 2398, doi:10.3390/MOLECULES24132398.
51. Sánchez-Salcedo, E.M.; Tassotti, M.; Del Rio, D.; Hernández, F.; Martínez, J.J.; Mena,

- P. (Poly)Phenolic Fingerprint and Chemometric Analysis of White (*Morus Alba* L.) and Black (*Morus Nigra* L.) Mulberry Leaves by Using a Non-Targeted UHPLC-MS Approach. *Food Chem.* **2016**, *212*, 250–255, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2016.05.121.
52. Eruygur, N.; Dural, E. Determination of 1-Deoxynojirimycin by a Developed and Validated HPLC-FLD Method and Assessment of In-Vitro Antioxidant, α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Activity in Mulberry Varieties from Turkey. *Phytomedicine* **2019**, *53*, 234–242, doi:10.1016/J.PHYMED.2018.09.016.
 53. Jo, S.P.; Kim, J.K.; Lim, Y.H. Antihyperlipidemic Effects of Stilbenoids Isolated from *Morus Alba* in Rats Fed a High-Cholesterol Diet. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *65*, 213–218, doi:10.1016/J.FCT.2013.12.040.
 54. Jiao, Y.; Wang, X.; Jiang, X.; Kong, F.; Wang, S.; Yan, C. Antidiabetic Effects of *Morus Alba* Fruit Polysaccharides on High-Fat Diet- and Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *199*, 119–127, doi:10.1016/J.JEP.2017.02.003.
 55. Kang, T.H.; Hur, J.Y.; Kim, H.B.; Ryu, J.H.; Kim, S.Y. Neuroprotective Effects of the Cyanidin-3-O-Beta-d-Glucopyranoside Isolated from Mulberry Fruit against Cerebral Ischemia. *Neurosci. Lett.* **2006**, *391*, 122–126, doi:10.1016/J.NEULET.2005.08.053.
 56. Kim, H.M.; Han, S.B.; Lee, K.H.; Lee, C.W.; Kim, C.Y.; Lee, E.J.; Huh, H. Immunomodulating Activity of a Polysaccharide Isolated from *Mori Cortex Radicis*. *Arch. Pharm. Res.* **2000**, *23*, 240–242, doi:10.1007/BF02976452.
 57. Thabti, I.; Elfalleh, W.; Tlili, N.; Ziadi, M.; Campos, M.G.; Ferchichi, A. Phenols, Flavonoids, and Antioxidant and Antibacterial Activity of Leaves and Stem Bark of *Morus* Species. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2012.660722> **2013**, *17*, 842–854, doi:10.1080/10942912.2012.660722.
 58. Chang, Y.C.; Yang, M.Y.; Chen, S.C.; Wang, C.J. Mulberry Leaf Polyphenol Extract Improves Obesity by Inducing Adipocyte Apoptosis and Inhibiting Preadipocyte Differentiation and Hepatic Lipogenesis. *J. Funct. Foods* **2016**, *21*, 249–262, doi:10.1016/J.JFF.2015.11.033.
 59. Petkov, V.D.; Yonkov, D.; Mosharoff, A.; Kambourova, T.; Alova, L.; Petkov, V. V.; Todorov, I. Effects of Alcohol Aqueous Extract from *Rhodiola Rosea* L. Roots on Learning and Memory. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* **1986**, *12*, 3–16.
 60. Bawa, P.A.S.; Khanum, F. Anti-Inflammatory Activity of *Rhodiola Rosea*--"a Second-Generation Adaptogen". *Phytother. Res.* **2009**, *23*, 1099–1102, doi:10.1002/PTR.2749.
 61. Bykov, V.A.; Zapesochnaya, G.G.; Kurkin, V.A. Traditional and Biotechnological

- Aspects of Obtaining Medicinal Preparations from *Rhodiola Rosea* L. (A Review). *Pharm. Chem. J.* **1999**, *33*, 29–40, doi:10.1007/BF02508414/METRICS.
62. Limanaqi, F.; Biagioni, F.; Busceti, C.L.; Polzella, M.; Fabrizi, C.; Fornai, F. Potential Antidepressant Effects of *Scutellaria Baicalensis*, *Hericium Erinaceus* and *Rhodiola Rosea*. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2020**, *9*, doi:10.3390/ANTIOX9030234.
 63. Panossian, A.; Wikman, G.; Sarris, J. Rosenroot (*Rhodiola Rosea*): Traditional Use, Chemical Composition, Pharmacology and Clinical Efficacy. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 481–493, doi:10.1016/J.PHYMED.2010.02.002.
 64. Edwards, D.; Heufelder, A.; Zimmermann, A. Therapeutic Effects and Safety of *Rhodiola Rosea* Extract WS® 1375 in Subjects with Life-Stress Symptoms – Results of an Open-Label Study. *Phyther. Res.* **2012**, *26*, 1220–1225, doi:10.1002/PTR.3712.
 65. Chiang, H.M.; Chen, H.C.; Wu, C.S.; Wu, P.Y.; Wen, K.C. *Rhodiola* Plants: Chemistry and Biological Activity. *J. food drug Anal.* **2015**, *23*, 359–369, doi:10.1016/J.JFDA.2015.04.007.
 66. Evstatieva, L.; Todorova, M.; Antonova, D.; Staneva, J. Chemical Composition of the Essential Oils of *Rhodiola Rosea* L. of Three Different Origins. *Pharmacogn. Mag.* **2010**, *6*, 256, doi:10.4103/0973-1296.71782.
 67. Ristivojević, P.M.; Tahir, A.; Malfent, F.; Opsenica, D.M.; Rollinger, J.M. High-Performance Thin-Layer Chromatography/Bioautography and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Hyphenated with Chemometrics for the Quality Assessment of *Morus Alba* Samples. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1594*, 190–198, doi:10.1016/J.CHROMA.2019.02.006.
 68. Dent, M.; Dragović-Uzelac, V.; Penić, M.; Brnčić, M.; Bosiljkov, T.; Levaj, B. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia Officinalis* L.) Extracts. *Food Technol. Biotechnol.* **2013**, *51*, 84-91.
 69. Olennikov, D.N.; Kashchenko, N.I.; Chirikova, N.K.; Akobirshoeva, A.; Zilfikarov, I.N.; Vennos, C. Isorhamnetin and Quercetin Derivatives as Anti-Acetylcholinesterase Principles of Marigold (*Calendula Officinalis*) Flowers and Preparations. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, doi:10.3390/IJMS18081685.
 70. Ricco, R.A.; Wagner, M.L.; Portmann, E.; Reides, C.; Llesuy, S.; Gurni, A.A.; Carballo, M.A. Survey on Polyphenols, Antioxidant Activity and Genotoxicity on Argentinean Species of *Lippia* and *Aloysia* (Verbenaceae). *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas* **2010**, *9*, 388–396.

71. Calvo, M.I.; San Julian, A.; Fernández, M. Identification of the Major Compounds in Extracts of *Verbena Officinalis* L. (Verbenaceae) by HPLC with Post-Column Derivatization. *Chromatographia* **1997**, *46*, 241–244, doi:10.1007/BF02496313/METRICS.
72. Casanova, E.; García-Mina, J.M.; Calvo, M.I. Antioxidant and Antifungal Activity of *Verbena Officinalis* L. Leaves. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2008**, *63*, 93–97, doi:10.1007/S11130-008-0073-0/METRICS.
73. Kubica, P.; Kokotkiewicz, A.; Malinowska, M.A.; Synowiec, A.; Gniewosz, M.; Hussain, S.; Yaqoob, M.; Bonn, G.K.; Jakschitz, T.; Mahmoud, E.A.; et al. Phenylpropanoid Glycoside and Phenolic Acid Profiles and Biological Activities of Biomass Extracts from Different Types of *Verbena Officinalis* Microshoot Cultures and Soil-Grown Plant. *Antioxidants* **2022**, *Vol. 11*, Page 409 **2022**, *11*, 409, doi:10.3390/ANTIOX11020409.
74. Khan, A.W.; Khan, A.U.; Ahmed, T. Anticonvulsant, Anxiolytic, and Sedative Activities of *Verbena Officinalis*. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/FPHAR.2016.00499.
75. Shu, J.; Chou, G.; Wang, Z. Two New Iridoids from *Verbena Officinalis* L. *Mol.* **2014**, *Vol. 19*, Pages 10473-10479 **2014**, *19*, 10473–10479, doi:10.3390/MOLECULES190710473.
76. dos Santos, A.C.; Sutili, F.J.; Heinzmann, B.M.; Cunha, M.A.; Brusque, I.C.M.; Baldisserotto, B.; Zeppenfeld, C.C. Aloysia Triphylla Essential Oil as Additive in Silver Catfish Diet: Blood Response and Resistance against *Aeromonas Hydrophila* Infection. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *62*, 213–216, doi:10.1016/J.FSI.2017.01.032.
77. Maliki, I.; Es-safi, I.; El Moussaoui, A.; Mechchate, H.; El Majdoub, Y.O.; Bouymajane, A.; Cacciola, F.; Mondello, L.; Elbadaoui, K. *Salvia Officinalis* and *Lippia Triphylla*: Chemical Characterization and Evaluation of Antidepressant-like Activity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *203*, 114207–, doi:10.1016/J.JPBA.2021.114207.
78. Rashid, H.M.; Mahmood, A.I.; Afifi, F.U.; Talib, W.H. Antioxidant and Antiproliferation Activities of Lemon Verbena (*Aloysia Citrodora*): An In Vitro and In Vivo Study. *Plants (Basel, Switzerland)* **2022**, *11*, doi:10.3390/PLANTS11060785.
79. Ali, H.F. Assessment of Volatile Components, Free Radical-Scavenging Capacity and Anti-Microbial Activity of Lemon Verbena Leaves. *Res. J. Phytochem.* **2008**, *2*.
80. Amin, B.; Noorani, R.; Razavi, B.M.; Hosseinzadeh, H. The Effect of Ethanolic

- Extract of *Lippia Citriodora* on Rats with Chronic Constriction Injury of Neuropathic Pain. *Cell J.* **2018**, *19*, 528–536, doi:10.22074/CELLJ.2018.4481.
81. Funes, L.; Fernández-Arroyo, S.; Laporta, O.; Pons, A.; Roche, E.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Micol, V. Correlation between Plasma Antioxidant Capacity and Verbascoside Levels in Rats after Oral Administration of Lemon Verbena Extract. *Food Chem.* **2009**, *117*, 589–598, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2009.04.059.
 82. Fotakis, C.; Tsigrimani, D.; Tsiaka, T.; Lantzouraki, D.Z.; Strati, I.F.; Makris, C.; Tagkouli, D.; Proestos, C.; Sinanoglou, V.J.; Zoumpoulakis, P. Metabolic and Antioxidant Profiles of Herbal Infusions and Decoctions. *Food Chem.* **2016**, *211*, 963–971, doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.124.
 83. Mirjalili, M.H.; Moyano, E.; Bonfill, M.; Cusido, R.M.; Palazón, J. Steroidal Lactones from *Withania Somnifera*, an Ancient Plant for Novel Medicine. *Molecules* **2009**, *14*, 2373–2393.
 84. Kulkarni, S.K.; Dhir, A. *Withania Somnifera*: An Indian Ginseng. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2008**, *32*, 1093–1105, doi:10.1016/J.PNPBP.2007.09.011.
 85. Chandra, P.; Kannujia, R.; Saxena, A.; Srivastava, M.; Bahadur, L.; Pal, M.; Singh, B.P.; Kumar Ojha, S.; Kumar, B. Quantitative Determination of Multi Markers in Five Varieties of *Withania Somnifera* Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography with Hybrid Triple Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometer Combined with Multivariate Analysis: Application to Pharmaceutical Dosage Forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *129*, 419–426, doi:10.1016/J.JPBA.2016.07.032.
 86. Gurav, S.; Wanjari, M.; Bhole, R.; Raut, N.; Prasad, S.; Saoji, S.; Chikhale, R.; Khanal, P.; Pant, A.; Ayyanar, M.; et al. Ethnological Validation of Ashwagandha (*Withania Somnifera* L. Dunal) Ghrita as “Vajikarana Rasayana”: In-Silico, in-Vitro and in-Vivo approach. *J. Ethnopharmacol.* **2023**, *304*, doi:10.1016/J.JEP.2022.116064.
 87. Ziauddin, M.; Phansalkar, N.; Patki, P.; Diwanay, S.; Patwardhan, B. Studies on the Immunomodulatory Effects of Ashwagandha. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *50*, 69–76, doi:10.1016/0378-8741(95)01318-0.
 88. Singh, N.; Bhalla, M.; de Jager, P.; Gilca, M. An Overview on Ashwagandha: A Rasayana (Rejuvenator) of Ayurveda. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2011**, *8*, 208, doi:10.4314/AJTCAM.V8I5S.9.
 89. Pawar, P.; Gilda, S.; Sharma, S.; Jagtap, S.; Paradkar, A.; Mahadik, K.; Ranjekar, P.; Harsulkar, A. Rectal Gel Application of *Withania Somnifera* Root Extract Expounds

- Anti-Inflammatory and Muco-Restorative Activity in TNBS-Induced Inflammatory Bowel Disease. *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *11*, doi:10.1186/1472-6882-11-34.
90. Mishra, L.C.; Singh, B.B.; Dagenais, S. Scientific Basis for the Therapeutic Use of Withania Somnifera (Ashwagandha): A Review. *Altern. Med. Rev.* **2000**, *5*, 334–346.
 91. Patil, D.; Gautam, M.; Mishra, S.; Karupothula, S.; Gairola, S.; Jadhav, S.; Pawar, S.; Patwardhan, B. Determination of Withaferin A and Withanolide A in Mice Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Application to Pharmacokinetics after Oral Administration of Withania Somnifera Aqueous Extract. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *80*, 203–212, doi:10.1016/J.JPBA.2013.03.001.
 92. Singh, K.B.; Hahm, E.R.; Kim, S.H.; Singh, S. V. Withaferin A Inhibits Fatty Acid Synthesis in Rat Mammary Tumors. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **2023**, *16*, 5–16, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-22-0193.
 93. Nile, S.H.; Liang, Y.; Wang, Z.; Zheng, J.; Sun, C.; Nile, A.; Patel, G.; Kai, G. Chemical Composition, Cytotoxic and pro-Inflammatory Enzyme Inhibitory Properties of Withania Somnifera (L.) Dunal Root Extracts. *South African J. Bot.* **2022**, *151*, 46–53, doi:10.1016/J.SAJB.2021.11.003.
 94. Saleem, S.; Muhammad, G.; Hussain, M.A.; Altaf, M.; Abbas Bukhari, S.N. Withania Somnifera L.: Insights into the Phytochemical Profile, Therapeutic Potential, Clinical Trials, and Future Prospective. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2020**, *23*, 1501, doi:10.22038/IJBMS.2020.44254.10378.
 95. Mekbib, S.B.; Regnier, T.J.C.; Sivakumar, D.; Korsten, L. Evaluation of Ethiopian Plant Extracts, Acacia Seyal and Withania Somnifera, to Control Green Mould and Ensure Quality Maintenance of Citrus (Citrus Sinensis L.). *Fruits* **2009**, *64*, 285–294, doi:10.1051/FRUITS/2009023.
 96. Tomar, V.; Beuerle, T.; Sircar, D. A Validated HPTLC Method for the Simultaneous Quantifications of Three Phenolic Acids and Three Withanolides from Withania Somnifera Plants and Its Herbal Products. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2019**, *1124*, 154–160, doi:10.1016/J.JCHROMB.2019.06.009.
 97. Alam, N.; Hossain, M.; Khalil, M.I.; Moniruzzaman, M.; Sulaiman, S.A.; Gan, S.H. High Catechin Concentrations Detected in Withania Somnifera (Ashwagandha) by High Performance Liquid Chromatography Analysis. *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *11*, doi:10.1186/1472-6882-11-65.

98. Wojdyło, A.; Oszmiański, J.; Czemerys, R. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in 32 Selected Herbs. *Food Chem.* **2007**, *105*, 940–949, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2007.04.038.