

Badania *in vitro* i *in vivo* aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów, olejków eterycznych i izolowanych związków gatunków z rodzaju *Eryngium* – krótki przegląd

Studies on antioxidant activity in vitro and in vivo of extracts, essential oils, and isolated compounds of species from Eryngium genus – a mini review

Małgorzata Kikowska¹, Elżbieta Studzińska-Sroka², Barbara Thiem¹

¹ Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

² Katedra i Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Praca przedstawia zaktualizowany przegląd piśmiennictwa na temat stanu badań aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów, olejków eterycznych i związków izolowanych z organów roślin z rodzaju *Eryngium*. Składniki fitochemiczne tych taksonów to saponiny triterpenowe, flawonoidy, kwasy fenolowe, kumaryny i furanokumaryny, olejki eteryczne, seskwiterpeny, poliacytleny, ekdysteroidy, fitosterole, lignany i betainy. Części nadziemne i korzenie mają szeroki zakres zastosowań leczniczych w tradycyjnej medycynie. Roślinne metabolity wtórne obecne w ekstraktach roślin leczniczych często wykazują silne właściwości antyoksydacyjne. Istnieje szereg metod pomiaru tej aktywności. Najbardziej rozpowszechnione jest stosowanie tzw. metod *in vitro* (np. DPPH, FRAP, ORAC, TBARS). (*Farm Współ* 2020; 13: 127-130)

Słowa kluczowe: aktywność antyoksydacyjna, ekstrakty, olejki eteryczne, mikołajki

Abstract

This work is an updated literature review on the current state of the research on the antioxidant activity of extracts, essential oils, and compounds isolated from organs of plants belonging to *Eryngium* genus. Phytochemical constituents of these taxa include triterpenoid saponins, flavonoids, phenolic acids, coumarins and furanocoumarins, essential oils, sesquiterpenes, polyacetylenes, ecdysteroids, phytosterols, lignans, and betaines. Aerial parts and roots have an immense range of medicinal uses in traditional medicine. Plant secondary metabolites present in extracts of medicinal plants often have strong antioxidant properties. There are several methods for measuring this activity. The most commonly used are so-called *in vitro* methods (e.g. DPPH, FRAP, ORAC, TBARS). (*Farm Współ* 2020; 13: 127-130)

Keywords: antioxidant activity, extracts, essential oils, Sea Holly

Wstęp

Na przestrzeni lat opracowano szereg metod badawczych, które pozwalają określać potencjał przeciwutleniający ekstraktów, frakcji czy związków izolowanych z roślin. Można tu wyróżnić zarówno testy wykonywane *in vivo*, jak i *in vitro*. Metody *in vitro* są łatwiejsze do przeprowadzenia, szybsze i mniej kosztowne, charakteryzuje je zwykle duża powtarzalność wyników. Jedną z częściej wykorzystywanych

technik jest metoda z użyciem roztworu rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl), dzięki której można zbadać zdolność zmiatania wolnych rodników. Zastosowanie roztworu kationorodnika ABTS [2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)] umożliwia, podobnie jak w poprzedniej analizie, pomiar właściwości przeciwrodnikowych. Jest to analiza rutynowo używana do oznaczania zdolności antyoksydacyjnych próbek związków zarówno

hydrofobowych, jak i hydrofilowych. Metoda oznaczania zdolności redukowania jonów żelaza (FRAP) pozwala na bezpośrednie określenie właściwości redukujących badanych próbek. Metoda czulsza niż technika FRAP to analiza ORAC badająca szybkość procesów utleniania zachodzących w próbce. Do oceny aktywności antyoksydacyjnej *in vivo* w reakcjach utleniania w systemach naśladujących rzeczywiste warunki wewnątrz organizmu znajdują zastosowanie liposomy i mikrosomy, z uwagi na podobieństwo do składu błon biologicznych. Często stosuje się pomiary peroksydacji lipidów błon liposomowych narażonych na promieniowanie UV [1-4].

Opisane w niniejszym przeglądzie mikołajki należą do rodzaju *Eryngium*, który jest najliczniejszym taksonem w rodzinie *Apiaceae*, podrodzinnie *Saniculoideae*. Rośliny z tego rodzaju występują prawie na całym świecie. Różne organy mikołajków, szczególnie części nadziemne i korzenie, mają szeroki zakres zastosowań leczniczych w medycynie tradycyjnej. W kilku badaniach wykazano ich aktywność przeciwutleniającą, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwwirusową, przeciwnowotworową, przeciwzapalną i neuroprotektoryjną dzięki obecności związków: saponin triterpenowych pochodnych barygenolu, flawonoidów należących do grup flawonoli, flawanonów oraz flawonów, kwasów fenolowych, kumaryn i furanokumaryn, olejków eterycznych, charakteryzujących się obecnością mono- i seskwiterpenowych węglowodorów, poliacetylenów oraz związków z grup ekdysteroidów, fitosteroli, lignanów i betain [5-7].

Aktywność antyoksydacyjna

Większość prac naukowych na temat aktywności biologicznej ekstraktów z organów gatunków *Eryngium* dotyczy ich aktywności przeciwutleniającej.

Ekstrakty metanolowe i wodno-metanolowe (50%) z owoców *E. planum* (mikołajka płaskolistnego) analizowano pod kątem ich ogólnego potencjału antyoksydacyjnego w układzie β -karoten/kwas linolowy. Wykazano, że wodno-metanolowy ekstrakt ($EC_{50} = 4,51$ mg/mL) posiadał silniejszą aktywność niż ekstrakt metanolowy ($EC_{50} = 8,64$ mg/mL). Trolox, który jest syntetyczną, rozpuszczalną w roztworach wodnych pochodną witaminy E o wysokiej aktywności przeciwutleniającej stosowany jako związek referencyjny, wskazywał wartość $EC_{50} = 0,89$ mg/mL [8]. W innym badaniu aktywność przeciwrodnikową wodnych i etanolowych ekstraktów z całej rośliny

E. planum mierzono testem zmiatania wolnych rodników 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH), a wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio $1,731 \pm 0,12$ mg/mL i $1,362 \pm 0,11$ mg/mL [9].

Ekstrakt z nadziemnej części *E. campestre* (mikołajka polnego), a także izolowane związki flawonoidowe klasy flawonolu (w stężeniu 0,5 mg/mL) badano pod kątem ich właściwości przeciwutleniającej. Zastosowano metodę zmiatania wolnych rodników DPPH. Aktywność przeciwrodnikowa była stosunkowo wysoka dla surowego ekstraktu (66,3%) i przewyższała działanie wszystkich badanych flawonoidów. Spośród badanych izolowanych związków najwyższą aktywnością charakteryzowała się rutyna (56,2%) [10]. W innym badaniu aktywność przeciwutleniającą ekstraktów *E. campestre* analizowano różnymi technikami. Z zastosowaniem metody DPPH ekstrakt etanolowy z korzeni mikołajka wykazywał wyższą aktywność ($IC_{50} = 0,70$ mg/L) niż ekstrakt z nadziemnej części rośliny ($IC_{50} = 1,14$ mg/mL). Aktywność obu ekstraktów nieznacznie różniła się w teście hamowania produkcji rodnika hydroksylowego w układzie dezoksyrybozy, zwanym testem TBARS (część nadziemna 50%, korzenie 44%). Ponadto oba ekstrakty etanolowe wykazywały niską aktywność w teście oksydacyjnego rozkładu β -karotenu i hamowaniu peroksydacji lipidów (test TBA) [11]. W innym badaniu właściwości przeciwutleniające różnych ekstraktów (ekstrahenty – butanol, woda i octan etylu) zarówno z korzeni, jak i nadziemnych części *E. campestre* zostały ocenione przy użyciu metody DPPH i w układzie β -karoten/kwas linolowy. Ekstrakt butanolowy z części nadziemnych wykazał najniższą wartość IC_{50} (16,140 μ g/mL), czyli najwyższą aktywność. Wodny ekstrakt z korzeni wykazał najwyższe hamowanie utleniania (89,78%) [12]. Z kolei aktywność antyoksydacyjną olejku eterycznego, bogatego w germakren D, wyizolowanego z części nadziemnej *E. campestre* określano metodami DPPH, FRAP, ABTS. Metoda FRAP wykazała, że olejek eteryczny posiadał umiarkowaną zdolność redukowania jonów żelaza [wartość stężenia antyoksydacyjnego w przeliczeniu na Trolox – TEAC = $61,2 \pm 2,3$ μ M TE/g]. Nie zaobserwowano aktywności antyoksydacyjnej olejku w stężeniu 1 mg/mL w dwóch pozostałych testach [13].

Natomiast ekstrakt butanolowy z korzenia *E. maritimum* był najbardziej aktywny w teście DPPH z wartością IC_{50} wynoszącą $0,0818 \pm 0,0048$ mg/mL oraz w metodzie oznaczania zdolności redukowania jonów

żelaza (FRAP) z $IC_{50} = 0,1113 \pm 0,0112$ mg/mL [14]. Z kolei inni autorzy zastosowali test oksydazy ksantynowej i DPPH do oceny działania przeciwutleniającego ekstraktów z części nadziemnej *E. maritimum*. Wyniki dwóch różnych technik przeciwutleniających dowiodły, że wodne ekstrakty wykazywały najlepszą odpowiedź w teście DPPH (> 70%), podczas gdy ekstrakty etanolowe w teście oksydazy ksantynowej [15].

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów metanolowych z części nadziemnej i korzeni *E. palmatum* przy zastosowaniu metod DPPH i rodnika hydroksylowego nie była znacząca ($0,6 \pm 0,00$ mg/mL i $0,5 \pm 0,00$ mg/mL, $0,6 \pm 0,00$ mg/mL i $0,3 \pm 0,00$ mg/mL, odpowiednio) w porównaniu z kontrolą - rutyną (odpowiednio $0,0006$ mg/mL i $0,002 \pm 0,0$ mg/mL) [16].

Aktywność przeciwutleniającą ekstraktu z liści *E. bornmuelleri* określono z wykorzystaniem metod oznaczania zdolności redukcji jonów żelaza (FRAP) i absorpcji rodników tlenowych (ORAC). Ekstrakt etanolowy najlepiej wychwytywał rodniki nadtlenowe (ORAC - $4415,9 \pm 177,1$ μ mol ekwiwalentu Trolox/g suchej masy), słabiej działały, w kolejności, ekstrakty acetonowy i wodny. Ekstrakty etanolowe i acetonowe były najbardziej aktywne w teście całkowitej zdolności redukcyjnej (odpowiednio wartości FRAP $890,2 \pm 41,6$ i $909,1 \pm 37,5$ μ mol Fe^{2+} /g suchej masy) [17].

Zdolność antyoksydacyjna ekstraktu metanolowego (80%) z liści *E. foetidum* zbadana została w testach DPPH, FRAP i TBARS. Wykazana aktywność była niska we wszystkich analizach [18]. Zdolność do usuwania wolnych rodników olejków eterycznych uzyskanych z organów *E. foetidum* określono za pomocą testów DPPH i FRAP. Wartości IC_{50} dla olejków z liści, łodyg i korzeni wynosiły odpowiednio 56 μ g/mL, 46 μ g/mL i $54,5$ μ g/mL, w teście DPPH, podczas gdy olejek z liści wykazywał najwyższy potencjał redukujący wśród testowanych olejków w teście FRAP [19].

Testy DPPH, aktywności wychwytywania rodnika nadtlenku wodoru (test H_2O_2) i zdolności chelatującej jonów żelaza (test ferrozyny) zastosowano do oceny

aktywności przeciwutleniającej *E. creticum* [20,21]. Ponadto zastosowano metodę z kationorodnikiem ABTS ((z wykorzystaniem odczynnika 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)) [20]. Wyniki wykazały znaczną aktywność antyoksydacyjną zarówno ekstraktów wodnych, jak i etanolowych [20,21]. W teście DPPH wyciągi etanolowe z liści i łodyg miały wyższą aktywność przeciwutleniającą niż ekstrakty wodne. Liście posiadały wyższą aktywność wychwytywania wolnych rodników niż łodygi [21]. Ekstrakty zarówno z liści, jak i z łodyg oraz z wodnych i etanolowych ekstraktów *E. creticum* były zdolne do usuwania H_2O_2 w sposób zależny od stężenia [20,21].

W innym badaniu aktywność przeciwutleniająca olejku eterycznego z *E. triquetrum* została wykazana w teście zdolności zmiatania rodnika DPPH. Wartość IC_{50} wynosiła $28,68$ μ g/mL [22].

Podsumowanie

Zastosowano szereg metod badania właściwości antyoksydacyjnych, głównie ekstraktów, ale także olejków eterycznych i izolowanych związków z różnych gatunków mikołajków. Badania te wykazały różną aktywność badanych próbek, jednakże ze względu na brak standaryzacji i warianty metod różniące się warunkami przeprowadzania analiz, porównanie wyników często nie jest możliwe.

Konflikt interesów / Conflict of interest
Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address

✉ Małgorzata Kikowska

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej
i Biotechnologii Roślin

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

ul. Św. Marii Magdaleny 14; 61-861 Poznań

☎ (+48 61) 668 78 50

✉ kikowska@ump.edu.pl

Piśmiennictwo/References

1. Koss-Mikołajczyk I, Baranowska M, Namieśnik J i wsp. Metody oznaczania właściwości przeciwutleniających fitozwiązków w systemach komórkowych z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji/luminescencji. Post Hig Med Dosw. (online), 2017;71:602-17.
2. Apak R. Current Issues in Antioxidant Measurement. J Agric Food Chem. 2019;67(33):9187-202.
3. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Arch Toxicol. 2020;94:651-715.

4. Cybul M, Nowak R. Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. *Herba Pol.* 2008;54(1):68-78.
5. Erdem SA, Nabavi SF, Orhan IE, et al. Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *DARU* 2015;23:1-22.
6. Wang P, Su Z, Yuan W, et al. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharm Crops.* 2012;3:99-120.
7. Kikowska M, Thiem B. *In Vitro* Systems of Selected *Eryngium* Species (*E. planum*, *E. campestre*, *E. maritimum*, and *E. alpinum*) for Studying Production of Desired Secondary Metabolites (Phenolic Acids, Flavonoids, Triterpenoid Saponins, and Essential Oil). W: Kishan Gopal Ramawat, Halina Maria Ekiert, Shaily Goyal. *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites. Fundamentals and applications.* Cham: Springer, 2020. pp.1-33.
8. Wojtanowski K, Skalicka-Woźniak K, Widelski J, et al. Free radical scavenging properties and antioxidant activity of polar extracts from fruits of *Eryngium planum* and *Eryngium amethystinum*. *Pharm Rep.* 2013;65:101-2.
9. Paun G, Neagu E, Albu C, et al. Inhibitory potential of some Romanian medicinal plants against enzymes linked to neurodegenerative diseases and their antioxidant activity. *Pharmacogn Mag.* 2015;11(1):S110-6.
10. Hawas UW, El-Kassem LAT, Award H, et al. Anti-Alzheimer, antioxidant activities and flavonol glycosides of *Eryngium campestre*. *L. Curr Chem Biol.* 2013;7(2):188-95(8).
11. Nebija F, Stefkov G, Karapandzova M, et al. Chemical characterization and antioxidant activity of *Eryngium campestre* L., Apiaceae from Kosovo. *Maced Pharm Bull.* 2009;55(1,2):22-32.
12. Bouzidi S, Benkiki N, Hachemi M, et al. Investigation of *in vitro* antioxidant activity and *in vivo* antipyretic and anti-inflammatory activities of Algerian *Eryngium campestre* L. *Curr Bioact Comp* 2017;13:340-6.
13. Cianfaglione K, Blomme EE, Quassinti L, et al. Cytotoxic essential oils from *Eryngium campestre* and *Eryngium amethystinum* (Apiaceae) growing in Central Italy. *Chem Biodiv.* 2017;14(7).
14. Meot-Duros L, Le Floch G, Magne C. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *J Ethnopharmacol.* 2008;116(2):258-62.
15. Traversier M, Gaslonde T, Lecso M, et al. Comparison of extraction methods for chemical composition, antibacterial, depigmenting and antioxidant activities of *Eryngium maritimum*. *Int J Cosmet Sci.* 2020;42(2):127-35.
16. Marčević MD, Petrović SD, Milenković MT, et al. Composition, antimicrobial and antioxidant activity of the extracts of *Eryngium palmatum* Pančić and Vis. (Apiaceae) *Cent Eur J Biol.* 2014;9(2):149-55.
17. Dalar A, Türker M, Zabarar D, et al. Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Eryngium bornmuelleri* leaf. *Plant Foods Hun Nutr.* 2014;69(1):30-6.
18. Swargiary A, Daimari A, Daimari M, et al. Phytochemicals, antioxidant, and anthelmintic activity of selected traditional wild edible plants of lower Assam. *Indian J Pharmacol.* 2016;48(4):418-23.
19. Thomas PS, Essien EE, Ntuk SJ, et al. *Eryngium foetidum* L. essential oils: chemical composition and antioxidant capacity. *Medicines (Basel).* 2017;4(2):24.
20. Farhan H, Malli F, Rammal H, et al. Phytochemical screening and antioxidant activity of Lebanese *Eryngium creticum* L. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012;2:S1217-20.
21. Dammous M, Farhan H, Rammal H, et al. Chemical composition of Lebanese *Eryngium creticum* L. *Int J Sci.* 2014;3:40-53.
22. Medbouhi A, Merad N, Khadir A, et al. Chemical composition and biological investigations of *Eryngium triquetrum* essential oil from Algeria. *Chem Biodivers.* 2018;15(1).