



STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ
Mgr inż. Michalina Adaszyńska-Skwirzyńska

W ostatnich latach na rynku krajowym pojawiło się wiele nowych odmian lawendy lekarskiej. Odmiany te mogą różnić się składem chemicznym, a w związku z tym właściwościami farmakologicznymi. Pomimo zastosowania surowca (kwiaty) w lecznictwie oraz przemyśle kosmetycznym i spożywczym skład chemiczny różnych odmian i części morfologicznych rośliny jest słabo poznany. Niewiele jest również badań nad ich aktywnością biologiczną. Dodatkowo należy podkreślić, że wiedza na temat fitochemii i wykorzystania ulistnionych łodyg jest bardzo ograniczona, co wynika z faktu, że opisanym surowcem farmakopealnym są wyłącznie kwiaty lawendy (*Lavandule Flos*) rekomendowane do izolacji olejków eterycznych.

W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki badań fitochemicznych nad substancjami biologicznie aktywnymi z lawendy lekarskiej (*Lavandula angustifolia*). W ramach analiz badaniami objęto dwie odmiany Blue River (BR) oraz Ellagance Purple (EP), ich kwiaty (K) i ulistnione łodygi (UL). Rośliny pochodziły z uprawy doświadczalnej Katedry Ogrodnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Jednocześnie wyniki porównano z lawendą lekarską z Zakładu Zielarskiego „Kawon” o nieznanym odmianie (KAW) dostępną na rynku.

Jednym z celów badań było oszacowanie zróżnicowania fitochemicznego następujących grup substancji czynnych: olejków eterycznych (OE), kwasów fenolowych, flawonoidów, garbników, kwasów seskwiterpenowych i biopierwiastków. Wszystkie analizy były przeprowadzone z wykorzystaniem zarówno klasycznych jak i nowoczesnych metod spektroskopowych i chromatograficznych: atomowej spektroskopii absorpcyjnej (AAS), fotometrii płomieniowej (FP), spektroskopii UV/VIS, wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC), ultrasprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (UPLC-ESI/MS/MS) oraz chromatografii gazowej sprzężonej z spektrometrią mas (GC/MS).

Stwierdzono, że skład chemiczny gatunku *L. angustifolia* charakteryzuje się zmiennością w zależności od odmiany i części anatomicznej rośliny. Wyniki analiz potwierdziły istotne statystycznie różnice w zawartości procentowej olejku eterycznego pomiędzy odmianami oraz

kwiatem a ulistnioną łądygą. Ponadto stwierdzono, że w przypadku olejków eterycznych z kwiatów największe istotne różnice wystąpiły w ich zawartości procentowej w badanych odmianach lawendy, mniejsze pomiędzy rokiem 2013 a 2014, w aparacie Derynga uzyskano większą zawartość olejków eterycznych niż w aparacie Clevengera we wszystkich badanych przypadkach.

W wyniku izolacji olejków eterycznych wykazano, że ich najwyższą średnią zawartością charakteryzowały się kwiaty odmiany Ellagance Purple ($1,86 \pm 0,06\%$), natomiast najniższą ulistnione łądygi odmiany Blue River ($0,45 \pm 0,14\%$). Wyniki analizy statystycznej potwierdziły istotne statystycznie różnice w: zawartości procentowej olejków eterycznych; pomiędzy kwiatem a ulistnioną łądygą; rokiem doświadczenia oraz aparatami Derynga i Clevengera. Przy czym typ aparatu destylacyjnego miał najmniejszy wpływ na zawartość procentową olejków eterycznych w porównaniu do pozostałych testowanych czynników. Ponadto wykazano, że typ wykorzystywanego do izolacji aparatu nie miał znaczącego wpływu na skład jakościowy olejku eterycznego.

Wyniki wskazują, że olejki eteryczne z poszczególnych odmian *Lavandula angustifolia* charakteryzują się zawartością tych samych głównych składników (linalolu, octanu linalolu, octanu lawandulolu, borneolu, eukaliptolu, α -terpineolu, octanu geraniolu), jednakże występują różnice w składzie jakościowym w przypadku związków o niewielkim stężeniu, które mogą mieć istotny wpływ na właściwości biologiczne olejku eterycznego. Analizy chromatograficzne (GC/MS) dowiodły, że wyizolowane olejki eteryczne charakteryzowały się odmienną względną zawartością procentową związków, a czasami jakościowym składem chemicznym, w zależności od odmiany, części morfologicznej rośliny oraz roku zbioru.

Większość zidentyfikowanych związków w wszystkich wyizolowanych olejkach eterycznych należy do grupy monoterpenuidów (utlenionych monoterepnów). Analizując dane doświadczalne dla utlenionych monoterepnów stwierdzono, że istnieją istotne różnice pomiędzy odmianami lawendy lekarskiej, rokiem 2012 i 2013. Nie stwierdzono istotnych różnic w przypadku 2012 i 2014 roku oraz dla dwóch typów zastosowanych aparatów destylacyjnych.

Analiza chromatograficzna (HPLC) wykazała, że badane surowce roślinne różnią się zawartością kwasów fenolowych. Stwierdzono obecność i oznaczono zawartość trzech kwasów fenolowych: rozmarynowego, ferulowego i kawowego. Najwyższą zawartością odznaczał się kwas rozmarynowy, którego zawartość wahała się od $1,5 \pm 0,3$ mg/g s.m. w ulistnionych łądygach odmiany Ellagance Purple do $9,7 \pm 0,5$ mg/g s.m. w kwiatach lawendy pochodzenia handlowego.

Badane zioła różniły się również zawartością flawonoidów. Analiza spektrofotometryczna (UV-VIS) wykazała, że całkowita zawartość flawonoidów w kwiatach waha się od $86,0 \pm 2,0$ mg/100 g w odmianie Ellagance Purple do $108,0 \pm 20,0$ mg/100 g w lawendzie handlowej. Ulistnione łodygi zawierały flawonoidy od $341,0 \pm 27,0$ mg/100 g w odmianie Ellagance Purple do $352,0 \pm 31,0$ mg/100 g w odmianie Blue River. Należy zwrócić uwagę, że ulistnione łodygi zawierały aż 3-krotnie więcej flawonoidów, niż kwiaty. Oznaczenie ilościowe UPLC w oparciu o metodę wzorca zewnętrznego pozwala stwierdzić, że w badanym materiale roślinnym zidentyfikowano następujące flawonoidy: apigeninę, glukozyd apigeniny, glukurono-glukozyd apigeniny, diglukuronid apigeniny, glukuronid luteoliny, diglukuronid luteoliny, *p*-kumaroilo-glukurono-diglukozyd luteoliny, *p*-kumaroilo-glukurono-diglukozyd kwercetyny. Badania ilościowe potwierdziły wyższe nagromadzenie flawonoidów w ulistnionych łodygach lawendy.

W przypadku analizy garbników stwierdzono, że część rośliny nie odznacza się wyraźną zależnością. Analiza spektrofotometryczna (UV-VIS) wykazała, że najwyższą zawartością garbników charakteryzował się susz ulistnionych łodyg odmiany Ellagance Purple ($0,48 \pm 0,002\%$), natomiast najniższą susz kwiatów pochodzenia handlowego ($0,15 \pm 0,002\%$).

Analiza chromatograficzna (HPLC) kwasów seskwiterpenowych potwierdziła, że badane surowce zielarskie różnią się pod względem ich zawartości. Wyższą koncentrację kwasów zaobserwowano w próbkach kwiatów. Najwięcej kwasu walerenowego oznaczono w odmianie Ellagance Purple ($1,5 \pm 0,06$ mg/100 g), a najmniej w odmianie Blue River ($0,75 \pm 0,02$ mg/100 g). Natomiast kwiaty tej odmiany charakteryzowały się 10-krotnie wyższą zawartością kwasu acetoksywalerenowego ($65,8 \pm 1,51$ mg/100 g) w porównaniu do odmiany Ellagance Purple ($6,5 \pm 0,18$ mg/100 g), co również zaobserwowano w przypadku ulistnionych łodyg.

W badanym materiale roślinnym oznaczono metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS) oraz fotometrii płomieniowej (FP) zawartość 8 pierwiastków, których koncentracja również różniła się w zależności od odmiany rośliny oraz części morfologicznej.

Badano wydajność różnych technik ekstrakcji ziół. Stwierdzono, że wydajności rosną kolejno dla następujących metod: maceracja < sonifikacja < ekstrakcja w aparacie Soxhleta. Czas trwania ekstrakcji miał wpływ na wydajność. Najniższe wydajności, rzędu 2–3% uzyskano w wyniku dwugodzinnych maceracji oraz maceracji wspomaganą wytrząsaniem, przy czym nie zauważono, aby wytrząsanie miało istotny wpływ na efektywność procesu. Natomiast wszystkie dziesięciogodzinne ekstrakcje w aparacie Soxhleta charakteryzowały się najwyższymi wydajnościami (ok. 16–20%). Nie stwierdzono jednoznacznej zależności pomiędzy wydajnością procesu a rodzajem surowca poddawanego ekstrakcji.

Analiza chromatograficzna (GC/MS) otrzymanych ekstraktów pozwoliła zidentyfikowanie trzech głównych składników chemicznych ekstraktów. W większości przypadków były to kumaryna i herniaryna. Wyjątkiem były ekstrakty z kwiatów otrzymane z wykorzystaniem dwugodzinnej maceracji, zawierające octan linalolu. Nie stwierdzono jednoznacznej zależności pomiędzy wydajnością procesu ekstrakcji i względną zawartością procentową związków a odmianą i częścią morfologiczną surowca poddawanego ekstrakcji.

Dokonano oceny aktywności przeciwutleniającej w odniesieniu do olejków eterycznych z kwiatów lawendy Blue River, Ellagance Purple oraz handlowej. Oznaczono także aktywność odwarów i naparów z kwiatów i ulistnionych łodyg badanych ziół. Do tej oceny wykorzystano metodę spektrofotometryczną ze stabilnym rodnikiem DPPH. Jako kontrolę zastosowano syntetyczny przeciwutleniacz – BHA, dezaktywujący rodnik DPPH na poziomie 99,0%. Olejki eteryczne oraz otrzymane napary i odwary wykazały działanie przeciwutleniające, jednakże ich aktywność była zróżnicowana. Olejki eteryczne i odwary odznaczały się silniejszymi właściwościami przeciwutleniającymi niż napary. Spośród badanych wyciągów z kwiatów najwyższą zdolność do dezaktywacji rodnika DPPH stwierdzono dla olejku eterycznego ($76,6 \pm 0,021\%$) i odwaru ($72,5 \pm 0,001\%$) z kwiatów lawendy handlowej, zawierających 4,5-krotnie więcej kwasów fenolowych niż surowiec o jednej z najniższych zdolności do dezaktywacji rodnika, a zarazem najniższej zawartości tych kwasów (odmiana Blue River). W kwiatach lawendy handlowej oznaczono najwyższą koncentrację kwasu rozmarynowego, którego stężenie może wpływać na aktywność przeciwutleniającą. Najwyższą aktywność przeciwutleniającą wyciągów z ulistnionych łodyg stwierdzono dla odmiany Ellagance Purple (odwar $70,5 \pm 0,005\%$ oraz napar $61,0 \pm 0,004\%$), w której oznaczono najwyższą kumulację takich polifenolowych substancji bioaktywnych jak flawonoidy i garbniki. W opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych, oprócz propozycji samodzielnego zastosowania związków naturalnych wchodzących, m.in. w skład układu obronnego roślin i zwierząt, bierze się pod uwagę ich łączenie z antybiotykami lub antyseptykami. W dostępnej literaturze brak jest doniesień oceniających interakcje pomiędzy olejkami lawendowymi a takimi antybiotykami syntetycznymi jak: gentamycyna i flukonazol. Było to powodem podjęcia badań nad potencjalnym synergizmem leków przeciwdrobnoustrojowych i olejków eterycznych oraz jednego z ich głównych składników – linalolu. Zbadano także oddziaływanie syntetycznych konserwantów (mieszanina parabenów). Oddziaływanie wyizolowanych olejków lawendowych z syntetycznymi antybiotykami gentamycyną i flukonazolem na wybrane szczepy bakterii i grzybów potwierdzono w tych badaniach, co jest nowością.

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej obejmowało ocenę wpływu wyizolowanych olejków eterycznych z kwiatów Blue River, Ellagance Purple i lawendy handlowej oraz ulistnionych łądyg Blue River i Ellagance Purple na komórki wzorcowych szczepów bakterii: Gram-dodatnich (*S. aureus*), Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*) oraz na komórki drożdżoidalnego grzyba (*C. albicans*). Ponadto przeprowadzono ocenę aktywności olejków na kliniczne, metycylinooporne szczepy *S. aureus*. W pierwszym etapie badań oznaczono wartości najmniejszych stężeń olejków eterycznych, linalolu i parabenów hamujących wzrost mikroorganizmów (MIC) metodą rozcieńczeń, następnie zbadano ich oddziaływanie z antybiotykami metodą szachownicy (*checkerboard*) i wyliczono współczynnik FIC (*fractional inhibitory concentration*).

Spośród wyizolowanych OE najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową stwierdzono dla olejku z kwiatów odmiany Blue River. Olejek ten był najbardziej aktywny wobec szczepu *S. aureus* wykazującego lekooporność. Jego właściwości przeciwdrobnoustrojowe mogą być związane z składem jakościowym, tzn. zawartością α -santalenu – związku o właściwościach przeciwbakteryjnych, który nie występował w pozostałych olejkach kwiatowych. Składnik ten występował także w składzie olejków eterycznych z ulistnionych łądyg, w których oznaczono niskie stężenie linalolu. Należy podkreślić, że linalol do tej pory, uważany był za składnik warunkujący działanie przeciwdrobnoustrojowe olejków lawendowych.

Przeprowadzone badania potwierdziły przypuszczenia o istnieniu synergizmu (Σ FIC 0,076–0,403) pomiędzy wyizolowanymi olejkami eterycznymi a gentamycyną i flukonazolem (w stosunku do *S. aureus* oraz *C. albicans*), co stanowi cenny wniosek odnoszący się do dalszych badań *in vivo*, uzasadniający słuszność stosowania połączeń substancji naturalnych z syntetycznymi. Należy podkreślić, że w żadnym połączeniu olejków, linalolu i parabenów z antybiotykami nie odnotowano antagonizmu.

Podjęto również próby zastosowania wybranych olejków eterycznych do konserwacji emulsji oraz maści kosmetycznych. Stwierdzono, że olejek eteryczny z kwiatów odmiany Blue River zastosowany w stężeniu 2% (v/v) do konserwacji emulsji kosmetycznych oraz olejek eteryczny z kwiatów odmiany Ellagance Purple w stężeniu 0,5% (v/v) wykorzystany do konserwacji maści mogą stanowić alternatywę dla syntetycznych konserwantów w celu zabezpieczenia czystości mikrobiologicznej receptur.

Praca ma charakter interdyscyplinarny – przede wszystkim posiada wartość praktyczną ujmującą aplikacyjny charakter badań, który może się przyczynić do poprawy bezpieczeństwa produktów kosmetycznych i leków. Uzyskane wyniki dostarczają też danych, które mogą być wykorzystane do opracowania monografii. Otrzymane wyniki badań wskazują na możliwości

nowych kierunków wykorzystania roślinnych substancji biologicznie aktywnych i stanowią znaczący wkład w rozwój technologii kosmetyków i leków.

Michalina Adaszyńska-Skwinyńska