



Otrzymano: 30 marca 2016  
Zaakceptowano: 19 maja 2016  
Udostępniono online: 30 maja 2016

## Zmiany wybranych właściwości antyoksydacyjnych soku z ziela nagietka lekarskiego (*Calendula officinalis* L.) pod wpływem napropamidu

### Changes of antioxidant properties in juice from marigold (*Calendula officinalis* L.) due to napropamid

Arkadiusz TELESIŃSKI,\* Mirosław ONYSZKO, Jacek WRÓBEL, Barbara MARSKA

Katedra Fizjologii Roślin i Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, 71-434 Szczecin, Słowackiego 17, Polska

**Streszczenie:** Praca przedstawia wyniki badań nad wpływem herbicydu napropamid na wybrane właściwości antyoksydacyjne soku z ziela nagietka lekarskiego. Doświadczenie polowe założono w układzie bloków losowanych w czterech powtórzeniach. Przed rozpoczęciem doświadczenia zastosowano dogłębowo herbicyd Devrinol 450 SC (substancja aktywna napropamid  $450 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) w ilościach: połowa dawki polowej (0.5 DP), dawka polowa (1 DP) i dwukrotność dawki polowej (2 DP). Punktem odniesienia były rośliny nagietka rosnące w glebie, na której nie zastosowano herbicydu. Ziele zebrano w okresie kwitnienia roślin. Za pomocą sokowirówki sporządzono z ziela sok, który następnie do analiz rozcieńczono wodą dejonizowaną w stosunku 1:10 (v/v). W rozcieńczonym soku z nagietka lekarskiego oznaczono spektrofotometrycznie: zawartość polifenoli ogółem, flawonoidów ogółem, karotenoidów ogółem, a także aktywność antyoksydacyjną oraz pojemność antyoksydacyjną. Po zastosowaniu napropamidu w ilości równej połowie dawki polowej, nie stwierdzono w większości przypadków istotnych zmian oznaczanych parametrów w soku z nagietka lekarskiego. Dawka polowa oraz dwukrotnie większa napropamidu wywołały obniżenie wszystkich oznaczanych parametrów przeciwutleniających soku z nagietka lekarskiego. Szczególnie istotną zmianę zawartości stwierdzono w zawartości flawonoidów ogółem.

**Słowa kluczowe:** nagietek lekarski; flawonoidy; polifenole; karotenoidy; aktywność antyoksydacyjna

**Abstract:** The paper presents results of experiment on the effects of the herbicide napropamide on some antioxidant properties of the juice from the herb marigold. The field experiment was carried out in a randomized block design with four replications. Before the experiment herbicide Devrinol 450 SC (active substance napropamide  $450 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) was applied to the soil in doses: half the field dose (0.5 DP), the field dose (1 DP) and twofold higher than field dose (2 DP). Marigold plants growing in the soil without herbicide were the reference. Herb was collected during the flowering, the juice was prepared and diluted with deionized water 1:10 (v/v). In the diluted juice of marigold total polyphenol contents, total flavonoid contents, total carotenoids contents, antioxidant activity and antioxidant capacity were determined. After application of napropamide in amount of half field dose significant changes measured parameters was not observed. Field dosage and twofold higher dosage of herbicide caused decrease all parameters, especially total flavonoid contents.

**Keywords:** marigold; flavonoids; polyphenols; carotenoids; antioxidant activity

#### 1. Wstęp

Od kilkunastu lat zauważalny jest malejący w zastraszającym tempie asortyment środków ochrony roślin, szczególnie herbicydów dopuszczonych do stosowania w Polsce w uprawach roślin zielarskich. Jednym spośród siedmiu aktualnie stosowanych herbicydów jest Devrinol 450 SC, zawierający jako substancję aktywną napropamid. Herbicyd ten stosowany jest przy kontroli zachwaszczenia w uprawie następujących ziół: dziurawiec zwyczajny, jeżówka purpurowa, kozłek lekarski oraz nagietek lekarski.

Napropamid (N,N-dietyl-2-(1-naftalenyloksy)-propanoamid) jest stosunkowo łatwo rozpuszczalną w wodzie substancją szeroko stosowaną do ograniczenia wzrostu traw i innych chwastów, zwłaszcza jednoliściennych [1]. Pulgarin

i Bermejo [2], podają, że dawka śmiertelna (LD50) u myszy przy podaniu doustnym jest mniejsza niż  $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , a przy podaniu dootrzewnowym lub podskórnym poniżej  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Czas połowicznego zaniku napropamidu w glebie wynosi około 70 dni. Ponadto herbicyd ten może w znacznych ilościach akumulować się w roślinach uprawnych [3].

Ponieważ zielarskie normy surowcowe są dosyć restrykcyjne, dlatego ważne jest poznanie wpływu stosowanych herbicydów na zawartość najważniejszych substancji czynnych w pozyskanym surowcu. Coraz częściej pojawiają się doniesienia o wykorzystaniu w fitoterapii soku z nagietka [4].

Działanie lecznicze surowców z nagietka jest częściowo związane z antyoksydacyjnymi właściwościami niektórych jego składników. Telesiński i in. [5], badając sok z różnych surowców zielarskich nagietka lekarskiego, wykazali, że największymi właściwościami przeciwutleniającymi odznaczał się sok z kwiatów oraz ziela. Do naturalnych antyoksydantów występujących w surowcach zielarskich zaliczamy między

\* Autor korespondencyjny.  
Adres e-mail: [arkadiusz.telesinski@zut.edu.pl](mailto:arkadiusz.telesinski@zut.edu.pl) (A. Telesiński).

innymi witaminę E, kwas askorbinowy, flawonoidy oraz polifenole, karotenoidy. Antyoksydanty roślinne wpływają na zahamowanie aktywności enzymów odpowiedzialnych za powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT) – oksydazy ksantynowej, oksydazy NADPH, czy mieloperoksydazy [6]. Prawdopodobnie pełnią one m.in. rolę donorów elektronów dla tych enzymów [7]. Antyoksydanty mają też zdolność chelatowania metali katalizujących reakcje powstawania RFT, w tym jonów miedzi i żelaza. Oprócz zapobiegania tworzeniu rodników tlenowych, związki roślinne mogą także wiązać i inaktywować już powstałe rodniki [8].

Celem podjętych badań było określenie wpływu napropamidu na właściwości antyoksydacyjne soku z nagietka lekarskiego.

## 2. Część eksperymentalna

Materiał do badań stanowiło ziele nagietka lekarskiego (*Calendula officinalis* L.) zebrane w trakcie dwuletniego doświadczenia polowego założonego w miejscowości Uniemino w województwie zachodniopomorskim. Doświadczenie polowe założono w układzie bloków losowanych w czterech powtórzeniach. Powierzchnia jednego poletka wynosiła 1.44 m<sup>2</sup> (1.2 m × 1.2 m). Poletka przed założeniem doświadczenia przygotowano zgodnie z wymogami agrotechniki przy uprawie nagietka lekarskiego. Gleba, na której przeprowadzono doświadczenie, charakteryzuje się składem granulometrycznym gliny piaszczysto-ilastej, a zawartość w niej C<sub>org</sub> wynosi 12.08 g·kg<sup>-1</sup>. Również przed rozpoczęciem doświadczenia zastosowano dogłębowo herbicyd Devrinol 450 SC (substancja aktywna napropamid 450 g·dm<sup>-3</sup>) w ilościach: połowa dawki polowej (0.5 DP), dawka polowa (1 DP) i dwukrotność dawki polowej (2 DP). Punktem odniesienia były rośliny nagietka rosnące w glebie, na której nie zastosowano herbicydu. Każdego roku badań doświadczenie założono 2 maja. Rok 2013 charakteryzował się wyższą średnią miesięczną temperaturą oraz większą sumą opadów, co spowodowało, że w roku 2013 kwitnienie nagietka lekarskiego nastąpiło po 74 dniach, a w roku 2014 po 88 dniach od wysiewu nasion.

Ziele zebrano w okresie kwitnienia roślin w następujących terminach: 15 lipca 2013 r. oraz 26 lipca 2014 r. Po zbiorze, za pomocą sokowirówki sporządzono z ziele sok, który następnie do analiz rozcieńczono wodą dejonizowaną w stosunku 1:10 (v/v).

W rozcieńczonym soku z nagietka lekarskiego oznaczono spektrofotometrycznie: zawartość polifenoli ogółem (Pfe) z odczynnikiem Folina-Ciocalteu, flawonoidów ogółem (Flav) z AlCl<sub>3</sub>, a także aktywność antyoksydacyjną (AA), polegającą na zmiataniu rodnika DPPH [12] oraz pojemność antyoksydacyjną (TAEC) z rodnikiem ABTS<sup>•+</sup> [13]. Oznaczono również zawartość karotenoidów ogółem (Car). Karotenoidy ekstrahowano z soku 80% roztworem acetonu i dokonano pomiaru absorbancji ekstraktów przy dwóch długościach fali: 440 nm i 663 nm. Otrzymane wyniki podstawiono do wzorów podanych w metodyce [14]. Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem spektrofotometru UV-1800 firmy Shimadzu.

Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz komplementarnie porównano testem post-hoc Tukey HSD, wykorzystując oprogramowanie Statistica 10.0. Przyjęty poziom istotności wynosił  $p < 0.05$ . Obliczono również współczynniki korelacji liniowej Pearsona pomiędzy oznaczanymi parametrami na dwóch poziomach istotności:  $p < 0.05$  oraz  $p < 0.01$ .

## 3. Wyniki i dyskusja

Zastosowanie napropamidu, zawartego w preparacie Devrinol 450 SC, spowodowało w większości przypadków istotne zmiany oznaczanych parametrów antyoksydacyjnych w soku z nagietka lekarskiego (Tabela 1 i 2), z tendencją malejącą w stosunku do roślin kontrolnych.

Zawartość flawonoidów ogółem oraz karotenoidów była największa w soku z nagietka lekarskiego, rosnącego w glebie bez dodatku herbicydu (obiekt kontrolny) w roku 2013 (odpowiednio 28.99 mg kwercetyny·dm<sup>-3</sup> oraz 24.16 mg·dm<sup>-3</sup>). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w koncentracji polifenoli ogółem w obiekcie kontrolnym, pomiędzy rokiem 2013 i 2014 (odpowiednio 52.65 i 52.80 mg kwasu galusowego·dm<sup>-3</sup>).

Zastosowanie napropamidu w ilości 0.5 DP nie spowodowało istotnych zmian zawartości polifenoli ogółem w soku z nagietka lekarskiego w obu latach trwania doświadczenia. W przypadku flawonoidów ogółem aplikacja herbicydu w ilości 0.5 DP wywołała w roku 2013 istotne statystycznie obniżenie (o 27%), a w roku 2014 – podwyższenie (o 34%) koncentracji tych związków. Natomiast zawartość karotenoidów ogółem jedynie w roku 2013 uległa statystycznie istotnemu obniżeniu

**Tabela 1.** Zawartość niskocząsteczkowych antyutleniaczy w soku z nagietka po zastosowaniu herbicydu Devrinol 450 SC.

| Rok  | Wielokrotność dawki polowej herbicydu Devrinol 450 SC | Karotenoidy ogółem (Car) mg·dm <sup>-3</sup> | Flawonoidy ogółem (Flav) mg kwercetyny·dm <sup>-3</sup> | Polifenole ogółem (Phe) mg kwasu galusowego·dm <sup>-3</sup> |
|------|---|--|---|--|
| 2013 | 0 (kontrola)  | 24.16 ± 0.49 <sup>a</sup>                    | 28.99 ± 0.90 <sup>a</sup>                               | 52.65 ± 5.87 <sup>a</sup>                                    |
|      | 0.5   | 20.04 ± 0.38 <sup>d,e</sup>                  | 21.13 ± 0.79 <sup>b</sup>                               | 49.17 ± 5.40 <sup>a,b</sup>                                  |
|      | 1   | 19.74 ± 0.47 <sup>f</sup>                    | 9.13 ± 1.14 <sup>d</sup>                                | 39.49 ± 2.82 <sup>c,d</sup>                                  |
|      | 2   | 17.90 ± 0.29 <sup>g</sup>                    | 8.32 ± 0.39 <sup>d</sup>                                | 30.09 ± 3.26 <sup>d</sup>                                    |
| 2014 | 0 (kontrola)  | 22.25 ± 0.18 <sup>b</sup>                    | 15.76 ± 1.44 <sup>c</sup>                               | 52.80 ± 4.01 <sup>a</sup>                                    |
|      | 0.5   | 21.36 ± 0.71 <sup>b,c</sup>                  | 21.13 ± 0.79 <sup>b</sup>                               | 53.33 ± 1.47 <sup>a</sup>                                    |
|      | 1   | 20.59 ± 0.50 <sup>c,d</sup>                  | 11.83 ± 1.25 <sup>d</sup>                               | 46.56 ± 1.58 <sup>a,b,c</sup>                                |
|      | 2   | 19.14 ± 0.09 <sup>f</sup>                    | 8.20 ± 0.93 <sup>d</sup>                                | 40.99 ± 1.11 <sup>b,c</sup>                                  |

Wyniki podane jako średnia ± odchylenie standardowe; wartości średnie oznaczone takimi samymi literami w obrębie kolumn nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności  $p < 0.05$ .

**Tabela 2.** Właściwości antyoksydacyjne soku z nagietka po zastosowaniu herbicydu Devrinol 450 SC.

| Rok  | Wielokrotność dawki polowej herbicydu Devrinol 450 SC | Aktywność antyoksydacyjna (AA) % DPPH | Pojemność antyoksydacyjna (TAEC) mmol Trolox·dm <sup>-3</sup> |
|------|---|---------------------------------------|---|
| 2013 | 0 (kontrola)  | 16.16 ±0.88 <sup>a,b</sup>            | 5.72 ±0.60 <sup>a</sup>                                       |
|      | 0.5   | 17.22 ±0.40 <sup>a</sup>              | 5.85 ±0.45 <sup>a</sup>                                       |
|      | 1   | 13.99 ±1.20 <sup>c,d</sup>            | 4.26 ±0.25 <sup>b,c</sup>                                     |
|      | 2   | 8.59 ±0.32 <sup>f</sup>               | 2.72 ±0.13 <sup>d</sup>                                       |
| 2014 | 0 (kontrola)  | 15.24 ±0.40 <sup>a,b,c</sup>          | 5.57 ±0.52 <sup>a</sup>                                       |
|      | 0.5   | 14.59 ±0.16 <sup>b,c</sup>            | 5.02 ±0.15 <sup>a,b</sup>                                     |
|      | 1   | 12.21 ±1.19 <sup>d,e</sup>            | 3.91 ±0.13 <sup>c</sup>                                       |
|      | 2   | 10.89 ±0.52 <sup>e</sup>              | 3.37 ±0.42 <sup>c,d</sup>                                     |

Wyniki podane jako średnia ± odchylenie standardowe; wartości średnie oznaczone takimi samymi literami w obrębie kolumn nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności  $p < 0.05$ .

(o 17%).

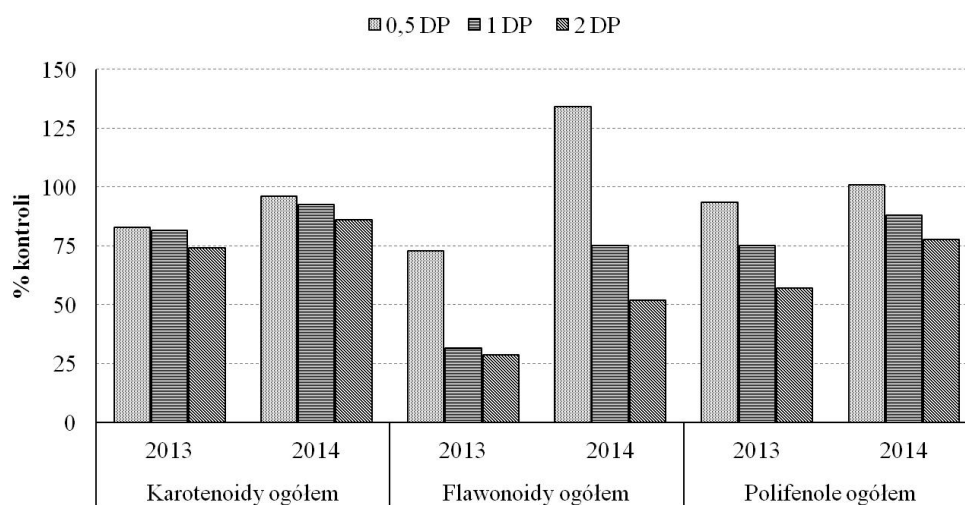
Po zastosowaniu napropamidu w dawce polowej (1 DP) oraz dwukrotnie większej (2 DP) stwierdzono istotnie statystyczny spadek zawartości oznaczanych niskocząsteczkowych antyutleniaczy, pogłębiający się wraz ze wzrostem dawki herbicydu. Największy wpływ napropamidu odnotowano w przypadku flawonoidów ogółem – przy ilości 2 DP wykazane obniżenie koncentracji tych związków wynosiło w próbkach roślin pobranych w roku 2013 – 71%, a w roku 2014 – 48% (Rysunek 1). Negatywny wpływ napropamidu na zawartość karotenoidów oraz innych barwników asymilacyjnych w roślinach śliwy domowej wykazali również Nacheva i in. [9]. Spadek zawartości oznaczanych substancji przeciwutleniających może wynikać z mechanizmu działania napropamidu. Związek ten hamuje syntezę białek roślinnych, przez co zaburza proces mitozy oraz indukuje produkcję  $O_2^{\cdot-}$  i  $H_2O_2$ , powodując występowanie stresu oksydacyjnego w komórkach roślinnych [10].

Przeciwutleniające związki niskocząsteczkowe odpowiadają za potencjał antyoksydacyjny surowców roślinnych, dlatego też analizując zmiany aktywności oraz pojemności antyoksydacyjnej stwierdzono podobne tendencje, jak w przypadku polifenoli ogółem, flawonoidów ogółem i karotenoidów ogółem. Aktywność antyoksydacyjna obiektu kontrolnego wynosi-

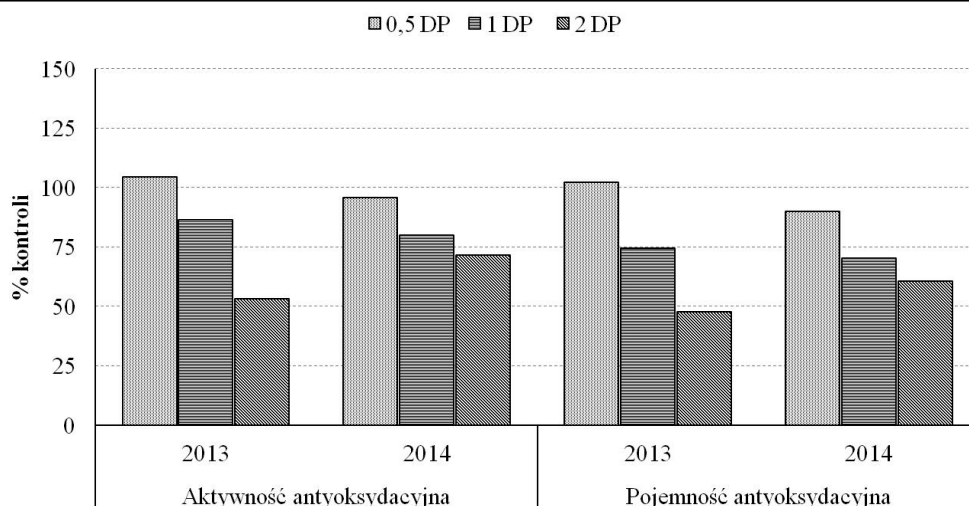
ła w kolejnych latach doświadczenia 16.16 i 15.24% DPPH, a pojemność antyoksydacyjna – 2.72 i 5.57 mmol Trolox·dm<sup>-3</sup>. Istotne obniżenie tych parametrów wystąpiło po aplikacji napropamidu dla roślin, gdzie stosowano dawkę 1 i 2 krotną. Zaobserwowane obniżenie aktywności antyoksydacyjnej dla roślin pobranych w roku 2013 i 2014 wynosiło 13 i 20% dla 1 DP oraz 47 i 29% dla 2 DP. Natomiast pojemność antyoksydacyjna zmniejszyła się odpowiednio o 26 i 30% dla 1 DP oraz 53 i 40% dla 2 DP (Rysunek 2).

W dostępnych danych literaturowych niewiele jest doniesień o wpływie środków ochrony roślin na właściwości antyoksydacyjne surowców zielarskich. Ciołek i Makarska [11], badając wpływ chemicznej ochrony na aktywność antyoksydacyjną polifenoli i frakcji tokoferoli ziarniaków pszenicy twardej wykazały, że aktywność antyutleniająca ekstraktów polifenoli zależała od: czasu trwania reakcji oraz poziomu i rodzaju środków ochrony chemicznej użytych w doświadczeniu. Zastosowane pestycydy nie wpływały na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów tokoferoli z badanych pszenic.

Na podstawie obliczonych współczynników korelacji liniowej Pearsona stwierdzono istotną dodatnią zależność pomiędzy oznaczanymi parametrami antyoksydacyjnymi na poziomie  $p < 0.05$  (Tabela 3). Ponadto pomiędzy zawartością poli-



**Rysunek 1.** Procentowe zmiany niskocząsteczkowych antyutleniaczy w soku z nagietka po zastosowaniu herbicydu Devrinol 450 SC.



**Rysunek 2.** Procentowe zmiany właściwości antyoksydacyjnych soku z zieleńki po zastosowaniu herbicydu Devrinol 450 SC.

**Tabela 3.** Współczynniki korelacji liniowej Pearsona pomiędzy parametrami antyoksydacyjnymi soku z zieleńki po zastosowaniu herbicydu Devrinol 450 SC.

| Parametr | Pfe | Flav | Car  | AA   | TAEC |
|----------|-----|------|------|------|------|
| Pfe      | –   | 0.78 | 0.85 | 0.83 | 0.87 |
| Flav     | *   | –    | 0.82 | 0.79 | 0.84 |
| Car      | **  | *    | –    | 0.71 | 0.78 |
| AA       | *   | *    | *    | –    | 0.98 |
| TAEC     | **  | *    | *    | **   | –    |

\* Istotne statystycznie przy  $p < 0.05$ . \*\* Istotne statystycznie przy  $p < 0.01$ .

fenoli ogółem, zawartością karotenoidów ogółem oraz aktywnością antyoksydacyjną, a pojemnością antyoksydacyjną współczynniki korelacji były wysoce istotne statystycznie ( $p < 0.01$ ). Telesiński i in. [5], wykazali, że pojemność antyoksydacyjna oraz aktywność antyoksydacyjna soku otrzymanego z surowców pozyskanych z zieleńki lekarskiego, uprawianego bez środków ochrony roślin, w największym stopniu zależała od zawartości flawonoidów. Ciołek i Makarska [11] nie stwierdziły natomiast w ekstraktach z ziemiaków pszenicy twardej, istotnej zależności pomiędzy zawartością polifenoli oraz aktywnością antyoksydacyjną, po zastosowaniu różnych pestycydów.

#### 4. Podsumowanie

(1) Zastosowanie dogłębne napropamidu spowodowało zmiany zawartości niskocząsteczkowych antyutleniaczy (polifenoli, flawonoidów i karotenoidów) oraz aktywności i pojemności antyoksydacyjnej soku z zieleńki lekarskiego.

(2) Po zastosowaniu napropamidu w ilości równej połowie dawki polowej nie stwierdzono w większości przypadków istotnych zmian oznaczanych parametrów w soku z zieleńki lekarskiego. Ma to duże znaczenie, ze względu na coraz częściej podejmowane próby opracowania technologii stosowania mniejszych dawek herbicydów w rolnictwie i ogrodnictwie.

(3) Dawka polowa oraz dwukrotnie większa napropamidu wywołały obniżenie wszystkich oznaczanych parametrów przeciwutleniających soku z zieleńki lekarskiego. Szczególnie istotną zmianę zawartości stwierdzono w przypadku flawonoidów ogółem.

(4) W soku z zieleńki lekarskiego wystąpiła istotna statystycznie, dodatnia korelacja pomiędzy wszystkimi oznaczanymi właściwościami antyoksydacyjnymi.

#### Literatura

- [1] M. Cycoń, A. Markowicz, Z. Piotrowska-Seget., *Appl. Soil Ecol.*, **2013**, 72, 242–250. doi: 10.1016/j.apsoil.2013.07.015
- [2] J.A.M. Pulgarin, L.F.G. Bermejo, *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 491, 37–45. doi: 10.1016/S0003-2670(03)00802-X
- [3] L.E. Cui, H. Yang, *J. Hazard. Mater.*, **2011**, 190, 81–86. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.02.086
- [4] S.M. Mohammad, H.H. Kashani, *Sci. Res. Essays*, **2012**, 7, 1468–1472. doi: 10.5897/SRE11.630
- [5] A. Telesiński, A. Wieteska, M. Onyszko, M. Okińska, E. Niedźwiecki, *Bromat. Chem. Toksykol.*, **2013**, 46, 428–433.
- [6] R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, C. Giovannini, *J. Nutr. Biochem.*, **2005**, 10, 577–586. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013
- [7] S. Kohnen, T. Franck, P. van Antwerpen, K.Z. Boudjeltia, A. Mouithys-Mickalad, C. Deby, N. Moguilevsky, G. Deby-Dupont, M. Lamy, D. Serteyn, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 8080–8087. doi: 10.1021/jf071741n
- [8] M. Paszkiewicz, A. Budzyńska, B. Różalska, B. Sadowska, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **2012**, 66, 637–646. doi: 10.5604/17322693.1009908
- [9] L. Nacheva, Z. Rankova, P. Gercheva, *Bulg. J. Agric. Sci.*, **2012**, 18, 583–588.
- [10] P.K. Biswas, S.K. Pramanik, S.R. Mitra, A. Bhattacharyya, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2007**, 79, 566–569. doi: 10.1007/s00128-007-9275-7

- [11] A. Ciolek, E. Makarska, *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.*, **2004**, 234, 147–156.
- [12] A. Kumaran, R.J. Karunakaran, *Food Sci. Technol.*, **2007**, 40, 344–352. doi: 10.1016/j.lwt.2005.09.011
- [13] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 26, 1231–1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- [14] A. Hager, T. Mayer-Berthenrath, *Planta*, **1966**, 69, 198–217.