

OCENA ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH ORAZ ZAWARTOŚĆ I SKŁAD OLEJKU ETERYCZNEGO W MELISIE LEKARSKIEJ (*MELISSA OFFICINALIS* L.)

Klaudia Kałwa, Jakub Wyrostek

Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

klaudia.kalwa91@gmail.com

Streszczenie

W niniejszej pracy przeprowadzono badania wykazujące zawartości związków biologicznie czynnych na naparze wykonanym klasyczną ekstrakcją odpowiadającą procesowi parzenia herbat według PN-ISO 3103 z Melisy lekarskiej (*Melissa Officinalis* L.) oraz półilościową i jakościową analizę składu olejku eterycznego pozyskanego z surowca wyjściowego. Przeprowadzono analizę zawartości związków polifenolowych ogółem, w tym flawonoidów oraz oznaczono aktywność antyoksydacyjną metodą redukcji rodnika DPPH. Wykazano, że melisa lekarska wykazuje aktywność przeciwutleniającą wyrażoną jako % inhibicji w wartości 18,24%, ponadto w naparze z badanego zioła odnotowano 21,5 mg GAE/100 ml polifenoli, w tym 15,7 mg/100 ml flawonoidów. Półilościowa i jakościowa analiza olejku eterycznego pozwoliła stwierdzić 0,26 % [V/m] jego zawartości oraz odnotowanie 23 związków obecnych w wyizolowanym oleju. Głównymi składnikami stanowi tlenek kariofilenu (20,63%), geranial (13,94%), neral (10,60%), E-kariofilen (10,12) oraz citronellal (9,28%).

Słowa kluczowe: właściwości antyoksydacyjne, melisa lekarska, olejki eteryczne, polifenole

ASSESSMENT OF THE CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS AND THE CONTENT AND COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL IN MEDICAL MELISE (*MELISSA OFFICINALIS* L.)

Summary

In this work, tests were carried out showing the content of biologically active compounds on a brew made with classical extraction corresponding to the process of brewing infusions according to PN-ISO 3103 from *Melissa Officinalis* and semi-quantitative and

qualitative analysis of the composition of the essential oil obtained from the starting raw material. The total polyphenol compounds, including flavonoids, were analyzed and the antioxidative activity was determined by the reduction of the DPPH radical. It has been shown that lemon balm has antioxidant activity expressed as% inhibition in the value of 18.24%, moreover in the infusion of the test herb 21.5 mg of GAE / 100 ml of polyphenols were observed, including 15.7 mg / 100 ml of flavonoids. Semi-quantitative and qualitative analysis of the essential oil allowed to state 0.26% [V / m] of its content and to record 23 compounds present in the isolated oil. The main components are cariphilene oxide (20.63%), geranial (13.94%), neral (10.60%), E-caryophyllene (10.12) and citronellal (9.28%).

Key words: antioxidant properties, melissa officinalis, essential oils, polyphenols

WPROWADZENIE

Niezwykłe właściwości roślin zielarskich wynikają z obecności w nich związków biologicznie aktywnych, wśród których możemy wyróżnić flawonoidy, antocyjany, garbniki, olejki eteryczne, kwasy organiczne, saponiny, śluzę i inne składniki. Świeże zioła, są źródłem wielu witamin, enzymów, fitoncydów oraz glikozydów [Kazimierzak i in., 2011]. Wiele wyników badań potwierdza, że prawidłowo zbilansowana dieta zasobna w związki polifenolowe, witaminy, tokoferole, fosfolipidy obniża ryzyko wystąpienia nowotworów czy chorób układu krążenia [Czeczot, 2000]. Istnieje bardzo wiele sposobów na wykorzystanie ziół, a także wydobycie z nich korzystnych składników. Jednym z nich jest napar, który definiowany jest jako wodny wyciąg z rozdrobnionego surowca zielarskiego. Głównym zadaniem w przygotowaniu takiego naparu jest wydobycie z zioła substancji biologicznie aktywnych. Sporządza się go z różnych części rośliny, które w łatwy sposób można ekstrahować wodą, np. z liści, kwiatów, ziela, drobnych nasion. Napar z ziół parzy się pod przykryciem zazwyczaj w czasie 10-15 minut [Kozak i in., 2016]. Zioła już od dawna słyną ze swoich unikalnych właściwości. Coraz częściej konsumenci sięgają po herbaty na bazie ziół, czy też produkty spożywcze z ich dodatkiem. Za pozytywne właściwości ziół odpowiedzialne są związki polifenolowe wchodzące w ich skład w dużej ilości. W organizmie człowieka spełniają szereg funkcji m.in. chronią przed niekorzystnym działaniem promieniowania UV, są naturalnymi antyoksydantami, fungicydami i barwnikami [Moraes-de-Souza i in., 2017].

Polifenole to jedne z najliczniejszych metabolitów wtórnych roślin, stanowią największą grupę substancji pochodzenia roślinnego. W roślinie polifenole znajdują się

w kwiatach, owocach, liściach, łodygach, korzeniach czy też w bulwach. Oprócz ziół bogatym źródłem polifenoli w diecie są owoce i warzywa, kawa, herbata czy też wino. Dzięki swoim właściwościom przeciwutleniającym polifenole mają zdolność wychwytywania wolnych rodników, przeciwdziałają peroksydacji lipidów, zmniejszają aktywność enzymów. Oprócz tego wykazują działanie immunomodulacyjne, przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe. Jak wynika z literatury wykazano, że spożycie żywności o znacznej zawartości tych substancji obniża ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia, chorób serca, a także nowotworów [Paszkiwicz, 2012; Mitek i Gasik, 2007]. Jedną z najważniejszych grup, które wchodzi w skład związków polifenolowych są flawonoidy. Flawonoidy zbudowane są z dwóch pierścieni benzenu związanych ze sobą za pomocą heterocyklicznego pierścienia piranu. Flawonoidy ze względu na budowę chemiczną dzielą się na podgrupy: flawony, flawanole, flawanony, flawonole, izoflawony oraz antocyjany. Najczęściej występują w formie stałej, jako barwniki syntetyzowane z fenyloalaniny o barwie żółtej do bezbarwnej. Dzięki swoim właściwościom prozdrowotnym są bardzo popularne w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym. Wykazują działanie przeciwzapalne, przeciwapagacyjne, przeciwmiażdżycowe, moczopędne, antydepresyjne, a co najważniejsze dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym neutralizują wolne rodniki [Nurzyńska-Wiedrak, 2015; Mikołajczuk-Szczyrba i in., 2016].

Kwasy fenolowe tuż po flawonoidach stanowią drugą podstawową grupę związków polifenolowych. W swojej strukturze zawierają grupę hydroksylową i karboksylową. Pod względem budowy chemicznej można je podzielić na kwasy benzoesowe, kwasy fenylooctowe i kwasy cynamonowe. Fenyloalanina i tyrozyna są prekursorem fenolokwasów, z których w wyniku procesu deaminacji powstają pochodne hydroksykwasów i kwas cynamonowy (Gawlik-Dziki, 2004). Do najczęściej występujących hydroksykwasów można zaliczyć: kwas galusowy, kwas wanilinowy, kwas syringowy, kwas β -hydroksybenzoesowy i kwas protokatechowy, natomiast wśród kwasów cynamonowych to: kawowy, ferulowy, p -kumarowy, synapiowy [Parsons, 2017]. Najczęściej fenolokwasy występują w roślinach w formie związanej pod postacią estrów i glikozydów, które wchodzi w skład lignin oraz tanin hydrolizujących. Ich silne właściwości przeciwutleniające zależą od ilości grup hydroksylowych i metoksylowych jakie są przyłączone do pierścienia fenolowego. Do ich głównych funkcji należy: neutralizacja wolnych rodników, chelatowanie jonów metali, a także zmniejszenie aktywności enzymów. Jako związki antyoksydacyjne spowalniają proces kancerogenezy. Wykazują działanie antibakteryjne, antywirusowe, przeciwzapalne,

przeciwgorączkowe, przeciwreumatyczne, przeciwgrzybicze, co więcej wspomagają procesy tworzenia i wydzielania żółci [Mróz i in., 2012].

Olejki eteryczne znalazły szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu spożywczego m.in. jako środki nadające aromat czy przyprawy. Wykorzystywane są także w przemyśle kosmetycznym, a przede wszystkim w przemyśle farmaceutycznym. Z biegiem lat aromaterapia zyskała coraz większe zaufanie i uznanie wśród konsumentów. Olejki eteryczne charakteryzują się obszernym składem chemicznym, różnorodnymi właściwościami leczniczymi co pozwala na ich wykorzystywanie jako środki o działaniu profilaktycznym bądź terapeutycznym [Nurzyńska-Wiedrak, 2015]. Olejki eteryczne to płynne mieszaniny wieloskładnikowe wtórnych metabolitów roślin, które w swoim składzie zawierają średnio od kilkudziesięciu do kilkuset składników mono-, seskwi- i diterpenowych oraz liczne pochodne fenylopropanu. Skład chemiczny olejku to między innymi związki takie jak węglowodory, estry, etery, ketony, aldehydy czy też alkohole. Oprócz nich można także znaleźć niewielkie ilości substancji siarkowych, azotowych, kumaryn, kwasów organicznych, pochodnych acetyleny i innych. Z danych literaturowych wynika, że jak dotąd obecnych w olejkach jest około 2000 związków [Kunicka-Styczyńska, 2016].

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał do badań stanowiła Melisa lekarska (*Melissa Officinalis* L.) producenta „Dary Natury”. Badania zostały przeprowadzone na klasycznych naparach przygotowanych zgodnie z normą PN-ISO 3103. W tym celu do zlewki odważano 2 g surowca, następnie zalewano 100 ml wrzącej wody destylowanej i przykryto szalką Petriego w celu dokonania ekstrakcji w czasie 10 minut. Półilościowa i jakościowa analiza olejku eterycznego została wykonana na materiale wyjściowym.

Polifenole

Zawartość polifenoli oznaczano wg procedury Singleton i Rossi [1965] przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu w stosunku 1:5. Wyniki podano w mg/100 ml naparu w przeliczeniu na kwas galusowy. Pomiary wykonano w trzech powtórzeniach. Do kolby miarowej o pojemności 25 ml pobierano 0,05 ml naparów, dodawano kolejno 2 ml metanolu (cz.d.a., 99,8%), 10 ml wody destylowanej oraz 2 ml odczynnika Folina-Ciocalteu'a (stosunek 1:5). Odstawiono na 3 min. Po tym czasie dodano 1 ml 10% roztworu węglanu sodu Na_2CO_3 , dokładnie wymieszano i pozostawiono na 30 min. po upływie czasu kolby

z próbkami uzupełniono wodą destylowaną do kreski. Absorbancje mierzono przy długości fali 750 nm, wobec próby zerowej.

Flawonoidy

Zawartość flawonoidów w przeliczeniu na epikatechine oznaczano spektrofotometrycznie według procedury opisanej przez Karadeniza i in. [2005]. Do probówek pobrano po 0,5 cm³ naparów, dodano 2,5 cm³ wody destylowanej, 0,15 cm³ 5% (w/w) wodnego roztworu azotanu (III) sodu NaNO₂ i wymieszano. Po upływie 5 minut wprowadzono również 0,3 cm³ 10% (w/w) wodnego roztworu sześciowodnego chlorku glinu AlCl₃·(H₂O)₆, po raz kolejny wymieszano i pozostawiono na 5 minut. Następnie dodawano 2 cm³ 1 M wodnego roztworu wodorotlenku sodu NaOH i 0,55 cm³ wody destylowanej. Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali 510 nm.

DPPH

Aktywność antyoksydacyjną oznaczano według zmodyfikowanej metody Branda-Wiliamsa i in. [1995] [Zych i Krzepińko, 2010] z użyciem syntetycznego rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl, Sigma Aldrich). Absorbancję roztworów mierzono przy długości fali $\lambda = 517$ nm. 0,5 mM alkoholowy roztwór DPPH przygotowano, rozpuszczając 19,71 mg DPPH (M = 394,32 g/mol) w 100 cm³ metanolu (cz.d.a., 99,8%). Otrzymany roztwór rozcieńczono tak, aby jego absorbancja przy długości fali $\lambda = 517$ nm wynosiła ok. 0,9. Roztwór przechowywano w ciemności. W pierwszym etapie doświadczenia zmierzono absorbancję roztworu rodnika DPPH (A_0) Następnie zdolność badanego antyoksydantu do przeciwdziałania reakcji utleniania obliczano ze wzoru (1):

$$\% \text{inhibicji} = 100 \cdot \frac{A_0 - A_{sr}}{A_0} \quad (1)$$

gdzie:

A_0 - absorbancja roztworu rodnika DPPH,

A_{sr} - średnia wartość absorbancji badanego roztworu zawierającego antyoksydant.

Olejki eteryczne

Olejki eteryczne pozyskane z pierwotnego materiału roślinnego poddano chromatograficznej analizie jakościowej i ilościowej (GC-FID, GC-MS). Analizę jakościową przeprowadzono na podstawie porównania indeksów retencji i otrzymanych widm MS dla rozdzielonych składników lotnych z danymi uzyskanymi dla substancji wzorcowych oraz

danymi literaturowymi [Adams 2001, biblioteka widm MS NIST, 2005]. Analizę ilościową przeprowadzono metodą normalizacji wewnętrznej, określając udział poszczególnych składników olejków eterycznych w sumie wszystkich zidentyfikowanych związków lotnych. Procentową zawartość olejku eterycznego oznaczano metodą destylacji z parą wodną w aparacie Derynga zgodnie z Farmakopeą Europejską.

Skład jakościowy i ilościowy olejku eterycznego i wyznaczano metodą GC/MS przy użyciu aparatu firmy Agilent model 6890 z kolumną chromatograficzną HP-5MS o długości 30 m, średnicy 0,25 mm. Grubość filmu fazy stacjonarnej wynosiła 0,25 μm , a stosowanym gazem nośnym był hel. Temperatura dozownika wynosiła 250°C. Stosowano gradient temperatury (60°C przez 3 min, następnie przyrost o 10°C·min⁻¹ do 300°C). Analizę MS prowadzono z zastosowaniem jonizacji elektronowej (70 V) w zakresie mas 35–400 jma.

WYNIKI I DISKUSJA

W tabeli 1 przedstawiono zawartość poszczególnych składników biologicznie aktywnych w naparze sporządzonym z melisy lekarskiej. W przypadku zawartości polifenoli wykazano, że badany napar wskazuje 21,5 mg GAE/100 ml. Atanassova i in. [2011] stwierdzili, że stężenie polifenoli w melisie lekarskiej kształtowało się na poziomie 48,86 mg GAE/100 g suchej masy, co przy założeniu 100% wydajności ekstrakcji wodnej i odniesieniu do zastosowanych w niniejszej pracy warunków doświadczalnych pozwala uzyskać po przeliczeniu dla analogicznego naparu (2 g surowca/100 ml wody) stężenie na poziomie 97,4 mg GAE/100 ml. Z kolei w badaniu przedstawionym przez Fernandes'a i in. [2016] stwierdzono nieco niższą zawartość tych związków dla melisy lekarskiej- 42,86 mg GAE/g suchej masy, co w przeliczeniu na napar wodny stanowi 86,5 mg GAE/100 ml. Rozbieżności w uzyskanych przez wszystkich autorów wyników zawartości związków polifenolowych mogą być związane z wieloma czynnikami, które wpływają na ilość składników biologicznie czynnych w roślinach m.in. sposób uprawy, warunki klimatyczne, odmiana. W przypadku zawartości flawonoidów w naparze z melisy lekarskiej wykazano ich ilość w zakresie 15,7 mg w przeliczeniu na epikatechine. Atanassova i in. [2011] wykazali, że stężenie flawonoidów w melisie lekarskiej wynosi 45,06 mg katechiny/100g suchej masy, co przy założeniu 100% wydajności ekstrakcji wodnej i odniesieniu do zastosowanych w niniejszej pracy warunków doświadczalnych pozwala uzyskać po przeliczeniu dla analogicznego naparu stężenie na poziomie 9,01 mg/100 ml. Natomiast Kazimierczak i in. [2011] w swoim

doświadczeniu wykazali zawartość tych związków na poziomie 42,49 mg/100g suchej masy, co po przeliczeniu dla naparu stanowi 8,49 mg/100ml. Przedstawione dane literaturowe wskazują dużo niższe zawartości flawonoidów niż uzyskane w pracy, co podobnie jak w przypadku zawartości polifenoli może wynikać z cech odmianowych surowca wykorzystanego w badaniach. Inną przyczyną rozbieżności wyników może być również rodzaj zastosowanej do badań wody. Chłopicka i in. [2015] podają, że woda bogata w jony wapnia i magnezu, może wiązać związki polifenolowe tym samym prowadząc do obniżenia stężeń tych związków. Ponadto, Regulska i Samsonowicz [2014] wskazują, że metale mogą tworzyć połączenia kompleksowe ze związkami polifenolowymi, obecnymi w materiale roślinnym, bądź co więcej uaktywniać niektóre grupy funkcyjne przez co mogą zmieniać aktywność przeciwutleniającą naparów. Analizując zdolność do neutralizacji rodnika DPPH wykazano, że napar uzyskany z melisy lekarskiej cechował się niewielką aktywnością (17,24%). Jak podaje Nurzyńska-Wierdak [2013] aktywność przeciwutleniająca surowca melisy zmienia się w przeciągu całego rozwoju roślin, co może być związane ze zmianami zarówno ilościowymi jak i jakościowymi substancji biologicznie czynnych. Dużo więcej związków polifenolowych w tym flawonoidów obecnych jest w liściach. Z kolei, jak podaje Saeb i in. [2011], dużą aktywnością antyoksydacyjną charakteryzują się rośliny w okresie kwitnienia. W przypadku zawartości olejku eterycznego w badanej roślinie stwierdzono, że melisa lekarska zawiera go w ilości 0,26 % [V/m]. Carnat i in. [1998] w swoich badaniach wykazali, że stężenie lotnych związków zapachowych w melisie lekarskiej kształtuje się na poziomie 0,3 %. Jak podaje Nurzyńska-Wierdak [2013] zawartość olejku eterycznego w wysuszonej melisie lekarskiej mieści się w zakresie 0,02-0,30%. Olejki eteryczne u roślin gromadzą się w różnych ich częściach, jednak w niektórych występują w znacznych ilościach. Zarówno ilość jak i jakość olejku melisowego pochodzącego z różnych części rośliny są znacznie zróżnicowane. Najwięcej znajduje się go w liściach (0,14-0,39 %) nieco mniej w wierzchołkach pędów (0,13 %) [Mrljanová i in. 2002]. Z kolei w badaniu Klimek i in. [2000] autorzy wykazali, że w próbach liści melisy lekarskiej zawartość olejku wahała się w granicach 0,08-0,22 ml/100 g. W tabeli 2 przedstawione zostały wyniki uzyskane z analizy jakościowej uzyskanego olejku eterycznego z badanej rośliny. Wykazano, że głównymi składnikami olejku z melisy lekarskiej jest tlenek kariofilenu (20,63%), geranial (13,94%), neral (10,60%), E-karofilen (10,12%) oraz citronellal (9,28%). Jalal i in. (2015) podają, że w olejku melisowym dominującymi komponentami są citronellal [14,4%], który stanowił nieco wyższy udział od uzyskanego w niniejszej pracy oraz tlenek kariofilenu (11%), z ok. 50% niższym udziałem w porównaniu do otrzymanego w pracy. Natomiast Carnat i in.

[1998] wykazali, że podstawowymi składnikami olejku melisowego są: citronellal, geranial i neral, a ich udział procentowy wynosi odpowiednio: 39,47%, 27,84%, 20,4%. Rehman i in. [2013] oraz Bagdad i Cosge [2012] stwierdzili dominujący poziom citronellalu tj. 31,1%. Natomiast olejek melisowy analizowany przez Singh i in. [2014] zawierał jako główne składniki geranial (24,53%), neral (18,8%) oraz E-kariofilen (7,7%). Jak podaje Mrlianová i in. (2002) citronellal i kariofilen są głównymi składnikami olejku pozyskanego z liści wierzchołków pędów melisy lekarskiej (odpowiednio: 59,74 i 24,07%), natomiast tlenek kariofilenu w olejku uzyskanym z całego zieleń (6,97%), a cytronellal (6,44%) w olejku wyekstrahowanym z liści. Olejek melisowy jest bardzo zróżnicowany pod względem składu chemicznego. Wynikać to może z dużej różnorodności botanicznej melisy, która przekłada się na skład jakościowy i ilościowy frakcji lotnej. Ponadto, skład olejku eterycznego determinowany jest warunkami geograficznymi, uprawowymi czy czynnikami technologicznymi tj. suszenie czy przechowywanie.

Tabela 1. Zawartość poszczególnych składników biologicznie aktywnych, w tym całkowita zdolność antyoksydacyjna DPPH w naparze z Melisy lekarskiej oraz olejku eterycznego z materiału wyjściowego

The content of individual components of biologically active and total antioxidant capacity DPPH Melissa infusion and essential oil from the starting material

Zawartość składników biologicznie aktywnych w 100 ml badanym naparze [\pm SD] oraz całkowita zdolność antyoksydacyjna DPPH			
Polifenole [mg GAE]	Flawonoidy [mg]	DPPH [% inhibicji]	Olejek eteryczny % [V/m]
21,5 \pm 1,04	15,7 \pm 0,86	17,24 \pm 0,91	0,26 \pm 0,01

Tabela 2. Zawartość procentowa składników olejku eterycznego w Melisie lekarskiej

The content percent of components of the essential oil in lemon balm

Lp.	Składnik	Udział procentowy składników olejku eterycznego [%]
1.	ρ-cymen	2,41
2.	gamma-terpinen	6,19
3.	linalol	0,60
4.	trans-tlenek różany	0,13
5.	neoizopulegol	4,02
6.	citronellal	9,28
7.	menton	3,23
8.	izopulegol	2,10
9.	izomenton	0,61
10.	borneol	0,63
11.	izomentol	1,46
12.	terpinen-4-ol	0,74
13.	neral	10,60
14.	citronelat metylu	1,93
15.	geranial	13,94
16.	octan neomentylu	0,51
17.	octan geranylu	1,29
18.	E kariofilen	10,12
19.	alfa-humulen	0,85
20.	E-beta-jonon	1,14
21.	tlenek kariofilenu	20,63
22.	epoksyd humulenu II	1,43
23.	14-hydroksy-9-epi-(E)-kariofilen	1,78
24.	Pozostałe niezidentyfikowane związki	4,38

WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania wykazały, że napar sporządzony z melisy lekarskiej wykazuje 21,5 mg GAE/100 ml zawartości polifenoli, w tym 15,7 mg/100 ml flawonoidów, co ma istotne znaczenie prozdrowotne.
2. Analizując zdolność do neutralizacji rodnika DPPH wykazano, że napar uzyskany z melisy lekarskiej cechował się niewielką aktywnością (17,24%).
3. Półilościowa i jakościowa analiza olejku eterycznego uzyskanego z melisy lekarskiej pozwoliła odnotować zawartość olejku tj. 0,26 % [V/m]. Wykazano, że głównymi składnikami olejku z melisy lekarskiej jest tlenek kariofilenu (20,63%), geranial (13,94%), neral (10,60%), E-kariofilen (10,12%) oraz citronellal (9,28%).

PIŚMIENNICTWO

1. Adams, R.P. (2001). Identification of Essential Oil Compounds by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured: Carol Stream, IL, USA
2. Atanassova, M., Georgieva, S., Ivancheva, K. (2011). Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 46, 1, 81-88
3. Bagdad, R.B., Cosge, B. (2012). The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) it's components and using fields. Central Research Institute for Field Crops, 4
4. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.,E., Berset, C. (1995). Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie, Food Science and Technology, 28, 25-30
5. Carnat, A.P., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J.L. (1998). The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. Pharmaceutica Acta Helveticiae, 72, 301-305
6. Chłopicka, J., Niedziela, A., Bartoń, H. (2015). Aktywności antyoksydacyjna i całkowita zawartości polifenoli w naparach kawy w zależności od rodzaju kawy i sposobu jej przygotowania. Bromatol Chem Toksyk. XLVII, 1, 5-11
7. Czczot, H. (2000). Biological activities of flavonoids – a review. Pol. J. Food. Nutr. Sci. 9, (50), 3-13
8. Fernandes, R.P.P., Trindade, F. G., Tonin, C. G., Lima, S. M. P., Pugine, P. E. S., Munkata, J. M., Lorenzo, de Melo M. P. (2016). Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the

- natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 451-460
9. Gawlik-Dziki, U. (2004). Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4(41), 29-40
 10. Jalal, Z., Atki, Y., Lyoussi, B., Abdellaoui, A. (2015). Phytochemistry of the essential oil of *Melissa Officinalis* L. growing wild in Marocco: Preventive approach against nosocomial infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(6), 458-461
 11. Karadeniz, F., Burdurlu, H., S., Koca, N., Soyer, Y. (2005). Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turk J Agric For*, 29(4), 297-303
 12. Kazmierczak, R., Hallmann, E., Sokołowska, O., Rembiałkowska, E. (2011). Zawartość związków bioaktywnych w roślinach zielarskich z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* Vol. 56(3)
 13. Klimek, B., Majda, T., Góra, J., Patora, J. (2000). Badanie olejku eterycznego kocimietki cytrynowej (*Nepeta cataria* L. var. *citriodora*) w porównaniu z olejkiem melisy lekarskiej (*Melissa officinalis* L.). *Herba Polonica*, 46(4), 226-234
 14. Kozak, M., Sobczak, P., Żukiewicz-Sobczak, W. (2016). Health properties of selected herbal plants. *Health Problems of Civilization*, 10(2), 64-70
 15. Kunicka-Styczyńska, A. Olejki eteryczne jako alternatywa dla syntetycznych konserwantów żywności [W:] *Innowacyjne rozwiązania w technologii żywności i żywieniu człowieka* pod red. Tarko T., Drożdż I., Najgebauer-Lejko D., Duda-Chodak A. Oddział Małopolski Towarzystwa Technologów Żywności, Kraków, 2016, 77.
 16. Mass Spectral Library (2005). NIST/EPA/NIH, USA
 17. Mikołajczuk-Szczyrba, A., Młynarczyk, I., Misiewicz, A. (2016). Naturalne źródła flawonoidów i ich wpływ na zdrowie człowieka. *Przemysł Spożywczy*, 5, 36-38
 18. Mitek, M., Gasik, A. (2007). Polifenole w żywności- właściwości przeciwutleniające. *Przemysł Spożywczy*, 9, 36-38
 19. Moraes-de-Souza, R.A., Oldoni, T.L.C., Regitin-d'Arce, M.A.B., Alencar, S.M. (2017). Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in brazil *activid ad antioxidante y compuestos fenólicos en infusiones herbarias consumid as en brasil*. *Scienca Tecnologia Alimentaria*, 6(1), 41-47
 20. Mrlianová, M., Tekel'ova, D., Felklová, M., Reinohl, V., Tóth. J. (2002). The influence of the harvest cut height on the quality of the herbal drugs *Melissae folium* and *Melissae herba*. *Planta Med.* 68 (2), 178–180

21. Mróz, P., Wilczek, K., Żak, M., Zielińska-Pisklak, M. (2012). Chromatograficzne metody izolacji i identyfikacji fenolokwasów. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*, 6, 40-48
22. Nurzyńska-Wiedrak, R. (2013). Melisa lekarska (*Melissa officinalis* L.) – skład chemiczny i aktywność biologiczna. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia*, XXIII (1), 25-35
23. Nurzyńska-Wiedrak, R. (2015). Terapeutyczne właściwości olejków eterycznych. *Annales UMCS Sect. EEE Horticultura*, 1, 1-19
24. Parsons, B.J. (2017). Aromatic Plants: Antioxidant Capacity and Polyphenol Characterization. *Journal List Food*, 6(4), 28
25. Paszkiewicz, M., Budzyńska, M., Różalska, B., Sadowska, B. (2012). Immunomodulacyjna rola polifenoli roślinnych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 66, 637-645
26. PN-ISO 3103:1996 - wersja polska, Herbata -- Przygotowanie naparu do badań sensorycznych
27. Regulska, E., Samsonowicz, M. (2014). Ekstrakty ziołowe w aspekcie zawartości związków polifenolowych i aktywności przeciwutleniającej [W:] *Właściwości produktów i surowców żywnościowych. Wybrane zagadnienia pod red. Tarko T., Duda-Chodak A., Witzak, M., Najgebauer-Lejko, D. Kraków*, 227-247
28. Rehman, S., Latief, R., Bhat, K.A., Khuroo, M.A., Shawl, A.S., Chandra, S. (2013). Comparative analysis of the aroma chemicals of *Melissa Officinalis* using hydrodistillation and HS-SPME techniques. *Arabian Journal of Chemistry*, 1-5
29. Saeb, K., Gholamrezaee, S., Asadi, M. (2011). Variation of antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves extracts during the different stages of plant growth. *Biomed. Pharmacol. J.* 4 (2), 237–243
30. Singh, S., Haider, S., Chauhan, N.K., Lohani, H., Sah, S., Yadav, R.K. (2014). Effect of time of harvesting on yield and quality of *Melissa officinalis* L. in doon valley India. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(5), 449-452
31. Singleton, V.L., Rosi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, 16, 144-158
32. Zych, I., Krzepiło A. (2010). Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH. *Chemia Dydaktyka Ekologia Metrologia*, 15 (1), 51-5