

*Anna Muzykiewicz, Joanna Zielonka-Brzezicka, Adam Klimowicz

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z wybranych roślin należących do rodziny *Rosaceae***

Antioxidant activity of extracts of selected plants belonging to *Rosaceae* family

Katedra i Zakład Chemii Kosmetycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. med. Adam Klimowicz

SUMMARY

Introduction. Plants are a valuable source of biologically active compounds, including antioxidants, which could prevent the development of oxidative stress. The members of *Rosaceae* family such as *Sorbus aucuparia* L. and *Cydonia oblonga* Mill. are the examples of plants contained antioxidants.

Aim. The aim of the study was to evaluate the antioxidant potential of leaves and fruits extracts of rowan and quince, taking into account influence of the extrahent as well as extraction method on this activity.

Material and methods. The extracts were obtained by classic extraction methods – shaking and extraction in Soxhlet apparatus. Methanol, acetone as well as 70 and 96% (v/v) ethanol were used as solvents. Antioxidant activity was estimated by DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu (F-C) and ABTS methods.

Results. The highest antioxidant activity was found in leaf extracts of both plants. In most cases, rowan extracts showed higher potential than appropriate extracts of quince. The most effective extraction method was extraction in Soxhlet apparatus using methanol (in case of rowan and quince) as well as 96% (v/v) ethanol (quince) and 70% (v/v) ethanol (rowan). The highest results were obtained with FRAP method, whereas the lowest – with DPPH.

Conclusions. The presented *in vitro* results confirmed, that the leaves and fruits extracts of selected plants belonging to the *Rosaceae* family showed antioxidant activity and could be applied in various industry branches.

Keywords: rowan, quince, classic extraction technique, antioxidant activity

STRESZCZENIE

Wstęp. Rośliny są cennym źródłem związków biologicznie czynnych, w tym przeciwutleniaczy, które wykazują zdolność zapobiegania rozwojowi tzw. stresu oksydacyjnego. Należące do rodziny *Rosaceae*: *Sorbus aucuparia* L. oraz *Cydonia oblonga* Mill. są przykładami roślin zawierających przeciwutleniacze.

Cel pracy. Celem pracy była ocena potencjału przeciwutleniającego ekstraktów z liści i owoców jarzębu pospolitego i pigwy pospolitej z uwzględnieniem wpływu rozpuszczalnika i metody ekstrakcji na badane właściwości uzyskanych ekstraktów.

Materiał i metody. Ekstrakty sporządzono klasycznymi metodami ekstrakcji – poprzez wytrząsanie oraz z wykorzystaniem aparatu Soxhleta. Jako rozpuszczalniki wykorzystano: metanol, aceton oraz 70 i 96% (v/v) etanol. Oceny aktywności przeciwutleniającej dokonano metodami DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu (F-C) oraz ABTS.

Wyniki. Najwyższą aktywnością przeciwutleniającą odznaczały się ekstrakty sporządzone z liści obu roślin. W większości przypadków ekstrakty z jarzębu pospolitego wykazywały wyższy potencjał niż odpowiadające im ekstrakty z pigwy pospolitej. Najskuteczniejszym sposobem ekstrakcji okazał się proces w aparacie Soxhleta z wykorzystaniem metanolu (w przypadku jarzębu i pigwy) oraz 96% (v/v) etanolu (pigwa) i 70% (v/v) etanolu (jarząb). Najwyższe wyniki uzyskano metodą FRAP, natomiast najniższe metodą DPPH.

Wnioski. Przedstawione wyniki analiz *in vitro* potwierdziły, że ekstrakty z liści oraz owoców wybranych roślin należących do rodziny *Rosaceae* charakteryzują się aktywnością przeciwutleniającą i mogą zostać wykorzystane w różnych dziedzinach przemysłu.

Słowa kluczowe: jarząb pospolity, pigwa pospolita, klasyczne metody ekstrakcji, aktywność przeciwutleniająca

**Prezentowane badania zostały sfinansowane z funduszu Młody Badacz (MB-326-207/16) i stanowią część pracy doktorskiej Anny Muzykiewicz.

Wprowadzenie

Rośliny towarzyszą człowiekowi od zarania dziejów, bowiem już ludzie pierwotni wykorzystywali je jako pożywienie. Najstarsze zachowane zapiski o stosowaniu roślin w ziołolecznictwie pochodzą z ok. 3000 roku p.n.e. i opisują zwyczaje ludów Mezopotamii. Z czasem postęp naukowy doprowadził do rozwoju przemysłu chemicznego, który pozwolił na syntezę leków, w wyniku czego lecznicze znaczenie roślin uległo marginalizacji. Wraz z rozwojem produkcji preparatów syntetycznych zaczęto obserwować coraz więcej działań niepożądanych związanych z ich stosowaniem, co spowodowało, że obecnie obserwujemy powrót do naturalnych środków leczniczych (1). Bogactwo związków biologicznie czynnych, takich jak: flawonoidy, glikozydy, garbniki, śluz, alkaloidy, pektyny, gorycze, sole mineralne, witaminy oraz olejki eteryczne, sprawia, że rośliny wykorzystywane są nie tylko w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, ale również coraz częściej są składnikami kosmetyków.

W opinii wielu badaczy prawidłowo skomponowane mieszanki świeżych bądź suszonych ziół, stosowane zarówno wewnątrz, jak i zewnątrz, mogą zapobiegać rozwojowi wielu chorób, działać przeciwbakteryjnie, wspomagać odnowę organizmu oraz pracę wielu układów, m.in. nerwowego, krążenia, oddechowego czy pokarmowego (2). Na szczególną uwagę zasługują przeciwutleniające właściwości roślin. Stres oksydacyjny, wywołany nadmierną ilością wolnych rodników w organizmie, przyczynia się do rozwoju wielu chorób, m.in. nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych, chorób układu sercowo-naczyniowego oraz narządu wzroku, jak również zaburzeń metabolicznych (np. cukrzyca, miażdżyca) i ich powikłań (3, 4). Ponadto zjawisko to jest jedną z przyczyn starzenia się organizmu (5). W piśmiennictwie można znaleźć wiele doniesień o korzystnym wpływie przeciwutleniaczy zawartych m.in. w pożywieniu (6), preparatach kosmetycznych (7) oraz wyrobach farmaceutycznych (8).

Cennym źródłem związków biologicznie aktywnych, w tym składników o potencjale przeciwutleniającym, są rośliny należące do rodziny różowatych (*Rosaceae*), która obejmuje ok. 3000 gatunków roślin okrytozalążkowych (drzew i krzewów), bardzo ważnych z punktu gospodarczego, ze względu na częste ich wykorzystanie w celach farmaceutycznych, spożywczych oraz kosmetycznych (9-11). Przedstawicielami tej rodziny są jarząb pospolity (*Sorbus aucuparia* L.) oraz pigwa pospolita (*Cydonia oblonga* Mill.). Rośliny te, występujące pospolicie na terenie naszego kraju, są bogate m.in. w związki o potencjale przeciwutleniającym (3, 12).

Cel pracy

Celem pracy była ocena potencjału przeciwutleniającego ekstraktów z liści oraz owoców dojrzałych jarzębu pospolitego i pigwy pospolitej, które pozyskano klasycznymi metodami ekstrakcji – z wykorzystaniem wytrząsania oraz w aparacie Soxhleta. Analizie poddano wpływ metody ekstrakcji, rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika i surowca oraz metody oceny aktywności przeciwutleniającej na badaną aktywność uzyskanych ekstraktów.

Materiał i metody

Odczynniki użyte do badań pochodziły z firm: Sigma Aldrich, USA: 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH), kwas 6-hydrokso-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksyłowy (troloks), 2,4,6-tripirydylo-S-triazyna (TPTZ), kwas 2,2-azyno-bis(etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (ABTS); Merck Darmstadt, Niemcy: chlorek żelaza(III) heksahydrat, odczynnik Folin-Ciocalteu; Chempur, Piekary Śląskie, Polska: węglan sodu bezwodny, kwas solny 36%, octan sodu bezwodny, potasu nadsiarczan, metanol, aceton oraz kwas octowy 99,5%, wszystkie o czystości cz.d.a. oraz Linegal Chemicals, Polska: alkohol etylowy skążony izopropanolem.

Surowiec rośliny wykorzystywany w procesie ekstrakcji stanowiły liście oraz owoce dojrzałe (miąższ i skórka) jarzębu pospolitego oraz pigwy pospolitej, które zebrano na terenie Świnoujścia (woj. zachodniopomorskie). Zbiór liści jarzębu dokonano w czerwcu, a owoców we wrześniu 2016 roku, natomiast liści pigwy w czerwcu, a owoców w listopadzie 2015 roku. Świeży surowiec poddawano ekstrakcji w aparacie Soxhleta oraz wytrząsaniu. W przypadku pierwszej metody, ekstrakcję prowadzono do momentu 5-krotnego obiegu rozpuszczalnika przez ekstraktor, natomiast proces wytrząsania kontynuowano przez 4 godziny, przy częstotliwości 400 obrotów/min (wytrząsarka SK-O330-PRO, Chemland). Jako rozpuszczalniki wykorzystano: 96 i 70% (v/v) etanol (EtOH), 99,85% (v/v) metanol (MeOH) oraz aceton.

Otrzymane 5% ekstrakty poddawano ocenie aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem metod DPPH, FRAP, ABTS oraz Folin-Ciocalteu (F-C) według schematu opisanego w poprzednich pracach (3, 13, 14). W przypadku wszystkich metod wyniki wyrażano w postaci równoważników troloksu [mg troloksu/g surowca] (średnia arytmetyczna wyliczona z trzech niezależnych pomiarów ± odchylenie standardowe – SD). Oceny statystycznej dokonano przy użyciu programu Statistica 12 (StatSoft, Polska), wykorzystując jednoczynnikową analizę wariancji

ANOVA (poziom istotności $p = 0,05$). Różnice międzygrupowe, osobno dla ekstraktów z jarzębu i pigwy, oceniono testem Tuckeya ($n = 3$), dzieląc uzyskane wyniki na grupy pod względem metody oceny aktywności przeciwutleniającej (DPPH, FRAP, F-C, ABTS) oraz surowca poddawanego ekstrakcji (liść i owoc). Ponadto, obliczono współczynniki korelacji Pearsona (r) pomiędzy wynikami uzyskanymi różnymi metodami dla ekstraktów z poszczególnych surowców roślinnych. Dodatkowo, oceniono istotność statystyczną różnic pomiędzy aktywnością przeciwutleniającą ekstraktów z liści i owoców obu roślin, z wykorzystaniem testu Wilcozona, przyjmując poziom istotności $p = 0,05$ (program Prostat 5.5. – Poly Software International Inc., USA).

Wyniki

Uzyskane wyniki aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów, otrzymane metodami DPPH, FRAP, F-C i ABTS, zamieszczono w tabeli 1. W grupie ekstraktów przebadanych metodą DPPH najwyższe wartości, niezależnie od surowca poddawanego ekstrakcji, uzyskano dla prób otrzymanych w aparacie Soxhleta, najniższe zaś dla ekstraktów sporządzonych z wykorzystaniem wytrząsania. Spośród ekstraktów z liści i owoców jarzębu najwyższe badane właściwości stwierdzono dla ekstraktów metanolowych, odpowiednio $4,13 \pm 0,01$ i $1,85 \pm 0,03$ mg troloksu/g surowca. Najniższą aktywność w przypadku tych surowców stwierdzono dla prób otrzymanych za pomocą 70% (v/v) etanolu ($2,92 \pm 0,02$ mg troloksu/g surowca – ekstrakt z liści i $0,39 \pm 0,01$ mg troloksu/g surowca – ekstrakt z owoców). W grupie ekstraktów z liści pigwy najwyższą aktywnością odznaczał się ekstrakt sporządzony za pomocą 96% (v/v) etanolu – $4,53 \pm 0,01$ mg troloksu/g surowca, natomiast najniższą ekstrakt uzyskany za pomocą 70% (v/v) etanolu – $2,48 \pm 0,07$ mg troloksu/g surowca. W przypadku ekstraktów z owoców pigwy badanych metodą DPPH najwyższą aktywność stwierdzono w przypadku ekstraktu metanolowego – $1,45 \pm 0,03$ mg troloksu/g surowca, najniższą natomiast dla ekstraktu sporządzonego przy użyciu acetonu – $0,56 \pm 0,04$ mg troloksu/g surowca.

Podobnie jak w przypadku analizy techniką DPPH, również w przypadku zastosowanej metody FRAP wyższym potencjałem przeciwutleniającym charakteryzowały się ekstrakty sporządzone w aparacie Soxhleta w porównaniu z ekstraktami uzyskanymi z wykorzystaniem wytrząsania. W grupie ekstraktów z liści jarzębu wyniki zawierały się w przedziale od $15,02 \pm 0,38$ do $59,62 \pm 0,58$ mg troloksu/g surowca (ekstrakty otrzymane za pomocą 70% (v/v) etanolu). W przypadku

owoców jarzębu najwyższą aktywność stwierdzono dla ekstraktu metanolowego ($6,69 \pm 0,04$ mg troloksu/g surowca), zaś najniższą dla ekstraktu otrzymanego przy użyciu 70% (v/v) etanolu ($0,93 \pm 0,06$ mg troloksu/g surowca). W grupie ekstraktów z liści pigwy najwyższe wartości uzyskano dla ekstraktu uzyskanego za pomocą 96% (v/v) etanolu ($27,75 \pm 0,24$ mg troloksu/g surowca), natomiast najniższe dla ekstraktu sporządzonego przy użyciu 70% (v/v) etanolu ($5,89 \pm 0,17$ mg troloksu/g surowca). Oceniając ekstrakty z owoców pigwy, najwyższe wyniki uzyskane metodą FRAP otrzymano dla ekstraktu metanolowego, najniższe natomiast dla ekstraktu acetonowego (odpowiednio $4,65 \pm 0,12$ i $1,28 \pm 0,03$ mg troloksu/g surowca).

Z podobną sytuacją mamy do czynienia w przypadku analizy ekstraktów metodą F-C oraz ABTS. Najwyższą zawartość polifenoli ocenioną metodą F-C w grupie ekstraktów z liści jarzębu stwierdzono dla ekstraktu metanolowego ($24,21 \pm 0,12$ mg troloksu/g surowca, ekstrakcja w aparacie Soxhleta), najniższą natomiast dla ekstraktu sporządzonego przy użyciu 70% (v/v) etanolu ($10,53 \pm 0,14$ mg troloksu/g surowca, ekstrakcja z wytrząsaniem). W grupie ekstraktów z owoców jarzębu najwyższą aktywność uzyskano dla ekstraktu sporządzonego za pomocą metanolu (proces wytrząsania – $5,60 \pm 0,17$ mg troloksu/g surowca), najniższą natomiast dla ekstraktu, dla którego jako rozpuszczalnik wykorzystano aceton ($0,21 \pm 0,02$ mg troloksu/g surowca, ekstrakcja w aparacie Soxhleta). W przypadku ekstraktów z liści pigwy najwyższą aktywnością przeciwutleniającą odznaczał się ekstrakt sporządzony przy użyciu 96% (v/v) etanolu, najniższą natomiast próba w tym samym rozpuszczalniku, jednak o stężeniu 70% (v/v) ($23,57 \pm 0,19$ i $6,84 \pm 0,24$ mg troloksu/g surowca). W grupie ekstraktów z owoców pigwy najwyższą aktywnością odznaczał się ekstrakt metanolowy, natomiast najniższą ekstrakt sporządzony za pomocą 96% (v/v) etanolu ($3,91 \pm 0,18$ i $1,05 \pm 0,07$ mg troloksu/g surowca).

W przypadku metody ABTS wyższą aktywność przeciwutleniającą w odniesieniu do liści obu roślin stwierdzono dla ekstraktów otrzymanych w aparacie Soxhleta, natomiast w odniesieniu do owoców – dla ekstraktów uzyskanych w procesie wytrząsania. Wartości uzyskane tą metodą dla ekstraktów z liści jarzębu mieściły się w zakresie od $4,16 \pm 0,27$ do $21,20 \pm 0,10$ mg troloksu/g surowca (odpowiednio dla ekstraktów uzyskanych przy użyciu acetonu i 70% (v/v) etanolu), natomiast dla ekstraktów z liści pigwy wartości te zawierały się w przedziale od $2,75 \pm 0,28$ (ekstrakt otrzymany za pomocą 70% (v/v) etanolu) do $34,80 \pm 0,22$ mg troloksu/g surowca (ekstrakt

Tab. 1. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z liści oraz owoców *S. aucuparia* L. oraz *C. oblonga* Mill. otrzymanych w aparacie Soxhleta (SOX) oraz techniką wytrząsania (WYT), oceniona metodą DPPH, FRAP, F-C oraz ABTS i wyrażona w postaci równoważników troloksu (mg troloksu/g surowca) (średnia \pm SD)

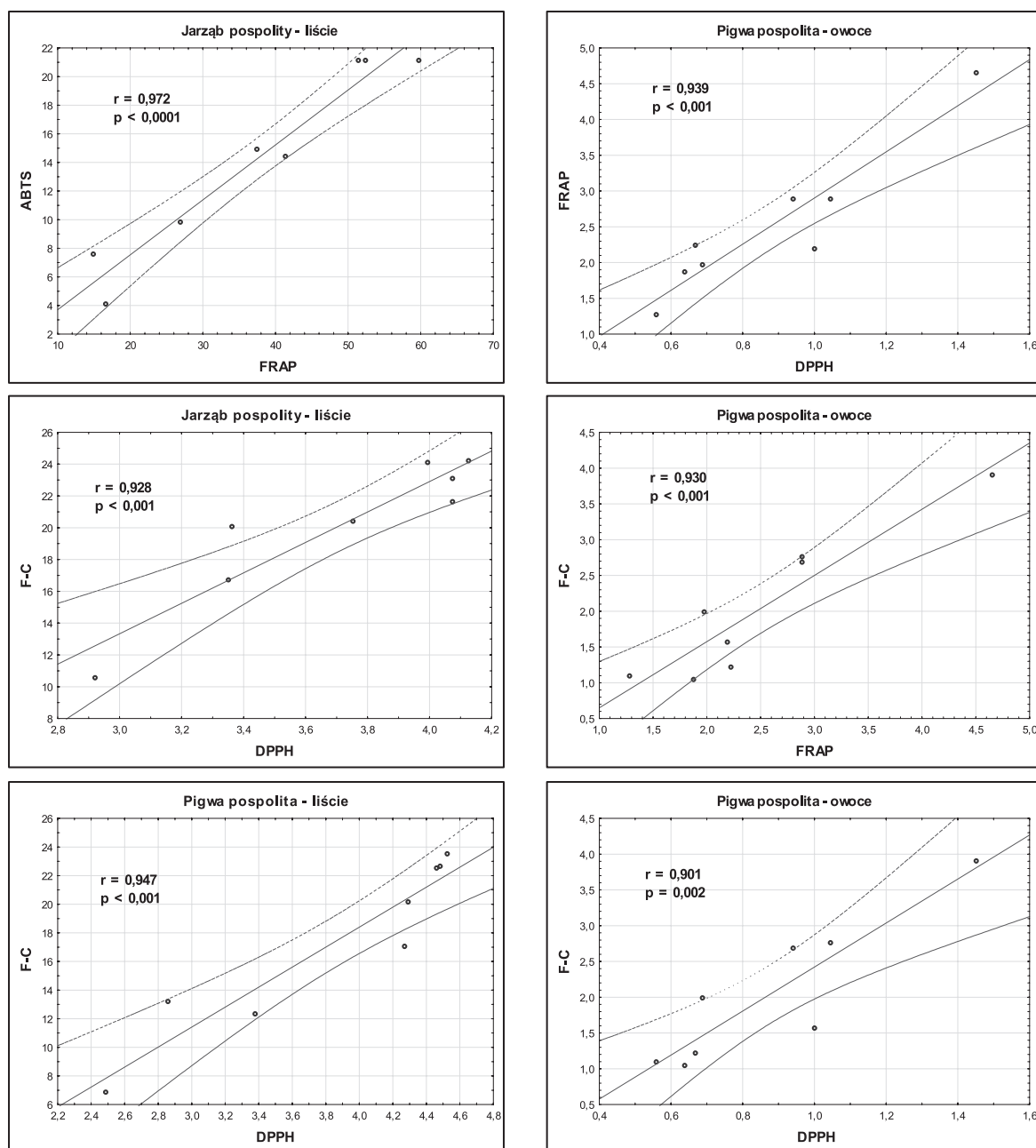
Metoda DPPH (mg troloksu/g surowca)									
Surowiec	Metoda ekstrakcji	jarząb pospolity				pigwa pospolita			
		EtOH 96% (v/v)	EtOH 70% (v/v)	MeOH	Aceton	EtOH 96% (v/v)	EtOH 70% (v/v)	MeOH	Aceton
Liść	SOX	3,99 \pm 0,02 ^b	4,07 \pm 0,03 ^{a, b}	4,13 \pm 0,01 ^a	3,75 \pm 0,04 ^c	4,53 \pm 0,01 ^a	4,48 \pm 0,02 ^a	4,46 \pm 0,01 ^a	3,38 \pm 0,06 ^c
	WYT	3,36 \pm 0,02 ^d	2,92 \pm 0,02 ^e	4,07 \pm 0,04 ^{a, b}	3,35 \pm 0,02 ^d	4,29 \pm 0,02 ^b	2,48 \pm 0,07 ^e	4,27 \pm 0,05 ^b	2,86 \pm 0,09 ^d
Owoc	SOX	1,43 \pm 0,03 ^e	1,59 \pm 0,04 ^b	1,85 \pm 0,03 ^a	0,98 \pm 0,04 ^d	0,94 \pm 0,04 ^c	1,04 \pm 0,04 ^b	1,45 \pm 0,03 ^a	0,69 \pm 0,03 ^d
	WYT	0,44 \pm 0,01 ^e	0,39 \pm 0,01 ^e	1,80 \pm 0,04 ^a	0,43 \pm 0,01 ^e	0,64 \pm 0,02 ^{d, e}	0,67 \pm 0,02 ^d	1,00 \pm 0,04 ^{b, c}	0,56 \pm 0,04 ^e
metoda FRAP (mg troloksu/g surowca)									
Liść	SOX	52,26 \pm 0,59 ^b	59,62 \pm 0,58 ^a	51,48 \pm 0,72 ^b	41,44 \pm 0,60 ^c	27,75 \pm 0,24 ^a	27,18 \pm 0,39 ^{a, b}	26,00 \pm 0,33 ^b	27,10 \pm 0,34 ^{a, b}
	WYT	26,91 \pm 0,32 ^e	15,02 \pm 0,38 ^f	37,51 \pm 0,06 ^d	16,58 \pm 0,39 ^f	22,89 \pm 0,13 ^c	5,89 \pm 0,17 ^f	18,10 \pm 0,40 ^d	9,68 \pm 0,44 ^e
Owoc	SOX	5,41 \pm 0,06 ^c	6,33 \pm 0,05 ^b	6,69 \pm 0,04 ^a	1,65 \pm 0,04 ^e	2,89 \pm 0,13 ^b	2,88 \pm 0,05 ^b	4,65 \pm 0,12 ^a	1,97 \pm 0,03 ^d
	WYT	4,06 \pm 0,03 ^d	0,93 \pm 0,06 ^g	6,37 \pm 0,14 ^b	1,19 \pm 0,06 ^f	1,87 \pm 0,04 ^d	2,23 \pm 0,03 ^c	2,19 \pm 0,01 ^c	1,28 \pm 0,03 ^e
metoda Folin-Ciocalteu (mg troloksu/g surowca)									
Liść	SOX	24,12 \pm 0,06 ^a	23,13 \pm 0,24 ^a	24,21 \pm 0,11 ^a	20,36 \pm 0,16 ^c	23,57 \pm 0,19 ^a	22,67 \pm 0,28 ^a	22,54 \pm 0,31 ^a	12,38 \pm 0,39 ^d
	WYT	20,05 \pm 0,21 ^c	10,53 \pm 0,14 ^e	21,66 \pm 0,14 ^b	16,71 \pm 0,11 ^d	20,14 \pm 0,16 ^b	6,84 \pm 0,24 ^e	17,00 \pm 0,23 ^c	13,23 \pm 0,23 ^d
Owoc	SOX	0,51 \pm 0,01 ^d	0,70 \pm 0,02 ^d	0,63 \pm 0,05 ^d	0,21 \pm 0,02 ^e	2,68 \pm 0,15 ^b	2,75 \pm 0,15 ^b	3,91 \pm 0,18 ^a	1,98 \pm 0,17 ^c
	WYT	1,20 \pm 0,17 ^{b, c}	1,01 \pm 0,05 ^c	5,60 \pm 0,17 ^a	1,43 \pm 0,06 ^b	1,05 \pm 0,07 ^d	1,23 \pm 0,09 ^d	1,56 \pm 0,06 ^{c, d}	1,10 \pm 0,04 ^d
metoda ABTS (mg troloksu/g surowca)									
Liść	SOX	21,15 \pm 0,16 ^a	21,20 \pm 0,10 ^a	21,09 \pm 0,00 ^a	14,40 \pm 0,68 ^b	20,68 \pm 0,30 ^b	19,08 \pm 0,41 ^c	34,80 \pm 0,22 ^a	10,02 \pm 0,36 ^d
	WYT	9,86 \pm 0,04 ^c	7,65 \pm 0,17 ^d	14,93 \pm 0,42 ^b	4,16 \pm 0,27 ^e	18,51 \pm 0,60 ^c	2,75 \pm 0,28 ^f	9,60 \pm 0,26 ^d	5,43 \pm 0,13 ^e
Owoc	SOX	1,62 \pm 0,08 ^{c, d}	2,01 \pm 0,18 ^{a, c}	1,93 \pm 0,05 ^{b, c}	0,77 \pm 0,02 ^e	0,30 \pm 0,07 ^{a, b}	0,11 \pm 0,02 ^{a, b}	0,19 \pm 0,04 ^{a, b}	0,07 \pm 0,02 ^b
	WYT	2,10 \pm 0,06 ^{a, b}	2,05 \pm 0,04 ^{a, c}	2,47 \pm 0,25 ^a	1,33 \pm 0,11 ^d	0,36 \pm 0,09 ^a	0,30 \pm 0,06 ^{a, b}	0,33 \pm 0,10 ^a	0,11 \pm 0,04 ^{a, b}

Wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się w stopniu statystycznie istotnym w obrębie rośliny i surowca oraz metody oceny potencjału przeciwutleniającego. Poziom istotności $p = 0,05$; $n = 3$

metanolowy). W grupie ekstraktów z owoców jarzębu najwyższą aktywnością odznaczał się ekstrakt metanolowy ($2,47 \pm 0,25$ mg troloksu/g surowca), natomiast w przypadku pigwy – ekstrakt otrzymany przy użyciu 96% (v/v) etanolu ($0,36 \pm 0,09$ mg troloksu/g surowca). Najniższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się ekstrakty acetonowe sporządzone w aparacie Soxhleta (jarzáb – $0,77 \pm 0,02$; pigwa – $0,07 \pm 0,02$ mg troloksu/g surowca).

Potencjał przeciwutleniający ekstraktów z liści oraz owoców, zarówno w przypadku jarzębu, jak i pigwy, różnił się w stopniu statystycznie istotnym (test Wilcoxon odpowiednio $z = -4,934$ i $z = -4,937$ przy $p < 0,000001$).

Na rycinie 1 przedstawiono istotne statystycznie korelacje ($r > 0,900$; $p \leq 0,002$) pomiędzy wynikami uzyskanymi różnymi metodami dla poszczególnych surowców roślinnych. W grupie ekstraktów z liści jarzębu



Ryc. 1. Zależności pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną ekstraktów z jarzębu pospolitego i pigwy pospolitej, oznaczoną różnymi metodami i wyrażoną w postaci równoważników troloksu (mg troloksu/g surowca) (r – współczynnik korelacji, p – prawdopodobieństwo)

i pigwy wysoki współczynnik korelacji stwierdzono pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą DPPH i F-C, dodatkowo w przypadku liści jarzębu wyniki uzyskane metodą FRAP korelowały istotnie z otrzymanymi metodą ABTS. W przypadku ekstraktów z owoców pigwy istotne statystycznie korelacje zaobserwowano pomiędzy wynikami uzyskanymi metodami: DPPH i FRAP, FRAP i F-C oraz DPPH i F-C. W grupie ekstraktów z owoców jarzębu nie stwierdzono zależności charakteryzujących się tak wysokim współczynnikiem korelacji.

Dyskusja

Stres oksydacyjny wywołany zbyt dużą ilością wolnych rodników w organizmie może przyczynić się do rozwoju wielu bardzo groźnych chorób. Jedną z metod ochrony organizmu przed rozwojem tego niekorzystnego zjawiska jest stosowanie przeciwutleniaczy. Według wielu autorów, m.in. Sieniawskiej (15), cennym ich źródłem są różne surowce roślinne, które z powodzeniem wykorzystywane są jako składniki żywności, kosmetyków oraz wyrobów farmaceutycznych. Ponadto autorka zwraca uwagę na fakt, że część syntetycznych przeciwutleniaczy może wywoływać szereg działań niepożądanych, takich jak uszkodzenia wątroby i inicjacja procesów nowotworowych. Podkreśla również dodatkowe zalety stosowania przeciwutleniaczy pochodzenia roślinnego, jako związków wykazujących właściwości przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, zapobiegające podziałom komórkowym oraz przeciwalergiczne (15).

Jak wspomniano poprzednio, rośliny należące do rodziny różowatych są cenione w różnych dziedzinach przemysłu, głównie ze względu na właściwości przeciwutleniające. W obecnym badaniu aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z liści jarzębu pospolitego była znacznie wyższa i różniła się istotnie statystycznie od potencjału przeciwutleniającego ekstraktów z owoców (tab. 1). W przeprowadzonych niedawno badaniach dokonano oceny aktywności przeciwutleniającej ekstraktów otrzymanych z jarzębu pospolitego, które sporządzono w procesie ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy (3), podobnie jak w obecnym badaniu, stwierdzili, iż ekstrakty z liści odznaczają się znacznie wyższym potencjałem przeciwutleniającym w porównaniu z ekstraktami z owoców (3). Obecność związków fenolowych o właściwościach przeciwutleniających, w tym flawonoidów, w ekstraktach z liści jarzębu zaobserwowali również Ozsoy i wsp. (16). Zespół ten poddał analizie ekstrakty z liści różnych roślin leczniczych występujących na terenie Turcji (jarzab pospolity,

pokrzywa zwyczajna, jabłoń dzika, babka zwyczajna). Stwierdzono, że ekstrakty sporządzone z jarzębu charakteryzowały się jednym z najwyższych stężeń związków fenolowych, w tym flawonoidów (16). Potencjał przeciwutleniający ekstraktów z owoców jarzębu pospolitego zaobserwowali również Šavikin i wsp. (17), stwierdzając obecność związków fenolowych w tym surowcu. Mikulic-Petkovsek i wsp. (18) sugerują, iż zawartość związków biologicznie aktywnych, w tym substancji wykazujących zdolność do zmiatania wolnych rodników, różni się w zależności od genotypu rośliny. Oprócz wspomnianych autorów, aktywność przeciwutleniającą ekstraktów pozyskanych z różnych części *S. aucuparia* zaobserwowali także Wojtowicz i wsp. (19), Aladedunye i Matthäus (20) oraz Fomenko i wsp. (21).

Podobnie jak w przypadku ekstraktów otrzymanych z liści i owoców jarzębu pospolitego, również w grupie ekstraktów z pigwy pospolitej zauważono wyraźną dysproporcję pomiędzy aktywnością prób sporządzonych z różnych części tej rośliny. Potencjał przeciwutleniający ekstraktów z liści pigwy był znacznie wyższy niż ekstraktów z owoców tej rośliny i różnił się w stopniu statystycznie istotnym (tab. 1). Wysoką aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z liści pigwy potwierdzili również Costa i wsp. (22) oraz Oliveira i wsp. (23). Ashraf i wsp. (24) bardzo obszernie opisali zawartość poszczególnych związków biologicznie aktywnych w różnych częściach pigwy. Autorzy ci wskazują na obecność w miąższu i skórce owoców oraz w liściach pigwy związków fenolowych, takich jak kwas kawoilochinowy i jego pochodne, rutyna, a także pochodne kwercetyny i kemferolu (24). Benzarti i wsp. (25) dokonali analizy zawartości związków fenolowych w metanolowych ekstraktach z liści pigwy, potwierdzając, iż surowiec ten bogaty jest w kwasy fenolowe oraz flawonoidy. Oceny potencjału przeciwutleniającego klonów owoców *Cydonia oblonga* dokonali Legua i wsp. (26). Stwierdzili oni, iż obecne są w nich związki o właściwościach przeciwutleniających, ale ich zawartość była zmienna w zależności od klonu rośliny poddanej analizie.

Oceniając wpływ metody ekstrakcji na uzyskane wartości aktywności antyoksydacyjnej, można zauważyć, iż w przypadku ekstraktów z liści najwyższe wartości uzyskano dla ekstraktów sporządzonych w aparacie Soxhleta. Podobną zależność stwierdzono w grupie ekstraktów z owoców, z wyjątkiem ekstraktów z owoców jarzębiny przebadanych metodą F-C oraz owoców obu roślin poddanych analizie metodą ABTS, dla których wyższą aktywność przeciwutleniającą stwierdzono dla prób uzyskanych w wyniku ekstrakcji wspomaganą wytrząsaniem (tab. 1).

Skuteczność ekstrakcji w aparacie Soxhleta, w celu uzyskania ekstraktów odznaczających się aktywnością przeciwutleniającą, potwierdzają również Murugan i Parimelazhagan (27). Ponadto autorzy ci postulują, iż dobór metody ekstrakcji jest bardzo istotnym etapem planowania sposobu izolacji składników biologicznie aktywnych o określonych właściwościach. Dhanani i wsp. (28) dokonując oceny potencjału przeciwutleniającego ekstraktów z *Withania somnifera*, zaproponowali podział metod ekstrakcji na klasyczne, do których zaliczamy proces w aparacie Soxhleta, oraz tzw. zielone metody ekstrakcji, które cechują się krótszym czasem procesu oraz mniejszym zużyciem energii. Przykładem takiej metody jest ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami. Autorzy ci uzyskali wysokie wartości aktywności przeciwutleniającej dla ekstraktów sporządzonych zarówno tradycyjnymi, jak i ekologicznymi technikami ekstrakcji, przy czym wydłużenie czasu trwania procesu skutkowało wzrostem zawartości związków fenolowych w badanych ekstraktach (28).

Analizując wpływ doboru ekstrahenta na aktywność przeciwutleniającą uzyskanych ekstraktów, można zauważyć, iż w przypadku liści i owoców jarzębu w prawie wszystkich przypadkach najwyższe wartości otrzymano dla ekstraktów metanолоwych i uzyskanych za pomocą 70% (v/v) etanolu – najwyższą aktywność w grupie ekstraktów sporządzonych z liści jarzębu stwierdzono dla ekstraktu uzyskanego przy użyciu 70% (v/v) etanolu – $59,62 \pm 0,58$ mg troloksu/g surowca, natomiast spośród ekstraktów z owoców – dla ekstraktu metanолоwego ($6,69 \pm 0,04$ mg troloksu/g surowca) (tab. 1). W grupie ekstraktów z pigwy, najskuteczniejszymi rozpuszczalnikami okazały się: metanol oraz 96% (v/v) etanol – najwyższą aktywność spośród ekstraktów sporządzonych z liści pigwy stwierdzono dla ekstraktu otrzymanego za pomocą 96% (v/v) etanolu – $27,75 \pm 0,24$ mg troloksu/g surowca, natomiast dla owoców – dla ekstraktu metanолоwego ($4,65 \pm 0,12$ mg troloksu/g surowca) (tab. 1). Przydatność metanolu jako ekstrahenta do otrzymywania ekstraktów o wysokiej aktywności przeciwutleniającej potwierdzili również Saeed i wsp. (29) oraz Costa i wsp. (22), którzy zaobserwowali jego skuteczność w procesie ekstrakcji surowców z pigwy pospolitej. Kobus-Cisowska i wsp. (30) poddali natomiast ocenie zawartość związków polifenolowych w ekstraktach sporządzonych z zielonych liści *Ginkgo biloba* L., uzyskując najwyższe wartości dla ekstraktów otrzymanych przy użyciu 96% (v/v) etanolu. Lou i wsp. (31) na podstawie analizy aktywności

przeciwutleniającej ekstraktów z owoców kalamondyny (*Citrus mitis* Blanco) potwierdzili skuteczność 70% (v/v) etanolu w pozyskiwaniu ekstraktów o wysokim potencjale przeciwutleniającym. Przytoczone dane potwierdzają zaobserwowaną w naszych badaniach przydatność zastosowanych alkoholi jako cennych rozpuszczalników do otrzymywania ekstraktów o silnych właściwościach przeciwutleniających.

Analizując aktywność przeciwutleniającą ekstraktów ocenioną różnymi metodami, stwierdzono dysproporcję pomiędzy wartościami uzyskanymi dla ekstraktów przebadanych metodą DPPH i FRAP (tab. 1). Według Matysiaka i wsp. (32) niższe wartości uzyskane metodą DPPH mogą być związane z niższą czułością tego testu. Zatem, zgodnie z sugestią Apaka i wsp. (33), iż żadna z powszechnie stosowanych metod nie jest w stanie skutecznie ocenić aktywności wszystkich związków, zaleca się stosowanie przynajmniej dwóch różnych metod, najlepiej opartych na różnych mechanizmach działania, a także wykonanie minimum trzech niezależnych oznaczeń do każdej próby. Jednak należy zwrócić uwagę, że w części przypadków wyniki uzyskane jedną metodą korelują istotnie z wartościami otrzymanymi innymi technikami pomiaru aktywności antyoksydacyjnej (ryc. 1).

Podsumowanie

Wszystkie przebadane ekstrakty otrzymane z jarzębu pospolitego i pigwy pospolitej wykazywały aktywność przeciwutleniającą, przy czym znacznie wyższym potencjałem przeciwutleniającym odznaczały się ekstrakty sporządzone z liści w porównaniu z ekstraktami otrzymanymi z owoców tych roślin. W większości przypadków ekstrakty z liści i owoców jarzębu pospolitego wykazywały wyższą aktywność niż odpowiadające im ekstrakty z pigwy pospolitej. Spośród zastosowanych technik ekstrakcji znacznie skuteczniejszą metodą okazał się proces z wykorzystaniem aparatu Soxhleta. Najskuteczniejszymi ekstrahentami w celu sporządzenia ekstraktów z jarzębu okazały się metanol oraz 70% (v/v) etanol, natomiast w przypadku pigwy metanol i 96% (v/v) etanol. Najwyższe wartości uzyskiwano w wyniku analiz ekstraktów za pomocą metody FRAP, najniższe zaś w przypadku większości oznaczeń metodą DPPH. Otrzymane wyniki badań *in vitro* sugerują, iż wybrane rośliny z rodziny *Rosaceae* mogą być cennym źródłem przeciwutleniaczy. Przedstawione wyniki mogą stać się przyczynkiem do dalszych badań pod kątem zastosowania omawianych roślin w różnych dziedzinach przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego.

Piśmiennictwo

- Dyduch J. Historia ziołarstwa w Polsce. *Nauk Przyr* 2014; 4(6):5-10.
- Kozak M, Sobczak P, Żukiewicz-Sobczak W. Health properties of selected herbal plants. *Health Probl Civil* 2016; 10(2):64-70.
- Muzykiewicz A, Zielonka-Brzezicka J, Klimowicz A i wsp. Jarząb pospolity (*Sorbus aucuparia* L.) jako źródło składników o potencjalnym działaniu antyoksydacyjnym – porównanie właściwości przeciwutleniających ekstraktów z liści, kwiatów i owoców. *Probl Hig Epidemiol* 2017; 98:125-32.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M i wsp. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2017; 38:592-607.
- Guillaumet-Adkins A, Yañez Y, Peris-Diaz MD i wsp. Epigenetics and oxidative stress in aging. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017:9175806.
- Kim K, Vance TM, Chun OK. Greater total antioxidant capacity from diet and supplements is associated with a less atherogenic blood profile in US adults. *Nutrients* 2016; 8(1):pii: E15.
- Kerscher M, Buntrock H. Cosmetics and cosmeceuticals. W: André P, Haneke E, Marini L i wsp. (red.): *Cosmetic Medicine and Surgery*. CRC Press, London 2017:77-89.
- Kim S, Song Y, Lee JE i wsp. Total antioxidant capacity from dietary supplement decreases the likelihood of having metabolic syndrome in Korean adults. *Nutrients* 2017; 9(10):pii: E1055.
- Ekin HN, Gokbulut A, Aydin ZU i wsp. Insight into anticholinesterase and antioxidant potential of thirty-four *Rosaceae* samples and phenolic characterization of the active extracts by HPLC. *Ind Crops Prod* 2016; 91:104-13.
- Cendrowski A, Kalisz S, Mitek M. Właściwości i zastosowanie owoców róży w przetwórstwie spożywczym. *Żywn Nauka Technol Jakość* 2012; 4(83):24-31.
- Możdżeń K, Barabasz-Krasny B, Szymacha K i wsp. Rośliny wykorzystywane w maskach kosmetycznych. *Pol J Cosmetol* 2016; 19:372-9.
- Sadeghpour O, Alias F, Toliyat T i wsp. Medicinal properties of *Cydonia oblonga* Mill. fruit (pulp and peel) in Iranian traditional medicine and modern phytotherapy. *Trad Integr Med* 2016; 1(3):122-8.
- Zielonka-Brzezicka J, Nowak A, Zielińska M, Klimowicz A. Porównanie właściwości przeciwutleniających wybranych części maliny właściwej (*Rubus idaeus*) i jeżyny europejskiej (*Rubus fruticosus*). *Pomeranian J Life Sci* 2016; 62(4):52-9.
- Nowak A, Zielonka-Brzezicka J, Pechaiko D i wsp. Ocena właściwości antyoksydacyjnych liści *Ginkgo biloba* L. po zakończeniu wegetacji. *Pomeranian J Life Sci* 2017; 63(1):24-30.
- Sieniawska E. Losy roślinnych antyoksydantów w organizmie ludzkim. *Post Fitoter* 2012; 13:55-8.
- Ozsoy N, Yilmaz-Ozden T, Serbetci T i wsp. Antioxidant, anti-inflammatory, acetylcholinesterase and thioredoxin reductase inhibitory activities of nine selected Turkish medicinal plants. *Indian J Tradit Know* 2017; 16:553-61.
- Šavikin KP, Zdunić GM, Krstić-Milošević DB i wsp. *Sorbus aucuparia* and *Sorbus aria* as a source of antioxidant phenolics, tocopherols and pigments. *Chem Biodiv* 2017; 14(12):e1700329.
- Mikulic-Petkovsek M, Krška B, Kiprovski B i wsp. Bioactive components and antioxidant capacity of fruits from nine *Sorbus* genotypes. *J Food Sci* 2017; 82:647-58.
- Wojtowicz E, Krupska A, Zawirska-Wojtasiak R. Antioxidant activity and free radicals of roasted herbal materials. *Herba Pol* 2017; 63(2):34-41.
- Aladedunye F, Matthäus B. Phenolic extracts from *Sorbus aucuparia* (L.) and *Malus baccata* (L.) berries: antioxidant activity and performance in rapeseed oil during frying and storage. *Food Chem* 2014; 159:273-81.
- Fomenko SE, Kushnerova NF, Sprygin VG i wsp. Chemical composition and biological action of rowanberry extract. *Russ J Bioorg Chem* 2016; 42:764-9.
- Costa RM, Magalhães AS, Pereira JA i wsp. Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: a comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chem Toxicol* 2009; 47:860-5.
- Oliveira AP, Pereira JA, Andrade PB i wsp. Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *J Agric Food Chem* 2007; 55:7926-30.
- Ashraf MU, Muhammad G, Hussain MA i wsp. *Cydonia oblonga* M., A medicinal plant rich in phytonutrients for pharmaceuticals. *Front Pharmacol* 2016; 7:163.
- Benzarti S, Hamdi H, Lahmayer I i wsp. Total phenolic compounds and antioxidant potential of quince (*Cydonia oblonga* Miller) leaf methanol extract. *Int J Innov Appl Stud* 2015; 13:518-26.
- Legua P, Serrano M, Melgarejo P i wsp. Quality parameters, bio-compounds and antioxidant activity in fruits of nine quince (*Cydonia oblonga* Miller) accessions. *Sci Hort* 2013; 154:61-5.
- Murugan R, Parimelazhagan T. Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. – an *in vitro* approach. *J King Saud Univ Sci* 2014; 26:267-75.
- Dhanani T, Shah S, Gajbhiye NA i wsp. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arab J Chem* 2017; 10:1193-9.
- Saeed N, Khan MR, Shabbir M. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12:221.
- Kobus-Cisowska J, Flaczyk E, Siger A i wsp. Wpływ warunków ekstrakcji na wydajność i skład wybranych ekstraktów z liści zielonych i żółtych miłorzębu dwuklapowego. *Nauka Przyr Technol* 2015; 9(1):1-15.
- Lou SN, Hsu YS, Ho C. Flavonoid compositions and antioxidant activity of calamondin extracts prepared using different solvents. *J Food Drug Anal* 2014; 22:290-5.
- Matysiak M, Gaweł-Bęben K, Rybczyńska K i wsp. Porównanie wybranych właściwości biologicznych czosnku (*Allium sativum* L.) pochodzącego z Polski i Chin. *Żywn Nauka Technol Jakość* 2015; 2(99):160-9.
- Apak R, Gorinstein S, Böhm V i wsp. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 2013; 85:957-98.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów
None

otrzymano/received: 16.07.2018
zaakceptowano/accepted: 27.07.2018

Adres/address:

*dr n. med. Anna Muzykiewicz
Katedra i Zakład Chemii Kosmetycznej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin
tel.: +48 501-483-469
e-mail: anna.muzykiewicz@pum.edu.pl