

# Jarząb pospolity (*Sorbus aucuparia* L.) jako źródło składników o potencjalnym działaniu antyoksydacyjnym – porównanie właściwości przeciwutleniających ekstraktów z liści, kwiatów i owoców

Rowan (*Sorbus aucuparia* L.) as a source of compounds with potential antioxidant properties – comparison of antioxidant properties of leaves, flowers and fruit extracts

ANNA MUZYKIEWICZ, JOANNA ZIELONKA-BRZEZICKA, ADAM KLIMOWICZ, KATARZYNA FLORKOWSKA

Katedra i Zakład Chemii Kosmetycznej i Farmaceutycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

**Wprowadzenie.** Nadmierna produkcja wolnych rodników tlenowych w organizmie prowadzi do powstawania tzw. stresu oksydacyjnego. Zjawisko to jest przyczyną wielu coraz częściej występujących schorzeń, do których zaliczamy m.in. choroby układu krążenia, zaburzenia neurodegeneracyjne, nowotwory czy szereg tzw. chorób cywilizacyjnych, w tym miażdżycę i cukrzycę. Jednym ze sposobów obrony przed tym niekorzystnym zjawiskiem jest stosowanie antyoksydantów. Cenionym źródłem związków o potencjale przeciwrodnikowym są rośliny.

**Cel.** Porównanie właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów z kwiatów, liści i owoców jarzębu pospolitego (*Sorbus aucuparia* L.).

**Materiały i metody.** Wyciągi metanolowe oraz w 96 i 70%(v/v) etanolu otrzymano w procesie ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami trwającą 15, 30 i 60 min. Uzyskane ekstrakty oceniano pod kątem aktywności przeciwutleniającej korzystając z metod DPPH, FRAP i Folina-Ciocalteu'a opartych na pomiarach spektrofotometrycznych.

**Wyniki.** Najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym odznaczały się ekstrakty z liści i kwiatów, natomiast najniższe właściwości przeciwrodnikowe, ocenione wszystkimi metodami, wykazywały wyciągi z owoców. Ekstrakty z liści o najwyższej aktywności uzyskiwano w wyniku ekstrakcji trwającej zaledwie 15 min, natomiast z kwiatów i owoców podczas godzinowego oddziaływania ultradźwięków na surowiec. W przypadku metod DPPH i FRAP najlepsze wyniki stwierdzono dla wyciągów metanolowych, natomiast ekstrakty etanolowe charakteryzowały się najwyższym stężeniem polifenoli, ocenionym metodą Folina-Ciocalteu'a.

**Wnioski.** Otrzymane wyniki wskazują, że liście i kwiaty jarzębu mogą być cennym źródłem antyoksydantów, które mogą zostać wykorzystane w różnych dziedzinach przemysłu.

**Słowa kluczowe:** wolne rodniki, stres oksydacyjny, ocena aktywności antyoksydacyjnej, *Sorbus aucuparia* L.

**Introduction.** Excessive free radicals production in the organism leads to so-called oxidative stress. This phenomenon is the cause of frequently occurring diseases, which include, among others, cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, cancers or a number of civilization diseases, with atherosclerosis and diabetes. The antioxidants application seems to be one of the ways of defense against this negative phenomenon. Plants are a valued source of compounds with antiradical potential.

**Aim.** To compare the antioxidant properties of rowan (*Sorbus aucuparia* L.) flowers, leaves and fruit extracts.

**Material & Method.** Methanol as well as 96 and 70%(v/v) ethanol were applied as solvent for ultrasound-assisted extraction, lasting 15, 30 and 60 minutes. The obtained extracts were evaluated for antioxidant activity using the DPPH, FRAP and Folin-Ciocalteu methods based on spectrophotometric measurements.

**Results.** The highest antioxidant potentials were found in the leaves and flowers extracts, while the lowest – in fruit extracts, as evaluated by all the methods. Samples with the highest activity were obtained in 15-minute extractions in the case of leaves, whereas flowers and fruit needed an hour of sonication on the raw material to exhibit the highest properties. The best results for DPPH and FRAP methods were observed in methanolic extracts, while the highest polyphenol concentrations, evaluated by the Folin-Ciocalteu method, were found in the ethanolic ones.

**Conclusion.** The obtained results show that rowan leaves and flowers can be a valuable source of antioxidants to be used in various branches of industry.

**Key words:** free radicals, oxidative stress, antioxidant activity evaluation, *Sorbus aucuparia* L.

© Probl Hig Epidemiol 2017, 98(2): 125-132

www.phie.pl

Nadesłano: 22.03.2017

Zakwalifikowano do druku: 15.05.2017

Adres do korespondencji / Address for correspondence

mgr inż. Anna Muzykiewicz

Katedra i Zakład Chemii Kosmetycznej i Farmaceutycznej

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

tel. 501 48 34 69, e-mail: anna.muzykiewicz@pum.edu.pl

## Wprowadzenie

Wiele procesów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki przebiega z użyciem energii. Znaczna jej część pozyskiwana jest w wyniku oddychania tlenowego, które zachodzi w mitochondriach. Podczas tego procesu dochodzi do czteroelektronowej redukcji cząsteczki tlenu do wody. W przypadku, gdy cząsteczka tlenu nie ulegnie całkowitej redukcji, powstają wolne rodniki tlenowe (ROS – *reactive oxygen species*). Oprócz nich, do grupy reaktywnych substancji tlenowych zaliczamy także związki wykazujące zdolność do ich generowania (np. nadtlenek wodoru –  $H_2O_2$ ) [1].

Terminem wolny rodnik tlenowy określamy cząsteczkę, która posiada co najmniej jeden atom tlenu i przynajmniej jeden niesparowany elektron na zewnętrznej powłoce elektronowej [1, 2]. Wolne rodniki tlenowe są zdolne do samodzielnego funkcjonowania i charakteryzują się krótkim okresem półtrwania. Ponadto odznaczają się wysoką reaktywnością i łatwo reagują z elementami komórek. Znaczna część ROS powstaje w wyniku naturalnych procesów metabolicznych zachodzących w organizmie, m.in. w procesach kurczenia się mięśni, w mechanizmach obronnych organizmu czy w procesach wytwarzania hormonów. Część z nich powstaje również w wyniku działania czynników egzogennych, tj. palenie papierosów, spożywanie alkoholu, źle zbilansowana dieta, zanieczyszczenia środowiska, a także promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe. W sprawnie funkcjonującym organizmie działanie ROS jest równoważone przez tzw. antyoksydacyjny układ ochronny (ADS – *antioxidant defense system*) [2]. W przypadku nadprodukcji utleniaczy i niewystarczającego działania ADS dochodzi do tzw. stresu oksydacyjnego, który możemy określić jako brak równowagi pomiędzy tworzeniem wolnych rodników a zdolnościami antyoksydacyjnymi organizmu. W wyniku stresu oksydacyjnego dochodzi do szeregu niekorzystnych zmian w organizmie, tj. peroksydacja lipidów, degradacja białek czy uszkodzenia mitochondrialnego i jądrowego DNA [1-3].

Nadmiar wolnych rodników jest przyczyną wielu, coraz częściej występujących chorób. ROS generuje rozwój chorób układu krążenia, w tym nadciśnienia tętniczego [4], a także chorób narządu wzroku (jaskry) [5] czy zwyrodnienia plamki związanej z wiekiem [6]. Przyczyniają się ponadto do powstawania chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera czy Parkinsona [7-9], jak również do niektórych chorób zapalnych, np. reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) [10, 11]. Stres oksydacyjny jest także ważnym czynnikiem patogenetycznym niepłodności męskiej [12] oraz wielu chorób cywilizacyjnych, w tym miażdżycy, cukrzycy [4] i związanych z nią powikłań, np. nefropatii cukrzycowej [13]. Uszkodzenia DNA, wywołane wolnymi rodnikami,

prowadzą do zaburzeń mechanizmów komórkowych, co może skutkować inicjacją procesów nowotworowych, przekształcaniem się zmian łagodnych w złośliwe, a także większą ilością przerzutów [14]. Należy nadmienić, iż nowotwory złośliwe stanowią drugą (po chorobach układu krążenia) przyczynę zgonów w Polsce. Stres oksydacyjny może zwiększać predyspozycje do zachorowania m.in. na raka piersi, płuc, prostaty, trzustki [15], a także na inne nowotwory, w tym pęcherza moczowego [16], jelita grubego [17] i tarczycy [18]. Oprócz ww. chorób, ROS mogą powodować inne schorzenia, jak chociażby choroby przyzębia [19].

Należy również pamiętać, że wolne rodniki tlenowe są jedną z głównych przyczyn starzenia się organizmu. Jednym z mechanizmów obrony przed nimi jest wykorzystanie niskocząsteczkowych antyoksydantów [4]. Cennym ich źródłem są rośliny. Jedną z roślin o potwierdzonych właściwościach antyoksydacyjnych jest jarząb pospolity (*Sorbus aucuparia* L.) zwany potocznie jarzębiną. Drzewo to (lub krzew), należące do rodziny różowatych (*Rosaceae*), jest bardzo pospolite w polskich lasach i zaroślach. Osiąga wysokość do 20 m. Charakteryzuje się rzadką koroną i gładką, jasnopopielatą korą. Okres jego kwitnienia przypada na maj, kiedy to pojawiają się białe kwiaty zebrane w baldachy. Owoce jarzębiny są kuliste, o cierpkim i gorzkim smaku. Niedojrzałe mają kolor pomarańczowy, natomiast w pełni dojrzałe są koloru szkarłatnoczerwonego [20].

## Cel

Porównanie właściwości przeciwutleniających metanolowych i etanolowych ekstraktów uzyskanych z liści, kwiatów oraz dojrzałych owoców jarzębu pospolitego (*S. aucuparia* L.) przy zastosowaniu trzech odmiennych metod oznaczania badanej aktywności.

## Materiały i metody

Surowiec roślinny będący przedmiotem badań stanowiły liście, dojrzałe owoce oraz kwiaty jarzębu pospolitego, rosnącego na terenie Świnoujścia. Zbioru kwiatów dokonano w połowie maja, liści na przełomie maja i czerwca, a owoców w połowie września w 2015 r. Materiał w formie świeżej poddawano ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami o częstotliwości 40 kHz, w łaźni ultradźwiękowej, w czasie 15, 30 i 60 min. Rozpuszczalnik stanowił 70 i 96%(v/v) etanol oraz metanol 99,8%(v/v). W ten sposób uzyskano 5% ekstrakty, które szczelnie zamknięte, przechowywano w zaciemnionym miejscu w temperaturze pokojowej do czasu analizy.

Odczynniki użyte do oceny aktywności antyoksydacyjnej, w tym 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH), kwas 6-hydrokso-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksylowy (troloks), 2,4,6-tripirydylo-S-triazyna (TPTZ), pochodziły z firmy Sigma Aldrich,

USA. Siarczan(VI) żelaza(II) heptahydrat, chlorek żelaza(III) heksahydrat, kwas galusowy i odczynnik Folina-Ciocalteu'a, wszystkie o czystości cz.d.a, były produkcji Mercka Darmstadt, Niemcy, natomiast węglan sodu cz.d.a, kwas solny 36% cz.d.a, octan sodu bezwodny cz.d.a, oraz kwas octowy 99,5% cz.d.a, pochodziły z firmy Chempur, Piekary Śląskie.

Oceny właściwości przeciwutleniających otrzymanych ekstraktów dokonano przy użyciu trzech metod: DPPH, FRAP i metody Folina-Ciocalteu'a. Znalazły one zastosowanie w analizach aktywności antyutleniających w warunkach *in vitro* i są powszechnie stosowane w celu oceny przydatności danych surowców, jako źródła składników czynnych w różnych dziedzinach przemysłu. W przypadku pierwszej, opartej na redukcji rodnika DPPH, wykorzystano nieznacznie zmodyfikowany schemat analizy opisanej przez Molyneuxa, Abderrahima i wsp., Apaka i wsp. oraz Regulską i Samsonowicz [21-24]. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 517 nm. Uzyskane wyniki porównano do aktywności etanolowego roztworu troloksu, który stanowił materiał odniesienia. Na podstawie zawartości niezredukowanego rodnika DPPH w badanej próbce, wykreślono krzywą wzorcową. Porównano do niej badane ekstrakty, biorąc pod uwagę fakt, że stężenie antyoksydantu jest odwrotnie proporcjonalne do zawartości niezredukowanego rodnika. Wyznaczono w ten sposób tzw. równoważniki troloksu, czyli stężenia wzorca, którym odpowiadała określona aktywność antyoksydacyjna (wyrażone w mg/g surowca), a także RSA (*radical scavenging activity*) [%] – wartość określającą zdolność do eliminacji wolnych rodników. Wykorzystano w tym celu wzór:

$$RSA [\%] = \left(1 - \frac{A_p}{A_0}\right) \cdot 100\%$$

przy czym  $A_p$  oznacza absorbancję próbki badanej, natomiast  $A_0$  – absorbancję próbki kontrolnej.

Drugą zastosowaną metodą była metoda FRAP oparta na innym typie zachodzącej reakcji. Polegała ona na ocenie zdolności do redukcji jonów żelaza  $Fe^{3+}$  z kompleksu żelazo-2,4,6-tripirydylo-S-triazyny (TPTZ). Oznaczeń dokonano metodą opisaną przez Apaka i wsp. Regulską i Samsonowicz oraz Cybula i Nowaka [23-25] z nieznacznymi modyfikacjami. Przy długości fali 593 nm dokonano pomiarów absorbancji badanych próbek, których wyniki odniesiono do wyników materiału wzorcowego – roztworu siarczanu(VI) żelaza(II). W ten sposób obliczono zdolność redukcji jonów żelaza, wyrażoną jako stężenie  $FeSO_4$ .

Całkowitą zawartość polifenoli w badanych ekstraktach oznaczono metodą Folina-Ciocalteu'a (F-C) według Apaka i wsp. oraz Tana i wsp. [23, 26], w przypadku której wprowadzono nieznaczne zmiany. Technika ta oparta jest na odwracalnej reakcji reduk-

cji molibdenu(VI) do molibdenu(V), który wchodzi w skład odczynnika F-C. Materiał odniesienia, będący podstawą do wykreślenia krzywej wzorcowej, stanowił roztwór kwasu galusowego (GA). Długość fali użyta przy pomiarach była równa 750 nm. Ogólną zawartość polifenoli wyrażono w mg GA/g surowca badanego.

W przypadku wszystkich zastosowanych metod, pomiarów dokonywano wykonując trzy niezależne próby dla każdego z uzyskanych ekstraktów. Z otrzymanych wyników wyliczono średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe (SD).

Ocenę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 12 wykorzystując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$ . Uzyskane wartości pogrupowano biorąc pod uwagę część rośliny, z jakiej pozyskano ekstrakty (liść, owoc, kwiat). Różnice międzygrupowe oceniano testem Tuckey'a, ( $n=3$ ), dzieląc uzyskane wyniki na grupy, oddzielnie dla RSA [%] oraz dla poszczególnych równoważników stężeń substancji wzorcowej.

## Wyniki

Tabela I przedstawia wyniki pomiarów zdolności przeciwutleniających dokonanych metodą redukcji rodnika DPPH. Porównano w niej aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z jarzębiny wyrażoną jako RSA [%], natomiast odpowiednik stężenia wzorcowego antyoksydanta (troloksu) wyrażono w mg troloksu/g surowca. Każda z badanych próbek wykazywała działanie przeciwutleniające, przy czym wyniki RSA mieściły się w zakresie od  $12,13 \pm 1,33\%$  do  $88,11 \pm 0,10\%$ . Najwyższą aktywność wykazano w grupie wyciągów z kwiatu, w tym dla ekstraktów metanolowych otrzymanych w wyniku działania ultradźwięków przez 60 min ( $88,11 \pm 0,10\%$ ), następnie przez 30 minut ( $87,31 \pm 0,86\%$ ), a w przypadku ekstrakcji 15-min ( $86,32 \pm 0,43\%$ ). Również wysokie wartości wykazały etanolowe ekstrakty z kwiatów – do  $87,64 \pm 0,50\%$  dla wyciągów, do których sporządzenia zastosowano 96%(v/v) etanol oraz do  $86,32 \pm 1,22\%$  w przypadku stężenia 70%(v/v) tego alkoholu. Aktywność przeciwutleniająca wyciągów z liści jarzębu utrzymywała się także na wysokim poziomie. W każdej grupie surowca najwyższe wartości RSA [%], a także równoważniki troloksu [mg troloksu/g surowca] wykazywały ekstrakty metanolowe, co może potwierdzać przydatność użycia tego rozpuszczalnika. Najniższe wartości RSA [%], różniące się znacząco od innych grup, stwierdzono dla wyciągów z owoców, szczególnie etanolowych, w tym  $12,13 \pm 1,33\%$  w przypadku ekstraktu w 70% etanolu, uzyskanego w łaźni ultradźwiękowej w czasie 30 min.

Tabela I. Właściwości przeciwutleniające ekstraktów z liści, owoców oraz kwiatów jarzębu pospolitego, oznaczone metodą DPPH wyrażone jako RSA [%] i równoważnik troloksu [mg troloksu/g surowca] (M±SD)

Table I. Antioxidant properties of rowan leaves, fruit and flowers extracts evaluated with DPPH method and expressed as Radical Scavenging Activity [%] and trolox equivalents [mg trolox/g raw material] (Mean±SD)

Czas ekstrakcji /Extraction time	Rozpuszczalnik /Solvent					
	etanol /ethanol 96%(v/v)		etanol /ethanol 70%(v/v)		metanol /methanol 99,88%(v/v)	
	RSA	równoważnik troloksu /trolox equivalent	RSA	równoważnik troloksu /trolox equivalent	RSA	równoważnik troloksu /trolox equivalent
	liść /leaf					
15 min	66,73±2,64 <sup>c</sup>	3,08±0,14 <sup>c</sup>	60,03±1,74 <sup>d</sup>	2,73±0,09 <sup>d</sup>	84,37±0,32 <sup>a</sup>	3,99±0,02 <sup>a</sup>
30 min	67,33±2,35 <sup>c</sup>	3,11±0,12 <sup>c</sup>	58,40±0,61 <sup>d</sup>	2,64±0,03 <sup>d</sup>	80,33±2,56 <sup>ab</sup>	3,78±0,13 <sup>ab</sup>
60 min	78,63±2,43 <sup>b</sup>	3,69±0,13 <sup>b</sup>	69,83±1,60 <sup>c</sup>	3,24±0,08 <sup>c</sup>	80,33±1,76 <sup>ab</sup>	3,78±0,09 <sup>ab</sup>
	owoc /fruit					
15 min	14,97±0,21 <sup>cd</sup>	0,38±0,01 <sup>cd</sup>	16,27±0,42 <sup>cd</sup>	0,45±0,02 <sup>cd</sup>	17,97±0,81 <sup>c</sup>	0,54±0,04 <sup>c</sup>
30 min	16,37±0,51 <sup>cd</sup>	0,46±0,03 <sup>cd</sup>	12,13±1,33 <sup>d</sup>	0,24±0,07 <sup>d</sup>	22,27±2,80 <sup>b</sup>	0,76±0,15 <sup>b</sup>
60 min	18,73±0,31 <sup>bc</sup>	0,58±0,02 <sup>bc</sup>	18,70±1,85 <sup>bc</sup>	0,58±0,10 <sup>bc</sup>	28,20±2,43 <sup>a</sup>	1,07±0,13 <sup>a</sup>
	kwiat /flower					
15 min	81,63±2,18 <sup>e</sup>	3,85±0,11 <sup>e</sup>	82,72±0,51 <sup>de</sup>	3,91±0,03 <sup>de</sup>	86,32±0,43 <sup>abc</sup>	4,09±0,02 <sup>abc</sup>
30 min	84,87±0,06 <sup>bcd</sup>	4,02±0,00 <sup>bcd</sup>	86,32±1,22 <sup>abc</sup>	4,09±0,06 <sup>abc</sup>	87,31±0,86 <sup>ab</sup>	4,15±0,04 <sup>ab</sup>
60 min	87,64±0,50 <sup>a</sup>	4,16±0,03 <sup>a</sup>	84,47±0,51 <sup>cd</sup>	4,00±0,03 <sup>cd</sup>	88,11±0,10 <sup>a</sup>	4,19±0,01 <sup>a</sup>

Przedstawione wartości średnie, oznaczone różnymi literami (<sup>a-c</sup>) różnią się istotnie statystycznie ( $\alpha=0,05$ ),  $n=3$ . Różnice międzygrupowe, oddzielnie dla wyników RSA [%] i równoważnika troloksu [mg troloksu/g surowca], oceniano grupując uzyskane wartości pod względem części rośliny z jakiej pozyskano ekstrakty.

Tabela II przedstawia wyniki pomiaru aktywności antyoksydacyjnej jako zdolności redukcji jonów  $Fe^{3+}$ , wyrażone jako stężenie  $FeSO_4$  [mg  $FeSO_4$ /g surowca]. Mieściły się one w przedziale od  $0,42\pm0,03$  do  $18,38\pm0,85$ , przy czym najwyższą wartość uzyskano dla metanolowego ekstraktu z liści (czas działania ultradźwięków 15 min), zaś najniższą zdolność redukcyjną wykazał ekstrakt z owoców w 96%(v/v) etanolu, uzyskany podczas ekstrakcji trwającej 15 min. Podobnie niskie wartości obserwowano dla prób ekstrahowanych przez 30 min ( $0,45\pm0,01$ ), przy czym należy zaznaczyć, że wszystkie ekstrakty z owoców wykazywały średnie wartości, wyraźnie niższe od ekstraktów z liści i kwiatów. Mieściły się one w zakresie od  $0,42\pm0,03$  do  $2,47\pm0,09$ , ze średnią  $1,23\pm0,78$  mg  $FeSO_4$ /g surowca. Dla porównania, obliczone równoważniki stężeń  $FeSO_4$  dla wyciągów z liści jarzębu utrzymywały się na poziomie od  $7,39\pm0,21$  do  $18,38\pm0,85$ , ze średnią  $13,59\pm3,38$  mg  $FeSO_4$ /g surowca, a dla wyciągów z kwiatów badanej rośliny, na poziomie od  $3,66\pm0,05$  do  $13,16\pm0,47$  (średnia  $9,06\pm3,09$  mg  $FeSO_4$ /g surowca).

Przedstawione wartości średnie, oznaczone różnymi literami (<sup>a-g</sup>) różnią się istotnie statystycznie ( $\alpha=0,05$ ),  $n=3$ . Różnice międzygrupowe oceniano grupując uzyskane wartości pod względem części rośliny z jakiej pozyskano ekstrakty.

Tabela II. Właściwości antyoksydacyjne ekstraktów z liści, owoców oraz kwiatów jarzębu pospolitego, oznaczone metodą FRAP wyrażone jako równoważnik  $FeSO_4$  [mg  $FeSO_4$ /g surowca] (M±SD)

Table II. Antioxidant properties of rowan leaves, fruit and flowers extracts evaluated with FRAP method expressed as  $FeSO_4$  equivalents [mg  $FeSO_4$ /g raw material] (Mean±SD)

Czas ekstrakcji /Extraction time	Rozpuszczalnik /Solvent		
	etanol /ethanol 96%(v/v)	etanol /ethanol 70%(v/v)	metanol /methanol 99,8%(v/v)
	liść /leaf		
15 min	13,54±0,12 <sup>b</sup>	16,66±0,28 <sup>a</sup>	18,38±0,85 <sup>a</sup>
30 min	12,66±0,61 <sup>bc</sup>	7,39±0,21 <sup>d</sup>	12,03±1,62 <sup>bc</sup>
60 min	14,15±1,44 <sup>b</sup>	16,64±0,67 <sup>a</sup>	10,87±0,17 <sup>c</sup>
owoc /fruit			
15 min	0,42±0,03 <sup>f</sup>	0,53±0,03 <sup>ef</sup>	1,19±0,03 <sup>d</sup>
30 min	0,45±0,01 <sup>f</sup>	1,24±0,08 <sup>d</sup>	1,91±0,01 <sup>c</sup>
60 min	0,69±0,02 <sup>e</sup>	2,14±0,14 <sup>b</sup>	2,47±0,09 <sup>a</sup>
kwiat /flower			
15 min	3,66±0,05 <sup>g</sup>	9,13±0,70 <sup>d</sup>	11,17±0,11 <sup>bc</sup>
30 min	5,28±0,63 <sup>f</sup>	9,62±0,78 <sup>d</sup>	13,16±0,47 <sup>a</sup>
60 min	7,54±0,19 <sup>e</sup>	11,93±0,33 <sup>ab</sup>	10,04±0,23 <sup>cd</sup>

Wyniki pomiarów zawartości polifenoli, przeprowadzonych z użyciem metody Folin-Ciocalteu'a, przedstawiono w tabeli III. Badane ekstrakty wykazywały wartości od  $0,01\pm0,00$  do  $7,58\pm0,46$  mg GA/g surowca. Podobnie, jak w przypadku poprzednich oznaczeń, najwyższe wyniki uzyskano w grupie ekstraktów z liści i kwiatu jarzębu pospolitego, natomiast najniższe dla ekstraktów z owoców. Znaczną zawartością polifenoli cechowały się ekstrakty z liści sporządzone w 96%(v/v) etanolu w czasie 15 min ( $7,47\pm0,10$ ) i w czasie 60 min ( $7,11\pm0,06$  mg GA/g surowca), a także ekstrakt w 70%(v/v) etanolu poddawany działaniu ultradźwięków przez 60 min

Tabela III. Ogólna zawartość polifenoli w liściach, owocach oraz kwiatach jarzębu pospolitego, oznaczona metodą Folina-Ciocalteu'a wyrażona w równoważnikach kwasu galusowego [mg GA/g surowca] (M±SD)

Table III. Total phenolic content as gallic acid equivalent in rowan leaves, fruit and flowers evaluated with Folin-Ciocalteu method [mg GA/g raw material] (Mean±SD)

Czas ekstrakcji /Extraction time	Rozpuszczalnik /Solvent		
	etanol /ethanol 96%(v/v)	etanol /ethanol 70%(v/v)	metanol /methanol 99,8%(v/v)
	liść /leaf		
15 min	7,47±0,10 <sup>a</sup>	5,27±0,14 <sup>e</sup>	6,73±0,05 <sup>c</sup>
30 min	6,15±0,07 <sup>d</sup>	3,95±0,08 <sup>f</sup>	6,87±0,02 <sup>bc</sup>
60 min	7,11±0,06 <sup>ab</sup>	7,45±0,27 <sup>a</sup>	6,79±0,14 <sup>bc</sup>
	owoc /fruit		
15 min	0,01±0,00 <sup>d</sup>	0,06±0,01 <sup>d</sup>	0,58±0,02 <sup>c</sup>
30 min	0,20±0,03 <sup>d</sup>	0,59±0,05 <sup>c</sup>	1,35±0,15 <sup>b</sup>
60 min	0,25±0,04 <sup>d</sup>	1,48±0,09 <sup>ab</sup>	1,62±0,16 <sup>a</sup>
	kwiat /flower		
15 min	4,62±0,14 <sup>d</sup>	6,61±0,19 <sup>b</sup>	6,23±0,11 <sup>b</sup>
30 min	5,54±0,05 <sup>c</sup>	7,47±0,14 <sup>a</sup>	6,43±0,09 <sup>b</sup>
60 min	6,12±0,07 <sup>b</sup>	7,58±0,46 <sup>a</sup>	6,54±0,15 <sup>b</sup>

(7,45±0,27). Najwyższe wartości uzyskano badając etanolowe (70% v/v) wyciągi z kwiatów (7,58±0,46), gdy czas ekstrakcji wynosił 60 min oraz 7,47±0,14 mg GA/g surowca w przypadku ekstrakcji 30-min. Próby uzyskane z wytrawiania owoców jarzębu w 96%(v/v) etanolu wykazywały niskie właściwości na poziomie od 0,01±0,00 do 0,25±0,04, a w 70%(v/v) etanolu od 0,06±0,01 do 1,48±0,09 mg GA/g surowca.

W grupie wyciągów z kwiatów i owoców zaobserwowano wzrost badanych wartości, dla ekstraktów sporządzonych przy użyciu tych samych rozpuszczalników, wraz ze wzrostem czasu działania ultradźwięków na próbę. Nie stwierdzono jednak podobnej prawidłowości w przypadku ekstraktów z liści.

Przedstawione wartości średnie, oznaczone różnymi literami (<sup>a-f</sup>) różnią się istotnie statystycznie ( $\alpha=0,05$ ),  $n=3$ . Różnice międzygrupowe oceniano grupując uzyskane wartości pod względem części rośliny z jakiej pozyskano ekstrakty.

## Dyskusja

Biorąc pod uwagę negatywny wpływ stresu oksydacyjnego na organizm, zasadnym wydaje się zapobieganie temu zjawisku. Oprócz unikania egzogennych czynników wywołujących nadprodukcję wolnych rodników, tj. palenia tytoniu czy spożywania nadmiernych ilości alkoholu, bardzo istotne staje się przyjmowanie antyoksydantów, np. w postaci suplementów diety. Mają one na celu zapobieganie lub zmniejszenie ryzyka rozwoju chorób, w patogenezie których biorą udział ROS [1]. Antyoksydanty, ze względu na hamowanie wpływu wolnych rodników na proces fotostarzenia skóry, coraz częściej są składnikami kosmetyków i dermokosmetyków przeznaczonych dla skóry dojrzałej

[27]. W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie fitomedycyną – działem nauki zajmującym się naturalnymi substancjami leczniczymi [20], w tym także antyoksydantami. Dlatego też podjęto próbę oceny właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów z jarzębu pospolitego pod kątem ich ewentualnego zastosowania, jako źródeł przeciwutleniających. Wyniki otrzymane przy użyciu metody DPPH wykazały, iż najwyższą zdolnością do zmiatania wolnych rodników, zarówno w przypadku liści, owoców, jak i kwiatów, cechują się wyciągi metanolowe (tab. I). Olszewska i Michel zwracają również uwagę na bardzo wysoką aktywność metanolowych ekstraktów z kwiatostanów jarzębiny [28], a dodatkowo również Olszewska i wsp. potwierdzają analizowane właściwości w przypadku liści badanych metodą DPPH [29]. Ta sama autorka sugeruje, że za wysoką aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z liści i kwiatów jarzębiny odpowiedzialne są związki fenolowe w nich zawarte [30], co potwierdziło się w badaniach własnych. Leja i wsp. wskazują na właściwości przeciwutleniające owoców jarzębu, jednakże w porównaniu z owocami niektórych innych roślin, pospolicie występujących na terenie naszego kraju, m.in. dzięki róży czy głogu jednoszyjkowego, ich aktywność antyoksydacyjna jest stosunkowo niska [31].

W przedstawionym badaniu, przeprowadzonym z użyciem metody FRAP, najwyższym stężeniem równoważnika FeSO<sub>4</sub> [mg/g surowca] wykazywały się metanolowe ekstrakty zarówno z liści, jak i w nieco mniejszym stopniu z kwiatów, zaś ekstrakty z owoców charakteryzowały się najniższym stężeniem odpowiadającym substancji wzorcowej (tab. II). Jabłońska-Ryś i wsp. również podjęła się badania metodą FRAP owoców jarzębiny. Uzyskane przez nich wyniki potwierdzają nasze obserwacje, że owoce te charakteryzują się niską aktywnością antyoksydacyjną [32]. W badaniach przeprowadzonych w naszej jednostce z użyciem omawianej metody, stwierdzono bardzo wysoką aktywność przeciwrodnikową liści maliny i jeżyny, co potwierdza założenie, iż właśnie te części różnych rodzimych roślin mogą być cennym źródłem związków o potencjale przeciwutleniającym [33]. Do podobnych wniosków doszedł również Kruczek i wsp., który zwrócił również uwagę na fakt, że owoce tych roślin są cenionym surowcem stosowanym w ziołolecznictwie, natomiast liście, pomimo bogatej zawartości związków o potencjale antyrodnikowym, stosowane są dopiero od niedawna [34].

Wyniki uzyskane w naszym badaniu, otrzymane przy pomocy metody Folina-Ciocalteu'a, wykazały, że najwyższym stężeniem polifenoli, wyrażanym jako równoważnik kwasu galusowego [mg/g surowca], charakteryzują się ekstrakty z kwiatów pozyskane przy użyciu 70%(v/v) alkoholu etylowego jako rozpuszczalnika. Nieznacznie niższe wartości stwierdzono w przypadku ekstraktów z liści w 96%(v/v) etanolu.

Podobnie, jak w pozostałych metodach, ekstrakty z owoców jarzębiny wykazywały najniższe stężenia polifenoli, a co za tym idzie, najniższy potencjał antyoksydacyjny. Olszewska i wsp. dokonali również oceny zawartości polifenoli metodą F-C w liściach i kwiatostanach jarzębiny pospolitej, uzyskując wartości wskazujące na nieznacznie wyższe stężenie polifenoli (wyrażone poprzez stężenie kwasu galusowego) w kwiatostanach niż w liściach [29]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach własnych prezentowanych w niniejszej publikacji (tab. III). Wspomniani badacze potwierdzili swoje obserwacje w kolejnej publikacji, wskazując ponadto na bardzo niskie stężenie polifenoli w owocach jarzębiny pospolitej [30]. W swoich badaniach poddali oni również analizie metodą F-C kwiatostany, liście i owoce innej odmiany jarzębu – jarzębu brekinia (*Sorbus torminalis*), uzyskując podobne wyniki. W tym przypadku także kwiatostany charakteryzowały się najwyższym stężeniem polifenoli, a owoce najniższym, jednak wyniki dla wszystkich trzech surowców były niższe niż dla odmiany *S. aucuparia* L. [30].

W przeprowadzonych badaniach własnych wykazano, że wyciągi z liści o najwyższej aktywności antyoksydacyjnej, ocenianej danymi metodami, otrzymuje się w wyniku ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami w czasie 15 min, natomiast w przypadku owoców i kwiatów najkorzystniejsza była ekstrakcja 60-min. Bimakr i wsp. sugerują, iż ekstrakcja z użyciem ultradźwięków jest bardzo dobrą metodą otrzymywania wyciągów roślinnych o wysokiej zawartości przeciwutleniaczy i związków fenolowych [35]. Tiwari opisuje, że na wyniki badań ekstraktów uzyskanych z użyciem ultradźwięków mogą mieć wpływ m.in. takie czynniki, jak rozpuszczalnik, częstotliwość zastosowanych ultradźwięków czy czas ekstrakcji. Zaznacza on, że wydłużenie czasu wytrawiania surowca może korzystnie wpływać na zawartość substancji aktywnych w wyciągach. Z drugiej zaś strony, może jednak prowadzić do niepożądanych zmian w substancjach uzyskiwanych w procesie ekstrakcji [36].

W badaniach z zastosowaniem metod DPPH i FRAP najwyższą aktywność antyoksydacyjną wykazywały metanolowe ekstrakty z poszczególnych części rośliny (tab. I, II). Prawdopodobnie ta potwierdziła się w badaniach innych autorów, którzy analizowali rośliny, takie jak ziarniaki gryki [37] czy liście miłorzębu japońskiego [38, 39]. Wskazywali oni na fakt, że w porównaniu do innych rozpuszczalników, ekstrakty metanolowe charakteryzują się wyższą aktywnością antyoksydacyjną. Wyniki te mogą sugerować dobre właściwości ekstrakcyjne metanolu względem związków o potencjale antyoksydacyjnym.

Rozbieżności w wynikach otrzymanych różnymi metodami mogą być skutkiem odmiennych mecha-

nizmów ich działania. Według Cybula i Nowaka metoda DPPH jest często wykorzystywana do badania zdolności antyoksydacyjnych naturalnych surowców, zwłaszcza przy określaniu właściwości przeciworodnikowych związków fenolowych. Autorzy ci sugerują, że jej niewątpliwą zaletą jest szybkość dokonywania pomiarów i dokładność otrzymanych wyników, a także dość wysoka porównywalność z wynikami uzyskanymi innymi metodami, natomiast ograniczeniem może być trudność oznaczania z jej użyciem antyoksydantów hydrofilowych, ze względu na fakt, iż DPPH rozpuszcza się jedynie w rozpuszczalnikach organicznych. Metoda FRAP pozwala z kolei na oznaczenie zdolności redukcji jonów żelaza  $Fe^{3+}$ . Jej zaletą są niskie koszty, łatwość przygotowania odczynników, szybkość dokonywania pomiarów, a także wysoka powtarzalność wyników. Dlatego też, jest ona coraz częściej wykorzystywana do badań antyoksydantów pochodzenia roślinnego. Trzecia ze stosowanych w badaniu technik, metoda Folina-Ciocalteu'a, służy do określania całkowitej zawartości polifenoli. Jej zaletą jest łatwość wykonania, w związku z czym jest często stosowana w analizie ekstraktów roślinnych, natomiast za wadę uważa się jej małą specyficzność [25]. Należy jednak zauważyć, że niezależnie od zastosowanej techniki wyniki badań własnych wskazywały na wyraźnie wyższą aktywność antyoksydacyjną liści i kwiatostanów jarzębiny, w porównaniu do ekstraktów pozyskiwanych z owoców (tab. I, II, III).

Wysoka aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z liści i kwiatów jarzębiny może mieć przełożenie na wykorzystanie tych surowców jako potencjalnych źródeł substancji antyrodnikowych. Owoce jarzębiny spożywane są w postaci win, nalewek, powideł, soków, a także w postaci wysuszonej [40]. Przetwory z nich sporządzone wykorzystywane są również w przemyśle farmaceutycznym, m.in. w produkcji środków na hemoroidy czy wspomagających krążenie obwodowe u chorych na miażdżycę. Karczmarszuk wspomina o stosowaniu odwarów z liści również w leczeniu schorzeń dróg oddechowych i moczowych oraz przy zaburzeniach trawienia. Napary z kwiatów jarzębiny stosowane są przy zaparciach [41]. Niewiele jest doniesień dotyczących wykorzystania wyciągów z jarzębu jako źródła antyoksydantów w kosmetykach przeciwstarzeniowych, co może być zastanawiające, z uwagi na wspomniany wcześniej fakt, iż wolne rodniki stanowią jedną z przyczyn starzenia się także skóry, w przypadku której objawy możemy obserwować najszybciej. Składniki o działaniu przeciwutleniającym są często stosowanymi substancjami aktywnymi w preparatach przeciwstarzeniowych. Autorem pierwotnej wersji tzw. 'wolnorodnikowej teorii starzenia' był Harman. Teoria ta zakłada, że wraz z wiekiem produkcja wolnych rodników nasila się, natomiast aktywność systemów antyoksydacyjnych spada. Osłabieniu ulegają komórkowe

mechanizmy naprawy, w wyniku czego dochodzi do zaburzeń wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Od 1956 r. teoria ta była wielokrotnie modyfikowana i w dalszym ciągu jest przedmiotem badań [42, 43]. Biorąc pod uwagę rosnącą liczbę zgłaszanych wynalazków i patentów dotyczących wyciągów roślinnych o potencjale antyoksydacyjnym [44], otrzymane wyniki mogą sugerować przydatność zastosowania ekstraktów z badanych surowców pochodzących z jarzębu jako cennego źródła przeciwutleniających, m.in. w przemyśle kosmetycznym czy farmaceutycznym. Pamiętać należy jednak, że wpływ badanych składników na organizm człowieka, zależy

może od wielu innych czynników związanych z utrzymaniem równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej.

## Wnioski

Zarówno kwiaty, liście i owoce jarzębu pospolitego (*Sorbus aucuparia* L.) wykazują właściwości przeciwutleniające. Najwyższą aktywnością antyoksydacyjną charakteryzowały się ekstrakty z liści i kwiatów, natomiast najniższą wyciągi pozyskiwane z owoców. Wskazuje to, że liście i kwiaty jarzębu stanowią cenne źródło antyoksydantów, które mogą zostać wykorzystane w różnych dziedzinach przemysłu.

## Piśmiennictwo / References

- Skiba M, Pedrycz A, Cichacz B. Reaktywne rodniki tlenowe – skuteczność antyoksydantów w terapii. *Pol Hyp Res* 2016,1(54): 41-48.
- Czajka A. Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu. *Now Lek* 2006, 75(6): 582-586.
- Kulbacka J, Saczko J, Chwiłkowska A. Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek. *Pol Merk Lek* 2009, 27(157): 44-47.
- Łuszczewski A, Matyska-Piekarska E, Treffler J i wsp. Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia* 2007, 45(5): 284-289.
- Rokicki W, Kabiesz A, Romaniuk W. Związek stresu oksydacyjnego z jaskrą. *Ann Acad Med Siles* 2014, 68(1): 62-65.
- Drobnik-Słowik M, Karczewicz D, Safranow K. Potencjalny udział stresu oksydacyjnego w patogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD). *Postepy Hig Med Dosw* 2007, 61: 28-37.
- Jiang T, Sun Q, Chen S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2016, 147: 1-19.
- Karpińska A, Gromadzka G. Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne – znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych. *Postepy Hig Med Dosw* 2013, 67: 43-53.
- Kubis AM, Janusz M. Choroba Alzheimera – nowe możliwości terapeutyczne oraz stosowane modele eksperymentalne. *Postepy Hig Med Dosw* 2008, 62: 372-392.
- Mateen S, Moin S, Zafar A, Khan AQ. Redox signaling in rheumatoid arthritis and the preventive role of polyphenols. *Clin Chim Acta* 2016, 463: 4-10.
- Matyska-Piekarska E, Łuszczewski A, Łacki J, Wawer I. Rola stresu oksydacyjnego w etiopatogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. *Postepy Hig Med Dosw* 2006, 60: 617-623.
- Havrylyuk A, Chopyak V, Nakonechnyyj A, Kurpisz M. Nowe aspekty niepłodności partnerskiej: czynnik męski. *Postepy Hig Med Dosw* 2015, 69: 1228-1238.
- Aghadavod E, Khodadadi S, Baradaran A, et al. Role of oxidative stress and inflammatory factors in diabetic kidney disease. *Iran J Kidney Dis* 2016, 10(6): 337-343.
- Ścibior-Bentkowska D, Czeczot H. Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny. *Postepy Hig Med Dosw* 2009, 63: 58-72.
- Janicka A, Szymańska-Pasternak J, Bober J. Polimorfizm genów obrony antyoksydacyjnej a ryzyko rozwoju raka. *Ann Acad Med Stetin* 2013, 59(2): 18-28.
- Sawicka E, Lisowska A, Kowal P, Długosz A. Rola stresu oksydacyjnego w raku pęcherza moczowego. *Postepy Hig Med Dosw* 2015, 69: 744-752.
- Klimczak A, Kubiak K, Cybulska M i wsp. Etiologia raka jelita grubego oraz bariera antyoksydacyjna ustroju. *Pol Merk Lek* 2010, 28(165): 223-226.
- Vodusek AL, Goricar K, Gazic B, et al. Antioxidant defence-related genetic variants are not associated with higher risk of secondary thyroid cancer after treatment of malignancy in childhood or adolescence. *Radiol Oncol* 2016, 50(1): 80-86.
- Król K, Konopka T. Reaktywne pochodne tlenu i mechanizmy antyoksydacyjne w patogenezie zapalenia przyzębia. *Dent Med Probl* 2003, 40(1): 121-128.
- Nurzyńska-Wierdak R. Właściwości lecznicze i wykorzystanie w fitoterapii niektórych gatunków roślin drzewiastych. Drzewa liściaste półkuli północnej. *Ann UMCS, sec EEE Horticultura* 2016, 26(2): 23-40.
- Molyneux P. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004, 26(2): 211-219.
- Abderrahim F, Arribas SM, Gonzalez MC, Condezo-Hoyos L. Rapid high-throughput assay to assess scavenging capacity index using DPPH. *Food Chem* 2013, 141(2): 788-794.
- Apak R, Özyürek M, Güçlü K, et al. Antioxidant activity/capacity measurement. I. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J Agric Food Chem* 2016, 64(5): 997-1027.
- Regulska E, Samsonowicz M. Ekstrakty ziołowe w aspekcie zawartości związków polifenolowych i aktywności przeciwutleniającej. [w:] Właściwości produktów i surowców żywnościowych. Tarko T, Duda-Chodak A, Witczak MD, Najgebauer-Lejko D (red). *Pol Tow Technol Żywn* 2014: 227-237.
- Cybul M, Nowak R. Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. *Herba Pol* 2008, 54(1): 68-78.
- Tan YS, Baskaran A, Nallathamby N, et al. Influence of customized cooking methods on the phenolic contents and antioxidant activities of selected species of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.). *J Food Sci Technol* 2015, 52(5): 3058-3064.

27. Nowak A, Zielonka J, Turek M, Klimowicz A. Wpływ przeciwutleniaczy zawartych w owocach na proces fotostarzenia się skóry. *Post Fitoter* 2014, 15(2): 94-99.
28. Olszewska MA, Michel P. Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species in relation to their polyphenolic composition. *Nat Prod Res* 2009, 23(16): 1507-1521.
29. Olszewska MA, Nowak S, Michel P. Assessment of the content of phenolics and antioxidant action of inflorescences and leaves of selected species from the genus *Sorbus sensu stricto*. *Molecules* 2010, 15(12): 8769-8783.
30. Olszewska MA. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of the inflorescences, leaves and fruits of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. *Acta Pol Pharm* 2011, 68(6): 945-953.
31. Leja M, Mareczek A, Nanaszko B. Antyoksydacyjne właściwości owoców wybranych gatunków dziko rosnących drzew i krzewów. *Rocz AR Pozn* 2007, 383(41): 327-331.
32. Jabłońska-Ryś E, Zalewska-Korona M, Kalbarczyk J. Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *J Fruit Ornament Plant Res* 2009, 17(2): 115-120.
33. 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): 52-59.
34. Kruczek M, Kostecka-Gugała A, Augustynowicz J i wsp. Liście maliny i jeżyny jako surowiec dla przemysłu farmaceutycznego. *Przem Chem* 2015, 94(8): 1431-1436.
35. Bimakr M, Rahman RA, Taip FS, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa hispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition. *Molecules* 2012, 17(10): 11748-11762.
36. Tiwari BK. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trend Anal Chem* 2015, 71: 100-109.
37. Hęś M, Górecka D, Dziedzic K i wsp. Właściwości przeciwutleniające ekstraktów z ziarniaków gryki i produktów otrzymanych w procesie ich przerobu. *Zywn Nauk Technol Jakosc* 2015, 1(98): 102-115.
38. Sati P, Pandey A, Rawat S, Rani A. Phytochemicals and antioxidants in leaf extracts of *Ginkgo biloba* with reference to location, seasonal variation and solvent system. *J Pharm Res* 2013, 7(9): 804-809.
39. Boonkaew T, Camper ND. Biological activities of *Ginkgo* extracts. *Phytomedicine* 2005, 12(4): 318-323.
40. Łuczaj Ł. Dziko rosnące rośliny jadalne użytkowane w Polsce od połowy XIX w. do czasów współczesnych. *Pol Ethnobiol* 2011, 1: 57-125.
41. Karczmarczuk R. Jarząb, jarzębina i jarzębiak. *Wszechświat* 2011, 112(7-9): 188-193.
42. Kirkwood TBL, Kowald A. The free-radical theory of ageing – older, wiser and still alive: Modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support. *Bioessays* 2012, 34(8): 692-700.
43. Clancy D, Birdsall J. Flies, worms and the Free Radical Theory of ageing. *Ageing Res Rev* 2013, 12(1): 404-412.
44. Ratz-Łyko A. Składniki aktywne pochodzenia roślinnego w kosmetykach anti-age. *Cosmet Today Patents Inventions* 2013, 3: 10-13.