

NATALIA ŻUREK, IRENEUSZ KAPUSTA, TOMASZ CEBULAK

WPLYW WARUNKÓW EKSTRAKCJI NA POTENCJAŁ PRZECIWIUTLENIAJĄCY WYCIĄGÓW Z KWIATÓW, LIŚCI I OWOCÓW GŁOGU (*CRATAEGUS* × *MACROCARPA* L.)

Streszczenie

Głóg należy do roślin o dużej zawartości związków biologicznie czynnych, których stężenie w gotowym wyciągu zależy między innymi od zastosowanych parametrów ekstrakcji. Celem pracy była optymalizacja warunków ekstrakcji (temperatury, czasu i stężenia rozpuszczalników) zapewniających osiągnięcie jak największego potencjału przeciwutleniającego preparatów otrzymanych z liofilizowanych części anatomicznych głogu (*Crataegus* × *macrocarpa* L.) – z kwiatów, liści i owoców. Ekstrakcję prowadzono w temp. 20 ± 2 °C przy użyciu trzech rozpuszczalników, w dwóch stężeniach każdy, w ciągu 2 i 24 h. Porównano również efektywność ekstrakcji wspomaganą działaniem ultradźwięków. Potencjał przeciwutleniający określono metodami: ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP i CUPRAC oraz za pomocą testu mocy redukującej. Dodatkowo oznaczono zawartość polifenoli i flawonoidów.

W uzyskaniu wyciągów z kwiatów głogu najbardziej skuteczna okazała się 24-godzinna ekstrakcja 70-procentowym acetonem z dodatkiem 1-procentowego kwasu mrówkowego. Ekstrakty te charakteryzowały się najwyższymi wartościami potencjału przeciwutleniającego ABTS^{•+}, CUPRAC i FRAP. Z kolei w wyciągach z owoców, jak i liści głogu najwyższy potencjał przeciwutleniający stwierdzono po 24-godzinnej ekstrakcji wspomaganą dwukrotnym działaniem ultradźwięków. Najwyższe wartości określonego potencjału wyciągów z owoców głogu ekstrahowanych 50-procentowym acetonem uzyskano po zastosowaniu metody ABTS^{•+} i CUPRAC, natomiast w ekstraktach z liści głogu – po zastosowaniu metody DPPH[•], CUPRAC oraz testu mocy redukującej. Pod względem potencjału przeciwutleniającego najbardziej efektywnym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji liofilizatów z głogu jest 70-procentowy roztwór acetonowo-wodny, wspomagany ultradźwiękami bądź 1-procentowym kwasem mrówkowym.

Słowa kluczowe: głóg, ekstrakcja, potencjał przeciwutleniający, flawonoidy, polifenole ogółem

Wprowadzenie

Rodzaj *Crataegus* L. (głóg), należący do rodziny różowatych (*Rosacea*), obejmuje ok. 300 gatunków krzewów i drzew szeroko rozpowszechnionych w Europie, Azji

Mgr inż. N. Żurek, dr hab. I. Kapusta, prof. UR, dr inż. T. Cebulak, Zakład Ogólnej Technologii Żywności i Żywnienia Człowieka, Instytut Technologii Żywności i Żywnienia, Uniwersytet Rzeszowski, ul. Żelaznowicza 4, 35-601 Rzeszów. Kontakt: nataliazurek7@gmail.com

i Ameryce Północnej [7]. Głóg jest rośliną dziko rosnącą w lasach i zaroślach w postaci ciernistych, rozgałęzionych 2 - 5-metrowych krzewów lub drzew osiągających wysokość do 8 metrów [10]. W Polsce występuje pospolicie w niższych partiach górskich oraz na niżu, zwłaszcza zachodnim. Głóg zaliczany jest do roślin o długiej historii stosowania w ziołolecznictwie i tradycyjnej medycynie chińskiej. Wyciągi z kwiatostanów, liści lub owoców głogu wykorzystywane były jako środek ściągający, uspokajający i moczopędny [18, 21]. Obecnie surowce pochodzące z głogu w największym stopniu znane są z korzystnego wpływu na układ sercowo-naczyniowy. Wieloma badaniami klinicznymi potwierdzono ich działanie antyarytmiczne, antyagregacyjne, hipotensyjne i hipolipidemiczne [1, 5, 19].

Wymienione właściwości prozdrowotne, potwierdzone w badaniach *in vitro* i *in vivo*, wynikają z dużej zawartości w głogu związków biologicznie aktywnych, w tym w głównej mierze flawonoidów i procyanidyn, wykazujących wysoki potencjał przeciwutleniający [5, 17]. Spośród zidentyfikowanych do tej pory 25 flawonoidów, do najważniejszych należą: flawony (witeksyna) oraz flawonole, w tym pochodne kwercetyny (rutozyd, hiperozyd), a spośród procyanidyn – oligomeryczne proantocyjanidyny. W kwiatach, owocach i liściach obecne są również kwasy: fenolowe (chlorogenowy i kawowy), trójterpenowe (oleanowy, ursolowy), organiczne (szczawiovowy i winowy) oraz składniki mineralne [7, 9, 15].

Stopień zawartości tych związków w poszczególnych częściach rośliny zależy od wielu czynników, w tym przede wszystkim od gatunku oraz warunków środowiskowych, jak rodzaj gleby i ekspozycja na słońce [12, 14]. Równie ważnym zagadnieniem jest wybór metody ekstrakcji związków biologicznie aktywnych z materiału roślinnego. Warunki ekstrakcji wynikające z zastosowanej metody ekstrakcji, tj. temperatura, czas trwania ekstrakcji, stan fizyczny surowca lub stopień jego homogenizacji wpływają na efektywność pozyskiwania fitozwiązków z materiału roślinnego. Stąd prowadzone są badania nad optymalizacją i intensyfikacją procesu ekstrakcji w odniesieniu do konkretnych surowców [8, 11, 17]. Klasyczne metody ekstrakcji, jak maceracja czy ekstrakcja w aparacie Soxhleta są coraz częściej modyfikowane bądź zastępowane przez nowo opracowane techniki. W ostatnich latach dużego znaczenia nabrała m.in. ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym (SFE), ekstrakcja wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (MAE) lub ultradźwiękami (UAE) oraz ekstrakcja rozpuszczalnikiem pod zwiększonym ciśnieniem (PFE) [4, 23].

Celem pracy była optymalizacja warunków ekstrakcji (temperatury, czasu i stężenia rozpuszczalników) zapewniających osiągnięcie jak największego potencjału przeciwutleniającego preparatów otrzymanych z liofilizowanych części anatomicznych głogu – z kwiatów, liści i owoców.

Material i metody badań

Materiałem doświadczalnym były kwiaty, liście i owoce z krzewu głogu (*Crataegus × macrocarpa* L.) zebrane w 2016 roku na terenie miejscowości Błazowa. Świeży surowiec poddawano liofilizacji (liofilizator ALPHA 1-2 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Niemcy), rozdrabnianiu w moździerzu, a następnie przechowywano w szczelnie zamkniętych pojemnikach w warunkach zamrażalniczych ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) do momentu analizy. Rozdrobniony materiał ekstrahowano za pomocą trzech różnych rozpuszczalników: wodnych roztworów metanolu (CH_3OH), etanolu ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) i acetonu ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) w dwóch stężeniach (50 i 70 % v/v). Ekstrakcję prowadzono w trzech wariantach:

- w temp. $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, przez 2 i 24 h,
- w temp. $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, z dwukrotnym oddziaływaniem ultradźwiękami (20 min, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$), przez 2 i 24 h,
- w temp. $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, z udziałem 1-procentowego kwasu mrówkowego w mieszaninie ekstrakcyjnej, przez 2 i 24 h.

Po przeprowadzonej ekstrakcji mieszaninę odwirowywano (7 tys. obr./min) przy użyciu wirówki Centrifuge 5430 (Eppendorf Poland, Polska).

Charakterystyka fitochemiczna otrzymanych ekstraktów obejmowała określenie potencjału przeciwutleniającego z wykorzystaniem kationorodnika $\text{ABTS}^{\cdot+}$ [16], rodnika DPPH^{\cdot} [22], metody CUPRAC [15], FRAP [3] oraz z zastosowaniem pomiaru mocy redukującej (AAE) [13]. Dodatkowo w badanych ekstraktach oznaczano całkowitą zawartość polifenoli (TPC) [20] oraz całkowitą zawartość flawonoidów (TFC) [8].

Pomiary absorbancji prowadzono przy użyciu spektrofotometru UV-Vis Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, USA). Wyniki uzyskane metodami z rodnikiem $\text{ABTS}^{\cdot+}$ i DPPH^{\cdot} oraz FRAP i CUPRAC wyrażano w mmol równoważników troloksu (TE) na 100 g suchej masy [mmol TE/100 g s.m.]. Moc redukującą określano poprzez pomiar absorbancji (A) badanych ekstraktów o stężeniu 1 mg/ml przy długości fali $\lambda = 700\text{ nm}$. Wyższa absorbancja wskazuje na wyższą moc redukującą. Całkowitą zawartość polifenoli wyrażano w mg kwasu galusowego (GAE) na 1 g suchej masy [mg GAE/g s.m.], zaś całkowitą zawartość flawonoidów – w mg kwercetyny (QE) na 1 g suchej masy [mg QE/g s.m.]. Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki poddano analizie statystycznej w programie Statistica 12.0 (StatSoft, USA). Obliczono współczynniki korelacji Pearsona oraz przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Do zweryfikowania istotności różnic między wartościami średnimi zastosowano test Duncana ($p \leq 0,05$).

Wyniki i dyskusja

Wyniki oznaczeń przedstawiono w tab. 1 - 3.

Tabela 1. Potencjał przeciwutleniający oraz zawartość polifenoli i flawonoidów w ekstraktach z kwiatów głogu

Table 1. Antioxidant potential and content of polyphenols and flavonoids in hawthorn flower extracts

Warunki ekstrakcji Extraction conditions		Rozpuszczalnik / Solvent						
		CH ₃ OH [%]		C ₂ H ₅ OH [%]		C ₃ H ₆ O [%]		
		50	70	50	70	50	70	
Temperatura Temperature: 20 ± 2 °C	2 h	1	47,1 ^a ± 0,5	57,5 ^b ± 0,7	52,6 ^c ± 1,1	54,2 ^c ± 2,3	81,6 ^d ± 1,3	84,4 ^d ± 1,7
		2	19,5 ^a ± 0,0	27,3 ^c ± 0,3	22,6 ^b ± 0,1	27,9 ^c ± 0,2	30,6 ^d ± 0,1	31,2 ^e ± 0,1
		3	46,0 ^a ± 0,1	61,8 ^b ± 0,1	52,4 ^c ± 0,1	64,4 ^d ± 0,2	81,3 ^e ± 0,1	90,9 ^f ± 0,1
		4	17,9 ^a ± 0,1	26,9 ^b ± 0,1	20,2 ^c ± 0,1	27,9 ^d ± 0,3	34,3 ^e ± 0,1	42,2 ^f ± 0,1
		5	51,4 ^a ± 0,7	66,1 ^b ± 0,7	59,2 ^c ± 1,0	69,1 ^d ± 0,0	79,6 ^e ± 1,1	90,7 ^f ± 0,6
		6	13,1 ^a ± 0,0	13,4 ^b ± 0,0	14,3 ^c ± 0,0	14,6 ^d ± 0,0	17,9 ^e ± 0,0	18,2 ^f ± 0,0
		7	0,47 ^a ± 0,0	0,69 ^b ± 0,0	0,44 ^c ± 0,0	0,68 ^d ± 0,0	0,97 ^e ± 0,0	1,22 ^f ± 0,0
	24 h	1	36,3 ^a ± 0,1	45,7 ^b ± 0,6	46,0 ^b ± 0,4	48,5 ^c ± 0,3	67,5 ^d ± 0,2	78,5 ^e ± 0,1
		2	21,6 ^a ± 0,0	22,2 ^a ± 0,1	23,2 ^b ± 0,0	25,7 ^c ± 0,2	28,0 ^e ± 0,0	28,4 ^f ± 0,0
		3	49,5 ^a ± 0,0	54,3 ^b ± 0,0	54,7 ^c ± 0,1	59,4 ^d ± 0,1	75,3 ^e ± 0,1	83,6 ^f ± 0,1
		4	20,6 ^a ± 0,1	21,8 ^b ± 0,1	23,6 ^c ± 0,1	24,9 ^d ± 0,0	28,0 ^e ± 0,1	33,7 ^f ± 0,1
		5	50,8 ^a ± 0,0	64,5 ^b ± 0,1	57,4 ^c ± 0,1	68,3 ^d ± 0,1	78,9 ^e ± 0,1	89,4 ^f ± 0,1
		6	12,5 ^a ± 0,0	12,2 ^a ± 0,0	13,4 ^b ± 0,0	13,9 ^b ± 0,0	20,6 ^c ± 0,0	16,3 ^d ± 0,0
		7	0,48 ^a ± 0,0	0,54 ^b ± 0,0	0,41 ^c ± 0,0	0,62 ^d ± 0,0	0,62 ^d ± 0,0	0,85 ^e ± 0,0
Temperatura Temperature: 20 ± 2 °C, łaźnia ultra- dźwiękowa ultrasonic bath: 2 × (35 °C, 20 min)	2 h	1	44,2 ^a ± 1,3	50,0 ^b ± 1,1	60,9 ^c ± 0,5	59,0 ^c ± 0,7	80,2 ^d ± 2,8	73,9 ^e ± 2,0
		2	16,5 ^a ± 0,1	24,4 ^b ± 0,1	24,0 ^b ± 0,1	27,8 ^c ± 0,0	29,1 ^d ± 0,1	29,9 ^d ± 0,2
		3	40,1 ^a ± 0,0	59,2 ^b ± 0,0	55,2 ^c ± 0,1	62,5 ^d ± 0,0	73,7 ^d ± 0,3	78,2 ^e ± 0,0
		4	16,1 ^a ± 0,1	25,8 ^b ± 0,3	21,3 ^c ± 0,1	27,2 ^d ± 0,1	29,2 ^d ± 0,2	36,3 ^e ± 0,1
		5	46,9 ^a ± 0,3	61,6 ^b ± 0,5	58,3 ^c ± 0,2	64,2 ^d ± 0,1	72,2 ^d ± 0,3	79,1 ^e ± 1,5
		6	13,1 ^a ± 0,0	14,5 ^b ± 0,0	14,6 ^b ± 0,0	14,5 ^b ± 0,0	17,3 ^c ± 0,0	17,1 ^c ± 0,0
		7	0,37 ^a ± 0,0	0,60 ^b ± 0,0	0,36 ^a ± 0,0	0,59 ^b ± 0,0	0,90 ^c ± 0,0	1,04 ^e ± 0,0
	24 h	1	32,5 ^a ± 0,1	59,4 ^b ± 0,7	38,9 ^c ± 0,4	48,2 ^d ± 0,5	57,0 ^e ± 0,0	65,6 ^f ± 0,3
		2	18,7 ^a ± 0,2	27,5 ^b ± 0,0	23,1 ^c ± 0,1	25,7 ^d ± 0,1	26,1 ^d ± 0,1	26,2 ^d ± 0,0
		3	44,5 ^a ± 0,1	67,9 ^b ± 0,1	49,8 ^c ± 0,1	60,3 ^d ± 0,1	67,4 ^b ± 0,1	71,2 ^e ± 0,1
		4	18,8 ^a ± 0,1	30,6 ^b ± 0,1	22,5 ^c ± 0,2	24,9 ^d ± 0,1	23,9 ^e ± 0,0	28,3 ^f ± 0,1
		5	47,8 ^a ± 0,1	63,0 ^b ± 0,1	59,5 ^c ± 0,2	61,6 ^b ± 0,1	70,6 ^d ± 0,3	74,9 ^e ± 0,1
		6	12,3 ^a ± 0,0	14,9 ^b ± 0,0	14,5 ^b ± 0,0	14,5 ^b ± 0,0	19,8 ^c ± 0,0	15,8 ^d ± 0,0
		7	0,43 ^a ± 0,0	0,79 ^b ± 0,0	0,49 ^c ± 0,0	0,66 ^d ± 0,0	0,73 ^e ± 0,0	1,04 ^f ± 0,0
Temperatura Temperature:	2 h	1	55,8 ^a ± 0,4	57,1 ^a ± 0,1	68,6 ^b ± 1,8	68,2 ^b ± 1,8	87,1 ^c ± 1,9	87,3 ^c ± 1,8
		2	16,9 ^a ± 0,8	19,2 ^a ± 0,1	17,7 ^a ± 0,6	18,0 ^a ± 0,3	18,6 ^a ± 0,3	21,9 ^b ± 0,1

20 ± 2 °C, dodatek 1-procentowego kwasu mrówkowego 1 % formic acid added		3	63,9 ^a ± 0,1	76,1 ^b ± 0,0	64,3 ^a ± 0,8	71,3 ^c ± 0,0	90,8 ^d ± 0,7	99,9 ^e ± 0,0	
		4	26,1 ^a ± 0,5	29,8 ^b ± 0,1	28,3 ^b ± 0,0	30,1 ^b ± 0,1	39,9 ^c ± 0,3	43,4 ^d ± 0,0	
		5	66,6 ^a ± 0,1	74,8 ^b ± 0,1	67,1 ^a ± 0,1	79,9 ^c ± 0,4	90,2 ^d ± 0,1	93,7 ^d ± 0,1	
		6	14,5 ^a ± 0,0	15,9 ^b ± 0,0	14,8 ^a ± 0,1	15,6 ^b ± 0,0	16,2 ^b ± 0,0	18,8 ^c ± 0,0	
		7	0,42 ^a ± 0,0	0,77 ^b ± 0,0	0,49 ^c ± 0,0	0,72 ^d ± 0,0	0,73 ^d ± 0,0	1,38 ^c ± 0,0	
		24 h	1	58,7 ^a ± 1,1	63,5 ^b ± 0,4	63,8 ^b ± 0,2	59,1 ^a ± 0,1	96,8 ^c ± 0,4	143,8 ^d ± 2,1
			2	19,4 ^a ± 0,1	18,1 ^b ± 0,1	16,9 ^c ± 0,1	17,5 ^c ± 0,0	17,4 ^c ± 0,1	26,6 ^d ± 0,1
	3		65,9 ^a ± 0,1	71,3 ^b ± 0,1	69,3 ^c ± 0,1	69,3 ^c ± 0,1	101,5 ^d ± 0,1	147,5 ^e ± 0,1	
	4		27,1 ^a ± 0,1	32,2 ^b ± 0,1	32,0 ^b ± 0,1	29,4 ^c ± 0,1	43,9 ^d ± 0,0	57,3 ^c ± 0,2	
	5		65,2 ^a ± 0,1	72,9 ^b ± 0,1	65,5 ^a ± 0,1	79,8 ^c ± 0,0	92,8 ^d ± 0,1	95,9 ^c ± 1,0	
	6		12,6 ^a ± 0,0	14,2 ^b ± 0,1	13,5 ^c ± 0,0	13,4 ^c ± 0,0	16,8 ^d ± 0,0	16,9 ^d ± 0,0	
	7		0,41 ^a ± 0,0	0,76 ^b ± 0,0	0,48 ^c ± 0,0	0,70 ^d ± 0,0	0,72 ^c ± 0,0	1,35 ^f ± 0,0	

Objaśnienia / Explanatory notes:

1 – ABTS^{•+} [mmol TE/100 g s.m. / d.m]; 2 – DPPH[•] [mmol TE/100 g s.m. / d.m.]; 3 – CUPRAC [mmol TE/100 g s.m. / d.m.]; 4 – FRAP [mmol TE/100 g s.m. / d.m.]; 5 – TPC [mg GAE/g s.m. / d.m.]; 6 – TFC [mg QE/g s.m. / d.m]; 7 – AAE [A; 700 nm]. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations.; a - f – wartości średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy p ≤ 0,05 / mean values in rows denoted by different letters differ statistically significantly at p ≤ 0.05.

Tabela 2. Potencjał przeciwutleniający oraz zawartość polifenoli i flawonoidów w ekstraktach z liści głogu

Table 2. Antioxidant potential and content of polyphenols and flavonoids in hawthorn leaves extracts

Warunki ekstrakcji Extraction conditions		Rozpuszczalnik / Solvent						
		CH ₃ OH [%]		C ₂ H ₅ OH [%]		C ₃ H ₆ O [%]		
		50	70	50	70	50	70	
Temperatura Temperature: 20 ± 2 °C	2 h	1	47,6 ^a ± 1,0	49,6 ^b ± 0,7	40,0 ^c ± 0,8	45,7 ^d ± 1,1	68,1 ^e ± 0,4	68,6 ^e ± 0,0
		2	25,9 ^a ± 0,5	33,8 ^b ± 0,1	40,9 ^c ± 0,1	38,0 ^d ± 0,2	44,0 ^e ± 0,2	39,3 ^f ± 0,1
		3	38,2 ^a ± 0,0	40,4 ^b ± 0,0	40,4 ^b ± 0,0	44,5 ^c ± 0,0	56,3 ^d ± 0,0	56,9 ^d ± 0,0
		4	20,6 ^a ± 0,1	21,1 ^b ± 0,2	25,1 ^c ± 0,3	23,8 ^d ± 0,2	28,3 ^d ± 0,2	27,3 ^e ± 0,1
		5	59,5 ^a ± 0,3	58,8 ^b ± 0,2	61,5 ^c ± 0,2	61,1 ^c ± 0,3	73,5 ^d ± 0,3	70,8 ^f ± 0,3
		6	7,1 ^a ± 0,0	6,1 ^b ± 0,0	8,3 ^c ± 0,0	11,4 ^d ± 0,0	10,2 ^e ± 0,0	16,5 ^f ± 0,0
		7	0,39 ^a ± 0,0	0,31 ^b ± 0,0	0,39 ^c ± 0,0	0,42 ^d ± 0,0	0,57 ^e ± 0,0	0,62 ^f ± 0,0
	24 h	1	56,9 ^a ± 1,3	55,6 ^a ± 0,8	55,8 ^a ± 0,4	60,6 ^b ± 1,4	56,7 ^a ± 0,6	65,7 ^c ± 0,2
		2	37,8 ^a ± 0,2	34,9 ^b ± 0,2	36,1 ^c ± 0,2	45,9 ^d ± 0,0	42,7 ^e ± 0,2	46,5 ^f ± 0,0
		3	53,8 ^a ± 0,3	52,0 ^b ± 0,1	57,3 ^c ± 0,1	59,1 ^c ± 3,3	58,3 ^c ± 0,1	54,7 ^a ± 0,1
		4	29,5 ^a ± 0,1	26,6 ^b ± 0,1	27,6 ^c ± 0,2	25,6 ^d ± 0,1	34,3 ^e ± 0,1	26,3 ^f ± 0,0
		5	57,5 ^a ± 0,7	58,8 ^b ± 0,7	56,8 ^a ± 0,3	69,1 ^c ± 0,0	59,0 ^b ± 0,5	63,3 ^d ± 0,5
		6	9,1 ^a ± 0,0	12,4 ^b ± 0,0	10,2 ^c ± 0,0	12,9 ^d ± 0,0	12,6 ^e ± 0,0	16,1 ^f ± 0,0
		7	0,38 ^a ± 0,0	0,30 ^b ± 0,0	0,37 ^c ± 0,0	0,41 ^d ± 0,0	0,57 ^e ± 0,0	0,63 ^f ± 0,0

Temperatura Temperature: 20 ± 2 °C, łaźnia ultradźwiękowa ultrasonic bath: 2 × (35 °C, 20 min)	2 h	1	41,5 ^a ± 0,3	47,8 ^b ± 0,6	49,4 ^b ± 0,8	49,1 ^b ± 0,2	58,7 ^c ± 1,8	61,3 ^d ± 0,5
		2	32,6 ^a ± 0,3	32,1 ^a ± 0,2	45,8 ^b ± 0,1	37,4 ^c ± 0,1	36,5 ^d ± 0,6	36,8 ^{cd} ± 0,2
		3	37,1 ^a ± 0,1	43,6 ^b ± 0,1	43,2 ^c ± 0,1	44,5 ^d ± 0,0	52,7 ^e ± 0,1	51,8 ^f ± 0,1
		4	20,3 ^a ± 0,0	19,7 ^b ± 0,2	22,5 ^c ± 0,2	24,9 ^d ± 0,0	28,9 ^e ± 0,2	27,1 ^f ± 0,1
		5	55,2 ^a ± 0,8	60,2 ^b ± 0,7	58,5 ^b ± 0,8	60,7 ^b ± 0,7	69,5 ^c ± 0,8	69,2 ^c ± 0,8
		6	7,7 ^a ± 0,0	8,8 ^b ± 0,0	11,6 ^c ± 0,1	13,6 ^d ± 0,4	9,7 ^e ± 0,1	15,1 ^f ± 0,1
		7	0,35 ^a ± 0,0	0,43 ^b ± 0,0	0,45 ^c ± 0,0	0,39 ^d ± 0,0	0,69 ^e ± 0,0	0,60 ^f ± 0,0
	24 h	1	44,9 ^a ± 0,7	50,0 ^b ± 0,3	53,7 ^c ± 2,7	66,4 ^d ± 0,4	76,9 ^e ± 1,5	68,8 ^f ± 1,9
		2	32,9 ^a ± 0,1	38,5 ^b ± 0,2	43,0 ^c ± 0,2	37,3 ^b ± 0,1	62,7 ^d ± 0,2	57,8 ^e ± 0,1
		3	43,7 ^a ± 0,0	48,8 ^b ± 0,0	49,7 ^c ± 0,0	50,2 ^c ± 0,6	69,8 ^d ± 0,3	56,5 ^e ± 0,1
		4	19,5 ^a ± 0,1	23,9 ^b ± 0,1	34,2 ^c ± 0,2	38,3 ^d ± 0,1	34,4 ^c ± 0,1	28,2 ^c ± 0,1
		5	48,3 ^a ± 0,3	54,9 ^b ± 0,3	62,6 ^c ± 0,3	58,0 ^d ± 0,3	79,6 ^e ± 0,3	77,4 ^f ± 0,3
		6	7,1 ^a ± 0,0	8,5 ^b ± 0,0	9,5 ^c ± 0,0	12,2 ^d ± 0,0	10,9 ^e ± 0,0	15,8 ^f ± 0,0
		7	0,33 ^a ± 0,0	0,42 ^b ± 0,0	0,43 ^c ± 0,0	0,39 ^d ± 0,0	0,82 ^e ± 0,0	0,59 ^f ± 0,0
Temperatura Temperature: 20 ± 2 °C, dodatek 1-procentowego kwasu mrówkowego 1 % formic acid added	2 h	1	35,3 ^a ± 2,4	56,3 ^b ± 0,6	59,9 ^c ± 1,5	71,1 ^d ± 1,0	74,2 ^d ± 0,9	59,3 ^{bc} ± 1,6
		2	29,4 ^a ± 0,2	27,8 ^b ± 0,2	38,2 ^c ± 0,0	44,1 ^d ± 0,1	43,1 ^e ± 0,0	36,9 ^f ± 0,1
		3	46,6 ^a ± 0,1	46,2 ^b ± 0,0	52,5 ^c ± 0,0	67,4 ^d ± 0,0	63,4 ^e ± 0,0	49,9 ^f ± 0,0
		4	23,7 ^a ± 0,3	24,8 ^b ± 0,2	26,5 ^c ± 0,1	27,3 ^d ± 0,1	31,2 ^e ± 0,1	23,2 ^f ± 0,0
		5	57,9 ^a ± 0,1	59,2 ^b ± 0,2	67,9 ^c ± 0,3	72,5 ^d ± 0,5	73,7 ^e ± 0,5	66,5 ^f ± 0,4
		6	9,0 ^a ± 0,2	9,1 ^a ± 0,0	10,0 ^b ± 0,2	11,2 ^c ± 0,0	11,4 ^c ± 0,0	16,2 ^d ± 0,0
		7	0,49 ^a ± 0,0	0,59 ^b ± 0,0	0,56 ^c ± 0,0	0,53 ^d ± 0,0	0,68 ^e ± 0,0	0,81 ^f ± 0,0
	24 h	1	58,5 ^a ± 0,2	65,2 ^b ± 1,2	72,3 ^c ± 1,6	69,3 ^{bc} ± 2,6	78,7 ^d ± 1,3	87,8 ^e ± 2,9
		2	31,8 ^a ± 0,2	38,6 ^b ± 0,2	32,6 ^c ± 0,0	32,4 ^d ± 0,1	42,3 ^e ± 0,0	34,9 ^f ± 0,1
		3	44,0 ^a ± 0,0	50,6 ^b ± 0,0	56,1 ^c ± 0,0	51,2 ^d ± 0,0	64,5 ^e ± 0,1	61,8 ^f ± 0,0
		4	22,7 ^a ± 0,1	20,2 ^b ± 0,1	24,7 ^c ± 0,0	21,9 ^d ± 0,1	27,4 ^e ± 0,5	29,1 ^f ± 0,1
		5	57,8 ^a ± 1,3	66,4 ^b ± 1,4	75,9 ^c ± 1,3	64,1 ^b ± 0,9	73,9 ^c ± 0,9	62,9 ^d ± 0,3
		6	7,7 ^a ± 0,2	9,3 ^b ± 0,2	8,5 ^c ± 0,2	10,6 ^d ± 0,2	9,5 ^b ± 0,2	19,4 ^e ± 0,2
		7	0,46 ^a ± 0,0	0,57 ^b ± 0,0	0,55 ^c ± 0,0	0,52 ^d ± 0,0	0,79 ^e ± 0,0	0,82 ^f ± 0,0

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Tabela 3. Potencjał przeciwutleniający oraz zawartość polifenoli i flawonoidów w ekstraktach z owoców głogu

Table 3. Antioxidant potential and content of polyphenols and flavonoids in hawthorn fruits extracts

Warunki ekstrakcji Extraction conditions		Rozpuszczalnik / Solvent						
		CH ₃ OH [%]		C ₂ H ₅ OH [%]		C ₃ H ₆ O [%]		
		50	70	50	70	50	70	
Temperatura Temperature: 20 ± 2 °C	2 h	1	67,0 ^a ± 0,6	61,5 ^b ± 0,1	58,3 ^c ± 0,0	64,2 ^d ± 0,1	73,1 ^e ± 0,0	77,3 ^f ± 0,0
		2	24,1 ^a ± 0,9	25,2 ^b ± 0,1	19,7 ^c ± 0,9	23,8 ^a ± 0,8	25,9 ^{bd} ± 0,3	25,5 ^{bd} ± 0,3
		3	33,9 ^a ± 0,0	39,7 ^b ± 0,0	30,6 ^c ± 0,0	42,1 ^d ± 0,0	49,1 ^e ± 0,0	44,6 ^f ± 0,1
		4	6,2 ^a ± 0,0	17,3 ^b ± 0,0	8,6 ^c ± 0,0	17,1 ^d ± 0,0	21,9 ^e ± 0,0	34,3 ^f ± 0,0
		5	29,4 ^a ± 0,1	45,7 ^b ± 0,0	37,6 ^c ± 0,5	50,0 ^d ± 0,2	55,6 ^e ± 0,3	76,3 ^f ± 0,2
		6	4,5 ^a ± 0,0	2,6 ^b ± 0,0	3,8 ^c ± 0,0	2,7 ^d ± 0,0	3,5 ^e ± 0,0	3,0 ^f ± 0,0

	24 h	7	0,25 ^a ± 0,0	0,38 ^b ± 0,0	0,25 ^a ± 0,0	0,38 ^b ± 0,0	0,56 ^c ± 0,0	0,73 ^d ± 0,0
		1	38,5 ^a ± 2,2	58,5 ^b ± 2,7	35,7 ^c ± 1,9	55,7 ^d ± 2,2	67,7 ^e ± 2,3	67,5 ^e ± 2,7
		2	15,3 ^a ± 0,6	24,1 ^b ± 0,6	18,3 ^c ± 0,7	24,8 ^b ± 0,2	27,2 ^d ± 0,7	26,6 ^d ± 0,7
		3	28,1 ^a ± 0,0	44,2 ^b ± 0,0	28,7 ^c ± 0,0	41,2 ^d ± 0,0	51,4 ^e ± 0,2	50,8 ^f ± 0,1
		4	8,2 ^a ± 0,0	18,0 ^b ± 0,1	9,5 ^c ± 0,0	17,9 ^b ± 0,0	24,3 ^d ± 0,2	33,6 ^f ± 0,1
		5	30,1 ^a ± 0,1	46,0 ^b ± 0,1	39,6 ^c ± 0,1	49,4 ^d ± 0,0	54,2 ^e ± 0,1	73,1 ^f ± 0,1
		6	4,6 ^a ± 0,0	2,7 ^b ± 0,0	3,8 ^c ± 0,0	2,8 ^d ± 0,1	3,5 ^e ± 0,0	3,1 ^f ± 0,0
Temperatura Temperature: 20 ± 2 °C, łaźnia ultradźwiękowa ultrasonic bath: 2 × (35 °C, 20 min)	2 h	1	61,3 ^a ± 0,0	73,9 ^b ± 0,1	73,0 ^b ± 0,1	72,4 ^c ± 0,1	67,9 ^d ± 0,1	84,3 ^e ± 0,1
		2	24,9 ^a ± 0,9	26,7 ^b ± 0,9	24,1 ^a ± 0,9	23,8 ^a ± 0,9	23,1 ^a ± 0,9	23,8 ^a ± 0,8
		3	43,6 ^a ± 0,1	47,6 ^b ± 0,2	47,0 ^c ± 0,1	45,9 ^d ± 0,0	49,5 ^e ± 0,0	48,4 ^f ± 0,0
		4	9,7 ^a ± 0,0	23,3 ^b ± 0,0	14,1 ^c ± 0,0	19,7 ^d ± 0,0	20,2 ^e ± 0,1	37,7 ^f ± 0,1
		5	38,1 ^a ± 0,2	58,4 ^b ± 0,0	47,9 ^c ± 0,2	54,7 ^d ± 0,0	60,4 ^e ± 0,0	84,7 ^f ± 0,2
		6	4,7 ^a ± 0,0	2,3 ^b ± 0,0	4,4 ^c ± 0,0	2,6 ^d ± 0,0	4,5 ^e ± 0,0	2,8 ^f ± 0,0
		7	0,26 ^a ± 0,0	0,49 ^b ± 0,0	0,36 ^c ± 0,0	0,44 ^d ± 0,0	0,52 ^e ± 0,0	0,83 ^f ± 0,0
	24 h	1	60,5 ^a ± 0,0	57,7 ^b ± 1,1	55,7 ^c ± 0,1	57,5 ^b ± 0,6	79,2 ^d ± 0,2	63,7 ^e ± 0,0
		2	25,2 ^a ± 0,5	26,9 ^b ± 0,4	26,8 ^b ± 0,1	24,9 ^a ± 0,5	25,3 ^a ± 0,7	25,1 ^a ± 0,4
		3	41,6 ^a ± 0,1	45,9 ^b ± 0,2	43,9 ^c ± 0,1	50,2 ^d ± 0,2	56,1 ^e ± 0,1	54,0 ^f ± 0,1
		4	9,8 ^a ± 0,0	25,1 ^b ± 0,0	14,6 ^c ± 0,0	20,0 ^d ± 0,0	20,3 ^e ± 0,0	38,3 ^f ± 0,0
		5	39,9 ^a ± 0,1	55,2 ^b ± 0,1	46,5 ^c ± 0,0	54,8 ^b ± 0,0	62,2 ^d ± 0,0	85,9 ^e ± 0,1
		6	4,7 ^a ± 0,0	2,4 ^b ± 0,0	4,6 ^c ± 0,0	2,6 ^d ± 0,1	4,5 ^e ± 0,0	2,8 ^f ± 0,0
		7	0,26 ^a ± 0,0	0,49 ^b ± 0,0	0,37 ^c ± 0,0	0,54 ^d ± 0,0	0,53 ^d ± 0,0	0,85 ^e ± 0,0
Temperatura Temperature: 20 ± 2 °C, dodatek 1-procentowego kwasu mrówkowego 1 % formic acid added	2 h	1	50,3 ^a ± 0,4	51,0 ^b ± 0,4	42,0 ^c ± 0,3	61,5 ^d ± 0,5	59,3 ^c ± 0,2	54,1 ^f ± 0,4
		2	11,7 ^a ± 0,1	15,6 ^b ± 0,0	10,2 ^c ± 0,1	15,5 ^b ± 0,0	14,0 ^d ± 0,1	16,3 ^c ± 0,0
		3	28,0 ^a ± 0,1	28,9 ^b ± 0,1	30,0 ^c ± 0,1	31,7 ^d ± 0,1	41,0 ^e ± 0,1	38,3 ^f ± 0,0
		4	4,5 ^a ± 0,1	20,7 ^b ± 0,1	13,4 ^c ± 0,0	18,9 ^d ± 0,1	23,4 ^e ± 0,0	35,3 ^f ± 0,4
		5	30,3 ^a ± 0,1	54,5 ^b ± 0,1	44,6 ^c ± 0,1	52,9 ^d ± 0,1	62,3 ^e ± 0,3	77,6 ^f ± 0,0
		6	4,1 ^a ± 0,0	1,7 ^b ± 0,0	4,1 ^c ± 0,00	2,1 ^d ± 0,0	4,4 ^e ± 0,0	2,7 ^f ± 0,0
		7	0,16 ^a ± 0,0	0,41 ^b ± 0,0	0,37 ^c ± 0,0	0,44 ^d ± 0,0	0,58 ^e ± 0,0	0,75 ^f ± 0,0
	24 h	1	54,2 ^a ± 0,5	44,5 ^b ± 0,5	40,1 ^c ± 0,5	59,4 ^d ± 0,6	54,6 ^a ± 0,1	51,5 ^e ± 0,6
		2	17,5 ^a ± 0,0	18,9 ^b ± 0,1	10,8 ^c ± 0,0	21,9 ^d ± 0,0	16,1 ^e ± 0,0	20,4 ^f ± 0,1
		3	31,8 ^a ± 0,0	30,7 ^b ± 0,1	32,8 ^c ± 0,0	37,7 ^d ± 0,2	40,1 ^e ± 0,0	38,0 ^f ± 0,1
		4	4,6 ^a ± 0,0	20,1 ^b ± 0,0	13,2 ^c ± 0,1	19,0 ^d ± 0,1	21,3 ^e ± 0,0	31,3 ^f ± 0,0
		5	29,5 ^a ± 0,0	52,9 ^b ± 0,0	42,1 ^c ± 0,0	51,6 ^d ± 0,0	60,4 ^e ± 0,1	69,4 ^f ± 0,0
		6	3,9 ^a ± 0,0	1,7 ^b ± 0,0	3,8 ^c ± 0,0	2,1 ^d ± 0,1	4,2 ^e ± 0,0	2,7 ^f ± 0,1
		7	0,16 ^a ± 0,0	0,36 ^b ± 0,0	0,37 ^c ± 0,0	0,40 ^d ± 0,0	0,55 ^e ± 0,0	0,73 ^f ± 0,0

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Ekstrakcja jest pierwszym etapem do wyodrębnienia pożądanych naturalnych fitozwiązków z matrycy materiału roślinnego. Kluczowym warunkiem wysokiej efektywności tego procesu jest odpowiedni dobór rozpuszczalnika. Do ekstrakcji związków o potencjale przeciwutleniającym z rośliny głogu najczęściej wykorzystywane są wodne roztwory metanolu, etanolu i acetonu, stąd w niniejszej pracy podjęto próbę wyboru najodpowiedniejszego rozpuszczalnika dla danej części anatomicznej rośliny.

W uzyskaniu najwyższego potencjału przeciwutleniającego ekstraktów z kwiatów głogu najskuteczniejszym rozpuszczalnikiem okazał się 70-procentowy wodny roztwór

acetonu z dodatkiem 1-procentowego kwasu mrówkowego. W ekstrakcie inkubowanym przez 24 h w temp. 20 ± 2 °C stwierdzono najwyższą średnią wartość tego potencjału, zarówno przy zastosowaniu metody z rodnikiem ABTS^{•+} (143,77 mmol TE/100 g s.m.), CUPRAC (147,53 mmol TE/100 g s.m.), FRAP (57,27 mmol TE/100 g s.m.), jak i testu mocy redukującej – 1,345. W przygotowanym ekstrakcie oznaczono również największą zawartość polifenoli – 95,96 mg GAE/g s.m. Najpowszechniej stosowanymi rozpuszczalnikami do ekstrakcji związków o właściwościach przeciwutleniających są alkohole (metanol, etanol), które były również najczęściej wykorzystywane do ekstrakcji części anatomicznych krzewów głogu przez innych autorów. Zawartość polifenoli w metanолоwym ekstrakcie z kwiatów głogu *C. monogyna*, którą oznaczyli Barros i wsp. [2], wyniosła średnio 330,32 mg GAE/g s.m. Wartość ta jest znacząco wyższa w stosunku do wyników uzyskanych w niniejszej pracy. Z kolei Bahari-Sahoul i wsp. [1] zbadali metanолоwe ekstrakty kwiatów głogu *C. azarolus var. aronia* inkubowane przez 48 h i stwierdzili średnią zawartość polifenoli równą 9,31 mg GAE/g s.m. W badaniach potencjału przeciwutleniającego kilkudziesięciu gatunków głogu z rejonu Turcji, w metanолоwych ekstraktach z kwiatów *C. monogyna Jacq. var. monogyna* określili metodami: CUPRAC, FRAP oraz ABTS^{•+} wartości potencjału przeciwutleniającego porównywalne z uzyskanymi w niniejszej pracy. W badaniach własnych roztwór metanolu okazał się najmniej efektywnym ekstrahentem. Przy jego 50-procentowym stężeniu, po 2-godzinnej ekstrakcji wspomaganiej działaniem ultradźwięków stwierdzono metodami CUPRAC i FRAP oraz testem mocy redukującej wartości mniejsze odpowiednio o [%]: 73, 72 i 73 (tab. 1) w stosunku do wartości potencjału przeciwutleniającego 70-procentowego ekstraktu acetonowego. Stwierdzono również o 51 % mniejszą zawartość polifenoli ogółem.

Zarówno w wyciągach z owoców, jak i liści głogu najwyższy potencjał przeciwutleniający stwierdzono po 24-godzinnej ekstrakcji wspomaganiej dwukrotnym działaniem ultradźwięków. W wyciągach z owoców głogu ekstrahowanych 50-procentowym acetonem najwyższe wartości potencjału przeciwutleniającego określono metodami: ABTS^{•+} (79,24 mmol TE/100 g s.m.) i CUPRAC (56,13 mmol TE/100 g s.m.), a przy zastosowaniu 70-procentowego acetonu – testem mocy redukującej (0,85), metodą FRAP (38,26 mmol TE/100 g s.m.) oraz oznaczono największą zawartość polifenoli (85,92 GAE/g s.m.). Ebrahimzadeh i wsp. [6] zbadali skuteczność ekstrakcji owoców głogu *C. pentaegyna* roztworami metanолоwymi oraz wodnymi i stwierdzili znacząco wyższy potencjał ekstraktów alkoholowych. Całkowita zawartość polifenoli w badanych wyciągach wyniosła 92,12 GAE/g s.m., zaś całkowita zawartość flawonoidów – 23,98 mg QE/g s.m. Tadic i wsp. [18] w wyciągu z owoców głogu ekstrahowanych 70-procentowym etanolem wykazali całkowitą zawartość polifenoli w ilości 35,40 mg GAE/g s.m. W badaniach własnych najmniej korzystnym ekstrahentem owoców głogu okazał się 50-procentowy wodny roztwór metanolu. W odniesieniu do wartości poda-

nych przez wymienionych autorów, ekstrakt własny inkubowany przez 2 h charakteryzował się o 66 % mniejszą całkowitą zawartością polifenoli, zaś z dodatkiem 1-procentowego roztworu kwasu mrówkowego – mniejszymi wartościami potencjału oznaczonego metodami: CUPRAC, FRAP oraz testem mocy redukującej odpowiednio o [%]: 55, 27 i 82.

W ekstraktach otrzymanych z liści głogu, przy użyciu 50-procentowego acetonu po 24-godzinnej ekstrakcji wspomaganą działaniem ultradźwięków, stwierdzono najwyższe wartości potencjału przeciwutleniającego oznaczonego metodami DPPH[•] (62,66 mmol TE/100 g s.m.) i CUPRAC (69,79 mmol TE/100 g s.m.), testem mocy redukującej (0,82) oraz największą zawartość polifenoli ogółem (79,65 mg GAE/g s.m.). Największą zawartość flawonoidów (19,45 mg QE/g s.m.) oraz najwyższą wartość potencjału oznaczonego metodą ABTS^{•+} (87,82 mmol TE/100 g s.m.) stwierdzono w preparatach z liści ekstrahowanych w ciągu 24 h 70-procentowym roztworem acetonu z dodatkiem 1-procentowego kwasu mrówkowego. Wyniki analizy ekstraktów acetonowych z liści głogu są wyższe w porównaniu z wartościami przedstawionymi w publikacjach innych autorów. Barros i wsp. [2] w etanolowym ekstrakcie z liści głogu (*C. oxyacantha*) określili całkowitą zawartość polifenoli na poziomie 16,70 mg GAE/g s.m. Z kolei Ozyurek i wsp. [14] w metanolowych ekstraktach z liści głogu wykazali potencjał przeciwutleniający [mmol TE/g s.m.] metodami: CUPRAC – 0,37, FRAP – 0,14, a ABTS^{•+} – 0,33. Spośród analizowanych w niniejszej pracy rozpuszczalników najmniej korzystnym ekstrahentem liści głogu okazał się 50-procentowy wodny roztwór metanolu. W stosunku do przywołanych powyżej wartości ekstrakt otrzymany przez 2 h z działaniem ultradźwięków charakteryzował się o 47 % mniejszą wartością potencjału oznaczonego metodą CUPRAC, zaś w wyciągu z liści ekstrahowanych przez 24 h stwierdzono potencjał oznaczony metodą FRAP mniejszy o 49 % i o 40 % mniejszą całkowitą zawartość polifenoli.

Po przeanalizowaniu poszczególnych części anatomicznych krzewu głogu można stwierdzić, że najwyższym potencjałem przeciwutleniającym charakteryzowały się ekstrakty uzyskane z kwiatów przy zastosowaniu 70-procentowego wodno-acetonowego roztworu zakwaszonego dodatkiem 1-procentowego kwasu mrówkowego, oznaczanym metodami: ABTS, FRAP, CUPRAC oraz testem mocy redukującej. Uzyskanie najwyższych wartości wynikało prawdopodobnie z optymalnych warunków do separacji barwników antocyjanowych, wykazujących wysokie działanie przeciwutleniające. Antocyjany zachowują stabilność w roztworach zasadowych i obojętnych, dlatego podczas ich ekstrakcji stosuje się wyłącznie roztwory zakwaszone. W ocenie otrzymanych wyciągów z kwiatów głogu wykazano również najsilniejsze, statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) korelacje pomiędzy metodą ABTS^{•+} a metodami: DPPH (r = 0,87), CUPRAC (r = 0,95), FRAP (r = 0,91), AAE (r = 0,88), TPC (r = 0,92) oraz TFC (r = 0,82), co potwierdziło, że zarówno duża zawartość polifenoli, jak i flawonoidów,

wpływała na wysoki potencjał przeciwutleniający otrzymanych wyciągów. Tak silne i istotne korelacje wykazano również w odniesieniu do wyciągów otrzymanych z owoców i liści głogu, niezależnie od warunków ekstrakcji.

Wnioski

1. Najbardziej efektywnym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji substancji o właściwościach przeciwutleniających z kwiatów, liści i owoców głogu jest 50-procentowy i 70-procentowy wodny roztwór acetonu.
2. Wydłużenie czasu ekstrakcji (z 2 do 24 h) oraz zastosowanie ultradźwięków zwiększyło efektywność ekstrakcji substancji o potencjale przeciwutleniającym z kwiatów, liści i owoców głogu.
3. Ekstrakty uzyskane z kwiatów głogu charakteryzują się znacznie wyższym potencjałem przeciwutleniającym niż ekstrakty z liści i owoców.

Literatura

- [1] Bahari-Sahloul R., Ammar S., Fredj R.B., Saguem S., Grec S., Trotin F., Skhiri F.H.: Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. Varieties. Pak. J. Biol. Sci., 2009, 12 (9), 660-668.
- [2] Barros L., Carvalho A., Ferreira I.: Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk medicine. Phytochem. Anal., 2011, 22, 181-188.
- [3] Benzie I.F.F., Strain J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. Anal. Biochem., 1996, 239, 70-76.
- [4] Dai J., Mumper R.J.: Plant phenolics: Extractions, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 2010, 15, 7313-7352.
- [5] Daniele C., Mazzanti G., Pittler M., Ernst E.: Adverse-event profile of *Crataegus* spp.: A systematic review. Drug Safety, 2006, 29 (6), 523-535.
- [6] Ebrahimzadeh M., Bahramian F.: Antioxidant activity of *Crataegus pentaegyna* subsp. *elburensis* fruits extracts used in traditional medicine in Iran. Pakistan J. Biol. Sci., 2009, 12 (5), 313-419.
- [7] Edwards E., Brown P., Talent N., Dickinson T., Shipley P.: Review of the chemistry of the genus *Crataegus*. Phytochemistry, 2012, 79, 5-26.
- [8] Gouveia S., Castilho P.C.: Antioxidant potential of *Artemisia argentea* L'Her alcoholic extracts and its relations with the phenolic composition. Food Res. Int., 2011, 44, 1620-1631.
- [9] Kirakosyan A., Seymour E., Kaufman P., Warber S., Bolling S., Chang S.: Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (hawthorn) subjected to drought and cold stress. J. Agric. Food Chem., 2003, 51, 3973-3976.
- [10] Kumar D., Arya V., Bhat Z. A.: The genus *Crataegus*: Chemical and pharmacological perspectives. Rev. Bras. Farmacogn., 2012, 22 (5), 1-14.
- [11] Liu T., Cao Y., Zhao M.: Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (*C. pinnatifida* Bge. var. *major*) fruits. Food Chem., 2010, 119, 1656-1662.
- [12] Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L.: Polyphenols: Food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr., 2004, 79, 727-747.
- [13] Oyaizu M.: Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr., 1986, 44, 307-315.

- [14] Ozyurek M., Bener M., Guclu K., Donmez A., Suzgec-Selcuk S., Pirildar S., Mericli A., Apak R.: Evaluation of antioxidant activity of *Crataegus* species collected from different regions of Turkey. *Rec. Nat. Prod.*, 2012, 6(3), 263-277.
- [15] Ozyurek M., Guclu K., Tutem E., Baskan K., Ercag E., Celik E., Baki S., Yildiz L., Karaman S., Apak R.: A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal. Meth.*, 2011, 3, 2439-2453.
- [16] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26, 1231-1237.
- [17] Shahat A., Cos P., Bruyne T., Apers S., Hammouda F., Ismail S., Azzam S., Claeys M., Goovaerts E., Pieters L., Berghe D., Vlietinck A.: Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Letter, Planta Med.*, 2002, 68, 539-541.
- [18] Tadic V., Dobric S., Markovic G., Dorevic S., Arsic I., Menkovic N., Stevic T.: Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 7700-7709.
- [19] Wang J., Xiong X., Feng B.: Effect of *Crataegus* usage in cardiovascular disease prevention: An evidence-based approach. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2013, #149363.
- [20] Xianggun G., Ohlander M., Jeppson N., Bjork L.: Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn during maturation. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 1485-1490.
- [21] Yang B., Liu P.: Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus* spp.) of different origins. *J. Sci. Food Agric.*, 2012, 92 (8), 1578-1590.
- [22] Yen G.C., Chen H.Y.: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, 27-32.
- [23] Zhang Q., Lin L., Ye W.: Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin. Med.*, 2018, 20, 1-26.

IMPACT OF EXTRACTION CONDITIONS ON ANTIOXIDANT POTENTIAL OF EXTRACTS OF FLOWERS, LEAVES AND FRUITS OF HAWTHORN (*CRATAEGUS* × *MACROCARPA* L.)

S u m m a r y

Hawthorn is among the plants with a high content of biologically active compounds; their concentration in a ready-to-use extract depends, among other things, on the extraction parameters used. The objective of the research study was to optimise the extraction conditions (temperature, time duration and concentration of solvents) in order to provide the highest possible antioxidant potential of preparations produced from lyophilised anatomic parts of hawthorn (*Crataegus* × *macrocarpa* L.), i.e. from its flowers, leaves and fruits. The extraction was carried out at a temperature of 20 ± 2 °C with the use of three solvents, each one of two concentrations, during 2- and 24-hour periods. The efficiency of ultrasound-assisted extraction was also compared. The antioxidant potential was determined using ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP and CUPRAC methods and a reducing power test. Additionally, the content of polyphenols and flavonoids was determined.

For the purpose of getting extracts from hawthorn flowers, the most effective method was the 24-hour extraction with 70 % acetone and 1 % formic acid added. Those extracts were characterised by the highest value of ABTS^{•+}, CUPRAC and FRAP antioxidant potential. Then, as regards the extracts from hawthorn fruit and leaves, the highest antioxidant potential was found after the 24-hour extraction supported by double sonication. The highest values of the potential under determination were obtained in extracts from hawthorn fruit extracted with 50 % acetone when using the ABTS^{•+} and CUPRAC methods. As for the

extracts from hawthorn leaves, the highest values of the antioxidant potential were determined using the DPPH[•] and CUPRAC methods, and the reducing power test. As regards the antioxidant potential, the most effective solvent to extract hawthorn lyophilisates was 70 % acetone-water solution assisted by an ultrasound or 1 % formic acid.

Key words: hawthorn, extraction, antioxidant potential, flavonoids, total polyphenols ☒