

Akademia Medyczna w Gdańsku
Wydział Farmaceutyczny



Natalia Filipowicz

**ANALIZA FITOCHEMICZNA I GENETYCZNA
*JUNIPERUS COMMUNIS L.***

Praca doktorska wykonana w Katedrze i
Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Wydziału Farmaceutycznego Akademii
Medycznej w Gdańsku, częściowo
sfinansowana w ramach grantu promotorskiego
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Promotor

prof. dr hab. J. Renata Ochocka

Gdańsk 2007

*Pragnę podziękować **Pani Profesor J. Renacie Ochockiej** za nieocenioną pomoc oraz nieprzebrane pokłady optymizmu, którym potrafi skutecznie zarazić w chwilach zwątpienia.*

*Szczególne podziękowania składam **mojemu Mężowi Bartkowi** za ogromną cierpliwość oraz przekonanie, że nie ma rzeczy niemożliwych. Dzięki temu udało mi się zakończyć tę pracę.*

SPIS TREŚCI

Spis treści.....	3
Spis tabel.....	6
Spis rysunków.....	9
Lista stosowanych skrótów.....	11
I. Streszczenie.....	13
II. Część teoretyczna.....	15
1. Charakterystyka botaniczna i fitochemiczna rodzaju <i>Juniperus</i> i jego gatunków.....	15
1.1.Przynależność systematyczna <i>J. communis</i> L. i <i>J. nana</i> Willd.....	15
1.2.Rozmieszczenie geograficzne <i>J. communis</i> i <i>J. nana</i> i zajmowane siedlisko.....	16
1.3.Charakterystyka botaniczna <i>J. communis</i> i <i>J. nana</i>	18
1.4.Znaczenie farmakognostyczne <i>J. communis</i>	21
1.5.Charakterystyka i skład olejku jałowcowego.....	23
1.6.Skład jakościowy i procentowy olejku jałowcowego.....	27
1.7.Aktywność biologiczna i zastosowanie olejku jałowcowego.....	31
2. Mikroekstrakcja do fazy stałej jako metoda badania składników olejku.....	34
2.1.Chromatografia gazowa.....	34
2.2.Mikroekstrakcja do fazy stałej.....	35
3. Markery molekularne w badaniach roślin.....	43
3.1.RFLP (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism).....	44
3.2.Metody genetycznego odcisku palca (ang. DNA fingerprinting).....	46
3.3.Metody VNTR (ang. Variable Number Tandem Repeats).....	50
3.4.Markery miejscowo-specyficzne.....	52
III. Cel pracy.....	56
IV. Część doświadczalna.....	60
1. Aparatura.....	60
2. Odczynniki, bufory i roztwory.....	61
2.1.Odczynniki.....	61
2.2.Bufory i roztwory.....	63
3. Materiały.....	64
3.1.Surowiec roślinny do badań.....	64
3.2.Przygotowanie prób w zależności od stosowanych metod badawczych.....	67
3.3.Startery stosowane w badaniach genetycznych jałowca.....	77
4. Metodyka analiz fitochemicznych.....	78

4.1. Wybór złoza do SPME.....	78
4.2. Przebieg HS SPME.....	79
4.3. Otrzymywanie olejków eterycznych metodą destylacji	79
4.4. Warunki analiz chromatograficznych.....	80
4.5. Integracja i interpretacja danych chromatograficznych.....	81
4.6. Powtarzalność procedury HS SPME-GC.....	84
4.7. Optymalizacja metody headspace SPME-GC (cel pochodny 1).....	87
4.8. Badania porównawcze olejku otrzymanego metodą destylacji z wodą i metodą HS SPME (cel pochodny 2).....	95
4.9. Analiza zróżnicowania fitochemicznego badanych prób <i>J. communis</i> (cel pochodny 3).....	96
5. Metodyka analiz genetycznych.....	98
5.1. Izolacja całkowitego DNA genomowego i ocena jego jakości i ilości	98
5.2. Amplifikacja DNA.....	101
5.3. Elektroforeza produktów amplifikacji PCR oraz archiwizacja danych.....	101
5.4. Analiza całkowitego DNA genomowego metodą RAPD-PCR (cel pochodny 4)	102
5.5. Zestawienie wyników analizy genetycznej i fitochemicznej.....	109
5.6. Analiza pokrewieństwa systematycznego <i>J. communis</i> i <i>J. nana</i> (cel pochodny 5).....	111
V. Wyniki i dyskusja.....	118
1. Optymalizacja HS SPME pod kątem jej zastosowania w analizie związków monoterpenowych <i>J. communis</i> (cel pochodny 1).....	118
1.1. Strategia podobieństwa profilu SPME do olejku eterycznego.....	119
1.2. Strategia dużej ilości pików związków monoterpenowych.....	120
1.3. Podsumowanie.....	123
2. Badania porównawcze składu frakcji monoterpenowej olejku <i>J. communis</i> otrzymanego metodą destylacji z wodą oraz składników otrzymanych drogą HS SPME (cel pochodny 2).....	126
2.1. Podsumowanie.....	135
3. Analiza zróżnicowania fitochemicznego <i>Juniperus communis</i> (cel pochodny 3)	137
3.1. Analiza achiralna.....	137
3.2. Analiza chiralna.....	149
3.3. Podsumowanie.....	158
4. Analiza zróżnicowania genetycznego <i>Juniperus communis</i> metodą RAPD-PCR (cel pochodny 4).....	162
4.1. Konstrukcja wykresów drzewiastych.....	164

4.2.Podsumowanie.....	172
5. Zestawienie wyników analizy genetycznej i fitochemicznej.....	173
5.1.Dane wejściowe i wybrana sieć.....	174
5.2.Podsumowanie.....	177
6. Analiza pokrewieństwa systematycznego <i>J. communis</i> L. i <i>J. nana</i> Willd. (cel pochodny 5).....	179
6.1.Analiza chromatograficzna na złożu achiralnym i chiralnym.....	179
6.2.Analiza sekwencji niekodującego łącznika trnL-trnF cpDNA.....	186
6.3.Podsumowanie.....	189
VI. Wnioski.....	191
VII. Piśmiennictwo.....	193
VIII. Supplement A – Wyniki analiz chromatograficznych.....	202

SPIS TABEL

TABELA 1: Wykaz synonimów <i>J. communis</i> i <i>J. nana</i> (Farjon, 2001; Flora Europaea, 2001).....	16
TABELA 2: Zestawienie porównawcze wybranych cech budowy morfologicznej <i>J. communis</i> i <i>J. nana</i>	21
TABELA 3: Główne monoterpény olejku jałowcowego z uwzględnieniem struktury i charakteru chemicznego.....	24
TABELA 4: Zawartości procentowe głównych składników olejku z szyszkogód <i>J. communis</i> wg. Farmakopei Europejskiej i Brytyjskiej (Ph Eur 5.0, 2005; BP, 2004)....	27
TABELA 5: Zawartość procentowa poszczególnych składników olejku z igieł i szyszkogód jałowca.....	28
TABELA 6: Komercyjnie dostępne złoża do SPME (w/g katalogu i materiałów Supelco).....	38
TABELA 7: Najpopularniejsze markery molekularne stosowane w badaniach roślin oparte na PCR (wg. Wolfe i Liston, 1998).....	45
TABELA 8: Zestawienie porównawcze metod genetycznego odcisku palca RAPD, DAF i AP-PCR (Caetano-Annollés, 1996; Marczewski, 1995).....	49
TABELA 9: Charakterystyka stanowisk, z których pozyskiwano surowiec do badań, z uwzględnieniem ilości prób oraz daty zbioru.....	64
TABELA 10: Zestawienie prób <i>J. communis</i> oraz <i>J. nana</i> użytych do badań.....	69
TABELA 11: Zestawienie sekwencji starterów zastosowanych w realizacji pracy.....	77
TABELA 12: Zestawienie warunków rozdziełów chromatograficznych na kolumnach o złożu achiralnym i chiralnym zastosowanych w przypadku wszystkich analiz GC w niniejszej pracy.....	81
TABELA 13: Zestawienie wyników badań powtarzalności procedury headspace SPME-GC w warunkach achiralnych i chiralnych dla badanych surowców roślinnych wykorzystywanych w toku realizacji pracy.....	85
TABELA 14: Wartości parametrów wejściowych (zmiennych niezależnych) do procesu optymalizacji SPME metodą Taguchi.....	90
TABELA 15: Plan doświadczeń według metody Taguchi – macierz ortogonalna L'16. 90	
TABELA 16: Strategie optymalizacji oraz zmienne zależne w procesie optymalizacji HS SPME wg Taguchi.....	93
TABELA 17: Startery RAPD użyte w analizie <i>J. communis</i> oraz optymalna temperatura ich przyłączania.....	108
TABELA 18: Parametry chemiczne i termiczne reakcji RAPD PCR	108
TABELA 19: Parametry chemiczne i termiczne reakcji PCR z primerami E i F dla sekwencji cpDNA trnL-trnF stosowane dla testu wydajności reakcji PCR.....	112
TABELA 20: Parametry chemiczne i termiczne reakcji PCR z primerami E i F dla sekwencji cpDNA trnL-trnF poprzedzającej sekwencjonowanie.....	113

TABELA 21: Warunki optymalne procesu HS SPME dla różnych strategii optymalizacji metodą Taguchi.....	125
TABELA 22: Kryteria wyodrębnienia chemotypów <i>J. communis</i> L. na podstawie zawartości dwóch głównych składników - α -pinenu i sabinenu w igłach.....	138
TABELA 23: Zestawienie badanych prób nizinnych <i>J. communis</i> z uwzględnieniem przynależności do rasy chemicznej	139
TABELA 24: Zakresy, średnie i mediany względnych zawartości procentowych badanych związków monoterpenu w poszczególnych chemotypach jałowca z uwzględnieniem surowca (igły, szyszkogody).....	142
TABELA 25: Macierz korelacji zawartości procentowej badanych związków monoterpenu oznaczonych na złożu HP101 w igłach <i>J. communis</i>	145
TABELA 26: Macierz korelacji zawartości procentowej badanych związków monoterpenu oznaczonych na złożu HP101 w szyszkogodach <i>J. communis</i>	145
TABELA 27: Zakresy i mediany nadmiarów enancjomerycznych α - i β -pinenu oraz limonenu w poszczególnych chemotypach jałowca z uwzględnieniem surowca (igły i szyszkogody).....	151
TABELA 28 : Macierz korelacji zawartości procentowej badanych związków monoterpenu oznaczonych na złożu HPChiral w igłach <i>J. communis</i>	154
TABELA 29: Macierz korelacji zawartości procentowej badanych związków monoterpenu oznaczonych na złożu HPChiral w szyszkogodach <i>J. communis</i>	154
TABELA 30: Macierz dystansów genetycznych pomiędzy próbkami <i>J. communis</i> wyznaczona wg algorytmu Simple Matching (Apostol) (wygenerowano w pakiecie RAPDistance).....	167
TABELA 31: Parametry zastosowanych sztucznych sieci neuronowych.....	175
TABELA 32: Wyniki klasyfikacji dla obu zastosowanych sieci neuronowych.....	175
TABELA 33: Zakresy, średnie i mediany względnych zawartości procentowych badanych związków monoterpenu w poszczególnych chemotypach jałowca z uwzględnieniem surowca (igły, szyszkogody).....	181
TABELA 34: Zakresy i mediany nadmiarów enancjomerycznych α -pinenu i limonenu w poszczególnych chemotypach prób jałowca pospolitego i halnego.....	183
TABELA 35: Macierz korelacji zawartości procentowej badanych związków monoterpenu oznaczonych na złożu enancjoselektywnym w igłach jałowca pospolitego i halnego.....	184
TABELA 36: Zestawienie 10 pierwszych wyników wyszukiwania w bazie danych BLAST.....	187
TABELA 37: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu achiralnym (HP101) otrzymane w badaniu powtarzalności procedury headspace SPME-GC dla igieł <i>J. communis</i> (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET).....	203
TABELA 38: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu achiralnym (HP101) otrzymane w badaniu powtarzalności procedury headspace SPME-GC dla szyszkogód <i>J. communis</i> (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET).....	204

TABELA 39: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu chiralnym (HPChiral) otrzymane w badaniu powtarzalności procedury headspace SPME-GC dla igieł <i>J. communis</i> (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET).....	205
TABELA 40: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu chiralnym (HPChiral) otrzymane w badaniu powtarzalności procedury headspace SPME-GC dla szyszkojagód <i>J. communis</i> (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET).....	206
TABELA 41: Wartości zmiennych zależnych obliczonych dla poszczególnych układów doświadczalnych w zależności od strategii optymalizacji.....	207
TABELA 42: Wyniki analiz porównawczych headspace SPME – destylacja olejku z parą wodną otrzymane w wyniku analiz chromatograficznych na złożu achiralnym dla igieł (HP101) (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET).....	208
TABELA 43: Wyniki analiz porównawczych headspace SPME – destylacja olejku z parą wodną otrzymane w wyniku analiz chromatograficznych na złożu achiralnym (HP101) dla komercyjnych szyszkojagód jałowca (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET).....	209
TABELA 44: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu achiralnym (HP101) otrzymane w toku analiz headspace SPME z igieł badanych prób jałowca (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET).....	210
TABELA 45: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu achiralnym (HP101) otrzymane w toku analiz headspace SPME z szyszkojagód badanych prób jałowca (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET).....	214
TABELA 46: Nadmiary enancjomeryczne α -pinenu, β -pinenu i limonenu obliczone na podstawie analiz headspace SPME GC (złożo chiralne HPChiral) z igieł i szyszkojagód badanych prób jałowca (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET).....	217
TABELA 47: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu achiralnym (HP101) otrzymane w toku analiz olejków eterycznych z igieł badanych prób jałowca pospolitego i halnego (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET).....	219
TABELA 48: Nadmiary enancjomeryczne α -pinenu i limonenu obliczone na podstawie analiz olejku prób jałowca pospolitego i halnego (kolumna enancjoselektywna beta-dex).....	221

SPIS RYSUNKÓW

RYSUNEK 1: Mapa zasięgu rodzaju <i>Juniperus</i> i gatunku <i>J. communis</i> na świecie (Meusel i in., 1965).....	17
RYSUNEK 2: Pokrój a) krzaczasty i b) kolumnowy <i>J. communis</i> L. (fot. Natalia Filipowicz).....	19
RYSUNEK 3: Fragment owocującego pędu oraz dojrzałe szyszkojagody <i>J. communis</i> (fot. N. Filipowicz, P. Madanecki).....	20
RYSUNEK 4: Prawdopodobne relacje biogenetyczne pomiędzy różnymi typami monoterpenów.....	24
RYSUNEK 5: Strzykawka SPME do ręcznego dozowania prób (ang. fiber holder for manual sampling) (a) schemat – Instruction for the Supelco™ Solid Phase MicroExtraction nr kat. 57330-U, b) zdjęcie – fot. Natalia Filipowicz).....	37
RYSUNEK 6: Poszczególne etapy procedury SPME (w/g Supelco Bulletin 923, 1998).....	39
RYSUNEK 7: Schemat mikroekstrakcji zanurzeniowej i powierzchniowej.....	40
RYSUNEK 8: Przybliżony zakres zastosowań wybranych markerów chloroplastowego, jądrowego i mitochondrialnego DNA do badań filogenetycznych na określonym poziomie taksonomicznym dla roślin okrytonasiennych (za Soltis i Soltis, 1998, zmodyfikowana przez autorkę).....	55
RYSUNEK 9: Lokalizacja poszczególnych stanowisk <i>J. communis</i> i <i>J. nana</i>	66
RYSUNEK 10: Chromatogram przedstawiający mieszaninę wzorcową części badanych związków monoterpenowych (kolumna HP101)	82
RYSUNEK 11: Chromatogram przedstawiający olejek eteryczny otrzymany w drodze destylacji z wodą igieł próby OT11 (kolumna HP101).....	82
RYSUNEK 12: Chromatogram przedstawiający profil SPME związków monoterpenowych w igłach próby SA6 (kolumna HP101).....	83
RYSUNEK 13: Chromatogram przedstawiający profil SPME związków monoterpenowych w igłach próby SA2 (kolumna HPChiral).....	83
RYSUNEK 14: Schemat postępowania eksperymentalnego HS SPME-GC w optymalizacji metodą Taguchi.....	92
RYSUNEK 15: Schemat postępowania eksperymentalnego w badaniach porównawczych profilu HS SPME i olejku eterycznego	96
RYSUNEK 16: Optymalizacja stężenia DNA matrycowego w różnych temperaturach annealingu.....	105
RYSUNEK 17: Optymalizacja temperatury annealingu dla startera RW02.....	107
RYSUNEK 18: Architektura sztucznej sieci neuronowej (StatSoft, 2006).....	110
RYSUNEK 19: Amplifikacja sekwencji trnL-trnF <i>J. nana</i> w różnych temperaturach przyłączania startera.....	113
RYSUNEK 20: Zestawienie sekwencji (ang. sequence alignment) niekodującego łącznika cpDNA trnL-trnF	115

RYSUNEK 21: Zestawienie porównawcze średnich względnych zawartości procentowych dwóch głównych grup związków występujących w igłach i szyszkogodach <i>J. communis</i>	127
RYSUNEK 22: Chromatogramy porównawcze olejku otrzymanego w drodze hydrodestylacji oraz profilu terpenów wyekstrahowanych metodą HS SPME z próby igieł OT2 (kolumna HP101).....	129
RYSUNEK 23: Zestawienie porównawcze względnych zawartości procentowych poszczególnych monoterpenów pozyskanych metodą destylacji z wodą oraz HS SPME z igieł <i>J. communis</i>	131
RYSUNEK 24: Zestawienie porównawcze względnych zawartości procentowych poszczególnych monoterpenów pozyskanych metodą destylacji z wodą oraz HS SPME z szyszkogód <i>J. communis</i>	132
RYSUNEK 25: Liczebność poszczególnych chemotypów jałowca pospolitego	140
RYSUNEK 26: Względne zawartości procentowe związków monoterpenowych w igłach i szyszkogodach jałowca z uwzględnieniem chemotypu.....	143
RYSUNEK 27: Diagram PCA na podstawie danych chromatograficznych otrzymanych na kolumnie achiralnej HP101 dla igieł jałowca	147
RYSUNEK 28: Diagram PCA na podstawie danych chromatograficznych otrzymanych na kolumnie achiralnej HP101 dla szyszkogód jałowca.....	149
RYSUNEK 29: Diagram PCA na podstawie danych chromatograficznych otrzymanych na kolumnie enancjoselektywnej HPChiral dla igieł jałowca.....	156
RYSUNEK 30: Diagram PCA na podstawie danych chromatograficznych otrzymanych na kolumnie enancjoselektywnej HPChiral dla szyszkogód jałowca.....	157
RYSUNEK 31: Rozdział elektroforetyczny produktów RAPD PCR z primerem Roth N-13.....	163
RYSUNEK 32: Wykres drzewiasty przedstawiający relacje genetyczne <i>J. communis</i> uzyskany metodą UPGMA (algorytm Simple Matching/Apostol).....	168
RYSUNEK 33: Wykres drzewiasty przedstawiający relacje genetyczne <i>J. communis</i> uzyskany metodą neighbour joining (algorytm Simple Matching/Apostol).....	169
RYSUNEK 34: Liczebność poszczególnych chemotypów.....	180
RYSUNEK 35: Względne zawartości procentowe związków monoterpenowych w igłach prób górskich i nizinnych jałowców z uwzględnieniem chemotypu.....	181
RYSUNEK 36: Diagram PCA na podstawie danych chromatograficznych otrzymanych na kolumnie enancjoselektywnej β -dex dla igieł jałowca pospolitego i halnego.....	185

LISTA STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AFLP – ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism* – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów

ANN – ang. *Artificial Neuronal Networks* – sztuczne sieci neuronowe

AP-PCR - ang. *Arbitrary Primed PCR*

BHP – ang. *British Herbal Pharmacopoeia*

BP – ang. *British Pharmacopoeia* – Farmakopea Brytyjska

CAPS - ang. *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* - polimorfizm sekwencji podzielonej i pociętej

CAR - karboksen

DAF - ang. *DNA Amplification Fingerprinting*

cpDNA – chloroplastowe DNA

dNTP - trójfosforany nukleotydów

DOX – deoksyksyluloza

DVB - diwinylobenzen

EE – ang. *Enantiomeric Excess* – nadmiar enancjomeryczny

ESCOP – ang. *European Scientific Cooperative on Phytotherapy*

Eta (S/N) – stosunek sygnału do szumu

FP – Farmakopea Polska

GC – ang. *Gas Chromatography* - chromatografia gazowa

GC MS – ang. *Gas Chromatography Mass Spectrometry* – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

GPP – pirofosforan geranylu

HD – ang. *hydrodistillation* – destylacja z wodą

HPLC – ang. *High Performance Liquid Chromatography* – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HS SPME – ang. *headspace Solid Phase Microextraction* – nadpowierzchniowa mikroekstrakcja do fazy stałej

IPP – pirofosforan 3-izopentylu

ISSR – ang. *Inter Simple Sequence Repeats* - polimorfizm odcinków pomiędzy sekwencjami mikrosatelitarnymi

MAAP (lub APT) – ang. *Multiple Arbitrary Amplicon Profiling* – grupa metod genetycznego odcisku palca

mtDNA – mitochondrialny DNA

MVA – kwas mewalonowy

OTU – ang. *Operational Taxonomical Unit* – robocza jednostka taksonomiczna

PhEur – Farmakopea Europejska

PA – poliakrylamid

PCA – ang. *Principal Component Analysis* – analiza głównych składowych

PCR – ang. *Polymerase Chain Reaction* – łańcuchowa reakcja polimerazy

PDMS – polidimetylosiloksan (złożenie stosowane w przypadku SPME)

PTP – ang. *Permutation Tail Probability*

RAMP – ang. *Random Amplified Microsatellite Polymorphism* - polimorfizm losowo amplifikowanych mikrosatelitów

RAPD – ang. *Random Amplified Polymorphic DNA* – polimorfizm losowo amplifikowanych fragmentów DNA

RFLP – ang. *Restricted Fragment Length Polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

SPE – ang. *Solid Phase Extraction* – ekstrakcja do fazy stałej

SPME – ang. *Solid Phase Microextraction* - mikroekstrakcja do fazy stałej

trnL(UAA)-trnF(GAA) - niekodująca sekwencja łącznikowej chloroplastowego DNA

UPGMA – ang. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

VNTR - ang. *VNTR – Variable Number Tandem Repeats* - zmienna liczba tandemowych powtórzeń

W_z – współczynnik zmienności

I. STRESZCZENIE

Jałowiec pospolity (*Juniperus communis* L.) jest rośliną olejkową dostarczającą surowca o szerokim spektrum zastosowań, głównie w lecznictwie oraz przemyśle spożywczym. Olejek wytwarzany jest w strukturach wydzielniczych igieł, łodyg i szyszkojagód, ale tylko szyszkojagoda jałowca (*Juniperi fructus*) jest surowcem farmakopealnym (FPVI, BP, PhEur). Monografie posiada także olejek z niej pozyskiwany (BP, PhEur). Ogólna dostępność i łatwość pozyskiwania surowca spowodowana jest szerokim występowaniem tego gatunku na całej półkuli północnej, w tym także w Polsce. Pomimo to wiele aspektów dotyczących aktywności i składu olejku, charakterystyki surowca czy struktury populacji gatunku nie jest do końca wyjaśnionych.

W niniejszej pracy podjęto tematykę zmierzającą do stosunkowo dokładnej charakterystyki fitochemicznej i genetycznej *J. communis* L. Celem było oszacowanie zmienności fitochemicznej tego gatunku na podstawie składu frakcji monoterpenowej. Stanowi ona blisko 90% całego olejku z szyszkojagód i igieł jałowca. Dodatkowo podjęto próbę charakterystyki molekularnej rośliny na podstawie genetycznego odcisku palca, otrzymanego w drodze RAPD PCR. W części teoretycznej niniejszej pracy autorka dokonała przeglądu dostępnej literatury dotyczącej olejku jałowcowego i surowca, a także metod biologii molekularnej i metod analitycznych służących głębszemu poznaniu tej rośliny. Ta część pracy stanowi uzasadnienie podjętej tematyki badań.

Do badań zebrano łącznie 92 próby *J. communis* oraz *J. nana* pochodzących z 12 stanowisk zlokalizowanych w 5 województwach. Realizując cel główny pracy postawiono kilka celów pochodnych. Pierwszym etapem było opracowanie optymalnych warunków techniki HS SPME GC służącej szybkiemu oszacowaniu względnych zawartości procentowych monoterpenów w badanym surowcu. Stosując metodę optymalizacji według Taguchi dobrano warunki HS SPME GC, które konsekwentnie zastosowano w dalszych analizach surowca. Udowodniono także przydatność optymalizacji Taguchi w procesach analitycznych. Badania porównawcze składu olejku i profilu związków monoterpenowych HS SPME przeprowadzono dla igieł jałowca i komercyjnych prób szyszkojagód. Podobieństwo profilu

chromatograficznego związków otrzymanych tymi dwoma metodami pozwoliło na zastosowanie HS SPME GC jako szybkiej metody oceny surowca olejkowego.

Realizacja dwóch pierwszych celów pośrednich umożliwiła dalsze dokładne analizy zróżnicowania fitochemicznego na poziomie intra- i interpopulacyjnym *J. communis*. Badania składu procentowego monoterpenów w igłach i szyszkojagodach wykazała istnienie trzech chemotypów, które wyróżniono na podstawie różnic ilościowych w zawartości α -pinenu i sabinenu. Stwierdzono także różnice ilościowe w składzie enancjomerów badanych węglowodorów monoterpenowych pomiędzy różnymi organami tej samej rośliny. Sugerują one, że poziom ekspresji enzymów katalizujących biosyntezę poszczególnych monoterpenów jest odmienny i regulowany niezależnie w różnych organach. Różnorodność składu monoterpenów najlepiej uwidaczniała się wewnątrz badanych populacji, podczas, gdy zmienność na poziomie międzypopulacyjnym była niewielka.

Podobne obserwacje dotyczące zróżnicowania wewnątrz- i międzypopulacyjnego poczyniono na podstawie analizy całkowitego DNA genomowego metodą RAPD PCR. Taki wynik jest pochodną specyfiki sposobu zapylenia, dyspersji nasion, długowieczności osobników i struktury zasięgu *J. communis* L.

Podobieństwo stopnia zróżnicowania fitochemicznego i genetycznego na poziomie inter- i intrapopulacyjnym spowodowało, że autorka postawiła sobie pytanie – czy możliwe jest znalezienie korelacji pomiędzy swoistym genetycznym i fitochemicznym odciskiem palca w przypadku *J. communis*? Osiągnięciu tego celu posłużyły sztuczne sieci neuronowe. Eksperymentalnie znaleziono dwa modele sieci, które są w stanie dokładnie odwzorować profil genetyczny na fitochemiczny, czyli rozpoznać określone chemotypy rośliny. Pomimo pewnych ograniczeń, wynik taki wydaje się być obiecujący i wskazuje, że uzasadnione jest szukanie współzależności między polimorfizmem DNA a cechą fenotypową, jaką jest specyficzny skład metabolitów wtórnych.

Dodatkowo w pracy podjęto próbę określenia pokrewieństwa *J. communis* oraz *J. nana*, których klasyfikacja systematyczna jest niejednoznaczna. Pomimo wyraźnych różnic morfologicznych pomiędzy *J. nana* i *J. communis* nie stwierdzono zróżnicowania na poziomie fitochemicznym i molekularnym. Sugeruje to przynależność tych dwóch jednostek do tego samego taksonu.

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka botaniczna i fitochemiczna rodzaju *Juniperus* i jego gatunków

1.1. Przynależność systematyczna *J. communis* L. i *J. nana* Willd.

Niniejsze opracowanie dotyczy dwóch gatunków – *Juniperus communis* L. oraz *Juniperus nana* Willd.. Oba należą do rzędu *Coniferales* (Szpilkowce), rodziny *Cupressaceae* (Cyprysowate) i rodzaju *Juniperus* (jałowiec). W skład rodzaju *Juniperus* wchodzi 10 gatunków, w tym oba badane. *J. communis* podzielony został na trzy podgatunki: *J. communis* subsp. *communis*, *J. communis* subsp. *hemisphaerica* (J. & C. Presl) Nyman oraz *J. communis* subsp. *alpina* (Suter) Celak. (Flora Europaea, 2001). Inne źródła systematyczne (por. Farjon, 2001) w obrębie rodzaju *Juniperus* wyróżniają 53 gatunki, w tym 6 podgatunków, 25 odmian, 1 formę. Biorąc za podstawę podział Farjona (2001) należy stwierdzić, że w ramach *J. communis* wydzielono 5 odmian, w tym *J. communis* var. *communis*, *J. communis* var. *saxatilis*, *J. communis* var. *depressa*, *J. communis* var. *megistocarpa* oraz *J. communis* var. *nipponica* (Farjon, 2001). Synonimem *J. nana* Willd. w najnowszych ujęciach systematycznych jest *J. communis* var. *saxatilis* Pall.. Dodatkowo rodzaj *Juniperus* bywa dzielony na trzy sekcje: *Caryocedrus*, *Oxycedrus* oraz *Sabina* (Seneta, 1973; Seneta, 1981; Zanoni i Adams, 1976). W tym ujęciu syntaksonomicznym oba badane gatunki należą do sekcji *Oxycedrus*.

Stanowisko systematyczne *J. communis* i *J. nana* jest zróżnicowane. W tabeli 1 podano najpowszechniej używane w literaturze synonimy dla tych dwóch taksonów. Jest to tylko część z nich, najczęściej stosowana we współczesnej literaturze botanicznej. W niniejszej pracy używane są nazwy *J. communis* L. dla *J. communis* var. *communis* wg. Farjon (2001) oraz *J. nana* Willd. dla *J. communis* var. *saxatilis* wg. Farjon (2001).

TABELA 1: Wykaz synonimów *J. communis* i *J. nana* (Farjon, 2001; *Flora Europaea*, 2001)

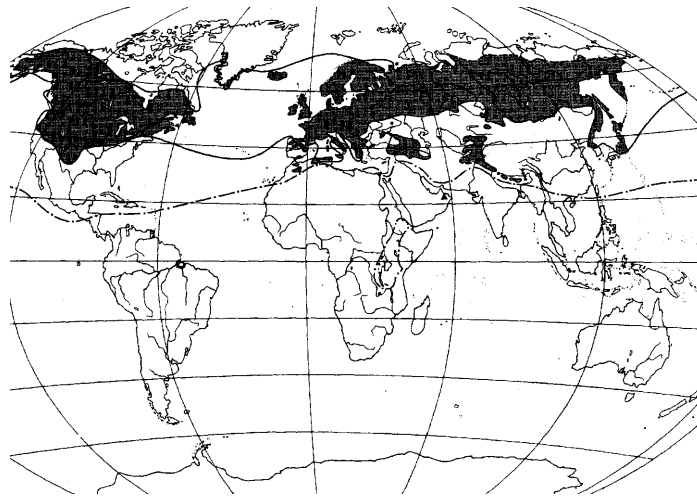
Nazwa używana w rozprawie doktorskiej	Synonimy
<i>Juniperus communis</i> L.	<i>J. communis</i> L. subsp. <i>communis</i> <i>J. communis</i> L. var. <i>vulgaris</i> Aiton <i>J. communis</i> var. <i>erecta</i> Pursh <i>J. hemisphaerica</i> J. & C. Presl <i>J. depressa</i> Steven <i>J. communis</i> var. <i>brevifolia</i> Sanio lub subsp. <i>brevifolia</i> (Sanio) Pénzes
<i>Juniperus nana</i> Willd.	<i>J. communis</i> L. var. <i>saxatilis</i> Pall. lub subsp. <i>saxatilis</i> (Pall.) E. Murray <i>J. sibirica</i> Burgsd. <i>J. communis</i> var. <i>montana</i> Aiton <i>J. montana</i> (Aiton) Lindl. & Gordon <i>J. communis</i> var. <i>nana</i> (Willd.) Baumg. lub subsp. <i>nana</i> (Willd.) Syme in Sowerby <i>J. communis</i> var. <i>alpina</i> Suter lub subsp. <i>alpina</i> (Suter) Čelak <i>J. alpina</i> S. F. Gray <i>J. oblonga</i> M.-Bieb.

1.2. Rozmieszczenie geograficzne *J. communis* i *J. nana* i zajmowane siedlisko

J. communis L. to roślina o szerokim spektrum występowania geograficznego, zarówno w Europie, jak i na świecie (por. rysunek 1, s. 17). Jest on typowym przedstawicielem elementu borealnego flory, zatem występuje wyłącznie na półkuli północnej. Jednocześnie jest jedynym gatunkiem rodzaju *Juniperus*, który spotykany jest na obydwu półkulach – wschodniej i zachodniej (Adams *i in.*, 2003; Adams i Pandey, 2003). W Europie *J. communis* L. występuje prawie w całej północnej i środkowej części kontynentu. Na zachodzie Europy notowano jego stanowiska w pasmie górskim Sierra Nevada, natomiast na wschodzie trudno jest ustalić granicę zasięgu, gdyż na Uralu oprócz *J. communis* i *J. nana* pojawiają się liczne formy

przejściowe. Południowa granica występowania tego gatunku to Włochy, Grecja, Bułgaria, a na północy jego występowanie notuje się w południowej części Wysp Brytyjskich i Półwyspu Skandynawskiego (Browicz, 1971). W Polsce *J. communis* występuje na obszarze całego kraju, w górach w reglu dolnym i pojedynczo sięga regła górnego (Browicz, 1978, Babiński, 1974).

RYSUNEK 1: Mapa zasięgu rodzaju Juniperus i gatunku J. communis na świecie (Meusel i in., 1965)



Linia ciągła i kolorem czarnym zaznaczono zasięg gatunku *J. communis*, linia przerywaną rodzaju *Juniperus*.

Stanowiska *J. communis* notowano na nizinach lub w niższych położeniach górskich. Ustalenie górnej granicy jego zasięgu jest trudne, ponieważ tylko nieliczni autorzy wyraźnie oddzielają od siebie stanowiska jałowca pospolitego i halnego w górach. W Tatrach *J. communis* spotykany jest jeszcze na wysokości ~1700 m n.p.m., podobnie w Bułgarii i Austrii, podczas, gdy w Grecji i Francji notowano go na wysokościach 900 – 1200 m n.p.m. (Browicz, 1971).

Siedliska jałowca pospolitego, podobnie jak rozmieszczenie geograficzne są bardzo zróżnicowane. Rośnie on pospolicie w poszyciu lasów iglastych lub na ich obrzeżach, rzadziej trafia się w lasach mieszanych i liściastych. Występuje również na torfowiskach mszarnych i wydmach. Może występować grupowo lub w rozproszeniu, na suchych wzgórzach, polanach. Jest rośliną światłolubną i nie wymagającą specjalnych warunków glebowych. Spotykany jest na siedliskach z natury ubogich, szczególnie w zdegradowanych zbiorowiskach roślinnych, których skład florystyczny uległ zmianie w wyniku zaburzeń siedliska.

Rozmieszczenie geograficzne jałowca halnego jest nieco mniej poznane niż rozmieszczenie *J. communis*, co wiąże się w dużym stopniu ze sprzecznymi poglądami na jego rangę systematyczną. Należy on do elementu północno-arktyczno-górskiego i ma porozrywany zasięg, co jest typową cechą dla wielu reliktywów polodowcowych. Rośnie, podobnie jak *J. communis* na półkuli północnej: w Europie, Azji i Ameryce Północnej, a także na Grenlandii. We florze Polski notowany był w górach tj. w Tatrach, a także na Hali Izerskiej, w masywie Śnieżnika i Babiej Góry i kilku innych stanowiskach (Browicz, 1971). Najwyżej położone stanowiska *J. nana* w Polsce notowano w Tatrach Wysokich ~2400 m n.p.m. (Browicz, 1971).

Jałowiec halny tworzy skupienia powyżej górnej granicy lasu, tworząc jednolite populacje roślinne lub w otoczeniu kosodrzewiny i obu gatunków borówek. Siedliska tego gatunku notowano zwykle w górach (choć występuje też w tundrze na brzegach lasów) w strefie subalpejskiej i alpejskiej, na kamienistych, słonecznych stokach, skałkach wapiennych, halach i brzegach dobrze oświetlonych lasów (Browicz, 1971).

1.3. Charakterystyka botaniczna *J. communis* i *J. nana*

***Juniperus communis* L.**

Jałowiec pospolity jest zimozielonym krzewem lub rzadziej drzewem o zmiennej wysokości i pokroju. W naszym kraju może osiągać 13m wysokości, a najwyższe notowane osobniki na świecie osiągały 20m (Seneta, 1973).

W zależności od liczby pędów głównych *J. communis* charakteryzuje się zróżnicowanym pokrojem zewnętrznym. Zwykle wytwarza kilka lub kilkanaście pędów, które nadają mu pokrój krzewiasty (rysunek 2a). Jest to najczęściej spotykana postać w zbiorowiskach roślinnych. U bardzo rzadko spotykanej formy drzewiastej roślina może wytwarzać jeden pęd główny lub u formy kolumnowej - kilka do kilkunastu (rysunek 2b). Występowanie najczęstszej formy krzewiastej związane jest z procesem rozwidlania pędu głównego powodowanym ograniczonym dostępem światła w poszyciu. Dodatkowo u młodych roślin, choć znacznie rzadziej, spotyka się formy płożące oraz pośrednie (Babiński, 1974).

RYSUNEK 2: Pokrój a) krzaczasty i b) kolumnowy *J. communis* L. (fot. Natalia Filipowicz)



a)



b)

Liście jałowca pospolitego osiągają od 10 do 15mm długości i 1 - 2mm szerokości. Zebrane są po trzy w okółkach i nie zbiegają po pędach, lecz stopniowo zwężają się i są kolczasto zakończone. Górna strona blaszki liściowej posiada szeroki, biały pasek i wąskie zielone brzegi, dolna zaś jest wypukła, zielona, zwykle z bruzdką na grzbiecie (Seneta, 1973; 1981). *J. communis* jest gatunkiem dwupiennym: kwiaty męskie tworzą małe kwiatostany, złożone z łuseczkowatych liści, natomiast kwiaty żeńskie występują pojedynczo i zbudowane są z kilku okółków łuskowatych „owocolistków”. Roślina kwitnie w maju i czerwcu. Od chwili zapylenia do zapłodnienia upływa rok. Po zapłodnieniu 3 najwyższe owocolistki stopniowo rosną, mięśnieją, zrastają się tworząc w ten sposób kulisty twór tzw. szyszkojagodę z wyraźną trójramienną bruzdką na szczycie (rysunek 3). Jesienią pierwszego roku szyszkojagoda jest drobna, jajowata i zielona, a w drugim sezonie wegetacyjnym zaokrąglą się i osiąga wielkość ziarna grochu. Jednocześnie w czasie dojrzewania stopniowo zmienia

barwę na granatowoczną z matowym, woskowym nalotem na wierzchu. W miąższu szyszkojagody znajduje się zwykle od 1 do 3 pestkowatych, trójgraniastych nasion z żywicznymi gruczołkami, które osadzone są na krótkiej szypułce (Babiński, 1974).

*RYSUNEK 3: Fragment owocującego pędu oraz dojrzałe szyszkojagody *J. communis* (fot. N. Filipowicz, P. Madanecki)*



Jałowiec należy do gromady nagolężkowców. Nie wytwarza więc właściwego owocu (brak owocni), a termin owocolistki jest tutaj używany raczej zwyczajowo. Roślina wytwarza mięsistą szyszkojagodę morfologicznie podobną do owocu typu jagody, a anatomicznie do szyszki. Można zatem w stosunku do szyszkojagody jałowca używać terminu „nibyowoc”, gdyż ochrania ona nasiona i bierze udział w ich rozsiewaniu (Babiński, 1974).

***Juniperus nana* Willd.**

Jałowiec halny jest karłowatym, płożącym się krzewem, od 20 do 30 cm wysokości (stąd też zwany jest czasem w literaturze jałowcem karłowatym). Jego pędy są krótkie, grube i często powyginane. Liście w postaci szpilek morfologicznie różnią się od igieł jałowca pospolitego – są krótsze (4 – 8 mm), ale grubsze (1 – 2 mm). Są

ostro zakończone, osadzone bardzo gęsto na pędzie i zwykle wygięte w kierunku jego końca, przez co pokrywają się. Grzbiety igieł są mocno wypukłe, ciemnozielone i błyszczące, a górna strona blaszki liściowej, podobnie, jak w przypadku *J. communis*, opatrzona jest szerokim białym paskiem, (Seneta, 1981).

W tabeli 2 przedstawiono porównawczo najważniejsze cechy budowy morfologicznej *J. communis* oraz *J. nana*.

TABELA 2: Zestawienie porównawcze wybranych cech budowy morfologicznej *J. communis* i *J. nana*

Cecha	<i>J. communis</i>	<i>J. nana</i>
forma występowania	krzew, rzadziej drzewo	krzew
forma życiowa wg Raunkiera	nanofanerofit, rzadziej mikrofanerofit	nanofanerofit
pokrój	krzewiasty, kolumnowy, piramidalny, drzewiasty	połzący krzewiasty
wysokość	od 0,5 do kilkunastu m	0,2 – 0,5m
liście	długość 10-15mm, odstające, silnie kłujące	długość 4-8mm, częściowo przylegające, miękkie i szerokie
międzywęzła krótkopędów	≥2mm	1-2mm

1.4. Znaczenie farmakognostyczne *J. communis*

Jałowiec pospolity należy do popularnych roślin olejkowych używanych w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i chemiczno-kosmetycznym. Według Kohlmünzera „za olejkowe gatunki roślin uważa się takie, które zawierają powyżej 0,01% olejku” (Kohlmünzer, 2000). Olejek produkowany jest zarówno w szyszkogodach, jak i igłach oraz pędach rośliny, w tkance wydzielniczej typu endotropowego (w schizogenowych przewodach olejkowych). W lecznictwie z *J. communis* pozyskiwany jest tylko jeden surowiec olejkowy. Jest nim szyszkogoda (*Baccae Juniperi*, *Juniperi fructus*) zawierająca od 0,5 do 1,5% olejku, około 33% cukru inwertowanego oraz żywice (Evans, 2000). Inne źródła podają zawartość następujących grup związków w szyszkogodzie jałowca: kwasy, flawonoidy, tanniny, olejek eteryczny stanowiący od 0,2 do 3,42% oraz inne związki (pochodne terpenowe nie będące składnikami olejku, lignany, żywice i cukry) (Barnes i in., 2002), a także flawonoidy, gorycz, kwasy organiczne (Ożarowski, 1993). Szyszkogoda jałowca posiada monografie w licznych farmakopeach i innych oficjalnie uznanych pozycjach literaturowych np.: BHP 1996, BP 2001 i 2004, Complete German Commission E, ESCOP 1997, Martindale 32nd

edition, PDR for Herbal Medicines 2nd edition, Ph Eur 2002 i 2005 (Barnes i in., 2002). Posiada także monografię w Farmakopei Polskiej VI (a także wcześniejszych – FP III, IV, V). Według FP VI surowcem farmakopealnym jest „dojrzała szyszkojagoda jałowca pospolitego *Juniperus communis* L., *Cupressaceae*, wysuszona w temperaturze nie wyższej niż 40°C. Surowiec powinien zawierać nie mniej niż 1,0% (v/m) (10µl/g) olejku” (FP VI, 2002).

Szyszkojagoda jałowca jest powszechnie stosowana jako składnik zapachowy i smakowy w produkcji ginu, natomiast sama roślina wymieniana jest przez Radę Europy na liście naturalnych źródeł aromatów spożywczych: szyszkojagoda w kategorii N2 (oznacza możliwość dodawania niewielkich ilości do pokarmu), igły i drewno w kategorii N3 (oznacza, że nie jest dostępna wystarczająca ilość informacji dotycząca potencjalnej toksyczności dodatków). W Niemczech surowiec ten został dopuszczony i jest stosowany w niestrawności, ponadto posiada udokumentowane działanie diuretyczne, antyseptyczne, wiatropędne, żołądkowe i przeciwreumatyczne (Barnes i in., 2002; Kohlmünzer, 2000; Martindale, 1999; Ożarowski, 1993), a niektórzy autorzy podają także działanie hipoglikemiczne (Sanchez de Medina i in., 1993). Szczegółowe dane dotyczące działania olejku z szyszek jałowca opisane zostały w rozdziale „Aktywność biologiczna i zastosowanie olejku jałowcowego” (s. 31).

Monografia czystego olejku jałowcowego znajduje się w FPV, a także we wcześniejszych FP – III i IV. Jest to „bezbarwna, żółtawa lub zielonawa ciecz o swoistym zapachu i palącym gorzkawym smaku”, której skręcalność optyczna [α_D^{20}] mieści się w granicach od +5° do -15°. Dodatkowo skręcalność optyczna jest skorelowana z pochodzeniem geograficznym surowca, z którego otrzymuje się olejek. Olejkiem południowo-europejskim przypisywana jest lewoskrętność, a północno-europejskim (w tym również polskim) prawoskrętność (FPV, 1999). Olejek jałowcowy posiada także monografie w najnowszych farmakopeach: europejskiej (Ph Eur 5.0, 2005) oraz brytyjskiej (BP, 2004) opisujące właściwości organoleptyczne, sposoby identyfikacji olejku, określania jego podstawowych właściwości fizykochemicznych oraz przechowywania.

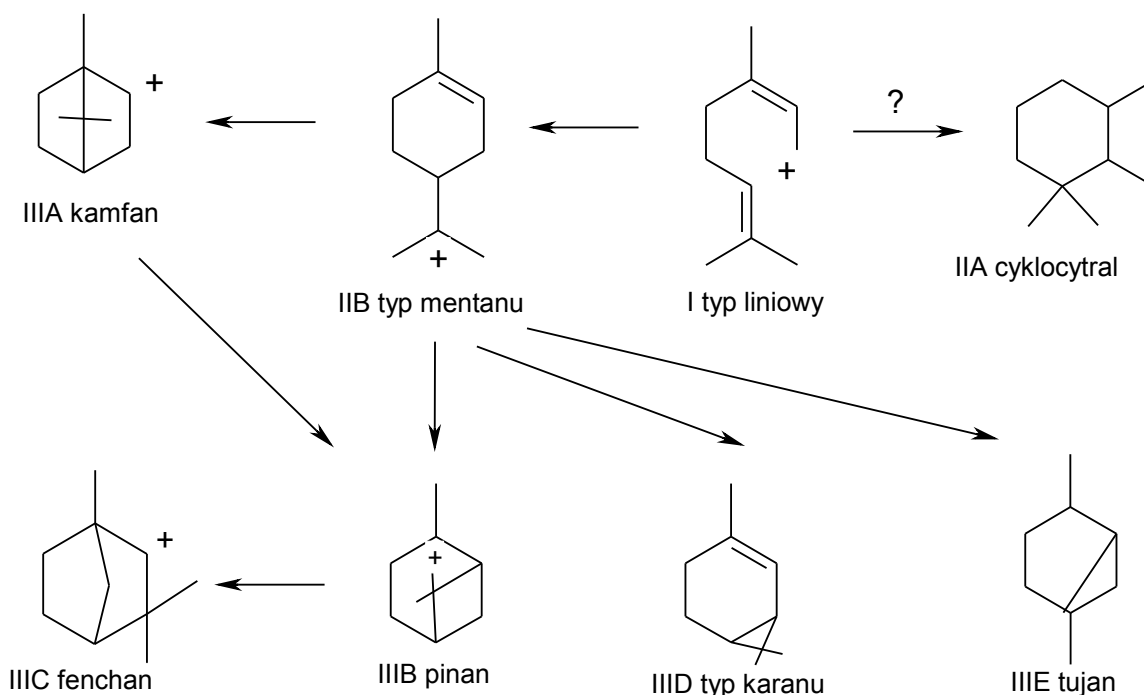
1.5. Charakterystyka i skład olejku jałowcowego

Monoterpenoidy

Olejek z szyszkogód jałowca może zawierać około 60 różnych składników, istnieją też dane mówiące o ponad 100 (Evans, 2000). Główną frakcją olejku jałowcowego pozyskiwanego zarówno z szyszkogód, igieł jak i pędów *J. communis* L. są składniki o charakterze monoterpenów. Stanowią one około 58 – 60% całego olejku.

Monoterpeny to bardzo liczna grupa związków terpenoidowych o zasadniczym wzorze sumarycznym $C_{10}H_{16}$. Ich cząsteczka powstaje z połączenia dwóch jednostek pięciowęglowych aktywnego izoprenu tj. 2-metylobuta-1,3-dienu, w których reszty izoprenowe łączą się wg reguły izoprenowej sformułowanej przez Ruzičkę (tzn. ogon – głowa). W reakcji biosyntezy terpenów bezpośrednim substratem nie jest sam izopren, a pirofosforan 3-izopentyli (IPP) (Kołodziejczyk, 2003). IPP powstaje w roślinie z acetylo-CoA głównie w szlaku kwasu mewalonowego (MVA), który jest głównym prekursorem terpenów. Nowe badania wykazały także jego powstawanie poza tym szlakiem biogenetycznym, w drodze przemian z deoksyksylulozy (DOX) (Evans, 2000). W szlaku kwasu mewalonowego (aktywna jest tylko forma prawoskrętna) na drodze jego przemian powstaje IPP, który ulega kondensacji ze swoją formą enancjomeryczną – pirofosforanem dimetyloallilu i powstaje tzw. forma rodzicielska (ang. *parent*) dla grupy monoterpenów - pirofosforan geranyli – GPP. Poprzez przyłączenie kolejnych pięciowęglowych jednostek w postaci IPP powstają prekursorzy innych grup o charakterze terpenowym (Evans, 2000; Banthorpe, 1994). GPP może być dalej przekształcany w acykliczne, mono- i bicykliczne monoterpenoidy pod wpływem działania enzymów zwanych cyklazami. Są one specyficzne dla poszczególnych klas terpenów (klasy wydzielono pod względem budowy szkieletu, są to mentany, pinany, tujany i inne). W roślinie pochodzą one prawdopodobnie od limonenu (możliwe zależności biogenetyczne i kolejność przekształceń przedstawiono na rysunku 4), a ich kolejne modyfikacje obejmują liczne konwersje i modyfikacje będące pod kontrolą enzymatyczną (Evans, 2001). Udowodniono, że aktywność poszczególnych cyklaz warunkowana jest genetycznie i zależy od poziomu ekspresji genów kodujących poszczególne enzymy (Maffei, 1990).

RYSUNEK 4: Prawdopodobne relacje biogenetyczne pomiędzy różnymi typami monoterpenu



Ze względu na strukturę monoterpenu można podzielić na cztery grupy – acykliczne, monocykliczne, dicykliczne i tricykliczne. W oleju z jałowca występują związki z trzech pierwszych grup. W tabeli 3 przedstawiono związki monoterpenu występujące w oleju jałowcowym z uwzględnieniem ich struktury i charakteru chemicznego.

TABELA 3: Główne monoterpenu oleju jałowcowego z uwzględnieniem struktury i charakteru chemicznego

Grupa monoterpenu ze względu na strukturę	Nazwa związku	Charakter chemiczny
Monoterpenu acykliczne	mircen	węglowodór
Monoterpenu monocykliczne	limonen	węglowodór
	α -terpinen	węglowodór
	γ -terpinen	węglowodór
	α -terpineol	alkohol trzeciorzędowy
	α -felandren	węglowodór
	β -felandren	węglowodór
	terpinolen	węglowodór
	1-terpinen-4-ol	alkohol

Grupa monoterpenów ze względu na strukturę	Nazwa związku	Charakter chemiczny
Monoterpeny dicykliczne	α -pinen	węglowodór
	β -pinen	węglowodór
	kamfen	węglowodór
	δ -3-karen	węglowodór
	sabinen	węglowodór

Największy udział procentowy w olejkach otrzymanych z *J. communis* mają monoterpeny dicykliczne – α -pinen i sabinen, nieco mniej jest β -pinenu, δ -3-karenu i kamfenu.

α -Pinen jest głównym przedstawicielem grupy pochodnych nasyconego pinanu. Jego pochodną jest także inny związek występujący w olejku w niewielkich ilościach (rzędu kilku procent) – β -pinen. Obydwa zawierają po dwa asymetryczne atomy węgla (C1 i C5 – rysunek 4), a więc każdy z nich posiada po dwa optycznie czynne stereoizomery i może tworzyć racematy. Wszystkie te cztery izomery występują w naturze, głównie w olejkach drzew iglastych. α - i β -pinen mają bardzo zbliżone temperatury wrzenia (odpowiednio 156°C i 163°C), a podczas łagodnego ogrzewania β -pinen przekształca się w α -pinen. Obydwa te związki można odróżnić na podstawie reakcji utlenienia, która potwierdza położenie wiązania podwójnego (a więc ich strukturę). W temperaturze 250°C ulegają one izomeryzacji do dipentenu, a w 350°C z α -pinenu powstaje acykliczny ocymen, a z β -pinenu mircen. Tego typu przekształcenia świadczą o bliskim pokrewieństwie strukturalnym pomiędzy poszczególnymi grupami monoterpenów (Kołodziejczyk, 2003; Wrzeciono i Zaprutko, 2001).

Sabinen, który podobnie do α -pinenu jest jednym z głównych i najbardziej zmiennych związków w opisywanym olejku należy do grupy pochodnych tujanu. Występuje w nim tylko w prawoskrętnej formie enancjomerycznej.

Inna duża grupa monoterpenów dicyklicznych to pochodne bornanu (kamfanu). Wśród związków olejku jałowcowego do tej grupy należy jego nienasycony analog tj. kamfen. W przyrodzie występuje on w postaci dwóch enancjomerów i racematu, a jego formy chiralne bardzo łatwo racemizują.

δ -karen należy do pochodnych karanu i we współczesnej nomenklaturze chemicznej częściej określany jest mianem 3-karenu. Jest on jednym z głównych

składników olejku sosnowego i obok α -pinenu jest związkami, który w lasach iglastych w dużych ilościach emitowany jest do atmosfery (Kołodziejczyk, 2003). Występuje też w olejku z jałowca, zwykle w formie enancjomeru lewoskrętnego.

Najważniejsze monoterpény o budowie monocyklicznej, takie jak: limonen, terpineny, terpinolen i felandreny posiadają strukturę p-metadienu. Wśród nich znaczący udział ilościowy w badanym olejku ma limonen. Asymetryczny atom węgla C4 warunkuje istnienie dwóch optycznie czynnych enancjomerów (+) i (-). Odmiana (+) występuje w olejkach cytrusowych, natomiast (-) w olejkach roślin szpilkowych, a obydwa enancjomery mają przyjemny zapach cytrusowy. W niektórych olejkach występuje ich mieszanina racemiczna zwana dipentenem, natomiast optycznie czynne limoneny racemizują do dipentenu w temperaturze 250°C. Limonen w środowisku kwasowym przyłącza stopniowo dwie cząsteczki wody przechodząc w α -terpineol (Wrzeciono i Zaprutko, 2001).

Terpineole są nienasyconymi monocyklicznymi alkoholami terpenowymi, powstającymi przez uwodnienie pinenów w środowisku kwaśnym. Z czterech izomerów terpineolu tylko α -terpineol występuje naturalnie w roślinach, m. in. także w olejkach z roślin szpilkowych. Jest związkiem optycznie aktywnym, ale w naturze spotykana jest głównie forma enancjomeryczna (-), forma (+) oraz racemat występują w różnych olejkach jedynie w śladowych ilościach. Inny alkohol 1-terpinen-4-ol, który w dużej mierze warunkuje działanie diuretyczne olejku z jałowca podobnie jak terpineol występuje w naturze w dwóch formach chiralnych oraz jako racemat (Bauer i in., 2001). W olejku *J. communis* występuje w formie enancjomerycznej (+).

Felandreny, podobnie jak limonen posiadają asymetryczny atom węgla C4.

Terpineny (α i γ) występują w badanym olejku w ilościach rzędu kilku procent i w odróżnieniu od opisywanych wcześniej monoterpénów jednopierścieniowych są nieczynne optycznie. Zarówno wspomniany wcześniej dipenten, jak i felandreny podgrzewane w alkoholowym roztworze chlorowodoru izomeryzują do α - i γ -terpinenu (Wrzeciono i Zaprutko, 2001).

Poza opisanymi tutaj związkami o charakterze monoterpénoidów w skład olejku wchodzi też frakcja seskwiterpénów będących trimerami izoprenu o niezwykle zróżnicowanej strukturze. Wśród nich najczęściej wymieniane to dicykliczne kadinen i

kariofilen oraz pochodna alkoholowa – α -kadinol. Seskwiterpeny w olejkach z roślin szpilkowych rzadko występują w ilości większej niż 10% (Kubeczka i Schultze, 1987).

1.6. Skład jakościowy i procentowy olejku jałowcowego

Zakresy zawartości procentowych głównych składników olejku otrzymywanego z szyszkojagód jałowca uwzględnione są w Farmakopei Europejskiej i Brytyjskiej (Ph Eur 5.0, 2005; BP, 2004). Zestawiono je w tabeli 4.

TABELA 4: Zawartości procentowe głównych składników olejku z szyszkojagód *J. communis* wg. Farmakopei Europejskiej i Brytyjskiej (Ph Eur 5.0, 2005; BP, 2004)

Składnik	Zawartość procentowa [%]
α -pinen	20-50
sabinen	<20
β -pinen	1-12
mircen	1-35
α -felandren	<1
limonen	2-12
terpinen-4-ol	0,5-10
β -kariofilen	<7
octan bornylu	<2

We współczesnej literaturze istnieje kilka doniesień na temat składu jakościowego i ilościowego olejku z igieł i szyszkojagód *J. communis*. Badano wpływ różnych czynników (głównie abiotycznych) na jego skład. W tabeli 5 zebrano wyniki prac wybranych autorów, którzy badali zawartość poszczególnych składników w oleju jałowcowym. Uwzględniono w niej rodzaj i pochodzenie surowca.

TABELA 5: Zawartość procentowa poszczególnych składników olejku z igieł i szyszkogagód jałowca

Związek	OLEJEK Z IGIEŁ [%]			OLEJEK Z DOJRZAŁYCH SZYSZKOJAGÓD [%]		
	Sardynia (Angioni i in., 2003)	Północnozachodnie Alpy (Caramiello i in., 1995)	Północnozachodnie Alpy (Caramiello i in., 1995)	Sardynia (Angioni i in., 2003)	Olimp (Chatzopoulou & Katsiotis, 1993)	Macedonia, Mt Vermion (Koukos & Papadopoulos, 1997)
monoterpeny						
α-tujen	2,27	-	-	0,53	0,08	-
α-pinen	6,41	9,2	22	52,26	42,55	57,06
kamfen	0,04	0	0,2	0,22	0,21	0,31
sabinen	61,09	44,7	32	5,58	0,17	6,08
β-pinen	0,63	0,6	2,2	2,86	1,65	3,41
mircen	2,57	3,5	3	15,32	8,1	10,74
α-felandren	0,1	-	-	0	ślady	0,4
karen	0	0,3	0	0	0,02	0,02
α-terpinen	1,79	2,4	1,9	0	0,02	0,12
p-cymen	1,15	0,7	0,4	0,25	0,11	0,08
limonen	2,5	2,9	4,1	3,11	0,83	1,73
β-felandren	0	2,9	0	0	0,11	-
γ-terpinen	3,32	4,1	3,2	0,52	0,05	0,34
α-terpinolen	1,34	2,4	1,7	0,49	0,41	0,62
razem*	~83%	~74%	70,7%	~81%	~55%	~81%
alkohole						
β-terpineol	0,71	-	-	0	-	-
linalool	0	-	-	0	0,11	0,26
terpinen-4-ol	10,67	11,1	6,6	1,51	0,74	0,05
α-terpineol	0,52	0,8	0,9	0	0,57	0,85
cytronelol	0	-	-	0	0,2	5,06
razem*	~12%	~12%	8,5%	~1,5%	~1,7%	~6,2%
ketony						
kamfora	0	-	-	0	0,53	-
β-tujon	0,29	1,2	0,6	0	0	-
razem*	~0,3%	~1,2%	~0,6%	0	~0,5%	-
estry						
octan linalilu	0	-	-	0	0	-
octan bornylu	0,13	0,4	1,1	0,66	0,59	1,08
octan myrtenylu	0,04	-	-	0	-	-
octan α-terpinylu	0,4	-	-	0	0,05	-

Związek	OLEJEK Z IGIEŁ [%]			OLEJEK Z DOJRZAŁYCH SZYSZKOJAGÓD [%]		
	Sardynia (Angioni i in., 2003)	Północnozachodnie Alpy (Caramiello i in., 1995)	Północnozachodnie Alpy (Caramiello i in., 1995)	Sardynia (Angioni i in., 2003)	Olimp (Chatzopoulou & Katsiotis, 1993)	Macedonia, Mt Vermion (Koukos & Papadopoulou, 1997)
razem*	~0,6%	~0,4%	~1%	~0,6%	~0,6%	~1%
seskwiterpeny						
α-kopaen	-	-	-	-	-	-
α-kubeben	0	-	-	1,25	1,29	-
β-kariofilen	0,12	0	1,2	0	0,77	1,86
α-humulen	0,11	-	-	0,81	0,72	-
garmakren D	0,75	0,4	0,7	6,69	3,99	-
α-muurolen	0,14	-	-	0	0,52	-
γ-kadinen	-	-	-	-	0,8	-
δ-kadinen	-	0,8	1,4	-	2,61	-
razem*	~1,3%	~1,2%	~3,5%	~9%	~10%	~2%
tlenki						
tlenek kariofilenu	0,14	-	-	0	-	-
tlenek humulenu	-	-	-	-	1,08	-
razem*	~0,2%	-	-	0	~1%	-

* - względna zawartość procentowa w całym olejku
 „-” oznacza brak danych w cytowanym źródle

W olejku jałowcowym zaznacza się wyraźnie przewaga związków o charakterze monoterpenów (od 55% do ponad 80% całego olejku). Zawartość pochodnych tlenowych oraz związków z grupy seskwiterpenów nie przekracza 10%. Głównym i najbardziej zmiennym składnikiem olejku jest α-pinen, duże wahania zawartości wykazuje także sabinen. mircen natomiast jest swoistym markerem olejku z szyszkogod. Caramiello i in. jako główne składniki olejku z igieł jałowca wymieniają α-pinen, sabinen i alkohol monoterpenowy – terpinen-4-ol, przy czym wysoka zawartość terpinen-4-olu skorelowana jest z obecnością sabinenu jako prekursora monoterpenów z grupy tujanu (Caramiello *et. al.*, 1995). Duża ilość sabinenu często przypisywana jest osobnikom pochodzącym z siedlisk górskich, a α-pinenu z niżu (Baerheim Svendsen i in., 1985, Vernin i in., 1988; Angioni i in., 2003). Nie jest to jednak regułą, co potwierdzają prace prowadzone w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej (Ochocka i in., 1997; Filipowicz i in., 2006). Informacje na temat składu procentowego olejku z *J. nana* są zdecydowanie bardziej skąpe –

Looman i Baerheim Svendsen w badaniach norweskich prób *J. communis* var. *saxatilis* stwierdzili wysoką zawartość sabinenu dla większości badanych olejków (25-54%) i zdecydowanie mniejszą zawartość α -pinenu (13-45%) (Looman i Baerheim Svendsen, 1992), podczas, gdy w oleju z *J. communis* ssp. *nana* rosnącym w portugalskim paśmie górskim Serra da Estrela poziom sabinenu utrzymywał się na poziomie około 2% (Proenca da Cunha i Roque, 1989).

W nielicznych źródłach dotyczących oleju z jałowca pospolitego uwzględniono zawartość poszczególnych enancjomerów związków o charakterze chiralnym. Hiltunen i Laakso (1995) wyróżnili jałowce z niską i wysoką zawartością (+)sabinenu. W tych dwóch chemotypach udział poszczególnych enancjomerów optycznych α -pinenu w oleju z igieł różni się. W typie niskosabinenowym dominuje forma (+) (średnio 54,3%) nad formą (-) (średnio 26,6%). W chemotypie wysokosabinenowym średnia zawartość odmian chiralnych (+) i (-) jest zbliżona i wynosi odpowiednio 24,6% oraz 28,9%. Sabinen występuje w oleju jałowcowym tylko w formie enancjomerycznej (+) (Hiltunen i Laakso, 1995; Ochocka i in., 1997). Ci sami autorzy obserwowali porównywalną zawartość formy (+) i (-)- β -pinenu, podczas gdy inne zespoły tylko formę lewoskrętną tego związku i śladowe ilości formy prawoskrętną (Ochocka i in., 1997; Sybilska i in., 1994). Obecność formy (+) limonenu przypisywana jest olejkom z roślin z rodziny *Rutaceae*, a (-) - roślinom szpilkowym (głównie z rodziny *Pinaceae*) (Sjōdin i in. 1996, Bauer i in., 2001). Niemniej jednak w opracowaniach dotyczących oleju jałowcowego obserwowano zwykle znaczącą przewagę enancjomeru (+) nad (-) (Sybilska i in., 1994; Hiltunen i Laakso, 1995; Ochocka i in., 1997).

Przy omawianiu składu procentowego olejków nie można pominąć wpływu różnych czynników biotycznych i abiotycznych na jego skład i wydajność otrzymywania. W przypadku oleju otrzymywanego z *J. communis* wykazano istnienie zależności pomiędzy pokrojem osobnika a zawartością głównych monoterpenu i wydajnością pozyskiwania oleju (Kallio i Jünger-Mannermaa, 1989). Ponadto badano różnice w składzie między olejkiem pozyskiwanym z niedojrzałych (zielonych) i dojrzałych szyszkojagód (Koukos i Papadopoulou, 1997; Angioni i in., 2003) oraz olejkiem z surowca zbieranego w różnych okresach wegetacyjnych (Chatzopoulou i Katsiotis, 1993, Ochocka i in., 1997). Ponadto duży wpływ na skład oleju ma także sposób jego otrzymywania. Udowodniono, że wydajność otrzymywania oleju z całych (nierozdrobnionych) szyszkojagód jałowca wynosi odpowiednio ~0,3% po 6h destylacji

(po zwiększeniu czasu do 8h – 0,35%), a z rozdrobnionych 1,75-2,2% po 3h destylacji. Ponadto destylacja olejku z nierozdrobnionych szyszkojagód skutkuje prawie całkowitym brakiem seskwiterpenów w otrzymanym oleju. Wraz z czasem trwania destylacji rozdrobnionego surowca z wodą zawartość węglowodorów monoterpenowych w oleju spada, seskwiterpenów i pochodnych tlenowych rośnie (Chatzopoulou i Katsiotis, 1995). Na skalę laboratoryjną używa się obecnie coraz częściej nowoczesnej, ale wymagającej drogiej aparatury ekstrakcji CO₂ w stanie nadkrytycznym (ang. *Supercritical Fluid Extraction* – SFE), w której kluczową rolę odgrywa odpowiednie dobranie parametrów ciśnienia, temperatury i czasu ekstrakcji. Badania porównawcze SFE i destylacji z wodą wykazały znaczne różnice w wydajności otrzymywania i zawartości składników olejku pomiędzy tymi dwoma metodami. Składniki o większej lotności (grupa węglowodorów monoterpenowych) występują w większych stężeniach w oleju po destylacji z wodą niż otrzymanym w drodze SFE (Chatzopoulou i in., 2002; Pourmortazavi i in., 2004), podczas gdy seskwiterpeny ekstrahowane są z większą wydajnością w czasie SFE (Poiana i in., 1998).

1.7. Aktywność biologiczna i zastosowanie olejku jałowcowego

Szyszkojagody jałowca wykazują działanie diuretyczne (związane bezpośrednio z obecnością olejku), obniżające ciśnienie krwi i poziom glukozy we krwi. Komisja E do spraw monografii zatwierdziła użycie szyszkojagody jako środka pobudzającego apetyt i w przypadku dyspepsji (PDR for Herbal Medicines, 2000; Barnes i in., 2002). Najczęściej szyszkojagody używane są w przypadku zapaleń pęcherza moczowego, wzdęć i kolek oraz zewnętrźnie w bólach reumatycznych oraz mięśniowych (Barnes i in., 2002).

Część z wymienionych działań została potwierdzona doświadczalnie na zwierzętach laboratoryjnych. Należą do nich:

- a) działanie diuretyczne – wymieniane jako główne w monografii szyszkojagód (FPVI, 2002) oraz olejku z szyszkojagód (Ph Eur 5.0, 2005; BP, 2004). Przypisywane jest obecności alkoholu monoterpenowego – terpinen-4-olu, który zwiększa filtrację kłębuszkową w nerkach (Barnes i in., 2002) prowadząc do zmniejszenia obrzęków i odciążenia układu krążenia i hamując powstawanie kamieni w drogach moczowych (Podlewski i Chwalibogowska-Podlewska,

- 2002). Długotrwałe doustne stosowanie może jednak powodować podrażnienie oraz uszkodzenie nerek, co przypisywane jest obecności dużej ilości węglowodorów monoterpenu, przy jednoczesnej niewielkiej ilości terpinen-4-olu (Evans, 2000).
- b) przeciwwirusowe – działanie to zostało potwierdzone *in vitro* dla ekstraktu z jałowca w wyniku hamowania cytopatogenności wirusa *Herpes simplex* (typ I), a związkami, którym przypisuje się takie działanie jest obecny w szyszkojagodzie lignan (ang. *desoxypodophyllotoxin*) oraz flawonoid – amentoflawon (Barnes i in., 2002).
- c) poronne (stymulujące skurcze macicy) – po podaniu doustnym ekstraktu z jałowca między 1 a 16 dniem ciąży u samicy szczura obserwowano efekt poronny przy jednoczesnym braku teratogenności (Barnes i in., 2002). Inne źródła podają brak działania poronnego, podając jedynie wśród działań stymulację skurczy mięśni macicy i krwawienia z dróg rodnych (Burda, 1998). Przeciwwskazaniem do stosowania preparatów zawierających szyszkojagodę lub olejek jałowca jest ciąża (PDR for Herbal Medicines, 2000; Barnes i in., 2002).
- d) przeciwzapalne – udowodniono, że ekstrakt z jałowca wykazuje 60% aktywność przeciwzapalną (w stosunku do 45% aktywności wykazywanej przez indometacynę) przy podaniu doustnym zwierzętom laboratoryjnym z obrzękiem kończyn (Barnes i in., 2002).
- e) hipotensyjne – przy podaniu dożylnym ekstraktu z jałowca szczurom laboratoryjnym stwierdzono krótkotrwały efekt hipertensyjny, po którym następował długotrwały efekt hipotensyjny (PDR for Herbal Medicines, 2000; Barnes i in., 2002).
- f) bakterio- i grzybobójcze – aktywność przeciwgrzybiczą ekstraktu stwierdzono dla *Penicillium notatum* (Barnes i in., 2002), olejku – dla *Candida albicans* (Filipowicz i in., 2003), *Staphylococcus aureus* MRSA (Nelson, 1997; Filipowicz i in., 2003) oraz *Enterococcus faecium* VRE (Nelson, 1997). Olejki otrzymane z igieł i szyszkojagód innych gatunków *Juniperus* (*J. oxycedrus*, *J. turbinata*, *J. communis* subsp. *alpina*) także wykazują działanie przeciwgrzybicze i

przeciwbakteryjne (*Candida*, *Aspergillus* i inne grzyby dermatofityczne) (Cavaleiro i in., 2006).

- g) hipoglikemiczne – po podaniu naparu z szyszkojagód *J. communis* szczurom zdrowym i z cukrzycą wywołaną eksperymentalnie streptozotocyną obserwowano aktywność hipoglikemiczną u obu grup zwierząt (u zwierząt zdrowych porównywalną z gibenklamidem) (Sanchez de Medina i in., 1993).

Wśród nieudokumentowanych działań wymieniane są przeciwreumatyczne (kąpiele, nacierania), przeciwbólowe (w medycynie ludowej jako uśmierzające bóle menstruacyjne), przeciwzapalne, szczególnie w przypadku chorób dolnej części układu moczowego (PDR for Herbal Medicines, 2000, Barnes i in., 2002), wiatropędne i żołądkowe (Barnes i in., 2002; Ożarowski i Rumińska, 1990).

Na polskim rynku dostępne są preparaty zawierające szyszkojagody jałowca (wysuszone szyszkojagody, Cholavit), wyciągi z jagód (Cholesol) oraz olejek jałowcowy (Analgol, Pulmonil, Pinimentol, Olbas Oil).

2. Mikroekstrakcja do fazy stałej jako metoda badania składników olejku

2.1. Chromatografia gazowa

Chromatografia gazowa (ang. GC – *Gas Chromatography*) ma kluczowe znaczenie w analizie związków będących składnikami olejków eterycznych. Należą do nich terpeny, których masa cząsteczkowa zwykle nie przekracza 400 i dlatego mogą stosunkowo łatwo przechodzić w stan lotny, a więc spełniają podstawowe kryterium umożliwiające ich oznaczanie za pomocą GC. GC gwarantuje ilościowe i jakościowe oznaczanie składników olejków eterycznych. Od czasu pierwszego rozdziału metodą chromatografii gazowej na początku lat 50 XX wieku technika ta jest stale udoskonalana. Obecnie w analizie olejków stosuje się nową generację chromatografy gazowej zwykle sprzężone ze spektrometrem masowym (ang. GC-MS – *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) i wyposażone w kolumnę kapilarną (do lat 80 stosowano głównie kolumny pakowane) o odpowiednim rodzaju i grubości żłóża, średnicy i długości. Szacuje się, że 85% opisanych analiz z zastosowaniem GC po roku 1986 dotyczy kolumn kapilarnych (Lockwood, 2001). Do najczęściej stosowanych faz stacjonarnych w przypadku rozdziałów mono- i seskwiterpenów należą DB-1, Carbowax, OV-1, OV-101, PEG 20M, BP5, DB-5, które reprezentują różną polarność; zakres długości stosowanych kolumn to 25-100m, grubości fazy 0,2-0,7 μ m. Temperatury rozdziałów mieszczą się w przedziale 50°C-280°C (zwykle z narostem 5°C) (Lockwood, 2001). Rozwój stabilnych żłóż chiralnych opartych na cyklodekstrynach i ich rozmaitych modyfikacjach w latach 80 zapoczątkował nowy trend w chromatografii gazowej. Umożliwił rozdziały izomerów geometrycznych, diastereoizomerów i enancjomerów, między innymi związków mono- i seskwiterpenowych, głównie z wykorzystaniem α -cyklodekstryn jako fazy stacjonarnej (Lockwood, 2001; Sybilska i Asztemborska, 2002; Asztemborska i in., 2003). W ostatnich latach powstaje też dużo nowych rozwiązań, takich jak techniki tandemowe: GC-GC (próby analizowane są z zastosowaniem dwóch różnych kolumn) czy HPLC-GC (Lockwood, 2001), których głównym celem jest poprawienie rozdzielczości analiz chromatograficznych.

2.2. Mikroekstrakcja do fazy stałej

Właściwe analizy chromatograficzne poprzedza proces przygotowania surowca i poddania go procesowi wyodrębnienia grupy związków, którą chcemy analizować. W przypadku olejków eterycznych analizę poprzedza proces destylacji olejku z wodą (lub parą wodną) lub ekstrakcji odpowiednim rozpuszczalnikiem. Destylacja olejku z wodą (ang. *hydrodistillation*) ze względu na niewielki koszt aparatury i jej małą złożoność (aparat do oznaczania olejków wg Derynga zwany także aparatem typu Clevengera) jest najpowszechniej używaną metodą otrzymywania olejków eterycznych na skalę laboratoryjną. Niemniej jednak metoda ta posiada kilka wad. Należy do nich długotrwałość procesu, pracochłonność i konieczność posiadania stosunkowo dużej ilości wyjściowej surowca roślinnego. Proces destylacji trwa 3 godziny. Dodatkowo należy doliczyć czas potrzebny na podgrzanie całego układu destylacyjnego oraz na wystygnięcie aparatury przed ostatecznym pobraniem olejku z odbieralnika. Bardzo pracochłonnym i czasochłonnym etapem jest rozdrobnienie surowca. Wysoka temperatura procesu stwarza konieczność ciągłego dozoru procesu, a dodatkowo może powodować przemiany termolabilnych związków m. in. hydrolizę (Reverchon i in., 1995; Chatzopoulou i in., 2002) oraz zjawisko tzw. hydrodyfuzji (ang. *hydrodiffusion*) czyli rozpuszczania się pochodnych tlenowych w wodzie (Chatzopoulou i Katsiotis, 1995). Destylacja staje się zatem czynnikiem ograniczającym w przypadku badań związanych z koniecznością analizy wielu prób. Można do nich zaliczyć badania zróżnicowania chemicznego populacji roślinnych czy badania przesiewowe surowca roślinnego pod kątem zawartości składników czynnych.

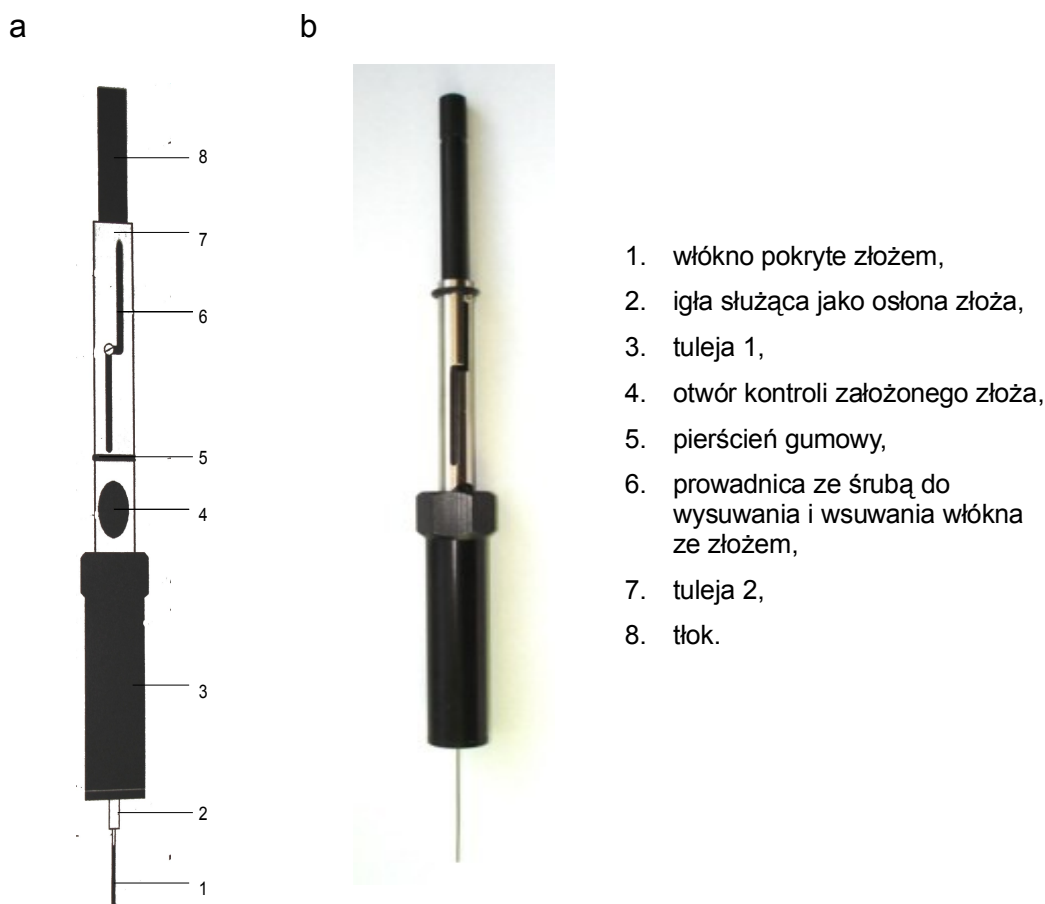
W obliczu wymienionych powyżej głównych wad destylacji (a także ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi) istnieje tendencja do poszukiwania alternatyw. Jedną z nich jest opracowana w latach 70 metoda ekstrakcji do fazy stałej (ang. *Solid Phase Extraction* – SPE), która stała się alternatywą do ekstrakcji ciecz-ciecz. Polega ona na zabsorbowaniu lub zadsorbowaniu analitu z roztworu na fazę stałą. Związane w ten sposób anality mogą być następnie desorbowane termicznie lub rozpuszczalnikiem organicznym. Pomimo wielu niekwestionowanych zalet SPE posiada również wady. Wymienić tu należy niezbyt dobrą powtarzalność powodowaną zmiennością różnych partii sorbentu, oddziaływanie analitu ze sztucznym tworzywem, z którego wykonane są kolumny do SPE, mały odzysk analizowanych substancji ze

złoża i jego częste zatykanie oraz konieczność modyfikacji iniektora chromatografu w celu przeprowadzenia termodesorpcji. Większość tych problemów rozwiązało wynalezienie przez zespół Pawliszyna modyfikacji tej metody, nazwanej mikroekstrakcją do fazy stałej (ang. *Solid Phase Microextraction* – SPME) (Pawliszyn i Arthur, 1990).

Modyfikacją SPME w stosunku do SPE jest zdecydowane zmniejszenie wymiarów fazy stałej służącej jako adsorbent badanych analitów. Adsorbent lub adsorbent nanoszony jest na cienkie włókno o średnicy od 100 do 300 μm (obecnie dostępne są włókna o jeszcze mniejszej średnicy). Taki rozmiar fazy stałej eliminuje problem termodesorpcji, gdyż rozmiar włókna pozwala na jego wprowadzenie bezpośrednio do iniektora chromatografu. Możliwe jest zatem przeprowadzenie analitu bezpośrednio na kolumnę chromatograficzną (ang. *on-column injection*). Przewagą SPME jest prostota wykonania, wyeliminowanie konieczności stosowania rozpuszczalników ekstrakcyjnych oraz redukcja czasu ekstrakcji nawet do kilku minut (Pawliszyn i Arthur, 1990). Dodatkową zaletą SPME jest niewysoki koszt potrzebnego wyposażenia tj. specjalnej strzykawki do SPME, włókien ze złożem oraz specjalnego wkładu do iniektora chromatografu gazowego.

Obecnie jedynym producentem aparatury do SPME jest firma Supelco (Bellefonte, USA), oferująca trzy rodzaje urządzeń do SPME: do automatycznego dozowania i HPLC, do ręcznego dozowania oraz przenośne do zastosowań w terenie. Zasada działania wszystkich trzech urządzeń jest taka sama. Przypominają one strzykawkę z igłą, wewnątrz której ukryte jest cienkie włókno pokryte złożem (o charakterze adsorbenta lub absorbenta). Specjalny tłok strzykawki służy do wysuwania włókna (w trakcie jego ekspozycji w obecności analizowanej mieszaniny lub w trakcie desorpcji termicznej w iniektorze chromatografu) lub jego chowania. Tłok ten posiada regulację wysokości wysunięcia włókna. Rysunek 5 przedstawia schemat i zdjęcie urządzenia (strzykawki) SPME do ręcznego dozowania, używanej w toku realizacji niniejszej pracy.

RYSUNEK 5: Strzykawka SPME do ręcznego dozowania prób (ang. fiber holder for manual sampling) (a) schemat – Instruction for the Supelco™ Solid Phase MicroExtraction nr kat. 57330-U, b) zdjęcie – fot. Natalia Filipowicz)



Kluczowe znaczenie w procesie SPME ma odpowiedni dobór złoża. Można je podzielić ze względu na polarność oraz na rodzaj oddziaływania analitu ze złożem – może to być zjawisko adsorpcji lub absorpcji. Ponadto występują złoża o różnej grubości. Tabela 6 uwzględnia wszystkie komercyjnie dostępne rodzaje złoż.

Złoża o charakterze absorpcyjnym (PDMS i PA) mają charakter cieczy (ang. *liquid-like*) związanej na nośniku i działają na zasadzie gąbki, tzn. że analit migruje do i ze złoża, a jego zdolność do wiązania zależy od dwóch czynników – grubości złoża oraz wielkości cząsteczek ekstrahowanych substancji. W przypadku włókien absorpcyjnych dodatkowym czynnikiem warunkującym powinowactwo analitu do złoża jest jego polarność. Kompetycja analizowanych związków o miejsce wiązania ma związek jedynie z szybkością migracji do i ze złoża i grubością samego złoża, które ma określoną i ograniczoną pojemność (Shirley i Mindrup, 1999).

TABELA 6: Komercyjnie dostępne złoża do SPME (w/g katalogu i materiałów Supelco)

Rodzaj złoża	Dostępne grubości złoża	Rodzaj oddziaływania z analitem	Polarność
PDMS	7, 30, 100 μ m	absorpcja	niepolarne
PDMS/DVB	60 i 65 μ m	adsorbpcja	dipolarne
PA	85 μ m	absorpcja	polarne
CAR/PDMS	75 i 85 μ m	adsorbpcja	dipolarne
CW/DVB	65 μ m	adsorbpcja	polarne
DVB/CAR/PDMS	50/30 μ m	adsorbpcja	dipolarne

PDMS – polydimethylsiloxane

PDMS/DVB – polydimethylsiloxane/divinylbenzene

PA – polyacrylate

CAR/PDMS – carboxen/polydimethylsiloxane

CW/DVB – carbowax/divinylbenzene

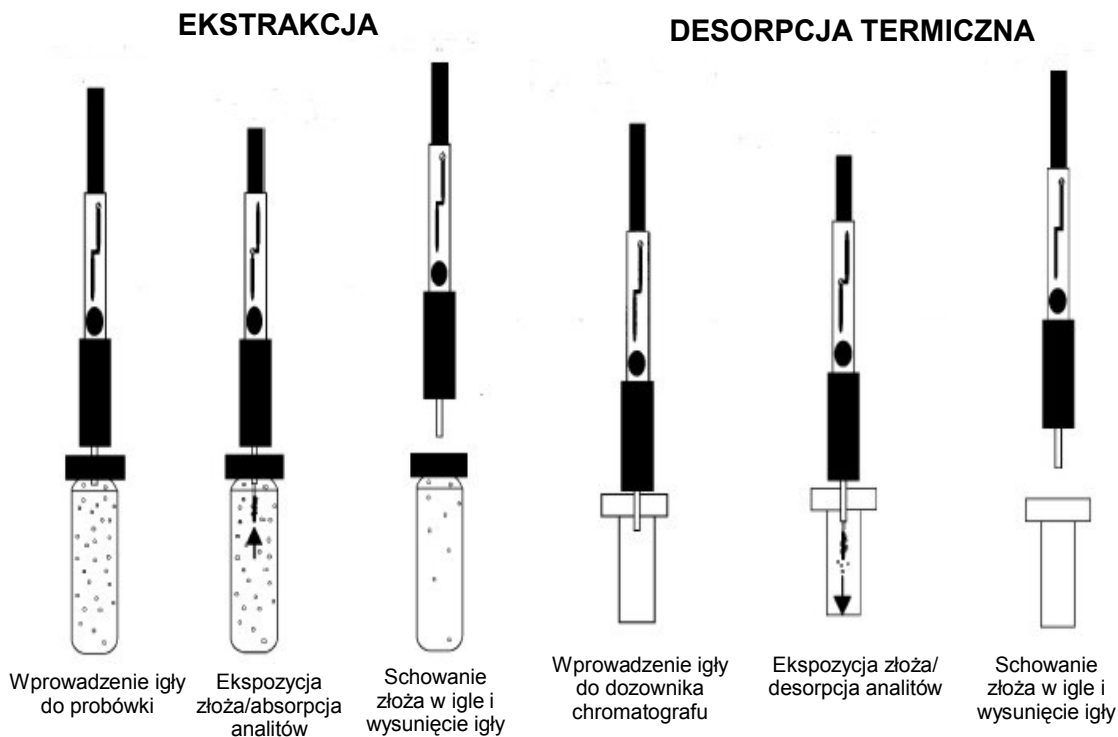
DVB/CAR/PDMS – divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane

Ekstrakcja analitów na złożach o charakterze adsorbentu opiera się na oddziaływaniach międzycząsteczkowych tj. wiązaniach wodorowych i oddziaływaniach Van der Waalsa oraz na wyłapywaniu analitów na zasadzie pułapki (ang. *trapping*). Adsorbenty mają charakter porowatych ciał stałych, co pozwala na zwiększenie ich powierzchni oddziaływania z analizowanymi cząsteczkami. Cząsteczki o małej i średniej wielkości wyłapywane są w mikro- i mezoporach złoża. Makropory mogą wyłapywać cząsteczki o większych rozmiarach, choć zwykle ich oddziaływanie ze złożem oparte jest na wspomnianych wyżej oddziaływaniach międzycząsteczkowych. Pojemność włókna adsorpcyjnego jest ograniczona, stąd cząsteczki analitu konkurują o miejsce wiązania ze złożem, a faworyzowane są te o większych współczynnikach podziału (Shirley i Mindrup, 1999).

Dwa najpowszechniej stosowane włókna pokryte są złożem z polimerów – poliakrylamidem (PA) oraz polidimetylosiloksanem (PDMS). Specyfika złoża PDMS powoduje, że zachwuje się ono jak ciecz. Skutkuje to szybką ekstrakcją w porównaniu z PA (Pawliszyn i in., 1997). Ogólnie przyjmuje się, podobnie jak przy doborze złoża kolumny chromatograficznej, że anality niepolarne są najefektywniej ekstrahowane na złożu niepolarnym, a polarne – na polarnym. Dla związków lotnych (ang. *volatiles*), do których zaliczyć można także związki o charakterze terpenów występujące w olejkach eterycznych producent zaleca złożo PDMS (Supelco Bulletin 923, 1998). Potwierdzają to dane literaturowe z zakresu tematyki SPME i jej aplikacji w analizie terpenów olejkowych (Schäfer i in., 1995; Rohloff, 1999; Coleman i Lawrence, 2000; Cornu i in., 2001).

Procedura SPME obejmuje dwa kluczowe etapy: etap ekstrakcji oraz desorpcji. Pierwszy z nich odbywa się poprzez wprowadzenie igły SPME do pojemnika zawierającego badaną mieszaninę poprzez przekłucie specjalnej septy, a następnie wysunięcie złoża z igły w celu jego ekspozycji na cząsteczki analitu. Po ustalonym eksperymentalnie czasie ekspozycji złoża następuje schowanie włókna do igły strzykawki do SPME i przeniesienie całości do dozownika chromatografu gazowego. Na tym etapie włókno ze złożem jest ponownie wysuwane z igły w celu jego ekspozycji na działanie wysokiej temperatury w dozowniku. Zadsorbowane/zabsorbowane anality ulegają termicznej desorpcji, a strumień gazu nośnego (w przypadku GC) przenosi je bezpośrednio na kolumnę chromatograficzną. Opisane etapy SPME przedstawiono schematycznie na rysunku 6.

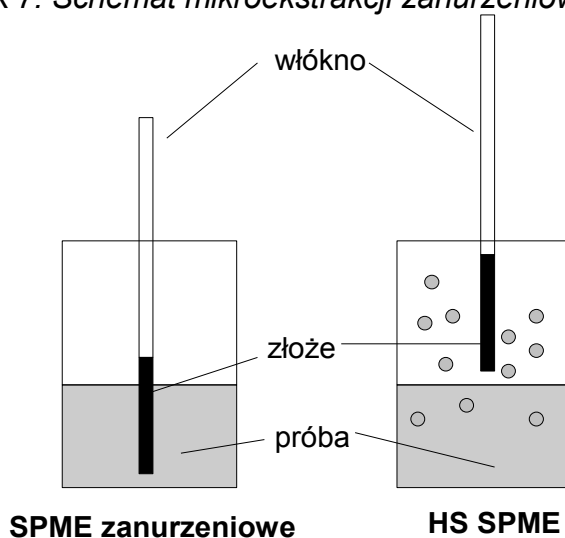
RYSUNEK 6: Poszczególne etapy procedury SPME (w/g Supelco Bulletin 923, 1998)



Proces ekstrakcji w przypadku SPME może być przeprowadzony w dwojaki sposób: poprzez bezpośredni kontakt złoża z analitami (mikroekstrakcja zanurzeniowa) oraz nadpowierzchniowo czyli bez bezpośredniego kontaktu z badaną matrycą (ang. HS SPME – *headspace Solid Phase Microextraction*). W pierwszym przypadku włókno SPME ze złożem zanurzane jest w badanej próbce, a anality ekstrahowane są bezpośrednio z matrycy na złożo. W przypadku matryc płynnych wskazane jest

dotatkowo mieszanie, co niweluje efekt wyczerpania się analitu w bezpośrednim sąsiedztwie zanurzonego włókna. HS SPME dotyczy związków znajdujących się w fazie gazowej (nadpowierzchniowej) nad matrycą, a więc absorpcja/adsorpcja analitów jest powiązana z ich lotnością. Takie podejście umożliwia ekstrakcję nie tylko z matryc o charakterze ciekłym, lecz także z matryc stałych, takich, jak próbki żywności, gleby, surowiec roślinny, stałe próbki materiału biologicznego. Niekwestionowaną zaletą HS SPME jest brak bezpośredniego kontaktu matrycy ze złożem, co zwiększa jego żywotność zapobiegając zanieczyszczeniu przez związki wielkocząsteczkowe (białka, kwas humusowy) lub związki o bardzo niskim lub wysokim pH. Ponadto, oprócz zwiększenia trwałości włókna w przypadku HS SPME, dodatkową zaletą jest zwiększenie efektywności ekstrakcji. HS SPME oraz SPME zanurzeniowe różnią się znacząco kinetyką procesu ekstrakcji. Pamiętać należy, że w przypadku HS SPME ekstrakcji ulegają preferencyjnie związki o większej lotności, ponieważ jest ich więcej w fazie nadpowierzchniowej matrycy (Pawliszyn i in., 1997). Rysunek 7 obrazuje różnicę pomiędzy opisanymi typami mikroekstrakcji.

RYSUNEK 7: Schemat mikroekstrakcji zanurzeniowej i powierzchniowej



Prostota wykonania, niewysoki koszt, niezbyt skomplikowana aparatura i brak konieczności stosowania wysokoczystych rozpuszczalników ekstrakcyjnych czyni z SPME bardzo użyteczne narzędzie w rękach analityków. Początkowo metodę stosowano w analizie związków organicznych z czystych matryc typu powietrze czy woda. Większość dostępnej literatury z zakresu zastosowań SPME do roku 1999

dotyczy analiz środowiskowych. Z czasem SPME zaczęto wykorzystywać w analizie składników zapachowych i smakowych w żywności, a obecnie jest coraz częściej stosowana w szeroko pojętych bioanalizach. Znajduje to odbicie w ewolucji tej metody, która w fazie początkowej związana była z chromatografią gazową, a z czasem została z powodzeniem sprzężona z elektroforezą kapilarną oraz chromatografią cieczową. Umożliwiło to analizę związków, takich jak białka, alkaloidy polarne, farmaceutyki i surfaktanty, które nie mogły być wcześniej analizowane przy użyciu GC (Theodoridis i in., 2000). SPME znajduje obecnie zastosowanie w wielu dziedzinach, wśród których jako wiodące należy wymienić:

- analizy toksykologiczne obejmujące zarówno badania środowiskowe (np. zanieczyszczenia wód i gleby pestycydami) (Liu i Gan, 2004), jak i badania sądowe (zawartość alkoholi, substancji trujących w próbach biologicznych) (Brewer i in., 1997),
- analizy używek w próbach biologicznych obejmujące związki z grupy pochodnych amfetaminy, benzodiazepiny, barbituranów (Mosaddegh i in., 2001; Raikos i in., 2003),
- badania z zakresu chemii klinicznej, analizy farmaceutyków i ich metabolitów, w których SPME stosuje się jako metodę ekstrakcji wyżej wymienionych z płynów ustrojowych, czy wydychanego powietrza (Grote i Pawliszyn, 1997; Ulrich i Martens, 1997),
- analizy żywności i napojów (m. in. win) obejmujące głównie badanie obecności zanieczyszczeń i zafałszowań (Jeleń, 2006),
- analizy produktów naturalnych, szczególnie surowców roślinnych zawierających związki o charakterze lotnym z grupy terpenów, w badaniach o charakterze farmaceutycznym, populacyjnym i ekologicznym. Ze względu na tematykę niniejszej pracy zagadnienie analizy terpenów z użyciem SPME omówiono poniżej w szerszym ujęciu.

Terpeny (a szczególnie grupa monoterpenów) to związki o dużej lotności i reaktywności, ulegające przemianom pod wpływem różnych czynników (głównie termicznych). Dlatego też przygotowanie próby ma niebagatelny wpływ na wynik końcowych analiz chromatograficznych. Szczególnie duże możliwości stwarza mikroekstrakcja z fazy nadpowierzchniowej. We wcześniejszych źródłach najczęściej

stosuje się HS SPME znad olejku w tradycyjnym ujęciu (tzn. mieszaniną otrzymaną w wyniku destylacji czy ekstrakcji) (Coleman i in., 1998; Coleman i Lawrence, 2000), ale największą zaletą HS SPME jest możliwość ekstrakcji składników lotnych z matryc o charakterze ciał stałych. Schäfer i in. jako jedni z pierwszych zajęli się optymalizacją HS SPME bezpośrednio z igieł *Pinus peuce* i zbadali dynamikę parametrów SPME (m. in. czas i temperaturę preinkubacji i ekspozycji) (Schäfer i in., 1995). Metoda ta okazała się użyteczna w analizie emisji terpenów *in situ* przez zdrowe i uszkodzone igły roślin szpilkowych (*Abies fraseri*). Ma to duże znaczenie w przypadku badania interakcji tych roślin z atakującymi je owadami (Vereen i in., 2000). Innym ciekawym przykładem zastosowania HS SPME jest analiza zawartości związków terpenowych w mleku i produktach nabiałowych z niego wytwarzanych. Podczas wypasu zwierzęta odżywiają się różnymi gatunkami roślin zielnych, także olejkowymi. Terpeny z tych roślin przenikają do wytwarzanego przez zwierzęta mleka, a tym samym przy użyciu HS SPME mogą stać się swoistymi markerami paszy (Cornu i in., 2001; Tornambe i in., 2006). Wymienione przykłady zastosowań nie oddają w pełni zakresu zastosowań HS SPME. Niemniej jednak należy stwierdzić, że ta technika ekstrakcji jest traktowana współcześnie tuż obok destylacji, SPE czy SFE jako jedna z popularniejszych, mająca szerokie zastosowanie w przypadku roślin olejkowych.

3. Markery molekularne w badaniach roślin

Zastosowanie markerów w badaniach roślin ma długą historię. Pierwotnie wykorzystywano markery morfologiczne zwane też fenotypowymi, które znajdują swoje odzwierciedlenie w wyglądzie zewnętrznym rośliny (barwa kwiatu, kształt blaszki liściowej) oraz markery izoenzymatyczne (różne formy tego samego enzymu). Choć nadal wykorzystuje się je w identyfikacji odmian hodowlanych roślin, to jednak nie znalazły one szerszego zastosowania ze względu na ich ograniczoną ilość oraz zależność od modyfikującego wpływu środowiska. Prawdziwy przełom w diagnostyce molekularnej roślin nastąpił w połowie lat 80 XX wieku, kiedy w badaniach roślin zastosowano po raz pierwszy technikę RFLP (wynalezioną i opisaną w 1980 roku). Od tamtej pory wciąż znajdują się i udoskonalane są nowe markery oparte na sekwencji DNA.

Marker genetyczny, aby spełniać swoją funkcję powinien posiadać kilka kluczowych cech. Należą do nich:

- duży polimorfizm (czyli obecność wielu form allelicznych),
- dziedziczenie kodominujące,
- wysoka frekwencja i równomierność rozłożenia w genomie,
- neutralność selekcyjna,
- powtarzalność,
- prostota i szybkość metody wykrywania (Masojć, 2001).

Duża użyteczność i powszechność badań genomów roślinnych powodują, że znanych jest coraz więcej rodzajów markerów molekularnych, a różnice pomiędzy nimi wynikają z charakteru samego markera. Ze względu na sposób identyfikacji polimorfizmu genetycznego markery DNA można sklasyfikować według kilku kryteriów. Główną i najliczniejszą grupę stanowią takie, które wykorzystują łańcuchową reakcję polimerazy (ang. PCR – *Polymerase Chain Reaction*), a dodatkowym kryterium jest konieczność lub brak konieczności znajomości sekwencji badanego DNA. Inna grupa markerów bazuje na reakcji trawienia DNA z zastosowaniem endonukleaz restrykcyjnych. Mogą być one oparte tylko na cięciu lub też występować w kombinacji z reakcją PCR. Dużą grupę stanowią markery określane wspólnym mianem zmiennej

liczby tandemowych powtórzeń (ang. VNTR – *Variable Number Tandem Repeats*). W tabeli 7 zestawiono 6 najpopularniejszych typów markerów genetycznych opartych na PCR wykorzystywanych w badaniach roślin. W tym ujęciu jedynym kryterium uwzględnienia ich w zestawieniu była powszechność zastosowania. W dalszej części rozdziału omówiono szczegółowo tylko część z nich.

3.1.RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Technika analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych – RFLP została opracowana w 1974 roku, a do badań genomu roślinnego zastosowano ją po raz pierwszy w połowie lat 80 (Łuczak, 2004). Jej opracowanie było przełomem w diagnostyce molekularnej. Przebieg RFLP jest dość złożony i pracochłonny. Wymaga ona stosunkowo dużej ilości (rzędu kilku μg) dobrze oczyszczonego DNA, który trawiony jest jednym lub dwoma enzymami restrykcyjnymi. Uzyskane w ten sposób fragmenty rozdzielane są na żelu agarozowym o dużej długości. Następnie przenoszone są techniką Southerna na filtr, na którym zachodzi hybrydyzacja z wyznakowaną radioaktywnie sondą molekularną. Sonda jest zwykle klonem biblioteki badanego DNA lub DNA innego, pokrewnego gatunku (sonda homologiczna i heterologiczna) (Masojć, 2001). Polimorfizm RFLP wynika z mutacji punktowych obejmujących miejsca restrykcyjne lub mutacji w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca trawienia oraz z większych zmian w DNA zmieniających odległość pomiędzy dwoma miejscami cięcia (Masojć, 2001, Łuczak, 2004). Dużą zaletą RFLP jest wysoka powtarzalność i wiarygodność oraz kodominacyjny sposób dziedziczenia. RFLP rybosomalnego DNA (rDNA RFLP) jest dość powszechnie wykorzystywane w szacowaniu przepływu genów w obrębie i pomiędzy gatunkami (Arnold i Emms, 1998). Ponadto RFLP jest przydatny w analizie polimorfizmu mitochondrialnego i chloroplastowego DNA w badaniach filogenetycznych i taksonomicznych (Masojć, 2001).

TABELA 7: Najpopularniejsze markery molekularne stosowane w badaniach roślin oparte na PCR (wg. Wolfe i Liston, 1998)

	RAPD	ST-SSR	ISSR	RAMP	AFLP	CAPS i PCR-MRSP
Zasada	amplifikacji DNA genomowego ze starterami o arbitralnie dobranej sekwencji	miejscowo specyficzna amplifikacja fragmentów mikrosatelitarnych (SSR)	niespecyficzna amplifikacja fragmentów mikrosatelitarnych (SSR)	kombinacja RAPD i ISSR	amplifikacja fragmentów restrykcyjnych różnej długości	trawienie restrykcyjne produktów PCR
Rodzaj polimorfizmu	substytucje, insercje, delecje	zmiany ilości powtórzeń motywu podstawowego	substytucje, insercje, delecje	substytucje, insercje, delecje	substytucje, insercje, delecje	substytucje, insercje, delecje
Sposób dziedziczenia	dominacyjne/kodominacyjne mendlowskie i niemendlowskie	kodominacyjne mendlowskie (niemendlowskie dla DNA organellowego)	dominacyjne/kodominacyjne mendlowskie	dominacyjne/kodominacyjne mendlowskie	kodominacyjne mendlowskie dla jądrowego DNA	kodominacyjne (jądrowe DNA) dominacyjne (organellowe DNA) mendlowskie dla DNA jądrowego
Znajomość sekwencji DNA	nie wymagana	wymagana	nie wymagana	nie wymagana	nie wymagana	wymagana
Zastosowanie	analiza przepływu genów i rodzicielstwa, identyfikacja odmian hodowlanych, analiza struktury populacji, rekonstrukcja filogenezy, mapowanie genetyczne	analiza przepływu genów i rodzicielstwa, identyfikacja odmian hodowlanych, analiza struktury populacji i zmienności genetycznej, mapowanie genetyczne	analiza przepływu genów i rodzicielstwa, identyfikacja odmian hodowlanych, analiza struktury populacji, mapowanie genetyczne	analiza przepływu genów i rodzicielstwa, identyfikacja odmian hodowlanych, analiza struktury populacji, mapowanie genetyczne	analiza przepływu genów i rodzicielstwa, identyfikacja odmian hodowlanych, analiza struktury populacji, mapowanie genetyczne	analiza przepływu genów, rekonstrukcja filogenezy, mapowanie genetyczne, screening przed sekwencjonowaniem

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA, ST-SSR – Sequence-Tagged Simple Sequence Repeat, ISSR – Inter Simple Sequence Repeat, RAMP – Random Amplified Microsatellite Polymorphism, AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism, CAPS – Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, PCR-MRSP – Polymerase Chain Reaction Mapped Restriction Site Polymorphism.

3.2. Metody genetycznego odcisku palca (ang. DNA fingerprinting)

Metody tzw. genetycznego odcisku palca określane też często terminem MAAP (ang. *Multiple Arbitrary Amplicon Profiling*) (Caetano-Anolles i in., 1991) lub APT (ang. *Arbitrary Primer Technology*) (Bassam i Bentley, 1994) polegają na uzyskaniu charakterystycznych fragmentów DNA ("odcisków palca") bez wcześniejszej konieczności znajomości sekwencji DNA badanego organizmu, z zastosowaniem starterów o arbitralnej sekwencji nukleotydów. Startery te są albo całkowicie arbitralne lub też otrzymane na podstawie znanych sekwencji terminalnych, unikalnych, powtarzalnych lub rozproszonych. Hybrydują one do całkowicie lub częściowo komplementarnej sekwencji w badanym DNA inicjując proces amplifikacji (Caetano-Annollés, 1993). Ta niekwestionowana zaleta metod MAAP powoduje, że znajdują one szerokie zastosowanie w badaniach na poziomie molekularnym, w tym także w analizie genomu roślinnego. Metody genetycznego odcisku palca są z powodzeniem stosowane w badaniach z zakresu hodowli, biologii populacyjnej, ekologii, taksonomii i systematyki roślin (Caetano-Annollés, 1996; Demeke i Adams, 1994). Istnieje wiele technik i ich odmian, które można zaklasyfikować jako markery oparte na genetycznym odcisku palca (Caetano-Annollés, 1996). W niniejszym opracowaniu opisano tylko kilka z nich, które po analizie dostępnej literatury wydają się najbardziej rozpowszechnione.

RAPD (ang. Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD, w języku polskim zwana losowo amplifikowanym polimorficznym DNA, opisana po raz pierwszy na początku lat 90 XX wieku (Williams i in., 1990) jest najprostszą w wykonaniu techniką pozwalającą na szybkie wykrycie różnic w sekwencji DNA w obszarze całego genomu (Masojć, 2001). Reakcja amplifikacji prowadzona jest z jednym, krótkim starterem 9-11 nukleotydowym (zwykle dekamerem) w stałej temperaturze przyłączania (zazwyczaj 34-37°C) (Caetano-Annollés, 1993; Wolfe i Liston, 1998; Masojć, 2001). Każdy starter RAPD inicjuje amplifikację w wielu miejscach genomu jednocześnie, a liczba produktów z pojedynczym starterem waha się w zakresie od kilku do kilkunastu, rzadziej kilkudziesięciu (Masojć, 2001; Łuczak, 2004). Zadowalającą detekcję produktów RAPD uzyskuje się zwykle metodą 1,5-2% elektroforezy agarozowej z barwieniem bromkiem etydyyny (Bassam i Bentley, 1994; Wolfe i Liston, 1998). Polimorfizm RAPD

polega na obecności lub braku prążka (produktu) danej długości i wynika z mutacji w obrębie sekwencji komplementarnej do startera oraz z delecji i insercji pomiędzy miejscami przyczepu startera RAPD (Wolfe i Liston, 1998; Masojć, 2001).

Prostota, niskie koszty wykonania oraz niewielka ilość DNA matrycowego używanego w RAPD powodują, że została ona zastosowana w licznych badaniach. Należy jednak pamiętać, że metoda ta posiada wiele ograniczeń. Markery RAPD wykazują dominujący i kodominujący charakter dziedziczenia, co oznacza, że nie można ustalić czy amplifikowany fragment DNA występuje w obu allelach, czy tylko w jednym. Stąd elektroforetyczny obraz produktów amplifikacji jest taki sam zarówno dla homozygoty dominującej jak i heterozygoty (Marczewski, 1995). Ponadto założenie, że polimorfizm jest wynikiem mutacji powodującej brak amplifikacji bądź powstanie nowego miejsca hybrydyzacji startera dotyczy tylko sytuacji modelowej (Wolfe i Liston, 1998). W rzeczywistości istnieje kilka udokumentowanych odstępstw od tych przewidywań. Są to między innymi odchylenia od prostego dziedziczenia Mendlowskiego wynikające najczęściej ze zmienności o innym podłożu niż genetyczne, spowodowane obecnością artefaktów, prążków organellowego DNA i czynników epigenetycznych (Wolfe i Liston, 1998). Taka "niegenetyczna" zmienność spowodowana jest bardzo dużą wrażliwością RAPD na czynniki zewnętrzne, tj. niewielkie zmiany czystości matrycowego DNA, stężenia jonów Mg^{2+} , stosunku primer/matryca (Ellsworth i in., 1993; Williams i in., 1993), rodzaju i ilości stosowanej polimerazy termostabilnej czy temperatury annealing'u (Williams i in., 1993). Dlatego kluczowym elementem analizy RAPD powinna być standaryzacja procesu w celu wyeliminowania takiej zmienności (Caetano-Annollés, 1993; Khandka i in., 1997), a także właściwa interpretacja danych elektroforetycznych (zliczania prążków) (Skroch i Nienhuis, 1995). W starannie zoptymalizowanych warunkach problemem w RAPD może być nadal zjawisko kompetycyjnego przyłączania starterów (Nybom, 2004) i obecność artefaktów powstałych w wyniku interakcji pomiędzy i w obrębie matrycy DNA (Rabouam i in., 1999).

Badania porównawcze markerów molekularnych wykazały, że metody RAPD i AFLP generują bardzo podobny poziom polimorfizmu, a macierze podobieństwa genetycznego uzyskane w wyniku RAPD i AFLP dla *Malus domestica* oraz *Saxifraga cernua* wykazują ścisłą korelację (Gaulao i in., 2001; Kjølner i in., 2004). Nybom w badaniach 307 dziko rosnących roślin z podgromady nago- i okrytonasiennych

wykazał, że analiza AFLP pozwoliła na wyodrębnienie średnio 238 markerów, RAPD – 72, a ISSR – 55. Dla markerów dominujących, a więc RAPD i AFLP uzyskano zbliżony profil podobieństwa genetycznego (Nybom, 2004).

Metoda RAPD w zestawieniu z analizą olejków eterycznych była i jest przedmiotem badań zespołu R. P. Adamsa. Wykazała ona wyraźne grupowanie gatunków rodzaju *Juniperus* w zależności od przynależności do sekcji (Adams i Demeke, 1993). Została zastosowana także w badaniach pokrewieństwa systematycznego gatunków w obrębie sekcji *Sabina* (Adams, 1999) i *Oxycedrus* (Adams, 2000). Badania na poziomie gatunku *J. communis* wykazały duże podobieństwo genetyczne odmian *J. communis* var. *saxatilis*, var. *communis*, var. *nipponica*, var. *hemispherica* i var. *oblonga* (Adams i Pandey, 2003). RAPD wykazało także grupowanie się odmian *J. communis* półkuli zachodniej (*J. communis* var. *depressa* i var. *megistocarpa*) i wschodniej (*J. communis* var. *communis* i *saxatilis*) (Adams i in., 2003). Inny zespół badawczy wykazał grupowanie gatunków *Juniperus chinensis* oraz *J. scopulorum* oraz rodzajów *Juniperus* oraz *Chamaecyparis* na podstawie markerów RAPD (Hsiang i Huang, 1999).

DAF (ang. DNA Amplification Fingerprinting) i AP-PCR (ang. Arbitrary Primer PCR)

Obok opisanej wyżej RAPD alternatywnymi technikami genetycznego odcisku palca są AP-PCR – wynaleziona niemal jednocześnie z RAPD (Welsh i McClelland, 1990) oraz DAF (Caetano-Annollés, 1990). DAF i AP-PCR różnią się od RAPD wyłącznie długością i stężeniem stosowanego startera o arbitralnej sekwencji oraz złożonością profilu amplifikacyjnego (Caetano-Annollés, 1996). DAF polega na losowej amplifikacji DNA matrycowego z użyciem starterów o długości 5-8 nt, podczas gdy AP-PCR wykorzystuje zwykle nieco dłuższe startery (>20 nt). W przypadku drugiej z metod często stosuje się obniżoną temperaturę przyłączania startera (ang. *annealing'u*) w dwóch pierwszych cyklach, kolejne cykle charakteryzują się już wyższą temperaturą *annealing'u* (Wolfe i Liston, 1998). Zestawienie porównawcze wszystkich trzech technik znajduje się w tabeli 8.

TABELA 8: Zestawienie porównawcze metod genetycznego odcisku palca RAPD, DAF i AP-PCR (Caetano-Annollés, 1996; Marczewski, 1995)

Cecha	RAPD	DAF	AP-PCR
Długość startera (nt)	9-10	5-15	18-32
Stężenie startera (μM)	0,3	3-30	1-10
Stosunek starter/matryca	<1	1-500	5-5x10 ⁴
Stężenie DNA matrycowego (ng/μl)	1	0,01-1	0,1-5
Temperatura annealingu [°C]	35-42	30-70	35-50
Sposób rozdziła	żel agarozowy	żel poliakrylamidowy	żel poliakrylamidowy
Detekcja	EtBr	srebro, autoradiografia	srebro, autoradiografia

AFLP (ang. Amplification Fragment Length Polymorphism)

Polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów łączy w sobie zalety RFLP oraz PCR i został wynaleziony w 1995 roku (Vos i in., 1995). Podobnie jak inne metody fingerprintingu nie wymaga znajomości sekwencji badanego DNA i może być użyty dla materiału genetycznego dowolnego pochodzenia i o dowolnym stopniu złożoności. DNA matrycowe w pierwszym etapie doświadczenia jest trawione z użyciem dwóch endonukleaz restrykcyjnych – tnącym często (rozpoznającym sekwencje czteronukleotydowe) oraz rzadziej (rozpoznającym sekwencje sześcionukleotydowe). Dalsze postępowanie polega na ligacji adaptorów i pierwszej amplifikacji (preamplifikacja) ze starterami posiadającymi sekwencję komplementarną do części adaptorowej i miejsca restrykcyjnego oraz jeden nukleotyd selekcyjny na końcu 3'. Jego zadaniem jest ograniczenie liczby produktów preamplifikacji. Produktów tych jest zwykle bardzo dużo i służą one dalej jako matryca do kolejnej właściwej, selektywnej amplifikacji przeprowadzonej z primerami posiadającymi na końcu 3' dwa dodatkowe nukleotydy selekcyjne. W ten sposób dla większych genomów generowanych jest zwykle od 50 do 100 unikalnych fragmentów DNA (Vos i in., 1995; Wolfe i Liston, 1998). Brak konieczności znajomości sekwencji DNA matrycowego, generowanie dużej liczby fragmentów polimorficznych, duża powtarzalność AFLP oraz dostępność komercyjnych zestawów do AFLP to jej niekwestionowane zalety. Ograniczenia wynikają ze złożoności i czasochłonności samej procedury i związanego z tym wysokiego kosztu przeprowadzenia analiz. Dodatkowym problemem jest rozdział produktów amplifikacji – ze względu na ich dużą ilość wymagana jest wysoka rozdzielczość, którą zapewnić może elektroforeza

poliakrylamidowa w aparacie do sekwencjonowania lub rozdział w sekwenatorze (Wolfe i Liston, 1998). Zasadniczo AFLP uważana jest za metodę o dużej powtarzalności, szczególnie w porównaniu do RAPD czy ISSR, jednak istnieją doniesienia sugerujące powstawanie artefaktów związanych z niekompletnym trawieniem DNA (Goulao i in., 2001; Arnau i in., 2002). AFLP wykorzystuje się między innymi do konstrukcji silnie zagęszczonych map genetycznych różnych gatunków roślin czy badań populacyjnych. Metoda ta została użyta między innymi w analizie zmienności populacji jałowca pospolitego na terenie Wielkiej Brytanii (Van Der Merwe i in., 2000).

3.3. Metody VNTR (ang. Variable Number Tandem Repeats)

Dużą pulę stanowią markery należące do grupy określanej wspólnym terminem zmiennej liczby tandemowych powtórzeń – VNTR. Oparte są na analizie sekwencji mini- i mikrosatelitarnych, które bywają określane także mianem prostych sekwencji powtórzonych (ang. SSR – Simple Sequences Repeats) lub sekwencji tandemowych. Oba rodzaje sekwencji rozproszone są równomiernie w całym genomie organizmów eukariotycznych i wykorzystywane w genetycznym odcisku palca (Nybom i Kraft, 1995; Wolfe i Liston, 1998). Wykazują silny polimorfizm pod względem długości, który warunkowany jest liczbą powtórzeń podstawowego motywu (Masojć, 2001). Minisatelitarny DNA to taki, w którym powtarzający się motyw może osiągać długość do 200pz (ten rodzaj DNA rzadko bywa stosowany jako marker), natomiast mikrosatelitarny DNA to krótkie sekwencje o powtarzającym się motywie poniżej 6bp ((AT)_n, (A)_n(T)_n, (GAA)_n, (GACA)_n (Wolfe i Liston, 1998). Sekwencje mikrosatelitarne służą do projektowania starterów umożliwiających otrzymanie genetycznego odcisku palca genomów roślin, jednak ze względu na swoją specyfikę w niniejszym opracowaniu zostały omówione w osobnym rozdziale. Poniżej opisano krótko trzy z nich.

ISSR (ang. Inter Simple Sequences Repeats)

Jedną z prostych metod bazujących na SSR jest wynaleziona w 1994 roku ISSR, która generuje dość złożony obraz prążkowy wykorzystując polimorfizm odcinków pomiędzy sekwencjami mikrosatelitarnymi (Ziętkiewicz i in., 1994). Markery ISSR generowane są w pojedynczej reakcji PCR ze starterem składającym się z powtózonego dwu- lub trójnukleotydowego motywu z dodatkową sekwencją

zakotwiczoną (2-3nt) na końcu 3' lub 5' (startery selekcyjne o długości 17-18nt). Sekwencja zakotwiczona eliminuje zjawisko niepełnej komplementarności startera (ang. *strand-slippage*) i podobnie jak w RAPD jest przypadkowa. Podstawowym założeniem metody jest równomierne rozłożenie SSR w całym genomie oraz wysokie prawdopodobieństwo amplifikacji dwóch sąsiadujących regionów DNA, skutkujące dużą ilością polimorficznych produktów (Wolfe i in., 1998). Markery ISSR wykazują charakter dominujący lub kodominujący i są dziedziczone w sposób mendelowski (Wolfe i Liston, 1998).

ST-SSR (ang. Sequence Tagged Simple Sequence Repeats)

Markery ST-SSR są amplifikowanymi sekwencjami mikrosatelitarnymi, w których primery zostały zaprojektowane dla sekwencji flankujących konserwowanych ewolucyjnie. Zwykle sekwencje flankujące różnią się znacznie sekwencją, a powstające produkty amplifikacji mają różną długość dlatego możliwe jest przeprowadzenie wielu reakcji PCR podczas jednej reakcji (multiplex PCR). Startery ST-SSR projektowane są dla unikalnego locus, stąd są specyficzne dla konkretnego organizmu (Wolfe i Liston, 1998).

RAMP (ang. Random Amplified Microsatellite Polymorphism)

Polimorfizm losowo amplifikowanych mikrosatelitów jest wykrywany z użyciem dwóch starterów w jednej reakcji amplifikacji – ISSR i RAPD (Wu i in., 1994). W metodzie RAMP wykrywane są trzy rodzaje produktów: ISSR, RAPD oraz sekwencje oflankowane z jednej strony primerem ISSR, a z drugiej RAPD (Wolfe i Liston, 1998).

Oprócz metod MAAP czy też tych opartych na sekwencjach mikrosatelitarnych istnieją także inne bazujące na amplifikacji jądrowego czy organellowego materiału genetycznego techniką PCR. Do takich należy metoda CAPS (ang. *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) - polimorfizm sekwencji podzielonej i pociętej. Charakteryzuje on wariant konkretnego genu i polega na jego amplifikacji z parą primerów zaprojektowanych do tej konkretnej sekwencji, a następnie trawieniu tegoż produktu endonukleazą restrykcyjną. Jako, że sam amplifikowany fragment jest zwykle krótki stosuje się enzymy rozpoznające czteronukleotydowe sekwencje DNA (potencjalnie istnieje możliwość, że enzym rozpoznający i tnący sekwencję sześcionukleotydową nie rozpozna żadnego miejsca w tak krótkim fragmencie) (Wolfe i Liston, 1998).

3.4. Markery miejscowo-specyficzne

W poprzednich rozdziałach przedstawiono techniki, które w większości przypadków nie wymagały bezpośredniej wiedzy o sekwencji badanego DNA. Istnieje wiele metod generowania markerów molekularnych, które polegają na miejscowo specyficznej (ang. *site specific*) amplifikacji wybranego fragmentu DNA z użyciem metody PCR oraz jego dalszej obróbce (analiza restrykcyjna, sekwencjonowanie). Początkowo w badaniach genomu roślinnego (głównie badania filogenetyczne) wykorzystywano niekodujące i kodujące sekwencje chloroplastowego DNA (cpDNA). Z czasem poczytne miejsce wśród roślinnych markerów DNA znalazły geny lub odcinki DNA zlokalizowane w DNA jądrowym i mitochondrialnym (mtDNA). W pełni zautomatyzowany proces sekwencjonowania DNA powoduje, że coraz nowsze rejony roślinnego DNA poddawane są analizie porównawczej (ang. *comparative sequencing*). Należy podkreślić, że tempo ewolucji dla konkretnego rejonu DNA stosowanego jako marker może się znacząco różnić nie tylko pomiędzy grupami systematycznymi, ale także w obrębie tych grup (Soltis i Soltis, 1998). Ponadto każdy fragment DNA w obrębie tej samej grupy wykazuje inne tempo ewolucji, np. sekwencja *ndhF* cpDNA w rodzinie *Solanaceae* dostarcza około 1,5 razy więcej informacji z punktu widzenia parsymonii niż *rbcL* (Olmstead i Sweere, 1994). Każdy gen lub inny fragment DNA służący jako marker genetyczny ma w związku z tym typowy zakres zastosowań "taksonomicznych", który może się znacząco różnić w obrębie jednostek systematycznych. Przykładowo sekwencja *rbcL* u okrytozależkowych stosowana jest na poziomie rodziny i wyżej, ale w przypadku niektórych rodzin tej podgromady oraz paprotników znajduje zastosowanie w obrębie rodzaju, a nawet gatunku (Wolf i in., 1998). Poniżej omówiono krótko kilka najpopularniejszych markerów miejscowo-specyficznych z uwzględnieniem podziału na jądrowy, chloroplastowy i mitochondrialny DNA.

Markery cpDNA

Podstawową zaletą cpDNA w kontekście jego zastosowania w badaniach filogenetycznych jest jego wielkość – przeciętnie od 120 do 200kb, co umożliwia jego całościową analizę m. in. z zastosowaniem endonukleaz restrykcyjnych. Ponadto większość genów w cpDNA występuje w jednej kopii (podczas gdy większość genów jądrowego DNA należy do rodzin wielogenowych). Genom chloroplastowy jest konserwowany ewolucyjnie i na poziomie sekwencji nukleotydów ewoluuje

stosunkowo wolno, niemniej jednak różne jego regiony ewoluują z różną prędkością. W związku z tym sekwencje cpDNA zwykle służą określaniu podobieństwa czy pokrewieństwa na poziomie gatunku, rodzaju i rodziny, czasem także na wyższych poziomach. Jako ograniczenie wynikające z dość wolnej ewolucji cpDNA wymienia się niemożność zastosowania go w przypadku blisko spokrewnionych gatunków oraz do badań populacyjnych (Soltis i Soltis, 1998). Jednak coraz częściej pojawiają się dane świadczące, że cpDNA może być także zastosowane w szacowaniu pokrewieństwa na poziomie populacji i w obrębie gatunku (Soltis i in., 1992). Do najczęściej sekwencjonowanych fragmentów cpDNA w filogenezie roślin nasiennych należy gen *rbcL* kodujący dużą podjednostkę karboksylazy bifosforanu rybulozy (RUBISCO), którego długość u większości roślin wynosi 1428, 1431 lub 1434bp, a insercje i delecje w jego obrębie są niezwykle rzadkie (Soltis i Soltis, 1998). Gen ten jest przedmiotem wielu kompleksowych analiz filogenetycznych (Manhart, 1994; Soltis i in., 2000). Najczęściej używa się *rbcL* w analizie na poziomie rodziny i rodzaju, ale opisane są także badania na niższych poziomach (między innymi dla krasnorostów) (Soltis i Soltis, 1998). Markerem o bardzo podobnej charakterystyce do *rbcL* (tempo ewolucji, długość 1497bp) jest gen kodujący podjednostkę β syntazy ATP – *atpB* (Soltis i Soltis, 1998). Szybkim tempem ewolucji pozwalającym na wykorzystanie w badaniach na poziomie gatunku i rodzaju charakteryzuje się sekwencja genu *matK*, kodującego maturazę zaangażowaną w splicing intronów typu II, której długość wynosi 1550bp (Neuhaus i Link, 1987). Częste mutacje w obrębie tego genu czynią go nieprzydatnym na wyższych poziomach taksonomicznych. Do innych popularnych sekwencji cpDNA stosowanych w badaniach filogenetycznych roślin należą *ndhF* (gen kodujący białko będące podjednostką dehydrogenazy NADH), 16S rDNA, niekodujący region *atpB-rbcL* (Soltis i Soltis, 1998), czy też intron *trnL*(UAA) oraz łącznik pomiędzy eksonem *trnL* (UAA) a genem *trnF*(GAA) (Taberlet i in., 1991).

Markery jądrowego DNA

Genom jądrowy charakteryzuje się dużym rozmiarem i ogromną zmiennością zakodowanych w nim genów, dlatego w obszarze badań filogenetycznych analizie poddaje się głównie jego fragment kodujący rRNA rybosomalne (rDNA). rDNA zbudowany jest z fragmentów ETS (ang. *External Transcribed Sequence*), 18S, ITS1 (ang. *Internal Transcribed Sequence*), 5.8S, ITS2, 26S powtórzonych wielokrotnie w obrębie całego genomu w różnych chromosomach i rozdzielonych sekwencją IGS

(ang. *Intergenic Spacer*). Szacuje się, że rDNA reprezentuje około 10% całego genomu roślinnego, a liczba jego powtórzeń jest zmienna (Soltis i Soltis, 1998). Rodzina genów rDNA obejmuje:

- regiony wysoce konserwatywne (18S rDNA o długości 1800kb kodujący małą podjednostkę 18S rDNA rybosomalnego oraz 26S rDNA o długości 3300kb kodujący dużą podjednostkę rDNA rybosomalnego) używane do szacowania pokrewieństwa na wyższych poziomach taksonomicznych (rodzina, rząd, podklasa, typ),
- regiony wysoce zmienne (ITS, IGS) w filogenezie przydatne na niższych poziomach taksonomicznych (rodzaj, gatunek), a także w badaniach populacyjnych (Soltis i Soltis, 1998).

Wykazują one tzw. ewolucję zespołową (ang. *concerted evolution*) dlatego pomimo dużej ilości kopii mogą być i są używane w rekonstrukcji filogenezy (Sanderson i Doyle, 1992).

Najczęściej sekwencjonowanym fragmentem DNA jądrowego jest 18S rDNA, w przypadku którego początkowo analizowano tylko część sekwencji, a z czasem coraz częściej cały odcinek (Kranz i in. 1995; Soltis i in., 2000). Znalazł on zastosowanie w rekonstrukcji filogenezy glonów i roślin okrytonasiennych (Nickrent i Soltis, 1995; Soltis i in., 2000).

ITS 1 i 2 są częścią transkryptu jądrowego rDNA i pełnią rolę w powstawaniu rRNA, ale nie wchodzą w skład dojrzałych rybosomów (Baldwin i in., 1995). Pomimo kilku wad sekwencji ITS (problem z sekwencjonowaniem wynikający z wysokiej zawartości rejonów bogatych w zasady G+C, istnienie sekwencji drugorzędowych w rejonie ITS) znajdują one szerokie zastosowanie w badaniach filogenezy roślin okrytonasiennych (Baldwin i in., 1995, Soltis i in., 2000), glonów i paprotników (Doyle i Doyle, 1998).

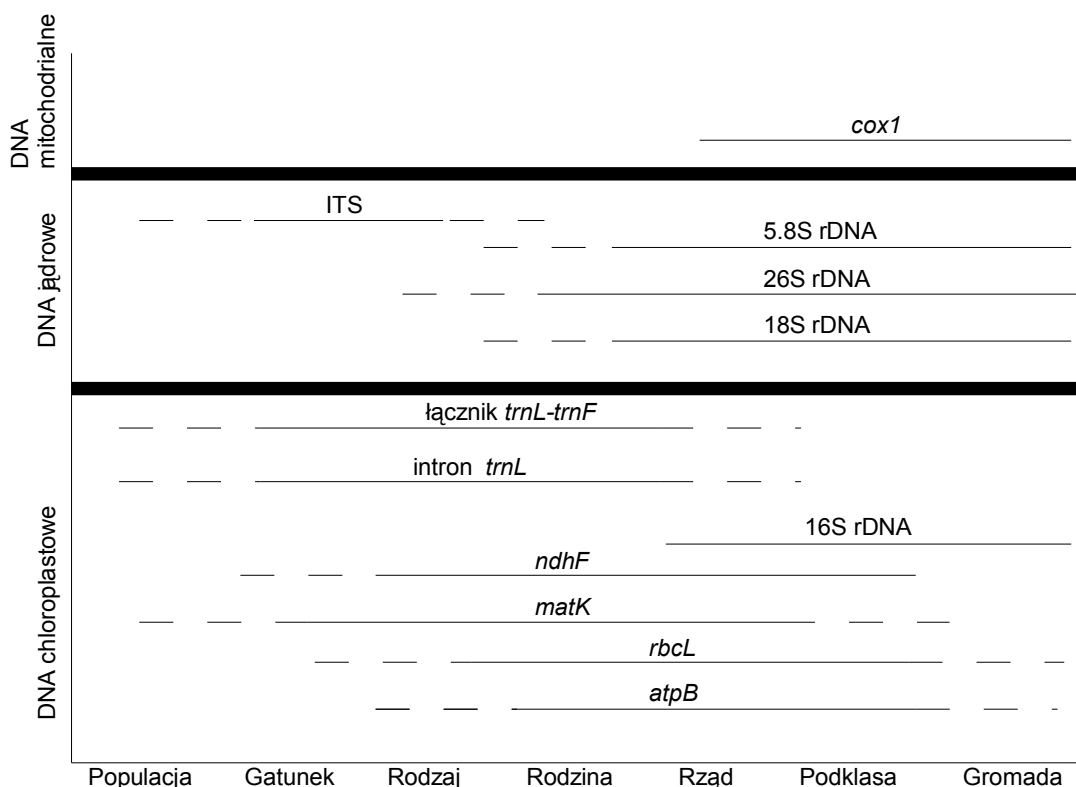
Markery mtDNA

Badania molekularne struktury, rozmiaru i konfiguracji mitochondrialnego DNA roślin wykazały jego niewielką przydatność w badaniach filogenetycznych (rejon mtDNA znajdują szerokie zastosowanie w przypadku filogenezy zwierząt). Problemem w przypadku mtDNA roślin jest jego wielkość i zmienność tej wielkości, obecność

obcych sekwencji DNA (głównie cpDNA), duże duplikacje, zjawisko rekombinacji pomiędzy sekwencjami o wysokiej częstości występowania, obecność krótkich (1-11kb), niestabilnych plazmidów pozachromosomalnych oraz szybkość rearanżacji nawet w przypadku blisko spokrewnionych gatunków. Ponadto tempo substytucji nukleotydowych jest 3-4 razy wolniejsze niż dla cpDNA, 12 razy wolniejsze niż dla jądrowego DNA i aż 40-100 razy niż w przypadku zwierzęcego mtDNA (Palmer, 1992). Powoduje to, że sekwencje mtDNA są użyteczne na wyższych poziomach taksonomicznych. Do najpopularniejszych markerów mtDNA należą geny *cox1* oraz *atpA* i zostały zastosowane w szacowaniu różnorodności genetycznej nago- i okrytonasiennych (Doyle i Doyle, 1998).

Na rysunku 8 przedstawiono zakresy zastosowań poszczególnych markerów miejscowo-specyficznych w badaniach o podłożu filogenetycznym.

RYSUNEK 8: Przybliżony zakres zastosowań wybranych markerów chloroplastowego, jądrowego i mitochondrialnego DNA do badań filogenetycznych na określonym poziomie taksonomicznym dla roślin okrytonasiennych (za Soltis i Soltis, 1998, zmodyfikowana przez autorkę).



*Linia przerywana na rysunku oznacza dolny lub górny limit zastosowania (co oznacza, że dany region może być użyteczny w wybranych grupach).

III. CEL PRACY

Biorąc pod uwagę szerokie zastosowanie farmakopealnego surowca leczniczego, jakim jest szyszkojagoda *Juniperus communis* L., jak i powszechność występowania tego gatunku w Polsce przystępując do realizacji niniejszego projektu autorka postawiła następujący cel główny:

Charakterystyka i oszacowanie zróżnicowania fitochemicznego i genetycznego *Juniperus communis* L.

Analiza różnorodności fitochemicznej w niniejszym opracowaniu objęła względną zawartość procentową składników lotnych o charakterze monoterpenu będących składnikami olejku eterycznego obecnego w strukturach wydzielniczych igieł i szyszkojagód jałowca pospolitego. Celowo nie użyto w tym przypadku pojęcia „skład procentowy olejku”, gdyż analizowane związki monoterpenu poddawano procesowi mikroekstrakcji bezpośrednio ze struktur wydzielniczych z pominięciem tradycyjnego procesu destylacji olejku z wodą. W analizach uwzględniono także zawartości procentowe enancjomerów poszczególnych monoterpenu.

Zróżnicowanie na poziomie molekularnym określono na podstawie „genetycznego odcisku palca” (ang. *DNA fingerprinting*) uzyskanego w drodze analizy DNA badanej puli prób jałowca metodą RAPD (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*). Metoda ta pozwala na oszacowanie zmienności całego genomu, a nie wybranego fragmentu badanego DNA.

Złożoność problematyki zawartej w celu głównym rozprawy skłoniła autorkę do postawienia kilku celów pochodnych, zgodnych z kolejnymi etapami realizacji projektu. Wśród nich należy wymienić:

- 1) Optymalizację metody HS SPME-GC pod kątem jej zastosowania w analizie związków lotnych o charakterze monoterpenu obecnych w organach *J. communis*.

- 2) Badania porównawcze składu frakcji monoterpenowej olejku *J. communis* otrzymanego w wyniku destylacji wodą oraz profilu monoterpenów otrzymanych w wyniku analizy HS SPME-GC.
- 3) Analizę zróżnicowania fitochemicznego w rozumieniu względnej zawartości związków monoterpenowych (z uwzględnieniem form enancjomerycznych) w szpilkach i szyszkogodach gatunku *Juniperus communis* L.
- 4) Oszacowanie zróżnicowania genetycznego gatunku *Juniperus communis* na podstawie analizy przeprowadzonej metodą RAPD-PCR.
- 5) Analizę pokrewieństwa systematycznego *Juniperus communis* L. i *Juniperus nana* Willd. na podstawie składu frakcji monoterpenowej olejku eterycznego z igieł tych roślin oraz w oparciu o sekwencję markera molekularnego *trnL-trnF* obecnego w chloroplastowym DNA (ang. *cpDNA*).

Ad. 1 i 2. Analiza składu monoterpenów w surowcu olejkowym z zastosowaniem techniki HS SPME GC pomimo wielu niekwestionowanych zalet (czas analizy, ilość materiału użytego do analiz, wyeliminowanie konieczności stosowania rozpuszczalników organicznych) jest procesem złożonym z kilku etapów. Dobranie właściwych parametrów całej procedury jest więc niezwykle istotne dla uzyskania powtarzalnych i wiarygodnych analiz chromatograficznych (Schäfer i in., 1995; Hamm i in., 2003). W związku z tym podjęto próbę optymalizacji parametrów takich etapów HS SPME-GC jak czas preinkubacji próby surowca, czas i temperatura procesu absorpcji składników badanego materiału na włóknie SPME (100µm PDMS) oraz czas desorpcji tych składników w iniektorze chromatografu gazowego. Proces optymalizacji przeprowadzono według schematu Taguchi (Taguchi, 1987). Umożliwia on szybkie zbadanie kilku zmiennych wejściowych (niezależnych) przyjmujących kilka wartości w stosunkowo niewielkiej liczbie doświadczeń. Dane z analiz HS SPME GC w warunkach optymalnych porównano z danymi uzyskanymi z analiz chromatograficznych olejku jałowcowego uzyskanego metodą destylacji z wodą z tych samych prób.

Ad. 3. W obrębie badanej puli prób znalazły się osobniki zebrane z 10 różnych stanowisk zlokalizowanych w Polsce Północnej i Północno-Wschodniej, które można potraktować jako izolowane populacje. Taki dobór prób umożliwił zbadanie różnorodności osobniczej na podstawie zawartości składników lotnych igieł i szyszkogagód w obrębie i pomiędzy populacjami *J. communis*. Wszystkie próby *J. communis* poddano analizie fitochemicznej pod kątem zawartości głównych monoterpenów i ich odmian enancjomerycznych z zastosowaniem techniki HS SPME GC. Analiza zawartości poszczególnych form enancjomerycznych głównych monoterpenów wnosi duży aspekt nowości w przypadku olejku pozyskiwanego z jałowca pospolitego. W literaturze znaleźć można bardzo skąpe dane dotyczące tej problematyki. Wydaje się, że szybki rozwój ziół o charakterze chiralnym, udokumentowane przykłady odmiennych aktywności biologicznych enancjomerów tego samego związku oraz duża różnorodność składu enancjomerycznego surowców roślinnych doprowadzą w niedalekiej przyszłości do ich standaryzacji pod kątem zawartości poszczególnych enancjomerów. Z tego względu dogłębna analiza ich zawartości w przypadku roślin olejkowych wydaje się w pełni uzasadniona.

Ad. 4. Analizy DNA genomowego umożliwią określenie zróżnicowania genetycznego w obrębie badanego gatunku, pomiędzy populacjami *Juniperus communis* (różne stanowiska), jak i w obrębie tych populacji.

W przypadku celów pochodnych 3 i 4 podjęto próbę określenia, czy istnieje związek pomiędzy profilem fitochemicznym *J. communis* otrzymanym w drodze HS SPME GC a profilem genetycznym uzyskanym w wyniku analizy DNA genomowego tej rośliny. Znalezienie takiej współzależności mogłoby stać się podstawą do poszukiwania narzędzi molekularnych umożliwiających prognozowanie określonych cech fitochemicznych (w tym wypadku produkcja określonych składników olejku) roślin leczniczych.

Ad. 5. Jak już wspomniano we wstępie ranga systematyczna jałowca halnego rosnącego w naszym kraju wyłącznie w wyższych piętrach górskich (Tatry) nie jest do końca wyjaśniona. Najnowsze opracowania klasyfikują go jako odmianę *Juniperus*

communis (*Juniperus communis* var. *saxatilis*) (Farjon, 2001). Zaplanowano analizę porównawczą 40 prób jałowca pospolitego i halnego pod kątem zawartości głównych monoterpenów w olejku otrzymanym poprzez destylację z wodą oraz analizę genetyczną. Założono zastosowanie sekwencji markera molekularnego, którym w tym przypadku będzie rejon łącznika międzygenowego *trnL* (UAA) 3' – *trnF* (GAA) 5' chloroplastowego DNA. Marker ten znajduje zastosowanie w badaniach taksonomicznych na poziomie gatunku i rodzaju. W przypadku *J. communis* i *J. nana* postulowano jego użycie w celu określenia czy zaliczenie ich jako dwóch odrębnych jednostek taksonomicznych ma przełożenie na różnice w sekwencjach DNA. Sprawdzone także, czy fakt zasiedlania przez te dwa gatunki/odmiany/podgatunki różnych siedlisk może mieć odzwierciedlenie w zawartości procentowej głównych składników monoterpenowych. Wyniki tej części rozprawy doktorskiej zostały opublikowane przez autorkę w 2006 roku (Filipowicz i in., 2006).

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Aparatura

- aparat Derynga do oznaczania zawartości olejków oraz szkło laboratoryjne,
- aparat do elektroforezy agarozowej ME 99X (Hoeffer, Niemcy) oraz C.B.S. SGU 040T 02 (Scientific CO, USA),
- autoklaw Cominox 22 Vacuum S (Cominox, Włochy),
- butelki laboratoryjne z gwintem i zakrętką do przechowywania buforów (Schott, Niemcy),
- chromatograf gazowy HP4890D wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny (Agilent Technologies, USA) oraz kolumny: o złożu niepolarnym achiralnym HP101 (25m, I.D. 0,32mm, grubość filmu 0,3 μ m), polarnym achiralnym HP InnoWax (30m, I.D. 0,25mm, grubość filmu 0,25 μ m) oraz chiralnym HP Chiral (30m, I.D. 0,32mm, grubość filmu 0,25 μ m) (Agilent Technologies, USA),
- elektroniczna waga laboratoryjna AM50 (Axis, Polska),
- komora laminarna Steril-Gemini (Steril, Włochy),
- komputer PC systemem operacyjnym Windows 2000 oraz PC z systemem operacyjnym Linux (dystrybucja Ubuntu),
- koncentrator próżniowy Eppendorf 5301 (Eppendorf, Niemcy),
- mieszadło typu Vortex MS-1 (IKA-Werke GMBH&Co, Niemcy),
- mikrostrzykawka chromatograficzna (Hamilton, USA),
- młynek analityczny z reduktorem objętości 20000 obr/min (IKA-Werke GMBH&Co, Niemcy),
- młynek mechaniczny do rozdrabniania surowca roślinnego,
- odbiornik GPS 76 z anteną zewnętrzną (Garmin, USA),
- pHmetr cyfrowy Metrohm 744 (Metrohm, Szwajcaria),

- probówki laboratoryjne z ciemnego szkła zaopatrzone w nakrętki oraz obojętne septy teflonowe (BGB, Wielka Brytania),
- spektrofotometr UV-Vis Lambda 40 (Perkin Elmer, Niemcy),
- sprzęt jednorazowy (końcówki do pipet, probówki cienkościenne do PCR, probówki typu Eppendorf) (Eppendorf, Niemcy oraz Sarstedt, Niemcy),
- termocykler PTC-150 Mini Cycler oraz PTC-200DNA Engine (MJ Research, USA),
- termostatowana łaźnia wodna ThermoStat Plus (Eppendorf, Niemcy),
- transiluminator 9000mW/cm² (Ultralum, USA),
- urządzenie do SPME: strzykawka (ang. *Fiber Holder for Manual Use*) zaopatrzona w mikrowłókno PDMS 100µm (Supelco, USA),
- waga analityczna (Zakłady Mechaniki Precyzyjnej, Polska),
- wirówka laboratoryjna Eppendorf 5804R ((Eppendorf, Niemcy),
- wytrząsarka laboratoryjna KS130 Basic (IKA-Werke GMBH&Co, Niemcy),
- zasilacz do elektroforezy STABNAP 200 (Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Polska) oraz PS-9009 (Apelex, Francja),
- zegar ze stoperem WB338 (Huger, Polska),
- zestaw do komputerowej dokumentacji zdjęciowej (Scion Corporation, USA),
- zestaw pipet automatycznych Eppendorf Research (Eppendorf, Niemcy) oraz LabMate (PZ HTL, Polska).

*Lista stosowanej aparatury została sporządzona w kolejności alfabetycznej.

2. Odczynniki, bufony i roztwory

2.1. Odczynniki

- agarozą Basica Le GQT (Prona, EU),
- alkany C₈-C₂₀ roztwór wzorcowy do określania indeksów retencji (Sigma Aldrich, Szwajcaria),
- błękit bromofenolowy cz. d. a. (POCH, Polska),

- bromek etydyyny (Sigma Aldrich, Niemcy),
- bufor reakcyjny do PCR 10x *Taq* Buffer + (NH₄)₂SO₄ – MgCl₂ (MBI Fermentas, Litwa),
- chlorek magnezu 25mM (MBI Fermentas, Litwa),
- glicerol (POCH, Polska),
- heksan 99% (BDH, Wielka Brytania),
- izopropanol cz. d. a. (Eurochem BGD, Polska),
- ksylen cz. d. a. (POCH, Polska),
- kwas borowy (MP Biomedicals, Niemcy),
- kwas solny (POCH, Polska),
- marker DNA do elektroforezy GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 oraz Mass Ruler DNA Ladder SM0383 (MBI Fermentas, Litwa),
- metanol LiChrosolv (Merck, Niemcy),
- podchloryn sodu Clorox (Henkel, Polska),
- polimeraza termostabilna *Taq* 5u/μl oraz 1u/ μl (MBI Fermentas, Litwa),
- rybonukleaza A wolna od DNA-zy (Promega, USA),
- spirytus rektyfikowany 95% obj. (Polmos S.A., Polska),
- substancje wzorcowe do GC: (+)-α-pinen (≥ 97% GC), (-)- α-pinen (≥ 99% GC), (+)-β-pinen (≥ 99% GC), (-)-β-pinen (≥ 99% GC), (-)-kamfen (85% GC), (+)-3-karen (99% GC), p-cymen (99,5% GC), mircen (~90% GC), (-)-α-terpineol (~99% GC), α-terpinen (~97% GC), terpinolen (~90% GC), (+)-terpinen-4-ol (≥ 99% GC) [Fluca Chemica, Niemcy] oraz (-)-limonen (96% GC), (+)-limonen (96% GC), γ-terpinen (97% GC) [Sigma Aldrich, Niemcy],
- Tris-Base (Sigma Aldrich, Niemcy),
- Tris-HCl (Roth, Niemcy),
- trójfosforany nukleotydów (dNTP: dATP, dCTP, dGTP i dTTP) 100mM (MBI Fermentas, Litwa),
- wersenian dwusodowy (EDTA) (Sigma Aldrich, Niemcy),

- wodorotlenek sodu (POCH, Polska),
- zestaw do czyszczenia DNA po reakcjach enzymatycznych Clean-Up 021-250 (A&A Biotechnology, Polska).
- zestaw do izolacji DNA z roślin Genomic Mini AX Plant 050-60 (A&A Biotechnology, Polska).

*Lista stosowanych odczynników została sporządzona w kolejności alfabetycznej.

2.2. Bufory i roztwory

Bufor TE

- 10mm Tris-HCl
- 1mM EDTA pH 8,0

Bufor TBE (5x stężony)

- 54,0g Tris-Base
- 27,5g kwasu borowego
- 20ml 0,5M EDTA pH 8,0 do końcowej objętości 1000ml

Barwnik elektroforetyczny typ III (Maniatis, 1982)

- 0,25% błękit bromofenolowy
- 30% glicerol (v/v) roztwór wodny

3. Materiały

3.1. Surowiec roślinny do badań

Materiał roślinny zastosowany w niniejszej pracy został pozyskany ze stanowisk naturalnych. Zbiór surowca dokonywano w miesiącach jesiennych i zimowych, co znajduje uzasadnienie w źródłach literaturowych (Strzelecka i Kowalski, 2000). W tym właśnie okresie wydajność destylacji olejku z roślin szpilkowych jest najwyższa, gdyż na skutek niskich temperatur zewnętrznych emisja monoterpenów do atmosfery jest dużo niższa niż w okresie wiosenno-letnim.

Obszar badań stanowiły tereny leśne, głównie o charakterze zbiorowisk roślinnych z grupy borów sosnowych (*Dicrano-Pinion*), przede wszystkim typu *Leucobryo-Pinetum*. Większość badanych prób jałowca pospolitego (*J. communis*) została zebrana z tego typu stanowisk. Część prób zlokalizowana była w pobliżu borów sosnowych na terenach rolniczych (miedze). Stosowane w pracy próby jałowca halnego (*J. nana*) zebrano ze zbiorowisk typu karpaccich zarośli kosówki (*Pinetum mugo carpaticum*) w Tatrach Wysokich, z piętra hal (1800-2300m npm) za zgodą władz Tatrzańskiego Parku Narodowego. Ujęcia fitosocjologiczne są zgodne z opracowaniem Matuszkiewicza (Matuszkiewicz, 2001).

Tabela 9 zawiera zestawienie stanowisk, z których pozyskiwano surowiec olejkowy do badań, z uwzględnieniem województwa, krótkim opisem stanowiska oraz datą zbioru. W tabeli znajdują się także akronimy, które zastosowano dla prób z wybranych stanowisk (populacji) i które konsekwentnie stosowano w trakcie realizacji niniejszej pracy.

TABELA 9: Charakterystyka stanowisk, z których pozyskiwano surowiec do badań, z uwzględnieniem ilości prób oraz daty zbioru

Miejsce zbioru (województwo)	Akronim populacji	Ilość zebranych prób	Data zbioru	Opis stanowiska
Borucino (pomorskie)	BO	3	03-03-15	miedza w bezpośredniej bliskości boru sosnowego
Cis (pomorskie)	CI	6	03-03-05	bór sosnowy

Miejsce zbioru (województwo)	Akronim populacji	Ilość zebranych prób	Data zbioru	Opis stanowiska
Konarzyny (pomorskie)	KO	4	04-02-05	bór sosnowy gęsto zasiedlony przez <i>J. communis</i>
Kolno (podlaskie)	G1 i G2	11	04-02-13	G1 – bór sosnowy, G2 – polana w obrębie boru sosnowego
Lubowisko (pomorskie)	LU	9	03-02-19	brzeg jeziora Lubowisko gęsto porośnięty przez <i>J. communis</i>
Ocypel (pomorskie)	OC	4	03-03-08	suchy brzeg jeziora w borze sosnowym
Otomin (pomorskie)	OT	13	04-02-14	bor sosnowy i młode nasadzenia sosny
Samociązek (kujawsko-pomorskie)	SA	9	03-02-28	bór sosnowy
Stary Dwór (warmińsko-mazurskie)	SD	11	04-02-05	bór sosnowy, gęsto zasiedlony przez <i>J. communis</i>
Stężycza (pomorskie)	ST	4	03-02-19	miedza
Tatry Wysokie (małopolskie)	T	16	01-09-14	piętro hal górskich
Zamkowa Góra (pomorskie)	ZG	2	03-03-05	pojedyncze osobniki na skraju lasu mieszanego

Łącznie zebrano 92 próby *J. communis* oraz *J. nana* z 12 stanowisk naturalnych zlokalizowanych w 5 województwach. Jako, że wszystkie eksplorowane stanowiska zlokalizowane są w znacznej odległości od siebie (najmniejsza odległość pomiędzy stanowiskami to około 6km pomiędzy próbami oznaczonymi akronimami LU i ST) można uznać, że każde badane skupisko stanowi odrębną populację. Podsumowując – 8 populacji pochodzi z miejscowości zlokalizowanych w województwie pomorskim, pozostałe cztery populacje pochodzą odpowiednio z województw: podlaskiego, kujawsko-pomorskiego, warmińsko-mazurskiego oraz małopolskiego. Lokalizację poszczególnych populacji przedstawiono na rysunku 9.

W trakcie eksploracji stanowisk naturalnych, przed zbiorem szacowano stan ogólny poszczególnych osobników. Do zbioru i dalszych badań kwalifikowano tylko rośliny nie wykazujące cech wysychania, nie dotknięte przez widoczne choroby (pleśnie, owady), zwykle dojrzałe (a więc o stosunkowo grubych konarach i powyżej 0,5-0,6m wysokości). W przypadku większości prób kolekcjonowano osobniki owocujące (osobniki żeńskie) o szyszkojadach dojrzałych w kolorze granatowym lub ciemnofioletowym, czyli w drugim roku owocowania. Niektóre stanowiska charakteryzowały się deficytem owocujących osobników żeńskich (lub też były w nich obecne rośliny w pierwszym roku owocowania, o szyszkojadach zielonych). W takiej sytuacji pobierano materiał w postaci igieł z osobników, co do których niemożliwe było określenie płci (zawiązki kwiatów męskich pojawiają się jesienią, ale są słabo widoczne, natomiast kwiaty żeńskie – wiosną).

W badaniach wykorzystano także komercyjne szyszkojagody jałowca pospolitego dostępne na polskim rynku, wysuszone i przechowywane zgodnie z normami FPV.

*RYSUNEK 9: Lokalizacja poszczególnych stanowisk *J. communis* i *J. nana*.*



3.2. Przygotowanie prób w zależności od stosowanych metod badawczych

W kolejnych punktach opisano krótko sposób postępowania z próbami wykorzystywanymi do realizacji poszczególnych celów.

Próby badane techniką HS SPME-GC

Do analiz przeprowadzonych techniką HS SPME (cele pośrednie 1, 2 i 3) używano szyszkogód oraz igieł zebranych prób *J. communis*. Surowiec do tych analiz po zbiorze poddawany był suszeniu przez 2 tygodnie, w suchym, całkowicie zaciemnionym miejscu i temperaturze pokojowej (wahającej się w granicach 18-21°C), w stanie rozłożonym na papierowych płachtach. Po tym okresie wysuszane próby umieszczano w szczelnie zamykanych woreczkach strunowych i zamrażano w -20°C do czasu analizy. Wytyczne farmakopealne zarówno w przypadku szyszkogody jałowca, jak i samego olejku podają, że surowiec używany jest po uprzednim wysuszeniu w temperaturze nie przekraczającej 40°C. Ponieważ metoda HS SPME GC zastosowana została w niniejszej pracy jako technika umożliwiająca szybką ocenę surowca olejkowego o znaczeniu leczniczym, sposób postępowania z tym surowcem był analogiczny jak opisany w FPV. Miało to na celu w miarę wierne odwzorowanie zawartości terpenów w szyszkogodzie jałowca używanej do celów terapeutycznych.

Próby do destylacji olejku z parą wodną i analiz GC

W realizacji celów pochodnych 2 i 5 szyszkogody i igły wykorzystywano do otrzymywania olejku metodą zalecaną przez FPVI – destylacją z parą wodną. Surowiec suszono podobnie, jak w przypadku prób badanych techniką HS SPME GC. Bezpośrednio po wysuszeniu igły i szyszkogody oddzielano, określano ich masę i rozdrabniano w mechanicznym młynku laboratoryjnym. Rozdrobnienie poprzedzało bezpośrednio etap destylacji surowca olejkowego z parą wodną.

Próby do analizy genetycznej

W realizacji celów pochodnych 4 i 5 czyli w analizach genetycznych (zarówno z zastosowaniem markerów RAPD, jak i markera *cpDNA trnL-trnF*) źródłem DNA genomowego były szpilki badanych prób *J. communis*. Z zebranych roślin bezpośrednio po zbiorze oddzielano niewielkie ilości ulistnionych pędów, które umieszczano w szczelnie zamkniętych woreczkach, opisywano i poddawano

niezwłocznie zamrożeniu w -20°C . Tak przygotowane igły w stanie świeżym przechowywano do czasu izolacji DNA genomowego.

Tabela 10 zawiera zestawienie wszystkich prób *J. communis* i *J. nana* wykorzystanych w trakcie realizacji pracy. W opisie prób uwzględniono współrzędne geograficzne i wysokość nad poziomem morza stanowiska wyznaczone za pomocą odbiornika GPS (dla części badanych prób nie autorka nie dysponuje takimi danymi, jako, że odbiornik został zakupiony już po rozpoczęciu realizacji badań), syntetyczny opis osobnika i stanowiska. W zestawieniu tym uwzględniono też do jakiej części badań (realizacji celów) zebrany materiał został wykorzystany.

TABELA 10: Zestawienie prób *J. communis* oraz *J. nana* użytych do badań

Lp.	Symbol próby	Współrzędne geograficzne i wysokość stanowiska (n.p.m.) szerokość/długość/wysokość	Surowiec ³	Opis próby i stanowiska	Cel pochodny 1 ⁴	Cel pochodny 2 ⁵	Cel pochodny 3 ⁶	Cel pochodny 4 ⁷	Cel pochodny 5 ⁸
1	BO1	54.26N/17.99E/207m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,7m, miedza o dużej ekspozycji na światło					
2	BO2	54.26N/17.99E/199m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 2,5m, stanowisko j/w					
3	BO3	54.26N/17.99E/194m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 1,5m, skraj boru sosnowego, duża ekspozycja na światło					
4	CI1	53.94N/18.27E/140m	S I	pokrój krzaczasty, skraj boru sosnowego, umiarkowana ekspozycja na światło					
5	CI2	53.94N/18.27E/107m	S I	j/w					
6	CI3	53.94N/18.25E/140m	S I	pokrój krzaczasty, skraj boru sosnowego i pola, duża ekspozycja na światło					
7	CI4	53.94N/18.25E/165m	S I	pokrój krzaczasty, bór sosnowy, słaba ekspozycja na światło					
8	CI5	53.94N/18.25E/121m	S I	pokrój krzaczasty, skraj boru sosnowego i pola, słaba ekspozycja na światło					
9	CI6	53.94N/18.25E/153m	S I	pokrój krzaczasty, skraj boru sosnowego i pola, słaba ekspozycja na światło					
10	KO1	53.97N/18.05E/148m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 1,8m, duże skupienie jałowców w borze sosnowym zlokalizowanym na brzegu jeziora, słaba ekspozycja na światło					
11	KO2	53.97N/18.05E/102m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 2,5m, bór sosnowy na brzegu jeziora, umiarkowana ekspozycja na światło					

Lp.	Symbol próby	Współrzędne geograficzne i wysokość stanowiska (n.p.m.) szerokość/długość/wysokość	Surowiec ³	Opis próby i stanowiska	Cel pochodny 1 ⁴	Cel pochodny 2 ⁵	Cel pochodny 3 ⁶	Cel pochodny 4 ⁷	Cel pochodny 5 ⁸
12	KO3	53.97N/18.05E/115m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 2,5m, bór sosnowy na brzegu jeziora, duża ekspozycja na światło					
13	KO4	53.97N/18.05E/134m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 3m, młodnik sosnowy, duża ekspozycja na światło					
14	G1-1	- ¹	S I	bór sosnowy, słaba ekspozycja na światło					
15	G1-2	- ¹	S I	j/w					
16	G1-3	- ¹	S I	j/w					
17	G1-4	- ¹	S I	j/w					
18	G1-5	- ¹	S I	j/w					
19	G2-1	- ¹	S I	bór sosnowy, duża ekspozycja na światło					
20	G2-2	- ¹	S I	j/w					
21	G2-3	- ¹	S I	j/w					
22	G2-4	- ¹	S I	j/w					
23	G2-5	- ¹	S I	bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
24	GG2	- ¹	S I	j/w					
25	LU1	54.20N/17.97E/179m	S	pokrój kolumnowy, wys. 3m, bór sosnowy, na brzegu jeziora, umiarkowana ekspozycja na światło					
26	LU2	54.20N/17.97E/167m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,4m, bór sosnowy, 30m od brzegu jeziora, umiarkowana ekspozycja na światło					

Lp.	Symbol próby	Współrzędne geograficzne i wysokość stanowiska (n.p.m.) szerokość/długość/wysokość	Surowiec ³	Opis próby i stanowiska	Cel pochodny 1 ⁴	Cel pochodny 2 ⁵	Cel pochodny 3 ⁶	Cel pochodny 4 ⁷	Cel pochodny 5 ⁸
27	LU3	54.20N/17.97E/186m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 2m, bór sosnowy, 30m od brzegu jeziora, umiarkowana ekspozycja na światło					
28	LU4	54.20N/17.97E/177m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 2,2m, bór sosnowy, 30m od brzegu jeziora, umiarkowana ekspozycja na światło					
29	LU5	54.20N/17.97E/183m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 1,9m, bór sosnowy, 20m od brzegu jeziora, umiarkowana ekspozycja na światło					
30	LU6	54.20N/17.97E/159m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,9m, bór sosnowy, 20m od brzegu jeziora, umiarkowana ekspozycja na światło					
31	LU7	54.20N/17.97E/156m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 2,5m, bór sosnowy, 2m od brzegu jeziora, duża ekspozycja na światło					
32	LU8	54.20N/17.97E/180m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 2,5m, bór sosnowy, 2m od brzegu jeziora, duża ekspozycja na światło					
33	LU9	54.20N/17.96E/155m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 2,5m, bór sosnowy, około 1,5km od brzegu jeziora, przecinka leśna, bardzo duża ekspozycja na światło					
34	OC1	-	S I	pokrój kolumnowy, wys. 2m, bór sosnowy, duża ekspozycja na światło					
35	OC2	-	S I	pokrój krzaczasty, wys. 0,5m, bór sosnowy, duża ekspozycja na światło					
36	OC3	53.80N/18.29E/47m	S I	-					
37	OC4	53.80N/18.29E/49m	S I	-					

Lp.	Symbol próby	Współrzędne geograficzne i wysokość stanowiska (n.p.m.) szerokość/długość/wysokość	Surowiec ³	Opis próby i stanowiska	Cel pochodny 1 ⁴	Cel pochodny 2 ⁵	Cel pochodny 3 ⁶	Cel pochodny 4 ⁷	Cel pochodny 5 ⁸
38	OT1		I	pokrój krzaczasty, bór sosnowy, duże skupisko <i>J. communis</i> , umiarkowana ekspozycja na światło					
39	OT2	54.33N/18.48E/125m	I	pokrój kolumnowy, wys. 2m, skraj boru sosnowego, duża ekspozycja na światło					
40	OT3	54.33N/18.48E/131m	I	pokrój kolumnowy, wys. 3m, bór sosnowy, słaba ekspozycja na światło					
41	OT4	54.33N/18.48E/130m	I	pokrój kolumnowy, wys. 2,5m, wzgórze ~15m od granicy lasu (bór sosnowy), duża ekspozycja na światło					
42	OT5	54.33N/18.48E/128m	I	pokrój kolumnowy, wys. 1,6m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
43	OT6	54.33N/18.48E/128m	I	pokrój kolumnowy, wys. 2,3m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
44	OT7	54.33N/18.48E/110m	I	pokrój krzaczasty, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
45	OT8	54.33N/18.48E/131m	I	pokrój krzaczasty, wys. 1,6m, nasadzenia sosny, duża ekspozycja na światło					
46	OT9	54.33N/18.48E/133m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,8m, nasadzenia sosny, duża ekspozycja na światło					
47	OT10	54.33N/18.48E/143m	S I	pokrój krzaczasty, młodnik sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
48	OT11	-	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,8m, młodnik sosnowy, bardzo słaba ekspozycja na światło					
49	OT12	54.33N/18.48E/140m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,8m, młodnik sosnowy, bardzo słaba ekspozycja na światło					
50	OT13	-	I	pokrój krzaczasty, wys. 1m, bór sosnowy, słaba ekspozycja na światło					
51	OT-OPT	-	I	pokrój krzaczasty, bór sosnowy					

Lp.	Symbol próby	Współrzędne geograficzne i wysokość stanowiska (n.p.m.) szerokość/długość/wysokość	Surowiec ³	Opis próby i stanowiska	Cel pochodny 1 ⁴	Cel pochodny 2 ⁵	Cel pochodny 3 ⁶	Cel pochodny 4 ⁷	Cel pochodny 5 ⁸
52	SA1	53.24N/17.98E/34m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,5m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
53	SA2	53.24N/17.98E/34m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 2,5m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
54	SA3	53.24N/17.98E/49m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 2,2m, granica boru sosnowego i nasadzeń drzew liściastych, silna ekspozycja na światło					
55	SA4	53.24N/17.98E/104m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 3,5m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
56	SA5	53.24N/17.98E/50m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 2m, bór sosnowy, słaba ekspozycja na światło					
57	SA6	53.24N/17.98E/55m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,7m, bór sosnowy, słaba ekspozycja na światło					
58	SA7	53.24N/17.98E/43m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,2m, bór sosnowy, słaba ekspozycja na światło					
59	SA8	53.24N/17.98E/79m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 2,8m, bór sosnowy, słaba ekspozycja na światło					
60	SA9	53.24N/17.98E/81m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 4m, słaba ekspozycja na światło					
61	SD1	53.57N/20.26E/112m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 2,9m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
62	SD2	53.57N/20.26E/115m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,2m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
63	SD3	53.57N/20.26E/116m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 1,9m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
64	SD4	53.57N/20.26E/119m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,3m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
65	SD5	53.57N/20.26E/60m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 1,8m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					

Lp.	Symbol próby	Współrzędne geograficzne i wysokość stanowiska (n.p.m.) szerokość/długość/wysokość	Surowiec ³	Opis próby i stanowiska	Cel pochodny 1 ⁴	Cel pochodny 2 ⁵	Cel pochodny 3 ⁶	Cel pochodny 4 ⁷	Cel pochodny 5 ⁸
66	SD6	53.57N/20.26E/141m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,4m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
67	SD7	53.57N/20.26E/113m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,9m, bór sosnowy, duża ekspozycja na światło					
68	SD8	53.57N/20.26E/110m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 1,7m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
69	SD9	53.57N/20.26E/48m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,9m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
70	SD10	53.57N/20.26E/-	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,7m, bór sosnowy, umiarkowana ekspozycja na światło					
71	SD11	53.57N/20.26E/-	S I	pokrój krzaczasty, wys. 1,8m, skraj boru sosnowego, umiarkowana ekspozycja na światło					
72	ST10	54.22N/17.97E/167m S I	S I	pokrój krzaczasty, wys. 2m, miedza, w bezpośredniej bliskości dużego jarzaba pospolitego, umiarkowana ekspozycja na światło					
73	ST11	54.22N/17.97E/174m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 4m, miedza, duża ekspozycja na światło					
74	ST12	54.22N/17.98E/168m	S I	pokrój krzaczasty, wys. 5m, łąka, duża ekspozycja na światło					
75	ST13	54.22N/17.98E/183m	S I	j/w					
76	T1	Suche Czuby, 1799m	I	J. nana osobnik duży, silnie płożący, południowy stok					
77	T2	Suche Czuby, 1799m	I	j/w					
78	T3	Suche Czuby, 1799m	I	j/w					
79	T4	okolice Czuby Goryczkowej, ~1900m	I	J. nana osobnik duży, silnie płożący, północny stok					
80	T5	okolice Czuby Goryczkowej, ~1800m	I	J. nana osobnik duży, silnie płożący, północny stok					

Lp.	Symbol próby	Współrzędne geograficzne i wysokość stanowiska (n.p.m.) szerokość/długość/wysokość	Surowiec ³	Opis próby i stanowiska	Cel pochodny 1 ⁴	Cel pochodny 2 ⁵	Cel pochodny 3 ⁶	Cel pochodny 4 ⁷	Cel pochodny 5 ⁸
81	T6	okolice Czuby Goryczkowej, ~1800m	I	J. nana osobnik duży, silnie płożący, południowy stok					
82	T7	wzdłuż szlaku turystycznego na Przełęcz pod Kopą Kondracką, ~1600m	I	J. communis/J. nana – osobnik o pośrednich cechach morfologicznych, charakterystyczny dla J. communis nalot na szpilkach po jednej stronie, przy jednoczesnej niewielkich wymiarach szpilek (cecha J. nana), północny stok, granica piętra kosówki i hal					
83	T8	wzdłuż szlaku turystycznego na Przełęcz pod Kopą Kondracką, ~1500m	I	J. communis, osobnik o typowych cechach tego gatunku, pokrój krzaczasty					
84	T9	Przełęcz pod Kopą Kondracką, 1863m	I	J. nana, północny stok					
85	T10	Przełęcz pod Kopą Kondracką, 1863m	I	J. nana, młody osobnik o płożących i stosunkowo krótkich pędach, północny stok					
86	T11	Suche Czuby, 1799m	I	J. nana, osobnik duży, silnie płożący, północny stok					
87	T12	okolice Goryczkowej Czuby, 1780m	I	J. nana, osobnik duży, silnie płożący, południowy stok					
88	T13	okolice Goryczkowej Czuby, 1780m	I	J. nana, osobnik duży, silnie płożący, północny stok					
89	T14	okolice Goryczkowej Czuby, 1800m	I	j/w					
90	T15	okolice Goryczkowej Czuby, 1800m	I	j/w					
91	T16	wzdłuż szlaku turystycznego na Przełęcz pod Kopą Kondracką, ~1600m	I	J. communis, osobnik szeroko płożący o innych cechach morfologicznych charakterystycznych dla J. communis					
92	ZG1	54.08N/18.36E/139m	I	pokrój kolumnowy, wys. 6m, łąka na nadrzecznym stoku, duża ekspozycja na światło					

Lp.	Symbol próby	Współrzędne geograficzne i wysokość stanowiska (n.p.m.) szerokość/długość/wysokość	Surowiec ³	Opis próby i stanowiska	Cel pochodny 1 ⁴	Cel pochodny 2 ⁵	Cel pochodny 3 ⁶	Cel pochodny 4 ⁷	Cel pochodny 5 ⁸
93	ZG2	54.08N/18.36E/126m	S I	pokrój kolumnowy, wys. 5m, skraj lasu mieszanego, duża ekspozycja na światło					

PRÓBY KOMERCYJNE SZYSZKOJAGÓD JAŁOWCA POSPOLITEGO

94	Herbapol Lublin		S	Wysuszone według wymogów FPV szyszkogody jałowca pospolitego (pochodzenie surowca nieznanne)					
95	Flos		S						
96	Herba Lux		S						
97	Kawon		S						
98	Zioła Lecznicze Boguccy		S						

-- oznacza brak danych z odbiornika GPS

¹ – brak szczegółowych danych, próby *J. communis* oznaczone symbolami G1 i G2 zostały zebrane przez studentkę Wydziału Farmacji AMG Annę Stachelską

² – próby oznaczone symbolami SD zostały zebrane i opisane przez studenta Wydziału Farmacji AMG Konrada Okurowskiego

³ – symbol "I" oznacza, że z opisywanej próby pozyskiwano igły, "S" - szyszkogody

⁴ – cel pośredni 1 – optymalizacja metody headspace SPME-GC

⁵ – cel pośredni 2 – badania porównawcze składu frakcji monoterpenu olejku SPME

⁶ – cel pośredni 3 – analiza zróżnicowania fitochemicznego *J. communis*

⁷ – cel pośredni 4 – analiza zróżnicowania genetycznego *J. communis*

⁸ – cel pośredni 5 – analiza pokrewieństwa systematycznego *J. communis* oraz *J. nana*

3.3. Startery stosowane w badaniach genetycznych jałowca

W pracy wykorzystano dwie grupy starterów – w realizacji celu pochodnego 4 startery RAPD, w realizacji celu 5 startery uniwersalne E i F dla sekwencji cpDNA *trnL-trnF* (Taberlet i in., 1991). Sekwencje oraz pochodzenie zastosowanych starterów przedstawiono w poniższej tabeli 11.

TABELA 11: Zestawienie sekwencji starterów zastosowanych w realizacji pracy

Nazwa startera	Sekwencja	Pochodzenie
STARTERY RAPD		
RB04	5'-GGACTGGAGT-3'	Proligo ²
RO12	5'-CAGTGCTGTG-3'	Proligo ²
RO04	5'-AAGTCCGCTC-3'	Proligo ²
RW02	5'-ACCCCGCCAA-3'	Proligo ²
RZ06	5'-GTGCCGTTCA-3'	Proligo ²
RZ08	5'-GGGTGGGTAA-3'	Proligo ²
RZ11	5'-CTCAGTCGCA-3'	Proligo ²
RothA 11	5'-CAATCGCCGT-3'	Carl Roth GmbH&Co. KG, Niemcy
RothN 03	5'-GGTACTCCCC-3'	Carl Roth GmbH&Co. KG, Niemcy
RothN 05	5'-ACTGAACGCC-3'	Carl Roth GmbH&Co. KG, Niemcy
RothN 07	5'-CAGCCCAGAG-3'	Carl Roth GmbH&Co. KG, Niemcy
RothN 12	5'-CACAGACACC-3'	Carl Roth GmbH&Co. KG, Niemcy
RothN 13	5'-AGCGTCACTC-3'	Carl Roth GmbH&Co. KG, Niemcy
RothN 16	5'-AAGCGACCTG-3'	Carl Roth GmbH&Co. KG, Niemcy
SEKWENCJA cpDNA		
E	5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3'	Proligo ¹
F	5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'	Proligo ¹

¹ – startery zsyntetyzowane na zamówienie na podstawie sekwencji zaprojektowanej przez Taberlet i in. (Taberlet i in., 1991)

² – startery zsyntetyzowane na zamówienie na podstawie sekwencji komercyjnie dostępnych zestawów starterów RAPD (Carl Roth GmbH&Co. KG, Niemcy oraz Operon Technologies, USA)

*Czcionką pogrubioną zaznaczono primery zastosowane po przetestowaniu całej puli starterów w ostatecznych analizach RAPD PCR 42 prób *J. communis*.

4. Metodyka analiz fitochemicznych

Poszczególne cele pośrednie niniejszej pracy związane są nierozzerwalnie z celem głównym czyli pełną charakterystyką fitochemiczną i genetyczną surowca pozyskiwanego z *J. communis*. Zastosowane w pracy metody zostały opisane w kolejności realizacji kolejnych celów pośrednich z uwzględnieniem podziału na część fitochemiczną i genetyczną.

Podstawą badań fitochemicznych w realizacji pracy była HS SPME sprzężona ze standardową metodą analityczną stosowaną w przypadku związków o charakterze lotnym – chromatografią gazową (GC). Rozdziały „Wybór złoża do SPME”, „Przebieg HS SPME”, „Otrzymywanie olejków eterycznych metodą destylacji”, „Warunki analiz chromatograficznych”, „Integracja i interpretacja danych chromatograficznych”, „Powtarzalność procedury HS SPME-GC” dotyczą realizacji celów pochodnych 1, 2 i 3.

4.1. Wybór złoża do SPME

Jednym z ważniejszych aspektów zastosowania SPME jest dobór złoża oraz jego grubości. Na rynku dostępne są włókna krzemionkowe pokrywane trzema rodzajami polimerów o różnej grubości. Ogólna zasada, podobnie jak w przypadku złożeń chromatograficznych, mówi, że anality niepolarne najlepiej ekstrahuje się na niepolarnym złożu, a polarne – na polarnym. Ponieważ sama powierzchnia włókna eksponowana na działanie analitów jest niezwykle mała, to każda nawet niewielka zmiana w jego polarności ma niebagatelny wpływ na proces adsorpcji/absorpcji. Biuletyn informacyjny Supelco dla lotnych związków niepolarnych zaleca włókno pokrywane polidimetylosiloksanem (PDMS) o grubości 100µm (Supelco Bulletin 923, 1998). Większa grubość złoża związana jest bezpośrednio z ilością zaadsorbowanych związków i mniejszymi stratami podczas procesu ich desorpcji w iniektorze chromatografu. Złoże cieńsze zapewnia szybszą dyfuzję i uwolnienie związków o wyższej temperaturze wrzenia w czasie desorpcji. Przegląd aplikacji SPME w analizie terpenów potwierdził, że jednym z częściej używanych złożeń jest 100µm PDMS (Coleman i Lawrence, 1997; Rohloff, 1999; Kim i Lee, 2004; Silvestrini i in., 2004). We wszystkich etapach doświadczeń zastosowano zatem ten rodzaj włókna.

4.2.Przebieg HS SPME

Poniżej opisano etapy przygotowania próbki do mikroekstrakcji do fazy stałej. Warunki poszczególnych etapów zostały dobrane eksperymentalnie w toku optymalizacji wg metody Taguchi opisanej w kolejnym rozdziale.

Przygotowanie próby surowca do analizy HS SPME obejmowało następujące etapy:

Rozdrobnienie surowca – odważony surowiec w ilości 100mg rozdrobniono w młynku analitycznym przez 10s i przenoszono do szklanej próbówki o objętości 8ml zaopatrzonej w septę silikonowo-teflonową.

Preinkubacja – w celu ustalenia się równowagi związków fазie nadpowierzchniowej nad surowcem próbę poddawano procesowi preinkubacji w temperaturze 60°C przez 10 minut. Równomierne ogrzanie próbówki zapewniano poprzez jej zanurzenie w termostатовanej łaźni wodnej.

Mikroekstrakcja – ekstrakcję polegającą na absorpcji składników lotnych próby prowadzono po wprowadzeniu igły przyrządu do SPME poprzez septę do próbówki i wysunięciu złoża, tak, aby jego koniec znajdował się ~0,5cm nad materiałem roślinnym. Proces absorpcji trwał 5 minut i przeprowadzany był, podobnie jak preinkubacja, w 60°C.

Desorpcja – proces desorpcji termicznej zachodził po wprowadzeniu strzykawki do SPME do dozownika chromatografu gazowego nagrzanego do 220°C. Czas tego etapu wynosił 2 minuty. Długość wysunięcia włókna wynosiła 3cm.

4.3.Otrzymywanie olejków eterycznych metodą destylacji

Olejki eteryczne można pozyskiwać z surowca olejkowego kilkoma sposobami, w zależności od specyfiki zarówno surowca, jak i olejku. W przypadku surowców i olejków farmakopealnych najczęściej stosowaną i rekomendowaną metodą jest destylacja z parą wodną (ang. *steam distillation*) (BP, 2004; Ph Eur, 2004, Evans, 2004) oraz destylacja z wodą (FPV, 1999; FPVI, 2002). Nomenklatura dotycząca destylacji z parą wodną i wodą w języku polskim nie jest jednoznaczna. W języku angielskim istnieją bowiem dwa pojęcia „steam distillation”, czyli destylacja z parą wodną oraz „hydrodistillation”, czyli destylacja z wodą. Pierwsza dotyczy metody destylacji, w której ekstrahowany surowiec poddawany jest działaniu pary wodnej

wprowadzanej zwykle przez rurkę. Druga polega na bezpośrednim zanurzeniu surowca w wodzie i doprowadzeniu go do wrzenia w jednym naczyniu. W polskiej literaturze dotyczącej otrzymywania olejków te dwa terminy traktowane są zwykle równoważnie, prawdopodobnie ze względu na podobieństwo fizyczne samego procesu. Używany standardowo na małą skalę w laboratoriach aparat do oznaczania zawartości olejków wg Derynga służy do otrzymywania olejków metodą destylacji z wodą.

W trakcie wykonywania pracy autorka do otrzymywania olejków z igieł i szyszkojagód używała aparatu do oznaczania olejków wg Derynga korzystając z metody farmakopealnej I (szyszkojagody) i II (igły) (odpowiednio "Bezpośrednie oznaczanie oleju w surowcach" oraz "Pośrednie oznaczanie oleju w surowcach przy użyciu ksylenu OD") (FPIV, 1970; FPV, 1999; FPVI, 2002). Oba badane surowce poddawano rozdrabnianiu w młynku mechanicznym w celu zwiększenia wydajności otrzymywania oleju. Olejek z szyszkojagód otrzymywano zwykle ze 100g suchej masy surowca (dotyczy to surowca komercyjnego), w przypadku igieł masa surowca wahała się w granicach 60-100g w zależności od ilości zebranego surowca i dlatego stosowano zmodyfikowaną metodę z dodatkiem ksylenu (metoda II). Średnia wydajność procesu destylacji dla szyszkojagód to 1,8% (czyli 1,8ml oleju w 100g suchej masy), dla igieł, po odliczeniu poprawki ksylenowej, 1%.

Metodę destylacji olejków z wodą zastosowano przy realizacji celów pochodnych 1, 2 oraz 5.

4.4. Warunki analiz chromatograficznych

Analizy chromatograficzne wykonano z zastosowaniem chromatografu gazowego Hewlett Packard 4890D wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) oraz dwie kolumny kapilarne: o złożu niepolarnym HP101 (Agilent Technologies, USA) oraz złożu enancjoselektywnym HP Chiral (Agilent Technologies, USA). Kolumna HP InnoWax (Agilent Technologies, USA) o złożu niepolarnym została dodatkowo użyta w celu wyznaczenia indeksów retencji (R_i). Dozownik chromatografu w przypadku analiz HS SPME został wyposażony w specjalną wkładkę (tzw. inlet chromatograficzny) o małej średnicy – 0,75mm, zalecany przez producenta oprzyrządowania do SPME jako element poprawiający rozdział zaabsorbowanych na włóknie analitów.

Warunki analiz chromatograficznych na obu złożach (achiralnym i chiralnym) zostały dobrane eksperymentalnie. Zestawienie zastosowanych parametrów analiz znajduje się w tabeli 12.

TABELA 12: Zestawienie warunków rozdzielania chromatograficznych na kolumnach o złożu achiralnym i chiralnym zastosowanych w przypadku wszystkich analiz GC w niniejszej pracy

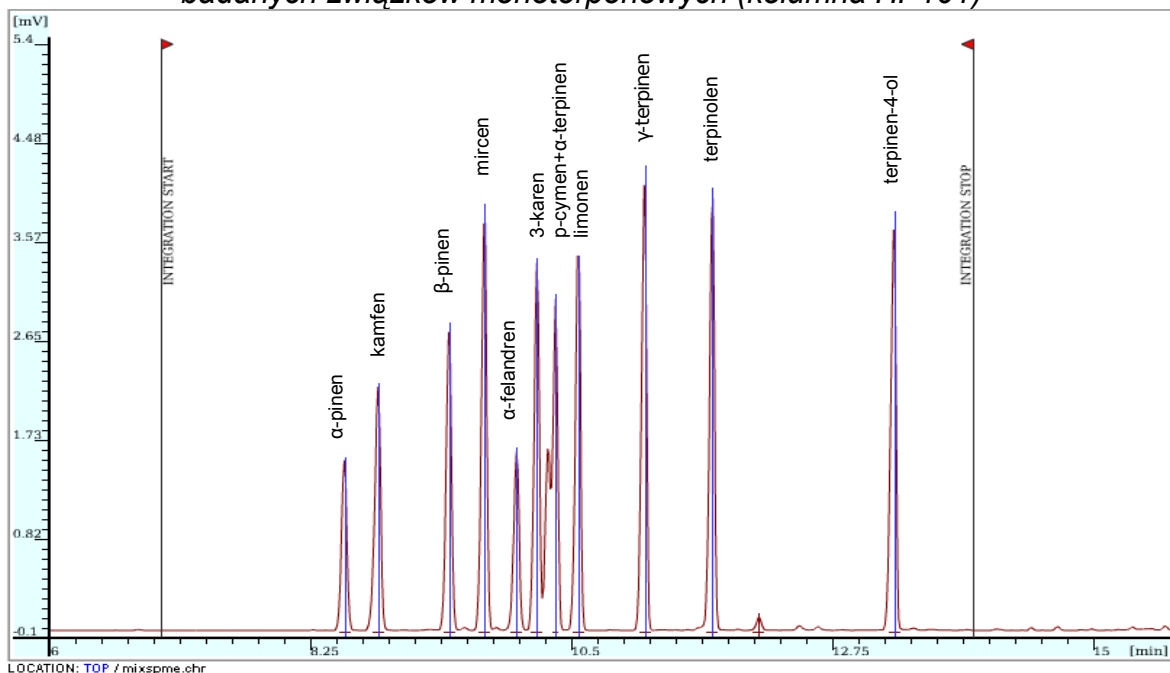
Warunki rozdzielania	Analiza na złożu o charakterze achiralnym	Analiza enancjoselektywna
Rodzaj kolumny oraz parametry techniczne	kolumna kapilarna HP101 (Agilent Technologies, USA): 25m, I.D. 0,32mm, grubość filmu 0,3µm	kolumna kapilarna HP101 (Agilent Technologies, USA): 30m, I.D. 0,32mm, grubość filmu 0,25µm
Temperatura dozownika	220°C	220°C
Temperatura detektora	250°C	250°C
Program temperaturowy	50°C (4min) – 10°C/min - 240°C	65°C (50min) – 5°C/min - 160°C
Czas rozdzielania	40min	90min
Gaz nośny	Ar 39,5kPa	He 47,5kPa
Dzielenie strumienia (tzw. split)	1:50 od 1min analizy	1:30 przez cały czas trwania analizy

4.5. Integracja i interpretacja danych chromatograficznych

Identyfikację związków z grupy monoterpenów przeprowadzono poprzez porównanie czasów retencji z substancjami wzorcowymi. Poprawność identyfikacji głównych monoterpenów potwierdzono dzięki uprzejmości prof. dr hab. Danuty Kalemby z Instytutu Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej przeprowadzając analizę GC-MS. Integracji pików dokonywano w oprogramowaniu Chroma (POL-LAB, Polska), a pliki po integracji archiwizowano i poddawano dalszej obróbce w systemie ChromNET (Madanecki, 2005).

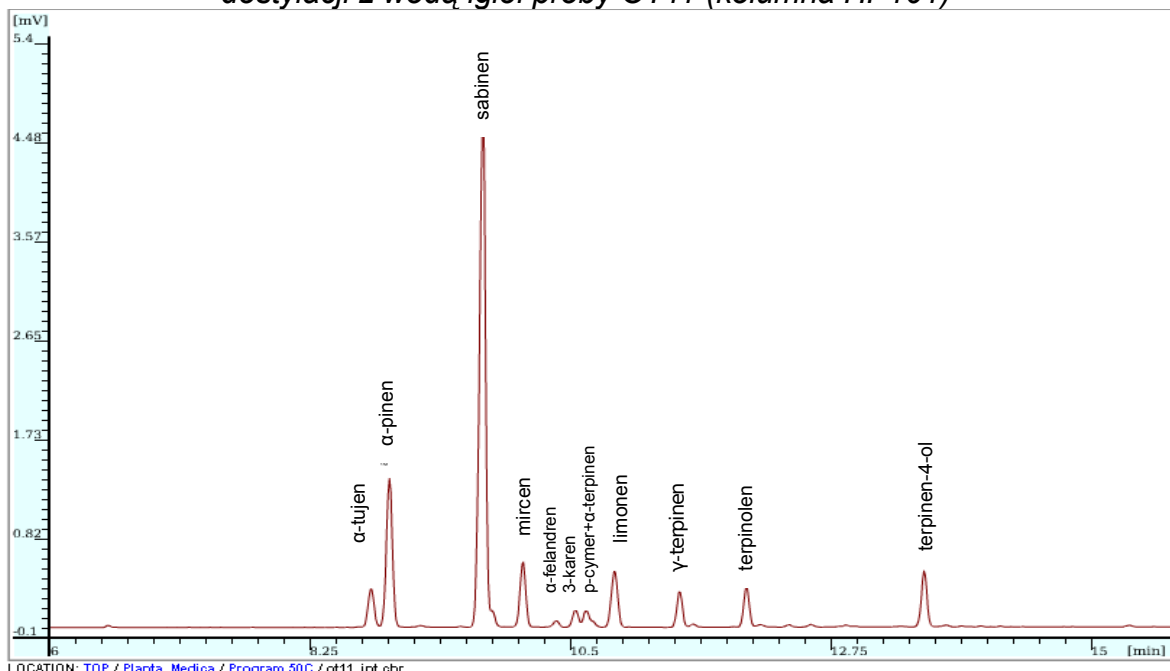
W dalszej części rozdziału zamieszczono przykładowe chromatogramy substancji wzorcowych oraz właściwych analiz olejków eterycznych i związków wyekstrahowanych metodą HS SPME.

RYSUNEK 10: Chromatogram przedstawiający mieszaninę wzorcową części badanych związków monoterpenu (kolumna HP101)



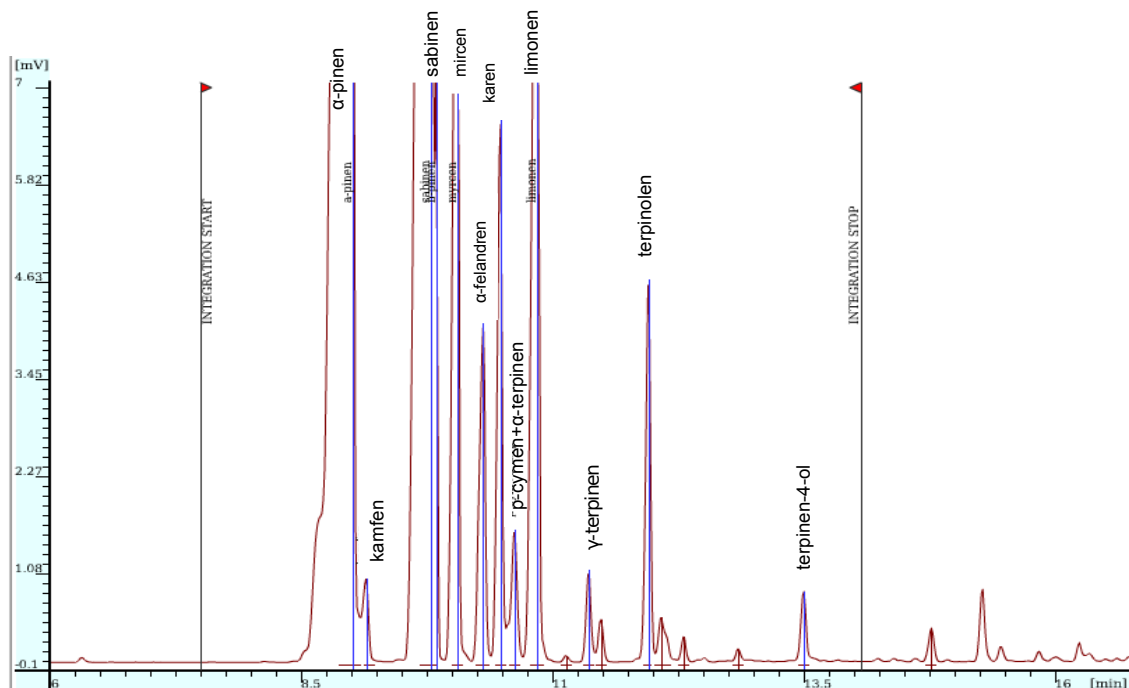
Chromatogram wygenerowany przez oprogramowanie ChromNET, uzyskany w wyniku nastrzyku mieszaniny wzorców w heksanie na kolumnę HP101 (warunki analizy podano w tabeli 12, s. 81).

RYSUNEK 11: Chromatogram przedstawiający olejek eteryczny otrzymany w drodze destylacji z wodą igieł próby OT11 (kolumna HP101)



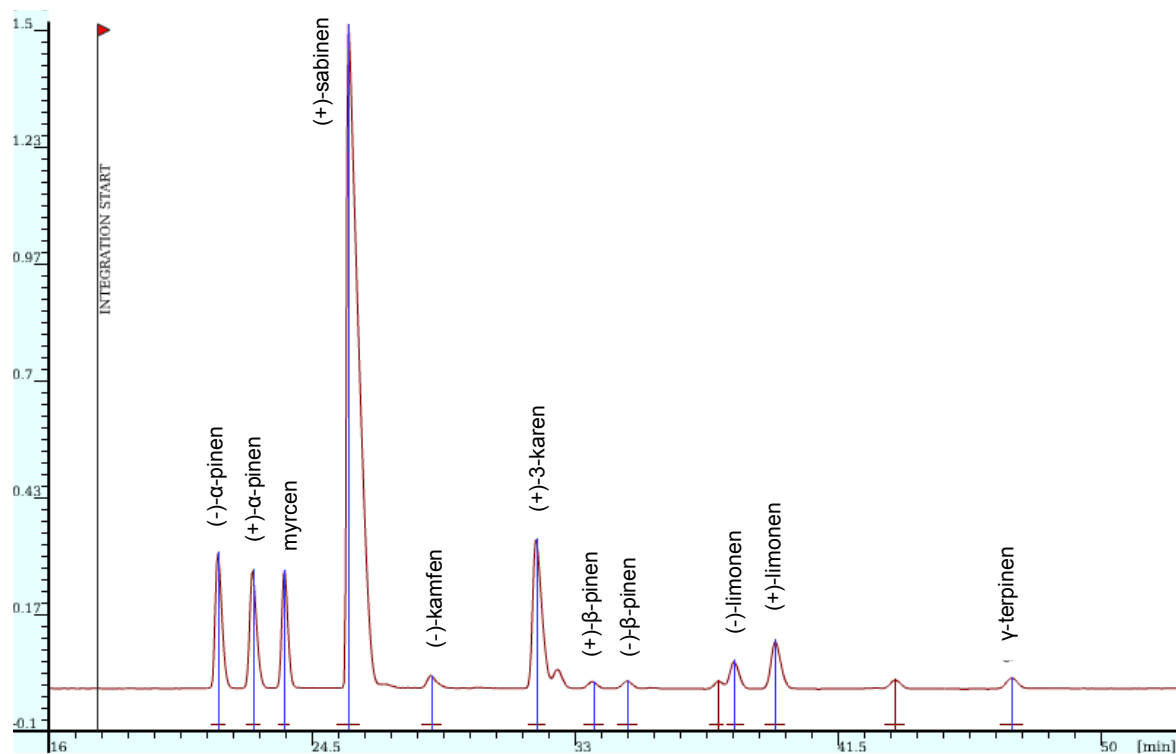
Chromatogram wygenerowany przez oprogramowanie ChromNET, uzyskany w wyniku nastrzyku olejku w heksanie na kolumnę HP101 (warunki analizy podano w tabeli 12, s. 81).

RYSUNEK 12: Chromatogram przedstawiający profil SPME związków monoterpenowych w igłach próby SA6 (kolumna HP101)



Chromatogram wygenerowany przez oprogramowanie ChromNET, uzyskany w wyniku heaspac SPME znad rozdrobionych igieł próby jałowca SA6 (warunki analizy podano w rozdziale "Przebieg headspace SPME", s. 79). na kolumnie HP101.

RYSUNEK 13: Chromatogram przedstawiający profil SPME związków monoterpenowych w igłach próby SA2 (kolumna HPChiral)



Chromatogram wygenerowany przez oprogramowanie ChromNET, uzyskany w wyniku heaspac SPME znad rozdrobionych igieł próby jałowca SA2 (warunki analizy podano w rozdziale "Przebieg headspace SPME", s. 79). na kolumnie HPChiral.

4.6. Powtarzalność procedury HS SPME-GC

Jak już wspomniano wcześniej używana technika HS SPME nie daje możliwości ilościowego oznaczenia analitów lotnych. Stąd też niemożliwe staje się przeprowadzenie walidacji, którą standardowo wykonuje się w innych typowo ilościowych metodach analitycznych. W toku niniejszych analiz HS SPME można potraktować jako “półilościową” technikę oznaczania związków lotnych w olejkach. Nie jest to jednak przeszkodą w przypadku analizy olejków eterycznych, gdyż większość norm dla olejków określa w nich jedynie względną zawartość procentową poszczególnych składników (normy takie określają monografie farmakopealne). HS SPME jest zatem doskonałym narzędziem w przypadku składników olejków roślinnych, jako szybka metoda screeningu surowca roślinnego pod kątem zawartości związków o pożądanej aktywności biologicznej.

Niemniej jednak do oceny przydatności tej metody istotne wydaje się zbadanie jej powtarzalności dla badanego surowca roślinnego. Badanie takie przeprowadzono zarówno dla oznaczeń w warunkach achiralnych, jak i chiralnych, dla dwóch rodzajów używanego w badaniach surowca – szpilek i szyszkojagód *J. communis*, traktując je jako dwie odmienne matryce do analizy. Różnią się one strukturą i wielkością utworów wydzielniczych produkujących i gromadzących olejek. Prawdopodobne jest więc, że specyfika ich budowy anatomicznej może mieć wpływ na powtarzalność procedury ekstrakcji i analizy chromatograficznej.

Celem zbadania powtarzalności HS SPME GC losowo wyselekcjonowano próby igieł i szyszkojagód jałowca pospolitego – w przypadku analiz achiralnych były to odpowiednio OT-OPT oraz SA9, w przypadku analiz na złożu enancjoselektywnym – SD10 i SA7. Procedura postępowania z próbkami była identyczna jak opisana w rozdziale “Przebieg HS SPME” (s. 79). Oznaczenia we wszystkich przypadkach prowadzono przez kolejne 11 dni, otrzymując tym samym 11 powtórzeń tych samych pomiarów dla każdego surowca i kolumny chromatograficznej. Wyniki wątpliwe odrzucano przyjmując kryteria testu Q-Dixona (znanego także jako test Q lub test Dixona) z prawdopodobieństwem na poziomie 95%. Szczegółowe dane wyjściowe otrzymane w wyniku badania powtarzalności metody zamieszczono w rozdziale “Suplement A – Wyniki analiz chromatograficznych” w tabelach 37, 38, 39, 40, natomiast w tabeli 13 poniżej znajduje się zestawienie obejmujące średnie oraz

odchylenia standardowe dla poszczególnych związków monoterpenu igieł i szyszkogagód prób użytych do badań powtarzalności.

TABELA 13: Zestawienie wyników badań powtarzalności procedury headspace SPME-GC w warunkach achiralnych i chiralnych dla badanych surowców roślinnych wykorzystywanych w toku realizacji pracy

Związek	ANALIZY ACHIRALNE względna zawartość procentowa [%] ±odchylenie standardowe (współczynnik zmienności)	
	igły próby OT-OPT	szyszkogagody próby SA9
α-tujen	0,18±0,03 (14,31)	-
α-pinen	74,46±1,08 (1,45)	57,44±1,79 (3,11)
kamfen	2,66±0,10 (3,77)	0,32±0,02 (6,22)
sabinen	0,29±0,03 (9,44)	-
β-pinen	3,09±0,17 (5,62)	2,41±0,15 (6,20)
mircen	2,65±0,16 (6,24)	18,11±0,21 (6,65)
α-felandren	3,04±0,30 (8,60)	-
karen	1,30±0,16 (12,71)	-
p-cymen+α-terpinen	0,23±0,06 (28,91)	0,06±0,01 (16,40)
limonen	9,85±0,74 (7,57)	20,38±0,06 (4,24)
γ-terpinen	-	0,04±0,01 (17,35)
terpinolen	0,58±0,05 (8,00)	0,74±0,07 (9,72)
terpinen-4-ol	0,12±0,03 (26,97)	0,14±0,04 (15,31)
Związek	ANALIZY CHIRALNE względna zawartość procentowa [%] ±odchylenie standardowe (współczynnik zmienności)	
	igły próby SD10	szyszkogagody próby SA7
(-)α-pinen	13,51±0,61 (4,50)	40,05±0,13 (7,73)
(+)α-pinen	20,05±0,59 (2,96)	1,31±0,16 (11,96)
mircen	5,43±0,16 (2,92)	41,73±2,06 (4,94)
(+)sabinen	48,26±0,34 (3,48)	7,09±1,09 (15,38)
(+)3-karen	2,22±0,34 (15,15)	-
α-felandren+α-terpinen	0,88±0,05 (5,57)	-
(+)β-pinen	-	-
(-)β-pinen	1,09±0,05 (6,06)	2,74±0,26 (9,64)
(-)limonen	0,71±0,05 (6,90)	0,91±0,09 (10,27)
(+)limonen	2,55±0,14 (5,51)	4,51±1,09 (42,16)
γ-terpinen	-	-
terpinolen	2,65±0,24 (9,10)	13,51±0,61 (13,15)

Z wyników zestawionych w tabeli 9 wynika wyraźnie zależność pomiędzy powtarzalnością zastosowanej procedury analitycznej HS SPME-GC a matrycą, z której pozyskiwano składniki lotne o charakterze monoterpenów. Jako miarę powtarzalności przyjęto odchylenie standardowe oraz współczynnik zmienności (W_z), który, aby metodę można było uznać za powtarzalną powinien kształtować się na poziomie do 5% (przy czym poziom 10% można uznać jeszcze jako akceptowalny). Wartości W_z dla matrycy, jaką są liście szpilkowe *J. communis* są mniejsze niż odpowiadające im W_z dla szyszkojagód. Wynika to prawdopodobnie ze specyfiki budowy anatomicznej struktur olejkowych w tych organach rośliny – schizogenowe przewody olejkowe w szpilce są zdecydowanie lepiej dostępne niż zbiorniki o tym samym pochodzeniu w szyszkojagodzie rośliny. Ponadto wielkość i masa pojedynczych igieł pozwalają na lepsze uśrednienie badanej niewielkiej próby materiału (100mg) używanej do ekstrakcji związków lotnych, podczas, gdy na badaną próbę 100mg jagód składają się zwykle 2-3 sztuki, co może powodować w przypadku niektórych związków (oznaczenia (+)sabinenu czy (+)limonenu na kolumnie chiralnej HPChiral) dość znaczne różnice w badaniu powtarzalności. Znane są bowiem dane wskazujące na wahania zawartości monoterpenów pomiędzy pojedynczymi igłami czy liśćmi w obrębie jednej rośliny w zależności od pozycji na łodydze (Rohloff, 1999; Chviličková i Kubáň, 2004). Wysokie W_z (powyżej 10%) są też bezpośrednio związane z niską zawartością procentową niektórych monoterpenów – im mniej danego związku, tym mniejsza powtarzalność metody i w związku z tym wyższy W_z . Losowość wyboru prób do badań nie pozwoliła na dokładne zbadanie powtarzalności oznaczeń takich związków jak α -felandren, δ -3-karen i γ -terpinen, gdyż zawartość ich w badanym surowcu była znikoma.

Rohloff w przypadku badań pojedynczych liści mięty pieprzowej stwierdził niską powtarzalność HS SPME-GC/MS – odchylenie standardowe wynosiło od 8 do 23%. Pomimo takiego wyniku postulował użycie tej techniki jako metody screeningowej dla surowca roślinnego (Rohloff, 1999). Z drugiej strony w przypadku drewna *Picea abies* inny zespół badawczy otrzymał bardzo wysoką powtarzalność ze współczynnikiem zmienności względnych zawartości procentowych poszczególnych terpenów nie przekraczającym 5% (Wajs i in., 2006). Bicchi testując różne złoża dla czterech olejkowych roślin leczniczych określił powtarzalność na poziomie między 6,5% dla bardziej lotnych składników a 2,5% dla słabiej lotnych (Bicchi i in., 2000). Chviličková i

Kubàň podkreślają, że słaba powtarzalność wyników ekstrakcji węglowodorów monoterpenowych metodą HS SPME może być powodowana stratami (parowaniem) tych związków na poszczególnych etapach procesu, szczególnie w trakcie rozdrabniania (Chviličková i Kubàň, 2004). Dla głównych składników *J. communis* W_z nie przekraczają 5%. Takie wyniki badań powtarzalności pozwalają na zastosowanie HS SPME jako szybkiej metody diagnostycznej dla surowców olejkowych.

4.7.Optymalizacja metody headspace SPME-GC (cel pochodny 1)

W przypadku rutynowych analiz surowców olejkowych SPME może stać się szybką i relatywnie niedrogą alternatywą klasycznej metody oznaczania składników olejków po uprzedniej destylacji. Należy podkreślić, że określenie “metoda alternatywna” nie oznacza tutaj, że techniką SPME można pozyskać olejek w sensie fizycznym. Oznacza to, że można ją zastosować zamiast długotrwałego i wymagającego większej ilości surowca procesu otrzymywania olejku w przypadku, gdy zamysłem analityka jest ocena składu konkretnego surowca pod kątem zawartości związków lotnych. W takim przypadku SPME staje się techniką umożliwiającą “screening” surowca roślinnego pod kątem jego przydatności do dalszych analiz.

SPME jest techniką niezwykle użyteczną i powtarzalną pod warunkiem dobrania i zoptymalizowania jej kluczowych parametrów. Stąd też pierwszym etapem badań była optymalizacja wybranych warunków SPME. Tradycyjny dobór warunków metody analitycznej polega na wykonaniu wielu eksperymentów i doborze wartości każdego parametru indywidualnie. Przy wielu zmiennych przyjmujących po kilka wartości staje się niezwykle czasochłonny a czasem wręcz niemożliwy. Alternatywną w takim przypadku może stać się stosowana w procesach przemysłowych metoda Taguchi wynaleziona w 1987 roku (Taguchi, 1987).

Podstawy teoretyczne optymalizacji według Taguchi

Metody Taguchi stosowane są z powodzeniem od lat 80 w optymalizacji procesów przemysłowych (Noori, 1998), ale z czasem zaczęły być także stosowane w doborze parametrów procesów w skali laboratoryjnej. Zastosowano je między innymi w optymalizacji warunków RAPD-PCR (Cobb&Clarkson, 1994), doborze optymalnego buforu w dwuwymiarowej elektroforezie poliakrylamidowej białek (Khoudoli i in., 2004), warunków procedury ELISA (Jeney i in., 1999). Istotą techniki Taguchi (i jednocześnie cechą, która odróżnia ją od tradycyjnej metody optymalizacji) jest stosowanie dużej

liczby wielkości wejściowych (czyli innymi słowy wielu parametrów procesu przyjmujących wiele wartości) w jak najmniejszej liczbie eksperymentów. Jej podstawy matematyczne są dość skomplikowane, jednak zastosowanie jej z użyciem pakietu *Statistica 7.1* (StatSoft, 2005) jest możliwe dla przeciętnego użytkownika. Wystarczy znać jej kluczowe założenia, wśród których wymienić należy:

1. koncepcję **funkcji straty jakości**,
2. użycie **współczynnika stosunku sygnału do szumu** (oznaczonego S/N),
3. użycie **tablic ortogonalnych** (StatSoft, 1995).

Jakość i funkcja straty. Według autorów programu *Statistica* (StatSoft, 1995) nie łatwo jest zdefiniować "jakość". Można jednak posłużyć się przeciwieństwem definicji "jakość" - czyli stratą poniesioną przez użytkownika (dotyczy to produktów otrzymywanych w drodze procesu przemysłowego) z powodu usterek funkcjonalnych i szkodliwych efektów ubocznych danego produktu. Jakość można więc mierzyć poprzez tę stratę – im wyższa jest strata, tym jakość produktu maleje. Konwencjonalne metody optymalizacji procesów przemysłowych zakładają, że funkcja utraty jakości ma charakter nieciągły tzn. że dopóki usterki w procesie produkcyjnym mieszczą się w założonej granicy tolerancji to nie ma utraty jakości. Innymi słowy – w przedziale tolerancji utrata jakości jest pomijalna, natomiast po wyjściu poza ten przedział jest nieakceptowalna. Z punktu widzenia użytkownika nie jest to podejście właściwe, gdyż drobne usterki mieszczące się w granicach tolerancji zmniejszają satysfakcję użytkownika, a więc powodują utratę jakości produktu. Metoda Taguchi zakłada więc, że funkcja utraty jakości nie jest liniową funkcją odchylenia od nominalnej specyfikacji, lecz funkcją kwadratową. Oznacza to, że stopniowe odchylenie procesu produkcji od specyfikacji nie skutkuje liniową utratą jakości, a raczej podniesioną do kwadratu. Podsumowując – w procesie produkcyjnym należałoby dążyć do zminimalizowania kwadratów odchyłeń wokół idealnej (nominalnej) specyfikacji (StatSoft, 1995).

Współczynnik stosunku sygnału do szumu. Sygnałem (S – ang. *signal factors*) w rozumieniu metody Taguchi są czynniki, które pozostają pod kontrolą użytkownika w celu spełnienia określonej funkcji. Szumem (N – ang. *noise factors*) zdefiniować można wszystkie czynniki zakłócające użytkowanie produktu i pozostające poza kontrolą użytkownika. Celem optymalizacji Taguchi jest zminimalizowanie odpowiedzi

produktu na sygnały szumowe i jednocześnie zmaksymalizowanie zmienności odpowiedzi na czynniki zaliczane jako sygnały. Wyraża się to w dążeniu do zmaksymalizowania współczynnika sygnału do szumu (S/N – ang. *signal-to-noise-ratio*). Ważnym aspektem takiego procesu optymalizacji jest znalezienie takich czynników znajdujących się pod kontrolą (wielkości wejściowych lub sterujących), które spowodują wzrost S/N. Idealny produkt powinien odpowiadać tylko na sygnały i nie reagować na czynniki losowe. W metodzie Taguchi możliwych jest kilka strategii postępowania w przypadku S/N (StatSoft, 1995).

W przypadku optymalizacji techniki HS SPME jako czynniki stanowiące sygnał (czyli zmienne wejściowe) potraktowano parametry termiczne i czasy trwania poszczególnych etapów procesu: preinkubacji, absorpcji i desorpcji. Czynniki stanowiące szum to wahania temperatury próbki w trakcie trwania procesu ekstrakcji czy małe różnice w czasie trwania tych etapów. Wybrano dwa modele obliczania S/N w zależności od strategii optymalizacji (opisanych w dalszych częściach rozdziału) – „im-większe–tym-lepsze” (ang. *the-larger-the-better*) oraz „im-mniejsze–tym-lepsze” (ang. *the-smaller-the-better*).

Tablice ortogonalne. Taguchi w swojej metodzie opracował system planów doświadczalnych, które umożliwiają obliczenie maksymalnej liczby nieobciążonych czyli ortogonalnych efektów przy niewielkiej liczbie układów planu (StatSoft, 1995). Aby uzmysłowić sobie wyższość optymalizacji Taguchi nad tradycyjnym procesem doboru parametrów wystarczy dokonać prostej kalkulacji. W przypadku potrzeby optymalizacji 4 zmiennych, które mają przyjmować 4 poziomy wartości w konwencjonalnej metodzie optymalizacji należałoby przeprowadzić $4^4 = 256$ niezależnych układów doświadczalnych (eksperymentów). Taguchi w takim przypadku proponuje zastosowanie tablicy ortogonalnej L'16, co skutkuje koniecznością przeprowadzenia 16 eksperymentów w dwóch powtórzeniach.

Efektom prawidłowo przeprowadzonej optymalizacji Taguchi jest wykres średnich wartości S/N względem wartości czynników. Najwyższa wartość S/N może być odczytana z wykresu – w ten sposób określa się poziom danej zmiennej wejściowej. W ustalonych w ten sposób warunkach przeprowadza się eksperyment weryfikujący, wylicza rzeczywistą wartość S/N i porównuje się ją z wartościami przewidywanymi. Zgodność obu wartości potwierdza poprawność dobranych w ten sposób warunków. Odchylenia wartości rzeczywistej od przewidywanej wymagają rozważenia

zastosowania modelu optymalizacji, który bierze pod uwagę interakcje dwuczynnikowe i wyższego rzędu (StatSoft, 1995).

Optymalizację procesu HS SPME przeprowadzono w następujących etapach:

1. W oparciu o dostępną literaturę z zakresu SPME i opisane aplikacje tej metody wybrano wartości wejściowe, a więc takie, które mają kluczowe znaczenie dla jakości sygnału (w tym wypadku sygnałem jest wynik analizy chromatograficznej). Jako zmienne zależne potraktowano: czas preinkubacji (przy czym założono, że temperatura preinkubacji będzie taka sama, jak ta, w której przeprowadza się absorpcję), temperaturę absorpcji, czas absorpcji, czas desorpcji. Każda z nich przyjmowała cztery wartości, które przedstawiono w tabeli 10.

TABELA 14: Wartości parametrów wejściowych (zmiennych niezależnych) do procesu optymalizacji SPME metodą Taguchi

A	B	C	D
Czas preinkubacji	Temperatura absorpcji	czas absorpcji	Czas desorpcji
1 (5min)	1 (30°C)	1 (30s)	1 (30s)
2 (10min)	2 (40°C)	2 (1min)	2 (1min)
3 (20min)	3 (50°C)	3 (2 min)	3 (2 min)
4 (30min)	4 (60°C)	4 (5min)	4 (5min)

2. Dla układu, w którym cztery zmienne wejściowe przyjmują każda po 4 wartości zastosowano tablicę ortogonalną L'16 oferowaną przez pakiet *Statistica 7.0* (tabela).

TABELA 15: Plan doświadczeń według metody Taguchi – macierz ortogonalna L'16.

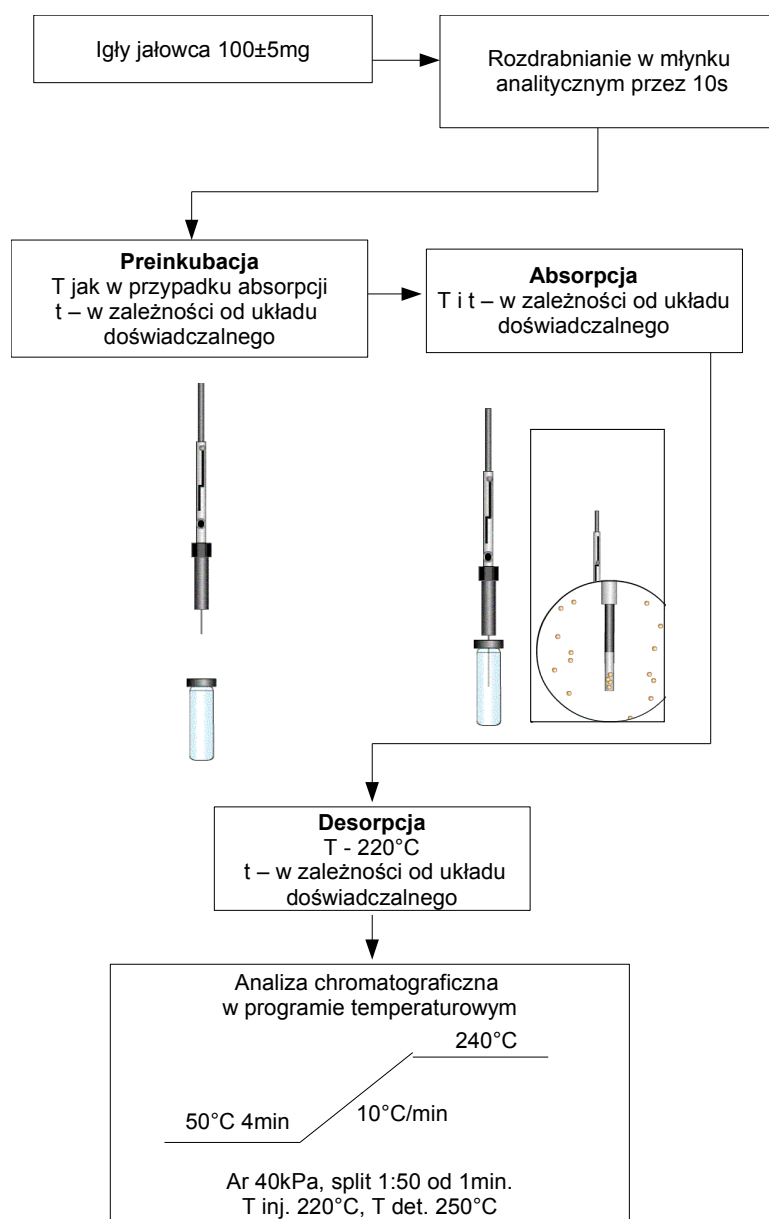
Układ	A	B	C	D
	CZAS PREINKUBACJI	TEMPERATURA ABSORPCJI	CZAS ABSORPCJI	CZAS DESORPCJI
1	1 (5min)	1 (30°C)	1 (30s)	1 (30s)
2	1 (5min)	2 (40°C)	2 (1min)	2 (1min)
3	1 (5min)	3 (50°C)	3 (2 min)	3 (2 min)

Układ	A CZAS PREINKUBACJI	B TEMPERATURA ABSORPCJI	C CZAS ABSORPCJI	D CZAS DESORPCJI
4	1 (5min)	4 (60°C)	4 (5min)	4 (5min)
5	2 (10min)	1 (30°C)	2 (1min)	3 (2 min)
6	2 (10min)	2 (40°C)	1 (30s)	4 (5min)
7	2 (10min)	3 (50°C)	4 (5min)	1 (30s)
8	2 (10min)	4 (60°C)	3 (2 min)	2 (1min)
9	3 (20min)	1 (30°C)	3 (2 min)	4 (5min)
10	3 (20min)	2 (40°C)	4 (5min)	3 (2 min)
11	3 (20min)	3 (50°C)	1 (30s)	2 (1min)
12	3 (20min)	4 (60°C)	2 (1min)	1 (30s)
13	4 (30min)	1 (30°C)	4 (5min)	2 (1min)
14	4 (30min)	2 (40°C)	3 (2 min)	1 (30s)
15	4 (30min)	3 (50°C)	2 (1min)	4 (5min)
16	4 (30min)	4 (60°C)	1 (30s)	3 (2 min)

Optymalizację SPME według powyższego planu wykonano z wykorzystaniem igieł próby oznaczonej symbolem OT-OPT. Do fiolek z ciemnego szkła zaopatrzonych w nakrętkę z neutralną septą silikonowo-teflonową odważono po 100 ± 5 mg igieł badanej próby. Wykonano 16 eksperymentów – każdy z nich opatrzony jest numerem (tabela 15) i zawiera unikalny zestaw wartości czterech optymalizowanych parametrów. Aby proces optymalizacji można było uznać za wiarygodny każdy z układów powtórzono stosując przypadkową kolejność (łącznie przeprowadzono 32 doświadczenia). Schemat postępowania eksperymentalnego przedstawiony jest na rysunku 14.

Jednocześnie z tak samo przygotowanego materiału roślinnego (igieł próby OT-OPT) otrzymano olejek eteryczny metodą destylacji z wodą, opisaną w rozdziale „Otrzymywanie olejków eterycznych metodą destylacji” (s. 79). Olejek ten po destylacji poddano analizie chromatograficznej analogicznie jak w przypadku SPME. Wyniki analiz olejku wykorzystano dalej w jednej z przyjętych strategii optymalizacji.

RYSUNEK 14: Schemat postępowania eksperymentalnego HS SPME-GC w optymalizacji metodą Taguchi



*czcionką pogrubioną zaznaczono etapy procesu headspace SPME, które były optymalizowane w procesie Taguchi

3. Obliczono zmienne zależne dla przyjętych strategii optymalizacji i wyznaczenia S/N.

W opisie podstaw teoretycznych procesu optymalizacji Taguchi wspomniano, że w zależności od wybranej strategii optymalizacji, współczynnik S/N (nazywany też często *Eta*) można obliczać w różny sposób. W trakcie planowania doświadczenia przyjęto dwie strategie optymalizacji warunków HS SPME:

- podobieństwa profilu GC związków ekstrahowanych metodą SPME do profilu olejku otrzymanego w drodze destylacji z wodą,
- jak największej ilości pików związków o charakterze monoterpenowym.

W pierwszym przypadku założono, że jeśli HS SPME ma być zastosowana jako szybka metoda oceny surowca olejkowego, to profil chromatograficzny związków z HS SPME powinien w miarę wiernie odzwierciedlać profil olejku otrzymanego z tego samego surowca. Chromatogramy związków monoterpenowych olejku i HS SPME porównywano więc, a jako zmienne zależne (mierzone) wybrano dwie wielkości – współczynnik korelacji oraz sumę odchyłeń kwadratowych względnych zawartości procentowych poszczególnych monoterpenów z SPME w stosunku do ich zawartości w olejku.

Druga strategia optymalizacji zakładała, że optymalny chromatogram otrzymany w toku analiz związków z HS SPME powinien zawierać możliwie dużą ilość pików związków monoterpenowych. W tym przypadku jako parametr mierzony przyjęto ilość pików związków monoterpenowych. Zastosowane strategie oraz odpowiadające im zmienne niezależne przedstawiono w tabeli 16.

TABELA 16: Strategie optymalizacji oraz zmienne zależne w procesie optymalizacji HS SPME wg Taguchi

	Strategia optymalizacji (strategia obliczania S/N)	Wielkość mierzona (zmienna zależna)
1	Podobieństwo profilu SPME do olejku eterycznego (im-mniejszy-tym-lepszy)	suma odchyłeń standardowych
2	Podobieństwo profilu SPME do olejku eterycznego (im-większy-tym-lepszy)	współczynnik korelacji
3	Duża ilość pików związków monoterpenowych	ilość pików

Za pomocą pakietu *Statistica* obliczono wartość S/N (wartość *Eta*) z użyciem wzorów:

- a) dla strategii “im-większy-tym-lepszy”

$$Eta = -10 \cdot \log_{10} \left(\frac{1}{n} \cdot \sum \frac{1}{y^2} \right)$$

b) dla strategii “im-mniejszy-tym-lepszy”

$$Eta = -10 \cdot \log_{10} \left(\frac{1}{n} \cdot \sum y^2 \right)$$

gdzie:

n – liczba pomiarów dla danego układu doświadczalnego

y – zmienna zależna

Strategia obliczania współczynnika S/N “im-większy-tym-lepszy” powinno się używać w przypadku, gdy zależy nam na maksymalizacji pożądanych cech produktu (w przypadku optymalizacji SPME ilość pików oraz współczynnik korelacji), natomiast “im-mniejszy-tym-lepszy” gdy pożądana jest minimalizacja wystąpienia pewnych niepożądanych cech (w przypadku SPME minimalizacja odchylenia standardowego zawartości procentowych monoterpenów w stosunku do olejku eterycznego).

4. W pakiecie *Statistica* obliczono współczynniki S/N. Każdy zestaw warunków optymalnych dla danej strategii optymalizacji charakteryzuje się określoną wielkością oczekiwanego S/N, czyli takiego, który powinno się otrzymać przeprowadzając analizę w tych warunkach.
5. Sprawdzono poprawność procedury poprzez przeprowadzenie eksperymentu weryfikującego w warunkach optymalnych dla każdej z trzech strategii. Każdy eksperyment weryfikujący powtórzono dwukrotnie. Po zestawieniu eksperymentalnych i oczekiwanych *Eta* przyjęto ostatecznie parametry poszczególnych etapów HS SPME.

Optymalizację procedury HS SPME przeprowadzono dla igieł *J. communis*. Te same warunki zastosowano także w przypadku szyszkojagód tej rośliny. Celowo pominięto proces optymalizacji, gdyż tylko zastosowanie tych samych warunków ekstrakcji i analiz daje możliwość porównania wyników między surowcami.

4.8. Badania porównawcze olejku otrzymanego metodą destylacji z wodą i metodą HS SPME (cel pochodny 2)

Ten etap badań miał na celu porównanie składu procentowego olejku otrzymanego metodą destylacji oraz składników otrzymanych techniką HS SPME ze struktur olejkowych badanego materiału. Dodatkowo z prób komercyjnych szyszkogagód przeprowadzono HS SPME znad olejku rozcieńczonego 100 razy alkoholem etylowym.

Destylacja i mikroekstrakcja składników o charakterze monoterpenowym

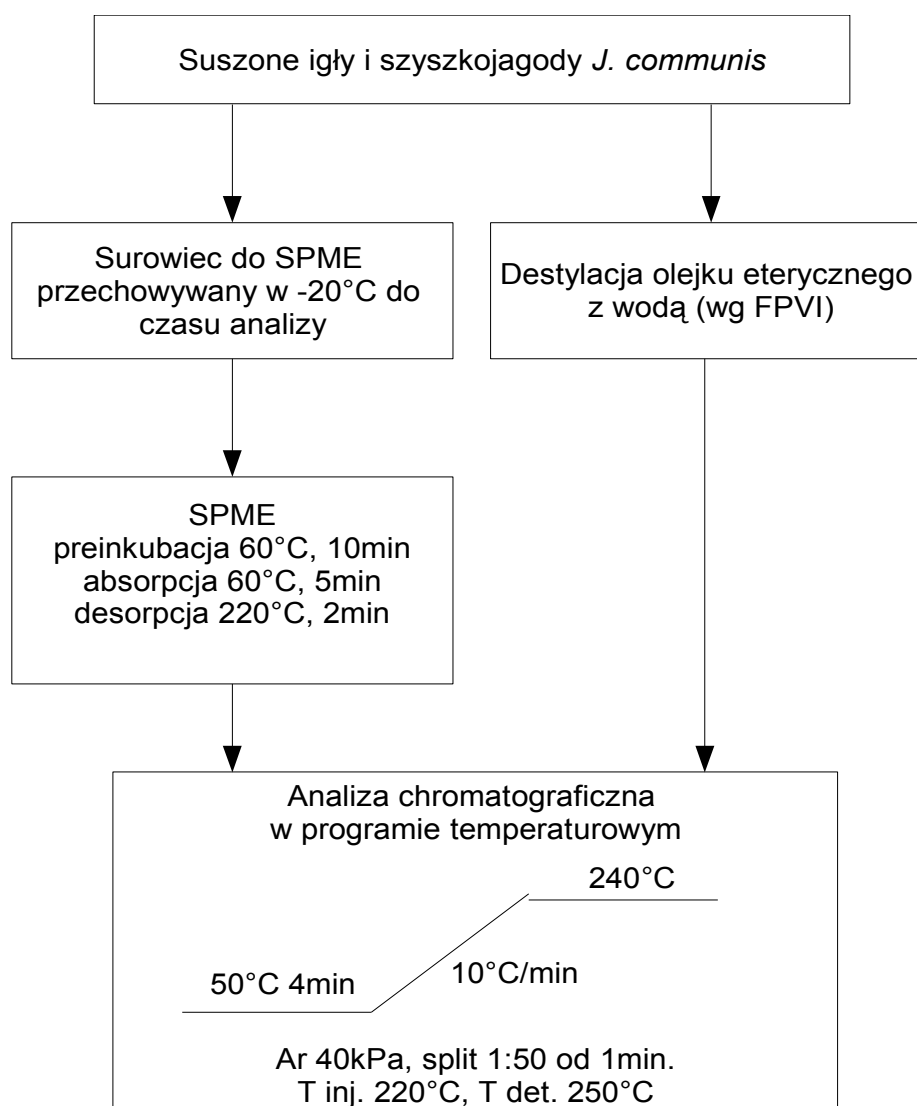
W badaniach porównawczych wykorzystano 17 prób igieł *J. communis* zebranych z prób ze stanowisk naturalnych oraz 5 prób szyszkogagód dostępnych na rynku zielarskim w Polsce (tabela 10, s. 69). Dla każdej z badanych prób przeprowadzono kolejno:

1. destylację olejku eterycznego z wodą,
2. HS SPME znad rozdrobnionego materiału (por. „Przebieg HS SPME”, s. 79),
3. HS SPME znad olejku z szyszkogagód – czysty olejek z szyszkogagód rozcieńczano 100x etanolem do objętości końcowej 2ml. W przypadku złoża PDMS nie dopuszcza się możliwości stosowania rozpuszczalników organicznych, stąd konieczność użycia alkoholu.

Procedurę postępowania w toku realizacji tego celu pracy przedstawiono na rysunku 15.

Wyniki surowe otrzymane w wyniku analiz porównawczych zawarto w tabelach 42 i 43 w “Suplemencie A” (s. 208 i 209).

RYSUNEK 15: Schemat postępowania eksperymentalnego w badaniach porównawczych profilu HS SPME i olejku eterycznego



4.9. Analiza różnicowania fitochemicznego badanych prób *J. communis* (cel pochodny 3)

Badanie różnicowania fitochemicznego w obrębie i pomiędzy populacjami przeprowadzono dla 76 prób igieł oraz 58 prób szyszkojagód *J. communis*. Pierwszym etapem badań była analiza względnej zawartości procentowej związków frakcji monoterpenowej na złożu o charakterze achiralnym (kolumna HP101). Etap ten umożliwił wstępną klasyfikację prób pod kątem zawartości głównych składników monoterpenowych i w efekcie doprowadził do wyodrębnienia tzw. ras chemicznych

(zwanymi też często w literaturze chemotypami) w badanej puli prób. Na podstawie wybranych kryteriów (por. tabela 22, s. 138) pulę badanych prób podzielono na 3 chemotypy. Z zaklasyfikowanych w ten sposób prób wyselekcjonowano 42 próby do dalszych analiz pod kątem zawartości izomerów optycznych poszczególnych związków monoterpenowych. Wybór tylko części prób do analizy chiralnej podyktowany był czasochłonnością analiz na złożu cyklodekstrynowym.

Zarówno w przypadku analiz na złożu achiralnym i chiralnym jako metodę pozyskiwania związków lotnych z igieł i szyszkojagód jałowca zastosowano metodę HS SPME GC. Wszystkie warunki były identyczne, jak opisane w rozdziale „Przebieg HS SPME” (s. 79).

Szczegółowe dane wyjściowe obejmujące względne zawartości procentowe poszczególnych związków monoterpenowych oznaczone na kolumnie HP101 znajdują się w rozdziale „Suplement A – Wyniki analiz chromatograficznych” w tabelach 44 i 45 (s. 210 i 214). Wyniki analiz uwzględniające zawartość izomerów optycznych badanych monoterpenów przedstawione są w tabeli 46 (s.217).

5. Metodyka analiz genetycznych

Uwzględniając zalety i wady markerów molekularnych najczęściej stosowanych w analizie genomów roślinnych (por. rozdział „Markery molekularne w badaniach roślin”, s. 43) autorka zdecydowała, że w przypadku określenia zróżnicowania w obrębie i pomiędzy badanymi nizinnymi populacjami *J. communis* (cel pochodny 4) zastosowana zostanie metoda RAPD (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*) PCR. Wypadkową realizacji celów pośrednich 3 i 4 była próba znalezienia korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi w drodze RAPD oraz HS SPME (a więc pomiędzy informacją fitochemiczną i genetyczną). W analizie RAPD wykorzystano 42 próby igieł, tych samych prób, które poddano analizie chromatograficznej na złożu chiralnym (por. tabela 10, s.69). Sposób postępowania z materiałem roślinnym opisano w części „Materiał roślinny: Próby do analizy genetycznej” (s. 67).

W przypadku analiz porównawczych mających na celu wyjaśnienie rangi systematycznej *J. communis* oraz *J. nana* jako marker molekularny wybrano niekodującą sekwencję łącznika *trnL-trnF* chloroplastowego DNA (cpDNA). Do realizacji tego celu rozprawy (cel pochodny 5) autorka wybrała 40 prób *J. communis* oraz *J. nana* (por. tabela 10, s.69).

Etapy izolacji, szacowania ilości i jakości całkowitego DNA genomowego po izolacji oraz rozdzielenia elektroforetycznego produktów amplifikacji PCR były identyczne w przypadku celu pochodnego 4 i 5, dlatego opis tych procedur dotyczy wszystkich analiz genetycznych przeprowadzonych dla prób jałowca.

5.1. Izolacja całkowitego DNA genomowego i ocena jego jakości i ilości

Izolacja całkowitego DNA genomowego

Wybór metody izolacji DNA genomowego z roślin jest nierozdzielnie związany ze specyfiką fitochemiczną badanego surowca roślinnego, czyli z zawartością w nim metabolitów, które mogą interferować z DNA i w następstwie uniemożliwiać jego skuteczną amplifikację czy klonowanie. Udowodniono między innymi, że polisacharydy mogą uniemożliwiać amplifikację wyizolowanego DNA poprzez blokowanie aktywności polimerazy *Taq*. Mogą one także ulegać koprecypitacji z DNA po dodaniu alkoholu w trakcie izolacji, tworząc roztwory o wysokiej lepkości i tym

samym uniemożliwiając zastosowanie takiej jakości DNA w hybrydyzacji typu Southern (Sharma i in., 2002). Polifenole i tanniny biorą udział w degradacji DNA poprzez wiązanie się do DNA po lizie ściany komórkowej (John, 1992). Duże znaczenie w przypadku izolacji DNA roślinnego ma także sposób przechowywania materiału po zbiorze. Większość dostępnych protokołów izolacji zaleca stosowanie świeżych tkanek (Sharma i in., 2002).

Liście szpilkowe *J. communis* są materiałem roślinnym, który przysparza wielu trudności w izolacji wysokiej jakości DNA genomowego. Wynika to ze specyfiki budowy tego materiału. Gruba warstwa wosków na powierzchni liścia szpilkowego oraz jego niewielka powierzchnia i zwarta budowa stwarza problem na etapie rozdrabniania w trakcie izolacji. Dodatkowym problemem jest zawartość niepożądanych, z punktu widzenia izolacji DNA, związków chemicznych – wosków oraz składników olejku eterycznego, które mogą wiązać się do DNA i skutecznie hamować reakcję amplifikacji. W prowadzonych badaniach przetestowano kilka metod izolacji całkowitego DNA z roślin: z PVP, który tworząc kompleksy z polifenolami uniemożliwia ich wiązanie się do DNA (Kim i in., 1997), z CTAB (Doyle i Doyle, 1987) według zmodyfikowanego protokołu opisanego przez Dobrzańską (Dobrzańska, 1995) oraz z zastosowaniem komercyjnych zestawów do izolacji DNA – Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) oraz DNA Genomic Mini AX Plant (A&A Biotechnology, Polska). Pomimo, iż metoda z PVP jest zalecana do izolacji DNA genomowego z roślin reprezentujących rodziny *Pinaceae* oraz *Cupressaceae*, w przypadku badanych prób *J. communis* nie przyniosła satysfakcjonujących rezultatów jakościowych i ilościowych. Reszta stosowanych technik izolacji dawała dobre rezultaty, więc szacując stosunek czasochłonności i kosztów procedury izolacji oraz jakości i ilości otrzymanego DNA genomowego zdecydowano, że w w badaniach zastosowany zostanie komercyjny zestaw DNA Genomic Mini AX Plant nr kat. 050-60 (A&A Biotechnology, Polska). Procedurę izolacji przeprowadzono według instrukcji załączonej przez producenta poprzedzoną następującymi etapami:

1. Liście szpilkowe w liczbie 3-4 (~20-30mg) umieszczono w 1,5ml probówce typu Eppendorf i rozdrobniono przy pomocy plastikowej szpatułki (Eppendorf, Niemcy). W trakcie rozcierania próbki zamrażano poprzez zanurzenie na kilka sekund w ciekłym azocie, aby nie dopuścić do rozmrożenia rozartego materiału.

2. Po osiągnięciu odpowiedniego stanu rozdrobnienia (brak obecności fragmentów liścia) roztarty materiał natychmiast zawieszano w 900 μ l zawiesiny lizującej i dodawano 20 μ l roztwory proteazy.
3. Dalsze postępowanie przebiegało zgodnie z załączoną przez producenta instrukcją do zestawu (A&A Biotechnology, Polska) z dodatkowym, traktowanym przez producenta opcjonalnie, usuwaniem RNA poprzez dodanie RNAzy. Pełna instrukcja protokołu izolacji z zastosowaniem zestawu DNA Genomic Mini AX Plant znajduje się w Bibliotece Katedry i Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej AMG.
4. Osad wysuszonego w wirówce próżniowej DNA zawieszano w 60 μ l buforu TE i inkubowano w 65°C przez około 60 minut.

Ilościowa i jakościowa ocena wyizolowanego DNA genomowego

Do oznaczeń ilości i jakości DNA przygotowano dziesięciokrotne rozcieńczenie prób DNA genomowego. Pomiarów dokonywano w spektrofotometrze UV-Vis Lambda 40 (Perkin Elmer, USA) w specjalnej kuwecie kwarcowej o objętości 100 μ l i długości drogi optycznej 1cm w obecności próby referencyjnej (kuweta kwarcowa wypełniona buforem TE). Pomiaru ilościowego DNA dokonywano przy długości fali 260nm (maksimum absorbancji dsDNA), a pomiaru jakościowego przy długości fali 280nm (maksimum absorbancji białek) w analogicznych warunkach. Przeprowadzono korekcję tła w 320nm. Pomiar taki koryguje pomiary w sytuacji, gdy w badanej próbce znajdują się zawieszane cząstki rozpraszające wiązkę światła. Wszystkie pomiary wykonano przy szerokości szczeliny monochromatora 2nm przez 2s. Przy szacunku ilości DNA w roztworach skorzystano z założenia, że OD=1 odpowiada stężeniu 50 μ g/ml dsDNA. Jakość (czystość lub też stopień zanieczyszczenia białkami) otrzymanego DNA określano ilorazem wartości współczynnika gęstości optycznej przy długościach fali 260 i 280nm – OD_{260/280}. W większości źródeł za czyste uznaje się próby o wartości OD_{260/280} powyżej 1,6 - 1,7. W przypadku części badanych prób pomimo kilkukrotnych powtórzeń procesu izolacji współczynnik OD_{260/280} nie osiągnął wartości wyższych niż 1,4. Jak już wspomniano wcześniej izolacja DNA genomowego ze szpilek jałowca następuje wielu problemów, co prawdopodobnie można tłumaczyć wysoką zawartością składników o charakterze wosków oraz związków terpenowych. W przypadku wszystkich wyizolowanych prób przeprowadzono test wydajności reakcji

PCR, który miał ca celu sprawdzenie obecności inhibitorów reakcji. Dla wszystkich wyizolowanych prób DNA jałowcowego przeprowadzono PCR z uniwersalnymi primerami E i F dla sekwencji *trnL-trnF* cpDNA (Taberlet i in., 1991) (por. tabela 19, s. 112). Słaba wydajność amplifikacji lub całkowity brak produktu amplifikacji świadczył o obecności inhibitorów lub degradacji wyizolowanego DNA i skutkował koniecznością powtórzenia izolacji. Jednak nawet w przypadku prób o $OD_{260/280}$ poniżej 1,6 amplifikacje przyniosły pozytywne rezultaty. Jedyna obserwacja jaką poczyniono w przypadku prób o niskich wartościach $OD_{260/280}$ to fakt, że w trakcie przechowywania roztworu wyjściowego do reakcji o stężeniu 20ng/ μ l w -4°C wydajność amplifikacji spadała szybciej w toku przechowywania niż dla prób z wartością $OD_{260/280}$ powyżej 1,6-1,7.

5.2. Amplifikacja DNA

Zarówno w przypadku amplifikacji PCR sekwencji *trnL-trnF*, jak i RAPD PCR mieszaninę reakcyjną przygotowano w komorze laminarnej i rozdzielano do jednorazowych probówek reakcyjnych o objętości 0,2ml (Eppendorf, Niemcy). DNA matrycowe dodawano tuż przed rozpoczęciem reakcji PCR w schłodzonym do 4°C bloku termocyklera. Każdorazowo, równoległe z badanymi próbami, prowadzono kontrole negatywne, zawierające wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej poza matrycowym DNA.

5.3. Elektroforeza produktów amplifikacji PCR oraz archiwizacja danych

Rozdziału produktów amplifikacji PCR dokonywano w żelach agarozowych w 0,5x stężonym buforze TBE, nie przekraczając napięcia 5V/cm. Zarówno w przypadku produktów RAPD PCR, jak i w przypadku rozdziału sekwencji *trnL-trnF* zadowalającą rozdzielczość dały rozdziały w żelu o stężeniu agarozy 1,5%. Nanoszoną do studzienki żelu mieszaninę poreakcyjną obciążano buforem z gliceryną lub z sacharozą oraz błękitem bromofenolowym. Detekcję produktów przeprowadzano z bromkiem etydy (EtBr) poprzez 20 minutowe barwienie żelu w wodnym roztworze EtBr (0,5 μ g/ml) i odbarwienie 30 minut w wodzie destylowanej (w celu redukcji tła).

Po barwieniu żełe wizualizowano z zastosowaniem transiluminatora i dokumentowano z użyciem systemu do cyfrowej dokumentacji zdjęć wyposażonego w kamerę ze sprzętową integracją obrazu (tzw. integracja on-chip) (4910 series, COHU,

USA). W przypadku produktów RAPD prążki zliczano za pomocą oprogramowania UVImap v. 99 (UVItec, Wielka Brytania). Prążki RAPD zliczane były z zastosowaniem tych samych parametrów: szerokości prążka, intensywności w skali szarości oraz wrażliwości. Dokonano także korekcji migracji na podstawie ścieżek markera, który nanoszono do żelu agarozowego co 6 studzienek zawierających produkty amplifikacji DNA badanych prób (pomiędzy poszczególnymi ścieżkami istniały odchylenia spowodowane nierównomierną migracją fragmentów DNA w brzeźnych i środkowych studzienkach żelu). Wyniki zestawiano w pogrupowanych tabelach (ang. *classified order*) według kryterium długości fragmentów w odniesieniu do markera. Takie podejście polega na zestawianiu (zrównywaniu) produktów z poszczególnych ścieżek względem siebie. Innymi słowy prążki tej samej długości zestawiane są na tym samym poziomie tabeli z założeniem 5% błędu wynikającego z nierównomiernej migracji produktów w żelu. Tak skonstruowane tabele konwertowano następnie do macierzy binarnej, która poddawana była dalszej analizie.

5.4. Analiza całkowitego DNA genomowego metodą RAPD-PCR (cel pochodny 4)

Przed przystąpieniem do właściwych analiz RAPD PCR przetestowano 30 starterów RAPD, z których 14 (sekwencje zebrane zostały w tabeli 11, s. 77) dawało stosunkowo dużą ilość produktów po amplifikacji przy jednoczesnej niewielkiej ilości produktów niespecyficznych. Finalnie zoptymalizowano warunki dla 9 primerów (zaznaczonych w tabeli 11 pogrubioną czcionką), które zastosowano do analizy 42 prób jałowca pospolitego.

Stężenie DNA genomowego, polimerazy *Taq* oraz primera

Stężenie DNA matrycowego stosowanego w reakcji RAPD PCR w pracach oryginalnych waha się w granicach 1 – 50 ng matrycy na 25µl całkowitej objętości mieszaniny reakcyjnej. Bassam i Bentley w przypadku większych genomów zalecają stosowanie 1ng/µl DNA matrycowego podkreślając jednocześnie duże znaczenie jakości matrycy po izolacji, która może być potencjalnie zanieczyszczona inhibitorami polimerazy *Taq* (Bassam i Bentley, 1994). W innych pracach zaobserwowano zanikanie niektórych produktów amplifikacji w stężeniach wyższych niż 0,8ng/µl i niższych niż 0,004ng/µl (Bowditch i in., 1993). Khandka i in. obserwowali stopniowy spadek ilości produktów amplifikacji wraz ze wzrostem stężenia matrycowego DNA (13-400ng DNA na reakcję), przy jednoczesnej zmianie ilości polimerazy DNA.

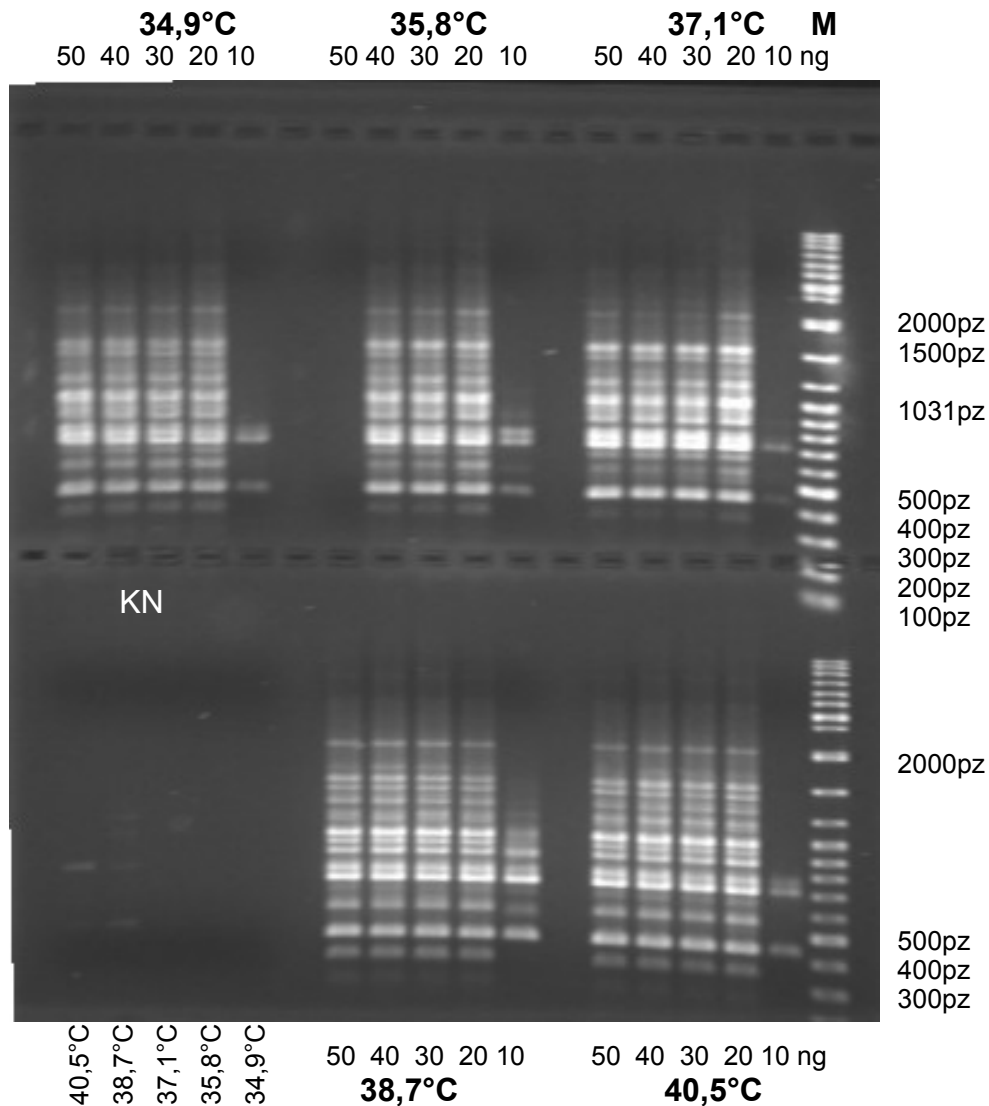
Wyższe stężenia polimerazy *Taq* przy wysokich stężeniach DNA (100ng) częściowo kompensowały efekt zanikania niektórych produktów RAPD. Spostrzeżenie to sugeruje istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stosunkiem matryca DNA/polimeraza *Taq* a liczbą produktów amplifikacji (Khandka i in., 1997). Ponadto istotnym czynnikiem jest częściowa degradacja DNA matrycowego (Bassam i Bentley, 1994), choć Khandka i in. otrzymali ciekawe wyniki eksperymentów amplifikacji zdegradowanego DNA. DNA w ich badaniach było degradowane mechanicznie przez sonikację oraz enzymatycznie poprzez cięcie endonukleazami restrykcyjnymi *BamHI* i *HindIII*. Mechaniczna degradacja powodowała redukcję intensywności produktów amplifikacji (porównywaną do tego samego DNA niezdegradowanego), ale nie miała wpływu na obecność tych produktów, podczas gdy enzymatyczne cięcie DNA zdecydowanie zmieniało profil prążków DNA w żelu (zanikanie niektórych produktów i pojawianie się nowych). Zjawisko zmiany intensywności prążków w przypadku mechanicznych uszkodzeń matrycy można tłumaczyć brakiem specyficzności tych uszkodzeń oraz różnym stopniem i miejscem uszkodzeń różnych kopii DNA. Autorzy sugerują, że RAPD toleruje zatem niewielkie mechaniczne uszkodzenia matrycy (Khandka i in., 1997).

Ilość polimerazy *Taq* zwykle waha się w granicach od 0,5 do 2,5u na reakcję (25 μ l) (Penner i in., 1993). Innym istotnym parametrem nierozdzielnie związanym z ilością matrycy i polimerazy *Taq* jest stężenie startera RAPD. W pracach oryginalnych przedział stężenia tego składnika mieszaniny mieści się od 0,1 do 1,6 μ M, przy czym najczęściej jest to 0,2-0,4 μ M. Obserwowano ujemną korelację pomiędzy stężeniem primera i wielkością produktów amplifikacji – przy stężeniach 0,1; 0,2 i 0,4 μ M amplifikacji ulegają dłuższe fragmenty DNA, podczas gdy w stężeniach wyższych rzędu 0,8 i 1,6 μ M preferencyjnie amplifikowane są krótsze fragmenty DNA (Khandka i in., 1997). Podobne wyniki uzyskał zespół MacPherson i in. - większe stężenia powodowały zwiększoną syntezę niewielkich produktów, ale nie miały znaczącego wpływu na powstawanie głównych produktów obserwowanych przy niższych stężeniach (MacPherson i in., 1993).

Przy optymalizacji warunków RAPD PCR należy pamiętać, że wszystkie omówione powyżej czynniki – stężenie startera RAPD, ilość matrycy DNA oraz polimerazy DNA są ze sobą nierozdzielnie związane. Stechiometria oddziaływań primer-matryca-enzym ma bezpośrednie przełożenie na profil amplifikacji.

W badaniach *J. communis* optymalizacji poddano stężenie DNA matrycowego. Zastosowano stężenie robocze primera na poziomie 0,8 μ M, ustalone wcześniej przez autorkę w trakcie realizacji pracy magisterskiej (Filipowicz, 2001) oraz ilość polimerazy *Taq* 1u na 25 μ l ustaloną na podstawie uśrednienia danych innych badaczy. W eksperymencie mającym na celu dobór stężenia matrycy zastosowano losowo primer RW02 oraz DNA z próby BO2. Ponieważ temperatura przyłączania startera (ang. *annealing*) była optymalizowana dla każdego startera indywidualnie (omówienie w rozdziale „Profil temperaturowy RAPD PCR” (s. 107) przy doborze stężenia DNA zastosowano program z gradientem temperatur *annealing*'u. Wyniki tego eksperymentu przedstawiono na rysunku 16.

RYSUNEK 16: Optymalizacja stężenia DNA matrycowego w różnych temperaturach annealingu



Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA matrycowego próby BO2 w zakresie 10-50ng DNA na probówkę z primerem RW02 w różnych temperaturach annealingu (35-40°C), M oznacza ścieżkę markera DNA., KN – kontrolę ujemną. Warunki reakcji: 2,5xstężony bufor reakcyjny z (NH₄)₂SO₄, 2mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 0,8μM startera RAPD, 1u polimerazy na 25μl końcowej objętości mieszaniny reakcyjnej. Warunki termiczne reakcji: wstępna denaturacja 94°C, 3min, denaturacja 94°C, 1min, annealing T w gradiencie 35-40°C, 2min, elongacja 72°C, 2min przez 40 cykli, końcowa elongacja 72°C, 7min.

Porównując wyniki amplifikacji we wszystkich pięciu temperaturach przyłączenia startera wyraźnie widać, że 10ng DNA genomowego *J. communis* daje bardzo niewyraźny profil prążków w żelu agarozowym. Kolejne ścieżki (20-50ng DNA na reakcję) dają wyraźny profil produktów RAPD PCR porównywalny w przypadku wszystkich ilości matrycy. Z tego względu do dalszych analiz RAPD wybrano najmniejszą ilość matrycy – 20ng/25μl mieszaniny reakcyjnej mając na uwadze duże

prawdopodobieństwo występowania w roztworze DNA składników roślinnych o charakterze wosków, polifenoli i terpenów, które w przypadku większych ilości roztworu DNA mogłyby hamować reakcję amplifikacji.

Stężenie jonów Mg^{2+} i nukleotydów

Stężenie jonów Mg^{2+} (zazwyczaj wprowadzanych do mieszaniny reakcyjnej w postaci $MgCl_2$) w mieszaninie RAPD ma wpływ zarówno na ilościowe, jak i jakościowe zmiany w profilu amplifikacyjnym (Park i Kohel, 1994). Zwykle testowane są stężenia w zakresie 1,5-6mM (Park i Kohel, 1994, Khandka i in., 1997, Fraga i in., 2005). Park i Kohel zauważają, że przy doborze stężenia jonów Mg^{2+} większa liczba produktów nie oznacza wcale warunków optymalnych, gdyż ich wysokie stężenia mogą skutkować powstawaniem pseudopolimorficznego DNA. Powyżej 5mM widoczny jest także "smear" DNA. Spowodowane jest to przyłączaniem startera do nie w pełni komplementarnej sekwencji matrycowego DNA (Park i Kohel, 1994). Bassam i Bentley postulują koncepcję okna powtarzalności (ang. *reproducibility window*), która zakłada ustalenie zakresu wartości dla każdego składnika mieszaniny (także $MgCl_2$), z założeniem, że wartość środkowa tego zakresu daje powtarzalne rezultaty amplifikacji – w przypadku $MgCl_2$ to 4-6mM (Bassam i Bentley, 1994). Najczęściej optimum stężenia tej soli w mieszaninie PCR mieści się w granicach 1,5-4mM (Khandka i in., 1997, Ellsworth i in., 1993, Park i Kohel, 1994).

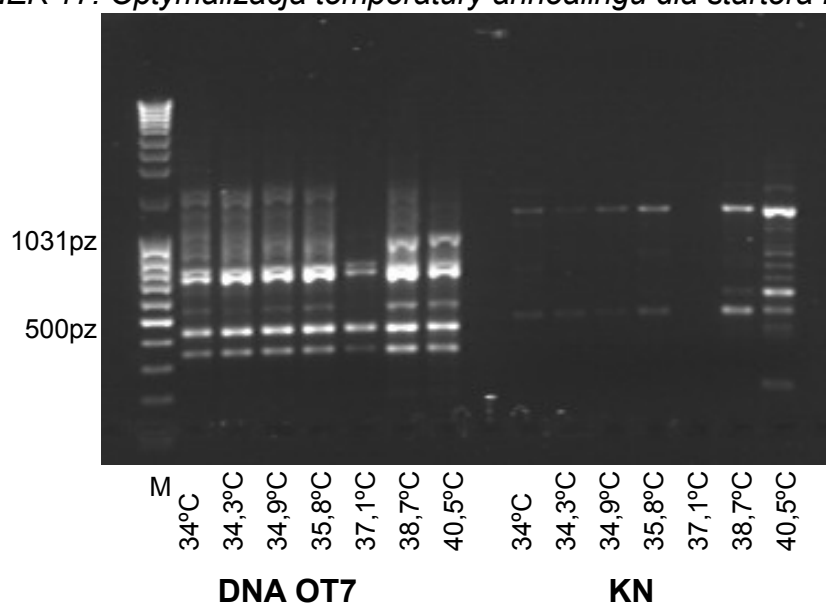
W pracy przetestowano 5 stężeń $MgCl_2$ 1; 1,5; 2; 2,5 oraz 3mM, z dwoma próbkami DNA – ZG1 i BO2 (20ng/reakcję) i primerem RW02. Analiza produktów w przeprowadzonych kontrolach negatywnych i pozytywnych pod kątem powstawania produktów niespecyficznych wykazała, że najbardziej zadowalający efekt amplifikacji uzyskano przy 2mM. Kilukrotne powtórzenie RAPD PCR wykazało też powtarzalność procesu przy tych parametrach.

Stężenie nukleotydów (dNTP) stosowanych w RAPD PCR zwykle utrzymywane jest na poziomie 100-200 μ M każdego z czterech nukleotydów (McEwan i in., 1998, Khandka i in., 1997, Park i Kohel, 1994, Bassam i Bentley, 1994). We wszystkich przeprowadzonych eksperymentach zastosowano stężenie 200 μ M dATP, dCTP, dGTP i dTTP.

Profil temperaturowy RAPD PCR

Profil temperaturowy reakcji PCR ustalono na podstawie dostępnych publikacji oraz wcześniej otrzymanych wyników własnych autorki (Filipowicz, 2001). Jako kluczowy parametr, który poddawano każdorazowej optymalizacji dla poszczególnych starterów potraktowano temperaturę przyłączania startera. W początkowej fazie badań próbowano zastosować tą samą temperaturę dla wszystkich primerów, ale podejście to nie przyniosło satysfakcjonujących rezultatów. W przypadku niektórych starterów w kontrolach negatywnych pojawiały się produkty niespecyficzne, co obserwowano wcześniej w innych pracach, sugerując, że obecność takich produktów związana jest ze specyfiką startera, a nie z obecnością w nim obcego DNA (Pan i in., 1997). Dążąc do zminimalizowania niespecyficznych amplifikacji temperaturę aneling'u optymalizowano indywidualnie dla każdego primera poprzez amplifikację gradientową. Przykładowy elektroforogram przedstawiono na rysunku 17.

RYSUNEK 17: Optymalizacja temperatury anealingu dla startera RW02



Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA matrycowego próby OT7 z primerem RW02 w różnych temperaturach anealingu (34-40,5°C), M oznacza ścieżkę markera DNA., KN – kontrolę negatywną. Warunki reakcji: 2,5xstężony bufor reakcyjny z (NH₄)₂SO₄, 2mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 0,8μM startera RAPD, 1u polimerazy na 25μl końcowej objętości mieszaniny reakcyjnej. Warunki termiczne reakcji: wstępna denaturacja 94°C, 3min, denaturacja 94°C, 1min, anealing T w gradiencie 34-40,5°C, 2min, elongacja 72°C, 2min przez 40 cykli, końcowa elongacja 72°C, 7min.

Zestawienie starterów RAPD oraz temperatur ich przyłączania w trakcie amplifikacji PCR przedstawiono w tabeli 17.

TABELA 17: Startery RAPD użyte w analizie *J. communis* oraz optymalna temperatura ich przyłączania.

Nazwa primera	Sekwencja	Optymalna temperatura annealingu
Roth N-03	5'-GGTACTCCCC-3'	42°C
Roth N-05	5'-ACTGAACGCC-3'	42°C
Roth N-12	5'-CACAGACACC-3'	42°C
Roth N-13	5'-AGCGTCACTC-3'	42°C
RB-04	5'-GGACTIONGGAGT-3'	35°C
RO-04	5'-AAGTCCGCTC-3'	39°C
RW02	5'-ACCCCGCCAA-3'	37°C
RZ-08	5'-GGGTGGGTAA-3'	35°C
RZ-11	5'-CTCAGTCGCA-3'	39°C

Warunki RAPD PCR

Ostatecznie ustalone eksperymentalnie warunki prowadzenia analiz metodą RAPD PCR przedstawiono w tabeli 18.

TABELA 18: Parametry chemiczne i termiczne reakcji RAPD PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej		Warunki termiczne	
H ₂ O	15,8µl		
Bufor reakcyjny z (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5x (2,5µl)	Wstępna denaturacja 94°C, 3min	
MgCl ₂	2mM (2µl)	Denaturacja 94°C, 1min	
dNTPs	0,2mM (2,5µl)	Przyłączanie starterów 35-42°C, 2min	40x
starter RAPD	0,8µM (1µl)	Elongacja 72°C, 2min	
polimeraza <i>Taq</i>	1u (0,2µl)	Końcowa elongacja 72°C, 7min	
matrycowe DNA	20ng (1µl)		
Objętość końcowa	25µl		

Analiza danych RAPD PCR

Produkty RAPD PCR po rozdziale na żelu agarozowym analizowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Elektroforeza produktów amplifikacji PCR oraz archiwizacja danych,,, s. 101. Powstałe w efekcie macierze binarne poddano dalszej analizie. W pakiecie RAPDistance konwertowano je do macierzy dystansów genetycznych po uprzednim wybraniu algorytmu w teście PTP (ang. *Permutation Tail Probability*). Na podstawie macierzy dystansów wykreślono dendrogramy metodą

neighbour joining oraz UPGMA (ang. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Bardziej szczegółowy opis znajduje się w rozdziale „Konstrukcja wykresów drzewiastych,,, s. 164.

5.5. Zestawienie wyników analizy genetycznej i fitochemicznej

Pochodną celów 3 i 4, dla których metodykę opisano powyżej, była próba odpowiedzi na pytanie, czy istnieje zależność pomiędzy profilem fitochemicznym a genetycznym badanych prób *J. communis*. Profil fitochemiczny w ujęciu niniejszej pracy rozumiany jest jako wartości względnych zawartości procentowych poszczególnych monoterpenu i ich form enancjomerycznych. Profil genetyczny w postaci genetycznego odcisku palca otrzymano w wyniku RAPD. Zestawienie obu profili przeprowadzono dla 42 prób (por. tabela 10, s. 69). Jako metodę klasyfikacji prób do określonej rasy chemicznej na podstawie wyników RAPD zastosowano sztuczne sieci neuronowe (ang. *ANN - Artificial Neural Networks*). Istotę działania ANN przedstawiono krótko poniżej.

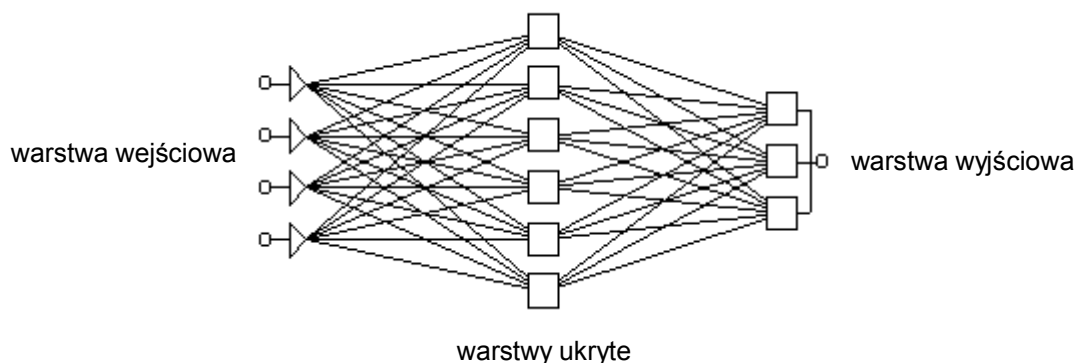
Istota działania sieci neuronowych

Sieci neuronowe naśladują działanie umysłu, są jednak one oparte na jego bardzo prostym modelu, przedstawiającym najbardziej podstawową istotę działania systemu nerwowego. Najważniejszą cechą sieci neuronowych jest ich automatyczne uczenie na podanych przykładach. Użytkownik sieci gromadzi reprezentatywne dane pokazujące, jak rozkłada się interesująca go zależność, a następnie uruchamia *algorytm uczenia*, który ma na celu automatyczne wytworzenie w pamięci sieci potrzebnej struktury danych. Następnie opierając się na tej wiedzy (tj. strukturze danych) sieć realizuje wszystkie funkcje związane z eksploatacją utworzonego modelu. Użytkownik potrzebuje empirycznej wiedzy dotyczącej sposobu wyboru i przygotowania danych stanowiących przykłady, a także wyboru właściwego rodzaju sieci neuronowej. Poziom wymaganej od użytkownika wiedzy teoretycznej, niezbędnej do skutecznego opracowania modelu, przy stosowaniu sieci neuronowych jest znacznie niższy niż w przypadku stosowania tradycyjnych metod statystycznych.

Typową architekturę sieci neuronowej przedstawia rysunek 18. Każda z warstw sieci spełnia określone zadanie. Warstwa wejściowa służy do wprowadzania do sieci

wartości zmiennych wejściowych. Warstwy ukryte przetwarzają sygnały, zaś warstwa wyjściowa wyznacza rozwiązanie końcowe, będące rezultatem pracy całej sieci (StatSoft, 2006).

RYSUNEK 18: Architektura sztucznej sieci neuronowej (StatSoft, 2006)



Najczęstszą metodą wykorzystywaną do nauczenia sieci prawidłowej reakcji jest metoda wstecznej propagacji błędów (ang. *Back-Propagation*). Metodzie tej dane wejściowe dzieli się losowo na 3 podzbiory: uczący, walidacyjny oraz testowy. Zbiór uczący używany jest do nauczenia sieci reakcji na bodźce, czyli stopniowej zmiany wag neuronów, a zbiór walidacyjny służy do każdorazowego sprawdzenia poprawności odpowiedzi sieci. Jednorazowe uczenie i walidacja nosi nazwę epoki (ang. *epoch*). Zbiory uczące i walidacyjne używane są wielokrotnie do momentu, gdy błąd walidacji spadnie poniżej zadanego progu lub, gdy przekroczona zostanie liczba zadanych powtórzeń. Po nauczeniu sieci, czyli w momencie gdy błąd walidacji osiągnie założony poziom, badana jest odpowiedź sieci dla elementu zbioru testowego.

W niniejszej pracy wykorzystano pakiet *Statistica 7.0* (StatSoft). Posiada on szerokie możliwości zastosowania do budowy sztucznych sieci neuronowych, umożliwia korzystanie z kilku podstawowych rodzajów sieci i automatyczne badania architektur sieci neuronowych ze zbioru modeli obsługiwanych przez program. Dzięki automatycznemu badaniu topologii sieci możliwe jest „empiryczne” przebadanie wielu topologii pod kątem przydatności dla potrzeb klasyfikacji zadanego typu danych. Po uruchomieniu tego eksperymentu można zorientować się jaki rodzaj sieci najlepiej odpowiada potrzebom i przygotować wstępną architekturę sieci.

5.6. Analiza pokrewieństwa systematycznego *J. communis* i *J. nana* (cel pochodny 5)

W analizie pokrewieństwa genetycznego *J. communis* i *J. nana* zastosowano uniwersalne startery dla sekwencji niekodującej cpDNA. Markery molekularne oparte na cpDNA zaczęto stosować z na poziomie gatunku w latach 90. Wcześniej, podobnie jak markery RFLP, sekwencje cpDNA ze względu na wolne tempo ewolucji używane były głównie na wyższych poziomach taksonomicznych. Udowodniono jednak, że niekodujące fragmenty cpDNA wykazują większą częstotliwość mutacji (Taberlet *i in.*, 1991). Zespół Taberlet *i in.* opracował uniwersalne startery w rejonach konserwowanych genetycznie flankujących rejony o większym tempie ewolucji, między innymi, fragment łącznikowy pomiędzy eksonem *trnL* (UAA) i genem *trnF* (GAA). Autorzy postulują zastosowanie tej sekwencji w badaniach ewolucyjnych spokrewnionych gatunków, jak i również badaniach populacyjnych w obrębie gatunku. W przypadku niejasnej rangi systematycznej *J. nana* (różne podejścia do przynależności taksonomicznej *J. nana* przedstawiono w rozdziale „Przynależność systematyczna *J. communis* L. i *J. nana* Willd.„, s. 15) marker *trnL-trnF* mógłby dać odpowiedź na pytanie, czy *J. nana* i *J. communis* są taksonami spokrewnionymi w bliskim czy dalekim stopniu i czy bytowanie w skrajnie różnych warunkach przekłada się na różnice w sekwencji tego markera.

Do badań porównawczych zebrano 16 prób tatrzańskich jałowca (w znaczącej przewadze były to próby jednoznacznie zaklasyfikowane pod względem cech morfologicznych jako *J. nana*) oraz 24 próby jałowca pospolitego zebranego w rejonie Trójmiasta. Analizę z zastosowaniem opisanego powyżej markera cpDNA poprzedziła analiza chromatograficzna na złożu achiralnym i chiralnym olejków otrzymanych metodą destylacji z wodą. Analiz olejków na złożu achiralnym dokonano w warunkach opisanych w rozdziale „Warunki analiz chromatograficznych” (s. 80), natomiast analizy na złożu chiralnym wykonane zostały we współpracy z dr inż. Moniką Asztemborską z Instytutu Chemii Fizycznej PAN w Warszawie na kolumnie Beta-Dex (Supelco, USA) 30m x 0,25mm ID w izotermie 70°C, gazem nośnym był Ar 100kPa, T_{inj} 200°C, T_{det} 250°C.

Optymalizacja warunków amplifikacji sekwencji łącznika *trnL-trnF*

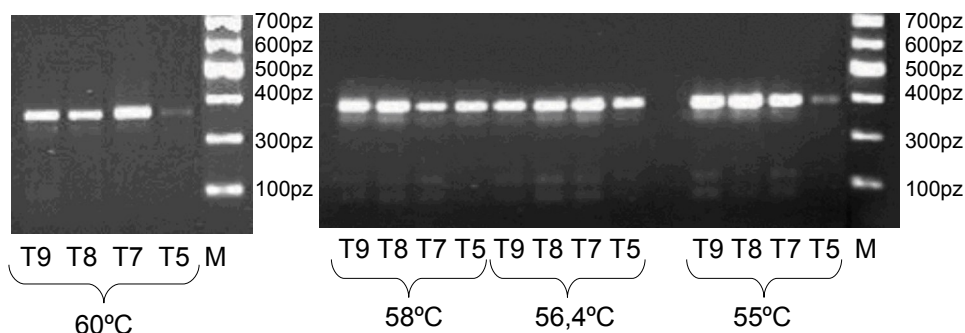
Amplifikację niekodującej sekwencji łącznika *trnL-trnF* przeprowadzono dla wszystkich wyizolowanych prób jałowca pospolitego i halnego jako test wydajności reakcji PCR. W tym wypadku stosowano standardowe warunki PCR oraz skład mieszaniny reakcyjnej zalecane przez Taberlet i in. (Taberlet i in., 1991), przedstawione poniżej w tabeli 19.

TABELA 19: Parametry chemiczne i termiczne reakcji PCR z primerami E i F dla sekwencji cpDNA *trnL-trnF* stosowane dla testu wydajności reakcji PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej (stężenie robocze oraz objętość stosowanego odczynnika)		Warunki termiczne	
H ₂ O	12,5μl		
Bufor reakcyjny z (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5x (2,5μl)	Wstępna denaturacja 94°C, 3min	
MgCl ₂	2mM (2μl)	Denaturacja 94°C, 1min	
dNTPs	0,2mM (2,5μl)	Przyłączanie starterów 55°C, 1min	29x
primer E	0,4μM (1μl)	Elongacja 72°C, 3min	
primer F	0,4μM (1μl)	Końcowa elongacja 72°C, 7min	
polimeraza <i>Taq</i>	1u		
matrycowe DNA	10ng (1μl)		
Objętość końcowa	25μl		

W celu uniknięcia powstawania produktów niespecyficznych w próbach do sekwencjonowania zoptymalizowano kluczowe parametry reakcji PCR – temperaturę przyłączania primerów (ang. *annealingu*), stężenie MgCl₂, primerów oraz liczbę cykli. Do ich optymalizacji wybrano losowo 4 próby: T5, T7, T8 oraz T9. Na rysunku 19 przedstawiono wyniki rozdziału produktów amplifikacji z primerami E i F przeprowadzonej w programie z gradientem temperatur *annealingu*. W temperaturze *annealingu* wynoszącej 60°C uzyskano zadowalające efekty w odniesieniu do braku produktów niespecyficznych PCR, a więc tę temperaturę stosowano w dalszych doświadczeniach.

RYSUNEK 19: Amplifikacja sekwencji *trnL-trnF* *J. nana* w różnych temperaturach przyłączenia startera



Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego z czterema losowymi próbkami *J. nana* (T5, T7, T8, T9) w warunkach reakcji przedstawionych w tabeli 20 i w gradiencie temperatur annealingu od 55 do 60°C, M – oznacza ścieżkę markera – drabinki DNA

Finalny skład mieszaniny i warunki reakcji PCR poprzedzającej reakcję sekwencjonowania przedstawiono w tabeli 20.

TABELA 20: Parametry chemiczne i termiczne reakcji PCR z primerami E i F dla sekwencji cpDNA *trnL-trnF* poprzedzającej sekwencjonowanie

Skład mieszaniny reakcyjnej		Warunki termiczne	
H ₂ O	14μl		
Bufor reakcyjny z (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5x (2,5μl)	Wstępna denaturacja 94°C, 3min	
MgCl ₂	1,5mM (2μl)	Denaturacja 94°C, 1min	
dNTPs	0,2mM (2,5μl)	Przyłączenie starterów 60°C, 1min	27x
primer E	0,2μM (1μl)	Elongacja 72°C, 3min	
primer F	0,2μM (1μl)	Końcowa elongacja 72°C, 7min	
polimeraza <i>Taq</i>	1u		
matrycowe DNA	10ng (1μl)		
Objętość końcowa	25μl		

Przygotowanie matrycy DNA do sekwencjonowania

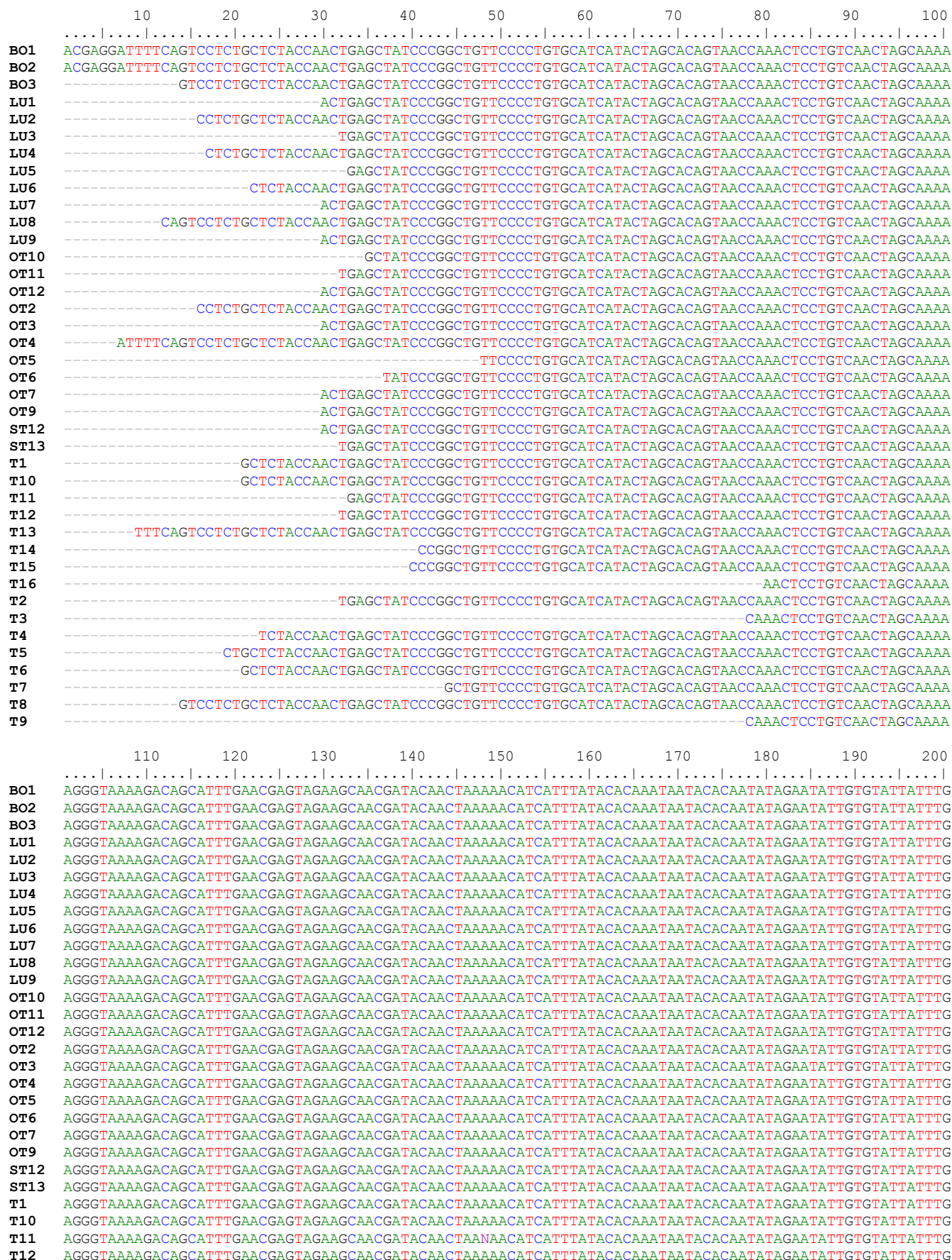
Aby uzyskać większą ilość matrycy do sekwencjonowania w postaci amplifikowanej sekwencji cpDNA *trnL-trnF* przeprowadzono reakcję PCR w wielokrotnionej objętości (patrz tabela 20) - podwójnej (50μl) dla prób ze stosunkowo wysoką zawartością wyizolowanego DNA oraz poczwórnej (100μl) dla prób zawierających małe ilości DNA. Uzyskane produkty amplifikacji oczyszczano stosując zestaw do czyszczenia DNA po reakcjach enzymatycznych Clean-up nr kat. 021-50

(A&A Biotechnology, Polska). W końcowym etapie oczyszczania DNA wymywano z kolumny jałową wodą dejonizowaną. Ilość matrycy do sekwencjonowania określono szacunkowo w 1,5% żelu agarozowym poprzez porównanie intensywności badanego produktu (~350 par zasad) z fragmentami markera masowego DNA (Mass Ruler DNA Ladder, nr kat. SM0383, MBI Fermentas, Litwa). Szacunkowe stężenie produktu PCR po czyszczeniu wynosiło od 13 do 30 ng/μl.

Sekwencjonowanie produktów amplifikacji

Sekwencjonowanie metodą z fluorescencyjnie znakowanymi terminatorami reakcji (metoda Sangera) oraz odczyt sekwencji zostały zlecone i wykonane w MacroGen Inc., w Korei Południowej (www.macrogen.com). Zastosowano odczynniki "ABI Prism Big Dye Terminator" (Applied Biosystems, USA) oraz sekwenatory ABI 3700 oraz ABI3730XL. Otrzymane wyniki obydwu komplementarnych nici DNA (starter E oraz F) w postaci plików z rozszerzeniem "abi" zestawiano w *contig* za zastosowaniem oprogramowania Phred/Phrap/Consed (Gordon i in., 1998; Ewing i in., 1998). Średnia długość prawidłowego odczytu sekwencji wynosiła 300 zasad. Sekwencje zestawiano (ang. *alignment*) porównywno w programie BioEdit (Hall, 1999). Wszystkie zostały zarejestrowane i zdeponowane w GenBanku (NCBI accession numbers DQ017710 – DQ017749). Zestawienie badanych sekwencji przedstawiono na rysunku 20.

RYSUNEK 20: Zestawienie sekwencji (ang. sequence alignment) niekodującego łącznika cpDNA trnL-trnF




```
OT6 AAATCGAAAAATAAACAGATAA -----
OT7 AA -----
OT9 AAAT -----
ST12 -----
ST13 AAATCGAAAAATAAACAGATAA -----
T1 AAATCGAAAAATAAACAGAT -----
T10 -----
T11 AAATCGAAAAATAAACCA -----
T12 AAATCGAAAAATAAACAGATAA -----
T13 AAATCGAAAAATAAACAGATAA CCTGGGGATAG
T14 AAATCGAAAAATAAACCA -----
T15 AA -----
T16 AAATCGAAAAATAAACCA -----
T2 AAA -----
T3 -----
T4 -----
T5 -----
T6 AAATCGAAAAATAAA -----
T7 AAATCGAAAAATAAACAGAT -----
T8 AAATCGAAAAATAAACAGATA -----
T9 -----
```

Różnice w długości sekwencji wynikają z długości uzyskanego odczytu wysokiej jakości, a nie z różnic w długości sekwencjonowanego fragmentu. Oznaczenia prób są zgodne z przedstawionymi w tabeli 10, s. 69).

V. WYNIKI I DYSKUSJA

Poniższa część pracy została skonstruowana w kolejności realizacji celów pośrednich, które sformułowano w rozdziale „Cel pracy”, s. 56. Dane wyjściowe (surowe) otrzymane w toku analiz chromatograficznych ze względu na dużą objętość przedstawiono w rozdziale „Suplement A – Wyniki analiz chromatograficznych”, s. 202. Poniżej w tabeli zestawiono kolejne cele pochodne pracy oraz odpowiadające im tabele z wynikami surowymi.

Cel*	Tabela w rozdziale „Suplement A – Wyniki analiz chromatograficznych”
Optymalizacja HS SPME pod kątem jej zastosowania w analizie związków monoterpenowych <i>J. communis</i> (cel pochodny 1)	tab. 41, s. 207
Badania porównawcze składu frakcji monoterpenowej olejku <i>J. communis</i> otrzymanego metodą destylacji z wodą oraz składników otrzymanych drogą HS SPME (cel pochodny 2)	tab. 42, s. 208
	tab. 43, s. 209
Analiza zróżnicowania fitochemicznego <i>Juniperus communis</i> (cel pochodny 3)	tab. 44, s. 210
	tab. 45, s. 214
	tab. 46, s. 217
Analiza pokrewieństwa systematycznego <i>J. communis</i> L. i <i>J. nana</i> Willd. (cel pochodny 5)	tab. 47, s. 219
	tab. 48, s. 221

*Kolejność celów jest zgodna z opisem zawartym w rozdziale „Cel pracy”, s. 56.

1. Optymalizacja HS SPME pod kątem jej zastosowania w analizie związków monoterpenowych *J. communis* (cel pochodny 1)

Etap optymalizacji warunków SPME nieprzypadkowo został przeprowadzony jako jeden z pierwszych w trakcie realizacji niniejszej pracy. Udowodniono, że ilość analitu zaabsorbowana na złożu SPME jest wypadkową dwóch stanów równowagi: matryca/faza nadpowierzchniowa (zależnego od lotności analitów oraz cech fizycznych matrycy) oraz faza nadpowierzchniowa/złoże SPME (związanego ze zjawiskiem dyfuzji analitów z fazy nadpowierzchniowej do złoża oraz ich interakcji ze złożem) (Zhang i Pawliszyn, 1993). Dlatego ważnym aspektem stosowania tej metody jest staranny dobór parametrów termicznych i czasu trwania jej etapów. Otrzymane w toku optymalizacji warunki analiz zostały zastosowane z powodzeniem w dalszych

doświadczeniach. W tabeli 41 (Suplement A, s. 207) zostało zawarte zestawienie zmiennych zależnych i niezależnych otrzymane dla poszczególnych strategii optymalizacji i układów doświadczalnych wg schematu Taguchi. Obliczone po integracji chromatogramów zmienne zależne (y) wykorzystano w dalszych obliczeniach w pakiecie *Statistica 7.0* (StatSoft). Poniżej przedstawiono wyniki optymalizacji Taguchi w zależności od przyjętych dwóch strategii.

1.1.Strategia podobieństwa profilu SPME do olejku eterycznego

Jak wspomniano w części metodycznej HS SPME zostało zastosowane jako stosunkowo nieskomplikowana i relatywnie niedroga metoda ekstrakcji, pozwalająca na szybkie zdiagnozowanie materiału roślinnego pod kątem zawartości głównych związków czynnych, w tym przypadku monoterpenów. W ten sposób HS SPME stało się alternatywą do długotrwałego procesu pozyskiwania olejku metodą destylacji z wodą. Optymalizując kluczowe parametry tego procesu jako jedno z założeń przyjęto podobieństwo profilu chromatograficznego olejku po destylacji z wodą do profilu chromatograficznego związków wyekstrahowanych w drodze HS SPME. W tym podejściu do procesu optymalizacji jako wartości mierzone (zmienne zależne) w optymalizacji Taguchi przyjęto wielkości będące miarą podobieństwa lub różnicowania chromatogramu po HS SPME i destylacji. Były to odpowiednio współczynnik korelacji oraz suma odchyłeń standardowych zawartości procentowych poszczególnych związków monoterpenowych (tabela 41, s. 207).

Współczynnik korelacji

Wyniki rozdziału chromatograficznego w postaci względnych zawartości procentowych związków z grupy monoterpenów dla poszczególnych układów doświadczalnych zestawiano z chromatogramem olejku eterycznego i obliczano współczynnik korelacji. W dalszych obliczeniach traktowano go jako zmienną zależną. Dane wyjściowe do dalszych obliczeń w procesie optymalizacji Taguchi w postaci wyliczonych współczynników korelacji dla wszystkich układów podano w tabeli 41 (Suplement A, s. 207). Analiza wartości współczynników korelacji (y we wzorze na S/N) wskazuje na korelację prawie pełną ($0,9 < n < 1$). Na ich podstawie obliczono Eta (S/N) według wzoru:

$$Eta = -10 \cdot \log_{10} \left(\frac{1}{n} \cdot \sum \frac{1}{y^2} \right) ,$$

Zastosowano strategię “im-większy-tym-lepszy” (ang. “*the-larger-the-better*”).

Suma odchyłeń standardowych

Jako miarę zróżnicowania profilu związków monoterpenu otrzymanych w wyniku zastosowania HS SPME oraz destylacji z wodą potraktowano odchylenia standardowe względnej zawartości procentowej poszczególnych monoterpenu oznaczone tymi dwoma metodami. Jako wartość mierzona (y) potraktowano sumę odchyłeń poszczególnych związków, a Eta obliczano według strategii “im-mniejszy-tym-lepszy” (ang. “*the-smaller-the-better*”) wg wzoru (tabela 41, s. 207):

$$Eta = -10 \cdot \log_{10} \left(\frac{1}{n} \cdot \sum y^2 \right)$$

1.2. Strategia dużej ilości pików związków monoterpenu

Druga strategia optymalizacji warunków HS SPME zakłada, że w wyniku ekstrakcji tą metodą otrzymany chromatogram powinien posiadać możliwie jak największą ilość pików monoterpenu. Złoże stosowane w HS SPME oraz parametry samego procesu można wybrać i zoptymalizować pod kątem pozyskiwania określonej grupy związków. Badania dostępnych komercyjnie złożeń SPME do pozyskiwania różnych grup związków potwierdzają selektywność włókna PDMS w stosunku do węglowodorów (Ceva-Antunes i in., 2003). Do najbardziej uniwersalnych złożeń zaliczane są takie, które łączą PDMS o charakterze cieczy (dla mniej polarnych składników) z DVB czy CAR o charakterze ciał stałych (do ekstrakcji składników polarnych) (Bicchi i in., 2000). Hamm i in. badali właściwości ekstrakcyjne różnych złożeń (CW/DVB, PDMS/DVB, CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, PDMS) dla pięciu wybranych mono- i seskwiterpenów (między innymi dla limonenu). Dowiedli, że profil ekstrahowanych składników na wszystkich pięciu złożach był bardzo zbliżony. Wydaje się więc, że ilość „wyłapanego” analitu jest niezależna od rodzaju złoża, gdyż oddziaływania terpenów z nim nie są specyficzne (Hamm i in., 2003). Dostępna literatura dowodzi, że 100µm włókno pokryte złożem PDMS jest najbardziej odpowiednie dla badanej grupy monoterpenu, a dobranie temperatury preinkubacji oraz absorpcji umożliwia preferencyjną ekstrakcję tej grupy związków. Stąd jako zmienną mierzoną w tej strategii przyjęto ilość pików związków monoterpenu.

W tabeli 21 zestawiono optymalne warunki HS SPME dla obu przyjętych strategii oraz oczekiwane i eksperymentalnie zweryfikowane stosunki sygnału do szumu. Na podstawie dwóch wybranych w optymalizacji strategii oraz trzech podejść do procesu optymalizacji (trzy rodzaje zmiennych zależnych) dokonano wyboru optymalnych parametrów HS SPME.

Należy zauważyć, że w przypadku obu strategii i wszystkich zmiennych zależnych otrzymane warunki optymalne były bardzo zbliżone – dotyczy to zwłaszcza temperatury i czasu absorpcji, które we wszystkich przypadkach wynoszą odpowiednio 60°C i 5min. Obydwa parametry wejściowe przyjmują maksymalne wartości z badanego zakresu. Wydaje się to zrozumiałe ze względu na charakter badanej grupy związków. W 60°C monoterpény łatwiej i szybciej przechodzą w stan lotny, podczas, gdy seskwiterpény o większych masach cząsteczkowych potrzebują zwykle wyższej temperatury oraz dłuższego czasu ekstrakcji. Udowodniono, że podwyższenie temperatury, w której eksponowane jest włókno, skutkuje wyższym stężeniem związków lotnych w fazie nadpowierzchniowej, a więc zwiększa efektywność ekstrakcji (Pellati, 2005). Z drugiej strony Schäfer i in. obserwowali spadek stałej podziału (K) dla poszczególnych związków terpenowych wraz ze wzrostem temperatury absorpcji. W tym wypadku stała podziału charakteryzuje stan równowagi pomiędzy fazą nadpowierzchniową nad próbą a złożem SPME. Stan ten powinien być osiągnąć stosunkowo szybko, gdyż stała podziału składników w fazie gazowej jest w przybliżeniu o cztery jednostki wyższa niż w przypadku stanu ciekłego (Schäfer i in., 1995). Przy wyższych temperaturach absorpcji istnieje ryzyko, że temperatura spowoduje zjawisko powrotu składników do fazy gazowej nad próbą, a więc ich desorpcję z włókna (Hamm i in., 2003), co obserwowano między innymi dla α -pinenu (Coleman i Lawrence, 1997). W przypadku tradycyjnych metod pozyskiwania olejku (SFE oraz destylacja z wodą) dla szyszkojagód jałowca obserwowano zjawisko spadku zawartości monoterpény wraz ze wzrostem zawartości seskwiterpény (Chatzopoulou i Katsiosis, 1995). Podobne analizy prowadzono w przypadku HS SPME i zanotowano, że wraz ze wzrostem czasu ekspozycji włókna (od 5 do 120min) proporcje ekstrahowanych terpenów zmieniają się – zawartość zabsorbowanych monoterpény spada, a seskwiterpény rośnie (Stashenko i in., 2004). Vereen i in. stosowali czasy absorpcji od 5min do 4h, wykazując, że profil chromatograficzny po pięciominutowej ekstrakcji jest zdominowany przez monoterpény (masa cząsteczkowa

rzędu 136), a w śladowych ilościach przez inne terpenoidy i seskwiterpeny, podczas gdy po 3 godzinnej ekstrakcji głównym zabsorbowanym składnikiem był octan bornylu oraz inne wcześniej nie obserwowane składniki (kamfora, borneol, humulen i β -bisabolen) (Vereen i in., 2000). Hamm podaje, że 20 minut ekstrakcji (niezależnie od rodzaju użytego złoża) jest optymalnym czasem dla badanych przez niego mono- i seskwiterpenów. Po upływie tego czasu obserwowano stopniowy spadek zawartości monoterpenów, który jest typowy dla złożonych mieszanin (czyli między innymi olejków) i związany z kompetycją o miejsce wiązania na złożu (Hamm i in., 2003).

W odniesieniu do cytowanych źródeł otrzymane w toku optymalizacji parametry SPME wydają się nie przekraczać krytycznego poziomu czasu i temperatury, przy której obserwuje się zjawisko desorpcji związków ze złoża z powrotem do fazy gazowej. Dodatkowo należy zauważyć, że badaną matrycą jest tutaj szpilka jałowca, która pomimo rozdrobnienia nie ma jednorodnego charakteru, a więc uwalnianie z niej badanych związków może być przez to utrudnione. Parametrem znacząco ułatwiającym ten proces wydaje się być wysoka temperatura.

Największe rozbieżności w optymalizowanych parametrach HS SPME zaobserwowano dla czasu preinkubacji. Jak wynika z tabeli 21 w trzech podejściach do procesu optymalizacji otrzymano różne czasy – 20min dla współczynnika korelacji jako zmiennej zależnej, 5min przy sumie odchyłeń standardowych oraz 10min przy ilości pików. Jako optymalny czas ustalenia się równowagi badanych związków w fazie nad powierzchnią surowca uznano 10 minut, jako medianę tych trzech wartości. W literaturze istnieją duże rozbieżności pomiędzy czasem preinkubacji, począwszy od 5min w temperaturze pokojowej (Vereen i in., 2000), poprzez 15min w 40°C (Cornu i in., 2001), 40-60min (Kim i Lee, 2004) do 24h w 25°C (Rohloff, 1999). W opisywanej pracy HS SPME zostało zoptymalizowane i użyte jako szybka metoda ekstrakcji składników lotnych badanego surowca, stąd założono, że czas ustalenia się równowagi pomiędzy stałą matrycą (rozdrobnione organy jałowca) a fazą nadpowierzchniową nie może trwać zbyt długo. Głównym przesłaniem jest tutaj bowiem skrócenie czasu analiz. Stosunkowo niedługi czas preinkubacji kompensowany jest w tym przypadku podwyższoną temperaturą (60°C), co przyspiesza zdecydowanie przechodzenie badanych związków w stan lotny i ustalenie się równowagi.

W kilku podejściach do procesu optymalizacji otrzymano czasy desorpcji 2 minuty (w dwóch przypadkach) oraz 30s (zmienna zależna – współczynnik korelacji) W tym wypadku jako optymalny uznano powtarzające się 2min zakładając, że długość procesu desorpcji pozwoli w tym wypadku nie tylko na uwolnienie zabsorbowanych związków monoterpenu, ale także innych, potencjalnych zanieczyszczeń przed kolejną ekstrakcją. Schäfer i in. zwraca uwagę, że proces desorpcji powinien być przeprowadzony w najwyższej temperaturze dopuszczalnej dla badanych związków oraz dla stosowanego włókna. W przypadku prowadzonych analiz przyjęto arbitralnie temperaturę 250°C, jako standardową używaną temperaturę dozownika w przypadku analiz olejków eterycznych w naszym laboratorium. Według literatury 10s ekspozycji włókna SPME w temperaturze 250°C pozwala na całkowitą ilościową desorpcję, przy czym 95% monoterpenu desorbowana jest już w pierwszej sekundzie analizy (Schäfer i in., 1995). Należy podkreślić, że większość autorów stosuje nieco dłuższe czasy desorpcji (zwykle 1-5min w 250-260°C), aby mieć pewność, że nastąpiło całkowite uwolnienie wszystkich związków (także tych o większej masie cząsteczkowej) ze złoża (Rohloff, 1999; Cornu i in., 2001; Hamm i in., 2003; Stashenko i in., 2004).

Analizując dane w ostatniej kolumnie tabeli 21, w której zawarty jest stosunek E_{ta} oczekiwanego do eksperymentalnego można zauważyć, że jest on bliski 1. Podobieństwo wartości oczekiwanej i eksperymentalnej E_{ta} świadczy o poprawności przeprowadzonej procedury optymalizacji. Ostatecznie przyjęte warunki optymalne przedstawione są pogrubioną czcionką w tabeli 21.

1.3.Podsumowanie

W wyniku optymalizacji wg schematu Taguchi otrzymano warunki HS SPME, które zostały zastosowane dla czyli igieł i szyszkojagód *J. communis*, zarówno w przypadku analiz achiralnych, jak i chiralnych. Wybrane dwie strategie optymalizacji oraz trzy zmienne zależne dały bardzo zbliżone wyniki, a poprawność przeprowadzonej optymalizacji potwierdziły wartości eksperymentalnych S/N. Były one zgodne z oczekiwanymi. Badanie powtarzalności procesu HS SPME z zastosowaniem parametrów optymalnych (por. „Powtarzalność procedury HS SPME-GC„ s. 84) dowiodło, że metodę tę można z powodzeniem zastosować w szybkim screeningu surowca pod kątem zawartości związków lotnych olejku. Ponadto uzyskane wyniki

udowadniają dużą przydatność optymalizacji Taguchi w doborze warunków HS SPME-GC. Można przypuszczać, że może być ona użyta w optymalizacji warunków innych procesów analitycznych.

TABELA 21: Warunki optymalne procesu HS SPME dla różnych strategii optymalizacji metodą Taguchi

Strategia optymalizacji	Wielkość mierzona (zmienna zależna)	A: czas preinkubacji	B: temperatura absorpcji	C: czas absorpcji	D: czas desorpcji	Oczekiwany S/N (<i>Eta</i>)	Eksperymentalny S/N (<i>Eta</i>) ¹	Oczekiwany/eksperymentalny S/N ²
1	Podobieństwo profilu SPME i olejku eterycznego („im-większy-tym-lepszy”)	3 (20min)	4 (60°C)	4 (5min)	1 (30s)	-0,16	-0,14	1,1
2	Podobieństwo profilu SPME i olejku eterycznego („im-mniejszy-tym-lepszy”)	1 (5min)	4 (60°C)	4 (5min)	3 (2min)	-28,33	-28,48	0,99
3	Duża ilość pików związków monoterenowych	2 (10min)	4 (60°C)	4 (5min)	3 (2min)	21,29	24,08	0,88

WARUNKI OPTYMALNE

10min

60°C

5min

2min

S/N (Eta) – stosunek sygnału do szumu (ang. *signal-to-noise ratio*)

¹ eksperymentalny S/N został wyznaczony poprzez przeprowadzenie eksperymentu weryfikującego w wyznaczonych dla danej strategii warunkach optymalnych, obliczony S/N jest średnią z trzech pomiarów

² iloraz oczekiwanego i eksperymentalnego S/N

2. Badania porównawcze składu frakcji monoterpenowej olejku *J. communis* otrzymanego metodą destylacji z wodą oraz składników otrzymanych drogą HS SPME (cel pochodny 2)

Analizę porównawczą profili chromatograficznych uzyskanych na kolumnie o złożu achiralnym (HP101) przeprowadzono dla 17 prób igieł *J. communis* pochodzących ze zbioru surowca ze stanowisk naturalnych oraz dla 5 prób szyszkogagód różnych producentów dostępnych w hurtowniach i sklepach zielarskich. Wybór surowca komercyjnego (*Juniperi fructus*) do badań porównawczych podyktowany był chęcią zbadania surowca, dla którego producent podaje, że spełnia normy farmakopealne. Analizy porównawcze objęły dwie metody „wydobycia” związków o charakterze monoterpenów ze struktur wydzielniczych szpilki i szyszkogagody jałowca: destylację z wodą (metoda farmakopealna oznaczania olejków eterycznych) oraz HS SPME w zoptymalizowanych uprzednio warunkach dla organów jałowca. W przypadku badań składu frakcji monoterpenowej szyszkogagód jałowca dla każdej próby uzyskano trzy profile chromatograficzne:

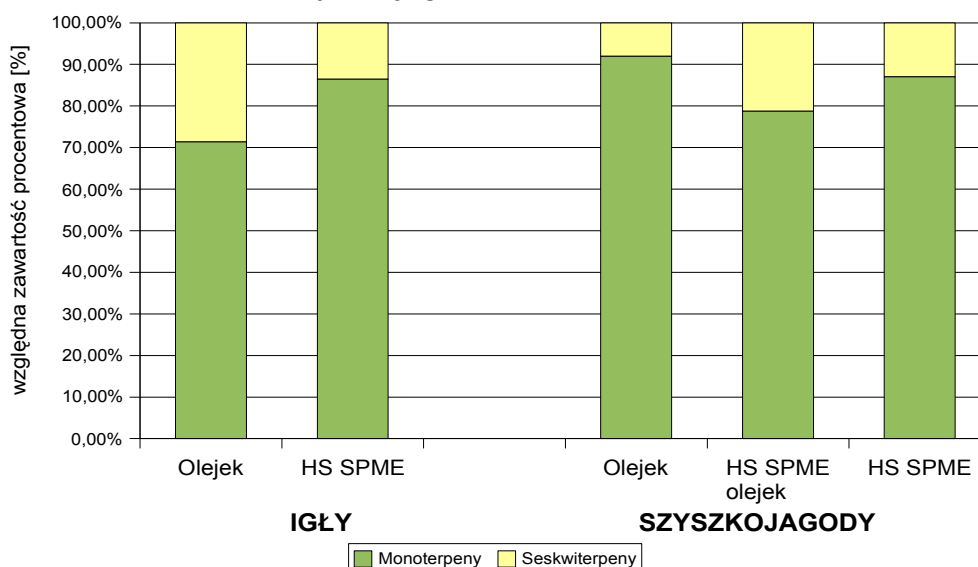
- olejku wprowadzonego na kolumnę bezpośrednio przez nastrzyk,
- składników fazy nadpowierzchniowej olejku rozcieńczonego alkoholem etylowym (HS SPME z nadroztworu olejku),
- składników pozyskanych bezpośrednio ze zbiorników olejkowych szyszkogagody w wyniku HS SPME.

Surowe dane chromatograficzne przedstawiono w tabeli 42 (s. 208) oraz 43 (s. 209) w rozdziale „Suplement A – Wyniki analiz chromatograficznych”.

Analizując chromatogramy badanych prób igieł i szyszkogagód, integracji poddano frakcję monoterpenów oraz ich pochodnych (t_R do 14min, $R_i \sim 1180$). Zidentyfikowano 13 składników tej frakcji na podstawie czasów oraz indeksów retencji (identyfikacja została potwierdzona poprzez GC MS). Ponadto przeprowadzono integrację pików wszystkich składników olejku w celu oszacowania względnej zawartości procentowej dwóch głównych grup związków – mono- i seskwiterpenów. Wykres na rysunku 21 przedstawia średnie względne zawartości procentowe tych

dwóch grup związków dla igieł i szyszkojagód w odniesieniu do sposobu pozyskiwania.

RYSUNEK 21: Zestawienie porównawcze średnich względnych zawartości procentowych dwóch głównych grup związków występujących w igłach i szyszkojagodach *J. communis*



*Średnie względne zawartości procentowe mono- i seskwiterpenów dla igieł *J. communis* obliczono na podstawie 17 badanych prób, dla szyszkojagód na podstawie 5 prób komercyjnych szyszkojagód)

**olejek – olejek otrzymany metodą destylacji z wodą (FPV, 1999; FPVI, 2002) i analizowany w drodze nastrzyku na kolumnę

***HS SPME olejek – headspace SPME znad olejku otrzymanego metodą destylacji w wodą i rozcieńczonego 100x alkoholem etylowym (do końcowej objętości 2ml) w warunkach podanych w rozdziale „Przebieg HS SPME” (s. 79)

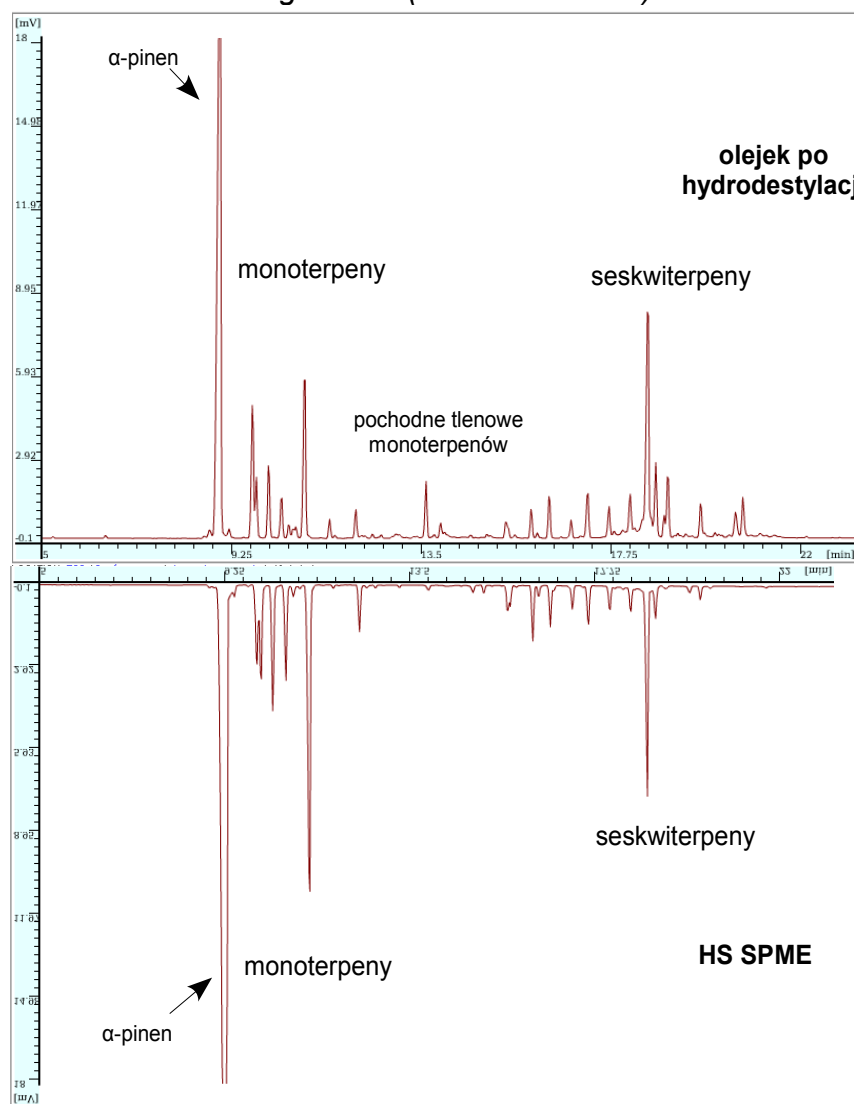
****HS SPME – headspace SPME znad 100mg rozdrobnionych szyszkojagód jałowca w warunkach podanych w warunkach podanych w rozdziale „Przebieg HS SPME” (s. 79)

W przypadku szpilek jałowca pospolitego stwierdzono, że HS SPME skutkuje zdecydowanie wyższą zawartością monoterpenów niż olejek otrzymany z tego samego materiału drogą destylacji z wodą. Średnia zawartość procentowa tej grupy związków dla HS SPME wynosi 86%, a dla olejku 71%. Wyjaśnieniem takiego rozkładu tych grup składników jest budowa ich cząsteczek, a co za tym idzie ich właściwości fizykochemiczne. Monoterpeny należą do związków o mniejszej masie cząsteczkowej i niższej temperaturze wrzenia. Ich przechodzenie do fazy nadpowierzchniowej w HS SPME odbywa się stosunkowo szybko (preinkubacja 10min). Seskwiterpeny potrzebują zdecydowanie dłuższego czasu preinkubacji i ekstrakcji. W trakcie destylacji z wodą surowiec poddawany jest długotrwałemu działaniu temperatury 100°C, co sprzyja ekstrakcji składników o wyższych masach cząsteczkowych (seskwi- i diterpeny). W grupie tych składników mogą znajdować się także produkty degradacji składników termolabilnych oraz produkty hydrolizy (Orav i

in., 1998). Podobne wyniki uzyskano dla terpenów z bieli i twardzieli drewna *Picea abies*. W wyniku HS SPME zidentyfikowano odpowiednio 84-86% i 82-84% monoterpenoidów, podczas gdy dla olejku było to tylko 53% i 40% (Wajs i in., 2006). Jednak porównywanie wyników zawartości procentowych otrzymanych przez różnych autorów jest dyskusyjne, ze względu na to, że nawet drobne zmiany parametrów absorpcji prowadzą do dość znacznych zmian w profilu uzyskanym w HS SPME związków. Stashenko i in. w porównaniu kilku metod ekstrakcji i technik headspace (HD, MWHD, SDE, SFE oraz P&T, S-HS, HS-SPME) terpenów z liści i łodygi *Lippia alba* w technice HS SPME uzyskali zdecydowanie mniej monoterpenów i ich pochodnych niż w hydrodestylacji (45% w stosunku do 87%). Profil HS SPME zdominowany był przez seskwiterpeny (12% versus 55%). Takie wyniki spowodowane były długim czasem ekspozycji włókna – 60min w temperaturze pokojowej (Stashenko i in., 2004).

Na rysunku 22 przedstawiono porównawczo chromatogram olejku otrzymanego w drodze destylacji oraz profil związków terpenowych po HS SPME. Widać na nim przewagę pików monoterpenów (zwłaszcza pik α -pinenu) w HS SPME w stosunku do olejku oraz nieco większą ilość pików związków pochodnych tlenowych monoterpenów oraz seskwiterpenów w olejku. Należy jednak zwrócić uwagę na duże podobieństwo obydwu profili chromatograficznych.

RYSUNEK 22: Chromatogramy porównawcze olejku otrzymanego w drodze hydrodestylacji oraz profilu terpenów wyekstrahowanych metodą HS SPME z próby igieł OT2 (kolumna HP101)



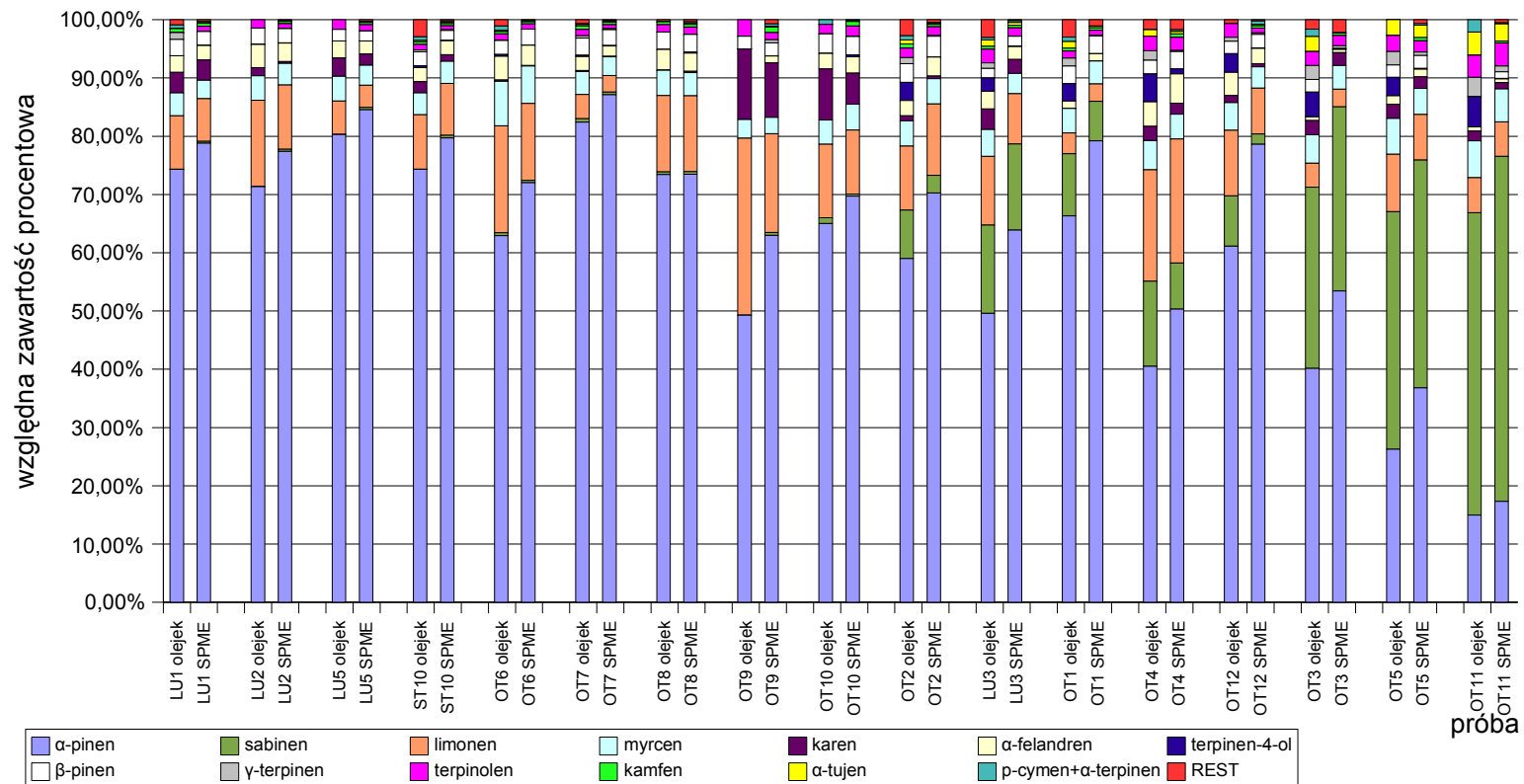
*chromatogram wygenerowany w oprogramowaniu ChromNET

Średnie zawartości procentowe monoterpenów i ich pochodnych w przypadku olejku z szyszkojagód wprowadzonego bezpośrednio na kolumnę oraz HS SPME znad rozdrobionych szyszkojagód są zbliżone i wynoszą odpowiednio 91% i 87%. W fazie nadpowierzchniowej nad rozcieńczonym olejkim monoterpeny stanowią blisko 79%. Niewielka przewaga monoterpenów w olejkim (w stosunku do profilu HS SPME znad surowca) znajduje się w granicy błędu statystycznego (odchylenie standardowe w obu przypadkach wynosi 3,5%). W przypadku szyszkojagód jałowca nie widać wyraźnej przewagi grupy seskwiterpenów w olejkim w stosunku do HS SPME.

Zaskakującym wynikiem jest natomiast najwyższa w przypadku trzech stosowanych metod zawartość seskwiterpenów w fazie nadpowierzchniowej nad olejkami. Dominacja tej grupy związków w stosunku do HS SPME znad surowca jest naturalną konsekwencją charakteru matrycy, z której uwalniane są do fazy nadpowierzchniowej badane związki. Z roztworu olejku mogą one przechodzić w stan gazowy i osiągać stan równowagi w badanym układzie zdecydowanie szybciej i łatwiej niż w przypadku rozdrobnionej szyszkojagody. Niemniej jednak trudno wyjaśnić przewagę seskwiterpenów w HS SPME znad olejku w stosunku do wyniku analizy chromatograficznej tego samego olejku w bezpośredniej iniekcji. Tendencja ta jest widoczna w przypadku wszystkich pięciu badanych prób, jednak liczebność analizowanych prób jest zbyt niska, aby wyciągnąć ostateczne wnioski. Aby potwierdzić te wyniki należałoby przeprowadzić podobne badania dla większej ilości prób szyszkojagód.

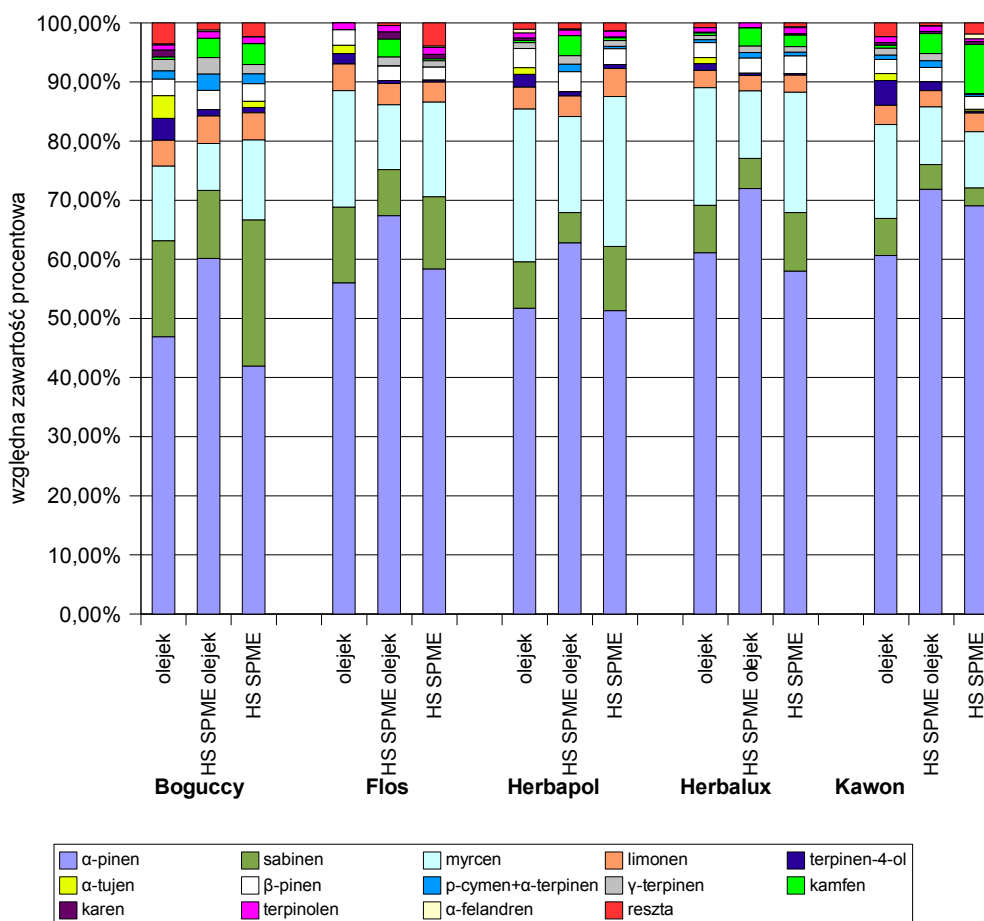
Rysunki 23 i 24 przedstawiają wykresy porównawcze względnych zawartości procentowych głównych związków wyizolowanych ze szpilek i szyszkojagód jałowca opisanymi wcześniej metodami. Integracja chromatogramów objęła piki frakcji monoterpenów i monoterpenoidów o RI do 1180.

RYSUNEK 23: Zestawienie porównawcze względnych zawartości procentowych poszczególnych monoterpenu pozyskanych metodą destylacji z wodą oraz HS SPME z *igieł J. communis*



*Wykres sporządzono na podstawie danych zawartych w tabeli 42, s. 208

RYSUNEK 24: Zestawienie porównawcze względnych zawartości procentowych poszczególnych monoterpenu pozyskanych metodą destylacji z wodą oraz HS SPME z szyszkogód *J. communis*



Wykres sporządzono na podstawie danych zawartych w tabeli 43, s. 209.

*olejek – olejek otrzymany metodą destylacji z wodą (FPV, 1999; FPVI, 2002) i analizowany w drodze nastrzyku na kolumnę

**HS SPME olejek – headspace SPME znad olejku otrzymanego metodą destylacji w wodą i rozcieńczonego 100x alkoholem etylowym (do końcowej objętości 2ml) w warunkach podanych w rozdziale „Przebieg HS SPME” (s. 79)

***HS SPME – headspace SPME znad 100mg rozdrobionych szyszkogód jałowca w warunkach podanych w warunkach podanych w rozdziale „Przebieg HS SPME” (s. 79)

Trzema głównymi związkami frakcji monoterpenu są α -pinen, sabinen oraz limonen, a w przypadku szyszkogód dodatkowo myrcen. Analizując różnicę zawartości procentowej w olejku i w profilu HS SPME dla poszczególnych składników igieł stwierdzono, że tylko w przypadku α -pinenu, widać, że metoda HS SPME skutkuje wyższą zawartością tego składnika niż destylacja (średnia różnica to ~8%). Zawartość pozostałych związków różni się nieznacznie w profilu chromatograficznym związków po destylacji i HS SPME, a obserwowaną tendencją jest lekka przewaga

monoterpenów w olejku otrzymanym metodą destylacji (mircen, limonen, sabinen). Podobne wyniki dla względnej zawartości procentowej α -pinenu otrzymali inni autorzy. Wajs i in. dla bieli i twardego drewna *Picea abies* obserwowała niemal trzykrotnie wyższą względną zawartość procentową tego związku w stosunku do olejku po hydrodestylacji (Wajs i in., 2006). Zbliżone wyniki dla tego monoterpenu uzyskano też porównując profil monoterpenu z HS SPME oraz hydrodestylacji liści *Mentha piperita* (4,12% - HS SPME, 1,63% - HD) (Rohloff, 1999) natomiast w przypadku owoców *Xylopija aromatica* w wyniku HS SPME ekstrakcja dawała tylko o 2% więcej tego związku (8% względem 10%) niż w przypadku olejku (Stashenko i in., 2004).

Zawartość procentowa α -pinenu w przypadku profilu olejku i HS SPME z szyszkojagód jałowca różni się od wyników otrzymanych dla igieł. Stwierdzono go o 2% więcej w olejku otrzymanym poprzez destylację i aż o 11% więcej w fazie nadpowierzchniowej nad olejkiem w porównaniu do HS SPME znad surowca. Zestawienie dwóch podejść do mikroekstrakcji tzn. HS SPME znad olejku oraz znad surowca olejkowego daje pogląd na temat specyfiki matrycy z której „wydobywane” są składniki. Pierwsza – matryca o charakterze ciekłym (etanolowy roztwór olejku) jako bardziej jednorodna powoduje, że najbardziej lotny składnik olejku – α -pinen szybciej i bardziej efektywnie przechodzi w stan lotny. W przypadku matrycy stałej (rozdrobione szyszkojagody jałowca) przechodzenie składników olejku do fazy nadpowierzchniowej jest procesem mniej efektywnym. W profilu HS SPME znad olejku w przypadku wszystkich 5 badanych prób szyszkojagód zaobserwowano najwyższą zawartość α -pinenu - średnio o 11% wyższą niż w pozostałych metodach. Taka obserwacja, szczególnie w odniesieniu do bezpośredniego nastrzyku tego samego olejku na kolumnę, świadczy prawdopodobnie o dużym powinowactwie α -pinenu do stosowanego złoza PDMS. Ma ono, jak wspomniano w części teoretycznej, charakter absorbenta, a kompetycja o miejsce wiązania ma związek z jego grubością oraz z szybkością migracji analitu do złoza (Shirley i Mindrup, 1999). Bicchi wykazał, że współczynnik podziału między fazę gazową a złoże dla α -pinenu tylko w przypadku 100 μ m PDMS jest porównywalny z tym, który uzyskuje się w statycznym headspace (S-HS) (Bicchi i in., 2000). W badanych próbach jałowca α -pinen występuje w zdecydowanej przewadze (powyżej 40%) i jest jednym z najbardziej lotnych składników. Dlatego w przypadku HS SPME znad roztworu olejku jest prawdopodobnie preferencyjnie absorbowanym składnikiem na złożu. Należy

zaznaczyć, że odbywa się to kosztem innych składników, głównie sabinenu i mircenu, których udział na złożu wynosi jest odpowiednio 7,6% i 3,7% mniej niż w przypadku bezpośredniego nastrzyku olejku na kolumnę.

Zawartość procentowa limonenu (kolor pomarańczowy na rys. 23 i 24), mircenu (kolor błękitny) oraz sabinenu (kolor zielony) jest bardzo zbliżona w technice headspace i w bezpośrednim nastrzyku olejku, zarówno w przypadku igieł, jak i szyszkojagód. Bardzo zbliżone wyniki uzyskano zarówno w przypadku integracji wyłącznie frakcji monoterpenowej, jak i całego olejku. Wyniki takie znajdują potwierdzenie w literaturze. Badania porównawcze HS SPME oraz ekstrakcji dichlorometanem żywicy kadzidłowca (olibanum) wykazały bardzo zbliżony profil chromatograficzny: w przypadku mircenu i limonenu względna zawartość procentowa była porównywalna (odpowiednio 4,1% versus 3,2% i limonen 7,4% versus 5,1%) (Hamm i in., 2003). Podobne wyniki uzyskał inny zespół dla owoców *Xylopija aromatica* (dla mircenu w HD – 9%, w HS SPME 10,31%, dla limonenu odpowiednio 2,7% i 2,2%) (Stashenko i in., 2004). Z drugiej strony porównanie rozdziałów chromatograficznych roztworu etanolowego olejku z mięty pieprzowej i HS SPME znad pojedynczych liści tej rośliny wykazało, zdecydowanie wyższą zawartość tych związków w przypadku HS SPME (3x więcej β -pinenu, 11x - sabinenu, 9x – mircenu, 4x – limonenu) (Rohloff, 1999). HS SPME z różnych części drewna *Picea abies* w zestawieniu z olejkami dawało porównywalne zawartości procentowe sabinenu, nieco więcej mircenu i β -felandrenu z limonenem (koelucja) oraz zdecydowanie więcej β -pinenu (ponad dwa razy) (Wajs i in., 2006).

W nielicznej ilości prób (tych o najwyższej zawartości sabinenu) w olejku otrzymanym w drodze hydrodestylacji odnotowano zawartość alkoholu terpenowego terpinen-4-olu rzędu kilku do około 5%. Jednocześnie dla tych samych prób ekstrahowanych metodą HS SPME związek ten występował w ilościach rzędu 0,5%. Podobne wyniki w przypadku alkoholi z grupy monoterpenów (terpinen-4-ol oraz α -terpineol) obserwowano także dla innych złoż – DVB/CAR/PDMS oraz CAR/PDMS o charakterze bipolarnym (Wajs i in., 2006). Przypuszczalnie większa zawartość alkoholi w olejku otrzymanym w wyniku destylacji spowodowana jest degradacją glikozydów w temperaturze około 100°C, a co za tym idzie – uwolnieniem wolnych alkoholi terpenowych (Ceva-Antunes i in., 2003). Należy zauważyć, że w przeprowadzonych badaniach, HS SPME znad roztworu olejku skutkuje o połowę niższą zawartością

procentową terpinen-4-olu w stosunku do bezpośredniego nastrzyku olejku na kolumnę. Prawdopodobnie więc w przypadku HS SPME bezpośrednio znad surowca niska zawartość procentowa terpinen-4-olu jest efektem nałożenia się dwóch zjawisk. Pierwsze to niska zawartość procentowa terpinen-4-olu w świeżym (lub suszonym) surowcu (jak wspomniano wyżej zjawisko uwalniania wolnych alkoholi spowodowane degradacją glikozydów w trakcie hydrodestylacji w efekcie prowadzi do wyższej zawartości terpinen-4-olu w oleju). Drugie zjawisko związane jest z niskim powinowactwem związków o większej polarności do stosowanego złoża PDMS. Badania porównawcze stałych podziału dla różnych związków na różnych złożach używanych w technice HS SPME wykazały, że terpinen-4-ol oraz α -terpineol są najefektywniej ekstrahowane na złożach CAR-PDMS 75 μ m oraz CAR-DVB-PDMS (Bicchi i in., 2000).

Po weryfikacji liniowości wyników analiz olejku i HS SPME dla igieł *J. communis* obliczono współczynniki korelacji liniowej (ρ) dla poszczególnych analizowanych związków. W przypadku 8 z 12 badanych składników lotnych (α -pinen, sabinen, mircen, α -felandren, karef, limonen, γ -terpinen, terpinolen) stwierdzono bardzo silną korelację dodatnią ($0,7 < \rho < 1$), dla β -pinenu silną korelację dodatnią ($0,5 < \rho < 0,7$), dla terpinen-4-olu korelację dodatnią o średnim natężeniu ($0,3 < \rho < 0,5$). W przypadku dwóch związków, których zawartość zarówno w oleju, jak bezpośrednio w strukturach wydzielniczych badanych prób sporadycznie przekracza 1% (kamfen oraz para związków eluujących razem – p-cymen + α -terpinen) współczynnik mieścił się w przedziale $-0,5 < \rho < -0,3$, co wskazuje na korelację ujemną o średnim natężeniu. Niemniej jednak sama zawartość tych składników w badanych próbach znajduje się na granicy błędu statystycznego, stąd obliczone dla nich współczynniki korelacji są mało wiarygodne.

2.1. Podsumowanie

Podsumowując, zestawienie wyników rozdziałów chromatograficznych monoterpenów jałowca otrzymanych w wyniku HS SPME oraz destylacji z wodą wskazuje na to, że HS SPME w warunkach zoptymalizowanych może być z powodzeniem zastosowana jako szybka metoda oceny surowca olejkowego. Porównanie średniej zawartości frakcji związków mono- i seskwiterpenowych dla olejku i profilu HS SPME wykazało, że w przypadku igieł zawartość monoterpenów

otrzymanych w HS SPME jest wyższa o ponad 10%. Dla szyszkojagód w przypadku obu metod zawartość frakcji monoterpenowej była zbliżona. Jedynym związkiem, którego zawartość różniła się o niecałe 10% w HS SPME znad igieł w stosunku do olejku po destylacji był α -pinen. Zależności tej nie obserwowano jednak w przypadku szyszkojagód. Opisane zjawiska związane są ze specyfiką matrycy, jaką stanowią rozdrobnione igły i szyszkojagody w przypadku mikroekstrakcji nadpowierzchniowej oraz lotnością mono- i seskwiterpenów. α -Pinen jako dominujący składnik igieł i szyszkojagód jałowca jest związkiem preferencyjnie absorbowanym na złożu. Względne zawartości procentowe innych monoterpenów (mircen, sabinen, limonen) są zbliżone w przypadku olejku i HS SPME. Ważny z punktu widzenia aktywności surowca i olejku alkohol monoterpenowy terpinen-4-ol wykazuje słabe powinowactwo do zastosowanego złoża PDMS. W związku z tym obserwowana zawartość nie przekroczyła 1%, podczas, gdy w oleju (szczególnie w próbach o wyższej zawartości sabinenu) osiąga on 5-6%. Zawartości procentowe poszczególnych związków w oleju i odpowiadające im wartości w HS SPME porównano obliczając współczynniki korelacji dla każdego z nich. Dla 10 badanych monoterpenów ich wartości wskazywały na bardzo silną i silną korelację dodatnią. Świadczy to, że w przypadku głównych monoterpenów jałowca HS SPME jest metodą dającą podobny profil chromatograficzny do wydestylowanego olejku. Jej główną zaletą jest szybkość wykonania oraz minimalna ilość surowca do analizy. Może być niezwykle użyteczna jako metoda oceny i wyboru surowca olejkowego o pożądanym składzie biologicznie aktywnych związków terpenowych. Oprócz zdecydowanego skrócenia czasu analiz (w stosunku do destylacji olejku), HS SPME ma jeszcze jedną niekwestionowaną zaletę. Może być użyteczne w przypadku badań trudno dostępnego materiału roślinnego (mały rozmiar roślin, małe ilości materiału do analiz). Potencjalnie użyteczną aplikacją HS SPME mogą być kultury roślin *in vitro*, gdzie zwykle ilość materiału roślinnego jest niewielka, a z punktu widzenia uzyskania roślin o pożądanym składzie metabolitów wtórnych informacja o ich składzie jest niezbędna.

3. Analiza zróżnicowania fitochemicznego *Juniperus communis* (cel pochodny 3)

Jak opisano w części metodycznej („Analiza zróżnicowania fitochemicznego badanych prób *J. communis* (cel pochodny 3)”, s. 96) pierwszym etapem realizacji tego celu była analiza związków monoterpenowych pozyskanych w wyniku HS SPME na złożu achiralnym (HP101). Przeprowadzono ją dla 76 prób szpilek *J. communis* oraz 58 prób szyszkojagód (nie wszystkie zebrane osobniki były okazami owocującymi). Wyniki wyjściowe analiz chromatograficznych na złożu achiralnym HP101 znajdują się w rozdziale „Suplement A – Wyniki analiz chromatograficznych”, w tab. 44, s.210 (dla igieł) oraz tabeli 45, s.214 (dla szyszkojagód).

Analiza na złożu achiralnym umożliwiła wstępną klasyfikację prób pod kątem zawartości głównych składników monoterpenowych. W efekcie tego w badanej puli prób wyodrębniono tzw. rasy chemiczne, z których wyselekcjonowano próby do dalszych analiz chromatograficznych na złożu enancjoselektywnym. Objęły one 42 próby igieł oraz 34 próby szyszkojagód. Wybór tylko części prób do analizy chiralnej podyktowany był czasochłonnością analiz na złożu cyklodekstrynowym (HP Chiral). Na podstawie wyników uzyskanych na kolumnie enancjoselektywnej obliczono nadmiary enancjomeryczne, które przedstawiono w poniższym rozdziale („Analiza chiralna”, s. 149) oraz w tabeli 46, s.217 („Suplement A – Wyniki analiz chromatograficznych”).

3.1. Analiza achiralna

Uzyskane w toku analiz chromatograficznych wyniki (tab. 44 i 45) jednoznacznie wskazują, że dominującymi składnikami frakcji monoterpenowej igieł i szyszkojagód jałowca są α -pinen, sabinen i limonen. Dane te są zgodne ze źródłami literaturowymi (Vernin i in., 1988; Caramiello i in., 1995; Angioni i in., 2003). Mircen jest swoistym markerem fitochemicznym szyszkojagód, gdyż występuje w nich w zdecydowanej przewadze w stosunku do igieł. Obserwacja ta znajduje także potwierdzenie w wynikach innych autorów (Chatzopoulou i Katsiosis, 1993; Angioni i in., 2003). α -Pinen oraz sabinen jako główne składniki utworów wydzielniczych badanej rośliny są jednocześnie związkami wykazującymi największą zmienność osobniczą. Obserwacja wzajemnych proporcji zawartości procentowych tych dwóch składników w igłach jałowca doprowadziła w efekcie do wyodrębnienia w badanej puli prób jałowca tzw. ras

chemicznych (chemotypów). Chemotyp (ang. *chemotype*, *chemovar*) definiowany jest jako chemicznie odmienna jednostka (roślina lub mikroorganizm). Wyróżnienie chemotypu opiera się na różnicach w składzie metabolitów wtórnych (<http://en.wikipedia.org/wiki/Chemotype>). Znanych jest wiele chemotypów roślin olejkowych. Najpopularniejsze to chemotypy *Thymus vulgaris*, które charakteryzują się odpowiednio najwyższą zawartością geraniolu, α -terpineolu, tujanolu, linalolu, karwakrolu oraz tymolu (Thompson i in., 2003), czy *Malaleuca alternifolia* (Shelton i in., 2002). Znane są także chemotypy olejkowych roślin szpilkowych: *Pinus sylvestris* (dwa chemotypy: z niską i wysoką zawartością 3-karenu) (Hiltunen i Laakso, 1995; Sjödin i in., 1996) oraz *Juniperus communis* (dwa chemotypy: z niską i wysoką zawartością sabinenu) (Hiltunen i Laakso, 1995).

W przypadku badanych prób *J. communis* podstawowym kryterium wyodrębnienia trzech chemotypów były względne zawartości procentowe α -pinenu i sabinenu. Pierwszy z nich charakteryzuje się dominacją α -pinenu, przy jednocześnie niewielkiej (zwykle poniżej 1%) i nie przekraczającej 10% zawartości sabinenu. Druga rasa chemiczna zdominowana jest przez sabinen, podczas, gdy zawartość α -pinenu nie przekracza zwykle 30%. Zaobserwowano też trzecią grupę prób, którą zaklasyfikowano jako chemotyp pośredni. W tym przypadku zawartość α -pinenu nie przekraczała 60%, a sabinenu – 40%. Należy podkreślić, że opisywane tutaj proporcje tych dwóch składników oraz podział na rasy chemiczne dotyczą wyników chromatograficznych otrzymanych dla igieł. W przypadku szyszkojagód trudno zastosować te same kryteria, gdyż zawartość sabinenu w tych organach jest zdecydowanie niższa, co przedstawiono w dalszej części rozdziału. Przyjęte kryteria klasyfikacji prób jałowca do poszczególnych chemotypów przedstawiono w tabeli 22.

TABELA 22: Kryteria wyodrębnienia chemotypów *J. communis* L. na podstawie zawartości dwóch głównych składników - α -pinenu i sabinenu w igłach

Chemotyp	Zawartość α -pinenu [%]	Zawartość sabinenu [%]	α -pinen/sabinen
α -pinenowy	50-90	<10	α -pinen>sabinen
pośredni	45-65	10-40	α -pinen \geq sabinen
sabinenowy	10-30	40-60	α -pinen<sabinen

W tabeli 23 zestawiono badane nizinne próby *J. communis* ze względu na przynależność do opisanych ras chemicznych. Czcionką pogrubioną zaznaczono próby wybrane do dalszej analizy chromatograficznej na złożu enancjoselektywnym. Sposób selekcji nie był przypadkowy – w puli tych prób znalazły się takie, które reprezentują wszystkie trzy chemotypy. W przypadku chemotypu pośredniego i sabinenowego ze względu na niewielką liczebność osobników były to wszystkie próby, a w przypadku najliczniej reprezentowanego chemotypu α -pinenowego - połowa. Założono, że analizy chiralne przeprowadzone w ramach tego projektu mają na celu przede wszystkim stwierdzenie, czy istnieje jakaś tendencja wśród poszczególnych ras chemicznych do produkcji określonej formy enancjomerycznej.

TABELA 23: Zestawienie badanych prób nizinnych *J. communis* z uwzględnieniem przynależności do rasy chemicznej

Chemotyp ¹	Osobnik (akronim próby) ²
α -pinenowy	BO1, BO3 , CI1 , CI2, CI3, CI6 , G1-1, G1-2 , G1-3 , G1-4 , G1-5, G2-1, G2-3, G2-4 , G2-5, GG2, LU1 , LU2 , LU4, LU5, LU6, LU7, LU8 , LU9 , KO2, KO3 , KO4, OC1 , OC2, OC3 , OC4, OT1 , OT2, OT4 , OT6 , OT7, OT8, OT9, OT10, OT12, OT13, SA3 , SA4 , SA9 , SD1 , SD2, SD3, SD4, SD5 , SD6, SD7, SD9, SD11 , ST10 , ST11, ST12 , ST13, ZG1 , ZG2
pośredni	CI4 , CI5 , G2-2 , KO1 , LU3 , OT3 , SA5 , SA6 , SA7 , SA8 , SD8
sabinenowy	BO2 , OT5 , OT11 , SA1 , SA2 , SD10

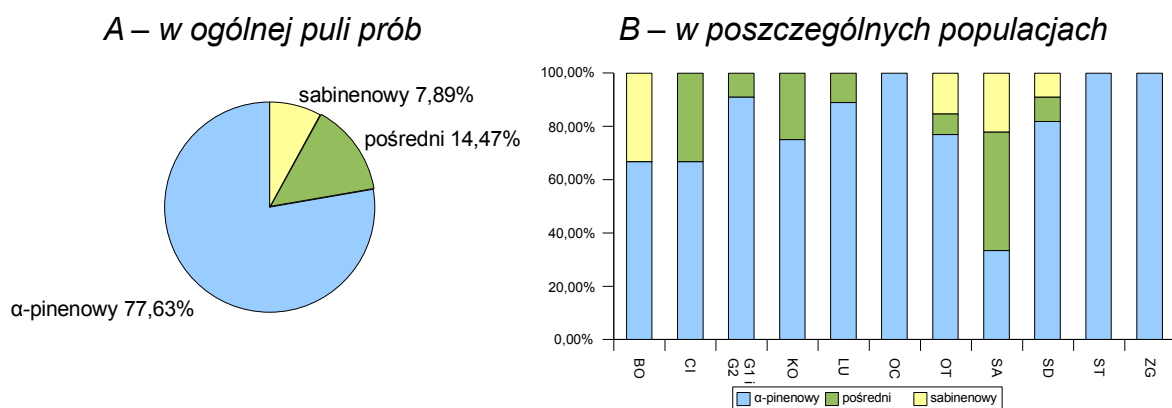
¹ przynależność do chemotypu określono na podstawie wyników analiz chromatograficznych otrzymanych dla igieł badanych prób na złożu achiralnym.

² Pogrubioną czcionką zaznaczono próby użyte do analizy na złożu chiralnym kolumny HP Chiral.

Sklassyfikowane w trzech kategoriach próby *J. communis* poddano dalszej analizie. Na rysunku 25 przedstawiono liczebność poszczególnych chemotypów w ogólnej puli badanych prób (rys. 25A) oraz liczebność chemotypów w poszczególnych badanych populacjach (rys. 25B). Wynika z nich wyraźnie dominacja rasy chemicznej α -pinenowej, zarówno w przypadku całej puli prób (59 prób z badanych 76), jak i pojedynczych populacji. Rasa chemiczna sabinenowa jest bardzo rzadka, a występowanie osobników o takich proporcjach związków monoterpenowych stwierdzono w czterech z jedenastu badanych populacji. Najwięcej prób o cechach chemotypu pośredniego i sabinenowego stwierdzono w przypadku populacji pochodzącej ze wsi Samociążek (symbol SA), zlokalizowanej w województwie kujawsko-pomorskim. W literaturze wysoką zawartość sabinenu przypisywana jest często próbom zebranych ze stanowisk górskich, podczas gdy głównym składnikiem

prób ze stanowisk położonych na terenach nizinnych wymieniany jest α -pinen (Baerheim Svendsen i in., 1985; Vernin i in., 1988; Caramiello i in., 1995; Hiltunen i Laakso, 1997; Angioni i in., 2003). Wyniki uzyskane w tej pracy nie potwierdzają tej hipotezy, gdyż w badanych 76 próbach nizinnych jałowca blisko 8% stanowią próby zdominowane przez sabinen. Jałowce o wysokiej zawartości procentowej sabinenu pochodzące ze stanowisk nizinnych notowano także w pracach innych autorów (Ochocka i in., 1997). Korelacji pomiędzy zawartością sabinenu i wysokością stanowiska nie stwierdzono także dla olejku otrzymanego z owoców i łodyg *J. brevifolia* (da Silva i in., 2000). W dalszej części pracy omówiono także wyniki analiz chromatograficznych olejków otrzymanych z igieł prób jałowca pospolitego i jałowca halnego zebranych na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego (por. „Analiza pokrewieństwa systematycznego *J. communis* L. i *J. nana* Willd. (cel pochodny 5)”, s. 179). Analiza olejków z tych gatunków/odmian umożliwi szersze spojrzenie na powiązanie zawartości sabinenu z wysokością stanowiska, z którego zebrano surowiec.

RYSUNEK 25: Liczebność poszczególnych chemotypów jałowca pospolitego



Akronimy prób oraz liczebność poszczególnych populacji są zgodne z danymi zawartymi w tabeli 9, s. 64.

*Liczebność chemotypów podano jako procent całej puli prób. Dane dotyczą wyników analiz chromatograficznych otrzymanych dla igieł jałowca pospolitego.

Jak już wspomniano wyżej zastosowanie tych samych kryteriów wyznaczania chemotypów w przypadku szyszkojagód skutkuje odmiennym podziałem badanych prób. W związku z wysoką zawartością mircenu w tym surowcu udział procentowy innych monoterpenów jest niższy. Zawartość procentowa α -pinenu i sabinenu w

szyszkojagodach pozwoliła na zaklasyfikowanie tylko dwóch prób do chemotypu sabinenowego (SA1 i SA2) oraz trzech do chemotypu pośredniego (BO2, SA6 i SA8). Reszta prób szyszkojagód charakteryzuje się zdecydowaną przewagą α -pinenu.

W tabeli 24 przedstawiono zestawienie zakresów zawartości procentowych zidentyfikowanych monoterpenu oraz dwa wskaźniki struktury: średnią i medianę, z uwzględnieniem podziału na chemotypy. Graficznym zobrazowaniem danych zebranych w tabeli 24 jest wykres na rysunku 26. W tabeli 24 celowo zestawiono dla każdej rasy chemicznej dwa wskaźniki struktury, czyli średnią oraz medianę (wartość środkową). Dla większości związków uzasadnione wydaje się zastosowanie mediany jako parametru najlepiej opisującego daną grupę (chemotyp), gdyż rozkłady zawartości poszczególnych składników nie są symetryczne. Konsekwencją jest wysoka wartość odchylenia standardowego (SD). Jest to szczególnie widoczne w przypadku karenu i limonenu.

Dla igieł i szyszkojagód zaobserwować można wyraźne zależności pomiędzy zawartością α -pinenu i sabinenu (por. rysunek 26) w trzech wyznaczonych chemotypach. Zawartość średnia (także mediana) sabinenu w przypadku szyszkojagód jest o 3% i 10% niższa niż dla igieł, odpowiednio dla chemotypu pośredniego i sabinenowego. Angioni i in. w pracy porównawczej składów z igieł oraz dojrzałych i niedojrzałych szyszkojagód obserwowali znaczące różnice w zawartości sabinenu pomiędzy badanymi organami (odpowiednio 61%, 13,7% i 5,6%) (Angioni i in., 2003). Podobne wyniki otrzymały też inne zespoły badawcze (Hiltunen i Laakso, 1995; Ochocka i in., 1997). Jak już wspomniano wyżej mircen jest związkiem charakterystycznym dla szyszkojagód, co znajduje potwierdzenie w licznych opracowaniach (Hiltunen i Laakso, 1995; Ochocka i in., 1997). Dodatkowo obserwowano wzrost jego względnej zawartości wraz z dojrzewaniem szyszkojagód (Vernin i in., 1988; Angioni i in., 2003). W niniejszej pracy jego zawartość w igłach prób chemotypu α -pinenowego jest pięciokrotnie niższa niż dla szyszkojagód (średnia 3,85% versus 21%).

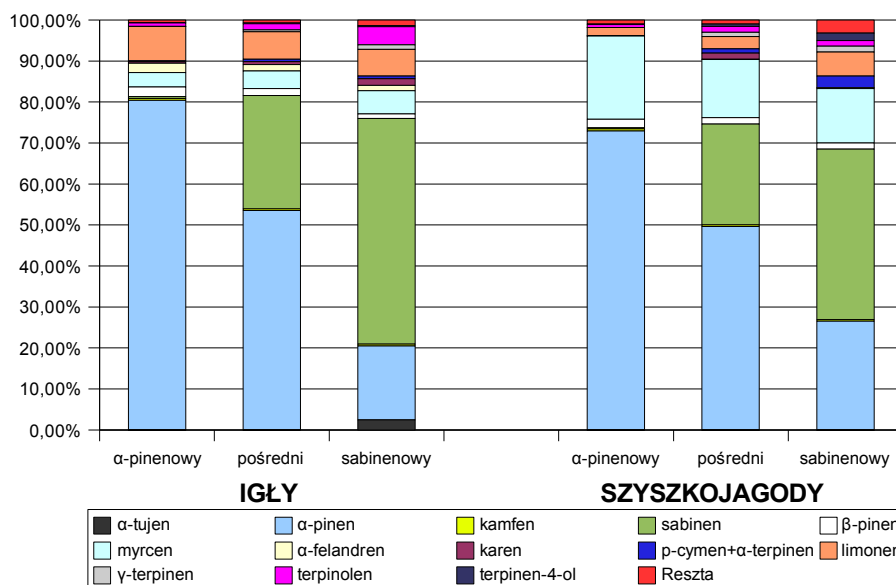
Dla limonenu, wymienionego wcześniej jako jeden z głównych związków monoterpenuowych jałowca, trudno jest określić kierunkową tendencję w opisywanych surowcach. Średnio jest go więcej w strukturach wydzielniczych igieł, w chemotypie α -pinenowym. Przewagę zawartości procentowej limonenu we fragmentach pędów (igły

oraz elementy łądy) w porównaniu do szyszkogąd stwierdzono dla olejku z *Juniperus brevifolia* (da Silva i in., 2000).

TABELA 24: Zakresy, średnie i mediany względnych zawartości procentowych badanych związków monoterpenu w poszczególnych chemotypach jałowca z uwzględnieniem surowca (igły, szyszkogady).

związek	IGŁY (n=76)								
	Chemotyp α-pinenowy (n=59)			Chemotyp pośredni (n=11)			Chemotyp sabinenowy (n=6)		
	zakres	średnia±SD	mediana	zakres	średnia±SD	mediana	zakres	średnia±SD	mediana
α-tujen	0,00-1,58	0,05±0,27	0,00	0,00-1,35	0,12±0,41	0,00	0,00-3,37	1,83±1,49	2,33
α-pinen	50,35-92,45	77,95±8,40	78,99	45-64,14	55,3±7,09	53,42	9,40-37,6	20,76±11,10	16,92
kamfen	0,34-1,18	0,48±0,17	0,42	0,32-0,62	0,43±0,10	0,41	0,30-0,66	0,44±0,14	0,43
sabinen	0,28-7,98	0,89±1,49	0,44	14,04-31,56	24,51±6,6	27,57	39,90-59,30	50,67±6,36	51,70
β-pinen	1,45-4,17	2,34±0,54	2,32	1,29-2,93	1,85±0,54	1,71	0,70-2,33	1,16±0,6	1,04
mircen	2,16-11,5	3,85±1,43	3,46	3,42±5,09	4,25±0,61	4,26	4,60-5,65	5,24±0,4	5,29
α-felandren	0,03-5,65	2,11±1,32	2,24	0,31±2,38	1,34±0,76	1,55	0,63-1,68	1,19±0,38	1,20
karen	0,00-21,99	1,85±3,70	0,36	0,04±6,29	1,47±1,83	0,70	0,86-8,67	3,53±3,62	1,56
p-cymen+α-terpinen	0,00-0,60	0,19±0,15	0,18	0,16±1,03	0,52±0,31	0,60	0,34-1,93	0,83±0,64	0,58
limonen	1,16-21,42	8,41±5,05	8,25	3,03±10,80	6,7±2,57	6,70	5,1-11,33	7,1±2,28	6,14
γ-terpinen	0,00-1,70	0,07±0,22	0,03	0,15±0,72	0,43±0,18	0,42	0,61-1,53	1,04±0,31	1,05
terpinolen	0,29-2,78	0,92±0,43	0,80	1,09±2,02	1,55±0,26	1,51	1,98-5,14	3,83±1,11	4,15
terpinen-4-ol	0,00-0,77	0,10±0,11	0,07	0,04±2,84	0,52±0,83	0,19	0,08-1,42	0,57±0,63	0,26
reszta	0,08-3,48	0,80±0,65	0,65	0,21±3,53	0,98±0,94	0,73	0,29-4,76	1,83±1,73	1,28
związek	SZYSZKOJAGODY (n=58)								
	Chemotyp α-pinenowy (n=53)			Chemotyp pośredni (n=3)			Chemotyp sabinenowy (n=2)		
	zakres	średnia±SD	mediana	zakres	średnia±SD	mediana	zakres	średnia±SD	mediana
α-tujen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-pinen	37,41-91,24	68,88±11,96	70,35	47,4-54,96	50,64±3,90	49,55	25,97-27,10	26,54±0,80	26,54
kamfen	0,27-1,47	0,52±0,20	0,45	0,35-0,80	0,50±0,26	0,36	0,37-0,42	0,4±0,04	0,40
sabinen	0,00-9,23	0,89±1,90	0,28	13,18-29,57	22,44±8,40	24,58	40,40-42,72	41,56±1,64	41,56
β-pinen	0,86-4,03	2,15±0,78	2,02	1,40-2,32	1,76±0,49	1,56	1,45-1,53	1,49±0,06	1,49
mircen	0,00-46,61	21,00±10,15	19,53	4,29-21,80	13,41±8,78	14,15	11,96-14,64	13,3±1,90	13,30
α-felandren	0,00-0,27	0,05±0,05	0,04	0,10-0,14	0,11±0,02	0,10	0,17-0,18	0,18±0,01	0,18
karen	0,00-6,32	0,40±1,17	0,05	0,22-6,46	2,71±3,31	1,44	-	-	-
p-cymen+α-terpinen	0,00-1,81	0,17±0,27	0,09	0,42-1,64	1,05±0,61	1,08	2,74-3,00	2,87±0,18	2,87
limonen	0,90-22,51	3,42±4,76	1,85	2,69-3,30	2,98±0,31	2,96	5,27-6,40	5,84±0,80	5,84
γ-terpinen	0,00-0,38	0,05±0,08	0,03	0,48-1,21	0,90±0,38	1,02	1,40-1,57	1,49±0,12	1,49
terpinolen	0,23-1,38	0,64±0,23	0,64	1,00-2,28	1,57±0,65	1,42	1,24-1,46	1,35±0,16	1,35
terpinen-4-ol	0,00-1,9	0,40±0,45	0,16	0,40-0,86	0,63±0,23	0,64	1,68-1,92	1,8±0,17	1,80
reszta	0,18-13,94	1,46±1,95	0,94	0,83-2,08	1,29±0,61	0,96	2,86-3,55	3,21±0,49	3,21

RYSUNEK 26: Względne zawartości procentowe związków monoterpenu w igłach i szyszkojagodach jałowca z uwzględnieniem chemotypu



*Podane na wykresie wartości to znormalizowane mediany względnych zawartości procentowych.

α -Tujen, będący monoterpem dicyklicznym o masie cząsteczkowej identycznej jak α -pinen, występuje w niewielkich ilościach tylko w igłach, najliczniej w chemotypie sabinenowym. W igłach, w porównaniu z szyszkojagodami, zaobserwować można także więcej 3-karenu i terpinolenu (najwięcej dla prób bogatych w sabinen) oraz α -felandrenu (z niewielką przewagą w chemotypie α -pinenowym).

Pomimo niewielkiego powinowactwa pochodnych tlenowych do złoża PDMS zanotowano nieco wyższą zawartość terpinen-4-olu w szyszkojagodach. Zawartość innych węglowodorów: kamfenu, β -pinenu oraz p-cymenu ulegającego koelucji z α -terpinenem pozostaje na niewysokim i nie wykazującym większych wahań poziomie w obydwu surowcach, bez względu na przynależność do chemotypu.

Korelacja liniowa względnych zawartości procentowych badanych monoterpenu

W pakiecie *Statistica 7.1* wygenerowano macierze korelacji (na poziomie istotności $p < 0,05$) dla zmiennych losowych w postaci względnych zawartości procentowych identyfikowanych monoterpenu. Macierze korelacji przedstawiono w tabeli 25 (dla igieł *J. communis*) oraz 26 (dla szyszkojagody). Analiza współczynników korelacji pozwoliła na ustalenie zależności oraz kierunkowości zmian składników

monoterpenowych występujących w badanych surowcach. Zarówno w przypadku igieł, jak i szyszkogód jałowca stwierdzono bardzo silną ($0,7 < p < 1$) i silną ($0,5 < p < 0,7$) korelację dodatnią pomiędzy monoterpenem dicyklicznym z grupy tujanu – sabinenem, a grupą monoterpenow monocyklicznych: p-cymenem, α -terpinenem, γ -terpinenem i terpinolenem. Jednocześnie w przypadku igieł obserwowano silną korelację dodatnią sabinenu z innym dicyklicznym monoterpenem – α -tujenem. Obydwa należą do pochodnych węglowodoru tujanu i w trakcie cyklizacji powstają ze wspólnego prekursora (Hiltunen i Laakso, 1995). Powiązanie zawartości sabinenu z α -tujenem oraz wymienionymi wyżej związkami z grupy monocyklicznych monoterpenów zanotowano w wynikach innych zespołów badawczych (Chatzopoulou i Katsiosis, 1993).

Szyszkogody, jak już wspomniano zawierają w strukturach wydzielniczych więcej terpinen-4-olu, a jego zawartość procentowa jest silnie skorelowana z ilością sabinenu ($\rho=0,51$). Współczynnik korelacji sabinenu i terpinen-4-olu dla igieł jest odpowiednio niższy i wynosi 0,46. Korelację zawartości procentowej terpinen-4-olu i sabinenu obserwowali wcześniej inni autorzy dla olejku z igieł różnych gatunków jałowca, także dla igieł i szyszkogód *J. communis* (Chatzopoulou i Katsiosis, 1993; Caramiello i in., 1995; Angioni i in., 2003). Współzależność zawartości procentowych tych dwóch związków związana jest ze szlakiem biosyntezy terpinen-4-olu. Sabinen jest bowiem prekursorem tlenowych pochodnych monoterpenów z grupy tujanu (Caramiello i in., 1995 za Karp i Croteau, 1982). Korelacja taka widoczna jest także w przypadku badanej puli prób pomimo tego, że wydajność ekstrakcji terpinen-4-olu na złożu PDMS jest niewysoka.

TABELA 25: Macierz korelacji zawartości procentowej badanych związków monoterpenu oznaczonych na złożu HP101 w igłach *J. communis*

	α -tujen	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	mircen	α -felandren	karen	p-cymen+ α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol
α -tujen	1,00	-0,62	-0,02	0,65	-0,43	0,21	-0,16	0,15	0,51	-0,13	0,51	0,68	0,30
α -pinen	-0,62	1,00	-0,01	-0,92	0,45	-0,34	-0,04	-0,27	-0,74	-0,22	-0,78	-0,92	-0,48
kamfen	-0,02	-0,01	1,00	-0,11	0,04	-0,24	-0,14	0,64	0,07	-0,04	-0,25	0,17	0,16
sabinen	0,65	-0,92	-0,11	1,00	-0,53	0,31	-0,24	0,07	0,66	-0,11	0,80	0,84	0,46
β -pinen	-0,43	0,45	0,04	-0,53	1,00	-0,16	0,25	-0,15	-0,40	0,15	-0,33	-0,50	-0,07
mircen	0,21	-0,34	-0,24	0,31	-0,16	1,00	0,01	-0,07	0,17	0,03	0,28	0,23	0,14
α -felandren	-0,16	-0,04	-0,14	-0,24	0,25	0,01	1,00	-0,08	0,11	0,75	-0,15	-0,05	-0,10
karen	0,15	-0,27	0,64	0,07	-0,15	-0,07	-0,08	1,00	0,18	0,00	0,13	0,41	0,14
p-cymen+ α -terpinen	0,51	-0,74	0,07	0,66	-0,40	0,17	0,11	0,18	1,00	0,16	0,58	0,66	0,59
limonen	-0,13	-0,22	-0,04	-0,11	0,15	0,03	0,75	0,00	0,16	1,00	-0,03	0,07	-0,05
γ -terpinen	0,51	-0,78	-0,25	0,80	-0,33	0,28	-0,15	0,13	0,58	-0,03	1,00	0,69	0,45
terpinolen	0,68	-0,92	0,17	0,84	-0,50	0,23	-0,05	0,41	0,66	0,07	0,69	1,00	0,48
terpinen-4-ol	0,30	-0,48	0,16	0,46	-0,07	0,14	-0,10	0,14	0,59	-0,05	0,45	0,48	1,00

Oznaczone współczynniki korelacji są istotne z $p < 0,05$, $N=76$ (wyniki wygenerowane w pakiecie Statistica 7.1)

TABELA 26: Macierz korelacji zawartości procentowej badanych związków monoterpenu oznaczonych na złożu HP101 w szyszkogodach *J. communis*

	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	mircen	α -felandren	karen	p-cymen+ α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol
α -pinen	1,00	0,07	-0,64	0,33	-0,52	-0,31	-0,21	-0,66	-0,50	-0,64	-0,43	-0,48
kamfen	0,07	1,00	-0,03	0,08	-0,21	-0,08	0,48	0,23	-0,10	-0,04	0,23	0,49
sabinen	-0,64	-0,03	1,00	-0,21	-0,23	0,48	0,22	0,91	0,14	0,99	0,68	0,51
β -pinen	0,33	0,08	-0,21	1,00	-0,26	0,10	-0,14	-0,23	-0,09	-0,22	-0,34	-0,28
mircen	-0,52	-0,21	-0,23	-0,26	1,00	-0,13	-0,09	-0,20	0,13	-0,19	-0,20	-0,01
α -felandren	-0,31	-0,08	0,48	0,10	-0,13	1,00	0,04	0,42	0,14	0,49	0,20	0,11
karen	-0,21	0,48	0,22	-0,14	-0,09	0,04	1,00	0,30	-0,06	0,25	0,64	0,18
p-cymen+ α -terpinen	-0,66	0,23	0,91	-0,23	-0,20	0,42	0,30	1,00	0,20	0,88	0,59	0,69
limonen	-0,50	-0,10	0,14	-0,09	0,13	0,14	-0,06	0,20	1,00	0,11	0,03	0,09
γ -terpinen	-0,64	-0,04	0,99	-0,22	-0,19	0,49	0,25	0,88	0,11	1,00	0,72	0,51
terpinolen	-0,43	0,23	0,68	-0,34	-0,20	0,20	0,64	0,59	0,03	0,72	1,00	0,45
terpinen-4-ol	-0,48	0,49	0,51	-0,28	-0,01	0,11	0,18	0,69	0,09	0,51	0,45	1,00

Oznaczone współczynniki korelacji są istotne z $p < 0,05$, $N=57$ (wyniki wygenerowane w pakiecie Statistica 7.1)

Główny monoterepen jałowca – dicykliczny α -pinen wykazuje jedynie korelację dodatnią ze związkiem z tej samej grupy, czyli β -pinenem ($p=0,45$ dla igieł). Wyniki

potwierdzające związek zawartości obu pinenów można znaleźć w literaturze (Caramiello i in., 1995, Angioni i in., 2003), jednak wielu autorów notowało zwykle stałą, niewysoką zawartość β -pinenu na poziomie 1-3%, nie związaną z występowaniem α -pinenu (Chatzopoulou i Katsiosis, 1993; Koukos i Papadopoulou, 1997; da Silva i in., 2000). Relacje α -pinenu z innymi badanymi związkami opierają się na korelacji ujemnej o bardzo silnym ($-1 < \rho < -0,7$), silnym ($-0,7 < \rho < -0,5$) oraz średnim ($-0,5 < \rho < -0,3$) natężeniu. Wraz ze wzrostem jego zawartości maleje zawartość sabinenu (na tej podstawie wyselekcjonowano rasy chemiczne w badanej puli prób jałowca), α -tujenu, p-cymenu, α -felandrenu i γ -terpinenu w igłach i szyszkojagodach jałowca. Jednocześnie, w samych szyszkojagodach stwierdzono także dość silną korelację ujemną α -pinenu z mircenem i limonenem ($\rho \approx -0,50$). Wyniki analiz chromatograficznych dla szyszkojagód jałowca przeprowadzone przez innych badaczy uwidaczniają taką tendencję. Analizy te zwykle dotyczą tylko kilku prób, na podstawie których nie można wyciągnąć ostatecznych wniosków (Chatzopoulou i Katsiosis, 1993; Koukos i Papadopoulou, 1997).

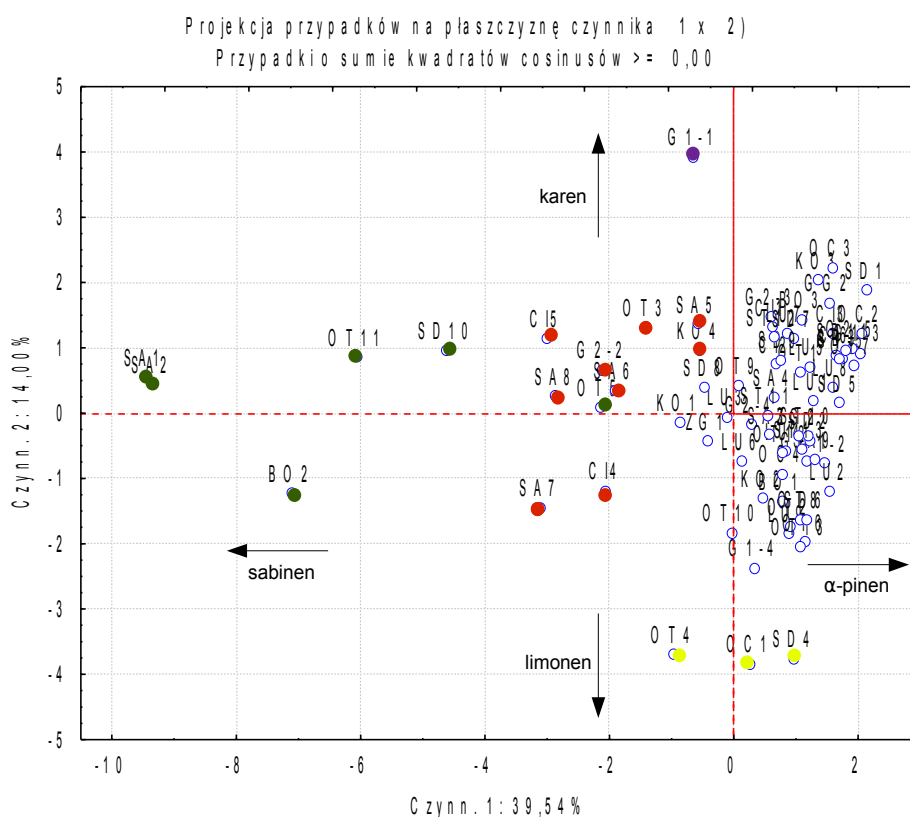
Monoterpeny o budowie monocyklicznej w strukturach wydzielniczych *J. communis* najliczniej reprezentuje limonen. Jednak jego zawartość wykazuje słabe związki z innymi badanymi monoterpenami. Stwierdzono korelację dodatnią o silnym natężeniu dla limonenu i α -felandrenu (także należącego do składników monocyklicznych).

Analiza zmiennych składowych w badaniu zmienności populacyjnej *J. communis*

Analizę zmienności populacyjnej badanych prób *J. communis* przeprowadzono stosując metodę głównych składowych (ang. PCA - *Principal Component Analysis*). Jest to technika eksploracyjna umożliwiająca analizę obiektów (przypadków) opisanych wieloma zmiennymi. Pozwala ona zwizualizować wielowymiarowe zależności. Jej głównym celem jest redukcja wymiarowości problemu dzięki wyznaczeniu głównych składowych oryginalnego zestawu zmiennych objaśniających. Główne składowe składają się na największą możliwą część zmienności (wariancji) występującej w zestawie zmiennych. Sporządzono dwa diagramy PCA będące schematami rozmieszczenia przypadków (w tym wypadku prób jałowca) w przestrzeni czynników. Pierwszy z nich objął dane chromatograficzne otrzymane dla igieł badanych prób jałowca (rysunek 27), a drugi dane dla szyszkojagód (rysunek 28).

Przy tworzeniu dwuwymiarowych wykresów w pakiecie *Statistica* zastosowano składowe o najwyższych wartościach własnych, czyli takie, które niosą ze sobą najwięcej informacji. W obydwu przypadkach dwie pierwsze składowe zawierają ponad 50% łącznej zmienności. Podjęto próby wykreślenia diagramów PCA na podstawie kolejnych głównych składowych o mniejszych wartościach własnych. Otrzymane dla nich schematy rozmieszczenia przypadków w przestrzeni (nie przedstawione w niniejszej pracy) nie różniły się znacząco od wykresów czynnika 1 względem czynnika 2 (por. rysunek 27 i 28).

RYSUNEK 27: Diagram PCA na podstawie danych chromatograficznych otrzymanych na kolumnie achiralnej HP101 dla igieł jałowca



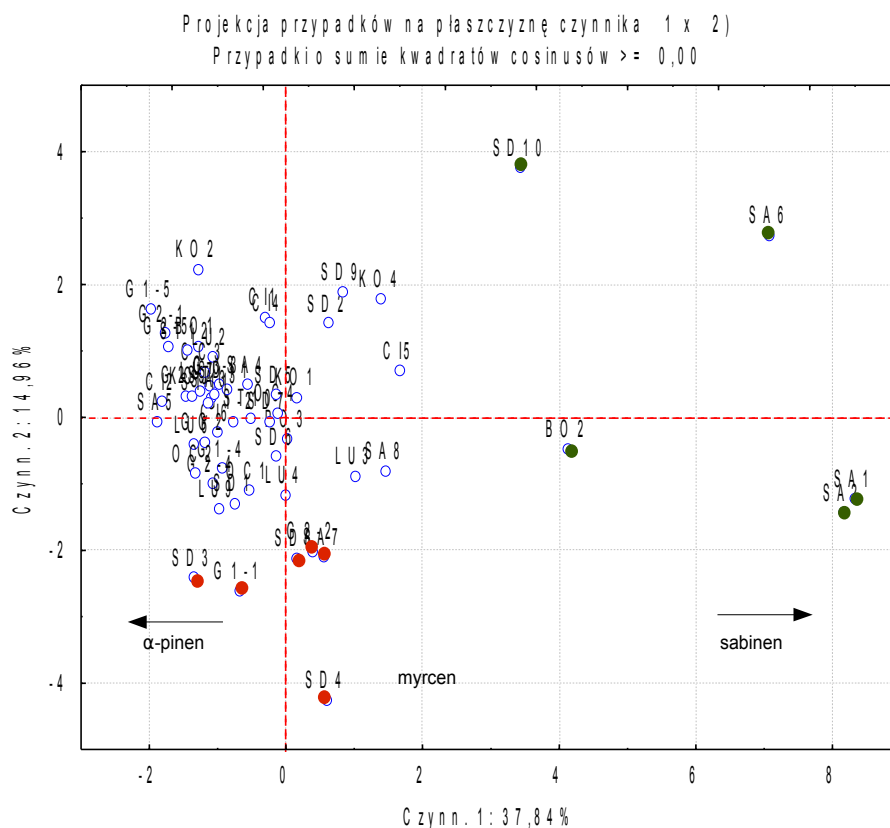
Wykres sporządzono na podstawie dwóch zmiennych składowych o największej zmienności (łącznie 53,54% ogółu wariacji), N=76. Kolejne kolory oznaczają: zielony – chemotyp sabinenowy, czerwony - chemotyp pośredni, niebieski – chemotyp α -pinenowy, żółty – chemotyp α -pinenowy o wysokiej zawartości limonenu, fioletowy - chemotyp α -pinenowy o wysokiej zawartości karenu. Schematy rozmieszczenia wygenerowano w pakiecie Statistica 7.1.

Badane osobniki nie wykazują tendencji do grupowania się pod względem przynależności do określonej populacji (akronimy prób wyróżniają poszczególne populacje). Rozmieszczenie prób w przestrzeni czynników jest warunkowane zawartością identyfikowanych terpenów. Na wykresie zaznaczono strzałkami

kierunkowość rozproszenia prób, związaną z zawartością czterech terpenów (α -pinenem, sabinenem, limonenem i δ -3-karenem). Żadna z badanych dwunastu populacji nie charakteryzuje się określonym zestawem cech fitochemicznych, który powodowałby jej wyraźne wydzielenie na diagramie. Wyodrębnione na wykresie 27 duże skupienie przypadków reprezentuje opisany wcześniej chemotyp α -pinenowy. 56 prób tego skupiska wykazuje typowy dla tej rasy chemicznej rozkład względnych zawartości procentowych 13 badanych monoterenów (por. zestawienie podstawowych statystyk dla chemotypów tab. 24 s. 142 oraz rys. 26 s. 143). Z grupy tej oddzielają się kierunkowo próby OC1, OT4, SD4 (oznaczone kolorem żółtym) oraz G1-1 (kolor fioletowy). Trzy pierwsze charakteryzują się wysoką zawartością limonenu (~20%), wykazującej zdecydowane odchylenie od obliczonej średniej dla tego chemotypu. Próba G1-1 różni się od pozostałych ponad 20% zawartością δ -3-karenu (średnia obliczona dla tego związku to 1,85%). Wysoka zawartość limonenu i δ -3-karenu nie jest charakterystyczną cechą olejku z *J. communis*. W dostępnych źródłach dotyczących składu olejku z tej rośliny ich zawartość nie przekracza kilku procent (Chatzopoulou i Katsiosis, 1993; Caramiello i in., 1995; Hiltunen i Laakso, 1995). Sporadycznie w literaturze notowane są próby o podwyższonym poziomie limonenu (Looman i Baerheim Svendsen, 1992; Ochocka i in., 1997) oraz δ -3-karenu (powyżej 20%) (Angioni i in., 2003). Wysoka zawartość tego ostatniego jest cechą charakterystyczną dla innej rośliny z rzędu *Pinales* – *Pinus sylvestris* i stała się podstawą do wydzielenia chemotypów tej rośliny (Hiltunen i Laakso, 1995; Sjödin i in., 1996). Pozostałe zaznaczone na diagramie PCA przypadki (kolor czerwony i zielony) to te próby, w których względna zawartość sabinenu rośnie, a α -pinenu spada (są to odpowiednio chemotyp pośredni i sabinenowy).

Diagram PCA wykreślony na podstawie zawartości tych samych związków wyizolowanych z szyszkojagód jałowca (por. rys. 28) potwierdza obserwacje uzyskane dla igieł. Z największego skupiska prób sklasyfikowanych jako chemotyp α -pinenowy wyodrębniają się próby o nieprzeciętnie wysokiej zawartości mircenu (~40%) (zaznaczone na czerwono G1-1, G2-2, SA7, SD3, SD4). Występujące w dużym rozproszeniu próby oznaczone na zielono to takie, które zostały określone jako chemotyp pośredni i sabinenowy.

RYSUNEK 28: Diagram PCA na podstawie danych chromatograficznych otrzymanych na kolumnie achiralnej HP101 dla szyszkojagód jałowca



Wykres sporządzono na podstawie dwóch zmiennych składowych o największej zmienności (łącznie 52,8% ogółu wariancji), $N=57$. Kolejne kolory oznaczają: zielony – chemotyp sabinenowy i pośredni, niebieski – chemotyp α -pinenowy, czerwony – chemotyp α -pinenowy o wysokiej zawartości mircenu (~40%). Schematy rozmieszczenia wygenerowano w pakiecie Statistica 7.1.

W celu dokładniejszego prześledzenia zależności pomiędzy zawartością badanych związków monoterpowych przeprowadzono analizę chromatograficzną na złożu enancjoselektywnym. Jej wyniki omówiono poniżej.

3.2. Analiza chiralna

Identyfikacja enancjomerów związków monoterpowych w badanym surowcu poszerzyła spektrum badanych składników, gdyż z punktu widzenia ich biosyntezy postuluje się, aby dwa enancjomery związku chiralnego traktować jako dwa odrębne składniki (Sjödin i in., 1996 za Croteau, 1987). Dodatkowo duża zmienność wewnątrzgatunkowa składu terpenów u roślin szpilkowych oraz często odmienne aktywności biologiczne i rola ekologiczna enancjomerów potwierdzają zasadność tej tezy (Fäldt i in., 2001). Pomimo dynamicznego rozwoju złożów enancjoselektywnych opartych między innymi na modyfikowanych cyklodestrynach (Asztemborska i in.,

2003) istnieje stosunkowo niewiele danych dotyczących zawartości poszczególnych enancjomerów w strukturach olejkowych jałowca pospolitego. Zestawienie trzech dostępnych źródeł (Sybilska i in., 1994; Hiltunen i Laakso, 1995; Ochocka i in., 1997) nie daje pełnego poglądu w tej tematyce, gdyż zawarte w nich wyniki dotyczą zwykle tylko niewielkiej, reprezentatywnej grupy roślin. Oznaczanie skręcalności optycznej, obok badania ciężaru właściwego, gęstości czy współczynnika załamania światła, należy do podstawowych wielkości mierzonych w badaniu tożsamości olejków eterycznych. Dostępne monografie farmakopealne dotyczące olejku z szyszkojagody jałowca określają wartość kąta skręcenia płaszczyzny światła ($\alpha_D^{20^\circ}$). Farmakopea Europejska i Brytyjska podają zakres od -15° do $-0,5^\circ$ (Ph Eur 5.0, 2005; BP, 2004), natomiast ostatnia polska monografia farmakopealna olejku jałowcowego od -15° do $+5^\circ$. Wyniki analizy enancjoselektywnej w przypadku igieł i szyszkojagód jałowca pospolitego stanowią zatem cenne uzupełnienie wiedzy z tego zakresu.

Wśród monoterpenów zidentyfikowanych na zastosowanym złożu enancjoselektywnym trzy występują w obydwu formach enancjomerycznych. Są to α - i β -pinen oraz limonen. W rozdziale „Suplement A – Wyniki analiz chromatograficznych,„) w tabeli 46, s. 217 zestawiono nadmiary enancjomeryczne (EE - ang. *enantiomeric excess*) z uwzględnieniem wyznaczonych wcześniej kryteriów ras chemicznych. Obliczono je dla α - i β -pinenu oraz limonenu według wzoru:

$$EE(\%) = \frac{R-S}{R+S} \cdot 100\%.$$

gdzie R i S oznaczają odpowiednio prawo- i lewoskrętny enancjomer.

Wytyczne IUPAC zalecają podawanie EE jako wartości bezwzględnej (<http://www.iupac.org/goldbook/E02070.pdf>). W niniejszej pracy ze względu na dość znaczne zróżnicowanie zawartości procentowych poszczególnych enancjomerów przyjęto jednak formułę bez wartości bezwzględnej. Znak (+) lub (-) przed wartością EE informuje o kierunkowości nadmiaru (czyli o przewadze formy prawo- lub lewoskrętnej). W tabeli 27 zestawiono podstawowe statystyki dla obliczonych wartości EE. W niektórych chemotypach nadmiary enancjomeryczne α -pinenu i limonenu przyjmowały zarówno wartości dodatnie, jak i ujemne, dlatego zdecydowano w obrębie chemotypów wydzielić dwie kategorie ze względu na dominację jednego z dwóch enancjomerów. W obrębie tak wyznaczonych przedziałów podano zakresy wartości EE oraz wartości mediany.

Inne monoterpény chiralne, takie, jak sabinen i δ -3-karen występują w badanym surowcu tylko w jednej formie enancjomerycznej (+), zaś kamfen w postaci lewoskrętnej (-). Pozostałe związki nie wykazują czynności optycznej.

TABELA 27: Zakresy i mediany nadmiarów enancjomerycznych α - i β -pinenu oraz limonenu w poszczególnych chemotypach jałowca z uwzględnieniem surowca (igły i szyszkojagody).

Chemotyp	EE ¹ (%) α -pinen			EE ¹ (%) limonen			EE ¹ (%) β -pinen		
	wartość ²	zakres	mediana	wartość ²	zakres	mediana	wartość ²	zakres	mediana
IGŁY									
α -pinenowy n=27	(-) n=0	-	-	(-) n=15	-53,45÷-5,17	-33,33	(-) n=27	-100,00÷-4,05	-51,16
	(+) n=27	4,84÷92,42	45,27	(+) n=12	4,84÷92,42	37,71	(+) n=0	-	-
pośredni n=10	(-) n=3	-86,00÷-1,10	-11,20	(-) n=1	-14,72	-	(-) n=10	-64,34÷-22,61	-57,45
	(+) n=7	1,96÷68,91	29,21	(+) n=9	1,96÷68,91	40,79	(+) n=0	-	-
sabinenowy n=6	(-) n=4	-15,59÷-3,62	-7,23	(-) n=0	-	-	(-) n=6	-100,00÷-9,09	-27,11
	(+) n=2	25,34÷100,00	22,41	(+) n=6	25,34÷100,00	77,52	(+) n=0	-	-
SZYSZKOJAGODY									
α -pinenowy n=26	(-) n=3	-46,34÷-6,04	-32,27	(-) n=4	-23,08÷-4,08	-19,19	(-) n=26	-100,00÷-5,26	-57,56
	(+) n=23	7,79÷92,51	49,96	(+) n=22	0,43-100,00	26,97	(+) n=0	-	-
pośredni n=5 ³	(-) n=3	-94,37÷-21,24	-68,08	(-) n=0	-	-	(-) n=3	-78,17÷-53,40	-76,83
	(+) n=1	10,65	-	(+) n=5	8,14÷70,59	38,03	(+) n=0	-	-
sabinenowy n=3	(-) n=2	-66,79÷-64,75	-65,77	(-) n=0	-	-	(-) n=5	-100,00÷-56,80	-78,17
	(+) n=1	27,40	-	(+) n=3	3,72÷78,73	75,33	(+) n=0	-	-

¹ EE(%) (nadmiar enancjomeryczny) obliczano wg wzoru $EE(\%) = \frac{R-S}{R+S} \cdot 100\%$.

² znaki (+) oraz (-) oznaczają dodatnią i ujemną wartość nadmiaru enancjomerycznego

³ wartość EE dla α -pinenu w jednej z trzech badanych prób wynosiła 0

Spośród trzech monoterpenu występujących w obu formach enancjomerycznych tylko forma (-) β -pinenu dominuje nad formą (+). Dotyczy to wszystkich chemotypów i obu surowców pozyskiwanych z badanej rośliny. W chemotypie α -pinenowym obserwuje się przewagę enancjomeru (+) α -pinenu we wszystkich próbach igieł oraz w większości prób szyszkojagód (3 próby szyszkojagód w chemotypie α -pinenowym zdominowana jest przez formę (-) tego związku). Wraz ze wzrostem zawartości procentowej (+)sabinenu (chemotyp pośredni i sabinenowy) spada zawartość (+) α -pinenu. Zaczyna dominować jego forma (-), co skutkuje ujemnymi wartościami EE dla α -pinenu. Podobne zależności obserwowali Hiltunen i Laakso, którzy dla niskosabinenowego chemotypu jałowca określili średnie zawartości

(-) i (+) α -pinenu na poziomie 26,6% i 54,3%, a dla wysokosabinenowego – odpowiednio 28,9% oraz 24,6% (Hiltunen i Laakso, 1995).

Nieco trudniej znaleźć prawidłowości we wzajemnych proporcjach zawartości procentowej enancjomerów limonenu. W najliczniej reprezentowanym chemotypie α -pinenowym w nieco ponad połowie prób igieł obserwuje się dominację formy (-). W chemotypie pośrednim i sabinenowym EE limonenu przyjmuje wartości dodatnie (dane dla igieł). Wynik taki może wskazywać, że zawartość formy (+) limonenu może być związana z obecnością w strukturach olejkowych igieł podwyższonej ilości (+)sabinenu. Jednocześnie w szyszkojagodach zdecydowana większość prób bez względu na chemotyp (30 prób z 34 badanych) charakteryzuje się przewagą formy (+) limonenu nad formą (-). Różne źródła wskazują, że (+)limonen jest charakterystyczny dla roślin z rodziny *Rutaceae*, podczas, gdy roślinom szpilkowym przypisywana jest obecność formy enancjomerycznej (-) (Sjödin i in., 1996). Uzyskane wyniki oraz dane dostępne w literaturze (Hiltunen i Laakso, 1995; Ochocka i in., 1997) dowodzą, że (+)limonen może także występować w przewadze nad formą (-) także u roślin szpilkowych.

Analizując dane z tabeli 46 s. 217 zawierającej obliczone EE dla obydwu badanych surowców oraz podstawowe dane statystyczne zebrane w tabeli 27 s. 151 należy także zwrócić uwagę na zróżnicowanie składu enancjomerycznego w obrębie tej samej rośliny. Dominacja jednej z form α -pinenu i limonenu w igłach nie zawsze skutkuje takim samym rozkładem form enancjomerycznych w szyszkojagodach. Z 34 prób szyszkojagód tylko 13 wykazuje taką samą kierunkowość nadmiaru enancjomerycznego α -pinenu i limonenu jak w igłach. Pozostałe 21 różni się proporcjami enancjomerów limonenu (15 prób), α -pinenu (5 prób) oraz obu tych związków (1 próba). Zjawisko produkcji różnych enancjomerów przez różne organy tej samej rośliny sugeruje, że ich szlaki biosyntetyczne w różnych organach są niezależne. Można wnioskować, iż w igłach i szyszkojagodach poziom ekspresji enzymów katalizujących przemiany różni się znacząco w obrębie tej samej rośliny. Ciągłe jednak nierozwiązany zostaje problem czynników, które wpływają na tak znaczące różnice.

Duża zmienność składu olejków z roślin szpilkowych na poziomie międzypopulacyjnym, wewnątrzpopulacyjnym oraz nawet w obrębie tej samej rośliny była obserwowana przez innych badaczy (Vernin i in., 1988; Persson i in., 1996;

Sjödin i in., 1996; Angioni i in., 2003). Badania składu enancjomerycznego olejku *Picea abies* wykazały istnienie różnic pomiędzy organami (igły, drewno) z różnych konarów tego samego drzewa, przy czym igły wykazywały większą homogenność składu (Persson i in., 1996). Duże różnice ilościowe w składzie olejku z różnych tkanek i organów tego samego drzewa zanotowano także dla *Pinus sylvestris* (Sjödin i in., 1996) oraz *J. communis* subsp. *communis* (Ochocka i in., 1997; Angioni i in., 2003) i *J. phoenicea* subsp. *turbinata* (Angioni i in., 2003). Tak duże zróżnicowanie, obserwowane również w niniejszej pracy pozwala na stwierdzenie, że niemożliwe jest prognozowanie składu olejku jednego z organów na podstawie innego organu tego samego osobnika. Należy także pamiętać, że analizując skład olejków należy zwrócić szczególną uwagę na specyfikację tkanki, z której był on pozyskiwany, aby nie porównywać ze sobą olejków otrzymanych z różnych surowców, nawet w obrębie tej samej rośliny.

Korelacja liniowa względnych zawartości procentowych badanych form enancjomerycznych monoterpenów

W tabelach 28 i 29 przedstawiono macierze korelacji (odpowiednio dla igieł i szyszkogagód) otrzymane w pakiecie *Statistica 7.1* dla związków oznaczonych na złożu enancjoselektywnym. Analiza współczynników korelacji umożliwiła dokładne prześledzenie powiązań pomiędzy zawartością poszczególnych enancjomerów związków monoterpenowych.

Przedstawione macierze korelacji są potwierdzeniem wzajemnych powiązań pomiędzy zawartościami poszczególnych monoterpenów przedstawionych w macierzach sporządzonych na podstawie wyników achiralnych. Zawartość (+)sabinenu jest skorelowana silnie dodatnio z zawartością terpinolenu i (+)-3-karenu w igłach oraz terpinolenu, p-cymenu i γ -terpinenu w szyszkogagodach. Ponadto w przypadku igieł, w których stwierdzono więcej prób z wyraźną przewagą (-)limonenu nad (+)limonenem, obserwuje się silną korelację dodatnią pomiędzy (-) limonenem a (-)kamfenem.

TABELA 28 : Macierz korelacji zawartości procentowej badanych związków monoterpowych oznaczonych na złożu HPChiral w igłach *J. communis*

	(-)α-pinen	(+)α-pinen	mircen	(+)sabinen	(-)kamfen	(+)3-karen	α-felandren+α-terpinen	(+)β-pinen	(-)β-pinen	p-cymen	(-)limonen	(+)limonen	γ-terpinen	terpinolen
(-)α-pinen	1,00	-0,09	-0,09	-0,28	0,18	-0,35	0,17	-0,42	0,96	0,20	0,19	-0,26	-0,09	-0,38
(+)α-pinen	-0,09	1,00	-0,39	-0,88	-0,01	-0,45	0,05	0,42	-0,14	-0,39	-0,05	-0,27	0,02	-0,78
mircen	-0,09	-0,39	1,00	0,29	0,00	0,06	0,05	-0,23	-0,03	0,15	0,22	0,40	0,30	0,31
(+)sabinen	-0,28	-0,88	0,29	1,00	-0,15	0,50	-0,34	-0,19	-0,27	0,24	-0,06	0,24	-0,12	0,86
(-)kamfen	0,18	-0,01	0,00	-0,15	1,00	0,16	0,24	0,09	0,12	0,27	0,78	-0,22	-0,02	0,04
(+)3-karen	-0,35	-0,45	0,06	0,50	0,16	1,00	-0,30	-0,19	-0,33	0,09	0,21	0,26	-0,09	0,62
α-felandren+α-terpinen	0,17	0,05	0,05	-0,34	0,24	-0,30	1,00	-0,12	0,28	0,09	-0,03	-0,10	0,20	-0,16
(+)β-pinen	-0,42	0,42	-0,23	-0,19	0,09	-0,19	-0,12	1,00	-0,41	0,03	0,04	-0,03	0,06	-0,20
(-)β-pinen	0,96	-0,14	-0,03	-0,27	0,12	-0,33	0,28	-0,41	1,00	0,29	0,12	-0,19	-0,02	-0,34
p-cymen	0,20	-0,39	0,15	0,24	0,27	0,09	0,09	0,03	0,29	1,00	0,25	0,00	0,10	0,07
(-)limonen	0,19	-0,05	0,22	-0,06	0,78	0,21	-0,03	0,04	0,12	0,25	1,00	-0,09	-0,15	0,02
(+)limonen	-0,26	-0,27	0,40	0,24	-0,22	0,26	-0,10	-0,03	-0,19	0,00	-0,09	1,00	0,43	0,28
γ-terpinen	-0,09	0,02	0,30	-0,12	-0,02	-0,09	0,20	0,06	-0,02	0,10	-0,15	0,43	1,00	0,01
terpinolen	-0,38	-0,78	0,31	0,86	0,04	0,62	-0,16	-0,20	-0,34	0,07	0,02	0,28	0,01	1,00

Oznaczone współczynniki korelacji są istotne z $p < 0,05$, $N=42$ (wyniki wygenerowane w pakiecie Statistica 7.1)

TABELA 29: Macierz korelacji zawartości procentowej badanych związków monoterpowych oznaczonych na złożu HPChiral w szyszkojadach *J. communis*

	(-)α-pinen	(+)α-pinen	mircen	(+)sabinen	(-)kamfen	(+)3-karen	α-felandren+α-terpinen	(+)β-pinen	(-)β-pinen	p-cymen	(-)limonen	(+)limonen	γ-terpinen	terpinolen
(-)α-pinen	1,00	-0,62	-0,24	0,03	0,41	-0,05	0,07	-0,39	0,98	-0,04	0,24	-0,04	0,12	-0,20
(+)α-pinen	-0,62	1,00	-0,03	-0,61	-0,07	-0,19	-0,17	0,53	-0,61	-0,55	-0,19	-0,27	-0,56	-0,22
mircen	-0,24	-0,03	1,00	-0,33	-0,16	-0,25	-0,04	-0,30	-0,27	-0,11	0,25	-0,06	-0,07	-0,30
(+)sabinen	0,03	-0,61	-0,33	1,00	-0,19	0,36	0,21	0,03	0,03	0,81	-0,21	0,07	0,65	0,62
(-)kamfen	0,41	-0,07	-0,16	-0,19	1,00	0,13	-0,04	-0,02	0,36	-0,26	0,12	-0,18	-0,16	-0,04
(+)3-karen	-0,05	-0,19	-0,25	0,36	0,13	1,00	0,14	-0,12	-0,09	0,42	0,08	-0,07	0,00	0,34
α-felandren+α-terpinen	0,07	-0,17	-0,04	0,21	-0,04	0,14	1,00	0,04	0,09	-0,03	-0,04	-0,10	0,24	0,20
(+)β-pinen	-0,39	0,53	-0,30	0,03	-0,02	-0,12	0,04	1,00	-0,40	-0,14	-0,41	-0,39	-0,01	0,19
(-)β-pinen	0,98	-0,61	-0,27	0,03	0,36	-0,09	0,09	-0,40	1,00	-0,06	0,21	0,03	0,11	-0,21
p-cymen	-0,04	-0,55	-0,11	0,81	-0,26	0,42	-0,03	-0,14	-0,06	1,00	0,12	0,04	0,53	0,33
(-)limonen	0,24	-0,19	0,25	-0,21	0,12	0,08	-0,04	-0,41	0,21	0,12	1,00	0,07	-0,16	-0,54
(+)limonen	-0,04	-0,27	-0,06	0,07	-0,18	-0,07	-0,10	-0,39	0,03	0,04	0,07	1,00	0,16	0,15
γ-terpinen	0,12	-0,56	-0,07	0,65	-0,16	0,00	0,24	-0,01	0,11	0,53	-0,16	0,16	1,00	0,43
terpinolen	-0,20	-0,22	-0,30	0,62	-0,04	0,34	0,20	0,19	-0,21	0,33	-0,54	0,15	0,43	1,00

Oznaczone współczynniki korelacji są istotne z $p < 0,05$, $N=34$ (wyniki wygenerowane w pakiecie Statistica 7.1)

W obydwu surowcach wyraźnie zaznacza się także współzależność pomiędzy formami enancjomerycznymi lewoskrętnymi (-) α - i β -pinenu ($\rho \approx 0,95$), podczas, gdy współczynnik korelacji dla form (+) tych składników wynosi 0,42 dla igieł oraz 0,53 dla szyszkojagód. Fäldt i in. określali korelację pomiędzy związkami monoterpenu z sześciu gatunków *Pinus*, których zawartość procentową oznaczali na złożu chiralnym. Dla wszystkich gatunków zanotowali bardzo wysokie wartości współczynnika korelacji liniowej Pearsona pomiędzy zawartością (+) α - i (+) β -pinenu, podczas gdy tylko trzy gatunki wykazywały silne powiązanie pomiędzy zawartością form enancjomerycznych (-) tych składników (Fäldt i in., 2001). Ponieważ wśród badanych prób istnieje tendencja do wyraźnej dominacji jednej z form (tylko jedna próba szyszkojagód jest racematem pod względem zawartości enancjomerów α -pinenu, a jedna próba igieł wykazuje EE na poziomie -1%) zwrócono szczególną uwagę na współczynniki korelacji pomiędzy dwoma enancjomerami pinenów. Analiza macierzy korelacji wykazała, że dla α -pinenu korelacja form (+) i (-) jest słaba i ujemna w przypadku igieł oraz silna i ujemna w przypadku szyszkojagód. Dla enancjomerów β -pinenu w obydwu surowcach stwierdzono korelację ujemną o średnim natężeniu. Podobne wyniki uzyskano dla enancjomerów tych związków w przypadku wspomnianych już wyżej badań nad składem olejków z różnych gatunków rodzaju *Pinus* (Fäldt i in., 2001). Niski współczynnik korelacji (+) i (-) α -pinenu otrzymany dla igieł *J. communis* w niniejszej pracy może sugerować, że dwa enancjomery α -pinenu mogą być syntetyzowane z udziałem innego enzymu w tych organach rośliny. Dla gatunku *Pinus conorta* udowodniono, że syntezę obu enancjomerów tego związku katalizuje ten sam enzym (Savage i in., 1995), podczas, gdy dla innego gatunku tego samego rodzaju (*Pinus taeda*) – dwa różne enzymy (Phillips i in., 1999).

Ponadto notuje się silną korelację ujemną pomiędzy zawartością procentową (+) α -pinenu i (+)sabinenu, co wydaje się uzasadnione w odniesieniu do szlaku biosyntezy monoterpenu. Enancjomery z serii (+) powstają bowiem ze wspólnego prekursora w szlaku przemian karbokationów geranylu i nerylu. Możliwe jest, że cyklazy katalizujące syntezę tych terpenów współzawodniczą ze sobą o substraty, a zwiększony poziom ekspresji jednej z nich skutkuje zmniejszeniem wydajności powstawania drugiego związku.

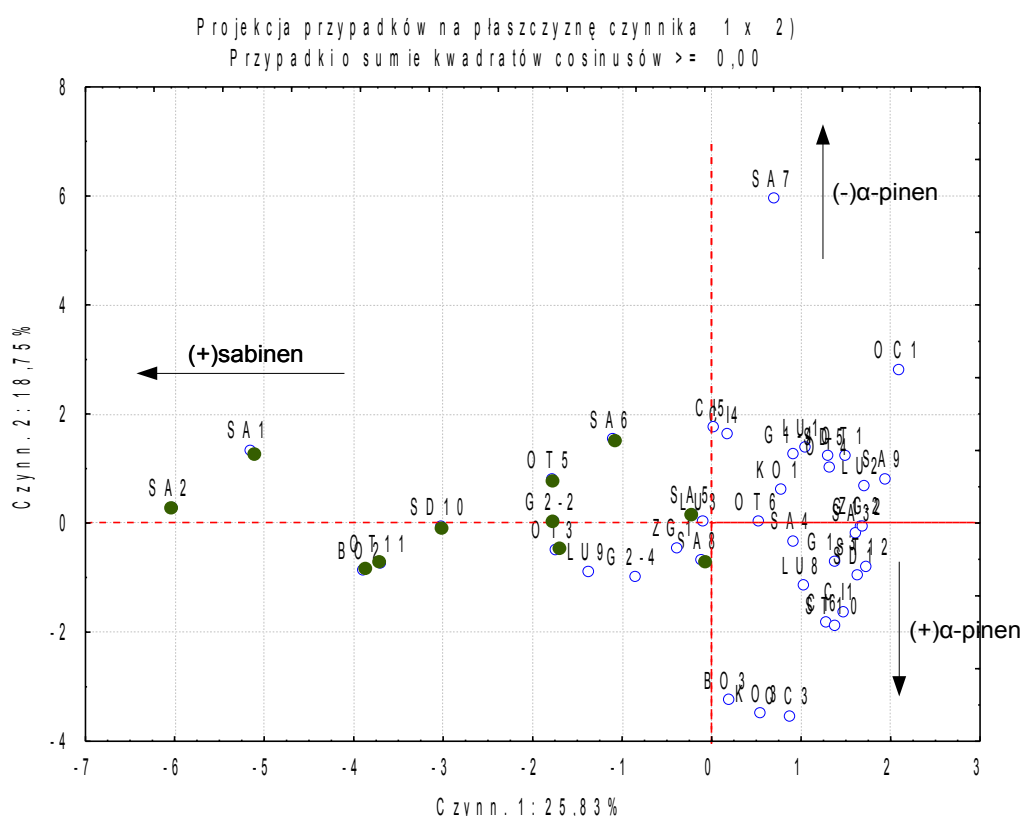
Pomimo obserwacji poczynionych wcześniej na podstawie podstawowych statystyk dla danych chiralnych (por. tab. 27, s. 151) współczynniki korelacji nie

wskazują na silną współzależność pomiędzy zawartością (+)limonenu i (+)sabinenu w przypadku igieł.

Analiza głównych składowych

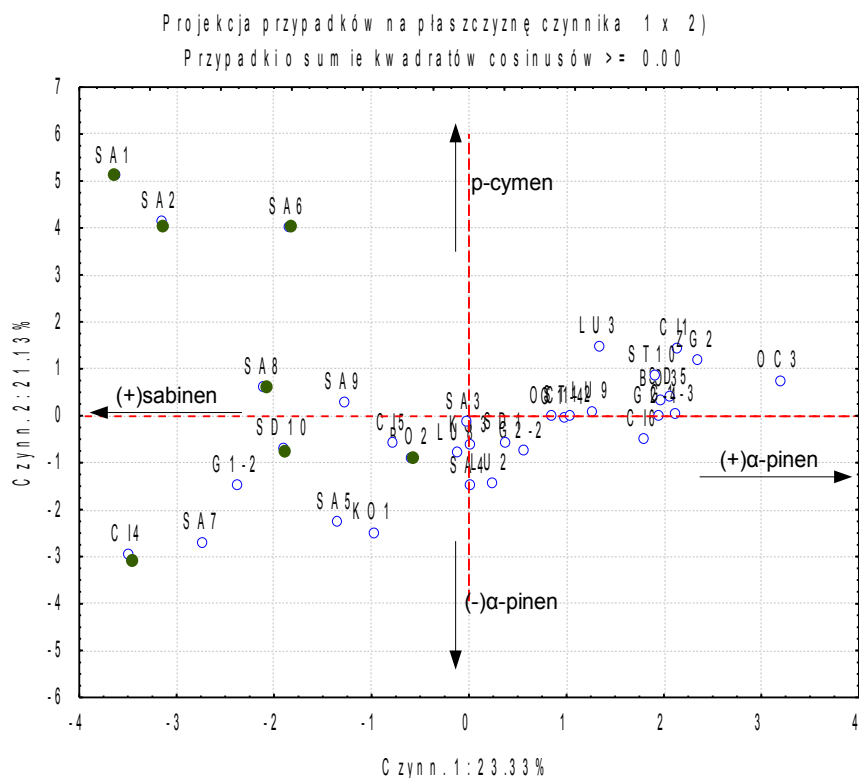
Podobnie jak w przypadku danych chromatograficznych otrzymanych w wyniku HS SPME GC na złożu HP101 wyniki analiz na złożu enancjoselektywnym poddano analizie PCA. Rysunki 29 i 30 przedstawiają rzut badanych przypadków (prób igieł oraz szyszkojagód) na płaszczyznę dwóch najbardziej zmiennych czynników. Zarówno w przypadku igieł, jak i szyszkojagód główne składowe 1 i 2 składają się na nieco powyżej 45% ogólnej wariacji. Strzałki na diagramach PCA oznaczają kierunkowość grupowania się badanych prób pod względem zawartości procentowej trzech głównych związków monoterpenu: obydwu enancjomerów α -pinenu oraz (+)sabinenu.

RYSUNEK 29: Diagram PCA na podstawie danych chromatograficznych otrzymanych na kolumnie enancjoselektywnej HPChiral dla igieł jałowca



Wykres sporządzono na podstawie dwóch zmiennych składowych o największej zmienności (łącznie 44,58% ogółu wariacji), N=42. Kolejne kolory oznaczają: zielony – chemotyp sabinenowy i pośredni, niebieski – chemotyp α -pinenowy. Schematy rozmieszczenia wygenerowano w pakiecie Statistica 7.1.

RYSUNEK 30: Diagram PCA na podstawie danych chromatograficznych otrzymanych na kolumnie enantioselektywnej HPChiral dla szyszkojagód jałowca



Wykres sporządzono na podstawie dwóch zmiennych składowych o największej zmienności (łącznie 44,72% ogółu wariancji), $N=34$. Kolejne kolory oznaczają: zielony – chemotyp sabinenowy i pośredni, niebieski – chemotyp α-pinenowy. Schematy rozmieszczenia wygenerowano w pakiecie Statistica 7.1.

Wyniki PCA, w których jako zmienne potraktowano związki zidentyfikowane na złożu chiralnym potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia dotyczące zmienności fitochemicznej monoterpenu jałowca oznaczonych na kolumnie HP101. Także w tym przypadku nie obserwuje się grupowania prób na podstawie przynależności do określonej populacji. Próby tworzą skupiska, których cechą wspólną jest względna zawartość procentowa podstawowych związków monoterpenu. Duże skupisko prób zaznaczonych na niebiesko na diagramie sporządzonym dla igieł (rys. 29) reprezentuje chemotyp α-pinenowy, z którego wyodrębniają się próby o nieprzeciętnie wysokiej zawartości procentowej (+) lub (-)α-pinenu. Na zielono zaznaczono próby zakwalifikowane jako chemotyp sabinenowy i pośredni. Podobne rozmieszczenie prób można zaobserwować na diagramie dla szyszkojagód (rys. 30). Główne cechy grupujące to względne zawartości procentowe (+) i (-)α-pinenu oraz (+)sabinenu. Dodatkowo należy zauważyć, że próby na rys. 30 oznaczone symbolami SA1, SA2 i

SA6 (chemotyp sabinenowy oraz pośredni), które leżą w znacznej odległości od reszty, odznaczają się najwyższą zawartością p-cymenu.

3.3. Podsumowanie

Na podstawie oznaczeń głównych związków monoterpenowych w igłach i szyszkojagodach *J. communis* na złożu achiralnym i chiralnym stwierdzono dużą zmienność składu monoterpenów jałowca. Obserwowane różnice pomiędzy surowcami pozyskiwanymi z tej samej rośliny oraz różnorodność składu tych związków w badanej puli prób mają przede wszystkim charakter ilościowy. Najlepiej uwidaczniają się one wewnątrz populacji, przy jednoczesnej niedużej zmienności na poziomie międzypopulacyjnym. Trudno jest jednak dyskutować kwestię zmienności wewnątrzpopulacyjnej, gdyż nie przeprowadzono szczegółowych badań obejmujących dużej ilości prób jednej populacji. Rozmieszczenie geograficzne stanowisk, z których pochodziły badane populacje jest na tyle mało zróżnicowane, że nie obserwowano zmienności składu monoterpenów wynikającej z pochodzenia surowca. Czynnikiem ten jest jednym z najczęściej wymienianych wśród warunkujących różnice w składzie olejków eterycznych (Vernin i in., 1988; Hiltunen i Laakso, 1995), jednak wyniki uzyskane w niniejszej pracy nie potwierdzają tej hipotezy. Prawdopodobnie o zróżnicowaniu olejku wynikającym z różnego pochodzenia surowca można mówić w przypadku, gdy badane rośliny tego samego gatunku zasiedlają bardziej odległe stanowiska, o odmiennych warunkach ukształtowania terenu i innym klimacie. Ochocka i in. obserwowali znaczące różnice w składzie enancjomerycznym olejków z igieł *Pinus sylvestris* pochodzących odległych stanowisk zlokalizowanych w Polsce, Włoszech, Korei i Austrii. Jednocześnie olejki otrzymane z igieł *Pinus montana* i *Abies alba* (ze stanowisk w Austrii, Włoszech i Korei) nie wykazywały dużej zmienności składu głównych monoterpenów (Ochocka i in., 2002).

Przeprowadzone analizy chromatograficzne wykazały, że głównymi składnikami frakcji monoterpenowej struktur wydzielniczych jałowca są dicykliczne monoterpeny - α -pinen i sabinen w igłach oraz α -pinen, sabinen i acykliczny węglowodór - mircen w szyszkojagodach. Względne zawartości procentowe α -pinenu i sabinenu stały się podstawą do wyróżnienia w puli prób trzech ras chemicznych, z których α -pinenowa reprezentuje ponad 70% wszystkich badanych roślin. Zarówno α -pinen, jak i sabinen posiadają w cząsteczce asymetryczny atom węgla i mogą występować w dwóch

odmianach enancjomerycznych. Sabinen w jałowcu wykazuje wysoką czystość optyczną, występując tylko w formie prawoskrętnej, zaś odmiany (+) i (-) α -pinenu występują we wszystkich badanych próbach w różnych proporcjach. Mircen jest składnikiem nieaktywnym optycznie i syntetyzowany jest w większych ilościach w szyszkojagodach jałowca. Może on być potencjalnym markerem olejku z szyszkojagód, a jego niska zawartość może świadczyć o zafałszowaniu olejkiem z igieł. Zawartości pozostałych związków rzadko wykazują większe wahania, sporadycznie notowano próby o podwyższonej ilości karenu, limonenu i p-cymenu.

Można sobie także zadać pytanie, czy istnienie chemotypów w obrębie gatunków, z których pozyskiwane są surowce farmakopealne powinno być uwzględnione w przypadku ich monografii. Wydaje się, że w przypadku *J. communis* nie powinno mieć to dużego znaczenia, gdyż surowcem farmakopealnym jest szyszkojagoda, w której stwierdzono zdecydowanie niższą zawartość sabinenu. Ponadto, surowiec farmakopealny pozyskiwany jest z wielu osobników gatunku, można więc stwierdzić, że jest to próba uśredniona. Po uśrednieniu zawartości procentowych głównych składników olejku z szyszkojagód w przypadku badanej puli prób wartości średnich nie przekraczają norm zawartych w Farmakopei Brytyjskiej i Europejskiej (por. tabela 4 „Zawartości procentowe głównych składników olejku z szyszkojagód *J. communis* wg. Farmakopei Europejskiej i Brytyjskiej”, s. 27).

Analiza enancjoselektywna w znaczącej większości prób wykazała dominację formy prawoskrętnej α -pinenu, sabinenu i (+)3-karenu oraz lewoskrętnej β -pinenu i kamfenu. Forma prawoskrętna limonenu dominowała nad lewoskrętną w nieco ponad połowie prób igieł oraz większości prób szyszkojagód. Można więc stwierdzić sumaryczną dominację enancjomerów (+) nad formą (-). Dominacja enancjomerów lewoskrętnych (-) α - i β -pinenu oraz limonenu przypisywana jest różnym gatunkom rodzaju *Picea*, *Abies* oraz *Pinus* (Persson i in., 1997; Yassaa i in., 2001), podczas, gdy dla gatunków z rodzaju *Cupressus* sumaryczna zawartość (+)-enancjomerów jest wyższa niż (-) (Yassaa i in., 2001). Ponieważ w literaturze istnieje stosunkowo mało danych dotyczących składu enancjomerycznego olejku pozyskiwanego z rodzaju *Juniperus*, trudno jest zestawić uzyskane wyniki z wynikami innych autorów. Na podstawie przeprowadzonych badań można więc wnioskować, że pod względem zawartości enancjomerów prawo- i lewoskrętnych olejek z jałowca posiada cechy zbliżone do opisanego w literaturze rodzaju *Cupressus*. Być może wnikliwa analiza

enancjoselektywna innych rodzajów z rodziny *Cupressaceae* pozwoliłaby na określenie, czy preferencyjna synteza form prawoskrętnych związków monoterpenowych jest cechą charakterystyczną tej jednostki taksonomicznej.

Dane na temat zawartości procentowej poszczególnych odmian enancjomerycznych w jałowcu są istotne nie tylko ze względów czysto poznawczych. Są niezwykle istotne z aspekcie jego zastosowania w lecznictwie. Obecnie normy farmakopealne nie określają w przypadku olejków dopuszczalnych zawartości form enancjomerycznych terpenów. Określony w pracy skład enancjomeryczny głównych związków monoterpenowych igieł i szyszkojagód można odnieść do norm Farmakopei Europejskiej i Brytyjskiej dla olejku z szyszkojagód jałowca. Określają one wartość kąta skręcenia wiązki światła sodowego w zakresie od -15° do $-0,5^{\circ}$. W przypadku niniejszych badań nie pozyskiwano olejku eterycznego w tradycyjnym rozumieniu, a więc nie było możliwości zbadania kąta skręcalności. Niemniej jednak stwierdzony sumaryczny nadmiar form prawoskrętnych głównych monoterpenów pozwala przypuszczać, że kąt ten przyjmowałby wartość dodatnią. Wymienione zaś wyżej monografie zakładają wyraźną przewagę form lewoskrętnych w olejku z szyszkojagód. Ostatnia polska monografia *Oleum Juniperi* znajduje się w FPV z 1999 roku i podaje skręcalność α_D^{20} na poziomie $+5^{\circ}$ do -15° . Dodatkowo zaznacza, że olejki południowo-europejskie są lewoskrętne, natomiast północno-europejskie, a wśród nich niektóre polskie wykazują prawoskrętność. Wydaje się, że takie podejście do zawartości różnych form enancjomerycznych terpenów w olejkach jest nieprecyzyjne. Należy się spodziewać, że coraz szerzej prowadzone analizy chiralne, szczególnie preparatów pozyskiwanych z roślin, doprowadzą w przyszłości do standaryzacji ich składu enancjomerycznego. Jest to naturalna konsekwencją jego dużej różnorodności, nawet w obrębie surowców pochodzących z roślin zbieranych w tym samym regionie. Ponadto istnieją udokumentowane dane na temat różnej aktywności biologicznej dwóch enancjomerów tego samego związku (Lis-Balchin i in., 1999). Enancjomery węglowodorów monoterpenowych obecne w charakterystycznych proporcjach w surowcu roślinnym mogą być traktowane jako swoisty odcisk palca w analizie chemotaksonomicznej oraz w wykrywaniu zanieczyszczeń (König i in., 1997). Ponadto zbadano, że olejki otrzymane syntetycznie wykazują znaczące różnice w składzie enancjomerycznym w stosunku do swoich naturalnych odpowiedników (König, 1998). W świetle przytoczonych faktów enancjoselektywna chromatografia gazowa jawi się

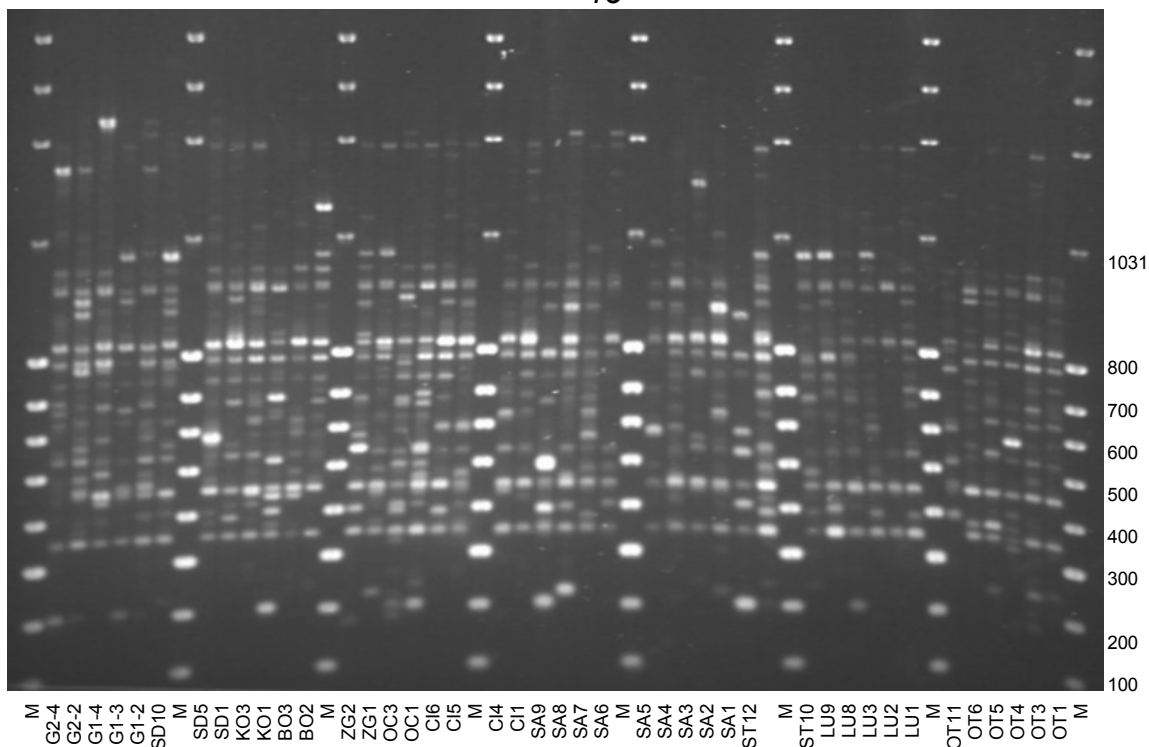
jako nowoczesny i pożądaný element w standaryzacji surowca roślinnego pod kątem jego zastosowania w lecznictwie.

4. Analiza zróżnicowania genetycznego *Juniperus communis* metodą RAPD-PCR (cel pochodny 4)

Analiza materiału genetycznego *J. communis* metodą RAPD w zestawieniu z wynikami rozdziałów chromatograficznych posłużyła osiągnięciu celu głównego realizowanej pracy. W tym rozdziale przedstawiono wyniki analizy genetycznej badanych prób jałowca w ujęciu zróżnicowania tej rośliny na poziomie gatunku – w obrębie badanych populacji oraz między populacjami. Ze względu na dużą wrażliwość techniki RAPD na parametry chemiczne i termiczne w pierwszym etapie analizy dokonano ich optymalizacji. Wpływ poszczególnych parametrów reakcji na jej powtarzalność oraz przebieg procesu optymalizacji przedstawiono w części metodycznej pracy (por. rozdz. 5.4 „Analiza całkowitego DNA genomowego metodą RAPD-PCR (cel pochodny 4)”, s. 102). Dobrane w toku optymalizacji warunki reakcji zastosowano we właściwych analizach genetycznych z 10 primerami RAPD oraz 42 próbkami *J. communis*. Do badań metodą RAPD wykorzystano te same próby, które wcześniej poddano analizie fitochemicznej z zastosowaniem enancjoselektywnej HS SPME GC (por. tabela 10, s. 69). Rozdziału i detekcji produktów RAPD PCR dokonano w żelu agarozowym, zgodnie z opisem zawartym w części metodycznej pracy (por. rozdz. „Elektroforeza produktów amplifikacji PCR oraz archiwizacja danych”, s. 101). Przykładowy wynik rozdziału produktów PCR dla wszystkich 42 badanych próbek jałowca pospolitego przedstawiony jest na rysunku 31. Żele elektroforetyczne archiwizowano i poddawano dalszej analizie z wykorzystaniem oprogramowania UVImap v. 99 (UVItec, Wielka Brytania). W efekcie analizy otrzymywano macierze danych binarnych, w których „1” oznacza w danej ścieżce obecność prążka określonej długości, natomiast „0” oznacza jego brak.

W trakcie badań przetestowano łącznie 30 starterów (dekamerów) RAPD. Część z nich nie dawała produktów z badanym DNA matrycowym lub ilość produktów była znikoma. W efekcie parametry reakcji PCR zoptymalizowano dla 10 starterów. W trakcie analizy żeli po elektroforezie napotkano na trudności w interpretacji żeli związane ze zjawiskiem tzw. smilingu, czyli nierównomiernej migracji w studzienkach środkowych i brzeżnych żelu. Z 10 rozdziałów (z 10 wybranymi starterami RAPD) wybrano 9, w których korekcja migracji przyniosła spodziewany efekt i umożliwiła ustalenie homologii prążków i transformację do macierzy binarnej. W konstrukcji dendrogramów odrzucono dane z reakcji PCR ze starterem RO04.

RYSUNEK 31: Rozdział elektroforetyczny produktów RAPD PCR z primerem Roth N-13



Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA matrycowego 42 prób *J. communis*. M oznacza ścieżkę markera DNA., Warunki reakcji: 2,5xstężony bufor reakcyjny z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2mM MgCl_2 , 0,2mM dNTP, 0,8 μM startera RAPD, 1u polimerazy na 25 μl końcowej objętości mieszaniny reakcyjnej. Warunki termiczne reakcji: wstępna denaturacja 94°C, 3min, denaturacja 94°C, 1min, przyłączanie starterów 42°C, 2min, elongacja 72°C, 2min przez 40 cykli, końcowa elongacja 72°C, 7min.

W przeglądzie literatury z zakresu zastosowań RAPD podano, że ilość stosowanych primerów w analizach populacyjnych oraz na poziomie gatunku i rodzaju waha się w szerokich granicach od 2 do 41. Generują one od 23 do 595 produktów polimorficznych (średnio 10/primer) (Wolfe i Liston, 1998). Wiarygodność interpretacji danych RAPD opartej na dystansach genetycznych wzrasta wraz z ilością użytych primerów, przy czym duże znaczenie ma poziom taksonomiczny, na którym wykonywana jest analiza (a więc pokrewieństwo badanych prób) (Landry i Lapointe, 1996). Analiza danych zebranych przez Wolfe i Liston pokazuje, że stopień polimorfizmu markerów RAPD znacząco spada na niższych poziomach taksonomicznych i w obrębie populacji. W prowadzonych badaniach na poziomie gatunku *J. communis* dla 9 primerów zliczono łącznie 195 markerów RAPD (prążków określonej długości). Ilość produktów przypadająca na starter wahała się od 16 do 29, średnio 22 prążki. Większość, 177 (90%) z 195 prążków była polimorficzna, co daje 19 produktów polimorficznych dla jednego startera RAPD. Taki poziom polimorfizmu na

poziomie gatunku wydaje się być wysoki, choć w literaturze dla badań populacyjnych notowano polimorfizm na poziomie 80-90% (Nebauer i in., 1999; Tang i in., 2006). Powstałą w wyniku zliczenia macierz binarną poddano dalszej analizie.

4.1. Konstrukcja wykresów drzewiastych

Pierwszym etapem analizy danych zawartych w macierzy binarnej był wybór najlepszego algorytmu służącego oszacowaniu odległości genetycznych, a w następstwie wykreśleniu wykresu drzewiastego (dendrogramu). W tym celu w pakiecie RAPDistance (Armstrong i in., 1994) przeprowadzono test PTP (ang. *Permutation Tail Probability*). W pierwszej kolejności wygenerowano macierze dystansów genetycznych dla danych binarnych z RAPD z użyciem 18 dostępnych w programie algorytmów. Istotą testu PTP jest sprawdzenie, czy drzewo wykreślone na podstawie danego algorytmu odzwierciedla dane zawarte w macierzy dystansów, czy też jest drzewem uzyskanym w sposób przypadkowy (jest artefaktem użytego algorytmu). Miarę poprawności drzewa (ang. *tree-likeness*) oznacza się parametrem Z. Obliczana jest całkowita długość gałęzi drzewa rzeczywistego (ang. *total branch length*) wykreślonego na podstawie oryginalnych danych. Następnie program wielokrotnie losowo usuwa lub wstawia dane w macierzy binarnej generując kolejne przypadkowe drzewa. Obliczana jest średnia całkowita długość gałęzi drzew randomizowanych oraz odchylenie standardowe. Parametr Z obliczany jest kolejno dla macierzy wyznaczonych z danym algorytmem według wzoru:

$$Z = \frac{\text{długość gałęzi drzewa oryginalnego} - \text{średnia długość gałęzi drzew randomizowanych}}{\text{odchylenie standardowe}}$$

Algorytm, dla którego parametr Z przyjmuje najwyższą wartość, a więc taki, dla którego długość gałęzi drzewa oryginalnego jest większa niż randomizowanego jest używany do konstrukcji dendrogramu.

Dla macierzy binarnych sporządzonych na podstawie reakcji PCR z 9 starterami RAPD dla 42 wybranych prób jałowca pospolitego najlepszym algorytmem okazał się Simple Matching (lub Apostol) (Apostol i in., 1993 za Armstrong i in., 1994). Odległości genetyczne dla niego obliczane są według wzoru:

$$d_{ij} = \frac{n_{11} + n_{00}}{n} \quad \text{gdzie}$$

d_{ij} – odległość pomiędzy próbami i oraz j,

n_{11} – ilość wspólnych prążków o danej długości,

n_{00} – ilość braków prążka o danej długości,

n – całkowita ilość prążków

Odległości przyjmują wartości w przedziale (0, 1), gdzie 0 oznacza całkowite podobieństwo, a 1 – brak podobieństwa.

Tabela 30 (s. 167) przedstawia macierz dystansów genetycznych otrzymaną z algorytmem Simple Matching (Apostol). Na jej podstawie wykreślono wykresy drzewiaste metodą *neighbour joining* oraz UPGMA (ang. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Są to dwie najpopularniejsze metody tworzenia dendrogramów oparte na dystansach. UPGMA jest najprostszą z nich, a drzewo wykreślone na jej podstawie zwane jest czasem fenogramem (ang. *phenogram*), gdyż oryginalnie metoda ta używana była do określania podobieństw fenotypowych w taksonomii numerycznej (Nei i Kumar, 2000). UPGMA zakłada stałe, jednakowe tempo ewolucji dla wszystkich roboczych jednostek taksonomicznych (ang. OTU – *Operational Taxonomical Unit*). Dlatego jest przydatna w przypadkach, gdy tempo ewolucji badanych prób jest w przybliżeniu równe i stosowana jest bardzo często na poziomie populacyjnym. Druga z opisywanych metod – *neighbour joining* (nazywana czasem w polskiej literaturze metodą „wspólnego sąsiada”) oparta jest na kryterium minimalnych zmian ewolucyjnych. Obie opisane metody bazują na wielokrotnym przetwarzaniu macierzy dystansów genetycznych. Za każdym razem wyznaczana jest najbardziej podobna para jednostek taksonomicznych, jest ona łączona w zbiorcze jednostki (OTU) oraz wyznaczana jest nowa macierz dla zredukowanej w ten sposób ilości danych. Przetwarzanie kończy się w momencie połączenia wszystkich elementów. UPGMA i *neighbour joining* różnią się sposobem wyznaczania macierzy dystansów.

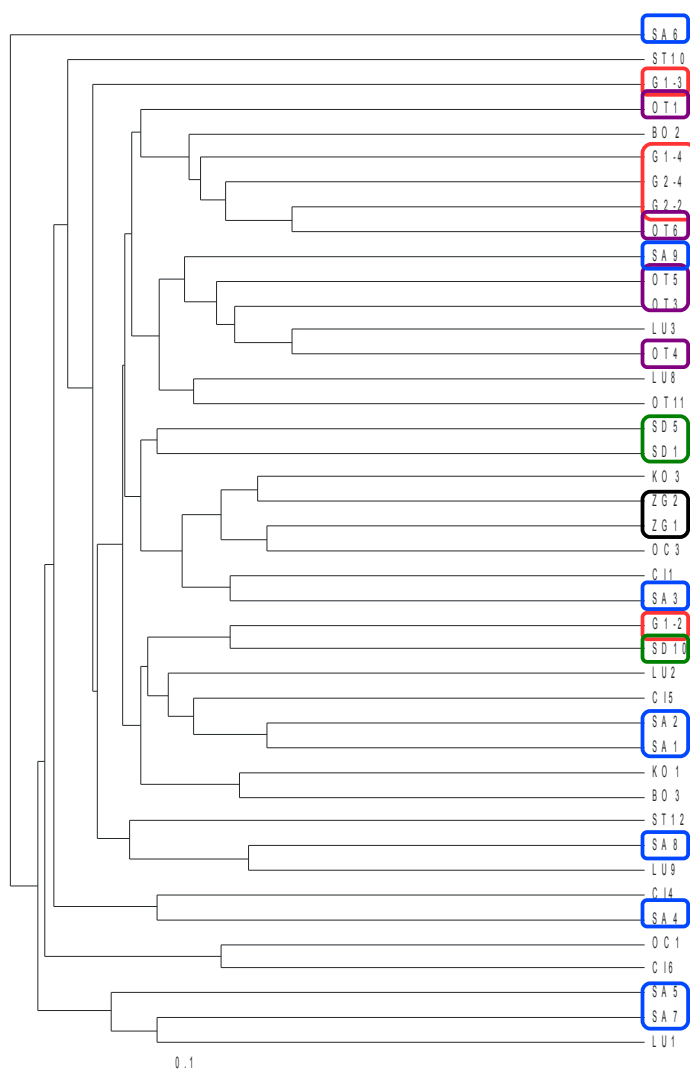
Rysunki 32 (s. 168) oraz 33 (s. 169) przedstawiają dendrogramy wykreślone z algorytmem Simple Matching (Apostol) dla badanych 42 prób *J. communis* opisanymi wyżej metodami. Na obydwu wykresach można zaobserwować podobne tendencje w rozkładzie prób reprezentujących poszczególne populacje. Już sama analiza macierzy dystansów (por. tab. 30, s. 167) wskazuje na istnienie podobieństw na zbliżonym poziomie (wartości odległości genetycznych między próbkami przyjmują wartości w przedziale 0,200 – 0,400). Świadczą one o stosunkowo niewysokim zróżnicowaniu

genetycznym badanej puli prób. Znajduje to odzwierciedlenie na wykresach drzewiastych.

TABELA 30: Macierz dystansów genetycznych pomiędzy próbkami *J. communis* wyznaczona wg algorytmu Simple Matching (Apostol) (wygenerowano w pakiecie RAPDistance)

	G2-4	G2-2	G1-4	G1-3	G1-2	SD10	SD5	SD1	KO3	KO1	BO3	BO2	ZG2	ZG1	OC3	OC1	CI6	CI5	CI4	CI1	SA9	SA8	SA7	SA6	SA5	SA4	SA3	SA2	SA1	ST12	ST10	LU9	LU8	LU3	LU2	LU1	OT11	OT6	OT5	OT4	OT3	OT1						
G2-4																																																
G2-2	0,215																																															
G1-4	0,241	0,241																																														
G1-3	0,241	0,262	0,287																																													
G1-2	0,267	0,267	0,262	0,272																																												
SD10	0,287	0,308	0,282	0,303	0,236																																											
SD5	0,354	0,344	0,277	0,349	0,333	0,303																																										
SD1	0,323	0,292	0,369	0,338	0,282	0,282	0,277																																									
KO3	0,251	0,282	0,277	0,297	0,292	0,251	0,308	0,256																																								
KO1	0,344	0,364	0,349	0,328	0,344	0,292	0,297	0,297	0,267																																							
BO3	0,297	0,308	0,282	0,313	0,267	0,256	0,303	0,292	0,282	0,231																																						
BO2	0,287	0,236	0,272	0,354	0,297	0,328	0,313	0,272	0,313	0,272	0,267																																					
ZG2	0,308	0,277	0,282	0,323	0,267	0,256	0,272	0,262	0,221	0,282	0,297	0,308																																				
ZG1	0,292	0,282	0,277	0,318	0,303	0,282	0,297	0,318	0,246	0,297	0,333	0,344	0,221																																			
OC3	0,292	0,292	0,287	0,328	0,282	0,262	0,277	0,297	0,256	0,318	0,333	0,323	0,241	0,215																																		
OC1	0,349	0,338	0,354	0,385	0,338	0,328	0,405	0,344	0,292	0,374	0,338	0,359	0,297	0,344	0,313																																	
CI6	0,323	0,313	0,349	0,369	0,313	0,344	0,379	0,349	0,277	0,359	0,344	0,303	0,282	0,318	0,349	0,241																																
CI5	0,318	0,277	0,292	0,333	0,287	0,267	0,323	0,303	0,292	0,313	0,277	0,318	0,246	0,292	0,303	0,287	0,323																															
CI4	0,379	0,359	0,395	0,364	0,390	0,359	0,364	0,333	0,364	0,282	0,369	0,359	0,338	0,344	0,354	0,379	0,364	0,379																														
CI1	0,308	0,318	0,323	0,323	0,318	0,297	0,292	0,282	0,241	0,303	0,287	0,318	0,236	0,292	0,262	0,318	0,303	0,318	0,287																													
SA9	0,313	0,323	0,297	0,297	0,292	0,262	0,359	0,287	0,287	0,308	0,262	0,323	0,313	0,297	0,297	0,344	0,390	0,292	0,344	0,313																												
SA8	0,297	0,318	0,385	0,364	0,308	0,328	0,313	0,292	0,303	0,333	0,349	0,328	0,297	0,344	0,333	0,318	0,333	0,308	0,359	0,318	0,323																											
SA7	0,318	0,338	0,354	0,303	0,328	0,338	0,313	0,333	0,292	0,313	0,308	0,328	0,277	0,292	0,333	0,328	0,344	0,328	0,431	0,328	0,282	0,338																										
SA6	0,379	0,349	0,395	0,385	0,400	0,410	0,374	0,323	0,374	0,333	0,379	0,359	0,349	0,374	0,395	0,338	0,354	0,318	0,421	0,349	0,385	0,359	0,359																									
SA5	0,385	0,344	0,431	0,359	0,344	0,364	0,359	0,359	0,349	0,369	0,385	0,374	0,313	0,359	0,390	0,354	0,390	0,354	0,364	0,344	0,390	0,344	0,292	0,344																								
SA4	0,308	0,308	0,333	0,323	0,308	0,308	0,313	0,303	0,262	0,303	0,277	0,308	0,297	0,303	0,282	0,338	0,344	0,318	0,277	0,297	0,272	0,308	0,318	0,390	0,313																							
SA3	0,328	0,287	0,272	0,251	0,256	0,318	0,282	0,292	0,272	0,313	0,246	0,287	0,267	0,262	0,272	0,359	0,323	0,287	0,338	0,236	0,272	0,338	0,277	0,318	0,333	0,277																						
SA2	0,328	0,328	0,344	0,364	0,277	0,267	0,313	0,313	0,313	0,282	0,277	0,287	0,287	0,303	0,313	0,359	0,344	0,267	0,410	0,338	0,262	0,318	0,349	0,359	0,385	0,318	0,287																					
SA1	0,297	0,277	0,313	0,303	0,297	0,287	0,303	0,323	0,303	0,282	0,277	0,256	0,287	0,303	0,313	0,369	0,344	0,246	0,451	0,338	0,272	0,318	0,287	0,318	0,323	0,338	0,277	0,215																				
ST12	0,338	0,328	0,354	0,303	0,308	0,369	0,374	0,364	0,303	0,313	0,297	0,369	0,277	0,313	0,344	0,328	0,323	0,267	0,451	0,308	0,323	0,287	0,318	0,338	0,385	0,359	0,277	0,287	0,277																			
ST10	0,349	0,328	0,344	0,374	0,328	0,318	0,323	0,313	0,313	0,282	0,349	0,318	0,308	0,313	0,344	0,338	0,323	0,338	0,349	0,328	0,323	0,308	0,338	0,379	0,364	0,318	0,379	0,297	0,308	0,349																		
LU9	0,297	0,277	0,313	0,313	0,308	0,287	0,272	0,292	0,262	0,303	0,277	0,287	0,256	0,262	0,282	0,338	0,354	0,267	0,359	0,267	0,333	0,226	0,328	0,359	0,323	0,287	0,246	0,318	0,287	0,297	0,297																	
LU8	0,323	0,333	0,318	0,287	0,313	0,313	0,338	0,277	0,287	0,267	0,333	0,313	0,231	0,287	0,287	0,323	0,369	0,333	0,333	0,303	0,267	0,251	0,323	0,303	0,338	0,292	0,241	0,303	0,303	0,282	0,333	0,272																
LU3	0,344	0,272	0,297	0,318	0,251	0,323	0,277	0,318	0,267	0,277	0,262	0,303	0,251	0,338	0,297	0,344	0,379	0,292	0,354	0,333	0,246	0,344	0,303	0,344	0,338	0,292	0,262	0,292	0,282	0,323	0,333	0,313	0,236															
LU2	0,338	0,277	0,313	0,354	0,267	0,308	0,303	0,292	0,292	0,282	0,287	0,267	0,256	0,292	0,323	0,369	0,333	0,287	0,359	0,308	0,303	0,338	0,318	0,328	0,303	0,318	0,308	0,256	0,267	0,369	0,338	0,318	0,292	0,272														
LU1	0,359	0,338	0,385	0,333	0,369	0,349	0,405	0,374	0,344	0,354	0,328	0,338	0,328	0,374	0,395	0,338	0,395	0,328	0,369	0,308	0,374	0,400	0,277	0,349	0,313	0,328	0,369	0,379	0,379	0,369	0,390	0,359	0,374	0,395	0,297													
OT11	0,333	0,282	0,297	0,328	0,354	0,313	0,318	0,328	0,308	0,328	0,323	0,292	0,313	0,308	0,318	0,323	0,369	0,292	0,395	0,354	0,297	0,344	0,333	0,333	0,328	0,323	0,251	0,333	0,282	0,364	0,354	0,313	0,256	0,267	0,292	0,395												
OT6	0,262	0,200	0,277	0,318	0,303	0,292	0,267	0,308	0,287	0,308	0,292	0,241	0,262	0,277	0,236	0,323	0,349	0,282	0,385	0,272	0,287	0,323	0,292	0,333	0,328	0,292	0,241	0,292	0,251	0,344	0,344	0,272	0,246	0,226	0,282	0,374	0,256											
OT5	0,318	0,277	0,282	0,323	0,318	0,277	0,272	0,333	0,292	0,313	0,328	0,297	0,277	0,313	0,313	0,369	0,323	0,379	0,379	0,277	0,292	0,318																										

RYSUNEK 32: Wykres drzewiasty przedstawiający relacje genetyczne *J. communis* uzyskany metodą UPGMA (algorytm Simple Matching/Apostol)

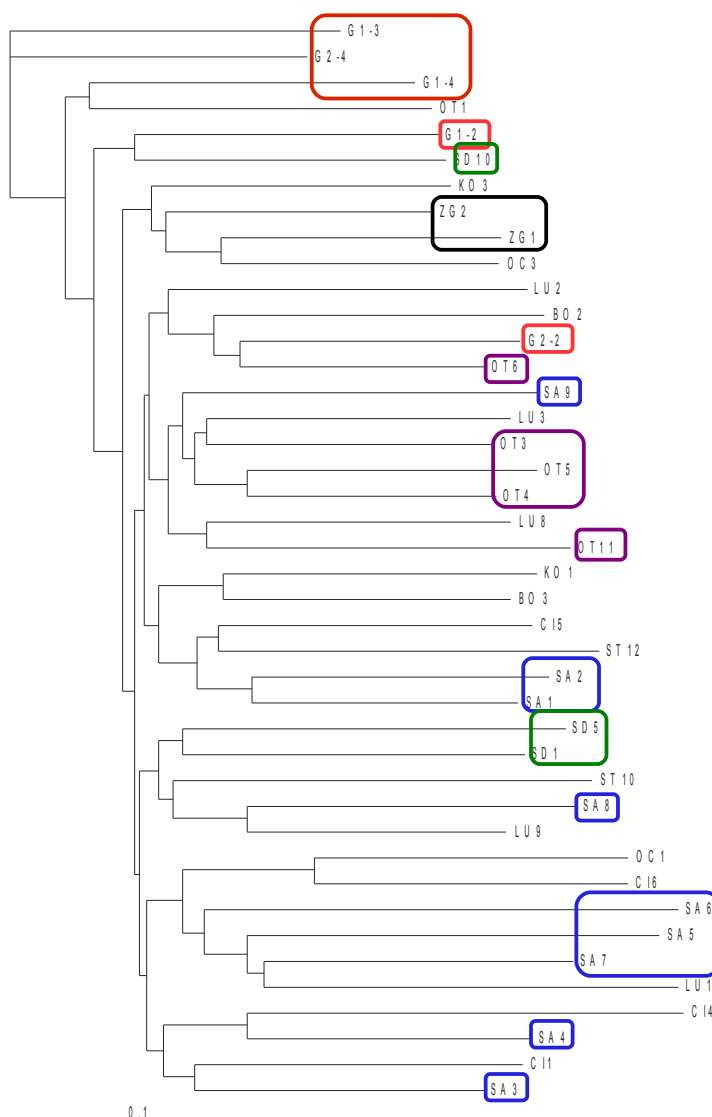


*Kolorami zaznaczono wybrane populacje badanych prób *J. communis*:

- niebieskim – populację z Samociążka (SA),
- czerwonym – populacje z okolic Kolna (G1 i G2)
- zielonym -populację ze Starego Dworu (SD)
- fioletowym – populację z Otomina
- czarnym – 2 próby z Zamkowej Góry

**Nomenklatura prób jest zgodna z danymi w tabeli 9, 64. Lokalizacja poszczególnych populacji została przedstawiona na rysunku 9, s. 66.

RYSUNEK 33: Wykres drzewiasty przedstawiający relacje genetyczne *J. communis* uzyskany metodą *neighbour joining* (algorytm *Simple Matching/Apostol*)



*Kolorami zaznaczono wybrane populacje badanych prób *J. communis*:

- niebieskim – populację z Samociażka (SA),
- czerwonym – populację z okolic Kolna (G1 i G2)
- zielonym -populację ze Starego Dworu (SD)
- fioletowym – populację z Otomina
- czarnym – 2 próby z Zamkowej Góry

**Nomenklatura prób jest zgodna z danymi w tabeli 9, 64. Lokalizacja poszczególnych populacji została przedstawiona na rysunku 9, s. 66.

Na dendrogramach wykreślonych metodą UPGMA i *neighbour joining* można zaobserwować słabą tendencję do grupowania się badanych prób pod względem ich przynależności do określonej populacji. Analiza topologii tych dwóch drzew wykazuje, że nieco wyraźniej zjawisko to widoczne jest w przypadku *neighbour joining*. Dotyczy

to populacji SA, a także OT oraz G1/G2. Najliczniejszą jest populacja oznaczona akronimem SA, pochodząca z województwa pomorskiego, z boru sosnowego w okolicy wsi Samociążek. Na wykresie *neighbour joining* oraz UPGMA próby SA1 i SA2 tworzą jeden węzeł drzewa. Rośliny oznaczone tymi symbolami rosły w odległości około 0,5m od siebie, a ich zbliżona wysokość może sugerować, że należą do tej samej klasy wiekowej. Tym samym można przypuszczać, że pochodzą z tych samych linii rodzicielskich. Dodatkowo na wykresie drzewiastym przygotowanym metodą *neighbour joining* próby SA5, SA6 i SA7 skupiają się (razem z próbą LU1). Rośliny te rosły w bezpośredniej bliskości, w niewielkim jarze zlokalizowanym w lesie sosnowym. Populacje G1 i G2 pochodzą z okolic Kolna (województwo podlaskie) i wykazują spore różnice w stosunku do reszty badanych prób. Wspólny węzeł tworzą także próby OT3, OT4 i OT5, których podobieństwo może być tłumaczone prawdopodobnie wspólnym pochodzeniem, gdyż próby te rosły w bezpośredniej bliskości (~10-15m od siebie). Jednak próba OT6, zlokalizowana w tym samym skupisku na dendrogramie leży nieco dalej niż OT3, 4 i 5, co pozwala przypuszczać, że nie pochodzi z tych samych linii rodzicielskich.

Poczynione obserwacje pozwalają na stwierdzenie, że badane populacje jałowca pospolitego wykazują dość znaczne zróżnicowanie genetyczne wewnątrz populacji przy jednoczesnym stosunkowo niewielkim zróżnicowaniu międzypopulacyjnym. Świadczy o tym brak wyraźnego oddzielania się populacji w obrębie dendrogramu. Wyjątkiem jest populacja z województwa podlaskiego (akronim G1 i G2), choć nie wszystkie osobniki z tej populacji tworzą wyraźne skupisko na dendrogramie. Osobniki innych populacji skupiają się często w przypadku, gdy zostały pozyskane ze stanowisk w bezpośredniej bliskości (zwykle rzędu kilku czy kilkunastu metrów), tak, jak w przypadku opisanych prób SA1 i SA2, czy OT3, OT4 i OT5. Wyjątek stanowią próby ZG1 oraz ZG2, pochodzące z okolic Zamkowej Góry, wsi zlokalizowanej w dolinie rzeki Więcisy. Osobniki te rosły około 0,5km od siebie. Zbiorowisko to charakteryzowało się wysoką wilgotnością oraz obecnością mezotroficznego (średnio żyznego) lasu liściastego. Takie cechy środowiska są czynnikami ograniczającymi występowanie *J. communis* (Babiński, 1974). Dlatego też zebrane w tej okolicy próby pochodzą z niewielkich zgrupowań osobników tego gatunku. Podobieństwo genetyczne prób wynika prawdopodobnie z izolacji tych roślin od innych większych skupień jałowca pospolitego, a co za tym idzie - braku przepływu genów.

Fizjologia rozwoju *J. communis* wydaje się potwierdzać duże zróżnicowanie wewnątrzpopulacyjne i małe zróżnicowanie międzypopulacyjne uzyskane na podstawie wyników RAPD. Stopień zróżnicowania genetycznego jest bezpośrednio powiązany z dwoma zjawiskami: sposobem rozsiewania pyłku oraz sposobem dyspersji nasion (Działuk i Burczyk, 2005). *J. communis* jest gatunkiem dwupiennym, wiatropylnym, a jego nasiona przenoszone są przez zwierzęta. Wiatropylność (anemogamia) jest typem transportu bezkierunkowego, a pyłek produkowany u roślin wiatropylnych w bardzo dużych ilościach może być przenoszony na ogromne odległości (nawet rzędu kilkuset km) (Działuk i Burczyk, 2005). Dodatkowym czynnikiem wprowadzającym znaczącą zmienność genetyczną w przypadku populacji jałowca jest specyfika dojrzewania szyszkojagody i kiełkowania chronionych przez nią nasion. Wg Babińskiego nasiona jałowca po dojrzewaniu szyszkojagody (co następuje zwykle z drugim lub trzecim roku po zapyleniu) po opadnięciu na glebę zaczynają długi okres spoczynku, trwający do trzech lat (Babiński, 1974). W ciągu tak długiego okresu szyszkojagody są spożywane przez ptaki i gryzonie, co umożliwia przenoszenie nasion na znaczne odległości. Główna rola w dyspersji nasion jałowca przypisywana jest ptakom (ornitochoria) (Van Der Merwe i in., 2000), a Clifton wśród gatunków ptaków żywiących się szyszkojagodami jałowca wymienia gatunki wędrownie: kwiczoły, drozdy oraz kosy (Clifton, 1997). W tym aspekcie oraz w świetle tego, że badane populacje w większości pochodziły z jednego województwa (znacząca większość z pomorskiego) mała zmienność między populacjami i stosunkowo duża wewnątrz nich wydaje się zrozumiała. Wyniki te znajdują potwierdzenie w danych literaturowych. Praca przeglądowa Działuka i Burczyka podaje, że drzewa leśne (gatunki w większości wiatropylne) charakteryzuje wysoki poziom zmienności genetycznej wewnątrz populacji oraz niski – między populacjami. Świadczy to o intensywnym przepływie genów u tej grupy roślin (Działuk i Burczyk, 2005). Zmienność międzypopulacyjna u drzew szacowana jest na poziomie 10-15%, a u drzew wiatropylnych zwykle utrzymuje się na poziomie poniżej 10% (Hamrick i in., 1992 za Działuk i Burczyk, 2005). Dotyczy to szczególnie gatunków o szerokim i ciągłym zasięgu występowania (dla nich zmienność międzypopulacyjna spada nawet do 3%) (Działuk i Burczyk, 2005), do których należy także *J. communis* (por. rysunek 1, s. 17 obrazujący zasięg tego gatunku na świecie). Ponadto długi okres trwania pokoleń (jałowiec należy do krzewów długoletnich, najstarsze osobniki opisane na Syberii miały około 1000 lat (Babiński, 1974)) powoduje, że populacje tej rośliny są

mniej podatne na fluktuacje liczebności i w konsekwencji zmniejszenie zmienności genetycznej (tzw. efekt szyjki butelki – ang. *bottle neck*). W skład populacji mogą bowiem wchodzić osobniki z różnych, czasem odmiennych genetycznie klas wiekowych (Działuk i Burczyk, 2005).

Przestrzenna i czasowa analiza populacji *J. communis* na Wyspach Brytyjskich z zastosowaniem AFLP przyniosła inne rezultaty niż uzyskane przez autorkę. Pomimo wysokiej zmienności wewnątrzpopulacyjnej autorzy obserwowali wyraźną tendencję do grupowania się badanych prób w zależności od pochodzenia populacji. Wskazuje to, że przepływ informacji genetycznej między badanymi populacjami zachodzi w niewielkim stopniu (Van Der Merwe i in., 2000). Niemniej jednak rozmieszczenie *J. communis* na Wyspach Brytyjskich jest znacząco odmienne od rozmieszczenia tego gatunku w Polsce. Populacje brytyjskie na skutek wylesiania są niewielkie i izolowane (szczególnie na południu wyspy) (Van Der Merwe i in., 2000), podczas, gdy w Polsce powierzchnia lasów stanowi ciągle blisko 30% całej powierzchni kraju.

4.2.Podsumowanie

Analiza zróżnicowania genetycznego 42 prób jałowca pospolitego metodą RAPD wykazała istnienie dużej zmienności wewnątrz badanych populacji oraz niezbyt duży stopień różnorodności między populacjami. Wynik taki jest pochodną specyfiki sposobu zapylenia, dyspersji nasion, długowieczności osobników i struktury zasięgu badanego gatunku. Choć RAPD jest metodą obarczoną kilkoma ograniczeniami i coraz częściej zastępowana jest innymi, bardziej złożonymi technikami fingerprintingu DNA, uzyskane wyniki są zgodne z oczekiwaniami. Autorka zdaje sobie sprawę, że ilość przebadanych prób jest o wiele za mała, aby wyciągnąć daleko idące wnioski dotyczące struktury populacji jałowca w Polsce. Jednak przeprowadzone analizy mogą stanowić wartościowy wstęp do dalszych, szeroko zakrojonych badań populacyjnych na poziomie molekularnym.

5. Zestawienie wyników analizy genetycznej i fitochemicznej

Pochodną celów 3 i 4, których wyniki opisano powyżej była próba odpowiedzi na pytanie, czy istnieje zależność pomiędzy profilem fitochemicznym a genetycznym badanych prób *J. communis*. Profil fitochemiczny w ujęciu niniejszej pracy rozumiany jest jako wartości względnych zawartości procentowych poszczególnych monoterpenu i ich form enancjomerycznych. Profil genetyczny otrzymano w wyniku zastosowania metody RAPD PCR. Zestawienie danych z tych dwóch typów analiz przeprowadzono dla 42 prób.

Głównym problemem związanym z określeniem zależności między danymi genetycznymi i fitochemicznymi jest znalezienie metody, która pozwoli na porównanie tak odmiennych i złożonych danych. Przystępując do jej poszukiwania można zadać sobie pytanie „jak porównać nieporównywalne”? Próby takie podejmowane były przez kilku autorów. Dane z RAPD w zestawieniu ze składem olejku eterycznego były analizowane przez Adamsa dla różnych gatunków *Juniperus* w kontekście pokrewieństwa systematycznego. Analiza PCO (ang. *Principal Coordinate Analysis*) wykazała zbliżone grupowanie się poszczególnych gatunków w sekcjach (Adams, 1999; Adams, 2000). Keskitalo i in. opisywali zgodność grupowania się chemotypów i genotypów (genetyczny odcisk palca otrzymany w drodze RAPD) prób *Tanacetum vulgare* pochodzących z populacji z różnych regionów Finlandii. Zarówno w przypadku danych RAPD, jak i zawartości procentowych terpenów olejku skonstruowano macierze binarne, macierze odległości i otrzymano dendrogramy metodą pełnego wiązania (ang. *complete linkage*) (Keskitalo i in., 2001). Takie podejście nie jest możliwe w przypadku badanych prób jałowca, gdyż skład frakcji monoterpenu wykazuje przede wszystkim różnice ilościowe, a nie jakościowe. Określenie obecności lub braku poszczególnych związków tej frakcji wygenerowałoby macierz złożoną w większości z „1”. Startery RAPD posłużyły też konstrukcji markerów SCAR (ang. *Sequence-characterized Amplified Region*) umożliwiającą identyfikację molekularną chemotypów *Cannabis sativa* L. Analizę RAPD przeprowadzono stosując strategię BSA (ang. *Bulked Segregant Analysis*) (de Meijer i in., 2003). Zestawienie wyników rozdziałów seskwiterpenów i fenoli z wynikami analizy RAPD 24 populacji *Leontodon autumnalis* wykazało grupowanie się prób w zależności od pochodzenia roślin, a nie ze względu na wyodrębnione dwa chemotypy (Grass i in., 2006).

W niniejszej pracy podjęto próbę zestawienia danych genetycznych i fitochemicznych z zastosowaniem sztucznych sieci neuronowych (ang. *ANN - Artificial Neural Networks*). W ostatnich latach cieszą się one rosnącym zainteresowaniem ze względu na szerokie możliwości zastosowań w modelowaniu zjawisk (StatSoft, 2006). Znanych jest szereg aplikacji ANN w medycynie, farmacji czy biologii molekularnej. Przegląd literatury z tego zakresu nie jest przedmiotem niniejszej pracy, dlatego poniżej wymieniono tylko kilka przykładów. ANN wykorzystane zostały między innymi w szukaniu asocjacji pomiędzy polimorfizmem pojedynczych nukleotydów (ang. *SNP – Single Nucleotide Polymorphism*) a różnymi schorzeniami (Yoon i in., 2003), w identyfikacji szczepów bakterii (Rebuffo i in., 2006), szeroko pojętej analizie ekspresji genów (Tan i Pan, 2005). ANN są z powodzeniem stosowane wszędzie tam, gdzie pojawiają się zadania związane z klasyfikacją lub predykcją (StatSoft, 2006).

Krótki opis działania ANN zawarto w rozdziale „Zestawienie wyników analizy genetycznej i fitochemicznej„ na s. 109).

5.1. Dane wejściowe i wybrana sieć

Jako dane wejściowe dla sieci neuronowej zastosowano macierz binarną uzyskaną w wyniku analizy 42 prób *J. communis* metodą RAPD z dziewięcioma starterami. Zawierała ona łącznie 195 produktów amplifikacji o określonej długości. Badane 42 próby jałowca podzielono na trzy kategorie, w zależności od rasy chemicznej, którą określono w drodze analizy HS SPME. Kryteria wyodrębniania chemotypów jałowca przedstawiono w tabeli 22 na s. 138. Chemotyp α -pinenowy reprezentowało 26 prób, sabinenowy – 6 oraz pośredni – 10. Wśród nich znajdowały się 22 próby uczące sieć neuronową, 10 walidacyjnych i 10 testowych.

Kilkukrotne automatyczne badanie topologii w pakiecie *Statistica 7.0* wskazało na perceptron trójwarstwowy o architekturze MLP 132:132-94-3:1 oraz czterowarstwowy MLP 109:109-245-72-3:1 jako najlepiej klasyfikujący dane. W pierwszym przypadku na 10 prób testowych pomyłka nastąpiła tylko raz, w drugim zaś 3 razy – nastąpiło zaklasyfikowanie 3 prób pośrednich jako α -pinenowych. Do nauczania obu sieci zastosowano algorytm wstecznej propagacji błędu (BP) przez 100 epok, a następnie metodę gradientową (CG) przez 20 epok. W trakcie uczenia sieci odrzucono te wejścia, które miały zbyt mały wpływ na wynik – stąd ilość neuronów wejściowych została ograniczona do 132 czy nawet do 109 w drugim przypadku.

Tabela 31 zawiera współczynniki związane z procesem uczenia dla wybranych sieci, zaś tabela 32 rezultaty klasyfikacji dla obu sieci. Czcionką pogrubioną zaznaczono próby błędnie zaklasyfikowane.

TABELA 31: Parametry zastosowanych sztucznych sieci neuronowych

Sieć	jakość uczenia	jakość walidacji	jakość testów	błąd uczenia	błąd walidacji	błąd testów
MLP 132:132-94-3:1	1,00	0,90	0,90	0,16	0,61	1,38
MLP 109: 109-245-72-3:1	1,00	1,00	0,70	0,000042	0,24	3,48

TABELA 32: Wyniki klasyfikacji dla obu zastosowanych sieci neuronowych

Lp.	nazwa próby	klasyfikacja fitochemiczna (chemotyp)	MLP 132:132-94-3:1	MLP 109:109-245-72-3:1
1	G2-4	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
2	G1-4	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
3	G1-3	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
4	G1-2	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
5	SD5	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
6	SD1	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
7	KO3	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
8	BO3	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
9	ZG2	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
10	ZG1	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
11	OC3	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
12	OC1	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
13	Cl6	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
14	Cl1	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
15	SA9	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
16	SA4	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
17	SA3	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
18	ST12	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
19	ST10	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
20	LU9	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
21	LU8	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
22	LU2	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
23	LU1	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
24	OT6	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
25	OT4	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy
26	OT1	α -pinenowy	α -pinenowy	α -pinenowy

Lp.	nazwa próby	klasyfikacja fitochemiczna (chemotyp)	MLP 132:132-94-3:1	MLP 109:109-245-72-3:1
27	BO2	sabinenowy	α-pinenowy	sabinenowy
28	OT5	sabinenowy	sabinenowy	sabinenowy
29	OT11	sabinenowy	sabinenowy	sabinenowy
30	SA2	sabinenowy	sabinenowy	sabinenowy
31	SA1	sabinenowy	sabinenowy	sabinenowy
32	SD10	sabinenowy	sabinenowy	sabinenowy
33	CI5	pośredni	pośredni	pośredni
34	CI4	pośredni	pośredni	pośredni
35	G2-2	pośredni	pośredni	α-pinenowy
36	KO1	pośredni	pośredni	pośredni
37	LU3	pośredni	pośredni	pośredni
38	OT3	pośredni	pośredni	α-pinenowy
39	SA8	pośredni	pośredni	pośredni
40	SA7	pośredni	pośredni	α-pinenowy
41	SA6	pośredni	pośredni	pośredni
42	SA5	pośredni	pośredni	pośredni

Wykorzystując pakiet *Statistica 7.0* eksperymentalnie znaleziono dwie sieci, które są w stanie dokładnie odwzorować profil genetyczny na fitochemiczny. Znalezione sieci wydają się dawać obiecujące rezultaty, niemniej jednak należy pamiętać, że proces jakości uczenia, weryfikacji i testowania może być obciążony błędem wynikającym z niewielkiej ilości prób (42 łącznie z czego 22 to próby uczące, 10 – walidacyjne, 10 – testowe). W literaturze stosowane są zwykle zdecydowanie większe ilości prób – od kilkudziesięciu (Buciński i in., 2000; Yoon i in., 2003), poprzez kilkaset do ponad 2000 (Bączek i in., 2004). Należy także podkreślić, że znaleziona współzależność między profilem RAPD a składem frakcji monoterpenowej igieł jałowca nie skutkuje stworzeniem modelu sieci, który umożliwiłby prognozowanie cech fitochemicznych na podstawie profilu RAPD dla nowych, nieznanych prób. Czynnikiem ograniczającym jest w tym przypadku metoda rozdziału fragmentów DNA po amplifikacji. W analizie mieszaniny po reakcji PCR zastosowano elektroforezę agarozową. Produkty amplifikacji wszystkich 42 prób z każdym zastosowanym starterem RAPD powinny być rozdzielone równolegle, w sąsiadujących ze sobą studzienkach w jednym żelu. Takie podejście pozwala na zachowanie powtarzalnych warunków rozdziału i umożliwia porównanie prób między sobą. Innymi słowy

obecność lub brak produktu amplifikacji określonej długości może być wiarygodnie określone w przypadku gdy rozdział badanych prób zachodzi w tych samych warunkach. Uzyskanie identycznych warunków pomiędzy dwoma żelami agarozowymi jest bardzo trudne i wymagałoby opracowania skomplikowanego systemu zliczania w odniesieniu do markerów DNA (tzw. drabinek DNA). Dlatego w przypadku uzyskanych danych binarnych dla 9 primerów nie można stworzyć systemu do „rozpoznawania” chemotypów na podstawie danych uzyskanych dla innych prób *J. communis*. Dodatkowo przeprowadzenie 9 reakcji PCR z opisywanymi starterami RAPD w celu określenia rasy chemicznej byłoby zdecydowanie bardziej czasochłonnym zajęciem, niż przeprowadzenie HS SPME z interesującego nas surowca. Analizy przeprowadzone z użyciem sztucznych sieci neuronowych miały w tym wypadku na celu wykazanie, że poszukiwanie korelacji pomiędzy złożonymi i zupełnie odmiennymi zestawami danych jest możliwe. Co więcej, uzyskane w ten sposób wstępne wyniki sugerują, że taka korelacja istnieje. Wykazuje ona istnienie związku pomiędzy polimorfizmem DNA a cechą fenotypową, którą w tym wypadku jest preferencyjna biosynteza określonych monoterpenu przez roślinę. Należy jednak wyraźnie podkreślić, że obserwowany polimorfizm nie musi mieć związku z genami kodującymi enzymy odpowiedzialne za syntezę określonych grup związków terpenowych. Aktualnie opracowywane są techniki rozdziału fragmentów DNA z zastosowaniem systemu do elektroforezy kapilarnej z detekcją laserową. Oferuje ona dużo większą powtarzalność, a zastosowanie wzorców DNA o znanej długości dodawanych do rozdzielanej próby umożliwi zbadanie nieograniczonej liczby prób w niezależnych rozdzielach. Wydaje się, że w takim przypadku możliwe byłoby opracowanie sieci neuronowej służącej rozpoznawaniu prób o określonych właściwościach fitochemicznych na podstawie genetycznego odcisku palca.

5.2.Podsumowanie

W toku analiz stworzono dwie sztuczne sieci neuronowe o takiej architekturze i wagach, które były w stanie bardzo dobrze odwzorować profil genetyczny *J. communis* na fitochemiczny. Badania te mają na razie charakter wstępny i miały na celu wykazanie, że sieci neuronowe mogą być wykorzystane w poszukiwaniu związku między polimorfizmem DNA a określonymi cechami objawiającymi się w fenotypie rośliny. Ich wyniki są obiecujące, jednak warunkiem uzyskania wiarygodnych wyników

jest zdecydowane zwiększenie liczby prób, które wiąże się z opracowaniem bardziej powtarzalnej i oferującej szersze możliwości metody rozdziału produktów PCR.

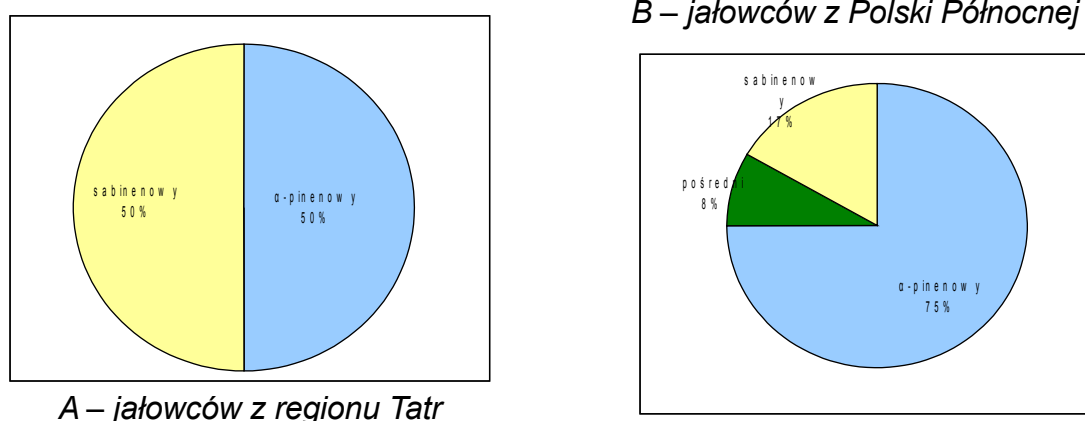
6. Analiza pokrewieństwa systematycznego *J. communis* L. i *J. nana* Willd. (cel pochodny 5)

Uzasadnienie podjęcia badań w omawianym zakresie przedstawiono w rozdziałach „Cel pracy„, s. 56 oraz „Przynależność systematyczna *J. communis* L. i *J. nana* Willd.„, s. 15. W trakcie wykonywania pracy pozyskano unikalne (za zgodą władz TPN) próby tych roślin z Tatrzańskiego Parku Narodowego (rejon Czerwonych Wierchów). Z 16 wybranych prób jałowców rosnących w tym rejonie (wśród nich jeden mieszaniec morfologiczny oraz dwa osobniki o morfologicznych cechach *J. communis*) oraz 24 prób osobników z populacji nizinnych przeprowadzono analizę porównawczą – zarówno fitochemiczną, jak i genetyczną. Ponieważ w okresie wykonywania tej części pracy autorka nie dysponowała aparaturą do SPME, olejki z tej puli prób otrzymano na drodze destylacji z wodą (metoda farmakopealna). Wyniki tej części pracy zostały opublikowane w 2006 roku (Filipowicz i in., 2006).

6.1. Analiza chromatograficzna na złożu achiralnym i chiralnym

Wyjściowe wyniki chromatograficzne otrzymane w wyniku oznaczeń roztworów olejków w heksanie na kolumnie o złożu achiralnym i chiralnym zamieszczono w tabelach 47, s. 219 oraz 48, s. 221 w rozdziale „Suplement A – Wyniki analiz chromatograficznych„. Podobnie, jak w przypadku prób nizinnych badanych techniką HS SPME, w badanej puli osobników *J. communis* i *J. nana* wyróżniono trzy chemotypy na podstawie kryteriów przedstawionych w tabeli 22, s. 138. Na rysunku 34 przedstawiono w formie wykresów kołowych liczebność poszczególnych chemotypów w obrębie badanych prób. Pula prób w przypadku tego wykresu została podzielona na dwie grupy, pod względem pochodzenia osobników. Wykres A przedstawia próby zebrane w Tatrach, wśród których 14 to *J. nana*, jeden – *J. communis* oraz jeden mieszaniec o cechach morfologicznych obu podgatunków. Wykres B reprezentuje próby *J. communis* zebrane w Polsce Północnej.

RYSUNEK 34: Liczebność poszczególnych chemotypów



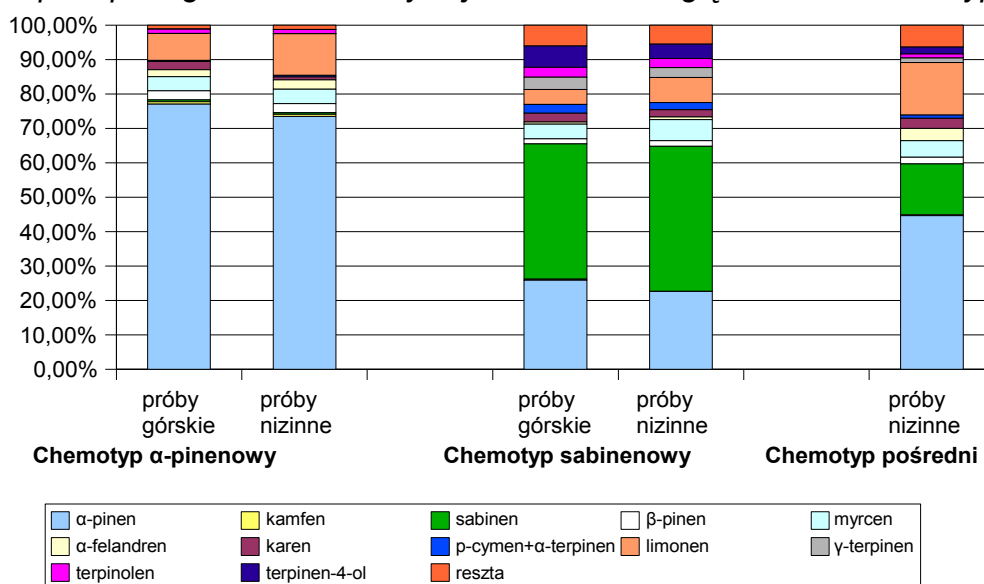
Wykres A dotyczy 16 prób (*J. nana*, *J. communis* oraz jednego mieszańca morfologicznego), wykres B – 24 prób *J. communis* zebranych w Polsce Północnej.

Na wykresie liczebności wyraźnie zaznacza się przewaga rasy chemicznej sabinenowej w próbach górskich (8 z 16 badanych prób) w porównaniu z próbami Polski Północnej (4 z 24 prób). Ponadto osobniki o cechach pośrednich występują nielicznie i tylko w puli prób nizinnych (2 rośliny). 75% (18 z 24 prób) *J. communis* z Polski Północnej reprezentuje chemotyp α-pinenowy, podczas, gdy w przypadku *J. nana* stanowi on 50% wszystkich prób. Jak już wspomniano w dyskusji wyników analiz HS SPME prób nizinnych (rozdział „Analiza zróżnicowania fitochemicznego badanych prób *J. communis* (cel pochodny 3),”) kilka źródeł przypisuje wysoką zawartość tego związku próbom *J. communis* pochodzącym z terenów górskich (Baerheim Svendsen i in., 1985; Vernin i in., 1988; Caramiello i in., 1995; Hiltunen i Laakso, 1997; Angioni i in., 2003). Adams w analizie wszystkich gatunków sekcji *Oxycedrus* jako cechę fitochemiczną wyróżniającą *J. communis* var. *saxatilis* z reszty gatunków w tej sekcji podaje wysoką zawartość sabinenu (ponad 30%) (Adams i in., 2000). Wyniki uzyskane dla prób tatrzańskich *J. nana* w pewnym stopniu potwierdzają tę zależność. Z drugiej strony wysoka zawartość sabinenu (chemotyp sabinenowy) odzwierciedla jedynie pewną tendencję wśród jałowców „górkich”, nie jest jednak ich unikalną cechą. Około 10% prób nizinnych w badanej pracy charakteryzowała się przewagą zawartości sabinenu nad α-pinenem.

Dla danych otrzymanych na kolumnie HP101 obliczono podstawowe wskaźniki struktury (mediana, średnia, odchylenie standardowe) z uwzględnieniem chemotypu

oraz zakresów zawartości procentowych identyfikowanych związków. Dane te zawarto w tabeli 33. Należy nadmienić, że dane te podane są dla całej puli badanych prób, bez wyróżnienia na próby pochodzące z terenów górskich i nizinnych. Niemniej jednak zestawienie podstawowych statystyk (przedstawione na rysunku 35) pokazuje wyraźnie, że zawartości oznaczonych monoterpenuw w poszczególnych chemotypach prób tatrzańskich i nizinnych różnią się w nieznaczny sposób.

RYSUNEK 35: Względne zawartości procentowe związków monoterpenuw w igłach prób prób górskich i nizinnych jałowców z uwzględnieniem chemotypu



*próby górskie obejmują pulę 16 osobników (*J. nana*, *J. communis* oraz jednego mieszańca morfologicznego) pochodzących ze stanowisk zlokalizowanych w rejonie Tatr Zachodnich (por. tab. 10, s. 69)

**próby nizinne obejmują pulę 24 osobników *J. communis* pochodzących ze stanowisk zlokalizowanych w Polsce Północnej.

***Zawartości procentowe wyrażone są jako znormalizowane mediany.

TABELA 33: Zakresy, średnie i mediany względnych zawartości procentowych badanych związków monoterpenuw w poszczególnych chemotypach jałowca z uwzględnieniem surowca (igły, szyszkogagody).

związek	Chemotyp α -pinenowy (n=26)			Chemotyp pośredni (n=2)			Chemotyp sabinenowy (n=12)		
	zakres	średnia \pm SD	media na	zakres	średnia \pm SD	media na	zakres	średnia \pm SD	media na
α -pinen	47,72–84,77	71,99 \pm 8,59	73,59	39,72–62,81	44,67 \pm 6,99	44,67	14,96–39,41	24,64 \pm 7,96	24,92
kamfen	0–1,34	0,62 \pm 0,31	0,67	0–0,49	0,25 \pm 0,35	0,25	0–1,24	0,35 \pm 0,36	0,28
sabinen	0–2,12	1,13 \pm 0,47	0,49	8,58–15,19	14,76 \pm 0,62	14,76	25,67–55,28	39,23 \pm 9,24	39,94
β -pinen	0–7,82	2,76 \pm 1,28	2,56	1,64–3,35	1,97 \pm 0,47	1,97	0–4,14	1,5 \pm 1,07	1,41
myrcen	0,07–7,81	3,66 \pm 1,62	3,87	4,65–4,9	4,78 \pm 0,18	4,78	0–6,23	4,26 \pm 1,67	4,28
α -felandren	0–3,91	1,83 \pm 1,11	1,97	2,78–4,09	3,58 \pm 0,73	3,58	0,16–1,66	0,8 \pm 0,46	0,66
karen	0–20,27	4,63 \pm 5,17	2,26	0,85–3,49	2,96 \pm 0,76	2,96	0–24,60	4,96 \pm 7,10	2,40
p-cymen+ α -terpinen	0–6,99	0,96 \pm 1,58	0,32	0–1,25	0,93 \pm 0,12	0,93	1,02–3,36	2,11 \pm 0,97	2,25

WYNIKI I DYSKUSJA

związek	Chemotyp α -pinenowy ($n=26$)			Chemotyp pośredni ($n=2$)			Chemotyp sabinenowy ($n=12$)		
	zakres	średnia \pm SD	media na	zakres	średnia \pm SD	media na	zakres	średnia \pm SD	media na
limonen+ β -felandren	0,23–29,23	9,80 \pm 7,33	7,46	11,13–18,78	15,29 \pm 4,94	15,29	2,50-9,76	5,32 \pm 2,27	4,93
γ -terpinen	0–0,60	0,14 \pm 0,12	0,06	0,56–1,61	1,28 \pm 0,47	1,28	2,14-4,76	3,25 \pm 0,87	3,33
terpinolen	0,06–6,28	1,56 \pm 1,18	1,12	0–2,38	1,19 \pm 1,68	1,19	2,31-3,76	2,84 \pm 0,45	2,73
terpinen-4-ol	0–0,46	0,25 \pm 0,18	0,05	0–2,99	2,00 \pm 0,47	2,00	0-9,31	5,26 \pm 2,34	5,15
reszta*	0–7,50	1,65 \pm 1,63	1,13	0,73–9,35	6,39 \pm 4,19	6,39	3,99-9,35	5,48 \pm 0,85	5,65

reszta=100% - suma wszystkich niezidentyfikowanych pików

Powyższe zestawienie podstawowych statystyk dla *J. nana* i *J. communis* oddaje wyraźnie proporcje w zawartościach dwóch głównych składników olejku jałowcowego, czyli α -pinenu i sabinenu. Limonen, wymieniany w literaturze jako trzeci pod względem zawartości monoteren w przypadku złoza HP101 ulega koelucji z β -felandrenem. Obydwa te związki występują w większej ilości w chemotypie α -pinenowym, co stwierdzono także w przypadku prób nizinnych badanych techniką HS SPME. Nieliczne źródła literaturowe dotyczące składu olejku z *J. nana* podają, że proporcje zawartości procentowych α -pinenu:sabinenu:limonenu wynoszą średnio 20:40:5 (Looman i Baerheim Svendsen, 1992). W badanej puli prób tylko chemotyp sabinenowy (do którego zaliczono 8 osobników *J. nana* oraz 4 nizinne próby *J. communis*) charakteryzował się niemal identycznymi średnimi proporcjami tych węglowodorów – 24,64:39,23:5,42 (przy czym ostatnia wartość liczbowa dotyczy sumarycznej zawartości limonenu i β -felandrenu). W cytowanym wyżej opracowaniu dotyczącym *J. communis* var. *saxatilis* (synonim *J. nana*) stwierdzono również istnienie pojedynczych osobników charakteryzujących się wyższą zawartością α -pinenu (nawet do 86%) z jednoczesną niewielką ilością sabinenu (<1%) (Looman i Baerheim Svendsen, 1992). Należy także zauważyć, że wysoka zawartość sabinenu jest skorelowana z obecnością terpinen-4-olu, p-cymenu (koelującego z α -terpinenem), γ -terpinenem oraz terpinolenem. Jak już wspomniano w części teoretycznej pracy (por. „Skład jakościowy i procentowy olejku jałowcowego„, s. 27) współwystępowanie sabinenu i terpinen-4-olu związane jest ze wspólnym szlakiem biosyntezy tych związków (Caramiello i in., 1995).

Dokładniejszych danych na temat składu i wzajemnych relacji poszczególnych składników dostarczyły dane otrzymane w wyniku rozdziałów tych samych olejków na kolumnie o charakterze enancjoselektywnym. Stanowią one cenne uzupełnienie analiz

achiralnych nie tylko w sensie poznawczym, ale także metodycznym, gdyż zastosowana stacjonarna faza chiralna umożliwiła rozdzielenie limonenu i β -felandrenu. Wszystkie próby, które w analizie achiralnej wykazały wysoka sumaryczną zawartość limonenu i β -felandrenu, w analizie chiralnej wykazały dużą przewagę β -felandrenu nad limonemem. W tabeli 34 zebrano wartości nadmiarów enancjomerycznych (EE) α -pinenu i limonenu. Nie podano wartości EE dla β -pinenu, gdyż koeluował on z α -terpinenem, niemniej jednak na podstawie danych liczbowych można z dużym prawdopodobieństwem założyć, że dominuje tutaj forma lewoskrętna. 3-karen oraz sabinen wykazują we wszystkich badanych olejkach wysoką czystość enancjomeryczną związaną z zawartością wyłącznie formy prawoskrętnej.

TABELA 34: Zakresy i mediany nadmiarów enancjomerycznych α -pinenu i limonenu w poszczególnych chemotypach prób jałowca pospolitego i halnego

Chemotyp	EE ¹ (%) α -pinen			EE ¹ (%) limonen		
	wartość ²	zakres	mediana	wartość ²	zakres	mediana
α -pinenowy	(-) n=0	-	-	(-) n=13	-61,29÷-9,09	-36
n=26	(+) n=26	9,29÷70,65	47,43	(+) n=13	0÷91,21	61,90
pośredni	(-) n=0	-	-	(-) n=1	-2,56	-
n=2	(+) n=2	26,90÷52,71	39,80	(+) n=1	48,28	-
sabinenowy	(-) n=5	-53,28÷-8,61	-21,08	(-) n=0	-	-
n=12	(+) n=7	0,75÷20,00	6,27	(+) n=12	19,30÷66,67	49,94

¹ EE(%) (nadmiar enancjomeryczny) obliczono wg wzoru $EE(\%) = \frac{R-S}{R+S} \cdot 100\%$.

² znaki (+) oraz (-) oznaczają dodatnią i ujemną wartość nadmiaru enancjomerycznego

Obliczone EE dla α -pinenu i limonenu są zgodne z tymi otrzymanymi dla prób nizinnych *J. communis* techniką HS SPME (por. „Analiza zróżnicowania fitochemicznego badanych prób *J. communis* (cel pochodny 3): Analiza chiralna,, s. 149). W próbach chemotypu α -pinenowego zdecydowanie dominuje forma prawoskrętna tego związku. Wraz ze wzrostem zawartości (+)sabinenu spada znacząco jej zawartość, na korzyść formy lewoskrętnej. W chemotypie sabinenowym 5 prób (OT3, OT5, OT11, T1 oraz T8) wykazuje ujemną wartość EE dla α -pinenu, podczas, gdy pozostałe 7 wykazuje niewielką dominację (+)- α -pinenu nad formą (-) - wartości EE są niskie i nie przekraczają 20%. W przypadku enancjomerów limonenu w chemotypie α -pinenowym zaobserwowano, że dla połowy prób EE przyjmuje wartości ujemne, a dla połowy dodatnie, natomiast wraz ze wzrostem zawartości (+)sabinenu zaznacza się wyraźna dominacja formy prawoskrętnej tego związku. Zaobserwowano

także, że przewaga formy (-) limonenu w chemotypie α -pinenowym dotyczy przede wszystkim prób nizinnych *J. communis* (LU1, 2, 3, 5, 6, 8, OT2, 6, 7, 10, 12, ST12) oraz jednej próby *J. communis* pochodzącej z Tatr (T16) i jednej – *J. nana* (T12). Być może forma (+) tego związku chiralnego produkowana jest preferencyjnie przez rośliny pochodzące z wyższych stanowisk. Z drugiej strony także dla nizinnych *J. communis* należących do chemotypu α -pinenowego obserwowano dodatnie wartości EE dla limonenu (por. tab. 27, s. 151).

Dla wyników analiz enancjoselektywnych w pakiecie *Statistica 7.0* skonstruowano macierz korelacji, która w przejrzysty sposób oddaje relacje pomiędzy zawartościami procentowymi poszczególnych związków monoterpenowych. Przedstawiono ją w tabeli 35.

TABELA 35: Macierz korelacji zawartości procentowej badanych związków monoterpenowych oznaczonych na złożu enancjoselektywnym w igłach jałowca pospolitego i halnego.

	(-)α-pinen	(+)α-pinen	mircen	(+)sabinen	(+)3-karen	α-felandren	α-terpinen+ (+)β-pinen	(-)β-pinen	(-)limonen	(+)limonen	β-felandren	γ-terpinen	terpinolen
(-)α-pinen	1,00	0,38	-0,19	-0,57	0,09	-0,38	0,08	0,53	0,22	-0,24	0,26	-0,57	-0,57
(+)α-pinen	0,38	1,00	-0,37	-0,92	-0,11	-0,54	0,08	0,26	0,27	0,00	0,07	-0,90	-0,82
mircen	-0,19	-0,37	1,00	0,36	-0,47	0,48	-0,53	0,30	0,05	-0,01	0,33	0,31	0,14
(+)sabinen	-0,57	-0,92	0,36	1,00	-0,06	0,54	0,02	-0,42	-0,31	-0,10	-0,27	0,96	0,78
(+)3-karen	0,09	-0,11	-0,47	-0,06	1,00	-0,37	0,39	-0,40	-0,29	-0,08	-0,22	-0,05	0,33
α-felandren	-0,38	-0,54	0,48	0,54	-0,37	1,00	-0,42	0,00	0,05	-0,23	0,39	0,62	0,44
α-terpinen+ (+)β-pinen	0,08	0,08	-0,53	0,02	0,39	-0,42	1,00	-0,68	-0,33	-0,24	-0,47	0,01	-0,03
(-)β-pinen	0,53	0,26	0,30	-0,42	-0,40	0,00	-0,68	1,00	0,54	0,11	0,54	-0,45	-0,44
(-)limonen	0,22	0,27	0,05	-0,31	-0,29	0,05	-0,33	0,54	1,00	0,08	0,10	-0,31	-0,22
(+)limonen	-0,24	0,00	-0,01	-0,10	-0,08	-0,23	-0,24	0,11	0,08	1,00	-0,14	-0,07	0,09
β-felandren	0,26	0,07	0,33	-0,27	-0,22	0,39	-0,47	0,54	0,10	-0,14	1,00	-0,25	-0,22
γ-terpinen	-0,57	-0,90	0,31	0,96	-0,05	0,62	0,01	-0,45	-0,31	-0,07	-0,25	1,00	0,78
terpinolen	-0,57	-0,82	0,14	0,78	0,33	0,44	-0,03	-0,44	-0,22	0,09	-0,22	0,78	1,00

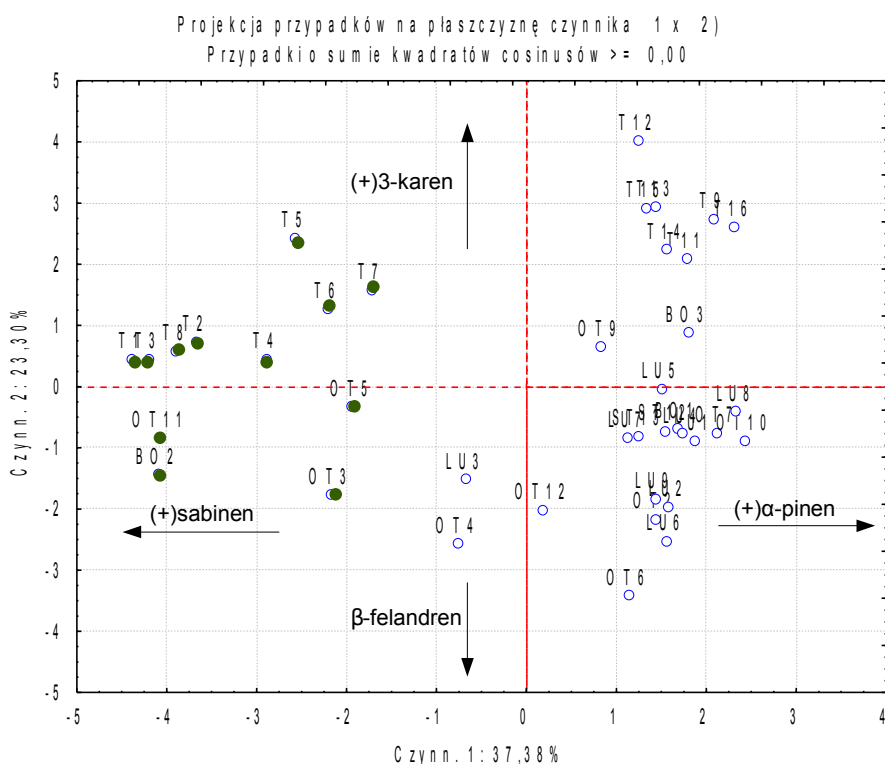
Oznaczone współczynniki korelacji są istotne z $p < 0,05$, $N = 40$ (wyniki wygenerowane w pakiecie *Statistica 7.1*)

Na podstawie sporządzonej macierzy korelacji stwierdzono podobne zależności jak te, omówione w rozdziale „Analiza różnicowania fitochemicznego badanych prób *J. communis* (cel pochodny 3): Analiza chiralna”, s. 154. Stwierdzono bardzo silną i silną korelację dodatnią dla zawartości (+)sabinenu w stosunku do γ -terpinenu, α -

felandrenu i terpinolenu. Zawartości tych trzech składników olejku jałowcowego wykazują też silną korelację pomiędzy sobą. Ponadto wykazano istnienie silnej zależności pomiędzy zawartością formy lewoskrętnej β -pinenu a (-) α -pinenem oraz (-)limonenem. Konsekwencją istnienia dodatniej korelacji (+)sabinenu z grupą węglowodorów monocyklicznych (γ -terpinen, α -felandren i terpinolen) jest korelacja ujemna o silnym i bardzo silnym natężeniu tych związków z (+) i (-) α -pinenem.

Dla wyników analiz achiralnych i chiralnych przeprowadzono także analizę metodą głównych składowych (PCA). Ponieważ dwuwymiarowe rzuty przypadków dla danych z kolumny achiralnej i chiralnej wykazywały duże podobieństwo, w pracy zamieszczono tylko diagram PCA otrzymany dla wyników rozdziałów na złożu enancjoselektywnym (rys. 36). Strzałki na diagramie wskazują kierunkowość rozmieszczenia prób pod względem czterech najbardziej zmiennych związków występujących w olejku. Na zielono zaznaczono próby zaklasyfikowane jako chemotyp sabinenowy.

RYSUNEK 36: Diagram PCA na podstawie danych chromatograficznych otrzymanych na kolumnie enancjoselektywnej β -dex dla igieł jałowca pospolitego i halnego



Wykres sporządzono na podstawie dwóch zmiennych składowych o największej zmienności (łącznie 60,68% ogółu wariancji), N=40. Kolor zielony oznacza chemotyp sabinenowy, kolor niebieski – chemotyp pośredni (2 próby) oraz α -pinenowy. Schematy rozmieszczenia wygenerowano w pakiecie Statistica 7.1.

Cztery główne związki odpowiedzialne za największą zmienność badanych prób to opisane wcześniej (+)sabinen i (+) α -pinen. Ponadto w kilku próbach, głównie nizinnych (OT2, OT4, OT6, OT8, OT12, LU2, LU3, LU6, LU9), widocznej w dolnej części wykresu stwierdzono stosunkowo wysoką zawartość β -felandrenu, przekraczającą w kilku przypadkach 10%. Charakterystyczny jest niski, nie przekraczający 4%, poziom tego związku w próbach górskich. W odróżnieniu od nizinnych wyróżniają się one natomiast wysoką zawartością (+) β -karenu - średnia zawartość tego związku wynosi 8,48% w próbach górskich oraz 2,1% - w nizinnych. Analiza macierzy korelacji (tab. 35) wykazała, że zawartość tego dicyklicznego węglowodoru wykazuje jedynie słabą korelację dodatnią z wymywanymi razem z kolumny α -terpinenem i (+) β -pinenem oraz terpinolenem.

Analiza składu olejku otrzymanego z *J. nana* oraz jego porównanie do *J. communis* wnoszą duży aspekt nowości w badaniach gatunków z rodzaju *Juniperus*. W literaturze istnieje niewiele doniesień dotyczących *J. nana*, a te które są dotyczą zwykle danych otrzymanych dla kilku prób tego gatunku/podgatunku (Proenca da Cunha i Roque, 1989; Looman i Baerheim Svendsen, 1992; Adams, 2000). W niniejszych badaniach unikalność badanego materiału (Tatrzański Park Narodowy) oraz liczba zebranych prób pozwalają na nieco szersze podejście do tematu. Ponadto przeprowadzone analizy chiralne stanowią cenne uzupełnienie istniejącej wiedzy. Przeszukując bazy danych autorka nie spotkała się z danymi literaturowymi dotyczącymi składu enancjomerycznego olejku z *J. nana*. Choć znane jest wykorzystanie składu terpenowego olejków jako markera pozwalającego odróżnić klony, hybrydy czy odmiany rośliny olejkowej (Asztemborska i Ochocka, 2002) w niniejszych badaniach nie udało się znaleźć żadnego składnika olejku eterycznego, który pozwoliłby na fitochemiczne odróżnienie jałowca halnego od pospolitego. Innymi słowy – skład frakcji monoterpenów nie wykazuje korelacji z klasyfikacją taksonomiczną. Istnienie trzech chemotypów jest bowiem także domeną gatunku *J. communis*. Taki wynik analiz chromatograficznych może sugerować bliskie pokrewieństwo *J. communis* i *J. nana*.

6.2. Analiza sekwencji niekodującego łącznika *trnL-trnF* cpDNA

Na rysunku 20 (rozdział „Analiza pokrewieństwa systematycznego *J. communis* L. i *J. nana* Willd. (cel pochodny 5): Sekwencjonowanie produktów amplifikacji,,, s. 114)

przedstawiono zestawienie sekwencji łącznika *trnL(UAA)-trnF(GAA)* dla wszystkich badanych prób. Obejmuje ono tylko część odczytu o wysokiej jakości oznaczenia każdej, pojedynczej zasady. Dla sekwencji wynikowej consensus jako graniczną wartość jakości odczytu wyznaczono 25, przy czym dla większości zasad wartości te były znacznie wyższe i wynosiły nawet powyżej 70. Wartość jakości q wygenerowana przez program Phred/Phrap/Consed jest logarytmicznie powiązany z z prawdopodobieństwem błędu. Obliczany jest z wzoru $q = -10 \cdot \log(p)$ gdzie p oznacza oszacowane prawdopodobieństwo błędnego oznaczenia danej zasady. Spadek jakości odczytu obserwowany był szczególnie na krańcach analizowanej sekwencji. Obserwowane na rysunku 20 różnice w długości sekwencji nie wynikają z różnic w jej długości, lecz z faktu różnej jakości odczytu dla początku i końca sekwencji. Średnia długość sekwencji consensus wynosiła 280pz. Wszystkie 40 sekwencji zostało zarejestrowanych i zdeponowanych w GenBanku z numerami dostępowymi (ang. *NCBI accession number*) DQ017710-DQ017749.

Przed zarejestrowaniem sekwencji dla badanych prób *J. nana* oraz *J. communis* przeszukano bazę sekwencji nukleotydowych BLAST (pakiet blastn nucleotide-nucleotide). W ten sposób odnaleziono zarejestrowane w bazie sekwencje o największym podobieństwie do badanej. Pierwszych dziesięć wyników wyszukiwania w bazie danych BLAST przedstawiono w tabeli 36.

TABELA 36: Zestawienie 10 pierwszych wyników wyszukiwania w bazie danych BLAST

Nazwa gatunku (Entrez accession number, query length, e-value, identities) (Low complexity filter ON)
<i>Juniperus rigida</i> (ABO29868.1, 321bp, e-176, 317/319 – 99%)
<i>Juniperus communis</i> var. <i>saxatilis</i> (AY354295.1, 314bp, e-164, 304/306 – 99%)
<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>hemisphaerica</i> (AY354287.1, 314bp, e-164, 304/306 – 99%)
<i>Juniperus communis</i> var. <i>communis</i> (AY354286.1, 314bp, e-164, 304/306 – 99%)
<i>Cupressus funebris</i> (AJ224794.1, 314bp, e-142, 307/320 – 95%)
<i>Juniperus thurifera</i> (AF438550.1, 311bp, e-138, 393/303 – 96%)
<i>Juniperus communis</i> (AF211519.1, 458bp, 3e-80, 182/190 – 95%)
<i>Juniperus saltillensis</i> (AF211521.1, 459bp, 4e-76, 182/191 – 95%)
<i>Juniperus osteosperma</i> (AF211524.1, 459bp, 9e-74, 181/191 – 94%)
<i>Juniperus occidentalis</i> (AF211517.1, 459bp, 9e-74, 181/191 – 94%)

Sekwencje wygenerowane przez bazę danych BLAST w odpowiedzi na zapytanie pochodziły, zgodnie z oczekiwaniami, z gatunków rodzaju *Juniperus*. Tylko jedna z 10 najbardziej podobnych sekwencji pochodziła z innego rodzaju, należącego, tak jak *Juniperus*, do rodziny *Cupressaceae*. Taki wynik potwierdził, że sekwencjonowaniu poddano właściwy fragment DNA. Zastosowanie primera uniwersalnego niesie bowiem ze sobą zagrożenie amplifikacji produktu niespecyficznego pochodzącego z innego organizmu roślinnego, który może zanieczyszczać badany surowiec.

Niekodująca sekwencja łącznikowa *trnL(UAA)-trnF(GAA)* należy do markerów chloroplastowego DNA, używanych w badaniach molekularnej identyfikacji roślin na poziomie rodziny, rodzaju i gatunku (Taberlet i in., 1991; Soltis i Soltis, 1998). Należy podkreślić, że tak, jak całe cpDNA, jest dziedziczona z linii matczynej w przypadku większości roślin okrytonasiennych i stabilnie przekazywany między pokoleniami (Yang i in., 2001). Uniwersalne primery dla niekodującej sekwencji łącznika *trnL-trnF* zostały zaprojektowane w ten sposób, że są komplementarne do flankujących go regionów o silnie konserwowanej ewolucyjnie sekwencji (Taberlet i in., 1991). Najczęściej sekwencja *trnL-trnF* opisywana jest w badaniach na poziomie rodzaju. Została z powodzeniem zastosowana w identyfikacji gatunków rodzaju *Cinnamomum* (Kojoma i in., 2002), *Ephedra* (Long i in., 2004) i *Rheum* (Yang i in., 2001). Została także zastosowana w badaniach dwóch gatunków rodzaju *Juniperus*, gdzie wraz z markerami jądrowego DNA i analizą RFLP potwierdziła zjawisko hybrydyzacji międzygatunkowej *J. occidentalis* i *J. osteosperma* (Terry i in., 2000). Niektóre źródła opisują zastosowanie tego markera na poziomie wewnątrzgatunkowym. Pozwolił on, wraz z jądrową sekwencją ITS oraz analizą AFLP, na molekularną identyfikację odmian *Croton alabamensis* (Van Ee i in., 2006).

Jak opisano w celach niniejszej pracy, analiza sekwencji łącznika *trnL-trnF* chloroplastowego DNA podjęta została jako próba odpowiedzi na pytanie o pokrewieństwo dwóch dziko rosnących w Polsce gatunków (podgatunków/odmian) jałowca. Pierwszy z nich to *J. communis*, który zasięgiem obejmuje prawie cały obszar naszego kraju, drugi to *J. nana*, który w Polsce występuje dziko jedynie w Tatrach, powyżej górnej granicy lasu. Stanowiska systematyków dotyczące klasyfikacji *J. nana* są niejednoznaczne (problem ten opisano szczegółowo w rozdziale „Przynależność systematyczna *J. communis* L. i *J. nana* Willd.„ s. 15), choć nowsze źródła wskazują

na bliskie pokrewieństwo do *J. communis* i klasyfikują go jako *J. communis* var. *saxatilis* (Farjon, 2001) lub *J. communis* subsp. *alpina* (Flora Europea, 2001). Zestawienie sekwencji 40 prób *J. nana* i *J. communis* pozyskanych ze stanowisk naturalnych w Tatrach Zachodnich i Polsce Północnej (woj. Pomorskie) (por. rys. 20, s. 115) wykazało ich 100% podobieństwo. Wynik taki może sugerować, że badane jednostki systematyczne są na tyle blisko spokrewnione, że nie obserwuje się polimorfizmu badanej sekwencji *trnL-trnF*. Z drugiej strony, wyniki otrzymane w wyniku przeszukiwania bazy danych BLAST wykazały 99% podobieństwo otrzymanej sekwencji do sekwencji innego gatunku jałowca – *Juniperus rigida* (por. tab. 36, s. 187). Może to wskazywać na małą zmienność tej sekwencji w obrębie całego rodzaju *Juniperus*, choć wyniki Terry'ego dla *J. occidentalis* i *J. osteosperma* dowiodły istnienia mutacji punktowych w obrębie *trnL-trnF*. Jak już wspomniano, *trnL-trnF* wykazuje największą zmienność na poziomie rodzaju i gatunku, niemniej jednak należy pamiętać, że stopień tej zmienności jest zróżnicowany i charakterystyczny dla danej grupy taksonomicznej (Soltis i Soltis, 1998). Polimorfizm taki nie może być także określony *a priori* bez empirycznej weryfikacji dla badanego organizmu.

6.3. Podsumowanie

Zarówno porównawcza analiza chromatograficzna olejków, jak zestawienie niekodującej sekwencji łącznikowej *trnL(UAA)-trnF(GAA)* nie wykazały istnienia polimorfizmu związanego z pozycją systematyczną *J. communis* oraz *J. nana*. Mimo, iż morfologiczne rozróżnienie tych gatunków/podgatunków/odmian nie przysparza większych trudności, nie jest to możliwe na poziomie fitochemicznym czy molekularnym z zastosowaniem markera *trnL(UAA)-trnF(GAA)*. Wyniki uzyskane przez Adamsa i współpracowników, w których przeprowadzono analizę RAPD różnych odmian *J. communis* nie wykazały wyraźnego rozgraniczenia między *J. communis* var. *communis* oraz *J. communis* var. *saxatilis*. W związku z tym autorzy postulowali, że zgodnie ze współczesną klasyfikacją systematyczną, rośliny te reprezentują jeden takson (odmiany) (Adams i in., 2002; Adams i Pandey, 2003).

W przeprowadzonych w pracy analizach nie wykazano różnic pomiędzy sekwencją markera *trnL-trnF* cpDNA dla wyróżnionych na podstawie składu olejku chemotypów. Jeśli udałoby się znaleźć jakiegokolwiek powiązanie pomiędzy cechami fitochemicznymi a genetycznymi kolejnym krokiem mogłoby się stać opracowanie

markerów molekularnych dla określonych cech objawiających się w fenotypie rośliny (w tym wypadku skład monoterpenów olejku). Taka korelacja nie opierałaby się jednak na bezpośrednim związku przyczynowo-skutkowym pomiędzy polimorfizmem sekwencji DNA a cechą fenotypową.

Na podstawie uzyskanych wyników wydaje się, że stopień pokrewieństwa *J. communis* i *J. nana* jest na tyle wysoki, że nie notuje się różnic w obrębie badanej sekwencji, jak i w składzie metabolitów wtórnych. Cechy morfologiczne, które pozwalają na wyróżnienie *J. nana* od *J. communis* są w dużej mierze formą przystosowania się rośliny do bytowania w różnych warunkach klimatycznych i ukształtowania terenu. Jednak przystosowania te nie znajdują odzwierciedlenia w innych cechach fenotypowych, takich, jak skład olejku eterycznego. Trudno także znaleźć zależność pomiędzy warunkami środowiska a obecnością lub brakiem danego składnika w olejku, ponieważ nie znaleziono cechy fitochemicznej różnicującej olejki otrzymane z roślin górskich od olejków z roślin nizinnych.

VI. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, które miały na celu osiągnięcie celu głównego, a więc **oszacowanie zróżnicowania fitochemicznego i genetycznego *Juniperus communis* L.** wyciągnięto następujące wnioski końcowe:

- 1) *Juniperus communis* L. wykazuje duże zróżnicowanie osobnicze, intrapopulacyjne zarówno na poziomie fitochemicznym, jak i genetycznym, przy jednoczesnym nie wysokim zróżnicowaniu interpopulacyjnym.
- 2) W badanej populacji *Juniperus communis* L. wyodrębniono trzy chemotypy: α -pinenowy, sabinenowy i pośredni. Istniejące monografie farmakopealne olejku jałowcowego nie uwzględniają istnienia ras chemicznych, co w świetle odmiennej aktywności biologicznej poszczególnych monoterpenu może mieć duże znaczenie dla właściwości leczniczych całego surowca.
- 3) Różnice ilościowe w składzie węglowodorów terpenowych i ich enancjomerów pomiędzy różnymi organami tej samej rośliny sugerują, że poziom ekspresji enzymów katalizujących biosyntezę poszczególnych grup związków w tych organach jest inny i regulowany niezależnie.
- 4) Mircen może być markerem olejku z szyszkojagód, a jego niska zawartość może świadczyć o zafałszowaniu olejkami z igieł.
- 5) Przyczyną różnorodności genetycznej wewnątrz badanych populacji *Juniperus communis* L., może być sposób zapylania (wiatropylność), dyspersja nasion (ornitochoria), długowieczność osobników i struktura zasięgu. Można przypuszczać, że znajduje to także odzwierciedlenie w cechach fenotypowych, do których należy między innymi skład wtórnych metabolitów.
- 6) Zróżnicowanie fenotypowe objawiające się występowaniem ras chemicznych *J. communis* może być skorelowane z genetycznym odciskiem palca otrzymanym w wyniku RAPD PCR. Należy pokreślić, że nie jest możliwe stwierdzenie, czy obserwowany polimorfizm DNA ma bezpośredni związek z regionami DNA odpowiedzialnymi za kodowanie enzymów biorących udział w biosyntezie monoterpenu rośliny.

- 7) Zaproponowane dwa modele sieci neuronowych pozwalają odwzorować profil genetyczny (otrzymany na podstawie RAPD PCR) na fitochemiczny, czyli rozpoznać określone chemotypy *J. communis*.
- 8) Pomimo wyraźnych różnic morfologicznych pomiędzy *J. nana* i *J. communis* analiza składu frakcji monoterpenu oleju z igieł oraz niekodującej sekwencji łącznikowej *trnL(UAA)-trnF(GAA)* cpDNA, nie wykazała istnienia polimorfizmu na poziomie fitochemicznym i molekularnym. Sugeruje to przynależność tych dwóch jednostek do tego samego taksonu.

Wnioski na podstawie wyników realizacji **celów pochodnych** przedstawiają **propozycje rozwiązań metodycznych** do zastosowań w pracach standaryzacyjnych farmaceutycznych surowców roślinnych.

- 1) HS SPME bezpośrednio z surowca olejkowego jest szybką i użyteczną metodą oceny składu związków lotnych zawartych w strukturach wydzielniczych niewielkich ilości surowca (rzędu kilkudziesięciu mg).
- 2) Metoda Taguchi może być przydatna w optymalizacji procesów analitycznych, co udowodniono dla HS SPME sprzężonego z GC w przypadku surowca pozyskiwanego z *J. communis*. Oferuje ona możliwość zbadania wielu parametrów przyjmujących różne wartości w stosunkowo niedużej liczbie eksperymentów.
- 3) RAPD PCR może być wykorzystana z powodzeniem w badaniach populacyjnych, co pokazano w przypadku badań zróżnicowania wewnątrz- i międzypopulacyjnego *J. communis*.
- 4) Sieci neuronowe mogą okazać się przydatnym narzędziem w porównywaniu wyników metod fingerprintingu DNA, dających trudne w interpretacji profile produktów po amplifikacji z wynikami złożonych jakościowo i ilościowo analiz fitochemicznych.

VII. PIŚMIENNICTWO

- Adams, R. P. 1999. Systematics of multi-seeded eastern hemisphere *Juniperus* based on leaf essential oils and RAPD DNA fingerprinting. *Biochem. Syst. Ecol.* 27: 709-725
- Adams, R. P. 2000. Systematics of *Juniperus* section *Juniperus* based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 515-528
- Adams, R. P., Demeke, T. 1993. Systematic relationships in *Juniperus* based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Taxon* 42: 553-571
- Adams, R. P., Hsieh, C., Murata, J., Pandey, R. N. 2002. Systematics of *Juniperus* from eastern Asia based on Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem. Syst. Ecol.* 30: 231-241
- Adams, R. P., Pandey, R. N. 2003. Analysis of *Juniperus communis* and its varieties based on DNA fingerprinting. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 1271-1278
- Adams, R. P., Pandey, R. N., Leverenz, J. W., Dignard, N., Hoegh, K., Thorfinnsson, T. 2003. Pan-Arctic variation in *Juniperus communis*: historical biogeography based on DNA fingerprinting. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 181-192
- Angioni, A., Barra, A., Russo, M. T., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P. 2003. Chemical Composition of the Essential Oils of *Juniperus* from Ripe and Unripe Berries and Leaves and Their Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3073-3078
- Armstrong, J., Gibbs, A. J., Peakall, R., Weiller, G. 1994. „The RAPDistance Package”. Australian National University, Canberra, Australia.
- Arnau, G., Lallemand, J., Bourgoïn, M. 2002. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica* 129: 69-79
- Arnold, M. L., Emms, S. K. 1998. *Molecular Markers, Gene Flow and Natural Selection*. W: Soltis, D. E., Soltis, P. S., Doyle, J. J. 1998. *Molecular systematics of plants II. DNA Sequencing*. Kluwer Academic Publishers, New York.
- Asztemborska, M., Ochocka, J. R. 2002. Chiral monoterpenoids in plants – enantioselective chromatographic analysis, and their bioactivity. W: Atta-ur-Rahman. 2002. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, Science B. V.
- Asztemborska, M., Sybilska, D., Nowakowski, R., Perez, G. 2003. Chiral recognition ability of α -cyclodextrin with regard to some monoterpenoids under gas-liquid chromatographic conditions. *J. Chromatogr. A* 1010: 233-242
- Babiński, J. 1974. *Jałowiec pospolicie i jego rola w lesie*. PWRiL, Warszawa.
- Baerheim Svendsen, A., Scheffer, J. J. C., Looman, A. 1985. A comparative study of the composition of the essential needle oils of Norwegian lowlands juniper and high mountains juniper. *Sci. Pharm.* 53: 159-161
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S., Donoghue, M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 82: 247-277
- Banthorpe, D., V. 1994. Terpenoids, s.291 – 316. W: J. Mann, R. S. Davidson, J. B. Hobbs, D. V. Banthorpe, J. H. Harborne, *Natural products – their chemistry and biological significance*. Longman Scientific & Technical, Harlow.
- Barnes, J., Anderson, L. A., Phillipson, J. D. 2002. *Herbal Medicines – A guide for healthcare professionals*. London, Chicago, PhP.
- Bassam, B. J., Bentley, S. 1994. DNA Fingerprinting using Arbitrary Primer Technology (APT): A Tool or a Torment. *Australas. Biotechnol.* 4: 232-236
- Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H. 2001. *Common Fragrances and Flavour Materials – Preparation, Properties and Uses*. Wiley-VCH, Weinheim.

- Bączek, T., Buciuński, A., Ivanov, A. R., Kaliszan, R. 2004. Artificial Neural Network Analysis for Evaluation of Peptide MS/MS Spectra in Proteomics. *Anal. Chem.* 76: 1726-1732
- Bicchi, C., Drigo, S., Rubiolo, P. 2000. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *J. Chromatogr. A* 892: 469-485
- Bowditch, B. M., Albright, D. G., Williams, J. G., Braun, M. J. 1993. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods Enzymol.* 224: 294-309
- Brewer, W. E., Galipo, R. C., Morgan, S. L., Habben, K. H. 1997. The confirmation of volatiles by solid-phase microextraction and GC-MS in the investigation of two traffic fatalities. *J. Anal. Toxicol.* 21: 286-290
- British Pharmacopoeia. 2004. TSO, London.
- Browicz, K. (red.) 1971. Atlas rozmieszczenia drzew i krzewów w Polsce. Zeszyt 10. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Poznań.
- Browicz, K. (red.) 1978. Atlas rozmieszczenia drzew i krzewów w Polsce. Zeszyt 25. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Poznań.
- Buciuński, A., Nasal, A., Kaliszan, R. 2000. Pharmacological Classification of Drugs Based on Neural Network Processing of Molecular Modeling Data. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 3: 525-533
- Burda, P. R. 1998. *Zatrucia ostre grzybami i roślinami wyższymi*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Caetano-Anollés, G. 1993. Amplifying DNA with Arbitrary Oligonucleotide Primers. *PCR Methods Applic.* 3: 85-94
- Caetano-Anollés, G. 1996. Scanning of nucleic acids by in vitro amplification: New developments and applications. *Nature Biotech.* 14: 1668-1674
- Caetano-Anollés, G., Bassam, B. J., Gresshoff, P. M. 1992. DNA fingerprinting: MAAPing out a RAPD redefinition? *Bio/Technology* 10: 937
- Caramiello, R., Bocco, A., Buffa, G., Maffei, M. 1995. Chemotaxonomy of *Juniperus communis*, *J. sibirica* and *J. intermedia*. *J. Essent. Oil Res.* 7: 133-145
- Cavaleiro, C., Pinto, E., Gonçalves, M. J., Sagueiro, L. 2006. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *J. Appl. Microbiol.* 100: 1333-1338
- Ceva-Antunes, P. M. N., Bizzo, H. R., Alves, S. M., Antunes, O. A. C. 2003. Analysis of Volatile Compounds of Tapereba (*Spondias mombin* L.) and Caja (*Spondias mombin* L.) by Simultaneous Distillation and Extraction (SDE) and Solid Phase Microextraction (SPME). *J. Agric. Food Chem.* 51: 1387-1392
- Chatzopoulou, P. S., de Haan, A., Katsiotis, S. T. 2002. Investigation on the Supercritical CO₂ Extraction of the Volatile Constituents from *Juniperus communis* Obtained under Different Treatments of the "Berries" (Cones). *Planta Med.* 68: 827-831
- Chatzopoulou, P. S., Katsiotis, S. T. 1993. Study of the Essential Oil from *Juniperus communis* „Berries” (Cones) Growing Wild in Greece. *Planta Med.* 59: 554-556
- Chatzopoulou, P. S., Katsiotis, S. T. 1995. Procedures influencing the yield and the quality of the essential oil from *Juniperus communis* L. berries. *Pharm. Acta Helv.* 70: 247-253
- Chviličková, I., Kubàň, V. 2004. Headspace solid phase microextraction (HS-SPME): a microscale sampling technique for determination of monoterpene hydrocarbons in coniferous needles by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 150-158
- Cisowski, W., Dembińska-Migas, W., Gill, S., Łuczkiwicz, I. 1995. *Analiza fitochemiczna*. Akademia Medyczna w Gdańsku, Gdańsk.
- Clifton, S. J., Ward, L. K., Ranner, D. S. 1997. The status of *Juniperus communis* L. in north-east England. *Biol. Conserv.* 79: 67-77
- Cobb, B. D., Clarkson, J. M. 1994. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucl. Acid Res.* 18: 3801-3805

- Coleman, W. M., Lawrence, B. M. 1997. A Comparison of Selected Analytical Approaches to the Analysis of an Essential Oil. *Flavour Fragr. J.* 12: 1-8
- Coleman, W. M., Lawrence, B. M. 2000. Examination of the Enantiomeric Distribution of Certain Monoterpene Hydrocarbons in Selected Essential Oils by Automated Solid-Phase Microextraction-Chiral Gas Chromatography-Mass Selective Detection. *J. Chromatogr. Sci.* 38: 95-98
- Coleman, W. M., Perfetti, T. A., Lawrence, B. M. 1998. Automatic Injection Solid-Phase Microextraction-Chiral Gas Chromatography-Mass Selective Detection analyses of Essential Oils. *J. Chromatogr. Sci.* 36: 575-578
- Cornu, A., Carnat, A. P., Martin, B., Coulon, J. B., Lamaison, J. L., Berdagué, J. L. 2001. Solid-phase Microextraction of Volatile Components from Natural Grassland Plants. *J. Agric. Food Chem.* 49: 203-209
- Demeke, T., Adams, R. P. 1994. The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution. W: Griffin, H. G., Griffin, A. M. (red.) 1994. *PCR Technology: Current Innovations*. CRC Press, Boca Raton.
- Dobrzańska, M. 1995. Izolacja całkowitego DNA roślinnego metodą CTAB, s. 4.10-4.11. W: G. Palmarczyk, J. Rytka, M. Skonieczny (red.) *Inżynieria Genetyczna i Biologia Molekularna – Metody, Podręcznik Laboratoryjny*. Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15
- Działuk, A., Burczyk, J. 2005. Metody badania przepływu genów u drzew leśnych. *Wiadomości Botaniczne* 49 (1/2): 7-18
- Działuk, A., Burczyk, J. 2005. Intensywność przepływu genów u drzew leśnych. *Wiadomości Botaniczne* 49 (3/4): 15-27
- Ellsworth, D. L., Rittenhouse, K. D., Honeycutt, R. L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* 14: 214-217
- European Pharmacopoeia 5.0. 2004. EDQM, Strasbourg
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8: 175-185
- Evans, W. C. 2000. *Trease and Evans Pharmacognosy*. Saunders, Edinburgh.
- Farjon, A. 2001. *World Checklist and Bibliography of Conifers*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Farmakopea Polska V. 1999. PTF, Warszawa.
- Farmakopea Polska VI. 2002. PTF, Warszawa.
- Fäldt, J., Sjödin, K., Persson, M., Valterova, I., Borg-Karlson, A.-K. 2001. Correlations between selected monoterpene hydrocarbons in the xylem of six *Pinus* (Pinaceae) species. *Chemoecology* 11: 97-106
- Filipowicz, N. 2001. GC i RAPD fingerprinting w badaniach *Juniperus communis* L. – rośliny olejkowej o wysokiej zawartości biologicznych aktywnie metabolitów wtórnych. *MWB UG i AMG, Gdańsk*
- Filipowicz, N., Kamiński, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M., Ochocka, J. R. 2003. Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phytother Res.* 17: 227-31
- Filipowicz, N., Piotrowski, A., Ochocka, J. R., Asztemborska, M. 2006. The Phytochemical and Genetic Survey of Common and Dwarf Juniper (*Juniperus communis* and *Juniperus nana*) Identifies Chemical Races and Close Taxonomic Identity of the Species. *Planta Med.* 72: 850-853
- Flora Europaea on CD-ROM. 2001. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fraga, J., Rodriguez, J., Fuentes, O., Fernandez-Calienes, A. Castex, M. 2005. Optimization of random amplified polymorphic DNA technique for use in genetic studies of cuban triatomine. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 47: 295-300
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8: 195-202

- Goulao, L., Cabrita, L., Oliveira, C. M., Leitao, J. M. 2001. Comparing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. *Euphytica* 119: 259-270
- Grass, S., Zidorn, C., Blattner, F. R., Stuppner, H. 2006. Comparative molecular and phytochemical investigation of *Leontodon autumnalis* (Asteraceae, Lactuceae) populations from Central Europe. *Phytochemistry* 67: 122-131
- Grote, C., Pawliszyn, J. 1997. Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *J. Anal. Chem.* 69: 587-596
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41:95-98
- Hamm, S., Lesellier, E., Bleton, J., Tchaplal, A. 2003. Optimization of headspace solid phase microextraction for gas chromatography/mass spectrometry analysis of widely different volatility and polarity terpenoids in olibanum. *J. Chromatogr. A* 1018: 73-83
- Hegi, G. 1906. *Illustrierte Flora Von Mitteleuropa*. München, Verlag von J. F. Lehmann.
- Hiltunen, R., Laakso, I. 1995. Gas Chromatographic Analysis and Biogenetic Relationships of Monoterpene Enantiomers in Scots Pine and Juniper Needle Oils. *Flav. Fragr. J.* 10: 203-210
- Hsiang, T., Huang, J. 1999. The use of RAPD markers to distinguish among juniper and cedar cultivars. *Can. J. Bot.* 78: 655-659
- Jelen, H. H. 2006. Solid-phase microextraction in the analysis of food taints and off-flavors. *J. Chromatogr. Sci.* 44: 399-415
- Jeney, C., Dobay, O., Lengyel, A., Adam, E., Nasz, I. 1999. Taguchi optimisation of ELISA procedures. *J. Immunol. Methods* 223: 137-146
- John, M. E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acid Res.* 20: 2381
- Kallio, H., Jünger-Mannermaa, K. 1989. Maritime Influence on the Volatile Terpenes in the Berries of Different Ecotypes of Juniper (*Juniperus communis* L.) in Finland. *J. Agric. Food Chem.* 37: 1013-1016
- Keskitalo, M., Pehu, E., Simon, J. E. 2001. Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 267-285
- Khandka, D. K., Tuna, M., Tal, M., Nejjad, A., Golan-Goldhirsh, A. 1997. Variability of the pattern of random amplified polymorphic DNA. *Electrophoresis* 18: 2852-2856
- Khoudoli, G. A., Porter, I. M., Blow, J. J., Swedlow, J. R. 2004. Optimisation of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the Taguchi approach. *Proteome Sci.* 2: 6
- Kim, C. S., Lee, C. H., Shin, J. S., Chung, Y. S., Hyung, N. I. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acid Res.* 25: 1085-1086
- Kim, N. S., Lee, D. S. 2004. Headspace solid-phase microextraction for characterisation of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 27: 96-100
- Kohlmünzer, S. 2000. *Farmakognozja – podręcznik dla studentów farmacji*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Kojoma, M., Kurihara, K., Yamada, K., Sekita, S., Satake, M., Iida, O. 2002. Genetic Identification of Cinnamon (*Cinnamomum* spp.) Based on the *trnL-trnF* Chloroplast DNA. *Planta Med.* 68: 94-96
- Kołodziejczyk, A. 2003. *Naturalne związki organiczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Koukos, P., Papadopoulou, K., I. 1997. Essential Oil of *Juniperus communis* L. Grown in Northern Greece: Variation of Fruit Oil Yield and Composition. *J. Essent. Oil Res.* 9: 35-39
- König, W. A. 1998. Enantioselective Capillary Gas Chromatography in the Investigation of Stereochemical Correlations of Terpenoids. *Chirality* 10: 499-504.

- König, W. A., Fricke, C., Saritas, Y., Momeni, B., Hohenfeld, G. 1997. Adulteration or Natural Variability? Enantioselective Gas Chromatography in Purity Control of Essential Oils. *J. High Resol. Chromatogr.* 20: 55-61
- Kranz, H. D., Miks, D., Siegler, M.-L., Capesius, I., Sensen, C. W., Huss, V. A. 1995. The origin of land plants: phylogenetic relationships between Charophytes, Bryophytes, and vascular plants inferred from complete small subunit ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* 41: 74-84
- Kjølner, S., Såstad, S. M., Taberlet, P., Brochmann, C. 2004. Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. *Mol. Ecol.* 13: 81-86
- Kubeczka, K. H., Schultze, W. 1987. Biology and Chemistry of Conifer Oils. *Flavour Fragr. J.* 2: 137-148
- Lis-Balchin, M., Ochocka, J. R., Deans, S. G., Asztemborska, M., Hart, S. 1999. Differences in bioactivity between the enantiomers of α -pinene. *J. Essent. Oil Res.* 11: 393-397
- Liu, W., Gan, J. J. 2004. Determination of Enantiomers of Synthetic Pyrethroids in Water by Solid Phase Microextraction – Enantioselective Gas Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 52: 736-741
- Lockwood, G. B. 2001. Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. *J. Chromatogr. A* 936: 23-31
- Long, Ch., Kakiuchi, N., Takahashi, A., Komatsu, K., Cai, S., Mikage, M. 2004. Phylogenetic Analysis of the DNA Sequence of the Non-Coding Region of Nuclear Ribosomal DNA and Chloroplast of *Ephedra* Plants in China. *Planta Med.* 70: 1080-1084
- Looman, A., Baerheim Svendsen, A. 1992. The Needle Essential Oil of Norwegian Mountain Juniper, *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. *Flavour Fragr. J.* 7: 23-26
- Łuczak, M. 2004. Markery molekularne. Przegląd najbardziej popularnych technik. Internet URL: <http://www.racjonalista.pl/kk.php/s,3411>
- MacPherson, J. M., Eckstein, P. E., Scoles, G. J., Gajadhar, A.A. 1993. Variability of the random amplified polymorphic DNA assays among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Mol. Cell Probes* 7: 293-299
- Madanecki, P. 2005. ChromNET - sieciowy system archiwizacji i analizy danych chromatograficznych (opracowanie w przygotowaniu).
- Maffei, M. 1990. F1 and F2 hybrids from *Mentha x verticillata* clone 7303 x *Mentha spicata* L. A chemogenetic study. *Flav. Fragr. J.* 5: 211-217
- Manhart, J. R. 1994. Phylogenetic analysis of green plant *rbcl* sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 3: 114-127
- Marczewski, W. 1995. Markery molekularne w genetyce i hodowli roślin. *Postępy Biochemii* 41: 237-243
- Martindale, W. 1999. Martindale: The Complete Drug Reference. 32nd edition. Pharmaceutical Press, London.
- Masoń, P. 2001. Ustalanie tożsamości genetycznej, 485-519. W: Malepszy, S. (red.). 2001. Biotechnologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Matuszkiewicz, W. 2001. Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- de Meijer, E. P. M., Bogatta, M., Carboni, A., Crucitti, P., Moliterni, V. M. C., Ranalli, P., Mandolino, G. 2003. The Inheritance of Chemical Phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics* 163: 335-346
- Meusel, H., Jäger, E., Weinert, E. 1965. Vergleichende Chorologie Der Zentraleuropäischen Flora. Veb Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Mosaddegh, M. H., Richardson, T., Stoddart, R. W., McClure, J. 2001. Application of solid-phase micro-extraction technology to drug screening and identification. *Ann. Clin. Biochem.* 38: 541-547
- Nebauer, S. G., del Castillo-Agudo, L., Segura, J. 1999. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved foxglove. *Theor. Appl. Genet.* 98: 985-994
- Nelson, R. R. S. 1997. In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemoth.* 40: 305-306

- Neuhaus, H., Link, G. 1987. The chloroplast tRNA (UUU) gene from mustard (*Sinapsis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. *Curr. Genet.* 11: 251-257
- Nei, M., Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
- Nickrent, D. L., Soltis, D. E. 1995. A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear 18S rDNA and *rbcL* sequences. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 82: 208-234
- Noori, H. 1998. The Taguchi methods: Achieving design and output quality. *The Academy of Management Executive* 3: 322-326
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13: 1143-1155
- Ochocka, J. R., Asztemborska, M., Zook, D., R., Sybilska, D., Perez, G., Ossicini, L. 1997. Enantiomers of monoterpene hydrocarbons in essential oils from *Juniperus communis*. *Phytochemistry* 44: 869-873
- Ochocka, J. R., Asztemborska, M., Sybilska, D., Langa, W. 2002. Determination of Enantiomers of Terpenic Hydrocarbons in Essential Oils Obtained from Species of *Pinus* and *Abies*. *Pharm. Biol.* 40: 395-399
- Olmstead, R. G., Sweere, J. A. 1994. Combining data in phylogenetic systematics: an empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Syst. Biology* 43: 467-481
- Orav, A., Kailas, T., Koel, M. 1998. Simultaneous Distillation, Extraction and Supercritical Fluid Extraction for Isolating Volatiles and Other Materials from Conifer Needles. *J. Essent. Oil Res.* 10: 387-393
- Ożarowski, A. 1993. *Leksykon leków naturalnych*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Ożarowski, A., Rumińska, A. 1990. *Leksykon roślin leczniczych*. PWRiL, Warszawa.
- Palmer, J. D. 1992. Mitochondrial DNA in plant systematics: applications and limitations. s. 36-49. W: W: Soltis, D. E., Soltis, P. S., Doyle, J. J. (ed.) 1992. *Molecular Systematics of Plants*, Chapman&Hall, New York.
- Pan, Y. B., Burner, K. C., Ehrlich, K. C., Grisham, M. P., Wei, Q. 1997. Analysis of Primer-Derived, Nonspecific Amplification Products in RAPD-PCR. *Biotechniques* 22: 1071-1077
- Park, Y. H., Kohel, R. J. 1994. Effect of Concentration of MgCl₂ od Random-Amplified DNA Polymorphism. *Biotechniques* 16: 652-657
- Paurmortazavi, S. M., Baghaee, P., Mirhosseini, M. A. 2004. Extraction of volatile compounds from *Juniperus communis* L. leaves with supercritical fluid carbon dioxide: comparison with hydrodistillation. *Flavour Fragr. J.* 19: 417-420
- Pawliszyn, J., Arthur, C. L. 1990. Solid Phase Microextraction with Ternal Desorbition Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* 62: 2145-2148
- Pawliszyn, J., Pawliszyn, B., Pawliszyn, M. 1997. Solid Phase Microextraction (SPME). *The Chemical Educator* 2: 1-7 (www.springer-ny.com)
- PDR for herbal medicines. 2000. Medical Economics Company, Montvale, New Yersey.
- Pellati, F., Benvenuti, S., Yoshizaki, F., Bertelli, D., Rossi, M. C. 2005. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of the volatile compounds of *Evodia* species fruits. *J. Chromatogr. A* 1087: 265-273
- Penner, G. A., Bush, A., Wise, R., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. J., Fedak, G. 1993. Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis among Laboratories. W: *PCR Methods and Applications*, s. 341-345. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Persson, M., Sjödin, K., Borg-Karlson, A.-K., Norin, T., Ekberg, I. 1996. Relative amounts and enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in xylem and needles of *Picea abies*. *Phytochemistry* 42: 1289-1297
- Phillips, M. A., Savage, T. J., Croteau, R. 1999. Monoterpene Synthases of Loblolly Pine (*Pinus taeda*) Produce Pinene Isomers and Enantiomers. *Arch. Biochem. Biophys.* 372: 197-204
- Podlewski, J. K., Chwalibogowska-Podlowska, A. 2002. *Leki współczesnej terapii*. Split Trading, Warszawa.

- Poiana, M., Sicari, V., Mincione, B. 1998. A comparison between the chemical compositions of the oil, solvent extract and supercritical carbon dioxide extract of *Citrus medica* cv. Diamante. J. of Ess. Oil Res. 10: 145-152
- Proenca da Cunha, A., Roque, O. L. R. 1989. The Chemical Composition of the Essential Oil and Alcoholic extract of *Juniperus communis* L. ssp. *nana* Syme. J. Ess. Oil Res. 1: 15-17
- Rabouam, C., Comes, A. M., Bretagnolle, V., Humbert, J. F., Periquet, G., Bigot, Y. 1999. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. Mol. Ecol. 8: 493-503
- Raikos, N., Christopoulou, K., Theodoridis, G., Tsoukali, H., Psaroulis, D. 2003. Determination of amphetamines in human urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. J. Chromat. B 789: 59-63
- Rebuffo, C. A., Schmitt, J., Wenning, M., von Stetten, F., Scherer, S. 2006. Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. Appl. Environ. Microbiol. 72: 994-1000
- Reverchon, E., Della Porta, G., Senatore, F. 1995. Supercritical CO₂ extraction and fractionation of lavender essential oil and waxes. J. Agric. Food Chem. 43: 1654-1658
- Rohloff, J. 1999. Monoterpene Composition of Essential Oil from Peppermint (*Mentha x piperita* L.) with Regard to Leaf Position Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis. J. Agric. Food Chem. 47: 3782-3786
- Rutkowski, L. 1998. Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski Niżowej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Sanchez de Medina, F., Gamez, M. J., Jimenez, J., Osuna, J. I., Zarzuelo, A. 1993. Hypoglycemic Activity of Juniper „Berries”. Planta Med. 60: 197-200
- Sanderson, S. J., Doyle, J. J. 1992. Reconstruction of organismal gene phylogenies from data on multigene families: concerted evolution, homoplasy, and confidence. Syst. Biol. 41: 4-17
- Savage, T. J., Ichii, H., Hume, S. D., Little, D. B., Croteau, R. 1995. Monoterpene Synthases from Gymnosperms and Angiosperms: Stereospecificity and Inactivation by Cysteiny- and Arginy- Directed Modyfing Reagents. Arch. Biochem. Biophys. 320: 257-265
- Seneta, W. 1973. Dendrologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Seneta, W. 1981. Drzewa i krzewy iglaste. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Scharma, A. D., Gill, P. K., Singh, P. 2002. DNA Isolation From Dry and Fresh Samples of Polysaccharide-Rich Plants. Plant Mol. Biol. Rep. 20: 415a-415f
- Schäfer, B., Hennig, P., Engewald, W. 1995. Analysis of Monoterpenes from Conifer Needles using Solid Phase Microextraction, J. High Resol. Chromatogr. 18: 587-593
- Shelton, D., Aitken, K., Doimo, L., Leach, D., Baverstock, P., Henry, R. 2002. Genetic control of monoterpene composition in the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (Cheel). Theor. Appl. Genet. 105: 377-383
- Shirey, R. E., Mindrup, R. F. 1999. SPME-Adsorption versus Absorption: Which Fiber is Best for Your Application?. Supleco/Sigma Aldrich.
- Silva da, J. A., Pedro, L. G., Santos, P. A. G., Figueiredo, A. C., Barosso, J. G., Tenreiro, R. P., Ribeiro, C. A., Deans, S. G., Looman, A., Scheffer, J. J. C. 2000. Essential oils from seven populations of *Juniperus brevifolia* (Seub.) Antoine, an endemic species of the Azores. Flavour Fragr. J. 15: 31-39
- Silvestrini, E., Michelozzi, M., Skroppa, T., Brancaleoni, E., Ciccioli, P. 2004. Characterisation of different clones of *Picea abies* (L.) Karst using head-space sampling of cortical tissues combined with enantioselective capillary gas chromatography for the separation of chiral and non-chiral monoterpenes. J. Chromatogr. A 1034: 183-189
- Sjöldin, K., Persson, M., Borg-Karlson, A. K., Norin, T. 1996. Enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in different tissues of four individuals of *Pinus sylvestris*. Phytochemistry 41: 439-445
- Skroch, P., Nienhuis, J. 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. Theor. Appl. Genet. 91: 1086-1091

- Soltis, D. E., Soltis, P. S. 1998. Choosing an Approach and an Appropriate Gene for Phylogenetic Analysis, s. 1-43. W: Soltis, D. E., Soltis, P. S., Doyle, J. J. (ed.) 1998. Molecular systematics of plants II. DNA Sequencing. Kluwer Academic Publishers, New York.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Milligan, B. 1992. Intraspecific chloroplast DNA variation, s. 177-201. W: Soltis, D. E., Soltis, P. S., Doyle, J. J. (ed.) 1992. Molecular Systematics of Plants, Chapman&Hall, New York.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Chase, M. W., Mort, M. E., Albach, D. C., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W. H., Hoot, S. B., Fay, M. F., Axtell, M., Swensen, S. M., Prince, L. M., Kress, W. J., Nixon, K. C., Farris, J. S. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL* and *atpB* sequences. Bot. J. Linn. Soc. 133: 381-461
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., Martinez, J. R. 2004. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. J. Chromatogr. A 1025: 93-103
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., Martinez, J. R. 2004. Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiya aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. J. Chromatogr. A 1025: 105-113
- StatSoft Inc. 1995. *Statistica* dla Windows – podręcznik elektroniczny programu *Statistica* (www.statsoft.com.pl).
- StatSoft. 2006. Elektroniczny Podręcznik Statystyki PL. Kraków. URL: <http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>
- Strzelecka, H., Kowalski, J. (red.) 2000. Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Supelco Bulletin 923. 1998. Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions. Sigma-Aldrich Co. (www.supelco.com)
- Sybiliska, D., Asztemborska, M., Kowalczyk, J., Ochocka, J. R., Ossicini, L., Perez, G. 1994. Enantiomeric composition of terpenic hydrocarbons in essential oils from *Juniperus communis* L. J. Chromatogr. A 659: 389-394
- Sybiliska, D., Asztemborska, M. 2002. Chiral recognition of terpenoids in some pharmaceuticals derived from natural sources. J. Biochem. Biophys. Methods 54: 187-195
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 17: 1105-1109
- Taguchi, G. 1987. System of experimental design. UNIPUB/Kraus International, White Plains, New York.
- Tan, A. H., Pan, H. 2005. Predictive neural networks for gene expression data analysis. Neural Netw. 18: 297-306
- Tang, S., Bin, X., Wang, L., Zhong, Y. 2006. Genetic Diversity and Population Structure of Yellow Camellia (*Camellia nitidissima*) in China as Revealed by RAPD and AFLP Markers. Biochem. Genet. 44: 449-461
- Theodoridis, G., Koster, E. H. M., de Jong, G. J. 2000. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. J. Chromatogr. B 745: 49-82
- Terry, R. G., Nowak, R. S., Tausch, R. J. 2000. Genetic variation in chloroplast and nuclear ribosomal DNA in Utah Juniper (*Juniperus osteosperma*, Cupressaceae): evidence for interspecific gene flow. Am. J. Bot. 87: 250-258
- Thompson, J. D., Chalchat, J.-C., Michet, A., Linhart, Y. B., Ehlers, B. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. J. Chem. Ecol. 29: 859-880
- Tornambe, G., Cornu A., Pradel, P., Kondjoyan, N., Carnat, A. P., Petit, M., Martin, B. 2006. Changes in terpene content in milk from pasture-fed cows. J. Dairy Sci. 89: 2309-2319
- Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A. 1964. Flora Europaea. The University Press, Cambridge.

- Ulrich, S., Martens, J. 1997. Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma. *J. Chromat. B* 696: 217-234
- Van Der Merwe, M., Winfield, M. O., Arnold, G. M., Parker, J. S. 2000. Spatial and temporal aspects of the genetic structure of *Juniperus communis* populations. *Mol. Ecol.* 9: 379-386
- Van Ee, B. W., Jelinski, N., Berry, P., Hipp, A. L. 2006. Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. *Mol. Ecol.* 15: 2735-2751.
- Vereen, D. A., McCall, J. P., Butcher, D. J. 2000. Solid phase microextraction for the determination of volatile organics in the foliage of Fraser fir (*Abies fraseri*). *Microchem. J.* 65: 269-276
- Vernin, G., Boniface, C., Metzger, J., Ghiglione, C., Hammoud, A., Suon, K., N., Fraise, D., Parkanyi, C. 1988. GC-MS-Specma bank analysis of *Juniperus communis* needles and berries. *Phytochemistry* 27: 1061-1064
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23: 4407-4414
- Wajs, A., Pranovich, A., Reunanen, M., Willför, S., Holmbom, B. 2006. Characterisation of Volatile Organic Compounds in Stemwood using Solid-phase Microextraction. *Phytochem. Anal.* 17: 91-101
- Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 19: 861-866
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535
- Wolf, P. G., Pryer, K. M., Smith, A. R., Hasebe, M. 1998. Phylogenetic studies of Extant Pteridophytes. W: Soltis, D. E., Soltis, P. S., Doyle, J. J. 1998. Molecular systematics of plants II. DNA Sequencing. Kluwer Academic Publishers, New York.
- Wolfe, A. D., Xiang, Q. Y., Kephart, S. R. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol. Ecol.* 7: 1107-1125
- Wolfe, A. D., Liston, A. 1998. Contributions of PCR-Based Methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology, s. 43-87. W: Soltis, D. E., Soltis, P. S., Doyle, J. J. (ed.) 1998. Molecular systematics of plants II. DNA Sequencing. Kluwer Academic Publishers, New York.
- Wu, K., Jones, R., Danneberg, L., Scolnik, P. A. 1994. Detection of microsatellite polymorphism without cloning. *Nucl. Acids Res.* 22: 3257-3258
- Yang, M., Zhang, D., Liu, J., Zheng, J. 2001. A Molecular Marker that is Specific to Medicinal Rhubarb Based on Chloroplast *trnL/trnF* Sequences. *Planta Med.* 67:784-786
- Yassaa, N., Brancaleoni, E., Frattoni, M., Ciccioli, P. 2001. Trace level determination of enantiomeric monoterpenes in terrestrial plant emission and in the atmosphere using β -cyclodextrin capillary column coupled with thermal desorption and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 915: 185-197
- Yoon, Y., Song, J., Hong, S. H., Kim, J. Q. 2003. Analysis of multiple single nucleotide polymorphism of candidate genes related to coronary heart disease susceptibility by using support vector machines. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41: 529-534
- Zanoni, T. A., Adams, R. P. 1976. The genus *Juniperus* (Cupressaceae) in Mexico and Guatemala: numerical and chemosystematic analysis. *Biochem. Syst. Ecol.* 4: 147-158
- Zhang, Z., Pawliszyn, J. 1993. Headspace Solid Phase Microextraction. *Anal. Chem.* 65: 1843-1852
- Ziętkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183

VIII. SUPLEMENT A – WYNIKI ANALIZ CHROMATOGRAFICZNYCH

TABELA 37: Wyniki chromatograficzne analiz na **złożu achiralnym** (HP101) otrzymane w badaniu powtarzalności procedury headspace SPME-GC dla **igiel J. communis** (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET)

związek	względne zawartości procentowe [%]											\bar{x}	SD	Wz [%]
	Kolejne oznaczenia (dni)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
α -tujen	0,16	0,21	0,21	0,16	0,21	0,20	0,20	0,19	0,16	0,14	0,00	0,18	0,03	14,31
α -pinen	75,57	74,66	74,82	75,99	74,78	73,34	74,73	72,89	75,22	72,62	74,45	74,46	1,08	1,45
kamfen	2,60	2,72	2,68	3,14	2,79	2,68	2,73	2,48	4,12	6,74	2,57	2,66	0,10	3,77
sabinen	0,28	0,29	0,30	0,26	0,30	0,35	0,28	0,27	0,00	0,00	0,00	0,29	0,03	9,44
β -pinen	3,07	3,05	3,03	3,03	3,05	2,80	2,98	2,99	3,39	3,19	3,38	3,09	0,17	5,62
mircen	2,51	2,65	2,72	2,43	2,66	2,70	2,69	2,97	2,48	2,47	2,83	2,65	0,16	6,24
α -felandren	3,27	3,51	3,59	2,94	3,55	3,18	3,38	3,95	3,14	3,14	3,65	3,40	0,30	8,6
karen	1,37	1,42	1,16	1,51	1,24	3,50	1,52	1,25	1,07	1,31	1,07	1,30	0,16	12,71
p-cymen+ α -terpinen	0,11	0,20	0,19	0,24	0,15	0,29	0,34	0,28	0,24	0,20	0,25	0,23	0,06	28,91
limonen	9,79	10,04	10,22	9,11	10,08	9,53	9,94	11,45	9,09	8,74	10,4	9,85	0,74	7,57
γ -terpinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
terpinolen	0,61	0,61	0,58	0,53	0,61	0,78	0,57	0,64	0,50	0,53	0,62	0,58	0,05	8,00
terpinen-4-ol	0,15	0,16	0,07	0,14	0,12	0,14	0,11	0,08	0,00	0,00	0,00	0,12	0,03	26,97

* - na szaro zaznaczono komórki z wartościami będącymi wynikami wątpliwymi odrzuconymi po przeprowadzeniu testu Q-Dixona

TABELA 38: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu achiralnym (HP101) otrzymane w badaniu powtarzalności procedury headspace SPME-GC dla szyszkogagód *J. communis* (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET)

związek	względne zawartości procentowe [%]											\bar{x}	SD	Wz [%]	
	KOLEJNE OZNACZENIA (DNI)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				
α -tujen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -pinen	58,20	56,63	57,07	55,10	60,16	54,46	57,66	58,86	57,59	59,79	56,34	57,44	1,79	3,11	
kamfen	0,35	0,35	0,29	0,33	0,32	0,31	0,31	0,34	0,30	0,34	0,32	0,32	0,02	6,22	
β -pinen	2,13	2,20	2,26	2,41	2,49	2,50	2,50	2,48	2,45	2,48	2,62	2,41	0,15	6,20	
mircen	17,63	16,62	19,71	19,21	17,00	19,61	18,12	17,53	18,76	16,21	18,78	18,11	1,21	6,65	
α -felandren	0,03	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03	0,04	0,03	0,01	23,74	
karen	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	18,54	
p-cymen+ α -terpinen	0,07	0,06	0,05	0,07	0,05	0,06	0,05	0,06	0,04	0,06	0,05	0,06	0,01	16,40	
limonen	20,39	20,28	19,75	21,81	19,12	21,96	20,34	19,67	19,98	20,09	20,82	20,38	0,86	4,24	
γ -terpinen	0,04	0,03	0,05	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04	0,01	17,35	
terpinolen	1,04	0,69	0,68	0,76	0,60	0,82	0,81	0,78	0,68	0,74	0,80	0,74	0,07	9,72	

- na szaro zaznaczono komórki z wartościami będącymi wynikami wątpliwymi odrzuconymi po przeprowadzeniu testu Q-Dixona

TABELA 39: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu chiralnym (HPChiral) otrzymane w badaniu powtarzalności procedury headspace SPME-GC dla igieł *J. communis* (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET)

związek	względne zawartości procentowe [%]											\bar{x}	SD	Wz [%]
	Kolejne oznaczenia (dni)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
(-)α-pinen	13,24	13,65	13,58	14,12	12,73	13,94	13,02	14,14	12,94	14,46	12,76	13,51	0,61	4,50
(+)α-pinen	20,15	20,43	19,72	20,32	18,85	20,15	19,41	20,50	19,68	21,02	20,28	20,05	0,59	2,96
mircen	5,29	5,59	5,39	5,36	5,59	5,31	5,46	5,69	5,43	5,13	5,45	5,43	0,16	2,92
(+)sabinen	46,01	50,97	49,13	47,55	49,83	47,63	47,51	49,78	49,36	47,48	45,61	48,26	1,68	3,48
(+)3-karen	2,02	1,80	1,92	2,42	2,14	2,74	2,13	2,21	1,94	2,27	2,87	2,22	0,34	15,15
α-felandren+α-terpinen	1,62	0,86	0,79	0,83	0,91	0,88	0,92	0,00	0,92	0,84	0,93	0,88	0,05	5,57
(+)β-pinen	-	-	-	-	-	-	-	-	0,56	0,52	-	-	-	-
(-)β-pinen	1,23	1,04	1,02	1,13	1,05	1,03	1,11	0,00	1,05	1,14	1,06	1,09	0,07	6,06
(-)limonen	0,00	0,90	0,00	0,74	0,69	0,62	0,75	0,00	0,74	0,00	0,72	0,71	0,05	6,90
(+)limonen	2,75	0,00	2,47	2,47	2,67	2,31	2,61	2,69	2,57	2,38	2,54	2,55	0,14	5,51
γ-terpinen	1,87	0,00	0,72	0,00	1,93	0,00	0,79	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-

* - na szaro zaznaczono komórki z wartościami będącymi wynikami wątpliwymi odrzuconymi po przeprowadzeniu testu Q-Dixona

TABELA 40: Wyniki chromatograficzne analiz na **złożu chiralnym** (HPChiral) otrzymane w badaniu powtarzalności procedury headspace SPME-GC dla **szyszkogód J. communis** (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET)

związek	względne zawartości procentowe [%]											\bar{x}	SD	Wz [%]
	Kolejne oznaczenia (dni)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
(-)α-pinen	36,12	42,64	40,97	39,43	40,03	46,97	42,38	37,71	37,82	43,22	38,26	40,50	3,13	7,73
(+)α-pinen	1,39	1,11	1,34	1,56	1,22	1,28	1,26	1,31	1,60	1,11	1,27	1,31	0,16	11,96
mircen	43,75	41,93	41,22	40,52	45,95	37,48	40,86	41,63	41,92	41,88	41,88	41,73	2,06	4,94
(+)sabinen	7,47	6,55	7,86	8,66	7,29	6,03	5,21	7,35	8,63	5,99	6,90	7,09	1,09	15,38
(+)3-karen	2,55	2,76	2,88	2,45	2,71	3,35	2,96	2,52	2,45	2,77	2,71	-	-	-
α-felandren+α-terpinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+)β-pinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(-)β-pinen	2,55	2,76	2,88	2,45	2,71	3,35	2,96	2,52	2,45	2,77	2,71	2,74	0,26	9,64
p-cymen	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	-	-	-
(-)limonen	1,04	0,87	0,96	0,79	0,93	0,89	1,06	0,88	0,88	0,75	0,94	0,91	0,09	10,27
(+)limonen	5,91	3,09	3,02	5,49	1,27	2,67	5,24	7,13	5,85	3,29	6,60	4,51	1,9	42,16
γ-terpinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
terpinolen	0,68	0,47	0,86	0,53	0,52	0,52	0,49	0,52	0,54	0,44	0,62	0,53	0,07	13,15

* - na szaro zaznaczono komórki z wartościami będącymi wynikami wątpliwymi odrzuconymi po przeprowadzeniu testu Q-Dixona

TABELA 41: Wartości zmiennych zależnych obliczonych dla poszczególnych układów doświadczalnych w zależności od strategii optymalizacji

Układ	ZMIENNE NIEZALEŻNE				ZMIENNE ZALEŻNE		
	A	B	C	D	STRATEGIA 1 ¹	STRATEGIA 2 ²	
	czas preinkubacji	temperatura absorpcji	czas absorpcji	czas desorpcji	suma odchyłeń standardowych	współczynnik korelacji	(ilość pików monoterpenów)
POWTÓRZENIE 1							
1	1 (5min)	1 (30°C)	1 (30s)	1 (30s)	35,80	0,974	8
2	1 (5min)	2 (40°C)	2 (1min)	2 (1min)	24,52	0,973	8
3	1 (5min)	3 (50°C)	3 (2min)	3 (2min)	29,50	0,979	9
4	1 (5min)	4 (60°C)	4 (5min)	4 (5min)	29,68	0,979	9
5	2 (10min)	1 (30°C)	2 (1min)	3 (2min)	37,04	0,967	10
6	2 (10min)	2 (40°C)	1 (30s)	4 (5min)	35,04	0,973	7
7	2 (10min)	3 (50°C)	4 (5min)	1 (30s)	29,76	0,982	9
8	2 (10min)	4 (60°C)	3 (2min)	2 (1min)	31,18	0,976	11
9	3 (20min)	1 (30°C)	3 (2min)	4 (5min)	36,98	0,973	8
10	3 (20min)	2 (40°C)	4 (5min)	3 (2min)	31,05	0,978	10
11	3 (20min)	3 (50°C)	1 (30s)	2 (1min)	32,80	0,975	9
12	3 (20min)	4 (60°C)	2 (1min)	1 (30s)	30,14	0,979	11
13	4 (30min)	1 (30°C)	4 (5min)	2 (1min)	34,90	0,975	7
14	4 (30min)	2 (40°C)	3 (2min)	1 (30s)	37,07	0,973	8
15	4 (30min)	3 (50°C)	2 (1min)	4 (5min)	34,05	0,974	10
16	4 (30min)	4 (60°C)	1 (30s)	3 (2min)	28,16	0,980	10
POWTÓRZENIE 2							
17	1 (5min)	1 (30°C)	1 (30s)	1 (30s)	36,23	0,973	8
18	1 (5min)	2 (40°C)	2 (1min)	2 (1min)	34,18	0,975	9
19	1 (5min)	3 (50°C)	3 (2min)	3 (2min)	31,88	0,976	9
20	1 (5min)	4 (60°C)	4 (5min)	4 (5min)	27,39	0,981	10
21	2 (10min)	1 (30°C)	2 (1min)	3 (2min)	35,66	0,973	9
22	2 (10min)	2 (40°C)	1 (30s)	4 (5min)	35,09	0,975	8
23	2 (10min)	3 (50°C)	4 (5min)	1 (30s)	27,61	0,982	12
24	2 (10min)	4 (60°C)	3 (2min)	2 (1min)	31,54	0,977	9
25	3 (20min)	1 (30°C)	3 (2min)	4 (5min)	35,93	0,976	7
26	3 (20min)	2 (40°C)	4 (5min)	3 (2min)	30,11	0,978	12
27	3 (20min)	3 (50°C)	1 (30s)	2 (1min)	33,07	0,975	8
28	3 (20min)	4 (60°C)	2 (1min)	1 (30s)	29,85	0,977	9
29	4 (30min)	1 (30°C)	4 (5min)	2 (1min)	36,22	0,969	9
30	4 (30min)	2 (40°C)	3 (2min)	1 (30s)	35,78	0,973	9
31	4 (30min)	3 (50°C)	2 (1min)	4 (5min)	32,96	0,977	9
32	4 (30min)	4 (60°C)	1 (30s)	3 (2min)	29,05	0,979	9

¹ strategia zakładająca podobieństwo profilu SPME do olejku eterycznego

² strategia zakładająca dużą ilość pików związków monoterpenowych

TABELA 42: Wyniki analiz porównawczych headspace SPME – destylacja olejku z parą wodną otrzymane w wyniku analiz chromatograficznych na złożu achiralnym dla igieł (HP101) (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET)

próba	α-tujen		α-pinen		kamfen		sabinen		β-pinen		mircen		α-felandren		karen		p-cymen+α-terpinen		limonen		γ-terpinen		terpinolen		terpinen-4-ol		reszta*	
	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME	olejek	SPME
LU1	0,00	0,09	74,35	78,78	0,68	0,52	0,00	0,35	2,82	2,35	3,96	3,17	2,82	2,50	3,52	3,49	0,58	0,22	9,16	7,29	1,20	0,03	0,00	0,88	0,00	0,00	0,92	0,31
LU2	0,00	0,07	71,33	77,39	2,79	0,35	0,00	0,37	0,00	2,45	4,21	3,73	3,99	3,21	1,42	0,28	0,00	0,14	14,83	11,02	0,00	0,05	1,43	0,79	0,00	0,02	0,00	0,12
LU3	1,09	0,46	49,57	63,90	0,49	0,43	15,18	14,77	1,64	1,72	4,64	3,48	3,05	2,21	3,51	2,40	0,43	0,31	11,77	8,63	0,93	0,02	2,36	1,42	2,28	0,05	3,05	0,19
LU5	0,00	0,10	80,31	84,56	0,00	0,40	0,00	0,41	2,01	1,71	4,26	3,44	2,89	2,24	3,13	1,93	0,00	0,08	5,74	3,76	0,00	0,02	1,66	1,05	0,00	0,00	0,00	0,29
OT1	1,12	0,26	66,31	79,22	0,49	0,39	10,69	6,76	3,00	3,03	4,20	3,94	1,28	1,21	0,00	0,04	0,76	0,07	3,56	2,98	1,37	0,14	1,24	0,87	2,98	0,00	2,99	1,07
OT2	0,69	0,13	58,99	70,24	0,70	0,44	8,35	3,03	3,20	3,58	4,37	4,36	2,60	3,24	0,85	0,47	0,72	0,16	10,97	12,24	1,04	0,11	1,64	1,48	3,14	0,00	2,75	0,50
OT3	2,59	0,00	40,17	53,42	0,00	0,38	31,08	31,60	2,15	0,00	4,91	4,08	0,62	0,53	2,44	2,24	1,26	0,09	4,11	3,03	2,42	0,47	2,36	1,79	4,26	0,14	1,63	2,22
OT4	1,14	0,39	40,49	50,31	0,00	0,60	14,61	7,93	2,36	2,99	5,01	4,23	4,18	5,02	2,48	1,92	0,00	0,32	19,14	21,30	1,64	0,19	2,49	2,25	4,77	0,84	1,70	1,72
OT5	2,69	2,14	26,26	36,83	0,00	0,53	40,77	39,11	2,13	2,23	6,15	4,5	1,44	1,31	2,44	1,98	0,00	0,27	9,86	7,79	2,32	0,60	2,77	1,94	3,17	0,13	0,00	0,66
OT6	0,17	0,18	62,92	72,00	0,44	0,37	0,52	0,45	2,37	2,67	7,61	6,43	4,07	3,48	0,24	0,09	0,76	0,18	18,36	13,18	0,10	0,00	1,03	0,91	0,32	0,06	1,08	0,00
OT7	0,22	0,20	82,44	87,11	0,58	0,42	0,57	0,44	2,94	2,73	3,95	3,19	2,39	1,78	0,17	0,08	0,19	0,07	4,18	2,89	0,42	0,20	1,08	0,64	0,20	0,06	0,68	0,18
OT8	0,00	0,20	73,45	73,48	0,51	0,46	0,42	0,41	3,01	3,06	4,36	4,01	3,54	3,12	0,00	0,23	0,00	0,23	13,12	13,02	0,00	0,00	1,24	1,25	0,00	0,15	0,36	0,37
OT9	0,00	0,15	49,27	62,97	0,00	0,95	0,00	0,51	2,18	2,25	3,25	2,77	0,00	1,14	12,09	9,39	0,00	0,40	30,37	16,97	0,00	0,52	2,84	1,22	0,00	0,05	0,00	0,71
OT10	0,00	0,15	64,99	69,72	0,00	0,78	1,02	0,38	3,37	3,19	4,15	4,41	2,67	2,79	8,75	5,34	0,83	0,16	12,62	10,98	0,00	0,10	1,60	1,69	0,00	0,31	0,00	0,00
OT11	3,98	2,94	14,96	17,31	0,00	0,32	51,91	59,25	0,00	1,10	6,32	5,65	0,70	0,63	1,71	1,10	2,13	0,19	6,01	5,90	3,31	1,00	3,79	3,97	5,19	0,10	0,00	0,53
OT12	0,00	0,23	61,12	78,64	0,00	0,41	8,64	1,76	2,14	2,34	4,76	3,69	4,00	2,63	1,22	0,53	0,00	0,60	11,23	7,84	0,68	0,25	2,35	0,81	3,19	0,07	0,66	0,20
ST10	0,21	0,19	74,33	79,69	0,48	0,37	0,00	0,47	2,43	1,74	3,76	3,83	2,37	2,43	1,97	1,10	0,65	0,22	9,35	8,88	0,28	0,10	0,96	0,70	0,31	0,03	2,91	0,20

TABELA 43: Wyniki analiz porównawczych headspace SPME – destylacja olejku z parą wodną otrzymane w wyniku analiz chromatograficznych na złożu achiralnym (HP101) dla komercyjnych szyszkogąd jałowca (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET)

Związek	Zioła lecznicze Boguccy			Flos			Herbalux			Herbapol			Kawon		
	olejek nastrzyk ¹	olejek hs SPME ²	surowiec hs SPME ³	olejek nastrzyk	olejek hs SPME	surowiec hs SPME	olejek nastrzyk	olejek hs SPME	surowiec hs SPME	olejek nastrzyk	olejek hs SPME	surowiec hs SPME	olejek nastrzyk	olejek hs SPME	surowiec hs SPME
α-tujen	3,87	0,00	1,00	1,42	0,00	0,00	1,05	0,00	0,00	1,14	0,00	0,00	1,21	0,00	0,29
α-pinen	46,87	60,11	41,89	56,01	67,38	58,36	61,09	71,95	57,99	51,70	62,76	51,31	60,64	71,83	69,05
kamfen	0,40	3,26	3,53	0,00	2,99	0,28	0,38	3,11	1,95	0,39	3,36	0,45	0,53	3,39	8,28
sabinen	16,23	11,52	24,74	12,80	7,80	12,20	8,04	5,12	9,93	7,87	5,13	10,87	6,30	4,19	3,00
β-pinen	2,79	3,24	3,02	2,61	2,45	2,20	2,54	2,56	2,95	3,23	3,36	2,62	2,38	2,44	2,20
mircen	12,67	7,93	13,55	19,72	10,95	16,02	19,88	11,41	20,37	25,82	16,26	25,36	15,88	9,74	9,55
α-felandren	0,18	0,28	0,14	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00	0,12	0,62	0,18	0,02	0,00	0,00	0,82
karen	1,19	0,00	0,07	0,00	1,23	0,78	0,13	0,00	0,23	0,42	0,00	0,15	0,43	0,34	0,51
p-cymen+α-terpinen	1,40	2,76	1,65	0,00	0,00	0,00	0,48	0,94	0,64	0,00	1,26	0,43	0,71	1,15	0,31
limonen	4,38	4,69	4,59	4,52	3,63	3,39	2,92	2,61	2,87	3,70	3,49	4,75	3,21	2,74	3,14
γ-terpinen	1,93	2,77	1,56	0,00	1,54	1,12	0,74	1,07	0,94	0,98	1,47	0,98	1,15	1,21	0,18
terpinolen	0,87	1,14	1,04	1,18	1,11	1,18	0,77	0,85	1,03	0,84	0,95	0,98	0,99	0,92	0,45
terpinen-4-ol	3,66	1,07	0,92	1,75	0,48	0,32	1,13	0,37	0,29	2,18	0,72	0,69	4,21	1,50	0,32
reszta	3,56	1,21	2,29	0,00	0,44	3,92	0,84	0,00	0,70	1,10	1,06	1,40	2,37	0,54	1,90

¹ – olejek nastrzyk – olejek otrzymany metodą destylacji z wodą i analizowany w drodze nastrzyku na kolumnę.

² – olejek hs SPME – olejek otrzymany metodą destylacji z wodą, rocieńczony 100x etanolem (końcowa objętość próby po rozcieńczeniu – 2ml), analiza wykonana techniką hs SPME znad olejku w warunkach podanych w rozdziale “Przebieg hs SPME” (s. 79).

³ – surowiec hs SPME – związki monoterpene wyekstrahowane techniką hs SPME znad 100mg szyszkogąd jałowca w warunkach podanych w rozdziale “Przebieg hs SPME” (s. 79).

TABELA 44: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu achiralnym (HP101) otrzymane w toku analiz headspace SPME z igieł badanych prób jalowca (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET)

Próba	α -tujen	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	mircen	α -felandren	karen	p-cymen+ α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	reszta*
RI _{polarna} ¹		940	950	973	974	988	1003	1012	1019	1028	1056	1086	1171	-
RI _{niepolarne} ²		1026	1068	1172	1115	1163	1172	1155	1190	1209	1253	1331	1614	-
BO1	0,00	72,85	0,40	0,41	2,28	3,47	2,14	0,64	0,38	15,31	0,03	0,70	0,06	1,33
BO2	0,00	16,50	0,30	52,07	0,70	5,37	1,07	0,86	0,79	11,33	1,53	4,32	0,40	4,76
BO3	0,00	83,08	0,83	0,81	1,61	2,49	0,69	0,09	0,22	8,79	0,04	0,75	0,07	0,53
CI1	0,00	82,77	0,61	0,43	1,66	4,02	1,78	3,89	0,42	2,99	0,02	0,92	0,17	0,32
CI2	0,00	84,95	0,42	0,48	2,29	3,34	1,22	0,27	0,18	3,01	0,15	0,89	0,14	2,66
CI3	0,00	87,88	0,39	1,06	2,43	3,20	0,90	0,18	0,09	2,33	0,03	0,60	0,09	0,82
CI4	0,00	46,88	0,37	27,57	2,02	5,00	2,38	0,70	0,65	10,80	0,42	2,02	0,42	0,77
CI5	0,00	58,11	0,57	23,36	2,93	4,26	0,31	0,46	0,60	3,26	0,72	1,69	2,84	0,89
CI6	0,00	87,43	0,39	0,47	2,00	3,33	1,66	0,35	0,10	3,46	0,02	0,65	0,04	0,10
G1-1	0,00	63,44	1,18	0,42	2,03	3,11	0,68	21,99	0,00	3,73	0,00	2,78	0,25	0,39
G1-2	0,00	78,93	0,38	0,42	2,42	3,84	2,76	0,24	0,10	9,59	0,02	0,76	0,03	0,51
G1-3	0,00	88,31	0,40	0,41	2,52	3,04	1,62	0,08	0,00	2,73	0,00	0,53	0,04	0,32
G1-4	0,00	66,12	0,69	0,37	2,38	4,13	5,18	2,62	0,42	15,71	0,05	1,55	0,17	0,61
G1-5	0,00	87,65	0,38	0,40	2,29	3,17	1,61	0,12	0,07	3,15	0,00	0,59	0,05	0,52
G2-1	0,00	76,35	0,48	0,40	2,48	3,84	2,45	0,36	0,08	11,73	0,00	1,12	0,26	0,45
G2-2	1,35	51,63	0,39	30,97	1,44	5,09	1,55	0,34	0,28	4,29	0,48	1,59	0,1	0,50
G2-3	1,58	83,61	0,47	0,58	1,76	3,45	0,48	0,36	0,00	6,12	0,00	0,77	0,00	0,82
G2-4	0,00	77,63	0,34	0,46	1,75	11,5	1,27	0,07	0,08	5,17	0,03	0,54	0,03	1,13
G2-5	0,00	86,41	0,40	0,38	2,84	3,20	0,55	0,08	0,04	4,79	0,00	0,42	0,06	0,83

Próba	α-tujen	α-pinen	kamfen	sabinen	β-pinen	mircen	α-felandren	karen	p-cymen+α-terpinen	limonen	γ-terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	reszta*
GG2	0,00	87,84	0,43	0,45	2,08	2,58	0,14	0,91	0,02	3,97	0,05	0,73	0,05	0,75
KO1	0,00	63,53	0,32	19,03	1,71	3,99	1,63	0,09	0,72	6,7	0,27	1,09	0,19	0,73
KO2	0,00	74,44	0,47	0,37	2,38	3,81	2,50	0,10	0,59	12,77	0,03	0,63	0,15	1,76
KO3	0,00	91,05	0,39	0,67	1,45	3,28	0,14	0,08	0,03	1,49	0,05	0,68	0,04	0,65
KO4	0,00	65,17	0,87	0,41	1,80	3,44	2,79	13,71	0,49	8,53	0,05	1,88	0,14	0,72
LU1	0,00	79,00	0,51	0,35	2,34	3,17	2,50	3,50	0,21	7,30	0,02	0,87	0,07	0,16
LU2	0,00	77,55	0,35	0,37	2,44	3,74	3,21	0,28	0,14	11,04	0,02	0,76	0,02	0,08
LU3	0,00	64,14	0,43	14,83	1,73	3,48	2,21	2,41	0,31	8,66	0,15	1,40	0,04	0,21
LU4	0,00	78,48	0,39	0,48	1,76	2,85	2,33	0,30	0,19	10,49	0,03	0,75	0,07	1,88
LU5	0,00	84,52	0,40	0,42	1,71	3,44	2,24	1,93	0,08	3,76	0,02	1,06	0,05	0,37
LU6	1,35	76,03	0,39	0,42	2,57	3,46	2,41	0,31	0,42	10,09	0,08	0,82	0,13	1,52
LU7	0,00	81,96	0,46	0,47	2,10	8,09	0,03	1,15	0,00	4,25	0,00	0,63	0,20	0,66
LU8	0,00	84,32	0,37	0,46	2,33	4,21	1,64	0,23	0,07	5,22	0,00	0,58	0,01	0,56
LU9	0,00	70,03	0,34	0,43	2,22	5,71	2,49	0,61	0,22	16,88	0,02	0,79	0,07	0,19
OC1	0,00	60,07	0,34	5,42	2,42	4,27	5,65	0,23	0,40	19	0,13	1,26	0,16	0,65
OC2	0,00	81,54	0,87	0,31	4,17	3,86	1,11	1,85	0,00	5,00	0,00	0,81	0,28	0,20
OC3	0,00	92,45	0,42	0,6	1,61	2,16	0,12	0,13	0,03	1,16	0,04	0,69	0,04	0,55
OC4	0,00	77,04	0,51	0,48	1,95	2,98	3,03	0,04	0,39	11,65	0,05	0,91	0,19	0,78
OT1	0,00	79,25	0,38	6,76	3,03	3,94	1,20	0,04	0,09	2,97	0,17	0,86	0,12	1,19
OT2	0,00	69,88	0,43	3,05	3,54	4,34	3,23	0,47	0,16	12,18	0,12	1,46	0,22	0,92
OT3	0,00	53,42	0,37	31,56	1,65	4,08	0,53	2,23	0,21	3,03	0,47	1,79	0,14	0,52
OT4	0,00	50,35	0,56	7,98	3,01	4,26	5,05	1,94	0,32	21,42	0,19	2,23	0,77	1,92
OT5	0,00	37,60	0,53	39,90	2,33	4,6	1,33	2,02	0,36	7,96	0,61	1,98	0,11	0,67
OT6	0,00	72,12	0,37	0,46	2,66	6,44	3,48	0,08	0,18	13,20	0,00	0,88	0,04	0,09

Próba	α-tujen	α-pinen	kamfen	sabinen	β-pinen	mircen	α-felandren	karen	p-cymen+α-terpinen	limonen	γ-terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	reszta*
OT7	0,00	87,3	0,42	0,44	2,73	3,20	1,78	0,07	0,07	2,89	0,00	0,64	0,05	0,41
OT8	0,00	73,24	0,44	0,41	3,03	3,99	3,11	0,22	0,23	12,97	0,00	1,21	0,13	1,02
OT9	0,00	63,17	0,94	0,51	2,24	2,78	1,14	9,41	0,40	17,02	0,00	1,22	0,09	1,08
OT10	0,00	70,40	0,00	0,39	3,22	4,46	2,82	5,38	0,16	11,08	1,7	0,29	0,00	0,10
OT11	2,94	17,34	0,31	59,29	1,14	5,65	0,63	1,10	0,34	5,91	1,00	3,97	0,09	0,29
OT12	0,00	78,69	0,4	1,77	2,32	3,69	2,63	0,53	0,60	7,84	0,03	0,80	0,05	0,65
OT13	0,00	72,66	0,34	0,40	2,07	3,74	3,96	0,75	0,26	14,61	0,02	0,82	0,09	0,28
SA1	3,37	12,69	0,66	51,32	1,10	5,01	1,68	7,62	1,93	5,90	1,10	4,41	1,33	1,88
SA2	2,7	9,40	0,44	52,92	0,71	5,61	1,47	8,67	1,21	6,37	1,13	5,14	1,42	2,81
SA3	0,00	76,92	0,45	0,52	2,49	3,14	2,07	1,96	0,27	8,92	0,18	1,09	0,11	1,88
SA4	0,00	76,06	0,49	0,53	1,78	3,23	2,4	5,2	0,26	8,25	0,03	1,18	0,09	0,50
SA5	0,00	62,92	0,62	14,04	2,11	3,42	0,61	6,29	0,17	6,24	0,29	1,36	0,13	1,80
SA6	0,00	51,02	0,41	30,18	1,42	4,38	1,58	2,11	0,67	5,39	0,37	1,44	0,30	0,73
SA7	0,00	45,00	0,43	28,87	2,69	5,05	2,26	0,22	1,03	8,06	0,69	1,76	0,41	3,53
SA8	0,00	49,7	0,48	29,61	1,29	4,32	1,21	1,32	0,91	7,43	0,55	1,39	1,08	0,71
SA9	0,00	79,33	0,38	0,50	2,41	3,41	2,54	0,13	0,24	9,46	0,02	0,65	0,07	0,86
SD1	0,00	90,78	0,50	0,32	3,02	2,46	0,11	0,06	0,03	1,54	0,00	0,44	0,09	0,65
SD2	0,00	78,99	0,41	0,41	2,21	4,02	2,56	1,31	0,21	8,72	0,03	0,80	0,04	0,29
SD3	0,00	81,15	0,52	0,28	3,43	4,42	0,91	2,67	0,00	5,09	0,04	0,73	0,07	0,69
SD4	0,00	65,43	0,35	0,37	2,67	4,46	5,53	0,00	0,24	19,19	0,03	1,25	0,04	0,44
SD5	0,00	80,43	0,42	3,61	3,34	3,17	1,74	0,08	0,10	5,76	0,09	0,85	0,07	0,34
SD6	0,00	75,08	0,36	0,41	2,15	3,79	4,18	1,06	0,09	11,00	0,03	0,96	0,03	0,86
SD7	0,00	83,95	0,41	0,55	1,71	6,96	1,04	1,85	0,04	2,35	0,06	0,57	0,02	0,49
SD8	0,00	62,21	0,32	19,62	1,37	3,65	0,51	0,04	0,16	9,88	0,27	1,51	0,04	0,42

Próba	α -tujen	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	mircen	α -felandren	karen	p-cymen+ α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	reszta*
SD9	0,00	73,26	0,65	0,47	2,26	3,40	2,24	8,42	0,12	7,34	0,04	1,34	0,04	0,42
SD10	1,96	31,03	0,42	48,49	0,97	5,21	0,95	0,88	0,36	5,10	0,85	3,15	0,08	0,55
SD11	0,00	86,99	0,39	0,49	2,37	3,47	1,11	0,13	0,04	4,10	0,04	0,59	0,00	0,28
ST10	0,00	79,99	0,35	0,46	1,73	3,83	2,44	1,10	0,22	8,91	0,00	0,69	0,00	0,28
ST11	0,00	76,10	0,66	0,40	2,40	3,92	2,25	2,00	0,21	8,97	0,06	1,43	0,14	1,46
ST12	0,00	83,92	0,84	0,43	1,72	3,09	1,69	0,24	0,37	5,05	0,06	0,74	0,13	1,72
ST13	0,00	79,54	0,41	0,45	1,70	2,93	2,62	0,06	0,22	10,39	0,00	0,94	0,00	0,74
ZG1	0,00	65,82	0,55	0,43	2,02	3,17	1,03	5,88	0,20	15,83	0,13	1,36	0,10	3,48
ZG2	0,00	79,08	0,42	0,39	2,44	3,32	2,53	1,50	0,21	7,79	0,04	1,00	0,08	1,20

¹ – indeksy na złożu o charakterze niepolarnym wyznaczono na kolumnie HP101 25m x 0,25mm ID (Agilent Technologies, USA)

² – indeksy na złożu o charakterze polarnym wyznaczono na kolumnie HP Innowax 30m x 0,25mm ID (Agilent Technologies, USA)

*Jako "resztę" potraktowano sumę niezidentyfikowanych pików, w przypadku których zawartość procentowa pojedynczego związku nie przekraczała 0,3%. Integracji poddawano piki monoterpenów i ich pochodnych do t_R 15min.

Poszczególnymi kolorami oznaczono:

chemotyp α -pinenowy

chemotyp pośredni

chemotyp sabinenowy

TABELA 45: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu achiralnym (HP101) otrzymane w toku analiz headspace SPME z szyszkogód badanych prób jalowca (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET)

Próba	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	mircen	α -felandren	karen	p-cymen+ α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	reszta*
RI _{polarna} ¹	940	950	973	974	988	1003	1012	1019	1028	1056	1086	1171	-
RI _{niefolarna} ²	1026	1068	1172	1115	1163	1172	1155	1190	1209	1253	1331	1614	-
BO1	76,03	0,71	0,00	2,96	16,21	0,04	0,05	0,08	1,80	0,02	0,34	0,50	1,26
BO2	49,55	0,36	24,58	1,4	14,15	0,1	1,44	1,08	3,3	1,02	1,42	0,64	0,96
BO3	67,81	0,59	0,2	1,26	25,06	0,13	0,08	0,19	1,61	0,08	0,46	0,88	1,65
CI1	80,73	0,45	0,33	1,78	10,71	0,03	2,76	0,04	1,22	0,04	1,28	0,12	0,51
CI2	80,72	0,44	0,24	1,84	14,52	0,00	0,00	0,04	1,37	0,02	0,36	0,07	0,38
CI3	77,74	0,44	0,00	2,72	13,72	0,10	0,09	0,07	1,73	0,02	0,51	0,16	2,70
CI4	73,50	0,67	7,97	3,93	8,22	0,07	0,05	0,29	2,99	0,29	0,72	0,16	1,14
CI5	56,71	0,68	3,87	1,94	6,90	0,00	0,00	0,87	13,60	0,00	0,60	0,89	13,94
CI6	74,35	0,43	0,31	1,88	18,54	0,09	0,10	0,09	2,28	0,03	0,51	0,12	1,27
G1-1	51,05	0,27	0,42	1,04	42,56	0,02	0,06	0,07	2,84	0,05	0,65	0,03	0,94
G1-2	62,27	0,59	0,00	3,55	27,43	0,09	0,12	0,10	2,82	0,03	0,65	0,16	2,19
G1-3	69,96	0,79	0,53	1,53	23,31	0,00	0,14	0,00	2,34	0,00	0,76	0,00	0,64
G1-4	67,33	0,39	0,34	1,89	25,93	0,05	0,11	0,06	2,19	0,06	0,66	0,11	0,88
G1-5	91,24	0,47	0,00	3,20	2,79	0,02	0,03	0,00	1,31	0,02	0,6	0,07	0,25
G2-1	82,80	0,53	0,11	4,03	8,98	0,07	0,09	0,08	2,29	0,00	0,42	0,16	0,44
G2-2	47,85	0,43	2,19	1,32	43,32	0,04	0,09	0,22	2,18	0,15	0,73	0,92	0,56
G2-3	79,77	0,43	0,31	2,05	14,24	0,02	0,05	0,06	1,6	0,04	0,54	0,12	0,77
G2-4	70,66	0,35	0,41	0,86	24,42	0,04	0,12	0,07	1,56	0,05	0,48	0,07	0,91
G2-5	80,19	0,60	0,00	3,47	12,43	0,07	0,04	0,06	1,56	0,02	0,34	0,05	1,17

Próba	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	mircen	α -felandren	karen	p-cymen+ α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	reszta*
GG2	75,77	0,35	0,35	1,36	19,46	0,02	0,04	0,04	1,4	0,04	0,69	0,13	0,35
KO1	64,12	0,71	0,20	2,30	27,16	0,06	0,05	0,20	2,06	0,12	0,76	1,14	1,12
KO2	90,35	0,65	0,51	2,27	0,00	0,00	0,00	0,11	1,69	0,00	0,68	0,18	3,56
KO3	80,67	0,38	0,27	2,43	12,45	0,03	0,03	0,11	2,64	0,05	0,68	0,08	0,18
KO4	56,7	0,74	0,25	2,05	26,78	0,06	6,32	0,18	2,51	0,06	1,31	0,41	2,63
LU2	83,30	0,47	0,25	2,87	6,41	0,17	0,00	0,15	1,77	0,00	0,23	0,18	4,20
LU3	61,55	0,38	9,23	0,90	20,18	0,06	0,66	0,39	4,22	0,38	1,03	0,13	0,89
LU4	59,49	0,55	0,23	1,76	23,42	0,05	0,06	0,13	11,69	0,05	0,66	0,55	1,36
LU6	69,48	0,38	0,00	3,15	23,16	0,08	0,04	0,14	2,08	0,00	0,46	0,10	0,93
LU7	79,91	0,44	0,25	1,93	14,51	0,02	0,03	0,06	1,41	0,03	0,64	0,31	0,46
LU9	64,03	0,31	0,26	1,61	30,12	0,05	0,07	0,06	1,91	0,03	0,55	0,16	0,84
OC1	61,99	0,43	0,28	1,48	31,84	0,05	0,09	0,11	1,85	0,03	0,70	0,40	0,75
OC2	65,75	0,41	0,00	2,30	28,31	0,04	0,05	0,05	1,69	0,03	0,36	0,22	0,79
OC3	87,49	0,39	0,43	1,05	7,93	0,01	0,01	0,05	0,90	0,03	0,66	0,45	0,60
OC4	73,18	0,69	0,28	1,97	18,38	0,27	0,00	0,28	2,64	0,00	0,40	0,15	1,76
SA1	27,10	0,42	40,40	1,45	14,64	0,17	0,00	2,74	5,27	1,57	1,46	1,92	2,86
SA2	25,97	0,37	42,72	1,53	11,96	0,18	0,00	3,00	6,40	1,40	1,24	1,68	3,55
SA3	73,49	0,44	0,29	3,00	18,52	0,07	0,10	0,08	1,59	0,00	0,68	0,23	1,51
SA4	70,35	0,44	0,00	2,72	19,53	0,08	2,38	0,09	2,63	0,04	0,77	0,13	0,84
SA5	71,74	0,42	0,00	3,51	21,49	0,03	0,03	0,04	1,81	0,02	0,30	0,10	0,51
SA6	47,4	0,80	29,57	1,56	4,29	0,14	6,46	1,64	2,96	1,21	2,28	0,86	0,83
SA7	44,69	0,42	5,44	2,19	40,86	0,05	0,04	0,36	3,90	0,32	0,64	0,62	0,47
SA8	54,96	0,35	13,18	2,32	21,80	0,10	0,22	0,42	2,69	0,48	1,00	0,40	2,08
SA9	57,01	0,35	0,00	2,47	16,18	0,04	0,02	0,07	22,3	0,04	0,70	0,09	0,73

Próba	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	mircen	α -felandren	karen	p-cymen+ α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	reszta*
SD1	60,13	0,36	0,18	1,79	33,87	0,02	0,04	0,05	1,52	0,04	0,62	0,55	0,83
SD2	70,13	0,75	1,55	3,18	17,29	0,07	0,11	0,41	2,35	0,18	0,78	1,65	1,55
SD3	46,83	0,33	0,00	2,86	46,61	0,03	0,06	0,04	1,96	0,03	0,29	0,00	0,96
SD4	37,41	0,27	0,00	1,93	35,63	0,12	0,03	0,23	22,51	0,05	0,58	0,16	1,08
SD5	72,01	0,57	1,05	1,11	20,03	0,00	0,00	0,26	1,64	0,00	0,61	1,35	1,37
SD6	63,99	0,50	0,26	1,10	29,22	0,02	0,03	0,13	1,63	0,02	0,69	1,09	1,32
SD7	60,37	0,62	0,31	1,42	30,65	0,00	1,79	0,11	2,08	0,02	0,77	0,38	1,48
SD8	50,59	0,45	1,37	2,02	25,53	0,04	0,05	0,20	16,36	0,04	0,55	0,4	2,4
SD9	72,27	0,94	0,15	1,73	18,74	0,03	0,05	0,19	1,63	0,04	1,38	1,45	1,40
SD10	54,75	1,47	4,39	1,60	21,93	0,00	4,77	1,81	2,49	0,14	0,84	1,90	3,91
SD11	74,90	0,48	0,27	2,1	17,87	0,02	0,04	0,06	1,45	0,00	0,66	0,71	1,44
ST10	67,46	0,61	0,31	2,07	25,06	0,07	0,07	0,15	1,8	0,04	0,58	0,58	1,20
ST11	77,91	0,43	0,29	1,95	16,16	0,05	0,06	0,04	1,38	0,02	0,75	0,08	0,88
ST12	81,4	0,57	0,00	2,62	12,48	0,03	0,03	0,07	1,27	0,04	0,5	0,30	0,69
ST13	78,66	0,49	0,44	2,02	15,03	0,09	0,04	0,08	1,47	0,04	0,64	0,06	0,94

¹ – indeksy na złożu o charakterze niepolarnym wyznaczono na kolumnie HP101 25m x 0,25mm ID (Agilent Technologies, USA)

² – indeksy na złożu o charakterze polarnym wyznaczono na kolumnie HP Innowax 30m x 0,25mm ID (Agilent Technologies, USA)

*Jako "resztę" potraktowano sumę niezidentyfikowanych pików, w przypadku których zawartość procentowa pojedynczego związku nie przekraczała 0,3%. Integracji poddawano piki monoterpenów i ich pochodnych do t_R 15min.

Poszczególnymi kolorami oznaczono:

chemotyp α -pinenowy

chemotyp pośredni

chemotyp sabinenowy

TABELA 46: Nadmiary enancjomeryczne α -pinenu, β -pinenu i limonenu obliczone na podstawie analiz headspace SPME GC (złożenie chiralne HPChiral) z igieł i szyszkogagód badanych prób jalowca (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET)

próba igieł	EE α -pinen	EE β -pinen	EE limonen	próba szyszkogagód	EE α -pinen	EE β -pinen	EE limonen
BO2	24,13	-18,40	91,13	BO2	0,00	-78,17	8,14
BO3	70,33	-18,52	92,42	BO3	60,85	-31,75	31,30
CI1	63,51	-12,26	-53,06	CI1	54,68	-38,53	100,00
CI4	-1,10	-70,00	47,03	CI4	-68,08	-100,00	12,63
CI5	-11,20	-100,00	40,79	CI5	22,22	-100,00	92,86
CI6	61,20	-28,09	-33,66	CI6	50,67	-42,03	37,62
G1-2	44,79	-56,38	-5,17	G1-2	-46,34	-89,68	-4,08
G1-3	48,01	-49,57	-53,45	G1-3	65,27	-23,50	33,09
G1-4	48,87	-53,47	-6,67	G1-4	45,19	-49,30	5,63
G2-2	26,81	-34,59	35,73	G2-2	33,68	-51,61	10,20
G2-4	65,04	-28,40	37,15	G2-4	92,51	-100,00	25,97
KO1	29,21	-59,34	1,96	KO1	-6,04	-76,62	4,53
KO3	79,03	-4,05	-6,56	KO3	36,86	-61,00	-23,08
LU1	41,09	-100,00	-39,13	LU2	16,98	-67,60	0,43
LU2	37,07	-62,18	-20,00	LU3	65,32	-20,30	77,97
LU3	51,13	-40,43	14,04	LU8	17,56	-69,17	27,96
LU8	51,36	-45,00	-35,35	LU9	61,92	-29,80	11,24
LU9	45,27	-50,65	90,87	OC1	54,74	-48,47	24,68
OC1	25,54	-69,63	-8,86	OC3	87,35	26,67	-100,00
OC3	74,12	-13,77	-38,27	SA1	-64,75	-66,67	75,33
OT1	9,20	-73,37	-35,05	SA2	-66,79	-56,80	78,73
OT3	18,44	-50,24	52,90	SA3	19,14	-69,28	2,91
OT4	25,22	-61,43	42,57	SA4	21,97	-65,80	3,70
OT5	-7,88	-100,00	100,00	SA5	-32,27	-86,89	-17,65
OT6	44,85	-56,96	4,84	SA6	10,65	-53,40	70,59
OT11	-15,59	-35,95	100,00	SA7	10,59	-54,15	72,15
SA1	-6,59	-20,00	25,34	SA8	-21,24	-76,83	38,03
SA2	-3,62	-9,09	28,99	SA9	7,79	-82,14	93,23
SA3	49,77	-51,16	5,08	SD1	33,64	-61,11	-20,73
SA4	62,89	-38,71	-24,36	SD5	70,66	-13,39	32,92
SA5	29,45	-100,00	68,91	SD10	27,40	-100,00	3,72
SA6	12,13	-55,56	6,47	ST10	49,96	-36,36	8,57
SA7	-86,00	-100,00	-14,72	ST12	37,46	-54,13	15,09
SA8	40,00	-22,61	64,17	ZG2	77,07	-5,26	37,33

SUPLEMENT A – WYNIKI ANALIZ CHROMATOGRAFICZNYCH

próba igieł	EE α-pinen	EE β-pinen	EE limonen	próba szyszkojagód	EE α-pinen	EE β-pinen	EE limonen
SA9	35,19	-56,03	-33,33				
SD1	35,21	-62,54	20,51				
SD5	15,54	-67,97	-12,36				
SD10	20,68	-34,21	63,91				
ST10	63,97	-33,33	14,00				
ST12	56,32	-44,93	-28,18				
ZG1	40,14	-62,11	79,43				
ZG2	43,24	-59,02	-38,46				

* W tabeli policzono nadmiary enancjomeryczne (ang. EE – *Enantioeric Excess*) wg wzoru $EE(\%) = \frac{R-S}{R+S} \cdot 100\%$.
 Pozostałe związki monoterpenowe o charakterze chiralnym w igłach i szyszkojagodach *J. communis* występowały tylko w postaci jednego enancjomeru, a więc EE dla nich wynosiło 100 lub -100%.

TABELA 47: Wyniki chromatograficzne analiz na złożu achiralnym (HP101) otrzymane w toku analiz olejków eterycznych z igieł badanych prób jalowca pospolitego i halnego (wyniki wygenerowane przez oprogramowanie ChromNET)

Próba	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	mircen	α -felandren	karen	p-cymen+ α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	reszta*
RI _{polarna} ¹	940	950	973	974	988	1003	1012	1019	1028	1056	1086	1171	
RI _{niepolarna} ²	1026	1068	1172	1115	1163	1172	1155	1190	1209	1253	1331	1614	
BO1	69,22	0,62	0,10	2,56	3,97	1,95	0,70	0,57	15,61	0,07	0,83	0,00	3,79
BO2	19,18	0,20	43,6	1,18	6,06	0,94	0,66	3,36	8,60	3,82	2,55	4,15	5,69
BO3	69,33	0,60	0,46	1,70	3,82	0,71	0,10	0,30	19,73	0,11	1,04	0,46	1,66
LU1	74,22	0,68	0,43	2,82	3,95	2,81	3,52	0,57	9,14	0,00	1,19	0,00	0,68
LU2	70,34	0,70	0,00	2,72	4,13	3,91	1,38	0,44	14,59	0,00	1,37	0,00	0,42
LU3	49,61	0,49	15,19	1,64	4,65	3,06	3,49	1,01	11,79	0,95	2,38	2,31	3,43
LU4	77,14	0,58	0,44	2,55	3,77	1,82	0,95	0,33	8,09	0,06	0,98	0,45	2,85
LU5	79,78	0,00	0,58	2,01	4,25	2,9	3,13	0,00	5,68	0,00	1,68	0,00	0,00
LU6	73,89	0,53	0,36	3,28	4,57	2,67	0,30	0,68	10,94	0,07	0,95	0,00	1,77
LU7	75,11	0,01	2,12	7,82	0,07	0,00	0,10	6,99	0,23	0,01	0,06	0,00	7,5
LU8	82,65	0,69	0,00	0,00	0,48	2,89	0,00	4,30	1,89	0,60	6,28	0,00	0,22
LU9	66,21	0,54	0,42	2,75	6,90	2,16	0,56	0,77	18,36	0,00	0,88	0,00	0,45
OT2	62,81	0,00	8,98	3,35	4,67	2,78	0,85	1,25	11,81	1,06	1,73	0,00	0,73
OT3	39,41	0,00	30,49	2,09	4,78	0,59	2,37	2,11	4,02	2,36	2,31	4,17	5,30
OT4	39,72	0,00	14,32	2,30	4,90	4,09	2,42	0,84	18,78	1,61	0,00	1,68	9,35
OT5	26,01	0,00	40,39	2,10	6,05	1,41	2,42	1,02	9,76	2,29	2,74	0,00	5,80
OT6	63,35	0,00	0,00	2,45	7,81	0,00	4,34	0,77	20,18	0,00	1,08	0,00	0,00
OT7	81,94	0,56	0,58	2,91	3,92	2,37	0,17	0,19	4,16	0,11	1,08	0,11	1,91
OT9	47,72	0,86	0,00	2,09	3,13	1,36	11,65	0,00	29,23	0,00	2,64	0,00	1,32
OT10	63,68	0,78	1,04	3,29	4,09	2,63	8,59	0,82	12,38	0,00	1,57	0,00	1,14
OT11	14,96	0,00	51,76	0,00	6,32	0,69	1,72	2,11	6,00	3,29	3,76	5,14	4,27
OT12	61,16	0,45	8,58	2,08	4,66	3,88	1,15	0,00	11,13	0,56	2,24	2,99	1,12

Próba	α -pinen	kamfen	sabinen	β -pinen	mircen	α -felandren	karen	p-cymen+ α -terpinen	limonen	γ -terpinen	terpinolen	terpinen-4-ol	reszta*
ST12	80,24	0,66	0,27	2,42	3,93	2,46	0,05	0,29	6,82	0,05	0,07	0,27	2,48
ST13	69,78	0,5	0,51	2,31	4,35	2,67	0,05	0,44	13,74	0,1	1,66	0,46	3,43
T1	16,29	0,26	44,6	1,09	4,37	0,50	1,83	3,12	4,48	4,76	3,05	9,31	6,35
T2	24,32	0,33	39,49	1,54	4,09	0,62	2,43	2,87	3,86	4,28	2,72	7,85	5,61
T3	18,89	0,30	43,69	1,39	4,19	0,93	2,50	2,81	5,37	4,04	2,79	7,06	6,04
T4	31,65	0,29	36,32	0,00	4,17	1,30	0,39	2,54	6,66	3,36	2,32	6,01	4,99
T5	25,52	1,24	25,67	1,31	3,14	0,32	24,6	0,00	2,85	2,63	3,58	5,15	3,99
T6	32,09	0,62	27,94	1,79	4,36	1,66	8,89	1,72	6,47	2,43	3,07	4,16	4,80
T7	32,17	0,75	31,48	1,42	3,62	0,16	11,59	1,25	2,50	2,14	2,63	4,14	6,15
T8	15,21	0,17	55,28	4,14	0,00	0,42	0,11	2,38	3,32	3,57	2,58	6,01	6,81
T9	80,99	0,82	0,41	2,79	2,86	0,73	6,23	0,00	3,63	0,00	1,04	0,00	0,51
T10	84,77	0,73	0,06	3,04	2,78	0,00	5,35	0,00	1,43	0,00	1,00	0,09	0,76
T11	77,95	0,76	0,62	2,47	2,79	1,48	5,82	0,15	5,08	0,11	1,18	0,28	1,30
T12	62,65	1,34	0,52	2,61	2,97	1,03	20,27	0,17	4,77	0,12	2,32	0,35	0,89
T13	83,2	0,8	0,56	2,55	2,35	0,14	5,03	0,00	3,64	0,00	1,07	0,21	0,45
T14	80,27	0,76	0,64	2,14	3,23	0,53	5,92	0,00	3,88	0,09	1,16	0,26	1,13
T15	73,28	1,02	0,64	2,01	2,41	1,37	11,21	0,27	5,23	0,00	1,44	0,32	0,81
T16	71,43	0,95	1,24	2,82	2,74	1,99	12,01	0,48	3,50	0,11	0,91	0,36	1,46

¹ – indeksy na złożu o charakterze niepolarnym wyznaczono na kolumnie HP101 25m x 0,25mm ID (Agilent Technologies, USA)

² – indeksy na złożu o charakterze polarnym wyznaczono na kolumnie HP Innowax 30m x 0,25mm ID (Agilent Technologies, USA)

*Jako "resztę" potraktowano sumę niezidentyfikowanych pików, w przypadku których zawartość procentowa pojedynczego związku nie przekraczała 0,3%. Integracji poddawano piki monoterpenów i ich pochodnych do t_R 15min.

Poszczególnymi kolorami oznaczono:

chemotyp α -pinenowy

chemotyp pośredni

chemotyp sabinenowy

TABELA 48: Nadmiary enancjomeryczne α -pinenu i limonenu obliczone na podstawie analiz olejku prób jalowca pospolitego i halnego (kolumna enancjoselektywna beta-dex)

próba	EE α -pinen	EE limonen	
BO1	46,35	76,84	<p>W tabeli policzono nadmiary enancjomeryczne (ang. EE – <i>Enantiomeric Excess</i>) wg wzoru $EE(\%) = \frac{R-S}{R+S} \cdot 100\%$.</p> <p>Pozostałe związki monoterpenowe o charakterze chiralnym w igłach i szyszkogodach <i>J. communis</i> występowały tylko w postaci jednego enancjomeru, a więc EE dla nich wynosiło 100 lub -100%.</p>
BO2	20,00	53,49	
BO3	69,15	91,21	
LU1	43,16	-48,15	
LU2	41,77	-30,43	
LU3	52,71	-2,56	
LU4	45,69	42,22	
LU5	70,65	-34,78	
LU6	31,67	-36,00	
LU7	55,64	85,92	
LU8	50,42	-44,00	
LU9	40,21	72,73	
OT2	9,29	-15,38	
OT3	-53,28	19,30	
OT4	26,90	48,28	
OT5	-8,61	46,94	
OT6	48,52	-30,77	
OT7	49,10	-55,56	
OT9	32,49	84,73	
OT10	25,11	-41,67	
OT11	-20,75	66,67	
OT12	51,13	-33,33	
ST12	53,94	-46,15	
ST13	60,06	46,67	
T1	-21,08	64,71	
T2	0,75	40,54	
T3	3,00	54,29	
T4	15,66	60,00	
T5	6,27	46,15	
T6	4,76	33,33	
T7	17,54	44,00	
T8	-39,88	52,94	
T9	37,79	0,00	
T10	34,43	33,33	
T11	54,59	20,00	
T12	30,79	-9,09	
T13	57,58	71,43	
T14	66,13	61,90	
T15	64,47	9,09	
T16	24,97	-61,29	

