





Akademia Medyczna w Gdańsku

Wydział Farmaceutyczny

Loretta Pobłocka-Olech

**Zastosowanie metod chromatograficznych
w badaniach składu chemicznego
kory niektórych gatunków i klonów wierzby**

Rozprawa doktorska

Promotor pracy: dr hab. Mirosława Krauze-Baranowska

Katedra i Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych

Gdańsk 2006

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	1
1. Charakterystyka botaniczna rodzaju <i>Salix</i>.....	4
1.1. Stanowisko systematyczne	4
1.2. Opis botaniczny badanych gatunków	4
2. Naryngenina i jej pochodne – flawanony o wielokierunkowej aktywności farmakologicznej	9
2.1. Działanie estrogenopodobne	10
2.2. Działanie obniżające poziom cholesterolu oraz przeciwmiażdżycowe.....	14
2.3. Działanie wazorelaksacyjne i przeciwnadciężycowe.....	15
2.4. Działanie ochronne na skórę.....	15
2.5. Działanie przeciwwrzodowe.	16
2.6. Właściwości przeciwutleniające.....	16
2.7. Działanie na CYP3A4.	18
2.8. Działanie neuroprotektywne.....	18
2.9. Wpływ na ukrwienie siatkówki	18
3. Proantocyjanidyny – składniki leków i żywności o cennych właściwościach farmakologicznych i biologicznych	19
3.1. Proantocyjanidyny jako składniki diety	22
3.2. Aktywność farmakologiczna proantocyjanidyn	23
3.2.1. Wpływ proantocyjanidyn na układ krwionośny	23
3.2.2. Działanie przeciwutleniające	26
3.2.3. Działanie przeciwnowotworowe	28
3.2.4. Działanie przeciwzapalne	29
3.2.5. Aktywność biologiczna proantocyjanidyn	30
3.2.6. Wpływ proantocyjanidyn na biodostępność związków naturalnych.....	32
4. Wielowymiarowa chromatografia cieczowa (MDLC) – historia i zastosowanie	33
II. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	38
1. Rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne.....	38
1.1. Rozpuszczalniki organiczne	38
1.2. Odczynniki chemiczne	38
1.3. Woda.....	39
1.3.1. Woda demineralizowana	39
1.3.2. Woda redestylowana	39
2. Związki wzorcowe	39
2.1. Glikozydy fenolowe	39
2.2. Fenolokwasy.....	40
2.2.1. Pochodne kwasu benzoowego.....	40
2.2.2. Pochodne kwasu cyjanowego.....	41
2.2.3. Depsydy	42
2.2.4. Inne fenolokwasy.....	43
2.3. Flawonoidy	43
2.3.1. Aglikony flawonoidowe	43
2.3.2. Glikozydy flawonoidowe	44
2.3.3. Chalkony.....	45
2.3.4. Dimery flawonoidowe	45
2.3. Flawan-3-ole i ich dimeryczne pochodne.....	46
3. Aparatura i sprzęt laboratoryjny.....	47
3.1. Systemy chromatografii cienkowarstwowej – TLC i HPTLC	47
3.2. Systemy wysokiej wydajności chromatografii cieczowej – HPLC.	47
3.2.1. Systemy do celów analitycznych.....	47
3.2.2. System HPLC do celów preparacyjnych.....	48
3.3. Inne.....	48

4. Analiza chromatograficzna.....	49
4.1. Chromatografia cienkowarstwowa – TLC	49
4.1.1. Płytki chromatograficzne.....	49
4.1.2. Fazy ruchome.	49
4.1.3. Odczynniki wywołujące	50
4.2. Wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa – HPTLC.....	51
4.2.1. Płytki chromatograficzne.....	51
4.2.2. Fazy ruchome	52
4.3. Wysokosprawna chromatografia cieczowa – HPLC	52
4.3.1. Kolumny chromatograficzne	52
4.3.2. Programy elucji.	53
4.4. Chromatografia preparatywna	54
4.4.1. Preparatywna chromatografia cienkowarstwowa (TLC i HPTLC).....	54
4.4.2. Preparatywna chromatografia kolumnowa (CC).....	55
4.4.3. Preparatywna wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)	55
5. Ekstrakcja materiału roślinnego rozpuszczalnikami organicznymi do celów analizy chromatograficznej.....	56
5.1. Ekstrakcja pochodnych salicylowych wolnych i związanych estrowo z materiału roślinnego.	56
5.2. Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej prostych fenoli oraz polifenoli	56
5.3. Przygotowanie próbek do analizy fenolokwasów	56
5.4. Przygotowanie próbek do analizy ilościowej	56
6. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE).....	57
7. Hydroliza alkaliczna i kwasowa	57
7.1. Hydroliza alkaliczna ekstraktów metanolowych.....	57
7.2. Hydroliza alkaliczna frakcji wodnych ekstraktów metanolowych.....	58
7.3. Hydroliza alkaliczna wyodrębnionych związków naturalnych	58
7.4. Hydroliza kwasowa frakcji wodnych ekstraktów metanolowych	58
7.5. Hydroliza kwasowa wyodrębnionych związków naturalnych	58
8. Analiza spektralna.....	58
8.1. UV (MeOH) – Unicam SP 1750 PYE.....	58
8.2. 1H NMR – 90 MHz Jeol, 300 MHz Bruker MSL 300, TMS wzorec wewnętrzny	58
8.3. 13C NMR – 90 MHz Jeol, 75,5 MHz Bruker MSL 300, TMS wzorec wewnętrzny	58
8.4. EI-MS – 70 eV, Jeol 100	58
8.5. FAB-MS (+) spektrometr Trio-3 VG (Masslab, Wielka Brytania), tiogliceryna.....	58
9. Materiał roślinny.	59
9.1. Oznaczanie zawartości wody w korze wierzb	60
10. Analiza chromatograficzna pochodnych alkoholu salicylowego i innych pochodnych prostych fenoli.....	60
10.1. Analiza chromatograficzna jakościowa.....	60
10.1.1. TLC.....	60
10.1.2. HPLC	60
10.2. Analiza ilościowa salicyny metodą SPE-HPLC z użyciem metody wzorca zewnętrznego	61
10.2.1. Ekstrakcja do fazy stałej salicyny (SPE).	61
10.2.2. Warunki rozdzielania chromatograficznego.....	62
10.2.3. Walidacja metody	62
10.3 Analiza pirokatechiny.....	62
10.3.1. Analiza chromatograficzna jakościowa.....	62
10.3.2. Analiza ilościowa pirokatechiny	63
11. Analiza chromatograficzna związków flawonoidowych i fenolokwasów.	64
11.1. Analiza chromatograficzna jakościowa.....	64
11.1.1. TLC.....	64
11.1.2. 2D TLC.....	64

11.1.3. MGD – HPTLC	64
11.1.4. HPLC	65
11.2. Analiza ilościowa flawanonów metodą HPLC z użyciem metody wzorca zewnętrznego	65
11.2.1. Warunki rozdzielania chromatograficznego	65
11.2.2. Sporządzanie krzywych regresji	65
11.3. Analiza ilościowa chalkonów metodą SPE-HPLC z użyciem metody wzorca zewnętrznego	66
11.3.1. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) izosalipurpozydu i jego estru p-kumarowego	66
11.3.2. Warunki rozdzielania chromatograficznego	66
11.3.3. Sporządzanie krzywych regresji	66
11.4. Dwuwymiarowa wysokosprawną chromatografia cieczowa – 2D-HPLC	67
11.5. Analiza ilościowa fenolokwasów metodą 2D-HPLC z użyciem metody wzorca zewnętrznego	67
11.5.1. Warunki rozdzielania chromatograficznego	67
11.5.2. Sporządzanie krzywych regresji	67
12. Analiza mono- i dimerycznych flawan-3-oli.....	67
12.1. Analiza chromatograficzna jakościowa	67
12.1.1. TLC	67
12.1.2. HPTLC	68
12.1.3. MGD – HPTLC	68
12.1.4. HPLC	68
12.2 Analiza ilościowa katechin	68
12.2.1. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) katechiny	68
12.2.2. Analiza ilościowa metodą HPLC z użyciem metody wzorca zewnętrznego	69
12.2.3. Analiza ilościowa metodą HPTLC	69
12.3. Analiza ilościowa procyjanidyny B ₁ metodą SPE-HPTLC	70
12.3.1. Ekstrakcja SPE procyjanidyny B ₁ z ekstraktów metanolowych	70
12.3.2. Warunki rozdzielania chromatograficznego	71
12.3.3. Walidacja metody	71
13. Izolacja związków naturalnych z materiału roślinnego.....	72
13.1. Izolacja związków wzorcowych z grupy pochodnych prostych fenoli metodą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej	72
13.1.1. Izolacja triandryny	72
13.1.2. Izolacja salikortyny i 2'-acetylosalikortyny	72
13.2. Izolacja prostych fenoli i polifenoli z kory <i>Salix purpurea</i> (7043)	73
13.2.1. Izolacja związków flawonoidowych z kory wierzby <i>S. purpurea</i> (7043)	73
13.2.2. Izolacja prostych fenoli z kory <i>Salix purpurea</i> (7043)	75
14. Identyfikacja związków.....	75
15. Badania aktywności cyto- i genotoksycznej pirokatechiny i innych związków czynnych z rodzaju <i>Salix</i> oraz ekstraktów suchych z kory wierzb.....	78
15. 1. Linie komórkowe	78
15.1.1. Linie komórek adherentnych	78
15.1.2. Linie komórek zawieszinowych	78
15.2. Pożywki	78
15.3. Roztwory buforowe	79
15.4. Warunki hodowli komórek ludzkich	79
15.5. Test MTT do określania aktywności cytotoksycznej	80
15.6. Test kometowy (<i>Single Cell Gel Electrophoresis</i> – SCGE) do określania aktywności genotoksycznej	80
15.7. Materiał do badań	81

III. BADANIA WŁASNE.....	83
1. Omówienie wyników badań nad pochodnymi alkoholu salicylowego i innymi prostymi fenolami w korze wierzb.	84
1.1. Omówienie wyników analizy jakościowej zespołów związków salicylowych i innych glikozydów fenolowych.	84
1.2. Omówienie wyników analizy ilościowej salicyny wolnej i estrowo związanej w korze wierzb	102
1.3. Omówienie wyników badań nad innymi pochodnymi prostych fenoli.....	105
2. Omówienie wyników badań zespołów fenolokwasów w korze wierzb.....	113
3. Omówienie wyników badań związków flawonoidowych w korze gatunków i klonów z rodzaju <i>Salix</i>.	136
3.1. Omówienie wyników izolacji i identyfikacji związków flawonoidowych w korze <i>Salix purpurea</i> (7043) firmy Labofarm	136
3.2. Omówienie wyników badań chromatograficznych związków flawonoidowych w korze gatunków i klonów z rodzaju <i>Salix</i>	142
3.2.1. Omówienie wyników badań jakościowych zespołów flawonoidowych.....	142
3.2.2. Omówienie wyników analizy ilościowej związków flawonoidowych z grupy chalkonów i flawanonów	147
4. Omówienie wyników badań pochodnych flawan-3-olu w korze wierzb.....	153
4.1. Omówienie wyników analizy jakościowej i ilościowej katechiny i jej monomerycznych pochodnych.....	153
4.2. Omówienie wyników analizy jakościowej i ilościowej procyanidyn B ₁ i B ₂	160
5. Omówienie wyników badań metodą dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (2D-HPLC) – opracowanie systemu oraz analiza składu chemicznego wybranych kor wierzb.....	169
6. Omówienie wyników badań aktywności cytotoksycznej i genotoksycznej związków fenolowych oraz ekstraktów suchych z kory wierzb.	178
IV. WNIOSKI	182
V. SUMMARY	189
VI. PIŚMIENNICTWO	198

WSTĘP I CEL PRACY

Standaryzacja chemiczna ekstraktów roślinnych i potwierdzone wynikami badań klinicznych skuteczność i bezpieczeństwo ich stosowania, spowodowały w ostatnich latach wzrost zainteresowania pacjentów i lekarzy nowoczesnym lekiem roślinnym [51,73,202,204].

Kora wierzby należy do nielicznej grupy surowców roślinnych o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwreumatycznym [10,22,51,123,202].

W krajach zjednoczonej Europy, ekstrakty z kory różnych gatunków *Salix* są stosowane w leczeniu osteoartrozy oraz gorączki i bólu, włączając lekkie migreny [34,201,202]. Liczne monografie kory wierzby [50,55], m. in. monografia Farmakopei Europejskiej [50], wymienia jako surowce lecznicze kory różnych gatunków wierzb (m.in. *S. alba* [55], *S. daphnoides*, *S. fragilis*, *S. purpurea*) z zawartością salicyny nie niższą niż 1,5% [50].

Dominuje pogląd, że leki roślinne o udokumentowanym badaniami klinicznymi działaniu przeciwzapalnym i przeciwbólowym, powinny być stosowane w terapii chorób reumatycznych przed konwencjonalnymi analgetykami (NLPZ), m.in. ze względu na brak działań ubocznych w obrębie przewodu pokarmowego [33,35,201,202].

Działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe oraz przeciwgorączkowe wierzby jest warunkowane obecnością pochodnych salicylowych, przede wszystkim salicyny oraz salikortyny, tremulacyny i innych [10,22,34,71,232]. Po podaniu doustnym są one hydrolizowane przez bakterie jelitowe górnego odcinka przewodu pokarmowego do alkoholu salicylowego, który po absorpcji utlenia się do kwasu salicylowego [201,202].

Wyniki badań klinicznych wykazują skuteczność przeciwbólową i przeciwzapalną podawanych przez ESCOP (*European Scientific Cooperative on Phytotherapy*) dawek salicyny – 240 mg na dobę, wyższych niż dotychczas zalecane m.in. przez niemiecką Komisję E (60 mg – 120 mg na dobę) [201,202]. Stosowanie takich dawek wymaga wysokiej zawartości salicyny w surowcu lub ekstrakcie – około 15%. W związku z tym, do celów farmaceutycznych, istnieje konieczność wyboru materiału roślinnego o wysokiej zawartości pochodnych salicylowych.

Mechanizm działania przeciwzapalnego i przeciwbólowego kory wierzby nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony [33,58,59,241]. W świetle ostatnich badań aktywność przeciwzapalna surowca nie jest związana z wpływem na enzym cyklooksygenazę 2 (COX-2), który obok cyklooksygenazy 1 (COX-1) odpowiada za działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych – NLPZ [58,241]. Doświadczenia wskazują, że ekstrakt może blokować prostaglandynę E₂ (PGE₂) przez hamowanie fosfolipazy A₂, generującej kwas arachidonowy – substrat dla COX [59].

Podczas ostatniego Kongresu Towarzystwa Badań Roślin Leczniczych w Helsinkach naukowcy niemieccy [113], przedstawili wyniki testów *in vitro* i *in vivo*, w których wykazali hamujący wpływ ekstraktu z kory wierzby – STW 33-1 (preparat Proactiv) na szereg markerów stanu zapalnego, m.in. COX-1, COX-2 oraz enzymy: matriks metaloproteazę (MMP-3) i hialuronidazę oraz czynnik martwicy guza TNF- α [113,114,118].

W badaniach biodostępności ekstraktu z kory wierzby podanego doustnie, oznaczane poziomy kwasu salicylowego w osoczu i moczu odpowiadały poziomowi obserwowanemu po podaniu kwasu acetylosalicylowego w dawce, która nie wywołuje efektu przeciwzapalnego, a jedynie przeciwwagregacyjny [201]. Rezultaty przeprowadzonych badań zarówno *in vitro* [59,113] jak i *in vivo* [201], sugerują udział w efekcie przeciwzapalnym i przeciwbólowym, obok salicyny, związków polifenolowych przypuszczalnie flawonoidów, katechiny oraz fenolokwasów [59,113,201].

Uwzględniając powyższe dane, celem pracy była selekcja, przy użyciu metod chromatograficznych, materiału roślinnego charakteryzującego się najwyższą zawartością związków fenolowych (prostych fenoli oraz polifenoli), w oparciu o przeprowadzenie badań składu chemicznego kor 38 gatunków i klonów wierzb, uprawianych lub pochodzących ze stanu naturalnego, mianowicie: *Salix acutifolia* (7031); *S. alba* (7032) i klon 1100 (7001); *S. × americana* klon 1036 (7002); *S. amygdalina × viminalis* klon 1155 (7003); *S. daphnoides* (7033) i klon 1095 (7004); *S. eriocephala* (7034); *S. × erythroflexuosa* (7019); *S. fragilis* (7035), *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020); *S. herbacea* (7030); *S. lapponum* (7021); *S. matsudana* ‘Tortuosa’ (7028); *S. melanostachys* (7022); *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025); *S. purpurea* (7036), (7037) i klony: 1038 (7005), 1067 (7006), 1081 (7007), 1084 (7008), 1101 (7009), 1132 (7010), 1136 (7011), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014); *S. purpurea × daphnoides* 1107 (7015); *S. rosmarinifolia* (7023); *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026); *S. × sepulcralis* (7027); *S. silesiaca* (7024); *S. triandra* (7038) i klony 1044 (7016), 1045 (7017); *S. viminalis* (7029) i klon 1083 (7018). Ponadto, postanowiono w powyższym zakresie porównać również surowiec roślinny, dostępny na rynku zielarskim, mianowicie mieszankę kor wierzb *S. alba* i *S. purpurea* (7039) firmy „Kawon-Hurt” (Gostyń), korę *S. alba* lub *S. purpurea* (7040) firmy „Flos” (Mokrsk) oraz kory *S. purpurea* (7041), (7042) i (7043) pochodzące odpowiednio z firm: „Herbapol” Gdańsk, „Herbapol” Wrocław i „Labofarm” (Starogard Gdański).

Cel pracy obejmował następujące problemy badawcze:

1. Izolacja i identyfikacja nowych, wcześniej nieopisanych w badanych surowcach związków z grupy prostych fenoli i polifenoli.

2. Ustalenie składu jakościowego zespołów związków salicylowych, fenolokwasów, flawonoidów, pochodnych flawan-3-oli metodami chromatograficznymi: chromatografii cienkowarstwowej – TLC, wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej – HPTLC, wysokosprawnej chromatografii cieczowej – HPLC.

3. Opracowanie procedur analitycznych oznaczania ilościowego związków:

- z grupy pochodnych salicylowych, salicyny wolnej i związanej estrowo,
- z grupy flawanonów, naryngeniny i jej 5-O- oraz 7-O-glukozydów,
- z grupy chalkonów, izosalipurpozydu i jego pochodnych oraz
- z grupy pochodnych flawan-3-olu, katechin i procyjanidyny B₁, B₂.

4. Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego TLC, HPTLC i HPLC wyżej wymienionych grup związków dla przyjętych celów analitycznych i preparatywnych, w tym opracowanie systemu dwuwymiarowej chromatografii cieczowej – 2D-HPLC.

5. Badania aktywności cytotoksycznej i genotoksycznej ekstraktów z kory wierzby oraz izolowanych z nich związków naturalnych.

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka botaniczna rodzaju *Salix*.

1.1. Stanowisko systematyczne.

Królestwo: *Eukariota* (Jądrowe)

Podkrólestwo: *Phytobionta* (Rośliny)

Gromada: *Spermatophyta* (Nasienne)

Podgromada: *Angiospermae* (Okrytonasienne)

Klasa: *Dicotyledoneae* (Dwuliścienne)

Podklasa: *Dilleniidae* (Ukęślowe)

Nadrząd: *Cistiflorae* [83]

Rząd: *Salicales* (Wierzbowce)

Rodzina: *Salicaceae* (Wierzbowate)

Rodzaj: *Salix* L. (Wierzba) [83,184,223,225]

1.2. Opis botaniczny badanych gatunków.

Rodzaj *Salix* stanowi liczna grupa gatunków, których liczbę w świecie szacuje się na około 350-500. Większość przedstawicieli rodzaju występuje w Chinach (270 gatunków) i krajach byłego Związku Radzieckiego [94]. W Europie jest znanych 65 gatunków wierzby, w tym 31 występuje na terenie Polski [21,94]. Jedynie na obszarach Australii i Oceanii nie odnotowano stanowisk naturalnych taksonu [94].

Wierzby są roślinami dwupiennymi o obłych pędach, pojedynczych liściach, niekiedy zaopatrzonych w przylistki [81,207]. Są to krzewy lub drzewa, rzadziej drobne krzewinki. Rozdzielnopłciowe kwiaty o prostej budowie są zebrane w kotkowate kwiatostany. Słupek jest górny, dwukrotny. Pręciki występują w liczbie od 2 do 5. Kwiaty są pozbawione okwiatu. Zarówno słupek jak i pręciki posiadają u nasady gruczoły miodnikowe. Owoc stanowi wielonasienna torebka wypełniona bezbielmowymi i opatrzonymi puchem nasionami [21,81,193,207,223,225].

Systematyka rodzaju *Salix* przysparza botanikom wiele problemów, między innymi ze względu na tworzenie przez wierzby mieszańców międzygatunkowych oraz tendencję do powielania liczby chromosomów [94,193]. Badania nad ujednoczeniem systematyki wierzby są prowadzone na całym świecie [94,105,174].

***Salix acutifolia* Willd.** (syn. *S. daphnoides* Vill. var. *acutifolia* Döll. [83]) – **Wierzba ostrolistna** (wierzba kaspijska) [83,193,223]. Gatunek jest antropofitem zdomowionym we florze polskiej [83], uprawianym na piaszczystych glebach i sadzonym w celu umocnienia wydm. Jest krzewem o niebiesko owoszczonych, fioletowych do brązowo-czerwonych, obłych gałęziach. Na młodych pędach kora łuszczy się płatami, a jej wewnętrzna strona jest cytrynowożółta. Liście są lancetowate i zaopatrzone w przylistki [21,193,207,223].

***S. alba* L.** (syn. *S. alba* ssp. *alba*, *S. vitellina* L. [184]) – **Wierzba biała**. Roślina jest drzewem o szerokiej koronie, dorastającym do 30 m wysokości. Kora jest żółta lub jasnobrunatna. Podłużnie lancetowate liście są z obu stron jedwabście owłosione i połyskujące, u starszych jedynie dolna strona blaszki pozostaje srebrzysto-zielono owłosiona. Blaszka liściowa posiada gruczołowato piłkowany brzeg i zaostrowany szczyt [21,193,207,223].

***S. × americana* Hoedt.** – **Wierzba amerykańska (wierzba uniwersalna)**. Roślina jest mieszańcem międzygatunkowym *S. cordata* var. *americana* Hort i *S. gracilis* Andersson, wykorzystywanym w wikliniarstwie. Gatunek stanowi zwarty krzew o wysokości do 2,5 m. Posiada elastyczne, lekko zwisające pędy o barwie zielonej, jasnoczerwone na szczycie. Liście są lancetowate zaopatrzone w duże, nerkowate przylistki [92,193].

***S. amygdalina* L.** (syn. *S. triandra* ssp. *discolor* (Koch) Arcang.) – **Wierzba migdałowa**. Gatunek jest krzewem, rzadziej stanowi niewielkie drzewo. Gałązki są brunatne o pomarańczowej miazdze. Młode pędy są czterokanciaste. Krótkoogonkowe liście są nagie, szerokolancetowate, zaopatrzone w duże, sercowate przylistki. Blaszka liściowa z wierzchu ciemnozielona, spodem modrawo-szara ma krótko zaostrowany szczyt i piłkowany brzeg [21,193,207,223].

Według niektórych autorów [21,83,207] gatunek *S. amygdalina* odpowiada gatunkowi *S. triandra*. Natomiast Rutkowski [193] podaje, że wierzba migdałowa w odróżnieniu od wierzby kruchej posiada liście spodem niebiesko-zielone oraz u młodych okazów owłosione ogonki i pączki.

***S. daphnoides* Vill.** – **Wierzba wawrzynkowa**. Roślina jest krzewem lub drzewem o wysokości do 10 m. Posiada fioletowe lub wiśniowe pędy, które zwykle pokrywa niebieskawy wosk. Kora jest od wewnątrz cytrynowożółta. Blaszka liściowa posiada krótko zaostrowany szczyt i piłkowany brzeg. Liście zaopatrzone są w półsercowate i nietrwale przylistki [21,193,207,223].

S. eriocephala Michx. (syn. *S. discolor* Muhl. [184]) – **Wierzba diamentowa** (wierzba amerykańska, wierzba Missouri). Gatunek jest krzewem lub małym drzewem dorastającym do 7 m wysokości. Młode gałązki są czerwono-brązowe i szaro owłosione, w miarę wzrostu brunatnieją. Posiada lancetowate liście, z wierzchu żółtawo- do ciemnozielono zabarwione, od spodu słabo owłosione. Liście są osadzone na długich, nagich ogonkach. Okrągła lub sercowata u nasady blaszka liściowa ma piłkowany brzeg i klinowaty szczyt. Przylistki są trwałe, półsercowate i bezwłose [93].

S. × erythroflexuosa Ragab – **Wierzba żółtopędowa, odm. argentyńska**. Roślina jest mieszańcem powstałym ze skrzyżowania gatunków *S. × sepulcralis* i *S. babylonica*. Jest to krzew o krótkim, nieco krzywym pniu i szerokiej koronie. Posiada żółto-pomarańczowe, zwisające pędy. Liście i gałązki są falisto pogięte [207].

S. fragilis L. – **Wierzba krucha**. Jest to drzewo dorastające do 30 m wysokości, rzadziej stanowi krzew. Gałązki są żółte lub jasnobrunatne, nagie i połyskujące, kruche – bardzo łamliwe u nasady. Kora jest głęboko splekana. Gatunek posiada jajowato-lancetowate liście. Blaszka liściowa ma odległe piłkowany brzeg i zastrzony szczyt. Młode liście są ciemnozielone, błyszczące, od spodu modrawo-zielone lub szare z nalotem woskowym. Przylistków brak lub są drobne, nerkowate [21,193,207,223].

S. herbacea L. – **Wierzba zielna** (wierzba nibyzielna [83]). Gatunek stanowi niski krzew o krótkoogonkowych, drobnych liściach, kształtu okrągło-jajowatego. Ciemnozielona blaszka liściowa jest wycięta u szczytu lub tępo zakończona, błyszcząca o karbowano-piłkowanym brzegu. Posiada silnie uwytłonięte unerwienie [223].

S. lapponum L. (syn. *S. marrubifolia* Tausch ex Andersson [83]) – **Wierzba lapońska**. Gatunek podlega w Polsce ścisłej ochronie stanowiąc relikwyt polodowcowy. Znane są stanowiska w Sudetach oraz na Wyżynie Lubelskiej [223]. Jest krzewem osiagającym 2 m wysokości. Młode pędy są jedwabisto owłosione, starsze nagie i czerwono-brunatne. Eliptyczno-podługowate liście z wierzchu są szaro-zielone, zazwyczaj kutnerowato owłosione [193,223].

S. matsudana Koidz. ‘Tortuosa’ – **Wierzba mandzurska, odmiana pogięta**. Występuje we wschodniej Azji, odmiana jest znana tylko w uprawie. Roślina stanowi drzewko o pokroju początkowo wąskim i wyprostowanych gałęziach. Starsze okazy mają zaokrąglone korony. Pędy są falisto powyginane i poskręcane [207].

S. melanostachys Mak. Jest to rozłożysty krzew uprawiany w Polsce, jako ozdobny. Łukowato wygięte pędy są w młodym wieku pokryte jedwabistymi włoskami. Owalne, owłosione liście w miarę wzrostu stają się błyszczące. Brzeg blaszki liściowej jest cały lub drobno piłkowany. Gatunek wyróżnia się czarnym zabarwieniem męskich kotków [19,81].

S. purpurea L. (syn. *S. helix* [184]) – **Wierzba purpurowa** (wiklina). Gatunek jest krzewem dorastającym do 6 m wysokości. Młode pędy są nagie i połyskujące, purpurowo lub żółto zabarwione. Kora od strony wewnętrznej jest cytrynowożółta. Łopatkowato-lancetowate liście są często ułożone naprzeciwlegle. Blaszka liściowa jest ciemnozielona na górnej stronie, natomiast sinawozielona na dolnej stronie. Brzeg blaszki jest dołem cały, a górą piłkowany. Młode liście na końcach pędów są zwykle czerwono-brązowe [21,193,207,223].

S. rosmarinifolia L. (syn *S. repens* ssp. *rosmarinifolia* (L.) Čelak) – **Wierzba rokita**. Gatunek jest niskim krzewem z podziemnym pędem i cienkimi łukowato wznoszącymi się gałązkami. Okrągławe, krótkoogonkowe liście posiadają podwinięty, cały lub odlegle piłkowany brzeg. Młode liście i gałązki są z obu stron jedwabisto owłosione. Strona dolna starszych liści jest srebrzyście owłosiona. Nerw główny wystaje z powierzchni liścia. Przylistki są drobne, lancetowate i nietrwałe [21,193,207,223].

S. sachalinensis Fr. Schmidt 'Sekka' – **Wierzba sachalińska odmiana staśmiona**. W Polsce uprawiana, jako roślina ozdobna. Jest to wysoki krzew (10-15 m) o purpurowych pędach, których szczyty są płaskie (staśmione) lub skrzycone. Posiada ułożone skrzytolegle, lancetowate liście. Ciemnozielona blaszka liściowa jest naga o ząbkowanym brzegu [91].

S. × sepulcralis Simonk. – **Wierzba żałobna**. Roślina sadzona w ogrodach i parkach jest mieszańcem *S. alba* i *S. babylonica*. Giętkie i zwisające ku ziemi pędy o żółtym zabarwieniu tworzą szeroką koronę. Liście są krótkoogonkowe, węższe niż u wierzby białej, klinowate u nasady o drobno piłkowanym brzegu [85,207].

S. silesiaca Willd. – **Wierzba śląska**. Gatunek stanowi krzew o rocznych pędach czerwono-żółto zabarwionych i słabo owłosionych, które w miarę wzrostu brunatnieją i tracą owłosienie. Liście posiadają jajowaty kształt i karbowano-piłkowany brzeg. Młode liście są czerwone, później stają się ciemnozielone. Blaszka liściowa jest naga. Jedynie wystające nerwy na dolnej stronie liścia bywają owłosione [81,223].

***S. triandra* L. – Wierzba trójpręcikowa.** Gatunek stanowi krzew lub drzewo o wysokości do 10 m. Gałązki są nagie, oliwkowo-brunatne i łamliwe u nasady. Kora na pniu i grubszych gałęziach łuszczy się nieregularnymi, szarymi płatami jak u platana, odsłaniając wewnętrzną, cynobrową powierzchnię. Odwrotnie lancetowate liście są ciemnozielone i połyskujące z wierzchu. Blaszka liściowa posiada gruczołowato piłkowany brzeg i ostro zakończony szczyt [21,193,207,223].

***S. viminalis* L. – Wierzba wiciowa** (witwa, konopianka). Gatunek jest krzewem dorastającym do 10 m wysokości lub rzadziej drzewem. Gałęzie są szare lub żółto-zielone, częściowo owłosione. Posiada krótkoogonkowe, równowąskie liście. Brzeg blaszki liściowej jest podwinięty, cały lub falisto-ząbkowany. Z wierzchu liście są matowe i ciemnozielone. Natomiast dolna strona liścia jest gęsto, jedwabiście owłosiona i połyskująca [21,193,207,223].

***S. nakamura* var. *yezoalpina* Koidz.** Roślina jest rozłożystym, niskim krzewem porastającym zbocza gór japońskiej wyspy Hokkaido. W Polsce uprawiana w skalnych ogródkach. Owalne liście są jedwabiste wiosną, jesienią zmieniają barwę z ciemnozielonej na jasnożółtą. Posiada grube, mahoniowe pędy [82].

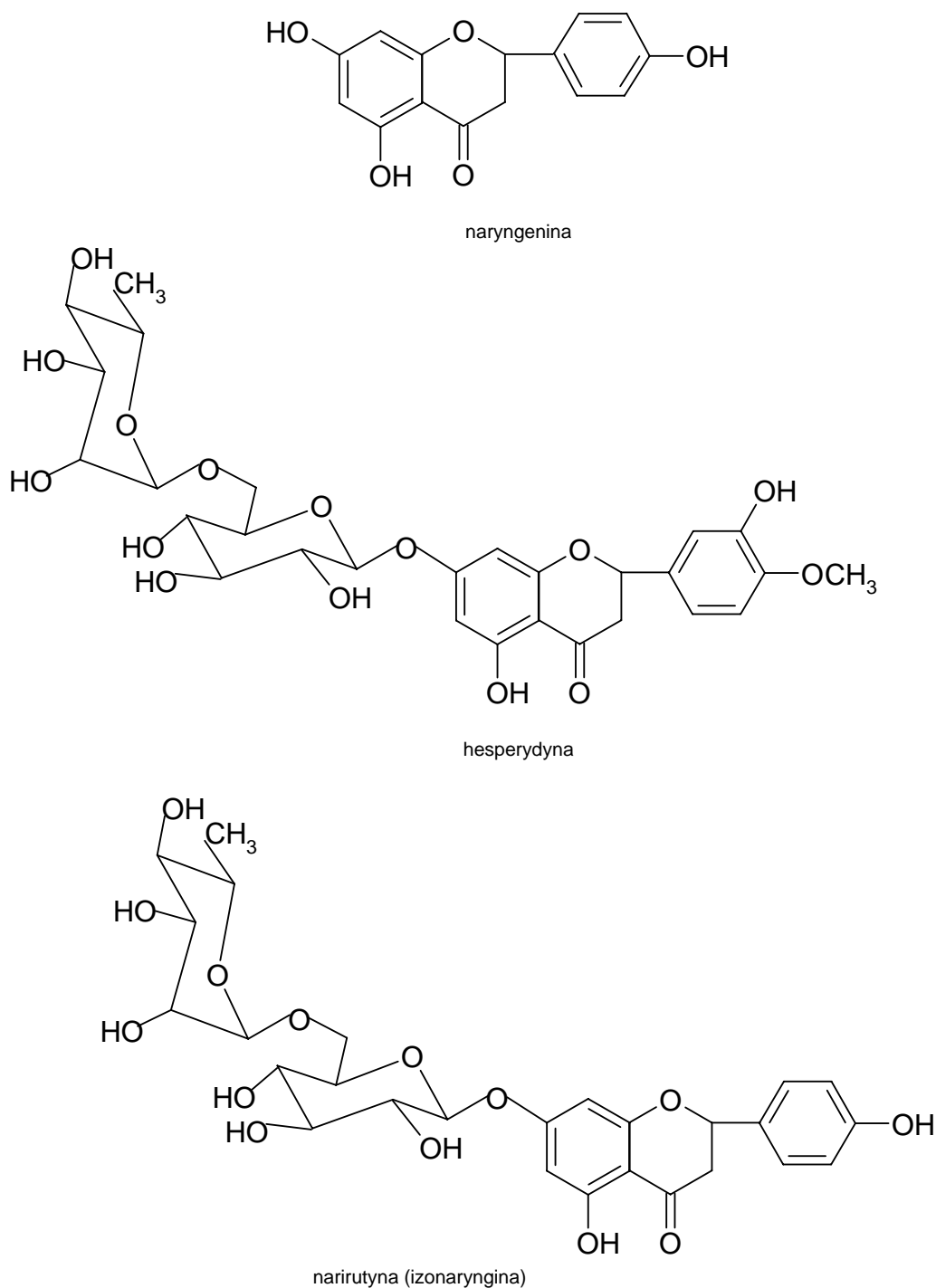
2. Naryngenina i jej pochodne – flawanony o wielokierunkowej aktywności farmakologicznej.

Flawanony należą do grupy związków flawonoidowych rzadko spotykanych w świecie roślinnym, stanowiących jednocześnie składniki codziennej diety człowieka (naryngenina i jej pochodne) oraz leczniczych surowców roślinnych (kora wierzby – *Salicis cortex*). Dotychczas na tle innych połączeń flawonoidowych – flawonoli oraz flawonów, aktywność farmakologiczna flawanonów pozostawała w dużym stopniu nieznana. Badania ostatnich lat, szczególnie naryngeniny i jej pochodnych, przyniosły wiele interesujących wyników oraz wskazały na nowe możliwości zastosowania w leczeniu pojedynczych, izolowanych związków bądź zawierających je surowców roślinnych.

Naryngenina (5,7,4'-trihydroksyflawanon) (Ryc. 1) jest aglikonem – pochodną uwodornionego flawonu, nie zawierającego podwójnego wiązania między atomami węgla C-2 i C-3 (flawanon). Większość flawanonowych połączeń glikozydowych w świecie roślinnym stanowią O-glikozydy obok rzadko spotykanych form C-glikozydowych [95]. Dotychczas wyodrębniono i zidentyfikowano około 100 struktur aglikonów oraz 350 glikozydów flawanonowych, w tym 5 związków o charakterze C-glikozydów. Flawanony występują zazwyczaj w formie rutynozydów z fragmentem cukrowym przyłączonym w pozycji C-7 [234]. W przyrodzie bogatym źródłem flawanonów są owoce cytrusowe, przede wszystkim pomarańcze (*Citrus sinensis*) i mandarynki (*Citrus reticulata*) zawierające narirutynę (7-O-rutynozyd 5,7,4'-trihydroksyflawanonu) (Ryc. 1) i hesperydynę (7-O-rutynozyd 5,7,3'-trihydroksy-4'-metoksyflawanonu – hesperetyny) (Ryc. 1) [49,234].

Narirutyna i naryngina nadająca gorzki smak owocom, są obecne w grejpfrutach (*Citrus paradisi*) (20% i 70%, odpowiednio) [49]. Niewielkie stężenia naryngeniny wykryto w pomidorze i jego przetworach [49]. Prenylowe pochodne flawanonowe w formie wolnych aglikonów występują w gatunkach rodzin *Moraceae*, *Leguminosae*, *Asteraceae* i *Cannabaceae*, m.in. 6- i 8-prenylonaryngeninę (6-PN i 8-PN) zidentyfikowano obok izoksantohumolu i chalkonu ksantohumolu w szyszkach chmielu (*Humulus lupulus*) oraz w piwie [234].

Do kierunków aktywności farmakologicznej naryngeniny i jej pochodnych należą: działanie estrogenne [39,49,132,152,215,236,255-257], obniżające poziom cholesterolu [18,49,133,198], przeciwzapalne [49], przeciwwrzodowe [7,143,211], rozkurczowe [65,172], ochronne na skórę [14,197] i przeciwnowotworowe [215,236].



Ryc. 1. Wzory strukturalne flawanonów.

2.1. Działanie estrogenopodobne.

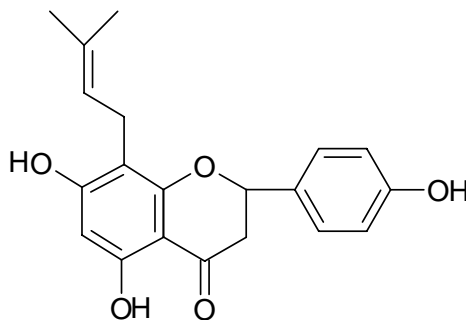
Estrogeny pełnią funkcję regulacyjną w obrębie układu krwionośnego, nerwowego i kostnego oraz układu moczowo-płciowego – męskich i żeńskich organów rozrodczych [39]. W lecznictwie są stosowane w zapobieganiu i łagodzeniu symptomów przekwitania oraz w antykoncepcji [39]. Posiadają one korzystny wpływ w leczeniu osteoporozy i chorób układu sercowo-naczyniowego [39]. Efektem ubocznym terapii estrogenami jest stymulacja zmian nowotworowych m.in. rozwój nowotworu piersi [39].

Fitoestrogeny to polifenolowe, niesteroidowe związki roślinne wiążące się z receptorami estrogenowymi (ERs) o działaniu podobnym do fizjologicznych estrogenów [39]. Liczne doniesienia naukowe, podkreślają znaczenie diety bogatej w fitoestrogeny, głównie obecne w soi, jako czynnik zmniejszający ryzyko rozwoju raka prostaty, okrężnicy oraz schorzeń układu sercowo-naczyniowego [39]. Z drugiej strony należy brać pod uwagę potencjalne ryzyko „spożycia” znacznych ilości tych związków, jako składników żywności.

Mechanizm działania fitoestrogenów opiera się na wiązaniu receptorów estrogenowych dwóch typów: ER α i ER β . Receptor ER α wykazuje wysoką ekspresję w macicy, oraz w jądrach, jajnikach i nerkach, podczas gdy ER β głównie w prostatie oraz w macicy, jajnikach, jądrach, kościach, płucach i mózgu [39]. Jednocześnie fitoestrogeny oddziałują na enzymy uczestniczące w biosyntezie estrogenów [39]. Fitoestrogeny, podobnie jak leki syntetyczne, będąc selektywnymi modulatorami ER (SERMs), mogą pełnić funkcje agonistów lub antagonistów receptorów estrogenowych w zależności od izoformy receptora. Do grupy roślinnych estrogenów są zaliczane izoflawonoidy – kumestrol, genisteina, ekwol, daidzeina, biochanina A, flawanony pochodne naryngeniny oraz stilbeny i lignany [39]. Stwierdzono, że naryngenina wywiera działanie antyestrogenne w obecności receptorów ER α , natomiast w obecności receptorów ER β wykazuje działanie podobne do 17 β -estradiolu [236].

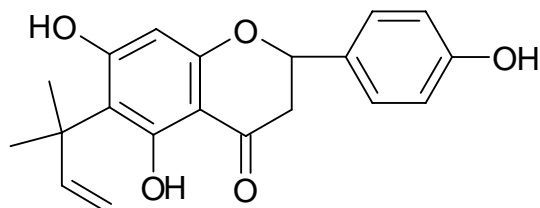
Naryngenina w mniejszym stopniu niż 4,4'-dihydroksychalkon, genisteina i izolikwirytygenina współzawodniczy z 17 β -estradiolem o wiązanie z receptorem estrogenowym w komórkach COS-7 [152]. Aktywność estrogenową flawonoidowych związków naturalnych opisano w następującej kolejności: 17 β -estradiol >> 4,4'-dihydroksychalkon = izolikwirytygenina = genisteina > floretyna = 4',7-dihydroksyflawanon = naryngenina = apigenina. Siła oddziaływania z receptorem zwiększa się ze wzrostem stężenia analizowanych związków. Działanie estrogenopodobne naryngeniny jest 10³ – 10⁴ – krotnie słabsze niż 17 β -estradiolu [152].

Wysocze aktywnym fitoestrogenem w warunkach *in vitro* jest 8-prenylonaryngenina (8-PN) (Ryc. 2) występująca w drewnie *Anaxagorea luzonensis* oraz w szyszkach chmielu i w piwie [255].



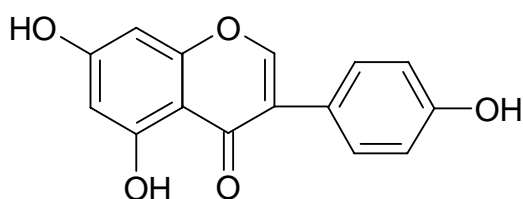
Ryc. 2. Wzór strukturalny 8-prenylonaryngeniny (8-PN).

Zbliżoną aktywnością do 8-PN charakteryzuje się 6-(1,1-dimetyloallilo)-naryngenina (6-DMAN) (Ryc. 3) z liści afrykańskiego drzewa *Monotes engleri*.



Ryc. 3. Wzór strukturalny 6-(1,1-dimetyloallilo)-naryngeniny (6-DMAN).

Powinowactwo 8-prenylnaryngeniny do receptorów ER α i ER β jest większe niż w przypadku uznanych za najbardziej aktywne izoflawonoidów: kumestrolu i genisteiny (Ryc. 4) [154]. Zmiana położenia podstawnika prenylowego z pozycji C-8 na C-6 powoduje zanik aktywności estrogennej. Dla obydwu prenylowych pochodnych naryngeniny wykazano *in vitro* działanie przeciwnowotworowe poprzez wpływ na kompleks białek adhezyjnych E-kadheryny/kateniny, odkrycie to wymaga dalszych badań w warunkach *in vivo*.



Ryc. 4. Wzór strukturalny genisteiny.

Aktywność pochodnych naryngeniny badano w modelu receptora estrogenowego w komórkach drożdży oraz na linii komórek MVLN – ER α -pozytywne komórki ludzkiego nowotworu piersi MCF-7 [255]. 8-prenylnaryngenina i 6-DMAN w eksperymencie z użyciem komórek MVLN, były aktywne w stężeniach 5×10^{-6} i 10^{-6} M odpowiednio, w porównaniu do estradiolu aktywnego w stężeniu 10^{-8} M. W innych badaniach na komórkach MVLN, 6-DMAN ujawniła nieznacznie silniejszy efekt od genisteiny i 8-prenylnaryngeniny [256]. Na linii komórek raka piersi (MCF-7) wykazano, że aktywność estrogenna 8-prenylnaryngeniny była 25 razy wyższa od aktywności izoflawonu – genisteiny [120]. Podobnie, w eksperymentach na receptorze ER β w drożdżach, 8-prenylnaryngenina charakteryzowała się silniejszą aktywnością estrogenową w porównaniu do 6-DMAN i genisteiny [153].

Estrogeny są odpowiedzialne za rozwój raka piersi [132]. Hamowanie aromatazy i dehydrogenazy 17 β -hydroksysteroidowej (17 β -HSD) – enzymów uczestniczących w biosyntezie hormonów steroidowych może zmniejszać ryzyko wystąpienia nowotworu [132]. Naryngenina oraz 4-hydroksychalkon najsilniej spośród testowanych flawanonów (7-hydroksyflawanon, eriodykcjol, hesperetyna) i chalkonów (2'-hydroksychalkon, 4'-hydroksychalkon, 2',4'-dihydroksychalkon, 2',4-dihydroksychalkon, floretyna, 2'-hydroksy-4'-metoksychalkon, pinostrobin, izolikwirytygenina, chalkon naryngeniny, chalkon eriodykcjolu, chalkon hesperetyny) hamowały aktywność aromatazy i dehydrogenazy 17 β -hydroksysteroidowej (17 β -HSD) [132]. Wykazano, że naryngenina, w stężeniu 50 μ M hamuje aktywność aromatazy w ponad 90%, natomiast dehydrogenazy 17 β -hydroksysteroidowej w 76,5% [132].

8-prenylnaryngeninę, 6-DMAN i naryngeninę badano pod kątem aktywności antyandrogennej w modelu receptora androgenowego w komórkach drożdży i analizę specyficznego antygenu prostaty (*Prostate Specific Antigen* – PSA) [257]. 6-DMAN i 8-PN hamowały aktywność dihydrotestosteronu, natomiast naryngenina nie wykazała aktywności antyandrogennej. 6-DMAN hamowała powstawanie PSA, jakkolwiek związek okazał się mniej aktywny od bikalutamidu – antyandrogenu stosowanego w leczeniu raka prostaty. Eksperyment wykazał, że efekt antyandrogenny związków jest niezależny od aktywności estrogenowej [257].

Wpływ flawanonów na receptory estrogenowe oraz ich aktywność pro- i antynowotworową nie zostały jeszcze dokładnie zbadane i są one w ostatnich latach obiektem szczególnego zainteresowania naukowców.

Naryngenina wykazuje działanie antyproliferacyjne wobec szeregu linii ludzkich nowotworów m. in. MCF-7. W jego mechanizmie wymienia się m. in. stymulację aktywacji p38/MAPK prowadzącą do aktywacji proapoptotycznej kaspazy 3 [236] i hamowanie stymulowanego insuliną wychwyty glukozy (o około 25%) [236]. Należy podkreślić, że hamowanie wychwyty glukozy występuje w stężeniach naryngeniny osiągniętych w warunkach fizjologicznych – 10 μ M, co wskazuje na potencjalne znaczenie terapeutyczne związku [236].

Aktywność przeciwnowotworową naryngeniny oceniano w modelu chemicznie indukowanego 7,12-dimetylobenz[a]antracem (DMBA) raka piersi u szczurów [215]. W eksperymencie jednej grupie szczurów podawano sok grejpfrutowy, a drugiej naryngeninę w stężeniu porównywalnym do zawartego w soku z grejpfruta. W obu przypadkach odnotowano spowolnienie rozwoju zmian nowotworowych.

2.2. Działanie obniżające poziom cholesterolu oraz przeciwmiażdżycowe.

Naryngenina silniej obniża poziom cholesterolu całkowitego oraz słabiej poziom frakcji HDL (*High-Density Lipoprotein*) w porównaniu z rutyną i kwasem nikotynowym, stosowanym jako lek przeciwmiażdżycowy [198]. Obserwowano w badaniach na królikach z dietą bogatą w cholesterol, że podawanie naryngeniny powoduje spadek poziomu LDL (*Low-Density Lipoprotein*) w osoczu i cholesterolu w wątrobie [49]. W przypadku TAG (triacyloglicerole), naryngenina obniża ich poziom porównywalnie z kwasem nikotynowym [198]. W warunkach *in vitro* z użyciem testu TBARS wykazano, że naryngenina w stężeniu 25 μM wywiera efekt protleniający w oksydacji LDL w środowisku siarczanu miedzi. Natomiast jej prenylowe pochodne (6-PN i 8-PN), obecne w chmielu i piwie, ujawniły właściwości antyoksydacyjne.

Nadprodukcja w wątrobie apolipoprotein (apoB-Lp) stanowi podłoże szeregu hiperlipoproteinemii, włączając hiperlipidemię oraz hipercholesterolemię, prowadząc w rezultacie do zmian miażdżycowych w obrębie naczyń obwodowych i mózgowych. Naryngenina w stężeniu 200 μM zmniejsza wydzielanie o około 52% apolipoproteiny (apoB) i selektywnie zwiększa jej degradację w hepatocytach [18]. Badania przeprowadzone na linii komórek nowotworu wątroby HepG2 wykazały, że hamowanie wydzielania apoB jest spowodowane zmniejszeniem gromadzenia triglicerydów w siateczce endoplazmatycznej w wyniku inhibicji MTP (białko transportujące mikrosomalne triglicerydy) [18]. Ponadto naryngenina hamuje syntezę estrów cholesterolu poprzez inhibicję ekspresji i aktywności acylotransferazy cholesterolu (ACAT), enzymu katalizującego jego estryfikację [49].

Naryngenina wykazuje również działanie antyagregacyjne w wyniku hamowania fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów w płytkach krwi, dzięki czemu zapobiega miażdżycy [18].

Jedną z przyczyn hipercholesterolemii jest brak równowagi pomiędzy produkcją wolnych rodników, a działaniem mechanizmów ochronnych [133]. Zarówno erytrocyty jak i wątroba posiadają enzymy o właściwościach antyoksydacyjnych, są to katalaza i dysmutaza nadtlenkowa. Katalaza jest jednym z najważniejszych enzymów uczestniczących w przemianach H_2O_2 , który chroni erytrocyty przed reaktywnymi formami tlenu. Enzymem o podobnym działaniu jest paraoksonaza osoczowa, związana z HDL, hydrolizująca nadtlenki lipidów. Inne enzymy, jak glutation (GSH) chronią komórki przez toksycznymi związkami chemicznymi pochodzenia egzo- i endogenego [133].

Przeciwmiażdżycowe właściwości naryngeniny i jej eteru 7-O-acetylowego badano na szczurach karmionych przez 6 tygodni pożywieniem wzbogaconym w cholesterol obserwując zmiany aktywności enzymów: katalazy i dysmutazy nadtlenkowej, paraoksonazy

osoczowej i peroksydazy glutationu [133]. Naryngenina oraz w większym stopniu jej eter hamowały w wątrobie oraz zwiększały w erytrocytach aktywność katalazy i dysmutazy nadtlenkowej, powodując obniżenie poziomu anionów nadtlenkowych. Odnotowano podwyższoną aktywność paraoksonazy osoczowej w stosunku do grupy kontrolnej. Obydwa związki obniżały aktywność peroksydazy glutationu, zwiększając poziom glutationu w wątrobie. Naryngenina i jej eterowa pochodna znacząco zmniejszały poziom produktów peroksydacji lipidów w osoczu [133]. Hamowanie utleniania lipidów blokuje powstawanie komórek piankowatych, dzięki czemu spada ryzyko wystąpienia miażdżycy [133].

2.3. Działanie wazorelaksacyjne i przeciwskurczowe.

Naryngenina w porównaniu do chryzyny, wykazuje słabsze działanie hamujące skurcze jelit, ze względu na brak podwójnego wiązania między węglami C-2 i C-3 [65]. Obecność grup -OH w pozycjach C-5 i C-7 flawanonu powoduje wzrost siły działania przeciwskurczowego. Przypuszcza się, że mechanizm przeciwskurczowej aktywności flawanonów polega na wzroście akumulacji cyklicznych nukleotydów np. cAMP i hamowaniu skurczu [65]. cAMP jest substratem dla enzymu fosfodiesterazy, którego inhibitorami są flawonoidy [65]. Wykazano zależność pomiędzy stopniem hamowania skurczów izolowanej szczurzej aorty a zdolnością hamowania fosfodiesterazy. Z uwagi na fakt, że aktywność enzymu jest regulowana przez białko kalmodulinę uważa się, że flawonoidy wiążąc kalmodulinę unieczynniają ją [65]. Wśród innych potencjalnych mechanizmów działania przeciwskurczowego flawonoidów opisywane jest indukowanie syntezy tlenu azotu i nitratów w różnych tkankach, np. w mięśniach gładkich żołądka i stymulacja relaksacji jako wynik zmiatania anionów nadtlenkowych [65].

Badania potwierdziły wazorelaksacyjne i hamujące fosfodiesterazę cyklicznych nukleotydów właściwości naryngeniny [172]. Związek powoduje relaksację skurczów aorty szczura, wywołanych fenylefryną lub wysokimi stężeniami pozakomórkowego KCl. Nie wpływając na podstawowy wychwyt jonów Ca^{2+} , zmniejsza ich napływ stymulowany fenylefryną i KCl do pozbawionej endotelium aorty. Naryngenina znacznie zwiększa w miocytach aorty produkcję cGMP i cAMP hamowaną przez fenylefrynę i wysokie stężenie KCl [172]. Wykazuje także działanie hamujące fosfodiesterazę cyklicznych nukleotydów (PDE1, PDE4 i PDE5) w izolowanej aorcie wołowej [172].

2.4. Działanie ochronne na skórę.

Bonina i wsp. [14] udowodnili w warunkach *in vitro* ochronne działanie na skórę kwercetyny, hesperetyny i naryngeniny przed promieniowaniem UV. Mechanizm procesu

obejmuje hamowanie utleniania fosfatydylocholiny w błonach liposomów i zmniejszenie produkcji dialdehydu malonowego (MDA). Flawonoidy obniżały ilość MDA w zależności od zastosowanego stężenia, a efektywność ich działania malała w kolejności: kwercetyna > hesperetyna > naryngenina. Aktywność ochronna flawonoidów wynika z ich zdolności zmiatania wolnych rodników. Kwercetyna wykazuje najsilniejsze działanie antyrodnikowe w przeciwieństwie do hesperetyny i naryngeniny. Cząsteczka kwercetyny działa jak ekran absorbujący promieniowanie UV, nie dopuszczając do powstawania wolnych rodników oraz reakcji łańcuchowych przez nie zapoczątkowywanych. Jednak strukturalnie odmienne hesperetyna i naryngenina wykazują słabsze działanie antyrodnikowe, ale ze względu na lepszą absorpcję i właściwość penetracji do głębszych warstw skóry stanowią bardziej korzystne składniki preparatów ochronnych [197].

2.5. Działanie przeciwwrzodowe.

Jednym z czynników wpływających na wydzielanie soku żołądkowego jest histamina [143]. Jej nadmierna produkcja i uwalnianie powoduje chorobę wrzodową [143]. Naryngenina posiada działanie przeciwhistaminowe, hamując dekarboksylazę histaminy i stabilizując mastocyty [143]. Badania przeprowadzone na szczurach wykazały, że zarówno naryngenina jak i kwercetyna znacznie zmniejszają stężenie histaminy w żołądku, nie obniżając kwaśności ani całkowitej ilości wydzielanego soku żołądkowego [143]. Obydwa flawonoidy hamują aktywność lipooksygenazy, co ogranicza powstawanie leukotrienów. Leukotrieny są czynnikami prozapalnymi i warunkują uwalnianie enzymów lizosomalnych oraz produkcję nadtlenków. Inhibitory lipooksygenazy mogą ułatwiać regenerację błony śluzowej poprzez aktywność antyrodnikową. Naryngenina i kwercetyna przyspieszają leczenie ostrych i przewlekłych owrzodzeń błony śluzowej u szczurów [143].

Bae i wsp. [7] wykazali, że naryngenina hamuje wzrost *Helicobacter pylori* i jest słabym inhibitorem enzymu bakteryjnego – ureazy [7]. Ureaza produkowana przez *H. pylori* hydrolizuje mocznik do CO₂ i NH₃, który alkalizuje środowisko żołądka i uszkadza jego błonę śluzową [211]. Późniejsze badania nie potwierdziły jednak wpływu naryngeniny na ureazę [211].

2.6. Właściwości przeciwutleniające.

Przypuszcza się, że mechanizm działania przeciwutleniającego flawonoidów opiera się m.in. na zdolności modyfikowania procesów błonowych w komórkach, w tym utleniania wolnorodnikowego lipidów błonowych. Proces ten jest związany również z właściwościami strukturalnymi cząsteczek, ich zdolnością do penetracji przez błony oraz powierzchniowym

oddziaływaniem z błonami [196]. Działanie ochronne flawonoidów w stosunku do lipidów błonowych polega na oddawaniu wodoru z grup hydroksylowych i „zmiataniu” wolnych rodników, głównie rodnika OH i O₂⁻ oraz rodnika alkoksyłowego. Siła efektu ochronnego zależy także od współczynnika dyfuzji związków do błon i ich orientacji w membranach. W oparciu o badania autooksydacji z użyciem testu TBARS (*Tiobarbituric Acid Reactive Substances Assay*) w homogenatach mózgowych szczurów, antyutleniające właściwości flawonoidów scharakteryzowano w kolejności: kwercetyna > rutyna >> hesperetyna > naryngenina. Z przeprowadzonych badań wynika, że rutyna, hesperetyna i naryngenina słabo przenikają przez błony biologiczne. W przypadku rutyny brak właściwości penetracji jest spowodowany obecnością w cząsteczce podstawnika cukrowego, który obniża rozpuszczalność w tłuszczach oraz decyduje o wielkości cząsteczki, co hamuje wnikanie do wnętrza błony. Kwercetyna najgłębiej penetruje błony biologiczne dzięki zdolności przybierania (w przeciwieństwie do hesperetyny i naryngeniny) płaskiej konformacji. Ustalono, że za właściwości antyoksydacyjne flawonoidów odpowiadają: (1) grupa katecholowa (ugrupowanie o-dihydroksy) w pierścieniu B, (2) podwójne wiązanie między węglami C-2 i C-3 oraz (3) obecność grup hydroksylowych w pozycjach C-7, C-5 i dodatkowo w pozycji C-3. Hesperetyna i naryngenina ze względu na brak podwójnego wiązania oraz obecność w naryngeninie tylko jednej grupy –OH, wykazują słabsze działanie [196].

Jednym z czynników katalizujących powstawanie wolnych rodników są jony Fe²⁺. W teście hamowania utleniania w obecności jonów Fe²⁺ sklasyfikowano aktywność antylipoperoksydacyjną badanych flawonoidów w kolejności: rutyna > hesperetyna > kwercetyna >> naryngenina [196].

Kolejnym mechanizmem przeciwutleniającego działania flawonoidów jest redukovanie lub chelatowanie metali, które generują wolne rodniki. Dla naryngeniny nie wykazano aktywności redukującej jony Fe³⁺ [156]. W wyniku prowadzonych badań nad zdolnością flawonoidów do redukovania jonów Cu²⁺ i Fe³⁺ ustalono, że zdolność do redukcji jonów Cu²⁺ wzrasta z ilością grup –OH w cząsteczce, natomiast działanie redukujące jony Fe³⁺ zależy od obecności w cząsteczce podwójnego wiązania pomiędzy C-2 i C-3 w połączeniu z grupą 4-okso oraz wynika z obecności grupy katecholowej w pierścieniu B w połączeniu z grupą hydroksylową przy C-3 [156]. Naryngenina zawierająca trzy grupy hydroksylowe redukuje jony Cu²⁺ silniej niż zawierające trzy grupy hydroksylowe apigenina i genisteina. Ponadto związek wykazuje wyższą aktywność niż flawonoidy posiadające cztery grupy –OH tj.: luteolina i kemferol.

Izoflawony i flawanony (w tym naryngenina) w przeciwieństwie do flawonów i flawonoli nie tworzą chelatów z Cu²⁺ i Fe³⁺ [156].

2.7. Działanie na CYP3A4.

Początkowo twierdzono, że naryngina i jej aglikon – naryngenina decydują o oddziaływaniu soku grejpfrutowego z cytochromem 3A4 [48]. W badaniach na ludziach naryngina i naryngenina podawane w ilościach porównywalnych do ich zawartości w soku grejpfrutowym nie hamowały aktywności CYP3A4. W późniejszych pracach wykazano, że występujące w soku grejpfrutowym w znacznie mniejszych ilościach furanokumaryny, dihydroksybergamotyna i bergapten, hamują aktywność CYP3A4 i wpływają na metabolizm leków oraz ich poziomy w surowicy krwi [77].

2.8. Działanie neuroprotektywne.

Naryngenina zmniejsza efekt neurotoksyczny indukowany peptydem β -amyloidowym (A β) [74]. A β pośredniczy w mechanizmie wolnorodnikowym, jednym z głównych przyczyn choroby Alzheimera, zwiększając produkcję wolnych rodników i peroksydację lipidów w komórkach nerwowych, co w konsekwencji powoduje ich apoptozę. Podawanie naryngeniny zapobiega generowaniu wolnych rodników przez A β . W badaniach na myszach z amnezją aktywowaną skopolaminą, naryngenina spowalniała proces zaniku pamięci [74].

2.9. Wpływ na ukrwienie siatkówki.

Naryngenina stymuluje ukrwienie siatkówki [31]. W przeprowadzonych na szczurach badaniach wykazano pozytywne efekty w rekonwalescencji siatkówki po wywołaniu stanu jej niedokrwienia [31]. Na królikach przeprowadzono podobny eksperyment, porównując działanie lecznicze flawonoidów różniących się liczbą grup hydroksylowych w cząsteczce (od 2 do 5) [182]. Stwierdzono, że związki posiadające 3 grupy hydroksylowe (np. naryngenina) najsilniej zwiększają ukrwienie gałki ocznej poprzez stymulację przepływu krwi w naczyniach krwionośnych. Związki z czterema grupami –OH wywołują pośredni efekt, natomiast związki z ilością grup –OH powyżej czterech i poniżej trzech są nieaktywne. Obecność rutynozy lub grup metoksyloowych w cząsteczce nie decyduje o efekcie leczniczym [182].

3. Proantocyjanidyny – składniki leków i żywności o cennych właściwościach farmakologicznych i biologicznych.

Proantocyjanidyny są szeroko rozpowszechnioną grupą związków fenolowych, występujących w roślinach – w liściach, zdrewniałych częściach roślin, oraz kwiatach i owocach [22]. Znanym i od lat stosowanym w leczeniu surowcem zawierającym proantocyjanidyny jest kwiatostan głogu (*Crataegi inflorescentia*, *Crataegus sp. Rosaceae*) [22,68]. W ostatnich latach prowadzono intensywne badania nad ekstraktem z kory sosny nadmorskiej *Pinus pinaster (Pinaceae)*, opatentowanym pod nazwą Pycnogenol, w którym zawartość proantocyjanidyn wynosi 85%. Posiada on m. in. silne właściwości przeciwutleniające [80,100,179].

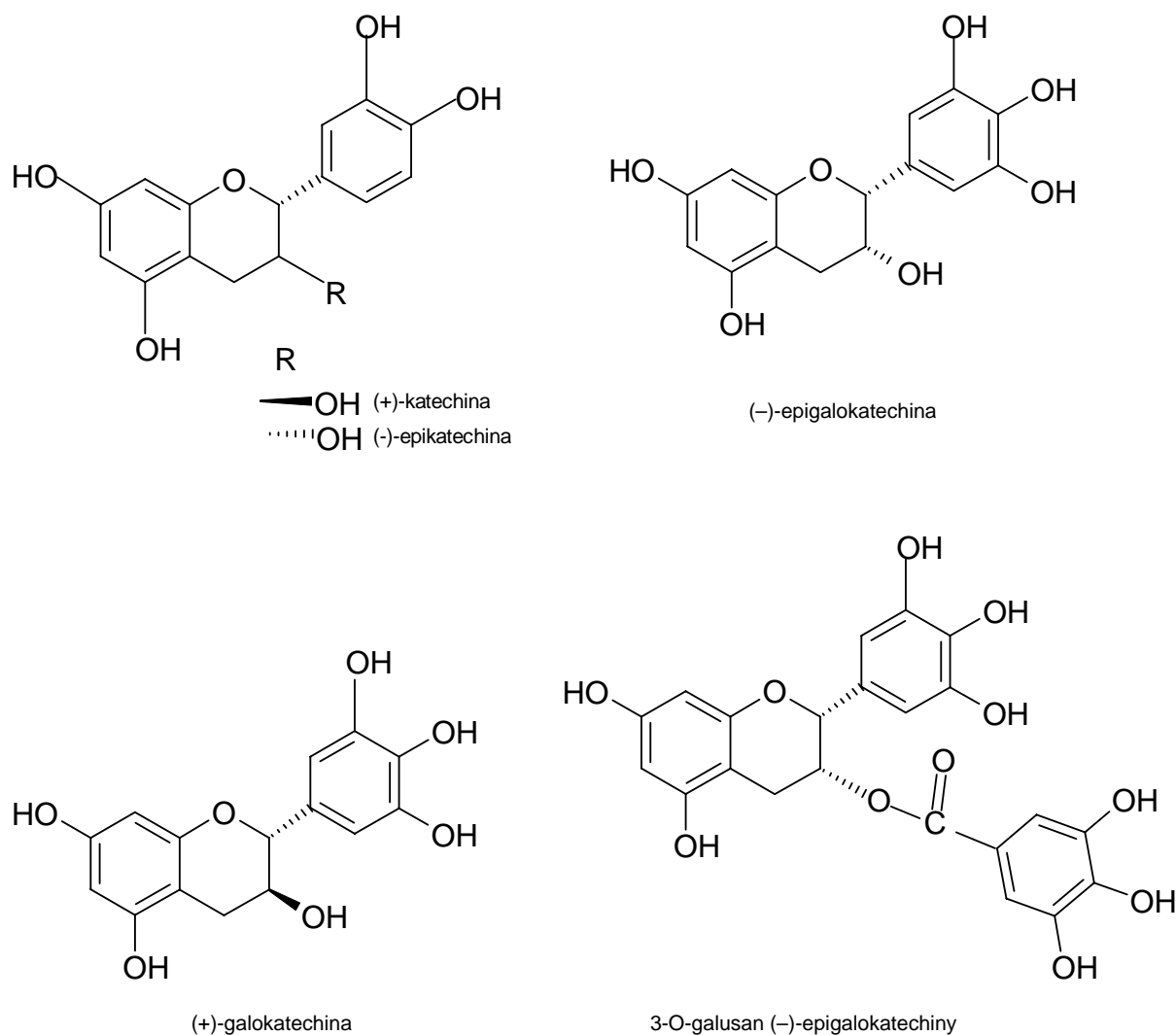
Proantocyjanidyny, zaliczane do skondensowanych tanin, stanowią polimery flawanów, w których jednostki monomerów są połączone wiązaniem C-C najczęściej w pozycjach 4→8 lub 4→6 [9,17,22,57,116]. Polimery trudno ulegają hydrolizie, jednak w środowisku kwaśnego alkoholu i w podwyższonej temperaturze, wytwarzają czerwony barwnik – antocyjanidynę, dlatego są zwane proantocyjanidynami [17].

Według Borkowskiego i wsp. [17] związki te nie są właściwymi garbnikami, ale posiadają nieco ściągający smak i lekko kwaśny odczyn [17].

Proantocyjanidyny tworzy elektrofilowa jednostka flawanylowa, powstająca z flawan-4-olu, lub flawan-3,4-diolu, połączona z nukleofilową jednostką flawanylową, którą zwykle jest flawan-3-ol [57,116]. Większość skondensowanych tanin budują jednostki katechiny i epikatechiny [17]. Katechina – 5,7,3',4'-tetrahydroksy-flawan-3-ol, mając dwa centra chiralne występuje w czterech formach optycznie czynnych oraz dwóch racemicznych. W przyrodzie spotykane są obok (+)-katechiny i jej izomeru (–)-epikatechiny (Ryc. 5), tworzących procyjanidyny [57], inne flawan-3-ole, mianowicie (+)-galokatechina (Ryc. 5), (–)-epigalokatechina (Ryc. 5), i galusan (–)-epigalokatechiny (Ryc. 5) [40].

Strukturalna różnorodność proantocyjanidyn jest możliwa dzięki obecności grup hydroksylowych i ich odmiennym położeniom w cząsteczce związku, stereoizomerii (proantocyjanidyny zawierają trzy centra chiralne) oraz lokalizacji wiązania międzyflawanolowego [43]. Ponadto struktury związków różnią się stopniem metylacji, C- i O-glikozydacji oraz estryfikacji w wyniku przyłączenia jednostki kwasu galusowego [116].

Skondensowane taniny występują w przyrodzie jako oligomery, zawierające od dwóch do dziesięciu jednostek katechiny (flawan-3-olu) oraz jako polimery [116].



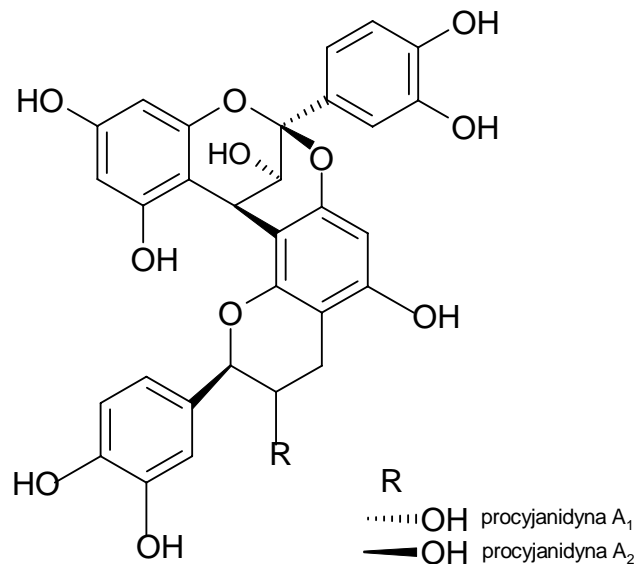
Ryc. 5. Wzory strukturalne monomerycznych flawan-3-oli.

W obrębie proantocyjanidyn, ze względu na różnice w położeniu grup hydroksylowych wyróżnia się:

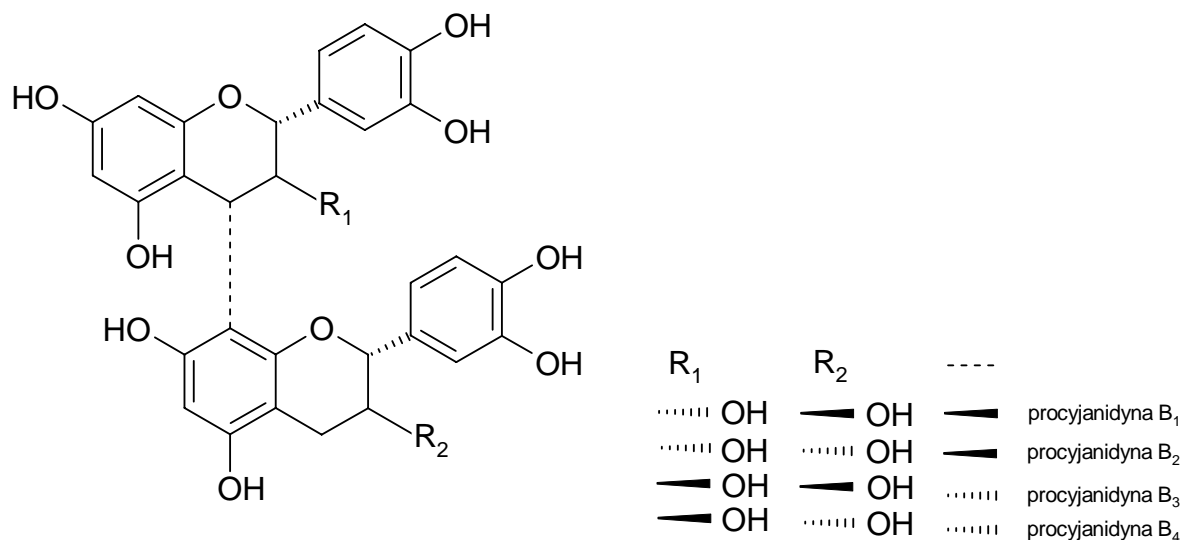
- procyanidyny (3, 5, 7, 3', 4' – OH),
- prodelfinidyny (3, 5, 7, 3', 4', 5' – OH),
- propelargonidyny (3, 5, 7, 4' – OH),
- profizetynidyny (3, 7, 3', 4' – OH),
- prorobinetynidyny (3, 7, 3', 4', 5' – OH),
- proguibourtynidyny (3, 7, 4' – OH),
- proterakacynidyny (3, 7, 8, 4' – OH),
- promelakacynidyny (3, 7, 8, 3', 4' – OH).

Spośród nich najpowszechniej w przyrodzie występują procyanidyny [57]. Ze względu na różnice w budowie oligomerów procyanidyn w obrębie grupy wyróżnia się dimery – typu A i B (Ryc. 6,7) oraz trimery - typu C (Ryc. 8).

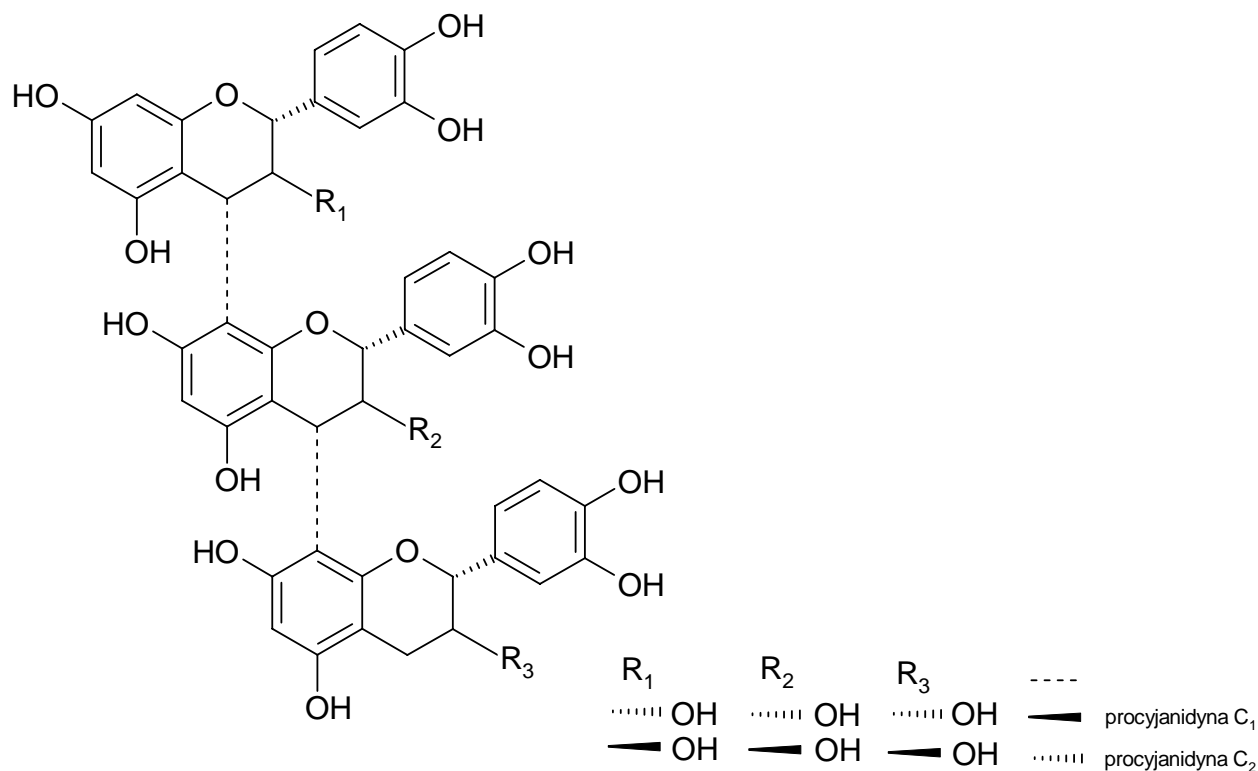
Typ B i C charakteryzuje obecność pojedynczych wiązań C-C pomiędzy C-4 jednostki flawan-3-olu I a C-6 lub C-8 jednostki monomeru II. Natomiast dimery procyanidyn typu A (Ryc. 6) posiadają dodatkowe wiązanie eterowe, pomiędzy C-2 jednostki I, a C-7-OH lub C-5-OH jednostki flawan-3-olu II [57,116].



Ryc. 6. Wzory strukturalne dimerycznych flawan-3-oli typu A.



Ryc. 7. Wzory strukturalne dimerycznych flawan-3-oli typu B.



Ryc. 8. Wzory strukturalne dimerycznych flawan-3-oli typu C.

3.1. Proantocyjanidyny jako składniki diety.

Skondensowane taniny występują w wielu produktach spożywczych. Przeprowadzone na populacji amerykańskiej badania wykazały, że główne źródło proantocyjanidyn w diecie stanowią jabłka (32%), czekolada (17,9%) i winogrona (17,8%) [64]. Ponadto jako produkty bogate w omawiane połączenia wymienia się czerwone wino, zieloną herbatę, niektóre piwa oraz gruszki, żurawiny, korę cynamonową i korzeń żeń-szenia [64,66,200]. W kwiatach głogu wykazano wysoką zawartość procyanidyn B₂ i C₁, w zbożu sorgowym procyanidyny B₁, w malinach B₄, zaś jabłka charakteryzują się znaczną zawartością dimeru – procyanidyny B₂ [40].

Ustalenie dziennego spożycia proantocyjanidyn sprawia wiele problemów. Zróżnicowane ilościowo pobieranie tych związków w obrębie populacji wynika z preferencji i nawyków żywieniowych [66]. W populacji amerykańskiej średnie dzienne spożycie proantocyjanidyn ustalono jako 57,7 mg na osobę [64].

Badania ujawniły, że dzieci w wieku od 2 do 5 lat oraz mężczyźni powyżej 60 roku życia spożywają średnio więcej proantocyjanidyn obecnych w owocach, niż pozostali członkowie społeczeństwa. U dzieci średnie spożycie proantocyjanidyn wynosiło 68,2 mg na dobę, natomiast u mężczyzn 70,8 mg na dobę. Ponadto wykazano, że proantocyjanidyny stanowią podstawową grupę bioflawonoidów w diecie obywateli USA oraz państw Europy Zachodniej [64].

Stwierdzono, że różnice w zawartości proantocyjanidyn w pożywieniu mogą wynikać z nierównej dystrybucji tych związków w tkankach roślinnych, sezonowych zmian zawartości w różnych częściach surowca, a także z zastosowanego w przetwórstwie procesu technologicznego [40].

Biodostępność i wchłanianie proantocyjanidyn to temat aktualnie badany i omawiany [40]. Wcześniej sądzono, że skondensowane tanoidy ze względu na wysoką masę cząsteczkową nie wchłaniają się z przewodu pokarmowego [40], jednak wyniki badań z ostatnich lat zmieniły ten pogląd.

Ustalono, że epikatechina jest wchłaniana jako produkt rozpadu procyjanidyn B₂ i B₅ [40]. Z kolei badania na szczurach dowiodły, że procyjanidyna B₂ jest w większości wchłaniana i wydalana z moczem, a tylko jej część jest degradowana do epikatechiny [6].

Badania *in vitro* wskazują, że zarówno dimery jak i trimery wchłaniają się z jelita cienkiego w stopniu porównywalnym do (+)-katechiny, w odróżnieniu od polimerów o średnim stopniu polimeryzacji, które nie są wchłaniane. Badania prowadzono na linii komórkowej *caco-2*, modelu komórek ludzkiego nabłonka jelitowego [40]. Dla potwierdzenia powyższych wyników brakuje prac na modelu *in vivo*.

Na podstawie badań na sześciu zdrowych ochotnikach wykazano, że obecne w kakao proantocyjanidyny są stabilne w soku żołądkowym i dostają się do jelita cienkiego nierozłożone [40].

W innych badaniach stwierdzono, że oligomery w środowisku soku żołądkowego ulegają zależnej od czasu, degradacji do mieszaniny monomerów oraz dimerów. Ponadto, związki o wyższym stopniu polimeryzacji szybciej ulegają rozpadowi [40]. Zakłada się, że degradacja proantocyjanidyn zachodzi pod wpływem fizjologicznej flory bakteryjnej okrężnicy [40]. Po 10 godzinach inkubacji w warunkach beztlenowych 50% omawianych związków ulegało degradacji pod wpływem bakterii, a znacząca większość po 48 godzinach inkubacji [40]. Jest to kolejny dowód na wchłanianie oligomerów w formie mono- i dimerów, pochodzących z rozpadu tych związków.

Oceniono, że po spożyciu czekolady wzrost stężenia epikatechiny we krwi osiąga maksimum po 2-3 godzinach [40].

3.2. Aktywność farmakologiczna proantocyjanidyn.

3.2.1. Wpływ proantocyjanidyn na układ krwionośny.

Wiele przeprowadzonych badań potwierdziło korzystne działanie proantocyjanidyn na układ krążenia. Wykazano aktywność przeciwmiażdżycową [40,189], obniżającą ciśnienie

tętnicze [40,80], zmniejszając przepuszczalność naczyń [100] oraz wskazano na efekt ochronny przed niedokrwieniem miejscowym mięśnia sercowego [199].

3.2.1.1. Aktywność przeciwmiażdżycowa.

Udowodniono zależność między zawartością polifenoli w diecie a zdolnością do hamowania peroksydacji lipidów [189]. Badania na zdrowych ochotnikach ujawniły, że dieta bogata w proantocyjanidyny (spożywanie takich produktów jak czekolada lub czerwone wino), zabezpiecza frakcję LDL przed oksydacją [189]. Efekt ten zmienia się w zależności od struktury proantocyjanidyn i maleje w kolejności: trimer $C_1 >$ dimer $B_2 >$ (+)-katechina $>$ (-)-epikatechina. Na siłę działania protekcyjnego wobec frakcji LDL wpływa liczba grup hydroksylowych, jak i stopień polimeryzacji [189].

Surowcem roślinnym, którego korzystne działanie na układ krwionośny wykorzystuje się od dawna jest kwiatostan głogu (*Crataegi inflorescentia*) [22]. Badania wykazały, że polifenole obecne w surowcu hamują Cu^{2+} zależną oksydację LDL. Najsilniejszą aktywnością charakteryzowała się (-)-epikatechina, słabszą procyjanidyny B_2 i B_5 , które były bardziej aktywne niż hyperozyd i kwercetyna [189].

Najwyższą zawartość proantocyjanidyn stwierdzono w kwiatach głogu. Przewyższa ona dwukrotnie ilość tych związków w szczytach pędów przy niewielkiej zawartości w owocach [189].

Z patogenezą miażdżycy związana jest również agregacja płytek krwi. Endotelium naczyń krwionośnych zapobiegając agregacji wydziela rodnik NO^\bullet i prostacyklinę jednak, gdy jest ono uszkodzone, odsłonięte zostają włókna kolagenu, do których przyłączają się aktywowane płytki krwi [40]. W badaniach na ludziach wykazano hamujące działanie na aktywację płytek krwi bogatego w proantocyjanidyny ekstraktu z nasion kakaowca przez supresję ADP lub epinefryny. Jednocześnie udowodniono, że po spożyciu czekolady zawierającej proantocyjanidyny podwyższa się poziom prostacyklin i obniża się poziom leukotrienów we krwi [40].

3.2.1.2. Obniżenie ciśnienia tętniczego.

Proantocyjanidyny obniżają ciśnienie tętnicze przez efekt rozkurczający naczyń krwionośne oraz wpływ na układ renina-angiotensyna-aldosteron [40].

Pierwszy mechanizm jest związany ze wzrostem wydzielania NO^\bullet przez komórki śródbłonna w obecności proantocyjanidyn. NO^\bullet powstaje z L-argininy przy udziale syntetazy tlenu azotu NOS. Potwierdzono, że inhibicja NOS odwraca wazodylatacyjne działanie proantocyjanidyn [40].

W badaniach na grupie pacjentów z umiarkowanym nadciśnieniem, po 16 tygodniach stosowania Pycnogenolu, obserwowano znaczne obniżenie ciśnienia skurczowego i średnie ciśnienia rozkurczowego. Mechanizm działania ekstraktu powiązано z wpływem na powstawanie i uwalnianie NO[•] w mięśniówce naczyń [80]. Stymulacja wydzielania NO[•] zwiększa się ze wzrostem liczby jednostek kwasu galusowego oraz stopniem polimeryzacji proantocyjanidyn. Jest ona skorelowana z obecnością i liczbą jednostek epikatechiny w strukturze związku [40].

Inny mechanizm obniżania przez proantocyjanidyny ciśnienia tętniczego wynika z hamowania aktywności enzymu konwertazy angiotensynowej I (ACE), katalizującego przemianę angiotensyny I w angiotensynę II. Angiotensyna II jest hormonem silnie podwyższającym ciśnienie krwi [80]. Aktywność hamująca ACE rośnie wraz ze stopniem polimeryzacji proantocyjanidyn. Wykazano, że trimer C₁ jest prawie dwa razy bardziej aktywny od dimeru B₂ [40].

W warunkach *in vitro* analizowano inhibicję wiązania angiotensyny II z receptorem AT₁ w obecności skondensowanych tanin, która wzrastała ze stopniem polimeryzacji badanych związków, osiągając maksimum przy pentamerach i heksamerach [26].

3.2.1.3. Uszczelnianie naczyń krwionośnych.

Proantocyjanidyny wywierają znaczący wpływ na stan naczyń krwionośnych. Mechanizm działania opisano dla Pycnogenolu i obecnych w ekstrakcie flawan-3-oli. Związki te wiążą białka kolagenowe i elastylowe ścian naczyń w rezultacie wzmacniając je i uszczelniając. O trwałości wiązania białko-Pycnogenol świadczy duża termostabilność kompleksu, wykazana w badaniach *in vitro* [100]. Na tej drodze preparat zapobiega powstawaniu obrzęków i krwotoków u pacjentów z patologicznymi zmianami w budowie naczyń krwionośnych. W badaniach *in vivo* potwierdzono korzystny wpływ Pycnogenolu na poprawę struktury ścian naczyń tętniczych i żylnych [100]. Zadowalające wyniki uzyskano w leczeniu pacjentów z niewydolnością krążenia żylnego, zapaleniem żył, obrzękami kończyn i mikrokrwawieniami okołospojówkowymi, które często towarzyszą postępującej degeneracji ciała żółtego, jako wyniku retinopatii cukrzycowej [100].

3.2.1.4. Działanie chroniące przed miejscowym niedokrwieniem.

Badania prowadzone przez Sato i wsp. [199] wykazały, że po podawaniu szczurom w ciągu trzech tygodni, bogatego w proantocyjanidyny ekstraktu z pestek winogron, zmniejszały się uszkodzenia tkanek spowodowane miejscowym niedokrwieniem.

Przypuszcza się, że jednym z mechanizmów kardioprotekcyjnego działania proantocyjanidyn jest inhibicja czynników proapoptycznych *JNK-1* i *c-Jun* [199].

3.2.2. Działanie przeciwutleniające.

Procesy utleniania przebiegające w organizmach żywych są przyczyną wielu chorób. Wobec tego uwagę naukowców skupiają substancje mające właściwości przeciwutleniające [40].

Mechanizm aktywności antyoksydacyjnej proantocyjanidyn wynika z ich zdolności do:

- zmiatania wolnych rodników,
- chelatowania metali,
- inhibicji enzymów [40].

3.2.2.1. Zmiatanie wolnych rodników przez proantocyjanidyny.

De Bruyne i wsp. [42] oznaczali ilość powstających anionów nadtlennokowych w systemach enzymatycznych, jako rezultat zmiatania wolnych rodników przez badane związki. Porównując uzyskane wyniki ze strukturą chemiczną pochodnych flawan-3-olu stwierdzili, że grupy hydroksylowe w pierścieniu B proantocyjanidyn, a także nasycone wiązanie między węglami C₂ i C₃, grupa hydroksylowa przy węglu C₃ i brak karbonylu przy C₄, powodują wzrost zdolności do zmiatania wolnych rodników. Najbardziej aktywne były procyjanidyny B₂ i B₅, natomiast procyjanidyny B₃, B₄, B₆, B₈ były prawie trzy razy słabsze. Proantocyjanidyny typu A wykazywały znacznie niższą aktywność niż należące do typu B, podobnie jak dimery zbudowane z jednostek epikatechiny w porównaniu do zawierających katechinę. Trimery nie wykazywały wyższej aktywności od ich dimerycznych analogów [42]. W rezultacie stwierdzono, że to nie stopień polimeryzacji, lecz ilość grup hydroksylowych, jest odpowiedzialna za wzrost aktywności zmiatania wolnych rodników [42].

Shahat i wsp. [208], badając liście głogu *Crataegus sinaica* odnotowali, że wzrastająca ilość jednostek (-)epikatechiny w poszczególnych proantocyjanidynach nie wpływa na aktywność przeciwutleniającą wobec rodnika hydroksylowego. Wykazano, że procyjanidyna C₁ posiada wyższą aktywność niż B₂, a ta z kolei była bardziej aktywna niż (-)epikatechina [208].

Aktywność proantocyjanidyn, jako zmiataczy wolnych rodników oceniano w odniesieniu do troloksu, w tzw. próbie TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) [40]. Wykazano, że wprowadzenie fragmentu kwasu galusowego w pozycji C-3, znacząco zwiększa zdolność do zmiatania wolnych rodników, podczas gdy glikozydacja obniża tę aktywność. Odnosi się to zarówno do procyjanidyn, jak i do monomerycznych flawan-3-oli [40].

Wysoką aktywność zmiatania wolnych rodników wykazują ekstrakt z pestek winogron oraz Pycnogenol, będące bogatymi źródłami procyjanidyn [40,80,100,179]. Pycnogenol jest

uniwersalnym „zmiataczem” wolnych rodników tlenowych i azotowych oraz innych nadreaktywnych form typu ROS i RNS. Jest on mieszaniną oligomerów flawanolowych, spośród których działanie zmiatające wolne rodniki DDPH[•] i rodnik nadtlenkowy wykazano dla dimerów B₁ i B₂ oraz oligomerów procyjanidyn [100,179].

3.2.2.2. Chelatowanie metali.

Niewiele jest prac poświęconych zdolności proantocyjanidyn do chelatowania metali, o której decyduje obecność w cząsteczce pierścienia katecholowego B. W badaniach stabilności kompleksów glinu z proantocyjanidynami ujawniono, że aktywność chelatująca proantocyjanidyn rośnie ze wzrostem stopnia polimeryzacji [40].

Chelatowanie metali przez proantocyjanidyny, jak i inne polifenole obecne np. w herbacie może zmniejszać ich absorpcję z przewodu pokarmowego. Badania na szczurach pokazały, że herbata nie wpływa na wchłanianie żelaza z przewodu pokarmowego [40]. Stwierdzono również, że w populacjach krajów wysoko rozwiniętych konsumpcja herbaty nie wpływa na poziom żelaza w organizmie [40]. Jednak w odniesieniu do populacji charakteryzujących się niedoborem żelaza wydaje się, że istnieje związek między konsumpcją herbaty a słabym wchłanianiem tego pierwiastka [40]. Nie ma jednak w piśmiennictwie szczegółowych danych na ten temat.

3.2.2.3. Inhibicja enzymów.

Kolejnym mechanizmem działania przeciwutleniającego proantocyjanidyn jest inhibicja enzymów uczestniczących w procesie utleniania, m.in. syntetazy tlenu azotu (NOS).

W serii badań wykazano, że procyjanidyny B₂, B₄ i galusan (-)-epigalokatechiny są najaktywniejszymi inhibitorami NOS, podczas gdy procyjanidyna B₃, (+)-katechina oraz (-)-epikatechina są nieaktywne. Jako konsekwencję tego wniosku podano, że dimery posiadające (-)-epikatechinę jako końcową jednostkę strukturalną są silniejszymi inhibitorami NOS niż dimery mające w tym samym miejscu jednostkę (+)-katechiny [40].

3.2.2.4. Ochrona przed nadtlenkiem azotu.

Działanie nadtlenu azotu (ONOO⁻) na organizm polega na tym, że w nadmiernych ilościach razem z rodnikiem NO[•] mogą one być przyczyną chorób układu nerwowego, takich jak: zespół Parkinsona, płasawica Huntingtona i porażenie nerwowe [235]. Arteel i wsp. [5] badali wpływ proantocyjanidyn wyizolowanych z *Theobroma cacao* na zależną od ONOO⁻ oksydację dihydrorodaminy oraz nitrację tyrozyny. Testowano związki od monomerów do nanomerów proantocyjanidyn. Oligomery wykazywały wyższą aktywność protekcyjną

przed ONOO⁻ niż (-)-epikatechina. Najaktywniejsze spośród wszystkich badanych związków były tetramery [5].

Przypuszcza się, że proantocyjanidyny nie reagują bezpośrednio z ONOO⁻, lecz najprawdopodobniej z utleniającymi i azotującymi związkami pośrednimi [4].

3.2.3. Działanie przeciwnowotworowe.

Według danych statystycznych choroby nowotworowe obok chorób układu krążenia stanowią główną przyczynę zgonów. Rocznie na świecie odnotowuje się ok. 10 mln zachorowań na nowotwory i w ciągu najbliższych 20 lat przewiduje się podwojenie tej liczby [183].

Wyniki badań [29,40,248] potwierdzają protekcyjne działanie proantocyjanidyn procesów flawan-3-oli wobec procesów prowadzących do powstawania nowotworów. Opiera się ono na regulacji apoptozy, działaniu przeciwtleniającym, przeciwmutagennym, zdolności hamowania aktywności naskórkowej dekarboksylazy ornityny (ODC) i produkcji wodorotlenku HPx [40]. Pozwala to przypuszczać, że przyjmowanie proantocyjanidyn w odpowiednich ilościach, m. in. jako składników pożywienia, może znacznie zmniejszyć ryzyko zapadania na nowotwory.

Jedną z możliwości hamowania wzrostu tkanki nowotworowej jest apoptoza promowana, m.in. przez geny: *Bax*, *Bcl-xs*, *p53* i charakteryzująca się w przeciwieństwie do nekrozy kondensacją chromatyny i powstaniem tzw. ciał apoptycznych [40].

Obserwowano, że hydrolizujące tanoidy wykazują wyższą aktywność w pobudzaniu apoptozy niż proantocyjanidyny [40]. Galusan (-)-epigalokatechiny indukuje apoptozę komórek nowotworowych przez wzmacnianie ekspresji genów *c-fos* i *c-myc* w przekształconych wirusowo ludzkich fibroblastach SV40 [30].

Badania na ludzkich keratynocytach poddanych działaniu ekstraktu z tabaki (*smokeless tobacco extract* – *STE*) wskazują na zależną od czasu i dawki produkcję wolnych rodników, peroksydację lipidów, uszkodzenie sekwencji DNA i apoptozę komórek [8]. Bogaty w proantocyjanidyny ekstrakt z pestek winogron wykazuje silniejsze niż witamina C i E działanie protekcyjne przeciwko indukowanemu *STE* stresowi oksydacyjnemu. Komórki inkubowane z ekstraktem z pestek winogron powodują znaczący wzrost ekspresji genu *Bcl-2* mRNA oraz zahamowanie ekspresji genu *p53* [8]. Postawiono tezę, że ochronna aktywność ekstraktu z pestek winogron wobec zmian komórkowych indukowanych *STE* może być związana z modulacją genów regulatorowych *Bcl-2* i *p53*. Ekstrakt zwiększa również ekspresję genu *Bcl-x_L* w komórkach wątroby i zapobiega ich apoptozie powodowanej acetaminofenem [8].

Roztwór alkoholowy proantocyjanidyn z nasion kakaowca wywiera korzystny wpływ na mysie komórki trzustki, zapobiegając rozwojowi nowotworu tego narządu [248]. Jednocześnie *in vitro* i *in vivo* wykazuje silne właściwości przeciwmutagenne i antykancerogenne w odniesieniu do 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo{4,5-b}pirydyny. W badaniach prowadzonych na samicach szczurów nie potwierdzono natomiast działania hamującego karcynogenezę raka piersi [40].

Monomery, dimery i trimery procyjanidyn wyizolowane z kory daglezi zielonej (*Pseudotsuga menziesii*) są uważane za czynniki zapobiegające nowotworowi skóry [60]. Badania potwierdzające tę tezę Gali i wsp. [60] przeprowadzili na samicach myszy. Oceniono hamowanie przez proantocyjanidyny procesów biochemicznych powodowanych przez potencjalny promotor raka 12-O-tetradekanoilforbolu 13-octan (TPA). O powstawaniu raka skóry decydują trzy mechanizmy: wzbudzenie aktywności naskórkowej dekarboksylazy ornityny (ODC), stymulacja produkcji wodorotlenku (HPx) oraz wzrost syntezy DNA [60]. Miejscowa aplikacja proantocyjanidyn na ogolony mysi kark przed podaniem miejscowym TPA, hamowała aktywność naskórkowej dekarboksylazy ornityny (ODC). Inhibicja wzrastała ze stopniem polimeryzacji proantocyjanidyn (trimery > dimery > monomery). Katechina i epikatechina nie wykazywały aktywności w stosunku do produkcji wodorotlenku (HPx), podczas gdy dimery i trimery proantocyjanidyn hamowały produkcję tego związku w 40% [60]. Dekarboksylaza ornityny jest enzymem aktywnym w innych typach nowotworów, m. in. w nowotworze jelita grubego. Carnesecci i wsp. [29] wiążą z hamowaniem aktywności ODC działanie przeciwnowotworowe proantocyjanidyn wobec komórek rakowych odbyticy.

3.2.4. Działanie przeciwzapalne.

Mechanizm działania przeciwzapalnego proantocyjanidyn wynika z właściwości modulacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B oraz ich aktywności przeciwutleniającej [40]. Czynniki transkrypcyjne NF- κ B jest induktorem zapalnych cytokin i pełni podstawową rolę we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej oraz w przewlekłych stanach zapalnych, m. in. w zapaleniu stawów [40]. Na liniach komórkowych makrofagów mysich wykazano, że galusan (-)-epigalokatechiny przez blokowanie aktywności NF- κ B hamuje ekspresję czynnika martwicy guza – TNF- α . Po podaniu doustnym polifenoli z zielonej herbaty w dawce 0,5 g/kg m.c. obserwowano spadek poziomu TNF- α w surowicy krwi o około 80% w porównaniu z grupą kontrolną [40].

W modelach *in vivo* stanu zapalnego indukowanego olejem krotonowym obserwowano zmniejszenie obrzęku ucha u myszy oraz zmniejszenie obrzęku tylnych łap u szczurów po podaniu ekstraktu z kory *Pinus pinaster* (Pycnogenol). Najlepsze rezultaty uzyskano

stosując frakcję ekstraktu zawierającą oligomeryczne proantocyjanidyny o długości łańcucha powyżej czterech jednostek.

Miejscowe podanie na skórę szczurów ekstraktu z *Pinus pinaster* w żelu hydroksyetylocelulozowym, hamuje wzrost przepuszczalności naczyń włosowatych spowodowany działaniem promieniowania UV [12]. Mechanizm działania przeciwzapalnego wiąże się z regulacją czynnika NF- κ B.

Badania prowadzone na makrofagach, stymulowanych interferonem (INF- γ) ujawniły, że (+)-katechina i (-)-epikatechina oraz niektóre proantocyjanidyny (np. B₁, B₂) hamują, podczas gdy inne (np. procyjanidyna C₂, ekstrakt z *Pinus pinaster*) pobudzają zależną od NF- κ B ekspresję genów. Wskazuje to na zależny od stopnia polimeryzacji cząsteczki mechanizm aktywności przeciwzapalnej proantocyjanidyn [181].

Proantocyjanidyny typu A, izolowane z tajwańskiego krzewu *Ecdysanthera utilis*, w medycynie ludowej stosowanego jako: *antiphlogisticum*, *analgeticum* i *spasmolyticum*, hamują produkcję interleukiny IL-2 oraz interferonu INF- γ [135].

3.2.5. Aktywność biologiczna proantocyjanidyn.

3.2.5.1. Działanie przeciwbakteryjne.

Działanie przeciwbakteryjne tanoidów oparte jest na trzech mechanizmach:

- inhibicji pozakomórkowych enzymów mikroorganizmów, wynikającej z charakterystycznego działania ściągającego,
- bezpośrednim działaniu na metabolizm bakterii i grzybów,
- kompleksowaniu jonów metali niezbędnych dla wzrostu drobnoustrojów [40].

Działanie przeciwbakteryjne proantocyjanidyn potwierdzono w stosunku do *Streptococcus pyogenes* (najsilniejsze działanie), *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia* i *Proteus vulgaris* [126].

W badaniach na szczepie *Cryptococcus neoformans* wykazano jedynie umiarkowaną aktywność przeciwbakteryjną proantocyjanidyn. Dimery typu B były bardziej aktywne od należących do typu A [126].

Najbardziej interesującymi ze względu na siłę działania przeciwdrobnoustrojowego są proantocyjanidyny występujące w żurawinach *Vaccinium macrocarpon*. Badania kliniczne dowiodły, że konsumpcja żurawin zapobiega bakteryjnym zakażeniom dróg moczowych [40]. Zapalenie dróg moczowych jest powodowane w 85% przez bakterie z rodzaju *Escherichia coli*. Mechanizm działania proantocyjanidyn z żurawin polega na uniemożliwieniu adhezji bakterii do nabłonka przewodów moczowych. Jest to możliwe dzięki hamowaniu aktywności włókien białkowych [40]. Spośród proantocyjanidyn typu A wyizolowanych z żurawin,

trimery były bardziej aktywne od dimerów, podczas gdy dimery typu B nie wykazywały żadnej aktywności. Stwierdzono, że obecność przynajmniej jednego wiązania charakterystycznego dla typu A jest niezbędna dla uzyskania działania antyadhezyjnego [40]. Ponadto ekstrakt żurawinowy wykazuje aktywność antyadhezyjną w stosunku do bakterii *Helicobacter pylori*, odpowiedzialnych za powstawanie wrzodów żołądka [24]. Kompleks proantocyjanidyn zawarty w ekstrakcie żurawinowym ma również właściwości zapobiegające przyleganiu bakterii jamy ustnej do szkliwa zębów [40].

3.2.5.2. Działanie przeciwwirusowe.

Pierwsze dane o działaniu przeciwwirusowym skondensowanych tanoidów pochodzą z początku lat dziewięćdziesiątych [40]. W kolejnych latach udowodniono, że polimeryzacja oraz obecność fragmentów kwasu galusowego wzmacnia siłę działania przeciwwirusowego [42].

Proantocyjanidyny inkubowane z zawiesiną wirusa opryszczki – HSV (*Herpes Simplex Virus*) wykazywały zależną od budowy, inhibicję jego replikacji. Najsilniejszy wpływ hamujący posiadały procyjanidyny A₁, A₂, C₁, B₂ i B₅. Wykazano również większą aktywność dimerów z wiązaniem C-C 4→6 w porównaniu do izomerów C-C 4→8. Udowodniono, że obecne w epigalokatechinie ugrupowanie o-trihydroksylowe decyduje o wzroście efektu przeciwwirusowego, podobnie jak wiązanie podwójne obecne w proantocyjanidynach typu A.

W badaniach wobec wirusa HIV najaktywniejsza była procyjanidyna A₂, natomiast jej izomer A₁ wykazywał prawie o połowę mniejszą, ale i tak większą od pozostałych aktywność. W grupie dimerów z pojedynczym wiązaniem obecność monomeru – (–)-epikatechiny zwiększała siłę działania przeciwwirusowego wobec HIV [42].

W badaniach *in vivo* mieszaniny oligomerów proantocyjanidyn SP-303 o masie cząsteczkowej 2100 Da, wyizolowanych z *Croton lechleri*, obserwowano ograniczenie penetracji wirusów do wnętrza komórek [40]. Podjęto próbę leczenia SP-303 nawracających zakażeń wirusem opryszczki u pacjentów z zespołem obniżonej odporności AIDS, jednak uzyskane efekty okazały się niezadowalające [40].

3.2.5.3. Działanie przeciwpierwotniakowe.

Jedną z głównych przyczyn chorób i zgonów w krajach słabo rozwiniętych są zakażenia pierwotniakami z rodzaju *Plasmodium sp.* i *Leishmania sp.* Z kolei w państwach Europy Zachodniej zakażenie *Giardia lamblia* jest częstym czynnikiem powodującym biegunki [40].

Proantocyjanidyny badano pod kątem działania przeciw *Leishmania donovani* [125]. Wykazano znaczące działanie statyczne przeciw wewnątrzkomórkowym formom

pierwotniaka – amastigotom, porównywalne z działaniem leku przeciwpierwotniakowego - Pentostamu. Jednak w stosunku do pozakomórkowych promastigotów badane związki były nieaktywne [125].

Otrzymane z *Geranium niveum* proantocyjanidyny typu A – geraniny A i B wykazują silniejszą aktywność pierwotniakobójczą w stosunku do *G. lamblia* niż metronidazol [40].

3.2.6. Wpływ proantocyjanidyn na biodostępność związków naturalnych.

Hyperycyna – związek decydujący o właściwościach przeciwdepresyjnych ziela dziurawca, charakteryzuje się słabą rozpuszczalnością w wodzie. Wzrasta ona w obecności proantocyjanidyn lub glikozydów flawonolowych [237]. Butterweck i wsp. [25] badali korelację między wzrostem rozpuszczalności hyperycyny a jej poziomem we krwi. W badaniach przeprowadzonych na szczurach potwierdzono, że procyjanidyna B₂ podobnie jak hyperozyd, zwiększa biodostępność hyperycyny po podaniu doustnym. Efekt ten był silniejszy dla procyjanidyny B₂. Biodostępność hyperycyny wzrosła o 58% w porównaniu do 34% dla hyperozydu. Maksymalne stężenie we krwi osiągnęto po 150 min w obecności procyjanidyny B₂ i po 360 min w obecności hyperozydu [25].

Z innych właściwości proantocyjanidyn należy wymienić wpływ na wydolność organizmów sportowców oraz wpływ na porost włosów. Badania przeprowadzone na sportowcach wykazały, że ekstrakt z kory sosny nadmorskiej *Pinus pinaster* podawany w dawce 200 mg na dobę zwiększał wydolność sportowców o 21% oraz skracał okres regeneracji powysiłkowej [100]. Japońscy naukowcy wykazali, że oligomery proantocyjanidyn stymulowały wzrost komórek nabłonkowych włosów u myszy [237]. Doświadczenia *in vivo* ujawniły, że Minoksidil powszechnie stosowany w leczeniu łysienia ma zbliżoną siłę działania do procyjanidyny B₂ [237]. W doświadczeniach na ludziach dimer B₂ znacząco pobudzał wzrost włosów w porównaniu z grupą kontrolną, stosującą placebo [226].

4. Wielowymiarowa chromatografia cieczowa (MDLC) – historia i zastosowanie.

Wzrastające potrzeby rozdzielania wieloskładnikowych mieszanin, stanowiących złożone matryce biologiczne, związane są z szybkim rozwojem takich dziedzin nauki, jak proteomika, metabolomika oraz fitochemia. W celu osiągnięcia większej siły rozdzielczej układów wykorzystywane są techniki wielowymiarowe, które polegają na łączeniu niezależnych metod/technik chromatograficznych [11,46,96,119,168,238].

Pojęcie chromatografii wielowymiarowej wywodzi się z chromatografii planarnej (PC). W układzie dwukierunkowym 2D-PC rozdzielone składniki mieszaniny w pierwszym kierunku (I wymiar) są poddawane separacji na drodze migracji fazy ruchomej w drugim kierunku (II wymiar), położonym pod kątem prostym – prostopadle (ortogonalnie) do kierunku pierwszej [168,238]. Po raz pierwszy taki model rozwijania chromatogramów wykorzystano w analizie peptydów w 1944 roku [38,238]. Od tamtego czasu dwukierunkową chromatografię bibułową lub cienkowsarstwową stosowano powszechnie w badaniach ekstraktów roślinnych [61,69,70,138].

Obecnie najczęściej separację w dwóch wymiarach prowadzi się w systemach opartych na chromatografii gazowej ($GC \times GC$) lub stanowiących połączenie dwóch metod – chromatografii gazowej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej ($GC \times LC$) [96,238]. Dwuwymiarowa chromatografia znajduje zastosowanie przede wszystkim w analizie jakości żywności – w tym olejów roślinnych oraz olejków eterycznych [238,46]. Ostatnio obserwuje się wzrost przykładów aplikacji systemów dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej w badaniach matryc biologicznych ($LC \times LC$) [11,46,216,242]. Natomiast niewiele jest danych o systemach 2D chromatografii w stanie nadkrytycznym ($pSFC \times pSFC$) [238].

Według Nyirediego [168] oraz Tranchidy i wsp. [238] chromatografię w systemie wielowymiarowym (MDC – *Multidimensional Chromatography*) charakteryzuje

- a) wykorzystanie dwóch lub więcej odmiennych mechanizmów separacji,
- b) dwa składniki rozdzielane w pierwszym wymiarze pozostają rozdzielone w drugim wymiarze – założenie wyklucza układy, w których składniki rozdzielone w pierwszym wymiarze łączą się, posiadając te same parametry retencyjne w drugim,
- c) zachowanie w obydwu wymiarach profilów elucji [46,168,238].

Celem stosowania układów wielowymiarowych jest zwiększenie rozdzielczości, czułości i skrócenie czasu analizy [168].

W zależności od sposobu przenoszenia rozdzielanych analitów w układach wielowymiarowych wyróżnia się systemy: *off-line* i *on-line*. W systemie *off-line*, służącym do wstępnej analizy złożonych matryc biologicznych, poszczególne frakcje z separacji na pierwszej kolumnie są w późniejszym czasie sukcesywnie wprowadzane na drugą

kolumnę [46,238]. Wadą systemu jest jego czaso- i pracochłonność, niska odtwarzalność oraz możliwość zanieczyszczenia prób i tworzenie się artefaktów [45,46,238].

Natomiast w klasycznych systemach *on-line* MDLC, w wyniku połączenia co najmniej dwóch kolumn, określona objętość eluatu z pierwszej kolumny jest przenoszona na kolejne kolumny [238]. Systemy tego typu posiadają szereg zalet – dobrą odtwarzalność, stosunkowo krótki czas analizy oraz możliwość automatyzacji procesu [46,238]. Z drugiej strony, są one trudniejsze w obsłudze i wymagają zastosowania specjalnych układów transferowych – separatorów, umożliwiających „wycinanie” i przenoszenie określonych frakcji (eluatów) z pierwszej kolumny na drugą [46,238]. Separatory są najczęściej ośmio- lub dziesięciopiętrowymi zaworami zaopatrzonymi w dwie pętle dozujące, lub jest to zawór umożliwiający transfer frakcji z I wymiaru na dwie, symultaniczne kolumny II wymiaru, bez użycia pętli magazynujących [238]. Systemy, w których zastosowano pętle magazynujące sprawdzają się wtedy, gdy prędkość przepływu w I wymiarze jest znacznie niższa niż w II. Natomiast, aby uniknąć długiego magazynowania analitów w pętlach dozujących, system dwuwymiarowy musi składać się z kilku kolumn zastosowanych w II wymiarze [119,238,242].

W obrębie wielowymiarowych układów *on-line* wyróżnia się dwa sposoby pracy, mianowicie tzw. *heart-cutting*, w którym jedynie część rozdzielanych w I kierunku składników mieszaniny jest poddawana separacji w II wymiarze [45,46] oraz *comprehensive* – wyczerpujący, w którym wszystkie składniki analizowanej matrycy są przenoszone i rozdzielane w II wymiarze, często składającym się np. z dwóch kolumn [46].

Celem większości prac jest osiągnięcie maksymalnej rozdzielczości badanej próby, którą zapewnia system *comprehensive* [46,238].

W świetle zebranych danych literaturowych, jako pierwsi dwuwymiarową HPLC zastosowali w 1978 roku Erni i Frei [46], zaś kolejne opracowania systemów 2D-HPLC należą w większości do zespołów Jorgensona [46] i Jandery [11,96].

Przyjmuje się, że dla uzyskania pełnego rozdzielenia składników skomplikowanych matryc, stanowiących ekstrakty z tkanek żywych organizmów, pojemność względem pików (P) – (*peak capacity*) pojedynczej kolumny HPLC jest niewystarczająca [242]. Ustalono, że w przypadku pojedynczej kolumny rozdzielenie próby, z liczbą oznaczanych składników wyższą niż 37% wartości P, jest jedynie kompromisem, w którym piki uznane za sygnały pojedynczych związków zawierają 2 lub więcej koeluujących składników [238]. Wykazano, że wartość P można znacząco zwiększyć łącząc różne typy kolumn HPLC, na których separacja będzie opierać się na różnych – ortogonalnych mechanizmach chromatograficznych [46,242]. W idealnym przypadku wartość P ortogonalnego systemu 2D-HPLC równa jest pojemnościom poszczególnych wymiarów [242].

Techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej charakteryzuje różnorodność mechanizmów separacji z istotnie różną selektywnością, co sprawia, że teoretycznie ilość kombinacji układów ortogonalnych jest znaczna [238]. Opracowanie rozdzielania mieszanin za pomocą dwuwymiarowej chromatografii cieczowej jest znacznie trudniejsze niż w przypadku GC lub PC, ze względu m. in. na nie mieszanie się stosowanych faz ruchomych, osadzanie się soli buforów, brak kompatybilności fazy ruchomej w jednym wymiarze wobec fazy stacjonarnej ortogonalnego wymiaru [238].

Dążąc do możliwie nieskomplikowanej aparatury, konstruowanie systemów MDLC opiera się przede wszystkim na różnicach prędkości przepływu faz ruchomych w poszczególnych wymiarach, co stawia wysokie wymagania wobec faz stacjonarnych II wymiaru [242].

W systemach MDLC wykorzystuje się typowe dla HPLC rodzaje i typy kolumn, począwszy od kolumn tradycyjnych, poprzez kolumny mikro (*microbore*) i kapilarne do kolumn monolitycznych [46,119,238,239,242]. Kolumny z adsorbentami o ziarnistej strukturze (sferycznej lub nieregularnej) charakteryzują stosunkowo niskie prędkości przepływu fazy ruchomej (3 $\mu\text{l}/\text{min}$ – 2 ml/min) [45,46,119,239,242], w przeciwieństwie do kolumn monolitycznych (4 ml/min – 5 ml/min) o lepszych właściwościach transportu masy w strukturze złoża [46,119,238,239]. Z kolei kolumny *microbore*, ze względu na małą średnicę, zapewniają minimalne rozcieńczenie przenoszonej frakcji analizowanej próby oraz „dopasowanie” prędkości przepływu fazy ruchomej do II wymiaru a także dają możliwość eliminacji niezgodności faz ruchomych, szczególnie w układach LC-RP \times LC-NP [46,238]. Wadę może stanowić mała pojemność, jaka charakteryzuje kolumny *microbore*, jakkolwiek spadek wydajności związany ze stosowaniem dużych objętości próby mieści się w granicach tolerancji [46,238].

Według Dugo i wsp. [46] w analizie peptydów i białek, w przypadku użycia w I wymiarze konwencjonalnych kolumn, konieczne jest paralelne zastosowanie, co najmniej dwóch szybkich kolumn.

W proteomice, 2D-HPLC jest techniką komplementarną dla dwuwymiarowej elektroforezy kapilarnej (2D-EC), ze względu na krótsze czasy analiz decydujące o trwałości rozdzielanych związków oraz lepszą powtarzalność [242]. Zastosowanie systemów 2D-HPLC jest szczególnie efektywne dla protein o m.cz. < 20 000, które nie ulegają rozdzielaniu przy pomocy 2D-EC [242].

W analizie białek pochodzenia zwierzęcego zastosowano system 2D-HPLC składający się z jonowymiennej kolumny TSK – gel NP (35 mm \times 4,6 mm, 2,5 μm) w I wymiarze oraz w II wymiarze układu dwóch równoważnych kolumn pracujących równolegle, wypełnionych nieporowatą krzemionką z związaną chemicznie fazą oktadecylową Micra NPS

ODS I (14 mm × 4,6 mm, 1,5 μm). Zastosowanie krótkich kolumn, wypełnionych nieporowatym żelom krzemionkowym, o wysokiej stabilności mechanicznej oraz szybkim przenoszeniu masy wskutek eliminacji dyfuzji w warstwie porowatej, umożliwiło osiągnięcie wysokiej prędkości przepływu i rozdzielczości w II wymiarze – $P = 600$. Opracowany układ kolumn zapewniał maksymalną ortogonalność systemu, ponieważ w I wymiarze wykorzystano oddziaływania elektrostatyczne, natomiast II oparto na oddziaływaniach hydrofobowych [242].

Peptydy rozdzielano również, stosując systemy 2D-HPLC składające się w I wymiarze z kolumny kationowymiennej MCI CQK-31 S (50 mm × 2,1 mm, 2,5 μm) oraz w II wymiarze z kolumn wypełnionych monolitycznym żelom krzemionkowym RP-18 Chromolith Flash (25 mm × 4,6 mm) lub kolumny kapilarnej (100 mm × 0,1 mm). Stosowano prędkości przepływu 50 μl/min i 5,0 ml/min oraz 3 μl/min i 2,0 ml/min, odpowiednio [119].

Łączenie w systemach wielowymiarowych układów NP z RP komplikuje nie mieszanie się stosowanych faz ruchomych [46,238].

Głównym ograniczeniem systemu 2D-HPLC opracowanego dla analizy frakcji nietlotnej oryginalnego, sycylijskiego olejku cytrynowego, zawierającej tlenowe związki heterocykliczne z grupy kumaryn (metoksyłowane pochodne kumaryny i psoralenu) oraz flawonów, była niezgodność faz ruchomych poszczególnych wymiarów. Wprowadzenie dużych objętości niezgodnego rozpuszczalnika skutkuje pogorszeniem kształtów pików oraz spadkiem rozdzielczości [46]. Zastosowanie mikrokolumny SupelcoSil LC-Si (300 mm × 1 mm, 5 μm) w I wymiarze pozwoliło na wprowadzanie małych objętości eluatów na drugą kolumnę Chromolith Flash (25 mm × 4,6 mm) z przedkolumną Chromolith (5 mm × 4,6 mm) oraz umożliwiło transfer niezgodnych w fazie rozpuszczalników z I wymiaru na II [46].

Kombinację LC-NP × LC-RP zastosowano w systemie *comprehensive* w analizie etoksylatów alkoholi. Adsorbent stanowiący fazę normalną – żel krzemionkowy wmywano z użyciem roztworu wodnego, co umożliwiało przenoszenie analitów z I wymiaru na II [46].

System 2D-HPLC złożony z kolumny jonowymiennej AX 300 (250 mm × 4,6 mm, 6 μm) oraz pięciu kolumn Aquasil C-18 (30 mm × 4,6 mm, 3 μm) wykorzystano w badaniach ekstraktów wodnych i metanolowych *Artemisia vulgaris* w zakresie związków karotenowych, kumaryn, steroidów oraz składników olejków [216].

Technikę 2D-HPLC zastosowano jako alternatywną wobec SPE w analizie materiału roślinnego (kielkujące ziarna i pędy pszenicy *Triticum aestivum*, rośliny i kultury zawieszinowe tytoniu *Nicotiana tabacum*, części nadziemne *Arabidopsis thaliana*) w zakresie oceny zawartości hormonów roślinnych: auksyny (IAA) oraz kwasu abscyzynowego (ABA).

Analiza hormonów roślinnych rodzi wiele problemów, wynikających z niskich stężeń związków w ekstraktach roślinnych oraz obecności szeregu interferujących metabolitów wtórnych [45]. Wykorzystano kolumnę ACE-3CN (150 mm × 4,6 mm, 3 μm) w I wymiarze oraz kolumnę Luna C18 (2) (150 mm × 4,6 mm, 3 μm) w II. W obu wymiarach rozdzielanie prowadzono z użyciem elucji gradientowej o prędkości przepływu faz ruchomych 0,6 ml/min [45]. Wykorzystanie elucji gradientowej w I wymiarze umożliwiło uzyskanie frakcji o małej objętości, ze stosunkowo niskim stężeniem organicznego rozpuszczalnika (~35%), zawierającej obie analizowane substancje, które następnie rozdzielono w II wymiarze na adsorbencie RP-18. Stwierdzono, że duża objętość frakcji (~1 ml) przenoszona z I wymiaru na II nie wpływała na rozdzielczość i wydajność separacji prowadzonej w II wymiarze [45]. Proces posiadał odtwarzalność na poziomie 0,27-1,44% RSD, a odzysk analitów oszacowano na > 95%. Porównano wyniki oznaczania ilościowego metodą 2D-HPLC-DAD-FLD wobec GC-MS i wykazano, że są one statystycznie identyczne na poziomie istotności 95% [45].

Na początku bieżącego roku Blahova i wsp. [11] opisali oznaczanie metodą 2D-HPLC 11 fenolokwasów w produktach spożywczych otrzymywanych z jęczmienia i chmielu – m.in. piwa. Rozdzielenie uzyskano poprzez zastosowanie kolumny Discovery HS PEG (50 mm × 2,1 mm, 3 μm) w I wymiarze i kolumny Purospher Star RP-18e (125 mm × 2 mm, 5 μm) w II [11].

W układach wielowymiarowych 2D-HPLC, w oparciu o zebrane dane piśmiennictwa, zwykle stosuje się w obu wymiarach elucję gradientową [45,119,216,239,242]. Natomiast Dugo i wsp. [46] zastosowali w I wymiarze elucję izokratyczną.

Elucja izokratyczna nie wymaga kalibracji kolumny w II wymiarze przed przeniesieniem kolejnej frakcji, umożliwiając skrócenie czasu analizy. Jednak wyeliminowanie etapu mycia kolumny w I wymiarze rozpuszczalnikiem organicznym w wysokim stężeniu prowadzi do skrócenia czasu życia kolumny. Dłuższy czas analizy w przypadku zastosowania w obu wymiarach elucji gradientowej rekompensuje wyższa rozdzielczość układu i możliwość regeneracji adsorbentu [45].

Kolejnym krokiem w rozwoju układów wielowymiarowych są systemy zautomatyzowane, stosowane m.in. w separacji mieszanin amin aromatycznych [239]. Tworzenie tego typu systemów jest możliwe poprzez użycie sterowanych elektronicznie zaworów [239]. Systemy zautomatyzowane w porównaniu do obsługiwanych manualnie charakteryzują się lepszą rozdzielczością i powtarzalnością [216].

II. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały i metody.

1. Rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne.

1.1. Rozpuszczalniki organiczne.

Lp.	Rozpuszczalnik	Producent
1.	Aceton cz.d.a	POCH S.A., Gliwice, Polska
2.	Acetonitryl stopnia czystości HPLC, super gradient	J.T. Baker, Deventer, Holandia
3.	Butanol cz.d.a	POCH S.A., Gliwice, Polska
4.	Chloroform cz.d.a	POCH S.A., Gliwice, Polska
5.	Dichlorometan stopnia czystości HPLC	Merck, Darmstadt, Niemcy
6.	Etanol	Polmos, Starogard Gdański, Polska
7.	Eter dietylowy cz.d.a	POCH S.A., Gliwice, Polska
8.	Heksan stopnia czystości HPLC	Fluka, Buchs, Szwajcaria
9.	Izopropanol stopnia czystości HPLC, super gradient	POCH, Gliwice, Polska
10.	Keton metylo-etylowy stopnia czystości HPLC, super gradient	J.T. Baker, Deventer, Holandia
11.	Metanol stopnia czystości HPLC, super gradient	POCH, Gliwice, Polska
12.	Metoksyetanol cz.d.a	J.T. Baker, Deventer, Holandia
13.	Octan etylu cz.d.a	POCH, Gliwice, Polska
14.	Tetrahydrofuran stopnia czystości HPLC, super gradient	J.T. Baker, Deventer, Holandia
15.	Toluen cz.d.a	Merck, Darmstadt, Niemcy
16.	Dimetylosulfotlenek cz.d.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy

1.2. Odczynniki chemiczne.

Lp.	Odczynnik	Producent
1.	Amoniak 25% cz.d.a	POCH, Gliwice, Polska
2.	Azotyn sodu cz.d.a	J.T. Baker, Deventer, Holandia
3.	Chlorek glinu cz.d.a	Merck, Darmstadt, Niemcy
4.	Chlorek żelaza cz.d.a	Reanal, Budapeszt, Węgry
5.	Kwas mrówkowy 89-91% cz.d.a	Merck, Darmstadt, Niemcy
6.	Kwas octowy lodowaty cz.d.a	POCH, Gliwice, Polska
7.	Kwas ortofosforowy 85% cz.d.a	POCH, Gliwice, Polska
8.	Kwas ortoftalowy cz.d.a	POCH, Gliwice, Polska
9.	Kwas siarkowy 98% cz.d.a	POCH, Gliwice, Polska
10.	Kwas solny 30% cz.d.a	Merck, Darmstadt, Niemcy
11.	Kwas sulfanilowy cz.d.a	POCH, Gliwice, Polska
12.	Kwas trifluoroctowy 99% cz.d.a	Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy
13.	Mrówczan sodu cz.d.a	Merck, Darmstadt, Niemcy
14.	Siarczan sodu (bezwodny) cz.d.a	POCH, Gliwice, Polska
15.	Tymol cz.d.a	Loba Feinchemie, Fischamend, Austria
16.	Wanilina cz.d.a	Loba Feinchemie, Fischamend, Austria
17.	Węglan sodu cz.d.a	Schering A.G., Berlin, Niemcy
18.	Wodorotlenek potasu cz.d.a	POCH, Gliwice, Polska

Lp.	Odczynnik	Producent
19.	Wodorotlenek sodu cz.d.a.	POCH, Gliwice, Polska
20.	Chlorek sodu cz.d.a.	POCH, Gliwice, Polska
21.	Chlorek potasu cz.d.a.	POCH, Gliwice, Polska
22.	Wodorofosforan sodu cz.d.a.	POCH, Gliwice, Polska
23.	Wodorofosforan potasu cz.d.a.	POCH, Gliwice, Polska
24.	Tris (hydroksymetyloaminometan)	POCH, Gliwice, Polska
25.	Dodecylosiarczan sodu (SDS) cz.	POCH, Gliwice, Polska
26.	Wersenian potasowy (EDTA) cz.d.a.	POCH, Gliwice, Polska
27.	Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy
28.	Trypsyna	Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy
29.	Trypan Blue	GIBCO™, Invitrogen Technologies
30.	Dwutlenek węgla	PGNiG S.A. O/ZOG Krio, Odolanów, Polska
31.	Hel	PGNiG S.A. O/ZOG Krio, Odolanów, Polska
32.	Nadtlenek wodoru	Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy
33.	Niskotopliwa agarozą	Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy
34.	Bromek etydyny	Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy
35.	MTT	Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy

1.3. Woda.

1.3.1. Woda demineralizowana otrzymana z użyciem systemu Millipore (Molsheim, Francja)

1.3.2. Woda redestylowana otrzymana z użyciem destylarki REL-5 (Zakłady Automatyki Mera - Polna, Przemysł, Polska).

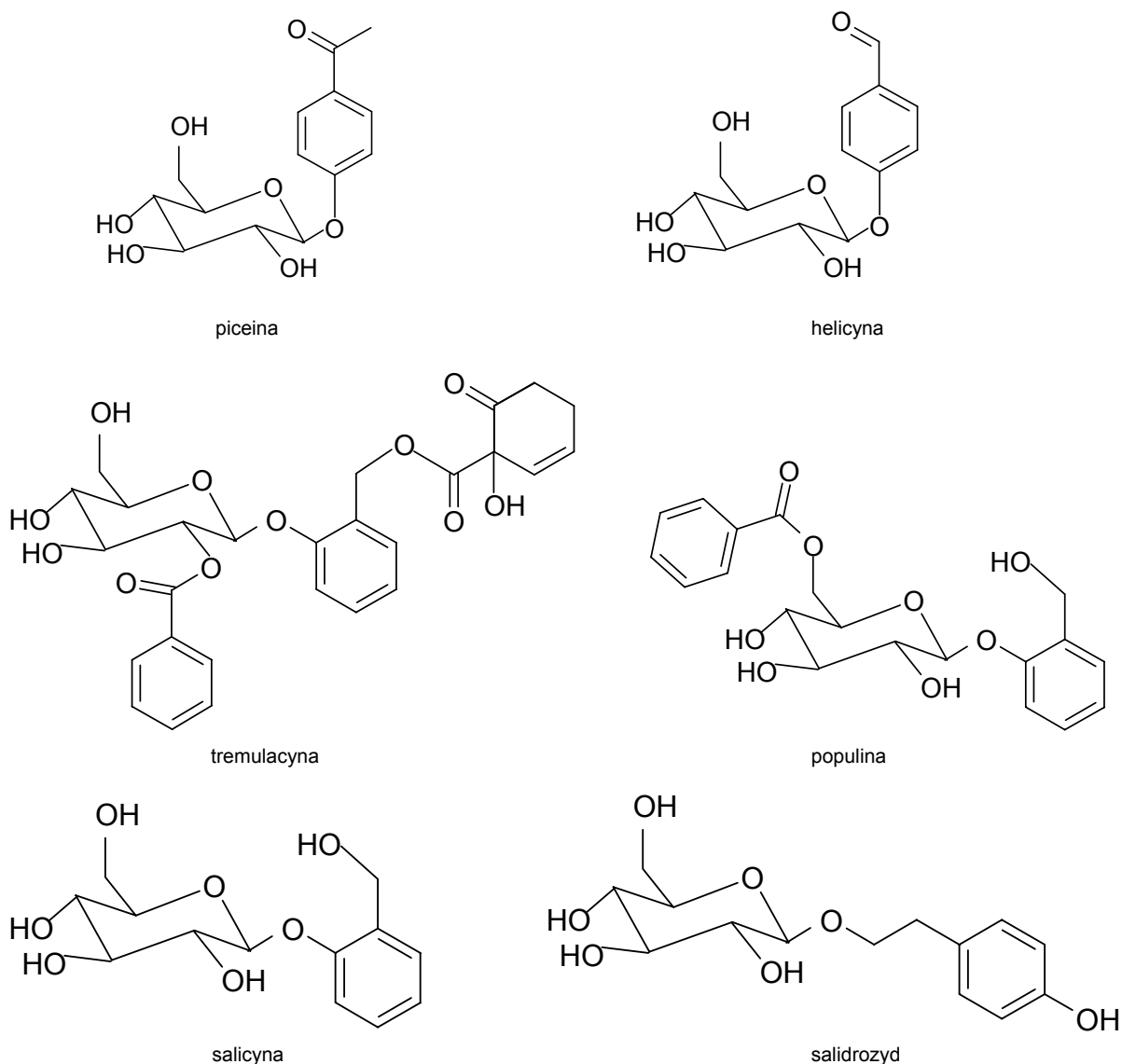
2. Związki wzorcowe.

Roztwory związków wzorcowych przygotowano przez rozpuszczenie 1 mg związku w 1 ml metanolu.

2.1. Glikozydy fenolowe (Ryc. 9):

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	Piceina	Extrasynthèse, Genay, Francja
2.	Helicyna	Extrasynthèse, Genay, Francja
3.	Tremulacyna	Apin Chemicals, Abingdon, Wielka Brytania
4.	Populina	Apin Chemicals, Abingdon, Wielka Brytania
5.	Salicyna	Sigma, Steinheim, Niemcy
6.	Salidrozyd	Chroma Dex, Santa Ana, Stany Zjednoczone Ameryki

Ryc.9. Wzory strukturalne glikozydów fenolowych.



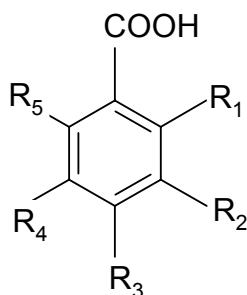
2.2. Fenolokwasy.

2.2.1. Pochodne kwasu benzoowego (Ryc. 10).

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	Kwas benzoowy	Argon, Łódź, Polska
2.	Kwas salicylowy (kwas o-hydroksybenzoowy)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
3.	Kwas m-hydroksybenzoowy	Extrasynthèse, Genay, Francja
4.	Kwas p- hydroksybenzoowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
5.	Kwas 2,3-dihydroksybenzoowy	Sigma, Steinheim, Niemcy
6.	Kwas β-rezorcyloy (kwas 2,4-dihydroksybenzoowy)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
7.	Kwas gentyzynowy (kwas 2,5-dihydroksybenzoowy)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
8.	Kwas γ-rezorcyloy (kwas 2,6-dihydroksybenzoowy)	Extrasynthèse, Genay, Francja
9.	Kwas protokatechowy (kwas 3,4-dihydroksybenzoowy)	Sigma, Steinheim, Niemcy

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
10.	Kwas α -rezorcylowy (kwas 3,5-dihydroksybenzoesowy)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
11.	Kwas 2,4-dimetoksybenzoesowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
12.	Kwas weratrowy (kwas 3,4-dimetoksybenzoesowy)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
13.	Kwas galusowy (kwas 3,4,5-trihydroksybenzoesowy)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
14.	Kwas wanilinowy (kwas 4-hydroksy-3-metoksybenzoesowy)	Sigma, Steinheim, Niemcy
15.	Kwas syringowy (kwas 4-hydroksy-3,5-dimetoksybenzoesowy)	Sigma, Steinheim, Niemcy

Ryc.10. Wzory strukturalne pochodnych kwasu benzoesowego.

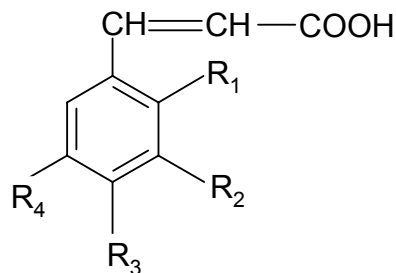


Związek	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
kwas benzoesowy	H	H	H	H	H
kwas salicylowy	OH	H	H	H	H
kwas m-hydroksybenzoesowy	H	OH	H	H	H
kwas p-hydroksybenzoesowy	H	H	OH	H	H
kwas 2,3-dihydroksybenzoesowy	OH	OH	H	H	H
kwas β - rezorcylowy	OH	H	OH	H	H
kwas gentyzynowy	OH	H	H	OH	H
kwas γ - rezorcylowy	OH	H	H	H	OH
kwas protokatechowy	H	OH	OH	H	H
kwas α - rezorcylowy	H	OH	H	OH	H
kwas galusowy	H	OH	OH	OH	H
kwas 2,4 -dimetoksybenzoesowy	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H
kwas weratrowy	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
kwas wanilinowy	H	OCH ₃	OH	H	H
kwas syringowy	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H

2.2.2. Pochodne kwasu cynamonowego (Ryc. 11).

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	Kwas cynamonowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
2.	Kwas o-kumarowy (kwas o-hydroksycynamonowy)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
3.	Kwas m-kumarowy (kwas m-hydroksycynamonowy)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
4.	Kwas p-kumarowy (kwas p-hydroksycynamonowy)	Koch-Light, Colnbrook, Wielka Brytania
5.	Kwas ferulowy (kwas 4-hydroksy-3-metokscynamonowy)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
6.	Kwas izoferulowy (kwas 3-hydroksy-4-metokscynamonowy)	Extrasynthèse, Genay, Francja
7.	Kwas kawowy (kwas 3,4-dihydroksycynamonowy)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
8.	Kwas synapinowy (kwas 4-hydroksy-3,5-dimetokscynamonowy)	Sigma, Steinheim, Niemcy
9.	Kwas 4-metokscynamonowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
10.	Kwas 3,4-dimetokscynamonowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria

Ryc. 11. Wzory strukturalne pochodnych kwasu cynamonowego.

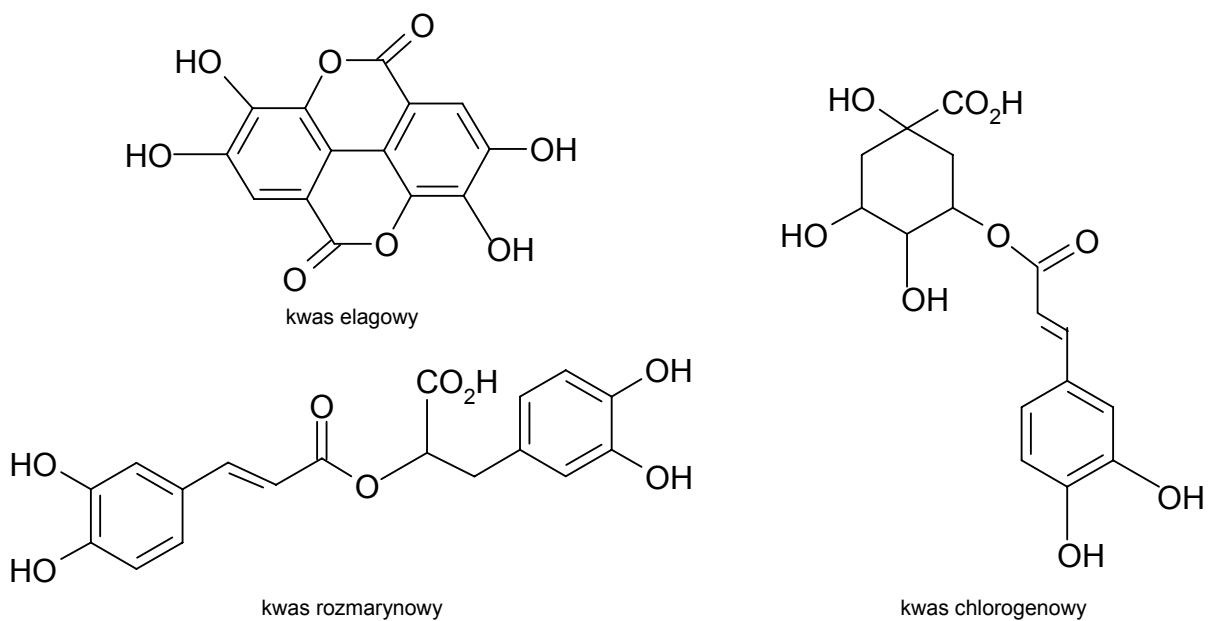


Związek	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
kwas cynamonowy	H	H	H	H
kwas p-kumarowy	H	H	OH	H
kwas m-kumarowy	OH	H	H	H
kwas o-kumarowy	H	OH	H	H
kwas ferulowy	H	OCH ₃	OH	H
kwas izoferulowy	H	OH	OCH ₃	H
kwas kawowy	H	OH	OH	H
kwas synapinowy	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
kwas 4-metoksycynamonowy	H	H	OCH ₃	H
kwas 3,4-dimetoksycynamonowy	H	OCH ₃	OCH ₃	H

2.2.3. Depsydy (Ryc. 12).

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	Kwas elagowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
2.	Kwas chlorogenowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
3.	Kwas rozmarynowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria

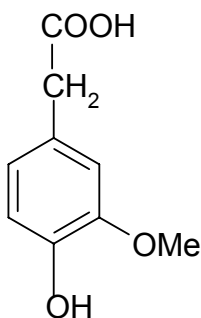
Ryc. 12. Wzory strukturalne depsydów.



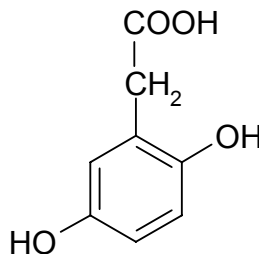
2.2.4. Inne fenolokwasy (Ryc. 13).

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	Kwas homogentyzynowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
2.	Kwas homowanilinowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
3.	Kwas hydrokawowy (kwas 3,4- dihydroksyhydrocynamonowy)	Sigma, Steinheim, Niemcy

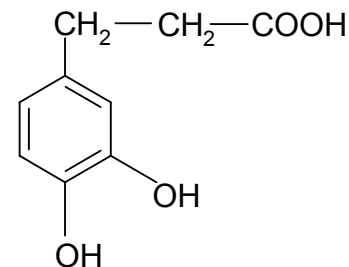
Ryc. 13. Wzory strukturalne innych fenolokwasów.



kwas homowanilinowy



kwas homogentyzynowy



kwas dihydrokawowy

2.3. Flawonoidy (Ryc. 14).

2.3.1. Aglikony flawonoidowe.

2.3.1.1. Pochodne flawonu.

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	Apigenina	Fluka, Buchs, Szwajcaria
2.	Luteolina	Extrasynthèse, Genay, Francja

2.3.1.2. Pochodne flawonolu.

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	Izoramnetyna	Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL AMG
2.	Kemferol	Fluka, Buchs, Szwajcaria
3.	Kwercetyna	Fluka, Buchs, Szwajcaria
4.	Mirycetyna	Fluka, Buchs, Szwajcaria

2.3.1.3. Pochodne flawanonu.

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	Naryngenina	Koch-Light, Colnbrook, Wielka Brytania

2.3.2. Glikozydy flawonoidowe.

2.3.2.1. Pochodne flawonu.

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	7-O-glukozyd apigeniny	Extrasynthèse, Genay, Francja
2.	7-O-glukozyd luteoliny	Extrasynthèse, Genay, Francja

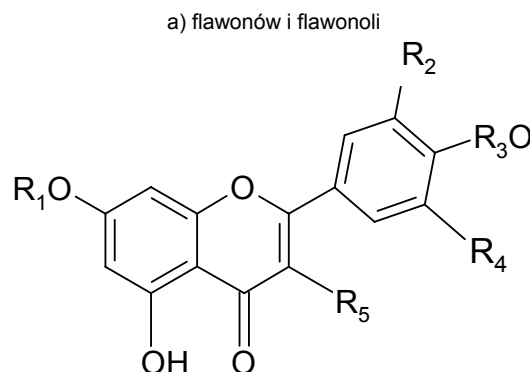
2.3.2.2. Pochodne flawonolu.

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	3-O-glukozyd izoramnetyny	Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL AMG
2.	3-O-glukozyd kemferolu (astragalina)	Extrasynthèse, Genay, Francja
3.	3-O-glukozyd kwercetyny (izokwercytryna)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
4.	7-O-ramnozyd kemferolu	Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL AMG
5.	3-O-rutynozyd kwercetyny (rutyna)	Extrasynthèse, Genay, Francja

2.3.2.3. Pochodne flawanonu.

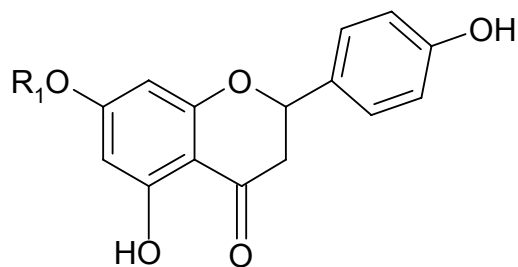
Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	7-O-glukozyd naryngeniny (prunina)	Extrasynthèse, Genay, Francja
2.	7-O-neohesperozyd naryngeniny (naryngina)	Extrasynthèse, Genay, Francja

Ryc. 14. Wzory strukturalne aglikonów i glikozydów flawonoidowych z grup:



Związek	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
kemferol	H	H	H	H	OH
3-O-glukozyd kemferolu	H	H	H	H	glukoza
7-O-ramnozyd kemferolu	glukoza	H	H	H	OH
kwercetyna	H	OH	H	OH	OH
3-O-glukozyd kwercetyny	H	OH	H	OH	glukoza
rutyna	H	OH	H	OH	rutynoza
apigenina	H	H	H	H	H
7-O-glukozyd apigeniny	glukoza	H	H	H	H
luteolina	H	OH	H	H	H
7-O-glukozyd luteoliny	glukoza	OH	H	H	H
izoramnetyna	H	OCH ₃	H	H	H
3-O-glukozyd izoramnetyny	H	OCH ₃	H	H	glukoza
mirycetyna	H	OH	H	OH	OH

b) flawanonów

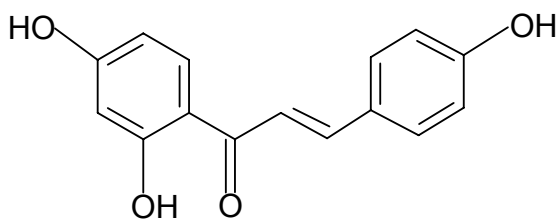


Związek	R ₁
naryngenina	H
7-O-glukozyd naryngeniny	glukoza
naryngina	neohesperydoza

2.3.3. Chalkony (Ryc. 15).

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	Izolikwirytygenina	Extrasynthèse, Genay, Francja

Ryc. 15. Wzór strukturalny chalkonu – izolikwirytygeniny.

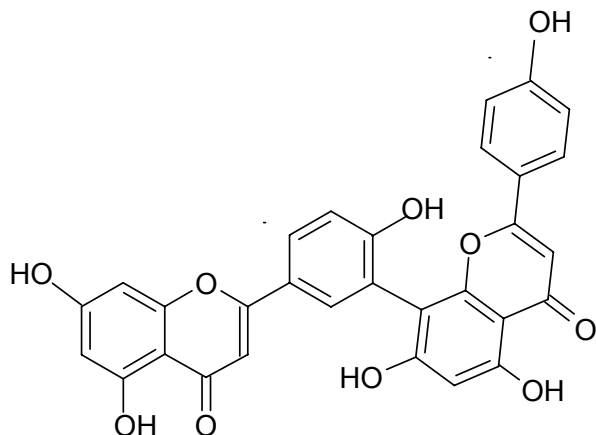


izolikwirytygenina

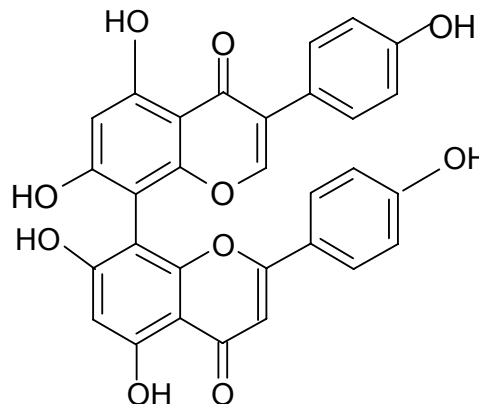
2.3.4. Dimery flawonoidowe (Ryc. 16).

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	Amentoflawon	Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL AMG
2.	Kupressuflawon	Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL AMG

Ryc. 16. Wzory strukturalne dimerów flawonoidowych.



amentoflawon

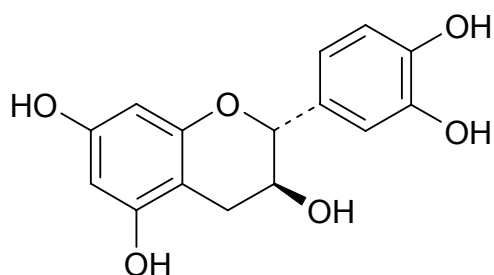


kupressuflawon

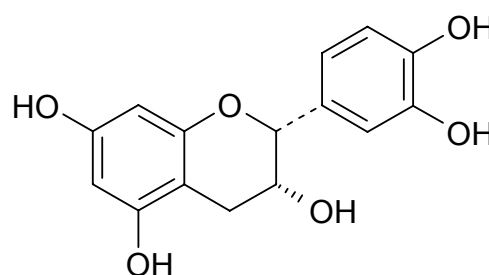
2.4. Flawan-3-ole i ich dimeryczne pochodne (Ryc. 17).

Lp.	Związek wzorcowy	Producent
1.	Katechina	Fluka, Buchs, Szwajcaria
2.	Epikatechina	Sigma, St. Louis, Stany Zjednoczone Ameryki
3.	Galokatechina	Sigma, St. Louis, Stany Zjednoczone Ameryki
4.	Galusan katechiny	Sigma, St. Louis, Stany Zjednoczone Ameryki
5.	Procyjanidyna B ₁	Extrasynthèse, Genay, Francja
6.	Procyjanidyna B ₂	Extrasynthèse, Genay, Francja

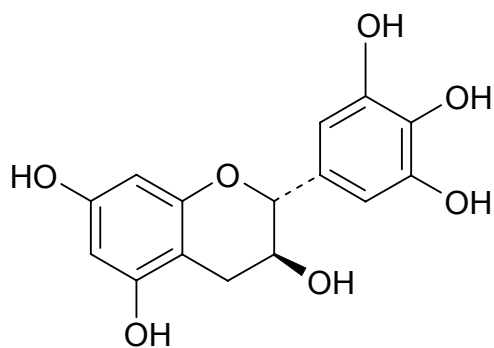
Ryc. 17. Wzory strukturalne flawan-3-oli i ich dimerycznych pochodnych.



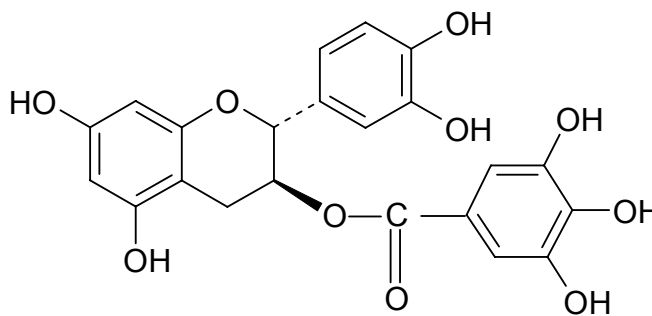
(+) – katechina



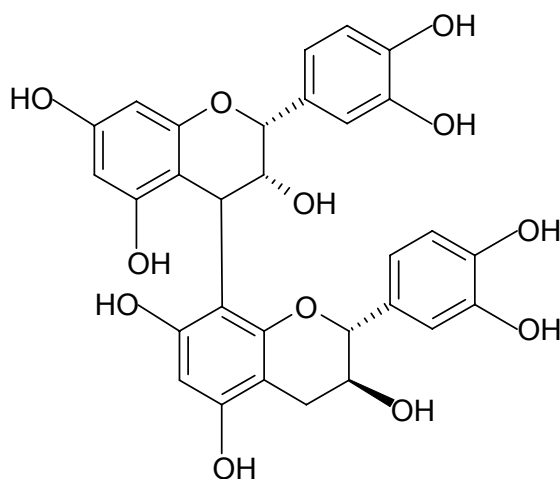
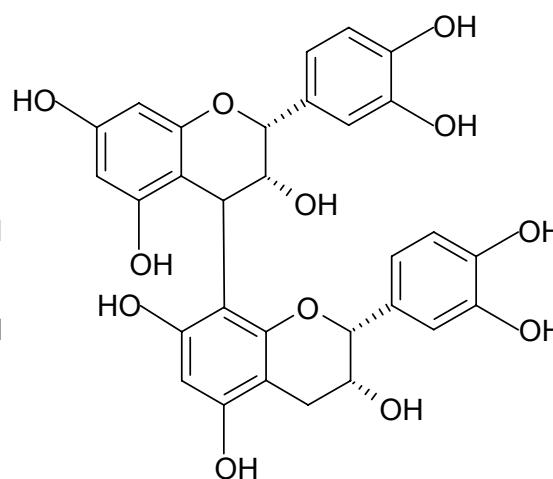
(-) – epikatechina



(+) – galokatechina



(-) – galusan katechiny

procyjanidyna B₁procyjanidyna B₂

3. Aparatura i sprzęt laboratoryjny.

3.1. Systemy chromatografii cienkowarstwowej – TLC i HPTLC.

a) komory chromatograficzne.

- pionowa analityczna komora Chropa.
- pozioma komora DS II d (Chromdes, Lublin).
- pionowa komora szklana o wymiarach: 100 mm × 60 mm × 90 mm.

b) mikrostrzykawkki o objętości 10 µl i 100 µl (Hamilton, Reno, Stany Zjednoczone Ameryki).

c) półautomatyczny aplikator AS 30 Desaga (Nümbrecht, Niemcy).

d) densytmotr CD 60 HPTLC Desaga (Nümbrecht, Niemcy) pracujący pod kontrolą komputera PC – oprogramowanie ProQuant.

c) półautomatyczny spryskiwacz SG 1 Desaga (Nümbrecht, Niemcy).

d) płyta grzewcza Termoplate S Desaga (Nümbrecht, Niemcy).

3.2. Systemy wysokosprawnej chromatografii cieczowej – HPLC.

3.2.1. Systemy do celów analitycznych.

3.2.1.1. Systemy jednowymiarowe.

a)

- pompa L-7100 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- detektor UV-VIS L-7420 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- interfejs Well Chrom V7566 Version 0696 (Knauer, Niemcy)
- termostat Jetstream 2 PLUS (Merck, Niemcy)
- zawór dozujący 7125, o objętości pętli 20 µl (Rheodyne, Stany Zjednoczone Ameryki)
- oprogramowanie: Eurochrom 2000 (Knauer, Niemcy)
- dynamiczna komora mieszania rozpuszczalników (Knauer, Niemcy)
- butla z helem

b)

- pompa L-7100 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- odgazowywacz rozpuszczalników L-7612 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- automatyczny podajnik próbek L-7200 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- termostat L-7350 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- detektor UV-Vis L-7400 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- detektor z matrycą diod (DAD - diode array detector) (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)

- interfejs D-7000 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- oprogramowanie: LaChrom D-7000 HPLC System Manager (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia).

c)

- pompa L-7100 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- odgazowywacz rozpuszczalników L-7612 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- automatyczny podajnik próbek L-7250 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- termostat L-7350 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- detektor UV-Vis L-7400 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- detektor światła rozproszonego ELSD 2000 (Alltech Associates, Stany Zjednoczone Ameryki) ze sprzężonym powietrzem (60 psi, 4.14 bar) jako gazem nebulizującym, oprogramowanie ELSD 2000 Control (Alltech Associates, Stany Zjednoczone Ameryki)
- interfejs D-7000 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- oprogramowanie: LaChrom D-7000 HPLC System Manager (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia).

3.2.1.2. System dwuwymiarowy.

a) I wymiar - system przedstawiony w pkt. 3.2.1.1. a

b) II wymiar

- pompa izokratyczna L-7100 (Merck Hitachi, Niemcy- Japonia)
- zawór sześciopiętrowy 7125 (Rheodyne, Stany Zjednoczone Ameryki)
- detektor UV-VIS Variable Wavelength Monitor (Knauer, Niemcy)
- interfejs V7566 Version 0696 (Knauer, Niemcy)
- oprogramowanie Eurochrom 2000 (Knauer, Niemcy).

3.2.2. System HPLC do celów preparatywnych:

- pompa L-7100 (Merck-Hitachi, Niemcy-Japonia)
- zawory sześciopiętrowe – model 7000 (Rheodyne, USA)
- detektor UV-Vis Variable Wavelength Monitor z kuetą preparatywną (Knauer, Niemcy)
- butla z helem
- oprogramowanie Eurochrom 2000 (Knauer, Niemcy).

3.3. Inne

a) aparaty cyfrowe: Kodak, Olympus.

b) skanery: Lexmark X1170, Plustek Optic Pro UT12.

c) liofilizator Leybold Steris Lyovac GT 2, próżnia: $4,5 \times 10^{-2}$ atm.

d) łaźnie wodne: SWL (Bytom, Polska), Unipan typ 356P (Warszawa, Polska).

e) płuczka ultradźwiękowa: Unipan (Warszawa, Polska).

- f) **homogenizator:** Yellow line DI 25 (IKA-Werke, Staufen, Niemcy).
- g) **zestaw Bakerbond SPE** (J.T. Baker, Phillipsburg, USA).
- h) **wyparka próżniowa** Unipan typ 350P (Warszawa, Polska).
- i) **inkubator** (Heraeus Instruments, Düsseldorf, Niemcy).
- j) **mikroskop świetlny** (Olympus, Tokio, Japonia).
- k) **hemocytometr** (Sigma, Steinheim, Niemcy).
- l) **komora laminarna:** Biohazard (Heraeus Instruments, Düsseldorf, Niemcy).
- m) **mikroplytki 96-dółkowe:** Tissue Culture Plate 96-well (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy).
- n) **spektrofotometr:** Wallac 1420 Viktor2 (PerkinElmer, Wellesley, Stany Zjednoczone Ameryki).
- o) **wirówka:** Mikro 20 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Niemcy).
- p) **aparat elektroforetyczny** (Kucharczyk, Warszawa, Polska).
- r) **mikroskop fluorescencyjny:** Eclipse PE3005 (Nikon, Tokio, Japonia).

4. Analiza chromatograficzna.

4.1. Chromatografia cienkowarstwowa – TLC.

4.1.1. Płytki chromatograficzne.

Stosowano płytki szklane pokryte różnymi adsorbentami:

- żelem krzemionkowym – Silica gel 60 (20 cm × 20 cm) (0,25 mm) (Merck, Niemcy)
- poliamidem – Polyamide 11 F_{254S} (20 cm × 20 cm) (0,15 mm) (Merck, Niemcy)
- celulozą – Cellulose (20 cm × 20 cm) (0,1 mm) (Merck, Niemcy)
- celulozą – Cellulose F_{254S} (10 cm × 20 cm) (0,1 mm) (Merck, Niemcy)
- żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi – RP-18 F_{254S} (10 cm × 20 cm, 0,25 mm) (Merck, Niemcy).

4.1.2. Fazy ruchome.

Stosowano fazy ruchome

Lp.	Faza ruchoma		
	Indeks	Rozpuszczalniki	Stosunek objętościowy (v/v)
1.	S ₁	octan etylu / metanol / woda	77+13+10 [27]
2.	S ₂	kwasy octowy / kwas solny / woda	30+3+10
3.	S ₃	kwasy octowy / kwas solny / woda	5+3+82
4.	S ₄	kwasy octowy / woda	15+85

Lp.	Faza ruchoma		
	Indeks	Rozpuszczalniki	Stosunek objętościowy (v/v)
5.	S ₅	kwias octowy / woda	30+70
6.	S ₆	butanol / kwas octowy / woda (faza organiczna – układ Partridge'a)	4+1+5
7.	S ₇	butanol / woda / metanol	30+7+3
8.	S ₈	butanol / woda / kwas octowy	10+3+7
9.	S ₉	butanol / kwas octowy / woda	3+1+1 [2]
10.	S ₁₀	mrówczan sodu / kwas mrówkowy / woda	10+1+200
11.	S ₁₁	acetonitryl / woda	85+15
12.	S ₁₂	metanol / woda	30+70
13.	S ₁₃	metanol / woda / kwas mrówkowy	40+60+6
14.	S ₁₄	chloroform / metanol / keton metylo-etylowy	40+20+30
15.	S ₁₅	chloroform / metanol / keton metylo-etylowy / kwas mrówkowy	40+20+30+6
16.	S ₁₆	chloroform / etanol / butanol / kwas mrówkowy	10+8+1+1
17.	S ₁₇	chloroform / etanol / kwas mrówkowy	50+40+6
18.	S ₁₈	toluen / aceton / kwas mrówkowy	30+60+10 [191]
19.	S ₁₉	octan etylu / kwas mrówkowy / kwas octowy / woda	75+3+2+15 [221]
20.	S ₂₀	octan etylu / dichlorometan / metanol / kwas mrówkowy	60+40+17+6
21.	S ₂₁	aceton / woda / kwas mrówkowy	90+5+5 [191]
22.	S ₂₂	izopropanol / heksan / woda / kwas mrówkowy	40+50+10+6

4.1.3. Odczynniki wywołujące.

4.1.3.1. Odczynniki wywołujące pochodne salicylowe.

- mieszanina 0,5% etanolowego roztworu tymolu ze stężonym kwasem siarkowym (95+5, v/v) [10]
- roztwór kwasu siarkowego w metanolu (10+90, v/v) [27].

4.1.3.2. Odczynniki wywołujące flawan-3-ole.

- roztwór waniliny w 85% kwasie ortofosforowym [240]
- roztwór waniliny w stężonym kwasie solnym [191]
- stężony kwas siarkowy [99].

Chromatogramy analizowano w świetle UV o długości fali $\lambda = 254$ nm i w świetle dziennym, po spryskaniu odczynnikiem wywołującym i ogrzaniu (temp. 75°C – 120°C, w zależności od stosowanego odczynnika).

4.1.3.3. Odczynniki wywołujące flawonoidy.

- 2% metanolowy roztwór AlCl₃ [142]
- pary amoniaku [142].

Chromatogramy analizowano w świetle dziennym i UV o długości fali $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm, przed i po wywołaniu odczynnikami, obserwując zmiany fluorescencji badanych związków.

4.1.3.4. Odczynniki wywołujące fenolokwasy.

- a) zdiazowany kwas sulfanilowy [219]
- b) 2% roztwór FeCl_3 [219]
- c) pary amoniaku [142].

Chromatogramy analizowano w świetle dziennym i UV o długości fali $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm, przed i po wywołaniu odczynnikami, obserwując zmiany fluorescencji badanych związków.

4.1.3.5. Odczynnik wywołujący cukry proste.

- a) ftalan aniliny [171].

4.2. Wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa – HPTLC.

4.2.1. Płytki chromatograficzne.

Stosowano płytki szklane pokryte różnymi rodzajami adsorbentów:

- żelem krzemionkowym – Silica gel 60 (10 cm × 10 cm) (0,2 mm) (Merck, Niemcy)
- żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi – RP-18 W F_{254S} (10 cm × 10 cm) (0,2 mm) (Merck, Niemcy)
- żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi – Lichrospher RP-18 W F_{254S} (20 cm × 10 cm) (0,2 mm) (Merck, Niemcy)
- żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami propyloaminowymi – NH₂ F_{254S} (10 cm × 10 cm) (0,2 mm) (Merck, Niemcy)
- żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami diolowymi – Diol F_{254S} (10 cm × 10 cm) (0,2 mm) (Merck, Niemcy)
- żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami propylocyjanowymi – CN F_{254S} (10 cm × 10 cm) (0,2 mm) (Merck, Niemcy).

4.2.2. Fazy ruchome.

Stosowano fazy ruchome:

Lp.	Faza ruchoma		
	Indeks	Rozpuszczalniki	Stosunek objętościowy (v/v)
1.	S ₂₃	acetonitryl / woda / kwas mrówkowy	15+85+6
2.	S ₂₄	acetonitryl / woda / kwas mrówkowy	20+80+6
3.	S ₂₅	acetonitryl / woda / kwas mrówkowy	22+78+6
4.	S ₂₆	metanol / acetonitryl / woda / kwas mrówkowy	10+10+80+6
5.	S ₂₇	metanol / woda / kwas mrówkowy	23+77+6
6.	S ₂₈	metanol / acetonitryl / woda / kwas mrówkowy	2+2+77+6
7.	S ₂₉	woda / metanol	60+40
8.	S ₃₀	metanol / woda / kwas mrówkowy	70+30+6
9.	S ₃₁	tetrahydrofuran / woda / kwas mrówkowy	30+70+6
10.	S ₃₂	tetrahydrofuran / woda / kwas mrówkowy	12+88+6
11.	S ₃₃	tetrahydrofuran / woda / kwas mrówkowy	20+80+6
12.	S ₃₄	aceton / lodowy kwas octowy	85+15
13.	S ₃₅	octan etylu / chloroform	60+40
14.	S ₃₆	octan etylu / chloroform / metanol	70+20+10
15.	S ₃₇	octan etylu / metanol	90+10
16.	S ₃₈	octan etylu / metanol / woda	100+13,5+10 [188]
17.	S ₃₉	octan etylu / woda / kwas mrówkowy	80+13+7 [10]
18.	S ₄₀	octan etylu / dichlorometan / metanol / woda	60+40+17+5
19.	S ₄₁	octan etylu / chloroform / kwas mrówkowy	85+15+6
20.	S ₄₂	octan etylu / keton metylo-etylowy / kwas mrówkowy / woda	60+20+2+2 [246]
21.	S ₁₇	chloroform / etanol / kwas mrówkowy	50+40+6
22.	S ₄₃	chloroform / etanol / kwas mrówkowy	60+30+6
23.	S ₄₄	metyloetanol / woda / kwas mrówkowy	60+40+6
24.	S ₄₅	tetrahydrofuran / woda / kwas mrówkowy	30+70+6
25.	S ₄₆	tetrahydrofuran / heksan / kwas mrówkowy	50+50+6
26.	S ₄₇	tetrahydrofuran / woda / kwas mrówkowy	85+15+6
27.	S ₄₈	izopropanol / heksan / kwas mrówkowy	50+50+6
28.	S ₄₉	heksan / aceton	50+50
29.	S ₅₀	chloroform / heksan	70+30
30.	S ₅₁	chloroform : heksan (7+3) / octan etylu: kwas mrówkowy	90+10+0,01
31.	S ₅₂	chloroform : heksan (7+3) / octan etylu	85+15
32.	S ₅₃	chloroform : heksan (7+3) / octan etylu	80+20

4.3. Wysokosprawna chromatografia cieczowa – HPLC.

4.3.1. Kolumny chromatograficzne.

4.3.1.1. Systemy jednowymiarowe.

Stosowano następujące typy kolumn:

- kolumna wypełniona monolitycznym żelem krzemionkowym Chromolith Performance Si (100 mm × 4,6 mm) (Merck, Niemcy)

- kolumna wypełniona monolitycznym żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi Chromolith Performance RP-18e (100 mm × 4,6 mm) (Merck, Niemcy)
- kolumna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi Discovery C-18 (150 mm × 2,1 mm, 5 μm) (Supelco, Stany Zjednoczone Ameryki)
- kolumna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi Discovery HS C-18 (75 mm × 4,6 mm, 3 μm) (Supelco, Stany Zjednoczone Ameryki)
- kolumna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi Supelcosil™ LC-18 (150 mm × 3 mm, 3 μm) (Supelco, Stany Zjednoczone Ameryki)
- kolumna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi Lichrospher 100 RP-18e (250 mm × 4 mm, 5 μm) (Merck, Niemcy).
- kolumna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi Purospher Star RP-18e (55 mm × 4 mm, 3 μm) (Merck, Niemcy).

4.3.1.2. System dwuwymiarowy.

- **I wymiar** – kolumna wypełniona żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi Supelcosil™ LC-18 (150 mm × 3 mm, 3 μm) (Supelco, Stany Zjednoczone Ameryki)
- **II wymiar** – kolumna wypełniona monolitycznym żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi Chromolith Performance RP-18e (100 mm × 4,6 mm) (Merck, Niemcy).

4.3.2. Programy elucji.

4.3.2.1. Elucja izokratyczna.

Lp.	Faza ruchoma		
	Indeks	Rozpuszczalniki	Stosunek objętościowy (v/v)
1.	S ₅₄	acetonitryl / woda / kwas ortofosforowy	7+92,91+0,09
2.	S ₅₅	acetonitryl / woda	5+95
3.	S ₅₆	acetonitryl / woda	7+93
4.	S ₅₇	acetonitryl / woda	10+90
5.	S ₅₈	acetonitryl / woda	15+85
6.	S ₅₉	acetonitryl / woda	20+80
7.	S ₆₀	acetonitryl / woda	30+70
8.	S ₆₁	heksan / izopropanol / metanol	87+12+1

4.3.2.2. Elucja gradientowa.

Rozpuszczalniki:

A – acetonitryl, **B** – izopropanol, **C** – metanol, **D** – tetrahydrofuran, **E** – woda / kwas trifluoroctowy (99,95+0,05, v/v), **F** – woda / kwas ortofosforowy (99,9+0,1, v/v), **G** – woda / kwas octowy (99,9+0,1, v/v), **H** – woda / kwas ortofosforowy (99+1, v/v).

Programy gradientu $G_1 - G_{10}$

- o systemy jednowymiarowe HPLC

a) – gradient liniowy:

G_1 – od 6% do 31% A w A+G, od 0 min do 50 min

G_2 – od 3% do 42% B w B+E, od 0 min do 40 min

G_3 – od 3% do 53% D w D+E, od 0 min do 30 min

G_4 – od 3% do 48% A w A+E, od 0 min do 27 min

G_5 – od 3% do 70% C w C+E, od 0 min do 40 min

G_6 – od 2% do 37% A w A+F, od 0 min do 60 min

G_7 – od 20% do 50% A w A+F, od 0 min do 15 min

G_8 – od 2% do 17% A w A+F, od 0 min do 25 min

G_9 – od 2% do 17% A w A+G, od 0 min do 20 min

b) – gradient liniowo-skokowy według programu G_{10} (Tabl. 1)

Tabl.1. Program gradientu liniowo-skokowego – G_{10} .

Czas (min)	C (% v/v)	H (% v/v)	prędkość przepływu (ml/min)
0 – 20	2	98	0,9
20,1 – 31	48,6	51,4	0,92
31,1 – 40	31	69	0,8
40,1 – 90	31	69	0,8

- o system dwuwymiarowy HPLC – gradient liniowy:

G_{11} – od 3% do 70% C w C + F, od 0 min do 50 min – I wymiar.

4.4. Chromatografia preparatywna.

4.4.1. Preparatywna chromatografia cienkowarstwowa (TLC i HPTLC).

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono na:

- płytkach szklanych pokrytych żelem krzemionkowym TLC – Silica gel 60 (20 cm × 20 cm) (0,25 mm) (Merck, Niemcy) z użyciem fazy ruchomej S_1
- płytkach szklanych pokrytych żelem krzemionkowym HPTLC modyfikowanym grupami propylodiolowymi – Diol F_{254S} (10 cm × 10 cm) (0,2 mm) (Merck, Niemcy) stosując technikę wielokrotnej elucji gradientowej – MGD (*Multiple Gradient Development*) [145,146] oraz fazy ruchome: S_{51} , S_{52} i S_{53} .

Ekstrakty metanolowe nanoszono w formie pasma o długości 18 cm. Rozwinięte chromatogramy analizowano w świetle lampy UV zaznaczając pasma analizowanego związku. Warstwy adsorbentu ze związkiem zdejmowano z płytek i ekstrahowano metanolem (3 × 20 ml) na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną w temp. 60°C (30 min). Po odsączeniu adsorbentu otrzymane wyciągi metanolowe połączono, a następnie rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Suche pozostałości rozpuszczono w metanolu i analizowano chromatograficznie (TLC, HPTLC, HPLC).

4.4.2. Preparatywna chromatografia kolumnowa (CC).

Stosowano kolumny szklane o różnych rozmiarach wypełnione adsorbentami:

- a) poliamid – Polyamide (Roth, Niemcy)
- b) celuloza – CF-11 (Whatmann, Niemcy)
- c) żel krzemionkowy – Silica gel 60 (Macherey Nagel, Niemcy).

Jako fazy ruchome stosowano mieszaniny rozpuszczalników

Lp.	Faza ruchoma		
	Indeks	Rozpuszczalniki	Stosunek objętościowy
1.	S ₆₂	metanol / woda	60+40
2.	S ₆₃	metanol / woda	80+20
3.	S ₆₄	metanol	
4.	S ₁	octan etylu / metanol / woda	7+13+10

4.4.3. Preparatywna wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC).

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono z użyciem systemu przedstawionego w punkcie 3.2.2. oraz

- kolumny dozującej (125 mm × 4 mm) wypełnionej żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi LiChrorep™ RP-18 (40-63 μm) (Merck, Niemcy) i
- kolumny preparatywnej wypełnionej żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi Lichrosorb RP-18 (250 mm × 110 mm, 7 μm) (Merck, Niemcy).

Stosowano elucję gradientową według programu gradientu **G₁₂**: (rozpuszczalnik A – acetonitryl, rozpuszczalnik J – woda) od 2% do 60% A w A+J (t_G = 150 min), prędkość przepływu fazy ruchomej v = 5,0 ml/min, detekcja UV o długości fali λ = 280nm.

5. Ekstrakcja materiału roślinnego rozpuszczalnikami organicznymi do celów analizy chromatograficznej.

5.1. Ekstrakcja pochodnych salicylowych wolnych i związanych estrowo z materiału roślinnego.

Sproszkowaną korę wierzby (300 mg) ekstrahowano:

- a) metanolem (3×30 ml) pod chłodnicą zwrotną (temp. 60°C , 45 min)
- b) metanolem (3×10 ml) w płuczce ultradźwiękowej (temp. pok., 10 min)
- c) mieszaniną aceton / woda (80+20 v/v) (3×50 ml) w homogenizatorze (temp. pok., 3 min)
- d) mieszaniną metanol / woda (50+50 v/v) (3×50 ml) w homogenizatorze (temp. pok., 3 min).

Otrzymane wyciągi metanolowe lub acetonowe połączono, a następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu (5 ml).

5.2. Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej prostych fenoli oraz polifenoli.

Wysuszoną w warunkach naturalnych korę wierzby sproszkowano. Surowiec (6 g) ekstrahowano metanolem (3×180 ml) w temperaturze 60°C pod chłodnicą zwrotną (45 min). Połączone ekstrakty metanolowe zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem (30 ml). Z otrzymanego wyciągu pobierano dwie próbki o objętości 5 ml. Pierwszą przeznaczono do jakościowych badań chromatograficznych pochodnych salicylowych, fenolokwasów oraz polifenoli, natomiast drugą do oznaczeń sumy związków salicylowych. Z pozostałej objętości ekstraktu metanolowego (20 ml) oddestylowano rozpuszczalnik, a suchą pozostałość rozpuszczono w wodzie.

5.3. Przygotowanie próbek do analizy fenolokwasów.

Wodny wyciąg (20 ml) ekstraktu metanolowego pozostawiono w chłodni (24 h) i przesączono w celu usunięcia balastów. Następnie przesącz wytrząsano z eterem etylowym (4×20 ml). Z połączonych ekstraktów eterowych oddestylowano rozpuszczalnik, a suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu (3 ml) i przeznaczono do badań chromatograficznych (wolne fenolokwasy). Pozostałość wodną po ekstrakcji eterem podzielono na dwie równe objętości (10 ml) i poddano odpowiednio hydrolizie alkalicznej i kwaśnej według procedury opisanej w punkcie 7.2. i 7.4. w celu uwolnienia związków fenolowych oraz polifenolowych z połączeń o charakterze estrów i glikozydów, odpowiednio.

5.4. Przygotowanie próbek do analizy ilościowej.

Ekstrakty do analizy ilościowej otrzymano według procedury opisanej w punkcie 5.2. Otrzymane wyniki stanowią średnie z trzech oznaczeń. Do analizy sumy salicyny i jej estrowych pochodnych, przeznaczono próbkę o objętości 5 ml pobraną z ekstraktu pierwotnego.

6. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE).

Stosowano kolumny szklane SPE o wymiarach: 200 mm × 4 mm, 140 mm × 4 mm, 42 mm × 4 mm oraz kolumny szklane Bakerbond o pojemności 8 ml wypełnione żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi LiChroprep™ RP-18 (40–63 μm) (Merck, Niemcy), zaopatrzone w spieki teflonowe (PTFE) (J.T. Baker, Holandia) oraz krążki bibuły filtracyjnej.

Stosowano mieszaniny rozpuszczalników – eluenty

Lp.	Eluent		
	Indeks	Rozpuszczalniki	Stosunek objętościowy
1.	S ₆₅	acetonitryl / woda	2+98
2.	S ₅₉	acetonitryl / woda	20+80
3.	S ₆₀	acetonitryl / woda	30+70
4.	S ₆₆	metanol / woda	3+97
5.	S ₆₇	metanol / woda	5+95
6.	S ₆₈	metanol / woda	7+93
7.	S ₆₉	acetonitryl	
8.	S ₆₄	metanol	

7. Hydroliza alkaliczna i kwasowa.

7.1. Hydroliza alkaliczna ekstraktów metanolowych.

Hydrolizę alkaliczną wyciągów metanolowych przeprowadzono według procedury stosowanej przez firmę „Herbapol” Wrocław [151] oraz według metody opisanej przez Cisowskiego i wsp. [37].

Do wyciągu metanolowego z kory wierzby (5 ml) dodano 0,1 M KOH (1,7 ml) i ogrzewano na łaźni wodnej (60°C) (1,5 h). Hydrolizat zobojętniono 1 M HCl (0,17 ml) i uzupełniono metanolem w kolbie miarowej do objętości 25 ml. Wyciąg metanolowy przeznaczono do badań chromatograficznych (TLC, HPLC) lub po usunięciu do sucha rozpuszczalnika oczyszczano według procedury opisanej w piśmiennictwie [37]. Suchą pozostałość zawieszano w 10 ml wody i ekstrahowano octanem etylu (5 × 20 ml). Frakcje octanowe połączono i po zagęszczeniu do sucha rozpuszczono w metanolu (25 ml). Otrzymany roztwór metanolowy analizowano chromatograficznie (HPLC).

7.2. Hydroliza alkaliczna frakcji wodnych ekstraktów metanolowych.

Wodną pozostałość po ekstrakcji eterem (15 ml) zalkalizowano 4% KOH do pH ~ 12 i pozostawiono w temperaturze pokojowej (4 h). Następnie roztwór zobojętniono i ekstrahowano eterem etylowym (4 × 15 ml). Z połączonych wyciągów eterowych oddestylowano rozpuszczalnik a suchą pozostałość rozpuszczono w 3 ml metanolu i przeznaczono do dalszych badań (TLC, HPTLC, HPLC).

7.3. Hydroliza alkaliczna wyodrębnionych związków naturalnych.

2 mg związku hydrolizowano 4% KOH w temperaturze pokojowej (4 h). Następnie roztwór zobojętniano 10% HCl i ekstrahowano eterem etylowym. Frakcję eterową i pozostałość wodną analizowano chromatograficznie.

7.4. Hydroliza kwasowa frakcji wodnych ekstraktów metanolowych.

Wodną pozostałość po ekstrakcji eterem etylowym (15 ml) zakwaszono 2 M HCl do pH ~ 2 i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną ($t = 100^{\circ}\text{C}$, 0,5 h). Po ostudzeniu hydrolizat zobojętniono do pH = 7 i ekstrahowano eterem (4 × 15 ml). Z połączonych wyciągów eterowych oddestylowano rozpuszczalnik a suchą pozostałość rozpuszczono w 3 ml metanolu i przeznaczono do badań chromatograficznych (TLC, HPTLC, HPLC).

7.5. Hydroliza kwasowa wyodrębnionych związków naturalnych.

1 mg związku hydrolizowano 1 M wodno-metanolowym (1+1, v/v) roztworem HCl (2 ml) w temperaturze wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną (1 h). Następnie z hydrolizatu oddestylowano rozpuszczalnik i odparowywano kwas solny. Suchą pozostałość rozpuszczono w wodzie (2 ml) i ekstrahowano eterem etylowym w celu analizy chromatograficznej wolnych aglikonów. Pozostałość wodną analizowano na obecność wolnych cukrów (TLC).

8. Analiza spektralna.

8.1. UV (MeOH) – Unicam SP 1750 PYE.

Widma wykonano według procedury opisanej w literaturze [139].

8.2. ^1H NMR – 90 MHz Jeol, 300 MHz Bruker MSL 300, TMS wzorzec wewnętrzny.

8.3. ^{13}C NMR – 90 MHz Jeol, 75,5 MHz Bruker MSL 300, TMS wzorzec wewnętrzny.

8.4. EI-MS – 70 eV, Jeol 100.

8.5. FAB-MS (+) spektrometr Trio-3 VG (Masslab, Wielka Brytania), tiogliceryna.

9. Materiał roślinny.

Badaniami objęto wysuszone w warunkach naturalnych kory 38 gatunków i klonów z rodzaju *Salix*, którym dla odróżnienia materiału pochodzącego z różnych źródeł (warunki naturalne lub uprawa) nadano indeksy w zakresie: 7001 – 7043. Materiał roślinny stanowiły:

Lp.	Gatunek/klon	Indeks	Data zbioru	Występowanie
1.	<i>Salix acutifolia</i>	7031 N*	IV 2004	Poznań – Dębina
2.	<i>S. alba</i>	7032 N	IV 2004	Poznań – Dębina
3.	<i>S. alba</i> klon 1100	7001 U*	III/IV 2003	UWM*, Olsztyn
4.	<i>S. × americana</i> klon 1036	7002 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn
5.	<i>S. amygdalina × viminalis</i> klon 1155	7003 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn
6.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095	7004 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn
7.	<i>S. daphnoides</i>	7033 N	IV 2004	Poznań – Chartowo
8.	<i>S. eriocephala</i>	7034 N	IV 2004	Poznań – Chartowo
9.	<i>S. × erythroflexuosa</i>	7019 U	III/IV 2004	OB UW*, Rogów
10.	<i>S. fragilis</i>	7035 N	IV 2004	Poznań – Chartowo
11.	<i>S. fragilis</i> var. <i>sphaerica</i>	7020 U	III/IV 2004	OB UW, Rogów
12.	<i>S. herbacea</i>	7030 U	IV 2004	ORL AM*, Gdańsk
13.	<i>S. lapponum</i>	7021 U	III/IV 2004	OB UW, Rogów
14.	<i>S. matsudana</i> ‘Tortuosa’	7028 U	IV 2004	ORL AM, Gdańsk
15.	<i>S. melanostachys</i>	7022 U	III/IV 2004	OB UW, Rogów
16.	<i>S. nakamuraana</i> var. <i>yezoalpina</i>	7025 U	III/IV 2004	OB UW, Rogów
17.	<i>S. purpurea</i>	7036 N	IV 2004	Poznań – Dębina
18.	<i>S. purpurea</i>	7037 N	IV 2004	Poznań – Dębina
19.	<i>S. purpurea</i> klon 1038	7005 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn
20.	<i>S. purpurea</i> klon 1067	7006 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn
21.	<i>S. purpurea</i> klon 1081	7007 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn
22.	<i>S. purpurea</i> klon 1084	7008 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn
23.	<i>S. purpurea</i> klon 1101	7009 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn
24.	<i>S. purpurea</i> klon 1132	7010 U	III/IV 2004	UWM, Olsztyn
25.	<i>S. purpurea</i> klon 1136	7011 U	III/IV 2004	UWM, Olsztyn
26.	<i>S. purpurea</i> klon 1153	7012 U	III/IV 2004	UWM, Olsztyn
27.	<i>S. purpurea</i> klon 1156	7013 U	III/IV 2004	UWM, Olsztyn
28.	<i>S. purpurea</i> klon 1157	7014 U	III/IV 2004	UWM, Olsztyn
29.	<i>S. purpurea × daphnoides</i> klon 1107	7015 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn;
30.	<i>S. rosmarinifolia</i>	7023 U	III/IV 2004	OB UW, Rogów
31.	<i>S. sachalinensis</i> ‘Sekka’	7026 U	IV 2004	ORL AM, Gdańsk
32.	<i>S. × sepulcralis</i>	7027 U	IV 2004	ORL AM, Gdańsk
33.	<i>S. silesiaca</i>	7024 U	III/IV 2004	OB UW, Rogów
34.	<i>S. triandra</i> klon 1044	7016 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn
35.	<i>S. triandra</i> klon 1045,	7017 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn
36.	<i>S. triandra</i>	7038 N	IV 2004	Poznań – Dębina
37.	<i>S. viminalis</i>	7029 U	IV 2004	ORL AM, Gdańsk
38.	<i>S. viminalis</i> klon 1083	7018 U	III/IV 2003	UWM, Olsztyn

*Objaśnienia:

U – materiał roślinny pochodzący z upraw

N – materiał roślinny pochodzący z warunków naturalnych

UWM, Olsztyn – kolekcja Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

ORL AM, Gdańsk – Ogród Roślin Leczniczych Akademii Medycznej w Gdańsku

OB UW, Rogów – Ogród Botaniczny Uniwersytetu Warszawskiego w Rogowie

Ponadto do analiz przeznaczono materiał roślinny z firm zielarskich oraz ekstrakty suche otrzymane metodą perkolacji według FP VI [55] w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych Akademii Medycznej w Gdańsku.

Lp	Materiał roślinny	Indeks	Seria	Pochodzenie
1.	kora <i>S. alba</i> + <i>S. purpurea</i>	7039 N	1423.2004	Kawon, Gostyń
2.	kora <i>S. alba</i> lub <i>S. purpurea</i>	7040 N	11/2004	Flos, Mokrsk
3.	kora <i>S. purpurea</i>	7041 N	–	Herbapol, Gdańsk
4.	kora <i>S. purpurea</i>	7042 N	020725	Herbapol, Wrocław
5.	kora <i>S. purpurea</i>	7043 U	WIZ01904031	Labofarm, Starogard
6.	ekstrakt suchy z kory <i>S. alba</i> klon 1100	7044	–	K.Z.F.ORLAMG*
7.	ekstrakt suchy z kory <i>S. daphnoides</i> klon 1095	7045	–	K.Z.F.ORLAMG
8.	ekstrakt suchy z kory <i>S. purpurea</i> (7043)	7046	–	K.Z.F.ORLAMG

*Objaśnienia: K.Z.F. ORL AMG – Katedra i Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych w Gdańsku.

9.1. Oznaczanie zawartości wody w korze wierzb.

Ocenę zawartości wody w badanych korach wierzb przeprowadzono metodą suszenia wg FP VI [55]. Strata masy surowców po suszeniu wynosiła od 10% – 12%.

10. Analiza chromatograficzna pochodnych alkoholu salicylowego i innych pochodnych prostych fenoli.

10.1. Analiza chromatograficzna jakościowa.

10.1.1. TLC.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono na płytkach szklanych pokrytych:

- żelem krzemionkowym – Silica gel 60 (20 cm × 20 cm) w nasyconej (t = 20 min) komorze pionowej Chropa z użyciem fazy ruchomej S₁. Po rozwinięciu chromatogramów, na dystansie 6 cm, związki wywoływano za pomocą odczynnika tymolowego (punkt 4.1.3.1.a). Chromatogramy analizowano densytometrycznie przy długości fali $\lambda = 500$ nm, stosując skanowanie liniowe o parametrach szczeliny 0,02 mm × 2,0 mm.

10.1.2. HPLC.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono z użyciem:

- systemu HPLC przedstawionego w punkcie 3.2.1.1.a. i kolumn chromatograficznych:

a) Supelcosil™ LC-18 (150 mm × 3 mm, 3 μm) według programu gradientu **G₁** ($t_G = 50$ min), $t = 25^\circ\text{C}$, pętla dozująca 20 μl, przepływ fazy ruchomej $v = 0,6$ ml/min, detekcja UV przy długości fali $\lambda = 280$ nm,

b) Chromolith Performance Si (100 mm × 4,6 mm) stosując elucję izokratyczną i fazę ruchomą **S₆₁**, $t = 20^\circ\text{C}$, pętla dozująca 2,8 μl, $v = 1$ ml/min, detekcja UV przy długości fali $\lambda = 220$ nm.

Ponadto rozdzielanie prowadzono z użyciem

- systemu HPLC przedstawionego w punkcie 3.2.1.1.c. i kolumn chromatograficznych:

a) kolumny Chromolith Performance Si (100 mm × 4,6 mm) połączonej za pomocą łącznika z

b) kolumną Chromolith Performance RP-18e (100 mm × 4,6 mm) według programów elucji: **G₂** ($t_G = 40$ min), **G₃** ($t_G = 30$ min), **G₄** ($t_G = 27$ min), **G₅** ($t_G = 40$ min), $t = 30^\circ\text{C}$, pętla dozująca 20 μl, $v = 1$ ml/min, detekcja UV przy długości fali $\lambda = 268$ nm oraz detekcja ELS – poziom 1, układ *off mode*, prędkość przepływu gazu $v = 3,2$ l/min, temperatura fazy ruchomej w kapilarze: **G₂** - $113,2^\circ\text{C}$, **G₃** - $112,8^\circ\text{C}$, **G₄** - $113,7^\circ\text{C}$, **G₅** - $113,3^\circ\text{C}$.

Analizy z użyciem detektora ELS przeprowadzono, w ramach umowy polsko-flandryjskiej, w Katedrze Chemii Analitycznej i Technologii Farmaceutycznej (FABI), Instytutu Farmaceutycznego na Wolnym Uniwersytecie (VUB) w Brukseli (Belgia).

10.2. Analiza ilościowa salicyny metodą SPE-HPLC z użyciem metody wzorca zewnętrznego [224].

10.2.1. Ekstrakcja do fazy stałej salicyny (SPE).

Szklane kolumny SPE (200 mm × 4 mm) wypełnione modyfikowanym chemicznie żelem krzemionkowym LiChroprep™ RP-18 (40–63 μm) (150 mg) kondycjonowano kolejno acetonitrylem **S₆₉** (6 ml) i eluentem **S₆₅** (6 ml). Z roztworu wzorcowej salicyny i analizowanych próbek: wyciągów metanolowych i hydrolizatów alkalicznych ekstraktów metanolowych (50 μl) odparowano rozpuszczalnik w strumieniu helu. Suchą pozostałość rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników **S₆₅** (100 μl). Następnie 50 μl próbki nanoszono na kolumnę SPE, którą wymywano eluentem **S₆₅**, kontrolując przepływ mieszaniny rozpuszczalników strumieniem helu (0,5 atm, prędkość przepływu $v = 0,4$ ml/min). Zbierano frakcje o objętości 1,5 ml (frakcja I) i 3,5 ml (frakcja II). Liofilizat frakcji II rozpuszczono w metanolu (200 μl) i analizowano metodą HPLC.

Odzysk salicyny metodą SPE oznaczono dla roztworu salicyny o stężeniu 1 mg/ml, który nanoszono (200 μ l) na kolumny SPE ($n = 6$) i wmywano eluentem S₆₅. Następnie postępowano według procedury opisanej powyżej. Średni odzysk salicyny wynosił $97,67\% \pm 1,26$.

10.2.2. Warunki rozdzielania chromatograficznego.

Separację prowadzono z użyciem systemu przedstawionego w punkcie 3.2.1.1.a. na kolumnie Discovery C18 (150 mm \times 2,1 mm, 5 μ m), stosując elucję izokratyczną i fazę ruchomą S₅₄, $t = 20^\circ\text{C}$, pętla dozująca 20 μ l, $v = 0,4$ ml/min, detekcja UV przy długości fali $\lambda = 210$ nm.

10.2.3. Walidacja metody.

Krzywą regresji wyznaczono w oparciu o analizę pól powierzchni pików odpowiadających stężeniom salicyny: 1,25; 2,50; 5,00; 6,50; 8,00 i 10,0 μ g/ml, przygotowanych z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/ml.

Równanie regresji: $y = 1,07x - 0,31$; współczynnik korelacji $r = 0,9998$.

Wyznaczone zgodnie z danymi literaturowymi [88] granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) salicyny wynosiły 1,50 μ g/ml i 5,0 μ g/ml, odpowiednio.

10.3 Analiza pirokatechiny.

10.3.1. Analiza chromatograficzna jakościowa.

10.3.1.1. TLC.

Analizę chromatograficzną prowadzono stosując płytki szklane pokryte:

- celulozą – Cellulose (20 cm \times 20 cm) i fazę ruchomą S₁₀,
- modyfikowanym chemicznie żelem krzemionkowym – RP-18 F_{254S} (10 cm \times 20 cm) i fazę ruchomą S₁₃.

Chromatogramy rozwijano w komorach pionowych Chropa na dystansie 8 cm, a następnie analizowano w świetle lampy UV $\lambda = 254$ nm przed i po derywatywacji zdiawozanym kwasem sulfanilowym (punkt 4.1.3.4.a).

10.3.1.2. MGD – HPTLC.

W badaniach wykorzystano warunki rozdzielania chromatograficznego opisane w punkcie 11.1.3.

10.3.2. Analiza ilościowa pirokatechiny.

10.3.2.1. Analiza ilościowa metodą HPLC z użyciem metody wzorca zewnętrznego [224].

10.3.2.1.1. Warunki rozdzielania chromatograficznego.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono z użyciem systemu HPLC przedstawionego w punkcie 3.2.1.1.a. na kolumnie Discovery HS C-18 (75 mm × 4,6 mm, 3 μm), według programu G₉ (t_G = 20 min), t = 20° C, pętla dozująca 2,8 μl, v = 0,5 ml/min, detekcja UV o długości fali λ = 280 nm.

10.3.2.1.2. Sporządzanie krzywej regresji.

Krzywą regresji wyznaczono w oparciu o analizę stężeń pirokatechiny: 0,02; 0,03; 0,04; 0,07; 0,10 i 0,30 mg/ml, przygotowanych z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/ml. Równanie regresji: $y = 0,0071 x - 0,0023$ o współczynniku korelacji $r = 0,9999$.

10.3.2.2. Analiza ilościowa metodą MGD-HPTLC.

10.3.2.2.1. Warunki rozdzielania chromatograficznego.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono według opisu w punkcie 11.1.3.

Roztwory substancji wzorcowych oraz ekstrakty z kory wierzby (2–6 μl) nanoszono na płytki chromatograficzne techniką *data-pair* [168], w formie pasma (s = 5 mm) za pomocą półautomatycznego aplikatora AS 30 z prędkością 3 μl/s. Otrzymane chromatogramy analizowano densytometrycznie, stosując skanowanie meandrem (s = 7 mm, parametry szczeliny 0,4 mm × 0,4 mm) w świetle UV o długości fali λ = 254 nm.

10.3.2.2.2. Walidacja metody.

W oparciu o dane literaturowe [168] przeprowadzono walidację metody uwzględniając liniowość, precyzję aparatu, powtarzalność oraz granicę wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) (Tabl. 2).

Krzywą regresji wyznaczono w oparciu o analizę pól powierzchni pików odpowiadających ilościom pirokatechiny: 200, 250, 500, 750, 1000, 1250 i 1350 ng / 2 μl.

Tabl. 2. Wartości parametrów walidacji analizy ilościowej pirokatechiny metodą SPE-HPTLC.

Parametry walidacji	UV λ = 280 nm
Liniowość	$y = 0,20 x + 3,52$
(krzywa regresji, współczynnik korelacji – r)	$r = 0,9992$
Granica wykrywalności (DL) [ng]	60 ng
Granica oznaczalności (QL) [ng]	200 ng
Precyzja aparatu [CV](n=7)	0,77 %
Powtarzalność [CV](n=7)	1,96 %
Precyzja pośrednia [CV](n=7)	2,53 %

11. Analiza chromatograficzna związków flawonoidowych i fenolokwasów.

11.1. Analiza chromatograficzna jakościowa.

11.1.1. TLC.

Analizę chromatograficzną fenoli prowadzono stosując płytki szklane pokryte:

- celulozą – Cellulose (20 cm × 20 cm) lub Cellulose F_{254S} (10 cm × 20 cm) i fazy ruchome: S₂, S₃, S₄, S₆, S₁₀,
- poliamidem – Polyamide 11 F_{254S} (20 cm × 20 cm) i fazę ruchomą S₁₄,
- żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi RP-18 F_{254S} (10 cm × 20 cm) i fazę ruchomą S₁₃.

Chromatogramy rozwijano w komorach pionowych Chropa na dystansie 8 cm, a następnie analizowano w świetle lampy UV $\lambda = 254$ nm i 366 nm przed i po derywatywacji odczynnikami wywołującymi wymienionymi w punktach 4.1.3.3. i 4.1.3.4.

11.1.2. 2D TLC.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono na płytkach szklanych pokrytych

- celulozą – Cellulose F_{254S} (10 cm × 20 cm) w fazie ruchomej: S₆ w pierwszym kierunku oraz w fazie ruchomej S₄ w drugim kierunku.

Chromatogramy rozwijano w komorach pionowych Chropa na dystansie 8 cm i analizowano w świetle UV o długości fali $\lambda = 254$ nm i 366 nm przed i po derywatywacji odczynnikami wywołującymi (punkt 4.1.3.3).

11.1.3. MGD – HPTLC.

Rozdzielenie chromatograficzne prowadzono na płytkach szklanych pokrytych

- modyfikowanym chemicznie żelem krzemionkowym – Diol F_{254S} w komorze poziomej DS II d, na dystansie 4 cm (warunki nienasycone), stosując trójstopniowy gradient fazy ruchomej techniką wielokrotnej elucji gradientowej – MGD [145,146]:

I etap: faza ruchoma S₅₁,

II etap: faza ruchoma S₅₂,

III etap: faza ruchoma S₅₃.

Otrzymane chromatogramy analizowano w świetle lampy UV oraz densytometrycznie stosując skanowanie liniowe przy długości fali $\lambda = 254$ nm (parametry szczeliny: 0,02 mm × 2,0 mm).

11.1.4. HPLC.

11.1.4.1. Analiza jakościowa flawanonów i chalkonów.

Do separacji użyto systemów HPLC przedstawionych w punktach 3.2.1.1.a. lub 3.2.1.1.b. Stosowano kolumnę Discovery C-18 (150 mm × 2,1 mm, 5 μm) i elucję gradientową według programu G₆ (t_G = 90 min), t = 20°C, pętla dozująca 20 μl, prędkość przepływu 0,4 ml/min, detekcja UV przy długości fali λ = 280 nm.

Analizy z użyciem systemu opisanego w punkcie 3.2.1.1.b. przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Biofarmacji i Farmakodynamiki Akademii Medycznej w Gdańsku.

11.1.4.2. Analiza jakościowa fenolokwasów i flawonów.

Do separacji użyto system HPLC przedstawiony w punkcie 3.2.1.1.a. Stosowano kolumnę Lichrospher 100 RP-18e (250 mm × 4 mm, 5 μm) i gradient liniowo-skokowy według programu G₁₀ (t_G = 90 min), t = 20°C, pętla dozująca 20 μl. Detekcję związków prowadzono w świetle UV przy zmieniającej się długości fali światła, mianowicie: przy długości fali λ = 265 nm od 0 min do 22 min, a następnie przy długości fali λ = 280 nm od 22,1 min do 90 min.

11.2. Analiza ilościowa flawanonów metodą HPLC z użyciem metody wzorca zewnętrznego [224].

11.2.1. Warunki rozdzielania chromatograficznego.

Rozdzielanie chromatograficzne związków prowadzono na kolumnie Supelcosil™ LC-18 (150 mm × 3 mm, 3 μm) według programu G₁ (t_G = 75 min), t = 20°C, pętla dozująca 20 μl, prędkość przepływu 0,4 ml/min, detekcja UV przy długości fali λ = 280 nm.

11.2.2. Sporządzanie krzywych regresji.

Krzywe regresji sporządzono dla następujących stężeń roztworów podstawowych substancji wzorcowych (1 mg / 5 ml) w mieszaninie rozpuszczalników acetonitryl / woda (6+94, v/v):

a) 7-O-glukozyd naryngeniny – stężenia: 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 i 60,0 μg/ml

równanie regresji: $y=1,12x + 1,10$, współczynnik korelacji $r = 0,9999$

b) naryngenina – stężenia: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,5; 4,0 μg/ml

równanie regresji: $y=0,37x + 0,08$, współczynnik korelacji $r = 0,9999$.

11.3. Analiza ilościowa chalconów metodą SPE-HPLC z użyciem metody wzorca zewnętrznego [224].

11.3.1. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) izosalipurpozydu i jego estru p-kumarowego.

Szklane kolumny SPE (42 mm × 4 mm) wypełnione modyfikowanym chemicznie żelem krzemionkowym LiChroprep™ RP-18 (40–63 μm) (300 mg) kondycjonowano acetonitrylem – S₆₉ (6 ml), a następnie eluentem S₅₉ (6 ml). Z wyciągu metanolowego z kory wierzby (80 μl) odparowano do sucha rozpuszczalnik w strumieniu helu. Suchą pozostałość rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników S₅₉ (80 μl) i naniesiono na kolumnę SPE, którą wmywano kolejno eluentem S₅₉ (5,2 ml) i S₆₀ (5 ml), kontrolując przepływ strumieniem helu (0,5 atm, $v = 0,4$ ml/min). Zbierano frakcje o objętości: 3,2 ml eluent S₅₉ (frakcja I), 2 ml S₅₉ (frakcja II), 2,7 ml S₆₀ (frakcja III), 2,3 ml S₆₀ (frakcja IV). Frakcje II i IV łączono, uzupełniano w kolbce miarowej rozpuszczalnikiem do objętości 10 ml i analizowano metodą HPLC.

Oznaczono odzysk izosalipurpozydu i jego estru p-kumarowego, który wynosił $82,51\% \pm 2,16$ i $95,83\% \pm 1,74$, odpowiednio.

11.3.2. Warunki rozdzielania chromatograficznego.

Separację prowadzono z użyciem systemu przedstawionego w punkcie 3.2.1.1.a. na kolumnie Discovery C-18 (150 mm × 2,1 mm, 5 μm) według programu G₇ ($t_G = 15$ min), $t = 21^\circ\text{C}$, pętla dozująca 20 μl, $v = 0,4$ ml/min, detekcja UV przy długości fali $\lambda = 280$ nm.

11.3.3. Sporządzanie krzywych regresji.

Krzywe regresji sporządzono dla następujących rozcieńczeń roztworów podstawowych substancji wzorcowych (1 mg / 5 ml) w mieszaninie rozpuszczalników acetonitryl / woda (20+80, v/v):

a) izosalipurpozyd – stężenia: 2,0; 2,5; 3,5; 4,5; 6,0 i 7,0 μg/ml

równanie regresji: $y = 4,02x - 0,26$, współczynnik korelacji $r = 0,9999$

b) ester p-kumarowy izosalipurpozydu – stężenia: 2,0; 2,5; 3,5; 4,5; 6,0 i 7,0 μg/ml

równanie regresji: $y = 0,964x + 0,263$, współczynnik korelacji $r = 0,9994$

c) izolikwirytygenina – stężenia: 9,0; 15,0; 21,0; 27,0; 32,0 i 36,0 μg/ml

równanie regresji: $y = 2,58x - 1,09$, współczynnik korelacji $r = 0,9995$.

11.4. Dwuwymiarowa wysokosprawna chromatografia cieczowa – 2D-HPLC.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono z użyciem systemu przedstawionego w punkcie 3.2.1.2. na kolumnach:

- Supelcosil LC-18 (150 mm × 3 mm, 3 μm) – I wymiar separacji
- Chromolith Performance RP18e (100 mm × 4,6 mm) – II wymiar separacji

oraz elucji gradientowej według programu G_{10} ($t_G = 150\text{min}$), $t = 20^\circ\text{C}$, pętla dozująca 2,5 μl, $v = 0,4\text{ ml/min}$, detekcja UV $\lambda = 280\text{ nm}$ – I wymiar separacji

i elucji izokratycznej stosując fazy ruchome: S_{55} , S_{57} , S_{58} , S_{59} , S_{60} , $v = 1,0\text{ ml/min}$, detekcja UV $\lambda = 210\text{ nm}$ – II wymiar separacji.

11.5. Analiza ilościowa fenolokwasów metodą 2D-HPLC z użyciem metody wzorca zewnętrznego [224].

11.5.1. Warunki rozdzielania chromatograficznego.

Rozdzielanie chromatograficzne związków prowadzono według opisu w punkcie 11.4.

11.5.2. Sporządzanie krzywych regresji.

Krzywe regresji sporządzono dla następujących stężeń roztworów podstawowych substancji wzorcowych przygotowanych z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg /5 ml:

a) kwas chlorogenowy – stężenia: 2,0; 5,0; 9,0; 12,0 i 15,0 μg/ml

równanie regresji: $y=0,94x - 0,04$, współczynnik korelacji $r = 0,9999$

b) kwas cynamonowy – stężenia: 1,0; 3,0; 6,0; 9,0 i 12,0 μg/ml

równanie regresji: $y=0,37x + 0,08$, współczynnik korelacji $r = 0,9997$

c) kwas protokatechowy – stężenia: 0,5; 2,5; 4,5; 6,5 i 8,0 μg/ml

równanie regresji: $y=0,38x + 0,01$, współczynnik korelacji $r = 0,9999$.

12. Analiza mono- i dimerycznych flawan-3-oli.

12.1. Analiza chromatograficzna jakościowa.

12.1.1. TLC.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono na płytkach szklanych pokrytych:

- żelem krzemionkowym – Silica gel 60 (20 cm × 20 cm) stosując fazę ruchomą S_{17} ,
- poliamidem – Polyamide 11 F_{254S} (20 cm × 20 cm) stosując fazy ruchome S_{14} i S_{15} .

Chromatogramy rozwijano w komorach pionowych na dystansie 4 cm lub 8 cm i analizowano w świetle lampy UV o $\lambda = 254$ nm oraz w świetle widzialnym po derywatywacji etanolowym roztworem waniliny w kwasie ortofosforowym (punkt 4.1.3.2.a).

12.1.2. HPTLC.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono na płytkach szklanych pokrytych:

- żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi – RP-18W (10 cm × 10 cm) stosując fazy ruchome S₂₇ i S₂₄ w komorze poziomej DS II d na dystansie 4 cm,
- żelem krzemionkowym – Silica gel 60 (10 cm × 10 cm) stosując fazę ruchomą S₁₇, w komorze pionowej na dystansie 2 cm.

Chromatogramy analizowano w świetle lampy UV o $\lambda = 254$ nm oraz po derywatywacji etanolowym roztworem waniliny w kwasie ortofosforowym (punkt 4.1.3.2.a).

12.1.3. MGD – HPTLC.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono na płytkach szklanych pokrytych:

- żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi – RP-18W (10 cm × 10 cm) w komorze poziomej DS-II d (warunki nienasycone), stosując trójstopniowy gradient fazy ruchomej techniką wielokrotnej elucji gradientowej (MGD) [145,146]:

I etap: faza ruchoma S₂₄, droga rozwijania d = 3 cm, czas rozwijania t = 10 min,

II etap: faza ruchoma S₂₅, d = 6 cm, t = 30 min,

III etap: faza ruchoma S₂₆, d = 9 cm, t = 45 min.

Otrzymane chromatogramy analizowano w świetle lampy UV o długości fali $\lambda = 254$ nm oraz densytometrycznie, stosując skanowanie liniowe (parametry szczeliny: 0,02 mm × 3 mm) w świetle UV o długości fali $\lambda = 275$ nm oraz po derywatywacji odczynnikiem wanilinowym (punkt 4.1.3.2.a) przy długości fali $\lambda = 500$ nm.

12.1.4. HPLC.

Analizę jakościową metodą HPLC prowadzono w warunkach opisanych w punkcie 11.1.4.1.

12.2 Analiza ilościowa katechin.

12.2.1. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) katechiny.

Szklane kolumny Octadecyl C₁₈ Bakerbond SPE (500 mg, 3 ml) kondycjonowano acetonitrylem – S₆₉ (4 ml), a następnie mieszaniną rozpuszczalników S₆₀ (4 ml). Ekstrakt

metanolowy z kory wierzby (200 μ l) наносzono na kolumnenkę SPE, a następnie oczyszczano wymywając złoże eluentem S₆₀ (4 ml). Oczyszczony ekstrakt zliofilizowano i rozpuszczono w metanolu (200 μ l). Roztwór metanolowy przeznaczono do badań metodą HPLC i HPTLC.

12.2.2. Analiza ilościowa metodą HPLC z użyciem metody wzorca zewnętrznego [224].

12.2.2.1. Warunki rozdzielania chromatograficznego.

Analizę prowadzono z użyciem systemu HPLC przedstawionego w punkcie 3.2.1.1.a. na kolumnie Purospher Star RP-18e (55 mm \times 4 mm, 3 μ m), według programu G₈ (t_G = 25 min), t = 22°C, pętla dozująca 20 μ l, v = 1,0 ml/min, detekcja UV o długości fali λ = 280 nm.

12.2.2.2. Walidacja metody.

Krzywe regresji sporządzono dla następujących stężeń roztworów podstawowych substancji wzorcowych (1 mg / 5 ml) w mieszaninie rozpuszczalników acetonitryl/woda+kwasy ortofosforowy (99,9+0,1, v/v) / (2+98, v/v):

a) katechyna – stężenia: 2,5; 4,5; 9,0; 13,0; 15,0 i 18,0 μ g/ml

równanie regresji: $y = 2,95x - 0,52$, współczynnik korelacji $r = 0,9998$

b) epikatechyna – stężenia: 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 i 10,0 μ g/ml

równanie regresji: $y = 2,93x + 0,03$, współczynnik korelacji $r = 0,9998$;

c) galusan katechiny – stężenia: 0,1; 0,5; 2,0; 4,0; 6,0 i 7,0 μ g/ml

równanie regresji: $y = 0,342x - 0,01$, współczynnik korelacji $r = 0,9997$.

Granica wykrywalności (LOD) i granica oznaczalności (LOQ) wynosiły, odpowiednio:

a) katechyna: 0,5 μ g/ml i 7,0 μ g/ml, b) epikatechyna: 0,2 μ g/ml i 1,0 μ g/ml, c) galusan katechiny: 0,01 μ g/ml i 0,7 μ g/ml i d) galokatechyna: 1,2 μ g/ml i 6,4 μ g/ml.

12.2.3. Analiza ilościowa metodą HPTLC.

12.2.3.1. Warunki rozdzielania chromatograficznego.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono na płytkach szklanych pokrytych:

- żel krzemionkowy modyfikowanym grupami oktadecylowymi – RP-18W F_{254S} z użyciem fazy ruchomej S₂₄ w komorze poziomej DS II d (warunki nienasycone) na dystansie 4 cm. Roztwory substancji wzorcowych oraz oczyszczone metodą SPE ekstrakty z kory wierzby

(2-6 μl) nanoszono na płytki techniką *data-pair* [168], w formie pasma ($s = 5 \text{ mm}$) za pomocą półautomatycznego aplikatora AS 30 z prędkością 3 $\mu\text{l/s}$.

Otrzymane chromatogramy analizowano densytometrycznie, stosując skanowanie meandrem ($s = 9 \text{ mm}$, parametry szczeliny 0,4 mm \times 0,4 mm) przed ($\lambda = 275 \text{ nm}$) i po wywołaniu chromatogramów za pomocą odczynnika wanilinowego (punkt 4.1.3.2.a) ($\lambda = 500 \text{ nm}$).

12.2.3.2. Walidacja metody.

W oparciu o dane literaturowe [168] przeprowadzono walidację metody, uwzględniając liniowość, precyzję aparatu, powtarzalność oraz granicę wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) (Tabl. 3).

Krzywą regresji wyznaczono w oparciu o korelację pól powierzchni pików odpowiadających ilościom katechiny: 500; 600; 700; 800; 900; 1000; 1100 ng / 2 μl .

Tabl. 3. Wartości parametrów walidacji analizy ilościowej katechiny metodą SPE-HPTLC.

Parametry walidacji	Sposób detekcji	
	UV $\lambda=282\text{nm}$	wanilina/ H_3PO_4 ($t=75^\circ\text{C}$), $\lambda=500\text{nm}$
Liniowość (krzywa regresji, współczynnik korelacji – r)	$y=0,2547 x + 2,7983$, $r = 0,9957$	$y= 0,93 x + 2,98$, $r = 0,9990$
Granica wykrywalności (DL) [ng/2 μl]	60	25
Granica oznaczalności (QL) [ng/2 μl]	200	85
Precyzja aparatu ($n=7$)[CV]	0,63	1,30
Powtarzalność ($n=7$)[CV]	0,92	12,15
Precyzja pośrednia ($n=7$)[CV]	1,30	12,92

12.3. Analiza ilościowa procyjanidyny B₁ metodą SPE-HPTLC.

12.3.1. Ekstrakcja SPE procyjanidyny B₁ z ekstraktów metanolowych.

Kolumny szklane SPE (4 mm \times 140 mm) wypełnione modyfikowanym chemicznie żelem krzemionkowym LiChroprep™ RP-18 (40–63 μm , 150 mg) kondycjonowano metanolem (5 ml), a następnie mieszaniną rozpuszczalników S₆₈ (5 ml). Z ekstraktu metanolowego (200 μl) odparowano rozpuszczalnik w strumieniu helu. Suchą pozostałość rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników S₆₈ (50 μl) i nanoszono na kolumnę. Następnie kolumnę wmywano eluentem S₆₈, kontrolując przepływ strumieniem helu (1 atm, $v = 0,5 \text{ ml/min}$). Otrzymany eluat (6 ml) liofilizowano, a następnie rozpuszczono w 300 μl metanolu i przeznaczono do badań metodą HPTLC.

Oznaczono odzysk procyjanidyny B₁ dla roztworu zawierającego 450 ng związku w 50 µl mieszaniny rozpuszczalników S₆₈. Próbę (n = 3) nanoszono na kolumny SPE i wmywano w powyżej opisany sposób. Średni odzysk procyjanidyny B₁ wynosił 89,9% ± 2,1.

12.3.2. Warunki rozdzielania chromatograficznego.

Separację prowadzono na płytkach szklanych pokrytych

- żelem krzemionkowym – Silica gel 60 (5 cm × 10 cm) z użyciem fazy ruchomej S₁₇ w nienasyconej komorze pionowej, o wymiarach: 100 mm × 60 mm × 90 mm, na dystansie 2 cm.

Roztwory substancji wzorcowych i oczyszczone metodą SPE ekstrakty z kory wierzby (2 µl) nanoszono na płytki techniką *data-pair* [168] w formie pasma (s = 5 mm) za pomocą półautomatycznego aplikatora AS 30 z prędkością 3 µl/s. Chromatogramy wywoływano za pomocą odczynnika wanilinowego i analizowano densytometrycznie, stosując skanowanie meandrem (s = 8 mm, parametry szczeliny 0,4 mm × 0,4 mm) w świetle o długości fali λ = 500 nm.

12.3.3. Walidacja metody.

W oparciu o dane literaturowe [168] w walidacji metody uwzględniono liniowość, precyzję aparatu, powtarzalność oraz granicę wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) (Tabl. 4).

Krzywą regresji wyznaczono w oparciu o analizę pól powierzchni pików odpowiadających ilościom procyjanidyny B₁: 200; 300; 500; 600; 700; 900 i 1000 ng / 2µl.

Tabl.4. Wartości parametrów walidacji analizy ilościowej procyjanidyny B₁ metodą SPE-HPTLC.

Parametry walidacji	wanilina/H ₃ PO ₄ (t=75°C), λ = 500 nm
Liniowość (krzywa regresji, współczynnik korelacji – r)	y = 0,66 x + 6,64, r = 0,9992
Granica wykrywalności (DL) [ng]	50
Granica oznaczalności (QL) [ng]	170
Precyzja aparatu (n=7)[CV]	1,26
Powtarzalność (n=7)[CV]	7,85
Precyzja pośrednia (n=7)[CV]	8,73

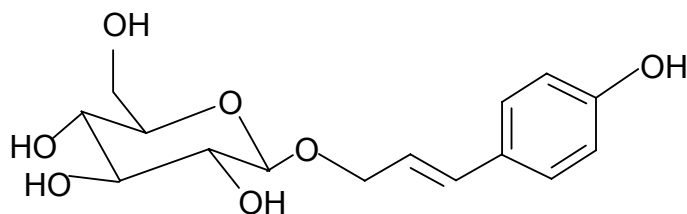
13. Izolacja związków naturalnych z materiału roślinnego.

13.1. Izolacja związków wzorcowych z grupy pochodnych prostych fenoli metodą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej.

13.1.1. Izolacja triandryny.

Sproszkowaną korę wierzby wiciowej – *S. viminalis* (7029) (20 g) poddano ekstrakcji metanolem (3×600 ml, $t = 60^\circ\text{C}$). Otrzymane ekstrakty zagęszczono w wyparce próżniowej do objętości 100 ml, a następnie наносono obustronnie na płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym – Silica gel 60 ($20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$). Chromatogramy rozwijano w pionowej komorze Chropa (warunki nasycone, $t = 20$ min) na dystansie 8 cm w fazie ruchomej S_1 . Chromatogramy wywoływano odczynnikiem tymolowym zaznaczając pasmo na wysokości analizowanego związku ($hR_F = 49$). W dalszym etapie pracy postępowano według procedury opisanej w punkcie 4.4.1.

Związek otrzymano w postaci krystalicznego osadu (5 mg) i jego strukturę potwierdzono metodą FAB-MS. Obecny w widmie masowym jon molekularny o masie 335 m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ odpowiada masie cząsteczkowej triandryny ($\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_8$).

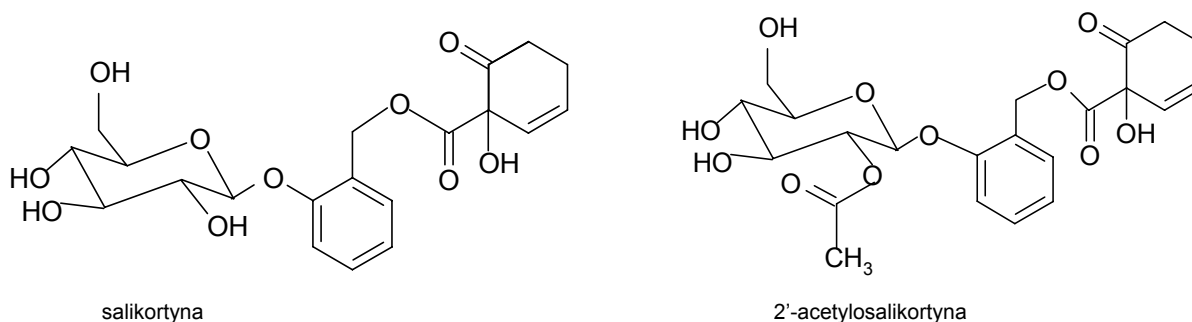


Ryc. 18. Wzór strukturalny triandryny.

13.1.2. Izolacja salikortyny i 2'-acetylosalikortyny.

Do izolacji a) salikortyny i b) 2'-acetylosalikortyny wykorzystano odpowiednio ekstrakty metanolowe z kory: a) *S. purpurea* (7037) i b) *S. fragilis* (7035), w których w oparciu o dane piśmiennictwa [16,27,102,150] i porównanie wartości hR_F stwierdzono obecność salikortyny i 2'-acetylosalikortyny. Ekstrakt наносono na płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym i postępowano według powyżej opisanej procedury chromatograficznej oddzielnie zdejmując pasma odpowiadające salikortynie ($hR_F = 52$) i 2'-acetylosalikortynie ($hR_F = 75$) [27]. Związki otrzymano w formie bezpostaciowych osadów odpowiednio w ilości 2 mg i 1 mg.

Identyfikację związków przeprowadzono w oparciu o hydrolizę alkaliczną, w której produktach stwierdzono obecność salicyny (TLC $R_F = 41$, HPLC $t_{G4} = 7$ min).



Ryc. 19. Wzory strukturalne wzorcowych związków salicylowych wyodrębnionych z kory *S. purpurea* (7037) – salikortyna i *S. fragilis* (7035) – 2'-acetylosalikortyna.

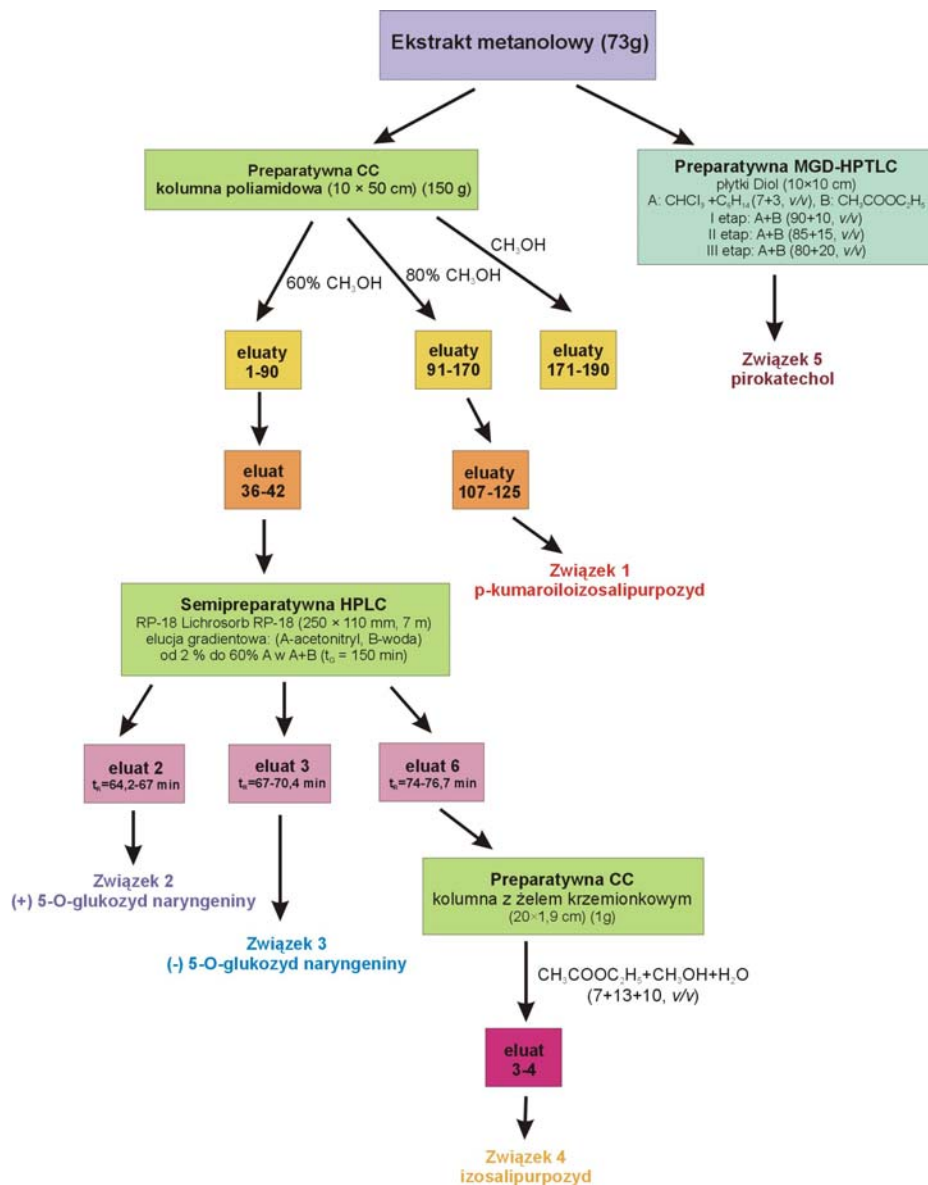
13.2. Izolacja prostych fenoli i polifenoli z kory *Salix purpurea* (7043).

13.2.1. Izolacja związków flawonoidowych z kory wierzby *S. purpurea* (7043).

Sproszkowaną korę wierzby *S. purpurea* (7043) (450,0 g) poddano wyczerpującej ekstrakcji metanolem pod chłodnicą zwrotną ($3 \times 4,5$ l, 45 min, $t = 60^\circ\text{C}$). Otrzymane ekstrakty po połączeniu zagęszczono w wyparce próżniowej i następnie zaadsorbowano na celulozie CF-11 (50 g). Matrycę celulozową naniesiono na kolumnę szklaną – K_1 ($\varnothing = 10$ cm) wypełnioną poliamidem (150 g, wysokość $h = 20$ cm). Związki flawonoidowe wmywano kolejno eluentami: S_{62} (eluaty 1 – 90), S_{63} (eluaty 91 – 170) oraz metanolem (S_{64}) (eluaty 171 – 190). Zbierano eluaty o objętości około 50 ml, które kontrolowano metodą TLC (płytki pokryte celulozą, faza ruchoma S_6 – układ Patridge'a) i łączono w zespoły. Z połączonych frakcji oddestylowano rozpuszczalnik, a suchą pozostałość rozpuszczono w 80% metanolu i umieszczono w lodówce (72 h). Z eluatów 107-125 wypadł krystaliczny osad o barwie żółtej – związek **1**. Natomiast w eluatach 36-42 wykazano chromatograficznie obecność związków **2**, **3** i **4**, które izolowano za pomocą semipreparatywnej HPLC (Ryc. 20).

Eluaty 36-42 z kolumny K_1 zaadsorbowano na żelu krzemionkowym RP-18 (40-63 μm) (6 ml) i umieszczono w stalowej kolumnie (125 mm \times 4 mm). W celu usunięcia powietrza z kolumny zastosowano gaz obojętny – hel ($v = 1,6$ ml/min). W układzie HPLC kolumnę zastosowano jako prekolumnę połączoną z kolumną semi-preparatywną Lichrosorb RP-18 (250 mm \times 110 mm, 7 μm), którą poprzez użycie zaworu dwudrożnego kondycjonowano mieszaniną acetonitrylu w wodzie (2+98, v/v) ($t = 15$ min).

Wymywanie naniesionych związków z adsorbentu oraz ich separację prowadzono przy użyciu elucji gradientowej w mieszaninie acetonitrylu i wody o wzrastającym stężeniu rozpuszczalnika organicznego od 2% do 60% ($t_G = 150$ min) (Ryc. 20).



Ryc. 20. Schemat izolacji związków fenolowych z kory wierzby purpurowej *S. purpurea* (7043).

Związek 2 ($t_R = 64,2$ min – 67min) (9 mg) i związek 3 ($t_R = 67$ min – 70,4 min) (10 mg) otrzymano w formie jasnych, krystalicznych osadów.

Frację zawierającą związek 4 ($t_R = 74$ min – 76,7 min) liofilizowano i następnie oczyszczano na kolumnie szklanej (20 cm x 1,9 cm) z żelalem krzemionkowym Silica gel 60 (0,075-0,15 mm), z użyciem eluentu S_1 , kontrolując przepływ strumieniem helu ($v = 0,5$ ml/min).

Zbierano eluaty o objętości 3 ml. Z połączonych eluatów 3-4 związek **4** otrzymano w formie żółtego, krystalicznego osadu (15 mg) (Ryc. 20). Otrzymane związki przeznaczono do badań identyfikacyjnych.

13.2.2. Izolacja prostych fenoli z kory *Salix purpurea* (7043).

Ekstrakt metanolowy z kory wierzby purpurowej – *S. purpurea* (7043) firmy „Labofarm” наносzono pasmowo na płytki szklane pokryte modyfikowanym chemicznie żelem krzemionkowym HPTLC Diol (10 cm × 10 cm) i rozwijano w komorze poziomej DS II d (warunki nienasycone) stosując elucję gradientową MGD [145,146] z użyciem faz ruchomych: S₅₁, S₅₂, S₅₃ na dystansie 4 cm (pkt. 12.3). Otrzymane chromatogramy analizowano w świetle lampy UV ($\lambda = 254$ nm) zaznaczając pasmo związku **5** ($hR_F = 64$). W kolejnym etapie pracy postępowano według procedury opisanej w punkcie 4.4.1. Związek **5** otrzymano w formie krystalicznego osadu (3 mg), który przeznaczono do badań identyfikacyjnych.

14. Identyfikacja związków.

Związek 1 – 6'-O-(6''-O-(E)-p-kumaroilo)- β -D-glukopiranozyd-2',4',4-trihydroksychalkonu (6''-p-kumaroiloizosalipurpozyd, ester p-kumarowy izosalipurpozydu). żółta, krystaliczna substancja. TLC celuloza: hR_F (S₂) = 55, hR_F (S₆) = 83. HPLC t_R (G₆) = 49,7 min. UV λ_{max} (MeOH) nm: 292 sh, 318, 368; + NaOMe: 320 sh, 366, 430; + AlCl₃: 318, 418; + AlCl₃/HCl: 316, 402; + CH₃COONa: 318, 382; CH₃COONa/H₃BO₃: 316, 388 sh, 424 sh. FAB-MS (+) m/z (rel.int.): 582 [M+2H]⁺ (95), 309 [M+A]⁺ (20), 273 [A+H]⁺ (60).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 3,5-3,3 (3H, m, H-2'', 3'', 4''), 3,60 (1H, t, H-5''), 4,15 (1H, dd, J=6,3/11,0 Hz, H-6''e), 4,42 (1H, d, J=11,0 Hz, H-6''a), 5,12 (1H, d, J=7,3 Hz, H-1''), 5,30 (1H, d, J=4,3 Hz, C-OH-3''), 5,41 (2H, dd, J=4,3/12,2 Hz, C-OH-2'', 4''), 5,98 (1H, d, J=2,4 Hz, H-3'), 6,20 (1H, d, J=2,4 Hz, H-5'), 6,32 (1H, d, J=16,2 Hz, H-8'''), 6,76 (1H, d, J=8,3 Hz, H-3''', 5'''), 6,82 (1H, d, J=8,8 Hz, H-3, 5), 7,42 (1H, d, J=8,30 Hz, H-2''', 6'''), 7,5 (1H, d, J=16,2 Hz, H-7'''), 7,60 (1H, d, J=15,6 Hz, H- α), 7,63 (1H, d, J=8,8 Hz, H-2, 6), 7,95 (1H, d, J=15,6 Hz, H- β), 10,00, 10,05 (1H, brs, C-OH-4, C-OH-4'''), 10,6 (1H, s, C-OH-4'), 13,9 (1H, s, C-OH-2').

¹³C NMR (MHz, DMSO-d₆) δ : 192,0 (C=O), 166,5 (C-9'''), 166,0 (C-4'), 164,7 (C-2'), 160,1 (C-6'), 159,9 (C-4'''), 159,9 (C-4), 144,9 (C-7'''), 142,9 (C- α), 130,8 (C-2, 6), 130,3 (C-2''', 6'''),

126,2 (C-1'''), 125,0 (C-β), 124,0 (C-1), 115,9 (C-3, 5), 115,7 (C-3''', 5'''), 113,8 (C-8'''), 105,5 (C-1'), 100,3 (C-1''), 97,0 (C-3'), 94,9 (C-5'), 76,5 (C-3''), 74,1 (C-5''), 73,6 (C-2''), 69,7 (C-4''), 63,2 (C-6'').

Produkty hydrolizy kwasowej – naryngenina (TLC celuloza: hR_F (S₂) = 75) i glukoza (TLC żel krzemionkowy: hR_F (S₁₁) = 26). Produkty hydrolizy zasadowej – kwas p-kumarowy (TLC RP-18: hR_F (S₁₃) = 28) i związek 4 (TLC celuloza: hR_F (S₂) = 42).

Związek 2 – (+)-5-O-β-D-glukopiranozyd-5,7,4'-trihydroksyflawanonu ((+)-5-O-glukozyd naryngeniny, salipurpozyd). biała, krystaliczna substancja. TLC celuloza: hR_F (S₃) = 60, hR_F (S₆) = 78. HPLC t_R (G₆): 23 min. UV λ_{max} (MeOH) nm: 224, 280. FAB-MS (+) m/z (rel.int.): 435 [M+H]⁺ (20), 272 [M – glukoza]⁺ (100).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 2,62 (1H, dd, J=17,0/2,5 Hz, H-3e), 3,08 (1H, dd, J=13/17 Hz, H-3a), 3,3 – 3,15 (4H, H-2'', 3'', 4'', 5''), 3,53 (1H, m, H-6''e), 3,72 (1H, dd, J=5,8/10,7 Hz, H-6''a), 4,64 (1H, t, C-OH-6''), 4,72 (1H, d, J=7,3 Hz, H-1''), 5,07 (1H, d, J=5,3 Hz, C-OH-3''), 5,12 (1H, d, J=4,8 Hz, C-OH-4''), 5,18 (1H, d, J=1,9 Hz, C-OH-2''), 5,36 (1H, dd, J=13/3 Hz, H-2), 6,11 (1H, d, J=2,5 Hz, H-6), 6,40 (1H, d, J=2,5 Hz, H-8), 6,78 (2H, d, J=8,8 Hz, H-3', 5'), 7,31 (2H, d, J=8,8 Hz, H-2', 6'), 9,60 (1H, s, C-OH-4'), 10,80 (1H, s, C-OH-7).

¹³C NMR (MHz, DMSO-d₆) δ: 190,1 (C-4), 164,9 (C-7), 164,2 (C-9), 160,7 (C-5), 157,7 (C-4'), 128,9 (C-1'), 128,3 (C-2', 6'), 115,1 (C-3', 5'), 105,5 (C-10), 103,4 (C-1''), 98,8 (C-6), 97,7 (C-8), 78,2 (C-2), 77,6 (C-5''), 75,6 (C-3''), 73,5 (C-2''), 69,6 (C-4''), 60,7 (C-6''), 44,5 (C-3).

Produkty hydrolizy kwasowej – naryngenina (TLC celuloza: hR_F (S₂) = 75) i glukoza (TLC żel krzemionkowy: hR_F (S₁₁) = 26).

Związek 3 – (-)-5-O-β-D-glukopiranozyd-5,7,4'-trihydroksyflawanonu (5-O-glukozyd naryngeniny, salipurpozyd). biała, krystaliczna substancja. TLC celuloza: hR_F (S₃) = 60, hR_F (S₆) = 78. HPLC t_R (G₆): 23 min. UV λ_{max} (MeOH) nm: 224, 280. FAB-MS (+) m/z (rel.int.): 435 [M+H]⁺ (20), 272 (100).

Produkty hydrolizy kwasowej – naryngenina (TLC celuloza: hR_F (S₂) = 75) i glukoza (TLC żel krzemionkowy: hR_F (S₁₁) = 26).

Związek 4 – 6'-O-β-D-glukopiranozyd-2',4',4'-trihydroksychalkonu (6'-O-glukozyd chalconaryngeniny, izosalipurpozyd). żółta, krystaliczna substancja. TLC celuloza: hR_F (S₂)

= 42, hR_F (S_6) = 66. HPLC t_R (G_6): 42,8 min. UV λ_{max} (MeOH) nm: 237 sh, 312 sh, 368; + NaOMe: 266 sh, 322 sh, 432; + $AlCl_3$: 258 sh, 340 sh, 420; + $AlCl_3/HCl$: 251 sh, 329 sh, 406; + CH_3COONa : 236 sh, 313 sh, 382; CH_3COONa/H_3BO_3 : 390 sh, 428. FAB-MS (+) m/z (rel.int.): 435 $[M+H]^+$ (30), 273 $[M+H - \text{glukoza}]^+$ (100).

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 3,28 – 3,40 (4H, m, H-2''-5''), 3,52 (1H, m, H-6''e), 3,71 (1H, d, $J=11,7$ Hz, H-6''a), 4,61 (1H, brs, C-OH-6''), 5,07 (1H, d, $J=7,0$ Hz, H-1''), 5,10 (1H, brs, C-OH-3''), 5,18 (1H, brd, $J=3,9$ Hz, C-OH-4''), 5,35 (1H, d, $J=5,9$ Hz, C-OH-2''), 5,97 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-3'), 6,18 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-5'), 6,82 (2H, d, $J=8,8$ Hz, H-3,5), 7,61 (1H, d, $J=15,6$ Hz, H- α), 7,65 (2H, d, $J=8,8$ Hz, H-2,6), 7,98 (1H, d, $J=15,6$ Hz, H- β), 10,14 (1H, s, C-OH-4), 10,59 (1H, s, C-OH-4'), 13,88 (1H, s, C-OH-2').

^{13}C NMR (MHz, DMSO- d_6) δ : 192,1 (C=O), 166,0 (C-4'), 164,6 (C-2'), 160,3 (C-6'), 159,9 (C-4), 142,8 (C- α), 130,8 (C-2,6), 126,2 (C- β), 124,2 (C-1), 115,9 (C-3,5), 105,6 (C-1'), 100,4 (C-1''), 96,9 (C-3'), 94,6 (C-5'), 77,3 (C-3''), 76,8 (C-5''), 73,7 (C-2''), 69,4 (C-4''), 60,5 (C-6'').

Produkty hydrolizy kwasowej – naryngenina (TLC celuloza: hR_F (S_2) = 75) i glukoza (TLC żel krzemionkowy: hR_F (S_{11}) = 26).

Związek 5 – *1,2-dihydroksybenzen (pirokatechol, pirokatechina, katechol)*. biała, krystaliczna substancja. TLC RP-18: hR_F (S_{13}) = 49, celuloza: hR_F (S_{10}) = 74. HPTLC Diol: hR_F (MGD: S_{51} , S_{52} , S_{53}) = 64, HPLC t_R (G_9): 15,5 min. UV λ_{max} (MeOH) nm: 220, 280. EI-MS: m/z (rel.int.) 110 $[M]^+$ (100).

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 6,71 (2H, dd, $J=5,9/3,4$ Hz, H-4,5), 6,59 (2H, dd, $J=5,9/3,4$ Hz, H-3, 6), 8,81 (2H, s, C-OH-1,2).

^{13}C NMR (MHz, DMSO- d_6) δ : 145,3 (C-1,2), 119,2 (C-4,5), 115,7 (C-3,6).

15. Badania aktywności cyto- i genotoksycznej pirokatechiny i innych związków czynnych z rodzaju *Salix* oraz ekstraktów suchych z kory wierzb.

Badania przeprowadzono we współpracy z Zakładem Ochrony i Biotechnologii Roślin Katedry Biotechnologii, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku.

15.1. Linie komórkowe.

15.1.1. Linie komórek adherentnych.

- ◇ Linia ludzkich fibroblastów skóry

Pochodzenie: Katedra Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej

- ◇ HeLa – linia ludzkich komórek nabłonkowych wywodzących się z komórek raka szyjki macicy

Pochodzenie: Katedra Histologii i Immunologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku.

15.1.2. Linie komórek zawieszonych.

- ◇ HL-60 – linia ludzkiej białaczki promielocytarnej

Pochodzenie: Katedra Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

15.2. Pożywki.

Tabl. 5. Skład pożywek do hodowli komórek ssaczych (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy).

Składnik	RPMI	MEM	DMEM
	mg/l	mg/l	mg/l
Aminokwasy			
L-arginina-HCl	200	126	84
L-asparagina*H ₂ O	56,82	-	-
L-kwas asparaginowy	20	-	-
L-cysteina-2HCl	65	31,3	62,6
L-kwas glutaminowy	20	-	-
L-glutamina	300	292	-
glicyna	10	-	30
L-histydyna	15	-	-
L-histydyna*HCl*H ₂ O	-	42	42
L-izoleucyna	50	52	105
L-leucyna	50	52	105
L-lizyna-HCl	40	72,5	146
L-metionina	15	15	30
L-feniloalanina	15	32	66
L-prolina	20	-	-
hydroksy-L-prolina	20	-	-
L-seryna	30	-	42
L-treonina	20	48	95
L-tryptofan	5	10	16
L-tyrozyna *2Na*2H ₂ O	28,83	51,9	103,79
L-walina	20	46	94

Składnik	RPMI	MEM	DMEM
	mg/l	mg/l	mg/l
Witaminy			
D-biotyna	0,2	-	-
chlorek choliny	3	1	4
D-pantotenian wapnia	0,25	1	4
kwasy foliowe	1	1	4
m-inozytol	35	2	7,2
niacynamid	1	1	4
pirydoksyna – HCl	1	-	4
pirydoksal – HCl	-	1	-
ryboflawina	0,2	0,1	0,4
tiamina – HCl	1	1	4
witamina B ₁₂	0,005	-	-
Kwas p-amino benzoesowy	1	-	-
Sole nieorganiczne			
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	100	-	-
CaCl ₂ *2H ₂ O	-	265	265
MgSO ₄ bez H ₂ O	48,8	97,67	97,67
KCl	400	400	400
NaCl	6000	6800	4400
Na ₂ HPO ₄ bez H ₂ O	800	-	-
NaH ₂ PO ₄ bez H ₂ O	-	122	109
NaHCO ₃	2000	2200	3700
Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O	-	-	0,1
Inne składniki			
D-glukoza	2000	1000	4500
czerwień fenolowa + Na	5,3	11	15,9
glutation	1	-	-
HEPES	-	-	5958

Tabl. 6. Składniki uzupełniające do pożywek do hodowli linii komórek ssaczy.

Składnik	RPMI	MEM	DMEM
Aminokwasy			
L-glutamina	-	-	584 [mg/l]
Antybiotyki			
Penicylina G	10000 [U/ml]	10000 [U/ml]	10000 [U/ml]
Streptomycyna	10000 [U/ml]	10000 [U/ml]	10000 [U/ml]
Amfoterycyna B	25 [µg/ml]	25 [µg/ml]	25 [µg/ml]
Pozostałe			
plodowa surowica bydlęca (FBS)	10 [%]	10 [%]	10 [%]

15.3. Roztwory buforowe.

- Bufor PBS – skład: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄ i 0,24 g/l K₂HPO₄.
- Bufor lizujący – skład: 1,21 g/l Tris, 164 mg/ml NaCl; 1% SDS; 0,1 M EDTA o pH 7,5 i 1% Triton X-100 o pH 10.
- Bufor alkaliczny – skład: 0,1 mM EDTA o pH 8 i 0,3 M NaOH.

15.4. Warunki hodowli komórek ludzkich.

Komórki hodowano w butelkach do hodowli komórkowych (objętość 50 ml), w inkubatorze, w temperaturze 37°C i obecności 5% CO₂. Linię HL-60 hodowano w pożywce RPMI – 1640, komórki HeLa w pożywce MEM, natomiast linię ludzkich fibroblastów skóry oraz linię MDA MB w pożywce DMEM (Tabl. 5,6). Linię komórek zawieszinowych pasażowano

co 2-3 dni. Zawiesinę komórek rozcieńczano w stosunku 1:4 świeżą pożywką do objętości ~ 5 ml. Linie komórek adherentnych pasażowano 2 razy w tygodniu. Starą pożywkę usuwano i komórki przemywano dwukrotnie buforem PBS, a następnie dodawano 1 ml trypsyny w ciągu 1-2 minut w celu oderwania komórek od podłoża. Następnie dodawano równą objętość świeżej pożywki. Połowę zawiesiny usuwano, a pozostałość rozcieńczano świeżą pożywką w stosunku 1:4.

Stan i żywotność komórek sprawdzano pod mikroskopem świetlnym. Liczbę komórek na jednostkę objętości szacowano przy pomocy hemocytometru, a martwe komórki wyznakowano barwnikiem Trypan Blue przy stosunku barwnika do zawiesiny komórkowej równym 1:1. Wszystkie czynności z liniami komórkowymi przeprowadzano w komorze laminarnej Biohazard.

15.5. Test MTT do określania aktywności cytotoksycznej.

Komórki rozsiano na mikroplątkach 96-dółkowych (*Tissue Culture Plate 96-well*) w ilości 10^5 /dółek. Po rozsianiu komórki pozostawiono do proliferacji przez dobę w temperaturze 37°C , w obecności 5% CO_2 . Następnie komórki traktowano poszczególnymi roztworami badanych związków i ekstraktów suchych z kory wierzby, o stężeniach w zakresie od 0 $\mu\text{g/ml}$ do 70 $\mu\text{g/ml}$. Próby nie poddane działaniu związków służyły jako kontrole, pozwalając na wyznaczenie 100-procentowej przeżywalności. Pod koniec inkubacji do dółków dodano MTT (1,2 mM) (Tabl.5,6). Po 3 godzinnej inkubacji z MTT pożywkę pobierano do analizy. Kryształki formazanu rozpuszczono w 100 μl DMSO. Absorbancję roztworu mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 570 \text{ nm}$. Ilość formazanu powstającego w komórkach inkubowanych z badanymi związkami porównano z ilością powstającą w próbach z kontrolą [161]. Przeżywalność wyliczono ze wzoru:

$$\text{Przeżywalność [\%]} = (A_{\text{próby}} - A_{\text{tla}}) / (A_{\text{kontroli}} - A_{\text{tla}}) \times 100$$

A – absorbancja

15.6. Test kometowy (*Single Cell Gel Electrophoresis* – SCGE) do określania aktywności genotoksycznej.

Komórki HL-60 inkubowano z pirokatechiną w zakresie stężeń 0,5–5 $\mu\text{g/ml}$ lub z ekstraktem suchym z kory *Salix purpurea* (7043), w zakresie stężeń 5–50 $\mu\text{g/ml}$. Jako kontrolę pozytywną zastosowano nadtlenuk wodoru w stężeniu 50 μM . Inkubację ze związkami i ekstraktem przeprowadzono przez 1 h w inkubatorze. Następnie komórki odwirowano (1000 obr/min przez 5 min), przepłukano buforem PBS i ponownie osadzono poprzez wirowanie

(1000 obr/min przez 5 min). W dalszym etapie pracy komórki zawieszono w 50 μ l PBS, a następnie 10 μ l zawiesiny komórkowej przeniesiono do 100 μ l 1% niskotopliwej agarozy. 75 μ l mieszaniny naniesiono na przygotowane szkiełko mikroskopowe pokryte 1% agarozą. Szkiełko inkubowano na lodzie w ciemni (10 min). Następnie zdjęto szkiełko nakrywkowe i nałożono warstwę 0,5% niskotopliwej agarozy, którą przykryto szkiełkiem nakrywkowym. Całość pozostawiono na lodzie do zestalenia (10 min). Tak przygotowany preparat, inkubowano w buforze lizującym Tris o pH = 10 (1 h, 4°C, ciemnia). Następnie przeniesiono do buforu alkalicznego (30 min, 4°C). Po tym czasie szkiełka mikroskopowe umieszczono w aparacie elektroforetycznym i przeprowadzono elektroforezę przy natężeniu prądu 0,9 V/cm (30 min, 4°C). W kolejnym etapie preparat inkubowano w 0,4 M buforze Tris o pH 7,5 (15 min), wybarwiono bromkiem etydyny (0,5 μ g/ml, 5 min), a następnie odbarwiono w wodzie. Preparaty analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym. Stopień uszkodzeń DNA określono wyznaczając stosunek fluorescencji ogona, do fluorescencji mierzonej w centrum głowy i wynik przedstawiono jako % DNA w ogonie [213]. Obrazy około 50 komórek z trzech preparatów analizowano przy użyciu programu Cometscore[®].

15.7. Materiał do badań.

Materiał do badań stanowiły ekstrakty suche otrzymane metodą perkolacji według FP VI [55], w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych Akademii Medycznej w Gdańsku, z kory *S. alba* klon 1100 (7001), *S. daphnoides* klon 1095 (7004), *S. purpurea* (7043) firmy „Labofarm”. Ponadto do badań włączono związki naturalne: kwas salicyłowy, salicynę, pirokatechol, katechinę, tremulacynę, naryngeninę, (+)-5-O-glukozyd naryngeniny, 7-O-glukozyd naryngeniny, izosalipurpozyd i ester p-kumarowy izosalipurpozydu.

Ekstrakty i związki naturalne (1 mg) rozpuszczono w metanolu (1 ml). Z roztworów podstawowych przygotowano do badań rozcieńczenia w zakresie od 0 do 70 μ g/ml.

III. BADANIA WŁASNE

Badaniami objęto kory 38 gatunków i klonów z rodzaju *Salix*, pochodzących z upraw lub rosnących w warunkach naturalnych, którym dla odróżnienia przypisano indeksy w zakresie od 7001 do 7043. Materiał roślinny stanowiły:

Salix acutifolia (7031); *S. alba* (7032); i klon 1100 (7001); *S. × americana* klon 1036 (7002); *S. amygdalina × viminalis* klon 1155 (7003); *S. daphnoides* (7033) i klon 1095 (7004); *S. eriocephala* (7034); *S. × erythroflexuosa* (7019); *S. fragilis* (7035), *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020); *S. herbacea* (7030); *S. lapponum* (7021); *S. matsudana* ‘Tortuosa’ (7028); *S. melanostachys* (7022); *S. nakamuraana* var. *yezoalpina* (7025), *S. purpurea* (7036), (7037) i klony: 1038 (7005), 1067 (7006), 1081 (7007), 1084 (7008), 1101 (7009), 1132 (7010), 1136 (7011), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014), *S. purpurea × daphnoides* 1107 (7015); *S. rosmarinifolia* (7023); *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026); *S. × sepulcralis* (7027); *S. silesiaca* (7024); *S. triandra* (7038) i klony 1044 (7016), 1045 (7017); *S. viminalis* (7029) i klon 1083 (7018). Ponadto, do badań włączono materiał roślinny otrzymany z firm zielarskich „Kawon-Hurt” (Gostyń), „Flos” (Mokrsk), „Herbapol” – Gdańsk, „Herbapol” - Wrocław i „Labofarm” (Starogard Gdański), stanowiący według opisu producentów odpowiednio mieszankę kory wierzb *S. alba* i *S. purpurea* (7039), korę *S. alba* lub *S. purpurea* (7040) oraz korę *S. purpurea* (7041), (7042) i (7043).

W celu analizy pochodnych fenolowych – prostych fenoli oraz polifenoli, do badań przeznaczono ekstrakty metanolowe oraz ich frakcje eterowe, a także frakcje eterowe hydrolizatów kwaśnych i zasadowych ekstraktów metanolowych.

Skład chemiczny wyżej wymienionych gatunków i ich klonów, w zakresie jakościowym i ilościowym, rozpoznano w oparciu o chromatografię cienkowarstwową (*Thin Layer Chromatography* – TLC), wysokosprawną chromatografię cienkowarstwową (*High Performance Thin Layer Chromatography* – HPTLC), wysokosprawną chromatografię cieczową (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) w systemie jedno- i dwuwymiarowym (*Two Dimensional HPLC* – 2D-HPLC).

Rozdzielenia chromatograficzne prowadzono wobec 63 substancji wzorcowych z grupy prostych fenoli, w tym fenolokwasów: kwasu benzoowego i jego pochodnych – kwasy: salicylowy, m- i p-hydroksybenzoowy, 2,3-dihydroksybenzoowy, λ-, β- i γ-rezorcylowy, gentyzynowy, protokatechowy, galusowy, 2,4-dimetoksybenzoowy, weratrowy, wanilinowy, syringowy; kwasu cynamonowego i jego pochodnych – kwasy: p-, m- i o-kumarowy, ferulowy, izoferulowy, kawowy, synapinowy, 4-metoksycynamonowy, 3,4-dimetoksycynamonowy; depsydów – kwasy: chlorogenowy, elagowy, rozmarynowy; kwasu dihydrokawowego, homowanilinowego, homogentyzynowego i glikozydowych pochodnych prostych fenoli – salicyna, populina, tremulacyna, helicyna, piceina, salidrozyd

oraz polifenoli, włączając związki flawonoidowe: pochodne flawonu – apigenina, luteolina i ich 7-O-glukozydy; pochodne flawonolu – izoramnetyna, kemferol, kwercetyna i ich 3-O-glukozydy, mirycetyna, 7-O-ramnozyd kemferolu, rutyna; pochodne flawanonu – naryngenina i jej 7-O-glukozyd oraz 7-O-neohesperozyd; dimery flawonoidowe – amentoflawon, kupressuflawon, a także flawan-3-ole – katechina, epikatechina, galokatechina, galusan katechiny i ich dimeryczne pochodne – procyjanidyna B₁ i B₂.

Grupę substancji wzorcowych uzupełniono o triandrynę, salikortynę i 2'-acetylosalikortynę, które wyizolowano metodą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (TLC) z materiału roślinnego, stanowiącego odpowiednio korę *S. viminalis* (triandryna) [16,104,229], *S. purpurea* (salikortyna) i *S. fragilis* (2'-acetylosalikortyna) [16,86,102,150].

1. Omówienie wyników badań nad pochodnymi alkoholu salicylowego i innymi prostymi fenolami w korze wierzb.

1.1. Omówienie wyników analizy jakościowej zespółów związków salicylowych i innych glikozydów fenolowych.

Z chemotaksonomicznego punktu widzenia pochodne alkoholu salicylowego są charakterystyczną grupą związków dla rodzaju *Salix* [10,51,123,150]. Najczęściej występują w korze wierzb salicyna oraz jej estry – salikortyna, fragilina, tremulacyna, 2'-cynamoilosalicyna zwana grandydentatyną, 2'-, 3'- i 4'-acetylosalikortyna oraz populina. W obrębie rodzaju *Salix* wykazano również obecność pochodnych alkoholu p-kumarowego – triandryny, wimaliny, alkoholu gentyzynowego – salirepozydu oraz hydroksyacetofenonu – piceiny i fenyloetanolu – salidrozydu [10,16,123,229].

Wierzby obok kaliny (*Viburnum prunifolium*), topoli (*Populus tremula*) i wiązówki (*Filipendula ulmaria*) stanowią w przyrodzie bogate źródło wolnych oraz związanych glikozydowo związków salicylowych [51,123]. Glikozydy salicylowe wykryto również w rodzaju *Betula*, *Viola* i *Primula*, natomiast estry kwasu salicylowego w gatunkach *Gaultheria procumbens* i *Polygala senega* [123,194].

Badania nad naturalnymi związkami salicylowymi rozpoczęto w latach 1826-1829 w wielu europejskich ośrodkach naukowych [71,73]. W 1830 roku francuski badacz Henri Leroux wyodrębnił salicynę z kory wierzby i opisał jej właściwości przeciwgorączkowe [71]. Jednocześnie badano skład chemiczny wiązówki błotnej (*Spirea ulmaria* syn. *Filipendula ulmaria*), co zaowocowało wyizolowaniem aldehydu salicylowego [71,73]. W Stanach Zjednoczonych Ameryki badania nad gatunkami z rodzaju *Gaultheria* zakończyły się wyodrębnieniem salicylanu metylu [71].

W 1897 roku, opierając się na wcześniejszych osiągnięciach Gerhardta i Krauta w zakresie syntezy chemicznej kwasu salicylowego, chemik firmy Bayer – Felix Hoffmann opracował syntezę kwasu acetylosalicylowego. Firma Bayer opatentowała związek w 1899 roku pod nazwą "aspirin" ("a" – acetyl, "spir" – *Spiraea*, "in" – popularny w tym czasie przyrostek stosowany w nazewnictwie leków) [51,71,73].

W celu oznaczenia, w zebranych materiale roślinnym, zawartości salicyny wolnej i związanej estrowo, porównano wydajność różnych metod ekstrakcji wykorzystywanych wcześniej w analizie tego związku w korze wierzb [50,55,107,108,151,173]. Wykazano metodą HPLC, że najwydajniejszą ekstrakcją jest trzykrotna ekstrakcja surowca metanolem pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 60°C (Tabl. 7).

Tabl. 7. Zawartość salicyny [mg/g] oznaczona metodą HPLC w wyciągach metanolowych z kory wierzb purpurowej – *S. purpurea* (7043) otrzymanych z użyciem różnych metod ekstrakcji.

Zawartość związku [mg/g]	Metoda ekstrakcji			
	I	II	III	IV
salicyna	23,4±0,32	21,6±0,27	12,4±0,19	17,4±0,42

Objaśnienia:

metoda I – ekstrakcja metanolem pod chłodnicą zwrotną (3×30 ml, 45 min, temp. 60°C) [151,50]

metoda II – ekstrakcja metanolem w płuczce ultradźwiękowej (3×10 ml, 10 min, temp. pok.) [173]

metoda III – ekstrakcja mieszaniną aceton / woda (80+20, v/v) w homogenizatorze (3×50 ml, 3 min, temp. pok.) [108]

metoda IV – ekstrakcja mieszaniną metanol / woda (50+50, v/v) w homogenizatorze (3×50 ml, 3 min, temp. pok.) [107,55].

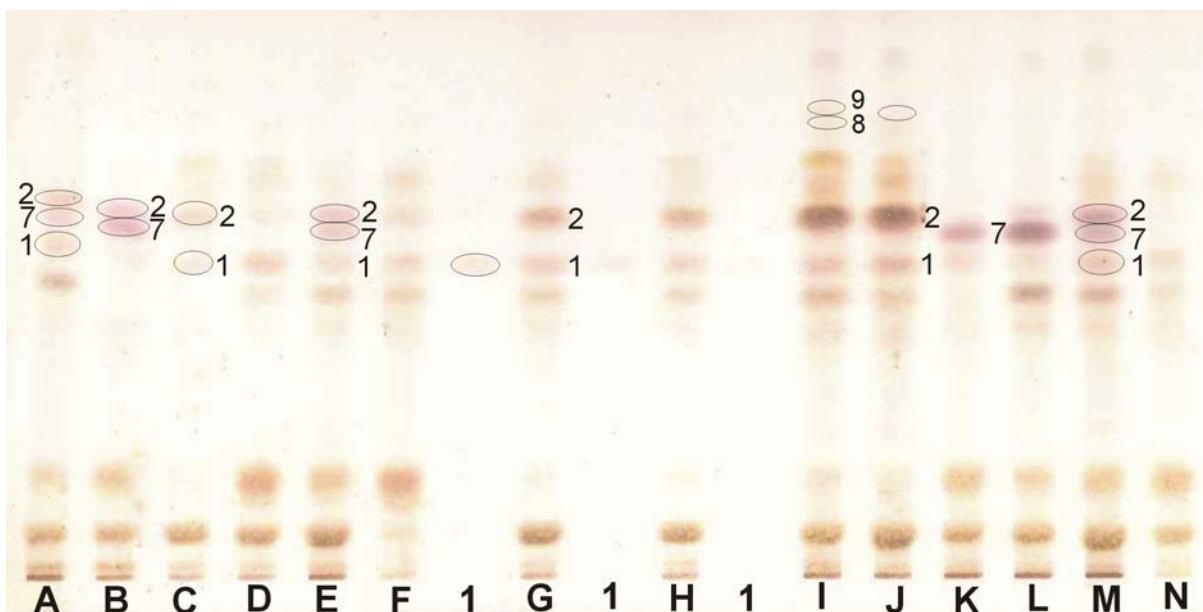
Obecność glikozydów fenolowych w otrzymanych ekstraktach metanolowych i ich hydrolizatach alkalicznych analizowano wobec wzorców – salicyny, salikortyny, 2'-acetylosalikortyny, piceiny, helicyny, salidrozydu, triandryny, populiny i tremulacyny stosując chromatografię cienkowsarstwową (TLC, HPTLC) oraz wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC).

Opracowując warunki rozdzielania chromatograficznego związków salicylowych wykorzystano układy chromatograficzne opisane w literaturze [10,86,188]. Stosowano żel krzemionkowy jako fazę stacjonarną oraz trój- i czterokładnikowe fazy ruchome: octan etylu / metanol / woda (77+13+10, v/v/v) [86], octan etylu / bezwodny kwas mrówkowy / woda (80+13+7, v/v/v) [10], octan etylu / metanol / woda (100+13,5+10, v/v/v) [188] oraz octan etylu / keton metylo-etylowy / kwas mrówkowy / woda (60+20+2+2, v/v/v/v) [188].

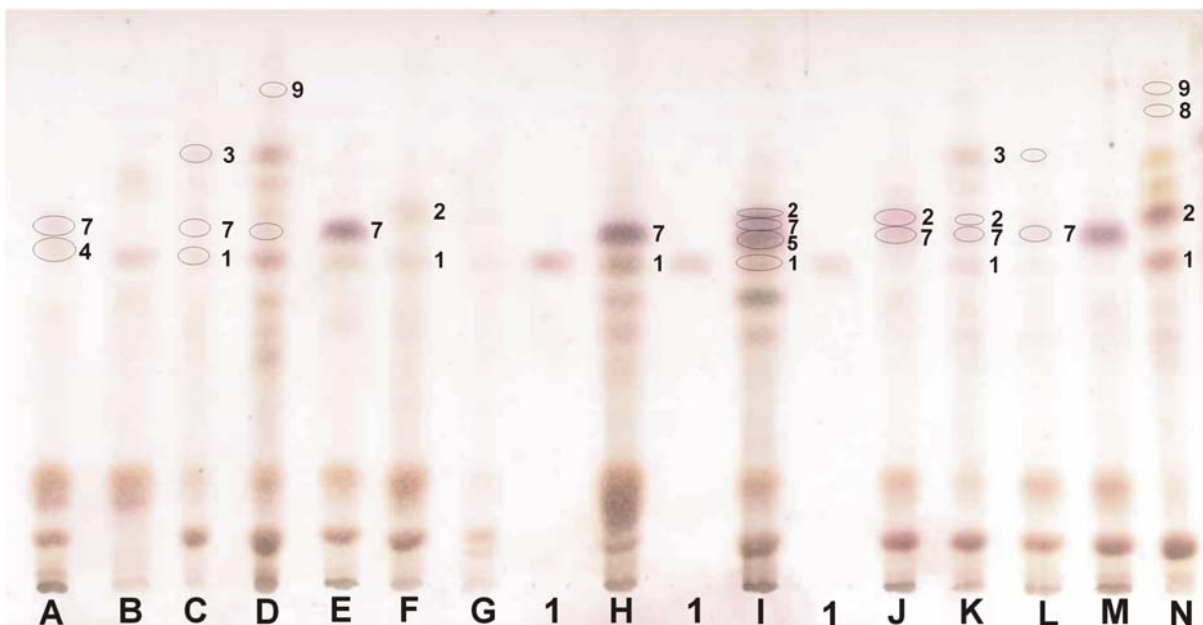
Najkorzystniejsze rozdzielanie analizowanych połączeń uzyskano w fazie ruchomej stanowiącej mieszaninę octan etylu / metanol / woda (77+13+10, v/v/v) (Ryc. 21-23, Tabl. 8).

Tabl. 8. Wartości współczynników hR_F ($R_F \times 100$) wzorcowych glikozydów fenolowych rozdzielonych na żelu krzemionkowym z użyciem fazy ruchomej: octan etylu / metanol / woda (77+13+10, v/v/v).

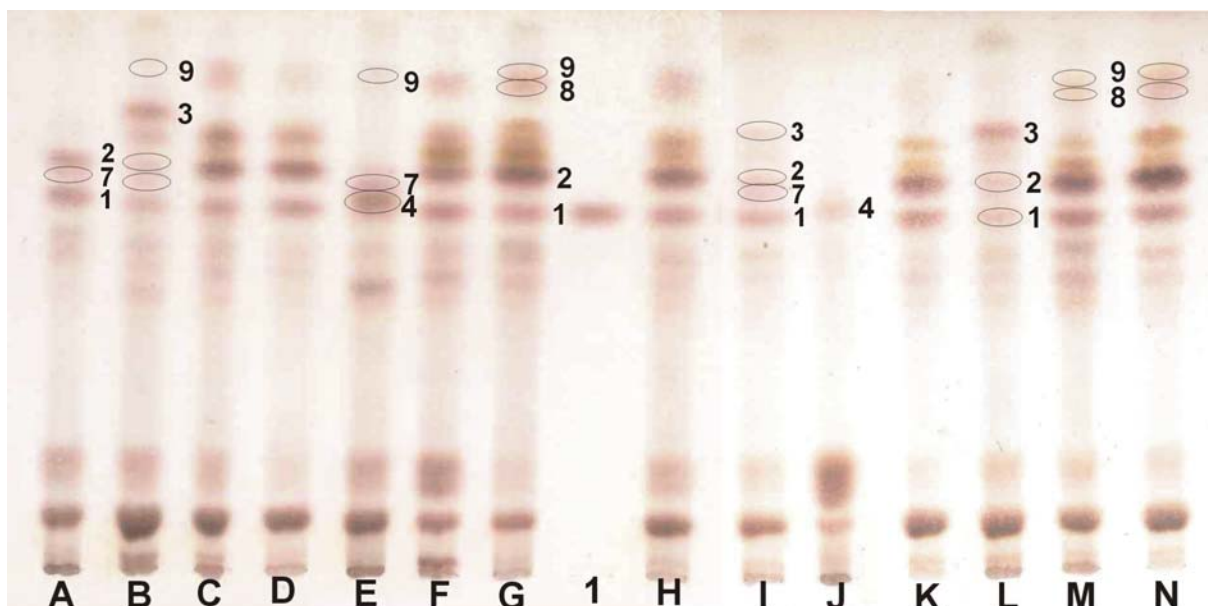
substancja wzorcowa	salicyna	salikortyna	2'-acetylo-salikortyna	salidrozyd	piceina	helicyna	triandryna	populina	tremulacyna
współczynnik hR_F	41	52	75	44	47	55	49	83	87



Ryc. 21. Chromatogram TLC salicyliny (1) i ekstraktów metanolowych z kory wierzb: **A** – *S. americana* klon 1036 (7002), **B** – *S. amygdalina* × *viminalis* klon 1155 (7003), **C** – *S. viminalis* klon 1083 (7018), **D** – *S. purpurea* klon 1038 (7005), **E** – *S. purpurea* klon 1067 (7006), **F** – *S. purpurea* klon 1081 (7007), **G** – *S. purpurea* klon 1084 (7008), **H** – *S. purpurea* klon 1101 (7009), **I** – *S. purpurea* klon 1132 (7010), **J** – *S. purpurea* klon 1136 (7011), **K** – *S. purpurea* klon 1153 (7012), **L** – *S. purpurea* klon 1156 (7013), **M** – *S. purpurea* klon 1057 (7014), **N** – *S. purpurea* klon 1107 (7015), **1** – salicylina, **2** – salikortyna, **7** – triandryna, **8** – populina, **9** – tremulacyna. Adsorbent: żel krzemionkowy, faza ruchoma S_1 : octan etylu / metanol / woda, 77+13+10, v/v/v; odczynnik tymolowy).



Ryc. 22. Chromatogram TLC salicyliny (1) i ekstraktów metanolowych z kory wierzb: **A** – *S. triandra* klon 1045 (7017), **B** – *S. viminalis* klon 1083 (7018), **C** – *S. × erythroflexuosa* (7019), **D** – *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020), **E** – *S. lapponum* (7021), **F** – *S. melanostachy* (7022), **G** – *S. rosmarinifolia* (7023), **H** – *S. silesiaca* (7024), **I** – *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), **J** – *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026), **K** – *S. × sepulcralis* (7027), **L** – *S. matsudana* 'Tortuosa' (7028), **M** – *S. viminalis* (7029), **N** – *S. purpurea* (7043), **1** – salicylina, **2** – salikortyna, **3** – 2'-acetylosalikortyna, **4** – salidrozyd, **5** – piceina, **7** – triandryna, **8** – populina, **9** – tremulacyna. Adsorbent: żel krzemionkowy, faza ruchoma S_1 : octan etylu / metanol / woda, 77+13+10, v/v/v; odczynnik tymolowy).



Ryc. 23. Chromatogram TLC salicyliny (1) i ekstraktów metanolowych z kory wierzb: **A** – *S. eriocephala* (7034), **B** – *S. fragilis* (7035), **C** – *S. purpurea* (7036), **D** – *S. purpurea* (7037), **E** – *S. triandra* (7038), **F** – *S. alba* lub *S. purpurea* (7040), **G** – *S. alba*+*S. purpurea* (7039), **H** – *S. purpurea* (7042), **I** – *S. alba* klon 1100 (7001), **J** – *S. triandra* klon 1044 (7016), **K** – *S. acutifolia* (7031), **L** – *S. alba* (7032), **M** – *S. daphnoides* (7033), **N** – *S. daphnoides* klon 1095 (7004), **1** – salicylina, **2** – salikortyna, **3** – 2'-acetylosalikortyna, **4** – salidrozyd, **7** – triandryna, **8** – populina, **9** – tremulacyna. Adsorbent: żel krzemionkowy, faza ruchoma S₁: octan etylu / metanol / woda, 77+13+10, v/v/v, odczynnik tymolowy).

Jednocześnie, podjęto próby optymalizacji rozdzielania mieszaniny glikozydów fenolowych w układzie faz odwróconych, na płytkach pokrytych żelą krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi (RP-18), włączając złożę typu LiChrospher oraz w układzie faz normalnych na żelach krzemionkowych modyfikowanych grupami aminopropylowymi, cyjanopropylowymi i diolowymi. Fazy ruchome stanowiły dwu-, trój- lub czteroskładnikowe mieszaniny acetonitrylu, metanolu, tetrahydrofuranu, heksanu, acetonu, octanu etylu, chloroformu i wody oraz kwasów: lodowatego kwasu octowego i kwasu mrówkowego.

Najkorzystniejsze rozdzielanie związków wzorcowych – salicyliny, salidrozydu, piceiny i helicyny otrzymano w układzie faz odwróconych stosując jako fazę ruchomą mieszaninę metanol / acetonitryl / woda / kwas mrówkowy (10+10+80+6, v/v/v/v) (Tabl. 9).

W analizach TLC, ekstraktów z kory niektórych gatunków wierzb, problemem jest rozdzielanie piceiny od salicyliny [52,188]. W przypadku badań ilościowych może prowadzić to do oznaczenia wyższej niż rzeczywista zawartości salicyliny w surowcach [52,188]. Opracowane warunki rozdzielania chromatograficznego pozwalają na identyfikację piceiny obok salicyliny, a także salidrozydu i helicyny (Tabl. 9). W surowych ekstraktach metanolowych z kory wierzb obecność związków balastowych zakłócała separację TLC pochodnych salicylowych.

Tabl. 9. Wartości współczynników hR_F ($R_F \times 100$) wzorcowych glikozydów fenolowych w różnych układach chromatograficznych.

Układ chromatograficzny		Wartości hR_F			
Faza stacjonarna	Faza ruchoma (v/v/v)	salicyna	salidrozyd	piceina	helicyna
HPTLC RP-18W	acetonitryl / woda / kwas mrówkowy 20+80+6 (S_{24})	63	53	55	62
	metanol / acetonitryl / woda / kwas mrówkowy 10+10+80+6 (S_{25})	56	47	45	53
	metanol / woda / kwas mrówkowy 23+77+6 (S_{27})	53	39	40	42
	metanol / acetonitryl / woda / kwas mrówkowy 2+2+77+6 (S_{28})	65	55	53	60

W rezultacie, do analizy jakościowej zespołów związków salicylowych w wyciągach metanolowych z kory wierzb, zastosowano żel krzemionkowy i fazę ruchomą octan etylu / metanol / woda (77+13+10, v/v/v) (Ryc. 21-23, Tabl. 8).

Rozdzielone pochodne salicylowe na płycie chromatograficznej wywoływało mieszaniną 0,5% etanolowego roztworu tymolu i stężonego kwasu siarkowego [10]. Odczynnik tymolowy, w odróżnieniu od innych zastosowanych odczynników derywatyżujących – 10% roztworu kwasu siarkowego w metanolu [86] i odczynnika wanilinowego [52], gwarantował otrzymanie trwałych, barwnych pochodnych związków salicylowych o zabarwieniu od różowego do ciemnofioletowego (Ryc. 21-23).

W oparciu o wyniki przeprowadzonych analiz chromatograficznych obecność salicyny ($hR_F = 41$) stwierdzono w większości badanych gatunków i klonów (Ryc. 21-23, Tabl. 10). Natomiast nie wykazano jej występowania w korze gatunku *S. triandra* (7038) oraz w korze jego klonów 1044 (7016) i 1045 (7017), co jest zgodne z charakterystyką chemiczną gatunku [229]. Gatunek *S. triandra* według niektórych botaników [21,83,207] jest klasyfikowany jako *S. amygdalina*. W niniejszej pracy wykazano brak salicyny w korze mieszańca *S. amygdalina* × *viminalis* klon 1155 (7003), co wskazuje na pewne podobieństwa między wierzbami: trójpręcikową (*S. triandra*) i migdałową (*S. amygdalina*). Salicyna nie występowała również w korze *S. matsudana* ‘Tortuosa’ (7028) i *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026). W przeciwieństwie do danych piśmiennictwa [21,23,104,148,155,229] obecności salicyny nie obserwowano w korze dwóch gatunków: *S. rosmarinifolia* (7023) i *S. viminalis* (7029) (Tabl. 10).

Salicyna jest markerem chemotaksonomicznym rodzaju *Salix* [150], jakkolwiek jest nieobecna w gatunkach *S. lasiandra*, *S. sachalinensis* i *S. triandra* [159,190,229]. Wyniki analiz TLC sugerują również, że związek nie występuje w gatunku *S. matsudana* (Tabl. 10).

Tabl. 10. Obecność glikozydów fenolowych w ekstraktach metanolowych otrzymanych z kor gatunków i klonów wierzb oznaczona metodą TLC (żel krzemionkowy, octan etylu / metanol / woda, 73+13+10, v/v/v, odczynnik tymolowy): **1** – salicyna, **2** – salikortyna, **3** – 2'-acetylosalikortyna, **4** – salidrozyd, **5** – piceina, **7** – triandryna, **8** – populina, **9** – tremulacyna.

Lp.	Gatunek / klon	Indeks	Glikozydy fenolowe								
			1	2	3	4	5	7	8	9	
1.	<i>Salix acutifolia</i>	7031	+	++	-	-	-	-	-	-	
2.	<i>S. alba</i>	7032	śl.	śl.	++	-	-	-	-	śl.	
3.	<i>S. alba</i> klon 1100	7001	+	śl.	+	-	-	+	-	-	
4.	<i>S. x americana</i> klon 1036	7002	śl.	śl.	-	-	-	+	-	-	
5.	<i>S. amygdalina x viminalis</i> klon 1155	7003	-	+	-	-	-	++	-	-	
6.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095	7004	+	+++	-	-	-	-	+	+	
7.	<i>S. daphnoides</i>	7033	++	+++	-	-	-	-	śl.	śl.	
8.	<i>S. eriocephala</i>	7034	++	+	-	-	-	śl.	-	-	
9.	<i>S. x erythroflexuosa</i>	7019	śl.	-	śl.	-	-	śl.	-	-	
10.	<i>S. fragilis</i>	7035	+	+	++	-	-	śl.	-	śl.	
11.	<i>S. fragilis</i> var. <i>sphaerica</i>	7020	+	śl.	++	-	-	-	-	śl.	
12.	<i>S. herbacea</i>	7030	+	śl.	-	-	+++	-	-	-	
13.	<i>S. lapponum</i>	7021	śl.	-	-	-	-	+++	-	-	
14.	<i>S. matsudana</i> 'Tortuosa'	7028	-	-	śl.	-	-	śl.	-	-	
15.	<i>S. melanostachys</i>	7022	śl.	+	-	-	-	-	-	-	
16.	<i>S. nakamuraana</i> var. <i>yezoalpina</i>	7025	+	śl.	-	-	++	+	-	-	
17.	<i>S. purpurea</i>	7036	+	+++	śl.	-	-	-	-	+	
18.	<i>S. purpurea</i>	7037	+	+++	-	-	-	-	-	śl.	
19.	<i>S. purpurea</i> klon 1038	7005	++	+	-	-	-	-	-	-	
20.	<i>S. purpurea</i> klon 1067	7006	+	++	-	-	-	+	-	-	
21.	<i>S. purpurea</i> klon 1081	7007	+	+	-	-	-	-	-	-	
22.	<i>S. purpurea</i> klon 1084	7008	+	++	-	-	-	-	-	-	
23.	<i>S. purpurea</i> klon 1101	7009	+	++	-	-	-	-	-	-	
24.	<i>S. purpurea</i> klon 1132	7010	+	+++	-	-	-	-	śl.	+	
25.	<i>S. purpurea</i> klon 1136	7011	+	+++	-	-	-	-	-	śl.	
26.	<i>S. purpurea</i> klon 1153	7012	śl.	-	-	-	-	++	-	-	
27.	<i>S. purpurea</i> klon 1156	7013	śl.	-	-	-	-	++	-	-	
28.	<i>S. purpurea</i> klon 1157	7014	+	++	-	-	-	+	-	-	
29.	<i>S. purpurea x daphnoides</i> klon 1107	7015	+	-	-	-	-	-	-	-	
30.	<i>S. rosmarinifolia</i>	7023	-	-	-	-	-	-	-	-	
31.	<i>S. sachalinensis</i> 'Sekka'	7026	-	+	-	-	-	+	-	-	
32.	<i>S. x sepulcralis</i>	7027	śl.	śl.	+	-	-	śl.	-	-	
33.	<i>S. silesiaca</i>	7024	++	-	-	-	-	+++	-	-	
34.	<i>S. triandra</i> klon 1044	7016	-	-	-	+	-	-	-	-	
35.	<i>S. triandra</i> klon 1045	7017	-	-	-	+	-	+	-	-	
36.	<i>S. triandra</i>	7038	-	-	-	++	-	+	-	śl.	
37.	<i>S. viminalis</i>	7029	-	-	-	-	-	+++	-	-	
38.	<i>S. viminalis</i> klon 1083	7018	+	śl.	-	-	-	-	-	-	
39.	<i>S. alba</i> + <i>S. purpurea</i>	7039	+	+++	-	-	-	-	+	+	
40.	<i>S. alba</i> lub <i>S. purpurea</i>	7040	+	++	-	-	-	-	-	+	
41.	<i>S. purpurea</i>	7041	śl.	-	-	-	+++	+	-	-	
42.	<i>S. purpurea</i>	7042	+	+++	-	-	-	-	-	+	
43.	<i>S. purpurea</i>	7043	++	+++	-	-	-	-	śl.	śl.	

Objaśnienia:

(śl.) – zawartość śladowa

(+) – niska zawartość

(++) – średnia zawartość

(+++) – wysoka zawartość

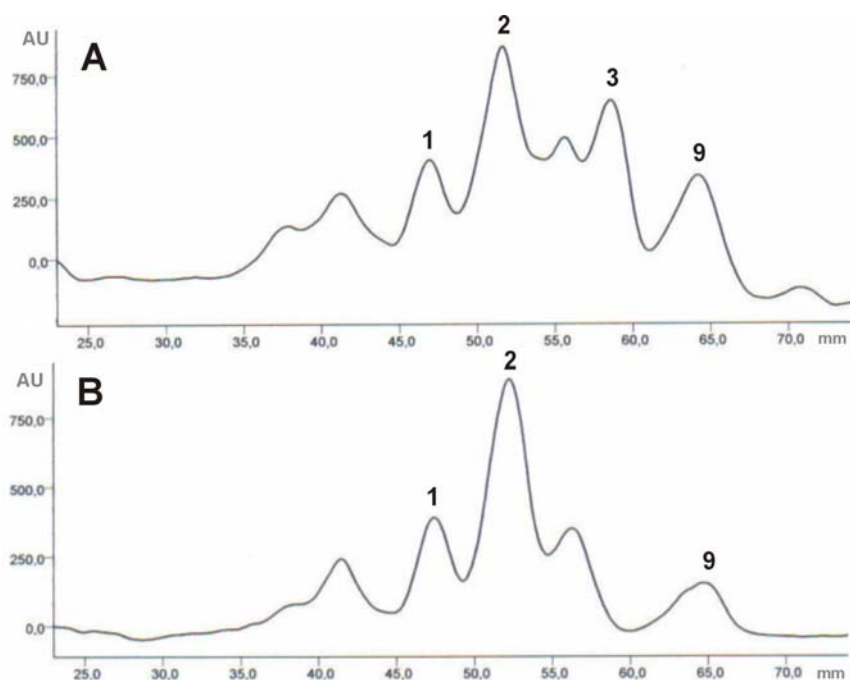
(-) – związek nie występuje

W 30 spośród 43 analizowanych gatunków i klonów występowała salikortyna (Tabl. 10). Ta estrowa pochodna salicyny dominuje w zespołach pochodnych salicylowych wielu gatunków wierzb, m.in. *S. caprea*, *S. daphnoides*, *S. fragilis*, *S. myrsinifolia*, *S. pentandra* i *S. purpurea* [16,86,102,104,108,150,173,229]. W badanym materiale roślinnym, porównując intensywność plam salikortyny na chromatogramach TLC ($hR_F = 71$), dominację związku wykazano w korze taksonów: *S. acutifolia* (7031), *S. daphnoides* – (7033) i jego klonie 1095 (7004) oraz *S. purpurea* – (7036), (7037), (7039), (7040), (7042), (7043) i klonów tego gatunku 1067 (7006), 1084 (7008), 1101 (7009), 1132 (7010), 1136 (7011) i 1157 (7014). Wyjątek stanowią klony wierzby purpurowej 1153 (7012) i 1156 (7013) oraz wierzba purpurowa (7041) „Herbapolu” Gdańsk i mieszańiec *S. purpurea* × *daphnoides* klon 1107 (7015), w których chromatograficznie nie stwierdzono obecności salikortyny (Ryc. 21-23, Tabl. 10).

Salikortyna występowała w mniejszych stężeniach w korze *S. amygdalina* × *viminalis* klon 1155 (7003), *S. eriocephala* (7034), *S. melanostachys* (7022), *S. purpurea* klony 1038 (7005), 1081 (7007) i *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026) oraz w śladowych ilościach w gatunkach: *S. alba* (7032) i *S. alba* klon 1100 (7001) oraz *S.* × *americana* klon 1036 (7002), *S. fragilis* (7035), *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020), *S. herbacea* (7030), *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), *S.* × *sepulcralis* (7027) i *S. viminalis* klon 1083 (7018) (Ryc. 21-23, Tabl. 10).

W przeciwieństwie do danych piśmiennictwa [104,148] nie stwierdzono obecności salikortyny w korze *S. lapponum* (7021), *S. rosmarinifolia* (7023) i *S. viminalis* (7029) (Ryc. 22, Tabl. 10).

Z kolei 2'-acetylosalikortynę, jako związek dominujący w badanych zespołach pochodnych salicylowych, zidentyfikowano wobec wzorca w gatunkach *S. alba* (7032) i jego klonie 1100 (7001) oraz *S. fragilis* (7035) i *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020) (Ryc. 22,23). Obecność związku odnotowano również w korze *S.* × *erythroflexuosa* (7019), *S. matsudana* ‘Tortuosa’ (7028), *S. purpurea* (7036) i *S.* × *sepulcralis* (7027). W świetle zebranych danych literaturowych jest to pierwsze doniesienie o występowaniu 2'-acetylosalikortyny w *S. alba* i *S. purpurea*. W świecie roślinnym obecność tej estrowej pochodnej salicyny wykryto dotąd jedynie w *S. fragilis* [86,102], *S. lasiandra* [190], *S. myrsinifolia* [101,104,107,108,148] oraz *S. pentandra* [86,104,108]. Przeprowadzone analizy chromatograficzne wskazały na różnice w składzie chemicznym dwóch rosnących w warunkach naturalnych egzemplarzach *S. purpurea* (7036) i (7037), spośród których 2'-acetylosalikortynę zawierała jedynie kora *S. purpurea* (7036) (Ryc. 24).



Ryc. 24. Densytogram rozdzielania TLC ekstraktów metanolowych z kory **A** – *S. purpurea* (7036) i **B** – *S. purpurea* (7037), **1** - salicyna, **2** – salikortyna, **3** – 2'-acetylosalikortyna, **9** – tremulacyna. Adsorbent: żel krzemionkowy, faza ruchoma S_1 : octan etylu / metanol / woda (77+13+10, v/v/v), odczynnik tymolowy.

Populina – glikozydoester saligeniny i kwasu benzoowego, powszechnie występuje w korze, liściach i pączkach topól (*Populus sp.*) [123]. Jest również wymieniana jako składnik kory *S. petiolaris* [247] i *S. purpurea* [21].

W badanym materiale, obecność populiny potwierdzono jedynie w dwóch korach wierzby purpurowej – *S. purpurea* klon 1132 (7010) i *S. purpurea* „Labofarm” (7043) oraz w mieszance kor *S. purpurea* i *S. alba* firmy „Kawon” (7039) (Ryc. 22,23, Tabl. 10).

W zespołach pochodnych salicylowych gatunków: *S. daphnoides* (7033) i jego klonu 1095 (7004), *S. purpurea* (7036) i jego klonu 1132 (7010), a także w materiale z firmy „Flos” (7040), „Kawon” (7039) i „Herbapol” Wrocław (7042) wykazano, wobec wzorca, obecność tremulacyny. Ponadto, śladowe ilości związku obserwowano na chromatogramach ekstraktów z kory *S. alba* klon 1100 (7001), *S. fragilis* (7035), *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020), *S. purpurea* (7037) i jej klonu 1136 (7011), *S. triandra* (7038) oraz z kory firmy „Labofarm” (7043) (Ryc. 21-23, Tabl. 10). Tremulacyna stanowi ester p-kumarowy tremuloidyny, glikozydu wyodrębnionego z kory topoli osiki (*Populus tremula*) [247]. W rodzaju *Salix* jej występowanie opisano w różnych częściach *S. caprea* [104,108], *S. chaenomeloides* [160], *S. daphnoides* [102,148], *S. petiolaris* [247], *S. purpurea* [108] i *S. rosmarinifolia* [102,148]. Uwzględniając te dane, wyniki pracy stanowią pierwsze doniesienie o występowaniu tremulacyny w korze gatunków *S. fragilis* i *S. triandra*.

Triandryna jest prostym fenolem, bardzo rozpowszechnionym w rodzaju *Salix*. Dane piśmiennictwa wskazują, że bogatym źródłem triandryny jest kora wierzby wiciowej

(*S. viminalis*) [16,104,229]. Ponadto związek jest składnikiem kor gatunków *S. acutifolia* [251], *S. alba* [47], *S. × aquatica* [104], *S. aurita*, *S. bicolor* [150], *S. caprea*, *S. cinerea* [16,229], *S. fragilis*, *S. lapponum* [104,108,148], *S. myrsinifolia*, *S. nigricans*, *S. phlyicifolia*, *S. pentandra* i *S. triandra* [21,102,104,108,148].

W wyniku przeprowadzonych rozdzielen chromatograficznych po raz pierwszy wykazano obecność triandryny w korze następujących taksonów: *S. × americana* klon 1036 (7002), *S. eriocephala* (7034), *S. matsudana* 'Tortuosa' (7028), *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), *S. purpurea* klony 1067 (7006), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014) i *S. purpurea* z firmy „Herbapol” Gdańsk oraz *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026) i *S. silesiaca* (7024) (Tabl. 10). Triandrynę zidentyfikowano również w korze *S. amygdalina × viminalis* klon 1155 (7003), *S. × erythroflexuosa* (7019) i *S. × sepulcralis* (7027) (Tabl. 10), co może wynikać z faktu, że wymienione taksony są mieszańcami gatunków: *S. alba* (7027 i 7019) i *S. viminalis* (7003) z innymi gatunkami wierzb.

Obok kory *S. viminalis* (7029) obecność triandryny, jako związku dominującego ujawniono w korach: *S. × americana* klon 1036 (7002), *S. amygdalina × viminalis* klon 1155 (7003), *S. lapponum* (7021), *S. silesiaca* (7024) oraz *S. purpurea* klony 1153 (7012) i 1156 (7013), co wyróżnia je spośród pozostałych badanych egzemplarzy tego gatunku (Ryc.21,22, Tabl. 10). Zgodnie z danymi literaturowymi obecność związku potwierdzono w korach *S. alba* klon 1100 (7001), *S. fragilis* (7035), *S. triandra* (7038) i jej klonu 1044 (7016). Natomiast nie odnotowano obecności związku w korze *S. alba* (7032), pochodzącej ze stanu naturalnego oraz *S. triandra* klon 1045 (7017) i *S. viminalis* klon 1083 (7018) z kolekcji Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego (Tabl. 10).

Glikozyd tyrozolu zwany salidrozydem po raz pierwszy wyodrębniono w 1926 roku z wierzby trójpręcikowej – *Salix triandra* [20]. Jego obecność wykryto również w gałązkach *S. lapponum* [104]. Nazwa związku wywodzi się od łacińskiej nazwy rodzajowej wierzb - *Salix*. Salidrozyd jest markerem chemotaksonomicznym rodzaju *Rhodiola* (różeniec) [51,233] oraz składnikiem zespołów związków czynnych przedstawicieli rodzaju *Vaccinium* i *Rhododendron* [230,231].

Wśród analizowanych gatunków salidrozyd zidentyfikowano jedynie w zespołach *S. triandra* (7038) oraz klonach tego gatunku: 1044 (7016) i 1045 (7017), natomiast nie stwierdzono jego występowania w korze wierzby lapońskiej – *S. lapponum* (7021), pochodzącej z upraw Ogrodu Botanicznego w Rogowie (Ryc. 22, Tabl. 10).

Piceina jest glikozydem piceolu (4-hydroksyacetoenu) występującym m.in. w gatunkach *Picea abies* [79], *Arctostaphylos uva ursi* [121], *Rhodiola litvinovii* [127] i *R. rosea* [233]. Należy ona do pochodnych prostych fenoli często spotykanych w obrębie rodzaju *Salix*, m.in. w gatunkach: *S. aurita*, *S. bicolor*, *S. caprea*, *S. cinerea*, *S. glabra*,

S. herbacea, *S. myrsinifolia*, *S. nigricans*, *S. reticulata* i *S. viminalis* [101,104,107,108,148, 150,229,247]. Podobnie do salidrozydu, piceinę zawierały tylko nieliczne kory, a mianowicie kora wierzby zielnej – *S. herbacea* (7030) i wierzby purpurowej – *S. purpurea* (7041) „Herbapolu” Gdańsk, a także kora *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025) (Tabl. 10).

W rezultacie przeprowadzonych metodą TLC analiz jakościowych stwierdzono, że skład zespołu pochodnych salicylowych w klonie *S. viminalis* 1083 (7018) z kolekcji UWM różni się od składu kory *S. viminalis* pochodzącej z warunków naturalnych (7029). Klon charakteryzuje obecność salicyny i salikortyny oraz brak triandryny – markera chemotaksonomicznego gatunku. Natomiast obecność triandryny wyróżnia klony *S. purpurea* 1067 (7006), 1153 (7012), 1156 (7013) i 1157 (7014) spośród innych badanych przedstawicieli tego gatunku. Ponadto klony 1153 (7012) i 1156 (7013) charakteryzuje brak salikortyny – związku dominującego w korach wierzby purpurowej [16,229]. Podobnie zupełnie odmienny skład zespołu glikozydów fenolowych posiada kora *S. purpurea* (7041) „Herbapolu” Gdańsk. W materiale tym dominuje piceina obok triandryny i śladowych ilości salicyny, co w świetle danych piśmiennictwa wskazuje raczej na gatunek *S. caprea* lub *S. cinerea* [104,150,229]. Bardzo ubogim surowcem w połączenia salicylowe jest *S. rosmarinifolia* (7031) – wśród rozdzielonych składników ekstraktu metodą TLC nie wykazano obecności żadnego z wymienionych powyżej związków. Jest to sprzeczne z wynikami wcześniejszych badań wskazującymi na obecność w tym gatunku salicyny i salirepozydu [23].

Przeprowadzone analizy TLC ujawniły podobieństwa i różnice w zespołach glikozydów fenolowych w obrębie poszczególnych gatunków wierzb. Wykazano, że występowanie salicyny obok dominującej salikortyny charakteryzuje gatunki: *S. acutifolia*, *S. daphnoides* i *S. purpurea*, natomiast obecność 2'-acetylosalikortyny, jako dominującej w zespole, wyróżnia wierzbę białą (*S. alba*) i wierzbę kruchą (*S. fragilis*). Wysokie stężenia piceiny odróżniają od pozostałych *S. herbacea* i *S. nakamura* var. *yezoalpina*, natomiast obecność salidrozydu determinuje gatunek *S. triandra* (Tabl. 10). Bogate i zróżnicowane jakościowo zespoły glikozydów fenolowych obserwowano dla gatunków *S. alba*, *S. daphnoides*, *S. fragilis*, *S. nakamura* var. *yezoalpina* i *S. purpurea* w przeciwieństwie do *S. lapponum*, *S. triandra* i *S. viminalis*, które cechuje obecność jako dominującego jednego glikozydu – piceiny, salidrozydu i triandryny, odpowiednio (Tabl. 10). W gatunkach dotychczas nie badanych w zakresie składu chemicznego, chromatograficznie wobec wzorców zidentyfikowano następujące glikozydy fenolowe: salicynę, 2'-acetylosalikortynę i triandrynę – *S. × erythroflexuosa* (7019), salicynę i salikortynę – *S. melanostachys* (7022), salicynę, salikortynę, triandrynę i piceinę – *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), salicynę,

salikortynę, 2'-acetylosalikortynę, triandrynę – *S. × sepulcralis* (7027) oraz salicynę i triandrynę – *S. silesiaca* (7024) (Tabl. 10).

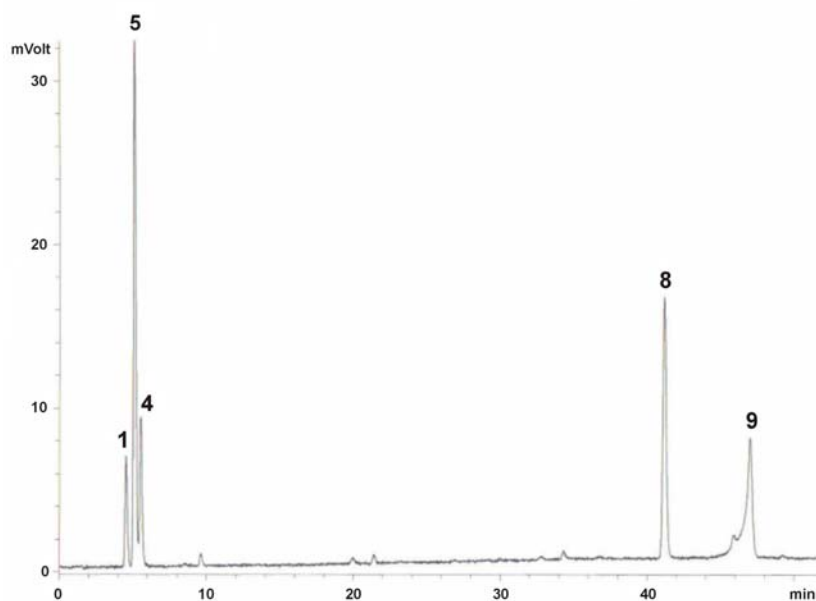
W badaniach salicyny i glikozydowych pochodnych prostych fenoli w surowcach roślinnych, poza chromatografią cienkowarstwową, wykorzystuje się chromatografię gazową (GC) [101,104,108,148], wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) [102,107,109,134, 137,148,149,150,155,159,169,173,217,249] oraz HPLC sprzężoną z tandemową spektrometrią mas MS/MS [109] i elektroforezą kapilarną (EC) [252].

Najczęściej stosowaną metodą w analizie pochodnych salicylowych jest wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych [102,107,109,134, 137,148,149,150,155,159,169,173,217]. Fazę stacjonarną stanowi modyfikowany grupami oktadecylowymi żel krzemionkowy - RP-18, natomiast fazy ruchome są mieszaninami wody oraz metanolu, tetrahydrofuranu lub acetonitrylu z dodatkiem kwasu ortofosforowego lub octowego [102,107,148,150,159,169,217].

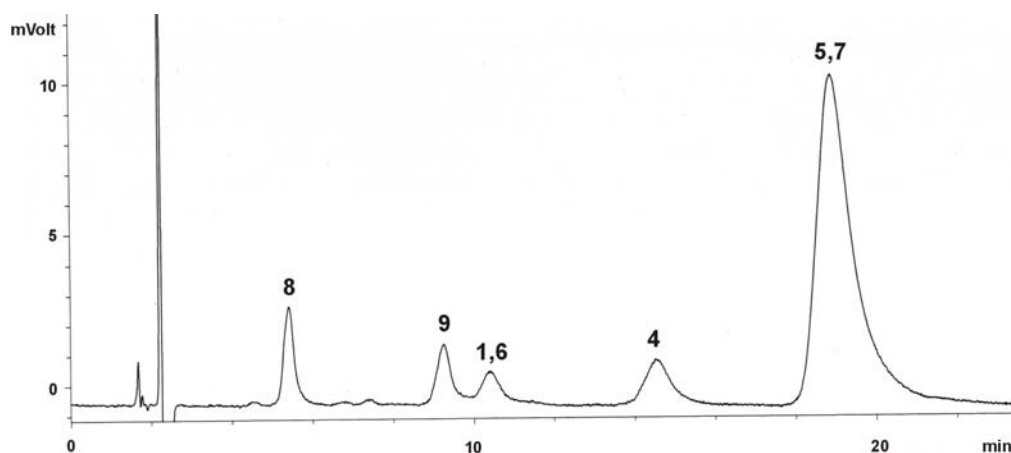
Do badań metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, w niniejszej pracy, przeznaczono wyciągi metanolowe z kor gatunków i klonów wierzby charakteryzujących się odmiennym i reprezentatywnym dla poszczególnych gatunków składem zespołów pochodnych alkoholu salicylowego i innych prostych fenoli. Eksperymenty prowadzono w układach faz odwróconych (RP) i normalnych (NP). Układ faz normalnych jest rzadko wykorzystywany w analizie HPLC związków naturalnych. Jednak rozpoczynając badania zakładano lepsze rozdzielanie glikozydów fenolowych od obecnych w ekstrakcie mniej hydrofilowych pochodnych flawonoidowych.

Do analiz w układzie RP użyto kolumnę Supelcosil™ LC-18 (150 mm × 3 mm, 3µm). Rozdzielenie mieszaniny związków: salicyna, piceina, salidrozyd, populina, tremulacyna uzyskano stosując elucję gradientową w mieszaninie acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu octowego (99,9+0,1, v/v) o wzrastającym stężeniu acetonitrylu od 6% do 31% ($t_G = 50$ min) (Ryc. 25).

Z kolei w układzie NP wykorzystano kolumnę wypełnioną monolitycznym żelem krzemionkowym Chromolith Performance Si (100 mm × 4,6 mm) oraz jako eluenty dwu- i trójskładnikowe mieszaniny rozpuszczalników: heksanu, heptanu, metanolu, dioksanu i izopropanolu. Najlepsze rozdzielanie pięciu związków wzorcowych: salicyny, salidrozydu, piceiny, populiny i tremulacyny uzyskano stosując elucję izokratyczną i fazę ruchomą stanowiącą mieszaninę rozpuszczalników: heksan / izopropanol / metanol (87+12+1, v/v). Jednak w tych warunkach nie rozdzielały się piceina i triandryna oraz salicyna i helicyna (Ryc. 26). W opracowanym systemie na chromatogramach obserwowano szerokie podstawy pików analizowanych związków w przeciwieństwie do układu RP (Ryc. 25,26).



Ryc. 25. Chromatogram HPLC mieszanki związków salicylowych: **1** – salicyna, **4** – salidrozyd, **5** – piceina, **8** – populina, **9** – tremulacyna. Kolumna HPLC Supelco LC – 18, faza ruchoma acetonitryl / woda / kwas octowy (7+93+0,1; v/v/v), UV $\lambda = 280$ nm.



Ryc. 26. Chromatogram NP-HPLC mieszanki wzorców prostych fenoli i ich glikozydowych pochodnych: **1** – salicyny, **4** – salidrozydu, **5** – piceiny, **6** – helicyny, **7** – triandryny, **8** – populiny i **9** – tremulacyny. Kolumna Chromolith Performance Si (100 mm \times 4,6mm), elucja izokratyczna – faza ruchoma: heksan / izopropanol / metanol 87+12+1, v/v, $t = 20^\circ\text{C}$, $v = 1$ ml/min, detekcja UV przy $\lambda = 220$ nm

Uwzględniając niską absorpcję związków salicylowych w zakresie nadfioletu, do dalszych prac w układzie RP-HPLC wykorzystano detektor światła rozproszonego (ELSD – *Evaporative Light Scattering Detector*). Po raz pierwszy zastosowanie detektora ELS w wysokosprawnej chromatografii ciekowej opisano w 1983 roku [218]. Zasadą jego działania jest zjawisko rozpraszania światła emitowanego z lasera przez cząstki analitu [218]. Eluat z kolumny chromatograficznej ulega rozpyleniu w strumieniu dwutlenku węgla i następnie odparowaniu w nebulizatorze. Na cząstkach powstałego aerozolu promień światła emitowany z lasera ulega rozproszeniu, a natężenie rozproszonego promieniowania jest przetwarzane w odpowiedni sposób i rejestrowane w postaci chromatogramu [87,244,250].

Intensywność sygnału na chromatogramie zależy od wielkości cząstki badanej substancji, a nie od jej struktury chemicznej. W związku z tym, detektor umożliwia wykrywanie wszystkich stosunkowo nielotnych substancji i uważany jest za uniwersalny [244,250]. W badaniach metodą HPLC substancji nie posiadających grup chromoforowych stanowi on szczególnie korzystną alternatywę wobec powszechnie stosowanego detektora fotometrycznego absorpcji nadfioletu i światła widzialnego (UV-Vis) [250].

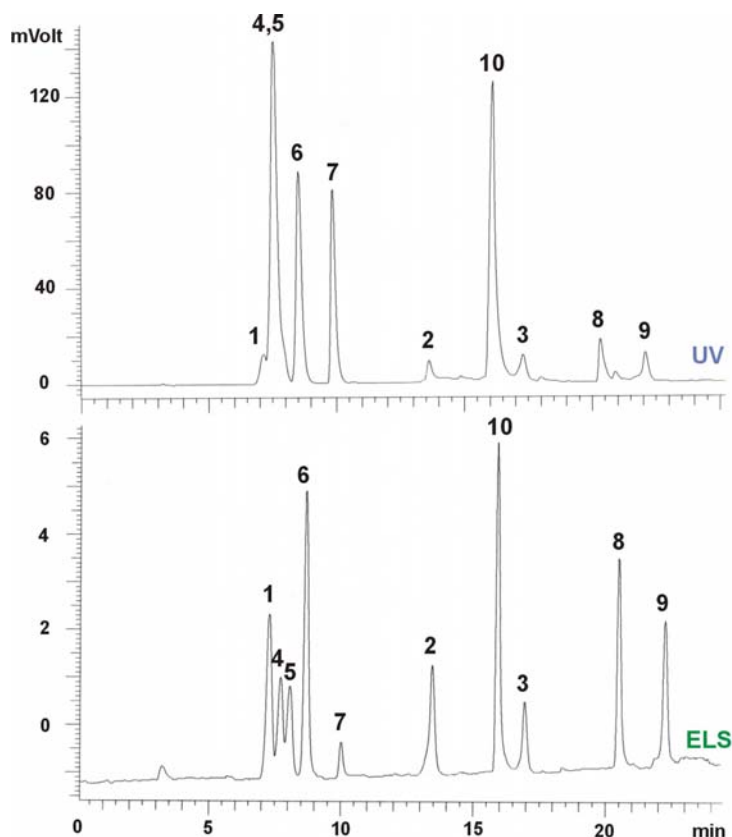
W ostatnich latach popularne staje się równoległe stosowanie laserowej detekcji fotodyspersyjnej z detekcją UV-Vis, jako dostarczającej dodatkowych informacji o składzie analizowanej próby [163,249]. W analizie HPLC wyciągów suchych z *Ginkgo biloba* detektor ELS umożliwił identyfikację ginkgolidów i bilobalidu, które nie absorbują promieniowania nadfioletowego [163]. Podobnie korzystne rezultaty uzyskano w badaniach saponin – ginsenozydów i notoginsenozydów z korzenia *Panax notoginseng* [243]. W 2004 roku Young wykorzystał detektor światła rozproszonego w analizie salicyny techniką NP-HPLC [249].

Analizy z użyciem detektora ELS przeprowadzono w ramach umowy polsko-flandryjskiej, w Katedrze Chemii Analitycznej i Technologii Farmaceutycznej (FABI), Instytutu Farmaceutycznego na Wolnym Uniwersytecie (VUB) w Brukseli (Belgia).

Do pracy z detektorem ELS optymalizowano warunki rozdzielania chromatograficznego w zakresie typu kolumn chromatograficznych i składu faz ruchomych. W rezultacie, w celu poprawy sprawności procesu rozdzielania metodą HPLC mieszaniny pochodnych salicylowych: salicyny, salikortyny, 2'-acetylosalikortyny, populiny i tremulacyny oraz pochodnych innych prostych fenoli: piceiny, triandryny, helicyny i salidrozydu w obecności 7-O-glukozydu naryngeniny, zastosowano połączone szeregowo kolumny monolityczne Chromolith Performance Si (100 mm × 4,6 mm) i Chromolith Performance RP-18e (100 mm × 4,6 mm). Adsorbenty monolityczne stanowią nową grupę wypełnień kolumn w HPLC. Charakteryzują się strukturą porowatą, w której wyróżnia się makro- i mezopory zapewniające znaczną powierzchnię wewnętrzną monolitu krzemionkowego. Brak objętości międzyziarnowych w porównaniu do złóż o strukturze ziarnistej, powoduje lepsze przenoszenie masy oraz umożliwia stosowanie dużych prędkości przepływu eluentu dzięki małym oporom przepływu. W rezultacie osiągany jest wzrost sprawności stosowanego układu chromatograficznego [178].

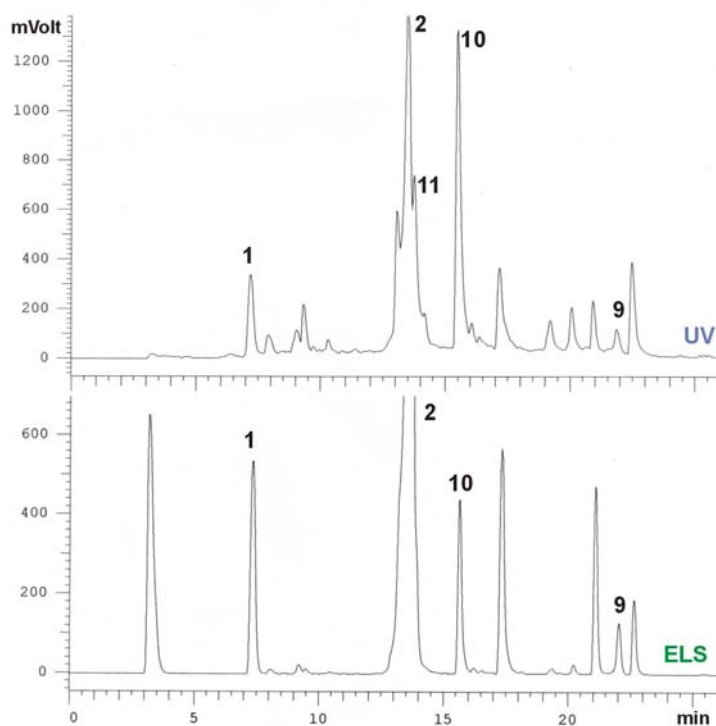
Warunki elucji gradientowej zoptymalizowano w oparciu o dwuskładnikowe mieszaniny rozpuszczalników: woda+kwasy trójfluoroctowy (99,95+0,05, v/v) oraz acetonitryl, metanol, izopropanol lub tetrahydrofuran w różnych proporcjach. Najkorzystniejsze rozdzielanie uzyskano stosując liniowo wzrastające stężenie acetonitrylu w mieszaninie acetonitryl / woda+kwasy trójfluoroctowy (99,95+0,05, v/v) od 3% do 48% ($t_G = 27$ min)

(Ryc. 27), jakkolwiek w tych warunkach salikortyna ($t_R = 13,5$ min) słabo rozdzielała się od 5-O-glukozydu naryngeniny ($t_R = 13,9$ min), obecnego w wyciągach z kory wierzby purpurowej i wawrzynkowej (Ryc. 28). 5-O-glukozyd naryngeniny (salipurpozyd) użyto, jako standard na etapie prac nad składem zespołów związków salicylowych w ekstraktach metanолоwych badanych gatunków wierzby.

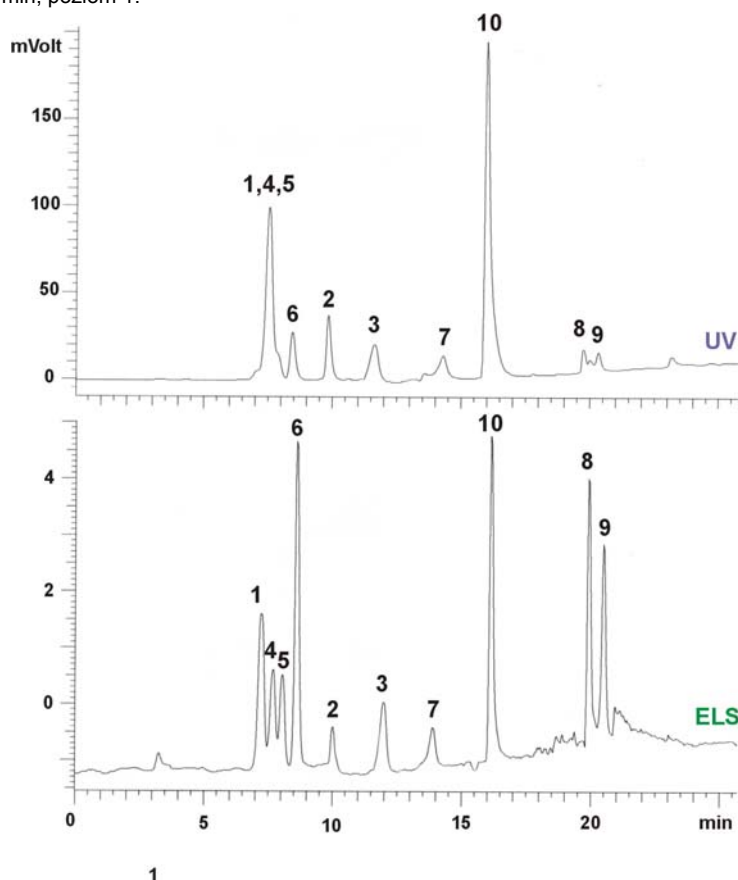


Ryc. 27. Chromatogramy HPLC-UV i HPLC-ELS mieszaniny glikozydów fenolowych: **1** - salicyna, **2** - salikortyna, **3** - 2'-acetylosalikortyna, **4** - salidrozyd, **5** - piceina, **6** - helicyna, **7** - triandryna, **8** - populina, **9** - tremulacyna, **10** - 7-O-glukozyd naryngeniny. Kolumna Chromolith Performance Si połączona z kolumną Chromolith Performance RP18e (100 mm × 4,6 mm), elucja gradientowa G_3 (A – acetonitryl, B – woda / TFA (99,95/0,05; v/v): od 3 do 48 % A w A+B ($t_G = 27$ min), $t = 30^\circ\text{C}$, $v = 1$ ml/min, detekcja UV przy $\lambda = 268$ nm, detekcja ELS: układ *off mode*, temp. fazy ruchomej w kapilarze - DTT = $113,2^\circ\text{C}$, prędkość przepływu gazu - NGF = 3,2 l/min, poziom 1;

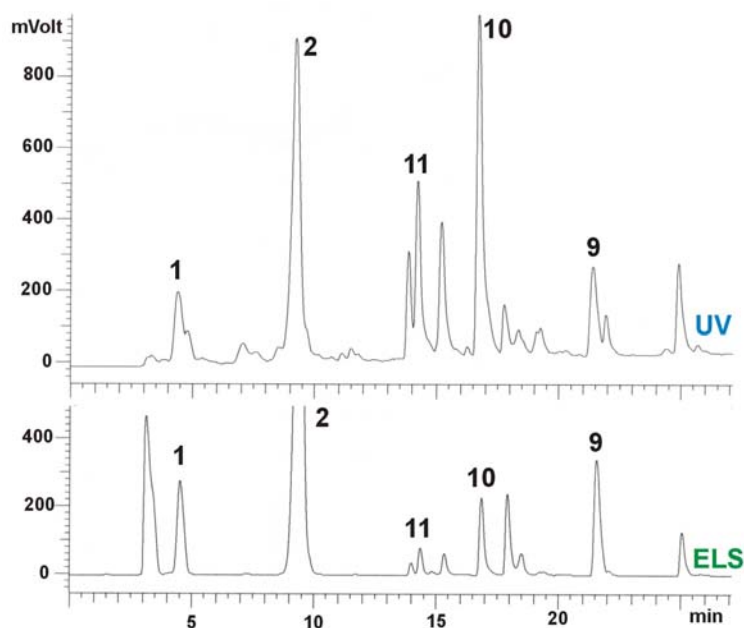
Efektywne rozdzielenie obu związków wzorcowych z różnicą $\Delta t_R = 5$ min uzyskano w warunkach gradientu liniowego o wzrastającym stężeniu od 3% do 53% tetrahydrofuranu w mieszaninie tetrahydrofuran / woda+kwasy trifluoroctowy (99,95+0,05, v/v) ($t_G = 30$ min) (Ryc. 29,30). Zastosowanie tego układu do badań skryningowych ekstraktów metanолоwych utrudniały obserwowane na chromatogramach, w czasie kolejnych rozdzieleń ($n = 5$), dryf linii zerowej oraz pogorszenie separacji – brak rozdzielenia populiny od tremulacyny.



Ryc. 28. Chromatogram HPLC ekstraktu metanolowego z kory *S. daphnoides* klon 1095 (7004); **1** - salicyna, **2** - salikortyna, **9** - tremulacyna, **10** - 7-O-glukozyd naryngeniny, **11** - 5-O-glukozyd naryngeniny. Kolumna Chromolith Performance Si połączona z kolumną Chromolith Performance RP18e (100 × 4,6 mm), G₃ (A – acetonitryl, B - woda / TFA (99,95/0,05, v/v): od 3 do 48 % A w A+B (t_G = 27 min), t = 30°C, v = 1 ml/min, detekcja UV przy λ = 268 nm, detekcja ELS: układ *off mode*, DTT = 113,2° C, NGF = 3,2 l/min, poziom 1.



Ryc. 29. Chromatogramy HPLC-UV i HPLC-ELS mieszaniny glikozydów fenolowych: **1** - salicyna, **2** - salikortyna, **3** - 2'-acetylosalikortyna, **4** - salidrozyd, **5** - piceina, **6** - helicyna, **7** - triandryna, **8** - populina, **9** - tremulacyna, **10** - 7-O-glukozyd naryngeniny. Kolumna Chromolith Performance Si połączona z kolumną Chromolith Performance RP18e (100 mm × 4,6 mm), (A – tetrahydrofuran, B - woda / TFA (99,95/0,05, v/v): od 3 do 53 % A w A+B (t_G = 30 min), t = 30°C, v = 1 ml/min, detekcja UV przy λ = 268 nm, detekcja ELS: układ *off mode*, DTT = 112,8° C, NGF = 3,2 l/min, poziom 1.

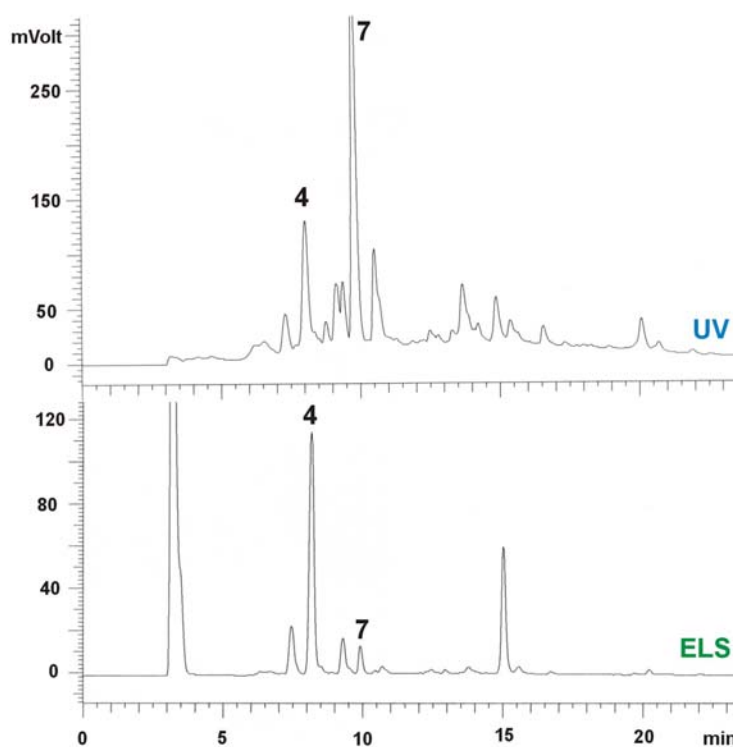


Ryc. 30. Chromatogram HPLC ekstrakstu metanolowego z kory *S. daphnoides* klon 1095 (7004); **1** - salicyna, **2** - salikortyna, **9** - tremulacyna, **10** - 7-O-glukozyd naryngeniny, **11** - 5-O-glukozyd naryngeniny. Kolumna Chromolith Performance Si połączona z kolumną Chromolith Performance RP18e (100 mm × 4,6 mm), (A – tetrahydrofuran, B - woda / TFA (99,95/0,05, v/v): od 3 do 53 % A w A+B ($t_G = 30$ min), $t = 30^\circ\text{C}$, $v = 1$ ml/min, detekcja UV przy $\lambda = 268$ nm, detekcja ELS: układ *off mode*, DTT = $112,8^\circ\text{C}$, NGF = $3,2$ l/min, poziom 1.

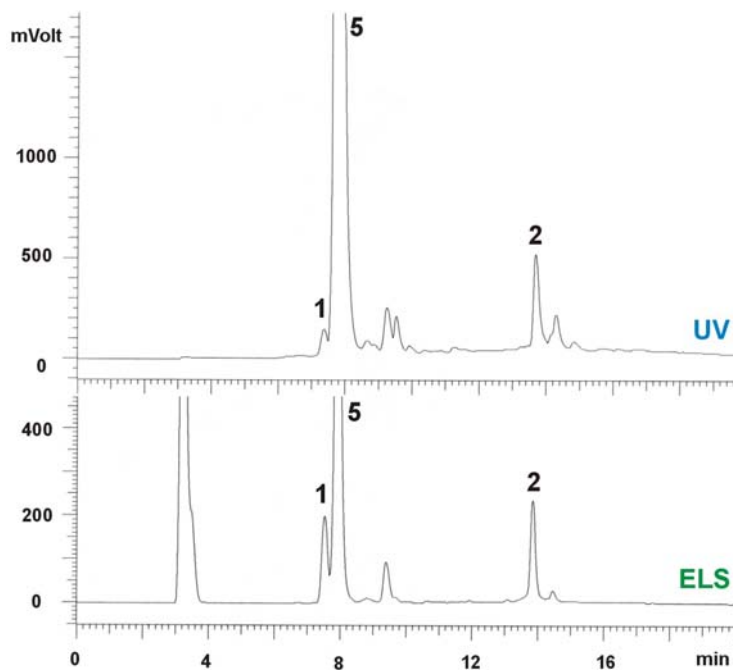
W związku z tym, w dalszych pracach użyto acetonitrylu, jako składnik fazy ruchomej. Detekcję badanych związków prowadzono równolegle w świetle UV o długości fali $\lambda = 268$ nm oraz stosowano detektor światła rozproszonego w układzie *off mode* na poziomie pierwszym, przy prędkości przepływu gazu nebulizującego $3,2$ l/min. Czasy retencji związków salicylowych zawierały się między 7 min a 23 min. Zastosowanie kolumny monolitycznej znacznie skróciło czas analizy w porównaniu do rozdzieleń uzyskanych na kolumnie konwencjonalnej (z 50 min do 23 min) (Ryc. 25,27).

Istotną korzyścią zastosowania detektora ELS była lepsza selektywność i wyższa intensywność pików związków salicylowych w stosunku do innych substancji obecnych w ekstrakcie, przede wszystkim flawonoidów, w tym 5-O- i 7-O-glukozydów naryngeniny (Ryc. 28,30).

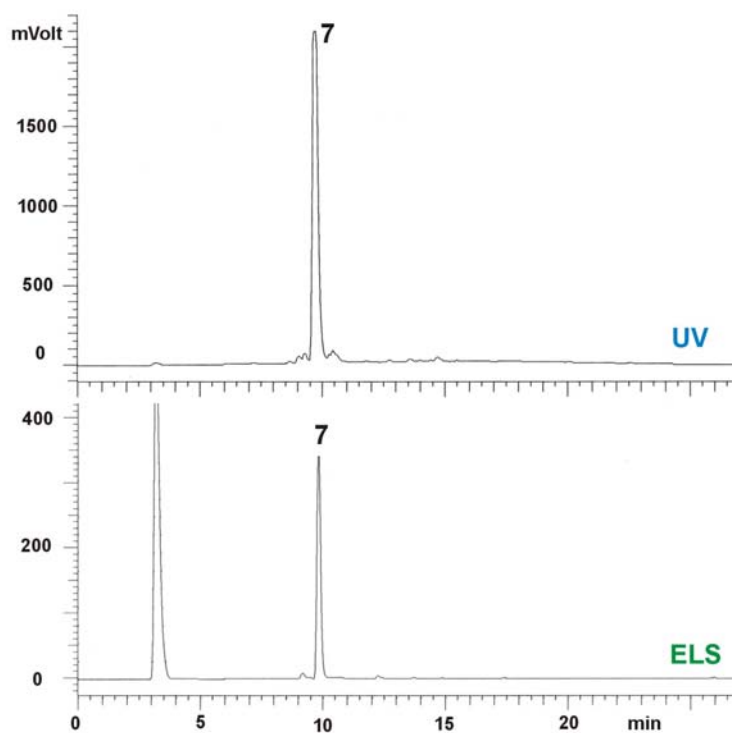
W opracowanych warunkach analizy metodą HPLC-UV-ELS potwierdzono występowanie: 2'-acetylosalikortyny w korach gatunku *S. alba* (7032) i jego klonie 1100 (7002), piceiny obok salicyny w korze *S. herbacea* (7030), salidrozydu w korze *S. triandra* (7038) oraz triandryny w *S. viminalis* (7029) (Ryc. 31-34).



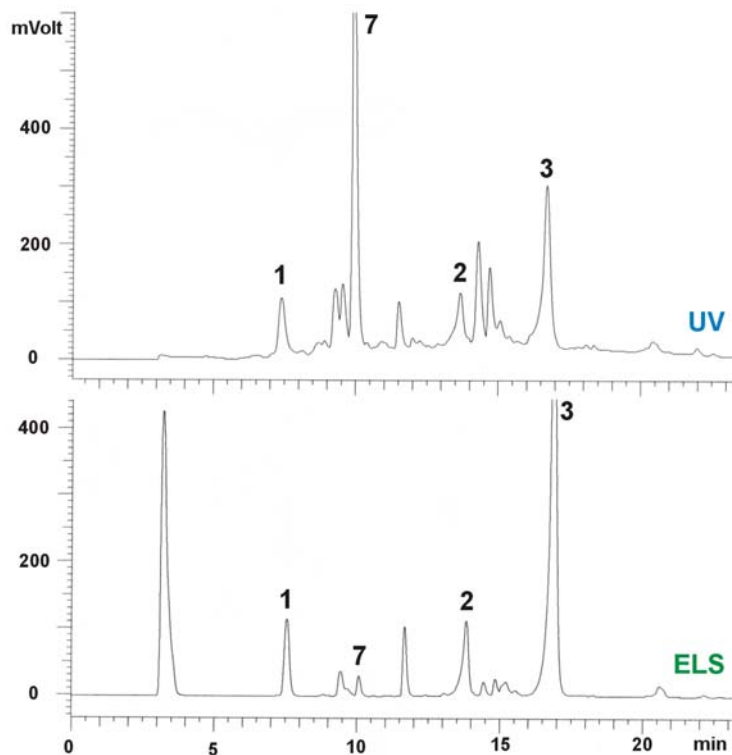
Ryc. 31. Chromatogram HPLC ekstraktu metanolowego z kory *S. triandra* (7038); 4 – salidrozyd, 7 – triandryna. Kolumna Chromolith Performance Si połączona z kolumną Chromolith Performance RP18e (100 × 4,6 mm), G_3 : A – acetonitryl, B – woda / TFA (99,95/0,05, v/v), od 3 do 48 % A w A+B ($t_G = 27$ min), $t = 30^\circ\text{C}$, $v = 1$ ml/min, detekcja UV przy $\lambda = 268$ nm, detekcja ELS: układ *off mode*, DTT = $113,2^\circ\text{C}$, NGF = $3,2$ l/min, poziom 1.



Ryc. 32. Chromatogram HPLC ekstraktu metanolowego z kory *S. herbacea* (7030); 1 – salicyna, 2 – salikortyna, 5 – piceina. Kolumna Chromolith Performance Si połączona z kolumną Chromolith Performance RP18e (100 × 4,6 mm), G_3 : A – acetonitryl, B – woda / TFA (99,95/0,05, v/v), od 3 do 48 % A w A+B ($t_G = 27$ min), $t = 30^\circ\text{C}$, $v = 1$ ml/min, detekcja UV przy $\lambda = 268$ nm, detekcja ELS: układ *off mode*, DTT = $113,2^\circ\text{C}$, NGF = $3,2$ l/min, poziom 1.



Ryc. 33. Chromatogram HPLC ekstrakstu metanolowego z kory *S. viminalis* (7029); **7** – triandryna. Kolumna Chromolith Performance Si połączona z kolumną Chromolith Performance RP18e (100 × 4,6 mm), G_3 : A – acetonitryl, B – woda / TFA (99,95/0,05, v/v), od 3 do 48 % A w A+B ($t_G = 27$ min), $t = 30^\circ\text{C}$, $v = 1$ ml/min, detekcja UV przy $\lambda = 268$ nm, detekcja ELS: układ *off mode*, DTT = $113,2^\circ\text{C}$, NGF = 3,2 l/min, poziom 1.



Ryc. 34. Chromatogram HPLC ekstrakstu metanolowego z kory *S. alba* klon 1100 (7001); **1** – salicyna, **2** – salikortyna, **3** – 2'-acetylosalikortyna, **7** – triandryna. Kolumna Chromolith Performance Si połączona z kolumną Chromolith Performance RP18e (100 × 4,6 mm), G_3 : A – acetonitryl, B – woda / TFA (99,95/0,05, v/v), od 3 do 48 % A w A+B ($t_G = 27$ min), $t = 30^\circ\text{C}$, $v = 1$ ml/min, detekcja UV przy $\lambda = 268$ nm, detekcja ELS: układ *off mode*, DTT = $113,2^\circ\text{C}$, NGF = 3,2 l/min, poziom 1.

W przeciwieństwie do wyników analiz przeprowadzonych metodą TLC nie potwierdzono obecności populiny w korze *S. daphnoides* klon 1095 (7004) (Ryc. 23,28, Tabl. 10). Ponadto stwierdzono, na podstawie intensywności pików na chromatogramie *fingerprint* ELS, że w zespole glikozydów fenolowych kory *S. herbacea* (7029) dominuje piceina przy stosunkowo niskich stężeniach salicyny (Ryc. 32).

Na podstawie zebranych danych piśmiennictwa jest to pierwsze doniesienie o rozdzieleniu wieloskładnikowej mieszaniny związków salicylowych metodą HPLC z użyciem detektora ELS.

1.2. Omówienie wyników analizy ilościowej salicyny wolnej i estrowo związanej w korze wierzb.

W celu oceny badanego materiału roślinnego, jako źródła nowych surowców bogatych w związki salicylowe, opracowano metodę oznaczania wolnej oraz estrowo związanej salicyny z użyciem HPLC-UV.

Sumę zawartości glikozydów fenolowych w korach wierzb badano w hydrolizatach alkalicznych ekstraktów metanolowych i na tej podstawie oceniano przydatność surowca do celów farmaceutycznych [37,151]. FP VI [55] wymaga dla kory wierzby jako surowca leczniczego zawartości glikozydów fenolowych, w przeliczeniu na salicynę, na poziomie co najmniej 1 % (10 mg/g), natomiast Farmakopea Europejska 1,5% (15 mg/g) [50].

W procedurze oznaczania zawartości salicyny opisaną przez Cisowskiego i wsp. [37] hydrolizat poddawano oczyszczaniu drogą ekstrakcji ciecz-ciecz z użyciem octanu etylu. W niniejszej pracy przeprowadzono ocenę wydajności opisanego procesu oczyszczania i wykazano znaczne straty salicyny (dziewięciokrotny spadek) w porównaniu do surowego hydrolizatu. Inne źródła [55,151] podają możliwość oznaczenia zawartości salicyny bezpośrednio z zobojętnionego hydrolizatu alkalicznego. Stosowanie tej metody przy tak dużej liczbie prób, jaką obejmowały badania byłoby czasochłonne, wobec czego zoptymalizowano warunki oczyszczania salicyny z wyciągu metanolowego metodą ekstrakcji do fazy stałej – SPE (*Solid Phase Extraction*). W procesie optymalizacji zastosowano kolumnę szklaną wypełnioną modyfikowanym grupami oktadecylowymi żelem krzemionkowym LiChroprep RP-18. Kolumnę kondycjonowano acetonitrylem, a następnie mieszaniną acetonitryl / woda (2+8, v/v). Salicynę po naniesieniu ekstraktu metanolowego wymywano z kolumny tą samą mieszaniną rozpuszczalników. W opracowanej metodzie SPE odzysk salicyny wynosił: 97,67 % ± 1,26.

Rozdzielanie chromatograficzne przeprowadzono na kolumnie Discovery C18, (150 mm × 2,1 mm, 5 μm) stosując elucję izokratyczną w fazie ruchomej stanowiącej mieszaninę acetonitryl / woda / kwas fosforowy (7+92,91+0,09, v/v/v).

Otrzymane wyniki wykazały znaczne różnice w zawartości salicyny w obrębie badanych egzemplarzy (Tabl. 11). Stężenie wolnej salicyny w korach wierzb mieściło się w zakresie od 1,2 mg/g suchego surowca do 24,7 mg/g, natomiast wolnej i estrowo związanej od 1,2 mg/g do 94,7 mg/g. Najwyższe zawartości wolnej salicyny > 20 mg/g odnotowano dla kory wierzby purpurowej (7043) otrzymanej z firmy „Labofarm” (24,7 mg/g), kory wierzby wawrzynkowej (7033) zebranej ze stanu dzikiego (22,8 mg/g) i kory klonu 1081 wierzby purpurowej (7007) (20,1 mg/g) pochodzącej z upraw Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. W hydrolizatach alkalicznych ekstraktów z wymienionych kor obserwowano wzrost zawartości salicyny odpowiednio do 52,4 mg/g, 48,7 mg/g i 25,6 mg/g, w przeliczeniu na surowiec, co odpowiada sumie ilości salicyny wolnej i powstałej z rozpadu jej estrowych pochodnych np. salikortyny, obserwowanych na chromatogramach TLC (Ryc. 23, Tabl.11).

Dane piśmiennictwa potwierdzają znaczne zróżnicowanie poziomu zawartości związków salicylowych w gatunkach wierzb [10,16,178]. Jako bogate źródła salicyny literatura opisuje gatunki: *S. caprea* (43 mg/g) [178], *S. daphnoides* (49-56 mg/g) [10], *S. fragilis* (39-102 mg/g) [10,178], *S. myrsinifolia* (69 mg/g) [229], *S. phyllicifolia* (140 mg/g) [101,104] i *S. purpurea* (60-110 mg/g) [10,178,229]. Natomiast w korze *S. alba*, którą monografie farmakopealne [50,55] opisują obok *S. purpurea* i *S. daphnoides*, jako równorzędne źródło surowca do celów leczniczych, zawartość pochodnych salicylowych sięga zaledwie 28 mg/g [178,188,229].

Warto odnotować, że badania zawartości glikozydów salicylowych w liściach, korze, drewnie i całych gałązkach różnych gatunków wierzb (*S. caprea*, *S. myrsinifolia*, *S. pentandra*, *S. purpurea*), dowiodły znacznie wyższych stężeń tych związków (o 60-95%) w korze [104,108].

W badanym materiale wysokie koncentracje wolnej salicyny – na poziomie ≥ 10 mg/g do 20 mg/g, obserwowano także dla kory wierzby wawrzynkowej klon 1095 (7004), wierzby purpurowej (7042) i jej klonów 1038 (7005), 1084 (7008), 1132 (7010), 1136 (7011), 1157 (7014), wierzby białej lub wierzby purpurowej otrzymanej z firmy „Flos” (7040), wierzby zielnej (7030) oraz kory klonu *S. purpurea* × *daphnoides* 1107 (7015). Po hydrolizie alkalicznej obserwowano wzrost zawartości salicyny dla przedstawionych powyżej taksonów, z wyjątkiem ostatniego. Wysoką zawartością salicyny wolnej oraz najwyższą w formie związanej charakteryzowała się kora *S. daphnoides* klon 1095 (7004) – 15 mg/g i 94,7 mg/g, odpowiednio (Tabl. 11). Z danych piśmiennictwa wynika, że zawartość salicyny w korze wierzby wawrzynkowej (*S. daphnoides*) zawiera się od 8 do 11 mg/g, natomiast w formie związanych estrowo pochodnych od 49 do 56 mg/g [10,102]. Badany w niniejszej pracy klon 1095 *S. daphnoides* stanowi jedno z bogatszych źródeł salicyny wśród dotychczas opisanych w literaturze [10,101,104,229].

Tabl. 11. Zawartość salicyny wolnej i związanej estrowo [mg/g] w korze gatunków i klonów z rodzaju *Salix* oznaczona metodą SPE-HPLC.

Lp.	Kora gatunku lub klonu	Indeks	Zawartość [mg/g]	
			MeOH	H ₂
1.	<i>Salix acutifolia</i>	7031	7,7 ± 0,11	37,0 ± 0,21
2.	<i>S. alba</i>	7032	1,2 ± 0,04	5,7 ± 0,11
3.	<i>S. alba</i> klon 1100	7001	6,8 ± 0,09	35,8 ± 0,24
4.	<i>S. × americana</i> klon 1036	7002	1,3 ± 0,05	1,2 ± 0,08
5.	<i>S. amygdalina × viminalis</i> klon 1155	7003	-	5,8 ± 0,09
6.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095	7004	15,0 ± 0,21	94,7 ± 0,31
7.	<i>S. daphnoides</i>	7033	22,8 ± 0,32	48,7 ± 0,14
8.	<i>S. eriocephala</i>	7034	6,8 ± 0,14	5,4 ± 0,10
9.	<i>S. × erythroflexuosa</i>	7019	3,2 ± 0,07	*
10.	<i>S. fragilis</i>	7035	5,6 ± 0,08	15,9 ± 0,12
11.	<i>S. fragilis</i> var. <i>sphaerica</i>	7020	7,5 ± 0,18	*
12.	<i>S. herbacea</i>	7030	11,1 ± 0,24	16,5 ± 0,17
13.	<i>S. lapponum</i>	7021	1,8 ± 0,05	*
14.	<i>S. matsudana</i> 'Tortuosa'	7028	-	8,5 ± 0,09
15.	<i>S. melanostachys</i>	7022	2,2 ± 0,03	*
16.	<i>S. nakamuraana</i> var. <i>yezoalpina</i>	7025	6,5 ± 0,17	*
17.	<i>S. purpurea</i>	7036	9,0 ± 0,08	27,2 ± 0,16
18.	<i>S. purpurea</i>	7037	7,0 ± 0,13	25,4 ± 0,19
19.	<i>S. purpurea</i> klon 1038	7005	15,7 ± 0,21	42,1 ± 0,22
20.	<i>S. purpurea</i> klon 1067	7006	4,5 ± 0,13	15,7 ± 0,11
21.	<i>S. purpurea</i> klon 1081	7007	20,1 ± 0,22	25,6 ± 0,16
22.	<i>S. purpurea</i> klon 1084	7008	14,5 ± 0,09	24,8 ± 0,09
23.	<i>S. purpurea</i> klon 1101	7009	8,5 ± 0,08	19,2 ± 0,12
24.	<i>S. purpurea</i> klon 1132	7010	10,2 ± 0,10	49,4 ± 0,22
25.	<i>S. purpurea</i> klon 1136	7011	12,6 ± 0,12	66,3 ± 0,21
26.	<i>S. purpurea</i> klon 1153	7012	-	-
27.	<i>S. purpurea</i> klon 1156	7013	4,5 ± 0,09	3,5 ± 0,08
28.	<i>S. purpurea</i> klon 1157	7014	10,0 ± 0,19	13,2 ± 0,11
29.	<i>S. purpurea × daphnoides</i> klon 1107	7015	13,4 ± 0,23	11,3 ± 0,19
30.	<i>S. rosmarinifolia</i>	7023	-	*
31.	<i>S. sachalinensis</i> 'Sekka'	7026	-	-
32.	<i>S. × sepulcralis</i>	7027	3,9 ± 0,06	17,8 ± 0,09
33.	<i>S. silesiaca</i>	7024	*	*
34.	<i>S. triandra</i> klon 1044	7016	-	-
35.	<i>S. triandra</i> klon 1045	7017	-	-
36.	<i>S. triandra</i>	7038	-	-
37.	<i>S. viminalis</i>	7029	-	-
38.	<i>S. viminalis</i> klon 1083	7018	7,7 ± 0,12	31,6 ± 0,22
39.	<i>S. alba</i> + <i>S. purpurea</i>	7039	8,7 ± 0,06	26,0 ± 0,15
40.	<i>S. alba</i> lub <i>S. purpurea</i>	7040	12,0 ± 0,13	18,8 ± 0,20
41.	<i>S. purpurea</i>	7041	1,7 ± 0,09	1,3 ± 0,07
42.	<i>S. purpurea</i>	7042	10,3 ± 0,25	51,0 ± 0,22
43.	<i>S. purpurea</i>	7043	24,7 ± 0,21	52,4 ± 0,26

Objaśnienia:

MeOH – wyciąg metanolowy z kory wierzby

H₂ – hydrolizat alkaliczny wyciągu metanolowego

(-) – związek nie występuje

(*) – nie oznaczono

Wysoką zawartość salicyny wykazano również w hydrolizatach alkalicznych wyciągów z *S. purpurea* klon 1136 (7011) (66,3 mg/g) i 1132 (7010) (49,4 mg/g) oraz *S. purpurea* (7042) firmy „Herbapol” Wrocław (51,0 mg/g) (Tabl. 11). Wyniki analiz TLC hydrolizatu alkalicznego ekstraktu metanolowego klonu *S. purpurea × daphnoides* 1107 (7015) potwierdziły w korze brak estrowych pochodnych salicyny.

W 19 taksonach spośród 43 badanych, wykazano zawartość wolnej salicyny na poziomie 1,2 mg/g – 9 mg/g. Najniższą zawartością charakteryzuje się kora *S. alba* (7032) (1,2 mg/g) pochodząca z egzemplarza dziko rosnącego oraz kory: *S. × americana* klon 1036 (7002) (1,3 mg/g) z kolekcji Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, *S. lapponum* (7021) i *S. melanostachys* (7022) z upraw Ogrodu Botanicznego w Rogowie oraz *S. purpurea* (7042) „Herbapolu” Gdańsk. W tej grupie wierzb wzrost zawartości salicyny po hydrolizie alkalicznej w zakresie od 5,4 mg/g do 37,0 mg/g, obserwowano dla gatunków i klonów: *S. acutifolia* (7031), *S. alba* (7032) i *S. alba* klon 1100 (7001), *S. fragilis* (7035), *S. × sepulcralis* (7027), *S. viminalis* (7029) oraz dla mieszanki kory *S. alba* i *S. purpurea* (7039) firmy „Kawon” (Tabl. 11).

Wierzba kaspijska (*S. acutifolia*) jest przez niektórych autorów [83] klasyfikowana jako podgatunek wierzby wawrzynkowej (*S. daphnoides*). Wyniki przeprowadzonych analiz, jakościowych i ilościowych, ukazujące zbliżony skład zespołów związków salicylowych w korach naturalnie występujących przedstawicieli obu gatunków, mogą potwierdzać ich bliskie pokrewieństwo (Tabl. 10,11).

Dla kory klonu 1100 wierzby białej wykazano wyższe od dotychczas opisanych [10,188,229] dla gatunku *S. alba* stężenie salicyny – 35,8 mg/g, podczas gdy literatura podaje zawartości od 16 do 28 mg/g [188].

Z przeprowadzonych badań wynika, że kolekcja wierzb Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego stanowi cenne źródło surowca *Salicis cortex* o bardzo wysokich zawartościach salicyny na tle danych literaturowych [10,102,188,222,229]. Są to mianowicie klony *S. daphnoides* klon 1095 (7004) (94,7 mg/g), *S. purpurea* klon 1136 (7011) (66,3 mg/g) oraz *S. alba* klon 1100 (7001) (35,8 mg/g) (Tabl. 11).

1.3. Omówienie wyników badań nad innymi pochodnymi prostych fenoli.

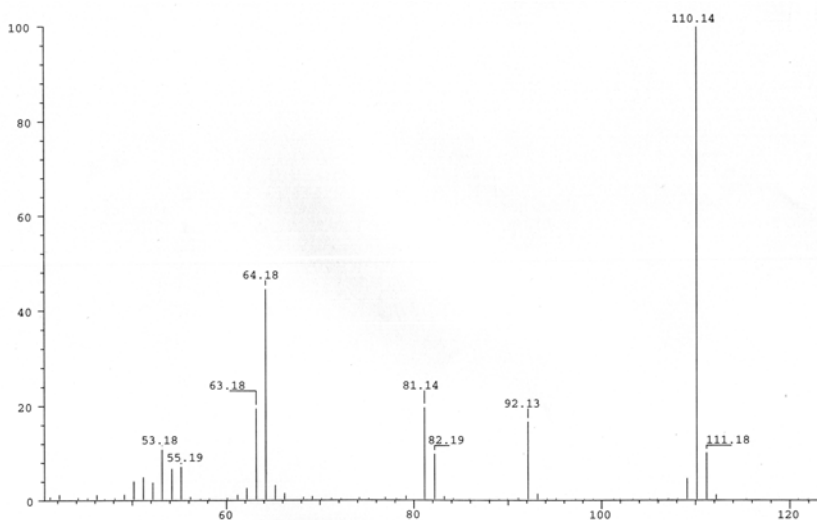
Na chromatogramach TLC (Tabl. 12) i HPTLC (Tabl. 16) ekstraktów eterowych wyciągów metanolowych oraz kwaśnych i zasadowych hydrolizatów większości analizowanych gatunków i klonów wierzby, obserwowano w świetle UV o długości fali $\lambda = 254$ nm obecność związku **5**, który pod wpływem zdiazowanego kwasu sulfanilowego wybarwiał się na kolor brunatno-czerwony (Tabl. 12). Związek w świetle widzialnym, w wyniku szybko zachodzącego procesu utleniania, był widoczny jako beżowo-szara plama.

Tabl. 12. Wartości hR_F związku 5 w stosowanych układach chromatograficznych TLC.

Układ chromatograficzny		Wartości hR_F związku 5
Faza stacjonarna	Faza ruchoma	
TLC celuloza	mrówczan sodu / kwas mrówkowy / woda 10+1+200, v/v (S ₁₀)	72
TLC RP-18	metanol / woda / kwas mrówkowy 40+60+6, v/v (S ₁₃)	49

Związek **5** otrzymano w formie białego, krystalicznego osadu, z wyciągu metanolowego z kory *S. purpurea* (7043), metodą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej na złożu stanowiącym modyfikowany grupami propylodiolowymi żel krzemionkowy z użyciem wielokrotnej elucji gradientowej – MGD ($hR_F = 64$) (Tabl. 16). Wykorzystano warunki rozdzielania chromatograficznego, zoptymalizowane dla celów analizy jakościowej zespołów fenolokwasów w korze wierzb.

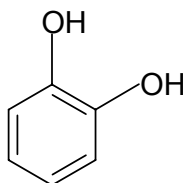
Strukturę związku **5** określono metodami spektroskopii w UV, spektrometrii masowej – EI-MS (*Electron Impact – Mass Spectrometry*) oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. Widmo UV związku **5** charakteryzowało się obecnością dwóch maksimów absorpcji przy długości fali $\lambda = 220$ nm i 280 nm. Obecny w widmie EI-MS jon molekularny o wartości m/z 110 jest zgodny z masą cząsteczkową dihydroksybenzeny ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$, m.cz. 110 Da) (Ryc. 35).



Ryc. 35. Widmo EI-MS związku 5.

W widmie ^1H NMR związku **5** przy δ 6,71 i δ 6,59 obserwowano dwa dwuprotonowe dublety dubletów o stałych sprzężenia $J = 5,7/3,4$ Hz, które przypisano odpowiednio protonom H-4,5 oraz H-3,6 układu o-difenolu [73]. Z kolei obecny w widmie ^1H NMR przy δ 8,81 dwuprotonowy singlet odpowiada dwóm grupom OH związanym przez węgle w pozycji C-1 i C-2 [142]. Strukturę związku jako o-hydroksypochodnej fenolu potwierdza widmo ^{13}C NMR, w którym sygnały δ 145,3, δ 119,2 i δ 115,7 przypisano odpowiednio węglom C-1,2, C-3,4 oraz C-5,6 [142]. W oparciu o powyższe dane związek **5** zidentyfikowano, jako 1,2-dihydroksybenzen (1,2-benzenodiol) – pirokatechinę (Ryc. 36).

Nazwą związku zalecaną przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) jest pirokatechol (ang. *pyrocatechol*) [84].



Ryc. 36. Wzór strukturalny pirokatecholu.

Obecność pirokatecholu ujawniono chromatograficznie (MGD-HPTLC, Tabl. 16) w korze 29 spośród 43 badanych gatunków i klonów wierzb (Tabl. 13). Jedynie w *S. amygdalina* × *viminalis* klon 1155 (7003), *S. eriocephala* (7034), *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026), *S. triandra* (7038) i jej klonach 1044 (7016), 1045 (7017) oraz *S. purpurea* (7041), otrzymanej z „Herbapolu” Gdańsk nie stwierdzono występowania pirokatecholu, zarówno w formie wolnej oraz jako produktu hydrolizy kwasowej i zasadowej (surowe wyciągi metanolowe i ich ekstrakty eterowe oraz hydrolizaty). Podobnie związek nie występował w ekstraktach metanolowych z kor: *S. melanostachys* (7022), *S. rosmarinifolia* (7023) i *S. silesiaca* (7024) (Tabl. 13).

Dotychczas w obrębie rodzaju *Salix* występowanie pirokatechiny odnotowano w liściach *Salix capitata* [112]. Ponadto w świecie roślinnym pirokatechol zidentyfikowano w nasionach koli (*Cola sp.*, *Sterculiaceae*) [51], liściach starzeńli rozesłanej (*Gaultheria procumbens*, *Ericaceae*) [51], smole drzewnej (*Pix liquida*) otrzymywanej z różnych gatunków należących do rodziny *Pinaceae* [51], korzeniach *Byrsonima intermedia* [41] i suchych sokach – żywicach, zwanych „kino” np. kino malabarskie z gatunku *Pterocarpus marsupium* (*Leguminosae*), kino bengalskie (*Butea frondosa*, *Leguminosae*), czy kino eukaliptusowe – czerwona guma (*Eucalyptus rostrata*, *E. camaldulensis*, *Myrtaceae*) [51,90]. Pochodnymi pirokatecholu są toksyczne, alergizujące w kontakcie ze skórą, urusziolate występujące w soku kanałów żywicznych sumaka jadowitego (*Rhus toxicodendron*, *Anacardiaceae*) [84] oraz w liściach miłorzębu (*Ginkgo biloba*, *Ginkgoaceae*) [203].

W oparciu o wyniki badań Julkunen-Titto i Meier [106] można przypuszczać, że pirokatechol powstaje w korze wierzb w wyniku rozpadu związków salicylowych. Autorki opisały szlaki rozpadu salicyny i jej estrowych pochodnych w procesach enzymatycznych oraz określiły wpływ pH środowiska na ich trwałość. W środowisku zasadowym następuje rozpad wiązania estrowego w cząsteczce salikortyny, tremulacyny i 2'-acetylosalikortyny. Proces prowadzi do odłączenia 1-hydroksy-6-okso-2-cyclohekseno-1-karbonylu – ugrupowania obecnego w tego typu połączeniach. Powstający w wyniku spontanicznej dekarboksylacji 6-hydroksycyklohekseno-2-on (6-HCH) częściowo utlenia się do pirokatecholu (Ryc. 37). Pozostałe produkty rozpadu stanowią odpowiednio glikozydy: salicyna, tremuloidyna i 2'-acetylosalicyna.

Tabl. 13. Obecność pirokatechiny w wyciągach i hydrolizatach z kory wierzby oznaczona metodą TLC.

Lp.	Kora gatunku lub klonu	Indeks	MeOH	K _w	K _z	K _k
1.	<i>Salix acutifolia</i>	7031	śl.	śl.	+	++
2.	<i>S. alba</i>	7032	śl.	śl.	+	++
3.	<i>S. alba</i> klon 1100	7001	śl.	+	++	+
4.	<i>S. americana</i> klon 1036	7002	śl.	+	+	+
5.	<i>S. amygdalina</i> × <i>viminalis</i> klon 1155	7003	-	-	-	-
6.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095	7004	+	+	+++	++
7.	<i>S. daphnoides</i>	7033	śl.	śl.	+++	++
8.	<i>S. eriocephala</i>	7034	-	-	-	-
9.	<i>S. × erythroflexuosa</i>	7019	+	*	*	*
10.	<i>S. fragilis</i>	7035	+	+	śl	++
11.	<i>S. fragilis</i> var. <i>sphaerica</i>	7020	śl.	*	*	*
12.	<i>S. herbacea</i>	7030	śl.	śl.	+	+
13.	<i>S. lapponum</i>	7021	+	*	*	*
14.	<i>S. matsudana</i> 'Tortuosa'	7028	+	+	-	++
15.	<i>S. melanostachys</i>	7022	-	*	*	*
16.	<i>S. nakamura</i> var. <i>yezoalpina</i>	7025	śl.	*	*	*
17.	<i>S. purpurea</i>	7036	śl.	+	++	+++
18.	<i>S. purpurea</i>	7037	śl.	+	++	++
19.	<i>S. purpurea</i> klon 1038	7005	śl.	śl.	+	++
20.	<i>S. purpurea</i> klon 1067	7006	-	+	-	+
21.	<i>S. purpurea</i> klon 1081	7007	śl.	śl.	+	++
22.	<i>S. purpurea</i> klon 1084	7008	śl.	+	+	++
23.	<i>S. purpurea</i> klon 1101	7009	+	+	+	+
24.	<i>S. purpurea</i> klon 1132	7010	+	+	++	++
25.	<i>S. purpurea</i> klon 1136	7011	+	+	++	+++
26.	<i>S. purpurea</i> klon 1153	7012	śl.	śl.	+	+
27.	<i>S. purpurea</i> klon 1156	7013	-	śl.	+	-
28.	<i>S. purpurea</i> klon 1157	7014	-	+	+	+
29.	<i>S. purpurea</i> × <i>daphnoides</i> klon 1107	7015	śl.	-	-	+
30.	<i>S. rosmarinifolia</i>	7023	-	*	*	*
31.	<i>S. sachalinensis</i> 'Sekka'	7026	-	-	-	-
32.	<i>S. × sepulcralis</i>	7027	+	+	+	+
33.	<i>S. silesiaca</i>	7024	-	*	*	*
34.	<i>S. triandra</i> klon 1044	7016	-	-	-	-
35.	<i>S. triandra</i> klon 1045	7017	-	-	-	-
36.	<i>S. triandra</i>	7038	-	-	-	-
37.	<i>S. viminalis</i>	7029	śl.	śl.	śl.	śl.
38.	<i>S. viminalis</i> klon 1083	7018	-	-	+	+
39.	<i>S. alba</i> + <i>S. purpurea</i>	7039	+	+	++	++
40.	<i>S. alba</i> lub <i>S. purpurea</i>	7040	+	+	++	++
41.	<i>S. purpurea</i>	7041	-	-	-	-
42.	<i>S. purpurea</i>	7042	śl.	+	++	+
43.	<i>S. purpurea</i>	7043	+	+	++	+

Adsorbent: celuloza, faza ruchoma: mrówczan sodu/woda/kwas/mrówkowy (10+200+1, v/v/v) oraz adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v).

Objaśnienia:

MeOH – wyciąg metanolowy z kory wierzby

K_w – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego

K_z – ekstrakt eterowy hydrolizatu alkalicznego wyciągu metanolowego

K_k – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwaśnego wyciągu metanolowego

(-) – związek nie występuje

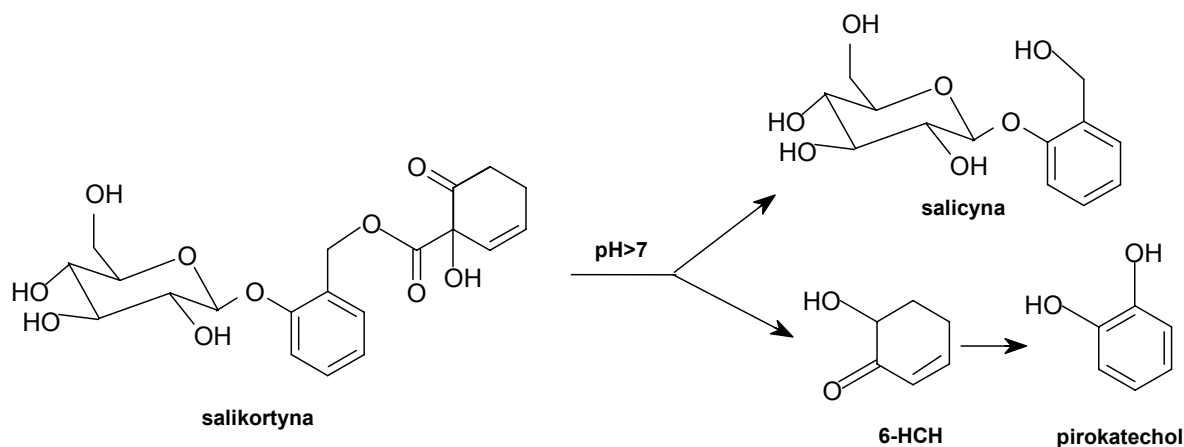
(śl.) – zawartość śladowa

(+) – niska zawartość

(++) – średnia zawartość

(+++)

(*) – nie oznaczono



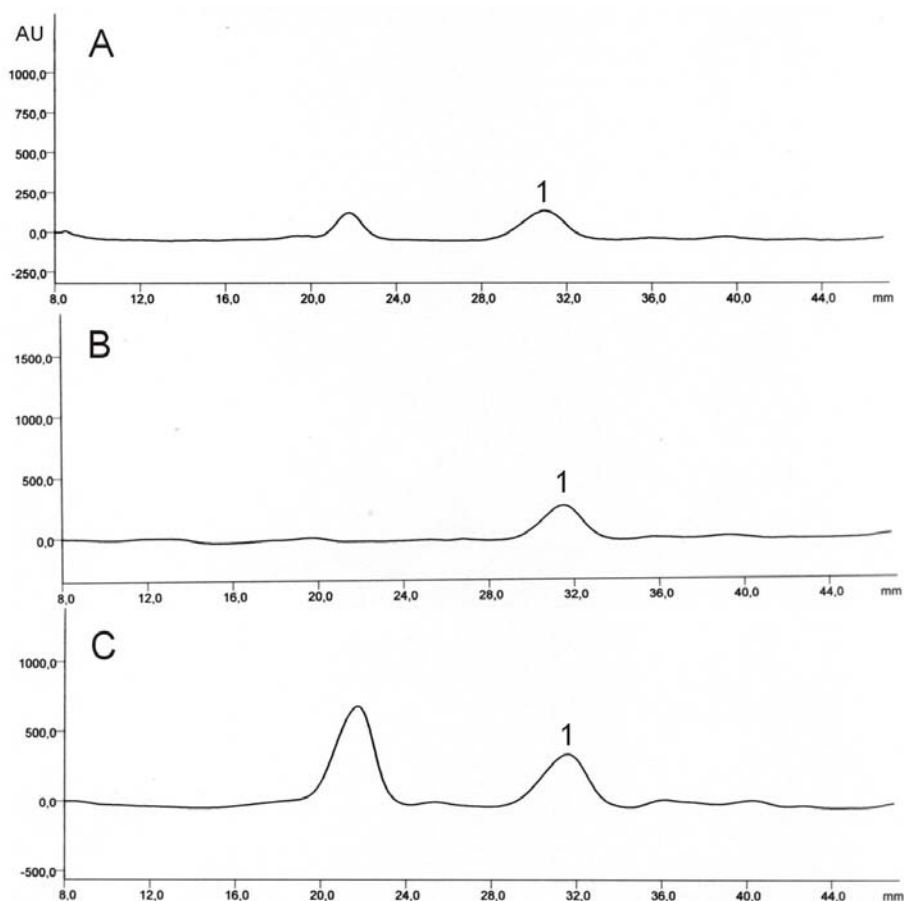
Ryc. 37. Schemat procesu rozpadu estrowych pochodnych salicyliny na przykładzie salikortyny.

W środowisku kwaśnym jedynie salikortyna ulega rozpadowi do saligeniny (alkoholu salicylowego), glukozy i 6-HCH – prekursora pirokatecholu, który w tych warunkach ($\text{pH} < 1$) jest stosunkowo stabilny [106]. Trwałość pozostałych estrowych pochodnych salicyliny: 2'-acetylosalikortyny, tremulacyny i 2'-acetylosalicyliny tłumaczy się ochronnym wpływem acetylacji grup cukrowych [106].

W związku z tym, postanowiono określić zawartość pirokatechiny w tych korach, które charakteryzowały się najwyższą zawartością związków salicylowych, w tym salikortyny, i mogą stanowić potencjalne źródło surowca leczniczego, mianowicie *S. daphnoides* klon 1095 (7004) i *S. alba* klon 1100 (7001). Ponadto w badaniach uwzględniono materiał roślinny, pochodzący ze stanu dzikiego, stanowiący surowiec zielarski firmy „Herbapol” Wrocław – *S. purpurea* (7042) oraz kory rosnących w warunkach naturalnych *S. acutifolia* (7031) i *S. daphnoides* (7033) w przeciwieństwie do pochodzącej z upraw kory firmy „Labofarm” – *S. purpurea* (7043).

Do badań przeznaczono ekstrakty metanolowe i frakcje eterowe wyciągów metanolowych oraz hydrolizatów kwasowych i zasadowych w celu oceny zawartości pirokatechiny wolnej i powstającej w wyniku procesów hydrolitycznych.

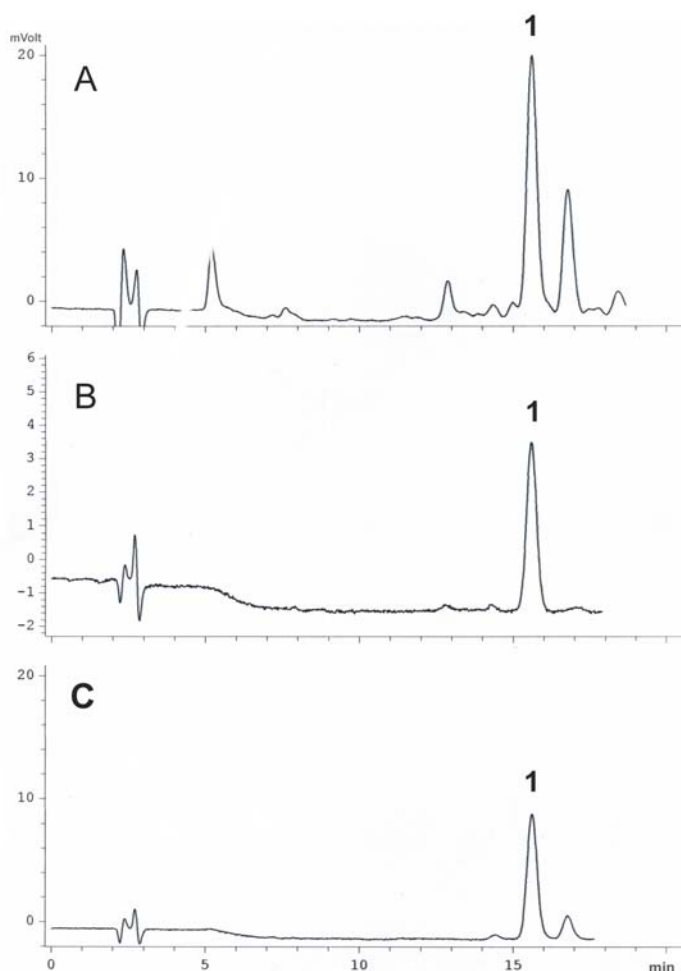
W analizie ilościowej pirokatecholu wykorzystano układ chromatograficzny z adsorbentem typu HPTLC Diol i gradientem MGD, stosowanym w izolacji związku oraz w badaniach jakościowych (Tabl. 16). Chromatogramy analizowano densytometrycznie, stosując skanowanie meandrem przy długości fali $\lambda = 254 \text{ nm}$ (Ryc. 38).



Ryc. 38. Densytogram rozdzielania MGD-HPTLC ekstraktów eterowych z kory *S. purpurea* (7042): **A** – wyciągu metanolowego, **B** – hydrolizatu zasadowego, **C** – hydrolizatu kwasowego, **1** – pirokatechina. Adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, elucja gradientowa MGD-HPTLC (Tabl. 16).

Analizę pirokatecholu techniką MGD-HPTLC w ekstraktach metanolowych uniemożliwiała duża ilość substancji balastowych (*S. acutifolia* (7031), *S. daphnoides* klon 1095 (7004), *S. daphnoides* (7033), *S. purpurea* (7042) i (7043)) przy niskich stężeniach oznaczanego związku – poniżej granicy wykrywalności (LOQ = 200 ng) (Tabl. 2). Natomiast oznaczenie związku było możliwe w ekstraktach eterowych frakcji wodnych wyciągów metanolowych z kor wierzb. Jednocześnie, ocenę zawartości pirokatechiny w ekstraktach metanolowych, bez etapu oczyszczania próbki, umożliwiła metoda HPLC opracowana w celu weryfikacji wyników uzyskanych metodą MGD-HPTLC. Rozdzielanie prowadzono na kolumnie Discovery HS C-18 (75 mm × 4,6 mm, 3 μm) stosując elucję gradientową w mieszaninie acetonitryl / woda+kwas octowy (99,9+0,1, v/v) o wzrastającym stężeniu acetonitrylu od 2% do 17% ($t_G = 20$ min) oraz detekcję UV przy długości fali $\lambda = 280$ nm (Ryc. 39).

Współczynnik korelacji wyników oznaczeń ilościowych uzyskanych metodą HPLC i HPTLC wyniósł 0,9905.



Ryc. 39. Chromatogram HPLC rozdzielania ekstraktów eterowych z kory *S. purpurea* (7042): **A** – wyciągu metanolowego, **B** - hydrolizatu zasadowego, **C** - hydrolizatu kwasowego, **1** – pirokatechiny. Kolumna Discovery HS C-18 (75 × 4,6 mm × 3 μm), elucja gradientowa G₉: (A – acetonitryl, B – woda+kwasy octowy 99,9+0,1; v/v), od 2 do 17 % A w A+B (t_G = 20 min), t = 20°C, detekcja UV przy λ = 280 nm.

Ilość pirokatecholu w badanych próbach zawierała się w granicach od 0,05 mg/g do 12,57 mg/g suchej masy surowca (Tabl. 14). Najwyższa zawartość pirokatechiny (2,25 mg/g) charakteryzowała korę *S. purpurea* (7043) pochodzącą z plantacji firmy „Labofarm”. Oznaczona zawartość była dziesięciokrotnie wyższa w porównaniu do kory tego gatunku zebranej ze stanu dzikiego – *S. purpurea* (7042), w której ilość związku wynosiła 0,22 mg/g (Tabl. 14).

W oznaczeniach metodą HPLC odnotowano dwukrotnie wyższe stężenie pirokatechiny w ekstrakcie eterowym wyciągu metanolowego z kory *S. purpurea* (7042) w porównaniu do zawartości związku oznaczonej w surowym ekstrakcie (0,22 mg/g i 0,099 mg/g, odpowiednio). Z kolei wyniki oznaczeń pirokatecholu w ekstrakcie eterowym metodą MGD-HPTLC i ekstrakcie metanolowym metodą HPLC były zbliżone (0,12 mg/g i 0,099 mg/g, odpowiednio) (Tabl. 14). Można wyjaśnić to ko-ekstrakcją eterem etylowym innych składników obecnych w wyciągu metanolowym, które migrują na kolumnie HPLC w tym samym czasie co katechol.

Tabl. 14. Zawartość pirokatechiny w wyciągach metanolowych i ich ekstraktach eterowych oraz hydrolizatach oznaczona metodą HPLC i MGD-HPTLC.

Lp.	Gatunek/klon	Indeks	Zawartość pirokatechiny [mg/g]	
			HPLC	MGD-HPTLC
1.	<i>S. purpurea</i> (MeOH)	7043	2,25 ± 0,07	*
2.	<i>S. purpurea</i> (K _w)	7043	2,34 ± 0,12	2,12 ± 0,09
3.	<i>S. purpurea</i> (K _z)	7043	3,05 ± 0,09	2,64 ± 0,08
4.	<i>S. purpurea</i> (K _k)	7043	0,50 ± 0,05	0,35 ± 0,07
5.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095 (MeOH)	7004	0,21 ± 0,04	*
6.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095 (K _w)	7004	0,56 ± 0,02	0,53 ± 0,03
7.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095 (K _z)	7004	12,57 ± 0,11	11,06 ± 0,12
8.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095 (K _k)	7004	3,71 ± 0,09	3,85 ± 0,06
9.	<i>S. purpurea</i> (MeOH)	7042	0,099 ± 0,03	*
10.	<i>S. purpurea</i> (K _w)	7042	0,22 ± 0,05	0,12 ± 0,05
11.	<i>S. purpurea</i> (K _z)	7042	1,77 ± 0,02	1,95 ± 0,09
12.	<i>S. purpurea</i> (K _k)	7042	1,98 ± 0,03	1,48 ± 0,07
13.	<i>S. alba</i> klon 1100 (MeOH)	7001	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,03
14.	<i>S. alba</i> klon 1100 (K _w)	7001	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,02
15.	<i>S. alba</i> klon 1100 (K _z)	7001	5,23 ± 0,04	5,72 ± 0,11
16.	<i>S. alba</i> klon 1100 (K _k)	7001	1,05 ± 0,08	1,12 ± 0,07
17.	<i>S. acutifolia</i> (MeOH)	7031	0,05 ± 0,01	*
18.	<i>S. daphnoides</i> (MeOH)	7033	0,05 ± 0,01	*

Objaśnienia:

(MeOH) – wyciąg metanolowy z kory wierzby

(K_w) – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego(K_z) - ekstrakt eterowy hydrolizatu alkalicznego wyciągu metanolowego(K_k) - ekstrakt eterowy hydrolizatu kwaśnego wyciągu metanolowego

(*) – nie oznaczono

Zgodnie z wynikami badań Julkunen-Titto i Meier [106] odnotowano znacznie wyższe stężenia pirokatechiny w hydrolizatach zasadowych w porównaniu do kwasowych (Tabl. 14). Wysoka zawartość salikortyny w korze *S. daphnoides* klon 1095 (7004) (różnica zawartości salicyny całkowitej i wolnej) (Tabl. 14) wyjaśnia, w świetle tych danych, najwyższy wzrost zawartości związku w hydrolizatach ekstraktu metanolowego kory tego klonu, przy czym ilość pirokatechiny powstałej w wyniku hydrolizy zasadowej była prawie pięciokrotnie wyższa niż w przypadku kwasowej (3,71 mg/g i 12,57 mg/g, odpowiednio). Podobne różnice obserwowano dla *S. alba* klon 1100 (7001) (1,05 mg/g i 5,23 mg/g, odpowiednio) (Tabl. 14).

Obserwowane wysokie stężenie wolnego katecholu w korze wierzby firmy „Labofarm” (7043) na tle oznaczonej zawartości związków salicylowych (Tabl. 11), nie potwierdza jednoznacznie pochodzenia związku jedynie jako produktu rozpadu tych połączeń. Wysoka zawartość związku w korze *S. purpurea* (7043) może wynikać z mechanicznego zbioru surowca i domieszek drewna. Kanitskaya i wsp. [111] wykryli dużą liczbę jednostek pirokatecholu w ligninie kory bawełny (*Gossypium sp.*).

Obecność pirokatechiny w korach niektórych wierzby, w świetle danych o jej działaniu nowotworowym i genotoksycznym [3,76,192,205] nasuwa pytanie o bezpieczeństwo stosowania surowca, w tym przede wszystkim jednorocznych gałęzi, stanowiących według monografii Farmakopei Europejskiej surowiec równocenny z korą [50].

2. Omówienie wyników badań zespołów fenolokwasów w korze wierzb.

W badanym materiale roślinnym zespoły fenolokwasów rozpoznano wobec trzydziestu substancji wzorcowych, pochodnych kwasu benzoowego i cynamonowego. Stosowano techniki chromatografii planarnej – TLC i HPTLC. W celu chromatograficznej identyfikacji wolnych oraz estrowo lub glikozydowo związanych fenolokwasów, analizie poddano wyciągi metanolowe z kory wierzb i frakcje eterowe wyciągów metanolowych oraz hydrolizatów zasadowych i kwaśnych.

Badania fenolokwasów w matrycach roślinnych najczęściej są prowadzone w oparciu o chromatografię cienkowarstwową [61,70,146,147,167,185,212,214]. W gałązkach i liściach *Salix myrsinifolia*, kwas chlorogenowy zidentyfikowano metodą wysokosprawną chromatografię cieczową [103], natomiast frakcję fenoli w drewnie *S. caprea* analizowano metodą chromatografii gazowej z użyciem detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID) [187].

Wstępne badania metodą TLC, prowadzono w układzie często stosowanym w analizie fenolokwasów w surowcach roślinnych, w którym fazę stacjonarną stanowi celuloza, a fazę ruchomą mieszanina rozpuszczalników: woda / mrówczan etylu / kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v). Spośród trzydziestu substancji wzorcowych stanowiących fenolokwasy, w tych warunkach, nie uzyskano rozdzielania następujących grup kwasów: 2,3-dihydroksybenzoowego, 2,4-dimetoksybenzoowego i dihydrokawowego; kawowego, ferulowego i izoferulowego; gentyzynowego, cynamonowego i α -rezorcylowego oraz β -, γ -rezorcylowego i chlorogenowego (Tabl. 15). Rozdzielenia na złożu celulozowym charakteryzują się znacznym rozmyciem plam analizowanych związków, co obniża selektywność separacji w ekstraktach. Natomiast zaletą układu jest możliwość identyfikacji form *cis* i *trans* pochodnych kwasu cynamonowego. Stosowany na celulozie zdziazowany kwas sulfanilowy, jako odczynnik wywołujący, charakterystycznie wybarwia plamy fenolokwasów, co obok wartości współczynnika zatrzymania (R_F) dodatkowo potwierdza tożsamość związku (Tabl. 15).

Równoległe badania zespołów fenolokwasów prowadzono na żelu krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi RP-18, stosując mieszaninę: metanol / woda / kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v), jako fazę ruchomą (Tabl. 15). W warunkach tych rozdzielono izomery kwasu hydroksycynamonowego, mianowicie kwasy o-, m- i p-kumarowy. Uzyskano także dobre rozdzielanie kwasu kawowego i dihydrokawowego, który pod wpływem zdziazowanego kwasu sulfanilowego wybarwiał się na kolor brunatno-czerwony (Tabl. 15).

Tabl. 15. Wartości hR_F ($R_F \times 100$) wzorcowych fenolokwasów w stosowanych układach chromatograficznych – TLC i HPTLC.

Lp.	Substancja wzorcowa	Wartość hR_F ($R_F \times 100$)			
		I	II	III	IV
1.	Kwas salicylowy	71 c*	37	17 c*	6,3
2.	Kwas m-hydroksybenzoesowy	74 ż	34	42 ż	49
3.	Kwas p-hydroksybenzoesowy	61 ż	43	43 p	52
4.	Kwas 2,3-dihydroksybenzoesowy	65 r	60	32	4,6
5.	Kwas β -rezorcylowy	50 cz	36	32 żbr	7
6.	Kwas gentyzynowy	56 cz	38	40 br	4
7.	Kwas γ -rezorcylowy	52 cz	46	40 żbr	3,4
8.	Kwas protokatechowy	46 p	15	61 br	44
9.	Kwas α -rezorcylowy	55 cz	7,9	-	32
10.	Kwas 2,4-dimetoksybenzoesowy	66	68	14	79
11.	Kwas weratrowy	-	66	19	73
12.	Kwas galusowy	38 kr	4,5	77 br	31
13.	Kwas wanilinowy	47 p	55	39 żp	62
14.	Kwas syryngowy	43 m	47	38 ż	73
15.	Kwas homowanilinowy	85 cz	74	42	68
16.	Kwas homogentyzynowy	79	66	76 blnb	13
17.	Kwas cynamonowy	56	69	9	63
18.	Kwas o-kumarowy	38 p	-	20	-
19.	Kwas m-kumarowy	33 p	35	22 m	-
20.	Kwas p-kumarowy	25 m 75 m	41 39	28 cz	42
21.	Kwas ferulowy	16 f 66 f	50	32	52
22.	Kwas izoferulowy	16 r 67 r	39 46	23 szr	41
23.	Kwas kawowy	15 szr 66 szr	15	44	36
24.	Kwas synapinowy	10 szr 55 szr	48 82	24	3,4
25.	Kwas dihydrohydrokawowy	65 cz	14	52 czbr	54
26.	Kwas 4-metoksycynamonowy	26	71	6	75
27.	Kwas 3,4-dimetoksycynamonowy	15	65 72	8 12	69
28.	Kwas elagowy	-	-	15	1,7
29.	Kwas chlorogenowy	52 c 71 c	-	55 br	3,4
30.	Kwas rozmarynowy	27 58	-	-	3,5

Objaśnienia: I – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: woda/mrówczan sodu/kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v); II – adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, gradient MGD (Tabl.16); III – adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v); IV - adsorbent: poliamid, faza ruchoma chloroform/metanol/keton metylo-etylowy (40+20+30, v/v/v).

(*) – zabarwienie plam związków wzorcowych otrzymane pod wpływem derywatyzacji zdiadowanym kwasem sulfanilowym: blnb – bładniebieski, br – brunatny, c – cytrynowy, cz – czerwony, czbr –czerwonobrunatny, cz – ciemnożółty, f – fioletowy, kr – kremowy, m – malinowy, p - pomarańczowy, r – różowy, sz- szary, szr – szaro-różowy, ż – żółty, żbr – żółto-brunatny, żp – żółto-pomarańczowy.

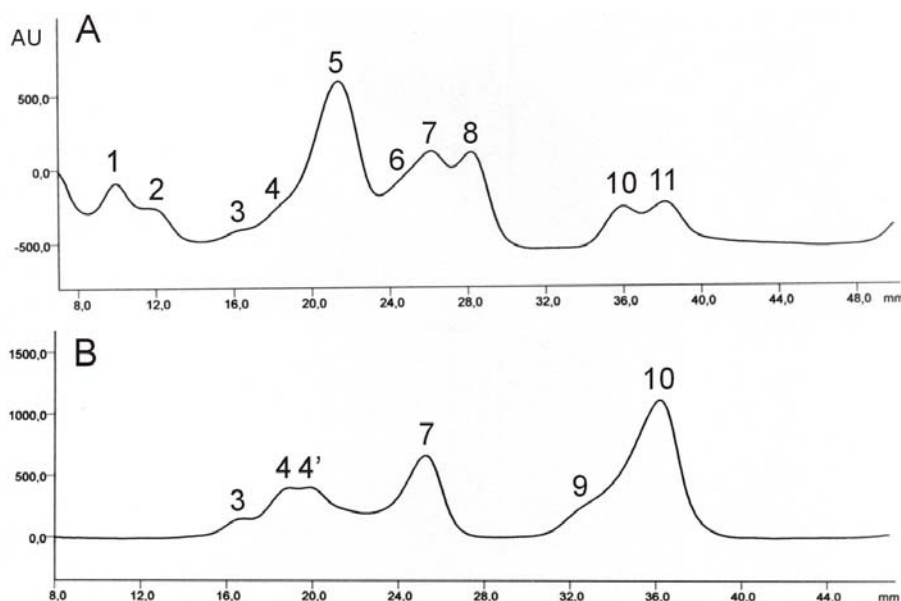
W rezultacie prac nad zespołami związków fenolowych w korze wierzb, zoptymalizowano warunki rozdzielania mieszaniny jedenastu fenolokwasów techniką wielokrotnej elucji gradientowej – MGD [145,146], wykorzystane wcześniej w analizie kwasu p-kumarowego w rodzinie *Solanaceae* [185]. Rozdzielenia prowadzono na żelu krzemionkowym z chemicznie związanymi grupami diolowymi, z użyciem mieszaniny rozpuszczalników: chloroform / heksan / octan etylu o wzrastającym od 10% do 25% stężeniu octanu etylu w kolejnych etapach gradientu (Tabl. 16).

Tabl. 16. Program elucji gradientowej techniką MGD-HPTLC stosowany na żelu krzemionkowym modyfikowanym grupami diolowymi.

Faza ruchoma (v/v/v)	Etap elucji gradientowej		
	I	II	III
Chloroform + heksan 7+3, (v/v)	18	17	16
Octan etylu	2	3	4
Kwas mrówkowy	0,001	-	-

Zastosowanie techniki HPTLC-MGD w analizie alkaloidów, antocyjanów i kardenolidów w ekstraktach roślinnych opisała Matysik [146].

Chromatogramy początkowo rozwijano na dystansie 8 cm. Uwzględniając długi czas analizy (90 min) podjęto próbę separacji mieszaniny substancji wzorcowych na dystansie 4 cm, co w rezultacie umożliwiło rozwijanie chromatogramów z dwóch stron płytki chromatograficznej. Separację prowadzono w komorze poziomej, w warunkach nienasyconych. Stosując technikę MGD (Tabl. 16) rozdzielono wszystkie spośród 11 obecnych w mieszaninie fenolokwasów, mianowicie: kwasy α -rezorcylowy, kawowy, m-hydroksybenzoesowy, p-kumarowy, p-hydroksybenzoesowy, syryngowy, ferulowy, wanilinowy, weratrowy, cynamonowy i 4-metoksycynamonowy (Ryc. 40, Tabl. 15).



Ryc. 40. Densytogramy rozdzielania mieszaniny wzorcowych fenolokwasów: **A** – mieszaniny związków 1-8, 10-11, **B** – mieszaniny związków 3-4,7,9-10: **1** – kwas α - rezorcylowy, **2** – kwas kawowy, **3** – kwas m-hydroksybenzoesowy, **4, 4'** - p-kumarowy (forma cis i trans), **5** – kwas p-hydroksybenzoesowy, **6** – kwas syryngowy, **7** – kwas ferulowy, **8** – kwas wanilinowy, **9** – kwas weratrowy, **10** – kwas cynamonowy, **11** – 4-metoksycynamonowy. Adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC - Diol, elucja gradientowa – MGD (Tabl. 16).

Opracowany układ chromatograficzny umożliwia separację izomerów o-, m- i p-kwasu benzoesowego oraz grupy kwasów dihydroksybenzoesowych różniących się strukturalnie położeniem grup hydroksylowych w pierścieniu aromatycznym (Tabl. 15).

W celu rozdzielenia kwasów wanilinowego i syringowego obok synapinowego, którego nie zapewniały powyżej opisane układy, na adsorbencie poliamidowym użyto fazę ruchomą: chloroform / metanol / keton metylo-etylowy (40+20+30, v/v) (Tabl. 15). W tych warunkach kwas ferulowy oddzielał się od izomeru – kwasu izoferulowego z wysoką wartością $\Delta hR_F = 11$ (Tabl. 15). Złoże poliamidowe zastosowano po raz pierwszy w analizie fenolokwasów [61,69,70,146,167,214]. Podobnie jak w przypadku chromatogramów otrzymanych na złożu celulozowym, obserwowano charakterystyczne zabarwienie plam fenolokwasów pod wpływem derywatywacji zdiadowanym kwasem sulfanilowym.

W przeciwieństwie do adsorbentów celulozowego i poliamidowego, na złożu diolowym możliwe było użycie jedynie par amoniaku, jako odczynnika wywołującego fenolokwasy. Jednocześnie, pod wpływem odczynnika tymolowego, opisanego w literaturze jako specyficzny dla pochodnych salicylowych [10], obserwowano charakterystyczne żółte zabarwienie metoksylowych pochodnych kwasu cynamonowego. Specyficzne oddziaływanie odczynnika tymolowego na złożu diolowym z fenolokwasami posiadającymi grupy metoksyłowe: kwasy ferulowy, izoferulowy, 4-metoksycynamonowy, 3,4-dimetoksycynamonowy i synapinowy, można wykorzystać w rozpoznawaniu tego typu połączeń w matrycach roślinnych.

W oparciu o porównanie wartości hR_F oraz charakterystyczne zabarwienie plam związków pod wpływem odczynnika wywołującego, w badanych korach wierzb, w formie wolnej lub związanej glikozydowo, bądź estrowo, zidentyfikowano: kwas p-hydroksybenzoesowy (41 przedstawicieli gatunków i klonów), salicylowy (38), p-kumarowy (36), cynamonowy (33), wanilinowy (31), chlorogenowy (26), protokatechowy (26), ferulowy (22), kawowy (14), gentyzynowy (12), galusowy (10), α -rezorcyłowy (7), syringowy (3) i dihydrokawowy (3) (Tabl. 17-26).

Obok fenolokwasów, na chromatogramach większości hydrolizatów i niektórych ekstraktów eterowych wyciągów metanolowych, obserwowano pirokatechinę, jako związek dominujący (Ryc. 41-43, Tabl. 13). Ponadto w hydrolizatach kwaśnych ekstraktów metanolowych z kory *S. acutifolia* (7031), *S. daphnoides* klon 1095 (7004), *S. daphnoides* (7033), *S. eriocephala* (7034), *S. fragilis* (7035), *S. herbacea* (7030), *S. purpurea* (7036), (7037) i klonów 1067 (7006), 1081 (7007), 1084 (7008), 1132 (7010), 1136 (7011), 1153 (7012), 1157 (7014), *S. viminalis* (7029) i jej klonu 1083 (7018) oraz z kory wierzb z firm zielarskich: (7039), (7040), (7042) i (7043) stwierdzono występowanie naryngeniny (Ryc. 41,42, Tabl. 17-26).

Tabl. 17. Fenolokwasy i flawonoidy zidentyfikowane metodami TLC i HPTLC w zespołach ekstraktów eterowych z kory wierzby: *Salix acutifolia* (7031), *S. alba* (7032), *S. alba* klon 1100 (7001) i *S. x americana* klon 1036 (7002).

Lp.	Związek	<i>S. acutifolia</i> (7031)			<i>S. alba</i> (7032)			<i>S. alba</i> 1100 (7001)			<i>S. x americana</i> 1036 (7002)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1.	Kwas p-hydroksybenzoesowy			+	+				+	+			+
2.	Kwas chlorogenowy	+		+	+			+			+		
3.	Kwas cynamonowy								+		+		+
4.	Kwas ferulowy			+								+	
5.	Kwas galusowy	+		+									
6.	Kwas gentyzynowy												
7.	Kwas kawowy			+					+				
8.	Kwas dihydrokawowy												
9.	Kwas protokatechowy								+	+			+
10.	Kwas p-kumarowy			+		+			++			+	+
11.	Kwas α-rezorcylowy												
12.	Kwas salicylowy	+		+			+			+			+
13.	Kwas syringowy												
14.	Kwas wanilinowy			+						+	+		+
15.	Apigenina	+						+		+			
16.	Izosalipurpozyd	++	+										
17.	Ester izosalipurpozydu	+											
18.	Kemferol						++					+	+
19.	Kwercetyna	+		+	+	+	+					+	
20.	Luteolina												
21.	Mirycetyna							+		+			
22.	Naryngenina	+	+	+++								+	
23.	7-O-glukozyd apigeniny												
24.	3-O-glukozyd kemferolu											+	
25.	7-O-ramnozyd kemferolu												
26.	3-O-glukozyd kwercetyny							+					
27.	7-O-glukozyd luteoliny												
28.	5-O-glukozyd naryngeniny	++											
29.	7-O-glukozyd naryngeniny	++											
30.	Rutyna												

Objaśnienia:

I – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego

II – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego

III – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego

(+) – niska zawartość

(++) – średnia zawartość

(+++)

Stosowane układy chromatograficzne: **A** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielania aglikonów (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v); **B** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielania glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v); **C** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Patridge'a (butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v); **D** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: 15% kwas octowy; **E** – adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v); **F** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: woda/mrówczan sodu/kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v); **G** – adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, gradient MGD (Tabl.16); **H** – adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v);

Tabl. 18. Fenolokwasy i flawonoidy zidentyfikowane metodami TLC i HPTLC w zespołach ekstraktów eterowych z kory wierzby: *S. amygdalina x viminalis* 1155 (7003), *S. daphnoides* klon 1095 (7004), *S. daphnoides* (7033) i *S. eriocephala* (7034).

Lp.	Związek	<i>S. amygdalina x viminalis</i> 1155 (7003)			<i>S. daphnoides</i> 1095 (7004)			<i>S. daphnoides</i> (7033)			<i>S. eriocephala</i> (7034)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1.	Kwas p-hydroksybenzoesowy	+		+	+		+		+	+			+
2.	Kwas chlorogenowy		+	+	++	+		+	+		+		
3.	Kwas cynamonowy	+			+	+	+		+	+		+	+
4.	Kwas ferulowy		+		+		+						
5.	Kwas galusowy				+								
6.	Kwas gentyzynowy								+			+	
7.	Kwas kawowy				++	+	+			+	+		+
8.	Kwas dihydrokawowy												
9.	Kwas protokatechowy			+	+	+							
10.	Kwas p-kumarowy		+		+	+	+	+	+			+	+
11.	Kwas α-rezorcylowy				+								
12.	Kwas salicylowy			+	+		++	+		+	+		+
13.	Kwas syringowy				+								
14.	Kwas wanilinowy			+	+	+	+			+			
15.	Apigenina	+	+		+			+					
16.	Izosalipurpozyd				+++	+		+	+				
17.	Ester izosalipurpozydu				++			+					
18.	Kemferol												
19.	Kwercetyna	+	+		+		+						+
20.	Luteolina					+							
21.	Mirycetyna			+	+								
22.	Naryngenina				+	+	+++	+		+++	+		+
23.	7-O-glukozyd apigeniny												
24.	3-O-glukozyd kemferolu												
25.	7-O-ramnozyd kemferolu												
26.	3-O-glukozyd kwercetyny				+							+	
27.	7-O-glukozyd luteoliny				+								
28.	5-O-glukozyd naryngeniny				++			+++					
29.	7-O-glukozyd naryngeniny				+++			++					
30.	Rutyna	+											

Objaśnienia:

I – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego

II – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego

III – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego

(+) – niska zawartość

(++) – średnia zawartość

(+++) – wysoka zawartość

Stosowane układy chromatograficzne: **A** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielania aglikonów (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v); **B** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielania glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v); **C** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Patridge'a (butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v); **D** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: 15% kwas octowy; **E** – adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v); **F** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: woda/mrówczan sodu/kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v); **G** – adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, gradient MGD (Tabl.16); **H** – adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v);

Tabl. 19. Fenolokwasy i flawonoidy zidentyfikowane metodami TLC i HPTLC w zespołach ekstraktów eterowych z kory wierzby: *S. fragilis* (7035), *S. herbacea* (7030), *S. matsudana* 'Tortuosa' (7028) i *S. purpurea* (7036).

Lp.	Związek	<i>S. fragilis</i> (7035)			<i>S. herbacea</i> (7030)			<i>S. matsudana</i> 'Tortuosa' (7028)			<i>S. purpurea</i> (7036)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1.	Kwas p-hydroksybenzoesowy	+		+	+		+			+	+		+
2.	Kwas chlorogenowy	+			+			+		++		+	+
3.	Kwas cynamonowy		+	+					+	+		++	
4.	Kwas ferulowy												
5.	Kwas galusowy			+						+			
6.	Kwas gentyzynowy		+								+		
7.	Kwas kawowy			+			+						
8.	Kwas dihydrokawowy												
9.	Kwas protokatechowy		+						+		+		
10.	Kwas p-kumarowy		+			+	+			+	+	+	
11.	Kwas α -rezorcylowy			+									
12.	Kwas salicylowy	+		+			+	+		+			+
13.	Kwas syringowy												
14.	Kwas wanilinowy	+			+			+					+
15.	Apigenina	+		+	+		+	+	+	+	+		+
16.	Izosalipurpozyd										+		
17.	Ester izosalipurpozydu												
18.	Kemferol			+								+	+
19.	Kwercetyna			+			++			+			+
20.	Luteolina												
21.	Mirycecyta						+	+		+			
22.	Naryngenina	+		+	+		+				+		++
23.	7-O-glukozyd apigeniny												
24.	3-O-glukozyd kemferolu												
25.	7-O-ramnozyd kemferolu												
26.	3-O-glukozyd kwercetyny				+								
27.	7-O-glukozyd luteoliny												
28.	5-O-glukozyd naryngeniny										++		
29.	7-O-glukozyd naryngeniny										+		
30.	Rutyna												

Objaśnienia:

I – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego

II – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego

III – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego

(+) – niska zawartość

(++) – średnia zawartość

(+++) – wysoka zawartość

Stosowane układy chromatograficzne: **A** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielania aglikonów (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v); **B** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielania glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v); **C** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Patridge'a (butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v); **D** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: 15% kwas octowy; **E** – adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v); **F** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: woda/mrówczan sodu/kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v); **G** – adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, gradient MGD (Tabl.16); **H** – adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v);

Tabl. 20. Fenolokwasy i flawonoidy zidentyfikowane metodami TLC i HPTLC w zespołach ekstraktów eterowych z kory wierzby: *S. purpurea* (7037), i *S. purpurea* klon 1038 (7005), *S. purpurea* klon 1067 (7006) i *S. purpurea* klon 1081 (7007).

Lp.	Związek	<i>S. purpurea</i> (7037)			<i>S. purpurea</i> 1038 (7005)			<i>S. purpurea</i> 1067 (7006)			<i>S. purpurea</i> 1081 (7007)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1.	Kwas p-hydroksybenzoesowy	+		+			+	+		+	+		+
2.	Kwas chlorogenowy	+						+					
3.	Kwas cynamonowy			+			+	+	+			+	+
4.	Kwas ferulowy		+	+	+				+		+	+	
5.	Kwas galusowy												
6.	Kwas gentyzynowy		+				+						
7.	Kwas kawowy												
8.	Kwas dihydrokawowy												
9.	Kwas protokatechowy						+			+			+
10.	Kwas p-kumarowy	+				+	+		+	+		+	+
11.	Kwas α-rezorcylowy			+						+			
12.	Kwas salicylowy	+		+				+		+			+
13.	Kwas syringowy												
14.	Kwas wanilinowy						+			+			+
15.	Apigenina	+		+				+		+			
16.	Izosalipurpozyd	+				+		+				+	
17.	Ester izosalipurpozydu												
18.	Kemferol									+	+		
19.	Kwercetyna		+	+				+		+			
20.	Luteolina												
21.	Mirycetyna					++	+						
22.	Naryngenina	+	+	+++	+		+	+		+	+		+
23.	7-O-glukozyd apigeniny												
24.	3-O-glukozyd kemferolu											+	
25.	7-O-ramnozyd kemferolu												
26.	3-O-glukozyd kwercetyny												
27.	7-O-glukozyd luteoliny					+		+				+	
28.	5-O-glukozyd naryngeniny	++						+					
29.	7-O-glukozyd naryngeniny	+				+		+					
30.	Rutyna												

Objaśnienia:

I – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego

II – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego

III – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego

(+) – niska zawartość

(++) – średnia zawartość

(+++)

Stosowane układy chromatograficzne: **A** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielania aglikonów (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v); **B** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielania glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v); **C** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Patridge'a (butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v); **D** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: 15% kwas octowy; **E** – adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v); **F** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: woda/mrówczan sodu/kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v); **G** – adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, gradient MGD (Tabl.16); **H** – adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v);

Tabl. 21. Fenolokwasy i flawonoidy zidentyfikowane metodami TLC i HPTLC w zespołach ekstraktów eterowych z kory wierzby: *S. purpurea* klon 1084 (7008), *S. purpurea* klon 1101 (7009), *S. purpurea* klon 1132 (7010) i *S. purpurea* klon 1136 (7011).

Lp.	Związek	<i>S. purpurea</i> 1084 (7008)			<i>S. purpurea</i> 1101 (7009)			<i>S. purpurea</i> 1132 (7010)			<i>S. purpurea</i> 1136 (7011)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1.	Kwas p-hydroksybenzoesowy			+	+					+			+
2.	Kwas chlorogenowy		+										+
3.	Kwas cynamonowy	+	+	+		+			+	+			+
4.	Kwas ferulowy	+			+			+		+			+
5.	Kwas galusowy												
6.	Kwas gentyzynowy		+			+							
7.	Kwas kawowy				+					+	+		
8.	Kwas dihydrokawowy												
9.	Kwas protokatechowy				+	+						+	
10.	Kwas p-kumarowy		++			+			+	+		+	+
11.	Kwas α-rezorcylowy										+		
12.	Kwas salicylowy	+		+			+			+			+
13.	Kwas syringowy												
14.	Kwas wanilinowy			+			+	+	+			+	
15.	Apigenina									+	+		+
16.	Izosalipurpozyd	+			+			++			+		
17.	Ester izosalipurpozydu												
18.	Kemferol	+											+
19.	Kwercetyna	+	+		+	+	+			++			++
20.	Luteolina												
21.	Mirycetyna												
22.	Naryngenina	+		+	+		+	+		+++	+		+++
23.	7-O-glukozyd apigeniny												
24.	3-O-glukozyd kemferolu												
25.	7-O-ramnozyd kemferolu												
26.	3-O-glukozyd kwercetyny										+		
27.	7-O-glukozyd luteoliny	+			+								
28.	5-O-glukozyd naryngeniny	+						++			++		
29.	7-O-glukozyd naryngeniny	+			+						+		
30.	Rutyna												

Objaśnienia:

I – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego

II – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego

III – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego

(+) – niska zawartość

(++) – średnia zawartość

(+++) – wysoka zawartość

Stosowane układy chromatograficzne: **A** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielń aglikonów (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v); **B** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielń glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v); **C** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Patridge'a (butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v); **D** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: 15% kwas octowy; **E** – adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v); **F** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: woda/mrówczan sodu/kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v); **G** – adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, gradient MGD (Tabl.16); **H** – adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v);

Tabl. 22. Fenolokwasy i flawonoidy zidentyfikowane metodami TLC i HPTLC w zespołach ekstraktów eterowych z kory wierzby: *S. purpurea* klon 1153 (7012), *S. purpurea* klon 1156 (7013), *S. purpurea* klon 1157 (7014) i *S. purpurea* x *daphnoides* klon 1107 (7015).

Lp.	Związek	<i>S. purpurea</i> 1153 (7012)			<i>S. purpurea</i> 1156 (7013)			<i>S. purpurea</i> 1157 (7014)			<i>S. purpurea</i> x <i>daphnoides</i> 1107 (7015)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1.	Kwas p-hydroksybenzoesowy	+		+	+			+		+			+
2.	Kwas chlorogenowy												
3.	Kwas cynamonowy				+	+	+					+	+
4.	Kwas ferulowy											+	+
5.	Kwas galusowy												
6.	Kwas gentyzynowy								+				
7.	Kwas kawowy												
8.	Kwas dihydrokawowy		+										
9.	Kwas protokatechowy				+			+					+
10.	Kwas p-kumarowy					+		+	+		+	+	+
11.	Kwas α-rezorcylowy									+			
12.	Kwas salicylowy		+	+		+	+	+		+	+		+
13.	Kwas syringowy												
14.	Kwas wanilinowy				+			+					+
15.	Apigenina	+	+		+			+		+			
16.	Izosalipurpozyd							+			+		
17.	Ester izosalipurpozydu												
18.	Kemferol						++					+	
19.	Kwercetyna			+									
20.	Luteolina											+	
21.	Mirycecytna			+									
22.	Naryngenina							+	+	++	+		++
23.	7-O-glukozyd apigeniny												
24.	3-O-glukozyd kemferolu											+	
25.	7-O-ramnozyd kemferolu												
26.	3-O-glukozyd kwercetyny												
27.	7-O-glukozyd luteoliny											+	
28.	5-O-glukozyd naryngeniny							+			+		
29.	7-O-glukozyd naryngeniny											+	
30.	Rutyna												

Objaśnienia:

I – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego

II – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego

III – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego

(+) – niska zawartość

(++) – średnia zawartość

(+++)

Stosowane układy chromatograficzne: **A** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielania aglikonów (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v); **B** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielania glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v); **C** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Patridge'a (butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v); **D** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: 15% kwas octowy; **E** – adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v); **F** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: woda/mrówczan sodu/kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v); **G** – adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, gradient MGD (Tabl.16); **H** – adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v);

Tabl. 23. Fenolokwasy i flawonoidy zidentyfikowane metodami TLC i HPTLC w zespołach ekstraktów eterowych z kory wierzby: *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026), *S. x sepulcralis* (7027), *S. triandra* klon 1044 (7016) i *S. triandra* klon 1045 (7017).

Lp.	Związek	<i>S. sachalinensis</i> 'Sekka' (7026)			<i>S. x sepulcralis</i> (7027)			<i>S. triandra</i> 1044 (7016)			<i>S. triandra</i> 1045 (7017)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1.	Kwas p-hydroksybenzoesowy	+	++	++	+		+	+		+	+		+
2.	Kwas chlorogenowy	+			+								+
3.	Kwas cynamonowy	+	+++	+++		+	+	+	+			+	+
4.	Kwas ferulowy		+				+		+				
5.	Kwas galusowy	+									+		+
6.	Kwas gentyzynowy												
7.	Kwas kawowy						+		+				
8.	Kwas dihydrokawowy												
9.	Kwas protokatechowy	+									+	+	
10.	Kwas p-kumarowy		+	+		+	+	+	+			+	+
11.	Kwas α-rezorcylowy												
12.	Kwas salicylowy			+	+		+				+	+	+
13.	Kwas syringowy	+											
14.	Kwas wanilinowy			+	+		+				+		+
15.	Apigenina			+	+		+					+	
16.	Izosalipurpozyd												
17.	Ester izosalipurpozydu												
18.	Kemferol			+			++						
19.	Kwercetyna			++	+		++	+				+	+
20.	Luteolina												
21.	Mirycetyna	+		+	+			+	+			+	
22.	Naryngenina	+											
23.	7-O-glukozyd apigeniny	+										+	
24.	3-O-glukozyd kemferolu												
25.	7-O-ramnozyd kemferolu												
26.	3-O-glukozyd kwercetyny	+											
27.	7-O-glukozyd luteoliny	+							+				
28.	5-O-glukozyd naryngeniny												
29.	7-O-glukozyd naryngeniny												
30.	Rutyna	+											

Objaśnienia:

I – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego

II – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego

III – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego

(+) – niska zawartość

(++) – średnia zawartość

(+++)

Stosowane układy chromatograficzne: **A** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielni aglikonów (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v); **B** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielni glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v); **C** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Patridge'a (butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v); **D** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: 15% kwas octowy; **E** – adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v); **F** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: woda/mrówczan sodu/kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v); **G** – adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, gradient MGD (Tabl.16); **H** – adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v);

Tabl. 24. Fenolokwasy i flawonoidy zidentyfikowane metodami TLC i HPTLC w zespołach ekstraktów eterowych z kory wierzby: *S. triandra* (7038), *S. viminalis* (7029), *S. viminalis* klon 1083 (7018) i firmy „Herbapol” Gdańsk (7041).

Lp.	Związek	<i>S. triandra</i> (7038)			<i>S. viminalis</i> (7029)			<i>S. viminalis</i> 1083 (7018)			<i>S. purpurea</i> (7041)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1.	Kwas p-hydroksybenzoesowy	+		+	+		+			+	+		++
2.	Kwas chlorogenowy	+			++								
3.	Kwas cynamonowy		++		+		+		+	+			
4.	Kwas ferulowy					+		+	+	+			
5.	Kwas galusowy										+		
6.	Kwas gentyzynowy												
7.	Kwas kawowy												
8.	Kwas dihydrokawowy					+						+	
9.	Kwas protokatechowy	+			+					+			
10.	Kwas p-kumarowy					+	+		+	+	+	+	+
11.	Kwas α-rezorcylowy												
12.	Kwas salicylowy			+	+		+			+	+		+
13.	Kwas syringowy												
14.	Kwas wanilinowy	+			+		+			+	+		
15.	Apigenina				+								
16.	Izosalipurpozyd							+					
17.	Ester izosalipurpozydu												
18.	Kemferol						++						
19.	Kwercetyna	+		++			+	+					
20.	Luteolina					+					++		
21.	Mirycetyna				+		++						
22.	Naryngenina						+	+		+			
23.	7-O-glukozyd apigeniny												
24.	3-O-glukozyd kemferolu							+					
25.	7-O-ramnozyd kemferolu												
26.	3-O-glukozyd kwercetyny												
27.	7-O-glukozyd luteoliny							+					
28.	5-O-glukozyd naryngeniny							+					
29.	7-O-glukozyd naryngeniny												
30.	Rutyna				+								

Objaśnienia:

I – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego

II – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego

III – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego

(+) – niska zawartość

(++) – średnia zawartość

(+++)

Stosowane układy chromatograficzne: **A** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielni aglikonów (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v); **B** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielni glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v); **C** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Patridge'a (butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v); **D** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: 15% kwas octowy; **E** – adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v); **F** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: woda/mrówczan sodu/kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v); **G** – adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, gradient MGD (Tabl.16); **H** – adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v);

Tabl. 25. Fenolokwasy i flawonoidy zidentyfikowane metodami TLC i HPTLC w zespołach ekstraktów eterowych z kory wierzby: firmy: „Kawon” (7039), „Flos” (7040), „Herbapol” Wrocław (7042) i „Labofarm” (7043).

Lp.	Związek	Kora wierzby „Kawon” (7039)			Kora wierzby „Flos” (7040)			S. <i>purpurea</i> (7042)			S. <i>purpurea</i> (7043)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1.	Kwas p-hydroksybenzoesowy	+		++			++	+		+	+		+
2.	Kwas chlorogenowy		+	+	++			+			+		
3.	Kwas cynamonowy		+	+			+	+		+			+
4.	Kwas ferulowy			+			+	+			+	+	
5.	Kwas galusowy							+					
6.	Kwas gentyzynowy		+			+			+				
7.	Kwas kawowy							+			+		+
8.	Kwas dihydrokawowy												
9.	Kwas protokatechowy							+					
10.	Kwas p-kumarowy		++		+	+		+	+		+	+	
11.	Kwas α-rezorcylowy							+					
12.	Kwas salicylowy	+		+	+		+		+	+			+
13.	Kwas syringowy							+					
14.	Kwas wanilinowy	+						+		+			+
15.	Apigenina	+		+	+		+	+	+	+			
16.	Izosalipurpozyd	++			++			+			++	+	
17.	Ester izosalipurpozydu										++		
18.	Kemferol			+				+		+		+	
19.	Kwercetyna			+				++					
20.	Luteolina				+								
21.	Mirycetyna							+					
22.	Naryngenina	+	+	++	+		++	+		++	+		++
23.	7-O-glukozyd apigeniny							+					
24.	3-O-glukozyd kemferolu							+					
25.	7-O-ramnozyd kemferolu	+						+					
26.	3-O-glukozyd kwercetyny												
27.	7-O-glukozyd luteoliny							+					
28.	5-O-glukozyd naryngeniny	+			+			+++			++		
29.	7-O-glukozyd naryngeniny							+			++		
30.	Rutyna							+					

Objaśnienia:

I – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego

II – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego

III – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego

(+) – niska zawartość

(++) – średnia zawartość

(+++) – wysoka zawartość

Stosowane układy chromatograficzne: **A** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielń aglikonów (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v); **B** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielń glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v); **C** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Patridge'a (butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v); **D** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: 15% kwas octowy; **E** – adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v); **F** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: woda/mrówczan sodu/kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v); **G** – adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, gradient MGD (Tabl.16); **H** – adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v);

Tab. 26. Fenolokwasy i flawonoidy zidentyfikowane metodami TLC i HPTLC w zespołach ekstraktów metanolowych z kory wierzby: **A** – *S. erythroflexuosa* (7019), **B** – *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020), **C** – *S. lapponum* (7021), **D** – *S. melanostachys* (7022), **E** – *S. rosmarinifolia* (7023), **F** – *S. silesiaca* (7024), **G** – *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025).

Lp.	Związek	A	B	C	D	E	F	G
1.	Kwas p-hydroksybenzoesowy	+	+			+	+	+
2.	Kwas chlorogenowy							+
3.	Kwas cynamonowy					+	+	++
4.	Kwas ferulowy							
5.	Kwas galusowy				++			
6.	Kwas gentyzynowy							
7.	Kwas kawowy							
8.	Kwas dihydrokawowy							
9.	Kwas protokatechowy		+	+			+	+
10.	Kwas p-kumarowy	+	+					
11.	Kwas α -rezorcylowy							
12.	Kwas salicylowy		+				+	+
13.	Kwas syringowy							
14.	Kwas wanilinowy							
15.	Apigenina							
16.	Izosalipurpozyd							
17.	Ester izosalipurpozydu							
18.	Kemferol							
19.	Kwercetyna							
20.	Luteolina	++						
21.	Mirycecytna							
22.	Naryngenina	+			+			+
23.	7-O-glukozyd apigeniny							
24.	3-O-glukozyd kemferolu	++			++			
25.	7-O-ramnozyd kemferolu							
26.	3-O-glukozyd kwercetyny							
27.	7-O-glukozyd luteoliny							
28.	5-O-glukozyd naryngeniny							
29.	7-O-glukozyd naryngeniny							
30.	Rutyna							

Objaśnienia:

I – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego

II – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego

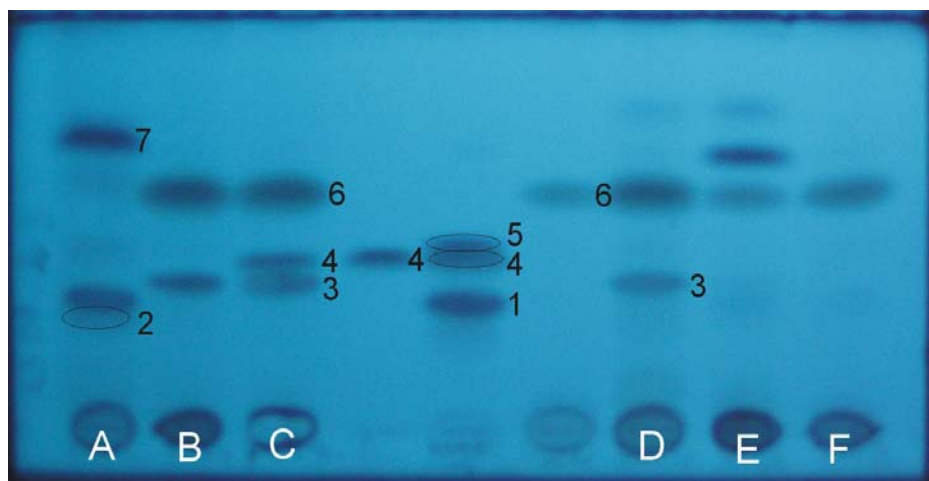
III – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego

(+) – niska zawartość

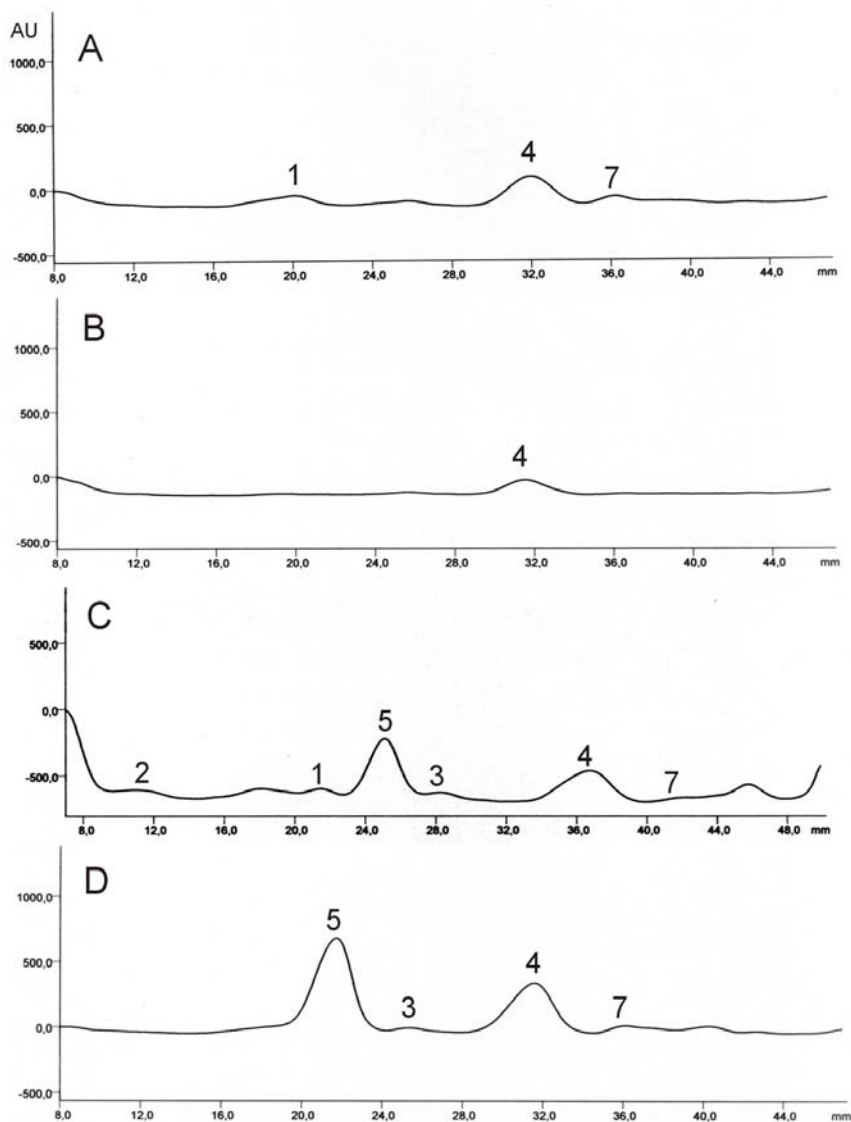
(++) – średnia zawartość

(+++)

Stosowane układy chromatograficzne: **A** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzieleń aglikonów (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v); **B** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzieleń glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v); **C** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Patridge'a (butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v); **D** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: 15% kwas octowy; **E** – adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v); **F** – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: woda/mrówczan sodu/kwas mrówkowy (200+10+1, v/v/v); **G** – adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, gradient MGD (Tabl.16); **H** – adsorbent: żel krzemionkowy RP-18, faza ruchoma: metanol/woda/kwas mrówkowy (40+60+6, v/v/v);

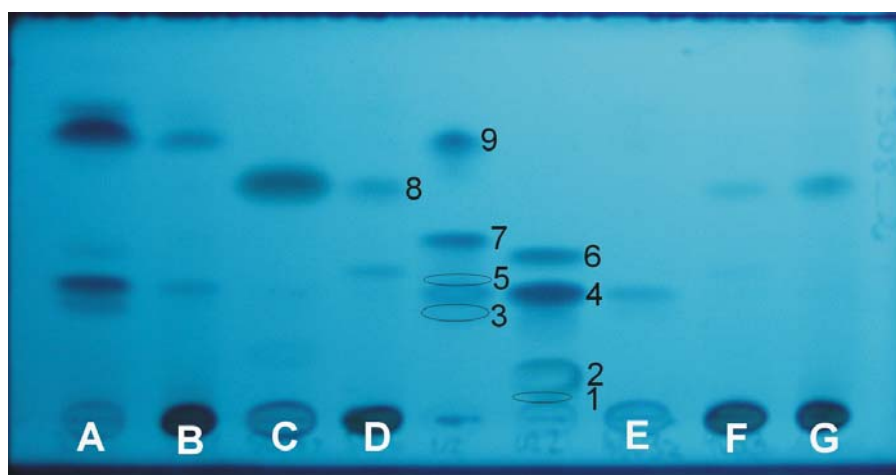


Ryc. 41. Chromatogram rozdzielenia związanych glikozydowo fenolokwasów z badanych gatunków rodzaju *Salix*: **A** – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego z kory *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026), **B** – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego z kory *S. purpurea* (7042), **C** – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego z kory *S. purpurea* klon 1136 (7011), **D** – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego z kory *S. daphnoides* (7033), **E** – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego z kory *S. herbacea* (7030), **F** – ekstrakt eterowy hydrolizatu kwasowego z kory *S. matsudana* 'Tortuosa' (7028): 1 – kwas p-hydroksybenzoesowy, 2 – kwas p-kumarowy, 3 – naryngenina, 4 – kwas ferulowy, 5 – kwas wanilinowy, 6 – pirokatechina, 7 – kwas cynamonowy. Adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC-Diol, elucja gradientowa – MGD (Tabl. 16).



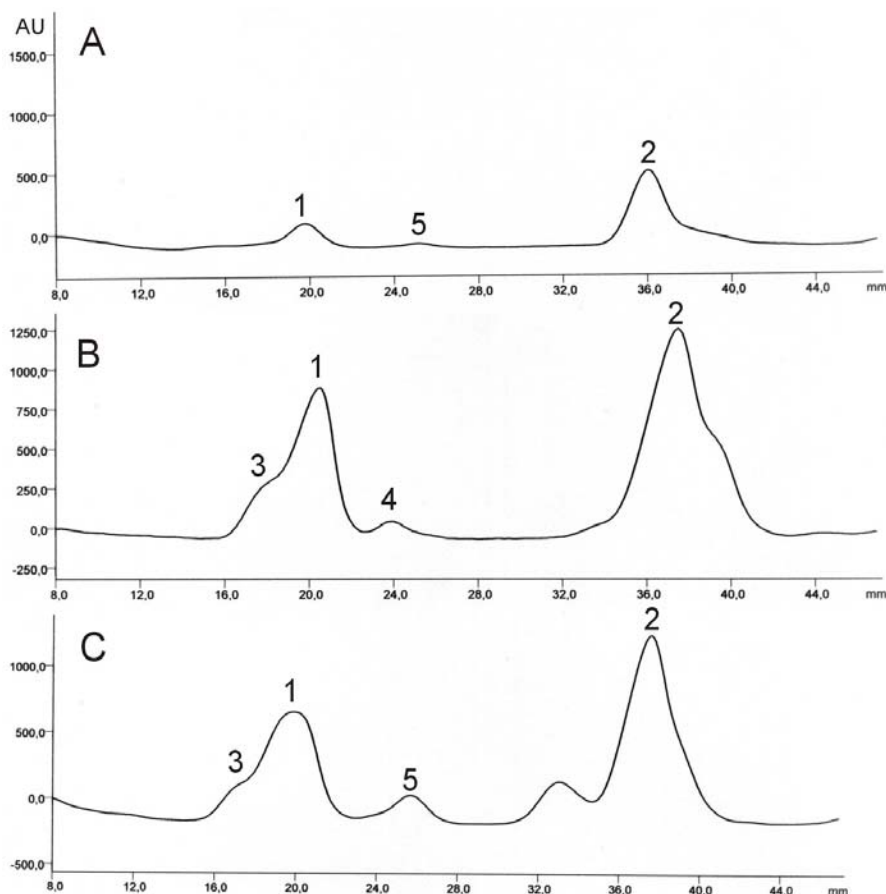
Ryc. 42. Densytogramy ekstraktów eterowych hydrolizatów kwasowych z kory wierzb: **A** – *S. matsudana* 'Tortuosa' (7028), **B** – *S. alba* (7032), **C** – *S. daphnoides* (7033), **D** – *S. purpurea* (7042): 1 – kwas p-hydroksybenzoesowy, 2 – kwas kawowy, 3 – kwas wanilinowy, 4 – pirokatechina, 5 – naryngenina, 6 – kwas p-kumarowy, 7 – kwas cynamonowy. Adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC-Diol, elucja gradientowa – MGD (Tabl. 16).

Dla badanych kor wierzb, obserwowano większe zróżnicowanie składu fenolokwasów w hydrolizatach kwaśnych w porównaniu do zasadowych (Ryc. 41-46, Tabl. 17-25). W hydrolizatach kwaśnych większości analizowanych klonów i gatunków, obok kwasu p-hydroksybenzoesowego stwierdzono obecność kwasu salicylowego (Tabl. 17-25). Wyjątek stanowiły *S. alba* (7032) oraz klony: 1038 (7005), 1101 (7009) i 1156 (7013) gatunku *S. purpurea*. Kwas p-hydroksybenzoesowy dominował w zespołach hydrolizatów kwaśnych ekstraktów metanolowych z surowców firm: „Kawon” (7039), „Flos” (7040) i „Herbapol” Gdańsk (7041). Często obserwowanym na chromatogramach HPTLC produktem rozpadu połączeń glikozydowych był kwas cynamonowy (22 gatunki i klony) (Tabl. 17-25), natomiast szczególnie wysokimi stężeniami tego związku, obok niższych koncentracji kwasów: p-hydroksybenzoesowego, p-kumarowego i ferulowego, charakteryzował się hydrolizat alkaliczny z gatunku *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026) (Ryc. 43,44, Tabl. 23). W świetle danych piśmiennictwa [157,158] jest to wynik rozpadu sachalizydów, stanowiących estrowe pochodne kwasu cynamonowego.



Ryc. 43. Chromatogram rozdzielania wolnych oraz związanych estrowo fenolokwasów z badanych gatunków rodzaju *Salix*: **A** - ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego z kory *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026), **B** – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego z kory *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026), **C** – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego z kory *S. purpurea* (7042), **D** – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego z kory *S. purpurea* (7042), **E** – ekstrakt eterowy hydrolizatu zasadowego z kory *S. daphnoides* klon 1095 (7004), **F** – ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego z kory *S. daphnoides* klon 1095 (7004), **G** - ekstrakt eterowy wyciągu metanolowego z kory *S. purpurea* klon 1136 (7011): **1** – kwas α - rezorcylowy, **2** – kwas kawowy, **3** - kwas p-kumarowy, **4** – kwas p-hydroksybenzoesowy, **5** – kwas syringowy, **6** – kwas ferulowy, **7** – kwas wanilinowy, **8** - pirokatechina, **9** – kwas cynamonowy. Adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC Diol, elucja gradientowa – MGD (Tabl. 16).

W grupie badanych kor wierzb odnotowano także znaczne rozpowszechnienie kwasów wanilinowego i protokatechowego, występujących w postaci wolnej (21 gatunków i klonów) lub jako związane glikozydowo (19) (Tabl. 17-26). Ponadto kwas wanilinowy zawierały hydrolizaty alkaliczne z kory *S. purpurea* klon 1132 (7010) i 1136 (7011) oraz *S. daphnoides* klon 1095 (7004). Obecność estrowo związanego kwasu protokatechowego odnotowano w korach gatunku *S. fragilis* (7035), kultywaru *S. matsudana* ‘Tortuosa’ (7028) i klonów: *S. alba* klon 1100 (7001), *S. daphnoides* klon 1095 (7004), *S. purpurea* klon 1101 (7009) oraz 1136 (7011) (Tabl. 17-26).



Ryc. 44. Densytogramy ekstraktów eterowych z kory *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026): **A** – wyciągu metanolowego (frakcja kwasów wolnych), **B** – hydrolizatu zasadowego (frakcja kwasów związanych estrowo), **C** – hydrolizatu kwasowego (frakcja kwasów związanych glikozydowo): **1** – kwas p-hydroksybenzoesowy, **2** – kwas cynamonowy, **3** – kwas p-kumarowy, **4** – kwas ferulowy, **5** – kwas wanilinowy. Adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC-Diol, elucja gradientowa – MGD (Tabl. 16).

Kwas p-kumarowy najczęściej obserwowano w hydrolizatach alkalicznych badanych gatunków i klonów (31 gatunków i klonów). Zwykle towarzyszyły mu kwasy cynamonowy, gentyzynowy, chlorogenowy lub ferulowy, m.in. w gatunkach i klonach: *S. daphnoides* (7033), *S. eriocephala* (7034), *S. fragilis* (7035), *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026), *S. triandra* klon 1044 (7016), *S. viminalis* klon 1083 (7018), *S. amygdalina* × *wiminalis* klon 1155 (7003), *S. purpurea* (7036), (7037), (7039) i klony 1067 (7006), 1081 (7007), 1084 (7008), 1101 (7009) oraz *S. purpurea* × *daphnoides* klon 1107 (7015) (Tabl. 17-25). Kwasu p-kumarowego nie zidentyfikowano w żadnej z form – wolnej lub związanej glikozydowo, w gatunkach i klonach: *S. purpurea* klon 1153 (7012), *S. triandra* (7038), *S. lapponum* (7021), *S. melanostachys* (7022), *S. rosmarinifolia* (7023), *S. silesiaca* (7024) i *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025) (Tabl. 22,24,26).

Jedynie w 3 korach stwierdzono obecność kwasu syringowego, mianowicie w *S. daphnoides* klon 1095 (7004), *S. purpurea* (7042) i *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026) (Tabl. 18,23,25).

Obecność wolnego kwasu galusowego wyróżniała kory *S. acutifolia* (7031), *S. melanostachys* (7022), *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026) i *S. daphnoides* klon 1095 (7004) oraz surowce z firm „Herbapol” Wrocław (7042) i „Herbapol” Gdańsk (7041). Ponadto kwas galusowy występował w hydrolizatach kwaśnych ekstraktów metanolowych z kory *S. fragilis* (7035), *S. matsudana* 'Tortuosa' (7028) oraz klonów gatunku *S. triandra* 1044 (7016) i 1045 (7018) (Tabl. 17-19,23-26).

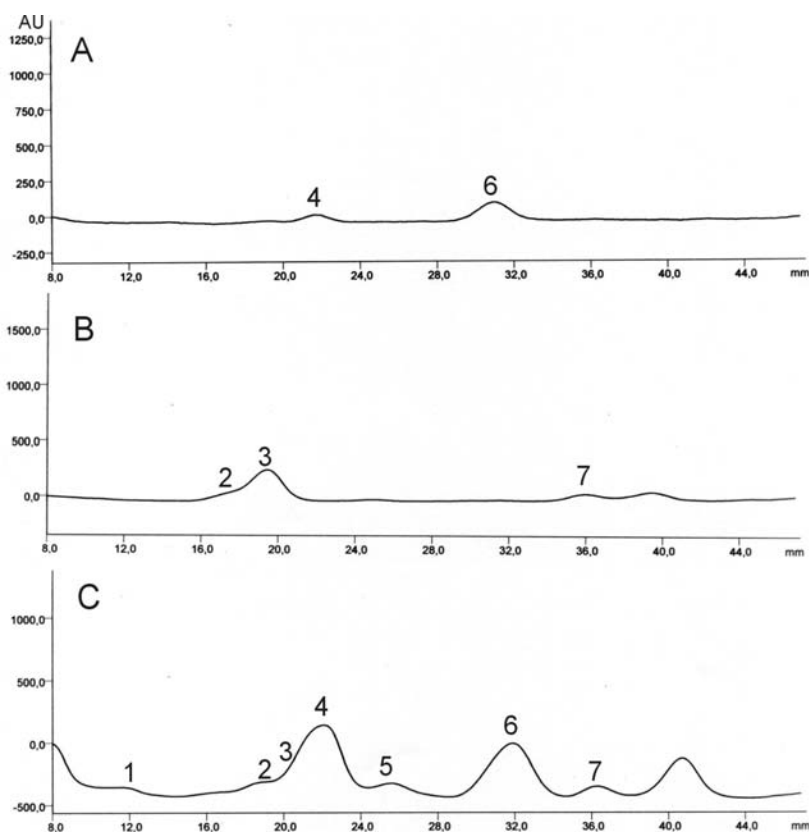
W hydrolizatach alkalicznych z *S. viminalis* (7029), *S. purpurea* klon 1153 (7012) i *S. purpurea* (7041) „Herbapolu” Gdańsk obserwowano występowanie kwasu dihydrokawowego (Tabl. 22,24). Związek ten jest bardzo rzadko spotykany w świecie roślinnym. Dotychczas kwas dihydrokawowy (kwas 3-(3,4-dihydroksyfenylo)propionowy) zidentyfikowano we frakcji związków fenolowych marynowanych, czarnych owoców oliwki (*Olea europaea*, *Oleaceae*) [177]. Ester kwasu dihydrokawowego – mykonozyd jest markerem chemotaksonomicznym rodzaju *Ramonda* i *Haberlea* (*Gesneriaceae*) [98].

Spśród 43 analizowanych gatunków i klonów jedynie w korze dwóch klonów wierzb, mianowicie *S. purpurea* 1136 klon (7011) i *S. daphnoides* klon 1095 (7004) oraz w korze firmy „Herbapol” Wrocław, ujawniono występowanie kwasu α -rezorcylowego (Tabl. 18,21,25). Natomiast w korach wierzb rosnących w środowisku naturalnym: *S. daphnoides* (7033), *S. fragilis* (7035), *S. purpurea* (7037) oraz pochodzących z kolekcji Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego klonach *S. purpurea* 1067 (7006) i 1157 (7014) stwierdzono obecność form glikozydowych tego fenolokwasu (Tabl. 18-20,22). Wcześniej występowanie kwasu α -rezorcylowego (kwas 3,5-dihydroksybenzoesowy) odnotowano w liściach *Asclepias syriaca* [212] i *Secamone afzelli* (*Asclepiadaceae*) [167], ziele *Platycodon grandiflorum* (*Campanulaceae*) [147] oraz w ogonkach liściowych *Rheum undulatum* i *R. rhaponticum* (*Polygonaceae*) [214].

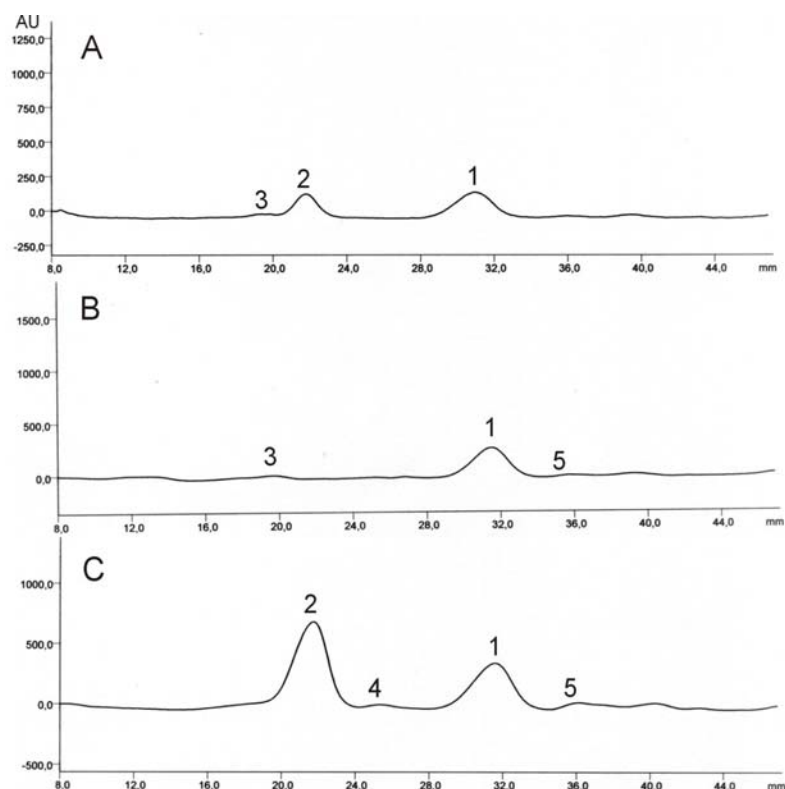
Analiza zespołów fenolokwasów gatunków dotychczas nie rozpoznanych w zakresie składu chemicznego, potwierdziła obecność w obrębie rodzaju *Salix* następujących fenolokwasów: kwasu p-hydroksybenzoesowego (*S. × erythroflexuosa* (7019), *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), *S. × sepulcralis* (7027), *S. silesiaca* (7024)), kwasu p-kumarowego (*S. × erythroflexuosa* (7019), *S. × sepulcralis* (7027)), kwasu chlorogenowego (*S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), *S. × sepulcralis* (7027)), kwasu protokatechowego (*S. × sepulcralis* (7027), *S. silesiaca* (7024), *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025)), kwasu cynamonowego i salicylowego (*S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), *S. silesiaca* (7024), *S. × sepulcralis* (7027)), kwasu ferulowego, kawowego i wanilinowego (*S. × sepulcralis* (7027)) oraz ujawniły występowanie kwasu galusowego w korze gatunku *S. melanostachys* (7022) (Tabl. 23,26).

Fenolokwasy są grupą związków rozpoznaną w niewielkim stopniu w obrębie przedstawicieli rodzaju *Salix*. W charakterystyce chemicznej wierzb wymienia się obecność kwasów: p-hydroksybenzoesowego, wanilinowego, p-kumarowego, syringowego, ferulowego i kawowego [3,89]. W drewnie gatunków *S. nigra*, *S. babylonica* i *S. eriocephala* występują kwasy: p-hydroksybenzoesowy, wanilinowy, syringowy i ferulowy [89,187], natomiast w drewnie *S. caprea* obok dominującego kwasu salicylowego, również kwas wanilinowy oraz kwasy 4-hydroksycynamonowy i ferulowy [187]. Kwas p-kumarowy zidentyfikowano w *S. alba* [47], chlorogenowy w *S. myrsinifolia*, protokatechowy i cynamonowy w liściach *S. capitata* [103,112,227]. W liściach *S. babylonica* występował kwas p-kumarowy i kawowy obok estru benzyłowego 2'-acetylo- β -glukozydu kwasu gentyzynowego [117,209]. Glikozydy innych fenolokwasów, mianowicie ferulowego i p-kumarowego wykryto w korze *S. gilgiana* [131].

Podsumowując wyniki przeprowadzonych metodą TLC analiz jakościowych (Ryc. 41, 42,45,46,48,49) można stwierdzić, że w korze wierzb bardziej rozpowszechnione są pochodne glikozydowe niż wolne i estrowo związane fenolokwasy (Ryc. 41-46, Tabl. 17-25). W świetle zebranych danych literaturowych [3,47,89,103,112,131,187,209,227] po raz pierwszy w korze wierzb wykazano obecność kwasów: dihydrokawowego, α -rezorcyłowego i galusowego (Tabl. 18-25).



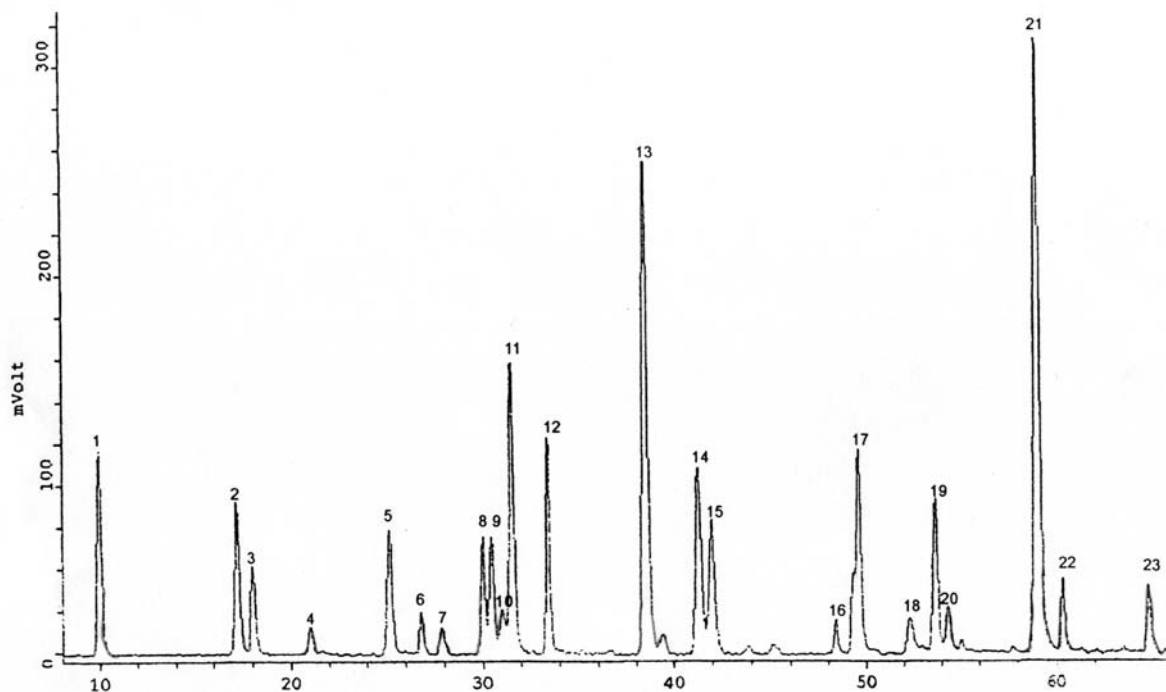
Ryc. 45. Denzytogramy ekstraktów eterowych z kory *S. daphnoides* klon 1095 (7004): **A** – wyciągu metanolowego (frakcja kwasów wolnych), **B** – hydrolizatu zasadowego (frakcja kwasów związanych estrowo), **C** – hydrolizatu kwasowego (frakcja kwasów związanych glikozydowo): **1** – kwas kawowy, **2** – p-kumarowy, **3** – p-hydroksybenzoesowy, **4** – naryngenina, **5** – kwas wanilinowy, **6** – pirokatechina, **7** – kwas cynamonowy. Adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC-Diol, elucja gradientowa – MGD (Tabl. 16).



Ryc. 46. Densytogramy ekstraktów eterowych z kory *S. purpurea* (7042): **A** – wyciągu metanolowego (frakcja kwasów wolnych), **B** – hydrolizatu zasadowego (frakcja kwasów związanych estrowo), **C** – hydrolizatu kwasowego (frakcja kwasów związanych glikozydowo): **1** – pirokatechina, **2** – naryngenina, **3** – kwas p-kumarowy, **4** – kwas wanilinowy, **5** – kwas cynamonowy. Adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC-Diol, elucja gradientowa – MGD (Tabl. 16).

Wyniki analiz TLC dla niektórych związków, obecnych w ekstraktach eterowych wyciągów metanolowych, potwierdzono metodą HPLC w systemie jednowymiarowym. Rozdzielanie prowadzono na kolumnie Lichrospher 100 RP-18e (250 mm × 4 mm, 5 μm) stosując liniowo-skokową elucję gradientową w mieszaninie metanol / woda+kwas ortofosforowy (99+1, v/v) o zmiennym stężeniu metanolu i zmiennej prędkości przepływu fazy ruchomej (Tabl. 1). Warunki rozdzielania zoptymalizowano dla mieszaniny dwudziestu trzech substancji wzorcowych – kwasy: galusowy, protokatechowy, α-rezorcyłowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzynowy, β-rezorcyłowy, chlorogenowy, wanilinowy, m-hydroksybenzoesowy, kawowy, syringowy, p-kumarowy, ferulowy, synapinowy, salicyłowy i cynamonowy oraz salicyna, katechina, 7-O-glukozyd luteoliny, 7-O-glukozyd apigeniny, izosalipurpozyd, kwercetyna i kemferol (Ryc. 47).

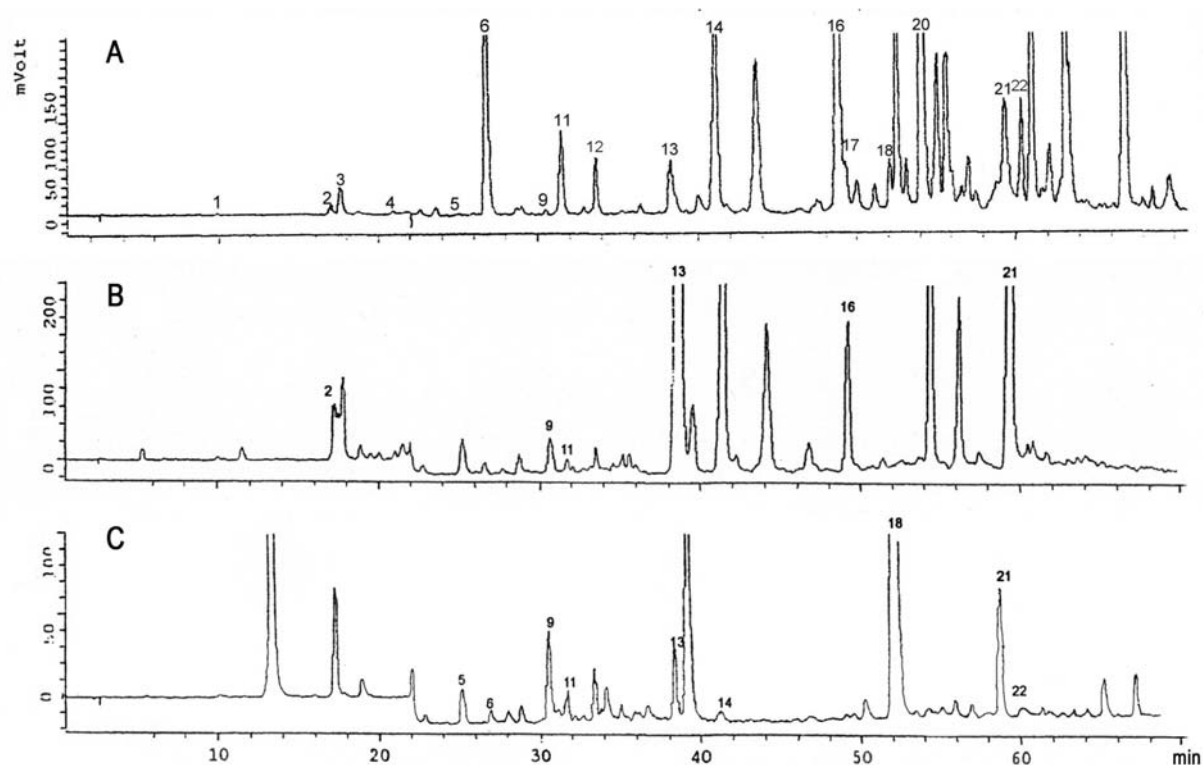
W tych warunkach nie uzyskano rozdzielania kwasów gentyzynowego i β-rezorcyłowego (Ryc. 47). Porównując intensywność pików niektórych związków na chromatogramach HPLC z intensywnością ich plam na chromatogramach cienkowarstwowych (Ryc. 48,49) stwierdzono, że sygnały HPLC nie stanowią pojedynczych związków, ale są mieszaninami kilku substancji. Rozpoznanie fenolokwasów metodą HPLC w systemie jednowymiarowym było trudne i wymagało optymalizowania warunków rozdzielania praktycznie dla każdej badanej matrycy roślinnej lub opracowania warunków selektywnej ekstrakcji fenolokwasów.



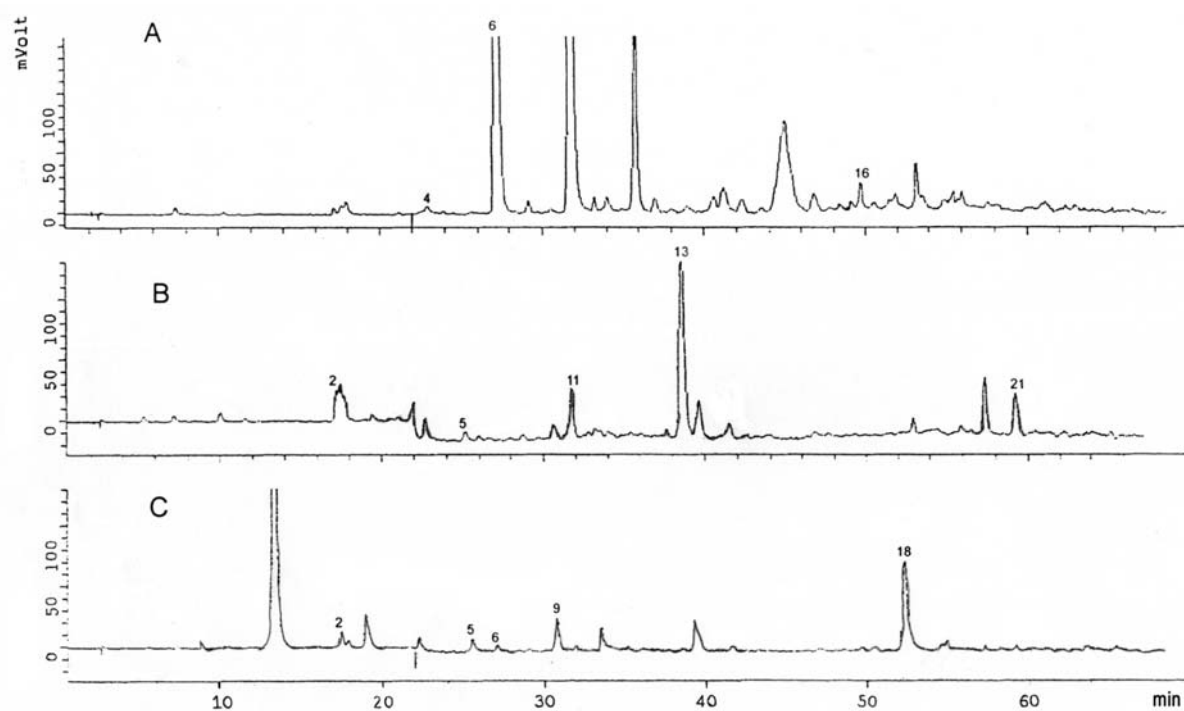
Ryc. 47. Chromatogram HPLC mieszaniny substancji wzorcowych: 1 – kwas galusowy, 2 – kwas protokatechowy, 3 – kwas α -rezorcylowy, 4 – salicyna, 5 – kwas p-hydroksybenzoesowy, 6 – katechina, 7 – kwas gentyzynowy i kwas β -rezorcylowy, 8 - kwas izochlorogenowy, 9 – kwas wanilinowy, 10 – kwas m-hydroksybenzoesowy, 11 – kwas kawowy 12 – kwas syringowy, 13 – kwas p-kumarowy, 14 – kwas ferulowy, 15 – kwas synapinowy, 16 – kwas chlorogenowy, 17 – 7-O-glukozyd luteoliny, 18 - kwas salicylowy, 19 – 7-O-glukozyd apigeniny, 20 – izosalipurpozyd, 21 – kwas cynamonowy, 22 – kwercetyna, 23 – kemferol. Kolumna Lichrospher 100 RP-18e (250 mm \times 4 mm, 5 μ m), elucja gradientowa według programu G₁₀, detekcja UV przy 265 nm (0-22 min) i przy λ =280 nm (22,1-90 min).

Ekstrakcję eterem etylowym stosuje się z wyboru w analizie wolnych fenolokwasów w surowcach roślinnych. Zgórka i wsp. [253] do oczyszczania wyciągów metanolowych z owoców oleśnika długosłupkowego (*Libanotis dolichostyla*), dla celów analizy dziewięciu fenolokwasów (kwasy: galusowy, protokatechowy, chlorogenowy, p-hydroksybenzoesowy, wanilinowy, kawowy, syringowy, p-kumarowy i ferulowy) wykorzystali ekstrakcję do fazy stałej (SPE), jako etap przygotowania próbek do analizy fitochemicznej.

Na podstawie wyników analiz TLC z użyciem densytometrii oraz uwzględniając wyniki rozdzieleń metodą HPLC stwierdzono, że badane kory wierzb charakteryzują się niską zawartością wolnych fenolokwasów. Jakkolwiek, do dalszych badań wyodrębniono kory trzech taksonów: *S. purpurea* (7042), *S. daphnoides* klon 1095 (7004) i *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026) wyróżniające się zróżnicowanym składem jakościowym zespołów tych związków (Ryc. 44-46, 48, Tabl. 18,23,25). Przeznaczono je do szczegółowej analizy metodą dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej – 2D HPLC.



Ryc. 48. Chromatogram HPLC ekstraktów eterowych z kory *S. daphnoides* klon 1095 (7004): **A** – wyciągu metanolowego, **B** - hydrolizatu zasadowego, **C** – hydrolizatu kwasowego, **1** – kwas galusowy, **2** – kwas protokatechowy, **3** – kwas α -rezorcylowy, **4** – salicyna, **5** – kwas p-hydroksybenzoesowy, **6** – katechina, **9** – kwas wanilinowy, **11** – kwas kawowy, **13** - kwas p-kumarowy, **14** – kwas ferulowy, **16** – kwas chlorogenowy, **17** – 7-O-glukozyd luteoliny, **18** – kwas salicylowy, **20** - izosalipurpozyd, **21** – kwas cynamonowy, **22** – kwercetyna. Kolumna Lichrospher 100 RP-18e (250 mm \times 4 mm, 5 μ m), elucja gradientowa według programu G₁₀, detekcja UV przy 265 nm lub λ =280 nm



Ryc. 49. Chromatogram HPLC ekstraktów eterowych z kory *S. alba* klon 1100 (7001): **A** – wyciągu metanolowego, **B** - hydrolizatu zasadowego, **C** – hydrolizatu kwasowego, **2** – kwas protokatechowy, **4** – salicyna, **5** – kwas p-hydroksybenzoesowy, **6** – katechina, **11** – kwas kawowy, **13** – kwas p-kumarowy, **16** – kwas chlorogenowy, **18** – kwas salicylowy, **21** – kwas cynamonowy. Kolumna Lichrospher 100 RP-18e (250 mm \times 4 mm, 5 μ m), elucja gradientowa według programu G₁₀, detekcja UV przy 265 nm (0-22 min) i przy λ =280 nm (22,1-90 min).

Liczni autorzy [15,36,97,129] wskazują na aktywność przeciwzapalną fenolokwasów. Znany fenolokwasem o działaniu przeciwzapalnym i przeciwgorączkowym jest kwas salicylowy – pochodna kwasu benzoowego [36], natomiast spośród pochodnych kwasu cynamonowego aktywność przeciwzapalną i przeciwbólową ujawniono dla kwasu kawowego w dawce 10 mg/kg m.c. [15,97]. Kwas kawowo-jabłkowy wyodrębniony z pokrzywy (*Urtica dioica*) hamował cyklooksygenazę z wartością $IC_{50} = 38 \mu\text{g/ml}$ [97,186]. Efekt przeciwzapalny niektórych fenolokwasów wynika z ich właściwości antyoksydacyjnych [129]. Ustalono, że wychwytywanie wolnych rodników $O_2\cdot$ przez kwasy galusowy i protokatechowy hamuje proces fagocytozy i aktywność cyklooksygenazy [129]. Działanie przeciwutleniające wykazano również dla kwasów: kawowego, ferulowego, chlorogenowego i cykoriowego [53,63,72,206].

W świetle wyników przeprowadzonych badań chromatograficznych zespołów fenolokwasów w korach wierzb, można przypuszczać, że związki te jedynie w niewielkim stopniu wpływają na efekt terapeutyczny surowca.

3. Omówienie wyników badań związków flawonoidowych w korze gatunków i klonów z rodzaju *Salix*.

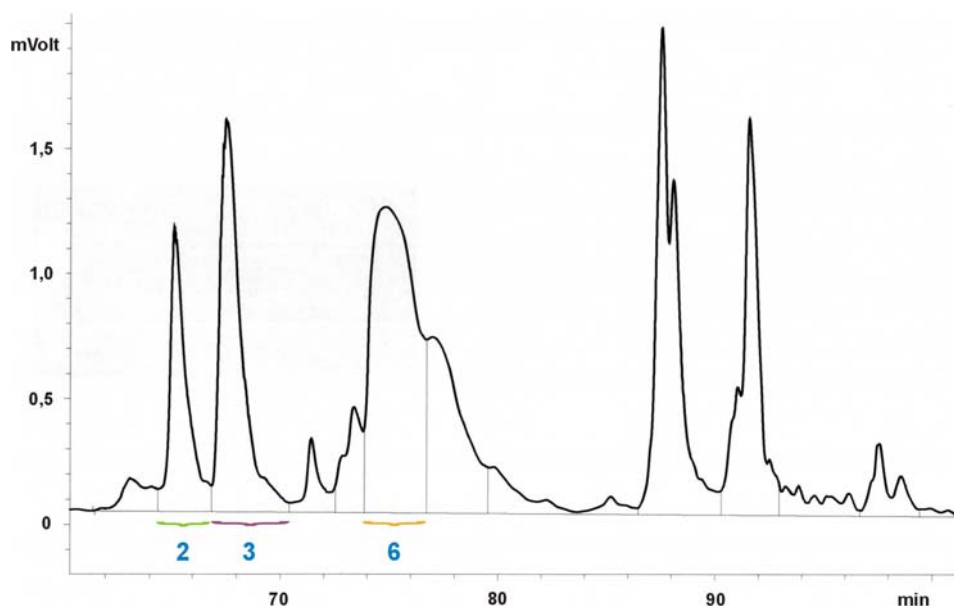
Gatunki wierzb wykazują duże zróżnicowanie w zakresie charakteru chemicznego występujących w nich związków flawonoidowych. Kory taksonów *S. acutifolia*, *S. daphnoides* i *S. purpurea* zawierają pochodne flawanonu – salipurpozyd (5-O-glukozyd naryngeniny) i pruninę (7-O-glukozyd naryngeniny) obok chalkonu – izosalipurpozydu [109,149,251]. Obecność pochodnych flawonu ujawniono w gatunkach *S. bakko*, *S. gilgiana*, *S. matsudana*, *S. myrsinifolia* i *S. oritrepha* [67,136,210,227,254]. Związki flawonolowe występują w *S. chaenomeloides*, *S. pet-susu*, *S. sachalinensis* i *S. viminalis* [67,144,158,160,170]. Natomiast pochodne flawonolu obok pochodnych flawonu obecne są w *S. alba*, *S. babylonica*, *S. caprea*, *S. lindleyana* i *S. triandra* [1,47,62,67,95,117,130,140,160,164,187, 228].

Spośród diglikozydów flawonoidowych odnotowano obecność rutyny oraz 3-O-diglikozydu ramnetyny odpowiednio w liściach *S. chaenomeloides*, *S. triandra*, *S. acutifolia* i *S. caprea* [47,130,160,164,195] oraz w liściach *S. triandra* [130]. Ponadto w obrębie rodzaju *Salix*, w gatunkach *S. alba* i *S. fragilis* stwierdzono występowanie dimerów flawonoidowych – amentoflawonu i kupressuflawonu [67].

3.1. Omówienie wyników izolacji i identyfikacji związków flawonoidowych w korze *Salix purpurea* (7043) firmy Labofarm.

Wstępna analiza chromatograficzna metodą chromatografii cienkowarstwowej (1D i 2D-TLC) ekstraktu metanolowego z kory *S. purpurea* (7043) wykazała obecność, jako dominujących, czterech związków flawonoidowych (związki **1** – **4**) (2% AlCl₃, pary NH₃, UV λ = 366 nm). Związek **1** otrzymano w formie krystalicznej z połączonych eluatów 107-125, z preparatywnej kolumny chromatograficznej wypełnionej poliamidem. Związki **2**, **3** i **4** rozdzielano z połączonych eluatów 36-42 z kolumny poliamidowej, metodą semi-preparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie Lichrosorb RP-18 (250 mm × 110 mm, 7 μm) (związki **2** i **3**) (Ryc. 50) oraz re-chromatografii na kolumnie grawitacyjnej wypełnionej żelalem krzemionkowym (związek **4**).

W rozdzieleniach metodą semi-preparatywnej HPLC zastosowano dozowanie próbki z warstwy żelu krzemionkowego, stanowiącego wypełnienie prekolumny połączonej z kolumną semi-preparatywną i użytej jako kolumna dozująca. Umożliwiło to prowadzenie pojedynczych rozdzieleń dla większych objętości próby, niż w przypadku zastosowania pętli dozującej.



Ryc. 50. Preparatywny chromatogram HPLC ekstraktu metanolowego z kory *S. purpurea* (7043). Prekolumna (125 mm × 4 mm) wypełniona żelom krzemionkowym LiChrorep™ RP-18 (40-63 μm) i kolumna Lichrosorb RP-18 (250 mm × 110 mm, 7 μm), elucja gradientowa G₁₂: (A – acetonitryl, B – woda) od 2 % do 60% A w A+B (t_G = 150 min), detekcja UV przy λ=280 nm.

W eluacie 6 (t_R = 74 – 76,7 min) z semi-preparatywnej HPLC (Ryc. 50) obserwowano obecność w wysokich stężeniach związku **4**, który w dalszym etapie pracy oczyszczano metodą preparatywnej chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. W rezultacie związek **4** otrzymano w postaci żółtego, krystalicznego osadu.

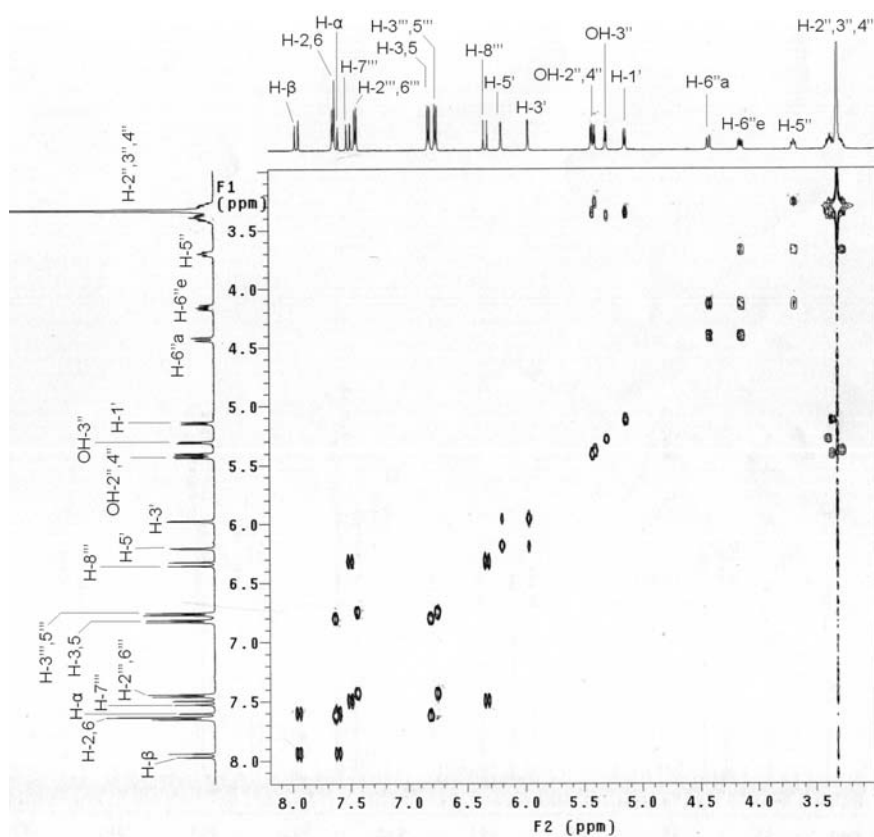
Związki **1** i **4** na chromatogramach TLC pod wpływem par amoniaku zmieniały fluorescencję z czerwono-brunatnej na intensywnie pomarańczową. W widmach UV obu związków wykonanych w metanolu, obserwowano I maksimum absorpcji przy λ = 368 nm. Ponadto w widmie UV związku **1** występowało intensywne pasmo przy długości fali λ = 318 nm. Obecność pasma absorpcji w widmie UV flawonoidów w zakresie 310-320 nm, zgodnie z danymi piśmiennictwa [142], wskazuje na estryfikację związku **1** pochodnymi kwasu cynamonowego.

W produktach hydrolizy kwasowej związków **1** i **4** stwierdzono wobec wzorców obecność naryngeniny i glukozy. W warunkach hydrolizy zasadowej związek ulegał rozpadowi do związku **4** i kwasu p-kumarowego, zidentyfikowanych chromatograficznie wobec wzorców.

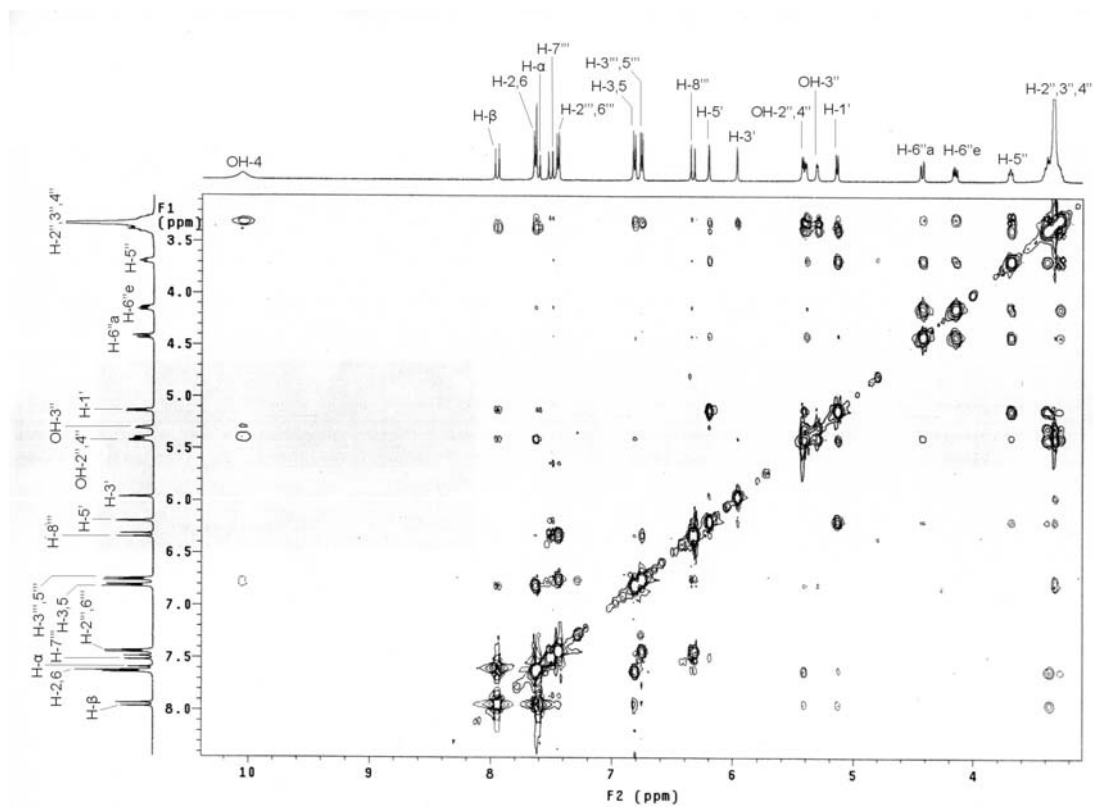
W widmie masowym FAB-MS (*Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry*) związku **1** obserwowano jon molekularny o wartości 582 m/z [M+2H]⁺ wskazujący na wzór sumaryczny związku C₃₀H₂₈O₁₂. Obok niego w widmie FAB-MS odnotowano obecność jonu fragmentacyjnego o wartości 273 m/z identycznego z jonem fragmentacyjnym w widmie FAB-MS związku **4**. Jednocześnie w widmie związku **1** występuje jon fragmentacyjny o wartości 309 m/z, odpowiadający m.c.z. kumaroilglukozy. Produkty hydrolizy kwaśnej

i alkalicznej oraz wyniki spektrometrii masowej FAB-MS wskazują na charakter estrowy związku **1**.

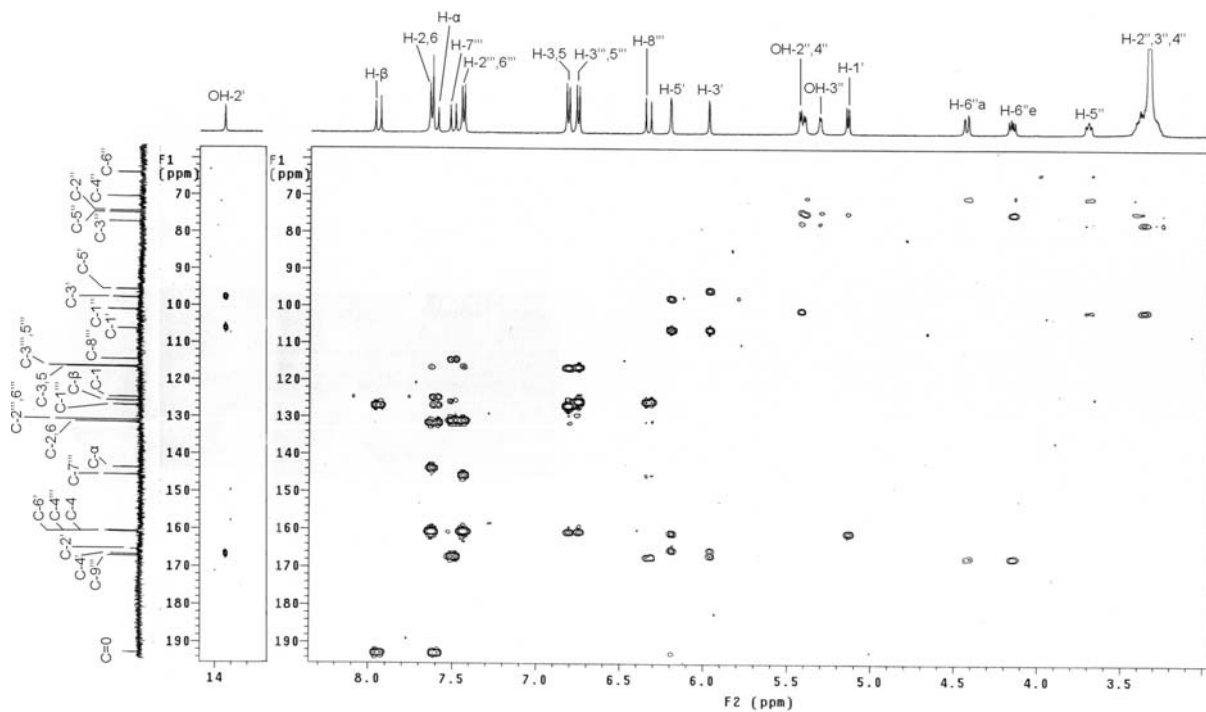
Obecność kwasu p-kumarowego w związku **1** potwierdzają widma ^1H i ^{13}C NMR, w których wartości δ protonów i węgli są zgodne z danymi literaturowymi dla estrów flawonoidowych, zawierających w swojej cząsteczce kwas p-kumarowy, wiązany przez cukier glukozę w pozycji C-6'' [128]. Konfigurację protonów H-7'''/H-8''' w jednostce kwasu p-kumarowego oznaczono w oparciu o wartość stałej sprzężenia $J = 16,2$ Hz, charakterystyczną dla izomerów *trans* pochodnych kwasu cynamonowego [128]. Wartości przesunięć chemicznych protonów oraz węgli jednostki glukozy są zgodne z danymi piśmiennictwa dla 6''-O-glikozydoestrów flawonoidowych (przesunięcie sygnału węgla C-6'' w kierunku niższego pola o $\Delta\delta = 2,7$ ppm oraz sygnału C-5'' w kierunku wyższego pola $\Delta\delta = 2,7$ ppm) [128]. Dodatkowo wartości δ potwierdzono w oparciu o widma hetero- i homokorelacyjne związku **1**: ^1H - ^1H COSY (*Homonuclear Proton Correlation Spectroscopy*), ROESY (*Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy*), HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) i HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) (Ryc. 51-54).



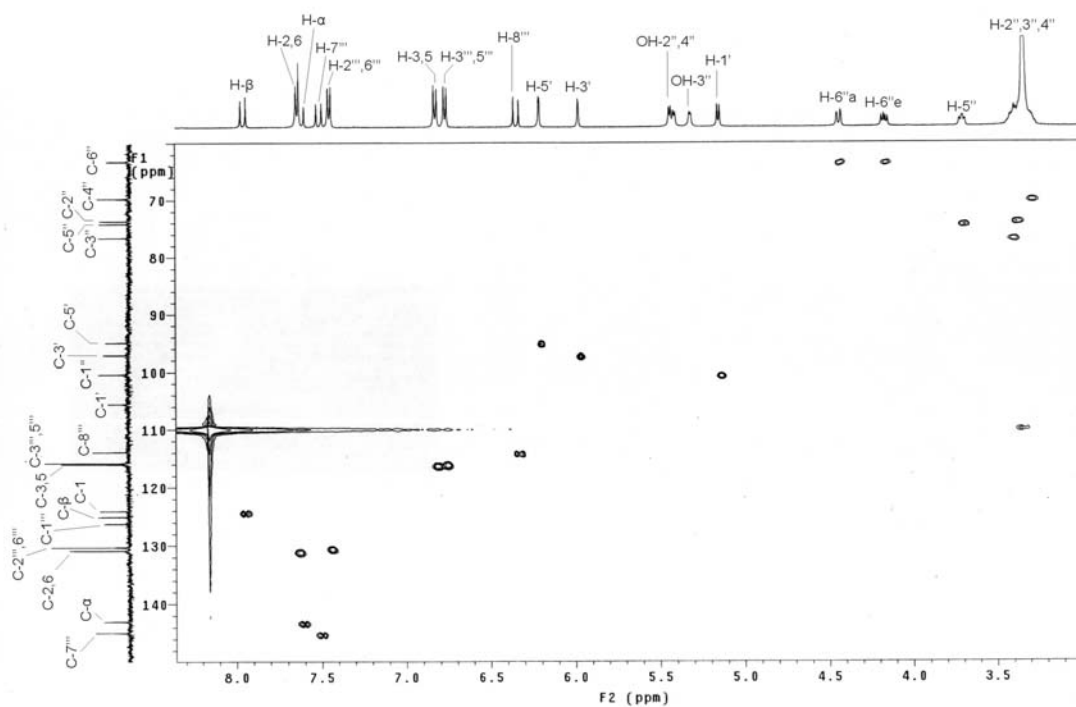
Ryc. 51. Widmo ^1H - ^1H COSY związku **1**.



Ryc. 52. Widmo ROESY związku 1.



Ryc. 53. Widmo HMBC związku 1.



Ryc. 54. Widmo HSQC związku 1.

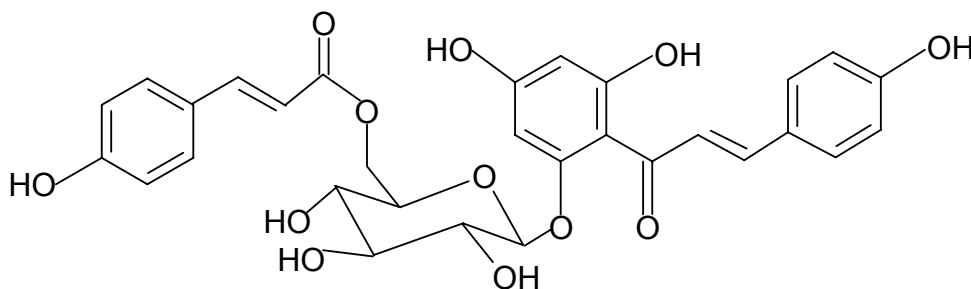
Obserwowane w widmie HMBC (Ryc. 53) sygnały korelacyjne między H-6''a/C-9'' przy δ_H 4,42/ δ_C 166,5 i H-6''e/C-9'' przy δ_H 4,15/ δ_C 166,5, potwierdzają obecność wiązania estrowego przy C-6'' glukozy. Natomiast obecność sygnału korelacyjnego między C-6'/H-1' przy δ_C 160,1/ δ_H 5,12 świadczy o obecności wiązania O-glikozydowego w pozycji C-6' chalkonu zidentyfikowanego na podstawie wartości przesunięć chemicznych dwóch dubletów o wartości stałej sprzężenia $J = 15,6$ Hz – H- α przy δ 7,60 oraz H- β przy δ 7,95 [128,142]. W oparciu o widmo korelacyjne HSQC (Ryc. 54) i sygnały korelacyjne (δ H- α / δ C- α i δ H- β / δ C- β) węglom w pozycjach C- α i C- β przypisano wartości δ 142,9 i 125,0, odpowiednio. W widmie ^{13}C NMR związków **1** i **4** obserwowano obecność sygnału węgla przy 192 ppm, który odpowiada węglowi grupy karbonylowej w zakresie charakterystycznym dla chalkonów. W widmach flawonoli i flawanonów wartości przesunięć węgla grupy karbonylowej C=O występują w wyższym polu przy ~ 170 ppm [139,142].

Na obecność trzech wolnych grup hydroksylowych wskazują, obok widma FAB-MS (jon fragmentacyjny przy 273 m/z), widma ^1H NMR związków **1** i **4**. Sygnały protonów grup OH przypisano odpowiednio wartościom δ : 10,1 (OH-4), 10,6 (OH-4'), 13,9 (OH-2') w związku **1** i 10,14 (OH-4), 10,59 (OH-4'), 13,88 (OH-2') w związku **4**. Spośród nich sygnał OH przy C-4 jest skorelowany z sygnałem protonów H-3,5 przy δ 6,82 (2H, d, $J = 8,8$ Hz) w widmie ROESY związku **1** (Ryc. 52). Natomiast sygnał grupy OH w pozycji C-2'

przy δ 13,9 daje sygnały korelacyjne w widmie HMBC (Ryc. 53), odpowiednio z węglem C-1' i C-3' (OH-2'/C-1' i OH-2'/C-3' przy δ_H 13,9/ δ_C 105,5 i δ_H 13,9/ δ_C 97,0).

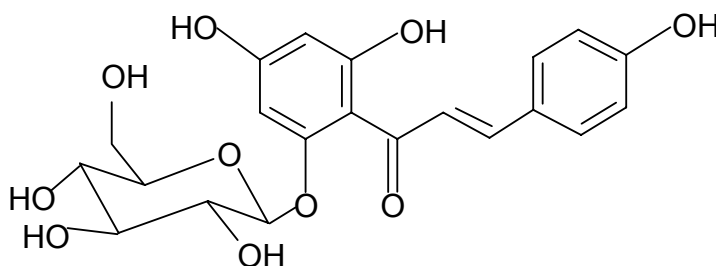
Dla sygnału grupy OH w pozycji C-4' nie obserwowano sygnałów korelacyjnych w widmach dwuwymiarowych i wartość δ 166,0 dla tej grupy w widmie ^{13}C NMR, przypisano w oparciu o dane literaturowe dla chalkonów [142,251].

Na podstawie powyższych wyników badań związek **1** zidentyfikowano jako 6'-O-(6''-O-(*E*)-p-kumaroilo)- β -D-glukopiranozyd-2',4',4,-trihydroksychalkonu.



Ryc. 55. Wzór strukturalny związku 1 – 6'-O-(6''-O-(*E*)-p-kumaroilo)- β -D-glukopiranozyd-2',4',4,-trihydroksychalkonu.

W widmie FAB-MS związku **4** jon molekularny o wartości 435 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ odpowiada m.cz. $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ glukozydu chalkonaryngeniny – izosalipurpozydu. Sygnały protonów w zakresie od 3,5 ppm do 5,41 ppm i węgli od 63,2 ppm do 100,3 ppm, w widmach ^1H i ^{13}C NMR odpowiednio, są charakterystyczne dla fragmentu cukrowego stanowiącego jednostkę glukozy [142]. Na podstawie przeprowadzonych badań identyfikacyjnych związku **4**, jego strukturę określono, jako 6'-O- β -D-glukopiranozyd-2',4',4-trihydroksychalkonu.

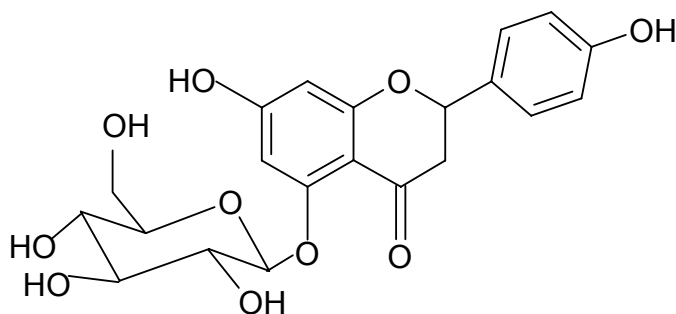


Ryc. 56. Wzór strukturalny związku 4 – 6'-O- β -D-glukopiranozydu-2',4',4-trihydroksychalkonu.

Związki **2** i **3** na chromatogramach TLC wybarwiały się pod wpływem 2% AlCl_3 na jasnożółto. W produktach hydrolizy kwasowej związków **2** i **3** stwierdzono chromatograficznie wobec wzorca obecność naryngeniny i glukozy. W widmie FAB-MS związków **2** i **3** występował jon molekularny o wartości 435 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$, odpowiadający

m.cz. glukozydu naryngeniny (C₂₁H₂₂O₁₀). Strukturę związku **2** potwierdzono analizą widm ¹H i ¹³C NMR, przez porównanie wartości δ protonów i węgli z danymi literaturowymi i na tej podstawie zidentyfikowano jako 5-O-β-D-glukopiranozyd-5,7,4'-trihydroksyflawanonu [142].

Uwzględniając opisane w literaturze wartości t_R dla (+) i (-)-5-O-glukozydów naryngeniny [149] związek **2** określono jako izomer (+)-5-O-β-D-glukopiranozyd-5,7,4'-trihydroksyflawanonu a związek **3** jako izomer (-)-5-O-β-D-glukopiranozyd-5,7,4'-trihydroksyflawanonu.



Ryc. 57. Wzór strukturalny związków **2** i **3** – 5-O-β-D-glukopiranozydu-5,7,4'-trihydroksyflawanonu.

3.2. Omówienie wyników badań chromatograficznych związków flawonoidowych w korze gatunków i klonów z rodzaju *Salix*.

3.2.1. Omówienie wyników badań jakościowych zespołów flawonoidowych.

We wstępnych badaniach flawonoidów metodą jedno- i dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej wykorzystano klasyczne dla tej grupy związków układy chromatograficzne. Stosowano złożę celulozowe jako fazę stacjonarną oraz fazy ruchome: układy Forestala do rozdzieleń aglikonów i glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v i kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v, odpowiednio), układ Patridge'a (n-butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v), 15 % i 30 % kwas octowy (Tabl. 27) [128,139]. Dimery flawonoidowe rozdzielano na adsorbencie poliamidowym, stosując jako eluent mieszaninę rozpuszczalników chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v) (Tabl. 27).

Obecność flawonoidów analizowano w świetle UV o długości fali λ = 366 nm przed i po wywołaniu parami amoniaku oraz 2% roztworem AlCl₃.

Badania chromatograficzne prowadzono wobec następujących substancji wzorcowych: apigeniny, luteoliny i ich 7-O-glukozydów spośród pochodnych flawonu, izoramnetyny, kemferolu, kwercetyny i ich 3-O-glukozydów, mirycetyny, 7-O-ramnozydu kemferolu, rutyny z pochodnych flawonolu, naryngeniny i jej 7-O-glukozydu oraz 7-O-neohesperozydu z pochodnych flawanonu, a także amentoflawonu i kupressuflawonu z grupy dimerów flawonoidowych. Jako związki wzorcowe wykorzystano

również wyodrębnione z kory *S. purpurea* (7043) (+) i (-)-5-O-glukozyd naryngeniny, izosalipurpozyd i jego ester p-kumarowy. Związki obecne w badanych ekstraktach metanолоwych rozpoznano w oparciu o ko-chromatografię i porównanie wartości hR_F z substancjami wzorcowymi oraz specyficzną fluorescencją w świetle UV o długości fali $\lambda = 366$ nm, przed i po derywatywacji odczynnikami wywołującymi (pary NH_3 , 2% $AlCl_3$).

Tabl. 27. Wartości hR_F wzorcowych flawonoidów w stosowanych układach chromatograficznych TLC.

Lp.	Substancja wzorcowa	Wartość hR_F ($R_F \times 100$)				
		I	II	III	IV	V
1.	Apigenina	62	-	-	16	54
2.	Luteolina	47	-	-	14	33
3.	Izoramnetyna	43	-	-	7	-
4.	Kemferol	45	-	87	11	37
5.	Kwercetyna	30	-	75	6	30
6.	Mirycecyta	18	-	-	2	22
7.	Naryngenina	75	17	-	62	80
8.	7-O-glukozyd apigeniny	66	4	56	40	-
9.	7-O-glukozyd luteoliny	51	-	-	20	-
10.	3-O-glukozyd izoramnetyny	61	12	-	56	-
11.	3-O-glukozyd kemferolu	69	15	-	61	-
12.	3-O-glukozyd kwercetyny	62	12	-	51	-
13.	7-O-ramnozyd kemferolu	65	-	-	33	-
14.	3-O-rutynozyd kwercetyny	66	28	-	66	-
15.	5-O-glukozyd naryngeniny	72	60	78	72	-
15.	7-O-glukozyd naryngeniny	76	76	73	80	-
16.	7-O-neohesperozyd naryngeniny	79	68	-	91	-
17.	Izosalipurpozyd	42	6	66	19	44
18.	Ester p-kumarowy izosalipurpozydu	55	6	83	5	38
19.	Amentoflawon	-	-	-	-	18
20.	Kupressuflawon	-	-	-	-	26

Objaśnienia: I – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielenia aglikonów (kwas octowy / kwas solny / woda 30+3+10, v/v/v); II – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Forestala do rozdzielenia glikozydów flawonoidowych (kwas octowy / kwas solny / woda 5+3+82, v/v/v); III – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: układ Patridge'a (butanol / kwas octowy / woda 4+1+5, v/v/v), IV – adsorbent: celuloza, faza ruchoma: 15% kwas octowy, V – adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy (4+2+3, v/v/v)

W rezultacie przeprowadzonych analiz TLC ekstraktów metanолоwych z badanych kor wierzb obecność chalkonu – izosalipurpozydu jako związku dominującego, potwierdzono (wartość hR_F związku zgodna z wartością hR_F wzorca – Tabl. 27) w zespołach większości przedstawicieli gatunków: *S. acutifolia*, *S. daphnoides* i *S. purpurea*. Wyjątek stanowiły kory pochodzące z klonów wierzby purpurowej – *S. purpurea* klon: 1153 (7012) i 1156 (7013) oraz kora *S. purpurea* (7041) firmy „Herbapol” Gdańsk (Tabl. 22,24). Ponadto izosalipurpozyd obserwowano w ekstrakcie z kory klonu wierzby wiciowej *S. viminalis* klon 1083 (7018). Jednocześnie stwierdzono, że gatunki: *S. acutifolia* (7031), *S. daphnoides* (7033) i jego klon 1095 (7004) oraz *S. purpurea* (7043) firmy „Labofarm” odróżnia od innych analizowanych wierzb obecność 6''-O-(E)-p-kumaroiloizosalipurpozydu (Tabl. 17,18,25). Dotychczas związek ten zidentyfikowano jedynie w korze wierzby *S. rubra* i *S. acutifolia* [3,251]. Występowanie estru p-kumarowego izosalipurpozydu w korze wierzby

wawrzynkowej (*S. daphnoides*) stanowi potwierdzenie bliskiego pokrewieństwa z wierzbą ostrolistną, która przez niektórych botaników jest uważana za podgatunek *S. daphnoides* [83]. Natomiast ujawnienie obecności tego związku w korze firmy „Labofarm”, wobec jego braku w pozostałych badanych przedstawicielach wierzby purpurowej (14 gatunków i klonów), wskazuje na błąd w klasyfikacji systematycznej rośliny.

Zgodnie z danymi literaturowymi [109,149,251] potwierdzono w gatunkach *S. acutifolia*, *S. purpurea* i *S. daphnoides* występowanie flawanonów – naryngeniny i jej 5-O- i 7-O-glukozydów (Tabl. 17-22,25). Fakt obecności glikozydowych pochodnych tego flawanonu w korach wierzb potwierdza wzrost stężenia aglikonu – naryngeniny w hydrolizatach kwasowych frakcji wodnych ekstraktów metanолоwych. Podobnie, jak w przypadku chalkonów nie ujawniono obecności flawanonów w korach *S. purpurea* klony 1153 (7012) i 1156 (7013) oraz *S. purpurea* (7041) firmy „Herbapol” Gdańsk, co przemawia za nieprawidłowo określonym pochodzeniem botanicznym surowców.

Występowanie salipurpozydu (wartość hR_F związku zgodna z wartością hR_F wzorca – Tabl. 27) i wolnej naryngeniny obok izosalipurpozydu odnotowano także w korze klonu wierzby wiciowej *S. viminalis* klon 1083 (7018). Potwierdzeniem występowania flawanonów w obrębie gatunku jest obecność naryngeniny w hydrolizacie kwasowym ekstraktu z kory *S. viminalis* (7029), jakkolwiek wcześniejsze dane piśmiennictwa, opisują występowanie w konopiance jedynie pochodnych flawonolu: izokwercetyny i glukozydów izoramnetyny [67].

Naryngeninę, jako wolny aglikon wykryto również w odmianie staśmionej wierzby sachalińskiej, gatunku znanego z obecności flawonolowych i flawanonolowych pochodnych [144,158].

Po raz pierwszy występowanie wolnej naryngeniny (wartość hR_F związku zgodna z wartością hR_F wzorca – Tabl. 27), odnotowano w korze nie badanych wcześniej w zakresie związków flawonoidowych wierzb: *S. × americana* klon 1036 (7002), *S. × erythroflexuosa* (7019), *S. fragilis* (7035), *S. melanostachys* (7022), *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), *S. eriocephala* (7034), *S. fragilis* (7035) i *S. herbacea* (7030) (Tabl. 19,26).

Ponadto wśród tych gatunków chromatograficznie ujawniono obecność pochodnych flawonolu, mianowicie kwercetyny, kemferolu i jego 3-O-glukozydu – *S. × americana* klon 1036 (7002), 3-O-glukozydu kwercetyny – *S. eriocephala* (7034) i *S. herbacea* (7030) oraz 3-O-glukozydu kemferolu – *S. × erythroflexuosa* (7019) i *S. melanostachys* (7022). W hydrolizacie kwasowym gatunku *S. herbacea* (7030) wykryto również mirycetynę i kwercetynę (Tabl. 17-19,26).

Rezultaty analiz TLC wskazały na dość powszechne występowanie w korach wierzby purpurowej i wawrzynkowej pochodnych flawonolu obok dominujących w zespołach flawonoidowych flawanonów i chalkonów. Kwercetyna i mirycetyna (wartości hR_F związków zgodne z wartościami hR_F wzorców – Tabl. 27) były obecne w korze *S. daphnoides* klon 1095 (7004) pochodzącej z upraw oraz w surowcu firmy „Herbapol” Wrocław – *S. purpurea* (7042) zebranych ze stanowisk naturalnych. W korach tych obserwowano także obecność 3-O-glukozydu kwercetyny (*S. daphnoides* klon 1095 (7004)) oraz kemferolu, 3-O-glukozydu i 7-O-ramnozydu kemferolu (*S. purpurea* (7042)). Obecność kwercetyny jako wolnego aglikonu stwierdzono w trzech klonach wierzby purpurowej – *S. purpurea* klony 1067 (7006), 1084 (7008) i 1101 (7009), natomiast jej 3-O-glukozyd zawierał klon 1136 (7011) gatunku. Z kolei występowanie kemferolu obserwowano w korze klonów *S. purpurea* 1081 (7007) i 1084 (7008), mieszańca wierzby purpurowej i wawrzynkowej – *S. purpurea* × *daphnoides* klon 1107 (7015) oraz w hydrolizatach alkalicznych wyciągów metanolowych z *S. purpurea* klon 1156 (7013), *S. purpurea* (7036) i *S. purpurea* (7043) firmy „Labofarm” (Tabl. 18,19,22,25). 3-O-glukozyd kemferolu chromatograficznie zidentyfikowano (wartość hR_F związku zgodna z wartością hR_F wzorca – Tabl. 27) w korze *S. purpurea* klon 1081 (7007), *S. purpurea* × *daphnoides* klon 1107 (7015) i *S. viminalis* klon 1083 (7018), natomiast 7-O-ramnozyd kemferolu w mieszance kor *S. alba* i *S. purpurea* firmy „Kawon” (7039) (Tabl. 20,24,25). W grupie badanych wierzby z gatunku *S. daphnoides* i *S. purpurea* rutynę, rozpoznano jedynie w korze firmy „Herbapol” Wrocław – *S. purpurea* (7042). Ponadto obecność tej pochodnej flawonolu obok monoglikozydów – izokwercytryny i 7-O-ramnozydu kemferolu obserwowano na chromatogramach TLC ekstraktów z kory *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (Tabl. 23,25).

Według danych piśmiennictwa pochodne flawonolu – kemferol i jego 7-O-glukozyd występują w gatunku *S. lindleyana* oraz *S. babylonica*, odpowiednio [117,228]. Natomiast kwercetynę zidentyfikowano w liściach *S. acutifolia*, *S. alba*, *S. caprea*, *S. chaenomeloides* i *S. triandra* [47,160,164,195]. Z kolei w wierzbie wiciowej – *S. viminalis* wykryto izokwercetynę i glukozydy izoramnetyny [67]. Obecność mirycetyny i dihydromirycetyny oraz ampelopsyny charakteryzuje wierzbę sachalińską – *S. sachalinensis* [144,158]. Mirycetynę obok pochodnych luteoliny wykryto w liściach *S. myrsinifolia* [227], a dihydromirycetynę w gatunku *S. pet-susu* [170].

Wśród badanych gatunków i klonów obecność kwercetyny (wartość hR_F związku zgodna z wartością hR_F wzorca – Tabl. 27) potwierdzono w korze *S. acutifolia* (7031), *S. alba* (7032) oraz *S. triandra* (7038) i klonach gatunku: 1044 (7016), 1045 (7017). Występowanie tego flawonolu stwierdzono również w korze *S. × sepulcralis* (7027),

będącej mieszańcem *S. alba* i *S. babylonica* oraz obok rutyny w korze *S. amygdalina* × *viminalis* klon 1155 (7003). Gatunek *S. amygdalina* według niektórych autorów odpowiada *S. triandra*. Chromatograficznie wykazano występowanie rutyny i mirycetyny w korze konopianki (7029) oraz kwercetyny w jej klonie – *S. viminalis* klon 1083 (7018), jako nowych związków wobec dotychczas rozpoznanych w obrębie gatunku innych pochodnych flawonoli (Tabl. 24) [67].

Obecność mirycetyny (wartość hR_F związku zgodna z wartością hR_F wzorca – Tabl. 27) potwierdzono dla gatunków: *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026) i *S. matsudana* ‘Tortuosa’ (7028) [136,144,254], natomiast po raz pierwszy występowanie tego związku odnotowano w korze: *S. alba* klon 1100 (7001), *S. purpurea* klon 1038 (7005), *S. × sepulcralis* (7027), *S. triandra* klon 1044 (7016) i 1045 (7017) oraz w hydrolizatach kwaśnych wyciągów metanolowych z kory: *S. amygdalina* × *viminalis* klon 1155 (7003) i *S. purpurea* klon 1153 (7012) (Tabl. 18,22).

Dotychczas z grupy pochodnych flawonu, obecność luteoliny w rodzaju *Salix*, jako wolnego aglikonu obok jej glikozydów i pochodnych metylowych, opisano w liściach *S. babylonica* [1], *S. lindleyana* [228] i *S. caprea* [195]. Estry i glikozydy luteoliny charakteryzują również gatunki: *S. gilgiana* [67], *S. myrsinifolia* [227], *S. matsudana* [136,254], *S. oritrepha* [210] i *S. triandra* [115].

Chromatograficznie potwierdzono występowanie 7-O-glikozydu luteoliny w *S. triandra* klon 1044 (7016). Ujawniono jego obecność w korach sześciu badanych przedstawicieli wierzby purpurowej, mianowicie *S. purpurea* klony: 1038 (7005), 1067 (7006), 1081 (7007), 1084 (7008), 1101 (7009), w wierzbie purpurowej firmy „Herbapol” Wrocław (7042) oraz w korze mieszańca *S. purpurea* × *daphnoides* klon 1107 (7015) (Tabl. 20-22), a także w *S. daphnoides* klon 1095 (7004), *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026) i *S. viminalis* klon 1083 (7018) (Tabl. 17-25). Natomiast wolny aglikon – luteolinę (wartość hR_F związku zgodna z wartością hR_F wzorca – Tab. 27) chromatograficznie stwierdzono w materiale z: *S. × erythroflexuosa* (7019), *S. purpurea* × *daphnoides* klon 1107 (7015), w surowcach firm zielarskich: „Flos” (7040) i „Herbapol” Gdańsk (7041) oraz w hydrolizatach ekstraktów metanolowych z kor: *S. daphnoides* klon 1095 (7004) i *S. viminalis* (7029) (Tabl. 18,22,24-26).

Rzadziej występującym w obrębie rodzaju *Salix* flawonem jest apigenina, którą zidentyfikowano dotychczas jedynie w gatunkach: *S. alba* [47], *S. lindleyana* [228] oraz wyodrębniono z liści *S. matsudana* w postaci 7-O-glikozydu [254]. Wśród badanych taksonów obecność apigeniny (wartość hR_F związku zgodna z wartością hR_F wzorca – Tabl. 27) potwierdzono w korze *S. matsudana* ‘Tortuosa’ (7028). Ponadto ujawniono jej

występowanie w korze *S. acutifolia* (7031), *S. alba* klon 1100 (7001), *S. amigdalina* × *viminalis* klon 1155 (7003), *S. daphnoides* (7033), *S. daphnoides* klon 1095 (7004), *S. fragilis* (7035), *S. herbacea* (7030), *S. purpurea* (7036), (7037), (7039), (7040), (7042) oraz w klonach gatunku: 1067 (7006), 1136 (7011), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014), *S. × sepulcralis* (7027) oraz w hydrolizatach ekstraktów metanolowych z kor *S. purpurea* klon 1132 (7010), *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026) i *S. triandra* klon 1045 (7017) (Tabl. 17-25). 7-O-glukozyd apigeniny obserwowano na chromatogramach TLC w wyciągach metanolowych z kory: *S. purpurea* (7042), *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026), *S. triandra* klon 1045 (7017) (Tabl. 23,25).

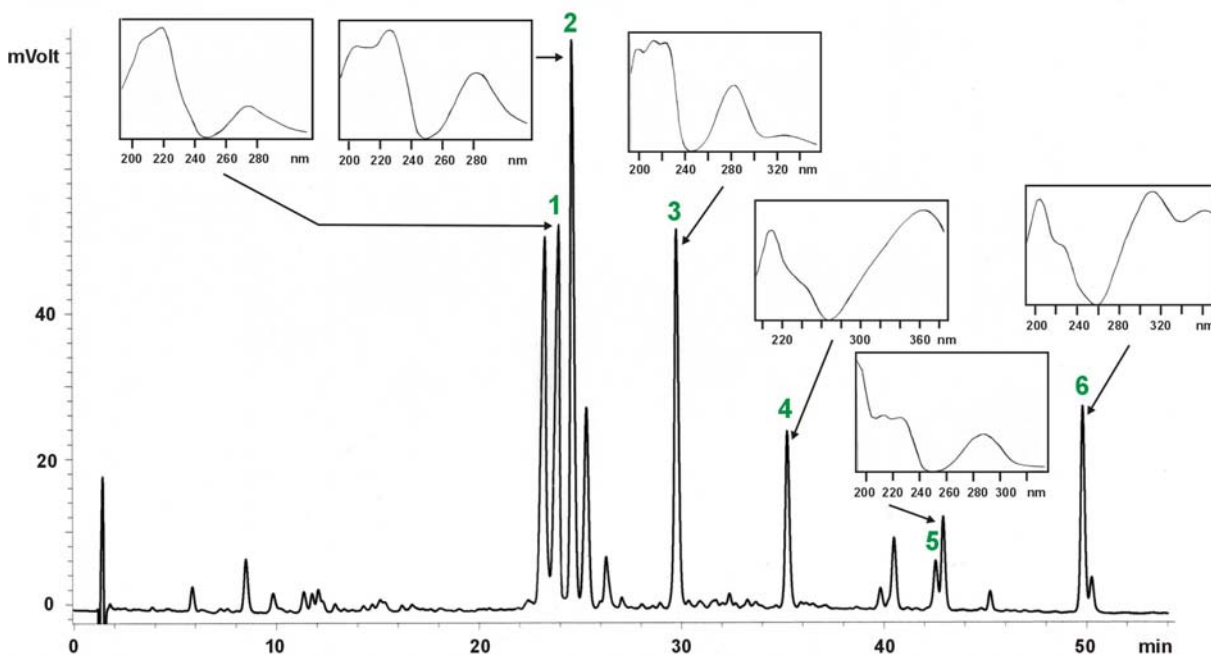
Wyniki oznaczeń TLC dla 7-O-glukozydów apigeniny i luteoliny oraz kwercetyny i kemferolu potwierdzono analizą HPLC na kolumnie Lichrospher 100 RP-18e (250 mm × 4 mm, 5 μm) stosując liniowo-skokową elucję gradientową o zmiennym stężeniu metanolu w mieszaninie metanol / woda+kw. ortofosforowy (99+1, v/v) (Tabl. 1, Ryc. 48,49).

3.2.2. Omówienie wyników analizy ilościowej związków flawonoidowych z grupy chalconów i flawanonów.

Kierując się wynikami badań jakościowych przeprowadzonych z użyciem chromatografii cienkowarstwowej, do analizy ilościowej metodą HPLC przeznaczono kory uznane za szczególnie bogate w połączenia flawonoidowe – zawierające jako dominujące flawanony i chalkony, mianowicie kory: wierzby ostrolistnej – *S. acutifolia* (7031), wierzby wawrzynkowej – *S. daphnoides* (7033), *S. daphnoides* klon 1095 (7004), wierzby purpurowej – *S. purpurea* (7036), (7037), (7042), (7043) i jej klonów: 1067 (7006), 1084 (7008), 1136 (7011) oraz mieszańca *S. purpurea* × *daphnoides* klon 1107 (7015). W wymienionym materiale roślinnym, nie analizowano ilościowo pozostałych grup związków flawonoidowych – flawonów i flawonoli, ze względu na niskie stężenia, w jakich one występowały na chromatogramach TLC.

Rozdzielenie metodą HPLC związków flawonoidowych: (+) i (-)-5-O- i 7-O-glukozydów naryngeniny oraz izosalipurpozydu obok niektórych glikozydów fenolowych: salicyny, syrynginy, salirepozydu, salikortyny i tremulacyny przeprowadzili Meier i wsp. [149]. Kammerer i wsp. [109] analizowali za pomocą HPLC sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS), połączenia flawonoidowe obok prostych fenoli i ich glikozydów oraz glikozydoestrów, w tym salicyny, tremulacyny, salikortyny, salicylosalicyny i piceiny.

W niniejszej pracy mieszaninę substancji wzorcowych – naryngeniny, 5-O-glukozydów naryngeniny (+) i (-), 7-O-glukozydu naryngeniny, izosalipurpozydu oraz jego estru p-kumarowego, rozdzielono metodą HPLC w układzie faz odwróconych na kolumnie Discovery C18 (150 mm × 3 mm, 3 μm), stosując elucję gradientową o wzrastającym stężeniu acetonitrylu od 2% do 37% w mieszaninie acetonitryl / woda+kwas ortofosforowy (99,9+0,1 v/v) ($t_G = 60$ min). W celu identyfikacji analizowanych związków obok detektora UV-Vis ($\lambda = 280$ nm) wykorzystano detektor z matrycą diod (DAD) (Ryc. 58).



Ryc. 58. Chromatogram HPLC ekstrakstu z kory wierzby *S. purpurea* (7043): **1** – 5-O-glukozyd naryngeniny (+), **2** – 5-O-glukozyd naryngeniny (-), **3** – 7-O-glukozyd naryngeniny, **4** – izosalipurpozyd, **5** – naryngenina, **6** – ester p-kumarowy izosalipurpozydu. Kolumna Discovery C18 (150 mm × 3 mm, 3 μm), elucja gradientowa G_0 : A – acetonitryl, B – woda / kwas ortofosforowy (99,9+0,1; v/v) od 2 do 37% A w A+B, $t_G = 60$ min, detekcja UV-Vis/DAD przy $\lambda = 280$ nm.

Najwyższą zawartość flawanonów (41,93 mg/g) ujawniono w korze wierzby purpurowej firmy „Herbapol” Wrocław – *S. purpurea* (7042), zebranej z okazów rosnących w środowisku naturalnym. W zespole związków flawonoidowych gatunku dominował izomer (+) 5-O-glukozydu naryngeniny (25,30 mg/g) obok izomeru (-) (15,87 mg/g), przy znacznie niższej zawartości 7-O-glukozydu naryngeniny (0,68 mg/g) i wolnej naryngeniny (0,077 mg/g) (Tabl. 28).

Pozostałe analizowane kory gatunku *S. purpurea* i jego klonów (6 gatunków i klonów) posiadały niższe stężenia flawanonów – od 1,66 do 14,37 mg/g. W tej grupie wysoką zawartością 7-O-glukozydu naryngeniny (4,57 mg/g) wyróżniała się kora *S. purpurea* (7043) pochodząca z upraw firmy „Labofarm”. Zbliżone koncentracje pruniny charakteryzowały kory gatunków *S. acutifolia* (7031) (3,64 mg/g) i *S. daphnoides* (7033) (3,27 mg/g),

natomiast najwyższą zawartość tego glukozydu odnotowano dla kory klonu wierzby wawrzynkowej – *S. daphnoides* klon 1095 (7004) (15,82 mg/g) (Tabl. 28).

W obrębie gatunku *S. daphnoides* stwierdzono znaczne różnice w zawartości poszczególnych glukozydów naryngeniny. Korę pochodzącą z rosnącego w warunkach naturalnych egzemplarza charakteryzują wysokie (33,36 mg/g) stężenia salipurpozydu przy stosunkowo niskich koncentracjach pruniny (3,27 mg/g) w przeciwieństwie do klonu 1095 (7004) pochodzącego z upraw (10,65 mg/g i 15,82 mg/g, odpowiednio) (Tabl. 28).

Różnice w zawartości związków czynnych z grupy pochodnych flawanonu mogą wynikać z różnej pory zbioru surowca i stopnia nasłonecznienia stanowiska występowania wierzby. Tegelberg i wsp. [227] obserwowały wzrost stężenia związków flawonoidowych w liściach *S. myrsinifolia* pod wpływem ekspozycji na promieniowanie UV-B.

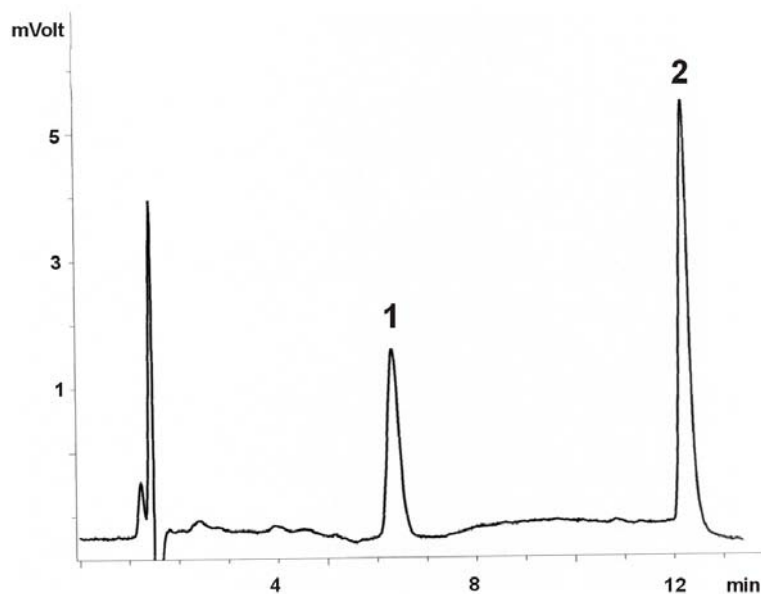
Tabl. 28. Zawartość [mg/g] flawanonów oznaczona metodą HPLC w wyciągach metanolowych i ekstraktach suchych z kory wierzby.

Lp.	Gatunek / klon	Indeks	Zawartość [mg/g]				
			5-O-glukozyd naryngeniny (-)	5-O-glukozyd naryngeniny(+)	7-O-glukozyd naryngeniny	naryngenina	Σ flawanonów
1.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095	7004	3,96 ± 0,11	6,69 ± 0,09	15,82 ± 0,14	0,14 ± 0,01	26,60 ± 0,17
2.	<i>S. daphnoides</i>	7033	13,16 ± 0,17	20,19 ± 0,21	3,27 ± 0,08	0,12 ± 0,02	36,75 ± 0,26
3.	<i>S. acutifolia</i>	7031	3,02 ± 0,09	4,82 ± 0,09	3,64 ± 0,07	0,11 ± 0,01	11,59 ± 0,11
4.	<i>S. purpurea</i> klon 1084	7008	0,49 ± 0,07	0,84 ± 0,08	0,43 ± 0,08	0,03 ± 0,007	1,80 ± 0,07
5.	<i>S. purpurea</i> klon 1136	7011	1,81 ± 0,04	2,63 ± 0,13	0,24 ± 0,08	0,01 ± 0,005	4,69 ± 0,08
6.	<i>S. pupurea</i> klon 1067	7006	0,48 ± 0,04	1,13 ± 0,07	0,05 ± 0,01	-	1,66 ± 0,05
7.	<i>S. purpurea</i> × <i>daphnoides</i> 1107	7015	0,62 ± 0,05	0,95 ± 0,08	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,008	1,68 ± 0,06
8.	<i>S. purpurea</i>	7036	2,81 ± 0,09	4,49 ± 0,11	0,23 ± 0,03	-	7,53 ± 0,09
9.	<i>S. purpurea</i>	7037	2,15 ± 0,06	3,35 ± 0,08	0,22 ± 0,05	-	5,72 ± 0,06
10.	<i>S. purpurea</i>	7042	15,87 ± 0,17	25,30 ± 0,24	0,68 ± 0,07	0,08 ± 0,01	41,93 ± 0,21
11.	<i>S. purpurea</i>	7043	3,63 ± 0,08	6,17 ± 0,14	4,57 ± 0,11	0,014 ± 0,007	14,37 ± 0,12

Zasadniczy problem w analizie ilościowej izosalipurpozydu i jego estru p-kumarowego metodą HPLC stanowiły wysokie wartości t_R obydwu związków. Jego rozwiązaniem było zastosowanie metody ekstrakcji do fazy stałej (SPE), jako procesu frakcjonowania wyciągów metanolowych z kory wierzby. Eksperymenty prowadzono na kolumnach wypełnionych żelem krzemionkowym Lichrorep RP-18. Po naniesieniu ekstraktu metanolowego na kolumnę SPE złożę wymywano mieszaniną acetonitryl / woda w różnych stosunkach objętościowych, mianowicie 20+80, v/v oraz 30+70, v/v, otrzymując dwie frakcje zawierające odpowiednio izosalipurpozyd oraz ester p-kumarowy izosalipurpozydu. Połączone frakcje analizowano metodą HPLC na kolumnie Discovery C18 (150 mm × 2,1 mm, 5 μm), stosując elucję gradientową o wzrastającym stężeniu acetonitrylu od 20% do 50% w mieszaninie acetonitryl / woda+kwasy ortofosforowy (99,9+0,1; v/v) (t_G = 15 min) (Ryc. 59).

W opracowanej metodzie ekstrakcji do fazy stałej odzysk chalkonów: izosalipurpozydu i 6''-O-p-(*E*)-kumaroiloizosalipurpozydu wynosił: $82,51\% \pm 2,16$ i $95,83\% \pm 1,74$, odpowiednio.

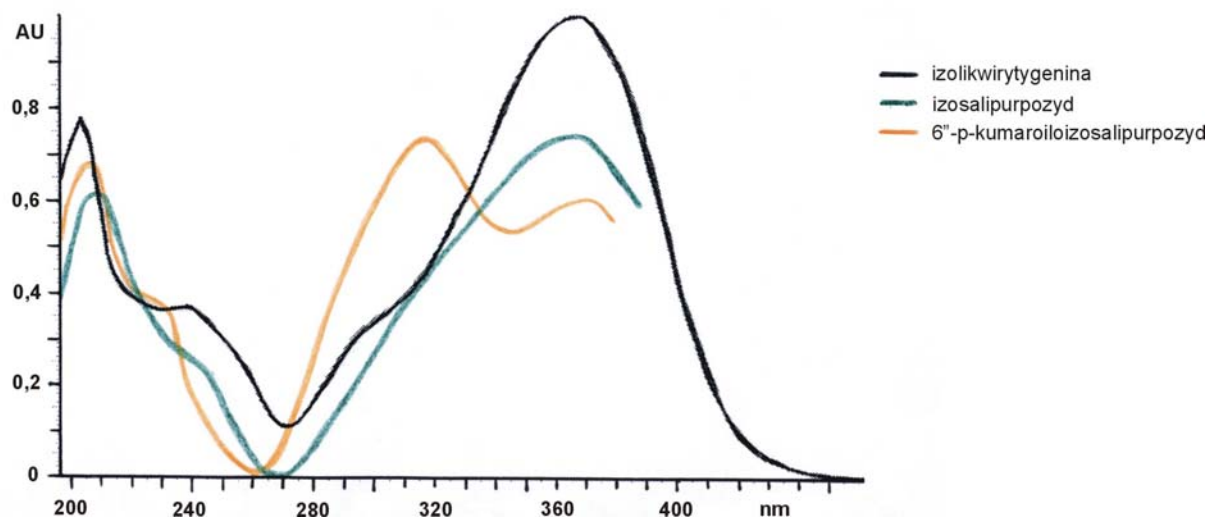
Oznaczenia ilościowe chalkonów przeprowadzono stosując metodę wzorca zewnętrznego [224] z użyciem standardów stanowiących analizowane związki, a także chalkonu – izolikwirytygeniny.



Ryc. 59. Chromatogram HPLC rozdzielania oczyszczonego metodą SPE ekstraktu metanolowego z kory *Salix purpurea* (7043): **1** – izosalipurpozyd, **2** – ester p-kumarowy izosalipurpozydu. Kolumna Discovery C18 (150 mm × 2,1 mm, 5 μm), elucja gradientowa G₇: A – acetonitryl, F – woda / kwas ortofosforowy (99,9+0,1, v/v), od 20 % do 50% A w A+B, t_G = 15 min, detekcja UV λ=280 nm.

Stwierdzono, że stężenia izosalipurpozydu oznaczone w przeliczeniu na izolikwirytygeninę są niższe od stężeń w oznaczeniach bezpośrednich z użyciem związku jako wzorca, natomiast dla estru p-kumarowego izosalipurpozydu są wyższe (Tabl. 29). Obserwowane zależności wynikają z różnic absorpcji przez analizowane związki światła UV przy długości fali $\lambda = 280$ nm (Ryc. 60).

W rezultacie przeprowadzonych analiz wykazano znaczne różnice w zawartości chalkonów w obrębie gatunków. W materiale stanowiącym kory wierzby purpurowej stężenie izosalipurpozydu wahało się w granicach od 0,08 mg/g do 10 mg/g suchego surowca i było prawie dwukrotnie wyższe od zawartości w korach wierzby wawrzynkowej odpowiednio 1,85 mg/g i 17,54 mg/g (Tabl. 29). Wśród przedstawicieli wierzby purpurowej (*Salix purpurea*) najwyższe stężenia izosalipurpozydu odnotowano w korach klonów 1132 (7010) (10 mg/g) i 1136 (7011) (2,48 mg/g). W pozostałych korach wierzby, zarówno pochodzących z upraw jak i środowiska naturalnego stężenia związku były znacznie niższe – w granicach od 0,1 mg/g do 1,74 mg/g (Tabl. 29).



Ryc 60. Widma DAD chalkonów.

Z kolei zawartość estru p-kumarowego izosalipurpozydu zmieniała się w zależności od pochodzenia surowca – w korze *S. daphnoides* (7033) zebranej ze stanu naturalnego stężenie związku wynosiło 0,59 mg/g, podczas gdy w korze klonu *S. daphnoides* 1095 (7004) było prawie ośmiokrotnie wyższe – 4,47 mg/g. Klon ten wyróżnia w badanej grupie wierzby wysoka zawartość obu chalkonów – w sumie 22,01 mg/g suchej masy surowca, w przeciwieństwie do kory wierzby wawrzynkowej, pochodzącej ze stanu dzikiego zawierającej oba chalkony w niskich stężeniach – w sumie 2,44 mg/g. Kolejną uznaną za bogate źródło chalkonów (7,77 mg/g) jest kora wierzby purpurowej (7043) firmy „Labofarm” (Tabl. 29).

Tabl. 29. Zawartość [mg/g] chalkonów: izosalipurpozydu i jego estru p-kumaroilowego w gatunkach i klonach wierzby oznaczona metodą SPE-HPLC.

Lp.	Gatunek/klon	Indeks	Zawartość [mg/g]					
			Izosalipurpozyd		Ester izosalipurpozydu		Σ Chalkonów	
			I	II	I	II	I	II
1.	<i>Salix daphnoides</i> 1095	7004	17,54±0,12	10,44±0,09	4,47±0,09	10,64±0,12	22,01±0,13	21,08±0,11
2.	<i>S. purpurea</i> 1038	7005	0,54±0,08	0,36±0,03				
3.	<i>S. purpurea</i> 1067	7006	0,08±0,006	0,11±0,03				
4.	<i>S. purpurea</i> 1081	7007	0,36±0,06	0,26±0,04				
5.	<i>S. purpurea</i> 1084	7008	0,44±0,05	0,32±0,07				
6.	<i>S. purpurea</i> 1101	7009	1,07±0,07	0,69±0,03				
7.	<i>S. purpurea</i> 1132	7010	9,998±0,13	5,92±0,11				
8.	<i>S. purpurea</i> 1136	7011	2,48±0,06	1,50±0,05				
9.	<i>S. purpurea</i> 1157	7014	0,74±0,007	0,47±0,07				
10.	<i>S. purpurea-daphnoides</i> 1107	7015	0,15±0,005	0,12±0,01				
11.	<i>S. viminalis</i> 1083	7018	0,31±0,01	0,23±0,03				
12.	<i>S. acutifolia</i>	7031	4,45±0,09	2,76±0,05	0,74±0,05	1,61±0,08	5,19±0,09	4,37±0,09
13.	<i>S. daphnoides</i>	7033	1,85±0,005	1,19±0,07	0,59±0,03	1,28±0,04	2,44±0,07	2,47±0,07
14.	<i>S. purpurea</i>	7036	1,04±0,004	0,69±0,04				
15.	<i>S. purpurea</i>	7037	1,74±0,05	1,12±0,06				
16.	<i>S. purpurea</i>	7042	1,35±0,02	0,90±0,07				
17.	<i>S. purpurea</i>	7043	5,28±0,11	3,57±0,09	2,49±0,11	5,41±0,14	7,77±0,15	8,98±0,12

Objaśnienia: I – zawartość oznaczona względem wzorca zewnętrznego – izosalipurpozydu lub 6''-p-kumaroiloizosalipurpozydu
 II – zawartość oznaczona względem wzorca zewnętrznego – izolikwirytygeniny

Dotychczas analizę ilościową związków flawonoidowych przeprowadzono dla gatunków *Salix caprea* (flawonole i flawanonole), *S. myrsinifolia* (flawony i flawonole) i *S. sachalinensis* (flawanonole) [158,187,227]. Zawartość flawonoidów w drewnie *S. caprea* wynosiła od 17 mg/g do 39 mg/g [187], a w liściach *S. myrsinifolia* od 2,11 mg/g do 3,66 mg/g [227], natomiast w korze wierzby sachalińskiej stężenie pochodnej flawanonolu – taksyfoliny wynosiło 7,51 mg/g [158]. W świetle tych danych kory badanych taksonów: *S. purpurea* (7042), (7043), *S. daphnoides* (7033) i *S. daphnoides* klon 1095 (7004) oraz *S. acutifolia* (7031) stanowią w obrębie rodzaju, bogate źródło związków flawonoidowych – flawanonów i chalkonów (Σ 41,93 mg/g; 39,00 mg/g; 48,61 mg/g i 16,78 mg/g, odpowiednio) (Tabl. 28,29) [1,47,130].

W podsumowaniu otrzymanych wyników należy podkreślić, że wierzbę ostrolistną i wawrzynkową od purpurowej odróżnia obecność estru p-kumarowego izosalipurpozydu (Tabl. 29). Występowanie tego związku w korze wierzby (7043) firmy „Labofarm” świadczy o nieprawidłowo oznaczonej przynależności gatunkowej. Przypuszczalnie nie jest to wierzba purpurowa, ale wierzba wawrzynkowa. Podobnie niewłaściwą wydaje się klasyfikacja klonu *S. viminalis* 1083 (7018) z kolekcji Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, którego kora zgodnie z danymi literaturowymi oraz wynikami badań otrzymanych dla kory *S. viminalis* (7029), nie powinna zawierać izosalipurpozydu oraz naryngeny i jej 5-O-glukozydu.

Wyniki przeprowadzonych analiz potwierdzają zależny od gatunku wierzby skład chemiczny zespołów związków flawonoidowych w korze. W obrębie rodzaju *Salix* jedynie trzy z badanych gatunków wykazują zbliżony skład zespołów flawonoidowych, mianowicie *S. acutifolia*, *S. daphnoides* i *S. purpurea*. Gatunki te są bardzo bogatym źródłem rzadko spotykanych w świecie roślinnym połączeń z grupy chalkonów – izosalipurpozydu i jego estru p-kumaroilowego oraz flawanonów – salipurpozydu i pruniny [22,67,73,123].

Flawonoidy stanowią grupę związków naturalnych o właściwościach przeciwzapalnych [97,75,110,115,141,186], wobec czego mogą włączać się w efekty terapeutyczne surowca – kory wierzby. Mechanizm działania przeciwzapalnego flawonoidów opiera się na inhibicji aktywności cyklooksygenazy, lipooksygenazy oraz na właściwościach zmiatania wolnych rodników – właściwościach przeciwutleniających, a także na hamowaniu uwalniania cytokin z bazofilii i komórek tucznych [75,97,110,115,186]. W badaniach na myszach wykazano, że naryngina podawana dootrzewnowo jest potencjalnym inhibitorem stymulowanej lipopolisacharydem (LPS) produkcji czynnika martwicy guza – TNF- α . Aktywność przeciwzapalną naryngeny wykazano w modelu ziarniniaka u szczurów [141]. Z kolei w badaniach zależności aktywności przeciwzapalnej pochodnych flawonoidowych od ich struktury chemicznej stwierdzono, że naryngena jest selektywnym inhibitorem lipooksygenazy ($IC_{50} = 16 \mu M$) [141].

4. Omówienie wyników badań pochodnych flawan-3-olu w korze wierzb.

W badaniach mono- i dimerycznych pochodnych flawan-3-olu w korach wierzb wykorzystano techniki chromatografii cienkowarstwowej: TLC i HPTLC oraz wysokosprawną chromatografię cieczową – HPLC.

4.1. Omówienie wyników analizy jakościowej i ilościowej katechiny i jej monomerycznych pochodnych.

Katechina jest rozpowszechnionym w świecie roślinnym flawan-3-olem, stanowiąc jednostkę składową m.in. proantocyjanidyn i garbników w rodzinach: *Ericaceae*, *Fagaceae*, *Polygonaceae*, *Rosaceae* i *Salicaceae* [22,51,123]. Dotychczas obecność wolnej katechiny wśród gatunków rodzaju *Salix* odnotowano m.in. w *S. acutifolia* [251], *S. alba* [47], *S. caprea* [108,187], *S. gilgiana* [131], *S. myrsinifolia* [102,107,108], *S. pentandra* [108], *S. phyllicifolia* [108], *S. petiolaris* [89], *S. pet-susu* [170] i *S. sachalinensis* [159].

Ekstrakty roślinne stanowią złożone mieszaniny związków chemicznych i często konieczne jest wprowadzenie etapu oczyszczania surowych wyciągów w celu wyeliminowania substancji balastowych, co ułatwia optymalizację warunków rozdzielania chromatograficznego i skraca czas analizy. Ponadto, w wysokosprawnej chromatografii cieczowej wydłuża czas życia kolumny.

Przed przystąpieniem do analizy chromatograficznej monomerycznych pochodnych flawan-3-olu ekstrakty metanolowe z kor wierzb poddano oczyszczaniu metodą ekstrakcji ciecz-ciecz z użyciem eteru etylowego oraz octanu etylu. Ocena wydajności procesu (trzykrotna ekstrakcja) wykazała około 60% odzysk wzorcowej katechiny. Zwiększanie liczby etapów ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi w celu uzyskania zadowalającego poziomu odzysku wydłużałoby czas pracy analityka oraz powodowałoby znaczne zużycie ekstrahentów.

W związku z tym opracowano warunki oczyszczania wyciągów metanolowych metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) na kolumnach Octadecyl C18 (500 mg, 3ml), z wykorzystaniem zestawu Bakerbond SPE. Kolumny kondycjonowano acetonitrylem i mieszaniną acetonitryl / woda (30+70, v/v). Po naniesieniu ekstraktu metanolowego z kory wierzb, złożę wmywano tą samą mieszaniną rozpuszczalników. Uzyskany w tych warunkach odzysk katechiny wynosił $96,5\% \pm 1,7$.

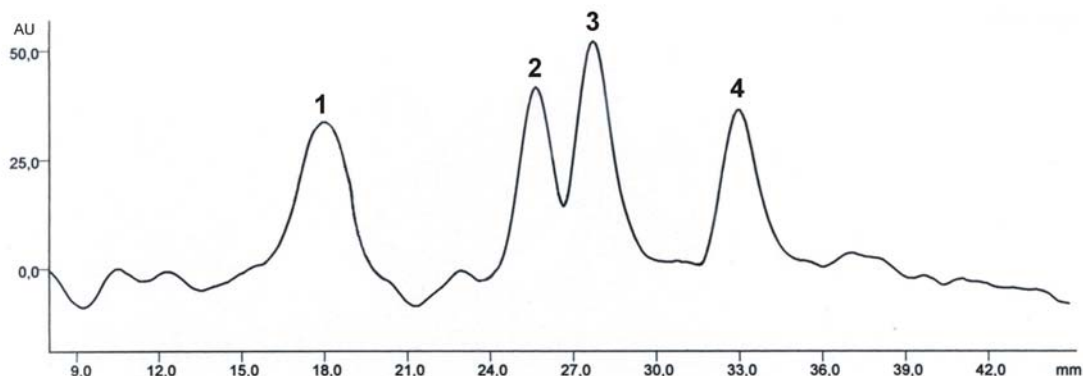
W analizie monomerycznych pochodnych flawan-3-olu metodą TLC, rozdzielania prowadzi się na złożu celulozowym lub żelu krzemionkowym w układzie faz normalnych (NP) [78,166,240]. Separację katechiny i epikatechiny w układzie faz odwróconych (RP) opisała Fecka i wsp. [56]. Eksperymenty w układach RP, w których

elenty zawierają wodę, pozwalają na mniejsze zużycie szkodliwych dla środowiska rozpuszczalników organicznych, w porównaniu do systemów NP [244].

Separację mieszaniny czterech flawan-3-oli: katechiny, epikatechiny, galusanu katechiny i galokatechiny, optymalizowano metodą wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej – HPTLC, na modyfikowanym grupami oktadecylowymi żelu krzemionkowym RP-18W. Fazy ruchome stanowiły mieszaniny wody i acetonitrylu oraz metanolu, metyloetanolu lub tetrahydrofuranu z dodatkiem kwasu mrówkowego w stężeniu 6%.

W porównaniu do adsorbentów stosowanych w TLC, posiadających ziarna o wielkości 10-100 μm , adsorbenty HPTLC charakteryzują się znacznie mniejszą średnicą ziaren w zakresie 3-7 μm , co poprawia sprawność układu chromatograficznego [32,146,168]. Z kolei zaletą złożeń RP-18 typu W jest możliwość stosowania w fazach ruchomych stężeń wody wyższych niż 50% [32,168].

Najlepsze rozdzielanie mieszaniny analizowanych substancji uzyskano z użyciem fazy ruchomej – acetonitryl / woda / kwas mrówkowy (20+80+6, v/v/v) na dystansie rozwijania 4 cm (czas rozwijania $t = 10$ min) (Ryc. 61).



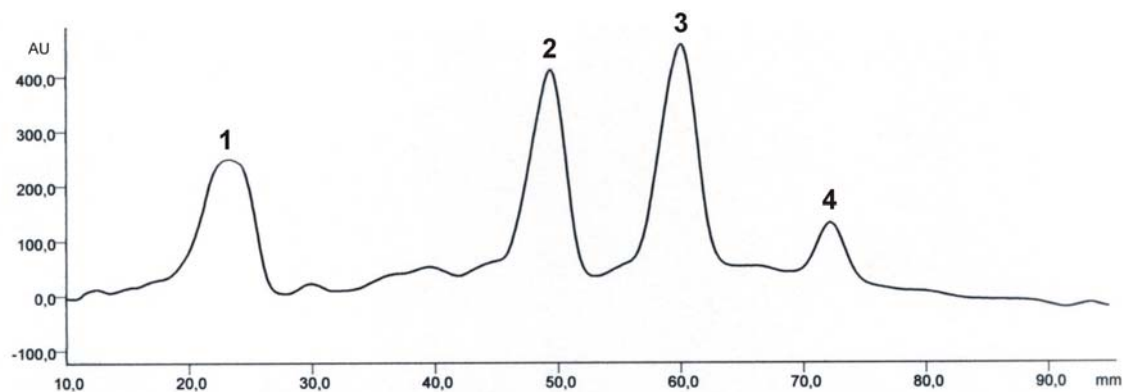
Ryc. 61. Densytogram rozdzielania HPTLC mieszaniny flawan-3-oli: **1** – galusan katechiny, **2** – epikatechina, **3** – katechina, **4** - galokatechina. Adsorbent: żel krzemionkowy RP-18 W, elucja izokratyczna – faza ruchoma: acetonitryl / woda / kwas mrówkowy (20+80+6, v/v)

Zastosowanie techniki wielokrotnej elucji gradientowej MGD (*Multiple Gradient Development*) [145,146], przy wzrastającym stężeniu acetonitrylu w fazie ruchomej w kolejnych etapach elucji (Tabl. 30), zwiększyło wartość ΔhR_F katechiny i epikatechiny z 5 do 19 (Ryc. 62).

Tabl. 30. Program elucji gradientowej, stosowany na żelu krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi – HPTLC RP-18 W, techniką MGD-HPTLC.

Faza ruchoma (v/v/v)	Etapy elucji gradientowej		
	I (s = 4 cm)	II (s = 6 cm)	III (s = 8 cm)
Acetonitryl	20	22	22
Woda	80	78	78
Kwas mrówkowy	6	6	6

Objaśnienia: s – droga migracji



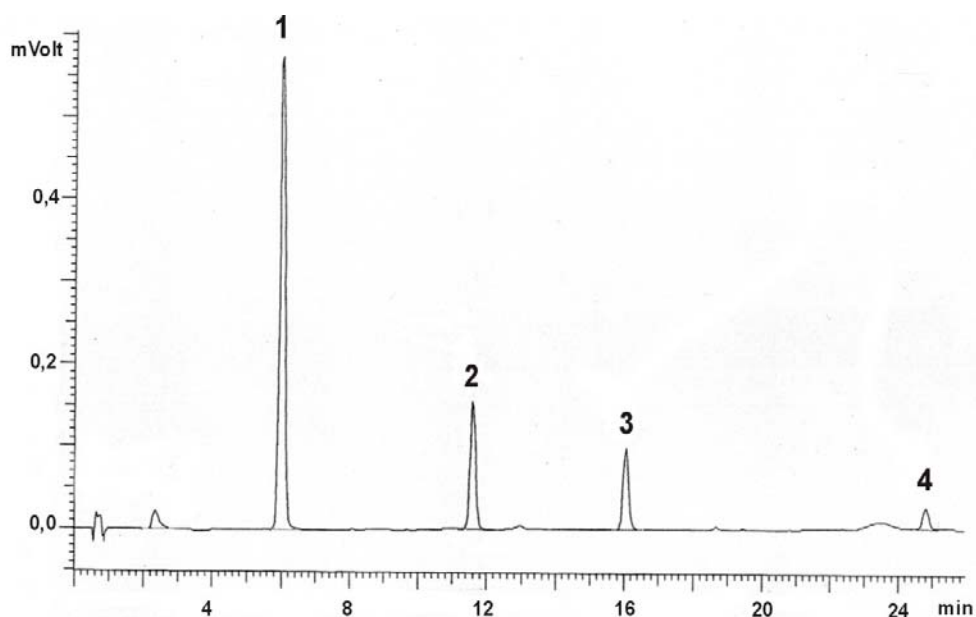
Ryc. 62. Densytogram rozdzielania mieszaniny flawan-3-oli: **1** – galusan katechiny, **2** – epikatechina, **3** – katechina, **4** – galokatechina. Adsorbent: żel krzemionkowy RP-18 W, elucja gradientowa MGD-HPTLC (Tabl. 30).

Chromatogramy analizowano w świetle UV o długości fali $\lambda = 282$ nm, przy której katechina wykazuje maksimum absorpcji oraz w świetle widzialnym po wywołaniu chromatogramów mieszaniną kwasu ortofosforowego i etanolowego roztworu waniliny (temp. 110°C) [240], wybarwiająca plamy związków na kolor różowo-czerwony.

Wadą opracowanej metody rozdzielania monomerycznych flawan-3-oli techniką MGD-HPTLC był długi czas analizy wynoszący około 85 min.

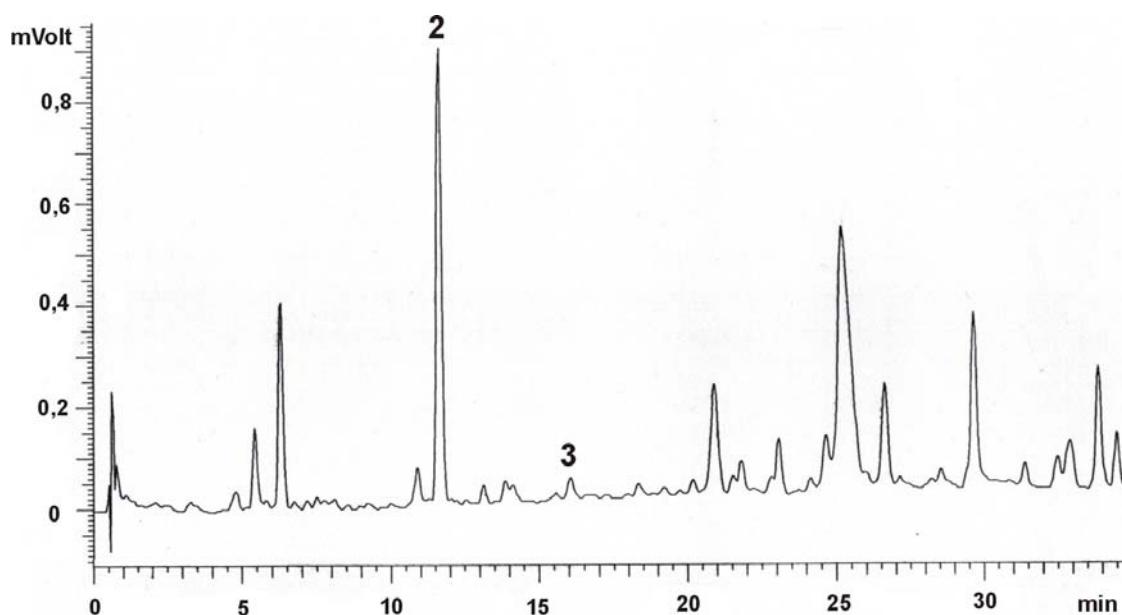
Wyniki chromatografii cienkowarstwowej pochodnych flawan-3-oli w badanym materiale roślinnym potwierdzono metodą HPLC. Warunki rozdzielania czteroskładnikowej mieszaniny flawan-3-oli: katechiny, epikatechiny, galokatechiny oraz galusanu katechiny opracowano na kolumnie Purospher Star RP-18e ($55\text{ mm} \times 4\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$) z użyciem elucji gradientowej w mieszaninie acetonitrylu / woda+kwas ortofosforowy (99,9+0,1, v/v) o liniowo wzrastającym stężeniu acetonitrylu od 2% do 17% ($t_{\text{G}} = 25$ min). Stosowano detekcję UV przy długości fali $\lambda = 280$ nm (Ryc. 63).

Modyfikowany grupami oktadecylowymi żel krzemionkowy (RP-18) jest z powodzeniem stosowany jako adsorbent w rozdzieleniach metodą HPLC katechiny i jej pochodnych: epikatechiny oraz galusanów epigalokatechiny, galokatechiny, epikatechiny i katechiny [13]. W celu zwiększenia selektywności rozdzielania tych związków stosowano również perfluorowany żel krzemionkowy. Grupy fluorowe, wprowadzone do alkilowego łańcucha adsorbentu, warunkowały zmiany w oddziaływaniach między fazą ruchomą i stacjonarną [13].



Ryc. 63. Chromatogram HPLC rozdzielenia mieszaniny substancji wzorcowych: **1** – galokatechina, **2** – katechina, **3** - epikatechina, **4** – galusan katechiny. Kolumna Purospher Star RP-18e (55 mm × 4 mm, 3 μm), elucja gradientowa G₈: A - acetonitryl, B – woda / kwas ortofosforowy 99,9/0,1 v/v, od 2 % do 17% A w A+B (t_G = 25 min), detekcja UV przy λ = 280 nm.

W opracowanych warunkach analizy metodą SPE-HPLC we wszystkich analizowanych gatunkach i klonach jako dominującą zidentyfikowano katechinę przy stosunkowo niewielkich ilościach epikatechiny (Tabl. 31, Ryc. 64). Epikatechiny nie stwierdzono jedynie w korze *S. rosmarinifolia* (7023) i *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026). Odnotowano również występowanie niskich stężeń galusanu katechiny w korach: *S. acutifolia* (7031), *S. alba* (7032), *S. fragilis* (7035), *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020), *S. melanostachy* (7022), *S. purpurea* (7036) i (7037) oraz klonów wierzby purpurowej: 1132 (7010), 1136 (7011), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014). Na ich tle wyróżnia się kora mieszańca *S. × erythroflexuosa* (7019), w której zawartość związku wynosi 0,76 mg/g. Obecność galusanu katechiny chromatograficznie wykazano po raz pierwszy w korze wierzb. Potwierdzeniem tych danych powinna być izolacja związku z materiału roślinnego. Galokatechiny nie ujawniono w żadnym z analizowanych gatunków (Tabl. 31). Dotychczas występowanie tej pochodnej flawan-3-olu odnotowano jedynie w drewnie *S. caprea* [187], natomiast epikatechiny w *S. purpurea* [162].



Ryc. 64. Chromatogram HPLC rozdzielenia ekstraktu metanolowego *S. purpurea* 1101 (7009): **2** – katechina, **3** – epikatechina. Kolumna Purospher Star RP-18e (55 mm × 4 mm, 3 μm), elucja gradientowa G₈: A – acetonitryl, B – woda / kwas ortofosforowy 99,9/0,1 v/v: od 2 % do 17% A w A+B (t_G = 25 min), detekcja UV przy λ = 280 nm.

Dane literaturowe wskazują na znaczne różnice w zawartościach katechiny w gatunkach i klonach wierzb [107,108,159,187]. W drewnie *S. caprea* katechina występuje w stężeniach od 16 mg/g do 24 mg/g, podczas gdy zawartość związku w gałązkach *S. myrsinifolia* waha się od 0,3 mg/g do 1,62 mg/g [107,187].

Za najbogatsze źródło katechiny wśród badanych taksonów uznano odmianę staśmioną wierzby sachalińskiej – *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026) o zawartości związku 18 mg/g kory (Tabl. 31). Kultywar ten zawiera wyższe ilości katechiny niż egzemplarze gatunku rosnące naturalnie w Japonii, w których zawartość związku waha się od 0,94 mg/g do 8,09 mg/g [159]. Ponadto wysokie stężenia katechiny wśród badanych egzemplarzy charakteryzowały korę z *S. melanostachys* (7022) (11,02 mg/g) i *S. alba* (7032) (9,39 mg/g). Natomiast najniższe stężenie katechiny odnotowano dla kory wierzby rokity – *S. rosmarinifolia* (7023) (0,09 mg/g) (Tabl. 31).

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń potwierdzają zmienną zawartość katechiny w korach pochodzących z tego samego gatunku wierzby. Kora *S. purpurea* (7036) zawierała 2,88 mg/g katechiny, podczas gdy kora pochodząca z innego egzemplarza wierzby purpurowej – *S. purpurea* (7037) 5,39 mg/g. Obserwowano również różnice w zawartości katechiny między gatunkami pochodzącymi z warunków naturalnych i upraw a ich klonami. W korze dziko rosnącej wierzby białej – *S. alba* (7032), zawartość katechiny wynosiła 9,39 mg/g, podczas gdy w korze uprawianego klonu *S. alba* 1100 (7001) 3,9 mg/g. Podobne różnicowanie obserwowano dla gatunków i klonów *S. triandra* i *S. viminalis* (Tabl. 31). Wśród egzemplarzy najliczniej reprezentowanego gatunku wierzby – wierzby purpurowej (*S. purpurea*) stężenia katechiny zawierały się między 1,4 mg/g – kora *S. purpurea* klon 1081 (7007) a 7,68 mg/g – kora *S. purpurea* klon 1136 (7011) (Tabl. 31).

Tabl. 31. Zawartość flawan-3-oli w ekstraktach metanolowych z kor gatunków i klonów rodzaju *Salix* oznaczona metodą SPE-HPLC.

Lp.	Kora gatunku lub klonu	Indeks	Zawartość [mg/g]		
			katechina	epikatechina	galusan katechiny
1.	<i>Salix acutifolia</i>	7031	2,16 ± 0,09	0,11 ± 0,03	0,05 ± 0,006
2.	<i>S. alba</i>	7032	9,39 ± 0,17	0,46 ± 0,03	0,03 ± 0,002
3.	<i>S. alba</i> klon 1100	7001	3,90 ± 0,08	0,27 ± 0,05	-
4.	<i>S. x americana</i> klon 1036	7002	3,50 ± 0,11	0,24 ± 0,07	-
5.	<i>S. amygdalina x viminalis</i> klon 1155	7003	2,10 ± 0,07	0,12 ± 0,01	-
6.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095	7004	1,90 ± 0,07	0,68 ± 0,05	-
7.	<i>S. daphnoides</i>	7033	2,60 ± 0,09	0,42 ± 0,04	0,05 ± 0,005
8.	<i>S. eriocephala</i>	7034	3,37 ± 0,11	0,03 ± 0,005	0,01 ± 0,002
9.	<i>S. x erythroflexuosa</i>	7019	1,04 ± 0,05	0,41 ± 0,02	0,76 ± 0,05
10.	<i>S. fragilis</i>	7035	7,60 ± 0,15	0,46 ± 0,06	0,01 ± 0,003
11.	<i>S. fragilis</i> var. <i>sphaerica</i>	7020	4,02 ± 0,10	0,17 ± 0,02	0,01 ± 0,002
12.	<i>S. herbacea</i>	7030	*	*	*
13.	<i>S. lapponum</i>	7021	1,87 ± 0,07	0,14 ± 0,03	-
14.	<i>S. matsudana</i> 'Tortuosa'	7028	5,13 ± 0,09	0,32 ± 0,01	-
15.	<i>S. melanostachys</i>	7022	11,02 ± 0,13	0,48 ± 0,06	0,10 ± 0,01
16.	<i>S. nakamura</i> var. <i>yezoalpina</i>	7025	5,79 ± 0,09	0,19 ± 0,04	-
17.	<i>S. purpurea</i>	7036	2,88 ± 0,07	0,21 ± 0,02	0,07 ± 0,003
18.	<i>S. purpurea</i>	7037	5,39 ± 0,10	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,04
19.	<i>S. purpurea</i> klon 1038	7005	2,00 ± 0,09	0,49 ± 0,06	-
20.	<i>S. purpurea</i> klon 1067	7006	4,20 ± 0,08	0,30 ± 0,07	-
21.	<i>S. purpurea</i> klon 1081	7007	1,40 ± 0,04	0,11 ± 0,006	-
22.	<i>S. purpurea</i> klon 1084	7008	3,50 ± 0,08	0,31 ± 0,02	-
23.	<i>S. purpurea</i> klon 1101	7009	2,20 ± 0,08	0,11 ± 0,01	-
24.	<i>S. purpurea</i> klon 1132	7010	6,12 ± 0,11	0,20 ± 0,05	0,14 ± 0,02
25.	<i>S. purpurea</i> klon 1136	7011	7,68 ± 0,07	0,41 ± 0,03	0,10 ± 0,007
26.	<i>S. purpurea</i> klon 1153	7012	5,13 ± 0,06	0,27 ± 0,07	0,01 ± 0,003
27.	<i>S. purpurea</i> klon 1156	7013	5,45 ± 0,09	0,53 ± 0,04	0,01 ± 0,003
28.	<i>S. purpurea</i> klon 1157	7014	7,21 ± 0,11	0,42 ± 0,04	0,02 ± 0,004
29.	<i>S. purpurea x daphnoides</i> klon 1107	7015	1,80 ± 0,04	0,39 ± 0,03	-
30.	<i>S. rosmarinifolia</i>	7023	0,09 ± 0,01	-	-
31.	<i>S. sachalinensis</i> 'Sekka'	7026	18,00 ± 0,21	-	-
32.	<i>S. x sepulcralis</i>	7027	6,46 ± 0,11	0,14 ± 0,04	-
33.	<i>S. silesiaca</i>	7024	*	*	*
34.	<i>S. triandra</i> klon 1044	7016	0,92 ± 0,08	0,15 ± 0,02	-
35.	<i>S. triandra</i> klon 1045	7017	0,67 ± 0,08	0,10 ± 0,006	-
36.	<i>S. triandra</i>	7038	6,21 ± 0,16	0,15 ± 0,01	-
37.	<i>S. viminalis</i>	7029	5,40 ± 0,09	0,24 ± 0,01	-
38.	<i>S. viminalis</i> klon 1083	7018	0,69 ± 0,06	0,10 ± 0,006	-
39.	<i>S. alba</i> + <i>S. purpurea</i>	7039	*	*	*
40.	<i>S. alba</i> lub <i>S. purpurea</i>	7040	*	*	*
41.	<i>S. purpurea</i>	7041	*	*	*
42.	<i>S. purpurea</i>	7042	*	*	*
43.	<i>S. purpurea</i>	7043	1,57 ± 0,06	0,37 ± 0,06	-

Objaśnienia:

(-) - związek nie występuje

(*) - nie oznaczano

Epikatechina występowała w znacznie niższych koncentracjach, mianowicie najwyższe jej stężenie ujawniono w korze *S. daphnoides* klon 1095 (7004) i wynosiło ono 0,68 mg/g, natomiast najniższe – 0,03 mg/g, w korze *S. eriocephala* (7034) (Tabl. 31).

Galusan katechiny w najwyższym stężeniu – 0,76 mg/g, był obecny w wierzbie żółtopędowej – *S. × eythroflexuosa* (7019), pochodzącej z upraw. W pozostałych badanych egzemplarzach wierzby koncentracje estru kwasu galusowego katechiny były niskie – na poziomie od 0,01 mg/g do 0,14 mg/g (Tabl. 31).

Badano możliwość wykorzystania opracowanych warunków rozdzielania mieszaniny czterech flawan-3-oli metodą MGD-HPTLC do analizy ilościowej tych związków. W tym celu przeprowadzono walidację metody w oparciu o badanie liniowości, granicy wykrywalności i oznaczalności, precyzji aparatu, powtarzalności i precyzji pośredniej (Tabl. 3) dla zastosowanych sposobów detekcji. Analizę ilościową prowadzono densytometrycznie przy użyciu densytometru CD 60 (Desaga) stosując skanowanie meandrem przed ($\lambda = 282$ nm) (metoda 1) i po derywatywacji odczynnikiem wanilinowym ($\lambda = 500$ nm) (metoda 2).

Metoda 1 charakteryzowała się lepszą precyzją aparatu ($CV_1 = 0,63$ wobec $CV_2 = 1,30$), powtarzalnością ($CV_1 = 0,92$ wobec $CV_2 = 12,15$) i precyzją pośrednią ($CV_1 = 1,30$ wobec $CV_2 = 12,92$), natomiast zastosowanie derywatywacji odczynnikiem wanilinowym obniżało wartości granicy wykrywalności (np. katechina 60 ng i 25 ng, odpowiednio) i oznaczalności (200 ng i 85 ng) (Tabl. 32).

Tabl. 32. Wartości granicy wykrywalności (LOD) i granicy oznaczalności (LOQ) katechiny i jej pochodnych przy użyciu różnych sposobów detekcji: w świetle UV o $\lambda = 282$ nm i derywatywacja mieszaniną etanolowego roztworu waniliny w H_3PO_4 ($\lambda = 500$ nm).

Substancja wzorcowa	Granica wykrywalności LOD [ng]		Granica oznaczalności LOQ [ng]	
	sposób detekcji		sposób detekcji	
	UV $\lambda = 282$ nm	wanilina/ H_3PO_4	UV $\lambda = 282$ nm	wanilina/ H_3PO_4
Katechina	60	25	200	85
Epikatechina	35	10	120	35
Galusan	90	30	300	100
Galokatechina	40	30	135	100

Biorąc pod uwagę powyższe dane zawartość katechiny metodą SPE-HPTLC analizowano w 13 wybranych klonach rodzaju *Salix*, stosując detekcję w świetle UV o długości fali $\lambda = 282$ nm. Otrzymane wyniki skorelowano z danymi otrzymanymi przy pomocy analizy HPLC (Tabl. 33). Współczynnik korelacji danych z obu metod wyniósł 0,98.

Opracowana metoda SPE-HPTLC jest precyzyjna i powtarzalna, a jej jedynym ograniczeniem wobec metody SPE-HPLC, jest wyższa wartość granicy wykrywalności i oznaczalności badanych związków.

Tabl. 33. Zawartość katechiny [mg/g] w korze 13 klonów rodzaju *Salix* oznaczona metodą SPE-HPTLC i SPE-HPLC.

Lp	Klon	Zawartość katechiny [mg/g] oznaczona metodą	
		SPE-HPTLC	SPE-HPLC
1.	<i>Salix alba</i> klon 1100	3,88 ± 0,17	3,90 ± 0,08
2.	<i>S. x americana</i> klon 1036	2,76 ± 0,23	3,50 ± 0,11
3.	<i>S. amygdalinax viminalis</i> klon 1155	2,10 ± 0,11	2,10 ± 0,07
4.	<i>S. daphnoides</i> klon1095	1,62 ± 0,09	1,90 ± 0,07
5.	<i>S. purpurea</i> klon 1038	1,98 ± 0,10	2,00 ± 0,09
6.	<i>S. purpurea</i> klon 1067	4,28 ± 0,21	4,20 ± 0,08
7.	<i>S. purpurea</i> klon 1081	1,32 ± 0,07	1,40 ± 0,04
8.	<i>S. purpurea</i> klon 1084	3,45 ± 0,15	3,50 ± 0,08
9.	<i>S. purpurea</i> klon 1101	1,81 ± 0,09	2,20 ± 0,08
10.	<i>S. purpurea x daphnoides</i> klon 1107	1,34 ± 0,10	1,80 ± 0,04
11.	<i>S. triandra</i> klon 1044	0,87 ± 0,07	0,92 ± 0,08
12.	<i>S. triandra</i> klon 1045	0,69 ± 0,05	0,67 ± 0,08
13.	<i>S. viminalis</i> klon 1083	0,72 ± 0,07	0,69 ± 0,06

4.2. Omówienie wyników analizy jakościowej i ilościowej procyjanidyn B₁ i B₂.

W rodzaju *Salix* powszechnie występują garbniki skondensowane [9,67,124,165,170,173-176]. W niektórych gatunkach stanowią one obok glikozydów fenolowych dominującą grupę związków czynnych o składzie chemicznym rozpoznany w niewielkim stopniu [175]. Behrens i wsp. [9] w badaniach metodą MALDI-TOF MS i ¹³C NMR wykazali, że garbniki, występujące w gałęziach *S. alba*, zbudowane są z fragmentów katechiny i epikatechiny. Jednostki katechiny oraz epikatechiny budują struktury o charakterze di-, oligo- i polimerów proantocyjanidyn [9]. Dotychczas występowanie form dimerycznych procyjanidyn – procyjanidyn B₃, B₆ i B₇ obok trimeru C₂, ujawniono w *S. caprea* [44,67,124], procyjanidyny B₇ i C₄ obok arekataniny A₁ w *S. sieboldiana* [67] oraz katechino-(4α→8)-katechiny, galokatechino-(4α→8)-katechiny oraz wyższych polimerów – dekamerów proantocyjanidyn pochodnych 2,3-*cis* i 2,3-*trans* prodelfinidyny i procyjanidyny w *S. pet-susu* [170].

W analizie proantocyjanidyn w surowcach roślinnych, najczęściej wykorzystuje się metodę HPLC w układzie faz odwróconych [28,180,220]. Uwzględniając dużą liczbę badanych kor wierzb, postanowiono opracować warunki analizy dimerycznych pochodnych katechiny: procyjanidyny B₁ i B₂ metodą TLC. Zaletą chromatografii planarnej jest możliwość przeprowadzenia w stosunkowo krótkim czasie analizy jakościowej i ilościowej serii prób w jednym rozdzielaniu chromatograficznym [32,168].

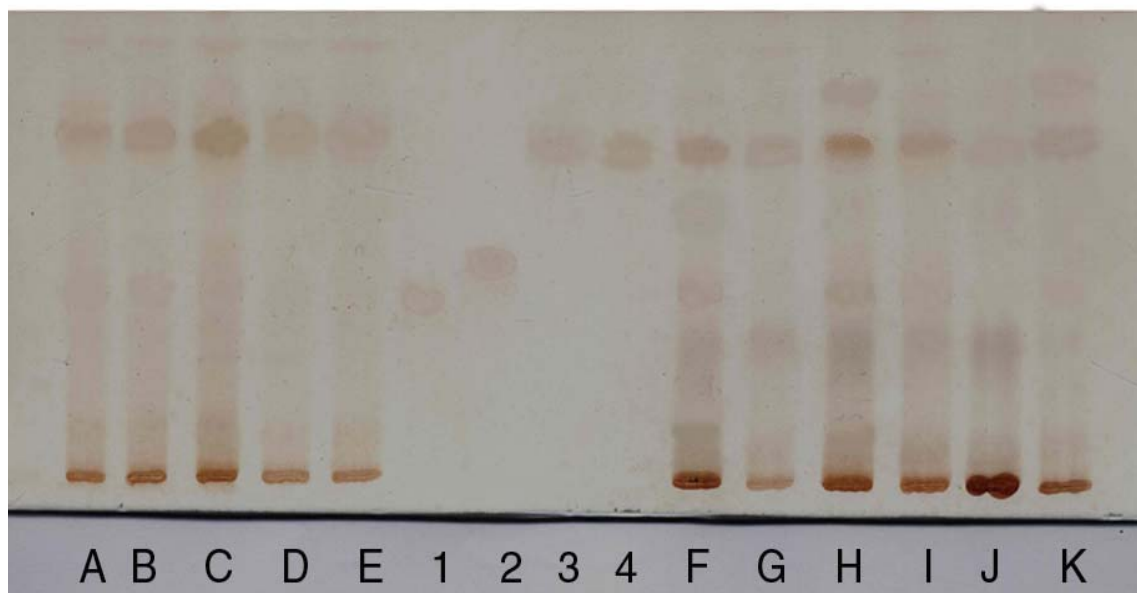
Wstępne rozdzielania TLC przeprowadzono w powszechnie stosowanych w analizie proantocyjanidyn układach chromatograficznych na złożu celulozowym oraz żelu krzemionkowym [2,191,221] (Tabl. 34). Ponadto wykorzystano stosowany wcześniej w analizie dimerów flawonoidowych w różnych matrycach roślinnych, układ

chromatograficzny stanowiący jako adsorbent poliamid oraz fazę ruchomą: chloroform / metanol / keton metylo-etylowy (40+20+30, v/v/v) (Tabl. 34).

Tabl. 34. Wartości współczynników hR_F ($R_F \times 100$) procyjanidyn B_1 , B_2 i (+)-katechiny w różnych układach chromatograficznych.

Faza stacjonarna	Układ chromatograficzny Faza ruchoma	Wartości hR_F		
		procyjanidyna B_1	procyjanidyna B_2	katechyna
HPTLC Si 60	chloroform/etanol/kwas mrówkowy 50+40+6, v/v (S_{17})	66	74	94
	octan etylu/kwas mrówkowy/kwas octowy/woda 75+3+2+15, v/v (S_{19}) [14]	64	67	83
	aceton/woda/kwas mrówkowy 90+5+5, v/v (S_{21}) [191]	72	73	92
	octan etylu/dichlorometan/metanol/kwas mrówkowy 60+40+17+6, v/v (S_{20})	27	32	66
	toluen/aceton/kwas mrówkowy 30+60+10, v/v (S_{18}) [191]	71	71	93
HPTLC RP-18W	metanol/woda/kwas mrówkowy 23+77+6, v/v (S_{27})	39	31	35
HPTLC Chromospher RP 18W	tetrahydrofuran/woda/kwas mrówkowy 30+70+6, v/v (S_{31})	46	37	40
	metanol/woda/kwas mrówkowy 23+77+6, v/v (S_{27})	62	57	51
HPTLC Diol	octan etylu/chloroform/metanol 70+20+10, v/v (S_{36})	8	10	12
HPTLC CN	heksan/aceton 50+50, v/v (S_{49})	23	26	40
TLC Poliamid	chloroform/metanol/keton metylo-etylowy 40+20+30, v/v (S_{14})	25	34	59
	chloroform/metanol/keton metylo-etylowy/kwas mrówkowy 40+20+30+6, v/v (S_{15})	20	30	54
TLC Si 60	chloroform/etanol/kwas mrówkowy 50+40+6, v/v (S_{17})	53	64	89
	toluen/aceton/kwas mrówkowy 30+60+10, v/v (S_{18}) [191]	25	27	59
TLC Celuloza	butanol/kwas octowy/woda 30+10+10, v/v (S_9) [12]	53	59	76

Najlepsze rozdzielanie związków wzorcowych uzyskano na adsorbencie poliamidowym, który wykorzystano do wstępnej oceny obecności procyjanidyn B_1 i B_2 w badanych korach wierzb (Ryc. 65).



Ryc. 65. Chromatogram TLC rozdzielania ekstraktów metanolowych z kory wierzb oraz substancji wzorcowych: **A** – wyciąg metanolowy z kory *S. purpurea* (7036), **B** – wyciąg metanolowy z kory *S. purpurea* (7039), **C** – wyciąg metanolowy z kory *S. purpurea* (7042), **D** – wyciąg metanolowy z kory *S. purpurea* 1081 (7007), **E** – wyciąg metanolowy z kory *S. purpurea* 1038 (7005), **F** – wyciąg metanolowy z kory *S. purpurea* 1067 (7006), **G** – wyciąg metanolowy z kory *S. purpurea x daphnoides* 1107 (7015), **H** – wyciąg metanolowy z kory *S. alba* 1100 (7001), **I** – wyciąg metanolowy z kory *S. purpurea* 1101 (7009), **J** – wyciąg metanolowy z kory *S. eriocephala* (7034), **K** – wyciąg metanolowy z kory *S. triandra* 1045 (7016), **1** – procyjanidyna B_1 , **2** – procyjanidyna B_2 , **3** – katechyna, **4** – epikatechyna. Adsorbent: poliamid, faza ruchoma: chloroform / metanol / keton metyloetylowy 4+2+3, v/v).

Wizualizację chromatogramów prowadzono z użyciem jako odczynnika derywatyzującego mieszaniny etanolowego roztworu waniliny i kwasu ortofosforowego [240] ($t = 75^{\circ}\text{C}$). Odczynnik ten w przeciwieństwie do równolegle zastosowanych: roztworu waniliny w stężonym kwasie solnym [191] i stężonego kwasu siarkowego [99] dawał trwale wybarwione, różowo-czerwone plamy analizowanych związków. Ponadto w porównaniu do detekcji w świetle UV przy długości fali $\lambda = 254 \text{ nm}$, umożliwił obniżenie granicy wykrywalności (LOD) procyanidyny B₁ z 300 ng na 50 ng.

W oparciu o porównanie wartości współczynników opóźnienia – hR_F rozdzielonych składników ekstraktów z substancjami wzorcowymi stwierdzono obecność procyanidyny B₁ ($hR_F = 25$) w 30 badanych korach wierzby (Tabl. 35).

Jest to pierwsze doniesienie o obecności procyanidyny B₁ w wierzbach i jego potwierdzeniem są wyniki badań Nahrstedta i wsp. [162] prezentowane na tegorocznej 54 Konferencji Towarzystwa Badań Roślin Leczniczych w Helsinkach.

Dla celów analizy ilościowej procyanidyny B₁ metodą TLC w korze wierzby optymalizowano warunki rozdzielania chromatograficznego pochodnych flawan-3-olu.

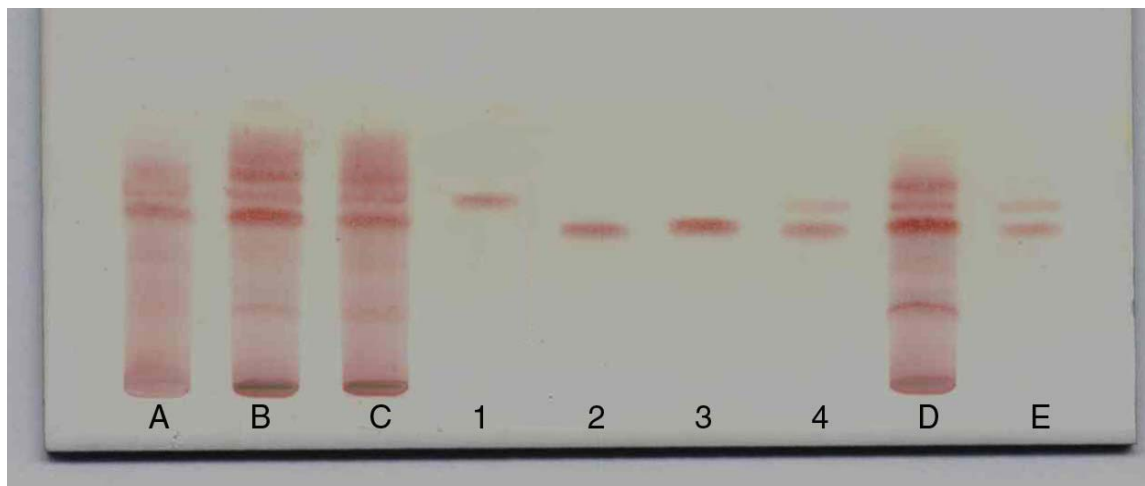
Eksperymenty prowadzono w układzie faz normalnych stosując jako adsorbenty żel krzemionkowy i modyfikowane grupami diolowymi lub propylocyanowymi żele krzemionkowe oraz w układzie faz odwróconych przy użyciu złożów typu RP-18W i Lichrospher RP-18W. W układach NP fazy ruchome stanowiły trój- i czteroskładnikowe mieszaniny rozpuszczalników: chloroformu, heksanu, acetonu, metanolu, octanu etylu, dichlorometanu, butanolu, etanolu i kwasu mrówkowego (Tabl. 34). Natomiast w układach RP typowe mieszaniny wody i organicznych modyfikatorów – metanolu, tetrahydrofuranu i acetonitrylu.

Sferyczna struktura cząstek żelu krzemionkowego typu Lichrospher powoduje zawężenie dystrybucji masy rozdzielanych substancji, co zwiększa sprawność układu i umożliwia analizę niższych stężeń badanych związków (dziesięciokrotne zwiększenie stosunku przenieszonej masy do szumu) [32,168].

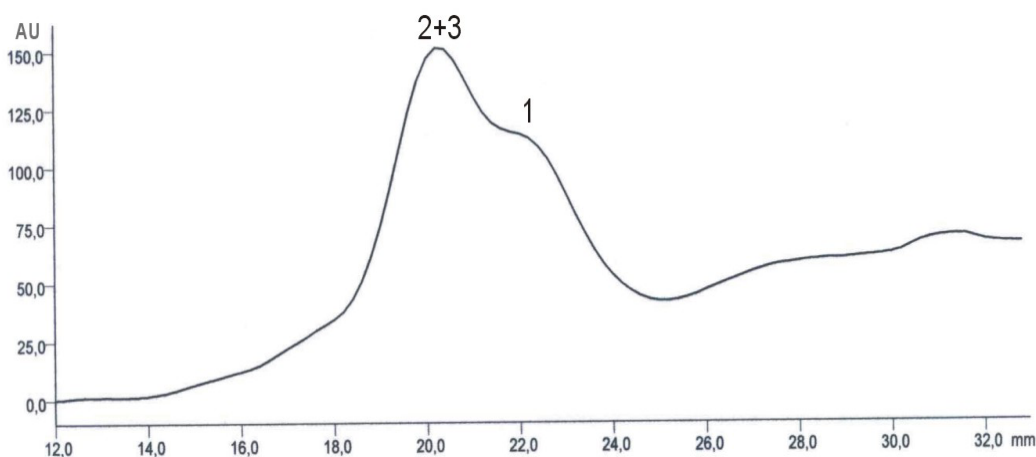
W układzie RP najkorzystniejsze rozdzielanie mieszaniny substancji wzorcowych uzyskano na płytkach HPTLC RP-18W przy użyciu fazy ruchomej: metanol / woda / kwas mrówkowy (23+77+6, v/v/v) (Ryc. 66, Tabl. 34).

Analiza densytometryczna otrzymanych chromatogramów (Ryc. 67) i ocena wartości współczynnika separacji (rozdzielenia) R_s procyanidyny B₁ i katechiny wykazała zbyt niską wartość R_s wynoszącą 0,54, aby opracowane układy mogły być zastosowane do oznaczeń ilościowych. Przyjmuje się, że dobre rozdzielanie dwóch substancji powinno charakteryzować się współczynnikiem separacji R_s wynoszącym powyżej 0,8 [146]. Na selektywność

rozdzielenia wyrażoną wartością R_s lub α (selektywność) mają wpływ poza strukturą i właściwościami fizykochemicznymi chromatografowanych substancji, przede wszystkim temperatura rozdziału, skład i pH fazy ruchomej oraz rodzaj adsorbentu i grubość jego warstwy [146].



Ryc. 66. Chromatogram HPTLC rozdzielenia surowych i oczyszczonych metodą SPE ekstraktów metanolowych z kory wierzb oraz substancji wzorcowych: **A** – wyciąg metanolowy z kory *Salix purpurea* (7042), **B** – wyciąg metanolowy z kory *S. fragilis* (7035), **C** – wyciąg metanolowy z kory *S. eriocephala* (7034), **D** – wyciąg metanolowy z kory *S. alba* 1100 (7001), **E** - oczyszczony metodą SPE wyciąg metanolowy z kory *S. alba* 1100 (7001), **1** – procyanidyna B₁, **2** – procyanidyna B₂, **3** - katechina, **4** – mieszanina wzorców 1, 2, 3. Adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC RP-18W, faza ruchoma: metanol / woda / kwas mrówkowy (23+77+6, v/v/v).

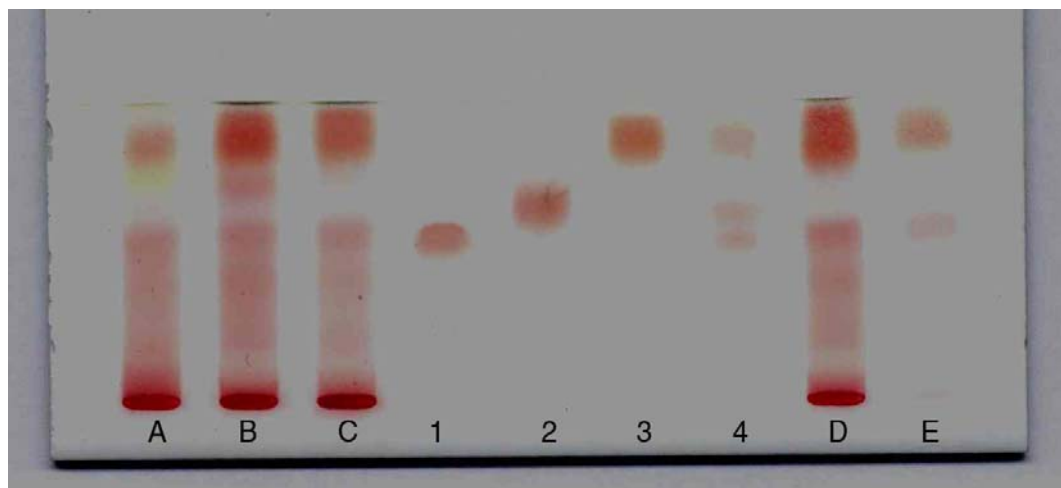


Ryc. 67. Densytogram rozdzielenia mieszaniny substancji wzorcowych: **1** – procyanidyna B₁, **2** – procyanidyna B₂, **3** - katechina. Adsorbent: żel krzemionkowy HPTLC RP-18W, faza ruchoma: metanol / woda / kwas mrówkowy (23+77+6, v/v/v).

Z kolei w układach NP procyanidyny B₁ i B₂ rozdzielały się z niską wartością ΔhR_F podobnie, jak we wcześniejszych rozdzieleniach na żelu krzemionkowym z użyciem faz ruchomych stosowanych standardowo w analizie proantocyjanidyn, m.in. w *Rhei radix* i *Crataegi inflorescentia* [191,221]. Na płytkach pokrytych adsorbentem cyjanowym – HPTLC CN przy użyciu fazy ruchomej heksan / aceton (50+50, v/v) uzyskano dobrą separację katechiny od procyanidyn ($\Delta hR_F = 17$) przy słabej separacji procyanidyny B₁ od B₂ ($\Delta hR_F = 3$) (Tabl. 34).

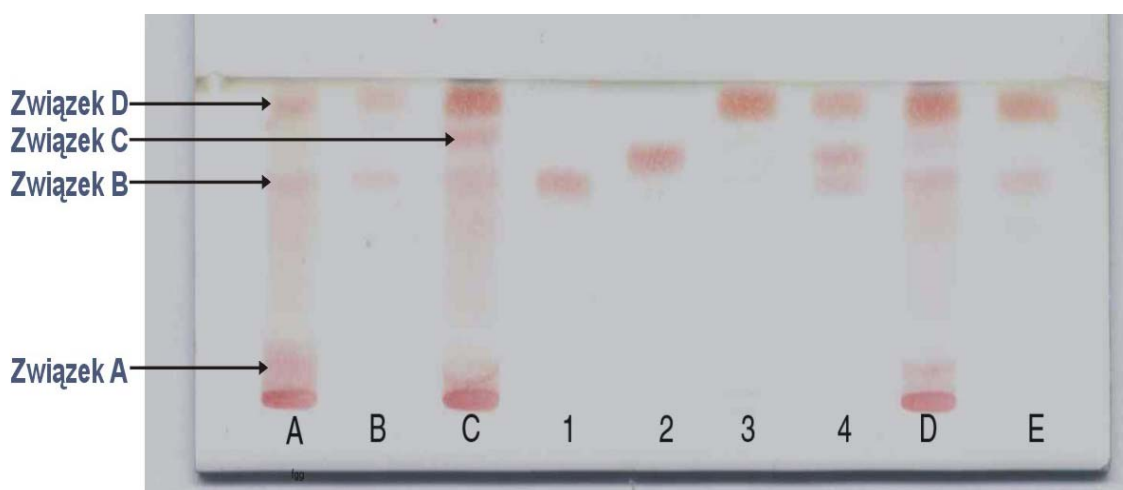
Dążąc do weryfikacji danych uzyskanych na poliamidzie i biorąc pod uwagę stosunkowo wysokie koszty zakupu płytek HPTLC CN dalsze doświadczenia prowadzono na nie modyfikowanym żelu krzemionkowym typu TLC i HPTLC.

W rezultacie przeprowadzonych eksperymentów najlepsze rozdzielanie analizowanych substancji otrzymano w układzie faz normalnych stosując fazę ruchomą: chloroform / etanol / kwas mrówkowy 50+40+6 (v/v/v) na żelu krzemionkowym typu TLC i HPTLC jako fazie stacjonarnej (Tabl. 34) (Ryc. 68,69).



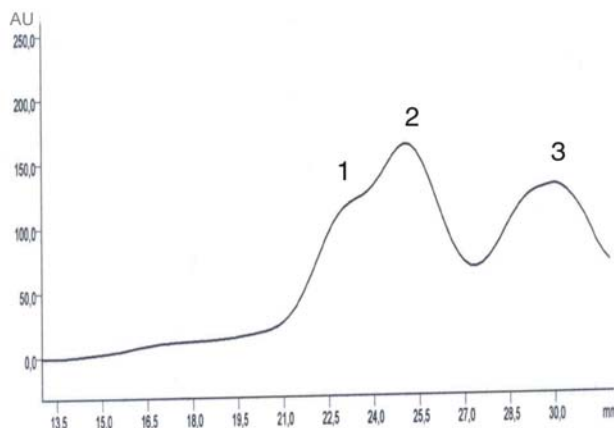
Ryc. 68. Chromatogram TLC rozdzielania surowych i oczyszczonych metodą SPE ekstraktów metanolowych z kory wierzb oraz substancji wzorcowych: **A** – wyciąg metanolowy z kory *S. purpurea* (7042), **B** – wyciąg metanolowy z kory *S. fragilis* (7035), **C** - wyciąg metanolowy z kory *S. eriocephala* (7034), **D** – wyciąg metanolowy z kory *S. alba* 1100 (7001), **E** – oczyszczony metodą SPE wyciąg metanolowy z kory *S. alba* 1100 (7001), **1** – procyanidyna B₁, **2** – procyanidyna B₂, **3** – katechina, **4** - mieszanina wzorców 1, 2, 3. Adsorbent: żel krzemionkowy, faza ruchoma: chloroform / etanol / kwas mrówkowy 50+40+6, v/v/v.

Ostatecznie zastosowano płytki HPTLC o mniejszych rozmiarach ziaren, aby poprawić selektywność układu chromatograficznego (Ryc. 69).



Ryc. 69. Chromatogram HPTLC rozdzielania surowych i oczyszczonych metodą SPE ekstraktów metanolowych z kory wierzb oraz substancji wzorcowych: **A** – wyciąg metanolowy z kory *S. purpurea* (7042), **B** – oczyszczony metodą SPE wyciąg metanolowy z kory *S. purpurea* (7042), **C** – wyciąg metanolowy z kory *S. fragilis* (7035), **D** – wyciąg metanolowy z kory *S. alba* 1100 (7001), **E** – oczyszczony metodą SPE wyciąg metanolowy z kory *S. alba* 1100 (7001), **1** – procyanidyna B₁, **2** - procyanidyna B₂, **3** – katechina, **4** – mieszanina wzorców 1, 2, 3. Adsorbent: żel krzemionkowy, faza ruchoma: chloroform / etanol / kwas mrówkowy 50+40+6, v/v/v.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono w komorach pionowych i poziomej typu DS II, porównując rozdzielanie mieszaniny substancji wzorcowych na dystansie 2 cm i 4 cm. W dalszym etapie pracy, ze względu na otrzymane lepsze parametry współczynników zatrzymania związków, zastosowano komorę pionową (100 mm × 60 mm × 90 mm) i rozwijanie chromatogramów na dystansie 4 cm (Ryc. 69,70).



Ryc. 70. Densytogram rozdzielania HPTLC procyanidyny B₁, B₂ i katechiny: **1** – procyanidyna B₁, **2** – procyanidyna B₂, **3** - katechyna. Adsorbent: żel krzemionkowy, eluent: chloroform / etanol / kwas mrówkowy 50+40+6,v/v/v, komora pionowa, odczynnik wywołujący: etanolowy roztwór waniliny w H₃PO₄, λ=500 nm.

Opracowane warunki rozdzielania ujawniły obecność czterech związków o charakterze flawan-3-oli – związki A, B, C i D (Ryc. 8). Związek A o wartości $hR_F = 46$ występował w 33 ekstraktach, związek B o wartości $hR_F = 66$ zgodnym z hR_F procyanidyny B₁ w 30 ekstraktach i związek C o wartości $hR_F = 80$ w 22 obok związku D ($hR_F = 93$), zidentyfikowanego jako katechyna (Tabl. 31, 35). Biorąc pod uwagę dane literaturowe [191] można przypuszczać, że związek C jest trimerem flawan-3-olu, prawdopodobnie procyanidyną C.

Obecność procyanidyny B₁ obserwowano w korach następujących gatunków i klonów: *S. alba* (7032) i jej klonie 1100 (7001), *S. daphnoides* (7033) i klon 1095 (7004), *S. purpurea* (7036), (7037), (7042) i jej klonach: 1067 (7006), 1132 (7010), 1136 (7011), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014), *S. × sepulcralis* (7027), *S. triandra* (7038) i klonach 1044 (7016), 1045 (7017), *S. viminalis* (7029), *S. fragilis* (7035) i (7020), *S. melanostachys* (7022), *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026), *S. matsudana* ‘Tortuosa’ (7028), *S. eriocephala* (7034) i *S. herbacea* (7030) (Tab. 35).

Uwzględniając obecność w ekstraktach metanolowych z kory wierzby niezidentyfikowanych substancji towarzyszących procyanidynie B₁, do celów ilościowej analizy densytometrycznej opracowano warunki oczyszczania analizowanych matryc

roślinnych metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE). W procesie optymalizacji zastosowano kolumny szklane wypełnione modyfikowanym żelem krzemionkowym LiChrorep C-18 (150 mg i 300 mg), które kondycjonowano mieszaniną metanol / woda 7+93 (v/v). Po naniesieniu próby zawierającej badane związki, kolumnę wmywano tym samym eluentem (6 ml).

Tabl. 35. Obecność procyanidyny B₁ w wyciągach metanolowych z kory wierzby oznaczona metodą TLC i HPTLC.

Lp.	Kora gatunku lub klonu	Indeks	związek A	procyanidyna B ₁	związek C
1.	<i>Salix acutifolia</i>	7031	+	-	-
2.	<i>S. alba</i>	7032	+	+	+
3.	<i>S. alba</i> klon 1100	7001	+	+	-
4.	<i>S. x americana</i> klon 1036	7002	-	-	-
5.	<i>S. amygdalina x viminalis</i> klon 1155	7003	-	-	+
6.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095	7004	+	+	-
7.	<i>S. daphnoides</i>	7033	+	+	-
8.	<i>S. eriocephala</i>	7034	+	+	+
9.	<i>S. x erythroflexuosa</i>	7019	-	-	-
10.	<i>S. fragilis</i>	7035	+	+	+
11.	<i>S. fragilis</i> var. <i>sphaerica</i>	7020	+	+	+
12.	<i>S. herbacea</i>	7030	+	+	+
13.	<i>S. lapponum</i>	7021	+	-	+
14.	<i>S. matsudana</i> 'Tortuosa'	7028	+	+	+
15.	<i>S. melanostachys</i>	7022	+	+	-
16.	<i>S. nakamura</i> var. <i>yezoalpina</i>	7025	+	+	-
17.	<i>S. purpurea</i>	7036	+	+	+
18.	<i>S. purpurea</i>	7037	+	+	+
19.	<i>S. purpurea</i> klon 1038	7005	-	-	-
20.	<i>S. purpurea</i> klon 1067	7006	+	+	-
21.	<i>S. purpurea</i> klon 1081	7007	-	-	-
22.	<i>S. purpurea</i> klon 1084	7008	-	-	-
23.	<i>S. purpurea</i> klon 1101	7009	-	-	-
24.	<i>S. purpurea</i> klon 1132	7010	+	+	-
25.	<i>S. purpurea</i> klon 1136	7011	+	+	-
26.	<i>S. purpurea</i> klon 1153	7012	+	+	+
27.	<i>S. purpurea</i> klon 1156	7013	+	+	+
28.	<i>S. purpurea</i> klon 1157	7014	+	+	+
29.	<i>S. purpurea x daphnoides</i> klon 1107	7015	+	-	-
30.	<i>S. rosmarinifolia</i>	7023	-	-	-
31.	<i>S. sachalinensis</i> 'Sekka'	7026	+	+	+
32.	<i>S. x sepulcralis</i>	7027	+	+	+
33.	<i>S. silesiaca</i>	7024	-	-	-
34.	<i>S. triandra</i> klon 1044	7016	+	+	+
35.	<i>S. triandra</i> klon 1045	7017	+	+	+
36.	<i>S. triandra</i>	7038	+	+	+
37.	<i>S. viminalis</i>	7029	+	+	+
38.	<i>S. viminalis</i> klon 1083	7018	-	-	-
39.	<i>S. alba</i> + <i>S. purpurea</i>	7039	+	+	+
40.	<i>S. alba</i> lub <i>S. purpurea</i>	7040	+	+	+
41.	<i>S. purpurea</i>	7041	+	+	+
42.	<i>S. purpurea</i>	7042	+	+	-
43.	<i>S. purpurea</i>	7043	+	+	-

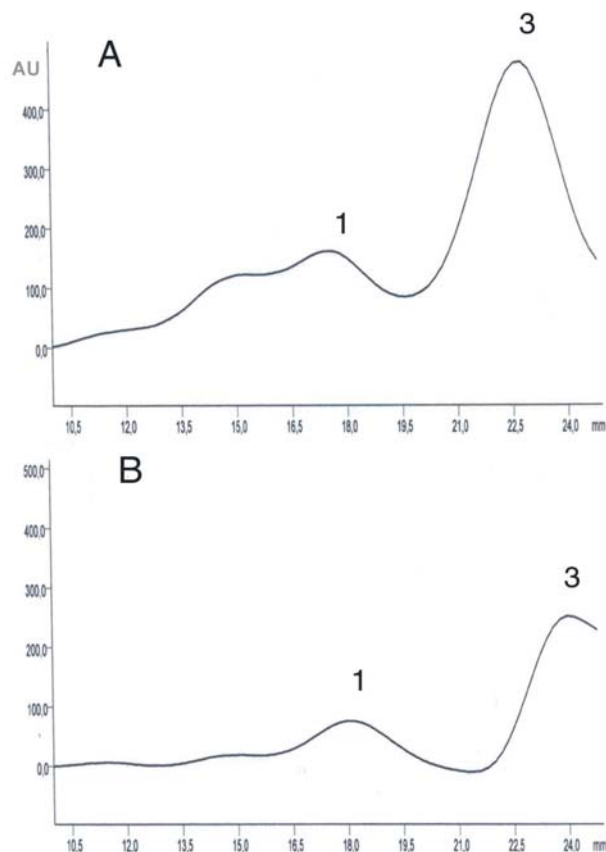
Objaśnienia:

(+) – stwierdzono obecność związku

(-) - związek nie występuje

Uwzględniając wyższą wydajność i krótszy czas analizy, ekstrakty oczyszczano na kolumnie wypełnionej 150 mg adsorbentu, który wymywano 6 ml mieszaniny metanol / woda 7+93 (v/v).

Wartość odzysku procyjanidyny B₁ w omawianej metodzie SPE oznaczono jako 89,9% ± 2,1.



Ryc. 71. Densytogramy HPTLC rozdzielania: **A** – wyciągu metanolowego z kory *S. purpurea* 1132 (7010), **B** – oczyszczonego metodą SPE wyciągu metanolowego z kory *S. purpurea* 1132 (7010) **1** – procyjanidyna B₁, **3** – katechina. Adsorbent: żel krzemionkowy, faza ruchoma: chloroform / etanol / kwas mrówkowy 50+40+6, v/v, odczynnik wywołujący: etanolowy roztwór waniliny w H₃PO₄, λ=500 nm.

Analizę ilościową przeprowadzono dla ekstraktów z kory uznanych za reprezentatywne dla badanych wierzb na podstawie różnic zabarwienia plam na chromatogramach TLC (odczynnik wanilinowy), mianowicie *Salix alba* 1100 (7001), *S. purpurea* (7036), (7042) i klonów 1132 (7010) oraz 1067 (7006), *S. eriocephala* (7034), *S. fragilis* (7035), *S. matsudana* ‘Tortuosa’ (7028) i *S. × sepulcralis* (7027) (Tabl. 36, Ryc. 71).

Podsumowując wyniki analiz jakościowych i ilościowych dimerów flawan-3-oli stwierdzono, że najwyższą zawartością procyjanidyny B₁ wśród badanych gatunków charakteryzuje się kora klonu wierzy białej – *S. alba* klon 1100 (7001) (2,24 mg/g suchego surowca), w przeciwieństwie do kory mieszańca wierzy białej i wierzy babilońskiej – *S. × sepulcralis* (7027) (0,16 mg/g) (Tabl. 36) oraz kory wierzy białej (7032) pochodzącej

z warunków naturalnych zawierającej śladowe ilości związku (Tabl. 35,36). Podobne różnice obserwowano dla kor 10 klonów wierzby purpurowej (*S. purpurea*) pochodzących z kolekcji wierzb Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. W czterech klonach: 1038 (7005), 1081 (7007), 1084 (7008), 1101 (7009) nie potwierdzono obecności tego dimeru (Tabl. 35). W pozostałych klonach *S. purpurea* występowała procyjanidyna B₁, przy czym jej zawartość w klonie 1067 (7006) wynosiła 0,26 mg/g, a w 1132 (7010) 0,42 mg/g suchej kory. Zbliżone zawartości tego związku odnotowano w korach *S. purpurea* (7036) i (7042), pochodzących ze stanowisk naturalnych (Tabl. 36). Natomiast w obrębie gatunku *Salix viminalis* obecności procyjanidyny B₁ nie wykazano w korze klonu *S. viminalis* 1083 (7018) z kolekcji wierzb Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, w przeciwieństwie do kory wierzby wiciowej (7029) z Ogrodu Roślin Leczniczych AMG (Tabl. 35).

Po raz pierwszy stwierdzono występowanie wysokich, w porównaniu do pozostałych, ilości procyjanidyny B₁ w korze *S. eriocephala* (7034) (0,80 mg/g), *S. fragilis* (7035) (0,57 mg/g) i *S. matsudana* 'Tortuosa' (7028) (0,42 mg/g) (Tabl. 36).

Tabl. 36. Zawartość procyjanidyny B₁ w korze gatunków i klonów z rodzaju *Salix* oznaczona metodą SPE-HPTLC.

Lp.	Kora gatunku lub klonu	Indeks	Zawartość [mg/g]
1.	<i>S. alba</i> klon 1100	7001	2,24 ± 0,15
2.	<i>S. eriocephala</i>	7034	0,79 ± 0,07
3.	<i>S. fragilis</i>	7035	0,57 ± 0,04
4.	<i>S. purpurea</i>	7036	0,34 ± 0,02
5.	<i>S. purpurea</i> klon 1067	7006	0,26 ± 0,02
6.	<i>S. purpurea</i> klon 1132	7010	0,42 ± 0,02
7.	<i>S. × sepulcralis</i>	7027	0,16 ± 0,03
8.	<i>S. matsudana</i> 'Tortuosa'	7028	0,42 ± 0,04

Otrzymane wyniki świadczą o dużej zmienności zawartości procyjanidyny B₁ w populacji wierzb. Uwzględniając aktywność przeciwzapalną proantocyjanidyn, m.in. poprzez wpływ na czynnik transkrypcyjny NF-κB [12,40,181], należy sądzić, że związki te decydują o efekcie terapeutycznym kory, m.in. wierzby białej (*S. alba*), dla której klonu 1100 (7001) wykazano najwyższą zawartość procyjanidyny B₁.

5. Omówienie wyników badań metodą dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (2D-HPLC) – opracowanie systemu oraz analiza składu chemicznego wybranych kor wierzb.

Uwzględniając różnorodność grup związków czynnych występujących w korze wierzb [5,10] postanowiono dla celów szybkiej ich analizy opracować warunki rozdzielania metodą 2D-HPLC.

Opracowany w ramach niniejszej dysertacji system 2D-HPLC składa się m.in. z dwóch pomp umożliwiających separację w warunkach elucji gradientowej i izokratycznej, dwóch detektorów UV-Vis oraz dwóch zaworów sześciodrożnych. Umożliwia on prowadzenie techniką *heart-cut* jednocześnie dwóch niezależnych rozdzielen chromatograficznych, sprzężonych w systemie *on-line*, poprzez manualne przenoszenie rozdzielanych składników matrycy z jednej kolumny, stanowiącej kolumnę podstawową (rozdzielanie w I wymiarze) na drugą, stanowiącą kolumnę pomocniczą (rozdzielanie w II wymiarze). Czas przenoszenia i rozdzielania zespołu z kolumny podstawowej na kolumnę pomocniczą nie może przekraczać 10 min, a tym samym maksymalną objętość aplikowanej próbki na kolumnę pomocniczą ustalono eksperymentalnie jako ~ 1,2 ml. Przed aplikacją i przeniesieniem kolejnego zespołu, kolumnę pomocniczą (rozwijana w „drugim wymiarze”) kondycjonowano (Ryc. 72).

Prowadzenie rozdzielania w obu wymiarach jest możliwe tylko przy zachowaniu określonych parametrów kolumny podstawowej i pomocniczej oraz doboru odpowiedniej fazy ruchomej. Kolumna podstawowa powinna charakteryzować się wysoką rozdzielczością i niskimi wartościami prędkości przepływu fazy ruchomej, w porównaniu do kolumny pomocniczej, natomiast kolumnę pomocniczą muszą charakteryzować przy wysokiej rozdzielczości małe opory przepływu, decydujące o dużej prędkości fazy ruchomej. Uwzględniając powyższe parametry w I wymiarze zastosowano kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami oktadecylowymi Supelcosil LC-18 o wielkości ziarna 3 μm , średnicy wewnętrznej kolumny 3 mm i długości 15 cm oraz w II wymiarze kolumnę wypełnioną monolitycznym żelem krzemionkowym – Chromolith Performance RP18e, o długości 10 cm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm (Ryc. 72). Poprzez odpowiedni dobór składu fazy ruchomej i profilu elucji rozdzielane związki na kolumnie podstawowej powinny charakteryzować się zróżnicowanymi czasami retencji od niskich do wysokich, natomiast na kolumnie pomocniczej niskimi czasami retencji, umożliwiającymi analizę kolejno przenoszonych zespołów i kondycjonowanie kolumny.

Zoptymalizowano warunki rozdzielania mieszaniny 52 substancji wzorcowych, w tym 29 połączeń z grupy fenolokwasów i 21 połączeń flawonoidowych: 9 flawonoli, 4 flawonów, 4 flawanonów, 2 dimerów flawonoidowych i 2 chalkonów oraz salicyny i katechiny.

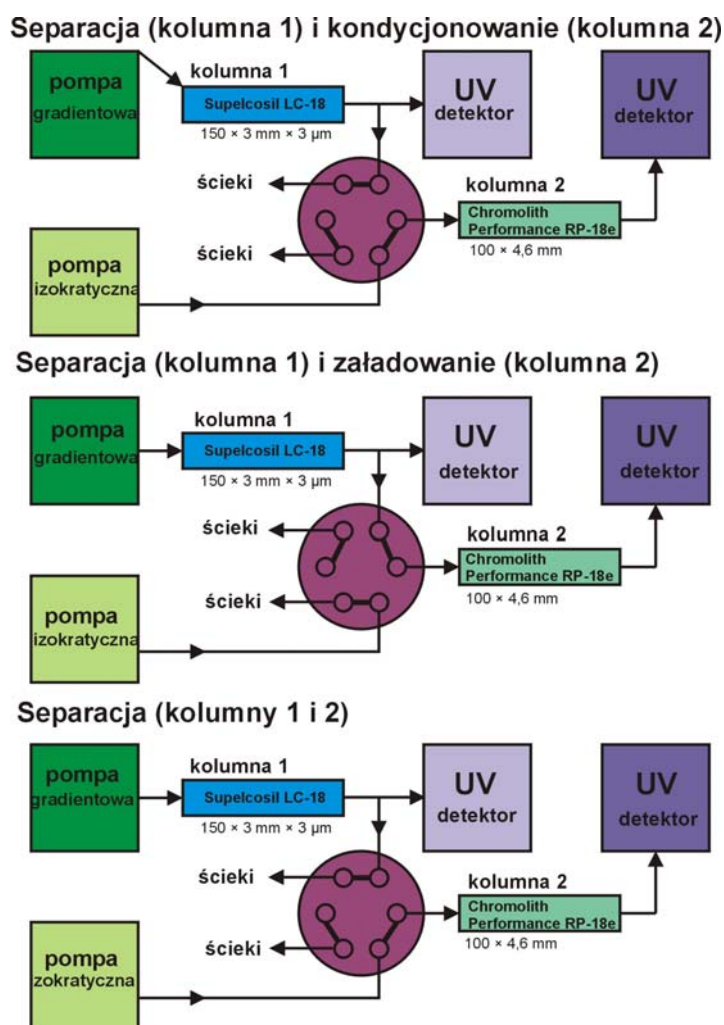
W optymalizacji składu faz ruchomych wykorzystano typowe dla układów RP (*reversed phase*) mieszaniny acetonitrylu lub metanolu z wodą. W rezultacie rozdzielanie na kolumnie podstawowej prowadzono z użyciem elucji gradientowej o wzrastającym stężeniu metanolu od 3% do 70% w mieszaninie wody i metanolu przy prędkości przepływu fazy ruchomej 0,4 ml/min ($t_R = 150$ min), natomiast na kolumnie pomocniczej (II) zastosowano elucję izokratyczną dla mieszanin acetonitryl / woda w stosunkach objętościowych 5+95, 10+90, 15+85, 20+80, 30+70, w zależności od rozdzielanego zespołu związków, przy stałej prędkości przepływu fazy ruchomej 1,0 ml/min.

Proces rozdzielania składników próby przebiegał w następujący sposób: związki obecne w analizowanej próbce po wprowadzeniu na kolumnę podstawową (I) ulegają całkowitemu lub częściowemu rozdzielaniu w formie symetrycznych lub niesymetrycznych pików. Po opuszczeniu kolumny podstawowej frakcję zawierającą nie rozdzielone związki, przeznaczają się do dalszej separacji i przenosi do dzielnika strumienia, który w ściśle określonym stosunku objętościowym (1:5) dzieli go na dwa strumienie - jeden trafia do detektora (1), natomiast drugi przez zawór sześciostrożny (2) do kolumny pomocniczej (II). Kolejne eluaty nie zawierające interesujących składników ekstraktu są kierowane do ścieków. Przenoszenie frakcji i jej rozdzielanie na kolumnie pomocniczej odbywa się bez przerywania separacji na kolumnie podstawowej (Ryc. 72).

Z 52 składnikowej mieszaniny substancji wzorcowych na kolumnie podstawowej (w I wymiarze) nie rozdzielono: kwasu 2,3-dihydroksybenzoesowego i β -rezorcylowego ($t_R = 30-32$ min); kwasu syringowego i kwasu chlorogenowego ($t_R = 48-50$ min); kwasu m-kumarowego, kwasu 2,4-dimetoksybenzoesowego i kwasu ferulowego ($t_R = 62-68$ min); kwasu synapinowego, kwasu o-kumarowego i kwasu izoferulowego ($t_R = 70-73$ min) oraz apigeniny i izoramnetyny ($t_R = 107-108$ min) (Ryc. 73), które w rezultacie rozdzielono na kolumnie pomocniczej (w II wymiarze), stosując odpowiednio, jako fazy ruchome mieszaniny acetonitrylu i wody w stosunkach objętościowych – 5+95, 10+90, 15+85, 20+80, 30+70. Ponadto na kolumnie wypełnionej żelalem monolitycznym RP-18, w fazie ruchomej: acetonitryl / woda 30+70 (v/v), rozdzielono frakcję ($t_R = 90-97$ min) zawierającą: rutynę, 3-O-glukozyd kwercetyny, 7-O-glukozyd apigeniny, mirycetynę, kwas rozmarynowy, izosalipurpozyd i kwas 4-metoksycynamonowy (Ryc. 73).

W opracowanych warunkach poddano analizie jakościowej ekstrakty metanolowe z kory *S. purpurea* (7042), *S. daphnoides* klon 1095 (7004) oraz *S. sachalinensis*

‘Sekka’ (7026) (Ryc. 74-76). Potwierdzono wyniki otrzymane w badaniach technikami chromatografii planarnej oraz 1D-HPLC. We wszystkich trzech ekstraktach, dzięki zastosowaniu rozdzielania w II wymiarze, grupa niepodzielonych związków z I wymiaru w zakresie czasów retencji – $t_R = 46,5-48$ min, ulegała separacji na kwasy chlorogenowy i syryngowy oraz inne niezidentyfikowane składniki (Ryc. 74-76). W ekstraktach *S. purpurea* (7042) i *S. daphnoides* klon 1095 (7004), system 2D-HPLC umożliwił oznaczenie kwasu protokatechowego, poprzez jego rozdzielanie w II wymiarze od ko-eluuujących z nim w I wymiarze nieznanymi składnikami ($t_R = 12-14$ min – I wymiar) (Ryc. 74,75). Obserwowany na chromatogramie ekstraktu z kory *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026) z kolumny podstawowej pik o $t_R = 64$ min (I wymiar) oznaczony jako kwas weratrowy, którego obecności nie wykazano metodą TLC, dzielił się na kolumnie pomocniczej (II wymiar) na kilka sygnałów, nie odpowiadających w zakresie wartości t_R wzorcowi (Ryc. 76).



Ryc. 72. Etapy separacji metodą 2D HPLC.

Zastosowanie rozdzielania na kolumnie pomocniczej (II wymiar) pozwoliło na zadowalającą separację salicyny i kwasu α -rezorcylowego oraz oddzielenie od nich

związków balastowych w ekstrakcie z kory *S. purpurea* (7042), słabo oddzielonych na kolumnie podstawowej (I wymiar) (Ryc. 75).

Uwzględniając duże stężenia 7-O-glukozydu naryngeny w ekstrakcie *S. daphnoides* klon 1095 (7004) analiza w II wymiarze umożliwiła oznaczenie koeluującego z nim w I wymiarze kwasu cynamonowego ($t_R = 81-84$ min) (Ryc. 74).

Z kolei w ekstraktach *S. purpurea* (7042) i *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026) zastosowanie II wymiaru zaowocowało rozdzieleniem kwasu salicylowego z frakcji o $t_R = 50,2-55$ min z I wymiaru od ko-migrujących z nim składników, występujących w wysokich stężeniach (Ryc. 75,76). Niezwykle korzystne okazało się zastosowanie II wymiaru w analizie koeluujących na I kolumnie rutyny, 7-O-glukozydu luteoliny, 3-O-glukozydu kwercetyny, mirycetyny i izosalipurpozydu ($t_R = 91-98$ min). W ten sposób potwierdzono obecność 3-O-glukozydu kwercetyny i mirycetyny obok dominującego w zespole izosalipurpozydu w korze *S. daphnoides* klon 1095 (7004), rutyny, 7-O-glukozydu apigeniny i mirycetyny obok izosalipurpozydu w korze *S. purpurea* (7042) oraz rutyny, 3-O-glukozydu kwercetyny, 7-O-glukozydu apigeniny oraz mirycetyny w *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026) (Ryc. 74-76).

Porównanie czasów retencji pików o dużej intensywności, obserwowanego w ekstraktach z kory *S. daphnoides* klon 1095 (7004) i *S. purpurea* (7042) ($t_R = 8,5$ min), z mieszaniną wzorców sugerowało obecność kwasu homogentyzynowego, którego nie obserwowano w rozdzieleniach metodą TLC (Ryc. 74,75). Potwierdzenie jego obecności wymagałoby optymalizacji separacji w II wymiarze lub zastosowania specyficznych detektorów (DAD, MS).

Opracowany system 2D-HPLC wykorzystano do analizy ilościowej trzech wolnych fenolokwasów występujących w korze *S. daphnoides* klon 1095 (7004), mianowicie kwasu chlorogenowego, cynamonowego i protokatechowego, których obecność wykazano metodą TLC i 1D-HPLC (Tabl. 37).

Tabl. 37. Zawartość [mg/g] fenolokwasów w korze klonu wierzby wawrzynkowej – *S. daphnoides* klon 1095 (7004) oznaczona metodą 2D HPLC.

Lp.	Substancja oznaczana	Zawartość [mg/g]
1.	Kwas chlorogenowy	5,31 ± 0,15
2.	Kwas cynamonowy	0,066 ± 0,005
3.	Kwas protokatechowy	0,12 ± 0,02

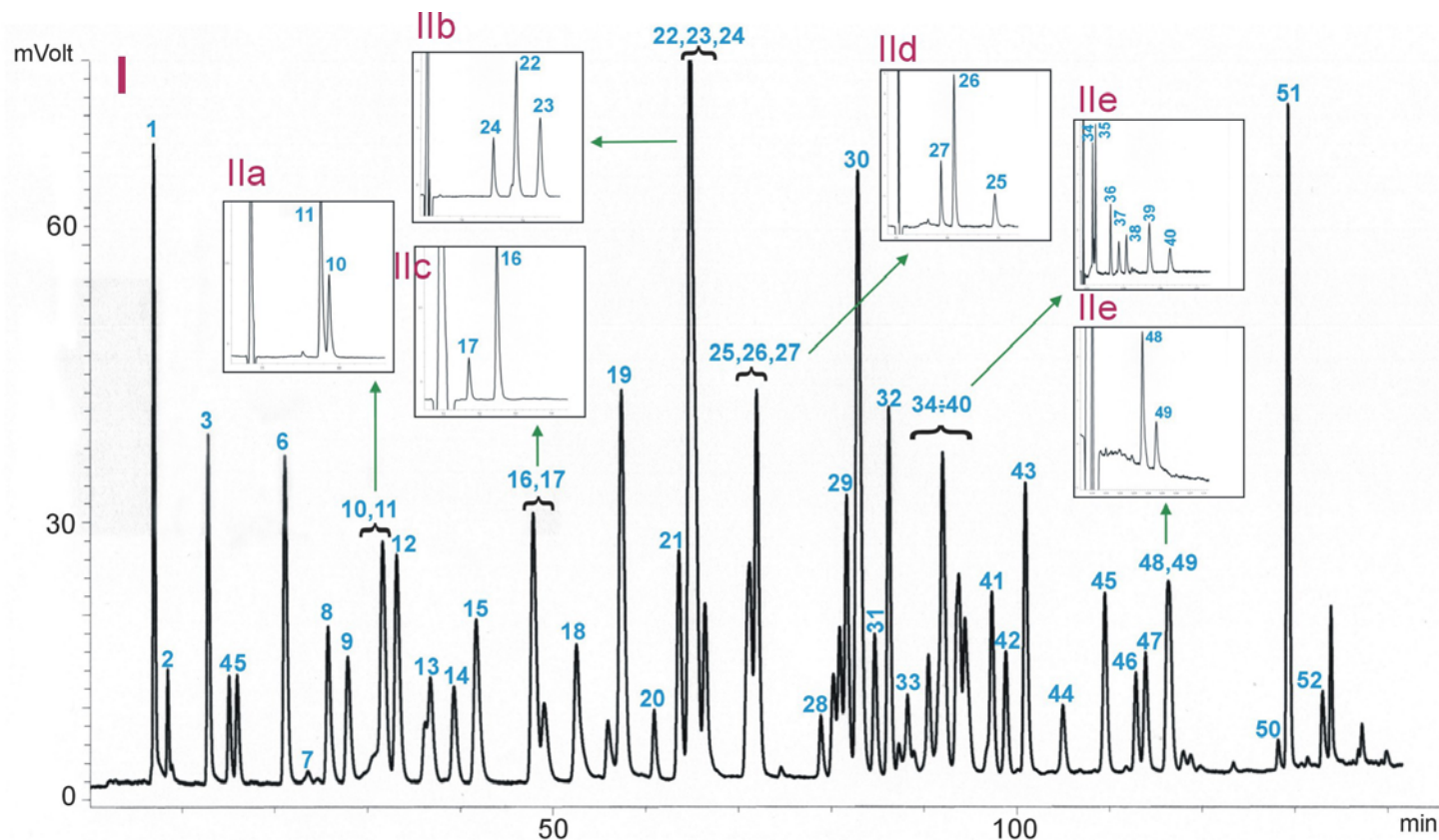
Najwyższe stężenie odnotowano dla kwasu chlorogenowego – 5,31 mg/g, natomiast dwa pozostałe kwasy występowały w znacznie niższych koncentracjach (Tabl. 37).

Julkunnen-Titto i wsp. [103,227] w badaniach ilościowych fenoli w liściach różnych klonów gatunku *S. myrsinifolia* odnotowali zawartość kwasu chlorogenowego w przedziale

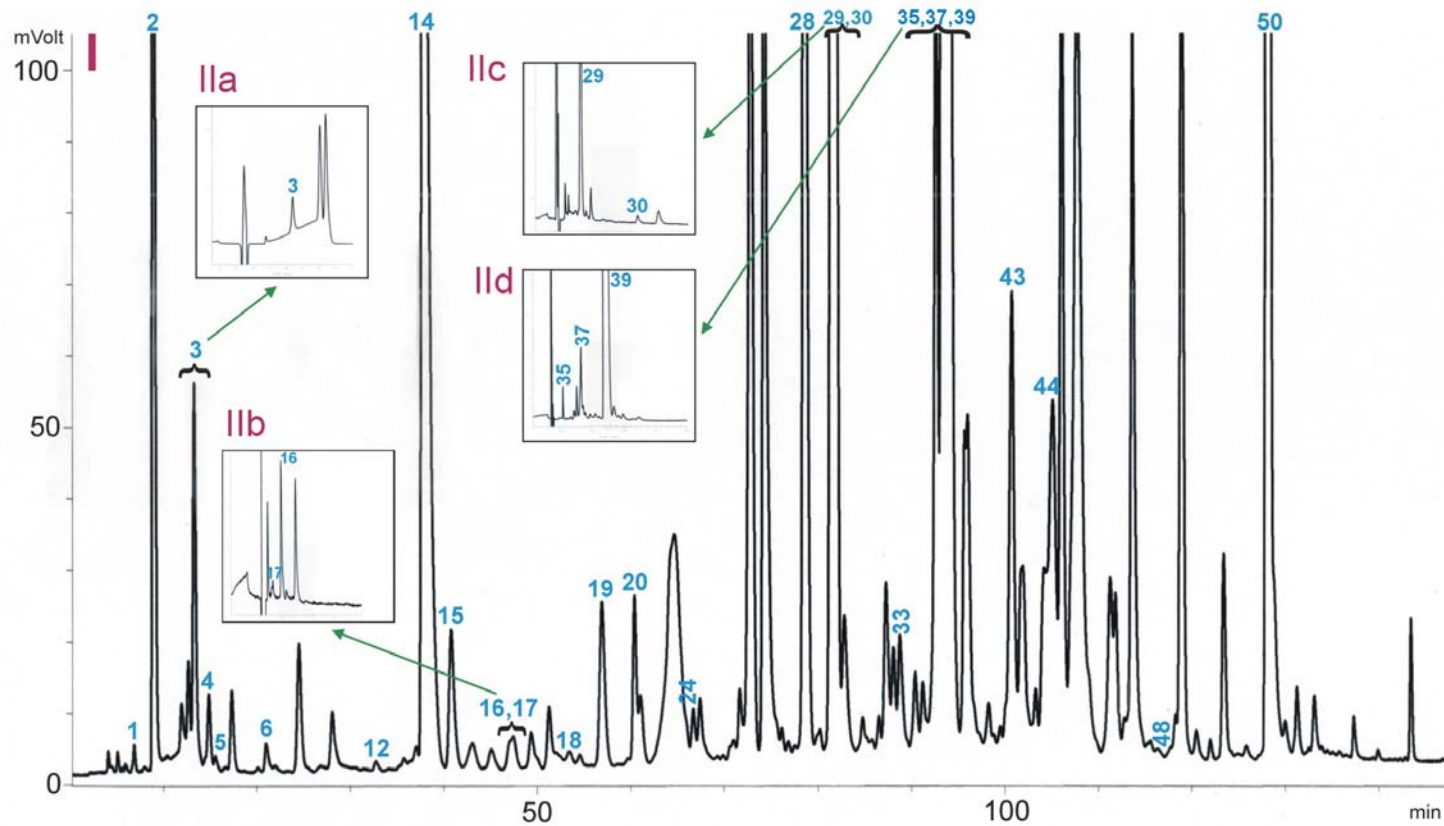
od 0,1 mg/g do 6,56 mg/g obok niskich koncentracji (od 0,1 mg/g do 0,59 mg/g) trzech pochodnych kwasu p-kumarowego. Z kolei w drewnie *S. caprea* dominował kwas salicylowy (2 mg/g), któremu towarzyszył w niskich ilościach kwas wanilinowy (0,1 mg/g) oraz ślady kwasu ferulowego i 4-hydroksycynamonowego [187].

Opracowany system 2D-HPLC w porównaniu do 1D-HPLC i TLC, umożliwia w stosunkowo krótkim czasie pełną charakterystykę zespołów związków prostych fenoli i polifenoli – flawonoidów, pochodnych salicylowych i fenolokwasów.

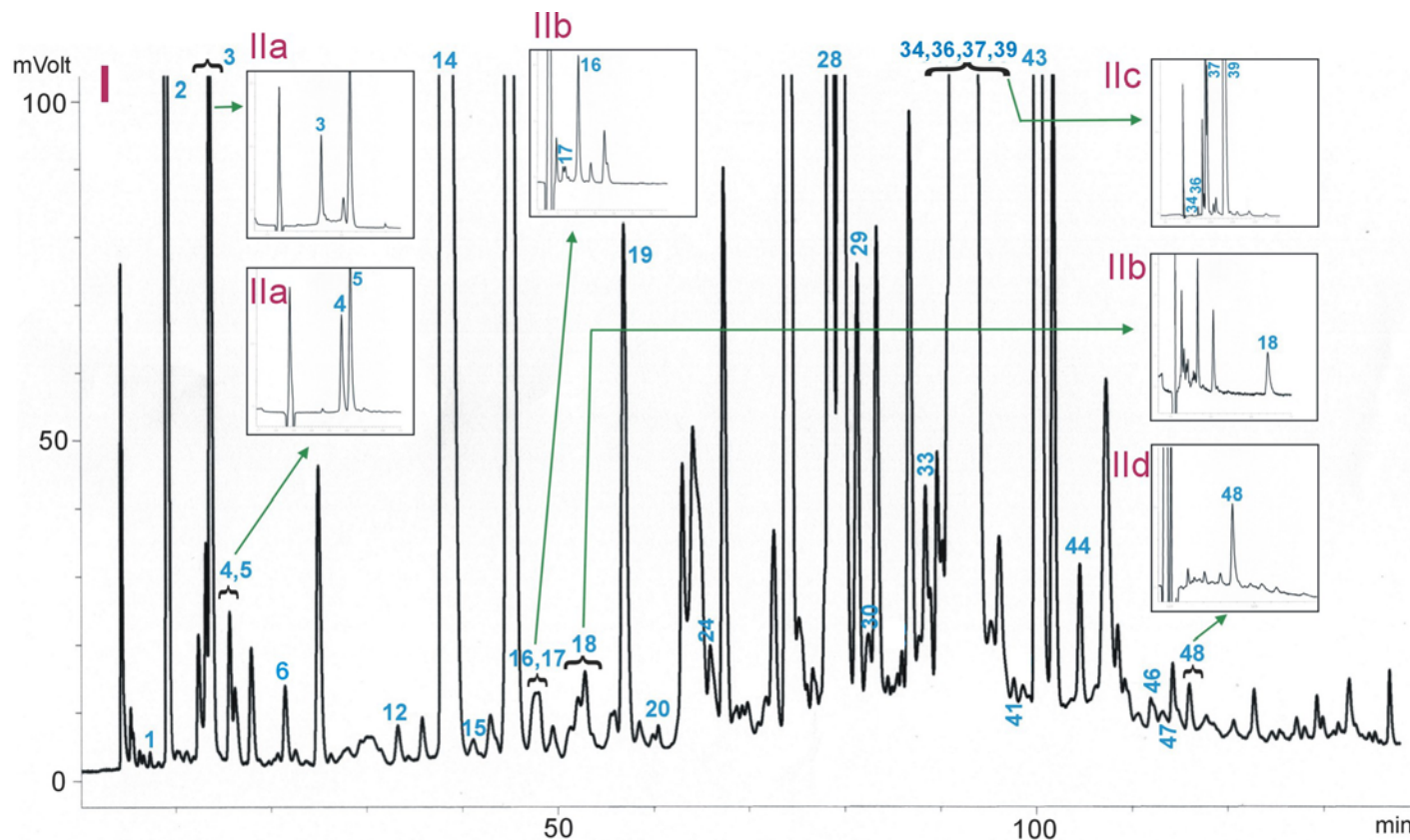
Odnosząc się do aktualnych danych piśmiennictwa z zakresu wielowymiarowej chromatografii cieczowej [rozdział I.4], jest to pierwsze doniesienie o wykorzystaniu metody 2D-HPLC w analizie tak skomplikowanych matryc pochodzenia roślinnego oraz wieloskładnikowej mieszaniny związków wzorcowych (52 składniki).



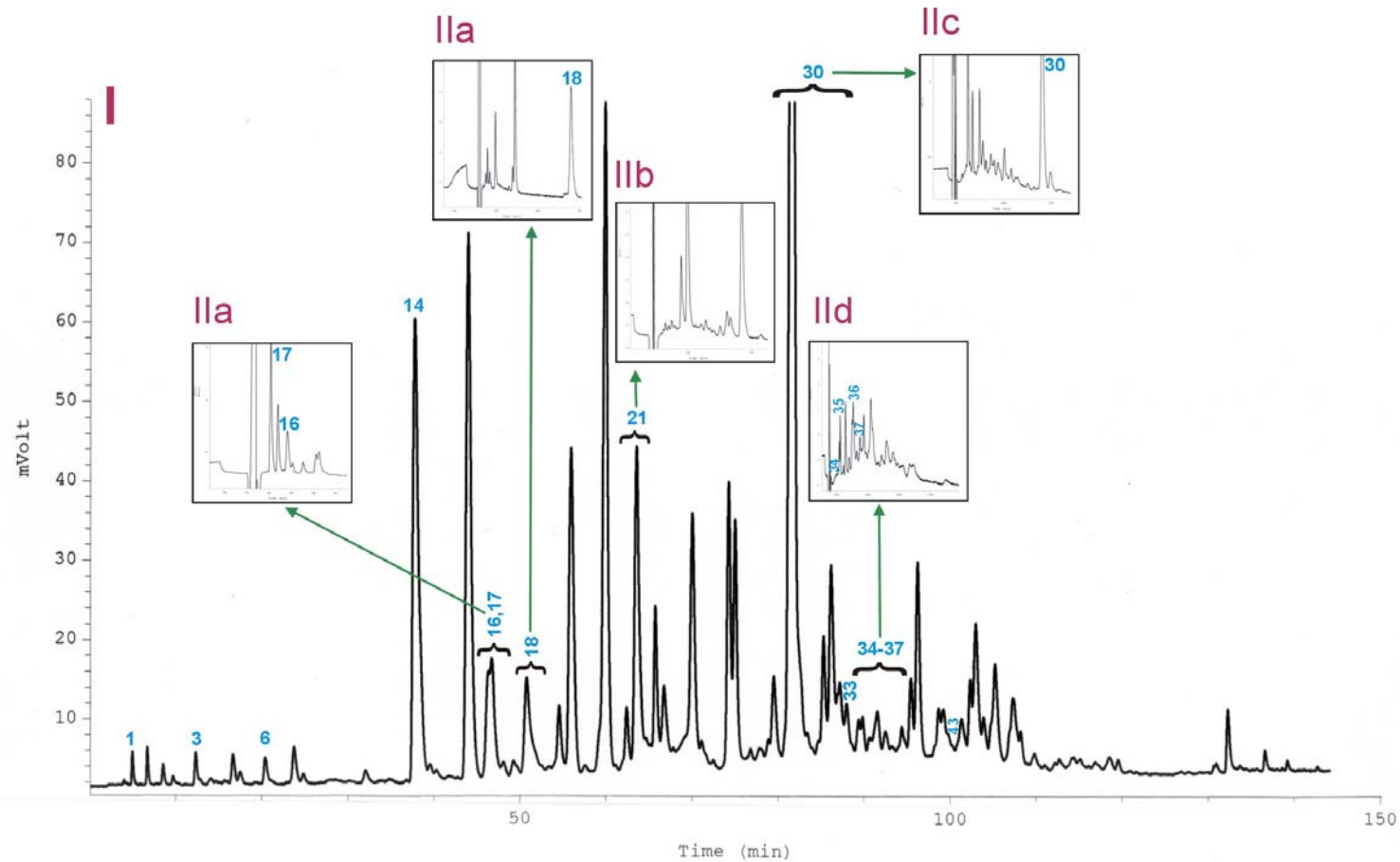
Ryc. 73. Chromatogram 2D-HPLC mieszaniny substancji wzorcowych: **1** – kwas galusowy, **2** – kwas homogentyzynowy, **3** – kwas protokatechowy, **4** – salicyna, **5** – kwas α -rezorcyloyowy, **6** – kwas p-hydroksybenzoesowy, **7** – kwas gentyzynowy, **8** – kwas dihydrokawowy, **9** – kwas m-hydroksybenzoesowy, **10** – kwas 2,3-dihydroksybenzoesowy, **11** – kwas β -rezorcyloyowy, **12** – kwas wanilinowy, **13** – kwas homowanilinowy, **14** – katechina, **15** – kwas kawowy **16** – kwas syringowy, **17** – kwas chlorogenowy, **18** – kwas salicyloyowy, **19** – kwas p-kumarowy, **20** – epikatechina, **21** – kwas weratrowy, **22** – kwas m-kumarowy, **23** – kwas 2,4-dimetoksybenzoesowy, **24** – kwas ferulowy, **25** – kwas synapinowy, **26** – kwas o-kumarowy, **27** – kwas izoferulowy, **28** – 5-O-glukozyd naryngeny, **29** – 7-O-glukozyd naryngeny, **30** – kwas cynamonowy, **31** – kwas 3,4-dimetokscynamonowy, **32** – naryngina, **33** – 7-O-glukozyd luteoliny, **34** – rutyna, **35** – 3-O-glukozyd kwercetyny, **36** – 7-O-glukozyd apigeniny, **37** – mirycetyna, **38** – kwas rozmarynowy, **39** – izosalipurpozyd, **40** – kwas 4-metokscynamonowy, **41** – 3-O-glukozyd kemferolu, **42** – 3-O-glukozyd izoramnetyny, **43** – naryngena, **44** – kwercetyna, **45** – luteolina, **46** – 7-O-ramnozyd kemferolu, **47** – kemferol, **48** – apigenina, **49** – izoramnetyna, **50** – 6''-p-kumarolioizosalipurpozyd, **51** – kupresuflawon, **52** – amentoflawon; **Objaśnienia:** **I wymiar:** kolumna Supelcosil LC-18 (150 mm \times 3 mm, 3 μ m), elucja gradientowa według programu G₁₂: (A – metanol, B – woda / kwas ortofosforowy 99,9+ 0,1, v/v) od 3% do 70% A w A + B (t_R = 150 min), v = 0,4 ml/min, detekcja UV λ =280 nm, **II wymiar:** kolumna Chromolith Performance RP18e (100 mm \times 4,6 mm), elucja izokratyczna: mieszaniny acetonitryl / woda (v/v): **Ila** 5+95, **IIb** 10+90, **IIc** 15+85, **IIId** 20+80, **IIe** 30+70, v = 1,0 ml/min, detekcja UV λ =210 nm.



Ryc. 74. Chromatogram 2D HPLC metanolowego ekstraktu z kory *Salix daphnoides* 1095 (7004): 1 – kwas galusowy, 2 – kwas homogentyzynowy, 3 – kwas protokatechowy, 4 – salicyna, 5 – kwas α -rezorcylowy, 6 – kwas p-hydroksybenzoesowy, 12 – kwas wanilinowy, 14 – katechina, 15 – kwas kawowy 16 – kwas syringowy, 17 – kwas chlorogenowy, 18 – kwas salicylowy, 19 – kwas p-kumarowy, 20 – epikatechina, 24 – kwas ferulowy, 28 – 5-O-glukozyd naryngeniny, 29 – 7-O-glukozyd naryngeniny, 30 – kwas cynamonowy, 33 – 7-O-glukozyd luteoliny, 35 – 3-O-glukozyd kwercetyny, 37 - mirycetyna, 39 – izosalipurpozyd, 43 – naryngenina, 44 – kwercetyna, 48 – apigenina, 50 – 6''-p-kumaroilozosalipurpozyd. Objasnienia: **I wymiar:** kolumna Supelcosil LC-18 (150 mm \times 3mm, 3 μ m), elucja gradientowa według programu G₁₂: (A – metanol, B – woda / kwas ortofosforowy 99,9+ 0,1, v/v) od 3% do 70% A w A + B (t_R = 150 min), v = 0,4 ml/min, detekcja UV λ =280 nm, **II wymiar:** kolumna Chromolith Performance RP18e (100 mm \times 4,6 mm), elucja izokratyczna: mieszaniny acetonitryl / woda (v/v): **IIa** 5+95, **IIb** 15+85, **IIc** 20+80, **IIId** 30+70, v = 1,0 ml/min, detekcja UV λ =210 nm.



Ryc. 75. Chromatogram 2D HPLC metanolowego ekstraktu z kory *Salix purpurea* (7042): 1 – kwas galusowy, 2 – kwas homogentyzynowy, 3 – kwas protokatechowy, 4 – salicyna, 5 – kwas α -rezorcyłowy, 6 - kwas p-hydroksybenzoesowy, 12 – kwas wanilinowy, 14 – katechina, 15 – kwas kawowy 16 – kwas syringowy, 17 – kwas chlorogenowy, 18 – kwas salicyłowy, 19 – kwas p-kumarowy, 20 - epikatechina, 24 – kwas ferulowy, 28 – 5-O-glukozyd naryngeny, 29 – 7-O-glukozyd naryngeny, 30 – kwas cynamonowy, 33 – 7-O-glukozyd luteoliny, 34 – rutyna, 36 – 7-O-glukozyd apigeniny, 37 – mirycetyna, 39 - izosalipurpozyd, 41 – 3-O-glukozyd kemferolu, 43 – naryngenina, 44 – kwercetyna, 46 – 7-O-ramnozyd kemferolu, 47 – kemferol, 48 – apigenina. Objasnienia: I wymiar: kolumna Supelcosil LC-18 (150 mm \times 3mm, 3 μ m), elucja gradientowa według programu G₁₂: (A – metanol, B – woda / kwas ortofosforowy 99,9+ 0,1, v/v) od 3% do 70% A w A + B (t_R = 150 min), v = 0,4 ml/min, detekcja UV λ =280 nm, II wymiar: kolumna Chromolith Performance RP18e (100 mm \times 4,6 mm), elucja izokratyczna: mieszaniny acetonitryl / woda (v/v): IIa 5+95, IIb 15+85, IIc 17+83, IIe 30+70, v = 1,0 ml/min, detekcja UV λ =210 nm.



Ryc. 76. Chromatogram 2D HPLC metanolowego ekstraktu z kory *Salix sachalinensis* 'Sekka' (7026): **1** – kwas galusowy, **3** – kwas protokatechowy, **6** – kwas p-hydroksybenzoesowy, **14** – katechina, **16** - kwas syringowy, **17** – kwas chlorogenowy, **18** – kwas salicylowy, **19** – kwas p-kumarowy, **21** – kwas weratrowy, **30** – kwas cynamonowy, **33** – 7-O-glukozyd luteoliny, **34** – rutyna, **35** – 3-O-glukozyd kwercetyny, **36** – 7-O-glukozyd apigeniny, **37** – mirycetyna, **43** – naryngenina. Objasnienia: **I wymiar:** kolumna Supelcosil LC-18 (150 mm × 3mm, 3 μm), elucja gradientowa według programu G₁₂: (A - metanol, B – woda / kwas ortofosforowy 99,9+ 0,1, v/v) od 3% do 70% A w A + B (t_R = 150 min), v = 0,4 ml/min, detekcja UV λ=280 nm, **II wymiar:** kolumna Chromolith Performance RP18e (100 mm × 4,6 mm), elucja izokratyczna: mieszaniny acetonitryl / woda (v/v): **IIa** 10+90, **IIb** 15+85, **IIc** 20+80, **IId** 30+70, v = 1,0 ml/min, detekcja UV λ=210 nm.

6. Omówienie wyników badań aktywności cytotoksycznej i genotoksycznej związków fenolowych oraz ekstraktów suchych z kory wierzb.

Od wielu lat liczne ośrodki naukowe podejmują badania nad właściwościami kancerogennymi i genotoksycznymi pirokatecholu, jako jednego z głównych metabolitów benzenu [3]. Mechanizm genotoksycznego działania katecholu wciąż pozostaje niewyjaśniony. Jedną z hipotez zakłada, że związek w wysokich stężeniach indukuje reaktywne formy tlenu (ROS) uszkodzające DNA, natomiast w niskich posiada działanie przeciwutleniające [3]. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (*International Agency for Research on Cancer* – IARC) klasyfikuje związek jako substancję potencjalnie rakotwórczą [3]. W eksperymentach na szczurach katechol stymulował procesy karcynogenne w błonie śluzowej żołądka [3].

W związku z obecnością pirokatecholu w większości analizowanych kor wierzb, podjęto badania nad cytotoksycznością i genotoksycznością związku oraz ekstraktów suchych otrzymanych z kory wierzby – *S. alba* klon 1100 (7001), *S. daphnoides* klon 1095 (7004) oraz *S. purpurea* (7043), otrzymanych w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych Akademii Medycznej w Gdańsku, o oznaczonej według opracowanych procedur analitycznych, zawartości poszczególnych związków czynnych (Tabl. 38).

Tabl. 38. Zawartość związków czynnych [mg/g] w ekstraktach suchych z kory wierzb.

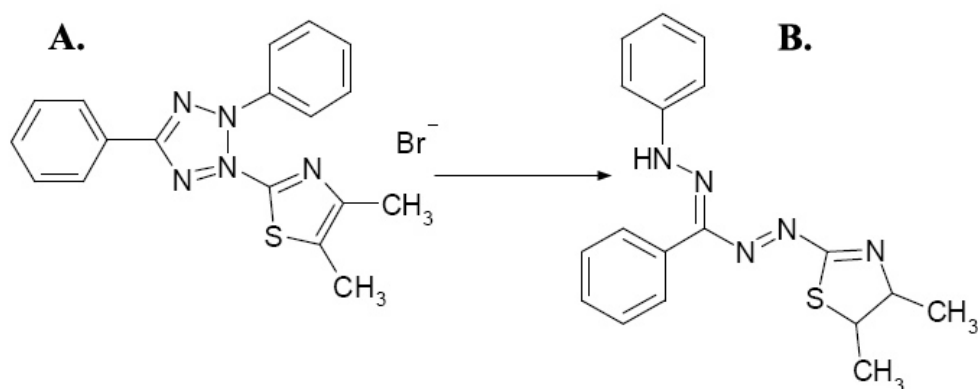
Lp.	Związek	Zawartość [mg/gm] w ekstrakcie suchym z kory:		
		<i>S. alba</i> klon 1100 (7001)	<i>S. daphnoides</i> klon 1095 (7004)	<i>S. purpurea</i> (7043)
1.	Salicyna wolna	27,1 ± 0,21	36,5 ± 0,27	83,0 ± 0,85
2.	Suma związków salicylowych w przeliczeniu na salicynę	147,2 ± 2,12	222,4 ± 2,34	220,7 ± 1,87
3.	5-O-glukozyd naryngeniny	-	26,3 ± 0,20	31,1 ± 0,23
4.	7-O-glukozyd naryngeniny	-	57,2 ± 0,43	24,0 ± 0,22
5.	Naryngenina	-	0,54 ± 0,07	0,44 ± 0,09
6.	Izosalipurpozyd	-	16,0 ± 0,17	9,2 ± 0,11
7.	6'-p-kumaroilizosalipurpozyd	-	11,0 ± 0,11	8,4 ± 0,09
8.	Katechina	7,0 ± 0,11	4,7 ± 0,09	4,9 ± 0,09
9.	Pirokatechina	1,1 ± 0,07	2,3 ± 0,10	10,3 ± 0,12

Objaśnienia: (-) – nie stwierdzono obecności związku.

W eksperymentach uwzględniono również związki reprezentujące poszczególne grupy połączeń obecnych w rodzaju *Salix* i występujące w wysokich stężeniach w badanym materiale, mianowicie: salicynę, tremulacynę, kwas salicylowy z grupy połączeń salicylowych oraz katechinę, izosalipurpozyd i jego ester p-kumarowy, naryngeninę i jej 5-O- i 7-O-glukozydy z grupy polifenoli.

Aktywność cytotoksyczną badano przy pomocy testu redukcji soli tetrazolowej – testu MTT, w stosunku do dwóch linii komórek nowotworowych: HL-60 (komórki białaczki promielocytarnej) i HeLa (komórki ludzkiego raka szyjki macicy) analizując % przeżywalności komórek w obecności poszczególnych związków i ekstraktów z kory wierzby. Aktywność cytotoksyczną związków i ekstraktów suchych z kory wierzby analizowano w zakresie stężeń od 0 $\mu\text{g/ml}$ do 70 $\mu\text{g/ml}$. Badania prowadzono wobec kontroli linii ludzkich fibroblastów skóry.

Test MTT pozwala na ocenę aktywności metabolicznej komórek [161]. W żywych komórkach, sole tetrazolowe (w tym MTT) ulegają przekształceniu pod wpływem dehydrogenazy bursztynianowej do nierozpuszczalnych kryształków formazanu (Ryc. 77). Ilość powstającego formazanu jest proporcjonalna do liczby żywych komórek, a tym samym świadczy o stopniu ich przeżywalności.



Ryc. 77. Redukcja MTT (A) do formazanu (B).

Wykazano selektywną aktywność cytotoksyczną wobec linii komórek białaczki promielocytarnej (HL-60). Najwyższą aktywnością cytotoksyczną wśród badanych związków charakteryzowała się pirokatechina, dla której wartość IC_{50} wynosiła 2,5 $\mu\text{g/ml}$, a najniższą katechina – $\text{IC}_{50} = 55 \mu\text{g/ml}$ (Tabl. 39). Pozostałe związki wykazały porównywalny efekt cytotoksyczny. Nie stwierdzono hamowania wzrostu ludzkich fibroblastów skóry, zarówno w obecności związków jak i ekstraktów (Tabl. 39). Świadczy to o ich specyficznej aktywności wobec linii HL-60.

Dla salicyny nie ujawniono aktywności cytotoksycznej wobec żadnej z badanych linii komórkowych, w stosowanym zakresie stężeń (od 0 $\mu\text{g/ml}$ do 70 $\mu\text{g/ml}$) (Tabl. 39). Natomiast kwas salicylowy posiadał działanie cytotoksyczne również w stosunku do linii komórek ludzkiego raka szyjki macicy (HeLa).

Spośród badanych ekstraktów suchych najwyższą cytotoksycznością charakteryzował się ekstrakt z kory *S. purpurea* (7043) ($\text{IC}_{50} = 35 \mu\text{g/ml}$) (Tabl. 39). Silniejszą aktywność cytotoksyczną tego ekstraktu w stosunku do pozostałych – $\text{IC}_{50} = 40 \mu\text{g/ml}$ oraz 45 $\mu\text{g/ml}$,

odpowiednio dla *S. alba* klon 1100 (7001) i *S. daphnoides* klon 1095 (7004), można wiązać z najwyższą zawartością pirokatechiny (0,96%) (Tabl. 38).

Obserwowano wzrost aktywności cytotoksycznej ekstraktów suchych w ciągu 48h trwania eksperymentu, natomiast dla pojedynczych substancji wartość IC_{50} utrzymywała się na tym samym poziomie, jaki obserwowano po 24h (Tabl. 39).

Tabl. 39. Aktywność cytotoksyczna związków i ekstraktów z kory wierzby (*Salix sp.*) analizowana przy pomocy testu MTT.

Lp.	Związek/ekstrakt	Linia komórkowa			
		Linia HL-60	Linia HeLa	Linia ludzkich fibroblastów skóry	
		Wartość IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
1.	Kwas salicylowy	35 ± 1,7	-	27 ± 1,3	>70
2.	Salicyna	>70	-	>70	>70
3.	Tremulacyna	20 ± 1,3	-	>70	>70
4.	Katechina	55 ± 2,7	-	>70	>70
5.	Naryngenina	25 ± 1,2	-	>70	>70
6.	5-O-glukozyd naryngeniny	20 ± 1,0	-	>70	>70
7.	7-O-glukozyd naryngeniny	35 ± 2,1	-	>70	>70
8.	Izosalipurpozyd	45 ± 2,0	-	>70	>70
9.	Ester izosalipurpozydu	35 ± 1,7	-	>70	>70
10.	Pirokatechol	2,5 ± 0,2	-	>70	>70
11.	<i>S. purpurea</i> 7043 (e. s.)	35 ± 1,7	25 ± 1,2	>70	>70
12.	<i>S. daphnoides</i> klon 1095 (7004) (e. s.)	40 ± 2,1	30 ± 1,5	>70	>70
13.	<i>S. alba</i> klon 1100 (7001) (e. s.)	40 ± 2,2	30 ± 1,3	>70	>70

Objaśnienia:

(*) – Czas ekspozycji komórek

(e. s.) – ekstrakt suchy

Uwagę zwraca wpływ miejsca glukozydacji naryngeniny na jej aktywność cytotoksyczną. Dla 7-O-glukozydu naryngeniny wykazano niższą aktywność w porównaniu do aglikonu (35 $\mu\text{g/ml}$ i 25 $\mu\text{g/ml}$, odpowiednio), natomiast 5-O-glukozyd posiadał aktywność wyższą (20 $\mu\text{g/ml}$). Obecność podstawnika stanowiącego kwas fenolowy powodowała wzrost aktywności cytotoksycznej związku, czego potwierdzeniem są wartości IC_{50} salicyny i tremulacyny – $IC_{50} > 70$ i $IC_{50} = 20$ $\mu\text{g/ml}$ odpowiednio, oraz izosalipurpozydu i jego estru p-kumarowego – $IC_{50} = 45$ $\mu\text{g/ml}$ i $IC_{50} = 35$ $\mu\text{g/ml}$ odpowiednio) (Tabl. 39).

Badanie aktywności genotoksycznej pirokatechiny przeprowadzono dla ekstraktu suchego z kory *Salix purpurea* (7043) o najwyższej zawartości pirokatecholu (Tabl. 38). Badania prowadzono na linii HL-60.

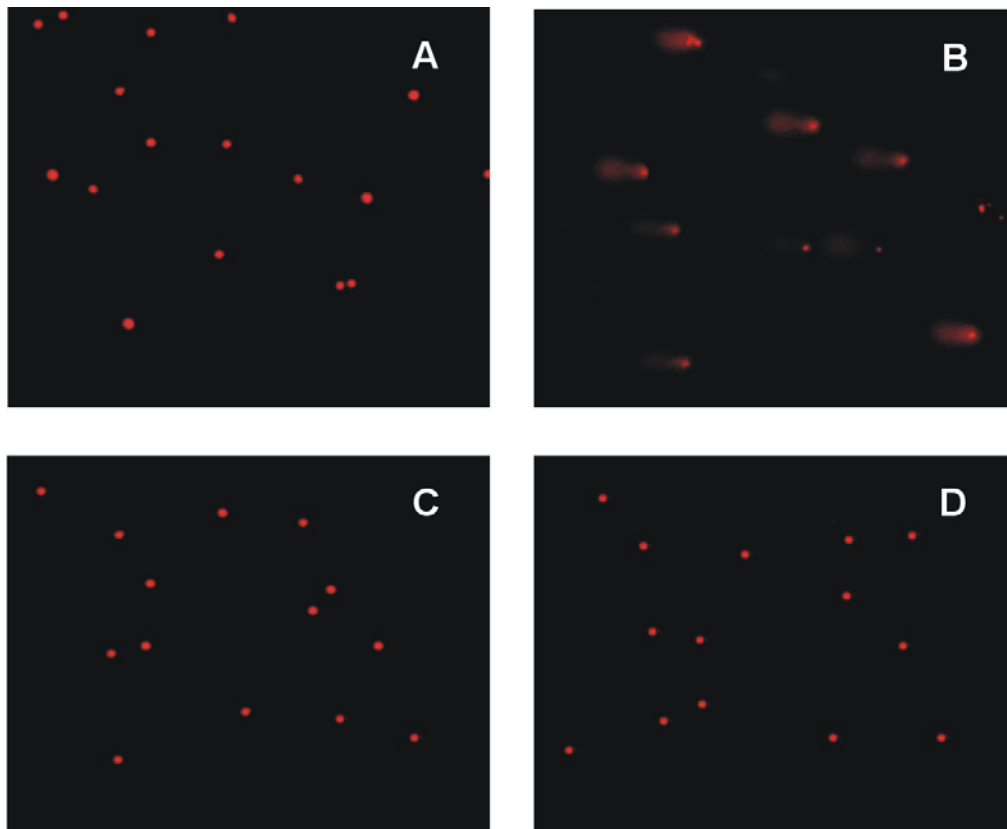
W eksperymencie zastosowano test kometowy (*Single Cell Gel Electrophoresis* – SCGE), który umożliwia oszacowanie uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczych komórek i uważany jest za najbardziej czułą technikę oceny uszkodzeń DNA [213]. Wykorzystuje on zdolność niskocząsteczkowego DNA do migracji w żelu agarozowym. Migrujące uszkodzone DNA tworzy charakterystyczny obraz imitujący ogon komety, a nieuszkodzone DNA kształtuje tak zwaną „głowę” komety.

W ocenie indukowania przez pirokatechinę uszkodzeń DNA, komórki HL-60 poddano działaniu związku w zakresie od 0,5 µg/ml do 5 µg/ml. Zastosowano stężenia, które nie wywoływały efektu cytotoksycznego – do 2,5 µg/ml (przeżywalność komórek > 50%) oraz stężenia powodujące śmierć ponad 50% komórek, czyli od 2,5 µg/ml do 5 µg/ml. W przypadku ekstraktu suchego z kory *S. purpurea* (7043) aktywność genotoksyczną kontrolowano w zakresie stężeń od 5 µg/ml do 50 µg/ml.

Nie obserwowano indukcji uszkodzeń w komórkach HL-60 traktowanych pirokatechiną i ekstraktem suchym nawet przy stężeniach cytotoksycznych (Ryc. 78C). % DNA w ognie w przypadku pirokatechiny odpowiadał kontroli i wynosił $1\% \pm 0,1$. Podobnie nie ujawniono efektu genotoksycznego dla badanego ekstraktu suchego z kory wierzby wobec linii HL-60 (% DNA w ognie wynosił $1\% \pm 0,1$) (Ryc. 78D), w stosowanym zakresie stężeń. Nadtlenek wodoru zastosowany jako kontrola pozytywna w stężeniu 50 µM, indukował uszkodzenia DNA – % DNA w ognie oszacowano na poziomie $50\% \pm 5$ (Ryc. 78B).

W rezultacie stwierdzono w oparciu o test kometowy, że obecność pirokatechiny w ekstraktach nie powoduje uszkodzeń DNA.

Wyniki badań dostarczają nowych informacji o aktywności farmakologicznej i biologicznej kory wierzby, w tym specyficznej aktywności przeciwnowotworowej wobec linii komórek białaczki promielocytarnej – HL-60.



Ryc. 78. Wpływ pirokatechiny, ekstraktu suchego z kory *Salix purpurea* (7043) i nadtlenu wodoru na indukcję uszkodzeń DNA w linii HL-60: **A** – kontrola negatywna, komórki nietraktowane, **B** – kontrola pozytywna, komórki traktowane 50 µM H₂O₂, **C** - komórki traktowane pirokatechiną (5 µg/ml), **D** – komórki traktowane ekstraktem z kory wierzby purpurowej (7043) (50 µg/ml).

IV. WNIOSKI

1. Stosując metody chromatografii planarnej – TLC i HPTLC oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), opracowano i zoptymalizowano warunki rozdzieleń chromatograficznych, w zakresie stosowanych faz stacjonarnych i ruchomych, pochodnych salicylowych, flawonoidów, fenolokwasów, katechin i procyjanidyn, obecnych w korze badanych gatunków i klonów wierzb, mianowicie:

a) związki salicylowe (salicyna, salikortyna, 2'-acetylosalikortyna, piceina, helicyna, salidrozyd, triandryna, populina i tremulacyna) rozdzielano metodą HPLC na szeregowo połączonych dwóch kolumnach – Chromolith Performance Si i Chromolith Performance RP-18e, stosując elucję gradientową w mieszaninie acetonitryl / woda+kwasy trifluoroctowy (99,95+0,05, v/v) o wzrastającym stężeniu od 3% do 48% acetonitrylu. Równolegle z detektorem UV zastosowano detektor światła rozproszonego (ELS), jako specyficzny dla tych związków;

b) związki flawonoidowe analizowano w dwóch systemach HPLC: na kolumnie Discovery C18, z użyciem elucji gradientowej w mieszaninie acetonitryl / woda + kwas ortofosforowy o wzrastającym stężeniu acetonitrylu od 2% do 37% oraz z użyciem gradientu liniowo-skokowego na kolumnie Lichrospher 100 RP-18e w mieszaninie metanol / woda + kwas ortofosforowy (99,9+0,1, v/v) o zmiennym stężeniu metanolu i zmiennej prędkości przepływu fazy ruchomej;

c) fenolokwasy (kwasy: α -rezorecyłowy, kawowy, m-hydroksybenzoesowy, p-kumarowy, p-hydroksybenzoesowy, syringowy, ferulowy, wanilinowy, weratrowy, cynamonowy i 4-metoksycynamonowy) rozdzielano stosując technikę MGD-HPTLC na żelu krzemionkowym z chemicznie związanymi grupami diolowymi – HPTLC Diol, według programu gradientu fazy ruchomej chloroform / heksan / octan etylu o wzrastającym stężeniu, od 10% do 25%, octanu etylu w kolejnych etapach gradientu. Wykazano specyficzność odczynnika tymolowego w stosunku do metoksyłowych pochodnych kwasu cynamonowego;

d) monomeryczne flawan-3-ole (katechina, epikatechina, galusan katechiny i galokatechina) analizowano metodą MGD-HPTLC na żelu krzemionkowym RP-18W stosując elucję gradientową w mieszaninie acetonitryl / woda / kwas mrówkowy o wzrastającym stężeniu rozpuszczalnika organicznego z 20% do 22%.

e) procyjanidyny B₁ i B₂ w obecności katechiny analizowano na złożu poliamidowym, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę: chloroform / metanol / keton metylo-etyłowy (40+20+30, v/v/v) oraz żelu krzemionkowym HPTLC w fazie ruchomej: chloroform / etanol / kwas mrówkowy (50+40+6, v/v/v).

2. Z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE), jako etapu przygotowania próbki do analizy, oraz metod chromatograficznych – HPTLC i HPLC, opracowano procedury analityczne dla oznaczeń ilościowych następujących związków czynnych:

a) salicyny wolnej i estrowo związanej metodą SPE-HPLC na kolumnie Discovery C18, stosując elucję izokratyczną w mieszaninie: acetonitryl / woda / kwas fosforowy (7+92,91+0,09, v/v/v);

b) katechiny metodami: SPE-HPTLC na żelu krzemionkowym RP-18W z użyciem fazy ruchomej acetonitryl / woda / kwas mrówkowy (20+80+6, v/v) i SPE-HPLC na kolumnie Purospher Star RP-18e, stosując elucję gradientową w mieszaninie acetonitryl / woda + kwas ortofosforowy (99,9+0,1, v/v) o wzrastającym stężeniu acetonitrylu od 2% do 17%;

c) procyjanidyny B₁ metodą SPE-HPTLC na żelu krzemionkowym z użyciem fazy ruchomej chloroform / etanol / kwas mrówkowy (50+40+6, v/v);

d) flawanonów – naryngeniny oraz jej 5-O- i 7-O-glukozydów, metodą HPLC/DAD na kolumnie Discovery C18, stosując elucję gradientową w mieszaninie acetonitryl / woda + kwas ortofosforowy o wzrastającym stężeniu acetonitrylu od 2% do 37%;

e) chalkonów – izosalipurpozydu oraz jego estru p-kumarowego metodą SPE-HPLC na kolumnie Discovery C18 z wykorzystaniem elucji gradientowej w mieszaninie acetonitryl / woda + kwas ortofosforowy (99,9+0,1, v/v) o wzrastającym stężeniu acetonitrylu od 20% do 50%.

3. Do celów skryningowych analiz składu chemicznego kory wierzby, w zakresie związków salicylowych, fenolokwasów, flawonoidów i flawan-3-oli opracowano system 2D-HPLC oraz zoptymalizowano warunki rozdzieleń chromatograficznych, w systemie *on-line*, techniką *heart-cut*, z użyciem kolumny Supelcosil LC-18, jako kolumny podstawowej i elucji gradientowej o wzrastającym stężeniu metanolu w mieszaninie metanol / woda (I wymiar) oraz kolumny monolitycznej Chromolith Performance RP18e, jako kolumny pomocniczej i elucji izokratycznej mieszaninami acetonitryl / woda (5+95, 10+90, 15+85, 20+80, 30+70, v/v) (II wymiar).

Po raz pierwszy metodą 2D-HPLC rozdzielono wieloskładnikowe zespoły, stanowiące mieszaninę związków wzorcowych (52 składniki: 29 fenolokwasów i 21 flawonoidów, w tym: 9 flawonoli, 4 flawony, 4 flawanony, 2 dimery flawonoidowe i 2 chalkony oraz salicyna i katechina) oraz matryce roślinne (ekstrakty metanolowe z kor wierzb: *S. purpurea* (7042), *S. daphnoides* klon 1095 (7004) i *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026)). Ponadto opracowany system 2D-HPLC wykorzystano w celu oznaczenia zawartości kwasu chlorogenowego, cynamonowego i protokatechowego w korze *S. daphnoides* klon 1095 (7004). Najwyższe stężenie odnotowano dla kwasu chlorogenowego – 5,31 mg/g.

4. Potwierdzono metodami chromatograficznymi skład flawonoidów obecnych w gatunkach: *S. acutifolia*, *S. daphnoides* i *S. purpurea*. Ponadto z wyciągu metanolowego z kory *S. purpurea* (7043) firmy „Labofarm”, metodami preparatywnej, grawitacyjnej chromatografii kolumnowej i semi-preparatywnej HPLC, wyodrębniono cztery związki, które w oparciu o porównanie parametrów retencyjnych (t_R) z danymi literaturowymi oraz widma UV, FAB-MS, ^1H i ^{13}C NMR oraz widma dwuwymiarowego rezonansu magnetycznego: ^1H - ^1H COSY, ROESY, HMBC i HSQC zidentyfikowano, jako 6''-O-(*E*)-p-kumaroiloizosalipurpozyd, (+) i (-)-5-O-glukozyd naryngeniny oraz izosalipurpozyd.

5. Po raz pierwszy stwierdzono obecność 6''-O-(*E*)-p-kumaroiloizosalipurpozydu w korze *S. daphnoides*. Obecność tego związku w korze firmy „Labofarm” uważanej za wierzbę purpurową (*S. purpurea*) świadczy o nieprawidłowo określonej przynależności systematycznej i wskazuje na gatunek *S. daphnoides* lub *S. acutifolia*.

6. Z ekstraktu metanolowego z kory *S. purpurea* (7043) wyodrębniono pirokatechinę, której strukturę potwierdzono w oparciu o widma UV, EI-MS oraz ^1H i ^{13}C NMR. Obecność pirokatecholu, metodą MGD-HPTLC, stwierdzono w 29 z 43 badanych gatunków i klonów wierzb. Zawartość pirokatecholu wahała się od 0,05 mg/g do 2,25 mg/g. Najwyższą zawartością pirokatechiny charakteryzowała się kora *S. purpurea* (7043) (2,25 mg/g). Obserwowano wzrost stężenia pirokatecholu w procesie hydrolizy, szczególnie alkalicznej. Wśród hydrolizatów najwyższe stężenie pirokatechiny odnotowano dla hydrolizatu alkalicznego z *S. daphnoides* klon 1095 (7004) o wysokiej zawartości salikortyny.

7. Potwierdzono, w obrębie rodzaju *Salix*, występowanie kwasów: p-hydroksybenzoesowego, salicylowego, wanilinowego, p-kumarowego, chlorogenowego, syryngowego, protokatechowego, gentyzynowego, ferulowego i kawowego. Spośród nich najczęściej występowały w badanym materiale roślinnym kwasy: p-hydroksybenzoesowy (41 przedstawicieli gatunków i klonów), salicylowy (38), p-kumarowy (36) i cynamonowy (33).

Po raz pierwszy odnotowano obecność kwasów: α -rezorcylowego (*S. daphnoides* klon 1095 (7004), *S. purpurea* klon 1136 (7011) i *S. purpurea* (7042)), dihydrokawowego (*S. purpurea* (7041), *S. purpurea* klon 1153 (7012) i *S. viminalis* (7029)) oraz galusowego (*S. acutifolia* (7031), *S. daphnoides* klon 1095 (7004), *S. melanostachys* (7022), *S. purpurea* (7042) i (7041) oraz *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026)).

8. W opracowanych warunkach analizy chromatograficznej TLC, HPTLC i HPLC po raz pierwszy określono skład zespołów związków czynnych w gatunkach: *S. × erythroflexuosa*, *S. melanostachys*, *S. nakamura* var. *yezoalpina*, *S. × sepulcralis* i *S. silesiaca*, mianowicie:

a) w mieszańcu *S. × erythroflexuosa* (7019) wykryto: salicynę, 2'-acetylosalikortynę i triandrynę z grupy glikozydów fenolowych, naryngeninę, 3-O-glukozyd kemferolu i luteolinę z grupy flawonoidów, kwasy p-hydroksybenzoesowy i p-kumarowy z grupy fenolokwasów, oraz katechinę, epikatechinę, galusan katechiny z grupy flawan-3-oli;

b) w gatunku *S. melanostachys* (7022) wykryto: salicynę i salikortynę z grupy glikozydów fenolowych, kwas galusowy z grupy fenolokwasów, naryngeninę, 3-O-glukozyd kemferolu z grupy flawonoidów oraz katechinę, epikatechinę, galusan katechiny, procyanidynę B₁ z grupy flawan-3-oli;

c) w podgatunku *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025): salicynę, salikortynę, triandrynę i piceinę z grupy glikozydów fenolowych, naryngeninę, z grupy flawonoidów, kwasy: p-hydroksybenzoesowy, chlorogenowy, cynamonowy, protokatechowy, salicylowy z grupy fenolokwasów oraz katechinę, epikatechinę, procyanidynę B₁ z grupy flawan-3-oli;

d) w mieszańcu *S. × sepulcralis* (7027): salicynę, 2'-acetylosalikortynę, salikortynę, triandrynę z grupy glikozydów fenolowych, kwercetynę, mirycetynę, apigeninę z grupy flawonoidów, kwasy: p-hydroksybenzoesowy, chlorogenowy, salicylowy i wanilinowy z grupy fenolokwasów oraz katechinę, epikatechinę, procyanidynę B₁ z grupy flawan-3-oli;

e) w gatunku *S. silesiaca* (7024): salicynę i triandrynę, z grupy glikozydów fenolowych, kwasy: p-hydroksybenzoesowy, cynamonowy, protokatechowy, salicylowy z grupy fenolokwasów.

Ponadto w gatunkach, z uwzględnieniem ich klonów, o rozpoznanym składzie chemicznym zidentyfikowano chromatograficznie wobec wzorców obecność nie opisanych w nich wcześniej związków, mianowicie:

- *S. acutifolia* (7031) – kwas galusowy, apigeninę, epikatechinę, galusan katechiny;
- *S. alba* (7032) i jej klonie 1100 (7001) – 2'-acetylosalikortynę, epikatechinę, procyanidynę B₁ oraz galusan katechiny w *S. alba* (7032), natomiast mirycetynę i apigeninę w jej klonie – *S. alba* klon 1100 (7001);
- *S. amygdalina × viminalis* klon 1155 (7003) – salikortynę, triandrynę, apigeninę, katechinę, epikatechinę;
- *S. × americana* klon 1036 (7002) – salikortynę, triandrynę, naryngeninę, kwercetynę, kemferol, 3-O-glukozyd kemferolu, katechinę, epikatechinę;

- *S. daphnoides* (7033) i jej klonie 1095 (7004) – apigeninę, katechinę, epikatechinę, procyanidynę B₁ oraz galusan katechiny w *S. daphnoides* (7033), natomiast kwasy α -rezorcylowy i galusowy, kwercetynę i jej 3-O-glukozyd, mirycetynę, 7-O-glukozyd luteoliny w *S. daphnoides* klon 1095 (7004);
- *S. eriocephala* (7034) – salikortynę, triandrynę, naryngeninę, 3-O-glukozyd kwercetyny, katechinę, epikatechinę, procyanidynę B₁,
- *S. fragilis* (7035) i jej podgatunku *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020) – tremulacynę, katechinę, epikatechinę, galusan katechiny, procyanidynę B₁ oraz naryngeninę i apigeninę w *S. fragilis* (7035);
- *S. herbacea* (7030) – naryngeninę, 3-O-glukozyd kwercetyny, apigeninę, procyanidynę B₁,
- *S. matsudana* ‘Tortuosa’ (7028) – 2’-acetylosalikortynę, triandrynę, katechinę, epikatechinę, procyanidynę B₁,
- *S. purpurea* (7042) i jej klonach: 1038 (7005), 1067 (7006), 1081 (7007), 1084 (7008), 1101 (7009) – 7-O-glukozyd luteoliny oraz *S. purpurea* (7042) i jej klonach 1067 (7006), 1084 (7008), 1101 (7009) – kwercetynę, *S. purpurea* (7042) i jej klonach 1081 (7007), 1084 (7008) – kemferol, *S. purpurea* (7036), (7037) i jej klonach 1067 (7006), 1136 (7011), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014) – apigeninę, *S. purpurea* (7036), (7037) i jej klonach: 1132 (7010), 1136 (7011), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014) – galusan katechiny, *S. purpurea* (7041) i jej klonach: 1067 (7006), 1153 (7012), 1156 (7013) – triandrynę, *S. purpurea* (7042) i jej klonie 1081 (7007) – 3-O-glukozyd kemferolu, *S. purpurea* (7041) i jej klonie 1153 (7012) – kwas dihydrokawowy, *S. purpurea* (7042) i jej klonie 1136 (7011) – kwas α -rezorcylowy, *S. purpurea* (7042) i jej klonie 1038 (7005) – mirycetynę, *S. purpurea* (7041), (7042) – kwas galusowy oraz *S. purpurea* (7042) – 7-O-ramnozyd kemferolu, 7-O-glukozyd apigeniny, rutyne, *S. purpurea* (7041) – piceinę i luteolinę, *S. purpurea* (7036) – 2’-acetylosalikortynę i *S. purpurea* klon 1136 (7011) – 3-O-glukozyd kwercetyny.
- *S. purpurea* \times *daphnoides* klon 1107 (7015) – kemferol, 3-O-glukozyd kemferolu, luteolinę, 7-O-glukozyd luteoliny;
- *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026) – salikortynę, triandrynę, kwas galusowy, naryngeninę, 3-O-glukozyd kwercetyny, rutyne, 7-O-glukozyd luteoliny, 7-O-glukozyd apigeniny, procyanidynę B₁;
- *S. triandra* (7038) i jej klonach: 1044 (7016) i 1045 (7017) – katechinę, epikatechinę, procyanidynę B₁ oraz tremulacynę w *S. triandra* (7038), natomiast mirycetynę w klonach: 1044 (7016) i 1045 (7017);
- *S. viminalis* (7029) i jej klonie 1083 (7018) – katechinę, epikatechinę, oraz kwas dihydrokawowy, rutyne, apigeninę i procyanidynę B₁ w *S. viminalis* (7029), natomiast

salikortynę, kwercetynę, 3-O-glukozyd kemferolu, salipurpozyd, izosalipurpozyd i 7-O-glukozyd luteoliny w *S. viminalis* klon 1083 (7018).

9. Opierając się na wynikach przeprowadzonych analiz jakościowych i ilościowych, następujące gatunki i klony uznano za najbogatsze źródła, następujących związków czynnych:

a) salicyny wolnej i estrowo związanej – gatunki *S. purpurea* (7043) oraz *S. daphnoides* klon 1095 (7004) (24,7 mg/g i 94,7 mg/g, odpowiednio);

b) flawanonów – *S. purpurea* (7042) (41,93 mg/g), *S. daphnoides* (7033) (36,75 mg/g) i *S. daphnoides* klon 1095 (7004) (26,60 mg/g); chalkonów – *S. daphnoides* klon 1095 (22,01 mg/g), *S. purpurea* klon 1132 (7010) (9,99 mg/g) i *S. purpurea* (7043) (7,77 mg/g); najwyższą zawartość sumy tych związków odnotowano dla *S. daphnoides* klon 1095 (7004) (48,61 mg/g) i *S. purpurea* (7042) (41,93 mg/g).

c) procyjanidyny B₁ klon 1100 *S. alba* (7001) (2,23 mg/g);

d) katechiny gatunki *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026) (18,0 mg/g), *S. melanostachy* (7022) (11,02 mg/g) i *S. alba* (7032) (9,39 mg/g); epikatechiny – *S. daphnoides* klon 1095 (7004) (0,68 mg/g) oraz galusanu katechiny – *S. × erythroflexuosa* (7019) (0,76 mg/g).

10. W teście MTT wykazano selektywną aktywność cytotoksyczną: pirokatecholu, tremulacyny, kwasu salicylowego, katechiny, izosalipurpozydu i jego estru p-kumarowego, także naryngeniny oraz jej 5-O- i 7-O-glukozydów oraz ekstraktów suchych z kory wierzby – *Salix purpurea* (7043), *S. daphnoides* klon 1095 (7004) oraz *S. alba* klon 1100 (7001) wobec linii komórek białaczki promielocytarnej (HL-60). Najwyższą aktywnością cytotoksyczną wśród badanych związków charakteryzowała się pirokatechina (IC₅₀ = 2,5 µg/ml), a najniższą katechina (IC₅₀ = 55 µg/ml). Kwas salicylowy posiadał działanie cytotoksyczne również w stosunku do linii komórek ludzkiego raka szyjki macicy (HeLa) (IC₅₀ = 27 µg/ml). Spośród badanych ekstraktów suchych, najwyższą aktywnością cytotoksyczną charakteryzował się ekstrakt z kory *S. purpurea* (7043) (IC₅₀ = 35 µg/ml).

Nie ujawniono aktywności genotoksycznej pirokatecholu i ekstraktu suchego z kory *S. purpurea* (7043) w teście kometowym (*Single Cell Gel Electrophoresis* – SCGE).

11. Przeprowadzone badania materiału otrzymanego z firm zielarskich, wskazują na niską jakość surowców znajdujących się w obrocie farmaceutycznym. Na tym tle kory firm „Herbapol” Wrocław i „Labofarm” charakteryzują się stosunkowo wysoką zawartością salicyny i flawonoidów.

Skład chemiczny kory firmy „Herbapol” Gdańsk (7041) wskazuje na błąd w oznaczeniu pochodzenia botanicznego surowca. W zespole kory wierzby dominuje piceina obok triandryny i śladowych ilości salicyny, natomiast nie występuje izosalipurpozyd i pochodne naryngeniny, co przemawia za gatunkiem *S. caprea* lub *S. cinerea*, a nie *S. purpurea*, jak podaje producent [104,150,229].

12. W rezultacie przeprowadzonych prac, kolekcję wierzb Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, na tle danych literaturowych [10,102,188,222,229], uznano za cenne źródło surowca *Salicis cortex* o bardzo wysokich zawartościach salicyny. Są to mianowicie klony *S. daphnoides* klon 1095 (7004) (94,7 mg/g), *S. purpurea* klon 1136 (7011) (66,3 mg/g) oraz *S. alba* klon 1100 (7001) (35,8 mg/g).

Jednocześnie wyniki analiz składu chemicznego kor poszczególnych klonów, wskazują na nieprawidłową klasyfikację:

a) klonu *S. viminalis* 1083 (7018), który zawiera salicynę, salikortynę i izosalipurpozyd, a nie posiada triandryny – markera chemotaksonomicznego tego gatunku, co wskazuje przypuszczalnie na przynależność klonu do wierzby purpurowej;

b) klonów *S. purpurea* 1067 (7006), 1153 (7012), 1156 (7013) i 1157 (7014), które zawierają triandrynę w przeciwieństwie do innych przedstawicieli tego gatunku. Ponadto klony 1153 (7012) i 1156 (7013) charakteryzuje brak izosalipurpozydu i glikozydów naryngeniny oraz salikortyny – związku dominującego w korach wierzby purpurowej [16,229].

13. Wykazane metodami chromatograficznymi różnice w składzie zespołów fenolowych w korze badanych wierzb, w tym szczególnie gatunków dostarczających surowca leczniczego, mianowicie *Salix alba*, *S. daphnoides* i *S. purpurea*, wskazują na konieczność precyzyjnego określenia gatunków wierzby, które mogą stanowić źródło surowca leczniczego – *Salicis cortex* o powtarzalnej aktywności leczniczej, warunkowanej jego składem chemicznym.

V. SUMMARY

The aim of this dissertation are the research on the chemical composition of the barks of 38 species and clones of *Salix*, which are cultivated or are grown in natural conditions. In order to differentiate each species or clones the indexes are assigned to them in range from 7001 to 7043. The plant material was chosen as follows: *Salix acutifolia* (7031); *S. alba* (7032); and clone 1100 (7001); *S. × americana* clone 1036 (7002); *S. amygdalina × viminalis* clone 1155 (7003); *S. daphnoides* (7033) and clone 1095 (7004); *S. eriocephala* (7034); *S. × erythroflexuosa* (7019); *S. fragilis* (7035), *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020); *S. herbacea* (7030); *S. lapponum* (7021); *S. matsudana* ‘Tortuosa’ (7028); *S. melanostachys* (7022); *S. nakamuraana* var. *yezoalpina* (7025), *S. purpurea* (7036), (7037) and clones: 1038 (7005), 1067 (7006), 1081 (7007), 1084 (7008), 1101 (7009), 1132 (7010), 1136 (7011), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014), *S. purpurea × daphnoides* 1107 (7015); *S. rosmarinifolia* (7023); *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026); *S. × sepulcralis* (7027); *S. silesiaca* (7024); *S. triandra* (7038) and clones 1044 (7016), 1045 (7017); *S. viminalis* (7029) and its clone 1083 (7018). Moreover, the research comprised the herbal remedy from herbal companies such as Kawon-Hurt Gostyń, Flos Morks, Herbapol Gdańsk, Herbapol Wrocław, and Labofarm Starogard Gdański. According to the producers specification the starting plant material was a mixture of the willows’ bark *S. alba* and *S. purpurea* (7039), *S. alba* or *S. purpurea* (7040), *S. purpurea*: (7041), (7042), and (7043), respectively.

This doctoral dissertation consists of three main parts. The first part contains the general botanical characteristic of an investigated willow species. Furthermore, it discusses the actual state of knowledge about pharmacological activity of proanthocyanidins and flavanones with taking into consideration the presence of these compounds in some willows. On the other hand, the basis of two dimensional separation systems are presented, including two dimensional high performance liquid chromatography – 2D-HPLC against their applications to biological samples analysis. The second part explains the research methodology, whereas the third describes the results of phytochemical research on: salicylic compounds, phenolic acids, flavonoids, and derivatives of flavan-3-ols in analysed plant material.

In order to perform these analysis the analytical procedures were prepared employing solid phase extraction (SPE) as a sample preparation stage.

The chemical composition of the species and clones of willows mentioned above, both in qualitative and quantitative range was recognized by the following chromatographic methods: *Thin Layer Chromatography* (TLC), *High Performance Thin Layer*

Chromatography (HPTLC), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) in one or two dimensional systems (2D-HPLC).

In order to characterize the plant material in the range of phenolic derivatives – simple phenols and polyphenols, the research took into consideration the methanol extracts and their ether fractions, and also acid hydrolysates, as well as alkaline of the methanol extracts.

The chromatographic separations were optimised for 63 standard compounds from the simple phenols group, including phenolic acids as follows: benzoic acid and its derivatives such as acids: salicylic, m- and p-hydroxybenzoic, 2,3-dihydroxybenzoic acid, α -, β -, γ -resorcylic acid, gentisic acid, protocatechuic acid, gallic acid, 2,4-dimethoxybenzoic acid, veratric acid, vanillic acid, syringic acid, cinnamic acid and its derivatives such as: acids m-, o-, p-coumaric acid, ferulic acid, isoferulic acid, caffeic acid, synapinic acid, 4-methoxycinnamic acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid, chlorogenic acid, dihydrocaffeic acid, homogentisic acid, homovanillic acid; the glycoside derivatives of simple phenols as follows: salicin, salicortin, 2'-acetylsalicortin, populin, tremulacin, helicin, picein, salidroside, and polyphenols, including flavonoids: the derivatives of flavone: apigenin, luteolin, and their 7-O-glycosides, the derivatives of flavonols: isorhamnetin, kaempferol, quercetin, and their glycosides, myricetin, kaempferol 7-O-rhamnoside, rutin, the derivatives of flavanones: naringenin and its 7-O-glycoside as well as 7-O-neohesperoside, biflavonoids: amentoflavone, cupressuflavone, flavan-3-ols: catechin, epicatechin, galocatechin, catechin gallate and their dimers: procyanidins B₁ and B₂ as well. The group of standard substances was completed by the compounds, which were isolated by the preparative thin layer chromatography from the bark of: *S. viminalis* – triandrin [16,229], *S. purpurea* – salicortin and *S. fragilis* – 2'-acetylsalicortin, respectively [86,102].

From the bark of *S. purpurea* (7043) four compounds (compounds 1-4) were isolated by the preparative column chromatography, and semi-preparative HPLC. Those compounds were identified by the comparison of its retention parameters (t_R) to the literature data [149] and also on the basis of its spectra: UV, ¹H NMR, ¹³C NMR, and ¹H-¹H-COSY, HMBC, HSQC, ROESY as: 6''-O-(*E*)-p-coumaroyloisosalipurposide – **1**, naringenin (+)-5-O-glycoside – **2**, naringenin (-)-5-O-glycoside – **3** and isosalipurposide – **4**.

The analysis of phenolic glycosides as follows; salicin, salicortin, 2'-acetylsalicortin, picein, helicin, salidroside, triandrin, populin and tremulacin was carried out by TLC on silica gel as stationary phase with the use of the solvent mixture: ethyl acetate / methanol / water (77+13+10, v/v/v). The separation conditions of the same standard mixture were optimized by HPLC method on the monolithic column Chromolith Performance Si connected with Chromolith Performance RP-18e, by the use of gradient elution in the mixture of acetonitrile /

water+trifluoroacetic acid (99,95+0,05, v/v) with the increasing concentration of acetonitrile from 3% to 48% ($t_G = 27$ min). In the compounds' detection both UV-Vis and ELS (*Evaporative Light Scattering Detector*) detectors were used. The ELS detector was applied parallel with UV detector, as a specific one in the analysis of salicylic compounds.

In these conditions the chemical composition of salicylic compounds was established in species such as: *S. alba* (7032), and in its clone 1100 (7002), *S. daphnoides* clone 1095 (7004), *S. herbacea* (7030), *S. purpurea* (7036), *S. triandra* (7038) and *S. viminalis* (7029).

The presence of salicin in the majority of analysed barks was confirmed with the exception of the following willows' barks: *S. triandra* (7038), and its clones 1044 (7016) as well as 1045 (7017), and in the barks *S. amygdalina* × *viminalis* clone 1155 (7003), *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026), *S. matsudana* 'Tortuosa' (7028), *S. rosmarinifolia* (7023) and *S. viminalis* (7029).

Within the salicylic derivatives and some phenolic glycosides the appearance of mentioned below compounds in willow barks was revealed for the first time:

- a) 2'-acetylsalicortin in the barks of *S. alba* (7032) and its clones 1100 (7001) as well as *S. purpurea* (7036), *S. × sepulcralis* (7027), *S. × erythroflexuosa* (7019) and *S. matsudana* 'Tortuosa' (7028),
- b) salicortin in the barks of: *S. amygdalina* × *viminalis* clone 1155 (7003), *S. melanostachy* (7022), *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026), *S. eriocephala* (7034), *S. americana* clone 1036 (7002), *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), *S. × sepulcralis* (7027) and *S. viminalis* clone 1083 (7018),
- c) tremulacin in the bark of *S. triandra* (7038), *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020) and *S. fragilis* (7035),
- d) triandrin in the barks of *S. silesiaca* (7024), *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026), *S. matsudana* 'Tortuosa' (7028), *S. eriocephala* (7034), *S. americana* clone 1036 (7002), *S. purpurea* (the Herbapol Gdańsk company (7041)), *S. × sepulcralis* (7027), *S. × erythroflexuosa* (7019) and *S. amygdalina* × *viminalis* 1155 (7003). This compound was present in the 4 out of 10 the analysed red willow clones – *S. purpurea* clones: 1067 (7006), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014),
- e) picein in the bark of *S. purpurea* (7041) and *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025).

The quantitative analysis method of free and total salicin as SPE-HPLC method was worked out. The methanol extracts from bark and its alkaline hydrolysates were placed on SPE columns, which were filled up with the silica gel LiChroprep RP-18 (150 mg) and the next were eluted with the mixture of acetonitrile / water (2+8, v/v). The chromatographic separation of purified extracts was carried out on Discovery C18 column with the use

of isocratic elution in the mixture of acetonitrile / water / orthophosphoric acid (7+92,91+0,09, v/v/v), as the mobile phase.

The highest concentration of free salicin was observed in the bark of *S. purpurea* (7043) (24,7 mg/g), whereas the bark of *S. daphnoides* clone 1095 (7004) had the highest concentration of total salicin (94,7 mg/g), which was determined after alkaline hydrolysis of its ester derivatives.

The analysis of phenolic acids was made by the TLC method on cellulose, silica gel, and silica gel RP-18 plates in the known for these compounds chromatographic systems [147,166]. Moreover, the conditions of phenolic acids separation were optimised (11 phenolic acids: α -resorcylic, caffeic, p-, m-hydroxybenzoic, p-coumaric, syringic, ferulic, vanillic, veratric, cinnamic and 4-methoxycinnamic) on the HPLTC Diol adsorbent as stationary phase with the use of MGD technique. The best separation was achieved according to the optimised gradient programme in the mixture of solvents: chloroform / hexane / ethyl acetate with the increasing concentration of ethyl acetate from 10% to 25% within the subsequent gradient stages.

The obtained TLC results of phenolic acids presence in the willow barks were confirmed by the HPLC method on Lichrospher column 100 RP-18e (250 mm \times 4 mm, 5 μ m) with linear / irregular profile of gradient elution in the mixture of methanol / water / orthophosphoric acid (99,9+0,1, v/v).

As the result of carried out analysis in the range of *Salix* genus the presence of the following acids was confirmed: p-hydroxybenzoic, salicylic, syringic, vanillic, cinnamic, p-coumaric, chlorogenic, protocatechuic, gentisic, ferulic and caffeic. The most often of the above-mentioned acids were identified as follows: p-hydroxybenzoic (41 species and clones), salicylic (38), p-coumaric (36) and cinnamic (33).

Regarding of the gathered literature data the presence of some acids in the willows' bark was demonstrated for the first time: α -resorcylic – *S. daphnoides* clone 1095 (7004), *S. purpurea* clone 1136 (7011), and *S. purpurea* (7042), dihydrocaffeic – *S. purpurea* (7041), *S. purpurea* clone 1153 (7012), and *S. viminalis* (7029), and gallic – *S. acutifolia* (7031), *S. daphnoides* clone 1095 (7004), *S. melanostachys* (7022), *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026) as well as the materials of Herbapol Wrocław (7042), and Herbapol Gdańsk (7041).

The low concentration of phenolic acids in the examined material was observed. The phenolic acids' group in the clone bark of the violet willow (*S. daphnoides* clone 1095 (7004)) were recognized as the most diversity ones.

As the result, the possibility to use of thymol reagent for specific identification of phenolic acids containing methoxyl groups on Diol adsorbent, was showed for the first time.

During the phenolic acids separation by MGD-HPTLC method in the bark of 28 out of 43 examined species and willow clones the presence of compound **5** was revealed, which was isolated from *S. purpurea* (7043) by preparative HPTLC method. The compound **5** was identified as pyrocatechol on the basis on the UV, EI-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR spectra.

In pyrocatechin quantitative analysis within the bark of willow, the chromatographic system earlier applied also to the phenolic acids analysis – MGD-HPTLC was used. Moreover, the compound was determined by HPLC method on Discovery HS C18 column with the use of gradient elution in the mixture of acetonitrile / water+acetic acid (99,9+0,1, v/v) with the increasing acetonitrile concentration from 2% to 17%.

The *S. purpurea* bark (7043) characterized the highest content of pyrocatechol (2,25 mg/g). In hydrolysis process, mainly in alkaline one the increase of pyrocatechol concentration was observed. Among the hydrolysates, the highest pirocatechin concentration was noted down for alkaline hydrolysate from *S. daphnoides* clone 1095 (7004)'s bark with high salicortin content.

The flavonoids analysis was carried out by 1D and 2D-TLC methods on cellulose adsorbent with typical for these compounds mobile phases – Forestal's and Patridge's systems, 15% and 30% acetic acid as well [128,139].

For the first time the presence of the following flavonoids was revealed:

a) naringenin – *S. × americana* clone 1036 (7002), *S. × erythroflexuosa* (7019), *S. fragilis* (7035), *S. melanostachys* (7022), *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026), *S. eriocephala* (7034), *S. fragilis* (7035) and *S. herbacea* (7030),

b) quercetin – *S. × americana* clone 1036 (7002), *S. daphnoides* clone 1095 (7004), *S. purpurea* (7042) and its clones: 1067 (7006), 1084 (7008), 1101 (7009) and *S. viminalis* clone 1083 (7018),

c) quercetin 3-O-glycoside – *S. daphnoides* clone 1095 (7004), *S. eriocephala* (7034), *S. herbacea* (7030), *S. purpurea* clone 1136 (7011) and *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026),

d) rutin – *S. purpurea* (7042), *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026) and *S. viminalis* (7029),

e) kaempferol – *S. purpurea* (7042), (7036), (7043), and clones: 1081 (7007), 1084 (7008), 1153 (7012), *S. purpurea* × *daphnoides* clone 1107 (7015),

f) kaempferol 3-O-glycoside – *S. × americana* clone 1036 (7002), *S. × erythroflexuosa* (7019), *S. melanostachys* (7022), *S. purpurea* (7042), *S. purpurea* clone 1081 (7007), *S. purpurea* × *daphnoides* klon 1107 (7015) and *S. viminalis* clone 1083 (7018),

g) kaempferol 7-O-rhamnoside – *S. purpurea* (7039),

h) myricetin – *S. alba* clone 1100 (7001), *S. daphnoides* clone 1095 (7004), *S. purpurea* (7042), *S. purpurea* clone 1038 (7005), *S. × sepulcralis* (7027), *S. triandra* clone 1044 (7016), and 1045 (7017) *S. amygdalina × viminalis* clone 1155 (7003), *S. herbacea* (7030), *S. purpurea* clone 1153 (7012) and *S. viminalis* (7029),

i) luteolin – *S. daphnoides* (7033), *S. × erythroflexuosa* (7019), *S. Purpurea × daphnoides* clone 1107 (7015), *S. daphnoides* clone 1095 (7004), *S. purpurea* clone 1153 (7012), *S. amygdalina × viminalis* clone 1155 (7003) and *S. viminalis* (7029),

j) luteolin 7-O-glycoside – *S. purpurea* clones: 1038 (7005), 1067 (7006), 1081 (7007), 1084 (7008), 1101 (7009), and *S. purpurea × daphnoides* clone 1107 (7015), *S. purpurea* (7042), *S. daphnoides* clone 1095 (7004), *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026) and *S. viminalis* clone 1083 (7018),

k) apigenin – *S. acutifolia* (7031), *S. alba* clone 1100 (7001), *S. amygdalina × viminalis* clone 1155 (7003), *S. daphnoides* (7033), *S. daphnoides* clone 1095 (7004), *S. fragilis* (7035), *S. herbacea* (7030), *S. purpurea* (7036), (7037), (7039), (7040), (7042) and clones: 1067 (7006), 1136 (7011), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014), *S. × sepulcralis* (7027), *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026), *S. triandra* clone 1045 (7017) and *S. viminalis* (7029),

l) apigenin 7-O-glycoside – *S. purpurea* (7042), *S. sachalinensis* ‘Sekka’ (7026), *S. triandra* clone 1045 (7017).

The qualitative and quantitative analysis conditions were worked out by HPLC method within the mixture of five flavonoids: naringenin, naringenin (+) and (-)-5-O-glycosides, naringenin 7-O-glycoside, isosalipurposide and its p-coumaric ester. The chromatographic separation was carried out on reversed phases’ system on Discovery C18 column, including the use of gradient elution in the mixture of acetonitrile / water+orthophosphoric acid (99,9+0,1, v/v) with the increasing concentration of organic solvent from 2% to 37%. In order to identify the analysed compounds not only the detector UV-Vis ($\lambda = 280$ nm), but also the diode array detector (DAD) were applied. Furthermore, for the purpose of time shortening the chalcones chromatographic analysis, the conditions of purifying extracts were elaborated by SPE method.

The highest content of flavanones had the barks of: *S. purpurea* (7042) (41,93 mg/g), *S. daphnoides* (7033), and *S. daphnoides* clone 1095 (7004) (26,60 mg/g), whereas the highest concentrations of chalcones were revealed for barks of *S. daphnoides* clone 1095 (22,01 mg/g), *S. purpurea* clone 1132 (7010) (9,99 mg/g), and *S. purpurea* (7043) (7,77 mg/g) as well.

The conditions of quantitative and qualitative analysis were optimized within the mixtures of four flavan-3-ols: catechin, epicatechin, catechin gallate and gallic acid by the following methods: SPE-HPTLC and SPE-HPLC in reversed phases' system on RP-18 adsorbent. The separation by planar chromatography was carried out on silica gel HPTLC RP-18W with the use of MGD technique with the mixture of acetonitrile / water / formic acid with the increasing concentration of an organic modifier from 20% to 22%.

The HPLC analysis was performed on Purospher Star RP-18e column with gradient elution in the mixture of acetonitrile / water+orthophosphoric acid (99,9+0,1, v/v) with the increasing concentration of acetonitrile from 2 % to 17%.

In order to carry on the analyse of monomeric flavan-3-ols, the conditions of purifying extracts were worked out by methanol SPE method from the willows' bark. There were used the Octadecyl C18 (500 mg, 3ml) column, which were washed out with the mixture of acetonitrile / water (30+70, v/v) after the depositing of methanol extract from the willow bark. In the obtained conditions the recovery of catechin was $96,5 \pm 1,7\%$.

The catechin was identified in all analysed species and clones. However, the epicatechin was not identified in the bark *S. rosmarinifolia* (7023) and *S. sachalinensis* 'Sekka'. The presence of catechin gallate was observed in bark extracts such as: *Salix acutifolia* (7031), *S. alba* (7032), *S. × erythroflexuosa* (7019), *S. fragilis* (7035), *S. fragilis* var. *sphaerica* (7020), *S. melanostachys* (7022), *S. purpurea* (7036), (7037) and the clones of purple willow; 1132 (7010), 1136 (7011), 1153 (7012), 1156 (7013), 1157 (7014). However, the presence of gallic acid was not observed in any of analysed species.

The highest content of catechin was noted down for *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026) (18,0 mg/g), *S. melanostachys* (7022) (11,02 mg/g) and *S. alba* (7032) (9,39 mg/g), epicatechin for *S. daphnoides* clone 1095 (7004) (0,68 mg/g), and catechin gallate for the bark of *S. × erythroflexuosa* (7019) (0,76 mg/g).

In the preliminary TLC analysis of B₁ and B₂ procyanidins in catechin presence, the stationary polyamide phase was used with the mixture of solvents such as: chloroform/ methanol/ methyl-ethyl keton (40+20+30, v/v/v). The conditions of procyanidins quantitative analysis by HPTLC method on silica gel were worked out with the use of solvents mixture: chloroform / ethanol / formic acid (50+40+6, v/v/v).

In the 30 of examined willows' bark the presence of procyanidin B₁ was revealed. However, the presence of procyanidin B₂ was not stated in any of the analysed willows. The highest content of procyanidin B₁ was determined in the willow *S. alba* clone 1100 (7001) (2,23 mg/g).

It is worthy to notice, that the chemical composition of the following species was recognized for the first time, namely *S. × erythroflexuosa* (7019), *S. melanostachys* (7022), *S. nakamura* var. *yezoalpina* (7025), *S. × sepulcralis* (7027) and *S. silesiaca* (7024).

The system of two dimensional high performance liquid chromatography (2D-HPLC) was elaborated for the purpose of the rapid comparative analysis of the willows' bark. This system considers the separation of 52 standard substances, including 29 phenolic acids and 21 flavonoids: 9 flavonols, 4 flavones, 4 flavanones, 2 biflavones, and 2 chalcones, and salicin, catechina as well.

The separation was performed on the *on-line* system by *heart-cut* technique. At first (I) dimension the Supelcosil column LC-18 was used as well as the gradient elution of the increasing methanol concentration in the mixture of methanol/ water with the flow rate of mobile phase 0,4 ml/min, and at the second (II) it was filled up with monolithic silica gel on the column of Chromolith Performance RP18e, and isocratic elution with the use of the acetonitrile and water mixtures as eluents (5+95, 10+90, 15+85, 20+80, 30+70, v/v).

In this conditions the methanol extracts from barks such as: *Salix purpurea* (7042), *S. daphnoides* clone 1095 (7004), and *S. sachalinensis* 'Sekka' (7026) were analysed. The 2D-HPLC method was used in order to analyse quantitatively three phenolic acids, which are dominant in the bark of violet willow clone 1095 (7004) – the acids chlorogenic, cinnamic, and protocatechuic. The highest concentration was estimated for chlorogenic acid – 5,31 mg/g.

The 2D-HPLC method enables to analyse the plant extracts with the avoidance of the purifying sample process. The worked out system can be successfully used in the phenolic acids and flavonoids compounds analysis in other plant matrices.

The cytotoxic activity of: pyrocatechol, salicin, tremulacin, salicylic acid, catechin, isosalipurposide and its p-coumaric ester, naringenin and its 5-O- and 7-O-glycosides was examined in MTT assay. The experiments were carried out also for dried extracts, which were prepared from the willow bark of: *S. purpurea* (7043), *S. daphnoides* clone 1095 (7004), and *S. alba* clone 1100 (7001). The selective cytotoxic activity of the above mentioned compounds and dry extracts in the presence of the human promyelocytic leukemia cells (HL-60) was determined.

Among the examined compounds the highest cytotoxic activity was revealed for pyrocatechol ($IC_{50} = 2,5 \mu\text{g/ml}$), whereas the lowest value was for catechin ($IC_{50} = 55 \mu\text{g/ml}$). The cytotoxicity was not identified for salicin, among the used range of concentration (0-70 $\mu\text{g/ml}$), within any of the examined cell lines. However, the salicylic acid had the cytotoxic effect in comparison with the cell lines of the human cervical cancer cells (HeLa) (27 $\mu\text{g/ml}$).

The highest cytotoxic activity of dry extracts was characteristic for the extract of *S. purpurea* bark (7043) ($IC_{50} = 35 \mu\text{g/ml}$).

The genotoxic activity of pyrocatechol and dry extracts from *S. purpurea* bark (7043) by the comet test (*Single Cell Gel Electrophoresis – SCGE*) was not revealed.

The obtained results indicate that the botanic classification of *S. viminalis* clone 1083 (7018) from UWM collection is not correct. The clone mentioned above by contrast with literature data [229] and the chemical composition of *S. viminalis* bark (7029), characterizes the presence of salicin, salicortin, and isosalipurposide but it does not contain triandrin – chemotaxonomic marker of this species. The chemical composition of the bark of this clone points out the red willow affiliation. Whereas the presence of triandrin distinguishes the clone *S. purpurea* 1067 (7006), 1153 (7012), 1156 (7013), and 1157 (7014) among the representative of this species. Moreover, the clones 1153 (7012) and 1156 (7013) are characterized by the lack of salicortin, which is dominant in the bark of red willow [16,229].

Furthermore, the similar differences of compounds composition were characteristic for the *S. purpurea* (7041) bark, produced by the Herbapol Gdańsk company. In this material the dominant is picein as well as triandrin and the trace amount of salicin. Furthermore, the presence of isosalipurposide and the derivatives of naringenin were not stated, what among the background details of literature indicates rather on the species of *S. caprea* or *S. cinerea* [104,150,229]. The presence of 6''-O-(*E*)-p-coumaroylisosalipurposide in the bark of Labofarm company (7043) indicate rather on the species of *S. daphnoides* or *S. acutifolia*, but not the *S. purpurea* as the producer label informs.

In the case of carried qualitative and quantitative analysis on the chemical composition of the willows' barks, the species and clones of *S. daphnoides* clone 1095 (7004), *S. purpurea* (7042) and *S. acutifolia* (7031) were particularly abounded with the derivatives of salicylic compounds, and the polyphenol compounds from the groups of chalcones and flavanones.

The differences, shown by the use of chromatographic methods, in the compositions of phenolic compounds in the examined willows' bark, mainly in the species, which are the source of the starting plant material – *Salix alba*, *S. daphnoides*, and *S. purpurea* indicate the necessity of an accurate designation of the willow species, which can be used as a plant material – *Salicis cortex*, about the reproducible medicinal activity.

The carried research of the material, which was given by the herbal companies indicate on very poor quality of the raw material in the pharmaceutical turnover. In addition to that the barks produced by: Herbapol Wrocław and Labofarm characterized of relatively high content in salicin, and flavonoids.

VI. PIŚMIENICTWO

- [1] Abou Zeid A.H. (2006): *Phenolics, Volatiles and Biological Activities of Salix babylonica L. Leaves and Stem Bark*. *Planta Med.* 72: 1032.
- [2] Achmadi S., Syahbirin G., Choong E. T., Hemingway R. W. (1994): *Catechin-3-rhamnoside Chain Extender Units in Polymeric Procyanidins from Mangrove Bark*. *Phytochemistry* 35: 217-9.
- [3] Andersson M.A., Hellman B.E. (2005): *Different Roles of Fpg and Endo III on Catechol-Induced DNA Damage in Extended-term Cultures of Human Lymphocytes and L5178Y Mouse Lymphoma Cells*. *Toxicol. Vitro* 19: 779-86.
- [4] Arteel G.E., Schroeder P., Sies H. (2000): *Reactions of Peroxynitrite with Cocoa Procyanidin Oligomers*. *J. Nutr.* 130: 2100-4.
- [5] Arteel G.E., Sies H. (1999): *Protection Against Peroxynitrite by Cocoa Polyphenol Oligomers*. *FEBS Lett.* 462: 167-70.
- [6] Baba S., Osakebe N., Natsume M., Terao J. (2002): *Absorption and Urinary Excretion of Procyanidin B2 [Epicatechin-(4 β -8)-Epicatechin] in Rats*. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 142-148.
- [7] Bae E.A., Han M.J., Kim D.H. (1999): *In vitro Anti-Helicobacter pylori Activity of Some Flavonoids and Their Metabolites*. *Planta Med.* 65: 442-3.
- [8] Bagchi M., Balmoori J., Bagchi D., Ray S.D., Kuszynski Ch., Stohs S.J. (1999): *Smokeless Tobacco, Oxidative Stress, Apoptosis and Antioxidants in Human Oral Keratinocytes*. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 992-1000.
- [9] Behrens A., Maie N., Knicker H., Kögel-Knabner I. (2003): *MALDI-TOF Mass Spectrometry and PSD Fragmentation as Means for the Analysis of Condensed Tannins in Plant Leaves and Needles*. *Phytochemistry* 62: 1159-70.
- [10] Bisset N., Wichtl M. (2001): *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. CRC, London.
- [11] Blahova E., Jandera P., Cacciola F., Mondello L. (2006): *Two-Dimensional and Serial Column Reversed-Phase Separation of Phenolic Antioxidants on Octadecyl-, Polyethyleneglycol-, and Pentafluorophenylpropyl-Silica Columns*. *J. Sep. Sci.* 29: 555-66.
- [12] Blazsó G., Gábor M., Rohdewald P. (1997): *Antiinflammatory Activities of Procyanidin-Containing Extracts from Pinus pinaster Ait. after Oral and Cutaneous Application*. *Pharmazie* 52: 380-382.
- [13] Blythe C., Pereira L. (2005): *Selectivity Screening in the HPLC Analysis of Catechins*. *LC/GC – The Applications Book*, Dec. 22.

- [14] Bonina F., Lanza M., Montenegro L., Puglisi C., Tomaino A., Trombetta D., Castelli F., Saija A. (1996): *Flavonoids as Potential Protective Agents Against Photo-Oxidative Skin Damage*. Int. J. Pharm. 145: 87-94.
- [15] Borkowski B. (1993): *Fenolokwasy i ich estry*. Herba Pol. 39: 71-83.
- [16] Borkowski B. (1974): *Zarys farmakognozji*. PZWL, Warszawa.
- [17] Borkowski B., Miłowska K. (1997): *Garbniki skondensowane*. Herba Pol. 43: 73-97.
- [18] Borradaile N.M, De Dreu L.E., Barrett P.H.R., Huff M.W. (2002): *Inhibition of Hepatocyte apoB Secretion by Naringenin: Enhanced Rapid Intracellular Degradation Independent of Reduced Microsomal Cholesteryl Esters*. J. Lipid Res. 43: 1544-54.
- [19] Brickell Ch. (1999): *Wielka encyklopedia roślin ogrodowych od A do Z*. Muza S.A. Warszawa.
- [20] Bridel M., Beguin C. (1926): *Isolation of Rutoside, Asparagines and a New Glycoside, Hydrolysable by Emulsion, Salidroside from Salix triandra L*. Seances Acad. Sci. 183: 321-3.
- [21] Broda B., Mowszowicz J. (2000): *Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych*. PZWL, Warszawa.
- [22] Brūneton J. (1999): *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Intercept Ltd. London.
- [23] Bukowiecki H., Figurski R. (1968): *Wyodrębnienie salicyny i salirepozydu z Salix rosmarinifolia*. Acta Pol. Pharm. 25: 591-5.
- [24] Burger O., Ofek I., Tabak M., Weiss E.I., Sharon N., Neeman I. (2000): *A High Molecular Mass Constituent of Cranberry Juice Inhibits Helicobacter pylori Adhesion to Human Gastric Mucus*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29: 295-301.
- [25] Butterweck V., Lieflander-Wulf U., Winterhoff H., Nahrstedt A. (2003): *Plasma Levels of Hypericin in Presence of Procyanidin B2 and Hyperoside: a Pharmacokinetic Study in Rats*. Planta Med. 69: 189-92.
- [26] Caballero-George C., Vanderheyden P. M. L., Apers S., Van den Heuvel H., Solis P.N., Gupta M.P., Claeys M., Pieters L., Vauquelin G., Vlietinck A.J. (2002): *Inhibitory Activity on Binding of Specific Ligands to the Human Angiotensin II AT1 and Endothelin 1 ETA Receptors: Bioactive Benzo[c]phenanthridine Alkaloids from the Root of Bocconia frutescens*. Planta Med. 68: 770-5.
- [27] Camag – www.camag.com/pdf/Herbals/F-07_salix.pdf
- [28] Carando S., Teissedre P. L., Cabanis J. C. (1999): *HPLC Coupled with Fluorescence Detection for the Determination of Procyanidins in White Wines*. Chromatographia 50: 253-4.

- [29] Carnésecchi S., Schneider Y., Lazarus S.A., Coehlo D., Gossé F., Raul F. (2002): *Flavanols and Procyanidins of Cocoa and Chocolate Inhibit Growth and Polyamine Biosynthesis of Human Colonic Cancer Cells*. *Cancer Lett.* 175: 147-55.
- [30] Chen Z.P., Schell J.B., Ho Ch.T., Chen K.Y. (1998): *Green Tea Epigallocatechin Gallate Shows a Pronounced Growth Inhibitory Effect on Cancerous Cells but not on Their Normal Counterparts*. *Cancer Lett.* 129: 173-9.
- [31] Chiou G.C.Y., Xu X.R. (2004): *Effects of Some Natural Flavonoids on Retinal Function Recovery after Ischemic Insult in the Rat*. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 20: 107-13.
- [32] ChromBook 2004, Merck – chrombook.merck.de, www.chemdat.info.
- [33] Chrubasik S. (2003): *Effects of Willow Bark Extract and Therapeutic Activity*. *Clin. Pharmacol. Therap.* 74: 95.
- [34] Chrubasik S., Eisenberg E., Balan E., Weinberger T., Luzzati R., Conradt Ch. (2000): *Treatment of Low Back Pain Exacerbations with Willow Bark Extract: a Randomized Double-Blind Study*. *Am. J. Med.* 109: 9-14.
- [35] Chrubasik S., Pollack S., Black A. (2003): *Willow Bark Extract, a Useful Alternative for the Treatment of Osteoarthritis: Comment on the Editorial by Marcus and Suarez-Almazor*. *Arthritis Rheum.* 48: 278-80.
- [36] Chruściel T., Gibiński K. (1991): *Leksykon leków*. PZWL, Warszawa.
- [37] Cisowski W., Dembinska-Migas W., Majewska E. (1997): *Oznaczenie salicylanów po hydrolizie alkalicznej i salicyny przed hydrolizą w tabletkach z kory wierzby – Salicortex (Labofarm)*. *Herba Pol.* 43: 150-3.
- [38] Consden R., Gordon A. H., Martin A.J.P. (1944): *Qualitative Analysis of Proteins: a Partition Chromatographic Method Using Paper*. *J. Biochem.* 38: 224-32.
- [39] Cos P., De Bruyne T., Apers S., Berghe D.V., Pieters L., Vlietinck A.J. (2003): *Phytoestrogens: Recent Developments*. *Planta Med.* 69: 589-99.
- [40] Cos P., De Bruyne T., Hermans N., Apers S., Vanden Berghe D., Vlietinck A.J. (2004): *Proanthocyanidins in Health Care: Current and New Trends*. *Curr. Med. Chem.* 11: 1345-1359.
- [41] da Silva J.B. (1975): *Gallic Acid, Pyrogallol and Pyrocatechol in the Roots of Byrsonima intermedia Ad. Jussieu Forma Latifolia grisebach*. *Tappi* 58: 142-5 (cyt. wg Scopus).
- [42] De Bruyne T., Pieters L., Witvrouw M., De Clercq E., Vanden Berghe D., Vlietinck A.J. (1999): *Biological Evaluation of Proanthocyanidin Dimers and Related Polyphenols*. *J. Nat. Prod.* 62: 954-8.

- [43] De Bruyne T., Pieters T., Deelstra H., Vlietinck A. (1999): *Condensed Vegetable Tannins: Biodiversity in Structure and Biological Activities*. *Biochem. Syst. Ecol.* 27: 445-59.
- [44] Deprez S., Mila I., Scalbert A. (1999): *Carbon-14 Biolabeling of (+)-Catechin and Proanthocyanidin Oligomers in Willow Tree Cuttings*. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4219-30.
- [45] Dobrev P.I., Havliček L., Vágner M., Malbeck J., Kamínek M. (2005): *Purification and Determination of Plant Hormones Auxin and Abscisic Acid Using Solid Phase Extraction and Two-Dimensional High Performance Liquid Chromatography*. *J. Chromatogr. A* 1075: 159-66.
- [46] Dugo P., Favoino O., Luppino R., Dugo G., Mondello L.: (2004): *Comprehensive Two-Dimensional Normal-Phase (Adsorption) – Reversed-Phase Liquid Chromatography*. *Anal. Chem.* 76: 2525-30.
- [47] Duke J. A. (1992): *Handbook of Phytochemical Constituents of Grass Herbs and Other Economic Plants*. CRC, London.
- [48] Edwards D.J., Bernier S.M. (1996): *Naringin and Naringenin are not the Primary CYP3A Inhibitors in Grapefruit Juice*. *Life Sci.* 59: 1025-30.
- [49] Erlund I. (2004): *Review of the Flavonoids Quercetin, Hesperetin and Naringenin. Dietary Sources, Bioactivities, Bioavailability and Epidemiology*. *Nutr. Res.* 24: 851-74.
- [50] European Pharmacopoeia (2004). Council of Europe, Strasbourg.
- [51] Evans W. C. (2000): *Pharmacognosy*. Saunders, Edinburgh.
- [52] Poukens-Renwart P., Tits M., Angenot L. (1993): *Semi-Quantitative Salicin Analysis According the German Pharmacopoeia (DAB X): Avoidance of Picein Interference*. *Planta Med.* 59: 629-30.
- [53] Facino R.M., Carini M., Aldini G., Seibene L., Pietta P., Mauri P. (1995): *Echinacoside and Caffeoyl Conjugates Protect Collagen from Free Radical-Induced Degradation: a Potential Use of Echinacea Extracts in the Prevention of Skin Photodamage*. *Planta Med.* 61: 510-14.
- [55] Farmakopea Polska VI (2002). PTFarm, Warszawa.
- [56] Fecka I., Cisowski W., Łuczkiwicz M. (2001): *Determination of Catechin and Epicatechin in an Extract from Uncaria tomentosa Bark by TLC with Chemically Modified Stationary Phases*. *J. Planar Chromatogr.* 14: 405-8.
- [57] Ferreira D., Slade D. (2002): *Oligomeric Proanthocyanidins: Naturally Occurring O-Heterocycles*. *Nat. Prod. Rep.* 19: 517-41.
- [58] Fiebich B.L., Appel K., Wagner I., Heide L. (2003): *Anti-inflammatory Effects of Willow Bark Extract*. *Clin. Pharmacol. Therap.* 74: 96-7.

- [59] Fiebich B.L., Chrubasik S. (2004): *Effects of an Ethanolic Salix Extract on the Release of Selected Inflammatory Mediators in Vitro*. *Phytomedicine*, 11: 135-8.
- [60] Gali H.U., Perchellet E.M., Gao X.M., Karchesy J.J., Perchellet J.P. (1994): *Comparison of the Inhibitory Effects of Monomeric, Dimeric and Trimeric Procyanidins on the Biochemical Markers of Skin Tumor Promotion in Mouse Epidermis In Vivo*. *Planta Med.* 60: 235-9.
- [61] Gleńsk M., Sawicka U., Mazol I., Cisowski W. (2002): *2D TLC – Graft Planar Chromatography in the Analysis of A Mixture of Phenolic Acids*. *J. Planar Chromatogr.* 15: 463-5.
- [62] Gorobets A.B., Bandyukova V.A., Shapirom D.K. (1982): *Flavonoid Composition of Pollen of Salix caprea and S. alba*. *Khim. Prir. Soedin.* 6: 781-2.
- [63] Graf E. (1992): *Antioxidant Potential of Ferulic Acid*. *Free Radic. Biol. Med.* 13: 435-448.
- [64] Gu L., Kelm M.A., Hammerstone J.F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S., Prior R.L. (2004): *Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption*. *J. Nutr.* 134: 613-7.
- [65] Hammad H.M., Shtaywy A.H. (1997): *Pharmacological Effects of Selected Flavonoids on Rat Isolated Ileum: Structure – Activity Relationship*. *Gen. Pharmac.* 28: 767-71.
- [66] Hammerstone J.F., Lazarus S.A., Schmitz. H.H. (2000): *Procyanidin Content and Variation in Some Commonly Consumed Foods*. *J. Nutr.* 130: 2086-2092.
- [67] Harborne J.B., Baxter H. (1999): *The Handbook of Natural Flavonoids*. John Wiley and Sons Ltd. Chichester.
- [68] Haslam E. (1996): *Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action*. *J. Nat. Prod.* 59: 205-15.
- [69] Hawrył M. A., Hawrył A., Soczewiński E. (2002): *Application of Normal- and Reversed-Phase 2D TLC on a Cyanopropyl-Bonded Polar Stationary Phase for Separation of Phenolic Compounds from the Flowers of Sambucus nigra L.* *J. Planar Chromatogr.* 15: 4-10.
- [70] Hawrył M. A., Soczewiński E. (2001): *Normal Phase 2D TLC Separation of Flavonoids and Phenolic Acids from Betula sp. Leaves*. *J. Planar Chromatogr.* 14: 415-21.
- [71] Hedner T., Everts B. (1998): *The Early Clinical History of Salicylates in Rheumatology and Pain*. *Clin. Rheumat.* 17: 17-25.
- [72] Heilman J., Merfort I., Weiss M. (1995): *Radical Scavenger Activity of Different 3',4'-dihydroflavonols and 1,5-dicaffeoylquinic acid Studied by Inhibition of Chemiluminescence*. *Planta Med.* 61: 435-8.

- [73] Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E. M. (2004): *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- [74] Heo H.J., Kim D.O., Shin S.C., Kim M.J., Kim B.G., Shin D.H. (2004): *Effect of Antioxidant Flavanone, Naringenin, from Citrus junos on Neuroprotection*. J. Agric. Food Chem. 52: 1520-25.
- [75] Hiermann A. (1993): *Concentrations of Myricetin 3-O-β-D-Glucuronide in Epilobium angustifolium During Different Vegetation Stages and Evaluation of its Antiphlogistic Activity*. Planta Med. 59: 631.
- [76] Hirose M., Fukushima S., Tanaka H., Asakawa E., Takahashi S., Ito N. (1993): *Carcinogenicity of Catechol in F344 Rats and B6C3F1 Mice*. Carcinogenesis 14: 525-9.
- [77] Ho P.C., Saville D.J., Coville P.F., Wanwimolruk S. (2000): *Content of CYP3A4 Inhibitors, Naringin, Naringenin and Bergapten in Grapefruit and Grapefruit Juice Products*. Pharm. Acta Helv. 74: 379-85.
- [78] Hofmann T., Albert L., Retfalvi T. (2004): *Quantitative TLC Analysis of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin from Fagus sylvatica L. with and without Red Heartwood*. J. Planar Chromatogr. 17: 350-4.
- [79] Hoque E. (1984): *Norway Spruce die-back: Isolation, Biological Activity, Measurement of Concentration of p-Hydroxyacetophenone and its O-glucoside (Picein) by Gas Chromatography*. Eur. J. Forest Pathol. 14: 377-82.
- [80] Hosseini S., Lee J., Sepulveda R.T., Rohdewald P., Watson R.R. (2001): *A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Prospective, 16 Week Crossover Study to Determine the Role of Pycnogenol in Modifying Blood Pressure in Mildly Hypertensive Patients*. Nutrition Res. 21: 1251-60.
- [81] Hryniewicz-Sudnik J., Sękowski B., Wilczkiewicz M. (1990): *Rozmnażanie drzew i krzewów liściastych*. PWN, Warszawa.
- [82] <http://aknhp.uaa.alaska.edu/willow/>
- [83] <http://bobas.ib-pan.krakow.pl/cgi/foxweb.exe/czek/gatdframe?rodz=Salix>
- [84] <http://encyclopedia.thefreedictionary.com/Pyrocatechin?p>
- [85] <http://www.anbg.gov.au/chah/apc/interim/Salicaceae.pdf>
- [86] http://www.camag.com/pdf/Herbals/F-07_salix.pdf
- [87] http://www.ely.pg.gda.pl/osdos/detektor_laserowy/specyf01.html
- [88] <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.pdf> - Bioanalytical Method Validation, 2001.
- [89] <http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/fplgr18.pdf>
- [90] http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/eucalyptus_camaldulensis.html

- [91] <http://www.hort.uconn.edu/plants/s/salsac/salsac3.html>
- [92] http://www.inr.edu.pl/naukprak/rosliny/martyn/wierzba_uprawa.pdf
- [93] <http://www.npwrc.usgs.gov/resource/plants/vascplnt/species/seri.htm>
- [94] <http://www.ou.edu/cas/botany-micro/ben/ben227.html>
- [95] Iwashina T. (2000): *The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants*. J. Plant Res. 113: 287-99.
- [96] Jandera P., Halama M., Kolářová L., Fischer J., Novotná K. (2005): *Phase System Selectivity and Two-Dimensional Separations in Liquid Column Chromatography*. J. Chromatogr. A 1087: 112-23.
- [97] Janeczko Z., Podolak I., Łyszczarz K. (1996): *Substancje roślinne o działaniu przeciwzapalnym*. 52: 759-801.
- [98] Jensen S.R. (1996): *Caffeoyl Phenylethanoid Glycosides in Sanango racemosum and in the Gesneriaceae*. Phytochemistry 43: 777-83.
- [99] Jerzmanowska Z. (1970): *Substancje roślinne. Metody wyodrębniania*. PWN, Warszawa.
- [100] Jędrzejko K., Zakrzewski P., Bobiński P. (2004): *Pyknogenol (Pygenol) – suchy ekstrakt z kory sosny nadmorskiej Pinus pinaster naturalnym źródłem bioflawonoidów*. Farm. Pol. 60: 663-8.
- [101] Julkunen-Tiitto R. (1985): *Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics*. J. Agric. Food Chem. 33: 213-17.
- [102] Julkunen-Tiitto R., Gebhardt K. (1992): *Further Studies on Drying Willow (Salix) Twigs: the Effect of Low Drying Temperature on Labile Phenolics*. Planta Med.: 58, 385-6.
- [103] Julkunen-Tiitto R., Meier B. (1992): *Variation in Growth and Secondary Phenolics Among Field-Cultivated Clones of Salix myrsinifolia*. Planta Med. 58: 77-9.
- [104] Julkunen-Tiitto R. (1985): *Chemotaxonomical Screening Phenolic Glycosides in Northern Willow Twigs by Capillary Gas Chromatography*. J. Chromatogr. 324: 129-39.
- [105] Julkunen-Tiitto R. (1989): *Phenolic Constituents of Salix: a Chemotaxonomic Survey of Further Finnish Species*. Phytochemistry 28: 2115-25.
- [106] Julkunen-Tiitto R., Meier B. (1992): *The Enzymatic Decomposition of Salicin and its Derivatives Obtained from Salicaceae Species*. J. Nat. Prod. 55: 1204-12.
- [107] Julkunen-Tiitto R., Meier B. (1992): *Variation in Growth and Secondary Phenolics Among Field-Cultivated Clones of Salix myrsinifolia*. Planta Med. 58: 77-80.
- [108] Julkunen-Tiitto R., Tahvanainen J. (1989): *The Effect of the Sample Preparation Method of Extractable Phenolics of Salicaceae Species*. Planta Med. 55: 55-58.

- [109] Kammerer B., Kahlich R., Biegert C., Gleiter C.H., Heide L. (2005): *HPLC-MS/MS Analysis of Willow Bark Extracts Contained in Pharmaceutical Preparations*. *Phytochem. Anal.* 16: 470-8.
- [110] Kandere-Grzybowska K., Kempuraj D., Cao J., Cetrulo C.L., Theoharides T.C. (2006): *Regulation of IL-1-induced Selective IL-6 Release from Human Mast Cells and Inhibition by Quercetin*. *Br. J. Pharmacol.* 148: 208-15.
- [111] Kanitskaya L.V., Rokhin A.V., Kushnarev D.F., Kalabin G.A. (2000): *Inhomogeneity of the Chemical Structure of Lignins Isolated from Various Plant Tissues: 1H and 13C NMR Study*. *Polymer Sci. A* 42: 694-698.
- [112] Keapigu M.C., Wang M. (1996): *Chemical Studies on Antituberculosis Compounds from Salix capitata*. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 27: 271-3 (cyt. wg CA 1996, 125: 323005z).
- [113] Kelber O., Abdel-Aziz H., Elstner E.F., Fiebich B.L., Heinle H., Jaeggi R., Khayyal M.T., Metz J., Müller J., Okpanyi S.N., Weiser D. (2006): *Polyphenols are of Special Relevance for the Multiple Mechanisms of Action of the Willow Bark Extract STW 33-1 (Proactiv)*. *Planta Med.* 72:1037.
- [114] Kelber O., Bonaterra G.A., Kinscherf R., Weiser D., Metz J. (2006): *Inhibitory Effects of Willow Bark Extracts on Proinflammatory Processes in LPS Activated Human Monocytes*. *Planta Med.* 72:1066.
- [115] Kempuraj D., Madhappan B., Christodoulou S., Boucher W., Cao J., Papadopoulou N., Cetrulo C.L., Theoharides T.C. (2005): *Flavonols Inhibit Proinflammatory Mediator Release, Intracellular Calcium Ion Levels and Protein Kinase C Theta Phosphorylation in Human Mast Cells*. *Br. J. Pharmacol.* 23: 934-44.
- [116] Khanbabee K., Ree T. (2001): *Tannins: Classification and Definition*. *Nat. Prod. Rep.* 18: 641-9.
- [117] Khatoon F., Khabiruddin M., Ansari W.H. (1988): *Phenolic Glycosides from Salix babylonica*. *Phytochemistry* 27: 3010-11.
- [118] Khayyal M.T., El-Ghazaly M.A., Abdallah D.M., Okpanyi S.N., Kelber O., Weiser D. (2005): *Mechanisms Involved in the Antiinflammatory Effect of a Standardized Willow Bark Extract*. *Arzneimittelforschung.* 55:677-87.
- [119] Kimura H., Tanigawa T., Morisaka H., Ikegami T., Hosoya K., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Ueda M., Cabrera K., Tanaka N. (2004): *Simple 2D-HPLC Using a Monolithic Silica Column for Peptide Separation*. *J. Sep. Sci.* 27: 897-904.
- [120] Kitaoka M., Kadokawa H., Sugano M., Ichikawa K., Taki M., Takaishi S., Iijima Y., Tsutsumi S., Boriboon M., Akivama T. (2002): *Prenylflavonoids: a New Class*

of Non-Steroidal Phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-Isopentenylnaringenin and an Initial Study on Its Structure – Activity Relationship. Planta Med. 68: 449-51.

[121] Jahodar L., Kolb I. (1990): *4-Hydroxyacetophenone-β-D-glucopyranoside from Arctostaphylos uva ursi Twigs.* Pharmazie 45: 446.

[123] Kohlmünzer (2003): Farmakognozja. PZWL, Warszawa.

[124] Kołodziej H. (1990): *Oligomeric Flavan-3-ols from Medicinal Willow Bark.* Phytochemistry 29: 955-60.

[125] Kołodziej H., Kayser O., Kiderlen A.F., Ito H., Hatano T., Yoshida T., Foo L.Y. (2001): *Proanthocyanidins and Related Compounds: Antileishmanial Activity and Modulatory Effects on Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor-α-Release in the Murine Macrophage-Like Cell Line RAW 264.7.* Biol. Pharm. Bull. 24: 1016-21.

[126] Kołodziej H., Kayser O., Latte K.P., Ferreira D. (1999): *Evaluation of the Antimicrobial Potency of Tannins and Related Compounds Using the Microdilution Broth Method.* Planta Med. 65: 444-6.

[127] Krasnov E.A., Demidenko L.A., Zeman L.P. (1973): *p-Hydroxyacetophenone and Picein from Rhodiola litvinovii.* Khim. Prir. Soedin. 3: 421-422.

[128] Krauze-Baranowska M. (2003): *Badania dimerycznych pochodnych flawonoidowych w niektórych gatunkach o znaczeniu leczniczym z podgromady Gymnospermae.* Ann. Acad. Med. Gedan. 33.

[129] Kroes B.H., van den Berg A.J.J., van Ufford H.C.Q., van Dijk H., Labadie R.P. (1992): *Anti-inflammatory Activity of Gallic Acid.* Planta Med. 58: 499-504.

[130] Kuzmicheva N.A., Mazan I.F., Bulat V.S. (1992): *Seasonal Dynamics of Flavonoid Accumulation in Leaves of Almondleaf Willow (Salix triandra L.).* Vesti Akademii Navuk Belarusi, Ser. Byial. Navuk 5: 23 (cyt. wg CA 119,1993: 68051y).

[131] Kyunn W., Whang Y. S. Ch., Kim I. H. (1995): *Phenolic Compounds from the Bark of Salix gilgiana.* Yakhak Hoechi 39:193-9 (cyt. wg CA 1995, 123: 152666t).

[132] Le Bail J.C., Pouget C., Fagnere C., Basly J.P., Chulia A.J., Habrioux G. (2001): *Chalcones Are Potent Inhibitors of Aromatase and 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activities.* Life Sci. 68: 751-61.

[133] Lee M.K., Bok S.H., Jeong T.S., Moon S.S., Lee S.E., Park Y.B., Choi M.S. (2002): *Supplementation of Naringenin and Its Synthetic Derivative Alters Antioxidant Enzyme Activities of Erythrocyte and Liver in High Cholesterol Fed Rats.* Bioorg. Med. Chem. 10: 2239-44.

- [134] Li L., Huang W., He Q., Ye S. (2001): *Determination of Salicin in Extract of Willow Bark by High Performance Liquid Chromatography*. Kexue Chubanshe 19: 446-8 (cyt. wg CA 2001, 135: 322797d).
- [135] Lin L.Ch., Kuo Y.Ch., Chou Ch.J. (2002): *Immunomodulatory Proanthocyanidins from Ecdysanthera utilis*. J. Nat. Prod. 65: 505-8.
- [136] Liu M.X., Zheng Y.N., Liu X.F., Li X.G., Xiang L. (1998): *Isolation and Identification of Two Flavone Type Compounds from Salix matsudana*. Che. Res. Chin. Univ. 14: 218-20 (cyt. wg CA 1998. 129: 287795d).
- [137] Luo W., Ang C.Y.W., Schmitt T.C., Betz J.M. (1998): *Determination of Salicin and Related Compounds in Botanical Dietary Supplements by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection*. J. AOAC Int. 81: 757-62. (cyt.wgC. A. 1998, 129: 188476u).
- [138] Łuczkiwicz M., Migas P., Kokotkiewicz A., Walijewska M., Cisowski W. (2004): *Two Dimensional TLC with Adsorbent Gradient for Separation of Quinolizidine Alkaloids in the Herb and In-Vitro Cultures of Several Genista Species*. J. Planar Chromatogr. 17: 89-94.
- [139] Mabry J., Markham K.R., Thomas M.B. (1970): *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin.
- [140] Malterud K.M., Bremnes T.E., Faegri A., Moe T., Sandanger-Dugstad E.K., Anthosen T., Henriksen L.M. (1985): *Flavonoids from the Woods of Salix caprea as Inhibitors of Wood-Destroying Fungi*. J. Nat. Prod. 48: 559-63.
- [141] Manthey J.A., Guthrie N., Grohmann K. (2001): *Biological Properties of Citrus Flavonoids Pertaining to Cancer and Inflammation*. Curr. Med. Chem. 8: 135-53.
- [142] Markham K.R. (1982): *Techniques of Flavonoids Identification*, Academic Press, London.
- [143] Martin M.J., Motilva V., De la Lastra A. (1993): *Quercetin and Naringenin; Effects on Ulcer Formation and Gastric Secretion in Rats*. Phytother. Res. 7: 150-3.
- [144] Matsumoto T., Tahara S. (2001): *Ampelopsin, a Major Antifungal Constituent from Salix sachalinensis, and Its Methyl Ethers*. Nippon Nogei Kagaku Kaishi 75: 659-67 (cyt. wg CA 2001, 135: 119585r).
- [145] Matysik G. (1996): *Modified Programmed Multiple Gradient (MGD) in the Analysis of Complex Plant Extracts*. Chromatographia 43: 39-43.
- [146] Matysik G. (1996): *Problemy optymalizacji chromatografii cienkowarstwowej*. Akademia Medyczna w Lublinie, Lublin.
- [147] Mazol I., Gleńsk M., Cisowski W. (2004): *Polyphenolic Compounds from Platycodon grandiflorum A. DC*. Acta Pol. Pharm 61: 203-208.

- [148] Meier B., Julkunen-Tiitto R., Tahvanainen J., Sticher O. (1988): *Comparative High-Performance Liquid and Gas-Liquid Chromatographic Determination of Phenolic Glucosides in Salicaceae Species*. J. Chromatogr. 442: 175-86.
- [149] Meier B., Lehmann D., Sticher O., Bettschart A. (1985): *Identifikation und Bestimmung von je acht Phenolglykosiden in Salix purpurea und Salix daphnoides mit modern HPLC*. Pharm. Acta Helv. 60: 269-75.
- [150] Meier B., Shao Y., Julkunen-Titto R., Bettschart A., Sticher O. (1992): *A Chemotaxonomic Survey of Phenolic Compounds in Swiss Willow Species*. Planta Med. 58: 698.
- [151] Metoda badawcza nr MB 007/0722/3: Oznaczanie zawartości sumy glikozydów fenolowych w przeliczeniu na salicynę w korze wierzby. Herbapol Wrocław S.A.
- [152] Miksicek R.J. (1993): *Commonly Occuring Plant Flavonoids Have Estrogenic Activity*. Mol. Pharmacol. 44: 37-43.
- [153] Miligan S. R., Kalita J. C., Heyerick A., Rong H., De Cooman L., De Keukeleire D. (1999): *Identification of a Potent Phytoestrogen in Hops (Humulus lupulus L.) and Beer*. J. Clin. Endocr. Metab. 83: 2249-52.
- [154] Miligan S. R., Kalita J. C., Pocock V., Van de Kauter V., Stevens J. F., Deinzer M. L. (2000): *The Endocrine Activities of 8-Prenylnaringenin and Related Hop (Humulus lupulus L.) Flavonoids*. J. Clin. Endocr. Metab. 85: 4912-5.
- [155] Minakhmetov R.A., Onuchak L.A., Kurkin V.A., Zapesocznyaya G.G., Medvedeva S.A. (2002): *Determination of Triandrin and Salicin in Salix viminalis L. by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*. J. Anal. Chem. 57: 401-5.
- [156] Mira L., Fernandez M.T., Santos M., Rocha R., Florencio M.H., Jennings K.R. (2002): *Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity*. Free Radic. Res. 36: 1199-208.
- [157] Mizuno M., Kato M., Hosoi N., Iinuma M., Tanaka T., Kimura A., Ohashi H., Sakai H., Kajita T. (1990): *Phenolic Compounds from Salix sachalinensis*. Heterocycles 31: 1409-12.
- [158] Mizuno M., Kato M., Iinuma M., Tanaka T., Kimura A., Ohashi H., Sakai H., Kajita T. (1989): *Two Chemical Races in Salix sachalinensis Fr. Schmidt (Salicaceae)*. Bot. Mag. 102: 403-11.
- [159] Mizuno M., Kato M., Iinuma M., Tanaka T., Kimura A., Ohashi H., Sakai H., Kajita T. (1991): *Further Study on Two Chemical Races of Salix sachalinensis Fr. Schmidt*. Chem. Pharm. Bull. 39: 803-804.

- [160] Mizuno M., Kato M., Misu Ch., Iinuma M., Tanaka T. (1991): *Chaenomeloidin: a Phenolic Glucoside from Leaves of Salix chaenomeloides*. J. Nat. Prod. 54: 1447-1450.
- [161] Mosmann T. (1983): *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*. J. Immun. Method 65: 55-63.
- [162] Nahrstedt A., Jürgenliemk G., Peterleit F. (2006): *Flavan-3-ols and Procyanidins from the Bark of Salix purpurea*. Planta Med. 72: 1063.
- [163] Nederkassel A.M., Vijverman V., Massart D.L., Vander Heyden Y. (2005): *Development of a Ginkgo biloba Fingerprint Chromatogram with UV and Evaporative Light Scattering Detection and Optimization of the Evaporative LightScattering Detector Operating Conditions*. J. Chromatogr. A 1085: 230-9.
- [164] Nikitina V.S., Orazov O.E., Shendel G.V. (1995): *Use of Spheron 40 for Separation of Flavonoids from Willow Leaves*. Khim. Prir. Soedin. 5: 755-6.
- [165] Nikitina W. S., Orazow O. E. (2001): *The Dynamics of Total Flavonoids in Leaves and Tannides in the Bark of Branches in Heterosexual Specimens of Salix tiandra L. And S. acutifolia Willd.* Rast. Resur. 3: 65-72.
- [166] Nowak R., Hawrył M. (2005): *Application of Densitometry to the Determination of Catechin in Rose-Hip Extracts*. J. Planar Chromatogr. 18: 217-20.
- [167] Nowak R., Kawka S. (1998): *Phenolic Acids in Leaves of Secamone afzelii (Roem.) Schult. (Asclepiadaceae)*. Acta Soc. Bot. Pol. 67: 243-5.
- [168] Nyiredy Sz. (2001): *Planar Chromatography. A Retrospective View for the Third Millennium*: 103-117. Springer, Budapeszt.
- [169] Nyman T., Julkunen-Tiitto R. (2005): *Chemical Variation within and among Six Northern Willow Species*. Phytochemistry 66: 2836-43.
- [170] Ohara S., Hujimori H. (1996): *Polyphenols in Salix species II. Polyphenols from the Bark of Salix pet-susu Kimura*. Mokuzai Gakkishi: 42, 618-23 (cyt. wg CA 1996, 125: 137799m).
- [171] Opieńska-Blauth J. (1957): *Chromatografia*, PWN, Warszawa.
- [172] Orallo F., Camina M., Alvarez E., Basaran H., Lugnier C. (2005): *Implication of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Inhibition in the Vasorelaxant Activity of the Citrus-Fruits Flavonoid (±)-Naringenin*. Planta Med. 71: 99-107.
- [173] Orians M. C. (1995): *Preserving Leaves for Tannin and Phenolic Glycoside Analyses: A Comparison of Methods Using Three Willow Taxa*. J. Chem. Ecol. 21 (9): 1235-43.

- [174] Orians C.M., Griffiths M.E., Roche B.M., Fritz R.S. (2000): *Phenolic Glycosides and Condensed Tannins in Salix sericea, S. eriocephala, and Their F1 Hybrids: Not All Hybrids are Created Equal*. Biochem. System. Ecol. 28: 619-32.
- [175] Orians C.M., Fritz R.S. (1995): *Secondary Chemistry of Hybrid and Parental Willows: Phenolic Glycosides and Condensed Tannins in Salix sericea, S. eriocephala, and Their Hybrid*. J. Chem. Ecol. 21: 1245-53.
- [176] Orians C.M., Roche B.M., Fritz R.S. (1996): *The Genetic Basis for Variation in the Concentration of Phenolic Glycosides in Salix sericea: an Analysis of Heritability*. Biochem. System. Ecol. 24: 719-24.
- [177] Owen R.W., Haubner R., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2003): *Isolation, Structure Elucidation and Antioxidant Potential of the Major Phenolic and Flavonoid Compounds in Brined Olive Drupes*. Food Chem. Toxicol. 41: 703-17.
- [178] Ożarowski A. (1997): *Wierzba purpurowa jako roślina lecznicza*. Herba Pol. 43: 184-6.
- [179] Packer L., Rimbach G., Virgili F. (1999): *Antioxidant Activity and Biologic Properties of a Procyanidin-Rich Extract from Pine (Pinus maritima) Bark, Pycnogenol*. Free Radic. Biol. Med. 27: 704-24.
- [180] Papagiannopoulos M., Zimmermann B., Mellenthin A., Krappe M., Maio G., Galensa R. (2002): *On-line Coupling of Pressurized Liquid Extraction, Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography for Automated Analysis of Proanthocyanidins in Malt*. J. Chromatogr. A 958: 9-16.
- [181] Park Y.Ch., Rimbach G., Saliou C., Valacchi G., Packer L. (2000): *Activity of Monomeric, Dimeric, and Trimeric Flavonoids on NO Production, TNF- α Secretion, and NF- κ B-Dependent Gene Expression in RAW 264.7 Macrophages*. FEBS Lett. 465: 93-97.
- [182] Park Y.H., Chiou G.C.Y. (2004): *Structure-Activity Relationship (SAR) between Some Natural Flavonoids and Ocular Blood Flow in the Rabbit*. J. Ocul. Pharmacol. Ther. 20: 35-42.
- [183] Pawłęga J. (2001): Podręcznik onkologii klinicznej. Przegląd Lekarski, Kraków.
- [184] Penso G. (1997): Index Plantarum Medicinalium Totius Mundi Eorumque Synonymorum. OEMF International, Milano.
- [185] Pobłocka L., Matysik G., Cisowski W. (2003): *Multiple Gradient TLC and Densitometric Analysis of p-Coumaric Acid in Some Medicinal Plants from the Family Solanaceae*. J. Planar Chromatogr. 16: 76-9.
- [186] Podolak I., Janeczko Z., Sobolewska D. (2006): *Właściwości przeciwzapalne substancji roślinnych – wybrane zagadnienia*. Farm. Pol. 62: 62-9.

- [187] Pohjamo S.P., Hemming J.E., Willför S.M., Reunanen M.H.T., Holmbom B.R. (2003): *Phenolic Extractives in Salix caprea Wood and Knots*. *Phytochemistry* 63: 165-169.
- [188] Poukens-Renwart P., Tits M., Angenot L. (1993): *Densitometric Determination of Salicin in Willow Stem Bark*. *J. Planar Chromatogr.* 6: 434-7.
- [189] Quettier-Deleu C., Voiselle G., Fruchart J.C., Duriez P., Teissier E., Bailleul F., Vasseur J., Trotin F. (2003): *Hawthorn Extracts Inhibit LDL Oxidation*. *Pharmazie* 58: 577-81.
- [190] Reichardt P.B., Merken H. M., Clausen T.P., Wu J. (1992): *Phenolic Glycosides from Salix lasiandra*. *J. Nat. Prod.* 55: 970-3.
- [191] Richter J., Kabrodt K., Schellenger J. (2002): *TLC Separation of Rhubarb Root Extracts*. *Camag Bibliography Service.* 88: 4-5.
- [192] Robertson M. L., Eastmond D.A., Smith M.T. (1991): *Two Benzene Metabolites, Catechol and Hydroquinone Produce a Synergistic Introduction of Micronuclei and Toxicity in Cultured Human Lymphocytes*. *Mutation Research* 249: 201-9.
- [193] Rutkowski L. (1998): *Klucz do oznaczania roślin naczyniowych*. PWN, Warszawa.
- [194] Rybnicky D.M., Poulev A., Raskin I. (2003): *The Determination of Salicylates in Gaultheria procumbens for Use as a Natural Aspirin Alternative*. *J. Nutr. Funct. Med. Foods* 4: 39-51.
- [195] Sagareishvili T.G., Alaniya M.D., Kemerelidze E.P. (1990): *Phenols in Leaves of Salix caprea*. *Khim. Prir. Soed.* 1: 119-20.
- [196] Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F., Castelli F. (1995): *Flavonoids as Antioxidant Agents: Importance of Their Interaction with Biomembranes*. *Free Radic. Biol. Med.* 19: 481-6.
- [197] Saija A., Tomaino A., Trombetta D., Giacchi M., De Pasquale A., Bonina F. (1998): *Influence of Different Penetration Enhancers on in Vitro Skin Permeation and in Vivo Photoprotective Effect of Flavonoids*. *Int. J. Pharm.* 175: 85-94.
- [198] Santos K.F.R., Oliveira T.T., Nagem T.J., Pinto A.S., Oliveira M.G.A. (1999): *Hypolipidaemic Effects of Naringenin, Rutin, Nicotinic Acid and Their Associations*. *Pharmacol. Res.* 40: 493-6.
- [199] Sato M., Bagchi D., Tosaki A., Das D.K. (2001): *Grape Seed Proanthocyanidin Reduces Cardiomyocyte Apoptosis by Inhibiting Ischemia/Reperfusion-Induced Activation of JNK-1 and C-JUN*. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 729-37.
- [200] Scalbert A., Williamson G. (2000): *Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols*. *J. Nutr.* 130: 2073-85.

- [201] Schmid B., Kötter I., Heide L. (2001): *Pharmacokinetics of Salicin after Oral Administration of a Standardised Willow Bark Extract*. Eur. J. Clin. Pharmacol. 57: 387-91.
- [202] Schmid B., Lüdtke R., Selbmann H. K., Kötter I., Tschirdewahn B., Schaffner W., Heide L. (2001): *Efficacy and Tolerability of a Standardized Willow Bark Extract in Patients with Osteoarthritis: Randomized Placebo-controlled Double Blind Clinical Trial*. Phytother. Res. 15: 344-50.
- [203] Schötz K. (2002): *Detection of Allergenic Urusols in Ginkgo bilobae Leaves*. Pharmazie 57: 508-10.
- [204] Schultz V., Hänsel R., Tyler V. (2001): *Rational Phytotherapy*. Springer, Berlin.
- [205] Schweigert N., Zehnder A.J., Eggen R.I. (2001): *Chemical Properties of Catechols and Their Molecular Modes of Toxic Action in Cells, from Microorganisms to Mammals*. Environmental Microbiol. 3: 81-92.
- [206] Scott B.C., Butler J., Halliwell B., Aruoma O.J. (1993): *Evaluation of the Antioxidant Action of Ferulic Acid and Catechins*. Free Radic. Res. Commun. 19: 241-53.
- [207] Seneta W., Dolatowski J. (2002): *Dendrologia*. PWN, Warszawa.
- [208] Shahat A.A., Cos P., De Bruyne T., Apers S., Hammouda F.M., Shams I.I., Azzam S., Claeys M., Goovaerts E., Pieters L., Vanden Berghe D., Vlietinck A.J. (2002): *Antiviral and Antioxidant Activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from Crataegus sinaica*. Planta Med. 68: 539-41.
- [209] Sharma V., Voil N. (1997): *Age-related Changes in Indolic and Phenolic Compounds in Leaves from Enforced Salix Shoot*. Indian Plant Physiol. 2: 207-10.
- [210] Shilan F., Ce S., Shengyu D., Liren Ch. (2001): *Chemical Constituents from Salix oritrepha Schneid*. Zhongguo Zhongyao Zazhi 26: 607-8 (cyt. wg CA 2002, 137: 98756w).
- [211] Shin J.E., Kim J.M., Bae E.A., Hyun Y.J., Kim D.H. (2005): *In Vitro Inhibitory Effect of Flavonoids on Growth, Infection and Vacuolation of Helicobacter pylori*. Planta Med. 71: 197-201.
- [212] Sikorska M., Matławska I., Głowniak K., Zgórka G. (2000): *Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Acids in Asclepias syriaca L*. Acta Pol. Pharm. 57: 69-72.
- [213] Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988): *A Simple Technique for Quantification of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells*. Exp. Cell Res. 175: 184-91.
- [214] Smolarz H.D., Medyńska E., Matysik G. (2005): *Determination of Emodin and Phenolic Acids in the Petioles of Rheum undulatum and Rheum rhaponticum*. J. Planar Chromatogr. 18: 319-22.

- [215] So F.V., Guthrie N., Chambers A.F., Moussa M., Carroll K.K. (1996): *Inhibition of Human Breast Cancer Cell Proliferation and Delay of Mammary Tumorigenesis by Flavonoids and Citrus Juices*. Nutr. Cancer 26: 167-81.
- [216] Stevens J., Hamstra A., Hegeman T., Roenneburg L. (2005): *Automated 2-D HPLC Using Trap Columns for the Fractionation, Isolation and Screening of Natural Products*. Gilson Application Note 227: 1-5. <http://www.gilson.com/PDFs/pdfid257.pdf>
- [217] Sticher O., Egloff C., Bettschart A. (1981): *Isolierung und quantitative Bestimmung von Phenolglykosiden aus Salix-Species*. Planta Med. 42: 126-7.
- [218] Stołyhwo A., Colin H., Guiochon G. (1983): *Use of Light Scattering as a Detector Principle in Liquid Chromatography*. J. Chromatogr. 265: 1-18.
- [219] Strzelecka H., Kamińska J., Kowalski J., Walewska E. (1982): *Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych*. PZWL, Warszawa.
- [220] Svedström U., Vuorela H., Kostianen R., Huovinen K., Laakso I., Hiltunen R. (2002): *High-performance Liquid Chromatographic Determination of Oligomeric Procyanidins from Dimers Up to the Hexamer in Hawthorn*. J. Chromatogr. A 968: 53-60.
- [221] Svedström U., Vuorela H., Kostianen R., Tuominen J., Kokkonen J., Rauha J. P., Laakso I., Hiltunen R. (2002): *Isolation and Identification of Oligomeric Procyanidins from Crataegus Leaves and Flowers*. Phytochemistry 60: 821-25.
- [222] Szabo L., Botz L. (1999): *Salicin Content in the Bark of Willow*. Olaj Szappan Kozmet. 48: 207-9 (cyt. wg CA 2000, 132: 269897w).
- [223] Szafer W. (1986): *Rośliny Polskie*. PWN, Warszawa.
- [224] Szczepaniak W. (2005): *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. PWN, Warszawa.
- [225] Szweykowski J., Szweykowska A. (1993): *Botanika. Systematyka*. PWN, Warszawa.
- [226] Takahashi T., Kamiya T., Hasegawa A., Yokoo Y. (1999): *Procyanidin Oligomers Selectively and Intensively Promote Proliferation of Mouse Hair Epithelial Cells In Vitro and Activate Hair Follicle Growth In Vivo*. J. Invest.Dermatol. 112: 310-16.
- [227] Tegelberg R., Julkunen-Titto R. (2001): *Quantitative Changes in Secondary Metabolites of Dark-Leaved Willow (Salix myrsinifolia) Exposed to Enhanced Ultraviolet-B Radiation*. Physiol. Plant. 113: 543-7.
- [228] Thapliyal R.P., Bahuguna R.P. (1993): *Fatty Acids and Flavonoids of Salix lidleyana*. Int. J. Pharmacogn. 31: 165.
- [229] Thieme H. (1965): *Die Phenolglykoside der Salicaceen*. Planta Med. 13: 431-8.
- [230] Thieme H. (1969): *On the Identity of Glucoside Rhodioloside and Salidroside*. Pharmazie 24: 118-9.

- [231] Thieme H., Walewska E., Winkler H.J. (1969): *Isolation of Salidroside from Leaves of Rhododendron ponticum × catawbiense*. Pharmazie 24: 783.
- [232] Thun M. (2000): *Beyond Willow Bark: Aspirin the Prevention of Chronic Disease*. Epidemiology 11: 371-4.
- [233] Tolonen A., Pakonen M., Hohtola A., Jalonen J. (2003): *Phenylpropanoid Glycosides from Rhodiola rosea*. Chem. Pharm. Bull. 51: 467-70.
- [234] Tomas-Barberan F.A., Clifford M.N. (2000): *Flavanones, Chalcones and Dihydrochalcones – Nature, Occurrence and Dietary Burden*. J. Sci. Food Agric. 80: 1073-80.
- [235] Torreilles F., Salman-Tabcheh S., Guérin M., Torreilles J. (1999): *Neurodegenerative Disorders: the Role of Peroxynitrite*. Brain Res. Brain Res. Rev. 30: 153-63.
- [236] Totta P., Acconcia F., Leone S., Cardillo I., Marino M. (2004): *Mechanisms of Naringenin-Induced Apoptotic Cascade in Cancer Cells: Involvement of Estrogen Receptor α and β Signalling*. IUBMB Life 56: 491-9.
- [237] Towatari K., Yoshida K., Mori N., Shimizu K., Kondo R., Sakai K. (2002): *Polyphenols from the Heartwood of Cercidiphyllum japonicum and their Effects on Proliferation of Mouse Hair Epithelial Cells*. Planta Med. 68: 995-8.
- [238] Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G., Mondello L. (2004): *Comprehensive Two-Dimensional Chromatography in Food Analysis*. J. Chromatogr. A 1054: 3-16.
- [239] Venkatramani C. J., Zelechonok Y. (2003): *An Automated Orthogonal Two-Dimensional Liquid Chromatograph*. Anal. Chem. 75: 3484-94.
- [240] Vovk I., Simonovska B., Vuorela P., Vuorela H. (2002): *Optimization of Separation of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin on Cellulose TLC Plates*. J. Planar Chromatogr. 15: 433-36.
- [241] Wagner I., Greim C., Laufer S., Heide L., Gleiter C.H. (2003): *Influence of Willow Bark Extract on Cyclooxygenase Activity and on Tumor Necrosis Factor α or Interleukin 1β Release in Vitro And ex Vivo*. Clin. Pharmacol. Therap. 73: 272-4.
- [242] Wagner K., Racaityte K., Unger K.K., Miliotis T., Edholm L.E., Bischoff R., Marko-Varga G. (2000): *Protein Mapping by Two-Dimensional High Performance Liquid Chromatography*. J. Chromatogr. A 893: 293-305.
- [243] Wan J.B., Li P., Li S., Wang Y., Dong T.T.X., Tsim K.W.K. (2006): *Simultaneous Determination of 11 Saponins in Panax notoginseng Using HPLC-ELSD and Pressurized Liquid Extraction*. J. Sep. Sci. 29: 2190-6.
- [244] Witkiewicz Z. (2005): Podstawy chromatografii. WNT, Warszawa.

- [246] Wuthold K., Germann I., Roos G., Kelber O., Weiser D., Heinle H., Kovar K.-A. (2004): *Thin-Layer Chromatography and Multivariate Data Analysis of Willow Bark Extracts*. J. Chromatogr. Sci. 42: 306-9.
- [247] www.fpl.fs.fed.us/documnts/fplgr18.pdf
- [248] Yamagishi M., Natsume M., Osakabe N., Nakamura H., Furukawa F., Imazawa T., Nishikawa A., Hirose M. (2002): *Effects of Cacao Liquor Proanthocyanidins on PhIP-Induced Mutagenesis In Vitro, and In Vivo Mammary and Pancreatic Tumorigenesis in Female Sprague-Dawley Rats*. Cancer Lett. 185: 123-30.
- [249] Young C.S. (2004): *The HPLC Analysis of Salicin Containing White Willow Bark Extract Using Evaporative Light-Scattering Detection*. LC/GC – The Application Notebook, February: 47.
- [250] Young C.S., Dolan J.W. (2003): *Success with Evaporative Light-Scattering Detection*. LC/GC 16: 132-7.
- [251] Zapesochnaya G.G., Kurkin W.A., Braslavskii V.B., Filatova N.V. (2002): *Phenolic Compounds of Salix acutifolia Bark*. Khim. Prir. Soedin. 4: 263-6.
- [252] Zaugg S.E., Cefalo D., Walker E.B. (1997): *Capillary Electrophoretic Analysis of Salicin in Salix spp.* J. Chromatogr. A 781: 487-90.
- [253] Zgórk G., Główniak K. (1999): *Simultaneous Determination of Phenolic Acids and Linear Furanocoumarins in Fruits of Libanotis dolichostyla by Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography*. Phytochem. Anal. 10: 268-271.
- [254] Zhang J., Zheng Y., Han L. (2000): *Studies on Chemical Constituents of Leaves of Salix matsudanea Koidz. and Their Influence on Lipolysis*. Zhongguo Zhongyao Zazhi 25: 538-41 (cyt. wg CA 2001, 134: 277874t).
- [255] Zierau O., Gester S., Schwab P., Metz P., Kolba S., Wulf M., Vollmer G. (2002): *Estrogenic Activity of the Phytoestrogens Naringenin, 6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin and 8-Prenylnaringenin*. Planta Med. 68: 449-51.
- [256] Zierau O., Hamann J., Tischer S., Schwab P., Metz P., Vollmer G., Gutzeit H.O., Scholz S. (2005): *Naringenin-Type Flavonoids Show Different Estrogenic Effects in Mammalian and Teleost Test Systems*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 326: 909-16.
- [257] Zierau O., Morrissey C., Watson R.W.G., Schwab P., Kolba S., Metz P., Vollmer G. (2003): *Antiandrogenic Activity of the Phytoestrogens Naringenin, 6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin and 8-Prenylnaringenin*. Planta Med. 60: 856-8.

Praca obejmuje wyniki dotychczas nie publikowane oraz zawarte w następujących publikacjach:

1. Loretta Pobłocka-Olech, Jarosław Kram, Mirosława Krauze-Baranowska (2006): *Proantocyjanidyny – składniki leków i żywności o cennych właściwościach farmakologicznych i biologicznych*. Farm. Pol. 62: 78-88.
2. Loretta Pobłocka-Olech, Karina Marcinkowska, Mirosława Krauze-Baranowska (2006): *Naryngenina i jej pochodne – flawanony o wielokierunkowej aktywności farmakologicznej*. Post. Fitoter. 7: 16-22.
3. Loretta Pobłocka-Olech, Mirosława Krauze-Baranowska, Marian Wiwart (2006): *HPTLC Determination of Catechins in Different Clones of the Genus Salix*. J. Planar Chromatogr. (praca w druku).