

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**



Barbara Król-Kogus

**BADANIA SKŁADU CHEMICZNEGO I AKTYWNOŚCI
BIOLOGICZNEJ SUROWCA KRAJOWEGO
*FOENUGRAECI SEMEN***

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR:

prof. dr hab. Mirosława Krauze - Baranowska, prof. nadzw.

**KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOGNOZJI
Z OGRODEM ROŚLIN LECZNICZYCH**

Gdańsk, 2016

Składam serdeczne podziękowania

Profesor Mirosławie Krauze-Baranowskiej za wskazanie tematu badań, poświęcony czas oraz pomoc przy realizacji pracy doktorskiej

Mojej Rodzinie za nieocenione wsparcie i motywację w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Farmakognozji za okazaną pomoc, życzliwość i przyjazną atmosferę pracy.

Zespołowi Katedry Biologii i Botaniki Farmaceutycznej oraz Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego GUMed za pomoc w realizacji badań aktywności biologicznej oraz zespołowi Katedry i Zakładu Roślin Warzywnych i Leczniczych Wydziału Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego za umożliwienie przeprowadzenia badań w zakresie ekstrakcji.

Praca obejmuje wyniki dotychczas nieopublikowane oraz zawarte w następujących publikacjach:

Oryginalne prace eksperymentalne:

Król-Kogus B., Głód D., Krauze-Baranowska M., Matławska I. (2014) Application of one- and two-dimensional high-performance liquid chromatography methodologies for the analysis of C-glycosylflavones from fenugreek seeds, *Journal of Chromatography A* 1367, 48-56.

Prace przeglądowe:

Król-Kogus B., Krauze-Baranowska M. Kozieradka pospolita - źródło związków o aktywności hormonalnej? 2012. *Farmacja Polska* 68, (1), 39-41

Król-Kogus B., Krauze-Baranowska M. (2011) Kozieradka pospolita (*Trigonella foenum-graecum* L.) - tradycja stosowania na tle wyników badań naukowych. 2011. *Postępy fitoterapii* 12 (3), 185-190

Król-Kogus B., Krauze-Baranowska M. (2011) Greckie sianko, Boża trawka – o właściwościach leczniczych kozieradki pospolitej. *Panacea*, 4, 20-21

Praca została częściowo wykonana w ramach grantu NN405669140 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w latach 2013-2015 oraz projektu MN 0-0024/08 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Wykaz skrótów stosowanych pracy

% RSD	względne odchylenie standardowe wyrażone w %
AChE	acetylocholinoesteraza
ACN	acetonitryl
ADC2	automatyczna komora chromatograficzna (<i>ang. automatic development chamber</i>)
ANOVA	analiza wariancji
ApoB	apolipoproteina b
ASE	przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (<i>ang. accelerated solvent extraction</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BMI	wskaźnik masy ciała (<i>ang. body mass index</i>)
CO₂	dwutlenek węgla
COX-1	cyklooksygenaza-1
COX-2	cyklooksygenaza-2
CV	współczynnik zmienności
DAD	detektor z matrycą diodową (<i>ang. diode array detector</i>)
DMEM	pożywka do hodowli linii komórkowych
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
EC₅₀	minimalne stężenie efektywne, które indukuje określony efekt u 50% badanych komórek/organizmów (<i>ang. half maximal effective concentration</i>)
ELSD	laserowy detektor światła rozproszonego (<i>ang. evaporative light scattering detector</i>)
ER	receptory estrogenowe
ESI	elektrozpylanie w polu elektrycznym,, metoda jonizacji w spektrometrii mas, (<i>ang. electrospray ionization</i>)
GABA	receptory błonowe wiążące kwas γ -aminomasłowy
GABA	kwas γ -aminomasłowy
GC	chromatografia gazowa (<i>ang. gas chromatography</i>)
GC-O	chromatografia gazowa z olfaktometrią (<i>ang. gas chromatography-olfactometry</i>)
GFAP	kwaśne białko włóknikowe (<i>ang. glial fibrillary acidic protein</i>)
HDL	lipoproteiny wysokiej gęstości (<i>ang. very low density lipoproteins</i>)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (<i>ang. high performance liquid chromatography</i>)
HPTLC	wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (<i>ang. high performance thin layer chromatography</i>)
HSCCC	wysokosprawna chromatografia przeciwprądowa (<i>ang. high-speed countercurrent chromatography</i>)
IC₅₀	stężenie czynnika, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana o 50%
IL	interleukina
LC	chromatografia cieczowa (<i>ang. liquid chromatography</i>)
LCAT	acylotransferaza lecytyna:cholesterol
LC-LC	dwuwymiarowa wysokosprawna chromatografia cieczowa technika <i>heart-cutting</i>
LCxLC	dwuwymiarowa wysokosprawna chromatografia cieczowa technika <i>comprehensive</i>
LDL	lipoproteiny niskiej gęstości (<i>ang. low density lipoproteins</i>)
LH	hormon luteinizujący
LOD	granica wykrywalności, (<i>ang. limit of detection</i>)
LOQ	granica oznaczalności (<i>ang. limit of quantification</i>)
MAE	ekstrakcja wspomagana mikrofalami (<i>ang. microwave extraction</i>)
MAO-A	monoaminooksydaza a
MAO-B	monoaminooksydaza b
MBC	minimalne stężenie bakteriobójcze (<i>ang. minimal bactericidal concentration</i>)
MDA	dialdehyd malonowy
MD-LC	wielowymiarowa chromatografia cieczowa (<i>ang. multidimensional liquid chromatography</i>)
MIC	minimalne stężenie hamujące (<i>ang. minimal inhibitory concentration</i>)
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy
MS	spektrometria mas (<i>ang. mass spectrometry</i>)
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazolowy
NAD	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NADP	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NGF	czynnik wzrostu nerwów (<i>ang. nerve growth factor</i>)

NLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne
NP	normalny układ faz
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy
PK	kinaza pirogronianowa (<i>ang. pyruvate kinase</i>)
PPARγ	receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów (<i>ang. peroxisome proliferator-activated receptors</i>),
QTOF	analiza czasu przelotu (<i>ang. quadrupole – time-off-flight</i>)
Rf	współczynnik zatrzymania
ROS	reaktywne formy tlenu (<i>ang. reactive oxygenspecies</i>)
RP	odwrócony układ faz
Rs	współczynnik separacji (rozdzielenia)
RTCA	system RealTime xCELLigence
SD	odchylenie standardowe
SIM	monitorowanie wybranych jonów (<i>ang. selected ion monitoring</i>)
SREBP-1	białko wiążące się z elementem odpowiedzi na sterole) (<i>ang. sterol regulatory element binding proteins</i>)
TBARS	produkty peroksydacji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (<i>ang. (thiobarbituric acid reactive substances)</i>)
TCM	tradycyjne surowce medycyny chińskiej
TFA	kwas trifluorooctowy
TG	triglicerydy
TLC	chromatografia cienkowarstwowa
UE	ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (sonikacja; <i>ang. ultrasound extraction</i>)
UPLC	ultrasprawną chromatografią cieczą (<i>ang. ultra high performance liquid chromatography</i>)
UV	promieniowanie ultrafioletowe
VIS	światło widzialne
VLDL	lipoproteiny bardzo niskiej gęstości (<i>ang. very low density lipoproteins</i>)

Spis treści

CEL PRACY	11
CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	13
1. CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA I STANOWISKO SYSTEMATYCZNE <i>TRIGONELLA FOENUM- GRAECUM L.</i>	13
1.1. STANOWISKO SYSTEMATYCZNE.....	13
1.2. WYSTĘPOWANIE <i>TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM L.</i>	14
1.3. CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA GATUNKU <i>TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM L.</i>	14
2. SKŁAD CHEMICZNY NASION <i>TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM L.</i> – AKTUALNY STAN BADAŃ.....	16
2.1. FLAWONOIDY.....	16
<i>C-glikozydy flawonów</i>	16
<i>Metoksylowane flawony</i>	19
<i>O-glikozydy flawonów</i>	19
<i>Flawonole</i>	19
<i>Flawanony</i>	20
<i>Izoflawony</i>	20
<i>Inne związki flawonoidowe</i>	21
2.2. SAPONINY.....	22
2.2.1.1. Saponozydy	22
2.2.1.2. Sapogeniny	28
2.3. ALKALOIDY	30
2.4. POLISACHARYDY	31
2.5. FENOLOKWASY.....	31
2.6. WITAMINY	32
2.7. ZWIĄZKI MINERALNE	32
2.8. AMINOKWASY I BIAŁKA	32
2.9. LIPIDY.....	33
2.10. STEROLE	34
2.11. INNE ZWIĄZKI.....	34
3. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA NASION <i>T. FOENUM-GRAECUM</i>.....	36
3.1. AKTYWNOŚĆ PRZECIWCUKRZYCOWA.....	36
3.2. AKTYWNOŚĆ HIPOLIPIDEMICZNA	38
3.3. AKTYWNOŚĆ NEUROLOGICZNA	40
3.4. AKTYWNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA	42
3.5. AKTYWNOŚĆ PRZECIWZAPALNA I IMMUNOMODULUJĄCA	43
3.6. AKTYWNOŚĆ PRZECIWBÓLOWA	45

3.7. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA	46
3.8. AKTYWNOŚĆ HORMONALNA.....	47
3.9. AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA I CYTOTOKSYCZNA	51
3.10. SCHORZENIA PRZEWODU POKARMOWEGO	53
4. DWUWYMIAROWA WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA W ANALIZIE ZWIĄZKÓW FLAWONOIDOWYCH	56
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	67
A. BADANIA FITOCHEMICZNE	67
1. ROZPUSZCZALNIKI I ODCZYNNIKI CHEMICZNE	67
1.1. <i>Rozpuszczalniki organiczne</i>	67
1.2 <i>Odczynniki chemiczne</i>	67
1.3. <i>Woda</i>	67
2. ZWIĄZKI WZORCOWE.....	68
2.1. <i>Flawonoidy</i>	68
2.1.1. <i>Glikozydy flawonoidowe</i>	68
2.1.2. <i>Aglikony flawonoidowe</i>	68
2.1.3. <i>Izoflawony</i>	68
2.2. <i>Saponiny steroidowe</i>	69
2.2.1. <i>Saponozydy furostanowe</i>	69
2.2.2. <i>Sapogeniny steroidowe</i>	69
2.3. <i>Alkaloidy</i>	69
3. APARATURA I SPRZĘT LABORATORYJNY	69
3.1. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA - TLC I HPTLC.....	69
3.2. SYSTEMY WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ - HPLC	70
3.2.1. <i>Systemy do jednowymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej</i>	70
3.2.1.1. System HPLC-UV Prominence firmy Shimadzu (Japonia):	70
3.2.1.2. System HPLC-DAD-ESI-MS Prominence firmy Shimadzu (Japonia):.....	70
3.2.1.3. System HPLC-ELSD firmy Shimadzu (Japonia):.....	70
3.2.2. <i>Systemy do dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej</i>	71
3.3. <i>Inne</i>	71
4. ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA	71
4.1. <i>Chromatografia cienkowarstwowa</i>	71
4.1.1. Płytki chromatograficzne do chromatografii cienkowarstwowej (TLC)	71
4.1.2. Płytki chromatograficzne do wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC).....	72
4.1.3. Fazy ruchome	72
4.1.4. Odczynniki wywołujące	73
4.1.5. Rozdzielenia w automatycznej komorze chromatograficznej ADC2.....	74
4.2. <i>Wysokosprawna chromatografia cieczowa</i>	75

4.2.1. Kolumny chromatograficzne	75
4.2.2. Elucja	75
4.2.2.1. Fazy ruchome	75
4.2.2.2. Elucja izokratyczna.....	76
4.2.2.3. Programy elucji gradientowej.....	76
5. MATERIAŁ ROŚLINNY	77
6. EKSTRAKCJA MATERIAŁU ROŚLINNEGO	77
6.1. Przygotowanie ekstraktów do analizy związków czynnych w materiale roślinnym.....	77
6.1.1. Przygotowanie ekstraktów do analizy saponin steroidowych i związków flawonoidowych	78
6.1.1.1. Ekstrakcja w aparacie Soxhleta.....	78
6.1.1.2. Przygotowanie wyciągu do analizy saponin furostanowych.....	78
6.1.2. Przygotowanie wyciągów do oceny wydajności ekstrakcji C-glikozyloflawonów.....	78
6.1.3. Przygotowanie prób do analizy diosgeniny po hydrolizie kwasowej.....	81
7. Analiza chromatograficzna związków czynnych wyciągów z nasion kozieradki	82
7.1. Analiza chromatograficzna C-glikozyloflawonów	82
7.1.1. Analiza jakościowa metodą chromatografii cienkowarstwowej.....	82
7.1.2. Analiza jakościowa metodą HPLC-DAD-ESI-MS	83
7.1.3. Analiza jakościowa metodą dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (2D LC)	83
7.1.4. Analiza ilościowa C-glikozyloflawonów	85
7.2. Analiza chromatograficzna izoflawonów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC-DAD-ESI-MS	87
7.3. Analiza chromatograficzna saponin steroidowych	87
7.3.1. Analiza jakościowa metodą chromatografii cienkowarstwowej TLC i HPTLC	87
7.3.2. Analiza ilościowa diosgeniny po hydrolizie kwasowej.....	88
7.3.3. Analiza jakościowa metodami HPLC-ESI-MS i HPLC-ELSD.....	91
7.3.4. Analiza ilościowa metodą HPLC-ELSD.....	91
B. BADANIA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ	92
1. BADANIA AKTYWNOŚCI CYTOTOKSYCZNEJ	92
1.1. Odczynniki do hodowli linii komórkowych.....	92
1.2. Pożywki do hodowli	93
1.3. Linie komórkowe	93
1.4. Hodowle komórkowe in vitro	93
1.5. Przygotowanie wyciągów i frakcji z nasion kozieradki do badań.....	94
1.5.1. Przygotowanie wyciągów A i B.....	94
1.5.2. Przygotowanie wyciągu C.....	94
1.5.3. Przygotowanie frakcji D.....	94
1.6. Przygotowanie roztworów badanych związków flawonoidowych, saponinowych i alkaloidowych do badań	94
1.7. Test oceny cytotoksyczności MTT.....	94

1.7.1. Określenie ilości komórek potrzebnej do eksperymentu	94
1.7.2. Przeprowadzenie testu MTT	95
1.8. Ocena cytotoksyczności metodą <i>RealTimeXCelligence</i>	96
1.9. Badania mechanizmów aktywności cytotoksycznej i proapoptotycznej	96
1.9.1. Oznaczenia cytometryczne	96
2. BADANIA AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ	98
2.1. Przygotowanie wyciągów do badań	98
2.2. Przygotowanie roztworów substancji wzorcowych do badań	98
2.3. Hodowle bakteryjne	98
2.4. Oznaczanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej	98
III. BADANIA WŁASNE	100
A. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ FITOCHEMICZNYCH	100
OPTIMALIZACJA WARUNKÓW EKSTRAKЦИИ C-GLIKOZYLOFLAWONÓW Z NASIENIA KOZIERADKI	101
BADANIA C-GLIKOZYLOFLAWONÓW W NASIENIU KOZIERADKI Z ZASTOSOWANIEM RÓŻNYCH TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH - TLC, HPLC	114
ANALIZA C-GLIKOZYLOFLAWONÓW METODĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ	115
ANALIZA C-GLIKOZYLOFLAWONÓW METODĄ HPTLC	115
ANALIZA C-GLIKOZYLOFLAWONÓW METODĄ 2D TLC	116
ANALIZA C-GLIKOZYLOFLAWONÓW METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)	117
OPTIMALIZACJA WARUNKÓW SEPARACJI C-GLIKOZYDÓW FLAWONOWYCH METODĄ 1D HPLC-DAD	117
ANALIZA I IDENTYFIKACJA C-GLIKOZYDÓW FLAWONOWYCH METODĄ HPLC-DAD-ESI-MS	124
ANALIZA IZOFLAWONÓW W NASIENIU KOZIERADKI METODĄ HPLC-DAD-ESI-MS	130
ANALIZA C-GLIKOZYLOFLAWONÓW METODĄ DWUWYMIAROWEJ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (2D HPLC)	132
ANALIZA C-GLIKOZYLOFLAWONÓW W NASIENIU KOZIERADKI METODĄ <i>HEART-CUTTING OFF-LINE</i> (LC-LC <i>OFF-LINE</i>)	133
ANALIZA C-GLIKOZYLOFLAWONÓW W NASIENIU KOZIERADKI METODĄ <i>COMPREHENSIVE</i> (LCxLC)	144
ANALIZA C-GLIKOZYLOFLAWONÓW W NASIENIU KOZIERADKI METODĄ <i>COMPREHENSIVE ON-LINE</i> (LCxLC <i>ON-LINE</i>)	151
ANALIZA ILOŚCIOWA C-GLIKOZYLOFLAWONÓW W NASIENIU KOZIERADKI METODĄ LC-LC-DAD <i>ON-LINE</i>	159
ANALIZA C-GLIKOZYLOFLAWONÓW W NASIENIU KOZIERADKI POCHODZENIA TURECKIEGO I AFRYKAŃSKIEGO METODĄ HPLC-DAD-ESI-MS ORAZ LC-LC-DAD <i>ON-LINE</i>	162
ANALIZA SAPONIN STEROIDOWYCH Z UŻYCIEM METOD CHROMATOGRAFICZNYCH (TLC, HPLC)	166
ANALIZA SAPONIN STEROIDOWYCH METODĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ	166
ANALIZA WOLNYCH AGLIKONÓW W NASIONACH KOZIERADKI POSPOLITEJ	167

ANALIZA GLIKOZYDÓW FUROSTANOWYCH METODĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ	168
ANALIZA ILOŚCIOWA DIOSGENINY PO HYDROLIZIE KWASOWEJ W WYCIĄGACH Z NASION KOZIERADKI POSPOLITEJ.....	173
<i>Optymalizacja warunków analizy chromatograficznej metodą chromatografii cienkowarstwowej ..</i>	<i>174</i>
<i>Optymalizacja warunków ekstrakcji i hydrolizy kwasowej saponin steroidowych z nasion kozieradki</i>	<i>184</i>
<i>Analiza ilościowa diosgeniny po hydrolizie kwasowej w nasionach kozieradki pospolitej</i>	<i>188</i>
ANALIZA SAPONIN STEROIDOWYCH METODĄ HPLC-ELSD ORAZ HPLC-ESI-MS	193
ANALIZA SAPONIN STEROIDOWYCH W NASIENIU KOZIERADKI POCHODZENIA TURECKIEGO I AFRYKAŃSKIEGO METODĄ HPLC-ELSD	217
ANALIZA ILOŚCIOWA SAPONIN STEROIDOWYCH W WYCIĄGACH I FRAKCJI WYCIĄGU METANOLOWEGO Z NASIENIA KOZIERADKI POSPOLITEJ METODĄ HPLC-ELSD	218
B. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ.....	220
1. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ AKTYWNOŚCI CYTOTOKSYCZNEJ.	220
2. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ.....	237
WYNIKI I WNIOSKI	245
STRESZCZENIE.....	250
SUMMARY.....	260
BIBLIOGRAFIA.....	270

CEL PRACY

Kozieradka pospolita *Trigonella foenum-graecum* L. (*Fabaceae*) występuje w stanie naturalnym na terenie Azji i basenu Morza Śródziemnego [229, 368, 585]. Opisana w hinduskiej Ayurwedzie pod nazwą *methi*, kozieradka pospolita od wieków stosowana jest w medycynie azjatyckiej. Jest również popularnym surowcem leczniczym w krajach europejskich. Wysuszone nasiona kozieradki w formie wyciągu wodnego oraz preparatów galenowych podawane są doustnie jako środek odżywczy i wspomagający trawienie oraz leczniczy w schorzeniach przewodu pokarmowego, stanach zapalnych oraz chorobie wrzodowej żołądka i ponadto jako obniżający poziom cukru we krwi w przebiegu cukrzycy. Nasiona kozieradki tradycyjnie stosowane są w postaci kataplazmów na trudno gojące się rany oraz stany zapalne skóry i tkanki podskórnej [256, 373, 585].

Nasiona kozieradki zawierają szereg grup metabolitów wtórnych, wśród których, obok polisacharydów, dominującymi są C-glikozydy flawonowe oraz saponiny steroidowe, identyfikowane przede wszystkim w surowcach pochodzenia azjatyckiego [253, 418, 456, 493, 574] i afrykańskiego [66, 113, 143, 202, 387]. Wymienione związki czynne warunkują wielokierunkową aktywność biologiczną surowca - m.in. przeciwzapalną, przeciwcukrzycową, przeciwdrobnoustrojową oraz przeciwnowotworową w modelach *in vitro* [270, 276, 486, 491] i *in vivo* [34, 42, 532].

Nasienie kozieradki (*Foenugraeci Semen*) posiada monografię w Farmakopei Polskiej X oraz w Farmakopei Europejskiej i jest klasyfikowane jako surowiec śluzowy. Obecnie *Foenugraeci Semen* jest składnikiem coraz większej liczby suplementów diety ze wskazaniem jako pomocnicze w terapii cukrzycy, trądziku oraz jako wzmacniające organizm.

Pomimo wzrastającej popularności nasion kozieradki na krajowym rynku produktów roślinnych jako składnika głównie suplementów diety, skład chemiczny *Foenugraeci Semen* pochodzenia krajowego pozostaje nierozpoznany, z wyjątkiem doniesienia Adamskiej i wsp. [15], którzy w 1971 roku wyizolowali z surowca polskiego 4 C-glikozyloflawony.

Uwzględniając wykazane znaczne różnice w składzie jakościowym i zawartości związków czynnych w zależności od warunków wzrostu kozieradki [54, 108, 153, 185, 356, 422, 627] oraz wielokierunkową, zróżnicowaną aktywność biologiczną, w tym sygnalizowany w literaturze niewyjaśniony w pełni wpływ surowca na układ hormonalny człowieka [110, 248, 299, 367, 588], uznano za konieczne badania nad związkami czynnymi surowca krajowego oraz jego aktywnością biologiczną.

Podstawowy cel pracy stanowiła analiza jakościowa i ilościowa nasion *T. foenum-graecum* pochodzenia krajowego w zakresie 2 grup dominujących związków czynnych: C-glikozydów flawonowych i saponin steroidowych oraz ocena aktywności biologicznej surowca w zakresie przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej, na tle występujących w nim metabolitów wtórnych.

Realizacja celu podstawowego obejmowała następujące cele cząstkowe:

- optymalizację warunków ekstrakcji C-glikozydów flawonowych z nasienia kozieradki z użyciem różnych technik ekstrakcyjnych (ekstrakcja w klasycznym i automatycznym aparacie Soxhleta, ekstrakcja z użyciem mieszadła magnetycznego, sonikacja, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem)
- opracowanie metod analizy jakościowej i ilościowej zespołu C-glikozydów flawonowych z użyciem jednowymiarowej i dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (1D i 2D HPLC) oraz technik: *heart-cutting* (LC-LC) i *comprehensive* (LCxLC) w trybach *off-line* i *on-line*, w sprzężeniu z detektorem z matrycą diodową (DAD) oraz spektrometrem mas (MS).
- przeprowadzenie analizy izoflawonów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w sprzężeniu z detektorem z matrycą diodową (DAD)
- opracowanie metod analizy zespołu saponin steroidowych z użyciem różnych technik chromatograficznych:
 - opracowanie metody TLC analizy diosgeniny po hydrolizie kwasowej, wraz z optymalizacją warunków ekstrakcji i hydrolizy
 - opracowanie metody HPLC analizy jakościowej i ilościowej zespołu saponin steroidowych w sprzężeniu z laserowym detektorem światła rozproszonego (ELSD) oraz detektorem mas (MS)
- ocenę aktywności przeciwnowotworowej wyciągów, frakcji i pojedynczych związków czynnych z *Foenugraeci Semen* oraz badania mechanizmów działania proapoptotycznego
- ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągów i pojedynczych związków czynnych z *Foenugraeci Semen* wobec wybranych patogenów.

CZEŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka botaniczna i stanowisko systematyczne *Trigonella foenum-graecum L.*

1.1. Stanowisko systematyczne

Nadkrólestwo:	<i>Eukaryota</i>
Królestwo:	<i>Planta</i>
Podkrólestwo:	<i>Viridaeplantae</i>
Gromada:	<i>Tracheophyta</i>
Podgromada:	<i>Spermatophytina</i>
Klasa:	<i>Magnoliopsida (Dicotyledones)</i>
Podklasa:	<i>Rosidae</i>
Nadrząd:	<i>Rosanae</i>
Rząd:	<i>Fabales</i>
Rodzina:	<i>Fabaceae</i> <i>(Leguminosae, Papilionaceae)</i>
Podrodzina:	<i>Trifoliae</i>
Rodzaj:	<i>Trigonella L.</i>
Gatunek:	<i>Trigonella foenum-graecum L.</i>



Ryc.1. Kozieradka pospolita
(*Trigonella foenum-graecum*) [2]

[13, 368, 431, 468]

1.2. Występowanie *Trigonella foenum-graecum* L.

Kozieradka pospolita (*Trigonella foenum-graeum*) pochodzi z rejonu Morza Śródziemnego [229, 368, 585] lub według innych źródeł z Azji [115, 368]. W krajach europejskich *T. foenum-graecum* spotykana jest jako efemerofit. W stanie naturalnym występuje m.in. w Pakistanie, Turcji, Sudanie oraz Indiach i Chinach [229, 256, 585]. Gatunek jest powszechnie uprawiany w Azji i Europie oraz Ameryce Północnej jako roślina lecznicza oraz pastewna [13, 229, 431].

Nazwa rodzaju *Trigonella*, nadana prawdopodobnie przez starożytnych Rzymian, wywodzi się z języka łacińskiego i oznacza „mały trójkąt” w nawiązaniu do kształtu kwiatów, natomiast nazwa gatunkowa kozieradki pospolitej jest związana z jej intensywnym zapachem i sposobem użycia i pochodzi z języka greckiego – „*foenum-graecum*” oznacza ‘greckie siano’ [368, 431]. O znaczeniu *T. foenum-graecum* jako rośliny leczniczej oraz użytkowej świadczy m.in. występowanie nazwy gatunku w ponad 30 językach świata [431, 585].

1.3. Charakterystyka botaniczna gatunku *Trigonella foenum-graecum* L.

T. foenum-graecum (kozieradka pospolita) jest jednoroczną rośliną zielną o wysokości 20 – 160 cm. Pędy są wzniesione, rozgałęzione, słabo owłosione, puste, zazwyczaj u nasady (lub na całej długości) podbarwione fioletowo. Dolne liście są owalne lub okrągłe, długoogonkowe, nieznacznie trójlistkowe. Przylistki dość duże, miętko owłosione. Górne liście są pierzaste, trójlistkowe, poszczególne listki kształtu jajowatego, podłużnego lub lancetowatego, 1-4 cm długości, pokryte drobnymi włoskami. Blaszka liściowa o brzegach ząbkowanych, jest lekko wycięta na szczycie, wyraźnie unerwiona (nerwy zazwyczaj zakończone w ząbkach blaszki liściowej). Ogonki liściowe są krótkie, lekko owłosione, o chrząstkowej konsystencji, nieznacznie fioletowo nabiegłe.

Kwiaty pojedyncze, zebrane w kątach liści, po dwa lub rzadziej pojedynczo. Kielich o ząbkach miętko owłosionych, tej samej długości co rurka kielicha, w połowie tak długich jak płatki korony. Korona jasnożółta (przebarwiająca się na biało pod koniec kwitnienia), u nasady zabarwiona lekko fioletowo. Żagielek w tylnej części podłużnie wycięty, z niebieskawymi plamkami na wierzchołku (plamki są nieobecne u niektórych

genotypów). Skrzydełka w połowie tak długie jak żagielek, łódeczka tępo zakończona, rozwarta, podzielona u nasady.

Owoce jest równowąski strąk, zakończony dzióbkiem, zazwyczaj lekko zakrzywiony, zawierający od 10 do 20 nasion. Nasiona twarde, długości 3,5 – 6 mm i szerokości 2,5 – 4 mm o zróżnicowanym kształcie – od romboidalnego do trójkątnego, lekko zaokrąglonego w zarysie, z wyraźnym, głębokim rowkiem na powierzchni, oddzielającym korzonek od liścieni. Nasiona barwy od jasnoszarej, przez pomarańczową lub zielonkawą, do brązowej, o powierzchni nieznacznie dołeczkowatej, lekko błyszczącej [222, 362, 431, 465, 468, 559].

Korzeń palowy, słabo rozgałęziony.



Ryc.2. Kozieradka pospolita (*Trigonella foenum-graecum*) [1]

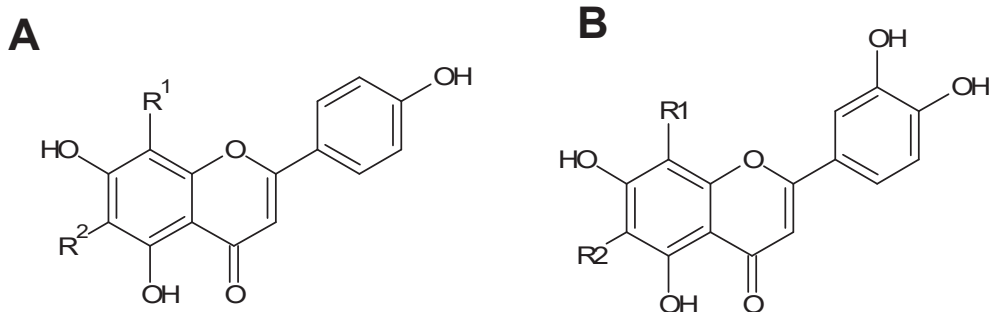
2. Skład chemiczny nasion *Trigonella foenum-graecum* L. – aktualny stan badań

Nasienie kozieradki pospolitej (*Foenugraeci Semen*) jest bogatym źródłem związków aktywnych biologicznie o zróżnicowanej budowie chemicznej. Skład chemiczny *Foenugraeci Semen* jest w dużym stopniu rozpoznany, szczególnie surowców pochodzących z Azji lub Afryki. Dane literaturowe wskazują na znaczne różnice w składzie jakościowym i zawartości związków czynnych w zależności od warunków wzrostu kozieradki [54, 108, 153, 185, 356, 422, 627].

2.1. Flawonoidy

C-glikozydy flawonów

W nasionach kozieradki pospolitej stwierdzono występowanie bogatego zespołu C-glikozydów flawonowych, głównie pochodnych apigeniny i luteoliny [15, 144, 435, 456, 490, 493, 494, 511, 570, 574]. Wśród C-glikozyloflawonów zidentyfikowano: *mono*-C-glikozydy (zawierające resztę cukrową w pozycji C-6 lub C-8) oraz *di*-C-glikozydy (zawierające reszty cukrowe w pozycjach C-6 i C-8 cząsteczki flawonu), jak również estry C-glikozydów, ich pochodne O-glukozydowe oraz etery metylowe [15, 143, 144, 435, 456, 490, 493, 494, 511, 570, 574].



Ryc.3. Struktury chemiczne aglikonów flawonowych w nasieniu kozieradki pospolitej (*T. foenum-graecum*): A – apigenina, B – luteolina.

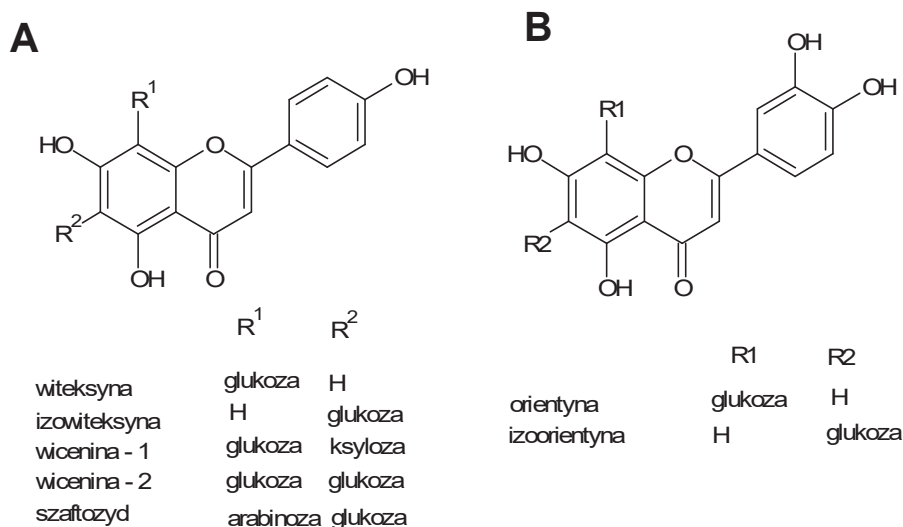
Pierwszym i dotychczas jedynym doniesieniem o obecności C-glikozydów flawonowych dotyczącym surowca pochodzenia krajowego jest praca Adamskiej i

Lutomskiego [15]. W toku dalszych badań analizowano głównie materiał roślinny pochodzący z Azji [456, 490, 493, 494, 510, 574] lub Afryki [66, 143, 144].

Zespół *mono*-C-glikozydów obejmuje pochodne apigeniny: witeksynę (8-C-glukopiranozyd apigeniny) [15, 144, 419, 435, 456, 490, 570] i izowiteksynę (6-C-glukopiranozyd apigeniny) [144, 419, 456, 490, 570] oraz pochodne luteoliny: orientynę (8-C-glukopiranozyd luteoliny [144, 435, 456] i izorientynę (6-C-glukopiranozyd luteoliny) [144, 419, 435, 456, 570].

W obrębie zespołu *di*-C-glikozydów rozpoznano pochodne apigeniny: wiceninę-1 (6-C-ksylopiranozylo-8-C-glukozyd apigeniny) [143, 570], wiceninę-2 (6,8-di-C-glukopiranozyd apigeniny) [143, 144, 493, 570], 6-C-β-D-glukopiranozylo-8-C-β-D-galaktopiranozyd apigeniny [493], szaftozyd (6-C-β-D-glukopiranozylo-8-C-α-L-arabinozyd apigeniny) [493], 6-C-galaktopiranozylo-8-C-α-L-arabinozyd apigeniny [493] oraz 8-C-ramnozylo-6-C-glukopiranozyd apigeniny obok dwóch niezidentyfikowanych 6,8-di-C-heksozydów apigeniny [143]. Ponadto analiza HPLC-DAD-MS surowca azjatyckiego ujawniła obecność 6,8-C-di-galaktopiranozydu apigeniny, 6-C-β-arabinopiranozylo-8-C-β-galaktopiranozydu apigeniny oraz 6-C-β-ksylopiranozylo-8-C-β-galaktopiranozydu apigeniny [456]. Prati i wsp. [435] analizując profil związków flawonoidowych w *Foenugraeci Semen* metodą HPLC-UV-MS, stwierdzili obecność C-ramnozydów orientyny/izorientyny lub witeksyny. Natomiast najnowsze badania z użyciem UPLC/UV/QTOF-MS ujawniły obecność 6,8-di-C-heksozydu chryzyny [144]

Struktury chemiczne wybranych C-glikozyloflawonów, obecnych w nasieniu kozieradki pospolitej przedstawiono na ryc.4.



Ryc.4. Struktury niektórych C-glikozyloflawonów, obecnych w nasieniu kozieradki pospolitej (*T. foenum-graecum*): A – pochodne apigeniny, B – pochodne luteoliny.

Adamska i Lutomski [15] metodą jedno- i dwuwymiarowej chromatografii cienkowarstwowej zidentyfikowali w nasionach kozieradki dwie O-glikozydowe pochodne mono-C-glikozyloflawonów: 7-O-glukozyd witeksyny (saponaretynę, potwierdzoną również przez Wagnera [570]) oraz O-arabinozyd orientyny lub izoorientyny. W 2007 roku Prati i wsp. [435] dodatkowo ujawnili metodą HPLC-UV-MS obecność dwóch O-ksylozydów witeksyny w oparciu o wartość m/z 565 $[M+H]^+$ jonu pseudomolekularnego w ich widmach MS.

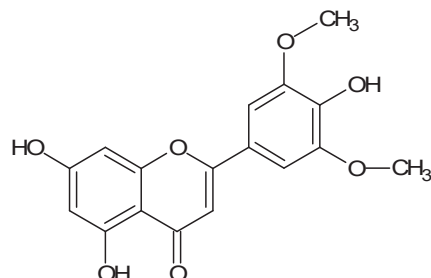
W toku badań nad zespołem C-glikozydów flawonowych w nasieniu kozieradki wykazano występowanie ich połączeń estrowych. W 1976 roku Sood [511] wyizolował z surowca pochodzenia indyjskiego ester p-kumarowy witeksyny (2''-O-p-kumaroilowiteksyna). Jednocześnie Rayyan i wsp. [456] oraz Wang i wsp. [574] ujawnili obecność estru p-kumarowego orientyny (2''-O-p-kumaroiloorientyny) [456, 574]. Ponadto Rayyan i wsp. [456] jako pierwsi wykryli w badanym surowcu i również po raz pierwszy w świecie roślinnym estrowe pochodne *di*-C-glikozydów apigeniny, zawierające reszty kwasów chinowego oraz hydroksymetyloglutarowego: 6-C- β -chinowopiranozylo-8-C- β -galaktopiranozydu oraz 6-C- β -D-ksylopiranozylo-8-C-(6-O-(3-hydroksy-3-metyloglutaroiło))- β -D-glukopiranozydu.

W ostatnich latach badania afrykańskich nasion kozieradki pospolitej dowiodły występowania zespołu acylowanych pochodnych C-glikozyloflawonów apigeniny i luteoliny, zawierających reszty kwasów: dihydroferulowego, galusowego, dihydrogalusowego, metoksyglutarowego, hydroksyglutarowego oraz malonylowego [143]. W oparciu o otrzymane metodą HPLC-UV-ESI-MS dane chromatograficzne (t_R), oraz spektralne ($[M-H]^-$, UV λ_{max}) wykazano obecność następujących związków:

- pochodnych apigeniny: 6-C-glukozylo-8-C-(2''-O-dihydroferuloilo)-glukozydu, 6-C-glukozylo-8-C-(6''-O-metoksygaloilo)-glukozydu, 6-C-glukozylo-8-C-(2''-O-hydroksyferuloilo)-pentozydu, 7-O-(2''-dihydrogaloilo)-ramnozylo-6-C-(2''-pentozylo)-glukozydu, 7-O-(6''-dihydrogaloilo)-ramnozylo-6-C-(2''-pentozylo)-glukozydu, 7-O-(6''-dihydrogaloilo)-glukozylo-8-C-(2''-pentozylo)-ramnozydu, 7-O-(2''-dihydrogaloilo)-glukozylo-8-C-(2''-pentozylo)-ramnozydu
- pochodnych luteoliny: 7-O-[6''-dihydrogaloilo]-glukozylo-8-C-pentozylo(1→6)-glukozydu, 7-O-[6''-dihydrogaloilo]-glukozylo-8-C-pentozylo(1→2)-glukozydu, 7-O-(2''-galoilo)-glukozylo-6-C-(2''-pentozylo)-ramnozydu, 7-O-(6''-chinoilo)-ramnozylo-6-C-pentozylo-8-C,O-(6''-acetylo)-glukozydu, 8-C-(2''-malonylo)-glukozydu oraz 7-O-(2''-dihydrogaloilo)-pentozylo-4'-O-(2'',6''-malonylo-pentozylo)-ramnozydu [143]

Metoksylowane flawony

Obok C-glikozyloflawonów w nasionach kozieradki stwierdzono również występowanie metoksyloowanych pochodnych flawonów: trycyny oraz jej 7-O-β-D-glukopiranozydu [494, 574].



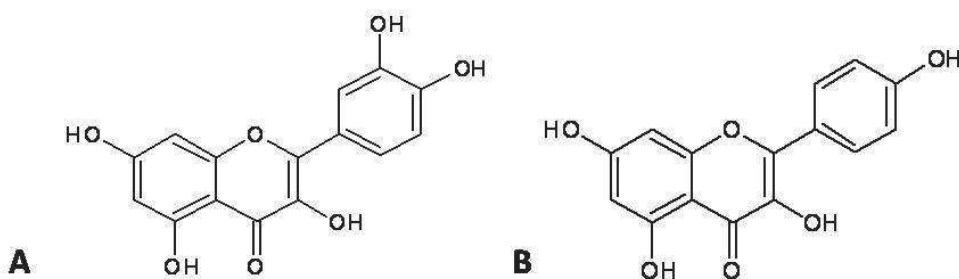
Ryc.5. Struktura chemiczna trycyny.

O-glikozydy flawonów

Z użyciem technik chromatograficznych potwierdzono występowanie w surowcu 7-O-glikozydów flawonów: luteoliny i apigeniny oraz wolnej luteoliny [268].

Flawonole

Flawonole (kwercetyna i kemferol oraz ich 3-O-glukozydy i 7-O-glukozydy) występują głównie w liściach i pędach *T. foenum-graecum* [162, 194]. W nasionach stwierdzono dotychczas obecność kwercetyny [494], mirycetyny [268] i dwóch pochodnych kemferolu: 7-O-ramnozylo(1→2)glukozydu oraz 7-O-(2''',6''',2''-malonylo)-ramnozylo-diglukozylo-3-O-(6''-ramnozylo)-ramnozydu [143].



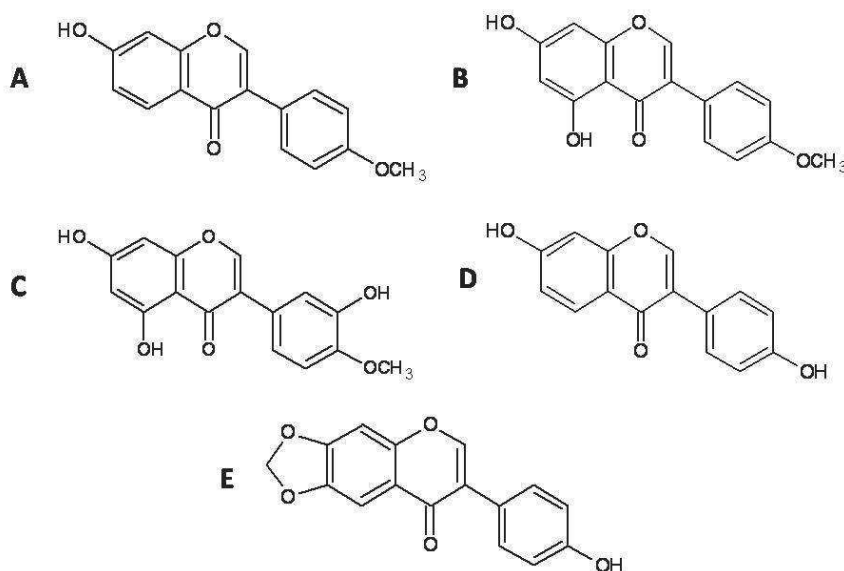
Ryc.6. Struktury chemiczne flawonoli: A – kwercetyna, B – kemferol.

Flawanony

Shang i wsp. [494] ujawnili występowanie naryngeniny w nasionach *T. foenum-graecum*, uprawianej w Chinach. Natomiast Kenny i wsp. [268], analizując materiał pochodzący z Wysp Brytyjskich, stwierdzili występowanie 7-O-glukozydu naryngeniny metodą ultrasprawną chromatografię cieczową w sprzężeniu z detektorem mas (UPLC-MS).

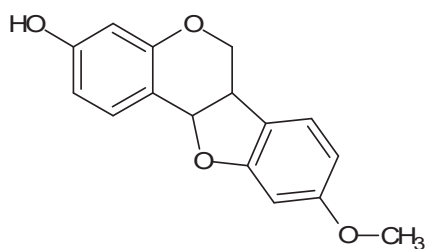
Izoflawony

Badania potwierdziły występowanie w nasionach *T. foenum-graecum* izoflawonów – metabolitów wtórnych o charakterze fitoestrogenów [574]. Wang i wsp. [574] jako pierwsi wyizolowali z surowca chińskiego zespół izoflawonów, w którym zidentyfikowali: biochaninę A, formononetynę, daidzeinę, kalikozyne, irylon oraz 5,7,3'-trihydroksy-5'-metoksyizoflawon (ryc. 7). Natomiast według innych źródeł [240, 364] w nasionach kozieradki występują daidzeina i genisteina (10,2 - 18,2 µg/ 100g oraz 9,8 - 11,8 µg/ 100 g, odpowiednio).



Ryc.7. Struktury chemiczne izoflawonów zidentyfikowanych w nasieniu kozieradki pospolitej (*T. foenum-graecum*): A – formononetyna, B – biochanina A, C – 5,7,3'-trihydroksy-5'-metoksyizoflawon, D – kalikozyne, E – irylon.

Wykazano, że *T. foenum-graecum* w odpowiedzi na stres biotyczny (np. atak patogenów) i abiotyczny (np. wzrost stężenia niektórych jonów metali w podłożu), wydziela fitoaleksyny – roślinne metabolity wtórne o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [109, 226, 227, 431]. W odpowiedzi na zakażenie *Rhizobium mellilotus*, w korzeniach kozieradki pospolitej jest syntezowana medykarpina – fitoaleksyna, pochodna pterokarpanu [54]. Elicytacja 6-dniowych siewek *T. foenum-graecum* dodatkiem do podłoża hodowlanego soli miedzi (CuCl_2) powodowała wzrost stężenia medykarpiny wskutek redukcji jej 3-O-glukozylo-6'-O-malonianu lub syntezy *de novo*, przy czym stężenie wolnego aglikonu było odwrotnie proporcjonalne do stężenia jonów miedzi w korzeniach, natomiast wprost proporcjonalne – w pędach [556, 557]. Podobnie elicytacja solami selenu, glinu lub kadmu skutkowałą nasileniem ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę medykarpiny, zwiększeniem jej stężenia w tkankach roślinnych, a następnie wydzieleniem do podłoża hodowlanego [360].



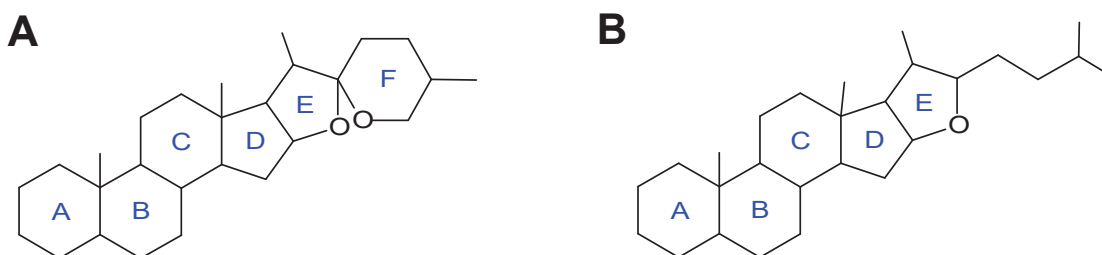
Ryc.8. Struktura chemiczna medykarpiny.

Inne związki flawonoidowe

Spośród innych związków flawonoidowych, w badanym surowcu zidentyfikowano dihydrochalkon floryzynę (2'-O-glukozyd floretyny) [268].

2.2. Saponiny.

Nasienie kozieradki pospolitej stanowi bogate źródło saponin steroidowych, zarówno typu spirostanu, jak i furostanu. Badania nad saponinami nasion kozieradki podjęto już w latach 70-tych XX wieku [146, 198-200, 202, 458, 498], jakkolwiek pierwsze doniesienia o ich obecności pochodzą z 1943 roku [352, 509]. Saponozydy typu furostanu są charakterystyczne dla surowców roślinnych analizowanych bezpośrednio po zbiorze, natomiast w trakcie suszenia ich hydroliza może prowadzić do powstania pochodnych typu spirostanu poprzez cyklizację łańcucha alifatycznego przy C-22 i powstania układu piranu, w którym atom węgla C-22 ma charakter spiro [124, 362].



Ryc.9. Struktura chemiczna saponin steroidowych: A - szkielet spirostanu, B - szkielet furostanu.

2.2.1.1. Saponozydy

Na przestrzeni ostatnich czterech dekad stwierdzono występowanie szeregu saponozydów furostanolowych: trigofenozydów A – G [176-178] oraz trigoneozydów I – XVIII [387, 418, 605, 606]. W obu grupach występują bidesmozydowe pochodne Δ^5 -nienasycone (wiązanie podwójne między atomami węgla C-5 i C-6) oraz 5α -nasycone (brak wiązania podwójnego między C-5 i C-6), różniące się przede wszystkim rodzajem. Zarówno trigoneozydy, jak i trigofenozydy posiadają w pozycji C-3 prosty lub rozgałęziony łańcuch cukrowy, zawierający od dwóch do sześciu cząsteczek monosacharydów. Wśród cukrów prostych, budujących łańcuch cukrowy saponin w nasieniu kozieradki rozpoznano β -D-glukopiranozę, β -D-ksylopiranozę i α -L-ramnopiranozę. W pozycji C-22 znajduje się grupa hydroksylowa, natomiast do atomu

węgla w pozycji C-26 przyłączona jest cząsteczka β -D-glukopiranozy. Niektóre glikozydy posiadają dodatkowe wiązanie nienasycone pomiędzy atomami węgla C-4 i C-5 (np. trigoneozydy XIIa i XIIb) lub C-25 i C-27 (np. trigoneozydy VIa i VIb). W cząsteczkach trigofenozydów B i C oraz trigoneozydów Ia, Ib, Xa, Xb, XIa, XIb w pozycji C-2 występuje dodatkowa grupa hydroksylowa.

Podstawową różnicą w strukturach obu wymienionych powyżej grup saponin steroidowych jest obecność grupy metylowej przy węglu C-25 w trigofenozydach. Związki te rozpoznano wraz z ich 22-eterami metylowymi (trigofenozydy A1-G1). Trigoneozydy nie posiadają grupy metylowej (CH_3) w pozycji C-25 i w zależności od konfiguracji atomu węgla występują w postaci dwóch epimerów oznaczonych odpowiednio literami „a” (25S) oraz „b” (25R). Struktury chemiczne zidentyfikowanych trigofenozydów i trigoneozydów przedstawiają tabele 1 i 2.

Hardman i wsp. [202] wydzielili ze świeżych nasion 22-O-eter metylowy (25S)-3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)]- β -D-glukopiranozylo-26-O- β -D-glukopiranozydu 5 α -furostan-3 β ,22,26-triolu. Natomiast Hibasami i wsp. [205] wyizolowali z surowca protodioscynę - (3 β ,22R,25R)-26- β -D-glukopiranozylo-22-hydroksyfurost-5-eno-3-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozyd, a Yang i wsp. [602] - metylo-protodioscynę oraz metylo-protodeltoinę. Uważa się, że protodioscyna odpowiada za gorzki smak surowca, a jej hydroliza enzymatyczna prowadzi do uwolnienia dioscyny, a następnie diosgeniny, pozbawionych goryczy [388, 537].

Inne glikozydy furostanowe, wyizolowane z nasion kozieradki stanowią: związek C i dwa glikozydy F [606] oraz D [387]. Pang i wsp. [416] ujawnili występowanie dwóch kolejnych związków: 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozydu (25S)-26-O- β -D-glukopiranozylo-furost-5-eno-3 β ,22 α ,26-triolu oraz 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozydu (25R)-26-O- β -D-glukopiranozylo-furost-5-eno-3 β ,22 α ,26-triolu.

Kang i wsp. [253] z użyciem UHPLC-QTOF-MS^E stwierdzili obecność 95 saponin, w tym 22 par izomerów. Spośród rozpoznanych związków, 30 autorzy uznali za nowe [253]. Są to pochodne głównie proto-neogitogeniny, proto-gitogeniny, proto-jukkageniny, proto-gitogeniny, proto-jamogeniny oraz proto-diosgeniny [253]. W cząsteczce aglikonu niektórych z nich występuje dodatkowe wiązanie nienasycone między atomami węgla C-25 i C-27, reszta cukrowa (ramnoza, glukoza lub ksyloza) albo grupa hydroksylowa przy węglu C-26 lub C-27 [253].

Obok glikozydów furostanowych, nasiona kozieradki zawierają również szereg saponin spirostanowych, m.in. grekuniny H-N, zidentyfikowane przez Varshney'a i Beg'a w 1978 roku [565] oraz następujące glikozydy ujawnione w toku badań [417]:

- 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25S)-22 β -O-spirost-5-eno-3 β -olu,
- 3-O-[α -L-ramnopiranozylo (1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd spirost-5,25(27)-dieno-2 α ,3 β -diolu,
- 3-O-[α -L-ramnopiranozylo (1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 5 α -spirost-25(27)-eno-2 α ,3 β -diolu,
- 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozyd (25R)-spirost-5-eno-2 α ,3 β -diolu,
- 3-O-[β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 4)]-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25R)-spirost-5-eno-3 β -olu,
- 3-O-[β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 4)]-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 6)]-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd spirost-5,25(27)-dieno-3 β -olu,
- 3-O-[β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozyd (25S)-5 α -spirost-2 α ,3 β -diolu,
- 3-O-[β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozyd (25R)-5 β -spirost-3 β -olu,
- 3-O-[β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozyd (25R)-5 β -spirost-3 β -olu,
- 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25R)-spirost-5-en-2 α ,3 β -diolu
- 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25S)-spirost-5-en-2 α ,3 β -diolu

Z surowca wyizolowano dwa glikozydy jamogeniny: 3-O-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-ksylopiranozyd [483] oraz trigonellozyd C [(3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 4)]-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-jamogeniny] i jego 22-O-eter metylowy [79].

Nazwa	Nazwa chemiczna	Lit.
Trigofenozyd A	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozylo-26-O- β -D-glukopiranozyd jamogeniny	[177, 178]
Glikozyd D	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozylo-26-O- β -D-glukopiranozyd diosgeniny	[177, 178]
Trigofenozyd B	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranozylo-26-O- β -D-glukopiranozyd tigogeniny	[178, 179]
Trigofenozyd C	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozylo-26-O- β -D-glukopiranozyd gitogeniny	[178, 179]
Trigofenozyd D	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)]- β -D-glukopiranozylo-26-O- β -D-glukopiranozyd jamogeniny	[177, 178]
Trigofenozyd E	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)-[β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozylo-26-O- β -D-glukopiranozyd tigogeniny	[178]
Trigofenozyd F	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozylo-26-O- β -D-glukopiranozyd diosgenina	[176, 178]
Trigofenozyd G	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)-[β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozylo-26-O- β -D-glukopiranozyd diosgeniny	[176, 178]
Związek C (protodioscyna)	[(3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 4))[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd-26-O- β -D-glukopiranozyd diosgenina	[253, 418, 606],
Trigonellozyd C (protoneodioscyna)	[(3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 4))[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd-26-O- β -D-glukopiranozyd jamogeniny	[253, 418, 606],

Tab.1. Struktury chemiczne trigofenozydów, glikozydu D, związku C (protodioscyny) i trigonellozydu C (protoneodioscyny) zidentyfikowanych w nasionach *T. foenum-graecum*.

Nazwa	Nazwa chemiczna	Lit.
Trigoneozyd Ia	3-O-[(β -D-ksylopiranozylo)(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25S)-5 α -furostano-2 α ,3 β ,22 ξ ,26-tetraolu	[253, 387, 605]
Trigoneozyd Ib	3-O-[(β -D-ksylopiranozylo)(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-5 α -furostano-2 α ,3 β ,22 ξ ,26-tetraolu (25R-epimer trigoneozodu Ia)	[253, 387, 605]
Trigoneozyd IIa	3-O-[(β -D-ksylopiranozylo)(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25S)-5 β -furostano-3 β ,22 ξ ,26-triolu	[253, 605]
Trigoneozyd IIb	3-O-[(β -D-ksylopiranozylo)(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-5 β -furostano-3 β ,22 ξ ,26-triolu (25R-epimer trigoneozodu IIa)	[253, 605]
Trigoneozyd IIIa	3-O-[(α -L-ramnopiranozylo)(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25S)-5 α -furostano-3 β ,22 ξ ,26-triolu	[605]
Trigoneozyd IIIb	3-O-[(α -L-ramnopiranozylo)(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-5 α -furostano-3 β ,22 ξ ,26-triolu (25R-epimer trigoneozodu IIIa)	[605]
Trigoneozyd IVa	3-O-[(α -L-ramnopiranozylo)(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25S)-furost-5-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu	[606]
Glikozyd F	3-O-[(α -L-ramnopiranozylo)(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-furost-5-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu (25R-epimer trigoneozydu IVa)	
Trigoneozyd Va	3-O-[(α -L-ramnopiranozylo)(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25S)-furost-5-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu	[253, 387, 606]
Trigoneozyd Vb	3-O-[(α -L-ramnopiranozylo)(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-furost-5-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu (25R-epimer trigoneozydu Va)	[253, 606]
Trigoneozyd VI	3-O-[(α -L-ramnopiranozylo)(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-furost-5,25(27)-dieno-3 β ,22 ξ ,26-triolu	[606]
Trigoneozyd VIIb	3-O-[(α -L-ramnopiranozylo)(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-furost-5-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu	[606]

Trigoneozyd VIIIb	3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)] [[β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 4)] [β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)]- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-5-furostano-3 β ,22 ξ ,26-triolu	[606]
Trigoneozyd IX	<i>Związek wyizolowany z surowca; nie określono struktury chemicznej</i>	[606]
Trigoneozyd Xa	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25S)-5 α -furostano-2 α ,3 β ,22 ξ ,26-tetraolu	[387]
Trigoneozyd Xb	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-5 α -furostano-2 α ,3 β ,22 ξ ,26-tetraolu (25R epimer trigoneozydu Xa)	[387]
Trigoneozyd XIb	3-O- β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-5 α -furostano-2 α ,3 β ,22 ξ ,26-tetraolu	[387]
Trigoneozyd XIIa	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25S)-furost-4-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu	[387]
Trigoneozyd XIIb	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-furost-4-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu (25R epimer trigoneozydu XIIa)	[387]
Trigoneozyd XIIIa	3-O- α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)]- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25S)-furost-5-eno-3- β ,22- Ξ ,26-triolu	[387]
Trigoneozyd XIV	3-O- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-furost-5,25(27)-dien-3 β ,22 α ,26-triolu	[418]
Trigoneozyd XV	3-O- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd,26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-furost-5-en-2 α ,3 β ,22,26-tetraolu	[418]
Trigoneozyd XVI	3-O- β -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-5 α -furost-25(27)-en-2 α ,3 β ,22 α ,26-tetraolu	[418]
Trigoneozyd XVIIa	3-O- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)-[β -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25S)-5 α -furost-2 α ,3 β ,22 α ,26-tetraolu	[418]
Trigoneozyd XVIIb	3-O- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)-[β -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-5 α -furost-2 α ,3 β ,22 α ,26-tetraolu	[418]
Trigoneozyd XVIII	3-O- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-furost-5-en-2 α ,3 β ,22 α ,26-tetraolu	[418]

Tab.2. Struktury chemiczne trigoneozydów oraz glikozydu F, zidentyfikowanych w nasionach *T. foenum-graecum*.

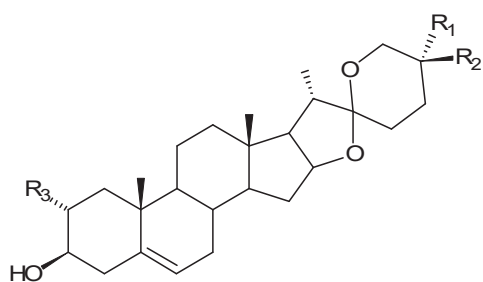
2.2.1.2. Sapogeniny

Struktury genin wchodzących w skład saponozydów obecnych w nasionach kozieradki pospolitej rozpoznano w oparciu o hydrolizę kwasową glikozydów i badanie strukturalne otrzymanych aglikonów. Zidentyfikowane geniny posiadają budowę spirostanową, a ich prekursorami są formy furostanowe, nie posiadające cząsteczki glukozy przy atomie węgla C-26, tzw. *proto-sapogeniny* [253, 418] (ryc.11)

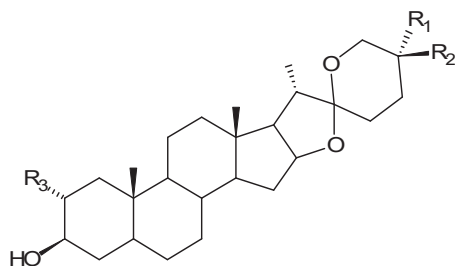
Wykazano, że w surowcu obecne są pochodne Δ^5 -nienasycone: diosgenina (Δ -5, 25R- α -spirostan-3 β -ol) i jej 25S-epimer jamogenina (w stosunku 3:2) oraz jukkagenina i jej 25-epimer lilagenina [80, 113, 180, 198-200, 430, 431, 541]. Ponadto stwierdzono występowanie 5- α -nasyconych pochodnych spirostanu: tigogeniny i jej 25-epimeru neotigogeniny, gitogeniny i jej 25-epimeru neogitogeniny, jak również sarsasapogeniny i jej 25-epimeru smilageniny [84, 113, 180, 198-200, 430, 431, 541]. Gitogenina i jukkagenina oraz ich 25-epimery posiadają dwie grupy hydroksylowe – w pozycjach C-2 i C-3. Natomiast w cząsteczkach pozostałych aglikonów występuje tylko jedna grupa hydroksylowa – przy atomie węgla C-3 (ryc.10.). Wykazano, że 3,26-diglikozydy Δ^5 -furostenowe uwalniają w wyniku hydrolizy diosgeninę i jamogeninę, natomiast 5 α -furostanowe uwalniają tigogeninę i neotigogeninę, a 2 α ,5 α -furostanowe – gitogeninę oraz neogitogeninę [431]. W wyciągach z surowca stwierdzono obecność 25 α -spirosta-3,5-dieniu, który prawdopodobnie jest artefaktem, powstającym w wyniku dehydratacji diosgeniny [198, 430, 431]. Dodatkowo Yoshikawa i wsp. [606] w wyniku hydrolizy trigoneozydu VI otrzymali sceptrumgeninę. Natomiast Murakami i wsp. [387] w wyniku hydrolizy enzymatycznej trigoneozydów XIIa i XIIb z użyciem enzymu narynginazy uzyskali dwa izomeryczne aglikony, posiadające nietypowe wiązanie nienasycone pomiędzy atomami węgla C4 i C5: triognegeninę A (25S) i trigonegeninę B (25R), odpowiednio. Aglikonów tych nie zidentyfikowano w żadnej innej pracy poświęconej badaniom sapogenin steroidowych w nasionach kozieradki. Możliwe, że ich obecność mogła być wynikiem zachodzących w trakcie hydrolizy enzymatycznej przegrupowań chemicznych w obrębie cząsteczek znanych i zidentyfikowanych aglikonów.

Dominującą geniną w nasionach *T. foenum-graecum* jest diosgenina, której zawartość w zależności od pochodzenia surowca wynosi od 0,1% [112] do 0,92 % [543], a nawet – jak podaje Bruneton [85] – 2,0 %. Hardman i wsp. [198, 201] wykazali, że poziom zawartości diosgeniny oraz innych sapogenin jest związany z aktywnością enzymów endogennych oraz warunków przechowywania nasion. Udowodniono wpływ różnych strategii biotechnologicznych na stężenie sapogenin, w tym Δ -5,25- α -spirostan-3 β -olu w kulturach *in vitro* kozieradki [93, 96, 119, 182, 370, 411, 414, 461].

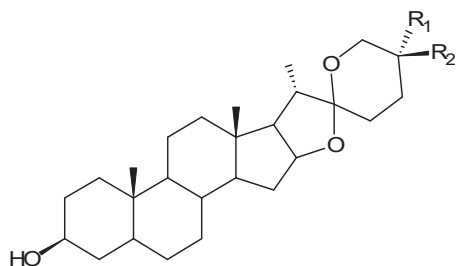
Uważa się, że *Foenugraeci Semen* jest alternatywnym źródłem otrzymywania diosgeniny [201]. Petropoulos [431] wskazuje, że hydroliza kwasowa surowca prowadzi do uwolnienia mieszaniny izomerycznych monohydroksysapogenin: diosgeniny i jamogeniny w stosunku 3:2. Jedynie ok.10% uwolnionych aglikonów stanowią ich pochodne 5- α -nasycone: tigogenina i neotigogenina [431]. Natomiast w niewielkich ilościach występują dihydroksysapogeniny: jukkagenina, lilagenina, gitogenina i neogitogenina [431].



Nazwa	R ₁	R ₂	R ₃
Diosgenina	H	CH ₃	H
Jamogenina	CH ₃	H	H
Jukkagenina	H	CH ₃	OH
Lilagenina	CH ₃	H	OH
Sceptrumgenina 25(27)en	H	H	H

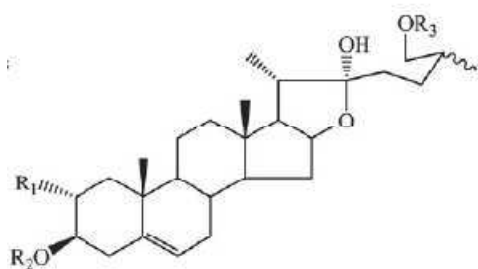


Nazwa	R ₁	R ₂	R ₃
Tigogenina	H	CH ₃	H
Neotigogenina	CH ₃	H	H
Gitogenina	H	CH ₃	OH
Neogitogenina	CH ₃	H	OH

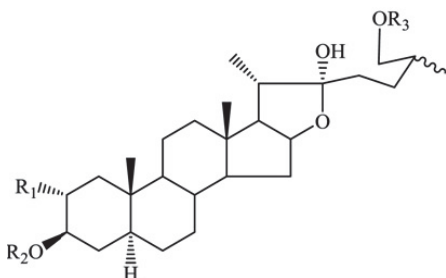


Nazwa	R ₁	R ₂
Sarsasapogenina	H	CH ₃
Smilagenina	CH ₃	H
Makrantogenina 25(27)en	H	H

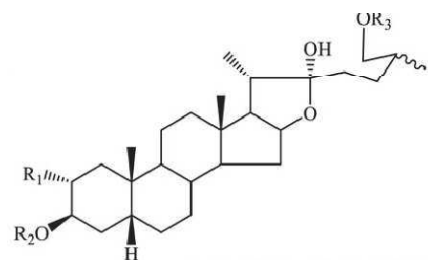
Ryc.10. Wzory strukturalne podstawowych sapogenin zidentyfikowanych w nasionach *T. foenum-graecum*.



Nazwa	R ₁	R ₂	R ₃
Proto-diosgenina	H	CH ₃	H
Proto-jamogenina	CH ₃	H	H
Proto-jukkagenina	H	CH ₃	OH
Proto-lilagenina	CH ₃	H	OH
Proto-sceptrumgenina 25(27)en	H	H	H



Nazwa	R ₁	R ₂	R ₃
Proto-tigogenina	H	CH ₃	H
Proto-neotigogenina	CH ₃	H	H
Proto-gitogenina	H	CH ₃	OH
Proto-neogitogenina	CH ₃	H	OH



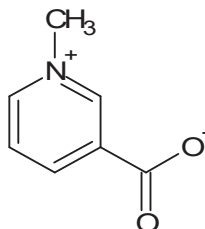
Nazwa	R ₁	R ₂
Proto-sarsasapogenina	H	CH ₃
Proto-smilagenina	CH ₃	H

Ryc.11. Wzory strukturalne prekursorowych form sapogenin - *proto-sapogenin* zidentyfikowanych w nasionach *T. foenum-graecum*.

2.3. Alkaloidy

W nasionach kozieradki pospolitej występuje alkaloid pirydynowy trygonelina – N-metylobetaina kwasu nikotynowego (kwas 1-metylonikotynowy) [44, 168, 431, 476, 495]. Zawartość trygoneliny w świeżych nasionach jest znacznie wyższa od zawartości w surowcu wysuszonym, ponieważ w podwyższonej temperaturze związek ulega rozkładowi do kwasu nikotynowego (witaminy PP) [516] i wynosi ok. 0,15% [431]. Trygonelina powstaje w tkankach roślinnych na drodze syntezy z kwasu nikotynowego, będącego katabolitem cyklu nukleotydów pirydynowych [44]. Alkaloid pełni w tkankach

roślinnych rolę regulatora wzrostu [374] oraz swoistej substancji osmoregulującej [44]. Ponadto bierze udział m.in. w transdukcji sygnałów [67], nyktynastii [44], detoksyfikacji [44], stanowi składnik odżywczy [44] oraz element reakcji obronnej roślin w odpowiedzi na stres [67, 68, 244].



Ryc.12. Struktura chemiczna trygoneliny.

2.4. Polisacharydy

Ze względu na wysoką zawartość polisacharydów (od 20-45% [362, 582, 585]) nasienie kozieradki zaliczane jest do surowców śluzowych o wskaźniku pęcznienia nie mniejszym niż 6 według monografii w Farmakopei Polskiej X. We frakcji rozpuszczalnej w wodzie obecne są galaktomannany – polimery cząsteczek β -D-mannopiranozy połączonych wiązaniami 1,4-glikozydowymi, do których poprzez wiązanie α -1,6-glikozydowe przyłączane są cząsteczki α -D-galaktopiranozy [39, 127, 239, 359, 362, 582]. Liczba i położenie w bocznych łańcuchach cząsteczek galaktozy jest zmienne i wpływa na rozpuszczalność oraz właściwości reologiczne galaktomannanów [359, 582]. Stosunek galaktozy do mannozy w nasionach *T. foenum-graecum* wynosi 1:1 lub (rzadziej) 1:2 [156, 412].

Oprócz rozpuszczalnych w wodzie galaktomannanów w nasionach *T. foenum-gracum* wykazano również obecność nierozpuszczalnej frakcji polisacharydów: pektyn (zbudowanych z reszt kwasu galakturonowego i monosacharydów: ramnozy, ksylozy, mannozy, galaktozy, arabinozy) oraz hemiceluloz, w skład których wchodzi cząsteczki galaktozy, mannozy, ksylozy, arabinozy i glukozy [412].

2.5. Fenolokwasy

Zespół fenolokwasów w nasionach kozieradki rozpoznano z użyciem metod sprzężenia HPLC-UV-ESI-MS [143] oraz UPLC-MS [268]. W surowcu zidentyfikowano fenolokwasy: chinowy, protokatechowy, galusowy, kawowy, chlorogenowy, ferulowy oraz *m*- i *p*-kumarowy [268]. Ponadto wykazano występowanie złożonych kwasów

fenolowych: trikawoilo-hydroksyferulowego, dihydrogalusowego, disinapinoilo-hydroferuloilo-feruloilo-hydroksykawowego oraz kawoilo-kumaroilo-chinowego [143]. W nasionach kozieradki fenolokwasy występują również w formie glikozydowej, mianowicie: diglukozydu kwasu trikawoiloowego, diglukozydu kwasu dikawoilo-protokatechowego oraz pentozydu kwasu galoilo-kumarowego [143].

2.6. Witaminy

Wśród zespołu witamin *Foenugraeci Semen* wymieniane są m.in.: kwas askorbinowy, tiamina, ryboflawina, pirydoksyna, cyjanokobalamina, niacyna i biotyna [268, 357, 431], tokoferole (wśród których α -tokoferol stanowi 84%) [104] oraz kwas nikotynowy (witamina PP), powstający z alkaloidu trygoneliny podczas obróbki termicznej surowca [516].

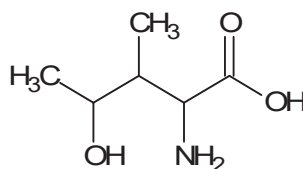
2.7. Związki mineralne

Nasiona *T. foenum-graecum* są źródłem związków mineralnych – zarówno mikro- jak i makroelementów, m.in. wapnia (Ca), magnezu (Mg), żelaza (Fe), cynku (Zn), baru (Ba), bromu (Br), kobaltu (Co), miedzi (Cu) i manganu (Mn) [225, 431, 582]. W odpowiedzi na stres, zwłaszcza abiotyczny, zmienia się pobór składników mineralnych z podłoża, a tym samym ich zawartość w surowcu [221]. Wykazano, że w warunkach suszy obniża się zawartość manganu, azotu, fosforu, potasu, żelaza i miedzi, podczas gdy zawartość cynku wzrasta [221].

2.8. Aminokwasy i białka

Nasiona kozieradki zawierają ok. 25% białka [529, 582]. 90% związków białkowych zgromadzonych jest w liścieniach i zarodku [481]. W skład protein obecnych w nasieniu kozieradki wchodzi liczne aminokwasy (w tym aminokwasy egzogenne): asparagina, kwas asparaginowy, treonina, glutamina, kwas glutaminowy, prolina, glicyna, alanina, cysteina, walina, metionina, leucyna, izoleucyna, tyrozyna, seryna, fenyloalanina, lizyna, histydyna, tryptofan, arginina [140, 431, 477].

Foenugraeci Semen charakteryzuje się obecnością nietypowego aminokwasu: (2S, 3R, 4S)-4-hydroksyzioleucyny [26, 60, 151, 168, 185, 186, 189, 582] (ryc. 13), posiadającej aktywność m.in. przeciwcukrzycową (p. rozdział 3.1. *Aktywność przeciwcukrzycowa*). Analiza stereochemiczna wykazała, że 90% 4-hydroksyzioleucyny w nasionach kozieradki posiada konfigurację (2S, 3R, 4S), natomiast izomer (2R, 3R, 4S) występuje w niewielkiej ilości i nie posiada aktywności przeciwcukrzycowej [582]. Zawartość 4-hydroksyzioleucyny w wysuszonych nasionach *T. foenum-graecum* może wynosić nawet 80% wolnych aminokwasów [431, 582] i – podobnie jak w przypadku innych metabolitów wtórnych - zależy od warunków wzrostu i uprawy [185]. Obserwowano wzrost poziomu tego atypowego aminokwasu podczas kiełkowania nasion [185].



Ryc.13. Wzór strukturalny 4-hydroksyzioleucyny.

2.9. Lipidy

Wśród składników odżywczych nasion kozieradki wymieniane są związki lipidowe o różnicowanej budowie chemicznej, których zawartość wynosi ok. 8% [94, 104, 529, 569]. Dotychczas wykazano obecność triacylogliceroli (85% lipidów), diacylogliceroli (5,5%), monoacylogliceroli (2,1%), wolnych kwasów tłuszczowych (3,2%), jak również fosfolipidów [94, 104, 529, 569]. Skład jakościowy oraz zawartość poszczególnych związków tłuszczowych zależy nie tylko od warunków uprawy, lecz także od genotypu rośliny macierzystej [104]. W profilu kwasów tłuszczowych surowa wykazano głównie kwasy nienasycone: oleinowy (13%), linolowy (36%) i linolenowy (18%) [94, 104, 365, 529, 569]. Z grupy nasyconych kwasów tłuszczowych w surowcu występują: kwas palmitynowy (9-11%) [94, 529] oraz kwas stearynowy (4%) [104, 529]. W śladowych ilościach obecne są kwasy: mirystynowy, palmitooleinowy, arachidonowy, eikozamonoenowy, behenowy oraz lignocerynowy [529]. Stosunek kwasów nienasyconych omega-6:omega-3 wynosi 2,1–2,7 [104]. Fosfolipidy występujące w nasionach *T. foenum-graecum* to m.in. fosfatydylocholina (18,5%), fosfatydyloetanolamina (6%) oraz fosfatydyloinozytol (1,5%). Ponadto wykazano

obecność N-acylofosfatydyloetanolamin (*N-Acyl-phosphatidylethanolamines - NAPE*), głównie N-linoleilofosfatydyloetanolaminy [94]. W grupie amidów kwasów tłuszczowych wyróżniono oleamid [94].

2.10. Sterole

Analiza steroli w różnych genotypach *T. foenum-graecum* wykazała obecność β -sitosterolu jako głównego składnika zespołu (56–72%) [104]. Pozostałe zidentyfikowane związki to kampestrol i cykloartenol [104]. Stwierdzono również obecność cholesterolu oraz jego pochodnych, m.in.: Δ -7-cholesterolu, 24-metylocholesterolu oraz 24-metylencholesterolu, obok fukosterolu, Δ -7-kampestenolu, Δ -7-stigmasterolu i Δ -5-awenastenolu [84, 104].

2.11. Inne związki

Nasiona kozieradki pospolitej posiadają intensywny, charakterystyczny zapach, związany z obecnością związków lotnych, które rozpoznano z użyciem chromatografii gazowej w połączeniu ze spektrometrią mas (GC-MS) i/lub olfaktometrią (GC-O) [77, 365, 366, 569] oraz chromatografii cienkowarstwowej (TLC) [164]. Badania wykazały, że składnikiem odpowiedzialnym za zapach surowca jest sotolon (3-hydroksy-4,5-dimetylo-2(5H)-furanon) [77, 163, 164, 366]. Sotolon posiada wysoki potencjał zapachowy i jest wyraźnie wyczuwalny już w bardzo niskich stężeniach - 0,02 ng/L (w powietrzu) i 0,3 μ g/kg (w wodzie) [77]. W nasionach *T. foenum-graecum* związek w 95% występuje w formie enancjomeru (5S) [77]. W różnych odmianach surowca (w zależności od pochodzenia) zawartość sotolonu wynosi od 3 do 25 mg/kg [77]. 3-hydroksy-4,5-dimetylo-2(5H)-furanon powstaje z odpowiednich prekursorów, którymi są m.in. lakton 3-amino-4,5-dimetylo-3,4-dihydro-2(5H)-furanon lub 4-hydroksyizoleucyna [76, 77, 164]. Oprócz sotolonu w skład olejku eterycznego z nasion kozieradki wchodzi m.in. n-alkany, aldehydy, ketony, alkohole, estry kwasów tłuszczowych, 2 – alkilopirazyne, związki siarkowe, fenole, pochodne furanu, mono- i seskwiterpeny [77, 365, 366, 569]. Blank i wsp. [77] z użyciem GC-O wykazali w surowcu obecność 17 związków zapachowych, Mebazaa i wsp. [366] metodą GC-MS zidentyfikowali ponad 67 lotnych metabolitów, natomiast Mazza i wsp. [365] – aż 175.

W toku badań nad składem chemicznym nasion kozieradki, wykazano również obecność kumaryn (0,34 mg/kg), głównie w formie połączeń glikozydowych (68%) [469]. Ponadto w procesie izolacji z materiału roślinnego, stanowiącego całe wysuszone rośliny *T. foenum-graecum* wyodrębniono trigokumarynę (3-(etoksykarbonylo)-1-metylo-4-metylo-5,8-dimetoksy- kumarynę) [424].

Pang i wsp. [419] przeprowadzili izolację z surowca dwóch glikozydów diterpenowych i określili ich struktury jako: grekumozyd A (ester metylowy 3-O- β -D-glukopiranozydu kwasu kaur-5,16-dieno-3 β ,6,13 β -trihydroksy-7-okso-18-owego) i grekumozyd B (ester metylowy 3-O- β -neohesperozydu kwasu kaur-5,16-dieno-3 β ,6,13 β -trihydroksy-7-okso-18-owego).

Spośród lignanów, w nasionach kozieradki ujawniono obecność sekoizolarycyrezynolu oraz anhydrosekoizolarycyrezynolu [364] - fitoestrogenów i silnych antyoksydantów, należących do klasy lignanów, występujących także m.in. w *Lini Semen* [257].

3. Aktywność biologiczna nasion *T. foenum-graecum*

3.1. Aktywność przeciwcukrzycowa

Znane już w starożytności obniżające poziom glukozy we krwi działanie nasion *T. foenum-graecum* potwierdzono w modelach *in vivo* na zwierzętach z cukrzycą indukowaną aloksanem [11, 52, 171, 384, 438, 493] lub streptozocyną [9, 16, 300, 438, 452, 475, 535] oraz w badaniach klinicznych [59, 159, 171, 174, 258, 329].

Stwierdzono, że suplementacja diety nasionami kozieradki zwiększa obniżoną aktywność enzymów glikolitycznych, m.in. kinazy pirogronianowej (PK) i związanych z NADP enzymów lipogenicznych (m.in. dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa) oraz normalizuje podwyższoną aktywność enzymów glukoneogenicznych (glukozy-6-fosfataz i fruktozy-1,6-bisfosfataz) [379, 444]. Stymulowana jest również aktywność adiponektyny [302]. Surowiec znacząco obniża stężenie glukozy we krwi [9, 11, 16, 174, 241, 358, 384, 460, 474, 525, 592] oraz ilość glikozylowanej hemoglobiny (HbA1c) [9, 11, 174, 592], z jednoczesnym zwiększeniem wydzielania insuliny [9, 11, 452], regeneracją komórek β wyspepek Langerhansa w trzustce [52, 438] oraz wzrostem ich liczby i wielkości [300, 452]. Ponadto surowiec usprawnia funkcjonowanie nerek i wątroby oraz nasila magazynowanie glikogenu w hepatocytach [9, 493]. Badania wskazują, że mechanizm działania ekstraktu z nasion kozieradki obejmuje aktywację w adipocytach i komórkach wątroby insulinowej ścieżki sygnalizacyjnej [566]. W obecności wyciągu obserwowano aktywację podjednostki β receptora insulinowego (IR- β), prowadzącą do szeregu przemian biochemicznych (fosforylacja białek, synteza przekaźników drugiego rzędu, aktywacja kinazy białkowej C), którego skutkiem była translokacja z przestrzeni międzykomórkowej do błony komórkowej insulinozależnego transportera glukozy GLUT-4, obecnego w adipocytach i tkance mięśniowej [379, 566] obok zwiększonego wychwytu glukozy. W przeciwieństwie do insuliny, ekstrakt z nasion kozieradki nie powodował aktywacji kinazy białkowej B [566]. Jednocześnie w wyniku podaży wyciągu zwiększała się wrażliwość tkanek na insulinę [174], natomiast obniżała się insulinooporność [193]. Obserwowano synergistyczny efekt hipoglikemiczny przy jednoczesnym podawaniu nasion kozieradki oraz glibenklamidu [304], co wskazuje na możliwość stosowania terapii łączonej lub suplementacji diety surowcem w przebiegu standardowej terapii przeciwcukrzycowej. Metaanaliza badań klinicznych weryfikujących przeciwcukrzycowe działanie surowca potwierdziła spadek

poziomu glikozylowanej hemoglobiny oraz obniżanie stężenia glukozy na czczo i po dwóch godzinach od obciążenia [398].

Działanie hipoglikemiczne surowca wynika prawdopodobnie z synergistycznego wpływu różnych związków chemicznych. Dzięki obecności znacznych ilości galaktomannanów, nasiona kozieradki przyjmowane doustnie w postaci kleiku, opóźniają opróżnianie żołądka i wchłanianie węglowodanów w jelitach [23, 514] oraz redukują poposiłkowy wzrost stężenia glukozy [29, 463, 533]. Hamują aktywność enzymów rozkładających węglowodany [23] i obniżają poziom glukozy, zarówno we krwi [195, 250, 463, 513], jak i w moczu [533].

Aktywność hipoglikemiczną wykazał obecny w nasionach kozieradki nietypowy aminokwas – 4-hydroksyzioleucyna. Zwiększa on uwalnianie insuliny z komórek wysypek Langerhansa [480]. Jest to działanie dwufazowe, zależne od stężenia glukozy, obserwowane przy nieobecności innych agonistów uwalniania insuliny [480]. Działanie insulinotropowe i obniżenie stężenia glukozy we krwi odnotowano również u zwierząt z cukrzycą typu 2 oporną na insulinę [184]. Ponadto 4-hydroksyzioleucyna zwiększała wychwyt zwrotny glukozy poprzez nasilenie translokacji transporterów GLUT-4 [230].

W badaniach na szczurach z indukowaną cukrzycą, wskazano na związek aktywności przeciwcukrzycowej z występowaniem saponin [329, 395]. Diosgenina podawana doustnie obniżała stężenia glukozy we krwi oraz zwiększała wydzielanie insuliny w sposób zależny od dawki [421, 475]. Jednocześnie osłabieniu ulegała insulinooporność [395]. Związek regulował podwyższone poziomy niektórych enzymów w mięśniach i nerkach (m.in. glukozo-6-fosfatazy i fruktozo-1,6-bisfosfatazy) [475]. Obserwowane efekty były porównywalne z wywoływanyymi przez glibenklamid – standardowy lek stosowany w terapii cukrzycy [475]. Opatentowany pod nazwą Fenufuro™ wyciąg z nasion kozieradki, bogaty w saponiny furostanolowe (>60%, w/w, HPLC) w znaczący sposób obniżał poziom glukozy we krwi, nie wywołując efektów ubocznych [535]. Natomiast badania kliniczne na grupie pacjentów w cukrzycą typu 2 wykazały, że saponiny w kombinacji z pochodnymi sulfonilomocznika znacząco obniżają stężenie glukozy (na czczo i poposiłkowe), a także w istotny sposób zmniejszają ilość glikozylowanej hemoglobiny [59, 330].

Działaniem hipoglikemicznym charakteryzuje się alkaloid – trygonelina [187, 495, 524, 562, 623], który wykazuje efekt ochronny wobec komórek β wysypek Langerhansa, zwiększa uwalnianie insuliny i stymuluje wrażliwość na ten hormon tkanek [623].

Aktywność przeciwcukrzycowa surowca, obejmująca inhibicję α -amylazy i α -glukozydazy jest bezpośrednio związana z obecnością związków polifenolowych [103,

451], których zawartość wzrasta w wyniku termicznego przetwarzania nasion [451]. Zespół polifenoli z surowca zwiększa wrażliwość tkanek na insulinę w stopniu porównywalnym z metforminą [255]. C-glikozydy apigeniny wykazują aktywność hipoglikemiczną [493].

3.2. Aktywność hipolipidemiczna

Nasiona kozieradki po podaniu doustnym powodują obniżenie w surowicy krwi stężenia całkowitego cholesterolu, lipoproteiny niskiej gęstości (*Low Density Lipoproteins* – LDL), triglicerydów (TG) i lipoproteiny bardzo niskiej gęstości (*Very Low Density Lipoproteins* – VLDL) [9, 11, 23, 62, 64, 65, 95, 141, 193, 197, 241, 258, 278, 302, 358, 381, 434, 460, 482, 525, 567, 592]. Obniżeniu ulega również ogólny poziom lipidów oraz białek zawierających apolipoproteinę B (ApoB; główny białkowy składnik LDL) [78, 302, 525]. Natomiast stężenie lipoproteiny o wysokiej gęstości (*High Density Lipoproteins* – HDL) wzrasta [9, 64, 65, 141, 193, 197, 241, 278]. Powyższe efekty potwierdzają korzystny wpływ składników surowca na hiperlipidemię, również w przebiegu zespołu metabolicznego w cukrzycy.

W mechanizm działania surowca włączają się saponiny steroidowe. Związki te, częściowo rozkładane w przewodzie pokarmowym do sapogenin [478], nasilają metabolizm cholesterolu i jego przemianę w wątrobie do kwasów żółciowych [23, 152] oraz stymulują ich wydalanie, m.in. w postaci kompleksów z błonnikiem [23]. Jednocześnie hamują aktywność lipazy i opóźniają wchłanianie związków tłuszczowych [152] (działanie wykazane również dla ekstraktu wodnego z *Foenugraeci Semen* [302]). Składniki nasion *T. foenum-graecum* blokują akumulację tłuszczu w komórkach poprzez aktywację czynników adipogennych m.in. receptorów PPAR γ (ang. *Peroxisome proliferator-activated receptors*), zlokalizowanych w tkance tłuszczowej, nerkach, sercu i płucach, i białek SREBP-1 (ang. *Sterol Regulatory Element Binding Proteins*) – białek wiążących czynnik regulujący sterole i kontrolujących aktywność genów zaangażowanych w syntezę cholesterolu, kwasów tłuszczowych i triglicerydów [284, 567]. W rezultacie dochodzi do zwiększenia na powierzchni hepatocytów gęstości receptorów dla LDL (LDLR) [567], wychwytu cząsteczek LDL z krwi i obniżenia ich stężenia w osoczu. Badania wykazały, że hydrolizat wyciągu saponinowego z nasion kozieradki oraz diosgenina znacząco hamują stężenie triglicerydów w osoczu, ich akumulację w komórkach wątroby HepG2 oraz ekspresję genów enzymów

lipolitycznych [561]. Ponadto diosgenina pobudza różnicowanie adipocytów i hamuje ekspresję genów stanu zapalnego w komórkach tłuszczowych 3T3-L1 [560].

Badania Ghorbani'ego i wsp. [160] wskazują na hamujący wpływ nasion kozieradki na adipogenezę i powstawanie nowych adipocytów z komórek prekursorowych. Podobne rezultaty uzyskali Kim i wsp. [284], badając wpływ witeksyny i orientyny na komórki 3T3-L1. C-glikozyloflawony hamowały proces adipogenezy [284]. Shan i wsp. [493] w eksperymentach *in vivo* ujawnił hipolipidemiczne właściwości C-glikozydowych pochodnych apigeniny. Natomiast Belguith-Hasaid i wsp. [65], prowadząc porównawcze badania na zwierzętach różnych wyciągów z nasion kozieradki (wodnego, metanolowego, heksanowego, octanowego i dichlorometanowego) w podaniu *per os* ujawnili, że najsilniejszym działaniem hipolipidemicznym i antyoksydacyjnym charakteryzuje się wyciąg octanowy, w którym zawartość flawonoidów i innych fenoli była najwyższa.

Inne związki, obecne w nasionach kozieradki, wywierające wpływ na gospodarkę lipidową, to m.in. trygonelina ulegająca rozkładowi do kwasu nikotynowego oraz amidu kwasu nikotynowego (witamina PP, niacyna). Niacyna jest ważnym składnikiem NAD (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) i NADP (fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego), biorących udział w procesach energetycznych (rozkład i synteza węglowodanów, kwasów tłuszczowych i aminokwasów) oraz w oddychaniu komórkowym. NAD i NADP wpływają m.in. na właściwe funkcjonowanie ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego oraz stan skóry. Niacyna wywiera wpływ na układ krążenia i wykazuje aktywność przeciwmiażdżycową: w sposób niekompetytywny i bezpośredni blokuje obecną w wątrobie acetylotransferazę-2 diacyloglicerolu, co skutkuje obniżeniem syntezy triglicerydów oraz VLDL, a także nasileniem degradacji ApoB [249]. Obniżeniu ulega również ilość cząsteczek LDL – produktu katabolizmu VLDL [249]. Wykazano, że podawanie niacyny (pojedynczo lub w terapii skojarzonej z innymi środkami obniżającymi poziom lipidów) znacząco zmniejsza śmiertelność i liczbę incydentów wieńcowych oraz opóźnia rozwój miażdżycy tętnic wieńcowych, jednocześnie stymulując regresję [249].

Działanie hipolipidemiczne i przeciwhiperlipidemiczne wykazują również polisacharydy, w tym galaktomannany z nasienia kozieradki [78, 463] oraz alkaloid trygonelina [192].

Badania na zwierzętach wykazały, że włączenie do diety nasion kozieradki skutkuje obniżeniem poziomu lipidów w osoczu i w wątrobie na skutek aktywacji acylotransferazy lecytyna:cholesterol (LCAT), lipazy trójglicerydowej i lipazy lipoproteinowej, poheparynowej aktywności lipolitycznej poprzez zwiększenie

wydalania kwasów żółciowych z kałem [95]. Również stosowanie ekstraktów wodnych z surowca powoduje obniżenie przyrostu masy ciała, wskaźnika masy ciała (*Body Mass Index* – BMI) i usprawnia metabolizm lipidów [302].

3.3. Aktywność neurologiczna

Interesującym kierunkiem aktywności farmakologicznej surowca jest wpływ na układ nerwowy. Trygonelina obecna w nasionach kozieradki wykazuje zdolność hamowania acetylocholinesterazy (AChE) ($IC_{50}=233\pm 0,12 \mu M$) [476, 581]. Chlorowodorek trygoneliny jest kompetytywnym antagonistą receptorów $GABA_A$ i zależnie od dawki hamuje odpowiedź neuronalną, stymulowaną kwasem γ -aminomasłowym (GABA). Stopień inhibicji stymulowanej chlorowodorkiem trygoneliny (13mM) jest porównywalny z kofeiną (15mM) [212]. Zdolność hamowania AChE potwierdzono również dla wyciągu z nasion *T. foenum-graecum* [496]. W badaniach na komórkach ludzkiej neuroblastomy SK-N-SH obserwowano, że trygonelina stymuluje regenerację aksonów komórek mózgowych [550]. Alkaloid wpływa na funkcjonalną regenerację neurytów, nasilając powstawanie synaps [550], co skutkuje poprawą pamięci [551]. Efekt potwierdzono oceną wpływu suplementacji diety nasionami kozieradki na zdolności prokognitywne w różnych modelach amnezji [470]. Działanie neuroprotekcjne surowca obejmuje ochronę przed dendrytyczną i aksonalną atrofią mózgowych neuronów korykalnych inkubowanych w obecności β -amyloidu [551]. Ostatnie doniesienia wskazują, że diosgenina może być obiecującym lekiem w terapii choroby Alzheimera, wykazując powinowactwo zarówno do monomerów, jak i dojrzałych włókien β -amyloidu [400].

Wyciąg wodny [546] i wodno-alkoholowy [378] z *Foenugraeci Semen* w badaniach na zwierzętach przeciwdziałał objawom neuropatii indukowanej pirydoksyną [378] oraz uszkodzeniu mózgu wywołanemu etanolem [546]. W szeregu badań odnotowano, że związki czynne nasion kozieradki odwracają zmiany obserwowane w tkance mózgowej w przebiegu cukrzycy, co związane jest m.in. z działaniem hipolipidemicznym, przeciwutleniającym i redukcją stresu oksydacyjnego [158, 254, 301]. W badaniach na zwierzętach z neuropatią cukrzycową diosgenina nasilała produkcję czynnika wzrostu nerwów (*Nerve Growth Factor* – NGF) w nerwie kulszowym, stymulowała rozrost neurytów w komórkach PC12 oraz zwiększała szybkość przewodzenia w neuronach [254]. Ocena histopatologiczna badanych tkanek z użyciem mikroskopu elektronowego wykazała obniżenie poziomu demielinizacji neuronów i wzrost powierzchni

zmielinizowanych aksonów [254]. Diosgenina odwracała funkcjonalne i ultrastrukturalne zmiany oraz indukowała regenerację nerwów w zwierzęcym modelu neuropatii cukrzycowej [254]. Włączenie do diety sproszkowanych nasion kozieradki skutkowało działaniem ochronnym na komórki nerwowe objęte neuropatią cukrzycową oraz ograniczało występującą w jej przebiegu degenerację aksonów [396]. Autorzy badań zwrócili uwagę, że surowiec włączony jako stały składnik diety chorych na cukrzycę z ryzykiem rozwoju neuropatii, może być elementem profilaktycznej terapii ochronnej [396]. Podobne działanie obserwowano dla flawonolu – kwercetyny [396]. Podawany *per os* (*p.o.*) w modelu *in vivo* wyciąg z *Foenugraeci Semen* „IND01”, standaryzowany na trygonelinę (HPLC) znacząco poprawiał zaburzone funkcjonowanie nerwów w neuropatii [382].

Badania kliniczne, prowadzone na pacjentach z chorobą Parkinsona, leczonych L-Dopą wykazały, że włączenie do ich diety standaryzowanego wyciągu z nasion kozieradki (IBHB), wspomaga terapię, a wyciąg jest dobrze tolerowany i bezpieczny [397].

Suplementacja diety nasionami *T. foenum-graecum* nasila osłabioną aktywność kwaśnego białka włókienkowego (*Glial Fibrillary Acidic Protein* – GFAP) i ekspresję interleukiny-6 (IL-6) [63], której obniżone stężenie stanowi jeden z głównych mechanizmów chronicznej neurotoksyczności aluminium [63]. Surowiec jako składnik diety może działać ochronnie na komórki astrogleju dzięki wykazywanej aktywności przeciwutleniającej oraz immunomodulującej [63]. Należy podkreślić, że podwyższony poziom interleukiny prozapalnej IL-6 w komórkach nerwowych związany jest z patogenezą choroby Alzheimera [19, 462]. Dlatego konieczne są dalsze badania nad wpływem *Foenugraeci Semen* na procesy biochemiczne związane z ekspresją IL-6 w tkance mózgowej.

Nasiona *T. foenum-graecum* wykazują aktywność antydepresyjną, co wykazano dla wyciągów alkoholowych z surowca [280], jak i pojedynczych związków czynnych: witeksyny [89] i 4-hydroksyzioleucyny [157]. Obserwowany efekt jest porównywalny ze standardowo stosowanym w terapii trójpierścieniowym lekiem przeciwdepresyjnym – imipraminą [427]. W mechanizmie działania antydepresyjnego surowca wymienia się inhibicję monoaminooksydaz A i B (MAO-A i MAO-B) [243, 280, 427], oraz wpływ na układ adrenergiczny, serotonergiczny i GABA-ergiczny [89, 157, 427]

Ze związków flawonoidowych obecnych w surowcu witeksyna wykazuje działanie przeciwdrgawkowe, prawdopodobnie wskutek powinowactwa do miejsca wiązania GABA_A w obrębie receptora benzodiazepinowego [8].

Wyniki powyższych badań pozwalają zaliczyć nasiona kozieradki do grupy surowców roślinnych potencjalnie użytecznych w profilaktyce i leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, szczególnie choroby Alzheimerera.

3.4. Aktywność antyoksydacyjna

Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z surowca potwierdzono w licznych eksperymentach *in vitro* i *in vivo*, w różnych modelach badawczych [12, 14, 45, 64, 65, 95, 261, 264, 268, 457, 523, 593].

Bogate w polifenole wyciągi z nasion kozieradki i sproszkowany surowiec stymulują wzrost poziomu glutationu, stężenie katalazy i dysmutazy nadtlenkowej w wątrobie, sercu, nerkach i soczewce gałki ocznej [27, 45, 64, 65, 72, 95, 181, 302, 497, 503, 534] oraz przywracają prawidłowe poziomy peroksydazy glutationu i S-transferazy glutationu [45, 72, 181]. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że obniżeniu ulega poziom markerów stresu oksydacyjnego, m.in. dialdehydu malonowego (MDA) (w eksperymentalnym modelu zaćmy indukowanej selenitem) [181] oraz poziom grup karbonylowych oksydacyjnie zmienionych białek (w uszkodzonych etanolem komórkach wątroby szczurów) [265].

Ekstrakty z surowca hamują peroksydację lipidów [95, 264, 503] oraz obniżają poziom produktów peroksydacji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* – TBARS) [65, 302, 503]. Ponadto fenolowe składniki wyciągów zmiatają rodniki nadtlenkowe i ograniczają uwalnianie reaktywnych form tlenu (ROS) [305, 523] oraz aktywują enzymy antyutleniające w komórkach wątroby [265, 457].

Spośród polifenoli obecnych w surowcu, szczególne znaczenie mają C-glikozydy flawonowe, których aktywność przeciwutleniająca potwierdzono w licznych badaniach [38, 203, 281, 285, 286, 315, 322, 429, 622]. Witeksynę i izowiteksynę uznano za antyoksydanty wyciągu octanu etylu z *Foenugraeci Semen* [277]. Wyciągi octanu etylu charakteryzowały się najwyższym stężeniem związków fenolowych oraz najsilniejszą aktywnością antyoksydacyjną [65, 268].

Działaniem antyutleniającym, potwierdzonym w badaniach *in vitro* i *in vivo* charakteryzowały się również kielki *T. foenum-graecum* [128, 348].

3.5. Aktywność przeciwzapalna i immunomodulująca

Właściwości przeciwzapalne nasion kozieradki opisywano w starożytnej Ayurwedzie [256]. Tradycyjnie stosowane w tym zakresie przede wszystkim zewnętrznie (w postaci kataplazmów) [256], ujawniają aktywność również po podaniu doustnym (p.o) [346, 568] i dootrzewnowym (i.p.) [568]. Obserwowane efekty przeciwzapalne są porównywalne z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ, NSAID), m.in.: pentazocyną [568], diklofenakiem sodu [568] lub potasu [346] oraz indometacyną [503, 522].

Wyciąg z nasion *T. foenum-graecum* stymuluje uwalnianie interleukin IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 oraz czynnika martwicy nowotworu TNF α i osłabia ekspresję cyklooksygenazy-2 (COX-2) [53, 208, 266, 328, 385, 534]. W obecności czynników prozapalnych i mutagennych, nasiona kozieradki hamują syntezę prostaglandyn również poprzez supresję ekspresji genu cyklooksygenazy-1 (COX-1) [564] i hamowanie aktywności enzymu [328]. Jedynie Rastegar Maghadam i wsp. [453] wykazali, że wyciąg wodny z surowca nie ma wpływu na aktywność COX-1 i COX-2, , jakkolwiek łagodzi stan zapalny i dolegliwości bólowe.

Badania w modelu obrzęku łapy indukowanego karageniną lub formaliną potwierdziły przeciwzapalne właściwości podawanych *per os* wyciągów alkoholowych [346, 522, 534] i wodnych z surowca [349, 453, 454, 503] oraz frakcji bogatych w alkaloidy i flawonoidy [349, 454]. Wyciąg etanolowy ujawnił silniejszą aktywność w porównaniu do wyciągu wodnego [346]. Wykazywał znaczące działanie przeciwzapalne nie tylko w ostrych (obrzęk łapy), ale i przewlekłych (ziarniniaki) stanach zapalnych [522], przy czym stopień redukcji obrzęku był wprost proporcjonalny do dawki [534].

Tradycyjne zastosowanie surowca w chorobach reumatycznych, w tym w reumatycznym zapaleniu stawów [45, 57], potwierdzono w badaniach na szczurach [24, 45, 503]. W zwierzęcym modelu zapalenia stawów (ang. *adjuvant arthritis*) wykazano, że macerat z nasion kozieradki znacząco redukował obrzęk oraz poziomy czynników prozapalnych (cyklooksygenazy-2, lipooksygenazy, mieloperoksydazy oraz białka zapalnego C) [503]. Wyciąg wodno-alkoholowy obniżał aktywność elastazy neutrofilowej [45]. Obserwowane zmiany w parametrach biochemicznych potwierdzono histopatologiczną oceną tkanek [45, 503].

W mechanizm aktywności przeciwzapalnej surowca zaangażowane są różnorodne metabolity wtórne: alkaloidy [349], polifenole [328, 349, 593], saponiny [97, 118, 208,

266], 4-OH-izoleucyna [363], kwasy tłuszczowe i ich triglicerydy [328] oraz polisacharydy [362].

Badania na ko-kulturach adipocytów 3T3-L1 i makrofagów RAW 264 ujawniły przeciwzapalną i immunomodulującą aktywność diosgeniny, która hamowała produkcję mediatorów i sygnałów prozapalnych w makrofagach [208]. Ocena wyciągu metanolowego z nasion kozieradki, prowadzona na linii komórkowej THP-1 potwierdziła przeciwzapalną aktywność saponin steroidowych [266]. Zarówno sproszkowany surowiec, jak i bogate w polifenole wyciągi, znacząco obniżały stężenie malonodialdehydu, aktywując procesy przeciwutleniające, co prowadziło do redukcji stanu zapalnego w eksperymentalnie indukowanym zwłóknieniu płuc u szczurów [593]

Z działaniem przeciwzapalnym surowca bezpośrednio związana jest także jego aktywność immunomodulująca [69, 191, 448]. Ma ona znaczenie w łagodzeniu zespołu metabolicznego, któremu towarzyszą procesy zapalne [134, 207, 415]. Działanie immunomodulujące surowca oraz wyciągu etanolowego potwierdzono zarówno w badaniach *in vitro* [553] jak i *in vivo* [191, 448] oraz w badaniach klinicznych [69]. Sproszkowane nasiona kozieradki łagodziły objawy eksperymentalnie indukowanego zespołu metabolicznego u szczurów z cukrzycą typu 1 i otyłością [448]. Ponadto wykazywały działanie immunostymulujące w immunosupresji wywołanej cyklofosfamidem [448]. Natomiast ekstrakt etanolowy z liści kozieradki pobudzał tworzenie przeciwciał i rozet limfocytów T, stymulując układ siateczkowo-śródbłonkowy, zwiększając indeks fagocytarny oraz znacząco zmniejszając obrzęk zapalny tkanek [17, 553]. Dodatkowo w eksperymentach *in vivo* i *ex vivo* udowodniono, że wyciąg z nasienia kozieradki ma działanie antyalergiczne wobec stanów zapalnych skóry na tle uczuleniowym, a w jego mechanizmie uwzględnia się m.in.: supresję ekspresji, produkcji i wydzielania czynników prozapalnych, różnicowania komórek Th2 w splenocytach, a we wczesnej fazie – pobudzenie ekspresji mRNA interferonu γ (IFN- γ) oraz czynnika transkrypcji IFN- γ , czynnika transkrypcyjnego T-bet, jak również zwiększenia liczby komórek T CD4⁺, wydzielających IFN- γ [53].

Działanie przeciwzapalne surowca wykorzystywane jest w podaniu wewnętrznym, jak również zewnętrznym – w formie kataplazmów lub maści w łagodzeniu stanów zapalnych skóry i tkanki podskórnej oraz gojeniu ran [27, 53, 137, 242, 394, 526, 530, 539, 540].

Jyothi i wsp. [242] w modelu obrzęku łapy indukowanego karageniną porównali działanie przeciwzapalne maści zawierających 5% (w/w) wyciąg etanolowy z nasion kozieradki. Maść przygotowana na podłożu zawierającym parafinę ciekłą, stałą oraz wosk wykazywała redukcję obrzęku o 41,77%, natomiast maść, którą otrzymano na podłożu zawierającym parafinę stałą, lanolinę i alkohol cetosterylowy – o 40,0% [242].

Eksperymenty na królikach w modelu ran ciętych ujawniły, że aplikacja maści zawierającej 10% zmielonych nasion *T. foenum-graecum* (podłoże maściowe stanowiła wazelina) znacząco przyspiesza tworzenie tkanki włóknistej i ziarniny, jak również epitelizację i dojrzewanie tkanki łącznej [386]. W badaniu histopatologicznym tkanek poddanych leczeniu ocenianym preparatem, w porównaniu do grupy kontrolnej, obserwowano normalizację warstwy naskórka, tworzenie nowych mieszków włosowych, wzrost syntezy kolagenu oraz hamowanie reakcji zapalnych [386].

Podobne rezultaty odnotowano w wyniku miejscowej aplikacji kleiku z nasion [530]. Autorzy badań zwrócili szczególną uwagę na stopień rozdrobnienia surowca, ponieważ grubo sproszkowane fragmenty będą opóźniać proces gojenia rany, powodując jako ciała obce nawet przewlekłe reakcje zapalne [386].

Działanie przyspieszające procesy gojenia badano w zwierzęcych modelach ran powstałych przez wycięcie, nacięcie oraz modelu ran martwiczych [530, 539, 540]. Miejscowe, podskórne (s.c.) podanie wyciągów z *Foenugraeci Semen* znacząco usprawniło proces zablizniania ran [539], podobnie jak zastosowanie terapii łączonej, obejmującej miejscową aplikację przetworów z surowca i miodu [390]. Obserwowany efekt potwierdzono badaniami histopatologicznymi [539]. Zastosowanie kleików i wyciągów z nasion kozieradki znacząco przyspieszało proces zamykania ran oraz powodowało wzrost wytrzymałości na rozciąganie i rozrywanie [530, 540]. Autorzy wskazują, że mechanizm ww. aktywności związany jest m.in. z nasileniem wydzielania hormonu wzrostu oraz wzrostem poziomu kwasu foliowego w surowicy [540]. Interesującym jest fakt uzyskania podobnych efektów po podaniu doustnym kleiku z *Foenugraeci Semen* [530].

3.6. Aktywność przeciwbólowa

Szerokie spektrum aktywności biologicznej nasion kozieradki pospolitej obejmuje również działanie przeciwbólowe [71, 349, 385].

Bhalke i wsp. [71] w badaniach na zwierzętach wykazali znaczącą aktywność przeciwbólową podawanych dootrzewnowo różnych wyciągów organicznych z *Foenugraeci Semen*. Ponadto bogata w alkaloidy frakcja chloroformowa wyciągu metanolowego w modelu *in vivo* wykazywała zależny od dawki efekt analgetyczny, w stężeniu 100 mg/kg m.c. porównywalny z morfiną (5 mg/z kg) [349]. Autorzy [453] wskazują, że mechanizm przeciwbólowego działania surowca związany jest z wpływem na receptory opioidowe i/lub glutaminianowe. Efekt analgetyczny wyciągu

wodnego z *Foenugraeci Semen* w pierwszej i drugiej fazie bólu indukowanego formaliną, jest znoszony przez nalokson oraz memantynę [453]

Surowiec okazał się skuteczny w łagodzeniu dolegliwości bólowych w przebiegu neuropatii cukrzycowej [396]. Dla wyciągu wodno-etanolowego wykazano zdolność ograniczania bólu poprzez podnoszenie progu wrażliwości bólowej badanych zwierząt [74].

Działanie analgetyczne potwierdzono również dla wyciągów z liści *T. foenum-graecum* [71, 238, 425].

3.7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Wyciągi z *T. foenum-graecum* posiadają działanie antybiotyczne, potwierdzone wynikami badań mikrobiologicznych [40, 410, 487, 569]. Na podstawie oceny wielkości strefy zahamowania wzrostu (mm) patogenów z grupy bakterii Gramm(+) oraz Gramm(-) na płytkach agarowych, wykazano działanie bakteriostatycznie wobec: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* i *Salmonella typhimurium*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus amyloliquifaciens*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Shigella dysentery*, *Enterobacter aerogenes*, jak również wobec pierwotniaków: *Trichomonas vaginalis* oraz *Plasmodium falciparum* [10, 279, 410, 473, 487, 506, 544]. Ujawniono, że wyciągi wodne (silniej niż metanolowe) hamują wzrost antybiotykoopornego szczepu *Xantomonas campestris* – patogenu roślinnego, atakującego liczne odmiany zbóż i warzyw [114]

Odmienne wyniki otrzymali Nimri i wsp. [402], badający wpływ wyciągu etanolowego z surowca na 14 szczepów bakteryjnych (w tym 4 szczepy *E. coli*), spośród których aż 13 wykazało oporność na wyciąg (jedynie *P. aeruginosa* był wrażliwy). Alzoreky i wsp. [33] nie potwierdzili aktywności przeciwbakteryjnej wobec następujących szczepów: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* B-1030, *Salmonella infantis* L-164, *Listeria monocytogenes* Tottori, *Staphylococcus aureus* KR-103 oraz *Bacillus cereus* 5020024. W eksperymentach wykorzystano ekstrakty uzyskane z użyciem acetonu oraz buforowanego metanolu (80%MeOH + 20%PBS) [33]. Wyciągi heksanowe oraz etanolowe z nasion kozieradki w stężeniach 5, 50 i 100 mg/ml hamowały wzrost *E. coli* ATCC 25922 i *P. aeruginosa* ATCC 27853, nie wpływając jednocześnie na wzrost *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus*

aureus ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 oraz *Salmonella cholerae-suis* ATCC 13312 [473].

Obok aktywności przeciwbakteryjnej, metabolity wtórne obecne w etanolowych ekstraktach z *Foenugraeci Semen* wykazują działanie przeciwgrzybicze wobec *Aspergillus niger*, *Alternaria syphillus*, *Rhizopus syphillus*, *Fusarium solani* oraz *Aspergillus flavus* [279]. Znaczącą aktywność przeciwgrzybiczą wobec chorobotwórczych patogenów potwierdzono dla wodnych ekstraktów z korzeni, nasion i pędów kozieradki [196] oraz wyciągów alkoholowych z liści [58, 436, 504] i nalewek z ziela [583]. Zdolność hamowania wzrostu grzybów z gatunku *Fusarium oxysporum f. sp. radialis-lycopersici* (FORL) and *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL) wykazują wyciągi z ziela kozieradki, zebranego w różnych okresach rozwoju rośliny [409].

Olej z nasion kozieradki hamuje rozwój *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Apergillus niger* i *A. fumigatus* [569].

Natomiast wyciągi z liści *T. foenum-graecum* wykazują aktywność przeciwbakteryjną wobec *Serratia marcescens* i *Bacillus cereus* oraz przeciwgrzybiczą wobec *Trichoderma viridae* [125].

W badaniach nad aktywnością przeciwwirusową ujawniły, że diosgenina całkowicie hamowała replikację wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w stężeniu 20 μM (EC_{50} = 3,8 μM) [580]. Ponadto związek znacząco obniżał stężenie wirusowego RNA oraz białek wirusa [580].

3.8. Aktywność hormonalna

Ayurveda, zalicza nasiona kozieradki do środków poronnych [138, 373]. Według niektórych autorów *T. foenum-graecum* wykazuje aktywność estrogenową, ponieważ ujawnia działanie mlekoopędne [138].

Badania nad oddziaływaniem wyciągów z *Foenugraeci Semen* z receptorem estrogenowym (ER) prowadzono na linii komórek nowotworu piersi MCF-7, charakteryzującej się ekspresją receptorów ER (ER+). Wykazano, że obecne w wyciągach związki czynne, wiążą się z receptorem oraz stymulują wzrost komórek nowotworowych [512]. Odnotowano wzrost ekspresji estrogeno-zależnego białka pS2 [512]. W kolejnych badaniach wyciągów etanolowych na linii komórkowej nowotworu piersi MCF-7 (ER+) potwierdzono wiązanie z receptorami estrogenowymi [486] i

obserwowano hamowanie wzrostu linii komórkowej poprzez indukcję apoptozy i hamowanie cyklu życiowego na poziomie fazy G2/M [486]. W przeciwieństwie do ekstraktu z nasion *T. foenum-graecum*, wyciąg z *Sojae Semen* stymulował proliferację komórek nowotworowych [486].

Przedstawione w literaturze odmienne efekty i wpływ wyciągów z nasion kozieradki na rozwój komórek nowotworowych mogą być wynikiem różnic w ich składzie chemicznym. Z dotychczasowych badań wynika, że jest on zmienny i zależy od pochodzenia surowca [54, 387, 430, 435, 605, 606]. W ostatnich latach potwierdzono obecność w surowcu izoflawonów – metabolitów wtórnych o charakterze fitoestrogenów, m.in. daidzeiny, formononetyny i biochaniny A [574], jakkolwiek ich zawartość nie jest znana. Hakimi i wspł. [190] zaliczyli nasiona kozieradki pospolitej do surowców roślinnych o aktywności fitoestrogenowej, oceniając wpływ suplementacji diety surowcem na występujące w okresie klimakterium „uderzenia gorąca”. Wykazali, że spożywanie sproszkowanych nasion przez okres 4-8 tygodni (6g surowca dziennie) ogranicza częstotliwość „uderzeń gorąca” oraz objawów wazomotorycznych, jednak obserwowany efekt był słabszy w porównaniu do hormonalnej terapii zastępczej (w badaniu zastosowano HTZ: 0,625 mg estrogeny z połączeniu z 10 mg octanu medroksyprogesteronu) [190].

W dyskusji o potencjalnej aktywności hormonalnej wyciągów z nasion kozieradki pospolitej należy zwrócić uwagę na obecność w surowcu saponin steroidowych. Niektórzy autorzy [132, 324] zaliczają saponiny steroidowe do związków o aktywności estrogenowej, jednak w większości prac przeglądowych, poświęconych fitoestrogenom, związki te nie są wymieniane [129, 389]. Jednocześnie w niektórych roślinnych preparatach leczniczych, stosowanych w łagodzeniu skutków menopauzy, obok fitoestrogenów z nasion soi, kłącza pluskwicy lub kwiatu czerwonej koniczyny obecne jest kłącze pochryznu (*Dioscorea*) [549]. Produkty te standaryzowane są na zawartość diosgeniny lub saponin steroidowych [549], co sugeruje znaczenie tej grupy związków w terapii menopauzy.

Jedynie nieliczne prace koncentrują się na ocenie aktywności hormonalnej izolowanych saponin, w tym diosgeniny. W badaniach prowadzonych na gryzoniach obserwowano efekty fizjologiczne, identyczne do wywoływanych przez naturalne estrogeny [41, 206]. Wykazano, że diosgenina posiada zdolność odwracania osteoporozy wywołanej brakiem endogennych estrogenów – badanym zwierzętom usunięto jajniki i obserwowano indukcję procesów osteoporozy po 14 dniach od zabiegu [206]. Ponadto diosgenina odwracała atrofię tkanek reprodukcyjnych, rozwijającą się wskutek usunięcia źródła endogennych estrogenów [206]. W eksperymencie prowadzonym na myszach po owariektomii, ujawniono, że diosgenina

w dawce 20 i 40 mg/kg m.c. (podanie *subcutanea*) stymulowała rozrost nabłonka sutka, a jednoczesne podawanie estrogenu i diosgeniny, szczególnie w dawce 40 mg/kg m.c. potęgowało działanie saponiny [41]. Z drugiej strony, w trakcie eksperymentu oceniającego wpływ diosgeniny jako substancji przeciwdziałającej procesowi starzenia skóry w okresie klimakterium, stwierdzono, że w obserwowane efekty, m.in. nasilenie syntezy DNA oraz wzrost stężenia cAMP wewnątrz keratynocytów, nie są zaangażowane receptory estrogenowe ER α ani ER β , ponieważ wymienione procesy nie były znoszone w obecności inhibitora ER (ICI) [536].

Wpływ frakcji steroidowej z nasion kozieradki na płodność oceniano na samcach szczurów [248]. Wykazano spadek liczby plemników oraz ich ruchliwości. Również waga tkanek reprodukcyjnych i poziom parametrów androgenozależnych, w tym kwasu salicylowego oraz fruktozy znacznie się obniżały, co świadczy o spadku poziomu androgenów [248]. Jednocześnie odnotowano wzrost poziomu cholesterolu w jądrach i surowicy, co wskazuje na blokadę przemian cholesterolu (będącego substratem do syntezy androgenów) i jest bezpośrednio związane ze spadkiem stężeń hormonów płciowych [248]. Skutkiem obserwowanych procesów była utrata płodności badanych samców. Uznano, że frakcja steroidowa posiada właściwości zarówno przeciwandrogenowe, jak i obniżające płodność u samców [248]. Aktywność antyandrogenową potwierdzono dla wyciągu z nasion kozieradki, bogatego w saponiny, m.in. diosgeninę [380]. U badanych zwierząt odnotowano obniżenie stężenia testosteronu oraz hormonu luteinizującego (LH) we krwi [380]. Z kolei brak działania androgenowego glikozydów furostanowych z nasion kozieradki wykazano w badaniach na szczurach po kastracji (normalna waga i budowa jąder oraz niepodwyższony poziom testosteronu we krwi) [46]. Obniżającą płodność aktywność surowca potwierdzono również w eksperymentach na królikach [259]. Dokarmianie zwierząt paszą, zawierającą 30% nasion kozieradki przez okres 3 miesięcy powodowało znaczący spadek poziomu androgenów (testosteron), wagi jąder i produkcji spermy u samców [259]. Toksyczne działanie składników paszy na kanaliki plemnikotwórcze potwierdzono badaniami histopatologicznymi [259]. Jednocześnie obserwowano, że dodatek do paszy 30% nasion kozieradki skutkuje nasileniem owulacji i zwiększeniem stężenia progesteronu we krwi u samic, a w okresie ciąży – anormalnym rozwojem płodów, przebiegającym z ich zwiększoną resorpcją [259]. Autorzy konkludują, że obserwowane efekty mogą wynikać z obecności w nasionach związków o aktywności estrogenowej, ingerujących w proces powstawania i rozwoju nabłonka macicy oraz w rozwój płodu [259]. W badaniach na myszach udowodniono również, że liofilizowany wyciąg wodny z surowca (1g/kg/dzień) upośledza rozwój i funkcjonowanie rdzenia kręgowego, zarówno u płodów, jak i ciężarnych samic [271].

W przyrodzie głównym źródłem diosgeniny są bulwiaste kłącza przedstawicieli rodzaju pochryzn (*Dioscorea sp.*), tradycyjnie stosowanego w łagodzeniu objawów menopauzy [292]. W wielu badaniach oceniano wyciągi z kłączy *Dioscorea* w zakresie aktywności hormonalnej, jednak uzyskane wyniki są niejednoznaczne. W badaniach wiązania z receptorem estrogenowym (ER) oraz indukowania trans aktywacji genu reporterowego dla ER ujawniono słabe działanie estrogenowe surowego ekstraktu z kłączy pochryznu [139]. Natomiast surowy ekstrakt z *Dioscorea villosa* (pochryzn włochaty), zawierający 0,4% saponin sterydowych nie wykazywał aktywności estrogenowej [209]. W badaniu na linii komórkowej nowotworu piersi MCF-7 (ER+) obserwowano, że wyciąg z kłączy *Dioscorea*, podobnie jak 17 β -estradiol, nasilał ekspresję genu pS2 oraz powodował obniżenie liczby receptorów ER α oraz ilość mRNA ER α , a efekty te były znoszone przez inhibitor receptorów estrogenowych (ICI). Sugeruje to zaangażowanie w mechanizm działania składników aktywnych wyciągu receptorów ER [423]. Tada i wsp. [536] oceniali wpływ diosgeniny jako składnika wyciągu z *D. villosa* (zawartość diosgeniny 0,09%) na nowotwór piersi u myszy. Stwierdzili, że badany wyciąg, w przeciwieństwie do wyciągu z nasion soi, nie stymulował rozrostu tkanek rakowych. Z kolei w badaniach na linii komórkowej BT-474, charakteryzującej się ekspresją receptorów estrogenowych (ER), androgenowych (AR) oraz progesteronowych (PR), wykazano, że wyciąg z kłączy *Dioscorea*, o nieznannej zawartości diosgeniny, posiada słabą aktywność antagonistyczną wobec receptorów estrogenowych [464].

Uwzględniając fakt, że diosgenina przekształcana jest chemicznie do progesteronu, uznano że związek jako składnik bulw *Dioscorea* i surowiec w formie wyciągów posiadają aktywność progesteronową. Dlatego wyciągi z *Dioscorea* nazywano naturalnym progesteronem (*Natural Progesteron* – NP) [423]. Zava i wsp. [612], badając poziom progesteronu (PG) i białek wiążących progesteron w ślinie 11 kobiet stosujących wyciąg z kłączy *D. villosa* zawierający diosgeninę, wykazali, że poziom PG u wszystkich badanych był bardzo niski, jakkolwiek u niektórych wzrósł poziom komponentów wiążących PG. W badaniach prowadzonych na grupie 24 zdrowych kobiet w okresie postmenopauzalnym, stosujących dietę suplementowaną bulwami pochryznu o zawartości diosgeniny 360 μ g/100 g [589] stwierdzono, że diosgenina nie jest wykorzystywana jako prekursor czy aktywator syntezy hormonów płciowych w organizmie ludzkim. Na brak dowodów o konwersji diosgeniny w progesteron wskazano w eksperymencie oceniającym niwelowanie przez diosgeninę skutków niedoboru endogennych estrogenów [206].

3.9. Aktywność przeciwnowotworowa i cytotoksyczna

Wyciągi z nasion *T. foenum-graecum* posiadają aktywność cytotoksyczną, potwierdzoną w badaniach *in vitro* [270, 276, 486, 491] i *in vivo* [34, 42, 532].

Shabbeer i wsp. [491] badali aktywność cytotoksyczną wyciągu etanolowego z nasion kozieradki oraz diosgeniny wobec linii komórkowych: nowotworu prostaty (DU-145; LNCaP, PC-3), nowotworu piersi (MDA-MB-231; MCF-7; T47D i SKBR3) oraz raka trzustki (MiaPaCa, HS766T, Panc1, L3.6.PL oraz BXPC3). W eksperymentach wykorzystano również linię prawidłowych komórek epitelialnych gruczołu krokowego. Wykazano, że po 72 godzinach inkubacji badany ekstrakt w stężeniu 15 µg/ml znacząco hamował proliferację użytych linii komórkowych. Ponadto wykazywał zależny od dawki efekt cytotoksyczny wobec komórek raka trzustki MiaPaCa, HS766T, Panc1, raka prostaty DU-145 i LNCaP oraz nowotworu piersi MDA-MB-231, powodując całkowitą eliminację komórek nowotworowych w stężeniu 10 µg/ml. W hodowli linii komórek nowotworu gruczołu krokowego PC-3 efekt cytotoksyczny wyciągu odnotowano w stężeniu 5 µg/ml, natomiast całkowite zahamowanie wzrostu komórek nowotworu piersi MCF-7, T47D i SKBR3 obserwowano w obecności badanego ekstraktu w stężeniu 1 µg/ml. Jednocześnie nie stwierdzono toksycznego wpływu wyciągu na prawidłowe komórki stercza. Rezultaty badań przeprowadzonych przez innych autorów [20, 31] wskazują na właściwości antyproliferacyjne wyciągów z surowca wobec komórek nowotworowych, bez wpływu na komórki zdrowe. Odmienne wyniki otrzymano dla diosgeniny, która pomimo że wykazywała zależny od dawki efekt cytotoksyczny wobec komórek nowotworowych, była również cytotoksyczna wobec komórek zdrowych [491].

Badania na linii komórkowej estrogeno-zależnego nowotworu piersi MCF-7 potwierdziły wiązanie związków czynnych wyciągów z nasion *T. foenum-graeum* z receptorem ER [486, 512]. Obserwowano odmienny wpływ na wzrost nowotworu: stymulację proliferacji wskutek zwiększenia ekspresji receptorów ER [512] lub zahamowanie proliferacji, indukcję zmian apoptotycznych i inhibicję cyklu życiowego komórek na poziomie fazy G2/M [486]. Hamowanie wzrostu komórek MCF-7 przez wyciągi z nasion kozieradki potwierdzono również w innych badaniach [31, 32, 276].

Inkubacja komórek białaczki T limfoblastycznej Jurkat z 50% etanolowym ekstraktem z kozieradki (30-1500 µg/ml) skutkowała śmiercią komórek nowotworowych na drodze autofagii, a obserwowany efekt był zależny od dawki i czasu eksperymentu [21]. Efekt cytotoksyczny wyciągów z nasion *T. foenum-graecum* ujawniono w badaniach na liniach pierwotnego raka wątroby HepG2 [270], ludzkiego

raka szyjki macicy HeLa oraz raka prostaty szczurów Mat-LyLu [20], chłoniaka T-komórkowego [31], chłoniaka B-komórkowego [31], raka brodawkowego tarczycy (FRO) [31], ludzkiego raka jelita grubego HT-29 [445]. Dodatkowo wykazano aktywność cytotoksyczną ekstraktu eterowego z nasion kozieradki wobec linii komórkowych Hep-2 i MCF-7 [25]. Z drugiej strony badany wyciąg ujawnił działanie toksyczne również wobec kontrolnych linii komórek nabłonkowych z nerki koczodana zielonego (linia Vero) [25].

W badaniach *in vivo* ekstrakt wodny z nasion kozieradki (200 mg/kg m.c.) hamował hiperplazję gruczołu sutkowego i zmniejszał częstość występowania nowotworu piersi indukowanego DMBA (7,12-dimetylobenzenoantracen) u szczurów, wykazując tym samym efekt chemoprewencyjny [34]. W badaniach na myszach aplikacja ekstraktu etanolowego hamowała wzrost komórek nowotworu jamy brzusznej (*Ehrlich Ascites Carcinoma*) wraz z utratą ich złośliwości i zdolności do proliferacji [42, 532]. Jednocześnie obserwowano liczne zmiany ultrastrukturalne wewnątrz komórek nowotworowych (m.in. zagęszczenie chromatyny jądrowej, poszerzenie otoczki jądrowej, przerost jąderka, obrzmienie lizosomów, poszerzenie kanałów siateczki śródplazmatycznej i oddzielanie rybosomów) [42].

W mechanizm indukcji apoptozy powodowany przez wyciągi z nasion kozieradki zaangażowane są kaspazy 3 i 8, białko p53, Fas, FADD, PCNA, Bax i Bak [21, 32, 270]. Jednocześnie wykazano, że związki czynne wyciągu wodnego z nasion kozieradki pozostają bez wpływu na komórki NK (*Natural Killer*) [492]. Natomiast związki czynne wyciągu chloroformowego z całej rośliny *T. foenum-graecum* aktywują dodatkowo kaspazę-9 [276]

Właściwości przeciwnowotworowe surowca mogą być związane z obecnością saponin steroidowych [205, 433, 552, 571, 578]. W ostatnich latach w toku wielokierunkowych prac ujawniono aktywność cytotoksyczną dioscyny wobec linii komórkowych glejaka wielopostaciowego [336] nowotworów piersi MCF-7 i MDA-MB-231 [49], MDA-MB-453 i T47D [283], raka prostaty LNCaP [99], raka trzustki Mia-Pa-Ca-2 [620], raka wątrobowokomórkowego Huh7 [214], nowotworu żołądka SGC-7901 [216] i raka jelita grubego HT-29 [610]. W mechanizmie działania dioscyny wymieniane są: aktywacja mitochondrialnego szlaku apoptozy [336, 502], zatrzymanie cyklu komórkowego, aktywacja kaspaz 3 i 8 oraz modyfikacja ekspresji białek w tym Bcl-2 i Bcl-xl [99, 214, 216, 283, 336, 610]. Aktywność cytotoksyczną wykazano dla protodioscyny [205] i metyloprotodioscyny [55, 325, 573]. Liczne prace poświęcono aktywności cytotoksycznej i proapoptotycznej aglikonu steroidowego - diosgeniny [107, 311, 314, 318, 321, 324, 369, 377, 445-447, 489]. Związek aktywuje kaspazę 3, nasila ekspresję białka p21, obniża ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2 i pobudza

rozpad polimerazy poli(ADP-rybozy) (*Poly(ADP-Ribose) Polymerase* – PARP), modyfikuje cykl komórkowy w fazach sub/G1, G1 i G2/M, aktywuje czynnik NF- κ B i receptor śmierci DR5 oraz mitochondrialny szlak apoptozy [107, 311, 324, 377, 445-447]. Aktywność cytotoksyczną i proapoptotyczną diosgeniny oceniano zarówno w licznych badaniach *in vitro* na liniach komórkowych [107, 314, 369, 377, 446, 447], jak i *in vivo* na zwierzętach [228, 447, 515]. Spośród aglikonów steroidowych, właściwości antyproliferacyjne wobec linii komórek kostniakomięsa 1547 wykazuje również tigogenina [106].

Dotychczasowe badania ujawniły aktywność przeciwnowotworową witeksyny wobec linii komórkowych ludzkiego raka jamy ustnej OC2 [601], ludzkiej białaczki U937 [307] oraz raka przełyku EC109 [625]. Właściwości przeciwnowotworowe posiadają również mono-C-glikozydy luteoliny: orientyna (wobec linii komórkowych : EC109 [37] i HeLa [173]) oraz izorientyna (wobec linii komórkowych HepG2 [608, 609]. Natomiast vicenina-2 podawana pojedynczo i w kombinacji z docetakselem znacząco hamuje wzrost komórek raka prostaty (PC-3, DU-145 and LNCaP), wykazując efekt proapoptotyczny [392].

3.10. Schorzenia przewodu pokarmowego

Przetwory z *Foenugraeci semen* tradycyjnie wykorzystywane są w leczeniu schorzeń przewodu pokarmowego. Ekstrakty wodne i maceraty wykazują działanie ochronne na błonę śluzową, zmienioną zapalnie w przebiegu choroby wrzodowej [22, 51, 274, 528]. Pozytywne wyniki terapii choroby wrzodowej otrzymano stosując wyciągi wodne w połączeniu z miodem [340] lub wyciągami z jęczmienia [22]. Efekt gastroprotekcyny wykazano również dla olejku eterycznego z nasion kozieradki w [251].

Aktywność przeciwwrzodowa obecnej w surowcu frakcji polisacharydowej wynika z tworzenia warstwy ochronnej, pokrywającej błonę śluzową żołądka [528]. Warstwa chroni śluzówkę przed czynnikami egzogennymi (np. etanol) oraz endogennymi (np. kwas solny, pepsyna) [528]. Obserwowany efekt protekcyjny, przebiegający ze zmniejszeniem obrzęku i przekrwienia błony śluzowej, związany jest również z obniżaniem wydzielania pepsyny i soku żołądkowego (w stopniu porównywalnym z omeprazolem) oraz działaniem przeciwutleniającym [528]. Polifenole obecne w wyciągach z nasion kozieradki ograniczają uwalnianie reaktywnych form tlenu (ROS)

oraz zmiatają wolne rodniki nadtlenkowe z objętej stanem zapalnym śluzówki jelit, co udowodniono w badaniach *in vitro* [305].

Jedną z głównych przyczyn wrzodów żołądka jest zakażenie *Helicobacter pylori* [169]. Badania wskazują, że patogen stanowi czynnik etiologiczny nowotworu żołądka [70, 169, 211]. W dotychczasowych eksperymentach, mających na celu ocenę wpływu wyciągów wodnych [317, 405] i alkoholowych [317, 611] z *Foenugraeci Semen* na wzrost oraz adhezję bakterii wykorzystano różne szczepy *H. pylori* [317, 405, 611]. Niektóre badania dowiodły, że wyciągi z nasion kozieradki hamują wzrost patogenu [317, 611], inne wykazały, że surowiec nie posiada aktywności bakteriobójczej oraz antyadhezyjnej wobec *H. pylori* [405]. Randhir i wsp. [450] oceniali wpływ wyciągów wodnych z kielków kozieradki na wzrost bakterii. Kielki hodowane były na pożywce z dodatkiem grzyba *Rhizopus oligosporus*, zwiększającego pulę związków fenolowych w materiale roślinnym [450]. Autorzy wykazali, że badany ekstrakt hamował wzrost *H. pylori*, a wielkość strefy zahamowania wzrostu była bezpośrednio zależna od stężenia wyciągu [450]. Wykazano, że efekt przeciwdrobnoustrojowy może być wynikiem wzrostu kwasowości środowiska stymulowanym związkami fenolowymi, co jest niekorzystne dla *H. pylori* i prowadzi do uszkodzenia błony komórkowej patogenu [450]. Zawarte we wzbogaconym w fenole ekstrakcie z kozieradki związki zaburzają także aktywność ureazy, zapewniającej idealne, alkaliczne środowisko dla komórek bakteryjnych [450]. Dodatkowo dalsze badania prowadzone przez ten sam zespół wykazały, że obserwowana aktywność ulega nasileniu po termicznej obróbce wyciągów wodnych (poprzez autoklawowanie), skutkującej wzrostem stężenia polifenoli [451]. Jednocześnie udowodniono, że wyciągi z siewek *T. foenum-graecum*, skielkowane w ciemności, bez elicytacji, charakteryzują się również silnym działaniem przeciwko *H. pylori* [449]. Natomiast wyciąg z surowca, otrzymany z użyciem 80% metanolu posiada zdolność inhibicji ureazy (IC_{50} 523,74 μ g/ml) [73]. Warto podkreślić, że zdolność inhibicji ureazy przez witeksynę i jej 2"-O-ramnozyd oraz orientynę, izolowane wraz z innymi C-glikozyloflawonami z *Celtis africana* została potwierdzona w badaniach *in vitro* [429]

Nasienie kozieradki wykazuje działanie hepatoprotekcyjne porównywalne z sylimaryną [263, 265, 437], prowadząc do ograniczenia peroksydacji lipidów i aktywacji enzymów przeciwutleniających w komórkach wątroby [265, 457]. Jest to prawdopodobnie spowodowane obecnością związków polifenolowych [265, 437]. Obniżeniu ulega poziom grup karbonylowych oksydacyjnie zmienionych białek, stanowiących jeden z markerów stresu oksydacyjnego [265]. Podawanie frakcji polifenolowej z nasion kozieradki lub sproszkowanego surowca normalizuje podwyższone poziomy markerów wątrobowych, m.in. aminotransferazy alaninowej

(ALAT), aminotransferazy asparaginianowej (ASPAT), dehydrogenazy mleczanowej (LDH), fosfatazy alkalicznej (ALP), bilirubiny i γ -glutamylotransferazy (GGT) [263, 457] oraz zwiększa się poziom zredukowanego glutationu [262, 265]. W innych badaniach stwierdzono, że wyciąg wodny z nasion kozieradki nie posiada aktywności hepatoprotekcyjnej i sprzyja powstawaniu aberracji chromosomalnych, co wskazuje na jego potencjał mutagenny [269].

Korzystny wpływ wyciągów z surowca na przewód pokarmowy obejmuje ochronę przed rakiem jelita grubego [445]. Obecna w nasionach diosgenina hamuje wzrost i stymuluje apoptozę komórek ludzkiego nowotworu jelita grubego HT-29 [445]. Zwiększa wrażliwość linii komórek nowotworowych wątroby (HCC - hepatocellular carcinoma) na działanie paklitakselu i doksorubicyny oraz hamuje aktywność czynnika transkrypcyjnego STAT3, powiązanego z powstawaniem guza i konstytutywnie aktywowanego w wielu komórkach rakowych, w tym również w komórkach HCC [314]. Inhibicja STAT3 blokuje wzrost komórek nowotworowych i stymuluje ich apoptozę [314].

Diosgenina wykazuje właściwości prebiotyczne, potwierdzone w eksperymentach *in vitro* i *in vivo* [217]. Badania wpływu diosgeniny na gęstość jelitowych bakterii kwasu mlekowego (LAB) w mysim modelu alergii pokarmowej ujawniły, że w wyniku doustnej aplikacji sapogeniny przywracane jest prawidłowe zagęszczenie bakterii kwasu mlekowego (LAB), ograniczone wskutek reakcji alergicznych [217]. Diosgenina i sarsasapogenina znacząco nasilają wzrost *Lactobacillus murinus* i *Lactobacillus reuteri*, izolowanych z przewodu pokarmowego badanych zwierząt, w przeciwieństwie do enterokoków [217]. Autorzy sugerują, że sapogeniny steroidowe mogą stanowić nową klasę prebiotyków [217]. Jednak ich działanie uzależnione jest od obecności wiązania nienasyconego pomiędzy atomami węgla C-5 i C-6 oraz zachowanej struktury pierścieni E i F [217].

Udowodniono, że nasiona kozieradki w wyniku aktywności przeciwzapalnej oraz przeciwutleniającej, mogą stanowić cenny surowiec, wspomagający leczenie nieswoistych stanów zapalnych jelit (IBD – *inflammatory bowel disease*) [305]. Diosgenina natomiast znacząco łagodzi wywołane indometacyną zaburzenia w wydzielaniu żółci oraz podostre stany zapalne jelit [594].

4. Dwuwymiarowa wysokosprawna chromatografia cieczowa w analizie związków flawonoidowych

Wielowymiarową chromatografię cieczową (MD-LC), po raz pierwszy zaprezentowano w 1978 roku [142] jako skuteczne narzędzie w analizie złożonych, wieloskładnikowych próbek. Wyciągi roślinne, zawierające metabolity wtórne o zróżnicowanej budowie, należące do różnych grup chemicznych, są jednymi z najbardziej złożonych matryc analitycznych [142, 219, 501]. Nierzadko stanowią bardzo duże wyzwanie dla osiągnięcia efektywnej separacji składników próbki oraz ich identyfikacji [142, 219]. W procesie optymalizacji warunków analiz HPLC często obserwuje się koelucję metabolitów wtórnych, uniemożliwiającą ich rozpoznanie wobec wzorców (porównanie wartości t_R) [613]. Niejednokrotnie dotyczy to izomerów o tej samej masie cząsteczkowej, co wyklucza ich rozpoznanie w oparciu o wartości m/z jonów molekularnych (związki izobaryczne) w sprzężeniu HPLC-MS [122, 613]. Chromatografia wielowymiarowa umożliwia rozwiązanie wymienionych problemów analitycznych, zapewniając wysoką zdolność rozdzielczą oraz wysoką pojemność względem pików (P - *peak capacity*), zazwyczaj niemożliwych do osiągnięcia w systemach jednowymiarowych [142, 219, 234, 499, 501]. Wykazano, że zastosowanie 2D HPLC ogranicza tzw. efekt matrycy [135, 621].

W dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (2D HPLC) wyróżniane są dwie podstawowe techniki: *heart-cutting* (LC-LC) oraz *comprehensive* (LCxLC). W technice *heart-cutting* (niekiedy *heart-cut*) jedynie część nierozdzielonych składników analizowanej mieszaniny, w formie poszczególnych frakcji z rozdzielania w pierwszym wymiarze (1D), jest przenoszona na kolumnę drugiego wymiaru (2D). Stwarza to możliwość optymalizacji warunków separacji składników każdej frakcji z zastosowaniem różnych eluentów, profili elucji gradientowej/izokratycznej oraz różnych faz stacjonarnych. Ponadto wykorzystanie techniki LC-LC zwłaszcza w trybie *off-line*, nie wymaga użycia skomplikowanej aparatury, najczęściej wymaganej w pełni zautomatyzowanym procesie w trybie *on-line*. W praktyce po zebraniu wszystkich frakcji z 1D , ich analizę w 2D można prowadzić z wykorzystaniem tego samego systemu chromatograficznego LC [123]. Dodatkowo *heart-cutting* umożliwia wykrycie składników, występujących w badanej próbce w niskim stężeniu, ponieważ przed separacją na kolumnie 2D , analizowana frakcja jest zagęszczana [123, 135, 204, 235, 621]. Natomiast technika *comprehensive* obejmuje analizę wszystkich składników badanej próbki w dwóch wymiarach [123, 135, 204, 224, 231, 232, 234, 235, 290]. Analizy z wykorzystaniem technik *heart-cutting* oraz *comprehensive*, mogą być

prorowadzone w trybach: *off-line* lub *on-line*. W trybie *off-line*, wybrane/kolejne frakcje z kolumny 1D przenoszone są na kolumnę 2D ręcznie [204]. Jednak w przypadku analiz związków wrażliwych na działanie czynników środowiskowych, stwarza to ryzyko utraty analitu lub jego degradacji, bądź formowania artefaktów pod wpływem światła lub powietrza [135, 204]. Jednocześnie manualne przenoszenie frakcji zazwyczaj skutkuje niską powtarzalnością analiz [135, 204]. Natomiast tryb *on-line* charakteryzuje pełna automatyzacja procesu. Transfer kolejnych frakcji z 1D na 2D odbywa się zazwyczaj za pomocą zaworu zaopatrzonego w pętle magazynujące/dozujące o różnej pojemności, dostosowanej do warunków analizy [123, 135, 204, 224, 231, 232, 234, 235, 290]. Jak wspomniano powyżej, w technice *heart-cutting on-line* automatycznie są przenoszone wyselekcjonowane frakcje, zawierające nierozdzielone związki w 1D . Natomiast w technice *comprehensive* cały eluat z kolumny 1D zbierany jest w pętlach magazynujących w formie frakcji o bardzo małej objętości, i następnie kolejno przenoszonych na kolumnę 2D w wielokrotnych naprzemiennych cyklach, kontrolowanych częstotliwością przełączania zaworu, stanowiącego łącznik między wymiarami 1D i 2D . Są to najczęściej dwudrożne zawory 6-, 8- [441], 10- [86], 12-portowe [2] zaopatrzone w dwie pętle magazynujące/dozujące [204, 235]. Tryb *on-line* wymaga zastosowania specjalistycznego sprzętu, obejmującego obok bardziej złożonych systemów HPLC, użycie łącznika (*interfejs*) i odpowiedniego oprogramowania komputerowego umożliwiającego zarządzanie systemem, obróbkę danych chromatograficznych i generowanie dwuwymiarowych chromatogramów [204, 235]. Automatyzacja procesu zapewnia minimalizację problemów związanych z niestabilnością analitów oraz powtarzalnością separacji [135, 204]. Rozdzielenia w trybie *on-line*, szczególnie w systemie *comprehensive*, stanowią doskonałe rozwiązanie w seryjnych analizach dużej liczby próbek [135, 204, 235]. Z drugiej strony optymalizacja separacji w warunkach całkowitej automatyzacji procesu jest trudniejsza i nierzadko związana z problemami niewystępującymi w trybie *off-line* 2D LC, takimi jak np. niewystarczająca mieszalność rozpuszczalników stosowanych w 1D i 2D [135, 204]. Niekiedy pętle dozujące zastępowane są przez tzw. kolumny wychwytyjące (*trapping columns*) [86]. Wykorzystanie kolumn wychwytyjących pomiędzy 1D a 2D umożliwia usunięcie eluentu stosowanego w 1D , eliminując problem niekompatybilności faz ruchomych 1D i 2D oraz obecności niepożądanych związków (np. soli) [123]. Opracowanie warunków analiz w obu omawianych trybach jest procesem czasochłonnym. Tryb *off-line* wymaga bowiem ręcznego, często wielokrotnego zbierania poszczególnych frakcji z 1D (niekiedy także ich zagęszczania lub odparowywania do sucha), natomiast optymalizacja pracy systemu w trybie *on-line*

wymaga rozwiązania większej liczby problemów analitycznych niż w trybie *off-line* [135, 204, 235].

Niektórzy autorzy [123, 236, 247, 312] wykorzystują również tzw. tryb *stop-flow* (niekiedy określany jako *stop-and-go* [236]) - tryb pracy w systemie dwuwymiarowym, polegający na przenoszeniu wybranych/wszystkich frakcji ¹D na kolumnę ²D w czasie rzeczywistym (bez etapu magazynowania) z jednoczesnym zatrzymaniem przepływu fazy ruchomej w kolumnie ¹D do czasu zakończenia separacji w drugim wymiarze. Zazwyczaj jest on stosowany w analizach LCxLC [236, 246, 247, 312], rzadziej – w LC-LC [87, 459].

Podstawową właściwością uwzględnianą w procesie konfiguracji systemu dwuwymiarowego jest ortogonalność [123, 142, 219, 234, 499, 501], odnosząca się do odmiennych mechanizmów separacji, charakteryzujących pierwszy i drugi wymiar, umożliwiających zwiększenie zdolności rozdzielczych [123, 142, 219, 234, 499, 501]. Jednak w praktyce systemy w pełni ortogonalne, o całkowicie nieskorelowanej selektywności w ¹D i ²D, są rzadko spotykane [86]. Wykazano, że nawet systemy 2D HPLC o ograniczonej ortogonalności umożliwiają uzyskanie wysokiej zdolności rozdzielczej [310, 313, 441, 621, 624]. Ponadto stwierdzono, że użycie w trybie *on-line* systemu RPLC x RPLC, opartego na dwóch różnych fazach stacjonarnych, jest mniej skomplikowane niż systemów RPLC x NPLC lub RPLC x HILIC [234].

Podstawowym elementem w konfigurowaniu systemu LCxLC jest wyznaczenie odpowiedniego czasu modulacji, który obejmuje czas separacji w ²D składników eluatu z ¹D, w czasie napełniania pętli magazynującej/dozującej kolejnym eluatem z ¹D. Czas modulacji określa się również jako czas pomiędzy wprowadzeniem na kolumnę ²D dwóch kolejnych eluatów/frakcji z ¹D [354, 484].

Szeroki wybór kolumn chromatograficznych, wraz z możliwością zastosowania mieszanin rozpuszczalników o różnej sile elucyjnej, stwarza możliwość projektowania różnorodnych systemów 2D HPLC. W analizie 2D LC fazy stacjonarne wykorzystywane w pierwszym wymiarze są kolumnami, wypełnionymi żelom krzemionkowym modyfikowanym resztami: fenyłowymi [86], oktyłowymi (C-8) [621], oktadecylowymi (C-18) [48, 289] i cyjanowymi (CN) [614, 624]. Niekiedy wykorzystywane są kolumny wypełnione żelom krzemionkowym modyfikowanym β-cyklodekstrynami (CD) ([613], polietylenoglikolami (PEG) [86, 223, 467] lub immobilizowanymi liposomami [579]. Rozdzielenia związków flawonoidowych w pierwszym wymiarze mogą być również prowadzone z wykorzystaniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC) [61, 245, 459], chromatografii wykluczania (SEC) [122, 485] lub chromatografii jonowymiennej (IE) [100].

W drugim wymiarze najczęściej wykorzystywane są kolumny typu C-18 [61, 86, 100, 122, 223, 245, 467, 485, 614, 621, 624]. Jakkolwiek, Zeng i wsp. [613] w wielowymiarowej analizie LC surowców roślinnych tradycyjnej medycyny chińskiej (*Traditional Chinese Medicines* – TCM) zastosowali równoczesną separację na dwóch kolumnach XTerra C18 oraz kolumnie oligoetylenoglikolowej (OEG). Kivilompolo i wsp. [289] w badaniach związków fenolowych w winach testowali w ²D kolumny wypełnione żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami cyjanowymi, aminowymi oraz C-18 z reagentem par jonowych. Aturki i wsp. [48] przeprowadzili separację stereoizomerów 7-O-glukozydów flawanonów obecnych w sokach cytrusowych, wykorzystując w ²D kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym modyfikowanym karboksymetylowanymi β-cyklodekstrynami. Natomiast w celu rozdzielenia związków flawonoidowych w *Fagopyrum tataricum* w ²D użyto kolumnę z resztami amidowymi (RSLC *Polar Advantage amide-embadded column*) [459].

W licznych publikacjach dotyczących analizy 2D LC związków polifenolowych są porównywane różne typy faz stacjonarnych oraz ich kombinacji w dwóch wymiarach [86, 223, 224, 232]. Przegląd systemów 2D HPLC, opracowanych w analizie związków flawonoidowych przedstawili Villiers i wsp. [123] w obszernej pracy przeglądowej o wysokosprawnej chromatografii cieczowej flawonoidów.

Dotychczas analizę związków flawonoidowych metodą 2D HPLC prowadzono w szeregu matryc roślinnych, obejmujących składniki żywności: soki i owoce cytrusowe [48, 467, 621], wina i piwa [86, 233, 289], herbaty: zieloną [245, 485], czarną [485], rooibos [61] i yerba mate [136] oraz roślinne surowce lecznicze [88, 100, 122, 310, 313, 320, 441, 459, 614, 624]. Ponadto z zastosowaniem 2D LC analizowano surowce roślinne tradycyjnej medycyny chińskiej (TCM) [337, 440, 579, 613].

Zespoły flawonoidów obecne w matrycach roślinnych metodą dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej najczęściej analizowane są z wykorzystaniem techniki *comprehensive* [61, 86, 88, 233, 288, 310, 313, 440, 441, 467, 485, 614], natomiast rzadziej - *heart-cutting* [122, 440, 459].

Cacciola i wsp. [86] zastosowali technikę LCxLC w analizie polifenoli w winach i piwach wobec mieszaniny 31 związków wzorcowych z grupy polifenoli i prostych fenoli, m. in. flawonów, izoflawonów, flawanonów, fenolokwasów i kumaryn. Autorzy testowali pięć różnych konfiguracji systemu 2D LC, stosując w ²D kolumnę Chromolith C-18 o długości 5 cm lub 10 cm oraz profil elucji gradientowej złożony, obejmujący gradient liniowy oraz elucję izokratyczną w mieszaninie rozpuszczalników acetonitrylu i wody [86]. Natomiast w ¹D użyto kolumn wypełnionych żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami fenyłowymi oraz kolumn polietylenoglikolowych o różnej długości PEG (5 cm lub 15 cm), testowanych pojedynczo lub połączonych szeregowo z

dotatkową kolumną Gemini C-18 lub Zorbax SB-Aq [86]. System o najwyższej ortogonalności (najniższa wartość współczynnika korelacji) utworzyły kolumny PEG lub fenylowa w ¹D i C-18 w ²D [86]. Pętle magazynujące zastąpiono dwoma kolumnami wychwytyjącymi (*trapping columns*) XTerra, zapewniającymi silniejszą retencję flawonów, co zapobiegało rozcieńczeniu analitów i zwiększało czułość analiz w ²D [86]. Autorzy stosowali w ¹D różne programy elucji gradientowej - gradient liniowy acetonitrylu w wodzie: od 1% do 57% ACN (t_G 200 min), od 10% do 42% ACN (t_G 190 min) lub gradient skokowy (złożony), o profilu obejmującym elucję izokratyczną i gradient liniowy o zmianach stężenia acetonitrylu od 1% do 40% lub od 10% do 50% lub od 1% do 30% w wodzie. Jandera i wsp. [233] analizowali mieszaninę 29 związków wzorcowych (flawonów i fenolokwasów), wykorzystując w ¹D kolumnę wypełnioną polietylenoglikolem (PEG), natomiast w ²D - kolumny C-18, wykonane w technologii "core-shell" (Ascentis Express oraz Kinetex). Autorzy przeprowadzili szereg analiz, porównując efektywność rozdzieleń w ²D w warunkach elucji gradientowej o różnych profilach - gradient liniowy, liniowo-skokowy, liniowo-izokratyczny oraz tzw. *shifting gradient* [233]. System 2D LC złożony z kolumn PEG w ¹D oraz Kinetex w ²D wykorzystano następnie w analizie czerwonego wina [233].

Quiao i wsp. [441] badali zespół związków flawonoidowych obok saponin triterpenowych w wyciągach z korzeni *Glycyrrhiza uralensis* metodą *on-line* RPLC x RPLC *comprehensive*. System optymalizowano testując sześć kolumn RP, stanowiących fazę oktadecylową lub fazę mieszaną – fenylowo-heksylową w różnych konfiguracjach [441]. Ostatecznie w obu wymiarach zastosowano kolumny RP różnego typu (Acquity CSH C₁₈ w ¹D; Poroshell Phenyl-Hexyl w ²D). Ponadto ortogonalność systemu zwiększono, optymalizując skład eluentów, mianowicie w ¹D użyto metanolu a w ²D acetonitrylu. W ¹D program elucji gradientowej obejmował liniowy wzrost stężenia metanolu od 50% do 90% w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (t_G 40 min) [441]. Natomiast w ²D zastosowano tzw. *shift gradient*, obejmujący w poszczególnych skokach zmiany stężenia acetonitrylu w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego w zakresach: 25%-35%-25%, 35%-45%-35%, 52%-72%-52%, 75%-88%-75% [441]. Autorzy rozdzielili 39 flawonoidów, w tym flawanonów i ich glikozydów, glikozydowych form chalkonów oraz izoflawonów, flawonoli i flawonów [441].

Liang i wsp. [320] opracowali warunki kompleksowej analizy *off-line* 2D LC związków flawonoidowych z wyciągu wodnego *Scutellaria barbata* D. Don. Związki czynne frakcji różniących się polarnością, otrzymanych metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) rozdzielano w systemie 2D LC HILIC x HILIC oraz w systemie HILIC x RPLC [320]. W systemie HILIC x HILIC rozdzielania w ¹D prowadzono w warunkach elucji, obejmującej liniowy wzrost stężenia od 5% do 40% mieszaniny ACN:woda (95:5, v/v) w

wodzie z dodatkiem mrówczanu amonu (5 mM). W ²D zastosowano gradient złożony, liniowo-izokratyczny, obejmujący wzrost stężenia w zakresie od 10% do 65% ACN w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (v/v) [320]. W rozdzieleniach 2D HILIC x RPLC frakcji o średniej polarności, zawierającej związki flawonoidowe, w obu wymiarach stosowano elucję gradientową, charakteryzującą się wzrastającym stężeniem ACN w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego: liniowo od 10% do 30% ACN (t_g 30 min) w ¹D oraz o profilu liniowo-skokowym w ²D od 10% do 65% (t_g 50 min) [320]. We frakcji średnio-polarnej metodą 2D HILIC x RPLC rozdzielono 543 związki, spośród których z użyciem detekcji UV oraz MS, w tym QTOF-MS zidentyfikowano 22 flawonoidy: glikozydowe formy flawonów oraz flawanonów obok wolnych aglikonów [320].

System 2D LC HILIC x RPLC zastosowano w badaniach zespołu polifenoli w herbacie rooibos (*Aspalathus linearis*) [61] oraz mieszaniny sześciu surowców roślinnych tradycyjnej medycyny chińskiej (TCM) [613]. W analizie wyciągów wodnych z *A. linearis* w ¹D wykorzystano jako fazę stacjonarną kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym, modyfikowanym resztami diolowymi (Nomura Chemical Develosil Diol-100), natomiast w ²D - kolumnę C-18 (Agilent Zorbax SB-C18) [61]. Z użyciem detektorów UV i Q-TOF (ESI+/-) rozpoznano 20 polifenoli z grupy dihydrochalkonów, flawanonów, flawonów oraz flawonoli [61]. W obu wymiarach użyto gradientu liniowo-skokowego. W ¹D program gradientu obejmował wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:kwas octowy (93,05:4,95:2,00, v/v/v) od 0% do 10% (t_g 0–45 min), następnie od 10% do 100% w mieszaninie woda:kwas octowy (98:2, v/v) (t_g 45–65 min). Natomiast w ²D program gradientu obejmował wzrost stężenia acetonitrylu w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu octowego w zakresie 10%–14,8% (0–8,5 min), 14,8%–50% (8,5–20,5 min), 50%–100% (20,5–21,5 min) [61]. Natomiast związki czynne mieszanki ziołowej TCM (*Dalbergia odorifera* T. Chen, *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Scutellaria barbata* D. Don, *Citrus aurantium* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Pueraria lobata*) analizowano z wykorzystaniem kolumny wypełnionej żelem krzemionkowym modyfikowanym β-cyklodekstrynami w ¹D oraz dwiema kolumnami pracującymi równocześnie: kolumną C-18 i oligoetylenoglikolową (OEG) w ²D [613]. Wybór kolumn o różnych mechanizmach separacji umożliwił skonstruowanie systemu 2D RPLC o wysokiej ortogonalności [613]. Autorzy podkreślają "elastyczność" systemu - każda z kolumn może być stosowana w ¹D; wówczas dwie pozostałe, połączone równolegle, decydują o efektywności separacji w ²D [613]. Jako składnik fazy ruchomej zastosowano acetonitryl z dodatkiem 0,2% kwasu mrówkowego (A) i wodę z dodatkiem 0,2% kwasu mrówkowego (B) na kolumnie C-18 oraz acetonitryl z dodatkiem 0,2% kwasu mrówkowego (A), wodę z dodatkiem 0,2% kwasu mrówkowego (B) oraz 100mM

mrówczanu amonu (C) w separacji na kolumnie CD. Na każdej z kolumn zastosowano odmienne programy elucji gradientowej: kolumna C-18 - liniowy wzrost stężenia A od 5% do 70% w B (t_G 15 min), kolumna OEG - liniowy wzrost stężenia A od 5% do 60% w B (t_G 30 min), kolumna CD liniowy wzrost stężenia A od 5% do 40% w mieszaninie B+30%C (t_G 30 min) [613]. W rezultacie uzyskano rozdzielanie 25 flawonoidów, w tym izoflawonów, flawonów i flawanonów oraz ich glikozydów [613].

Wang i wsp. [579] analizowali metodą *on-line* LCxLC z detekcją UV i APCI-Q-MS^e produkt ziołowy tradycyjnej medycyny chińskiej *Longdan Xiegan Decoction* (LXD), stanowiący mieszaninę dziesięciu roślinnych surowców leczniczych (*Gentianae Radix*, *Scutellariae Radix*, *Gardeniae Fructus*, *Rehmanniae Radix*, *Alismatis Rhizoma*, *Plantaginis Semen*, *Angelicae Sinensis Radix*, *Clematidis Armandii Caulis*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and *Bupleuri Radix* zawierającej obok flawonoidów, również triterpeny, irydoidy, olejki, fenolokwasy i aminokwasy [579]. W opracowanym systemie wykorzystano w ¹D kolumnę wypełnioną immobilizowanymi liposomami (ILC) jako imitującą błonę biologiczną i elucję izokratyczną przy stężeniu 10mM octanu amonu (pH 6,8), natomiast w ²D - kolumnę C-18 (Kromasil ODS) oraz elucję gradientową o wzrastającym stężeniu acetonitrylu od 10% do 30% w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu octowego (t_G 7 min). W wyniku analizy frakcji octanowej wyciągu wodnego z LDX rozdzielono 50 związków, w tym w rezultacie oddziaływań na kolumnie ILC zidentyfikowano 8 flawonoidów: 7-O-glukuronid oroksyliny, wogonozyd, 7-O-glukuronid chryzyny, bajkalinę, ononinę, likwirytynę i jej apiozyd oraz 3',4'-dihydroksy-5,6-dimetoksy-7-O-glukozyloflawon [579]. Autorzy podkreślają, że opracowaną metodę można wykorzystać w badaniach skryningowych złożonych matryc roślinnych w zakresie obecności składników zdolnych do przenikania przez błonę biologiczną, której model stanowiła kolumna ILC [579].

Glikozydy flawonolowe i ich pochodne estrowe analizowano obok irydoidów metodą LCxLC w wyciągu wodnym z *Hedyotis diffusa* [313]. System konfigurowano w oparciu o dwie kolumny - Luna CN w ¹D i Kinetex C-18 w ²D [313]. W ¹D jako składniki fazy ruchomej zastosowano ACN i wodę, a elucja gradientowa przebiegała według następującego programu: 0-10 min - 0% ACN, 10-150 min - 64% ACN. Składnikami eluentu w drugim wymiarze były ACN i woda z dodatkiem 0,05% kwasu mrówkowego, a separację prowadzono z użyciem tzw. „*shift gradient*” (gradientu skokowego o liniowym na każdym etapie w bardzo krótkim czasie wzroście stężenia rozpuszczalnika organicznego) dla którego zakres zmian stężeń ACN w początkowym etapie separacji (czas „skoku”- 0-0,7 min) wynosił 5%-50%, natomiast w końcowym etapie - 20%-75%. Uzyskano rozdzielanie 10 związków [313]. Czas modulacji obejmujący separację w ²D i przenoszenie z ¹D wynosił 1 minutę [313].

Analizy chromatograficzne LCxLC wyciągów wodno-alkoholowych oraz frakcji wodnych i organicznych (butanolowa, octanowa i chloroformowa) z liści zielonej i czarnej herbaty (*Camellia sinensis*) prowadzono z wykorzystaniem systemu, składającego się z kolumny SEC (chromatografia wykluczania; *size exclusion chromatography*) w ¹D (Ultrahydrogel-120) oraz kolumny UHPLC BEH-C18 w ²D [485]. W ¹D stosowano gradient liniowy, obejmujący wzrost stężenia ACN od 0% do 50% w wodzie (t_G 40 min), natomiast w ²D elucję gradientową o wzrastającym stężeniu metanolu od 0% do 100% w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (t_G 6 minut). W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano głównie we frakcji butanolowej 29 mono-, di-, tri- i tetraglikozydów flawonoli (kemferolu, kwercetyny i mirycetyny) oraz ich estrów z kwasem galusowym, obok dwóch C-glikozydów flawonów [485].

Chromatografię wykluczania w połączeniu z chromatografią w układzie odwróconych faz zastosowano w analizie *heart-cutting* LC-LC flawonoli w wyciągach z liści *Maytenus ilicifolia* [122]. Wykorzystanie kolumny SEC Ultrahydrogel-120 w ¹D oraz RP - SupelCosil LC-18 umożliwiło rozdzielanie 36 glikozydów flawonolowych, głównie pochodnych kwercetyny i kemferolu, zawierających od jednej do czterech cząsteczek cukrów [122]. W obu wymiarach zastosowano elucję gradientową o profilu złożonym, obejmującym liniowy wzrost stężenia mieszaniny woda:ACN:kwas octowy (49:50:1, v/v) w 1% kwasie octowym: w ¹D od 10% do 80% (t_G 40 min), a następnie elucję izokratyczną przy jej stężeniu 80% (t_G 40–45 min), natomiast w ²D wzrost od 10% do 40% (t_G 17 min), a następnie elucję izokratyczną przy stężeniu 40% (t_G 17-20 min) [122].

Rozdzielenie 12 składników wyciągu z *Fagopyrum tataricum*, w tym 7 glikozydów kwercetyny i kemferolu, otrzymano w systemie *on-line stop-flow heart-cutting*, składającym się z kolumny HILIC w ¹D oraz dwóch kolumn w ²D wypełnionych żelami krzemionkowym modyfikowanym odpowiednio resztami amidowymi (kolumna Polar Advantage II) i fenyłowymi (kolumna Phenyl-1), na których prowadzono równoczesne separacje [459]. W pracy systemu wykorzystano przepływ wsteczny tzw. *back-flush* poprzedzający separację ²D odpowiedniej frakcji z ¹D [459]. Eluat z kolumny ¹D (elucja izokratyczna - 5% ACN w wodzie z dodatkiem 0,03% wodnego roztworu kwasu fosforowego), dzielono na dwie frakcje, spośród których jedną kierowano na kolumnę ²D Polar Advantage II i rozdzielano związki flawonoidowe w warunkach gradientu liniowego (11%-23% ACN w wodzie z dodatkiem 0,03% wodnego roztworu kwasu fosforowego) [459]. Natomiast drugą frakcję zatrzymywano na kolumnie ¹D, a następnie przenoszono wykorzystując przepływ wsteczny na kolumnę Phenyl-1 w ²D, i rozdzielano jej składniki w warunkach elucji gradientowej (gradient liniowy 35%-43%

ACN w wodzie z dodatkiem 0,03% wodnego roztworu kwasu fosforowego) [459]. Opracowaną metodę zwalidowano i wykorzystano do oznaczenia zawartości 12 związków w wyciągu z *Fagopyrum tataricum* [459].

Możliwość elastycznego konstruowania systemów 2D LC dyskutowali Kivilompolo i wsp. [289]. Zastosowali system LCxLC, w analizie jakościowej i ilościowej związków fenolowych w winach oraz sokach owocowych [289]. Rozdzielenia w ¹D prowadzono na kolumnie Atlantis C-18 według programu elucji gradientowej, charakteryzującego się wzrastającym liniowo stężeniem ACN od 5% do 50% w wodzie z dodatkiem 0,5% kwasu octowego w czasie t_G 45 min. Natomiast w ²D separację prowadzono na kolumnie XBridge C-18 w warunkach elucji izokratycznej w fazie ruchomej, stanowiącej mieszaninę 15 mM bromku tetrapentyloamoniowego w acetonitrylu z dodatkiem 0,05% kwasu octowego (21:79, v/v) [289]. System LCxLC, zawierający dwa dwudrożne zawory 10-portowe, wyposażono dodatkowo w dwa zawory 3-portowe, umożliwiające przeniesienie eluatu, zawierającego mirycetynę, kwercetynę i kemferol, z kolumny ¹D bezpośrednio do detektora DAD, z pominięciem separacji na kolumnie ²D [289]. W rezultacie otrzymano rozdzielanie 16 składników badanego zespołu, w tym 5 flawonoidów (obok fenolokwasów i flawan-3-oli): rutyny i izokwercetyny (rozdzielonych w systemie LCxLC) oraz mirycetyny, kwercetyny i kemferolu (rozdzielonych w ¹D) [289].

Przeprowadzono analizę NPxRP LC *comprehensive* flawonoidów obok glikozydów stewiolowych w wyciągach ze *Stevia rebaudiana* [88]. Separację ¹D prowadzono na mikrokolumnie poliaminowej (YMC-Pack PA-G) w układzie NP, stosując elucję gradientową (gradient liniowo-izokratyczny) według programu obejmującego wzrastające stężenie ACN od 5% do 70% w wodzie z dodatkiem 0,004% kwasu fosforowego (t_G 85 min). Natomiast rozdzielania ²D każdej frakcji przenoszonej z ¹D prowadzono na kolumnie UHPLC C-18 (*Agilent Zorbax RRHD SB-C18*) w krótkim czasie separacji (0,33 min), w warunkach elucji gradientowej według programu gradientu liniowo-izokratycznego, obejmującego wzrastające stężenie ACN od 5% do 70% w wodzie z dodatkiem 0,004% kwasu fosforowego (v/v/v) (t_G 0,28 min) oraz etap kondycjonowania (70%-5% ACN w czasie t_G 0,28-0,33 min) [88]. W badanym wyciągu zidentyfikowano 5 flawonoidów (7-O-glukozydy apigeniny i luteoliny oraz 3-O-glukozyd, 3-O-ramnozyd i 3-O- rutynozyd kwercetyny) [88].

Analizy polimetoksyloowanych flawonów obecnych w owocni pomarańczy (*Aurantii Fructus*), prowadzone w systemie o ograniczonej ortogonalności (kolumny C-8 i C-18) umożliwiły separację 42 związków [621]. W obu wymiarach ¹D i ²D zastosowano ten sam profil gradientu, obejmujący wzrastające liniowo stężenie ACN od 30% do 90% w wodzie (t_G 30 min).

Leme i wsp. [310] wykorzystali system LCxLC, łączący kolumny CN w ¹D i C-18 w ²D w analizie wyciągu z liści trzciny (*Saccharum sp.*). W ¹D stosowano elucję gradientową, obejmującą wzrastające stężenie etanolu w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu octowego od 10% do 100% w czasie t_G 132 min. W ²D rozdzielania prowadzono z użyciem metanolu oraz wody z dodatkiem 0,1% kwasu octowego, w warunkach różnych programów elucji gradientowej, obejmujących gradienty typu: "CS" (*continuously shifting*), "FIF" (*full in fraction*), "SIF" (*segmented in fraction*). Otrzymano rozdzielanie 38 polifenoli, spośród których zidentyfikowano 15 pochodnych flawonów i jedną pochodną flawonolu - 3-O-glukozyd kwercetyny [310].

Z kolei Zhou i wsp. [624] do analizy flawonoidów w ziele *Lobelia chinensis* zastosowali kolumnę wypełnioną żelom krzemionkowym modyfikowanym grupami cyjanowymi (CN), która, w zależności od składu eluentu, może być efektywną zarówno w systemie faz normalnych (NP), jak i odwróconych (RP) [624]. W ¹D autorzy zastosowali jako fazę ruchomą mieszaninę metanol:woda, co umożliwiło wykorzystanie kolumny jako słabej fazy stacjonarnej typu RP [624]. Rozdzielenia w ¹D prowadzono według programu gradientu liniowego: 5%-100% metanolu w wodzie (t_G 40 min). W ²D zastosowano kolumnę ODS C-18 i „*stepwise gradient*” o zwiększającym się stężeniu acetonitrylu od 5% do 70% w wodzie (liniowo i izokratycznie) (t_G 0-55 min) [624]. Osiągnięto wzrost pojemności pikowej do wartości 5731 [624]. W badanym wyciągu stwierdzono obecność 536 związków, z których zidentyfikowano 6, w tym 4 flawony [624].

Russo i wsp. [467] porównali profile flawonów i flawanonów w sokach cytrusowych z użyciem metod 1D LC i 2D LC. Zastosowanie systemu LCxLC o wysokiej ortogonalności, złożonego z kolumn: polietylenoglikowej (¹D) oraz C-18 (²D) umożliwiło całkowite rozdzielanie składników zespołu flawonoidowego soku pomarańczowego, obejmującego 11 związków: 6 flawonów i 5 flawanonów [467]. Ponadto przeprowadzono oznaczenie zawartości flawanonów (ericytryny, naryrutyny, hesperydyny, narynginy, dydiminy) metodą 2D LC *comprehensive* [467]. W ¹D i ²D zastosowano elucję gradientową o wzrastającym stężeniu mieszaniny woda:ACN:izopropanol:kwas mrówkowy (39,9:20:40:0,1, v/v/v) (B) od 0% do 30% w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (A) (t_G 55 min). W ²D wykorzystano wielokrotny gradient o powtarzalnym profilu obejmującym wzrost mieszaniny B w czasie 0,90 minut od 15% do 30% a następnie od 0,90 do 0,91 minuty każdego etapu kondycjonowanie kolumny fazą ruchomą: 15% B w A [467]. Czas modulacji obejmujący separację w ²D i przeniesienie z ¹D wynosił 1 minutę [467].

Izoflawony - związki o charakterze fitoestrogenów - stanowiły przedmiot badań metodą 2D LC w systemie łączącym techniki *heart-cutting* oraz *comprehensive* jako

składniki mieszanki surowców roślinnych tradycyjnej medycyny chińskiej (TCM) "Ge-Gen", składającej się z korzeni *Pueraria lobata* oraz *P. thomsonii* [440]. System 2D LC skonstruowano w oparciu o kolumny Acquity CSH w ¹D oraz kolumny Poroshell 120 Phenyl-Hexyl w ²D, włączając dodatkową kolumnę wychwytną - kolumnę XTerra MS C18 [440]. W ¹D elucja gradientowa obejmowała wzrastające stężenie metanolu w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego od 20% do 100% w czasie t_G 31 min. Natomiast w ²D rozdzielania prowadzono według programu elucji gradientowej, obejmującego dla każdej frakcji wzrastające stężenie acetonitrylu w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego od 5% do 60% w czasie t_G 35,4 min (*ang. shifted linear gradient*). Autorzy wykorzystali technikę *on-line heart-cutting*, jako element opracowanego systemu *on-line comprehensive*, do usunięcia z badanego ekstraktu pięciu dominujących składników, przenosząc zawierający je eluat z kolumny ¹D do kolumny wychwytnącej [440]. Pozostały eluat z kolumny ¹D kierowano do kolumny ²D, co umożliwiło rozpoznanie składników występujących w niskich stężeniach [440]. W rezultacie uzyskano separację 271 związków z wyciągu z *P. lobata* oraz 254 z *P. thomsonii* [440].

Kombinacja chromatografii wykluczania (SEC) i chromatografii w układzie faz odwróconych (RP) umożliwiła analizę składników frakcji octanowej wyciągu wodno-alkoholowego z *Astragali Radix* (surowiec pochodził z gatunku *A. membranaceus*) [617]. W rozdzieleniach w ¹D wykorzystano kolumnę BIOSEP-SEC-S 2000, charakteryzującą się wysoką zdolnością separacji glikozydowych form flawonoidów od wolnych aglikonów w oparciu o różnice w masach cząsteczkach [617]. W ¹D stosowano gradient liniowy: 0%-50% ACN w wodzie (t_G 30 minut). W optymalizacji rozdzieleń w ²D testowano siedem kolumn RP, spośród których najbardziej efektywną była kolumna Phenomenex Gemini-NX C18 [617]. Separację w ²D prowadzono z użyciem elucji gradientowej, obejmującej wzrost stężenia ACN od 20% do 75% w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu octowego (t_G 50 min) [617]. W skonstruowanym systemie otrzymano rozdzielenie 24 izoflawonów obok 10 pterokarpanów i izoflawanów oraz 13 astragalozydów [617].

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

A. BADANIA FITOCHEMICZNE

1. Rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne

1.1. Rozpuszczalniki organiczne

Lp.	Nazwa	Producent
1.	Aceton cz.d.a.	POCh S.A., Gliwice, Polska
2.	Acetonitryl (stopień czystości HPLC)	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.	Cykloheksan	POCH S.A., Gliwice, Polska
6.	Etanol	Polmos, Starogard Gdański, Polska
7.	Eter dietylowy cz.d.a.	POCh S.A., Gliwice, Polska
8.	Eter naftowy cz.d.a.	POCh S.A., Gliwice, Polska
9.	Heksan	J.T. Baker, Deventer, Holandia
10.	Izopropanol	POCH S.A., Gliwice, Polska
11.	Metanol (stopień czystości HPLC)	POCh S.A., Gliwice, Polska
12.	n-Heptan	POCh S.A., Gliwice, Polska
13.	Octan etylu cz.d.a.	POCh S.A., Gliwice, Polska
14.	Tetrahydrofuran (stopień czystości HPLC)	J.T. Baker, Deventer, Holandia

1.2 Odczynniki chemiczne

Nazwa	Producent
Aldehyd anyżowy	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bezwodnik octowy	POCh S.A., Gliwice, Polska
Chlorek antymonu	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chlorek magnezu cz.d.a.	POCh S.A., Gliwice, Polska
Chlorek sodu	POCh S.A., Gliwice, Polska
Kwas fosfomolibdenowy cz.d.a.s	POCh S.A., Gliwice, Polska
Kwas fosforowy cz.d.a.	POCH S.A., Gliwice, Polska
Kwas mrówkowy cz.d.a.	Merck, Darmstadt, Niemcy
Kwas octowy cz.d.a.	POCh S.A., Gliwice, Polska
Kwas siarkowy 98% cz.d.a.	POCh S.A., Gliwice, Polska
kwas solny 30% cz.d.a	Merck, Darmstadt, Niemcy
kwas trifluoroctowy 99% cz.d.a	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tiocyanian potasu cz.d.a.	POCh S.A., Gliwice, Polska
Wanilina cz.d.a	Loba Feinchemie, Fischamend, Austria

1.3. Woda

- woda demineralizowana otrzymana z użyciem systemu Millipore (Molsheim, Francja)
- woda redestylowana otrzymana z użyciem destylarki REL-5 (Zakłady Automatyki Mera- Polna, Przemyśl, Polska).

2. Związki wzorcowe

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

2.1. Flawonoidy

2.1.1. Glikozydy flawonoidowe

Nazwa	Producent
Witekсыna	PhytoLab GmbH & Co. KG (Germany)
Izowitekсыna	Wyizolowana z ziela <i>Bryonia dioica</i> w toku wcześniejszych badań w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji GUMed [295, 296]
Orientyna	PhytoLab GmbH & Co. KG (Germany)
Izoorientyna	PhytoLab GmbH & Co. KG (Germany)
Wicenina-1	Wuxi Apptec (China)
Wicenina-2	Wuxi Apptec (China)
Wicenina-3	Wuxi Apptec (China)
Szaftozyd	Katedra i Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu (Polska) Extrasynthese, Genay, Francja
Izoszaftozyd	Katedra i Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu (Polska) Extrasynthese, Genay, Francja
7-O-glukozyd izowitekсыny	Extrasynthese, Genay, Francja
2"-O-ramnozyd witekсыny	Extrasynthese, Genay, Francja

2.1.2. Aglikony flawonoidowe

Nazwa	Producent
Apigenina	Fluka, Buchs, Szwajcaria
Luteolina	Fluka, Buchs, Szwajcaria

2.1.3. Izoflawony

Nazwa	Producent
Biochanina A	Extrasynthese, Genay, Francja
Daidzeina	Extrasynthese, Genay, Francja
Formononetyna	Extrasynthese, Genay, Francja
Irylon	Extrasynthese, Genay, Francja
Kalikozyina	Extrasynthese, Genay, Francja
Kalikozyiny 7-O-glukozyd	Phytomarker, Tianjin, Chiny
5,7,3'-trihydroksy-5' metoksyizoflawon	Extrasynthese, Genay, Francja

2.2. Saponiny steroidowe

2.2.1. Saponozydy furostanowe

Nazwa	Producent
Protodioscyyna	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.2.2. Sapogeniny steroidowe

Nazwa	Producent
Diosgenina	PhytoLab GmbH & Co. KG, Niemcy Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Jamogenina	PhytoLab GmbH & Co. KG, Niemcy
Tigogeniny octan	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sarsasapogenina	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Smilagenina	PhytoLab GmbH & Co. KG, Niemcy

2.3. Alkaloidy

Nazwa	Producent
Trygonelina	Extrasynthese, Genay, Francja

3. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

3.1. Chromatografia cienkowarstwowa - TLC i HPTLC

- **komory chromatograficzne:**
 - **automatyczna komora chromatograficzna ACD 2** (*Automating Developing Chamber*) (Camag, Muttenz, Szwajcaria),
 - **pozioma komora DS II** (Chromdes, Polska) (10 cm x 10 cm)
 - **komora pionowa** o wymiarach 10 cm x 11 cm x 6 cm
 - **pionowa analityczna komora Chropa,**
- **półautomatyczny aplikator AS 30** (Desaga, Numbrecht, Niemcy),
- **mikrostrzykawka 10 µl** (Hamilton, Reno, USA)
- **półautomatyczny spryskiwacz TLC** (Camag, Szwajcaria)
- **kabina do spryskiwania chromatogramów TLC** (Camag, Szwajcaria)
- **plyta grzewcza** Termoplate S (Desaga, Niemcy),
- **komora wizualizacyjna z lampą UV** (254 nm/366 nm) (Camag, Muttenz, Szwajcaria)
- **densytometr CD 60** (Desaga, Niemcy), pracujący pod kontrolą komputera PC (oprogramowanie ProQuant).
- **przyrząd do cięcia płytek chromatograficznych** (Desaga, Niemcy)

3.2. Systemy wysokosprawnej chromatografii cieczowej - HPLC

3.2.1. Systemy do jednowymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej

3.2.1.1. System HPLC-UV Prominence firmy Shimadzu (Japonia):

- urządzenie odgazowujące ciecz elucyjną (degazer) DGU-20A5 Prominence
- termostat kolumny CTO-10ASVP Prominence
- automatyczny podajnik próbek (autosampler) SIL-20ACXR Prominence
- pompa LC-20AD Prominence
- detektor UV-VIS SPD-20A Prominence
- łącznik CBM-20A/20 Alite Prominence
- oprogramowanie LCsolution, wersja 1.2

3.2.1.2. System HPLC-DAD-ESI-MS Prominence firmy Shimadzu (Japonia):

- urządzenie odgazowujące ciecz elucyjną (degazer) DGU-20A5
- pompy LC-20AD (2)
- statyczna komora mieszania (mieszalnik) (V 100 µl)
- kontroler CBM-20A
- termostat kolumny CTO-20AC
- automatyczny podajnik próbek (autosampler) SIL 20AC_{XR}
- detektor DAD (Diode Array Detector) SPD-20A Prominence
- spektrometr mas LCMS-2020 (Liquid Chromatography Mass Spectrometer) ze źródłem jonów ESI (Electrospray Ionization)
- wytwornica azotu (Nitrogen generator) (Peak Scientific, Szkocja)
- oprogramowanie Lab Solution wersja 1.2.

3.2.1.3. System HPLC-ELSD firmy Shimadzu (Japonia):

- urządzenie odgazowujące ciecz elucyjną (degazer) DGU-20A5 Prominence
- termostat kolumny CTO-10ASVP Prominence
- automatyczny podajnik próbek (autosampler) SIL-20ACXR Prominence
- pompa LC-20AD Prominence
- statyczna komora mieszania (mieszalnik) 0,5-2,6 ml HP
- kontroler CBM-20A
- wytwornica azotu (Nitrogen generator) (Peak Scientific, Szkocja)
- laserowy detektor światła rozproszonego ELSD 3300 (Alltech Associates, USA) z azotem jako gazem nebulizującym
- łącznik CBM-20A/20Alite Prominence
- oprogramowanie LCsolution, wersja 1.2

3.2.2. Systemy do dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej

- urządzenie odgazowujące ciecz elucyjną (degazer) DGU-20A5
- pompy LC-20AD (2)
- pompy LC-20AD_{XR} (2)
- statyczna komora mieszania (mieszalnik) (V 100 µl) (2)
- kontroler CBM-20A
- termostat kolumny CTO-20AC
- automatyczny podajnik próbek (autosampler) SIL 20ACXR
- dwukierunkowy zawór 10-drożny
- detektor DAD (Diode Array Detector) SPD-20A (2,5 µl objętość celki detektora dla ¹D; 18 µl objętość celki dla ²D)
- spektrometr mas LCMS-2020 ze źródłem jonów ESI (Electrospray Ionization)
- dzielnic strumienia (No. 600-PO10-06) (Analytical Scientific Instruments, USA).
- wytwornica azotu (Nitrogen generator) (Peak Scientific, Wielka Brytania)
- oprogramowanie LCsolution, wersja 1.2

3.3. Inne

- **łaźnie wodne:** Unipan typ 356P (Warszawa, Polska), SWL (Bytom, Polska),
- **mieszadło magnetyczne** (IKA, Niemcy),
- **ekstraktor ASE 350** (*Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor system*) (Dionex, Kalifornia, USA)
- **ekstraktor mikrofalowy** NEOS GR (Milestone, Włochy)
- **pluczka ultradźwiękowa** (Bandelin, Niemcy)
- **automatyczny aparat Soxhleta B-811** (BÜCHI Labortechnik AG, Szwajcaria)
- **klasyczny aparat Soxhleta**
- **wirówka** (MPW Med. Instruments, Polska)
- **wyparka próżniowa** (Unipan, Polska)
- **sączoneki membranowe** o średnicy porów 0,45 µm (Supelco, USA).

4. Analiza chromatograficzna

4.1. Chromatografia cienkowarstwowa

4.1.1. Płytki chromatograficzne do chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Stosowano płytki szklane pokryte następującymi adsorbentami:

- żelem krzemionkowym – Kieselgel 60 F₂₅₄ (10 cmx20 cm; 0,25 mm) (Merck, Niemcy),
- żelem krzemionkowym - Kieselgel 60 F₂₅₄ Lux Plate (10 cmx20 cm; 0,25 mm) (Merck, Niemcy).
- celulozą – Cellulose (10 cm x 10 cm; 0,1 mm) (Merck, Niemcy)

- żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi – C-18 F_{254S} (10 cm × 20 cm; 0,25 mm) (Merck, Niemcy)
- żelem krzemionkowym Kieselgel 60 F₂₅₄ Adamant (5,0 cm x 10,0 cm; 0,25 mm) (Merck, Niemcy).

4.1.2. Płytki chromatograficzne do wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC)

Stosowano płytki szklane pokryte następującymi adsorbentami:

- żelem krzemionkowym – Silicagel 60 F₂₅₄ (10 cm x 20 cm, 0,2 mm) (Merck, Niemcy),
- żelem krzemionkowym – Silicagel 60 F₂₅₄ Lichrospher (10 cm x 20 cm; 0,2 mm),
- żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami oktylowymi RP-8 F₂₅₄ (10 cm x 10 cm; 0,25 mm) (Merck, Niemcy),
- żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami oktadecylowymi C-18 F₂₅₄ (10 cm x 10 cm; 0,25 mm) (Merck, Niemcy), ;
- żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi – C-18W F_{254S} (10 cm ×10 cm) (0,2 mm) (Merck, Niemcy)
- żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami diolowymi DIOL F_{254S} (10 cm x 10 cm; 0,25 mm) (Merck, Niemcy).

4.1.3. Fazy ruchome

- F₁ – chloroform:metanol:kwas mrówkowy (30:20:2, v/v/v)
- F₂ – heptan:octan etylu (7:3, v/v)
- F₃ – metanol:woda (4:1, v/v)
- F₄ – chloroform:metanol:woda (13:6:2, v/v/v)
- F₅ – chloroform:metanol:woda (90:5:5, v/v/v)
- F₆ – cykloheksan:aceton (1:1, v/v)
- F₇ – chloroform:aceton (7:3, v/v)
- F₈ – chloroform:aceton (8:2, v/v)
- F₉ – chloroform:aceton (9:1, v/v)
- F₁₀ – dichlorometan:aceton (9:1, v/v)
- F₁₁ – heksan:aceton (8:2, v/v)
- F₁₂ – heksan:octan etylu (6:1, v/v)
- F₁₃ – izopropanol:heptan (1:12, v/v)
- F₁₄ – izopropanol:eter naftowy (1:12, v/v)
- F₁₅ – eter naftowy:octan etylu (7:3, v/v)
- F₁₆ – butanol:woda:kwas octowy (4:1:1, v/v/v)
- F₁₇ – izopropanol (100%)
- F₁₈ – chloroform (100%)
- F₁₉ – octan etylu (100%)
- F₂₀ – metanol (100%)
- F₂₁ – butanol (100%)

- F₂₂ – eter etylowy (100%)
- F₂₃ – heptan:octan etylu (1:2, v/v)
- F₂₄ – heptan:octan etylu (1:1, v/v)
- F₂₅ – heptan:octan etylu (2:1, v/v)
- F₂₆ – heptan:octan etylu (3:1, v/v)
- F₂₇ – heptan:octan etylu (4:1, v/v)
- F₂₈ – heptan:octan etylu (10:3, v/v)
- F₂₉ – n-butanol: kwas octowy: woda (BAW) (3:1:1, v/v)
- F₃₀ – 15% kwas octowy
- F₃₁ – metanol:woda:kwas mrówkowy (40:60:1, v/v)
- F₃₂ – metanol:woda:kwas mrówkowy (40:60:6, v/v)
- F₃₃ – metanol:woda:kwas mrówkowy (25:75:1, v/v/v)
- F₃₄ – metanol:woda:kwas mrówkowy (50:50:1, v/v/v)
- F₃₅ – metanol:woda:kwas mrówkowy (70:30:6, v/v/v)
- F₃₆ – metanol:woda:kwas mrówkowy (75:25:1, v/v/v)
- F₃₇ – metanol:woda:kwas mrówkowy (70:30:1, v/v/v)
- F₃₈ – acetonitryl:woda:kwas mrówkowy (50:50:0,5, v/v/v)
- F₃₉ – chloroform:metanol:kwas mrówkowy (13:6:2, v/v/v)
- F₄₀ – chloroform:metanol:kwas mrówkowy (30:10:2, v/v/v)
- F₄₁ – chloroform:metanol:kwas mrówkowy (35:30:2, v/v/v)
- F₄₂ – chloroform:metanol:kwas mrówkowy (30:20:3, v/v/v)
- F₄₃ – chloroform:metanol:kwas mrówkowy (30:20:4, v/v/v)
- F₄₄ – chloroform:etanol:kwas mrówkowy (30:20:2, v/v/v)
- F₄₅ – butanol:woda:kwas octowy (50:20:20, v/v/v)
- F₄₆ – butanol:woda:kwas octowy (50:10:10, v/v/v)
- F₄₇ – metanol:0,1% kwas mrówkowy (70:30, v/v)
- F₄₈ – chloroform:metanol:kwas mrówkowy:woda (10:4:1:1, v/v/v/v)
- F₄₉ – metanol:woda (75:25, v/v)
- F₅₀ – octan etylu:kwas octowy:woda (7:2:2, v/v/v)
- F₅₁ – tetrahydrofuran:woda:kwas mrówkowy (24:76:1, v/v/v)
- F₅₂ – butanol:woda (1:1, v/v)

4.1.4. Odczynniki wywołujące

4.1.4.1. Odczynniki wywołujące sapogeniny steroidowe

➤ **Roztwór waniliny w kwasie fosforowym [521]**

Po spryskaniu odczynnikiem chromatogram ogrzewano na płycie grzewczej w temperaturze 105°C przez 3 minuty.

➤ **2 % roztwór kwasu siarkowego w metanolu [521]**

Po spryskaniu odczynnikiem chromatogram ogrzewano na płycie grzewczej w temperaturze 105°C przez 3 minuty.

➤ **Odczynnik Liebermanna – Burcharda [213, 521]**

Po spryskaniu odczynnikami chromatogram ogrzewano na płycie grzewczej w temperaturze 105°C przez 3 minuty.

➤ **5% etanolowy roztwór kwasu fosfomolibdenowego [521]**

Po spryskaniu odczynnikami chromatogram ogrzewano na płycie grzewczej w temperaturze 105°C przez 3 minuty.

➤ **10% roztwór chlorku antymonu [213, 521]**

Po spryskaniu odczynnikami chromatogram ogrzewano na płycie grzewczej w temperaturze 105°C przez 3 min.

➤ **Roztwór aldehydu anyżowego [82, 213]**

Po spryskaniu odczynnikami chromatogram ogrzewano w temperaturze 105°C przez 3 min.

➤ **Zmodyfikowany roztwór aldehydu anyżowego**

Do 10ml roztworu aldehydu anyżowego [82, 213] dodano 8,5 ml metanolu i 1,0 ml kwasu octowego. Po spryskaniu odczynnikami chromatogram ogrzewano na płycie grzewczej w temperaturze 105°C przez 1 min.

4.1.4.2. Odczynniki wywołujące saponiny furostanowe

➤ **Odczynnik Ehrlicha [213, 521]**

Po spryskaniu odczynnikami chromatogram ogrzewano na płycie grzewczej w temperaturze 105°C przez 3 minuty.

4.1.5. Rozdzielenia w automatycznej komorze chromatograficznej ADC2

Parametry rozdzielenia TLC w komorze chromatograficznej ADC2 optymalizowano w zakresie:

- czasu ustalania określonej wilgotności z użyciem nasyconych roztworów soli nieorganicznych :
 - chlorku magnezu ($MgCl_2$) - 33%
 - tiocyjanianu potasu (KSCN) - 47%,
 - chlorku sodu (NaCl) - 75%
- czasu wysycania komory,
- czasu prekondycjonowania płytki w wysyczonej komorze chromatograficznej,
- dystansu rozwijania chromatogramu,
- czasu suszenia chromatogramu po rozwinięciu.

4.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

4.2.1. Kolumny chromatograficzne

Stosowano kolumny HPLC o różnych wymiarach, wypełnione różnymi adsorbentami o zmiennej wielkości ziaren.

4.2.1.1. Systemy jednowymiarowe

- Nova Pack (150 mm x 4 mm x 4 μm) (Waters)
- Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, USA)
- Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, USA)
- Discovery C-18 (150 mm x 2,1 mm x 3 μm) (SUPELCO, Bellefonte, USA) (2)

4.2.1.2. Systemy dwuwymiarowe

4.2.1.2.1. Kolumny stosowane w pierwszym wymiarze (¹D):

- Nucleodur Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm) (Macherey-Nagel, Düren, Germany)

4.2.1.2.2. Kolumny stosowane w drugim wymiarze (²D):

- Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, USA)
- Discovery HS C-18 (75 mm x 2,1 mm x 3 μm) (SUPELCO, Bellefonte, USA)

4.2.2. Elucja

Stosowano fazy ruchome, stanowiące mieszaniny rozpuszczalników organicznych i wody, z dodatkiem kwasów organicznych.

4.2.2.1. Fazy ruchome

- A. 0,1% roztwór TFA w wodzie (v/v)
- B. 0,1% roztwór TFA w mieszaninie metanol : woda (50:50, v/v)
- C. 0,1% roztwór TFA w mieszaninie metanol : woda (85:15, v/v)
- D. 0,1% roztwór TFA w mieszaninie metanol : acetonitryl : woda (330:40:80, v/v/v)
- E. 0,1% roztwór TFA w mieszaninie acetonitryl : woda (50:50, v/v)
- F. 0,1% roztwór TFA w mieszaninie metanol : woda : tetrahydrofuran (83:15:2, v/v/v)
- G. 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (v/v)
- H. 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu (v/v)
- I. 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w metanolu (v/v)

Fazy ruchome sporządzano wykorzystując rozpuszczalniki organiczne (stopień czystości HPLC) oraz wodę redestylowaną (analityczny stopień czystości), a następnie filtrowano przez sącziki membranowe o średnicy porów 0,22 μm (Supelco, USA).

4.2.2.2. Elucja izokratyczna

Stosowano mieszaniny rozpuszczalników E i A o różnym stężeniu E:

- S1 – 20% E w A+E
- S2 – 23% E w A+E
- S3 – 26% E w A+E
- S4 – 30% E w A+E
- S5 – 32% E w A+E
- S6 – 35% E w A+E
- S7 – 36% E w A+E
- S8 – 38% E w A+E
- S9 – 40% E w A+E
- S10 – 45% E w A+E
- S11 – 50% E w A+E
- S12 – 55% E w A+E

Stosowano mieszaniny rozpuszczalników G i I o różnym stężeniu I:

- S13 – 20% I w G+I
- S14 – 30% I w G+I

4.2.2.3. Programy elucji gradientowej

- **Program I - mieszanina rozpuszczalników A + E:**
0 min 16% E, 15 min 16% E, 15–35 min 16–24% E, 35–45 min 24% E, 45–60 min 24–50% E, 60–70 min 50–70% E
- **Program II - mieszanina rozpuszczalników B + A:**
0 min - 40% B, 5 min - 60% B, 5 min, B 15 min– 60% B
- **Program III - mieszanina rozpuszczalników B + A:**
0 min – 43% B, 5 min – 50% B, 27 min – 50% B, 30 min - 60% B, 40 min – 60% B, 50 min – 70% B, 60 min – 100% B
- **Program IV - mieszanina rozpuszczalników C + A:**
0 min - 40% C, 5 min - 50% C, 27 min - 50% C, 30 min - 60% C, 40 min - 60% C, 50 min - 100% C,
- **Program V - mieszanina rozpuszczalników F + A:**
0 min - 43% F, 5 min - 50% F, 15 min - 60% F, 30 min - 80% F, 40 min - 90% F
- **Program VI - mieszanina rozpuszczalników D + A:**
0 min - 43% D, 5 min - 50% D, 20 min - 60% D, 40 min - 80% D, 50 min - 90%,
- **Program VII - mieszanina rozpuszczalników E + A:**
0 min - 35% E, 5 min - 40% E, 30 min - 80% E, 40 min - 80% E, 50 min - 90% E
- **Program VIII - mieszanina rozpuszczalników D + A:**
0 min - 43% D, 1,2 min - 43% D, 12 min - 60% D, 35 min - 80% D, 47 min - 90% D
- **Program IX - mieszanina rozpuszczalników G + H:**
0 min - 20% H, 27 min - 33,5% H, 45 min - 100% H
- **Program X - mieszanina rozpuszczalników G + H:**
0 min - 20% H, 54 min - 33,5% H, 90 min - 100% H
- **Program XI - mieszanina rozpuszczalników G + H:**
0 min - 20% H, 40 min - 25% H, 45 min - 100% H

- **Program XII - mieszanina rozpuszczalników G + I:**
0 min - 20% I, 10 min - 20% I, 30 min - 30% I, 40 min - 30% I,
- **Program XIII - mieszanina rozpuszczalników G + I:**
0 min - 10% I, 10 min - 30% I, 40 min - 30% I,
- **Program XIV - mieszanina rozpuszczalników G + I:**
0 min - 10% I, 10 min - 25% I, 30 min - 25% I, 46 min - 30% I,
- **Program XV - mieszanina rozpuszczalników A+E:**
0 min - 0% E, 50 min - 50% E, 55 min - 100% E
- **Program XVI - mieszanina rozpuszczalników A+E:**
0 min - 0% E, 20 min - 18% E, 30 min - 25% E, 50 min - 50% E,
- **Program XVII - mieszanina rozpuszczalników A+E:**
0 min - 8% E, 20 min - 16% E, 30 min - 24% E, 50 min - 50% E,
- **Program XVIII - mieszanina rozpuszczalników A+E:**
0 min - 8% E, 10 min - 16% E, 20 min - 24% E, 40 min - 50% E,
- **Program XIX - mieszanina rozpuszczalników A+E:**
0 min - 16% E, 15 min - 16% E, 35 min - 24% E, 45 min - 50% E,
- **Program XX - mieszanina rozpuszczalników A+E:**
0 min - 16% E, 15 min - 16% E, 35 min - 24% E, 45 min - 24% E, 50 min - 50% E.

5. Materiał roślinny

Materiał roślinny stanowiły wysuszone nasiona kozieradki pospolitej (*Trigonella foenum-graecum*), otrzymane od trzech producentów krajowych (firmy zielarskie Lewandowski, Kawon, Flos) oraz wysuszone nasiona kozieradki pospolitej (*Trigonella foenum-graecum*) zebrane ze stanu naturalnego w południowo-zachodniej Turcji, w prowincji Antalya (nasiona T1), a także otrzymane z *Département des Sciences Naturelles et de la Vie école normal supérieure de Laghouat* (Algieria) (nasiona T2).

6. Ekstrakcja materiału roślinnego

6.1. Przygotowanie ekstraktów do analizy związków czynnych w materiale roślinnym

Sproszkowany materiał roślinny wytrawiano stosując: ekstrakcję w aparacie Soxhleta, ekstrakcję w automatycznym aparacie Soxhleta, macerację, ekstrakcję z użyciem mieszadła magnetycznego, sonikację, ekstrakcję wspomaganą mikrofalami (MAE) oraz przyspieszoną ekstrakcję rozpuszczalnikiem (ASE).

Badania w zakresie ekstrakcji surowca roślinnego z zastosowaniem metod MAE i ASE oraz automatycznego aparatu Soxhleta prowadzono we współpracy z Katedrą Roślin Warzywnych i Leczniczych Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

6.1.1. Przygotowanie ekstraktów do analizy saponin steroidowych i związków flawonoidowych

6.1.1.1. Ekstrakcja w aparacie Soxhleta

Sproszkowane nasiona kozieradki (10 g) umieszczono w gilzie ekstrakcyjnej i poddano trójstopniowej, wyczerpującej ekstrakcji w aparacie Soxhleta, stosując kolejno eter naftowy, chloroform i metanol (łączy czas ekstrakcji 100 godzin). Otrzymane wyciągi organiczne uzupełniono w kolbach miarowych do objętości: wyciąg eterowy - 25 ml; wyciąg chloroformowy - 25 ml; wyciąg metanolowy (SPPChE) - 100 ml.

6.1.1.2. Przygotowanie wyciągu do analizy saponin furostanowych

Sproszkowane nasiona kozieradki (5,0 g) ekstrahowano 70% etanolem (v/v) z użyciem mieszadła magnetycznego, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze 60°C (2 x 3 h; 2 x 100 ml). Otrzymany wyciąg F zliofilizowano i przeznaczono do analiz.

6.1.2. Przygotowanie wyciągów do oceny wydajności ekstrakcji C-glikozyloflawonów

Wyciągi otrzymane według procedur opisanych w punktach 6.1.2.1. - 6.1.2.6. zestawiono w tabeli 3.

6.1.2.1. Ekstrakcja w klasycznym aparacie Soxhleta

Sproszkowane nasiona kozieradki (5,0 g) ekstrahowano wyczerpująco według procedury opisanej w punkcie A 6.1.1.1. lub wytrawiano metanolem w aparacie Soxhleta przez 5 godzin.

6.1.2.2. Ekstrakcja z użyciem mieszadła magnetycznego

Sproszkowane nasiona kozieradki (5,0 g) ekstrahowano 50%, 70% oraz 100% metanolem (v/v) z użyciem mieszadła magnetycznego, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze pokojowej (maceracja) oraz w temperaturze 60°C (2 x 3 h; 2 x 100 ml). Wyciąg przesączono przez sączek bibułowy i zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem, doprowadzając do objętości 100 ml w kolbie miarowej

6.1.2.3. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami

Sproszkowane nasiona kozieradki (0,5 g) ekstrahowano jedno- lub trzykrotnie w zamkniętych, plastikowych probówkach w płuczce ultradźwiękowej z użyciem 50%, 70% oraz 100% metanolu (v/v) (10 ml). Czas ekstrakcji wynosił odpowiednio: 15 minut, 30 minut, 35 minut, 40 minut, 50 minut oraz 60 minut lub 3 x 10 minut. Otrzymane wyciągi sączono przez sączek bibułowy i doprowadzono do objętości 10 ml w kolbach miarowych.

6.1.2.4. Ekstrakcja w automatycznym aparacie Soxhleta

Sproszkowane nasiona kozieradki (5,0 g) poddano ekstrakcji metanolem w automatycznym aparacie Soxhleta (15 cykli ekstrakcji oraz 25 cykli ekstrakcji). Otrzymane wyciągi (AS-15 i AS-25, odpowiednio) przesączono przez sączonek bibułowy i doprowadzono do objętości 100 ml w kolbie miarowej.

6.1.2.5. Ekstrakcja wspomagana mikrofalami (MAE - *Microwave-Assisted Extraction*)

Sproszkowane nasiona kozieradki (5,0 g) poddano ekstrakcji 70% metanolem (v/v) w ekstraktorze mikrofalowym NEOS GR. Stosowano zmienny czas ekstrakcji (5 min, 10 min, 15 min i 30 min) oraz zmienną moc (50 W, 100 W i 150 W). Ekstrakcję prowadzono w temperaturze 71°C (temperatura wrzenia rozpuszczalnika w ekstraktorze).

6.1.2.6. Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE - *Accelerated Solvent Extraction*)

Sproszkowane nasiona kozieradki (5,0 g) umieszczono w celkach ekstrakcyjnych ze stali nierdzewnej o pojemności 10 ml, które dopełniono ziemią krzemkową (Dionex DE (P/N 062819)). Materiał roślinny poddano ekstrakcji 70% metanolem (v/v) oraz 100% metanolem, stosując zmienny czas ekstrakcji (5 min, 10 min, 15 min) oraz zmienną temperaturę (temp. 25°C, 60°C, 100°C). Objętość płukania rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym: *rinse vol.*=50% objętości celki ekstrakcyjnej. Otrzymane wyciągi sączone przez sączonek bibułowy do kolb miarowych, uzupełniając rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym do objętości 10 ml.

Wyciąg	Surowiec	Rozpuszczalnik	Ilość rozpuszczalnika	Temperatura	Czas
Ekstrakcja w aparacie Soxhleta					
SPPChE	5,0 g	metanol ^a	100 ml	80°C	25 h
SXb	5,0 g	metanol	100 ml	80°C	5 h
Ekstrakcja z użyciem mieszadła magnetycznego					
M1	5,0 g	metanol	2x100 ml	pokojowa ^d	2x3 h
M2	5,0 g	metanol	2x100 ml	60°C	2x3 h
M3	5,0 g	70% metanol	2x100 ml	pokojowa ^d	2x3 h
M4	5,0 g	70% metanol	2x100 ml	60°C	2x3 h
M5	5,0 g	50% metanol	2x100 ml	pokojowa ^d	2x3 h
M6	5,0 g	50% metanol	2x100 ml	60°C	2x3 h
Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami					
S1	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	15 min.
S2	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	15 min.
S3	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	15 min.
S4	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	30 min.
S5	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	30 min.
S6	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	30 min.
S7	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	35 min.
S8	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	35 min.
S9	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	35 min.
S10	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	40 min.
S11	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	40 min.
S12	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	40 min.

Wyciąg	Surowiec	Rozpuszczalnik	Ilość rozpuszczalnika	Temperatura	Czas
S13	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	50 min.
S14	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	50 min.
S15	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	50 min.
S16	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	60 min.
S17	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	60 min.
S18	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	60 min.
S19	0,5 g	50% metanol	3 x 10 ml	pokojowa ^b	3 x 10 min.
S20	0,5 g	70% metanol	3 x 10 ml	pokojowa ^b	3 x 10 min.

Ekstrakcja w automatycznym aparacie Soxhleta

AS-15	5,0 g	metanol	100 ml	80°C	15 cykli
AS-25	5,0 g	metanol	100 ml	80°C	25 cykli

Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE)

ASE-A	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	24°C	5 min.
ASE-B	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	24°C	2x5min.
ASE-C	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	24°C	4x5min.
ASE-D	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	60°C	5 min.
ASE-E	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	60°C	2x5min.
ASE-F	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	60°C	4x5min.
ASE-G	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	100°C	5 min.
ASE-H	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	100°C	2x5min.
ASE-I	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	100°C	4x5min.
ASE-J	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	125°C	5 min.
ASE-K	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	150°C	5 min.
ASE-L	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	200°C	5 min.
ASE-A _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	24°C	5 min.
ASE-B _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	24°C	2x5min.
ASE-C _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	24°C	4x5min.
ASE-D _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	60°C	5 min.
ASE-E _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	60°C	2x5min.
ASE-F _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	60°C	4x5min.

Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE) c.d.

ASE-G _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	100°C	5 min.
ASE-H _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	100°C	2x5min.
ASE-I _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	100°C	4x5min.

Ekstrakcja wspomagana mikrofalami (MAE)

Wyciąg	Ilość surowca	Rozpuszczalnik	Ilość rozpuszczalnika	Temperatura	Czas [min]	Moc [W]
MAE1	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	15	50
MAE2	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	15	100
MAE3	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	5	100
MAE4	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	10	50
MAE5	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	5	150
MAE6	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	10	100
MAE7	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	30	50
MAE8	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	10	150
MAE9	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	15	150

^a ekstrakcja surowca oczyszczonego wstępnie z użyciem rozpuszczalników organicznych (A.6.1.1.1.)

^b początkowa temperatura ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej

^c objętość celki ekstrakcyjnej, do której wprowadzany jest rozpuszczalnik pod ciśnieniem

^d maceracja

Tab.3. Zestawienie wyciągów przeznaczonych do badań wydajności ekstrakcji C-glikozyloflawonów w nasieniu kozieradki, otrzymanych w użyciu metod opisanych w punktach 6.1.2.1. - 6.1.2.6.

6.1.3. Przygotowanie prób do analizy diosgeniny po hydrolizie kwasowej

Wysuszone, sproszkowane nasiona kozieradki (2,0 g) poddano ekstrakcji i hydrolizie kwasowej zgodnie z procedurami opisanymi w literaturze [282, 554] oraz przedstawionymi poniżej. W badaniach wykorzystano surowiec nieoczyszczony oraz wstępnie odtłuszczony. Otrzymane hydrolizaty ekstrahowano za pomocą chloroformem (3 x 50 ml). Połączone wyciągi chloroformowe zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem i uzupełniano do objętości 10 ml w kolbach miarowych.

6.1.3.1 Oczyszczanie materiału roślinnego

Materiał roślinny w aparacie Soxhleta z użyciem eteru naftowego (nasiona SPP)(wyciąg SPPE1) lub chloroformu (nasiona SPCh)(wyciąg SPChE1) lub eteru naftowego, a następnie chloroformu (nasiona SPPCh).

6.1.3.2. Otrzymywanie wyciągów metanolowych

Nasiona SPP, SPCh oraz SPPCh poddano wyczerpującej ekstrakcji metanolem w aparacie Soxhleta (wyciągi: SPPE2, SPChE2, SPPChME, odpowiednio). Nieoczyszczone wstępnie nasiona kozieradki, nasiona SPP i SPCh ekstrahowano metanolem po chłodnicą zwrotną (50 ml, 2h, 80°C) (wyciągi: E, SPPE3, SPChE3, odpowiednio). Ponadto nieoczyszczone nasiona kozieradki ekstrahowano z użyciem ultradźwięków metanolem (10 ml; temp. 25°C) (10 minut, 20 minut lub 30 minut) (wyciągi UME1, UME2, UME3, odpowiednio).

6.1.3.3. Oczyszczanie wyciągów metanolowych

Wyciąg E oczyszczano wg zmodyfikowanej metody Kim i wsp. [282]: rozcieńczono wodą destylowaną do objętości 100 ml i wytrąsano z n-heksanem (3 x 50 ml). Pozostałość wodną (EAq) poddano hydrolizie kwasowej, a otrzymany hydrolizat (hydrolizat Eaq-H) przeznaczono do badań.

6.1.3.4. Hydroliza kwasowa saponin steroidowych

Hydrolizę kwasową prowadzono z użyciem roztworów kwasu siarkowego VI (H_2SO_4) o różnym stężeniu w roztworach różnych rozpuszczalników, mianowicie:

- 2M H_2SO_4 w wodzie (2M $H_2SO_{4\text{ aq}}$)
- 2,5M H_2SO_4 w wodzie (2,5M $H_2SO_{4\text{ aq}}$)
- 2M H_2SO_4 w 50% metanolu (2M $H_2SO_{4\ 50\%MeOH}$)
- 2M H_2SO_4 w 70% izopropanolu (2M $H_2SO_{4\ izo}$)
- 2,5M H_2SO_4 w etanolu (2,5M $H_2SO_{4\ EtOH}$)

Hydrolizie kwasowej poddano :

- nasiona nieoczyszczone (2,0 g) (hydrolizat H)
- nasiona wstępnie odtłuszczone: SPP i SPCh (hydrolizaty SPP-H and SPCh-H, odpowiednio)
- wyciągi metanolowe: ME, SPPME, SPChME, SPPChME, UME1, UME2, UME3 (hydrolizaty: ME-H, SPPME-H, SPChME-H, SPPChME-H, UME1-H, UME2-H, UME3-H, odpowiednio)
- wyciągi SPPE oraz SPChE (hydrolizaty SPPE-H i SPChE-H)
- pozostałość wodną po ekstrakcji heksanem (MEAq) (hydrolizat MEAq-H).

Otrzymane hydrolizaty odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Do suchej pozostałości dodano 2M H₂SO₄ _{aq} lub 2M H₂SO₄ _{50%MeOH} w stosunku 50 ml roztworu kwasu na 2,0 g surowca (lub odpowiednią masę wyciągu organicznego) i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 80°C przez 2 godziny.

Stosowano następujące modyfikacje warunków hydrolizy:

- A. 2,5M H₂SO₄ _{EtOH}, 80°C, 4 godziny [554]; nieoczyszczone nasiona kozieradki (hydrolizat HA)
- B. 2,5M H₂SO₄ _{aq}; 80°C, 4 godziny; wyciąg SPPChME (hydrolizat SPPChME-HB)
- C. 2M H₂SO₄ _{izo}; 80°C, 2 godziny; wyciąg SPPChME (hydrolizat SPPChME-HC).

7. Analiza chromatograficzna związków czynnych wyciągów z nasion kozieradki

7.1. Analiza chromatograficzna C-glikozyloflawonów

7.1.1. Analiza jakościowa metodą chromatografii cienkowarstwowej

7.1.1.1. Analiza metodą HPTLC

Analizy wykonano na płytkach HPTLC C-18w z zastosowaniem fazy ruchomej metanol:woda:kwas mrówkowy (40:60:6, v/v) (F₃₂). Badane ekstrakty oraz roztwory substancji wzorcowych наносzono mikrostrzykawką w formie plamy. Chromatogramy rozwijano na dystansie 8 cm, w temperaturze pokojowej. Analizy prowadzono w pionowej komorze chromatograficznej (10 cm x 11 cm x 6 cm) oraz komorze ADC2, w warunkach wysycenia komory parami fazy ruchomej (czas wysycania 10 minut).

7.1.1.2. Analiza jakościowa metodą dwukierunkowej TLC (2D TLC)

Rozdzielenia prowadzono w analitycznej komorze Chropa, na płytkach chromatograficznych pokrytych celulozą. Jako fazę ruchomą w pierwszym kierunku stosowano mieszaninę n-butanol: kwas octowy: woda (BAW) (3:1:1, v/v) (F₂₉) (czas wysycania komory 30 minut), natomiast w drugim kierunku, stosowano 15% kwas octowy (F₃₀) jako fazę ruchomą (czas wysycania komory 20 minut). Badany wyciąg (10 kropli) наносzono w formie plamy za pomocą kapilary. Otrzymane chromatogramy analizowano w świetle lampy UV przy długościach fali λ-254 nm i λ-366 nm.

7.1.2. Analiza jakościowa metodą HPLC-DAD-ESI-MS

7.1.2.1. Analiza jakościowa metodą jednowymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC-DAD (1D HPLC)

W analizie jakościowej C-glikozydów flawonowych zastosowano system opisany w punkcie A 3.2.1.1. Rozdzielenia prowadzono na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μm). Jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę rozpuszczalników A i E (A.4.2.2.) oraz elucję gradientową według programu I. Objętość dozowanej próbki wynosiła 1 μl ; natężenie przepływu fazy ruchomej 1 ml/min; temperatura kolumny t_{kol} 25°C. Detekcja UV przy długości fali λ -330 nm.

7.1.2.2. Analiza jakościowa metodą jednowymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC-DAD-ESI-MS (1D HPLC)

Stosowano system opisany w punkcie A 3.2.1.2. Rozdzielenia prowadzono na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm). Jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę rozpuszczalników A i E (A.4.2.2.) oraz elucję gradientową (program I). Objętość dozowanej próbki wynosiła 1 μl ; natężenie przepływu fazy ruchomej 0,25 ml/min; temperatura kolumny t_{kol} 25°C. Detekcja UV przy długości fali λ -330 nm.

Jako metodę zbierania danych chromatograficznych stosowano monitorowanie wybranych jonów SIM (*Selected Ion Monitoring*) w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Parametry pracy detektora masowego: napięcie jonizacji 1 kV, napięcie detektora 1,5 kV, temperatura DL 250°C, temperatura bloku grzewczego 200°C, przepływ gazu rozpylającego (N_2) 1,5 l/min, przepływ gazu suszącego (N_2) 10 l/min.

Związki identyfikowano na podstawie uzyskanych danych spektralnych DAD-ESI-MS, poprzez porównanie z substancjami wzorcowymi oraz w oparciu o dane literaturowe [143, 353, 435, 456, 574].

7.1.3. Analiza jakościowa metodą dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (2D LC)

7.1.3.1. Analiza metodą 2D-LC *heart-cutting off-line*

7.1.3.1.1. Rozdzielenie w pierwszym wymiarze (¹D)

Rozdzielenia prowadzono w wykorzystaniem systemu opisanego w punkcie A.3.2.2. na kolumnie Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm). Jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę rozpuszczalników A i B (A.4.2.2.) oraz elucję gradientową (program II). Objętość dozowanej próbki wynosiła 0,2 μl , natężenie przepływu 0,05 ml/min, temperatura kolumny t_{kol} 20°C. Detekcja UV przy długości fali λ -330 nm. Z kolumny ¹D zebrano 9 frakcji (Fr. I-IX). Poszczególne frakcje zbierano ręcznie do naczyń laboratoryjnych o poj. 1,5 ml, poprzez umieszczenie naczynka przy kapilarze wyprowadzającej eluat z detektora (średnica kapilary 0,13 mm, długość 20 cm). Uwzględniając parametry kapilary wylotowej oraz natężenie przepływu fazy ruchomej (0,05 ml/min), zbieranie każdej kolejnej frakcji rozpoczynano 2,5 sekundy po początku wstępującej

strony odpowiedniego piksu [344] na chromatogramie i kończono 2,5 sekundy po zakończeniu zstępującej strony odpowiedniego piksu [344] na chromatogramie. Każdą frakcję zbierano 16-krotnie, łącząc kolejne eluaty, przechowywano w szczelnie zamkniętych naczyniach laboratoryjnych i poddano analizie w drugim wymiarze w ciągu 24 godzin od zebrania.

7.1.3.1.2. Rozdzielenie w drugim wymiarze (²D)

Rozdzielenia składników Fr. I-IX prowadzono na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm). Objętość dozowanej próbki wynosiła 20 μl, natężenie przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min, temperatura kolumny t_{kol} 20°C. Detekcja UV przy długości fali λ-330 nm. Składniki poszczególnych frakcji rozdzielano w eksperymentalnie dobranych warunkach elucji izokratycznej, stosując fazy ruchome S1 - S12, opisane w punkcie A.4.2.2.2.

7.1.3.2. Analiza metodą 2D HPLC *comprehensive*

7.1.3.2.1. Optymalizacja separacji metodą *comprehensive off-line*

Rozdzielenia prowadzono w wykorzystaniem systemu opisanego w punkcie A 3.2.2. Separację w pierwszym wymiarze prowadzono na kolumnie Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm), przy natężeniu przepływu 0,017 ml/min. Jako fazy ruchome stosowano mieszaniny rozpuszczalników A-F oraz elucję gradientową (programy II - VIII). Z kolumny ¹D zebrano 12 frakcji (Fr. I'-XII'). Zbieranie frakcji prowadzono w warunkach opisanych w punkcie 7.1.3.1.1. Separację składników Fr. I'-XII' ²D Wykonano na kolumnie Discovery HS C18 (75 mm x 2,1 mm x 3 μm), przy natężeniu przepływu 2,3 ml/min, w warunkach elucji izokratycznej z wykorzystaniem faz ruchomych: S3 - frakcja I; S4 - frakcja II; S5 - frakcja III; S6 - frakcje IV, V, VII; S7 - frakcja VI; S8 - frakcje VIII i IX; S11 - frakcje X i XI; S12 - frakcja XII.

7.1.3.2.2. Analiza metodą *comprehensive on-line*

Wykorzystano system opisany w punkcie 3.2.2. Rozdzielenia w pierwszym wymiarze (¹D) prowadzono na kolumnie Nucleodur Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm). Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę rozpuszczalników A i D (A 4.2.2.) i elucję gradientową (program VIII). Czas próbkowania sygnału analogowego z detektora był stały i wynosił 0,32 sekundy. Natężenie przepływu wynosiła 0,017 ml/min, temperatura kolumny t_{kol} 20°C. Eluat z kolumny ¹D podzielono na 12 frakcji (Fr. I'-XII'). Stosowano zmienny czas modulacji, dobrany eksperymentalnie, który wynosił odpowiednio: frakcja I - 2,7 min; frakcja II - 2,1 min; frakcja III - 2,5 min; frakcja IV - 3,0 min; frakcja V - 1,5 min; frakcja VI - 2,6 min; frakcja VII - 2,3 min; frakcja VIII - 3,1 min; frakcja IX - 2,0 min; frakcja X - 2,1min; frakcja XI - 2,5 min; frakcja XII - 4,0 min. W drugim wymiarze zastosowano kolumnę Discovery HS C18 (75 mm x 2,1 mm x 3 μm). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina rozpuszczalników A i E (A 4.2.2.2). Składniki frakcji rozdzielane były w warunkach izokratycznych z wykorzystaniem faz ruchomych S3-S8 oraz S11-S12 (p. 4.2.2.): Faza ruchoma S3 - frakcja I; S4 - frakcja II; S5 - frakcja III; S6 - frakcje IV, V, VII; S7 - frakcja VI; S8 - frakcje VIII i IX; S11 - frakcje X i XI; S12 - frakcja XII. Czas

próbki: 0,2 sekundy, temperatura kolumny t_{kol} 20°C. Natężenie przepływu fazy ruchomej v 2,3 ml/min. Przed wprowadzeniem do detektora masowego strumień eluatu rozdzielono z użyciem dzielnika strumienia w stosunku 1:1.

7.1.4. Analiza ilościowa C-glikozyloflawonów

7.1.4.1. Analiza ilościowa sumy C-glikozyloflawonów metodą HPLC-DAD

Rozdzielenia prowadzono przy użyciu systemu opisanego w punkcie A 3.2.1.2 na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m) w warunkach elucji gradientowej według programu I. Objętość dozowanej próbki wynosiła 1 μ l; natężenie przepływu fazy ruchomej 0,25 ml/min; temperatura kolumny t_{kol} 25°C. Detekcja UV przy długości fali λ -330 nm. Zawartość C-glikozyloflawonów obliczono jako sumę w przeliczeniu na apigeninę i luteolinę.

7.1.4.1.1. Walidacja metody

Walidację przeprowadzono w zakresie wyznaczenia: liniowości, granicy wykrywalności, granicy oznaczalności, precyzji jedno- i międzydniowej (powtarzalności).

7.1.4.1.2. Sporządzenie krzywych regresji

Krzywe regresji wyznaczono w oparciu o analizę powierzchni pików na chromatogramie, odpowiadającym następującym stężeniom flawonów: apigeniny - 1,257; 4,4; 8,8; 22; 66; 110 μ g/ml oraz luteoliny - 0,714; 2,5; 5,0; 12,5; 37,5; 62,5 μ g/ml. Odpowiednie stężenia przygotowano, wykorzystując roztwory podstawowe flawonów o stężeniu 1 mg/ml. Równanie regresji i współczynnik korelacji podano w tabeli 5.

7.1.4.1.3. Określenie granicy wykrywalności (LOD) oraz granicy oznaczalności (LOQ)

Granice wykrywalności (LOD) oznaczono dla każdego związku na chromatogramie jako trzykrotność najwyższej wysokości pików szumu do pików wzorca (stosunek sygnał:szum=3). Granice oznaczalności dla każdego związku na chromatogramie wyznaczono jako stężenie substancji wzorcowej odpowiadające stosunkowi sygnał/szum=10. W obliczeniach uwzględniono największą powierzchnię pola pików szumu na chromatogramie (tab. 5)

7.1.4.1.4. Określenie powtarzalności

Powtarzalność metody wyznaczono jako względne odchylenie standardowe (% RSD) w oparciu o analizę powierzchni pików otrzymanych w wyniku 8-krotnego dozowania roztworów substancji wzorcowych: apigeniny (0,714 μ g/ml) oraz luteoliny (1,25 μ g/ml) (tab. 5).

7.1.4.1.5. Określenie precyzji

Precyzję jedno- i międzydniową wyznaczono na podstawie 7-krotnej analizy badanej próbki. Parametr wyznaczono dla każdego z pików związków na

chromatogramie HPLC i wyrażono jako względne odchylenie standardowe (% RSD) (tab. 5).

7.1.4.2. Analiza ilościowa C-glikozyloflawonów metodą LC-LC-DAD *on-line*

Analizy prowadzono przy użyciu systemu opisanego w punkcie A.3.2.2. Rozdzielenia w pierwszym wymiarze prowadzono na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 µm), stosując elucję gradientową według programu I (II.4.2.2.); natężenie przepływu 0,23 ml/min; t_{kol} 25°C; objętość dozowanej próbki 1 µl. Detekcja UV λ - 330 nm. W czasie t_R 28,2-30,7 min zebrano frakcję "Z", którą poddano dalszej separacji w drugim wymiarze, stosując kolumnę Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 µm) oraz elucję izokratyczną z użyciem fazy ruchomej S2 (4.2.2.2.); natężenie przepływu 1 ml/min; t_{kol} 20°C. Zawartość C-glikozyloflawonów obliczono w przeliczeniu na witeksynę, izowiteksynę, wiceninę-1, wiceninę-2, wiceninę-3, orientynę, izorientynę, szaftozyd i izoszaftozyd. Zawartość związków 1, 2, 5-15 oznaczono w oparciu o powierzchnię pików, otrzymanych na chromatogramie ¹D. Zawartość związków 3a, 3b, 4a, 4b oznaczono w oparciu o powierzchnię pików, otrzymanych na chromatogramie ²D.

7.1.4.2.1. Walidacja metody

Walidację przeprowadzono w oparciu o: liniowość, granicę wykrywalności, granicę oznaczalności oraz precyzję jedno- i międzydniową (powtarzalność).

7.1.4.2.2. Sporządzenie krzywych regresji.

Krzywe regresji wyznaczono w oparciu o analizę powierzchni pól pików, odpowiadających stężeniom związków wzorcowych, przedstawionym poniżej (tab.4.). Odpowiednie stężenia przygotowano, wykorzystując roztwory podstawowe C-glikozyloflawonów o stężeniu 1 mg/ml. Równania regresji oraz wartości współczynników korelacji przedstawiono w tabelach 11-A i 11-B.

Związek	Stężenie [µg/ml]					
witeksyna	5	10	17,77	50	88,88	400
izowiteksyna	10	210	33,33	00	166,66	600
orientyna	6,666	1,111	33,333	55,555	366,666	-
izoorientyna	7,33	14,66	24,44	73,33	122,22	366,66
wicenina-1	13,3	44,2	133	266	533	-
wicenina-2	7,33	14,66	24,44	73,33	122,22	-
wicenina-3	8,66	17,32	28,88	86,66	144,43	-
szaftozyd	5	10	40	250	500	-
izoszaftozyd	5	10	40	250	500	-

Tab.4. Stężenia związków wzorcowych uwzględnione przy wyznaczeniu krzywych regresji.

7.1.4.2.3. Określenie granicy wykrywalności (LOD) oraz granicy oznaczalności (LOQ)

Granice wykrywalności (LOD) oraz granicę oznaczalności (LOQ) wyznaczono jak w p. 7.1.4.3.

7.1.4.2.4. Określenie precyzji jedno- i międzydniowej (powtarzalności)

Zmienność metody wyrażono, jako precyzję jedno- i międzydniową. Precyzję jedno- i międzydniową wyznaczono na podstawie 7-krotnej analizy badanej próbki. Parametr wyznaczono dla każdego z pików związków na chromatogramie i wyrażono jako względne odchylenie standardowe (% RSD) (tab.11-A i 11-B.).

7.2. Analiza chromatograficzna izoflawonów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC-DAD-ESI-MS

Rozdzielenia prowadzono w warunkach opisanych w punktach 7.1.2.1. i 7.1.2.2. Detekcja UV przy długości fali λ -254 nm.

7.3. Analiza chromatograficzna saponin steroidowych

Stosowano chromatografię cienkowarstwową oraz wysokosprawną chromatografię cieczową z użyciem laserowego detektora światła rozproszonego (ELSD) oraz detektora mas (MS).

7.3.1. Analiza jakościowa metodą chromatografii cienkowarstwowej TLC i HPTLC

7.3.1.1. Analiza glikozydów furostanowych metodą TLC i HPTLC

7.3.1.1.1. Optymalizacja rozdzielania glikozydów furostanowych metodą TLC i HPTLC

Stosowano płytki chromatograficzne pokryte żelem krzemionkowym TLC: Kieselgel 60 F₂₅₄, Silica gel 60 ADAMANT F₂₅₄, Kieselgel 60 F₂₅₄ Lux Plate oraz żelem krzemionkowym HPTLC: Si 60 F₂₅₄, jak również żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami oktadecylowymi C-18 (TLC), C-18W F_{254S} (HPTLC) oraz modyfikowanym resztami diolowymi DIOL F_{254S}. Jako fazy ruchome stosowano fazy F₁, F₃₃-F₄₈, opisane w punkcie A.4.1.3. Do wizualizacji chromatogramów użyto odczynnik Ehrlicha (temp. 105°C, 3 minuty).

7.3.1.1.2. Rozdzielenia glikozydów furostanowych metodą dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (2D TLC i 2DHPTLC)

Stosowano płytki chromatograficzne pokryte żelem krzemionkowym: TLC Kieselgel 60 F₂₅₄ i HPTLC Si 60 F₂₅₄. Badany ekstrakt (3 μ l) nanoszono mikrostrzykawką w formie plamy. Jako fazy ruchome stosowano: mieszaninę

chloroform:metanol:kwasy mrówkowy (30:20:2, v/v/v) (F_1) w pierwszym kierunku oraz mieszaninę butanol:woda:kwasy octowy (50:10:10, v/v/v) (F_{45}) w drugim kierunku. Jako odczynnik wywołujący użyto odczynnik Ehrlicha (temp. 105°C, 3 minuty).

7.3.1.1.3. Rozdzielenie glikozydów furostanowych metodą HPTLC z gradientem fazy stacjonarnej

Rozdzielenia prowadzono dwuetapowo w pionowej komorze chromatograficznej. W pierwszym etapie stosowano płytki chromatograficzne HPTLC C-18w oraz fazę ruchomą metanol:woda:kwasy mrówkowy (70:30:1, v/v/v) (F_{37}). Dystans rozwijania: 5 cm; czas wysycania komory 10 minut. Otrzymaną płytkę TLC z rozwiniętym chromatogramem (Chromatogram 1) połączono z płytką HPTLC pokrytą żelazem krzemionkowym Si 60. Związki przenoszono na złożę HPTLC Si 60 z użyciem tzw. *Migas device* [372], a następnie rozwijano w fazie ruchomej chloroform:metanol:kwasy mrówkowy (30:20:2, v/v/v) (F_1) na dystansie 85 mm. Jako odczynnik wywołujący użyto odczynnik Ehrlicha (temp. 105°C, 3 minuty).

7.3.1.2. Optymalizacja rozdzielania TLC i HPTLC diosgeniny w hydrolizatach kwasowych

7.3.1.2.1. Dobór warunków analizy

Hydrolizaty analizowano stosując następujące płytki chromatograficzne: TLC Si 60_{F254}, HPTLC Si 60_{F254}, Lichrospher HPTLC Si 60_{F254}, TLC Si 60_{F254} Lux Plate, HPTLC C-18 and HPTLC Si 60 DIOL.

Jako fazy ruchome stosowano:

- dwuskładnikowe mieszaniny następujących rozpuszczalników: chloroformu, acetonu, cykloheksanu, eteru naftowego, izopropanolu, n-heksanu, n-heptanu, octanu etylu, butanolu, metanolu i wody (fazy ruchome F_2 , F_3 , F_{17} , $F_6 - F_{15}$, $F_{23} - F_{28}$);
- trójskładnikowe mieszaniny chloroformu, metanolu i wody (fazy ruchome oraz butanolu, kwasu octowego i wody (fazy ruchome F_4 , F_5 , F_{16})).
- pojedyncze rozpuszczalniki (100%) (fazy ruchome $F_{17} - F_{22}$)

Chromatogramy rozwijano w automatycznej komorze chromatograficznej ADC2 w warunkach kontrolowanej wilgotności (47%), stosując czas wysycania komory 10 minut oraz czas prekondukcjonowania płytki 5 minut. Do wizualizacji chromatogramów stosowano odczynniki wymienione w punkcie A 4.1.4.1.

7.3.2. Analiza ilościowa diosgeniny po hydrolizie kwasowej

Substancję wzorcową (1 mg/ml; 1 μ l) oraz badane hydrolizaty (1 μ l) nanoszono za pomocą półautomatycznego aplikatora AS 30 w formie pasm (5 mm) na płytki chromatograficzne HPTLC Si 60 F_{254} (20 cm x 5 cm). Aplikację próbki/wzorca wykonywano w pojedynczym cyklu z prędkością 15 s/ μ l. Odległość pasm od bocznej

krawędzi płytki - 10 mm; od dolnej krawędzi - 7 mm, pomiędzy pasmami wynosiła 5 mm. Jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę n-heptan:octan etylu (7:3, v/v) (F₂). Chromatogramy rozwijano na dystansie 45 mm w automatycznej komorze ADC2 (czas wysycenia: 10 minut; czas prekondukcjonowania płytki: 5 minut; wilgotność 47%; temp. 22±2°C). Po wysuszeniu chromatogramu (15 minut w komorze ADC2) badane związki poddano wizualizacji poprzez spryskanie zmodyfikowanym roztworem aldehydu anyżowego i ogrzewanie na płycie grzewczej (temp. 105 °C; 1 minuta).

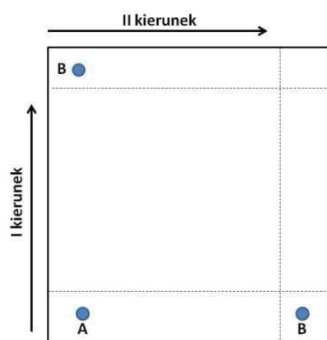
Analizę densytometryczną otrzymanych chromatogramów prowadzono przy użyciu densytometru CD 60 (Desaga, Niemcy) oraz oprogramowania ProQuant, 5 minut po derywatywacji. Stosowano skanowanie liniowe przy długości fali lampy UV: λ-426 nm oraz λ-590 nm. Parametry pracy densytometru: szerokość szczeliny - 4,0 mm, wysokość szczeliny - 0,02 mm; liczba pomiarów w punkcie - 4; rozdzielczość pomiaru - 0,025.

7.3.2.2. Walidacja metody

Walidację metody przeprowadzono w oparciu o oznaczenie: specyficzności, liniowości, precyzji instrumentalnej oraz precyzji jedno- i między-dniowej, granicy wykrywalności oraz granicy oznaczalności, powtarzalności i stałości. Parametry walidacyjne przedstawiono w tabeli 15.

7.3.2.2.1. Określenie specyficzności metody

Specyficzność metody określono poprzez przeprowadzenie analizy badanej próbki w obecności substancji wzorcowej metodą dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (2D HPTLC), stosując jako fazę stacjonarną złożę HPTLC Si 60 F₂₅₄. Jako fazę ruchomą w obu kierunkach stosowano mieszaninę n-heptan:octan etylu (7:3, v/v) (F₂). Badany hydrolyzат (1 μl) oraz diosgeninę (1 mg/ml; 1 μl) nanoszono w formie plamy, według schematu na ryc.14. Po rozwinięciu chromatogramu w pierwszym kierunku, płytkę wysuszyliśmy, a następnie poddano analizie w drugim kierunku, prostopadłym do pierwszego. Po ponownym wysuszeniu związki na chromatogramie wizualizowano zgodnie z warunkami opisanymi w punkcie 7.2.3. [188]



Ryc.14. Określenie specyficzności metody - schemat rozdzieleń przeprowadzonych metodą 2D HPTLC: A - badany ekstrakt, B -diosgenina. Warunki analizy opisano w p.7.3.2.2.1.

7.3.2.2.2. Określenie liniowości metody

Na płytkę chromatograficzną za pomocą półautomatycznego aplikatora AS 30 nanoszono roztwory wzorcowej diosgeniny o stężeniach 0,25 - 0,9 μg/ml,

przygotowane z roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/ml, odpowiadające ilości od 25 do 900 ng/pasmo. Każde stężenie wzorca nanoszono w trzech punktach startowych. Chromatogram rozwijano, wywoływano i analizowano densytometrycznie zgodnie z warunkami opisanymi w punkcie 7.3.2. Wyznaczono przedział stężenia diosgeniny, w którym obserwowano wprost proporcjonalną zależność pola powierzchni pasma diosgeniny na chromatogramie od naniesionej ilości związku (tab. 15).

7.3.2.2.3. Określenie granicy wykrywalności (LOD) i granicy oznaczalności (LOQ)

Roztwory diosgeniny w ilości 25 – 900 ng/pkt nanoszono na płytkę chromatograficzną za pomocą półautomatycznego aplikatora AS 30. Chromatogram rozwijano, wywoływano i analizowano densytometrycznie zgodnie z warunkami opisanymi w punkcie 7.3.2. Na podstawie densytogramów, wyznaczono granicę wykrywalności (LOD) oraz granicę oznaczalności (LOQ) dla analiz prowadzonych przy długościach fali λ -426 nm oraz λ -590 nm.

Granice wykrywalności (LOD) oznaczono jako trzykrotność najwyższej wysokości pików szumu (stosunek sygnał:szum=3). Dodatkowo wyznaczono praktyczną granicę wykrywalności, jako najniższe stężenie substancji wzorcowej, widoczne jako pik na densytogramie. Granicę oznaczalności jako stężenie substancji wzorcowej odpowiadające stosunkowi sygnał/szum=10 oraz dodatkowo jako jedną trzecią wartości granicy wykrywalności (1/3 LOD). W obliczeniach uwzględniono największą powierzchnię pola pików szumu na densytogramie (tab. 15).

7.3.2.2.4. Precyzja instrumentalna

Precyzję określono względem substancji wzorcowej – diosgeniny (1 mg/ml) oraz badanej próbki, nanoszonych w objętości 1 μ l. Rozdzielenia i analizę densytometryczną prowadzono zgodnie z warunkami opisanymi w 7.2.3. i 7.2.3.1.

Precyzję instrumentalną wyznaczono w oparciu o 9-krotny pomiar powierzchni pola pasma diosgeniny (roztwór podstawowy substancji wzorcowej) oraz 9-krotny pomiar pasma diosgeniny w badanym hydrolizacie. Otrzymane wyniki wyrażono jako współczynnik zmienności CV (tab. 15).

7.3.2.2.5. Powtarzalność (precyzja jedno- i między-dniowa)

Na płytkę chromatograficzną nanoszono badany hydrolizat (1 μ l) w trzech punktach startowych i przeprowadzono rozdzielenia oraz analizę densytometryczną zgodnie z warunkami opisanymi w 7.2.3. i 7.2.3.1. Powtarzalność jednodniową wyznaczono analizując trzy kolejne rozdzielenia chromatograficzne uzyskane w ciągu jednego dnia, natomiast powtarzalność między-dniową – poprzez analizę trzech rozdzieleni chromatograficznych uzyskanych w trzech kolejnych dniach. Otrzymane wyniki wyrażono jako współczynnik zmienności CV (tab. 15).

7.3.2.2.6. Stabilność metody

Stabilność metody (*ang. robustness*), czyli jej odporność na zmianę warunków, oceniono w oparciu o analizy przeprowadzone przez różnych analityków, z użyciem odczynników różnych producentów.

7.3.3. Analiza jakościowa metodami HPLC-ESI-MS i HPLC-ELSD

Stosowano system opisany w punkcie A 3.2.1.2 (HPLC-ESI-MS) oraz punkcie A 3.2.1.3. (HPLC-ELSD). Rozdzielenia prowadzono na dwóch połączonych szeregowo kolumnach Discovery C 18 (15 cm x 2,1 mm x 3 µm) w warunkach elucji gradientowej według programu XI. Objętość dozowanej próbki wynosiła 1 µl; natężenie przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min; temp. kolumny t_{kol} 20°C.

7.3.3.1. Analiza jakościowa metodą HPLC-ESI-MS

Analizy ESI-MS prowadzono w trybie jonów dodatnich oraz w trybie jonów ujemnych. Jako metodę zbierania danych chromatograficznych zastosowano monitorowanie wybranych jonów SIM (*Selected Ion Monitoring*). Parametry pracy detektora masowego: SCAN(+); SCAN(-) m/z 800-1600, napięcie jonizacji 4,5 kV, napięcie detektora 2 kV, temperatura DL 250°C, temperatura bloku grzewczego 200°C, przepływ gazu rozpylającego (N₂) 1,5 l/min, przepływ gazu suszącego (N₂) 8,5 l/min. Związki identyfikowano na podstawie porównania uzyskanych danych spektralnych DAD-ESI-MS z danymi literaturowymi [177, 253, 387, 416-418, 483, 605, 606].

7.3.3.2. Analiza jakościowa metodą HPLC-ELSD

Rozdzielenia prowadzono na kolumnie Discovery C 18 (150 mm x 2,1mm x 3 µm) oraz dwóch połączonych szeregowo kolumnach 2 x Discovery C-18 (15 cm x 2,1 mm x 3 µm), według programów elucji gradientowej IX i X, odpowiednio. Parametry pracy detektora ELSD: temperatura parownika 40°C, natężenie przepływu gazu nebulizującego (N₂) 1,8 L/min, wzmocnienie 4.

7.3.4. Analiza ilościowa metodą HPLC-ELSD

Stosowano system opisany w punkcie A 3.2.1.3. Rozdzielenia prowadzono w warunkach opisanych w punkcie 7.3.3.2. Zawartość saponin oznaczono w przeliczeniu na protodioscyne.

7.2.4.1. Walidacja metody

Metodę zwalidowano w oparciu o oznaczenie liniowości, granicy wykrywalności, granicy oznaczalności, powtarzalności, precyzji jedno- i międzydniowej (tab. 17).

7.2.4.1.1. Sporządzenie krzywej regresji

Krzywą regresji wyznaczono w oparciu o analizę pól powierzchni pików, odpowiadających następującym ilościom wzorcowej protodioscyny: 75; 120;

150; 240; 300; 600; 750; 200; 1500; 2400 µg/ml. Równanie regresji oraz wartość współczynnika korelacji podano w tabeli 17.

7.2.4.1.2. Określenie granicy wykrywalności (LOD) oraz granicy oznaczalności (LOQ)

Granice wykrywalności (LOD) oraz granicę oznaczalności (LOQ) wyznaczono jak w punkcie 7.1.4.3.

7.2.4.1.3. Określenie precyzji jednodniowej oraz międzydniowej (powtarzalności)

Zmienność metody wyrażono, jako precyzję jedno- i międzydniową. Precyzję jednodniową wyznaczono analizując 5 objętości dozowanej próbki, stanowiącej roztwór protodioscyny o stężeniu 0,24 mg/ml w ciągu jednego dnia. Precyzję międzydniową (powtarzalność) wyznaczono analizując 5 objętości dozowanej próbki tego samego roztworu protodioscyny o stężeniu 0,24 mg/l w ciągu pięciu kolejnych dni. Parametry wyrażono jako względne odchylenia standardowe (RSD,%) (tab. 17).

B. BADANIA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ

1. Badania aktywności cytotoksycznej

Badania prowadzono we współpracy z Katedrą Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

1.1. Odczynniki do hodowli linii komórkowych

- 0,4% roztwór błękitu tryptanu *Tryptan Blue* (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- dimetylosulfotlenek (DMSO) *cz.d.a.*, (POCH, Polska)
- L-glutamina (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- płodowa surowica bydlęca FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- MTT - bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolowy (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Roztwór MTT o stężeniu 5 mg/ml przygotowano w jałowym roztworze DPBS i przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C bez dostępu światła.

- trypsyna (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- penicylina G (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- streptomycyna (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- bufor DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) – buforowana sól fizjologiczna (Sigma-Aldrich, Niemcy)

1.2. Pożywki do hodowli

- **DMEM** (*Dulbeccos' Modified Eagles Medium*) (Sigma-Aldrich, Niemcy) uzupełniona płodową surowicą bydlęcą (FBS10%) oraz antybiotykami: penicyliną G (100 jedn./ml) i streptomycyną (100 µg/ml).
- **McCoy's 5A** (*McCoy's 5A Medium Modified*) (Sigma-Aldrich, Niemcy) uzupełniona płodową surowicą bydlęcą (FBS10%) oraz antybiotykami: penicyliną G (100 jedn./ml) i streptomycyną (100 µg/ml).
- **RPMI 1640** (Sigma-Aldrich, Niemcy) - uzupełniona płodową surowicą bydlęcą (FBS10%), 2 mM L-glutaminy oraz antybiotykami: penicyliną G (100 jedn./ml) i streptomycyną (100 µg/ml).

Pożywki przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C.

1.3. Linie komórkowe

W badaniach wykorzystano następujące linie komórek nowotworowych A - D, pochodzące z kolekcji Katedry i Zakładu Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (linia A), Katedry i Zakładu Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (linia D) oraz z kolekcji ATCC (*American Type Culture Collection*) (LGC Standards) (linie B i C):

- A. **HeLa** - ludzkie komórki raka szyjki macicy; komórki epitelialne, adherentne.
- B. **SKOV-3** - ludzkie komórki gruczolakoraka jajnika; komórki epitelialne, adherentne.
- C. **MOLT-4** - ludzkie komórki białaczki limfoblastycznej; komórki zawiesinowe.
- D. **HaCaT** - kontrolna linia nienowotworowych komórek ludzkich keratynocytów; komórki adherentne.

1.4. Hodowle komórkowe *in vitro*

Linie komórkowe HeLa oraz HaCaT hodowano w pożywce DMEM, linię komórkową SKOV-3 w pożywce McCoy's 5A, natomiast linię komórkową MOLT-4 - w pożywce RPMI 1640. Hodowle komórkowe inkubowano w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Komórki pasażowano co 2-3 dni:

- komórki adherentne (linie komórkowe HeLa, SKOV-3 i HaCaT): po usunięciu pożywki (ok. 7 ml), komórki przepłukiwano jałowym buforem DBPS, a następnie dodawano 4 ml trypsyny i inkubowano w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO₂ przez 5 minut w celu oderwania komórek od dna naczynia hodowlanego. Oderwane komórki usuwano (ok. 70% zawiesiny) z użyciem pompy aspiracyjnej (Biosan, Łotwa), a pozostałe uzupełniano 6 ml świeżej pożywki inkubowano.
- komórki zawiesinowe (linia komórkowa MOLT-4) - z użyciem pompy aspiracyjnej (Biosan, Łotwa), usuwano ok. 70% komórek, a pozostałe rozcieńczano świeżą pożywką w stosunku 1:4. Hodowle poddawano dalszej inkubacji. Stan i żywotność komórek oceniano pod mikroskopem świetlnym.

1.5. Przygotowanie wyciągów i frakcji z nasion kozieradki do badań

1.5.1. Przygotowanie wyciągów A i B

Sproszkowane nasiona kozieradki (5,0 g) ekstrahowano: 70% metanolem (v/v) na mieszadłe magnetycznym, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze 60°C (2 x 3 h; 2 x 100 ml) (wyciąg A) lub wodą w temperaturze 100°C przez 5 minut na mieszadłe magnetycznym, a następnie ekstrahowano przez 30 minut pod przykryciem (wyciąg B). Wyciągi przesączono przez sączi bibułowe i zliofilizowano.

Odpowiednią ilość liofilizatów rozpuszczano w DMSO, uzyskując roztwór wyciągu A o stężeniu 10 mg/ml, lub w wodzie dejonizowanej na łaźni wodnej (temp. 90°C), uzyskując roztwór wyciągu B o stężeniu wyjściowym 0,375 mg/ml. Otrzymane roztwory przechowywano w temperaturze 4°C.

1.5.2. Przygotowanie wyciągu C

Sproszkowane nasiona kozieradki (1,0 g) ekstrahowano metanolem z użyciem ultradźwięków (20 ml, 15 min), przesączono i uzupełniono w kolbie miarowej do objętości 25 ml.

1.5.3. Przygotowanie frakcji D

Nasiona kozieradki (250 g) poddano dwustopniowej, wyczerpującej ekstrakcji w aparacie Soxhleta, stosując kolejno chloroform i metanol. Wyciąg metanolowy (300 ml) zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 150 ml i umieszczono w lodówce (temp. 2-8°C) na 48 godzin. Wytrącony osad D zliofilizowano i przeznaczono do badań. Odpowiednią ilość liofilizatu rozpuszczono w metanolu, uzyskując roztwór o stężeniu wyjściowym 10 mg/ml, który przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C. Roztwór rozcieńczano metanolem do 3 mg/ml.

1.6. Przygotowanie roztworów badanych związków flawonoidowych, saponinowych i alkaloidowych do badań

Roztwory przygotowano poprzez rozpuszczenie 1 mg substancji wzorcowej w 1 ml metanolu. Do badań przeznaczono:

- C-glikozydy flawonowe - witeksynę, orientynę, izoorientynę, wiceninę-1, wiceninę-2, wiceninę-3,
- saponiny steroidowe (diosgeninę, jamogeninę, octan tigogeniny i esmilageninę)
- alkaloid trygonelinę.

1.7. Test oceny cytotoksyczności MTT

1.7.1. Określenie ilości komórek potrzebnej do eksperymentu

- **komórki adherentne (linie komórkowe HeLa, SKOV-3 i HaCaT)** - po usunięciu pożywki z naczynia hodowlanego, do komórek dodano 4 ml trypsyny i inkubowano

przez 5 minut w temperaturze 37°C i obecności 5% CO₂ w celu całkowitego oderwania komórek od dna naczynia. Do 4 ml zawiesiny komórkowej dodano 0,4% roztwór błękitu tryptanu w stosunku 1:1. Po 3 minutach zawartość probówki przenoszono na płytkę do zliczania komórek. Ilość komórek obliczano za pomocą licznika Countness (Automated Cell Counter, Life Technologies, USA).

Odpowiednią objętość zawiesiny komórek przenoszono do probówki z określoną objętością pożywki. Pozostałą zawiesinę komórek w naczyniu hodowlanym uzupełniano świeżą pożywką i poddano dalszej inkubacji. Przed wysianiem na płytkę, komórki wymieszano.

- **komórki zawieszinowe (linia komórkowa MOLT-4)** - do probówki pobrano określoną ilość zawiesiny komórkowej, natomiast do pozostałej części dodawano świeżą pożywkę i poddawano dalszej inkubacji. Do 4 ml zawiesiny komórkowej dodano 0,4% roztwór błękitu tryptanu w stosunku 1:1. Po 3 minutach zawartość probówki przenoszono na płytkę do zliczania komórek. Żywotność i ilość komórek określono za pomocą licznika Countness (Automated Cell Counter, Life Technologies, USA).

Odpowiednią objętość zawiesiny komórek, przeznaczoną do eksperymentu, przenoszono do probówki z określoną objętością pożywki. Pozostałą zawiesinę komórek w naczyniu hodowlanym uzupełniono świeżą pożywką i poddano dalszej inkubacji. Przed wysianiem na płytkę, komórki wymieszano

1.7.2. Przeprowadzenie testu MTT

Komórki wysiewano na płytkach 96-dołkowych (Starstedt) (objętość pojedynczego dołka 200 µl) w ilości: 200 µl/dołek (komórki adherentne) i 100 µl/dołek (komórki zawieszinowe), otrzymując następujące ilości komórek: 5000/dołek (komórki adherentne) i 50000/dołek (komórki zawieszinowe). Po wysianiu, komórki inkubowano przez 24 godziny (temp. 37°C; 5% CO₂). Następnie komórki traktowano przez 24 godziny badanymi roztworami w zakresach stężeń: 5-80 µg/ml (wyciąg A), 5-120 µg/ml (wyciąg B), 5-100 µg/ml (frakcja D) i 1-50 µg/ml (związki wzorcowe) (temp. 37°C; 5% CO₂; ilość powtórzeń dla każdego stężenia n=6). Po tym czasie usuwano pożywkę z roztworami badanych wyciągów i związków (w przypadku komórek zawieszinowych płytkę poddawano wirowaniu celem oddzielenia pożywki; 300 x g max.; 7 minut; temp. 8°C) i do każdego dołka dodano świeżą pożywkę (200 µl/dołek - komórki adherentne; 100 µl/dołek - komórki zawieszinowe) oraz roztwór MTT w DBPS (5 mg/ml) w celu otrzymania końcowego stężenia 0,5 mg/ml (20 µl - komórki adherentne; 10 µl - komórki zawieszinowe). Płytki poddano inkubacji (2-4 h; temp. 37 ; 5% CO₂).

Następnie pożywkę usuwano (w przypadku eksperymentu z komórkami zawieszinowymi - płytkę poddano wcześniej wirowaniu (4000 obr/min., 15 minut, temp. 17°C), a otrzymane kryształy formazanu rozpuszczono w DMSO (100 µl/dołek). Po wytrząśnięciu na wytrząsarce (10 minut), przeprowadzono pomiar absorbancji przy długości fali λ-570 nm oraz λ-650 nm. Jako kontrolę stosowano próbki nie poddane działaniu roztworów badanych wyciągów i związków: próba ślepa (pożywka+roztwarzalnik), kontrola wzrostu komórek (pożywka+komórki) i kontrola wpływu rozpuszczalnika o danym stężeniu na wzrost komórek (pożywka+komórki+roztwarzalnik)

1.8. Ocena cytotoksyczności metodą RealTimeXCelligence

W eksperymencie wykorzystano linie komórek adherentnych: HeLa, SKOV-3, HaCaT oraz system RealTimeXCELLigence (xCELLigence Real-Time Analyzer DP, AceaBiosciences, USA). Początkowo przeprowadzono autozerowanie systemu z płytką 16-dółkową E-plate (AceaBiosciences, USA) (objętość dołka 200 μ l) zawierającą 100 μ l samej pożywki [Etap 1]. Następnie wysiewano komórki w ilości 20000 komórek/dołek. Płytkę umieszczano w jednym z portów systemu i poddawano inkubacji (24 godziny; temp. 37°C; 5% CO₂) [Etap 2]. Po tym czasie pożywkę usuwano za pomocą pompy aspiracyjnej (Biosan, Łotwa), do każdego dołka dodano odpowiednią ilość świeżej pożywki oraz odpowiednie stężenia roztworów badanych wyciągów (w każdym eksperymencie dla każdego stężenia liczba powtórzeń n=2), a płytki poddano dalszej inkubacji (24 godziny; temp. 37°C; 5% CO₂) [Etap 3]. Otrzymane wyniki analizowano użyciem oprogramowania RTCA wersja 1.2.1

1.9. Badania mechanizmów aktywności cytotoksycznej i proapoptotycznej

1.9.1. Oznaczenia cytometryczne

1.9.1.1. Określenie populacji komórek apoptotycznych

Komórki HeLa oraz SKOV-3 wysiano w ilości 1x10⁵/dołek i inkubowano przez 24 h w inkubatorze (temp. 37°C, 5% CO₂). Następnie komórki inkubowano z roztworem frakcji w stężeniach 3-100 μ g/ml przez kolejne 24 h. Po zakończonej inkubacji, do każdego dołka płytki dodano (po usunięciu pożywki) roztwór trypsyny (100 μ l) i inkubowano przez 10 minut w inkubatorze. Komórki zebrano do probówek Eppendorf zawierających po 100 μ l kompletnej pożywki DMEM (w przypadku komórek HeLa) oraz McCoy (w przypadku komórek SKOV-3) i wirowano (200 x g max., 5 minut). Pożywkę z nad osadu komórek usunięto, a komórki zawieszono ponownie w 100 μ l kompletnej pożywki hodowlanej. Do przygotowanej zawiesiny komórek dodano po 100 μ l odczynnika Muse Annexin V & Dead Cell Reagent (zawierającego aneksynę V oraz 7-aminoaktynomycynę (7-AAD)). Zawiesinę komórek zmieszano i pozostawiono w temperaturze pokojowej, w ciemnym miejscu na 20 minut. Pomiar cytometryczny prowadzono przy użyciu analizatora Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, Niemcy). Określenie liczby komórek w poszczególnych populacjach (żywych, wczesno-, późnoapoptotycznych oraz martwych) wykonano przy użyciu oprogramowania Muse 1.4 Analysis.

1.9.1.2. Określenie potencjału mitochondrialnego w komórkach HeLa oraz SKOV-3

Komórki HeLa oraz SKOV-3 wysiano w ilości 1x10⁵/dołek i inkubowano przez 24 h w inkubatorze (temp. 37°C, 5% CO₂). Następnie komórki inkubowano z roztworami frakcji w stężeniach 3-100 μ g/ml przez kolejne 24 h. Po zakończonej

inkubacji, do każdego dołka płytki dodano (po usunięciu pożywki) roztwór trypsyny (100 μ l) i inkubowano przez 10 minut w inkubatorze. Komórki zebrano do probówek Eppendorf zawierających po 100 μ l kompletnej pożywki DMEM (w przypadku komórek HeLa) oraz McCoy (w przypadku komórek SKOV-3) i wirowano (200 x g max., 5 minut). Pożywkę z nad osadu komórek usunięto, a komórki zawieszono w 100 μ l 1 x stężonego buforu Assay Buffer (Merck Millipore). Następnie, do każdej zawiesiny komórek dodano po 95 μ l Muse MitoPotential Dye (rozcieńczonego uprzednio w stosunku 1:1000 (v/v) w 1 x stężonym buforze Assay Buffer). Komórki po zmieszaniu inkubowano w inkubatorze (temp. 37°C, 5% CO₂) przez 20 minut, a następnie dodano do nich po 5 μ l odczynnika Muse MitoPotential 7-AAD (Merck Millipore). Zawiesinę komórek inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie poddano analizie cytometrycznej przy użyciu analizatora Muse Cell Analyzer. Określenie liczby komórek w poszczególnych populacjach (żywych, żywych/depolaryzowanych, martwych oraz martwych/zdepolaryzowanych) wykonano przy użyciu oprogramowania Muse 1.4 Analysis.

1.9.1.3. Określenie aktywności kaspazy-3/7 w komórkach HeLa oraz SKOV-3

Komórki HeLa oraz SKOV-3 wysiano w ilości 1x10⁵/dołek i inkubowano przez 24 h w inkubatorze (temp. 37°C, 5% CO₂). Następnie komórki inkubowano z roztworem frakcji w stężeniach 3-100 μ g/ml przez kolejne 24 h. Po zakończonej inkubacji, do każdego dołka płytki dodano (po usunięciu pożywki) roztwór trypsyny (100 μ l) i inkubowano przez 10 minut w inkubatorze. Komórki zebrano do probówek Eppendorf zawierających po 100 μ l kompletnej pożywki DMEM (w przypadku komórek HeLa) oraz McCoy (w przypadku komórek SKOV-3) i wirowano (200 x g max., 5 minut). Pożywkę z nad osadu komórek usunięto, a komórki zawieszono w 50 μ l 1 x stężonego buforu Assay Buffer BA (Merck Millipore). Do każdej zawiesiny komórek dodano po 5 μ l odczynnika Muse Caspase-3/7 Reagent (rozcieńczonego uprzednio w stosunku 1:8 w 1 x stężonym buforze PBS). Komórki inkubowano w inkubatorze (temp. 37°C, 5% CO₂) przez 30 minut, a następnie dodano do nich po 150 μ l barwnika Muse Caspase 7-AAD (uprzednio rozcieńczonego 1:75 w 1 x stężonym buforze Assay Buffer BA). Komórki, po wymieszaniu, inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, w ciemnym miejscu. Określenie aktywności kaspazy-3/7 wyrażonej jako odsetek komórek wczesno- i późnoapoptotycznych w badanych zawiesinach wykonano przy użyciu analizatora Muse Cell Analyzer oraz oprogramowania Muse 1.4 Analysis.

1.9.1.4. Określenie stresu oksydacyjnego w komórkach HeLa oraz SKOV-3

Komórki HeLa oraz SKOV-3 wysiano w ilości 1x10⁵/dołek i inkubowano przez 24 h w inkubatorze (temp. 37°C, 5% CO₂). Następnie komórki inkubowano z roztworem frakcji w stężeniach 3-50 μ g/ml przez kolejne 24 h. Po zakończonej inkubacji, do każdego dołka płytki dodano (po usunięciu pożywki) roztwór trypsyny (100 μ l) i inkubowano przez 10 minut w inkubatorze. Komórki zebrano do probówek Eppendorf zawierających po 100 μ l kompletnej pożywki DMEM (w przypadku komórek HeLa) oraz McCoy (w przypadku komórek SKOV-3) i

wirowano (200 x g max, 5 minut). Pożywkę z nad osadu komórek usunięto, a komórki zawieszono w 100 µl 1 x stężonego buforu Assay Buffer. Z tak przygotowanej zawiesiny komórek pobrano 10 µl i przeniesiono do 190 µl odczynnika Muse Oxidative Stress Reagent (rozcieńczonego uprzednio 1:8000 w 1 x stężonym buforze Assay Buffer). Komórki, po zmieszaniu, inkubowano przez 30 minut w temp. 37°C, a następnie analizowano przy użyciu analizatora Muse Cell Analyzer oraz oprogramowania Muse 1.4 Analysis.

2. Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Badania przeprowadzono we współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W badaniach wykorzystano 7 szczepów bakterii Gram(-): *Helicobacter pylori* ATCC43504, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella enteritica* ATCC 13076, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris* NCTC 4635, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9077 oraz 1 szczepu bakterii Gram(+): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

2.1. Przygotowanie wyciągów do badań

Do badań przeznaczono wyciągi A - C oraz frakcję D, przygotowane według procedur opisanych w punkcie II.B.1.5.

2.2. Przygotowanie roztworów substancji wzorcowych do badań

Roztwory związków wzorcowych przygotowano poprzez rozpuszczenie 1mg substancji referencyjnej w 1 ml metanolu, z wyjątkiem trygoneliny, którą rozpuszczono w stosunku 2 mg/ml. Do badań przeznaczono C-glikozydy flawonowe (witeksynę, izowiteksynę, orientynę, wiceninę-2, wiceninę-3), saponiny steroidowe (diosgeninę, sarsasapogeninę, octan tigogeniny) oraz alkaloid trygonelinę.

2.3. Hodowle bakteryjne

Szczepy *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* hodowano w bulionie Mueller-Hinton (MH, Becton Dickinson) (48 godzin, temp. 37°C, warunki tlenowe). *Helicobacter pylori* hodowano na podłożu agarowym tryptozowo-sojowym (TSA, Becton Dickinson) a oznaczanie wrażliwości przeprowadzano na podłożu płynnym tryptozowo-sojowym w zestawie do hodowli GENbagmicroaer (BioMerieux) (72-96 godzin, temp. 37 °C, warunki mikroaerofilne).

2.4. Oznaczanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Hodowlę bakterii, prowadzoną na odpowiednim podłożu rozcieńczano do gęstości 10⁵ CFU/ml. Badane ekstrakty rozpuszczano w: 70% metanolu (Wyciąg A), 100% metanolu (Wyciąg C, substancje wzorcowe), wodzie dejonizowanej (Wyciąg B) i metanolu (frakcja D), a następnie rozcieńczano w postępie geometrycznym w 96-dółkowych płytkach mikrotitracyjnych (n=3). Następnie do każdej próby dodano zawiesinę bakterii i całość poddano inkubacji w warunkach wzrostowych, odpowiednich dla danego szczepu bakteryjnego. Wyjątek stanowił szczep *Helicobacter pylori*,

którego wyjściową zawiesinę sporządzono z kolonii bakterii hodowanych na podłożu TSA, inkubowanych w warunkach przeznaczonych do hodowli tej bakterii. W toku badań wyznaczono MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*), tj. najniższe stężenie badanego związku/ekstraktu, dla którego nie stwierdzono wizualnie wzrostu bakterii.

Dodatkowo, z każdego dołka bez wzrostu bakterii pobierano 100 μ l zawiesiny i przenoszono na płytki agarowe w celu określenia żywotności komórek. MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) było określano jako najniższe stężenie bakteriobójcze po 24 godzinach inkubacji.

III. BADANIA WŁASNE

A. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ FITOCHEMICZNYCH

Przeprowadzone badania fitochemiczne obejmowały opracowanie metod analizy jakościowej i ilościowej metabolitów wtórnych z grupy C-glikozydów flawonowych oraz saponin steroidowych w nasieniu kozieradki pospolitej (*T. foenum-graecum*) pochodzenia krajowego. W tym celu wykorzystano chromatografię cienkowarstwową (*Thin Layer Chromatography* - TLC, *High Performance Thin Layer Chromatography* - HPTLC) z analizą densytometryczną oraz wysokosprawną chromatografię cieczą (HPLC) w systemach jedno- i dwuwymiarowych, sprzężonych z detektorem UV, z matrycą diodową (DAD), laserowym detektorem światła rozproszonego (ELSD) oraz detektorem mas (MS). W separacji metodą dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (2D HPLC) zastosowano techniki *heart-cutting* (LC-LC) oraz *comprehensive* (LCxLC), zarówno w trybie *off-line* jak i *on-line*.

Dotychczas badano zespoły wymienionych grup związków czynnych głównie w surowcu pochodzenia azjatyckiego [253, 418, 456, 493, 574] i afrykańskiego [66, 113, 143, 202, 387] oraz zebrany z eksperymentalnej uprawy w południowej Francji [435] i wykorzystywanym w produkcji suplementów diety (firma *Aboca*) [435]. Natomiast brakuje doniesień o kompozycji metabolitów wtórnych nasion kozieradki pospolitej uprawianej w środkowo-wschodniej Europie, w tym w Polsce. Wzrastająca popularność nasienia kozieradki jako surowca leczniczego oraz składnika coraz większej liczby suplementów diety na krajowym rynku produktów roślinnych wymaga wyczerpującej wiedzy o kompozycji związków czynnych, warunkujących aktywność farmakologiczną. Potwierdzeniem wzrastającego zainteresowania nasionami kozieradki jako surowcem leczniczym jest znacząca liczba publikacji naukowych, które ukazały się w ostatnich 5 latach (2011-2016) - ponad 1000 prac.

Do badań przeznaczono surowiec otrzymany od trzech producentów krajowych, firm zielarskich: Lewandowski, Kawon oraz Flos. Analizie porównawczej poddano również nasiona *Trigonella foenum-graecum* pochodzenia azjatyckiego (Turcja, nasiona T1) oraz afrykańskiego (Algieria, nasiona T2).

Optymalizacja warunków ekstrakcji C-glikozyloflawonów z nasienia kozieradki

W celu opracowania wydajnej metody wytrawiania C-glikozydów flawonowych z badanej matrycy roślinnej optymalizowano warunki ekstrakcji wysuszonych, sproszkowanych nasion kozieradki pospolitej, otrzymanych z firmy zielarskiej Flos, z uwzględnieniem różnych technik ekstrakcji, mianowicie: ekstrakcji w klasycznym aparacie Soxhleta, ekstrakcji w automatycznym aparacie Soxhleta, maceracji, ekstrakcji z użyciem mieszadła magnetycznego, ekstrakcji z użyciem ultradźwięków (sonikację), ekstrakcji wspomaganej mikrofalami (MAE; MASE) oraz przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem (ASE).

Ekstrakcję C-glikozyloflawonów, jako związków polarnych, najczęściej przeprowadza się, stosując jako rozpuszczalniki alkohole (metanol, etanol) lub ich mieszaniny z wodą w różnym stosunku objętościowym [38, 98, 105, 143, 147, 148, 435, 456, 471, 587]. Niekiedy dla celów analizy C-glikozyloflawonów otrzymywane są wyciągi wodne [98, 531, 626].

W zakresie technik ekstrakcyjnych najczęściej stosowane są: bezpośrednia ekstrakcja surowca pod chłodnicą zwrotną lub z użyciem mieszadła magnetycznego lub ekstrakcja w aparacie Soxhleta [38, 98, 143, 355, 435, 456, 590]. W ostatnich latach w wytrawianiu C-glikozyloflawonów z materiału roślinnego wykorzystuje się również nowoczesne techniki ekstrakcyjne: ekstrakcja wspomagana mikrofalami (MAE) [90, 355], przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (ASE) [66, 143] oraz ekstrakcja z użyciem ultradźwięków (UE; USAE) [105, 148, 587].

Ocenę wydajności wytrawiania C-glikozyloflawonów prowadzono metodą 1D HPLC-DAD na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m), stosując elucję gradientową według programu I, który charakteryzował się wzrastającym stężeniem mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1; v/v/v) od 16% do 70% w 0,1% wodnym TFA w czasie t_G 70 minut (program elucji I, II.4.2.2.). Dla oznaczeń ilościowych opracowana metoda HPLC została zwalidowana w zakresie liniowości, granicy wykrywalności, granicy oznaczalności, precyzji jedno- i międzydniowej (tab. 5). Zawartość C-glikozydów flawonowych obliczono jako sumę, w przeliczeniu na apigeninę (związki 1, 2, 4a, 4b, 5, 6-13, 15 - glikozydy i glikozydoestry, pochodne apigeniny) i luteolinę (związki 3a, 3b oraz 14 - glikozydy i glikozydoestry, pochodne luteoliny).

Parametry walidacji				
		Apigenina		Luteolina
Liniiowość (krzywa regresji, współczynnik korelacji)		y = 6804,x - 6966, R ² = 0,998		y = 6238,x - 10996 R ² = 0,998
Powtarzalność [RSD, %]		4,16		3,29
Parametry walidacji				
Związek	Precyzja		Granica wykrywalności (LOD)	Granica oznaczalności (LOQ)
	jednodniowa [RSD, %]	międzydniowa [RSD, %]	[µg/ml]	[µg/ml]
1	3,28	3,22	1,67 ^a	5,0 ^a
2	1,53	1,42	1,1 ^a	3,3 ^a
3a+3b	1,53	1,40	1,1 ^b	3,3 ^b
4a+4b	1,36	1,27	0,95 ^a	3,3 ^a
5	2,01	1,88	1,1 ^a	3,3 ^a
6	0,45	0,33	0,73 ^a	2,2 ^a
7	1,65	1,12	0,73 ^a	2,2 ^a
8	0,82	0,54	0,73 ^a	2,2 ^a
9	0,97	0,74	0,73 ^a	2,2 ^a
10	2,42	3,01	0,73 ^a	2,2 ^a
11	8,18	9,78	0,73 ^a	2,2 ^a
12	1,13	1,18	0,73 ^a	1,1 ^a
13	1,55	1,47	0,22 ^a	0,66 ^a
14	0,76	0,80	0,23 ^b	0,7 ^b
15	1,06	1,12	0,22 ^a	0,66 ^a

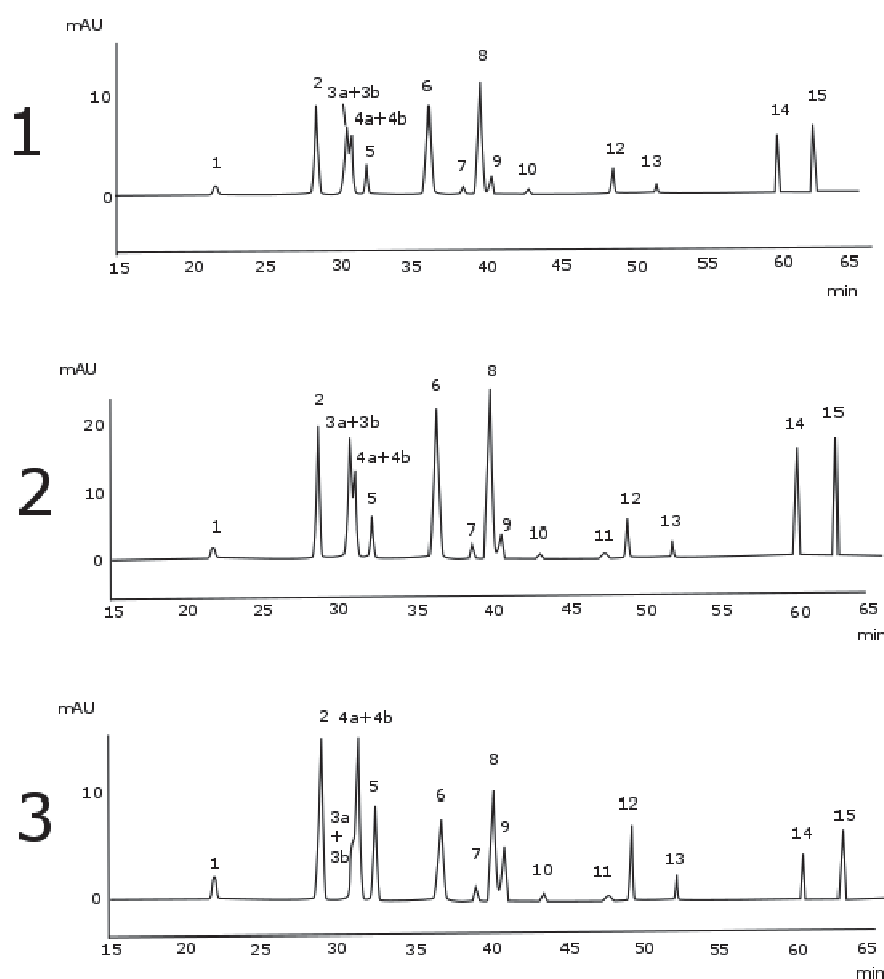
^a - w przeliczeniu na apigeninę

^b - w przeliczeniu na luteolinę

Tab.5. Parametry walidacji opracowanej metody 1D HPLC oznaczania ilościowego C-glikozyloflawonów w wyciągach metanolowych z nasion kozieradki pospolitej.

Obserwowano różnice w profilu i zawartości C-glikozydów flawonowych, w zależności od użytego rozpuszczalnika. 50% metanol słabo wytrawiał di-C-glikozydy flawonowe (związki 2, 4a+4b, 5, 7, 9-13) (ryc. 15, tab. 5), natomiast silniej mono-C-glukozydy (związki 3a+3b, 6, 8) (ryc. 15, tab. 5) oraz ich estry p-kumarowe (związki 14 i 15) (ryc. 15, tab. 5). Jednocześnie ekstrakcja prowadzona z użyciem 50% metanolu powodowała wytrawienie znacznej ilości polisacharydów, a otrzymane ekstrakty charakteryzowały się zwiększoną lepkością, co utrudniało ich sączenie i dalszą analizę. Frakcja polisacharydowa utrudniała wytrawianie pozostałych związków, stanowiąc rodzaj bariery mechanicznej dla rozpuszczalnika. W wyciągach otrzymanych z użyciem 100% metanolu (niezależnie od zastosowanej techniki ekstrakcji) dominującymi związkami są di-C-glikozydy flawonowe (związki 2, 4a+4b, 5, 7) (ryc. 15), natomiast w mniejszych ilościach występują mono-C-glukozyloflawony (związki 3a+3b, 6, 8) (ryc. 15) oraz ich estry p-kumarowe (związki 14 i 15) (ryc. 15, tab. 5). Przeprowadzone badania nad wydajnością ekstrakcji C-glikozyloflawonów wskazują, że 100% metanol dobrze ekstrahuje di-C-glikozydy flawonowe, ale jest słabszym ekstrahentem dla

mono-C-glikozyloflawonów oraz ich estrów (ryc. 15, tab. 5). Zastosowanie 70% metanolu jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego umożliwiło wydajne wytrawienie mono-C-glikozydów flawonowych (związki 3a+3b, 6, 8) i ich estrów (związki 14 i 15) przy poziomie ekstrakcji di-C-glikozyloflawonów porównywalnym do ekstrakcji z użyciem 100% metanolu (ryc. 15, tab. 5). Na podstawie otrzymanych wyników do dalszych badań nad wydajnością ekstrakcji użyto jako ekstrahentów 70% i 100% metanol.



Ryc.15. Chromatogramy 1D HPLC-DAD C-glikozydów flawonowych w wyciągach z nasion kozieradki, otrzymanych przy użyciu różnych rozpuszczalników ekstrakcyjnych : 1 - 50% metanol, 2 - 70% metanol, 3 - 100% metanol. Kolumna Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m), elucja gradientowa według programu I, UV λ -330 nm. Numery związków odpowiadają opisanym w tabeli 7.

Wyciąg	Ilość surowca	Rozpuszczalnik	Ilość rozpuszczalnika	Temperatura	Czas	Zawartość C-glikozyloflawonów
Ekstrakcja w aparacie Soxhleta						
SPPChE	5,0 g	metanol ^a	100 ml	80°C	25 h	341,690 ± 14,23
SXb	5,0 g	metanol	100 ml	80°C	5 h	149,806 ± 18,77
Ekstrakcja z użyciem mieszadła magnetycznego						
M1	5,0 g	metanol	2x100 ml	pokojowa ^d	2x3 h	140,51 ± 20,01
M2	5,0 g	metanol	2x100 ml	60°C	2x3 h	237,581 ± 18,27
M3	5,0 g	70% metanol	2x100 ml	pokojowa ^d	2x3 h	404,781 ± 17,35
M4	5,0 g	70% metanol	2x100 ml	60°C	2x3 h	557,082 ± 15,62
M5	5,0 g	50% metanol	2x100 ml	pokojowa ^d	2x3 h	118,612 ± 36,98
M6	5,0 g	50% metanol	2x100 ml	60°C	2x3 h	268,539 ± 27,49
Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami						
S1	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	15 min.	164,525 ± 13,13
S2	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	15 min.	128,964 ± 27,56
S3	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	15 min.	229,486 ± 25,31
S4	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	30 min.	198,564 ± 26,68
S5	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	30 min.	119,744 ± 16,98
S6	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	30 min.	354,195 ± 31,04
S7	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	35 min.	202,669 ± 23,24
S8	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	35 min.	125,632 ± 28,55
S9	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	35 min.	356,112 ± 20,54
S10	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	40 min.	242,656 ± 36,17
S11	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	40 min.	121,366 ± 17,58
S12	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	40 min.	362,412 ± 22,14
S13	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	50 min.	288,981 ± 35,96
S14	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	50 min.	126,119 ± 32,46
S15	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	50 min.	374,723 ± 31,45
S16	0,5 g	metanol	10 ml	pokojowa ^b	60 min.	324,765 ± 18,93
S17	0,5 g	50% metanol	10 ml	pokojowa ^b	60 min.	130,999 ± 23,78
S18	0,5 g	70% metanol	10 ml	pokojowa ^b	60 min.	382,881 ± 38,85
S19	0,5 g	50% metanol	3 x 10 ml	pokojowa ^b	3 x 10 min.	270,788 ± 42,59
S20	0,5 g	70% metanol	3 x 10 ml	pokojowa ^b	3 x 10 min.	548,174 ± 19,06
Ekstrakcja w automatycznym aparacie Soxhleta						
AS-15	5,0 g	metanol	100 ml	80°C	15 cykli	269,765 ± 25,58
AS-25	5,0 g	metanol	100 ml	80°C	25 cykli	339,473 ± 24,36

Tab.6. Zawartość C-glikozyloflawonów w wyciągach z nasion kozieradki pospolitej, otrzymanych z użyciem różnych procedur ekstrakcji badanego materiału roślinnego.

Wyciąg	Ilość surowca	Rozpuszczalnik	Ilość rozpuszczalnika	Temperatura	Czas	Zawartość C-glikozyloflawonów	
Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE)							
ASE-A	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	24°C	5 min.	93,152 ± 1,78	
ASE-B	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	24°C	2x5min.	84,614 ± 10,59	
ASE-C	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	24°C	4x5min.	85,381 ± 16,18	
ASE-D	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	60°C	5 min.	100,979 ± 12,39	
ASE-E	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	60°C	2x5min.	96,117 ± 13,59	
ASE-F	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	60°C	4x5min.	120,852 ± 12,80	
ASE-G	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	100°C	5 min.	93,505 ± 10,91	
ASE-H	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	100°C	2x5min.	133,391 ± 13,49	
ASE-I	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	100°C	4x5min.	144,632 ± 19,10	
ASE-J	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	125°C	5 min.	256,295 ± 12,01	
ASE-K	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	150°C	5 min.	70,051 ± 24,31	
ASE-L	0,5 g	70% metanol	10 ml ^c	200°C	5 min.	151,995 ± 19,14	
ASE-A _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	24°C	5 min.	43,172 ± 8,59	
ASE-B _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	24°C	2x5min.	103,018 ± 18,45	
ASE-C _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	24°C	4x5min.	129,613 ± 17,66	
ASE-D _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	60°C	5 min.	191,778 ± 20,59	
ASE-E _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	60°C	2x5min.	254,796 ± 18,55	
ASE-F _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	60°C	4x5min.	262,833 ± 16,03	
ASE-G _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	100°C	5 min.	336,543 ± 24,88	
ASE-H _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	100°C	2x5min.	305,978 ± 30,09	
ASE-I _{MeOH}	0,5 g	metanol	10 ml ^c	100°C	4x5min.	338,054 ± 28,36	
Ekstrakcja wspomaganą mikrofalami (MAE)							
Wyciąg	Ilość surowca	Rozpuszczalnik	Ilość rozpuszczalnika	Temperatura	Czas [min]	Moc [W]	Zawartość C-glikozyloflawonów
MAE1	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	15	50	363,28 ± 59,8
MAE2	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	15	100	X
MAE3	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	5	100	369,13 ± 16,87
MAE4	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	10	50	416,90 ± 72,62
MAE5	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	5	150	347,484 ± 18,485
MAE6	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	10	100	X
MAE7	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	30	50	383,688, ± 7,33
MAE8	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	10	150	X
MAE9	5,0 g	70% metanol	100 ml	71°C	15	150	X

Tab.6.c.d. Zawartość C-glikozyloflawonów w wyciągach z nasion kozieradki pospolitej, otrzymanych z użyciem różnych procedur ekstrakcji badanego materiału roślinnego.

W niniejszej pracy wytrawianie materiału roślinnego w aparacie Soxhletha metanolem przeprowadzono z zastosowaniem dwóch procedur ekstrakcyjnych (II.6.1.1.1.). Analiza ilościowa 1D HPLC-DAD wykazała, że wyczerpująca ekstrakcja w aparacie Soxhletha (wyciąg SPPChE) umożliwia wytrawienie znacznie większej ilości badanych związków ($341,690 \pm 4,23 \mu\text{g/ml}$) w porównaniu do ekstrakcji 5-godzinnej (wyciąg SXb - $149,806 \pm 18,77 \mu\text{g/ml}$) (tab. 6). W analizie fitochemicznej ekstrakcja w aparacie Soxhletha stanowi standardową procedurę analityczną, której popularność związana jest ze stosunkowo niskim kosztem, wykorzystaniem nieskomplikowanej aparatury i wysoką wydajnością [341, 342]. W klasycznym aparacie Soxhletha ekstrakcja prowadzona jest zazwyczaj do całkowitego wytrawienia surowca, a punkt końcowy procesu wyznacza obserwowany brak zabarwienia rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, bądź negatywny wyniku próby na obecność wytrawianych związków w ostatniej porcji ekstraktu. Wadą jest jednak zużywanie znacznych objętości rozpuszczalników ekstrakcyjnych [341]. Alternatywą dla klasycznego aparatu Soxhletha jest automatyczny aparat Soxhletha (ryc. 16), w którym punkt końcowy ekstrakcji stanowi przeprowadzenie zaprogramowanej liczby cykli ekstrakcyjnych, przy czym jeden cykl obejmuje ekstrakcję materiału roślinnego skraplającymi się parami rozpuszczalnika wypełniającego gilzę ekstrakcyjną i przeniesienie otrzymanej porcji wyciągu do odbieralnika. Dodatkowo po wykonaniu odpowiedniej liczby cykli ekstrakcyjnych, zebrany w odbieralniku wyciąg może zostać zagęszczony/odparowany do sucha w rezultacie bezpośredniego ogrzewania odbieralnika [341, 342]. Eliminuje to dodatkowe, czasochłonne etapy procedury laboratoryjnej, takie jak przenoszenie otrzymanego wyciągu do kolby okrągłodennej, a następnie zagęszczanie z użyciem wyparki próżniowej, co może niekiedy skutkować niską powtarzalnością procesu.



Ryc. 16. Automatyczny aparat Soxhletha B-811 (BÜCHI Labortechnik AG, Szwajcaria).

W niniejszej pracy wytrawianie surowca w automatycznym aparacie Soxhleta prowadzono w oparciu o zróżnicowaną ilość cykli (15 - wyciąg AS-15 lub 25 - wyciąg AS-25). Wykazano, że zawartość C-glikozyloflawonów w wyciągu uzyskanym w 25-cyklach ekstrakcyjnych (wyciąg AS-25; $339,473 \pm 24,36 \mu\text{g/ml}$) jest zbliżona do zawartości w wyciągu uzyskanym przez wyczerpującą ekstrakcję w klasycznym aparacie Soxhleta (wyciąg SPPChE; $341,690 \pm 14,23 \mu\text{g/ml}$). Natomiast ilość badanych związków wytrawiona podczas 15 cykli ekstrakcji w automatycznym aparacie Soxhleta jest znacznie niższa i wynosi $269,765 \pm 25,58 \mu\text{g/ml}$ (wyciąg AS-15) (tab. 6). Wyciąg AS-25 uzyskano w wyniku ok. 9 godzin wytrawiania, jakkolwiek użyty do ekstrakcji metanol nadal wykazywał żółte zabarwienie w końcowym punkcie procesu. Otrzymanie wyciągu SPPChE wymagało ok. 35 godzin ekstrakcji i prowadzone było do uzyskania bezbarwnego wyciągu (metanol). Z drugiej strony należy podkreślić, że wyciąg SPPChE otrzymano z wstępnie odtłuszczonego i oczyszczonego surowca przy użyciu eteru naftowego i chloroformu (II.6.1.1.1), co skutkowało znacznym obniżeniem zawartości związków balastowych, korzystnym dla utrzymania sprawności detektora mas oraz wydłużenia czasu życia kolumn HPLC.

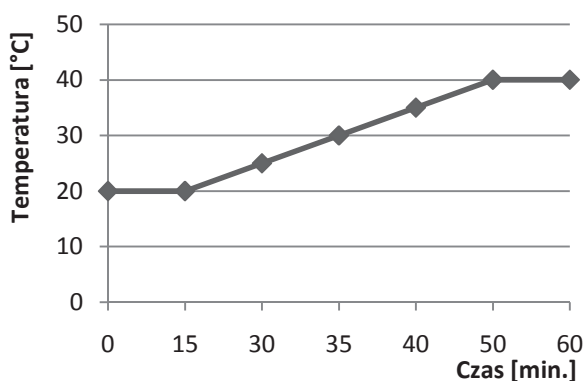
Ekstrakcję surowca z **użyciem mieszadła magnetycznego** prowadzono w temperaturze pokojowej (maceracja) lub w temperaturze 60°C przy użyciu różnych rozpuszczalników (II.6.1.2.2., tab. 6). Podwyższenie temperatury ekstrakcji do 60°C (wyciągi M2, M4, M6), skutkowało wytrawieniem większej ilości badanych związków, bez zmian w ich profilu, w porównaniu do ekstrakcji w temperaturze pokojowej (wyciągi M1, M2, M5). Spośród wyciągów otrzymanych tą techniką, najwyższą zawartością C-glikozyloflawonów charakteryzował się ekstrakt M4, otrzymany w temperaturze 60°C z użyciem 70% metanolu ($557,082 \pm 15,62 \mu\text{g/ml}$) (tab. 6). Jednocześnie, biorąc pod uwagę tradycyjne techniki ekstrakcji, procedura otrzymania wyciągu M4 zapewniła wytrawienie największej ilości badanych związków w porównaniu z maceracją oraz ekstrakcją w aparacie Soxhleta. Natomiast maceracja, tradycyjnie stosowana w przygotowywaniu przetworów z *Foenugraeci Semen* [273], nie zapewnia wytrawienia maksymalnej ilości C-glikozydów flawonowych.

W procesie **ekstrakcji z użyciem ultradźwięków** (sonikacja; UE - *ultrasound extraction*; UAE - *ultrasound-assisted extraction*) wykorzystano zmienny czas procesu oraz różne rozpuszczalniki. Sonikację prowadzono jedno- lub trzykrotnie (II.6.1.2.3.) (tab. 6) poprzez umieszczenie naczyń ekstrakcyjnych w płuczce ultradźwiękowej, w

temperaturze pokojowej. Ponieważ w trakcie procesu wytrawiania temperatura wzrastała, dlatego jej ponownego pomiaru dokonywano również na etapie końcowym procesu (ryc. 17). Obserwowano, że w ciągu pierwszych 15 minut ekstrakcji temperatura nie ulegała zmianie, natomiast wydłużenie czasu procesu do 50 minut powodowało liniowy wzrost temperatury do 40°C. Natomiast w 60-ej minucie nie odnotowano dalszego jej wzrostu.

Sonikacja uważana jest za szybką i wydajną metodę wytrawiania, w której proces ekstrakcji trwa zazwyczaj od 10 do 60 minut [375, 518]. Wytrawianie związków czynnych wspomagane jest przez fale ultradźwiękowe, które rozchodząc się w cieczy, powodują zjawisko jej sprężania i rozprężania, skutkujące zmianami ciśnienia, występowaniem zjawiska kawitacji, tarcia na powierzchniach międzyfazowych oraz absorbowania energii fali akustycznej, co prowadzi do wytwarzania ciepła [375, 518].

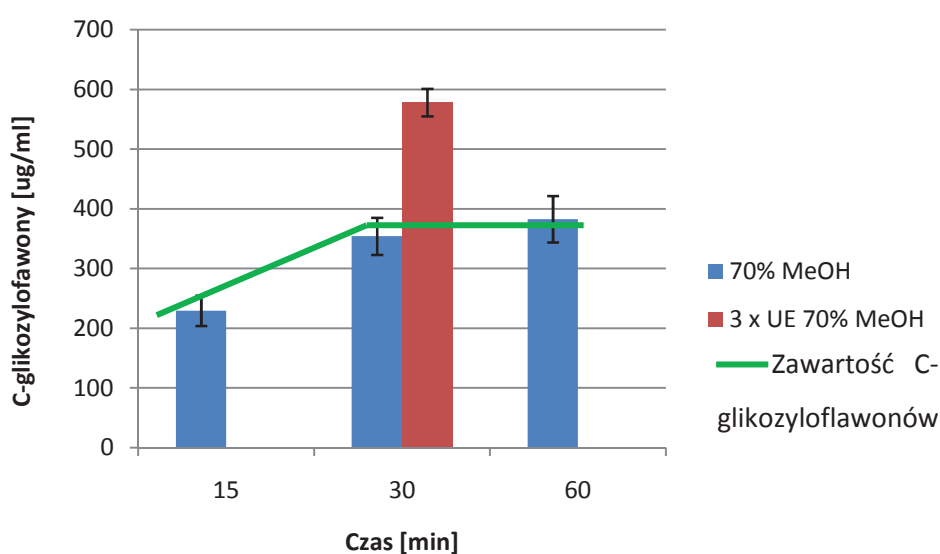
Podobnie jak w przypadku ekstrakcji z użyciem mieszadła magnetycznego, wzrost temperatury (będący skutkiem wydłużenia czasu ekstrakcji) powodował wytrawienie większej ilości badanych związków. Znanym jest fakt, że podwyższenie temperatury dodatkowo nasila zjawisko kawitacji i skutkuje zwiększeniem wydajności ekstrakcji [335].



Ryc.17. Zmiany temperatury ekstrakcji z użyciem ultradźwięków w zależności od czasu trwania procesu.

Wraz z wydłużeniem czasu wytrawiania surowca 70% metanolem oraz 100% metanolem od 15 do 60 minut, w otrzymanych wyciągach wzrastało stężenie C-glikozyloflawonów. Obserwowano wzrost intensywności pików, szczególnie mono-C-glukozydów i ich estrów p-kumarowych na chromatogramach HPLC-DAD wyciągów otrzymanych z użyciem 70% metanolu w różnym czasie (15 minut - wyciąg S3, 30 minut - wyciąg S6 i 60 minut - wyciąg S18), co skutkowało zmianą profilu badanego

zespołu C-glikozyloflawonów. Odnotowano zmianę proporcji między ilością wytrawionych di-C-glikozydów i mono-C-glukozydów oraz ich estrami. Zależności takiej nie obserwowano dla wyciągów otrzymanych z użyciem 50% metanolu, których profil nie zmieniał się zależnie od wydłużenia czasu i wzrostu temperatury ekstrakcji. Spośród wyciągów otrzymanych techniką jednokrotnej sonikacji, najwyższą zawartością C-glikozyloflawonów ($382,88 \pm 38,85 \mu\text{g/ml}$) charakteryzował się ekstrakt, otrzymany z użyciem 70% metanolu w czasie 60 minut (ekstrakt S18) (tab. 6). Jednak analiza statystyczna (Anova) wyników oznaczonej zawartości w wyciągach otrzymanych w czasie 15, 30 i 60 minut - S3, S6, S18, odpowiednio, wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy wyciągiem S3 a wyciągami S6 i S18. Oznacza to, że ilość C-glikozydów flawonowych, wytrawionych z użyciem ultradźwięków i 70% metanolu wzrasta w wyciągu do 30. minuty ekstrakcji (wyciąg S6) i nie ulega istotnym zmianom wraz z dalszym wydłużeniem procesu (do 60 minut - wyciąg S18) (ryc. 18). Zastosowanie trzykrotnej sonikacji 70% metanolem (wyciąg S20) skutkowało zwiększeniem sumy wytrawionych C-glikozyloflawonów do $548,174 \pm 19,06 \mu\text{g/ml}$, a otrzymany wynik był statystycznie istotnie różny od wyników uzyskanych dla wyciągów S3, S6 i S18, otrzymanych tym samym rozpuszczalnikiem w czasie: 15 minut, 30 minut i 60 minut, odpowiednio (tab. 6). Podczas trzykrotnej sonikacji, każdorazowo przed wykonaniem kolejnego cyklu ekstrakcji kontrolowano temperaturę wody w płuczce ultradźwiękowej i utrzymywała się ona na poziomie temperatury pokojowej. Dlatego na wydajność ekstrakcji nie miała wpływu temperatura, lecz jedynie czas trwania procesu oraz ilość użytego rozpuszczalnika w stosunku do surowca.



Ryc.18. Zawartości C-glikozydów flawonowych w wyciągach z nasion kozieradki pospolitej, otrzymanych z użyciem sonikacji 70% metanolem w zależności od czasu procesu.

Kolejny etap prac nad optymalizacją ekstrakcji C-glikozyloflawonów z nasienia kozieradki stanowiła ekstrakcja wspomagana mikrofalami (MAE) oraz przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (ASE). Na podstawie wyników otrzymanych podczas eksperymentów, z dalszych badań wykluczono ekstrakcję 50% metanolem.

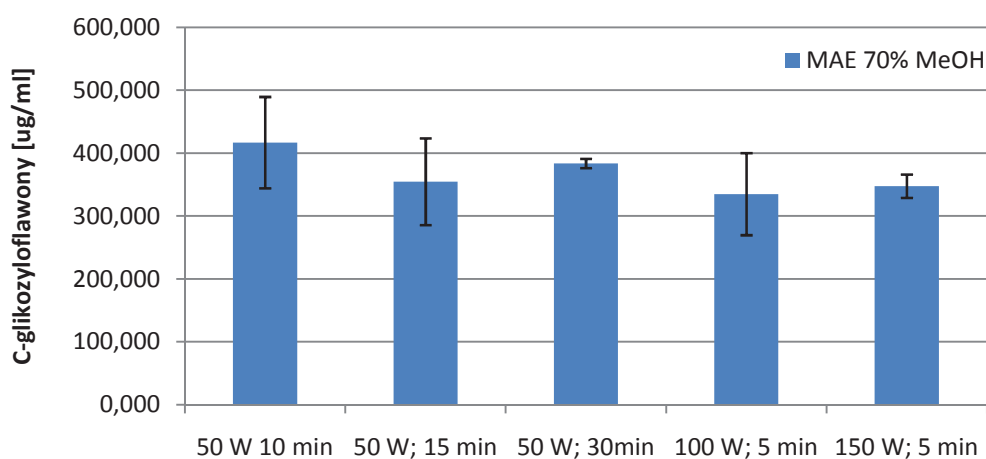
Ekstrakcję wspomaganą mikrofalami (*microwave-assisted extraction - MAE; microwave-assisted solvent extraction - MASE*) prowadzono z użyciem 70% metanolu. Wybór rozpuszczalnika ekstrakcyjnego warunkowany był zarówno wynikami wcześniejszych eksperymentów, jak i mechanizmem wytrawiania związków czynnych z materiału roślinnego z użyciem promieniowania mikrofalowego. W mechanizmie ekstrakcji techniką MAE wykorzystywana jest zdolność cząsteczek substancji do bezpośredniej absorpcji promieniowania mikrofalowego, które wywołuje ruch jonów w polu elektromagnetycznym [376, 455, 518, 558]. W ekstrakcji MAE wskazanym jest użycie rozpuszczalników polarnych, tworzących dipole i absorbujących promieniowanie mikrofalowe [376, 455, 558]. Ekstrakcja prowadzona jest w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, a maksymalny odzysk analitów uzyskiwany jest zazwyczaj po 5-20 minutach wytrawiania [376, 558].



Ryc.19. Ekstraktor mikrofalowy NEOS GR (Milestone, Włochy)

W niniejszej pracy w badaniach zastosowano zmienny czas ekstrakcji oraz zmienną moc (50 W, 100 W oraz 150 W). Spośród wyciągów otrzymanych techniką MAE najwyższą zawartością C-glikozyloflawonów charakteryzował się wyciąg MAE4

($416,90 \pm 72,62 \mu\text{g/ml}$), uzyskany w wyniku 10 minutowej ekstrakcji przy mocy 50 W (tab. 6). Jednak ekstrakcja wspomaganą mikrofalami o mocy 50 W w ciągu 10 minut (wyciąg MAE4) lub 15 minut (wyciąg MAE1) charakteryzowała niska powtarzalność, wyrażona wysoką wartością odchylenia standardowego (SD) otrzymanych wyników (tab. 6). Analiza statystyczna (Anova) wykazała brak istotnych różnic w zawartości C-glikozyloflawonów w zależności od zastosowanych procedur ekstrakcji MAE - wyciągi MAE1, MAE3 - MAE5, MAE7, otrzymane z użyciem różnej mocy 50W (MAE1, MAE4, MAE7), 100W (MAE3) lub 150W (MAE5) w czasie 5 minut (MAE3, MAE5), 10 minut (MAE4), 15 minut (MAE1) lub 30 minut (MAE7) (tab. 6). Stwierdzono, że charakteryzuje je zbliżona wydajność (ryc. 20). Podobnie jak w przypadku techniki ASE, zawartość badanych związków w ekstraktach otrzymanych w wyniku wytrawiania wspomaganego mikrofalami przy użyciu 70% metanolu była niższa w porównaniu do wyciągów otrzymanych z użyciem mieszadła magnetycznego (wyciąg M4) lub ultradźwięków (wyciąg S20) (tab. 6). Dodatkowo ekstrakcja przy mocy 100 W lub 150 W możliwa była jedynie w czasie 5 minut. Wydłużenie czasu procesu do 10 minut (wyciągi MAE6 i MAE9, odpowiednio) lub 15 minut (wyciągi MAE2 i MAE9, odpowiednio) skutkowało nadmiernym wrzeniem mieszaniny ekstrakcyjnej i jej "wyrzucaniem" do chłodnicy zwrotnej. Mieszanina metanolu i wody absorbuje promieniowanie mikrofalowe i ulega szybkiemu nagrzewaniu, dlatego wytrawianie matrycy w temperaturze powyżej temperatury wrzenia musi odbywać się przy użyciu specjalnej aparatury, w układzie zamkniętym [518].



Ryc.20. Zawartość C-glikozyloflawonów w wyciągach otrzymanych z użyciem różnych procedur ekstrakcji wspomaganą mikrofalami.

Wytrawianie surowca z użyciem **przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem (ASE)** prowadzono stosując metanol oraz 70% metanol. Zastosowano zmienny czas, temperaturę oraz ilość cykli płukania świeżym rozpuszczalnikiem.

ASE (ang. *accelerated solvent extraction lub pressurized fluid extraction* - PFE lub *pressurized liquid extraction* - PLE) jest nowoczesną techniką ekstrakcyjną, w której podwyższona temperatura oraz wysokie ciśnienie umożliwiają ekstrakcję materiału roślinnego w stosunkowo krótkim czasie [518, 545]. W ekstraktorze ASE 350 wytrawianie prowadzone jest pod ciśnieniem 10,4 MPa (1500psi) w wykonanych ze stali nierdzewnej celkach i składa się z następujących etapów: doprowadzenia pieca do wymaganej temperatury, załadowania celki ekstrakcyjnej do pieca, napełnienia celki rozpuszczalnikiem, a następnie ogrzewania do wymaganej temperatury (tzw. równoważenie), ekstrakcja statyczna, płukanie świeżym rozpuszczalnikiem, usuwanie rozpuszczalnika z systemu poprzez wydmuchiwanie, odprężanie układu (odprężanie ciśnienia z celek ekstrakcyjnych i przewodów), odstawienie celki [545]. Ponieważ podgrzewanie rozpuszczalnika ekstrakcyjnego w zamkniętym naczyniu prowadzi do wzrostu ciśnienia, wytrawianie może być prowadzone w temperaturze przewyższającej temperaturę wrzenia stosowanego rozpuszczalnika [518]. W celu ilościowego przeniesienia otrzymanego wyciągu z ekstraktora, możliwe jest mycie celki dodatkową objętością świeżego rozpuszczalnika po zakończeniu podstawowego procesu ekstrakcji [545]. Dotychczas zespół polifenoli z nasion kozieradki z wykorzystaniem ASE analizowano w nielicznych pracach a jako rozpuszczalnik ekstrakcyjny zastosowano 50% metanol [66, 143]. Wyniki badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy wykazały jednak, że rozpuszczalnik ten nie jest wydajnym ekstrahentem dla C-glikozydów flawonowych

Zawartość C-glikozyloflawonów w wyciągach otrzymanych techniką ASE przy użyciu 70% metanolu wynosiła od $70,051 \pm 24,31$ $\mu\text{g/ml}$ (wyciąg ASE-K) do $256,295 \pm 12,01$ $\mu\text{g/ml}$ (wyciąg ASE-J) i w każdym z badanych wariantów parametrów ekstrakcji była niższa w porównaniu do wyciągów otrzymanych z użyciem mieszadła magnetycznego (wyciąg M4) lub ultradźwięków (wyciąg S20). 70% metanol użyto w oparciu o wcześniejsze eksperymenty jako najbardziej wydajny ekstrahent dla badanych związków flawonoidowych. Otrzymane wyniki mogą być zależne od obecności w badanej matrycy roślinnej znacznych ilości polisacharydów. Możliwe, że w przypadku podwyższonego ciśnienia i ekstrakcji prowadzonej z użyciem rozpuszczalnika zawierającego wodę, polisacharydy ulegają szybszej ekstrakcji niż badane C-glikozydy flawonowe i stanowią rodzaj mechanicznej bariery dla rozpuszczalnika podczas wytrawiania flawonoidów. W toku prac laboratoryjnych po

przeprowadzonej ekstrakcji ASE, podczas czyszczenia celek ekstraktora, każdorazowo obserwowano obecność gęstej, bardzo kleistej mieszaniny surowca i ziemi krzemkowej zatykającej celę ekstrakcyjną, której usunięcie było utrudnione.



Ryc.21. Ekstraktor ASE 350 (*Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor system*) (Dionex, Kalifornia, USA).

Zastosowanie 100% metanolu jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego eliminowało problem, a zawartość C-glikozyloflawonów w otrzymanych wyciągach (ASE-A_{MeOH} - ASE-I_{MeOH}) była wyższa niż w ekstraktach uzyskanych z użyciem 70% metanolu, osiągając maksymalne wartości w wyciągach otrzymanych w temperaturze 100°C: ASE-G_{MeOH} 336,543 ± 24,88 µg/ml, ASE-H_{MeOH} 305,978 ± 30,09 µg/ml oraz ASE-I_{MeOH} 338,054 ± 28,36 µg/ml). Jednak zawartości te są znacznie niższe od zawartości w wyciągach: M4, otrzymanym z użyciem mieszadła magnetycznego i 70% metanolu (557,082 ± 15,62 µg/ml) oraz S20, otrzymanym w wyniku trzykrotnej sonikacji surowca 70% metanolem (3 x 10 min) (548,174 ± 19,06 µg/ml). Wydajność wytrawiania C-glikozydów flawonowych z nasion kozieradki przy użyciu przyspieszonej ekstrakcji metanolem jest porównywalna z wydajnością wyczerpującej ekstrakcji w aparacie Soxhleta, ekstrakcji w automatycznym aparacie Soxhleta (25 cykli), jednokrotnej sonikacji 70% metanolem w czasie 30-60 minut (wyciągi S9, S12, S15, S18) lub ekstrakcji wspomagannej mikrofalami (MAE) (tab. 6).

Wyniki przeprowadzonych badań nad optymalizacją warunków wytrawiania C-glikozyloflawonów z nasienia kozieradki wskazują, że najbardziej wydajnymi metodami wytrawiania badanych związków z materiału roślinnego jest ekstrakcja 70% metanolem, prowadzona: z użyciem mieszadła magnetycznego, w temperaturze 60°C

(2 x 3 h) (wyciąg M4) oraz trzykrotna ekstrakcja z użyciem ultradźwięków (sonikacja 3 x 10 min, wyciąg S20). Analiza statystyczna wykazała brak istotnych różnic pomiędzy zawartością C-glikozyloflawonów w wyciągach M4 i S20 (Anova). Jakkolwiek wybór metody wytrawiania zależy od dostępności aparatury laboratoryjnej, należy jednak podkreślić, że otrzymanie wyciągu M4 wymaga aż 6 godzin ekstrakcji, podczas gdy uzyskanie wyciągu S20 z użyciem ultradźwięków trwa jedynie 30 minut, co przemawia na korzyść sonikacji. Z drugiej strony trzykrotna sonikacja sproszkowanych nasion kozieradki prowadziła do silnego zmętnienia ekstraktu, utrudniającego sączenie otrzymanych wyciągów. Jest to związane ze zjawiskami towarzyszącymi procesowi ekstrakcji wspomaganego ultradźwiękami, m.im. częściowym rozdrabnianiem surowca i kawitacją [518].

Uwzględniając czas ekstrakcji, należy podkreślić, że dla celów analizy jakościowej zespołu C-glikozyloflawonów możliwe jest otrzymanie wyciągu z zastosowaniem ekstrakcji wspomaganego mikrofalami (MAE) w bardzo krótkim czasie - nawet 5 minut (wyciągi MAE3, MAE5), co pozwala na wytrawienie ok. 65% badanych związków w porównaniu z wyciągami M4 lub S20 (100%). W ten sposób jest możliwe uzyskanie w krótkim czasie wyciągu z przeznaczeniem do określenia profilu C-glikozydów flawonoidowych w surowcu. Natomiast badania z użyciem przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem (ASE) wymagają dalszej optymalizacji i oceny użycia innych rozpuszczalników.

Badania C-glikozyloflawonów w nasieniu kozieradki z zastosowaniem różnych technik chromatograficznych - TLC, HPLC

Dane literaturowe wskazują, że zespół C-glikozydów flawonowych w nasieniu kozieradki obejmuje mono- i di-C-glikozydowe pochodne apigeniny i luteoliny [15, 435, 456, 490, 493, 494, 511, 570, 574], tworzące pary 6-C i/lub 8-C izomerów o tej samej masie cząsteczkowej, różniące się położeniem wiązania C-glikozydowego w strukturze flawonu: apigeniny lub luteoliny. Charakterystykę C-glikozyloflawonów w nasieniu kozieradki przedstawiono w rozdziale 1.2.1.

Dotychczas zespoły flawonoidów analizowano w surowcu pochodzenia azjatyckiego i marokańskiego [66, 143, 456, 490, 493, 494]. W Europie badania nad

komercyjnie dostępnymi nasionami kozieradki nieznanego pochodzenia w zakresie C-glikozyloflawonów prowadzili Wagner i wsp. [570] oraz Prati i wsp. [435]

W analizie C-glikozyloflawonów w nasionach *T. foenum-graceum* wykorzystano chromatografię cienkwarstwową [15, 490, 570] oraz wysokosprawną chromatografię cieczową [143, 435, 456].

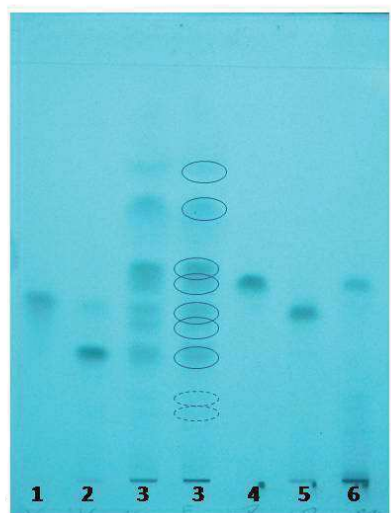
Analiza C-glikozyloflawonów metodą chromatografii cienkwarstwowej

Analiza C-glikozyloflawonów metodą HPTLC

Analizę chromatograficzną ekstraktów metanolowych z nasion kozieradki pospolitej prowadzono wobec 5 substancji wzorcowych: witeksyny, izowiteksyny, orientyny, izoorientyny (wcześniej zidentyfikowanych w surowcu) oraz 7-O-glukozydu izowiteksyny (saponaryna). Rozdzielenia prowadzono na płytkach TLC RP-18W F_{254S}, stosując fazy ruchome, stanowiące mieszaniny: wody i metanolu (F₃₁ - F₃₇), acetonitrylu (F₃₈) lub tetrahydrofuranu (F₅₁) w różnych stosunkach objętościowych, z dodatkiem kwasu mrówkowego. Chromatogramy rozwijano na dystansie 8 cm w komorze chromatograficznej, wysyczonej parami fazy ruchomej.

Najlepsze rozdzielanie otrzymano z użyciem fazy ruchomej metanol:woda:kwas mrówkowy (40:60:6, v/v) (F₃₂). Związki flawonoidowe analizowano w świetle UV przy długości fali λ -254 nm bez derywatywacji (ryc. 22).

Na otrzymanym chromatogramie HPTLC wyciągu metanolowego obserwowano 9 pasm związków. Wartości R_f czterech z nich odpowiadały wartościom R_f substancji wzorcowych: witeksynie (1), izowiteksynie (2), orientynie (4), izoorientynie (5) oraz saponarynie (6). Wartości współczynników R_f dla orientyny (3) oraz 7-O-glukozydu izowiteksyny (6) (R_f 0,52) były identyczne i rozdzielania tych związków nie otrzymano w żadnej ze stosowanych faz ruchomych. Chromatografia cienkwarstwowa umożliwiła potwierdzenie w badanym materiale roślinnym obecności witeksyny, izowiteksyny oraz izoorientyny.



Związek	R _f
Witekksyna	0,47
Izowitekksyna	0,30
Orientyna	0,52
Izoorientyna	0,44
7-O-glukozyd izowitekksyny	0,52

Ryc.22. Chromatogram HPTLC wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej (3) oraz wzorcowych C-glikozyloflawonów: 1 - witekksyna; 2 - izowitekksyna; 4 - orientyna; 5 - izoorientyna, 6 - 7-O-glukozyd izowitekksyny. Faza stacjonarna: żel krzemionkowy RP-18W F_{254S}, faza ruchoma: metanol:woda:kwask mrówkowy (40:60:6, v/v/v), detekcja: UV λ-254nm.

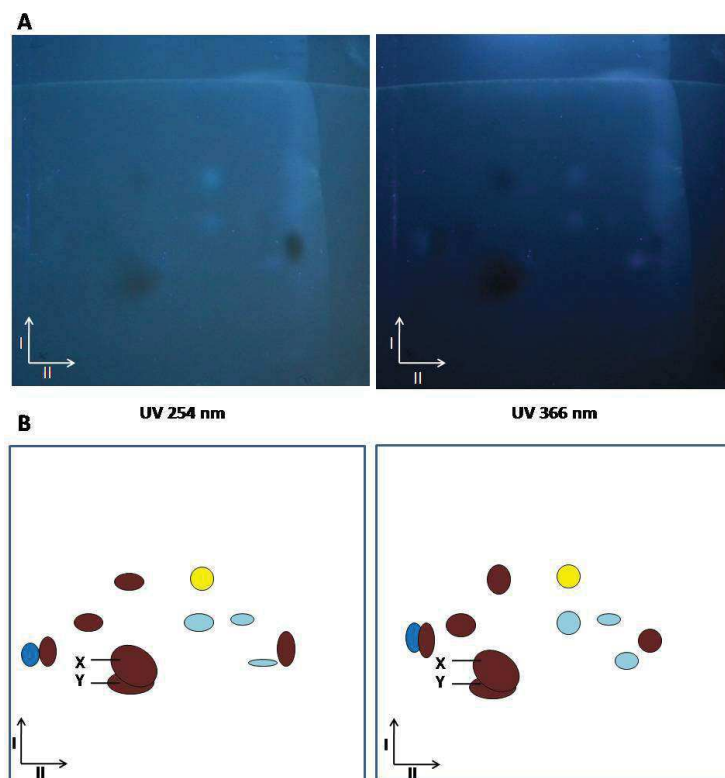
Analiza C-glikozyloflawonów metodą 2D TLC

Analizę chromatograficzną metodą 2D TLC ekstraktów metanolowych z nasion kozieradki pospolitej przeprowadzono na płytkach celulozowych, stosując następujące fazy ruchome: w pierwszym kierunku – mieszaninę n-butanol: kwas octowy: woda (BAW) (3:1:1, v/v) (F₂₉), natomiast w drugim kierunku – 15% kwas octowy (F₃₀) w warunkach wysycenia komory chromatograficznej parami fazy ruchomej (30 minut (F₂₉) lub 20 minut (F₃₀), odpowiednio (II.7.1.1.2.). Otrzymany chromatogram analizowano w świetle lampy UV przy długościach fali λ-254 nm oraz λ-366 nm.

Na chromatogramie 2D TLC wyciągu metanolowego z nasion kozieradki obecnych było 10 plam związków o różnej fluorescencji (ryc. 23) i przy zmianie długości fali, przy której analizowano chromatogram (λ-254 nm oraz λ-366 nm), nie obserwowano zmian we fluorescencji poszczególnych rozdzielonych analitów.

W badanym ekstrakcie dominowały związki flawonowe o charakterystycznej, brunatnej fluorescencji (6 plam) [353]. Ponadto obserwowano 3 plamy o fluorescencji błękitnej oraz 1 plamę o fluorescencji intensywnie niebieskiej, przypuszczalnie związków o charakterze fenolokwasów [353, 572]. Ponadto na chromatogramie widoczna była 1 plama o żółtej fluorescencji, prawdopodobnie należąca do związku o budowie flawonoidowej [353, 572].

Dwukierunkowa chromatografia cienkowarstwowa (2D TLC) wykazała, że badany wyciąg zawiera szereg innych związków flawonoidowych, w tym częściowo nierozdzielonych związków X i Y, prawdopodobnie di-C-glikozydów flawonowych, o wartościach Rf: Rf(I)_X ,36; Rf(I)_Y 0,36 oraz Rf(II)_X 0,33; Rf(II)_Y 0,26.



Ryc.23. Chromatogramy 2D TLC wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego: A - wideoskan, B - schemat chromatogramu. Faza stacjonarna: celuloza, faza ruchoma: I - butanol:kwas octowy:woda (3:1:1, v/v/v) (BAW) (F₂₉), II - 15% kwas octowy (F₃₀), detekcja UV λ -254 nm oraz UV λ -366 nm.

Analiza C-glikozyloflawonów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Optymalizacja warunków separacji C-glikozydów flawonowych metodą 1D HPLC-DAD

W analizie chromatograficznej związków flawonoidowych w matrycach roślinnych narzędziem stosowanym z wyboru jest wysokosprawna chromatografia cieczowa w systemie faz odwróconych (RP-HPLC) [38, 121, 123, 275, 391, 595, 626].

Fazę stacjonarną najczęściej stanowi żel krzemionkowy modyfikowany resztami oktadecylowymi (C-18) lub (rzadziej) - oktylowymi (C-8). Natomiast stosowana faza ruchoma jest przeważnie dwuskładnikową mieszaniną rozpuszczalnika organicznego (acetonitryl, metanol, tetrahydrofuran) i wody, z dodatkiem niewielkich objętości modyfikatora kwasowego - kwasu mrówkowego, octowego, trifluorooctowego lub fosforowego. Proces separacji zazwyczaj prowadzony jest w warunkach elucji gradientowej, rzadziej stosowana jest elucja izokratyczna [38, 121, 123, 275, 391, 595, 626]. Zespół C-glikozyloflawonów w nasieniu kozieradki różnego pochodzenia metodą HPLC analizowano w szeregu prac [66, 143, 435, 456].

W niniejszej pracy optymalizację warunków separacji HPLC C-glikozyloflawonów prowadzono w nasionach kozieradki pospolitej, otrzymanych z firmy zielarskiej Lewandowski (Polska). Do badań przeznaczono ekstrakty metanolowe, otrzymane w wyniku trójstopniowej, wyczerpującej ekstrakcji w aparacie Soxhleta, według procedury opisanej w punkcie II.6.1.1.1.

Optymalizacja rozdzielania składników zespołu C-glikozyloflawonów w badanym surowcu obejmowała selekcję fazy stacjonarnej i kompozycji eluentu, jak również dobór programu elucji gradientowej. Analizy prowadzono z wykorzystaniem detektora DAD (*Diode Array Detector*) przy długości fali λ -330 nm, przy której obserwowano I maksimum absorpcji w widmach UV C-glikozydów flawonowych [353]. Jako fazy stacjonarne stosowano żele krzemionkowe modyfikowane resztami oktadecylowymi, porowate: kolumna Nova-Pak C-18 (150 mm x 4 mm x 4 μ m) oraz częściowo porowate typu "core-shell": kolumny Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) oraz Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m). W badaniach zastosowano elucję izokratyczną (fazy ruchome S13 i S14, p.4.2.2.1.) oraz elucję gradientową (programy I, XII-XX) przy natężeniu przepływu fazy ruchomej 1 ml/min oraz temperaturze kolumny t_{kol} 25°C.

Początkowo analizy prowadzono na kolumnie Nova-Pak C-18 (150 mm x 4 mm x 4 μ m) z wykorzystaniem fazy ruchomej, stanowiącej mieszaninę metanolu i wody w stosunku 80:20 (v/v) lub 30:70 (v/v), z dodatkiem kwasu mrówkowego w stężeniu 0,1% (fazy ruchome S13 i S14, odpowiednio, II.4.2.2.1.). Badane związki eluowały w formie niecałkowicie rozdzielonych: czterech (faza S13) lub siedmiu (faza S14) pików. W rezultacie nie uzyskano separacji składników badanego wyciągu. Efektywne rozdzielanie C-glikozydów flawonowych w warunkach elucji izokratycznej uzyskano metodą HPLC w ekstraktach z sześciu gatunków z rodzaju *Passiflora* [626].

Kolejny krok stanowiło opracowanie profilu elucji gradientowej, charakteryzującego się wzrastającym stężeniem metanolu w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (fazy ruchome G+I, II.4.2.2.1.) w zakresie 20%-30% (gradient

złożony liniowo-izokratyczny, program XII) lub 10%-30% (gradient liniowy, programy XIII, XIV) w czasie: t_G 40 (programy XII i XIII) lub t_G 46 minut (program XIV). Na otrzymanych chromatogramach HPLC-DAD analizowane związki były słabo rozdzielone i widoczne w postaci 8 pików, jako częściowo koeluujących, co wskazywało na konieczność dalszej optymalizacji warunków analizy (ryc. 24).

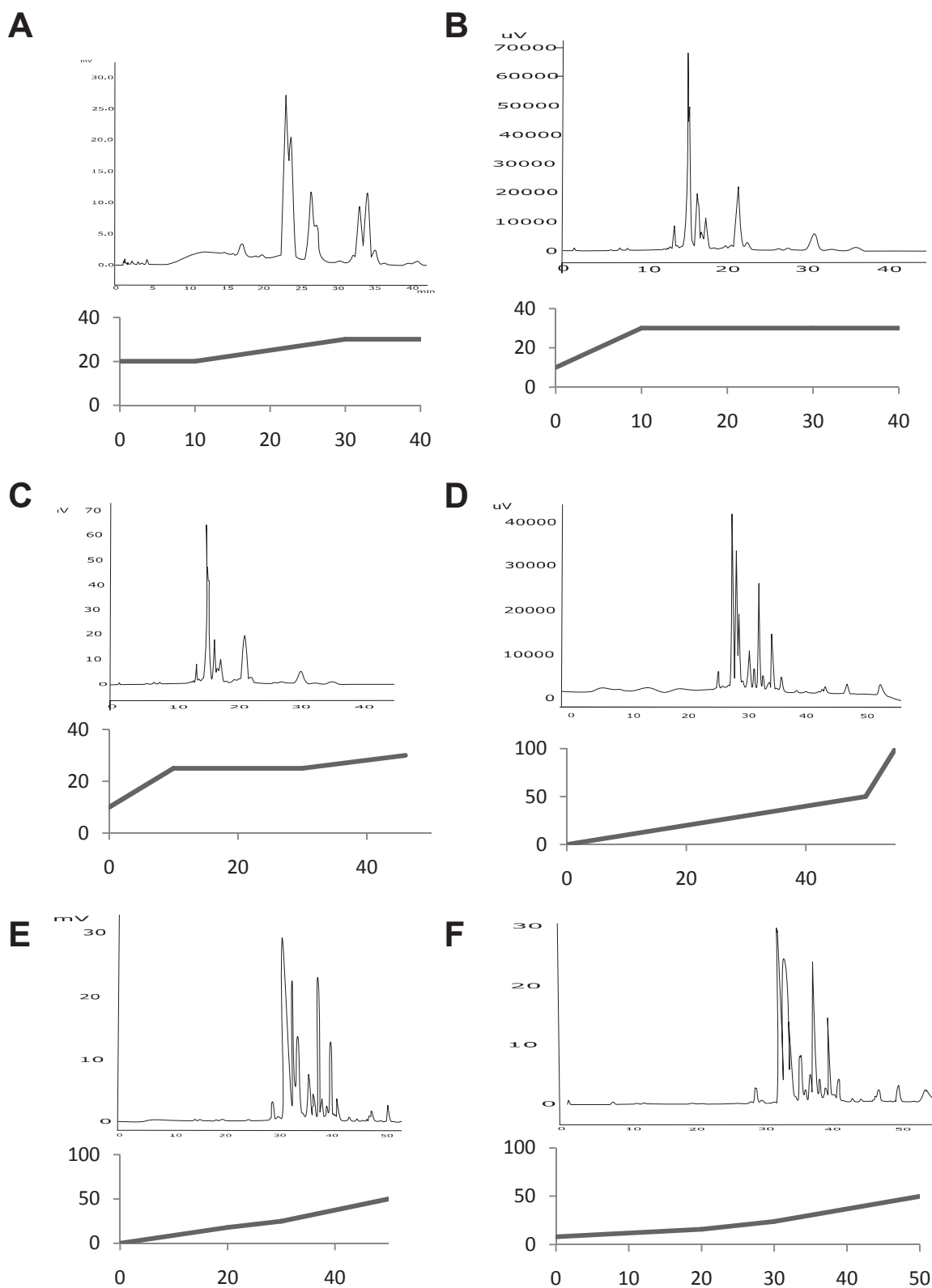
W kolejnym etapie prac zmieniono składnik organiczny fazy ruchomej z metanolu na acetonitryl, natomiast jako modyfikator kwasowy zastosowano kwas trifluorooctowy (TFA). Analizy prowadzono w warunkach elucji gradientowej, charakteryzującej się wzrostem stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) od 0% do 50% w 0,1% TFA (fazy ruchome A+E, II.4.2.2.1.) w czasie t_G 50 minut (gradient liniowy, program XV). Otrzymane chromatogramy charakteryzowały się lepszym rozdzielaniem związków w porównaniu do wcześniej testowanych warunków analizy (ryc. 24). Składniki badanego zespołu ulegały częściowej separacji w formie 12 pików, z których 10 eluowało w zakresie t_R 28-36 minut. Aby przyspieszyć wymywanie analitów z kolumny zwiększono stężenie mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA w początkowej fazie gradientu do 8% (program XVI), co jednak nie przyniosło pozytywnych rezultatów (ryc. 24).

Kolejnym krokiem w procesie optymalizacji rozdzielania składników zespołu C-glikozydów flawonowych w badanej matrycy była optymalizacja fazy stacjonarnej. Stosowana w początkowym etapie prac kolumna Nova-Pak C-18 (150 mm x 4 mm x 4 μ m) charakteryzuje się standardowym wypełnieniem C-18 o średnicy ziaren 4 μ m [5]. W celu zwiększenia rozdzielczości zastąpiono ją kolumną Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m), której wypełnienie stanowi żel krzemionkowy modyfikowany resztami oktadecylowymi, w technologii "core-shell" [6]. Pojedyncze ziarno wypełnienia o średnicy 2,6 μ m składa się z nieporowatego rdzenia (1,9 μ m) oraz cienkiej porowatej powłoki żelu krzemionkowego modyfikowanego resztami oktadecylowymi (0,35 μ m) [3, 6], co skutkuje wyższą sprawnością kolumny, lepszą rozdzielczością i czułością, przy akceptowalnym ciśnieniu (<400 bar) [6, 586]. Dlatego kolumny z wypełnieniem "core-shell" mogą być stosowane nie tylko w systemach UHPLC, ale również w standardowych systemach HPLC [6, 586].

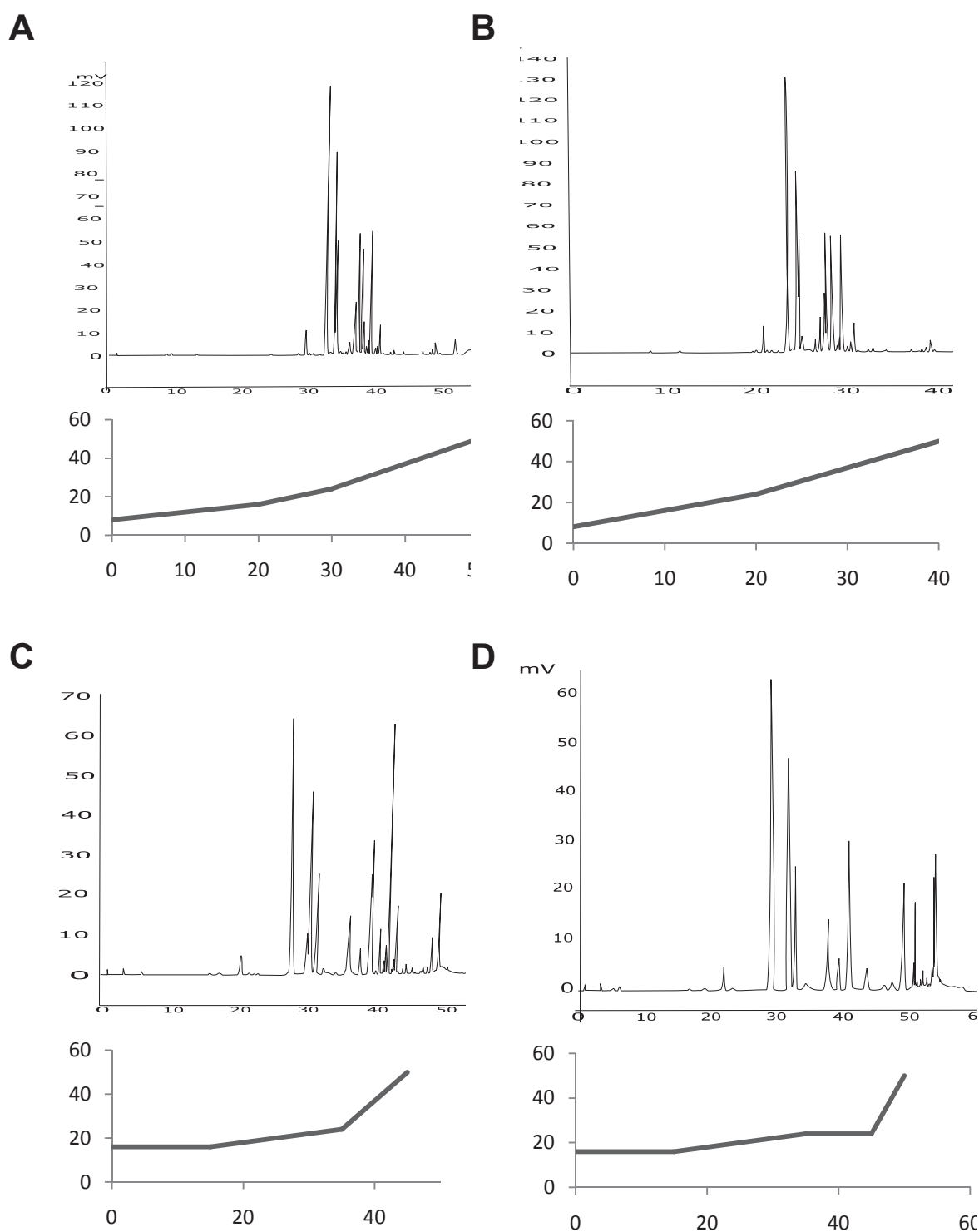
Analizy na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) prowadzono początkowo z wykorzystaniem elucji gradientowej według programu XVII, charakteryzującego się liniowym wzrostem stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w od 8% do 50% 0,1% TFA (II.4.2.2.1.) w czasie t_G 50 minut. Zmiana fazy stacjonarnej skutkowała lepszą rozdzielczością, a obserwowane na chromatogramie piki były węższe niż w przypadku analiz HPLC prowadzonych na kolumnie Nova-Pak C-18 (ryc. 25). Wysoka sprawność kolumn Kinetex teoretycznie

stwarza również możliwość prowadzenia analiz w czasie krótszym niż na standardowych kolumnach HPLC, z jednoczesnym zachowaniem wysokiej efektywności rozdzieleń [6]. Jednak w przypadku analizowanego zespołu związków z nasion kozieradki próba skrócenia czasu analizy do 40 min (program XVIII - gradient liniowy, wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) od 8% do 50% w 0,1% TFA w czasie t_G 40 minut nie przyniosła poprawy rozdzielania, a C-glikozyloflawony eluowały dopiero w czasie $t_G \geq 29$ minut (ryc. 25). Celem zwiększenia mocy elucyjnej fazy ruchomej w początkowej fazie gradientu dwukrotnie zwiększono stężenie mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA z 8% do 16% oraz wprowadzono etap elucji izokratycznej w pierwszych 15 minutach programu elucji przy stężeniu 16% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA, po którym następował liniowy wzrost stężenia od 16% do 50% w czasie t_G 45 minut [profil gradientu złożony, obejmujący liniowy wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA oraz elucję izokratyczną, program XIX]. Wprowadzone zmiany owocowały lepszym rozdzielaniem pików na chromatogramie HPLC i elucją pierwszych analitów w czasie $t_G \geq 20$ minut (ryc. 25). W kolejnym etapie optymalizacji warunków separacji wprowadzono do programu elucji dodatkowy etap elucji izokratycznej przy stężeniu 24% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA, w przedziale czasu gradientu 35-45 minut, przy zachowaniu czasu trwania gradientu t_G 50 minut (gradient złożony, obejmujący elucję izokratyczną oraz liniowy wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) od 16% do 50% w 0,1% TFA, program XX) (ryc. 25). W kolejnej modyfikacji gradientu zwiększono z 50% do 70% stężenie ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA w końcowej fazie gradientu (t_G 60-70 minut), wraz z wydłużeniem czasu analizy do t_G 70 minut - program I, stanowiący gradient o profilu złożonym, obejmujący elucję izokratyczną oraz liniowy wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) od 16% do 70% w 0,1% TFA (t_G 70 minut) (ryc. 26). Obserwowano, że zmiana temperatury kolumny (t_{kol} 20°C, t_{kol} 25°C lub t_{kol} 30°C) nie wpływa na efektywność rozdzielania. W celu uzyskania powtarzalnych rozdzieleń konieczne było wydłużenie czasu kondycjonowania kolumny fazą ruchomą o stężeniu 16% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA ze stosowanych dotychczas 10 minut do 20 minut.

Spośród testowanych w procesie optymalizacji zróżnicowanych warunków analizy, najlepsze rozdzielanie badanego zespołu C-glikozyloflawonów, w formie 15 pików, otrzymano na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m), stosując elucję gradientową według programu I (gradient złożony, izokratyczno-liniowy) przy natężeniu przepływu fazy ruchomej 1,0 ml/min i temperaturze kolumny t_{kol} 25°C (ryc. 26).

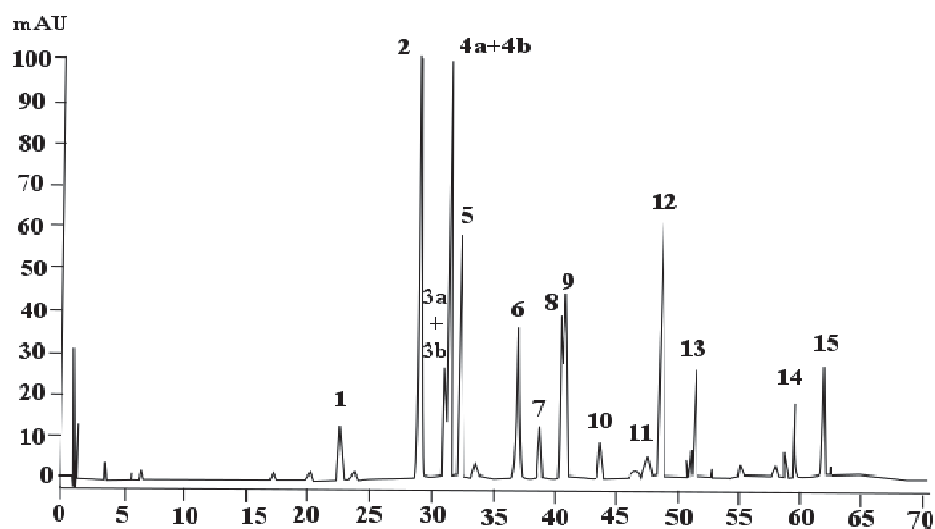


Ryc.24. Chromatogramy 1D HPLC-DAD wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej, otrzymane z użyciem różnych programów elucji gradientowej: A - program XII, B - program XIII, C - program XIV, D - program XV, E - program XVI, F - program XVII. Kolumna Nova-Pak C-18 (150 mm x 4 mm x 4 μ m), UV λ -330 nm.

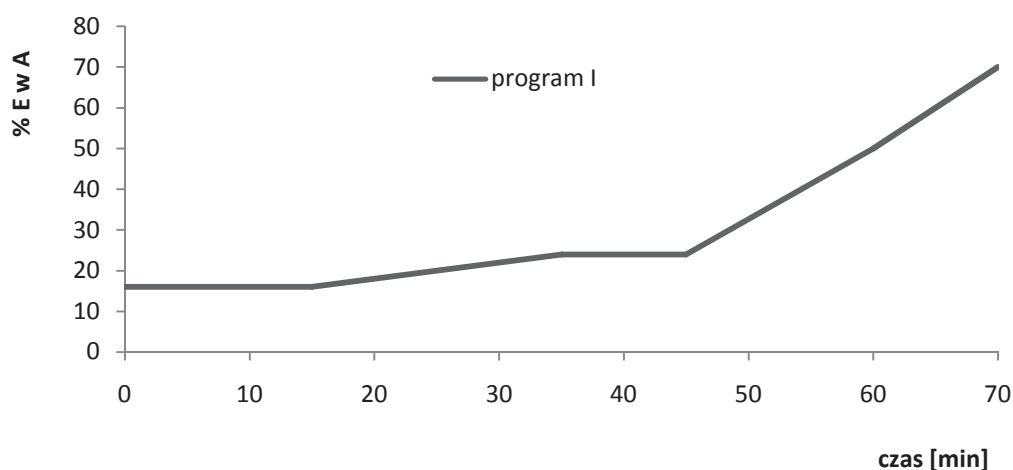


Ryc.25. Chromatogramy 1D HPLC-DAD wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej, otrzymane z użyciem różnych programów elucji gradientowej: A - program XVII, B - program XVIII, C - program XIX, D - program XX. Kolumna Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m), UV λ -330 nm.

A



B

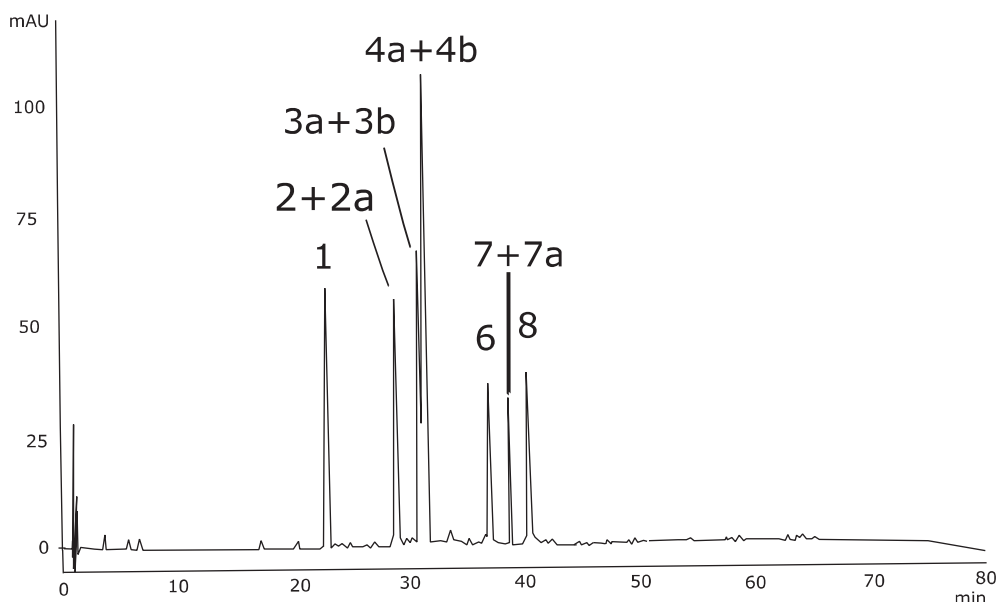


Ryc.26. Chromatogram 1D HPLC-DAD (A) wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego, otrzymany w warunkach elucji gradientowej według programu I (B): A - 0,1% TFA, E - ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v). Kolumna Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m), UV λ - 330nm. 1 - wicenina-2, 2 - wicenina-1, 3a+3b - izoorientyna+orientyna, 4a+4b - izoszaftozyd+szaftozyd, 5 - di-C-(6/8)-heksozylo-pentozyd apigeniny, 6 - witeksyna, 7 - wicenina-3, 8 - izowiteksyna, 9, 10, 11, 12, 13 di-C-(6/8)-pentozydy apigeniny, 14 - ester p-kumarowy orientyny/izoorientyny, 15 - ester p-kumarowy witeksyny/izowiteksyny.

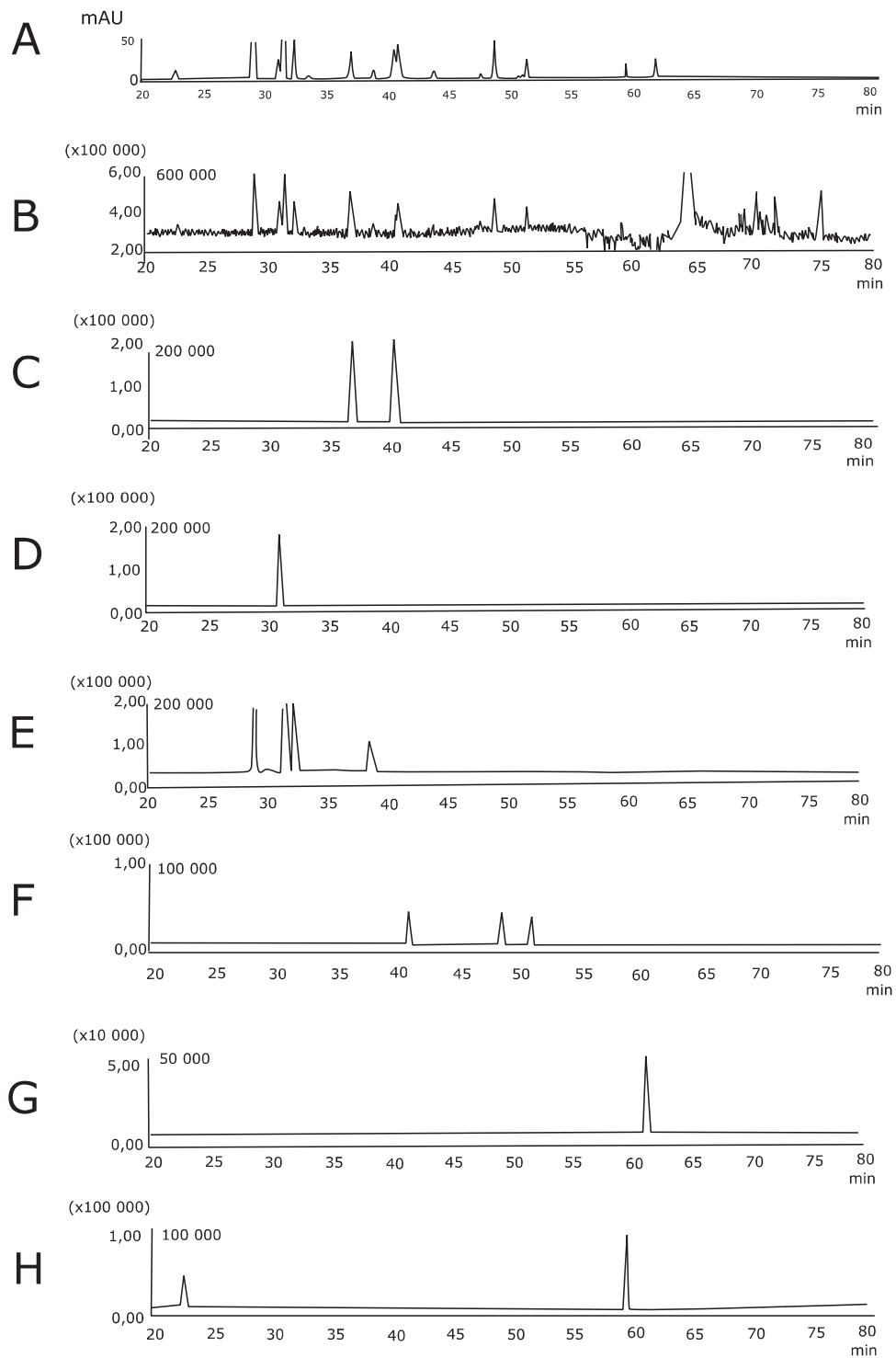
Opracowane warunki separacji zastosowano na kolumnie Kinetex C-18 o tej samej długości, ale mniejszej średnicy (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m), obniżając natężenie przepływu fazy ruchomej do 0,25 ml/min i otrzymując identyczny profil chromatograficzny. Biorąc pod uwagę mniejsze zużycie rozpuszczalników, dalsze eksperymenty chromatograficzne prowadzono z wykorzystaniem kolumny Kinetex o średnicy 2,1 mm.

Analiza i identyfikacja C-glikozydów flawonowych metodą HPLC-DAD-ESI-MS

Opracowane warunki analizy HPLC-UV w sprzężeniu z detektorami DAD i MS zastosowano do identyfikacji związków flawonoidowych w wyciągu metanolowym z nasion kozieradki pochodzenia krajowego. W procesie identyfikacji poszczególnych C-glikozyloflawonów uwzględniono wartości czasu retencji (t_R), przebieg widma UV i widma MS, otrzymanych odpowiednio z użyciem detektora DAD oraz detektora masowego. Jako technikę jonizacji zastosowano rozpylanie w polu elektrycznym (*ESI - Electrospray Ionisation*). Analizowano widma ESI-MS, otrzymane w trybie jonów dodatnich i ujemnych oraz wykorzystano technikę monitorowania wybranych jonów SIM (*Selected Ion Monitoring*) w trybie jonów dodatnich i ujemnych (ryc. 28). Rozdzielenia metodą HPLC-DAD-ESI-MS prowadzono wobec 11 związków wzorcowych: witeksyny, izowiteksyny, orientyny, izoorientyny, wiceniny-1, wiceniny-2, wiceniny-3, szaftozydu, izoszaftozydu, 7-O-glukozydu izowiteksyny i 2"-O-ramnozydu witeksyny (ryc. 27). Otrzymane dane chromatograficzne i spektralne identyfikowanych związków porównano z opisanymi w literaturze [66, 143, 353, 435, 456, 574].



Ryc.27. Chromatogram 1D HPLC-DAD mieszaniny wzorców C-glikozyloflawonów: 1 – wicenina-2, 2+2a – wicenina-1+7-O-glukozyd izowiteksyny, 3a+3b – izoorientyna+orientyna, 4a+4b – izoszaftozyd+szaftozyd, 6 – witeksyna, 7+7a – wicenina-3+2"-O-ramnozyd witeksyny, 8 – izowiteksyna. Kolumna Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m), elucja gradientowa według programu I, UV λ -330 nm.



Ryc.28. Chromatogram 1D HPLC-DAD-ESI-MS wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego:
 A – chromatogram HPLC-DAD; detekcja UV λ –330 nm
 B – chromatogram całkowitego prądu jonowego (TIC), otrzymany w trybie jonów dodatnich (TIC (+))
 C-H – chromatogramy jonów przy m/z 433, m/z 449 m/z , m/z 565, m/z 535, m/z 579 i m/z 595.

Związek/ Pik HPLC	UV _{max}	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ / [M-H+TFA] ⁻	t _R (min)	Związek zidentyfikowany
1	269,333	595 / 593 / 707	22,67	wicenina-2
2	269, 333	565 / 563 / 677	28,98	wicenina-1
3a/3b	254sh, 269, 346	449 / 447 / 561	31,07	izoorientyna / orientyna
4a/4b	270, 334	565 / 563 / 677	31,45	izoszaftozyd / szaftozyd
5	270, 335	565 / 563 / 677	32,32	di-C-(6/8)-heksozylo-pentozyd apigeniny
6	267, 336	433 / 431 / 545	36,96	witeksyna
7	269, 333	565 / 563 / 677	38,76	wicenina-3
8	268, 335	433 / 431 / 545	40,48	izowiteksyna
9	270, 335	535 / 533 / 647	40,85	di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny
10	270, 335	535 / 533 / 647	43,74	di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny
11	271, 335	535 / 533 / 647	47,50	di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny
12	269, 333	535 / 533 / 647	48,67	di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny
13	269, 333	535 / 533 / 647	51,30	di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny
14	255sh, 269, 315	595 / 593 / 707	59,41	ester p-kumarowy orientyny / izoorientyny
15	269, 315	579 / 577 / 691	61,79	ester p-kumarowy witeksyny / izowiteksyny

Tab.7. Dane spektralne i chromatograficzne C-glikozyloflawonów zidentyfikowanych w nasieniu kozieradki pospolitej metodą HPLC-DAD-ESI-MS.

Na podstawie otrzymanych widm UV 13 spośród 15 rozdzielonych związków zidentyfikowano wstępnie jako pochodne apigeniny (związki 1, 2, 4, 5-13 oraz 15), uwzględniając obecność dwóch maksimum absorpcji przy długościach fali λ_{max} 270 nm (I maksimum) oraz λ_{max} 330 nm (II maksimum) (związki 1, 2, 4, 5-13) lub λ_{max} 270 nm (I maksimum) oraz λ_{max} 315 nm (związek 15) [353].

Kolejne dwa związki (3 i 14) rozpoznano jako pochodne luteoliny, charakteryzujące się występowaniem w widmach UV przegięcia (tzw. *shoulder*) przy długości fali λ_{sh} -254-255 nm, obok dwóch maksimum absorpcji przy długości fali λ_{max} 269 nm (I maksimum) i λ_{max} 346 nm (II maksimum) (związek 3) lub λ_{max} 269 nm (I maksimum) i λ_{max} 315 nm (II maksimum) (związek 14), [298].

Uwzględniając obecność przesunięcia hipsochromowego II maksimum absorpcji w widmach związków 14 i 15 o wartości $\Delta\lambda_{max}$ 32 nm, wskazującego na obecność wiązania estrowego C-glikozyloflawonu z resztą kwasu fenolowego [297], związki te rozpoznano jako estry C-glikozyloflawonów, odpowiednio: apigeniny (związek 15) oraz luteoliny (związek 14).

Na chromatogramie jonu pseudomolekularnego przy m/z 595 $[M+H]^+$ (w trybie jonów dodatnich) i deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 593 $[M-H]^-$ (w trybie jonów ujemnych) obserwowano obecność dwóch pików o t_R 22,67 min. (związek 1) oraz t_R 59,41 min. (związek 14). Dodatkowo na widmach ESI-MS, otrzymanych w trybie jonów ujemnych odnotowano obecność adduktu z kwasem trifluorooctowym (TFA) przy m/z 707 $[M-H+114]^-$. Wartość t_R związku 1 była zgodna z wartością t_R wzorcowej wiceniny-2 (6,8-di-C-glukozydu apigeniny). Na podstawie uzyskanych danych chromatograficznych i spektralnych związek 1 zidentyfikowano jako wiceninę-2, natomiast związek 14 jako ester p-kumarowy orientyny lub izorientyny [456, 574].

W widmach ESI-MS związku 15 (t_R 61,79 min) w zastosowanych warunkach jonizacji obserwowano obok sygnału jonu pseudomolekularnego przy m/z 595 $[M+H]^+$ w trybie jonów dodatnich oraz w trybie jonów ujemnych deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 593 $[M-H]^-$ i sygnał jonu przy m/z 707, odpowiadający adduktowi z TFA $[M-H+114]^-$. Na podstawie uzyskanych danych chromatograficznych i spektralnych związek 15 zidentyfikowano jako ester p-kumarowy witeksyny/izowiteksyny [456, 511, 574].

W widmach masowych związków 6 (t_R 69,96 min) i 8 (t_R 40,48 min) obserwowano sygnał jonu pseudomolekularnego przy m/z 433 $[M+H]^+$ (w trybie jonów dodatnich) i deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 431 $[M-H]^-$ (w trybie jonów ujemnych), odpowiadającego masie cząsteczkowej mono-C-glukozydów apigeniny oraz jonu przy m/z 545, odpowiadający adduktowi z TFA $[M-H+114]^-$ (w trybie jonów ujemnych). Wartości t_R związków 6 i 8 były zgodne z wartościami t_R wzorcowych

witeksyny i izowiteksyny, odpowiednio. Na podstawie uzyskanych danych chromatograficznych i spektralnych związku 6 i 8 zidentyfikowano jako odpowiednio: witeksynę (8-C-glukozyd apigeniny) oraz i izowiteksynę (6-C-glukozyd apigeniny).

W widmie ESI-MS związku 12 obserwowano sygnały jonu pseudomolekularnego przy m/z 535 $[M+H]^+$ w trybie jonów dodatnich oraz w trybie jonów ujemnych deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 533 $[M-H]^-$ obok sygnału przy m/z 647, odpowiadającego adduktowi z TFA $[M-H+114]^-$. Identyfikację związków 9,10,11,12 i 13 (t_R 40,85 min, t_R 43,74 min, t_R 47,50 min, t_R 48,67 min i t_R 51,30 min, odpowiednio) oparto o technikę SIM (*Selected Ion Monitoring*), monitorując jony m/z 535 $[M+H]^+$ (w trybie jonów dodatnich), m/z 533 $[M-H]^-$ (w trybie jonów ujemnych) oraz m/z 647 $[M-H+114]^-$ (w trybie jonów ujemnych). Na podstawie uzyskanych danych chromatograficznych (wartości t_R) i spektralnych (wartości m/z , widmo UV), związki 9-13 zidentyfikowano jako di-C-(6/8)-glikozydowe pochodne apigeniny, zawierające w cząsteczce dwie pentozy (tab. 7).

Na otrzymanym techniką SIM chromatogramie jonu molekularnego m/z 565 wykazano obecność czterech pików o czasach retencji: t_R 28,98 min (związek 2), t_R 31,45 min (związek 4), t_R 32,32 min (związek 5) oraz t_R 38,76 min (związek 7). W widmach ESI-MS otrzymanych w trybie jonów dodatnich związków 2, 4, 5 i 7 obserwowano sygnały jonów pseudomolekularnych przy m/z 565 $[M+H]^+$. Natomiast w widmach ESI-MS otrzymanych w trybie jonów ujemnych obserwowano sygnały deprotonowanych jonów molekularnych przy m/z 563 $[M-H]^-$ oraz sygnały przy m/z 677 $[M-H+114]^-$, odpowiadające adduktom z TFA. Na podstawie uzyskanych danych chromatograficznych i spektralnych związki 2, 4, 5 i 7 wstępnie zidentyfikowano jako di-C-heksozylo-pentozydy apigeniny. Ponadto wartości t_R związków 2 i 7 były zgodne z wartościami t_R wzorcowych wiceniny-1 (6-C-ksylofuranozylo-8-C-galaktozyd apigeniny) oraz wiceniny-3 (6-C-glukopiranozylo-8-C-ksylofuranozyd apigeniny). Na podstawie uzyskanych danych chromatograficznych i spektralnych (wartości m/z , t_R , widmo UV) związek 2 zidentyfikowano jako wiceninę-1, związek 7 jako wiceninę-3, związek 5 jako di-C-heksozylo-pentozyd apigeniny. Identyfikacja związku 4 w warunkach opracowanej metody nie była możliwa ze względu na identyczne: wartości t_R , widmo UV i wartości m/z jonów molekularnych nierozdzielonych substancji wzorcowych - szaftozydu (4b) i izoszaftozydu (4a).

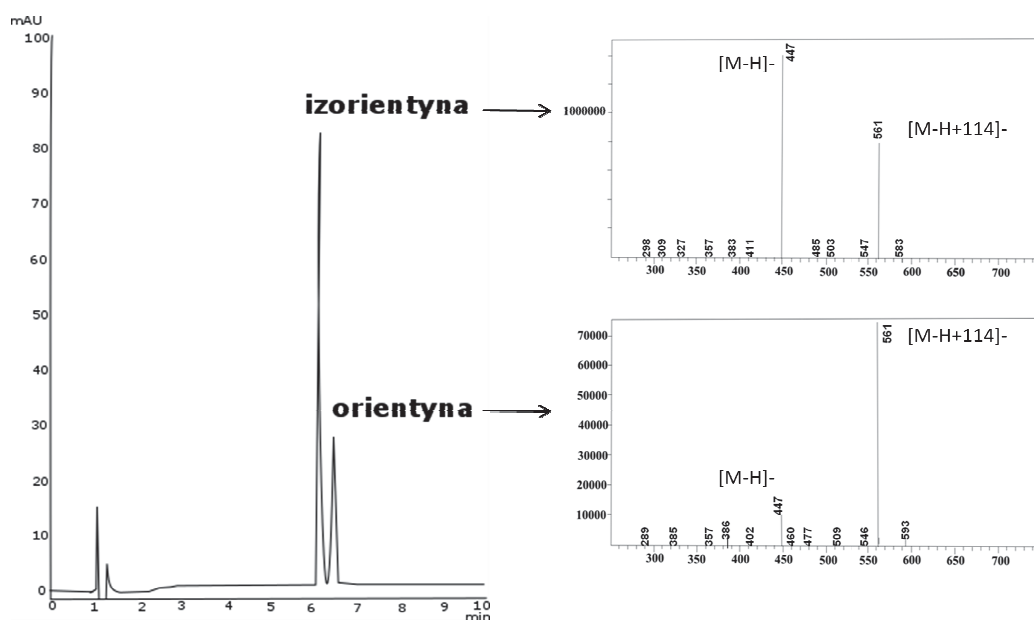
W widmie masowym związku 3 obserwowano jon pseudomolekularny przy m/z 449 $[M+H]^+$ w trybie jonów dodatnich i deprotonowany jon molekularny przy m/z 447 $[M-H]^-$ oraz addukt z TFA przy m/z 561 $[M-H+114]^-$ w trybie jonów ujemnych. Podobnie, jak w przypadku związku 4, również identyfikacja związku 3 nie była możliwa ze

względu na identyczne: wartości t_R , widmo UV i wartości m/z jonów molekularnych nierozdzielonych związków wzorcowych: orientyny (3b) i izorientyny (3a).

Na otrzymanym chromatogramie HPLC obserwowano koelucję pików związków 3a+3b oraz 4a+4b (tab. 7, ryc. 26), co mogło utrudniać ich analizę ilościową w wyciągach z nasion kozieradki.

Kolejne próby separacji związków 3a, 3b i 4a, 4b skutkowały pogorszeniem rozdzielania pozostałych związków flawonoidowych obecnych w nasionach kozieradki. Dlatego postanowiono w dalszej części pracy zastosować techniki dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (2D HPLC).

W otrzymanych w trybie jonów ujemnych widmach ESI-MS wzorcowych orientyny i izorientyny (ryc. 29), obserwowano różnice w intensywności sygnałów deprotonowanych jonów molekularnych przy m/z 447 $[M-H]^-$ oraz ich adduktów z TFA przy m/z 561 $[M-H+114]^-$, mianowicie: 20% i 100% odpowiednio dla orientyny i izorientyny oraz 100% i 60% odpowiednio dla orientyny i izorientyny. Odnotowane różnice w charakterystyce widm ESI-MS w trybie jonów ujemnych ułatwiły identyfikację orientyny i izorientyny w badanej matrycy roślinnej i mogą być wykorzystane w analizie tych związków w matrycach roślinnych różnego pochodzenia metodą HPLC-DAD-ESI-MS.



Ryc.29. Chromatogram 1D HPLC-DAD mieszaniny związków wzorcowych: orientyny i izorientyny oraz ich widma ESI-MS, otrzymane w trybie jonów ujemnych. Kolumna Kinetex (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m), faza ruchoma 32% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA (S5), UV λ -330 nm.

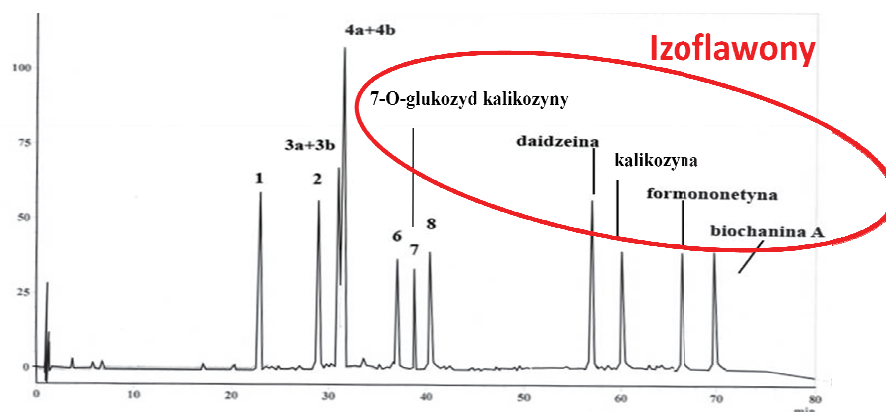
Analiza izoflawonów w nasieniu kozieradki metodą HPLC-DAD-ESI-MS

Dane literaturowe wskazują na obecność w nasionach *T. foenum-graecum* obok C-glikozyloflawonów również izoflawonów - związków flawonoidowych o charakterze fitoestrogenów [240, 364, 574]. Wang i wsp. [574] wyizolowali z surowca: biochaninę A, formononetynę, daidzeinę, kalikozynę, irylon, trycynę oraz 5,7,3'-trihydroksi-5'-metoksyizoflawon. Natomiast według innych autorów [240, 364] w nasionach kozieradki występują daidzeina i genisteina (10,2-18,2 µg / 100 g oraz 9,8-11,8 µg / 100 g, odpowiednio).

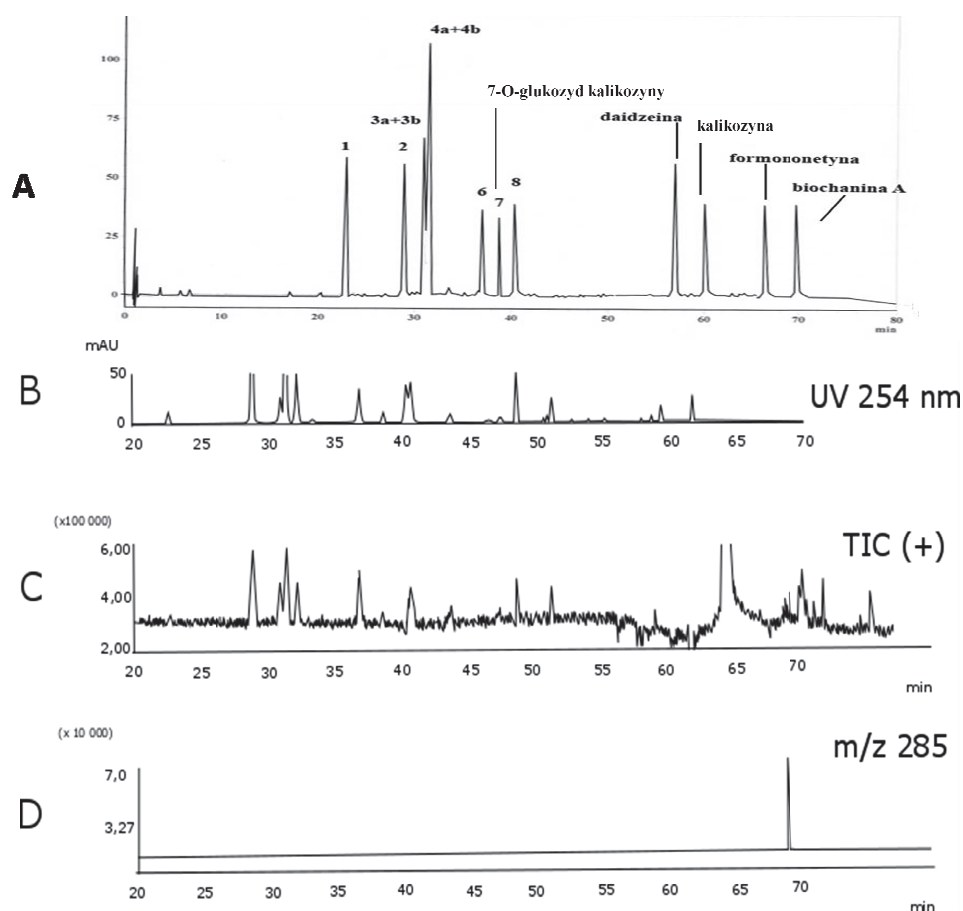
Izoflawony posiadają struktury zbliżone do 17-β-estradiolu i oddziałują z receptorem estrogenowym [138, 291]. Surowce roślinne zawierające izoflawony stosowane są w formie wyciągów w łagodzeniu objawów niedoboru endogennych estrogenów w przebiegu menopauzy [170, 291]. W ostatnich latach ujawniono również korzystne efekty izoflawonów w profilaktyce nowotworów hormonozależnych, chorób układu sercowo-naczyniowego oraz osteoporozy [291].

Analizę izoflawonów w badanym materiale roślinnym prowadzono w warunkach rozdzieleń, opracowanych dla C-glikozydów flawonowych, na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 µm), stosując elucję gradientową według programu I, który charakteryzował się wzrastającym stężeniem mieszaniny ACN:woda.TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA od 16% do 70% w czasie t_G 70 minut, (program elucji I, II.4.2.2.). W analizie izoflawonów stosowano detekcję UV przy długości fali λ-254 nm (II.7.2.). Analizy prowadzono wobec 5 substancji wzorcowych: biochaniny A, daidzeiny, formononetyny, kalikozyny oraz 7-O-glukozydu kalikozyny. Jako metodę zbierania danych chromatograficznych zastosowano monitorowanie wybranych jonów SIM (*Selected Ion Monitoring*) w trybie jonów dodatnich.

Na chromatogramie HPLC-DAD nie obserwowano pików odpowiadających wzorcowym izoflawonom (ryc. 31 B). Na podstawie analiz HPLC-DAD-ESI-MS z użyciem techniki SIM wobec wzorców wykluczono obecność: daidzeiny (m/z 255 [M+H]⁺) [574], formononetyny (m/z 269 [M+H]⁺) [574], kalikozyny (m/z 285 [M+H]⁺) [574] i jej 7-O-glukozydu (m/z 447 [M+H]⁺). Nie stwierdzono również obecności irylonu (m/z 299 [M+H]⁺) oraz 5,7,3'-trihydroksi-5'-metoksyizoflawonu (m/z 301 [M+H]⁺) [574].



Ryc.30. Chromatogram 1D HPLC-DAD mieszaniny wzorców C-glikozyloflawonów i izoflawonów: 1-8 C-glikozyloflawony (numeracja odpowiada ryc. 27), izoflawony: kalikozyzna, 7-O-glukozyd kalikozyzny, daidzeina, formononetyna, biochanina A. Kolumna Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m), elucja gradientowa według programu I, UV-254 nm.



Ryc.31. Chromatogramy HPLC-DAD-ESI-MS wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej (B) i mieszaniny wzorców C-glikozyloflawonów i izoflawonów (A).

- A. chromatogram HPLC-DAD mieszaniny wzorców C-glikozyloflawonów i izoflawonów. 1-8 C-glikozyloflawony (numeracja odpowiada ryc. 27), izoflawony: kalikozyzna, 7-O-glukozyd kalikozyzny, daidzeina, formononetyna, biochanina A, UV λ -254 nm
- B. chromatogram HPLC-DAD-ESI-MS wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej, UV λ -254 nm
- C. całkowity prąd jonowy (TIC) w trybie jonów dodatnich
- D. chromatogram jonu m/z 285, otrzymany techniką SIM w trybie jonów dodatnich

Na chromatogramie jonu molekularnego przy m/z 285 $[M+H]^+$ obserwowano pik o t_R 69,33 min, odpowiadający wzorcowej biochaninie A (ryc. 31 D). Niska intensywność obserwowanego piku oraz brak odpowiadającego mu piku na chromatogramie HPLC-DAD pozwalają przypuszczać, że biochanina A może być obecna w badanych nasionach kozieradki pospolitej jedynie w niewielkim stężeniu.

Otrzymane wyniki wskazują na odmienny skład surowca pochodzenia krajowego w porównaniu z nasionami kozieradki pochodzenia azjatyckiego [240, 574]. Brak izoflawonów w analizowanych wyciągach metanolowych może mieć istotny związek z wpływem surowca oraz jego przetworów na ludzki układ hormonalny, szczególnie w zakresie hormonów płciowych. Izoflawony są związkami charakterystycznymi dla rodziny *Leguminosae*, do której należy kozieradka pospolita. Jednak niewielka ilość doniesień literaturowych, poświęconych izoflawonom i ich występowaniu w nasionach *T. foenum-graecum* [240, 364, 574] może dodatkowo wskazywać, że za obserwowaną w toku wielu badań, zróżnicowaną aktywność hormonalną surowca (p. rozdział 1.3.8. *Aktywność hormonalna*), odpowiadają inne związki. Jednocześnie nie można wykluczyć faktu, że w zależności od pochodzenia i warunków wzrostu, kozieradka pospolita akumuluje lub nie biosyntezuje w nasionach izoflawonów.

Analiza C-glikozyloflawonów metodą dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (2D HPLC)

Ze względu na brak rozdzielania w warunkach 1D HPLC izomerycznych mono-C-(6/8)-glukozydów luteoliny (orientyny i izoorientyny) oraz di-C-(6/8)-glukozylo-arabinozydów apigeniny (szaftozydu i izoszaftozydu) jako składników mieszaniny wzorców oraz odpowiadających im składników wyciągu z nasion kozieradki (3a - izoorientyna, 3b - orientyna, 4a - izoszaftozyd, 4b - izoszaftozyd), w kolejnym etapie prac zastosowano dwuwymiarową wysokosprawną chromatografię cieczową, z użyciem technik *heart-cutting* (LC-LC) *off-line* i *comprehensive* (LCxLC) *off-line* oraz *on-line*. W tym celu wykorzystano system 2D HPLC opisany w punkcie A.II.3.2.2.. Opracowanie warunków analiz metodą *heart-cutting* było wstępem do opracowania systemu separacji, wykorzystującego technikę *comprehensive* w obu trybach (*off-line* i *on-line*).

Analiza C-glikozyloflawonów w nasieniu kozieradki metodą *heart-cutting off-line* (LC-LC *off-line*)

Opracowanie warunków rozdzielń w pierwszym wymiarze (¹D)

Opracowując metodę *heart-cutting off-line* założono, że celem separacji w pierwszym wymiarze będzie rozdzielenie badanego ekstraktu z nasion kozieradki na szereg pików o szerokiej podstawie, zawierających grupy nierozdzielonych związków flawonowych. Dodatkowym celem było skrócenie czasu separacji w porównaniu do rozdzielń 1D HPLC (t_G 70 minut). Analizując wyniki rozdzielenia składników badanego wyciągu metodą 1D HPLC uznano, że wybór typu kolumny w pierwszym wymiarze (¹D) ma kluczowe znaczenie dla opracowywanego systemu LC-LC. Ponieważ na kolumnie C-18 nie rozdzielono izomerów położeniowych: orientyny i izoorientyny (związki 3b i 3a, odpowiednio) oraz szaftozydu i izoszaftozydu (związki 4b i 4a, odpowiednio), przy wyborze kolumny w systemie 2D LC *heart-cutting* uwzględniono użycie adsorbentu o mieszanych grupach funkcyjnych, obejmujących grupy oktadecylowe i grupy fenyłowe. Do separacji w pierwszym wymiarze zastosowano kolumnę Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μ m), której wypełnienie stanowi żel krzemionkowy chemicznie modyfikowany grupami fenyłowymi oraz oktadecylowymi w stosunku 1:1. Kolumnę Sphinx C-18-Phenyl charakteryzuje inny mechanizm separacji w porównaniu do żelu krzemionkowego C-18, oparty nie tylko na oddziaływaniach hydrofobowych, związanych z resztami oktadecylowymi, lecz również na oddziaływaniach grup fenyłowych, warunkowanych kompozycją fazy ruchomej. Zastosowanie metanolu jako rozpuszczalnika organicznego powoduje, że poprzez oddziaływania elektronów π - π pierścieni aromatycznych w rozdzieleniu składników badanej próbki uczestniczą grupy fenyłowe (50% fazy stacjonarnej) [600]. Natomiast użycie acetonitrylu w składzie fazy ruchomej powoduje, że udział grup fenyłowych w mechanizmie separacji jest zmienny i zależy od jego stężenia. Wraz ze wzrostem stężenia ACN, oddziaływania elektronów π - π z analitem słabną, ponieważ elektrony zaangażowane są w interakcje z potrójnym wiązaniem nienasyconym $C\equiv N$ cząsteczek acetonitrylu [600], a w mechanizmie separacji biorą udział jedynie grupy C-18. Utrzymanie aktywności grup fenyłowych w fazie stacjonarnej, uniemożliwia całkowitą wymianę metanolu jako składnika fazy ruchomej na acetonitryl.

W początkowych eksperymentach oceniano z efektem negatywnym separację ekstraktu z nasion kozieradki na kolumnie Sphinx C-18-Phenyl, stosując program elucji gradientowej VII, charakteryzujący się wzrastającym stężeniem mieszaniny

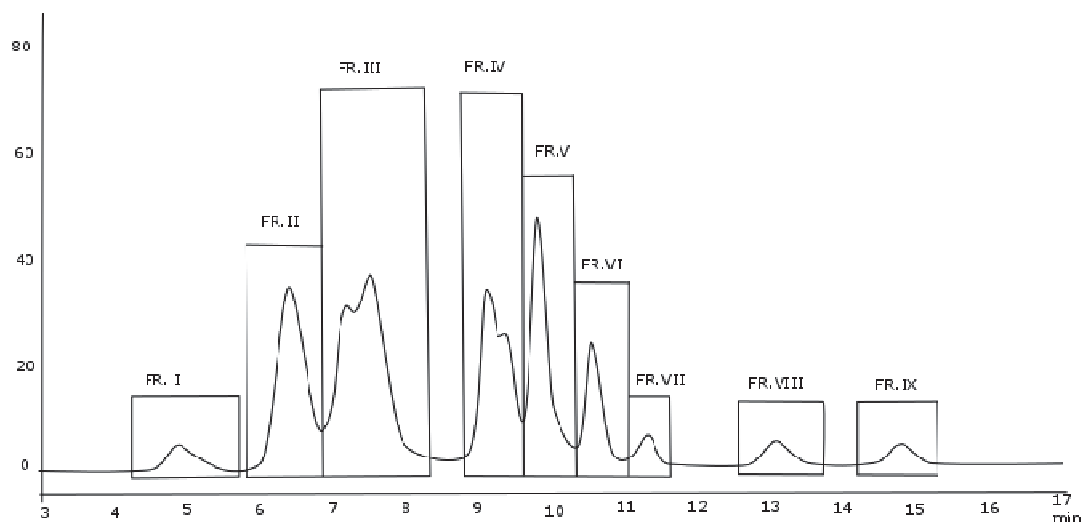
ACN:woda:TFA (50:50:0,1) od 35% do 90% w 0,1% TFA w czasie t_G 50 min [profil gradientu złożony, obejmujący elucję izokratyczną oraz liniowy wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1) w 0,1% TFA] (A.II.4.2.2.3.).

Następnie jako fazy ruchome w pierwszym wymiarze (1D) zastosowano mieszaniny metanolu i wody z dodatkiem kwasu trifluorooctowego jako modyfikatora kwasowego w różnych stosunkach objętościowych: 50:50:0,1 v/v/v (B; A.II.4.2.2.1.) oraz 85:15:0,1 v/v/v (C, p. A.II.4.2.2.1.). Separację prowadzono z zastosowaniem dwóch programów elucji gradientowej: II i IV (II.4.2.2.3.). Program II charakteryzował się liniowym wzrostem stężenia mieszaniny metanol:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) od 40% do 60% w 0,1% TFA w pierwszych 5 minutach rozdzielania, a następnie izokratyczną elucją przy stężeniu 60% przez kolejne 10 minut czasu gradientu (t_G 15 minut), przy natężeniu przepływu 0,05 ml/min. Natomiast program elucji gradientowej IV przy tym samym natężeniu przepływu charakteryzował się liniowym wzrostem stężenia mieszaniny metanol:woda:TFA (85:15:0,1 v/v/v) od 40% do 50% w 0,1% TFA w czasie t_G 0-5 minut, 50-60% w czasie t_G 27-30 minut i 60%-100% w czasie t_G 40-50 minut oraz elucją izokratyczną przy stężeniu 50% mieszaniny metanol:woda:TFA (85:15:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA w czasie t_G 5-27 minut i przy stężeniu 60% czasie t_G 30-40 minut (profil gradientu złożony, t_G 50 minut).

Optymalne rozdzielenie badanego ekstraktu z nasion kozieradki na poszczególne frakcje otrzymano z użyciem fazy ruchomej metanol:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) i 0,1% roztworu wodnego TFA oraz programu elucji gradientowej II. Obserwowano skrócenie czasu separacji (t_G 15 minut) oraz czasu zbierania poszczególnych frakcji z 1D w porównaniu do analiz prowadzonych według programu elucji gradientowej IV.

W rezultacie, w wyniku rozdzielenia na kolumnie Sphinx C-18-Phenyl w pierwszym wymiarze (1D), w podanych wyżej warunkach, dziewięć frakcji (frakcje I-IX) zebrano do dalszej analizy w drugim wymiarze (2D) (ryc. 32). Frakcje zbierano ręcznie do naczynek analitycznych o pojemności 1,5 ml, poprzez umieszczenie naczynka u wylotu kapilary (średnica - 0,13 mm, długość - 20 cm) wyprowadzającej eluat z detektora UV. Uwzględniając parametry kapilary wylotowej oraz natężenie przepływu fazy ruchomej (0,05 ml/min), zbieranie każdej kolejnej frakcji rozpoczynano 2,5 sekundy po pojawieniu się początku wstępującej strony odpowiedniego piku [344] na chromatogramie HPLC i kończono 2,5 sekundy po zakończeniu jego zstępującej strony [344]. Ze względu na niskie stężenie analitów w eluacie 1D , każdą frakcję zbierano 16-krotnie, łącząc kolejne eluaty, które przechowywano w szczelnie zamkniętych naczyniach laboratoryjnych i poddano analizie w 2D w ciągu 24 godzin od zebrania. Czas zbierania poszczególnych frakcji był zmienny, zależny od szerokości piku przy

podstawie i przy zastosowanym natężeniu przepływu fazy ruchomej (0,05 ml/min) wynosił odpowiednio: 0,5 min - frakcje IV-VII oraz 1 min - frakcje I-III, VIII-IX.



Ryc.32. Chromatogram ¹D wyciągu metanolowego z nasion *T. foenum-graecum* otrzymany metodą *heart-cutting off-line* (LC-LC *off-line*): Fr.I - Fr. IX - frakcje zebrane w ¹D. Kolumna Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm), elucja gradientowa według programu II, UV λ-330 nm.

Opracowanie warunków rozdzieleń w drugim wymiarze ²D

W wielu pracach dotyczących separacji 2D LC w ²D wykorzystywane są kolumny z wypełnieniem stanowiącym żel krzemionkowy C-18 [61, 86, 100, 122, 223, 245, 467, 614, 621, 624]. Biorąc pod uwagę zadowalające parametry retencyjne większości rozdzielonych metodą 1D HPLC związków na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm), w fazie ruchomej stanowiącej mieszaninę ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA, zdecydowano o użyciu tej kolumny w separacji ²D frakcji I-IX z ¹D. Zastosowano jako eluent mieszaninę rozpuszczalników: ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) oraz 0,1% TFA. Założono, że zespoły związków czynnych frakcji I-IX będą rozdzielane w ²D w warunkach elucji izokratycznej. Kompozycje faz ruchomych dobierano eksperymentalnie [mieszanina ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA w różnych stosunkach objętościowych (fazy ruchome S1 - S13, II.4.2.2.2.)], stosując natężenie przepływu 0,2 ml/min.

Identyfikację związków flawonoidowych frakcji I-IX prowadzono wobec substancji wzorcowych, w oparciu o otrzymane z użyciem detektorów DAD oraz MS dane chromatograficzne i spektralne (wartości t_R i m/z , widmo UV), w porównaniu do danych literaturowych [143, 353, 435, 456, 574].

Związki zidentyfikowane we frakcjach I - IX (Fr. I - IX) w rezultacie rozdzieleń w drugim wymiarze zestawiono w tabeli 8. Otrzymane chromatogramy HPLC przedstawiono na ryc. 36.

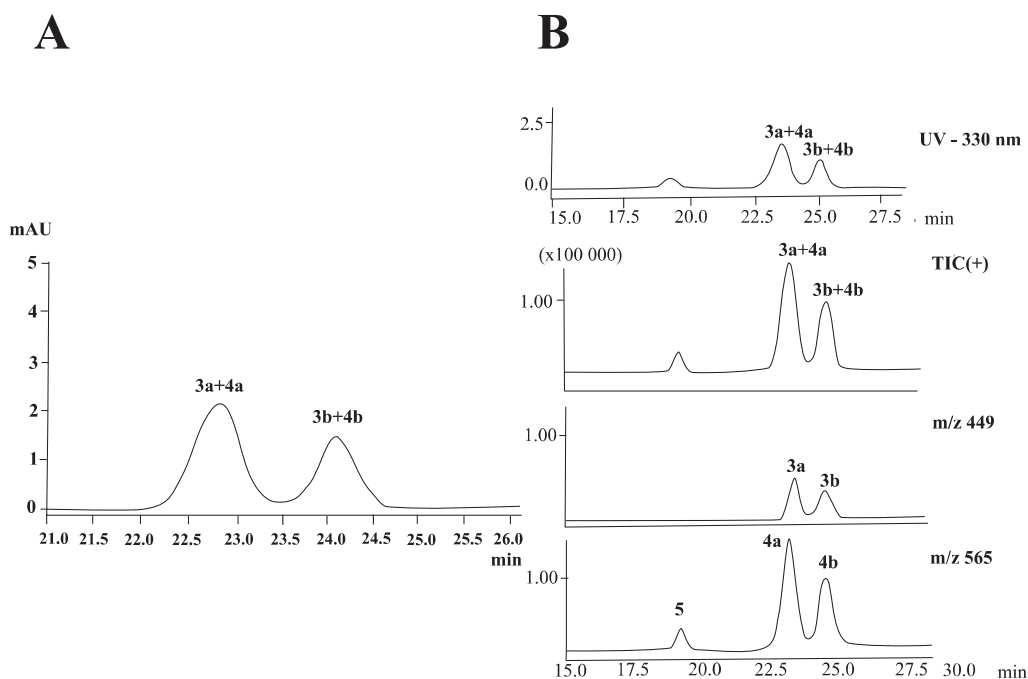
W analizie związków flawonoidowych **frakcji I** (Fr. I) początkowo testowano fazy ruchome, stanowiące 30%, 32%, 35% i 40% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (fazy ruchome S4, S5, S6 i S9, odpowiednio). Do dalszych badań wybrano fazę ruchomą, zawierającą 32% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (S5). Na otrzymanym chromatogramie ²D zidentyfikowano jako dominujący związek wiceninę-2 (związek 1; t_R 2,5 min) (ryc. 36).

Spośród testowanych w separacji **frakcji II** (Fr. II) faz ruchomych, stanowiących 32%, 35% i 40% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (fazy ruchome S4, S5 i S9, odpowiednio) do dalszych analiz, podobnie jak w przypadku frakcji I, wybrano fazę ruchomą S5. We frakcji II potwierdzono obecność wicenyiny-1 (związek 2; t_R 2,95 min) (ryc. 36).

Przeprowadzenia większej liczby eksperymentów wymagała optymalizacja warunków separacji związków flawonoidowych **frakcji III** (Fr. III). Przypuszczano, że we frakcji obecnych jest co najmniej 3, a maksymalnie 5 związków. W rozdzielaniu 1D HPLC wobec wzorców wykazano, że rozdzielaniu nie ulegały pary związków: izoorientyna i orientyna (związki 3a i 3b, odpowiednio) oraz izoszaftozyd i szaftozyd (związki 4a i 4b, odpowiednio). Zastosowano trzy fazy ruchome: 32% ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (faza ruchoma S5) (metoda I), 20% ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (faza ruchoma S1) (metoda II) oraz 23% ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (faza ruchoma S2) (metoda III). W badaniach wykorzystano mieszaninę związków wzorcowych: izoorientyny (związek 3a), orientyny (związek 3b), izoszaftozydu (związek 4a) i szaftozydu (związek 4b).

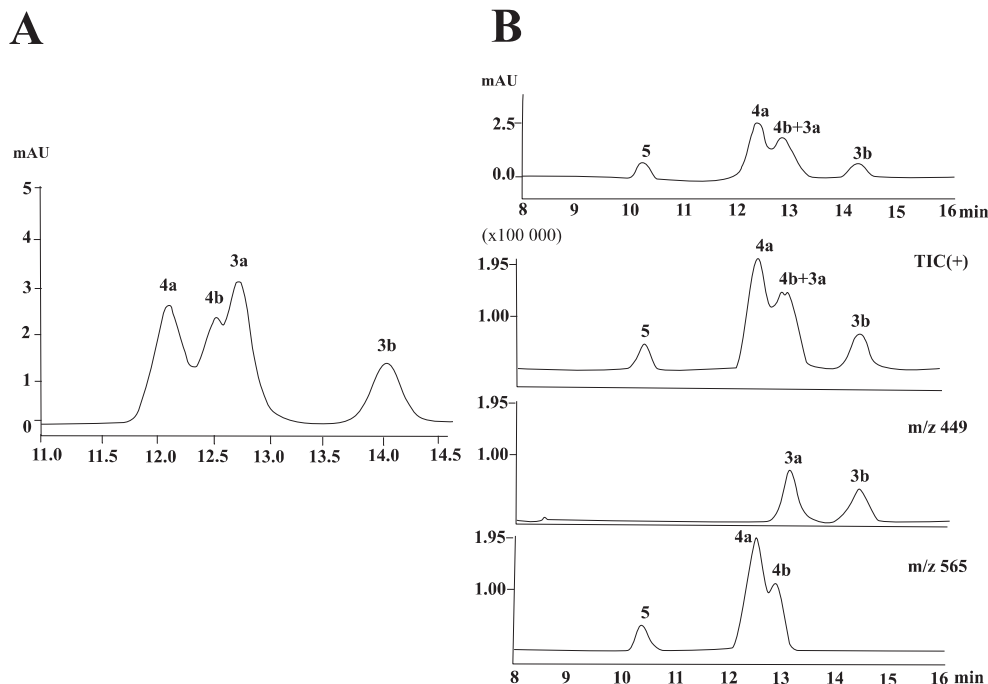
W wyniku zastosowania fazy ruchomej, stanowiącej 20% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (S1) (metoda II) na otrzymanym profilu chromatograficznym obserwowano dwa piki szerokie przy podstawie (t_R 12,84 min oraz t_R 24,11 min), z których każdy zawierał jeden mono-C-glukozyd luteoliny (orientynę lub izoorientynę) oraz jeden di-C-arabinozylo-glukozyd apigeniny (szaftozyd lub izoszaftozyd). Z użyciem jako detektora spektrometru mas oraz techniki SIM potwierdzono obecność jako koeluujących: izoorientyny (3a) i izoszaftozydu (4a) (t_R 12,84 min) oraz orientyny (3b) i szaftozydu (4b) (t_R 24,11 min). Stwierdzono, że w warunkach separacji HPLC z użyciem detektora ESI-MS i fazy ruchomej S1 jest

możliwa jakościowa i ilościowa analiza związków 3a, 3b, 4a i 4b (ryc. 33). W powyższych warunkach we frakcji III (Fr. III), obok wyżej wymienionych związków potwierdzono obecność di-C-(6/8)-heksozylo-pentozydu apigeniny (5). Występowanie izoszaftozydu ujawniono w nasionach *T. foenum-graecum* po raz pierwszy.



Ryc.33. Chromatogramy LC-LC-DAD-ESI-MS *off-line* mieszaniny związków wzorcowych (A) oraz frakcji II (B), otrzymane w warunkach metody III: 3a - izoorientyna, 3b - orientyna, 4a - izoszaftozyd, 4b - szaftozyd, 5 - di-C-(6/8)-heksozylo-pentozyd apigeniny. Kolumna Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m), faza ruchoma: 20% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (S1), UV λ -330 nm.

W kolejnym etapie prac optymalizowano warunki rozdzielania tych związków poprzez zwiększenie stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA z 20% (faza ruchoma S1) do 23% (faza ruchoma S2). W rezultacie zmianie uległy wartości t_R poszczególnych związków. Zastosowanie fazy ruchomej S2 (23% mieszaniny ACN:woda:TFA, 50:50:0,1 v/v/v w 0,1% TFA) (metoda III) w separacji mieszaniny 4 wzorców skutkowało częściowym rozdzielaniem 3 spośród nich - izoszaftozydu (4a), szaftozydu (4b), izoorientyny (3a) o wartościach t_R odpowiednio: t_R 12,11 min, t_R 12,52 min, t_R 12,71 min, obok orientyny (3b) - t_R 14,02 min. Jednak analizując frakcję III w tych warunkach chromatograficznych nie obserwowano separacji związków 3a - orientyny i 4b - szaftozydu (ryc. 34 B). Prawdopodobnie stosunek ilościowy związków 3a i 4b decydował o ich separacji w formie jednego piksu o t_R 12,90 min. Zastosowanie detektora mas i techniki SIM potwierdziło obecność izoorientyny (3a) oraz szaftozydu (4b) we frakcji III (ryc. 34 B).



Ryc.34. Chromatogramy LC-LC-DAD-ESI-MS *off-line* mieszaniny związków wzorcowych (A) oraz frakcji III (B), otrzymane w warunkach metody III: 3a - izoorientyna, 3b - orientyna, 4a - izoszaftozyd, 4b - szaftozyd, 5 - di-C-(6/8)-heksozylo-pentozyd apigeniny, kolumna Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m), faza ruchoma: 23% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (S2), UV λ -330 nm.

W opracowanych trzech wariantach warunków analizy HPLC-DAD-ESI-MS frakcji III: 32% ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (faza ruchoma S5) (metoda I); 20% ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (faza ruchoma S1) (metoda II); 23% ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (faza ruchoma S2) (metoda III) ujawniono obecność orientyny (związek 3b), izoorientyny (związek 3a), szaftozydu (związek 4b) oraz izoszaftozydu (związek 4a) wraz z di-C-(6/8)-heksozylo-pentozydem apigeniny (związek 5).

Najlepsze rozdzielenie izoorientyny (3a) (t_R 3,44 min) od orientyny (3b) (t_R 3,98) (R_s 2,45) uzyskano w fazie ruchomej 32% ACN:woda:TFA, 50:50:0,1 v/v/v w 0,1% TFA (S5) (metoda I) przy R_s 0,0 dla izoszaftozydu (4a) i szaftozydu (4b) (t_R 3,11 min) (ryc. 36).

Stwierdzono, że jakkolwiek możliwe jest uzyskanie separacji mono-C-glukozydów luteoliny (orientyny i izoorientyny) jako związków wzorcowych oraz jako związków flawonoidowych badanej frakcji w czasie 5 minut (ryc. 36), to czas konieczny do ich rozdzielenia obok di-C-arabinozylo-glukozydów apigeniny (szaftozydu i izoszaftozydu) jest dłuższy i wynosi 25 minut. Ponadto separacja orientyny i izoorientyny obok szaftozydu i izoszaftozydu jest możliwa jedynie z użyciem

opracowanej metody *heart-cutting off-line* (LC-LC *off-line*), nieograniczającej czasu analizy w ²D, co jest konieczne w rozdzieleniach 2D HPLC *on-line* [123, 135, 204, 224, 231, 232, 234, 235, 290].

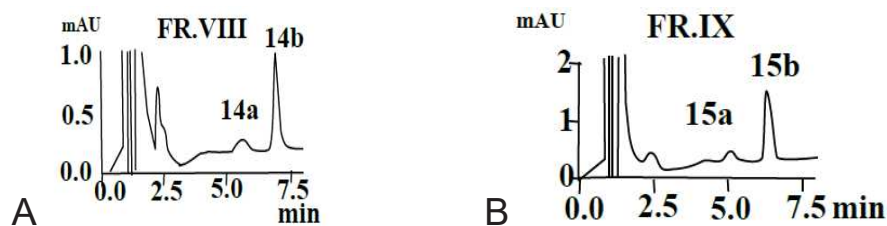
Rozdzielenie związków flawonoidowych **frakcji IV** (Fr. IV) w ²D prowadzono początkowo, testując fazy ruchome o stężeniu 30% i 35% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA (fazy ruchome S4 i S5, odpowiednio). Separację związków frakcji IV otrzymano z użyciem fazy ruchomej stanowiącej 30% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA (ryc. 36). We frakcji IV potwierdzono obecność witeksyny (związek 6) (t_R 7,27 min.) i wiceniny-3 (związek 7) (t_R 5,24 min) (ryc. 36).

Separację ²D związków flawonoidowych **frakcji V** (Fr. V) i **frakcji VI** (Fr. VI) prowadzono z zastosowaniem fazy ruchomej o stężeniu 35% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (faza ruchoma S6). Ponieważ uzyskano zadowalające rozdzielanie, dalsze modyfikacje składu eluentu nie były konieczne. We frakcji V ujawniono obecność 3 związków, natomiast we frakcji VI - 2 związków flawonoidowych. Problemem była identyfikacja związków 10 i 11, ponieważ na podstawie wartości m/z jonów pseudomolekularnych w trybie jonów dodatnich przy m/z 535 $[M+H]^+$ oraz w trybie jonów ujemnych deprotonowanych jonów molekularnych przy m/z 533 $[M-H]^-$ i adduktów z TFA przy m/z 647 $[M-H+114]^-$ nie było możliwe przypisanie obecności obydwu związków do odpowiednich frakcji. Związki te są związkami izobarycznymi. W celu identyfikacji związków 10 i 11 jako związków flawonoidowych frakcji V lub VI przeprowadzono dodatkowe eksperymenty. W warunkach rozdzielania 1D HPLC (program elucji gradientowej I; II.7.1.2.2) zebrano frakcje zawierające związki 10 i 11. Następnie przeprowadzono koiniekcję frakcji zawierających odpowiednio związek 10 i 11 z frakcjami V i VI, wykazując, że związek 10 obecny jest we frakcji V (²D t_R 7,05 min), natomiast związek 11 - we frakcji VI (²D t_R 3,79 min). Ponadto **frakcja V** (Fr. V) zawierała związki 8 (t_R 8,01 min) i 9 (t_R 6,16 min), zidentyfikowane w toku wcześniejszych badań odpowiednio jako: izowiteksyna oraz prawdopodobnie di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny (ryc. 36). Natomiast we **frakcji VI** (Fr. VI) ujawniono obecność związków 12a (t_R 3,96 min) i 12b (t_R 4,35 min) (ryc. 36). Analiza widma masowego związku 12a, uzyskanego w trybie jonów dodatnich i ujemnych wykazała obecność sygnałów jonów molekularnych przy m/z 535 $[M+H]^+$ (w trybie jonów dodatnich) i deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 533 $[M-H]^-$ obok adduktu z TFA przy m/z 647 $[M-H+114]^-$ (w trybie jonów ujemnych). W oparciu o uzyskane dane, związek 12a zidentyfikowano jako C-di-(6/8)-pentozyd apigeniny.

Natomiast w widmie ESI-MS związku 12b obecne były sygnały charakterystyczne dla mono-C-glukozydów apigeniny przy m/z 433 $[M+H]^+$ (w trybie jonów dodatnich) i m/z 431 $[M-H]^-$ oraz m/z 545 $[M-H+114]^-$ (addukt z TFA) (w trybie jonów ujemnych). W widmie UV związku 12b obecne były dwa charakterystyczne dla apigeniny maksima absorpcji: λ_{max} 269 nm (I maksimum) oraz λ_{max} 334 nm (II maksimum). W oparciu o uzyskane dane, stwierdzono, że związek 12b jest prawdopodobnie mono-C-heksozydem apigeniny, o nieznanym charakterze chemicznym heksozy.

Analiza **frakcji VII** (Fr. VII) z użyciem 35% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (faza ruchoma S6) ujawniła obecność jako dominującego związku, zidentyfikowanego w toku wcześniejszych badań jako przypuszczalnie di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny (związek 13) (ryc. 36).

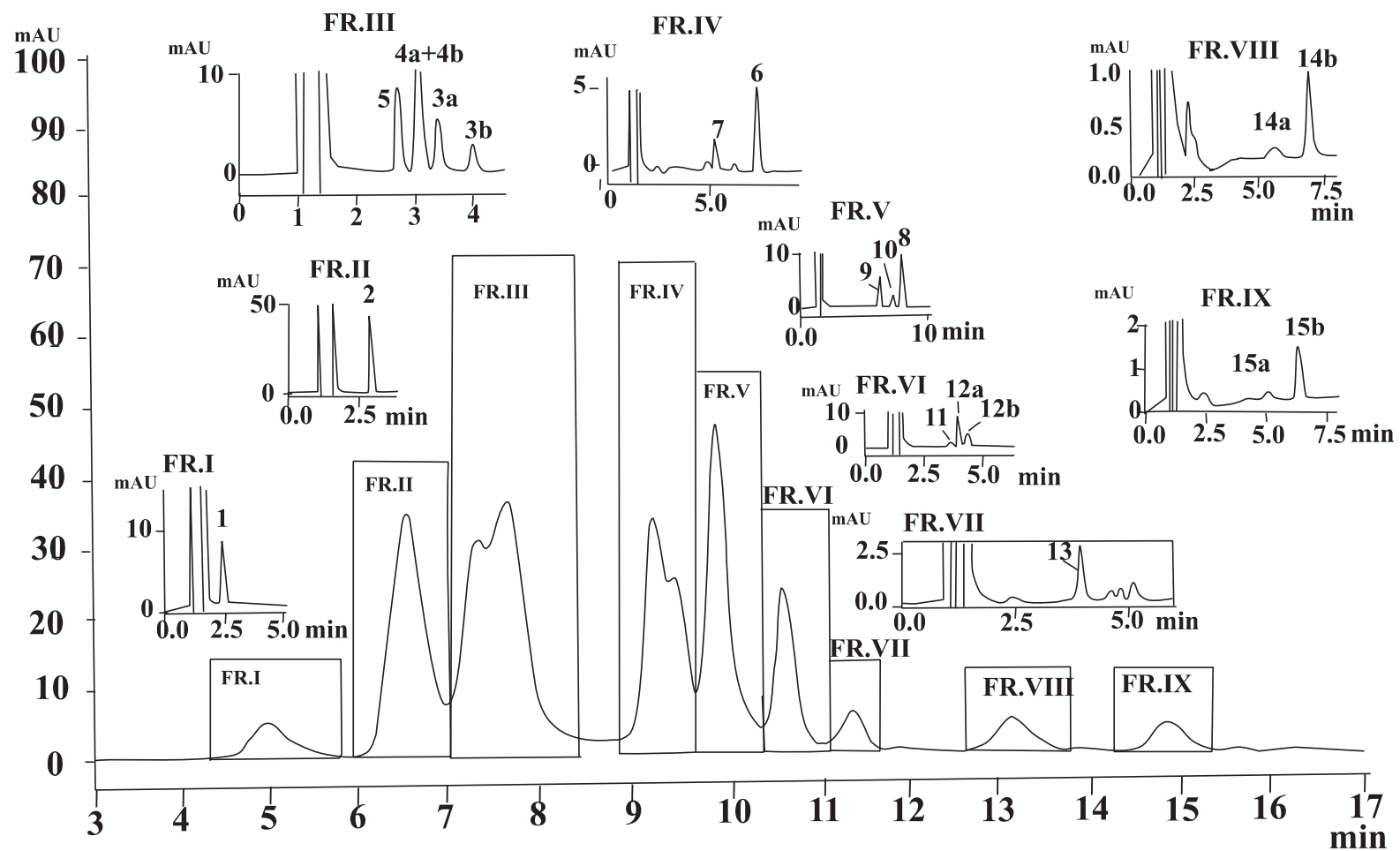
Rozdzielenie związków flawonoidowych **frakcji VIII** (Fr. VIII) i **frakcji IX** (Fr. IX), zawierających estry p-kumarowe mono-C-glukozyloflawonów, wymagało użycia faz ruchomych o wyższym stężeniu mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA, ponieważ zawarte w tych frakcjach związki wymywały się z kolumny 1D w końcowym etapie gradientu, przy najwyższym programowanym stężeniu mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (program elucji gradientowej II). W 2D zastosowano następujące fazy ruchome: dla frakcji VIII - 45% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (faza ruchoma S10) oraz dla frakcji IX - 50% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (faza ruchoma S11). Na chromatogramach 2D obserwowano obecność dwóch pików o widmach UV i MS odpowiadających estrom p-kumarowym: orientyny (15a) i izorientyny (15b) we **frakcji VIII** oraz witeksyny (15a) i izowiteksyny (15b) we **frakcji IX** (ryc. 35, 36). Porównując kolejność elucji wzorcowych izomerów C-6/8-glikozydów apigeniny - witeksyny (związek 6) i izowiteksyny (związek 8) oraz C-6/8-glikozydów luteoliny - orientyny (związek 3b) i izorientyny (związek 3a), założono, że we **frakcji VIII** dominującym związkiem jest ester p-kumarowy orientyny (związek 14b), natomiast we **frakcji IX** - ester p-kumarowy izowiteksyny (związek 15b) (ryc. 35).



Ryc.35. Chromatogramy ²D frakcji VIII (A) i IX (B) otrzymane metodą *heart-cutting off-line* (LC-LC *off-line*): 14a - ester p-kumarowy izoorientyny; 14b - ester p-kumarowy orientyny; 15a - ester p-kumarowy witeksyny; 15b - ester p-kumarowy izowiteksyny. Kolumna Kinetex C-18, fazy ruchome: 45% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (S10) – frakcja VIII (A); 50% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (S11) – frakcja IX (B), UV λ-330 nm.

Frakcja	Związki
I	1 wicenina-2 (6,8-C-diglukozyd)
II	2 wicenina-1 (6-C-ksylozylo-8-C-glukozyd)
III	3a izoorientyna (6-C-glukozyd luteoliny) 3b orientyna (8-C-glukozyd luteoliny) 4a izoszaftozyd (6-C-α-L-arabinozylo-8-C-β-D-glukozyd apigeniny) 4b szaftozyd(6-C-β-D-glukozylo-8-C-α-L-arabinozyd apigeniny) 5 C-di-(6/8)-heksozylo-pentozyd apigeniny
IV	6 witeksyna (8-C-glukozyd apigeniny) 7 wicenina-3 (6-C-glukozylo-8-C-ksylozyd apigeniny)
V	8 izowiteksyna (6-C-glukozyd apigeniny), 9 C-di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny 10 di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny
VI	11 di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny 12a di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny 12b mono-C-heksozyd apigeniny
VII	13 di-C-(6/8)-pentozyd apigeniny
VIII	14a ester p-kumarowy izoorientyny 14b ester p-kumarowy orientyny
IX	15a ester p-kumarowy izowiteksyny 15b ester p-kumarowy witeksyny

Tab.8. Charakterystyka C-glikozyloflawonów, rozdzielonych metodą *heart-cutting off-line* (LC-LC *off-line*).



Ryc.36. Chromatogram LC-LC wyciągu metanolowego z nasion *T. foenum-graecum* otrzymany w trybie *off-line*: 1-15 C-glikozyloflawony (p. tab. 7.): ¹D - kolumna Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm), elucja gradientowa według programu II, ²D - kolumna Kinetex C-18 100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm), fazy ruchome: S5 – frakcje I-III; S4– frakcja IV; S6– frakcje V-VII; S10– frakcja VIII; S11– frakcja IX, UV λ-330 nm.

W wyniku analiz wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej metodą dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej LC-LC*heart-cutting off-line*, uzyskano rozdzielenie 18 C-glikozyloflawonów (związki 1, 2, 3a, 3b, 4a, 4b, 5-11, 12a, 12b, 13, 14, 15), w tym pary izomerycznych: mono-C-glukozydów luteoliny (orientyny i izoorientyny) oraz izomerycznych di-C-arabinozylo-glukozydów apigeniny (szaftozydu i izoszaftozydu). Obecność izoszaftozydu oraz wiceniny-3 ujawniono w badanym materiale roślinnym po raz pierwszy.

Ponadto wskazano na obecność 4 związków o charakterze estrów, pochodnych izoorientyny, orientyny, izowiteksyny i witeksyny z kwasem p-kumarowym (związki 14a, 14b, 15a, 15b, odpowiednio).

Ujawniono obecność 5 związków flawonoidowych o charakterze di-C-(6/8)-pentozydów apigeniny (związki 9, 10, 11 12a, 13) i 1 mono-C-heksozydu apigeniny (związek 12b). Stwierdzone di-C-(6/8)-pentozydy apigeniny mogą zawierać dwie cząsteczki arabinozy, dwie cząsteczki ksylozy lub arabinozę i ksylozę przyłączone do aglikonu w pozycjach C-6 i C-8. Dotychczas nie wyizolowano z nasion kozieradki pospolitej C-glikozyloflawonów, zawierających dwie pentozy. Natomiast uwzględniając obecność w surowcu mono-C-glukozydów apigeniny (witeksyny i izowiteksyny), ujawniony mono-C-heksozyd (związek 12b) prawdopodobnie zawiera w swojej cząsteczce galaktozę, przyłączoną do cząsteczki apigeniny w pozycji C-6 lub C-8.

Biorąc pod uwagę dane chromatograficzne i spektralne związku 5, identyfikowanego jako di-C-(6/8)-heksozylo-pentozyd apigeniny oraz wykazaną obecność w surowcu 4 innych di-C-heksozylo-pentozydów, zawierających w swej cząsteczce: glukozę i arabinozę (szaftozyd i izoszaftozyd, związki 4b i 4a, odpowiednio) lub glukozę i ksylozę (wicenina-1 i wicenina-3, związki 2 i 7, odpowiednio) można przypuszczać, że w strukturze związku 5 występuje odmienna niż w związkach 2, 7, 4a i 4b kombinacja cukrów. Możliwe, że związek 5 zawiera pentozę (ksylozę lub arabinozę) i galaktozę. Shan i wsp. [493] zidentyfikowali w surowcu azjatyckim 6-C-galaktopiranozylo-8-C- α -L-arabinozyd apigeniny, natomiast Rayyan i wsp. [456] 6-C- β -arabinopiranozylo-8-C- β -galaktopiranozyd apigeniny oraz jej 6-C- β -ksylopiranozylo-8-C- β -galaktopiranozyd.

Analiza C-glikozyloflawonów w nasieniu kozieradki metodą *comprehensive* (LCxLC)

Jednym z kluczowych elementów projektowania systemu *comprehensive* jest czas separacji w ²D, który musi być wystarczająco długi, aby uzyskać rozdzielanie składników frakcji przenoszonych z ¹D, zanim kolejna frakcja będzie wprowadzona na kolumnę ²D. Uwzględniając złożoność składu chemicznego matrycy, należy dążyć do otrzymania jak największej liczby frakcji z ¹D i maksymalnego skrócenia czasu separacji w ²D przy zachowaniu efektywności rozdzieleń. W toku prac nad systemem *comprehensive* (*off-line*, *on-line*) utrzymano założenie rozdzielania w ²D składników poszczególnych frakcji z ¹D w warunkach elucji izokratycznej. Technika LCxLC w trybie *off-line/on-line* wymaga przeniesienia wszystkich składników próbki na kolumnę drugiego wymiaru, w formie całej objętości eluatu z kolumny ¹D, zawierającego rozdzielaną matrycę, a nie tylko wyselekcjonowanych frakcji, jak ma to miejsce w technice *heart-cutting* [204, 235]. Konstruując system LCxLC jako wyjściowe przyjęto warunki separacji opracowanej metody *heart-cutting off-line*, częściowo je modyfikując, początkowo dla trybu *off-line comprehensive*, a następnie - trybu *on-line comprehensive*.

Opracowanie warunków rozdzieleń w pierwszym wymiarze (¹D) *off-line*

Separację w pierwszym wymiarze prowadzono na kolumnie Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm), użytej w systemie LC-LC *off-line*. Biorąc pod uwagę ograniczenia techniczne projektowanego systemu *comprehensive* - przede wszystkim rodzaj łącznika stanowiącego zawór 10-portowy dwudrożny z dwoma pętlami o objętości 50 μl, optymalizacja rozdzieleń w ¹D obejmowała głównie modyfikację składu eluentu oraz programu elucji gradientowej. Uwzględniając objętość pętli dozującej w systemie LCxLC, elementem determinującym separację w obydwu wymiarach, było natężenie przepływu fazy ruchomej na kolumnie ¹D. Objętość każdej przenoszonej frakcji z ¹D musiała być równa objętości pętli lub mniejsza. Dlatego w porównaniu do opracowanego systemu *heart-cutting off-line* natężenie przepływu fazy ruchomej zmniejszono z 0,05 ml/min do 0,015 ml/min (program III) lub 0,017 ml/min (programy V, VI, VIII).

W pierwszym etapie prac wykorzystano fazę ruchomą użytą w analizach w systemie *heart-cutting off-line* - metanol:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA,

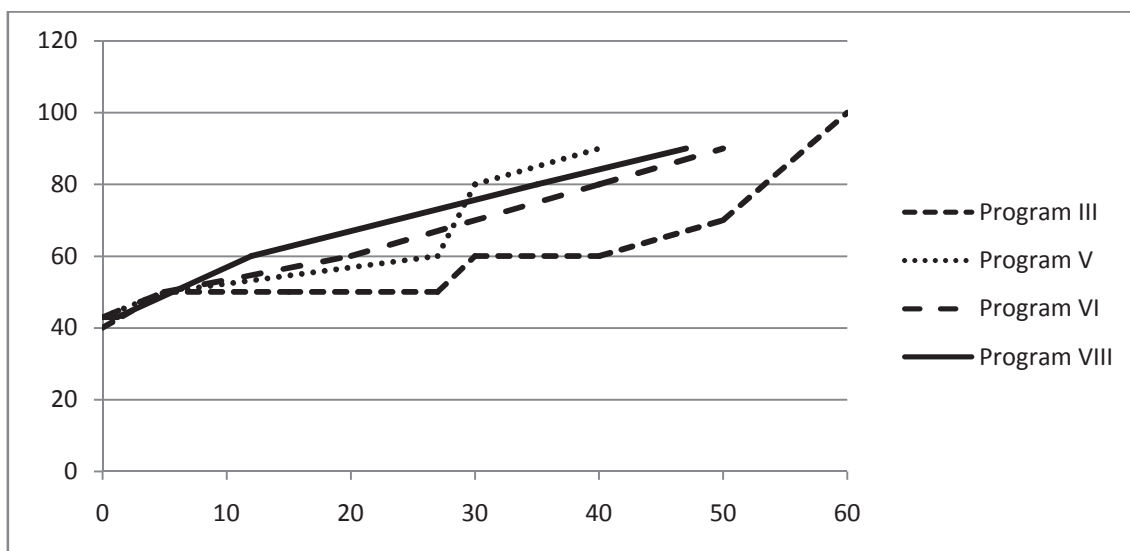
stosując przy natężeniu przepływu fazy ruchomej 0,015 ml/min program elucji gradientowej III, charakteryzujący się liniowym wzrostem stężenia mieszaniny metanol:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) od 43% do 50% w 0,1% TFA w czasie t_G 0-5 min, od 50% do 60% w czasie t_G 27-30 minut i od 60% do 100% w czasie t_G 40-60 minut oraz elucją izokratyczną przy stężeniu 50% mieszaniny metanol:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA w czasie t_G 5-27 minut, natomiast przy stężeniu 60% w czasie t_G 30-40 minut (ryc. 37, 38-1), co nie dało pozytywnych rezultatów.

Dlatego postanowiono ocenić wpływ dodatku innych rozpuszczalników organicznych (acetonitrylu i tetrahydrofuranu) do mieszaniny metanol:woda:TFA. W celu uzyskania profilu chromatograficznego wyciągu metanolowego z nasion kozieradki, umożliwiającą przeniesienie wieloskładnikowych pików o szerokiej podstawie, najkorzystniej rozdzielonych do linii bazowej, eliminując przeniesienie pojedynczego związku w dwóch oddzielnych frakcjach. Kompozycje objętościowe mieszaniny metanol:woda:TFA z dodatkiem acetonitrylu lub tetrahydrofuranu modyfikowano w oparciu o wartość siły elucyjnej mieszanin rozpuszczalnik organiczny:woda. W rezultacie porównano wpływ na rozdzielczość dwóch dodatkowych mieszanin rozpuszczalników: metanol:woda:tetrahydrofuran (83:15:2, v/v/v) z dodatkiem TFA w stężeniu 0,1% oraz metanol:ACN:woda (330:40:80, v/v/v) z dodatkiem TFA w stężeniu 0,1%. Na podstawie danych literaturowych [600] zakładano, że takie rozwiązanie powinno zapewnić utrzymanie ortogonalności projektowanego systemu oraz redukcję piku rozpuszczalnika próbki, widocznego na początku chromatogramu ²D, ponieważ eluent pierwszego wymiaru stanowi dla detektora UV w drugim wymiarze rozpuszczalnik próbki. Całkowite zastąpienie metanolu acetonitrylem nie było możliwe ze względu na utrzymanie mechanizmu separacji na kolumnie Sphinx C-18-Phenyl [600].

Rozdzielenia z użyciem fazy ruchomej metanol:woda:tetrahydrofuran:TFA (83:15:2:0,1, v/v/v/v) prowadzono według programu elucji gradientowej V, charakteryzującego się wzrostem stężenia mieszaniny metanol:woda:tetrahydrofuran:TFA (83:15:2:0,1, v/v/v/v) od 43% do 90% w 0,1% wodnym roztworze TFA w czasie t_G 40 minut przy natężeniu przepływu fazy ruchomej 0,017 ml/min (ryc. 37, 38-2). Na otrzymanym chromatogramie ¹D obserwowano częściową separację składników frakcji III (Fr. III) - orientyny i izoorientyny. W rezultacie czas konieczny do zebrania frakcji III ulegał wydłużeniu, co było niekorzystne w kontekście konieczności maksymalnego skrócenia czasu zbierania poszczególnych frakcji. Ponieważ orientyna i izoorientyna mogą być efektywnie rozdzielone w drugim wymiarze, ich separacja w ¹D nie była konieczna. Dodatkowo, na chromatogramie HPLC, otrzymanym z użyciem mieszaniny metanol:woda:tetrahydrofuran:TFA

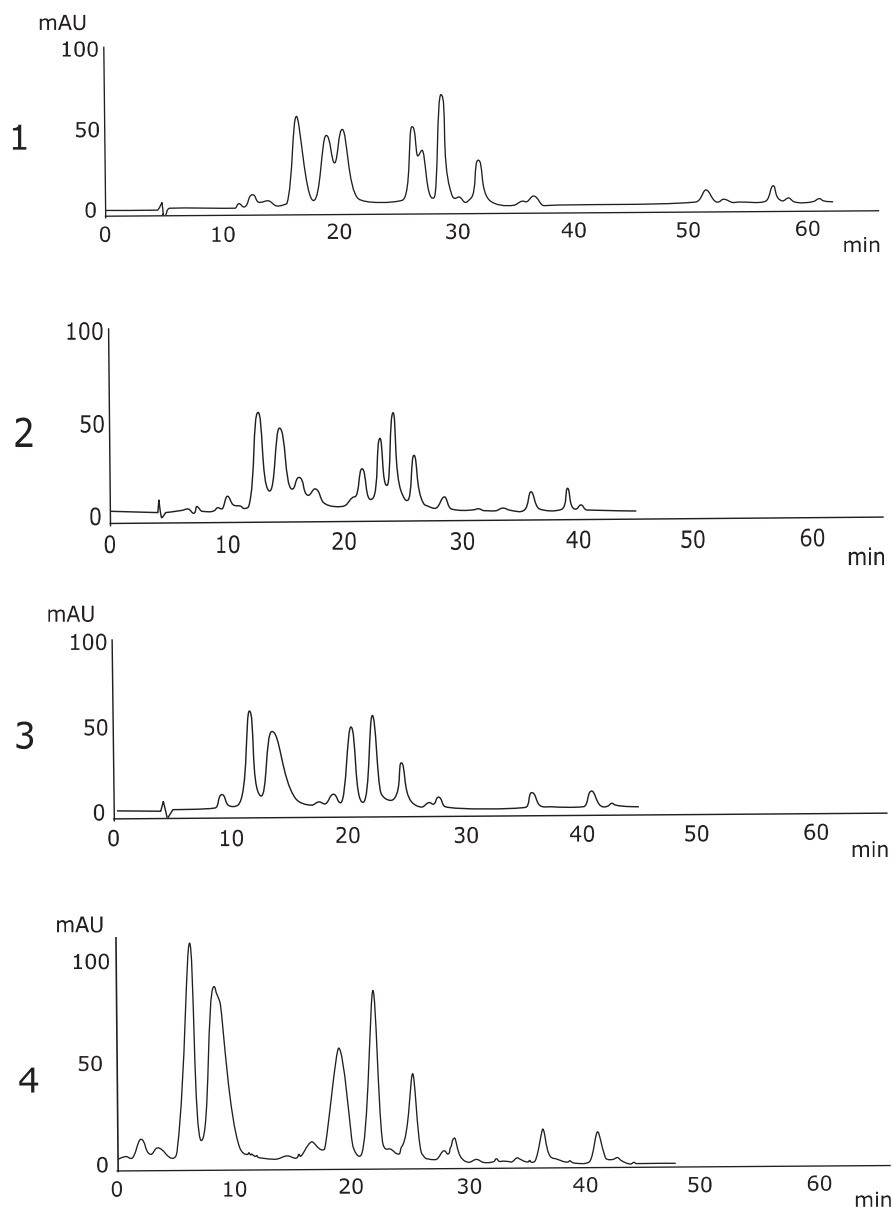
(83:15:2:0,1, v/v/v/v) w 0,1% wodnym TFA według programu elucji gradientowej V, frakcje IV i V nie były rozdzielone do linii bazowej, co utrudniało ich prawidłowe zebranie i skutkowało przeniesieniem niektórych związków w dwóch frakcjach.

Rozdzielenia z użyciem mieszaniny metanol:ACN:woda:TFA (330:40:80:0,45, v/v/v/v) początkowo prowadzono według programu elucji gradientowej VI, charakteryzującego się liniowym wzrostem stężenia mieszaniny metanol:ACN:woda:TFA (330:40:80:0,45 v/v/v/v) od 43% do 90% w 0,1% wodnym roztworze TFA w czasie t_G 50 minut (program VI) przy natężeniu przepływu 0,017 ml/min (ryc. 37, 38-3). Na otrzymanym chromatogramie HPLC-DAD obecne były niesymetryczne piki, dobrze rozdzielone do linii bazowej. Następnie separację prowadzono według programu elucji gradientowej VIII, charakteryzującego się elucją izokratyczną przy stężeniu 43% mieszaniny metanol:ACN:woda:TFA (330:40:80:0,45, v/v/v/v) w 0,1% wodnym roztworze TFA w czasie t_G 0-1,2 minuty, a następnie liniowym wzrostem stężenia mieszaniny metanol:ACN:woda:TFA (330:40:80:0,45, v/v/v/v) od 43% do 90% w 0,1% wodnym TFA w czasie t_G 1,2-47 minut (t_G 47 minut). Umożliwiło to lepsze rozdzielanie poszczególnych wieloskładnikowych pików o szerokiej podstawie, przy czym zmniejszyły się ich wartości t_R , co skutkowało osiągnięciem zakładanego skrócenia czasu separacji w 1D z 50 do 47 minut (ryc. 37, 38-4, 39).



Ryc.37. Programy elucji gradientowej (III, V, VI, VIII) stosowane w separacji 1D comprehensive off-line wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej.

W rezultacie do separacji w pierwszym wymiarze systemu LCxLC *off-line* na kolumnie Sphinx C-18-Phenyl użyto mieszaniny metanol:ACN:woda:TFA (330:40:80:0,45, v/v/v/v) w 0,1% TFA i programu elucji gradientowej VIII (ryc. 38-2), otrzymując w krótkim czasie (47 minut) separację zbliżoną do separacji w systemie LC-LC.



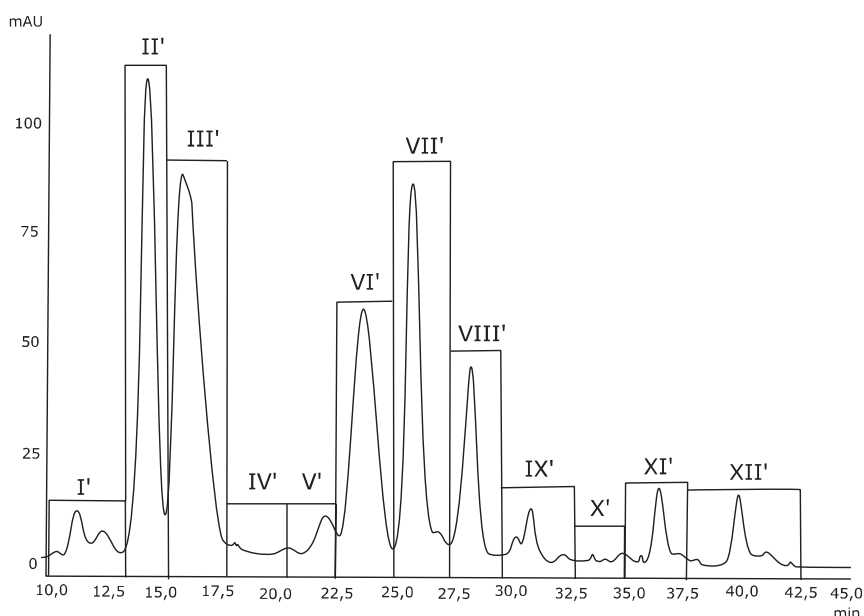
Ryc.38. Chromatogramy ¹D wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej, otrzymane w wyniku separacji z użyciem różnych faz ruchomych i programów elucji gradientowej:

1. metanol:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w mieszaninie z 0,1% roztworem TFA w wodzie, program III
2. metanol:woda:tetrahydrofuran:TFA (83:15:2:0,1, v/v/v/v) w mieszaninie z 0,1% roztworem TFA w wodzie, program V
3. metanol:ACN:woda:TFA (330:40:80:0,45, v/v/v/v) w mieszaninie z 0,1% roztworem TFA w wodzie, program VI
4. metanol:ACN:woda:TFA (330:40:80:0,45, v/v/v/v) w mieszaninie z 0,1% roztworem TFA w wodzie, program VIII.

W oparciu o otrzymany w opracowanych warunkach chromatogram ¹D LC wyróżniono 12 frakcji (I'-XII'), z których 9 odpowiadało frakcjom z rozdzielania ¹D w systemie LC-LC *off-line* (frakcje I'-III', VI'-VIII', XI'-XII'), natomiast 3 uzyskano jako dodatkowe (IV', IX' i X') (tab. 9). 10 z zebranych frakcji zawierało C-glikozyloflawony (frakcje I'-IV', VI'-IX', XI'-XII'), natomiast pozostałe 2 stanowiły frakcje "puste" (brak C-glikozydów flawonowych, frakcje V' i X') (tab. 9). Poszczególne frakcje zbierano ręcznie, a następnie poddawano analizie w drugim wymiarze.

Frakcja ¹ D	
<i>off-line heart-cutting</i>	<i>off-line / on-line comprehensive</i>
I	I'
II	II'
III	III'
–	IV'
IV	V'
V	VI'
VI	VII'
VII	VIII
–	IX'
–	X'
VIII	XI'
IX	XII'

Tab.9. Charakterystyka frakcji ¹D otrzymanych w systemach *heart-cutting off-line*, *comprehensive off-line* i *on-line*.



Ryc.39. Chromatogram ¹D LCxLC *off-line/on-line* wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej: I' - XII' - frakcje ¹D. Kolumna Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm), elucja gradientowa według programu VIII, UV λ-330 nm.

Opracowanie warunków rozdzieleń w drugim wymiarze (²D)

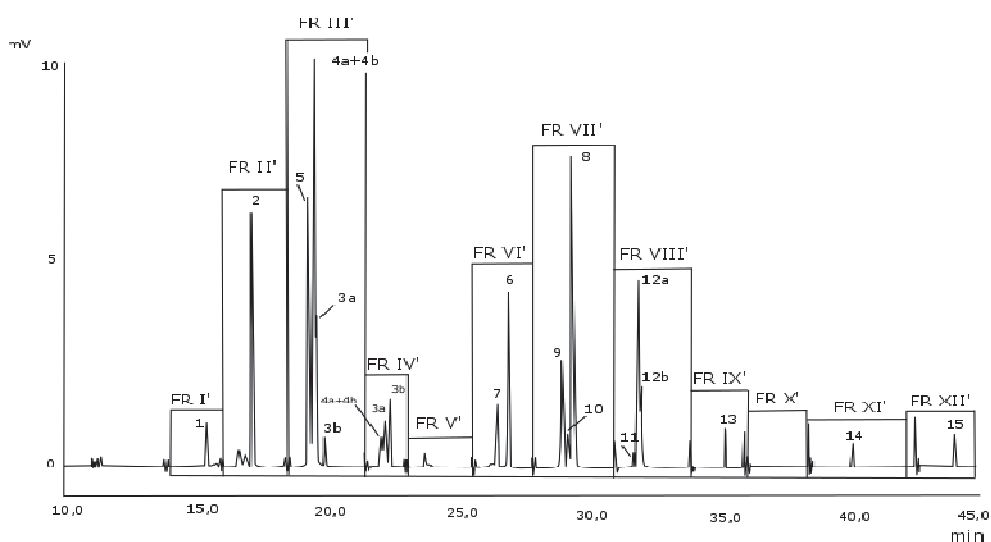
W celu skrócenia czasu analizy w drugim wymiarze zmieniono kolumnę ²D ze stosowanej wcześniej w systemie *heart-cutting off-line* kolumny Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm) na kolumnę krótszą o zbliżonej średnicy ziaren - Discovery HS C18 (75 mm x 2,1 mm x 3 μm). Dodatkowo zwiększono natężenie przepływu fazy ruchomej w ²D z 1 ml/min (LC-LC *off-line*) do 2,3 ml/min (LCxLC). Wstępne rozdzielania wykazały, że profile separacji składników poszczególnych frakcji, otrzymane z użyciem kolumny Discovery są identyczne z uzyskanymi na kolumnie Kinetex. Ponadto obserwowano zmniejszenie wartości t_R i skrócenie czasu separacji w ²D frakcji przenoszonych z ¹D.

Separację ²D składników poszczególnych przenoszonych frakcji prowadzono w warunkach elucji izokratycznej, stosując jako fazy ruchome mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1,v/v/v) w 0,1% wodnym TFA w różnym stosunku objętościowym: 20% (faza ruchoma S1), 23% (S2), 26% (S3), 30% (S4), 32% (S4), 35% (S6), 36% (S7), 38% (S8), 40% (S9), 45% (S10), 50% (S11), 55% (S12). Kompozycje faz ruchomych użytych do separacji składników poszczególnych frakcji w ²D dobierano eksperymentalnie. Uwzględniając przedstawione założenia w projektowaniu systemu *comprehensive on-line* warunki separacji w ²D modyfikowano w niewielkim zakresie, związanym ze zmianą kolumny w ²D. Wypełnienie kolumny Discovery użytej w ²D stanowią sferyczne ziarna żelu krzemionkowego chemicznie modyfikowanego resztami oktadecylowymi, porowate w całej objętości, podczas gdy kolumna Kinetex wykonana jest w technologii "core-shell" - warstwa żelu krzemionkowego chemicznie modyfikowanego resztami oktadecylowymi stanowi powłokę osadzoną na nieporowatym rdzeniu. W rezultacie na kolumnie Kinetex związki ulegają adsorpcji w powierzchniowej warstwie ziaren wypełnienia, podczas gdy na kolumnie Discovery - w całej objętości ziaren, co w celu ich desorpcji może skutkować koniecznością zmian stężenia rozpuszczalnika organicznego (tab. 10). Dlatego w separacji składników frakcji I' i II' obniżono stężenie mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1,v/v/v) w 0,1% wodnym TFA z 32% (S5) do 26% (S3) (frakcja I'), z 32% (S5) do 30% (S4) (frakcja II'). Natomiast w celu separacji składników frakcji V', VIII', XI' i XII' zwiększono stężenie mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1,v/v/v) w 0,1% wodnym TFA z 30% (S4) do 35% (S6) (frakcja V'), z 35% (S6) do 36% (S7) (frakcja VI'), z 35% (S6) do 38% (S8) (frakcja VIII'), z 45% (S10) do 50% (S11) (frakcja XI') oraz z 50% (S11) do 55% (S12) (frakcja XII'). Zwiększenie stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1,v/v/v) w 0,1% wodnym TFA było konieczne aby uzyskać separację składników frakcji V', VIII', IX', X'.

Numer frakcji		Faza ruchoma ² D		Numer frakcji		Faza ruchoma ² D	
<i>off-line</i> LC-LC	<i>off-line/</i> <i>on-line</i> LCxLC	<i>off-line</i>	<i>off-line/</i> <i>on-line</i> LCxLC	<i>off-line</i> LC-LC	<i>off-line/</i> <i>on-line</i> LCxLC	<i>off-line</i> LC-LC	<i>off-line/</i> <i>on-line</i> LCxLC
I	I'	S5	S3	VI	VII'	S6	S6
II	II'	S5	S4	VII	VIII'	S6	S8
III	III'	S1/S2/S5	S5	–	IX'	–	S8
–	IV'	–	S6	–	X'	–	S11
IV	V'	S4	S6	VIII	XI'	S10	S11
V	VI'	S6	S7	IX	XII'	S11	S12

Tab.10. Charakterystyka faz ruchomych, stosowanych w separacji ²D związków flawonoidowych z frakcji I'-XII' metodami 2D LC (LC-LC, LCxLC), stanowiących mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1,v/v/v) (E) w 0,1% wodnym TFA (v/v) (A): S1 – 20% E, S2 – 23% E, S3 – 26% E, S4 – 30% E, S5 – 32% E, S6 – 35% E, S7 – 36% E, S8 – 38% E, S9 – 40% E, S10 – 45% E, S11 – 50% E, S12 – 55% E.

Wyniki analizy ²D frakcji I' - XII' potwierdziły obecność C-glikozyloflawonów, zidentyfikowanych z użyciem opracowanego systemu *heart-cutting off-line*, przy czym część związków obecnych we frakcji III' (izoorientyna - 3a, orientyna - 3b, izoszaftozyd - 4a i szaftozyd - 4b) była obecna również we frakcji IV (ryc. 40). Dwa związki, zidentyfikowane wcześniej metodą *heart-cutting off-line*, mianowicie: izoszaftozyd (4a) i szaftozyd (4b) mogą być rozdzielone tylko w systemie LC-LC *off-line*, ze względu na długi czas (t ≥ 25 min) konieczny do ich separacji w obecności w matrycy orientyny i izoorientyny.

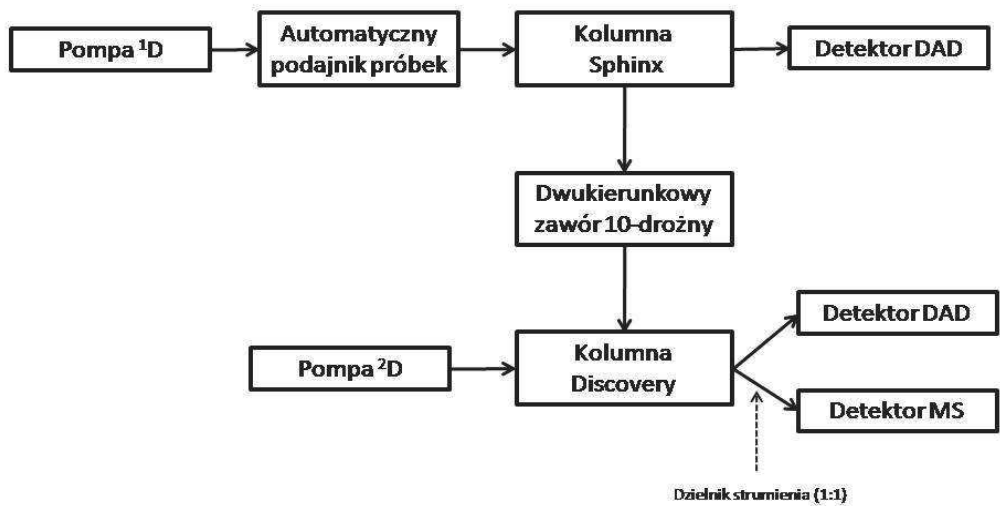


Ryc.40. Chromatogram ²D LCxLC *on-line* wyciągu metanolowego z nasion kozieradki: Fr I' - XII' - frakcje ¹D. Kolumna Discovery HS C18 (75 mm x 2,1 mm x 3 μm), fazy ruchome: S₃, S₄, S₅, S₆, S₇, S₈, S₁₁, S₁₂, UV λ=330 nm.

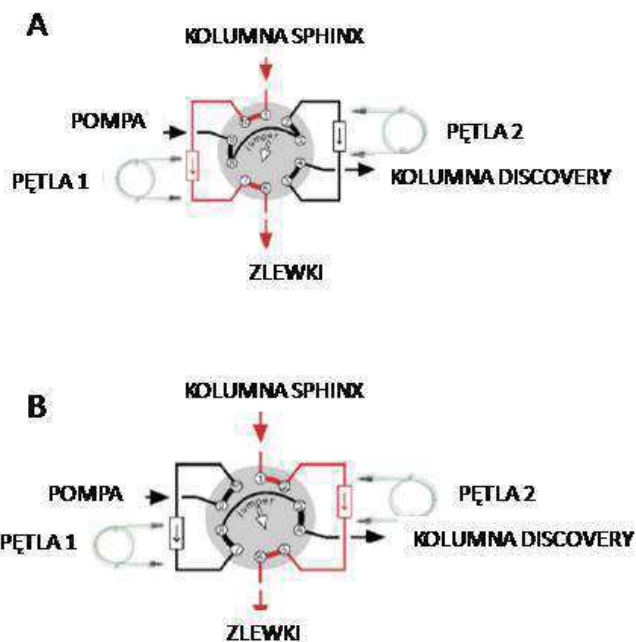
Opracowane warunki separacji ¹D i ²D C-glikozydów flawonowych w badanej matrycy roślinnej metodą LCxLC *off-line* mogą być stosowane w systemach HPLC, które nie wymagają automatyzacji.

Analiza C-glikozyloflawonów w nasieniu kozieradki metodą *comprehensive on-line* (LCxLC *on-line*)

Warunki opracowane w systemie *comprehensive off-line* wykorzystano w systemie *comprehensive on-line*. Użyto tych samych kolumn i faz ruchomych. W pierwszym wymiarze stosowano detektor DAD, natomiast w drugim wymiarze - detektory DAD i MS. Uwzględniając pełną automatyzację procesu (LCxLC *on-line*), podstawowym problemem systemu jest optymalizacja czasu modulacji. Jest to czas między wprowadzeniem na kolumnę ²D kolejnych frakcji z ¹D, obejmujący również czas konieczny do rozdzielenia składników pojedynczej frakcji w ²D [354, 484]. W opracowywanym systemie LCxLC czas modulacji zależał od szerokości pików odpowiadających poszczególnym frakcjom na chromatogramie ¹D (mierzonej u podstawy pików), jak i czasu koniecznego dla rozdzielania składników frakcji w drugim wymiarze. Jednocześnie nie może być on dłuższy od czasu napełniania pętli w zaworze stanowiącym łącznik między dwoma wymiarami - ¹D i ²D. W badaniach wykorzystywano pętle o objętości 50 µl, dlatego objętość każdej przenoszona frakcji musiała być równa objętości pętli lub mniejsza. W analizach w systemie *comprehensive on-line* zastosowanie dzielnika strumienia w celu zmniejszenia objętości eluentu z ¹D w jednostce czasu, nie zawsze jest dobrym rozwiązaniem, ponieważ dodatkowo obniża stężenia związków, często poniżej granicy ich wykrywalności. Dlatego czas konieczny do zebrania frakcji uzależniono od natężenia przepływu fazy ruchomej w ¹D na użytej kolumnie Sphinx C-18-Phenyl (0,017 ml/min) i wyniósł on odpowiednio: frakcja I' – 2,7 min, frakcja II' – 2,1 min, frakcja III' – 2,5 min, frakcja IV' – 3,0 min, frakcja V' – 1,5 min, frakcja VI' – 2,6 min, frakcja VII' – 2,3 min, frakcja VIII' – 3,1 min, frakcja IX' – 2,9 min, frakcja X' – 2,1 min, frakcja XI' – 2,5 min, frakcja XII' – 4,0 min. Otrzymane frakcje I'-XII', stanowiące eluaty z kolumny ¹D, przenoszone były automatycznie na kolumnę ²D.



Ryc.41. Schemat systemu LCxLC stosowanego w analizie C-glikozyloflawonów w wyciągu metanolowym z nasion kozieradki pospolitej.

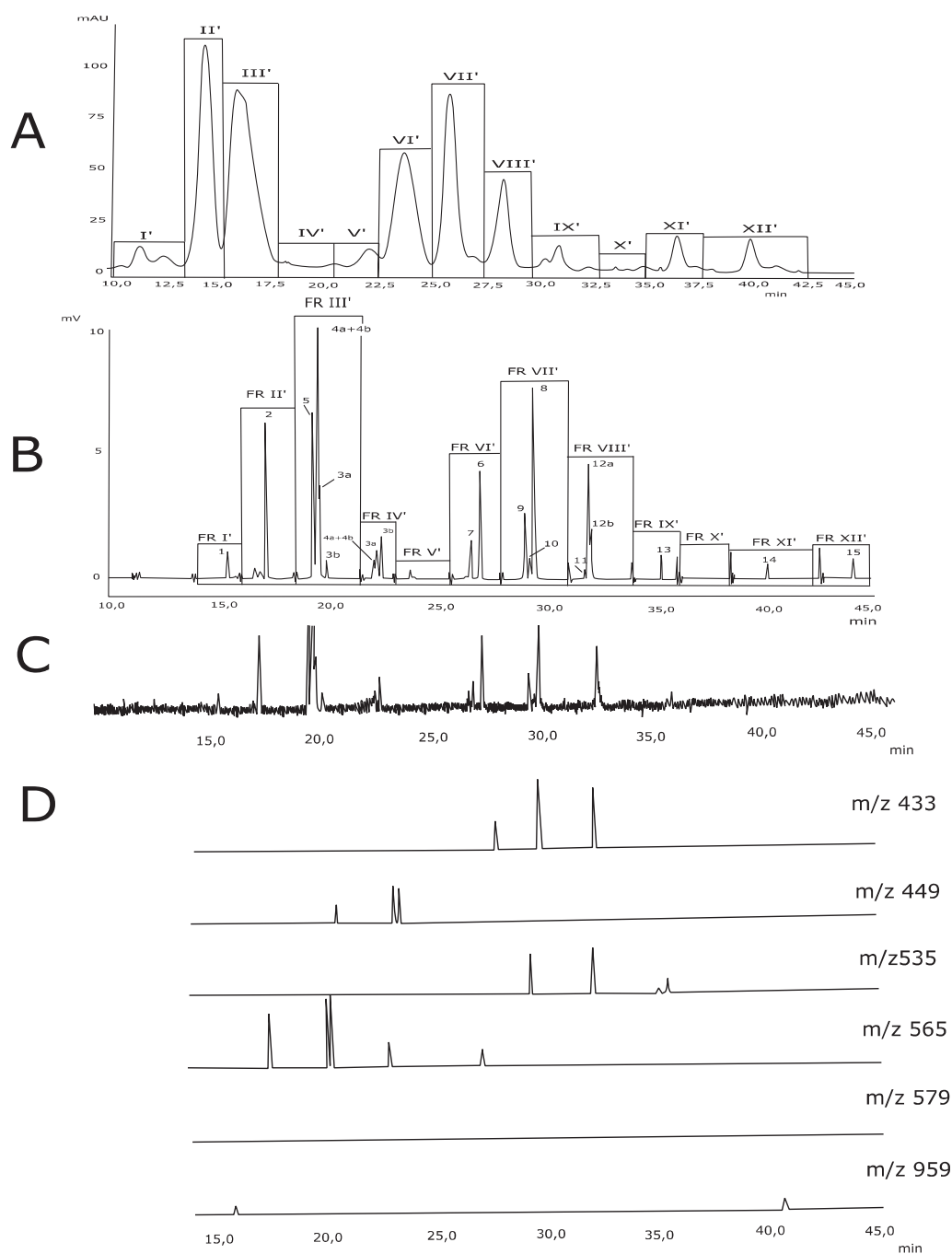


Ryc.42. Schemat konfiguracji łącznika systemu LCxLC *on-line*, stosowanego w analizie C-glikozyloflawonów z nasion kozieradki pospolitej [235]: A - dozowanie na kolumnę ²D z użyciem pętli 2, B - dozowanie na kolumnę ²D z użyciem pętli 1.

W drugim wymiarze separację prowadzono na kolumnie Discovery HS C18 (75 mm x 2,1 mm x 3 μ m) z użyciem gradientu skokowego (ryc. 44), w którym składniki poszczególnych frakcji I'-XII' rozdzielano w warunkach elucji izokratycznej (pojedynczy skok), z wykorzystaniem faz ruchomych opracowanego systemu LCxLC *off-line*, charakteryzujących się następującym stężeniem mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA (v/v): 26% (S3) - frakcja I; 30% (S4) - frakcja II; 32% (S5) - frakcja III; 35% (S6) - frakcje IV, V, VII; 36% (S7) - frakcja VI; 38% (S8) - frakcje VIII i IX; 50% (S11) - frakcje X i XI; 55% (S12) - frakcja XII. Zastosowanie detektora mas w ²D wymagało użycia dzielnika strumienia eluatu z kolumny ²D (natężenie przepływu 2,3 ml/min; strumień dzielono w stosunku 1:1), ponieważ maksymalna objętość eluatu, która mogła być wprowadzona do detektora wynosiła ok. 1 ml. Czas analizy pojedynczej frakcji nie przekraczał 3 minut, z wyjątkiem ostatniej frakcji XII, której czas rozdzielania mógł pozostać nieograniczony i nie miał wpływu na efektywność separacji. Jako technikę zbierania danych chromatograficznych zastosowano monitorowanie wybranych jonów SIM (*Selected Ion Monitoring*) (ryc. 43).

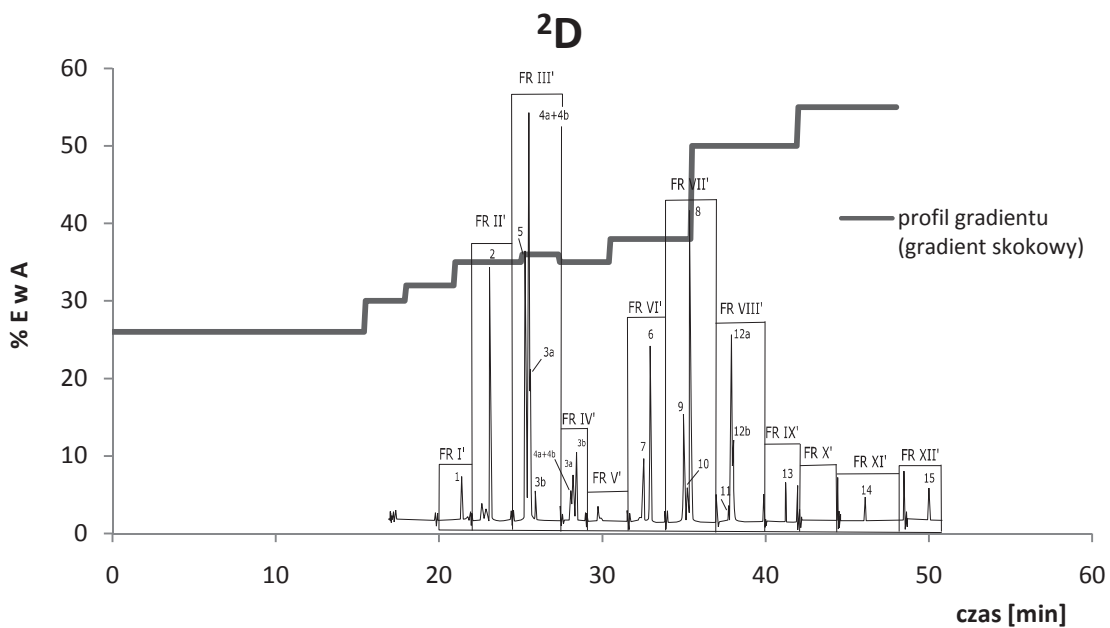
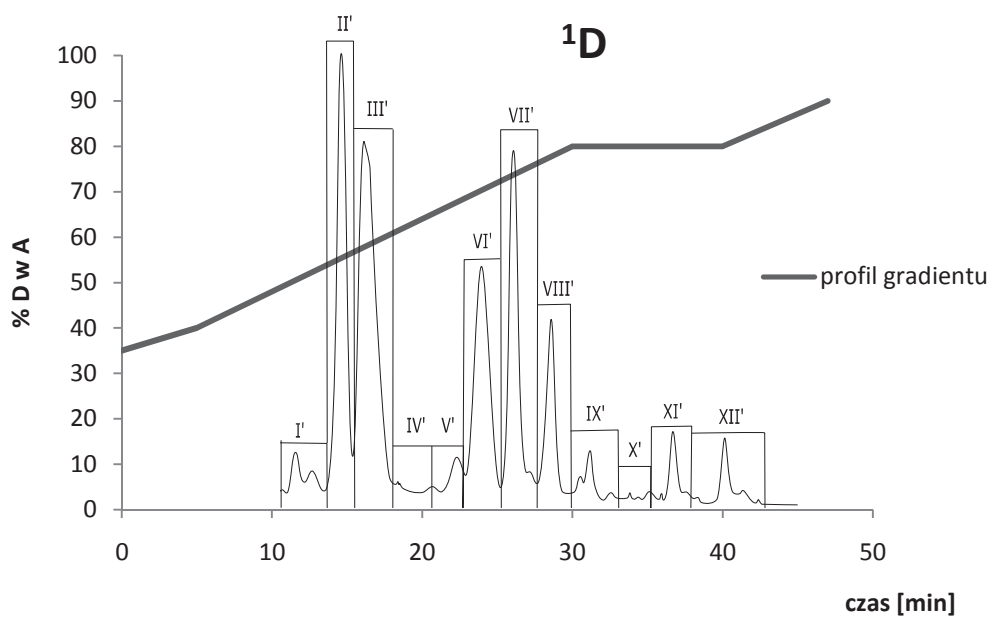
Analizując C-glikozyloflawony w nasieniu kozieradki pospolitej metodą *comprehensive on-line* (LCxLC) otrzymano rozdzielanie 17 związków. Opracowany system nie umożliwił separacji szaftozydu i izoszaftozydu, które w badanym zespole mogą być efektywnie rozdzielone jedynie z użyciem opracowanych metod *heart-cutting off-line* (LC-LC *off-line*, metody I i II). Jednocześnie przedstawiony system LCxLC *on-line*, ze względu na pełną automatyzację procesu analitycznego, stanowi przydatne narzędzie do szybkich analiz serii próbek, zawierających C-glikozyloflawony, pochodne apigeniny i luteoliny.

Wyniki separacji LCxLC *on-line* zespołu C-glikozyloflawonów badanego ekstraktu przedstawiono w formie pojedynczych chromatogramów (ryc. 43) oraz w postaci dwuwymiarowego diagramu konturowego (*ang. contour plot*) (ryc. 45). Prezentacja wyników 2D LC rozdzielenia chromatograficznego w formie diagramu stanowi efektowne narzędzie wizualizacji osiągniętych efektów rozdzielczych w odniesieniu do badanej matrycy roślinnej [123].

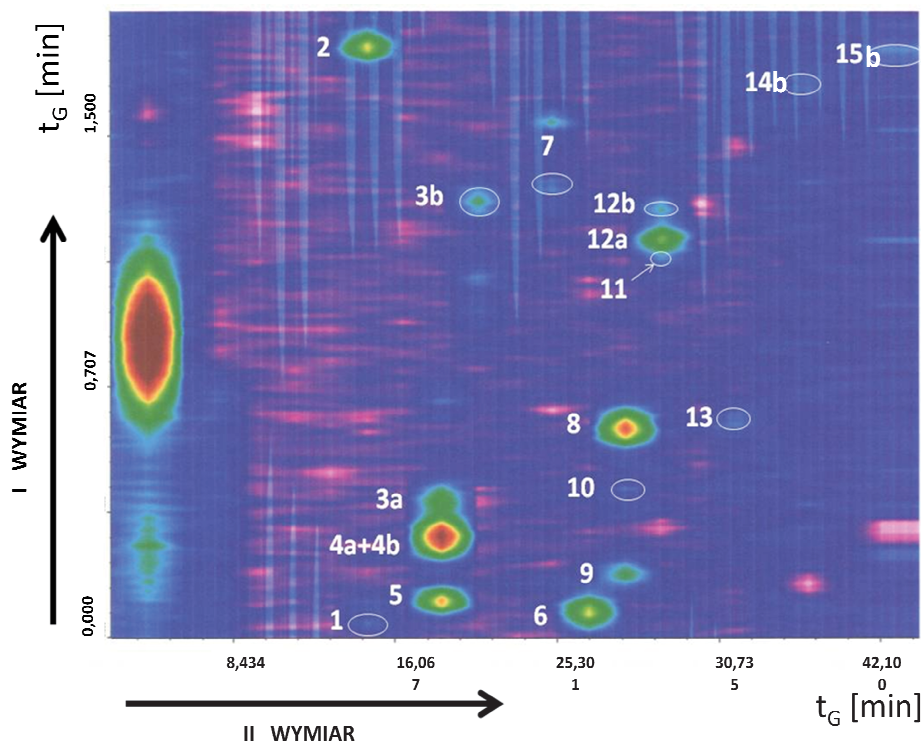


Ryc.43. Chromatogramy LCxLC *off-line/on-line* wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego:

- A. ¹D: kolumna Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm), elucja gradientowa według programu VIII, UV λ-330 nm;
- B. ²D: kolumna Discovery (75 mm x 2,1 mm x 3 μm), fazy ruchome S₃, S₄, S₅, S₆, S₇, S₈, S₁₁, S₁₂, UV λ-330 nm.
- C. całkowity prąd jonowy w trybie jonów dodatnich (TIC+)
- D. chromatogramy jonów molekularnych *m/z* 433, 449, 535, 565, 579, 595, otrzymane techniką SIM w trybie jonów dodatnich.



Ryc.44. Chromatogramy ¹D i ²D systemu LCxLC *on-line* rozdzielania C-glikozydów flawonowych w wyciągu metanолоwym z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego z profilami elucji gradientowej: ¹D - kolumna Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm), elucja gradientowa wg programu VIII, ²D - kolumna Discovery HS C-18 (75 mm x 2,1 mm x 3 μm), fazy ruchome S₃, S₄, S₅, S₆, S₇, S₈, S₁₁, S₁₂ (gradient skokowy), A - 0,1% TFA, D - metanol:ACN:woda:TFA (330:40:80:0,45, v/v/v), E - ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v), UV λ-330 nm.



Ryc.45. Chromatogram LCxLC *on-line* C-glikozydów flawonowych w wyciągu metanolowym z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego: ¹D - kolumna Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm), elucja gradientowa według programu VIII, ²D - kolumna Discovery (75 mm x 2,1 mm x 3 μm), fazy ruchome S₃, S₄, S₅, S₆, S₇, S₈, S₁₁, S₁₂ (gradient skokowy), UV λ-330 nm, numeracja pików odpowiada przedstawionej w tabeli 7.

Przeprowadzone analizy zespołu C-glikozydów flawonowych w nasieniu kozieradki pochodzenia krajowego z zastosowaniem różnych technik jedno- i dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej, umożliwiły wykrycie w surowcu po raz pierwszy dwóch metabolitów wtórnych z grupy C-glikozyloflawonów: wiceniny-3 oraz izoszaftozydu. Pełne rozdzielenie C-glikozyloflawonów zespołu otrzymano w warunkach opracowanej metody *heart-cutting off-line* (LC-LC *off-line*).

Na tle wyników uzyskanych przez innych autorów [143, 435, 456], badany w niniejszej pracy materiał roślinny, obok podobieństw, charakteryzują istotne różnice w składzie jakościowym zespołu C-glikozydów flawonowych.

Wykazano, że w profilu badanego zespołu dominują C-glikozydowe pochodne apigeniny (związki 1, 2, 4a, 4b, 5-13, 15a, 15b), co potwierdzają wyniki otrzymane przez innych autorów [143, 435, 456, 493]. Ujawniono, że analizowany zespół obejmuje 11 di-C-glikozydów apigeniny (związki 1, 2, 4a, 4b, 5, 7, 9-13) o zróżnicowanej budowie, 2 izomeryczne mono-C-glukozydy: witeksynę i izowiteksynę oraz 2 estry p-kumarowe: p-kumaroilo-witeksynę (15a) i p-kumaroilo-izowiteksynę (15b).

Witekryna i izowitekryna są powszechnie wykrywane w nasieniu kozieradki różnego pochodzenia [15, 419, 435, 456, 490, 570]. Wyjątek stanowią badania Prati i wsp. [435], w których nie stwierdzono obecności izowitekryny, jakkolwiek jej 8-C-izomer (witekryna) był obecny.

Natomiast w zakresie di-C-glikozydowych pochodnych surowiec wykazuje znaczną różnorodność. W badanym materiale roślinnym występują di-C-heksozylo-pentozydy (związki: 2 - wicenina-1, 4a - izoszaftozyd, 4b - szaftozyd, 5 - di-C-(6/8)-heksozylo-pentozyd, 7 - wicenina-3), zawierające glukozę (wicenina-1, izoszaftozyd, szaftozyd, wicenina-3) oraz ksylozę (wicenina-1, wicenina-3) lub arabinozę (izoszaftozyd, szaftozyd). Dominującym di-C-glikozyloflawonem jest wicenina-1 (związek 2), której obecność wykryli wcześniej w nasieniu kozieradki Wagner i wsp. [570], a potwierdzili - Es-Safi i wsp. [143]. Szaftozyd (związek 4b) jako składnik zespołu C-glikozydów w nasieniu kozieradki opisał Shan i wsp. [493]. W toku niniejszych badań prowadzonych metodą 2D-LC *heart-cutting* ujawniono występowanie w nasionach kozieradki izoszaftozydu (6-C-arabinopiranozylo-8-C-glukopiranozydu apigeniny) (związek 4a), dotychczas nie opisanego w nasionach *T. foenum-graecum*. Również wicenina-3 (związek 7) została stwierdzona w surowcu po raz pierwszy. Niedawno jej obecność potwierdzono również w nasionach kozieradki pochodzących z Maroka [143]. Ponadto w analizowanym surowcu występuje wicenina-2, zawierająca w strukturze dwie cząsteczki glukozy [143, 493, 570]. Jest to jedyny di-C-heksozyd, ujawniony w badanym materiale roślinnym, jakkolwiek w surowcu azjatyckim stwierdzono również występowanie di-C-heksozydów, zawierających dwie cząsteczki galaktozy [456] lub galaktozę i glukozę [493]. Natomiast Es-Safi i wsp. [143] w nasionach kozieradki z Maroka wykazali obecność aż trzech di-C-heksozydów apigeniny, spośród których dwóch nie zidentyfikowano (określane przez autorów jako izomery wiceniny-2), natomiast trzecim była wicenina-2. Interesującą grupę stanowi 5 związków (9, 10, 11, 12a i 13), zidentyfikowane wstępnie jako di-C-pentozydy apigeniny. Obecność di-C-pentozydów apigeniny nie została dotychczas opisana w zespole C-glikozyloflawonów nasienia kozieradki, jednak w celu określenia ich pełnych struktur chemicznych konieczne są dalsze prace izolacyjne.

Dodatkowo w badanym surowcu potwierdzono występowanie czterech pochodnych luteoliny (związki 3a, 3b, 14a, 14b). Ponadto ujawniono występowanie różnic w intensywności sygnałów deprotonowanych jonów molekularnych przy m/z 447 $[M-H]^-$ oraz ich adduktów z TFA przy m/z 561 $[M-H+114]^-$ w widmach ESI-MS wzorcowych orientyny i izoorientyny, otrzymanych w trybie jonów ujemnych. Izomeryczne mono-C-glukozydy luteoliny - orientyna (3b) oraz izoorientyna (3a) występują w surowcu zarówno krajowym, jak i azjatyckim [419, 435, 456, 570],

jakkolwiek często potwierdzano obecność jedynie 6-C-glukozydu luteoliny [435, 456]. Jednocześnie związki 14a i 14b (p-kumaroilo-izoorientyna i p-kumaroilo-orientyna, odpowiednio) stanowią, jak wspomniano wcześniej, pochodne estrowe luteoliny, jakkolwiek udowodniono, że surowiec afrykański zawiera aż sześć różnych estrów tego C-glukozyloflawonu [143].

W analizowanych ekstraktach nie stwierdzono obecności acylowanych pochodnych apigeniny i luteoliny, zawierających reszty kwasów fenolowych: galusowego, dihydrogalusowego, dihydroferulowego, hydroksyglutarowego, metoksyglutarowego i malonylowego [143] oraz chinowego i hydroksymetyloglutarowego [456]. Szereg związków o takiej budowie ujawniono w surowcu afrykańskim [143], natomiast dwóch - w palestyńskim [456]. Jedynymi związkami o budowie estrowej, występującymi w surowcu polskim są zestryfikowane resztą kwasu p-kumarowego pochodne izoorientyny i orientyny (związki 14a i 14b, odpowiednio) oraz witeksyny i izowiteksyny (związki 15a i 15b, odpowiednio). Występowanie p-kumaroilo-orientyny w surowcu pochodzenia azjatyckiego wykazali niezależnie od siebie w 2010 roku Wang i wsp. [574] oraz Rayyan i wsp. [456]. Natomiast obecności estru p-kumarowego izoorientyny nie stwierdzono. Spośród pochodnych estrowych C-6/8-glukozydów apigeniny, jedynie ester p-kumarowy witeksyny został stwierdzony przez Sood'a w 1976 roku [511], a następnie potwierdzony w roku 2010 przez Rayyan i wsp. [456, 574] oraz Wang i wsp. [456, 574].

W toku analiz nie potwierdzono występowania w badanym materiale O-glikozydowych pochodnych C-glikozyloflawonów, metoksyłowych flawonów oraz wolnych flawonów. Wobec substancji wzorcowych wykluczono obecność: 7-O-glukozydu izowiteksyny (saponaryny) (m/z 595) [15, 570], 2"-O-ramnozydu witeksyny (m/z 579) oraz luteoliny [268] i apigeniny. Przeprowadzone analizy 1D HPLC-DAD-ESI-MS oraz 2D HPLC-ESI-MS nie potwierdziły również obecności metoksyłowych flawonów: trycyny (m/z 331) oraz jej 7-O-glukozydu [494, 574]. Prati i wsp. [435] stwierdzili metodą HPLC-UV-MS obecność dwóch związków, które wstępnie identyfikowali jako O-ramnozyłowe pochodne orientyny/izoorientyny (m/z 595, λ_{\max} 318 nm) lub witeksyny (m/z 578, λ_{\max} 318 nm). Biorąc jednak pod uwagę wartość λ_{\max} 318 nm, wskazującą na obecność przesunięcia hipsochromowego maksimum absorpcji I, charakterystycznego dla związków o budowie estrowej, prawdopodobnie związki te, rozpoznane jako O-glikozydy mono-C-glikozyloflawonów, w rzeczywistości były ich pochodnymi estrowymi. Zarówno obserwowane wartości m/z i λ_{\max} , jak również dane literaturowe [456, 511, 574] wskazują, że w badanym przez autorów surowcu mogły występować estry p-kumarowe mono-C-glikozyloflawonów.

Analiza ilościowa C-glikozyloflawonów w nasieniu kozieradki metodą LC-LC-DAD *on-line*

Kolejny etap prac stanowiło opracowanie i walidacja metody LC-LC-DAD oznaczenia ilościowego poszczególnych C-glikozyloflawonów zespołu nasion kozieradki. Rozdzielenia w pierwszym wymiarze (¹D) prowadzono w warunkach separacji 1D HPLC C-glikozyloflawonów (II.7.1.2.), opracowanych na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm), stosując elucję gradientową według programu I (II.4.2.2.), który charakteryzował się wzrastającym stężeniem mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1; v/v/v) od 16% do 70% w 0,1% wodnym TFA w czasie t_G 70 minut (program elucji I, rozdział II.4.2.2.) - gradient mieszany, obejmujący liniowy wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA oraz elucję izokratyczną, przy natężeniu przepływu fazy ruchomej 0,23 ml/min. Zawartość związków 1, 2, 5-15 oznaczono w oparciu o wartości powierzchni pól pików, otrzymanych na chromatogramie ¹D. Ponieważ w warunkach rozdzielania ¹D związki 3a, 3b, 4a, 4b koeluowały, w celu oznaczenia ich zawartości zastosowano metodę *heart-cutting on-line* (LC-LC *on-line*). W wyniku rozdzielania ¹D, frakcję "Z" (t_R 28,2-30,7 min), zawierającą związki 3a, 3b, 4a i 4b przeniesiono automatycznie na kolumnę ²D o ponad dwukrotnie większej średnicy - Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μm), wykorzystując dzielnik strumienia, umożliwiający podział eluatu z kolumny ¹D w stosunku 210:20, przy objętości pętli dozującej zaworu (łącznika) 50 μl. Składniki frakcji "Z" rozdzielono, stosując elucję izokratyczną z użyciem fazy ruchomej o stężeniu 23% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA (S2)(4.2.2.2.) przy natężeniu przepływu 1 ml/min. użytą fazę ruchomą zastosowano w opracowanej metodzie *heart-cutting off-line* (metoda II). Podobnie jak w przypadku związków 1, 2, 5-15, zawartość związków 3a, 3b, 4a, 4b oznaczono w oparciu o wartości pól powierzchni pików, otrzymanych na chromatogramie ²D. Opracowaną metodę zvalidowano w zakresie liniowości, granicy wykrywalności, granicy oznaczalności oraz precyzji jedno- i międzydniowej (powtarzalności) (II.7.1.5.). Parametry walidacyjne przedstawiono w tabelach 11-A i 11-B. Opracowaną metodę wykorzystano do oznaczenia zawartości C-glikozyloflawonów w wyciągach: 70% metanolu (A), wodnym (B) oraz frakcji D (p. B.ii.1.5.), przeznaczonych do badań aktywności biologicznej. Do celów analizy chromatograficznej liofilizaty wyciągów i frakcji rozpuszczono w metanolu w stosunku: 25 mg/1,5 ml (wyciągi A i B) oraz 1 mg/ml (frakcja D). Stężenie C-glikozyloflawonów wyrażono w przeliczeniu na 1 mg liofilizatu (tab. 12)

Związek	Parametry walidacji		
	Liniowość (krzywa regresji, współczynnik korelacji)	Granica wykrywalności (LOD) [µg/ml]	Granica oznaczalności (LOQ) [µg/ml]
witekсыna	$y = 5644,68x - 18485,5$ $r = 0,9995$	1,812	5,44
izowitekсыna	$y = 5352,59x - 16585,8$ $r = 0,9999$	1,995	5,99
orientyna	$y = 163,112x - 470,071$ $r = 0,9998$	2,259	6,78
izoorientyna	$y = 202,047x - 1131,16$ $r = 0,9996$	3,054	9,16
wicenina-1	$y = 4143,75x - 25165,7$ $r = 0,9982$	2,095	6,29
wicenina-2	$y = 3232,07x - 8687,39$ $r = 0,9995$	2,985	8,95
wicenina-3	$y = 4261,85x - 16595,1$ $r = 0,9998$	1,951	5,853
szaftozyd	$y = 434,88x - 1691,1$ $r = 0,9999$	1,482	5,525
izoszaftozyd	$y = 238,123x - 445,146$ $r = 0,9999$	2,00	6,00

Tab.11-A. Parametry walidacyjne opracowanej metody LC-LC *on-line* oznaczenia zawartości C-glikozyloflawonów w nasieniu kozieradki: liniowość, granica wykrywalności, granica oznaczalności.

Związek	Parametry walidacji	
	Precyzja	
	jednodniowa [RSD, %]	międzydniowa [RSD, %]
1	0,836	1,182
2	0,029	0,041
3a	0,730	1,033
3b	0,518	0,732
4a	1,057	1,495
4b	4,771	6,747
5	1,615	2,284
6	0,273	0,386
7	1,115	1,577
8	0,073	0,103
9	0,835	1,181
10	0,443	0,627
11	8,194	11,588
12	0,294	0,416
13	0,141	0,199
14	0,430	0,609
15	0,345	0,488

Tab.11-B. Parametry walidacyjne opracowanej metody LC-LC *on-line* oznaczenia zawartości C-glikozyloflawonów w nasieniu kozieradki: precyzja jedno- i międzydniowa.

Związek	Zawartość w 1 mg liofilizatu [µg]			Zawartość w 1 g surowca
	Wyciąg A	Wyciąg B	Frakcja D	[mg]
1	1,703 ± 0,12	1,001 ± 0,23	26,575 ± 0,02	0,305 ± 0,04
2	10,682 ± 0,06	5,884 ± 0,05	194,739 ± 0,04	1,912 ± 0,15
3a	7,303 ± 0,20	3,693 ± 0,82	31,874 ± 0,03	1,307 ± 0,61
3b	5,555 ± 0,06	2,866 ± 0,53	18,342 ± 0,03	0,994 ± 0,40
4a	6,258 ± 0,13	3,343 ± 1,15	120,947 ± 0,06	1,120 ± 0,46
4b	1,046 ± 0,08	0,580 ± 0,17	21,177 ± 0,07	0,187 ± 0,15
5	36,681 ± 0,11	2,006 ± 0,91	767,089 ± 0,09	0,682 ± 0,07
6	9,955 ± 0,05	5,334 ± 0,47	47,663 ± 0,35	1,782 ± 0,09
7	1,178 ± 0,20	0,741 ± 0,29	22,299 ± 0,23	0,211 ± 0,14
8	14,011 ± 0,02	0,902 ± 0,17	62,373 ± 0,04	2,508 ± 0,50
9	5,146 ± 0,08	2,935 ± 0,78	12,038 ± 0,12	0,921 ± 0,74
10	1,357 ± 0,11	0,885 ± 0,12	25,852 ± 0,05	0,243 ± 0,27
11	0,437 ± 0,33	0,260 ± 0,30	13,297 ± 0,48	0,078 ± 0,03
12	4,703 ± 0,03	2,592 ± 0,24	93,385 ± 0,16	0,842 ± 0,08
13	1,247 ± 0,12	0,765 ± 0,03	25,861 ± 0,06	0,223 ± 0,07
14	3,025 ± 0,02	1,491 ± 0,19	12,910 ± 0,13	0,541 ± 0,18
15	3,082 ± 0,02	1,491 ± 0,15	14,138 ± 0,16	0,552 ± 0,11
Σ C-glikozydów	113,368 ± 0,12	36,769 ± 0,44	823,68 ± 0,14	14,409 ± 0,26

Tab.12. Zawartość C-glikozydów flawonowych, oznaczona metodą LC-LC-DAD *on-line* w nasionach kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego oraz otrzymanych wyciągach: 70% metanolu (A), wodnym (B) oraz frakcji D wyciągu metanolowego. Numeracja związków odpowiada przedstawionej w tabeli 7.

Zawartość C-glikozyloflawonów w nasionach kozieradki pospolitej oznaczono w wyciągu 70% metanolu (A), otrzymanym z użyciem opracowanej, najbardziej wydajnej metody wytrawiania tych związków (2 x 100 ml, ekstrakcja z użyciem mieszadła magnetycznego, 2 x 3h, 60°C). Oznaczona zawartość C-glikozydów flawonowych w nasionach kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego wynosiła 14,409 mg/g i była 10-krotnie wyższa od oznaczonej przez Prati i wsp. [435] metodą HPLC-DAD w świeżych nasionach kozieradki pospolitej (1,5 mg/g, w przeliczeniu na diosminę).

Wykazano różnice w zawartości poszczególnych C-glikozyloflawonów w odniesieniu do danych literaturowych. Dominującym związkiem w badanym surowcu jest izowiteksyna (związek 8) (2,508 ± 0,50 mg/g), obok wiceniny-1 (związek 2) (1,912 ± 0,15 mg/g) oraz obecnej w nieco niższym stężeniu witeksyny (związek 6) (1,782 ± 0,09 mg/g). Natomiast w mniejszych ilościach występują: izoorientyna (związek 3a) (1,307 ± 0,61 mg/g), izoszaftozyd (związek 4a) (1,120 ± 0,46 mg/g) i orientyna (związek 3b) (0,994 ± 0,40 mg/g). Odnotowano również wysokie stężenia związków 9 i 12, zidentyfikowanych jako prawdopodobnie di-C-(6/8)-pentozydy apigeniny (0,921 ±

0,74 oraz $0,842 \pm 0,08$, odpowiednio). Jak wspomniano wcześniej, związki o takiej strukturze nie zostały dotychczas stwierdzone w nasieniu kozieradki pospolitej, natomiast w badanym surowcu stanowią 16% zespołu C-glikozydów flawonowych (związki 9, 10, 11, 12a, 13).

Rayyan i wsp. [456] z użyciem metody HPLC-DAD-ESI-MS wykazali, że dominującymi w zespole C-glikozydów flawonowych w surowcu azjatyckim są: di-C-6,8-galaktozyd apigeniny (11%), 6-C-ksylozylo-8-C-galaktopiranozyd apigeniny (20%) oraz orientyna (20%), stanowiące łącznie 51% zespołu.

Z kolei w surowcu marokańskim dominowały: 7-O-[6"-dihydrogaloilo]-glukozylo-8-C-pentozylo-glukozyd apigeniny (15,80%), wicenina-3 (14,41%) oraz 7-O-[2"-dihydrogaloilo]-ramnozylo-6-C-(2"-pentozylo)-glukozyd apigeniny (12,02%) i wicenina-1 (8,82%) [143]. Natomiast nie wykazano obecności witeksyny, izowiteksyny, orientyny, izorientyny i izoszaftydu [143].

Estry p-kumarowe orientyny/izorientyny (14) oraz witeksyny/izowiteksyny (15) występują w badanym surowcu w zbliżonych stężeniach ($0,541 \pm 0,18$ mg/g i $0,552 \pm 0,11$, odpowiednio), podczas gdy w azjatyckich nasionach kozieradki, zawartość p-kumarynianu orientyny/izorientyny jest 4-krotnie wyższa niż p-kumarynianu witeksyny/izowiteksyny [456].

Analiza C-glikozyloflawonów w nasieniu kozieradki pochodzenia tureckiego i afrykańskiego metodą HPLC-DAD-ESI-MS oraz LC-LC-DAD *on-line*

Analizy C-glikozyloflawonów w wyciągu metanolowym z nasion kozieradki prowadzono we współpracy z Khenifim Mohammedem Lamine z *Département des Sciences Naturelles et de la Vie école normal supérieure de Laghouat* (Algieria). Rozdzielenia prowadzono w warunkach opracowanej metody LC-LC *on-line*. Do badań przeznaczono nasiona kozieradki pospolitej pochodzenia tureckiego, zebrane ze stanu naturalnego prowincji Antalya (nasiona T1) oraz pochodzenia afrykańskiego, otrzymane z *Département des Sciences Naturelles et de la Vie école normal supérieure de Laghouat* (Algieria) (nasiona T2). Analizie poddano wyciągi metanolowe z nasion T1 i T2, otrzymane w wyniku trójstopniowej, wyczerpującej ekstrakcji w aparacie Soxhleta, według procedury opisanej w punkcie II.6.1.1.1.

Na otrzymanych chromatogramach HPLC wyciągów metanolowych z nasion kozieradki T1 i T2 obserwowano 19 pików, z których 15 (piki 1 - 15) odpowiadało C-glikozyloflawonom, zidentyfikowanym wcześniej w surowcu pochodzenia krajowego (tab.7.). Natomiast pozostałe 4 (piki 16-19) odpowiadały związkom nieobecnym w surowcu krajowym. W celu ich identyfikacji analizowano widma UV oraz zastosowano skanowanie przy użyciu detektora mas w trybie jonów dodatnich [SCAN(+)] oraz ujemnych [SCAN(-)], w zakresie wartości mas m/z 400-1200. Ponadto, jako metodę zbierania danych chromatograficznych zastosowano monitorowanie wybranych jonów (SIM) w oparciu o zebrane dane literaturowe [143, 353, 435, 456, 574]. Poszukiwano związków flawonoidowych, wykrytych wcześniej w kozieradce pospolitej, w różnych jej częściach - nasionach i liściach. Otrzymane dane chromatograficzne zestawiono w tabeli 13.

Nr	UV _{max}	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ / [M-H+114]	t _R (min.)	Związek
16	270 335	595 / 593 / 707	17,22	di-C-(6/8)-heksozyd apigeniny
17	270 335	595 / 593 / 707	21,23	di-C-(6/8)-heksozyd apigeniny
18	270 335	565 / 563 / 677	26,53	di-C-(6/8)-heksozylo-pentozyd apigeniny
19	270 333	565 / 563 / 677	31,67	di-C-(6/8)-heksozylo-pentozyd apigeniny

Tab.13. Dane chromatograficzne i spektralne nowych związków flawonoidowych 16-19, zidentyfikowanych w wyciągach metanolowych z nasion kozieradki pochodzenia afrykańskiego i tureckiego.

W widmach UV związków 16-19 obserwowano dwa maksima absorpcji: przy długości fali λ_{max} 270 nm (I maksimum) i λ_{max} 335 nm (II maksimum) (związki 16-18) lub λ_{max} 333 nm (II maksimum) (związek 19), co wskazuje, że są one C-glikozyłowymi pochodnymi apigeniny [353].

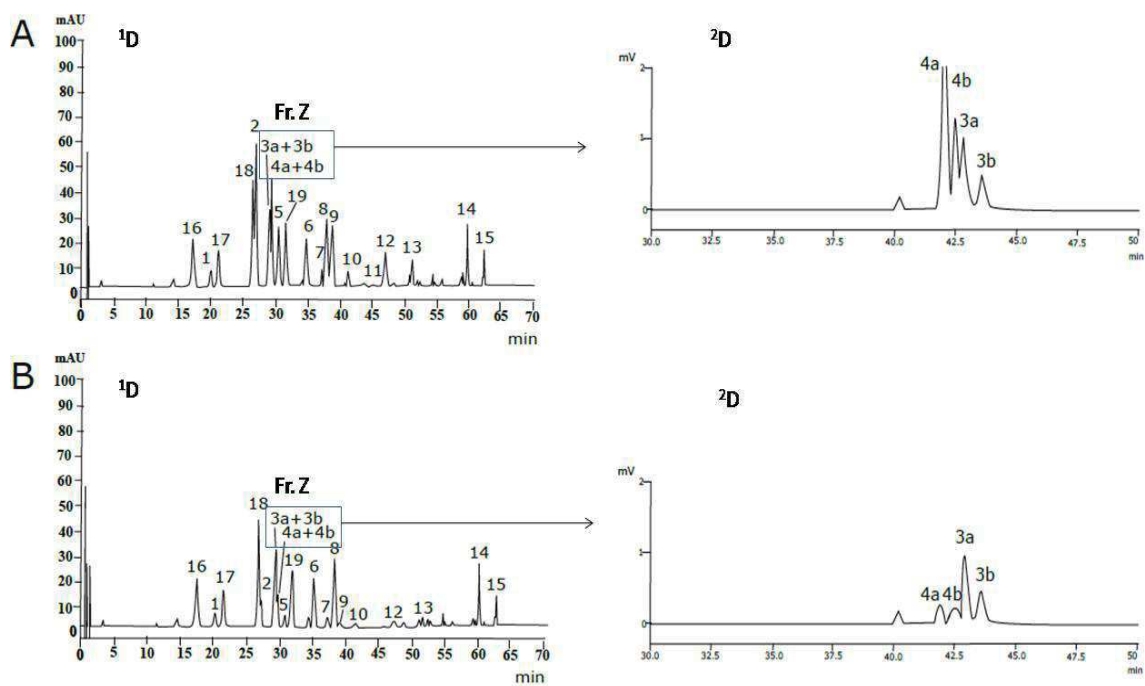
Na chromatogramach jonów o wartości m/z 595 [M+H]⁺ w trybie jonów dodatnich i m/z 593 [M-H]⁻ w trybie jonów ujemnych obserwowano obecność dwóch pików o t_R 17,22 min (związek 16) oraz t_R 21,23 min (związek 17). Dodatkowo oba związki analizowane w trybie jonów ujemnych tworzyły addukty z kwasem trifluorooctowym (TFA) [M-H+114]⁻ przy m/z 707. Na podstawie uzyskanych danych chromatograficznych i spektralnych, związki 16 i 17 zidentyfikowano jako prawdopodobnie di-C-(6/8)-heksozydy apigeniny. Uwzględniając obecność związków

16 i 17 obok rozpoznanego wcześniej w badanym materiale roślinnym, w tym również w surowcu krajowym, di-C-(6/8)-glukozydu apigeniny (wicenina-2, związek 1) można przypuszczać, że związki 16 i 17 zawierają dwie cząsteczki galaktozy lub galaktozę i glukozę. Związki o takiej strukturze w surowcu azjatyckim ujawnili Rayyan i wsp. [456] (di-C-(6/8)-galaktozyd apigeniny) oraz Shan i wsp. [493] (6-C-β-D-glukozylo-8-C-β-D-galaktozyd apigeniny). Podobnie w nasionach kozieradki pochodzenia afrykańskiego wykryto obok wiceniny-2, dwa różne di-C-heksozydy apigeniny, których pełnych struktur nie określono [143].

Analiza chromatogramu jonu m/z 565 wykazała obecność 6 pików o czasach retencji: t_R 26,53 min (związek 18) i t_R 31,67 min (związek 19), t_R 28,98 min (związek 2), t_R 31,45 min (związek 4), t_R 32,32 min (związek 5) oraz t_R 38,76 min (związek 7). Związki 2, 4a, 4b, 5 i 7 zidentyfikowano wcześniej w surowcu krajowym jako odpowiednio: wiceninę-1, izoszaftozyd, szaftozyd, di-C-(6/8)-heksozylo-pentozyd apigeniny i wiceninę-3 (tab. 7). W trybie jonów ujemnych związki 18 i 19 generowały jony molekularne przy m/z 565 $[M+H]^+$ i w trybie jonów ujemnych przy m/z 563 $[M-H]^-$ oraz przy m/z 677 addukty z TFA $[M-H+114]^-$, co wskazuje, że są to di-C-heksozylo-pentozydy apigeniny. Uwzględniając obecność w badanych wyciągach z nasion T1 i T2, zidentyfikowanych wcześniej w surowcu krajowym di-C-heksozylo-pentozydów, zawierających w swej cząsteczce: glukozę i arabinozę (szaftozyd - 6-C-β-D-glukopiranozylo-8-C-α-L-arabinozyd apigeniny, izoszaftozyd - 6-C-β-D-arabinopiranozylo-8-C-α-L-glukozyd apigeniny; związki 4b i 4a, odpowiednio) lub glukozę i ksylozę (wicenina-1 - 6-C-ksylopiranozylo-8-C-glukozyd apigeniny i wicenina-3 - 6-C-glukopiranozylo-8-C-ksylopiranozyd apigeniny; związki 2 i 7, odpowiednio) można przypuszczać, że struktury związków 18 i 19 tworzą odmienne kombinacje jednostek cukrowych niż w opisanych powyżej związkach 2, 7, 4a i 4b. Możliwe, że związki 18 i 19 zawierają galaktozę i pentozę (ramnozę, ksylozę lub arabinozę) lub glukozę i ramnozę. Shan i wsp. [493] zidentyfikowali w surowcu azjatyckim 6-C-galaktopiranozylo-8-C-α-L-arabinozyd apigeniny, natomiast Rayyan i wsp. [456] 6-C-β-arabinopiranozylo-8-C-β-galaktopiranozyd apigeniny oraz jej 6-C-β-ksylopiranozylo-8-C-β-galaktopiranozyd. W nasionach kozieradki pochodzących z Maroka Es-Safi i wsp. [143] ujawnili obecność 8-C-ramnozylo-6-C-glukopiranozydu apigeniny.

Ponadto analiza HPLC-DAD-MS surowca azjatyckiego ujawniła obecność 6,8-C-di-galaktopiranozydu apigeniny [456]. Prati i wsp. [435] analizując profil związków flawonoidowych w *Foenugraeci Semen* metodą HPLC-UV-MS, stwierdzili obecność C-ramnozydów orientyny/izoorientyny lub witeksyny. Natomiast najjnowsze badania z użyciem UPLC/UV/QTOF-MS ujawniły obecność 6,8-di-C-heksozydu chryzyny [144]

Zastosowanie dwuwymiarowej HPLC umożliwiło rozdzielenie i identyfikację 4 związków: izoorientyny, orientyny, izoszaftozydu i szaftozydu (związki 3a, 3b, 4a, 4b, odpowiednio) w nasionach kozieradki pochodzenia tureckiego i afrykańskiego. W surowcu pochodzenia afrykańskiego dominowały di-C-arabinozylo-glukozydy, w tym izoszaftozyd obok obecnego w niższych stężeniach szaftozydu (ryc. 46). Stężenie izoorientyny było zbliżone do stężenia szaftozydu, natomiast orientyna występowała w niewielkiej ilości (ryc. 46). Profil HPLC ujawnionych związków flawonoidowych odpowiadał profilowi w surowcu krajowym (ryc. 34). Natomiast w nasionach pochodzenia tureckiego dominowały mono-C-glukozydy luteoliny: izoorientyna i orientyna. Szaftozyd i izoszaftozyd występowały w niewielkich ilościach (ryc. 46).



Ryc.46. Chromatogramy LC-LC-DAD *on-line* wyciągów metanolowych z nasion kozieradki pochodzenia afrykańskiego (A) oraz tureckiego (B): 1 – wicenina-2, 2 – wicenina-1, 3a - izoorientyna, 3b - orientyna, 4a - izoszaftozyd, 4b - szaftozyd, 5 –C-di-(6/8)-heksozylo-pentozyd apigeniny, 6 – witeksyna, 7 – wicenina-3, 8 – izowiteksyna, 9, 10, 11, 12, 13 – C-di-(6/8)-pentozyd apigeniny, 14 – ester p-kumarowy orientyny/izoorientyny, 15 – ester p-kumarowy witeksyny/izowiteksyny; 16-17 - di-C-(6/8)-heksozydy apigeniny; 18-19 - di-C-(6/8)-heksozylo-pentozidy apigeniny, fr. Z - frakcja "Z". ¹D - kolumna Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm), elucja gradientowa wg programu I, ²D - kolumna Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μm), faza ruchoma 23% ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) i 0,1% TFA (S2), UV λ–330 nm.

Analiza saponin steroidowych z użyciem metod chromatograficznych (TLC, HPLC)

Nasienie kozieradki pospolitej stanowi bogate źródło saponin steroidowych, zarówno typu spirostanu, jak i furostanu [253, 387, 417, 418, 605, 606]. Badania nad saponinami z nasion *T. foenum-graecum* podjęto już w latach 70-tych XX wieku [146, 198-200, 202, 458, 498], choć pierwsze doniesienia o ich obecności pochodzą z 1943 roku [352, 509]. Charakterystykę saponin steroidowych w nasieniu kozieradki przedstawiono w rozdziale 1.2.2.

Dotychczas saponiny steroidowe w nasieniu *T. foenum-graecum* analizowano w surowcu pochodzenia azjatyckiego [253, 303, 418, 554, 563], afrykańskiego [113, 202, 387] oraz uzyskanego na eksperymentalnych uprawach w Kanadzie [542, 543, 548]. Analizy zespołu saponin steroidowych z nasion kozieradki prowadzono przede wszystkim z użyciem metod chromatograficznych: chromatografii cienkowarstwowej (TLC) [113, 180, 200, 202, 430, 483, 554], chromatografii w przeciwnym kierunku (CCC) [178], wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w połączeniu z detektorami UV [413, 430], laserowym detektorem światła rozproszonego (*Evaporative Light Scattering Detector* - ELSD) [430] i detektorem mas (MS) [413] oraz ultrasprawnej chromatografii cieczowej w sprzężeniu ze spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu (UHPLC-QTOF-MS) [253, 418]. Niekiedy stosowano również metody spektrofotometryczne [43] lub chromatografię gazową (GC) (lub kapilarną GC [541]) w połączeniu ze spektrometrami mas, w tym MS [541] lub QTOF-MS [417].

Analiza saponin steroidowych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC, HPTLC) wykorzystywana jest w jakościowej i ilościowej analizie saponin steroidowych w surowcach roślinnych [213, 407, 408]. Stosowane są techniki jedno- i dwukierunkowe (2D TLC) oraz chromatografia cienkowarstwowa z gradientem fazy stacjonarnej [165-167, 213, 303, 407, 408, 563]. Rozdzielenia prowadzone są najczęściej na płytkach chromatograficznych pokrytych żelazem krzemionkowym [83, 131, 161, 326, 407, 554, 563, 575], niekiedy z dodatkiem wskaźnika fluorescencyjnego (F_{254}) [326, 575] bądź też impregnowanego tlenkiem glinu lub azotanem (V) srebra [82, 113].

Analiza wolnych aglikonów w nasionach kozieradki pospolitej

W pierwszym etapie prac oceniano obecność wolnych aglikonów w badanym materiale roślinnym. W tym celu wysuszony i sproszkowany surowiec poddano trójstopniowej wyczerpującej ekstrakcji w aparacie Soxhleta, stosując kolejno eter naftowy, chloroform i metanol, a otrzymane wyciągi analizowano z użyciem chromatografii cienkowarstwowej w warunkach opracowanych w niniejszej pracy dla analizy diosgeniny jako substancji wzorcowej i składnika wyciągów z nasion kozieradki. Rozdzielenie TLC prowadzono z użyciem płytek chromatograficznych HPTLC Si 60 F₂₅₄ jako fazy stacjonarnej oraz mieszaniny heptan:octan etylu (7:3, v/v) (F₂) jako fazy ruchomej. Chromatogramy rozwijano na dystansie 45 mm w komorze automatycznej Camag ACD2 (temperatura 22±2°C; wilgotność 47±2%), a następnie po wysuszeniu spryskano zmodyfikowanym roztworem aldehydu anyżowego i ogrzewano na płycie grzewczej (temp. 105°C, 1 minuta). Na otrzymanych chromatogramach nie obserwowano pasm wolnych sapogenin, natomiast obecne były liczne pasma o zabarwieniu różowo-fioletowym, świadczące o obecności znacznych ilości związków sterolowych i/lub terpenowych (ryc. 47). W ekstrakcie metanolowym nie występowały związki, reagujące z zastosowanym odczynnikiem wywołującym. Otrzymane wyniki pozwalają wykluczyć występowanie wolnych sapogenin w badanym materiale roślinnym, a dodatkowo potwierdzają skuteczność dwustopniowego oczyszczania surowca poprzez wytrawianie związków lipofilowych eterem naftowym i chloroformem.



Ryc.47. Chromatogram HPTLC wzorcowej diosgeniny (D) oraz wyciągów organicznych z nasion *T. foenum-graecum* otrzymanych w aparacie Soxhleta: 1 - wyciąg eterowy, 2 - wyciąg chloroformowy, 3 - wyciąg metanolowy. Faza stacjonarna - HPTLC Si 60 F₂₅₄, faza ruchoma - heptan:octan etylu (7:3, v/v) (F₂), detekcja - zmodyfikowany aldehyd anyżowy (temp. 105°C, 5 min).

Analiza glikozydów furostanowych metodą chromatografii cienkowarstwowej

W nasionach *T. foenum-graecum* saponiny steroidowe występują m.in. w formie glikozydów furostanowych: trigofenozydów A – G [176-178], trigoneozydów I – XVIII [387, 418, 605, 606] oraz protodioscyny [563] (I.2.2.). Saponozydy typu furostanu spotykane są głównie w świeżym materiale roślinnym, natomiast ich hydroliza może prowadzić do powstania pochodnych typu spirostanu [124, 362]. Stwierdzono, że saponiny furostanowe odpowiadają za gorzki smak surowca [388], uczestniczą w mechanizmie aktywności przeciwcukrzycowej [535] i hipolipidemicznej [430] nasion kozieradki. W ostatnich latach Variya i wsp. [563] oznaczyli ilościowo saponinę furostanową - protodioscynę w przetworach z nasienia kozieradki metodą HPTLC. Jednak uwzględniając trudność w separacji 25-epimerów z użyciem chromatografii cienkowarstwowej oraz widoczne na zamieszczonych w publikacji chromatogramach TLC niecałkowite rozdzielanie związków, proponowana przez autorów [563] metoda wydaje się problematyczna.

Do badań w ramach niniejszej pracy przeznaczono wyciągi, otrzymane w wyniku trójstopniowej, wyczerpującej ekstrakcji w aparacie Soxhleta (eterowy, chloroformowy i metanolowy). W badaniach wykorzystano chromatografię cienkowarstwową TLC i HPTLC, dwukierunkową chromatografię cienkowarstwową (2D TLC) oraz chromatografię cienkowarstwową z gradientem fazy stacjonarnej.

W procesie optymalizacji rozdzielania badanych związków saponinowych stosowano szereg różnych adsorbentów: żel krzemionkowy TLC - Kieselgel 60 F₂₅₄, Silica gel 60 ADAMANT F₂₅₄, Kieselgel 60 F₂₅₄ Lux Plate oraz żel krzemionkowy HPTLC: Si 60 F₂₅₄, żel krzemionkowy modyfikowany resztami diolowymi DIOL F₂₅₄S, oktadecylowymi C-18 (TLC) oraz C-18W F₂₅₄. Jako fazy ruchome stosowano mieszaniny następujących rozpuszczalników organicznych w różnym stosunku objętościowym: chloroformu, metanolu (lub etanolu) i kwasu mrówkowego (fazy ruchome F₃₉ - F₄₄), również z dodatkiem wody (faza ruchoma F₃₇, F₄₈); butanolu, wody i kwasu octowego (fazy ruchome F₄₅ - F₄₆). Chromatogramy rozwijano na dystansie 85 mm w warunkach wysycenia parami fazy ruchomej (czas wysycania - 10 minut). Wizualizację chromatogramów prowadzono przy użyciu odczynnika Ehrlicha, który reaguje z saponinami furostanowymi, wybarwiając ich pasma/plamy na czerwono - różowo [213, 521]. Jednocześnie odczynnik nie reaguje z saponinami spirostanowymi, umożliwiając rozróżnienie typu saponin, występujących w badanym wyciągu [213, 521].

Wstępne analizy prowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym TLC - Kieselgel 60 F₂₅₄ oraz HPTLC Si 60 z wykorzystaniem faz ruchomych stanowiących mieszaniny następujących rozpuszczalników chloroformu, metanolu (lub etanolu) i kwasu mrówkowego (fazy ruchome F₃₉ - F₄₄), chloroformu, metanolu, wody i kwasu mrówkowego (F₄₈) oraz na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami oktadecylowymi HPTLC C-18W F_{254S} z użyciem faz ruchomych stanowiących mieszaniny metanolu, wody i kwasu mrówkowego w różnym stosunku objętościowym (70:30:1, v/v/v lub 75:25:1, v/v/v) (F₃₆, F₃₇) lub acetonitrylu, wody i kwasu mrówkowego (50:50:0,5, v/v/v) (F₃₈).

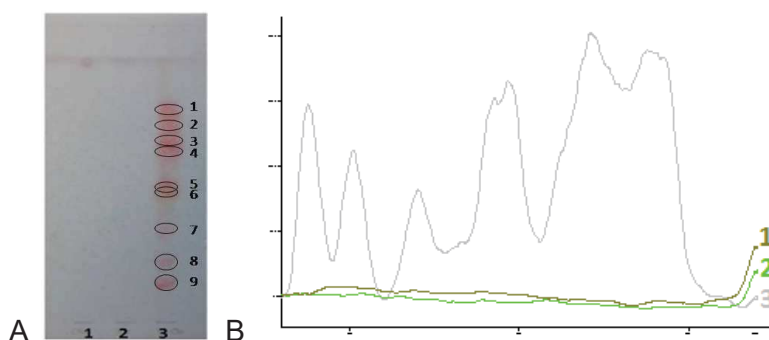
Spośród testowanych warunków separacji najlepsze rozdzielanie otrzymano na płytkach chromatograficznych TLC Kieselgel 60 F₂₅₄ z użyciem mieszaniny chloroform:metanol:kwas mrówkowy (30:20:2, v/v/v) (F₁) jako eluentu, jakkolwiek pasma rozdzielonych związków były szerokie. Kolejny etap prac stanowiła optymalizacja fazy stacjonarnej. W tym celu testowano adsorbenty stanowiące żel krzemionkowy HPTLC Si 60 F₂₅₄, żel krzemionkowy modyfikowany resztami diolowymi DIOL F₂₅₄, żel krzemionkowy Silica gel 60 ADAMANT F₂₅₄ oraz Kieselgel 60 F₂₅₄ Lux Plate. Rozdzielenia prowadzono w automatycznej komorze chromatograficznej Camag ACD2 w temperaturze 22±2°C. Najlepszą separację glikozydów furostanowych otrzymano na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym HPTLC Si 60 F₂₅₄ (ryc. 48-1). Z użyciem odczynnika Ehrlicha potwierdzono obecność szeregu saponin furostanowych w wyciągu metanolowym z nasion kozieradki pospolitej. Związków tych nie wykryto w wyciągach: eterowym i chloroformowym (ryc. 47). Glikozydy furostanowe efektywnie ekstrahowane są z badanego surowca metanolem, natomiast nie ulegają wytrawianiu podczas jego oczyszczania eterem naftowym i chloroformem w aparacie Soxhleta. Na otrzymanym chromatogramie TLC wyciągu metanolowego obserwowano 9 pasm związków (ryc. 48-1).

Jako kolejny etap prac podjęto próby separacji badanych związków z użyciem dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (2D TLC) oraz chromatografii cienkowarstwowej z gradientem fazy stacjonarnej [165, 166].

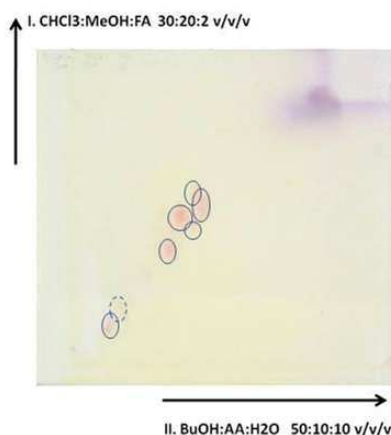
Gleńsk i wsp. [166] analizowali metodą 2D TLC mieszaninę wzorcowych saponin z korzeni *Medicago sativa* (*Fabaceae*) na złożu TLC Si 60, w fazach ruchomych, których kompozycję opracowano na podstawie wyników separacji metodą 1D TLC [166]. W pierwszym kierunku autorzy zastosowali jako eluent butanol nasycony wodą, natomiast w drugim kierunku - mieszaninę octanu etylu:kwas octowy:woda (7:2:2, v/v/v) [166]. Stosując analogiczne podejście, w analizach glikozydów furostanowych w niniejszej pracy prowadzonych metodą 2D TLC jako fazę stacjonarną wykorzystano płytki pokryte żelem krzemionkowym: TLC Kieselgel 60 F₂₅₄

i HPTLC Si 60 F₂₅₄. Uwzględniając wyniki otrzymane metodą 1D TLC oraz dane literaturowe [166], zastosowano trzy układy faz ruchomych: I) mieszaninę butanol:woda:kwasy octowy (50:20:20, v/v/v) (F₄₄) w pierwszym kierunku oraz mieszaninę chloroform:metanol:kwasy mrówkowy (30:20:2, v/v/v) (F₁) w drugim kierunku; II) mieszaninę chloroform:metanol:kwasy mrówkowy (30:20:2, v/v/v) (F₁) w pierwszym kierunku oraz mieszaninę butanol:woda:kwasy octowy (50:10:10, v/v/v) (F₄₅) w drugim kierunku oraz III) octan etylu:kwasy octowy:woda (7:2:2, v/v/v) (F₅₀) w pierwszym kierunku oraz butanol wysycony wodą (F₅₂) w drugim kierunku [166].

Z użyciem układów I i III nie uzyskano zadowalającego rozdzielania badanych związków, natomiast zastosowanie układu II faz ruchomych skutkowało separacją saponin w formie 7 pasm (ryc. 48-2), podczas gdy metodą 1D TLC otrzymano 9 pasm (ryc. 48-1).

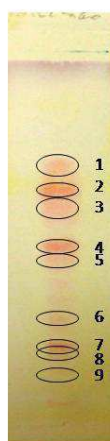


Ryc.48-1. Chromatogram HPTLC (A) oraz densytogram HPTLC (λ -520 nm) (B) ekstraktów organicznych z nasion kozieradki pospolitej otrzymanych w aparacie Soxhleta: 1 - ekstrakt chloroformowy, 2 - ekstrakt eterowy, 3 - ekstrakt metanolowy. Faza stacjonarna - HPTLC Si 60 F₂₅₄, faza ruchoma - chloroform:metanol:kwasy mrówkowy (30:20:2, v/v/v), detekcja - odczynnik Ehrlicha (temp. 105°C, 5 min).



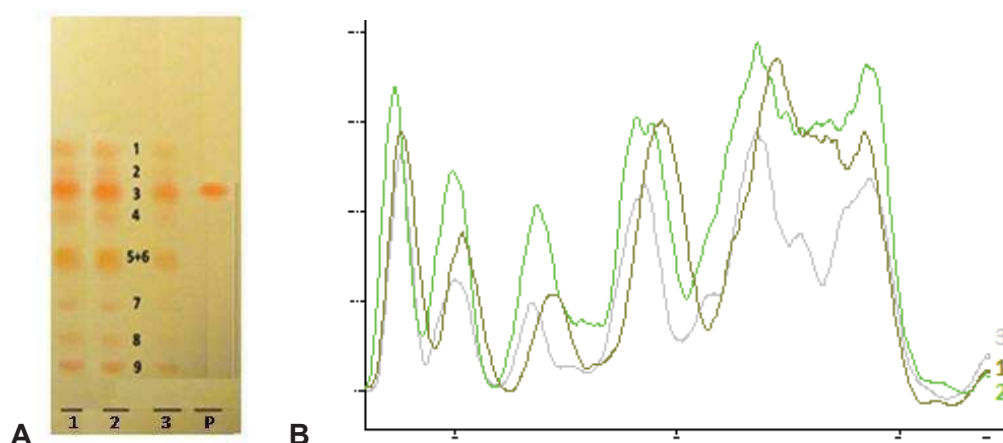
Ryc.48-2. Chromatogram 2D HPTLC wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej. Faza stacjonarna HPTLC Si 60 F₂₅₄, faza ruchoma: I kierunek - chloroform:metanol:kwasy mrówkowy (30:20:2, v/v/v) (F₁); II kierunek - butanol:woda:kwasy octowy (50:10:10, v/v/v) (F₄₅), detekcja: odczynnik Ehrlicha (temp. 105°C, 5 min).

Dalsze modyfikacje obejmowały zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej z gradientem fazy stacjonarnej. Analizy przeprowadzone w warunkach zaproponowanych przez Gleńska i wsp. [165] w analizie saponin triterpenowych w *Silene vulgaris* (złóże HPTLC Si 60_{F254}; fazy ruchome: pierwszy kierunek - metanol:0,1% kwas mrówkowy (70:30, v/v) (F₄₇); drugi kierunek - F₄₈ – chloroform:metanol:kwas mrówkowy:woda (10:4:1:1, v/v/v/v) (F₄₈) nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. W kolejnej pracy Gleńsk i wsp. [166], jako fazę stacjonarną wykorzystali złóże TLC RP-18 oraz mieszaninę metanol:woda (3:1, v/v) jako fazę ruchomą w pierwszym rozdzielaniu, natomiast w drugim kierunku chromatogram rozwijano na złóżu TLC Si 60 w fazie ruchomej stanowiącej butanol nasycony wodą [166]. W niniejszej pracy zastosowano podobną kombinację faz stacjonarnych, uwzględniając wyniki otrzymane metodami 1D i 2D TLC: złóże HPTLC RP-18W w pierwszym kierunku oraz złóże HPTLC Si 60_{F254} w drugim kierunku. Jako fazy ruchome wykorzystano: mieszaninę metanol:woda:kwas mrówkowy (70:30:1, v/v/v) (F₃₇) oraz chloroform:metanol:kwas mrówkowy (30:20:2, v/v/v) (F₁) w drugim kierunku. Na otrzymanym w pierwszym kierunku (¹D) chromatogramie TLC badane związki eluowały w formie 2 pasm. Pasma te przeniesiono na płytkę HPTLC Si 60, wykorzystując metodę opisaną przez Migasa i wsp. [372] oraz zaprojektowane przez autora urządzenie, tzw. *Migas device*, a następnie rozwinięto na dystansie 85 mm z użyciem wymienionego powyżej eluentu (F₁). Otrzymano rozdzielanie badanych glikozydów furostanowych w formie 9, w tym 2 częściowo nierozdzielonych pasm (pasma 7 i 8) (Chromatogram ²D) (ryc. 49).



Ryc.49. Chromatogram ²D HPTLC wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej otrzymany z użyciem gradientu fazy stacjonarnej: ¹D - faza stacjonarna HPTLC RP-18W, faza ruchoma metanol:woda:kwas mrówkowy (70:30:1, v/v/v) (F₃₇), ²D - faza stacjonarna HPTLC Si 60_{F254}, faza ruchoma chloroform:metanol:kwas mrówkowy (30:20:2, v/v/v) (F₁), detekcja: odczynnik Ehrlicha (temp. 105°C, 5 min).

Otrzymane rozdzielanie było bardziej efektywne w porównaniu do uzyskanych metodą 2D TLC, lecz porównywalne z chromatogramem 1D HPTLC (ryc. 48-1). Uwzględniając otrzymane wyniki oraz zużycie adsorbentów i rozpuszczalników, do dalszych badań porównawczych wykorzystano warunki opracowane dla rozdzieleń 1D HPTLC (faza stacjonarna HPTLC Si 60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform:metanol:kwas mrówkowy (30:20:2, v/v/v) (F₁). W opracowanych warunkach przeprowadzono analizę wyciągów metanolowych z nasion kozieradki pospolitej, otrzymanych od trzech producentów (firmy zielarskie: Lewandowki, Flos, Kawon) (ryc. 50) w obecności wzorcowej protodioscyny. W celu zapewnienia powtarzalności separacji, rozdzielania prowadzono w automatycznej komorze Camag ACD 2 w temperaturze 22 ± 2°C przy wilgotności 47 ± 2% (utrzymanie stałej wilgotności zapewniono dzięki nasyconemu roztworowi tiocyjanianu potasu KSCN). Nie obserwowano różnic w składzie jakościowym saponin furostanowych, natomiast biorąc pod uwagę intensywność pasm rozdzielonych związków stwierdzono, że surowiec otrzymany z firmy Kawon jest prawdopodobnie nieco uboższy w badane związki, co znajduje odzwierciedlenie w niższej intensywności pików na densytogramie wyciągu metanolowego. Obecność protodioscyny potwierdzono we wszystkich badanych wyciągach.



Ryc.50. Chromatogram HPTLC (A) oraz densytogram HPTLC (B) wyciągów metanolowych z nasion kozieradki pospolitej, otrzymanych od trzech producentów krajowych (1-3) oraz wzorcowej protodioscyny (P): 1 - firma zielarska „Lewandowski”, 2 - firma zielarska „Flos”, 3 - firma zielarska „Kawon”. Faza stacjonarna HPTLC Si 60 F₂₅₄, faza ruchoma chloroform:metanol:kwas mrówkowy (30:20:2, v/v/v), detekcja: odczynnik Ehrlicha (temp. 105°C, 5 min).

Analiza ilościowa diosgeniny po hydrolizie kwasowej w wyciągach z nasion kozieradki pospolitej

Nasiona kozieradki pospolitej uznawane są za bogate źródło diosgeniny (5,25- α -spirostan-3 β -olu). Według danych literaturowych [431, 541, 542] diosgenina stanowi dominujący aglikon saponin steroidowych w nasionach *T. foenum-graecum* na tle pozostałych zidentyfikowanych w surowcu genin. Diosgenina wykazuje wielokierunkową aktywność biologiczną, potwierdzoną licznymi badaniami. Posiada m.in. działanie przeciwnowotworowe [314, 445, 489, 515] i przeciwzapalne [488, 576]. Wykazuje aktywność hipolipidemiczną [430, 561] oraz przeciwcukrzycową [421, 475]. Ponadto ujawniono korzystny wpływ diosgeniny na układ sercowo-naczyniowy [350, 351] oraz zdolność do ograniczania utraty masy kostnej w przebiegu osteoporozy [206, 618, 619]. Zarówno diosgenina jak i nasiona kozieradki, uznawane za jej alternatywne źródło, stanowią półprodukty w przemysłowej syntezie progesteronu i hormonów steroidowych [111, 145, 404].

Obecnie, obok tradycyjnego zastosowania w formie przetworów do użytku wewnętrznego oraz kąpieli strosowanych na trudno gojące rany, *Foenugraeci Semen* jest składnikiem licznych suplementów diety o działaniu m.in. odżywczym i wzmacniającym, przeciwtrądzikowym oraz obniżającym poziom cukru we krwi. Wielokierunkowa aktywność diosgeniny warunkuje wiele potencjalnych zastosowań leczniczych surowców roślinnych bogatych w ten związek, m.in. nasion kozieradki. Z drugiej strony, wpływ 5,25- α -spirostan-3 β -olu na ludzki układ hormonalny w zakresie hormonów płciowych pozostaje niejasny i wymaga dalszych badań [110, 248, 299, 367, 588]. W świetle powyższych doniesień, uwzględniając wzrastającą popularność nasion kozieradki [91], ocena zawartości diosgeniny w *Foenugraeci Semen* jest konieczna w aspekcie efektywności i bezpieczeństwa stosowania tego surowca.

Dotychczas opracowano szereg metod oznaczania diosgeniny w matrycach roślinnych [35, 120, 161, 272, 393, 403, 542, 554, 575, 597]. Niektóre oparte są na wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [175, 393, 597], inne na chromatografii gazowej (GC) [120, 542]. Uwzględniając fakt, że obie wymienione techniki wymagają wykorzystania kosztownego sprzętu, ich efektywną alternatywą jest chromatografia cienkwarstwowa (TLC). Technika ta jest stosunkowo niskokosztowa, a jej użycie - możliwe w każdym laboratorium fitochemicznym. Dodatkowo TLC umożliwia równoległą, szybką analizę szeregu próbek, przy jednoczesnym niskim zużyciu rozpuszczalników organicznych, dlatego stosowana jest w analizie

skryningowej matryc roślinnych w zakresie różnych grup metabolitów wtórnych. TLC w połączeniu z analizą densytometryczną stanowi użyteczne narzędzie w analizie ilościowej, charakteryzując się dobrą precyzją, powtarzalnością, dokładnością i odtwarzalnością [343, 500, 572].

Wykazano, że oznaczona zawartość 5,25- α -spirostan-3 β -olu jest bezpośrednio związana z zastosowaną procedurą analityczną [420]. Dane literaturowe wskazują na konieczność optymalizowania warunków hydrolizy kwasowej saponin steroidowych, z uwzględnieniem możliwości hydrolizy niecałkowitej oraz formowania artefaktów [133, 428, 541, 542]. Nasiona kozieradki stanowią złożoną matrycę roślinną, zawierającą wiele grup metabolitów wtórnych o zróżnicowanej budowie chemicznej, które mogą utrudniać oznaczanie diosgeniny. W procesie optymalizacji parametrów analizy diosgeniny w nasionach *T. foenum-graecum* metodą TLC, konieczne jest uwzględnienie nie tylko warunków rozdzielania chromatograficznego, lecz również warunków ekstrakcji i hydrolizy kwasowej.

Cel badań opisanych w niniejszym rozdziale stanowiło opracowanie metody analizy ilościowej diosgeniny po hydrolizie kwasowej w nasionach kozieradki pospolitej, z użyciem chromatografii cienkowsarstwowej w połączeniu z analizą densytometryczną. Przeprowadzone eksperymenty obejmowały optymalizację warunków separacji TLC diosgeniny w zakresie fazy ruchomej, fazy stacjonarnej i doboru odczynnika wywołującego oraz optymalizację warunków ekstrakcji i hydrolizy kwasowej saponin steroidowych z nasion *T. foenum-graecum*.

Opracowaną metodę TLC z analizą densytometryczną poddano walidacji w zakresie: specyficzności, liniowości, wyznaczenia granicy wykrywalności oraz granicy oznaczalności, precyzji, powtarzalności oraz stabilności metody (tab. 16).

Następnie opracowaną metodę wykorzystano do oznaczenia zawartości 5,25- α -spirostan-3 β -olu w nasionach kozieradki pospolitej, otrzymanych od trzech producentów krajowych (firmy zielarskie: Lewandowski, Flos, Kawon).

Optymalizacja warunków analizy chromatograficznej metodą chromatografii cienkowsarstwowej

W analizie saponin steroidowych metodą chromatografii cienkowsarstwowej jako fazy ruchome najczęściej stosowane są dwu- lub trójskładnikowe mieszaniny następujących rozpuszczalników organicznych: chloroformu, acetonu, heksanu, octanu etylu, dichlorometanu, eteru naftowego oraz izopropanolu [83, 112, 113, 131, 200,

407, 554], niekiedy z dodatkiem kwasu octowego lub mrówkowego [167, 466]. W literaturze opisano również zastosowanie w analizie sapogenin, w tym diosgeniny, eluentów zawierających benzen [575] lub toluen [161, 272, 393, 466], jednak uwzględniając wysoką toksyczność tych związków [47, 92, 130, 401, 505, 603] w ramach niniejszej pracy wykluczono ich użycie.

Warunki rozdzielania TLC diosgeniny w hydrolizatach, uzyskanych w wyniku hydrolizy kwasowej wyciągów metanolowych z nasion kozieradki pospolitej optymalizowano w zakresie fazy stacjonarnej, fazy ruchomej oraz odczynnika wywołującego. Chromatogramy rozwijano na dystansie 45 mm w komorach chromatograficznych: poziomej DS II lub pionowej (10 cm x 11 cm x 6 cm). Analizy prowadzono wobec substancji wzorcowej - diosgeniny. Densytogramy rejestrowano przy długości fali λ -590 nm.

Do badań przeznaczono dwa hydrolizaty wyciągów metanolowych z nasion kozieradki (firma zielarska Lewandowski): hydrolizat wyciągu metanolowego otrzymanego pod chłodnicą zwrotną (hydrolizat ME-H) (II.1.6.3.) oraz hydrolizat wyciągu metanolowego, otrzymanego w wyniku trójstopniowej ekstrakcji w aparacie Soxhleta (hydrolizat SPPChE) (II.1.6.3.). W ocenie efektywności rozdzieleń TLC i HPTLC uwzględniono wartości współczynnika opóźnienia [586] diosgeniny (R_f_D).

Stosowano adsorbenty oparte na żelu krzemionkowym, powszechnie wykorzystywanym w analizie saponin steroidowych [83, 131, 161, 326, 407, 554, 575]. W badaniach wykorzystano następujące płytki chromatograficzne: TLC (Kieselgel 60 F₂₅₄, Kieselgel 60 F₂₅₄ Lux Plate) oraz HPTLC (Silicagel 60 F₂₅₄, Silicagel 60 F₂₅₄ Lichrospher, RP-18 F₂₅₄, RP-8 F₂₅₄, DIOL F₂₅₄S). Jako fazy ruchome testowano jedno-, dwu- i trójskładnikowe mieszaniny następujących rozpuszczalników: chloroform, aceton, izopropanol, eter naftowy, eter dietylowy, heksan, heptan, cykloheksan, dichlorometan, octan etylu, metanol, woda, kwas octowy (fazy ruchome F₂, F₄-F₂₉).

Wstępne analizy na złożu TLC Si 60 F₂₅₄ obejmowały ocenę zastosowania pojedynczych rozpuszczalników jako eluentów: metanolu, chloroformu, izopropanolu, octanu etylu, butanolu oraz eteru etylowego (fazy ruchome F₁₇ - F₂₂). Z użyciem żadnej z zastosowanych faz ruchomych nie otrzymano separacji produktów hydrolizy. Na chromatogramach TLC otrzymanych z użyciem chloroformu jako eluentu (F₁₈), pomimo bardzo dobrej rozpuszczalności aglikonów steroidowych, obserwowano pasmo diosgeniny o bardzo niskiej wartości R_f_D 0,1, co świadczyło o silnej adsorpcji związku na powierzchni żelu krzemionkowego. Przeprowadzono trzykrotne rozwinięcie chromatogramu z użyciem chloroformu jako eluentu (F₁₈) (tzw. *multidevelopment TLC*), jednak nie uzyskano poprawy efektywności rozdzielania. Natomiast zastosowanie

octanu etylu (F_{19}) i eteru etylowego (F_{22}), skutkowało migracją badanego związku w pobliżu czoła fazy ruchomej (R_{fD} 0,88 i R_{fD} 0,87, odpowiednio).

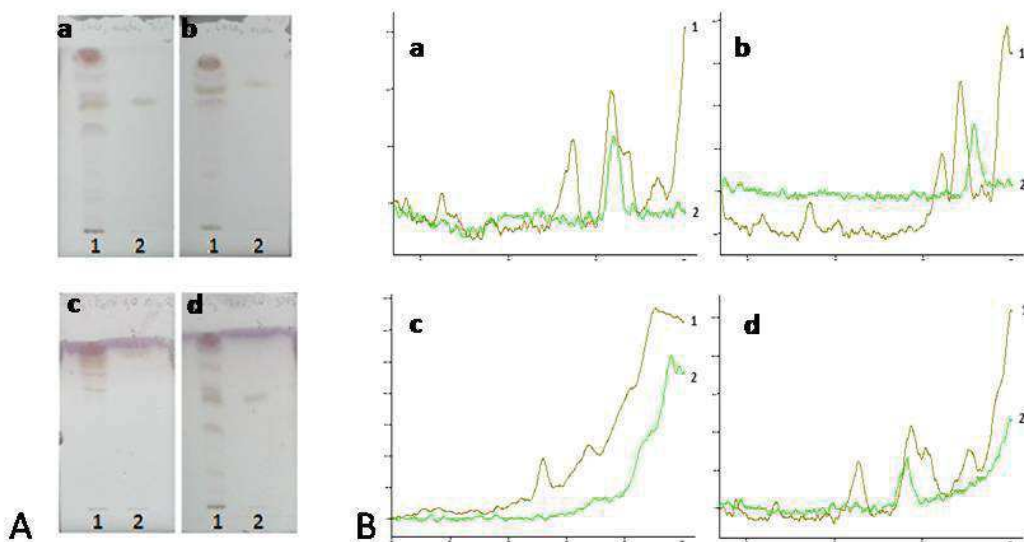
Następnie jako fazy ruchome zastosowano dwu- i trójskładnikowe mieszaniny rozpuszczalników organicznych (fazy ruchome F_2 , F_4 - F_{16} , F_{23} - F_{29}). Ze względu na wysoką lotność eteru etylowego (F_{22}), co skutkowało problemami z powtarzalnością warunków rozdzielania, w dalszych badaniach wykluczono ten rozpuszczalnik jako składnik faz ruchomych.

Podczas rozwijania chromatogramów na złożu TLC Si 60 F_{254} w fazach ruchomych, zawierających izopropanol w połączeniu z heptanem lub eterem naftowym [35] w stosunku objętościowym 1:12, v/v (fazy ruchome F_{13} i F_{14}) obserwowano na płytkach chromatograficznych zjawisko demiksji, a wartości współczynnika opóźnienia diosgeniny były niskie i wynosiły odpowiednio R_{fD} 0,1 (F_{13}) i R_{fD} 0,05 (F_{14}). Natomiast w fazie ruchomej, stanowiącej mieszaninę eteru naftowego i octanu etylu w stosunku objętościowym 7:3 (v/v) (F_{15}) współczynnik opóźnienia miał wartość R_{fD} 0,54, ale na chromatogramie TLC pasma związków obecnych w hydrolizacie były rozmyte. Również fazy ruchome cykloheksan:aceton (1:1, v/v) (F_6) oraz butanol:woda:kwas octowy (4:2:1, v/v, warstwa organiczna) (F_{16}) były nieefektywne, a diosgenina migrowała wraz z innymi związkami w pobliżu czoła fazy ruchomej (R_{fD} 0,87 (F_6) i R_{fD} 0,94 (F_{16}), odpowiednio).

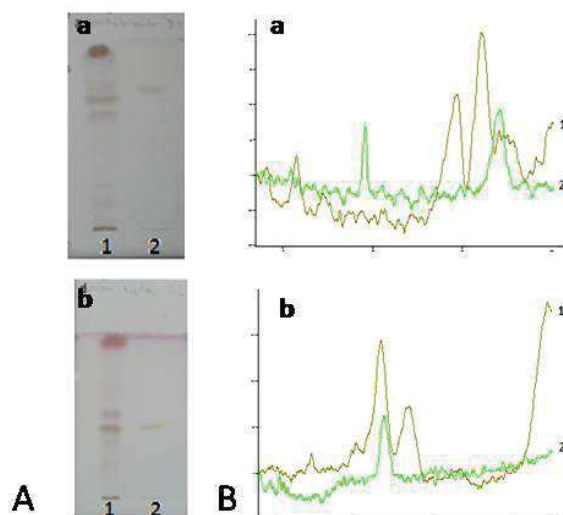
W kolejnym etapie prac optymalizacyjnych testowano eluenty, zawierające chloroform, mianowicie: chloroform:aceton [521] (7:3, 8:2 [131], 9:1, v/v) (F_7 , F_8 , F_9) oraz chloroform:metanol:woda [213] (13:6:2 i 90:5:5, v/v/v) (F_4 , F_5). Analizy prowadzono na płytkach chromatograficznych na złożu TLC Si 60 F_{254} . Wykazano, że 10% zawartość acetonu w mieszaninie z chloroformem (F_9) skutkowała zadowalającym oddzieleniem pasma badanego związku (R_{fD} 0,7) (ryc. 51), natomiast jej wzrost do 20% [131] (F_8) skutkował niekorzystnym wzrostem współczynnika opóźnienia (R_{fD} 0,77) z jednoczesnym pogorszeniem koncentracji pasma (ryc. 51), natomiast 30% stężenie acetonu w mieszaninie z chloroformem (F_7) powodowało, że pasma związków były szerokie i rozmyte. Również z użyciem trójskładnikowej mieszaniny chloroform:metanol:woda (13:6:2, v/v/v) (F_4) jako fazy ruchomej nie uzyskano separacji analizowanej matrycy, a diosgenina migrowała w pobliżu czoła fazy ruchomej (R_{fD} 0,89). Jakkolwiek w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji GUMed z użyciem fazy ruchomej chloroform:metanol:woda (13:6:2, v/v/v) (F_4) rozdzielono efektywnie saponiny steroidowe w różnych odmianach cebuli zwyczajnej [149]. Zmiana stosunku objętościowego poszczególnych rozpuszczalników fazy z 13:6:2, v/v/v (F_4) na 90:5:5, v/v/v (F_5) skutkowała lepszym rozdzielaniem składników hydrolizatu i obniżeniem wartości współczynnika opóźnienia (R_{fD} 0,61) (ryc. 51). Jednocześnie na

chromatogramie TLC widoczne było rozmycie pasm tworzące szare tło, utrudniające analizę densytometryczną. Dodatkowo dla obu faz ruchomych [chloroform:metanol:woda (13:6:2, v/v/v) (F₄) i 90:5:5, v/v/v (F₅)] obserwowano wydłużenie czasu migracji (22 min) (ryc. 51).

W toku prac prowadzono również eksperymenty TLC w odwróconym układzie faz (RP). Separacja z użyciem fazy ruchomej chloroform:metanol:woda (13:6:2, v/v/v) (F₄), przeprowadzona na złożu HPTLC RP-8 F₂₅₄ nie zapewniła rozdzielania produktów hydrolizy, których pasma na otrzymanym chromatogramie TLC grupowały się w górnej części płytki (Rf_D 0,84). Natomiast na chromatogramach otrzymanych na złożu HPTLC C-18W z wykorzystaniem fazy ruchomej metanol:woda (8:2, v/v) (F₃) pasma rozdzielanych związków koncentrowały się w dolnej części chromatogramu, z wartością Rf_D 0,15 dla diosgeniny. Następnie oceniano fazy ruchome, stanowiące mieszaniny dichlorometan:aceton (9:1, v/v) (F₁₀) oraz heksan:aceton (8:2, v/v) (F₁₁) (ryc. 51). Umożliwiły one lepsze rozdzielanie składników hydrolizatu, jakkolwiek w paśmie odpowiadającym diosgeninie: Rf_D 0,6 (F₁₀) oraz Rf_D 0,43 (F₁₁), odpowiednio, obserwowano obecność dodatkowego szarozielonego pasma związku pod wpływem odczynnika wywołującego.

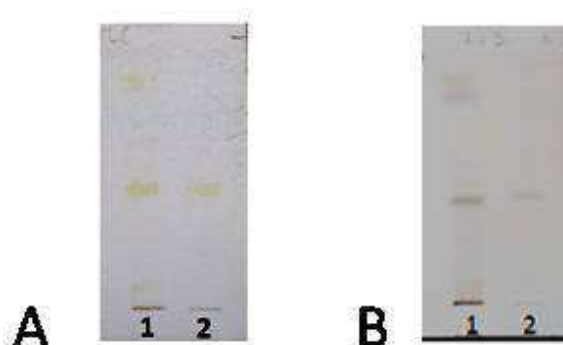


Ryc.51. Chromatogramy TLC (A) i densytogramy TLC (B) hydrolizatu ME-H (1) oraz wzorcowej diosgeniny (2), otrzymane na płytkach TLC Si 60 F₂₅₄ z użyciem faz ruchomych: a - chloroform:aceton (9:1, v/v) (F₉), b - chloroform:aceton (8:2, v/v) (F₈), c - chloroform:metanol:woda (13:6:2, v/v/v) (F₄), d - chloroform:metanol:woda (90:5:5, v/v/v) (F₅). Detekcja: aldehyd anyżowy (temp. 105°C, 5 min).



Ryc.52. Chromatogramy TLC (A) i densytogramy TLC (B) hydrolizatu ME-H (1) oraz wzorcowej diosgeniny (2) otrzymane na płytkach TLC Si 60 F₂₅₄ z użyciem faz ruchomych: a - dichlorometan:aceton (9:1,v/v) (F₁₀), b - heksan:aceton (8:2, v/v) (F₁₁). Detekcja: aldehyd anyżowy (temp. 105°C, 5 min).

W analizie TLC sapogenin steroidowych jako fazę ruchomą stosuje się również dwuskładnikową mieszaninę heksan:octan etylu [83, 478, 554]. W niniejszej pracy początkowo analizy prowadzono na płytkach TLC z wykorzystaniem jako fazy ruchomej mieszaniny heksan:octan etylu w stosunku objętościowym 6:1 (v/v) (F₁₂). Jednak lepszą powtarzalność rozdzieleń uzyskano w rezultacie zastąpienia heksanu n-heptanem, który wykazuje niższą lotność. Na chromatogramie TLC otrzymanym z użyciem fazy ruchomej heptan:octan etylu 7:3 (F₂) obserwowano pasmo odpowiadające diosgeninie o R_{fD} 0,47. Przeprowadzenie rozdzielania na złożu HPTLC Si 60F₂₅₄ skutkowało poprawą koncentracji pasma badanego związku (ryc. 53)



Ryc.53. Chromatogramy TLC (A) i HPTLC (B) hydrolizatu SPPChE-H (1) oraz wzorcowej diosgeniny (2) otrzymane na płytkach TLC Si 60 (A) oraz HPTLC Si 60 F₂₅₄ (B) z użyciem fazy ruchomej heptan:octan etylu (7:3, v/v). Detekcja: aldehyd anyżowy (temp. 105°C, 5 min).

W toku dalszych prac podjęto próby ustalenia optymalnego składu objętościowego mieszaniny rozpuszczalników heptan:octan etylu w różnym stosunku objętościowym (v/v), mianowicie: 1:2 (F₂₃), 1:1 (F₂₄), 2:1 (F₂₅), 3:1 (F₂₆), 4:1 (F₂₇), 7:3 (F₂) i 10:3 (F₂₈). Analizy prowadzono na złożu HPTLC Si 60 F₂₅₄ ze względu na lepszą koncentrację pasma diosgeniny.

W ocenie efektywności otrzymanych rozdieleń obok wartości współczynnika opóźnienia R_f (0,2<R_f<0,8 [343]), uwzględniono również rozdzielczość metody (R_s), wyrażającą stopień rozsunęcia na chromatogramie sąsiadujących pasm związków [343, 361]:

$$R_s = \frac{z_2 - z_1}{0,5 (w_1 + w_2)}$$

R_s – rozdzielczość

z₁, z₂ – odległość środków pasm od miejsca naniesienia próbki

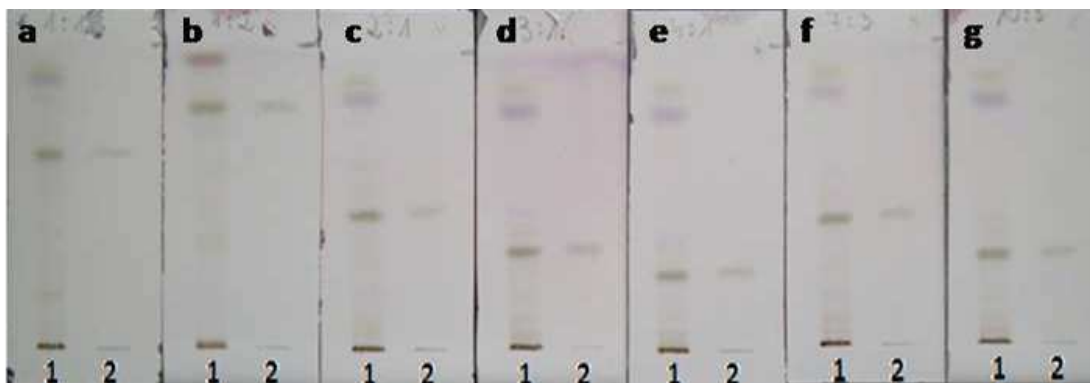
w₁, w₂ – szerokość pasm mierzona wzdłuż drogi rozwijania chromatogramu

Dla związków całkowicie rozdzielonych na chromatogramie rozdzielczość wynosi R_s>1,5, natomiast R_s<0,8 świadczy o zbyt słabym rozsunięciu pasm [361].

Otrzymane chromatogramy przedstawiono na ryc. 54. Natomiast wartości współczynników R_{fD} oraz R_s dla pasma diosgeniny w zależności od stosunków objętościowych składników fazy ruchomej przedstawiono w tabeli 14. Uwzględniając uzyskane wyniki, stwierdzono, że wśród ocenianych faz ruchomych (F₂,F₄-F₂₉) najlepszymi właściwościami rozdzielczymi na żelu krzemionkowym TLC charakteryzowała się mieszanina heptan:octan etylu w stosunku objętościowym 7:3 (v/v) (F₂) (R_{fD} 0,47; R_s 14,8).

Faza ruchoma	Stosunek objętościowy (v/v) mieszaniny rozpuszczalników heptan:octan etylu	R _{fD}	R _s
F ₂₃	1:2	0,79	4,6
F ₂₄	1:1	0,63	8,7
F ₂₅	2:1	0,52	11,4
F ₂	7:3	0,47	14,8
F ₂₆	3:1	0,34	13,7
F ₂₈	10:3	0,3	17,2
F ₂₇	4:1	0,27	17,5

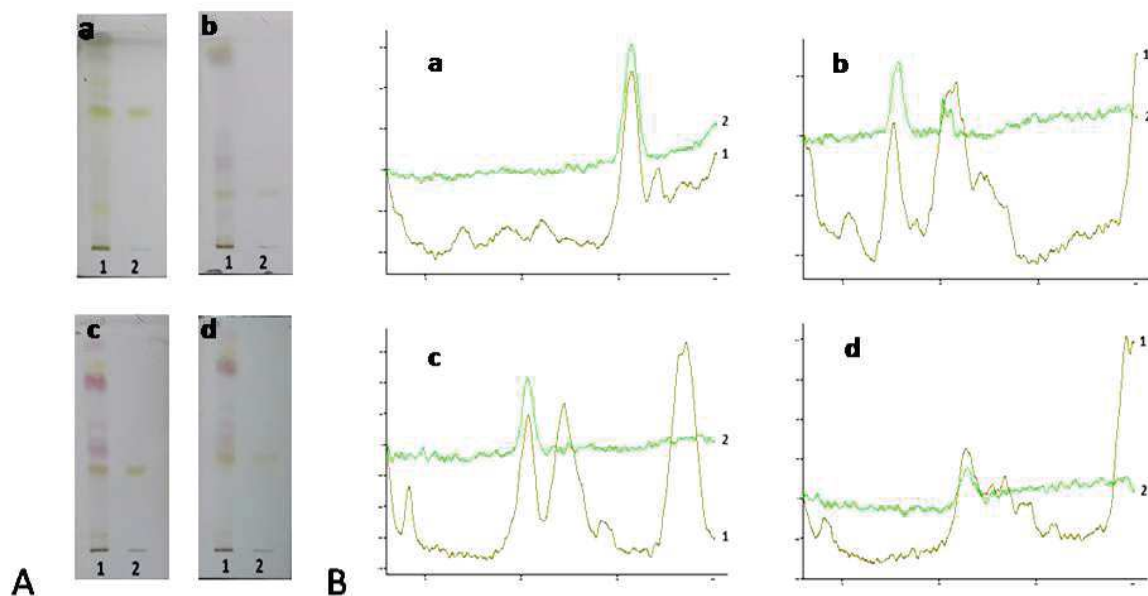
Tab.14 Wartości R_{fD} diosgeniny oraz rozdzielczości R_s otrzymane z użyciem faz ruchomych stanowiących mieszaniny heptan:octan etylu w różnych stosunkach objętościowych (v/v) (F₂, F₂₃-F₂₇).



Ryc.54. Chromatogramy HPTLC hydrolizatu SPPChE-H (1) oraz wzorcowej diosgeniny (2) otrzymane z użyciem faz ruchomych stanowiących mieszaniny heptan:octan etylu w różnych stosunkach objętościowych (v/v): a - 1:1 (F_{24}), b - 1:2 (F_{23}), c - 2:1 (F_{25}), d - 3:1 (F_{26}), e - 4:1 (F_{27}), f - 7:3 (F_2), g - 10:3 (F_{28}). Faza stacjonarna HPTLC Si 60 F_{254} , detekcja: aldehyd anyżowy (temp. 105°C, 5 min).

W kolejnym etapie prac optymalizowano warunki rozdzielania diosgeniny w hydrolizacie kwasowym wyciągu z nasion kozieradki z użyciem fazy ruchomej heptan:octan etylu (7:3, v/v) (F_2) w zakresie doboru fazy stacjonarnej stanowiącej złoża TLC Si 60 F_{254} Lux Plate, HPTLC Lichrospher Si 60 F_{254} , HPTLC RP-8 F_{254} i HPTLC Si 60 DIOL F_{254} .

Na chromatogramach TLC otrzymanych na płytkach TLC Si 60 F_{254} Lux Plate, HPTLC Lichrospher Si 60 F_{254} pasmu diosgeniny towarzyszyło pasmo nieznanego związku (ryc. 55). Na złożu TLC Si 60 F_{254} Lux Plate pozostałe składniki hydrolizatu rozdzielały się w formie nieostrych pasm, natomiast na złożu HPTLC Lichrospher Si 60 F_{254} uzyskano ich dobrą separację. Współczynnik opóźnienia dla badanego związku - diosgeniny - wynosił odpowiednio: Rf_D 0,41 (TLC Si 60 F_{254} Lux Plate) oraz Rf_D 0,37 (HPTLC Lichrospher Si 60 F_{254}) (ryc. 55). Separacja przeprowadzona z wykorzystaniem fazy stacjonarnej HPTLC RP - 8 F_{254} charakteryzowała się dobrym oddzieleniem pasma diosgeniny od pozostałych składników hydrolizatu, migrujących w większości w pobliżu czoła fazy ruchomej, a jej współczynnik opóźnienia wynosił Rf_D 0,63. Natomiast na złożu HPTLC Si 60 DIOL F_{254} pasmo diosgeniny charakteryzowało się niską wartością współczynnika opóźnienia (Rf_D 0,24), a pozostałe związki migrowały w formie pojedynczej plamy znajdującej się w pobliżu czoła fazy ruchomej (ryc. 55).



Ryc.55. Chromatogramy TLC (A) i densytogramy TLC (B) hydrolizatu SPPChE-H (1) oraz wzorcowej diosgeniny (2), otrzymane z użyciem różnych faz stacjonarnych: a - HPTLC RP – 8 F₂₅₄; b - HPTLC Si 60 DIOL F₂₅₄; c - TLC Si 60_{F254} Lux Plate; d - HPTLC Lichrospher Si 60 F₂₅₄. Faza ruchoma heptan:octan etylu (7:3, v/v), detekcja: aldehyd anyżowy (temp. 105°C, 5 min).

Na podstawie wyników przeprowadzonych eksperymentów w zakresie optymalizacji warunków separacji metodą TLC produktów hydrolizy wyciągów metanolowych z nasion kozieradki pospolitej, za najbardziej efektywne warunki rozdzielania uznano fazę stacjonarną stanowiącą żel krzemionkowy HPTLC Si 60 F₂₅₄ oraz mieszaninę heptan:octan etylu 7:3, (v/v) (F₂) jako fazę ruchomą.

Dodatkowy eksperyment stanowiła ocena wpływu czasu przechowywania eluentu na jakość rozdzieleń. Wykazano, że przechowywanie fazy ruchomej przez okres do 48 godzin nie wpływa na jakość rozdzielania, natomiast wydłużenie tego czasu skutkuje poszerzeniem pasm oraz nierównomierną migracją czoła fazy ruchomej. Uwzględniając obserwowane efekty, w procesie walidacji metody oraz podczas prowadzonych analiz faza ruchoma przygotowywana była *ex tempore*.

Ważnym etapem w procesie optymalizacji warunków separacji produktów hydrolizy wyciągów metanolowych z nasion kozieradki pospolitej metodą TLC była selekcja odczynnika wywołującego. Ze względu na brak ugrupowań chromoforowych w cząsteczkach sapogenin steroidowych, ich detekcja w świetle UV jest niemożliwa. W analizie metodą chromatografii cienkowarstwowej wykorzystywane są ich barwne reakcje z odpowiednimi odczynnikami derywatyzyjącymi. Do badań w zakresie selekcji efektywnego odczynnika wywołującego przeznaczono hydrolizat wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej, charakteryzującego się wysoką zawartością związków balastowych (hydrolizat ME-H), co miało na celu ocenę

specyficzności obserwowanych reakcji barwnych oraz możliwość stosowania poszczególnych reagentów w analizie jakościowej i ilościowej saponin steroidowych.

W badaniach wykorzystano opisane w literaturze odczynniki wywołujące: metanole roztwór kwasu siarkowego (VI), odczynnik Liebermanna-Burcharda, kwas fosfomolibdenowy, aldehydy aromatyczne (wanilinę oraz aldehyd anyżowy) i chlorek antymonu [82, 131, 154, 213, 408, 430, 572] oraz opracowano własną modyfikację podstawowego roztworu aldehydu anyżowego. Opis przygotowania poszczególnych reagentów przedstawiono w rozdziale II.A.4.1.4.1.

Alkoholowe roztwory kwasu siarkowego (VI) (H_2SO_4) stosowane są w wizualizacji saponin w stężeniach od 2% [131] do 25% [508]. Derywatywacja badanych związków z użyciem 2% roztworu H_2SO_4 w metanolu skutkowała niespecyficznym, o niskiej intensywności brunatnym pasmem diosgeniny wraz z pozostałymi brunatnymi pasmami rozdzielonych związków. Z odczynnikami reaguje większość związków organicznych [213, 430, 479, 572] i jest on reagentem uniwersalnym, co z drugiej strony ogranicza jego wykorzystanie w analizie ilościowej. Kwas siarkowy (VI) może być użyty do analizy dobrze oczyszczonych próbek, zawierających diosgeninę, ale nie w separacji zawierających ją matryc o złożonym składzie, co potwierdzają wyniki uzyskane przez innych autorów [131].

Bardzo słabe wybarwienie jasnobrunatnego pasma diosgeniny otrzymano również w wyniku zastosowania chlorku antymonu jako odczynnika wywołującego.

Odczynnik Liebermanna-Burcharda reaguje ze wszystkimi związkami o budowie steroidowej i wybarwia saponiny sterydowe na kolor zielononiebieski, natomiast z saponinami triterpenowymi - na różowo-czerwono [82, 213]. Umożliwia to różnicowanie jakościowe zespołu saponin obecnego w badanym materiale roślinnym już na etapie badań wstępnych. Jako wynik wizualizacji otrzymanych chromatogramów TLC odczynnikiem Liebermanna-Burcharda obserwowano szereg szaroniebieskich pasm. W rezultacie przeprowadzonych eksperymentów, odczynnik Liebermanna-Burcharda uznano za odpowiedni do analizy jakościowej saponin steroidowych i ich aglikonów, jednak niespecyficzny, aby był użyty w analizie ilościowej diosgeniny.

Kwas fosfomolibdenowy, jakkolwiek stosowany w derywatywacji wzorcowej diosgeniny przez Dołowego [131], stanowi niespecyficzny odczynnik o niskiej czułości [82], co ogranicza zastosowanie go w analizie wieloskładnikowych próbek. Ponadto pod wpływem kwasu fosfomolibdenowego obserwowano silne wybarwienie tła chromatogramu TLC przy niskiej intensywności zabarwienia badanego związku.

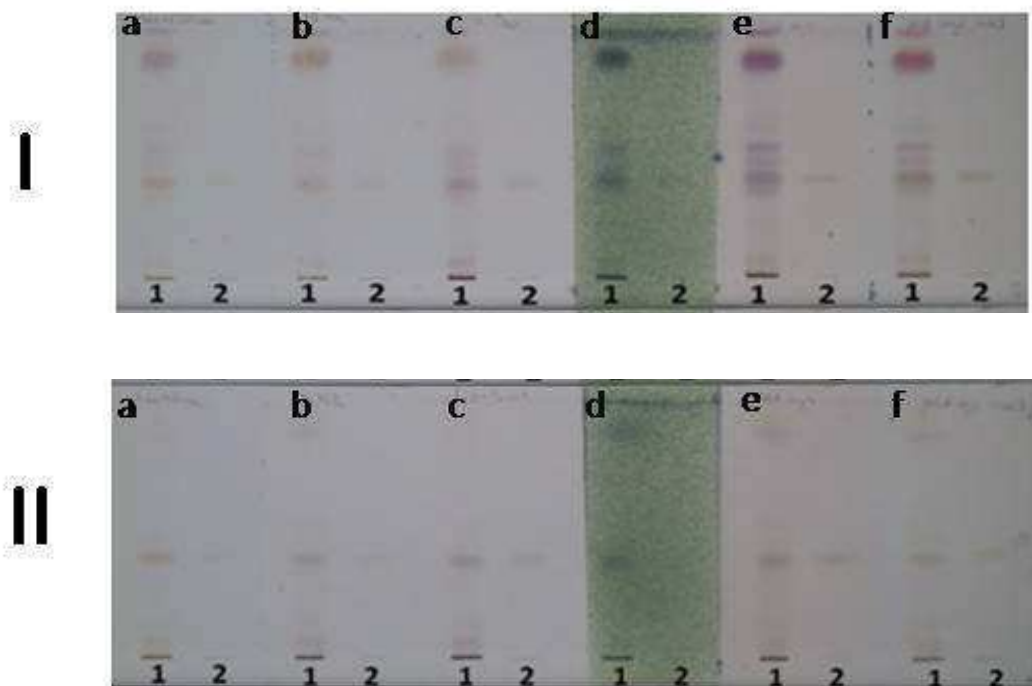
Dane literaturowe wskazują, że większą selektywnością w derywatywacji saponin steroidowych charakteryzują się aldehydy aromatyczne w roztworach kwasów nieorganicznych [213, 407, 408]. Eksperymenty przeprowadzone w niniejszej pracy z

użyciem roztworów waniliny w kwasie siarkowym lub fosforowym skutkowały wybarwieniem pasma diosgeniny na kolor pomarańczowy. Reakcja nie była specyficzna dla badanego związku. Wanilina reaguje ze związkami lipofilowymi, włączając - obok saponin steroidowych - również lignany, terpeny, alkaloidy, sterole oraz olejki eteryczne [572]. Natomiast aldehyd anyżowy w reakcji z saponinami steroidowymi tworzy pochodne o barwie od żółtej do niebieskiej [82, 213, 572]. W toku prowadzonych eksperymentów obserwowano silne wybarwienie nie tylko pasma diosgeniny (pasma zielonoszare), lecz również towarzyszących jej związków balastowych (pasma ciemnoniebieskie). Dlatego za konieczną uznano modyfikację składu odczynnika tak, aby zwiększyć jego specyficzność wobec diosgeniny. Początkowo modyfikowano skład według Trivedi i wsp. [554], jednak z wynikiem negatywnym. Kolejną modyfikację stanowiło rozcieńczenie podstawowego standardowego roztworu aldehydu anyżowego w mieszaninie metanolu i kwasu octowego (85:15, v/v) w stosunku 1:1. Znacząco zwiększyło to specyficzność reakcji barwnej odczynnika z diosgeniną. Zmodyfikowany roztwór aldehydu anyżowego intensywnie wybarwiał pasmo diosgeniny na zielono, przy jednoczesnej niskiej intensywności wybarwienia pozostałych związków, obecnych w badanym hydrolizacie, w tym pasma związku balastowego znajdującego się na chromatogramie poniżej pasma diosgeniny (hydrolizat ME-H).

Charakterystykę barw pasm produktów hydrolizy wyciągów z nasion kozieradki (nieoczyszczonego - ekstrakt ME oraz oczyszczonego - ekstrakt SPPChE) pod wpływem różnych odczynników wywołujących na chromatogramach HPTLC przedstawiono na rycinie 56.

Uwzględniając otrzymane wyniki, za najlepszy odczynnik wywołujący w analizie jakościowej i ilościowej diosgeniny po hydrolizie kwasowej uznano zmodyfikowany roztwór aldehydu anyżowego. Ponadto wykazano, że dla właściwego wybarwienia pasma diosgeniny wystarczające jest ogrzewanie chromatogramu TLC spryskanego odczynnikiem wywołującym przez 1 minutę w temperaturze 105°C.

W rezultacie przeprowadzonych eksperymentów opracowano warunki analizy TLC produktów hydrolizy kwasowej wyciągu z nasion *T. foenum-graecum* obejmujące rodzaj adsorbentu - płytki HPTLC Si 60_{F254} i fazę ruchomą heptan:octan etylu (7:3, v/v) oraz odczynnik wywołujący - zmodyfikowany roztwór aldehydu anyżowego.



Ryc.56. Chromatogramy HPTLC wzorcowej diosgeniny (2) i hydrolizatów kwasowych (1): ME-H (I) i SPPChE-H (II), otrzymane z użyciem różnych odczynników wywołujących: a - wanilina w kwasie fosforowym (temp. 105°C; 3 min) , b - kwas siarkowy (temp. 105°C; 3 min), c - odczynnik Libermann'a-Burchard'a (temp. 105°C; 3 min), d - kwas fosfomolibdenowy (temp. 105°C; 3 min), e - aldehyd anyżowy (temp. 105°C; 3 min), f - zmodyfikowany aldehyd anyżowy (temp. 105°C, 1 min). Faza stacjonarna HPTLC Si 60 F₂₅₄, faza ruchoma heptan:octan etylu (7:3, v/v).

Optymalizacja warunków ekstrakcji i hydrolizy kwasowej saponin steroidowych z nasion kozieradki

Wytrawianie saponin steroidowych z materiału roślinnego wymaga starannie dobranych warunków, ponieważ w trakcie ekstrakcji może zachodzić szereg niekorzystnych reakcji, m.in. hydroliza enzymatyczna w ekstrahentach z dodatkiem wody, transacylacja, estryfikacja kwaśnych saponin lub hydroliza grup estrowych [213]. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami są mieszaniny alkoholi (metanolu, etanolu, butanolu lub izopropanolu) i wody w różnym stosunku objętościowym [161, 218, 260, 308, 326, 347, 393]. W procesie doboru ekstrahentu należy uwzględnić skład chemiczny badanej matrycy roślinnej w zakresie różnych grup metabolitów wtórnych, aby uzyskać wyciąg bogaty w badane związki przy jednocześnie możliwie jak najniższej zawartości związków balastowych. Zastosowanie rozpuszczalników polarnych, uzasadnione budową chemiczną saponin steroidowych, może częściowo ograniczać przenikanie niektórych związków lipofilowych do wyciągu. W przypadku

nasion kozieradki pospolitej zastosowanie ekstrahentów zawierających wodę jest ograniczone ze względu na obecność w matrycy roślinnej znacznych ilości polisacharydów [239, 359]. Dlatego w eksperymentach prowadzonych w niniejszej pracy stosowano rozpuszczalniki organiczne [218, 308, 328, 430, 541].

W zakresie technik ekstrakcyjnych w procesie wytrawiania saponin steroidowych z materiału roślinnego najczęściej wykorzystywana jest ekstrakcja surowca w aparacie Soxhleta lub pod chłodnicą zwrotną [316, 393, 554]. Rzadziej stosowane są ekstrakcja wspomagana mikrofalami [260] lub sonikacja [538]. W ostatnich latach wykorzystano łączenie metod ekstrakcji - Wang i wsp. [575] w wytrawianiu saponin steroidowych z pędów *Asparagus officinalis* zastosowali perkolację, a następnie sonikację.

Aglikony steroidowe, w tym diosgenina, oznaczane są po przeprowadzeniu hydrolizy kwasowej ich form glikozydowych. Selekcja warunków hydrolizy kwasowej saponin steroidowych powinna uwzględniać wysoką wydajność procesu przy jednoczesnej eliminacji niekorzystnych przegrupowań w cząsteczkach badanych związków, prowadzących do formowania artefaktów - spirostadienów [213]. Obecność spirostadienów w otrzymanym hydrolizacie prowadzi do obniżenia oznaczanej zawartości diosgeniny. Zazwyczaj hydroliza kwasowa przeprowadzana jest z użyciem kwasu solnego (HCl) [81, 393, 575] lub kwasu siarkowego (VI) (H_2SO_4) [326, 428, 542, 543] w roztworach metanolowych [282], etanolowych [554], wodnych [428] lub w izopropanolu [133, 542, 543]. Dane literaturowe wskazują, że kwas solny nasila formowanie spirostadienów [541, 542]. Dlatego w niniejszej pracy zastosowano jako odczynnik hydrolityczny kwas siarkowy (VI) (H_2SO_4) w roztworze wodnym ($H_2SO_{4\text{ aq}}$) oraz w 50% metanolu ($H_2SO_{4\ 50\%MeOH}$). Dodatkowo testowano 2M H_2SO_4 w 70% izopropanolu (stężenie dobrano na podstawie wyników otrzymanych przez Taylor i wsp. [542]). Oceniono szereg procedur ekstrakcji i hydrolizy kwasowej (A.II.6.3.1.) saponin steroidowych w zakresie ich efektywności i przydatności w analizie ilościowej diosgeniny po hydrolizie kwasowej w warunkach opracowanej metody HPTLC.

Początkowo oznaczenie ilościowe diosgeniny przeprowadzono z użyciem metody opisanej przez Trivedi i wsp. [554], która łączyła w jednym procesie ekstrakcję i hydrolizę kwasową (etanolowy roztwór H_2SO_4 ; 4 godziny; temp. 80°C). Otrzymano wyciąg o niskiej zawartości diosgeniny, zawierający liczne związki balastowe, utrudniające analizę densytometryczną. Uwzględniając twardą konsystencję *Foenugraeci Semen*, zawierającego liczne grupy metabolitów wtórnych (szczególnie duże ilości polisacharydów), gdy procedurze poddawany jest surowiec rozdrobniony, prawdopodobnie dostęp odczynnika hydrolizującego do glikozydowych form był ograniczony, natomiast intensywnemu wytrawianiu ulegały związki balastowe,

utrudniająca analizę diosgeniny. Obniżenie stężenia kwasu do 2M w roztworach wodnym (2M $H_2SO_{4\text{aq}}$) lub w 50% metanolu (2M $H_2SO_{4\text{50\%MeOH}}$) oraz skrócenie czasu hydrolizy do 2 godzin nie zwiększyły stężenia oznaczanej diosgeniny, a przeprowadzane pomiary densytometryczne obciążone były dużymi błędami ze względu na koeluujące z diosgeniną związki towarzyszące, widoczne w postaci szarych pasm na chromatogramie TLC. Również włączenie etapu wstępnego oczyszczania nasion kozieradki poprzez ekstrakcję eterem naftowym (nasiona SPP) albo chloroformem (nasiona SPCh) nie przyniosły pozytywnego rezultatu.

Na podstawie otrzymanych wyników uznano, że wydajna hydroliza kwasowa zespołu saponin kozieradki wymaga przeprowadzenia oddzielnego etapu ich ekstrakcji z surowca, a następnie poddania hydrolizie kwasowej otrzymanego wyciągu. W tym celu otrzymano różne wyciągi metanolowe z nasion nieoczyszczonych oraz wstępnie oczyszczonych eterem naftowym (SPP) lub eterem naftowym i chloroformem (SPCh) ekstrahowanych metanolem pod chłodnicą zwrotną (50 ml, 2h, 80°C) (otrzymując wyciągi: E, SPPE2, SPChE2, odpowiednio) lub wyczerpująco w aparacie Soxhleta (wyciągi SPPE3 SPChE3, SPPChE, odpowiednio). Ponadto nieoczyszczone nasiona kozieradki ekstrahowano metanolem z użyciem ultradźwięków (10 ml; temp. 25°C) w różnym czasie, mianowicie: 10 minut, 20 minut lub 30 minut (wyciągi UME1, UME2, UME3, odpowiednio). Otrzymane wyciągi metanolowe poddano hydrolizie kwasowej z użyciem 2M $H_2SO_{4\text{aq}}$ i 2M $H_2SO_{4\text{50\%MeOH}}$, uzyskując odpowiednio hydrolizaty: E-H SPPE2-H, SPChE2-H, SPPE3-H, SPChE3-H, SPPChE-H, UME1-H, UME2-H, UME3-H.

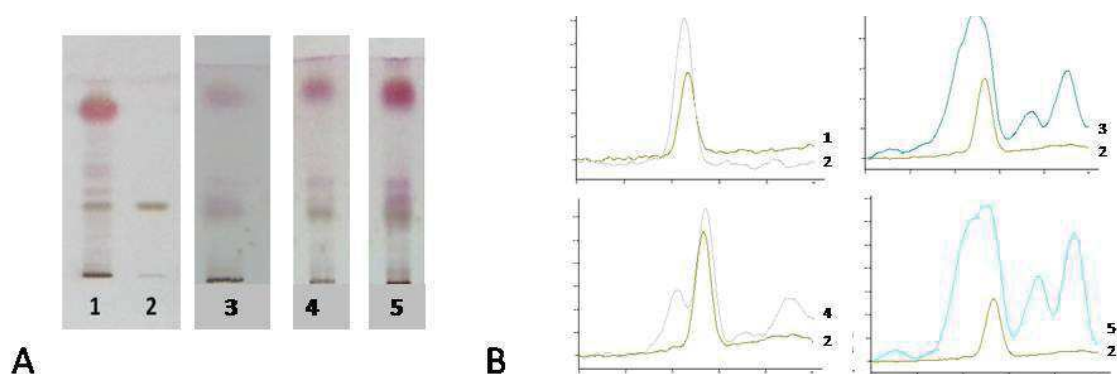
We wszystkich przeprowadzonych eksperymentach zastosowanie jako odczynnika hydrolitycznego 2M kwasu siarkowego (VI) w 50% metanolu ($H_2SO_{4\text{50\%MeOH}}$) zwiększało koncentrację związków balastowych w otrzymanych hydrolizatach. Prawdopodobną przyczynę stanowi przebieg procedury ekstrakcyjnej: w celu wytrawienia wolnych aglikonów mieszanina poreakcyjna wytrąsana jest z chloroformem - jeżeli hydrolizę przeprowadzono z użyciem wodno-alkoholowego (lub alkoholowego) roztworu kwasu, co może skutkować zwiększeniem zanieczyszczenia związkami balastowymi oczyszczonego hydrolizatu. Rozpuszczalne w metanolu związki towarzyszące, mogą przechodzić do ekstraktu metanolowo-chloroformowego wraz z badanymi związkami lipofilowymi. W eksperymentach zastosowano również 2M H_2SO_4 w 70% izopropanolu [133, 542], z negatywnym rezultatem, jakkolwiek niektóre publikacje [133, 542] wskazują, że odczynnik ten zapewnia wysoki odzysk diosgeniny i niski poziom związków towarzyszących. Należy jednak podkreślić, że przygotowanie hydrolizatu z użyciem 2M H_2SO_4 w 70% izopropanolu [133, 542] wiązało się z wieloma problemami analitycznymi. W trakcie wytrąsania mieszaniny poreakcyjnej z

chloroformem część wyciągu izopropanolowego tworzyła z warstwą chloroformową układ jednorodny. Ponadto hydrolizat otrzymany z użyciem izopropanolu charakteryzował się zwiększoną lepkością, co utrudniało aplikację wyciągów na płytkę chromatograficzną. Na otrzymanych chromatogramach, oprócz pasma diosgeniny o R_{fD} 0,47, obserwowano na linii startowej dodatkową oliwkowozieloną plamę (podobnie jak oznaczany związek). Ponieważ dane literaturowe [133, 541, 542] wskazują, że stosowanie 70% izopropanolu jako rozpuszczalnika dla kwasu w procesie hydrolizy kwasowej saponin steroidowych, ogranicza formowanie artefaktów (spirostadienów), przeprowadzono analizę porównawczą. W tym celu otrzymano chromatogram TLC hydrolizatu wyciągu metanolowego z aparatu Soxhleta hydrolizowanego z użyciem dwóch odczynników: 2M wodnego H_2SO_4 _{aq} i 2M H_2SO_4 w 70% izopropanolu. Ze względu na brak danych o maksimach absorpcji UV artefaktów, analizę chromatogramów przeprowadzono przy następujących długościach fali: λ -254 nm, λ -366 nm, λ -426 nm, λ -590 nm. Na uzyskanych chromatogramach nie obserwowano różnic jakościowych. Nie stwierdzono pasm, które są obecne w hydrolizatach otrzymanych z użyciem wodnego roztworu kwasu, a które nie występują w hydrolizatach po hydrolizie z użyciem H_2SO_4 w izopropanolu (lub takich, których intensywność w wyniku hydrolizy znacząco zmniejszyła się).

Również zwiększenie stężenia kwasu siarkowego z 2M do 2,5M i wydłużenie czasu hydrolizy do 4 godzin nie przyniosły poprawy wyników. Natomiast gdy jako odczynnik hydrolityczny zastosowano wodny roztwór H_2SO_4 , na etapie wytrąsania z chloroformem, obserwowano, że związki lipofilowe przechodzą do frakcji chloroformowej bez związków balastowych. Również włączenie etapów dodatkowego oczyszczania, poprzez wytrąsanie z heksanem wyciągu metanolowego rozcieńczonego wodą [282] i hydroliza kwasowa wodnej pozostałości (hydrolizat Eq-H) nie zapewniły otrzymania wyciągu o wyższej zawartości diosgeniny i jednocześnie pozbawionego związków balastowych.

Spośród wszystkich analizowanych hydrolizatów, najwyższym stężeniem diosgeniny (233,6 ng/ μ l \pm 2%) przy najniższej zawartości związków balastowych, charakteryzował się hydrolizat SPChE-H, otrzymany w wyniku hydrolizy wyciągu metanolowego SPChE z użyciem 2M wodnego roztworu kwasu siarkowego (VI). Wyciąg metanolowy SPPChE otrzymano w aparacie Soxhleta z oczyszczonego trójstopniowo surowca. Zastosowana procedura ekstrakcyjna umożliwiła wydajne oczyszczenie materiału roślinnego i usunięcie związków balastowych oraz wydajne wytrawienie saponin steroidowych. Według danych literaturowych zastosowanie jako odczynnika hydrolitycznego 2M kwasu siarkowego (VI) redukowało tworzenie artefaktów [541, 542] oraz dodatkowo ograniczyło niekorzystne przechodzenie

związków balastowych z mieszaniny poreakcyjnej do hydrolizatu na etapie wytrąsania z chloroformem, ponieważ reagent przygotowano jako roztwór wodny. Przeprowadzone badania wykazały, że pomimo długiego czasu przygotowywania próbki, jedynie ww. procedura pozwala na ilościowe oznaczenie zawartości diosgeniny w nasionach kozieradki pospolitej (ryc. 57).



Ryc.57. Chromatogramy HPTLC (A) i densytogramy HPTLC (B) wzorcowej diosgeniny (2) i hydrolizatów otrzymanych w wyniku hydrolizy kwasowej z użyciem 2M H_2SO_4 aq (2h; temp. 80°C) różnych wyciągów metanolowych z nasion kozieradki pospolitej: 1 - hydrolizat SPPChE-H, 3 - hydrolizat SPChE2-H, 4 - hydrolizat SPChE3, 5 - hydrolizat ME-H. Faza stacjonarna HPTLC Si 60 F₂₅₄, faza ruchoma heptan:octan etylu (7:3, v/v), detekcja: zmodyfikowany aldehyd anyżowy (temp. 105°C, 1 min).

Analiza ilościowa diosgeniny po hydrolizie kwasowej w nasionach kozieradki pospolitej

W toku przeprowadzonych badań fitochemicznych opracowano warunki oznaczenia ilościowego diosgeniny w badanym materiale roślinnym metodą HPTLC z analizą densytometryczną. Zoptymalizowane warunki ekstrakcji, hydrolizy kwasowej oraz separacji metodą chromatografii cienkowarstwowej zastosowano do oznaczenia diosgeniny w nasionach kozieradki pochodzenia krajowego, otrzymanych od trzech producentów (firmy zielarskie Lewandowski, Flos, Kawon).

Rozdzielenia prowadzono na złożu HPTLC Si 60F₂₅₄ z użyciem mieszaniny heptan:octan etylu (7:3, v/v) (F₂) jako fazy ruchomej. Uwzględniając stały poziom wilgotności w komorze ADC2, generowanej stosowaniem nasyconych roztworów odpowiednich soli, warunki rozdzielenia w komorze ADC2 charakteryzują się wysoką powtarzalnością. Chromatogramy rozwijano na dystansie 45 mm w komorze automatycznej Camag ACD2, w warunkach wysycenia parami eluentu (10 minut) i

prekondycjonowania płytki (5 minut), w temperaturze $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ oraz wilgotności $47\pm 2\%$, kontrolowanej przy użyciu nasyconego roztworu tiocyjanianu potasu. Wysuszone chromatogramy spryskano zmodyfikowanym roztworem aldehydu anyżowego i ogrzewano na płycie grzewczej (105°C , 1 minuta).

W celu oceny występowania wolnych aglikonów w badanych nasionach *T. foenum-graecum*, wysuszony i sproszkowany surowiec poddano trójstopniowej wyczerpującej ekstrakcji w aparacie Soxhleta, stosując kolejno eter naftowy (wyciąg SPPE), chloroform (wyciąg SPCh) i metanol (wyciąg SPPChE). Hydrolizę otrzymanych wyciągów prowadzono z użyciem $2\text{M H}_2\text{SO}_4_{\text{aq}}$ (2h; temp. 80°C), a otrzymane hydrolizaty (odpowiednio: SPPE-H, SPChE-H i SPPChE-H) poddano analizie metodą TLC (ryc. 58).

Na otrzymanych chromatogramach TLC hydrolizatów SPPE-H i SPChE-H nie obserwowano pasma diosgeniny, które obecne było jedynie na chromatogramie HPTLC hydrolizatu wyciągu metanolowego SPPChE-H. Otrzymane wyniki pozwalają wykluczyć występowanie pochodnych diosgeniny, w tym saponin spirostanowych, w ekstraktach eteru naftowego i chloroformu otrzymanych na etapie oczyszczania surowca (ryc. 58).

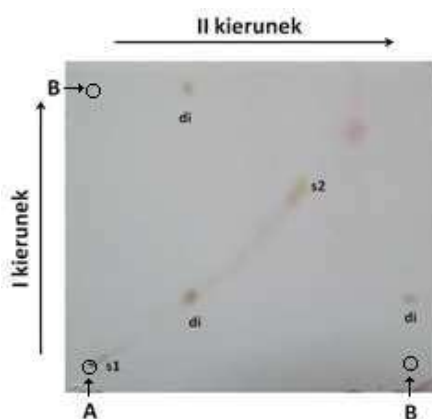


Ryc.58. Chromatogram HPTLC wzorcowej diosgeniny (3) i hydrolizatów (1,2,4) wyciągów organicznych z nasion kozieradki pospolitej, otrzymanych z użyciem aparatu Soxhleta: 1 - hydrolizat SPPChE-H, 2 - hydrolizat SPPE-H, 4 - hydrolizat SPChE-H. Faza stacjonarna HPTLC Si 60 F_{254} , faza ruchoma heptan:octan etylu (7:3, v/v) (F_2), detekcja zmodyfikowany aldehyd anyżowy (temp. 105°C , 1 min).

Walidacja

Opracowaną metodę HPTLC z analizą densytometryczną oznaczania diosgeniny po hydrolizie kwasowej, zwalidowano w zakresie: specyficzności, liniowości, wyznaczenia granicy wykrywalności oraz granicy oznaczalności, precyzji, powtarzalności oraz stabilności metody. Parametry walidacyjne przedstawiono w tabeli 15. Do badań przeznaczono wyciąg metanolowy, otrzymany w wyniku trójstopniowej ekstrakcji w aparacie Soxhleta (A.II.6.1.1.1., który poddano hydrolizie kwasowej z użyciem 2M wodnego roztworu kwasu siarkowego (VI) (2h; temp. 80°C).

Dane literaturowe [213] wskazują, że analiza densytometryczna sapogenin sterydowych może być prowadzona przy różnych długościach fali. Barwne produkty reakcji sapogenin z aldehydem anyżowym wykazują maksimum absorpcji w zakresie długości fali UV λ -510-620 nm. Dodatkowo pochodne spirostanowe posiadają drugie maksimum absorpcji przy długości fali λ -455-460 nm [213]. W publikacjach poświęconych analizie ilościowej diosgeniny metodą TLC, chromatogramy skanowano przy λ -366 nm [272], λ -428 nm [554], λ -430 nm [161] lub λ -540 nm [508]. Uwzględniając powyższe doniesienia oraz widmo UV, wykonane dla wzorcowej diosgeniny, w którym obserwowano dwa maksima absorpcji (przy długościach fali λ -426 nm oraz λ -590 nm) analizę densytometryczną prowadzono przy dwóch długościach fali UV: λ -426 nm oraz λ -590 nm (skanowanie liniowe), przy użyciu densytometru CD 60 oraz oprogramowania ProQuant, 5 minut po derywatywacji (czas konieczny do uzyskania temperatury pokojowej chromatogramu TLC).



Ryc. 59 Chromatogram 2D HPTLC badania specyficzności opracowanej metody separacji diosgeniny w hydrolizacie kwasowym SPPChE-H: A - hydrolizat SPPChE-H, B, di - diosgenina, s1, s2 – nieznanne sapogeniny. Faza stacjonarna HPTLC Si 60 F₂₅₄, faza ruchoma: n-heptan:octan etylu (7:3, v/v) (F₂), detekcja: zmodyfikowany roztwór aldehydu anyżowego (105°C, 1 min).

Specyficzność metody oznaczono na podstawie wyniku rozdzielania 2D TLC badanego hydrolizatu w obecności wzorcowej diosgeniny na złożu HPTLC Si 60 F₂₅₄, z użyciem fazy ruchomej heptan:octan etylu (7:3,v/v) (F₂) (por. schemat w p. A.II. 7.3.2.2.1.) [188]. Wskutek zastosowania identycznych warunków analizy w obu kierunkach, na otrzymanym chromatogramie TLC (ryc. 59) składniki badanego hydrolizatu migrowały w formie jednej linii na przekątnej płytki chromatograficznej, a plama diosgeniny była wolna od innych związków chemicznych (składników hydrolizatu), co potwierdza, że metoda jest specyficzna. Jednocześnie na chromatogramie obserwowano plamy dwóch nieznanymi związków: s1 i s2, które w reakcji z odczynnikiem wywołującym wybarwiały się na oliwkowozielono, podobnie jak

diosgenina. Sugeruje to, że związki s1 i s2 prawdopodobnie mają charakter sapogenin sterydowych, uwolnionych w wyniku hydrolizy zawartych w surowcu glikozydów. Przeprowadzone oznaczenia potwierdzają, że saponiny sterydowe obecne w nasieniu kozieradki pochodzenia krajowego, stanowią pochodne nie tylko diosgeniny, lecz również innych aglikonów.

Porównując otrzymane parametry walidacyjne wykazano, że przy długości fali λ -590 nm, charakteryzują się one mniejszym odchyleniem standardowym (precyzja jedno- i międzydniowa), a tym samym - wyższą powtarzalnością pomiarów (tab. 15). Długość fali UV λ -426 nm, pomimo obserwowanego maksimum w widmie wzorcowej diosgeniny, uznano za mniej selektywną w porównaniu do długości fali λ -590 nm. Analizy przy długości fali UV λ -426 nm, charakteryzowała większa asymetria pików i znacznie mniejsza precyzja (wyższe wartości RSD oraz CV). Obserwowany kształt pików diosgeniny sugerował, że na wysokości pasma diosgeniny obecny jest dodatkowo związek, wykazujący absorpcję w świetle UV, a niewidoczny w świetle widzialnym przy długości fali λ -590 nm. Uwzględniając powyższe, długość fali λ -590 nm uznano za optymalną dla densytometrycznych oznaczeń ilościowych diosgeniny po hydrolizie kwasowej, na chromatogramach wywoływanych zmodyfikowanym aldehydem anyżowym.

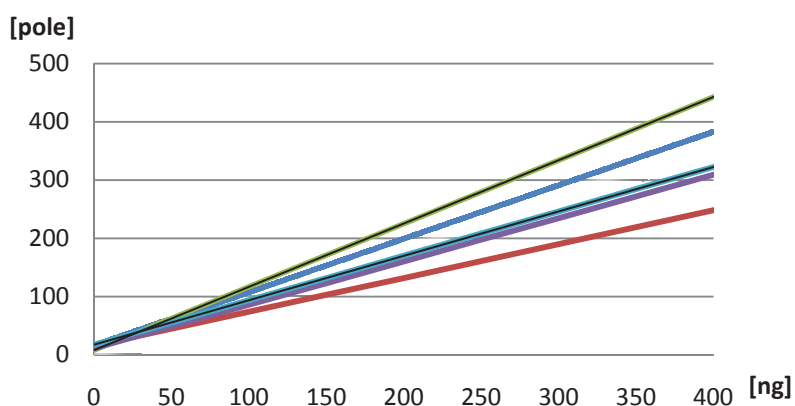
Parametry walidacyjne	λ -590nm	λ -426nm
Liniiowość	50-900 ng	200-800 ng
Limit wykrywalności (LOD)	5,1 ng	12,5 ng
Limit oznaczalności (LOQ)	3xLOD = 15,3 ng [S/N=10]* LOQ=17 ng	3xLOD=37,5ng [S/N=10]* LOQ=40 ng
Precyzja instrumentalna	CV = 1,94 % [wzorzec] CV 1,56 [próbka]	
Precyzja jednodniowa	RSD=0,102 CV 1,02%	RSD=47,7 CV 22,12
Precyzja międzydniowa (powtarzalność)	RSD=0,128 CV 1,28%	RSD=20,1 CV 8,96%

* S/N - stosunek sygnał/szumy (ang. *signal/noise*)

Tab.15. Parametry walidacyjne opracowanej metody TLC z analizą densytometryczną oznaczania ilościowego diosgeniny po hydrolizie kwasowej wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pospolitej.

Stołość metody (ang. *robustness*) jest parametrem charakteryzującym niezależność otrzymanych wyników od niewielkich zmian parametrów takich jak: prowadzenie analiz przez różnych analityków lub stosowanie rozpuszczalników/odczynników chemicznych różnych producentów. W niniejszej pracy stołość metody oceniono przez wykorzystanie do przygotowania eluentu octanu etylu oraz n-heptanu otrzymanych od dwóch producentów. Ponadto uwzględniono analizy prowadzone przez dwóch różnych analityków. Potwierdzono, że opracowana metoda charakteryzuje się stołością, bez względu na zmianę ww. parametrów.

W opracowanych warunkach przeprowadzono oznaczenie zawartości diosgeniny w badanym materiale roślinnym. Obserwowano różnice w przebiegu krzywych wzorcowych dla poszczególnych rozdzieleń (ryc. 60), dlatego każde oznaczenie prowadzono, wyznaczając krzywą kalibracyjną.



Ryc.60. Przebieg krzywych kalibracyjnych w opracowanych warunkach metody TLC.

Z użyciem opracowanej metody TLC oznaczona zawartość 5,25- α -spirostan-3 β -olu w nasionach kozieradki pospolitej, otrzymanych od trzech producentów krajowych (firmy zielarskie: Lewandowski, Flos, Kawon) wynosiła odpowiednio: 0,12% (Lewandowski i Kawon); 0,13% (Flos) i była niższa w porównaniu do materiału roślinnego pochodzącego z innych części świata [542, 543, 548, 554]. Zawartość diosgeniny oznaczona przez Trivedi i wsp. [554] w nasionach kozieradki, komercyjnie dostępnych w sprzedaży na terenie Indii, była ponad 5-krotnie wyższa (0,529 - 0,658 %). W porównaniu do metody Trivedi i wsp. [554] opracowaną w niniejszej pracy metodę TLC analizy ilościowej diosgeniny, charakteryzują lepsze wartości parametrów walidacyjnych: liniowość w zakresie stężeń 50-900 ng (por. 98-588 ng [554]), limit wykrywalności 5,1 ng (por. 20 ng [554]), limit oznaczalności 15,3 ng/17,3 ng (por. 80 ng [554]), precyzja instrumentalna CV=1,94% (por. RSD=0,45 [554]), precyzja

jednodniowa (wewnątrzdniowa) RSD=0,102 (por. RSD=0,64 [554]), precyzja międzydniowa RSD=0,128 (por. RSD=0,28 [554]). Zawartość 5,25- α -spirostan-3 β -olu w materiale roślinnym różnego pochodzenia - od Afryki po Kanadę była wyższa (0,42% do 0,98%) niż oznaczona w badanym w surowcu krajowym [542, 543, 548]. Podobną zawartość diosgeniny, badając *T. foenum-graecum* różnego pochodzenia i różnych odmian, wykazali Taylor i wsp. [542, 543] w nasionach uprawianych w Kanadzie (do 0,98%). Autorzy stwierdzili, że odmiany *T. foenum-graecum*: Amber, Quatro and ZT-5 wyróżnia najwyższa zawartość 5,25- α -spirostan-3 β -olu - odpowiednio: 0,42%, 0,52% i 0,75% [542]. W kolejnej pracy Taylor i wsp. [543] wykazali, że z 10 badanych odmian kozieradki pospolitej, najwyższym stężeniem diosgeniny charakteryzował się materiał roślinny z *T. foenum-graecum*, hodowanych w Kanadzie, lecz pochodzących z nasion uzyskanych z Iranu i Maroko (0,70%, 0,98%, odpowiednio) oraz dwóch odmian z Kanady (0,84 i 0,87 %, odpowiednio). Z drugiej strony według Thomas i wsp. [548] zawartość diosgeniny w kanadyjskich odmianach kozieradki wynosi około 0,6%. Jedynie Laila i wsp. [303] donoszą o indyjskiej odmianie *T. foenum-graecum* z niską zawartością diosgeniny (0,11-0,14%, w/w), porównywalną z oznaczoną w badanym materiale roślinnym. W świetle powyższych wyników, *Foenugraeci Semen* pochodzenia krajowego stanowi dość ubogie źródło diosgeniny. Wydaje się jednak, że na tle surowców azjatyckich o wysokiej zawartości diosgeniny, badany materiał roślinny może stanowić bardziej bezpieczny surowiec leczniczy, w kontekście niewyjaśnionego w pełni wpływu na układ hormonalny człowieka [110, 248, 299, 367, 588].

Analiza saponin steroidowych metodą HPLC-ELSD oraz HPLC-ESI-MS

Wysokosprawna chromatografia ciekłowa (HPLC) jest powszechnie stosowana w analizie saponin steroidowych w matrycach pochodzenia roślinnego [18, 117, 287, 319, 323, 327, 331, 347, 399, 426, 591, 596, 598]. Rozdzielenia prowadzone są zazwyczaj w układzie faz odwróconych (RP), natomiast rzadziej - w układzie faz normalnych [287, 399, 407, 408]. W analizach techniką RP wykorzystuje się kolumny wypełnione żelazem krzemionkowym modyfikowanym: resztami oktadecylowymi (C-18), oktylowymi (C-8), aminowymi (NH₂) lub diolowymi (DIOL) [213, 287, 323, 347, 399, 407, 408, 596]. Jako rozpuszczalniki w analizie saponin steroidowych w odwróconym

układzie faz stosowane są mieszaniny metanolu i wody lub acetonitrylu i wody [287, 399, 407, 408] z dodatkiem kwasów organicznych jako modyfikatorów kwasowych - kwasów: octowego, mrówkowego, fosforowego lub trifluorooctowego [287, 323, 347, 399, 407, 408, 596]. Rozdzielenia najczęściej prowadzi się w warunkach elucji gradientowej [117, 287, 319, 327, 331, 347, 399, 591, 596], jakkolwiek Hostettmann [213] wskazuje, że w separacji saponin, nieznacznie różniących się polarnością (np. obecność jednej cząsteczki cukru) możliwe jest zastosowanie elucji izokratycznej.

Saponiny steroidowe nie posiadają grup chromoforowych i nie wykazują absorpcji promieniowania UV [213, 407, 408]. Dlatego w analizie HPLC tych związków detektor UV-VIS jest rzadko wykorzystywany. Z drugiej strony, możliwa jest niespecyficzna detekcja saponin w zakresie długości fal λ –200-210 nm lub przy długości fali λ –254 nm po ich przeprowadzeniu w pochodne kumarynowe [213, 407, 408, 596]. Separację siedmiu saponin steroidowych z *Cynanchum otophyllum* Schneid. metodą HPLC z detekcją UV przy dwóch długościach fali (λ –259 nm oraz λ –223 nm) prowadzili Yang i wsp. [598], uzyskując rozdzielanie 7 związków. Dodatkowym problemem detekcji saponin steroidowych w świetle ultrafioletowym jest ograniczony wybór rozpuszczalników, stanowiących składniki fazy ruchomej oraz nieodpowiedni program elucji [407, 408]. Organicznym komponentem fazy ruchomej powinien być acetonitryl ze względu na słabszą absorpcję przy niskich długościach fali promieniowania ultrafioletowego w porównaniu do metanolu [213, 407, 408]. Analiza chromatograficzna wieloskładnikowych matryc roślinnych, zawierających związki saponinowe o różnej długości łańcucha cukrowego oraz różnej polarności zazwyczaj wymaga zastosowania szerokiego zakresu zmian stężenia składnika organicznego eluentu [407, 408]. Jakkolwiek Oleszek [407, 408] zwraca uwagę na fakt, że program elucji gradientowej w separacji HPLC saponin nie może charakteryzować się dużą różnicą stężeń składnika organicznego, ponieważ skutkuje to zaburzeniami linii bazowej [407, 408].

Ograniczenia w oznaczaniu saponin steroidowych z użyciem detektora UV-VIS powodują, że w analizie tej grupy związków metodą HPLC najczęściej wykorzystywany jest laserowy detektor światła rozproszonego (ELSD), detektor mas (MS) oraz tandemowy detektor mas z analizatorem czasu przelotu (Q-TOFMSⁿ) [117, 287, 319, 327, 331, 347, 399, 591, 596]

Zasada działania detektora ELSD oparta jest na wykorzystaniu rozpraszania przez cząstki analitu promieniowania emitowanego przez laser [520, 586]. Eluat z kolumny zostaje rozproszony za pomocą dwutlenku węgla, a następnie ogrzany do temperatury 40°C w nebulizatorze, co skutkuje odparowaniem eluentu i utworzeniem

aerozolu nietlotnych składników analizowanej próbki [586]. Cząsteczki aerozolu rozpraszają światło, a uzyskane dane rejestrowane są w postaci chromatogramu [586]. Detektor ELSD w porównaniu do detektora UV charakteryzuje się niższą wrażliwością na zaburzenia linii bazowej powstające w warunkach elucji gradientowej [596]. Jednocześnie uznawany jest za detektor uniwersalny, stosowany w analizie większości związków, z zachowaniem warunku, że są one mniej lotne od rozpuszczalnika [586]. Z drugiej strony charakteryzuje się również niższą czułością, wyrażoną wyższymi wartościami granicy wykrywalności badanych związków [596].

W analizie saponin steroidowych metodą HPLC powszechnie stosowany jest detektor mas (MS), szczególnie ESI-MS, wykorzystujący jonizację przez rozpylanie w polu elektrycznym (ang. *electrospray ionisation*) pod ciśnieniem atmosferycznym [117, 287, 319, 327, 331, 347, 399, 591, 596]. Wykorzystanie Q-TOF-MS umożliwia dokładny pomiar masy analizowanych związków [252, 253, 418]. Natomiast zastosowanie tandemowej spektrometrii mas umożliwia obserwację jonów fragmentacyjnych, związanych z odszczepianiem kolejnych cząsteczek cukrów, co pozwala na ustalenie sekwencji ich wiązania chemicznego w łańcuchu sacharydowym [183, 323, 347, 426, 599, 616]. Obecnie w analizie zespołów saponin steroidowych w matrycach roślinnych coraz częściej wykorzystywana jest ultrasprawa chromatografia cieczowa w sprzężeniu z tandemowym detektorem mas i analizatorem czasu przelotu (UPLC- Q-TOFMSⁿ) [50, 155, 252, 253, 418, 439].

W widmach masowych saponin występują charakterystyczne jony fragmentacyjne, powstające wskutek utraty fragmentów rozgałęzionych łańcuchów cukrowych oraz dehydratacji [253]. Widma masowe saponin furostanowych, otrzymane w trybie jonów ujemnych (ESI-) charakteryzuje obecność deprotonowanych jonów molekularnych $[M-H]^-$ oraz adduktów z kwasem np. mrówkowym $[M-H+HCOO]^-$ jako składnikiem fazy ruchomej [418]. Natomiast w trybie jonów dodatnich (ESI+), saponiny furostanowe tworzą addukty z Na $[M+Na]^+$ oraz jony typu $[M+H-H_2O]^+$ [418]. Z użyciem tandemowej spektrometrii mas obserwowano zależność pomiędzy wartością energii kolizyjnej (CE) a zdolnością generowania jonów fragmentacyjnych. W trybie jonów ujemnych (ESI-) przy niskiej energii kolizyjnej (6 eV) saponiny steroidowe ulegają minimalnej fragmentacji, tworząc deprotonowane jony molekularne $[M-H]^-$ oraz addukty kwasem mrówkowym $[M-H+HCOO]^-$. Natomiast przy wysokiej energii kolizyjnej (45-60 eV) w trybie jonów ujemnych powstają zarówno deprotonowane jony molekularne $[M-H]^-$, obok odpowiednich jonów fragmentacyjnych powstających w następstwie sekwencyjnej utraty kolejnych reszt cukrowych [253]. W trybie jonów dodatnich (ESI+) przy niskiej energii kolizyjnej saponiny furostanowe tworzą addukty z amoniakiem $[M+NH_4]^+$ oraz jony typu $[M+H-H_2O]^+$, natomiast saponiny spirostanowe - addukty z

amoniakiem $[M+NH_4]^+$ oraz jony pseudomolekularne $[M+H]^+$. Przy wysokiej energii kolizyjnej saponiny furostanowe tworzą addukty z Na $[M+Na]^+$ oraz jony typu $[M+Na-H_2O]^+$ i $[M+H-H_2O]^+$, natomiast saponiny spirostanowe - addukty z Na $[M+Na]^+$ oraz jony pseudomolekularne $[M+H]^+$.

Analizy saponin steroidowych z wykorzystaniem technik sprzężenia wysokosprawnej chromatografii cieczowej z laserowym detektorem światła rozproszonego i/lub detektorem mas prowadzono w szeregu matryc roślinnych [18, 117, 287, 319, 323, 327, 331, 347, 399, 426, 591, 596, 598], w tym w nasionach kozieradki pospolitej pochodzenia chińskiego [253, 418] oraz uzyskanych z eksperymentalnej uprawy w południowej Francji [430].

Petit i wsp. [430] metodą RP-HPLC w wyciągach wodno-alkoholowych: nieoczyszczonym oraz wstępnie oczyszczonym, z nasion *T. foenum-graecum* na kolumnie typu C-18 z użyciem jako fazy ruchomej mieszaniny acetonitrylu i wody oraz detektora LDD (*light diffusion detector*), wykazali na chromatogramie HPLC-UV przy długości fali λ -210 nm 9 częściowo koeluujących pików oraz 5 pików na chromatogramie HPLC-LDD. Autorzy potwierdzili metodą TLC z derywatyzacją odczynnikiem Ehrlicha, że są to saponiny furostanowe, a dominującą sapogeniną jest diosgenina [430], co jest zgodne z wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy.

W analizie saponin steroidowych w wyciągu wodno-etanolowym z nasion kozieradki pochodzenia chińskiego wykorzystano ultrasprawną chromatografię cieczową w sprzężeniu ze spektrometrem mas i analizatorem czasu przelotu (UPLC-ESI-QTOF-MSⁿ) [253, 418]. Pang i wsp. [418] metodą UPLC-ESI-QTOF-MS rozdzielili zespół saponin furostanowych w postaci 34 pików i ujawnili w nasionach kozieradki obecność 46 związków saponinowych, spośród których wydzielili i określili struktury 7 [253]. Natomiast Kang i wsp. [253] na otrzymanym chromatogramie BPI (*base peak chromatogram*) obserwowali 95 saponin furostanowych, wśród których zidentyfikowali 22 pary izomerów oraz 30 nowych związków. W określeniu budowy łańcucha cukrowego saponin izolowanych z nasion *T. foenum-graecum* wykorzystano tandemową spektrometrię mas z jonizacją przez rozpylenie w polu elektrycznym, w połączeniu z analizą czasu przelotu (ESI-Q/TOF-MSⁿ) [417, 418] oraz FAB-MS - bombardowanie szybkimi atomami [387, 605, 606].

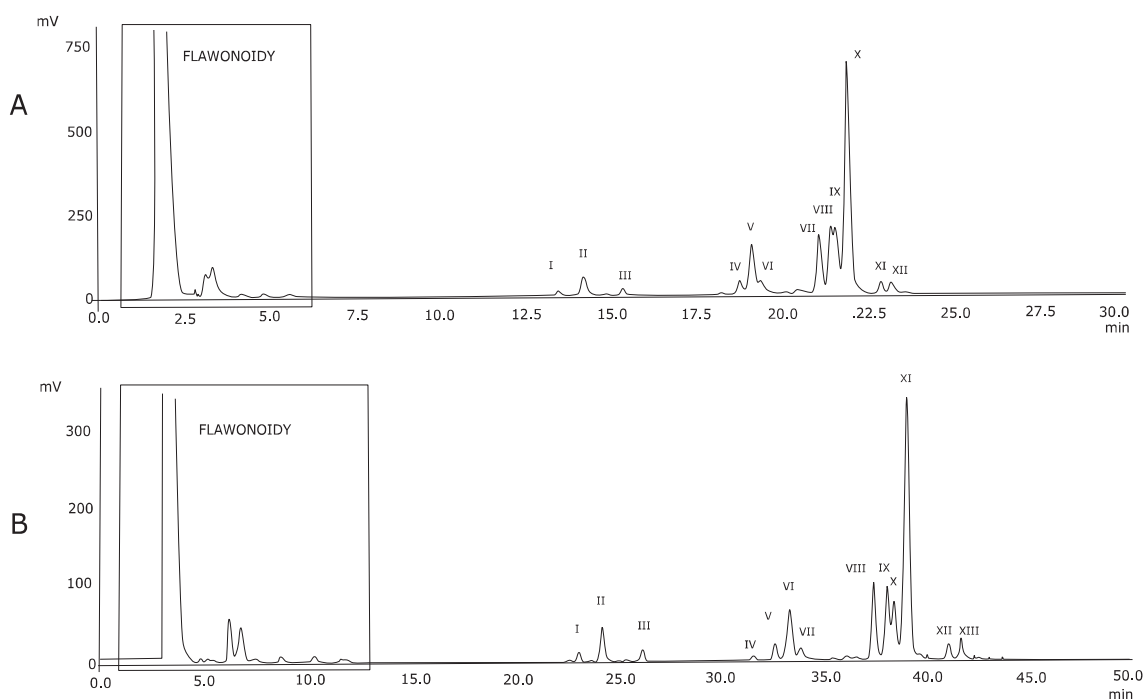
W niniejszej pracy badania prowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP) w sprzężeniu z laserowym detektorem światła rozproszonego (ELSD) oraz detektorem mas (MS). Do badań przeznaczono nasiona kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego (firma zielarska Lewandowski). W rezultacie przeprowadzonych eksperymentów po raz pierwszy scharakteryzowano zespół saponin steroidowych w surowcu pochodzenia krajowego.

Optymalizacja rozdzielania składników zespołu saponin steroidowych metodą HPLC-ELSD obejmowała selekcję fazy stacjonarnej, dobór programu elucji oraz parametrów pracy detektora ELSD: temperatury parownika, wzmocnienia sygnału oraz natężenia przepływu gazu nebulizującego. Stosowano kolumny wypełnione żelem krzemionkowym modyfikowanym resztami oktadecylowym (C-18). Dane literaturowe [253, 287] wskazują, że mieszanina acetoniryl:woda z dodatkiem modyfikatora kwasowego, stosowana w analizie saponin steroidowych metodą HPLC eliminuje formowanie metoksylowych pochodnych przy C-22 saponin furostanowych, posiadających w cząsteczce grupę hydroksylową w pozycji C-22 (widocznych jako dodatkowe piki na chromatogramie HPLC). Zjawisko obserwowano podczas analiz prowadzonych na złożu C-18 z użyciem eluentów zawierających metanol [253, 287]. Dodatkowo Kang i wsp. [253], analizując wpływ stężenia kwasu mrówkowego w fazie ruchomej na rozdzielanie HPLC saponin z nasion kozieradki, stwierdzili że jego 0,1% stężenie zapewnia najlepszy kształt pików saponin. Jednocześnie umożliwia pracę systemu przy niższym ciśnieniu w porównaniu do pracy z eluentem zawierającym metanol oraz zapewnia odpowiedni poziom jonizacji badanych związków. W świetle powyższych danych [253, 287], w niniejszej pracy jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę acetonitrylu i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego (0,1%). W oparciu o dane literaturowe [253, 287] stężenie początkowe w programie elucji gradientowej wynosiło 20% mieszaniny acetoniryl:kwas mrówkowy (99,9:0,1, v/v) w 0,1% kwasie mrówkowym (II.4.2.2.1.). Profil gradientu oraz parametry pracy detektora ELSD (temperaturę parownika, wzmocnienie sygnału i natężenie przepływu gazu nebulizującego) dobierano eksperymentalnie.

Początkowo rozdzielania prowadzono z wykorzystaniem systemu opisanego w punkcie A.II.3.2.1.3. na kolumnie Discovery C-18 (150 mm x 2,1 mm x 3 μ m) w warunkach elucji gradientowej według programu IX, charakteryzującego się wzrastającym stężeniem mieszaniny acetoniryl:kwas mrówkowy (99,9:0,1, v/v) od 20% do 100% w 0,1% kwasie mrówkowym w czasie t_G 45 minut (gradient skokowo-liniowy) przy natężeniu przepływu 0,2 ml/min. Rozdzielenia prowadzono w temperaturze od 40°C do 50°C, stosując wzmocnienie 4 i 8 oraz przepływ gazu nebulizującego (azotu) od 1,3 l/min do 2,0 l/min. Warunki analizy modyfikowano, uwzględniając uzyskiwaną intensywność pików rozdzielanych związków w stosunku do szumów. Obserwowano, że zwiększenie temperatury powyżej 40°C oraz natężenia przepływu gazu nebulizującego do 2,0 l/min obniża intensywność pików. Jest to prawdopodobnie wynikiem powstawania mniejszych kropli aerozolu analitów, a tym samym - rejestrowania sygnałów o niższej intensywności przez detektor. Najlepsze rozdzielanie uzyskano w temperaturze 40°C, przy 4-krotnym wzmocnieniu sygnału i natężeniu

przepływu gazu nebulizującego (azotu) 1,8 l/min. Otrzymano rozdzielenie zespołu saponin w badanym wyciągu w postaci 12 niecałkowicie rozdzielonych pików (ryc. 61-A) eluujących w czasie t_R 13,25 - 23,5 minuty.

W celu poprawy efektywności separacji kolejny krok stanowiło zastosowanie dwóch połączonych szeregowo kolumn Discovery C-18 (150 mm x 2,1 mm x 3 μ m) co wydłużało drogę migracji analitów i poprawiało rozdzielczość metody. Analizy prowadzono przy tych samych parametrach pracy detektora ELSD, z zastosowaniem programu elucji gradientowej X, charakteryzującego się wzrastającym stężeniem mieszaniny ACN: kwas mrówkowy (99,9:0,1, v/v) od 20% do 100% w 0,1% kwasie mrówkowym w czasie t_G 90 minut (gradient skokowo-liniowy). Dzięki wydłużeniu dystansu separacji badanych związków, na chromatogramie HPLC-ELSD otrzymano rozdzielenie składników zespołu saponin steroidowych w wyciągu metanolowym z nasion kozieradki pospolitej w formie 13 pików (ryc. 61-B), eluujących w czasie t_R > 21 min.



Ryc.61. Chromatogramy HPLC-ELSD frakcji wyciągu metanolowego (D) z nasion *T. foenum-graecum*, otrzymane na kolumnie HPLC pojedynczej oraz połączonych szeregowo dwóch kolumnach HPLC: I - XII - numery rozdzielonych pików, A - kolumna Discovery C-18 (150 mm x 2,1 mm x 3 μ m), elucja gradientowa wg programu IX, B - dwie połączone szeregowo kolumny Discovery C-18 (2 x 150 mm x 2,1 mm x 3 μ m), elucja gradientowa wg programu X.

Dane literaturowe [126, 176, 213, 253, 287] wskazują, że saponiny furostanowe, posiadające przy atomie węgla C-22 grupę hydroksylową, w wyniku reakcji z metanolem, stanowiącym rozpuszczalnik ekstrakcyjny, mogą tworzyć jako artefakty C-22-etry metylowe obecne na chromatogramach HPLC jako dodatkowe piki. Dlatego w opracowanych warunkach separacji porównano profile HPLC wyciągów z nasion kozieradki otrzymanych z użyciem 70% metanolu (wyciąg A, II.A.6.1.1.2) i 70% etanolu (wyciąg F, II.A.6.1.1.2), nie wykazując różnic, co sugeruje, że związki z grupą metoksyłową przy atomie węgla C-22 nie występują w badanym wyciągu lub obecne są w ilościach śladowych.

Kolejny etap analizy zespołu saponin w badanym surowcu stanowiła wstępna identyfikacja związków obserwowanych na chromatogramie HPLC-ELSD. W tym celu wykorzystano metodę sprzężenia HPLC-ESI-MS. Identyfikację związków prowadzono z użyciem detektora mas w trybie jonów dodatnich i ujemnych oraz techniką monitorowania wybranych jonów (SIM). Otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości t_R i m/z) porównano z danymi literaturowymi [177, 253, 387, 416-418, 483, 605, 606]. Obserwowano, że w trybie jonów ujemnych sygnały deprotonowanych jonów molekularnych charakteryzują się nieco wyższą intensywnością (ryc. 62). Zgodnie z danymi literaturowymi [253], w trybie jonów dodatnich obserwowano addukty z Na $[M+Na]^+$ oraz jony typu $[M+H-H_2O]^+$, natomiast w trybie jonów ujemnych - deprotonowane jony molekularne $[M-H]^-$ oraz addukty z kwasem mrówkowym $[M-H+HCOO]^-$. W badanym wyciągu z użyciem metody HPLC-MS oraz monitorowania wybranych jonów (SIM) ujawniono obecność 26 związków z grupy saponin steroidowych (ryc. 62). Zastosowane narzędzie analityczne nie umożliwiło rozróżnienia izomerów 25S i 25R identyfikowanych saponin steroidowych o tych samych masach cząsteczkowych.

W widmie masowym **związku 1** (t_R 21,95 min), otrzymanym w trybie jonów dodatnich, obserwowano sygnał adduktu z Na przy m/z 927 $[M+Na]^+$ oraz jonu typu $[M+H-H_2O]^+$ przy m/z 887. W trybie jonów ujemnych związek 1 generował deprotonowany jon molekularny przy m/z 903 $[M-H]^-$ oraz addukt z kwasem mrówkowym przy m/z 949 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R), w oparciu o dane literaturowe [253, 387, 416, 418, 605, 606] związek 1 zidentyfikowano jako saponinę o wzorze sumarycznym $C_{44}H_{72}O_{19}$. Związek 1 jest prawdopodobnie saponiną furostanową, zawierającą przy atomie węgla C-3 glukopiranozylo(6→1)-ksylopiranozę [253, 418]. Przypuszczalnie jest to pochodna epimerów: proto-lilageniny (25S) lub proto-jukkageniny (25R), po raz pierwszy wykryta w surowcu przez Pang i wsp. [418], a

następnie potwierdzona przez Kanga i wsp. [253]. Aglikonem związku 1 może być również 25(27)-eno-protoneogitogenina [252]. Strukturę związku 1 zidentyfikowano jako 3-O-[β-D-ksylopiranozylo(1→6)]-β-D-glukopiranozyd (25S/25R)-26-O-β-D-glukopiranozylo-furost-5-eno-2α,3β,22α,26-tetraolu [253, 418] lub 3-O-[β-D-ksylopiranozylo(1→6)]-β-D-glukopiranozyd (25S/25R)-26-O-β-D-glukopiranozylo-25(27)-eno-5-furostano-2α,3β,22α,26-tetraolu [253].

W widmie masowym **związku 2** (t_R 22,15 min) w trybie jonów dodatnich obecne były sygnały: adduktu z Na przy m/z 929 $[M+Na]^+$ oraz jonu typu $[M+H-H_2O]$ przy m/z 889. Natomiast w trybie jonów ujemnych związek 2 generował deprotonowany jon molekularny przy m/z 905 $[M-H]^-$ oraz addukt z kwasem mrówkowym przy m/z 951 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) oraz dane literaturowe [253, 387, 416, 418, 605, 606] związek 2 zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{44}H_{74}O_{19}$ - przypuszczalnie trigoneozyd Ia lub trigoneozyd Ib [418, 605]. Są to pochodne epimerów: proto-neogitogeniny (25S) (trigoneozyd Ia) lub proto-gitogeniny (25R) (trigoneozyd Ib), zawierające w pozycji C-3 glukopiranozylo(6→1)-ksylopiranozę. Strukturę chemiczną związku 2 określono jako przypuszczalnie 3-O-[β-D-ksylopiranozylo(1→6)]-β-D-glukopiranozyd (25S/25R)-26-O-β-D-glukopiranozylo-5α-furostano-2α,3β,2ξ,26-tetraolu [418, 605]. Trigoneozydy Ia oraz Ib wyizolowali z indyjskich nasion kozieradki Yoshikawa i wsp. [418, 605]. Ich obecność potwierdzono w dalszych badaniach nad surowcem pochodzenia egipskiego [387] oraz w surowcu egipskim i chińskim z użyciem UPLC-Q-TOFMSⁿ [253, 387, 418].

W widmie ESI-MS **związku 3** (t_R 22,94 min) obserwowano sygnały przy m/z 1105 odpowiadające adduktowi z Na $[M+Na]^+$ oraz przy m/z 1065 odpowiadające jonowi typu $[M+H-H_2O]^+$ w trybie jonów dodatnich. W trybie jonów ujemnych obserwowano sygnały: deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 1081 $[M-H]^-$ oraz adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 1127 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R), w odniesieniu do danych literaturowych [253, 387, 416, 418, 605, 606] zidentyfikowano związek 3 jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{51}H_{86}O_{24}$ [253, 418]. Prawdopodobnie jest to izomeryczny glikozyd proto-neogitogeniny (25S) (trigoneozyd XVIIa) lub proto-gitogeniny (25R) (trigoneozyd XVIIb), zawierający przy atomie węgla C-3 rozgałęziony łańcuch cukrowy glukozyl-[(2→1)ramnozylo]-(4→1)glukozy [253, 418]. Strukturę chemiczną związku 3 określono jako przypuszczalnie 3-O-[ramnopiranozylo(1→2)]-glukopiranozylo(1→4)]-β-D-glukopiranozyd (25S/25R)-26-O-β-D-glukopiranozylo-5α-

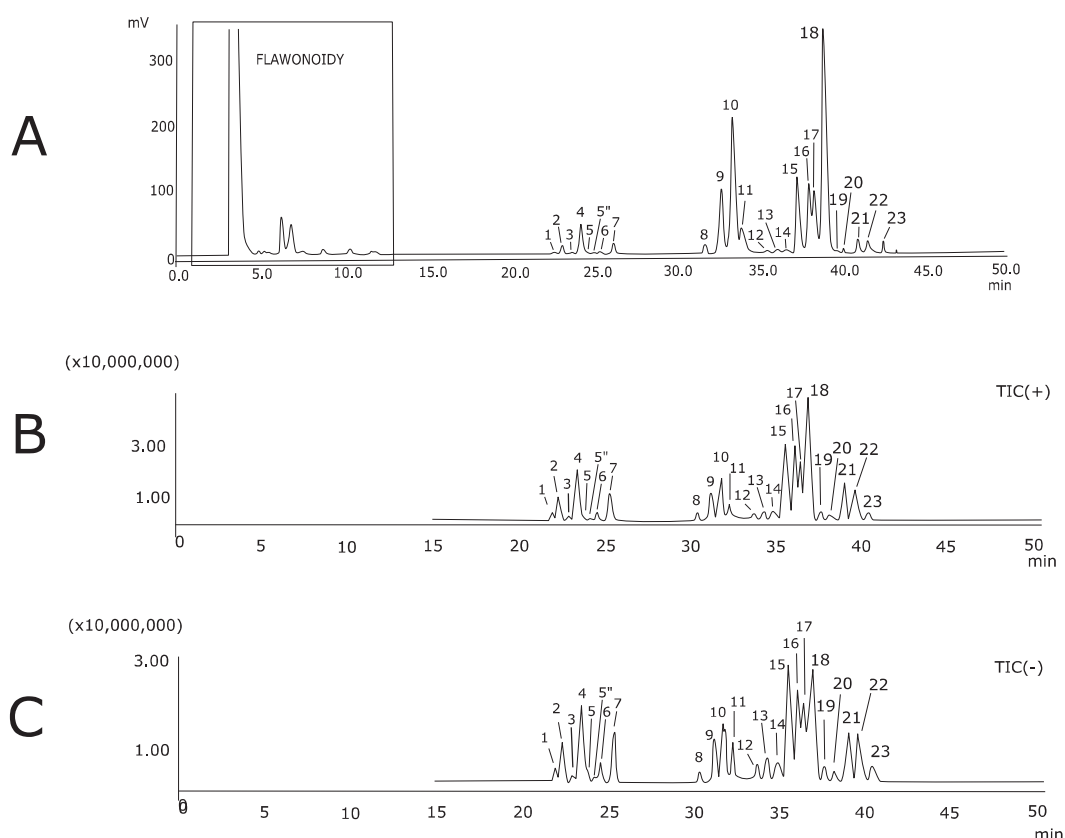
furostano-2 α ,3 β ,22 α ,26-tetraolu [253, 418]. Oba izomery (25S i 25R) wyizolowali z chińskich nasion kozieradki Pang i wsp. [418]. W kolejnych badaniach z użyciem UPLC-Q-TOFMSⁿ potwierdzono w nasionach tego samego pochodzenia obecność trigoneozydów XVIIa i XVIIb [253, 418].

Widmo masowe **związku 4** (t_R 23,5 min), otrzymane w trybie jonów dodatnich, charakteryzowała obecność sygnału przy m/z 929 odpowiadającego adduktowi z Na $[M+Na]^+$ obok sygnału jonu typu $[M+H-H_2O]^+$ przy m/z 889. Natomiast w trybie jonów ujemnych w widmie masowym związku 4 obecne były sygnały deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 905 $[M-H]^-$ oraz adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 951 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R), w oparciu o dane literaturowe [253, 387, 416, 418, 605, 606] związek 4 zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{44}H_{74}O_{19}$ [387, 418]. Jest to prawdopodobnie trigoneozyd XIb, zidentyfikowany w egipskich nasionach *T. foenum-graecum* przez Murakami i wsp. [387, 418] i potwierdzony w surowcu chińskim metodą UPLC-Q-TOFMSⁿ [418]. Strukturę związku 4 określono przypuszczalnie jako 3-O-[ksylopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozyd (25R)-26-O- β -D-5 α -furostano-2 α ,3 β ,22 ξ ,26-tetraolu [387, 418].

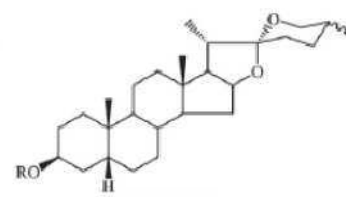
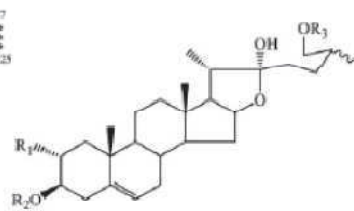
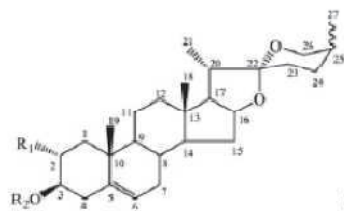
W widmie masowym **związku 5** (t_R 23,75 min) obserwowano sygnały adduktu z Na przy m/z 941 $[M+Na]^+$ obok sygnału jonu typu $[M+H-H_2O]$ przy m/z 901 w trybie jonów dodatnich. Natomiast w trybie jonów ujemnych - sygnał deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 917 $[M-H]^-$ obok sygnału adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 963 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R), w odniesieniu do danych literaturowych [253, 387, 418, 605, 606] związek 5 zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze $C_{45}H_{74}O_{13}$. Przypuszczalnie jest to 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd protolilageniny (25S) lub proto-jukkageniny (25R), identyfikowany przez Pang i wsp. [418] w nasionach *T. foenum-graecum* pochodzenia chińskiego metodą UPLC-Q-TOFMSⁿ i potwierdzony w kolejnych badaniach Kang i wsp. [253]. Strukturę chemiczną związku 5 określono jako przypuszczalnie 3-O-[ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25S/25R)-26-O- β -D-glukopiranozylo-furost-5-en-2- α ,3- β -diolu [253, 387, 418, 605, 606].

Z użyciem techniki SIM ujawniono obecność **związku 5''** (t_R 24,1 min), którego widmo ESI-MS otrzymane w trybie jonów dodatnich, charakteryzowały sygnały jonu

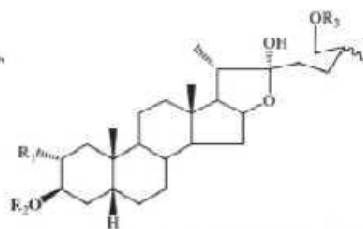
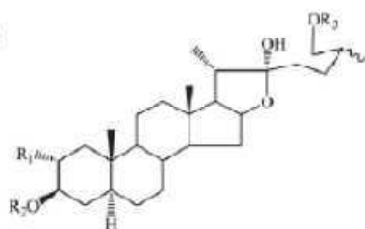
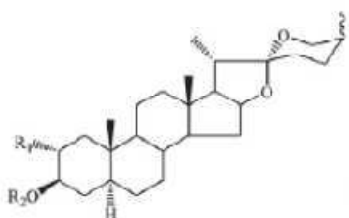
przy m/z 1235 odpowiadającego adduktowi z Na $[M+Na]^+$ oraz przy m/z 1195 odpowiadającego jonowi typu $[M+H-H_2O]$. W widmie ESI-MS uzyskanym w trybie jonów ujemnych obecne były sygnały deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 1211 $[M-H]^-$ oraz adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 1257 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) i dane piśmiennictwa [253, 387, 416, 418, 605, 606] związek 5" zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{57}H_{96}O_{27}$. Przepuszczalnie jest to pochodna proto-gitogeniny (25R) lub proto-neogitogeniny (25S), zawierająca w pozycji C-3 łańcuch 3-O- β -D-glukopiranozylo-[[$(2\rightarrow 1)\alpha$ -L-ramnopiranozylo]-[[$(4\rightarrow 1)\alpha$ -L-ramnopiranozylo]]-($4\rightarrow 1$) α -L-ramnopiranozylo [253, 418]. Strukturę chemiczną związku 5" zidentyfikowano jako 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 4)]-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 4)]-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25S/25R)-26-O- β -D-glukopiranozylo-5 α -furostano-2 α ,3 β , 22 ξ ,26-tetraolu. Obydwa epimery rozpoznano w surowcu chińskim w toku analiz UPLC-QTOF-MSⁿ [253, 418].



Ryc.62. Chromatogramy HPLC-ELSD (A) oraz HPLC-ESI-MS (B i C) frakcji D wyciągu metanolowego z nasion *T. foenum-graecum* pochodzenia krajowego. Kolumny Discovery C-18 (2 x 150 mm x 2,1 mm x 3 μ m), elucja gradientowa wg programu X.



jamogenina	R ₁ =H	R ₂ =H	25S	proto-jamogenina	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =H	25S	sarsasapogenina	R=H	25S
diosgenina	R ₁ =H	R ₂ =H	25R	proto-diosgenina	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =H	25R	smilagenina	R=H	25R
lilagenina	R ₁ =OH	R ₂ =H	25S	proto-lilagenina	R ₁ =OH	R ₂ =H	R ₃ =H	25S	makrantogenina	R=H	25(27)en
jukkagenina	R ₁ =OH	R ₂ =H	25R	proto-jukkagenina	R ₁ =OH	R ₂ =H	R ₃ =H	25R			
sceptrumgenina	R ₁ =H	R ₂ =H	25(27)en	proto-sceptrumgenina	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =H	25(27)en			



neolitogenina	R ₁ =H	R ₂ =H	25S	proto neolitogenina	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =H		proto earsasapogenina	R=H	25S
tigogenina	R ₁ =H	R ₂ =H	25R	proto-tigogenina	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =H		proto-amliagenina	R=H	25R
neogitogenina	R ₁ =OH	R ₂ =H	25S	proto-neogitogenina	R ₁ =OH	R ₂ =H	R ₃ =H				
gitogenina	R ₁ =OH	R ₂ =H	25R	proto-gitogenina	R ₁ =OH	R ₂ =H	R ₃ =H				

S1 : Glc (6→1)Xyl

S2: Glc (2→1)Rha

S3: Glc[(2→1) Rha](4→1)Glc

S4: Glc(4→1)Xyl

S5: Glc [[[2→1)Rha](4→1)Rha](4→1)Rha

S6: Glc[[[(4→1)Glc(3→1)Glc(6→1)Glc] [(4→1)Xyl]] (2→1)Rha

S7: Glc[(4→1)Glc(3→1)Glc(6→1)Glc] [(4→1)Xyl] [(2→1)Rha

S8: Glc[(4→1)Glc(3→1)Glc(6→1)Glc](2→1)Rha

S9: Glc [(2→1)Rha] [(4→1)Glc(3→1)Glc(6→1)Glc]

S10: Glc[[[(4→1)Glc(3→1)Glc] [(6→1)Glc(4→1)Xyl] (2→1)Rha

S11: Glc[[[(4→1)Glc(3→1)Glc](2→1)Rha

S12: Glc[(4→1)Glc](2→1)Rha

S13: Glc[(4→1)Rha](2→1)Rha

Ryc. 63. Struktury saponin steroidowych (sapogenin oraz łańcuchów cukrowych) identyfikowanych w nasionach *T. foenum-graecum*.

Związek	t _R (min)	[M+Na] ⁺ m/z	[M+H-H ₂ O] m/z	[M-H] ⁻ m/z	[M-H+HCOO] ⁻ m/z	Prawdopodobna struktura chemiczna (aglikon - S _{łańcuch cukrowy})
1	21,95	927	887,50	903,60	949,45.	proto-lilagenina-S1 / proto-jukkagenina-S1 / 25(27)-eno-protoneogitogenina-S1
2	22,15	929	889,25	905,35	951,50	proto-neogitogenina-S1 / proto-gitogenina-S1 (trigoneozyd Ia / trigoneozyd Ib)
3	22,94	1105,90	1065,30	1081,70	1127,60	proto-neogitogenina-S3 / proto-gitogenina-S3 (trigoneozyd XVIIa / trigoneozyd XVIIb)
4	23,5	929,35	889,30	905,45	951,45	proto-neogitogenina-S4 / proto-gitogenina-S4
5	23,75	941,40	901,20	917,05	963,45	proto-lilagenina-S2 / proto-jukkagenina-S2
5"	24,1	1235,40	1195,65	1211,45	1257,45	proto-gitogenina-S5 / proto-neogitogenina-S5
6	24,37	943,30	903,30	919,35	965,55	proto-neogitogenina-S2 (trigoneozyd Xa)
7	25,22	943,95	903,30	919,85	965,70	proto-gitogenina-S2 (trigoneozyd Xb)
8	30,34	1541,70	1501,55	1517,75	1563,70	25(27)-eno-proto-diosgenina(proto-sceptrumgenina)-S6 (trigoneozyd VI)
9	31,17	1543,30	1503,70	1519,85	1565,75	proto-jamogenina-S7 (trigoneozyd Va)
10	31,80	1543,70	1503,50	1519,75	1565,90	proto-diosgenina-S7 (trigoneozyd Vb)
11	32,1	1411,65	1371,40	1387,70	1433,50	proto-diosgenina-S8/S9 / proto-jamogenina-S8/S9
11"	32,1	1545,0	1505,35	1521,90	1567,80	proto-tigogenina-S10 / proto-neotigogenina-S10
12	33,77	1249,20	1209,35	1225,75	1271,85	proto-jamogenina-S11 (trigoneozyd XIIIa)

Tab.16. Dane chromatograficzne i spektralne oraz przypuszczalne struktury chemiczne saponin steroidowych, identyfikowanych z wyciągu metanolem z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego, S1 - S13 - budowa łańcuchów cukrowych (ryc. 63)

Związek	t _R (min)	[M+Na] ⁺ m/z	[M+H-H ₂ O] ⁻ m/z	[M-H] ⁻ m/z	[M-H+HCOO] ⁻ m/z	Prawdopodobna struktura chemiczna
13	34,22	1249,0	1209,50	1225,75	1271,80	proto-diosgenina-S11 (trigoneozyd XIIIb)
14	34,89	911,0	871,35	887,55	933,35	proto-diosgenina-S1 / proto-jamogenina-S1 / proto-makrantonigenina-S1 / 22-deoksy-trigoneozyd IIIa/IIIb
15	35,54	1087,35	1047,35	1063,45	1109,55	proto-jamogenina-S12 (trigoneozyd IVa)
15"	35,54	913,50	873,30	889,25	935,45	proto-neotigogenina-S1 / proto-tigogenina-S1 (trigoneozyd IIa/IIb)
16	36,08	1087,50	1047,35	1063,45	1109,55	proto-diosgenina-S12 (glikozyd F)
17	36,24	1071,35	1031,35	1047,55	1093,60	proto-jamogenina-S13 (trigonellozyd C, protoneodioscyna)
18	36,98	1071,45	1031,35	1047,55	1093,90	proto-diosgenina-S13 (związek C, protodioscyna)
19	37,60	1073,30	1033,50	1049,60	1095,70	n.i.
20	38,18	923,35	883,30	899,50	945,45	n.i.
21	39,00	925,30	885,25	901,45	947,60	proto-jamogenina-S2 (trigofenozyd A)
22	39,57	925,65	885,25	901,55	947,40	glikozyd D
23	40,50	927,25	88745	903,40	949,45	proto-neotigogenina-S2 / proto-tigogenina-S2 (trigoneozyd IIIa/IIIb)

n.i. - związek dotychczas nie identyfikowany w nasionach *T. foenum graecum*

Tab.16. c.d. Dane chromatograficzne i spektralne oraz przypuszczalne struktury chemiczne saponin steroidowych, identyfikowanych z wyciągu metanolowym z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego, S1 - S13 - budowa łańcuchów cukrowych (ryc. 63).

W widmie masowym **związku 6** (t_R 24,37 min) obserwowano sygnał adduktu z Na przy m/z 943 $[M+Na]^+$ oraz przy m/z 903 sygnał jonu typu $[M+H-H_2O]$ w trybie jonów dodatnich. Natomiast w trybie jonów ujemnych obserwowano sygnał deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 919 $[M-H]^-$, a przy m/z 965 sygnał adduktu z kwasem mrówkowym $[M-H+HCOO]^-$. Porównując otrzymane dane chromatograficzne (wartości m/z , t_R) z danymi literaturowymi [253, 387, 416, 418, 605, 606] związek 6 zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{45}H_{74}O_{19}$. Przypuszczalnie jest to trigoneozyd Xa, wyizolowany z surowca egipskiego przez Murakami i wsp. [387, 418], a następnie potwierdzony metodą UPLC-Q-TOFMSⁿ w surowcu chińskim [387, 418]. Trigoneozyd Xa jest glikozydową pochodną proto-neogitogeniny (25S), posiadającą przy atomie węgla C-3 łańcuch cukrowy 3-O- β -D-glukopiranozylo-[(2 \rightarrow 1) α -L-ramnopiranozy]. Związek 6 to przypuszczalnie 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25S)-26-O- β -D-glukopiranozylo-5 α -furostano-2 α ,3 β ,22 ξ ,26-tetraolu [387, 418]. Wartości t_R związku 6 w stosunku do jego 25R-epimeru (trigoneozyd Xb) (związek 7) są zgodne z wartościami t_R obserwowanymi przez innych autorów [387, 418].

W widmie ESI-MS, otrzymanym w trybie jonów dodatnich, **związek 7** (t_R 25,22 min) tworzył addukt z Na przy m/z 943 $[M+Na]^+$ oraz jon typu $[M+H-H_2O]$ przy m/z 903. Natomiast w trybie jonów ujemnych w widmie związku 7 obserwowano sygnały deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 919 $[M-H]^-$ obok sygnału adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 965 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R), w odniesieniu do danych literaturowych [253, 387, 416, 418, 605, 606] związek 7 zidentyfikowano jako saponinę o wzorze sumarycznym $C_{45}H_{76}O_{19}$: trigoneozyd Xb - 25R izomer trigoneozydu Xa, wyizolowany z surowca egipskiego przez Murakami i wsp. [387, 418], a następnie potwierdzony metodą UPLC-Q-TOFMSⁿ w surowcu chińskim [387, 418]. Struktura chemiczna związku 7 to przypuszczalnie 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25R)-26-O- β -D-glukopiranozylo-5 α -furostano-2 α ,3 β ,22 ξ ,26-tetraolu [387, 418].

Widmo masowe **związku 8** (t_R 30,34 min) charakteryzowała obecność sygnału adduktu z Na przy m/z 1541 $[M+Na]^+$ obok sygnału jonu typu $[M+H-H_2O]$ przy m/z 1501. Natomiast w trybie jonów ujemnych obserwowano obecność sygnału deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 1517 $[M-H]^-$ obok sygnału adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 1563 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) oraz dane literaturowe [253, 387, 416,

418, 605, 606] związek 8 zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{68}H_{110}O_{37}$ - przypuszczalnie trigoneozyd VI, czyli pochodną 25(27)-dieno-proto-diosgeniny (proto-sceptrumgeniny), zawierający przy atomie C-3 β -D-glukopiranozylo-[[$(4 \rightarrow 1)$]- β -D-glukopiranozylo- $(3 \rightarrow 1)$]- β -D-glukopiranozylo- $(6 \rightarrow 1)$]- β -D-glukopiranozylo]-[$(4 \rightarrow 1)$]- β -D-ksylopiranozylo]]- $(2 \rightarrow 1)$ - α -L-ramnopiranozę [387, 418]. Strukturę chemiczną związku 8 określono jako 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-[[β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-furost-5,25(27)-dieno-3 β ,22 ξ ,26-triolu [253, 387, 416, 418, 605, 606]. Trigoneozyd VI wyizolowali z surowca indyjskiego Yoshikawa i wsp. [606]. Natomiast Pang i wsp. [418] potwierdzili obecność ww. związku w chińskich nasionach kozieradki metodą UPLC-Q-TOF-MSⁿ.

W widmie masowym **związku 9** (t_R 31,17 min) otrzymanym w trybie jonów dodatnich obserwowano sygnały jonów odpowiadające: adduktowi z Na przy m/z 1543 $[M+Na]^+$ oraz jonowi typu $[M+H-H_2O]$ przy m/z 1503. Natomiast w widmie ESI-MS w trybie jonów ujemnych obserwowano sygnały deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 1519 $[M-H]^-$ obok sygnału adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 1565 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) oraz doniesienia literaturowe [253, 387, 416, 418, 605, 606] związek 9 zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{68}H_{112}O_{37}$ - prawdopodobnie trigoneozyd Va, czyli glikozyd proto-jamogeniny (25S), zawierający w pozycji C-3 łańcuch cukrowy β -D-glukopiranozylo-[[$(4 \rightarrow 1)$]- β -D-glukopiranozylo- $(3 \rightarrow 1)$]-glukopiranozylo-[[$(6 \rightarrow 1)$]- β -D-glukopiranozylo]-[$(4 \rightarrow 1)$]- β -D-ksylopiranozylo]]- $(2 \rightarrow 1)$ - α -L-ramnopiranozy [418, 606]. Przypuszczalna struktura chemiczna związku 9 to 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-[[β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25S)-furost-5-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu [418, 606].

Widmo **związku 10** (t_R 31,80 min) charakteryzowała obecność sygnałów adduktu z Na przy m/z 1543 $[M+Na]^+$ oraz jonu typu $[M+H-H_2O]$ przy m/z 1503 w trybie jonów dodatnich. Natomiast w trybie jonów ujemnych obserwowano sygnał deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 1519 $[M-H]^-$, obok sygnału adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 1565,90 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) oraz dane literaturowe [253, 387, 416,

418, 605, 606] związek 10 zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{68}H_{112}O_{37}$. Prawdopodobnie jest to 25R-izomer trigoneozydu Va - trigoneozyd Vb, będący pochodną proto-diosgeniny (25R) [418, 606]. Wartości t_R trigoneozydu Vb w odniesieniu do trigoneozydu Va są zgodne z danymi literaturowymi [418, 606]. Trigoneozyd Vb posiada w pozycji C-3 boczny łańcuch β -D-glukopiranozylo-[(4 \rightarrow 1) β -D-glukopiranozylo-(3 \rightarrow 1)glukopiranozylo-[(6 \rightarrow 1) β -D-glukopiranozylo]-[(4 \rightarrow 1) β -D-ksylopiranozylo]]-[(2 \rightarrow 1) α -L-ramnopiranozy] [418, 606]. Strukturę chemiczną związku 10 określono przypuszczalnie jako 3-O-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-[β -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 4)]-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-furost-5-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu [418, 606]. Trigoneozydy Va oraz Vb wyizolowali z indyjskich *nasion T. foenum-graecum* Yoshikawa i wsp. [606], a ich obecność metodą UPLC-Q-TOF-MSⁿ potwierdzono w surowcu chińskim [418].

Z użyciem techniki SIM wykazano w pikie 11 obecność dwóch **związków 11 i 11''**, które koeluowały w warunkach analizy HPLC (t_R 32,1 min).

W widmie ESI-MS **związku 11** odnotowano obecność jonu przy m/z 1411 odpowiadającego adduktowi z Na $[M+Na]^+$ i przy m/z 1371 odpowiadającego jonowi typu $[M+H-H_2O]^+$ w trybie jonów dodatnich. W trybie jonów ujemnych w widmie ESI-MS związku 11 obecne były sygnały deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 1387 $[M-H]^-$ obok sygnału adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 1433 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) oraz dane literaturowe [253, 387, 416, 418, 605, 606] **związek 11** zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{63}H_{104}O_{33}$. Prawdopodobnie jest to pochodna proto-diosgeniny (25R) lub proto-jamogeniny (25S), a łańcuch boczny przy atomie węgla C-3 zbudowany jest z 4 cząsteczek glukozy oraz 1 cząsteczki ramnozy [253, 416, 418]. Związki o takiej strukturze zidentyfikowano w surowcu pochodzenia chińskiego [253, 416, 418]. Pang i wsp. [416] wyizolowali dwa izomeryczne glikozydy furostanowe, których struktury rozpoznano jako 3-O-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 6)]-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)]-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozydy (25S/25R)-26-O- β -D-glukopiranozylo-furost-5-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu. Obecność ww. związków potwierdzono w późniejszych badaniach z użyciem UPLC-QTOF-MSⁿ [418]. Natomiast Kang i wsp. [253] z użyciem UPLC-QTOF-MSⁿ rozpoznali glikozydowe formy proto-diosgeniny (25R) lub proto-jamogeniny (25S), posiadające przy atomie węgla C-3 łańcuch 3-O- β -D-

glukopiranozylo-[(2→1)α-L-ramnopiranozylo]-[(4→1)β-D-glukopiranozylo-(3→1)β-D-glukopiranozylo-(6→1)β-D-glukopiranozylo]. Strukturę chemiczną związków rozpoznanych przez Kang i wsp. [253] określono jako 3-O-[[β-D-glukopiranozylo(1→6)-β-D-glukopiranozylo(1→3)-β-D-glukopiranozylo(1→4)]-[α-L-ramnopiranozylo(1→2)]-β-D-glukopiranozyd (25S/25R)-26-O-β-D-glukopiranozylo-furost-5-eno-3β,22 ξ,26-triolu.

W widmie masowym **związku 11"** obecne były sygnały odpowiadające adduktowi z Na przy m/z 1545 $[M+Na]^+$ i jonowi typu $[M+H-H_2O]$ przy m/z 1505 w trybie jonów dodatnich oraz deprotonowanemu jonowi molekularnemu przy m/z 1521 $[M-H]^-$ i adduktowi z kwasem mrówkowym przy m/z 1567 $[M-H+HCOO]^-$ w trybie jonów ujemnych. Na podstawie uzyskanych danych chromatograficznych (m/z , t_R), które porównano z danymi literaturowymi [253, 387, 416, 418, 605, 606], związek 11" zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{68}H_{114}O_{37}$ - prawdopodobnie trigoneozyd VIIIb, czyli glikozyd proto-tigogeniny (25R), posiadający w pozycji C-3 łańcuch β-D-glukopiranozylo-[[[(4→1)-β-D-glukopiranozylo-(3→1)-β-D-glukopiranozylo]-[(6→1)-β-D-glukopiranozylo-(4→1)-β-D-ksylopiranozylo]]-(2→1)-α-L-ramnopiranozy [418, 606] lub jego 25S epimer, którego aglikonem jest proto-neotigogenina [253]. Strukturę chemiczną związku 11" określono przypuszczalnie jako 3-O-β-D-glukopiranozylo-[[[(4→1)-β-D-glukopiranozylo-(3→1)-β-D-glukopiranozylo]-[(6→1)-β-D-glukopiranozylo(4→1)-β-D-ksylopiranozylo]]-(2→1)-α-L-ramnopiranozyd (25S/25R)-26-O-β-D-glukopiranozylo-furost-5-eno-3β,22ξ,26-triolu [606]. Trigoneozyd VIIIb wyizolowano z surowca indyjskiego [606] oraz metodą UPLC-Q-TOF-MSⁿ potwierdzono w surowcu pochodzenia chińskiego obecność 25R obok 25S izomeru [418].

W widmie ESI-MS **związków 12** (t_R 33,77 min) i **13** (t_R 34,22 min) obserwowano obecność sygnałów: przy m/z 1249, odpowiadających adduktom z Na $[M+Na]^+$ i przy m/z 1209, odpowiadających jonom typu $[M+H-H_2O]^+$ w trybie jonów dodatnich. Natomiast w trybie jonów ujemnych widmo ESI-MS związków 12 i 13 charakteryzowała obecność sygnałów przy m/z 1225, odpowiadających deprotonowanym jonom molekularnym $[M-H]^-$ oraz przy m/z 1271, odpowiadających adduktom z kwasem mrówkowym $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) na tle danych literaturowych [253, 387, 416, 418, 605, 606] związki 12 i 13 zidentyfikowano jako saponiny furostanowe o wzorze sumarycznym $C_{57}H_{94}O_{28}$. Z uwzględnieniem czasu retencji **związek 12** zidentyfikowano wstępnie jako trigoneozyd XIIIa (glikozyd proto-jamogeniny - 25S) natomiast **związek 13** - jako jego 25R epimer - trigoneozyd XIIIb (glikozyd proto-diosgeniny) [253, 418,

605]. Związki te posiadają w pozycji C-3 łańcuch cukrowy β -D-glukopiranozylo-[(4 \rightarrow 1)- β -D-glukopiranozylo-(3 \rightarrow 1) β -D-glukopiranozylo]-(2 \rightarrow 1) α -L-ramnopiranozy [253, 418, 605]. Strukturę chemiczną związków 12 i 13 określono jako odpowiednio: 3-O-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25S)-26-O- β -D-glukopiranozylo-furost-5-eno-3- β ,22 ξ -26-triolu oraz 3-O-[β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 3)- β -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]-[α -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25R)-26-O- β -D-glukopiranozylo-furost-5-eno-3- β ,22 ξ -26-triolu [253, 418, 605]. Związek o podanej strukturze, wykryty przez Panga i wsp. [418], został nieprawidłowo opisany przez autorów jako trigoneozyd IIIa, co nie jest zgodne z badaniami Yoshikawa i wsp. [605], którzy jako pierwsi wyizolowali z nasion kozieradki trigoneozyd IIIa i rozpoznali jego strukturę jako 3-O- β -D-glukopiranozylo(2 \rightarrow 1)- α -L-ramnopiranozydu proto-neotigogeniny. Natomiast obecność trigoneozydów XIIIa i XIIIb w nasieniu kozieradki pochodzenia afrykańskiego po raz pierwszy ujawnili Murakami i wsp. [387]. Następnie ich obecność potwierdzono w surowcu chińskim z użyciem UPLC-Q-TOF-MSⁿ [418].

W widmie ESI-MS **związku 14** (t_R 34,89 min) obserwowano sygnały adduktów z Na przy m/z 911 $[M+Na]^+$ obok sygnałów jonów typu $[M+H-H_2O]^+$ przy m/z 871 w trybie jonów dodatnich oraz sygnały deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 887 $[M-H]^-$ i adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 933 $[M-H+HCOO]^-$ w trybie jonów ujemnych. Porównując otrzymane dane chromatograficzne (wartości m/z , t_R) oraz dane literaturowe [253, 387, 416, 418, 605, 606] związek 14 zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym C₄₄H₇₂O₁₈. Opierając się na wynikach prac Panga i wsp. [253], związek 14 przypuszczalnie może być glikozydem proto-diosgeniny (25R) lub proto-jamogeniny (25S), zawierającym w pozycji C-3 β -D-glukopiranozylo(6 \rightarrow 1)- β -D-ksylopiranozę. Natomiast biorąc pod uwagę pracę Kanga i wsp. [418], związek 14 można uznać również za pochodną proto-makrantogeniny [253], zawierającą w pozycji C-3 łańcuch cukrowy β -D-glukopiranozylo(6 \rightarrow 1)- β -D-ksylopiranozy lub za 22-deoksy-trigoneozyd IIIa/IIIb, czyli 22-deoksy-pochodną związku 23, który może być jednym z dwóch izomerów [trigoneozydem IIIa (25S) lub IIIb (25R)]. Strukturę chemiczną związku 14 określono jako 3-O-[β -D-ksylopiranozy(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozyd (25S/25R)-26-O- β -D-glukopiranozylo-furost-5-eno-3- β ,22 ξ -26-triolu [418] lub 26-O- β -D-glukopiranozylo-3-O- β -D-glukopiranozylo-(6 \rightarrow 1)- β -D-ksylopiranozyd furost-5,25(27)-dieno-3- β ,22 ξ -26-triolu [253]. Saponiny o podanej strukturze rozpoznano w surowcu pochodzenia chińskiego. Pang i wsp. [418] po raz pierwszy zidentyfikowali metodą UPLC-Q-TOF-MSⁿ pochodną proto-diosgeniny (25R) lub proto-jamogeniny (25S).

Natomiast Kang i wsp. [418] wykryli w nasionach kozieradki zarówno 22-deoksytrigoneozyd IIIa/IIIb, jak i pochodną proto-makrantonogeniny. Obecność ww. saponin stwierdzono jedynie w surowcu chińskim [253, 387, 416, 418, 605, 606]. Uwzględniając dane chromatograficzne i spektralne, przypisanie w sposób jednoznaczny struktury związku 14 jako jednej z wymienionych saponin, jest niemożliwe.

W opracowanych warunkach analiz HPLC, **związki 15 oraz 15''** ulegały koelucji (t_R 35,54 min), a ich obecność ujawniono z użyciem techniki SIM.

W widmie masowym **związku 15** otrzymanym w trybie jonów dodatnich obserwowano sygnały adduktu z Na przy m/z 1087 $[M+Na]^+$ i jonu typu $[M+H-H_2O]^+$ przy m/z 1047. Natomiast w widmie masowym otrzymanym w trybie jonów ujemnych obserwowano sygnały: deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 1063 $[M-H]^-$ oraz adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 1109 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) oraz dane literaturowe [253, 387, 416, 418, 605, 606] związek 15 zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{51}H_{84}O_{23}$. - prawdopodobnie trigoneozyd IVa [418, 606], stanowiący pochodną proto-jamogeniny (25S), zawierającą w pozycji C-3 β -D-glukopiranozylo-[(4 \rightarrow 1) β -D-glukopiranozylo]-(2 \rightarrow 1) α -L-ramnopiranozę [253, 418, 606]. Strukturę chemiczną związku 15 określono przypuszczalnie jako 3-O- $[\beta$ -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- $[\alpha$ -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25S)-26-O- β -D-glukopiranozylo-furost-5-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu [253, 418, 606]. Trigoneozyd IVa z surowca indyjskiego wyizolowali po raz pierwszy Yoshikawa i wsp. [606]. Natomiast Pang i wsp. [418] metodą UPLC-Q-TOF-MSⁿ potwierdzili jego występowanie w materiale roślinnym pochodzenia chińskiego.

W widmie ESI-MS **związku 15''** obserwowano sygnały adduktu z Na przy m/z 913 $[M+Na]^+$ obok sygnału jonu typu $[M+H-H_2O]^+$ przy m/z 873 w trybie jonów dodatnich oraz w trybie jonów ujemnych: sygnał deprotonowanego jonu molekularnego m/z 889 $[M-H]^-$ i adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 935 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) na tle danych piśmiennictwa [253, 387, 416, 418, 605, 606] związek 15'' zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{44}H_{74}O_{18}$. Może być on trigoneozydem IIa lub jego 25R-epimerem (trigoneozyd IIb) [418, 605]. Przypuszczalna struktura chemiczna związku 15' to 3-O- $[\beta$ -D-ksylopiranozylo(1 \rightarrow 6)]- β -D-glukopiranozyd (25S/25R)-26-O- β -D-glukopiranozylo-5 α -furostano-3 β ,22 ξ ,26-triolu [418, 605]. Trigoneozydy IIa i IIb wyizolowano z nasion *T. foenum-graecum* pochodzenia

indyjskiego [418, 605], a następnie ujawniono ich obecność również w surowcu chińskim [418, 605].

W widmie masowym **związku 16** (t_R 36,08 min) w trybie jonów dodatnich obecne były sygnały jonów: przy m/z 1087 odpowiadający adduktowi z Na $[M+Na]^+$ i przy m/z 1047 odpowiadający jonowi typu $[M+H-H_2O]^+$. Natomiast w trybie jonów ujemnych obserwowano sygnały: odpowiadający deprotonowanemu jonowi molekularnemu przy m/z 1063 $[M-H]^-$ i odpowiadający adduktowi z kwasem mrówkowym przy m/z 1109 $[M-H+HCOO]^-$. Porównano otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R), z danymi literaturowymi [253, 387, 416, 418, 605, 606] i zidentyfikowano **związek 16** jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{51}H_{84}O_{23}$. Przepuszczalnie jest to 25R-izomer trigoneozydu IVa (glikozyd F) - 3-O- $[\alpha$ -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- $[\beta$ -D-glukopiranozylo(1 \rightarrow 4)]- β -D-glukopiranozyd 26-O- β -D-glukopiranozylo-(25R)-furost-5-eno-3 β ,22 ξ ,26-triolu [253, 418, 606]. Związek ten po raz pierwszy wyizolowano z nasion kozieradki pochodzenia indyjskiego [606]. W badaniach z użyciem UPLC-Q-TOF-MSⁿ potwierdzono obecność glikozydu F w surowcu chińskim [253, 418].

W widmach ESI-MS **związków 17** (t_R 36,24 min) i **18** (t_R 36,98 min), otrzymanych w trybie jonów dodatnich obserwowano sygnały adduktów z Na przy m/z 1071 $[M+Na]^+$ oraz jonów typu $[M+H-H_2O]^+$ przy m/z 1031. Natomiast w trybie jonów ujemnych obserwowano sygnały deprotonowanych jonów molekularnych przy m/z 1047 $[M-H]^-$ obok sygnałów adduktów z kwasem mrówkowym przy m/z 1093 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) oraz dane literaturowe [253, 387, 416, 418, 605, 606] związku 17 i 18, wstępnie zidentyfikowano jako saponiny furostanowe o wzorze sumarycznym $C_{51}H_{84}O_{22}$, będące prawdopodobnie wzajemnymi (25S/25R)-epimerami. Wartość t_R związku 18 (t_R 36,98 min) była zgodna z wartością t_R wzorcowej protodioscyny (25R). W widmie masowym **wzorcowej protodioscyny**, otrzymanym w trybie jonów dodatnich obserwowano sygnał adduktu z Na przy m/z 1071 $[M+Na]^+$ oraz przy m/z 1031 jonu typu $[M+H-H_2O]^+$. Natomiast w trybie jonów ujemnych obecne były sygnały deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 1047 $[M-H]^-$ obok adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 1093 $[M-H+HCOO]^-$. Sygnały występujące w widmie ESI-MS wzorcowej protodioscyny (w trybie jonów dodatnich oraz ujemnych) odpowiadały sygnałom widma ESI-MS związku 18. Jednorodność piku 18 potwierdzono dodatkowo metodą HPLC w innych warunkach separacji. Pík 18 wydzielono w formie frakcji w wyniku rozdzielania HPLC na kolumnie Discovery HS C-18 (150 mm x 2,1mm x 3 μ m)

według programu elucji gradientowej IX, a następnie wydzieloną frakcję analizowano wobec wzorcowej protodioscyny na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μm) według programu elucji gradientowej XI, charakteryzującego się wzrastającym stężeniem mieszaniny ACN: kwas mrówkowy (99,9 : 0,1, v/v) w 0,1% kwasie mrówkowym od 20% do 100% w czasie t_G 45 minut. Potwierdzono zgodność wartości t_R **związku 18** z protodioscyną (tzw. związek C (ang. *compound C*)) 3-O-β-D-glukopiranozylo-[(4→1)β-D-ramnopiranozylo]-(2→1)α-L-ramnopiranozydem protodiosgeniny [253, 418, 606]. Związek C (ang. *compound C*), po raz pierwszy wyizolowali w 1974 roku ze świeżych kłączy *Dioscorea gracillima* Kawaski i wsp. [267]. Autorzy określili jego strukturę chemiczną i zaproponowali nazwę zwyczajową: protodioscyna. Jednak w późniejszych pracach [253, 418, 606], publikowanych w latach 1998-2013, związek opisywano jako związek C (ang. *compound C*). Jedynie Hibasami i wsp. [205] w 2003 roku izolując z nasion *T. foenum-graecum* saponinę furostanową i ustalając jej strukturę chemiczną powrócili do nazwy *protodioscyna*. Variya i wsp. [563] oznaczyli ilościowo protodioscynę w przetworach z nasienia kozieradki metodą HPTLC. Uwzględniając trudności w separacji 25-epimerów metodą chromatografii cienkowarstwowej oraz widoczne na zamieszczonych w publikacji chromatogramach niecałkowite rozdzielenie pasm związków saponinowych, proponowana przez autorów metoda wydaje się problematyczna. Wobec identyfikacji związku 18 jako protodioscyny oraz otrzymanych danych widm ESI-MS(+) i ESI-MS(-), **związek 17** zidentyfikowano jako jeden z dwóch 25-epimerów: protoneodioscynę (trigonellozyd C) - pochodną proto-jamogeniny (25S-epimer protodioscyny) [79, 387, 418]. Struktura chemiczna związku 17 to przypuszczalnie 3-O-β-D-glukopiranozylo-[(4→1)-β-D-ramnopiranozylo]-(2→1)-α-L-ramnopiranozyd proto-jamogeniny [253, 418, 606]. Trigonellozyd C z nasion kozieradki po raz pierwszy wyizolowali Bogacheva i wsp. [79]. Następnie obecność ww. związku potwierdzono w badaniach izolacyjnych i chromatograficznych metodą UPLC-Q-TOF-MSⁿ [387, 418]. W stosowanych w niniejszej pracy warunkach rozdzieleń HPLC kolejność elucji protoneodioscyny (związek 17) i protodioscyny (związek 18) nie jest zgodna z opisaną przez Pang i wsp. [418]. Natomiast jest zgodna z kolejnością elucji obserwowaną w otrzymanym rozdzielaniu HPLC dla pozostałych rozpoznanych związków saponinowych tworzących pary izomerów 25R i 25S, mianowicie związków 6 i 7, 9 i 10, 12 i 13, 15 i 16 oraz 21 i 22. Odnotowano, że epimery 25S mają niższe wartości t_R w porównaniu do epimerów 25R. Możliwe, że obserwowana kolejność elucji związków 17 i 18, ze względu na fakt, że porównano ją z wzorcem protodioscyny, jest bardziej wiarygodna niż podana przez Pang i wsp. [418]. Z drugiej strony może być ona związana z zastosowanymi przez Panga i wsp. [418] warunkami separacji.

Ponieważ z użyciem techniki SIM nie zidentyfikowano związku 19, przeprowadzono skanowanie w trybie jonów dodatnich oraz ujemnych, w zakresie mas [SCAN(+)]; [SCAN(-)] m/z 800-1600. Ujawniono, że na chromatogramie jonu m/z 1049 obecny jest pik **związku 19** o t_R 37,60 min. Widmo ESI-MS **związku 19** charakteryzowało się obecnością sygnału adduktu z Na przy m/z 1073 $[M+Na]^+$ i przy m/z 1033 jonu typu $[M+H-H_2O]^+$ w trybie jonów dodatnich. W trybie jonów ujemnych w widmie ESI-MS związku 19 obecne były sygnały: deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 1049 $[M-H]^-$ i adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 1095 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) na tle dostępnych danych literaturowych [253, 387, 416, 418, 605, 606] stwierdzono, że dotychczas w nasionach kozieradki nie opisano saponiny steroidowej, której widmo masowe odpowiadałoby otrzymanym danym. Natomiast w toku analiz HPLC-ESI-MS zespołu saponin steroidowych w kłączach i liściach gatunków z rodzaju *Ruscus* ujawniono obecność związku, odpowiadającego otrzymanym danym, mianowicie (25R)-25,27-dihydrosuskozyd [116].

Podobnie jak w przypadku związku 19, również identyfikacja związku 20 z użyciem techniki SIM nie była efektywna. Dlatego przeprowadzono skanowanie w trybie jonów dodatnich oraz ujemnych, w zakresie mas [SCAN(+)]; [SCAN(-)] m/z 800-1600, ujawniając, że na chromatogramie jonu m/z 899 obecny jest pik **związku 20** o t_R 38,18 min. Na otrzymanym w trybie jonów dodatnich widmie masowym **związku 20** obserwowano sygnały: adduktu z Na przy m/z 923 $[M+Na]^+$ i przy m/z 883 jonu typu $[M+H-H_2O]^+$. Natomiast widmo ESI-MS, otrzymane w trybie jonów ujemnych cechowała obecność sygnałów: deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 899 $[M-H]^-$ i adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 945 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne (wartości m/z , t_R) stwierdzono, że dotychczasowe analizy zespołu saponin steroidowych w nasieniu kozieradki [253, 387, 416, 418, 605, 606] nie wykazały obecności saponiny o masie cząsteczkowej odpowiadającej masie związku 20. Natomiast Yoshikawa i wsp. [607] wyizolowali z męskich kwiatów *Borassus flabellifer* 2 izomeryczne saponiny steroidowe o wzorze sumarycznym $C_{45}H_{72}O_{18}$. Z użyciem spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości z jonizacją FAB (bombardowania szybkimi atomami) wykazano, że oba związki zawierają w pozycji C-3 łańcuch β -D-glukopiranozylo-[(4 \rightarrow 1) α -L-ramnopiranozylo]-(2 \rightarrow 1) α -L-ramnopiranozylo [607]. Natomiast aglikonami borassozydów B (23 α ,27-dihydroksydioscyny) i C są odpowiednio: 23 α ,27-dihydroksydiosgenina oraz 23 α , 27-dihydroksyjamogenina [607].

Widma ESI-MS **związków 21** (t_R 39,00 min) oraz **22** (t_R 39,57 min) charakteryzowała obecność sygnałów: adduktów z Na przy m/z 925 $[M+Na]^+$ obok sygnałów przy m/z 885 jonów typu $[M+H-H_2O]^+$ w trybie jonów dodatnich. Natomiast na widmach ESI-MS związków 21 i 22, otrzymanych w trybie jonów ujemnych, obserwowano sygnały deprotonowanych jonów molekularnych przy m/z 901 $[M-H]^-$ obok sygnałów adduktów z kwasem mrówkowym przy m/z 947 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) oraz dane literaturowe [253, 387, 416, 418, 605, 606], związki 21 i 22 zidentyfikowano jako izomeryczne saponiny furostanowe o wzorze sumarycznym $C_{45}H_{74}O_{18}$ - odpowiednio: trigofenozyd A [177, 418] i glikozyd D [418, 605]. Oba związki posiadają w pozycji C-3 łańcuch 3-O- β -D-glukopiranozylo-(2 \rightarrow 1) α -L-ramnopiranozy [177, 387, 418]. Glikozyd D jest pochodną proto-diosgeniny (25R) [418, 605], po raz pierwszy wyizolowaną z afrykańskich nasion kozieradki przez Murakami i wsp. [387], natomiast trigofenozyd A jest 25S-epimerem glikozydu D [177, 418], pochodną proto-jamogeniny, po raz pierwszy wyizolowaną przez Gupta i wsp. z nasion *T. foenum-graecum* pochodzenia indyjskiego [177, 418]. Obecność trigofenozydu A i glikozydu D w surowcu chińskim potwierdzono z użyciem UPLC-Q-TOF-MSⁿ [253, 418].

W widmie masowym **związku 23** (t_R 40,50 min) obserwowano sygnał adduktu z Na przy m/z 927 $[M+Na]^+$ i sygnału jonu typu $[M+H-H_2O]^+$ przy m/z 887 w trybie jonów dodatnich oraz w trybie jonów ujemnych sygnałów: deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 903 $[M-H]^-$ i adduktu z kwasem mrówkowym przy m/z 949 $[M-H+HCOO]^-$. Uwzględniając otrzymane dane chromatograficzne i spektralne (wartości m/z , t_R) na tle danych piśmiennictwa [253, 387, 416, 418, 605, 606] związek 23 zidentyfikowano jako saponinę furostanową o wzorze sumarycznym $C_{45}H_{76}O_{18}$ - przypuszczalnie jest to trigoneozyd IIIa lub jego 25R izomer - trigoneozyd IIIb [253, 418, 605]. Związki te zostały po raz pierwszy wyizolowane z nasion kozieradki przez Yoshikawa i wsp. [605]. Trigoneozyd IIIa jest pochodną proto-jamogeniny (25S), natomiast trigoneozyd IIIb - proto-diosgeniny (25R) [253, 418, 605]. Oba związki posiadają w pozycji C-3 łańcuch cukrowy 3-O- β -D-glukopiranozylo-(6 \rightarrow 1)- β -D-ksylopiranozy [253, 418, 605]. Trigoneozydy IIIa i IIIb rozdzielili z użyciem UPLC-Q-TOF-MSⁿ Pang i wsp. [253, 418] oraz Kang i wsp. [253, 418]. Struktura chemiczna związku 23 to przypuszczalnie 3-O- $[\alpha$ -L-ramnopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozyd (25S/25R)-26-O-D-glukopiranozylo-5 α -furostano-3 β ,22 ξ ,26-triolu [253, 418, 605].

W wyniku przeprowadzonych rozdzieleń HPLC-ELSD-ESI-MS po raz pierwszy scharakteryzowano zespół saponin steroidowych w nasionach *T. foenum-graecum* pochodzenia krajowego. Stwierdzono występowanie w wyciągu z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego 26 saponin steroidowych, stanowiących saponiny furostanowe, zawierające od dwóch do sześciu cząsteczek cukrów. Spośród nich 24 (1-18; 21-24) przypisano struktury związków wcześniej zidentyfikowanych w nasionach kozieradki pochodzenia afrykańskiego i azjatyckiego. Ujawniono liczbę saponin steroidowych jest mniejsza niż w surowcu pochodzenia chińskiego [253, 418], w którym przez Pang i wsp. [418] z użyciem UPLC-QTOF-MSⁿ rozpoznali 46 związków. Natomiast Kang i wsp. [253] - wstępnie zidentyfikowali 95 saponin, w tym 22 pary izomerów.

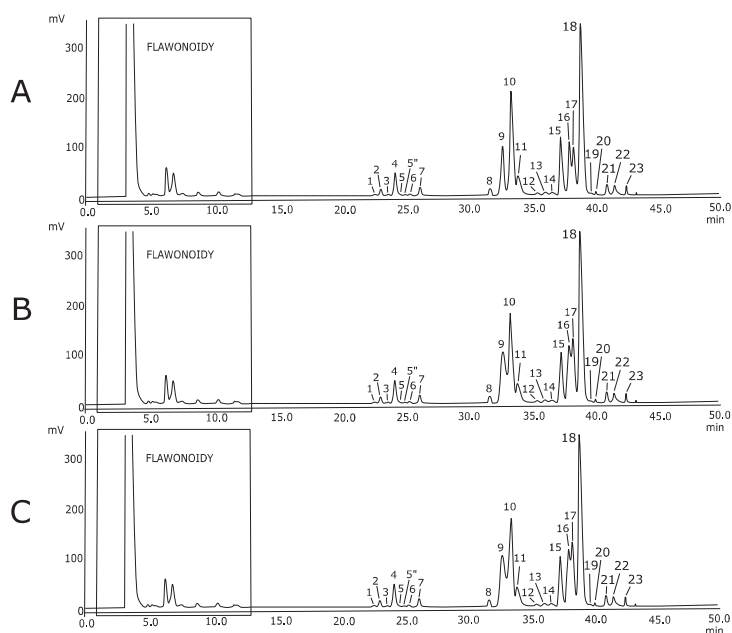
Uwzględniając intensywność pików odpowiadającym saponinom stwierdzono, że w badanym zespole dominują: protodioscyina (związek C, związek 18) oraz trigoneozyd Vb (związek 10). Natomiast w niższych stężeniach obecne są: trigoneozyd IVa (związek 15) i jego 25R-epimer - glikozyd F (związek 16), trigoneozyd Va (związek 9) i protoneodioscyina (związek 17). W większości są to pochodne diosgeniny (związki 10,16,18) oraz jej 25S-epimeru - jamogeniny (związki 9,15,17), stanowiących główne źródło diosgeniny, uwalnianej w warunkach hydrolizy kwasowej. 25S i 25R saponogeniny ulegają wzajemnej epimeryzacji [237, 339, 408], dlatego w kwaśnym środowisku jamogenina przekształca się w diosgeninę.

Profil HPLC związków saponinowych w surowcu krajowym różnił się od profilu saponin surowca chińskiego. W profilu UPLC-ESI-Q/TOF-MS (*low CE full scan*) saponin steroidowych w nasionach kozieradki pospolitej pochodzenia chińskiego, najwyższą intensywnością charakteryzował się pik mieszaniny związku zidentyfikowanego jako trigonellozyd C (protoneodioscyina) z saponiną furostanową o wzorze sumarycznym C₅₁H₈₆O₂₃ [418]. Nieco niższą intensywność wykazywały piki mieszanin: trigoneozydu Ia z trigoneozydem XVIIb oraz trigoneozydu Ib z trigoneozydem XVIIa [418]. Biorąc pod uwagę typ aglikonu, należy odnotować, że w chińskich nasionach kozieradki obok protoneodioscyny, będącej pochodną proto-jamogeniny, związkami dominującymi są pochodne proto-neogitogeniny (trigoneozydy Ia i XVIIa) oraz proto-gitogeniny (trigoneozydy Ib i XVIIb) [418]. W badanym surowcu pochodzenia krajowego obydwie związki występują w ilościach śladowych.

Analiza saponin steroidowych w nasieniu kozieradki pochodzenia tureckiego i afrykańskiego metodą HPLC-ELSD

Badania prowadzono we współpracy z Khenifim Mohammedem Lamine z *Département des Sciences Naturelles et de la Vie école normal supérieure de Laghouat* (Algieria). Opracowaną metodę separacji HPLC-ELSD saponin steroidowych zastosowano w analizie wyciągów metanolowych z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia tureckiego zebranych ze stanu naturalnego w prowincji Antalya (nasiona T1) oraz pochodzenia afrykańskiego otrzymane z *Département des Sciences Naturelles et de la Vie école normal supérieure de Laghouat* (Algieria) (nasiona T2).

Pomimo wykazanych różnic w zespole związków flawonoidowych pomiędzy nasionami kozieradki pochodzenia krajowego a surowcem pochodzenia tureckiego i afrykańskiego, nie wykazano istotnych różnic w profilu związków saponinowych. Jednocześnie, podobnie jak w przypadku surowca krajowego, otrzymane profile HPLC saponin steroidowych obecnych w nasionach kozieradki pochodzenia tureckiego (nasiona T1) i afrykańskiego (nasiona T2) różnią się od otrzymanego metodą HPLC-LDD profilu tych związków w surowcu francuskim [430] oraz od otrzymanego metodą UPLC-ESI-Q/TOF-MS (*low CE full scan*) profilu saponin steroidowych w surowcu chińskim [253, 418].



Ryc. 64. Chromatogramy HPLC-ELSD wyciągów metanolowych z nasion kozieradki pospolitej różnego pochodzenia: A - surowiec pochodzenia krajowego, B - surowiec pochodzenia tureckiego (nasiona T1); C - surowiec pochodzenia afrykańskiego (nasiona T2).

Analiza ilościowa saponin steroidowych w wyciągach i frakcji wyciągu metanolowego z nasienia kozieradki pospolitej metodą HPLC-ELSD

Analizę ilościową saponin steroidowych w wyciągach z nasion *T. foenum-graecum* metodą HPLC-ELSD prowadzono z wykorzystaniem warunków separacji opracowanych dla celów analizy jakościowej. Rozdzielenia prowadzono na dwóch połączonych szeregowo kolumnach Discovery C-18 (2 x 150 mm x 2,1 mm x 3 μm) w warunkach elucji gradientowej według programu X, charakteryzującego się wzrastającym stężeniem mieszaniny ACN: kwas mrówkowy (99,9:0,1, v/v) w 0,1% kwasie mrówkowym od 20% do 100% w czasie t_G 90 minut, stosując te same parametry pracy detektora ELSD. Związki saponinowe analizowano w wyciągach metanolowych z nasion kozieradki pochodzenia tureckiego i afrykańskiego. Ponadto do badań przeznaczono: zliofilizowane wyciągi: wodno-metanolowy (wyciąg A) i wodny przygotowany w postaci naparu (wyciąg B) oraz frakcję wyciągu metanolowego (D) z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego.

Zawartość saponin steroidowych oznaczono jako sumę w przeliczeniu na protodioscynę. Opracowaną metodę zwalidowano w zakresie wyznaczenia krzywej regresji, granicy wykrywalności, granicy oznaczalności, powtarzalności oraz precyzji (II.A.7.3.4.1.). W badanym zakresie stężeń wyznaczona krzywa regresji wykazywała zależność logarymiczną, co jest zgodne z danymi literaturowymi [586]. Otrzymane wartości parametrów walidacyjnych przedstawiono w tabeli 17. Natomiast oznaczoną zawartość saponin steroidowych w badanych wyciągach i frakcji przedstawiono w tabeli 18.

Oznaczona całkowita zawartość saponin steroidowych w surowcu krajowym wyniosła 0,14% i była niższa niż w analizowanym porównawczo surowcu tureckim i afrykańskim (0,20%) (tab. 17). Na tle doniesień literaturowych [43, 338], nasiona kozieradki pochodzenia krajowego stanowią surowiec o stosunkowo niskiej zawartości saponin steroidowych, co potwierdziły również wyniki oznaczenia diosgeniny po hydrolizie kwasowej metodą chromatografii cienkowarstwowej. Całkowita zawartość saponin steroidowych w nasionach *T. foenum-graecum*, pochodzących z różnych genotypów, otrzymanych z indyjskiego Narodowego Banku Genów, oznaczona z użyciem metod spektrofotometrycznych wynosiła od 0,92 - 1,68 g/100 g suchej masy [43]. Natomiast Madhava Naidu i wsp. [338] analizując nasiona kozieradki pochodzenia indyjskiego wykazali zawartość saponin steroidowych na poziomie 5,12 g/100 g.

Parametry walidacyjne	
Krzywa regresji, współczynnik korelacji	$y = x^{0,586726-1,26915}$ $R^2 = 0,999$
Granica wykrywalności (LOD) [µg/ml]	48,99
Granica oznaczalności (LOQ) [µg/ml]	146,97
Precyzja jednodniowa [RSD, %]	1,92
Powtarzalność [RSD, %]	1,80

Tab.17. Parametry walidacji opracowanej metody HPLC-ELSD oznaczania ilościowego saponin steroidowych w wyciągach z nasion kozieradki pospolitej.

Wyciąg / frakcja	Zawartość w 1 mg liofilizatu [µg]	
Wyciąg A	135,157±4,74	
Wyciąg B	63,134±8,14	
Frakcja D	163,182±11,03	
Wyciągi metanolowe z nasion <i>T. foenum-graecum</i>	Zawartość w 1 ml wyciągu [µg]	Zawartość w 1 g surowca [%]
pochodzenia krajowego	28,12	0,14
pochodzenia tureckiego i afrykańskiego	39,19	0,20

Tab.18. Zawartość saponin steroidowych w przeliczeniu na protodioscynę oznaczona metodą HPLC-ELSD w wyciągach organicznych i frakcjach z nasion kozieradki pospolitej różnego pochodzenia.

Oznaczona metodą HPLC-ELSD suma saponin steroidowych w badanym surowcu (0,14%) oraz zawartość diosgeniny, oznaczona metodą HPTLC z analizą densytometryczną (0,12%) wskazują, że główną część zespołu saponin steroidowych w badanym surowcu krajowym stanowią związki, z których w wyniku hydrolizy kwasowej uwalniana jest diosgenina. Otrzymane dane są zgodne z danymi literaturowymi [431, 541, 542].

Spośród analizowanych wyciągów (70% metanolu - A, naparu - B oraz frakcji wyciągu metanolowego - D), przeznaczonych do badań aktywności cytotoksycznej i przeciwdrobnoustrojowej, najwyższą zawartością saponin steroidowych charakteryzowała się frakcja D (163,182±11,03 µg/mg liofilizatu). Nieco niższą zawartość badanych związków wykryto w wyciągu A otrzymanym z użyciem 70% metanolu (135,157±4,74 µg/mg liofilizatu). Natomiast najniższym stężeniem saponin steroidowych charakteryzował się wyciąg B otrzymany w formie naparu (63,134±8,14 µg/mg liofilizatu).

B. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ

1. Omówienie wyników badań aktywności cytotoksycznej.

Ocenę aktywności cytotoksycznej prowadzono wobec linii ludzkich komórek nowotworowych: raka szyjki macicy HeLa, gruczolakoraka jajnika SKOV-3 oraz białaczki limfoblastycznej MOLT-4, które inkubowano w ciągu 24 godzin w obecności badanych wyciągów i frakcji z nasion kozieradki oraz pojedynczych związków jako ich składników. Jako kontrolę wykorzystano nienowotworową linię ludzkich keratynocytów HaCaT, stosunkowo łatwą w hodowli i charakteryzującą się nieograniczoną liczbą podziałów. W ocenie aktywności cytotoksycznej wyciągów i metabolitów wtórnych z nasion *T. foenum-graecum* stosowano test redukcji soli tetrazolowej MTT oraz system RealTimexCELLigence.

Test MTT umożliwia ocenę aktywności metabolicznej komórek i wykorzystuje zjawisko redukcji rozpuszczalnej w wodzie, żółtej lub białej soli tetrazolowej (bromku 3-4,5-dimetylo-2-ilo-2,5-difenylotetrazolu) do nierozpuszczalnych kryształów ciemnoniebieskiego formazanu przez mitochondrialne dehydrogenazy pirogronianowe żywych komórek. Ilość powstałego formazanu, oceniana spektrofotometrycznie po rozpuszczeniu kryształów w dimetylosulfotlenku lub izopropanolu, jest proporcjonalna do liczby żywych komórek i umożliwia ocenę stopnia ich przeżywalności [7].

System RealTimexCELLigence (RTCA) stanowi nowoczesne narzędzie diagnostyczne wykorzystywane do oceny aktywności cytotoksycznej związków *in vitro* [4]. Umożliwia obserwację śmierci komórek, ocenę stopnia ich żywotności oraz proliferacji i migracji [4]. Nie wymaga stosowania barwników i znaczników, a procesy zachodzące w komórkach - w przeciwieństwie do testu MTT - obserwowane są w czasie rzeczywistym - sygnał z systemu RTCA przesyłany jest do komputera w czasie trwania eksperymentu, bez ingerencji badacza. System RTCA wykorzystuje pomiar zmian impedancji (Z) w hodowli komórek adherentnych, prowadzonej na specjalnych, 16-dołkowych płytkach hodowlanych *E-Plate*, które w 80% pokryte są zintegrowanymi mikrosensoremami [4]. Impedancja (Z) stanowi opór wypadkowy pomiędzy oporem pojemnościowym i oporem właściwym, a jej zmiany w hodowli komórkowej związane są z żywotnością komórek, ich wielkością, morfologią, adhezją i zmianą liczebności [4, 101]. Umożliwia to stosowanie techniki RTCA w ocenie cytotoksyczności związków i wyciągów, poprzez obserwację wzrostu, proliferacji, adhezji i śmierci komórek, oraz

kontrolę ich jakości [4]. Pomiar zmian impedancji służy do wyznaczenia podstawowego parametru eksperymentu, tzw. *Cell Index* (CI):

$$CI = \frac{(Z_i - Z_0)\Omega}{15 \Omega}$$

CI - cell index

Z_i - impedancja w dowolnym momencie eksperymentu

Z₀ – impedancja w punkcie początkowym eksperymentu

Do badań przeznaczono zliofilizowane wyciągi z nasion *T. foenum-graecum*, otrzymane przez ekstrakcję z użyciem 70% metanolu (wyciąg A), wody (wyciąg B, przygotowany w postaci naparu) lub metanolu (wyciąg C) oraz frakcję D wyciągu metanolowego, uzyskanego w wyniku trójstopniowej, wyczerpującej ekstrakcji w aparacie Soxhleta (II.B.1.5.). Zliofilizowane wyciągi A i B oraz frakcję D rozpuszczono w DMSO (wyciąg A), wodzie dejonizowanej (wyciąg B) lub metanolu (frakcja D), otrzymując do badań odpowiednie stężenia wyjściowe: 10 mg/ml dla wyciągu A i frakcji D oraz 0,375 mg/ml dla wyciągu B. Obok wyciągów i frakcji do oceny aktywności cytotoksycznej przeznaczono 11 związków chemicznych, wcześniej identyfikowanych w surowcu, z grupy C-glikozydów flawonowych (witeksyna, orientyna, izoorientyna, wicenina-1, wicenina-2, wicenina-3), sapogenin steroidowych (diosgenina, jamogenina, tigogenina i esmilagenina) oraz alkaloidów (trygonelina) w formie roztworów w metanolu o stężeniu 1 mg/ml. Aktywność cytotoksyczną diosgeniny, jamogeniny, tigogeniny, wyciągu 70% metanolu (A) i wyciągu wodnego (B) oraz frakcji wyciągu metanolowego (D) oceniano z użyciem testu MTT oraz systemu RTCA, natomiast w celu oceny aktywności cytotoksycznej C-glikozydów flawonowych, esmilageniny, trygoneliny oraz wyciągu metanolowego (C) zastosowano test MTT. Doświadczenie zaprojektowano tak, aby ostateczne stężenie rozpuszczalników w pojedynczym dołku hodowlanym nie przekraczało: DMSO - 0,8%, metanol - 4%. Stężenie DMSO w zakresie 0,5-1,0% oraz 4% stężenie metanolu nie powodują znaczącego spadku żywotności komórek badanych linii komórkowych [102, 507]. Kontrolnie oceniano wpływ rozpuszczalników na komórki i wykazano, że w maksymalnych stężeniach stosowanych w eksperymentach nie wykazują one działania cytotoksycznego, co umożliwia prawidłową ocenę zmian ich przeżywalności.

Wyniki aktywności cytotoksycznej wyciągów i frakcji z nasion *T. foenum-graecum* oraz substancji wzorcowych, wobec różnych linii komórkowych, otrzymane z użyciem testu MTT oraz systemu RealTimeXCELLigence przedstawiono w tabelach 19-23.

Linia komórkowa	Wyciąg A	Wyciąg B	Frakcja D
	IC ₅₀ [µg/ml] ± SD		
HeLa	13,47 ± 0,62	17,43 ± 0,3	3,91 ± 0,03
SKOV-3	10,34 ± 0,16	16,68 ± 0,6	3,97 ± 0,07
MOLT-4	16,18 ± 1,14	26,55 ± 0,07	7,75 ± 0,37
HaCaT	3,58 ± 0,21	16,67 ± 0,22	3,94 ± 0,04

Tab.19. Aktywność cytotoksyczna wyciągów A i B oraz frakcji D z nasion *T. foenum-graecum* wobec badanych linii komórkowych oznaczona z użyciem testu MTT.

Linia komórkowa	Witekssyna	Orientyna	Izoorientyna	Wicenina-1	Wicenina-2	Wicenina-3	Trygonelina	Wyciąg C
	IC ₅₀ [µg/ml]							
HeLa	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
SKOV-3	n.b.	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
HaCaT	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

n.b. - nie badano

Tab.20. Aktywność cytotoksyczna wzorcowych C-glikozyloflawonów wobec badanych linii komórkowych oznaczona z użyciem testu MTT.

Linia komórkowa	Jamogenina	Tigogeniny octan	Diosgenina	Esmilagenina
	IC ₅₀ [µg/ml] ± SD			
HeLa	16,5 ± 0,59	35,6 ± 3,69	16,3 ± 0,26	n.b.*
SKOV-3	16,7 ± 0,08	>50	19,3 ± 0,97	17,96 ± 1,29
HaCaT	9,7 ± 0,91	31,1 ± 2,31	12,4 ± 0,5	n.b.*

Tab.21. Aktywność cytotoksyczna wzorcowych sapogenin steroidowych wobec badanych linii komórkowych oznaczona z użyciem testu MTT.

Linia komórkowa	Wyciąg A		Wyciąg B		Frakcja D	
	IC ₅₀ [µg/ml] ± SD	R ²	IC ₅₀ [µg/ml] ± SD	R ²	IC ₅₀ [µg/ml] ± SD	R ²
HeLa	9,65 ± 0,78	0,83	31,45 ± 0,21	0,97	3,99 ± 0,26	0,97
SKOV-3	7,73 ± 0,1	0,98	26,4 ± 0,71	0,98	2,26 ± 0,78	0,90
HaCaT	5,06 ± 0,36	0,54	35,26 ± 0,34	0,99	4,84 ± 1,22	0,89

R² - współczynnik determinacji

Tab.22. Aktywność cytotoksyczna wyciągów A i B oraz frakcji D z nasion *T. foenum-graecum* wobec badanych linii komórkowych oznaczona z użyciem systemu RealTimexCELLigence.

Linia komórkowa	Jamogenina		Tigogeniny octan		Diosgenina	
	IC ₅₀ [µg/ml] ± SD	R ²	IC ₅₀ [µg/ml] ± SD	R ²	IC ₅₀ [µg/ml] ± SD	R ²
HeLa	19,6 ± 1,41	0,92	25,1 ± 0,12	0,85	28,0 ± 2,40	0,87
SKOV-3	23,9 ± 1,48	0,97	28,3 ± 3,46	0,95	16,9 ± 2,89	0,91
HaCaT	16,4 ± 1,41	0,94	32,7 ± 0,07	0,89	23,4±0,42	0,91

n.b. - nie badano

Tab.23. Aktywność cytotoksyczna wzorcowych sapogenin steroidowych wobec badanych linii komórkowych oznaczona z użyciem systemu RealTimeCELLigence.

Dane literaturowe nie opisują aktywności cytotoksycznej przetworów z *Foenugraeci Semen* oraz badanych metabolitów wtórnych wobec linii komórkowych gruczolakoraka jajnika SKOV-3 oraz białaczki limfoblastycznej MOLT-4 (z wyjątkiem protodioscyny). Również potencjalna aktywność tigogeniny, jamogeniny i esmilageniny wobec badanych linii komórkowych pozostaje nieznana.

W niniejszej pracy po raz pierwszy przeprowadzono ocenę aktywności cytotoksycznej przetworów z nasion *T. foenum-graeum* oraz C-glikozyloflawonów i sapogenin wobec linii komórkowej SKOV-3 oraz wyciągów i frakcji z nasion kozieradki wobec linii komórkowej MOLT-4. Do oceny aktywności cytotoksycznej *T. foenum-graecum* również po raz pierwszy użyto system RealTimeXCELLigence.

Analizując otrzymane wyniki badań aktywności cytotoksycznej uwzględniono ograniczenia przyjęte przez Amerykański Narodowy Instytut Raka (*ang. US National Cancer Institute - NCI*). NCI realizuje Projekt Badań Przesiewowych, w ramach którego prowadzone są analizy skryningowe aktywności cytotoksycznej wyciągów roślinnych oraz metabolitów wtórnych wobec 60 linii ludzkich komórek nowotworowych [36, 306]. Przyjęto, że za aktywne cytotoksycznie można uznać te związki/wyciągi, dla których wyznaczona wartość IC₅₀ (stężenie wyciągu/związku, przy którym obserwuje się 50% zahamowanie wzrostu komórek) wynosi < 20-30 µg/ml [36, 306, 345]. Dlatego wszystkie badane C-glikozyloflawony (witeksynę, orientynę, izoorientynę, wiceninę-1, wiceninę-2 i wiceninę-3), alkaloid trygonelinę oraz wyciąg C uznano za nieaktywne, ponieważ wartości IC₅₀ wobec badanych linii komórkowych, uzyskane w teście MTT przekraczały 50 µg/ml (tab.20.). Jakkolwiek w toku badań prowadzonych przez innych autorów niektóre C-glikozydy flawonowe uznano za aktywne przeciwnowotworowo i proapoptotycznie wobec różnych linii komórkowych, np. ludzkiej białaczki U937 (witeksyna IC₅₀~200,34 µM [307]), raka przelyku EC109 (witeksyna i orientyna; 80 µM; zahamowanie wzrostu o 20,08% ± 1,16 i 34,08% ± 1,16 komórek, odpowiednio [625]), raka szyjki macicy HeLa [173] (orientyna; zahamowanie wzrostu 17,12% ± 0,25 komórek), raka wątrobowo-komórkowego HepG2 [608, 609] (izoorientyna) oraz raka

prostaty (linie komórkowe PC-3, DU-145 and LNCaP) (wicenina-2; IC_{50} $44 \pm 3 \mu M$; orientyna IC_{50} $124 \pm 7 \mu M$) [392].

Oznaczone wartości IC_{50} dla badanych wyciągów A i B, frakcji D oraz wzorcowych sapogenin (jamogeniny, tigogeniny, diosgeniny i esmilageniny) wobec badanych linii komórkowych umożliwiły zakwalifikowanie wymienionych wyciągów/frakcji/związków do posiadających aktywność cytotoksyczną.

Wyniki otrzymane w zakresie oceny siły działania cytotoksycznego z użyciem systemu RealTimexCELLigence były w większości zgodne z wynikami uzyskanymi w teście MTT, z wyjątkiem tigogeniny, która wobec linii komórek nowotworowych SKOV-3 nie ujawniła aktywności w teście MTT ($IC_{50} > 50 \mu g/ml$), natomiast w badaniach z użyciem systemu RTCA wykazywała działanie przeciwnowotworowe na poziomie IC_{50} $28,3 \pm 3,46 \mu g/ml$.

Dotychczas w wielu pracach analizowano aktywność cytotoksyczną diosgeniny [107, 311, 314, 318, 321, 324, 369, 377, 445-447, 489], jednak wpływ na wykorzystaną w niniejszych badaniach linię komórek SKOV-3 zarówno diosgeniny, jak i tigogeniny, esmilageniny oraz jamogeniny nie był oceniany. Dotychczas stwierdzono jedynie antyproliferacyjne działanie tigogeniny i smilageniny wobec linii komórek kostniakomięsa 1547 [106, 555]. Znana jest również aktywność cytotoksyczna glikozydowych form tigogeniny, przy czym Ohtsuki i wsp. [406] w badaniach zespołu saponin steroidowych z *Agave fourcroydes* udowodnili, że działaniem proapoptotycznym wobec linii HeLa wyróżniają się heksa-glikozydy sapogenin, podczas, gdy formy di-glikozydowe pozostają nieaktywne (IC_{50} dla heksa-glikozydu tigogeniny wobec linii HeLa wynosiło $4,8 \mu g/ml$).

Również właściwości cytotoksyczne wolnej jamogeniny nie były badane, jakkolwiek prowadzono badania nad jej formami glikozydowymi, m.in. potwierdzono aktywność 3-O- β -D-glukozylo(6 \rightarrow 1)-3-O- β -D-glukozydu jamogeniny, wyizolowanego z *Solanum torvum* (*Solanaceae*) wobec szeregu linii komórkowych, m.in. raka żołądka MCG-803 (IC_{50} $25,2 \mu g/ml$), wątrobowo-komórkowego Hep2G2 (IC_{50} $32,7 \mu g/ml$) raka płuc A549 (IC_{50} $34,2 \mu g/ml$) i raka piersi MCF-7 (IC_{50} $29,4 \mu g/ml$) [332, 432, 604].

Spośród poddanych ocenie aktywności cytotoksycznej sapogenin steroidowych, według wyników uzyskanych w teście MTT, najsilniejszym działaniem wobec linii HeLa charakteryzowały: jamogenina (IC_{50} $16,5 \pm 0,59 \mu g/ml$) oraz diosgenina (IC_{50} $16,3 \pm 0,26 \mu g/ml$), podczas gdy obserwowana aktywność tigogeniny była niemal dwukrotnie niższa (IC_{50} $35,6 \pm 3,69 \mu g/ml$). Natomiast wyniki otrzymane z użyciem systemu RTCA wskazują, że siła aktywności sapogenin wzrasta w następującej kolejności: diosgenina (IC_{50} $28,0 \pm 2,40 \mu g/ml$), tigogenina (IC_{50} $25,1 \pm 0,12 \mu g/ml$), jamogenina (IC_{50} $19,6 \pm 1,41$

µg/ml). Wyznaczone w teście MTT wartości IC_{50} dla diosgeniny wobec linii komórek HeLa (IC_{50} $16,3 \pm 0,26$ µg/ml) są zbliżone do wartości IC_{50} otrzymanych przez innych autorów (IC_{50} 18,2 µg/ml [577], IC_{50} 30 µmol/L [220] ≈ 12 µg/ml).

Aktywność cytotoksyczna diosgeniny, jamogeniny i esmilageniny wobec linii gruczolakoraka jajnika SKOV-3, oceniana w teście MTT była zbliżona, a wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio: $16,7 \pm 0,08$ µg/ml (jamogenina), $19,3 \pm 0,97$ µg/ml (diosgenina), $17,96 \pm 1,29$ µg/ml (esmilagenina). W oparciu o wytyczne NCI tigogenina nie wykazywała aktywności cytotoksycznej ($IC_{50} > 50$ µg/ml). Natomiast w badaniach działania cytotoksycznego z użyciem systemu RTCA aktywność przeciwnowotworową ujawniły wszystkie badane saponiny, a otrzymane wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio: $16,9 \pm 2,89$ µg/ml - diosgenina, $23,9 \pm 1,48$ µg/ml - jamogenina i $28,3 \pm 3,46$ µg/ml - tigogenina.

Otrzymane wyniki są pierwszymi danymi o aktywności cytotoksycznej jamogeniny. Ponadto uzupełniają dane o aktywności diosgeniny, tigogeniny i esmilageniny oraz - uwzględniając obecność wymienionych związków jako aglikonów saponin steroidowych w nasionach kozieradki - również dane o aktywności przeciwnowotworowej surowca.

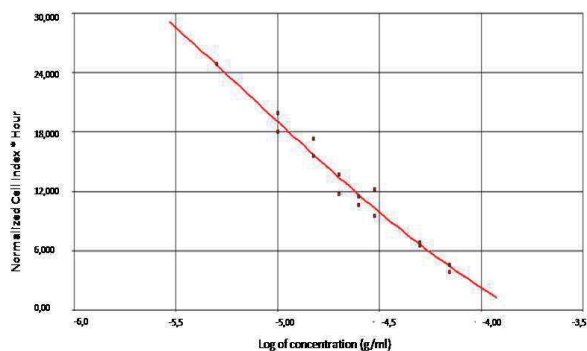
W niniejszej pracy po raz pierwszy przeprowadzono ocenę w aktywności przeciwnowotworowej przetworów z *Foenugraeci Semen* wobec linii komórkowych gruczolakoraka jajnika SKOV-3 i MOLT-4. Spośród badanych wyciągów i frakcji z nasion *T. foenum-graecum*, najsilniejszą aktywnością cytotoksyczną charakteryzowała się frakcja wyciągu metanolowego (D), dla której wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio: wobec linii HeLa $3,91 \pm 0,03$ µg/ml (MTT) i $3,99 \pm 0,26$ µg/ml (RTCA), wobec linii SKOV-3 $3,97 \pm 0,07$ µg/ml (MTT) i $2,26 \pm 0,78$ µg/ml (RTCA), wobec linii MOLT-4 $7,75 \pm 0,37$ µg/ml (MTT).

Nieco słabszą aktywność cytotoksyczną obserwowano dla wyciągu otrzymanego z użyciem 70% metanolu(A), dla którego wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio: wobec linii HeLa $13,47 \pm 0,62$ µg/ml (MTT) i $9,65 \pm 0,78$ µg/ml (RTCA), wobec linii SKOV-3 $10,34 \pm 0,16$ µg/ml (MTT) i $7,73 \pm 0,1$ µg/ml (RTCA), natomiast wobec linii MOLT-4 $16,18 \pm 1,14$ µg/ml (MTT).

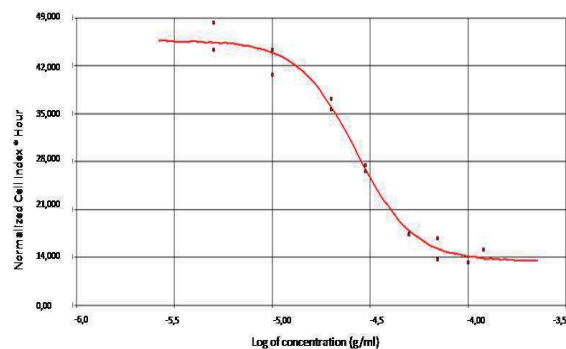
Wyciąg wodny, otrzymany w postaci naparu(B) był mniej aktywny wobec badanych linii komórek nowotworowych w porównaniu do frakcji wyciągu metanolowego (D) i wyciągu 70% metanolu (A). Wartości IC_{50} dla wyciągu B wynosiły odpowiednio: wobec linii HeLa $17,43 \pm 0,3$ µg/ml (MTT) i $31,45 \pm 0,21$ µg/ml (RTCA), wobec linii SKOV-3 $16,68 \pm 0,6$ µg/ml (MTT) i $26,4 \pm 0,71$ µg/ml (RTCA), natomiast wobec linii MOLT-4 $26,55 \pm 0,07$ µg/ml (MTT).

FRAKCJA D

Linia komórkowa HeLa

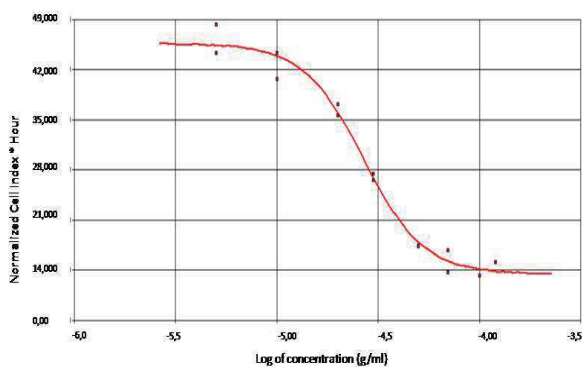


Linia komórkowa SKOV-3

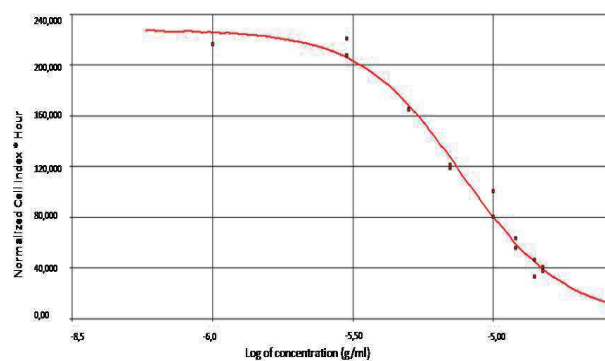


WYCIĄG A

Linia komórkowa HeLa

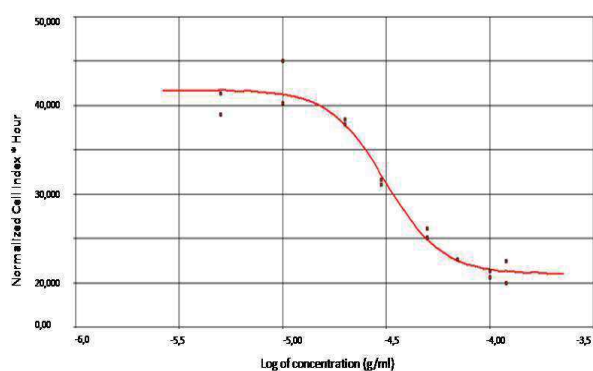


Linia komórkowa SKOV-3

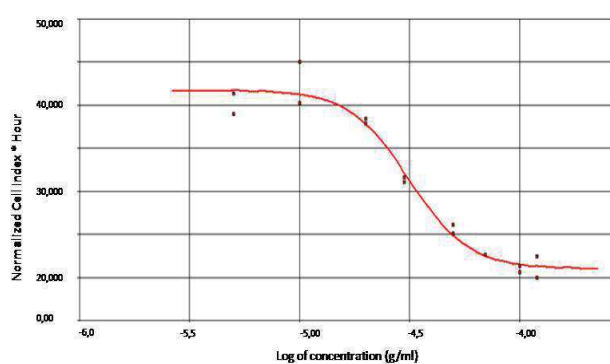


WYCIĄG B

Linia komórkowa HeLa



Linia komórkowa SKOV-3



Ryc.65. Wpływ badanej frakcji D oraz wyciągów A i B z nasion *T. foenum-graecum* na linie komórkowe HeLa i SKOV-3 (system RealTimexCELLigence; oprogramowanie RTCA 1.2.1.).

Wykazano, że wyznaczone wartości IC_{50} wyciągów wodno-alkoholowego (70% metanol) (wyciąg A) i wodnego (wyciąg B) oraz frakcji wyciągu metanolowego (D) z nasion *T. foenum-graecum* wobec linii ludzkiego raka szyjki macicy HeLa są znacząco niższe od wartości IC_{50} analizowanego przez Atkas i wsp. [20] wyciągu metanolowego z surowca (IC_{50} $84,0 \pm 0,34$ $\mu\text{g/ml}$).

Obserwowana zróżnicowana aktywność cytotoksyczna badanych wyciągów wodno-alkoholowego (70% metanol) (wyciąg A) i wodnego (wyciąg B) oraz frakcji wyciągu metanolowego (D) z nasion kozieradki jest skorelowana z oznaczoną w nich zawartością C-glikozyloflawonów. Najwyższe stężenia C-glikozyloflawonów obok saponin steroidowych, w przeliczeniu na 1 mg liofilizatu, stwierdzono we frakcji wyciągu metanolowego (D) ($823,68 \pm 0,05$ μg oraz $163,182 \pm 11,03$ μg , odpowiednio). Wyciąg wodno-alkoholowy (A) zawierał ponad 7-krotnie mniej C-glikozydów flawonowych niż frakcja D ($113,368 \pm 0,09$ μg), ale jedynie nieznacznie mniej saponin steroidowych ($135,157 \pm 4,74$ μg). Natomiast wyciąg wodny (B) o najsłabszym działaniu cytotoksycznym, wyróżniał się najniższą zawartością badanych metabolitów wtórnych. Zawierał ponad 22 razy mniej C-glikozyloflawonów w porównaniu do frakcji wyciągu metanolowego (D) i 3-krotnie mniej w porównaniu do wyciągu otrzymanego z użyciem 70% metanolu (A) ($36,769 \pm 0,29$ μg). Zawartość saponin steroidowych w wyciągu wodnym B była ponad dwukrotnie niższa w porównaniu do wyciągu A i frakcji D ($63,134 \pm 8,14$ μg).

Różnice w zawartości saponin steroidowych pomiędzy wyciągiem 70% metanolu (A) i wodnym (B) są niewielkie i nie wiążą się bezpośrednio ze znaczącą różnicą w aktywności cytotoksycznej. Jakkolwiek należy podkreślić, że w niniejszych badaniach oceniano aktywność cytotoksyczną wolnych saponin, natomiast w badanych wyciągach z nasion kozieradki obecne są ich formy glikozydowe, dla których udowodniono aktywność przeciwnowotworową i proapoptotyczną [55, 205, 325, 433, 552, 571, 573, 578]. Stąd obserwowana aktywność cytotoksyczna badanych wyciągów nie musi być skorelowana z aktywnością wolnych aglikonów.

Dominującym związkiem saponinowym w *Foenugraeci Semen* pochodzenia krajowego jest protodioscyna. *National Cancer Institute* opublikował raport o aktywności cytotoksycznej protodioscyny wobec 60 różnych linii komórek nowotworowych, z którego wynika, że saponina jest aktywna wobec większości z nich [215]. Szczególną wrażliwością na protodioscynę charakteryzują się białaczki, nowotwory jelita grubego oraz nowotwory prostaty [215]. Ponadto ujawniono, że protodioscyna wykazuje selektywną aktywność cytotoksyczną ($IC_{50} < 2\mu\text{M}$), wobec niektórych linii komórek nowotworowych m.in. nowotworów jelita grubego HCT-116 oraz SW-620, niedrobnokomórkowego raka płuc A549/ATCC, białaczki

limfoblastycznej MOLT-4, nowotworu układu nerwowego SNB-75, raka nerek 786-0 i czerniaka LOX IMVI [215]. Natomiast ujawniona aktywność cytotoksyczna protodioscyny wobec linii komórek nowotworu układu nerwowego EKVX, czerniaka SK-MEL-2, nowotworów jajników OVCAR-3 i OVCAR-5, nowotworów nerek ACHN i TK-10 oraz nowotworów piersi MDA-MB-231 i HS 578T była umiarkowana - wartości IC_{50} wynosiły 10-35 μM [215]. Linia komórek nowotworu nerek A498 była niewrażliwa na działanie protodioscyny ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$) [215]. Dodatkowo badania wskazują, że pod wpływem protodioscyny w komórkach ludzkiej białaczki HL-60 dochodziło do indukcji apoptozy, natomiast wzrost komórek ludzkiego raka żołądka KATO III był zahamowany, ale nie obserwowano indukcji apoptozy [205]. W świetle powyższych danych literaturowych różna zawartość protodioscyny w badanych wyciągach A (wodno-metanolowym) i B (wodnym) oraz frakcji D wyciągu metanolowego może stanowić wyjaśnienie obserwowanej i zróżnicowanej ich aktywności wobec linii białaczki limfoblastycznej MOLT-4.

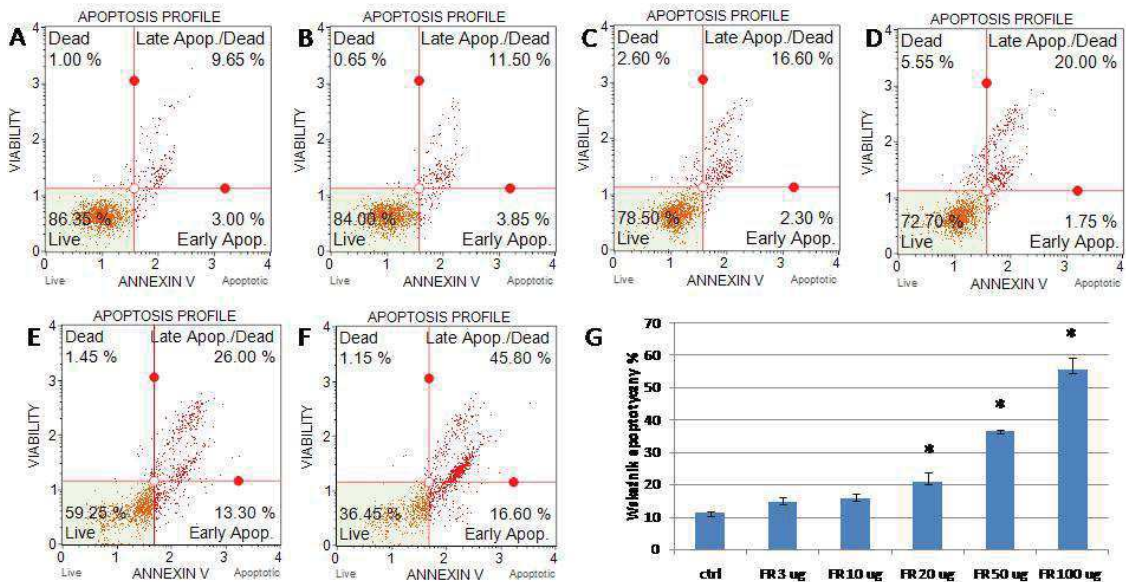
Uwzględniając różnice w składzie chemicznym oraz wyniki aktywności cytotoksycznej można wnioskować, że obserwowane efekty cytotoksyczne mogą być związane z synergizmem działania i obecnością różnych grup metabolitów wtórnych. Dla związków z grupy polifenoli udowodniono silny synergistyczny efekt cytotoksyczny wobec wielu linii komórek nowotworowych [309, 371, 383, 472, 527]. Z drugiej strony brak aktywności cytotoksycznej badanych C-glikozyloflawonów w połączeniu z wysoką aktywnością frakcji wyciągu metanolowego (D) o najwyższej zawartości C-glikozydów flawonowych sugeruje, że aktywnością cytotoksyczną mogą charakteryzować się pozostałe C-glikozydy flawonowe obecne w nasionach kozieradki.

Inne wyjaśnienie może stanowić obecność dotychczas nieopisanego składnika wyciągu o potencjalnie silnej aktywności przeciwnowotworowej. Dalsze badania w tym zakresie będą kontynuowane.

Kolejny etap prac stanowiła ocena mechanizmów działania proapoptotycznego frakcji wyciągu metanolowego (D) z nasion kozieradki, wykazującej najsilniejszą aktywność cytotoksyczną. Dotychczas udowodniono, że w mechanizm apoptozy indukowanej przez wyciągi z nasion kozieradki w komórkach chłoniaka T-komórkowego Jurkat [21], raka wątroby Hep2 [270] i nowotworu piersi MCF-7 [32, 276] zaangażowane są kaspazy 3 i 8 [21, 32, 270] oraz kaspaza 9 [276]. Stwierdzono, że apoptoza komórek nowotworu piersi MCF-7 warunkowana wyciągiem metanolowym z nasion *T. foenum-graecum* w 90% zachodzi wskutek stymulacji szlaku zewnętrznego - receptorowego [32]. Badania mechanizmów aktywności cytotoksycznej frakcji wyciągu metanolowego z nasion kozieradki (D) wobec linii komórkowych HeLa i SKOV-3

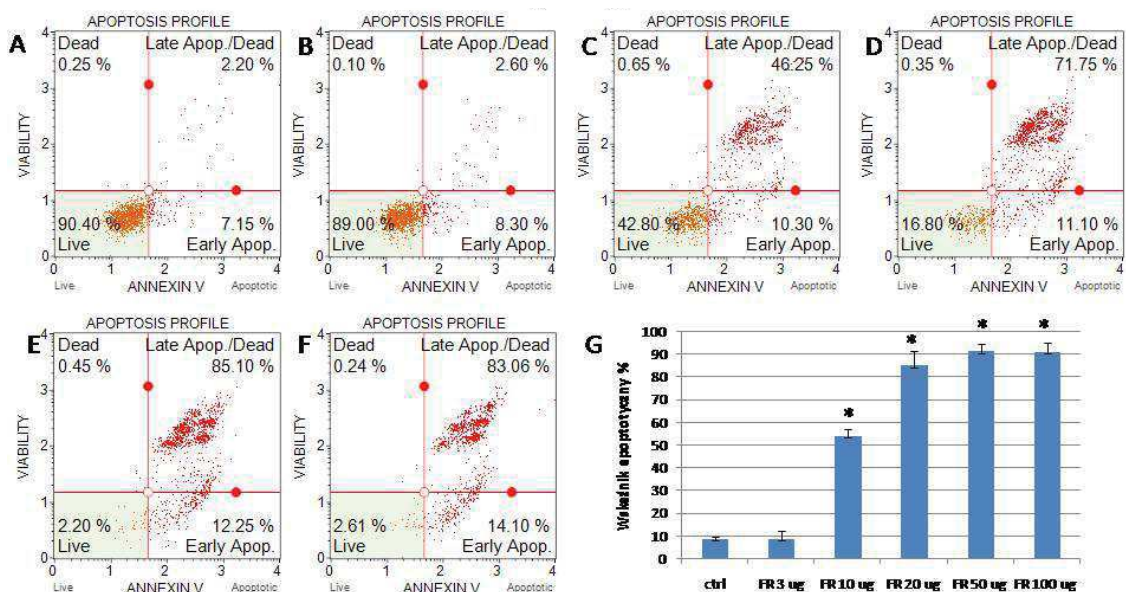
obejmowały: wyznaczenie procentu komórek apoptotycznych (*ang. apoptosis rate*), analizę poziomu aktywności kaspaz wykonawczych 3 i 7, badanie zmian błonowego potencjału mitochondrialnego oraz poziomu reaktywnych form tlenu (ROS). W tym celu komórki HeLa i SKOV-3 inkubowano w obecności następujących stężeń badanej frakcji wyciągu metanolowego (D): 3 µg, 10 µg, 20 µg, 50 µg i 100 µg. Po upływie 12 godzin oceniono zmiany potencjału mitochondrialnego, natomiast pozostałe badania przeprowadzono po upływie 24 godzin.

Obserwowano zależny od dawki wzrost procentu komórek apoptotycznych, jakkolwiek większą wrażliwością na badaną frakcję wyciągu metanolowego z nasion kozieradki (D) charakteryzowała się linia komórkowa SKOV-3 w porównaniu do linii HeLa - oznaczony procent komórek apoptotycznych przy tych samych, wzrastających stężeniach badanej frakcji D był wyższy. W wyniku inkubacji komórek SKOV-3 z frakcją wyciągu metanolowego (D) w stężeniu 10 µg obserwowano ponad 50% komórek apoptotycznych, podczas gdy w hodowli komórek HeLa to samo stężenie badanej frakcji powodowało apoptozę u 15% komórek. Stężenie frakcji D 20-100 µg wywołało apoptozę u 90% komórek SKOV-3. Natomiast w hodowli linii HeLa obserwowano następujący wzrost procentu komórek apoptotycznych: 20 µg frakcji D - 20%; 50 µg - 37%; 100 µg - 55,6%, odpowiednio.



Ryc. 66. Procent komórek apoptotycznych w hodowli linii komórkowej HeLa po 24-godzinach inkubacji z frakcją D, oznaczony z użyciem cytometrii przepływowej: *ctrl*- kontrola (1% metanol) (A), *FR* - frakcja D w stężeniach: 3 µg (B), 10 µg (C), 20 µg (D), 50 µg (E), 100 µg (F), G - procent komórek apoptotycznych w zależności od stężenia frakcji D.

* - różnice istotne statystycznie (test t-Studenta, $p < 0,05$, oprogramowanie Statistica)



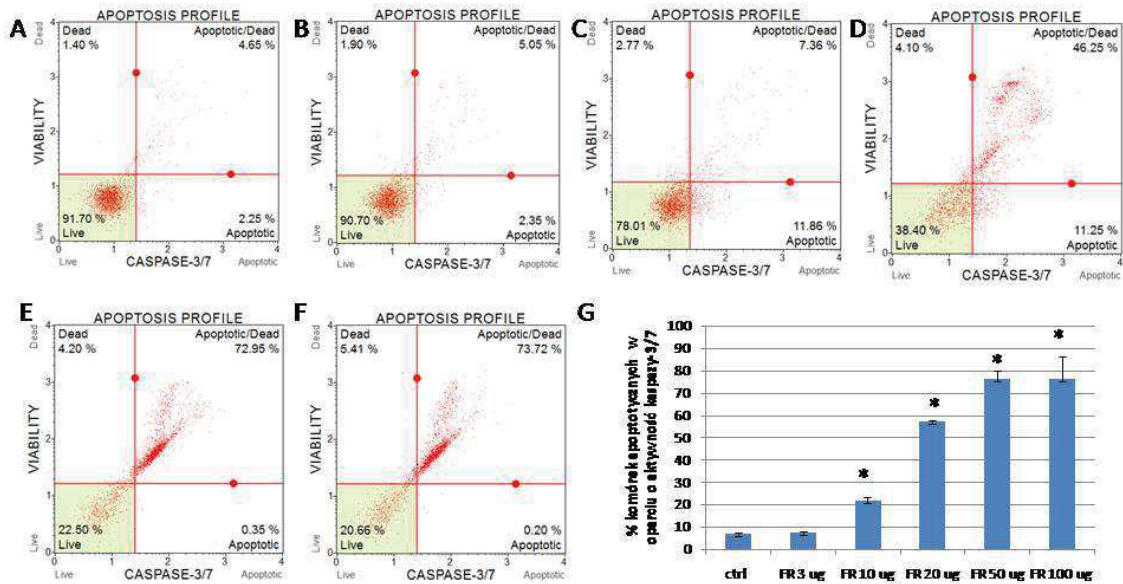
Ryc.67. Procent komórek apoptotycznych w hodowli linii komórkowej SKOV-3 po 24-godzinach inkubacji z frakcją D, oznaczony z użyciem cytometrii przepływownej: *ctrl*- kontrola (1% metanol) (A), *FR* - frakcja D w stężeniach: 3 µg (B), 10 µg (C), 20 µg (D), 50 µg (E), 100 µg (F), G - procent komórek apoptotycznych w zależności od stężenia frakcji D.

* - różnice istotne statystycznie (test t-Studenta, $p < 0,05$, oprogramowanie Statistica)

W mechanizmie apoptozy kluczową rolę odgrywiają wewnątrzkomórkowe proteazy cysteinowe - kaspazy, wśród których wyróżniamy kaspazy indukujące (2, 8, 9, 10) oraz kaspazy wykonawcze (3, 6, 7) [293, 294], obecne w komórkach w formie nieczynnych zymogenów - prokaspaz. Prokaspazy ulegają aktywacji w wyniku indukcji tzw. zewnętrznego lub wewnętrznego szlaku apoptozy [210, 293, 294, 519]. Zewnętrzna droga indukcji apoptozy (tzw. szlak receptorowy) związana jest z pobudzeniem receptora śmierci na błonie komórkowej i uruchomieniem kaskady kaspaz inicjujących i wykonawczych, przy czym prokaspazy 3 i 7 aktywowane są przez kaspazy 8 i 9 [210, 293, 294, 519]. Wewnętrzny szlak apoptozy, związany z mitochondrium i retikulum endoplazmatycznym, aktywowany jest pod wpływem wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu, zmian potencjału oksydoredukcyjnego w komórce, wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie, zaburzeń elektrolitowych i uszkodzenia DNA [172, 210, 519].

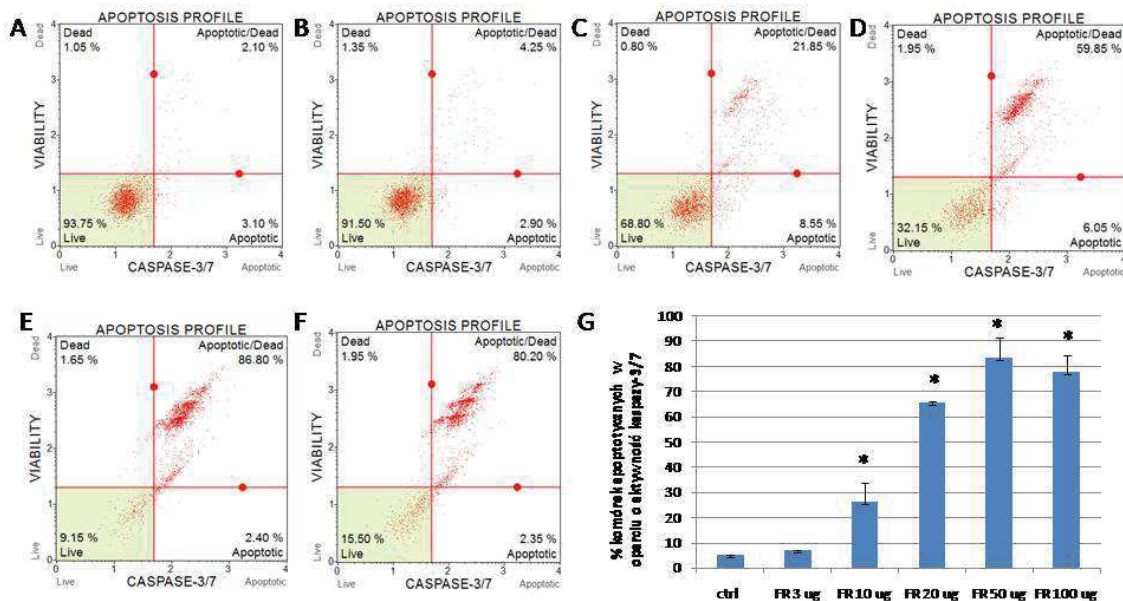
Określenie poziomu aktywności kaspaz wykonawczych 3 i 7 w badanej linii komórkowej potwierdzało proces apoptozy. Zarówno w hodowli linii komórkowej HeLa, jak i SKOV-3 obserwowano wzrost aktywności kaspaz wykonawczych w obecności badanej frakcji D (ryc. 68 i 69). Aktywność kaspaz 3 i 7 zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia frakcji D do 50 µg, natomiast zwiększenie dawki do 100 µg nie powodowało dalszego wzrostu aktywności. Maksymalna aktywność kaspaz 3 i 7 wynosiła odpowiednio: około 75% dla linii HeLa oraz około 80% dla linii SKOV-3 (ryc.

68 i 69). Ujawnione w niniejszym doświadczeniu zaangażowanie kaspaz wykonawczych w obserwowany proces śmierci komórek nowotworowych pod wpływem badanej frakcji D potwierdza indukcję apoptozy w komórkach HeLa i SKOV-3.



Ryc.68. Wpływ frakcji D na aktywność kaspaz wykonawczych 3 i 7 w hodowlach linii komórkowych HeLa po 24-godzinach inkubacji: *ctrl*- kontrola (1% metanol) (A), *FR* - frakcja D w stężeniach: 3 µg (B), 10 µg (C), 20 µg (D), 50 µg (E), 100 µg (F), G - procent komórek apoptotycznych w oparciu o aktywność kaspazy-3/7 w zależności od stężenia frakcji D.

* - różnice istotne statystycznie (test t-Studenta, $p < 0,05$, oprogramowanie Statistica)



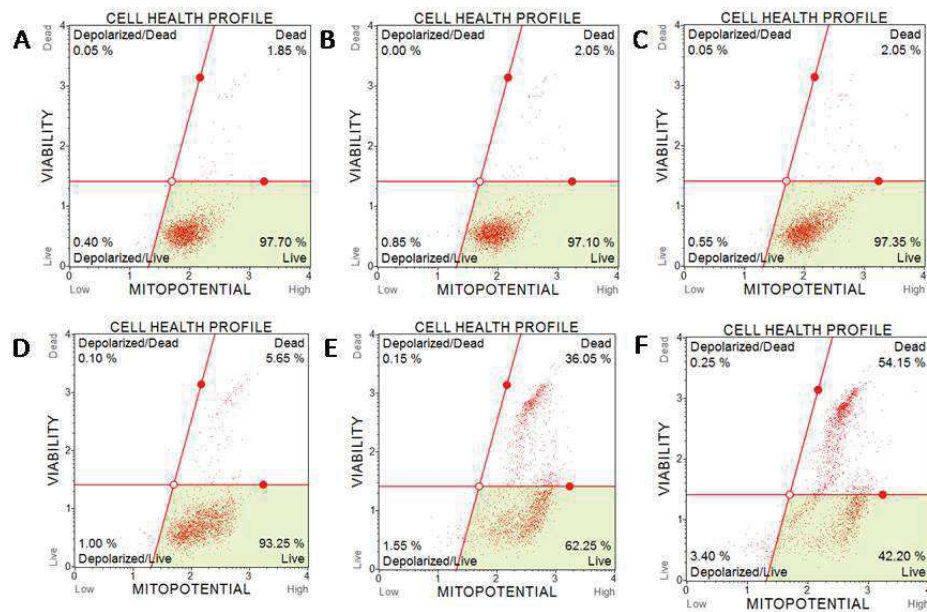
Ryc.69. Wpływ frakcji D na aktywność kaspaz wykonawczych 3 i 7 w hodowlach linii komórkowych SKOV-3 po 24-godzinach inkubacji: *ctrl*- kontrola (1% metanol) (A), *FR* - frakcja D w stężeniach: 3 µg (B), 10 µg (C), 20 µg (D), 50 µg (E), 100 µg (F), G - procent komórek apoptotycznych w oparciu o aktywność kaspazy-3/7 w zależności od stężenia frakcji D.

* - różnice istotne statystycznie (test t-Studenta, $p < 0,05$, oprogramowanie Statistica)

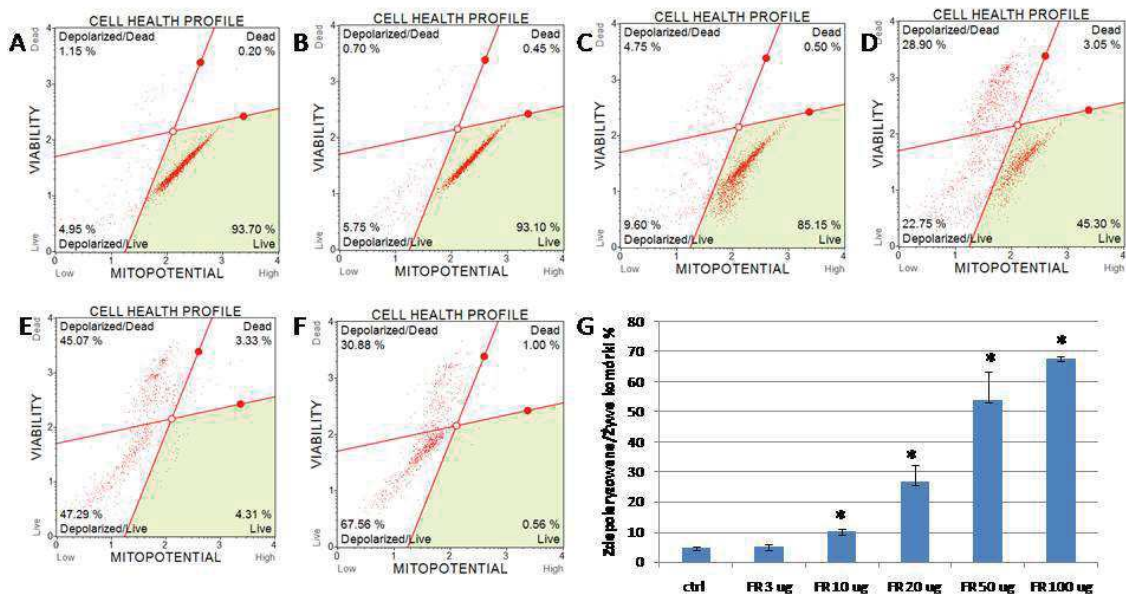
Kolejny etap oceny mechanizmów aktywności cytotoksycznej frakcji wyciągu metanolowego z nasion kozieradki (D) stanowiło określenie zmian błonowego potencjału mitochondrialnego w hodowli komórek HeLa i SKOV-3 pod wpływem 12-godzinnej inkubacji z różnymi stężeniami badanej frakcji (ryc. 70). Wskutek aktywacji wewnętrznego szlaku apoptozy dochodzi do spadku potencjału błony mitochondrium i wycieku cytochromu c do cytoplazmy [172, 519, 629]. W hodowli komórek raka szyjki macicy HeLa nie obserwowano zmian błonowego potencjału mitochondrialnego (ryc. 70). Natomiast w hodowli komórek gruczolaka jajnika stwierdzono zależne od dawki frakcji wyciągu metanolowego (D) zmiany błonowego potencjału mitochondrialnego, co dowodzi zaangażowania wewnętrznego szlaku apoptozy w śmierć komórek nowotworowych (ryc. 71).

W celu oceny udziału stresu oksydacyjnego w śmierci komórek nowotworowych w obecności różnych stężeń frakcji D, przeprowadzono pomiar poziomu reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species* - ROS) (ryc. 72 i 73). Wykazano, że pod wpływem inkubacji z badaną frakcją D z nasion *T. foenum-graecum* komórek HeLa i SKOV-3 wzrasta poziom wolnych rodników, co świadczy o występowaniu stresu oksydacyjnego, mogącego prowadzić do indukcji kaspazy-12 oraz wewnętrznego szlaku apoptozy [75, 172, 210, 519].

W wyniku eksperymentów przeprowadzonych z użyciem testu MTT oraz systemu RTCA ujawniono działanie cytotoksyczne badanych: frakcji wyciągu metanolowego (D), wyciągu 70% metanolu (A) i wyciągu wodnego (B) z nasion kozieradki pochodzenia krajowego oraz wybranych sapogenin steroidowych wobec linii komórek ludzkich nowotworów szyjki macicy (HeLa), gruczolaka jajnika (SKOV-3) oraz białaczki limfoblastycznej (MOLT-4). Wyznaczone stężenia aktywne spełniają wytyczne Amerykańskiego Narodowego Instytutu Raka (NCI) dotyczące wyciągów roślinnych klasyfikowanych jako aktywne cytotoksycznie ($IC_{50} < 20-30 \mu\text{g/ml}$). Jedynie stężenia wyciągu wodnego B oraz tigogeniny w badaniach z użyciem linii komórkowych HeLa nieznacznie przekraczają proponowany przez NCI zakres stężeń aktywnych i wynoszą odpowiednio: $35,6 \pm 3,69 \mu\text{g/ml}$ (tigogenina, MTT) oraz $31,45 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ (wyciąg B, RTCA).

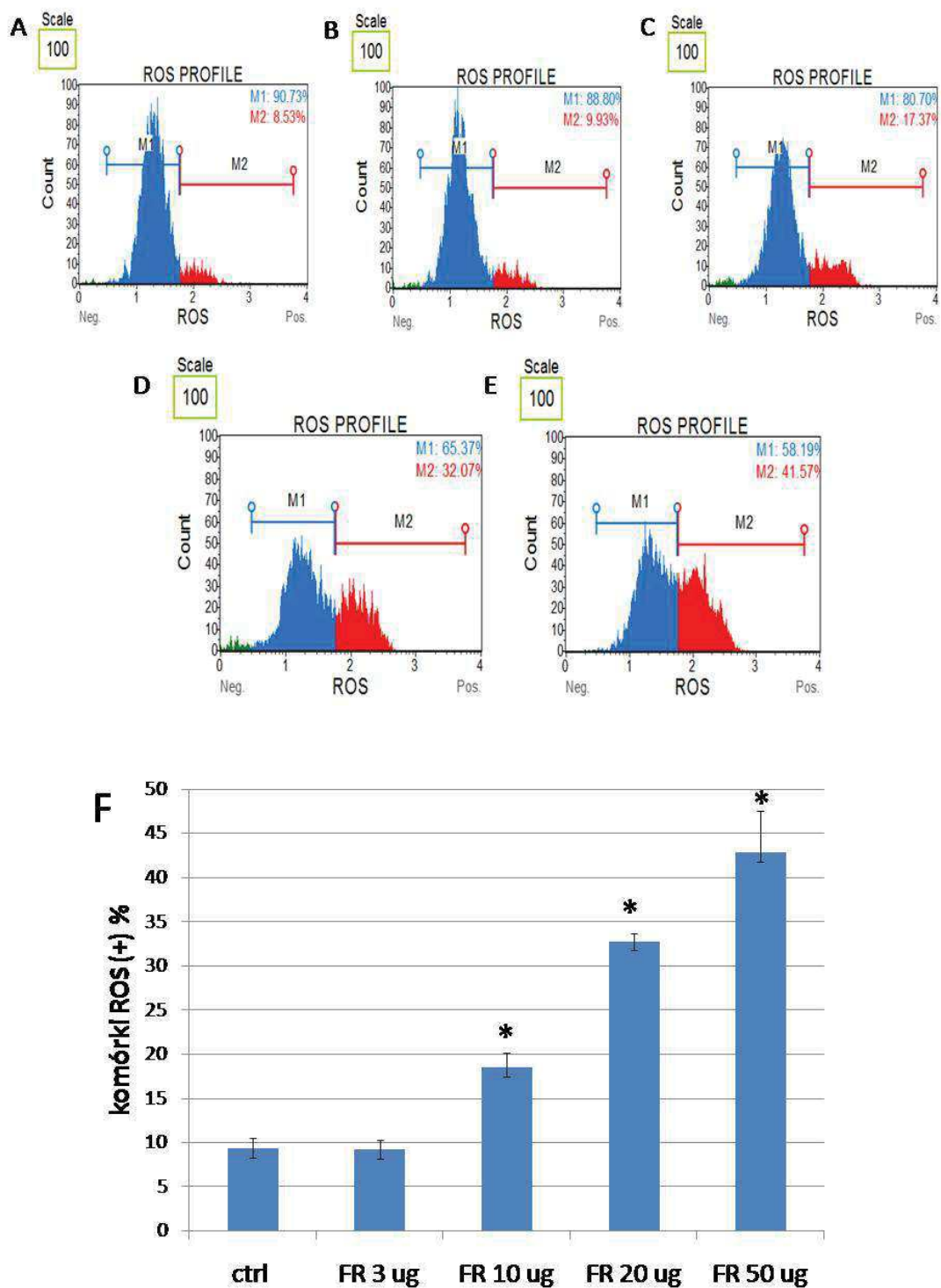


Ryc. 70. Wpływ frakcji D na błonowy potencjał mitochondrialny w hodowli linii komórkowej HeLa po 24 godzinach inkubacji: A - 1% metanol, B, C, D, E, F - stężenia frakcji D, odpowiednio 3 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 50 μ g, 100 μ g.



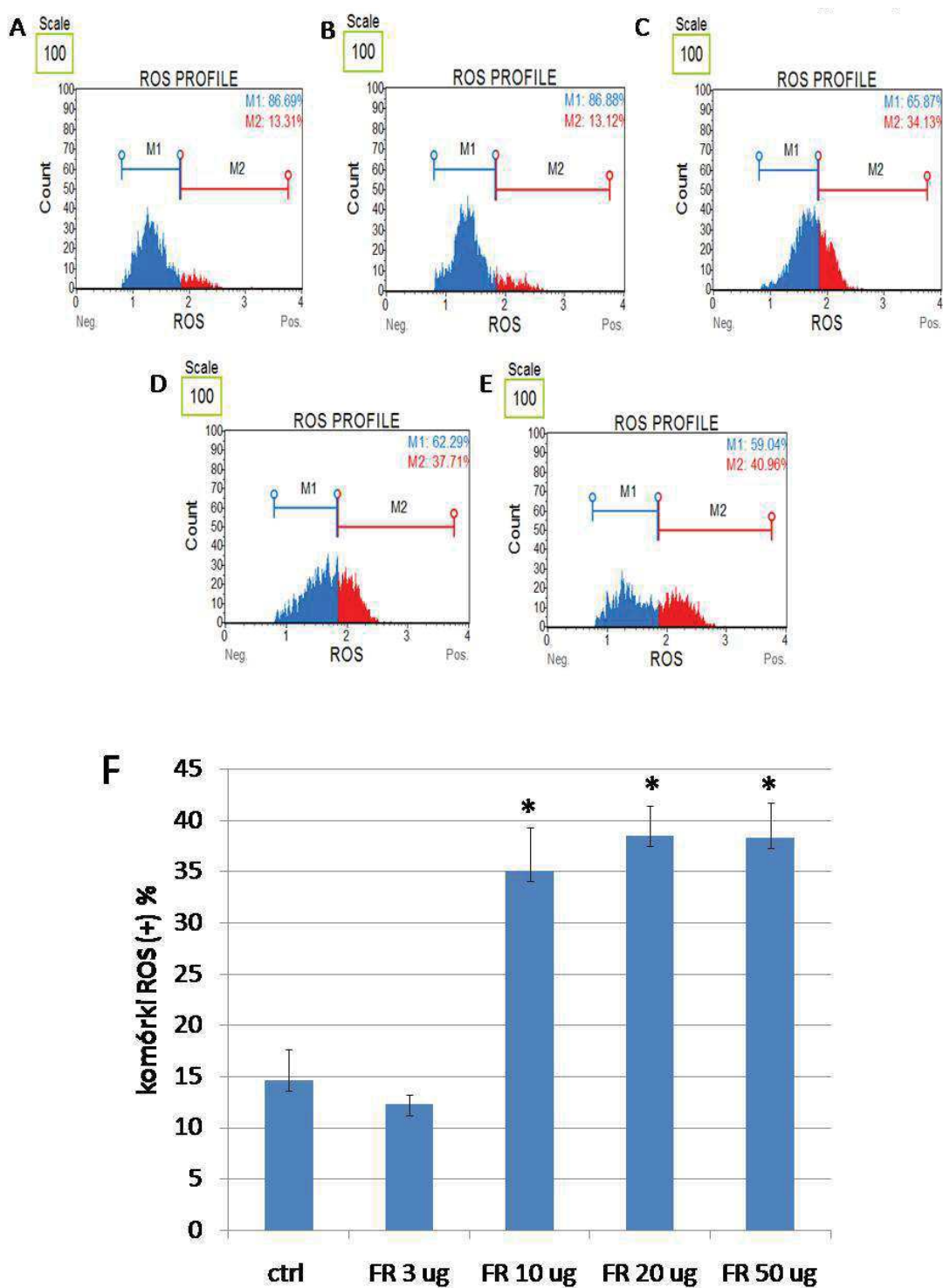
Ryc.71.Wpływ frakcji D na błonowy potencjał mitochondrialny w hodowli linii komórkowej SKOV-3 po 24 godzinach inkubacji: A - 1% metanol, B, C, D, E, F - stężenia frakcji D, odpowiednio 3 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 50 μ g, 100 μ g, G - zmiany błonowego potencjału mitochondrialnego w zależności od stężenia frakcji D.

* - różnice istotne statystycznie (test t-Studenta, $p < 0,05$, oprogramowanie Statistica)



Ryc.72. Wpływ frakcji D na poziom reaktywnych form tlenu (ROS,%) w hodowli linii komórkowych HeLa po 12-godzinach inkubacji z frakcją D: *ctrl*- kontrola (komórki traktowane 1% metanolem)(A), *FR* - frakcja D w stężeniach: 3 μ g (B), 10 μ g (C), 20 μ g (D), 50 μ g (E), F - wpływ stosowanych stężeń frakcji D na poziom reaktywnych form tlenu (ROS,%).

* - różnice istotne statystycznie (test t-Studenta, $p < 0,05$, oprogramowanie Statistica)



Ryc.73. . Wpływ frakcji D na poziom reaktywnych form tlenu (ROS,%) w hodowli linii komórkowych SKOV-3 po 12-godzinach inkubacji z frakcją D: *ctrl*- kontrola (komórki traktowane 1% metanolem) (A), *FR* - frakcja D w stężeniach: 3 μ g (B), 10 μ g (C), 20 μ g (D), 50 μ g (E), F - wpływ stosowanych stężeń frakcji D na poziom reaktywnych form tlenu (ROS, %).
* - różnice istotne statystycznie (test t-Studenta, $p < 0,05$, oprogramowanie Statistica)

Badane saponiny steroidowe, wyciąg 70% metanolu (A) i wyciąg wodny (B) oraz frakcja wyciągu metanolowego (D) z *Foenugraeci Semen* nie wykazują selektywnego działania wobec linii komórek nowotworowych HeLa, SKOV-3 i MOLT-4 w porównaniu do kontrolnej linii ludzkich keratynocytów HaCaT. W badaniach Stefanowicz-Hajduk i wsp. [517] saponiny z *Paris quadrifolia* wykazywały cytotoksyczność w stosunku do linii kontrolnej ludzkich keratynocytów HaCaT. Podobne rezultaty otrzymali Shabber i wsp. [491], wykazując aktywność cytotoksyczną diosgeniny zarówno wobec komórek nowotworów prostaty (DU-145, LNCaP, PC-3) jak i linii kontrolnej prawidłowych komórek epitelialnych gruczołu krokowego. Natomiast Al-Oqail i wsp. [25] obok aktywności cytotoksycznej ekstraktu eterowego z nasion kozieradki wobec linii komórkowych Hep-2 i MCF-7 obserwowali również jego działanie toksyczne wobec kontrolnych linii komórek. Z drugiej strony, według Shabber i wsp.[491], wyciąg z nasion *T. foenum-graecum*, w przeciwieństwie do diosgeniny, posiada selektywną aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworów prostaty (DU-145, LNCaP, PC-3) [491]. Również Alsemari i wsp. [31] ujawnili, że wyciąg metanolowy z nasion kozieradki wykazuje aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowych chłoniaka T-komórkowego, B-komórkowego, raka brodawkowego tarczycy (FRO) oraz raka sutka, bez wpływu na wzrost kontrolnej linii ludzkich limfocytów. Natomiast według Aktas i wsp. [20] wyciąg wodny z surowca był aktywny cytotoksycznie wobec linii ludzkiego raka szyjki macicy HeLa oraz raka prostaty szczurów Mat-LyLu, bez wpływu na kontrolną linię mysich fibroblastów 3T3 .

W rezultacie przeprowadzonych eksperymentów częściowo rozpoznano mechanizm działania proapoptotycznego frakcji D wobec linii komórkowych HeLa i SKOV-3, w który zaangażowane są kaspazy 3 i 7, a apoptoza prawdopodobnie zachodzi w rezultacie pobudzenia tzw. wewnętrznego szlaku apoptozy, prowadzącego m.in. do zmian potencjału mitochondrialnego komórek (linia komórkowa SKOV-3) i wzrostu poziomu wolnych rodników (stres oksydacyjny) (linie komórkowe HeLa i SKOV-3).

Otrzymane wyniki stanowią uzupełnienie dotychczasowych danych w zakresie aktywności cytotoksycznej *Foenugraeci Semen* oraz jej wybranych związków czynnych, szczególnie wobec linii komórek gruczolakoraka jajnika SKOV-3 oraz białaczki limfoblastycznej MOLT-4. W rezultacie przeprowadzonych eksperymentów po raz pierwszy ujawniono działanie proapoptotyczne nasion kozieradki oraz badanych saponin steroidowych wobec linii komórkowych SKOV-3 i MOLT-4, przy czym przedstawione wyniki są pierwszymi danymi o aktywności cytotoksycznej jamogeniny i esmilageniny oraz uzupełnieniem doniesień o aktywności cytotoksycznej tigogeniny.

Uwzględniając fakt rozpadu saponin steroidowych do aglikonów po podaniu *per os* [478], badania nad aktywnością cytotoksyczną wolnych sapogenin będą kontynuowane, szczególnie w zakresie nowotworów przewodu pokarmowego.

2. Omówienie wyników badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Dane literaturowe dotyczące aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągów z nasion kozieradki są zróżnicowane. Wielu autorów potwierdza działanie przeciwbakteryjne ekstraktów alkoholowych wobec licznych patogenów [10, 279, 410, 473, 487, 506, 544], podczas gdy inni ujawniają oporność badanych szczepów bakteryjnych wobec wyciągów alkoholowych z *T. foenum-graecum* [33, 402, 473]. Celem prowadzonych w niniejszej pracy badań była ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągów z nasion *T. foenum-graecum* pochodzenia krajowego oraz wybranych związków czynnych z grupy sapogenin steroidowych, C-glikozydów flawonowych i alkaloidów jako składników kozieradki. Działanie przeciwdrobnoustrojowe analizowano poprzez wyznaczenie wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (*Minimal Inhibition Concentration - MIC*) oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego (*Minimal Bactericidal Concentration - MBC*) po 24 godzinach inkubacji z badanymi wyciągiem/frakcją/związkiem. Badania prowadzono wobec 7 szczepów bakterii Gram(-): *Helicobacter pylori* ATCC 43504, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella enteritica* ATCC 13076, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris* NCTC 4635, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9077 oraz 1 szczepu bakterii Gram(+): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Do badań przeznaczono wyciągi: 70% metanolu (A), wodny (B), metanolowy (C), frakcję wyciągu metanolowego (D) z nasion *T. foenum-graecum* oraz 9 związków naturalnych, pochodzenia roślinnego, wcześniej identyfikowanych w surowcu: witeksynę, izowiteksynę, orientynę, wiceninę-2 i wiceninę-3 (C-glikozyloflawony), diosgeninę, sarsasapogeninę i tigogeninę (sapogeniny steroidowe) oraz trygonelinę (alkaloid).

Wyciągi A, B i C badano w zakresie stężeń 0,05-12,5 mg/ml, frakcję D w zakresie stężeń 0,014-28,25 mg/ml, natomiast związki naturalne w zakresie stężeń 0,00095-0,25 mg/ml, z wyjątkiem trygoneliny, której aktywność przeciwdrobnoustrojową analizowano w zakresie stężeń 0,002-0,5 mg/ml. Jako kontrolę stosowano metanol w stężeniach 0,07-17,5%. Udowodniono, że w zakresie stosowanych stężeń metanol nie ma wpływu na wzrost *Staphylococcus aureus*,

Salmonella enteritidis, *Salmonella enteritica*, *Helicobacter pylori* i *Escherichia coli*. Natomiast wykazuje aktywność bakteriostatyczną wobec *Shigella flexneri* w stężeniu 12,5% oraz wobec *Proteus vulgaris* w stężeniu 6,25%.

Interesującą częścią prowadzonych badań była ocena wpływu przetworów z surowca i badanych związków na wzrost *Helicobacter pylori* - patogenu uznawanego za jedną z głównych przyczyn rozwoju choroby wrzodowej żołądka [169] oraz czynnik etiologiczny nowotworu żołądka [70, 169, 211]. Dotychczas w badaniach wykorzystano różne szczepy *H. pylori* [317, 405, 611], w tym również użyty w niniejszej pracy szczep ATCC 43504. Li i wsp. [317] ocenili wpływ 10% wyciągów wodnych (AE) i alkoholowych (EE) z nasion kozieradki na wzrost *H. pylori*, a wyznaczone wartości MIC wynosiły >100 µg/ml (AE) oraz 100 µg/ml (EE), odpowiednio. Zaidi i wsp. [611] badając ekstrakt otrzymany z użyciem 70% etanolu, wykazali całkowite zahamowanie wzrostu szczepu referencyjnego ATCC 43504 oraz 7 izolatów klinicznych, w stężeniu 500 µg/ml. Natomiast całkowity brak aktywności przeciwdrobnoustrojowej i antyadhezyjnej wyciągu wodnego z nasion kozieradki wobec szczepów referencyjnych *H. pylori* NCTC 11637 oraz szeregu izolatów klinicznych ujawnili inni autorzy [405, 584]. Wykazano zdolność hamowania ureazy przez ekstrakt z nasion kozieradki, otrzymany z użyciem 80% metanolu - IC₅₀ 523,74 µg/ml [73].

Spośród analizowanych w niniejszej pracy wyciągów: 70% metanolu (A), wodnego (B), metanolowego (C) i frakcji wyciągu metanolowego (D) z nasion *T. foenum-graecum*, najsilniejszą aktywnością wobec *H. pylori* ATCC 43504 charakteryzował się otrzymany z użyciem 70% metanolu wyciąg A, dla którego wartość MIC wynosiła 0,27 mg/ml i była niemal dwukrotnie niższa w porównaniu do wyników otrzymanych wcześniej przez Zaidi i wsp. [611] oraz dwukrotnie wyższa w porównaniu do MIC w badaniach Li i wsp. [317]. Frakcja wyciągu metanolowego (D) ujawniła działanie bakteriostatyczne w stężeniu 0,88 mg/ml (MIC). Znacznie słabszy wpływ na wzrost patogenu posiadał wyciąg metanolowy (C) (MIC 12,5 mg/ml). Natomiast wyciąg wodny B (o najniższej zawartości badanych związków) był nieaktywny wobec *H. pylori*. Obserwowane różnice w działaniu wobec patogenu można uznać za związane z wysokimi zawartościami C-glikozydów flawonowych. Jakkolwiek najbogatsza w C-glikozyloflawony i saponiny steroidowe frakcja wyciągu metanolowego (D), ujawniła działanie wobec *H. pylori* w stężeniu ok. 3-krotnie wyższym niż zawierający mniej C-glikozyloflawonów wyciąg 70% metanolu (A). Natomiast wyciąg metanolowy (C) zawierał ponad 3-krotnie mniej C-glikozyloflawonów niż wyciąg 70% metanolu A. Wyniki otrzymane dla wyciągu B są potwierdzeniem braku aktywności ekstraktów wodnych [405, 584], co w świetle rezultatów analizy fitochemicznej przeprowadzonej w niniejszej pracy, może być związane z najniższą

zawartością C-glikozyloflawonów. Brak aktywności wyciągów wodnych potwierdzono również w innych pracach [317, 405, 584].

Wyciągi wodne z nasion *T. foenum-graecum* stosowane są pomocniczo w leczeniu choroby wrzodowej żołądka ze względu na wysoką zawartość polisacharydów, tworzących wokół niszy wrzodowej warstwę ochronną, umożliwiającą proces gojenia [528]. Efekt cytoprotekcyjny wyciągów wodnych z nasion kozieradki potwierdzono w eksperymentalnych modelach *in vivo* choroby wrzodowej żołądka u szczurów [51, 528, 547]. Dodatkowo w wyniku aplikacji ekstraktów wodnych obserwowano zmniejszenie wydzielania pepsyny i soku żołądkowego w stopniu porównywalnym z omeprazolem [528]. Jednak w świetle wyników uzyskanych w niniejszej pracy oraz otrzymanych przez innych autorów [317, 405, 584], w planowaniu terapii należałoby uwzględnić fakt, że wyciągi wodne są nieaktywne wobec *Helicobacter pylori*. Jako osłaniające mogą więc stanowić element skojarzonego leczenia wspomagającego, obejmującego leki o działaniu bakteriobójczym wobec tego patogenu. Z drugiej strony, większą skutecznością może charakteryzować się terapia prowadzona w użyciu wyciągów alkoholowych lub wodno-alkoholowych, wykazujących działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec *Helicobacter pylori*, co potwierdzają dane literaturowe [317, 611] oraz badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy (tab.25)

Stosunkowo wysoką aktywnością przeciwdrobnoustojową wobec *Helicobacter pylori* na tle badanych wyciągów, frakcji oraz związków, wyróżniały się 8-C-glukozyloflawony - witeksyna i orientyna. Witeksyna ujawniła najsilniejsze działanie bakteriobójcze wobec *H. pylorii*, którego wartość MBC wynosiła 0,03 mg/ml. Natomiast orientyna wykazywała działanie bakteriostatyczne w stężeniu 4-krotnie wyższym (MIC 0,125 mg/ml). W badaniach *in vitro* udowodniono, że związki fenolowe, obecne w wyciągach z nasion kozieradki posiadają zdolność zmiatania wolnych rodników oraz ograniczenia uwalniania reaktywnych form tlenu (ROS) z błony śluzowej jelit, objętej stanem zapalnym [305]. Ponadto zaburzają aktywność ureazy i stymulują niekorzystny dla *H. pylori* wzrost kwasowości środowiska [450]. Obserwowana aktywność ulega nasileniu wraz ze wzrostem stężenia fenoli w ekstrakcie [451]. Zdolność hamowania aktywności ureazy w badaniach *in vitro* ujawniono dla orientyny, witeksyny i jej 2"-O-ramnozydu [429]. Natomiast badania szeregu frakcji wyciągu etanolowego z *Piper carpunya* Ruiz & Pav. wykazały, że najsilniejszą aktywnością bakteriobójczą wobec *H. pylori* (MBC 6,25 µg/ml) charakteryzowała się frakcja zawierająca witeksynę, izowiteksynę, 4"-O-metylo-2"-O-ramnozylowiteksynę i 4',7-di-O-metylowiteksynę obok innych związków o właściwościach przeciwtleniających [443]. Autorzy sugerują, że obserwowany efekt przeciwdrobnoustrojowy wynika bezpośrednio z obecności

Szczep bakterii	orientyna		witeksyna		izowiteksyna		wicenina-2		wicenina-3		trygonelina	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,0625	-	0,0625	-	0,125	-	0,125	-	0,125	-	0,5	-
<i>Shigella flexneri</i>	0,0625	-	0,0625	-	0,0625	-	0,125	-	0,125	-	0,0625	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	0,125	-	0,0625	-	0,125	-	0,0625	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0625	0,125	0,125	0,125	0,0625	0,125	0,125	-	0,125	0,25	0,25	0,5
<i>Helicobacter pylori</i>	0,125	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-

- nie badano

Tab.24. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa (MIC, MBC [mg/ml]) C-glikozyloflawonów i trygoneliny.

Szczep bakterii	diosgenina		octan tigogeniny		sarsasapogenina		wyciąg A		wyciąg B		wyciąg C		frakcja D	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,0625	0,25	0,125	-	0,0625	-	12,5	-	x	x	6,25	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28,25	-
<i>Shigella flexneri</i>	0,0625	-	0,125	-	0,0625	-	x	x	x	x	3,125	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,125	0,125	0,0625	0,125	0,125	-	x	x	x	x	3,125	6,25	0,44	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	1,09	-	x	x	1,6	-	14,125	28,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x	6,25	6,25	14,125	28,25
<i>Helicobacter pylori</i>	-	0,125	-	0,0625	-	0,0625	0,27	-	-	-	12,5	12,5	0,88	-

- nie badano

x - brak aktywności

Tab.25. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa (MIC, MBC [mg/ml]), sapogenin steroidowych, wyciągów 70% metanolu (A), wodnego (B), metanolowego (C) oraz frakcji wyciągu metanolowego (D) z nasion kozieradki

związków flawonoidowych [443]. Wyniki niniejszej pracy po raz pierwszy wskazują na działanie bakteriobójcze witeksyny wobec *H. pylori*.

Interesującą częścią badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej była ocena aktywności przeciwbakteryjnej saponin steroidowych wobec *H. pylori*. Analizowane saponiny wykazały działanie bakteriobójcze na bardzo niskim poziomie wartości MBC 0,0625 mg/ml dla tigogeniny i sarsasapogeniny oraz MBC 0,125 mg/ml dla diosgeniny. Otrzymane wyniki stanowią pierwsze doniesienia o aktywności przeciwbakteryjnej wobec *Helicobacter pylori* wymienionych saponin steroidowych. Badane aglikony steroidowe różnią się również siłą hamującego wpływu na wzrost *Helicobacter pylori*: wyznaczone wartości MIC dla sarsasapogeniny i tigogeniny wynoszą 0,0625 mg/ml, podczas gdy dla diosgeniny wartość MIC jest dwukrotnie wyższa i wynosi 0,125 mg/ml.

Obserwowano zróżnicowaną wrażliwość badanych szczepów bakteryjnych na działanie wyciągów i frakcji z nasion kozieradki oraz związków wzorcowych. Wyciąg metanolowy (C) oraz frakcja wyciągu metanolowego (D) były aktywne wobec większej liczby drobnoustrojów (6 i 5, odpowiednio) w porównaniu do wyciągu 70% metanolu (A) (3). W badaniach wobec użytych szczepów bakterii Gramm(+) i Gramm(-) wyciąg wodny B był nieaktywny (tab. 25).

Wyciąg otrzymany z użyciem 70% metanolu (A) był aktywny, poza *H. pylori*, jedynie wobec *Salmonella enteritidis* i *Proteus vulgaris*, ujawniając działanie bakteriostatyczne z wartościami MIC odpowiednio 12,5 mg/ml i 1,09 mg/ml, przy czym szczepy *H. pylori* (MIC 0,27 mg/ml) i *P. vulgaris* (1,09 mg/ml) wyróżniała największa wrażliwość na działanie ekstraktu A (tab. 25). Aktywność bakteriostatyczna wobec wywołującego zakażenia układu moczowego szczepu *P. vulgaris* była zbliżona do aktywności wyciągu metanolowego (C) (MIC 1,6 mg/ml). Natomiast w stosunku do *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* ekstrakt A był nieaktywny (tab. 25).

Wyciąg metanolowy (C) z nasion kozieradki ujawnił działanie bakteriostatyczne wobec wszystkich badanych szczepów bakteryjnych w zakresie wartości MIC od 1,6 mg/ml (*P. vulgaris*) do 12,5 mg/ml (*H. pylori*) (tab. 25). Wyciąg C charakteryzował się jako jedyną aktywnością bakteriobójczą wobec *H. pylori* (MBC 12,5) spośród badanych wyciągów i frakcji z nasion kozieradki. Zarówno w przypadku wyciągu 70% metanolu (A), jak i wyciągu metanolowego (C) udowodniono, że na obserwowane działanie przeciwbakteryjne wobec *P. vulgaris* nie ma wpływu rozpuszczalnik - metanol, który w

użytym stężeniu 3,125% nie wykazywał aktywności bakteriostatycznej ani bakteriobójczej wobec badanego szczepu. Wobec *S. aureus* wyciąg C ujawnił aktywność bakteriostatyczną w stężeniu 3,125 mg/ml, natomiast bakteriobójczą - w stężeniu 6,25 mg/ml. Wartość MIC wyznaczona dla wyciągu C wobec *H. pylori* wyniosła 12,5 mg/ml.

Analizowana frakcja wyciągu metanolowego z nasion kozieradki (D) ujawniła aktywność bakteriostatyczną, obok *Helicobacter pylori*, wobec *Salmonella enteritica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, a wyznaczone wartości MIC wynosiły od 14,25 mg/ml do 28,25 mg/ml, przy wielokrotnie niższej wartości MIC dla *H. pylori* (MIC 0,88 mg/ml). Wyjątek stanowi wywołujący ropne zakażenia skóry szczep *Staphylococcus aureus*, który był najbardziej wrażliwym szczepem wobec frakcji D z wartością MIC 0,44 mg/ml, dwukrotnie niższą od MIC wobec *H. pylori* (0,88 mg/ml). Uwzględniając wykazaną aktywność bakteriobójczą wobec *Staphylococcus aureus* badanych sapogenin (diosgeniny i tigogeniny - MBC 0,125 mg/ml) oraz C-glikozyloflawonów (witeksyny, izowiteksyny, orientyny - MBC 0,03 mg/ml i wiceniny-3 - MBC 0,25 mg/ml), najsilniejszy efekt przeciwdrobnoustrojowy frakcji wyciągu metanolowego (D) spośród badanych wyciągów można wiązać z najwyższą zawartością tych związków we frakcji D. W świetle uzyskanych wyników, spośród badanych drobnoustrojów, szczep *Helicobacter pylori* wykazuje największą wrażliwość na składniki badanej frakcji D w porównaniu do pozostałych badanych drobnoustrojów (tab. 25).

Badane **C-glikozyloflawony** charakteryzowała aktywność bakteriostatyczna obok *H. pylori*, w stosunku do trzech szczepów bakterii Gramm(-): *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri* (wywołujących nieżyty przewodu pokarmowego), *Escherichia coli* oraz wobec Gramm(+): *Staphylococcus aureus* (tab. 24).

Wartości minimalnego stężenia hamującego dla mono-C-glikozyloflawonów (orientyny, witeksyny i izowiteksyny) wobec *Shigella flexneri* były identyczne i wynosiły 0,0625 mg/ml, natomiast dla di-C-glikozydów (wiceniny-2 i wiceniny-3) - 0,125 mg/ml.

W zakresie aktywności wobec *Salmonella enteritidis* obserwowano, że orientyna i witeksyna (MIC 0,0625 mg/ml) działały dwukrotnie silniej niż izowiteksyna, wicenina-2 i wicenina-3 (MIC 0,125 mg/ml) (tab. 24).

Szczep *Escherichia coli* charakteryzowała większa wrażliwość na C-glikozydy apigeniny, zawierające glukozę w pozycji C-6 (izowiteksyna i wicenina-3, MIC 0,0625 mg/ml) w porównaniu do zawierających glukozę przy atomie węgla C-8 apigeniny (witeksyna, wicenina-2, MIC 0,125 mg/ml). Należy podkreślić, że wyciągi A (70%

metanolu), C (metanolowy) i frakcja D wyciągu metanolowego oraz sapogeniny nie były aktywne wobec tej bakterii.

Aktywność bakteriostatyczna badanych C-glikozydów flawonowych wobec bakterii Gramm(+) - *Staphylococcus aureus* była zbliżona (MIC 0,125 mg/ml), z wyjątkiem orientyny i izowiteksyny, które działały dwukrotnie silniej (MIC 0,0625 mg/ml). Orientyna, witeksyna, izowiteksyna i wicenina-3 ujawniły również działanie bakteriobójcze wobec *S. aureus*. Wartość MBC dla mono-C-glukozydów apigeniny i luteoliny wyniosła 0,125 mg/ml. Natomiast spośród dwóch badanych di-C-glikozydów apigeniny (wicenina-2, wicenina-3), jedynie 6-C-glukozylo-8-C-ksylozyd apigeniny (wicenina-3) wykazywał działanie bakteriobójcze wobec *S. aureus*, dwukrotnie słabsze w porównaniu do mono-C-glukozydów (MBC 0,25 mg/ml).

Dotychczas, działanie przeciwdrobnoustrojowe witeksyny wyizolowanej z *Plagiomnium affine* potwierdzono w stosunku do *Proteus mirabilis* [56]. Natomiast orientyna w połączeniu z witeksyną i flawonoidami wyizolowanymi z *Ocimum sanctum* hamowała wzrost *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii*, *Klebsiella pneumoniae*, podczas gdy pojedyncze związki charakteryzowała niska aktywność [28].

Alkaloid **trygonelina** ujawnił działanie hamujące wzrost *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri* oraz *Staphylococcus aureus*, a siła działania, wyrażona wartością MIC kształtowała się następująco: *Shigella flexneri* (MIC 0,0625 mg/ml) > *Staphylococcus aureus* (MIC 0,25 mg/ml) > *Salmonella enteritidis* (MIC 0,5 mg/ml). Z danych literaturowych wynika, że trygonelina dodana do wyciągu wodnego z liści *Coffea arabica*, wraz z kofeiną, kwasem kawowym i protokatechowym, znacząco zwiększa siłę działania przeciwko *Streptococcus mutans* [30]. Potwierdzono również antybakteryjną aktywność alkaloidu m.in. wobec *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* [628].

W toku badań ujawniono działanie przeciwdrobnoustrojowe **sapogenin steroidowych** w stosunku do szczepów *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* oraz *Helicobacter pylori* (tab. 25).

Diosgenina i sarsasapogenina charakteryzują się dwukrotnie silniejszym wpływem hamującym na wzrost bakterii Gramm(-): *Shigella flexneri* (MIC 0,0625 mg/ml) i *Salmonella enteritidis* (MIC 0,0625 mg/ml) w porównaniu do ich aktywności wobec bakterii Gramm(+): *Staphylococcus aureus* (MIC 0,125 mg/ml). Ponadto diosgenina i tigogenina ujawniły aktywność bakteriobójczą wobec *S. aureus* (MBC 0,25 mg/ml i 0,125 mg/ml, odpowiednio). Tigogenina wykazała dwukrotnie silniejszą

aktywność wobec *Staphylococcus aureus* (MIC 0,0625 mg/ml) oraz dwukrotnie słabszą wobec *Shigella flexneri* i *Salmonella enteritidis* (MIC 0,125 mg/ml) w porównaniu do diosgeniny i sarsasapogeniny.

Dotychczas brakuje doniesień literaturowych dotyczących aktywności przeciwbakteryjnej wolnych sapogenin steroidowych. W badaniu szeregu matryc roślinnych udowodniono natomiast aktywność przeciwdrobnoustrojową ich glikozydowych form - saponin steroidowych wobec różnych szczepów bakteryjnych [150, 333, 334, 442, 615].

Otrzymane wyniki badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej przetworów z *Foenugraeci Semen* oraz pojedynczych związków chemicznych z grupy C-glikozydów flawonowych oraz sapogenin steroidowych i alkaloidów potwierdziły, że szczepem o szczególnej wrażliwości na składniki nasion kozieradki jest *Helicobacter pylori*. Po raz pierwszy wskazano na aktywność hamującą wzrost *H. pylori* orientyny oraz bakteriobójczą witeksyny, diosgeniny, tigogeniny i sarsapogeniny.

WYNIKI I WNIOSKI

Badaniami objęto nasiona kozieradki pospolitej *Trigonella foenum-graecum* L. (*Fabaceae*) pochodzenia krajowego, otrzymane od trzech producentów (firmy zielarskie Lewandowski, Flos, Kawon), których skład porównano w zakresie C-glikozyloflawonów i saponin steroidowych z surowcem pochodzenia tureckiego i afrykańskiego. Natomiast w zakresie aktywności biologicznej oceniano efekt cytotoksyczny i przeciwdrobnoustrojowy wyciągów i frakcji z nasion kozieradki.

1. Opracowano warunki analizy C-glikozyloflawonów, optymalizując parametry ekstrakcji tych związków z surowca oraz warunki separacji metodami 1D LC i 2D LC - LC-LC *off-line/on-line*, LCxLC *off-line/on-line*.
2. Wykazano, że spośród zastosowanych metod ekstrakcji (ekstrakcja w klasycznym aparacie Soxhleta, ekstrakcja w automatycznym aparacie Soxhleta, maceracja, ekstrakcja z użyciem mieszadła magnetycznego, sonikacja, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem) najbardziej wydajnym było wytrawianie z użyciem mieszadła magnetycznego i 70% metanolu jako ekstrahentu (2 x 3 h, 2 x 100ml, temp. 60°C).
3. Zoptymalizowano parametry rozdzieleń 1D HPLC C-glikozydów flawonowych oraz izoflawonów stosując: kolumnę Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 µm) oraz elucję gradientową o złożonym profilu gradientu, obejmującą elucję izokratyczną oraz liniowy wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) od 16% do 70% w 0,1% TFA w zakresie (t_G 70 minut). Uzyskano rozdzielenie mieszaniny 7 wzorcowych C-glikozyloflawonów, 5 wzorcowych izoflawonów oraz 15 C-glikozyloflawonów, stanowiących związki czynne wyciągu metanolowego z *Foenugraeci Semen*. Wykazano, że w warunkach rozdzieleń 1D HPLC nie jest możliwa separacja wszystkich związków flawonoidowych zespołu nasion kozieradki. Ponadto w surowcu krajowym nie wykazano obecności izoflawonów, charakterystycznych dla niektórych nasion kozieradki pochodzenia azjatyckiego.
4. Opracowano systemy 2D LC - LC-LC *off-line/on-line*, LCxLC *off-line/on-line*, umożliwiające rozdzielenie i identyfikację związków flawonoidowych, obecnych w wyciągu metanolowym z nasion kozieradki pospolitej.

- A.** Rozdzielenia w opracowanym systemie *comprehensive* (LCxLC) umożliwiły separację 17 z 20 C-glikozyloflawonów. Rozdzielenia w ¹D prowadzono na kolumnie Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm), natomiast w ²D na kolumnie Discovery HS C-18 (75 mm x 2,1 mm x 3 μm) z użyciem elucji gradientowej, charakteryzującej się w ¹D złożonym profilem gradientu, obejmującym elucję izokratyczną i liniowy wzrost stężenia mieszaniny metanol:ACN:woda:TFA (330:40:80:0,45, v/v/v) od 43% do 90% w 0,1% wodnym TFA (t_G 47 minut), natomiast w ²D gradientem skokowym obejmującym wzrost mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) od 26% do 55% w 0,1% TFA. W systemie LCxLC *on-line* użyto dzielnik strumienia (stosunek 1:1), umożliwiającą obniżenie natężenia przepływu fazy ruchomej w ²D (0,23 ml/min).
- B.** Całkowite rozdzielanie C-glikozyloflawonów nasion kozieradki otrzymano, w opracowanych warunkach separacji w systemie LC-LC *off-line* - w ¹D systemu LC-LC rozdzielanie prowadzono na kolumnie Sphinx C-18-Phenyl (100 mm x 1 mm x 5 μm) w warunkach elucji gradientowej, charakteryzującej się złożonym profilem gradientu, obejmującym elucję izokratyczną oraz liniowy wzrost stężenia od 40% do 60% mieszaniny rozpuszczalników metanol:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA (t_G 15 minut), natomiast w ²D C-glikozyloflawony obecne w 9 frakcjach otrzymanych z ¹D rozdzielano na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm) w eksperymentalnie dobranych dla każdej frakcji warunkach elucji izokratycznej i fazach ruchomych o różnych stężeniach mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA (20%, 23%, 30%, 32%, 35%, 45%, 50%).
- C.** W warunkach opracowanych metod analizy 1D LC oraz 2D LC (LC-LC *off-line*, LCxLC *off-line/on-line*) z użyciem detektorów DAD oraz MS rozpoznano w nasieniu kozieradki obecność następujących C-glikozyloflawonów: witeksyny, izowiteksyny, orientyny, izorientyny, wiceniny-1, wiceniny-2, wiceniny-3, szaftozydu i izoszaftozydu, di-C-(6/8)-heksozylo-pentozydu apigeniny, di-C-(6/8)-pentozydów apigeniny, mono-C-glikozydu apigeniny, estrów p-kumarowych witeksyny i izowiteksyny oraz estrów p-kumarowych orientyny i izorientyny. Obecność wiceniny-3 oraz izoszaftozydu ujawniono wobec wzorców w surowcu po raz pierwszy.

- D.** Opracowane metody 2D LC mogą być przydatne w analizie składu chemicznego nasion kozieradki różnego pochodzenia oraz w identyfikacji C-glikozyloflawonów w innych matrycach roślinnych.
- 5.** Do celów analizy ilościowej C-glikozyloflawonów opracowano zwalidowaną metodę LC-LC *on-line*, stanowiącą modyfikację opracowanej metody LC-LC *off-line*. W ¹D i ²D stosowano kolumny Kinetex C-18 o tej samej długości i różnej średnicy, odpowiednio: w ¹D Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm) oraz w ²D Kinetex C-18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μm). Rozdzielenia w ¹D prowadzono w warunkach elucji gradientowej, zoptymalizowanych dla rozdzielenia 1D HPLC (złożony profil gradientu, obejmujący elucję izokratyczną oraz liniowy wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) od 16% do 70% w 0,1% TFA - t_G 70 minut). Natomiast separację nierozdzielonego zespołu związków flawonowych z ¹D uzyskano w ²D w warunkach elucji izokratycznej przy stężeniu 23% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1 v/v/v) w 0,1% TFA.
- Oznaczona zawartość C-glikozyloflawonów wynosiła 14,409 ± 0,26 mg/g surowca. Związkami obecnymi w nasionach kozieradki w najwyższym stężeniu były: izowiteksyna (związek 8) (2,508 ± 0,50 mg/g), obok wiceniny-1 (związek 2) (1,912 ± 0,15 mg/g) oraz obecnej w nieco niższym stężeniu witeksyny (związek 6) (1,782 ± 0,09 mg/g). Natomiast w mniejszych ilościach występowały: izoorientyna (związek 3a) (1,307 ± 0,61 mg/g), izoszaftozyd (związek 4a) (1,120 ± 0,46 mg/g) i orientyna (związek 3b) (0,994 ± 0,40 mg/g).
- 6.** W oparciu o analizy LC-DAD-ESI-MS wykazano różnice jakościowe w zespołach C-glikozydów flawonowych w surowcu krajowym w porównaniu do surowców pochodzenia afrykańskiego i tureckiego, w których ujawniono obecność 4 dodatkowych związków flawonowych, przypuszczalnie dwóch di-C-(6/8)-heksozydów apigeniny oraz dwóch di-C-(6/8)-heksozylo-pentozydów apigeniny.
- 7.** Opracowano warunki analizy zespołu saponin steroidowych w nasionach kozieradki, optymalizując procedurę ekstrakcji, hydrolizy kwasowej i separacji metodą TLC z analizą densytometryczną sapogeniny - diosgeniny oraz optymalizując warunki rozdzielenia saponin steroidowych metodą HPLC w sprzężeniu z detektorami ELSD i MS.
- A.** Analizę diosgeniny metodą TLC prowadzono w wyciągu metanolowym, otrzymanym w wyniku trójstopniowej, wyczerpującej ekstrakcji w aparacie

Soxhleta, obejmującej kolejno eter naftowy, chloroform i metanol, który następnie poddano hydrolizie kwasowej z użyciem 2M wodnego roztworu kwasu siarkowego (VI) (2 h, temp. 80°C). Jako optymalne parametry separacji zastosowano: płytki chromatograficzne HPTLC Si 60_{F254}, mieszaninę heptan:octan etylu (7:3, v/v) jako fazę ruchomą oraz jako odczynnik wywołujący roztwór aldehydu anyżowego o zmodyfikowanym składzie. Zawartość diosgeniny oznaczona w surowcu krajowym w warunkach zwalidowanej metody TLC wyniosła 0,12% - Lewandowski i Kawon oraz 0,13% - Flos.

- B.** Po raz pierwszy w separacji saponin steroidowych z nasienia kozieradki metodą HPLC zastosowano dwie połączone szeregowo kolumny Discovery C-18 (150 mm x 2,1 mm x 3 μm). Rozdzielenia prowadzono z zastosowaniem eksperymentalnie dobranego programu elucji gradientowej, charakteryzującego się liniowym wzrostem stężenia mieszaniny ACN:kwas mrówkowy (99,9:0,1, v/v) od 20% do 100% w 0,1% kwasie mrówkowym (t_G 90 minut).
- C.** W opracowanych warunkach analiz HPLC-ELSD-ESI-MS w badanym materiale roślinnym zidentyfikowano w oparciu o otrzymane widma MS 26 saponin furostanowych, spośród których 24 przypisano struktury chemiczne wcześniej identyfikowanych w *Foenugraeci Semen* związków saponinowych, w oparciu o zebrane dane literaturowe [253, 387, 416, 418, 605, 606]. Uwzględniając otrzymane profile HPLC, wykazano, że dominującymi związkami w nasionach kozieradki pochodzenia krajowego są: protodioscyyna (związek 18) oraz trigoneozyd Vb (związek 10). Natomiast w niższych stężeniach obecne są: trigoneozyd IVa (związek 15) i jego 25R-epimer - glikozyd F (związek 16), trigoneozyd Va (związek 9) i protoneodioscyyna (związek 17).
- D.** Zawartość saponin steroidowych w surowcu krajowym oznaczona metodą HPLC-ELSD wyniosła 0,14% i była zbliżona do zawartości tych związków w surowcu pochodzenia afrykańskiego i tureckiego (0,20%). Wykazano, że w badanym surowcu dominują pochodne diosgeniny (Δ -5,25R- α -spirostan-3 β -olu) i jamogeniny (Δ -5, 25S- α -spirostan-3 β -olu), z których w wyniku hydrolizy kwasowej uwalniana jest diosgenina. Zawartość saponin steroidowych

oznaczona opracowaną metodą HPLC-ELSD była zbliżona do zawartości diosgeniny oznaczonej w warunkach zwalidowanej metody TLC.

- E. Nie wykazano istotnych różnic w zespole saponin steroidowych surowca krajowego w porównaniu do surowca pochodzenia tureckiego i afrykańskiego.
8. Z użyciem testu MTT i systemu RealTimeXCELLigence w czasie rzeczywistym wykazano, że najsilniejszą aktywnością cytotoksyczną wobec linii komórkowych: raka szyjki macicy HeLa, gruczolakoraka jajnika SKOV-3 oraz białaczki limfoblastycznej MOLT-4, skorelowaną z wysoką zawartością C-glikozyloflawonów i saponin steroidowych charakteryzowała się otrzymana z wyciągu metanolowego z nasion kozieradki frakcja D. W oparciu o przeprowadzone eksperymenty biologiczne ujawniono, że obserwowany efekt cytotoksyczny jest wynikiem indukcji apoptozy, wzrostu aktywności kaspaz 3 i 7, zmian błonowego potencjału mitochondrialnego oraz wzrostu poziomu wolnych rodników w komórkach nowotworowych. Słabszą aktywnością cytotoksyczną charakteryzował się wyciąg 70% metanolu, natomiast najslabszą - wyciąg wodny. Po raz pierwszy ujawniono aktywność cytotoksyczną jamogeniny oraz tigogeniny wobec linii komórkowych HeLa, SKOV-3 i MOLT-4 oraz diosgeniny wobec linii SKOV-3.
9. Potwierdzono aktywność przeciwdrobnoustrojową wyciągów z nasion kozieradki wobec *Helicobacter pylori* oraz ujawniono efekt bakteriobójczy wybranych C-glikozydów flawonowych i saponin steroidowych, spośród których najsilniejszą aktywnością bakteriobójczą wobec tego patogenu charakteryzowała się witeksyna (MBC 0,03 mg/ml). Aktywność bakteriobójczą witeksyny wobec *Helicobacter pylori* ujawniono po raz pierwszy.

W oparciu o przeprowadzone eksperymenty ujawniono działanie bakteriostatyczne saponin steroidowych - tigogeniny i sarsasapogeniny oraz działanie bakteriobójcze tigogeniny wobec *Staphylococcus aureus*.

10. Uwzględniając wykazany w surowcu krajowym brak izoflawonów oraz oznaczoną niską zawartość diosgeniny, wydaje się, że *Foenugraeci Semen* pochodzenia krajowego może stanowić bardziej bezpieczny surowiec w porównaniu do nasion kozieradki pochodzenia azjatyckiego, w zakresie potencjalnego wpływu na gospodarkę hormonalną i poziomy hormonów płciowych.

STRESZCZENIE

Kozieradka pospolita *Trigonella foenum-graecum* L. (*Fabaceae*) to jednoroczna roślina zielna, występująca na terenie Azji i basenu Morza Śródziemnego. Opisana w hinduskiej Ayurwedzie pod nazwą *methi*, *T. foenum-graecum* od wieków stosowana jest w tradycyjnej medycynie azjatyckiej. Nasienie kozieradki (*Foenugraeci Semen*) stanowi również popularny surowiec leczniczy w krajach europejskich. *Foenugraeci Semen* posiada monografię w Farmakopei Polskiej X oraz w Farmakopei Europejskiej i jest klasyfikowane jako surowiec śluzowy. Nasiona kozieradki stosowane są wewnętrznie jako środek odżywczy, wspomagający trawienie i leczniczy w schorzeniach przewodu pokarmowego, chorobie wrzodowej żołądka, stanach zapalnych oraz pomocniczo w terapii cukrzycy jako obniżające poziom cukru we krwi. Natomiast zewnętrznie surowiec stosowany jest w postaci kataplazmów na trudno gojące się rany oraz stany zapalne skóry i tkanki podskórnej. Obecnie nasienie kozieradki jest składnikiem coraz większej liczby suplementów diety dostępnych na krajowym rynku produktów roślinnych, stosowanych jako pomocnicze w terapii cukrzycy, trądziku oraz jako wzmacniające organizm.

Nasiona kozieradki zawierają szereg grup metabolitów wtórnych, wśród których, obok polisacharydów, dominującymi są C-glikozydy flawonowe oraz saponiny steroidowe, warunkujące wielokierunkową aktywność biologiczną surowca - m.in. przeciwzapalną, przeciwcukrzycową, przeciwdrobnoustrojową oraz przeciwnowotworową. Jakkolwiek, choć udowodniono zależność składu chemicznego od warunków wzrostu i uprawy kozieradki pospolitej, dotychczas badano wyłącznie skład chemiczny surowca pochodzenia azjatyckiego i afrykańskiego. W ciągu ostatnich 50-ciu lat ukazała się tylko jedna publikacja (1971) potwierdzająca obecność 4 C-glikozyloflawonów w surowcu pochodzenia krajowego. Biorąc pod uwagę wielokierunkową aktywność C-glikozydów flawonowych oraz saponin steroidowych (w tym niewyjaśniony w pełni wpływ na gospodarkę hormonalną człowieka w zakresie hormonów płciowych), rosnące zainteresowanie nasionami kozieradki (ponad 1000 publikacji w latach 2011-16) oraz ich wzrastającą popularność jako składnika suplementów diety, uznano za celowe badania nad związkami czynnymi surowca krajowego oraz jego aktywnością biologiczną.

W niniejszej rozprawie zaprezentowano wyniki analizy fitochemicznej *Foenugraeci Semen* pochodzenia krajowego oraz C-glikozydów flawonowych i saponin steroidowych jako składników surowca. Ponadto przedstawiono wyniki badań

aktywności przeciwnowotworowej i przeciwdrobnoustrojowej surowca oraz zawartych w nim związków czynnych.

Rozprawa doktorska składa się z trzech głównych części. Część pierwsza obejmuje aktualny stan wiedzy na temat składu chemicznego i aktywności biologicznej nasion kozieradki pospolitej oraz wykorzystania dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej w analizie związków flawonoidowych w matrycach roślinnych. W drugiej części rozprawy przedstawiono metodologię prowadzonych badań. Natomiast część trzecią dysertacji stanowi omówienie otrzymanych wyników analizy fitochemicznej oraz oceny aktywności biologicznej.

Cel pracy stanowiła jakościowa i ilościowa analiza nasienia kozieradki pochodzenia krajowego, w zakresie C-glikozydów flawonowych, izoflawonów oraz saponin steroidowych wraz z oceną aktywności biologicznej surowca oraz zawartych w nim związków czynnych.

Do badań przeznaczono nasiona kozieradki, otrzymane od trzech producentów - firmy zielarskie Lewandowski, Flos i Kawon. Dla celów analizy porównawczej wykorzystano nasiona kozieradki pochodzenia azjatyckiego i afrykańskiego.

W rezultacie przeprowadzonej analizy fitochemicznej opracowano i zoptymalizowano szereg metod chromatograficznych oraz procedur ekstrakcji badanych związków czynnych z surowca.

Oceniono wydajność wytrawiania C-glikozydów flawonowych z użyciem następujących technik ekstrakcyjnych: ekstrakcja w klasycznym aparacie Soxhleta, ekstrakcja w automatycznym aparacie Soxhleta, maceracja, ekstrakcja z użyciem mieszadła magnetycznego, sonikacja, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem. Stosowano zmienne parametry procesu (rodzaj rozpuszczalnika, czas, temperatura, moc, ilość cykli). Zawartość C-glikozyloflawonów w badanych ekstraktach oznaczono z użyciem opracowanej i zwalidowanej metody HPLC-DAD jako sumę, w przeliczeniu na apigeninę i luteolinę. Ujawniono różnice w profilach C-glikozydów flawonowych w otrzymanych ekstraktach, w zależności od użytego rozpuszczalnika. Spośród testowanych ekstrahentów najbardziej wydajnym był 70% metanol. Ponadto ujawniono różnice w zawartości badanych związków w zależności od stosowanej procedury wytrawiania. Wykazano, że wydajność ekstrakcji C-glikozydów flawonowych w automatycznym aparacie Soxhleta (25 cykli) jest zbliżona do wydajności ekstrakcji w klasycznym aparacie Soxhleta. Ponadto ujawniono, że w trakcie wytrawiania C-glikozyloflawonów 70% metanolem w procesie sonikacji, stężenie badanych związków w otrzymanym wyciągu wzrasta do 30. minuty, a następnie niezależnie od wydłużenia czasu trwania procesu, utrzymuje się na stałym poziomie i jest niższe niż w wyciągu otrzymanym w rezultacie trzykrotnej

sonikacji surowca z użyciem 70% metanolu. Udowodniono, że niezależnie od czasu trwania ekstrakcji wspomaganej mikrofalami (MAE), wydajność procesu jest zbliżona. Natomiast znaczące różnice w zawartości C-glikozyloflawonów obserwowano w wyciągach otrzymanych w wyniku przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem. Ponadto ujawniono i poddano dyskusji problemy analityczne związane z zastosowaniem tej techniki oraz 70% metanolu w odniesieniu do *Foenugraeci Semen*. Na podstawie wyników przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że najbardziej wydajnym było wytrawianie z użyciem mieszadła magnetycznego i 70% metanolu jako ekstrahentu (2 x 3 h, 2 x 100ml, temp. 60°C).

Analizę C-glikozydów flawonowych w wyciągach z nasienia kozieradki prowadzono z użyciem chromatografii cienkowarstwowej (TLC, 2D TLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (1D HPLC, 2D HPLC: LC-LC, LCxLC). Separację badanych związków metodą TLC prowadzono na płytkach HPTLC RP-18W F_{254S} z użyciem mieszaniny metanol:woda:kwas mrówkowy (40:60:6, v/v/v) jako fazy ruchomej. Ujawniono obecność 9 związków i potwierdzono występowanie w badanym surowcu witeksyny, izowiteksyny oraz izoorientyny. Natomiast na chromatogramie otrzymanym w rezultacie separacji 2D TLC z użyciem mieszaniny butanol:woda:kwas octowy (BAW) (3:1:1, v/v/v) (I kierunek) oraz 15% kwasu octowego (II kierunek) na płytkach pokrytych celulozą obserwowano 6 plam flawonów oraz 4 plamy innych związków, przypuszczalnie fenolokwasów.

Opracowano metodę 1D HPLC-DAD-ESI-MS rozdzielania składników zespołu C-glikozyloflawonów w wyciągu metanolowym z nasion kozieradki pospolitej, optymalizując fazę stacjonarną, fazę ruchomą oraz profil elucji gradientowej. Najlepsze rozdzielanie badanych związków, w formie 15 pików, otrzymano na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 µm), w warunkach elucji gradientowej o profilu złożonym, obejmującym liniowy wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA oraz elucję izokratyczną, w zakresie stężeń 16%-70% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA (t_G 70 minut). Potwierdzono obecność: witeksyny, izowiteksyny, wiceniny-1, wiceniny-2, wiceniny-3, di-C-(6/8)-heksozylo-pentozydu, estrów p-kumarowych witeksyny/izowiteksyny i orientyny/izoorientyny oraz 5 nieznanymi związków, przypuszczalnie di-C-(6/8)-pentozydów apigeniny. Obecność wiceniny-3 w nasieniu kozieradki ujawniono po raz pierwszy. W opracowanych warunkach separacji 1D HPLC koelucji ulegały: orientyna i izoorientyna oraz szaftozyd i izoszaftozyd. Dodatkowo w widmach ESI-MS wzorcowych orientyny i izoorientyny obserwowano różnice w

intensywności sygnałów deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 447 $[M-H]^-$ (20% - orientyna, 100% - izoorientyna) oraz adduktu z TFA przy m/z 561 $[M-H+114]^-$ (100% - orientyna, 60% - izoorientyna). Ujawnione różnice mogą ułatwiać identyfikację orientyny i izoorientyny w matrycach roślinnych różnego pochodzenia.

Z uwagi na brak separacji w warunkach 1D HPLC wzorcowych mono-C-glukozydów luteoliny (orientyna i izoorientyna) oraz di-C-(6/8)-glukozylo-arabinozydów apigeniny (szaftozyd i izoszaftozyd), kolejny etap pracy stanowiło opracowanie warunków rozdzielania C-glikozyloflawonów w wyciągu metanolowym z nasienia kozieradki z użyciem dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (2D LC) oraz technik: *heart-cutting* (LC-LC) i *comprehensive* (LCxLC), w trybach *off-line* i *on-line*.

Początkowo opracowano warunki rozdzielania badanych związków metodą LC-LC *off-line*, stosując w pierwszym wymiarze kolumnę Sphinx C-18-Phenyl oraz elucję gradientową o profilu gradientu złożonym, obejmującym liniowy wzrost stężenia mieszaniny metanol:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) od 40% do 60% w 0,1% wodnym TFA w ciągu pierwszych 5 minut, a następnie elucję izokratyczną przy stężeniu 60% mieszaniny metanol:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA przez kolejne 10 minut (t_G 15 minut) przy prędkości przepływu 0,05 ml/min. W rezultacie z kolumny 1D zebrano 9 frakcji (I-IX), których składniki następnie rozdzielono w 2D na kolumnie Kinetex C-18 w warunkach elucji izokratycznej z użyciem faz ruchomych, eksperymentalnie dobranych dla każdej frakcji 1D , o różnym stężeniu mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA: frakcje I i II - 32%, frakcja III - 20%, 23%, 32%, frakcja IV - 30%, frakcje V-VII - 35%, frakcja VIII - 45%, frakcja IX - 50%. W opracowanych warunkach otrzymano rozdzielanie wszystkich C-glikozydów flawonowych wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pochodzenia krajowego, w tym izomerów: orientyny - izoorientyny oraz szaftozydu - izoszaftozydu. Obecność izoszaftozydu w surowcu ujawniono po raz pierwszy.

Kolejny etap prac stanowiło opracowanie warunków separacji badanych związków metodą *comprehensive off-line*. W 1D użyto kolumnę Sphinx C-18-Phenyl. W rezultacie optymalizacji kompozycji fazy ruchomej oraz profilu gradientu, najlepsze rozdzielanie uzyskano w warunkach elucji gradientowej, obejmującej elucję izokratyczną przy stężeniu 43% (t_G 0-1,2 min) mieszaniny metanol:ACN:woda:TFA (330:40:80:0,45 v/v/v/v) w 0,1% TFA, a następnie liniowy wzrost jej stężenia od 43% do 90% w czasie t_G 1,2-47 minut (t_G 47 min) przy prędkości przepływu 0,017 ml/min. Otrzymany profil 1D LCxLC *off-line* był zbliżony do profilu 1D LC-LC. Badany wyciąg podzielono na 12 frakcji (I'-XII'), spośród których 9 odpowiadało frakcjom uzyskanym w systemie LC-LC, natomiast 3 pozostałe frakcje dodano aby spełnić podstawowe

założenie techniki *comprehensive* o rozdzielaniu w ²D całego eluatu z ¹D. W ²D wykorzystano kolumnę Discovery HS C-18 zamiast stosowanej w systemie LC-LC kolumny Kinetex, uwzględniając jej mniejszą długość przy zbliżonej średnicy, umożliwiającą utrzymanie profilu rozdzielania składników każdej frakcji ¹D w ²D. Składniki frakcji I'-XII' rozdzielano w ²D w warunkach elucji izokratycznej, eksperymentalnie dobranych dla każdej frakcji ¹D o nieznacznie zmodyfikowanych w odniesieniu do ²D systemu LC-LC stężeniach mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA: frakcja I' - 26%, frakcja II' - 30%, frakcja III' - 32%, frakcje IV', V', VII' - 35%, frakcja VI' - 36%, frakcje VIII' i IX' - 38%, frakcje X' i XI' - 50%, frakcja XII' - 55%.

Opracowano w pełni automatyczną metodę *comprehensive on-line* (LCxLC) separacji C-glikozydów flawonowych nasienia kozieradki. Użyto tych samych kolumn, które stosowano w systemie LCxLC *off-line* oraz tego samego programu elucji gradientowej w ¹D. Natomiast w ²D opracowane warunki separacji C-glikozyloflawonów połączono w gradient o profilu skokowym, w którym pojedynczy skok obejmował separację związków poszczególnych frakcji w warunkach elucji izokratycznej. Dobry eksperymentalnie czas modulacji był zmienny i wynosił: frakcja I' – 2,7 min, frakcja II' – 2,1 min, frakcja III' – 2,5 min, frakcja IV' – 3,0 min, frakcja V' – 1,5 min, frakcja VI' – 2,6 min, frakcja VII' – 2,3 min, frakcja VIII' – 3,1 min, frakcja IX' – 2,9 min, frakcja X' – 2,1 min, frakcja XI' – 2,5 min, frakcja XII' – 4,0 min. Separację HPLC w ¹D prowadzono w sprzężeniu z detektorem DAD, natomiast w ²D w sprzężeniu z detektorami DAD i MS. W rezultacie w opracowanych warunkach metody LCxLC *on-line*, otrzymano rozdzielanie wszystkich C-glikozyloflawonów, z wyjątkiem szaftozydu i izoszaftozydu, które ulegały koelucji. Udowodniono, że czas konieczny dla otrzymania ich separacji wynosi minimum 25 min, dlatego rozdzielanie szaftozydu i izoszaftozydu jest możliwe jedynie w warunkach opracowanej metody LC-LC *off-line*.

Kolejny etap prac stanowiło opracowanie zwalidowanej metody LC-LC-DAD *on-line* analizy ilościowej C-glikozydów flawonowych nasienia kozieradki. W zoptymalizowanych warunkach rozdzielania 1D HPLC oznaczono zawartość 11 związków, z wyjątkiem orientyny, izorientyny, szaftozydu i izoszaftozydu, które zebrano w formie pojedynczej frakcji, a następnie rozdzielono w ²D na kolumnie Kinetex C-18 przy stężeniu 23% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA. Opracowaną metodę LC-LC-DAD *on-line* wykorzystano do oznaczenia zawartości C-glikozydów flawonowych w różnych wyciągach z nasienia kozieradki pochodzenia polskiego: 70% metanolu, wodnym oraz frakcji wyciągu metanolowego.

Z użyciem opracowanych metod HPLC-DAD-ESI-MS and LC-LC-DAD-ESI-MS ujawniono różnice w profilach HPLC C-glikozyloflawonów w nasionach kozieradki

pochodzenia tureckiego i afrykańskiego, w porównaniu do surowca pochodzenia krajowego. W *Foenugraeci Semen* pochodzenia tureckiego i afrykańskiego ujawniono występowanie 4 dodatkowych C-glikozyloflawonów, przypuszczalnie dwóch di-C-(6/8)-heksozylo-pentozydów apigeniny oraz dwóch di-C-(6/8)-heksozydów apigeniny. Ponadto w rezultacie rozdzielania badanych związków w wyciągach metanолоwych z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego oraz afrykańskiego z użyciem opracowanej metody LC-LC-DAD-ESI-MS ujawniono, że profile orientyny, izoorientyny, szaftozydu i izoszaftozydu są zbliżone, a dominującym związkiem jest izoszaftozyd, obok szaftozydu i orientyny, występujących w mniejszych ilościach, podczas gdy stężenie izoorientyny jest znacząco niższe. Natomiast w nasionach kozieradki pochodzenia tureckiego, mono-C-glukozydy luteoliny (orientyna i izoorientyna) stanowiły związki dominujące, podczas gdy szaftozyd i izoszaftozyd występowały w niskich stężeniach.

Ponieważ według danych literaturowych, nasiona kozieradki zawierają naturalne fitoestrogeny - izoflawony, przeprowadzono analizę tych związków w warunkach opracowanej metody 1D HPLC-DAD-ESI-MS, wobec 5 związków wzorcowych. Nie wykazano obecności izoflawonów w wyciągu metanолоwym z *Foenugraeci Semen* pochodzenia krajowego, co istotnie różni badany materiał roślinny od niektórych nasion kozieradki pochodzenia azjatyckiego.

W analizie zespołu saponin steroidowych wykorzystano chromatografię cienkowarstwową (TLC, 2D TLC) oraz wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) w sprzężeniu z laserowym detektorem światła rozproszonego (ELSD) oraz spektrometrem mas (MS).

Z użyciem TLC, 2D TLC oraz TLC z gradientem fazy stacjonarnej, ujawniono obecność zespołu saponin furostanowych w surowcu pochodzenia krajowego (derywatyżacja odczynnikami Ehrlicha). Najlepsze rozdzielanie badanych związków otrzymano na płytkach chromatograficznych HPTLC Si60 F₂₅₄ z użyciem mieszaniny chloroform:metanol:kwasa mrówkowego (30:20:2, v/v/v) jako fazy ruchomej. Na otrzymanym chromatogramie TLC obserwowano 9 pasm saponin furostanowych.

Zoptymalizowano warunki oznaczenia ilościowego diosgeniny po hydrolizie kwasowej w nasieniu kozieradki, w zakresie warunków ekstrakcji, hydrolizy kwasowej, separacji TLC (faza stacjonarna, faza ruchoma, odczynnik wywołujący) oraz analizy densytometrycznej. Udowodniono, że najbardziej wydajną metodą wytrawiania jest

trójstopniowa, wyczerpująca ekstrakcja w aparacie Soxhleta z użyciem kolejno eteru naftowego, chloroformu oraz metanolu, a następnie hydroliza kwasowa wyciągu metanolowego z użyciem 2M wodnego roztworu kwasu siarkowego (VI) (temp. 80°C, 2 h). Najlepsze rozdzielanie TLC otrzymano na płytkach chromatograficznych HPTLC Si60 F₂₅₄ z użyciem mieszaniny heptan:octan etylu (7:3, v/v) jako fazy ruchomej, w automatycznej komorze chromatograficznej ADC2, w temperaturze 22±2°C oraz stałej wilgotności 47% (nasycony roztwór tiocyjanianu potasu). Otrzymane chromatogramy TLC poddano wizualizacji z użyciem zmodyfikowanego roztworu aldehydu anyżowego. Opracowaną metodę zwalidowano i wykorzystano do oznaczenia zawartości diosgeniny po hydrolizie kwasowej w nasionach kozieradki pochodzenia krajowego, otrzymanych od trzech producentów: Lewandowski (0,12%), Kawon (0,12%) i Flos (0,13%).

Opracowano metodę HPLC-ELSD-ESI-MS analizy jakościowej i ilościowej saponin steroidowych w wyciągu metanolowym z nasion kozieradki pospolitej. Rozdzielenia prowadzono na dwóch połączonych szeregowo kolumnach Discovery C-18 (150 mm x 2,1 mm x 3 µm) w warunkach elucji gradientowej, obejmującej liniowy wzrost stężenia ACN od 20% do 100% w 0,1% kwasie mrówkowym (t_c 90 minut, profil gradientu liniowo-skokowy). Otrzymano separację składników zespołu saponin steroidowych w formie 13 pików.

Nie wykazano różnic w profilu HPLC-ELSD-ESI-MS saponin steroidowych wyciągu metanolowego z surowca w porównaniu do wyciągu etanolowego. Dlatego wykluczono obecność artefaktów - 22-metoksy pochodnych saponin.

Z użyciem detektora masowego ujawniono obecność 26 saponin steroidowych w badanym surowcu, spośród których 24 wstępnie zidentyfikowano w oparciu o otrzymane dane spektralne i chromatograficzne (wartości t_R , m/z), przypisując im struktury związków, rozpoznanych wcześniej w nasieniu kozieradki pospolitej. Ponadto nie wykazano istotnych różnic w profilach badanych związków w surowcach pochodzenia tureckiego i afrykańskiego w porównaniu do nasion kozieradki pochodzenia krajowego. Dominującymi związkami były protodioscyna oraz trigoneozyd Vb. Trigoneozyd IVa i jego 25-epimer - glikozyd F, trigoneozyd Va oraz trigonellozyd C (protoneodioscyna) były obecne w niższych stężeniach. Wymienione związki są pochodnymi diosgeniny (protodioscyna, trigoneozyd Vb, glikozyd F) i jamogeniny (trigonellozyd C, trigoneozyd IVa, trigoneozyd Va) i stanowią źródło diosgeniny, uwalnianej w wyniku hydrolizy kwasowej, ponieważ izomery 25S i 25R ulegają epimeryzacji. Jamogenina w środowisku kwaśnym może ulegać przekształceniu do

diosgeniny. Otrzymane profile HPLC saponin steroidowych w *Foenugraeci Semen* różnią się od profili HPLC i UPLC opisanych w literaturze.

Kolejny krok stanowiło opracowanie zwalidowanej metody HPLC-ELSD oznaczenia ilościowego saponin steroidowych w badanym materiale roślinnym. Zawartość saponin, w przeliczeniu na protodioscynę, oznaczono w wyciągach: 70% metanolu ($163,182 \pm 11,03 \mu\text{g}$), wodnym ($63,134 \pm 8,14 \mu\text{g}$) oraz frakcji wyciągu metanolowego ($163,182 \pm 11,3 \mu\text{g}$) z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego. Ponadto, oznaczono zawartość saponin steroidowych w surowcach pochodzenia tureckiego i afrykańskiego (0,20 %).

Ocenę aktywności biologicznej nasion kozieradki pochodzenia krajowego przeprowadzono w zakresie aktywności cytotoksycznej oraz przeciwdrobnoustrojowej. Do badań przeznaczono różne wyciągi z surowca - wodno-alkoholowy, wodny i frakcję wyciągu metanolowego oraz wybrane związki czynne z grupy C-glikozydów flawonowych, sapogenin steroidowych oraz alkaloidów.

Aktywność cytotoksyczną ekstraktów z *Foenugraeci Semen* oraz pojedynczych związków czynnych oceniano wobec linii komórkowych: ludzkiego raka szyjki macicy HeLa, ludzkiego gruczolakoraka jajnika SKOV-3 oraz ludzkiej białaczki limfoblastycznej MOLT-4. Jak kontrolę wykorzystano linię komórkową ludzkich keratynocytów HaCaT. Badania prowadzono w użyciu testu MTT oraz systemu RealTimeXCELLigence (RTCA). System RTCA zastosowano w ocenie aktywności cytotoksycznej *Foenugraeci Semen* po raz pierwszy.

Najsilniejszą aktywność cytotoksyczną ujawniła frakcja wyciągu metanolowego (D), dla której oznaczone wartości IC_{50} wyniosły odpowiednio: wobec HeLa $3,91 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $3,99 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), wobec linii SKOV-3 $3,97 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $2,26 \pm 0,78 \mu\text{g/ml}$ (RTCA) oraz wobec linii MOLT-4 $7,75 \pm 0,37 \mu\text{g/ml}$ (MTT). Wyciąg wodno-alkoholowy wykazywał słabszą aktywność wobec badanych linii komórkowych, z oznaczonymi wartościami IC_{50} : wobec HeLa $13,47 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $9,65 \pm 0,78 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), wobec SKOV-3 $10,34 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $7,73 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ (RTCA) oraz wobec MOLT-4 $16,18 \pm 1,14 \mu\text{g/ml}$ (MTT), odpowiednio. Najśłabszą aktywność ujawnił wyciąg wodny, a oznaczone wartości IC_{50} wyniosły: wobec HeLa $17,43 \pm 0,3$ (MTT) i $31,45 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), wobec SKOV-3 $16,68 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $26,4 \pm 0,71 \mu\text{g/ml}$ (RTCA) oraz wobec MOLT-4 $26,55 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$ (MTT), odpowiednio. Natomiast wyciąg metanolowy był nieaktywny.

Spośród badanych związków czynnych, znaczącą aktywność cytotoksyczną wobec badanych linii komórkowych ujawniły sapogeniny steroidowe, podczas gdy C-

glikozydy flawonowe oraz trygonelina były nieaktywne. Otrzymane wyniki stanowią pierwsze doniesienia dotyczące aktywności proapoptotycznej jamogeniny, tigogeniny wobec wszystkich badanych linii komórkowych oraz pierwsze doniesienie o aktywności proapoptotycznej diosgeniny wobec linii gruczolakoraka jajnika SKOV-3. Oznaczone wartości IC_{50} badanych sapogenin wobec linii raka szyjki macicy HeLa wyniosły odpowiednio: jamogenina - $16,5 \pm 0,59 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $19,6 \pm 1,41 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), diosgenina - $16,3 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $28,0 \pm 2,40 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), tigogenina $35,6 \pm 3,69 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $25,1 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ (RTCA). Wobec linii komórek gruczolakoraka jajnika SKOV-3 badane sapogeniny ujawniły zbliżoną aktywność z wyznaczonymi wartościami IC_{50} odpowiednio: jamogenina - $16,7 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $23,9 \pm 1,48 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), diosgenina - $19,3 \pm 0,97 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $16,9 \pm 2,89 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), esmilagenina - $17,96 \pm 1,29 \mu\text{g/ml}$ (MTT), tigogenina - $28,3 \pm 3,46 \mu\text{g/ml}$ (RTCA) oraz $> 50 \mu\text{g/ml}$ (MTT).

Ponieważ najsilniejszą aktywnością cytotoksyczną charakteryzowała się frakcja wyciągu metanolowego (D), kolejny etap prac stanowiły badania mechanizmów aktywności proapoptotycznej frakcji D wobec linii komórek HeLa i SKOV-3. Oznaczono procent komórek apoptotycznych, który w komórkach SKOV-3 wynosił 50% przy stężeniu badanej frakcji D $10 \mu\text{g}$, natomiast w komórkach HeLa - 50% przy stężeniu $100 \mu\text{g}$ badanej frakcji D. Linia komórkowa SKOV-3 charakteryzowała się większą wrażliwością na składniki frakcji D.

Analiza aktywności kaspaz 3 i 7 ujawniła ich zaangażowanie w proces śmierci komórek nowotworowych pod wpływem składników frakcji D, co potwierdza indukcję apoptozy w komórkach linii HeLa i SKOV-3.

W rezultacie badań zmian błonowego potencjału mitochondrialnego w komórkach linii HeLa i SKOV-3 po 12 godzinach inkubacji z różnymi stężeniami badanej frakcji D obserwowano zależne od dawki zmiany potencjału błony mitochondrialnej w hodowli komórek SKOV-3, co potwierdza zaangażowanie wewnętrznego szlaku indukcji apoptozy w śmierć komórek gruczolakoraka jajnika SKOV-3 pod wpływem frakcji D. Natomiast w hodowli komórek HeLa nie obserwowano zmian błonowego potencjału mitochondrialnego.

Otrzymane wyniki pomiaru zmian poziomu wolnych rodników (ROS) ujawniły, że w rezultacie inkubacji z frakcją D poziom ROS wzrasta, co jest związane z występowaniem stresu oksydacyjnego, który może prowadzić do indukcji kaspazy-12 i wewnętrznego szlaku apoptozy.

Ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągów z nasiona kozieradki pospolitej oraz wybranych związków czynnych prowadzono wobec szeregu szczepów

bakteryjnych. Udowodniono, że szczepem o największej wrażliwości na przetwory z *Foenugraeci Semen* oraz pojedyncze metabolity wtórne – składniki chemiczne surowca był *Helicobacter pylori*, z najniższą wartością MBC 0,27 mg/ml dla wyciągu wodno-alkoholowego. Wyciąg wodny był nieaktywny. Otrzymane wyniki wskazują, że w celu efektywnego wspierania terapii choroby wrzodowej, przebiegającej z zakażeniem *H. pylori*, wskazane jest stosowanie wyciągów wodno-alkoholowych lub alkoholowych, posiadających aktywność przeciwbakteryjną wobec patogenu. Natomiast wyciągi wodne mogą pełnić rolę pomocniczą jako przeciwzapalne i ułatwiające gojenie niszy wrzodowej. Spośród badanych związków czynnych, witeksyna ujawniła najsilniejszą aktywność bakteriobójczą wobec *H. pylori*, z wartością MBC 0,03 mg/ml, obok saponin steroidowych, dla których wartości MBC wyniosły odpowiednio: 0,0625 mg/ml (tigogenina i sarsasapogenina) oraz 0,125 mg/ml (diosgenina). Natomiast orientyna ujawniła jedynie efekt bakteriostatyczny, a oznaczona wartość MIC wyniosła 0,125 mg/ml.

W rezultacie przeprowadzonych badań rozpoznano skład chemiczny surowca krajowego w zakresie C-glikozydów flawonowych i saponin steroidowych.

Opracowane metody 2D LC mogą być przydatne w analizie składu chemicznego nasion kozieradki różnego pochodzenia oraz w identyfikacji C-glikozyloflawonów w innych matrycach roślinnych.

Uwzględniając wykazany w surowcu krajowym brak izoflawonów oraz oznaczoną niską zawartość diosgeniny, wydaje się, że *Foenugraeci Semen* pochodzenia krajowego może stanowić bardziej bezpieczny surowiec w porównaniu do nasion kozieradki pochodzenia azjatyckiego, w zakresie potencjalnego wpływu na gospodarkę hormonalną i poziomy hormonów płciowych.

SUMMARY

Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L., *Fabaceae*) is annual herbaceous plant, widespread in Asia and Mediterranean region. Described in ancient Ayurveda as *methi*, fenugreek (especially its seeds) was used for centuries in traditional Asian medicine. Nowadays, the seed of fenugreek (*Foenugraeci Semen*) is also a popular healing agent in European phytotherapy, applied internally and externally. *Foenugraeci Semen* has a monographs as a mucilaginous plant material in both Polish Pharmacopoeia X and European Pharmacopoeia. The chemical composition of *Foenugraeci Semen* consists of several groups of plant secondary metabolites of which, besides polysaccharides, flavone C-glycosides and steroidal saponins are the most abundant and responsible for multidirectional biological activity of fenugreek seeds, including antidiabetic, hypolipidemic and anti-inflammatory. However, in the field of principal compounds, only the chemical composition of Asian and African plant material was recognized so far, though it is known as depending on the growth or cultivation conditions. For the last five decades, only one paper (1971) concerns the presence of 4 C-glycosylflavones in Polish *Foenugraeci Semen*. Taking into account the biological activity of flavone C-glycosides and steroidal saponins (including their unclear influence on human sex hormones), growing interest in fenugreek seeds (over 1000 of publications in the past five years) and fact that they are getting more popular as the ingredients of increasing number of dietary supplements, the need of phytochemical characteristic of secondary metabolites in Polish fenugreek seeds arises.

This thesis presents phytochemical and biological investigation of flavone-C-glycosides and steroidal saponins in *Foenugraeci Semen* of Polish origin and evaluation of its anticancer and antibacterial activity, not described previously in the literature or for which the insufficient data exist.

Presented dissertation consists of three main parts. The first part contains the general botanical, phytochemical and pharmacological characteristic of an investigated *Foenugraeci Semen*. Moreover, it discusses the current state of knowledge about the application of two-dimensional high-performance liquid chromatography in the analysis of flavonoids. The second part explains research methodology. In the third part the results of phytochemical studies are presented together with the study on biological activity.

The main objective was the qualitative and quantitative analysis of Polish fenugreek seeds in terms of three main groups of chemical compounds: flavone-C-glycosides, isoflavones and steroidal saponins together with the evaluation of biological activity of this plant material and its selected secondary metabolites.

For the experiments fenugreek seeds of unknown chemical composition, obtained from three Polish herbal companies were used, namely: Lewandowski, Flos, Kawon. Additionally for comparative analysis also the plant material of Turkish and African origin was used.

As a result of phytochemical studies, several chromatographic methods were developed and optimized together with optimized extraction procedures for the analysis of flavone-C-glycosides and steroidal saponins.

The influence of extraction mode on the yield of C-glycosylflavones from fenugreek seeds was examined. Several techniques were tested: extraction in classic and automatic Soxhlet apparatus, maceration, extraction with the use of magnetic stirrer, sonication, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction. Additionally, different parameters of process were examined (time, solvent, temperature, power, number of cycles) depending on the technique used. The amount of flavone-C-glycosides in obtained extracts, calculated on apigenin or luteolin, was quantified with the use of established HPLC-DAD method.

The differences in the obtained chromatographic profiles of C-glycosylflavones depending on the extraction solvent used, were revealed. The most effective extracting solvent was 70% methanol. Moreover, also the differences in the amount of analyzed compounds in extracts, obtained through various extraction techniques were revealed. The efficiency of flavone-C-glycosides extraction by the use of automatic Soxhlet apparatus (25 cycles) was similar to the exhaustive extraction in classic Soxhlet apparatus. It was proved, that during the sonication with 70% methanol, the concentration of C-glycosylflavones depends on temperature, but increases only till the 30. min, remaining stable even if process is prolonged. However, it was still lower than in the extract obtained by triple sonication with 70% methanol. The result of microwave extraction with 70% methanol showed that independently on the time and power of this process, the effectiveness of extraction remains similar. The significant differences in the amount of analyzed compounds were observed as a result of accelerated solvent extraction. Some analytical difficulties in the application of this method for the extraction of *Foenugraeci Semen* with 70% methanol were revealed and discussed. On the basis of performed experiments, the most effective method for the flavone-C-

glycosides from fenugreek seeds was: the extraction on magnetic stirrer with 70% methanol (2 x 3 h, 2 x 100 ml, temp. 60°C).

Analysis of C-glycosylflavones was performed with the use of thin layer chromatography (TLC, 2D TLC) and high-performance liquid chromatography (1D HPLC, 2D HPLC: LC-LC, LCxLC). The TLC analyses on HPTLC RP-18W F_{254S} plates with the mobile phase methanol:water:formic acid (40:60:6, v/v/v) revealed the presence of 9 compounds and confirmed the presence of vitexin, isovitexin and isoorientin. The 2D TLC analyses were performed on cellulose plates with the use of the mixtures butanol:water:acetic acid (BAW) (3:1:1, v/v/v) (1st direction) and 15% acetic acid (2nd direction). On the obtained chromatograms 6 spots of flavones and 4 spots tentatively identified as phenolic acids were observed.

The HPLC-DAD-ESI-MS method for the qualitative analysis of flavone-C-glycosides in the methanol extract from fenugreek seeds was established. In the optimization process different columns, mobile phases and gradient programs were tested. The best separation was achieved on Kinetex C-18 column (100 mm x 2,1 mm x 2,6 µm) under the gradient elution according to program I, comprising the linear increase of concentration of the mixture ACN:water:TFA (50:50:0,1, v/v/v) from 16% to 70% in 0,1% TFA and the isocratic elution (t_G 70 minutes). The separation of analyzed compounds was obtained in the form of 15 peaks. The presence of: vitexin, isovitexin, vicenin-1, vicenin-2, vicenin-3, apigenin di-C-(6/8)-hexosyl-pentoside, p-coumaric esters of vitexin/isovitexin and orientin/isoorientin together with 5 unknown compounds, tentatively identified as apigenin di-C-(6/8)-pentosides was revealed. The presence of vicenin-3 was revealed in fenugreek seeds for the first time. In the established chromatographic conditions (1D HPLC) orientin and isoorientin as well as schaftoside and isoschaftoside were coeluting. Additionally HPLC-DAD-ESI-MS analyses of reference substances - orientin and isoorientin revealed differences in the intensity of deprotonated molecular ions signals at m/z 447 [M-H]⁻ (20% - orientin, 100% - isoorientin) and adducts with TFA at m/z 561 [M-H+114]⁻ (100% - orientin, 60% - isoorientin). Observed differences in the ESI-MS spectra of orientin and isoorientin may be helpful in the HPLC-DAD-ESI-MS identification of these compounds in plant matrices of different origin.

Due to not achieving the separation of reference isomeric luteolin mono-C-glucosides (orientin and isoorientin) and isomeric apigenin di-C-(6/8)-glucosyl-arabinosides (schaftoside and isoschaftoside) in 1D HPLC, next step was

establishment the conditions for two-dimensional HPLC separations of C-glycosylflavones from fenugreek seeds with the use of *heart-cutting* (LC-LC) and *comprehensive* (LCxLC) techniques in both *off-line* and *on-line* modes.

Firstly, C-glycosylflavones in the methanol extract of fenugreek seeds were separated in the optimized *heart-cutting* (LC-LC) *off-line* method, which was the introduction to the establishment of the *comprehensive off-line* and *on-line* system. In the first dimension the LC-LC method, the Sphinx C-18-Phenyl column and gradient elution were used. The gradient program was characterized by the increasing concentration of the mixture methanol:water:TFA (50:50:0.1, v/v/v) from 40% to 60% in the 0.1% aqueous TFA in the first 5 minutes, followed by the isocratic elution at 60% of the mixture methanol:water:TFA (50:50:0.1, v/v/v) in the 0.1% aqueous TFA for next 10 minutes (t_G 15 minutes) at flow rate 0.05 ml/min. As a result of first-dimensional separation the extract was divided into nine fractions (I-IX), which ingredients were further successively separated in the second dimension on Kinetex C-18 column with the use of isocratic elution at experimentally assorted concentration of the mixture ACN:water:TFA (50:50:0.1, v/v/v) in 0.1% aqueous TFA: fractions I and II - 32%, fraction III - 20%, 23%, 32%, fraction IV - 30%, fraction V-VII - 35%, fraction VIII - 45%, fraction IX - 50%. In the established conditions all C-glycosylflavones in the analyzed extract were separated, including isomers: orientin - isoorientin and schaftoside - isoschaftoside. The presence of isochsiftoside in fenugreek seeds was revealed for the first time.

Next, the comprehensive *off-line* method was established. In the first dimension separation was performed on Sphinx C-18-Phenyl column. As a result of mobile phase composition optimization, comprising mixtures of different organic solvents and different gradient programs, the best separation was obtained with the use of the mixture methanol:ACN:water:TFA (330:40:80:0.45 v/v/v/v) in 0.1% aqueous TFA under gradient elution. The gradient program comprised initially isocratic elution at 43% (0-1.2 min) and next the linear increase mixture of methanol:ACN:water:TFA (330:40:80:0.45 v/v/v/v) in 0.1% aqueous TFA from 43% to 90% in t_G 1.2-47 minutes (t_G 47 min) at flow rate 0.017 ml/min. The obtained ¹D LCxLC *off-line* profile was similar to the in ¹D profile obtained in LC-LC method. Analyzed extract was divided into 12 fractions (I'-XII'), 9 of which corresponded to the fractions obtained in LC-LC method and 3 fractions were added to maintain comprehensive technique assumption of transferring the whole eluate from the first dimension to the second one. In the ²D the Discovery HS C-18 column was used instead of Kinetex column, due to its smaller length, while maintaining the separation profile of each fraction components in ²D. Ingredients of fractions I'-XII' were separated under experimentally assorted isocratic elution

conditions and some additional modifications in the concentration of ²D mobile phase (mixture ACN:water:TFA 50:50:0.1, v/v/v in 0.1% aqueous TFA) were made: fraction I' - 26%, fraction II' - 30%, fraction III' - 32%, fractions IV', V', VII' - 35%, fraction VI' - 36%, fractions VIII' and IX' - 38%, fractions X' and XI' - 50%, fraction XII' - 55%.

Finally, the fully automatic comprehensive (LCxLC) *on-line* method for the separation of C-glycosylflavones in the methanol extract from fenugreek seeds was established. The same columns were used as in the *off-line* LCxLC. In the first dimension also the same gradient elution was applied, while in the second dimension the established isocratic conditions for the separation of analyzed compounds were connected into the stepwise gradient, of which each step comprised single fraction separation at isocratic conditions. The modulation time was changeable and experimentally assorted: fraction I' – 2.7 min, fraction II' – 2.1 min, fraction III' – 2.5 min, fraction IV' – 3.0 min, fraction V' – 1.5 min, fraction VI' – 2.6 min, fraction VII' – 2.3 min, fraction VIII' – 3.1 min, fraction IX' – 2.9 min, fraction X' – 2.1 min, fraction XI' – 2.5 min, fraction XII' – 4.0 min. In the ¹D the DAD detector was used, while in the ²D both DAD and MS detectors were applied. As the result in the established *on-line* LCxLC method, all C-glycosylflavones were separated, except for schaftoside and isoschaftoside which were coeluting. It was demonstrated that their separation is possible only in the established *off-line* LC-LC-DAD-ESI-MS method, as the time needed for it is at least 25 minutes.

Next, the quantitative LC-LC-DAD *on-line* method for the estimation of C-glycosylflavones in fenugreek seeds was established. In the conditions optimized for one-dimensional HPLC separation and 11 compounds were quantified, apart from orientin, isoorientin, schaftoside and isoschaftoside, which were collected in a form of fraction, subsequently separated on Kinetex C-18 column at 23% concentration of the mixture ACN:water:TFA (50:50:0.1, v/v/v) in 0.1% aqueous TFA. The established method was applied to the quantitative analysis of C-glycosylflavones in obtained different extracts from plant material of Polish origin: alcohol-aqueous, aqueous and the fraction of methanol extract.

Comparative analysis of the C-glycosylflavones in Turkish and African fenugreek seeds was performed with the use of established HPLC-DAD-ESIMS and LC-LC-DAD-ESIMS methods. The qualitative differences were revealed. In comparison with Polish plant material, both Turkish and African contained 4 additional flavone C-glycosides: two apigenin di-C-(6/8)-hexosyl-pentosides and 2 apigenin di-C-(6/8)-hexosides. Additionally, the separation of methanol extracts with the use of LC-LC-DAD-ESI-MS method demonstrated that the profile of orientin, isoorientin, schaftoside

and isoschaftoside are similar in Polish and African plant material with the isoschaftoside being the most abundant, next to schaftoside and orientin, present in lower concentration, while the concentration of isoorientin is significantly lower. On the other hand, in fenugreek seeds of Turkish origin, luteolin mono-C-glucosides (orientin and isoorientin) are the most abundant, while schaftoside and isoschaftoside are minor components.

As fenugreek seeds are known to contain natural phytoestrogens - isoflavones, the analysis of these compounds was performed in the established 1D HPLC-DAD-ESI-MS conditions in the comparison with 5 standards. However, none isoflavones were detected in the methanol extract from *Foenugraeci Semen* of Polish origin, which significantly differs this plant material from fenugreek seeds originated from the other parts of the world.

In the analysis of steroidal saponins different chromatographic techniques were used, namely: thin layer chromatography (TLC, 2D TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) with the use of evaporative light scattering detector (ELSD) and mass detector (MS).

With the use of TLC, 2D TLC and TLC with adsorbent gradient, the complex of furostanol saponins in the Polish fenugreek seeds was revealed (derivatization with Ehrlich reagent). The best separation was achieved on HPTLC Si60 F₂₅₄ plates with the mixture of chloroform:methanol:formic acid (30:20:0.2, v/v/v) as the mobile phase. On the obtained TLC chromatogram 9 bands of furostanol saponins were observed.

The procedure for the quantification of diosgenin in the fenugreek seeds after acid hydrolysis was established, comprising extensive optimization of extraction, acid hydrolysis and TLC conditions (stationary phase, mobile phase, visualization reagent) and densitometric analysis. Finally, the most effective were: triple exhaustive extraction in a Soxhlet apparatus with petroleum ether, chloroform and methanol, followed by acid hydrolysis of the methanol extract with 2M aqueous sulphuric acid (temp. 80°C, 2 h). The TLC separation was performed on HPTLC Si60 F₂₅₄ plates and mobile phase n-heptane:ethyl acetate (7:3, v/v) in automatic development chamber (ADC2) at 22±2°C and 47% humidity (provided by a saturated solution of potassium thiocyanate). Obtained chromatograms were visualized by the use of modified anisaldehyde reagent. The established method was validated and applied to the estimation of diosgenin in the

fenugreek seeds from three Polish herbal companies: Lewandowski (0,12%), Kawon (0,12%) and Flos (0,13%).

The HPLC-ELSD-ESI-MS method for the qualitative analysis of steroidal saponins in methanol extract from fenugreek seeds was established. Compounds were separated on the two Discovery C-18 (150 mm x 2.1 mm x 3 μ m) columns, connected in series under gradient elution, comprising increasing concentration of ACN from 20% to 100% in 0,1% formic acid (t_G 90 minutes; stepwise-linear gradient). The resolution of the steroidal saponins complex was obtained in a form of 13 peaks.

Additionally, the analysis of ethanol extract revealed no differences in comparison to methanol extract, therefore the presence of 22-methoxy artefacts was excluded.

The use of mass detector revealed the presence of 26 steroidal saponins, 24 of which were tentatively identified as furostanol saponins according to obtained chromatographic and spectral data (t_R , m/z values) and comparison with literature data. The profiles of saponins in Polish, Turkish and African plant material were similar. The most abundant compounds were: protodioscin and trigoneoside Vb. Trigoneoside IVa and its 25-epimer glycoside F, trigoneoside Va and trigonelloside C (protoneodioscin) were present in lower concentrations. These compounds are derivatives of diosgenin (protodioscin, trigoneoside Vb, glycoside F) or yamogenin (trigonelloside C, trigoneoside IVa, trigoneoside Va), being the source of diosgenin quantified after acid hydrolysis, as 25S and 25R isomers are known to undergo the epimerisation. Therefore yamogenin may transform into diosgenin under acid hydrolysis conditions. The revealed HPLC profile of steroidal saponins varies from the HPLC and UPLC profiles of fenugreek seeds, described in literature.

Next, the established quantitative HPLC-ELSD was validated. Total amount of saponins, calculated as protodioscin, was estimated in extracts: alcohol-aqueous (135.157 \pm 4.74 μ g), aqueous (63.134 \pm 8.14 μ g) and the fraction from methanol extract (163.182 \pm 11.03 μ g) from the plant material of Polish origin. Additionally, the amount of saponins in Turkish and African fenugreek seeds was calculated (0.20%).

The evaluation of biological activity of analyzed fenugreek seeds of Polish origin was performed in the field of cytotoxic and antimicrobial activity. The different extract from the plant materials were examined: alcohol-aqueous, aqueous, methanol and the

fraction from methanol extract, as well as selected C-glycosylflavones, steroidal sapogenins and alkaloids.

The cytotoxic activity was evaluated against three human cell lines: cervical cancer HeLa, ovarian carcinoma SKOV-3, lymphoblastic leukemia MOLT-4 and control cell line of human keratinocytes HaCaT. In the experiments both MTT and RealTimexCELLigence (RTCA) system were used. The use of RTCA in the assessment of anticancer activity of *Foenugraeci Semen* was never described before.

The highest cytotoxicity was demonstrated by the fraction of methanol extract (D), for which IC₅₀ values were as follows: against HeLa 3.91 ± 0.03 µg/ml (MTT) and 3.99 ± 0.26 µg/ml (RTCA), against SKOV-3 3.97 ± 0.07 µg/ml (MTT) and 2.26 ± 0.78 µg/ml (RTCA) and against MOLT-4 7.75 ± 0.37 µg/ml (MTT). The alcohol-aqueous extract (A) revealed moderate cytotoxic activity with the IC₅₀ values: against HeLa 13.47 ± 0.62 µg/ml (MTT) and 9.65 ± 0.78 µg/ml (RTCA), against SKOV-3 10.34 ± 0.16 µg/ml (MTT) and 7.73 ± 0.1 µg/ml (RTCA) and against MOLT-4 16.18 ± 1.14 µg/ml (MTT). The weakest activity was observed for the aqueous extract, prepared in a form of infusion (B), for which obtained IC₅₀ values were: against HeLa 17.43 ± 0.3 µg/ml (MTT) and 31.45 ± 0.21 µg/ml (RTCA), against SKOV-3 16.68 ± 0.6 µg/ml (MTT) and 26.4 ± 0.71 µg/ml (RTCA) and against MOLT-4 26.55 ± 0.07 µg/ml (MTT), respectively. The methanol extract (C) was inactive.

Among the single metabolites examined, the steroidal sapogenins revealed significant activity, while C-glycosylflavones and trigonelline were inactive. These is the first report on the proapoptotic activity of yamogenin, tigogenin against all tested cell-lines and the first report on proapoptotic activity of diosgenin against SKOV-3 cell line.

The obtained IC₅₀ values for steroidal sapogenins against HeLa cell line were: yamogenin - 16.5 ± 0.59 µg/ml (MTT) and 19.6 ± 1.41 µg/ml (RTCA), diosgenin - 16.3 ± 0.26 µg/ml (MTT) and 28.0 ± 2.40 µg/ml (RTCA), tigogenin acetate 35.6 ± 3.69 µg/ml (MTT) and 25.1 ± 0.12 µg/ml (RTCA). In experiments with the use of ovarian carcinoma cell line, the steroidal sapogenins demonstrated similar activity at following IC₅₀ values: yamogenin - 16.7 ± 0.08 µg/ml (MTT) and 23.9 ± 1.48 µg/ml (RTCA); diosgenin - 19.3 ± 0.97 µg/ml (MTT) and 16.9 ± 2.89 µg/ml (RTCA); esmilagenin - 17.96 ± 1.29 µg/ml (MTT); tigogenin - 28.3 ± 3.46 µg/ml (RTCA) with activity > 50 µg/ml in MTT.

As fraction obtained from methanol extract from fenugreek seeds revealed the strongest cytotoxic activity, further investigation of its proapoptotic mechanisms was evaluated with the use of HeLa and SKOV-3 cell lines. The apoptosis rate was

calculated. In SKOV-3 cell line apoptosis rate was 50% at 10 µg concentration of fraction D, while in the HeLa cell line - 50% apoptosis rate was observed at 100 µg concentration of fraction D. The cell line SKOV-3 was more sensitive for the analyzed fraction than the HeLa cell line.

The analysis of the caspases 3 and 7 activity confirmed their involvement in the observed cancer cells death under the influence of the fraction D, which thus confirmed the induction of apoptosis in HeLa cells and SKOV-3.

The assessment of changes in mitochondrial potential in HeLa and SKOV-3 cells after 12-hour incubation with different concentrations of the fraction D revealed dose-dependent changes in mitochondrial potential in ovarian adenocarcinoma SKOV-3. It confirms the participation of the intrinsic pathway of apoptosis in tumor cell death SKOV-3 under the influence of the fraction D. In cervical cancer HeLa no changes in mitochondrial potential were observed, yet the involvement of intrinsic apoptosis pathway in the observed HeLa cells death cannot be excluded.

The results of the measurement of reactive oxygen species (ROS) revealed that after the incubation with analyzed fraction D from fenugreek seeds, the ROS level increases. This indicates the presence of oxidative stress, which can lead to the induction of caspase-12 and the intrinsic pathway of apoptosis.

The investigation on antimicrobial activity of the extracts from fenugreek seeds as well as single metabolites was performed against several bacteria strains. *Helicobacter pylori* demonstrated the highest susceptibility to extracts from the seeds of *T. foenum-graecum* at the lowest bacterial inhibitory concentration at 0.27 mg/ml for the alcohol-aqueous extract (A). The aqueous extract (B) was inactive. Obtained results suggest that in order to effectively support the therapy of peptic ulcers connected with *H. pylori* infection, it is advisable to apply alcohol-aqueous or alcohol extracts from fenugreek seeds, which possess antibacterial activity against this bacteria. Water extracts may play only a subordinate role due to their anti-inflammatory and healing properties. Among the single metabolites, vitexin was bactericidal against *H. pylori* at MBC 0.03 mg/ml, tigogenin and sarsasapogenin - at MBC 0.0625 mg/ml and diosgenin at MBC 0.125 mg/ml, while orientin demonstrated only bacteriostatic activity at MIC 0.125 mg/ml.

Established 2D LC methods may be used in the phytochemical analysis of fenugreek seeds of different origin and in C-glycosylflavones identification in other plant matrices.

Taking into account the absence of isoflavones and quantified low diosgenin content, *Foenugraeci Semen* of Polish origin seems to be a more secure plant material in comparison to fenugreek seeds of Asian origin, regarding its potential effects on the human sex hormones.

BIBLIOGRAFIA

1. <http://www.nutritional-supplement-educational-centre.com/benefits-of-fenugreek.html> [dostęp 01.10.2014].
2. https://en.wikipedia.org/wiki/Fenugreek#/media/File:Illustration_Trigonella_foenum-graecum0_clean.jpg [dostęp 10.10.2014].
3. http://shim-pol.pl/1,16,39,40,45-0-0-Kolumny_chromatograficzne_Kinetex_.html [dostęp 05.04.2016].
4. <http://www.aceabio.com/product/rta-dp/>; ACEA Biosciences Inc. [dostęp 01.08.2016].
5. <http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=WAT086344> [dostęp 05.04.2016].
6. <http://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology> [dostęp 05.04.2016].
7. <http://www.iz.binoz.uj.edu.pl/documents/4416519/044eb26a-6715-4984-9cc0-adf27e70b267> [dostęp 01.08.2016].
8. Abbasi E, Nassiri-Asl M, Shafeei M, Sheikhi M (2012) Neuroprotective effects of vitexin, a flavonoid, on pentylenetetrazole-induced seizure in rats. *Chemical Biology and Drug Design* 80:274-278
9. Abd El Rahman AMM (2014) Hypoglycemic and hypolipidemic effect of fenugreek in different forms on experimental rats. *World Applied Sciences Journal* 29:835-841
10. Abd-Alrahman SH, Salem-Bekhit MM (2013) Phytochemical screening and antimicrobial activity of EthOH/water *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) extracts. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 7:417-422
11. Abdelatif AM, Ibrahim MY, Mahmoud AS (2012) Antidiabetic effects of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Research Journal of Medicinal Plant* 6:449-455
12. Abeed Al Mashkor IM (2014) Phenolic content and antioxidant activity of fenugreek seeds extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 6:841-844
13. Acharya SN, Thomasl JE, Basu SK (2006) Fenugreek: an "old world" crop for the "new world". *Biodiversity (Tropical, Conservancy)* 7 (3 & 4):27-30
14. Acharya SN, Acharya K, Paul S, Basu SK (2011) Antioxidant and antileukemic properties of selected fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) genotypes grown in western Canada. *Canadian Journal of Plant Science* 91:99-105
15. Adamska M, Lutomski J (1971) C-flavonoid glycosides in the seeds of *Trigonella foenum-graecum*. *Planta Medica* 20:224-229
16. Ahmad M, Ismanil N, Ismanil Z (1995) Pharmacognostic profile of *Trigonella* seeds and its hypoglycaemic activity. *Natural Product Sciences* 1:25-30
17. Ahmadiani A, Javan M, Semnani S, Barat E, Kamalinejad M (2001) Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaves extract in the rat. *Journal of Ethnopharmacology* 75:283-286
18. Ahn MJ, Kim J (2005) Identification and quantification of steroidal saponins in *Polygonatum* species by HPLC/ESI/MS. *Archives of Pharmacal Research* 28:592-597
19. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WST, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue LF, Mrak R, MacKenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 21:383-421
20. Aktas HG, Altun S (2015) *In vitro* antitumor effects of a new cultivar (GÜrarslan) of *Trigonella foenum-graecum* L. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 12:113-119
21. Al-Daghri NM, Alkail MS, Alkharfy KM, Mohammed AK, Abd-Alrahman SH, Yakout SM, Amer OE, Krishnaswamy S (2012) Fenugreek extract as an inducer of cellular death via autophagy in human T lymphoma Jurkat cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*:202-210
22. Al-dalain S, El-kutry MS, Ibrahim HS (2008) Inhibitory effect of aqueous extracts of barley and fenugreek on ulcer induction in rats. *World Applied Sciences Journal* 5:332-339
23. Al-Habori M, Raman A (1998) Antidiabetic and hypocholesterolaemic effects of fenugreek. *Phytotherapy Research* 12:233-242
24. Al-Okbi SY, Mohamed DA (2012) Preparation and evaluation of functional foods in adjuvant arthritis. *Grasas y Aceites* 63:394-402
25. Al-Oqail MM, Farshori NN, Al-Sheddi ES, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, Siddiqui MA (2013) *In vitro* cytotoxic activity of seed oil of fenugreek against various cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14:1829-1832
26. Alcock NW, Crout DHG, Gregorio MVM, Lee E, Pike G, Samuel CJ (1989) Stereochemistry of the 4-hydroxyisoleucine from *Trigonella foenum-graecum*. *Phytochemistry* 28:1835-1841
27. Ali F, Sultana S (2010) *Trigonella foenum-graecum* prevents pathological exacerbation by toxic insults following chronic restraint stress in mice skin. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 7:110-116
28. Ali H, Dixit S (2012) *In vitro* antimicrobial activity of flavanoids of *Ocimum sanctum* with synergistic effect of their combined form. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2:S396-S398
29. Ali L, Azad Khan AK, Hassan Z, Mosihuzzaman M, Nahar N, Nasreen T, Nur-e-Alam M, Rokeya B (1995) Characterization of the hypoglycemic effects of *Trigonella foenum-graecum* seed. *Planta Medica* 61:358-360
30. Almeida AAP, Naghetini CC, Santos VR, Antonio AG, Farah A, Glória MBA (2012) Influence of natural coffee compounds, coffee extracts and increased levels of caffeine on the inhibition of *Streptococcus mutans*. *Food Research International* 49:459-461
31. Alsemari A, Alkhodairy F, Aldakan A, Al-Mohanna M, Bahoush E, Shinwari Z, Alaiya A (2014) The selective cytotoxic anti-cancer properties and proteomic analysis of *Trigonella foenum-graecum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14:1-7
32. Alshatwi AA, Shafi G, Hasan TN, Syed NA, Khoja KK (2013) Fenugreek induced apoptosis in breast cancer MCF-7 cells mediated independently by fas receptor change. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14:5783-5788
33. Alzoreky NS, Nakahara K (2003) Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology* 80:223-230
34. Amin A, Alkaabi A, Al-Falasi S, Daoud SA (2005) Chemopreventive activities of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) against breast cancer. *Cell Biology International* 29:687-694
35. Amir M, Ahmad A, Siddique N, Mujeeb M, Ahmad S, Siddique W (2012) Development and validation of HPTLC method for the estimation of diosgenin in *in vitro* culture and rhizome of *Dioscorea deltoidea*. *Acta Chromatographica* 24:111-121

36. Amundson SA, Do Kt Fau - Vinikoor LC, Vinikoor Lc Fau - Lee RA, Lee Ra Fau - Koch-Paiz CA, Koch-Paiz Ca Fau - Ahn J, Ahn J Fau - Reimers M, Reimers M Fau - Chen Y, Chen Y Fau - Scudiero DA, Scudiero Da Fau - Weinstein JN, Weinstein Jn Fau - Trent JM, Trent Jm Fau - Bittner ML, Bittner Ml Fau - Meltzer PS, Meltzer Ps Fau - Fornace AJ, Jr., Fornace AJ, Jr. Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen.
37. An F, Wang S, Tian Q, Zhu D (2015) Effects of orientin and vitexin from *Trollius chinensis* on the growth and apoptosis of esophageal cancer EC-109 cells. *Oncology Letters* 10:2627-2633
38. Andersen QM, Markham KM (ed) (2006) *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press, Boca Raton
39. Andrews P, Hough L, Jones JKN (1952) Mannose-containing polysaccharides. Part II. The galactomannan of fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*). *Journal of the Chemical Society*:2730-2735
40. Aqil F, Ahmad I (2003) Broad-spectrum antibacterial and antifungal properties of certain traditionally used indian medicinal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19:653-657
41. Aradhana, Rao AR, Kale RK (1992) Diosgenin. A growth stimulator of mammary gland of ovariectomized mouse. *Indian Journal of Experimental Biology* 30:367-370
42. Ardelean A, Pribac G, Hermenean A, Czapar M, Mathe E, Moş L, Cotoraci C, Bulzan O, Crăciun C (2010) Cytostatic and cytotoxic effects of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed extract. *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii* 20:25-29
43. Arivalagan M, Gangopadhyay KK, Kumar G (2013) Determination of steroidal saponins and fixed oil content in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) genotypes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 75:110-113
44. Ashihara H, Ludwig IA, Katahira R, Yokota T, Fujimura T, Crozier A (2014) Trigonelline and related nicotinic acid metabolites: occurrence, biosynthesis, taxonomic considerations, and their roles in planta and in human health. *Phytochemistry Reviews* 14:765-798
45. Asif M, Umar S, Khan HA (2012) *Trigonella foenum-graecum* mitigates proteases and restores antioxidant balance in collagen induced arthritis in rats. *International Journal of Pharmaceutical Research* 4:104-109
46. Aswar U, Bodhankar SL, Mohan V, Thakurdesai PA (2010) Effect of furostanol glycosides from *Trigonella foenum-graecum* on the reproductive system of male albino rats. *Phytotherapy Research* 24:1482-1488
47. Atay AA, Kismet E, Turkbay T, Kocaoglu M, Demirkaya E, Sarici SU, Congologlu A, Gokcay E (2005) Bone mass toxicity associated with inhalation exposure to toluene. *Biological Trace Element Research* 105:197-203
48. Aturki Z, Brandi V, Sinibaldi M (2004) Separation of flavanone-7-O-glycoside diastereomers and analysis in citrus juices by multidimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5303-5308
49. Aumswan P, Khan SI, Khan IA, Ali Z, Avula B, Walker LA, Shariat-Madar Z, Helferich WG, Katzenellenbogen BS, Dasmahapatra AK (2016) The anticancer potential of steroidal saponin, dioscin, isolated from wild yam (*Dioscorea villosa*) root extract in invasive human breast cancer cell line MDA-MB-231 *in vitro*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 591:98-110
50. Avula B, Wang YH, Wang M, Ali Z, Smillie TJ, Zweigenbaum J, Khan IA (2014) Characterization of steroidal saponins from *Dioscorea villosa* and *cayenensis* using ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Planta Medica* 80:321-329
51. Azari O, Kheirandish R, Shojaeepour S (2014) Protective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*) extract against experimental gastric ulcer in rats. *Comparative Clinical Pathology* 23:1743-1748
52. Babu RK, Yogesh, Raghavendra HL, Kantikar SM, Prakash KB (2010) Antidiabetic and histopathological analysis of fenugreek extract on alloxan induced diabetic rats. *International Journal of Drug Development and Research* 2:356-364
53. Bae MJ, Shin HS, Choi DW, Shon DH (2012) Antiallergic effect of *Trigonella foenum-graecum* L. extracts on allergic skin inflammation induced by trimellitic anhydride in BALB/c mice. *Journal of Ethnopharmacology* 144:514-522
54. Baggett BR, Cooper JD, Hogan ET, Carper J, Paiva NL, Smith JT (2002) Profiling isoflavonoids found in legume root extracts using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23:1642-1651
55. Bai Y, Qu XY, Yin JQ, Wu L, Jiang H, Long HW, Jia Q (2014) Methyl protodioscin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung cancer cells. *Pharmacognosy Magazine* 10:318-324
56. Basile A, Giordano S, López-Sáez JA, Cobianchi RC (1999) Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52:1479-1482
57. Basnyat S, Kolasinski SL (2014) Ayurvedic medicine for rheumatoid arthritis. *Current Rheumatology Reports* 16:435-443
58. Batta B, Katoch A, Bhatia VK, Patil S, Sharma PC (2013) Screening of leaf extracts of *Azadirachta indica* (Neem), *Aegle marmelos* (Bael) and *Trigonella foenum-graecum* (Methi) for their inhibitory activity on the strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida spp.* *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 19:42-46
59. Bawadi HA, Maghaydah SN, Tayyem RF (2009) The postprandial hypoglycemic activity of fenugreek seed and seeds' extract in type 2 diabetics: A pilot study. *Pharmacognosy Magazine* 4:134-138
60. Bedekar AN, Pise A, Naik A, Bhosale P (2009) Standardisation of fenugreek extract using 4-hydroxyisoleucine as a marker compound. *Journal of the Indian Chemical Society* 86:192-194
61. Beelders T, Kalili KM, Joubert E, De Beer D, De Villiers A (2012) Comprehensive two-dimensional liquid chromatographic analysis of rooibos (*Aspalathus linearis*) phenolics. *Journal of Separation Science* 35:1808-1820
62. Belaïd-Nouira Y, Bakhta H, Bouaziz M, Flehi-Slim I, Haouas Z, Ben Cheikh H (2012) Study of lipid profile and parieto-temporal lipid peroxidation in AICl₃ mediated neurotoxicity. Modulatory effect of fenugreek seeds. *Lipids in health and disease* 11:16-24
63. Belaïd-Nouira Y, Bakhta H, Samoud S, Trimech M, Haouas Z, Cheikh HB (2013) A novel insight on chronic AICl₃ neurotoxicity through IL-6 and GFAP expressions: Modulating effect of functional food fenugreek seeds. *Nutritional Neuroscience* 16:218-224
64. Belguith-Hadriche O, Bouaziz M, Jamoussi K, Feki AEL, Sayadi S, Makni-Ayedi F (2010) Lipid-lowering and antioxidant effects of an ethyl acetate extract of fenugreek seeds in high-cholesterol-fed rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:2116-2122

65. Belguith-Hadriche O, Bouaziz M, Jamoussi K, Simmonds MSJ, El Feki A, Makni-Ayedi F (2013) Comparative study on hypocholesterolemic and antioxidant activities of various extracts of fenugreek seeds. *Food Chemistry* 138:1448-1453
66. Benayad Z, Gómez-Cordovés C, Es-Safi NE (2014) Identification and quantification of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) germinated seeds by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 35:21-29
67. Berglund T (1994) Nicotinamide, a missing link in the early stress response in eukaryotic cells: A hypothesis with special reference to oxidative stress in plants. *FEBS Letters* 351:145-149
68. Berglund T, Kalbin G, Strid Å, Rydström J, Ohlsson AB (1996) UV-B- and oxidative stress-induced increase in nicotinamide and trigonelline and inhibition of defensive metabolism induction by poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor in plant tissue. *FEBS Letters* 380:188-193
69. Bernhardt V, D'Souza JRT (2012) Immunomodulatory potential of herbal medicine in type 2 DM patients as evaluated by neutrophil phagocytic index, serum opsonisation and lymphocyte proliferation rate. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5:36-41
70. Bessède E, Staedel C, Acuña Amador LA, Nguyen PH, Chambonnier L, Hatakeyama M, Belleannée G, Mégraud F, Varon C (2014) *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene* 33:4123-4131
71. Bhalke RD, Anarthe SJ, Sasane KD, Satpute SN, Shinde SN, Sangle VS (2009) Antinociceptive activity of *Trigonella foenum-graecum* leaves and seeds (*Fabaceae*). *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 8:57-59
72. Bhaskar A, Vidhya VG, Gopinath TN (2010) Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) on diabetes induced oxidative stress and tissue antioxidants in streptozotocin diabetic rats. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 7:419-424
73. Biglar M, Sufi H, Bagherzadeh K, Amanlou M, Mojab F (2014) Screening of 20 commonly used Iranian traditional medicinal plants against urease. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 13:195-198
74. Biswal S, Das MC, Nayak P (2003) Antinociceptive activity of seeds of *Trigonella foenum-graecum* in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 47:479-480
75. Bitko V, Barik S (2000) An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. *Journal of Cellular Biochemistry* 80:441-454
76. Blank I, Fay LB (1996) Formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone through maillard reaction based on pentose sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:531-536
77. Blank I, Lin J, Devaud S, Fumeaux R, Fay LB (1997) The Principal Flavor Components of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *ACS Symposium Series* 660:11-28
78. Boban PT, Nambisan B, Sudhakaran PR (2006) Hypolipidaemic effect of chemically different mucilages in rats: A comparative study. *British Journal of Nutrition* 96:1021-1029
79. Bogacheva NG, Kiselev VP, Kogan LM (1976) Isolation of 3,26-bisglycoside of yamogenin from *Trigonella foenum-graecum*. *Chemistry of Natural Compounds* 12:242-243
80. Bogacheva NG, Ulezlo IV, Kogan LM (1977) Steroid genins of the seeds of *Trigonella foenum-graecum*. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 10:343-345
81. Bogdanovic A, Tadic V, Stamenic M, Petrovic S, Skala D (2016) Supercritical carbon dioxide extraction of *Trigonella foenum-graecum* L. seeds: Process optimization using response surface methodology. *Journal of Supercritical Fluids* 107:44-50
82. Borkowski B (1973) Chromatografia cienkwarstwowa w analizie farmaceutycznej, PZWL, Warszawa
83. Brenac P, Sauvaire Y (1996) Accumulation of sterols and steroidal sapogenins in developing fenugreek pods: Possible biosynthesis in situ. *Phytochemistry* 41:415-422
84. Brenac P, Sauvaire Y (1996) Chemotaxonomic value of sterols and steroidal sapogenins in the genus *Trigonella*. *Biochemical Systematics and Ecology* 24:157-164
85. Bruneton J (1999) Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Lavoisier, Londyn
86. Cacciola F, Jandera P, Hajdú Z, Česla P, Mondello L (2007) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with parallel gradients for separation of phenolic and flavone antioxidants. *Journal of Chromatography A* 1149:73-87
87. Cacciola F, Jandera P, Mondello L (2007) Comparison of high-temperature gradient heart-cutting and comprehensive LC x LC systems for the separation of phenolic antioxidants. *Chromatographia* 66:661-667
88. Cacciola F, Delmonte P, Jaworska K, Dugo P, Mondello L, Rader JI (2011) Employing ultra high pressure liquid chromatography as the second dimension in a comprehensive two-dimensional system for analysis of *Stevia rebaudiana* extracts. *Journal of chromatography A* 1218:2012-2018
89. Can O, Demir Özkay U, Üçel UI (2012) Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms. *European Journal of Pharmacology* 699:250-257
90. Cao J, Du D, Qin Y, Yin C, Cheng Z (2015) Microwave-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry for the determination of three flavone di-C-glycosides in *Viola yedoensis*. *Current Analytical Chemistry* 11:225-233
91. Cardellina JH (2002) Challenges and opportunities confronting the botanical dietary supplement industry. *Journal of Natural Products* 65:1073-1084
92. Carpenter CP, Geary Jr DL, Myers RC, Nachreiner DJ, Sullivan LJ, King JM (1976) Petroleum hydrocarbon toxicity studies. XIII. Animal and human response to vapors of toluene concentrate. *Toxicology and Applied Pharmacology* 36:473-490
93. Cerdon C, Rahier A, Taton M, Sauvaire Y (1995) Effect of diniconazole on sterol composition of roots and cell suspension cultures of fenugreek. *Phytochemistry* 39:883-893
94. Chatterjee S, Variyar PS, Sharma A (2010) Bioactive lipid constituents of fenugreek. *Food Chemistry* 119:349-353
95. Chaturvedi U, Shrivastava A, Bhadauria S, Saxena JK, Bhatia G (2013) A mechanism-based pharmacological evaluation of efficacy of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds in regulation of dyslipidemia and oxidative stress in hyperlipidemic rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 61:505-512
96. Chaudhary S, Chikara SK, Sharma MC, Chaudhary A, Syed BA, Chaudhary PS, Mehta A, Patel M, Ghosh A, Iriti M (2015) Elicitation of diosgenin production in *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seedlings by methyl jasmonate. *International Journal of Molecular Sciences* 16:29889-29899

97. Chauhan G, Sharma M, Varma A, Kharkwal H (2010) Phytochemical analysis and anti-inflammatory potential of fenugreek. *Medicinal Plants - International Journal of Phytomedicines and Related Industries* 2:39-44
98. Chelyn JL, Omar MH, Mohd Yousof NSA, Ranggasamy R, Wasiman MI, Ismail Z (2014) Analysis of flavone C-glycosides in the leaves of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau by HPTLC and HPLC-UV/DAD. *Scientific World Journal* 2014:1-6
99. Chen J, Li HM, Zhang XN, Xiong CM, Ruan JL (2014) Dioscin-induced apoptosis of human LNCaP prostate carcinoma cells through activation of caspase-3 and modulation of Bcl-2 protein family. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science* 34:125-130
100. Chen X, Jiang Z, Zhu Y, Tan J (2007) Use of two-dimensional liquid chromatography combined with diode-array and mass spectrometric detection for analysis of compounds in *Flos Lonicera*. *Chromatographia* 65:141-147
101. Ching KA, Wang K, Kan Z, Fernandez J, Zhong W, Kostrowicki J, Xie T, Zhu Z, Martini JF, Koehler M, Arndt K, Rejto P (2015) Cell index database (CELLX): A web tool for cancer precision medicine. In: 20th Pacific Symposium on Biocomputing 2015:10-19
102. Chmielewska K (2013) System RealTime xCELLigence, a metoda MTT w badaniach programowanej śmierci komórek nowotworowych. Praca magisterska. Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny. Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk
103. Choo CY, Sulong NY, Man F, Wong TW (2012) Vitexin and isovitexin from the Leaves of *Ficus deltoidea* with *in vivo* α -glucosidase inhibition. *Journal of Ethnopharmacology* 142:776-781
104. Ciftci ON, Przybylski R, Rudzinska M, Acharya S (2011) Characterization of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 18:1603-1610
105. Colombo R, Yariwake JH, Queiroz EF, Ndjoko K, Hostettmann K (2006) On-line identification of further flavone C- and O-glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., *Gramineae*) by HPLC-UV-MS. *Phytochemical Analysis* 17:337-343
106. Corbiere C, Liagre B, Bianchi A, Bordji K, Dauça M, Netter P, Beneytout JL (2003) Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *International Journal of Oncology* 22:899-905
107. Corbiere C, Liagre B, Terro F, Beneytout JL (2004) Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. *Cell Research* 14:188-196
108. Dadrasan M, Chaichi MR, Pourbabae AA, Yazdani D, Keshavarz-Afshar R (2015) Deficit irrigation and biological fertilizer influence on yield and trigonelline production of fenugreek. *Industrial Crops and Products* 77:156-162
109. Dakora FD, Phillips DA (1996) Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49:1-20
110. Dande P, Patil S (2012) Evaluation of saponins from *Trigonella foenum-graecum* seeds for its antifertility activity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5:154-157
111. Davis KS (1978) The story of the pill. *American heritage* 29:80-91
112. Dawidar AM, Fayez MBE (1972) Thin-layer chromatographic detection and estimation of steroid saponins in fenugreek - Steroid Saponins. XIV. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* 259:283-285
113. Dawidar AM, Saleh AA, Elmotei SL (1973) Steroid saponin constituents of fenugreek seeds. *Planta Medica* 24:367-370
114. De Britto AJ, Gracelin DHS, Benjamin P, Kumar JR (2012) Antibacterial potency and synergistic effects of a few south Indian spices against antibiotic resistant bacteria. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 3:557-562
115. De Candolle A (1964) Origin of cultivated plants. Hafner, New York
116. De Combarieu E, Falzoni M, Fuzzati N, Gattesco F, Giori A, Lovati M, Pace R (2002) Identification of *Ruscus* steroidal saponins by HPLC-MS analysis. *Fitoterapia* 73:583-596
117. De Combarieu E, Fuzzati N, Lovati M, Mercalli E (2003) Furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. *Fitoterapia* 74:583-591
118. de Costa F, Yendo ACA, Fleck JD, Gosmann G, Fett-Neto AG (2011) Immunoadjuvant and anti-inflammatory plant saponins: Characteristics and biotechnological approaches towards sustainable production. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 11:857-880
119. De D, De B (2011) Elicitation of diosgenin production in *Trigonella foenum-graecum* L. seedlings by heavy metals and signaling molecules. *Acta Physiologiae Plantarum* 33:1585-1590
120. de Lourdes Contreras-Pacheco M, Santacruz-Ruvalcaba F, García-Fajardo JA, de Jesús Sánchez G J, Ruíz L MA, Estarrón-Espinosa M, Castro-Castro A (2013) Diosgenin quantification, characterisation and chemical composition in a tuber collection of *Dioscorea* spp. in the state of Jalisco, Mexico. *International Journal of Food Science and Technology* 48:2111-2118
121. de Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112:31-63
122. de Souza LM, Cipriani TR, Sant'Ana CF, Iacomini M, Gorin PAJ, Sasaki GL (2009) Heart-cutting two-dimensional (size exclusion \times reversed phase) liquid chromatography-mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Chromatography A* 1216:99-105
123. de Villiers A, Venter P, Pasch H (2015) Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*
124. Dewick PM (2009) *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3rd edition. John Wiley & Sons, Chichester, UK
125. Dharajiya D, Jasani H, Khatrani T, Kapuria M, Pachchigar K, Patel P (2016) Evaluation of antibacterial and antifungal activity of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8:212-217
126. Dinan L, Harmatha J, Lafont R (2001) Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *Journal of Chromatography A* 935:105-123
127. Dirk LMA, Van Der Krol AR, Vreugdenhil D, Hilhorst HWM, Bewley JD (1999) Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 37:41-50
128. Dixit P, Ghaskadbi S, Mohan H, Devasagayam TPA (2005) Antioxidant properties of germinated fenugreek seeds. *Phytotherapy Research* 19:977-983

129. Dixon RA (2004) Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology* 55:225-261
130. Donald JM, Hooper K, Hopenhayn-Rich C (1991) Reproductive and development toxicity of toluene: A review. *Environmental Health Perspectives* 94:237-244
131. Dołowy M (2012) Qualitative and quantitative analysis of diosgenin in pure substance by TLC-densitometry. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* 25:310-316
132. Dragomirescu A, Muresan A, Alexa E, Andoni M (2009) A HPLC evaluation of genistein - An estrogen-mimetic phytoestrogen in *Glycine max* (soy) beans. *Acta Endocrinologica* 5:41-47
133. Drapeau D, Sauvaire Y, Blanch HW, Wilke CR (1986) Improvement of diosgenin yield from *Dioscorea deltoidea* plant cell cultures by use of a nontraditional hydrolysis method. *Planta Medica* 6:474-478
134. Drzycimska-Tatka B, Drab-Rybczyńska A, Kasprzak J (2011) Metabolic disorder syndrome – an epidemic of 21st century [Zespół metaboliczny – epidemia XXI wieku]. *Hygeia Public Health* 46:423-430
135. Dugo P, Kumm T, Cacciola F, Dugo G, Mondello L (2008) Multidimensional liquid chromatographic separations applied to the analysis of food samples. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 31:1758-1807
136. Dugo P, Cacciola F, Donato P, Jacques RA, Caramão EB, Mondello L (2009) High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. *Journal of Chromatography A* 1216:7213-7221
137. Dumitriu BG, Olariu L, Ene MD, Zglimbea L, Roșoiu N (2013) Photo-protective activity of compounds isolated from fenugreek, alfalfa and wheat with therapeutically impact. *Archives of the Balkan Medical Union* 48:204-210
138. Dweck AC (2006) Isoflavones, phytohormones and phytosterols. *Journal of Applied Cosmetology* 24:17-32
139. Eagon PK, Tress NB, Ayer HA, Wiese JM, Henderson T, Elm MS, Eagon CL (1999) Medicinal botanicals with hormonal activity. *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting* 1999:161-162
140. El-Mahdy AR, El-Sebaïy LA (1985) Proteolytic activity, amino acid composition and protein quality of germinating fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Food Chemistry* 18:19-33
141. Elman A, Balgees A, Mangara JL (2012) Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed dietary levels on lipid profile and body weight gain of rats. *Pakistan Journal of Nutrition* 11:1004-1008
142. Erni F, Frei RW (1978) Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures. *Journal of Chromatography A* 149:561-569
143. Es-Safi NE, Gómez-Cordovés C (2014) Characterization of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) crude seeds by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 15:20668-20685
144. Farag MA, Rasheed DM, Kropf M, Heiss AG (2016) Metabolite profiling in *Trigonella* seeds via UPLC-MS and GC-MS analyzed using multivariate data analyses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*:1-14
145. Fazli FR (1968) Contraceptives and other steroid drugs: their production from steroidal saponin. *Pakistan Journal of Science* 20:64-67
146. Fazli FRY, Hardman R (1971) Isolation and characterization of steroids and other constituents from *Trigonella foenum-graecum*. *Phytochemistry* 10:2497-2503
147. Ferreres F, Silva BM, Andrade PB, Seabra RM, Ferreira MA (2003) Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochemical Analysis* 14:352-359
148. Ferreres F, Sousa C, Valentão P, Andrade PB, Seabra RM, Gil-Izquierdo Á (2007) New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:10187-10193
149. Filipkowska K (2010) Badania metabolitów wtórnych w cebuli zwyczajnej *Allium cepa* L. Praca magisterska. Katedra i Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych. Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk
150. Fouedjou RT, Teponno RB, Quassinti L, Bramucci M, Petrelli D, Vitali LA, Fiorini D, Tapondjou LA, Barboni L (2014) Steroidal saponins from the leaves of *Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev. and their cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochemistry Letters* 7:62-68
151. Powden L, Pratt HM, Smith A (1973) 4-Hydroxyisoleucine from seed of *Trigonella foenum-graecum*. *Phytochemistry* 12:1707-1711
152. Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K (2002) The biological action of saponins in animal systems: A review. *British Journal of Nutrition* 88:587-605
153. Freeman JR, Aboul-Ela MM (1973) Influence of postirradiation washing on the growth and mineral content of *Trigonella foenum-graecum* L. seedlings. *Radiation Botany* 13:185-190
154. Fried B, Sherma J (ed) (1999) *Thin-Layer Chromatography*, 4th, Revised and Expanded edn, New York
155. Gao X, Sun W, Fu Q, Niu X (2015) Rapid identification of steroidal saponins in *Trillium tschonoskii* Maxim by ultraperformance liquid chromatography coupled to electrospray ionisation quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* 26:269-278
156. Garti N, Madar Z, Aserin A, Sternheim B (1997) Fenugreek galactomannans as food emulsifiers. *LWT - Food Science and Technology* 30:305-311
157. Gaur V, Bodhankar SL, Mohan V, Thakurdesai P (2012) Antidepressant-like effect of 4-hydroxyisoleucine from *Trigonella foenum-graecum* L. seeds in mice. *Biomedicine and Aging Pathology* 2:121-125
158. Genet S, Kale RK, Baquer NZ (2002) Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: Effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). *Molecular and Cellular Biochemistry* 236:7-12
159. Ghorbani A (2013) Phytotherapy for diabetic dyslipidemia: Evidence from clinical trials. *Clinical Lipidology* 8:311-319
160. Ghorbani A, Hadjzadeh MAR, Rajaei Z, Zندهbad SB (2014) Effects of fenugreek seeds on adipogenesis and lipolysis in normal and diabetic rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 17:523-528
161. Ghosh VK, Bhoje SG, Kuber VV, Sagulale AD (2012) An improved method for the extraction and quantitation of diosgenin in *Tribulus terrestris* L. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 35:1141-1155
162. Gikas E, Bazoti FN, Papadopoulos N, Alesta A, Economou G, Tsaibopoulos A (2011) Quantitation of the flavonols quercetin and kaempferol in the leaves of *Trigonella foenum-graecum* by high-performance liquid chromatography - diode array detection. *Analytical Letters* 44:1463-1472
163. Girardon P, Bessiere JM, Baccou JC, Sauvaire Y (1985) Volatile constituents of fenugreek seeds. *Planta Medica* 6:533-534

164. Girardon P, Sauvaire Y, Baccou JC, Bessiere JM (1986) Identification de la 3-Hydroxy-4,5-Diméthyl-2(5H)-Furanone dans l'Arôme des Graines de Fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.). [Identification of 3-Hydroxy-4,5-Dimethyl-2(5H)-Furanone in aroma of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum* L.)]. LWT - Food Science and Technology 19:44-46
165. Glensk M, Cisowski W (2000) Two-dimensional TLC with an adsorbent gradient for analysis of saponins in *Silene vulgaris* Garcke. Journal of Planar Chromatography - Modern TLC 13:9-11
166. Glensk M, Bialy Z, Jurzysta M, Cisowski W (2001) Two-dimensional TLC with a sorbent gradient for the analysis of alfalfa root saponins. Chromatographia 54:669-672
167. Gleńsk M, Włodarczyk M, Radom M, Cisowski W (2005) TLC as a rapid and convenient method for saponin investigation. Journal of Planar Chromatography - Modern TLC 18:167-170
168. Gopu CL, Gilda SS, Paradkar AR, Mahadik KR (2008) Development and validation of a Densitometric TLC method for analysis of trigonelline and 4-hydroxyisoleucine in fenugreek seeds. Acta Chromatographica 20:709-719
169. Graham DY (1997) *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: A model. Gastroenterology 113:1983-1991
170. Gris Martinez JM (2006) Isoflavones in menopause women. Medicina Clinica 127:352-356
171. Grover JK, Yadav S, Vats V (2002) Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. Journal of Ethnopharmacology 81:81-100
172. Grądzka I (2006) Mechanizmy i regulacja programowanej śmierci komórek. Postępy Biochemii 52:157-165
173. Guo Q, Tian X, Yang A, Zhou Y, Wu D, Wang Z (2014) Orientin in *Trollius chinensis* Bunge inhibits proliferation of HeLa human cervical carcinoma cells by induction of apoptosis. Monatshefte für Chemie 145:229-233
174. Gupta A, Gupta R, Lal B (2001) Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A double blind placebo controlled study. Journal of Association of Physicians of India 49:1057-1061
175. Gupta PK, Nagore DH, Kuber VV, Purohit S (2012) A validated RP-HPLC method for the estimation of diosgenin from polyherbal formulation containing *Tribulus terrestris* Linn. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 5:91-94
176. Gupta RK, Jain DC, Thakur RS (1984) Furostanol glycosides from *Trigonella foenum-graecum* seeds. Phytochemistry 23:2605-2607
177. Gupta RK, Jain DC, Thakur RS (1985) Furostanol glycosides from *Trigonella foenum-graecum* seeds. Phytochemistry 24:2399-2401
178. Gupta RK, Jain DC, Thakur RS (1985) Droplet counter current chromatography of furostanol glycosides of *Trigonella foenum-graecum*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 47:25-26
179. Gupta RK, Jain DC, Thakur RS (1986) Two furostanol saponins from *Trigonella foenum-graecum*. Phytochemistry 25:2205-2207
180. Gupta RK, Jain DC, Thakur RS (1986) Minor steroidal saponins from fenugreek seeds, *Trigonella foenum-graecum*. Journal of Natural Products 49:1153-1156
181. Gupta SK, Kalaiselvan V, Srivastava S, Saxena R, Agrawal SS (2009) *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) protects against selenite-induced oxidative stress in experimental cataractogenesis. Biological Trace Element Research 136:258-268
182. Gómez P, Ortuño A, Del Río JA (2004) Ultrastructural changes and diosgenin content in cell suspensions of *Trigonella foenum-graecum* L. by ethylene treatment. Plant Growth Regulation 44:93-99
183. Ha YW, Na YC, Seo JJ, Kim SN, Linhardt RJ, Kim YS (2006) Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in *Platycodi Radix* by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1135:27-35
184. Haeri MR, Izaddoost M, Ardekani MRS, Nobar MR, White KN (2009) The effect of fenugreek 4-hydroxyisoleucine on liver function biomarkers and glucose in diabetic and fructose-fed rats. Phytotherapy Research 23:61-64
185. Haeri MR, Shams-Ardakani MR, Rahbani M, Izaddust M, Khanavi M (2010) Quantification of 4-hydroxyisoleucine content in treated and untreated fenugreek seeds using GC. Journal of Medicinal Plants 9:90-94
186. Haeri MR, Izaddoost M, Ardekani MRS, White K (2011) Improved isolation of 4-hydroxyisoleucine from *Trigonella foenum-graecum* seeds. Chemistry of Natural Compounds 47:157-158
187. Haeri MR, Limaki HK, White CJB, White KN (2012) Non-insulin dependent anti-diabetic activity of (2S, 3R, 4S) 4-hydroxyisoleucine of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) in streptozotocin-induced type i diabetic rats. Phytomedicine 19:571-574
188. Hahn-Deinstrop E (2007) Applied thin-layer chromatography. Best practice and avoidance of mistakes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim
189. Hajimehdipoor H, Sadat-Ebrahimi SE, Amanzadeh Y, Izaddoost M, Givi E (2010) Identification and quantitative determination of 4-hydroxyisoleucine in *Trigonella foenum-graecum* L. from Iran. Journal of Medicinal Plants 9:29-34
190. Hakimi S, Mohammad Alizadeh S, Delazar A, Abbasalizadeh F, Bamdad Mogaddam R, Siiahi MR, Mostafa Garabagi P (2006) Probable effects of fenugreek seed on hot flash in menopausal women. Journal of Medicinal Plants 5:9-14+65
191. Hamden K, Masmoudi H, Carreau S, Elfeki A (2010) Immunomodulatory, β -cell, and neuroprotective actions of fenugreek oil from alloxan-induced diabetes. Immunopharmacology and Immunotoxicology 32:437-445
192. Hamden K, Bengara A, Amri Z, Elfeki A (2013) Experimental diabetes treated with trigonelline: Effect on key enzymes related to diabetes and hypertension, β -cell and liver function. Molecular and Cellular Biochemistry 381:85-94
193. Hamza N, Berke B, Cheze C, Le Garrec R, Umar A, Agli AN, Lassalle R, Jové J, Gin H, Moore N (2012) Preventive and curative effect of *Trigonella foenum-graecum* L. seeds in C57BL/6J models of type 2 diabetes induced by high-fat diet. Journal of Ethnopharmacology 142:516-522
194. Han Y, Nishibe S, Noguchi Y, Jin Z (2001) Flavonol glycosides from the stems of *Trigonella foenum-graecum*. Phytochemistry 58:577-580
195. Hannan JMA, Ali L, Rokeya B, Khaleque J, Akhter M, Flatt PR, Abdel-Wahab YHA (2007) Soluble dietary fibre fraction of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed improves glucose homeostasis in animal models of type 1 and type 2 diabetes by delaying carbohydrate digestion and absorption, and enhancing insulin action. British Journal of Nutrition 97:514-521

196. Haouala R, Hawala S, El-Ayeb A, Khanfir R, Boughanmi N (2008) Aqueous and organic extracts of *Trigonella foenum-graecum* L. inhibit the mycelia growth of fungi. *Journal of Environmental Sciences* 20:1453-1457
197. Harchane H, El Addas H, Amsaguine S, El Amrani N, Radallah D (2012) Effects of the aqueous extract of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*) on improving the lipid profile and weight gain in rats. *Phytotherapie*:1-6
198. Hardman R, Brain KR (1972) Variations in the yield of total and individual 25 - and 25 -sapogenins on storage of whole seed of *Trigonella foenum-graecum* L. *Planta Medica* 21:426-430
199. Hardman R, Fazli FR (1972) Labelled steroidal sapogenins and hydrocarbons from *Trigonella foenum-graecum* by acetate, mevalonate and cholesterol feeds to seeds. *Planta Medica* 21:188-195
200. Hardman R, Fazli FR (1972) Methods of screening the genus *Trigonella* for steroidal sapogenins. *Planta Medica* 21:131-138
201. Hardman R, Fazli FR (1972) Studies in the steroidal sapogenin yield from *Trigonella foenum-graecum* seed. *Planta Medica* 21:322-328
202. Hardman R, Kosugi J, Parfitt RT (1980) Isolation and characterization of a furostanol glycoside from fenugreek. *Phytochemistry* 19:698-700
203. Hasegawa H, Tanaka A, Hosoda A, Takano F, Ohta T (2008) Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasa kurilensis* var. *gigantea*. *Phytochemistry* 69:1419-1424
204. Herrero M, Ibáñez E, Cifuentes A, Bernal J (2009) Multidimensional chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A* 1216:7110-7129
205. Hibasami H, Moteki H, Ishikawa K, Katsuzaki H, Imai K, Yoshioka K, Ishii Y, Komiya T (2003) Protodioscin isolated from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) induces cell death and morphological change indicative of apoptosis in leukemic cell line H-60, but not in gastric cancer cell line KATO III. *International journal of molecular medicine* 11:23-26
206. Higdon K, Scott A, Tucci M, Benghuzzi H, Tsao A, Puckett A, Cason Z, Hughes J (2001) The use of estrogen, dhea, and diosgenin in a sustained delivery setting as a novel treatment approach for osteoporosis in the ovariectomized adult rat model. *Biomedical Sciences Instrumentation* 37:281-286
207. Hirai S, Takahashi N, Goto T, Lin S, Uemura T, Yu R, Kawada T (2010) Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators of Inflammation* 2010:1-8
208. Hirai S, Uemura T, Mizoguchi N, Lee JY, Taketani K, Nakano Y, Hoshino S, Tsuge N, Narukami T, Yu R, Takahashi N, Kawada T (2010) Diosgenin attenuates inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Molecular Nutrition and Food Research* 54:797-804
209. Hooker E (2004) Final report of the amended safety assessment of *Dioscorea villosa* (wild yam) root extract. *International Journal of Toxicology* 23:49-54
210. Hordyjewska A, Pasternak K (2005) Apoptotic death of the cell. *Advances in clinical and experimental medicine* 14:545-554
211. Horiuchi Y, Fujisaki J, Yamamoto N, Shimizu T, Miyamoto Y, Tomida H, Taniguchi C, Morishige K, Omae M, Ishiyama A, Yoshio T, Hirasawa T, Yamamoto Y, Tsuchida T, Igarashi M, Nakajima T, Takahashi H (2014) Biological behavior of the intramucosal *Helicobacter pylori*-negative undifferentiated-type early gastric cancer: comparison with *Helicobacter pylori*-positive early gastric cancer. *Gastric Cancer* 19:160-165
212. Hossain SJ, Aoshima H, Koda H, Kiso Y (2003) Effects of coffee components on the response of GABA-A receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:7568-7575
213. Hostettmann K, Marston A (1995) Saponins. Cambridge University Press, New York
214. Hsieh MJ, Yang SF, Hsieh YS, Chen TY, Chiou HL (2012) Autophagy inhibition enhances apoptosis induced by dioscin in Huh7 cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012
215. Hu K, Yao X (2002) Protodioscin (NSC-698 796): Its spectrum of cytotoxicity against sixty human cancer cell lines in an anticancer drug screen panel. *Planta Medica* 68:297-301
216. Hu M, Xu L, Yin L, Qi Y, Li H, Xu Y, Han X, Peng J, Wan X (2013) Cytotoxicity of dioscin in human gastric carcinoma cells through death receptor and mitochondrial pathways. *Journal of Applied Toxicology* 33:712-722
217. Huang CH, Cheng JY, Deng MC, Chou CH, Jan TR (2012) Prebiotic effect of diosgenin, an immunoreactive steroidal saponin of the Chinese yam. *Food Chemistry* 132:428-432
218. Huang X, Kong L (2006) Steroidal saponins from roots of *Asparagus officinalis*. *Steroids* 71:171-176
219. Huber JFK, Van Der Linden R, Ecker E, Oreans M (1973) Column switching in high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 83:267-277
220. Huo R, Zhou QL, Wang BX, Tashiro SI, Onodera S, Ikejima T (2004) Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway. *Acta Pharmacologica Sinica* 25:1077-1082
221. Hussein MM, El-Dewiny CY (2011) Mineral constituents of fenugreek varieties grown under water stress condition. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5:2904-2909
222. Hutchinson J (1964) The Genera of Flowering Plants. Clarendon Press, Oxford
223. Hájek T, Škeříková V, Česla P, Vyňuchalová K, Jandera P (2008) Multidimensional LC×LC analysis of phenolic and flavone natural antioxidants with UV-electrochemical coulometric and MS detection. *Journal of Separation Science* 31:3309-3328
224. Hájek T, Jandera P (2012) Columns and optimum gradient conditions for fast second-dimension separations in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 35:1712-1722
225. Ila P, Jagam P (1980) Multielement analysis of food spices by instrumental neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical Chemistry* 57:205-210
226. Ingham JL, Harborne JB (1976) Phytoalexin induction as a new dynamic approach to the study of systematic relationships among higher plants. *Nature* 260:241-243
227. Ingham JL (1981) Phytoalexin induction and its chemosystematic significance in the genus *Trigonella*. *Biochemical Systematics and Ecology* 9:275-281
228. Jagadeesan J, Nandakumar N, Rengarajan T, Balasubramanian MP (2012) Diosgenin, a steroidal saponin, exhibits anticancer activity by attenuating lipid peroxidation via enhancing antioxidant defense system during NMU induced breast carcinoma. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 31:121-129
229. Jain SC, Agrawal M, Sharma RA (1996) The genus *Trigonella* - phytochemistry and biology. *Ancient Science of life* XVI:108 -117

230. Jaiswal N, Maurya CK, Venkateswarlu K, Sukanya P, Srivastava AK, Narender T, Tamrakar AK (2012) 4-Hydroxyisoleucine stimulates glucose uptake by increasing surface GLUT4 level in skeletal muscle cells *via* phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. *European Journal of Nutrition* 51:893-898
231. Jandera P (2007) Column selection for two-dimensional LC×LC. *LC GC Europe* 20:510-525
232. Jandera P, Vyňuchalová K, Hájek T, Česla P, Vohralík G (2008) Characterization of HPLC columns for two-dimensional LC×LC separations of phenolic acids and flavonoids. *Journal of Chemometrics* 22:203-217
233. Jandera P, Hájek T, Česla P (2010) Comparison of various second-dimension gradient types in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 33:1382-1397
234. Jandera P, Hájek T, Česla P, Škeřiková V (2011) Advantages of two-dimensional liquid chromatography in the analysis of complex samples. *Chemija* 22:149-154
235. Jandera P (2012) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography - practical impacts of theoretical considerations. A review. *Central European Journal of Chemistry* 10:844-875
236. Jandera P (2012) Programmed elution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1255:112-129
237. Jastrzębska I, Morzycki JW (2015) Erroneous epimerization at C-22 in sapogenins. *Steroids* 100:17-20
238. Javan M, Ahmadiani A, Semnani S, Kamalinejad M (1997) Antinociceptive effects of *Trigonella foenum-graecum* leaves extract. *Journal of Ethnopharmacology* 58:125-129
239. Jiang JX, Zhu LW, Zhang WM, Sun RC (2007) Characterization of galactomannan gum from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and its rheological properties. *International Journal of Polymeric Materials* 56:1145-1154
240. Joshi M, Nair S (2014) HPLC analysis of *Trigonella foenum-graecum* seeds to assess phytoestrogens. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 3:61-64
241. Joshi R, Rajni M (2007) Lipid profile of rats fed on domestically processed fenugreek. *Journal of Food Science and Technology* 44:542-544
242. Jyothi D, Koland M, Priya S (2014) Investigation of anti-inflammatory activity of ointments containing fenugreek extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 7:66-69
243. Jäger AK, Gauguin B, Andersen J, Adersen A, Gudiksen L (2013) Screening of plants used in Danish folk medicine to treat depression and anxiety for affinity to the serotonin transporter and inhibition of MAO-A. *Journal of Ethnopharmacology* 145:822-825
244. Kalbin G, Ohlsson AB, Berglund T, Rydström J, Strid Å (1997) UV-B radiation causes changes in intracellular levels of nicotinamide, trigonelline and glutathione in *Pisum sativum* leaves. *Phyton - Annales Rei Botanicae* 37:115-124
245. Kalili KM, De Villiers A (2010) Off-line comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction × reversed phase liquid chromatographic analysis of green tea phenolics. *Journal of Separation Science* 33:853-863
246. Kalili KM, De Villiers A (2013) Systematic optimisation and evaluation of on-line, off-line and stop-flow comprehensive hydrophilic interaction chromatography × reversed phase liquid chromatographic analysis of procyanidins. Part II: Application to cocoa procyanidins. *Journal of Chromatography A* 1289:69-79
247. Kalili KM, De Villiers A (2013) Systematic optimisation and evaluation of on-line, off-line and stop-flow comprehensive hydrophilic interaction chromatography × reversed phase liquid chromatographic analysis of procyanidins, Part I: Theoretical considerations. *Journal of Chromatography A* 1289:58-68
248. Kamal R, Yadav R, Sharma JD (1993) Efficacy of the steroidal fraction of fenugreek seed extract on fertility of male albino rats. *Phytotherapy Research* 7:134-138
249. Kamanna VS, Kashyap ML (2008) Mechanism of action of niacin. *American Journal of Cardiology* 101:20-26
250. Kamble H, Kandhare AD, Bodhankar S, Mohan V, Thakurdesai P (2013) Effect of low molecular weight galactomannans from fenugreek seeds on animal models of diabetes mellitus. *Biomedicine and Aging Pathology* 3:145-151
251. Kamel MA, Hamza RZ, Abdel-Hamid NE, Mahmoud FA (2014) Anti-ulcer and gastro protective effects of fenugreek, ginger and peppermint oils in experimentally induced gastric ulcer in rats. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6:451-468
252. Kang LP, Yu K, Zhao Y, Liu YX, Yu HS, Pang X, Xiong CQ, Tan DW, Gao Y, Liu C, Ma BP (2012) Characterization of steroidal glycosides from the extract of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* by UPLC/Q-TOF MSE. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62:235-249
253. Kang LP, Zhao Y, Pang X, Yu HS, Xiong CQ, Zhang J, Gao Y, Yu K, Liu C, Ma BP (2013) Characterization and identification of steroidal saponins from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* by ultra high-performance liquid chromatography and hybrid time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 74:257-267
254. Kang TH, Moon E, Hong BN, Choi SZ, Son M, Park JH, Kim SY (2011) Diosgenin from *Dioscorea nipponica* ameliorates diabetic neuropathy by inducing nerve growth factor. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34:1493-1498
255. Kannappan S, Anuradha CV (2009) Insulin sensitizing actions of fenugreek seed polyphenols, quercetin and metformin in a rat model. *Indian Journal of Medical Research* 129:401-408
256. Kapoor LD (2005) Handbook of ayurvedic medicinal plants: herbal reference library. CRC PRress, Boca Raton
257. Kardasz M, Pawłowska D (2008) The role of dietary components and different substance in the development of cancer [Rola składników odżywczych oraz innych substancji w powstawaniu nowotworów]. *Nowa Medycyna* 2:7-14
258. Kassaian N, Azadbakht L, Forghani B, Amini M (2009) Effect of fenugreek seeds on blood glucose and lipid profiles in type 2 diabetic patients. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 79:34-39
259. Kassem A, Al-Aghbari A, Al-Habori M, Al-Mamary M (2006) Evaluation of the potential antifertility effect of fenugreek seeds in male and female rabbits. *Contraception* 73:301-306
260. Kaufmann B, Rudaz S, Cherkaoui S, Veuthey JL, Christen P (2007) Influence of plant matrix on microwave-assisted extraction process. The case of diosgenin extracted from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Phytochemical Analysis* 18:70-76
261. Kaur C, Kapoor HC (2002) Anti-oxidant activity and total phenolic content of some asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 37:153-161

262. Kaviarasan S, Ramamurty N, Gunasekaran P, Varalakshmi E, Anuradha CV (2006) Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed extract prevents ethanol-induced toxicity and apoptosis in Chang liver cells. *Alcohol and Alcoholism* 41:267-273
263. Kaviarasan S, Anuradha CV (2007) Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed polyphenols protect liver from alcohol toxicity: A role on hepatic detoxification system and apoptosis. *Pharmazie* 62:299-304
264. Kaviarasan S, Naik GH, Gangabhairathi R, Anuradha CV, Priyadarsini KI (2007) *In vitro* studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. *Food Chemistry* 103:31-37
265. Kaviarasan S, Sundarapandiyani R, Anuradha CV (2008) Protective action of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed polyphenols against alcohol-induced protein and lipid damage in rat liver. *Cell Biology and Toxicology* 24:391-400
266. Kawabata T, Cui MY, Hasegawa T, Takano F, Ohta T (2011) Anti-inflammatory and anti-melanogenic steroidal saponin glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds. *Planta Medica* 77:705-710
267. Kawasaki T, Komori T, Miyahara K (1974) Furostanol bisglycosides corresponding to dioscin and gracillin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 22:2164-2175
268. Kenny O, Smyth TJ, Hewage CM, Brunton NP (2013) Antioxidant properties and quantitative UPLC-MS analysis of phenolic compounds from extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and bitter melon (*Momordica charantia*) fruit. *Food Chemistry* 141:4295-4302
269. Khader M, Eckl PM, Bresgen N (2007) Effects of aqueous extracts of medicinal plants on MNNG-treated rat hepatocytes in primary cultures. *Journal of Ethnopharmacology* 112:199-202
270. Khalil MIM, Ibrahim MM, El-Gaaly GA, Sultan AS (2015) *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cell line, HepG2, mediated by upregulation of p53 and proliferating cell nuclear antigen. *BioMed Research International* 2015
271. Khalki L, Bennis M, Sokar Z, Ba-M'Hamed S (2012) The developmental neurobehavioral effects of fenugreek seeds on prenatally exposed mice. *Journal of Ethnopharmacology* 139:672-677
272. Kharat SN, Singh R, Mendhulkar VD (2015) Quantitative analysis for diosgenin content in *Elephantopus scaber* (Linn.) by HPTLC using successive solvent extraction method. *Der Pharmacia Lettre* 7:236-244
273. Khare CP (2016) *Ayurvedic Pharmacopoeial plant drugs: expanded therapeutics*. CRC Press, New York
274. Khil'ko TD, Iakubtsova IV, Preobrazhenskaya TD, Ostapchenko LI (2013) [Glycoproteins of mucus of gastric and duodenal wall surface during ulcerogenesis and the impact of fenugreek]. *Fiziologichnyi zhurnal* 59:74-79
275. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH (2013) Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18:2328-2375
276. Khoja KK, Shaf G, Hasan TN, Syed NA, Al-Khalifa AS, Al-Assaf AH, Alshatwi AA (2011) Fenugreek, a naturally occurring edible spice, kills MCF-7 human breast cancer cells via an apoptotic pathway. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention: APJCP* 12:3299-3304
277. Khole S, Chatterjee S, Variyar P, Sharma A, Devasagayam TPA, Ghaskadbi S (2014) Bioactive constituents of germinated fenugreek seeds with strong antioxidant potential. *Journal of Functional Foods* 6:270-279
278. Khosla P, Gupta DD, Nagpal RK (1995) Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) on serum lipids in normal and diabetic rats. *Indian Journal of Pharmacology* 27:89-93
279. Khursheed R, Naz A, Naz E, Sharif H, Rizwani GH (2012) Antibacterial, antimycelial and phytochemical analysis of *Ricinus communis* Linn, *Trigonella foenum-graecum* Linn and *Delonix regia* (bojer ex hook.) raf of Pakistan. *Romanian Biotechnological Letters* 17:7237-7244
280. Khursheed R, Rizwani GH, Sultana V, Ahmed M, Kamil A (2014) Antidepressant effect and categorization of inhibitory activity of monoamine oxidase type A and B of ethanolic extract of seeds of *Trigonella foenum-graecum* Linn. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 27:1419-1425
281. Kiem PV, Cuong NX, Nhiem NX, Thu VK, Ban NK, Minh CV, Tai BH, Hai TN, Lee SH, Jang HD, Kim YH (2011) Antioxidant activity of a new C-glycosylflavone from the leaves of *Ficus microcarpa*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 21:633-637
282. Kim CM, Son KH, Kim SH, Kim HP (1991) Steroidal saponin contents in some domestic plants. *Archives of Pharmacal Research* 14:305-310
283. Kim EA, Jang JH, Lee YH, Sung EG, Song IH, Kim JY, Kim S, Sohn HY, Lee TJ (2014) Dioscin induces caspase-independent apoptosis through activation of apoptosis-inducing factor in breast cancer cells. *Apoptosis* 19:1165-1175
284. Kim J, Lee I, Seo J, Jung M, Kim Y, Yim N, Bae K (2010) Vitexin, orientin and other flavonoids from *Spirodela polyrhiza* inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Phytotherapy Research* 24:1543-1548
285. Kim JT, Chung IM, Son BY, Lee JS, Kim SL, Baek SB, Kim MJ, Kwon YU, Kim EH, Kim SH (2014) Comparison of the antioxidant activity of maysin (C-Glycosylflavone) and other flavonoids. *Asian Journal of Chemistry* 26:2931-2934
286. Kim YC, Jun M, Jeong WS, Chung SK (2005) Antioxidant properties of flavone C-glycosides from *Atractylodes japonica* leaves in human low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Food Science* 70:S575-S580
287. Kite GC, Porter EA, Simmonds MSJ (2007) Chromatographic behaviour of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1148:177-183
288. Kivilompolo M, Hyötyläinen T (2008) Comparison of separation power of ultra performance liquid chromatography and comprehensive two-dimensional liquid chromatography in the separation of phenolic compounds in beverages. *Journal of Separation Science* 31:3466-3472
289. Kivilompolo M, Obúrka V, Hyötyläinen T (2008) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in the analysis of antioxidant phenolic compounds in wines and juices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391:373-380
290. Kivilompolo M, Pol J, Hyötyläinen T (2011) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography (LCxLC): A review. *Chromatographia* 74:232-237
291. Ko KP (2014) Isoflavones: Chemistry, analysis, functions and effects on health and cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15:7001-7010
292. Komesaroff PA, Black CVS, Cable V, Sudhir K (2001) Effects of wild yam extract on menopausal symptoms, lipids and sex hormones in healthy menopausal women. *Climacteric* 4:144-150
293. Korzeniewska-Dyl I (2007) Caspases - Structure and function. *Polski Merkuriusz Lekarski* 23:403-407
294. Korzeniewska-Dyl I (2008) Caspases - A new target in inflammation and cancer therapy? *Polski Merkuriusz Lekarski* 24:5-7

295. Krauze-Baranowska M, Cisowski W (1994) High-performance liquid chromatographic determination of flavone C-glycosides in some species of the *Cucurbitaceae* family. *Journal of Chromatography A* 675:240-243
296. Krauze-Baranowska M, Cisowski W (1995) Flavone C-glycosides from *Bryonia alba* and *B. dioica*. *Phytochemistry* 39:727-729
297. Krauze-Baranowska M (2003) Badania dimerycznych pochodnych flawonoidowych w niektórych gatunkach o znaczeniu leczniczym z podgromady *Gymnospermae*. Rozprawa habilitacyjna. *Annales Academiae Medicae Gedanensis. Akademia Medyczna w Gdańsku, Gdańsk*
298. Krug H (1965) Spektrofotometria związków flawonoidowych w zakresie nadfioletu i podczerwieni. *Herba Polonica* 11:692-698
299. Król-Kogus B, Krauze-Baranowska M (2012) Fenugreek - source of compounds with hormonal activity? [Kozieradka polspolita - źródło związków o aktywności hormonalnej?]. *Farmacja Polska* 68:39-41
300. Kulkarni CP, Bodhankar SL, Ghule AE, Mohan V, Thakurdesai PA (2012) Antidiabetic activity of *Trigonella foenum-graecum* L. seeds extract (IND01) in neonatal streptozotocin-induced (n-STZ) rats. *Diabetologia Croatica* 41:29-40
301. Kumar P, Kale RK, Baquer NZ (2012) Antihyperglycemic and protective effects of *Trigonella foenum-graecum* seed powder on biochemical alterations in alloxan diabetic rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 16:18-27
302. Kumar P, Bhandari U, Jamadagni S (2014) Fenugreek seed extract inhibit fat accumulation and ameliorates dyslipidemia in high fat diet-induced obese rats. *BioMed Research International* 2014:1-8
303. Laila O, Murtaza I, Abdin MZ, Ahmad S, Ganai NA, Jehangir M (2014) Development and validation of HPTLC method for simultaneous estimation of diosgenin and quercetin in fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*). *ISRN Chromatography* 2014
304. Lal VK, Gupta PP, Tripathi P, Pandey A (2011) Interaction of aqueous extract of *Trigonella foenum-graecum* seeds with Glibenclamide in streptozotocin induced diabetic rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 6:102-106
305. Langmead L, Dawson C, Hawkins C, Banna N, Loo S, Rampton DS (2002) Antioxidant effects of herbal therapies used by patients with inflammatory bowel disease: An *in vitro* study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 16:197-205
306. Ledford H (2016) US cancer institute to overhaul tumour cell lines. *Nature* 530:391
307. Lee CY, Chien YS, Chiu TH, Huang WW, Lu CC, Chiang JH, Yang JS (2012) Apoptosis triggered by vitexin in U937 human leukemia cells via a mitochondrial signaling pathway. *Oncology Reports* 28:1883-1888
308. Lee ST, Mitchell RB, Wang Z, Heiss C, Gardner DR, Azadi P (2009) Isolation, characterization, and quantification of steroidal saponins in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:2599-2604
309. Leigh Ackland L, Van De Waarsenburg S, Jones R (2005) Synergistic antiproliferation action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *In Vivo* 19:69-76
310. Leme GM, Cacciola F, Donato P, Cavalheiro AJ, Dugo P, Mondello L (2014) Continuous vs. segmented second-dimension system gradients for comprehensive two-dimensional liquid chromatography of sugarcane (*Saccharum spp.*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406:4315-4324
311. Lepage C, Léger DY, Bertrand J, Martin F, Beneytout JL, Liagre B (2011) Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Letters* 301:193-202
312. Li D, Jakob C, Schmitz O (2014) Practical considerations in comprehensive two-dimensional liquid chromatography systems (LCxLC) with reversed-phases in both dimensions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407:153-167
313. Li D, Schmitz OJ (2015) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography tandem diode array detector (DAD) and accurate mass QTOF-MS for the analysis of flavonoids and iridoid glycosides in *Hedyotis diffusa*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407:231-240
314. Li F, Fernandez PP, Rajendran P, Hui KM, Sethi G (2010) Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters* 292:197-207
315. Li HB, Ying XX, Lu J (2010) The mechanism of vitexin-4"-O-glucoside protecting ECV-304 cells against tertbutyl hydroperoxide induced injury. *Natural Product Research* 24:1695-1703
316. Li T, Zhang Z, Zhang L, Huang X, Lin J, Chen G (2009) An improved facile method for extraction and determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by focused microwave-assisted extraction coupled with GC-MS. *Journal of Separation Science* 32:4167-4175
317. Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu JY, Tan RX (2005) *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 98:329-333
318. Li Y, Wang X, Cheng S, Du J, Deng Z, Zhang Y, Liu Q, Gao J, Cheng B, Ling C (2015) Diosgenin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Reports* 33:693-698
319. Liang M, Zheng Z, Yuan Y, Kong L, Shen Y, Liu R, Zhang C, Zhang W (2007) Identification and quantification of C-21 steroidal saponins from *Radix Cynanchi atrati* by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and electrospray mass spectrometric detection. *Phytochemical Analysis* 18:428-435
320. Liang Z, Li K, Wang X, Ke Y, Jin Y, Liang X (2012) Combination of off-line two-dimensional hydrophilic interaction liquid chromatography for polar fraction and two-dimensional hydrophilic interaction liquid chromatography x reversed-phase liquid chromatography for medium-polar fraction in a traditional Chinese medicine. *Journal of Chromatography A* 1224:61-69
321. Lin J, Tan YF, Ma TL, Ge ZJ, Wu YY, Ding WL, Feng JK, Jiang GJ, Shi GZ, Tang ZA (2013) Diosgenin regulates proliferation, apoptosis, migration and invasion of human esophageal cancer eca109 cells via the MAPK signaling pathway. *World Chinese Journal of Digestology* 21:3977-3982
322. Lin YL, Kuo YH, Shiao MS, Chen CC, Ou JC (2000) Flavonoid glycosides from *Terminalia catappa* L. *Journal of the Chinese Chemical Society* 47:253-256
323. Ling Y, Fu Z, Zhang Q, Xu L, Liao L (2015) Identification and structural elucidation of steroidal saponins from the root of *Paris polyphylla* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Natural Product Research* 29:1798-1803
324. Liu MJ, Wang Z, Ju Y, Wong RNS, Wu QY (2005) Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 55:79-90

325. Liu MJ, Yue PYK, Wang Z, Wong RNS (2005) Methyl protodioscin induces G2/M arrest and apoptosis in K562 cells with the hyperpolarization of mitochondria. *Cancer Letters* 224:229-241
326. Liu W, Huang W, Sun W, Zhu Y, Ni J (2010) Production of diosgenin from yellow ginger (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) saponins by commercial cellulase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:1171-1180
327. Liu X, Wang L, Yang J, Zhang T, Deng X, Wang Q (2009) Simultaneous analysis of eight bioactive steroidal saponins in Gongxuening capsules by HPLC-ELSD and HPLC-MS n. *Acta Chromatographica* 21:327-339
328. Liu Y, Kakani R, Nair MG (2012) Compounds in functional food fenugreek spice exhibit anti-inflammatory and antioxidant activities. *Food Chemistry* 131:1187-1192
329. Lu FR, Shen L, Qin Y, Gao L (2008) Clinical observation of *Trigonella foenum-graecum* saponin combining sulphanylureas on 36 cases of type 2 diabetes mellitus. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 33:184-187
330. Lu FR, Shen L, Qin Y, Gao L, Li H, Dai Y (2008) Clinical observation on *Trigonella foenum-graecum* L. total saponins in combination with sulfonylureas in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 14:56-60
331. Lu Y, Luo J, Xu D, Huang X, Kong L (2008) Characterization of spirostanol saponins in *Solanum torvum* by high-performance liquid chromatography/evaporative light scattering detector/electrospray ionization with multi-stage tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22:2447-2452
332. Lu Y, Luo J, Huang X, Kong L (2009) Four new steroidal glycosides from *Solanum torvum* and their cytotoxic activities. *Steroids* 74:95-101
333. Lunga PK, Qin XJ, Yang XW, Kuate JR, Du ZZ, Gatsing D (2014) Antimicrobial steroidal saponin and oleanane-type triterpenoid saponins from *Paullinia pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14
334. Luo Y, Shen HY, Zuo WJ, Wang H, Mei WL, Dai HF (2015) A new steroidal saponin from dragon's blood of *Dracaena cambodiana*. *Journal of Asian Natural Products Research* 17:409-414
335. Luque-García JL, Luque De Castro MD (2003) Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry* 22:41-47
336. Lv L, Zheng L, Dong D, Xu L, Yin L, Xu Y, Qi Y, Han X, Peng J (2013) Dioscin, a natural steroid saponin, induces apoptosis and DNA damage through reactive oxygen species: A potential new drug for treatment of glioblastoma multiforme. *Food and Chemical Toxicology* 59:657-669
337. Ma S, Liang Q, Jiang Z, Wang Y, Luo G (2012) A simple way to configure on-line two-dimensional liquid chromatography for complex sample analysis: Acquisition of four-dimensional data. *Talanta* 97:150-156
338. Madhava Naidu M, Shyamala BN, Pura Naik J, Sulochanamma G, Srinivas P (2011) Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *LWT - Food Science and Technology* 44:451-456
339. Mahato SB, Nandy AK, Luger P, Weber M (1990) Determination of structure and stereochemistry of tomentosic acid by x-ray crystallography. A novel mechanism for transformation of arjungenin to tomentosic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 2:1445-1450
340. Mahmood AA, Sidik K, Salmah I (2005) Anti-ulcer and gastro protective effects of honey in combination with *Trigonella foenum-graecum* seeds extract on experimental gastric ulcer in rats. *International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences* 1:225-229
341. Majors RE (2006) Modern techniques for the extraction of solid materials - An update. *LC GC North America* 24:648-660
342. Majors RE (2007) Modern techniques for the extraction of solid materials - An update. *LC GC Europe* 20:71-81
343. Makuch B (2004) Chromatografia cienkowarstwowa. In: Kamiński M, Kartanowicz R (ed) *Chromatografia cieczowa*. Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk:176-193
344. Makuch B, Kamiński M (2004) Podstawowe parametry opisujące układ chromatograficzny. In: Kamiński M, Kartanowicz R (ed) *Chromatografia cieczowa*. Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk:9-17
345. Malek SNA, Phang CW, Ibrahim H, Wahab NA, Sim KS (2011) Phytochemical and cytotoxic investigations of *Alpinia mutica* rhizomes. *Molecules* 16:583-589
346. Malviya KG, Babhulkar MW, Mali PY, Rangari VD (2010) Evaluation of anti-inflammatory potential of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed extracts by using carrageenan induced rat paw edema. *Drug Invention Today* 2:109-111
347. Man S, Gao W, Zhang Y, Wang J, Zhao W, Huang L, Liu C (2010) Qualitative and quantitative determination of major saponins in *Paris* and *Trillium* by HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878:2943-2948
348. Mandal P, Gupta SK (2014) Improvement of antioxidant activity and related compounds in fenugreek sprouts through nitric oxide priming. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 26:249-257
349. Mandegary A, Pournamdari M, Shariffar F, Pournourmohammadi S, Fardiar R, Shooli S (2012) Alkaloid and flavonoid rich fractions of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum* L.) with antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology* 50:2503-2507
350. Manivannan J, Barathkumar TR, Sivasubramanian J, Arunagiri P, Raja B, Balamurugan E (2013) Diosgenin attenuates vascular calcification in chronic renal failure rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 378:9-18
351. Manivannan J, Shanthakumar J, Silambarasan T, Balamurugan E, Raja B (2015) Diosgenin, a steroidal saponin, prevents hypertension, cardiac remodeling and oxidative stress in adenine induced chronic renal failure rats. *RSC Advances* 5:19337-19344
352. Marker RE, Wagner RB, Ulshafer PR, Goldsmith DPJ, Ruof CH (1943) Sterols. CLIV. Sapogenins. LXVI. The sapogenin of *Trigonella foenum-graecum*. *Journal of the American Chemical Society* 65:1247
353. Markham K (1982) *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, London
354. Marriott PJ, Schoenmakers P, Wu ZY (2012) Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography - an update. *LC GC Europe* 25:1-7
355. Martino E, Collina S, Rossi D, Bazzoni D, Gaggeri R, Bracco F, Azzolina O (2008) Influence of the extraction mode on the yield of hyperoside, vitexin and vitexin-2-O-rhamnoside from *Crataegus monogyna* Jacq. (Hawthorn). *Phytochemical Analysis* 19:534-540
356. Marzougui N, Ferchichi A, Guasmi F, Beji M (2007) Morphological and chemical diversity among 38 Tunisian cultivars of *Trigonella foenum-graecum* L. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 5:248-253

357. Marzougui N, Guasmi F, Mkaddem M, Boubaya A, Mrabet A, Elfalleh W, Ferchichi A, Beji M (2009) Assessment of Tunisian *Trigonella foenum-graecum* diversity using seed vitamin B6, B1, B9 and C contents. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 7:56-61
358. Marzouk M, Soliman AM, Omar TY (2013) Hypoglycemic and antioxidative effects of fenugreek and termis seeds powder in streptozotocin-diabetic rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 17:559-565
359. Mathur V, Mathur NK (2005) Fenugreek and other lesser known legume galactomannan-polysaccharides: Scope for developments. *Journal of Scientific and Industrial Research* 64:475-481
360. Matsouka I, Beri D, Chinou I, Haralampidis K, Spyropoulos CG (2011) Metals and selenium induce medicarpin accumulation and excretion from the roots of fenugreek seedlings: A potential detoxification mechanism. *Plant and Soil* 343:235-245
361. Matysik G (1997) *Problemy optymalizacji chromatografii cienkowarstwowej*. Akademia Medyczna w Lublinie, Lublin
362. Matławska I (2006) *Farmakognozja*. Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań
363. Maurya CK, Singh R, Jaiswal N, Venkateswarlu K, Narender T, Tamrakar AK (2014) 4-Hydroxyisoleucine ameliorates fatty acid-induced insulin resistance and inflammatory response in skeletal muscle cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 395:51-60
364. Mazur WM, Duke JA, Wähälä K, Rasku S, Adlercreutz H (1998) Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry* 9:193-200
365. Mazza G, Di Tommaso D, Foti S (2002) Volatile constituents of Sicilian fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds. *Sciences des Aliments* 22:249-264
366. Mebazaa R, Mahmoudi A, Fouchet M, Santos MD, Kamissoko F, Nafti A, Cheikh RB, Rega B, Camel V (2009) Characterisation of volatile compounds in Tunisian fenugreek seeds. *Food Chemistry* 115:1326-1336
367. Medigović I, Ristić N, Živanović J, Šošić-Jurjević B, Filipović B, Milošević V, Nestorović N (2014) Diosgenin does not express estrogenic activity: A uterotrophic assay. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 92:292-298
368. Mehrafarin A, Rezazadeh S, Naghdi Badi H, Noormohammadi G, Zand E, Qaderi A (2011) A review on biology, cultivation and biotechnology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a valuable medicinal plant and multipurpose. *Journal of Medicinal Plants* 10:6-24
369. Melo PS, De Azevedo MBM, Zullo MAT, Fabrin-Neto JB, Haun M (2004) Cytotoxicity of the phytosterol diosgenin and its derivatives in rat cultured hepatocytes and V79 fibroblasts. *Human and Experimental Toxicology* 23:487-493
370. Merkli A, Christen P, Kapetanidis I (1997) Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Plant Cell Reports* 16:632-636
371. Mertens-Talcott SU, Talcott ST, Percival SS (2003) Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. *Journal of Nutrition* 133:2669-2674
372. Migas P, Świtka M (2010) TLC with an adsorbent gradient for the analysis of taxol in *Taxus baccata* L. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 23:286-288
373. Mills S, Bone K (2005) *The essential guide to herbal safety*. Elsevier, St. Louis
374. Minorsky PV (2002) Trigonelline: A diverse regulator in plants. *Plant Physiology* 128:7-8
375. Mitra A, Bhattacharya D (2006) Effects of long term study of combination of nutraceuticals in non-insulin dependent diabetes mellitus patients. *Journal of Food Science and Technology* 43:477-483
376. Mitra S (2003) *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. John Wiley and Sons, New Jersey
377. Moalic S, Liagre B, Corbière C, Bianchi A, Dauça M, Bordji K, Beneytout JL (2001) A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. *FEBS Letters* 506:225-230
378. Moghadam FH, Vakili-Zarch B, Shafiee M, Mirjalili A (2013) Fenugreek seed extract treats peripheral neuropathy in pyridoxine induced neuropathic mice. *EXCLI Journal* 12:282-290
379. Mohammad S, Taha A, Akhtar K, Bamezai RNK, Baquer NZ (2006) *In vivo* effect of *Trigonella foenum-graecum* on the expression of pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and distribution of glucose transporter (GLUT4) in alloxan-diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84:647-654
380. Mokhtari M, Shariatie M, Gharamanie R (2008) Effect of *Trigonella foenum-graecum* L. seed extract on concentration of testosterone and spermatogenesis in rats. *Journal of Medicinal Plants* 7:12-20+127
381. Moosa ASM, Rashid MU, Asadi AZS, Ara N, Uddin M, Ferdaus A (2006) Hypolipidemic effect of fenugreek seed powder. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 1:66-67
382. Morani AS, Bodhankar SL, Mohan V, Thakurdesai PA (2012) Ameliorative effects of standardized extract from *Trigonella foenum-graecum* L. seeds on painful peripheral neuropathy in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5:385-390
383. Mouria M, Gukovskaya AS, Jung Y, Buechler P, Hines OJ, Reber HA, Pandol SJ (2002) Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis. *International Journal of Cancer* 98:761-769
384. Mowla A, Alauddin M, Rahman MA, Ahmed K (2009) Antihyperglycemic effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed extract in alloxan-induced diabetic rats and its use in diabetes mellitus: A brief qualitative phytochemical and acute toxicity test on the extract. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 6:255-261
385. Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A (2010) Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry* 122:987-996
386. Muhammed DO, Salih NA (2012) Effect of application of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) on skin wound healing in rabbits. *AL-Qadisiya Journal of Veterinary Medicine Science* 11:86-93
387. Murakami T, Kishi A, Matsuda H, Yoshikawa M (2000) Medicinal foodstuffs. XVII. Fenugreek seed. (3): Structures of new furostanol-type steroid saponins, trigoneosides Xa, Xb, X1b, X11a, X11b, and X11a, from the seeds of egyptian *Trigonella foenum-graecum* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 48:994-1000
388. Muraki E, Chiba H, Taketani K, Hoshino S, Tsuge N, Tsunoda N, Kasono K (2012) Fenugreek with reduced bitterness prevents diet-induced metabolic disorders in rats. *Lipids in Health and Disease* 11:58
389. Murkies AL, Wilcox G, Davis SR (1998) Phytoestrogens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83:297-303

390. Mustafa MR, Mahmood AA, Slamah I (2005) Effects of *Trigonella foenum-graecum* seed extract in combination with honey on experimental wound healing in rats. *International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences* 1:29-33
391. Nacz M, Shahidi F (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054:95-111
392. Nagaprashantha LD, Vatsyayan R, Singhal J, Fast S, Roby R, Awasthi S, Singhal SS (2011) Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. *Biochemical Pharmacology* 82:1100-1109
393. Nagore D, Patil P, Kuber V (2012) Comparison between high performance liquid chromatography and high performance thin layer chromatography determination of diosgenin from fenugreek seeds. *International Journal of Green Pharmacy* 6:315-320
394. Nagori BP, Solanki R (2011) Role of medicinal plants in wound healing. *Research Journal of Medicinal Plant* 5:392-405
395. Naidu PB, Ponmurugan P, Begum MS, Mohan K, Meriga B, Ravindarnaik R, Saravanan G (2015) Diosgenin reorganises hyperglycaemia and distorted tissue lipid profile in high-fat diet-streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95:3177-3182
396. Nanjundan PK, Arunachalam A, Thakur RS (2009) Antinociceptive property of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek seeds) in high fat diet-fed/low dose streptozotocin induced diabetic neuropathy in rats. *Pharmacologyonline* 2:24-36
397. Nathan J, Panjwani S, Mohan V, Joshi V, Thakurdesai PA (2014) Efficacy and safety of standardized extract of *Trigonella foenum-graecum* L seeds as an adjuvant to L-dopa in the management of patients with Parkinson's disease. *Phytotherapy Research* 28:172-178
398. Neelakantan N, Narayanan M, De Souza RJ, Van Dam RM (2014) Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) intake on glycemia: A meta-analysis of clinical trials. *Nutrition Journal* 13
399. Negi JS, Singh P, Pant GJN, Rawat MSM (2011) High-performance liquid chromatography analysis of plant saponins: An update 2005-2010. *Pharmacognosy Reviews* 5:155-158
400. Ngo ST, Li MS (2013) Top-leads from natural products for treatment of Alzheimer's disease: Docking and molecular dynamics study. *Molecular Simulation* 39:279-291
401. Nicolescu F, Lupu F, Pantea O, Gheorghe CG, Bondarev A, Calin C (2015) Toxicity study of benzene, toluene and xylene (BTX) at exposure on some experimental groups. *Revista de Chimie* 66:1181-1183
402. Nimri LF, Meqdam MM, Alkofahi A (1999) Antibacterial activity of Jordanian medicinal plants. *Pharmaceutical Biology* 37:196-201
403. Niño J, Jiménez DA, Mosquera OM, Correa YM (2007) Diosgenin quantification by HPLC in a *Dioscorea polygonoides* tuber collection from Colombian flora. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18:1073-1076
404. Norton SA (1998) Useful plants of dermatology. III. Corticosteroids, *Strophanthus* and *Dioscorea*. *Journal of the American Academy of Dermatology* 38:256-259
405. O'Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J, Basset C (2005) Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology* 11:7499-7507
406. Ohtsuki T, Koyano T, Kowithayakorn T, Sakai S, Kawahara N, Goda Y, Yamaguchi N, Ishibashi M (2004) New chlorogenin hexasaccharide isolated from *Agave fourcroydes* with cytotoxic and cell cycle inhibitory activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12:3841-3845
407. Oleszek W, Bialy Z (2006) Chromatographic determination of plant saponins - an update (2002-2005). *Journal of Chromatography A* 1112:78-91
408. Oleszek WA (2002) Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A* 967:147-162
409. Omezzine F, Daami-Remadi M, Ladhari A, Haouala R (2014) Variation in phytochemical content and antifungal activity of *Trigonella foenum-graecum* L. with plant developmental stage and ploidy level. *South African Journal of Botany* 92:120-125
410. Omoloso AD, Vagi JK (2001) Broad spectrum antibacterial activity of *Allium cepa*, *Allium roseum*, *Trigonella foenum-graecum* and *Curcuma domestica*. *Natural Product Sciences* 7:13-16
411. Oncina R, Botía JM, Del Río JA, Ortuño A (2000) Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Food Chemistry* 70:489-492
412. Orlovskaya TV, Chelombit'ko VA (2006) Carbohydrates from *Trigonella foenum-graecum*. *Chemistry of Natural Compounds* 42:219-220
413. Ortuño A, Oncina R, Botía JM, Del Río JA (1998) Distribution and changes of diosgenin during development of *Trigonella foenum-graecum* plants. Modulation by benzylaminopurine. *Food Chemistry* 63:51-54
414. Ortuño A, Oncina R, Botía JM, Del Río JA (1999) Regulation of the diosgenin expression in *Trigonella foenum-graecum* plants by different plant growth regulators. *Food Chemistry* 65:227-232
415. Pacholczyk M, Ferenc T, Kowalski J (2008) The metabolic syndrome. Part I: definitions and diagnostic criteria for its identification. Epidemiology and relationship with cardiovascular and type 2 diabetes risk. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* 62:530-542
416. Pang X, Yu HS, Kang LP, Feng B, Zhao Y, Xiong CQ, Tan DW, Song W, Liu B, Ma BP (2011) Two new furostanol saponins from the seeds of *Trigonella foenum-graecum*. *Journal of Asian Natural Products Research* 13:611-617
417. Pang X, Cong Y, Yu HS, Kang LP, Feng B, Han BX, Zhao Y, Xiong CQ, Tan DW, Song W, Liu B, Cong YW, Ma BP (2012) Spirostanol saponins derived from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* by α -glucosidase hydrolysis and their inhibitory effects on rat platelet aggregation. *Planta Medica* 78:276-285
418. Pang X, Kang L, Yu H, Zhao Y, Xiong C, Zhang J, Shan J, Ma B (2012) Rapid isolation of new furostanol saponins from fenugreek seeds based on ultra-performance liquid chromatography coupled with a hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 35:1538-1550
419. Pang X, Kang LP, Yu HS, Zhao Y, Xiong CQ, Zhang J, Ma BP (2013) New kaurene diterpenoid glycosides from fenugreek seeds. *Natural Product Research* 27:1202-1207
420. Pang X, Huang HZ, Zhao Y, Xiong CQ, Yu LY, Ma BP (2015) Conversion of furostanol saponins into spirostanol saponins improves the yield of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* by acid hydrolysis. *RSC Advances* 5:4831-4837
421. Pari L, Monisha P, Mohamed Jalaludeen A (2012) Beneficial role of diosgenin on oxidative stress in aorta of streptozotocin induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 691:143-150

422. Parida BK, Chhibba IM, Nayyar VK (2003) Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. *Scientia Horticulturae* 98:113-119
423. Park MK, Kwon HY, Ahn WS, Bae S, Rhyu MR, Lee YJ (2009) Estrogen activities and the cellular effects of natural progesterone from wild yam extract in MCF-7 human breast cancer cells. *American Journal of Chinese Medicine* 37:159-167
424. Parmar VS, Jha HN, Sanduja SK, Sanduja R (1982) Trigocoumarin - a new coumarin from *Trigonella foenum-graecum*. *Z Naturforsch* 37:521-523
425. Parvizpur A, Ahmadiani A, Kamalinejad M (2004) Spinal serotonergic system is partially involved in antinociception induced by *Trigonella foenum-graecum* (TFG) leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology* 95:13-17
426. Patil D, Gautam M, Gairola S, Jadhav S, Patwardhan B (2014) HPLC/Tandem mass spectrometric studies on steroidal saponins: An example of quantitative determination of shatavarin IV from dietary supplements containing *Asparagus racemosus*. *Journal of AOAC International* 97:1497-1502
427. Pawar VS, Hugar S, Gawade B, Patil RN (2008) Evaluation of antidepressant like activity of *Trigonella foenum-graecum* Linn. seeds in mice. *Pharmacologyonline* 1:455-465
428. Peng Y, Yang Z, Wang Y, Liu Z, Bao J, Hong Y (2011) Pathways for the steroidal saponins conversion to diosgenin during acid hydrolysis of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. *Chemical Engineering Research and Design* 89:2620-2625
429. Perveen S, El-Shafae AM, Al-Taweel A, Fawzy GA, Malik A, Afza N, Latif M, Iqbal L (2011) Antioxidant and urease inhibitory C-glycosylflavonoids from *Celtis africana*. *Journal of Asian Natural Products Research* 13:799-804
430. Petit PR, Sauvaire YD, Hillaire-Buys DM, Leconte OM, Baissac YG, Ponsin GR, Ribes GR (1995) Steroid saponins from fenugreek seeds: Extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids* 60:674-680
431. Petropoulos GA (ed) (2002) Fenugreek. The genus *Trigonella*. Taylor & Francis, London
432. Pettit GR, Doubek DL, Herald DL, Numata A, Takahashi C, Fujiki R, Miyamoto T (1991) Isolation and structure of cytostatic steroidal saponins from the African medicinal plant *Balanites aegyptica*. *Journal of Natural Products* 54:1491-1502
433. Podolak I, Galanty A, Sobolewska D (2010) Saponins as cytotoxic agents: A review. *Phytochemistry Reviews* 9:425-474
434. Prasanna M (2000) Hypolipidemic effect of fenugreek: A clinical study. *Indian Journal of Pharmacology* 32:34-36
435. Prati S, Baravelli V, Fabbri D, Schwarzingler C, Brandolini V, Maietti A, Tedeschi P, Benvenuti S, Macchia M, Marotti I, Bonetti A, Catizone P, Dinelli G (2007) Composition and content of seed flavonoids in forage and grain legume crops. *J Sep Sci* 30:491-501
436. Premanath R, Sudisha J, Devi NL, Aradhya SM (2011) Antibacterial and anti-oxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) leaves. *Research Journal of Medicinal Plant* 5:695-705
437. Pribac G, Ardelean A, Czapar M, Bodo E, Mos L (2009) *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella corniculata* seed extracts exert a protective action on alcohol toxicity in BRL3A rat liver cells. *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii* 19:87-93
438. Pribac G, Craciun C, Szoke-Nagy T, Simeoni I, Lang C, Rosioru C, Czapar M, Mathe E, Mos L, Ardelean A (2011) Comparative ultrastructural study of pancreatic beta cells from diabetic rats treated with fenugreek seed flour or ganoderma flour. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology* 16:62-80
439. Pérez AJ, Hussain SM, Pecio Ł, Kowalczyk M, Herling VR, Stochmal A (2016) Ultrahigh-performance liquid chromatography-high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry based metabolomics reveals key differences between *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha*, two similar pastures with different toxicities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64:4686-4694
440. Qiao X, Song W, Ji S, Li YJ, Wang Y, Li R, An R, Guo DA, Ye M (2014) Separation and detection of minor constituents in herbal medicines using a combination of heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1362:157-167
441. Qiao X, Song W, Ji S, Wang Q, Guo DA, Ye M (2015) Separation and characterization of phenolic compounds and triterpenoid saponins in licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) using mobile phase-dependent reversed-phase×reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1402:36-45
442. Qin XJ, Sun DJ, Ni W, Chen CX, Hua Y, He L, Liu HY (2012) Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Steroids* 77:1242-1248
443. Quílez A, Berenguer B, Gilardoni G, Souccar C, de Mendonça S, Oliveira LFS, Martín-Calero MJ, Vidari G (2010) Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpubya* Ruiz & Pav. *Journal of Ethnopharmacology* 128:583-589
444. Raju J, Gupta D, Rao AR, Yadava PK, Baquer NZ (2001) *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed powder improves glucose homeostasis in alloxan diabetic rat tissues by reversing the altered glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzymes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 224:45-51
445. Raju J, Patlolla JMR, Swamy MV, Rao CV (2004) Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 13:1392-1398
446. Raju J, Bird RP (2007) Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. *Cancer Letters* 255:194-204
447. Raju J, Mehta R (2009) Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutrition and Cancer* 61:27-35
448. Ramadan G, El-Beih NM, Abd El-Kareem HF (2011) Anti-metabolic syndrome and immunostimulant activities of Egyptian fenugreek seeds in diabetic/obese and immunosuppressive rat models. *British Journal of Nutrition* 105:995-1004
449. Randhir R, Lin YT, Shetty K (2004) Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 13:295-307

450. Randhir R, Shetty K (2007) Improved α -amylase and *Helicobacter pylori* inhibition by fenugreek extracts derived via solid-state bioconversion using *Rhizopus oligosporus*. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 16:382-392
451. Randhir R, Kwon YI, Lin YT, Shetty K (2009) Effect of thermal processing on the phenolic associated health-relevant functionality of selected legume sprouts and seedlings. Journal of Food Biochemistry 33:89-112
452. Rao S, Shettar M (2014) Histopathological and biochemical studies on the effect of *Trigonella foenum-graecum* and *Coccinia indica* extracts in streptozotocin induced diabetic rats. International Journal of Pharma and Bio Sciences 5:136-144
453. Rastegar Moghadam B, Ali-Beig H, Arbabian S, Farahbakhsh S, Emami F, Golmanesh L, Zardooz H, Jalili C, Sahraei H (2011) Effect of aqueous extract of *Trigonella foenum-graecum* on pain and inflammation induced by formalin in male mice. Journal of Medicinal Plants 10:22-32
454. Ravichandiran V, Jayakumari S (2013) Comparative study of bioactive fraction of *Trigonella foenum-graecum* L. leaf and seed extracts for Inflammation. International Journal Of Frontiers In Science And Technology 1:128-148
455. Raynie DE (2006) Modern extraction techniques. Analytical Chemistry 78:3997-4004
456. Rayyan S, Fossen T, Andersen ØM (2010) Flavone C-glycosides from seeds of fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58:7211-7217
457. Reddy RRL, Srinivasan K (2011) Hepatoprotective and antioxidant effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds in mice under lithogenic condition. Journal of Food Biochemistry 35:1619-1626
458. Reichelt J, Cizek J (1978) Steroidal sapogenins. II. The determination of diosgenin in *Trigonella foenum-graecum* L. by means of gas chromatography and spectrophotometry. Cesko-Slovenska Farmacie 27:221-224
459. Ren Q, Wu C, Zhang J (2013) Use of on-line stop-flow heart-cutting two-dimensional high performance liquid chromatography for simultaneous determination of 12 major constituents in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum Gaertn*). Journal of Chromatography A 1304:257-262
460. Renuka C, Ramesh N, Saravanan K (2009) Evaluation of the antidiabetic effect of *Trigonella foenum-graecum* seed powder on alloxan-induced diabetic albino rats. International Journal of PharmTech Research 1:1580-1584
461. Rezaeian S (2011) Assessment of diosgenin production by *Trigonella foenum-graecum* L. *in vitro* condition. American Journal of Plant Physiology 6:261-268
462. Ringheim GE, Szczepanik AM, Petko W, Burgher KL, Zhu SZ, Chao CC (1998) Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex. Molecular Brain Research 55:35-44
463. Roberts KT (2011) The potential of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) as a functional food and nutraceutical and its effects on glycemia and lipidemia. Journal of Medicinal Food 14:1485-1489
464. Rosenberg Zand RS, Jenkins DJA, Diamandis EP (2001) Effects of natural products and nutraceuticals on steroid hormone-regulated gene expression. Clinica Chimica Acta 312:213-219
465. Rothmaler W (1994) Exkursionsflora von Deutschland. Band 3. Gefasspflanzen: Atlasband. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
466. Roy A, Geetha RV (2013) Preliminary phytochemical screening of the ethanolic extract of *Dioscorea villosa* tubers and estimation of diosgenin by HPTLC technique. International Journal of Drug Development and Research 5:377-381
467. Russo M, Cacciola F, Bonaccorsi I, Dugo P, Mondello L (2011) Determination of flavanones in *Citrus* juices by means of one- and two-dimensional liquid chromatography. Journal of Separation Science 34:681-687
468. Rutkowski L (2004) Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa
469. Rychlik M (2008) Quantification of free coumarin and its liberation from glucosylated precursors by stable isotope dilution assays based on liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56:796-801
470. Saini D, Dhingra AK, Chopra B, Parle M (2011) Psychopharmacological investigation of the nootropic potential of *Trigonella foenum Linn.* in mice. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 4:76-84
471. Sakalem ME, Negri G, Tabach R (2012) Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. Brazilian Journal of Pharmacognosy 22:1219-1232
472. Sakamoto K (2000) Synergistic effects of thearubigin and genistein on human prostate tumor cell (PC-3) growth via cell cycle arrest. Cancer Letters 151:103-109
473. Saleem F, Khan MTJ, Mumtaz AM, Khan KI, Bashir S, Jamshaid M (2008) Antimicrobial activity of the extracts of seeds of *Trigonella foenum-graecum*. Pakistan Journal of Zoology 40:385-387
474. Sarasa D, Sridhar S, Prabakaran E (2012) Effect of an antidiabetic extract of *Trigonella foenum-graecum* on normal and alloxan induced diabetic mice. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 4:63-65
475. Saravanan G, Ponnuragan P, Deepa MA, Senthilkumar B (2014) Modulatory effects of diosgenin on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism and glycogen content in streptozotocin-induced diabetic rats. Canadian Journal of Diabetes 38:409-414
476. SatheeshKumar N, Mukherjee PK, Bhadra S, Saha BP (2010) Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum-graecum* L and its constituents. Phytomedicine 17:292-295
477. Sauvaire Y, Girardon P, Baccou JC, Ristérucchi AM (1984) Changes in growth, proteins and free amino acids of developing seed and pod of fenugreek. Phytochemistry 23:479-486
478. Sauvaire Y, Ribes G, Baccou JC, Loubatieres-Mariani MM (1991) Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. Lipids 26:191-197
479. Sauvaire Y, Baissac Y, Leconte O, Petit P, Ribes G (1996) Steroid saponins from fenugreek and some of their biological properties. Advances in Experimental Medicine and Biology 405:37-46
480. Sauvaire Y, Petit P, Broca C, Manteghetti M, Baissac Y, Fernandez-Alvarez J, Gross R, Roye M, Leconte A, Gomis R, Ribes G (1998) 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. Diabetes 47:206-210
481. Sauvaire YD, Baccou JCF, Kobrehel K (1984) Solubilization and characterization of fenugreek seed proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 32:41-47
482. Saxena B, Saxena U (2009) Anti-hyperlipidemic activity of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds extract in triton and high fat diet induced hyperlipidemic model: A potent anti-atherosclerotic agent. Pharmacologyonline 2:616-624

483. Saxena VK, Shalem A (2004) Yamogenin 3-O- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4)-O- α -D-xylopyranoside from the seeds of *Trigonella foenum-graecum*. Journal of Chemical Sciences 116:79-82
484. Schoenmakers P, Marriott P, Beens J (2003) Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography. LC GC Europe 16:335-339
485. Scoparo CT, de Souza LM, Dartora N, Sassaki GL, Gorin PAJ, Iacomini M (2012) Analysis of *Camellia sinensis* green and black teas via ultra high performance liquid chromatography assisted by liquid-liquid partition and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion x reversed phase). Journal of Chromatography A 1222:29-37
486. Sebastian KS, Thampan RV (2007) Differential effects of soybean and fenugreek extracts on the growth of MCF-7 cells. Chemico-Biological Interactions 170:135-143
487. Seema M, Ankur S, Manjari V, Akanshi K, Parish A (2013) Evaluation of antibacterial activity of methanol and acetone extracts of *Trigonella foenum-graecum*, *Coriandrum sativum* and *Brassica nigra*. International Journal of Drug Development and Research 5:316-321
488. Selim S, Al Jaouni S (2015) Anti-inflammatory, antioxidant and antiangiogenic activities of diosgenin isolated from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex. Retz.) Sm. Natural Product Research 30:1830-1833
489. Selim S, Al Jaouni S (2015) Anticancer and apoptotic effects on cell proliferation of diosgenin isolated from *Costus speciosus* (Koen.) BMC Complementary and Alternative Medicine 15:301-307
490. Seshadri TR, Varshney, I.P. and Sood, A.R. (1973) Study of glycosides from *Trigonella corniculata* Linn. and *T. foenum - graecum* Linn. Current Science 42:421-422
491. Shabbeer S, Sobolewski M, Anchoori RK, Kachhap S, Davidson N, Carducci MA, Khan SR (2009) Fenugreek a naturally occurring edible spice as an anticancer agent. Cancer Biology and Therapy 8:268-274
492. Shabsoug B, Khailil R, Abuharfeil N (2008) Enhancement of natural killer cell activity *in vitro* against human tumor cells by some plants from Jordan. Journal of Immunotoxicology 5:279-285
493. Shan JJ, Ren JW, Wu CM, Zhao YM (2008) Effect of flavonoid-C-glycosides from *Trigonella foenum-graecum* on hypoglycemic activities in alloxan-induced mice. Chinese Pharmaceutical Journal 43:1457-1460
494. Shang M, Cai S, Han J, Li J, Zhao Y, Zheng J, Namba T, Kadota S, Tezuka Y, Fan W (1998) Studies on flavonoids from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Zhongguo Zhongyao Zazhi 23:614-616
495. Shani J, Goldschmied A, Joseph B (1974) Hypoglycaemic effect of *Trigonella foenum-graecum* and *Lupinus termis* (Leguminosae) seeds and their major alkaloids in alloxan diabetic and normal rats. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie 210:27-37
496. Shariffar F, Moshafi MH, Shafazand E, Koohpayeh A (2012) Acetyl cholinesterase inhibitory, antioxidant and cytotoxic activity of three dietary medicinal plants. Food Chemistry 130:20-23
497. Sharma N, Kar A, Panda S (2014) *Trigonella foenum-graecum* seed extract enhances the antiperoxidative and antidiabetic activities of glibenclamide. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 24:152-156
498. Sharma RC, Gupta SK, Varshney IP, Jain DC (1978) Chemical and pharmacological studies on steroidal saponins isolated from *Trigonella foenum-graecum*. Journal of Steroid Biochemistry 9:813
499. Shellie RA, Haddad PR (2006) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography. Analytical and Bioanalytical Chemistry 386:405-415
500. Sherma J, Fried B (2002) Handbook of Thin-Layer Chromatography, 3rd Ed., Marcel Dekker Inc, New York
501. Shi X, Wang S, Yang Q, Lu X, Xu G (2014) Comprehensive two-dimensional chromatography for analyzing complex samples: Recent new advances. Analytical Methods 6:7112-7123
502. Si L, Zheng L, Xu L, Yin L, Han X, Qi Y, Xu Y, Wang C, Peng J (2016) Dioscin suppresses human laryngeal cancer cells growth via induction of cell-cycle arrest and MAPK-mediated mitochondrial-derived apoptosis and inhibition of tumor invasion. European Journal of Pharmacology 774:105-117
503. Sindhu G, Ratheesh M, Shyni GL, Nambisan B, Helen A (2012) Anti-inflammatory and antioxidative effects of muclage of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) on adjuvant induced arthritic rats. International Immunopharmacology 12:205-211
504. Singh P, Vishwakarma SP, Singh RL (2014) Antioxidant, oxidative DNA damage protective and antimicrobial activities of the plant *Trigonella foenum-graecum*. Journal of the Science of Food and Agriculture 94:2497-2504
505. Snyder R (2007) Benzene's toxicity: A consolidated short review of human and animal studies by HA Khan. Human and Experimental Toxicology 26:687-696
506. Sobhy MY, Abd-Alrahman SH, Salem-Bekhit MM, Mostafa A (2013) Chemical characterization and antibacterial activity of ethanolic extract of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds. Journal of Pure and Applied Microbiology 7:1373-1378
507. Sobocińska E Metody badania procesu apoptozy indukowanej w komórkach nowotworowych różnymi ekstraktami i metabolitami roślinnymi. Praca magisterska. Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny. Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk
508. Sobolewska D, Janeczko Z, Podolak I, Szerłomska A (2009) Densitometric analysis of diosgenin in methanolic extracts of *Allium ursinum* collected at different times during plant development. Journal of Planar Chromatography - Modern TLC 22:305-307
509. Soliman G, Mustafa Z (1943) The saponin of fenugreek seeds. Nature 151:195-196
510. Sood AR (1975) Chemical components from the leaves of *Trigonella foenum-graecum* Linn. Indian Journal of Pharmacy 37:100-101
511. Sood AR, Boutard B, Chadenson M, Chopin J, Lebreton P (1976) A new flavone C-glycoside from *Trigonella foenum-graecum*. Phytochemistry 15:351-352
512. Sreeja S, Anju VS (2010) *In vitro* estrogenic activities of fenugreek *Trigonella foenum-graecum* seeds. Indian Journal of Medical Research 131:814-819
513. Srichamroen A, Field CJ, Thomson ABR, Basu TK (2008) The modifying effects of galactomannan from Canadian-grown fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) on the glycemic and lipidemic status in rats. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 43:167-174
514. Srichamroen A, Thomson ABR, Field CJ, Basu TK (2009) *In vitro* intestinal glucose uptake is inhibited by galactomannan from Canadian fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum* L) in genetically lean and obese rats. Nutrition Research 29:49-54
515. Srinivasan S, Koduru S, Kumar R, Venguswamy G, Kyprianou N, Damodaran C (2009) Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. International Journal of Cancer 125:961-967

516. Stadler RH, Varga N, Hau J, Arce Vera F, Welti DH (2002) Alkylpyridiniums. 1. Formation in model systems via thermal degradation of trigonelline. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1192-1199
517. Stefanowicz-Hajduk J, Bartoszewski R, Bartoszevska S, Kochan K, Adamska A, Kosiński I, Ochocka JR (2015) Pennogenyl saponins from *Paris quadrifolia* L. induce extrinsic and intrinsic pathway of apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. *PLoS ONE* 10:1-16
518. Stepanowski P, Synak E, Szafrank B, Kaczyński Z (2010) Techniki separacyjne. Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii (ed). Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk
519. Stepień A, Izdebska M, Grzanka A (2007) The types of cell death. *Postepy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* 61:420-428
520. Stolyhwo A, Colin H, Guiochon G (1983) Use of light scattering as a detector principle in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 265:1-18
521. Strzelecka H, Kamińska J, Kowalski J, Walewska E (1982) Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych. PZWL, Warszawa
522. Subhashini N, Nagarajan G, Kavimani S (2011) Anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant property of *Trigonella foenum-graecum* seeds. *Journal of Pharmacology and Toxicology* 6:371-380
523. Subhashini N, Thangathirupathi A, Lavanya N (2011) Antioxidant activity of *Trigonella foenum-graecum* using various *in vitro* and *ex vivo* models. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3:96-102
524. Subramanian SP, Prasath GS (2014) Antidiabetic and antidyslipidemic nature of trigonelline, a major alkaloid of fenugreek seeds studied in high-fat-fed and low-dose streptozotocin-induced experimental diabetic rats. *Biomedicine and Preventive Nutrition* 4:475-480
525. Sudha Rani S, Subhashree S, Murugesan R (2012) Lipid lowering effect of fenugreek seed powder in diabetic rats fed high fat diet. *Biomedicine* 32:67-71
526. Sudheendra AT, Shenoy R, Taranalli AD (2009) Evaluation of flavonoid fraction of *Trigonella foenum-graecum* for its wound healing potential. *Pharmacologyonline* 1:1154-1162
527. Suganuma M, Okabe S, Kai Y, Sueoka N, Sueoka E, Fujiki H (1999) Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with (-)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9. *Cancer Research* 59:44-47
528. Suja Pandian R, Anuradha CV, Viswanathan P (2002) Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*) on experimental gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 81:393-397
529. Sulieman AME, Ali AO, Hemavathy J (2008) Lipid content and fatty acid composition of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds grown in Sudan. *International Journal of Food Science and Technology* 43:380-382
530. Sumitra M, Manikandan P, Suguna L, Cehittar G (2000) Study of dermal wound healing activity of *Trigonella foenum-graecum* m seeds in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 28:59-67
531. Sun Y, Yuan H, Hao L, Min C, Cai J, Liu J, Cai P, Yang S (2013) Enrichment and antioxidant properties of flavone C-glycosides from trolflowers using macroporous resin. *Food Chemistry* 141:533-541
532. Sur P, Das M, Gomes A, Vedasiromoni JR, Sahu NP, Banerjee S, Sharma RM, Ganguly DK (2001) *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent. *Phytotherapy Research* 15:257-259
533. Suresh Kumar G, Shetty AK, Salimath PV (2005) Modulatory effect of fenugreek seed mucilage and spent turmeric on intestinal and renal disaccharidases in streptozotocin induced diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 60:87-91
534. Suresh P, Kavitha CN, Babu SM, Reddy VP, Latha AK (2012) Effect of ethanol extract of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds on Freund's adjuvant-induced arthritis in albino rats. *Inflammation* 35:1314-1321
535. Swaroop A, Bagchi M, Kumar P, Preuss HG, Tiwari K, Marone PA, Bagchi D (2014) Safety, efficacy and toxicological evaluation of a novel, patented anti-diabetic extract of *Trigonella foenum-graecum* seed extract (Fenfuro). *Toxicology Mechanisms and Methods* 24:495-503
536. Tada Y, Kanda N, Haratake A, Tobiishi M, Uchiwa H, Watanabe S (2009) Novel effects of diosgenin on skin aging. *Steroids* 74:504-511
537. Taketani K, Hoshino S, Uemura T, Goto T, Takahashi N, Tsuge N, Kawada T (2015) An efficient purification method for quantitative determinations of protodioscin, dioscin and diosgenin in plasma of fenugreek-fed mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 61:465-470
538. Tang X, Li WH, Li XS, Chen DJ, Han F, Gao R, Cai LL, Xie B (2008) Extraction of diosgenin from fenugreek with ultrasound technology optimized by response surface methodology. *Huaxue Gongcheng/Chemical Engineering* 36:67-70
539. Taranalli AD, Kuppast IJ (1996) Study of wound healing activity of seeds of *Trigonella foenum-graecum* in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 58:117-119
540. Taranalli AD, Kumar S, Khatri CN (2004) Influence of *Trigonella foenum-graecum* seeds on wound healing, growth hormone and folic acid levels in rats. *Indian Drugs* 41:401-404
541. Taylor WG, Zaman MS, Mir Z, Mir PS, Acharya SN, Mears GJ, Elder JL (1997) Analysis of steroidal saponins from amber fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) by capillary gas chromatography and combined gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:753-759
542. Taylor WG, Elder JL, Chang PR, Richards KW (2000) Microdetermination of diosgenin from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. *J Agric Food Chem* 48:5206-5210
543. Taylor WG, Zulyniak HJ, Richards KW, Acharya SN, Bittman S, Elder JL (2002) Variation in diosgenin levels among 10 accessions of fenugreek seeds produced in western Canada. *J Agric Food Chem* 50:5994-5997
544. Tejaswini BA, Sireesha C, Kaladhar DSVGK, Rao DG, Satyanarayana KVVV, Surekha C (2012) *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of *Trigonella foenum-graecum* seeds. *Asian Journal of Chemistry* 24:5019-5022
545. Thermo Fisher Scientific I (2011) Dionex ASE 350 Accelerated solvent extractor operator's manual. Document No. 065220. Thermo Fisher Scientific Inc
546. Thirunavukkarasu V, Anuradha CV, Viswanathan P (2003) Protective effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds in experimental ethanol toxicity. *Phytotherapy Research* 17:737-743
547. Thirunavukkarasu V, Venkatraman Anuradha C (2006) Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*) on experimental gastric ulcer in rats. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 12:13-25
548. Thomas JE, Bandara M, Lee EL, Driedger D, Acharya S (2011) Biochemical monitoring in fenugreek to develop functional food and medicinal plant variants. *New Biotechnology* 28:110-117

549. Thompson LU, Boucher BA, Cotterchio M, Kreiger N, Liu Z (2007) Dietary phytoestrogens, including isoflavones, lignans, and coumestrol, in nonvitamin, nonmineral supplements commonly consumed by women in Canada. *Nutrition and Cancer* 59:176-184
550. Tohda C, Nakamura N, Komatsu K, Hattori M (1999) Trigonelline-induced neurite outgrowth in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 22:679-682
551. Tohda C, Kuboyama T, Komatsu K (2005) Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. *NeuroSignals* 14:34-45
552. Tong QY, He Y, Zhao QB, Qing Y, Huang W, Wu XH (2012) Cytotoxicity and apoptosis-inducing effect of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* Wright against cancer cells. *Steroids* 77:1219-1227
553. Tripathi S, Maurya AK, Kahrana M, Kaul A, Sahu RK (2012) Immunomodulatory property of ethanolic extract of *Trigonella foenum-graecum* leaves on mice. *Der Pharmacia Lettre* 4:708-713
554. Trivedi PD, Pundarikakshudu K, Rathnam S, Shah KS (2007) A validated quantitative thin-layer chromatographic method for estimation of diosgenin in various plant samples, extract, and market formulation. *Journal of AOAC International* 90:358-363
555. Trouillas P, Corbière C, Liagre B, Duroux JL, Beneytout JL (2005) Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: A molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 13:1141-1149
556. Tsiri D, Halabalaki M, Spyropoulos C, Haralampidis K, Chinou I (2008) Biosynthetic origin of medicarpin in elicited fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seedlings 7th International Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF Athens, Greece
557. Tsiri D, Chinou I, Halabalaki M, Haralampidis K, Ganis-Spyropoulos C (2009) The origin of copper-induced medicarpin accumulation and its secretion from roots of young fenugreek seedlings are regulated by copper concentration. *Plant Science* 176:367-374
558. Turner C (2006) Overview of modern extraction techniques for food and agricultural samples. *ACN Symposium Series* 926:3-19
559. Tutin TG, Heywood VH (1964) *Flora Europaea*. Cambridge University Press, Cambridge
560. Uemura T, Hirai S, Mizoguchi N, Goto T, Lee J, Taketani K, Nakano Y, Shono J, Hoshino S, Tsuge N, Narukami T, Takahashi N, Kawada T (2010) Diosgenin present in fenugreek improves glucose metabolism by promoting adipocyte differentiation and inhibiting inflammation in adipose tissues. *Molecular Nutrition and Food Research* 54:1596-1608
561. Uemura T, Goto T, Kang MS, Mizoguchi N, Hirai S, Lee JY, Nakano Y, Shono J, Hoshino S, Taketani K, Tsuge N, Narukami T, Makishima M, Takahashi N, Kawada T (2011) Diosgenin, the main aglycon of fenugreek, inhibits Ixra activity in hepg2 cells and decreases plasma and hepatic triglycerides in obese diabetic mice. *Journal of Nutrition* 141:17-23
562. Van Dijk AE, Olthof MR, Meeuse JC, Seebus E, Heine RJ, Van Dam RM (2009) Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. *Diabetes Care* 32:1023-1025
563. Variya K, Parmar V (2015) A validated high-performance thin-layer chromatographic method for the quantitation of protodioscin in *Trigonella foenum-graecum* and its herbal formulations. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 28:458-465
564. Varjas T, Nowrasteh G, Budán F, Horváth G, Cseh J, Gyöngyi Z, Makai S, Ember I (2011) The effect of fenugreek on the gene expression of arachidonic acid metabolizing enzymes. *Phytotherapy Research* 25:221-227
565. Varshney IP, Beg MFA (1978) Study of saponins from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* Linn. *Indian Journal of Chemistry B* 16:1134-1136
566. Vijayakumar MV, Singh S, Chhipa RR, Bhat MK (2005) The hypoglycaemic activity of fenugreek seed extract is mediated through the stimulation of an insulin signalling pathway. *British Journal of Pharmacology* 146:41-48
567. Vijayakumar MV, Pandey V, Mishra GC, Bhat MK (2010) Hypolipidemic effect of fenugreek seeds is mediated through inhibition of fat accumulation and upregulation of LDL receptor. *Obesity* 18:667-674
568. Vyas S, Agrawal RP, Solanki P, Trivedi P (2008) Analgesic and anti-inflammatory activities of *Trigonella foenum-graecum* (seed) extract. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 65:473-476
569. Wagh P, Rai M, Deshmukh SK, Durate MCT (2007) Bio-activity of oils of *Trigonella foenum-graecum* and *Pongamia pinnata*. *African Journal of Biotechnology* 6:1592-1596
570. Wagner H, Iyengar MA, Hörhammer L (1973) Vicenin-1 and -2 in the seeds of *Trigonella foenum-graecum*. *Phytochemistry* 12:2548
571. Waheed A, Barker J, Barton SJ, Owen CP, Ahmed S, Carew MA (2012) A novel steroidal saponin glycoside from *Fagonia indica* induces cell-selective apoptosis or necrosis in cancer cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47:464-473
572. Waksmundzka-Hajnos Monika SJ, Kowalska T (2008) *Thin Layer chromatography in phytochemistry*. CRC Press, Boca Raton
573. Wang G, Chen H, Huang M, Wang N, Zhang J, Zhang Y, Bai G, Fong WF, Yang M, Yao X (2006) Methyl protodioscin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 liver cancer cells. *Cancer Letters* 241:102-109
574. Wang GR, Tang WZ, Yao QQ, Zhong H, Liu YJ (2010) New flavonoids with 2BS cell proliferation promoting effect from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. *Journal of Natural Medicines* 64:358-361
575. Wang L, Wang X, Yuan X, Zhao B (2011) Simultaneous analysis of diosgenin and sarsasapogenin in *Asparagus officinalis* byproduct by thin-layer chromatography. *Phytochemical Analysis* 22:14-17
576. Wang L, Ma T, Zheng Y, Lv S, Li Y, Liu S (2015) Diosgenin inhibits IL-1 β -induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocytes. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8:4830-4836
577. Wang LJ, Wang Y, Chen SW, Ma JS, Fu Q, Wang BX (2002) The antitumor activity of diosgenin *in vivo* and *in vitro*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 27:9-779
578. Wang SL, Cai B, Cui CB, Liu HW, Wu CF, Yao XS (2004) Diosgenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside obtained as a new anticancer agent from *Dioscorea futschauensis* induces apoptosis on human colon carcinoma HCT-15 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway. *Journal of Asian Natural Products Research* 6:115-125

579. Wang Y, Kong L, Lei X, Hu L, Zou H, Welbeck E, Blich SWA, Wang Z (2009) Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography system with immobilized liposome chromatography column and reversed-phase column for separation of complex traditional Chinese medicine Longdan Xiegan Decoction. *Journal of Chromatography A* 1216:2185-2191
580. Wang YJ, Pan KL, Hsieh TC, Chang TY, Lin WH, Hsu JTA (2011) Diosgenin, a plant-derived sapogenin, exhibits antiviral activity *in vitro* against hepatitis C virus. *Journal of Natural Products* 74:580-584
581. Warke VB, Deshmukh TA, Patil VR (2011) Development and validation of RP-HPLC method for estimation of diosgenin in pharmaceutical dosage form. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 4:126-128
582. Watson R, Preedy V (ed) (2009) *Bioactive Foods in Promoting Health. Fruits and Vegetables*. Academic Press Inc, San Diego
583. Watt K, Christofi N, Young R (2007) The detection of antibacterial actions of whole herb tinctures using luminescent *Escherichia coli*. *Phytotherapy Research* 21:1193-1199
584. Weerasekera D, Fernando N, Bogahawatta LBAE, Rajapakse-Mallikahewa R, Naulla DJ (2008) Bactericidal effect of selected spices, medicinal plants and tea on *Helicobacter pylori* strains from Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 36:91-94
585. Wichtl M (2004) *Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis*. CRC Press New York
586. Witkiewicz Z, Kałużna-Czaplińska J (2012) *Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*. Wydawnictwo WNT, Warszawa
587. Wojakowska A, Perkowski J, Góral T, Stobiecki M (2013) Structural characterization of flavonoid glycosides from leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) using LC/MS/MS profiling of the target compounds. *Journal of Mass Spectrometry* 48:329-339
588. Wu L, Dong H, Zhao J, Wang Y, Yang Q, Jia C, Ma J (2015) Diosgenin stimulates rat TM4 cell proliferation through activating plasma membrane translocation and transcriptional activity of estrogen receptors. *Biology of Reproduction* 92
589. Wu WH, Liu LY, Chung CJ, Jou HJ, Wang TA (2005) Estrogenic effect of yam ingestion in healthy postmenopausal women. *Journal of the American College of Nutrition* 24:235-243
590. Xie J, Lin YS, Shi XJ, Zhu XY, Su WK, Wang P (2013) Mechanochemical-assisted extraction of flavonoids from bamboo (*Phyllostachys edulis*) leaves. *Industrial Crops and Products* 43:276-282
591. Xu CL, Chen HS, Tan XQ, Xuan WD, Liang S (2006) HPLC-ELSD in determination of AR-I content in total furostanol saponins of *Asparagus cochinchinensis*. *Academic Journal of Second Military Medical University* 27:427-428
592. Xue WL, Li XS, Zhang J, Liu YH, Wang ZL, Zhang RJ (2007) Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) extract on blood glucose, blood lipid and hemorheological properties in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16:422-426
593. Yacoubi L, Rabaoui L, Hamdaoui MH, Fattouch S, Serairi R, Kourda N, Khamsa SB (2011) Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Trigonella foenum-graecum* Linn., 1753 (fenugreek) seed extract in experimental pulmonary fibrosis. *Journal of Medicinal Plants Research* 5:4315-4325
594. Yamada T, Hoshino M, Hayakawa T, Ohhara H, Yamada H, Nakazawa T, Inagaki T, Iida M, Ogasawara T, Uchida A, Hasegawa C, Murasaki G, Miyaji M, Hirata A, Takeuchi T (1997) Dietary diosgenin attenuates subacute intestinal inflammation associated with indomethacin in rats. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 273:G355-G364
595. Yan QH, Yang L, Wei YM (2015) Optimization of extraction methods for flavonoids in onion by RP-HPLC-DAD. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 38:769-773
596. Yang DJ, Lu TJ, Hwang LS (2003) Simultaneous determination of furostanol and spirostanol glycosides in Taiwanese yam (*Dioscorea* spp.) cultivars by high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis* 11:271-276
597. Yang H, Chen B, Wang XB, Chue PW, Shen YP, Xia GH, Jia XB (2013) Rapid quantitative analysis of diosgenin in the tubers of *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright by coupling cellulose enzymolysis and two-phase acid hydrolysis in tandem with HPLC-UV. *Natural Product Research* 27:1933-1935
598. Yang J, Yin M, Zhang J, Wang L, Ye W, Yin Z (2014) Simultaneous determination of seven C21 steroidal saponins in the radix of *Cynanchum otophyllum* Schneid. by HPLC wavelength switching method. *Journal of China Pharmaceutical University* 45:200-204
599. Yang J, Wang P, Wu W, Zhao Y, Idehen E, Sang S (2016) Steroidal Saponins in Oat Bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64:1549-1556
600. Yang M, Fazio S, Munch D, Drumm P (2005) Impact of methanol and acetonitrile on separations based on π - π interactions with a reversed-phase phenyl column. *Journal of Chromatography A* 1097:124-129
601. Yang SH, Liao PH, Pan YF, Chen SL, Chou SS, Chou MY (2012) The Novel p53-dependent metastatic and apoptotic pathway induced by vitexin in human oral cancer OC2 cells. *Phytotherapy Research* 21:1154-1161
602. Yang WX, Huang HY, Wang YJ, Jia ZY, Li LL (2005) Study on chemical constituents in total saponin from *Trigonella foenum-graecum*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 30:1428-1430
603. Yardley-Jones A, Anderson D, Parke DV (1991) The toxicity of benzene and its metabolism and molecular pathology in human risk assessment. *British Journal of Industrial Medicine* 48:437-444
604. Yen CT, Lee CL, Chang FR, Hwang TL, Yen HF, Chen CJ, Chen SL, Wu YC (2012) Indiosides G-K: Steroidal glycosides with cytotoxic and anti-inflammatory activities from *Solanum violaceum*. *Journal of Natural Products* 75:636-643
605. Yoshikawa M, Murakami T, Komatsu H, Murakami N, Yamahara J, Matsuda H (1997) Medicinal foodstuffs. IV. Fenugreek seed. (1): Structures of trigoneosides Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, and IIIb, new furostanol saponins from the seeds of indian *Trigonella foenum-graecum* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 45:81-87
606. Yoshikawa M, Murakami T, Komatsu H, Yamahara J, Matsuda H (1998) Medicinal foodstuffs. VIII.1 Fenugreek seed. (2): Structures of six new furostanol saponins, trigoneosides IVa, Va, Vb, VI, VIIb, and VIIIb, from the seeds of indian *Trigonella foenum-graecum* L. *Heterocycles* 47:397-405
607. Yoshikawa M, Xu F, Morikawa T, Pongpiriyadacha Y, Nakamura S, Asao Y, Kumahara A, Matsuda H (2007) Medicinal flowers. XII. New spirostane-type steroid saponins with antidiabetogenic activity from *Borassus flabellifer*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 55:308-316

608. Yuan L, Wang J, Xiao H, Wu W, Wang Y, Liu X (2013) MAPK signaling pathways regulate mitochondrial-mediated apoptosis induced by isoorientin in human hepatoblastoma cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 53:62-68
609. Yuan L, Wei S, Wang J, Liu X (2014) Isoorientin induces apoptosis and autophagy simultaneously by reactive oxygen species (ROS)-Related p53, PI3K/Akt, JNK, and p38 signaling pathways in HepG2 cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:5390-5400
610. Yum CH, You HJ, Ji GE (2010) Cytotoxicity of dioscin and biotransformed fenugreek. *Journal of Applied Biological Chemistry* 53:470-477
611. Zaidi SFH, Yamada K, Kadowaki M, Usmanhani K, Sugiyama T (2009) Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology* 121:286-291
612. Zava DT, Dollbaum CM, Blen M (1998) Estrogen and progestin bioactivity of foods, herbs, and spices. *Experimental Biology and Medicine* 217:369-378
613. Zeng J, Zhang X, Guo Z, Feng J, Xue X, Liang X (2012) Separation and identification of flavonoids from complex samples using off-line two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1220:50-56
614. Zhang J, Tao D, Duan J, Liang Z, Zhang W, Zhang L, Huo Y, Zhang Y (2006) Separation and identification of compounds in *Adinandra nitida* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization source ion trap tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386:586-593
615. Zhang JD, Cao YB, Xu Z, Sun HH, An MM, Yan L, Chen HS, Gao PH, Wang Y, Jia XM, Jiang YY (2005) *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28:2211-2215
616. Zhang T, Liu H, Liu XT, Xu Dr, Chen Xq, Wang Q (2010) Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla var. yunnanensis* and *P. polyphylla var. chinensis* by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51:114-124
617. Zhang Y, Nie M, Shi S, You Q, Guo J, Liu L (2014) Integration of magnetic solid phase fishing and off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry for screening and identification of human serum albumin binders from *Radix Astragali*. *Food Chemistry* 146:56-64
618. Zhang Z, Song C, Fu X, Liu M, Li Y, Pan J, Liu H, Wang S, Xiang L, Xiao GG, Ju D (2014) High-dose diosgenin reduces bone loss in ovariectomized rats *via* attenuation of the RANKL/OPG ratio. *International Journal of Molecular Sciences* 15:17130-17147
619. Zhao S, Niu F, Xu CY, Liu Y, Ye L, Bi GB, Chen L, Tian G, Nie TH (2015) Diosgenin prevents bone loss on retinoic acid-induced osteoporosis in rats. *Irish Journal of Medical Science* 185:581-587
620. Zhao X, Ren H, Gao S, Hao J (2014) Effects of dioscin on apoptosis in pancreatic cancer MiaPaCa-2 cells and its mechanism. *Chinese journal of oncology* 36:5-10
621. Zhou DY, Xu Q, Xue XY, Zhang FF, Liang XM (2009) Characterization of polymethoxylated flavones in *Fructus aurantii* by off-line two-dimensional liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49:207-213
622. Zhou G, Lv G (2012) Comparative studies on scavenging DPPH free radicals activity of flavone C-glycosides from different parts of *Dendrobium officinale*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 37:1536-1540
623. Zhou J, Zhou S, Zeng S (2013) Experimental diabetes treated with trigonelline: Effect on β -cell and pancreatic oxidative parameters. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 27:279-287
624. Zhou Y, Wang Y, Wang R, Guo F, Yan C (2008) Two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry for the analysis of *Lobelia chinensis Lour.* using an ESI/APCI multimode ion source. *Journal of Separation Science* 31:2388-2394
625. Zhu DX, An F, Wang SH (2012) Effects of vitexin on cell growth and apoptosis of human esophageal cancer EC-109 cells. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 43:1781-1784
626. Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos L, Duque C, Schenkel EP (2012) Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis* 23:232-239
627. Zupančič A, Baričević D, Umek A, Kristl A (2001) The impact of fertilizing on fenugreek yield (*Trigonella foenum-graecum* L.) and diosgenin content in the plant drug. *Rostlinna Vyroba* 47:218-224
628. Özçelik B, Kartal M, Orhan I (2011) Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology* 49:396-402
629. Łabędzka K, Grzanka A, Izdebska M (2006) Mitochondria and cell death. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 60:439-446