

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY



mgr Marta Kula

**Badania fitochemiczne z oceną aktywności
biologicznej niektórych gatunków z rodzaju *Rubus*
i *Lonicera***

Rozprawa doktorska

Promotor pracy:

prof. dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska

Katedra i Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych

Gdańsk 2016

Podziękowania

Mojej Rodzinie i Znajomym, za wsparcie podczas wykonywania pracy doktorskiej.

Praca obejmuje wyniki dotychczas nieopublikowane oraz zawarte w następujących publikacjach:

- prace doświadczalne:

Kula M., Majdan M., Głód D., Krauze-Baranowska M.: *Phenolic composition of fruits from different cultivars of red and black raspberries grown in Poland*, J. Food Comp. Anal, 2016, 52: 74-82.

Kula M., Głód D., Krauze-Baranowska M.: *Application of on-line and off-line heart-cutting LC in determination of secondary metabolites from the flowers of Lonicera caerulea cultivar varieties*, J. Pharm. Biomed. Anal., 2016, 131: 316-326.

Kula M., Głód D., Krauze-Baranowska M.: *Two-dimensional liquid chromatography (LC) of phenolic compounds from the shoots of Rubus idaeus 'Glen Ample' cultivar variety*, J. Pharm. Biomed. Anal., 2016, 121: 99-106.

Kula M., Majdan M., Radwańska A., Nasal A., Hałasa R., Głód D., Matkowski A., Krauze-Baranowska M.: *Chemical composition and biological activity of the fruits from Lonicera caerulea var. edulis 'Wojtek'*, Acad. J. Med. Plants, 2013, 8: 141-148.

- prace przeglądowe:

Kula M., Krauze-Baranowska M.: *Rubus occidentalis: the black raspberry : its potential in the prevention of cancer*, Nutr. Cancer, 2016, 68: 18-28.

Kula M., Krauze-Baranowska M.: *Jagoda kamczacka (Lonicera caerulea L.) : aktualny stan badań fitochemicznych i aktywności biologicznej*, Post. Fitoter., 2016, 2: 111-118.

Krauze-Baranowska M., Majdan M., Kula M.: *Owoce maliny właściwej i maliny zachodniej źródłem substancji biologicznie aktywnych*, Post. Fitoter. 2014, 1: 32-39.

WYKAZ SKRÓTÓW

1D LC – jednowymiarowa chromatografia cieczowa
2D LC – dwuwymiarowa chromatografia cieczowa
AAE – ekwiwalenty kwasu askorbinowego
APCI – jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
AR – receptor androgenowy
COX – cyklooksigenaza
DAD – detektor UV-Vis z matrycą diodową
DPPH – rodnik 2,2-difenylo-1-pikhydrazylu
EC₅₀ – medialne stężenie skuteczne
ELSD – laserowy detektor światła rozproszonego
ER – receptor estrogenowy
ESI – jonizacja przez rozpylanie w polu elektrycznym
HHDP – kwas heksahydroksydifenowy
HILIC – chromatografia oddziaływań hydrofilowych
HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa
IC₅₀ – medialne stężenie inhibitora
IL – interleukina
LOD – granica wykrywalności
LOQ – granica oznaczalności
LPS – lipopolisacharyd
MBC – minimalne stężenie bakteriobójcze
MD LC – wielowymiarowa chromatografia cieczowa
MIC – minimalne stężenie hamujące
MS – spektrometria mas
NF- κ B – jądrowy czynnik kappa B
NOS – syntaza tlenku azotu
RNS – reaktywne formy azotu
ROS – reaktywne formy tlenu
RP LC – chromatografia w układzie faz odwróconych
SIM – monitorowanie wybranych jonów
TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α

SPIS TREŚCI

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	10
1. Charakterystyka botaniczna i fitochemiczna gatunków <i>Rubus idaeus</i> i <i>Rubus occidentalis</i>	10
1.1 Stanowisko systematyczne	10
1.1.1 <i>Rubus idaeus</i>	10
1.1.2 <i>Rubus occidentalis</i>	11
1.2 Skład chemiczny	12
1.2.1 Owoce <i>R. idaeus</i> i <i>R. occidentalis</i>	13
1.2.2 Pędy <i>R. idaeus</i>	14
1.3 Aktywność biologiczna badanych gatunków <i>R. idaeus</i> i <i>R. occidentalis</i>	15
1.3.1 Owoce <i>R. idaeus</i> i <i>R. occidentalis</i>	15
1.3.1.1 Aktywność przeciwreumatyczna	16
1.3.1.2 Aktywność przeciwrzodowa	17
1.3.1.3 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa	17
1.3.1.4 Aktywność chemoprewencyjna	19
1.3.1.4.1 Nowotwory skóry	19
1.3.1.4.2 Nowotwory piersi.....	20
1.3.1.4.3 Nowotwory jamy ustnej.....	20
1.3.1.4.4 Nowotwory przełyku.....	21
1.3.1.4.5 Nowotwory jelita grubego	22
1.3.1.4.6 Chemoprewencja w badaniach klinicznych.....	23
1.3.2 Pędy <i>R. idaeus</i>	24
1.3.2.1 Aktywność antyoksydacyjna	24
1.3.2.2 Aktywność przeciwbakteryjna	25
1.3.2.3 Aktywność cytotoksyczna	25
2. Charakterystyka chemiczna i aktywność biologiczna urolityn – produktów metabolizmu elagotanin	26
2.1 Struktura oraz biodostępność.....	26
2.2 Aktywność biologiczna.....	28
2.2.1 Aktywność antyoksydacyjna.....	28
2.2.2 Aktywność przeciwzapalna.....	29
2.2.3 Oddziaływanie na bakterie	30
2.2.4 Aktywność chemoprewencyjna	31
2.2.5 Inne kierunki aktywności.....	33

2.2.5.1 Aktywność przeciwmalaryczna.....	33
2.2.5.2 Modulacja receptora estrogenowego	33
2.2.5.3 Hamowanie powstawania zaawansowanych produktów glikacji (AGE)	34
2.2.5.4 Działanie przeciwiglikemiczne	34
2.2.5.5 Aktywność neuroprotekcyjna	34
2.2.5.6 Wpływ na adipogenezę i lipogenezę.....	35
3. Charakterystyka surowców z gatunku <i>Lonicera caerulea</i>.....	36
3.1 Stanowisko systematyczne	36
3.2 Opis botaniczny i charakterystyka stosowania.....	36
3.3 Skład chemiczny	37
3.3.1 Owoce <i>L. caerulea</i>	37
3.4 Aktywność biologiczna.....	41
3.4.1 Owoce <i>L. caerulea</i>	41
3.4.1.1 Aktywność antyoksydacyjna	41
3.4.1.2 Aktywność przeciwzapalna	42
3.4.1.3 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa.....	43
3.4.1.4 Przeciwdziałanie hiperglikemii i hiperlipidemii.....	43
3.4.1.5 Działanie radioprotekcyjne	43
3.4.1.6 Ochrona przed promieniowaniem UV	44
3.4.1.7 Badania kliniczne	44
4. Dwuwymiarowa chromatografia cieczowa wybranych grup metabolitów wtórnych obecnych w gatunkach z rodzaju <i>Rubus</i> i <i>Lonicera</i>.....	45
4.1 Analiza 2D LC flawonoidów.....	48
4.1.1 Analiza 2D LC procyanidyn	50
4.2 Analiza 2D LC irydoidów	51
4.3 Analiza 2D LC kwasów fenolowych.....	52
CEL PRACY.....	54
II. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	57
1. Odczynniki chemiczne.....	57
1.1 Rozpuszczalniki	57
1.2 Związki wzorcowe.....	57
1.3 Pożywki, podłoża i odczynniki do hodowli mikrobiologicznej	59
1.4 Antybiotyki.....	59
1.5 Linie komórek nowotworowych.....	59

1.6 Pożywki do hodowli komórek <i>in vitro</i>	60
1.7 Inne.....	60
2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny.....	60
2.1 Systemy HPLC.....	61
3. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)	61
3.1 Kolumny chromatograficzne.....	61
3.2 Programy elucji gradientowej	61
3.3 Detekcja badanych związków.....	63
3.3.1 Spektrometr mas	63
4. Materiał roślinny	63
5. Ekstrakcja materiału roślinnego	65
5.1 Ekstrakcja do celów analizy chromatograficznej.....	65
5.1.1 Ekstrakcja owoców <i>R. idaeus</i> i <i>R. occidentalis</i>	65
5.1.1.1 Przygotowanie próbek do analizy elagotanin	65
5.1.1.2 Przygotowanie próbek do analizy flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych.....	65
5.1.2 Ekstrakcja pędów <i>R. idaeus</i>	65
5.1.3 Ekstrakcja owoców <i>L. caerulea</i>	65
5.1.3.1 Przygotowanie próbek do analizy jakościowej związków fenolowych.....	65
5.1.3.2 Przygotowanie próbek do analizy ilościowej i jakościowej irydoidów	65
5.1.4 Ekstrakcja kwiatów <i>L. caerulea</i>	66
5.2 Przygotowanie próbek do analizy aktywności biologicznej.....	66
5.2.1 Przygotowanie ekstraktów suchych z owoców <i>R. idaeus</i> , <i>R. occidentalis</i> i <i>L. caerulea</i>	66
5.2.2 Przygotowanie ekstraktu suchego z pędów <i>R. idaeus</i> i kwiatów <i>L. caerulea</i>	66
6. Analiza HPLC.....	67
6.1 Parametry analiz HPLC badanych ekstraktów roślinnych	67
6.1.1 Analiza prostych fenoli i polifenoli w owocach <i>R. idaeus</i> oraz <i>R. occidentalis</i>	67
6.1.2 Analiza prostych fenoli i polifenoli w pędach <i>R. idaeus</i> oraz <i>R. occidentalis</i>	67
6.1.3 Parametry analizy ekstraktów z owoców krajowych odmian <i>L. caerulea</i>	69
6.1.4 Parametry analizy metabolitów wtórnych w kwiatach krajowych odmian <i>L. caerulea</i>	70
6.2 Walidacja opracowanych metod HPLC.....	71
6.3 Obliczenia pojemności pikowej	71
7. Badania aktywności biologicznej badanych surowców roślinnych.....	72
7.1 Analiza aktywności przeciwdrobnoustrojowej.....	72
7.1.1 Zastosowane szczepy drobnoustrojów oraz warunki prowadzenia ich hodowli.....	72

7.1.2 Oznaczanie wartości przeciwbakteryjnych MIC oraz MBC badanych wyciągów oraz związków pochodzenia roślinnego	73
7.1.3 Analiza oddziaływań z antybiotykami badanych wyciągów roślinnych.....	74
7.2 Analiza aktywności antyoksydacyjnej.....	75
7.2.1 Test DPPH	75
7.2.2 Test fosforomolibdenowy	76
7.3 Analiza aktywności przeciwzapalnej.....	76
7.3.1 Model indukowanego karageniną obrzęku łapy.....	76
7.4 Analiza aktywności cytotoksycznej wobec komórek ludzkiego raka piersi.....	77
7.4.1 Charakterystyka i warunki hodowli <i>in vitro</i> nowotworowych linii komórkowych.....	77
7.4.2 Test oceny cytotoksyczności MT ^T	78
III. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ WŁASNYCH	80
1. Analiza fitochemiczna surowców z gatunków <i>R. idaeus</i> i <i>R. occidentalis</i>.....	80
1.1 Analiza polifenoli i prostych fenoli w owocach <i>R. idaeus</i> i <i>R. occidentalis</i>	80
1.1.1 Procedura analiz LC	83
1.1.2 Analiza jakościowa elagotanin.....	84
1.1.3 Analiza jakościowa flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych	85
1.2 Analiza polifenoli i prostych fenoli w pędach <i>R. idaeus</i> i <i>R. occidentalis</i>	88
1.2.1 Analiza metodą dwuwymiarowej chromatografii cieczowej (2D LC)	88
1.2.1.1 Analiza ‘comprehensive’ LC x LC	88
1.2.1.2 Separacja na kolumnach wypełnionych powierzchniowo porowatą krzemionką	89
1.2.1.3 Optymalizacja i procedura rozdzielania dwuwymiarowego (2D LC).....	93
1.2.1.4 Analiza jakościowa ‘on-line’ 2D LC związków fenolowych w pędach <i>R. idaeus</i>	95
1.2.2 Analiza polifenoli i prostych fenoli w pędach <i>R. occidentalis</i>	100
1.2.2.1 Procedura analiz LC.....	100
1.2.2.2 Analiza jakościowa związków fenolowych w pędach <i>R. occidentalis</i>	100
1.2.3 Analiza profili związków fenolowych pędów <i>R. idaeus</i> w cyklu wegetacyjnym	104
1.2.3.1 Procedura analiz LC.....	104
1.2.3.2 Analiza jakościowa związków fenolowych pędów <i>R. idaeus</i> w cyklu wegetacyjnym	104
2. Analiza fitochemiczna surowców gatunku <i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i>.....	107
2.1 Analiza metabolitów wtórnych w owocach <i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i>	107
2.1.1 Procedura analiz LC	107
2.1.2 Analiza jakościowa związków fenolowych w owocach <i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i>	107
2.1.3 Analiza jakościowa i ilościowa irydoidów w owocach <i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i>	110

2.2 Analiza metabolitów wtórnych w kwiatach <i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i>	124
2.2.1 Skład chemiczny kwiatów różnych przedstawicieli rodzaju <i>Lonicera</i>	124
2.2.2 Analiza 1D LC.....	128
2.2.3 Optymalizacja i procedura rozdzielania 2D LC	130
2.2.3.1 On-line' 'heart-cutting' 2D LC	130
2.2.3.2 Off-line' 'heart-cutting' 2D LC.....	132
2.2.4 Analiza jakościowa i ilościowa metabolitów wtórnych w kwiatach <i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i>	136
2.2.4.1 Flawonoidy	136
2.2.4.2 Kwasy fenolowe.....	139
2.2.4.3 Irydoidy	140
2.2.5 Analiza saponin w kwiatach <i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i>	146
3. Badanie synergizmu ekstraktów z owoców i pędów <i>R. idaeus</i> i <i>R. occidentalis</i>	148
3.1 Analiza składu chemicznego ekstraktów suchych z owoców i pędów <i>R. idaeus</i> oraz <i>R. occidentalis</i> użytych w badaniach synergizmu z antybiotykami.....	149
3.1.1 Analiza jakościowa związków fenolowych.....	149
3.1.2 Analiza ilościowa wybranych związków fenolowych w ekstraktach suchych.....	152
3.2 Analiza aktywności przeciwdrobnoustrojowej.....	153
3.2.1 Interakcje antybiotyków z ekstraktami z owoców i pędów <i>R. idaeus</i> i <i>R. occidentalis</i> wobec wybranych szczepów bakteryjnych.....	154
3.2.2 Interakcje antybiotyków z ekstraktami z owoców i pędów <i>R. idaeus</i> i <i>R. occidentalis</i> wobec szczepów antybiotykoopornych	158
3.2.2.1 Wyznaczenie wartości MIC i MBC.....	158
3.2.2.2 Badania interakcji antybiotyków z ekstraktami	159
4. Badania aktywności biologicznej urolityn	164
4.1 Aktywność przeciwbakteryjna urolityn	164
4.2 Aktywność przeciwnowotworowa urolityn.....	165
5. Analiza aktywności biologicznej owoców i kwiatów <i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i>	168
5.1 Aktywność przeciwbakteryjna ekstraktów z owoców i kwiatów <i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i>	168
5.2 Aktywność antyoksydacyjna owoców <i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i>	169
5.3 Aktywność przeciwzapalna owoców <i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i>	172
WYNIKI I WNIOSKI	174
STRESZCZENIE	181
SUMMARY	193
LITERATURA	204

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka botaniczna i fitochemiczna gatunków *Rubus idaeus* i *Rubus occidentalis*

1.1 Stanowisko systematyczne [1]

<u>Królestwo:</u>	<i>Plantae</i>	(Rośliny)
<u>Gromada:</u>	<i>Spermatophyta</i>	(Nasienne)
<u>Podgromada:</u>	<i>Magnoliophyta</i>	(Okrytonasienne)
<u>Klasa:</u>	<i>Dicotyledonae</i>	(Dwuliścienne)
<u>Podklasa:</u>	<i>Rosidae</i>	(Różowe)
<u>Rząd:</u>	<i>Rosales</i>	(Różowce)
<u>Rodzina:</u>	<i>Rosaceae</i>	(Różowate)
<u>Rodzaj:</u>	<i>Rubus</i> L.	(Jeżyna)
<u>Podrodzaj:</u>	<i>Ideobatus</i> Focke	(Malina)
<u>Gatunek:</u>	<i>Rubus idaeus</i> L.	(Malina właściwa)
	<i>Rubus occidentalis</i> L.	(Malina czarna)



Ryc. 1 Malina właściwa i malina czarna
(<http://www.bdwallpaperspulse.com/raspberry-pictures.html>)

Rodzaj *Rubus* (jeżyna) (*Rosaceae*) obejmuje 740 gatunków należących do około 15 podrodzajów. Podrodzaj *Ideobatus* jest jednym z największych podrodzajów rodzaju *Rubus* skupiającym ponad 200 gatunków rozprzestrzenionych na terenie całego świata.

Rubus idaeus L. (malina właściwa) jest przedstawicielem podrodzaju *Ideobatus*, występującym powszechnie na terenie Europy Zachodniej i Środkowej [2-5]. *Rubus occidentalis* L. (malina czarna) występuje w stanie naturalnym w Ameryce Północnej, głównie we wschodnich stanach USA, gdzie również są prowadzone jej uprawy. Walory smakowe i właściwości odżywcze owoców decydują o popularności obydwu gatunków.

1.1.1 *Rubus idaeus*

Malina właściwa w stanie naturalnym występuje głównie w Europie oraz na terenach północnej i zachodniej Azji. W Polsce spotykana pospolicie na terenach nizinnych oraz w lasach liściastych i borach mieszanych [6, 7]. Jest krzewem o jasnobrunatnej korze, dorastającym do wysokości ok. 2 m, o wzniesionej, łukowato wygiętej lodydze w dolnej części okrytej delikatnymi szczecinowatymi kolcami. Liście są złożone z 3 do 7 lancetowatych listków, nieparzystopierzaste, ogonkowe z wąskimi przylistkami u nasady [8, 9]. Kwiaty są białe, promieniste zwykle obupłciowe i obcypylne z licznymi słupkami osadzonymi na wypukłym dnie kwiatowym. Dojrzały owoc jest wielokrotnym pestkowcem zwykle barwy czerwonej, który łatwo odpada od dna kwiatowego o swoistym, przyjemnym zapachu. Kwitnie w okresie od maja do lipca, natomiast owocuje na przełomie lipca i sierpnia [6, 7].

Uprawę maliny właściwej zapoczątkowano w ogródkach przyklasztornych późnego średniowiecza. Jednak dopiero z końcem XVIII wieku są wymieniane pierwsze odmiany hodowlane. Obecnie uprawiana jest na dużą skalę jako krzew owocowy w wielu odmianach, z których większość nie różni się zasadniczo od formy dzikiej. Znanych jest kilkaset odmian uprawowych maliny właściwej, pochodzących głównie od ekotypu europejskiego *R. idaeus vulgaris* i amerykańskiego *R. idaeus strigosus* [10]. Większość odmian charakteryzują owoce barwy czerwonej, choć znane są odmiany o owocach żółtych, pozbawionych barwników z grupy antocyjanów. Polska jest czołowym światowym producentem owoców, zajmując czwarte miejsce na świecie w produkcji owoców maliny właściwej (dane Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa, ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*).

Owoce maliny właściwej były znane starożytnym Grekom oraz Rzymianom. Rosnące na terenie Pompei krzewy maliny były introdukowane przez Rzymian z terenów południowej Troi około 65 lat p.n.e. Nazwa gatunku: *Rubus idaeus* nadana malinie właściwej przez Linneusza, wywodzi się od góry Ida (Turcja), którą intensywnie porastały jej krzewy. Hipokrates (460- 377 p.n.e.), jak również lekarze rzymscy wykorzystywali właściwości napotne owoców maliny w stanach gorączkowych. W „De Materia Medica” Dioskoridesa malina właściwa, obok jeżyny, jest źródłem szeregu surowców (owoce, liście, pędy), o działaniu ściągającym, przeciwzapalnym oraz przeciwbiegunkowym. Łodygi malin w formie odwarów stosowali również Indianie kanadyjscy w leczeniu anemii [11].

Obecnie *Rubi idaei fructus* oraz *Rubi idaei folium* stanowią surowce lecznicze. Suszone owoce maliny wchodzi w skład ziołowej mieszanki *Pyrosan*, stosowanej jako lek pobudzający czynność gruczołów potowych i przeciwgorączkowy w infekcjach bakteryjnych lub wirusowych przebiegających z podwyższoną temperaturą. Sok z owoców maliny wchodzi również w skład leczniczego syropu *Rubital*. Syrop malinowy (*Sirupus Rubi idaei*) jest stosowany w celu maskowania nieprzyjemnego smaku leków (*corrigen*s) [12, 13].

Owoce maliny są popularnie stosowanymi domowymi środkami przeciw przeziębieniu, oraz napotnymi, stosowanymi w stanach gorączkowych. Oprócz owoców, młode gałęzie malin są również stosowane w leczeniu przeziębienia w Europie Wschodniej [14]. Regionalnym surowcem Podlasia są pędy maliny, zbierane zimą po pierwszych mrozach gdy opadną liście, z których przygotowuje się napary stosowane w przeziębieniu i grypie [15].

1.1.2 *Rubus occidentalis*

Malina czarna jest rośliną występującą w stanie naturalnym we wschodniej Ameryce Północnej, i jest często spotykana na osłoniętych od wiatru zboczach, stokach i równinach o dużym

nasłonecznieniu. Jest blisko spokrewniona z *Rubus leucodermis* (ang. *white bark raspberry*) występującą na zachodzie Ameryki Północnej i obydwie gatunki nazywane są „czarną maliną” ze względu na intensywnie ciemne zabarwienie ich owoców [4, 5]. Malina czarna spotykana jest również w stanie naturalnym na terenie Republiki Czeskiej, Słowacji i Polski jako lokalnie zdomowiony gatunek [4]. Gęsty, obficie owocujący krzew osiąga wysokość od 1 do 5 m. Charakteryzuje się długimi, kolczastymi, łukowato wygiętymi pędami pokrytymi woskowym nalotem nadającym gałęziom fioletowo-szary barwę. Liście są złożone, nieparzystopierzaste pięciolistkowe w pierwszym, i trzylistkowe w drugim roku wegetacji. Liczne kwiaty posiadają 5 białych, eliptycznych płatków korony i 5 trójkątnych działek kielicha o tej samej długości. Owoce są niewielkie, zwarte, o kulistym kształcie, barwy granatowo-czarnej z silnym omszeniem. Są bardziej aromatyczne niż owoce maliny czerwonej i charakteryzują się większą ilością drobnych pestek. Roślina owocuje na pędach dwuletnich, w zależności od odmiany, od końca czerwca do połowy lipca [10].

Malina czarna nie była uprawiana do XIX wieku, a pierwsze informacje o jej stosowaniu pochodzą ze Stanów Zjednoczonych Ameryki. W XX wieku z owoców pozyskiwano barwnik spożywczy, używany m.in. w formie tuszu do stempli do znakowania mięsa [2]. Od pierwszych upraw na dużą skalę, hodowla maliny czarnej systematycznie malała, głównie ze względu na brak kultywarów odpornych na choroby i szkodniki oraz mniejszy popyt w porównaniu do maliny czerwonej. Niemniej jednak w ostatnich latach, obserwuje się wzrost sprzedaży i zastosowania czarnej maliny, głównie ze względu na wyniki badań naukowych, wskazujących na korzyści zdrowotne związane ze spożywaniem jej owoców [4, 5].

Obecnie, malina czarna jest uprawiana głównie w Stanach Zjednoczonych, gdzie opracowane zostały liczne odmiany kultywarowe, spośród których odmiany ‘Munger’, ‘Bristol’, ‘Jewel’, ‘MacBlack’ i ‘Haut’ należą do najbardziej popularnych [16, 17]. Polską odmianą maliny czarnej jest odmiana ‘Litacz’, otrzymana poprzez samozapylenie odmiany ‘Bristol’ [18].

1.2 Skład chemiczny

Zarówno owoce maliny właściwej jak i maliny czarnej stanowią dobrze rozpoznany surowiec w zakresie związków fenolowych, z licznymi doniesieniami dokumentującymi ich skład chemiczny opublikowanymi na przestrzeni ostatnich lat. Związkami dominującymi w owocach malin są antocyjany oraz elagotaniny, którym w znacznie mniejszych ilościach towarzyszą związki z grup flawonoli, kwasów fenolowych oraz flawan-3-oli. Skład chemiczny owoców *R. idaeus* i *R. occidentalis* został omówiony we wcześniejszych opracowaniach Katedry i Zakładu Farmakognozji GUMed [19], dlatego w niniejszej pracy przedstawione zostaną jedynie najnowsze doniesienia.

1.2.1 Owoce *R. idaeus* i *R. occidentalis*

Prace z ostatnich lat dotyczące składu chemicznego owoców maliny właściwej i zachodniej, w tym badania Katedry i Zakładu Farmakognozji, koncentrują się głównie na porównaniu dominujących grup polifenoli w owocach, biorąc pod uwagę takie czynniki jak odmiana hodowlana, pochodzenie owoców, czy stopień dojrzałości [19-28].

Badania koncentrują się w większości na ocenie zawartości antocyjanów, jakkolwiek analiza składu chemicznego jest jednym z punktów wyjściowych do opracowania nowych odmian hodowlanych. Jest to nowe podejście do tworzenia kultywarów, uwzględniające selekcję cech pożądanых nie tylko z punktu widzenia ekonomicznego (takich jak np. odporność na czynniki środowiskowe), ale również istotnych z punktu widzenia zdrowotnego – co w przypadku owoców malin przekłada się na otrzymanie odmian bogatych w związki polifenolowe [20-28].

W badaniu szeregu kultywarów maliny czerwonej na terenie Kolumbii Brytyjskiej w Kanadzie, przez 3 okresy zbioru z 3 różnych stanowisk, wykazano że owoce różniły się zawartością poszczególnych związków antocyjanowych. Zmiana warunków hodowli miała wpływ na stężenie poszczególnych antocyjanów w obrębie tej samej odmiany, natomiast ich ogólny profil jakościowy pozostawał niezmieniony [20]. W innym badaniu, różnice w profilach antocyjanów i 3-O-glukozydu kwercetyny między owocami poszczególnych odmian przypisywano głównie ich przynależności do danego kultywaru, ale obserwowano również zależność od czynników środowiskowych takich jak temperatura czy warunki nasłonecznienia [21]. Podobne wnioski wysunięto z dwóch badań nad owocami *R. idaeus* hodowanymi na terenie Brazylii, w których zawartość antocyjanów oraz prostych fenoli jak kwas galusowy, p-kumarowy i elagowy wiązano głównie z typem kultywaru i warunkami hodowli [22, 23], oraz z badań porównujących całkowitą zawartość antocyjanów i fenoli w owocach 4 różnych populacji *R. idaeus* zebranych na terenie Chorwacji [24]. W innym badaniu wskazano na zmiany w całkowitej zawartości fenoli i antocyjanów w owocach z różnych odmian *R. idaeus* hodowanych w tych samych warunkach [25]. Analizowano również zawartość antocyjanów, sangwiny H-6, lambertianiny C, kwasu elagowego oraz 3-O-glukuronidu kwercetyny w owocach popularnych kultywarów malin uprawianych w Norwegii. Oprócz różnic między kultywarami, głównie w zakresie antocyjanów, stężenia większości analizowanych związków w obrębie tej samej odmiany istotnie różniły się między poszczególnymi latami zbioru. Wyjątkiem była lambertianina C, która pozostawała na zbliżonym poziomie. Dlatego autorzy podkreślają konieczność oceny składu chemicznego owoców na przestrzeni lat, uwzględniając kilka okresów zbioru, celem selekcji odmian o stabilnym i mało podatnym na czynniki środowiskowe składzie chemicznym [26].

Badania porównujące zawartość związków fenolowych w 4 odmianach *R. idaeus* o czerwonych, i 5 odmianach o żółtych owocach ujawniły obecność szeregu związków z grupy kwasów fenolowych, flawonoli oraz flawan-3-oli, w tym wcześniej nie zidentyfikowanych w owocach *R. idaeus* [27]. Profile chromatograficzne badanych odmian były podobne, przy czym dominowały procyanidyny, epikatechina, katechina, 3-O-glukuronid kwercetyny, 3-O-galaktozyd kwercetyny i kwas elagowy. Po raz pierwszy w owocach malin wykryto również 3-O-glukozyd izoramnetyny. Odmiany o żółtych owocach nie zawierały procyanidyny B₁, którą wykryto w niewielkich ilościach w odmianach o owocach czerwonych obok dominującej procyanidyny B₂, oraz procyanidyn B₃ oraz B₄ [27].

Wszystkie przedstawione powyżej prace skupiają się na malinie czerwonej, i dotyczą analizy porównawczej związków których obecność w owocach jest dobrze udokumentowana, najczęściej antocyjanów, a także sangwiny H-6 i lambertianiny C.

Dane o składzie chemicznym owoców *R. occidentalis*, pochodzą z wcześniejszych badań Katedry i Zakładu Farmakognozji GUMed, i dotyczą antocyjanów, sangwiny H-6 i kwasu elagowego. Odnotowano wielokrotnie wyższą zawartość antocyjanów w owocach czarnej maliny (4-11 krotnie wyższa) w porównaniu do czerwonych owoców *R. idaeus* [19, 28, 29], oraz po raz pierwszy oznaczono zawartość sangwiny H-6 [19, 28, 30].

1.2.2 Pędy *R. idaeus*

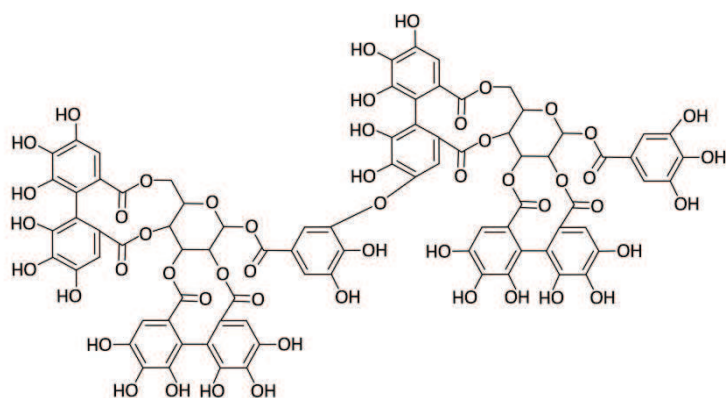
Dane o składzie chemicznym pędów *R. idaeus* pochodzą z wcześniejszych badań Katedry i Zakładu Farmakognozji GUMed obejmujących pędy 11 odmian uprawowych (Tab. 1) [31].

Sangwina H-6 jest związkiem dominującym w pędach *R. idaeus*, (139.2 – 633.1 mg/100 g s.m. (suchej masy)), podczas gdy inne identyfikowane elagotanniny: lambertianina C, sangwina H-2 oraz H-10 występują w niewielkich ilościach. W wysokich stężeniach występował kwas elagowy (26.1 – 106.8 mg/100 g s.m.), epikatechina (10.9 – 85.3 mg/100g s.m.), izokwercetyna oraz 3-O-glukuronid kwercetyny (10.3 – 67.4 mg/100 g s.m.), podczas gdy inne związki były obecne w niewielkich ilościach (Tab. 1).

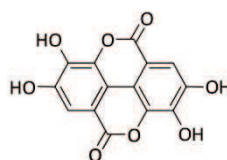
W porównaniu do owoców, pędy *R. idaeus* charakteryzowały się zbliżoną bądź wyższą zawartością sangwiny H-6 oraz znacząco wyższymi poziomami kwasu elagowego [31, 32]. Obserwowano również niewielkie różnice w profilach związków polifenolowych i prostych fenoli w zależności od odmiany [31].

Tab. 1 Związki fenolowe zidentyfikowane w pędach *R. idaeus*

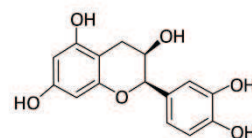
elagotaniny	
sangwina H-6	[31]
lambertianina C	[31]
sangwina H-2	[31]
sangwina H-10	[31]
potentylina/kazuaryktyna	[31]
kwasy fenolowe	
kw. elagowy	[31]
kw. chlorogenowy	[31]
kw. kawowy	[31]
kw. galusowy	[31]
kw. protokatechowy	[31]
flawonole	
hiperozyd	[31]
izokwercetyna	[31]
3-O-glukuronid kwercetyny	[31]
kwercytryna	[31]
myricetyna	[31]
tilirozyd	[31]
kwercetyna	[31]
kemferol	[31]
3-O-galaktozyd kemferolu	[31]
flawan-3-ole	
katechina	[31]
epikatechina	[31]
procyjanidyna B ₁	[31]
procyjanidyna B ₂	[31]



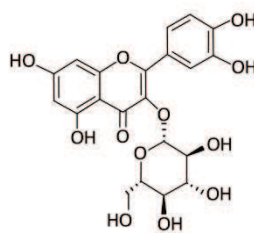
sangwina H-6



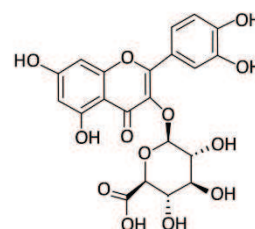
kw. elagowy



epikatechina



izokwercetyna



3-O-glukuronid kwercetyny

Ryc. 2 Wzory związków chemicznych zidentyfikowanych w pędach maliny właściwej

1.3 Aktywność biologiczna badanych gatunków *R. idaeus* i *R. occidentalis*

1.3.1 Owoce *R. idaeus* i *R. occidentalis*

W badaniach przesiewowych aktywności antyoksydacyjnej szeregu owoców, warzyw, zbóż, orzechów oraz nasion roślin strączkowych, owoce malin klasyfikowano w czołówce surowców charakteryzujących się najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym [33]. Dotychczasowe badania aktywności biologicznej owoców *R. idaeus* i *R. occidentalis* koncentrowały się przede wszystkim na ich potencjale antyoksydacyjnym, związanej z nim aktywności przeciwzapalnej, oraz aktywności

przeciwbakteryjnej. Aktywność biologiczną owoców maliny właściwej i maliny zachodniej szeroko omówiła Majdan M. [19], dlatego poniżej przedstawiono jedynie doniesienia z ostatnich lat.

1.3.1.1 Aktywność przeciwreumatyczna

Reumatoidalne zwyrodnienie stawów (RZS) jest chorobą przewlekłą o charakterze autoimmunologicznym i charakteryzuje ją stan zapalny stawów wraz z towarzyszącą mu destrukcją chrząstki, jako rezultatu utraty dwóch głównych składników o charakterze protein – proteoglikanu i kolagenu typu II (CII), odpowiedzialnych za biomechaniczne właściwości chrząstki. Utrata proteoglikanu zachodzi we wstępnej fazie degradacji chrząstki i jest procesem odwracalnym, natomiast degradacja CII jest nieodwracalna i prowadzi do utraty prawidłowej funkcji stawów.

W modelu *in vitro* hodowli chrząstki wołowych przegród nosowych, oraz w modelu *in vivo* indukowanej adiuwantem artrozy u szczurów, oceniano efekty przeciwzapalne i chroniące chrząstkę stawową ekstraktu z owoców maliny właściwej standaryzowanego w zakresie całkowitej zawartości fenoli, antocyjanów i elagotannin (RRE).

Porównano aktywność ekstraktu w dwóch dawkach: 30 i 120 mg/kg podawanych w ciągu 30 dni po zastosowaniu adjuwantu (*Mycobacterium tuberculosis*). W modelu *in vitro* hodowli chrząstki proteoglikan i CII ulegały degradacji pod wpływem cytokiny prozapalnej IL-1 β . Po dodaniu do medium hodowlanego RRE w stężeniu 50 μ g/ml obserwowano hamowanie procesu degradacji zarówno proteoglikanu jak i CII. W modelu *in vivo* ujawniono, że ekstrakt podany *per os* w wyższych dawkach hamuje rozwój choroby mierzony stopniem obrzęku łapy, bez spadku wagi szczura charakterystycznego dla tego modelu badawczego. Również w badaniach histologicznych nie wykazano znaczących zmian zapalnych (54% zahamowania stanu zapalnego), uszkodzeń chrząstki (67%) i resorpcji kości (67%), w porównaniu do grupy kontrolnej. W niższych dawkach ekstrakt pozostawał bez wpływu na rozwój choroby i obrzęk. Autorzy pracy stwierdzają, że regularne spożywanie owoców maliny czerwonej może mieć korzystny wpływ na hamowanie progresji choroby reumatoidalnej [34].

W innym badaniu zastosowano model kolagenowego zapalenia stawów (CIA, ang. *collagen-induced arthritis*), polegający na rozwoju RZS u genetycznie predysponowanych szczurów po wstrzyknięciu CII. Po 23 dniach od iniekcji zwierzętom podawano ekstrakt z owoców maliny czerwonej *per os* bądź dootrzewnowo w dawce 15 mg/kg (co odpowiada dziennej konsumpcji 150 g owoców u ludzi). W obydwu grupach badanych obserwowano wyraźne zmniejszenie obrzęku stawów w porównaniu do szczurów nieotrzymujących ekstraktu. Dodatkowo, w przypadku obydwu grup otrzymujących ekstrakt, analiza obrazu histologicznego tkanek po 35 dniach eksperymentu ujawniła znaczne zahamowanie degradacji chrząstki oraz redukcję rozrostu błony maziowej, resorpcji kości i

tworzenia narośli w postaci osteofitów, w porównaniu do grupy nieotrzymującej ekstraktu. W grupach otrzymujących ekstrakt nie obserwowano zapalenia błony maziowej, które było charakterystyczne dla grupy kontrolnej [35]. W porównaniu do poprzedniego badania [34], autorzy ujawniają efektywność niższych dawek ekstraktu z owoców maliny w hamowaniu progresji reumatoidalnego zapalenia stawów [35].

1.3.1.2 Aktywność przeciwrzodowa

W warunkach *in vitro*, elagotaniny ujawniły aktywność przeciwzapalną i hamującą wzrost bakterii powodującej chorobę wrzodową żołądka: *Helicobacter pylori*, dlatego poddano ocenie ich efekty biologiczne w modelach choroby wrzodowej żołądka. Badania *in vitro* prowadzono na linii ludzkich komórek raka żołądka (AGS) stymulowanej prozapalnymi cytokinami TNF- α (czynn timer martwicy nowotworu, ang. *tumor necrosis factor-alfa*) i IL-1 β , natomiast model *in vivo* obejmował indukowane etanolem owrzodzenie błony śluzowej żołądka u szczurów.

W modelu *in vitro* elagotaniny hamowały indukowaną TNF- α translokację czynn timer NF- κ B do jądra komórkowego na poziomie 57-67%, co przekładało się na hamowanie ekspresji IL-8, głównej cytokiny zapalenia błony śluzowej żołądka, towarzyszącej chorobie wrzodowej. Stwierdzono, że głównie sangwina H-6 i lambertianina C – związki dominujące w zespole elagotanin z owoców, są odpowiedzialne za efekty biologiczne ekstraktów.

W modelu *in vivo*, zwierzęta otrzymywały dożołądkowo wzbogacony w elagotaniny ekstrakt z owoców maliny właściwej, w dawce 20 mg/kg przez okres 10 dni przed indukcją zmian wrzodowych. Zmiany w błonie śluzowej indukowano poprzez dożołądkowe podanie 1 ml etanolu, na godzinę przed uśpieniem zwierząt i pobraniem materiału do badań. Wykazano, że ekstrakt z owoców *R. idaeus* obniżał liczbę powstałych wrzodów o ok. 75% i chronił śluzówkę przed indukowanym etanolem stresem oksydacyjnym, oraz ograniczał ekspresję CINC-1 (szczurzego homologu IL-8 u ludzi). Zmniejszoną ekspresję CINC-1, podobnie jak w modelu *in vitro*, wiąże się z ograniczeniem translokacji do jądra komórkowego czynn timer NF- κ B, które obserwowano na poziomie 72%. Badanie stanowi pierwsze doniesienie na temat ochronnego działania elagotanin w modelach choroby wrzodowej żołądka [36].

1.3.1.3 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

W badaniach właściwości przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów i frakcji bogatych w elagotaniny z owoców *R. idaeus* oceniano ich aktywność wobec bakterii flory fizjologicznej przewodu pokarmowego, lub bakterii których źródłem zakażenia mogą być produkty żywnościowe (m. in.

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. i *Listeria* spp.) [19]. W ostatnich latach badania poszerzono o szczepy patogenicznych bakterii odpowiedzialnych za infekcje układu oddechowego oraz skóry [28].

Badaniu właściwości przeciwdrobnoustrojowych wobec 15 różnych bakterii chorobotwórczych poddano sangwinę H-6, kwas elagowy oraz ekstrakty z owoców 4 odmian *R. idaeus* i *R. occidentalis* charakteryzujące się różną zawartością antocyjanów i elagotanin. Badane szczepy należały zarówno do bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, przy czym aktywność przeciwdrobnoustrojową owoców malin wobec 10 szczepów analizowano po raz pierwszy.

Sangwina H-6 była aktywna wobec 8 szczepów, wykazując aktywność przeciwbakteryjną wobec *Streptococcus* grupy A, *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes* i *Moraxella catarrhalis*. Kwas elagowy był aktywny wobec tych samych szczepów, z wyjątkiem *S. pneumoniae* and *S. epidermidis*, oraz dodatkowo wykazywał działanie hamujące wzrost bakterii *Neisseria meningitidis*. *C. diphtheriae* – maczugowiec odpowiedzialny za błonicę dróg oddechowych oraz skóry, był szczególnie wrażliwy na sangwinę H-6 oraz kwas elagowy w stężeniach 0.03 mg/ml. *M. catarrhalis* – bakteria komensaliczna flory fizjologicznej błon śluzowych człowieka, odpowiedzialna za nawracające zapalenia dróg oddechowych, ujawniła wysoką wrażliwość na kwas elagowy (stężenie bakteriobójcze 0.015 mg/ml).

Odnotowano zróżnicowaną wrażliwość poszczególnych szczepów na ekstrakty z owoców malin, z efektem bakteriobójczym obserwowanym dla stężeń ekstraktów od 0.5 mg/ml do 128 mg/ml. Podobnie jak w przypadku sangwiny H-6 i kwasu elagowego, najsilniejszą aktywność przeciwbakteryjną badanych ekstraktów obserwowano wobec *C. diphtheriae* i *M. catarrhalis*. Ekstrakty *R. idaeus* odmiany 'Veten' charakteryzowały się najwyższą zawartością sangwiny H-6 i kwasu elagowego co wiązano z silną aktywnością wobec *S. pneumoniae* i *C. diphtheriae*. Ekstrakt *R. occidentalis* 'Litacz', o najwyższej zawartości antocyjanów, wykazał najslabszą aktywność wobec badanych bakterii, z wyjątkiem *N. meningitidis* (dwoinki zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych). Ujawniono też działanie hamujące wszystkich badanych ekstraktów z owoców malin w stężeniu 8 mg/ml wobec *H. pylori*.

Odnotowano związek aktywności przeciwbakteryjnej z obecnością sangwiny H-6 i kwasu elagowego wobec bakterii *C. diphtheriae* i *M. catarrhalis*. Obserwowano, że siłę aktywności przeciwbakteryjnej niektórych ekstraktów z owoców może obniżać wysokie stężenie antocyjanów [28].

W badaniach nad przeciwbakteryjnymi właściwościami soków oraz wytłoczyn z owoców maliny właściwej, nie odnotowano różnic w aktywności dwóch kultywarów ('Meeker' i 'Willamette') wobec licznych bakterii obecnych w produktach żywnościowych oraz wodzie pitnej (*S. typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus saprophyticus*) [37].

1.3.1.4 Aktywność chemoprewencyjna

Badania aktywności biologicznej owoców maliny właściwej koncentrują się przede wszystkim na właściwościach przeciwzapalnych i przeciwbakteryjnych [38], natomiast badania owoców maliny czarnej obejmują głównie działanie chemoprewencyjne.

Utrzymujący się stres oksydacyjny, i towarzyszący mu stan zapalny, skutkują zaburzeniami struktury i funkcji zdrowych komórek, które mogą mieć związek z transformacją nowotworową, objawiającą się uszkodzeniami DNA, zwiększoną proliferacją, przeżywalnością, migracją i angiogenezą [39]. Zainteresowanie owocami *R. occidentalis* w zakresie ich działania chemoprewencyjnego wynika z wysokiej zawartości antocyjanów, które są jednymi z najsilniejszych antyoksydantów.

Liczne badania w modelach *in vitro* oraz *in vivo*, a także badania kliniczne, potwierdzają aktywność chemoprewencyjną owoców *R. occidentalis* w różnych typach nowotworów. Obejmują one regulację metabolizmu czynników rakotwórczych, hamowanie wzrostu komórek, promowanie apoptozy oraz redukcję ekspresji markerów zapalenia i angiogenezy [40-76].

1.3.1.4.1 Nowotwory skóry

Istnieje wiele doniesień o hamującym efekcie ekstraktu z owoców maliny zachodniej na proliferację komórek linii CI 41 mysiego naskórka traktowanych karcynogenem z grupy benzopirenów – BPDE [40-43]. Wykazano, że ekstrakty z owoców hamowały indukowaną BPDE aktywację czynników transkrypcyjnych AP-1 (ang. *activator protein 1*), NF- κ B i NFAT (ang. *nuclear factor of activated T-cells*) [40-42] oraz ekspresję powiązanych z nimi genów dla VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, ang. *vascular endothelial growth factor*), COX-2 (cyklooksygenaza 2) i TNF- α [41, 42]. Jednocześnie ustalono, że związkami odpowiedzialnymi za hamowanie NF- κ B indukowanego BPDE, są przede wszystkim pochodne cyjanidyny: 3-O-glukozyd, 3-O-rutynozyd i 3-O-(2^G-ksylozylrutynozyd) [43].

W badaniu *in vivo* na bezwłosych myszach SKH-1, miejscowe leczenie ekstraktem z owoców *R. occidentalis* istotnie ograniczało stan zapalny skóry i procesy nowotworzenia wywołane ekspozycją na promieniowanie UV-B. W modelu krótkoterminowym, badane myszy poddano dawce promieniowania powodującego minimalny rumień, leczony miejscowo ekstraktem z owoców lub placebo. Po 48 h od ekspozycji, dla ekstraktu podanego w dawce 500 μ g, obserwowano zmniejszenie obrzęku skóry, hamowanie odpowiedzi zapalnej oraz ekspresji markerów uszkodzenia DNA. W modelu długoterminowym, badane myszy poddawano działaniu tej samej dawki promieniowania 3-razy w tygodniu w okresie 25 tygodni, wykazując spadek liczby guzów i ograniczenie ich wielkości u zwierząt

otrzymujących miejscowo ekstrakt z owoców maliny czarnej, (17 guzów/mysz, średnia wielkość 10.1 mm²), w porównaniu do grupy placebo (30 guzów/mysz, średnia wielkość 30.2 mm²). Hamowanie procesów chorobowych było skorelowane ze zmniejszeniem liczby limfocytów T infiltrujących nowotwór: CD4+ oraz CD3+foxp3+, które nasilają odpowiedź zapalną indukowaną promieniowaniem UV-B i promują procesy nowotworzenia [44].

1.3.1.4.2 Nowotwory piersi

Podawanie sproszkowanych owoców *R. occidentalis* lub kwasu elagowego w diecie szczurów szczepu ACI z nowotworem piersi indukowanym estrogenem, skutkowało ograniczeniem objętości i liczby guzów w porównaniu do szczurów otrzymujących standardową dietę [45, 46]. Zarówno sproszkowane owoce jak i kwas elagowy ujawniły zbliżoną skuteczność w ograniczaniu objętości i liczby nowotworów [45], przy czym owoce maliny czarnej dodatkowo ograniczały ekspresję receptora estrogenowego ER α [46].

W badaniu na linii komórkowej MCF-7 ludzkiego raka piersi ujawniono, że ekstrakt z owoców maliny czarnej uwrażliwia na promieniowanie komórki zmienione nowotworowo. Efekt jest łączony z inhibicją czynnika NF- κ B, który w komórkach rakowych pełni rolę radioprotektanta [47].

1.3.1.4.3 Nowotwory jamy ustnej

Efekt chemoprewencyjny etanolowego ekstraktu z owoców maliny zachodniej oceniano na zdrowych i dotkniętych zmianami przednowotworowymi, bądź nowotworowymi, komórkach nabłonka jamy ustnej. Obserwowano hamowanie wzrostu komórek ze zmianami przednowotworowymi i nowotworowymi, przy braku oddziaływania ekstraktu na zdrowe komórki. Poziom hamowania wzrostu zmienionych komórek w obecności kwasu elagowego, ferulowego oraz β -sitosterolu był zbliżony, natomiast inhibicję zdrowych komórek obserwowano tylko w obecności kwasu elagowego. Inhibicja jest wiązana z oddziaływaniem na białka z grupy cyklin oraz kinaz cyklinozależnych (Cdk), regulujących przechodzenie w poszczególne fazy cyklu życia komórki [48].

W innym badaniu na liniach komórkowych raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, obserwowano hamowanie proliferacji komórek, zwiększoną indukcję apoptozy oraz inhibicję ekspresji VEGF i syntazy tlenu azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*) po inkubacji z etanolowym ekstraktem z owoców *R. occidentalis* [49].

Wpływ owoców maliny czarnej na formowanie się guzów w jamie ustnej badano *in vivo* w modelu nowotworu worka policzkowego u chomika, indukowanego 7,12-dimetylobenz(a)antracenenem (DMBA). Wykazano, że zwierzęta otrzymujące 5% sproszkowanych owoców maliny czarnej w

codziennej diecie charakteryzowała mniejsza liczba guzów w porównaniu do grupy kontrolnej, oraz w porównaniu do grupy otrzymującej 10% sproszkowanych owoców [50].

1.3.1.4.4 Nowotwory przełyku

Aktywność chemoprewencyjną *R. occidentalis* analizowano w indukowanym N-nitrozometylobenzyloaminą (NMBA) modelu raka płaskonabłonkowego przełyku (ESCC, ang. *esophageal squamous-cell carcinoma*) [51-61].

U zwierząt otrzymujących 5% i 10% sproszkowanych owoców maliny czarnej w codziennej diecie odnotowano mniej chorobowo zmienionych obszarów przełyku oraz mniejszą liczbę i wielkość guzów, na różnych etapach karcynogenezy (od inicjacji do progresji). Podobnie jak w badaniach nad nowotworami jamy ustnej, silniejszy efekt obserwowano dla 5% dawki owoców w diecie [51-55]. Efekt był skorelowany z ograniczeniem występowania powstającego pod wpływem NMBA karcynogennego adduktu: O⁶-metyloguaniny w DNA nabłonka przełyku [52-54], oraz modulacją abnormalnej ekspresji niektórych genów w komórkach przedrakowych [55].

W dalszych badaniach wykryto, że związkami hamującymi metabolizm NMBA w kulturach eksplantatów przełyku są 3-O-rutynozyd cyjanidyny, 3-O-glukozyd cyjanidyny oraz kwas elagowy [56]. Ponadto, ustalono że frakcje z owoców *R. occidentalis* bogate w antocyjany i elagotaniny mają zdolność hamowania proliferacji, angiogenezy i procesów zapalnych w komórkach przedrakowych nabłonka przełyku [57]. Przeciwnieństwem powyższych danych są wyniki suplementacji diety szczurów z ESCC frakcjami zawierającymi różne ilości elagotanin, wskazujące na brak istotnych różnic w sile działania chemoprewencyjnego. Uważa się, że elagotaniny nie są odpowiedzialne za działanie przeciwnowotworowe ekstraktów z maliny zachodniej, bądź też są odpowiedzialne w bardzo małym stopniu [58].

W badaniach na poziomie molekularnym ujawniono, że dieta zawierająca 5% sproszkowanych owoców maliny czarnej hamuje ekspresję COX-2, iNOS, PGE₂ (prostaglandyny E2) i c-Jun (podjednostki AP-1) w komórkach przednowotworowych nabłonka przełyku. Supresja COX-2 i iNOS korelowała z hamowaniem procesów angiogenezy, objawiających się inhibicją ekspresji VEGF i zmniejszoną gęstością mikronaczyń w chorobowo zmienionej tkance [59, 60]. Dieta zawierająca 5% sproszkowanych owoców maliny czarnej wpływała również na ograniczenie produkcji cytokin prozapalnych w odpowiedzi zapalnej indukowanej IL-1 β and TNF- α w zdrowych komórkach nabłonka przełyku [61].

1.3.1.4.5 Nowotwory jelita grubego

W badaniach na linii nowotworu jelita grubego HT-29, ustalono że komórki inkubowane w obecności ekstraktu z owoców maliny zachodniej charakteryzują się trzykrotnie zwiększonym poziomem apoptozy w porównaniu do grupy kontrolnej [62]. Obserwowano również zależne od dawki hamowanie proliferacji komórek, chociaż efekt nie był skorelowany z zawartością antocyjanów oraz całkowitą zawartością fenoli w owocach [63].

Rozszerzenie powyższych badań o model statystyczny analizy wieloczynnikowej, z wykorzystaniem widm ^1H NMR, wykazało że 3-O-(2^G-ksylozylorutynozyd) cyjanidyny i 3-O-rutynozyd cyjanidyny w największym stopniu decydują o obserwowanym efekcie antyproliferacyjnym. Natomiast nie obserwowano korelacji między zawartością antocyjanów a hamowaniem wzrostu komórek [64], co sugeruje, że antocyjany osiągają maksymalną efektywność przy określonym stężeniu i zwiększenie dawki, bądź udziału poszczególnych związków w profilu antocyjanów pozostaje bez wpływu na aktywność ekstraktów [63, 64]. Inne związki fenolowe, takie jak kwas p-kumarowy, 3-O-glukozyd kwercetyny, 3-O-rutynozyd kwercetyny i etylowe pochodne kwasu elagowego, pomimo że obecne w owocach w znacznie niższych stężeniach, biorą również udział w hamowaniu proliferacji komórek HT-29 [64]. Ujawniono, że antocyjany obecne w owocach *R. occidentalis* są odpowiedzialne za hamowanie ekspresji i aktywności DNA-metylotransferaz (DNMT1 i DNMT3B) w liniach komórkowych HTC-116, Caco-2 i SW480, odpowiedzialnych za abnormalną metylację w niektórych typach nowotworów u ludzi [65].

Aktywność biologiczną liofilizowanych owoców *R. occidentalis* badano w mysim modelu wrzodziejącego zapalenia okrężnicy indukowanym 3% siarczanem dekstranu sodu (DSS, ang. *dextran sodium sulfate*), które jest uważane za schorzenie znacznie zwiększające ryzyko raka okrężnicy. Obserwowano, że podawanie liofilizowanych owoców w znacznym stopniu ograniczało powstawanie wrzodów oraz skracanie jelita grubego (charakterystyczne dla działania DSS). Interesującym jest, że owoce pozostawały bez wpływu na poziom markerów stresu oksydacyjnego (NO) oraz naciek komórek zapalnych, natomiast obniżały poziom TNF- α , IL-1 β , COX-2 i fosforylowanej formy kinazy I κ B- α w tkance jelita grubego (fosforylacja I κ B- α poprzedza jego degradację do NF- κ B), co może sugerować, że owoce maliny zachodniej redukują procesy zapalne a nie ograniczają stres oksydacyjny [66].

Efektywność liofilizowanych owoców *R. occidentalis* oceniono również w dwóch modelach *in vivo*, indukowanego azoksymetanem nowotworu jelita grubego u szczurów szczepu F344, oraz u genetycznie zmodyfikowanych myszy ze spontanicznie występującym zapaleniem i nowotworami okrężnicy Muc2-/- i Apc1638+/- [67, 68].

Wykazano że codzienna dieta zawierająca 2.5%, 5% i 10% zliofilizowanych owoców maliny zachodniej skutkowała, odpowiednio, o 42%, 45% i 71% zmniejszoną ilością guzów u szczurów F344, wraz ze znacznym ograniczeniem oksydacyjnych uszkodzeń DNA, ocenianych poziomem biomarkera oksydacji DNA – 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-OH-dG) w moczu [67].

Suplementacja diety zliofilizowanymi owocami *R. occidentalis* w ciągu 12 tygodni powodowała zmniejszenie liczby nowotworów o 60% u myszy *Apc1638+/-* i o 50% u myszy *Muc2-/-*. Mechanizm prewencyjny wiązano z hamowaniem ekspresji β -kateniny (białka którego nadekspresja jest wiązana z rozwojem wielu nowotworów) u myszy *Apc1638+/-*, oraz z ograniczaniem procesu zapalnego u myszy *Muc2-/-* [68].

1.3.1.4.6 Chemoprewencja w badaniach klinicznych

Aktywność chemoprewencyjna sproszkowanych owoców maliny zachodniej analizowano w badaniach klinicznych u pacjentów predysponowanych do rozwoju raka jamy ustnej [69-72], przełyku [73] i jelita grubego [74-76].

W badaniach klinicznych oceniano działanie przylegającego do śluzówki żelu zawierającego zliofilizowane owoce *R. occidentalis*, przeznaczonego do miejscowej aplikacji na obszary śluzówki jamy ustnej u pacjentów z neoplazją śródnabłonkową, predysponującą do rozwoju raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (SSC) [69-71]. U pacjentów którym aplikowano miejscowo żel na zmienioną chorobowo śluzówkę, 4 razy dziennie przez okres 6 tygodni, obserwowano znaczną regresję abnormalnych zmian, połączoną z ograniczeniem przypadków utraty heterozygotyczności (LOH, ang. *loss of heterozygosity*) loci genów supresorowych INK4a/ARF, p53 i FHIT [69, 70] i obniżeniem poziomu COX-2 w komórkach nabłonka [71]. W kolejnym badaniu, pacjenci płukali jamę ustną roztworem zawierającym 10% sproszkowanych owoców, 3 razy dziennie, celem określenia udziału śliny, komórek nabłonkowych oraz flory bakteryjnej w metabolizmie antocyjanów. W szeregu analiz farmakokinetycznych i testów biologicznych wykryto, że antocyjany utrzymują się na stabilnym poziomie w ślinie, a płukanie dostarcza miejscowo większą ilość antocyjanów niż forma żelu. W ślinie odnotowano obecność kwasu protokatechowego, jako produktu degradacji antocyjanów, oraz ich form glukuronidowych, uznanych za aktywne biologicznie metabolity [72].

Podobne badanie przeprowadzono u pacjentów z przełykiem Barreta, charakteryzującego się dysplazją tkanek predysponującą pacjentów do rozwoju nowotworu przełyku. Nie obserwowano ograniczenia dysplazji tkanek przełyku u pacjentów otrzymujących wodny roztwór ze sproszkowanych owoców, jakkolwiek odnotowano niższe poziomy markerów stresu oksydacyjnego w moczu. Autorzy jako przyczynę podają niewystarczającą miejscową absorpcję składników aktywnych w przełyku [73].

W innych badaniach pacjenci z nowotworem bądź polipami gruczolakowatymi jelita grubego, spożywali 60 g sproszkowanych owoców dziennie [74, 75]. W grupie pacjentów przyjmującej owoce przez okres 2-4 tygodni przed planowanym operacyjnym usunięciem zmian, porównano wyniki biopsji guzów/polipów przed oraz po zastosowaniu owoców. Ujawniono, że poziomy dwóch markerów prognostycznych nowotworu jelita grubego: Ki-67 (związany z regulacją proliferacji) i CD105 (fragment receptora TGF- β , pełniącego rolę w regulacji angiogenezy), były znacznie niższe po podaniu sproszkowanych owoców, przy zwiększonym poziomie apoptozy [74]. U pacjentów przyjmujących zliofilizowane owoce przez okres 9 tygodni, obserwowano podobny mechanizm działania chemoprewencyjnego poprzez regulację markerów apoptozy, podziału komórkowego oraz angiogenezy w komórkach nowotworowych oraz sąsiednich tkankach. Dodatkowo obserwowano niższe poziomy IL-8 (markera predykcyjnego rozwoju nowotworu) w surowicy u pacjentów przyjmujących owoce przez co najmniej 10 dni [75]. U 14 pacjentów z rodzinną polipowatością gruczolakową, silnie predysponującą do rozwoju nowotworów jelita grubego, badano wpływ sproszkowanych owoców *R. occidentalis* podawanych *per os* i w formie czopków przez okres 9 miesięcy. Po tym czasie, u 11 pacjentów obserwowano spadek masy polipów przy jednoczesnym braku wpływu na ich liczbę, oraz hamowanie proliferacji, ekspresji DNMT1 i abnormalnej metylacji CDKN2A (genu promotorowego dla białka supresorowego p16) w komórkach [76].

1.3.2 Pędy *R. idaeus*

Podobnie jak skład chemiczny, aktywność biologiczna pędów *R. idaeus* była wcześniej przedmiotem badań w Katedry i Zakładu Farmakognozji GUMed [19, 31].

1.3.2.1 Aktywność antyoksydacyjna

W teście DPPH (test z użyciem 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu), wartość EC_{50} (stężenie antyoksydantu powodujące spadek początkowego stężenia rodnika o 50%) ekstraktu z pędów *R. idaeus* wynosiła 19.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, natomiast w teście fosfomolibdenowym aktywność antyoksydacyjna wyrażona w AAE (ekwiwalenty kwasu askorbinowego, ang. *ascorbic acid equivalents*) była równa 427.94 mg AAE/g [19, 31]. Są to wartości porównywalne dla surowców roślinnych uważanych za silne antyoksydanty, jak surowce z rodzaju *Potentilla* L. (EC_{50} - 16.9 to 23.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$) [77], *Rosa* L. (EC_{50} 12.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 354.87 mg AAE/g) [78] z rodziny *Rosaceae*, czy też liść mięty pieprzowej, ziele tymianku, ziele rozmarynu i liść szalwii z rodziny *Lamiaceae* (EC_{50} 15-21 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 156-410 mg AAE/g) [79, 80].

Potencjał zmiatania wolnych rodników ekstraktu z pędów *R. idaeus* był również 2-razy wyższy w porównaniu do owoców *R. occidentalis*, oraz 10-razy wyższy w porównaniu do owoców maliny

właściwej, natomiast potencjał redukcyjny od 2 do 3-razy wyższy niż owoców [19]. Ekstrakt z pędów jest znacznie silniejszym zmiataczem wolnych rodników niż liście roślin z rodzaju *Rubus*, dla których wartości EC_{50} wynosiły powyżej 180 $\mu\text{g/ml}$ [81]. [38][38][38]Silne właściwości antyoksydacyjne ekstraktu z pędów *R. idaeus* są związane z wysoką zawartością sangwiny H-6 w surowcu, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi dla owoców maliny właściwej, których frakcje bogate w elagotaniny charakteryzowały się wyższą aktywnością antyoksydacyjną w porównaniu do frakcji bogatych w antocyjany [82-84].

1.3.2.2 Aktywność przeciwbakteryjna

Pędy maliny właściwej ujawniły aktywność przeciwbakteryjną wobec szeregu szczepów bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Aktywność hamującą wzrost bakterii, w stężeniach ekstraktu od 0.2 do 30 mg/ml, obserwowano wobec *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* i *Helicobacter pylori*. Aktywność bakteriobójczą w stężeniach ekstraktu od 0.06 do 120 mg/ml odnotowano wobec *Streptococcus* grupy A, B, G, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus aureus* i *Klebsiella pneumoniae* [31].

Podobnie jak w badaniach aktywności przeciwbakteryjnej owoców maliny właściwej i maliny zachodniej, do najbardziej wrażliwych szczepów należały *C. diphtheriae* i *M. catarrhalis*, jakkolwiek ekstrakt z pędów dodatkowo silnie hamował wzrost bakterii *C. sporogenes* i *S. aureus*. Na tle owoców, pędy charakteryzowały się silniejszą aktywnością przeciwbakteryjną wobec badanych szczepów, co prawdopodobnie związane jest z wyższą zawartością sangwiny H-6 i kwasu elagowego [31].

1.3.2.3 Aktywność cytotoksyczna

Aktywność cytotoksyczną pędów *R. idaeus* i sangwiny H-6 oceniono wobec linii komórkowej ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej (HL-60), linii komórkowej raka szyjki macicy (HeLa) i linii ludzkich fibroblastów. Wartości IC_{50} dla pędów wynosiły 300 $\mu\text{g/ml}$ wobec linii HeLa i 110 $\mu\text{g/ml}$ wobec HL-60, oraz odpowiednio 35 $\mu\text{g/ml}$ i 25 $\mu\text{g/ml}$ dla sangwiny H-6, przy braku aktywności wobec komórek fibroblastów [31]. Efekt hamujący łączono z obecnością elagotanin, co jest zgodne z wcześniejszymi danymi o inhibicji wzrostu linii HeLa w obecności ekstraktu z owoców maliny właściwej [83].

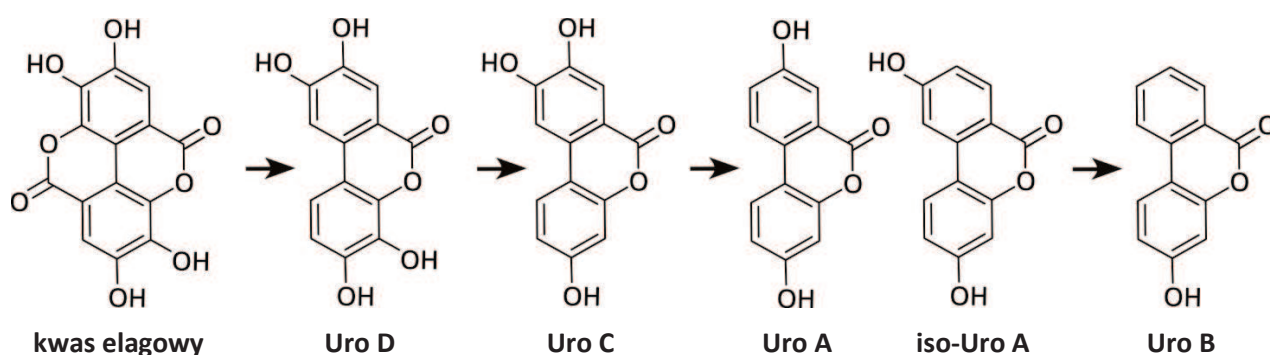
2. Charakterystyka chemiczna i aktywność biologiczna urolityn – produktów metabolizmu elagotanin

Ze względu na szerokie spektrum aktywności biologicznej elagotanin i kwasu elagowego [19] w szeregu prac badano ich absorpcję z przewodu pokarmowego oraz dystrybucję w organizmie [85-107].

2.1 Struktura oraz biodostępność

W badaniach na modelach zwierzęcych oraz badaniach na ludziach, wykazano, że absorpcja elagotanin z przewodu pokarmowego jest ograniczona [85-88]. U szczurów długotrwale spożywających znaczne ilości elagotanin, jedynie 3-6% było obecnych w formie niezmetylizowanej w moczu i osoczu [85], w przeciwieństwie do ludzi, u których nie stwierdzono obecności elagotanin w żadnym z płynów ustrojowych [86-88]. Ustalono natomiast, że większość elagotanin jest metabolizowana przez mikroflorę jelitową do związków zwanych urolitynami.

Po spożyciu, elagotaniny (ET) ulegają degradacji w kwaśnym środowisku przewodu pokarmowego, hydrolizując z uwolnieniem kwasu heksahydroksydifenowego (HHDP), który na drodze laktonizacji przekształcany jest w kwas elagowy (EA) (Ryc. 4) [108]. Badania płynnej treści jelitowej od pacjentów z ileostomią sugerują że ok. 80% sangwiny H-6 ulega hydrolizie do kwasu elagowego w żołądku oraz jelicie cienkim [88]. Ponadto, 80% wolnego kwasu elagowego jest przekształcanych przez mikroflorę jelita grubego w urolityny, poprzez otwarcie i dekarboksylację jednego z pierścieni laktonowych i degradację kolejnych grup hydroksylowych. W wyniku tego procesu powstają urolityny tetrahydroksylowe (urolityna D, Uro D), trihydroksylowe (urolityna C, Uro C), dihydroksylowe (urolityna A, Uro A oraz izourolityna A iso-Uro A) oraz monohydroksylowe (urolityna B, Uro B), które są pochodnymi 6H-dibenzo- β -D-piran-6-onu (Ryc. 3) [86, 88-96].

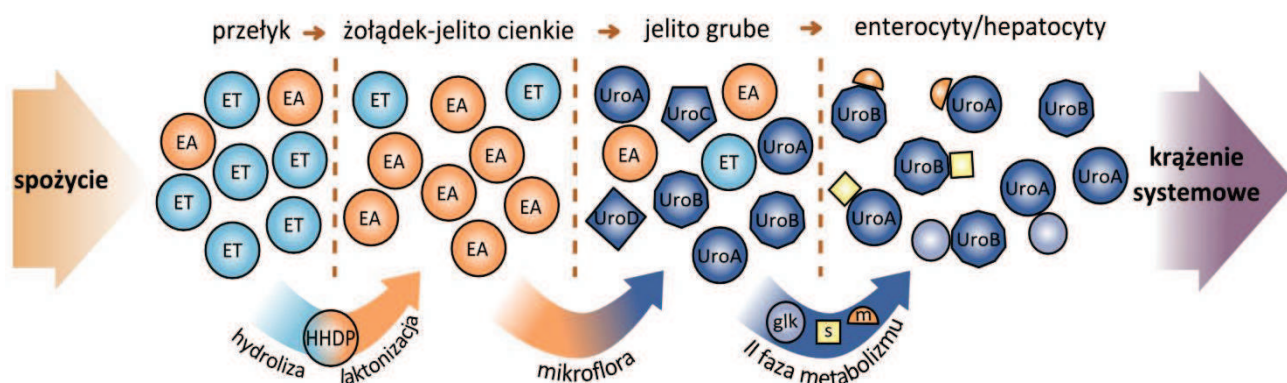


Ryc. 3 Schemat konwersji kwasu elagowego do urolityn [89]

Po absorpcji w jelicie grubym w II fazie metabolizmu, urolityny ulegają licznym przemianom (metylacji, glukuronidacji, sulfonacji) zachodzącym w ścianie jelita bądź po absorpcji w wątrobie (Ryc. 4) [88-90]. Obecnie uważa się, że urolityny są formą biodostępną elagotanin, ulegającą absorpcji i dystrybucji do tkanek *in vivo* [88, 89, 92, 97, 98]. W oparciu o badania w modelach zwierzęcych u myszy i świni iberyjskiej stwierdzono obecność urolityn w hepatocytach [92, 97], woreczku żółciowym oraz żółci wydzielanej do dwunastnicy [92], co sugeruje że urolityny i ich glukuronidy są włączane do obiegu jelitowo-wątrobowego.

Obecność urolityn wykazano również w innych tkankach [97, 98]. Urolityny (Uro A i jej glukuronid), wykryto w niskich stężeniach w gruczole krokowym i nerkach u myszy [97] oraz w gruczole krokowym u ludzi [98]. Wyniki biopsji prostaty ujawniły obecność glukuronidu urolityny A w stężeniu 2 ng/g i śladowe ilości glukuronidu urolityny B [98]. Inne tkanki badane w zakresie akumulacji urolityn i ich pochodnych w modelach zwierzęcych obejmowały tkankę mięśniową, tłuszczową i sercową, niemniej jednak w żadnej z nich nie ujawniono ich obecności [89, 92].

Urolityny przechodzą do krwi i są wydalone z moczem. W płynach ustrojowych u ludzi wykryto obecność Uro A-D oraz szeregu ich glukuronidowych, sulfonowych i metylowych pochodnych, z glukuronidem urolityny A jako dominującym (Ryc. 4) [85-89, 91, 92, 99-102]. Metabolity elagotanin są wykrywane w moczu po jednym do dwóch dni od spożycia produktów będących ich źródłem, takich jak maliny, truskawki, orzechy czy owoce granatu. Zarówno w moczu jak i we krwi, obserwowane jest duże zróżnicowanie osobnicze w zakresie oznaczonych stężeń urolityn [87, 88, 91, 105]. Uważa się, że kompozycja flory bakteryjnej jelita grubego wpływa na różnice w stężeniach i produkcji poszczególnych urolityn [87, 88, 94, 103-105].



Ryc. 4 Metabolizm elagotanin i kwasu elagowego

Na podstawie dotychczasowych badań na ludziach, można wyróżnić 3 grupy różniące się metabolizmem elagotanin: grupa produkująca głównie urolitynę A (25-80%), grupa produkująca głównie urolitynę B (10-50%) oraz grupa u której nie obserwuje się produkcji urolityn (5-25%). Przynależność do danej grupy nie jest skorelowana z płcią, wiekiem, BMI czy ilością oraz źródłem spożytych elagotanin. Obserwowano natomiast, że do grupy producentów Uro B częściej należą pacjenci z przewlekłymi schorzeniami takimi jak zespół metaboliczny, nowotwór jelita grubego czy dysbioza jelitowa [106]. U 10-50% ludzi, oprócz urolityny A, obserwowano produkcję jej izomeru: izourolityny A (iso-Uro-A) [107].

2.2 Aktywność biologiczna

W świetle ostatnich wyników badań przyjmuje się że to urolityny, a nie formy natywne elagotanin, są w głównej mierze odpowiedzialne za obserwowane efekty biologiczne *in vivo*. Skutkuje to wzrostem liczby prac dotyczących ich aktywności biologicznej [87, 107, 109-143].

2.2.1 Aktywność antyoksydacyjna

Dotychczasowe wyniki badań aktywności antyoksydacyjnej urolityn są rozbieżne. W testach z użyciem DPPH i redukcji rodnika ABTS – 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu), wykazano, że w porównaniu do elagotanin, urolityna A charakteryzuje się bardzo niską aktywnością antyoksydacyjną, ok. 42-razy słabszą w teście DPPH, oraz aż 3500-razy słabszą w teście ABTS [87]. Podobnie w badaniach Larrosa i wsp. [109], wartości IC_{50} urolityn w szeregu testów oksydacyjnych (m.in. DPPH i NADH) były powyżej 100 μM , jakkolwiek w teście ORAC (ang. *oxygen radical absorbance capacity*) badającym zdolność pochłaniania reaktywnych form tlenu – urolityny, w szczególności Uro A, wykazywały aktywność podobną do kwasu askorbinowego. Wyniki te są zgodne z innymi badaniami porównującymi właściwości antyutleniające związków fenolowych (m.in. flawonoli, flawan-3-oli, kwasów fenolowych) i ich metabolitów metodą ORAC, spośród których urolityna A była jednym z najsilniejszych antyoksydantów [110].

Przeciwwutleniający potencjał urolityn badano również w komórkowym teście antyoksydacyjnym. W badaniach na linii HL-60, stwierdzono, że urolityny C i D są najsilniejszymi antyoksydantami z wartościami IC_{50} wynoszącymi odpowiednio 0.16 i 0.33 μM , silniejszymi niż kwas elagowy (IC_{50} 1.1 μM) i witamina C (IC_{50} 1.9 μM). Urolityna A, pomimo że charakteryzowała się niższym potencjałem antyoksydacyjnym (IC_{50} 13.6 μM), to zawierał się on w zakresie stężeń osiąganych *in vivo*. Natomiast urolityna B nie wykazywała aktywności antyoksydacyjnej. Zaletą testów

antyoksydacyjnych przeprowadzonych na komórkach, w przeciwieństwie do testów enzymatycznych, jest uwzględnienie transportu przez błony i ocena biodostępności badanych związków [111].

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów sugerują że urolityny charakteryzują się wyższym potencjałem antyoksydacyjnym niż początkowo sądzono, przy czym obserwuje się dużą zmienność wyników w zależności od zastosowanej metody badawczej, co wymaga dalszych badań w warunkach *in vivo* [112].

2.2.2 Aktywność przeciwzapalna

Aktywność przeciwzapalną urolityn potwierdzono w badaniach na liniach ludzkich fibroblastów okrężnicy stymulowanych prozapalnie IL-1 β lub TNF- α [113, 114]. Komórki hodowano w obecności urolityny A, B, kwasu elagowego [113, 114] bądź mieszaniny wszystkich 3 metabolitów [114]. Urolityny A oraz B wykazywały aktywność przeciwzapalną charakteryzującą się spadkiem adhezji monocytów i ekspresji czynników takich jak PGE₂, PAI-1 (inhibitora aktywatora plazminogenu 1) oraz IL-8 [113]. Mechanizm działania obydwu związków obejmuje zdolność hamowania translokacji jądrowej czynnika NF- κ B oraz inhibicji szlaków metabolicznych kinaz aktywowanych miogenami (MAPK, ang. *miogen-activated protein kinases*) poprzez oddziaływanie na białka p38 (Uro A i B) i c-Jun (Uro A). Dodatkowym efektem urolityny A była inhibicja enzymów odpowiedzialnych za syntezę prostaglandyn w warunkach zapalenia – mPGES-1 (ang. *membrane-associated PGE synthase-1*) i COX-2 [114]. W innym badaniu, glukuronidy Uro A i B (główne metabolity obecne w osoczu) oddziaływały przeciwzapalnie na stymulowane TNF- α ludzkie komórki śródbłonna aorty, regulując poziomy szeregu markerów związanych z procesem miażdżycowym, takich jak chemotaktyczne białko makrofagów MCP1 (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*) i PAI-1 [115].

Oprócz działania przeciwzapalnego, ujawnionego wobec fibroblastów i komórek śródbłonna [113-115], urolityny A, B i C modulowały odpowiedź zapalną makrofagów oraz neutrofilów [116-118]. W mysich makrofagach RAW 264.7 indukowanych LPS (lipopolisacharyd) obserwowano inhibicję ekspresji iNOS, IL-1 β , TNF- α oraz IL-6 w obecności urolityn A-C [116]. Podobnie, w indukowanych prozapalnie makrofagach pochodzących z ludzkiej linii komórek białaczki THP-1, odnotowano spadek produkcji TNF- α w wyniku inkubacji z urolitynami A-C, przy czym Uro C była jedyną urolityną wykazującą zdolność inhibicji produkcji IL-6 [117]. W przypadku neutrofilów, urolityny A, B i C charakteryzowały się zróżnicowanym wpływem na modulatory zapalenia, obejmującym inhibicję IL-8 (Uro B), elastazy (Uro C) oraz uwalniania mieloperoksydazy z ziarnistości granulocytów (Uro A, C) [118]. W przypadku wszystkich analizowanych leukocytów najsilniejszy efekt przeciwzapalny przypisano urolitynie A [116-118].

Innym kierunkiem aktywności urolityn A i B, jest hamowanie aktywności acetylotransferaz histonów (HAT, ang. *histone acetyltransferases*) na poziomie 40-50% w stężeniu 5 μ M. HAT pełnią rolę koaktywatorów transkrypcji czynników transkrypcyjnych biorących udział w indukcji procesów zapalnych takich jak NF- κ B i AP-1 [119].

Aktywność przeciwzapalna urolityn w warunkach *in vivo* była badana na szczurzym modelu wrzodziejącego zapalenia okrężnicy. Początkowo, szczury szczepu Fisher otrzymywały urolitynę A w dawce 15 mg/kg dziennie przez 20 dni. Następnie przez 5 kolejnych dni kontynuowano dawkowanie Uro A, dodatkowo wzbogacając dietę szczurów o 5% DSS. Wykazano, że urolityna A obniżała poziom markerów zapalnych takich jak iNOS, COX-2, PGE₂ oraz enzymu syntazy prostaglandynowej PTGES (ang. *prostaglandin E synthase*). Interesującym jest twierdzenie o hamującym wpływie zapalenia jelita grubego na metabolizm elagotanin i powstawanie urolityn, co uzasadniałoby bezpośrednie podawanie urolityn jako potencjalnego leku przeciwzapalnego [109].

2.2.3 Oddziaływanie na bakterie

Informacje o wpływie urolityn na drobnoustroje są nieliczne [120, 121].

Stwierdzono, że wytwarzanie urolityny A w jelicie grubym znacząco wpływa na zróżnicowanie składu mikroflory jelitowej, do której należy szereg bakterii z typów *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* oraz *Actinobacteria* (Ryc. 5) [120].

Do interesujących wyników badań zalicza się określenie wpływu urolityn na system komunikacji bakteryjnej zwany ‘quorum sensing’ [121]. Quorum sensing (sygnałizator zagęszczenia) jest mechanizmem uczestniczącym w regulacji ekspresji genów drobnoustrojów, w odpowiedzi na gęstość populacji, przy udziale cząsteczek sygnalizacyjnych zwanych autoinduktorami. Przekroczenie progowego stężenia autoinduktorów, sygnalizującego osiągnięcie odpowiedniej liczebności populacji, skutkuje skoordynowaną ekspresją genów umożliwiającą bakteriom zapoczątkowanie szeregu

typ	rodzaj	liczebność
<i>Firmicutes</i>	<i>Butyrivibrio</i>	↑
	<i>Lactobacillus</i>	↑
	<i>Veillonella</i>	↑
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotella</i>	↑
<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacter</i>	↑
	<i>Escherichia</i>	↑
	<i>Serratia</i>	↑
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Akkermansia</i>	↑
<i>Actinobacteria</i>	<i>Collinsella</i>	↓

Ryc. 5 Wpływ Uro A na liczebność poszczególnych rodzajów bakterii mikroflory jelit [120]

procesów fizjologicznych prowadzących do m. in. rozwoju infekcji czy formowania charakteryzującego się wysokim stopniem antybiotykooporności biofilmu [144].

Dotychczas jedyną informacją o oddziaływaniu urolityn na quorum sensing, są dane o zdolności urolityn A i B do redukcji biofilmu oraz ruchliwości patogenu jelitowego *Yersinia enterocolitica*. Efekt ten był związany ze znacznym obniżeniem poziomów autoinduktora, laktonu N-acylo-L-homoseryny (AHL, ang. *acyl-L-homoserine lactone*) i redukcją ekspresji genów związanych z syntezą laktonów (*yenI* i *yenR*) oraz syntezą wici (*flhDC*, *fliA* i *fleB*) [121].

2.2.4 Aktywność chemoprewencyjna

Gruczoł krokowy stanowi jeden z organów w którym potwierdzono obecność urolityn u ludzi [98], dlatego w jego tkankach jako pierwszych oceniano wpływ urolityn na proces nowotworzenia [122-126].

Urolityna A hamowała wzrost oraz wykazywała aktywność proapoptotyczną wobec dwóch linii komórkowych raka prostaty, DU-145 i PC-3, poprzez inhibicję cyklu komórkowego w fazie G₂/M [122]. W innych badaniach oceniano wpływ urolityn na szereg markerów, stanowiących potencjalne cele w chemoprewencji nowotworów prostaty. Należały do nich monooksygenazy CYP1A1 i CYP1B1 z rodziny cytochromów P450 (CYP) [123], receptor androgenowy (AR, ang. *androgen receptor*), swoisty antygen sterczowy (PSA, ang. *prostate specific antigen*) [124], oraz receptory dla eferyn (Eph, ang. *erythropoietin-producing human hepatocellular receptors*) [125].

Aktywność katalityczną CYP1A1 i CYP1B1 oceniano w modelu badającym stopień dealkilacji O-deetylazy etoksyrezorufiny (EROD, ang. *ethoxyresorufin-O-deethylase*), w komórkach prostaty, inkubowanych w obecności urolityn. Analizowane urolityny (A-D) hamowały aktywność CYP1B1 przyjmując wartości IC₅₀ od 1.15 M dla urolityny A, do 137 M dla urolityny D, natomiast w przypadku CYP1A1 wartości IC₅₀ wynosiły 12.4 i 2907 M, odpowiednio. Ponadto urolityny okazały się inhibitorami ekspresji genu CYP1B1 [123]. Hamowanie ekspresji przez urolityny A i B odnotowano również wobec AR i PSA w komórkach raka gruczołu krokowego linii LNCaP. Efekt ten był połączony z obniżeniem stężenia białka antyapoptotycznego Bcl-2 i indukcją apoptozy [124]. W innym badaniu na linii LNCaP stwierdzono indukcję apoptozy przez urolitynę A, w wyniku aktywacji kontrolujących ją kaspaz 3 i 7. Dodatkowo odnotowano zwiększoną ekspresję CDKN1A, który jest genem promotorowym białka supresorowego p16 [126]. Uro C i D, jakkolwiek uważane za urolityny o najsłabszym działaniu chemoprewencyjnym wobec nowotworu prostaty, jako jedyne wykazały powinowactwo do receptorów Eph, będąc konkurencyjnymi dla promujących angiogenezę nowotworową ligandów (eferyn) [125].

Znanych jest wiele badań właściwości chemoprewencyjnych urolityn w nowotworach jelita grubego ponieważ w jelicie grubym są wytwarzane w stężeniach umożliwiających osiągnięcie efektu biologicznego [107, 127-133].

Effekt chemoprewencyjny urolityn oceniono w szeregu ludzkich linii komórkowych raka jelita grubego: Caco-2, SW480 i HT-29 [128-131]. Urolityny A-D hamowały proliferację wymienionych trzech linii zależnie od dawki, poprzez inhibicję cyklu komórkowego w fazie S bądź G₂/M [107, 128, 129]. Efektywność hamująca urolityn zmniejszała się w kolejności: Uro A > Uro C > Uro D > Uro B [128]. Inhibicję cyklu w fazie S i G₂/M w komórkach Caco-2 powodowała mieszanina urolityn A i B oraz kwas elagowego, poprzez modulację ekspresji szeregu genów regulujących cykl komórkowy, genów supresorowych, onkogenów oraz genów receptorów czynników wzrostu powiązanych ze szlakami metabolicznymi kinaz MAPK [130]. Urolityny A-D działały proapoptotycznie na komórki Caco-2 [107] i HT-29 [129, 131], przy czym wykazano, że Uro A i B wpływają na wzrost ekspresji i aktywację białek regulujących apoptozę takich jak p21, oraz kaspazy 3, 8 i 9 [129]. Ponadto urolityny A-D, w stężeniu indukującym apoptozę, hamowały aktywność enzymów CYP1 na poziomie 50% [131]. W komórkach linii SW480 i HT-29 obserwowano całkowitą glukuronidację urolityn A i B po 48 h inkubacji, co ograniczało ich aktywność hamującą. Autorzy sugerują, że glukuronidacja urolityn zachodzi z udziałem błonowych transporterów ABC (ang. *ATP-Binding Cassette Transporters*), uznawanych za receptory uczestniczące w protekcji komórek rakowych przed ksenobiotykami [128]. W innym badaniu na linii HEK T293 ujawniono, że urolityna A hamowała sygnalizację szlaku Wnt (który jest jednym ze szlaków odgrywających kluczową rolę w karcynogenezie jelita grubego), i jej efektywność była ok. 2-krotnie wyższa od kwasu elagowego [132].

Aktywność antyproliferacyjną urolityny A oceniono wobec izourolityny A, na linii Caco-2 oraz zdrowych komórek linii CCD18-Co. Zależny od dawki efekt antyproliferacyjny obserwowano dla obydwu związków, jakkolwiek był on silniejszy wobec linii Caco-2, a aktywność iso-Uro A była zauważalnie słabsza. W trakcie trwania eksperymentu, w komórkach linii Caco-2 wykazano glukuronidację ok. 20% Uro A oraz ok. 50% iso-Uro A. Glukuronidy Uro A i iso-Uro A nie wykazywały aktywności hamującej wzrost komórek, co znacząco ograniczało ogólny efekt antyproliferacyjny [107]. Urolityna A uwrażliwiała również komórki linii Caco-2, SW480 i HT-29 na działanie leku przeciwnowotworowego fluorouracylu (5-FU) [133].

Ponieważ urolityny i ich metabolity są obecne w pęcherzu moczowym i wydalone z moczem, ich aktywność antyproliferacyjną badano wobec linii T24 ludzkich komórek raka pęcherza moczowego. Urolityny A, B oraz kwas elagowy i metylo-Uro A hamowały proliferację w zbliżonym zakresie stężeń

IC₅₀ (33.7 – 46.3 μM), w wyniku aktywacji kontrolującej apoptozę kaspazy 3 i ograniczanie efektów stresu oksydacyjnego w komórkach pęcherza moczowego [134].

Oceniono wpływ urolityn na indukowaną testosteronem proliferację komórek raka piersi MCF-7, oraz powiązanego z nią enzymu – aromatazy. Aromataza umożliwia konwersję androgenów w estrogeny, i jest jednym z kluczowych czynników promujących rozwój raka piersi. Stwierdzono, że spośród 10 metabolitów kwasu elagowego, obejmujących urolitynę A, B oraz ich acetylowane, etylowane i sulfonowane pochodne, urolityna B jest najefektywniejszym inhibitorem zarówno proliferacji komórek rakowych jak i enzymu aromatazy [135]. W innym badaniu, obiektem chemoprewencyjnej aktywności urolityn było, należące do transporterów ABC, białko oporności raka piersi BCRP/ABCG2, warunkujące wielolekową oporność komórek nowotworowych. Spośród analizowanych urolityn A-D oraz ich metabolitów: siarczanu Uro A, glukuronidu Uro A i glukuronidu Uro B, jedynie urolityna A oraz jej siarczan wykazały powinowactwo do BCRP, ograniczając jego aktywność w transportowaniu mitoksantronu w komórkach linii MDCKII [136].

W pojedynczym badaniu aktywności antyproliferacyjnej urolityny A wobec komórek linii HepG2 nowotworu wątroby, Uro A hamowała ekspresję NF-κB, β-keniny, protoonkogenu c-Myc, ograniczała poziom cykliny D1 oraz zwiększała ekspresję p38, p58 oraz kaspazy 3. Obok działania antyproliferacyjnego, obserwowano efekt antyoksydacyjny związany z redukcją komórkowych ROS [137].

2.2.5 Inne kierunki aktywności

2.2.5.1 Aktywność przeciwmalaryczna

Zwiększona produkcja i wydzielanie metaloproteinazy 9 (MMP-9, ang. *matrix metalloproteinase-9*) przez monocyty jest jednym z kluczowych czynników związanych z patogenezą malarii. W ludzkich monocytach stymulowanych hemozoiną (związkiem powstającym z hemoglobiny hydrolizowanej przez pasożyta w zakażonych erytrocytach) i TNF-α, urolityny A i B hamowały uwalnianie i ekspresję MMP-9, ujawniając potencjał przeciwmalaryczny [138].

2.2.5.2 Modulacja receptora estrogenowego

Fitoestrogeny, w wyniku podobieństwa w budowie do estrogenów mogą normalizować ich poziomy w organizmie działając estrogenowo bądź antyestrogenowo. Z działaniem fitoestrogenów związanych jest wiele korzyści zdrowotnych jak regulacja poziomu cholesterolu oraz utrzymanie gęstości mineralnej i wytrzymałości mechanicznej kości [93]. Urolityny A i B badano pod kątem ich efektywności jako modulatorów estrogenowych na linii komórkowej MCF-7. Obydwie urolityny

wykazywały powinowactwo do receptorów ER α i ER β , przy czym silniejsze powinowactwo obserwowano dla ER α oraz urolityny A. Urolityny działały estrogenowo, promując przeżycie komórek MCF-7 nawet w wysokim stężeniu, oraz antyestrogenowo w obecności promującego ich przeżycie 17- β -estradiolu, co jest mechanizmem zbliżonym do obserwowanego dla innych znanych fitoestrogenów (rezweratrolu, genisteiny, daidzeiny oraz enterolaktanu) [139].

2.2.5.3 Hamowanie powstawania zaawansowanych produktów glikacji (AGE)

Zaawansowane produkty glikacji (AGE, ang. *advanced glycation end-products*) są wynikiem abnormalnej glikacji białek bądź tłuszczu, często będącej wynikiem utrzymującej się hiperglikemii, i są łączone z rozwojem angiopatii naczyniowych w cukrzycy czy chorobie Alzheimera. W eksperymentalnym modelu białka surowiczej albuminy wołowej (BSA, ang. *bovine serum albumin*) inkubowanego z glukozą ujawniono, że zarówno urolityna A jak i B wykazują znaczące działanie hamujące powstawanie AGE w dawce 1 mol/l, natomiast zależne od dawki zwiększenie efektu anty-AGE obserwowano tylko w przypadku urolityny A [140].

2.2.5.4 Działanie przeciwglikemiczne

Urolityny charakteryzowały się zdolnością do modulacji mediatorów prozapalnych i czynników wzrostu w komórkach mięśniowych serca (kardiomiocytach) i fibroblastach, w obecności wysokich stężeń glukozy. W stężeniu 1 μ M, urolityna B i jej glukuronid były najbardziej efektywne w kardiomiocytach, natomiast urolityna D w odniesieniu do fibroblastów. Ograniczane przez urolityny procesy zapalne będące wynikiem hiperglikemii, może mieć znaczenie w prewencji powikłania cukrzycowego jakim jest kardiomiopatia [141].

2.2.5.5 Aktywność neuroprotekcjna

Produkcja β -amyloidu, fibrylizujących nieaktywnych białek gromadzących się w mózgu w postaci złożeń, jest jednym z wyznaczników choroby Alzheimera.

W analizie szeregu związków, w tym elagotanin, kwasu elagowego, jak również urolityn i ich pochodnych, wykazano że urolityny A-D oraz metylo-urolityna B przeciwdziałały fibrylacji β -amyloidu w warunkach *in vitro*. Podobnie w modelu wykorzystującym nicienia *Caenorhabditis elegans*, odnotowano protekcyjne działanie urolityn, ograniczające neurotoksyczność i paraliż indukowane amyloidem β 1-42. Ponadto, obliczenia *in silico*, przewidujące poziom przechodzenia elagotanin obecnych w owocach granatu (*Punica granatum*) oraz urolityn będących produktami ich metabolizmu, przez barierę krew-mózg wykazały, że tylko urolityny spełniają kryteria przepuszczalności [142].

W innych badaniach ujawniono działanie promujące przeżycie komórek nerwowych w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego $\text{TNF-}\alpha$ przez urolityny A i B [140].

2.2.5.6 Wpływ na adipogenezę i lipogenezę

Wpływ urolityn A-D oraz iso-Uro A na procesy adipogenezy oraz lipogenezy badano w ludzkich adipocytach oraz hepatocytach linii Huh7 ludzkiego nowotworu wątroby. Ujawniono, że urolityny A, C i D w stężeniu 30 μM znacząco hamowały powstawanie nowych adipocytów, co było związane z inibicją akumulacji trójglicerydów, zwiększoną oksydacją kwasów tłuszczowych oraz zwiększoną fosforylacją (i przez to aktywacją) kinazy białkowej aktywowanej przez adenozyomono fosforan (AMPK). Aktywacja AMPK prowadzi do zahamowania szlaków anabolicznych (w tym syntezy tłuszczów) na korzyść procesów katabolicznych, w wyniku których powstaje ATP [143].

3. Charakterystyka surowców z gatunku *Lonicera caerulea*

3.1 Stanowisko systematyczne [145]

<u>Królestwo:</u>	<i>Plantae</i>	(Rośliny)
<u>Gromada:</u>	<i>Spermatophyta</i>	(Nasienne)
<u>Podgromada:</u>	<i>Magnoliophyta</i>	(Okrytonasienne)
<u>Klasa:</u>	<i>Dicotyledonae</i>	(Dwuliścienne)
<u>Podklasa:</u>	<i>Asteridae</i>	(Astrowe)
<u>Rząd:</u>	<i>Dipsacales</i>	(Szczeciowce)
<u>Rodzina:</u>	<i>Caprifoliaceae</i>	(Przewiertniowate)
<u>Rodzaj:</u>	<i>Lonicera</i> L.	(Wiciokrzew)
<u>Gatunek:</u>	<i>Lonicera caerulea</i> L.	(Wiciokrzew siny)



Ryc. 6 Wiciokrzew siny
(lechebnye-rasteniya.ru/img/72.bmp)

3.2 Opis botaniczny i charakterystyka stosowania

Lonicera caerulea L., (wiciokrzew siny) jest suchodrzewem należącym do rodziny przewiertniowatych (*Caprifoliaceae*) i jednym z 180 gatunków krzewów należących do rodzaju *Lonicera*, szeroko rozprzestrzenionych na półkuli północnej, głównie w strefie klimatu umiarkowanie chłodnego. Występuje powszechnie w północnej Rosji, Chinach i Japonii. W Europie, w środowisku naturalnym, jest spotykana na terenie Alp oraz w Skandynawii. W Ameryce Północnej i Europie jest mało znana, jednakowoż owoce wiciokrzewu systematycznie zyskują popularność [146, 147].

Wiciokrzew siny jest znaną rośliną użytkową o jadalnych owocach oraz rośliną leczniczą dostarczającą surowców wykorzystywanych w medycynie tradycyjnej północnej Rosji, Chin oraz Japonii. Owoce, nazywane ‘eliksirem życia’ przez tubylczy lud Ajnów zamieszkujący wyspę Hokkaido [148], są surowcem stosowanym w medycynie ludowej, jako wzmacniający, o działaniu hipotensyjnym i obniżającym ryzyko zawału serca, zapobiegający anemii, spowalniający rozwój jaskry, jako przeciwmalaryczny oraz pomocny w chorobach układu pokarmowego oraz infekcjach bakteryjnych [149]. Kwiaty, liście, gałęzie oraz kora są wykorzystywane jako remedia o działaniu moczopędnym (gałęzie, kora), przeciwprzeziębieniowym (kwiaty) czy też przeciwzapalnym w stanach zapalnych gardła (liście) [150]. Zastosowania owoców wiciokrzewu siniego w przemyśle spożywczym obejmują produkcję dżemów, win, słodczy i jogurtów, z przeznaczeniem głównie na rynek japoński. Ograniczeniem zwiększenia produkcji przemysłowej owoców są wysokie koszty ich pozyskiwania związane z koniecznością ręcznego zbioru (możliwości zbioru mechanicznego są ograniczone) [151].

Lonicera caerulea posiada liczne odmiany, z których kilka jest szeroko uprawianych m.in.: pochodzące z Rosji - *L. caerulea* var. *edulis*, *L. caerulea* var. *kamtschatica*, *L. caerulea* var. *altaica*, *L. caerulea* var. *boczłkarnikowae* oraz z wyspy Hokkaido z Japonii - *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* [152]. Do Polski odmianę *L. caerulea* var. *edulis* sprowadzono z Rosji około 30 lat temu i obecnie stanowi ona obiekt

zainteresowania prywatnych hodowców oraz instytutów hodowlanych. W Polsce opracowano szereg kultywarów krajowych do których należą m.in. ‘Wojtek’, ‘Brązowa’ oraz ‘Zielona’ [153].

Krzewy o zwartym i wzniesionym pokroju osiągają wysokość od 0,8 do 3,0 metrów, są długowieczne i mogą przeżyć od 25 do 30 lat. Rosną na glebach piaszczystych bądź też gliniastych, których pH może wahać się od 5 do 7 [150]. Charakteryzują się wysoką odpornością na mrozy, dochodzące do temperatury -46°C [154], jak również wysoką odpornością na choroby i szkodniki [149]. Krzewy są obcopolne, i zaczynają owocować w drugim roku po wysadzeniu. Zakwitają w pierwszej połowie kwietnia, natomiast owocują na przełomie maja i czerwca. Po 3 latach, osiągnęte plony wynoszą ok. 500 g owoców z jednej rośliny. Kwiaty o długości ok. 1,5 cm są koloru białoróżowego, rosnące po dwa na krótkiej szypulce. Owocem jest wydłużona, mięsista, wielonasienna pseudo-jagoda. Kształt owoców jest różny, najczęściej kubkowaty, owalny lub walcowato-elipsoidalny, koloru granatowego z woskowym nalotem. Jagody są koloru ciemnoniebieskiego bądź ciemnofioletowego, wielkości od 1,5 do 3 cm i wadze 0,6 do 2 g. Są soczyste o słodko-kwaśnym smaku z charakterystyczną goryczką [149, 150, 155].

Botaniczna klasyfikacja gatunku *L. caerulea* jest problematyczna ze względu na fakt opisywania niektórych kultywarów jako odmiennych gatunków (np. *L. caerulea* var. *edulis* jako *L. edulis*) oraz stosowania szeregu nazw synonimicznych jak ‘haskap’, ‘jagoda kamczacka’ czy ‘suchodrzew jadalny’ dla odmiennych gatunków [150]. Nazwa ‘haskap’ (znana również jako ‘zimolost’) w Rosji oznacza przeważnie odmiany *L. caerulea* var. *kamtschatica*, *L. caerulea* var. *edulis* i *L. caerulea* var. *boczkarnikowae*, podczas gdy w Japonii nazywana jest tak odmiana *L. caerulea* var. *emphylocalix* [152]. W Polsce popularna jest nazwa ‘jagoda kamczacka’, i odnosi się ona również do krajowych odmian hodowlanych pochodzących z *L. caerulea* var. *edulis*.

3.3 Skład chemiczny

Owoce *L. caerulea* są jedynym surowcem z rodzaju *Lonicera* którego skład chemiczny oraz właściwości biologiczne są analizowane w szerszym zakresie. Surowiec cieszy się większym zainteresowaniem od niespełna kilku lat, z większością informacji o profilach metabolitów wtórnych opracowanych przez polskie i czeskie zespoły badawcze [156-167]. Natomiast kwiaty *L. caerulea* pozostają surowcem niezbadanym w zakresie składu chemicznego.

3.3.1 Owoce *L. caerulea*

Większość danych o zawartości związków fenolowych w owocach *L. caerulea* dotyczy całkowitej zawartości fenoli (TPC, ang. *total phenolic content*) metodą Folina-Ciocalteu’a (F-C), oraz

całkowitej zawartości antocyjanów (TAC, ang. *total anthocyanin content*) oznaczonych z użyciem spektrofotometrycznej metody różnicowej. Wartości TPC owoców *L. caerulea*, wyrażone w ekwiwalentach kwasu galusowego (GAE), zawierały się w zakresie od 140.5 do 1142 mg GAE/100 g ś.m. (świeżej masy) [156, 158, 168-171], i były wielokrotnie wyższe w porównaniu do innych owoców, takich jak truskawki (238.0 mg GAE/100 g ś.m.) [172], maliny właściwe (455.5 mg GAE/100 g ś.m.) [158] czy owoce *Vaccinium virgatum*, borówki z południowo-wschodnich terenów Ameryki Północnej (330.0 mg GAE/100 g ś.m.) [173]. Wartość TAC owoców *L. caerulea*, wyrażona w ekwiwalentach 3-O-glukozydu cyjanidyny (CE), wynosiła 1300 mg CE/100 g ś.m. [158, 169], i również była wielokrotnie wyższa niż w przypadku innych popularnych w Europie owoców, takich jak malina właściwa (22.2 – 436.9 CE/100 g ś.m.) [174], malina zachodnia (125.6 – 152.2 CE/100 g ś.m.), czerwona porzeczka (1.4 – 7.8 CE/100 g ś.m.) [175] czy borówka wysoka (99.9 CE/100 g ś.m.) [176].

Analiza owoców *L. caerulea* metodami chromatografii cieczowej (LC, ang. *liquid chromatography*) ujawniła że obok antocyjanów, owoce wiciokrzewu siniego są źródłem szeregu kwasów fenolowych, flawonoli i flawan-3-oli które przedstawiono w Tabeli 2. Antocyjany stanowią dominującą grupę w owocach jagody kamczackiej, przy czym głównym związkiem jest 3-O-glukozyd cyjanidyny który stanowi 80 – 92% zespołu [156, 158, 159, 161, 162]. Towarzyszą mu 3,5-O-diglukozyd cyjanidyny, 3-O-rutynozyd cyjanidyny oraz w niskich stężeniach pochodne innych antocyjanozydów: peonidyny, pelargonidyny oraz delfinidyny (Tab. 2). Stwierdzono również obecność dwóch acetylowanych antocyjanów, 3-O-acetyloheksozydów cyjanidyny i peonidyny [162].

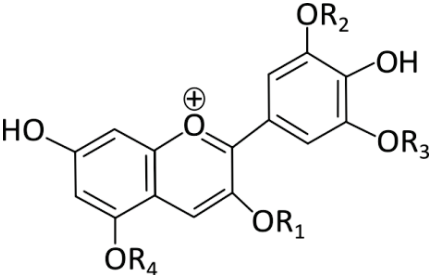
Zawartość kwasów fenolowych w owocach *L. caerulea* zawiera się od 2845.8 do 5418.2 mg/kg s.m., przy czym większość z nich występuje w formie związanej jako glikozydy lub estry, głównie pochodne kwasu m-kumarowego. Jedynie niewielka część (1,7 – 4,2%) kwasów fenolowych jest obecna w formie wolnej. W porównaniu do owoców borówki wysokiej i jeżyny bezkolcowej, *L. caerulea* zawiera mniej wolnych fenolokwasów, natomiast ok. 10 – 20% więcej w formie związanej [177]. Wśród wolnych fenolokwasów dominującymi są kwas kawowy, chlorogenowy, p-kumarowy oraz ferulowy, wraz z innymi towarzyszącymi im w znacznie niższych ilościach [157].

Znane są również nieliczne doniesienia o obecności glikozydu irydoidowego: 7-oksologaniny [178], oraz bis-glikozydów irydoidowych [179], obok estrów kwasu cytrynowego [180].

Tab. 2 Związki fenolowe dotychczas zidentyfikowane w owocach *L. caerulea*

antocyjany	piśmiennictwo
3-O-glukozyd cyjanidyny	[156-167]
3-O-rutynozyd cyjanidyny	[156-167]
3,5-O-diglukozyd cyjanidyny	[156-159, 161, 163-167]
3-O-galaktozyd cyjanidyny	[158]
3-O-ksylozyd cyjanidyny	[158]
3-O-glukozyd delfinidyny	[156, 162]
3-O-rutynozyd delfinidyny	[156]
3-O-arabinozydo-heksozyd delfinidyny	[156]
3-O-glukozyd pelargonidyny	[156-159, 161, 162, 167]
3-O-rutynozyd pelargonidyny	[156, 162]
3,5-O-diglukozyd pelargonidyny	[156]
3-O-glukozyd peonidyny	[156-159, 161-164, 166, 167]
3-O-rutynozyd peonidyny	[156, 157, 161, 162, 165, 167]
3,5-O-diglukozyd peonidyny	[156]
3-O-glukozyd petunidyny	[156]
kwasy fenolowe	piśmiennictwo
kwask chlorogenowy	[157, 159, 161, 163, 164, 166, 167]
kwask 5-O-kawoilochinowy (neochlorogenowy)	[157, 159, 163, 164, 166, 167]
kwask 3,5-O-dikawoilochinowy	[161, 163, 164, 166, 167]
kwask kawowy	[157]
kwask ferulowy	[157]
kwask galusowy	[156]
kwask 4-aminobenzoesowy	[156]
flawonole	piśmiennictwo
3-O-rutynozyd kwercetyny (rutyna)	[156, 157, 159, 161, 163, 164, 166, 167]
3-O-glukozyd kwercetyny (izokwercetyna)	[156, 157, 159, 161, 163, 164, 166, 167]
3-O-galaktozyd kwercetyny (hiperozyd)	[159, 166]
3-O-ramnozyd kwercetyny (kwercytryna)	[156, 161]
3-O-glukozyd kemferolu	[166]
3-O-rutynozyd kemferolu	[167]
7-O-glukozyd luteoliny	[156, 159, 161, 163]
7-O-rutynozyd luteoliny	[161, 164]
flawan-3-ole	piśmiennictwo
katechina	[156]
epikatechina	[156]
inne	piśmiennictwo
7-oksologanina	[178]

Jakkolwiek przedstawione powyżej wyniki badań całkowitej zawartości fenoli oraz antocyjanów wskazują, że owoce *L. caerulea* charakteryzują się wyższą zawartością związków fenolowych w porównaniu do wielu popularnych owoców jagodowych, to wypadają słabiej w porównaniu do składu chemicznego szeregu owoców jagodowych o czarnym kolorze, oznaczanego metodą LC. Owoce *L. caerulea* charakteryzowały się większym stężeniem antocyjanów niż owoce jeżyny, natomiast wypadają gorzej w porównaniu do reszty badanych owoców, w tym borówki czarnej, wysokiej, półwysokiej, aronii i jagody dzikiego bzu. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku flawonoli i kwasów fenolowych, gdzie owoce wiciokrzewu charakteryzowały się wyższym stężeniem obydwu grup związków tylko w przypadku jeżyny i borówki czarnej [163].

				
	R₁	R₂	R₃	R₄
3-O-Glc Cy	Glc	OH	H	H
3-O-Rut Cy	Rha-Glc	OH	H	H
3,5-O-diGlc Cy	Glc	OH	H	Glc
3-O-Gal Cy	Gal	OH	H	H
3-O-Ksyl Cy	Ksyl	OH	H	H
3-O-Glc Df	Glc	OH	OH	H
3-O-Rut Df	Rha-Glc	OH	OH	H
3-O-Glc Pg	Glc	H	H	H
3-O-Rut Pg	Rha-Glc	H	H	H
3,5-O-diGlc Pg	Glc	H	H	Glc
3-O-Glc Pn	Glc	OCH ₃	H	H
3-O-Rut Pn	Rha-Glc	OCH ₃	H	H
3,5-O-diGlc Pn	Glc	OCH ₃	H	Glc
3-O-Glc Pt	Glc	H	OCH ₃	H
Cy – cyjanidyna, Df – delfinidyna, Gal – galaktoza, Glc – glukoza, Ksyl – ksyloza, Pg – pelargonidyna, Pn – peonidyna, Pt – petunidyna, Rha – ramnoza, Rut – rutoza				

Ryc. 7 Wzory strukturalne antocyjanów występujących w owocach *L. caerulea*

3.4 Aktywność biologiczna

W porównaniu do innych owoców jagodowych stosowanych w medycynie tradycyjnej, owoce *L. caerulea* nie są szeroko zbadanym surowcem w zakresie działania biologicznego, z większością dotychczasowych badań koncentrujących się na ocenie ich aktywności antyoksydacyjnej. Podobnie jak w przypadku składu chemicznego, aktywność biologiczna kwiatów *L. caerulea* nie jest znana.

3.4.1 Owoce *L. caerulea*

3.4.1.1 Aktywność antyoksydacyjna

Aktywność antyoksydacyjną owoców *L. caerulea* oceniono z użyciem szeregu testów antyoksydacyjnych: ABTS, DPPH, FRAP (ang. *ferric ion reducing antioxidant power*), ORAC i TEAC (ang. *trolox equivalent antioxidant capacity*) [147, 158, 162, 167, 170, 171, 181, 182]. Wymienione testy opierają się na analizie zdolności dezaktywacji wolnych rodników i ich wyniki są wyrażane jako ekwiwalenty troloksu ($\mu\text{mol TE}$), ekwiwalenty kwasu askorbinowego (g AAE) (w zależności od tego który ze związków użyto jako standard), lub jako wartość EC_{50} [183, 184].

Ekstrakt z owoców *L. caerulea* redukował 85% rodnika DPPH, i był skuteczniejszy od ekstraktu z owoców pomidora (43%), rokitnika zwyczajnego (74%), oraz kwasu askorbinowego jako związku odniesienia (51%) [181]. Ekstrakty z różnych kultywarów *L. caerulea* var. *kamtschatica* zebrane na terenie Republiki Czeskiej wykazywały zdolność antyoksydacyjną w zakresie 6.59-10.17 g AAE/kg ś.m., co stanowi wyższe wartości od oznaczonych dla owoców czereśni (0.9 g AAE/kg ś.m.) oraz śliwki domowej (6 g AAE/kg ś.m.) [170]. Potencjał antyoksydacyjny owoców *L. caerulea* w testach ORAC wynosił od 31 do 552 $\mu\text{mol TE/g}$ ś.m. [162, 170], natomiast w teście FRAP od 7.6 do 113 $\mu\text{mol TE/g}$ ś.m. [182]. W teście TEAC owoce *L. caerulea* ujawniły najwyższą aktywność antyoksydacyjną (9.6 $\mu\text{mol TE/100 g}$ ś.m.) spośród 13 badanych owoców jagodowych, osiągając średnio dwu- lub trzy-krotnie wyższe wartości [158]. W niektórych badaniach odnotowano korelację efektu antyoksydacyjnego z zawartością polifenoli oraz antocyjanów w materiale roślinnym [147, 162, 167].

Porównanie zdolności antyoksydacyjnej przy pomocy trzech testów: DPPH, FRAP i ORAC wykazało, że w testach FRAP i ORAC owoce *L. caerulea* charakteryzowały się najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi w porównaniu do owoców borówki wysokiej, jeżyny, truskawki i czerwonej maliny. Wyjątkiem był test DPPH, w którym dla owoców maliny, jeżyny i truskawki odnotowano silniejszą aktywność antyoksydacyjną niż dla owoców *L. caerulea* [171].

Interesujące wyniki aktywności antyoksydacyjnej owoców wiciokrzewu siniego przedstawili Lee i wsp. [167], wykazując że owoce w bardzo wczesnym stadium dojrzewania charakteryzują się najsilniejszymi właściwościami przeciwutleniającymi.

3.4.1.2 Aktywność przeciwzapalna

W ostatnich 3 latach, przeciwzapalne efekty ekstraktu z owoców *L. caerulea* oceniono w kilku modelach *in vitro* oraz *in vivo* [166, 185-188].

Ekstrakt z owoców *L. caerulea* (zawartość antocyjanów 18,5%) ograniczał uszkodzenia komórek w warunkach stresu oksydacyjnego w kulturach *in vitro* szczurzych mikrosomów, hepatocytów oraz komórek śródbłonka naczyniowego izolowanych z ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC), poprzez hamowanie peroksydacji lipidów LDL (ang. *large density lipoproteins*) [185].

Wyniki badań w modelu zapalenia wątroby *in vitro*, szczurzej linii komórek wątroby BRL-3A indukowanych zapalnie LPS, potwierdzają przeciwzapalne działanie owoców *L. caerulea*. Komórki inkubowano w obecności ekstraktu metanolowego z owoców wiciokrzewu siniego oraz ekstraktu rozpuszczonego w soli fizjologicznej, poddanego trawieniu żołądkowo-jelitowemu w warunkach *in vitro* (inkubacja z HCl i pepsyną w warunkach pH = 2, temp. 37°C). Obserwowano redukcję poziomów markerów stresu oksydacyjnego: ROS, malonyldialdehydu (MDA), 8-OH-dG, karbonylowanych białek, oraz markerów prozapalnych: IL-1 β i IL-6. Ekstrakty promowały prawidłowe funkcjonowanie komórek i poprawiały ich obraz histologiczny [186].

Polifenolowy ekstrakt o 77% zawartości antocyjanów w kulturze fibroblastów dziąsła indukowanych prozapalnie (LPS), obniżał produkcję ROS i peroksydację lipidów, zapobiegał redukcji poziomów wewnątrzkomórkowego glutationu (GSH, antyoksydant) oraz ograniczał ekspresję wielu czynników prozapalnych takich jak TNF- α , COX-2 czy IL-6 [187].

W indukowanym LPS zapaleniu naczyń oka u szczurów dożylnie podawanie ekstraktu z owoców *L. caerulea* obniżało poziomy tlenku azotu (NO, ang. *nitric oxide*), TNF- α oraz PGE₂ w cieczy wodnistej oka i hamowało ekspresję NF- κ B. Ponadto odnotowano korzystniejszy wynik badania histologicznego tkanek oka. W modelu *in vitro* mysich makrofagów RAW264.7, obserwowano jednocześnie obniżenie ekspresji iNOS oraz COX-2. Natomiast w badaniu pojedynczych fenoli: 3-O-glukozydu cyjanidyny, 3-O-rutynozydu cyjanidyny i kwasu chlorogenowego, nie wykazano wpływu (lub był on niewielki) na regulację poziomów mediatorów zapalenia w komórkach [188].

Związek między utrzymującymi się warunkami stresu oksydacyjnego a stanem zapalnym jest powszechnie znany [39], i przedstawione powyżej dane wskazują na korelację działania przeciwzapalnego owoców *L. caerulea* z ich działaniem antyoksydacyjnym. Jednym z prawdopodobnych mechanizmów jest wiązanie fenoli obecnych w owocach, w regionie hydrofilowym błony komórkowej, co wpływa na jej stabilizację i chroni ją przed oksydacją [166].

3.4.1.3 Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Wykazano aktywność bakteriobójczą wodnych ekstraktów z owoców *L. caerulea* wobec bakterii *Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila* oraz *Campylobacter jejuni*, oraz etanolowych ekstraktów wobec *Escherichia coli* [181]. W innym badaniu ekstrakt oraz frakcja fenolowa z owoców wiciokrzewu siniego działały przeciwadhezyjnie wobec bakterii *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* oraz *Streptococcus mutans*. Adhezja jest niezbędnym elementem kolonizacji i rozwoju infekcji bakteryjnej, dlatego jej ograniczanie może być równie efektywną formą prewencji jak działanie bakteriobójcze [156].

3.4.1.4 Przeciwdziałanie hiperglikemii i hiperlipidemii

Zaburzenia metabolizmu glukozy i lipidów spowodowane niewłaściwą dietą zwiększają ryzyko chorób układu krążenia oraz cukrzycy. Dodatek ekstraktu z *L. caerulea*, do pokarmu szczurów z dietą wysokocukrową (dawka 327 mg antocyjanów/g masy ciała), powodował normalizację poziomów glukozy i lipidów we krwi, przeciwdziałając hiperlipidemii, hiperinsulinemii i insulinooporności obserwowanych w grupie nieprzyjmującej ekstraktu [189].

Podobne wyniki otrzymano w badaniu oceniającym wpływ ekstraktu z owoców wiciokrzewu siniego, dostarczającego 300 mg 3-O-glukozydu cyjanidyny na kg masy ciała, na poposiłkowe stężenie glukozy i triglicerydów w surowicy u szczurów. Ujawniono że doustna aplikacja ekstraktu na 30 min przed podaniem, oleju kukurydzianego bądź roztworu sacharozy w stężeniu 2g/kg masy ciała, istotnie zmniejszała poziom triglicerydów i glukozy, w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast 4-tygodniowa dieta wysokotłuszczowa zawierająca 1.5 – 3% związków fenolowych z owoców *L. caerulea*, wpływała na obniżenie poziomu triglicerydów, cholesterolu oraz glukozy w surowicy zwierząt, w porównaniu do grupy kontrolnej [190].

3.4.1.5 Działanie radioprotekcyjne

Antocyjany wyizolowane z *L. caerulea* podawane dożołądkowo myszom przez okres dwóch tygodni wykazały działanie radioprotekcyjne przy dawce promieniowania jonizującego 5 Gy (Grej) obejmującej powierzchnię całego ciała. Przypuszczalny mechanizm działania radioprotekcyjnego opiera się na antyrodnikowym działaniu, obejmującym obniżenie poziomu dialdehydu malonowego (markera peroksydacji lipidów), oraz zwiększoną aktywność enzymów zaangażowanych w eliminację wolnych rodników: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, ang. *superoxide dismutase*) oraz peroksydazy glutationowej w komórkach wątroby [191].

3.4.1.6 Ochrona przed promieniowaniem UV

Promieniowanie UV jest czynnikiem środowiskowym w patogenezie chorób skóry i może indukować proces nowotworzenia wywołując stres oksydacyjny, oraz powiązany z nim stan zapalny i uszkodzenia DNA [192].

Efekt ochronny antocyjanowego ekstraktu z owoców *L. caerulea* wobec promieniowania UV-A [193] oraz UV-B [192] obserwowano w modelach *in vitro* ludzkich keratynocytów. Wyznacznikiem działania ochronnego było ograniczenie peroksydacji lipidów, uszkodzeń DNA oraz obniżanie poziomu ROS i RNS (reaktywne formy azotu ang. *reactive nitrogen species*) w komórkach [192, 193]. Aktywność ochronną potwierdzono w badaniach *in vivo* na bezwłosych myszach SKH-1, u których suplementacja diety ekstraktem z owoców w stężeniu 10%, na 14 dni przed ekspozycją na promieniowanie UV-A lub UV-B, skutkowała częściową ochroną, głównie w zakresie modulowania aktywności enzymów z grupy oksydoreduktaz [194, 195].

3.4.1.7 Badania kliniczne

Dotychczas w pojedynczym badaniu klinicznym oceniono wpływ konsumpcji owoców *L. caerulea* na niektóre parametry osocza.

Przez okres 1 tygodnia, grupa 10 zdrowych ochotników spożywała 165 g świeżych owoców dziennie (ok. 208 mg antocyjanów). W końcowej fazie badań oznaczono w moczu stężenie kwasów fenolowych i organicznych, jako produktów metabolizmu antocyjanów. Obserwowano wzrost stężenia m.in. kwasu benzoesowego, protokatechowego, wanilinowego, p-kumarowego i ferulowego oraz kwasu hipurowego, w porównaniu do fazy początkowej eksperymentu. Odnotowano również wzrost stężenia enzymów z grupy oksydoreduktaz w osoczu, jednak ogólny status antyoksydacyjny osocza pozostał bez zmian [196].

4. Dwuwymiarowa chromatografia cieczowa wybranych grup metabolitów wtórnych obecnych w gatunkach z rodzaju *Rubus* i *Lonicera*

Ekstrakty roślinne stanowią złożone mieszaniny substancji o różnorodnym charakterze chemicznym i efekcie biologicznym. Niektóre ze związków aktywnych farmakologicznie występują w niskich stężeniach, a ich identyfikacja jest utrudniona m.in. z powodu towarzyszących im w znacznie wyższych stężeniach pozostałych metabolitów wtórnych (efekt matrycy, ang. *matrix effect*). Jakkolwiek skład chemiczny wielu leczniczych surowców roślinnych jest rozpoznany w zakresie głównych grup metabolitów wtórnych, to wiedza o ich składnikach występujących w mniejszych ilościach jest ograniczona. Procedury ich identyfikacji są często czaso- i pracochłonne, oraz nieefektywne pomimo dużej skali procesu separacyjnego (duża ilość ekstrahowanego materiału roślinnego, wysokie zużycie rozpuszczalników i adsorbentów).

Użycie zaawansowanych technik analitycznych zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia i identyfikacji nowych związków chemicznych, spośród których najpowszechniej stosowaną jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC, ang. *High Performance Liquid Chromatography*) w sprzężeniu z selektywnymi detektorami (głównie DAD, MS i NMR) [197-199].

W HPLC, powinowactwo poszczególnych analitów (jako składników badanej matrycy) do fazy stacjonarnej oraz fazy ruchomej, determinuje kolejność elucji poszczególnych związków, których sygnały rejestrowane są z użyciem odpowiednich detektorów (najczęściej UV oraz MS) [200]. Pomimo, że HPLC wykorzystuje różne modele separacji, oparte na różnicach w hydrofobowości, polarności, sile jonowej, wielkości cząsteczek czy powinowactwie chemicznym rozdzielanych związków, to użycie pojedynczego systemu rozdzielczego jest często niewystarczające do uzyskania optymalnej separacji składników matrycy pochodzenia roślinnego [201].

Kluczowe znaczenie dla zwiększenia zdolności rozdzielczej systemu HPLC ma wzrost pojemności względem pików (P, ang. *peak capacity*) oraz ograniczenie efektu matrycy [202]. Jeżeli separacja HPLC w systemie jednowymiarowym (1D) jest nieefektywna, poprawę rozdzielania uzyskuje się stosując kilka systemów chromatograficznych, łącząc różne rodzaje kolumn chromatograficznych w system wielowymiarowy (MD LC, ang. *Multidimensional Liquid Chromatography*). MD LC opiera się na wykorzystaniu różnych mechanizmów separacji w poszczególnych wymiarach, co zwiększa rozdzielczość i selektywność systemu [201, 203, 204].

Dwuwymiarowa chromatografia cieczowa (2D LC) jest najpowszechniej stosowaną konfiguracją chromatografii wielowymiarowej, wykorzystującą dwie kolumny stanowiące odpowiednio pierwszy (1D) i drugi wymiar (2D) [203].

Jakkolwiek w teorii z użyciem 2D LC można osiągnąć o rząd wyższą efektywność separacji od wypracowanej w wysoce zoptymalizowanych systemach jednowymiarowych, to w praktyce osiągnięcie takich wyników jest trudniejsze [203]. Aby w pełni wykorzystać potencjał oferowany przez 2D LC, opracowany system powinien charakteryzować się wysoką ortogonalnością. Warunkiem koniecznym ortogonalności są różne w każdym wymiarze separacji oddziaływania między składnikami matrycy, analitami, eluentem i fazą stacjonarną, osiągane poprzez dobór odpowiednich adsorbentów, stanowiących wypełnienia kolumn, kompozycji faz ruchomych i profili gradientu [201, 203]. Wysoce ortogonalne systemy, o nieskorelowanej selektywności w 1D i 2D charakteryzują się najwyższym wzrostem pojemności pikowej, i w konsekwencji większą liczbą rozdzielonych związków [205]. W analizie złożonych ekstraktów roślinnych, połączenie chromatografii jonowymiennej, chromatografii wykluczenia bądź chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC, ang. *Hydrophilic Interaction Chromatography*) z chromatografią w układzie faz odwróconych (RP, ang. *reverse phase*), generuje wysoką ortogonalność oraz wysoką pojemność względem pików [202]. Innym ważnym warunkiem jest zachowanie w 2D rozdzielania uzyskanego w 1D [203].

Technikami 2D LC stosowanymi w analizie metabolitów wtórnych obecnych w surowcach roślinnych są ‘comprehensive’ (LC x LC) oraz ‘heart-cutting’ (LC – LC). W technice ‘comprehensive’ wszystkie składniki badanej matrycy są poddawane separacji w obydwu wymiarach, a wartość P stanowi iloczyn pojemności pikowej pojedynczych rozdzieleń 1D i 2D [201]. Natomiast w przypadku ‘heart-cutting’ przeniesieniu i rozdzieleniu w 2D poddawane są tylko te składniki matrycy, które nie ulegają separacji w 1D , a wartość P jest sumą pojemności względem pików obydwu wymiarów [206].

Pojemność względem pików w systemach LC x LC jest wyrażona wzorem:

$$n_{2D} = {}^1n \times {}^2n$$

podczas gdy pojemność względem pików w technice LC – LC opisuje wzór:

$$n_{2D} = {}^1n + {}^2n$$

gdzie: n_{2D} – pojemność względem pików systemu 2D LC, 1n – pojemność względem pików 1D , 2n – pojemność względem pików 2D .

Wymienione techniki mogą być użyte w jednym z 3 trybów: ‘off-line’, ‘on-line’ i ‘stop-flow’. W trybie ‘off-line’ frakcje wymywane z 1D są zbierane manualnie bądź proces jest zautomatyzowany, a następnie pojedynczo analizowane w 2D . Zaletą trybu ‘off-line’ jest prostota, elastyczność i efektywność separacji. Ponadto tryb ‘off-line’ nie wymaga interfejsu – łącznika wiążącego kolumny z obydwu wymiarów, oraz nie nakłada ograniczeń związanych z objętością i liczbą zebranych frakcji i doбором kolumn w 1D i 2D . Niekompatybilność faz ruchomych w obydwu wymiarach również nie jest

problemem. Wadami systemu jest praco- i czasochłonność. Brak automatyzacji oznacza również ryzyko strat i zanieczyszczeń, generuje niską odtwarzalność i powtarzalność wyników [201, 203, 205].

Rozdzielenie w trybie 'on-line' polega na ciągłej analizie całości badanej matrycy w dwóch wymiarach, poprzez wykorzystanie zaworu (łącznika) do przełączania kolumn, umożliwiające bezpośrednie przeniesienie badanej frakcji z 1D na 2D , w określonym czasie modulacji. Przeniesienie eluentu z 1D odbywa się zazwyczaj poprzez przełączenie pozycji zaworu z dwoma lub więcej pętlami magazynującymi/dozującymi. Tryb 'on-line' oferuje zalety związane z automatyzacją systemu, a więc w porównaniu do trybu 'off-line', wyższą precyzję, powtarzalność i stanowi bardziej odpowiednie narzędzie do analizy ilościowej. Czas analizy w systemie 'on-line' jest zazwyczaj krótszy i zbliżony do rozdzielania 1D [201, 203]. Jednak tryb 'on-line' nie jest pozbawiony wad. Analiza każdej frakcji w 2D jest prowadzona w czasie zbierania kolejnej frakcji z 1D . Proces rozdzielania poszczególnych frakcji w 2D musi być zakończony z chwilą ukończenia magazynowania w pętli kolejnej frakcji z 1D . Ograniczenia czasowe separacji w 2D sprawiają, że 'on-line' 2D LC charakteryzuje się ograniczoną elastycznością procedury i wyższym kosztem optymalizacji. Konieczne bywa również zastosowanie dzielnika strumienia, dostosowującego natężenie przepływu fazy ruchomej do warunków separacji w 2D i do czasu wypełniania objętości pętli magazynujących, co obniża czułość metody [201, 203, 205].

Najnowszą aplikacją trybu 'on-line' w technice 'heart-cutting', niwelująca ograniczenia czasowe związane z rozdzieleniem w 2D , jest technika MHC 2D LC (ang. *multiple heart-cutting 2D LC*), w której do 8-portowego zaworu przełączającego, zamiast pętli, podłączone są dwa kolejne zawory 14-portowe, 6-drożne z 12 pętlami magazynującymi. Skonfigurowanie łącznika umożliwia magazynowanie do 12 frakcji w trakcie pojedynczej separacji w 2D , i nie obowiązuje ograniczenie czasowe charakteryzujące tradycyjne systemy 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC [207].

Tryb 'stop-flow' polega na zatrzymaniu przepływu fazy ruchomej w kolumnie 1D do czasu zakończenia elucji analitów z kolumny 2D . Tryb 'stop-flow' zapewnia efektywność podobną do trybu 'off-line' przy czym automatyzacja procesu ogranicza ekspozycję próbki na czynniki zewnętrzne, co skutkuje poprawą precyzji i większą powtarzalnością wyników [203, 205, 208, 209].

Wybór konfiguracji systemu 2D LC zależy od charakteru rozdzielanej matrycy oraz celu analizy (analiza jakościowa lub ilościowa) [209]. Praktyczne aplikacje 2D LC obejmują analizę składu chemicznego szeregu złożonych ekstraktów roślinnych w różnych konfiguracjach systemowych, umożliwiających rozdzielenie, identyfikację oraz oznaczenia ilościowe szeregu metabolitów wtórnych z grupy flawonoidów [202, 203], w tym procyanidyn [209, 210], irydoidów [211, 212] oraz kwasów fenolowych [213-215]. W większości prac, optymalizacja systemu 2D LC prowadzona jest metodą 'prób i błędów'.

4.1 Analiza 2D LC flawonoidów

Spośród wymienianych grup metabolitów wtórnych, flawonoidy stanowią związki najczęściej analizowane w systemach dwuwymiarowych. De Viliers i wsp. [203] dokonali kompleksowego porównania metod wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosowanych w analizie poszczególnych grup flawonoidów, w tym również metodami 2D LC. Zestawienie systemów 2D LC, wraz z grupami związków flawonoidowych identyfikowanych z ich użyciem przedstawiono w Tabeli 3.

Stosując techniki 2D LC (w sprzężeniu z detektorami UV oraz MS), rozdzielono zespoły związków flawonoidowych, lub związków z nimi spokrewnionych, włączając flawonole, flawan-3-ole, procyanidyny, chalkony, flawony, izoflawony, flawanony i antocyjany obecne w różnych surowcach pochodzenia roślinnego. W rozdzieleniach flawonoidów szerokie zastosowanie ma technika ‘comprehensive’ LC x LC realizowana w konfiguracjach $^1D \times ^2D$ głównie jako HILIC x RP-LC oraz RP-LC x RP-LC. Około 2/3 rozdzieleń LC x LC prowadzonych jest w trybie ‘on-line’, z pozostałą 1/3 stanowiącą rozdzielania w trybie ‘off-line’ (Tab. 3) i tylko dwoma aplikacjami trybu ‘stop-flow’ w separacji mieszanin procyanidyn [203].

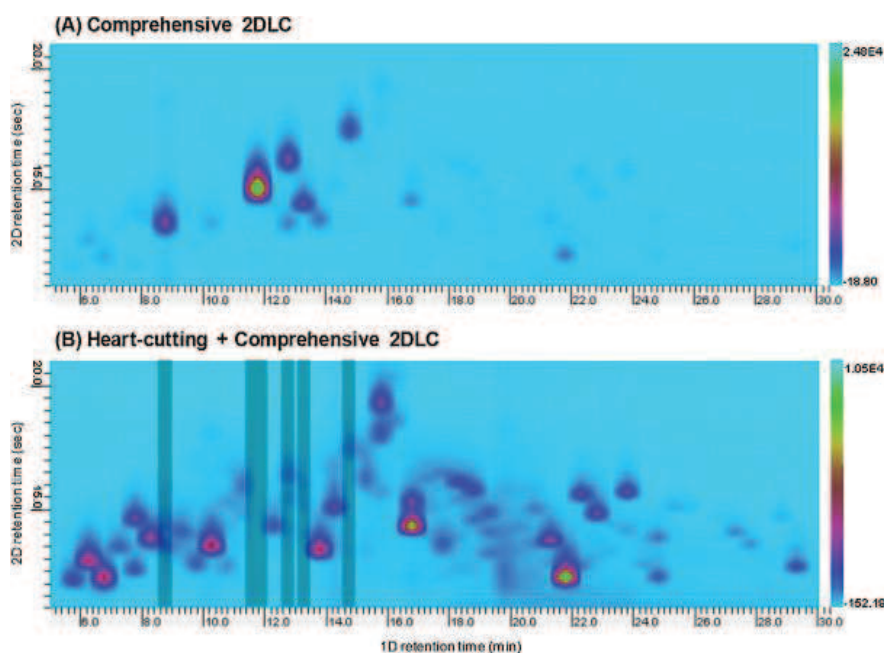
Interesującym przykładem zastosowania obydwu technik 2D LC jest praca Qiao i wsp. [202], w której po raz pierwszy wykorzystano kombinację technik ‘heart-cutting’ i ‘comprehensive’ w systemie ‘on-line’ w rozdzielaniu izoflawonów roślinnego produktu tradycyjnej medycyny chińskiej (TMC), stanowiącego mieszaninę korzeni gatunków *Pueraria lobata* i *Pueraria thomsonii*. Stwierdzono, że konwencjonalne zastosowanie techniki ‘comprehensive’ LC x LC w separacji ekstraktów metanolowych z korzeni nie dostarczyło nowych danych o składzie chemicznym badanych surowców w porównaniu do rozdzielania jednowymiarowego, ze względu na obecność wysokich stężeń 5 dominujących związków. W celu rozpoznania pozostałych związków obecnych w ekstraktach w niższych stężeniach, zastosowano technikę ‘heart-cutting’ przed rozdzielaniem techniką ‘comprehensive’, usuwając frakcje 1D zawierające dominujące związki. W rezultacie rozdzielono ponad 250 metabolitów wtórnych obecnych w badanych surowcach. ‘Heart-cutting’, jako metoda eliminująca z matrycy dominujące związki, wykluczyła czasochłonny proces obróbki wstępnej ekstraktu oraz pozwoliła na zwiększenie objętości frakcji analizowanych w 2D i otrzymanie widm masowych dla większej liczby związków o bardzo niskiej zawartości w analizowanej próbce (Ryc. 8).

Jakkolwiek często w 2D LC osiągana jest identyfikacja zbliżonej liczby związków co w zaawansowanych systemach 1D LC, to zastosowanie systemu 2D LC determinuje jakość danych MS, eliminując problem koelucji związków (efekt matrycy) [201, 203, 204].

Tab. 3 Systemy 2D LC stosowane w analizie różnych grup flawonoidów w surowcach pochodzenia roślinnego [203]

system 2D LC	identyfikowane flawonoidy	surowiec roślinny
on-line RP-LC x RP-LC	flawony	czerwone wina (<i>Vitis vinifera</i>) trzcina cukrowa (<i>Saccharum officinarum</i>) soki owoców rodzaju <i>Citrus</i> korzeń lukrecji (<i>Glycyrrhiza uralensis</i>)
	glikozydy flawonolowe	czerwone wina (<i>Vitis vinifera</i>) <i>Hedyotis diffusa</i> TMC liście <i>Ilex paraguariensis</i> (yerba mate)
	flawanony	czerwone wina (<i>Vitis vinifera</i>) soki owoców rodzaju <i>Citrus</i>
	glikozydy flawanonowe	czerwone wina (<i>Vitis vinifera</i>)
	izoflawony	korzeń lukrecji (<i>Glycyrrhiza uralensis</i>)
	glikozydy chalkonowe	korzeń lukrecji (<i>Glycyrrhiza uralensis</i>)
	flawonole	
	flawan-3-ole	czerwone wina (<i>Vitis vinifera</i>)
off-line RP-LC x RP-LC	flawony	owoc <i>Aurantii immaturus</i> TMC
on-line HILIC x RP-LC	flawony	ziele <i>Stevia rebaudiana</i>
	glikozydy flawonolowe	
	procyjanidyny	nasiona winogron (<i>Vitis vinifera</i>)
	dihydrochalkony	owoc jabłoni (<i>Malus</i>)
off-line HILIC x RP-LC	procyjanidyny	owoc jabłoni (<i>Malus</i>)
	flawonole i ich glikozydy	ziarno kakaowca (<i>Theobroma cacao</i> L.) ziele herbaty chińskiej <i>Camelia sinensis</i>
	flawan-3-ole	ziele herbaty chińskiej <i>Camelia sinensis</i>
	izoflawony	<i>Dalbergia odorifera</i> TMC <i>Citrus aurantium</i> TMC
	flawanony i ich glikozydy	<i>Glycyrrhiza glabra</i> TMC <i>Scutellaria barbata</i> TMC <i>Scutellaria baicalensis</i> TMC
	antocyjany	jagody (<i>Vaccinium</i>) czarna fasola (<i>Phaseolus</i>) rzodkiew zwyczajna (<i>Raphanus sativus</i>) czerwona kapusta (<i>Brassica capitata</i> L.)
off-line HILIC x HILIC	flawony i ich glikozydy	ziele <i>Scutellaria barbata</i> TMC
	flawanony i ich glikozydy	
off-line SEC x RP-LC	glikozydy flawonolowe	ziele herbaty chińskiej <i>Camelia sinensis</i>
	glikozydy flawonowe	
	poходne flawan-3-oli	
on-line SEC x RP-LC	izoflawony	korzeń <i>Astragalus membranaceus</i> TMC
	glukuronidy flawonowe	<i>Qingkailing</i> TMC

TMC – surowiec tradycyjnej medycyny chińskiej, SEC – chromatografia wykluczenia

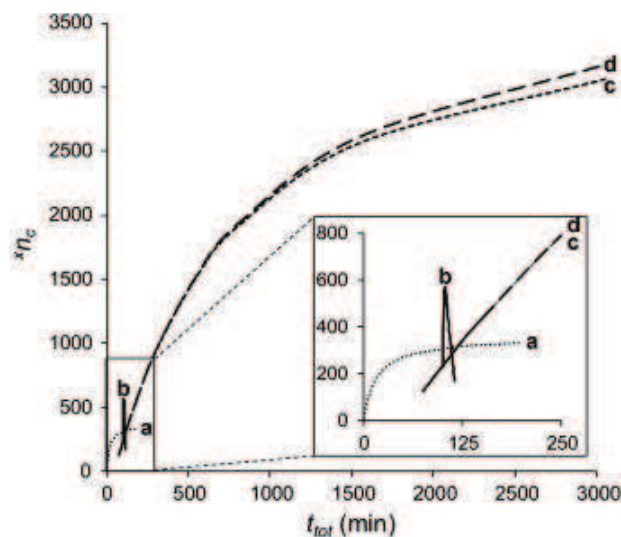


Ryc. 8 Porównanie systemu ‘comprehensive’ 2D LC (A) z systemem ‘heart-cutting’ + ‘comprehensive’ 2D LC w rozdzielaniu izoflawonów w korzeniach gatunków *Pueraria lobata* i *Pueraria thomsonii*. [202]

4.1.1 Analiza 2D LC procyanidyn

Badania 2D LC zespołu procyanidyn w szeregu surowców, w tym w owocu jabłoni, ziarnach kakaowca, ziele herbaty chińskiej czy nasionach winogron, są prowadzone wyłącznie techniką ‘comprehensive’ LC x LC z użyciem kolumny HILIC w ¹D oraz kolumny w ²D [203]. Porównanie efektywności metod 2D LC HILIC x RP-LC w trybach ‘off-line’, ‘on-line’, ‘stop-flow’ oraz rozdzielania 1D LC, przeprowadzono dla kompleksu procyanidyn pochodzących z nasion kakaowca właściwego (*Theobroma cacao* L.) (Ryc. 9) [209, 210].

Ustalono że jednowymiarowa RP-LC jest preferowanym rozwiązaniem gdy wymagana pojemność pikowa systemu nie przekracza 300, głównie ze względu na



Ryc. 9 Zależność wartości pojemności pikowej (n_p) od całkowitego czasu separacji (t_{tot}) w systemie: **a** – RP LC, **b** – ‘on-line’ HILIC x RP LC, **c** – ‘off-line’ HILIC x RP LC, **d** – ‘stop-flow’ HILIC x RP LC w badaniu kompleksu procyanidyn w nasionach kakaowca [209]

prostotę oraz dobrą efektywność osiąganą w stosunkowo krótkim czasie separacji. W przypadku gdy wymagane wartości P zawierają się w granicach od 300 do 600, 'on-line' HILIC x RP-LC uznano za najlepsze rozwiązanie, zapewniające wyższą efektywność rozdzielania niż RP-LC, w czasie t_G do 2 h (Ryc. 9) [209, 210].

Do analizy bardzo złożonych zespołów procyanidyn, wymagających jeszcze wyższych wartości P autorzy polecają systemy 'off-line' i 'stop-flow' HILIC x RP-LC, które pozwalają na osiągnięcie wielokrotnie wyższej pojemności pikowej względem rozdzielń 1D RP-LC i 'on-line' HILIC x RP-LC, jakkolwiek przy dłuższym całkowitym czasie separacji. W systemach off-line' i 'stop-flow' obserwowano również zbliżone wartości P . Obydwa systemy umożliwiały bardziej szczegółową analizę składu badanej matrycy i pozwalały na rozdzielanie izomerów o tych samych masach cząsteczkowych. Dodatkowym atutem trybu 'stop-flow' względem 'off-line' HILIC x RP-LC jest automatyzacja, co ogranicza ekspozycję na czynniki zewnętrzne wrażliwych na utlenianie związków procyanidynowych (Ryc. 9) [209, 210].

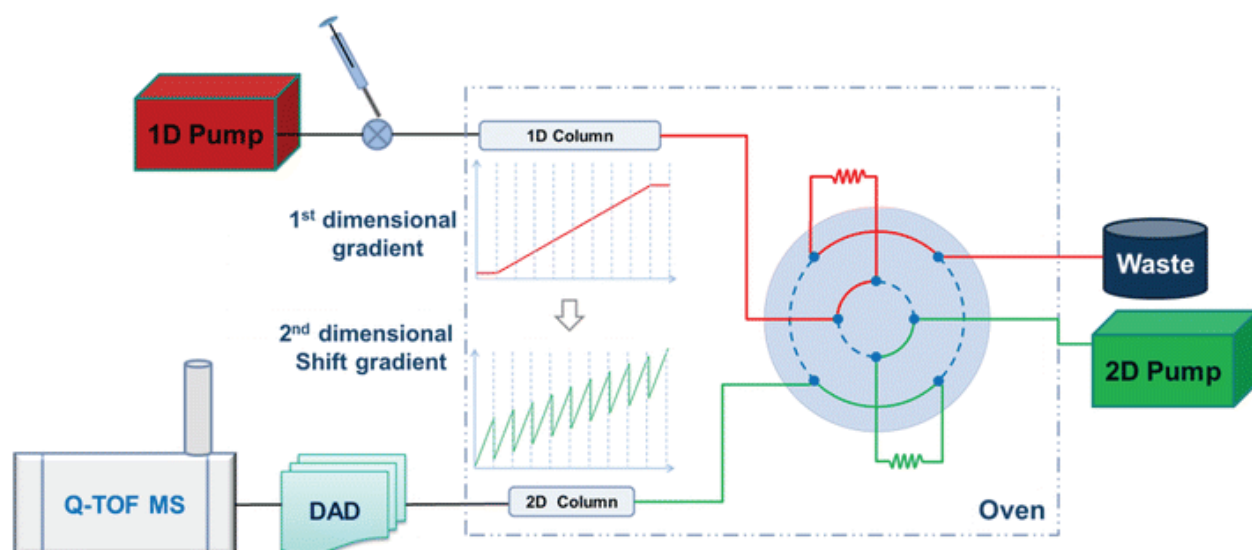
4.2 Analiza 2D LC irydoidów

W analizie wodnych ekstraktów z ziela *Hedyotis diffusa*, wykorzystywanego w tradycyjnej medycynie chińskiej, zastosowano technikę 'comprehensive' LC x LC w trybie 'on-line', w połączeniu z detektorami UV oraz MS wyposażonym w analizator czasu przelotu (TOF ang. *time of flight*). W obydwu wymiarach zastosowano kolumny RP-LC, co generowało wzrost pojemności pikowej, ale obniżało ortogonalność systemu ze względu na podobne mechanizmy separacyjne w obydwu wymiarach. Aby zwiększyć ortogonalność systemu, w rozdzielaniu ²D poszczególnych frakcji przenoszonych z ¹D wykorzystano tzw. gradient „przesuwany” (ang. *shift gradient*).

Polegał on na wieloetapowej, warunkowanej składem rozdzielanej frakcji, liniowej zmianie siły elucyjnej na poszczególnych etapach gradientu, przy jednoczesnym wzroście siły elucyjnej na początku i końcu każdego etapu gradientu w porównaniu do poprzedniego (Ryc. 10). Wysoka siła rozdzielcza systemu oraz widma masowe TOF-MS, umożliwiły rozdzielanie i identyfikację 3 związków irydoidowych obok 22 glikozydów flawonoidowych [211].

W innym badaniu, łączącym izolację 6 związków irydoidowych z wyciągu z owoców gardenii jaśminowatej (*Gardenia jasminoides*), zastosowano wariant dwuwymiarowego systemu 'heart-cutting' z 6-cio portowym 2-drożnym zaworem łączącym kolumny w obydwu wymiarach. Unikalną cechą systemu było podłączenie, poprzez odpowiednie kapilary, zaworu przełączającego bezpośrednio do przewodów kolumn ¹D i ²D, z wyłączeniem pętli dozujących. Ponieważ celem była izolacja irydoidów, a użycie pętli dozujących ograniczyłoby objętość eluatu przenoszonego na ²D, bezpośrednie

przeniesienie całości frakcji z kolumny ¹D na drugi wymiar zapewniło 100% odzysku przy przenoszonej objętości do 20 ml. Powyższy system umożliwił izolację 6 związków irydoidowych, z 96% odzyskiem, o czystości 99%. Dodatkowymi zaletami systemu było niskie zużycie rozpuszczalników i krótki czas analizy (19 min) [212].



Ryc. 10 Schemat systemu ‘on-line’ RP-LC x RP-LC użytego w analizie wodnych ekstraktów z zieleń *Hedyotis diffusa*, z profilami gradientu liniowego w ¹D, oraz gradientu „przesuwającego” (ang. *shift gradient*) w ²D [211]

4.3 Analiza 2D LC kwasów fenolowych

System ‘on-line’ ‘comprehensive’ LC x LC-TOF-MS zastosowano w separacji oraz oznaczeniu ilościowym szeregu kwasów fenolowych w ziele bazylii pospolitej (*Ocimum basilicum* L.), lebidki pospolitej (oregano, *Origanum vulgare*), rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis* L.), szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.), mięty zielonej (*Mentha spicata* L.) i tymianku pospolitego (*Thyme vulgaris* L.) z rodziny Lamiaceae [213].

W projektowaniu ortogonalnego systemu LC x LC, zastosowano kolumnę RP modyfikowaną grupami oktadecylowymi (C-18) w ¹D, która zapewniła wysoką rozdzielczość przy zachowaniu odpowiedniej szerokości pików umożliwiającą ich przeniesienie na kolumnę ²D. Warunki w ²D zoptymalizowano w zakresie szybkiej separacji przy dobrej rozdzielczości i czasie modulacji poniżej 1 minuty, co osiągnięto poprzez użycie kolumny wypełnionej żel krzemionkowym modyfikowanym grupami cyjanowymi (CN), zastosowanie acetonitrylu jako składnika fazy ruchomej, podwyższenie temperatury kolumny do 40°C oraz zwiększenie natężenia przepływu fazy ruchomej. Opracowany system generował wzrost pojemności pikowej oraz ograniczał efekt matrycy obserwowany w

rozdzieleniu jednowymiarowym LC-MS, umożliwiając oznaczenie ilościowe kwasów fenolowych w oparciu o chromatogramy EIC wybranych jonów (EIC, ang. *extracted ion chromatogram*) otrzymane w trybie jonów ujemnych $[M-H]^-$ [213].

Stosując metody chemometryczne, Jandera i wsp. [214] przewidywali selektywność kolumn oraz interakcje ze składnikami fazy ruchomej związków m.in. z grupy kwasów fenolowych, projektując najbardziej optymalny dla ich rozdzielania system LC x LC. Na podstawie teoretycznych indeksów oddziaływań (ang. *interaction indices*) w połączeniu z wielowymiarową analizą statystyczną oraz modelu liniowych relacji energii swobodnej (LFER, ang. *linear free energy relationship*) ustalono, że retencja i selektywność kolumn aminowych (NH_2) oraz kolumn z glikolami polietylenowymi jako fazą stacjonarną (PEG, ang. *polyethylene glycol*), znacząco różni się od selektywności kolumn C-18 dla fenolokwasów. W rezultacie kolumny NH_2 oraz PEG uznano za najbardziej właściwe do użycia w 1D , przy zastosowaniu kolumn typu C-18 w 2D .

Aby przewidywać efekt składu fazy ruchomej na retencję w systemie LC x LC zastosowano wzór funkcji semilogarytmicznej:

$$\log k = a - m\psi$$

gdzie: $\log k$ – współczynnik regresji, a , m – współczynniki zależne od termodynamicznych właściwości kolumny i mieszaniny rozpuszczalników, ψ – objętość organicznego rozpuszczalnika w fazie ruchomej (% obj. $\times 10^{-2}$). Ustalono, że dodatek acetonitrylu do fazy ruchomej wpływa pozytywnie na selektywność separacji kwasów fenolowych, w tym najbardziej optymalne warunki do ich rozdzielania są osiągane w zakresie 5%-12% zawartości ACN w fazie ruchomej [214].

W innej pracy, system ‘comprehensive’ HILIC x RP-LC w trybie ‘off-line’, w sprzężeniu z detektorami UV oraz MS z pułapką jonową (IT, ang. *ion trap*) oraz analizatorem czasu przelotu (TOF), zastosowano z powodzeniem w rozdzielaniu fenolokwasów z korzenia szalwii czerwonej (*Salvia miltiorrhiza*). Na kolumnie HILIC w 1D , mechanizm separacji związków wiązano ze zdolnością tworzenia wiązań wodorowych, natomiast w 2D , na kolumnie RP wypełnionej monolitycznym złożem krzemionkowym o wysokiej odporności na kruszenie (HSS, ang. *high strenght silica*), separację determinowały różnice w ich hydrofobowości. Opracowany system osiągał wartości P rzędu powyżej 2000, z ortogonalnością do 92.8%, co determinuje wysoką efektywność metody. Ogółem rozdzielono 265 związków, spośród których 196 sklasyfikowano jako należące do fenolokwasów wcześniej nieidentyfikowanych w surowcu [215].

CEL PRACY

Owoce (m.in. jagody, pestkowce, wielopestkowce) jako składniki codziennej diety są od wielu lat obiektem badań fitochemicznych [231-234] oraz badań aktywności biologicznej [235-237]. Liczne publikacje naukowe wykazały właściwości przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe oraz przeciwwirusowe owoców zawierających antocyjany (np. *Sambuci fructus*, *Aroniae fructus*) co skutkowało m.in. wprowadzeniem na rynek produktów roślinnych, preparatów o działaniu przeciwpriężbiennym zawierających kompleks *Rubini* (np. Sambucol).

W ramach projektu finansowanego przez MNiSW, w latach 2008-2011, w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji WF GUMed prowadzono badania nad owocami maliny właściwej i zachodniej *Rubus idaeus* L. i *Rubus occidentalis* L., odpowiednio (Rosaceae) oraz pędami *Rubus idaeus*, jako surowcami tradycyjnej medycyny wschodnich terenów Europy (Polska, Litwa, Białoruś) stosowanymi w leczeniu stanów infekcyjnych górnych dróg oddechowych. W rezultacie w owocach szeregu odmian uprawowych maliny właściwej i zachodniej rozpoznano zespoły antocyjanów, kompozycje związków czynnych biologicznie w pędach maliny właściwej oraz wyselekcjonowano surowce o najsilniejszym działaniu antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym - owoce *R. occidentalis* oraz przeciwbakteryjnym - pędy *R. idaeus* [19]. W obliczu narastającej antybiotykooporności wyciągi roślinne oraz izolowane z nich związki są intensywnie badane w zakresie właściwości przeciwdrobnoustrojowych, w tym również potencjalnych oddziaływań synergistycznych z antybiotykami [291, 294, 295, 299-306].

Dotychczasowe badania fitochemiczne owoców malin obejmowały identyfikację występujących w nich zespołów antocyjanów (pochodnych cyjanidyny) oraz sangwiny H-6 (elagotaniny) i wolnego kwasu elagowego [19-28]. W owocach większości badanych wcześniej odmian malin nie analizowano zespołów pozostałych związków polifenolowych – elagotantin, flawonoidów oraz prostych fenoli (kwasy fenolowe) [26, 28, 38, 82, 233-236], mogących decydować o aktywności biologicznej tych surowców (zjawisko synergizmu). Elagotaniny obecne w surowcach roślinnych są źródłem urolityn, produktów ich metabolizmu o wykazanych właściwościach przeciwzapalnych i cytotoksycznych [87, 107, 109-143].

Kontynuowane badania nad związkami czynnymi pędów maliny wskazały, że ich kompozycja może być bardziej zróżnicowana, i jej rozpoznanie wymaga zastosowania technik chromatograficznych o wysokiej rozdzielczości [19, 31]. W badaniach złożonych matryc pochodzenia roślinnego coraz większą popularnością cieszy się chromatografia wielowymiarowa, w tym dwuwymiarowa chromatografia ciekłowa (2D LC), umożliwiająca wielokrotne zwiększenie wartości pojemności względem pików (P) systemu chromatograficznego [201-204].

Wiciokrzew siny *Lonicera caerulea* L. (*Caprifoliaceae*) jest rośliną użytkową oraz leczniczą w medycynie tradycyjnej północnej Rosji, Chin oraz Japonii. Poza jadalnymi owocami, zawierającymi podobny do owoców malin profil antocyjanów (pochodne cyjanidyny), wykorzystywanymi m.in. w infekcjach górnych dróg oddechowych, schorzeniach przewodu pokarmowego, również inne części rośliny są stosowane jako remedia o działaniu moczopędnym - gałęzie, kora, przeciwprzeziębieniowym - kwiaty czy też przeciwzapalnym w stanach zapalnych gardła - liście [165].

Lonicera caerulea posiada liczne odmiany, z których szeroko uprawiane są m.in.: pochodzące z Rosji - *L. caerulea* var. *edulis* L., *L. caerulea* var. *kamtschatica*, *L. caerulea* var. *altaica*, *L. caerulea* var. *boczkarnikova* oraz z pochodząca Japonii - *L. caerulea* var. *emphyllocalyx* [167]. *Lonicera caerulea* var. *edulis* została sprowadzona do Polski około 30 lat temu i dotychczas otrzymano jej trzy kultywary ('Wojtek', 'Brazowa' oraz 'Zielona'). Skład chemiczny owoców *L. caerulea* var. *edulis* został rozpoznany i opisany w pojedynczych publikacjach, podczas gdy skład chemiczny kwiatów pozostaje nieznany. Dotychczas nie prowadzono również badań nad ich aktywnością biologiczną.

Celem pracy były poszerzenie wiedzy o składzie chemicznym i właściwościach biologicznych oraz farmakologicznych surowców przeciwprzeziębieniowych medycyny tradycyjnej - owoców i pędów pozyskiwanych z dwóch gatunków z rodzaju *Rubus* - *R. idaeus* i *R. occidentalis* (*Rosaceae*) oraz owoców i kwiatów *L. caerulea* var. *edulis* (*Caprifoliaceae*).

Cel główny pracy obejmował następujące cele cząstkowe:

- rozpoznanie i porównanie zespołów polifenoli (flawonole, flawan-3-ole) i prostych fenoli (kwas fenolowe) w owocach 11 odmian *R. idaeus* ('Benefis', 'Beskid', 'Glen Ample', 'Heritage', 'Laszka', 'Pokusa', 'Polana', 'Polesie', 'Polka', 'Poranna Rosa', 'Willamette') i 1 odmiany *R. occidentalis* ('Litacz') metodą HPLC-DAD-MS
- identyfikację metodami jedno- (1D LC) i dwuwymiarowej chromatografii cieczowej (2D LC) w sprzężeniu z selektywnymi detektorami (DAD, ESI-MS) związków czynnych pędów *R. idaeus* odmian 'Glen Ample' i 'Willamette' oraz pędów *R. occidentalis* odmian uprawowych 'Bristol' i 'Litacz'
- ocenę metodą HPLC-DAD-MS zmienności w cyklu wegetacyjnym profili metabolitów wtórnych w młodych pędach *R. idaeus* na tle pędów *Rubus fruticosus* zebranych ze stanowisk naturalnych
- rozpoznanie kompozycji chemicznej owoców 3 odmian uprawowych *L. caerulea* var. *edulis* ('Brazowa', 'Wojtek', 'Zielona') w zakresie polifenoli, prostych fenoli, antocyjanów i irydoidów metodą HPLC-DAD-MS (APCI, ESI)

- identyfikację związków czynnych biologicznie w kwiatach 3 odmian uprawowych *L. caerulea* var. *edulis* ('Brazowa', 'Wojtek', 'Zielona') z grupy flawonoidów, kwasów fenolowych, irydoidów oraz saponin z użyciem nowoczesnych technik chromatograficznych, w tym 2D LC *heart-cutting off-line/on-line* w sprzężeniu z detektorami DAD, MS (ESI, APCI, DUIS) oraz ELSD
- ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągów z owoców *R. idaeus* ('Poranna Rosa', 'Laszka'), *R. occidentalis* ('Litacz') oraz pędów *R. idaeus* ('Willamette') wobec wybranych szczepów bakteryjnych, w tym badania ich oddziaływań z niektórymi antybiotykami metodą krążkowo-dyfuzyjną
- badania aktywności biologicznej w zakresie działania przeciwbakteryjnego i cytotoksycznego urolityn - metabolitów elagotanin i kwasu elagowego
- ocenę aktywności biologicznej owoców *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek' w zakresie właściwości antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej i przeciwdrobnoustrojowej oraz kwiatów – przeciwdrobnoustrojowej.

II. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Odczynniki chemiczne

1.1 Rozpuszczalniki

acetonitryl stopnia czystości HPLC	J.T. Baker, Deventer, Holandia
chloroform cz.d.a.	POCH S.A., Gliwice, Polska
etanol 96%	Polmos, Starogard Gdański, Polska
kwas trifluorooctowy 99% (TFA) cz.d.a	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
metanol stopnia czystości HPLC	POCH, Gliwice, Polska
octan etylu cz.d.a.	POCH, Gliwice, Polska
woda demineralizowana	Merck Millipore, Darmstadt, Niemcy
dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

1.2 Związki wzorcowe

kwasy fenolowe

kwas chlorogenowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
kwas elagowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
kwas ferulowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
kwas galusowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
kwas kawowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
kwas protokatechowy	Sigma, St. Louis, USA
kwas p-kumarowy	Koch-Light, Colnbrook, Wielka Brytania
kwas salicylowy	Fluka, Buchs, Szwajcaria
kwas synapinowy	Sigma, St. Louis, USA
kwas syringowy	Sigma, St. Louis, USA

antocyjany

3-O-glukozyd cyjanidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3,5-O-diglukozyd cyjanidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-rutynozyd cyjanidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-sambubiozyd cyjanidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-soforozyd cyjanidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-(2 ^G glukozylorutynozyd) cyjanidyny	Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL GUMed
3-O-glukozyd pelargonidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3,5-O-diglukozyd pelargonidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-rutynozyd pelargonidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-glukozyd delfinidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-glukozyd malwidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-glukozyd peonidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-rutynozyd peonidyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja

elagotaniny	
sangwina H-6	Katedra i Zakład Farmakognozji UM we Wrocławiu
flawan-3-ole	
katechina	Fluka, Buchs, Szwajcaria
epikatechina	Sigma, St. Louis, USA
epigalokatechina	Sigma, St. Louis, USA
procyjanidyna B ₁	Extrasynthèse, Lyon, Francja
procyjanidyna B ₂	Extrasynthèse, Lyon, Francja
flawonole	
kemferol	Fluka, Buchs, Szwajcaria
kwercetyna	Fluka, Buchs, Szwajcaria
mirycetyna	Fluka, Buchs, Szwajcaria
3-O-galaktozyd kemferolu	Fluka, Buchs, Szwajcaria
3-O-glukuronid kemferolu	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-rutynozyd kemferolu	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Niemcy
3-O-glukozyd kwercetyny (izokwercytryna)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
3-O-galaktozyd kwercetyny (hiperozyd)	Fluka, Buchs, Szwajcaria
3-O-ramnozyd kwercetyny (kwercytryna)	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-rutynozyd kwercetyny (rutyna)	Extrasynthèse, Lyon, Francja
3-O-glukuronid kwercetyny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
4'-O-glukozyd kwercetyny (spireozyd)	Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL GUMed
tilirozyd	Extrasynthèse, Lyon, Francja
7-O-glukozyd luteoliny	Extrasynthèse, Lyon, Francja
7-O-glukuronid luteoliny	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Niemcy
7-O-rutynozyd luteoliny	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Niemcy
7-O-neohesperozyd apigeniny	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Niemcy
kupressuflawon	Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL GUMed
amentoflawon	Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL GUMed
hinokiflawon	Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL GUMed
ochnaflawon	Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL GUMed
irydoidy	
kwask loganowy	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Niemcy
loganina	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Niemcy
aukubina	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Niemcy
swerozyd	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Niemcy
inne	
urolityny A-C	Katedra i Zakład Chemii Organicznej GUMed
metylo-urolityny A-B	Katedra i Zakład Chemii Organicznej GUMed

1.3 Pożywki, podłoża i odczynniki do hodowli mikrobiologicznej

bulion z wyciągiem mózgowo-sercowym (BHI)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
bulion Mueller-Hinton (MH)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
podłoże sojowo-kazeinowe (TSA)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
podłoże agarowe BHI	Becton Dickinson, New Jersey, USA
podłoże agarowe MH	Becton Dickinson, New Jersey, USA
buforowana woda peptonowa	BioMaxima, Lublin, Polska
surowicza albumina wołowa (BSA)	Graso, Starogard Gdański, Polska
jałowa odwłókniona krew barania	Graso, Starogard Gdański, Polska
agar	Biocorp, Warszawa, Polska
Genbag microaer (hodowla w warunkach mikroaerofilnych)	bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francja

1.4 Antybiotyki

antybiotykowe krążki bibułowe (BioMaxima, Gdańsk, Polska)

amikacyna 30 µg	amoksycylina 10/25 µg	ampicylina 10 µg
aztreonam 30 µg	azytromycyna 15 µg	cefazolina 30 µg
cefepim 30 µg	cefoksytyna 30 µg	cefopodoksym 10 µg
cefotaksym 5/30 µg	ceftriakson 30 µg	cefuroksym 30 µg
chloramfenikol 30 µg	cyprofloksacyna 5/30 µg	doksycyklina 30 µg
doripenem 10 µg	ertapenem 10 µg	erytromycyna 15 µg
gentamycyna 10 µg	imipenem 10 µg	kanamycyna 30 µg
klarytomycyna 15 µg	klindamycyna 2 µg	kotrimoksazol 25 µg
kwas fusydowy 10 µg	lewofloksacyna 5 µg	linezolid 30 µg
meropenem 10 µg	metronidazol 5 µg	moksifloksacyna 10 µg
mupirocyna 200 µg	netylmycyna 10/30 µg	ofloksacyna 5 µg
oksacylina 1/5 µg	optochina 5 µg	penicylina 10 jedn.
piperacylina 30 µg	ryfampicyna 5 µg	teikoplanina 30 µg
telitromycyna 15 µg	tetracyklina 30 µg	tobramycyna 10 µg
amoksycylina 2 µg /kwas klawulanowy 1 µg		tygecyklina 15 µg
amoksycylina 20 µg /kwas klawulanowy 10 µg		tykarcylina 75 µg
piperacylina 100 µg /tazobaktam 10 µg		wankomycyna 30 µg
tykarcylina 75 µg /kwas klawulanowy 10 µg		

1.5 Linie komórek nowotworowych

BT474	Cell Line Services, Eppelheim, Niemcy
MCF-7	Cell Line Services, Eppelheim, Niemcy
MDA-MB-468	American Type Culture Collection, Manassas, USA
T47D	Katedra Biotechnologii Medycznej, MWB, UG i GUMed

1.6 Pożywki do hodowli komórek *in vitro*

D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D-MEM/F-12 (D-MEM/Nutrient mixture F-12 Ham)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RPMI 16040	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

1.7 Inne

karagenina	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
indometacyna	Polfa, Warszawa, Polska
Trypan Blue (błękit trypanowy)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
roztwór trypsyny z EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MTT (sól tetrazolowa)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

densytometr do pomiaru mętności roztworu DEN-1B	Biosan, Pila, Polska
pletzmozometr LE 7500	Panlab, Barcelona, Hiszpania
liofilizator Lyovac GT 2	Steris, Huerth, Niemcy
młynek elektryczny MK100S	Eldom, Katowice, Polska
waga analityczna XA/2X	Radwag, Radom, Polska
pompa próżniowa Leybold Trivac	Oerlikon, Kolonia, Niemcy
łaźnia ultradźwiękowa Sonorex Digitec	Bandelin, Berlin, Niemcy
wyparka próżniowa typ 350P	Unipan, Warszawa, Polska
łaźnia wodna typ 356P	Unipan, Warszawa, Polska
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem	Merck Millipore, Darmstadt, Niemcy
komora laminarna Biohazard	Heraeus Instruments, Düsseldorf, Niemcy
pipety automatyczne Research plus	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
autoklaw	Elmi, Warszawa, Polska
cieplarka laboratoryjna	SANLAB, Warszawa, Polska
zamrażarka ZD-600	Elektroserwis, Nowe Brzesko, Polska
aparat cyfrowy	Kodak, Nowy Jork, USA

szkło laboratoryjne: eksykator, kolby (miarowe, stożkowe), zlewki, cylindry miarowe, wale

plastiki laboratoryjne: szalki Petriego, probówki, tipsy, pipety polipropylenowe, strzykawki, filtry strzykawkowe, płytki titracyjne 96-dolkowe, butelki do hodowli komórkowej

inne: czytniki mikroskopowe, wymazówki z drewna

2.1 Systemy HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonia)

System jednowymiarowy (1D LC)	System dwuwymiarowy (2D LC)
- 2 pompy LC-20AD	- 2 pompy LC-20AD (¹ D)
- statyczna komora mieszania rozpuszczalników	- 2 pompy LC-20AD _{XR} (² D)
- kontroler CBM-20A	- 2 statyczne komory mieszania rozpuszczalników
- termostat kolumny CT0-20AC	- kontroler CBM-20A
- autosampler SIL 20AC _{XR}	- termostat kolumny CT0-20AC
- degazer DGU-20A5	- autosampler SIL 20AC _{XR}
- detektor UV-vis (DAD) SPD-M20A	- degazer DGU-20A5
- detektor ELSD 3300 Alltech®	- detektory UV-vis (DAD) SPD-M20A (¹ D, ² D)
- spektrometr mas LCMS-2020	- spektrometr mas LCMS-2020 (² D)
- oprogramowanie Lab Solution	- oprogramowanie Lab Solution
	- 10-cio portowy, 2-drożny zawór z dwoma pętlami o objętości 50 µl każda

3. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

3.1 Kolumny chromatograficzne

Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3 µm)	Supelco, Bellefonte, USA
Nucleodur Sphinx RP (50 x 1 mm, 5 µm)	Macherey-Nagel, Düren, Niemcy
Chromolith Performance (100 x 4.6 mm, 2 µm)	Merck, Darmstadt, Niemcy
Kinetex HILIC (150 x 4.6 mm, 2.6 µm)	Phenomenex, Torrance, USA
Kinetex C-18 (100 x 4.6 mm, 2.6 µm)	
Kinetex PFP (100 x 4.6 mm, 2.6 µm)	
Kinetex F5 (50 x 4.6 mm, 2.6 µm)	
Luna C-18 (150 x 1 mm, 3 µm)	

3.2 Programy elucji gradientowej

fazy ruchome			
A:	H ₂ O:TFA	100:0.1	<i>v/v</i>
B:	ACN:H ₂ O:TFA	50:50:0.1	<i>v/v/v</i>
C:	ACN:MeOH:H ₂ O:TFA	5:80:15:0.1	<i>v/v/v/v</i>
D:	H ₂ O:kw. mrówkowy	100:0.1	<i>v/v</i>
E:	ACN:MeOH: kw. mrówkowy	80:20:0.05	<i>v/v/v</i>
TFA: kwas trifluorooctowy, ACN: acetonitryl, MeOH: metanol			

program I (% B w A): 0 min – 12% B, 10 min – 20% B, 30 min – 43% B, 55 min – 100% B

program II (% B w A): 0 min – 10% B, 70 min – 56% B,

program III (% B w A): 0 min – 0% B, 6 min – 0% B, 6.1 min – 10% B, 14 min – 10% B, 14.1 min – 15% B, 18 min – 15% B, 18.1 min – 17% B, 20 min – 17% B, 20.1 min – 20% B, 22 min – 20% B, 22.1 min – 21% B, 24 min – 21% B, 24.1 min – 23% B, 30 min – 23% B, 30.1 min – 25% B, 32 min – 25% B, 32.1 min – 27% B, 34 min – 27% B, 34.1 min – 28% B, 36 min – 28% B, 36.1 min – 29% B, 40 min – 29% B, 40.1 min – 31% B, 42 min – 31% B, 42.1 min – 34% B, 46 min – 34% B, 46.1 min – 35% B, 52 min – 35% B, 52.1 min – 45% B, 60 min – 45% B, 60.1 min – 55% B, 70 min – 55% B

program IV (% B w A): 0 min – 10% B, 60 min – 40% B, 65 min – 100% B

program V (% C w A): 0 min – 10% C, 50 min – 60% C, 51 min – 100 % C

program VI (% B w A): 0 min – 10% B, 50 min – 50% B, 51 min – 100% B

program VII (% B w A): 0 min – 10% B, 9 min – 10% B, 17 min – 20% B, 25 min – 25% B, 33 min – 30% B, 41 min – 32% B, 49 min – 40% B

program VIII (% B w A): 0 min – 12% B, 10 min – 20% B, 30 min – 43% B, 40 min – 100% B

program IX (% B w A): 0 min – 12% B, 5 min – 12% B, 10 min – 20% B, 30 min – 43% B, 40 min – 100% B

program X (% B w A): 0 min – 12% B, 13 min – 12% B, 15 min – 17% B, 16 min – 17% B, 18 min – 22% B, 19.5 min – 25% B, 20 min – 32% B, 28 min – 32% B, 29 min – 40% B, 35 min – 40% B, 40 min – 100% B

program XI (% B w A): 0 min – 12% B, 13 min – 12% B, 15 min – 17% B, 16 min – 17% B, 18 min – 22% B, 19.5 min – 25% B, 20 min – 32% B, 27 min – 32% B, 27.5 min – 15% B, 28 min – 15% B, 40 min – 40% B, 42 min – 100% B,

program XII (% E w D): 0 min – 10% D, 20 min – 17% D, 32 min – 21% D, 40 min – 26% D, 49 min – 36% B, 54 min – 36% D, 59 min – 37% D, 65 min – 58% D, 70 min – 61% D, 75 min – 65% D

3.3 Detekcja badanych związków

DAD (ang. <i>diode array detector</i>)	detektor UV-Vis z matrycą diodową
ELSD (ang. <i>evaporative light scattering detector</i>)	laserowy detektor światła rozproszonego
MS (ang. <i>mass spectrometry</i>)	detekcja produktów jonizacji związków

3.3.1 Spektrometr mas

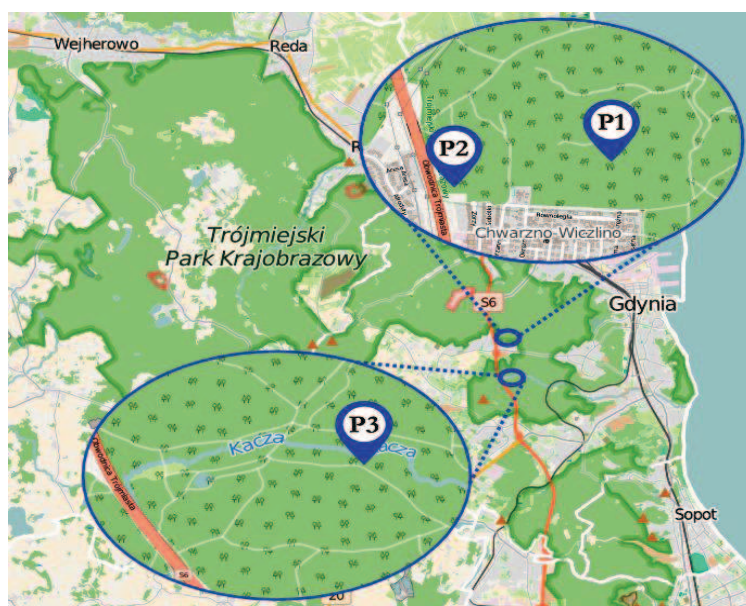
źródła jonizacji	
ESI (ang. <i>electrospray ionisation</i>)	technika rozpylania w polu elektrycznym
APCI (ang. <i>atmospheric-pressure chemical ionization</i>)	jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
DUIS (ang. <i>dual ion source</i>)	jednoczesna jonizacja ESI oraz APCI

techniki rejestracji jonów	
SIM (ang. <i>selected ion monitoring</i>)	monitorowanie wybranych jonów
tryb zbierania widm (ang. <i>full scan, scanning</i>)	rejestracja widma masowego badanego związku

4. Materiał roślinny

Materiał do badań stanowiły owoce 11 odmian uprawowych *Rubus idaeus*, owoce 1 odmiany *Rubus occidentalis*, pędy 2 odmian *Rubus idaeus* (zbiór w latach 2010 i 2014) (*Rosaceae*), owoce 3 odmian *Lonicera caerulea* var. *edulis* (zbiór w latach 2010 i 2011) oraz kwiaty 3 odmian *Lonicera caerulea* var. *edulis* (zbiór w roku 2013) (*Caprifoliaceae*), pędy 2 odmian *Rubus occidentalis* (zbiór w roku 2014), oraz pędy *Rubus idaeus* pozyskane ze stanu naturalnego (zbiór w roku 2014) przedstawione w Tabeli 4.

Zbiór pędów *R. idaeus* ze stanu dzikiego dokonano na terenie Trójmiejskiego Parku Krajobrazowego, z 3 stanowisk (P1-3) (Ryc. 11). Stanowiska P1 i P2 znajdowały się na północ od osiedla Gdynia-Chwarzno, a stanowisko P3 na terenie rezerwatu 'Kacze Buki', niedaleko rzeki Kaczej. Zbiór prowadzono na przestrzeni roku, w różnych etapach cyklu wegetacyjnego roślin. Niezdrewniałe pędy zbierano w zimie (styczeń), na wiosnę (kwiecień), latem (lipiec) oraz jesienią (październik).



Ryc. 11 Stanowiska zbioru pędów *R. idaeus*

Owoce oraz pędy badanych odmian *R. idaeus* oraz *R. occidentalis* pozyskano z egzemplarzy kolekcji Sadowniczego Zakładu Doświadczalnego Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Brzeźnej (Brzeźna, Polska). Owoce oraz kwiaty badanych odmian *L. caerulea* otrzymano dzięki uprzejmości Szkółki Borówki Wysokiej i Jagody Kamczackiej ‘Jagódka’ (Lębork, Polska).

Owoce badanych gatunków zamrożono w temp. -20°C, poddano liofilizacji (75 h) oraz sproszkowano. Młode, pozbawione liści pędy malin oraz kwiaty wiciokrzewu wysuszone w warunkach naturalnych oraz sproszkowano. Sproszkowany materiał roślinny przechowywano bez dostępu światła i wilgoci w temperaturze pokojowej.

Tab. 4 Materiał roślinny do badań

surowiec	gatunek	odmiana / źródło
owoce	<i>R. idaeus</i>	‘Benefis’ ^B
		‘Beskid’ ^B
		‘Glen Ample’ ^B
		‘Heritage’ ^B
		‘Laszka’ ^B
		‘Pokusa’ ^B
		‘Polana’ ^B
		‘Polesie’ ^B
		‘Polka’ ^B
		‘Poranna Rosa’ ^B
		‘Willamette’ ^B
	<i>R. occidentalis</i>	‘Litacz’ ^B
pędy	<i>R. idaeus</i>	‘Glen Ample’ ^B
		‘Willamette’ ^B
		ze stanu dzikiego ^{TPC}
	<i>R. occidentalis</i>	‘Litacz’ ^B
owoce	<i>L. caerulea</i>	‘Bristol’ ^B
		‘Brazowa’ ^L
		‘Wojtek’ ^L
kwiaty	<i>L. caerulea</i>	‘Zielona’ ^L
		‘Brazowa’ ^L
		‘Wojtek’ ^L

^B Brzeźna, ^{TPC} Trójmiejski Park Krajobrazowy, ^L Lębork



Ryc. 12 Sproszkowane surowce roślinne wybranych odmian badanych gatunków

5. Ekstrakcja materiału roślinnego

5.1 Ekstrakcja do celów analizy chromatograficznej

5.1.1 Ekstrakcja owoców *R. idaeus* i *R. occidentalis*

5.1.1.1 Przygotowanie próbek do analizy elagotanin

Sproszkowany materiał roślinny (5 g) poddano trzykrotnej ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej (temp. 25°C, 10 min) z użyciem 30 ml mieszaniny EtOH:H₂O (80:20, *v/v*). Otrzymane ekstrakty etanolowo-wodne przesączono przez sącze bibułowy, i oddestylowano etanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Wodną pozostałość ekstraktu zamrożono i poddano liofilizacji (75 h). Ekstrakt rozpuszczono w 1.5 ml metanolu i przesączono przez 0.22 µm sącze membranowy.

5.1.1.2 Przygotowanie próbek do analizy flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych

Sproszkowany materiał roślinny (5 g) poddano trzykrotnej ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej (temp. 25°C, 10 min) z użyciem 30 ml metanolu. Otrzymane ekstrakty metanolowe przesączono przez sącze bibułowy, i oddestylowano metanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczono w 30 ml wody na wrzącej łaźni wodnej i wytrząsano z octanem etylu (5 x 20 ml). Z połączonych ekstraktów octanu etylu oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczono w 1.5 ml metanolu i przesączono przez 0.22 µm sącze membranowy.

5.1.2 Ekstrakcja pędów *R. idaeus*

Sproszkowany materiał roślinny (5 g) wyczerpująco ekstrahowano chloroformem a następnie metanolem w aparacie Soxhleta pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia (100 h). Ekstrakty metanolowe przesączono przez sącze bibułowy, i zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 50 ml. Ekstrakt przesączono przez 0.22 µm sącze membranowy.

5.1.3 Ekstrakcja owoców *L. caerulea*

5.1.3.1 Przygotowanie próbek do analizy jakościowej związków fenolowych

Ekstrakcję do celów analizy jakościowej związków fenolowych w owocach *L. caerulea* przeprowadzono w sposób opisany w punkcie 5.1.1.1.

5.1.3.2 Przygotowanie próbek do analizy ilościowej i jakościowej irydoidów

Sproszkowany materiał roślinny (1 g) poddano ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej (temp. 25°C, 40 min) z użyciem 40 ml metanolu. Otrzymany ekstrakt zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 25 ml i przesączono przez 0.22 µm sącze membranowy.

5.1.4 Ekstrakcja kwiatów *L. caerulea*

Sproszkowany materiał roślinny (5 g) wyczerpująco ekstrahowano chloroformem a następnie metanolem w aparacie Soxhleta pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia (100 h). Ekstrakty metanolewne zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 25 ml i przesączono przez 0.22 µm sączeek membranowy.

5.2 Przygotowanie próbek do analizy aktywności biologicznej

5.2.1 Przygotowanie ekstraktów suchych z owoców *R. idaeus*, *R. occidentalis* i *L. caerulea*

Sproszkowany materiał roślinny (5 g) poddano trzykrotnej ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej (temp. 25°C, 10 min) z użyciem 30 ml EtOH:H₂O (80:20, *v/v*). Otrzymane ekstrakty etanolowo-wodne przesączono przez sączeek bibułowy, następnie oddestylowano etanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Wodną pozostałość ekstraktu zamrożono oraz poddano liofilizacji (75 h). Suchy ekstrakt z owoców przechowywano bez dostępu światła i wilgoci.

5.2.2 Przygotowanie ekstraktu suchego z pędów *R. idaeus* i kwiatów *L. caerulea*

Sproszkowany materiał roślinny (100 g) wyczerpująco ekstrahowano chloroformem a następnie metanolem w aparacie Soxhleta pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia (100 h).

Ekstrakty metanolewne przesączono przez sączeek bibułowy, oraz oddestylowano metanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczono w 100 ml wody na wrzącej łaźni wodnej, a następnie zamrożono oraz poddano liofilizacji (75 h). Suche ekstrakty z pędów oraz kwiatów przechowywano bez dostępu światła i wilgoci.

6. Analiza HPLC

6.1 Parametry analiz HPLC badanych ekstraktów roślinnych

6.1.1 Analiza prostych fenoli i polifenoli w owocach *R. idaeus* oraz *R. occidentalis*

Tab. 5 Parametry analizy elagotanin, flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych w owocach odmian uprawowych *R. idaeus* oraz *R. occidentalis*

v_{inj} – 1 μ l	v – 0.3 ml/min	t_G – 55 min
<u>kolumna</u> :	Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3 μ m), T – 32°C	
<u>program gradientu</u> :	I	
<u>detekcja UV</u> :	w zakresie 210-400 nm, chromatogramy zarejestrowane przy λ – 280 nm	
<u>analiza MS</u> :	ESI-MS, tryb SIM w dodatnim oraz ujemnym trybie monitorowania jonów	
<u>parametry detektora MS</u> :	natężenie przepływu strumienia gazu rozpylającego 1.5 l/min, natężenie przepływu strumienia gazu suszącego 16 l/min, napięcie detektora 1.3 kV, potencjał jonizacji 3.5 kV	

v_{inj} : objętość nastrzyku, v : natężenie przepływu fazy ruchomej, t_G : czas gradientu

6.1.2 Analiza prostych fenoli i polifenoli w pędach *R. idaeus* oraz *R. occidentalis*

Tab. 6 Parametry rozdzielania ‘comprehensive’ LC x LC ekstraktu z pędów *R. idaeus* ‘Willamette’

v_{inj} – 0.4 μ l	v_{1D} – 0.05 ml/min v_{2D} – 6 ml/min	t_G – 70 min
<u>kolumny</u> :	¹ D: Nucleodur Sphinx RP (50 x 1 mm, 5 μ m), T – 20°C ² D: Chromolith Performance (100 x 4.6 mm, 2 μ m), T – 20°C	
<u>program gradientu</u> :	¹ D: II ² D: III	
<u>detekcja UV</u> :	w zakresie 210-400 nm, chromatogramy zarejestrowane przy λ – 254 nm	
<u>analiza MS</u> :	ESI-MS, tryb SIM w dodatnim oraz ujemnym trybie monitorowania jonów	
<u>parametry detektora MS</u> :	natężenie przepływu strumienia gazu rozpylającego 1.5 l/min, natężenie przepływu strumienia gazu suszącego 16 l/min, napięcie detektora 3.5 kV, potencjał jonizacji 5.0 kV	

v_{inj} : objętość nastrzyku, v : natężenie przepływu fazy ruchomej, t_G : czas gradientu

¹D: pierwszy wymiar, ²D: drugi wymiar

Tab. 7 Parametry rozdzieleń 1D LC ekstraktu z pędów *R. idaeus* ‘Glen Ample’ na kolumnach HPLC typu ‘core-shell’

$v_{inj} - 1 \mu l$	$v - 1 \text{ ml/min}$	$t_G - 50/65 \text{ min}$
<u>kolumny:</u>	Kinetex C-18 (100 x 4.6 mm, 2.6 μm), T – 20°C Kinetex PFP (100 x 4.6 mm, 2.6 μm), T – 20°C	
<u>program gradientu:</u>	IV-V	
<u>detekcja UV:</u>	w zakresie 210-400 nm, chromatogramy zarejestrowane przy $\lambda - 280 \text{ nm}$	
<u>analiza MS:</u>	ESI-MS/APCI-MS, tryb zbierania pełnych widm (ang. <i>full scan mode</i>) z zakresie m/z od 100 do 2000 w ujemnym trybie monitorowania jonów	
<u>parametry detektora MS:</u>	natężenie przepływu strumienia gazu rozpylającego 1.5 l/min, natężenie przepływu strumienia gazu suszającego 16 l/min, napięcie detektora 3.5 kV (ESI), 2.0 kV (APCI), potencjał jonizacji 5.0 kV	

v_{inj} : objętość nastrzyku, v : natężenie przepływu fazy ruchomej, t_G : czas gradientu

Tab. 8 Parametry rozdzielania 2D LC ekstraktu z pędów *R. idaeus* ‘Glen Ample’

$v_{inj} - 2 \mu l$	$v_{1D} - 0.1 \text{ ml/min}$ $v_{2D} - 1 \text{ ml/min}$	$t_G - 50 \text{ min}$
<u>kolumny:</u>	¹ D: Luna C-18 (150 x 1 mm, 3 μm), T – 34°C ² D: Kinetex PFP (100 x 4.6 mm, 2.6 μm), T – 20°C	
<u>programy gradientu:</u>	¹ D: VI ² D: VII	
<u>detekcja UV:</u>	w zakresie 210-400 nm, chromatogramy zarejestrowane przy $\lambda - 280 \text{ nm}$ objętość celki detektora 2.5 μl dla ¹ D, oraz 18 μl dla ² D	
<u>analiza MS:</u>	ESI-MS/APCI-MS/DUIS-MS, tryb zbierania pełnych widm (¹ D) oraz tryb SIM (² D) w zakresie m/z od 100 do 2000 w ujemnym trybie monitorowania jonów	
<u>parametry detektora MS:</u>	natężenie przepływu strumienia gazu rozpylającego 1.5 l/min, natężenie przepływu strumienia gazu suszającego 16 l/min, napięcie detektora 3.5 kV (ESI), 2.0 kV (APCI, DUIS), potencjał jonizacji 5.0 kV	

v_{inj} : objętość nastrzyku, v : natężenie przepływu fazy ruchomej, t_G : czas gradientu

¹D: pierwszy wymiar, ²D: drugi wymiar

Tab. 9 Parametry analizy prostych fenoli i polifenoli w pędach *R. occidentalis* oraz w pędach *R. idaeus* w cyklu wegetacyjnym

v_{inj} – 1 μ l	v – 1 ml/min	t_G – 65 min
<u>kolumna:</u>	Kinetex PFP (100 x 4.6 mm, 2.6 μ m), T – 20°C	
<u>program gradientu:</u>	IV	
<u>detekcja UV:</u>	w zakresie 210-400 nm, chromatogramy zarejestrowane przy λ – 254 nm	
<u>analiza MS:</u>	ESI-MS, tryb zbierania pełnych widm w ujemnym trybie monitorowania jonów	
<u>parametry detektora MS:</u>	natężenie przepływu strumienia gazu rozpylającego 1.5 l/min, natężenie przepływu strumienia gazu suszającego 16 l/min, napięcie detektora 2.0 kV, potencjał jonizacji 4.5 kV	

v_{inj} : objętość nastrzyku, v : natężenie przepływu fazy ruchomej, t_G : czas gradientu

6.1.3 Parametry analizy ekstraktów z owoców krajowych odmian *L. caerulea*

Tab. 10 Parametry analizy metabolitów wtórnych w owocach *L. caerulea*

v_{inj} – 1 μ l	v – 0.3 ml/min	t_G – 40 min
<u>kolumna:</u>	Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3 μ m), T – 32°C	
<u>program gradientu:</u>	VIII	
<u>detekcja UV:</u>	w zakresie 210-400 nm, chromatogramy rejestrowane przy λ – 236, 280 i 520 nm	
<u>analiza MS:</u>	- ESI-MS, tryb SIM w dodatnim oraz ujemnym trybie monitorowania jonów (analiza jakościowa zw. fenolowych) - ESI-MS/APCI-MS w trybie zbierania pełnych widm, w zakresie m/z od 350 do 900 w dodatnim oraz ujemnym trybie monitorowania jonów (analiza irydoidów)	
<u>parametry detektora MS:</u>	natężenie przepływu strumienia gazu rozpylającego 1.5 l/min, natężenie przepływu strumienia gazu suszającego 16 l/min, napięcie detektora 1.6 kV, potencjał jonizacji 3.5 kV	

v_{inj} : objętość nastrzyku, v : natężenie przepływu fazy ruchomej, t_G : czas gradientu

6.1.4 Parametry analizy metabolitów wtórnych w kwiatach krajowych odmian *L. caerulea*

Tab. 11 Parametry analiz 1D LC i ‘heart-cutting’ 2D LC flawonoidów, kwasów fenolowych oraz irydoidów w kwiatach *L. caerulea* w trybie ‘on-line’ i ‘off-line’

$v_{inj\ 1D} - 1\ \mu l$ $v_{inj\ 2D} - 50\ \mu l$	$v_{1D} - 0.3\ ml/min$ $v_{2D\ on-line} - 3\ ml/min$ $v_{2D\ off-line} - 1\ ml/min$	$t_G - 40/42\ min$
<u>kolumny:</u>	1D : Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3 μm), T – 32°C $^2D\ on-line$: Kinetex F5 (50 x 4.6 mm, 2.6 μm), T – 32°C $^2D\ off-line$: Kinetex PFP (100 x 4.6 mm, 2.6 μm), T – 20°C	
<u>programy gradientu:</u>	1D : IX $^2D\ on-line$: X-XI $^2D\ off-line$: IX	
<u>detekcja UV:</u>	w zakresie 210-400 nm, chromatogramy zarejestrowane przy $\lambda - 236$ i 330 nm objętość celki detektora 2.5 μl dla 1D , oraz 12 μl dla 2D	
<u>analiza MS:</u>	ESI-MS, tryb zbierania pełnych widm (1D) oraz tryb SIM (2D) w zakresie m/z od 350 do 900 w dodatnim oraz ujemnym trybie monitorowania jonów	
<u>parametry detektora MS:</u>	natężenie przepływu strumienia gazu rozpylającego 1.5 l/min, natężenie przepływu strumienia gazu suszącego 12 l/min, napięcie detektora 2.5 kV, potencjał jonizacji 4.5 kV	
v_{inj} : objętość nastrzyku, v: natężenie przepływu fazy ruchomej, t_G : czas gradientu 1D : pierwszy wymiar, 2D : drugi wymiar		

Tab. 12 Parametry analizy LC saponin w kwiatach odmian krajowych *L. caerulea*

$v_{inj} - 1\ \mu l$	$v - 0.2\ ml/min$	$t_G - 75\ min$
<u>kolumna:</u>	Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3 μm), T – 25°C	
<u>program gradientu:</u>	XII	
<u>detekcja UV:</u>	w zakresie 210-400 nm, chromatogramy rejestrowane przy $\lambda - 236$ nm	
<u>detekcja ELSD:</u>	temperatura rozpylacza 40°C, temperatura parownika 40°C, natężenie przepływu strumienia gazu rozpylającego 1.8 l/min, wzmocnienie 16	
<u>analiza MS:</u>	- ESI-MS, w trybie zbierania pełnych widm w zakresie m/z od 250 do 1450 oraz tryb SIM, w ujemnym trybie monitorowania jonów	
<u>parametry detektora MS:</u>	natężenie przepływu strumienia gazu rozpylającego 1.5 l/min, natężenie przepływu strumienia gazu suszącego 16 l/min, napięcie detektora 1.6 kV, potencjał jonizacji 2.5 kV	

6.2 Walidacja opracowanych metod HPLC

Walidację metod do celów analizy ilościowej przeprowadzono w oparciu o wytyczne Agencji Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) poprzez wyznaczenie krzywych wzorcowych, regresji liniowych, granicy wykrywalności (LOD, ang. *limit of detection*), granicy oznaczalności (LOQ, ang. *limit of quantitation*), precyzji i odzysku dla analizowanych związków [223].

Wyznaczono krzywe kalibracyjne dla substancji wzorcowych oraz współczynniki korelacji (r) w celu określenia liniowości metody w badanym zakresie stężeń. Krzywe wzorcowe dla analizowanych związków wyznaczono w oparciu o analizę pól powierzchni pików odpowiadających znanym stężeniom substancji wzorcowych rozpuszczonych w metanolu (od 1 mg/ml do 3.124 μ g/ml w postępie geometrycznym).

LOD i LOQ określono, jako stężenie związku wzorcowego odpowiadające odpowiednio 3-krotnej oraz 10-krotnej wysokości szumów. Precyzję jedno- i międzydniową wyznaczono poprzez 6-krotną analizę otrzymanego ekstraktu w ciągu, odpowiednio, 1 bądź 3 kolejnych dni, i wyrażono jako względne odchylenie standardowe (%) obliczone ze wzoru:

$$RSD = 100\% \times SD / M$$

gdzie: RSD – względne odchylenie standardowe, SD – odchylenie standardowe, M – średnia arytmetyczna. Odzysk określono poprzez dodanie do próby znanej ilości wzorca odpowiadającej 25%, 50%, 75% bądź 100% jego zawartości w badanym materiale i przeprowadzenie procedury ekstrakcji odpowiedniej dla danego surowca. Parametr wyznaczono jako % odzysku analizowanych związków obliczony z sumy średniej 3 pomiarów zawartości związków w materiale oraz ilości dodanej, względem spodziewanej średniej wartości.

6.3 Obliczenia pojemności względem pików

Pojemność względem pików (pojemność pikowa) systemów chromatograficznych obliczono według poniższego wzoru:

$$P = 1 + t_G / \omega$$

gdzie: P – pojemność pikowa, t_G – czas gradientu, ω – szerokość pików mierzona na wysokości 4σ (13.4% wysokości od podstawy) [224]. Pojemność pikowa systemów LC – LC została obliczona jako suma wartości P pierwszego i drugiego wymiaru [225].

7. Badania aktywności biologicznej badanych surowców roślinnych

7.1 Analiza aktywności przeciwbakteryjnej

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

7.1.1 Zastosowane szczepy drobnoustrojów oraz warunki prowadzenia ich hodowli

	szczep bakterii	podłoże hodowlane	typ hodowli	T	t
G+	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	BHI z 5% BSA	tlenowa	37°C	48 h
G+	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ¹				
G+	<i>Clostridium sporogenes</i> PCM 248	BHI z 5% krwi baraniej	beztlenowa	37°C	48 h
G+	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	BHI z 5% krwi baraniej	5% CO ₂	37°C	48 h
G+	<i>Streptococcus</i> grupy A (<i>pyogenes</i>) ²				
G+	<i>Streptococcus</i> grupy B (<i>agalactiae</i>) ²				
G+	<i>Streptococcus</i> grupy G ²				
G+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ²	MH	tlenowa	37°C	48 h
G+	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, MRSA 15732, MRSA 13251, MRSA 12673, MRSA 13318, MRSA 12753, MRSA 12677				
G+	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990				
G –	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, ESBL 12518, ESBL 12275, ESBL 12819, ESBL 12882, ESBL 12186, ESBL 12293	BHI z 5% krwi baraniej	tlenowa	37°C	48 h
G –	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	BHI z 5% krwi baraniej	5% CO ₂	37°C	48 h
G –	<i>Haemophilus influenzae</i> PCM 2340				
G –	<i>Moraxella catarrhalis</i> PCM 2340				
G –	<i>Neisseria meningitidis</i> PCM 2586				
G –	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	MH	tlenowa	37°C	48 h
G –	<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504	TSA	mikroaerofilne	37°C	72 h

¹ szczep doświadczalny Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej GUMed

² szczep kliniczny wyizolowany od pacjentów ze Szpitala św. Wojciecha w Gdańsku

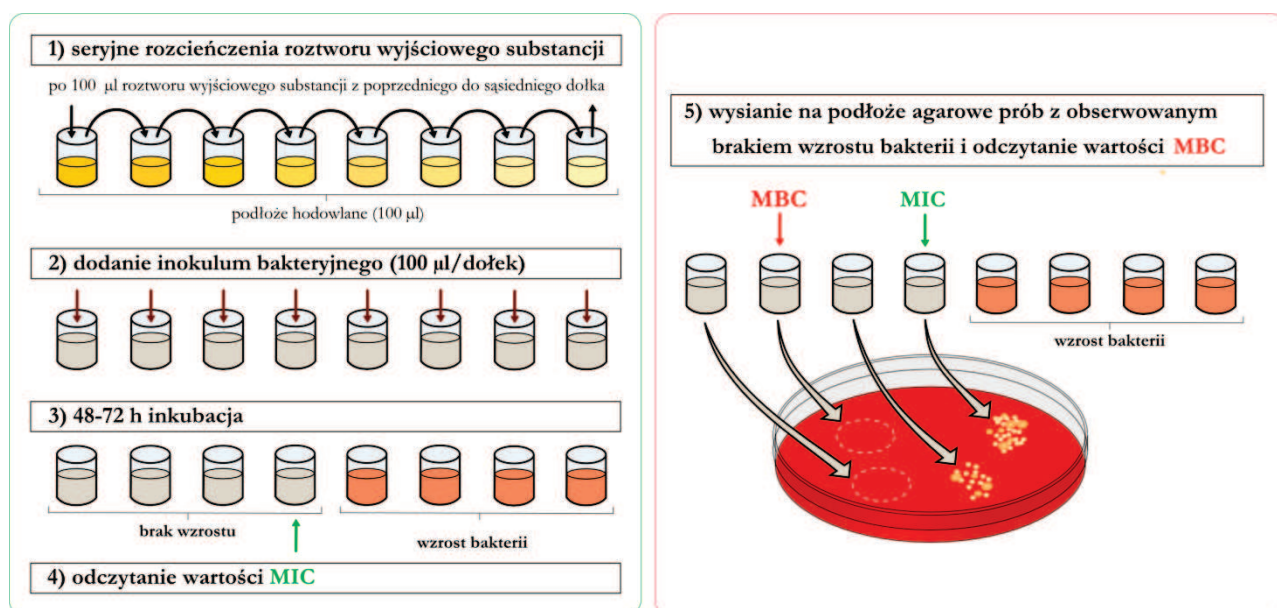
7.1.2 Oznaczanie wartości MIC oraz MBC badanych wyciągów oraz związków pochodzenia roślinnego

W celu wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) zastosowano metodę mikrorozcieńczeń (ang. *broth microdilution*).

Inokulum bakteryjne przygotowano z hodowli płynnej (rozcieńczenie w buforowanej wodzie peptonowej), bądź z hodowli stałej (zawieszenie 4 kolonii bakteryjnych w buforowanej wodzie peptonowej). Otrzymano inokulum o gęstości 0.5 w skali McFarlanda, co odpowiada 10^{7-8} CFU/ml w zależności od szczepu (jednostek tworzących kolonię, ang. *colony forming unit*). Roztwory wyjściowe badanych substancji przygotowano poprzez rozpuszczenie w sterylnej, dejonizowanej wodzie.

Oznaczenia MIC przeprowadzono w 96-dolkowych płytkach. Dolki wypełniono 100 μ l odpowiedniego podłoża hodowlanego, a następnie dodawano roztwory wyjściowe badanych substancji, rozcieńczając je w postępie geometrycznym, poprzez przenoszenie 100 μ l roztworu do kolejnego dolka. Do przygotowanych rozcieńczeń dodawano inokulum bakteryjne (100 μ l/dolek) i inkubowano 48 – 72 h w warunkach wzrostowych odpowiednich dla poszczególnych bakterii. Wartości MIC odczytywano jako wartość stężenia ekstraktu w próbach powodującą wizualny brak wzrostu bakterii w danej próbce (Ryc. 13).

Wartość minimalnego stężenia bakteriobójczego MBC (ang. *minimal bactericidal concentration*) wyznaczano poprzez przeniesienie 100 μ l, z prób w których nie obserwowano wzrostu bakterii, na wzbogacone podłoże agarowe (agar z krwią). Najwyższe stężenie ekstraktu przy którym nie obserwowano wzrostu kolonii bakteryjnych oznaczano jako MBC (Ryc. 13) [226].



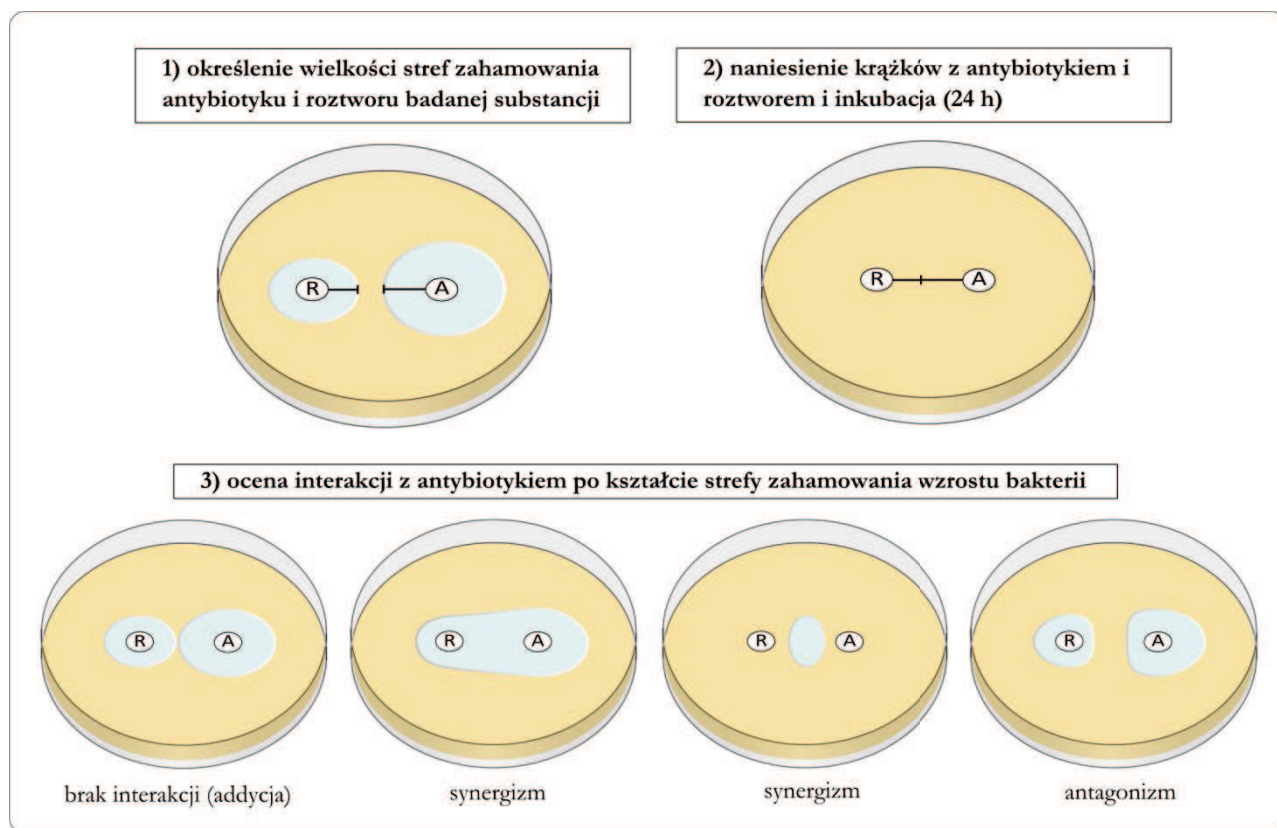
Ryc. 13 Procedura wyznaczania wartości MIC i MBC

7.1.3 Analiza oddziaływań z antybiotykami badanych wyciągów roślinnych

Do określenia oddziaływania z antybiotykami wykorzystano metodę dyfuzyjno-krażkową. Sporządzono inokulum bakteryjne o gęstości 0,5 w skali McFarlanda, które wysiano na całą powierzchnię podłoża agarowego (posiew murawowy).

Następnie na powierzchnię płytki naniesiono krążki impregnowane 10 μ l roztworu badanej substancji (R) o stężeniu 250 mg/ml i diagnostyczne krążki z antybiotykiem (A) w efektywnych stężeniach osiąganych w surowicy pacjenta, w celu określenia wielkości stref zahamowania dla poszczególnych bakterii (Ryc. 14).

Badanie przeprowadzono poprzez naniesienie na wysiane bakteriami podłoże agarowe krążków zaimpregnowanych roztworem badanej substancji oraz antybiotyku, w odległości uwzględniającej sumę promieni wcześniej oznaczonych stref zahamowania oznaczanych dla badanej substancji i antybiotyku ($n=2$). Po 30 minutowym czasie preinkubacji w temperaturze pokojowej, płytki inkubowano przez 24 h w warunkach wzrostowych odpowiednich dla poszczególnych bakterii. Po upływie tego czasu dokonano wizualnej oceny oddziaływań na podstawie kształtu strefy zahamowania wzrostu (Ryc. 14).



Ryc. 14 Procedura oceny interakcji badanych ekstraktów roślinnych z antybiotykiem

7.2 Analiza aktywności antyoksydacyjnej

Badania wykonano we współpracy z Katedrą i Zakładem Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

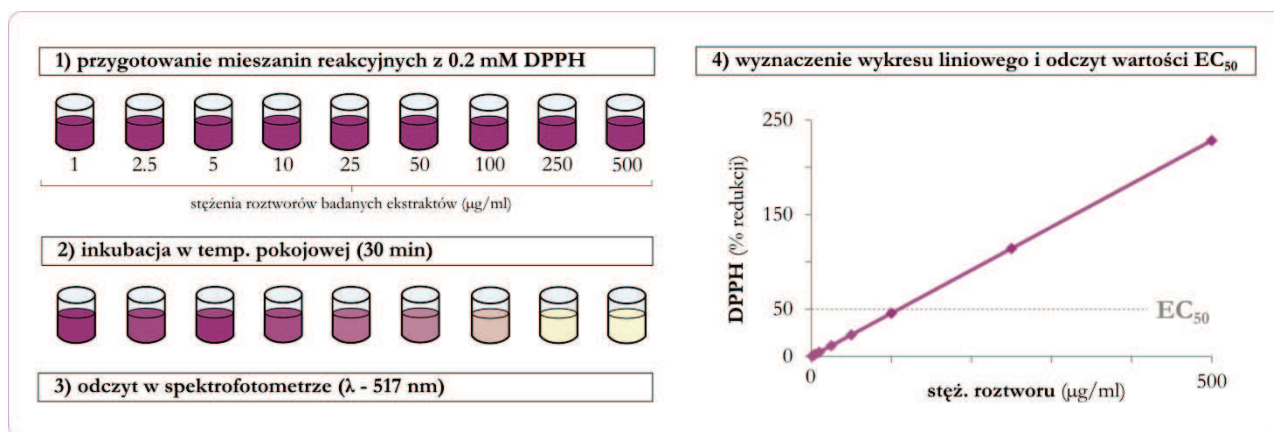
7.2.1 Test DPPH

Test redukcji DPPH (azotocentrowego rodnika 2,2-difenylo-1-pikhydrazylu) przeprowadzono według procedury Brand-Williams i wsp. [227].

Roztwory metanолоwe badanych ekstraktów o objętości 150 μl w stężeniach: 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 oraz 500 $\mu\text{g/ml}$, umieszczano w 96-dółkowych płytkach, z dodatkiem 0.2 mM roztworu metanолоwego DPPH. Mieszaninę inkubowano przez 30 min, bez dostępu światła, w temperaturze pokojowej. Redukcję rodnika DPPH obserwowano jako zmianę zabarwienia mieszaniny reakcyjnej z czerwono-fioletowej na żółtą. Absorbancję zmierzono wobec próby kontrolnej zawierającej 50% wodnego roztworu metanolu, przy λ – 517 nm. Na podstawie otrzymanych danych obliczono % redukcji rodnika DPPH ze wzoru:

$$\%_{DPPH} = (A_C - A_S / A_C) \times 100\%$$

gdzie: $\%_{DPPH}$ – procent redukcji, A_C – absorbancja kontroli, A_S – absorbancja próby. Na podstawie wyników sporządzono wykres liniowy i wyznaczono wartości EC_{50} (ang. *half maximal effective concentration*), stanowiące stężenie próbki powodujące 50% wygaszanie aktywności rodnika DPPH (Ryc. 15). Jako związku standardowego użyto kwercetyny (EC_{50} 9.8 $\mu\text{g/ml}$).



Ryc. 15 Procedura testu DPPH

7.2.2 Test fosforomolibdenowy

Test fosforomolibdenowy przeprowadzono według zmodyfikowanej procedury Prieto i wsp. [228].

Do roztworów metanолоwych badanych ekstraktów o objętości 200 μ l w stężeniach: 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 oraz 500 μ g/ml, dodano odczynnik fosforomolibdenowy (1.8 ml metanолоwego roztworu 4mM molibdenianu amonu, 28 mM fosforanu sodu oraz 600 mM kwasu siarkowego). Mieszaninę reakcyjną inkubowano w łaźni wodnej na wytrząsarce w 95°C przez 90 min, a następnie schłodzono. Zdolność redukcyjną obserwowano jako wynik utleniania molibdenu (VI) do molibdenu (V), skutkującą powstaniem zielonego kompleksu fosforomolibdenowego. Absorbancję mierzono wobec próby kontrolnej zawierającej 50% wodny roztwór metanolu, przy λ – 695 nm. Aktywność redukującą wyrażono w ekwiwalentach kwasu askorbinowego AAE (mg/g) i obliczono jako liniową zależność zmierzonej aktywności od stężenia ekstraktu.

7.3 Analiza aktywności przeciwzapalnej

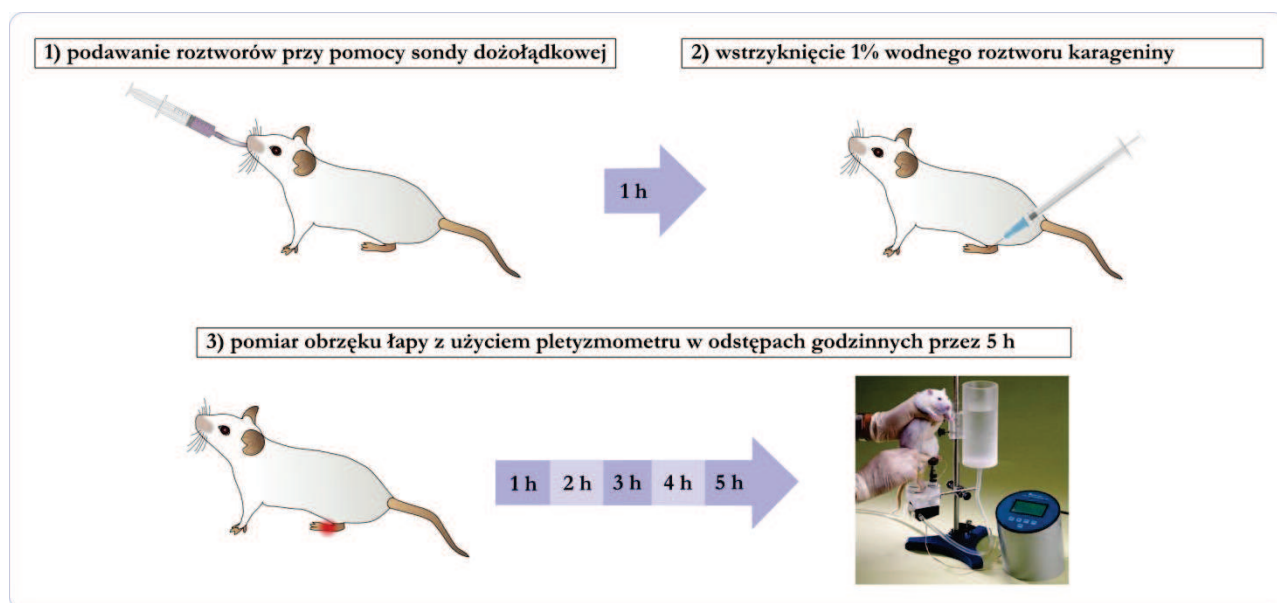
Badania wykonano we współpracy z Zakładem Farmakodynamiki, Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania zostały przeprowadzone za zgodą Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach GUMed.

7.3.1 Model indukowanego karageniną obrzęku łapy

W eksperymentach wykorzystano metodę pomiaru indukowanego karageniną obrzęku łapy szczura według procedury Winter i wsp. [229] oraz Sahin i wsp. [230].

Do badań użyto szczury albinotyczne szczepu Wistar (ok. 500 g), które losowo przydzielono (n=6) do 6-ciu grup: grupy kontroli negatywnej, kontroli pozytywnej oraz 3 grup badanych otrzymujących suche ekstrakty w dawkach 50 mg/kg, 500 mg/kg oraz 1000 mg/kg. Przed rozpoczęciem eksperymentu zmierzono objętość łap zwierząt z użyciem pletyzmometru. Ekstrakty podawano sondą żołądkową w objętości 0.5 ml na 100 g masy ciała (m.c.) (bądź odpowiadającą objętość wody w przypadku kontroli negatywnej), na 1h przed wstrzyknięciem 0.2 ml 1% wodnego roztworu karageniny do prawej tylnej łapy. Kontrolę pozytywną stanowił leku przeciwzapalny – indometacyna, podawany dożołądkowo w dawce 10 mg/kg m.c. w objętości 0.5 ml/100g m.c. Pomiar objętości łapy objętej obrzękiem przeprowadzono z użyciem pletyzmometru, w godzinnych odstępach czasowych, przez 5h od wstrzyknięcia karageniny (Ryc. 16).

Na podstawie wartości pomiarów objętości łap przed oraz w trakcie eksperymentu ($n = 6$) wyliczono średnią wartość oraz średni błąd standardowy (SEM). Na ich podstawie obliczono % zahamowania obrzęku łapy dla poszczególnych dawek w kolejnych godzinach eksperymentu. Oceny statystycznej uzyskanych parametrów dokonano przy pomocy oprogramowania Statistica 12.0. (SigmaStat 3.5, Statcon, Niemcy) na podstawie nieparametrycznego testu znamienności U-Manna-Whitneya dla dwóch prób niezależnych. Poziom istotności statystycznej wyznaczono ze średnich zmian procentowych dla badanych ekstraktów. Zmiany statystycznie istotne przyjęto od poziomu istotności $p < 0.05$.



Ryc. 16 Procedura testu indukowanego karageniną obrzęku łapy w ocenie aktywności przeciwzapalnej

7.4 Analiza aktywności cytotoksycznej wobec komórek ludzkiego raka piersi

Badania przeprowadzono we współpracy z Zakładem Ochrony i Biotechnologii Roślin Katedry Biotechnologii, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii (MWB) Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

7.4.1 Charakterystyka i warunki hodowli *in vitro* nowotworowych użytych linii komórkowych

Komórki hodowano w butelkach o pojemności 50 ml do hodowli komórkowych w inkubatorze z regulowanym przepływem CO_2 w temperaturze 37°C w obecności 5% CO_2 i pasażowano co 3-4 dni. W tym celu komórki przepłukiwano buforem fostofranowym (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2mM K_2HPO_4), dodawano 1 ml roztworu trypsyny (5g

trypsyny, 2 g EDTA 0.9% NaCl rozcieńczony 1:10 w jałowej H₂O) oraz inkubowano w temp. 37°C około 1-2 minut. Po tym czasie dodawano równą objętość świeżej pożywki, usuwano połowę zawiesiny, natomiast pozostałość rozcieńczano świeżą pożywką w stosunku 1 : 4.

Stan i żywotność komórek kontrolowano pod mikroskopem świetlnym, natomiast liczbę komórek oceniano przy pomocy hemocytometru. Martwe komórki znakowano roztworem błękitu trypanowego (0.4% roztwór barwnika w jałowej H₂O), który dodawano do zawiesiny komórkowej w proporcji 1 : 1.

linia komórkowa	charakterystyka	pożywka
MCF-7	- wyprowadzona z guza 69-letniej kobiety z kaukaskiej grupy etnicznej - komórki epitelialne, adherentne - wykazuje nadekspresję receptora ER i PR	RPMI
T47D	- wyprowadzona z guza 54-letniej kobiety - komórki epitelialne, adherentne - wykazuje nadekspresję receptora ER i PR	RPMI
BT474	- wyprowadzona z guza 60-letniej kobiety - komórki epitelialne, adherentne - wykazuje nadekspresję receptora HER2 i ER	D-MEM/F-12
MDA-MB-468	- wyprowadzona z guza 51-letniej kobiety - komórki epitelialne, adherentne - linia potrójnie ujemna ER-, PR-, HER2-	D-MEM

składnik uzupełniający	pożywka		
	D-MEM	D-MEM/F-12	RPMI
glukoza	4500 mg/l	3150 mg/l	–
HEPES	25 mM	15 mM	–
glutamina	4 mM	4 mM	4 mM
penicylina G	1000 jedn./ml	1000 jedn./ml	1000 jedn./ml
streptomycyna	1000 jedn./ml	1000 jedn./ml	1000 jedn./ml
plodowa surowica bydlęca	10%	10%	10%

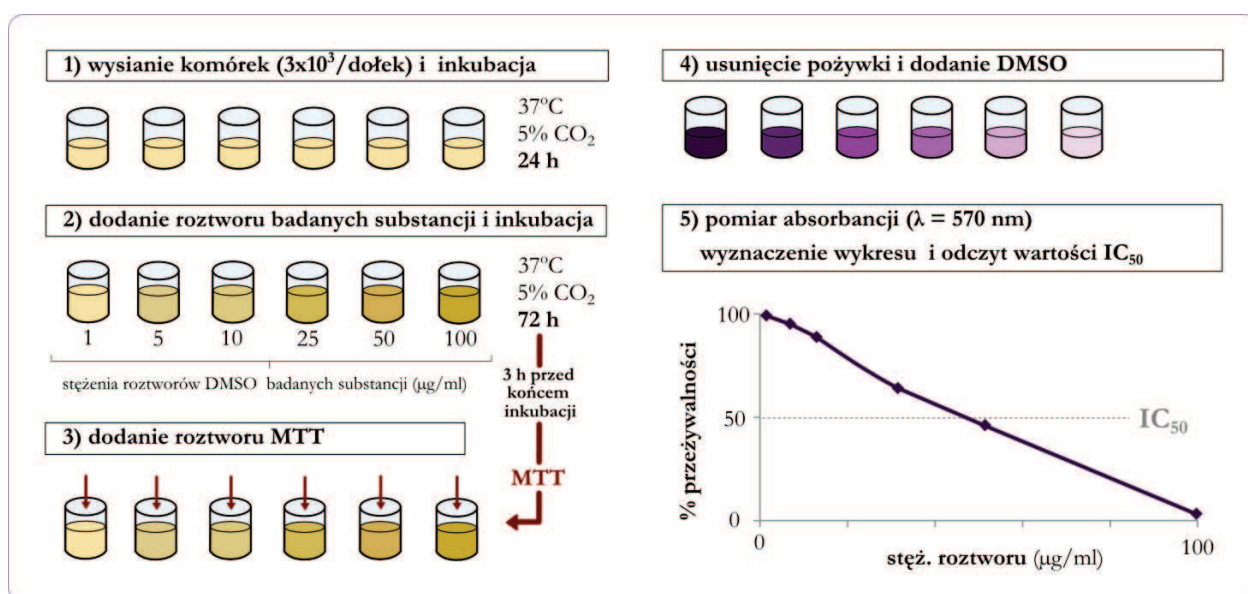
7.4.2 Test oceny cytotoksyczności MTT

Test MTT przeprowadzono w oparciu o zmodyfikowaną metodę Mosmann i wsp. [231] (Ryc. 17). Komórki wysiewano na 96-dółkowych płytkach w ilości 3 x 10³/dolek, po czym pozostawiano do proliferacji przez 24 h inkubację w temp. 37°C w obecności 5% CO₂. Następnie do komórek dodawano roztwór DMSO badanych substancji w zakresie stężeń od 1 do 100 µg/ml i inkubowano przez następne 72 h.

3 h przed zakończeniem inkubacji do dołeków dodano 1.2 mM roztwór MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy). Po zakończeniu inkubacji z dołeków zebrano pożywkę, a powstałe kryształy formazanu rozpuszczono w 100 µl DMSO. Absorbancję zmierzono wobec próby kontrolnej zawierającej jedynie DMSO (100% przeżywalności komórek), przy λ 570 nm. Przeżywalność komórek obliczono ze wzoru:

$$\%_s = (A_s - A_B) / (A_C - A_B) \times 100\%$$

gdzie: $\%_s$ – % przeżywalności, A_s – absorbancja próby, A_B – absorbancja tła, A_C – absorbancja kontoli. W oparciu o uzyskane wyniki sporządzono wykres liniowy i wyznaczono wartości IC_{50} (ang. *half maximal inhibitory concentration*), stanowiące stężenie próbki powodujące przeżycie 50% komórek (Ryc. 17).



Ryc. 17 Procedura testu MTT

III. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ WŁASNYCH

1. Analiza fitochemiczna surowców gatunków z *R. idaeus* i *R. occidentalis*

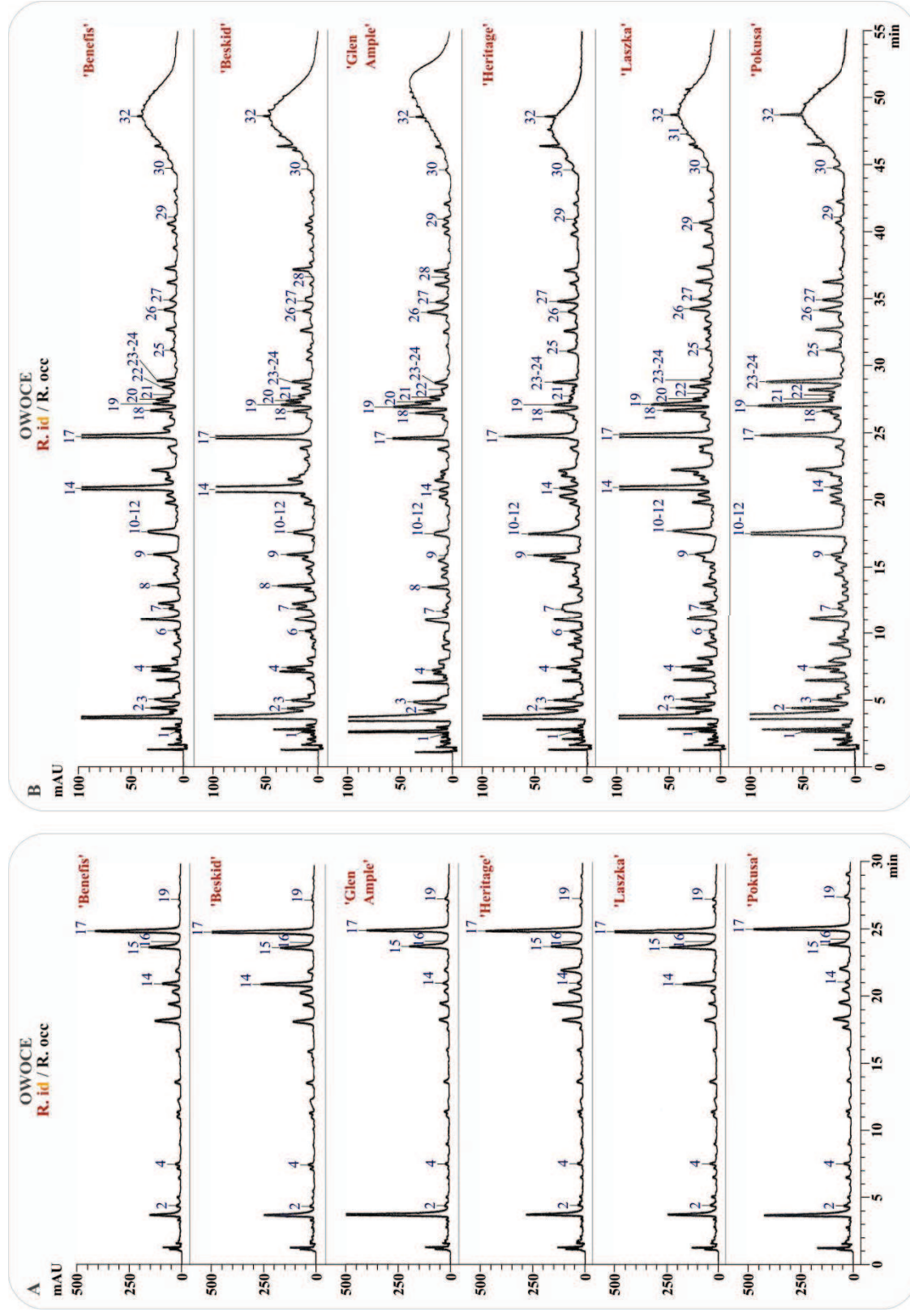
1.1 Analiza polifenoli oraz prostych fenoli w owocach *R. idaeus* i *R. occidentalis*

Wcześniejsze badania Katedry i Zakładu Farmakognozji szeregu odmian kultywarowych owoców maliny czerwonej i maliny czarnej obejmowały charakterystykę składu chemicznego głównie w zakresie antocyjanów oraz sangwiny H-6, które są dominującymi związkami w tym materiale roślinnym [19, 26, 232]. Dane literaturowe wskazują, że oprócz w/w metabolitów wtórnych, owoce *R. idaeus* i *R. occidentalis* są źródłem szeregu innych związków z grupy elagotanin, flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych [26, 28, 38, 82, 233-236].

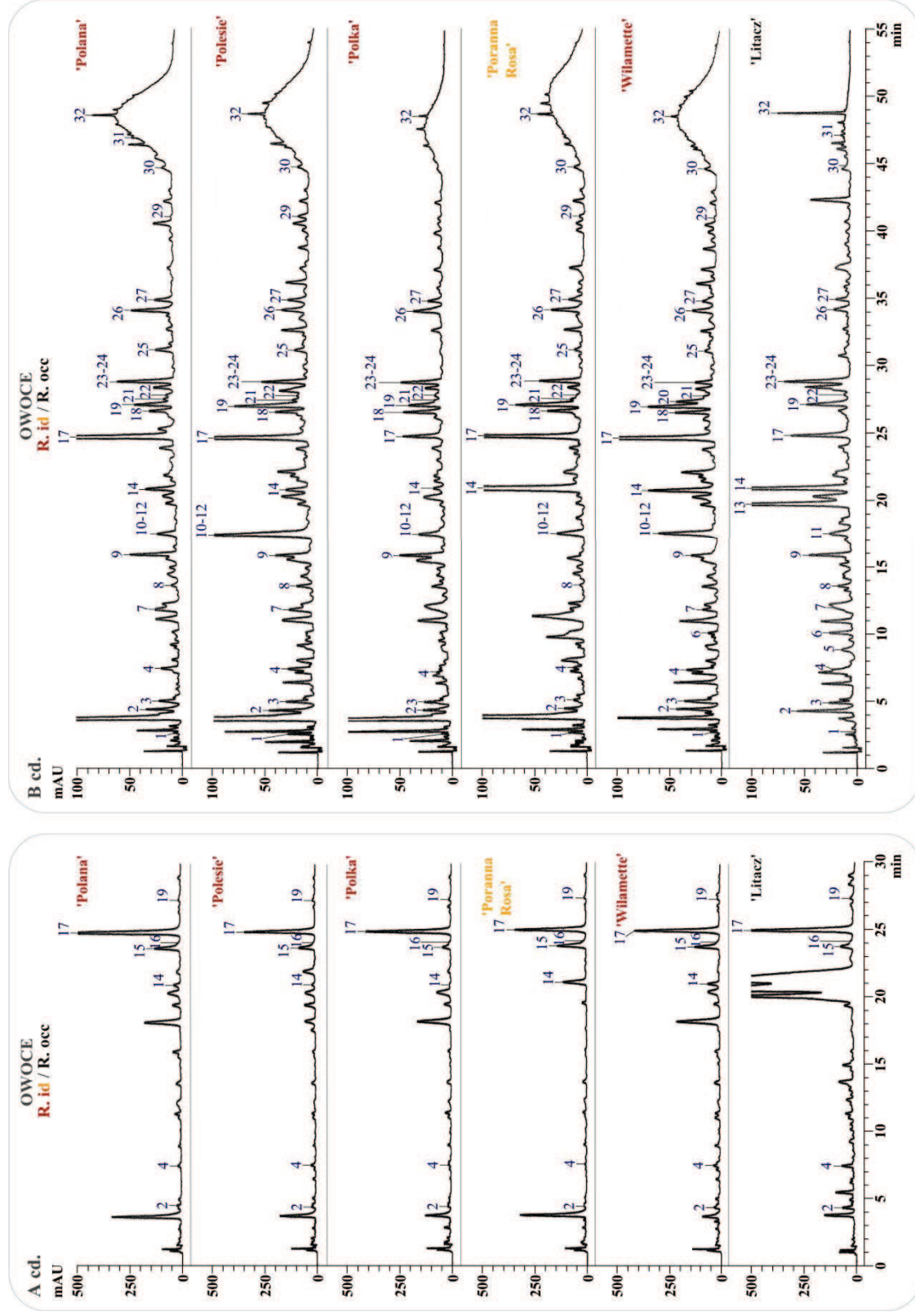
Elagotaniny są estrami kwasu heksahydroksydifenylowego (HHDP), spośród których dominującą elagotaniną w owocach maliny czerwonej, jest dimeryczna sangwina H-6 oraz towarzyszący jej trimer: lambertianina C [26, 38, 82, 233, 234]. Ponadto w owocach *R. idaeus* wykryto wiele innych elagotanin, w tym izomer sangwiny H-6, sangwinę H-10, sangwinę H-2 [233, 234], galoilo- i galoilo-bis-HHDP-glukozę [233-235], obok kwasu elagowego [38, 233, 234] oraz jego pochodnych, w postaci pentozydów, metylopentozydów oraz acetylopentozydów [82, 233, 235, 237]. Natomiast jedynymi doniesieniami o sangwinie H-6 i kwasie elagowym w owocach gatunku *R. occidentalis*, są wyniki badań jakościowych i ilościowych przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji [28].

W owocach jedynie niektórych odmian (bądź nie podając odmiany) *R. idaeus* wykryto inne związki polifenolowe i proste fenole [238]. Należały do nich flawonole (głównie kwercetyna, kemferol i ich glikozydy), flawan-3-ole (katechina, epikatechina, epigalokatechina), proantocyjanidyny (procyjanidyna B₂) oraz pochodne kwasów hydroksycynamonowego i benzoesowego (kwas p-kumarowy, ferulowy, kawowy, galusowy, synapinowy, wanilinowy oraz cynamonowy) [21, 26, 38, 233, 235, 236, 239, 240]. Dane o flawonolach, flawan-3-olach oraz kwasach fenolowych w owocach *R. occidentalis* są nieliczne, z pojedynczymi doniesieniami o obecności katechiny, kwercetyny, rutyny oraz kwasów p-kumarowego, ferulowego oraz kawowego [233, 241, 242].

Wymienione związki mogą wpływać na aktywność biologiczną owoców malin [243], dlatego postanowiono porównać ich kompozycję w owocach 11 krajowych odmian *R. idaeus* ('Benefis', 'Beskid', 'Glen Ample', 'Heritage', 'Laszka', 'Pokusa', 'Polana', 'Polesie', 'Polka', 'Poranna Rosa', 'Willamette') i jednej krajowej odmiany *R. occidentalis* ('Litacz').



Ryc. 18 Chromatogramy LC ekstraktów etanolowo-wodnych (A) oraz frakcji octanu etylu (B) z owoców 12 badanych odmian *R. idaeus* oraz *R. occidentalis*, numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 13
- Discovery HS C-18 (150 x 2,1 mm, 3 μ m), program I, $t_G = 55$ min, $v = 0.3$ ml/min, UV $\lambda = 280$ nm



Ryc. 18 cd. Chromatogramy LC ekstraktów etanolowo-wodnych (A) oraz frakcji octanu etylu (B) z owoców 12 badanych odmian uprawowych *R. idaeus* oraz *R. occidentalis*, numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 13 - Discovery HS C-18 ($150 \times 2,1 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$), program I, $t_c = 55 \text{ min}$, $v = 0,3 \text{ ml/min}$, $UV \lambda = 280 \text{ nm}$

Tab. 13 Dane chromatograficzne elagotanin, flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych zidentyfikowanych w owocach *R. idaeus* oraz *R. occidentalis* otrzymane metodą LC-DAD/ESI-MS

nr.	związek chemiczny	t _R (min)	UV λ _{max} (nm)	ESI-MS (m/z)	
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
1	kwasy galusowy *	2.8	214, 268	171	–
2	izomer sangwiny H-10	4.5	250, 270	–	301, 783, 1567
3	kwasy protokatechowy *	5.0	258, 293	155	–
4	izomer sangwiny H-10	7.6	250, 270	–	301, 783, 1567
5	procyjanidyna B ₁ *	8.7	279	579	–
6	katechina *	10.2	279	291	–
7	kwasy kawowy *	12.0	296, 300 _{sh} , 320	181	–
8	procyjanidyna B ₂ *	13.8	279	579	–
9	epikatechina *	16.0	279	291	–
10	epigalokatechina *	17.6	275, 289	–	305 , 419
11	pochodna procyjanidyny	17.7	279	291, 579	–
12	galoilo-bis-HHDP-glukoza	17.8	250, 270	–	934
13	pochodna katechiny	19.9	279	349, 365, 390	–
14	izomer sangwiny H-6	20.9	250, 270	–	935, 1869
15	lambertianina C	23.9	250, 270	–	1401
16	sangwina H-2	24.3	250, 270	–	1103
17	sangwina H-6 *	24.8	250, 270	–	935, 1869
18	pentozyd kwasu elagowego	26.6	252, 359	–	433
19	kwasy elagowy *	27.1	252, 366	–	301
20	pentozyd kwasu elagowego	27.5	252, 359	–	433
21	hiperozyd *	27.8	253, 349	465	–
22	rutyna *	28.1	254, 352	611	–
23	izokwercetyna *	28.9	254, 262 _{sh} , 353	465	–
24	3-O-glukuronid kwercetyny	28.9	254, 262 _{sh} , 352	479	–
25	pentozyd kwasu elagowego	31.2	252, 359	–	433
26	3-O-glukuronid kemferolu *	34.1	255, 352	463	–
27	acetylopentozyd kwasu elagowego	35.0	252, 357	–	475
28	acetylopentozyd kwasu elagowego	36.9	252, 357	–	475
29	acetylopentozyd kwasu elagowego	41.0	252, 357	–	475
30	kwercetyna *	44.8	253, 369	303	–
31	tilirozyd *	47.0	266, 313	595	–
32	kemferol *	48.7	262, 362	287	–

* związek wzorcowy, **pogrubienie**: jony pseudomolekularne/deprotonowane

1.1.1 Procedura analiz LC

Analizy przeprowadzono z użyciem techniki HPLC-DAD w sprzężeniu z detektorem MS, według procedury wcześniej opracowanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji GUMed [19]. Zastosowano kolumnę Discovery HS C-18 i elucję gradientową według programu I, obejmującego wzrost stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*) w 0.1% wodnym roztworze TFA od 12 do 100% (Tab. 5). Identyfikacji związków dokonano w oparciu o widma UV oraz ESI-MS (technika

SIM, w trybie jonów dodatnich oraz ujemnych), poprzez porównanie ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi (Tab. 5) [26, 28, 38, 82, 233-236, 244].

Elagotaniny i ich pochodne identyfikowano w ekstraktach etanolowo-wodnych, ponieważ we wcześniejszych badaniach ustalono, że związki te są wytrawiane z wysoką wydajnością mieszaniną EtOH:H₂O (80:20, *v/v*) [19].

Natomiast identyfikację flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych przeprowadzono we frakcjach octanu etylu ekstraktów metanolowych. Jakkolwiek otrzymane ekstrakty metanolowe charakteryzowały się niższą zawartością antocyjanów w porównaniu do ekstraktów etanolowo-wodnych, frakcje octanu etylu przygotowano celem oddzielenia związków antocyjanowych, które mogły interferować z identyfikowanymi fenolami w rozdzieleniach HPLC. Ponadto ekstrakcja octanem etylu umożliwiła otrzymanie próbek o wyższej koncentracji badanych grup polifenoli.

Związki fenolowe należące do elagotanin, flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych zidentyfikowano w ekstraktach z owoców 11 odmian *R. idaeus* i jednej odmiany *R. occidentalis*.

1.1.2 Analiza jakościowa elagotanin

Ocena profili chromatograficznych elagotanin w ekstraktach z owoców *R. idaeus* i *R. occidentalis* potwierdziła, że sangwina H-6 (pik 17) jest dominującą elagotaniną we wszystkich badanych owocach, z towarzyszącą jej w znacznie mniejszych ilościach lambertianiną C (pik 15) (niska intensywność pików). W oparciu o dane widm ESI-MS – wartości *m/z* jonów pseudomolekularnych $[M+H]^+$ i jonów deprotonowanych $[M-H]^-$ – w owocach wszystkich badanych odmian zidentyfikowano również izomer sangwiny H-6 (pik 14), dwa izomery sangwiny H-10 (piki 2 i 4), sangwinę H-2 (pik 16) oraz kwas elagowy (pik 19) (Tab. 13, Ryc. 18 A).

Owoce odmian ‘Beskid’, ‘Laszka’, ‘Polana’ i ‘Litacz’ wyróżniały się wysoką intensywnością pików sangwiny H-6, co jest zgodne z wynikami analizy ilościowej dla badanych odmian wykonanej w ramach wcześniejszych badań w Katedry i Zakładu Farmakognozji GUMed [19].

Spśród analizowanych owoców maliny czerwonej, odmiany ‘Glen Ample’ i ‘Laszka’ charakteryzowała najwyższa intensywność pików odpowiadających lambertianinie C, natomiast najniższą intensywność odnotowano dla owoców odmian ‘Polesie’ i ‘Polka’. Różnice pomiędzy owocami poszczególnych odmian obserwowano również dla izomeru sangwiny H-6, którego wyższe poziomy identyfikowano w owocach odmian ‘Beskid’, ‘Laszka’ oraz ‘Poranna Rosa’ (Tab. 13, Ryc. 18 A).

W porównaniu do owoców odmian *R. idaeus*, owoce *R. occidentalis* ‘Litacz’ charakteryzowały wyższe poziomy zawartości dwóch izomerów sangwiny H-10 (*t_R* 2.8 min i 5.0 min) oraz niższe

poziomy lambertianiny C, podczas gdy poziomy zawartości sangwiny H-2 i kwasu elagowego były zbliżone. Pik odpowiadający izomerowi sangwiny H-6 (t_R 20.9 min) nie mógł być identyfikowany w odmianie 'Litacz' ze względu na koelucję ze związkami antocyjanowymi (Tab. 13, Ryc. 18 A).

Dane literaturowe wyróżniają lambertianinę C jako drugą dominującą elagotaninę w owocach maliny czerwonej [28, 38, 82, 233, 234]. Jest to częściowo zgodne z otrzymanymi wynikami, ponieważ w większości badanych odmian, lambertianina C była drugą dominującą elagotaniną po sangwinie H-6. Wyjątkiem były owoce *R. idaeus* 'Beskid', w których odnotowano znacznie wyższe zawartości izomeru sangwiny H-6 (t_R 20.9 min) w porównaniu do lambertianiny C. Przedstawione wyniki są pierwszym doniesieniem o obecności sangwiny H-2 w owocach czerwonej i czarnej maliny. Ponadto po raz pierwszy opisano kompozycję elagotanin w owocach maliny czarnej (Tab. 13, Ryc. 18 A).

1.1.3 Analiza jakościowa flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych

We frakcjach octanu etylu wszystkich badanych owoców zidentyfikowano szereg związków z grup flawonoli (piki 21-24, 26, 30-32), flawan-3-oli (piki 5, 6, 8, 9, 10) oraz kwasów fenolowych (piki 1, 3, 7).

W widmach ESI-MS, w trybie jonów dodatnich, obserwowano obecność jonów pseudomolekularnych kwasów fenolowych (galusowego, protokatechowego i kawowego), flawonoidów (hiperozydu, rutyny, izokwercetyny, 3-O-glukuronidu kwercetyny, 3-O-glukuronidu kemferolu, kwercetyny, tilirozydu i kemferolu) oraz flawan-3-oli (katechiny, epikatechiny, procyanidyny B₁ i B₂). Natomiast w trybie jonów ujemnych zarejestrowano jony deprotonowane elagotanin (izomerów sangwiny H-10, galloilo-bis-HHDP-glukozy, izomeru sangwiny H-6, lambertianiny C, sangwiny H-2, sangwiny H-6), epigalokatechiny, kwasu elagowego oraz jego pentozydów i acetylopentozydów (Tab. 13).

Analiza LC-DAD/ESI-MS wobec związków wzorcowych, ujawniła obecność kwasu galusowego (pik 1), protokatechowego (pik 3), kawowego (pik 7), izokwercetyny (pik 23), 3-O-glukuronidu kwercetyny (pik 24), 3-O-glukuronidu kemferolu (pik 26) oraz kemferolu (pik 32) we wszystkich badanych owocach. Kwercetyna (pik 30) była obecna we wszystkich analizowanych odmianach z wyjątkiem owoców *R. idaeus* 'Polka'. Wszystkie odmiany charakteryzowały się również obecnością szeregu pentozydów (piki 18, 20, 25) oraz acetylopentozydów kwasu elagowego (piki 27-29). Hiperozyd (pik 21) i rutyna (pik 22) były obecne w śladowych ilościach, podczas gdy obecność tilirozydu (pik 31) wykazano tylko w odmianach 'Laszka', 'Polana' oraz 'Litacz' (Tab. 13, Ryc. 18 B).

Izokwercetyna oraz 3-O-glukuronid kwercetyny koeluowały w czasie t_R 28.9 min, co jest znany problemem w rozdzieleniach LC obydwu związków [26], i zostały zidentyfikowane przy

użyciu techniki SIM. Z dwóch flawonoli, 3-O-glukuronid kwercetyny był związkiem dominującym w większości badanych odmian, co jest zgodne z danymi literaturowymi [26, 82, 233, 235]. Owoce odmian *R. idaeus* ‘Pokusa’, ‘Polana’, ‘Polesie’, ‘Polka’, ‘Poranna Rosa’ i *R. occidentalis* ‘Litacz’ wyróżniały się wyższą intensywnością pików obydwu związków, natomiast w pozostałych odmianach były one znacznie niższe (Tab. 13, Ryc. 18 B).

W owocach sześciu analizowanych odmian (*R. idaeus* ‘Benefis’, ‘Beskid’, ‘Heritage’, ‘Laszka’, ‘Willamette’, *R. occidentalis* ‘Litacz’) potwierdzono obecność katechiny (pik 6) oraz epikatechiny (pik 9), przy czym dominującym związkiem była epikatechina (wyższa intensywność pików). Pozostałe pięć odmian (*R. idaeus* ‘Glen Ample’, ‘Polka’, ‘Pokusa’, ‘Polana’, ‘Polesie’) charakteryzowało się obecnością epikatechiny oraz brakiem bądź śladowymi ilościami katechiny, podczas gdy w owocach *R. idaeus* ‘Poranna Rosa’ nie zidentyfikowano żadnego z dwóch wymienionych flawan-3-oli (Tab. 13, Ryc. 18 B). Dane literaturowe o ilościowym stosunku katechiny do epikatechiny w owocach malin są sprzeczne, przy czym niektóre są zgodne z przedstawionymi powyżej wynikami [235], podczas gdy inne donoszą o zbliżonych poziomach zawartości obydwu związków [236].

W owocach *R. idaeus* ‘Benefis’, ‘Beskid’, ‘Glen Ample’, ‘Poranna Rosa’, ‘Polana’ oraz ‘Polesie’ wykryto obecność procyanidyny B₂ (pik 8), jakkolwiek w odmianach ‘Poranna Rosa’ oraz ‘Polana’ była ona obecna tylko w śladowych ilościach. W owocach *R. occidentalis* ‘Litacz’ zidentyfikowano zarówno procyanidynę B₂ (pik 5) jak i B₁, co jest pierwszą informacją o występowaniu obydwu dimerycznych pochodnych flawan-3-oli w owocach maliny czarnej (Tab. 13, Ryc. 18 B).

Pik odpowiadający epigalokatechinie (pik 10) zidentyfikowano przy t_R 17.6 min w owocach wszystkich badanych odmian maliny czerwonej. Dane widm UV oraz ESI-MS sugerują, że pik 10, obok epigalokatechiny, prawdopodobnie zawiera jeszcze dwa koeluujące związki (pik 11 i 12). Związek odpowiadający pikowi 11 zidentyfikowano jako pochodną procyanidyny, na podstawie widma UV (λ_{max} – 279 nm) oraz jonu pseudomolekularnego w widmie ESI-MS (m/z 579 [M+H]⁺) charakterystycznych dla procyanidyn. Pik 12 zidentyfikowano jako galoilo-bis-HHDP-glukozę na podstawie charakterystycznego dla związku jonu molekularnego w widmie ESI-MS (m/z 934 [M-H]) oraz charakterystycznych dla elagotanin maksimów absorpcji w widmie UV (λ_{max} – 250, 270 nm) (Tab. 13). Obserwowano również wyraźne różnice w intensywności pików odpowiadających koeluującym związkom 10-12 pomiędzy badanymi ekstraktami z owoców. Była ona wyższa w owocach *R. idaeus* ‘Pokusa’ oraz ‘Polesie’, niewiele niższa w przypadku *R. idaeus* ‘Heritage’, ‘Laszka’ oraz ‘Willamete’ natomiast znacznie niższa w pozostałych odmianach. W przeciwieństwie do koeluujących izokwercetyny i 3-O-glukuronidu kwercetyny, określenie które ze związków dominowały w pikach 10-12 nie było możliwe przy użyciu techniki SIM, ponieważ dla związku 11 odnotowano jony

pseudomolekularne tylko w jonizacji dodatniej, natomiast dla pozostałych tylko w jonizacji ujemnej. Jednocześnie na chromatogramie HPLC *R. occidentalis* 'Litacz', związek o wartości t_R 17.7 min zidentyfikowano wstępnie jako pochodną procyanidyny (Tab. 13, Ryc. 18 B).

Dla wszystkich badanych odmian odnotowano zbliżone poziomy 3-O-glukuronidu kemferolu (pik 26), z wyjątkiem *R. idaeus* 'Beskid' oraz 'Heritage', w których były one znacznie niższe.

Na chromatogramie HPLC wyciągu z owoców *R. occidentalis* 'Litacz', w czasie t_R 19.9 min, obserwowano pik o wysokiej intensywności (pik 13). Jego widmo UV było zbliżone do widma UV katechiny, co może sugerować że jest on pochodną flawan-3-olu, natomiast w widmie MS nie odnotowano obecności sygnałów jonów molekularnych i fragmentacyjnych które pozwoliłyby na wstępną identyfikację związku (Tab. 13, Ryc. 18 B).

W przeciwieństwie do powyższych wyników, Jakobek i wsp. [236] wykryli obecność kwasu ferulowego oraz p-kumarowego w owocach maliny właściwej, a nie zidentyfikowali rutyny oraz kemferolu. Natomiast w zgodzie z powyższymi wynikami Mullen i wsp. [82] oraz Mazur i wsp. [26] odnotowali obecność rutyny, 3-O-glukuronidu kwercetyny, izokwercetyny, 3-O-glukuronidu kemferolu oraz glikozydowych pochodnych kwasu elagowego jako składników owoców *R. idaeus* odmian 'Glen Ample', 'Octavia', 'Glen Magna' i 'Malling Hestia'. Na wykazane rozbieżności w składzie chemicznym badanych owoców maliny mogły wpływać takie czynniki jak odmiana, warunki uprawy czy też okres owocowania, szczególnie w przypadku odmian powtarzających owocowanie [26, 28, 239, 245, 246].

Podsumowując wyniki analiz HPLC, przeprowadzone badania dostarczają istotnych informacji o składzie chemicznym owoców *R. idaeus* i *R. occidentalis* w zakresie rzadziej identyfikowanych związków fenolowych. Wszystkie związki rozpoznane w owocach *R. idaeus* były wcześniej identyfikowane jako ich składniki. W zgodzie z danymi literaturowymi w owocach *R. occidentalis* oznaczono sangwinę H-6 i kwas elagowy, ale również izomer sangwiny H-6 i galoilo-bis-HHDP-glukozę, wcześniej identyfikowane jedynie w ekstraktach z pestek maliny czarnej [244]. Wyniki analizy są pierwszymi doniesieniami o obecności szeregu związków w owocach *R. occidentalis*, włączając izomery sangwiny H-10, pentozyd i acetylpentozydy kwasu elagowego, kwas protokatechowy, epikatechinę, epigaloakatechinę, procyanidynę B₁ i B₂, izokwercetynę, 3-O-glukuronid kwercetyny, kemferol oraz 3-O-glukuronid kemferolu.

Porównując otrzymane wyniki z wcześniej opublikowanymi [19], można stwierdzić że owoce malin charakteryzuje większe zróżnicowanie składu chemicznego w zakresie kompozycji związków antocyjanowych, natomiast kompozycje pozostałych związków należących do polifenoli i prostych fenoli są prawie identyczne w zakresie jakościowym, i można przypuszczać że również w zakresie ilościowym. Konsekwencją tego twierdzenia może być wniosek, że wymienione grupy związków

pozostają bez wpływu na wykazywane wcześniej różnice w aktywności biologicznej (szczególnie aktywności przeciwzapalnej) [19], i jedyny wyjątek mogą stanowić odmiany bogate w izomer sangwiny H-6 (pik 14).

1.2 Analiza polifenoli i prostych fenoli w pędach *R. idaeus* i *R. occidentalis*

1.2.1 Analiza metodą dwuwymiarowej chromatografii cieczowej (2D LC)

Przeprowadzone analizy chromatograficzne wyciągów z pędów wykazały obecność związków fenolowych, z których część nie rozdzielała się w jednowymiarowych systemach HPLC [31]. We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji opracowano dwuwymiarowy system ‘comprehensive’ LC x LC, składający się z kolumny Nucleodur Sphinx RP (50 x 1 mm, 5 μ m) w ¹D, oraz kolumny Chromolith Flash RP-18e (25 x 4.6 mm, 2 μ m) w ²D (T – 20°C), i programów elucji gradientowej obejmujących w ¹D wzrost stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 v/v/v) w 0.1 % wodnym roztworze TFA, od 10 do 56%, natomiast w ²D od 10 do 55% (t_G 70 min), z czasem modulacji wynoszącym 2 min. Powyższe warunki separacji opracowano przede wszystkim w celu oddzielenia związków koeluuujących w 1D LC: izokwercetyny i 3-O-glukuronidu kwercetyny [19]. Dlatego w niniejszej pracy podjęto próbę opracowania systemu 2D LC umożliwiającego rozdzielenie wszystkich składników złożonej matrycy roślinnej stanowiącej ekstrakt z pędów maliny właściwej.

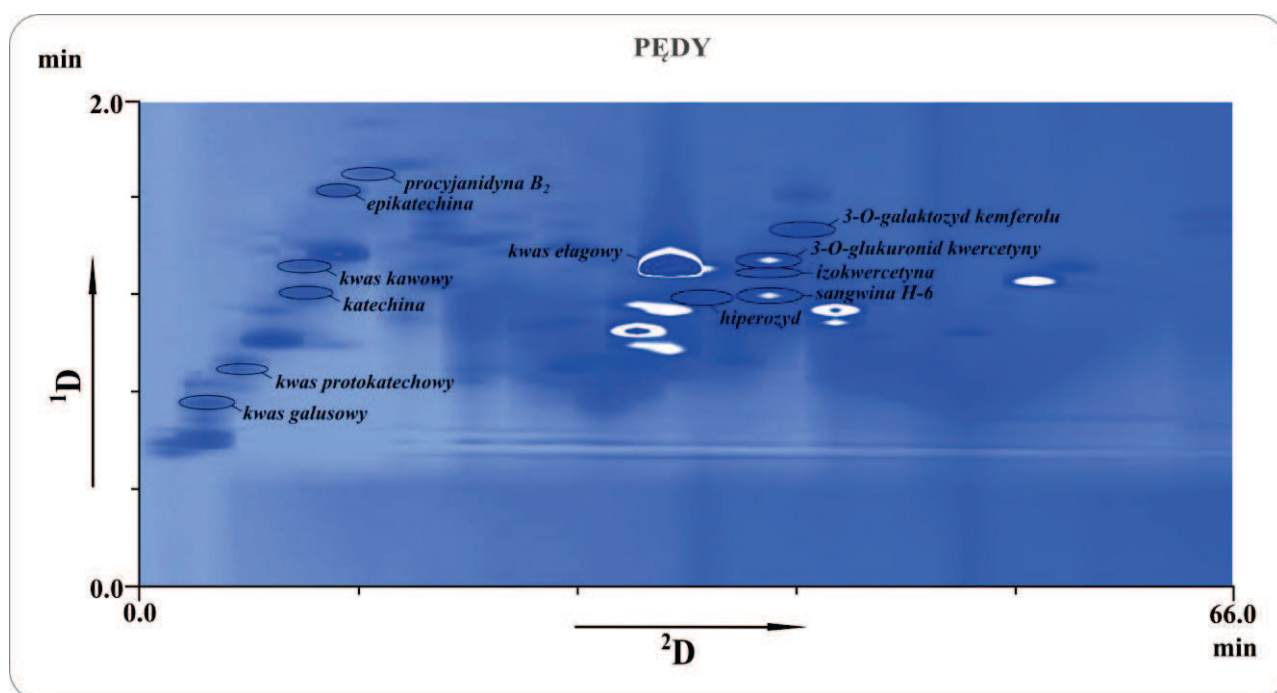
1.2.1.1 Analiza ‘comprehensive’ LC x LC

Początkowo podjęto próbę modyfikacji wcześniej opracowanego systemu ‘comprehensive’ LC x LC [19], prowadząc rozdzielenia związków czynnych ekstraktu metanolowego z pędów *R. idaeus* ‘Willamette’.

Rozdzielenia w ¹D również prowadzono na kolumnie Nucleodur Sphinx RP, natomiast w ²D zamiast Chromolith Flash RP-18e, zastosowano 4-razy dłuższą kolumnę Chromolith Performance (100 x 4.6 mm, 2 μ m). W obydwu wymiarach zastosowano te same fazy ruchome oraz profile elucji gradientowej co przedstawione powyżej (programy II i III). Wraz z zastosowaniem dłuższej kolumny w ²D, zwiększono również natężenie przepływu z 1.5 do 6 ml/min, przy zachowaniu temperatury kolumny T – 20°C w obydwu kierunkach (Tab. 6). Detekcję prowadzono z użyciem detektorów UV oraz MS.

W rezultacie otrzymano rozdzielenie około 50 związków, widocznych jako pojedyncze plamy na chromatogramie LC x LC (Ryc. 19), spośród których zidentyfikowano sangwinę H-6, kwasy galusowy, protokatechowy, kawowy oraz elagowy, katechinę, epikatechinę, procyanidynę B₂,

hiperozyd, izokwercetynę, 3-O-glukuronid kwercetyny oraz 3-O-galaktozyd kemferolu. Ze względu na niskie stężenie w próbce, na chromatogramie LC x LC nie odnotowano sygnałów związków odpowiadającym pozostałym elagotaninom (izomerom sangwiny H-10, lambertianinie C, izomerowi sangwiny H-6 i sangwinie H-2), które identyfikowano w pędach badanej odmiany w ramach wcześniejszej jednowymiarowej analizy HPLC-DAD ESI-MS [19].



Ryc. 19 Chromatogram ‘comprehensive’ LC x LC ekstraktu metanolowego z pędów *R. idaeus* ‘Willamette’

- ¹D: Nucleodur Sphinx RP (50 × 1 mm, 5 μm), program II, $t_G = 70$ min, $v = 0.05$ ml/min, UV λ – 254 nm

- ²D: Chromolith Performance (100 × 4.6 mm, 2 μm), program III, $t_G = 70$ min, $v = 6$ ml/min, UV λ – 254 nm

1.2.1.2 Separacja na kolumnach wypełnionych powierzchniowo porowatą krzemionką

W kolejnym etapie konfigurowania systemu 2D LC podjęto próbę poprawy rozdzielenia składników ekstraktu metanolowego z pędów innej odmiany: *R. idaeus* ‘Glen Ample’, poprzez optymalizację warunków separacji przy zastosowaniu innych kolumn oraz programów elucji gradientowej. Pędy *R. idaeus* ‘Glen Ample’ charakteryzowała wyższa zawartość związków polifenolowych z grupy elagotanin w porównaniu do badanych wcześniej pędów maliny czerwonej odmiany ‘Willamette’ [19].

W ostatnich latach wzrasta popularność kolumn chromatograficznych, wypełnionych powierzchniowo porowatą krzemionką (ang. *fused-core* albo *core-shell*). W odróżnieniu od tradycyjnego, w pełni porowatego złoza, podstawą technologii ‘core-shell’ jest osadzenie cienkiej warstwy porowatej

krzemionki, (w której zachodzi proces separacji) na nieporowatym rdzeniu. Efektem takiego rozwiązania jest zwiększenie pojemności sorpcyjnej złoża, oraz wzrost szybkości dyfuzji cząsteczek do wnętrza i na zewnątrz porów, przy jednoczesnym zachowaniu niskich ciśnień przepływu. Głównymi zaletami kolumn ‘core-shell’ są wyższa rozdzielczość i krótszy czas analizy [247, 248]. W optymalizacji warunków separacji metody 2D LC postanowiono użyć kolumn typu Kinetex, jako wykonanych w technologii ‘core-shell’.

W początkowym etapie eksperymentu, metanolowy ekstrakt z pędów poddano separacji 1D LC na kolumnach Kinetex o różnych mechanizmach retencji: C-18, PFP oraz HILIC. Separacja z użyciem Kinetex HILIC była mniej efektywna w porównaniu do C-18 i PFP dlatego wyłączono ją z dalszych badań.

Faza oktadecylowa C-18 jest najpowszechniej stosowaną fazą stacjonarną w analizie LC matryc roślinnych [197], w przeciwieństwie do mniej popularnej fazy PFP, zawierającej reszty pentafluorofenyłowe. Proces separacji na Kinetex PFP włącza 5 różnych mechanizmów oddziaływań dla związków polarnych oraz niepolarnych, w tym oddziaływania hydrofobowe, π - π (pierścieni aromatycznych), elektrostatyczne, steryczne oraz związane z tworzeniem wiązań wodorowych [249]. Według danych literaturowych [250], faza PFP umożliwia zwiększenie rozdzielczości systemu chromatograficznego w odniesieniu do szybko eluujących fenoli takich jak kwasy fenolowe i flawan-3-ole. Wadą Kinetex PFP są problemy z odtwarzalnością wyników związane z technologią otrzymywania złoża i powstawania wiązań w fazie stacjonarnej [249].

Porównano efektywność rozdzielania na kolumnach C-18 i PFP z użyciem dwóch faz ruchomych oraz dwóch programów elucji gradientowej. Program IV obejmował wzrastające stężenie mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*), od 10 do 100%, w 0.1% wodnym roztworze TFA, natomiast program V charakteryzowało wrastające stężenie mieszaniny ACN:MeOH:H₂O:TFA (5:80:15:0.1 *v/v/v/v*), od 10 do 60%, w 0.1% wodnym roztworze TFA. Obniżenie temperatury kolumny z T – 32 °C do T – 20°C względem wcześniej prowadzonych rozdzieleń 1D LC [19], pozwoliło na efektywniejsze rozdzielenie i ograniczenie efektu rozmycia pasma (ang. *band broadening*) (Tab. 7). Obliczone wartości pojemności pikowej (P) otrzymywanej w rozdzieleniach 1D LC były na podobnym poziomie i wynosiły 119 (Ryc. 20 A), 114 (Ryc. 20 B) i 108 (Ryc. 20 C).

W badaniach identyfikacyjnych, obok detektora UV, użyto detektora MS z dwoma źródłami jonizacji – ESI (ang. *electrospray ionization*) oraz APCI (ang. *atmospheric pressure chemical ionization*). ESI jest obecnie jedną z najbardziej popularnych technik ‘łagodnej jonizacji’ umożliwiającą obserwację jonu pseudomolekularnego z jego słabą fragmentacją do jonów potomnych. ESI oraz APCI stanowią techniki najczęściej wykorzystywane w spektrometrii mas. Obydwa typy jonizacji charakteryzują się

wysoką czułością oraz umożliwiając pracę przy wysokich przepływach fazy ruchomej. Są również komplementarnymi względem siebie metodami jonizacji, ponieważ ESI jest jonizacją odpowiednią dla związków o wysokiej polarności, natomiast jonizacja APCI jest korzystna w przypadku związków o umiarkowanej bądź niskiej polarności – co pozwala na uzyskanie dobrych warunków jonizacji dla szerokiego spektrum związków chemicznych.

Elagotaniny identyfikowano głównie w oparciu o widma ESI-MS, ponieważ jony o masie powyżej 1000 Da nie były rejestrowane w przypadku jonizacji APCI. Dla większości elagotanin i pochodnych kwasu elagowego obserwowano jon odpowiadający kwasowi elagowemu, obecny tylko w widmach APCI, przy m/z 301 [M-H]. Podobnie w widmach APCI glikozydów flawonoidowych obserwowano obecność jonów fragmentacyjnych odpowiadających aglikonom flawonoidowym (Tab. 14).

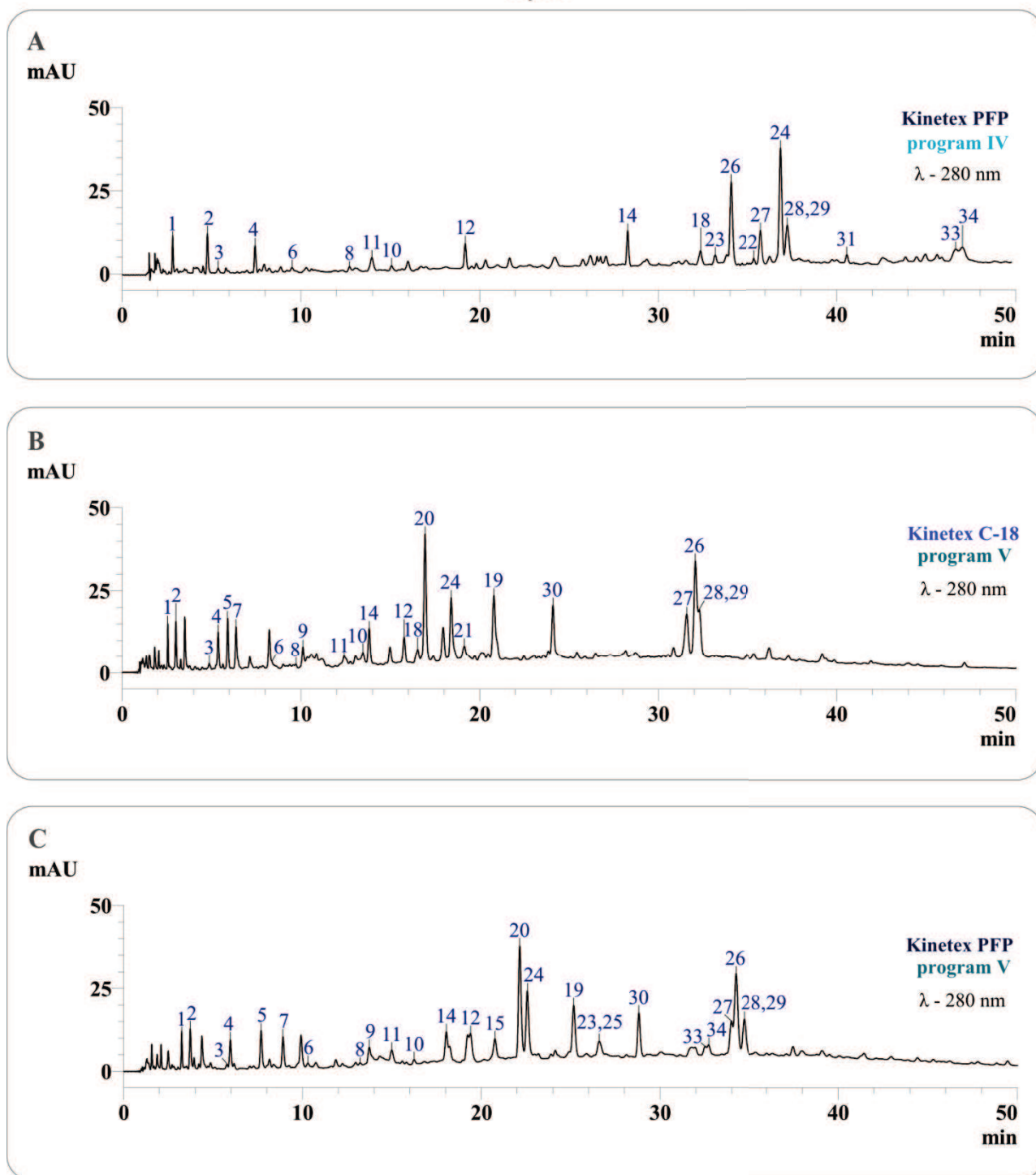
Identyfikację związków przeprowadzono na podstawie porównania widm UV oraz MS ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi (piki 1-12, 14-15, 18-31, 33-34) (Tab. 14) [183, 251-254].

Rozdzielone związki z wartościami t_R poniżej 30 min w większości rozpoznano jako elagotaniny, kwasy fenolowe oraz flawan-3-ole, natomiast związki o wartości t_R powyżej 30 min w przeważającej większości stanowiły flawonole oraz pochodne kwasu elagowego. Obserwowano różnice w efektywności separacji oraz kolejności elucji poszczególnych związków w zależności od zastosowanej kolumny oraz składu fazy ruchomej i profilu elucji (Ryc. 20).

Pomimo, że kolumna ‘core-shell’ Kinetex C-18 zapewniła lepszą rozdzielczość niż wcześniej użyta porowata krzemionka kolumny Discovery HS C-18 [31], to była mniej efektywna w porównaniu do kolumny Kinetex PFP. Na kolumnie Kinetex C-18 nie rozdzielono pentozydu (pik 23) i acetylpentozydów kwasu elagowego (piki 33 i 34), podczas gdy rozdzielały się one na kolumnie PFP. Jedynym związkiem dobrze oddzielonym na kolumnie Kinetex C-18 od sąsiadujących, był izomer sangwiny H-6 (pik 21) (Ryc. 20).

Ponadto, w rozdzieleniach z zastosowaniem fazy ruchomej zawierającej metanol (program V), na chromatogramach HPLC obserwowano pik o wysokiej intensywności (pik 20), którego widma UV (λ_{max} 251, 270 nm) oraz ESI-MS (m/z 935 [M-H]) odpowiadały galoilo-bis-HHDP-glukozie. Porównując otrzymane rozdzielania do wcześniejszych separacji HPLC przeprowadzonych z użyciem kolumny Discovery HS C-18 [31] wykazano, że pik identyfikowany wcześniej jako sangwina H-6 zawiera dwa związki – sangwinę H-6 (m/z 1870 [M-H]) oraz galoilo-bis-HHDP-glukozę (Ryc. 20).

PĘDY



Ryc. 20 Chromatogramy 1D LC ekstraktu metanolowego z pędów *R. idaeus* ‘Glen Ample’, numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 14

A – Kinetex PFP (100 × 4.6 mm, 2.6 μ m), program IV, t_G = 65 min, v = 1 ml/min UV λ – 280 nm

B – Kinetex C-18 (100 × 4.6 mm, 2.6 μ m), program V, t_G = 50 min, v = 1 ml/min UV λ – 280 nm

C – Kinetex PFP (100 × 4.6 mm, 2.6 μ m), program V, t_G = 50 min, v = 1 ml/min UV λ – 280 nm

Użycie elucji gradientowej według programu V pozwoliło na rozdzielenie epigalokatechiny (pik 19, m/z 305 [M-H]) oraz trzech związków identyfikowanych jako galoilo-HHDP-glukoza (piki 5, 7, 9, m/z 633 [M-H]), przy braku separacji sangwiny H-2 (pik 22) oraz metylopentozydu kwasu elagowego (pik 31), obserwowanych jako rozdzielone piki tylko z użyciem programu IV (Ryc. 20). W zależności od zastosowanej kolumny oraz fazy ruchomej, obserwowano koelucję niektórych związków o niższych intensywnościach pików, z pikami o wyższej intensywności (piki 23, 25), co uniemożliwiało ich rejestrację jako składników matrycy z użyciem detekcji UV o długości fali λ – 280 nm (Ryc. 20).

Wstępna separacja na kolumnach Kinetex pozwoliła na rozdzielenie i wykrycie szeregu związków dotychczas niezidentyfikowanych w pędach *R. idaeus*, takich jak pochodne kwasu elagowego czy epigalokatechina [31], jednak nie osiągnięto satysfakcjonującego rozdzielania kwasu elagowego, hiperozydu, izokwercetyny, 3-O-glukuronidu kwercetyny oraz acetylopentozydów kwasu elagowego (Ryc. 20).

1.2.1.3 Optymalizacja i procedura rozdzielania dwuwymiarowego (2D LC)

Wybrano kolumnę Luna C-18 (150 x 1 mm, 3 μ m) do rozdzieleń w pierwszym kierunku (¹D), ze względu na małą średnicę wewnętrzną, co umożliwiło obniżenie objętości elucyjnej względem kolumny Kinetex PFP w ²D. W celu skrócenia czasu analizy, rozdzielanie na kolumnie ¹D prowadzono w podwyższonej temperaturze (T – 34°C), przy której obserwowano niższe wartości t_R rozdzielanych analitów.

Biorąc pod uwagę duże różnice w wartościach t_R separowanych związków w rozdzieleniach otrzymanych na kolumnach Kinetex, stwierdzono że Kinetex PFP charakteryzuje się lepszą rozdzielczością, i na tej podstawie wybrano ją jako kolumnę ²D w opracowywanym systemie 2D LC. Średnica wewnętrzna Kinetex PFP jest 4.5-razy większa od średnicy kolumny Luna C-18, umożliwiając przeniesienie stosunkowo dużej objętości (50 μ l) każdej z rozdzielanych frakcji z ¹D w krótkim czasie.

Do rozdzieleń 2D LC wybrano fazę ruchomą będącą mieszaniną ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 v/v/v), pomimo bardziej efektywnych rozdzieleń otrzymywanych przy użyciu mieszaniny ACN:MeOH:H₂O:TFA (5:80:15:0.1 v/v/v/v) w analizie 1D LC. Użycie fazy ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 v/v/v) w ¹D umożliwiło podzielenie składników analizowanej matrycy na poszczególne frakcje w systemie on-line. Zastosowanie fazy zawierającej metanol w ²D nie było możliwe, ze względu na zbyt wysokie ciśnienie przy użytym natężeniu przepływu fazy ruchomej.

W analizie ‘on-line’ 2D LC, zastosowano system wyposażony w 10-cio portowy 2-drożny zawór przełączający, z dwoma pętlami dozującymi o pojemności 50 μ l, pełniący funkcję łącznika pomiędzy kolumnami ¹D i ²D. Na kolumnie ¹D składniki próbki wstępnie rozdzielono w warunkach

elucji gradientowej na frakcje o różnej polarności, które następnie wprowadzano na kolumnę ^2D . Rozdzielenie 2D LC przeprowadzono w warunkach zautomatyzowanych zmieniając pozycje 10-cio drożnego zaworu pomiędzy kolumną ^1D a kolumną ^2D . Dzielnik strumienia umieszczony za wylotem kolumny ^1D dzielił strumień eluatu z pierwszego wymiaru w stosunku 94:6, zapewniając natężenie przepływu 6 μl na minutę, co pozwoliło na wypełnienie pętli dozującej, przy czasie modulacji wynoszącym 8 minut. Czas modulacji dobrano w taki sposób, aby czas wymywania każdej z przenoszonych frakcji z ^1D był równy czasowi separacji w ^2D i czasowi napełniania jednej z 2 pętli dozujących (Ryc. 21).

Uwzględniając znaczące rozcieńczenie składników analizowanej matrycy w systemach ‘on-line’ 2D LC, związki obecne w niskich stężeniach często nie są wykrywane w drugim wymiarze, co uwzględniono w doborze parametrów kolumn w ^1D i ^2D .

W ^1D zastosowano elucję gradientową według programu VI obejmującego wzrastające liniowo stężenie $\text{ACN:H}_2\text{O:TFA}$ (50:50:0.1 $v/v/v$), od 10 do 100 %, w 0.1 % wodnym roztworze TFA. Profil elucji gradientowej optymalizowano w celu podzielenia składników próbki na 5 pojedynczych frakcji (FR.1-5) w taki sposób, aby uniknąć obecności pojedynczego związku z ^1D w dwóch sąsiednich frakcjach (Ryc. 21). Obecne w poszczególnych frakcjach składniki próbki rozdzielano na kolumnie w ^2D według profilu elucji gradientowej obejmującego wzrastające stężenie $\text{ACN:H}_2\text{O:TFA}$ (50:50:0.1 $v/v/v$), od 10 do 49%, w 0.1 % wodnym roztworze TFA, dobranym eksperymentalnie dla każdej z analizowanych frakcji (program VII) (Tab. 8, Ryc. 21).

W literaturowych systemach ‘comprehensive’ 2D LC, w których cała próbka poddawana jest analizie w obydwu wymiarach, czas modulacji wynosi przeważnie ok. 2 min, jakkolwiek stosowane są również czasy modulacji dwa- do trzech-razy dłuższe [255, 256]. Skrócenie czasu modulacji w opracowanym systemie 2D LC nie było możliwe ze względu na użycie krótszej kolumny w ^1D . Natomiast zwiększenie przepływu fazy ruchomej w ^2D skutkowałoby znacznym wzrostem ciśnienia, i w konsekwencji utratą rozdzielczości. Ortogonalność systemu 2D LC osiągnięto poprzez zastosowanie faz stacjonarnych o odmiennych mechanizmach retencji (C-18 oraz PFP) oraz w mniejszym stopniu użytymi profilami gradientu i kompozycjami faz ruchomych.

Wartość P uzyskana dla rozdzielen 2D LC wynosiła 216, co stanowiło ok. 100 % wzrost względem rozdzielen jednowymiarowych. W porównaniu do danych literaturowych jest to stosunkowo niska wartość, niemniej jednak jest porównywalna do wartości osiąganych w niektórych opracowanych w literaturze systemach 2D LC [257]. Zwiększenie pojemności pikowej otrzymywane jest zwykle poprzez znaczne wydłużenie czasu analizy oraz stosowanie dłuższych kolumn w ^2D . Biorąc pod uwagę satysfakcjonującą rozdzielczość osiągniętą dla różnych grup metabolitów wtórnych w opracowanym

systemie 2D LC, uznano że zwiększenie pojemności pikowej nie wpłynęłoby w sposób znaczący na efektywność separacji.

Opracowany system 'on-line' 2D LC obejmuje równoczesny podział próbki na frakcje w ¹D oraz ich separację w ²D. Pomimo że cała próbka jest poddawana separacji w obu wymiarach to system nie może być uznany za 'comprehensive' ponieważ nie spełnia wymogu zachowania separacji z ¹D w ²D (Ryc. 21) [258]. Opracowane warunki separacji są optymalne biorąc pod uwagę parametry techniczne systemu HPLC, typy zastosowanych kolumn oraz specyfikę badanej matrycy roślinnej w zakresie kompozycji związków czynnych.

1.2.1.4 Analiza jakościowa 'on-line' 2D LC związków fenolowych w pędach *R. idaeus*

Wyciągi z pędów *R. idaeus* odmiany 'Glen Ample' poddano analizie z użyciem opracowanego systemu 'on-line' 2D LC z detektorem DAD oraz MS z jonizacją ESI oraz APCI. Do identyfikacji elagotanin włączono również widma masowe otrzymane techniką DUIS-MS, łączącą jonizację ESI oraz APCI.

Rozdzielono ponad 40 związków w postaci pojedynczych pików, spośród których zidentyfikowano 34 (Ryc. 22, Tab. 14).

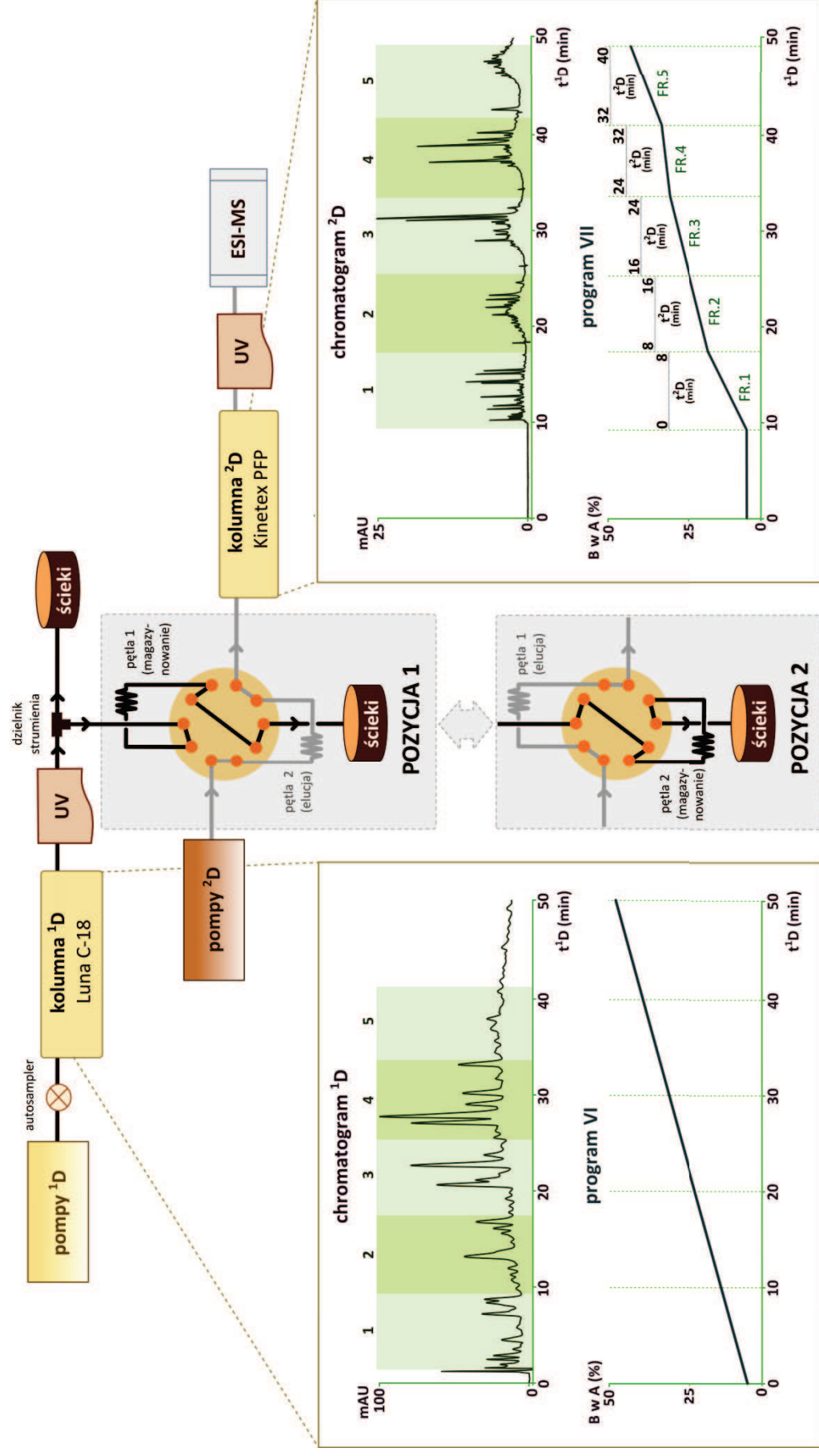
W badanym materiale roślinnym rozpoznano szereg elagotanin, włączając sangwinę H-6 oraz jej izomer, 4 izomery sangwiny H-10, dwa izomery sangwiny H-2 oraz szereg izomerów galoilo-HHDP-glukozy oraz galoilo-bis-HHDP-glukozy. Powyższe elagotaniny były wcześniej identyfikowane w owocach maliny właściwej oraz owocach innych przedstawicieli rodzaju *Rubus* [183, 251, 253]. Sangwina H-2 została rozpoznana po raz pierwszy jako składnik pędów *R. idaeus*. Nie potwierdzono obecności lambertianiny C w pędach odmiany 'Glen Ample', ujawnionej w poprzednich badaniach Katedry i Zakładu Farmakognozji [31]. W materiale wykryto również liczne pochodne kwasu elagowego w postaci pentozydu, dwóch metylopentozydów oraz dwóch acetylopentozydów kwasu elagowego [183]. W porównaniu do owoców, pędy *R. idaeus* charakteryzują się wyższą zawartością wolnego kwasu elagowego [82], co jest potwierdzeniem wyników uzyskanych we wcześniejszych badaniach pędów szeregu odmian uprawowych *R. idaeus* [31]. Inne grupy związków fenolowych rozdzielane i identyfikowane w pędach *R. idaeus* 'Glen Ample' obejmowały kwasy fenolowe: galusowy, protokatechowy, kawowy, oraz flawan-3-ole: monomeryczną katechinę, epikatechinę, oraz dimeryczne procyanidyny B₁ i B₂, jakkolwiek były one obecne w niewielkich ilościach. Wyjątkiem była epigalokatechina (pik 19) którą zaliczono do związków obecnych w wyższym stężeniu (Ryc. 22, Tab. 14).

Rejestrację widm ESI-MS prowadzono w trybie jonów ujemnych otrzymując sygnały jonów molekularnych elagotanin (nierejestrowanych w trybie jonów dodatnich), oraz innych identyfikowanych związków z grupy kwasów fenolowych, flawonoidów i flawan-3-oli (Tab. 13). W przypadku APCI, w trybie jonów ujemnych, sygnały jonów o masie powyżej 1000 Da nie były rejestrowane. Jakkolwiek uniemożliwiało to rejestrację jonów molekularnych dla większości elagotanin, to jonizacja APCI umożliwiła obserwację w widmach MS jonów fragmentacyjnych identyfikowanych związków. DUIS-MS umożliwiał jednoczesną detekcję jonów molekularnych przy użyciu ESI oraz jonów fragmentacyjnych, otrzymanych techniką APCI w przypadku wybranych elagotanin i prostych pochodnych glikozydowych kwasu elagowego (Tab.14).

W przypadku niektórych związków: kwasu galusowego, protokatechowego, kawowego, elagowego, katechiny, epikatechiny, epigalokatechiny, hiperozydu, izokwercetyny, 3-O-glukuronidu kwercetyny, procyanidyny B₁ i B₂, izomerów sangwiny H-10, galoilo-bis-HHDP-glukozy, oraz pentozydów, metylopetozydów i acetylpentozydów kwasu elagowego, w widmach MS dodatkowo obserwowano występowanie adduktów z TFA ($[M-[M-H+TFA]]^-$), zarówno w jonizacji ESI jak i APCI (Tab.14).

Wysoka rozdzielczość opracowanego systemu 2D LC skutkowałą separacją pentozydu kwasu elagowego i sangwiny H-2, kwasu elagowego i hiperozydu oraz izokwercetyny i 3-O-glukuronidu kwercetyny. Rozdzielono i zidentyfikowano również szereg elagotanin wcześniej nierozpoznanych w rozdzieleniach 1D LC, takich jak izomer sangwiny H-6 (pik 16), izomer sangwiny H-2 (pik 22), galoilo-HHDP-glukozę (piki 5, 7, 9) i galoilo-bis-HHDP-glukozę (pik 16, 20). Można przypuszczać, że w rozdzielaniu 1D LC z zastosowaniem fazy ruchomej ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*), epigalokatechina oraz galoilo-bis-HHDP-glukoza koeluowały z sangwiną H-6 tworząc jeden pik, co sugeruje że zawartość sangwiny H-6 może być niższa od wyznaczonej we wcześniejszych rozdzielaniach metodą HPLC [19] (Ryc. 22, Tab. 14).

Opracowany system 'on-line' 2D LC jest prosty, efektywny oraz nie wymaga użycia kilku kolumn 2D o różnej polarności dostosowanej dla każdej rozdzielanej frakcji. Zadowalająca zdolność rozdzielcza i pełna automatyzacja procesu czyni opracowany system 'on-line' 2D LC użytecznym narzędziem w badaniu złożonych ekstraktów roślinnych.

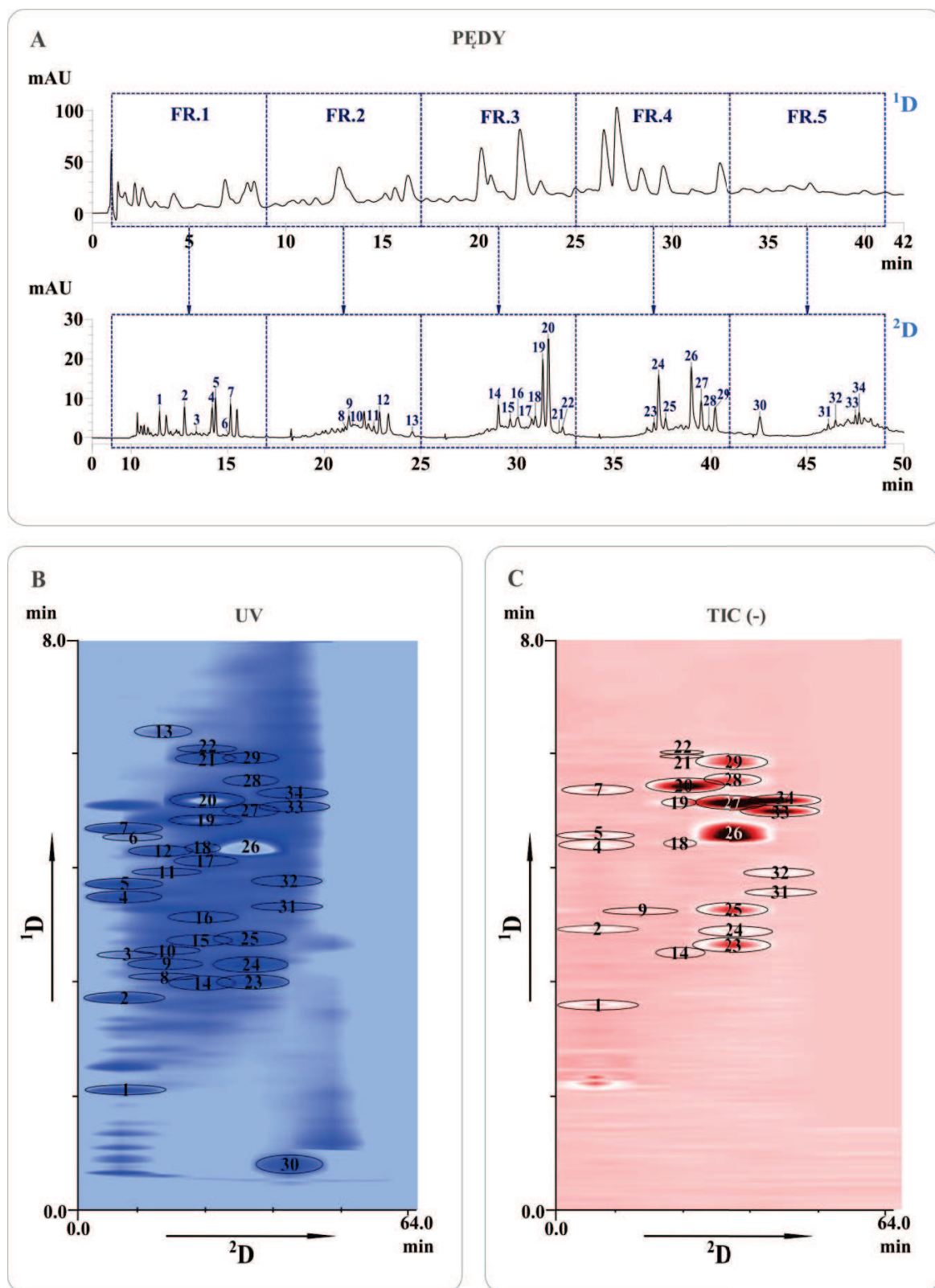


Ryc. 21 Schemat opracowanego systemu 2D LC oraz zastosowanych warunków separacji wyciągów z pędów *R. idaeus* w ¹D oraz ²D

Tab. 14 Dane chromatograficzne związków fenolowych zidentyfikowanych w pędach *R. idaeus* ‘Glen Ample’ otrzymane metodą 1D LC oraz 2D LC

nr.	związek chemiczny	tr ¹ (min)	UV λ _{max} (nm)	ESI-MS (m/z)		APCI-MS (m/z)		DUIS-MS (m/z)	
				[M-H] ⁻	[M-H] ⁻	[M-H] ⁻	[M-H] ⁻	[M-H+TFA] ⁻	[M-H] ⁻
1	kwask galusowy *	11.5	214, 268	169	283	169	283	283	–
2	izomer sangwiny H-10	12.8	251, 270	301, 783, 1567	1681	301, 481, 577, 783	–	301, 783, 1567	–
3	kwask protokatechowy *	13.4	258, 293	153	267	153	267	267	–
4	izomer sangwiny H-10	14.2	251, 270	301, 783, 1567	1681	301, 481, 577, 783	–	301, 783, 1567	–
5	galoilo-HHDP-glukoza	14.3	251, 270	301, 633	–	301, 481, 577, 633	–	633	–
6	procyanidyna B ₁ *	14.9	278	577	–	577	691	–	–
7	galoilo-HHDP-glukoza	15.1	251, 270	301, 633	–	301, 481, 577, 633	–	633	–
8	catechina *	21.1	278	289	–	289	403	–	–
9	galoilo-HHDP-glukoza	21.2	280, 301	301, 633	–	301, 481, 577, 633	–	633	–
10	procyanidyna B ₂ *	21.3	278	577	–	289, 577	403, 691	–	–
11	kwask kawowy *	22.5	235, 296 ^{sh} , 320	179	293	179	293	–	–
12	epikatechina *	22.8	278	289	–	289	403	–	–
13	nieznany związek	24.5	251, 270	–	–	–	–	–	–
14	izomer sangwiny H-10	29.0	251, 270	783, 1567	1681	301, 481, 577, 651	–	301, 783, 1567	–
15	nieznany związek	29.6	251, 270	–	–	–	–	–	–
16	galoilo-bis-HHDP-glukoza	29.9	251, 270	934, 935	–	–	–	–	–
17	nieznany związek	30.7	283	–	–	–	–	–	–
18	izomer sangwiny H-10	30.8	251, 270	783, 1567	1681	301, 481, 577, 651, 783	–	301, 783, 1567	–
19	epigalokatechina *	31.2	275, 289	305	419	305	419	–	–
20	galoilo-bis-HHDP-glukoza	31.5	251, 270	934	1049	301, 481, 577, 651, 934	1049	934	–
21	izomer sangwiny H-6	32.1	251, 270	934, 935, 1869, 1870	–	301	–	934, 935, 1869, 1870	–
22	sangwina H-2	32.3	251, 270	1103	–	–	–	1103	–
23	pentozyd kwasu elagowego	36.9	252, 359	433	–	301, 433	547	–	–
24	sangwina H-6 *	37.2	251, 270	934, 935, 1869, 1870	–	301, 609, 933, 1099	–	934, 935, 1869, 1870	–
25	izomer sangwiny H-2	37.6	252, 260	1103	–	–	–	1103	–
26	kwask elagowy *	38.9	252, 366	301	415	301	415	–	–
27	hiperozyd *	39.4	253, 349	463	577	301, 463	577	–	–
28	izokwercecytna *	39.8	254, 262 ^{sh} , 353	463	577	301, 463	577	–	–
29	3-O-glukuronid kwercecytny	40.1	254, 352	477	591	301, 477	591	–	–
30	nieznany związek	42.4	251, 270	–	–	301, 633	–	–	–
31	metypentozyd kwasu elagowego	46.0	251, 359	447	–	315, 447	561	–	–
32	metypentozyd kwasu elagowego	46.4	251, 359	447	–	315, 447	561	–	–
33	acetylpentozyd kwasu elagowego	47.5	252, 357	475	589	301, 433, 475	589	–	–
34	acetylpentozyd kwasu elagowego	47.6	252, 357	475	589	301, 433, 475	589	–	–

* związek wzorcowy ¹tr odpowiada rozdzieleniu 2D LC, pogrubienie: jony pseudomolekularne/deprotonowane



Ryc. 22 Chromatogram 2D LC ekstraktu metanolowego z pędów *R. idaeus* 'Glen Ample', numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 14

- 1D : Luna C-18 (150 $\times$ 1 mm, 3 μ m), program VI, t_G = 50 min, v = 0.1 ml/min, UV λ – 280 nm

- 2D : Kinetex PFP (100 $\times$ 4.6 mm, 2.6 μ m), program VII, t_G = 50 min, v = 1 ml/min, UV λ – 280 nm

1.2.2 Analiza polifenoli i prostych fenoli w pędach *R. occidentalis*

We wcześniejszych badaniach Katedry i Zakładu Farmakognozji, z użyciem metody LC-DAD/ESI-MS, po raz pierwszy scharakteryzowano skład chemiczny młodych pędów szeregu odmian hodowlanych gatunku *R. idaeus* [19, 31]. Ponieważ pędy maliny czarnej pozostają niezbadanym surowcem, w niniejszej pracy scharakteryzowano skład chemiczny pędów 2 odmian uprawowych *R. occidentalis* ('Bristol' i 'Litacz'), porównując ich profile z profilami pędów gatunku *R. idaeus* (odmiany 'Glen Ample') oraz gatunku pokrewnego *Rubus fruticosus* (pozyskanych ze stanu naturalnego).

1.2.2.1 Procedura analiz LC

Metanолоwe ekstrakty z pędów poddano separacji na kolumnie Kinetex PFP, z użyciem programu elucji gradientowej obejmującego wzrastające stężenie mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 v/v/v), od 10% do 40%, w 0.1% wodnym roztworze TFA (program IV) (Tab. 9). Identyfikacji związków dokonano w oparciu o porównanie widm UV oraz ESI-MS ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi [31, 183, 251-254]. W badaniach z użyciem detektora MS zastosowano technikę ESI w trybie jonów ujemnych, ponieważ uznano ją za optymalną do rejestracji jonów związków obecnych w badanych gatunkach rodzaju *Rubus*.

1.2.2.2 Analiza jakościowa związków fenolowych w pędach *R. occidentalis*

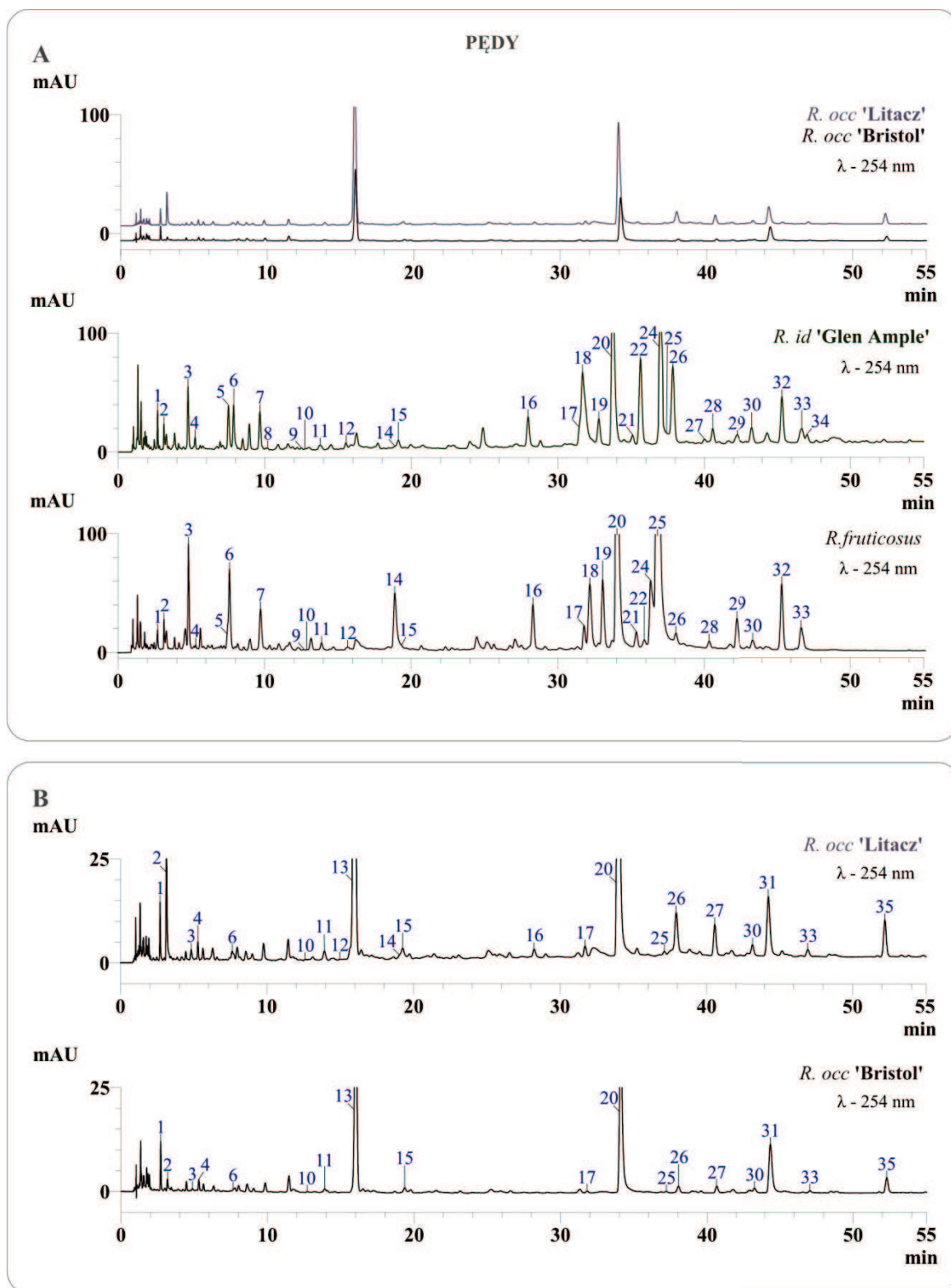
W pędach dwóch badanych odmian maliny zachodniej wykryto w 21 związków fenolowych, na tle 31 związków zidentyfikowanych w pędach *R. idaeus* 'Glen Ample' i 28 związków identyfikowanych w pędach *R. fruticosus*. Związkami obecnymi we wszystkich 3 gatunkach były kwasy galusowy (pik 1), protokatechowy (pik 4), kawowy (pik 11) i elagowy (pik 20), pentozyd (pik 17) i acetylpentozydy kwasu elagowego (piki 30, 33), izomery sangwiny H-10 (piki 3, 6, 16), katechina (pik 10), epikatechina (pik 15), procyanidyna B₂ (pik 12), izokwercetyna (pik 25) oraz 3-O-glukuronid kwercetyny (pik 26). Profil chromatograficzny pędów obydwu badanych odmian *R. occidentalis* był odmienny od profili pędów maliny właściwej i jeżyny, oraz znacznie uboższy we wszystkie związki fenolowe obecne w badanych gatunkach (Ryc. 23).

W pędach maliny zachodniej wykazano obecność 3 związków (piki 13, 31 oraz 35) o t_R 16.1, 44.3 i 52.2, jednak ich pełna identyfikacja nie była możliwa. Widmo UV pików 13 i 31 było zbliżone do widma UV katechiny. Ponadto, jon molekularny przy m/z 651 [M-H]⁻ obecny w widmie MS, otrzymany techniką ESI w trybie jonów ujemnych, wskazuje na pochodną katechiny, prawdopodobnie proantocyjanidynę. Widma UV pików 31 i 35 były podobne do widm UV flawonoidów wykazując dwa

maksima absorpcji $\lambda_{\max}$ 253 i 357 nm, jednak nie zarejestrowano żadnych charakterystycznych jonów pozwalających na ich identyfikację (Ryc. 23).

Związkami dominującymi w pędach *R. occidentalis* były kwas elagowy (pik 20) oraz przypuszczalnie nieznana pochodna katechiny/proantocyjanidyna (pik 13), podczas gdy prawie wszystkie inne identyfikowane związki były obecne w bardzo niskich bądź śladowych ilościach. W pędach *R. occidentalis* nie wykryto elagotaniminy najbardziej charakterystycznej dla rodzaju *Rubus*: sangwiny H-6, co stanowi kontrast w porównaniu do pędów maliny właściwej i jeżyny, w których sangwina H-6 jest jednym z dominujących związków. W pędach *R. occidentalis* wykryto niewielkie ilości izomerów sangwiny H-10, z czego 3 rozpoznano w odmianie 'Litacz' (piki 3, 6 i 16) oraz tylko 2 w odmianie 'Bristol' (pik 3 i 6). Na tle odmiany 'Litacz', *R. occidentalis* 'Bristol' była również uboższa w dwa związki dominujące w zespole (kwas elagowy i pochodną katechiny/proantocyjanidynę), oraz nie ujawniła obecności procyanidyny B₂ i niezidentyfikowanej elagotaniminy (pik 14) w profilu HPLC (Ryc. 23).

Interesującym z chemotaksonomicznego punktu widzenia jest wniosek odmiennym składzie chemicznym pędów *R. occidentalis* i *R. idaeus*, należących do tego samego podrodzaju (*Idaeobatus*), w przeciwieństwie do kompozycji chemicznej pędów *R. fruticosus*, z podrodzaju *Rubus*, wykazującej podobieństwo do maliny czerwonej.



Ryc. 23 Chromatogramy LC ekstraktów metanolowych z pędów odmian uprawowych *R. occidentalis*, *R. idaeus* i *R. fruticosus*, numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 15, **A** – profile pędów dwóch badanych odmian *R. occidentalis*, na tle profili *R. idaeus* 'Glen Ample' i *R. fruticosus*, **B** – profile pędów *R. occidentalis* 'Litacz' i 'Bristol'

- Kinetex PFP (100 × 4.6 mm, 2.6 μm), program IV, t_C = 65 min, v = 1 ml/min, UV λ – 254 nm

Tab. 15 Dane chromatograficzne związków fenolowych zidentyfikowanych pędach *R. occidentalis*, *R. idaeus* i *R. fruticosus* otrzymane metodą LC-DAD/ESI-MS

nr.	związek chemiczny	t _R (min)	UV λ _{max} (nm)	ESI-MS (m/z)	
				[M-H] ⁻	[M-H+TFA] ⁻
1	kwaskalusowy *	2.9	214, 270	169	—
2	nieznany związek	3.2	314	577	—
3	izomer sangwiny H-10	4.9	250, 270	301, 783, 1567	897
4	kwaskatechowy *	5.3	260, 287	153	267
5	nieznany związek	7.0	304, 329	341	455
6	izomer sangwiny H-10	7.7	250, 270	301, 783, 1567	897
7	procyjanidyna B ₁ *	9.5	277	577	691
8	nieznany związek	9.8	250, 270	617, 633	747
9	kwasklorogenowy *	12.4	235, 286 _{sh} , 325	353	467
10	katechina *	12.8	278	289	403
11	kwaskawowy *	14.0	234, 298 _{sh} , 320	179	293
12	procyjanidyna B ₂ *	15.1	277	577	691
13	pochodna katechiny/proantocyjanidyna	16.1	278	651	—
14	nieznany związek	18.9	253, 270	1567, 1718	—
15	epikatechina *	19.3	278	289	403
16	izomer sangwiny H-10	28.3	254, 270	301, 783, 1567	897
17	pentozyd kwasu elagowego	31.8	251, 351	433	—
18	izomer sangwiny H-10	32.3	254, 270	301, 783, 1567	897
19	pentozyd kwasu elagowego	33.1	252, 351	433	—
20	kwaselagowy *	34.0	253, 367	301	415
21	sangwina H-2	35.4	252, 270	1103	—
22	hiperozyd *	35.9	254, 352	463	577
23	lambertianina C	36.5	254, 270	1402	—
24	sangwina H-6 *	36.9	253, 270	934, 935, 1869, 1870	—
25	izokwercetyna *	37.2	255, 262 _{sh} , 348	463	577
26	3-O-glukuronid kwercetyny *	38.0	254, 350	477	591
27	nieznany związek	40.3	263, 351	433	—
28	metylpentozyd kwasu elagowego	40.6	243, 352	447	561
29	nieznany związek	42.1	230, 273	447, 935, 1083	—
30	acetylpentozyd kwasu elagowego	43.3	250, 353	475	—
31	nieznany flawonoid	44.3	253, 357	—	—
32	nieznany związek	45.3	230, 273	1117	1231
33	acetylpentozyd kwasu elagowego	46.6	251, 351	475	589
34	acetylpentozyd kwasu elagowego	47.1	250, 349	475	589
35	nieznany flawonoid	52.2	253, 357	—	—

* związek wzorcowy, **pogrubienie**: jony pseudomolekularne/deprotonowane

1.2.3 Analiza profili związków fenolowych pędów *R. idaeus* w cyklu wegetacyjnym

Uwzględniając tradycyjne zastosowanie zbieranych zimą pędów maliny właściwej jako surowca przeciwprzebiegowego [15], postanowiono ocenić profile metabolitów wtórnych w cyklu wegetacyjnym pędów maliny właściwej zebranych z trzech naturalnych stanowisk Trójmiejskiego Parku Krajobrazowego (P1-3).

1.2.3.1 Procedura analiz LC

Metanolowe ekstrakty z pędów poddano separacji na kolumnie Kinetex PFP, z użyciem programu elucji gradientowej obejmującego wzrastające stężenie mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 v/v/v), od 10% do 40%, w 0.1% wodnym roztworze TFA (program IV) (Tab. 9). Identyfikacji związków dokonano w oparciu o porównanie widm UV oraz MS ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi [31, 183, 251-254]. W identyfikacji MS zastosowano technikę ESI w trybie jonów ujemnych, ponieważ uznano ją za optymalną do rejestracji jonów identyfikowanych związków.

1.2.3.2 Analiza jakościowa związków fenolowych pędów *R. idaeus* w cyklu wegetacyjnym

Profile pędów maliny właściwej zebranych z 3 stanowisk naturalnych (P1-3) były zbliżone do pędów *R. idaeus* odmian uprawowych [19, 31], z kwasem elagowym (pik 20) oraz sangwiną H-6 (pik 24) jako związkami dominującymi w zespole. Najwyższe stężenia badanych fenoli (ocenione na podstawie intensywności pików poszczególnych związków) obserwowano w okresie wiosennym, jesienią odnotowując ich wyraźny spadek, który utrzymywał się w pędach zimowych. Powyższą zależność wykazano dla izomerów sangwiny H-10 (piki 3, 6, 16 i 18), sangwiny H-2 (pik 21), dimerycznych procyanidyn: B₁ (pik 7) i B₂ (pik 12), jak również szeregu niezidentyfikowanych związków (pik 2, 5, 8, 14, 29, 32). Wszystkie w/w związki były obecne w niewielkich ilościach w pędach wiosennych i letnich, oraz ich poziomy spadały do śladowych w pędach jesiennych i zimowych (Ryc. 24).

Odmianą zależność obserwowano w przypadku kwasów fenolowych: galusowego (pik1), protokatechowego (pik 4), i kawowego (pik 11) oraz pochodnych kwasu elagowego: pentozydów (piki 17, 19), metylopentozydu (pik 28) oraz acetylopentozydów (piki 30, 33, 34), dla których największy spadek zawartości odnotowano pomiędzy pędami wiosennymi a letnimi, z utrzymującymi się niskimi poziomami w pędach jesiennych i zimowych. Kwas chlorogenowy był obecny w śladowych ilościach w pędach wiosennych i letnich, oraz niewykrywalny w pędach jesiennych i zimowych (Ryc. 24).

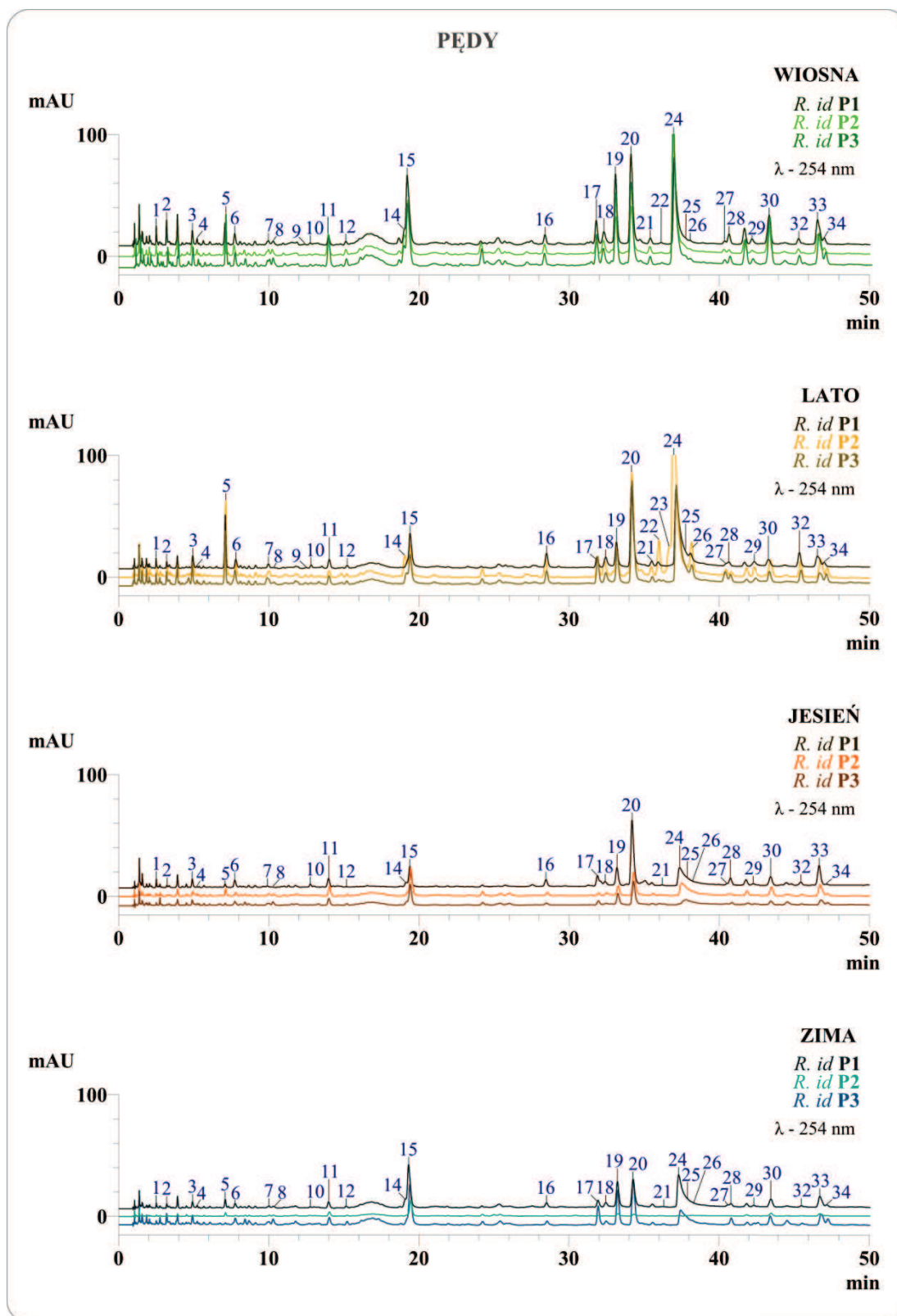
W przypadku związków dominujących: sangwiny H-6 oraz kwasu elagowego, odnotowano zróżnicowanie w poziomach ich zawartości pomiędzy pędami pochodzącymi z różnych stanowisk. W pędach z dwóch stanowisk (P1 i P3) poziomy sangwiny H-6 oraz kwasu elagowego są porównywalne w zbiorach wiosennych i letnich, natomiast w przypadku jednego stanowiska (P2), obserwowany był

wzrost poziomu obydwu związków w okresie letnim. Jesienią odnotowano spadek poziomu sangwiny H-6 w pędach ze wszystkich 3 stanowisk. Podobny spadek kwasu elagowego odnotowano w pędach ze stanowisk P2 i P3, podczas gdy w materiale roślinnym z P1 utrzymywał się na wysokim poziomie. Poziom kwasu elagowego w zimowych pędach P1 spada do poziomu kwasu elagowego w pędach ze stanowisk P2 i P3 obserwowanego jesienią, natomiast zawartość sangwiny H-6 nieznacznie wzrasta w pędach P1 i P3 (Ryc. 24).

Odmienne wahania zawartości w cyklu wegetacyjnym obserwowano dla pochodnej flawan-3-olu: epikatechiny (pik 15) oraz flawonoidów: hiperozydu (pik 22) i 3-O-glukuronidu kwercetyny (pik 26). Najwyższe poziomy epikatechiny, podobnie jak w przypadku większości identyfikowanych związków, obserwowano w pędach ze zbioru wiosennego, ze stopniowym spadkiem odnotowanym w zbiorach letnich i jesiennych. W pędach zimowych odnotowano natomiast ponowny wzrost poziomu epikatechiny, która dominowała w zespole związków czynnych pędów 3 stanowisk, jakkolwiek w przypadku jednego stanowiska (P3) towarzyszył jej na zbliżonym poziomie kwas elagowy. Śladowe ilości bądź całkowity brak hiperozydu oraz 3-O-glukuronidu kwercetyny odnotowano w pędach ze wszystkich 3 stanowisk w okresie od jesieni do wiosny, obserwując ich wzrost jedynie w pędach ze zbioru letniego (Ryc. 24). Katechinę (pik 10) oraz pentozyd kwercetyny (pik 27) identyfikowano w śladowych ilościach we wszystkich stadiach cyklu wegetacyjnego. Ocena zmienności zawartości izokwercetyny (pik 25) nie była możliwa ze względu na jej koelucję z sangwiną H-6.

Profile metabolitów wtórnych w pędach pochodzących ze stanu naturalnego były bardzo zbliżone na przestrzeni całego cyklu wegetacyjnego, z nielicznymi wyjątkami dotyczącymi pojedynczych związków w pędach z jednego stanowiska (P2). Pędy P2 ze zbioru wiosennego i letniego charakteryzowały się wyraźnie wyższymi poziomami sangwiny H-6 w porównaniu do pędów wiosennych i letnich ze stanowisk P1 i P3. Ponadto pędy P2 zebrane latem jako jedyne zawierały lambertianinę C, oraz wyraźnie wyższe poziomy hiperozydu oraz 3-O-glukuronidu kwercetyny. Natomiast pędy zimowe P2 zawierały śladowe ilości wszystkich identyfikowanych związków, z wyjątkiem epikatechiny (pik 15), w porównaniu do pędów P1 i P3 (Ryc. 24).

Na podstawie otrzymanych wyników można wysunąć wniosek że najwyższe stężenia aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych występują w pędach wiosennych, a więc zbiór surowca do celów leczniczych powinien być prowadzony we wskazanym okresie wegetacyjnym. Jednocześnie po raz pierwszy scharakteryzowano skład chemiczny pędów *R. idaeus* pochodzących ze stanu naturalnego, nie wykazując istotnych różnic w kompozycjach związków czynnych w porównaniu z odmianami hodowlanymi.



Ryc. 24 Chromatogramy LC ekstraktów metanolowych z pędów *R. idaeus* zebranych z 3 stanowisk naturalnych (P1-3) w cyklu wegetacyjnym, numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 15

- Kinetex PFP (100 × 4.6 mm, 2.6 μm), program IV, $t_C = 65$ min, $v = 1$ ml/min, UV $\lambda = 254$ nm

2. Analiza fitochemiczna surowców gatunku *L. caerulea* var. *edulis*

2.1 Analiza metabolitów wtórnych w owocach odmian *L. caerulea* var. *edulis*

2.1.1 Procedura analiz LC

W analizie różnych grup metabolitów wtórnych w owocach *L. caerulea* var. *edulis* zastosowano kolumnę Discovery HS C18 i program elucji gradientowej VIII, obejmujący wzrost stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, v/v/v), w 0.1% wodnym roztworze TFA od 12 do 100% (Tab. 10). Kolumny z żel krzemionkowym modyfikowanym grupami C-18, są jedynym typem kolumn stosowanym dotychczas w analizie fitochemicznej owoców *L. caerulea* metodą HPLC [156-167].

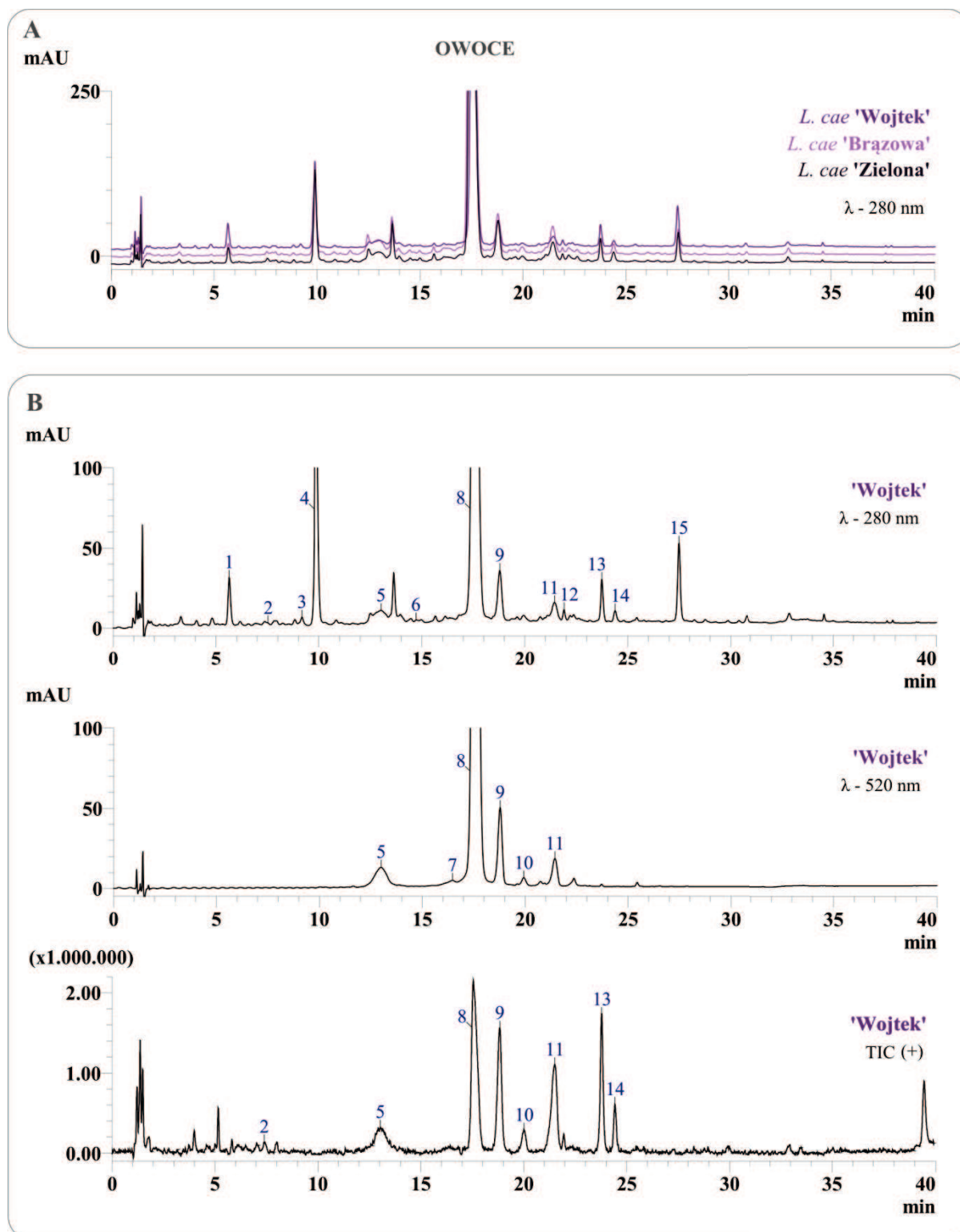
2.1.2 Analiza jakościowa związków fenolowych w owocach *L. caerulea* var. *edulis*

Zespoły związków fenolowych należących do antocyjanów, flawonoli, flawan-3-oli oraz fenolokwasów w metanолоwych ekstraktach z owoców 3 odmian *L. caerulea* var. *edulis* ('Wojtek', 'Brązowa', 'Zielona') porównano z użyciem LC-DAD w sprzężeniu z detektorem ESI-MS. Poszczególne związki identyfikowano w oparciu o kochromatografię ze związkami wzorcowymi i otrzymanymi widmami UV i MS, na tle zebranych danych literaturowych [156-167].

Badane odmiany charakteryzowały się zbliżonym profilem chromatograficznym (Ryc. 25 A), potwierdzającym obecność 3-O-glukozydu cyjanidyny (pik 8) jako dominującego związku, wraz z towarzyszącymi mu 3,5-O-diglukozydem cyjanidyny (pik 5), 3-O-rutynozydem cyjanidyny (pik 9), 3-O-glukozydem pelargonidyny (pik 10), 3-O-glukozydem peonidyny (pik 11), hiperozydem (pik 12), rutyną (pik 13), izokwercetyną (pik 14) oraz kwasami: chlorogenowym (pik 1), neochlorogenowym (pik 4) i 3,5-O-dikawoilochoinowym (pik 15) (Ryc. 25 B, Tab. 16).

Wymienione kwasy fenolowe identyfikowano w oparciu o wartości m/z jonów molekularnych w trybie jonów ujemnych, natomiast flawonoidy dobrze jonizowały w warunkach ESI w trybie jonów dodatnich (Tab. 16). Wyniki rozdzieleń HPLC są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami o składzie chemicznym owoców polskich odmian *L. caerulea* var. *edulis*, zarówno w zakresie identyfikowanych związków, jak i niewielkich różnic w profilach poszczególnych odmian [159, 163, 164].

Ponadto, poza w/w związkami w surowcach pochodzenia krajowego, stwierdzono po raz pierwszy obecność procyanidyny B₂, obok katechiny, epikatechiny (w oparciu parametry chromatograficzne t_R, UV i MS, odpowiadające związkom wzorcowym), oraz 3,5-O-diglukozydu peonidyny (w oparciu o otrzymane widma UV i ESI-MS oraz dane literaturowe) (Ryc. 25 B, Tab. 16) [259]. Większość wymienionych związków była wcześniej identyfikowana jako składniki owoców *L. caerulea* [156], z wyjątkiem procyanidyny B₂, dotychczas nierozpoznanej w owocach wiciorkrzewu siniego.



Ryc. 25 Chromatogramy LC ekstraktów metanolowych z owoców badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*, numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 16
A – profile owoców *L. caerulea* var. *edulis* odmian 'Wojtek', 'Brązowa' i 'Zielona', **B** – profile owoców *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek'

- Discovery HS C-18 (150 × 2.1 mm, 3 μ m), program VIII, t_G = 40 min, v = 0.3 ml/min

Jedyną informacją o procyanidynach jako akumulowanych w owocach wiciokrzewów (opublikowaną krótko po przedstawieniu powyższych wyników na łamach *Academia Journal of Medicinal Plants*) jest praca Wojdyło i wsp. [161] o obecności tri- i tetrametrów proantocyjanidyn w owocach *L. caerulea* var. *kamtschatica*.

Ze względu na niewielkie różnice ilościowe pomiędzy poszczególnymi kultywarami, oraz fakt że związki czynne badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis* pochodzących z tego samego źródła (Lębork) analizowali ilościowo Kusznierevich i wsp. [159], w niniejszej pracy analizę związków fenolowych ograniczono do oznaczenia jakościowego.

Tab. 16 Dane chromatograficzne związków fenolowych zidentyfikowanych w owocach *L. caerulea* var. *edulis* otrzymane metodą LC-DAD/ESI-MS

nr.	związek chemiczny	t _R (min)	UV λ _{max} (nm)	ESI-MS (m/z)	
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
1	kwas chlorogenowy *	5.7	215, 286 _{sh} , 326	–	353
2	procyanidyna B ₂ *	7.5	279	579	–
3	katechina *	9.2	279	291	–
4	kwas neochlorogenowy	9.9	215, 300 _{sh} , 324	–	355
5	3,5-O-diglukozyd cyjanidyny *	13.0	276, 513	611	–
6	epikatechina *	14.8	279	291	–
7	3,5-O-diglukozyd peonidyny	16.4	279, 519	625	–
8	3-O-glukozyd cyjanidyny *	17.7	279, 517	449	–
9	3-O-rutynozyd cyjanidyny *	18.9	279, 517	595	–
10	3-O-glukozyd pelargonidyny *	20.0	269, 504	433	–
11	3-O-glukozyd peonidyny *	21.4	279, 519	463	–
12	hiperozyd *	21.9	253, 349	465	–
13	rutyna *	23.8	254, 262 _{sh} , 352	611	–
14	izokwercetyna *	24.3	254, 262 _{sh} , 353	465	–
15	kwas 3,5-O-dikawoilochinowy	27.5	215, 300 _{sh} , 326	–	515

* związek wzorcowy, **pogrubienie:** jony pseudomolekularne/deprotonowane

2.1.3 Analiza jakościowa i ilościowa irydoidów w owocach *L. caerulea*

Wobec nielicznych doniesień o obecności glikozydów irydoidowych w owocach *L. caerulea* var. *edulis* [178, 179], postanowiono ocenić ich występowanie w owocach 3 badanych odmian kultywarowych wiciokrzewu siniego ('Wojtek', 'Brązowa', 'Zielona'). Rozdzielenia prowadzono w tych samych warunkach jakie stosowano w analizie związków polifenolowych (kolumna Discovery HS C18, program elucji gradientowej VIII) przy długości fali λ – 236 nm.

Dotychczas w analizie HPLC związków irydoidowych w matrycach pochodzenia roślinnego wykorzystywano przede wszystkim technikę RP-HPLC, stosując jako fazę stacjonarną żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi, aminowymi czy fenyłowymi. Większość rozdzieleń prowadzono na żelach krzemionkowych C-18, w tym stanowiących złożę monolityczne [260, 261]. Ponadto dla rozpoznania składu frakcji irydoidowej w niektórych taksonach stosowano technikę 2D LC [211, 212].

W badaniach chromatograficznych w niniejszej pracy zastosowano system HPLC sprzężony z detektorami DAD oraz ESI-MS i APCI-MS, porównując efektywność dwóch typów jonizacji: ESI i APCI, w dodatnim oraz ujemnym trybie jonów.

ESI jest jedną z najbardziej popularnych technik tzw. „łagodnej jonizacji” umożliwiających obserwację jonu pseudomolekularnego i praktycznie nie powodującej jego fragmentacji do jonów potomnych. Obok ESI, jonizacja APCI stanowi drugą najczęściej wykorzystywaną technikę w spektrometrach mas [262].

Obydwa źródła jonów mogą pracować pod ciśnieniem atmosferycznym, co zmniejsza problemy związane z usunięciem rozpuszczalnika i przeprowadzeniem analitu do fazy gazowej. Ponadto charakteryzują się wysoką czułością oraz możliwością pracy przy wysokich przepływach fazy ruchomej (do 3 ml/min). ESI i APCI są wykorzystywane w badaniach związków o małej masie cząsteczkowej, i są względem siebie komplementarnymi metodami jonizacji, ponieważ ESI pozwala na oznaczanie analitów o średniej lub dużej polarności o masach do 105 g/mol, a APCI na oznaczanie analitów o małej lub średniej polarności o masach rzędu 102 – 103 g/mol. Pomimo że ESI-MS jest jedną z najszerzej stosowanych technik monitorowania jonów w analizach HPLC surowców pochodzenia roślinnego, nadal trwają dyskusje dotyczące mechanizmu tworzenia jonów w fazie gazowej [211, 263-265]. Obserwowano, że w trybie jonów ujemnych intensywność pików jonów pseudomolekularnych irydoidów jest znacząco wyższa w porównaniu do trybu jonów dodatnich [266]. Ponadto, w badaniach identyfikacyjnych HPLC-MS, obecność kwasów organicznych w fazie ruchomej: octowego czy mrówkowego skutkowała w widmach masowych ESI irydoidów obserwacją adduktów typu $[M-H+HCOO]^-$, $[M-H+CH_3COO]^-$ [267].

W analizie HPLC-DAD/ESI-MS/APCI-MS użyto mieszaninę rozpuszczalników zawierającą 0.1% TFA. TFA nie jest powszechnie stosowanym kwasem w analizach identyfikacyjnych czy ilościowych HPLC-MS, ze względu na to że jako składnik fazy ruchomej ogranicza czułość detekcji MS. Z danych literaturowych wynika [211, 262-272], że powszechnie stosuje się roztwory kwasów organicznych takich jak HCOOH lub CH₃COOH. Jeżeli stosowany jest TFA, to jego stężenie w fazie ruchomej jest zmniejszane do 0.0025%.

Rozdzielenie HPLC zespołu związków irydoidowych uzyskano w t_G 40 min. W oparciu o otrzymane widma UV, zidentyfikowano 6 związków irydoidowych (związki 1-6) o maksimach absorpcji w zakresie λ_{max} 234-238 nm, przy czym związek 6 charakteryzowało przebiegięcie (sh) w widmie UV przy λ_{max} 278 nm (Ryc. 26, Tab. 17). Obserwowane maksima absorpcji odpowiadają maksimum widm UV związków irydoidowych, niemniej jednak w dostępnej literaturze nie odnotowano informacji o irydoidach, których widma UV ujawniłyby przebiegięcie w zakresie obserwowanym dla związku 6 [211, 262-268, 270, 271].

W oparciu o związki wzorcowe, trzy spośród sześciu rozdzielonych irydoidów rozpoznano jako kwas loganowy (związek 1, t_R 11.1 min), swerozyd (związek 4, t_R 20.7 min.) i loganinę (związek 5, t_R 21.8 min). Natomiast charakter chemiczny pozostałych trzech irydoidów (związki 2, 3 i 6, t_R 17.3, 19.4, 24.2 min odpowiednio) ustalono głównie w oparciu o porównanie danych widm MS z literaturą (Ryc. 26, Tab. 17) [273-275].

W jonizacji ujemnej, zarówno w widmach ESI jak i APCI badanych związków irydoidowych, obserwowano wysoką intensywność jonów stanowiących addukty z TFA ([M-H+TFA]⁻), przy bardzo niskiej intensywności sygnałów jonów pseudomolekularnych (Ryc. 27-32), co jest zgodne z danymi literaturowymi odnoszącymi się do widm ESI-MS irydoidów wykonanych w trybie jonów ujemnych z użyciem różnych kwasów organicznych jako składników fazy ruchomej [262-267].

Dane literaturowe wskazują na brak adduktów z kwasami organicznymi jako składnikami faz ruchomych, w widmach ESI-MS irydoidów posiadających grupę karboksylową lub aldehydową. Jest to związane z faktem że obydwie grupy odszczepiają łatwo proton i są wrażliwe na jonizację, co skutkuje obecnością głównie jonów molekularnych [M-H]⁻ w widmach ESI-MS w trybie jonów ujemnych [267]. Na podstawie otrzymanych widm MS można by wnioskować, że związki irydoidowe: 2, 3 i 6 mogą nie posiadać takich grup funkcyjnych. Jednak w otrzymanym widmie ESI-MS w trybie jonów ujemnych kwasu loganowego (związek 1), posiadającego grupę karboksylową, intensywność jonu pseudomolekularnego przy m/z 375 [M-H]⁻ była bardzo niska, przy dominującym jonie adduktu z TFA (Ryc. 27).

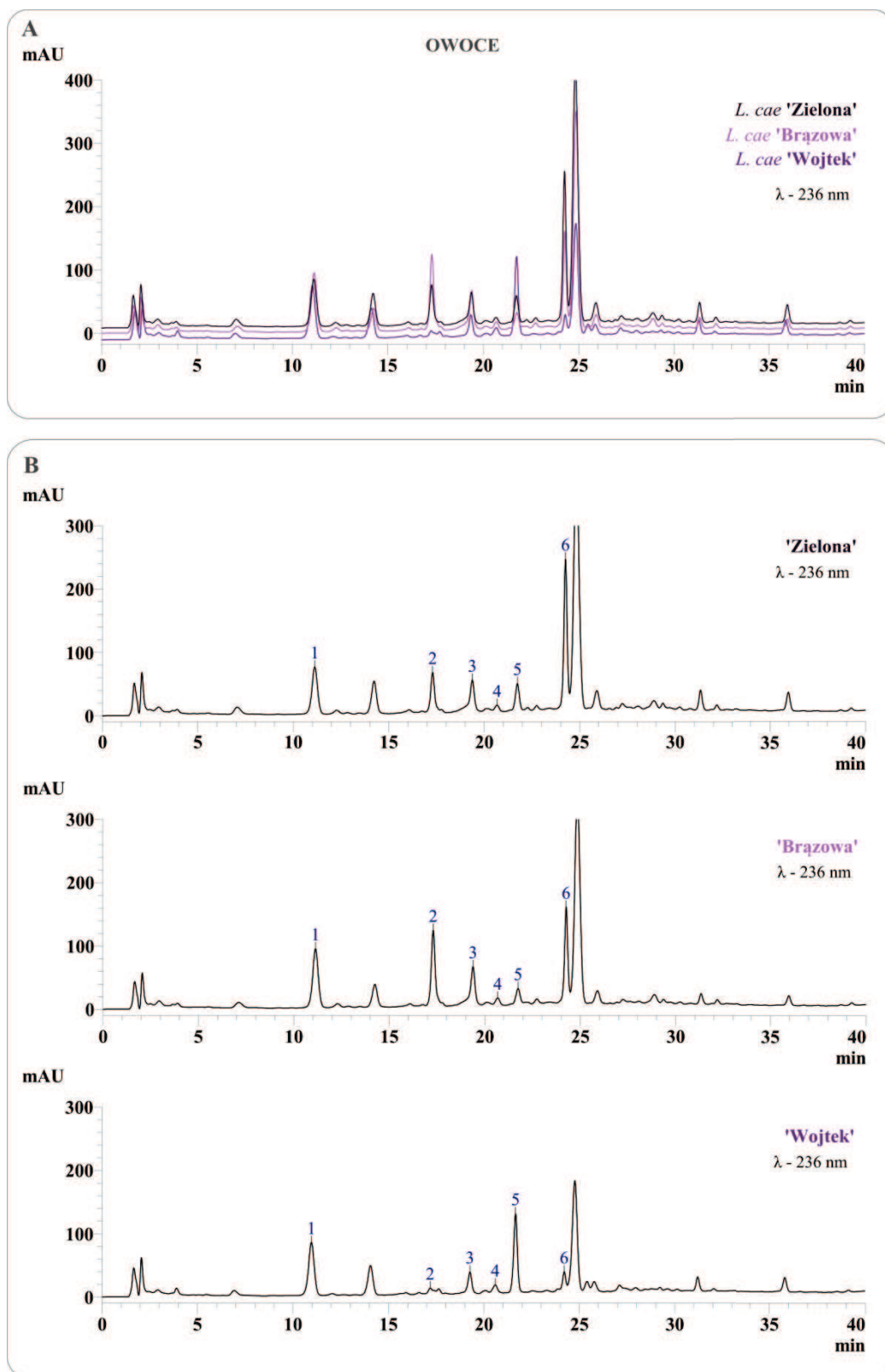
W większości otrzymanych widm ESI/APCI-MS związków 1-6, w trybie jonów dodatnich, sygnały jonów pseudomolekularnych charakteryzowały się wysoką intensywnością, i towarzyszył im szereg sygnałów innych jonów o różnej intensywności odpowiadających adduktom $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$ czy $[M+K]^+$ oraz jonowi $[M+H-H_2O]^+$ powstającemu po odszczepieniu cząsteczki wody. Wyjątkami były widma ESI (+) związków 1 i 5, charakteryzujące się bardzo niską intensywnością jonu pseudomolekularnego (Ryc. 27-32).

Na otrzymanych widmach MS analizowano jony o wartościach $m/z \geq 300$ (uwzględniając brak jonów fragmentacyjnych pochodzących z rozpadu jonów molekularnych), dlatego w widmach MS związków o charakterze glikozydów: swerozydu, kwasu loganowego czy loganiny, nie ujawniono obecności jonów $[M+H-162]^+/[M-H-162]^-$ (Ryc. 27-32).

W widmach masowych APCI (+) i ESI (+) związków 2, 3 i 6 wykazano obecność jonów fragmentacyjnych przy m/z 377 $[M+H-132]^+$ (związki 2 i 3) oraz przy m/z 391 $[M+H-132]^+$ (związek 6) co wskazuje na obecność fragmentu pentozy: arabinozy lub ksylozy. W większości wyodrębnionych ze świata roślinnego glikozydów irydoidowych obecne są glukoza lub arabinoza, stąd można wnioskować, że w związkach 2, 3 i 6 najprawdopodobniej występuje arabinoza [266, 267].

Dotychczas wyodrębniono dwa izomery 7-O-arabinozydu demetylosekologanolu z kwiatów *Lonicerae Flos*, surowca leczniczego Tradycyjnej Medycyny Chińskiej, w którego skład wchodzi kwiaty różnych gatunków z rodzaju *Lonicera* [273], oraz 6'-O-arabinozyd demetylosekologanolu z pąków kwiatowych *Lonicera macranthoides* [274]. Dwa izomery 7-O-arabinozydu demetylosekologanolu eluowały z kolumny C-18 z wartościami t_R 17.65 min i t_R 19.68 min [273], co stanowi wartości t_R podobne do obserwowanych dla związków 2 i 3 (Δt_R około 2 min).

Najwyższe intensywności sygnałów jonów pseudomolekularnych $[M+H]^+$ związków 2, 3 i 6 obserwowano w widmach APCI (+) przy m/z 509 dla związków 2 i 3 oraz przy m/z 523 dla związku 6, tak jak w widmach otrzymanych w trybie jonów dodatnich kwasu loganowego i loganiny (Ryc. 28, 29, 32). Ponadto w widmach APCI (+) związków 2 i 3 oraz 6 obserwowano wyższą ale zróżnicowaną (zależnie od związku) intensywność sygnałów jonów fragmentacyjnych $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-2H_2O]^+$, $[M+H-H_2O-162]^+$, $[M+H-H_2O-132]^+$, $[M+H-132]^+$. Również podobnie jak w widmach MS kwasu loganowego i loganiny, w widmach APCI i ESI związków 2, 3 i 6, otrzymanych w trybie jonów ujemnych, obserwowano obecność adduktów przy m/z 621 $[M-H+TFA]^-$ i m/z 635 $[M-H+TFA]^-$ odpowiednio (Ryc. 26-32). Związki 2, 3 i 6 wstępnie rozpoznano jako pentozydy kwasu loganowego (2, 3) oraz loganiny (6).



Ryc. 26 Chromatogramy LC ekstraktów metanolowych owoców badanych odmian *L. caerulea*, numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 17

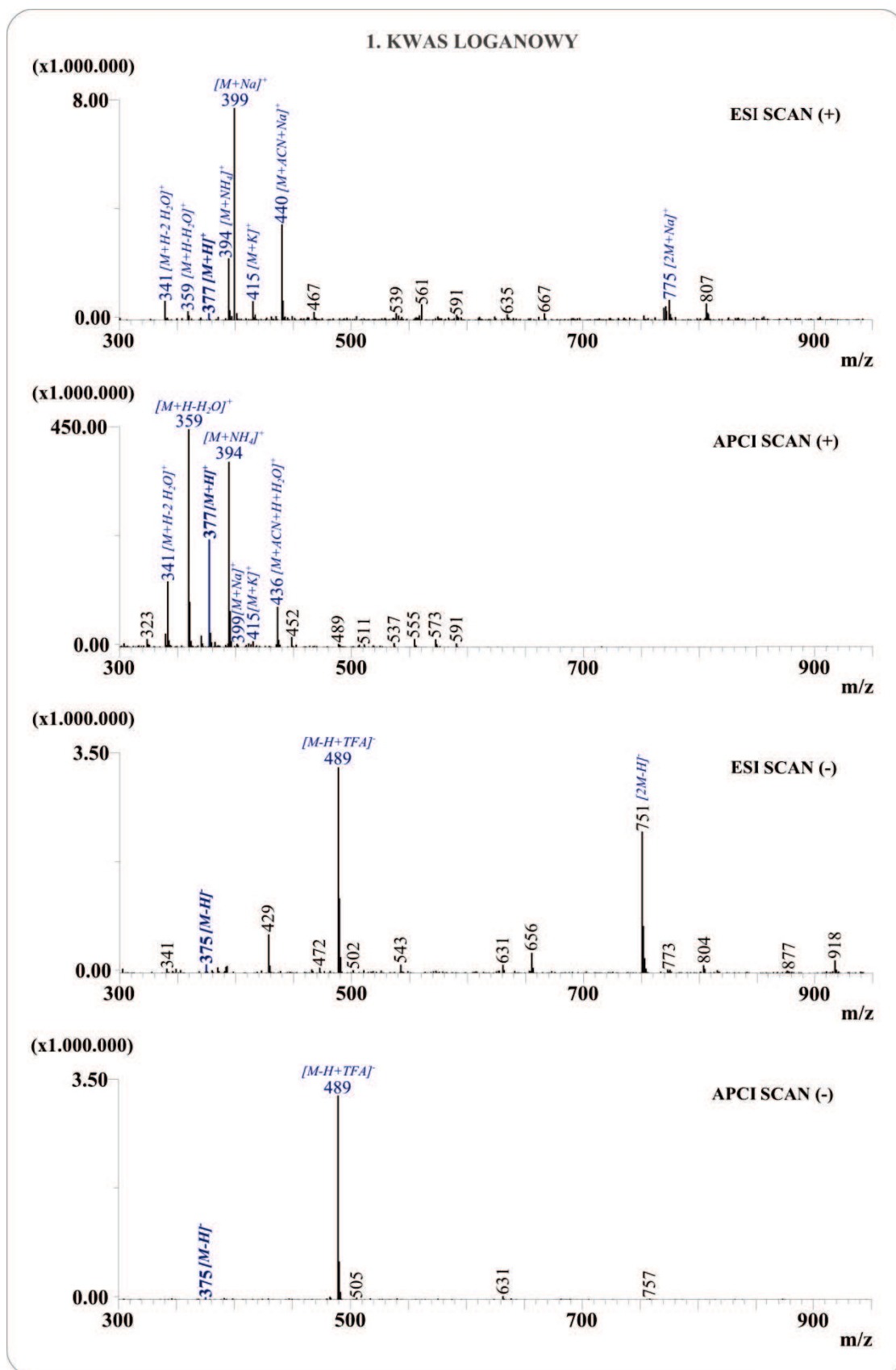
A, B – profile owoców *L. caerulea* var. *edulis* odmian 'Wojtek', 'Brązowa' i 'Zielona'

- Discovery HS C-18 (150 × 2.1 mm, 3 μ m), program VIII, t_G = 40 min, v = 0.3 ml/min

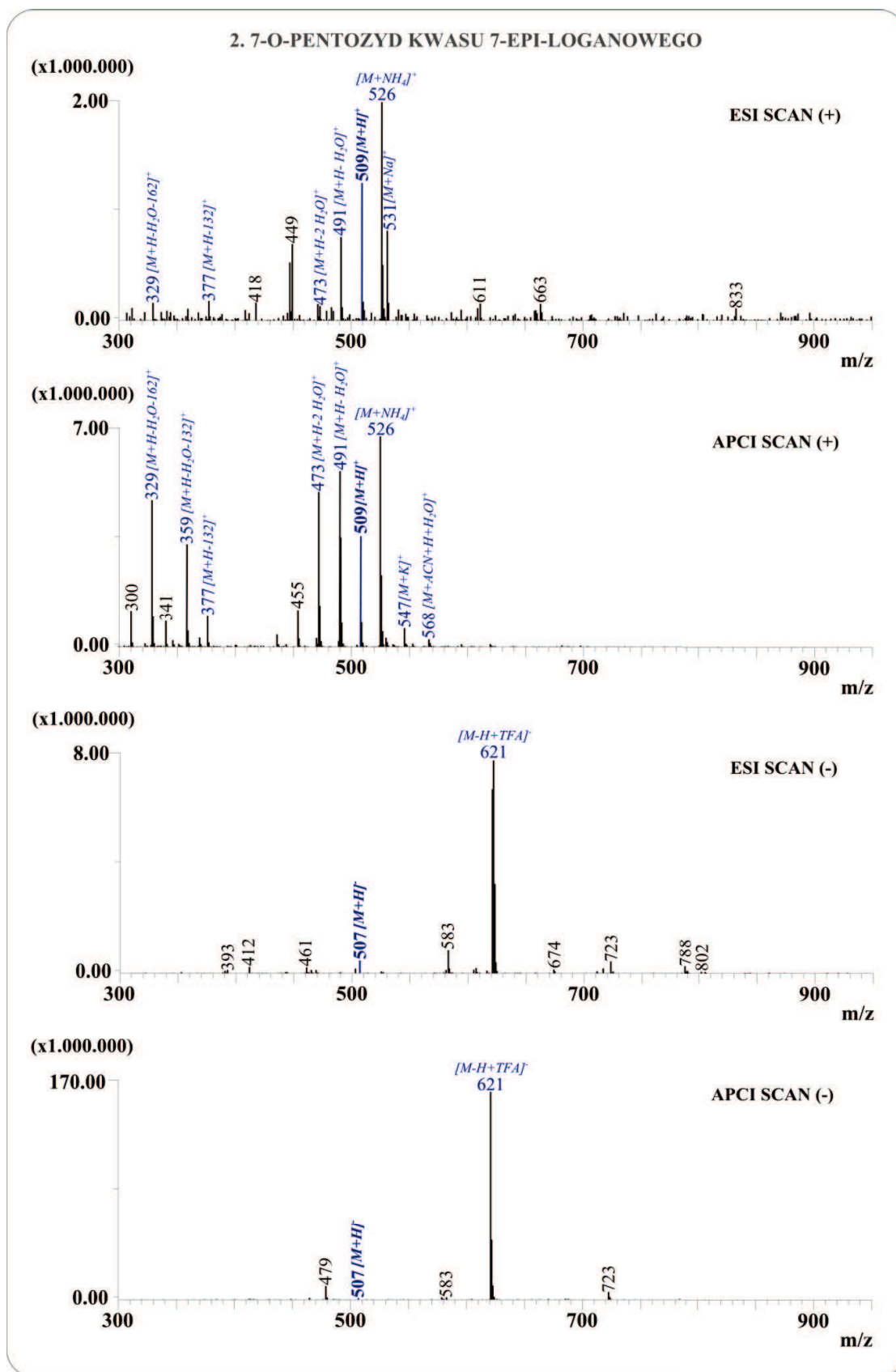
Tab. 17 Dane chromatograficzne związków irydoidowych zidentyfikowanych w owocach *L. caerulea* var. *edulis* otrzymane metodą LC-DAD/ESI-MS, APCI-MS

nr.	związek chemiczny	t _R (min)	UV λ _{max} (nm)	ESI-MS / APCI-MS (m/z)	
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
1	kwas loganowy *	11.1	236	341 [M+H-2H ₂ O] ⁺	
				359 [M+H-H ₂ O] ⁺	
				377 [M+H] ⁺	375 [M-H] ⁻
				394 [M+NH ₄] ⁺	489 [M-H+TFA] ⁻
				399 [M+Na] ⁺	751 [2M-H] ⁻
				415 [M+K] ⁺	
				440 [M+ACN+Na] ⁺	
2	7-O-pentozyd kwasu 7-epi-loganowego	17.3	236	329 [M+H-H ₂ O-162] ⁺ APCI	
				359 [M+H-H ₂ O-132] ⁺ APCI	
				377 [M+H-132] ⁺	
				473 [M+H-2H ₂ O] ⁺	
				491 [M+H-H ₂ O] ⁺	507 [M-H] ⁻
				509 [M+H] ⁺	621 [M-H+TFA] ⁻
				526 [M+NH ₄] ⁺	
				531 [M+Na] ⁺ ESI	
				547 [M+K] ⁺ APCI	
3	7-O-pentozyd kwasu loganowego	19.4	236	568 [M+ACN+H+H ₂ O] ⁺ APCI	
				329 [M+H-H ₂ O-162] ⁺ APCI	
				359 [M+H-H ₂ O-132] ⁺ APCI	
				377 [M+H-132] ⁺	
				473 [M+H-2H ₂ O] ⁺	
				491 [M+H-H ₂ O] ⁺	507 [M-H] ⁻
				509 [M+H] ⁺	621 [M-H+TFA] ⁻
				526 [M+NH ₄] ⁺	
				531 [M+Na] ⁺	
4	swerozyd *	20.7	243	547 [M+K] ⁺	
				359 [M+H] ⁺	
				381 [M+Na] ⁺ ESI	
				397 [M+K] ⁺ ESI	
				422 [M+ACN+Na] ⁺ ESI	471 [M-H+TFA] ⁻
				717 [2M+H] ⁺	
5	loganina *	21.8	236	739 [2M+Na] ⁺ ESI	
				373 [M+H-H ₂ O] ⁺	
				391 [M+H] ⁺	
				408 [M+NH ₄] ⁺	
				413 [M+Na] ⁺	389 [M-H] ⁻ ESI
				429 [M+K] ⁺ ESI	501 [M-H+TFA] ⁻
				454 [M+ACN+Na] ⁺ ESI	
6	7-O-pentozyd loganiny	24.2	236, 278sh	803 [2M+Na] ⁺ ESI	
				343 [M+H-H ₂ O-162] ⁺ APCI	
				373 [M+H-H ₂ O-132] ⁺ APCI	
				391 [M+H-132] ⁺	
				505 [M+H-H ₂ O] ⁺	
				523 [M+H] ⁺	635 [M-H+TFA] ⁻
				540 [M+NH ₄] ⁺	
				545 [M+Na] ⁺	
				561 [M+K] ⁺	
				586 [M+ACN+Na] ⁺ ESI	

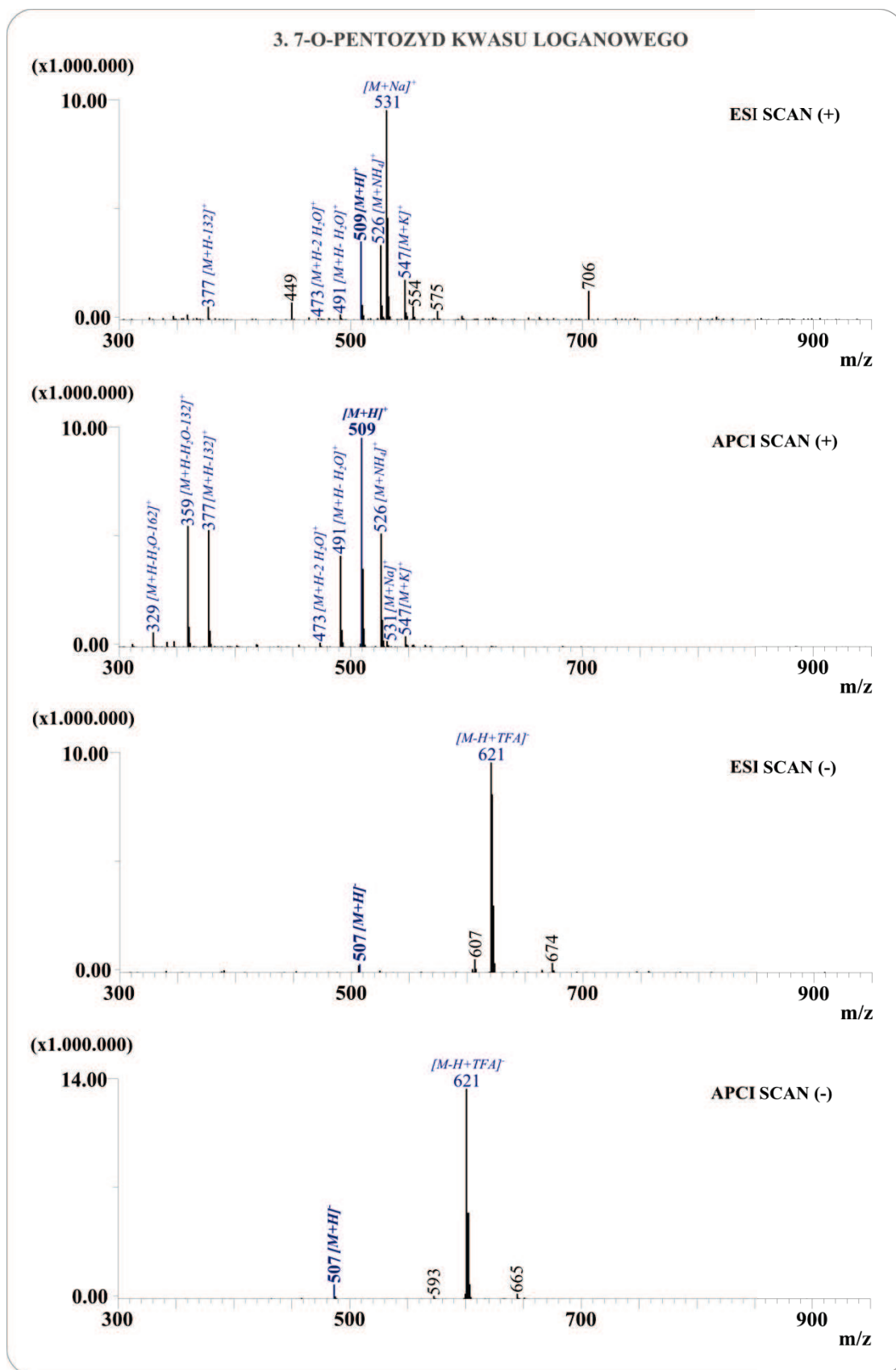
* związek wzorcowy, ^{ESI} wykrywany tylko w widmie ESI-MS, ^{APCI} wykrywany tylko w widmie APCI-MS



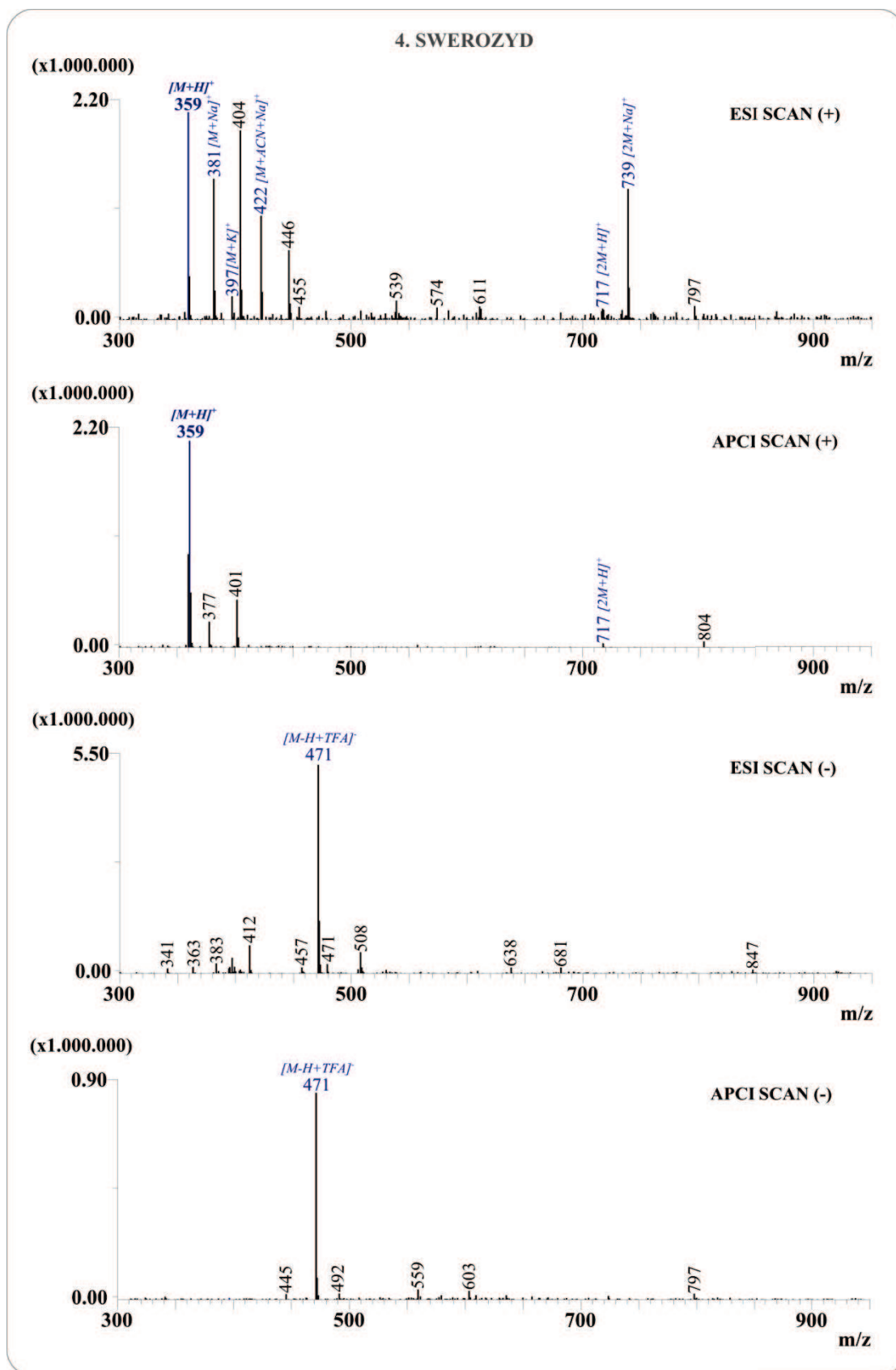
Ryc. 27 Widma ESI/APCI-MS związku 1 identyfikowanego w owocach badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*



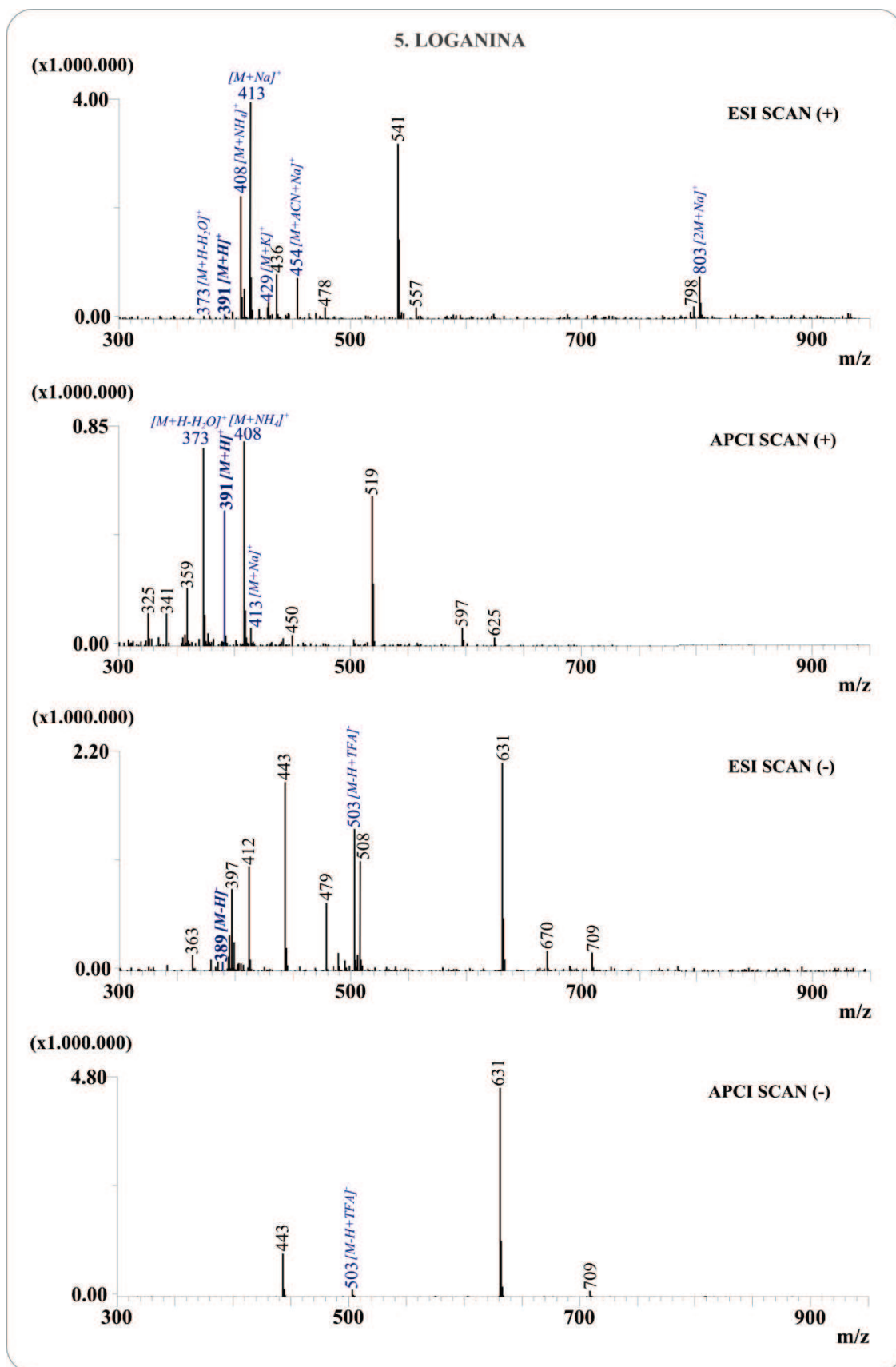
Ryc. 28 Widma ESI/APCI-MS związku 2 identyfikowanego w owocach badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*



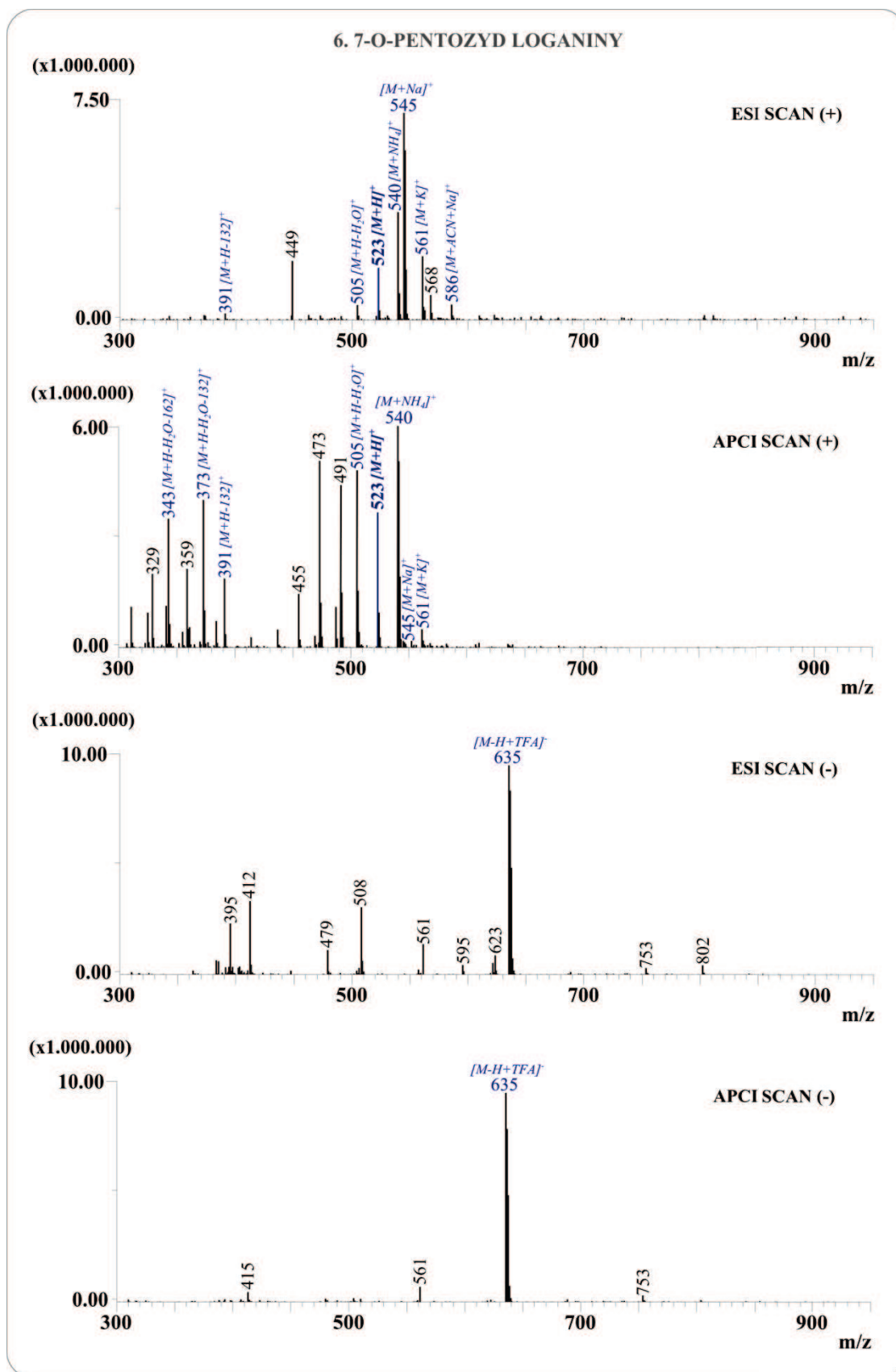
Ryc. 29 Widma ESI/APCI-MS związku 3 identyfikowanego w owocach badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*



Ryc. 30 Widma ESI/APCI-MS związku 4 identyfikowanego w owocach badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*



Ryc. 31 Widma ESI/APCI-MS związku 5 identyfikowanego w owocach badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*



Ryc. 32 Widma ESI/APCI-MS związku 6 identyfikowanego w owocach badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*

W roku bieżącym (2016), ukazała się praca Kucharskiej i wsp. [275], w której metodą UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS w owocach *L. caerulea* var. *kamtschatica* wykazano obecność szeregu związków irydoidowych, w tym 7-O-pentozydów kwasu loganowego, 7-epi-loganowego oraz loganiny. Autorzy wskazują na różnice w intensywności sygnałów jonów po odszczepieniu cukru, mianowicie w widmach kwasu loganowego i jego glikozydu sygnał jonu $[M-H-162]^-/[M-H-162]^+$ charakteryzował się wysoką intensywnością, podczas gdy w widmach kwasu 7-epi-loganowego i jego pentozydu był on nieobecny/lub charakteryzował się niską intensywnością natomiast występował jon po odszczepieniu cząsteczki wody i cukru $[M-H-H_2O-162]^-$. Według Kucharskiej i wsp. [275], jest to spowodowane większą stabilnością jonu $[M-H-162]^-$ w przypadku gdy grupa hydroksylowa znajduje się nad płaszczyzną pierścienia (pozycja α , kwas loganowy), natomiast mniejszą gdy znajduje się ona pod płaszczyzną pierścienia (pozycja β , kwas 7-epi-loganowy), co skutkuje odszczepieniem fragmentu cukru po utracie cząsteczki wody i utworzeniem jonu $[M-H-H_2O-162]^-$. W widmach APCI (+) związków 2 i 3 obserwowano różnice w intensywności jonu $[M-H-H_2O-162]^-$ (Ryc. 28 i 29).

Uwzględniając dane literaturowe [275] oraz otrzymane dane spektralne stwierdzono że związki 2 i 3 mogą być, odpowiednio, 7-O-pentozydami kwasu 7-epi-loganowego i kwasu loganowego, natomiast związek 6 uznano za 7-O-pentozyd loganiny (Tab. 17, Ryc. 28-29, 32).

W toku analizy HPLC nie stwierdzono różnic jakościowych w zespołach 6 identyfikowanych związków irydoidowych w owocach 3 badanych odmian *L. caerulea* (Ryc. 26). Obserwowano je natomiast w oznaczeniu ilościowym metodą HPLC, której parametry walidacyjne przedstawiono w Tabeli 18. Wyznaczone dla trzech wzorcowych irydoidów: kwasu loganowego, loganiny i swerozydu wartości LOD i LOQ ($\mu\text{g/ml}$) odpowiadały wartościom opisanym w literaturze dla związków irydoidowych [262, 263, 266].

Tab. 18 Parametry walidacyjne metody HPLC-DAD ESI/APCI-MS oznaczenia ilościowego irydoidów w owocach *L. caerulea*

związek chemiczny	krzywa wzorcowa	r^2	LOD	LOQ
			$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
kwas loganowy	$y = 0.000000227914x - 0.00489692$	0.9999	4.2	1.3
loganina	$y = 0.000000212338x - 0.00487121$	0.9999	3.7	1.1
swerozyd	$y = 0.000000287144x - 0.00138129$	0.9999	6.9	2.1

r^2 : równanie regresji, LOD: limit detekcji, LOQ: limit oznaczalności

PRECYZJA		ODZYSK		
jednodniowa	wielodniowa	25 %	75 %	100 %
1.6 – 3.9 %	0.9 – 2.5 %	101.7 – 105.5 %	94.6 – 102.5 %	96.2 – 102.5 %

Kwas loganowy jest jednym z dominujących związków w profilach chromatograficznych owoców wszystkich badanych kultywarów. Jego zawartość jest zbliżona w odmianach 'Brązowa' oraz 'Wojtek' (429.5 – 456.4 mg/100 g s.m.), natomiast wyraźnie niższa w odmianie 'Zielona' (330.1 mg/100 g s.m.). Odmianę 'Wojtek' wyróżniało około 3-razy wyższe stężenie loganiny (387.6 mg/100 g s.m.) w porównaniu do pozostałych odmian (97.5 – 125.3 mg/100 g s.m.), podczas gdy odmiany *L. caerulea* 'Brązowa' i 'Zielona' były o 5- do 10-razy bogatszym źródłem związku 2 oraz związku 6. Stężenia związku 3 były bardziej zbliżone i mieściły się w zakresie od 126.6 do 236.6 mg/100 g s.m. dla wszystkich 3 badanych kultywarów. W porównaniu do innych identyfikowanych irydoidów, zawartość swerozydu była stosunkowo niska we wszystkich 3 badanych odmianach, i mieściła się w zakresie 42.2 – 69.2 mg/100 g s.m. (Tab. 19).

Oznaczone metodą HPLC zawartości irydoidów wskazują, że owoce badanych odmian *L. caerulea* zawierają irydoidy w zakresie zbliżonych wartości (1141.9 – 1685.5 mg/100 g s.m.), przy czym najwyższą zawartością tych związków wyróżnia się odmiana 'Brązowa' (Tab. 19).

Zawartości kwasu loganowego i loganiny są porównywalne do ich zawartości oznaczanych w korzeniach *Gentiana straminea* i *Gentiana macrophylla*, w których ich stężenia oznaczano na poziomie, odpowiednio: 330.0 – 422.0 mg/100 g oraz 369.0 – 1116.0 mg/100 g dla kwasu loganowego, oraz 65.0 – 88.0 mg/100 g i 23.0 – 147.0 mg/ 100 g dla swerozydu [271]. W porównaniu do owoców, kwiaty gatunków rodzaju *Lonicera* charakteryzują się dużo większym zróżnicowaniem w zawartości m.in. swerozydu (18.0 – 866.0 mg/100 g) [262, 272] oraz loganiny, która jest identyfikowana od śladowych ilości do stężeń dochodzących do 279.0 mg/100 g [262, 266, 272].

Dane literaturowe wskazują na aktywność przeciwzapalną naturalnie występujących irydoidów [276-278]. Wykazano działanie przeciwzapalne loganiny i kwasu loganowego w modelu *in vivo* indukowanego karageniną obrzęku łapy szczura, w którym najsilniejszą aktywność odnotowano dla kwasu loganowego (44% zahamowania obrzęku). W innym, mysim modelu zapalenia ucha indukowanego octanem tetradekanoforbolu (TPA), obserwowano że loganina, aukubina i berberyna lina hamują obrzęk na poziomie 72-80%, a ich mechanizm działania opiera się na przeciwdziałaniu indukowanej TPA inhibicji katalazy odpowiedzialnej za rozkład H_2O_2 , co zapobiega powstawaniu reakcji zapalnej [276]. Dodatkowo stwierdzono, że loganina charakteryzowała się zdolnością obniżania poziomu ekspresji TNF- α , MCP-1 i IL-6, oraz hamowała aktywację czynnika NF- κ B w adipocytach myszy [277].

Wykazano że swerozyd wyizolowany z *Lonicera japonica* powoduje inhibicję melanogenezy w komórkach melan-A w stężeniu 300 μ M. Aktywność swerozydu była wiązana z oddziaływaniem na

kinazy MAPK oraz tyrozynazę – enzym zaangażowany w proces melanogenezy, przy braku działania cytotoksycznego na badane komórki [278].

Owoce wiciokrzewu siniego stanowią potencjalne źródło związków irydoidowych o różnym działaniu biologicznym. Wysoka zawartość loganiny oraz kwasu loganowego potwierdza aktywność przeciwzapalną surowca wykazaną w modelu *in vivo*.

Tab. 19 Wyniki analizy ilościowej irydoidów w owocach *L. caerulea* (mg/100 g s.m) (n = 3)

nr.	związek chemiczny	<i>L. cae</i> 'Brązowa'	<i>L. cae</i> 'Wojtek'	<i>L. cae</i> 'Zielona'
1	kwas loganowy	456.4 ± 15.2	429.5 ± 26.3	330.1 ± 19.4
2	7-O-pentozyd kwasu 7-epi-loganowego ¹	415.1 ± 11.6	42.1 ± 7.3	204.4 ± 10.5
3	7-O-pentozyd kwasu loganowego ¹	236.6 ± 6.4	126.6 ± 9.5	174.9 ± 16.8
4	swerozyd	56.2 ± 9.8	69.2 ± 7.5	42.2 ± 2.7
5	loganina	97.5 ± 1.7	387.6 ± 21.8	125.3 ± 11.2
6	7-O-pentozyd loganiny ²	423.7 ± 13.0	86.9 ± 2.4	591.0 ± 25.5
	suma	1685.5 ± 9.6	1141.9 ± 12.5	1467.9 ± 14.4

przeliczone na: ¹ kwas loganowy, ² loganinę

2.2 Analiza metabolitów wtórnych w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis*

2.2.1 Skład chemiczny kwiatów różnych przedstawicieli rodzaju *Lonicera*

Kwiaty gatunku *L. caerulea* są niezbadanym w zakresie składu chemicznego surowcem roślinnym, na tle kwiatów innych gatunków z rodzaju *Lonicera* rosnących m.in. na terenie Azji Wschodniej o rozpoznanych kompozycjach związków czynnych. W świetle licznych danych literaturowych, kwiaty wiciokrzewów są źródłem zróżnicowanych grup metabolitów wtórnych: fenolokwasów, irydoidów i flawonoidów (Tab. 20).

Większość informacji dotyczących składu chemicznego kwiatów z rodzaju *Lonicera* odnosi się do *Flos Lonicerae* (FL) i *Flos Lonicerae Japonicae* (FLJ), surowców w skład których wchodzi wysuszone kwiaty różnych wiciokrzewów. *Flos Lonicerae* jest surowcem Tradycyjnej Medycyny Chińskiej (TCM), z monografią szczegółową w edycjach Chińskiej Farmakopei do 2000 r., stanowiącym wysuszone kwiatostany gatunków z rodzaju *Lonicera* rosnących na terenie Azji Wschodniej, w tym: *L. japonica*, *L. macranthoides*, *L. confusa*, *L. hypoglauca* i *L. fulvotomentosa* [262, 263, 279]. W późniejszych edycjach Farmakopei Chińskiej (2005 r.), *Flos Lonicerae Japonicae*, stanowiący wyłącznie wysuszone kwiaty *L. japonica*, zastępuje *Flos Lonicerae* [263-265, 267, 279, 280].

Kwasy kawoilochinowe stanowią dominującą grupę metabolitów wtórnych w kwiatach rodzaju *Lonicera*, w tym kwas chlorogenowy oraz 3,5-di-O-kawoilochinowy jako główne związki zespołu. W znacznych ilościach towarzyszą im kwas neochlorogenowy, 3,4-di-O-kawoilochinowy oraz 4,5-di-O-kawoilochinowy, natomiast pozostałe kwasy fenolowe są obecne w znacznie niższych stężeniach [262, 264, 265, 267, 272, 279-281] (Tab. 20). Zhang i wsp. [264], w analizie kwiatów *L. japonica* metodami LC-MS rozdzielili i zidentyfikowali ponad 100 związków należących do kwasów fenolowych oraz ich glikozydów, m.in. kawoilochinowych, feruloilochinowych, p-kumaroilochinowych.

Irydoidy stanowią drugą, pod względem zawartości, grupę metabolitów wtórnych kwiatów wiciokrzewu [262], z loganiną i swerozydem jako związkami dominującymi, którym towarzyszą kwas loganowy, kwas sekologanowy, sekoksyloganina, 7-epi-wogelozyd, centaurozyd, oraz wiele innych pochodnych i izomerów, głównie loganiny [262, 263, 265-267, 272, 279, 282] (Tab. 20).

Flawonoidy występują w znacznie niższych stężeniach, w porównaniu do fenolokwasów i irydoidów [283]. Najczęściej wykrywano luteolinę, kwercetynę oraz ich pochodne, włączając flawony: 7-O-rutynozyd luteoliny, 7-O-glukozyd luteoliny oraz flawonole: izokwercetynę, hiperozyd i rutynę. Rzadziej rozpoznawanymi flawonolami są 3-O-glukozyd izoramnetyny oraz 7-O-glukozyd i 7-O-neohesperozyd trycyny. W kwiatach gatunków *Lonicera* zidentyfikowano również szereg innych flawonoidów, jednak dane o ich obecności są sprzeczne [262, 263, 265, 267, 272, 279, 280, 283] (Tab. 20).

Tab. 20 Związki zidentyfikowane w kwiatach różnych gatunków *Lonicera*

flawonole	gatunek/surowiec	piśmiennictwo
kwercetyna	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 267, 279]
rutyna	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 267, 272, 279]
izokwercetyna	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 267, 280]
hiperozyd	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 265, 267, 279]
heksozyd kwercetyny	<i>L. jap</i>	[283]
luteolina	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 267, 279, 280]
7-O-glukozyd luteoliny	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 265, 272, 279, 280]
7-O-rutynozyd luteoliny	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 267, 272]
7-O-galaktozyd luteoliny	<i>L. jap</i>	[267]
7-O-glukozylopiranozyd luteoliny	<i>L. jap</i>	[267]
diheksozyd luteoliny	FL	[279]
diosmetyna	FL	[262]
kemferol	<i>L. jap</i>	[283]
3-O-rutynozyd kemferolu	<i>L. jap</i>	[267, 283]
3-O-glukozyd kemferolu	FL	[279]
7-O-neohesperydozyd apigeniny	<i>L. jap</i>	[280]
3-O-glukozyd izoramnetyny	<i>L. jap</i> /FL	[279, 283]
7-O-glukozyd trycyny	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263]
7-O-neohesperydozyd trycyny	<i>L. jap</i> /FL	[263]
7-O-neohesperydozyd chryzoeriolu	<i>L. jap</i>	[267]
kupressuflawon	FL	[262]
ochnaflawon	<i>L. jap</i>	[284]
kwasy fenolowe	gatunek/surowiec	piśmiennictwo
kwaskawowy	<i>L. jap</i> /FL	[262, 264, 267, 272, 279, 280]
kwasklorogenowy	<i>L. jap</i> /FL	[262, 264, 265, 267, 272, 279-281]
kwaskatechowy	<i>L. jap</i>	[264, 280]
kwaskawowy 5-O-kawoilochinowy (neochlorogenowy)	<i>L. jap</i> /FL	[264, 265, 267, 279, 281]
kwaskawowy 4-O-kawoilochinowy	FL	[264, 267, 279]
kwaskawowy 1,4-di-O-kawoilochinowy	<i>L. jap</i>	[264, 265, 267]
kwaskawowy 1,5-di-O-kawoilochinowy	<i>L. jap</i>	[264, 267]
kwaskawowy 3,4-di-O-kawoilochinowy	<i>L. jap</i> /FL	[262, 264, 267, 272, 281]
kwaskawowy 3,5-di-O-kawoilochinowy	<i>L. jap</i> /FL	[262, 264, 265, 267, 272, 279-281]
kwaskawowy 4,5-di-O-kawoilochinowy	<i>L. jap</i> /FL	[264, 267, 279-281]
kwaskawowy feruloilochinowy	<i>L. jap</i>	[264]
kwaskawowy feruloilo-kawoilochinowy	<i>L. jap</i>	[264, 283]
kwaskawowy p-kumaroilochinowy	<i>L. jap</i>	[264, 283]
kwaskawowy p-kumaroilo-kawoilochinowy	<i>L. jap</i>	[264, 283]

L. jap – *Lonicera japonica*, FL – Flos *Lonicerae*

Tab. 20 cd. Związki zidentyfikowane w kwiatach różnych gatunków *Lonicera*

irydoidy	gatunek/surowiec	piśmiennictwo
kwask loganowy	<i>L. jap</i>	[265]
kwask sekologanowy	<i>L. jap</i> /FL	[265, 267, 279]
kwask 8-epi-loganowy	<i>L. jap</i>	[267]
swerozyd	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 265-267, 272, 279]
7-O-etylo-swerozyd	FL	[279]
loganina	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 265-267, 272, 279]
7-epi-loganina	<i>L. jap</i>	[267]
8-epi-loganina	<i>L. jap</i>	[260, 267]
sekoksyloganina	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 265-267, 272, 279, 282]
7-ester butylowy sekoksyloganiny	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263]
serynosekologanina	<i>L. jap</i>	[285]
treoninosekologanina	<i>L. jap</i>	[285]
acetal dimetylo-sekologaniny	<i>L. jap</i>	[282]
sekologanozyd	<i>L. mac</i> /FL	[262, 274]
etylo-sekologanozyd	<i>L. mac</i>	[274]
dimetylo-sekologanozyd	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 266, 267, 282]
7-ester metylowy sekologanozydu	<i>L. jap</i>	[267]
7-O-arabinozyd demetylosekologanolu	FL	[273]
6'-O- α -arabinopiranozylo-demetylosekologanol	<i>L. mac</i>	[274]
7-dehydrologanina (7-ketologanina)	<i>L. jap</i>	[282]
(E)-aldosekologanina (centaurozyd)	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 265, 266, 272, 279]
(Z)-aldosekologanina	<i>L. jap</i>	[265]
6'-O-(7 α -hydroksywerozyloksy)-loganina	<i>L. jap</i>	[265]
epi-wogelozyd	<i>L. jap</i> /FL	[262, 263, 265-267, 279, 282]
kingizyd	<i>L. jap</i>	[260]
8-epi-kingizyd	<i>L. jap</i>	[260]
harpagid	<i>L. jap</i>	[260]
harpagozyd	<i>L. jap</i>	[260]
swertiamaryna	<i>L. jap</i>	[260]
6'-O- β -glukopiranozyloharpagozyd	<i>L. jap</i>	[260]
loniceranan A	<i>L. jap</i>	[260]
loniceranan B	<i>L. jap</i>	[260]
loniceranan C	<i>L. jap</i>	[260]
(7 β)-7-O-metylomorroneizyd	<i>L. jap</i>	[260]
loniceracetalid A	<i>L. jap</i>	[286]
loniceracetalid B	<i>L. jap</i>	[286]

L. jap – *Lonicera japonica*, *L. mac* – *Lonicera macranthoides*, FL – Flos *Lonicerae*

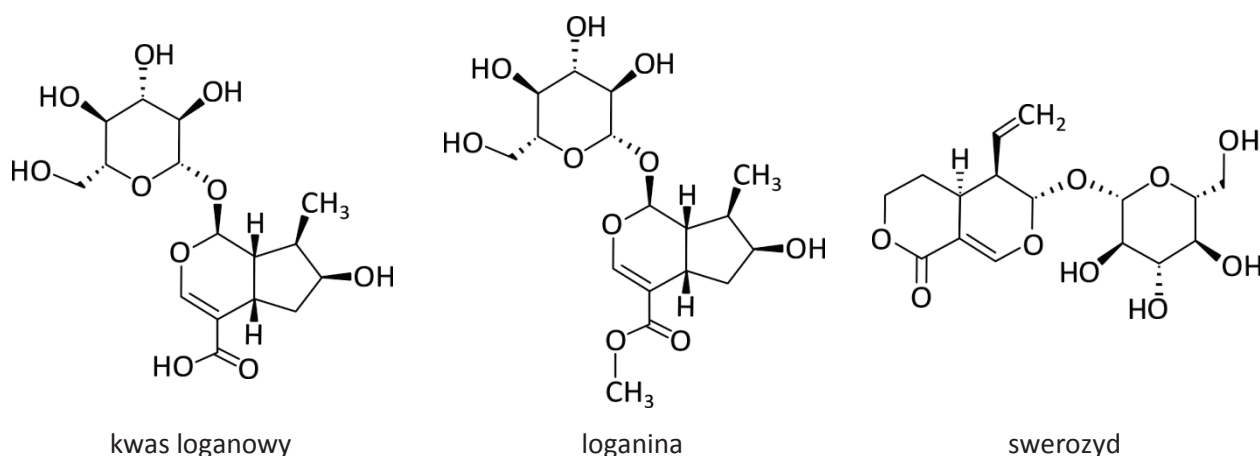
Tab. 20 cd. Związki zidentyfikowane w kwiatach różnych gatunków *Lonicera*

saponiny	gatunek/surowiec	piśmiennictwo
akebia saponina F	FL	[262]
akebia saponina D	FL	[262]
makrantoidyna A	<i>L. jap</i> /FL	[262, 267, 272]
makrantoidyna B	<i>L. jap</i> /FL	[262, 267, 272]
makrantozyd A	<i>L. jap</i> /FL	[262, 267, 272]
makrantozyd B	FL	[262, 272]
dipsakozyd B	<i>L. jap</i> /FL	[262, 267, 272]
3-O- α -arabinopiranozylo(2 $\rightarrow$ 1)-O- α - ramnopiranozyd hederageniny	<i>L. jap</i> /FL	[262, 267, 272]
ester 28-O- β -glukopiranozylo(6 $\rightarrow$ 1)-O- β - glukopiranozylo-hederageniny	FL	[262, 272]

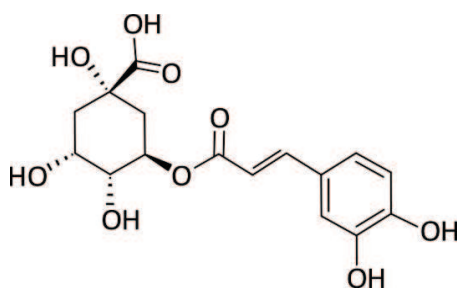
L. jap – *Lonicera japonica*, FL – Flos Lonicerae

Zespół saponin opisywano jedynie w pojedynczych publikacjach, wskazując na ich bardzo niską zawartość w kwiatach [262, 267, 272] (Tab. 20).

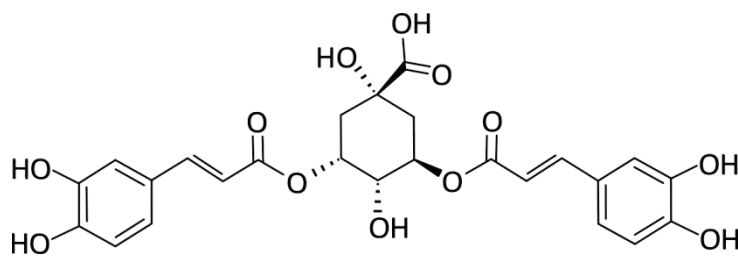
Zarówno FLJ jak i gatunki wchodzące w skład FL charakteryzują się zbliżonym profilem metabolitów wtórnych, w którym dominują kwasy fenolowe i irydoidy, przy niskich poziomach zawartości flawonoidów. Jedną z obserwowanych różnic jest wyższa zawartość związków irydoidowych, kwasu 3,4-di-O-kawoilochinowego oraz niektórych flawonoli i flawonów (rutyny, izokwercetyny i 7-O-glukozydu luteoliny) w kwiatach *L. japonica* w porównaniu do gatunków wchodzących w skład FL [262, 263, 266, 272].



Ryc. 33 Wzory strukturalne niektórych irydoidów identyfikowanych w kwiatach rodzaju *Lonicera*



kwas chlorogenowy



kwas 3,5-di-kawoilochinowy

Ryc. 34 Wzory strukturalne niektórych fenolokwasów identyfikowanych w kwiatach rodzaju *Lonicera*

	R ₁	R ₂
Lut-7-O-Glc	Glc	H
Lut-7-O-Rut	Rha-Glc	H
Qu-3-O-Glc	H	Glc
Qu-3-O-Rut	H	Rha-Glc
Qu-3-O-Gal	Gal	OH

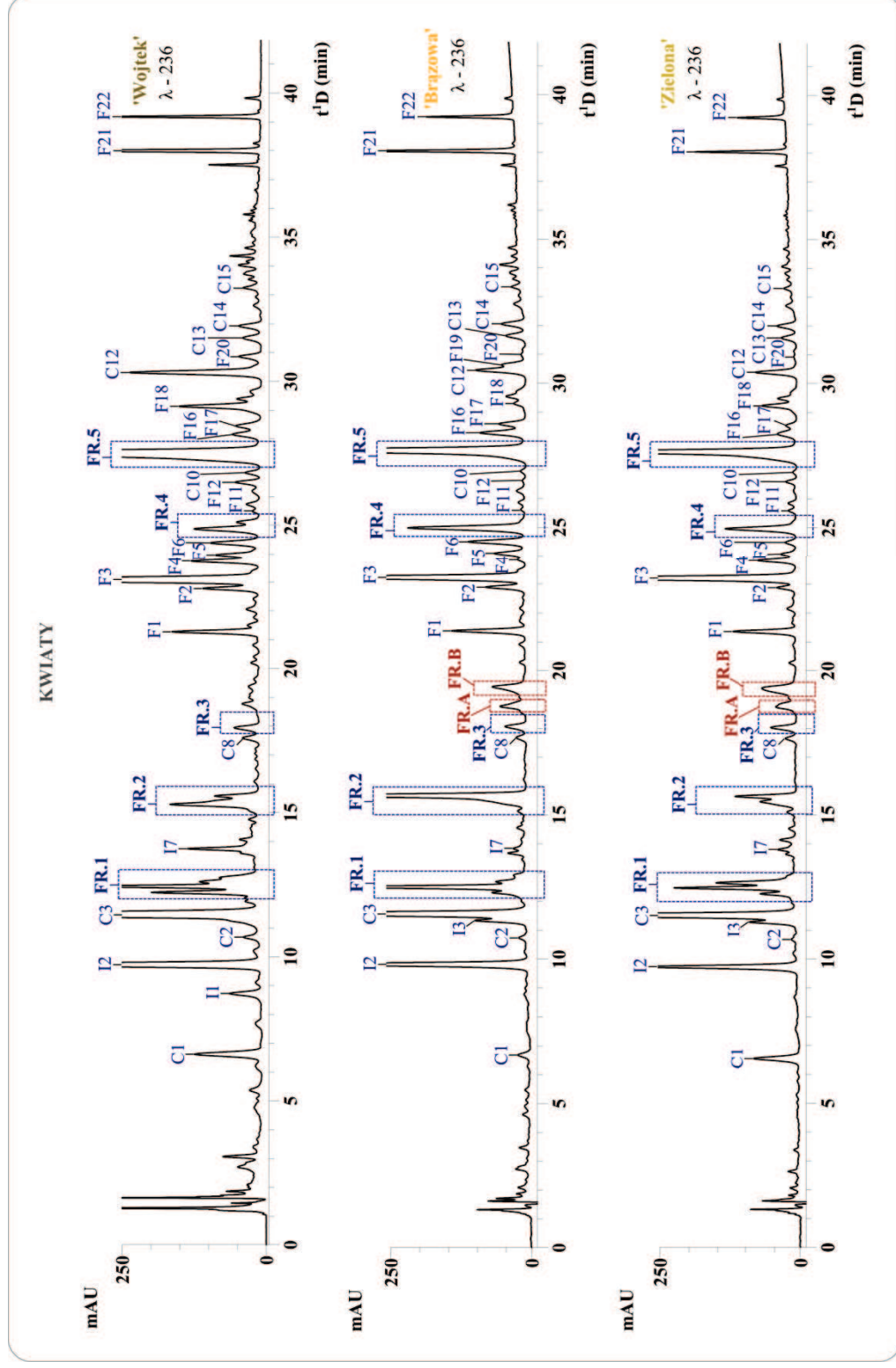
Lut – luteolina, Gal – galaktoza, Glc – glukoza,
Rut – rutynoza, Rha – ramnoza, Qu – kwercetyna

Ryc. 35 Wzory strukturalne niektórych flawonoli identyfikowanych w kwiatach rodzaju *Lonicera*

2.2.2 Analiza 1D LC

W rozdzielaniu metodą HPLC związków czynnych ekstraktów z kwiatów odmian *L. caerulea* var. *edulis* ('Brazowa', 'Wojtek' i 'Zielona') zastosowano kolumnę Discovery HS C-18, z żel krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi, który jest najczęściej wykorzystywanym adsorbentem w analizach chromatograficznych kwiatów rodzaju *Lonicera* [263-265, 267, 279, 280].

W optymalizacji rozdzieleń badanego zespołu związków czynnych, początkowo testowano mieszaniny ACN:H₂O oraz MeOH:H₂O z dodatkiem TFA. Najlepsze warunki rozdzielania otrzymano dla mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*), i zastosowano ją jako fazę ruchomą w programie elucji gradientowej (program IX), obejmującym wzrost stężenia w/w mieszaniny, od 12 do 100%, w 0.1% wodnym roztworze TFA. Identyfikację związków przeprowadzono w oparciu o analizę widm UV, MS oraz dane literaturowe [260, 262-267, 272-274, 279-283, 285, 286]. W warunkach 1D LC otrzymano dobre rozdzielanie 26 związków należących do kwasów fenolowych (C1-3, C8, C10, C12-15), irydoidów (I1-2, I7), oraz flawonoidów (F1-6, F11-12, F16-22), jakkolwiek obserwowano koelucję szeregu związków (Ryc. 36). Modyfikacja warunków separacji nie poprawiła rozdzielczości, dlatego przeprowadzono eksperymenty w kierunku opracowania systemu dwuwymiarowego (2D LC) umożliwiającego analizę jakościową i ilościową metabolitów wtórnych obecnych w kwiatach.



Ryc. 36 Chromatogramy 1D LC ekstraktów metanolowych z kwiatów badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*, numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 22-24
- Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3 μm), program IX, $t_G = 40$ min, $v = 0.3$ ml/min

2.2.3 Optymalizacja i procedura rozdzielania 2D LC

Ze względu na brak rozdzielania w 1D LC związków eluujących w zakresach wartości t_R 12-13 min, 15-16 min, 17.5-18.5 min, 18.5-19 min, 19.1-19.7 min, 24.5-25.5 min, oraz 27-28 min, postanowiono zastosować 2D LC i technikę 'heart-cutting', która nie wymaga rozdzielania wszystkich składników próbki w dwóch wymiarach (Ryc. 36). Warunki opracowanego rozdzielania 1D LC (kolumna, fazy ruchome, programy elucji gradientowej) wykorzystano w ¹D opracowanego systemu 2D LC (Tab. 11, Ryc. 37).

2.2.3.1 'On-line' 'heart-cutting' 2D LC

W konfigurowaniu ortogonalnego systemu 'on-line' 'heart-cutting' LC użyto kolumnę Discovery HS C-18 w ¹D oraz kolumnę Kinetex F5 w ²D. Fazę stacjonarną kolumny Discovery HS C-18 stanowi porowata krzemionka modyfikowana grupami oktadecylowymi, natomiast w Kinetex F5 jest to powierzchniowo porowata krzemionka modyfikowana fazą pentafluorofenyłową. Fazę F5 charakteryzuje 5 różnych mechanizmów oddziaływań charakterystycznych dla faz PFP – hydrofobowe, π - π , elektrostatyczne, steryczne oraz związane z tworzeniem wiązań wodorowych. Kolumna Kinetex F5 umożliwia rozdzielanie izomerów pozycyjnych w porównaniu do faz C-18 i innych faz PFP, gwarantując wysoką odtwarzalność, wyższą czułość i efektywność separacji, co zadecydowało o jej wyborze do oznaczeń w ²D [249].

W opracowaniu programów elucji do rozdzielania w ²D zastosowano takie same mieszaniny rozpuszczalników jak w rozdzielaniu 1D LC, tworząc 2 programy elucji o różnych profilach, łączące w poszczególnych segmentach elucję izokratyczną i gradient liniowy. Obejmowały one wzrost stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*) w 0.1% wodnym roztworze TFA od 12 do 100% (program X, XI) (Ryc. 37). Acetonitryl jako składnik fazy ruchomej częściowo niwelował oddziaływania typu π - π , zwiększając retencję związków aromatycznych [249].

Odmienne mechanizmy separacji w ¹D oraz ²D były podstawowym elementem zapewniającym ortogonalność opracowanego systemu 2D LC, ponieważ komponenty faz ruchomych były takie same w obydwu wymiarach, różniąc się jedynie profilami gradientu i siłą elucyjną.

Do rozdzielania 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC zastosowano system wyposażony w układ posiadający 10-cio portowy 2-drożny zawór, z dwiema pętlami dozującymi o pojemności 50 μ l. Poszczególne frakcje (FR.1-FR.5) przenoszono z ¹D i kolejno rozdzielano w ²D, w procesie przedstawionym na Rycinie 37. Dzielnik strumienia umieszczony za wylotem kolumny ¹D zapewniał podział strumienia eluatu w stosunku 5:1, z czego 50 μ l kierowano do pętli dozującej w czasie zbierania wynoszącym 1 minutę dla każdej z przenoszonych frakcji. Z kolumny ¹D zebrano 5 frakcji w zakresie

czasów retencji (t_R): 12-13 min (FR.1), 15-16 min (FR.2), 17.5-18.5 min (FR.3), 24.5-25.5 min (FR.4), oraz 27-28 min (FR.5/5*). Czas separacji w 2D był zależny od czasu zakończenia zbierania kolejnej frakcji do drugiej pętli dozującej (wiążący się ze zmianą pozycji zaworu), i wynosił 3 min dla FR.1, 2.5 min dla FR.2, 7 min dla FR.3, 2.5 min dla FR.4 oraz 7 min dla FR.5/5* (Ryc. 37).

Frakcje poddano separacji stosując program X który obejmował złożony profil elucji – gradientu liniowego i elucji izokratycznej. W przypadku frakcji FR.1, FR.3 i FR.5 ich separacja początkowo była prowadzona w warunkach elucji gradientowej, a następnie w warunkach elucji izokratycznej. Natomiast FR.2 i FR.4 były rozdzielane, odpowiednio, w warunkach liniowej elucji gradientowej lub elucji izokratycznej. Dla FR.1 gradient obejmował wzrost stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, $v/v/v$) w 0.1% wodnym roztworze TFA od 12 do 17% w pierwszych 2 minutach separacji (13-15 min), a następnie elucję izokratyczną (17%, 15-16 min). Rozdzielenie FR.2 przebiegało w warunkach liniowego gradientu i obejmowało wzrost stężenia ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, $v/v/v$) w 0.1% TFA z 17% do 23% w czasie 2.5 min (16-18.5 min). Gradient liniowy obejmował pierwsze 1.5 minuty rozdzielenia FR.3, i wiązał się ze wzrostem stężenia ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, $v/v/v$) w 0.1% TFA od 23% do 25% w ciągu pierwszej minuty (18.5-19.5 min), oraz od 25% do 32% w ciągu następnej 0.5 minuty (19.5-20 min). Następnie rozdzielenie FR.3 przebiegało w warunkach izokratycznych (32% ACN:H₂O:TFA 50:50:0.1, $v/v/v$, w 0.1% TFA) (20-25.5 min), zachowanych w czasie separacji FR.4 (25.5-28 min). Elucja gradientowa obejmująca wzrost stężenia ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, $v/v/v$) w 0.1% TFA z 32% do 40% charakteryzowała 1 minutę rozdzielenia FR.5 (28-28 min), następnie, do 35 minuty, zastosowano elucję izokratyczną (Ryc. 37).

We frakcjach FR.1-5 rozdzielono i oznaczono 21 związków należących do kwasów fenolowych, irydoidów, oraz flawonoidów. Kwasy fenolowe i irydoidy były związkami identyfikowanymi w pierwszych trzech frakcjach (FR.1-3), z czego po 3 związki z obydwu grup oznaczono we FR.1, 2 irydoidy i 1 fenolokwas we FR.2, oraz po 1 z nich we FR.3. Głównymi komponentami dwóch kolejnych frakcji były flawonoidy, jakkolwiek towarzyszył im 1 irydoid we FR.4 oraz 1 fenolokwas we FR.5, który koeluował z jednym ze związków flawonoidowych (Ryc. 38).

Program XI stanowił alternatywną wersję programu elucji w 2D , i jego profil był identyczny z profilem programu X do 27 min, natomiast w 27.5 min stężenie mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, $v/v/v$) w 0.1% TFA obniżono z 32 do 15% (Ryc. 37), co skutkowało rozdzieleniem składników FR.5 w gradiencie obejmującym liniowy wzrost stężenia ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, $v/v/v$) w 0.1% TFA od 15 do 40%, od 28 do 40 minuty (FR.5*). W rezultacie uzyskano rozdzielenie koeluujących pików C11 i F15 (przy koelucji F13 i F14), co umożliwiło ich oznaczenie ilościowe. Natomiast rozdzielenie

składników frakcji FR.1-4 zostało zachowane w warunkach elucji identycznych z programem X (Ryc. 38).

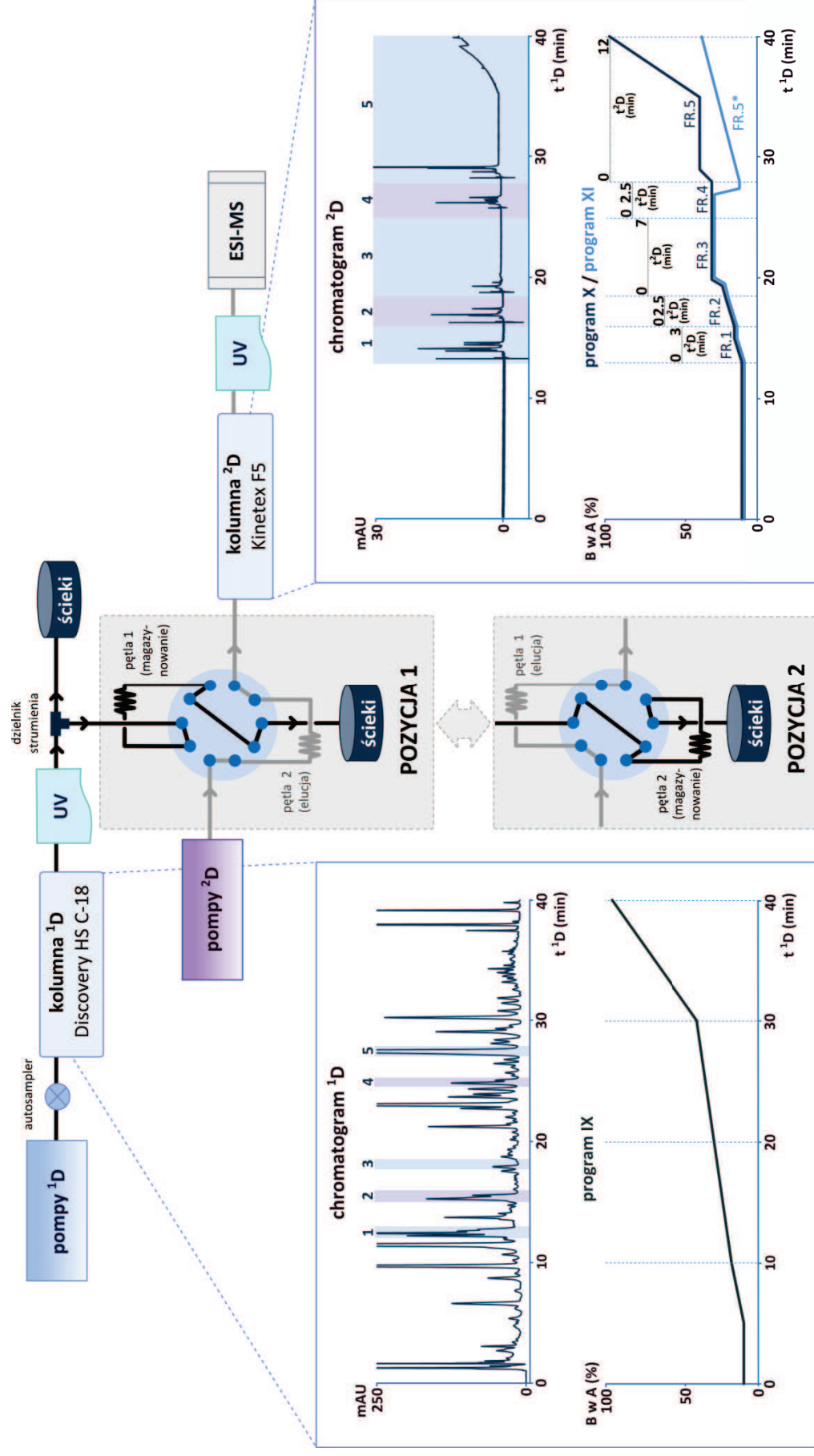
Zaletami opracowanego systemu 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC jest automatyzacja, precyzja i powtarzalność, szczególnie pożądane w analizie ilościowej. W opracowanym systemie 2D LC osiągnięto znaczny wzrost pojemności pikowej ($P = 760$) wobec rozdzielania 1D LC ($P = 166$).

2.2.3.2 'Off-line' 'heart-cutting' 2D LC

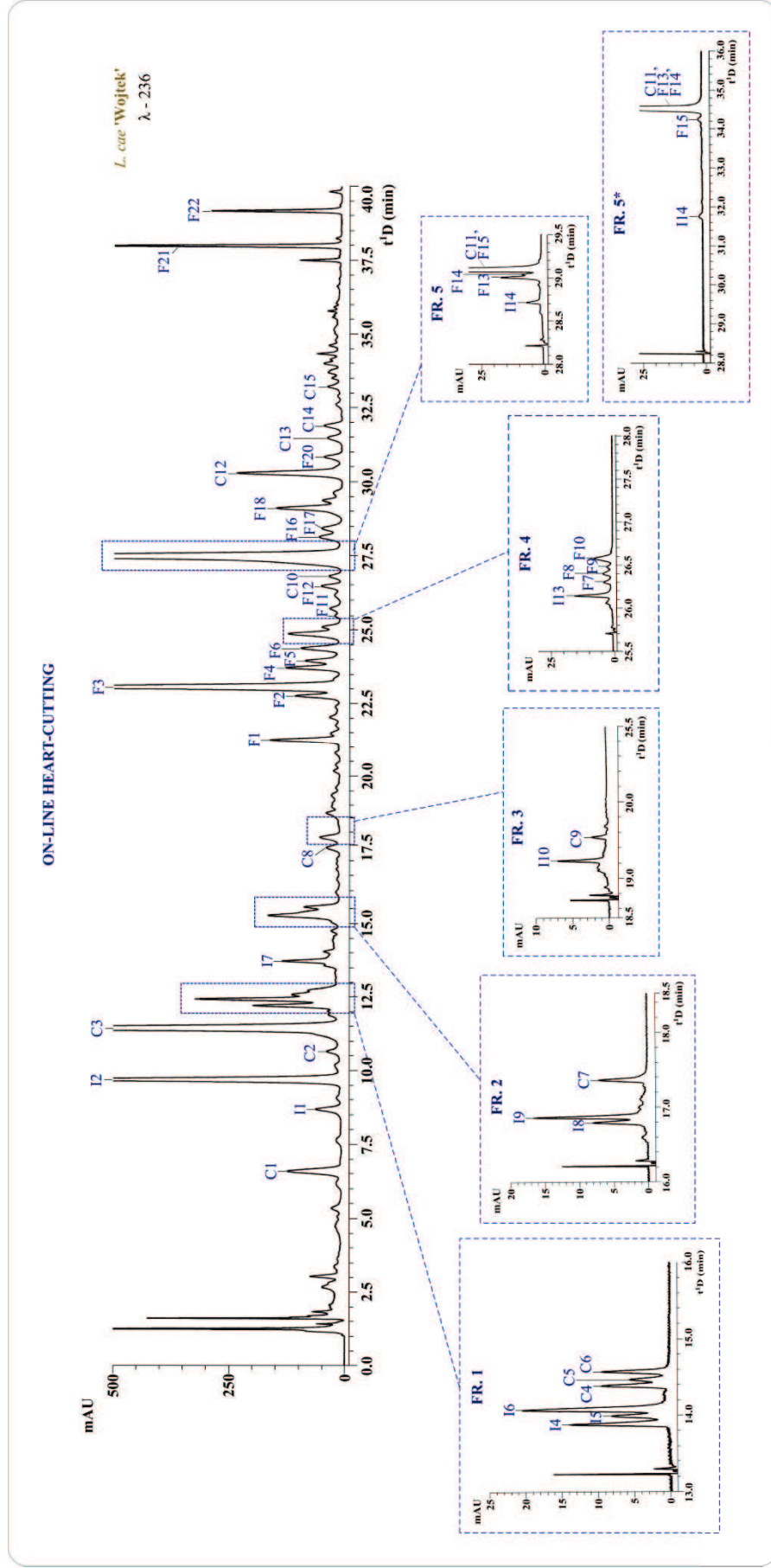
Porównując profile chromatograficzne związków czynnych kwiatów 3 odmian *L. caerulea* var. *edulis*, w odmianach 'Brązowa' i 'Zielona' obserwowano obecność dwóch pików o t_R 18.7 min – FR.A i t_R 19.4 – min FR.B, które nie były obecne w odmianie 'Wojtek' (Ryc. 36). Przy użyciu detektora MS ustalono że w/w piki stanowią mieszaniny więcej niż dwóch związków, dlatego do ich identyfikacji i separacji postanowiono zastosować tryb 'off-line' opracowanego systemu 2D LC.

Jakkolwiek system 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC umożliwił efektywne rozdzielanie związków czynnych odmiany 'Wojtek', to w odniesieniu do odmian 'Brązowa' i 'Zielona' separacja składników FR.A i FR.B eluujących jedna po drugiej z 1D nie była możliwa. Ponieważ wprowadzenie kolejnej frakcji na kolumnę 2D następowało po zakończeniu rozdzielania poprzedniej frakcji w 2D , ze względu na konfigurację systemu składającą się z dwóch objętości pętli 50 μ l przy określonym natężeniu przepływu fazy ruchomej oraz wymaganego czasu separacji w 2D (około 1.5 minuty), wykluczono użycie trybu 'on-line' do rozdzielania FR.A i FR.B (Ryc. 37).

Związki z FR.A i FR. B odmian 'Brązowa' oraz 'Wojtek' rozdzielono w systemie 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC. Frakcje zebrano ręcznie z kolumny 1D , w 3 powtórzeniach, w czasie t_R 18.5-19 min dla FR.A oraz t_R 19.1-19.7 min dla FR.B, a następnie poddano rozdzielaniu na kolumnie Kinetex PFP (100 x 4.6 mm, 2.6 μ m), (program IX), co pozwoliło na identyfikację dwóch dodatkowych związków irydoidowych (I11 i I12) (Ryc. 39).



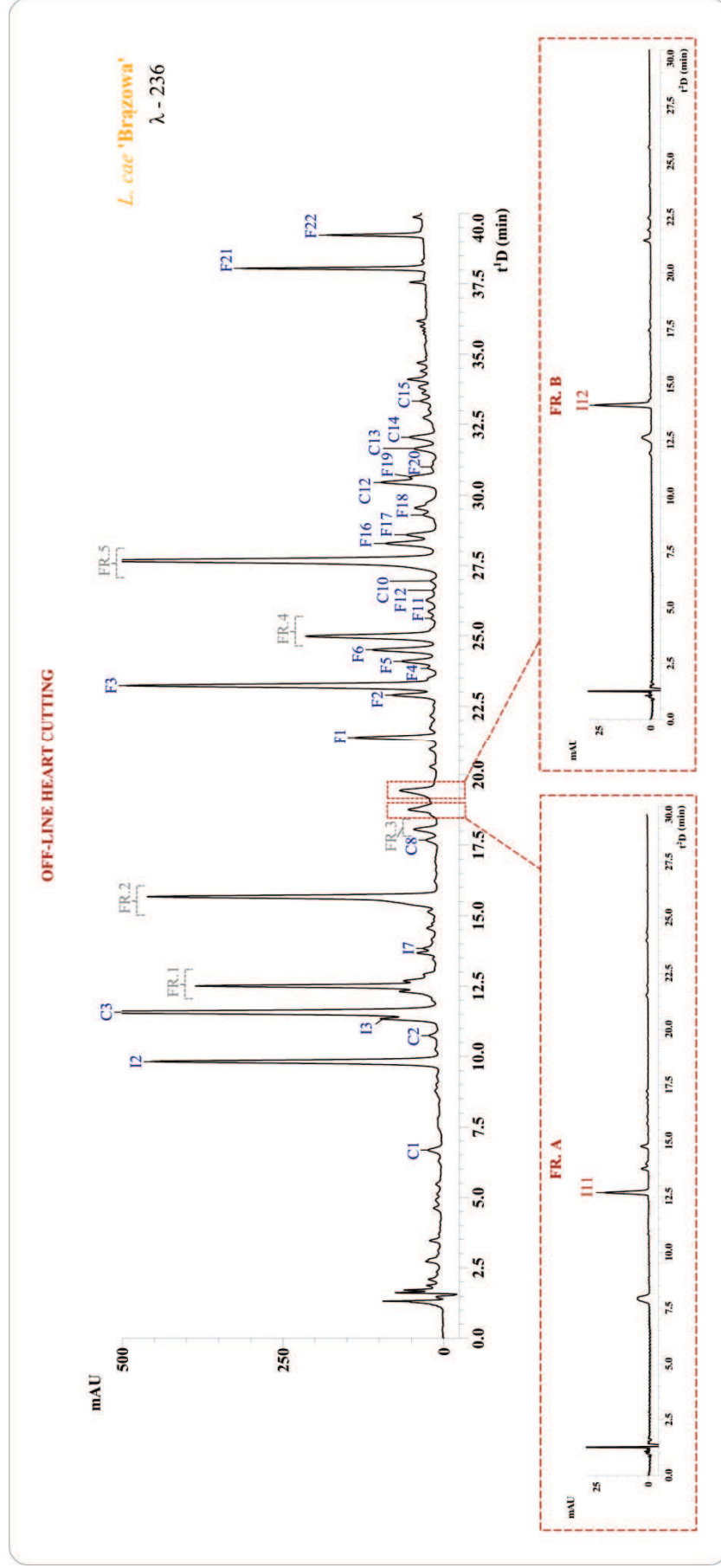
Ryc. 37 Schemat opracowanego systemu 2D LC oraz zastosowanych warunków separacji wyciągów z kwiatów *L. caerulea* w ¹D oraz ²D



Ryc. 38 Chromatogram 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC ekstraktu metanolowego z kwiatów *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek', numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 22-24

¹D: Discovery HS C-18 (150 × 2.1 mm, 3 μm), program IX, $t_c = 40$ min, $v = 0.3$ ml/min

²D: Kinetex F5 (50 × 4.6 mm, 2.6 μm), programy X-XI, $t_c = 40$ min, $v = 3$ ml/min



Ryc. 39 Chromatogram 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC ekstraktu metanolowego z kwiatów *L. caerulea* var. *edulis* 'Brazowa', numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 22-24

- ¹D: Discovery HS C-18 (150 × 2.1 mm, 3 μm), program IX, $t_G = 40$ min, $v = 0.3$ ml/min

- ²D: Kinetex PFP (100 × 4.6 mm, 2.6 μm), program IX, $t_G = 40$ min, $v = 1$ ml/min

2.2.4 Analiza jakościowa i ilościowa metabolitów wtórnych w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis*

Badania jakościowe i ilościowe metabolitów wtórnych w kwiatach 3 odmian *L. caerulea* var. *edulis* przeprowadzono w oparciu o rozdzielania ‘on-line’ i ‘off-line’ ‘heart-cutting’ 2D LC.

Chromatogramy LC rejestrowano przy λ – 236 nm dla związków irydoidowych, oraz λ – 330 nm dla fenolokwasów i flawonoidów. Identyfikacji dokonano w oparciu o związki wzorcowe, oraz widma ESI-MS otrzymane w trybie zbierania pełnych widm (1D) oraz techniką SIM (2D), porównując je z danymi literaturowymi [262-267, 272, 273, 279-283, 287].

Tab. 21 Parametry walidacyjne opracowanej metody ‘on-line’ ‘heart-cutting’ 2D LC

związek chemiczny	krzywa wzorcowa	r^2	LOD ($\mu\text{g/ml}$)		LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	
			1D	2D	1D	2D
kwas kawowy	$y = 0.000317x + 0.498$	0.9998	1.5	7.9	0.4	2.4
kwas chlorogenowy	$y = 0.000184x + 4.5$	0.9998	2.3	–	0.7	–
rutyna	$y = 0.000572x - 2.693$	0.9998	4.7	–	1.4	–
7-O-rutynozyd luteoliny	$y = 0.000476x - 3.233$	0.9998	2.6	–	0.8	–
izokwercetyna	$y = 0.0003196x - 0.33$	0.9999	6.1	–	1.8	–
7-O-glukozyd luteoliny	$y = 0.000155x - 0.426$	0.9964	1.2	–	0.4	–
3-O-rutynozyd kemferolu	$y = 2722.44x - 3277.55$	0.9995	4.2	–	1.3	–
kwercytryna	$y = 0.0003054x - 0.28$	0.9999	–	14.6	–	4.4
kupressuflawon	$y = 0.000557x - 1.972$	0.9999	1.7	–	0.5	–
amentoflawon	$y = 0.000673x - 1.822$	0.9999	1.8	–	0.6	–
kwas loganowy	$y = 0.0003466x - 16.65$	0.9999	4.2	–	1.3	–
loganina	$y = 0.000416x - 5.015$	0.9999	3.7	42.4	1.1	12.7
swerozyd	$y = 0.000566x - 16.07$	0.9997	6.9	57.8	2.1	17.3
r^2 : równanie regresji, LOD: limit detekcji, LOQ: limit oznaczalności						
PRECYZJA		ODZYSK				
jednodniowa	wielodniowa	25 %		50 %		
1.7 – 3.6 %	2.6 – 9.8 %	90.2 – 96.2 %		90.4 – 92.6 %		

2.2.4.1 Flawonoidy

22 związki rozpoznano jako flawonoidy, spośród których większość stanowiły pochodne luteoliny i kwercetyny. Wobec związków wzorcowych zidentyfikowano rutynę (F3), 7-O-rutynozyd luteoliny (F4), izokwercetynę (F5), 7-O-glukozyd luteoliny (F6), 3-O-rutynozyd kemferolu (F12), kwercytrynę (F15), ochnaflawon (F20), kupressuflawon (F21) oraz amentoflawon (F22). Większość z nich wcześniej wykryto w kwiatach rodzaju *Lonicera* [262, 263, 265, 267, 272, 279, 280, 284], z

wyjątkiem kwercytryny i amentoflawonu, które rozpoznano po raz pierwszy w kwiatach wiciokrzewów. Natomiast w badanych surowcach nie odnotowano obecności hiperozydu, 7-O-glukuronidu luteoliny oraz 7-O-neohesperozydu apigeniny, mimo że związki te wykrywano wcześniej w kwiatach rodzaju *Lonicera* (Ryc. 38, Tab. 22). Spośród pozostałych 14 związków uznanych za flawonoidy, w oparciu o otrzymane widma UV, 9 z nich wstępnie zidentyfikowano bazując na danych literaturowych (Tab. 22) [267, 279, 287].

Widma UV związków eluujących jako piki F10 i F16 były identyczne z widmem UV 7-O-rutynozydu luteoliny (F4), wykazując dwa maksima absorpcji przy $\lambda_{\max}$ 343 nm (I maksimum) i 250 nm (II maksimum) z przegięciem (sh) przy λ – 264 nm. Ponadto, w ich widmach MS występował jon pseudomolekularny przy m/z 595 $[M+H]^+$, odpowiadający masie cząsteczkowej 7-O-rutynozydu luteoliny. Na tej podstawie związki F10 i F16 uznano za ramnozylo-heksozydy luteoliny, o nieznanej pozycji atomu węgla wiążącego fragmenty cukrowe w strukturze aglikonu (Tab. 22).

Związek eluujący jako pik F9 charakteryzował się widmem UV charakterystycznym dla pochodnych kwercetyny $\lambda_{\max}$ 250(II), 266(sh), 350(I) nm, a obecność jonu molekularnego przy m/z 465 $[M+H]^+$ w jego widmie MS wskazywała na heksozyd kwercetyny o masie cząsteczkowej 464 Da. Porównanie czasów retencji t_R związku F9 ze związkami wzorcowymi stanowiącymi monoglikozydy kwercetyny: hiperozyd (3-O-galaktozyd kwercetyny) oraz spireozyd (4'-O-glukozyd kwercetyny) nie potwierdziło struktury F9 jako jednego z nich (Tab. 22).

Związek F14 wykazywał dwa maksima absorpcji $\lambda_{\max}$ 265(II), 337(I) nm w widmie UV, oraz charakteryzował się obecnością jonu molekularnego m/z 577 $[M-H]^-$ w widmie ESI-MS w trybie jonów ujemnych. Dane chromatograficzne były identyczne z danymi związku wzorcowego: 7-O-neohesperozydu apigeniny, jakkolwiek czasy retencji t_R obydwu związków były różne. Na tej podstawie F14 zidentyfikowano jako ramnozylo-heksozyd apigeniny, o nieznanym miejscu wiązania reszt cukrowych w strukturze aglikonu i charakterze wiązania międzycukrowego. Innymi zidentyfikowanymi flawonoidami były diheksozyd luteoliny (F11, $\lambda_{\max}$ 253(II), 263(sh), 350(I), m/z 611 $[M+H]^+$) oraz 7-O-neohesperozyd chryzoeriolu (F18, $\lambda_{\max}$ 252(II), 265(sh), 346(I), m/z 609 $[M+H]^+$), które wcześniej identyfikowano w kwiatach innych przedstawicieli rodzaju *Lonicera* (Tab. 22) [267, 279, 280].

Identyfikację związków eluujących jako piki F1, F2 i F13 utrudniał brak danych literaturowych o związkach kwiatów rodzaju *Lonicera* charakteryzujących się identycznymi widmami MS. Obecność jonów deprotonowanych przy, odpowiednio, m/z 595, 579 i 623 $[M-H]^-$ sugerowało, że związki te mogą być diglukozydami flawonoidowymi. Dodatkowo, w widmach MS związków F1 i F2 w trybie jonów dodatnich, obserwowano jon przy m/z 303 charakterystyczny dla kwercetyny oraz przy m/z

287, charakterystyczny dla luteoliny. Dwa diglukozydy flawonolowe, 7-O-(6-O-arabinozylo-glukozyd) luteoliny (m/z 579 [M-H]⁻) oraz 3-O-(6-O-ramnozylo-heksozyd) izoramnetyny (m/z 623 [M-H]⁻), wykryto wcześniej w liściach gatunku *Lonicera henryi* [287]. Informacja ta w połączeniu z zebranymi danymi widm UV oraz MS, pozwoliły na wstępną identyfikację związku F1 jak pentozylo-heksozydu kwercetyny, F2 jako pentozylo-heksozydu luteoliny oraz F13 jako ramnozylo-heksozydu izoramnetyny (Tab. 22).

Większość zidentyfikowanych flawonoidów rozdzielono w 1D, z wyjątkiem heksozydu kwercetyny (F9), ramnozylo-heksozydu luteoliny (F10), ramnozylo-heksozydu izoramnetyny (F13), ramnozylo-heksozydu apigeniny (F14) oraz kwercytryny (F15), identyfikowanych we frakcjach FR.4-5 w ²D (Ryc. 38).

Czterech związków, przypuszczalnie pochodnych flawonoidowych (F7, F8, F17), w tym jednego obecnego tylko w odmianie 'Brązowa' (F19) nie zidentyfikowano (Tab. 22). Interesującym jest fakt, że w materiale nie stwierdzono obecności aglikonów flawonoidowych: kwercetyny oraz luteoliny, często rozpoznawanych w kwiatach gatunków *Lonicera* [262, 263, 265, 267, 279].

Flawonoidy są dominującą grupą związków spośród wszystkich badanych grup metabolitów wtórnych, zarówno pod względem liczby zidentyfikowanych związków, jak i oznaczonych stężeń w kwiatach badanych odmian wiciokrzewu (Tab. 22, 25).

Rutyna (F3) była dominującym flawonolem we wszystkich 3 badanych odmianach (1246.3 – 2227.8 mg/100 g s.m.) wraz z obecnym w znacznych ilościach kupressuflawonem (F21, 235.6 – 744.8 mg/100 g s.m.), amentoflawonem (F22, 141.8 – 396.8 mg/100 g s.m.) oraz pentozylo-heksozydem kwercetyny (F1, 284.7 – 356.9 mg/100 g s.m.). Odmiana 'Wojtek' zawierała około 2-razy więcej rutyny, kupressuflawonu oraz amentoflawonu w porównaniu do pozostałych dwóch odmian, natomiast wszystkie 3 charakteryzowały się zbliżonymi poziomami pentozylo-heksozydu kwercetyny (Tab. 25).

Obserwowano różnice w stężeniach niektórych flawonoidów pomiędzy badanymi odmianami. Odnotowano niższe stężenie 7-O-rutynozydu luteoliny (F4) w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis* 'Brązowa', wyższe stężenie ramnozylo-heksozydu apigeniny w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek', oraz 2- do 6-razy wyższe stężenie 7-O-neohesperydozydu chryzoeriolu (F18) w odmianie 'Wojtek' w porównaniu do odmian 'Zielona' i 'Brązowa'. 3-O-rutynozyd kemferolu (F12) i ramnozylo-heksozyd izoramnetyny (F13) występowały w najwyższych stężeniach w odmianie 'Wojtek', natomiast w około 2-razy niższych stężeniach w odmianie 'Zielona' oraz najniższych w odmianie 'Brązowa' (Tab. 25).

Całkowita zawartość flawonoidów w kwiatach odmiany 'Wojtek' była około 2-razy wyższa w porównaniu do pozostałych badanych odmian (Tab. 25). Wysokie zawartości związków

flawonoidowych oznaczone w kwiatach badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*, pozostają w sprzeczności z dotychczasowymi wynikami prac nad kwiatami z rodzaju *Lonicera*, w których flawonoidy identyfikowano w niskich, bądź śladowych ilościach [262, 263, 283].

2.2.4.2 Kwasy fenolowe

Na podstawie otrzymanych widm UV wykryto 15 związków należących do kwasów fenolowych (C1-15) (Tab. 23, Ryc. 38). Poza kwasem kawowym (C6) i chlorogenowym (C3) zidentyfikowanymi w oparciu o porównanie z wzorcami, identyfikacja pozostałych fenolokwasów w badanym materiale roślinnym była oparta głównie na danych literaturowych z zakresu analiz LC-MS wyciągów z kwiatów rodzaju *Lonicera* [262, 264, 265, 267, 272, 279, 281, 283].

Obok kwasu chlorogenowego, wykryto szereg innych kwasów kawoilochinowych (C1, C4, C5 i C9) charakteryzujących się obecnością tego samego jonu molekularnego przy m/z 353 $[M-H]^-$ w widmach ESI-MS. Porównując otrzymane wartości t_R oraz kolejność elucji z opublikowanymi danymi, związek eluujący jako pik C1 zidentyfikowano jako kwas neochlorogenowy [262, 264, 265, 267, 279, 281]. Uwzględniając kolejność elucji przedstawioną we wcześniejszych pracach założono, że związki eluujące jako C4 i C5 odpowiadają kwasowi 4-O-kawoilochinowemu i jego izomerowi [264, 267, 279], natomiast C9 kwasowi 1-O-kawoilochinowemu bądź jego izomerowi [264]. W analogiczny sposób zidentyfikowano trzy kolejne kwasy dikawoilochinowe (C10, C11 i C12) jako, odpowiednio, kwas 4,5-di-O-kawoilochinowy, 3,5-di-O-kawoilochinowy oraz 3,4-di-O-kawoilochinowy [262, 272, 281]. Pik C7 zidentyfikowano jak kwas p-kumaroilochinowy, a pik C14 jako glikozyd kwasu p-kumaroilochinowego, opierając się na deprotonowanych jonach charakterystycznych dla kwasu p-kumaroilochinowego przy m/z 337 $[M-H]^-$ oraz jego glikozydu przy m/z 499 $[M-H]^-$ [264, 283]. Pozostałe związki zidentyfikowano jako heksozyd kwasu kawowego (C2) [283], kwas feruiloilochinowy (C8) oraz kwas feruilkawoilochinowy (C15) (Tab. 23) [264, 283].

6 z kwasów fenolowych rozdzielono w warunkach ‘on-line’ ‘heart-cutting’ 2D LC, co stanowi niemal połowę wszystkich zidentyfikowanych fenolokwasów. Większość z nich rozdzielono w pierwszych 3 frakcjach z 1D (C4-6 we FR.1, C7 we FR.2 i C9 we FR.3), z kwasem 3,5-di-O-kawoilochinowym (C11) rozdzielonym we FR.5 w 2D (Ryc. 38).

Podobnie jak w przypadku flawonoidów (choć z mniejszymi różnicami), kwiaty *L. caerulea* var. *edulis* ‘Wojtek’ charakteryzowały się wyższą zawartością fenolokwasów, podczas gdy ich stężenie w odmianach ‘Brazowa’ i ‘Zielona’ było zbliżone (Tab. 25).

Wśród oznaczonych stężeń pojedynczych fenolokwasów, zbliżone poziomy zawartości w kwiatach 3 badanych odmian obserwowano dla większości analizowanych związków. Kwasy chlorogenowy (C3) i 3,5-di-O-kawoilochinowy (C11) dominowały z zespole, wraz z kwasem

neochlorogenowym (C1) i 3,4-di-O-kawoilochinowym obecnymi w wyższych stężeniach (C12). Wszystkie w/w kwasy występowały w około 2-razy wyższych stężeniach w odmianie 'Wojtek', w porównaniu do pozostałych dwóch odmian, z wyjątkiem kwasu neochlorogenowego (C1) którego zawartość w odmianie 'Wojtek' była 3-razy wyższa niż w odmianie 'Brązowa' (Tab. 25). Znaczne różnice obserwowano również dla kwasu kawowego (C6), którego zawartość wynosiła 58.4 mg/100 g s.m. w odmianie 'Wojtek', oraz była znacznie niższa (6.9 – 8.4 mg/100 g s.m.) w odmianach 'Zielona' i 'Brązowa'. Natomiast kwas p-kumaroilochinowy (C7) występował w niskim stężeniu (6.5 mg/100 g s.m.) w odmianie 'Wojtek', natomiast w znacznie wyższych stężeniach (63.6 – 64.2 mg/100 g s.m.) w odmianach 'Zielona' i 'Brązowa' (Tab. 25).

Dane literaturowe opisują kwasy chlorogenowy i 3,5-di-O-kawoilochinowy jako dominujące fenolokwasy w kwiatach rodzaju *Lonicera*, co potwierdzają wyniki przeprowadzonych analiz [262, 272, 281].

2.2.4.3 Irydoidy

W materiale roślinnym zidentyfikowano 14 związków o widmach UV wykazujących maksima absorpcji charakterystyczne dla irydoidów ($\lambda_{\max}$ 236 – 243 nm) (Tab. 24). W oparciu o uzyskane dane chromatograficzne, w porównaniu ze związkami wzorcowymi, zidentyfikowano kwas loganowy (I2), loganinę (I8) oraz swerozyd (I9) (Tab. 24, Ryc. 38), które są powszechnie występującymi irydoidami w kwiatach rodzaju *Lonicera* [262, 263, 265-267, 272, 279]. Innymi związkami irydoidowymi często identyfikowanymi w rodzaju *Lonicera* są dimetylo-sekologanozyd, epi-wogelozyd i centaurozyd [262, 263, 265-267, 272, 279, 282], jakkolwiek w toku badań nad kwiatami *L. caerulea*, z powyższych (na podstawie kolejności elucji) zidentyfikowano jedynie epi-wogelozyd (I10) [262, 263, 265-267, 279, 282]. W oparciu o dane literaturowe, z zakresu widm MS oraz kolejności elucji, dokonano wstępnej identyfikacji dwóch izomerów kwasu sekologanowego (I1 i I5) [265, 267, 279], kwasu 8-epi-loganowego (I3) [267], sekologanozydu (I4) [262], 7-O-arabinozydu demetylosekologanolu (I7) [273] oraz 7-estru butylowego sekoksylaniny (I14) [262, 263]. We wszystkich odmianach zidentyfikowano również sekoirydoid związany z β -hydroksyaminokwasem: treoninosekologaninę (I13), który wraz z serynosekologaniną izolowano wcześniej z kwiatów *L. japonica* (Tab. 24).

W warunkach 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC, w odmianach 'Brązowa' i 'Zielona', dodatkowo rozdzielono i zidentyfikowano sekoksylaninę (I11) [262, 263, 265-267, 272, 279, 282] oraz serynosekologaninę (I12) [285] (Tab. 24, Ryc. 39).

Spośród badanych grup związków czynnych, separacja i identyfikacja irydoidów była najbardziej zależna od użycia techniki 2D LC. Tylko 4 irydoidy rozdzielono w ¹D (I1-3, I7), natomiast pozostałe 10 rozdzielono i zidentyfikowano przy użyciu systemów 'on-line' (I4-6, I8-10, I13-14) oraz

‘off-line’ (I11-12) ‘heart-cutting’. W rozdzielaniu ‘on-line’ irydoidy były identyfikowane we wszystkich 5 frakcjach, przy czym większość z nich występowała we FR.1 i FR.2 (Ryc. 38, 39).

Całkowitą zawartość irydoidów w odmianach ‘Wojtek’ oraz ‘Brązowa’ oznaczono na tym samym poziomie w zakresie 3308.5 – 3435.9 mg/100 g s.m., wyraźnie wyższym w porównaniu do zawartości w odmianie ‘Zielona’ (2072.2 mg/100 g s.m.) (Tab. 25). Odnotowano również różnice w zawartości poszczególnych irydoidów. Jeden z izomerów kwasu sekologanowego (I1) wykryto tylko w odmianie ‘Wojtek’, natomiast kwas 8-epi-loganowy (I3) był obecny jedynie w odmianach ‘Brązowa’ i ‘Zielona’ (Tab. 25). Ponieważ sekoksyloganina (I11) i serynosekologanina (I12) były identyfikowane w trybie ‘off-line’, nie uwzględniono ich w oznaczeniu ilościowym.

Kwas loganowy (I2) był dominującym irydoidem w odmianie ‘Wojtek’ (1390 mg/100 g s.m.). Występował on również w znacznych stężeniach w pozostałych dwóch odmianach, jednak towarzyszyło mu równie wysokie stężenie niezidentyfikowanego irydoidu (I6). Kwiaty *L. caerulea* var. *edulis* ‘Brązowa’ zawierały około 4-razy więcej loganiny (I8) niż kwiaty odmiany ‘Zielona’, oraz 6-razy więcej niż kwiaty odmiany ‘Wojtek’. W porównaniu do pozostałych dwóch, kwiaty odmiany ‘Brązowa’ zawierały najwięcej treoninosekologaniny (I13, 497.4 mg/100 g s.m.), ‘Zielona’ była najbogatszym źródłem izomeru kwasu sekologanowego (I5, 225.4 mg/100 g s.m.) natomiast ‘Wojtek’ zawierał najwięcej sekologanozydu (I4, 248.6 mg/100 g s.m.), 7-O-arabinozydu demetylosekologanolu (I7, 156.8 mg/100 g s.m.) i swerozydu (I9, 337 mg/100 g s.m.) (Tab. 25).

Dane literaturowe wskazują na swerozyd i loganinę jako dominujące irydoidy w kwiatach rodzaju *Lonicera* [262, 263, 266]. Pozostaje to w sprzeczności z otrzymanymi wynikami analiz chromatograficznych odmian krajowych *L. caerulea* var. *edulis* ‘Wojtek’ i ‘Zielona’, w których odnotowano wysokie stężenia kwasu loganowego a nie swerozydu i loganiny, natomiast jest częściowo zgodne z wynikami otrzymanymi dla kwiatów odmiany ‘Brązowa’, w których loganina jest dominującym związkiem obok kwasu loganowego.

Tab. 22 Dane chromatograficzne flawonoidów zidentyfikowanych w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis* otrzymane metodą LC-DAD/ESI-MS

nr.	związek chemiczny	t _R (min)		UV λ _{max} (nm)	ESI-MS (m/z)	
		¹ D	² D **		[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
F1	pentozylo-heksozyd kwercetyny	21.2	–	254, 260sh, 353	597 [M+H] ⁺ 303	595 [M-H] ⁻ 709 [M-H+TFA] ⁻
F2	pentozylo-heksozyd luteoliny	22.7	–	254, 260sh, 352	581 [M+H] ⁺ 287	579 [M-H] ⁻ 693 [M-H+TFA] ⁻
F3	rutyna *	23.1	–	254, 262sh, 354	611 [M+H] ⁺	609 [M-H] ⁻ 723 [M-H+TFA] ⁻
F4	7-O-rutynozyd luteoliny *	23.7	–	253, 263sh, 346	595 [M+H] ⁺	593 [M-H] ⁻ 707 [M-H+TFA] ⁻
F5	izokwercetyna *	23.9	–	254, 262sh, 353	465 [M+H] ⁺	463 [M-H] ⁻ 577 [M-H+TFA] ⁻
F6	7-O-glukozyd luteoliny *	24.4	–	252, 264sh, 346	449 [M+H] ⁺	447 [M-H] ⁻ 561 [M-H+TFA] ⁻
F7	nieznany flawonoid	–	26.3	252, 265sh, 350	391 [M+H] ⁺	389 [M-H] ⁻
F8	nieznany flawonoid	–	26.4	250, 267sh, 350	561 [M+H] ⁺	559 [M-H] ⁻ 673 [M-H+TFA] ⁻
F9	heksozyd kwercetyny	–	26.5	250, 266sh, 350	465 [M+H] ⁺	463 [M-H] ⁻ 557 [M-H+TFA] ⁻
F10	ramnozylo-heksozyd luteoliny	–	26.6	250, 264sh, 343	595 [M+H] ⁺	593 [M-H] ⁻ 707 [M-H+TFA] ⁻
F11	diheksozyd luteoliny	25.5	–	253, 263sh, 350	611 [M+H] ⁺	609 [M-H] ⁻ 723 [M-H+TFA] ⁻
F12	3-O-rutynozyd kemferolu *	26.8	–	264, 346	595 [M+H] ⁺	593 [M-H] ⁻ 707 [M-H+TFA] ⁻
F13	ramnozylo-heksozyd izoramnetyny	–	29.0	253, 261sh, 352	625 [M+H] ⁺	623 [M-H] ⁻ 737 [M-H+TFA] ⁻
F14	ramnozylo-heksozyd apigeniny	–	29.1	265, 337	579 [M+H] ⁺	577 [M-H] ⁻ 691 [M-H+TFA] ⁻
F15	kwercytryna *	–	29.2	254, 260sh, 347	449 [M+H] ⁺	447 [M-H] ⁻ 561 [M-H+TFA] ⁻
F16	ramnozylo-heksozyd luteoliny	28.2	–	250, 264sh, 343	595 [M+H] ⁺	593 [M-H] ⁻ 707 [M-H+TFA] ⁻
F17	nieznany flawonoid	28.4	–	254, 349	507 [M+H] ⁺	505 [M-H] ⁻ 619 [M-H+TFA] ⁻
F18	7-O-neohesperozyd chryzoeriolu	29.1	–	252, 265sh, 346	609 [M+H] ⁺	607 [M-H] ⁻ 721 [M-H+TFA] ⁻
F19	nieznany flawonoid	30.8	–	250, 264sh, 344	463 [M+H] ⁺ 303	575 [M-H+TFA] ⁻
F20	ochnaflawon *	31.0	–	282, 328	539 [M+H] ⁺	537 [M-H] ⁻ 651 [M-H+TFA] ⁻
F21	kupressuflawon *	38.0	–	270, 329	539 [M+H] ⁺	537 [M-H] ⁻ 651 [M-H+TFA] ⁻
F22	amentoflawon *	39.1	–	267, 335	539 [M+H] ⁺	537 [M-H] ⁻ 651 [M-H+TFA] ⁻

* związek wzorcowy, ** czasy retencji ²D są wyrażone w t_R ¹D

Tab. 23 Dane chromatograficzne kwasów fenolowych zidentyfikowanych w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis* otrzymane metodą LC-DAD/ESI-MS

nr.	związek chemiczny	t _R (min)		UV λ _{max} (nm)	ESI-MS (m/z)	
		¹ D	² D **		[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
C1	kwas neochlorogenowy	6.6	–	235, 300 _{sh} , 324	355 [M+H] ⁺	353 [M-H] ⁻ 467 [M-H+TFA] ⁻
C2	heksozyd kwasu kawowego	10.6	–	241, 300 _{sh} , 328	343 [M+H] ⁺	341 [M-H] ⁻ 455 [M-H+TFA] ⁻
C3	kwas chlorogenowy *	11.5	–	235, 300 _{sh} , 324	355 [M+H] ⁺	353 [M-H] ⁻ 467 [M-H+TFA] ⁻
C4	kwas kawoilochinowy	–	15.4	239, 300 _{sh} , 327	355 [M+H] ⁺	353 [M-H] ⁻ 467 [M-H+TFA] ⁻
C5	kwas kawoilochinowy	–	15.5	239, 300 _{sh} , 327	355 [M+H] ⁺	353 [M-H] ⁻ 467 [M-H+TFA] ⁻
C6	kwas kawowy *	–	15.6	235, 300 _{sh} , 322	181 [M+H] ⁺	179 [M-H] ⁻ 293 [M-H+TFA] ⁻
C7	kwas p-kumaroilochinowy	–	17.4	227, 312	339 [M+H] ⁺	337 [M-H] ⁻ 451 [M-H+TFA] ⁻
C8	kwas feruilochinowy	17.4	–	229, 317	369 [M+H] ⁺	367 [M-H] ⁻ 481 [M-H+TFA] ⁻
C9	kwas kawoilochinowy	–	19.6	235, 300 _{sh} , 324	355 [M+H] ⁺	353 [M-H] ⁻ 467 [M-H+TFA] ⁻
C10	kwas 4,5-di-O-kawoilochinowy	26.8	–	235, 300 _{sh} , 323	517 [M+H] ⁺	515 [M-H] ⁻ 629 [M-H+TFA] ⁻
C11	kwas 3,5-di-O-kawoilochinowy	–	29.1	240, 300 _{sh} , 327	517 [M+H] ⁺	515 [M-H] ⁻ 629 [M-H+TFA] ⁻ 353
C12	kwas 3,4-di-O-kawoilochinowy	30.3	–	235, 300 _{sh} , 328	517 [M+H] ⁺	515 [M-H] ⁻ 629 [M-H+TFA] ⁻ 365
C13	nieznany fenolokwas	31.5	–	300, 314	–	613 871
C14	glukozyd kwasu p-kumaroilochinowego	31.9	–	300, 315	–	499 [M-H] ⁻ 613 [M-H+TFA] ⁻ 337
C15	kwas feruilkawoilochinowy	33.2	–	235, 328	531 [M+H] ⁺	529 [M-H] ⁻ 643 [M-H+TFA] ⁻

* związek wzorcowy, ** czasy retencji ²D są wyrażone w t_R ¹D

Tab. 24 Dane chromatograficzne irydoidów zidentyfikowanych w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis* otrzymane metodą LC-DAD/ESI-MS

nr.	związek chemiczny	t _R (min)		UV λ _{max} (nm)	ESI-MS (m/z)	
		¹ D	² D **		[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
I1	izomer kwasu sekologanowego	8.7	–	236	375 [M+H] ⁺	373 [M-H] ⁻ 487 [M-H+TFA] ⁻
I2	kwas loganowy *	9.7	–	236	377 [M+H] ⁺	375 [M-H] ⁻ 489 [M-H+TFA] ⁻
I3	kwas 8-epi-loganowy	11.4	–	235	377 [M+H] ⁺	375 [M-H] ⁻ 489 [M-H+TFA] ⁻
I4	sekologanozyd	–	14.9	233	391 [M+H] ⁺	389 [M-H] ⁻ 503 [M-H+TFA] ⁻ 345
I5	izomer kwasu sekologanowego	–	15.0	243	375 [M+H] ⁺	373 [M-H] ⁻ 487 [M-H+TFA] ⁻
I6	nieznany irydoid	–	15.1	241	471 [M+H] ⁺	469 [M-H] ⁻ 583 [M-H+TFA] ⁻
I7	7-O-arabinozyd demetylosekologanolu	13.8	–	236	509 [M+H] ⁺	507 [M-H] ⁻ 621 [M-H+TFA] ⁻
I8	loganina *	–	16.8	236	391 [M+H] ⁺	389 [M-H] ⁻ 503 [M-H+TFA] ⁻
I9	swerozyd *	–	16.9	243	359 [M+H] ⁺	357 [M-H] ⁻ 471 [M-H+TFA] ⁻
I10	epi-wogelozyd	–	19.2	243	389 [M+H] ⁺	387 [M-H] ⁻ 501 [M-H+TFA] ⁻
I11	sekoksyloganina ***	–	12.5	236	405 [M+H] ⁺	517 [M-H+TFA] ⁻
I12	serynosekologanina ***	–	14.2	236	444 [M+H] ⁺	556 [M-H+TFA] ⁻
I13	treoninosekologanina	–	26.1	235	458 [M+H] ⁺	456 [M-H] ⁻ 570 [M-H+TFA] ⁻
I14	7-ester butylowy sekoksyloganiny	–	28.7	242	461 [M+H] ⁺	459 [M-H] ⁻ 573 [M-H+TFA] ⁻

* związek wzorcowy, ** czasy retencji ²D są wyrażone w t_R ¹D, *** t_R ²D z rozdzielania 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC

Tab. 25 Zawartość flawonoidów, fenolokwasów i irydoidów w kwiatach 3 odmian *L. caerulea* var. *edulis* (mg/100 g s.m.) (n = 3), numery związków odpowiadają numerom w Tab. 22-24

nr.	flawonoidy			nr.	fenolokwasy			nr.	irydoidy		
	<i>L. cae</i> W	<i>L. cae</i> B	<i>L. cae</i> Z		<i>L. cae</i> W	<i>L. cae</i> B	<i>L. cae</i> Z		<i>L. cae</i> W	<i>L. cae</i> B	<i>L. cae</i> Z
F1 ¹	356.9 ± 9.7	324.5 ± 11.0	284.7 ± 10.7	C1 ⁵	135.8 ± 2.7	40.4 ± 0.3	95.4 ± 0.6	I1 ⁶	95.8 ± 14.4	–	–
F2 ²	188.1 ± 8.4	170.9 ± 7.8	63.1 ± 1.0	C2 ⁵	33.7 ± 0.2	26.5 ± 0.1	24.3 ± 0.1	I2	1390.0 ± 24.3	805.2 ± 20.1	496.8 ± 1.0
F3	2227.8 ± 146.3	1246.3 ± 47.5	1417.5 ± 55	C3	1687.8 ± 40.2	939.2 ± 32.0	960.7 ± 5.5	I3 ⁶	–	67.2 ± 0.9	57.7 ± 2.2
F4	296.6 ± 12.8	28.8 ± 0.6	178.7 ± 1.1	C4 ⁵	70.4 ± 7.7	37.5 ± 6.8	41.8 ± 16.3	I4 ⁷	248.6 ± 8.1	89.7 ± 1.1	89.5 ± 4.2
F5	199.7 ± 8.7	163.4 ± 1.8	83.5 ± 0.9	C5 ⁵	39.8 ± 2.2	13.8 ± 1.0	18.1 ± 1.0	I5 ⁶	164.2 ± 2.0	74.4 ± 2.5	225.4 ± 6.0
F6	81.2 ± 1.9	99.6 ± 3.3	23.4 ± 0.2	C6	58.4 ± 3.2	8.4 ± 0.2	6.9 ± 0.2	I6 ⁷	444.7 ± 11.7	767.7 ± 8.0	442.5 ± 3.7
F7 ³	40.2 ± 3.2	27.1 ± 1.7	27.6 ± 0.7	C7 ⁵	6.5 ± 1.6	64.2 ± 0.3	63.6 ± 0.4	I7 ⁷	156.8 ± 5.3	18.2 ± 1.1	29.1 ± 0.1
F8 ³	34.1 ± 2.6	10.5 ± 0.8	22.2 ± 0.7	C8 ⁵	44.1 ± 0.2	35.7 ± 0.2	36.7 ± 0.1	I8	133.8 ± 4.0	872.3 ± 6.9	208.9 ± 4.7
F9 ³	27.5 ± 1.0	19.2 ± 4.1	12.7 ± 0.1	C9 ⁵	12.7 ± 0.4	10.1 ± 0.2	10.7 ± 0.5	I9	337.0 ± 13.1	94.4 ± 5.2	65.4 ± 0.5
F10 ³	133.6 ± 3.3	115.4 ± 13	29.5 ± 0.5	C10 ⁵	37.7 ± 0.3	26.9 ± 0.2	25.5 ± 0.1	I10 ⁸	74.5 ± 7.4	101.7 ± 2.8	127.6 ± 5.5
F11 ²	19.0 ± 1.1	8.4 ± 0.5	21.0 ± 0.2	C11 ⁵	1058.7 ± 10.5	642.0 ± 35.3	485.4 ± 25.8	I13 ⁷	192.9 ± 10.7	497.4 ± 2.1	296.9 ± 4.4
F12	81.3 ± 1.6	14.4 ± 0.8	40.6 ± 0.5	C12 ⁵	227.6 ± 1.8	105.3 ± 3.2	89.0 ± 1.0	I14 ⁷	70.2 ± 2.1	46.9 ± 0.7	32.4 ± 1.2
F13 ³	137.5 ± 2.1	49.3 ± 4.8	75.5 ± 2.8	C13 ⁵	52.1 ± 0.7	56.2 ± 1.0	48.0 ± 0.2	suma	3308.5 ± 33.7	3435.9 ± 40.9	2072.2 ± 58.1
F14 ³	76.2 ± 4.7	8.6 ± 0.1	6.0 ± 0.9	C14 ⁵	63.7 ± 0.3	66.6 ± 0.9	58.6 ± 0.2				
F15	39.5 ± 0.3	21.3 ± 2.2	11.6 ± 0.6	C15 ⁵	36.4 ± 0.2	30.9 ± 0.1	29.1 ± 0.1				
F16 ²	164.2 ± 11.8	282.3 ± 2.4	145.7 ± 2.9	suma	3565.4 ± 51.7	2103.7 ± 67.9	1993.8 ± 43.3				
F17 ¹	156.8 ± 11.8	160.9 ± 8.5	66.0 ± 1.6								
F18 ¹	505.9 ± 8.4	80.8 ± 0.3	226.2 ± 0.9								
F19 ¹	–	140.8 ± 4.1	–								
F20 ⁴	44.7 ± 3.1	13.5 ± 0.2	4.4 ± 0.1								
F21	744.8 ± 9.1	426.4 ± 13	235.6 ± 0.8								
F22	396.8 ± 9.8	255.9 ± 7.4	141.8 ± 0.7								
suma	5941.6 ± 189.3	3668.3 ± 97.3	3117 ± 120.1								

przełeczone na: ¹ rutynę, ² 7-O-rutynozyd luteoliny, ³ kwercytrynę, ⁴ kupressuflawon, ⁵ kwas kawowy, ⁶ kwas loganowy, ⁷ loganina, ⁸ swerozyd, *L. cae: Lonitara caerulea*, W: Wojtek, B: Brązowa, Z: Zielona

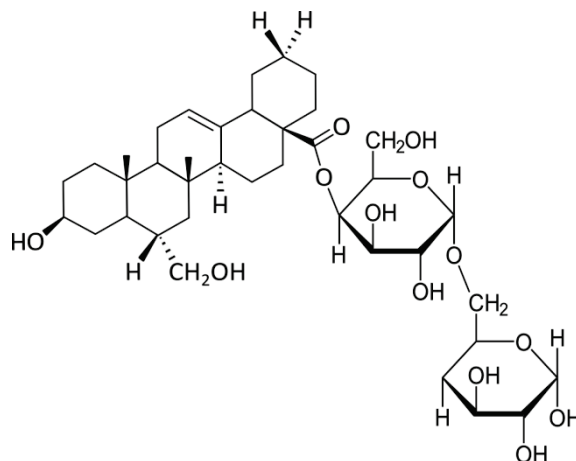
2.2.5 Analiza saponin w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis*

W rozdzielaniu HPLC saponin kwiatów 3 odmian uprawowych *L. caerulea* ('Brązowa', 'Wojtek', 'Zielona') użyto program elucji gradientowej opracowany wcześniej przez Ren i wsp [262]. Zastosowano kolumnę Discovery HS C-18 z programem elucji gradientowej XII, obejmującym wzrost stężenia mieszaniny ACN:MeOH:HCOOH (80:20:0.05, *v/v/v*), od 10 do 65%, w 0.1% wodnym roztworze HCOOH. Uwzględniając brak grup chromoforowych w saponinach, do identyfikacji związków zastosowano, obok detektora UV, detektory ELSD i MS. Parametry detektora ELSD optymalizowano w zakresie wzmocnienia sygnału, natężenia przepływu gazu rozpylającego i temperatury parownika, jako optymalne uznając wzmocnienie 16, natężenie przepływu gazu rozpylającego 1.8l/min i temperaturę parownika 40°C. Detekcję ESI-MS przeprowadzono techniką SIM oraz w trybie zbierania widm, w jonizacji ujemnej (Tab. 12).

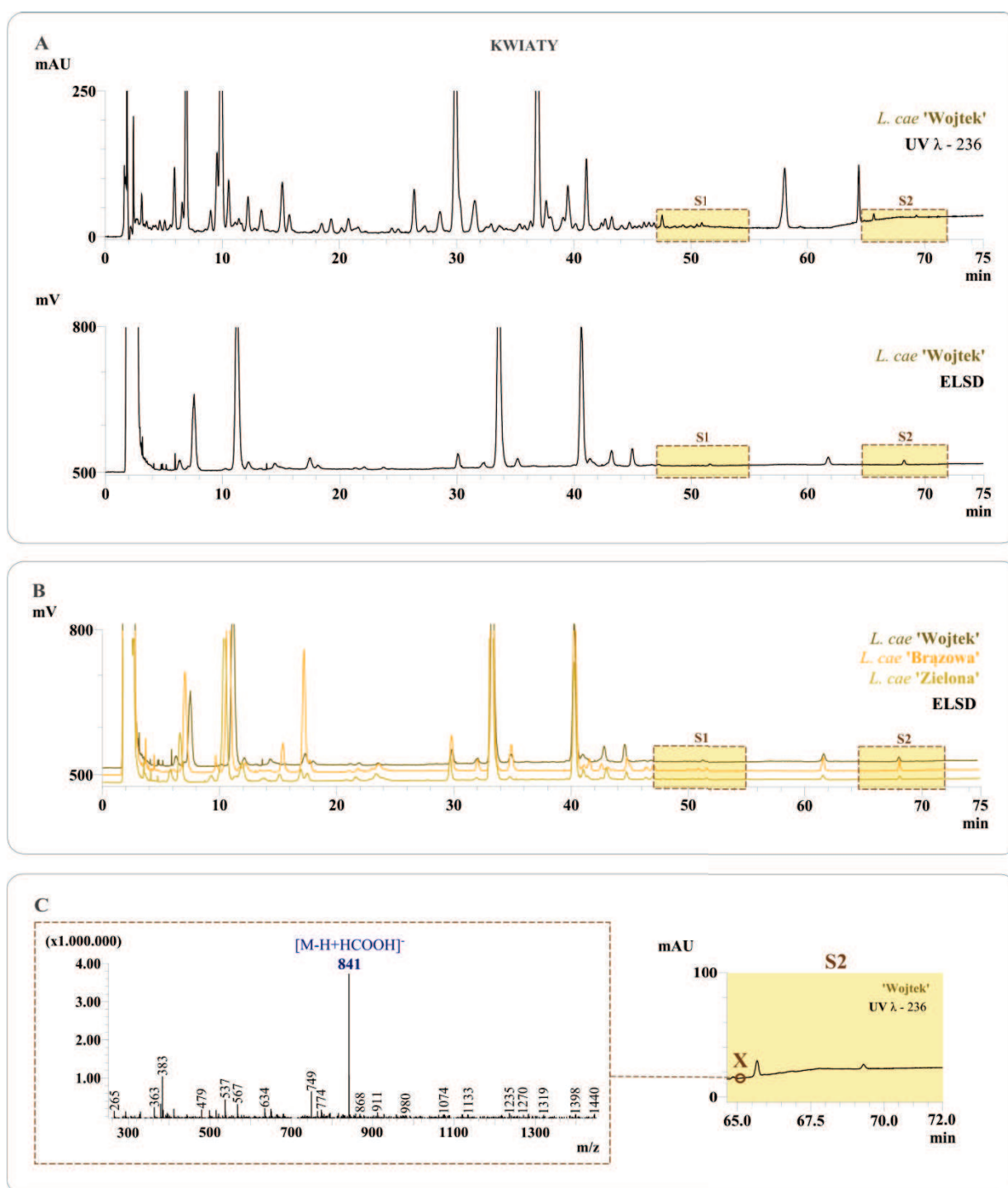
Opierając się na danych literaturowych [262], na otrzymanych chromatogramach LC wyznaczono dwa zakresy czasów t_R (S1: t_R 47.0 – 55.8 min, S2: t_R 64.2 – 72.0 min) w których techniką SIM monitorowano jony o wartościach m/z charakterystycznych dla 9 saponin wcześniej identyfikowanych w różnych kwiatach rodzaju *Lonicera* (Ryc. 41) [262].

Z użyciem detektora ELSD nie odnotowano obecności saponin w kwiatach wszystkich 3 odmian wiciokrzewów (Ryc. 41 A-B), co przypuszczalnie wynikało z ich niskich stężeń w badanych surowcach. W przypadku detektora ELSD zależność pola powierzchni piku od stężenia związku zmienia się w logarytmicznie, a nie liniowo (tak jak ma to miejsce w detektorze UV), co powoduje że przy niskich stężeniach związek może być niewykrywalny.

W widmie ESI-MS, w trybie jonów ujemnych, związku eluującego z wartością t_R 65.1 min, obecny był sygnał jonu przy m/z 841, stanowiącego addukt z kwasem mrówkowym ($[M-H+HCOOH]^-$) i odpowiadającego masie cząsteczkowej saponiny identyfikowanej we *Flos Lonicerae*: estrowi 28-O- β -glukopiranozylo(6 $\rightarrow$ 1)-O- β -glukopiranozylo-hederageniny [262]. Związek wykryto w śladowych ilościach we wszystkich 3 badanych odmianach (Ryc. 40, Ryc. 41 C). W dotychczasowych pracach saponiny identyfikowano w praktycznie śladowych ilościach w kwiatach rodzaju *Lonicera* [262, 267, 272], co jest zgodne w wynikami obecnej analizy, jakkolwiek ich zespół był jakościowo bogatszy.



Ryc. 40 Wzór strukturalny saponiny zidentyfikowanej w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis* metodą HPLC-ELSD/MS



Ryc. 41 Chromatogramy LC-UV-ELSD ekstraktów metanolowych z kwiatów badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*

A –chromatogramy LC-UV i LC-ESLD kwiatów odmiany 'Wojtek', **B** – chromatogramy LC-ELSD kwiatów *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek', 'Brazowa' i 'Zielona', **C** – chromatogram LC-UV identyfikowanej w odmianie 'Wojtek' saponiny (X), wraz z widmem ESI-MS, **S1, S2** – zakresy wartości t_R saponin według danych literaturowych [262]

- Discovery HS C-18 (150 $\times$ 2.1 mm, 3 μ m), program XII, t_G = 75 min, v = 0.2 ml/min

3. Badanie synergizmu ekstraktów z owoców i pędów *R. idaeus* i *R. occidentalis*

Narastająca antybiotykooporność jest problemem współczesnej medycyny. Zjawisko nabywania odporności na antybiotyki przez drobnoustroje jest procesem naturalnym, którego podstawą są zmiany ewolucyjne w genomie bakteryjnym, zachodzące drogą mutacji lub nabywania genów oporności od innych bakterii [288]. Nadmierna i niewłaściwa dystrybucja antybiotyków znacznie przyspiesza ten proces.

Mechanizm oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe jest najszerszej rozpoznany i wiąże się najczęściej z aktywnością β -laktamaz, bakteryjnych enzymów rozkładających antybiotyki, bądź też mutacjami w białkach PBP (ang. *penicilin binding protein*), w przypadku oporności na penicylinę. Szacuje się że około 90-95% szczepów *Staphylococcus aureus* jest penicylinoopornych, a w niektórych krajach 70-80% szczepów jest również metycylinoopornych [289]. Strategie walki z opornością bakterii koncentrują się na stosowaniu inhibitorów β -laktamaz bądź kwasu klawulanowego w połączeniu z antybiotykiem [289, 290].

Jednocześnie trwają poszukiwania nowych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Ekstrakty roślinne bądź ich składniki są źródłem struktur różnorodnych biologicznie związków aktywnych, o potencjalnym znaczeniu w leczeniu infekcji wywołanych patogennymi drobnoustrojami, bądź mogą być użyte w kombinacji z dotychczas stosowanymi antybiotykami zwiększając ich efektywność poprzez zjawisko synergizmu [290, 291].

We wcześniejszych badaniach Katedry i Zakładu Farmakognozji, aktywność przeciwbakteryjną ekstraktów z owoców i pędów malin badano wobec szeregu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wyznaczając wartości MIC i MBC [19, 28].

Biorąc pod uwagę dużą liczbę publikacji dotyczących aktywności przeciwbakteryjnej surowców bądź związków pochodzenia roślinnego, badania nad synergizmem z antybiotykami są nieliczne [289]. Dlatego w ramach kontynuacji badań nad właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi ekstraktów z owoców i pędów malin, metodą dyfuzyjno-krażkową oceniono możliwości ich oddziaływania z antybiotykami wobec wybranych szczepów bakteryjnych.

3.1 Analiza składu chemicznego ekstraktów suchych z owoców i pędów *R. idaeus* oraz *R. occidentalis* użytych w badaniach synergizmu z antybiotykami

Wyciągi z owoców odmian *R. idaeus* ('Poranna Rosa' i 'Laszka') i *R. occidentalis* ('Litacz') oraz pędów *R. idaeus* ('Willamette') przeznaczono do badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej uwzględniając wcześniejsze doniesienia o ich składzie jakościowym i ilościowym. Wyciągi otrzymano według procedury opracowanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji. Badania przeprowadzono metodą HPLC-DAD/MS w warunkach analogicznych do rozdzielania zastosowanego w analizie zmienności profili związków fenolowych w pędach *R. idaeus* oraz w pędach *R. occidentalis*.

3.1.1 Analiza jakościowa związków fenolowych

Wszystkie ekstrakty z owoców zawierały sangwinę H-6 (pik 31), cztery izomery sangwiny H-10 (piki 3, 6, 21, 24), sangwinę H-2 (pik 28), 3-O-glukuronid kwercetyny (pik 33), kwas elagowy (pik 27) oraz jego pentozydy (pik 23), metylopentozyd (pik 35) oraz acetylopentozyd (piki 37). Owoce odmiany 'Poranna Rosa' jako jedyne zawierały epikatechinę (pik 14), natomiast w owocach odmiany 'Laszka' stwierdzono obecność dodatkowego pentozydu kwasu elagowego (pik 25). Obydwie w/w odmiany charakteryzowały się również obecnością niezidentyfikowanego pentozydu kwercetyny (pik 34). W ekstrakcie z owoców maliny zachodniej 'Litacz' wykryto również kwas protokatechowy (pik 4) oraz hiperozyd (pik 29) (Ryc. 42, Tab. 26).

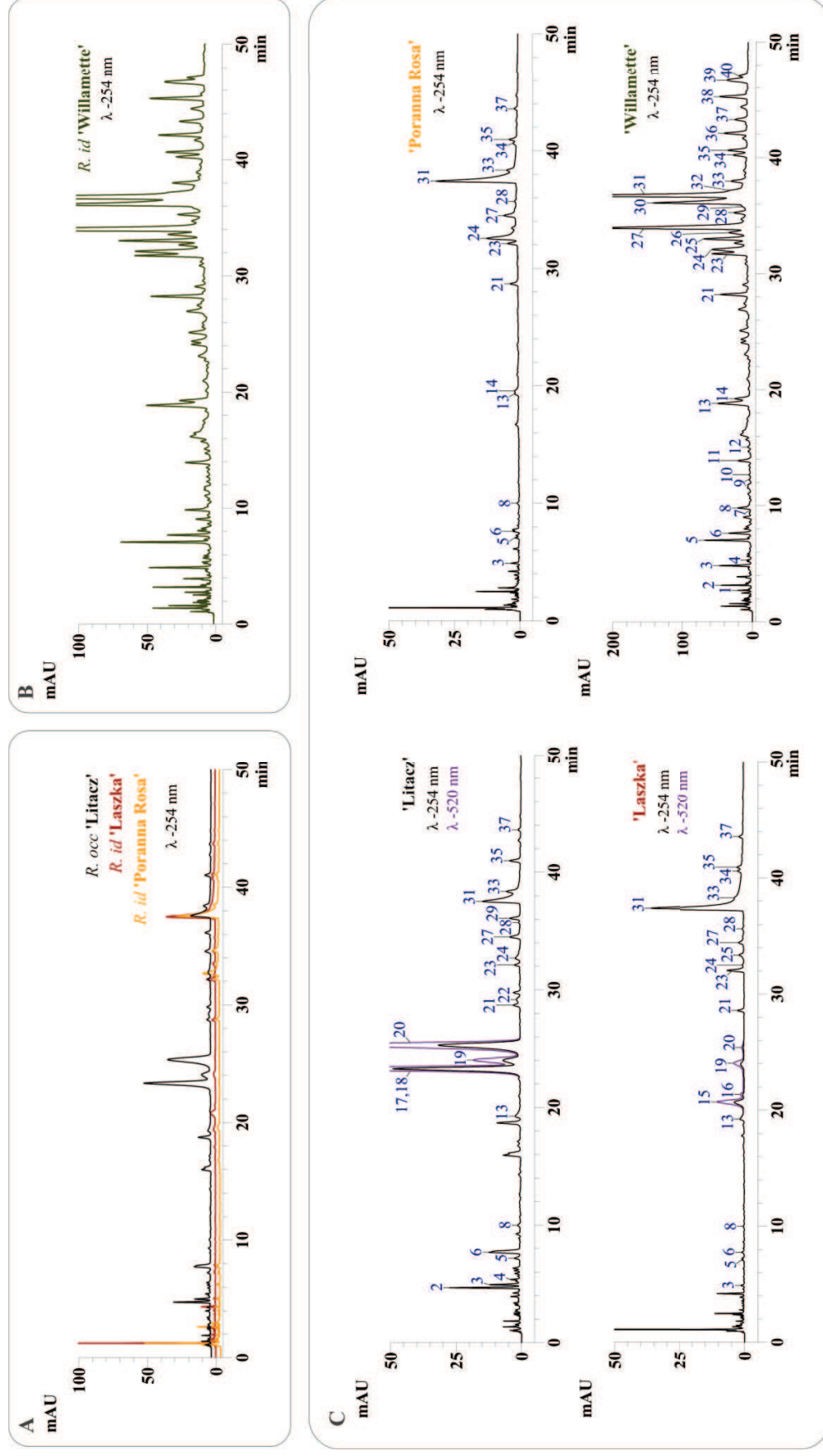
W ekstraktach z owoców *R. idaeus* 'Laszka' oraz *R. occidentalis* 'Litacz' potwierdzono obecność związków z grupy antocyjanów. Obie odmiany charakteryzowała obecność 3-O-glukozydu (pik 19) oraz 3-O-rutynozydu cyjanidyny (pik 20). 3-O-soforozyd (pik 15) i 3-O-(2^G-glukozylorutynozyd) cyjanidyny (pik 16) wykryto jedynie w odmianie 'Laszka', natomiast 3-O-(2^G-ksylozylorutynozyd) cyjanidyny (pik 17), 3-O-sambubiozyd cyjanidyny (pik 18) (w postaci jednego pików zawierającego nierozdzielone obydwa związki) oraz 3-O-rutynozyd pelargonidyny (pik 22) jedynie w odmianie 'Litacz' (Ryc. 42, Tab. 26).

Ekstrakt z pędów *R. idaeus* 'Willamette' wyróżniał się znacznie bogatszym zespołem elagotanin w porównaniu do ekstraktów z owoców badanych odmian. Oprócz związków fenolowych oznaczonych w owocach (z wyłączeniem antocyjanów), w pędach zidentyfikowano dodatkowo kwas galusowy (pik 1), chlorogenowy (pik 9) oraz kawowy (pik 11), procyanidynę B₁ (pik 7) i B₂ (pik 12), katechinę (pik 10), lambertianinę C (pik 30) oraz dwa dodatkowe acetylopentozydy kwasu elagowego (piki 39, 40) (Ryc. 42, Tab. 26).

Tab. 26 Dane chromatograficzne związków fenolowych zidentyfikowanych w ekstraktach suchych z owoców i pędów *R. idaeus* oraz *R. occidentalis* metodą LC-DAD/ESI-MS

nr.	związek chemiczny	t _R (min)	UV (nm)	ESI-MS (m/z) [M+H] ⁺ /[M-H+TFA] ⁻
1	kwask galusowy *	2.7	214, 270	169 ⁻ /283 ⁻
2	nieznany związek	3.2	314	577 ⁻
3	izomer sangwiny H-10	4.8	250, 270	301 ⁻ , 783 ⁻ , 1567 ⁻ /897 ⁻
4	kwask protokatechowy *	5.3	260, 287	153 ⁻ /267 ⁻
5	nieznany związek	7.0	304, 329	341 ⁻ /455 ⁻
6	izomer sangwiny H-10	7.6	250, 270	301 ⁻ , 783 ⁻ , 1567 ⁻ /897 ⁻
7	procyjanidyna B ₁ *	9.6	278	577 ⁻ /691 ⁻
8	nieznany związek	9.8	250, 270	617 ⁻ , 633 ⁻ /747 ⁻
9	kwask chlorogenowy *	12.3	235, 300 ^{sh} , 324	353 ⁻ /467 ⁻
10	katechina *	12.7	278	289 ⁻ /403 ⁻
11	kwask kawowy *	13.9	235, 296 ^{sh} , 320	179 ⁻ /293 ⁻
12	procyjanidyna B ₂ *	15.1	278	577 ⁻ /691 ⁻
13	nieznany związek	18.8	250, 270	1567 ⁻ , 1718 ⁻
14	epikatechina *	19.2	278	289 ⁻ /403 ⁻
15	3-O-soforozyd cyjanidyny *	20.7	278, 515	611 ⁺
16	3-O-(2 ^G glukozylorutynozyd) cyjanidyny *	21.3	282, 514	757 ⁺
17	3-O-(2 ^G ksylozylorutynozyd) cyjanidyny	23.3	279, 518	727 ⁺
18	3-O-sambubiozyd cyjanidyny *	23.3	279, 516	581 ⁺
19	3-O-glukozyd cyjanidyny *	24.0	279, 514	449 ⁺
20	3-O-rutynozyd cyjanidyny *	25.3	277, 520	595 ⁺
21	izomer sangwiny H-10	28.2	251, 270	301 ⁻ , 783 ⁻ , 1567 ⁻ /897 ⁻
22	3-O-rutynozyd pelargonidyny *	29.2	270, 505	579 ⁺
23	pentozyd kwasu elagowego	31.7	251, 359	433 ⁻
24	izomer sangwiny H-10	32.1	250, 270	301 ⁻ , 783 ⁻ , 1567 ⁻
25	pentozyd kwasu elagowego	33.0	252, 359	433 ⁻
26	nieznany związek	33.5	250, 270	1250 ⁻ , 1251 ⁻
27	kwask elagowy *	33.9	252, 366	301 ⁻ /415 ⁻
28	sangwina H-2	35.2	251, 270	1103 ⁻
29	hiperozyd *	35.8	258, 348	463 ⁻ /577 ⁻
30	lambertianina C	36.1	251, 270	1401 ⁻
31	sangwina H-6 *	36.7	250, 270	934 ⁻ , 935 ⁻ , 1869 ⁻ , 1870 ⁻
32	izokwercetyna *	37.1	256, 262 ^{sh} , 353	463 ⁻ /577 ⁻
33	3-O-glukuronid kwercetyny *	38.0	254, 352	477 ⁻ /591 ⁻
34	pentozyd kwercetyny	40.2	263, 351	433 ⁻
35	metrylopentozyd kwasu elagowego	40.6	252, 357	447 ⁻ /561 ⁻
36	nieznany związek	42.1	230, 273	447 ⁻ , 935 ⁻ , 1083 ⁻
37	acetylopentozyd kwasu elagowego	43.3	250, 353	475 ⁻ /589 ⁻
38	nieznany związek	45.2	230, 273	1117 ⁻ /1231 ⁻
39	acetylopentozyd kwasu elagowego	46.7	251, 359	475 ⁻ /589 ⁻
40	acetylopentozyd kwasu elagowego	47.1	251, 350	475 ⁻ /589 ⁻

* związek wzorcowy, **pogrubienie**: jony pseudomolekularne/deprotonowane



Ryc. 42 Chromatogramy LC-DAD ekstraktów suchych z owoców i pędów badanych odmian *R. idaeus* i *R. occidentalis*

A, B – chromatogramy wyciągów z owoców i pędów badanych odmian malin, **C** – związki identyfikowane w poszczególnych odmianach badanych surowców, numery pików identyfikowanych związków odpowiadają numerom w Tab. 26

- Kinetex PFP (100 × 4.6 mm, 2.6 μm), program IV, $t_C = 50$ min, $v = 1$ ml/min

3.1.2 Analiza ilościowa wybranych związków fenolowych w ekstraktach suchych

Oznaczenie ilościowe elagotanin, kwasu elagowego i jego pochodnych, antocyjanów oraz wybranych kwasów fenolowych, epikatechiny oraz 3-O-glukuronidu kwercetyny przeprowadzono w 4 badanych ekstraktach (Tab. 27). Wyniki analizy ilościowej potwierdziły, że ekstrakt z pędów *R. idaeus* 'Willamette' jest wielokrotnie bogatszym źródłem związków polifenolowych w porównaniu do badanych ekstraktów z owoców.

Stężenie kwasu elagowego w pędach *R. idaeus* 'Willamette' było ok. 15-razy wyższe w stosunku do badanych odmian owoców. Pędy odmiany 'Willamette' charakteryzowały się również najwyższą zawartością sangwiny H-6, której stężenie było wyższe od 2 do 5-razy w porównaniu do owoców (Tab. 27). Podobnie sumy badanych elagotanin oraz pochodnych kwasu elagowego w pędach odmiany 'Willamette' były odpowiednio 2-3-razy, oraz 4-6-razy wyższe w porównaniu do owoców. (Tab. 27).

Analiza ilościowa antocyjanów w ekstraktach owoców *R. idaeus* 'Laszka' i *R. occidentalis* 'Litacz' potwierdziła, że owoce czarnej maliny są ponad 13-razy bogatszym źródłem związków antocyjanowych. (Tab. 27).

Wyniki przeprowadzonej analizy ilościowej są zgodne z wynikami wcześniejszych analiz owoców i pędów maliny czerwonej i czarnej, jakkolwiek przeprowadzonych w innych warunkach metody HPLC [19, 28, 31].

W poprzednich badaniach 3-O-soforozyd i 3-O-(2^Gksylozylrutynozyd) cyjanidyny były dominującymi antocyjanami w owocach, odpowiednio, maliny właściwej oraz maliny zachodniej, przy czym suche ekstrakty z owoców *R. occidentalis* 'Litacz' były wielokrotnie bogatszym źródłem antocyjanów (od 5- do 10-razy) niż owoce odmian *R. idaeus*. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi w obecnej pracy, jakkolwiek ogólna zawartość związków antocyjanowych jest znacznie niższa. Podobnie w przypadku sangwiny H-6, którą oznaczano w średnio 10-razy niższych ilościach w 3 odmianach owoców oraz pędów *R. idaeus* 'Willamette', natomiast zawartość kwasu elagowego jest zbliżona do wartości wcześniej wyznaczonych [19, 28, 31].

Różnice w zawartości poszczególnych związków fenolowych, w obrębie odmian uprawowych, obserwowano również w poprzednich badaniach Katedry i Zakładu Farmakognozji [19, 28, 31]. Różnice te mogą być spowodowane odmiennymi warunkami kultywacji, oraz czasem zbioru. Znaczenie może mieć również fakt zastosowania kolumny Kinetex PFP, która ze względu na lepszą rozdzielczość względem Discovery HS C-18, prawdopodobnie umożliwiła bardziej efektywne rozdzielenie sangwiny H-6 od koeluujących z nią związków.

Powyższe oznaczenia ilościowe potwierdziły różnorodność kompozycji chemicznych ekstraktów suchych z badanych surowców analizowanych mikrobiologicznie.

Tab. 27 Zawartość związków fenolowych w ekstraktach suchych z owoców i pędów odmian *R. idaeus* oraz *R. occidentalis* (mg/100 g s.m.)

związek chemiczny	owoce <i>R. id.</i> 'PR'	owoce <i>R. id.</i> 'Lasz'	owoce <i>R. occ.</i> 'Lit'	pędy <i>R. id.</i> 'Will'
kwasy elagowe	32.1	24.6	29.6	455.6
<i>po pochodne kwasu elagowego</i>				
pentozydy kwasu elagowego ¹	26.8	56.4	23.5	195.1
metypentozyd kwasu elagowego ¹	24.5	22.9	27.9	51.6
acetylpentozydy kwasu elagowego ¹	21	22.7	20.6	174.0
suma	72.3	102.0	72.0	420.7
<i>elagotanniny</i>				
sangwina H-2 ¹	19.9	20.0	19.7	44.3
sangwina H-6 ¹	140.5	189.0	82.9	339.5
izomery sangwiny H-10 ¹	132.8	84.3	116.1	183.6
lambertianina C ¹	–	–	–	31.1
suma	293.2	293.3	218.7	598.5
<i>antocyjany</i>				
3-O-glukozyd cyjanidyny	–	56.4	253.1	–
3-O-rutynozyd cyjanidyny ²	–	14.0	1195.0	–
3-O-soforozyd cyjanidyny ²	–	122.1	–	–
3-O-(2 ^G -glukozylorutynozyd) cyjanidyny ²	–	16.1	–	–
3-O-(2 ^G -ksylozylorutynozyd) cyjanidyny ²	–	–	1312.0 *	–
3-O-sambubiozyd cyjanidyny ²	–	–	37.4	–
3-O-rutynozyd pelargonidyny ²	–	–	–	–
suma	–	208.6	2797.5	–
<i>inne</i>				
kwas galusowy	–	–	–	20.7
kwas kawowy	–	–	–	74.9
kwas protokatechowy	–	–	15.4	20.6
epikatechina	65.5	–	–	1538.2
glukuronid kwercetyny	15.7	10.1	74.4	166.9

¹ w przeliczeniu na kwas elagowy

² w przeliczeniu na 3-O-glukozyd cyjanidyny

* podane jako suma ze względu na brak rozdzielienia

3.2 Analiza aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Do oceny interakcji badanych ekstraktów z antybiotykami wybrano 8 szczepów bakterii charakteryzujących się największą wrażliwością na ekstrakty z owoców i pędów maliny czerwonej i czarnej [19, 28]: *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* i *Neisseria meningitidis*.

Aktywność antybakteryjna ekstraktów nie była wcześniej badana wobec szczepów antybiotykoopornych, dlatego badania rozszerzono dodatkowo o 6 szczepów antybiotykoopornych *S.*

aureus MRSA (ang. *metlicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (15732, 13251, 12673, 13318, 12753, 12677) oraz 6 szczepów antybiotykoopornych *Escherichia coli* ESBL (ang. *extended-spectrum beta-lactamases*) (12518, 12275, 12819, 12882, 12186, 12293), dla których wyznaczono wartości MIC oraz które poddano ocenie oddziaływań ekstraktów z antybiotykami. Szczepami wzorcowymi do szczepów antybiotykoopornych były *S. aureus* ATCC 6538 i *E. coli* ATCC 8739.

3.2.1 Interakcje antybiotyków z ekstraktami z owoców i pędów *R. idaeus* i *R. occidentalis* wobec wybranych szczepów bakteryjnych

Oceniono oddziaływania czterech ekstraktów z owoców i pędów malin z szeregiem antybiotyków wobec wybranych szczepów bakterii Gram + i Gram –. Wobec czterech bakterii Gram-dodatnich: *C. diphtheriae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* *S. pneumoniae*, zastosowano 28 antybiotyków, natomiast wobec czterech bakterii Gram-ujemnych: *H. pylori*, *K. pneumoniae*, *M. catarrhalis* i *N. meningitidis* 36 antybiotyków bądź ich kombinacji (3 kombinacje).

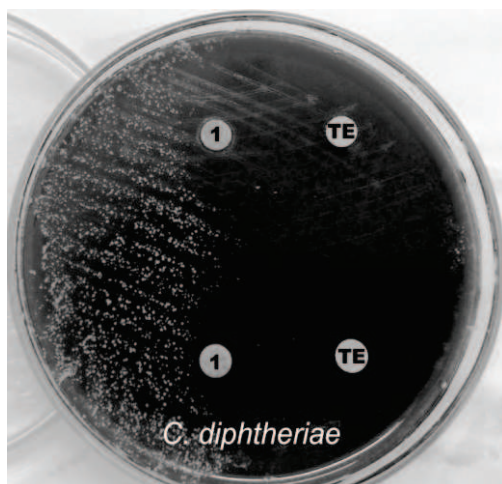
Obserwowano duże zróżnicowanie w typie oddziaływań poszczególnych kombinacji ekstrakt-antybiotyk w zależności od badanego szczepu, stosowanego ekstraktu oraz rodzaju antybiotyku (Tab. 28, 29).

Spośród wszystkich badanych bakterii, efekt synergistyczny ekstraktów roślinnych i antybiotyków najczęściej obserwowano wobec *C. diphtheriae*, na tle tylko jednego antagonistycznego oddziaływania obserwowanego między klindamycyną a ekstraktem z owoców *R. occidentalis* 'Litacz' (Tab. 28). Wobec innych bakterii Gram-dodatnich: *S. aureus* i *S. epidermidis* w bardzo wielu przypadkach obserwowano działania antagonistyczne badanych ekstraktów z antybiotykami z grup aminoglikozydów, fluorochinolonów, makrolidów (erytromycyna), linkozamidów (klindamycyna) i kotrimoksazolem, natomiast zjawisko synergizmu obserwowano między wszystkimi badanymi ekstraktami z owoców a mupirocyną. W przypadku penicylin, ryfampicyny, kwasu fusydowego i linezolidu obserwowano więcej oddziaływań synergistycznych z badanymi ekstraktami wobec *S. aureus*, podczas gdy wobec *S. epidermidis* dominującym rodzajem oddziaływań był antagonizm bądź efekt addycji. Natomiast wobec *S. pneumoniae*, dominującym typem interakcji w prawie wszystkich kombinacjach ekstrakt-antybiotyk był efekt addycji (Tab. 28).

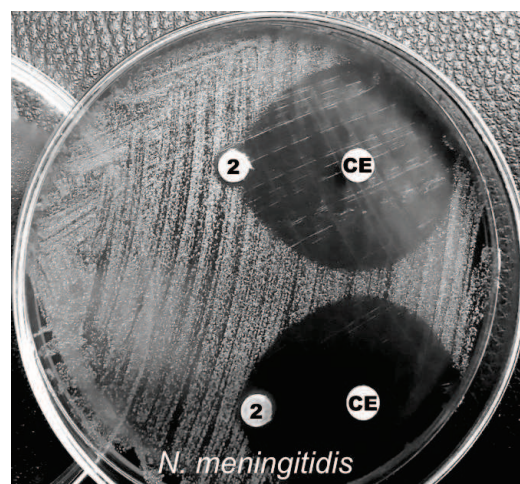
Dla większości bakterii Gram-ujemnych obserwowanym typem interakcji ekstrakt-antybiotyk był efekt addycji – i występował on również wobec wszystkich szczepów charakteryzujących się opornością na dany antybiotyk. Liczba obserwowanych synergizmów i antagonizmów była znacznie mniejsza dla bakterii Gram-ujemnych niż Gram-dodatnich (Tab. 29)

Obserwowano, że antybiotyki należące do tetracyklin: doksyacyklina i tetracyklina wyróżniają się działaniem synergistycznym wobec *C. diphtheriae* ze wszystkimi badanymi ekstraktami. Wobec bakterii

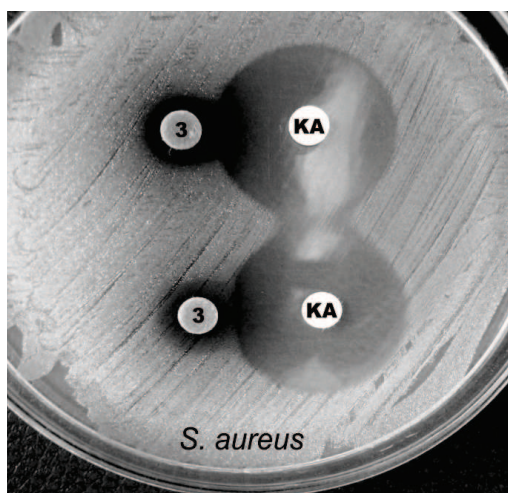
S. aureus i *S. epidermidis* obserwowano synergizm tetracykliny z ekstraktami z owoców *R. idaeus* 'Poranna Rosa' i 'Laszka', oraz antagonizm z ekstraktem z pędów *R. idaeus* 'Willamette'. Natomiast działanie synergistyczne pomiędzy tetracykliną a ekstraktem z owoców *R. occidentalis* 'Litacz' obserwowano jedynie wobec *S. aureus*. Podobnie dla dwóch bakterii Gram-ujemnych: *H. pylori* i *N. meningitidis*, obserwowano działania synergistyczne z tetracykliną dla wielu badanych kombinacji ekstrakt-antybiotyk (Tab. 28, 29).



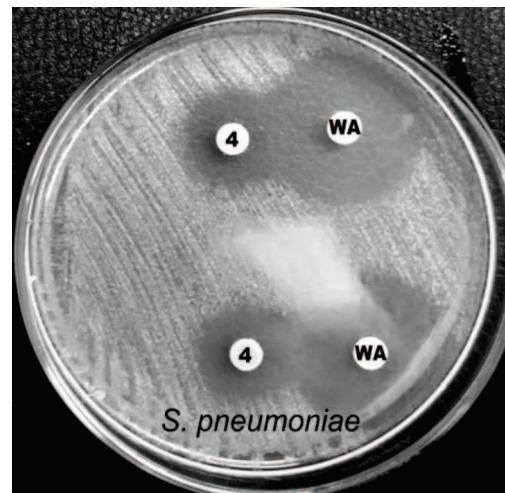
Ryc. 43 Synergizm ekstraktu z owoców *R. idaeus* 'Poranna Rosa' (1) z tetracykliną (TE) wobec *C. diphtheriae*



Ryc. 44 Synergizm ekstraktu z owoców *R. idaeus* 'Laszka' (2) z cefotaksymem (CE) wobec *C. diphtheriae*



Ryc. 45 Antagonizm ekstraktu z owoców *R. idaeus* 'Litacz' (3) z kanamycyną (KA) wobec *S. aureus*



Ryc. 46 Efekt addycji ekstraktu z pędów *R. idaeus* 'Willamette' (4) z wankomycyną (WA) wobec *S. pneumoniae*

Tab. 28 Interakcje antybiotyków z badanymi ekstraktami wobec wybranych szczepów bakterii Gram-dodatnich

grupa	antybiotyk	bakterie Gram-dodatnie															
		<i>C. diphtheriae</i>				<i>S. aureus</i>				<i>S. epidermidis</i>				<i>S. pneumoniae</i>			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
aminoglikozydy	amikacyna					A	A	A	A	A	A	A	A				
	kanamycyna					A	A	A	A	A	A	A	A				
	gentamycyna	x	S	S	x	A	A	A	x	A	A	A	x				
	netilmycyna					A	A	A	A	A	A	A	A				
	tobramycyna					A	x	A	A	A	A	A	A				
fluorochinolony	cyprofloksacyna	x	x	S	x	A	x	x	x	A	A	A	x				
	lewofloksacyna					A	x	x	A	A	A	A	A	x	x	x	A
	moksifloksacyna													x	x	x	x
	ofloksacyna					x	x	x	x	A	A	A	A	x	A	A	x
cefaolsporyny β -lak	cefotaksym	S	x	S	S												
	ceftriakson	S	x	S	x												
karbapenemy β -lak	imipenem	x	?	x	x												
penicyliny β -lak	oksacylina					S	x	x	x	S	A	A	x	x	A	A	x
	penicylina	x	S	S	x	S	S	A	S	x	x	x	x				
glikopeptydy	teikoplanina					x	x	x	x	x	x	x	x				
	wankomycyna	S	x	x	S	x	x	x	x	x	A	A	x	A	x	x	x
makrolidy	erytromycyna	x	x	S	S	A	x	A	A	A	A	A	A	x	x	x	x
	telitromycyna	x	x	S	S												
tetracykliny	doksycyklina	S	S	S	S												
	tetracyklina	S	S	S	S	S	S	S	A	S	S	x	A	x	x	x	x
amfenikole	chloramfenikol					A	x	S	x	A	A	A	A	x	x	A	x
linkozamidy	klindamycyna	x	x	A	x	A	A	A	x	A	A	A	x				
ansamycyny	ryfampicyna	S	x	S	x	S	x	S	x	x	A	x	x	x	x	x	x
	kotrimoksazol	x	?	S	x	A	x	A	A	A	A	A	x	x*	x*	x*	x
	kwas fusydowy					S	S	S	S	x	A	A	A				
	linezolid	x	x	?	S	x	S	S	x	x	A	A	x	x	x	x	x
	optochina													A	x	x	A
	mupirocyna					S	S	S	?	S	S	S	x				

1 owoce *R. idaeus* 'Poranna Rosa', 2 owoce *R. idaeus* 'Laszka', 3 owoce *R. occidentalis* 'Litacz', 4 pędy *R. idaeus* 'Willamette'

A: antagonizm, S: synergizm, x: efekt addycji, * brak strefy zahamowania antybiotyku (szczep oporny), β -lak antybiotyk β -laktamowy

Tab. 29 Interakcje antybiotyków z badanymi ekstraktami wobec wybranych szczepów bakterii Gram-ujemnych

grupa	antybiotyk	bakterie Gram-ujemne															
		<i>H. pylori</i>				<i>K. pneumoniae</i>				<i>M. catarrhalis</i>				<i>N. meningitidis</i>			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
aminoglikozydy	amikacyna					x	x	A	x								
	netilmycyna					A	A	A	A								
	tobramycyna					A	x	A	A								
penicyliny β -lak	amoksycylina	S	x*	x	x	!	!	!	x					x	x	x	x
	ampicylina					x*	x*	x*	x*								
	penicylina													?	x	?	?
	piperacylina					A	x	x	x								
	tykarcylina					x*	x*	x*	x*								
cefalosporyny β -lak	cefazolina					x	x	x	x								
	cefepim					A	x	x	A	x	x	x	x				
	cefoksytyna									x	S	x	x				
	cefopodoksym													x*	x	x	x
	cefotaksym					x	S	A	x	x	x	A	x	S	S	x	x
	cefuroksym					x	x	x	x								
	ceftriakson					!	!	!	A								
karbapenemy β -lak	doripenem					A	x	x	A								
	ertapenem					A	x	x	x								
	imipenem					x	x	x	x	x	x	A	x				
	meropenem					x*	x*	x*	x	?	S	?	x	x	?	x	x
monobaktamy β -lak	aztreonam					S	x	x	A	x*	x*	x	x				
	amoksycylina/kwas klawulanowy β -lak					x*	x*	x*	x*	A	x	A	x				
	piperacylina/tazobaktam β -lak					x	x	A	x								
	tykarcylina/kwas klawulanowy β -lak					x	x*	x*	A								
aminoglikozydy	gentamycyna					x	A	A	A								
makrolidy	azytromycyna													x	A	x	x
	erytromycyna									x*	x*	x	x*				
	telitromycyna									A	A	A	x				
	klarytomycyna	x*	x	x*	x												
fluorochinolony	cyprofloksacyna					S	A	A	A	x	x	x	x	x	x	x	x
	lewofloksacyna	x	x	x	x					x	x	x	x				
amfenikole	chloramfenikol					S	x	A	x	A	A	x	x	x	x	x	x
tetracykliny	tetracyklina	S	S	S	x	x	S	x	x	S	?	x	x	S	S	S	S
	tygecyklina					A	A	A	A								
ansamycyny	ryfampicyna	x	x	x	x									x	x	x	x
	kotrimoksazol					A	x	x	S	A	A	A	x	A	x	x	x
	metronidazol	x*	x*	x*	x*												

1 owoce *R. idaeus* 'Poranna Rosa', 2 owoce *R. idaeus* 'Laszka', 3 owoce *R. occidentalis* 'Litacz', 4 pędy *R. idaeus* 'Willamette'

A: antagonizm, S: synergizm, x: efekt addycji, * brak strefy zahamowania antybiotyku (szczep oporny), β -lak antybiotyk β -laktamowy

3.2.2 Interakcje antybiotyków z ekstraktami z owoców i pędów *R. idaeus* i *R. occidentalis* wobec szczepów antybiotykoopornych

3.2.2.1 Wyznaczenie wartości MIC i MBC

Aktywność przeciwbakteryjną analizowanych ekstraktów z owoców i pędów malin oceniono wobec szczepów antybiotykoopornych w odniesieniu do szczepów wzorcowych, poprzez wyznaczenie wartości MIC oraz MBC. W badanym zakresie stężeń ekstraktów roślinnych (320 – 0.04 mg/ml) wyznaczono tylko wartości stężeń hamujących wzrost badanych szczepów bakterii (Tab. 30).

Dla szczepu wzorcowego jak i szczepów MRSA *S. aureus* odnotowano takie same wartości MIC badanych ekstraktów z owoców, niezależnie od badanego gatunku i odmiany (5.2 mg/ml). Szczep wzorcowy *S. aureus* wykazywał dużą wrażliwość na ekstrakt z pędów *R. idaeus* 'Willamette' (MIC 0.6 mg/ml), podczas gdy aktywność hamująca ekstraktu wobec szczepów MRSA była wielokrotnie niższa (10.3-41.3 mg/ml). Wszystkie badane szczepy *E. coli* charakteryzowały się niską wrażliwością wobec ekstraktu z pędów (41.3 mg/ml), jakkolwiek ich wrażliwość wobec ekstraktów z owoców zawierała się w wyznaczonych wartościach MIC od 5.2 do 10.3 mg/ml, za wyjątkiem ekstraktu z owoców *R. occidentalis* 'Litacz' (MIC 20.6 mg/ml) (Tab. 30).

Uwzględniając zbliżone profile wrażliwości wobec badanych ekstraktów, do badań oddziaływań ekstrakt-antybiotyk przeznaczono szczepy wzorcowe *S. aureus* i *E. coli* oraz dwa wybrane szczepy antybiotykooporne: *S. aureus*: MRSA 13318 i 12677 oraz *E. coli* ESBL 12186 i 12293.

Tab. 30 Wyniki aktywności przeciwbakteryjnej badanych ekstraktów wobec szczepów wzorcowych i antybiotykoopornych

szczep bakteryjny		MIC (mg/ml)			
		owoce	owoce	owoce	pędy
		<i>R. id</i> 'PR'	<i>R. id</i> 'Lasz'	<i>R. occ</i> 'Lit'	<i>R. id</i> 'Will'
G+	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 ^W	5.2	5.2	5.2	0.6
	<i>S. aureus</i> MRSA 15732 ^A	5.2	5.2	5.2	41.3
	<i>S. aureus</i> MRSA 13251 ^A	5.2	5.2	5.2	41.3
	<i>S. aureus</i> MRSA 12673 ^A	5.2	5.2	5.2	10.3
	<i>S. aureus</i> MRSA 13318 ^A	5.2	5.2	5.2	10.3
	<i>S. aureus</i> MRSA 12753 ^A	5.2	5.2	5.2	10.3
	<i>S. aureus</i> MRSA 12677 ^A	5.2	5.2	5.2	10.3
G –	<i>E. coli</i> ATCC 8739 ^W	5.2	5.2	10.3	41.3
	<i>E. coli</i> ESBL 12518 ^A	10.3	10.3	20.6	41.3
	<i>E. coli</i> ESBL 12275 ^A	10.3	5.2	5.2	41.3
	<i>E. coli</i> ESBL 12819 ^A	10.3	10.3	5.2	41.3
	<i>E. coli</i> ESBL 12882 ^A	10.3	10.3	10.3	41.3
	<i>E. coli</i> ESBL 12186 ^A	5.2	10.3	5.2	41.3
	<i>E. coli</i> ESBL 12293 ^A	10.3	5.2	10.3	41.3

MIC minimalne stężenie hamujące, ^W szczep wzorcowy, ^A szczep antybiotykooporny

3.2.2.2 Badania interakcji antybiotyków z ekstraktami

Wyniki badań interakcji ekstraktów z owoców i pędów malin z antybiotykami wobec szczepów wzorcowych i wybranych szczepów antybiotykoopornych *S. aureus* i *E. coli* przedstawiono w Tabeli 31 i 32.

Zauważono, że wyniki interakcji otrzymane wobec szczepu wzorcowego *S. aureus*, odbiegają od tych otrzymanych dla tego samego szczepu w punkcie 3.2.1 (Tab. 28). Chociaż dominujący typ interakcji pozostaje w większości przypadków taki sam (np. przewaga oddziaływań antagonistycznych w interakcjach ekstrakt-gentamycyna) to poszczególne ekstrakty wykazują różnice w typie obserwowanych interakcji (np. antagonizm w przypadku owoców *R. idaeus* 'Laszka' – gentamycyna, oraz efekt addycji w przypadku pędów *R. idaeus* 'Willamette' w poprzedniej analizie, natomiast odwrotne interakcje obserwowane w przypadku obydwu ekstraktów w opisywanym badaniu).

Szczep *S. aureus* MRSA 12677 charakteryzował się opornością na wszystkie zastosowane antybiotyki, z wyjątkiem należącej do aminoglikozydów gentamycyny i kotrimoksazolu. Dla obydwu antybiotyków obserwowano oddziaływania antagonistyczne z prawie wszystkimi badanymi ekstraktami, z wyjątkiem ekstraktów z owoców *R. idaeus* 'Poranna Rosa' i 'Laszka' wykazujących efekty addytywne z kotrimoksazolem. W przypadku antybiotyków wobec których bakteria wykazała oporność, obserwowano efekt addycji z badanymi ekstraktami z wyjątkiem synergizmu ujawnionego dla ekstraktu z pędów *R. idaeus* 'Willamette' z klindamycyną (Tab. 31).

W przypadku szczepu *S. aureus* MRSA 13318 rozkład interakcji wszystkich ekstraktów z gentamycyną i kotrimoksazolem był taki sam jak w przypadku szczepu MRSA 12677. Szczep MRSA 13318 charakteryzował się opornością na ciprofloksacynę, ampicylinę oraz penicylinę, i podobnie dla szczepu MRSA 12677, większość obserwowanych interakcji ekstrakt-antybiotyk była efektem addycji. Wyjątkiem był ponownie ekstrakt z pędów *R. idaeus* 'Willamette' dla którego obserwowano oddziaływanie synergistyczne z penicylinami. Dla pozostałych badanych antybiotyków należących do makrolidów i linkozamin obserwowano zjawisko antagonizmu ze wszystkimi badanymi ekstraktami (Tab. 31).

Zarówno wobec szczepu wzorcowego jak i szczepów antybiotykoopornych ESBL 12293 i ESBL 12186 bakterii *E. coli* odnotowano działanie antagonistyczne prawie wszystkich badanych ekstraktów z gentamycyną, ciprofloksacyną oraz kotrimoksazolem. W przypadku szczepu wzorcowego obserwowano synergizm cefotaksymu ze wszystkimi badanymi ekstraktami oraz synergizm amoksycyliny ze wszystkimi ekstraktami z owoców. Natomiast wobec szczepów antybiotykoopornych *E. coli*, obserwowano jedynie efekt addycji, i występował on we wszystkich kombinacjach ekstrakt-antybiotyk, dla cefalosporyn i penicylin (Tab. 32).

Tab. 31 Interakcje antybiotyków z badanymi ekstraktami wobec szczepu wzorcowego i wybranych szczepów antybiotykoopornych *S. aureus*

grupa	antybiotyk	<i>S. aureus</i>											
		ATCC 6538 ^W				MRSA 12677 ^A				MRSA 13318 ^A			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
aminoglikozydy	gentamycyna	A	x	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
fluorochinolony	cyprofloksacyna	x	x	x	A	x*	x*	x*	x*	x*	x*	x*	x*
penicyliny ^{β-lak}	ampicylina	x	A	A	A	x*	x*	x*	x*	x*	x*	x*	S
	penicylina	S	A	A	A	x*	x*	x*	x*	x*	x*	x*	S
makrolidy	erytromycyna	A	x	A	A	x*	x*	x*	x*	A	A	A	A
	azytromycyna	A	A	A	A	x*	x*	x*	x*	A	A	A	A
linkozamidy	klindamycyna	A	S	x	A	x*	x*	x*	S	A	A	A	A
	kotrimoksazol	x	A	A	A	x	x	A	A	x	x	A	A

1 owoce *R. idaeus* 'Poranna Rosa', 2 owoce *R. idaeus* 'Laszka', 3 owoce *R. occidentalis* 'Litacz', 4 pędy *R. idaeus* 'Willamette'

A: antagonizm, S: synergizm, x: efekt addycji, * brak strefy zahamowania antybiotyku (szczep oporny), ^{β-lak} antybiotyk β-laktamowy

Tab. 32 Interakcje antybiotyków z badanymi ekstraktami wobec szczepu wzorcowego i wybranych szczepów antybiotykoopornych *E. coli*

grupa	antybiotyk	<i>E. coli</i>											
		ATCC 8739 ^W				ESBL 12293 ^A				ESBL 12186 ^A			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
aminoglikozydy	gentamycyna	A	A	A	A	A	A	A	x	A	A	A	A
fluorochinolony	cyprofloksacyna	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
cefalosporyny	cefotaksym	S	S	S	S	x	x	x	x	x	x	x	x
	ceftriakson	x	A	A	x	x*	x*	x*	x*	x	x	x	x
penicyliny ^{β-lak}	amoksycylina	S	S	S	A	x*	x*	x*	x*	x*	x*	x*	x*
	ampicylina	x	x	x	x	x*	x*	x*	x*	x*	x*	x*	x*
	kotrimoksazol	A	A	A	x	A	A	x	x	A	A	A	A

1 owoce *R. idaeus* 'Poranna Rosa', 2 owoce *R. idaeus* 'Laszka', 3 owoce *R. occidentalis* 'Litacz', 4 pędy *R. idaeus* 'Willamette'

A: antagonizm, S: synergizm, x: efekt addycji, * brak strefy zahamowania antybiotyku (szczep oporny), ^{β-lak} antybiotyk β-laktamowy

Odnotowano znaczne różnice w obserwowanym charakterze oddziaływań w poszczególnych kombinacjach ekstrakt-antybiotyk w odniesieniu od użytego szczepu, oraz występowanie takich samych typów interakcji dla ekstraktów znacznie różniących się składem chemicznym. Otrzymane wyniki wskazują na złożony charakter interakcji ekstraktów z antybiotykami, co uniemożliwia korelację obserwowanych synergizmów i antagonizmów z zawartością związków czynnych biologicznie.

Częściowym wyjaśnieniem otrzymanych rezultatów jest złożoność kompozycji chemicznej ekstraktów roślinnych, która może powodować, że osiągnięta aktywność w obecności zastosowanego antybiotyku wobec danego szczepu bakteryjnego jest kształtowana przez kilka związków czynnych

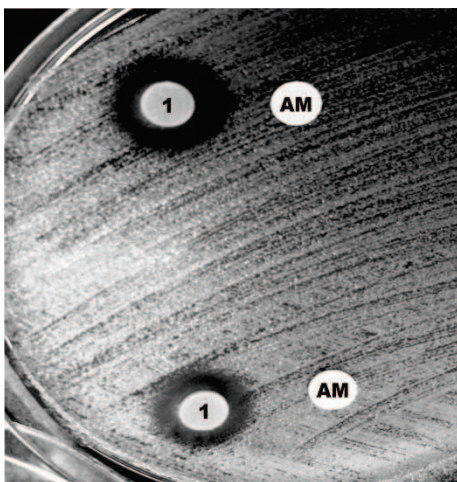
występujących w ekstrakcie. Działanie substancji pochodzenia roślinnego i ich interakcje z antybiotykami może przebiegać na wielu płaszczyznach niwelując bakteryjne mechanizmy antybiotykooporności: modyfikację białkowego miejsca wiązania antybiotyku zmniejszającą jego powinowactwo, rozkład bądź enzymatyczna modyfikacja antybiotyku oraz zmniejszenie przepuszczalności antybiotyku przez błony bądź jego aktywne usuwanie z komórki z użyciem pomp transblonowych [292]. Dodatkowo, wskazuje się na udział kwasu elagowego w destabilizacji bakteryjnej błony komórkowej w mechanizmie aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów z malin [293].

Ponadto na otrzymane wyniki może mieć wpływ zastosowana metoda badawcza. Jakkolwiek metoda dyfuzyjno-krażkowa jest odpowiednia do analiz przesiewowych ze względu na prostotę oraz relatywnie krótki czas badania, jej ograniczeniem jest uzależnienie wyniku końcowego od dystrybucji składników w stałym podłożu hodowlanym. Związki o charakterze polarnym lepiej rozprzestrzeniają się w stałym podłożu hodowlanym, co może generować większy udział bardziej polarnych składników ekstraktu w obserwowanym typie oddziaływań [294].

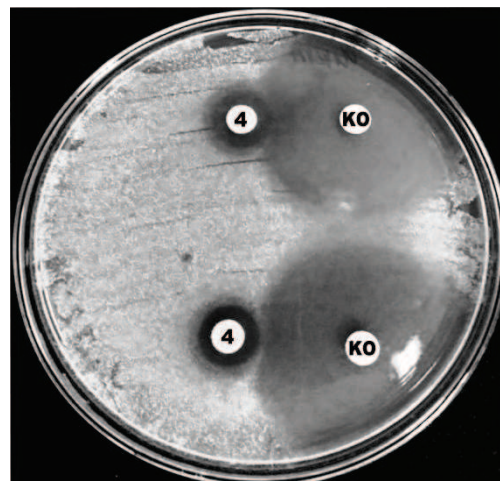
Złożoność składu chemicznego surowców pochodzenia roślinnego jest uważana za ich cenną właściwość w kontekście wielokierunkowego oddziaływania terapeutycznego, jakkolwiek w piśmiennictwie podkreślany jest problem identyfikacji wszystkich aktywnych związków odpowiedzialnych za obserwowane efekty terapeutyczne [294].

W kontekście aktywności przeciwbakteryjnej i synergizmu, zaletą złożonego składu ekstraktów i różnorodności potencjalnych oddziaływań z antybiotykiem jest to, że nabycie na niego odporności przez bakterie wydaje się mniej prawdopodobne. Wadą natomiast jest opisany powyżej problem w przewidywaniu typu oddziaływań, gdy wiele grup związków fenolowych oraz substancji im towarzyszących jest potencjalnie zaangażowanych w końcowy efekt [294].

Problemem szczególnie odnotowanym dla bakterii *S. aureus* i *S. epidermidis* jest duża liczba obserwowanych antagonizmów (Tab. 28). W literaturze opisywany jest synergizm związków z grupy flawonoidów z antybiotykami β -laktamowymi wobec *S. aureus* MRSA i PRSA (ang. *penicilin resistant Staphylococcus aureus*) [291]. Przykładami są niwelowanie antybiotykooporności *S. aureus* na m.in. metycylinę, ampicylinę, amoksycylinę przez inkubację bakterii z kwercetyną w stężeniu 400 $\mu\text{g/ml}$ [295], oraz synergizm tanin hydrolizujących z licznymi antybiotykami β -laktamowymi wobec *S. aureus* MRSA, głównie poprzez inaktywację białek PBP oraz w mniejszym stopniu inhibicję β -laktamaz [296].



Ryc. 47 Efekt addycji ekstraktu z owoców *R. idaeus* 'Poranna Rosa' (1) z ampicyliną (AM) wobec *S. aureus* MRSA 12677, przy braku strefy zahamowania antybiotyku



Ryc. 48 Antagonizm ekstraktu z pędów *R. idaeus* 'Willamette' (4) z kotrimoksazolem (KO) wobec *S. aureus* MRSA 12677

W przeciwieństwie do danych literaturowych, w niniejszej pracy, obok synergizmów, obserwowano również antagonizmy antybiotyków β -laktamowych wobec badanych szczepów *S. aureus* (Tab. 28, 31). Efekt synergizmu bądź antagonizmu, według danych literaturowych, może być również warunkowany stężeniem obydwu badanych substancji, i znane są przypadki występowania zależnych od dawki oddziaływań antagonistycznych przy wysokich stężeniach kombinacji dwóch antybiotyków [294, 297, 298]. Nie można wykluczyć więc, że obserwowane liczne antagonizmy mogą być konsekwencją zbyt wysokich stężeń badanych ekstraktów.

W eksperymentach przeprowadzonych na szczepach antybiotykoopornych *S. aureus* MRSA i *E. coli* ESBL, w wielu przypadkach nie obserwowano niwelowania zjawiska antybiotykooporności przez dodatek ekstraktów z owoców i pędów malin, z czego wyjątki stanowiły synergizmy obserwowane dla ekstraktu z pędów *R. idaeus* 'Willamette' z klindamycyną wobec *S. aureus* MRSA 12677 oraz z ampicyliną i penicyliną wobec *S. aureus* MRSA 13318 (Tab. 31, 32).

Pomimo użycia wystandaryzowanych ekstraktów z owoców i pędów malin, przeprowadzone badania nie dają odpowiedzi na to, które grupy związków czynnych obecnych w ekstraktach z malin są odpowiedzialne za obserwowane interakcje z antybiotykami. W badaniach interakcji ekstrakt-antybiotyk, zgodnie z celem pracy, nie badano wpływu pojedynczych związków obecnych w ekstraktach na ich oddziaływanie z antybiotykiem. Z danych literaturowych wynika, że ekstrakty z surowców pochodzenia roślinnego charakteryzują się silniejszym synergizmem z antybiotykami w porównaniu do pojedynczych związków [294, 299-302]. Z drugiej strony jest również wiele doniesień

wskazujących na bardzo silny synergizm izolowanych związków pochodzenia roślinnego z antybiotykami [291, 295, 303-306]. W przypadku hydrolizujących tanin (elagotanin i galotanin), ustalono że ich działanie synergistyczne warunkuje grupa HHDP [296].

W pracy przeglądowej, Mundy i wsp. [294] wskazują że wszystkie dotychczasowe badania synergizmu ekstraktów roślinnych z antybiotykami są badaniami *in vitro*, dlatego też ich wyniki nie odzwierciedlają efektu *in vivo*. Jakkolwiek stężenia antybiotyków w przeprowadzonym eksperymencie odpowiadały tym osiąganym w surowicy pacjenta, to stężenia ekstraktów roślinnych były o wiele wyższe od tych osiąganych w organizmie (z możliwym wyjątkiem dla przewodu pokarmowego) i produkty metabolizmu polifenoli i prostych fenoli w nich obecnych nie były brane pod uwagę. W potencjalnym efekcie *in vivo*, należy uwzględnić produkty metabolizmu elagotanin, obecnych w znacznych ilościach w owocach malin i pędach malin. Związki te ulegają hydrolizie pod wpływem mikroflory jelitowej i konwersji do urolityn. Działanie synergistyczne badanych wyciągów i antybiotyków miałyby znaczenie w miejscowej aplikacji np. na skórę [296]. Niewiadomym jest czy obserwowane interakcje mogą zachodzić w warunkach *in vivo* dla innych grup metabolitów wtórnych obecnych w badanych ekstraktach.

Podsumowując, badania aktywności przeciwbakteryjnej związków pochodzenia roślinnego stanowią ważny obszar poszukiwań nowych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, jakkolwiek należy podkreślić że badania synergizmu antybiotyków z ekstraktami pochodzenia roślinnego mogą prowadzić do opracowania nowych metod leczenia i mogą okazać się skutecznym narzędziem w walce z wieloopornością bakterii na antybiotyki [289]. Dlatego więcej badań powinno być ukierunkowanych na analizę interakcji roślinnych metabolitów wtórnych z antybiotykami, z uwzględnieniem ich molekularnego mechanizmu [289, 294].

4. Badania aktywności biologicznej urolityn

Badania aktywności biologicznej urolityn przeprowadzono w zakresie aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej.

Poprzednie badania Katedry i Zakładu Farmakognozji, ujawniły aktywność przeciwbakteryjną nie tylko ekstraktów z owoców i pędów malin, ale również wyizolowanych z nich związków: kwasu elagowego oraz sangwiny H-6 [19, 28]. Aktywność przeciwbakteryjna urolityn i ich metylowych pochodnych jest znana w niewielkim zakresie [120, 121] dlatego w niniejszej pracy oceniono ją wobec 10 szczepów patogennych bakterii.

Ponieważ aktywność przeciwnowotworową urolityn oznaczono w szeregu linii nowotworowych [122-137], w tym również linii raka piersi (MCF-7 i MDCKII) [135, 136], postanowiono porównać ich działanie cytotoksyczne wobec 3 innych linii komórkowych ludzkiego raka piersi: T47D, BT474 i MDA-MB-468, obok wcześniej badanej linii MCF-7.

4.1 Aktywność przeciwbakteryjna urolityn

Aktywność przeciwbakteryjną urolityn A-C oraz metylourolityn A-B (mUro A-B) oceniano wyznaczając wartości MIC i MBC wobec 5 bakterii Gram-dodatnich oraz 5 bakterii Gram-ujemnych, w zakresie stężeń od $0.5 \cdot 10^{-3}$ do 2 mg/ml. Urolityny rozpuszczono w 25% roztworze DMSO, który stosowano również jako kontrolę (Tab. 33).

Tab. 33 Wyniki aktywności przeciwbakteryjnej urolityn

szczep bakteryjny		MIC (mg/ml)				
		Uro A	Uro B	Uro C	mUro A	mUro B
G+	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1	–	1	–	1
	<i>Enterococcus faecalis</i>	–	–	–	–	–
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	–	–	–	–	–
	<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	0.25	–	–
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	–	0.06	–	–
G –	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	–	–	–	–
	<i>Helicobacter pylori</i>	–	–	–	–	–
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	–	1	–	–
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	–	–	–	–	–
	<i>Neisseria meningitidis</i>	–	–	–	–	–

MIC minimalne stężenie hamujące

Dla wszystkich badanych urolityn i ich metylowych pochodnych nie obserwowano działania bakteriobójczego, a działanie hamujące wzrost odnotowano tylko dla pojedynczych związków.

Działanie hamujące wzrost w stężeniu 1 mg/ml odnotowano dla Uro A, Uro C oraz mUro B wobec *C. diphtheriae*, dla Uro A wobec *S. epidermidis* oraz dla Uro C wobec *K. pneumoniae*. Niższe wartości MIC obserwowano jedynie dla Uro C wobec *S. aureus* (0.25 mg/ml) i *S. epidermidis* (0.06 mg/ml) (Tab. 33).

W porównaniu do poprzednich wyników kwasu elagowego i sangwiny H-6 [28], urolityny i ich metylowe pochodne charakteryzowały się słabszą aktywnością przeciwbakteryjną. Wyjątkiem była Uro C, która ujawniła selektywną aktywność wobec bakterii *S. aureus* i *S. epidermidis* i była ona silniejsza od aktywności zarówno kwasu elagowego jak i sangwiny H-6 (MIC 0.25 mg/ml oraz 0.06 mg/ml odpowiednio).

4.2 Aktywność przeciwnowotworowa urolityn

Aktywności przeciwnowotworową urolityn A-C oceniono stosując test cytotoksyczności MTT wobec 4 linii komórkowych ludzkiego raka piersi: MCF-7, T47D, BT474 i MDA-MB-468, wyznaczając wartości IC_{50} (Ryc. 49, Tab. 34). Aktywność metabolitów kwasu elagowego porównano z aktywnością wolnego kwasu elagowego, elagotaniny – sangwiny H-6, stanowiącą glikozydowo związany kwas elagowy, oraz ekstraktu z pędów *R. idaeus* 'Willamette', stanowiącego najbogatsze źródło kwasu elagowego w formie wolnej oraz związanej (sangwina H-6) w porównaniu do ekstraktów z owoców. Urolityny A-C badano w stężeniach do 10 $\mu\text{g/ml}$, ze względu na ich ograniczoną rozpuszczalność w DMSO. Uwzględniając fakt, że dla niektórych związków w warunkach eksperymentalnych nie osiągnięto stężenia odpowiadającego IC_{50} , tam gdzie było to możliwe, określono wartości predykcyjne.

Nie stwierdzono aktywności cytotoksycznej ekstraktu z pędów maliny właściwej wobec linii MCF-7 i T47D, dlatego nie oceniano jej wobec dwóch pozostałych linii (Ryc. 49 A).

Aktywność cytotoksyczna kwasu elagowego i sangwiny H-6 wobec poszczególnych linii była na zbliżonym poziomie i przyjmowała wartości IC_{50} 57-85 $\mu\text{g/ml}$ dla sangwiny H-6 oraz 54-80 $\mu\text{g/ml}$ dla kwasu elagowego. Linia najbardziej wrażliwą na działanie obydwu związków była linia MDA-MB-468, a następnie, w kolejności, linie T47D, MCF-7 oraz BT474. Pomiędzy najbardziej i najmniej wrażliwymi liniami różnica w wartościach IC_{50} wynosiła około 30 $\mu\text{g/ml}$ (Ryc. 49 B-C, Tab. 34).

W porównaniu do sangwiny H-6 i kwasu elagowego, urolityny A i C charakteryzowały się od 2 do 8-razy silniejszą aktywnością cytotoksyczną. Wyznaczenie wartości IC_{50} dla urolityny B w badanym zakresie stężeń nie było możliwe. Wartości IC_{50} oznaczone dla urolityny A wobec linii MCF-7 oraz BT474 były na zbliżonym poziomie i wynosiły 22-25 $\mu\text{g/ml}$. Natomiast wobec pozostałych dwóch linii (T47D i MDA-MB-468), aktywność cytotoksyczna urolityny A była ponad 2-razy silniejsza (IC_{50} 9-10 $\mu\text{g/ml}$). Dla urolityny C wyznaczenie wartości predykcyjnych IC_{50} było możliwe jedynie wobec linii T47D oraz MDA-MB-468, i wynosiły one odpowiednio 15 i 17 $\mu\text{g/ml}$ (Ryc. 49 D-F, Tab. 34).

Porównując rozkład wartości IC_{50} badanych substancji wobec wszystkich linii komórkowych, linie T47D oraz MDA-MB-468 charakteryzują się większą wrażliwością na wszystkie badane substancje (Tab. 34). Linia MDA-MB-468, jest linią potrójnie negatywną, to znaczy nie wykazującą ekspresji receptorów estrogenowych (ER), progesteronowych (PR) i oraz HER2 (receptor transbłonowy o aktywności kinazy tyrozynowej). Potrójnie negatywne nowotwory stanowią około 15% diagnozowanych nowotworów piersi, i rokowania na ich wyleczenie są złe, głównie ze względu na brak efektywnych terapii celowanych [307]. W tym kontekście obserwowane działanie cytotoksyczne urolityn, szczególnie Uro A (IC_{50} 9 μ g/ml), wobec linii MDA-MB-468 wydaje się interesujące.

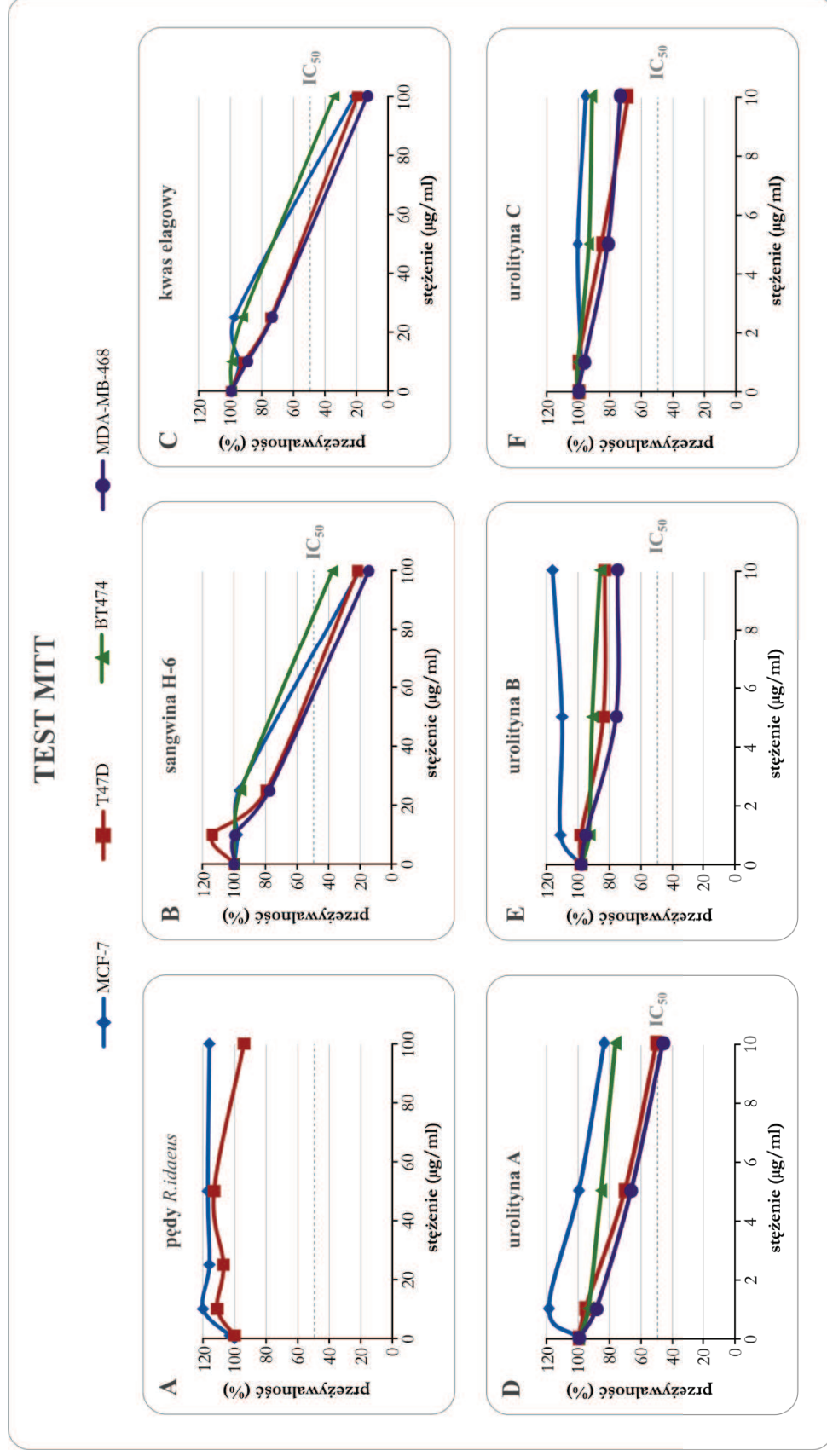
Interesujący jest również potencjalny synergizm działania urolityn z lekami cytostatycznymi. W badaniu aktywności cytotoksycznej ziela pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*) na linii MDA-MB-468, wykazano nie tylko działanie cytotoksyczne samego ekstraktu etanolowego z ziela pokrzywy, ale również zwiększające wrażliwość komórek rakowych na działanie paklitakselu [308].

W poprzednich badaniach dotyczących aktywności urolityn na linię MCF-7, Adams i wsp. [135] wykazali, że Uro B najefektywniej hamowała proliferację komórek linii MCF-7 estrogenem a jej sulfonowa pochodna komórek stymulowanych testosteronem. W niniejszym badaniu nie stwierdzono aktywności cytotoksycznej Uro B, co nie wyklucza innych mechanizmów działania chemoprewencyjnego Uro B, jak również innych urolityn oraz ich pochodnych.

Tab. 34 Wartości IC_{50} oznaczone w teście MTT dla badanych związków i ekstraktów (μ g/ml)

	linie komórkowe			
	MCF-7	T47D	BT474	MDA-MB-468
pędy <i>R. idaeus</i>	–	–	–	–
sangwina H-6	75	60	85	57
kwas elagowy	74	58	80	54
urolityna A	25 *	10	22 *	9
urolityna B	–	–	–	–
urolityna C	–	15 *	–	17 *

* wartość predykcyjna



Ryc. 49 Wyniki testu oceny cytotoksyczności MTT pędów *R. idaeus* (A), sangwiny H-6 (B), kwasu elagowego (C), urolityny A (D), urolityny B (E) oraz urolityny C (F) wobec 4 linii komórkowych ludzkiego raka piersi: MCF-7, T47D, BT474 i MDA-MB-4

5. Analiza aktywności biologicznej owoców i kwiatów *L. caerulea* var. *edulis*

Dotychczas, aktywność przeciwbakteryjną owoców *L. caerulea* oceniono wobec pojedynczych szczepów bakterii [156, 181], natomiast aktywność przeciwbakteryjna kwiatów *L. caerulea* nie jest znana. Z tego względu aktywność przeciwbakteryjną obydwu surowców oceniono poprzez wyznaczenie wartości MIC i MBC, wobec szeregu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. W analizie zastosowano szczepy bakteryjne użyte w ocenie przeciwbakteryjnego efektu owoców malin [28], co pozwoliło na porównanie w tym zakresie aktywności owoców obydwu gatunków.

Z danych literaturowych wynika, że wysokie stężenie antocyjanów w owocach malin wiąże się z ich aktywnością antyoksydacyjną i przeciwzapalną [19]. Wykazano, że owoce *L. caerulea* var. *edulis* charakteryzują się wysoką zawartością pochodnych cyjanidyny, dlatego postanowiono ocenić ich aktywność antyoksydacyjną w teście DPPH i fosforomolibdenowym oraz aktywność przeciwzapalną w modelu *in vivo* indukowanego karageniną obrzęku łapy szczura.

Do badań użyto ekstraktów z owoców i kwiatów *L. caerulea* var. *edulis* odmiany ‘Wojtek’, ze względu na wykazaną wyższą zawartość aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych.

5.1 Aktywność przeciwbakteryjna owoców i kwiatów *L. caerulea* var. *edulis*

Aktywność przeciwbakteryjną ekstraktów z owoców i kwiatów *L. caerulea* var. *edulis* ‘Wojtek’ oceniono wyznaczając MIC i MBC, w zakresie stężeń od 0.5 do 128 mg/ml, wobec 15 szczepów ludzkich patogennych bakterii, włączając izolaty kliniczne: *Streptococcus pneumoniae* i *Klebsiella pneumoniae*. Wyniki przedstawiono w Tabeli 35.

Ekstrakt z owoców hamował wzrost 4 bakterii z wartościami MIC od 1 do 32 mg/ml, oraz wykazywał aktywność bakteriobójczą wobec 11 bakterii, z wartościami MBC od 8 do 64 mg/ml. Dwoma bakteriami najbardziej wrażliwymi na bakteriobójcze działanie ekstraktu były *Corynebacterium diphtheriae*, (maczugowiec błonicy, odpowiedzialny za rozwój błonicy) i *Moraxella catarrhalis* (wywołująca nawracające infekcje dróg oddechowych i ośrodkowego układu nerwowego). Dodatkowo obserwowano hamowanie wzrostu bakterii *Neisseria meningitidis* (meningokokowe zapalenie opon mózgowych, sepsa) w stężeniu 1 mg/ml, jakkolwiek nie odnotowano działania bakteriobójczego w najwyższym z badanych stężeń ekstraktu z owoców wiciokrzewu (Tab. 35).

Ekstrakt z kwiatów *L. caerulea* var. *edulis* hamował wzrost 9 szczepów bakterii z wartościami MIC wyższymi lub odpowiadającymi wartościom MIC ekstraktów z owoców wiciokrzewu. Wyjątkiem były *C. diphtheriae*, *Streptococcus* grupy A oraz *S. epidermidis* wobec których wartości MIC zawierały się w zakresie od 2 do 4 mg/ml. Nie odnotowano działania bakteriobójczego ekstraktów z kwiatów wobec żadnego z badanych szczepów (Tab. 35).

Tab. 35 Wyniki aktywności przeciwbakteryjnej owoców i kwiatów *L. caerulea* var. *edulis*

szczep bakteryjny	<i>L. caerulea</i> (mg/ml)			
	owoce		kwiaty	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Bacillus subtilis</i>	32.0	–	–	–
<i>Clostridium sporogenes</i>	16.0	–	–	–
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	8.0	8.0	4.0	–
<i>Enterococcus faecalis</i>	16.0	16.0	16.0	–
G+ <i>Streptococcus</i> grupy A (<i>pyogenes</i>)	16.0	16.0	2.0	–
<i>Streptococcus</i> grupy B (<i>agalactiae</i>)	32.0	32.0	32.0	–
<i>Streptococcus</i> grupy G	16.0	16.0	–	–
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	8.0	16.0	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.0	16.0	–	–
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16.0	16.0	4.0	–
<i>Haemophilus influenzae</i>	32.0	32.0	–	–
<i>Helicobacter pylori</i>	16.0	–	64.0	–
G – <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32.0	64.0	64.0	–
<i>Moraxella catarrhalis</i>	8.0	8.0	32.0	–
<i>Neisseria meningitidis</i>	1.0	–	32.0	–

MIC minimalne stężenie hamujące, MBC minimalne stężenie bakteriobójcze

W poprzednich badaniach Katedry i Zakładu Farmakognozji analizowano aktywność przeciwbakteryjną 3 ekstraktów z owoców maliny czerwonej oraz 1 ekstraktu z owoców maliny zachodniej, które znacząco różniły się zawartością metabolitów wtórnych z grupy antocyjanów i elagotanin [28].

Porównując otrzymane wyniki z wynikami przeciwbakteryjnej aktywności owoców malin odnotowano, że ekstrakt z owoców *L. caerulea* var. *edulis* wykazywał zbliżone bądź słabsze działanie przeciwdrobnoustrojowe (oznaczone wartości MIC i MBC) w porównaniu do ekstraktów z owoców malin. Wyjątkiem była bakteria *E. faecalis* wobec której aktywne stężenia ekstraktu z owoców *L. caerulea* var. *edulis* ‘Wojtek’ były ok. 4- do 8-razy niższe w porównaniu do większości ekstraktów z owoców malin, oraz bakteria *N. meningitidis* dla której wartość MIC była od 16 do 32-razy niższa jakkolwiek przy braku działania bakteriobójczego.

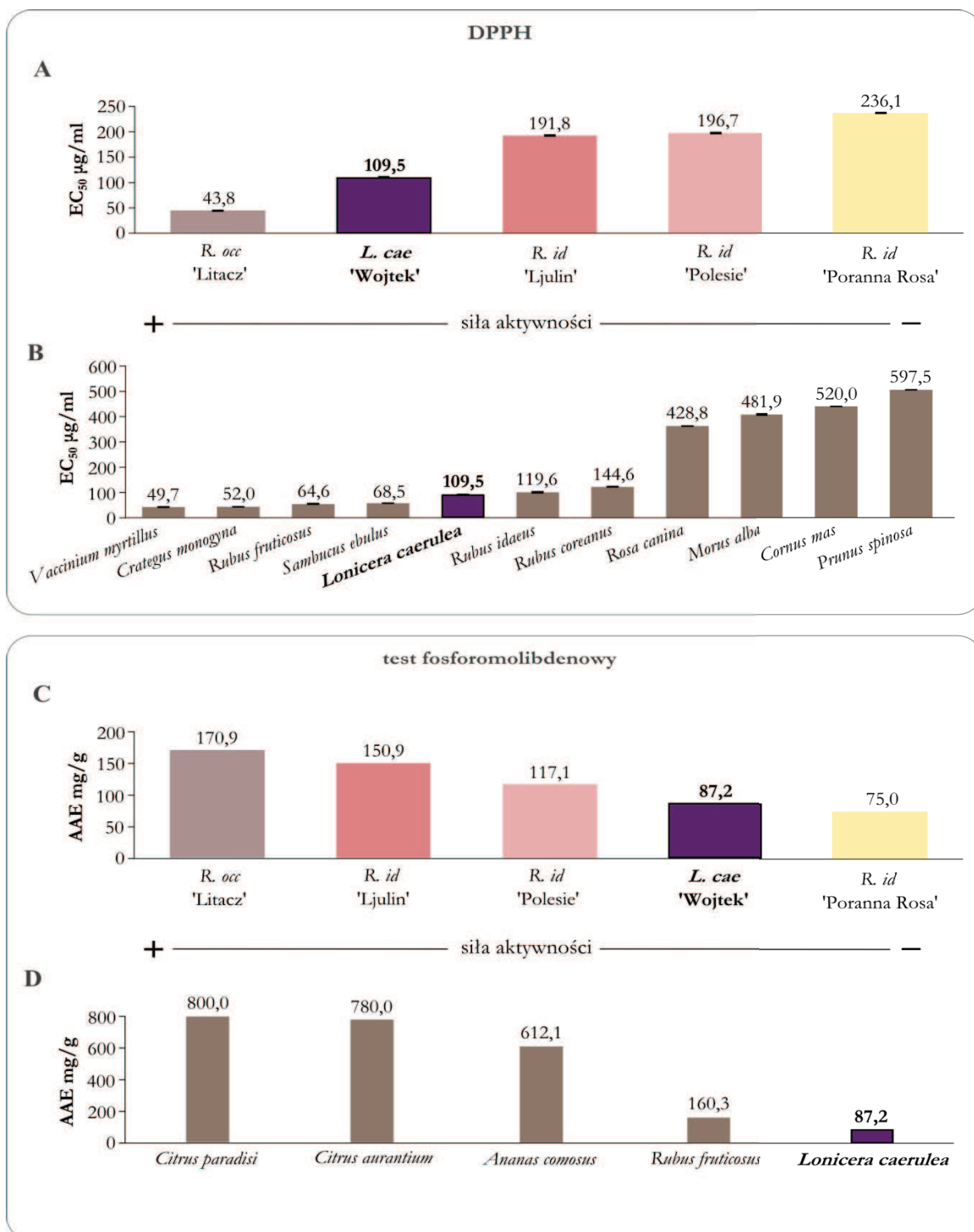
5.2 Aktywność antyoksydacyjna owoców *L. caerulea* var. *edulis*

Zdolność zmiatania wolnych rodników owoców *L. caerulea* var. *edulis* odmiany ‘Wojtek’, wyrażona jako EC₅₀ wynosiła 109.5 µg/ml w teście DPPH, i była zbliżona do wartości otrzymanych wcześniej dla badanych 12 kultywarów *L. caerulea* var. *kamtschatica* (76.1 – 134.9 µg/ml) [170].

W porównaniu do wcześniejszych wyników Katedry i Zakładu Farmakognozji [19], owoce wiciokrzewu siniego charakteryzowały się około 2-razy wyższą aktywnością antyoksydacyjną niż owoce różnych odmian *R. idaeus* ('Poranna Rosa', 'Polesie' i 'Ljulin') oraz około 3-razy niższą w porównaniu do owoców *R. occidentalis* 'Litacz'. Wykazane różnice w potencjale antyoksydacyjnym wskazują na związek aktywności przeciwutleniającej z zawartością antocyjanów w owocach, ponieważ zawierająca jedynie elagotaniny odmiana 'Poranna Rosa' charakteryzuje się najsłabszymi właściwościami antyoksydacyjnymi, na tle bogatych w antocyjany ekstraktów z owoców *L. caerulea* i *R. occidentalis* (Ryc. 50 A).

Analizując dane literaturowe dotyczące aktywności antyoksydacyjnej owoców różnych gatunków, aktywność badanego ekstraktu z owoców *L. caerulea* 'Wojtek' oceniono jako średnią. Niemniej jednak ekstrakt z owoców wiciokrzewu charakteryzuje się około 4- do 6-razy wyższą aktywnością przeciwutleniającą w stosunku do owoców: śliwy tarniny (*Prunus spinosa*) [309], derenia jadalnego (*Cornus mas*) [310], morwy białej (*Morus alba*) [311], i dzikiej róży (*Rosa canina*) [309]. Osiąga zbliżone wartości do niektórych owoców maliny właściwej (*Rubus idaeus*) [312] oraz koreańskiej czarnej maliny (*Rubus coreanus*) [311], oraz jest około 2-razy mniej aktywny w porównaniu do owoców borówki czarnej (*Vaccinium myrtillus*) [312], głogu jednoszyjkowego (*Crataegus monogyna*) [313], jeżyny (*Rubus fruticosus*) [312], oraz bzu hebd (*Sambucus ebulus*) [314] (Ryc. 50 B).

Potencjał redukcyjny wobec jonów MoVI w teście fosforomolibdenowym oceniono na 87.2 mg/g AAE (ekwiwalent 0.49 μ moli kwasu askorbinowego). Jest to znacznie słabszy wynik w porównaniu do wcześniej badanych w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji owoców różnych odmian uprawowych malin [19], z silniejszymi właściwościami redukcyjnymi obserwowanymi jedynie w porównaniu do *R. idaeus* 'Poranna Rosa' (Ryc. 50 C). W porównaniu z danymi literaturowymi, potencjał redukcyjny owoców *L. caerulea* jest co najmniej 2-razy niższy niż owoców grejpfruta (*Citrus paradisi*), gorzkiej pomarańczy (*Citrus aurantium*) [315], ananasa (*Ananas comosus*) [316] oraz jeżyny (*Rubus fruticosus*) [317] (Ryc. 50 D). Jakkolwiek wysoki potencjał redukcyjny jest cechą pozytywną, to może generować powstawanie rodnika hydroksylowego na drodze reakcji Fentona, w obecności jonów miedzi (Cu^{2+}) oraz żelaza (Fe^{2+}). Z tego punktu widzenia, związki o silnych właściwościach przeciwrodnikowych, z niższym potencjałem redukcyjnym, mogą być bardziej efektywnymi antyoksydantami, nie nasilającymi niepożądanych procesów oksydacyjnych w organizmie. Należy jednak podkreślić, że egzogenne antyoksydanty pochodzenia roślinnego w dawkach fizjologicznych są ogólnie bezpieczne i ryzyko ich działania prooksydacyjnego jest niewielkie [318].



Ryc. 50 Aktywność antyoksydacyjna wyciągów z owoców *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek' oznaczona z użyciem testu DPPH (A, B) i fosforomolibdenowego (C, D) owoców
 A, C – aktywność owoców wiciokrzewu na tle owoców malin [19], B, D – aktywność owoców wiciokrzewu na tle danych literaturowych [309-317]
R. id : *Rubus idaeus*, *R. occ*: *Rubus occidentalis*, *L. cae* : *Lonicera caerulea*

5.3 Aktywność przeciwzapalna owoców *L. caerulea* var. *edulis*

Aktywność przeciwzapalną ekstraktu suchego z owoców *L. caerulea* var. *edulis* odmiany 'Wojtek' oznaczano metodą pletyzmometryczną, w warunkach *in vivo*, modelu indukowanego karageniną obrzęku łapy szczura. Związkiem odniesienia był lek przeciwzapalny: indometacyna, w dawce 5 mg/kg masy ciała (m.c.).

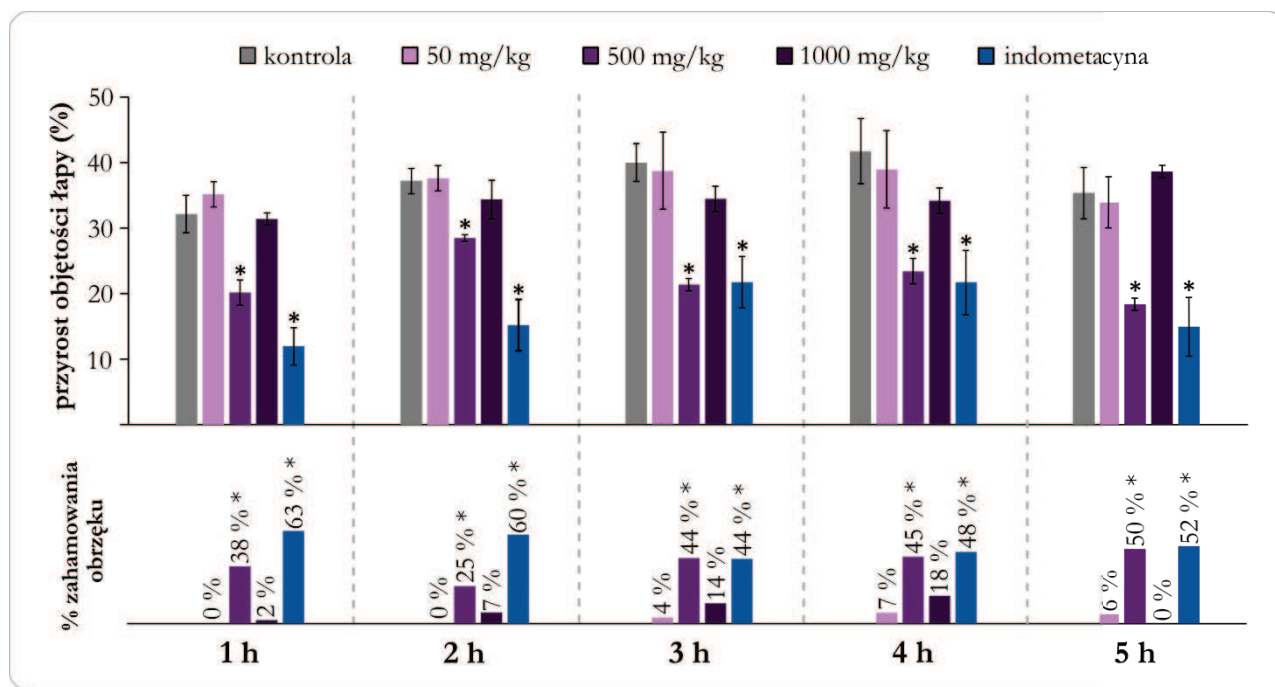
Z 3 badanych dawek ekstraktu (50, 500 oraz 1000 mg/kg m.c.), jedynie dla dawki 500 mg/kg m.c. obserwowano statystycznie istotne zahamowanie obrzęku w porównaniu do grupy kontrolnej. Działanie przeciwzapalne dawki 500 mg/kg m.c. było około 2-razy słabsze od działania indometacyny w pierwszych 2 godzinach eksperymentu, natomiast od 3 do 5 godziny ich efekt przeciwzapalny był porównywalny i utrzymywał się na tym samym poziomie (Ryc. 51).

We wcześniejszych badaniach efektu przeciwzapalnego owoców malin prowadzonych Katedrze i Zakładzie Farmakognozji, dawkę 500 mg owoców maliny zachodniej na kg m.c. również uznano za najbardziej efektywną. Jednak w porównaniu do otrzymanych wyników, w 5 h eksperymentu obserwowano bardzo wysoki wzrost aktywności przeciwzapalnej względem związku odniesienia – indometacyny[19]. Uznano że jest to wynikiem przedłużonego w czasie rozpadu (hydrolizy) form triglikozydowych cyjanidyny obecnych w *R. occidentalis* (posiadających silne działanie przeciwzapalne), w porównaniu do szybszego rozpadu form mono- i diglikozydowych (3-O-glukozyd i 3-O-rutynozyd cyjanidyny) obecnych w owocach wiciokrzewu siniego. W badaniach nad aktywnością przeciwzapalną owoców *R. idaeus* i *R. occidentalis* wykazano również silne korelacje (Spearmana) pomiędzy całkowitą zawartością antocyjanów a obserwowanym efektem przeciwzapalnym, i można przypuszczać że podobna zależność charakteryzuje owoce wiciokrzewu siniego [19].

Stwierdzono że 3-O-glukozyd cyjanidyny, dominujący w owocach wiciokrzewu siniego, jest metabolizowany u ludzi w formie 35 różnych metabolitów, z czego 17 wykryto we krwi, 31 w moczu oraz 28 w kale co wskazuje na jego wysoką biodostępność [319]. Badania biodostępności antocyjanów sugerują że ich absorpcja z żołądka jest bardzo szybka i są obecne w krwiobiegu w przeciągu kilku minut od spożycia [319]. Ponadto, w modelach zwierzęcych, obecność zarówno antocyjanów jak ich metabolitów stwierdzono w mózgu, wątrobie, tkankach oka oraz w nerkach [320, 321], co wskazuje na ich potencjalnie szeroką dystrybucję w organizmie.

Podsumowując, wysoki poziom absorpcji antocyjanów w wielu odcinkach przewodu pokarmowego, różnorodność ich metabolitów oraz szeroka dystrybucja w organizmie wskazują, że są być one odpowiedzialne za efekty przeciwzapalne. Aktywność przeciwzapalna wiązana jest z obniżaniem ekspresji szeregu markerów prozapalnych oraz wpływem na komórkowe szlaki sygnalizacyjne zależne od czynnika NF- κ B (COX-1, COX-2, iNOS, TNF- α i IL-1 β) [217, 322].

Przeciwzapalną aktywność antocyjanów potwierdza szereg badań klinicznych, w których wykazano że spożycie surowców roślinnych bogatych w antocyjany poprawia wskaźniki biomedyczne związane z procesami zapalnymi, u pacjentów z zespołem metabolicznym [323], wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego [324], chorobą wieńcową [325] czy insulinoopornością [326].



Ryc. 51 Aktywność przeciwzapalna wyciągu z owoców *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek' w modelu *in vivo* indukowanego karageniną obrzęku łapy szczura

* $p < 0.05$ w porównaniu do grupy kontrolnej

IV. WYNIKI I WNIOSKI

W oparciu o wyniki otrzymane w rezultacie przeprowadzonych analiz chromatograficznych oraz badań aktywności biologicznej surowców z maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.) (owoce, pędy), maliny zachodniej (*Rubus occidentalis* L.) (owoce, pędy) oraz wiciokrzewu siniego (*Lonicera caerulea* var. *edulis* L.) (owoce, kwiaty) sformułowano wnioski w trzech obszarach:

- I. zastosowania nowoczesnych technik separacyjnych w analizie złożonych matryc pochodzenia roślinnego - systemów dwuwymiarowej chromatografii cieczowej (2D LC)
- II. badań fitochemicznych i chemotaksonomicznych związanych z rozpoznaniem składu chemicznego surowców roślinnych
- III. aktywności biologicznej i farmakologicznej surowców roślinnych

mianowicie

- **W zakresie dwuwymiarowej chromatografii cieczowej (2D LC)**
 - ✓ opracowano systemy 2D LC, w tym techniką ‘comprehensive’ (LC x LC), umożliwiające rozdzielenie, obecnych w pędach *R. idaeus* odmian ‘Willamette’ i ‘Glen Ample’, różnych grup metabolitów wtórnych (kwasów fenolowych, elagotanin, flawonoidów, pochodnych kwasu elagowego). Najbardziej efektywne ($P = 216$) rozdzielenie związków czynnych pędów ‘Glen Ample’ uzyskano w systemie 2D LC obejmującym użycie w ¹D kolumny Luna C-18 natomiast w ²D kolumny Kinetex PFP oraz w obydwu wymiarach elucji gradientowej: w ¹D o wzrastającym liniowo stężeniu mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*), od 10 do 100 %, w 0.1 % wodnym roztworze TFA (program VI) natomiast w ²D profilu elucji gradientowej wzrastającym stężeniu ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*), od 10 do 49%, w 0.1 % wodnym roztworze TFA (program VII, skokowo-liniowy) (czas modulacji 8 min)
 - ✓ opracowano systemy ‘on-line’/‘off-line’ ‘heart-cutting’ 2D LC umożliwiające efektywne rozdzielenie obecnych w kwiatach krajowych odmian uprawowych *L. caerulea* var. *edulis* różnych grup metabolitów wtórnych (kwasów fenolowych, flawonoidów, irydoidów). W systemie ‘on-line’ ‘heart-cutting’ LC rozdzielenia w ¹D prowadzono na kolumnie Discovery HS C-18 natomiast w ²D na kolumnie Kinetex F5. W obydwu wymiarach zastosowano elucję gradientową charakteryzującą się w ¹D wzrostem stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*), od 12 do 100% w 0.1% wodnym roztworze TFA (gradient skokowo-liniowy, gradient IX), natomiast w ²D zastosowano dwa programy

gradientu o różnych profilach, łączące w poszczególnych skokach elucję izokratyczną oraz gradient liniowy, o wzrastającym stężeniu mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*) od 12 do 100% w 0.1% wodnym roztworze TFA (program X, XI) (*P* = 760). Ponadto dla celów identyfikacji związków czynnych dwóch odmian: 'Zielona' i 'Brązowa', opracowano warunki separacji w systemie 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC stosując w 2D kolumnę Kinetex PFP i ten sam program elucji gradientowej (gradient IX) w obydwu wymiarach.

- ✓ Metody zwalidowano dla celów analizy ilościowej.

Opracowane warunki rozdzieleń w systemach 2D LC mogą być zastosowane w badaniach jakościowych i ilościowych innych matryc roślinnych stanowiących mieszaniny analizowanych grup związków czynnych.

- **W zakresie analizy składu chemicznego badanych surowców roślinnych**

- ✓ metodą 1D HPLC-DAD-ESI-MS potwierdzono obecność szeregu związków należących do elagotanin, flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych w ekstraktach octanu etylu i etanolowo-wodnych z owoców 11 odmian krajowych *R. idaeus* ('Benefis', 'Beskid', 'Glen Ample', 'Heritage', 'Laszka', 'Pokusa', 'Polana', 'Polesie', 'Polka', 'Poranna Rosa', 'Willamette') oraz 1 odmiany krajowej *R. occidentalis* ('Litacz')
 - w owocach *R. idaeus* po raz pierwszy wykryto sangwinę H-2, natomiast w owocach *R. occidentalis* po raz pierwszy oznaczono: lambertianinę C, izomer sangwiny H-6, izomery sangwiny H-10, sangwinę H-2, pentozydy i acetylopentozydy kwasu elagowego, kwas protokatechowy, epikatechinę, epigalokatechinę, procyanidynę B₁ i B₂, izokwercetynę, 3-O-glukuronid kwercetyny, 3-O-glukuronid kemferolu oraz kemferol
 - nie wykazano istotnych różnic w profilach chromatograficznych wyżej wymienionych związków w obrębie badanych odmian maliny właściwej.

Stwierdzono, że pozostałe związki polifenolowe (z wyjątkiem dominujących antocyjanów i sangwiny H-6) z grupy flawonoidów oraz elagotanin i prostych fenoli, nie mogą wpływać na odnotowane wcześniej różnice w efektach biologicznych owoców różnych odmian maliny właściwej.

- ✓ metodami 1D LC i 2D LC w sprzężeniu z detektorami DAD i MS (ESI, APCI, DUIS) wykazano obecność, obok wcześniej rozpoznanych, szeregu metabolitów wtórnych w pędach *R. idaeus* 'Glen Ample', 'Willamette' w tym
 - z użyciem opracowanego systemu 'on-line' 2D LC ujawniono, sangwinę H-2 i jej izomer, izomer sangwiny H-6, izomery galoilo-HHDP-glukozy, izomery galoilo-bis-

HHDP-glukozy oraz pentozyd, metylopentozydy i acetylopentozydy kwasu elagowego jako składniki pędów *R. idaeus*

- ✓ metodą HPLC-DAD-ESI-MS po raz pierwszy scharakteryzowano skład chemiczny pędów *R. occidentalis* oraz profile metabolitów wtórnych pędów maliny właściwej zebranych w cyklu wegetacyjnym ze stanowisk naturalnych na tle składu chemicznego pędów *Rubus fruticosus*
 - w pędach *R. occidentalis* zidentyfikowano kwasy: galusowy, protokatechowy, kawowy i elagowy, oraz pentozyd i dwa acetylopentozydy kwasu elagowego, trzy izomery sangwiny H-10, katechinę, epikatechinę, procyanidynę B₂, izokwercetynę oraz 3-O-glukuronid kwercetyny
 - wykazano, że kompozycja związków czynnych pędów maliny właściwej zebranych ze stanowisk naturalnych jest zbliżona do pędów odmian uprawowych *R. idaeus*, z kwasem elagowym oraz sangwiną H-6 jako związkami dominującymi, w tym najwyższe stężenia aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych obserwowano w okresie wiosennym
 - w oparciu o porównanie otrzymanych profili chromatograficznych pędów maliny właściwej (*R. idaeus*) i maliny zachodniej (*R. occidentalis*) należących do podrodzaju *Idaeobatus* wskazano na różnice między obydwoma gatunkami maliny, natomiast ujawniono podobieństwo składu chemicznego pędów maliny właściwej do składu pędów gatunku *Rubus fruticosus* należącego do rodzaju *Rubus*

Wskazano, że najkorzystniejszym okresem zbioru pędów maliny właściwej jako surowca przeciwpriężbiennowego jest okres wiosenny.

- ✓ zanalizowano i porównano metodą HPLC-DAD-ESI/APCI-MS skład chemiczny owoców trzech krajowych odmian uprawowych *L. caerulea* var. *edulis* ('Brązowa', 'Wojtek', 'Zielona') w zakresie związków z grupy antocyjanów, flawonoli, flawan-3-oli, kwasów fenolowych i irydoidów
 - obok wcześniej rozpoznanych w owocach wiciokrzewu siniego związków czynnych biologicznie z grupy antocyjanów, flawonoli, flawan-3-oli i kwasów fenolowych, w owocach badanych odmian dodatkowo stwierdzono obecność katechiny, epikatechiny, 3,5-O-diglukozydu peonidyny oraz procyanidyny B₂, której występowanie w obrębie rodzaju *Lonicera* wykazano po raz pierwszy

- w zespółach irydoidów (związki 1-6), metodą HPLC-DAD-ESI/APCI-MS zidentyfikowano wobec związków wzorcowych kwas loganowy (1) jako dominujący we wszystkich badanych odmianach, z towarzyszącymi mu swerozydem (4) i loganiną (5). Ponadto w oparciu o zebrane dane chromatograficzne i spektralne pozostałe związki irydoidowe zidentyfikowano jako 7-O-pentozydy: kwasu loganowego (3), 7-epi-loganowego (2) oraz 7-O-pentozyd loganiny (6). Wyniki są pierwszym doniesieniem o kompozycji związków irydoidowych w owocach *L. caerulea* var. *edulis*. Oznaczone zawartości sumy związków irydoidowych oraz kwasu loganowego metodą HPLC (metoda zwalidowana) w owocach odmian krajowych były zbliżone, natomiast owoce odmiany 'Wojtek' charakteryzowały się 3-krotnie wyższą zawartością loganiny.

Biorąc pod uwagę dane literaturowe o działaniu przeciwzapalnym kwasu loganowego i loganiny stwierdzono, że różnice w zawartości związków irydoidowych w owocach *L. caerulea* var. *edulis* ('Brązowa', 'Wojtek', 'Zielona') mogą mieć wpływ na wykazywany efekt przeciwzapalny.

- ✓ rozpoznano metodami on-line/'off-line' 'heart-cutting' LC z użyciem detektorów MS i DAD oraz metodą HPLC w połączeniu z detektorem ELSD kompozycje związków czynnych w kwiatach odmian krajowych *L. caerulea* var. *edulis* 'Brązowa', 'Wojtek', 'Zielona' identyfikując 52 związki należące do flawonoidów, kwasów fenolowych, irydoidów i saponin
 - w kwiatach zidentyfikowano 22 flawonoidy spośród których większość stanowiły pochodne luteoliny i kwercetyny, 15 fenolokwasów oraz 14 związków irydoidowych
 - wskazano na różnice jakościowe i ilościowe w profilach metabolitów wtórnych kwiatów odmian krajowych wiciokrzewu siniego. Odmiana 'Wojtek' wyróżniała się najwyższym stężeniem związków z grupy flawonoidów i kwasów fenolowych podczas gdy najwyższe poziomy irydoidów oznaczono w odmianach 'Wojtek' i 'Brązowa'
 - metodą HPLC-ELSD-ESI-MS potwierdzono obecność w kwiatach 3 badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis* w niewielkich ilościach saponiny – przypuszczalnie estru 28-O-β-glukopiranozylo(6→1)-O-β-glukopiranozylo-hederageniny

Wysokie zawartości związków flawonoidowych w kwiatach badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*, wyróżniają je spośród innych kwiatów gatunków z rodzaju *Lonicera*, w których flawonoidy identyfikowano w niskich, bądź śladowych ilościach.

- W zakresie badań aktywności biologicznej oraz farmakologicznej wyciągów z owoców i pędów *Rubus idaeus* oraz owoców *Rubus occidentalis* i owoców oraz kwiatów *Lonicera caerulea*

- ✓ określono aktywność przeciwbakteryjną ekstraktów z owoców niektórych odmian uprawowych *R. idaeus* 'Poranna Rosa', 'Laszka' oraz *R. occidentalis* 'Litacz' i pędów z odmiany *R. idaeus* 'Willamette' wobec szczepów antybiotykoopornych *Staphylococcus aureus* MRSA i *Escherichia coli* ESBL oraz oceniono interakcje wyciągów z owoców i pędów maliny właściwej oraz maliny zachodniej z antybiotykami wobec wybranych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych
 - stwierdzono, że obserwowane oddziaływania – synergizm, antagonizm lub addycja w zakresie efektów przeciwdrobnoustrojowych kombinacji badanych ekstraktów z antybiotykami były zależne od typu zastosowanego ekstraktu, antybiotyku oraz szczepu bakteryjnego
 - wykazano że spośród badanych szczepów bakterii Gram-dodatnich ekstrakty z owoców i pędów działają synergistycznie z tetracyklinami wobec *Corynebacterium diphtheriae* i *Neisseria meningitidis*, natomiast antagonistycznie z aminoglikozydami i fluorochinolonami wobec *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Bakterią wobec której odnotowano największą liczbę oddziaływań o typie synergizmu była *C. diphtheriae*. Wobec użytych szczepów bakterii Gram-ujemnych dominującym typem interakcji ekstrakt-antybiotyk we wszystkich badanych szczepach był efekt addycji.
 - w pojedynczych kombinacjach antybiotyk-ekstrakt odnotowano synergizm antybiotyków - klindamycyny, ampicyliny, penicyliny z ekstraktem z pędów *R. idaeus* 'Willamette' niwelujący antybiotykooporność szczepów *S. aureus* MRSA 12677 i 13318.

Otrzymane wyniki badań oddziaływań kombinacji ekstrakt roślinny- antybiotyk są pierwszymi opisanymi dla wyciągów z malin (owoce, pędy).

- ✓ stwierdzono, że ekstrakt z owoców *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek' wykazuje działanie hamujące (MIC) lub bakteriobójcze (MBC) wobec szeregu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych w zakresie stężeń 1-64 mg/ml, podczas gdy ekstrakt z kwiatów *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek' ujawnił wyłącznie efekt hamujący (MIC) na wzrost bakterii, w zakresie stężeń 2-64 mg/ml
 - najbardziej wrażliwymi na bakteriobójcze działanie ekstraktu z owoców *L. caerulea* var. *edulis* były *Corynebacterium diphtheriae*, *Moraxella catarrhalis* i *Neisseria meningitidis*, podczas

gdy *C. diphtheriae*, *Streptococcus* grupy A oraz *S. epidermidis* były najbardziej wrażliwe na ekstrakt z kwiatów. Aktywność przeciwbakteryjną kwiatów *L. caerulea* var. *edulis* oceniono po raz pierwszy

- ekstrakty z owoców *L. caerulea* var. *edulis* wykazywały się zbliżoną bądź słabszą aktywnością przeciwbakteryjną wobec badanych szczepów bakterii, w porównaniu do wcześniej badanych w tym zakresie wyciągów z owoców różnych odmian uprawowych *R. idaeus* i *R. occidentalis*
- ✓ oznaczono aktywność przeciwzapalną oraz aktywność przeciwutleniającą (jako jeden z elementów mechanizmu aktywności przeciwzapalnej wyciągów roślinnych), ekstraktu z owoców *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek'
 - w modelu *in vivo* indukowanego karageniną obrzęku łapy szczura obserwowano statystycznie istotne zahamowanie obrzęku w dawce 500 mg/kg m. c., które było ok. 2-razy słabsze od działania indometacyny w pierwszych 2 h, natomiast porównywalne z indometacyną od 3 do 5 h eksperymentu
 - z użyciem testu DPPH oraz fosforomolibdenowego wykazano, że na tle innych surowców roślinnych owoce wiciokrzewu siniego charakteryzują się umiarkowaną aktywnością antyoksydacyjną (DPPH EC₅₀ 109.5 µg/ml) oraz słabym potencjałem redukcyjnym (87.2 mg/g AAE).

Stwierdzono, że w porównaniu do owoców maliny zachodniej, owoce wiciokrzewu siniego charakteryzują się słabszą aktywnością przeciwzapalną oraz antyoksydacyjną, natomiast silniejszą w porównaniu do owoców maliny właściwej. Jest to przypuszczalnie związane z obecnością w wysokim stężeniu antocyjanów (pochodnych cyjanidyny) oraz irydoidów (w tym loganiny), przy braku elagotanin. Ponadto owoce i kwiaty wiciokrzewu siniego wykazują słabszą aktywność przeciwdrobnoustrojową w porównaniu do owoców i pędów malin.

- **W zakresie badań aktywności biologicznej urolityn – produktów metabolizmu elagotanin i kwasu elagowego.**
 - ✓ po raz pierwszy oceniono aktywność przeciwbakteryjną urolityn A-C oraz metylourolityn A-B wobec wybranych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych
 - ujawniono działanie hamujące wzrost (MIC) tylko niektórych urolityn wobec pojedynczych szczepów bakterii. Najsilniejszym działaniem przeciwdrobnoustrojowym wyróżniała się urolityna C i najbardziej wrażliwymi bakteriami na związek były *S. aureus* (MIC 0.25 mg/ml) i *S. epidermidis* (MIC 0.06 mg/ml), powodująca zakażenia

wewnątrzszpitalne. O wiele słabsze działanie hamujące wzrost (w stężeniu 1 mg/ml) odnotowano dla urolityn A, C i metylourolityny B wobec *C. diphtheriae*, dla urolityny A wobec *S. epidermidis*, oraz dla urolityny C wobec *K. pneumoniae*.

- ✓ oceniono cytotoksyczność urolityn A-C wobec 4 linii komórkowych ludzkiego raka piersi: MCF-7, T47D, BT474 i MDA-MB-468, porównując ich aktywność do wolnego kwasu elagowego, sangwiny H-6 oraz ekstraktu z pędów *R. idaeus* 'Willamette'
 - urolityna A ujawniła działanie cytotoksyczne wobec wszystkich badanych linii nowotworowych, a jej aktywność cytotoksyczna była około 2-razy silniejsza wobec linii T47D i MDA-MB-468. Urolityna C wykazała efekt cytotoksyczny jedynie wobec linii T47D i MDA-MB-468 natomiast urolityna B była nieaktywna.
 - urolityny A i C w porównaniu do sangwiny H-6 i kwasu elagowego, charakteryzowały się od 2 do 8-razy silniejszą aktywnością cytotoksyczną, przy czym linie T47D oraz MDA-MB-468 wyróżniała większa wrażliwość na działanie cytotoksyczne urolityn A i C.

Stwierdzono, że aktywność przeciwbakteryjna urolityn jest słabsza od aktywności przeciwbakteryjnej sangwiny H-6 i kwasu elagowego (wyjątek urolityna C), natomiast urolityny (A i C) posiadają silniejsze właściwości cytotoksyczne.

STRESZCZENIE

Celem pracy była analiza fitochemiczna i farmakologiczna surowców roślinnych pochodzących z szeregu odmian *Rubus idaeus* (malina właściwa), *Rubus occidentalis* (malina zachodnia) i *Lonicera caerulea* var. *edulis* (wiciokrzew siny) hodowanych w Polsce.

Surowcami włączonymi w badania były owoce 11 odmian uprawowych *R. idaeus* ('Benefis', 'Beskid', 'Glen Ample', 'Heritage', 'Laszka', 'Pokusa', 'Polana', 'Polesie', 'Polka', 'Poranna Rosa', 'Willamette'), owoce 1 odmiany uprawowej *R. occidentalis* ('Litacz'), pędy 2 odmian *R. idaeus* ('Glen Ample', 'Willamette') oraz pędy 2 odmian *R. occidentalis* ('Bristol', 'Litacz') pozyskane z egzemplarzy kolekcji Sadowniczego Zakładu Doświadczalnego Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Brzeznej (Brzezna, Polska). Dodatkowo dokonano zbioru pędów *R. idaeus* ze stanu dzikiego, z trzech stanowisk Trójmiejskiego Parku Krajobrazowego. Owoce i kwiaty 3 krajowych odmian uprawowych *L. caerulea* var. *edulis* ('Brązowa', 'Wojtek', 'Zielona') pozyskano ze Szkołki Borówki Wysokiej i Jagody Kamczackiej 'Jagódka' (Lębork, Polska).

W analizie fitochemicznej użyto technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), włączając w to jedno- (1D LC) i dwuwymiarową chromatografię (2D LC), do rozdzielania szeregu metabolitów wtórnych w owocach i pędach malin, oraz owocach i kwiatach wiciokrzewu. Użycie nowych rozwiązań separacyjnych w zakresie opracowanych systemów 2D LC, umożliwiających efektywne rozdzielenie różnych grup metabolitów wtórnych było celem częściowym przeprowadzanych badań.

Analiza aktywności biologicznej obejmowała analizę aktywności przeciwbakteryjnej bogatych w elagotaniny ekstraktów z owoców i pędów malin, poprzez ocenę ich oddziaływania z antybiotykami wobec wybranych szczepów bakteryjnych oraz analizę aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksycznej urolityn – produktów metabolizmu elagotanin i kwasu elagowego. Owoce i kwiaty *L. caerulea* var. *edulis* oceniano w zakresie ich działania przeciwdrobnoustrojowego (owoce i kwiaty) antyoksydacyjnego i przeciwzapalnego (owoce).

Przedstawiona dysertacja składa się z czterech części: teoretycznej, doświadczalnej, omówienia wyników badań własnych oraz wyników i wniosków. W części teoretycznej przedstawiono charakterystykę botaniczną, oraz dotychczasowy stan wiedzy na temat składu chemicznego i aktywności biologicznej badanych surowców oraz wybranych produktów ich metabolizmu (urolityn), jak również przegląd technik 2D LC używanych w analizie wybranych grup metabolitów wtórnych obecnych w badanych surowcach. W drugiej części przedstawiono metodologię przeprowadzonych badań doświadczalnych, natomiast części trzecia i czwarta koncentrują się na opisie i omówieniu uzyskanych wyników i wyciągniętych z nich wniosków.

Przeprowadzono analizę fitochemiczną związków fenolowych należących do elagotanin, flawonoli i flawan-3-oli i kwasów fenolowych w owocach odmian krajowych *R. idaeus* i *R. occidentalis* metodą HPLC-DAD ESI-MS stosując kolumnę Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3µm) i elucję gradientową obejmującą wzrost stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*) w 0.1% wodnym roztworze TFA od 12 do 100%. Elagotaniny i ich pochodne identyfikowano w ekstraktach etanolowo-wodnych, natomiast identyfikację flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych przeprowadzono we frakcjach octanu etylu ekstraktów metanolowych.

W ekstraktach etanolowo-wodnych owoców wszystkich odmian potwierdzono obecność elagotanin: sangwiny H-6, lambertianiny C, oraz w mniejszych ilościach izomeru sangwiny H-6, dwóch izomerów sangwiny H-10, sangwiny H-2 oraz kwasu elagowego. Owoce badanych odmian odznaczały się pewnym zróżnicowaniem składu chemicznego w zakresie profili zawartości elagotanin, głównie sangwiny H-6, jej izomeru oraz lambertianiny C. Dodatkowo sangwinę H-2 oznaczono po raz pierwszy jako składnik owoców maliny właściwej i maliny zachodniej.

Oprócz związków należących do elagotanin, we frakcjach octanu etylu, w oparciu o związki wzorcowe zidentyfikowano kwas galusowy, protokatechowy, kawowy, izokwercetynę, hiperozyd, rutynę, tilirozyd, 3-O-glukuronid kwercetyny, 3-O-glukuronid kemferolu, kemferol katechinę, epikatechinę, epigalokatechinę, procyanidynę B₁ oraz B₂. Na podstawie widm ESI-MS otrzymanych techniką SIM zidentyfikowano dodatkowo galoilo-bis-HHDP-glukozę, trzy pentozydy i acetylopentozydy kwasu elagowego oraz nieznane pochodne katechiny i procyanidyny. Owoce badanych odmian charakteryzowały bardzo niskie stężenia w/w związków oraz niewielkie zróżnicowanie zakresie ich kompozycji pomiędzy badanymi odmianami. W związku z tym sformułowano wniosek, że powyższe związki nie mają wpływu na różnice w aktywności biologicznej owoców malin obserwowane we wcześniejszych badaniach [19].

W ekstraktach z owoców *R. occidentalis* po raz pierwszy oznaczono: lambertianinę C, izomer sangwiny H-6, izomery sangwiny H-10, sangwinę H-2, pentozydy i acetylopentozydy kwasu elagowego, kwas protokatechowy, epikatechinę, epigalokatechinę, procyanidynę B₁ i B₂, izokwercetynę, 3-O-glukuronid kwercetyny, 3-O-glukuronid kemferolu oraz kemferol.

Kontynuowano badania fitochemiczne pędów *R. idaeus* opracowując system 2D LC do separacji ich zespołu metabolitów wtórnych.

Do identyfikacji metabolitów wtórnych w pędach *R. idaeus* 'Willamette' zmodyfikowano wcześniej opracowany system 'comprehensive' LC x LC, w zakresie zastosowanej kolumny w ²D – Chromolith Performance (100 x 4.6 mm, 2 µm), która była 4-razy dłuższa od poprzedniej, oraz

zwiększając prędkość przepływu z 1.5 do 6 ml/min [19]. Na otrzymanym chromatogramie LC x LC zidentyfikowano sangwinę H-6, kwasy galusowy, protokatechowy, kawowy oraz elagowy, katechinę, epikatechinę, procyanidynę B₂, hiperozyd, izokwercetynę, 3-O-glukuronid kwercetyny oraz 3-O-galaktozyd kemferolu – natomiast nie odnotowano sygnałów związków odpowiadającym innym elagotaninom identyfikowanym w ramach jednowymiarowej analizy HPLC-DAD ESI-MS: izomerom sangwiny H-10, lambertianinie C, izomerowi sangwiny H-6 i sangwinie H-2.

Do badań włączono pędy odmiany o wyższej zawartości elagotanin ('Glen Ample'), modyfikując system 2D LC w zakresie rodzajów kolumn oraz programów elucji gradientowej. W badaniach wstępnych użyto kolumn wykonanych w technologii 'core-shell' typu Kinetex o różnych mechanizmach retencji: C-18, PFP oraz HILIC, oraz dwóch programów elucji gradientowej: jeden obejmujący wzrastające stężenie mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*), od 10 do 100%, w 0.1% wodnym roztworze TFA, natomiast drugi wrastające stężenie mieszaniny ACN:MeOH:H₂O:TFA (5:80:15:0.1 *v/v/v/v*), od 10 do 60%, w 0.1% wodnym roztworze TFA. W badaniach identyfikacyjnych użyto detektora UV, oraz MS z jonizacją ESI i APCI, które są komplementarnymi względem siebie metodami jonizacji. Obniżenie temperatury kolumny z T – 32 °C do T – 20°C pozwoliło na efektywniejsze rozdzielanie i ograniczenie efektu rozmycia pasma (ang. *band broadening*).

Rozdzielone związki z wartościami *t_R* poniżej 30 min w większości rozpoznano jako elagotaniny, kwasy fenolowe oraz flawan-3-ole, natomiast związki o wartości *t_R* powyżej 30 min w przeważającej większości stanowiły flawonole oraz pochodne kwasu elagowego. W zależności od zastosowanej kolumny oraz fazy ruchomej, obserwowano koelucję niektórych związków o niższych intensywnościach pików, z pikami o wyższej intensywności i nie mogły być zarejestrowane przy długości fali λ – 280 nm.

Kolumny Kinetex C-18 i Kinetex PFP zapewniały najlepszą rozdzielczość przy czym w porównaniu do Kinetex C-18, Kinetex PFP była bardziej efektywna, rozdzielając pentozydy i acetylopentozydy kwasu elagowego, podczas gdy jedynym związkiem oddzielonym lepiej na kolumnie Kinetex C-18 był izomer sangwiny H-6. Z zastosowaniem fazy ruchomej zawierającej ACN:MeOH:H₂O:TFA (5:80:15:0.1 *v/v/v/v*) rozdzielono epigalokatechinę oraz trzy związki identyfikowane jako galoilo-HHDP-glukoza, natomiast sangwina H-2 i metylopentozyd kwasu elagowego były rozdzielane tylko w fazie ruchomej zawierającej ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*).

Separacja na kolumnach Kinetex C-18 i PFP pozwoliła na rozdzielanie i wykrycie szeregu związków dotychczas niezidentyfikowanych w pędach *R. idaeus*, takich jak pochodne kwasu elagowego czy epigalokatechina, jednak nie osiągnięto satysfakcjonującego rozdzielania kwasu elagowego, hiperozydu, izokwercetyny, 3-O-glukuronidu kwercetyny oraz acetylopentozydów kwasu elagowego.

W procedurze rozdzielania ‘on-line’ 2D LC wybrano kolumnę Luna C-18 (150 x 1 mm, 3 μ m) (T – 34°C) do rozdzieleń w ¹D, oraz Kinetex PFP (100 x 4.6 mm, 2.6 μ m) (T – 20°C) w ²D. Do rozdzieleń zastosowano fazę ruchomą będącą mieszaniną ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*) w 0.1 % wodnym roztworze TFA tworząc program dwa programy elucji gradientowej, obejmujące wzrastające stężenie ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*), w 0.1 % wodnym roztworze TFA, od 10 do 100 % w przypadku programu w ¹D, oraz od 10 do 49 % w programie w ²D. Na kolumnie ¹D składniki próbki wstępnie rozdzielono w warunkach elucji gradientowej na frakcje o różnej polarności, które następnie wprowadzano na kolumnę ²D, w czasie modulacji wynoszącym 8 minut. Użyto detektora UV oraz MS z jonizacją ESI, APCI oraz DUIS-MS, w trybie jonów ujemnych. Identyfikację związków przeprowadzono na podstawie porównania widm UV oraz MS ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi. Opracowane warunki separacji uznano za optymalne biorąc pod uwagę parametry techniczne systemu HPLC, typy zastosowanych kolumn oraz specyfikę badanej matrycy roślinnej w zakresie kompozycji związków czynnych.

Wyciągi z pędów *R. idaeus* odmiany ‘Glen Ample’ poddano analizie z użyciem opracowanego systemu ‘on-line’ 2D LC rozdzielając ponad 40 związków w postaci pojedynczych pików, spośród których zidentyfikowano: sangwinę H-6 oraz jej izomer, 4 izomery sangwiny H-10, sangwinę H-2 i jej izomer, szereg izomerów galoilo-HHDP-glukozy oraz galoilo-bis-HHDP-glukozy, pochodne kwasu elagowego w postaci pentozydu, metylopentozydów oraz acetylopentozydów, kwasy galusowy, protokatechowy i kawowy, katechinę, epikatechinę, epigalokatechinę, procyanidyny B₁ i B₂, hiperozyd, izokwercetynę oraz 3-O-glukuronid kwercetyny.

Elagotaniny identyfikowano głównie w oparciu o widma ESI-MS, ponieważ jony o masie powyżej 1000 Da nie były rejestrowane w przypadku jonizacji APCI. Dla większości elagotanin i pochodnych kwasu elagowego obserwowano jon odpowiadający kwasowi elagowemu, obecny tylko w widmach APCI, przy *m/z* 301 [M-H]⁻. Podobnie w widmach APCI glikozydów flawonoidowych obserwowano obecność jonów fragmentacyjnych odpowiadających aglikonom flawonoidowym.

System ‘on-line’ 2D LC zapewnił 100% wzrost rozdzielczości względem rozdzieleń jednowymiarowych i pozwolił na rozdzielanie szeregu związków nie rozpoznawanych wcześniej jako składniki pędów *R. idaeus*, włączając w to sangwinę H-2 i jej izomer, izomer sangwiny H-6, trzy izomery galoilo-HHDP-glukozy, dwa izomery galoilo-bis-HHDP-glukozy oraz jeden pentozyd, dwa metylopentozydy oraz dwa acetylopentozydy kwasu elagowego.

Uwzględniając fakt że skład chemiczny pędów *R. occidentalis* nie jest znany, do badań fitochemicznych przeznaczono pędy 2 odmian uprawowych *R. occidentalis* (‘Bristol’ i ‘Litacz’), porównując ich profile z profilami pędów gatunku *R. idaeus* (odmiany ‘Glen Ample’) oraz gatunku

pokrewnego *Rubus fruticosus* (pozyskanych ze stanu naturalnego). Metanolowe ekstrakty z pędów poddano separacji na kolumnie Kinetex PFP, z użyciem programu elucji gradientowej obejmującego wzrastające stężenie mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*), od 10% do 40%, w 0.1% wodnym roztworze TFA. Identyfikacji związków dokonano w oparciu o porównanie widm UV oraz ESI-MS ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi.

W pędach dwóch badanych odmian *R. occidentalis* wykryto: kwasy galusowy, protokatechowy, kawowy i elagowy, pentozyd i dwa acetylpentozydy kwasu elagowego, trzy izomery sangwiny H-10, katechinę, epikatechinę, procyanidynę B₂, izokwercetynę oraz 3-O-glukuronid kwercetyny, pochodną katechiny/procyanidynę oraz dwa flawonoidy o nieznannej strukturze.

Profil chromatograficzny pędów obydwu badanych odmian *R. occidentalis* był odmienny od profili pędów maliny właściwej i jeżyny, oraz znacznie uboższy (21 związków fenolowych, na tle 31 związków zidentyfikowanych w pędach *R. idaeus* 'Glen Ample' i 28 związków w pędach *R. fruticosus*) we wszystkie związki fenolowe obecne w badanych gatunkach, z wyjątkiem kwasu elagowego. W pędach *R. occidentalis* nie wykryto również najbardziej charakterystycznej elagotaniny dla rodzaju *Rubus*: sangwiny H-6.

Chemotaksonomiczne porównanie profili pędów *R. occidentalis* z pędami *R. idaeus* i *R. fruticosus*, wskazują na dalsze pokrewieństwo *R. occidentalis* i *R. idaeus* pomimo przynależności do tego samego podrodzaju (*Idaeobatus*).

Uwzględniając tradycyjne zastosowanie zbieranych zimą pędów maliny właściwej jako surowca przeciwprzebiegowego, oceniono profile metabolitów wtórnych w cyklu wegetacyjnym pędów maliny właściwej zebranych z trzech naturalnych stanowisk Trójmiejskiego Parku Krajobrazowego. Metanolowe ekstrakty z pędów poddano separacji na kolumnie Kinetex PFP, z użyciem programu elucji gradientowej obejmującego wzrastające stężenie mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*), od 10% do 40%, w 0.1% wodnym roztworze TFA. Identyfikacji związków dokonano w oparciu o porównanie widm UV oraz ESI-MS ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi.

Profile pędów maliny właściwej zebranych z trzech stanowisk naturalnych były zbliżone do pędów *R. idaeus* odmian uprawowych, z kwasem elagowym oraz sangwiną H-6 jako związkami dominującymi w zespole.

Najwyższe stężenia dla badanych fenoli obserwowano w okresie wiosennym, jesienią odnotowując ich wyraźny spadek, który utrzymywał się w pędach zimowych. Na podstawie otrzymanych wyników wysunięto wniosek że zbiór pędów *R. idaeus* do celów leczniczych powinien mieć miejsce na wiosnę ze względu na najwyższe w tym okresie stężenia aktywnych biologicznych metabolitów wtórnych.

Oceniono skład chemiczny owoców trzech krajowych odmian uprawowych *L. caerulea* var. *edulis* ('Brązowa', 'Wojtek', 'Zielona') w zakresie metabolitów wtórnych należących do związków polifenolowych, prostych fenoli oraz irydoidów. W analizie zastosowano kolumnę Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3µm) i elucję gradientową obejmującą wzrost stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*) w 0.1% wodnym roztworze TFA od 12 do 100%. Identyfikacji związków dokonano w oparciu o porównanie widm UV oraz ESI-MS ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi.

Badane odmiany charakteryzowały się zbliżonym profilem chromatograficznym w zakresie związków fenolowych, z 3-O-glukozydem cyjanidyny jako dominującym związkiem, wraz z towarzyszącymi mu 3,5-O-diglukozydem cyjanidyny, 3-O-rutynozydem cyjanidyny, 3-O-glukozydem pelargonidyny, 3-O-glukozydem peonidyny, 3,5-O-diglukozydem peonidyny, hiperozydem, rutyną, izokwercetyną, procyanidyną B₂, katechiną, epikatechiną oraz kwasami chlorogenowym, neochlorogenowym i 3,5-O-dikawoilochoinowym. Chociaż większość związków była wcześniej identyfikowana jako składniki owoców *L. caerulea*, to procyanidyna B₂ została zidentyfikowana po raz pierwszy.

W oparciu o widma UV, we wszystkich badanych odmianach zidentyfikowano 6 związków o maksimach absorpcji charakterystycznych dla związków irydoidowych ($\lambda_{\max}$ 234-238 nm). W ich identyfikacji porównano efektywność dwóch typów jonizacji: ESI i APCI, w dodatnim oraz ujemnym trybie jonów. W przypadku jonizacji ujemnej, zarówno w widmach ESI jak i APCI, obserwowano wysoką intensywność jonów stanowiących addukty z TFA ([M-H+TFA]⁻), przy bardzo niskiej intensywności sygnałów jonów pseudomolekularnych, natomiast w trybie jonów dodatnich, w większości identyfikowanych związków, sygnały jonów pseudomolekularnych charakteryzowały się wysoką intensywnością, i towarzyszył im szereg innych jonów odpowiadających adduktom [M+NH₄]⁺, [M+Na]⁺ czy [M+K]⁺ oraz jon powstający po odszczepieniu cząsteczki wody ([M+H-H₂O]⁺).

W oparciu o związki wzorcowe, trzy spośród sześciu rozdzielonych irydoidów rozpoznano jako kwas loganowy, swerozyd i loganinę. Na podstawie widm UV, MS i porównania z danymi literaturowymi pozostałe związki wstępnie zidentyfikowano jako 7-O-pentozyd kwasu loganowego, 7-O-pentozyd kwasu 7-epi-loganowego oraz 7-O-pentozyd loganiny. Analiza ilościowa ujawniła że owoce badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis* zawierają irydoidy w zbliżonym zakresie stężeń, spośród których dominującym związkiem w badanych odmianach jest kwas loganowy. Są to pierwsze doniesienia na temat kompozycji związków irydoidowych w owocach *L. caerulea* var. *edulis*.

Oceniono skład chemiczny kwiatów trzech krajowych odmian uprawowych *L. caerulea* var. *edulis* ('Brązowa', 'Wojtek', 'Zielona') w zakresie metabolitów wtórnych należących do flawonoidów,

fenolokwasów, irydoidów oraz saponin. Kwiaty gatunku *L. caerulea* nie były wcześniej badane w zakresie składu chemicznego.

Do oznaczeń ilościowych i jakościowych zespołów metabolitów wtórnych z grup flawonoidów, irydoidów oraz fenolokwasów, w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis* opracowano system 'on-line' i 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC. Identyfikacji dokonano w oparciu o związki wzorcowe lub w oparciu o widma UV oraz ESI-MS otrzymane w trybie zbierania pełnych widm (¹D) oraz techniką SIM (²D), porównując je z danymi literaturowymi.

W warunkach 1D LC otrzymano dobre rozdzielanie 26 związków z czego 9 należało do kwasów fenolowych, 2 do irydoidów, oraz 15 do flawonoidów. Dla związków które nie rozdzieliły się w 1D LC, eluujących w zakresach wartości t_R 12-13 min (FR.1), 15-16 min (FR.2), 17.5-18.5 min (FR.3), 24.5-25.5 min (FR.4), oraz 27-28 min (FR.5), opracowano system 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC – składający się z kolumny Discovery HS C-18 w ¹D (150 x 2.1 mm, 3 μm) oraz kolumny Kinetex F5 (50 x 4.6 mm, 2.6 μm) w ²D. Wszystkie opracowane programy elucji obejmowały wzrost stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*) w 0.1% wodnym roztworze TFA od 12 do 100%, przy czym w ¹D zastosowano gradient liniowy, natomiast w ²D programy elucji łączące w poszczególnych etapach elucję izokratyczną i gradient liniowy. Przy użyciu 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC rozdzielono dodatkowo 21 związków z czego 6 należało do kwasów fenolowych, 8 do irydoidów, oraz 7 do flawonoidów.

System 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC umożliwił efektywne rozdzielanie związków czynnych kwiatów odmiany 'Wojtek', natomiast w odniesieniu do odmian 'Brazowa' i 'Zielona' separacja składników FR.A i FR.B eluujących z ¹D w czasach t_R 18.5-19 min i t_R 19.1-19.7 min nie była możliwa. Związki z FR.A i FR. B odmian 'Brazowa' oraz 'Wojtek' rozdzielono w systemie 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC. Frakcje zebrano ręcznie z kolumny ¹D, w 3 powtórzeniach oraz rozdzielono na kolumnie Kinetex PFP (100 x 4.6 mm, 2.6 μm) stosując program używany w rozdzielaniu ¹D, co pozwoliło na identyfikację dwóch dodatkowych związków irydoidowych.

Przy użyciu 'on-line' i 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC ustalono, że kwiaty 3 odmian krajowych *L. caerulea* są źródłem 51 związków należących do flawonoidów, kwasów fenolowych i irydoidów.

W materiale roślinnym 22 związki rozpoznano jako flawonoidy, spośród których większość stanowiły pochodne luteoliny i kwercetyny. Wobec związków wzorcowych zidentyfikowano 9 flawonoidów: rutynę, 7-O-rutynozyd luteoliny, izokwercetynę, 7-O-glukozyd luteoliny, 3-O-rutynozyd kemferolu, kwercytrynę, ochnaflawon, kupressuflawon oraz amentoflawon. Spośród pozostałych 14 związków uznanych za flawonoidy, w oparciu o otrzymane widma UV oraz MS, 9 z nich wstępnie zidentyfikowano bazując na danych literaturowych jako: dwa ramnozylo-heksozydy luteoliny, heksozyd

kwercetyny, ramnozylo-heksozyd apigeniny, diheksozyd luteoliny, 7-O-neohesperozyd chryzoeriolu, pentozylo-heksozyd kwercetyny pentozylo-heksozyd luteoliny oraz ramnozylo-heksozyd izoramnetyny. Obserwowano różnice w stężeniach niektórych flawonoidów pomiędzy badanymi odmianami, niemniej jednak dominującymi flawonoidami w kwiatach wszystkich trzech badanych odmian była rutyna, wraz z obecnymi w znacznych ilościach kupressuflawonem, amentoflawonem oraz pentozylo-heksozydem kwercetyny. Flawonoidy stanowiły dominującą grupę związków spośród wszystkich badanych grup metabolitów wtórnych w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis*, zarówno pod względem liczby zidentyfikowanych związków, jak i wartości stężeń, co wyróżnia kwiaty gatunku *L. caerulea* var. *edulis* na tle innych gatunków z rodzaju *Lonicera*.

W kwiatach badanych odmian 15 związków rozpoznano jako fenolokwasy. Dwa związki: kwas kawowy i chlorogenowy, zidentyfikowano w oparciu o porównanie z wzorcami, natomiast identyfikacja kolejnych 12 fenolokwasów: neochlorogenowego, 3 kwasów kawoilochinowych, 4,5-di-O-kawoilochinowego, 3,5-di-O-kawoilochinowego, 3,4-di-O-kawoilochinowego, p-kumaroilochinowego, feruilochinowego, feruilokawoilochinowego oraz glukozydu kwasu p-kumaroilochinowego i heksozydu kwasu kawowego była oparta na porównaniu wartości t_R , widm UV oraz MS z danymi literaturowymi. Odnotowano zbliżone poziomy stężeń fenolokwasów w kwiatach wszystkich 3 badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*. Kwasy chlorogenowy i 3,5-di-O-kawoilochinowy dominowały z zespole, wraz z kwasem neochlorogenowym i 3,4-di-O-kawoilochinowym obecnymi w wyższych stężeniach, co jest zgodne z wynikami dotyczącymi kwiatów innych gatunków z rodzaju *Lonicera*.

W materiale roślinnym 14 związków zidentyfikowano jako irydoidy. Kwas loganowy, loganinę i swerozyd zidentyfikowano w oparciu o porównanie ze związkami wzorcowymi, natomiast kolejne 10, w tym: dwa izomery kwasu sekologanowego, kwas 8-epi-loganowy, sekologanozyd, 7-O-arabinozyd demetylosekologanolu, epi-wogelozyd, sekoksyloganina, serynosekologanina, treoninosekologanina oraz 7-ester butylowy sekoksyloganiny zidentyfikowano w oparciu o porównanie wartości t_R , widm UV oraz MS z danymi literaturowymi. Kwas 8-epi-loganowy, sekoksyloganinę i serynosekologaninę zidentyfikowano jedynie w odmianach 'Brązowa' i 'Zielona' natomiast jeden z izomerów kwasu sekologanowego oznaczono tylko w odmianie 'Wojtek'. Kwas loganowy był dominującym irydoidem w odmianie 'Wojtek', oraz występował również w znacznych stężeniach w pozostałych dwóch odmianach, jednak towarzyszyło mu równie wysokie stężenie niezidentyfikowanego związku irydoidowego, oraz, w przypadku odmiany 'Brązowa', znaczne stężenie loganiny. Dane literaturowe wskazują na swerozyd i loganinę jako dominujące irydoidy w kwiatach rodzaju *Lonicera*, co jest częściowo zgodne z wynikami otrzymanymi dla kwiatów odmiany 'Brązowa'.

Odmiana ‘Wojtek’ wyróżniała się najwyższym stężeniem związków z grupy flawonoidów i kwasów fenolowych podczas gdy najwyższe poziomy irydoidów występowały w odmianach ‘Wojtek’ i ‘Brązowa’.

Do rozdzielania i identyfikacji saponin w kwiatach 3 badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*, użyto kolumnę Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3µm) wraz z programem elucji gradientowej obejmującym wzrost stężenia mieszaniny ACN:MeOH:HCOOH (80:20:0.05, *v/v/v*) w 0.1% wodnym roztworze HCOOH od 10 do 65%. Do identyfikacji związków zastosowano detektory ELSD i ESI-MS. Z użyciem detektora ELSD nie odnotowano obecności saponin w kwiatach wszystkich 3 odmian wiciokrzewów, natomiast w widmie ESI-MS, w trybie jonów ujemnych wykryto obecność jonu stanowiącego addukt z kwasem mrówkowym ([M-H+HCOOH]), odpowiadającego masie cząsteczkowej saponiny: estrowi 28-O-β-glukopiranozylo(6→1)-O-β-glukopiranozylo-hederageniny, identyfikowanej w kwiatach rodzaju *Lonicera*. Na tej podstawie stwierdzono że kwiaty wszystkich 3 badanych odmian krajowych są źródłem saponiny: estru 28-O-β-glukopiranozylo(6→1)-O-β-glukopiranozylo-hederageniny, która jest obecna w śladowych ilościach [262]. W dotychczasowych pracach saponiny identyfikowano w niewielkich ilościach w kwiatach rodzaju *Lonicera*, co jest zgodne w wynikami obecnej analizy, jakkolwiek ich zespół był jakościowo bogatszy [262, 267, 272].

Uwzględniając dane literaturowe o synergizmie niektórych ekstraktów roślinnych, lub wyizolowanych z nich związków z antybiotykami [291, 294, 295, 299-306], oceniono interakcje badanych ekstraktów z owoców *R. idaeus* (‘Poranna Rosa’, ‘Laszka’), owoców *R. occidentalis* (‘Litacz’) oraz pędów *R. idaeus* (‘Willamette’) z 36 różnymi antybiotykami wobec 4 szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) i 4 szczepów bakterii Gram-ujemnych (*Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*) charakteryzujących się największą wrażliwością na badane ekstrakty [19, 28]. Dodatkowo badania prowadzono również wobec 2 szczepów antybiotykoopornych *S. aureus* MRSA (12677 i 13318) oraz *Escherichia coli* ESBL (12186 i 12293), które zbadano na tle ich szczepów wzorcowych.

W badaniach interakcji ekstraktów z owoców i pędów malin z antybiotykami, obserwowane zjawiska synergizmu, antagonizmu lub addycji były zależne od rodzaju zastosowanego ekstraktu, antybiotyku oraz szczepu bakteryjnego.

W przypadku bakterii Gram-dodatnich, obserwowano że ekstrakty z owoców i pędów działają synergistycznie z teracyklinami wobec *C. diphtheriae* i *N. meningitidis*, natomiast antagonistycznie z aminoglikozydami i fluorochinolonami wobec *S. aureus* i *S. epidermidis*. Bakterią wobec której obserwowano największą liczbę synergizmów synergizmów była *C. diphtheriae*.

W przypadku bakterii Gram-ujemnych dominującym typem interakcji ekstrakt-antybiotyki we wszystkich badanych szczepach był efekt addycji. Jednakże podobnie jak w przypadku bakterii Gram-dodatnich obserwowano znaczną liczbę synergizmów badanych ekstraktów z tetracykliną wobec *H. pylori* i *N. meningitidis*.

Dla badanych szczepów *S. aureus* MRSA oraz *E. coli* ESBL obserwowano działanie antagonistyczne prawie wszystkich badanych ekstraktów z gentamycyną, oraz wszystkich badanych szczepów z cyprofloksacyną wobec szczepów *E. coli* ESBL. W pojedynczych przypadkach odnotowano synergizm antybiotyków (klindamycyna, ampicylina, penicylina) z ekstraktem z pędów *R. idaeus* 'Willamette' który niwelował antybiotykooporność szczepów *S. aureus* MRSA 12677 i 13318.

Zarówno wobec szczepu wzorcowego jak i szczepów antybiotykoopornych ESBL 12293 i ESBL 12186 bakterii *E. coli* zauważono działanie antagonistyczne prawie wszystkich badanych ekstraktów z gentamycyną, cyprofloksacyną oraz kotrimoksazolem.

Wyniki badań aktywności przeciwbakteryjnej związków pochodzenia roślinnego stanowią ważny obszar poszukiwań nowych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, jakkolwiek należy podkreślić że badania synergizmu antybiotyków z ekstraktami pochodzenia roślinnego mogą prowadzić do opracowania nowych metod leczenia i mogą okazać się skutecznym narzędziem w walce z wieloopornością bakterii na antybiotyki [289]. Dlatego więcej badań powinno być ukierunkowanych na analizę interakcji roślinnych metabolitów wtórnych z antybiotykami, z uwzględnieniem ich molekularnego mechanizmu [289, 294].

Ponieważ elagotaniny stanowią główną grupę metabolitów wtórnych w surowcach malin, oraz stwierdzono że ich metabolity – urolityny – są aktywne biologicznie [87, 107, 109-143], postanowiono ocenić ich aktywność przeciwdrobnoustrojową i cytotoksyczną.

Badania aktywności przeciwbakteryjnej urolityn A-C oraz metylourolityn A-B prowadzono wobec 10 szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) oraz Gram-ujemnych (*Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*). Działanie hamujące wzrost obserwowano dla 3 spośród 5 badanych urolityn obserwowano tylko wobec pojedynczych bakterii.

Działanie hamujące wzrost w stężeniu 1 mg/ml odnotowano wobec *C. diphtheriae* w przypadku urolityn A, C i metylourolityny B, wobec *S. epidermidis* w przypadku urolityny A, oraz wobec *K. pneumoniae* w przypadku urolityny C. Najsilniejszym działaniem charakteryzowała się urolityna C, której wartości MIC wobec bakterii *S. aureus* i *S. epidermidis* wynosiły 0.25 mg/ml i 0.06 mg/ml, odpowiednio. Aktywność przeciwbakteryjna urolityn była o wiele słabsza niż sangwiny H-6 i kwasu elagowego.

Oceny aktywności przeciwnowotworowej urolityn A-C dokonano przy pomocy testu oceny cytotoksyczności MTT wobec 4 linii komórkowych ludzkiego raka piersi: MCF-7, T47D, BT474 i MDA-MB-468, wyznaczając wartości IC_{50} . Ponadto porównano aktywność wolnego kwasu elagowego, elagotaniny sangwiny H-6 (stanowiącą formę glikozydowo związanego kwasu elagowego), oraz ekstraktu z pędów *R. idaeus* 'Willamette', stanowiącego bogate źródło kwasu elagowego i sangwiny H-6. Dla niektórych związków gdzie eksperymentalnie nie osiągnięto stężenia odpowiadającego IC_{50} , określono wartości predykcyjne.

Nie stwierdzono aktywności cytotoksycznej ekstraktu z pędów maliny natomiast aktywność cytotoksyczna kwasu elagowego i sangwiny H-6 wobec poszczególnych linii była na zbliżonym poziomie i przyjmowała wartości IC_{50} 57-85 $\mu\text{g/ml}$ dla sangwiny H-6 oraz 54-80 $\mu\text{g/ml}$ dla kwasu elagowego. Linia najbardziej wrażliwą na działanie obydwu związków była linia MDA-MB-468, a następnie, w kolejności, linie T47D, MCF-7 oraz BT474.

Wartości IC_{50} oznaczone dla urolityny A wobec linii MCF-7 oraz BT474 były na zbliżonym poziomie i wynosiły 22-25 $\mu\text{g/ml}$. Natomiast wobec pozostałych dwóch linii (T47D i MDA-MB-468), aktywność cytotoksyczna urolityny A była ponad 2-razy silniejsza (IC_{50} 9-10 $\mu\text{g/ml}$). Dla urolityny C wartości IC_{50} wobec linii T47D oraz MDA-MB-468 wynosiły odpowiednio 15 i 17 $\mu\text{g/ml}$.

W porównaniu do sangwiny H-6 i kwasu elagowego, urolityny A i C charakteryzowały się od 2 do 8-razy silniejszą aktywnością cytotoksyczną, przy czym linie T47D oraz MDA-MB-468 charakteryzowały się większą wrażliwością na działanie cytotoksyczne urolityn.

Aby porównać aktywność przeciwbakteryjną owoców i kwiatów *L. caerulea* var. *edulis* do aktywności poprzednio badanych owoców malin [19], wyznaczono wartości MIC i MBC badanych ekstraktów wobec 15 szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* grupy A, B i G, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) i Gram-ujemnych (*Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*).

Ekstrakt z owoców hamował wzrost 4 bakterii z wartościami MIC od 1 do 32 mg/ml, oraz wykazywał aktywność bakteriobójczą wobec 11 bakterii, z wartościami MBC od 8 do 64 mg/ml. Bakteriami najbardziej wrażliwymi na bakteriobójcze działanie ekstraktu były *Corynebacterium diphtheriae*, *Moraxella catarrhalis* i *Neisseria meningitidis*. W porównaniu do wcześniejszych danych [19], aktywność przeciwbakteryjna ekstraktu z owoców wiciokrzewu była podobna bądź na niższym poziomie niż oznaczana dla ekstraktów z owoców *R. idaeus* i *R. occidentalis*. Natomiast ekstrakt z kwiatów nie wykazywał działania bakteriobójczego i hamował wzrost tylko 9 bakterii. W większości przypadków ekstrakt z kwiatów działał słabiej niż ekstrakt z owoców, za wyjątkiem bakterii *C. diphtheriae*,

Streptococcus grupy A oraz *S. epidermidis* wobec których wartości MIC przyjmowały wartość od 2 do 4 mg/ml.

W poprzednich badaniach ustalono że aktywność antyoksydacyjna i przeciwzapalna ekstraktów z owoców *R. idaeus* i *R. occidentalis* jest skorelowana z zawartością pochodnych cyjanidyny [19]. Ponieważ owoce *L. caerulea* var. *edulis* rozpoznano jako bogate źródło antocyjanów, w tym pochodnych cyjanidyny, dokonano oceny ich aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej.

Aby ocenić aktywność antyoksydacyjną ekstraktu z owoców *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek', użyto dwóch testów oceniających zdolność zmiatania wolnych rodników (test DPPH) oraz potencjał redukcyjny (test fosforomolibdenowy). W teście DPPH wartość EC_{50} ekstraktu z owoców wicokrzewu wynosiła 109.5 μ g/ml, natomiast potencjał redukcyjny w teście fosforomolibdenowym wynosił 87.2 mg/g AAE (ekwiwalent 0.49 μ moli kwasu askorbinowego). W porównaniu do danych literaturowych, owoce wiciokrzewu siniego charakteryzują się średnią aktywnością antyoksydacyjną oraz słabym potencjałem redukcyjnym.

Aktywność przeciwzapalną ekstraktu z owoców *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek' oznaczano dla 3 dawek (50, 500 oraz 1000 mg/kg m.c.), w warunkach *in vivo*, modelu indukowanego karageniną obrzęku łapy szczura, w odniesieniu do indometacyny. Ze wszystkich badanych dawek statystycznie istotne zahamowanie obrzęku obserwowano jedynie dla dawki 500 mg/kg m.c., które było ok. 2-razy słabsze od działania indometacyny w pierwszych 2 godzinach eksperymentu, natomiast od 3 do 5 godziny ich efekt przeciwzapalny był porównywalny i utrzymywał się na tym samym poziomie.

Aktywność antyoksydacyjna i przeciwzapalna ekstraktu z owoców *L. caerulea* var. *edulis* była niewiele słabsza niż ekstraktu z owoców *R. occidentalis* (który zidentyfikowano jako najbardziej efektywny ekstrakt z owoców malin w poprzednich badaniach) oraz prawdopodobnie jest skorelowana z zawartością antocyjanów.

Otrzymane wyniki uzupełniają wiedzę o składzie chemicznym i właściwościach farmakologicznych owoców i pędów maliny *R. idaeus* i *R. occidentalis* oraz owoców i kwiatów *L. caerulea*.

System 2D LC użyty w analizie składu chemicznego pędów malin może być przydatny w badaniach polifenoli w innych surowcach z rodzaju *Rubus*. Podobnie, opracowany do analizy fitochemicznej kwiatów system 2D LC może być użyteczny w badaniach składu chemicznego innych gatunków z rodzaju *Lonicera*.

SUMMARY

The purpose of this research project was a phytochemical investigation and assessment of biological activity of plant materials from several varieties of *Rubus idaeus* (red raspberry), *Rubus occidentalis* (black raspberry) and *Lonicera caerulea* var. *edulis* (blue honeysuckle) grown in Poland.

The raspberry plant materials subjected to research included fruits from 11 cultivar varieties of *R. idaeus* ('Benefis', 'Beskid', 'Glen Ample', 'Heritage', 'Laszka', 'Pokusa', 'Polana', 'Polesie', 'Polka', 'Poranna Rosa', 'Willamette'), fruits of 1 variety of *R. occidentalis* ('Litacz'), shoots from 2 varieties of *R. idaeus* ('Glen Ample', 'Willamette') and shoots from 2 varieties of *R. occidentalis* ('Bristol', 'Litacz') obtained from the Research Institute of Pomology and Floriculture in Brzezna. Additionally, wild *R. idaeus* shoots were obtained from three natural sites from the Tricity Landscape Park in northern Poland.

Blue honeysuckle plant materials comprised fruits and flowers from 3 cultivar varieties of *L. caerulea* var. *edulis* ('Brazowa', 'Wojtek', 'Zielona') obtained from 'JAGÓDKA' Plantation in Lębork.

A number of HPLC techniques were used in phytochemical analysis, including both one-dimensional LC (1D LC) and two-dimensional LC (2D LC) for the separation of secondary metabolites from the fruits and shoots of raspberries as well as fruits and flowers of the blue honeysuckle. The use of modern separation techniques, such as 2D LC, for the resolution of diverse groups of plant metabolites, was a secondary goal of the phytochemical investigations.

Biological activity analysis comprised the analysis of antimicrobial activity of ellagitannin-rich raspberry fruit and shoot extracts, coupled with the assessment of their antibiotic interactions against selected microbes as well as the antimicrobial and cytotoxic activity of urolithins – dietary metabolites of ellagitannins and ellagic acid. The fruits and flowers of *L. caerulea* var. *edulis* were analyzed in terms of their antimicrobial (fruits and flowers), antioxidative and anti-inflammatory activity (fruits).

The thesis is separated into four main sections. The first section consists of botanical features, secondary metabolite composition and pharmacological activity of researched plant materials (and, in some cases, metabolites of their main compound groups), as well as characterization of two-dimensional liquid chromatography (2D LC) techniques employed in the analysis of selected groups of plant secondary metabolites. The second section outlines, in detail, the research methodology, whereas the third and fourth sections focus on describing the results of phytochemical and pharmacological research and conclusions.

A HPLC-DAD ESI-MS analysis, using Discovery HS C-18 column (150 x 2.1 mm, 3 μm) and gradient elution program consisting of an increasing concentration (12 to 100%) of ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*) in a 0.1% TFA water solution was used for the analysis of ellagitannin, flavonol,

flavan-3-ol and phenolic acid composition in the fruits from 11 varieties from *R. idaeus* and 1 variety of *R. occidentalis*. Ellagitannins were identified in ethanol-water (80:20 *v/v*) extracts while flavonols, flavan-3-ols and phenolic acids in ethyl acetate fractions of methanol extracts.

In all fruit extracts the presence of sanguin H-6 and lambertianin C was confirmed, alongside much lower levels of sanguin H-6 isomer, two isomers of sanguin H-10, sanguin H-2 and ellagic acid, which is the first information about the presence of sanguin H-2 in the fruits of both red and black raspberries. Certain differences in ellagitannin composition were also observed among the varieties, particularly in the case of sanguin H-6, its isomer and lambertianin C.

In ethyl acetate fractions a number of compounds belonging to flavonols, flavan-3-ols and phenolic acids were detected alongside ellagitannins, although they were found at much lower levels and not much variety between the cultivars was observed in their profiles. These compounds included gallic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, isoquercetin, hyperoside, rutin, tiliroside, quercetin 3-O-glucuronide, kaempferol 3-O-glucuronide, kaempferol, catechin, epicatechin, epigallocatechin, procyanidins B₁ and B₂, galloyl-bis-HHDP-glucose as well as pentosides and acetylpentosides of ellagic acid. Due to their low levels as well as similar composition in all tested *R. idaeus* and *R. occidentalis* fruits, it was concluded that their contribution to biological activity is negligible.

Several of the identified compounds: lambertianin C, sanguin H-6 isomer, sanguin H-10 isomers, sanguin H-2, ellagic acid pentosides and acetylpentosides, protocatechuic acid, isoquercetin, quercetin 3-O-glucuronide, kaempferol 3-O-glucuronide, kaempferol, epicatechin, epigallocatechin, procyanidins B₁ and B₂ have been identified for the first time in the fruits of black raspberries.

In order to proceed with the phytochemical investigations of the shoots of *R. idaeus* 'Willamette' a 2D LC system was developed for the separation of secondary metabolites.

A modification of the previously employed LC x LC system was made, by replacing the Chromolith Flash RP-18e (25 x 4.6 mm, 2 μ m) 2D column with a 4-times longer Chromolith Performance (100 x 4.6 mm, 2 μ m) [19], and increasing the flow rate from 1.5 to 6 ml/min. Sanguin H-6, ellagic, gallic, protocatechuic and caffeic acids, isoquercetin, hyperoside, quercetin 3-O-glucuronide, kaempferol 3-O-glucuronide, catechin, epicatechin and procyanidin B₂, were identified on the LC x LC chromatogram, however other ellagitannins identified in 1D LC, such as lambertianin C, sanguin H-10 isomers, sanguin H-6 isomer and sanguin H-2 were not detected.

In the attempt to improve phenolic compound separation in methanol shoot extract of *R. idaeus* 'Glen Ample' (possessing higher ellagitannins content than *R. idaeus* 'Willamette'), an optimization of the 2D LC system was made through using different columns and gradient elution programs. In the preliminary separations, 'core-shell' type Kinetex columns, employing different retention mechanisms

(C-18, PFP oraz HILIC), were used alongside two gradient elution programs: the first consisting of an increasing concentration (10 to 100%) of ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*), and the second of an increasing concentration (10 to 60%) of ACN:MeOH:H₂O:TFA (5:80:15:0.1 *v/v/v/v*) in 0.1% TFA water solution. Compounds were identified on the basis of UV and MS spectra in ESI and APCI mode, which are two complimentary ionization techniques. Lowering the column temperature from T – 32 °C to T – 20°C improved resolution and significantly reduced band broadening.

Compounds with retention time values $t_R < 30$ min belonged to ellagitannins, phenolic acids and flavan-3-ols, while those with $t_R > 30$ min were recognized as flavonols and ellagic acid derivatives. Depending on the type of column used and mobile phase composition, some compounds detected in low concentrations co-eluted or were covered by major peaks and could not be registered under UV detection at $\lambda = 280$ nm.

The best separations were achieved on Kinetex C-18 and PFP columns, with Kinetex PFP providing a significantly better resolution for ellagic acid derivatives (pentosides and acetyl pentosides), whereas sanguin H-6 isomer was the only compound resolved better on Kinetex C-18. Mobile phase incorporating ACN:MeOH:H₂O:TFA (5:80:15:0.1 *v/v/v/v*) enabled the separation of epigallocatechin and three galloyl-HHDP-glucose isomers, while the one containing ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*) provided separation for sanguin H-2 and methyl ellagic acid pentoside.

The separations on ‘core-shell’ Kinetex C-18 and PFP columns enabled the resolution and identification of a number of compounds not identified previously in the shoots of *R. idaeus*, such as ellagic acid derivatives and epigallocatechin, however a satisfactory separation of ellagic acid, hyperoside, isoquercetin, quercetin 3-O-glucuronide and acetyl ellagic acid pentosides was not achieved.

In the designed ‘on-line’ 2D LC system for the separation of *R. idaeus* ‘Glen Ample’ shoots, Luna C-18 column (150 x 1 mm, 3 μ m) (T – 34°C) was chosen for ¹D and Kinetex PFP column (100 x 4.6 mm, 2.6 μ m) (T – 20°C) for ²D. Gradient elution programs for both dimensions consisted of increasing concentration of ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*) in 0.1% TFA water solution, from 10 to 100% in the ¹D program, and from 10 to 49% in the ²D program. In ¹D, the sample was separated into 5 fractions differing in polarity, which were then consecutively separated in ²D, in modulation time of 8 minutes. UV and MS detectors, with ESI, APCI and DUIS ionization modes, paired with standard compounds and literature data, were used to identify the compounds. The developed 2D LC conditions of separation were optimal with respect to the technical parameters of the HPLC equipment, types of columns and specific of the plant matrix.

Using the designed 'on-line' 2D LC system, more than 40 *R. idaeus* shoot components were successfully separated as a single peaks, including: sanguin H-6 and its isomer, 4 isomers of sanguin H-10, sanguin H-2 and its isomer, a number of galloyl-HHDP-glucose isomers and galloyl-bis-HHDP-glucose isomers, ellagic acid derivatives (pentosides, methyl and acetyl pentosides), ellagic, gallic, protocatechuic and caffeic acids, catechin, epicatechin, epigallocatechin, procyanidin B₁ and B₂, hyperoside, isoquercetin, and quercetin 3-O-glucuronide.

Pseudo-molecular ions corresponding to ellagitannins were identified primarily on the basis of ESI-MS, because in APCI mode, ions with molecular mass above 1000 Da were not detected. However, an *m/z* ion corresponding to ellagic acid (301 [M-H]) was detected exclusively in APCI-MS for most ellagitannins and ellagic acid derivatives. The same situation was observed in APCI-MS spectra for flavonol glycosides, where *m/z* ions corresponding to flavonol aglycones were detected.

The 'on-line' 2D LC system improved resolution by 100% compared to 1D LC separations, and enabled the separation and identification of several compounds not identified previously in the shoots of *R. idaeus*, including sanguin H-6 isomer, sanguin H-2 and its isomer, 3 galloyl-HHDP-glucose isomers, 2 galloyl-bis-HHDP-glucose isomers, and one pentoside, 2 methyl pentoside and 2 acetyl pentosides of ellagic acid.

As the chemical composition of black raspberry shoots has not been investigated before, secondary metabolite profiles of the shoots from 2 varieties of *R. occidentalis* ('Bristol' and 'Litacz') were analyzed and compared with the composition of *R. idaeus* and *Rubus fruticosus* shoots. Methanol extracts were separated on Kinetex PFP column, and a gradient elution program consisted of increasing concentration of ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*), from 10 to 40%, in 0.1% TFA water solution. The compounds were identified by comparison with standard compounds and on the basis of UV and ESI-MS spectra and literature data.

Chemical composition of both varieties of *R. occidentalis* was similar and they were found to contain gallic, protocatechuic, caffeic and ellagic acids, ellagic acid pentoside and 2 acetyl ellagic acid pentosides, 3 sanguin H-10 isomers, catechin, epicatechin, procyanidin B₂, isoquercetin, quercetin 3-O-glucuronide as well as catechin/procyanidin derivative and two unidentified flavonoids. A total of 21 phenolic compounds was identified in the chromatographic profiles of *R. occidentalis*, which is 10 less than in *R. idaeus* and 7 less than in *R. fruticosus*. Concentration of all phenolic compounds identified in the shoots of *R. occidentalis* was found to be lower than in the shoots of *R. idaeus* and *R. fruticosus* (by comparing peak intensity). Additionally, the most characteristic ellagitannin for the genus *Rubus*: sanguin H-6, was also not detected in black raspberry shoots. The results are also interesting from a chemotaxonomic point of view, as the phenolic profiles between the shoots of *R. occidentalis* and *R.*

idaeus were found to differ more than the shoots of *R. idaeus* and *R. fruticosus*, despite *R. occidentalis* and *R. idaeus* belonging to the same subgenus (*Idaeobatus*).

Taking into account the traditional use of winter-collected shoots of *R. idaeus* in herbal teas as remedies for the common cold, phenolic compound profiles have been compared among shoots from three natural sites during 4 stages of their vegetative cycles (spring, summer, autumn, winter). Methanol extracts were separated on Kinetex PFP column, and a gradient elution program consisted of increasing concentration of ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*), from 10 to 40%, in 0.1% TFA water solution. The compounds were identified by comparison with standard compounds and on the basis of UV and ESI-MS spectra and literature data.

Chromatographic profiles of shoots from natural sites were similar to those observed in cultivar varieties, with sanguin H-6 and ellagic acid being two dominating compounds. The highest concentration of phenolics was observed in shoots gathered during spring, with a sharp decrease in their concentration in autumn which was maintained throughout winter. On the basis of the obtained results it can be concluded that spring is the most beneficial time for collecting shoots of *R. idaeus* to be used for medicinal purposes, as the concentration of phenolic compounds is the highest in that time period.

The chemical composition of fruits from three cultivar varieties of *L. caerulea* var. *edulis* ('Brazowa', 'Wojtek', 'Zielona') was analyzed in terms of secondary metabolites belonging to polyphenols, simple phenols and iridoids. The fruit extracts were separated on Discovery HS C-18 column, and a gradient elution program consisted of increasing concentration of ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*), from 12 to 100%, in 0.1% TFA water solution. The compounds were identified by comparison with standard compounds and on the basis of UV and ESI-MS spectra and literature data.

All the fruits were characterized by a similar profile in terms of phenolic compounds, with cyanidin 3-O-glucoside as the dominating one, accompanied by cyanidin 3,5-O-diglucoside, cyanidin 3-O-rutinoside, pelargonidin 3-O-glucoside, peonidin 3-O-glucoside, peonidin 3,5-O-diglucoside, hyperoside, rutin, isoquercetin, catechin, epicatechin, procyanidin B₂ and chlorogenic, neochlorogenic and 3,5-O-dicaffeoylquinic acids. Most of these compounds have been previously described in the fruits of *L. caerulea* var. *edulis*, however procyanidin B₂ was identified for the first time.

Basing on the UV spectra (λ_{max} 234-238 nm), 6 iridoid compounds have been identified in the fruits of *L. caerulea* var. *edulis*. To aid in their identification ESI-MS and APCI-MS spectra were obtained for them in positive and negative ionization mode. In negative ionization modes of both ESI- and APCI-MS spectra, an ion corresponding to a TFA adduct ([M-H+TFA]) was the dominating ion,

while the intensity of m/z molecular ions was very low in all 6 identified iridoids. In positive ionization modes, peak corresponding to the molecular ion was of much higher intensity, and was accompanied by several other ions: $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ and $[M+H-H_2O]^+$. Loganic acid, sweroside and loganin were identified basing on standard compounds, while the remaining 3 iridoids were tentatively identified as loganic acid 7-O-pentoside, 7-epi-loganic acid 7-O-pentoside and loganin 7-O-pentoside by comparing their UV and MS spectra with literature data. Quantitative analysis revealed that the fruits of all 3 varieties of *L. caerulea* var. *edulis* contain similar concentrations of iridoids, from which loganic acid is present in the highest concentrations. The results are the first to discuss iridoid composition of *L. caerulea* var. *edulis* fruits obtained from different cultivar varieties.

The chemical composition of flowers from three cultivar varieties of *L. caerulea* var. *edulis* ('Brazowa', 'Wojtek', 'Zielona') was analyzed in terms of secondary metabolites belonging to flavonoids, phenolic acids, iridoids and saponins. An 'on-line' and 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC system was designed to aid with the identification and quantification of selected compound groups. The compounds were identified by comparison with standard compounds and on the basis of UV and ESI-MS spectra (scanning mode in 1D and SIM in 2D) and literature data.

In 1D LC the separation of 26 compounds was achieved, from which 15 belonged to flavonoids, 9 to phenolic acids and 2 to iridoids. The compounds for which resolution was not achieved in 1D , eluted with t_R values of 12-13 min (FR.1), 15-16 min (FR.2), 17.5-18.5 min (FR.3), 24.5-25.5 min (FR.4), 27-28 min (FR.5), and separated using an 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC system, consisting of a Discovery HS C-18 column in 1D and Kinetex F5 in 2D . Elution programs for both dimensions comprised an increase of ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, $v/v/v$), from 12 to 100%, in 0.1% TFA water solution. The program used in 1D was a linear gradient elution program, while the program in 2D encompassed isocratic and linear gradient elution optimized for each fraction. With the aid of 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC system 21 additional compounds have been separated, from which 7 belonged to flavonoids, 6 to phenolic acids and 9 to iridoids. Although 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC system enabled an effective separation of all the compounds from 'Wojtek' variety, and most components of 'Brazowa' and 'Zielona', the separation of two fractions (FR.A and FR.B, t_R 18.5-19 min and t_R 19.1-19.7 min) in the latter two varieties was not possible. Therefore their components were separated in an 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC system. FR.A and FR.B were collected manually in three repetitions from 1D column and separated on Kinetex PFP column using a linear gradient elution program from 1D separation, which enabled the identification of 2 additional iridoids.

A total of 51 compounds belonging to flavonoids, phenolic acids and iridoids have been separated using 'on-line' and 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC systems in the flowers of three varieties of

L. caerulea var. *edulis*. 22 compounds were identified as flavonoids, most of them being derivatives of quercetin and luteolin. Basing on standard compounds 9 flavonoids were identified as rutin, luteolin 7-O-rutinoside, isoquercetin, luteolin 7-O-glucoside, kaempferol 3-O-rutinoside, quercitrin, ochnaflavone, cupressuflavone and amentoflavone. From the remaining 14 flavonoids, another 9 were identified by comparing their UV and MS spectra with literature data, as two luteolin rhamnosyl-hexosides, quercetin hexoside, apigenin rhamnosyl-hexoside, luteolin dihexoside, chrysoeriol 7-O-neohesperidoside, quercetin pentosyl-hexoside, luteolin pentosyl-hexoside and isorhamnetin rhamnosyl-hexoside. Although some variation in content of individual flavonoids could be observed among the three analyzed varieties, rutin, cupressuflavone, amentoflavone and quercetin pentosyl-hexoside were dominating in all of them. Flavonoids were the dominating group of compounds in all three varieties of *L. caerulea* var. *edulis* flowers, in terms of both number of identified compounds and their concentration in the plant material, which is contrast to the findings in flowers of other species from the genus *Lonicera*.

15 compounds were described as phenolic acids, with only 2 compounds: caffeic and chlorogenic acid identified basing on standard compounds, while the remaining phenolic acids were identified as neochlorogenic, caffeoylquinic, 4,5-di-O-caffeoylquinic, 3,5-di-O-caffeoylquinic, 3,4-di-O-caffeoylquinic, p-coumaroylquinic, feruloylquinic, feruloyl caffeoylquinic acids, p-coumaroylquinic acid glucoside and caffeic acid hexoside basing on literature data. The concentration of phenolic acids was similar between the tested varieties with chlorogenic, 3,5-di-O-caffeoylquinic, neochlorogenic and 3,4-di-O-caffeoylquinic found in markedly higher concentrations, which is in accordance with the literature data on flowers from different species of the genus *Lonicera*.

14 compounds were recognized as iridoids, with loganic acid, loganin and sweroside identified with the use of standard compounds, while the rest: two isomers of secologanic acid, 8-epi-loganic acid, secologanoside, demethylosecologanol 7-O-arabinoside, epi-vogeloside, secoxyloganin, serinosecologanin, threoninosecologanin and secoxyloganin 7-buthyl ester were identified by comparing their t_R values, UV and MS spectra with literature data. Secoxyloganin, 8-epi-loganic acid and serinosecologanin have been identified only in the flowers of 'Brazowa' and 'Zielona' varieties, while one of the isomers of secologanic acid was detected only in 'Wojtek'. Loganic acid was the dominating iridoid in the flowers of all three varieties of *L. caerulea* var. *edulis*, but in the case of variety 'Brazowa' it was accompanied by substantial levels of loganin. This is in stark contrast to the literature data pointing out loganin and sweroside as the two major iridoid compounds in the flowers of species from the genus *Lonicera*, however it is partially in agreement with the findings about iridoid content of variety 'Brazowa'.

L. caerulea var. *edulis*, ‘Wojtek’ contained the highest levels of flavonoids and phenolic acids compared to the remaining two varieties, while iridoids were at significantly higher levels in both ‘Brazowa’ and ‘Wojtek’ compared to ‘Zielona’.

For the HPLC separation and identification of saponins in the flowers of three varieties of *L. caerulea* var. *edulis*, a Discovery HS C-18 column and a gradient elution program consisting of an increasing concentration of ACN:MeOH:HCOOH (80:20:0.05, *v/v/v*), from 10 to 65%, in 0.1% HCOOH water solution. Detection was performed using ELSD and ESI-MS. Using ELSD no signals characteristic for saponins could be observed, and by using ESI-MS in negative ionization mode, only one ion corresponding to a saponin adduct with formic acid ($[M-H+HCOOH]^-$) was detected in the flowers of all analyzed varieties. This adduct was found to correspond to a saponin previously identified in the flowers of other species from the genus *Lonicera*: 28-O- β -glucopyranosyl (6 $\rightarrow$ 1)-O- β -glucopyranosyl-hederagenin ester [262]. Up to date, saponins have been identified in trace amounts in the flowers of *Lonicera* species [262, 267, 272], which is in agreement with our findings, however typically more than 1 saponin is detected.

The obtained results are the first to discuss qualitative and quantitative composition *L. caerulea* var. *edulis* flowers.

Published data outlines the synergistic effects of plant extracts, or their isolated compounds with antibiotics against antibiotic-resistant pathogenic bacteria [291, 294, 295, 299-306], which is why antibiotic interaction of raspberry fruit and shoot extracts were tested against selected bacterial strains.

Antibiotic interaction of fruit extracts from *R. idaeus* (‘Poranna Rosa’, ‘Laszka’) and *R. occidentalis* (‘Litacz’) as well as shoot extract from *R. idaeus* (‘Willamette’) was analyzed using 36 different antibiotics against 4 strains of Gram-positive (*Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) and Gram-negative bacteria (*Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*), which were assessed as the most sensitive to raspberry fruits and shoot extracts in previous experiments [19]. Additionally, antibiotic interaction with the extracts was analyzed for two antibiotic resistant strains of *Staphylococcus aureus* MRSA (12677 i 13318) and two strains of *Escherichia coli* ESBL (12186 i 12293).

It was observed that the type of antibiotic-extract interaction (synergistic, additive or antagonistic) was dependant on the type of extract, antibiotic and bacterial strain used in each combination.

In the case of Gram-positive bacteria, a number of synergistic interactions of the fruit and shoot raspberry extracts were observed with tetracycline antibiotics against *C. diphtheriae* and *N. meningitidis*, and several antagonistic interactions were observed with aminoglycosides and fluorochinolones against

S. aureus and *S. epidermidis*. Among all Gram-positive bacteria, *C. diphtheriae* was the one for which the greatest number of synergisms was observed.

In the case of Gram-negative bacteria, an additive effect was the most commonly observed interaction in the tested extract-antibiotic combinations, although just like in Gram-positive bacteria, a number of synergisms of the extracts with tetracycline could be observed against *H. pylori* and *N. meningitidis*.

For the antibiotic resistant strains of *S. aureus* MRSA and *E. coli* ESBL an antagonistic effect for most extracts was observed with gentamicin, and all extracts had an antagonistic effect with ciprofloxacin against *E. coli* ESBL strains. Interestingly, there were individual cases where the shoot extract from *R. idaeus* 'Willamette' displayed synergistic effect with clindamycin, ampicillin and penicillin against *S. aureus* MRSA 12677 and 13318, overcoming their antibiotic resistance.

Antagonistic effect of the majority of extracts with gentamicin, ciprofloxacin and cotrimoxazole was observed against all strains of *E. coli*.

While direct antimicrobial activity is an important area in the search for new antibacterial compounds, synergistic effects of plant extracts with antibiotics could provide an effective strategy to combat antibiotic resistance of microbes [289]. The obtained results are the first to report antibiotic interactions of raspberry fruit and shoot extracts against several strains of human pathogenic bacteria. Interactions of plant extracts with antibiotics should be studied more extensively and coupled with the analysis of the participation of single phenolics or their groups in the observed effect as well as the underlying mechanism [289, 294].

Urolithins are human microflora metabolites of ellagitannins and ellagic acid. Since ellagitannins constitute a major group of phenolics in raspberries, and their metabolites have been proven to be biologically active [87, 107, 109-143], during the course of the research project, the antimicrobial and cytotoxic activity of urolithins was tested.

Antimicrobial activity was analyzed for the metabolites of ellagitannins and ellagic acid: urolithins A, B, C and methylourolithins A and B, against 10 strains of Gram-positive (*Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) and Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*).

No bactericidal activity (MBC) of urolithins was observed against any tested strains, and inhibitory activity (MIC) was noted for only 3 out of 5 urolithins against individual strains. Inhibitory activity of urolithins was observed against *C. diphtheriae* (urolithins A, C and methylourolithin B), *S. epidermidis* (urolithin A) and *K. pneumoniae* (urolithin C) at 1 mg/ml. Stronger inhibitory activity was only

observed for urolithin C against *S. aureus* (0.25 mg/ml) and *S. epidermidis* (0.06 mg/ml). In comparison with sanguin H-6 and ellagic acid, the antimicrobial activity of urolithins is much weaker.

Cytotoxic activity of urolithins A-C was tested towards 4 human breast cancer cell lines MCF-7, T47D, BT474 and MDA-MB-468 by determining IC₅₀. Alongside urolithins – ellagic acid, sanguin H-6 and shoot extract from *R. idaeus* ‘Willamette’ (as a natural source of both sanguin H-6 and ellagic acid) were also tested in terms of their cytotoxicity towards the same cell lines. In the cases where IC₅₀ could not be determined directly within the range of the tested concentrations, a predictive value was determined where possible.

No cytotoxic activity was observed for *R. idaeus* shoot extract, while cytotoxic activity of sanguin H-6 and ellagic acid was observed at IC₅₀ 57-85 µg/ml for sanguin H-6 and 54-80 µg/ml for ellagic acid. MDA-MB-468 was the most sensitive cell line to ellagic acid and sanguin H-6, followed by T47D, MCF-7 and BT474. Cytotoxic activity of urolithin A was 2-times higher towards T47D and MDA-MB-468 lines (IC₅₀ 9-10 µg/ml) than it was towards MCF-7 and BT474 (IC₅₀ 22-25 µg/ml). Additionally, urolithin C displayed cytotoxic properties towards T47D and MDA-MB-468 lines with IC₅₀ values of 15 i 17 µg/ml respectively. Compared to sanguin H-6 and ellagic acid, the cytotoxic properties of urolithins A and C were from 2 to 8 times stronger, with T47D and MDA-MB-468 cell lines being the most sensitive to their activity.

To compare the antimicrobial properties of fruit and flower extracts from *L. caerulea* var. *edulis* with the previously investigated antimicrobial activity of raspberry fruit and shoot extracts [19], MIC and MBC values were determined against 15 strains of Gram-positive (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* group A, B and G, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) and Gram-negative bacteria (*Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*).

The fruit extract from *L. caerulea* var. *edulis* ‘Wojtek’ inhibited the growth of 4 bacteria (MIC from 1 to 32 mg/ml) and displayed bactericidal properties towards 11 remaining strains (MBC from 8 to 64 mg/ml), with *C. diphtheriae*, *M. catarrhalis* and *N. meningitidis* being the most sensitive. Compared to the literature data, the antimicrobial properties of the fruit extract were similar or worse than the properties of fruit extracts from *R. idaeus* i *R. occidentalis* [19]. On the contrary, the flower extract from *L. caerulea* var. *edulis* ‘Wojtek’ did not display bactericidal properties, and growth inhibition was observed only in 9 bacteria. The growth inhibition properties of the flower extract were typically weaker than the fruit extract, with the exception of *C. diphtheriae*, *Streptococcus* group A and *S. epidermidis*, for which the MIC values were 2 to 4 mg/ml.

It was determined, that the antioxidative and anti-inflammatory activity of the previously tested fruits extracts from *R. idaeus* and *R. occidentalis* was correlated with their cyanidin derivative content [19]. Since the fruits of *L. caerulea* var. *edulis* were recognized as a rich source of anthocyanins, including cyanidin derivatives, their antioxidative and anti-inflammatory activity was tested.

Two assays were applied to estimate the properties of *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek' fruit extract as an oxygen radicals scavenger (DPPH) and their reduction potential (phosphomolybdenum test). In the DPPH assay EC_{50} of the analysed extract was attained at $109.5 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$ while AAE value in the phosphomolybdenum assay was at 87.2 mg/g (equivalent of $0.49 \mu\text{mol}$ of ascorbic acid). Compared to the literature data, it can be concluded that the fruits of *L. caerulea* var. *edulis* have medium scavenging properties with weak reductive potential.

Anti-inflammatory activity of the fruit extract from *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek' was evaluated using an *in vivo* carageenan-induced paw edema rat model, with indomethacin as a reference. Out of the three tested doses (50, 500 and 1000 mg/kg body weight), a statistically significant inhibition on paw edema was observed only for the 500 mg/kg b.w. dose. The dose was about 2 times weaker than indomethacin in the first 2 h of the experiment, however since the 3rd hour till the end of the experiment (5 h), its inflammatory effect was comparable to that of indomethacin.

The antioxidative and anti-inflammatory activity of *L. caerulea* var. *edulis* fruit extract was slightly lower compared to that of *R. occidentalis* fruit extract (which was determined to be the most active raspberry extract in the previous studies [19]), and, likewise, most likely linked to their anthocyanin content.

The obtained results provide new information regarding the chemical composition and pharmacological activity of fruits and shoots of red and black raspberries, as well as fruits and flowers of the blue honeysuckle.

The 2D LC system developed for chemical composition analysis of the shoots from *R. idaeus* could be a useful tool for polyphenol analysis for other species from the genus *Rubus*. Similarly the 2D LC system employed in the phytochemical investigation of blue honeysuckle flowers could be used for secondary metabolite analysis in other species from the genus *Lonicera*.

LITERATURA

1. Broda, B., *Zarys botaniki farmaceutycznej*. 2002, Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 359.
2. Hummer, K.E., *Rubus pharmacology: Antiquity to the present*. HortScience, 2010. **45**(11): p. 1587-1591.
3. Patel, A.V., J. Rojas-Vera, and C.G. Dacke, *Therapeutic constituents and actions of Rubus species*. Current Medicinal Chemistry, 2004. **11**(11): p. 1501-1512.
4. Kosiński, P., A. Czarna, and T. Maliński, *Rubus occidentalis (Rosaceae) - A new naturalized raspberry species in the Polish flora*. Dendrobiology, 2014. **71**: p. 159-165.
5. Dossett, M., et al., *Genetic diversity in wild and cultivated black raspberry (Rubus occidentalis L.) evaluated by simple sequence repeat markers*. Genetic Resources and Crop Evolution, 2012. **59**(8): p. 1849-1865.
6. Polakowska, M., *Leśne rośliny zielarskie*. 1987, Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
7. Rumińska, A. and A. Ożarowski, *Leksykon roślin leczniczych*. 1990, Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
8. Korsznikow, B.M., et al., *Lecznicze właściwości roślin uprawnych*. 1991, Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
9. Czikow, P. and J. Łaptiew, *Rośliny lecznicze i bogate w witaminy*. 1988, Warszawa Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
10. Danek, J., *Uprawa maliny i jeżyny*. 2009, Hortpress: Warszawa.
11. Ritch-Krc, E.M., et al., *Carrier herbal medicine: traditional and contemporary plant use*. Journal of Ethnopharmacology, 1996. **52**(2): p. 85-94.
12. Ożarowski, A., *Ziołolecznictwo, poradnik dla lekarzy*. 1983, Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa.
13. Ożarowski, A. and W. Jaroniewski, *Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie*. 1987, Warszawa: Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych.
14. Kuźniewski, E. and J. Augustyn-Puziewicz, *Przewodnik ziołolecznictwa ludowego*. 1986, PWN: Warszawa.
15. Angielczyk, M., *Obrzędy i tradycje zielarskie Regionu Nadbużańskiego*. I ed. 2015, Grodzisk: Ziołowy Zakątek Angielczyk sp. jawna. 80.
16. Tulio Jr, A.Z., et al., *Cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-xylosylrutinoside as primary phenolic antioxidants in black raspberry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(6): p. 1880-1888.
17. Wyzgoski, F.J., et al., *Modeling relationships among active components in black raspberry (Rubus occidentalis L.) fruit extracts using high-resolution ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and multivariate statistical analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(6): p. 3407-3414.
18. Polish Gazette for Plant Breeder's Rights and National List, 2012. 2(109): p. 6.
19. Majdan, M., *Badania składu chemicznego Rubus idaeus i Rubus occidentalis z uwzględnieniem aktywności farmakologicznej*, in *Department of Pharmacognosy*. 2013, Medical University of Gdańsk: Gdańsk.
20. Pirogovskaia, T., et al., *Phenotypic diversity in antioxidant phytochemical composition among fruits from several genotypes of red raspberry (Rubus idaeus L.)*. Journal of Berry Research, 2012. **2**(4): p. 229-238.

21. Bradish, C.M., et al., *Comparison of flavonoid composition of red raspberries (Rubus idaeus L.) grown in the Southern United States*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(23): p. 5779-5786.
22. Segantini, D.M., et al., *Chemical quality parameters and bioactive compound content of Brazilian berries*. Food Science and Technology, 2015. **35**(3): p. 502-508.
23. Castilho Maro, L.A., et al., *Bioactive compounds, antioxidant activity and mineral composition of fruits of raspberry cultivars grown in subtropical areas in Brazil*. Fruits, 2013. **68**(3): p. 209-217.
24. Purgar, D.D., et al., *A comparison of fruit chemical characteristics of two wild grown Rubus species from different locations of Croatia*. Molecules, 2012. **17**(9): p. 10390-10398.
25. Lee, H.H., et al., *Contents of bioactive constituents and antioxidant activities of cultivated and wild raspberries*. Korean Journal of Horticultural Science and Technology, 2014. **32**(1): p. 115-122.
26. Mazur, S.P., et al., *Quality and chemical composition of ten red raspberry (Rubus idaeus L.) genotypes during three harvest seasons*. Food Chem, 2014. **160**: p. 233-40.
27. Carvalho, E., et al., *A targeted metabolomics approach to understand differences in flavonoid biosynthesis in red and yellow raspberries*. Plant Physiology and Biochemistry, 2013. **72**: p. 79-86.
28. Krauze-Baranowska, M., et al., *The antimicrobial activity of fruits from some cultivar varieties of Rubus idaeus and Rubus occidentalis*. Food and Function, 2014. **5**(10): p. 2536-2541.
29. Kim, L.S., S.H. Youn, and J.Y. Kim, *Comparative study on antioxidant effects of extracts from Rubus coreanus and Rubus occidentalis*. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2014. **43**(9): p. 1357-1362.
30. Spazsak, B., et al., *HPLC analysis of polyphenols in the fruits of Rubus idaeus L. (Rosaceae)*. Nat Prod Res, 2010. **24**(19): p. 1811-22.
31. Krauze-Baranowska, M., et al., *Chemical composition and biological activity of Rubus idaeus shoots - a traditional herbal remedy of Eastern Europe*. BMC Complement Altern Med, 2014. **14**(1): p. 480.
32. Spazsak, B., et al., *HPLC analysis of polyphenols in the fruits of Rubus idaeus L. (Rosaceae)*. Natural Product Research, 2010. **24**(19): p. 1811-1822.
33. Halvorsen, B.L., et al., *A systematic screening of total antioxidants in dietary plants*. Journal of Nutrition, 2002. **132**(3): p. 461-471.
34. Jean-Gilles, D., et al., *Anti-inflammatory effects of polyphenolic-enriched red raspberry extract in an antigen-induced arthritis rat model*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(23): p. 5755-5762.
35. Figueira, M.E., et al., *Chemical characterization of a red raspberry fruit extract and evaluation of its pharmacological effects in experimental models of acute inflammation and collagen-induced arthritis*. Food and Function, 2014. **5**(12): p. 3241-3251.
36. Sangiovanni, E., et al., *Ellagitannins from Rubus Berries for the Control of Gastric Inflammation: In Vitro and In Vivo Studies*. PLoS ONE, 2013. **8**(8).
37. Velićanski, A.S., D.D. Cvetković, and S.L. Markov, *Screening of antibacterial activity of raspberry (Rubus idaeus L.) fruit and pomace extracts*. Acta Periodica Technologica, 2012. **43**: p. 305-313.
38. Rao, A.V. and D.M. Snyder, *Raspberries and human health: A review*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(7): p. 3871-3883.
39. Reuter, S., et al., *Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?* Free Radical Biology and Medicine, 2010. **49**(11): p. 1603-1616.

40. Huang, C., et al., *Black raspberry extracts inhibit benzo(a)pyrene diol-epoxide-induced activator protein 1 activation and VEGF transcription by targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*. Cancer Research, 2006. **66**(1): p. 581-587.
41. Lu, H., et al., *Molecular mechanisms involved in chemoprevention of black raspberry extracts: From transcription factors to their target genes*. Nutrition and Cancer, 2006. **54**(1): p. 69-78.
42. Li, J., et al., *Differential effects of black raspberry and strawberry extracts on BaPDE-induced activation of transcription factors and their target genes*. Molecular Carcinogenesis, 2008. **47**(4): p. 286-294.
43. Hecht, S.S., et al., *Identification of cyanidin glycosides as constituents of freeze-dried black raspberries which inhibit anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide induced NF κ B and AP-1 activity*. Carcinogenesis, 2006. **27**(8): p. 1617-1626.
44. Duncan, F.J., et al., *Topical treatment with black raspberry extract reduces cutaneous UVB-induced carcinogenesis and inflammation*. Cancer Prevention Research, 2009. **2**(7): p. 665-672.
45. Aiyer, H.S., C. Srinivasan, and R.C. Gupta, *Dietary berries and ellagic acid diminish estrogen-mediated mammary tumorigenesis in ACI rats*. Nutrition and Cancer, 2008. **60**(2): p. 227-234.
46. Ravoori, S., et al., *Inhibition of estrogen-mediated mammary tumorigenesis by blueberry and black raspberry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(22): p. 5547-5555.
47. Madhusoodhanan, R., et al., *Effect of black raspberry extract in inhibiting NF κ B dependent radioprotection in human breast cancer cells*. Nutrition and Cancer, 2010. **62**(1): p. 93-104.
48. Han, C., et al., *Inhibition of the growth of premalignant and malignant human oral cell lines by extracts and components of black raspberries*. Nutrition and Cancer, 2005. **51**(2): p. 207-217.
49. Rodrigo, K.A., et al., *Suppression of the tumorigenic phenotype in human oral squamous cell carcinoma cells by an ethanol extract derived from freeze-dried black raspberries*. Nutrition and Cancer, 2006. **54**(1): p. 58-68.
50. Casto, B.C., et al., *Chemoprevention of oral cancer by black raspberries*. Anticancer Research, 2002. **22**(6 C): p. 4005-4015.
51. Kresty, L.A., et al., *Chemoprevention of esophageal tumorigenesis by dietary administration of lyophilized black raspberries*. Cancer Research, 2001. **61**(16): p. 6112-6119.
52. Stoner, G.D., et al., *Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries: Potential mechanisms*. Nutrition and Cancer, 2006. **54**(1): p. 33-46.
53. Stoner, G.D., et al., *Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries: potential mechanisms*. Nutr Cancer, 2006. **54**(1): p. 33-46.
54. Carlton, P.S., et al., *Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced tumorigenesis in the rat esophagus by dietary freeze-dried strawberries*. Carcinogenesis, 2001. **22**(3): p. 441-6.
55. Wang, L.S., et al., *Mechanistic basis for the chemopreventive effects of black raspberries at a late stage of rat esophageal carcinogenesis*. Molecular Carcinogenesis, 2011. **50**(4): p. 291-300.
56. Reen, R.K., R. Nines, and G.D. Stoner, *Modulation of N-nitrosomethylbenzylamine metabolism by black raspberries in the esophagus and liver of fischer 344 rats*. Nutrition and Cancer, 2006. **54**(1): p. 47-57.
57. Wang, L.S., et al., *Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats*. Cancer Prevention Research, 2009. **2**(1): p. 84-93.
58. Wang, L.S., et al., *Berry ellagitannins may not be sufficient for prevention of tumors in the rodent esophagus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(7): p. 3992-3995.

59. Chen, T., et al., *Chemopreventive properties of black raspberries in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis: Down-regulation of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, and c-Jun*. Cancer Research, 2006. **66**(5): p. 2853-2859.
60. Chen, T., et al., *Black raspberries inhibit N-nitrosomethylbenzylamine (NMB-A)-induced angiogenesis in rat esophagus parallel to the suppression of COX-2 and iNOS*. Carcinogenesis, 2006. **27**(11): p. 2301-2307.
61. Peiffer, D.S., et al., *Chemoprevention of esophageal cancer with black raspberries, their component anthocyanins, and a major anthocyanin metabolite, protocatechuic acid*. Cancer Prevention Research, 2014. **7**(6): p. 574-584.
62. Seeram, N.P., et al., *Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(25): p. 9329-9339.
63. Johnson, J.L., et al., *Effect of black raspberry (Rubus occidentalis L.) extract variation conditioned by cultivar, production site, and fruit maturity stage on colon cancer cell proliferation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(5): p. 1638-1645.
64. Paudel, L., et al., *NMR-based metabolomic investigation of bioactivity of chemical constituents in black raspberry (Rubus occidentalis L.) fruit extracts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(8): p. 1989-1998.
65. Wang, L.S., et al., *Black raspberry-derived anthocyanins demethylate tumor suppressor genes through the inhibition of DNMT1 and DNMT3B in colon cancer cells*. Nutrition and Cancer, 2013. **65**(1): p. 118-125.
66. Montrose, D.C., et al., *Anti-inflammatory effects of freeze-dried black raspberry powder in ulcerative colitis*. Carcinogenesis, 2011. **32**(3): p. 343-350.
67. Harris, G.K., et al., *Effects of lyophilized black raspberries on azoxymethane-induced colon cancer and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in the fischer 344 rat*. Nutrition and Cancer, 2001. **40**(2): p. 125-133.
68. Bi, X., et al., *Black raspberries inhibit intestinal tumorigenesis in Apc1638+/- and Muc2-/- mouse models of colorectal cancer*. Cancer Prevention Research, 2010. **3**(11): p. 1443-1450.
69. Shumway, B.S., et al., *Effects of a topically applied bioadhesive berry gel on loss of heterozygosity indices in premalignant oral lesions*. Clinical Cancer Research, 2008. **14**(8): p. 2421-2430.
70. Mallery, S.R., et al., *Topical application of a mucoadhesive freeze-dried black raspberry gel induces clinical and histologic regression and reduces loss of heterozygosity events in premalignant oral intraepithelial lesions: results from a multicentered, placebo-controlled clinical trial*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(7): p. 1910-24.
71. Mallery, S.R., et al., *Topical application of a bioadhesive black raspberry gel modulates gene expression and reduces cyclooxygenase 2 protein in human premalignant oral lesions*. Cancer Research, 2008. **68**(12): p. 4945-4957.
72. Mallery, S.R., et al., *Effects of human oral mucosal tissue, saliva, and oral microflora on intraoral metabolism and bioactivation of black raspberry anthocyanins*. Cancer Prevention Research, 2011. **4**(8): p. 1209-1221.
73. Kresty, L.A., et al., *Transitioning from preclinical to clinical chemopreventive assessments of lyophilized black raspberries: Interim results show berries modulate markers of oxidative stress in Barrett's esophagus patients*. Nutrition and Cancer, 2006. **54**(1): p. 148-156.
74. Stoner, G.D., L.S. Wang, and B.C. Casto, *Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries*. Carcinogenesis, 2008. **29**(9): p. 1665-1674.

75. Mentor-Marcel, R.A., et al., *Plasma cytokines as potential response indicators to dietary freeze-dried black raspberries in colorectal cancer patients*. Nutrition and Cancer, 2012. **64**(6): p. 820-825.
76. Wang, L.S., et al., *A phase Ib study of the effects of black raspberries on rectal polyps in patients with familial adenomatous polyposis*. Cancer Prevention Research, 2014. **7**(7): p. 666-674.
77. Wang, S.S., et al., *Phytochemical profiles, antioxidant and antimicrobial activities of three Potentilla species*. BMC Complement Altern Med, 2013. **13**: p. 321.
78. Abdel-Hameed, E.-S.S., S.A. Bazaid, and M.S. Salman, *Characterization of the Phytochemical Constituents of Taif Rose and Its Antioxidant and Anticancer Activities*. BioMed Research International, 2013. **2013**: p. 13.
79. Albayrak, S., et al., *In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species*. Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science, 2013. **37**(A1): p. 1-9.
80. Matkowski, A. and M. Piotrowska, *Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae*. Fitoterapia, 2006. **77**(5): p. 346-353.
81. Gawron-Gzella, A., M. Dudek-Makuch, and I. Matlawska, *Dpph Radical Scavenging Activity and Phenolic Compound Content in Different Leaf Extracts from Selected Blackberry Species*, in *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 2012. p. 32.
82. Mullen, W., et al., *Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(18): p. 5191-5196.
83. Ross, H.A., G.J. McDougall, and D. Stewart, *Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts*. Phytochemistry, 2007. **68**(2): p. 218-228.
84. Vuorela, S., et al., *Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health-related effects*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(15): p. 5922-5931.
85. Cerdá, B., et al., *Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice*. European Journal of Nutrition, 2003. **42**(1): p. 18-28.
86. Cerdá, B., F.A. Tomás-Barberán, and J.C. Espín, *Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: Identification of biomarkers and individual variability*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(2): p. 227-235.
87. Cerdá, B., et al., *The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzo[*a*]pyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans*. European Journal of Nutrition, 2004. **43**(4): p. 205-220.
88. González-Barrio, R., C.A. Edwards, and A. Crozier, *Colonic catabolism of ellagitannins, ellagic acid, and raspberry anthocyanins: In vivo and in vitro studies*. Drug Metabolism and Disposition, 2011. **39**(9): p. 1680-1688.
89. Mena, P., et al., *Chapter 6 - Bioactivation of High-Molecular-Weight Polyphenols by the Gut Microbiome*, in *Diet-Microbe Interactions in the Gut*. 2015, Academic Press: San Diego. p. 73-101.
90. Zhou, B.H., et al., *Metabolites of tannins in Punica granatum L. husk in rat urine*. Chinese Pharmaceutical Journal, 2014. **49**(10): p. 821-824.
91. Seeram, N.P., et al., *Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours*. Journal of Nutrition, 2006. **136**(10): p. 2481-2485.

92. Espín, J.C., et al., *Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(25): p. 10476-10485.
93. Espín, J.C., et al., *Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: The evidence so far*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2013. **2013**.
94. Cerdá, B., et al., *Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(14): p. 5571-5576.
95. Bialonska, D., et al., *The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota*. International Journal of Food Microbiology, 2010. **140**(2-3): p. 175-182.
96. Ludwig, I.A., et al., *New insights into the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. **89**: p. 758-769.
97. Seeram, N.P., et al., *Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(19): p. 7732-7737.
98. González-Sarriás, A., et al., *Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice*. Molecular Nutrition and Food Research, 2010. **54**(3): p. 311-322.
99. Van Der Hooft, J.J.J., et al., *Structural elucidation and quantification of phenolic conjugates present in human urine after tea intake*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(16): p. 7263-7271.
100. Tulipani, S., et al., *Urolithins are the main urinary microbial-derived phenolic metabolites discriminating a moderate consumption of nuts in free-living subjects with diagnosed metabolic syndrome*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(36): p. 8930-8940.
101. Truchado, P., et al., *Strawberry processing does not affect the production and urinary excretion of urolithins, ellagic acid metabolites, in humans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(23): p. 5749-5754.
102. Mertens-Talcott, S.U., et al., *Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(23): p. 8956-8961.
103. Selma, M.V., J.C. Espín, and F.A. Tomás-Barberán, *Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(15): p. 6485-6501.
104. Puupponen-Pimiä, R., et al., *Effects of ellagitannin-rich berries on blood lipids, gut microbiota, and urolithin production in human subjects with symptoms of metabolic syndrome*. Molecular Nutrition and Food Research, 2013. **57**(12): p. 2258-2263.
105. García-Muñoz, C., et al., *Diversity of urinary excretion patterns of main ellagitannins' colonic metabolites after ingestion of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*) juice*. Food Research International, 2014. **55**: p. 161-169.
106. Tomás-Barberán, F.A., et al., *Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: Consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(28): p. 6535-6538.
107. González-Sarriás, A., et al., *Antiproliferative activity of the ellagic acid-derived gut microbiota isourolithin A and comparison with its urolithin A isomer: the role of cell metabolism*. European Journal of Nutrition, 2015: p. 1-11.

108. Landete, J.M., *Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health*. Food Research International, 2011. **44**(5): p. 1150-1160.
109. Larrosa, M., et al., *Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2010. **21**(8): p. 717-725.
110. Ishimoto, H., et al., *Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2012. **76**(2): p. 395-399.
111. Dobroslawa, B., et al., *Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ~ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(21): p. 10181-10186.
112. Kallio, T., et al., *Urolithins display both antioxidant and pro-oxidant activities depending on assay system and conditions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(45): p. 10720-10729.
113. Giménez-Bastida, J.A., et al., *Intestinal ellagitannin metabolites ameliorate cytokine-induced inflammation and associated molecular markers in human colon fibroblasts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(36): p. 8866-8876.
114. González-Sarriás, A., et al., *NF- κ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts*. British Journal of Nutrition, 2010. **104**(4): p. 503-512.
115. Giménez-Bastida, J.A., et al., *Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF- α -induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells*. Molecular Nutrition and Food Research, 2012. **56**(5): p. 784-796.
116. Piwowarski, J.P., et al., *Urolithins, gut microbiota-derived metabolites of ellagitannins, inhibit LPS-induced inflammation in RAW 264.7 murine macrophages*. Molecular Nutrition and Food Research, 2015.
117. Piwowarski, J.P., et al., *Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials*. Journal of Ethnopharmacology, 2014. **155**(1): p. 801-809.
118. Piwowarski, J.P., S. Granica, and A.K. Kiss, *Influence of gut microbiota-derived ellagitannins metabolites urolithins on pro-inflammatory activities of human neutrophils*. Planta Medica, 2014. **80**(11): p. 887-895.
119. Kiss, A.K., et al., *Epigenetic modulation of mechanisms involved in inflammation: Influence of selected polyphenolic substances on histone acetylation state*. Food Chemistry, 2012. **131**(3): p. 1015-1020.
120. Li, Z., et al., *Pomegranate extract induces ellagitannin metabolite formation and changes stool microbiota in healthy volunteers*. Food and Function, 2015. **6**(8): p. 2487-2495.
121. Giménez-Bastida, J.A., et al., *Urolithins, ellagitannin metabolites produced by colon microbiota, inhibit Quorum Sensing in Yersinia enterocolitica: Phenotypic response and associated molecular changes*. Food Chemistry, 2012. **132**(3): p. 1465-1474.
122. Vicinanza, R., et al., *Pomegranate juice metabolites, ellagic acid and urolithin a, synergistically inhibit androgen-independent prostate cancer cell growth via distinct effects on cell cycle control and apoptosis*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2013. **2013**.
123. Kasimsetty, S.G., et al., *Effects of pomegranate chemical constituents/intestinal microbial metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 prostate cancer cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(22): p. 10636-10644.

124. Sánchez-González, C., et al., *Walnut polyphenol metabolites, urolithins A and B, inhibit the expression of the prostate-specific antigen and the androgen receptor in prostate cancer cells*. Food and Function, 2014. **5**(11): p. 2922-2930.
125. Giorgio, C., et al., *The ellagitannin colonic metabolite urolithin D selectively inhibits EphA2 phosphorylation in prostate cancer cells*. Molecular Nutrition and Food Research, 2015.
126. Sánchez-González, C., et al., *Urolithin A causes p21 up-regulation in prostate cancer cells*. European Journal of Nutrition, 2016. **55**(3): p. 1099-1112.
127. Nuñez-Sánchez, M.A., et al., *Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients*. Molecular Nutrition and Food Research, 2014. **58**(6): p. 1199-1211.
128. González-Sarriás, A., et al., *Phase-II metabolism limits the antiproliferative activity of urolithins in human colon cancer cells*. European Journal of Nutrition, 2014. **53**(3): p. 853-864.
129. Cho, H., et al., *Chemopreventive activity of ellagitannins and their derivatives from black raspberry seeds on HT-29 colon cancer cells*. Food and Function, 2015. **6**(5): p. 1675-1683.
130. González-Sarriás, A., et al., *Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins*. Molecular Nutrition and Food Research, 2009. **53**(6): p. 686-698.
131. Kasimsetty, S.G., et al., *Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and Urolithins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(4): p. 2180-2187.
132. Sharma, M., et al., *Effects of fruit ellagitannin extracts, ellagic acid, and their colonic metabolite, urolithin A, on Wnt signaling*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(7): p. 3965-3969.
133. González-Sarriás, A., et al., *The ellagic acid-derived gut microbiota metabolite, urolithin A, potentiates the anticancer effects of 5-fluorouracil chemotherapy on human colon cancer cells*. Food and Function, 2015. **6**(5): p. 1460-1469.
134. Qiu, Z., et al., *In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells*. Food and Chemical Toxicology, 2013. **59**: p. 428-437.
135. Adams, L.S., et al., *Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells In vitro*. Cancer Prevention Research, 2010. **3**(1): p. 108-113.
136. González-Sarriás, A., et al., *The gut microbiota ellagic acid-derived metabolite urolithin a and its sulfate conjugate are substrates for the drug efflux transporter breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(18): p. 4352-4359.
137. Wang, Y., et al., *In vitro antiproliferative and antioxidant effects of urolithin A, the colonic metabolite of ellagic acid, on hepatocellular carcinomas HepG2 cells*. Toxicology in Vitro, 2015. **29**(5): p. 1107-1115.
138. Dell'Agli, M., et al., *Ellagitannins of the fruit rind of pomegranate (Punica granatum) antagonize in vitro the host inflammatory response mechanisms involved in the onset of malaria*. Malaria Journal, 2010. **9**(1).
139. Larrosa, M., et al., *Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(5): p. 1611-1620.
140. Verzelloni, E., et al., *Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites*. Molecular Nutrition and Food Research, 2011. **55**(SUPPL. 1): p. S35-S43.
141. Sala, R., et al., *Urolithins at physiological concentrations affect the levels of pro-inflammatory cytokines and growth factor in cultured cardiac cells in hyperglucidic conditions*. Journal of Functional Foods, 2015. **15**: p. 97-105.

142. Yuan, T., et al., *Pomegranate's Neuroprotective Effects against Alzheimer's Disease Are Mediated by Urolithins, Its Ellagitannin-Gut Microbial Derived Metabolites*. ACS Chemical Neuroscience, 2016. **7**(1): p. 26-33.
143. Kang, I., et al., *Urolithin A, C, and D, but not iso-urolithin A and urolithin B, attenuate triglyceride accumulation in human cultures of adipocytes and hepatocytes*. Molecular Nutrition and Food Research, 2016.
144. Myszka, K. and K. Czaczyk, *Mechanizm quorum sensing jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2010. **64**: p. 582-589.
145. Stevens, P.F. *Angiosperm Phylogeny Website*. 2001 [cited 2016 29.06].
146. Hummer, K.E., *Blue honeysuckle: A new berry crop for North America*. Journal of the American Pomological Society, 2006. **60**(1): p. 3-8.
147. Zhao, L., et al., *Antioxidant Activities and Major Bioactive Components of Consecutive Extracts from Blue Honeysuckle (Lonicera Caerulea L.) Cultivated in China*. Journal of Food Biochemistry, 2015. **39**(6): p. 653-662.
148. Thompson, M.M., *Introducing Haskap, Japanese blue honeysuckle*. Journal of the American Pomological Society, 2006. **60**(4): p. 164-168.
149. Celli, G.B., A. Ghanem, and M.S.L. Brooks, *Haskap Berries (Lonicera caerulea L.)-a Critical Review of Antioxidant Capacity and Health-Related Studies for Potential Value-Added Products*. Food and Bioprocess Technology, 2014. **7**(6): p. 1541-1554.
150. Svarcova, I., J. Heinrich, and K. Valentova, *Berry fruits as a source of biologically active compounds: the case of Lonicera caerulea*. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia, 2007. **151**(2): p. 163-174.
151. Liu, C., et al., *Optimising microwave vacuum puffing for blue honeysuckle snacks*. International Journal of Food Science and Technology, 2010. **45**(3): p. 506-511.
152. Thompson, M.M. and D.L. Barney, *Evaluation and breeding of haskap in North America*. Journal of the American Pomological Society, 2007. **61**(1): p. 25-33.
153. Dossett, M., J. Lee, and C.E. Finn, *Anthocyanin content of wild black raspberry germplasm*, in *Acta Horticulturae*. 2012. p. 43-48.
154. Plekhanova, M.N., *Blue honeysuckle (Lonicera caerulea L.) - A new commercial berry crop for temperate climate: Genetic resources and breeding*, in *Acta Horticulturae*. 2000. p. 159-164.
155. Szot, I., T. Lipa, and B. Sosnowska, *Blue honeysuckle – healthful properties of fruits and possibilities of their applications*. Żywnosc. Nauka. Technologia. Jakość/Food. Science Technology. Quality, 2014. **4**(95): p. 18-29.
156. Palíková, I., et al., *Constituents and antimicrobial properties of blue honeysuckle: A novel source for phenolic antioxidants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(24): p. 11883-11889.
157. Chaovanalikit, A., M.M. Thompson, and R.E. Wrolstad, *Characterization and Quantification of Anthocyanins and Polyphenolics in Blue Honeysuckle (Lonicera caerulea L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(4): p. 848-852.
158. Bakowska-Barczak, A.M., M. Marianchuk, and P. Kolodziejczyk, *Survey of bioactive components in Western Canadian berries*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2007. **85**(11): p. 1139-1152.

159. Kuszniereicz, B., et al., *Phenolic composition and antioxidant properties of polish blue-berried honeysuckle genotypes by HPLC-DAD-MS, HPLC postcolumn derivatization with ABTS or FC, and TLC with DPPH visualization*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(7): p. 1755-1763.
160. Deineka, V.I., et al., *Anthocyanins from fruit of some plants of the Caprifoliaceae family*. Chemistry of Natural Compounds, 2005. **41**(2): p. 162-164.
161. Wojdyło, A., et al., *Variability of phytochemical properties and content of bioactive compounds in Lonicera caerulea L. var. kamtschatica Berries*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(49): p. 12072-12084.
162. Wang, Y., et al., *Comparison of polyphenol, anthocyanin and antioxidant capacity in four varieties of Lonicera caerulea berry extracts*. Food Chemistry, 2016. **197**: p. 522-529.
163. Ochmian, I., J. Oszmiański, and K. Skupień, *Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits*. Journal of Applied Botany and Food Quality, 2009. **83**(1): p. 64-69.
164. Ochmian, I., et al., *Chemical composition and physical characteristics of fruits of two cultivars of blue honeysuckle (Lonicera caerulea L.) in relation to their degree of maturity and harvest date*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2012. **40**(1): p. 155-162.
165. Feng, C., et al., *Antioxidant capacities and anthocyanin characteristics of the black-red wild berries obtained in Northeast China*. Food Chemistry, 2016. **204**: p. 150-158.
166. Bonarska-Kujawa, D., et al., *Biophysical mechanism of the protective effect of blue honeysuckle (Lonicera caerulea L. var. kamtschatica Sevast.) polyphenols extracts against lipid peroxidation of erythrocyte and lipid membranes*. Journal of Membrane Biology, 2014. **247**(7): p. 611-625.
167. Lee, H.J., et al., *Metabolomics of Lonicera caerulea fruit during ripening and its relationship with color and antioxidant activity*. Food Research International, 2015. **78**: p. 343-351.
168. Thompson, M.M. and A. Chaovanalikit, *Preliminary observations on adaptation and nutraceutical values of blue honeysuckle (Lonicera caerulea) in Oregon, USA*, in *Acta Horticulturae*. 2003. p. 65-72.
169. Lefèvre, I., et al., *Evaluation and comparison of nutritional quality and bioactive compounds of berry fruits from Lonicera caerulea, Ribes L. species and Rubus idaeus grown in Russia*. Journal of Berry Research, 2011. **1**(3): p. 159-167.
170. Rop, O., et al., *Antioxidant and radical oxygen species scavenging activities of 12 cultivars of blue honeysuckle fruit*. Horticultural Science, 2011. **38**(2): p. 63-70.
171. Vasantha Rupasinghe, H.P., et al., *Short Communication: Haskap (Lonicera caerulea): A new berry crop with high antioxidant capacity*. Canadian Journal of Plant Science, 2012. **92**(7): p. 1311-1317.
172. Vasco, C., J. Ruales, and A. Kamal-Eldin, *Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador*. Food Chemistry, 2008. **111**(4): p. 816-823.
173. You, Q., et al., *Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars*. Food Chemistry, 2011. **125**(1): p. 201-208.
174. Chen, L., et al., *Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties*. Journal of Functional Foods, 2013. **5**(1): p. 508-515.
175. Pantelidis, G.E., et al., *Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries*. Food Chemistry, 2007. **102**(3): p. 777-783.
176. Skrede, G., R.E. Wrolstad, and R.W. Durst, *Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (Vaccinium corymbosum L.)*. Journal of Food Science, 2000. **65**(2): p. 357-364.

177. Zadernowski, R., M. Naczek, and J. Nesterowicz, *Phenolic acid profiles in some small berries*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(6): p. 2118-2124.
178. Anikina, E.V., et al., *BITTER IRIDOID GLUCOSIDE FROM LONICERA-CAERULEA FRUIT*. Khimiya Prirodnikh Soedinenii, 1988(4).
179. Machida, K., J. Asano, and M. Kikuchi, *Caeruleosides A and B, bis-iridoid glucosides from Lonicera caerulea*. Phytochemistry, 1995. **39**(1): p. 111-114.
180. Anikina, E.V., et al., *COMPLEX ESTERS OF CITRIC-ACID FROM LONICERA-CAERULEA FRUIT*. Khimiya Prirodnikh Soedinenii, 1988(4).
181. Raudsepp, P., et al., *The antioxidative and antimicrobial properties of the blue honeysuckle (Lonicera caerulea L.), Siberian rhubarb (Rheum rhabonticum L.) and some other plants, compared to ascorbic acid and sodium nitrite*. Food Control, 2013. **31**(1): p. 129-135.
182. Rop, O., et al., *Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (Aronia melanocarpa (Michx.) Elliot) cultivars*. Journal of Medicinal Plants Research, 2010. **4**(22): p. 2431-2437.
183. Gasperotti, M., et al., *Profiling and accurate quantification of Rubus ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct uplc-q-tof hdms and hplc-dad analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(8): p. 4602-4616.
184. Cao, G., H.M. Alessio, and R.G. Cutler, *Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants*. Free Radical Biology and Medicine, 1993. **14**(3): p. 303-311.
185. Palíková, I., et al., *Protectivity of blue honeysuckle extract against oxidative human endothelial cells and rat hepatocyte damage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(15): p. 6584-6589.
186. Wang, Y., et al., *Lonicera caerulea berry extract attenuates lipopolysaccharide induced inflammation in BRL-3A cells: Oxidative stress, energy metabolism, hepatic function*. Journal of Functional Foods, 2016. **24**: p. 1-10.
187. Zdařilová, A., et al., *Polyphenolic fraction of Lonicera caerulea L. fruits reduces oxidative stress and inflammatory markers induced by lipopolysaccharide in gingival fibroblasts*. Food and Chemical Toxicology, 2010. **48**(6): p. 1555-1561.
188. Jin, X.H., et al., *Effects of blue honeysuckle (Lonicera caerulea L.) extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo*. Experimental Eye Research, 2006. **82**(5): p. 860-867.
189. Jurgoński, A., J. Juśkiewicz, and Z. Zduńczyk, *An anthocyanin-rich extract from Kamchatka honeysuckle increases enzymatic activity within the gut and ameliorates abnormal lipid and glucose metabolism in rats*. Nutrition, 2013. **29**(6): p. 898-902.
190. Takahashi, A., et al., *Dietary anthocyanin-rich Haskap phytochemicals inhibit postprandial hyperlipidemia and hyperglycemia in rats*. Journal of Oleo Science, 2014. **63**(3): p. 201-209.
191. Zhao, H., et al., *Protective effect of anthocyanin from Lonicera caerulea var. edulis on radiation-induced damage in mice*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. **13**(9): p. 11773-11782.
192. Svobodová, A., A. Zdařilová, and J. Vostálová, *Lonicera caerulea and Vaccinium myrtillus fruit polyphenols protect HaCaT keratinocytes against UVB-induced phototoxic stress and DNA damage*. Journal of Dermatological Science, 2009. **56**(3): p. 196-204.
193. Svobodová, A., et al., *Protective effects of phenolic fraction of blue honeysuckle fruits against UVA-induced damage to human keratinocytes*. Archives of Dermatological Research, 2008. **300**(5): p. 225-233.

194. Rajnochová Svobodová, A., et al., *Effects of oral administration of Lonicera caerulea berries on UVB-induced damage in SKH-1 mice. A pilot study*. Photochemical and Photobiological Sciences, 2013. **12**(10): p. 1830-1840.
195. Vostálová, J., et al., *Lonicera caerulea fruits reduce UVA-induced damage in hairless mice*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2013. **128**: p. 1-11.
196. Heinrich, J., et al., *Metabolic profiling of phenolic acids and oxidative stress markers after consumption of lonicera caerulea L. Fruit*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(19): p. 4526-4532.
197. Kalili, K.M. and A. De Villiers, *Off-line comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction $\times$ reversed phase liquid chromatographic analysis of green tea phenolics*. Journal of Separation Science, 2010. **33**(6-7): p. 853-863.
198. Seger, C., S. Sturm, and H. Stuppner, *Mass spectrometry and NMR spectroscopy: Modern high-end detectors for high resolution separation techniques-state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations*. Natural Product Reports, 2013. **30**(7): p. 970-987.
199. Sun, J., L. Lin, and P. Chen, *Recent applications for HPLC-MS analysis of anthocyanins in food materials*. Current Analytical Chemistry, 2013. **9**(3): p. 397-416.
200. Sarker, S.D. and L. Nahar, *Applications of High Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Herbal Products*, in *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*. 2015. p. 406-425.
201. Gilgenast, E., *Wielowymiarowa chromatografia cieczowa jako technika przygotowania próbek i oznaczania składu grupowego skomplikowanych mieszanin*, in *Department of Chemistry*. 2008, Technical University of Gdańsk: Gdańsk.
202. Qiao, X., et al., *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, 2014. **1362**: p. 157-167.
203. De Villiers, A., P. Venter, and H. Pasch, *Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids*. Journal of Chromatography A, 2016. **1430**: p. 16-78.
204. Kalili, K.M. and A. de Villiers, *Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds*. Journal of Separation Science, 2011. **34**(8): p. 854-876.
205. Česla, P., J. Fischer, and P. Jandera, *Separation of phenolic acids and flavone natural antioxidants by two-dimensional method combining liquid chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography*. Electrophoresis, 2010. **31**(13): p. 2200-2210.
206. Cacciola, F., P. Jandera, and L. Mondello, *Comparison of high-temperature gradient heart-cutting and comprehensive LC $\times$ LC systems for the separation of phenolic antioxidants*. Chromatographia, 2007. **66**(9-10): p. 661-667.
207. Pursch, M. and S. Buckenmaier, *Loop-based multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography for target analysis in complex matrices*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(10): p. 5310-5317.
208. Dugo, P., et al., *Stop-flow comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection for phospholipid analysis*. Journal of Chromatography A, 2013. **1278**: p. 46-53.
209. Kalili, K.M. and A. De Villiers, *Systematic optimisation and evaluation of on-line, off-line and stop-flow comprehensive hydrophilic interaction chromatography $\times$ reversed phase liquid chromatographic analysis of procyanidins, Part I: Theoretical considerations*. Journal of Chromatography A, 2013. **1289**: p. 58-68.
210. Kalili, K.M. and A. De Villiers, *Systematic optimisation and evaluation of on-line, off-line and stop-flow comprehensive hydrophilic interaction chromatography $\times$ reversed phase liquid chromatographic analysis of*

- procyanidins. Part II: Application to cocoa procyanidins.* Journal of Chromatography A, 2013. **1289**: p. 69-79.
211. Li, D. and O.J. Schmitz, *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, 2015. **407**(1): p. 231-240.
 212. Zhou, T., et al., *Isolation and purification of iridoid glycosides from Gardenia jasminoides Ellis by isocratic reversed-phase two-dimensional preparative high-performance liquid chromatography with column switch technology.* Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2007. **858**(1-2): p. 296-301.
 213. Kivilompolo, M. and T. Hyötyläinen, *Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids.* Journal of Chromatography A, 2007. **1145**(1-2): p. 155-164.
 214. Jandera, P., et al., *Characterization of HPLC columns for two-dimensional LC × LC separations of phenolic acids and flavonoids.* Journal of Chemometrics, 2008. **22**(3-4): p. 203-217.
 215. Sun, W., et al., *Separation and analysis of phenolic acids from Salvia miltiorrhiza and its related preparations by off-line two-dimensional hydrophilic interaction chromatography×reversed-phase liquid chromatography coupled with ion trap time-of-flight mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 2016. **1431**: p. 79-88.
 216. Veberic, R., et al., *Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species.* LWT - Food Science and Technology, 2015. **60**(1): p. 509-517.
 217. Smeriglio, A., et al., *Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins.* Phytotherapy Research, 2016: p. 1265-1286.
 218. Tsuda, T., *Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies.* Molecular Nutrition and Food Research, 2012. **56**(1): p. 159-170.
 219. Sakuta, M., *Diversity in plant red pigments: Anthocyanins and betacyanins.* Plant Biotechnology Reports, 2014. **8**(1): p. 37-48.
 220. Stintzing, F.C. and R. Carle, *Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition.* Trends in Food Science and Technology, 2004. **15**(1): p. 19-38.
 221. De Pascual-Teresa, S. and M.T. Sanchez-Ballesta, *Anthocyanins: From plant to health.* Phytochemistry Reviews, 2008. **7**(2): p. 281-299.
 222. Cisowska, A., D. Wojnicz, and A.B. Hendrich, *Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin.* Natural Product Communications, 2011. **6**(1): p. 149-156.
 223. Food and Drug Administration. *Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods.* 1994 [cited 2016 21.04]; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>.
 224. Gilar, M., et al., *Implications of column peak capacity on the separation of complex peptide mixtures in single- and two-dimensional high-performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, 2004. **1061**(2): p. 183-192.
 225. Ren, Q., C. Wu, and J. Zhang, *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, 2013. **1304**: p. 257-262.
 226. Andrews, J.M., *Determination of minimum inhibitory concentrations.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001. **48**(SUPPL. 1): p. 5-16.

227. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT - Food Science and Technology, 1995. **28**(1): p. 25-30.
228. Prieto, P., M. Pineda, and M. Aguilar, *Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E*. Analytical Biochemistry, 1999. **269**(2): p. 337-341.
229. Winter, C.A., E.A. Risley, and G.W. Nuss, *Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 1962. **111**: p. 544-547.
230. Sahin, N.O. and T. Librowski, *Investigations of anti-inflammatory and analgesic activities of prednisolone solid dispersion prepared with skimmed milk*. Polish Journal of Pharmacology, 2003. **55**(2): p. 261-265.
231. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of Immunological Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
232. Nile, S.H. and S.W. Park, *Edible berries: Bioactive components and their effect on human health*. Nutrition, 2014. **30**(2): p. 134-144.
233. Lee, J., M. Dossett, and C.E. Finn, *Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing*. Food Chemistry, 2012. **130**(4): p. 785-796.
234. Kähkönen, M., et al., *Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberries*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(5): p. 1167-1174.
235. Määttä-Riihinen, K.R., A. Kamal-Eldin, and A.R. Törrönen, *Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family rosaceae)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(20): p. 6178-6187.
236. Jakobek, L., et al., *Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of *Rubus* and *Prunus* species from Croatia*. International Journal of Food Science & Technology, 2009. **44**(4): p. 860-868.
237. Remberg, S.F., et al., *Influence of postflowering temperature on fruit size and chemical composition of glen ample raspberry (*Rubus Idaeus* L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(16): p. 9120-9128.
238. Vuorela, S., et al., *Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(15): p. 5922-31.
239. Gulcin, I., et al., *Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis, and antioxidant properties of domesticated and 3 wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.)*. J Food Sci, 2011. **76**(4): p. C585-93.
240. de Pascual-Teresa, S., C. Santos-Buelga, and J.G. Rivas-Gonzalo, *Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(11): p. 5331-5337.
241. Liu, Z., et al., *Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitors*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(10): p. 3909-3915.
242. Wada, L. and B. Ou, *Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(12): p. 3495-3500.
243. Kumar, S. and A.K. Pandey, *Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview*. The Scientific World Journal, 2013. **2013**.

244. Park, M., et al., *Antioxidant and anti-inflammatory activities of tannin fraction of the extract from black raspberry seeds compared to grape seeds*. Journal of Food Biochemistry, 2014. **38**(3): p. 259-270.
245. Stewart, D., et al., *Metabolomic approach to identifying bioactive compounds in berries: Advances toward fruit nutritional enhancement*. Molecular Nutrition and Food Research, 2007. **51**(6): p. 645-651.
246. Anttonen, M.J. and R.O. Karjalainen, *Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry*. Journal of Food Composition and Analysis, 2005. **18**(8): p. 759-769.
247. Waga, J., et al., *Efektywność wykorzystania kolumn chromatograficznych typu „Poroshell” w badaniach białek gliadynowych metodą RP-HPLC*. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 2011(260/261): p. 5-20.
248. Cabrera, K., *Applications of silica-based monolithic HPLC columns*. Journal of Separation Science, 2004. **27**(10-11): p. 843-852.
249. Phenomenex. *New Kinetex F5*. 2015 [cited 2016 01.06]; Available from: https://www.chromservis.eu/media/0/05_pdf/Kinetex%20F5_br28011114_I_brochure.pdf.
250. Regos, I. and D. Treutter, *Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (Onobrychis viciifolia)*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(40): p. 6169-6177.
251. Del Bubba, M., et al., *Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of polyphenolic composition of four cultivars of Fragaria vesca L. berries and their comparative evaluation*. Journal of Mass Spectrometry, 2012. **47**(9): p. 1207-1220.
252. Hashim, S.N.N.S., et al., *Rapid solid-phase extraction and analysis of resveratrol and other polyphenols in red wine*. Journal of Chromatography A, 2013. **1313**: p. 284-290.
253. Fracassetti, D., et al., *Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (Myrciaria dubia)*. Food Chemistry, 2013. **139**(1-4): p. 578-588.
254. Simirgiotis, M.J., J. Bórquez, and G. Schmeda-Hirschmann, *Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC-DAD-ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries Luma apiculata and L. chequén*. Food Chemistry, 2013. **139**(1-4): p. 289-299.
255. Chen, X., et al., *Separation and identification of compounds in Rhizoma chuanxiong by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2004. **1040**(2): p. 169-178.
256. Zhou, Y., et al., *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, 2008. **31**(13): p. 2388-2394.
257. Fairchild, J.N., K. Horváth, and G. Guiochon, *Approaches to comprehensive multidimensional liquid chromatography systems*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(9): p. 1363-1371.
258. Schoenmakers, P., P. Marriott, and J. Beens, *Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography*. LC GC Europe, 2003. **16**(6): p. 335-339.
259. Muñoz, N.C., et al., *Red-color related phenolic composition of garnacha tintoreria (Vitis vinifera L.) grapes and red wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(17): p. 7883-7891.
260. Liu, Z.-X., et al., *Iridoid glycosides from the flower buds of Lonicera japonica and their nitric oxide production and α-glucosidase inhibitory activities*. Journal of Functional Foods, 2015. **18, Part A**: p. 512-519.

261. Liang, J., et al., *Preparation of main iridoid glycosides in fructus corni by macroporous resin column chromatography and countercurrent chromatography*. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 2013. **36**(8): p. 983-999.
262. Ren, M.T., et al., *Identification and quantification of 32 bioactive compounds in Lonicera species by high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **48**(5): p. 1351-1360.
263. Chen, J., Y. Song, and P. Li, *Capillary high-performance liquid chromatography with mass spectrometry for simultaneous determination of major flavonoids, iridoid glucosides and saponins in Flos Lonicerae*. Journal of Chromatography A, 2007. **1157**(1-2): p. 217-226.
264. Zhang, J.Y., et al., *A strategy for comprehensive identification of sequential constituents using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer, application study on chlorogenic acids in Flos Lonicerae Japonicae*. Talanta, 2016. **147**: p. 16-27.
265. Ye, J., et al., *Comparative investigation on chemical constituents of flower bud, stem and leaf of Lonicera japonica Thunb. by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and GC-MS*. Journal of Analytical Chemistry, 2014. **69**(8): p. 777-784.
266. Song, Y., et al., *Qualitative and quantitative analysis of iridoid glycosides in the flower buds of Lonicera species by capillary high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detector*. Analytica Chimica Acta, 2006. **564**(2): p. 211-218.
267. Qi, L.W., C.Y. Chen, and P. Li, *Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos Lonicerae Japonicae by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009. **23**(19): p. 3227-3242.
268. Pan, Y., et al., *Optimization of ultrasonic extraction by response surface methodology combined with ultrafast liquid chromatography-ultraviolet method for determination of four iridoids in Gentiana rigescens*. Journal of Food and Drug Analysis, 2015. **23**(3): p. 529-537.
269. Li, H.J., P. Li, and W.C. Ye, *Determination of five major iridoid glucosides in Flos Lonicerae by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection*. Journal of Chromatography A, 2003. **1008**(2): p. 167-172.
270. Aberham, A., et al., *Quantitative analysis of iridoids, secoiridoids, xanthonenes and xanthone glycosides in Gentiana lutea L. roots by RP-HPLC and LC-MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **45**(3): p. 437-442.
271. Wei, S., et al., *Qualitative and quantitative determination of ten iridoids and secoiridoids in Gentiana straminea Maxim. by LC-UV-ESI-MS*. Journal of Natural Medicines, 2012. **66**(1): p. 102-108.
272. Chen, C.Y., et al., *Simultaneous determination of iridoids, phenolic acids, flavonoids, and saponins in Flos Lonicerae and Flos Lonicerae Japonicae by HPLC-DAD-ELSD coupled with principal component analysis*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(18): p. 3181-3192.
273. Li, C., et al., *A new iridoid glycoside from Lonicerae Flos*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013. **44**(21): p. 2951-2954.
274. Liu, J., et al., *New secoiridoid glycosides from the buds of lonicera macranthoides*. Natural Product Communications, 2012. **7**(12): p. 1561-1562.
275. Kucharska, A.Z. and I. Fecka, *Identification of iridoids in edible honeysuckle berries (Lonicera caerulea L. var. kamtschatica Sevest.) by UPLC-ESI-qTOF-MS/MS*. Molecules, 2016. **21**(9).

276. Ghisalberti, E.L., *Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids*. Phytomedicine, 1998. **5**(2): p. 147-163.
277. Li, Y., et al., *Loganin inhibits the inflammatory response in mouse 3T3L1 adipocytes and mouse model*. International Immunopharmacology, 2016. **36**: p. 173-179.
278. Jeong, Y.T., et al., *Modulation effects of sweroside isolated from the Lonicera japonica on melanin synthesis*. Chemico-Biological Interactions, 2015. **238**: p. 33-39.
279. Li, X.Q., et al., *Investigation on the chemical constituents and variation of the flower buds of Lonicera species by UPLC-ESI-MS/MS and principle component analysis*. Yaoxue Xuebao, 2009. **44**(8): p. 895-904.
280. Lee, E.J., et al., *Phenolic constituents from the flower buds of Lonicera japonica and their 5-lipoxygenase inhibitory activities*. Food Chemistry, 2010. **120**(1): p. 134-139.
281. Tan, T., et al., *Ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction and aqueous two-phase system for analysis of caffeoylquinic acids from Flos Lonicerae Japonicae*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016. **120**: p. 134-141.
282. Lee, E.J., et al., *Phytochemical studies on Lonicerae Flos (1) - isolation of iridoid glycosides and other constituents*. Natural Product Sciences, 2010. **16**(1): p. 32-38.
283. Seo, O.N., et al., *Determination of polyphenol components of Lonicera japonica Thunb. using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Contribution to the overall antioxidant activity*. Food Chemistry, 2012. **134**(1): p. 572-577.
284. Son, K.H., et al., *Flavonoids from the aerial parts of Lonicera japonica*. Archives of Pharmacal Research, 1992. **15**(4): p. 365-370.
285. Song, W.X., Y.C. Yang, and J.G. Shi, *Two new β -hydroxy amino acid-coupled secoiridoids from the flower buds of Lonicera japonica: Isolation, structure elucidation, semisynthesis, and biological activities*. Chinese Chemical Letters, 2014. **25**(9): p. 1215-1219.
286. Kakuda, R., et al., *Secoiridoid glycosides from the flower buds of Lonicera japonica*. Phytochemistry, 2000. **55**(8): p. 879-881.
287. Jaiswal, R., et al., *Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from Lonicera henryi L. (Caprifoliaceae) leaves by LC-MSn*. Phytochemistry, 2014. **108**: p. 252-263.
288. Davies, J. and D. Davies, *Origins and evolution of antibiotic resistance*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010. **74**(3): p. 417-433.
289. Hemaiswarya, S., A.K. Kruthiventi, and M. Doble, *Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases*. Phytomedicine, 2008. **15**(8): p. 639-652.
290. Wagner, H., *Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals*. Fitoterapia, 2011. **82**(1): p. 34-37.
291. Cushnie, T.P.T. and A.J. Lamb, *Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2011. **38**(2): p. 99-107.
292. Sheldon Jr, A.T., *Antibiotic resistance: a survival strategy*. Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology, 2005. **18**(3): p. 170-180.
293. Vattem, D.A. and K. Shetty, *Biological functionality of ellagic acid: A review*. Journal of Food Biochemistry, 2005. **29**(3): p. 234-266.
294. Mundy, L., B. Pendry, and M. Rahman, *Antimicrobial resistance and synergy in herbal medicine*. Journal of Herbal Medicine, 2016. **6**(2): p. 53-58.

295. Eumkeb, G., S. Sakdarat, and S. Siriwong, *Reversing β -lactam antibiotic resistance of Staphylococcus aureus with galangin from Alpinia officinarum Hance and synergism with ceftazidime*. Phytomedicine, 2010. **18**(1): p. 40-45.
296. Ekambaram, S.P., S.S. Perumal, and A. Balakrishnan, *Scope of Hydrolysable Tannins as Possible Antimicrobial Agent*. Phytotherapy Research, 2016: p. 1035-1045.
297. Meletiadiis, J., et al., *Concentration-dependent synergy and antagonism within a triple antifungal drug combination against Aspergillus species: Analysis by a new response surface model*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007. **51**(6): p. 2053-2064.
298. Rand, K.H. and P. Brown, *Concentration-dependent synergy and antagonism between cefoperazone and imipenem against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995. **39**(5): p. 1173-1177.
299. Junio, H.A., et al., *Synergy-directed fractionation of botanical medicines: A case study with goldenseal (hydrastis canadensis)*. Journal of Natural Products, 2011. **74**(7): p. 1621-1629.
300. Lee, O.H. and B.Y. Lee, *Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in Olea europaea leaf extract*. Bioresource Technology, 2010. **101**(10): p. 3751-3754.
301. Ncube, B., J.F. Finnie, and J. Van Staden, *In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs*. Journal of Ethnopharmacology, 2012. **139**(1): p. 81-89.
302. Garvey, M.I., et al., *Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2011. **37**(2): p. 145-151.
303. Bernal, P., M. Zloh, and P.W. Taylor, *Disruption of D-alanyl esterification of Staphylococcus aureus cell wall teichoic acid by the β -lactam resistance modifier (-)-epicatechin gallate*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009. **63**(6): p. 1156-1162.
304. Lechner, D., S. Gibbons, and F. Bucar, *Modulation of isoniazid susceptibility by flavonoids in Mycobacterium*. Phytochemistry Letters, 2008. **1**(2): p. 71-75.
305. Fujita, M., et al., *Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and β -lactams against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Microbiology and Immunology, 2005. **49**(4): p. 391-396.
306. Kusuda, M., et al., *Polyphenolic constituent structures of Zanthoxylum piperitum fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2006. **70**(6): p. 1423-1431.
307. Tate, C.R., et al., *Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat*. Breast Cancer Research, 2012. **14**(3).
308. Mohammadi, A., et al., *The Urtica dioica extract enhances sensitivity of paclitaxel drug to MDA-MB-468 breast cancer cells*. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2016. **83**: p. 835-842.
309. Barros, L., et al., *Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties*. Food Chemistry, 2010. **120**(1): p. 247-254.
310. Tural, S. and I. Koca, *Physico-chemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (Cornus mas L.) grown in Turkey*. Scientia Horticulturae, 2008. **116**(4): p. 362-366.
311. Jun, H.I., Y.A. Kim, and Y.S. Kim, *Antioxidant activities of Rubus coreanus Miquel and Morus alba L. fruits*. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2014. **43**(3): p. 381-388.
312. Stajčić, S.M., et al., *Chemical composition and antioxidant activity of berry fruits*. Acta Periodica Technologica, 2012. **43**: p. 93-105.

313. Tadić, V.M., et al., *Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(17): p. 7700-7709.
314. Rodino, S., et al., *Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of sambucus ebulus extract*. Farmacia, 2015. **63**(5): p. 751-754.
315. Jayaprakasha, G.K., B. Girennavar, and B.S. Patil, *Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems*. Bioresource Technology, 2008. **99**(10): p. 4484-4494.
316. Hossain, M.A. and S.M.M. Rahman, *Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple*. Food Research International, 2011. **44**(3): p. 672-676.
317. Milošević, T., et al., *Fruit quality attributes of blackberry grown under limited environmental conditions*. Plant, Soil and Environment, 2012. **58**(7): p. 322-327.
318. Bouayed, J. and T. Bohn, *Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2010. **3**(4): p. 228-237.
319. Fang, J., *Bioavailability of anthocyanins*. Drug Metabolism Reviews, 2014. **46**(4): p. 508-520.
320. Talavéra, S., et al., *Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(10): p. 3902-3908.
321. Kalt, W., et al., *Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(3): p. 705-712.
322. Mena, P., et al., *Flavan-3-ols, anthocyanins, and inflammation*. IUBMB Life, 2014. **66**(11): p. 745-758.
323. Basu, A., et al., *Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome*. Journal of Nutrition, 2010. **140**(9): p. 1582-1587.
324. Biedermann, L., et al., *Bilberry ingestion improves disease activity in mild to moderate ulcerative colitis - An open pilot study*. Journal of Crohn's and Colitis, 2013. **7**(4): p. 271-279.
325. Dohadwala, M.M., et al., *Effects of cranberry juice consumption on vascular function in patients with coronary artery disease*. American Journal of Clinical Nutrition, 2011. **93**(5): p. 934-940.
326. Stull, A.J., et al., *Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women*. Journal of Nutrition, 2010. **140**(10): p. 1764-1768.