



Paulina Znajdek – Awizeń

**Badania fitochemiczne ziela
Axyris amaranthoides L.**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

PROMOTOR
prof. dr hab. Wiesława Bylka

Poznań, 2016



Paulina Znajdek – Awizeń

Phytochemical studies on the herb of
Axyris amaranthoides L.

PHD THESIS

Chair and Department of Pharmacognosy
Poznan University of Medical Sciences

SUPERVISOR
prof. dr hab. Wiesława Bylka

Poznan, 2016

*Promotorowi mojej pracy
Pani prof. dr hab. Wiesławie Bylce
składam serdeczne podziękowania
za nieocenioną pomoc i nieustającą opiekę merytoryczną,
a także wsparcie i życzliwość okazane w trakcie realizacji niniejszej pracy*

*Serdecznie dziękuję
Pani prof. dr hab. Irenie Matławskiej
za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej*

*Dziękuję wszystkim pracownikom
Katedry i Zakładu Farmakognozji za wszelką pomoc i życzliwość*

*Z całego serca pragnę podziękować mojemu Mężowi
za niesamowitą cierpliwość i wsparcie,
a także nieustającą mobilizację do pracy*

Mamie i Tacie – za wszystko, dziękuję

Moim ukochanym dzieciom, Basi i Tymkowi, pracę tę dedykuję

SPIS TREŚCI

WSTĘP	10
CEL PRACY	12
CZEŚĆ TEORETYCZNA	13
1. KLASYFIKACJA TAKSONOMICZNA GATUNKU <i>Axyris amaranthoides</i> L.	13
2. CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA RODZAJU <i>Axyris</i> L.....	14
3. CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA <i>Axyris amaranthoides</i> L.....	18
4. STAN BADAŃ NAD GATUNKIEM <i>Axyris amaranthoides</i> L.....	19
5. FLAWONOIDY	20
5.1. Wprowadzenie.....	20
5.2. Biosynteza	21
5.3. Budowa i klasyfikacja	23
6. GLUKURONIDY FLAWONOIDOWE	28
6.1. Występowanie	28
6.2. Aktywność biologiczna	37
7. ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII MAS W IDENTYFIKACJI FLAWONOIDÓW	41
7.1. Wprowadzenie.....	41
7.2. Identyfikacja aglikonów	42
7.3. Identyfikacja glikozydów flawonoidowych	46
CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA	51
8. METODYKA BADAŃ.....	52
8.1. Izolacja i identyfikacja flawonoidów	52
8.1.1. Odczynniki	52
8.1.2. Podłoża	52
8.1.3. Aparatura.....	52
8.1.4. Surowiec.....	53
8.1.5. Metody chromatograficzne	53
8.1.5.1. Chromatografia planarna.....	53
8.1.5.1.1. Chromatografia bibułowa (PC)	53
8.1.5.1.2. Preparatywna chromatografia bibułowa (PPC).....	54
8.1.5.1.3. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)	54
8.1.5.1.4. Preparatywna chromatografia cienkowarstwowa (PTLC)	55

8.1.5.2.	Chromatografia kolumnowa (CC).....	56
8.1.6.	Analizy spektralne.....	57
8.1.6.1.	Spektrofotometria absorpcyjna w nadfiolecie (UV)	57
8.1.6.2.	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego NMR.....	57
8.1.6.3.	Ultrasprawną chromatografią cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas UPLC-Q-TOF-MS/MS	58
8.1.7.	Przygotowanie i frakcjonowanie wyciągu podstawowego.....	59
8.2.	Badania ilościowe	59
8.2.1.	Odczynniki i substancje wzorcowe	59
8.2.2.	Aparatura.....	60
8.2.3.	Oznaczanie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem <i>Folin-Ciocalteu</i> (FC)...	60
8.2.3.1.	Przygotowanie wzorcowego roztworu kwasu galusowego	60
8.2.3.2.	Przygotowanie wyciągów do badań.....	61
8.2.3.3.	Przebieg oznaczenia	61
8.2.4.	Oznaczanie zawartości flawonoidów (Ph. Eur. VII).....	62
8.2.4.1.	Przygotowanie wzorcowego roztworu 7-glukozydu apigeniny	63
8.2.4.2.	Przygotowanie wyciągu do badań.....	63
8.2.4.3.	Przebieg oznaczenia	63
8.3.	Badania aktywności biologicznej.....	64
8.3.1.	Odczynniki, bufony, substancje i szczepy wzorcowe, pożywki	64
8.3.2.	Podłoża, żele	67
8.3.3.	Aparatura.....	67
8.3.4.	Badanie aktywności antyoksydacyjnej.....	68
8.3.4.1.	Przygotowanie roztworów wzorcowych i wyciągów do badań	68
8.3.4.2.	Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej metodą z zastosowaniem odczynnika DPPH.....	69
8.3.4.2.1.	Przygotowanie alkoholowego roztworu rodnika DPPH'	69
8.3.4.2.2.	Przebieg oznaczenia	70
8.3.4.3.	Oznaczanie całkowitej zdolności redukowania jonów żelaza (III) (FRAP)	70
8.3.4.3.1.	Przygotowanie roztworów odczynników do badania.....	71
8.3.4.3.2.	Przebieg oznaczenia	72
8.3.5.	Badania aktywności przeciwzapalnej.....	72
8.3.5.1.	Przygotowanie wyciągów do badań.....	72
8.3.5.2.	Hodowla komórek HaCaT	73
8.3.5.3.	Badanie cytotoksyczności wyciągów z wykorzystaniem testu MTT	73
8.3.5.3.1.	Przebieg oznaczenia	74

8.3.5.4.	Oznaczanie poziomu białka COX-2.....	74
8.3.5.5.	Oznaczenie poziomu PGE ₂	75
8.3.6.	Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej.....	76
8.3.6.1.	Przygotowanie wyciągów do badań.....	76
8.3.6.2.	Przebieg oznaczenia.....	77
8.4.	Analiza statystyczna.....	78
9.	WYNIKI.....	80
9.1.	Izolacja i identyfikacja flawonoidów	80
9.1.1.	Izolacja związków flawonoidowych	80
9.1.1.1.	Rozdział frakcji chloroformowej (C) i frakcji octanu etylu (OE).....	81
9.1.1.1.1.	Próby rozdziału podfrakcji 39-68.....	81
9.1.1.1.2.	Rozdział frakcji wodnej (W).....	81
9.1.1.1.2.1.	Próby rozdziału podfrakcji 90-97 i 101-120	82
9.1.1.1.3.	Oczyszczanie frakcji flawonoidowych.....	82
9.1.1.1.3.1.	Oczyszczanie na kolumnach podfrakcji zawierających związki flawonoidowe 1, 2 i 3.....	82
9.1.1.1.3.2.	Oczyszczanie z wykorzystaniem systemu SPE.....	83
9.1.1.2.	Identyfikacja związków flawonoidowych.....	84
9.1.1.2.1.	Identyfikacja wyizolowanych flawonoidów	84
9.1.1.2.1.1.	Związek 1	84
9.1.1.2.1.2.	Związek 2	94
9.1.1.2.1.3.	Związek 3	101
9.1.1.2.2.	Identyfikacja związków flawonoidowych obecnych we frakcjach.....	118
9.1.1.2.2.1.	Analiza UPLC- MS/MS frakcji 7.....	119
9.1.1.2.2.1.1.	Związek 4	119
9.1.1.2.2.1.2.	Związek 5	120
9.1.1.2.2.1.3.	Związek 6	121
9.1.1.2.2.1.4.	Związek 7	122
9.1.1.2.2.1.5.	Związek 8	123
9.1.1.2.2.2.	Analiza UPLC- MS/MS frakcji 9.....	124
9.1.1.2.2.2.1.	Związek 9	124
9.1.1.2.2.2.2.	Związek 10	125
9.1.1.2.2.2.3.	Związek 11	126
9.1.1.2.2.2.4.	Związek 12	127
9.1.1.2.2.2.5.	Związek 13	128
9.1.1.2.2.2.6.	Związek 14	129

9.1.2.2.2.7.	Związek 15	130
9.1.2.2.2.8.	Związek 16	131
9.1.2.2.2.9.	Związek 17	132
9.1.2.2.2.10.	Związek 18	133
9.1.2.2.2.11.	Związek 19	134
9.1.2.2.2.12.	Związek 20	135
9.1.2.2.2.13.	Związek 21	136
9.1.2.2.2.14.	Związek 22	137
9.1.2.2.2.15.	Związek 23	138
9.1.2.2.2.16.	Związek 24	139
9.1.2.2.2.17.	Związek 25	140
9.1.2.2.2.18.	Związek 26	141
9.1.2.2.2.19.	Związek 27	142
9.1.2.2.3.	Analiza UPLC-MS/MS frakcji 11	143
9.1.2.2.3.1.	Związek 28	143
9.1.2.2.3.2.	Związek 29	144
9.1.2.2.3.3.	Związek 30	145
9.1.2.2.3.4.	Związek 31	146
9.1.2.2.3.5.	Związek 32	147
9.1.2.2.3.6.	Związek 33	148
9.1.2.2.3.7.	Związek 34	149
9.1.2.2.3.8.	Związek 35	150
9.1.2.2.3.9.	Związek 36	151
9.2.	Badania ilościowe	152
9.2.1.	Oznaczanie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem <i>Folin-Ciocalteu</i>	152
9.2.1.1.	Krzywa kalibracyjna dla kwasu galusowego	152
9.2.1.2.	Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w badanych wyciągach w przeliczeniu na kwas galusowy	154
9.2.2.	Oznaczanie zawartości flawonoidów	155
9.2.2.1.	Krzywa kalibracyjna dla 7-glukozydu apigeniny	155
9.2.2.2.	Oznaczenie zawartości flawonoidów w badanym surowcu	157
9.3.	Badania aktywności biologicznej	158
9.3.1.	Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej metodą z odczynnikiem DPPH	158
9.3.1.1.	Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej BHA	158
9.3.1.2.	Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej witaminy C	160
9.3.1.3.	Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej w badanych wyciągach	161

9.3.2.	Oznaczanie całkowitej zdolności redukowania jonów żelaza (III) metodą FRAP ...	165
9.3.2.1.	Oznaczenie zdolności redukowania jonów Fe ³⁺ przez witaminę C	165
9.3.2.2.	Oznaczenie zdolności redukowania jonów Fe ³⁺ przez badane wyciągi	167
9.3.2.3.	Oznaczenie zdolności redukowania jonów Fe ³⁺ przez odwar	168
9.3.3.	Zależność zawartości całkowitej sumy polifenoli i aktywności antyoksydacyjnej badanych wyciągów	170
9.3.4.	Badanie aktywności przeciwzapalnej.....	171
9.3.4.1.	Badanie cytotoksyczności wyciągów metodą MTT.....	171
9.3.4.2.	Oznaczanie poziomu białka COX-2.....	172
9.3.4.3.	Oznaczanie poziomu białka PGE ₂	174
9.3.5.	Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej.....	175
	OMÓWIENIE I DYSKUSJA.....	176
	WNIOSKI	207
	STRESZCZENIE	209
	SUMMARY	211
	SPIS TABEL I RYCIN	213
	BIBLIOGRAFIA.....	219

WSTĘP

Na świecie występuje około 500 000 różnych gatunków roślin, z czego jedynie około 2 000 uznaje się za lecznicze (Hadaś i Derda, 2014). Zdecydowana większość roślin porastających kulę ziemską pozostaje nadal niezbadana i stanowi nowe wyzwania dla świata nauki. Od początku ostatniej dekady XX wieku ponownie obserwuje się wzmożone zainteresowanie roślinami leczniczymi, które począwszy od wieku XIX, w związku z intensywnym rozwojem nauk chemicznych, ustępowały miejsca lekom syntetycznym. Obecnie naukowcy na całym świecie kierują swoją uwagę ku nowym, niepoznanym do tej pory roślinom leczniczym, z których izolowane są związki o potencjalnym działaniu terapeutycznym. Za sprawą dynamicznego rozwoju nauk analitycznych możliwa jest wszechstronna analiza jakościowa jak i ilościowa poszczególnych gatunków oraz otrzymywanych z nich leków pochodzenia naturalnego (Głowniak i Widelski, 2007).

Szczególne zainteresowanie budzą związki o charakterze polifenoli, zwłaszcza flawonoidy, wśród których liczba nowo poznawanych struktur ciągle wzrasta. W zależności od budowy chemicznej mogą one wykazywać szerokie i bardzo zróżnicowane spektrum działania biologicznego. Obecność flawonoidów w roślinach wiąże się z licznymi funkcjami biochemicznymi. Związki te stanowią m.in. ochronę przed promieniowaniem UV-A oraz UV-B, a także przed mikroorganizmami. Dodatkowo, pośrednio, pełnią rolę regulatorów wzrostu, wpływając na transport i katabolizm auksyn roślinnych oraz biorą udział w zjawisku allelopatii. Flawonoidy warunkują ponadto ubarwienie kwiatów, liści i owoców. Wykazują także korzystne działanie na organizm ludzki.

Najszerzej opisywaną aktywnością biologiczną flawonoidów jest działanie antyoksydacyjne. Wynika ono z różnych mechanizmów, wśród których wymienia się przede wszystkim: wychwytywanie oraz zmiatanie wolnych rodników tlenowych i reaktywnych form tlenu (RFT); supresję produkcji RFT na skutek hamowania aktywności enzymów biorących udział w ich powstawaniu (m.in. oksydazy ksantynowej, mieloperoksydazy); zapobieganie utlenianiu witaminy C oraz chelatowanie jonów miedzi i żelaza, które inicjują łańcuch reakcji wolnorodnikowych. W związku z powyższym flawonoidy mogą odgrywać ważną rolę w prewencji i leczeniu chorób degeneracyjnych i nowotworowych, a także w opóźnianiu procesów starzenia. Wśród innych aktywności

biologicznych prezentowanych przez tę grupę związków wymienić należy przede wszystkim działanie moczopędne i uszczelniające na naczynia krwionośne, a także, mniej specyficzne, działanie estrogenne (izoflawony), hepatoprotekcyjne (flawonolignany), przeciwdrobnoustrojowe, przeciwgrzybicze, uspokajające (Jasiński i wsp., 2009; Małolepsza i Urbanek, 2000).

W przypadku roślin dwuliściennych, związki flawonoidowe występują szczególnie często w rodzinach takich jak: Astrowate (*Asteraceae*), Jaskrowate (*Ranunculaceae*), Jasnotowate (*Lamiaceae*), Trędownikowate (*Scrophulariaceae*), Różowate (*Rosaceae*), Dziurawcowate (*Hypericaceae*), Rdestowate (*Polygonaceae*), Selerowate (*Apiaceae*), Brzozowate (*Betulaceae*), Rutowate (*Rutaceae*), Kapustowate (*Brassicaceae*), Bobowate (*Fabaceae*), Wrzosowate (*Ericaceae*), Fiołkowate (*Violaceae*), Pierwiosnkowate (*Primulaceae*) (Małolepsza i Urbanek, 2000).

Stosunkowo mało przebadaną, pod względem występowania związków flawonoidowych, rodzinę roślin stanowią Komosowate (*Chenopodiaceae*). Jednym ze szczególnie słabo zbadanych gatunków tej rodziny jest *Axyris amaranthoides* L. Do chwili obecnej skład chemiczny rośliny został poznany przede wszystkim w zakresie występowania związków o charakterze fitoekdysteroidów.

CEL PRACY

Celem pracy były badania fitochemiczne ziela *Axyris amaranthoides* L. obejmujące analizę jakościową i ilościową wybranych związków polifenolowych, głównie flawonoidów, a także określenie niektórych kierunków aktywności biologicznej dla wyciągów otrzymanych z surowca.

Szczegółowe badania realizowane w zakresie niniejszej pracy obejmowały:

- izolację związków flawonoidowych przy zastosowaniu wybranych metod chromatograficznych;
- ustalenie struktury chemicznej wyodrębnionych związków za pomocą wybranych metod spektralnych (UV, ^1H i ^{13}C NMR oraz LC-MS i LC-MS/MS);
- ustalenie struktury chemicznej izomerów i izobarów związków flawonoidowych występujących w mieszaninach z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS;
- oznaczenie zawartości flawonoidów w surowcu;
- oznaczenie całkowitej sumy polifenoli w wyciągach otrzymanych z surowca (metoda z odczynnikiem *Folin-Ciocalteu*);
- badanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów z surowca wybranymi metodami spektrofotometrycznymi (metoda z zastosowaniem odczynnika DPPH, metoda FRAP);
- badanie aktywności przeciwzapalnej wyciągów z surowca poprzez ocenę wpływu na poziom białka COX-2 i PGE₂;
- badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągów z surowca w stosunku do wybranych szczepów bakterii i grzybów, w tym dermatofitów.

CZEŚĆ TEORETYCZNA

1. KLASYFIKACJA TAKSONOMICZNA GATUNKU *Axyris amaranthoides* L.

Królestwo:	<i>Plantae</i> – Rośliny
Podkrólestwo:	<i>Tracheobionta</i> – Rośliny naczyniowe
Gromada:	<i>Spermatophyta</i> – Rośliny nasienne
Podgromada:	<i>Magnoliophyta</i> – Rośliny okrytonasienne
Klasa:	<i>Magnoliopsida</i> – Dwuliścienne
Podklasa:	<i>Caryophyllidae</i>
Rząd:	<i>Caryophyllales</i>
Rodzina:	<i>Chenopodiaceae</i> – Komosowate
Rodzaj:	<i>Axyris</i> L.
Gatunek:	<i>Axyris amaranthoides</i> L.

(www.plants.usda.gov)

Królestwo:	<i>Plantae</i> – Rośliny
Podkrólestwo:	<i>Viridaeplantae</i> – Rośliny zielone
Infrakrólestwo:	<i>Streptophyta</i> – Rośliny lądowe
Gromada:	<i>Tracheophyta</i> – Rośliny naczyniowe
Podgromada:	<i>Spermatophytina</i> – Rośliny nasienne
Infragromada:	<i>Angiospermae</i> – Rośliny okrytonasienne
Klasa:	<i>Magnoliopsida</i> – Dwuliścienne
Nadrząd:	<i>Caryophyllanae</i>
Rząd:	<i>Caryophyllales</i>

Rodzina: *Amaranthaceae* – Szarłatowate

Rodzaj: *Axyris* L.

Gatunek: *Axyris amaranthoides* L.

(www.itis.gov)

2. CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA RODZAJU *Axyris* L.

Rodzaj *Axyris* obejmuje 6 gatunków: *A. amaranthoides*, *A. prostrata*, *A. hybrida*, *A. sphaerosperma*, *A. caucasica* oraz *A. mira* (Sukhorukov, 2011). W zależności od różnych podziałów taksonomicznych zaliczany jest do rodziny *Chenopodiaceae* (Komosowate) lub rodziny *Amaranthaceae* (Szarłatowate), która w nowszych klasyfikacjach taksonomicznych, m.in. systemie APG III, obejmuje rodzaje należące do rodziny *Chenopodiaceae*. Niekiedy rodzaj przyporządkowywany jest do obu tych rodzin z zaznaczeniem: *Chenopodiaceae – sensu stricto* (Komosowate – w wąskim ujęciu), *Amaranthaceae – sensu lato* (Szarłatowate – w szerokim ujęciu) (Reveal, Chase, 2011; Sukhorukov, 2011). W obrębie podrodziny *Chenopodioidae*, *Axyris* wraz z rodzajem *Krascheninnikovia* Gueldenst. i *Ceratocarpus* L. tworzy oddzielny tryb *Axyridae* G. Kadereit & Sukhor. (Kadereit i wsp., 2010; Fuentes-Bazan i wsp., 2012).

Gatunki z rodzaju *Axyris* występują powszechnie na terenach górskich Centralnej Azji, zwłaszcza w północnej i północno-zachodniej części regionu oraz we wschodniej Syberii. *A. caucasica* porasta ponadto tereny Półwyspu Koreańskiego oraz pasma górskie Centralnego Kaukazu. Najmłodszy zidentyfikowany gatunek – *A. mira*, występuje przede wszystkim (obok *A. prostrata*) na terenie Tybetu i w Himalajach. *A. amaranthoides* natomiast jest gatunkiem porastającym obszary także poza Azją, obejmujący swym występowaniem niektóre części Europy i Ameryki Północnej (Blackwell, 1978; Sukhorukov, 2005; 2011).

Należące do rodzaju *Axyris* gatunki to jednoroczne rośliny zielne, jednopienne o wyprostowanej lub płożącej się łodydze, osiągające w zależności od gatunku wysokość od 2 do 80 cm (Wu i wsp., 2003). Ze względu na obecność dużej ilości włosków gwiaździstych pokrywających wszystkie organy, są dość łatwo rozpoznawalne *in situ* (Rycina 1) (Sukhorukov, 2011). Nierozgałęzionych włosków brak. Gatunki z rodzaju

Axyris posiadają całobrzegie, jajowate lub podłużne **liście** ogonkowe bądź bezogonkowe, zwykle ze słabo zaznaczonym unerwieniem.



Rycina 1. Fragment blaszki liściowej *A. prostrata*-włoski gwiazdziste (<http://greif.uni-greifswald.de>).

Owoce są elipsoidalne lub owalne o gładkiej bądź pomarszczonej powierzchni, jednonasienne, z obecnymi wyrostkami w górnej części owocni, która szczelnie przylega do powłoki nasienia. **Kwiaty** jednopłciowe. Rodzaju męskiego: siedzące, tworzą krótkie lub długie kłosowate kwiatostany wyrastające w kątach górnych odgałęzień; okwiat zwykle 3-5 segmentowy. Kwiaty żeńskie: umieszczone na szypułkach przylistków (podsadek); okwiat tworzony przez 3-4 listki.

Rozróżnienie poszczególnych gatunków jest trudne i opiera się na różnicach w kształcie liści, długości męskich kwiatostanów, sposobie rozgałęzienia rośliny oraz strukturze owoców (**Rycina 2**) (Sukhorukov, 2005; 2011; Wu i wsp., 2003).



A. amaranthoides

(fot. P. Znajdek-
Awizeń)



A. hybrida

(<http://greif.uni-greifswald.de>)



A. prostrata

(<http://www.plantarium.ru>)



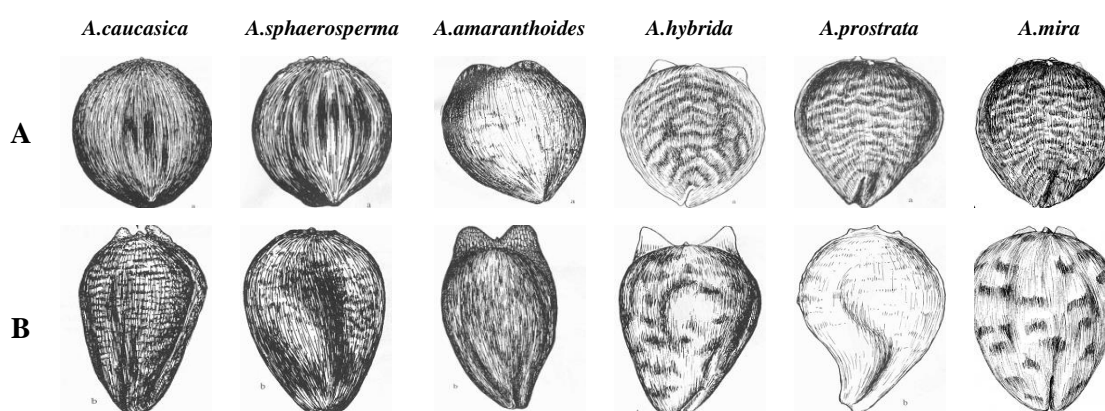
A. caucasica

(<http://www.plantarium.ru>)

Rycina 2. Różnice morfologiczne pomiędzy wybranymi gatunkami rodzaju *Axyris* L.

Wszystkie zbadane do tej pory gatunki wytwarzają dwa rodzaje owoców – czarne i brązowe. Heterokarpia zaznacza się wyraźnymi różnicami związanymi przede wszystkim z:

- kolorem owoców;
- obecnością sklereidów w perikarpium owoców czarnych oraz ich brakiem w perikarpium owoców brązowych;
- kształtem i wielkością wyrostków obecnych w górnej części owocni;
- kształtem i powierzchnią obu rodzajów owoców (**Rycina 3**) (Piskonov, 1968; Sukhorukov, 2011; 2013).



Rycina 3. Różnice w budowie owoców czarnych (A) i brązowych (B) poszczególnych gatunków z rodzaju *Axyris* (Sukhorukov, 2011; 2013).

Mimo prowadzonych badań, systematyka rodzaju *Axyris* nie została jeszcze w pełni poznana. Na podstawie określonych cech zaliczane do niego gatunki są niekiedy dzielone na dwie grupy:

- (1) *A. amaranthoides*, *A. hybrida* i *A. prostrata* – posiadają „skompresowane” czarne owoce zawierające łupinę nasienną średniej grubości (30-50 μm);
- (2) *A. sphaerosperma* i *A. caucasica* – posiadają prawie kuliste czarne owoce o bardzo grubej łupinie nasiennej (50-100 μm).

Brązowe owoce u wszystkich gatunków charakteryzuje cienka łupina nasienna (8-15 μm , niekiedy do 25 μm) (Sukhorukov, 2011).

3. CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA *Axyris amaranthoides* L.

Nazwy łacińskie (synonimy): *Axyris amaranthoides* L., *Axyris amaranthoides* f. *dentata* (Baranov) Kitagawa; *Axyris amaranthoides* var. *dentata* Baranov

Nazwy angielskie: Russian pigweed, Russian – pigweed

A. amaranthoides jest najbardziej rozpowszechnionym spośród wszystkich gatunków należących do rodzaju *Axyris*. Roślina ta pierwotnie wywodzi się z Azji, gdzie porasta przede wszystkim tereny Rosji, Mongolii, obu Korei, Kazachstanu i Japonii. Szczególnie często w rejonach tych spotkać ją można na stepach i terenach półpustynnych. Obecnie obszar jej występowania jest jednak znacznie większy i obejmuje również Europę i Amerykę Północną. Gatunek zaliczany jest do roślin ruderalnych i uznawany powszechnie za pospolity chwast (Wu i wsp., 2003; Blackwell, 1978). Porasta łąki, pola, stoki, nieużytki, przydroża, a także tereny nadrzeczne.

A. amaranthoides to roczna roślina zielna osiągająca średnią wysokość od 20 do 80 cm. Posiada wyprostowaną łodygę o wyrastających spiralnie, zwykle od połowy wysokości łodygi, **odgałęzieniach** długości od 3 do 13 cm. Ulistnienie łodygi spiralne. **Liście dolne** są krótkoogonkowe, jajowate, ostro zakończone, całobrzegie lub delikatnie ząbkowane, z dobrze zaznaczonym unerwieniem i włoskami gwiazdzistymi po spodniej stronie liścia (z czasem nagie). Osiągają rozmiary 3-7 x 0.5-1,3 cm. **Górne liście** i przylistki są mniejsze od dolnych, bezogonkowe, bezpośrednio przytwierdzone do łodygi głównej lub odgałęzień. Posiadają kształt lancetowaty, wąsko lancetowaty lub jajowaty i są niekiedy ząbkowane z lekko wklęsłymi krawędziami i włoskami gwiazdzistymi obecnymi po spodniej stronie liści. Ich wymiary mieszczą się w granicach 10 x 2-3 mm. Roślina kwitnie od lipca do końca sierpnia. **Kwiaty męskie** tworzą okwiat złożony zwykle z 3 segmentów o wąskim, podłużnym kształcie. Od strony spodniej są gęsto pokryte włoskami gwiazdzistymi. Zawierają trzy pręciki, wystające poza koronę kwiatu. **Kwiaty żeńskie:** okwiat 3-segmentowy, błonkowaty, od spodu gęsto pokryty włoskami gwiazdzistymi. Centralny segment mniejszy i podłużny. Segmenty boczne większe i szeroko jajowate. **Ciemenobrazowe owoce** kształtu elipsoidalnego, długości 2,25-3 mm, z białymi podłużnymi pasmami. W górnej części posiadają dobrze rozwinięte dwupłatowe wyrostki/skrzydółka, łączące się ze sobą i stanowiące od 1/5 do 1/7 części całego owocu. **Czarne owoce** owalne, o długości 1,8-2,2 mm, pozbawione są białych

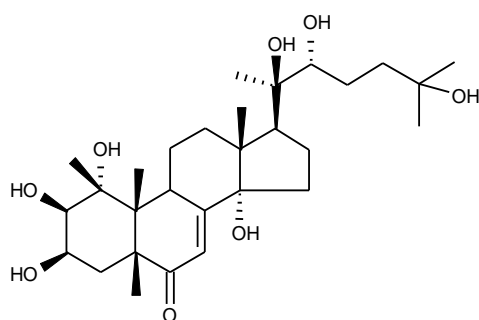
podłużnych pasm, posiadają dwupłatowe wyrostki długości 1/10-1/15 części owocu (Sukhorukov, 2005; 2011; 2013; Wu i wsp., 2003).



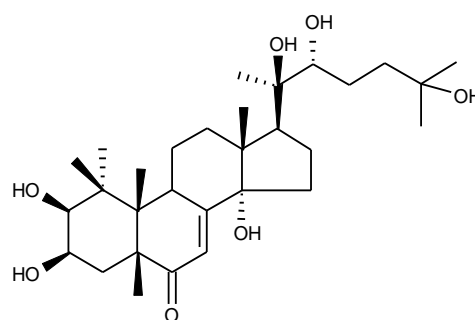
Rycina 4. *Axyris amaranthoides* L. (<http://www.farmazia.ru/>).

4. STAN BADAŃ NAD GATUNKIEM *Axyris amaranthoides* L.

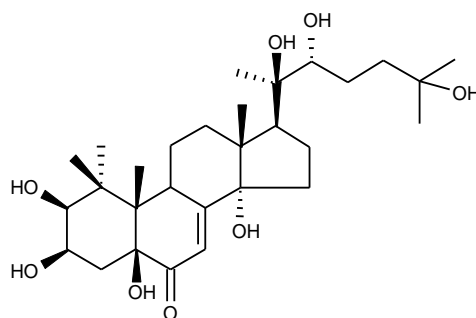
Do chwili obecnej *A. amaranthoides* był przedmiotem nielicznych badań naukowych. Jedno z nich dotyczyło określenia poziomu fitoekdysteroidów. Udowodniono, że zarówno nasiona jak i korzenie rośliny stanowią bogate źródło tych związków (Dinan, 1995). W późniejszym czasie z nasion *A. amaranthoides* wyizolowano 1 α ,20 R -dihydroksyekdyson, 20 E -hydroksyekdyson (polypodina A) i 5,20 E -dihydroksyekdyson (polypodina B) (Rycina 5) (Sarker, 1998).



1 α ,20 R -dihydroksyekdyson



20 E -hydroksyekdyson (polypodina A)



5,20E-dihydroksyekdyson (polypodina B)

Rycina 5. Związki zidentyfikowane w nasionach *A. amaranthoides* L. (Sarker, 1998).

Zbadano ponadto aktywność antyoksydacyjną 7-*O*-[2''''-*O*-feruiloglukuronopiranozylo-*O*-glukuronopiranozydu] trycyny wyizolowanego z ziela *A. amaranthoides* (Katedra i Zakład Farmakognozji UMP) i porównano z działaniem innych, równolegle badanych związków: 6-*C*- β -glukopiranozydu 4'-metoksy-5,7-dihydroksyflawonu (izocytyzoyd) i I 3' II 8 biapigeniny (amentoflawon) (Pawlak i wsp., 2010). Doświadczenie przeprowadzono z wykorzystaniem metody ABTS oraz elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), a za związek wzorcowy przyjęto beta-karoten. W wyniku przeprowadzonego badania stwierdzono, że spośród wszystkich testowanych związków 7-*O*-[2''''-*O*-feruiloglukuronopiranozylo-*O*-glukuronopiranozyd] trycyny wykazuje najwyższą aktywność antyoksydacyjną, co może być związane z obecnością ugrupowania hydroksylowego w pozycji 4' pierścienia B, grup metoksyowych w pozycji 3' i 5' pierścienia B oraz z obecnością acylowanej cząsteczki cukrowej.

5. FLAWONOIDY

5.1. Wprowadzenie

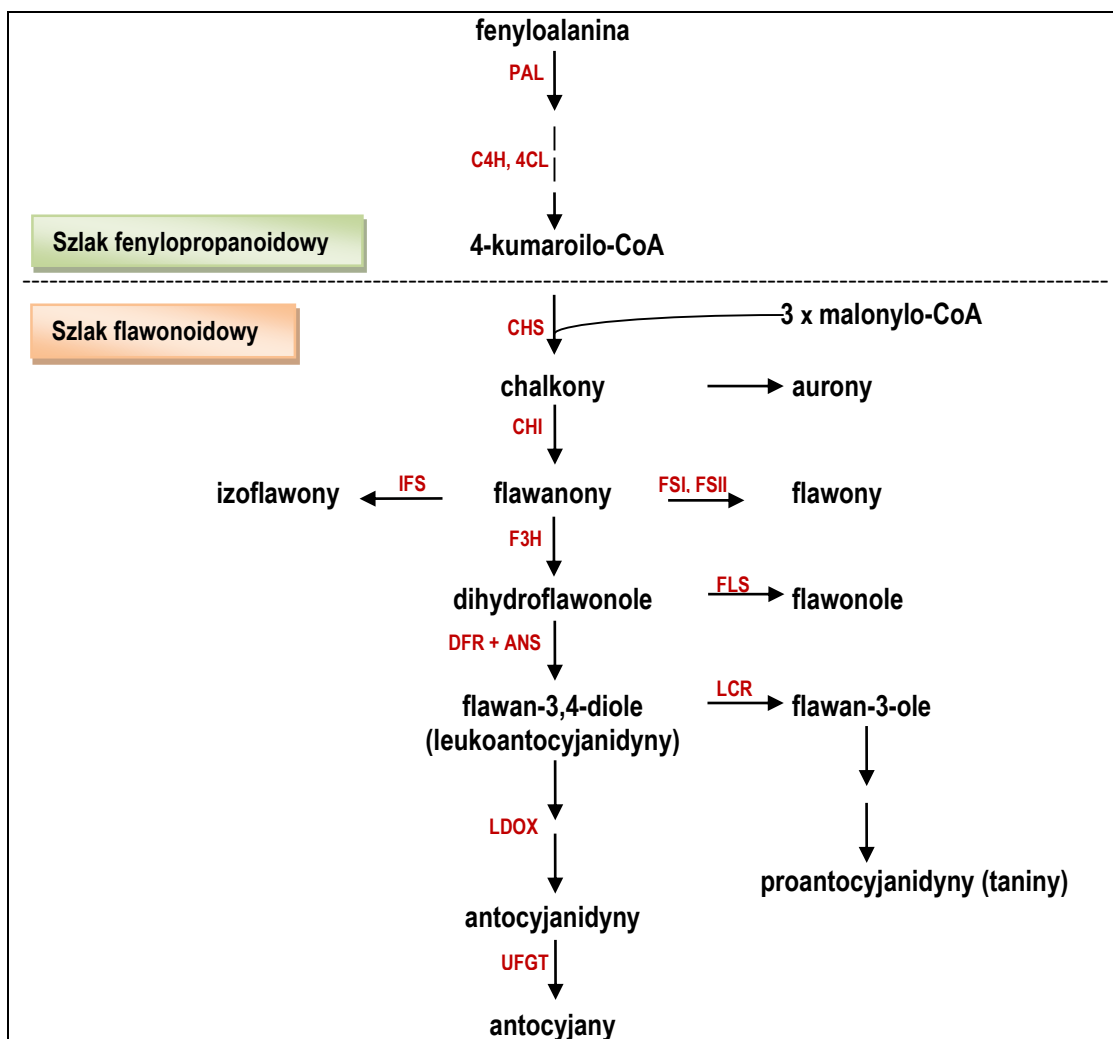
Flawonoidy to liczna grupa związków polifenolowych, niezwykle rozpowszechnionych w świecie roślinnym. Naturalne źródło tych metabolitów wtórnych stanowią rośliny zarodnikowe, naczyniowe, glony oraz mszaki. Flawonoidy występują we wszystkich częściach roślin, przede wszystkim w liściach i kwiatach, ale również w owocach, korze, drewnie, korzeniach czy nasionach (Jasiński i wsp., 2009). Związki te

zostały po raz pierwszy opisane w 1936 roku, a pionierem prac nad flawonoidami był węgierski naukowiec Albert Szent-Gyorgi. Wraz ze swoimi współpracownikami przeprowadził badania, na podstawie których stwierdzono, że wyciągi z czerwonej papryki i cytryn znacząco zmniejszają przepuszczalność i kruchość ścian naczyń włosowatych. W krótkim czasie ci sami badacze wyodrębnili z soku cytrynowego substancję nazwaną wówczas „cytrynem” lub witaminą P (Moszczyński, Pyć, 1999). Podawanie jej w dawce 1 mg/dzień świnkom morskim dotkniętym szkorbutem i przyjmującym witaminę C, przedłużało ich życie o średnio 2 tygodnie w porównaniu z osobnikami otrzymującymi wyłącznie witaminę C. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że witamina P wywiera działanie synergistyczne w stosunku do kwasu askorbinowego (Rusznayak, Szent-Gyorgi, 1936). Jak się później okazało substancja, określana jako „cytryn” lub witamina P, stanowiła w rzeczywistości mieszaninę różnych związków o podobnej budowie, które zaczęto określać flawonoidami. Od tamtej pory wyizolowano ponad 8000 struktur flawonoidowych różniących się budową i wykazujących rozmaite aktywności biologiczne (Gelejinse i Hollman, 2008; Tsao, 2010).

5.2. Biosynteza

Biosynteza flawonoidów to złożony proces, stanowiący część szlaku fenylopropanoidowego, podczas którego syntetyzowane są także inne metabolity wtórne, m.in. kwasy fenolowe, ligniny, lignany czy stilbeny (Andersen i Markham; 2006). Flawonoidy powstają z prekursorów metabolizmu podstawowego: fenyloalaniny pochodzącej ze szlaku szikimowego oraz malonylo-CoA powstałego z cytrynianu w cyklu Krebsa. Fenyloalanina w wyniku deaminacji pod wpływem enzymu amoniokoliazy fenyloalaniny (PAL) przekształcana jest do kwasu trans-cynamonowego. Ten ostatni na skutek hydrolizy katalizowanej przez 4-hydroksylazę kwasu cynamonowego (C4H) zamieniany jest do kwasu 4-kumarowego (p-kumarowego), który z kolei konwertowany jest przez ligazę 4-kumaroilo-CoA (4CL) do 4-kumaroilo-CoA. Kolejny etap biosyntezy to cyklizacja 4-kumaroilo-CoA przy udziale trzech cząsteczek malonylokoenzymu A i syntazy chalkonowej (CHS), prowadząca do powstania nietrwałego chalkonu. W wyniku enzymatycznej izomeryzacji chalkon przekształcany jest we flawanon, stanowiący wyjściową strukturę do syntezy wszystkich pozostałych podklas flawonoidów (Andersen i Markham; 2006; Petrusa i wsp., 2013; Stolarzewicz

i wsp., 2013). Ogólny schemat biosyntezy związków flawonoidowych przedstawiono poniżej (**Rycina 6**).

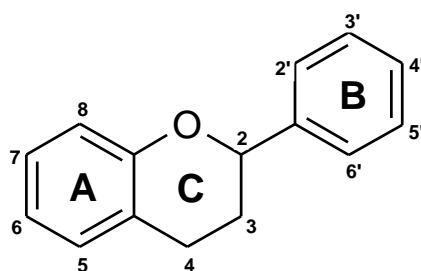


Rycina 6. Ogólny schemat biosyntezy flawonoidów (Boss i wsp., 1996; Winkel-Shirley, 2001).

ANS – syntaza antocyjanowa; **CHI** – izomeraza chalkonowa; **CHS** – syntaza chalkonowa; **DFR** – reduktaza dihydroflawonolowa; **F3H** – flawanon-3-hydroksylaza; **FSI, FSII** – syntazy flawonowe; **FLS** – syntaza flawonolowa; **IFS** – syntaza izoflawonowa; **LDOX** – dioksygenaza leukoantocyjanidynowa; **LCR** – reduktaza leukoantocyjanidynowa; **UFGT** – glukozylo transferaza UDP-flawonoidowa; **PAL** – amoniokoliaza fenyloalaninowa; **4CL** – ligaza 4-kumaroilo-CoA; **C4H** – 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego

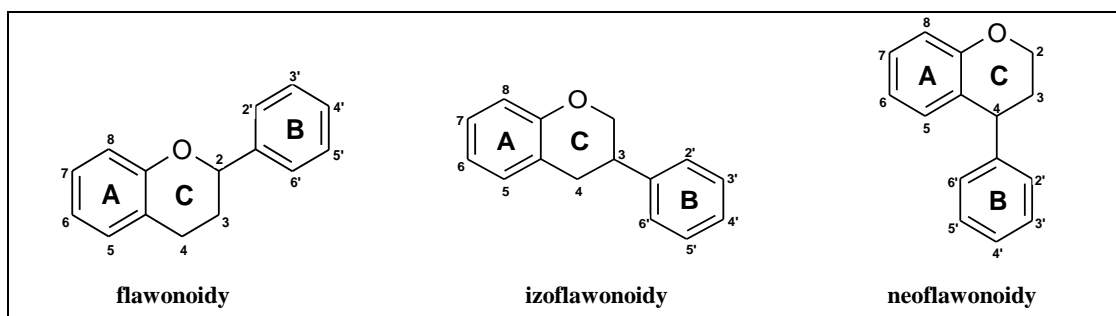
5.3. Budowa i klasyfikacja

Charakterystyczną cechą budowy wszystkich flawonoidów jest 15-węglowy szkielet o układzie C6-C3-C6. Tworzą go dwa pierścienie aromatyczne (A i B), połączone trójwęglowym łańcuchem, tworzonym przez układ wiązania podwójnego pomiędzy atomami węgla i przez grupę karbonylową. Na skutek biosyntezy mostek węglowy przekształcany jest w heterocykliczny układ zawierający tlen: piran lub piron (Jasiński i wsp., 2009).



Rycina 7. Podstawowa struktura flawonoidowa i schemat numeracji (Bravo, 1998).

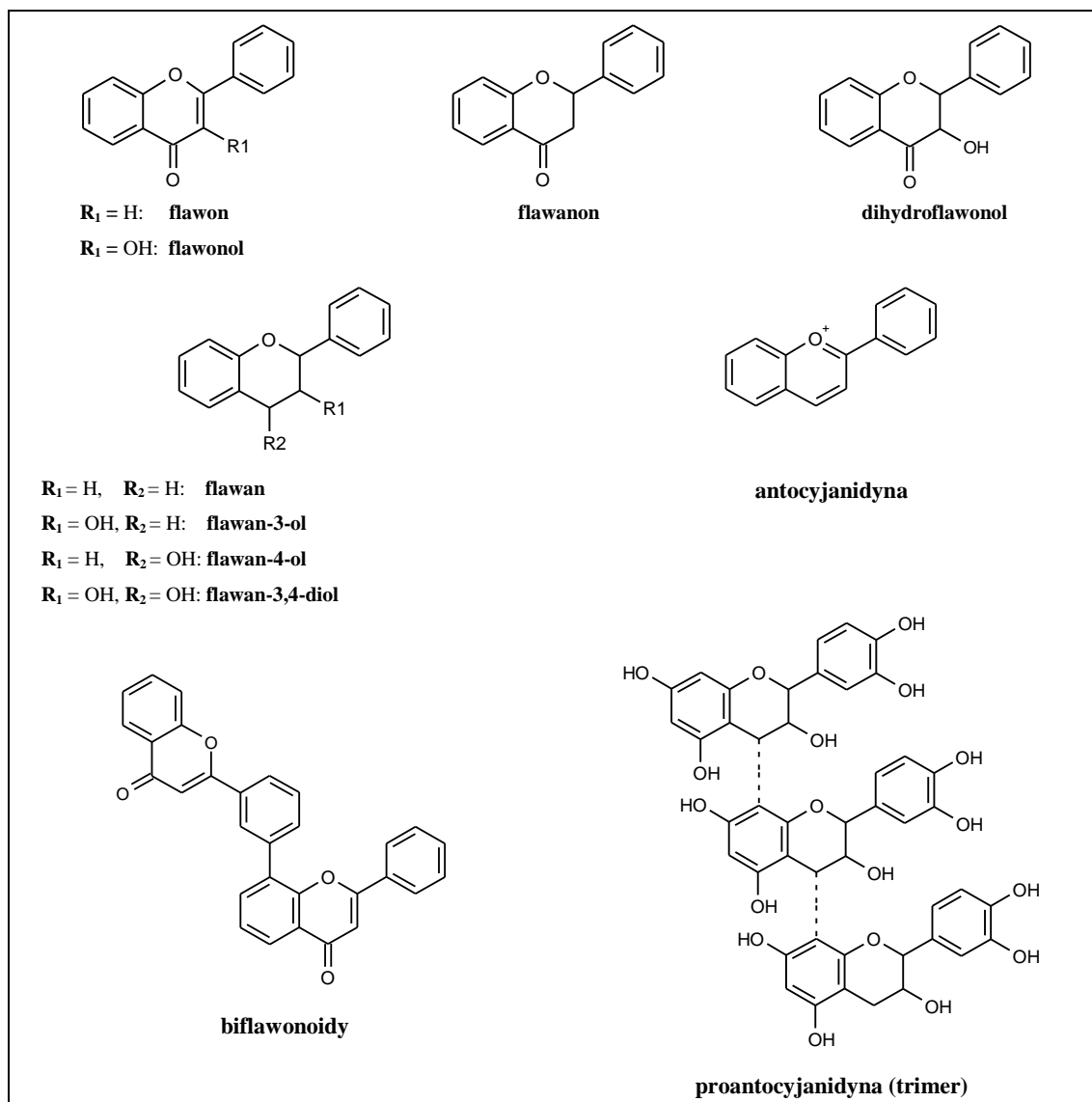
Związki flawonoidowe klasyfikowane są w oparciu o różnice w budowie. Podział ustanowiony przez IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) uwzględnia pozycję przyłączenia pierścienia aromatycznego B do cząsteczki benzopiranu. Wyróżnia on trzy podstawowe klasy związków flawonoidowych: flawonoidy (pochodne 2-fenylobenzopiranu), izoflawonoidy (pochodne 3-fenylobenzopiranu) oraz neoflawonoidy (pochodne 4-fenylobenzopiranu) (**Rycina 8**). (Moss i wsp., 1995).



Rycina 8. Trzy główne klasy flawonoidów wg IUPAC (Grotewold i wsp., 2006).

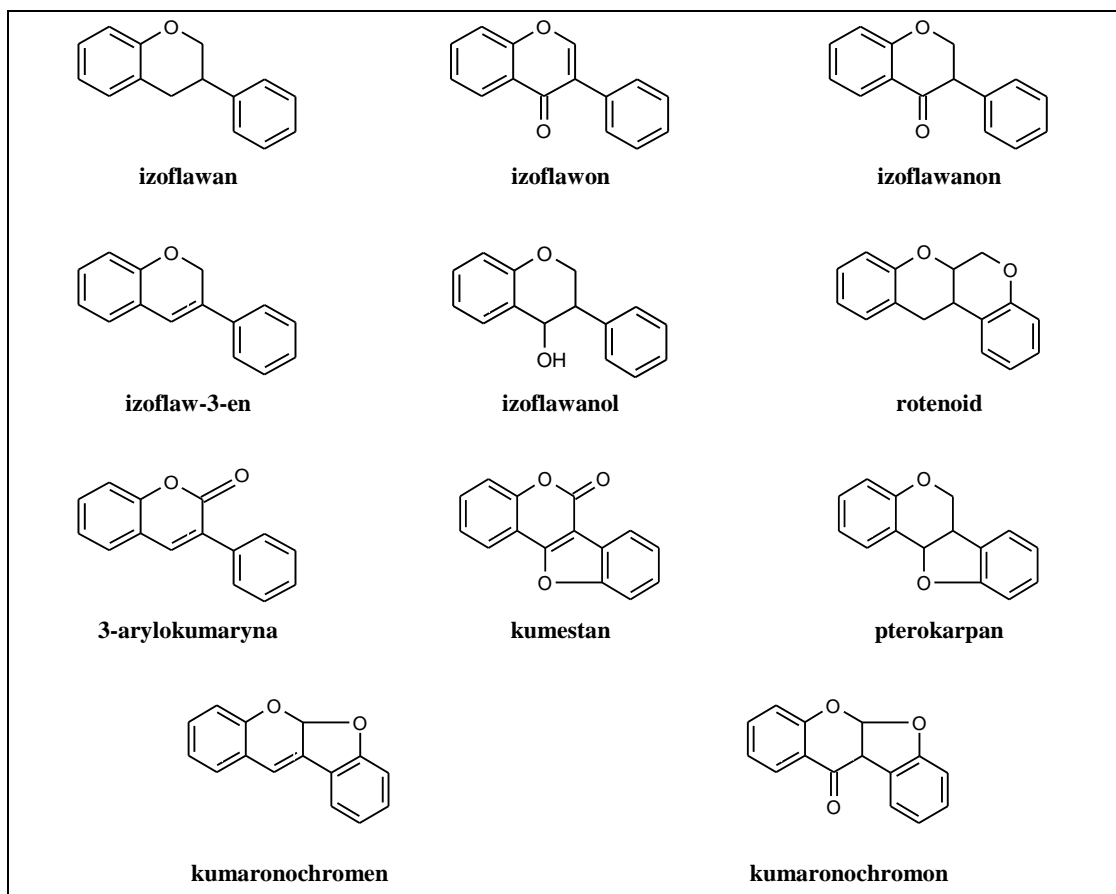
W zależności od dalszych modyfikacji strukturalnych związanych ze stopniem utlenienia i nasycenia pierścienia C, w każdej klasie ustanowiono dodatkowo odpowiednie podklasy. Poszczególne związki w obrębie podklas różni natomiast przede wszystkim podstawienie pierścieni A i B (Grotewold i wsp., 2006). Do najczęstszej modyfikacji układu flawonoidów należy hydroksylacja, głównie w pozycjach 3, 5, 7, 3', 4', 5'. Dodatkowo grupy hydroksylowe mogą być podstawione grupą metylową, sulfonową, acylową lub resztą cukrową. Ponadto flawonoidy mogą występować w postaci połączeń dimerycznych (biflawonoidy) (Muth i Kachlicki, 2009; Majewska i Czeczot, 2009).

Główną grupę związków flawonoidowych spotykanych w świecie roślinnym stanowią pochodne 2-fenylobenzopironu, do których zalicza się: flawony, flawonole, flawanony, dihydroflawonole. Do szeroko rozpowszechnionych w świecie roślinnym należą też pochodne 2-fenylobenzopirany: flawany, flawan-3-ole (katechiny), flawan-4-ole oraz flawan-3,4-diole, które mogą występować także w formie oligomerów, np. proantocyjanidyny. Flawan-3-ole łączące się wiązaniami C-C stanowią podstawową strukturę dużych, niehydrolizujących cząsteczek polimerycznych określanych jako taniny. Pochodnymi flawanu są też antocyjanidyny (**Rycina 9**) (Majewska i Czeczot, 2009; Beecher, 2003, Grotewold i wsp., 2006; Bravo, 1998).



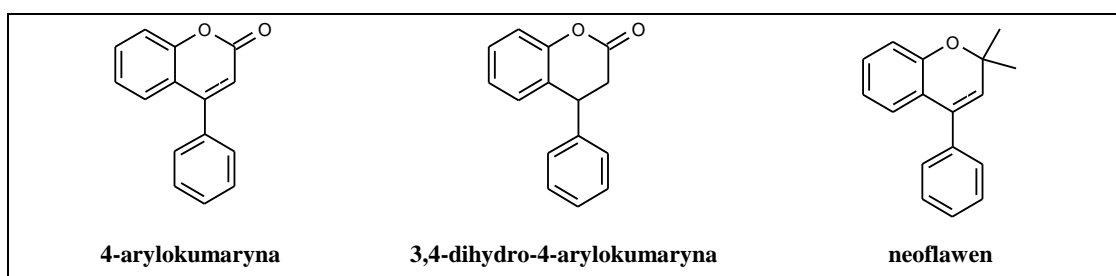
Rycina 9. Podklasy flawonoidów pochodnych 2-fenylobenzopironu i 2-fenylobenzopiranu (Grotewold i wsp., 2006; Jasiński i wsp., 2009; Beecher, 2003).

Izoflawonoidy, w odróżnieniu od pozostałych dwóch klas flawonoidów, może charakteryzować bardziej złożona budowa. Wynika ona nie tylko z liczby i złożoności podstawników przy podstawowym szkielecie oraz różnych stopni utlenienia, ale także z obecności dodatkowych pierścieni heterocyklicznych (**Rycina 10**) (Sharma i Ramawat, 2013).



Rycina 10. Podklasy flawonoidów pochodnych 3-fenylobenzopiranu (Grotewold i wsp., 2006).

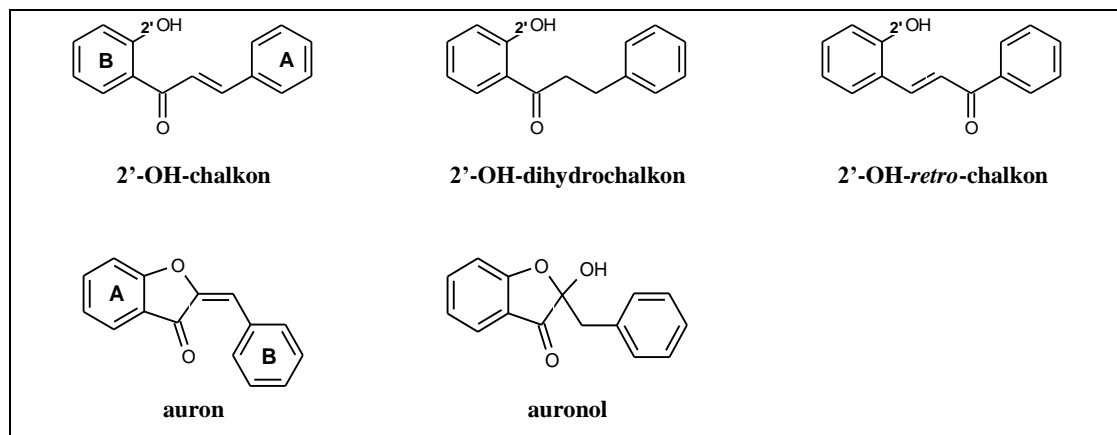
Neoflawonoidy natomiast to najrzadziej spotykana klasa związków flawonoidowych, zidentyfikowanych u zaledwie kilkudziesięciu roślin. Podstawową strukturę stanowi 4-arylokumaryna (**Rycina 11**) (Garazd i wsp., 2003).



Rycina 11. Podklasy flawonoidów pochodnych 4-fenylobenzopiranu (Grotewold i wsp., 2006).

Poza trzema głównymi klasami flawonoidów opisanymi powyżej zalicza się do nich także związki odbiegające budową od pierwotnej struktury tej grupy związków. Jedną z nich stanowią chalkony dla których cechą charakterystyczną jest otwarty

pierścień C, a dwa pozostałe pierścienie połączone są poprzez acykliczny, trójwęglowy fragment (Syam i wsp., 2012). Druga grupa związków to auronony i auronole, których budowa opiera się o układ benzofuranu (Rycina 12) (Detsi i wsp. 2009).



Rycina 12. Pozostałe klasy flawonoidów (Grotewold i wsp., 2006).

Flawonoidy mogą występować w roślinach w formie wolnej, aglikonów lub częściej w postaci połączeń cukrowych, głównie β -glikozydów (z wyjątkiem katechin). Glikozydacja zwiększa polarność i rozpuszczalność cząsteczki, co znacząco wpływa na jej magazynowanie w komórkach wakuoli. Do powszechnie przyłączanych cukrów należą: glukoza, galaktoza, ramnoza, arabinoza, apioza czy, będący pochodną glukozy, kwas glukuronowy. Najczęstszym miejscem przyłączenia cząsteczki cukru jest pozycja C-3 i C-7 rzadziej C-5, C-3' i C-4'. Pochodne związków flawonoidowych zasadniczo zawierają od jednej do czterech cząsteczek mono- lub monosacharydów połączonych w oligosacharydy wiązaniem glikozydowym 1 \rightarrow 6, 1 \rightarrow 2 lub rzadziej 1 \rightarrow 4 o konfiguracji α lub β (Stobiecki, 2000). Formy glikozydowe można dodatkowo podzielić na pochodne *O*-glikozydowe i *C*-glikozydowe. *C*-glikozydy są znacznie rzadziej spotykane w świecie roślinnym i powstają w wyniku bezpośredniego wiązania cząsteczki cukru z atomem węgla aglikonu, zazwyczaj w pozycji C-6 lub C-8 (Majewska i Czeczota, 2009).

6. GLUKURONIDY FLAWONOIDOWE

6.1. Występowanie

Flawonoidy występują w roślinach głównie w formie połączeń glikozydowych z prostymi cukrami, o wiele rzadziej podstawione są ich pochodnymi, np. kwasem glukuronowym, który może stanowić jedyną część cukrową związku lub występuje obok innych cząsteczek cukrowych. Glukuronidacja flawonoidów jest także możliwa w wyniku reakcji enzymatycznych określonych szlaków metabolicznych u ludzi i zwierząt. Reakcja sprzęgania z kwasem glukuronowym odbywa się głównie w wątrobie za sprawą UDP-glukuronylotransferazy, jednak może mieć miejsce także na wcześniejszych etapach metabolizmu flawonoidów, a mianowicie po bezpośrednim wchłonięciu aglikonów w jelicie grubym, w komórkach enterocytów (Aherne i wsp., 2002; Manach i wsp., 2004).

Glukuronidy flawonoidowe zidentyfikowane dotychczas w roślinach to głównie glukuronoflawony, zwłaszcza pochodne apigeniny, luteoliny, trycyny, chrysoeriolu, skutelareiny oraz glukuronoflawonole: pochodne kwercetyny, kemferolu, izoramnetyny. Związki te zidentyfikowano m.in. w rodzinach *Asteraceae* (*Cirsium rivulare*, *Erigeron multiradiatus*, *Tanacetum parthenium*) (Nazaruk i Gudej, 2003; Zhang i wsp., 2009; Williams i wsp., 1999), *Polygonaceae* (*Polygonum amphibium*, *P. aviculare*) (Smolarz i wsp., 2008; Granica i wsp., 2013), *Lamiaceae* (*Scutellaria indica*, *S. baicalensis*, *Salvia officinalis*) (Miyachi i wsp., 1987; Guozhu i wsp., 2011; Lu i Foo, 2000, Al-Qudah i wsp., 2014), *Scrophulariaceae* (*Picria fel-terrae*) (Huang i wsp., 1999), *Pedaliaceae* (*Uncarina* sp.) (Yamazaki i wsp., 2007) i *Chenopodiaceae* (*Spinacia oleracea*) (Aritomi i Kawasaki, 1984). Szczególnie rzadką grupę związków stanowią diglukuronoflawony zidentyfikowane w kilku gatunkach z rodziny *Fabaceae* (*Medicago truncatula*, *M. radiata*, *M. sativa*) (Kowalska i wsp., 2007; Stochmal i wsp., 2001a,b,c; Marczak i wsp., 2009); *Lamiaceae* (*Perilla ocimoides*) (Yoshida i wsp., 1993), *Poaceae* (*Secale cereale*) (Schulz i wsp., 1985) i *Hydrocharitaceae* (*Elodea canadensis*) (Mues, 1983). W przypadku *Medicago* sp. wyizolowane diglukuronoflawony były dodatkowo acylowane pochodnymi kwasu cynamonowego: kawowym, ferulowym, *p*-kumarowym i synapinowym (Tabela 1).

Tabela 1. Glukuronidy flawonoidowe w świecie roślinnym.

Związki	Gatunki roślin	Literatura
FLAWONY		
pochodne APIGENINY		
7-O-glukuronopiranozyd apigeniny	<i>Myoporum bontioides</i> <i>Uncarina sp.</i> <i>Conocephalum conicum</i> <i>Riccia fluitans</i> <i>Scutellaria galericulata</i> <i>Millingtonia hortensis</i>	Iwashina i wsp., 2010 Yamazaki i wsp., 2007 Markham i wsp., 1976 Markham i wsp., 1978 Popova i wsp., 1975 Hase i wsp., 1995
7-O-β-D-glukuronopiranozyd apigeniny	<i>Medicago truncatula</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Picris fel-terrae</i> <i>Cirsium rivulare</i> <i>Cirsium arvense</i> <i>Erigeron multiradiatus</i> <i>Tanacetum parthenium</i> <i>Marchantia berteroana</i> <i>Lycopus virginicus</i> <i>Verbascum lychnitis</i> <i>Silybum marianum</i>	Kowalska i wsp., 2007 Stochmal i wsp., 2001 Huang i wsp., 1999 Nazaruk i wsp., 2003 Shelyuto i wsp., 1972 Zhang i wsp., 2009 Williams i wsp., 1999 Markham i wsp., 1975 Bucar i Karting, 1995 Klimek, 1995 Mabry i wsp., 1989
7-O-[β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago truncatula</i> <i>Perilla ocimoides</i>	Kowalska i wsp., 2007 Yoshida i wsp., 1993
7-O-[glukuronopiranozylo-(1-2)-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Elodea sp.</i>	Mues, 1983
7-O-[β-D-glukuronopiranozylo-(1-3)-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago truncatula</i>	Kowalska i wsp., 2007
7-O-[2'-O-sinapoilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago truncatula</i>	Kowalska i wsp., 2007
7-O-[2'-O-feruilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-3)]-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago truncatula</i>	Kowalska i wsp., 2007
7-O-[2'-O-feruilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-3)]-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago truncatula</i> <i>Medicago sativa</i>	Kowalska i wsp., 2007 Stochmal i wsp., 2001
4'-O-[2'-O-E-feruilo-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago sativa</i>	Stochmal i wsp., 2001
4'-O-β-D-glukuronopiranozyd apigeniny	<i>Medicago sativa</i>	Stochmal i wsp., 2001
7-O-β-D-glukuronopiranozydo-4'-O-[2'-O-E-feruilo-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago sativa</i>	Stochmal i wsp. 2001
7-O-β-D-glukuronopiranozydo-4'-O-[2'-O-p-E-kumaroilo-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago sativa</i>	Stochmal i wsp., 2001
7-O-[β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozylo]-4'-O-β-D-glukuronopiranozyd apigeniny	<i>Medicago sativa</i>	Stochmal i wsp., 2001

7-O-[2'-O-feruilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozylo]-4'-O-β-D-glukuronopiranozyd apigeniny	<i>Medicago sativa</i>	Stochmal i wsp., 2001
7-O-[2'-O-p-kumaroilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozylo]-4'-O-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago sativa</i>	Stochmal i wsp., 2001
7-O-glukuronopiranozylo-(1-2)-glukopiranozyd apigeniny	<i>Medicago truncatula</i>	Marczak i wsp., 2010
7-O-[glukuronopiranozylo-(1-2)-O-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-glukopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago truncatula</i>	Marczak i wsp., 2010
7-O-[2'-feruilo-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago truncatula</i>	Marczak i wsp., 2010
7-O-[2'-feruilo-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-glukopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago truncatula</i>	Marczak i wsp., 2010
7-O-[2'-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago truncatula</i>	Marczak i wsp., 2010
7-O-[2'-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-glukopiranozyd] apigeniny	<i>Medicago truncatula</i>	Marczak i wsp. 2010
7-O-β-[2'-O-α-ramnozylo-glukuronopiranozyd] apigeniny	<i>Picria fel-terrae</i>	Huang i wsp., 1999
ester metylowy 7-O-β-D-glukuronopiranozydu apigeniny	<i>Luffa cylindrica</i> <i>Ixeris sonchifolia</i>	Du i wsp., 2006 Xizhi i wsp., 2000
7-O-glukuronopiranozyd-4'-O-ramnozydu apigeniny	<i>Conocephalum conicum</i>	Markham i wsp., 1976
7,4'-di-O-glukuronopiranozyd apigeniny	<i>Conocephalum conicum</i> <i>Marchantia polymorpha</i> <i>Riccia fluitans</i>	Markham i wsp., 1976 Markham i wsp., 1974 Markham i wsp., 1978
8-O-β-glukuronopiranozyd apigeniny	<i>Marchantia berteroana</i>	Markham i wsp., 1975
4'-glukuronopiranozyd apigeniny	<i>Riccia fluitans</i>	Markham i wsp., 1978
4'-O-β-D-glukozyd-7-O-β-D-glukuronidu apigeniny	<i>Centaurea cyanus</i>	Asen i wsp., 1974
7-O-β-D-(6"-O-metylo)-glukuronopiranozyd apigeniny	<i>Lycopus virginicus</i> <i>Bellis perennis</i>	Bucar i Karting, 1995 Gudej i Nazaruk, 1996
7-O-β-D-(6"-etylo)-glukuronopiranozyd apigeniny	<i>Silybum marianum</i>	Mabry i wsp., 1989
7-O-β-D-(2"-O-β-ramnozydo)-galakturonopiranozyd apigeniny	<i>Silybum marianum</i>	Mabry i wsp., 1989
7-(2'-acetylo-6'-metylo)-glukuronopiranozyd apigeniny	<i>Calluna vulgaris</i>	Daovy i wsp., 1991
pochodne LUTEOLINY		
7-O-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Myoporum bontioides</i> <i>Vitex rotundifolia</i> <i>Uncarina sp.</i> <i>Conocephalum conicum</i> <i>Riccia fluitans</i>	Iwashina i wsp., 2010 Iwashina i wsp., 2011 Yamazaki i wsp., 2007 Markham i wsp., 1976 Markham i wsp., 1978

	<i>Scutellaria galericulata</i> <i>Digitalis lanata</i>	Popova i wsp., 1975 Hiemann, 1982
7-O-β-D-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Medicago truncatula</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Picris fel-terrae</i> <i>Salvia officinalis</i> <i>Tanacetum parthenium</i> <i>Lemon balm</i> <i>Chrysanthemum morifolium</i> <i>Marchantia berteroana</i> <i>Lycopus virginicus</i> <i>Lycopus europeus</i> <i>Lycopus exaltatus</i> <i>Verbascum lychnitis</i> <i>Helichrysum bracteatum</i>	Kowalska i wsp., 2007 Stochmal i wsp., 2001 Huang i wsp., 1999 Lu i wsp., 2000 Williams i wsp., 1999 Patora i wsp., 2002 Beninger i wsp., 2005 Markham i wsp., 1975 Bucar i Karting, 1995 Bucar i Karting, 1995 Bucar i Karting, 1995 Klimek, 1995 Gunasegaran i wsp., 1993
7-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Medicago truncatula</i> <i>Stratiotes aloides</i> <i>Perilla ocimoides</i> <i>Secale cereale</i>	Kowalska i wsp., 2007 Conrad i wsp., 2009 Yoshida i wsp., 1993 Schulz i wsp., 1985
7-O-[glukuronopiranozylo-(1-2)-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Elodea sp.</i>	Mues, 1983
7-O-[β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-β-glukuronopiranozylo-4'-O-β-D-glukuronopiranozyd] luteoliny	<i>Secale cereale</i>	Schulz i wsp., 1985
7-O-[2'-O-fenilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)]-O-β-D-glukuronopiranozylo-4'-O-β-D-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Medicago sativa</i>	Stochmal i wsp., 2001
3'-O-β-D-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Salvia officinalis</i> <i>Lemon balm</i>	Lu i wsp., 2000 Patora i wsp., 2007
7-O-[β-glukuronopiranozyd]-6-hydroksyluteoliny	<i>Salvia officinalis</i>	Lu i wsp., 2000
ester metylowy 7-O-β-D-glukuronopiranozydu luteoliny	<i>Luffa cylindrica</i> <i>Ixeris sonchifolia</i>	Du i wsp., 2006 Xizhi i wsp., 2000
7,3'-di-O-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Conocephalum conicum</i> <i>Marchantia polymorpha</i>	Markham i wsp. 1976 Markham i wsp. 1974
7-O-glukuronopiranozyd-3'-4'-di-O-ramnozydu luteoliny	<i>Conocephalum conicum</i>	Markham i wsp., 1976
7-O-β-D-glukopiranozydo-3'-O-β-D-glukuronopiranozydu luteoliny	<i>Conocephalum conicum</i>	Markham i wsp., 1976
7-O-glukuronopiranozyd-4'-O-ramnozydu luteoliny	<i>Conocephalum conicum</i>	Markham i wsp., 1976
7,4'-di-O-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Conocephalum conicum</i> <i>Marchantia berteroana</i> <i>Marchantia polymorpha</i> <i>Riccia fluitans</i>	Markham i wsp., 1976 Markham i wsp., 1975 Markham i wsp., 1974 Markham i wsp., 1978
7,4'-di-O-glukuronopiranozydo-3'-feruiloglukopiranozyd luteoliny	<i>Riccia fluitans</i>	Markham i wsp., 1978
7,4'-di-O-glukuronopiranozydo-3'-glukopiranozyd luteoliny	<i>Riccia fluitans</i>	Markham i wsp., 1978
7-glukuronopiranozydo-3'-glukopiranozyd luteoliny	<i>Riccia fluitans</i>	Markham i wsp., 1978
3',4'-di-O-metylo-7-O-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Rhynchosia beddomei</i>	Adinarayana i wsp., 1980

3'-O-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Vitex rotundifolia</i>	Iwashina i wsp., 2011
7,3',4'-tri-O-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Marchantia polymorpha</i>	Markham i wsp., 1974
3'-O-β-D-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Lunularia cruciata</i> <i>Marchantia berteriana</i> <i>Marchantia polymorpha</i>	Markham i wsp., 1974a Markham i wsp., 1975 Markham i wsp., 1974b
3'-4'-di-O-β-D-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Lunularia cruciata</i> <i>Marchantia berteriana</i>	Markham i wsp., 1974a Markham i wsp., 1975
8-O-β-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Marchantia berteriana</i>	Markham i wsp., 1975
7-O-glukuronopiranozydo-3'-mono-(trans)feruiloglukopiranozyd luteoliny	<i>Riccia fluitans</i>	Markham i wsp., 1978
4'-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Riccia fluitans</i>	Markham i wsp., 1978
7-glukuronopiranozydo-3'-(2-hydroksypropionyl)-glukopiranozylo-4'-(2-hydroksypropionyl)-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Riccia fluitans</i>	Markham i wsp., 1978
7-glukuronopiranozydo-3'-(2-hydroksypropionyl)-glukopiranozyd luteoliny	<i>Riccia fluitans</i>	Markham i wsp., 1978
7-O-acetyloglukuronopiranozyd luteoliny	<i>Digitalis lanata</i>	Hiermann, 1982
6-metoksy-7-O-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Digitalis lanata</i>	Hiermann, 1982
6-metoksy-7-O-acetyloglukuronopiranozyd luteoliny	<i>Digitalis lanata</i>	Hiermann, 1982
7-O-galaktopiranozylo-glukuronopiranozyd luteoliny	<i>Andryala ragusina</i>	Recio i wsp., 1993
7-O-β-D-glukopiranozyd-3',4'-dimetyloluteoliny	<i>Rhynchosia beddomei</i>	Adinarayana i wsp., 1980
Pochodne TRYCYNY		
7-O-glukuronopiranozyd trycyny	<i>Myoporum tenuifolium</i>	Tomas i wsp., 1985
7-O-β-D-glukuronopiranozyd trycyny	<i>Medicago truncatula</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Marchantia foliacea</i>	Kowalska i wsp., 2007 Stochmal i wsp., 2001 Markham i wsp., 1973
7-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd trycyny	<i>Medicago truncatula</i>	Kowalska i wsp., 2007
7-O-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-glukopiranozyd chrysoeriolu	<i>Medicago truncatula</i>	Marczak i wsp., 2010
7-O-[2'-O-feruilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-3)]-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd trycyny	<i>Medicago truncatula</i> <i>Medicago sativa</i>	Kowalska i wsp., 2007 Stochmal i wsp., 2001
7-O-[2'-O-p-kumaroilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-3)]-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd trycyny	<i>Medicago truncatula</i>	Kowalska i wsp., 2007
7-O-[2'-O-feruilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] trycyny	<i>Medicago truncatula</i>	Kowalska i wsp., 2007

7-O-[2'-O-feruilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukopiranozyd] trycyny	<i>Medicago truncatula</i> <i>Medicago sativa</i>	Kowalska i wsp., 2007 Stochmal i wsp., 2001
7-O-[2'-O-sinapoilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] trycyny	<i>Medicago truncatula</i> <i>Medicago sativa</i>	Kowalska i wsp., 2007 Stochmal i wsp., 2001
7-O-[2'-O-p-kumaroilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] trycyny	<i>Medicago truncatula</i> <i>Medicago sativa</i>	Kowalska i wsp., 2007 Stochmal i wsp., 2001
7-O-β-D-glukuronopiranozydo-4'-O-glukopiranozyd trycyny	<i>Medicago truncatula</i>	Kowalska i wsp., 2007
pochodne CHRYSOERIOLU		
7-O-glukuronopiranozyd chrysoeriolu	<i>Myoporum bontioides</i> <i>Uncarina sp.</i> <i>Conocephalum conicum</i>	Iwashina i wsp., 2010 Yamazaki i wsp., 2007 Markham i wsp., 1976
7-O-[β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu	<i>Medicago truncatula</i> <i>Stratiotes aloides</i>	Kowalska i wsp., 2007 Conrad i wsp., 2009
7-O-[glukuronopiranozylo-(1-2)-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu	<i>Elodea sp.</i>	Mues, 1983
7-O-[glukuronopiranozylo-(1-2)-O-glukopiranozyd] chrysoeriolu	<i>Medicago truncatula</i>	Marczak i wsp., 2010
7-O-[2'-O-p-kumaroilo-[β-D-glukuronopiranozylo-(1-3')]-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu	<i>Medicago truncatula</i> <i>Medicago sativa</i>	Kowalska i wsp., 2007 Stochmal i wsp., 2001
7-O-[2'-O-feruilo-[β-D-glukuronopiranozylo-(1-3')]-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu	<i>Medicago truncatula</i> <i>Medicago sativa</i>	Kowalska i wsp., 2007 Stochmal i wsp., 2001
7-O-[β-D-glukuronopiranozydo-4'-O-β-D-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu	<i>Medicago sativa</i>	Stochmal i wsp., 2001
7-O-β-[2'-O-feruilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu	<i>Medicago sativa</i> <i>Medicago truncatula</i>	Stochmal i wsp., 2001 Marczak i wsp., 2010
7-O-[2'-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-glukopiranozyd] chrysoeriolu	<i>Medicago truncatula</i>	Marczak i wsp., 2010
7-O-[2'-O-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu	<i>Medicago truncatula</i>	Marczak i wsp., 2010
7-O-[2'-O-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-glukopiranozyd] chrysoeriolu	<i>Medicago truncatula</i>	Marczak i wsp., 2010
7-O-glukuronopiranozyd-4'-O-ramnozydu chrysoeriolu	<i>Conocephalum conicum</i>	Markham i wsp., 1976
7-O-β-D-glukuronopiranozyd chrysoeriolu	<i>Marchantia foliacea</i>	Markham i wsp., 1973
pochodne SKUTELAREINY / IZOSKUTELAREINY		
7-O-β-D-glukuronopiranozyd skutelareiny	<i>Erigeron multiradiatus</i>	Zhang i wsp., 2009

7-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-O-β-D-glukuronopiranozyd skutelareiny	<i>Perilla ocimoides</i>	Yoshida i wsp., 1993
8-O-β-glukuronopiranozyd izoskutelareiny	<i>Malope trifida</i> <i>Malva sylvestris</i> <i>Marchantia berteroana</i> <i>Takakia lepidozoioides</i>	Sikorska i wsp., 2004 Billeter i wsp., 1991 Markham i wsp., 1975 Markham i wsp., 1979
4'-metylowy eter -8-O-β-glukuronopiranozydu izoskutelareiny	<i>Malope trifida</i>	Sikorska i wsp., 2004
pochodne DIOSMETYNY		
7-O-β-glukuronopiranozyd diosmetyny	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Beninger i wsp., 2009
7-O-β-D-glukuronopiranozyd diosmetyny	<i>Luffa cylindrica</i> <i>Verbascum lychnitis</i>	Du i wsp., 2006 Klimek, 1995
ester metylowy 7-O-β-D-glukuronopiranozydu diosmetyny	<i>Luffa cylindrica</i>	Du i wsp., 2007
pochodne HYPOLETYNY		
4'-metylowy eter-8-O-β-glukuronopiranozydu hypoletyny	<i>Malva sylvestris</i>	Billeter i wsp., 1991
8-O-β-D-glukuronopiranozyd hypoletyny	<i>Malva sylvestris</i> <i>Marchantia berteroana</i>	Billeter i wsp., 1991 Markham i wsp., 1975
8,4'-di-O-β-D-glukuronopiranozyd hypoletyny	<i>Marchantia berteroana</i>	Markham i wsp., 1975
pochodne WOGONINY		
7-O-glukuronopiranozyd wogoniny	<i>Scutellaria indica</i> <i>Scutellaria galericulata</i> <i>Scutellaria rivularis</i>	Miyaichi i wsp., 1987 Popova i wsp., 1975 Tomimori i wsp., 1990
pochodne CHRZYNY		
7-O-glukuronopiranozyd chryzyny	<i>Scutellaria galericulata</i>	Popova i wsp., 1975
pochodne BAIKALEINY		
7-O-glukuronopiranozyd baikaleiny	<i>Scutellaria galericulata</i> <i>Scutellaria rivularis</i>	Popova i wsp., 1975 Tomimori i wsp., 1990
7-O-glukuronopiranozyd dihydrobaikaleiny	<i>Scutellaria galericulata</i>	Popova i wsp., 1975
pochodne AKACETYNY		
7-O-β -D-glukuronopiranozyd akacetyny	<i>Cirsium arvense</i> <i>Lycopus virginicus</i>	Glyzin i wsp., 1972 Bucar i Karting, 1995
8-O-glukuronopiranozyd 8-hydroksyakacetyny	<i>Takakia lepidozoioides</i>	Markham i wsp., 1979
7-O-β-D-(6''-O-metylo)-glukuronopiranozyd akacetyny	<i>Lycopus virginicus</i>	Buar i wsp., 1993
3-O-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)- β-D-glukuronopiranozyd akacetyny	<i>Clerodendron trochotomum</i>	Okigawa i wsp., 1971

FLAWONOLE		
pochodne KWERCETYNY		
3-O-β-glukuronopiranozyd kwercetyny	<i>Polygonum amphibium</i> <i>Polygonum aviculare</i> <i>Vitis vinifera</i> <i>Nelumbo nucifera</i> <i>Rotala rotundifolia</i> <i>Tamarix nilotica</i> <i>Arnica montana</i> <i>Anethum graveolens</i>	Smolarz i wsp., 2008 Granica i wsp., 2013 Makrisa i wsp., 2006 Rozario i wsp., 2012 Zhang i wsp., 2011 Nawwar i wsp., 1984 Merfort i Wendisch, 1988 Mohle i wsp., 1985
3- glukuronopiranozyd kwercetyny	<i>Euphorboa retusa</i> <i>Euphorbia sanctae-catharinae</i>	Saleh, 1985 Saleh, 1985
3-O-β-D-2"-acetyloglukuronopiranozyd kwercetyny	<i>Rotala rotundifolia</i>	Zhang i wsp., 2011
ester metylowy 3-O-β-D-glukuronopiranozyd kwercetyny	<i>Rotala rotundifolia</i>	Zhang i wsp., 2011
ester metylowy 3-O-β-D-2"-acetyloglukuronidu kwercetyny	<i>Rotala rotundifolia</i>	Zhang i wsp., 2011
3-O-α-ramnozylo-(1-2)-β-glukuronopiranozyd kwercetyny	<i>Polygonum amphibium</i>	Smolarz i wsp., 2008
3-O-α-ramnozylo-(1-2)-β-glukuronopiranozyd kwercetyny	<i>Polygonum amphibium</i>	Smolarz i wsp., 2008
3-O-β-(2'-O-acetylo-β-D-glukuronopiranozyd) kwercetyny	<i>Polygonum aviculare</i>	Granica i wsp., 2013
3-O-β-(3'-O-acetylo-β-D-glukuronopiranozyd) kwercetyny	<i>Polygonum aviculare</i>	Granica i wsp., 2013
3-O-izoferuilo-β-glukuronopiranozyd kwercetyny	<i>Tamarix aphylla</i>	El Ansari i wsp., 1976
7-O-β-D-glukuronopiranozyd kwercetyny	<i>Verbascum lychnitis</i>	Klimek, 1995
7-O-β-D-glukuronopiranozyd-3-O-β-D-gencjobiozydu kwercetyny	<i>Tulipa gesneriana</i>	Budzianowski, 1990
7-O-β-D-glukuronopiranozyd-3-O-β-D-rutynozydu kwercetyny	<i>Tulipa gesneriana</i>	Budzianowski, 1990
7-O-β-D-glukuronopiranozyd-3-O-β-D-glukozydu kwercetyny	<i>Tulipa gesneriana</i>	Budzianowski, 1990
3- glukuronopiranozyd-7-glukozyd kwercetyny	<i>Euphorboa retusa</i> <i>Euphorbia sanctae-catharinae</i>	Saleh, 1985 Saleh, 1985
6"-metylowy ester 3-O-β-D-glukuronopiranozydu kwercetyny	<i>Tamarix nilotica</i>	Nawwar i wsp., 1984
6"-etylowy ester 3-O-β-D-glukuronopiranozydu kwercetyny	<i>Tamarix nilotica</i>	Nawwar i wsp., 1984
7-O-glukuronopiranozyd-5-glukopiranozylo-4'-metoksykwercetyny	<i>Allysum minimum</i>	Afsharypuor i Lockwood, 1986
7-O-glukuronopiranozyd-5-glukopiranozylo-3',4'-dimetoksykwercetyny	<i>Allysum minimum</i>	Afsharypuor i Lockwood, 1986
pochodne KEMFEROLU		
3-O-β-D-glukuronopiranozyd kemferolu	<i>Polygonum aviculare</i> <i>Arnica montana</i>	Granica i wsp., 2013 Merfort i Wendisch, 1988

3- glukuronopiranozyd kemferolu	<i>Euphorbia sanctae-catharinae</i>	Saleh, 1985
3-O-β-D-glukuronopiranozyd 6-metoksykemferolu	<i>Arnica montana</i>	Merfort i Wendisch, 1988
3-O-β-(3'-O-acetylo-β-D-glukuronopiranozyd) kemferolu	<i>Polygonum aviculare</i>	Granica i wsp., 2013
3-O-β-(2'-O-acetylo-β-D-glukuronopiranozyd) kemferolu	<i>Polygonum aviculare</i>	Granica i wsp., 2013
7-O-β-D-glukuronopiranozyd-3-O-β-D-gencjobiozydu kemferolu	<i>Tulipa gesneriana</i>	Budzianowski, 1990
7-O-β-D-glukuronopiranozyd-3-O-β-D-rutynozydu kemferolu	<i>Tulipa gesneriana</i>	Budzianowski, 1990
7-O-β-D-glukuronopiranozyd-3-O-β-D-glukozydu kemferolu	<i>Tulipa gesneriana</i>	Budzianowski, 1990
3- glukuronopiranozyd-7-glukozydu kemferolu	<i>Euphorbia sanctae-catharinae</i>	Saleh, 1985
6"-etylowy ester 3-O-β-D-glukuronopiranozydu kemferolu	<i>Tamarix nilotica</i>	Nawwar i wsp., 1984
7-O-glukuronopiranozyd-5-glukopiranozylo-4'-metoksykemferolu	<i>Allysum minimum</i>	Afsharypuor i Lockwood, 1986
 pochodne IZORAMNETYNY		
3-O-β-D-glukuronopiranozyd izoramnetyny	<i>Polygonum aviculare</i>	Granica i wsp., 2013
3-O-β-(2'-O-acetylo-β-D-glukuronopiranozyd) izoramnetyny	<i>Polygonum aviculare</i>	Granica i wsp., 2013
7-O-glukuronopiranozyd izoramnetyny	<i>Uncarina sp.</i>	Yamazaki i wsp., 2007
3-O-β-glukuronopiranozyd izoramnetyny	<i>Arnica montana</i>	Merfort i Wendisch, 1988
 pochodne GOSSYPETYNY		
3-O-β-glukopiranozylo-8-O-β-glukuronopiranozyd gossypetyny	<i>Malope trifida</i> <i>Malva sylvestris</i>	Sikorska i wsp., 2004 Billeter i wsp., 1991
8-O-glukuronopiranozyd gossypetyny (hibifolina)	<i>Abelmoschus manihot</i> <i>Helichrysum bracteatum</i>	Lai i wsp., 2007 Gunasegaran i wsp., 1993
3-siarczan-8-O-β-D-glukuronopiranozydu gossypetyny	<i>Malva sylvestris</i>	Nawwar i Buddrus, 1981
3-O-β-D-glukuronopiranozylo-8-O-β-D-glukopiranozyd gossypetyny	<i>Romeria hybrida</i>	Saleh i wsp., 1988
 pochodne innych aglikonów		
7-O-β-D-glukuronopiranozyd-3'-O-metylotrycetyny	<i>Medicago sativa</i>	Stochmal i wsp., 2001
3-O-β-D-glukuronopiranozyd mirycetyny	<i>Polygonum aviculare</i> <i>Epilobium angustifolium</i>	Granica i wsp., 2013 Hiemann i wsp., 1991
3-O-β-D-glukuronopiranozyd mearsetyny	<i>Polygonum aviculare</i>	Granica i wsp., 2013
3-O-β-D-glukuronopiranozyd kemferydu	<i>Polygonum aviculare</i>	Granica i wsp., 2013

7-O-glukuronopiranozyd selaginy	<i>Myoporum bontioides</i>	Iwashina i wsp., 2010
3-O-β-glukopiranozyd-8-O-β-glukuronopiranozyd herbacetyny	<i>Malope trifida</i>	Sikorska i wsp., 2004
3-O-β-D-glukuronopiranozyd syryngetyny	<i>Philydium lanuginosum</i>	Bohm i wsp., 1975
7-O-β-D-glukuronopiranozyd kartamidyny	<i>Scutellaria rivularis</i>	Tomimori i wsp., 1990
7-O-β-D-glukuronopiranozyd izokartamidyny	<i>Scutellaria rivularis</i>	Tomimori i wsp., 1990
7-O-β-D-glukuronopiranozyd-5,8-dimetoksyflawonu	<i>Scutellaria rivularis</i>	Tomimori i wsp., 1990
7-O-β-D-glukuronopiranozyd-5,7,8,2'-dimetoksyflawonu	<i>Scutellaria rivularis</i>	Tomimori i wsp., 1990
2'-O-β-D-glukuronopiranozyd-5,2'-dimetoksy-7,8,6'-trimetoksyflawonu	<i>Scutellaria rivularis</i>	Tomimori i wsp., 1990
2'-O-β-D-glukuronopiranozyd-5,2',6'-trihydroksy-7,8,-diimetoksyflawonu	<i>Scutellaria rivularis</i>	Tomimori i wsp., 1990
7-O-β-D-glukuronopiranozyd-5,7,8,3',4',5'-heksahydroksyflawonu	<i>Scoparia dulcis</i>	Kawasaki i wsp., 1988
6"-metylowy ester -7-O-glukuronopiranozydu hispiduliny	<i>Millingtonia hortensis</i>	Hase i wsp., 1995
3-O-β-D-glukuronopiranozylo-8-O-β-D-glukopiranozyd herbacetyny	<i>Romeria hybrida</i>	Saleh i wsp., 1988
3-O-β-D-glukuronopiranozyd patuletyny	<i>Arnica montana</i>	Merfort i Wendisch, 1988
4'-O-β-D-glukuronopiranozyd-5,7,4'-trihydroksy-3,6,3'-trimetoksyflawonu	<i>Spinacia oleracea</i>	Aritomi i wsp., 1984
4'-O-β-D-glukuronopiranozyd-5,3',4'-trihydroksy-3-metoksy-6,7-metylenodioksyflawonu	<i>Spinacia oleracea</i>	Aritomi i wsp., 1984
metylowy eter 4'-O-β-D-glukuronopiranozydu-5,3',4'-trihydroksy-3-metoksy-6,7-metylenodioksyflawonu	<i>Spinacia oleracea</i>	Aritomi i wsp., 1984
4'-O-β-D-glukuronopiranozyd-3,6-dimetoksy-5,7,3',4'-tetrahydroksyflawonu	<i>Spinacia oleracea</i>	Aritomi i wsp., 1986

6.2. Aktywność biologiczna

Do chwili obecnej rola glukuronidów w roślinach nie została dokładnie wyjaśniona. Uważa się, że mogą one stanowić ochronę przed roślinożercami (Poe i wsp., 2013). Badania wykazały także, że niektóre z tych związków wykazują działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne.

Na podstawie doświadczenia przeprowadzonego przez Pawlaka i wsp. udowodniono, że wyizolowany z ziela *A. amaranthoides* (KiZ Farmakognozji UMP)

7-*O*-[2'''-*O*-feruiloglukuronopiranozylo-*O*-glukuronopiranozyd] trycyny cechuje duży potencjał antyoksydacyjny. Badanie wykonano z wykorzystaniem metody ABTS oraz elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), natomiast związek wzorcowy stanowił beta-karoten. Autorzy sugerowali, że wysoka aktywność antyoksydacyjna badanego związku może wynikać z jego wysokiej polarności oraz z obecności ugrupowania hydroksylowego w pozycji 4' pierścienia B, a także grup metoksyłowych w pozycji 3' i 5' pierścienia B (Pawlak i wsp., 2010).

Z kolei Cieśla i wsp. przeprowadzili badanie aktywności antyoksydacyjnej metodą TLC-DPPH dla glukuronidów wyizolowanych z *Medicago sativa* i *M. truncatula*. Wśród badanych związków dominowały diglukuronidy flawonów, głównie pochodne trycyny, apigeniny, luteoliny oraz chrysoeriolu. Niektóre z nich były dodatkowo acylowane pochodnymi kwasu cynamonowego: kwasem kumarowym, ferulowym i synapinowym. Za substancję referencyjną w doświadczeniu posłużyła rutyna. Najsilniejszą aktywnością antyoksydacyjną, porównywalną z rutyną, charakteryzował się 7-*O*-[2'''-*O*-feruilo-β-D-glukuronopiranozylo-(1-2)-*O*-β-D-glukuronopiranozyd] trycyny. Na podstawie przeprowadzonych badań udowodniono, że działanie przeciwutleniające pochodnych trycyny było silniejsze niż pochodnych apigeniny, luteoliny czy chrysoeriolu. Dodatkowo aktywność antyoksydacyjna wzrastała w przypadku związków acylowanych odpowiednimi kwasami hydroksycynamonowymi, najsilniej w przypadku podstawienia cząsteczki cukru kwasem ferulowym. Różnice w badanej aktywności zauważalne były ponadto dla związków różniących się ilością i rodzajem cząsteczek cukru. Aktywność antyoksydacyjna diglukuronidów była silniejsza w porównaniu z triglukuronidami oraz związkami posiadającymi jedną cząsteczkę kwasu glukuronowego i glukozy (Cieśla i wsp., 2012).

Zhang i wsp. również badali działanie przeciwutleniające flawonoidów podstawionych kwasem glukuronowym. Wyizolowane z *Rotala rotundifolia* związki: 3-*O*-β-D-glukuronid kwercetyny, 3-*O*-β-D-2''-acetyloglukuronid kwercetyny, ester metylowy 3-*O*-β-D-glukuronidu kwercetyny, ester metylowy 3-*O*-β-D-2''-acetyloglukuronidu kwercetyny, poddano badaniu aktywności antyoksydacyjnej metodą z zastosowaniem odczynnika DPPH. Wszystkie badane struktury wykazywały większą zdolność zmiatania wolnego rodnika DPPH[•] aniżeli (±)-α-tokoferol. Ponadto w tym samym doświadczeniu zbadano wpływ wyizolowanych glukuronidów na poziom antygeny HBsAg. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórek wątrobiaka ludzkiego HepA2 zawierających genom wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV), które

w sposób ciągły wydzielają do pożywki hodowlanej powierzchniowy antygen wirusa – HBsAg. Zastosowane w doświadczeniu glukuronidy, w stężeniu 10 µg/ml, nie wpływały na poziom antygeny HBsAg, tym samym nie wykazywały aktywności przeciwko wirusowi HBV (Zhang i wsp. 2011).

W innym badaniu, w przypadku glukuronidów wyizolowanych z *Polygonum aviculare* testowano ich zdolność hamowania produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) oraz uwalniania elastazy przez ludzkie neutrofile stymulowane fMLP (formylo-Met-Leu-Phe). Związki poddane badaniu stanowiły 3-O-β-D-glukuronidy flawonoli: mirycetyny, kwercetyny, izoramnetyny, kemferolu, mearsetyny oraz kemferydu, a także pochodne izoramnetyny, kwercetyny i kemferolu posiadające cząsteczkę kwasu glukuronowego, dodatkowo acetylowaną w pozycji 2'' lub 3''. Wszystkie badane związki w stężeniach 1 i 10 µM znacząco hamowały produkcję ROS. Nieco słabszą aktywność wykazywały związki posiadające w swojej strukturze grupy metoksyłowe (mearsetyna, izoramnetyna, kemferyd). W doświadczeniu nie wykazano wpływu acetylacji cząsteczki kwasu glukuronowego na wzrost bądź obniżenie aktywności antyoksydacyjnej badanych związków. W wyniku oceny aktywności cytotoksycznej wyizolowanych substancji na ludzkie neutrofile udowodniono, że nie wywierały one wpływu na żywotność komórek w stężeniach poniżej 30 µM. Ponadto wszystkie struktury w stężeniu 1 µM hamowały uwalnianie elastazy przez neutrofile stymulowane f-MLP. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy sugerowali, że glukuronidy flawonoidowe obecne w ziele *P. aviculare* mogą odpowiadać za jego aktywność przeciwzapalną (Granica i wsp., 2013).

Efekt przeciwzapalny zanotowano także w przypadku estru etylowego 3-O-β-D-glukuronidu kwercetyny wyizolowanego z *Polygonum perfoliatum*. Doświadczenie przeprowadzono na myszach, u których wywołano obrzęk ucha poprzez miejscową aplikację ksylenu. Doustne podawanie zwierzętom wyżej wymienionego glukuronidu w dawce 4 mg/kg m.c. i 8 mg/kg m.c., przez okres siedmiu dni poprzedzających aplikację ksylenu, skutkowało obrzękiem mniejszym o odpowiednio 35,15 % i 48,56 % w stosunku do próby kontrolnej. Efekt zanotowany dla obu zastosowanych dawek był silniejszy niż w przypadku aspiryny podawanej w ten sam sposób w dawce 100 mg/kg m.c., która względem próby kontrolnej zmniejszała odczyn zapalny o 24,62 %. W tym samym doświadczeniu zbadano wpływ estru etylowego 3-O-β-D-glukuronidu kwercetyny na zwiększoną przepuszczalność naczyń indukowaną kwasem octowym. Badany związek w dawkach 3 mg/kg m.c. i 6 mg/kg m.c., przez okres 8 dni poprzedzających dootrzewnowe podanie kwasu octowego, znacząco zmniejszał

przepuszczalność naczyń, odpowiednio o 47,4 i 59,9 % w stosunku do próby kontrolnej i charakteryzował się silniejszym działaniem w porównaniu z aspiryną, po zastosowaniu której przepuszczalność naczyń zmniejszyła się o 34,38 % w stosunku do próby kontrolnej (Gong i wsp. 2013).

Z kolei Hiermann i wsp. wyizolowali z liści *Epilobium angustifolium* 3-*O*- β -D-glukuronid mirycetyny, który wykazywał silne działanie przeciwzapalne w teście karageninowym przeprowadzonym na szczurach. Badany związek redukował stan zapalny łapy ponad dziesięć razy silniej niż indometacyna, a także, w porównywalnym do niej stopniu, hamował biosyntezę prostaglandyn (Hiermann i wsp. 1991).

Badanie przeprowadzone na królikach dowiodło natomiast, że frakcja glukuronidów flawonoidowych (7-*O*- β -glukuronid-3-*O*- β -gencjobiozydu kwercetyny i kemferolu, 7-*O*- β -glukuronid-3-*O*- β -rutynozydu kwercetyny i kemferolu, 7-*O*- β -glukuronid-3-*O*- β -glukozydu kwercetyny i kemferolu) wyizolowana z *Tulipa gesneriana* wywierała działanie ochronne na skórne naczynia krwionośne, w przypadku ich zwiększonej przepuszczalności, indukowanej poprzez miejscowe zastosowanie chloroformu i histaminy (Budzianowski i wsp., 1999).

3-*O*-glukuronid kwercetyny w badaniu *in vitro* zapobiegał przerostowi komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych stymulowanych działaniem angiotensyny II (Yoshizumi i wsp. 2002). Z kolei w innym badaniu ten sam związek wyizolowany z zioła *Polygonum amphibium* L. odpowiadał za indukcję apoptozy w komórkach białaczki ludzkiej HL-60 oraz w komórkach Jurkat, podobnie jak 3-*O*- α -ramnozylo-(1-2)- β -glukuronid kwercetyny. Mechanizm działania związany był z penetracją wymienionych związków przez cytoplazmę do jądra komórkowego badanych linii komórek i indukowaniem silnej odpowiedzi apoptotycznej (Smolarz i wsp., 2008).

Lee i wsp. zbadali aktywność 7-*O*- β -D-4'-kawoiloglukuronidu apigeniny wyizolowanego z *Chrysanthemum morifolium* względem wirusa HIV. Na podstawie badania przeprowadzonego z wykorzystaniem komórek MT-4 zainfekowanych wirusem HIV-1 udowodnili, że związek ten jest silnym inhibitorem integrazy HIV-1 ($IC_{50} = 7,2 \pm 3,4 \mu\text{g/ml}$), a także wykazuje działanie przeciwwirusowe anty-HIV ($EC_{50} = 41,86 \pm 1,43 \mu\text{g/ml}$) (Lee i wsp. 2003).

7. ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII MAS W IDENTYFIKACJI FLAWONOIDÓW

7.1. Wprowadzenie

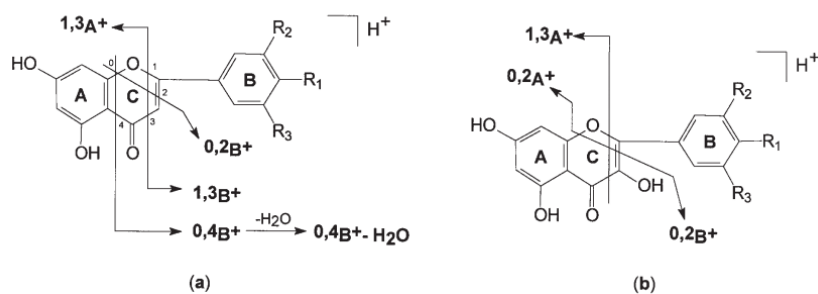
Ze względu na duże znaczenie flawonoidów w odniesieniu do organizmów żywych oraz poszukiwanie nowych aktywności biologicznych tej grupy związków, istotną staje się ich identyfikacja oraz dokładne określanie struktury chemicznej. Proces ten z reguły wymaga stosowania zaawansowanych, niejednokrotnie łączonych technik analitycznych. Jedną z metod umożliwiających poznanie budowy związków chemicznych stanowi spektrometria mas (MS). Intensywny rozwój tej techniki analitycznej w ciągu ostatnich dwóch dekad sprawił, że obecnie jest szeroko wykorzystywana także w analizie związków flawonoidowych. Spektrometria mas pozwala określać dokładną masę cząsteczkową i strukturę poszczególnych związków występujących pojedynczo lub w mieszaninie na podstawie wyznaczenia stosunku masy do ładunku (m/z) zjonizowanych cząsteczek. Wysoka czułość i specyficzność techniki MS umożliwia analizy substancji obecnych w materiale biologicznym w bardzo niewielkich, nawet śladowych ilościach i jest efektywna w przypadku rozdziału i identyfikacji związków o tej samej masie cząsteczkowej, a różnym składzie atomowym, niekiedy także i stereoizomerów (Stobiecki, 2000; Valls i wsp., 2009).

Możliwości wykorzystywania różnych metod jonizacji badanych związków oraz licznych typów analizatorów pozwalają na dobór optymalnych warunków rozdziału i analizy dla różnych grup związków. Badane próbki mogą być wprowadzane do spektrometru mas poprzez chromatograf gazowy (GC) lub cieczowy (LC), wykorzystując odpowiednio jonizację elektronową (EI) albo chemiczną (CI) dla próbek gazowych, a w drugim przypadku, szczególnie chętnie stosowaną w analizie związków flawonoidowych, jonizację poprzez elektrorozpraszanie (ESI) lub jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) (Muth i Kachlicki, 2009). Większość glikozydów flawonoidowych to związki stosunkowo polarne, nietlone i termicznie labilne. W związku z tym konwencjonalne techniki jonizacji wykorzystywane w analizie MS, takie jak jonizacja elektronami (EI) czy jonizacja chemiczna (CI) nie znalazły szerszego zastosowania w badaniu związków flawonoidowych, ze względu na konieczność przeprowadzenia jonizowanej próbki do stanu gazowego (Andersen i Markham, 2006). Identyfikacja flawonoidów tymi metodami była niemożliwa bez

uprzedniej derywatywacji polarnych grup hydroksylowych, głównie poprzez metylację, trimetylosililację lub acetylację (Stobiecki, 2000). Procesy derywatywacyjne pociągały jednak za sobą pewne ograniczenia związane m.in. z dużym wzrostem masy modyfikowanych związków, wykraczających poza zakresy detekcji większości systemów GC-MS, a także z możliwością ich rozkładu w trakcie nastrzyku na kolumnę. Dlatego też obecnie w analizie związków flawonoidowych wykorzystywane są głównie systemy LC-MS, a w szczególności tandemowe spektrometry mas LC-MS/MS pozwalające na fragmentację badanych jonów $[M+H]^+/[M-H]^-$, za sprawą kolizyjnie indukowanej dysocjacji (ang. *Collision Induced Dissociation*, CID). W wyniku tego procesu analizowane jony, na skutek zderzeń z cząsteczkami gazu szlachetnego (np. argonu lub helu), ulegają rozpadowi, co umożliwia otrzymanie informacji na temat budowy badanego związku. Analizatorami najczęściej wykorzystywanymi w analizach LC-MS są: pułapka jonowa (IT), potrójny analizator kwadrupolowy (QQQ), analizator cyklotronowego rezonansu jonowego z fourierowską transformacją wyników (FTICR), a ponadto charakteryzujący się wysoką rozdzielczością analizator OrbiTrap czy analizator Q-ToF, stanowiący połączenie dwóch analizatorów: typu kwadrupol oraz czasu przelotu. Biorąc pod uwagę rodzaj stosowanego analizatora otrzymywane są widma o niskiej lub wysokiej rozdzielczości, przy czym te drugie umożliwiają określenie masy oraz elementarnego składu badanego związku z dokładnością nawet do 2-5 ppm (Muth i Kachlicki, 2009).

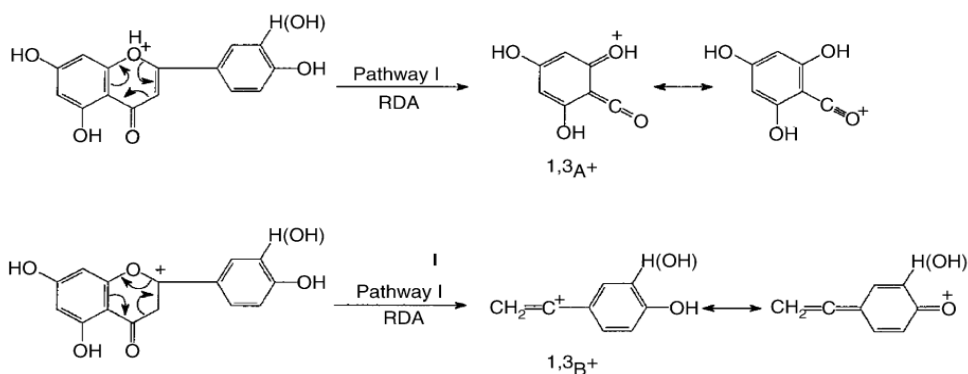
7.2. Identyfikacja aglikonów

Powszechnie akceptowana i stosowana nomenklatura ścieżek fragmentacyjnych flawonoidów została pierwotnie ustalona przez Mabry'ego i Markhama na początku lat 70. XX wieku (Mabry i wsp. 1970). Wraz z upływem czasu inni badacze wprowadzili do niej pewne modyfikacje (Ma i wsp. 1997). W przypadku aglikonów stosowane są symbole $^{i,j}A^+$ i $^{i,j}B^+$, które oznaczają główne fragmenty zawierające nienaruszony pierścień A lub B, natomiast indeksy górne wskazują na wiązania C-C, w pierścieniu C, które rozpadły się w wyniku fragmentacji (Rycina 13).



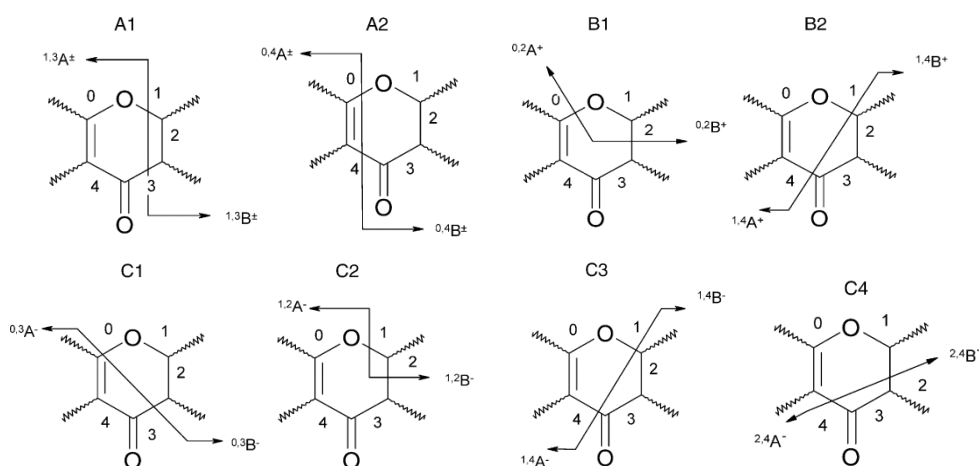
Rycina 13. Nomenklatura oraz główne produkty fragmentacji protonowanych (a) flawonów i (b) flawonoli (fragmentacja metodą CID) (Ma i wsp., 1997).

Energia fragmentacji stosowana w procesie CID ma istotny wpływ na sposób rozpadu badanych związków. W trybie jonów ujemnych energie potrzebne do prawidłowego przebiegu procesu fragmentacji są wyższe niż w trybie jonów dodatnich (Niessen, 2006). W przypadku aglikonów szczególnie istotnych informacji na temat budowy cząsteczki dostarcza fragmentacja przebiegająca według mechanizmu retro Dielsa-Aldera (RDA), polegająca na relokacji trzech par elektronów w sześciocyklicznym układzie zawierającym podwójne wiązanie. Reakcja ta skutkuje rozerwaniem dwóch wiązań σ i utworzeniem dwóch wiązań π , w efekcie czego dochodzi do powstania dwóch fragmentów: $^{1,3}A^+$ i $^{1,3}B^+$ (Rycina 14).



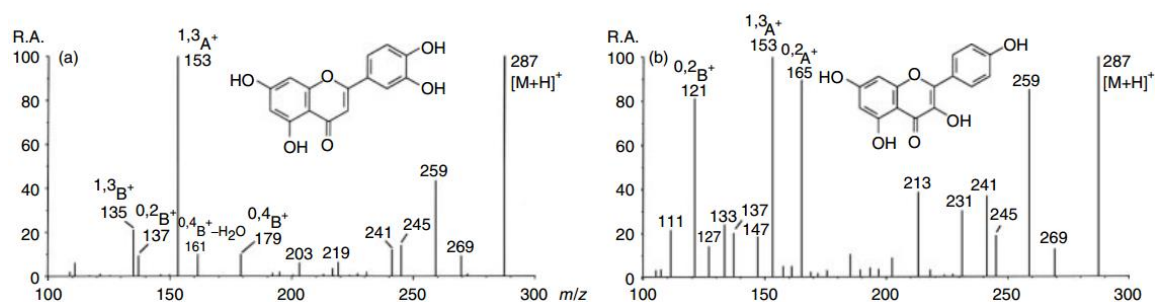
Rycina 14. Schemat reakcji tworzenia jonów $^{1,3}A^+$ i $^{1,3}B^+$ wg mechanizmu retro Dielsa-Aldera dla apigeniny (R=H) i luteoliny (R=OH) (Rijke i wsp., 2006).

Ścieżki fragmentacyjne prowadzące do powstania jonów A i B mogą przebiegać poprzez wiązania 1/3, 1/2, 0/2, 0/3, 0/4, 1/4, 2/4 pierścienia C (Rycina 15) (Rijke i wsp., 2006).



Rycina 15. Możliwe ścieżki fragmentacyjne flawonoidów związane z rozerwaniem wiązań C-C pierścienia C w dodatnim (PI) i ujemnym (NI) trybie jonizacji; (A) PI i NI: (A1) 1 i 3, (A2) 0 i 4, (B) PI: (B1) 0 i 2, (B2) 1 i 4, (C) NI: (C1) 0 i 3, (C2) 1 i 2, (C3) 1 i 4, (C4) 2 i 4 (Rijke i wsp., 2006).

Droga rozpadu cząsteczki jest ściśle związana z jej podstawieniem oraz grupą flawonoidów do jakiej należy. Dodatkowy podstawnik OH w pozycji 3 flawonoli skutkuje większą liczbą możliwych szlaków fragmentacyjnych w porównaniu np. z flawonami. Fragmenty typowe dla rozpadu flawonoli to: $^{0,2}A^+$, $^{0,2}A^+-C$, $^{1,4}A^+ + 2H$ i $^{1,3}B^+-2H$, natomiast dla flawonów obserwuje się przede wszystkim jony: $^{1,3}B^+$, $^{0,4}B^+$, i $^{0,4}B^+-H_2O$. Dzięki temu możliwe jest rozróżnienie np. flawonoli i flawonów o tej samej masie molekularnej (Rycina 16) (Cuyckens i Claeys, 2004).

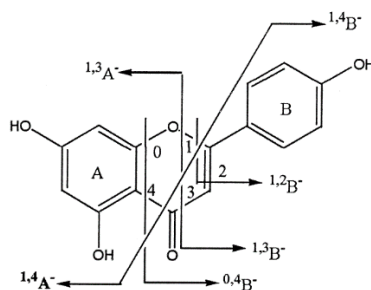


Rycina 16. Widma CID jonów $[M + H]^+$ (a) luteoliny i (b) kemferolu (Cuyckens, 2004).

Jon $^{1,3}A^+$ obserwowany jest w widmach CID wszystkich grup flawonoidów, dając charakterystyczny pik o dużej intensywności. Obecność jonu $^{0,2}A^+$ pozwala na rozróżnienie flawonoli od innych grup flawonoidów, w przypadku których nie jest on obserwowany w widmach CID. Rozszczepienie wiązania 0/4 w pierścieniu C jest stosunkowo rzadko opisywane w literaturze i odnosi się przede wszystkim do protonowanych fragmentów flawonów. W związku z tym obecność jonów $^{0,4}B^+$ w widmie można uznawać za element diagnostyczny przy identyfikacji tej grupy

związków (Ma i wsp., 1997; Rijke i wsp., 2006). Dodatkowo fragmenty $^{ij}A^+$ i $^{ij}B^+$ mogą tracić małe cząsteczki neutralne, m.in. H_2O (- 18 u), CO (- 28 u), C_2H_2O (- 42 u), CH_3 (- 15 u) z utworzeniem rodników jonów $[M+H]^+$, co jest szczególnie przydatne przy określaniu obecności dodatkowych grup funkcyjnych w cząsteczce (Cuyckens i Claeys, 2004).

Widma CID jonów w trybie dodatnim są częściej wykorzystywane w analizie związków flawonoidowych, co m.in. wynika z ich łatwiejszej interpretacji. Jednak analiza w trybie jonów ujemnych często charakteryzuje się większą czułością, w związku z tym widma wykonane w obu trybach mogą dostarczać wzajemnie uzupełniających się informacji, dotyczących badanych struktur (Hurst, 2008). Rozerwanie pierścienia C zgodnie z mechanizmem RDA prowadzi do powstania jonów $^{ij}A^-$ i $^{ij}B^-$ i, podobnie jak w przypadku trybu jonów dodatnich, umożliwia uzyskanie informacji na temat liczby i typu podstawników przy pierścieniach A i B. Dla fragmentacji aglikonów w ujemnym trybie jonizacji najbardziej charakterystyczny fragment stanowi jon $^{1,3}A^-$ (Rycina 17) (Fabre i wsp., 2001). Wyjątek stanowią izoflawony, dla których charakterystyczny jon fragmentacyjny to $^{0,3}B^-$ (Hughes i wsp., 2001).



Rycina 17. Nomenklatura i możliwe produkty fragmentacji deprotonowanych aglikonów flawonoidowych na przykładzie apigeniny (Fabre i wsp., 2001).

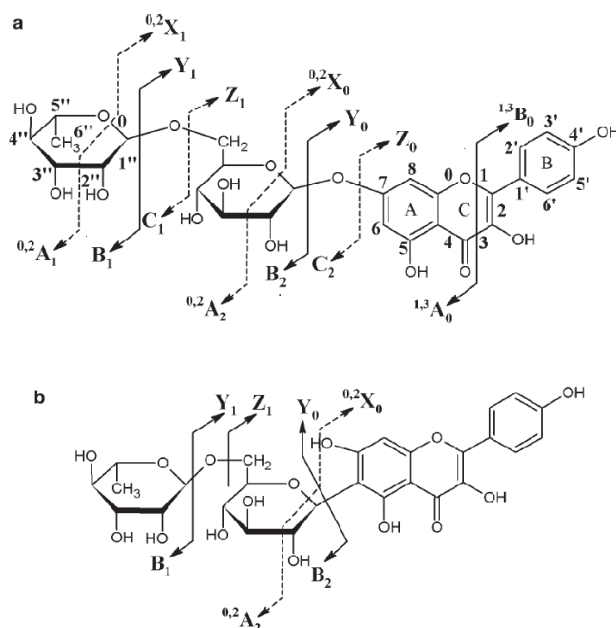
Ponadto rozpad w ujemnym trybie jonizacji jest związany ze stopniem hydroksylacji pierścienia B, np. w przypadku flawonoli zawierających dwie lub więcej grup OH w pierścieniu B (np. kwercetyna) obserwowane fragmenty to przede wszystkim $[^{1,2}A-H]^-$ i $[^{1,2}B-H]^-$ (Fabre i wsp., 2001; Cuyckens i wsp., 2000). Dla związków z niepodstawionym pierścieniem B energia potrzebna do fragmentacji jest znacznie wyższa i prowadzi do otrzymania większej liczby jonów fragmentacyjnych (Hughes i wsp., 2001). W niektórych przypadkach obserwowane jest bezpośrednie rozerwanie

wiązania pomiędzy pierścieniami B i C, prowadzące do powstania jonu fragmentacyjnego [M-B]⁻. Podobnie jak w przypadku fragmentacji w trybie jonów dodatnich, charakterystyczna jest tu utrata małych neutralnych cząsteczek: CO (- 28 u), CO₂ (- 34 u), C₂H₂O (- 42 u), CH₃ (- 15 u). Co ciekawe, w trybie jonizacji ujemnej brak fragmentów powstających na skutek rozpadu wiązań 0/2 (Fabre i wsp., 2001; Justesen, 2001).

7.3. Identyfikacja glikozydów flawonoidowych

Identyfikacja glikozydów flawonoidowych za pomocą spektrometrii mas może dostarczyć informacji na temat: masy molekularnej, rodzaju aglikonu, miejsca i typu glikozylacji (*O*-glikozylacja, *C*-glikozylacja), liczby oraz rodzaju cząsteczki lub cząsteczek cukrowych przyłączonych do aglikonu (pentoza, heksoza, deoksyheksoza), ich konfigurację i w niektórych przypadkach miejsce wiązania glikozydowego. Ponadto możliwe jest określenie podstawienia cząsteczek cukrów resztami acylowymi, a także grup hydroksylowych aglikonu grupami metylowymi i sulfonowymi. Tandemowa spektrometria mas nie dostarcza natomiast informacji na temat stereochemii wiązań glikozydowych (Li i Claeys, 1994; Stobiecki, 2000).

W przypadku nomenklatury glikozydów wprowadzono dodatkowy indeks po prawej stronie (A_0) umożliwiający rozróżnienie jonów fragmentacyjnych aglikonów od fragmentów cząsteczek cukrowych opisywanych jako A_i i B_i ($i \geq 1$), licząc od terminalnej cząsteczki cukru (**Rycina 18**).



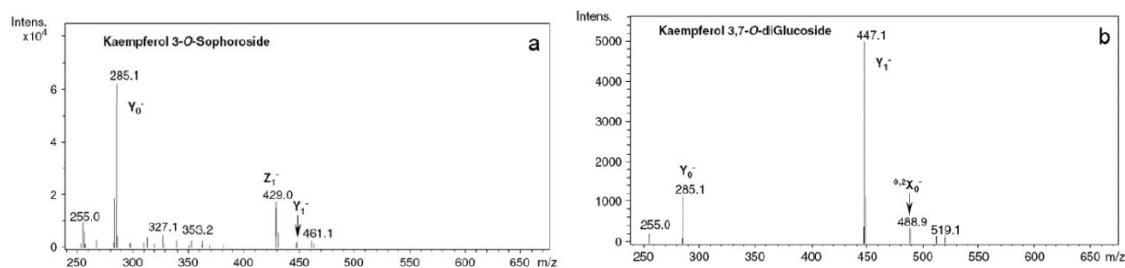
Rycina 18. Nomenklatura jonów fragmentacyjnych (a) *O*-glikozydów flawonoidowych oraz (b) *C,O*- i *C*-glikozydów flawonoidowych (Vukics i Guttman, 2008).

O-, *C*- i *C,O*-glikozydy mogą być rozróżniane na podstawie widm otrzymanych zarówno dla trybu jonizacji dodatniej jak i ujemnej, najczęściej poprzez analizę widm CID. Na podstawie obserwacji charakterystycznych produktów rozpadu (jony Y_1 , Y_0 , Z_1) oraz względnej intensywności pików im odpowiadających, można określić sposób połączenia cząsteczek cukrowych z aglikonem.

Liczne prace dowiodły, że w przypadku *O*-glikozydów zastosowanie niskiej bądź średniej energii fragmentacji skutkuje heterocyklicznym rozpadem ich wiązań hemiacetalowych O-C, w wyniku czego w widmie obserwowane są charakterystyczne fragmenty Y_1 (Li i Claeys, 1994; Ferreres i wsp. 2004; Mai wsp. 2000,2001; March i wsp. 2004; March i wsp. 2006; Ablajan i wsp. 2006). Na skutek rozpadu protonowanych *O*-diglikozydów, w widmie obserwowane są sygnały dla jonów $Y_1^{+1} Y_0^{+}$. W przypadku *O*-*C*-diglikozydów podczas fragmentacji powstają wyłącznie jony Y_1^{+} , natomiast w przypadku *C*-glikozydów obserwuje się fragmenty $[M+H]^{+}$ oraz jony fragmentacyjne powstałe na skutek krzyżowych rozpadów wiązań w cząsteczce cukru, a ponadto charakterystyczna jest tu utrata cząsteczek wody (Li i Claeys, 1994).

W ujemnym trybie jonizacji dla *C*-glikozydów obserwuje się wyłącznie macierzysty jon $[M-H]^{-}$, natomiast dla *O*-*C*-glikozydów charakterystyczny fragment stanowią także jony Y_1^{-} . Średnia intensywność pików dla jonów Y_1^{-} powyżej 90% jest typowa dla di-*O*-*C*-glikozydów. Jest ona o wiele słabsza w przypadku *O*-*C*-

diglikozydów, dla których główny jon fragmentacyjny stanowi $[Y-H_2O]^-$. Zarówno podczas fragmentacji deprotonowanych *O*-diglikozydów podstawionych w jednej pozycji jak i di-*O*-glikozydów podstawionych w różnych pozycjach w widmie obserwowane są przede wszystkim piki jonów Y_1^- i Y_0^- (Becchi i Fraise, 1989; Cuyckens i wsp. 2000). W przypadku di-*O*-glikozydów fragment Y_1^- dominuje w widmie dwu – , a nawet trzykrotnie nad produktem Y_0^- , podczas gdy dla *O*-diglikozydów stosunek ten jest odwrotny (Rycina 19). Analogicznie w widmach di-*C-O*-glikozydów jon Y_0^- charakteryzuje się największą intensywnością, natomiast w przypadku *C-O*-diglikozydów średnia intensywność piku odpowiadającego fragmentowi Y_0^- jest stosunkowo niewielka (Li i Claeys, 1994; Ferreres i wsp., 2004; Ferreres i wsp. 2007).



Rycina 19. Widmo masowe w trybie jonów ujemnych dla (a) 3-*O*-soforozydu kemferolu i (b) 3,7-*O*-diglukozydu kemferolu, prezentujące diagnostyczne różnice związane z intensywnością fragmentów Y_0^- i Y_1^- (Ferreres i wsp., 2004).

Obecność fragmentu Z_1 wskazuje, że jedna grupa cukrowa przyłączona jest do innej cząsteczki cukru, a nie łączy się bezpośrednio z aglikonem. Sposób przyłączenia cząsteczki cukru do aglikonu może być ponadto wnioskowany na podstawie obserwacji w widmie charakterystycznych jonów nieparzystoelektronowych. Dla di-*O*-glikozydów obserwowano fragmenty $[Y_1-H]^-$ oraz $[Y_0-2H]^-$, natomiast w widmach *O*-diglikozydów obecne były tylko fragmenty $[Y_0-H]^-$. Różnice związane z miejscem glikozylacji aglikonu można również określić na podstawie obecności lub braku charakterystycznych fragmentów w widmach CID dla negatywnego trybu jonizacji. Według danych literaturowych jon $[Y_0-CO]^-$ jest obserwowany tylko dla 7-*O*-monoglikozydów flawonoli, natomiast fragment $[Y_0-2H-CO]^-$ był opisywany wyłącznie dla widm MS/MS 3-*O*-monoglikozydów (Ablajan i wsp., 2006).

Informacje na temat miejsca glikozylacji mogą być ponadto uzyskane poprzez analizę widm CID dla jonów $[M+Na]^+$. Obecność fragmentu odpowiadającego pierścieniowi B, który zawiera cząsteczkę cukru jasno wskazuje na 4'-*O*-glikozylację. Z kolei jego oderwanie od potomnego jonu aglikonu sugeruje 3-*O*-glikozylację.

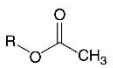
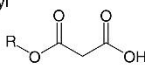
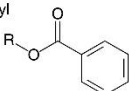
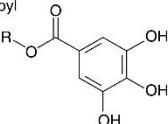
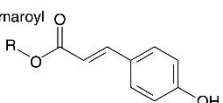
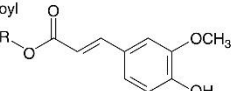
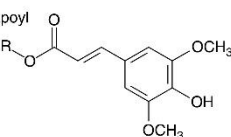
W przypadku 7-*O*-glikozylacji utrata fragmentu odpowiadającego pierścieniowi B obserwowana jest zarówno dla jonu macierzystego $[M+Na]^+$ jak i potomnego jonu aglikonu (Vukics i Guttman, 2008).

Rodzaj cząsteczki cukru w *O*-glikozydach może być określony na podstawie odszczepienia neutralnych fragmentów o określonej masie: -132, -146 -162 u (fragmenty B₁) określających odpowiednio: pentozę, deoksyheksozę oraz heksozę. W przypadku glukuronidów charakterystyczna jest utrata obojętnego fragmentu o stałej masie -176 u, natomiast dla *C*-glikozydów typowe jest oderwanie fragmentu -120 u (heksoza) i -122 u (deoksyheksoza) (Wolfender i wsp., 1992).

Zastosowanie spektrometrii mas umożliwia także rozróżnienie pomiędzy połączeniami cukrowymi 1→2 i 1→6. Stosunek Y_0^+/Y_1^+ jest zawsze większy dla połączenia 1→2. W jednym z przeprowadzonych badań porównano widma CID dla flawonoidów podstawionych neohesperydozą (ramnozylo-(α1→2)-glukoza) lub rutynożą (ramnozylo-(α1→6)-glukoza). W przypadku podstawienia cząsteczką neohesperydozy obserwowany w widmie stosunek jonów Y_0^+/Y_1^+ był wyższy niż dla podstawienia rutynożą. Ponadto dla deprotonowanych flawonoidów z przyłączoną cząsteczką *O*-neohesperydozy jon $^{0,2}X_0^-$ posiadał masę m/z wyższą o 146 u w porównaniu z jonem $^{0,2}X_0^-$ związku podstawionego *O* – rutynożą. Wynika to z faktu, że terminalna cząsteczka ramnozy nie ulega oderwaniu w przypadku występowania wiązania międzycukrowego 1→2 (Cuyckens i wsp., 2001). Podczas gdy dla rozerwania wiązania 1→2 charakterystyczne jest występowanie w widmie piku odpowiadającego fragmentowi $^{0,2}X_0^-$, w przypadku rozerwania innych połączeń (1→3, 1→4, 1→6) brak charakterystycznych produktów rozpadu (Vukics i Guttman, 2008).

W przypadku niektórych badań spektrometria mas posłużyła również do identyfikacji związków flawonoidowych, których reszty cukrowe były dodatkowo acylowane. Struktura grupy acylowej może być określona na podstawie utraty obojętnych fragmentów charakterystycznych dla grup acylowych lub acylowanych reszt cukrowych (Rycina 20). Specyficzne produkty fragmentacji obserwowane są m.in. w niskoenergetycznych widmach CID dla jonów $[M+H]^+$ i $[M+Na]^+$. Dokładne miejsce przyłączenia grupy acylowej do reszty cukrowej na podstawie widma MS jest trudne do określenia, jednak według danych literaturowych najczęstszą wskazywaną pozycją podstawienia jest pozycja 6 w przypadku heksozy (Cuyckens, 2004). Nie można jednak wykluczyć możliwości przyłączenia w innych miejscach. Jedynie w przypadku, gdy

w widmie obecny jest fragment $^{0,4}X$, lokalizacja grupy acylowej w pozycji 6 może być potwierdzona (Bylka i wsp., 2002).

Acyl group	Characteristic fragments
Acetyl 	$[M + H - \text{acetylhexose}]^+$: -204 u
Malonyl 	$[M \pm H - \text{CO}_2]^-$: -44 u $[M + H - \text{malonyl}]^+$: -86 u $[M + H - \text{malonylhexose}]^+$: -248 u
Benzoyl 	$[M + H - \text{benzoylhexose}]^+$: -266 u Benzoyl ⁺ at <i>m/z</i> 105 Benzoylhexose ⁺ at <i>m/z</i> 267
Galloyl 	$[M \pm H - \text{galloyl}]^-$: -152 u $[M - H - \text{gallic acid}]^-$: -170 u $[M + H - \text{galloylhexose}]^+$: -314 u $[\text{Gallic acid} - \text{H}]^-$ at <i>m/z</i> 169
Coumaroyl 	$[M + H - \text{coumaroyl}]^+$: -146 u $[M + H - \text{coumaroylhexose}]^-$: -308 u
feruloyl 	$[M \pm H - \text{feruloyl}]^+$: -176 u $[M \pm H - \text{feruloylhexose}]^+$: -338 u Feruloyl ⁺ at <i>m/z</i> 177 Ferulic acid ⁺ at <i>m/z</i> 194 Feruloylhexose ⁺ at <i>m/z</i> 339
Sinapoyl 	$[M \pm H - \text{sinapoyl}]^+$: -206 u $[M \pm H - \text{sinapoylhexose}]^+$: -368 u Sinapoyl ⁻ at <i>m/z</i> 207 Sinapic acid ⁺ at <i>m/z</i> 224 Sinapoylhexose ⁺ at <i>m/z</i> 369 Sinapoylhexose ⁻ at <i>m/z</i> 367

Rycina 20. Grupy acylowe najczęściej podstawiające cukrowe cząsteczki flawonoidów oraz ich charakterystyczne jony fragmentacyjne obserwowane w widmach CID (Cuyckens, 2004).

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Objaśnienia skrótów stosowanych w pracy

A	absorbancja
AA	aktywność antyoksydacyjna
BHA	butylohydroksyanizol
CC	chromatografia kolumnowa
DMEM	pożywka Dulbecco zmodyfikowana przez Eagle'a (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
cz.d.a.	czysty do analizy
DMSO	dimetylosulfotlenek
DPPH	test z użyciem rodnika 1,1 - difenylo - 2-pikrylohydrazylu
FRAP	test oznaczania zdolności redukowania jonów żelaza (ang. <i>ferric ion reducing antioxidant parameter</i>)
GAE	równoważnik kwasu galusowego (ang. <i>gallic acid equivalent</i>)
HaCaT	immortalizowane prawidłowe ludzkie keratynocyty
J	stała sprzężenia
MS	spektrometria mas (ang. <i>mass spectrometry</i>)
MTT	bromek (3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenyltetrazolu)
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
PBS	zbuforowany fizjologiczny roztwór soli o pH 6,9
R²	kwadrat współczynnika korelacji
S	odchylenie standardowe
S_{śr}	odchylenie standardowe średniej
TLC	chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>thin layer chromatography</i>)
TNFα	czynnik martwicy guza (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)
VCE	równoważnik witaminy C
Wz	współczynnik zmienności

8. METODYKA BADAŃ

8.1. Izolacja i identyfikacja flawonoidów

8.1.1. Odczynniki

W prowadzonych badaniach fitochemicznych wykorzystywano odczynniki czyste (cz.) i czyste do analizy (cz.d.a.).

- chlorek glinu (AlCl_3), Sigma-Aldrich
- chloroform (CHCl_3) cz.d.a., POCH
- eter dietylowy (Et_2O) cz.d.a., POCH
- kwas mrówkowy 99% (HCO_2H) cz., POCH
- kwas octowy lodowaty 99,5% (HOAc) cz.d.a., POCH
- metanol (MeOH) cz.d.a., POCH
- Naturstoffreagenz A (ester aminoetylowy kwasu difenyloborowego, NA), Roth
- octan etylu (EtOAc) cz.d.a., POCH
- wodorotlenek potasu (KOH)

8.1.2. Podłoża

- bibuła Whatman nr 1, Whatman
- bibuła Whatman nr 3, Whatman
- celuloza Whatman CF 11, Whatman
- żel krzemionkowy (30-70 mesh), Merck
- celuloza mikrokrystaliczna Avicel, Merck
- płytki aluminiowe pokryte celulozą DC-Allufolien Cellulose (grubość warstwy adsorbentu 0,1 mm), Merck
- Sephadex LH-20, Sigma-Aldrich (grubość ziaren 25-100 μm)

8.1.3. Aparatura

- lampa UV 366, Uvitec

- łaźnia ultradźwiękowa, Elma S 180H, Elmasonic
- spektrometr magnetycznego rezonansu jądrowego: Varian 300 MHz, Bruker Avance II 400 MHz i Bruker Avance III 500 MHz
- system ekstrakcji do fazy stałej (System SPE 12-G), Baker
- kolumnienki SPE Bond Elut C18, Agilent
- waga analityczna LE225D-0CE, Sartorius
- Rotavapor R-210, Büchi

8.1.4. Surowiec

Materiał do badań stanowiło wysuszone ziele *Axyris amaranthoides* L. (*Chenopodiaceae*) zebrane w okresie kwitnienia rośliny. Zbioru dokonano na przełomie lipca i sierpnia 2012 roku z upraw prowadzonych przez Pana mgr Tomasza Haake w ogrodzie przy Katedrze i Zakładzie Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych UMP.

8.1.5. Metody chromatograficzne

8.1.5.1. Chromatografia planarna

8.1.5.1.1. Chromatografia bibułowa (PC)

a) faza ruchoma:

- **S₁** HOAc-H₂O (15:85)
- **S₂** HOAc-H₂O (30:70)
- **S₃** EtOAc-HCO₂H-H₂O (10:2:3) (faza organiczna)
- **S₄** n-BuOH-HOAc-H₂O (4:1:2) (faza organiczna)
- **S₅** H₂O

b) odczynniki wywołujące:

- metanolewy roztwór KOH (1mol/l)
- 1% metanolewy roztwór AlCl₃
- 0,1% metanolewy roztwór Naturstoffreagenz A (NA)

Chromatografia bibułowa wykorzystywana była do analizy wyciągów podstawowych oraz kontroli rozdziału mieszanin flawonoidów na kolumnach chromatograficznych.

Otrzymane chromatogramy rozwijano w wysyconych odpowiednim układem szklanych kamerach, w temperaturze pokojowej, metodą jednokierunkową wstępującą. Po rozwinięciu chromatogramów pozostawiano je do wysuszenia w warunkach naturalnych, a następnie analizowano w świetle dziennym i świetle lampy UV 366 nm przed i po spryskaniu odczynnikami wywołującymi.

8.1.5.1.2. Preparatywna chromatografia bibułowa (PPC)

Preparatywna chromatografia bibułowa zastosowana została do rozdziału frakcji zawierających związki flawonoidowe, których nie udało wyodrębnić się na kolumnach.

Poddawane rozdziałowi frakcje nanoszono na bibułę chromatograficzną pasmowo i rozwijano metodą jednokierunkową wstępującą w temperaturze pokojowej w układach S_1 i S_2 . Po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogramy analizowano w świetle lampy UV 366 nm. Pasma związków flawonoidowych fluoryzujące na brunatno wycinano i przenoszono do kolbki okrągłodennej, po czym zalewano je kolejno dwukrotnie metanolem, a następnie mieszaniną metanol:woda (1:1) i każdorazowo wymywano na łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Eluaty poddawano sączeniu, przesącz zagęszczano w wyparce próżniowej i poddawano kontroli chromatograficznej technikami TLC i PC, stosując odpowiednie układy rozpuszczalników.

8.1.5.1.3. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

a) faza ruchoma

- **S₆** HOAc-H₂O (15:85)
- **S₇** HOAc-H₂O (30:70)
- **S₈** EtOAc-HCO₂H-H₂O (10:2:3) (faza organiczna)
- **S₉** n-BuOH-HOAc-H₂O (4:1:2) (faza organiczna)

b) odczynniki wywołujące:

- metanолоwy roztwór KOH (1mol/l)
- 1% metanолоwy roztwór AlCl₃
- 0,1% metanолоwy roztwór Naturstoffreagenz A (NA)

Technikę chromatografii cienkowiekowej stosowano w celu analizy frakcji otrzymanych w wyniku rozdziału na kolumnach wyciągu podstawowego oraz do kontroli jednorodności wyizolowanych związków.

Płytki chromatograficzne rozwijane były w szklanych kamerach wysyconych odpowiednim układem z zastosowaniem techniki wstępującej, w temperaturze pokojowej i przy ciśnieniu atmosferycznym. Po rozwinięciu chromatogramów poddano je wysuszeniu w warunkach naturalnych, a następnie analizowano podobnie jak w przypadku chromatogramów bibułowych (rozdz. 8.1.5.1.1.).

8.1.5.1.4. Preparatywna chromatografia cienkowiekowa (PTLC)

Technikę preparatywnej chromatografii cienkowiekowej wykorzystano do rozdziału frakcji flawonoidowych, których nie udało się wyizolować za sprawą chromatografii kolumnowej.

Poddawane rozdziałowi frakcje nanoszono na szklane płytki pokryte wcześniej warstwą celulozy mikrokryształicznej zawieszanej w metanolu. Płytki rozwijano metodą jednokierunkową wstępującą w temperaturze pokojowej w układach S₆ lub S₇. Po rozwinięciu, wysuszone chromatogramy analizowano w świetle lampy UV 366 nm. Pasma celulozy fluoryzujące na brunatno zeszkrobywano i przenoszono do kolbki okrągłodennej, po czym zalewano ją kolejno dwukrotnie metanolem, a następnie mieszaniną metanol:woda (1:1) i każdorazowo wymywano na łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Eluaty sączono, przesącz zagęszczano w wyparce próżniowej i poddawano kontroli chromatograficznej technikami TLC i PC, stosując odpowiednie układy rozpuszczalników.

8.1.5.2. Chromatografia kolumnowa (CC)

a) faza ruchoma:

- kolumny wypełnione celulozą
 - **S₁₀** EtOAc-MeOH-H₂O (100:6:6)
 - **S₁₁** EtOAc-MeOH-H₂O (100:10:9,5)
 - **S₁₂** EtOAc-MeOH-H₂O (100:16:13)
 - **S₁₃** EtOAc-MeOH-H₂O (100:18:15)
 - **S₁₄** MeOH
- kolumny wypełnione żelem krzemionkowym
 - **S₁₅** mieszanina CHCl₃-MeOH (zawierająca od 0 do 30% MeOH)
- kolumny wypełnione Sephadexem LH-20
 - **S₁₆** mieszanina MeOH z H₂O (zawierająca od 0 do 50% MeOH)
 - **S₁₇** MeOH
 - **S₁₈** H₂O
 - **S₁₉** mieszanina MeOH z H₂O (zawierająca od 0 do 40% MeOH)

Do przeprowadzenia kolumnowej chromatografii ciekowej stosowano kolumny szklane o różnej długości i średnicy. Technikę tę wykorzystywano do rozdzielenia wyciągów podstawowych na frakcje, a następnie pojedyncze związki flawonoidowe (kolumny celulozowe, kolumny żelowe). Ponadto metoda ta posłużyła do oczyszczania jednorodnych frakcji (kolumny wypełnione Sephadexem LH-20).

Podłoża nanoszono na kolumnę w formie zawiesiny w fazie ruchomej, którą stosowano do elucji. Badane wyciągi, frakcje i wyodrębnione związki adsorbowano na małej ilości adsorbentu, odparowywano rozpuszczalnik i nanoszono na kolumnę. Kontrolę rozdzielenia na kolumnach prowadzono z wykorzystaniem światła lampy UV 366 nm, analizując otrzymane frakcje metodą chromatografii bibułowej (PC) w układach S₁-

S₄ i chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w układach S₁-S₅. Eluaty o podobnym składzie łączono, a następnie zagęszczano w temperaturze ok. 50°C i pod zmniejszonym ciśnieniem.

8.1.6. Analizy spektralne

8.1.6.1. Spektrofotometria absorpcyjna w nadfiolecie (UV)

Widma wyizolowanych związków wykreślano w aparacie UV/VIS Perkin Elmer Lambda 35 wykorzystując oprogramowanie UV WinLab 2.80. Pomiaru dokonywano w 0,5 cm kuwetach kwarcowych przed i po dodaniu odczynników kompleksotwórczych i jonizujących. Dla każdego związku wykreślono sześć widm w zakresie 500-200 nm, począwszy od:

- a) metanolowego roztworu badanego związku

oraz po dodaniu do niego:

- b) 3 kropli 5% metanolowego roztworu metylanu sodu (NaOMe)
- c) nadmiaru bezwodnego octanu sodu (NaOAc)
- d) nadmiaru bezwodnego octanu sodu i 5 kropli nasyconego, metanolowego roztworu kwasu borowego (NaOAc/H₃BO₃)
- e) 5 kropli 5% metanolowego roztworu chlorku glinu (AlCl₃)
- f) 5 kropli 5% metanolowego roztworu chlorku glinu i 5 kropli 20% wodnego roztworu HCl (AlCl₃/HCl).

8.1.6.2. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego NMR

Analizy metodą NMR przeprowadzono w Pracowni NMR Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Widma 1D (¹H-NMR, ¹³C-NMR) wykonano w spektrometrach Varian 300 MHz, Bruker Avance II 400 MHz i Bruker Avance III 500 MHz, natomiast widma 2D (HMBC NMR) na aparacie Bruker Avance II 400 MHz. Jako rozpuszczalnik wykorzystywano deuterowany dimetylosulfotlenek (DMSO-*d*₆) lub metanol (CD₃OD), a wzorzec wewnętrzny stanowił tetrametylosilan (TMS), względem którego określano przesunięcia chemiczne.

8.1.6.3. Ultrasprawną chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas UPLC-Q-TOF-MS/MS

Analizy metodą UPLC-Q-TOF-MS/MS przeprowadzono w Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu we współpracy z dr Łukaszem Marczakiem¹.

Wszystkie wyizolowane związki jak i frakcje zawierające związki flawonoidowe analizowano za pomocą układu LC/MS składającego się z chromatografu cieczowego Waters Acquity UPLC (Waters, Milford MA, USA) połączonego ze spektrometrem masowym typu Q-TOF, model micrOTOF-Q (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy). Rozdziały prowadzono na kolumnie Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m; Agilent) przy przepływie 0,6 ml/min, w układzie dwóch rozpuszczalników: A (99,5% H₂O, 0,5% kwas mrówkowy (v/v)) oraz B (99,5% acetonitryl, 0,5% kwas mrówkowy (v/v)). Wyciek z kolumny rozdzielano w stosunku 3:2, aby umożliwić przepływ końcowy w źródle jonów ESI o wartości około 0,2 ml/min. Stosowano następujący gradient rozpuszczalników: 0-8 min; liniowy wzrost od 5 do 30% fazy B, 8-10 min wzrost liniowy do 95% fazy B, 10-12 min przepływ izokratyczny przy 95% fazy B i na koniec w celu ustabilizowania kolumny przed kolejnym nastrzykiem następował powrót do stanu początkowego.

Źródło ESI spektrometru micrOTOF-Q operowało przy napięciach \pm 4,5 kV, dodatkowo wykorzystywano azot przy ciśnieniu 1,6 bar do rozpylania cieczy oraz jako gaz osuszający przy przepływie 8,0 L/min w temperaturze 220°C. Stosowano kalibrację zewnętrzną z użyciem mieszaniny kalibracyjnej zawierającej klastry mrówczanu sodu. Dodatkowo, bezpośrednio przed każdą analizą, przez użycie zaworu przekazującego przepływ na pompę strzykawkową, podawano mieszaninę kalibracyjną w celu umożliwienia kalibrowania widm w późniejszym procesie edytowania danych. Kalibracja pozwalała na pomiar mas z dokładnością poniżej 10 ppm. Widma MS/MS zbierano z częstotliwością 1 Hz dla jonów wybranych automatycznie na podstawie widma MS. Energia fragmentacji była zależna od masy cząsteczkowej badanych związków i zawierała się w przedziale 10-25 eV. Uzyskane widma charakteryzowały się rozdzielczością powyżej 10000 (FWHM, szerokość połówkowa), a do zbierania danych stosowano program microTOF Control w wersji 2.3. Dane analizowano za pomocą pakietu DataAnalysis wersja 4.1, dostarczonego przez firmę Bruker Daltonics.

¹ Serdecznie dziękuję Panu dr Łukaszowi Marczakowi za pomoc w interpretacji widm MS.

Profile metabolitów w próbkach rejestrowano zarówno w trybie jonów dodatnich jak i w trybie jonów ujemnych.

8.1.7. Przygotowanie i frakcjonowanie wyciągu podstawowego

500 g wysuszonego ziela *A. amaranthoides* poddano 24-godzinnej maceracji metanolem, a następnie kolejno trzykrotnej ekstrakcji metanolem oraz trzykrotnej ekstrakcji mieszaniną metanol-woda (1:1) na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną, każdorazowo w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika w czasie 1 godziny. Dla każdego z otrzymanych wyciągów przeprowadzono kontrolę chromatograficzną. Obraz chromatograficzny wszystkich otrzymanych ekstraktów był podobny, wobec tego ekstrakty połączono i zagęszczono w wyparce próżniowej pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości ok. 100 ml. Następnie zagęszczony wyciąg zalano 100 ml gorącej wody i pozostawiono na 24 godziny, celem strącenia substancji balastowych. W kolejnym kroku całość przecedzono, a przesącz wytrząsano kolejno rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności: chloroformem (15 razy), eterem dietylowym (20 razy), octanem etylu (22 razy). Otrzymane frakcje (chloroformowa, eteru dietylowego i octanu etylu) oraz pozostałość wodna po wytrząsaniu (frakcja wodna) były kontrolowane chromatograficznie.

Frakcję eteru etylowego, ze względu na małą ilość flawonoidów, wykluczono z kolejnych etapów badań. Dalszemu rozdziałowi na kolumnach poddano frakcję chloroformową, octanu etylu oraz frakcję wodną.

8.2. Badania ilościowe

8.2.1. Odczynniki i substancje wzorcowe

Oznaczanie zawartości sumy polifenoli

- kwas galusowy, Sigma-Aldrich
- odczynnik *Folin-Ciocalteu*, Merck
- węglan sodu (Na_2CO_3), POCH
- metanol cz.d.a., POCH
- woda destylowana

Oznaczanie zawartości flawonoidów

- 7-glukozyd apigeniny (ze zbioru KiZ Farmakognozji UMP)
- kwas octowy lodowaty 99,5% (HOAc) cz.d.a., POCH
- kwas mrówkowy 99% (HCO₂H) cz., POCH
- kwas borowy (H₃BO₃) cz.d.a., POCH
- kwas szczawiowy (C₂H₂O₄) cz.d.a., POCH
- metanol cz.d.a., POCH
- woda destylowana

8.2.2. Aparatura

- spektrofotometr UV/VIS Lambda 35, Perkin-Elmer
- wytrząsarka Laboratory Shaker type 358S, Elpan
- waga analityczna LE225D-0CE, Sartorius
- waga apteczna PS 2100/C/2, Radwag
- wyparka próżniowa Rotavapor R-210, firmy Büchi

8.2.3. Oznaczanie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem *Folin-Ciocalteu* (FC)

Całkowitą zawartość sumy polifenoli oznaczano wg [Shi i wsp. \(2011\)](#), na podstawie zmodyfikowanej metody [Singleton i wsp. \(1999\)](#). Oznaczenie prowadzono wykorzystując odczynnik *Folin-Ciocalteu* (FC) oraz 20% roztwór węgla sodu (Na₂CO₃). Na skutek reakcji zachodzącej pomiędzy FC, Na₂CO₃ oraz obecnymi w badanych wyciągach związkami o charakterze fenoli, dochodziło do powstawania barwnego, niebieskiego kompleksu, wykazującego maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 760 \text{ nm}$ ([Shi i wsp., 2011](#)).

8.2.3.1. Przygotowanie wzorcowego roztworu kwasu galusowego

100 mg wzorcowego kwasu galusowego rozpuszczono w metanolu, w kolbie miarowej o pojemności 50 ml, otrzymując roztwór w stężeniu 2 mg/ml. Następnie do 7 owiniętych w folię aluminiową kolbek miarowych o pojemności 5 ml przeniesiono

kolejno 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4 ml roztworu wzorcowego kwasu galusowego i uzupełniono do współmierności metanolem, uzyskując stężenia w zakresie 0,04-0,16 mg/ml kwasu galusowego.

8.2.3.2. Przygotowanie wyciągów do badań

Stężenia wyciągów do badań zostały ustalone doświadczalnie tak, aby wartość mierzonej absorbancji mieściła się w zakresie pomiędzy 0,3-0,8.

Wyciąg metanolowy (W_p)

5 g rozdrobnionego ziela *A. amaranthoides* ekstrahowano dwukrotnie 150 ml metanolu na wrzącej łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną, każdorazowo przez 1 godzinę w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Otrzymane wyciągi połączono i przecedzono przez watę, a następnie zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce próżniowej, uzyskując 0,8607 g suchej masy. 100 mg wyciągu (W_p) rozpuszczono w niewielkiej objętości metanolu, a następnie przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełniono do współmierności, uzyskując roztwór o stężeniu 4 mg wyciągu/ml.

Odwar (O_p)

5 g rozdrobnionego ziela *A. amaranthoides* zalano 150 ml wody destylowanej i ogrzewano dwukrotnie przez 30 min na wrzącej łaźni wodnej w temperaturze 95° C. Uzyskane odwary połączono i przecedzono przez watę, a następnie zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce próżniowej, uzyskując 1,2343 g suchej masy. 75 mg wyciągu (O_p) rozpuszczono w niewielkiej objętości metanolu, a następnie przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełniono do współmierności, uzyskując roztwór o stężeniu 3 mg wyciągu/ml.

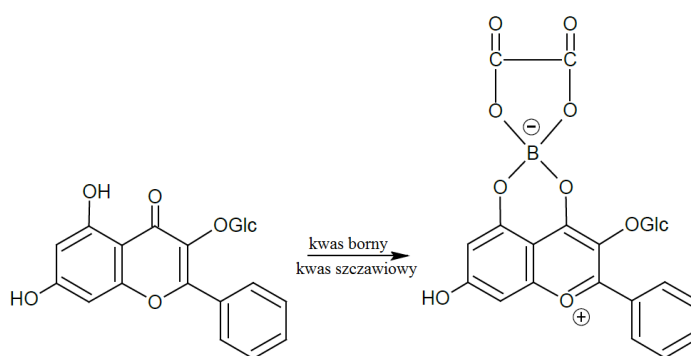
8.2.3.3. Przebieg oznaczenia

Do 10 ml kolbek miarowych owiniętych w folię aluminiową przeniesiono 4 ml wody destylowanej i 0,5 ml roztworu wzorcowego kwasu galusowego lub badanych

wyciągów w odpowiednim stężeniu. Następnie do każdej kolbki dodawano 0,5 ml odczynnika *Folin-Ciocalteu*, a po upływie minuty 2 ml 20% Na_2CO_3 . Wszystkie kolbki uzupełniono wodą destylowaną do współmierności i energicznie mieszano. Po 30 minutach od dodania węgla sodu prowadzono pomiar absorpcji dla poszczególnych prób przy długości fali $\lambda = 760 \text{ nm}$ wobec próby ślepej, w której badane wyciągi zastąpiono 0,5 ml metanolu (7 ml wody + 0,5 ml FC + 0,5 ml metanolu + 2 ml 20% Na_2CO_3). Liczba pomiarów dla każdego ze stężeń badanych wyciągów wynosiła 12, natomiast w przypadku wzorcowego kwasu galusowego dla każdej z prób otrzymano po 6 wyników. Całkowitą zawartość sumy polifenoli obliczono na podstawie krzywej wzorcowej dla kwasu galusowego.

8.2.4. Oznaczanie zawartości flawonoidów (Ph. Eur. VII)

Oznaczanie zawartości flawonoidów w surowcu prowadzono wykorzystując metodę farmakopealną opisaną w Ph. Eur. VII dla *Violae herba cum flore* (Ph. Eur. VII, 2010), zmodyfikowaną przez Siatka i Kašparová (2010). W metodzie tej wykorzystuje się charakterystyczną dla flawonoidów reakcję tworzenia barwnych, zielonożółtych kompleksów z kwasem borowym w obecności kwasu szczawowego, dla których pomiaru absorpcji dokonuje się przy długości fali $\lambda = 405 \text{ nm}$ (Rycina 21) (Strzelecka i wsp., 1982).



Rycina 21. Tworzenie kompleksu w wyniku reakcji flawonoidu z kwasem borowym i szczawowym.

8.2.4.1. Przygotowanie wzorcowego roztworu 7-glukozydu apigeniny

Oważono 5 mg wzorcowego 7-glukozydu apigeniny, przeniesiono do kolbki miarowej o pojemności 5 ml i dodano niewielką objętość metanolu. Po rozpuszczeniu uzupełniono do współmierności, uzyskując w ten sposób roztwór wzorcowy o stężeniu 1 mg/ml. Następnie do 6 kolbek miarowych o pojemności 25 ml przeniesiono kolejno 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ml roztworu wzorcowego i dodano mieszaniny o składzie 10 cz. metanolu i 100 cz. lodowatego kwasu octowego tak, by objętość każdej próby wynosiła 11 ml. W kolejnym etapie do każdej z kolbek dodano 10 ml roztworu zawierającego 25 g/l kwasu borowego i 20 g/l kwasu szczawiowego w bezwodnym kwasie mrówkowym. Na końcu wszystkie kolbki uzupełniono bezwodnym kwasem octowym do objętości 25 ml. Badane próby zawierały 7-glukozyd apigeniny w zakresie stężeń 2-20 $\mu\text{g/ml}$.

8.2.4.2. Przygotowanie wyciągu do badań

0,3 g surowca zalano 40 ml 60 % metanolu i ekstrahowano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika na łaźni wodnej przez 10 min, co jakiś czas mieszając. Otrzymany wyciąg ostudzono i przesączono przez watę do kolbki miarowej na 100 ml, a pozostałość (wraz z watą) przeniesiono do kolby okrągłodennej i poddano ponownej ekstrakcji w takich samych warunkach jak poprzednio. Otrzymany ekstrakt, podobnie jak pierwszy wyciąg, przesączono do tej samej kolbki miarowej. Surowiec pozostały w kolbie przemyto 60 % metanolem i przesączono do połączonych wyciągów. Całość uzupełniono do współmierności i poddano jeszcze jednej filtracji, uzyskując roztwór podstawowy o stężeniu 3 mg/ml.

8.2.4.3. Przebieg oznaczenia

5 ml roztworu podstawowego przeniesiono do kolbki okrągłodennej i odparowano do sucha w wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w 8 ml mieszaniny składającej się w 10 cz. z metanolu i 100 cz. w bezwodnego kwasu octowego, a następnie przeniesiono do kolbki miarowej o pojemności 25 ml. Dodatkowo kolbkę, w której zagęszczano roztwór podstawowy przemyto 3 ml powyższej mieszaniny i przeniesiono do tej samej kolbki miarowej. W dalszej części doświadczenia do badanej próby dodano 10 ml roztworu zawierającego 25 g/l kwasu borowego i 20 g/l kwasu

szczawiowego w bezwodnym kwasie mrówkowym, po czym uzupełniono kolbkę do współmierności bezwodnym kwasem octowym. Pomiaru absorbancji dla roztworu badanego (12 powtórzeń) i wzorcowego (6 powtórzeń dla każdej próby) prowadzono przy długości fali $\lambda = 405$ nm wobec próby odniesienia, którą stanowiła mieszanina otrzymana jak w przypadku próby badanej z tą różnicą, że 10 ml mieszaniny kwasu bornego i szczawiowego w bezwodnym kwasie mrówkowym zastąpiono samym bezwodnym kwasem mrówkowym. Całkowitą zawartość flawonoidów obliczono na podstawie krzywej wzorcowej dla 7-glukozydu apigeniny.

8.3. Badania aktywności biologicznej

8.3.1. Odczynniki, bufony, substancje i szczepy wzorcowe, pożywki

Badania aktywności antyoksydacyjnej

- DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyna), Sigma-Aldrich
- BHA (butylohydroksyanizol), Sigma-Aldrich
- kwas askorbinowy, Sigma-Aldrich
- kwas solny (odważka analityczna), POCH
- TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridylo)-1,3,5-triazyna), Sigma-Aldrich
- chlorek żelaza (III) uwodniony ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich
- octan sodu trójwodny ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), POCH
- kwas octowy lodowaty 99,5% (HOAc) cz.d.a., POCH
- metanol cz.d.a., POCH
- woda destylowana

Badanie aktywności przeciwzapalnej

Hodowla komórek HaCaT

Odczynniki:

- roztwór 0,25% trypsyny, do odklejania komórek
- PBS
- EDTA (sól dipotasowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego)

- pożywka DMEM z dodatkiem 5% FBS i antybiotyków
- PBS z dodatkiem 0,1% EDTA
- antybiotyki (amfoterycyna B, penicylina, streptomycyna)
- MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy)
- izo-PrOH zakwaszony stężonym HCl
- DMSO cz.d.a., POCH

Oznaczanie poziomu białek COX-2 i aktyny

Odczynniki:

- pożywka DMEM z dodatkiem 0,5% FBS
- TNF α
- PBS
- roztwór 0,25% trypsyny.

Bufory:

- TBS, pH 8,4
 - TRIS (Trisma Base) – 6,05 g
 - NaCl – 14,6 g
 - woda ultraczysta ad 500,0 ml
- TRIS, pH 9,5
 - TRIS (Trisma Base) - 6,05 g
 - woda ultraczysta ad 500,0 ml.
- DPBS-T, pH 7,4
 - KCl - 0,2 g
 - KH₃PO₄ - 0,2 g
 - NaCl - 6,0 g
 - Na₂PO₃·12 H₂O - 2,88 g
 - tween-20 - 500 ml
 - woda ultraczysta ad 1000,0 ml
- RIPA, pH 7,4
 - Tris-HCl 50 mM
 - NaCl 150 mM
 - NP-40 1%

- SDS 0,25%
- Na₂EDTA 1 mM
- PMSF 1 mM
- leupeptyna 1 µg/ml
- aprotynina 1 µg/ml
- pepstatyna 1 µg/ml
- Na₃VO₄ 1 mM
- NaF 1 mM
- do zagotowania białka 1:5 (loading buffer)
 - 1,25 M bufor TRIS - HCl (pH 6,8) - 2,5 ml
 - SDS - 20,0 g
 - 80% glicerol - 6,25 ml
 - DTT - 3,855 g
 - błękit bromofenolowy - 0,01 g
 - woda ultraczysta ad 100,0 ml
- do elektroforezy, pH 8,4
 - TRIS (Trisma Base) - 3,03 g
 - glicyna - 14,5 g
 - SDS - 1,0 g
 - woda ultraczysta ad 1000,0 ml
- do blotu, pH 8,4
 - TRIS (Trisma Base) - 3,03 g
 - glicyna - 14,5 g
 - SDS - 1,0 g
 - metanol - 200,0 ml
 - woda ultraczysta ad 1000,0 ml

Oznaczanie poziomu PGE₂

- pożywka DMEM z dodatkiem 0,5% FBS
- TNF α
- roztwór wywołujący AP-Conjugate-Substrate Kit, Bio-Rad

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej

- nystatyna, Sigma-Aldrich
- amikacyna, Sigma-Aldrich
- DMSO cz.d.a., POCH
- woda jałowa
- szczepy wzorcowe:
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 4163
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6749
 - *Candida albicans* ATCC 1023
 - *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533
 - *Trichophyton rubrum* ATCC TA 28188

8.3.2. Podłoża, żele

Badanie aktywności przeciwzapalnej

- płytki Prostaglandin E2 Express EIA Kit, Cayman Chemical
- żel poliakryloamidowy 10% Tris Ready Gel, Bio-Rad
- żel poliakryloamidowy 7,5% Tris Ready Gel, Bio-Rad

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej

- Trypticase Soy Agar (TSA) – bakterie
- Mueller-Hinton Bulion (MHB) – bakterie
- Sabouraud Dextrose Agar (SDA) – grzyby
- Sabouraud Dextrose Bulion (SDB) – grzyby

8.3.3. Aparatura

- spektrofotometr Tecan Infinite M200
- spektrofotometr UV/VIS Lambda 35, Perkin-Elmer
- aparat G-Box z programem do densytometrycznego pomiaru prążków GeneSnap, SynGene

- wirówka Thermo IEC CL31R
- wytrząsarka: Finepcr TW3T
- mikroskop: Nikon Eclipse TS100
- waga analityczna LE225D-0CE, Sartorius
- waga apteczna PS 2100/C/2, Radwag
- wyparka próżniowa Rotavapor R-210, Büchi
- wytrząsarka type 358S, Elpan

8.3.4. Badanie aktywności antyoksydacyjnej

8.3.4.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych i wyciągów do badań

W badaniu aktywności antyoksydacyjnej wykorzystano te same roztwory podstawowe (**W_P** i **O_P**), dla których oznaczano całkowitą sumę polifenoli metodą z odczynnikiem *Folin-Ciocalteu* (rozdz. 8.2.3.2.).

Ostateczne stężenia roztworów do badania otrzymano w wyniku rozcieńczenia roztworu podstawowego. Do kolbek miarowych o pojemności 10 ml przeniesiono kolejno w przypadku próby z rodnikiem DPPH^{*}: 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 ml roztworu podstawowego W_P i O_P, natomiast w przypadku badania aktywności antyoksydacyjnej metodą FRAP: 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 ml roztworu podstawowego W_P i O_P. Następnie kolbki uzupełniono metanolem do współmierności. Finalne stężenia badanych roztworów przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 2. Stężenia badanych wyciągów wykorzystane w badaniach aktywności antyoksydacyjnej.

Badane stężenie (mg/ml)									
Badanie aktywności antyoksydacyjnej metodą z odczynnikiem DPPH									
wyciąg i odwar	0,1875	0,375	0,75	1,5	3,0	6,0	9,0	12,0	15,0
Badanie aktywności antyoksydacyjnej metodą z odczynnikiem FRAP									
wyciąg i odwar	0,75	1,5	2,25	3,0	3,75	-	-	-	-

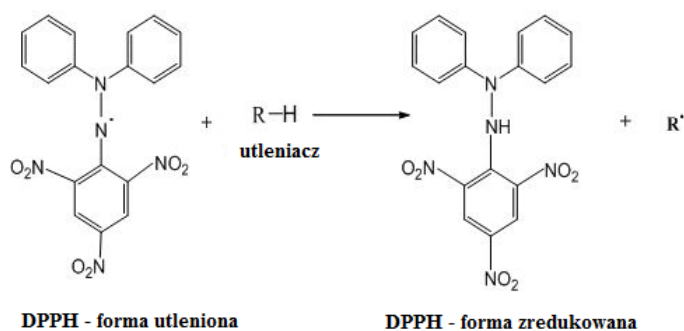
Stężenia roztworów substancji wzorcowych wykorzystanych w badaniach aktywności antyoksydacyjnej przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 3. Stężenia wzorców wykorzystanych w zastosowanych metodach badania aktywności antyoksydacyjnej

Badane stężenie (mg/ml)							
Badanie aktywności antyoksydacyjnej metodą z odczynnikiem DPPH							
wzorzec	BHA	0,00625	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2
	Wit. C	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
Badanie aktywności antyoksydacyjnej metodą z odczynnikiem FRAP							
wzorzec	Wit. C	0,015	0,03	0,06	0,09	0,12	

8.3.4.2. Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej metodą z zastosowaniem odczynnika DPPH

DPPH[•] (1,1-difenyl-2-pikrylohydrazyl) stanowi stabilny rodnik azowy. Roztwór rodnika DPPH[•] wykazuje barwę purpurową, a w wyniku redukcji pod wpływem przeciwutleniaczy przyjmuje zabarwienie jasnożółte (**Rycina 22**). Zastosowana w badaniu metoda polega na spektrofotometrycznym monitorowaniu zmiany zabarwienia ($\lambda = 517 \text{ nm}$). Stopień zmiany barwy roztworu DPPH[•] po dodaniu do niego roztworu zawierającego antyoksydanty stanowi miarę zdolności zmiatania wolnych rodników (Molyneux, 2004).

**Rycina 22.** Redukcja rodnika DPPH[•] pod wpływem związku o charakterze utleniacza.

8.3.4.2.1. Przygotowanie alkoholowego roztworu rodnika DPPH[•]

Do badania wykorzystywano 0,1 mM metanolowy roztwór DPPH[•] ($M=394,32$), który maksimum absorpcji wykazywał przy długości fali $\lambda = 517 \text{ nm}$. W tym celu odważono 3,94 mg związku i przeniesiono go do owiniętej folią aluminiową kolbki

miarowej o pojemności 100 ml. Substancję rozpuszczono w niewielkiej ilości metanolu, a po całkowitym rozpuszczeniu uzupełniono kolbkę do współmierności. Dla każdej serii oznaczeń roztwór rodnika DPPH[•] przygotowywano na ok. 1 godzinę przed rozpoczęciem badania.

8.3.4.2.2. Przebieg oznaczenia

Do 0,2 ml wyciągu lub roztworów związków wzorcowych o określonych stężeniach dodawano 1,4 ml metanolego roztworu DPPH[•]. Analizowane próby przygotowywano w fiolkach owiniętych folią aluminiową, a pomiaru absorbancji dokonywano wobec próby odniesienia (0,2 ml metanolu + 1,4 ml roztworu DPPH[•]) przy długości fali $\lambda = 517$ nm, po 30 minutach od dodania roztworu rodnika. Badanie prowadzono w jednorazowych kuwetach plastikowych. Zdolność redukcji rodnika DPPH[•] przez badane wyciągi oraz substancje wzorcowe obliczano wg wzoru:

$$A\% = [(A_{DPPH} - A_t) / A_{DPPH}] \times 100\%$$

gdzie:

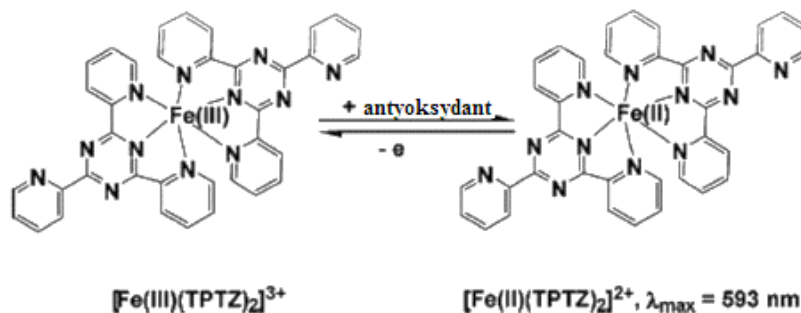
A_{DPPH} – absorbancja próbki kontrolnej,

A_t – absorbancja badanej próbki po upływie określonego czasu ($t = 30$ min).

Dla uzyskanych wyników wyznaczono wartość IC_{50} , którą obliczono z równania opisującego wykres zależności stopnia zmiatania rodnika DPPH[•] (%) od stężenia wyciągu/wzorca w badanej próbce. Otrzymane wyniki wyrażono ponadto jako równoważnik witaminy C.

8.3.4.3. Oznaczanie całkowitej zdolności redukcji jonów żelaza (III) (FRAP)

Zasada badania całkowitej aktywności oksydacyjnej metodą FRAP (*ang. ferric ion reducing antioxidant parameter*) opiera się na wyznaczeniu zdolności redukcji jonów Fe^{3+} do jonów Fe^{2+} , które są kompleksowane przez TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyna) z jednoczesnym wytworzeniem intensywnie niebieskiego zabarwienia o maksimum absorbancji przy długości fali $\lambda = 593$ nm (**Rycina 23**) (Wilczyńska, 2009).



Rycina 23. Schemat przebiegu redukcji jonów Fe^{3+} w metodzie FRAP.

8.3.4.3.1. Przygotowanie roztworów odczynników do badania

➤ Przygotowanie 300 mM buforu octanowego o pH = 3,6

Odważono 3,1 g trójwodnego octanu sodu ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) i przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 1000 ml, a następnie dodano 16 ml lodowatego kwasu octowego. Całość uzupełniono wodą destylowaną do współmierności, a następnie przeprowadzano kontrolę pH buforu, upewniając się, że jest ono równe 3,6.

➤ Przygotowanie 10 mM roztworu TPTZ w 40 mM HCl

Odważono 31,23 mg TPTZ ($M=312,33$) i przeniesiono do owiniętej folią aluminiową kolbki miarowej o pojemności 10 ml. Kolbkę uzupełniono do współmierności 40 mM HCl przygotowanym uprzednio z odważki analitycznej.

➤ Przygotowanie 20 mM wodnego roztworu FeCl_3

Odważono 54 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M=270,30$) i przeniesiono do owiniętej folią aluminiową kolbki miarowej o pojemności 10 ml. Kolbkę uzupełniono do współmierności wodą destylowaną.

➤ Przygotowanie mieszaniny FRAP

W celu otrzymania mieszaniny FRAP zmieszano 25 ml buforu octanowego o pH=3,6 oraz 2,5 ml 10 mM roztworu TPTZ w 40 mM HCl i 2,5 ml 20 mM wodnego roztworu $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

8.3.4.3.2. Przebieg oznaczenia

Oznaczenie prowadzono na podstawie zmodyfikowanej metody **Tiveron i wsp. (2012)**. Do 0,05 ml wyciągu w odpowiednim stężeniu lub analizowanej substancji wzorcowej dodawano 1,5 ml mieszaniny FRAP i po inkubowaniu przez 30 min na łaźni wodnej w temp. 37° C dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 593$ nm. Próby do badań przygotowywano w owiniętych folią aluminiową probówkach Eppendorfa, a absorbancję mierzono w jednorazowych kuwetach plastikowych. Potencjał antyoksydacyjny przeliczono na aktywność witaminy C, na podstawie sporządzonej krzywej kalibracyjnej (równoważnik witaminy C).

8.3.5. Badania aktywności przeciwzapalnej

Badanie aktywności przeciwzapalnej prowadzono Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UMP we współpracy z dr Michałem Cichockim² w oparciu o metodykę przedstawioną w pracy doktorskiej dr Justyny Chanaj-Kaczmarek (**Chanaj-Kaczmarek, 2013**).

8.3.5.1. Przygotowanie wyciągów do badań

Wyciąg metanolowy (W)

5 g rozdrobnionego surowca zalano 100 ml metanolu i przeprowadzono dwukrotną ekstrakcję, każdorazowo w temp. wrzenia rozpuszczalnika przez 1 godz. Otrzymane wyciągi połączono i zagęszczono do sucha, po czym rozpuszczono w ok. 50 ml wody dejonizowanej. Następnie przeniesiono rozpuszczony wyciąg do kolbki miarowej o pojemności 100 ml i uzupełniono wodą dejonizowaną do współmierności, otrzymując roztwór podstawowy o stężeniu 50 mg wyciągu/ml.

Odwar (O)

5 g rozdrobnionego surowca zalano 100 ml wody destylowanej i przeprowadzono dwukrotną ekstrakcję, każdorazowo w temp. wrzenia rozpuszczalnika przez 1 godz.

² Serdecznie dziękuję Panu dr Michałowi Cichockiemu za współpracę w realizacji badań aktywności przeciwzapalnej.

Otrzymane wyciągi połączono i zagęszczono do sucha, po czym rozpuszczono w ok. 50 ml wody dejonizowanej. Następnie przeniesiono rozpuszczony odwar do kolbki miarowej o pojemności 100 ml i uzupełniono wodą dejonizowaną do współmierności, otrzymując roztwór podstawowy o stężeniu 50 mg wyciągu/ml.

Uzyskane roztwory podstawowe posłużyły następnie do sporządzenia szeregu rozcieńczeń. Stężenia wykorzystane w badaniu wynosiły odpowiednio: 31; 25; 62,5; 125; 250; 500 i 1000 µg/ml.

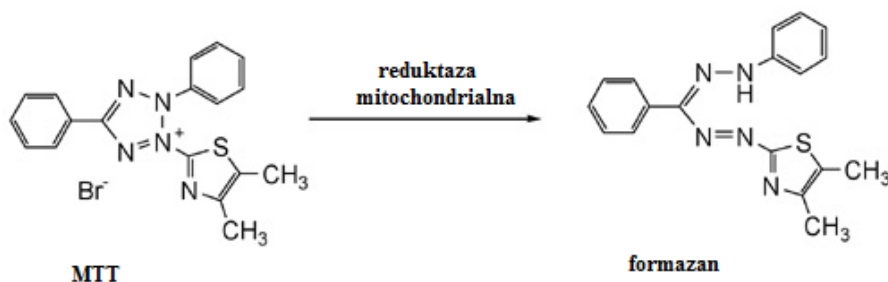
8.3.5.2. Hodowla komórek HaCaT

Komórki HaCaT hodowano w butelkach hodowlanych na płynnej pożywce DMEM, zawierającej dodatek antybiotyków i 10 % płodowej surowicy bydlęcej. Prowadzenie hodowli odbywało się w inkubatorze, w temp. 37° C i 5% CO₂, a co 2-3 dni wymieniano medium i inkubowano komórki przez 10 min w PBS z dodatkiem 0,1 % EDTA. W momencie uzyskania pojedynczej, ciągłej warstwy komórek, medium usunięto, a komórki dwukrotnie przemyto PBS, aby wypłukać pożywkę i usunąć martwe komórki. Zawiesinę komórek HaCaT uzyskano przez ich nadtrawianie w inkubatorze roztworem trypsyny, którego aktywność hamowano przez dodatek medium. Otrzymaną zawiesinę wirowano w probówce typu Falcon w temp. pokojowej w czasie 10 min przy 500xg. Liczenie komórek odbywało się przy użyciu komory Bürkera pod odwróconym mikroskopem. Supernatant usuwano, a zawiesinę komórek uzupełniano medium w celu otrzymania pożądanej CFU w 1 ml. Komórki wysiewano na płytki 96-cio dołkowe w ilości 20 000 CFU na dołek, po czym poddawano je 24-godzinnej inkubacji.

8.3.5.3. Badanie cytotoksyczności wyciągów z wykorzystaniem testu MTT

Test MTT może być wykorzystywany do określania żywotności komórek poprzez pomiar aktywności przemian energetycznych w mitochondriach. Mierzy on żywotność komórek za pomocą testu redukcji soli błękitu tetrazolowego (MTT) – żółtego, rozpuszczalnego w wodzie związku, do nierozpuszczalnego formazanu o barwie fioletowej (**Rycina 24**). Po rozpuszczenia soli w izopropanolu lub DMSO powstaje barwny roztwór, a intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do ilości

otrzymanego produktu. Metoda wykorzystująca test MTT zakłada, że powyższą reakcją są zdolne przeprowadzać tylko żywe komórki (Krzysztoń-Russjan i wsp., 2009).



Rycina 24. Przekształcenie MTT do formazanu.

8.3.5.3.1. Przebieg oznaczenia

Po 24-godzinnej inkubacji komórek wysianych na 96-cio dołkowe płytki zmieniano pożywkę (200 μ l) i dodawano wyciąg lub odwar z ziela *A. amaranthoides* w stężeniach 31; 25; 62,5; 125; 250; 500 i 1000 μ g/ml. Tak przygotowane płytki poddawano 72-godzinnej inkubacji, po czym studzienki przemywano dwukrotnie 200 μ l buforu PBS i dodawano roztwór MTT o stężeniu 0,5 mg/ml. Po kolejnej, 4-godzinnej inkubacji, pożywkę usuwano i celem rozpuszczenia otrzymanych kryształków formazanu, dodawano 200 μ l DMSO. W ostatnim etapie dokonywano pomiaru absorbancji (długość fali $\lambda = 570$ nm, długość fali odniesienia $\lambda = 690$ nm). Wyniki przedstawiono jako procent grupy kontrolnej, którą stanowiły komórki inkubowane z DMSO. Dla każdego stężenia badanie powtórzono trzy razy.

8.3.5.4. Oznaczanie poziomu białka COX-2

Badanie przebiegało kilkietapowo. W pierwszej kolejności prowadzono inkubację komórek HaCaT, odpowiednio z wyciągiem metanолоwym i odwarem, po czym uzyskiwano lizaty białkowe. W tym celu na szalki Petriego posiewano komórki w ilości 0,5 mln CFU na szalkę. Po upływie 24 godzin pożywkę wymieniano na nową, z dodatkiem 0,5 % FBS i inkubowano przez 24 godziny. Następnie dodawano przeznaczone do badań wyciągi z ziela *A. amaranthoides* w stężeniach 30, 300 i 600 μ g/ml, oznaczając wyciąg metanолоwy jako W (W30, W300, W600) oraz wodny jako O (O30, O300, O600). W próbie kontrolnej wyciągi zastąpiono wodą. Próby inkubowano

przez 30 minut, po czym dodawano do nich TNF α w stężeniu 20 ng/ml i inkubowano kolejne 4 godziny, a następnie usuwano medium i dwukrotnie przepłukiwano PBS. W kolejnym kroku komórki poddawano działaniu trypsyny, otrzymując ich zawiesinę, którą następnie odwirowywano (500xg) i pozbywano się supernatantu. Uzyskany osad przepukiwano PBS i ponownie odwirowywano (500xg), a następnie zawieszano go w 300 ml buforu RIPA i prowadzono godziną lizę. W tym czasie próbówki utrzymywane były na lodzie i wytrząsane co 15 minut. Otrzymane w ten sposób lizaty wirowano 30 minut (12000xg) w temp. 5° C. Do probówek typu Eppendorf przenoszono następnie supernatanty, a osad ze strukturami niebiałkowymi nie był wykorzystywany w dalszej części badania. Celem oznaczenia całkowitej zawartości białka w badanych frakcjach wykorzystano kolorymetryczną metodę Lowry'ego.

W kolejnym etapie otrzymane lizaty komórkowe gotowano przez 10 minut na wrzącej łaźni wodnej w buforze Loading buffer 1:5, po czym nakładano je na żel poliakryloamidowy 10 % Tris Ready Gel (COX-2), po 60 μ g białka na jedną kieszonkę i przeprowadzano rozdział elektroforetyczny białka (37 minut, napięcie 200 V). Po elektroforezie białka żel transferowano na błonę PVDF – transfer mokry (natężenie prądu 0,15 A, czas 90 minut). Następnie umieszczano błony w 10 % roztworze odtłuszczonego mleka w DPBS-T. Błony poddano trzykrotnemu płukaniu buforem DPBS-T i inkubowano z pierwszorzędowymi przeciwciałami (1:1000 w DPBS-T) przez 120 minut. Ponownie dokonywano trzykrotnego przepłukania błon buforem DPBS-T i inkubowano z drugorzędowymi przeciwciałami (1:2000 w DPBS-T) przez 60 minut. Po ostatnim trzykrotnym płukaniu błony DPBS-T, przepłukano ją dwukrotnie roztworem TBS i przeniesiono do buforu TRIS o pH 9,5. Celem wizualizacji białek związanych z błoną wykorzystano roztwór wywołujący AP-Conjugate-Substrate Kit. Densytometryczną ocenę blotów prowadzono przy pomocy aparatu G-Box i programu GeneSnap. W badaniu przeprowadzono równoległą próbę dla białka konstytutywnego – β -aktyny, aby kontrolować naniesienie jednakowej ilości białka na poszczególne ścieżki żelu (*loading control*).

8.3.5.5. Oznaczenie poziomu PGE₂

W pierwszym etapie badań komórki HaCaT posiewano na wielodołkowe płytki w ilości 200 000 CFU/dolek. Po upływie 24 godzin medium wymieniało na DMEM zawierające 0,5 % FBS i inkubowano przez 24 godziny. W kolejnym kroku dodawano

badane wyciągi w stężeniach 30, 300 i 600 µg/ml, oznaczając wyciąg metanolowy jako **W** (**W30**, **W300**, **W600**), a wodny jako **O** (**O30**, **O300**, **O600**). Następnie, po upływie 30 minut, dodawano TNF α w stężeniu 20 ng/ml i poddawano ponownej, 4-godzinnej inkubacji. W badaniu zastosowano trzy próby kontrolne: medium hodowlane, medium hodowlane z dodatkiem TNF α i medium hodowlane z dodatkiem odpowiedniego wyciągu w stężeniu 600 µg/ml (W600 lub O600). Po upływie 4 godzin pobierano 0,5 ml medium i rozcieńczano je buforem EIA (1:1), po czym наносono w objętości 100 µg/ml do płytki wielodołkowej zestawu Prostaglandin E₂ Express EIA Kit. Koniugaty PGE₂ z AChE (acetylocholinesteraza) dodawano w ilości 50 µl. Tak przygotowane płytki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, cały czas wytrząsając. Następnie usuwano zawartość studzienek poprzez trzykrotne przepłukiwanie buforem płuczającym. Celem przeprowadzenia reakcji barwnej do płytki dodano 200 µl odczynnika Ellmana i przeniesiono na 1 godzinę w ciemne miejsce. Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali $\lambda = 410$ nm. Zawartość PGE₂ w badanych próbach obliczono na podstawie krzywej wzorcowej.

8.3.6. Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej UMP we współpracy z dr Jolantą Długaszewską³. Oznaczenia prowadzono z zastosowaniem metody mikrorozcieńczeń, wyznaczając parametr MIC (*ang. Minimal Inhibitory Concentration*) – minimalne stężenie hamujące wzrost. Dla prób dających pozytywny wynik badania MIC oznaczano ponadto wartość MBC/MFC (*ang. Minimal Bactericidal and Fungicidal Concentration*) – minimalne stężenie bakteriobójcze/grzybobójcze.

8.3.6.1. Przygotowanie wyciągów do badań

Wyciąg metanolowy

15 g rozdrobnionego surowca zalano 250 ml metanolu i przeprowadzono dwukrotną ekstrakcję, każdorazowo w temp. wrzenia rozpuszczalnika przez 1 godz.

³ Serdecznie dziękuję Pani dr Jolancie Długaszewskiej za przeprowadzenie badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Otrzymane wyciągi połączono i przecedzono przez watę, a następnie zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce próżniowej, uzyskując 1,1504 g suchej masy. 430 mg suchej pozostałości rozpuszczono w 2,875 ml wody jałowej, uzyskując w ten sposób roztwór podstawowy o stężeniu 150 mg/ml.

Odwar

15 g rozdrobnionego surowca zalano 250 ml wody jałowej i przeprowadzono dwukrotną ekstrakcję, każdorazowo w temp. wrzenia rozpuszczalnika przez 1 godz. Otrzymane wyciągi połączono i przecedzono przez watę, a następnie zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce próżniowej, uzyskując 2,58 g suchej masy. 2,28 g suchej pozostałości rozpuszczono w 5,7 ml wody jałowej, uzyskując w ten sposób roztwór podstawowy o stężeniu 400 mg/ml.

Uzyskane roztwory podstawowe posłużyły następnie do sporządzenia szeregu rozcieńczeń poprzez dodanie odpowiedniego bulionu (MHB – bakterie; SDA – grzyby) Zakres serii rozcieńczeń wykorzystanych w badaniu przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 4. Stężenia wyciągów wykorzystane w badaniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Badany wyciąg	Badane stężenie (mg/ml)						
	75	37,5	18,75	9,375	4,6875	2,34375	-
wyciąg metanolowy							
odwar	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125

8.3.6.2. Przebieg oznaczenia

Badane roztwory w odpowiednich rozcieńczeniach, rozprowadzone wcześniej na 96-studzienkowych płytkach w objętości 100 µl na dołek, zaszczipiano 100 µl zawiesiny określonych szczepów drobnoustrojów, zawierających $2-5 \times 10^5$ komórek/ml. Płytki inkubowano w temperaturze 34°C w czasie 18 godzin (szczepy bakterii i *C. albicans*) lub 72 godzin (dermatofity). Następnie wyznaczano wartość MIC definiowaną jako najniższe stężenie, przy którym wzrost komórek był widocznie hamowany. Zawartość dołków ze stężeniami MIC oraz wyższymi posiewano na podłoża stałe (TSA-bakterie; SDA-grzyby), a płytki inkubowano w temperaturze 34°C w czasie 18 godzin (szczepy bakterii

i *C. albicans*) lub 72-96 godzin (dermatofity). Następnie oznaczano wartość MBC/MFC, określając najniższe stężenie wyciągu, przy którym ginęło 99,9% drobnoustrojów. Jako substancji wzorcowych w badaniu użyto amikacyny i nystatyny.

8.4. Analiza statystyczna

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Microsoft Excel 2007. Wyniki prezentowano jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe ($\pm S$) wyników prowadzonych pomiarów, gdzie:

$$S = \sqrt{\frac{(1-r^2) \cdot \sum y^2}{n-1}}, \text{ gdzie } n = 6 \text{ lub } n=12.$$

Dla poszczególnych parametrów obliczono dodatkowo następujące parametry statystyczne:

odchylenie standardowe średniej

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

współczynnik zmienności

$$W_z = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 \%$$

przedział ufności

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha, f}}{\sqrt{n}}$$

W przypadku wszystkich krzywych wyznaczono liniowość, określając współczynnik R^2 . Dla przyjętego poziomu istotności $\alpha = 0,05$ ($P=95\%$) i liczby stopni swobody $f = n-1$, wartość współczynnika t-studenta, biorąc pod uwagę ilość prób przeprowadzonych dla jednego stężenia, wynosi odpowiednio (Pawlaczyk i Zając, 2005):

n=3	f=2	$t_{\alpha, f}=4,403$
n=5	f=4	$t_{\alpha, f}=2,776$

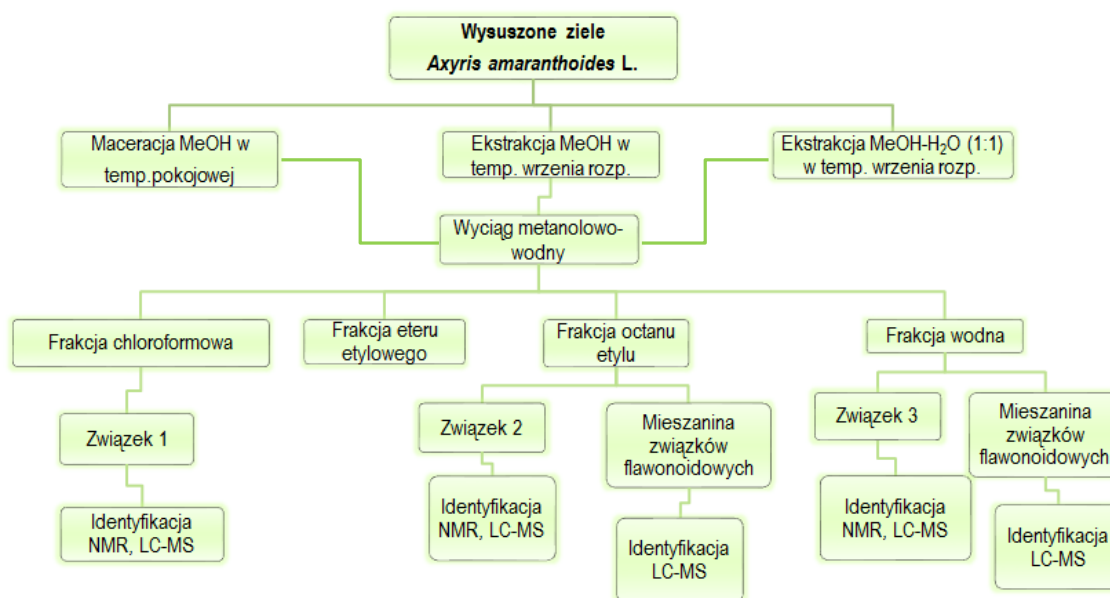
n=6	f=5	$t_{\alpha,f}=2,571$
n=8	f=7	$t_{\alpha,f}=2,365$
n=9	f=8	$t_{\alpha,f}=2,306$
n=10	f=9	$t_{\alpha,f}=2,262$
n=12	f=11	$t_{\alpha,f}=2,201$

9. WYNIKI

9.1. Izolacja i identyfikacja flawonoidów

9.1.1. Izolacja związków flawonoidowych

Obecność związków flawonoidowych stwierdzono we frakcji chloroformowej, eteru dietylowego, octanu etylu i wodnej uzyskanych w wyniku ekstrakcji wyciągu metanolowo-wodnego z ziela *A. amaranthoides*. Frakcji eterowej nie uwzględniono w dalszych badaniach, ze względu na małą ilość flawonoidów i podobny skład do frakcji octanu etylu. Ostatecznie rozdzielono metodą chromatografii kolumnowej (CC) poddano frakcję chloroformową, octanu etylu i wodną. W wyniku rozdzielania otrzymano trzy jednorodne flawonoidy, których budowę ustalono metodami UV, NMR, LC-MS i LC-MS/MS oraz wieloskładnikowe frakcje, w których obecne flawonoidy identyfikowano metodą LC-MS/MS. Ogólny schemat izolacji i identyfikacji związków flawonoidowych przedstawiono na rycinie 25.



Rycina 25. Ogólny schemat izolacji i identyfikacji związków flawonoidowych w ziele *A. amaranthoides*.

9.1.1.1. Rozdział frakcji chloroformowej (C) i frakcji octanu etylu (OE)

Zagęszczoną do suchej pozostałości frakcję chloroformową odmyto eterem dietylowym i po stwierdzeniu w niej obecności flawonoidów przeznaczono do dalszych prac izolacyjnych (frakcja C). Rozdział frakcji C i frakcji OE prowadzono na szklanych kolumnach wypełnionych celulozą Whatman CF-11 w układzie S₁₀. Z kolumny, na której rozdzielano frakcję C (**kolumna 1**) zebrano 42 podfrakcje, natomiast z kolumny, gdzie rozdzielano frakcję OE (**kolumna 2**) zebrano 70 podfrakcji po ok. 200 ml każda. Zebrane frakcje zagęszczano, a po kontroli chromatograficznej TLC (układy S₆-S₉) i PC (układy S₁-S₅) (rozd. 8.1.5.1.) łączono te, które prezentowały podobny obraz chromatograficzny. Do dalszych prac izolacyjnych wykorzystano podfrakcje:

- z kolumny 1 (C):
 - 35-37 zawierające **związek 1**
- z kolumny 2 (OE):
 - 22-35 zawierające **związek 2**
 - 39-68- frakcje wieloskładnikowe

9.1.1.1.1. Próby rozdziału podfrakcji 39-68

Wykonano próby rozdziału podfrakcji 39-68 metodą chromatografii kolumnowej i bibułowej. Do rozdziału na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym przeznaczono część uzyskanej podfrakcji, a fazę ruchomą stanowił układ S₁₅, o wzrastającym gradiencie stężenia MeOH. Z uwagi na brak odpowiedniego rozdziału, frakcję poddano następnie rozdzielaniu za pomocą preparatywnej chromatografii bibułowej, co także nie przyniosło oczekiwanych rezultatów.

9.1.1.2. Rozdział frakcji wodnej (W)

Pozostałość wodną po wytrząsaniu rozpuszczalnikami organicznymi (frakcja W) poddano rozdzielaniu na szklanej kolumnie (**kolumna 3**) wypełnionej celulożą Whatman CF-11 w układach S₁₁-S₁₃. Zebrano 128 podfrakcji po 200 ml każda, a po zagęszczeniu poddawano je kontroli chromatograficznej podobnie jak w przypadku frakcji C i OE (rozd. 8.1.5.1.). Do dalszych prac izolacyjnych wykorzystano podfrakcje:

- z kolumny 3 (**W**):
 - 73-89 zawierające **związek 3**
 - 90-97 – frakcje wieloskładnikowe
 - 101-120 – frakcje wieloskładnikowe

9.1.1.2.1. Próby rozdziału podfrakcji 90-97 i 101-120

Niewielką ilość podfrakcji 90-97 oraz 101-120 przeznaczono do dalszego rozdziału za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowsarstowej oraz preparatywnej chromatografii bibułowej. W obu przypadkach jako fazy rozwijające stosowano układy S₆ i S₇. Mimo podjętych prób nie udało się wyodrębnić pojedynczych związków.

9.1.1.3. Oczyszczanie frakcji flawonoidowych

Otrzymane jednoskładnikowe podfrakcje wymagały oczyszczenia od związków o niebieskiej fluorescencji pod lampą UV 366 nm, nad którymi nie prowadzono dalszych badań.

9.1.1.3.1. Oczyszczanie na kolumnach podfrakcji zawierających związki flawonoidowe 1, 2 i 3

Próby oczyszczania związków flawonoidowych prowadzono w pierwszej kolejności na szklanych kolumnach wypełnionych podłożem Sephadex LH-20, wykorzystując do eluowania kolejno odpowiednie fazy ruchome (**Tabela 5**).

Tabela 5. Układy wykorzystane do oczyszczania poszczególnych związków na kolumnach wypełnionych podłożem Sephadex LH-20.

Związek	Faza ruchoma		
1	S ₁₆	S ₁₇	-
2	S ₁₆	S ₁₇	-
3	S ₁₈	S ₁₆	S ₁₇

9.1.1.3.2. Oczyszczanie z wykorzystaniem systemu SPE

Oczyszczanie związków 1, 2, i 3 kontynuowano na kolumnkach SPE wypełnionych odpowiednim podłożem (Bond Elut C18, Agilent). Oczyszczanie prowadzono na podstawie zmodyfikowanej metody Svedström'a (Svedström i wsp., 2006), wykorzystując system do ekstrakcji do fazy stałej (System BAKER SPE 12-G). W pierwszej kolejności kolumnki kondycjonowano. W tym celu przemywano je kolejno 10 ml metanolu i 5 ml wody destylowanej. Następnie wysuszone frakcje badanych związków rozpuszczano w 5 ml wody destylowanej i наносzono na kolumnki w ilości 1 ml, po czym wymywano układem S₁₉. Ostatecznie otrzymano w formie jednorodnego, jasnożółtego i bezpostaciowego osadu:

- 10 mg **związku 1**
- 12 mg **związku 2**
- 18 mg **związku 3**

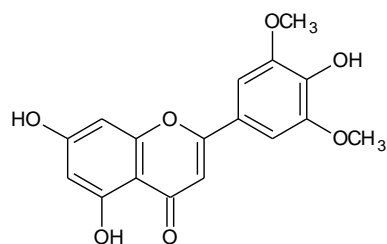
9.1.2. Identyfikacja związków flawonoidowych

9.1.2.1. Identyfikacja wyizolowanych flawonoidów

9.1.2.1.1. Związek 1

5,7,4'-trihydroksy-3',5'-dimetoksyflawon (trycyna)

Wzór:



Analiza chromatograficzna

Tabela 6. Analiza chromatograficzna związku 1.

Wartość współczynnika R _f				Fluorescencja			
S ₁	S ₃	S ₄	S ₅	UV 366 nm	UV/KOH	UV/AlCl ₃	UV/NA
0,1	0,26	0,25	0,0	brunatna	intensywnie jasnożółta	ciemnożółta	pomarańczowo-różowa

Analiza spektralna UV

Tabela 7. Analiza spektralna UV związku 1.

	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)
MeOH	248, 271	350
+NaOMe	265	427
+NaOAc	265	320sh, 422
+NaOAc/H ₃ BO ₃	248sh, 272	355
+AlCl ₃	260sh, 280	310sh, 371, 401
+AlCl ₃ /HCl	260sh, 280	310sh, 362, 397sh

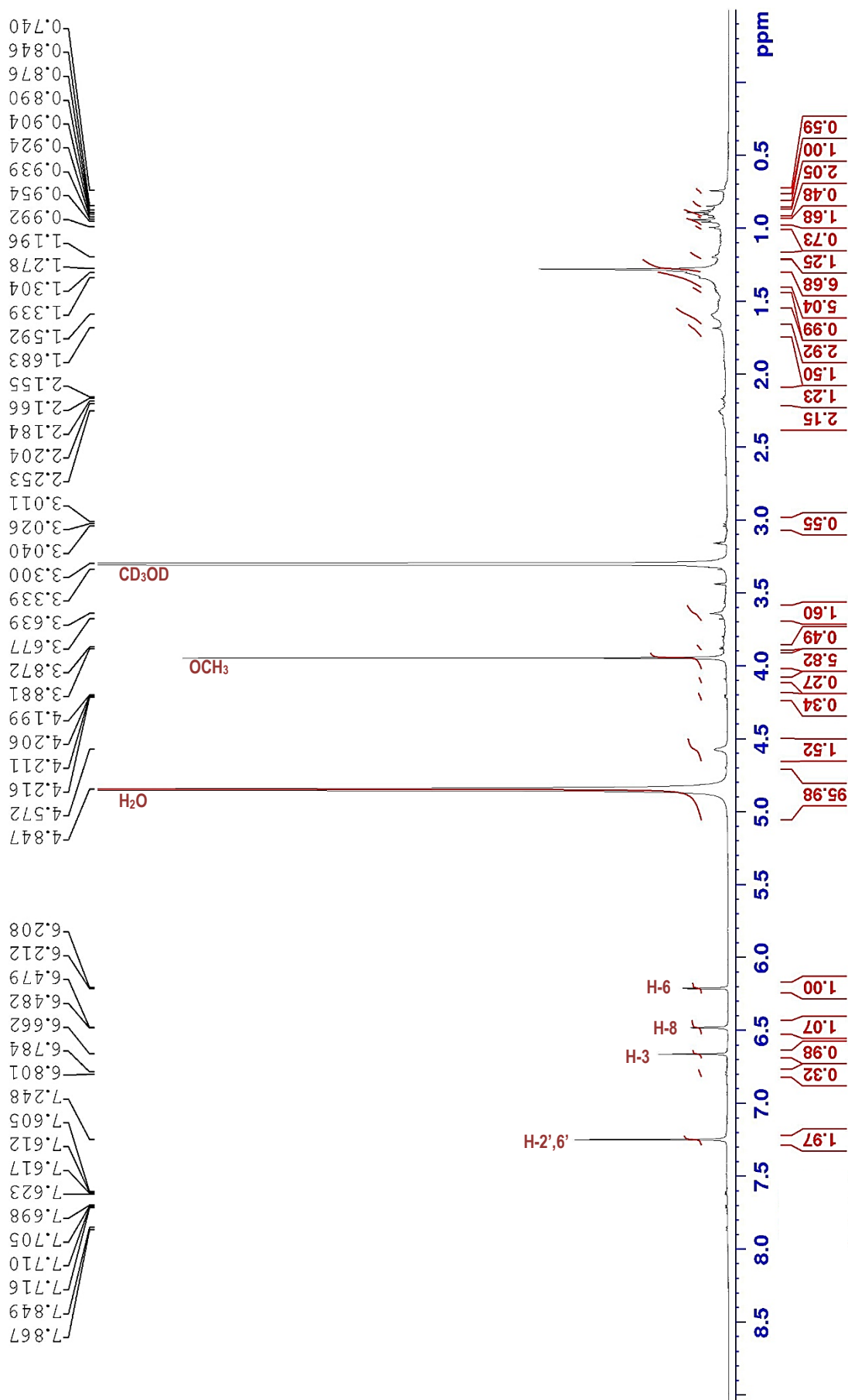
Analiza spektralna ^1H i ^{13}C NMR (CD_3OD , $\text{DMSO}-d_6$)Tabela 8. ^1H i ^{13}C NMR związku 1 (CD_3OD i $\text{DMSO}-d_6$).

Pozycja	δH ppm 500 MHz (CD_3OD)	δH ppm 300 MHz ($\text{DMSO}-d_6$)	δC ppm 125 MHz (CD_3OD)	δC ppm 75 MHz ($\text{DMSO}-d_6$)	Dane literaturowe	
					δH ppm ^{*/**} ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{DMSO}-d_6$)	δC ppm ^{***} (CD_3OD)
2			166,11	164,19		165,1
3	6,66 (s)	6,98 (s)	104,60	103,55	6,67(s) / 6,96 (s)	104,7
4			183,87	181,70		183,1
5			163,25	161,34		163,4
6	6,21 (d, $J=2,03$)	6,21 (d, $J=2,03$)	100,16	98,88	6,21 (d, $J=2,1$) / 6,21 (d, $J=2,00$)	99,7
7			166,08	163,64		164,9
8	6,48 (d, $J=2,11$)	6,65 (d, $J=2,03$)	95,12	94,17	6,49 (d, $J=2,1$) / 6,56 (d, $J=2,00$)	94,9
9			159,46	157,31		158,8
10			105,37	103,63		105,3
1'			122,72	120,43		122,4
2'	7,24 (s)	7,33(s)	105,29	104,55	7,2 (s) / 7,32 (s)	105,3
3'			149,67	148,17		149,1
4'			141,24	139,86		141,0
5'			149,67	148,17		149,1
6'	7,24 (s)	7,33(s)	105,29	103,63	7,2 (s) / 7,32 (s)	105,3
3',5'- OCH_3	3,94 (s)	3,89 (s)	57,06	56,34	3,96 (s) / 3,95 (s)	57,0

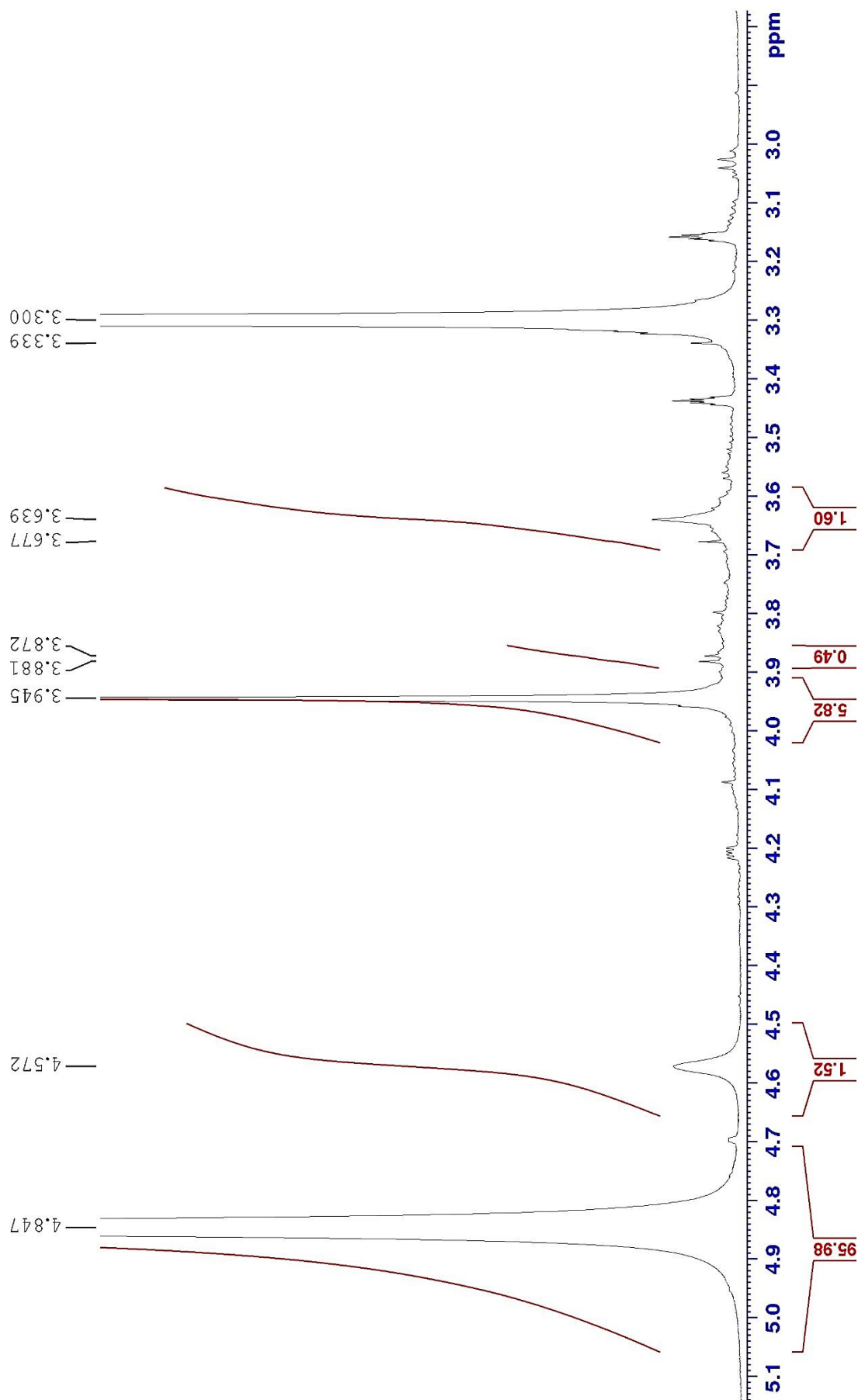
*Rivera, 2013

**Harborne; 1994

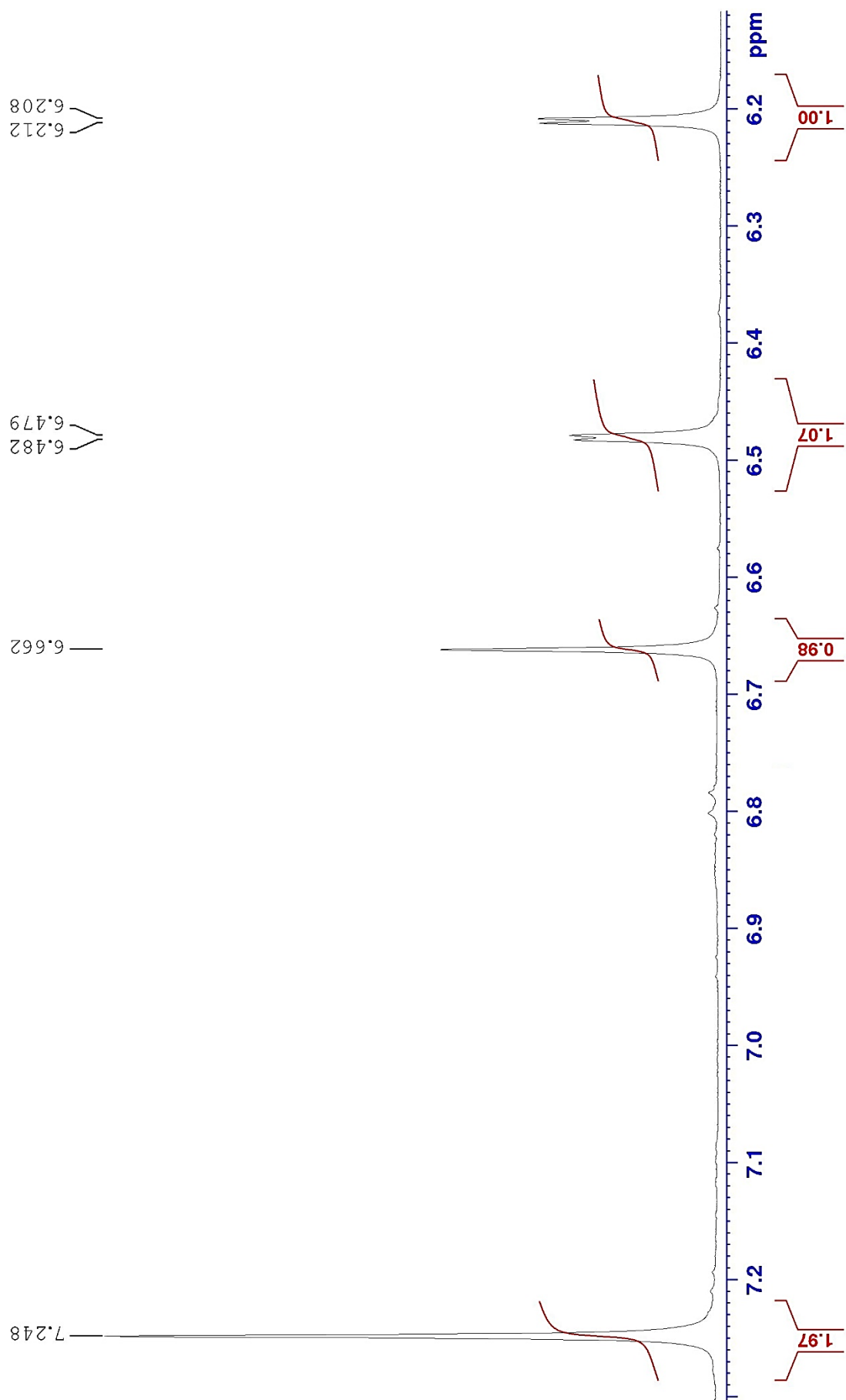
***Chao-Lin, 2010



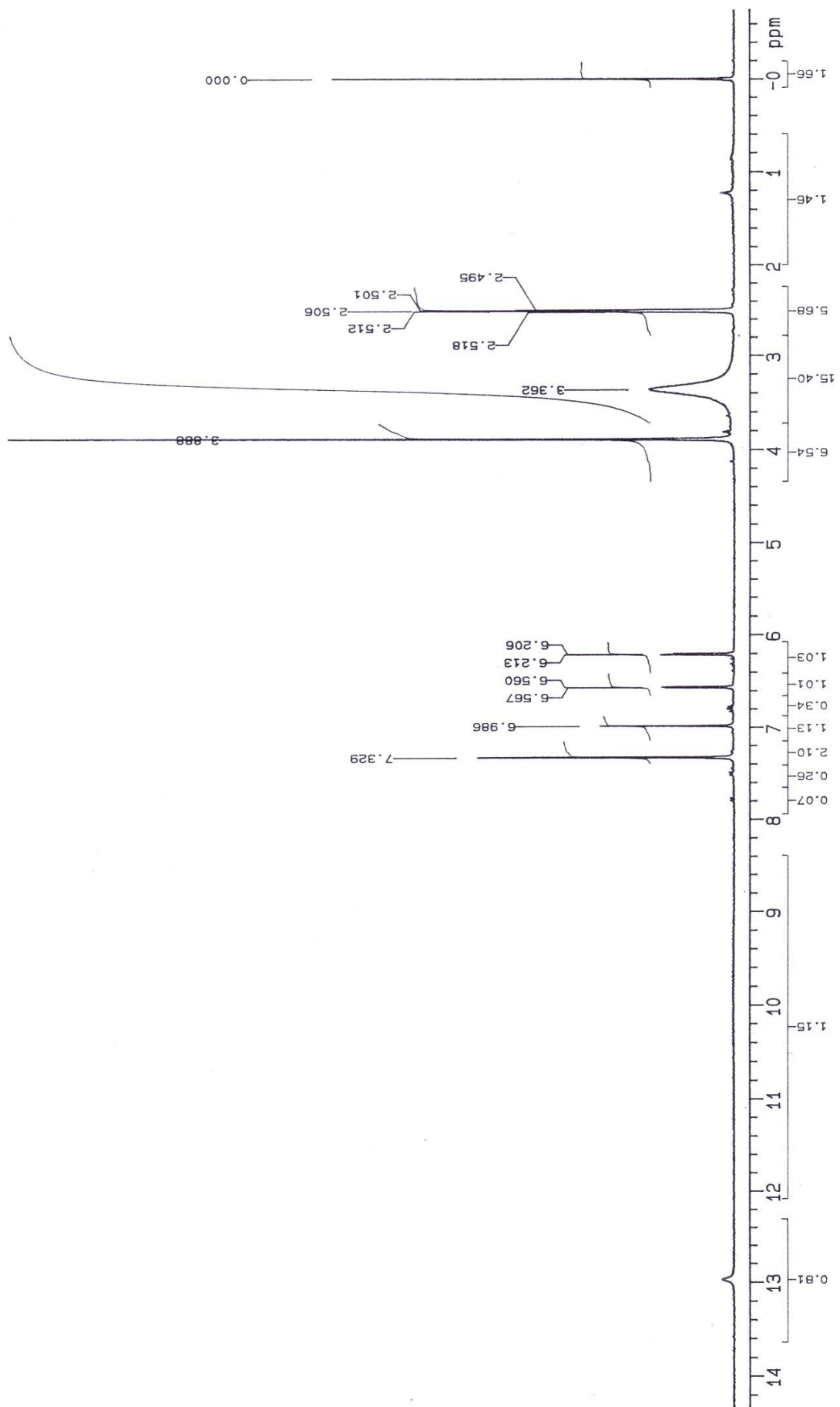
Rycina 26. Widmo ^1H NMR związku 1 (a) (CD_3OD).



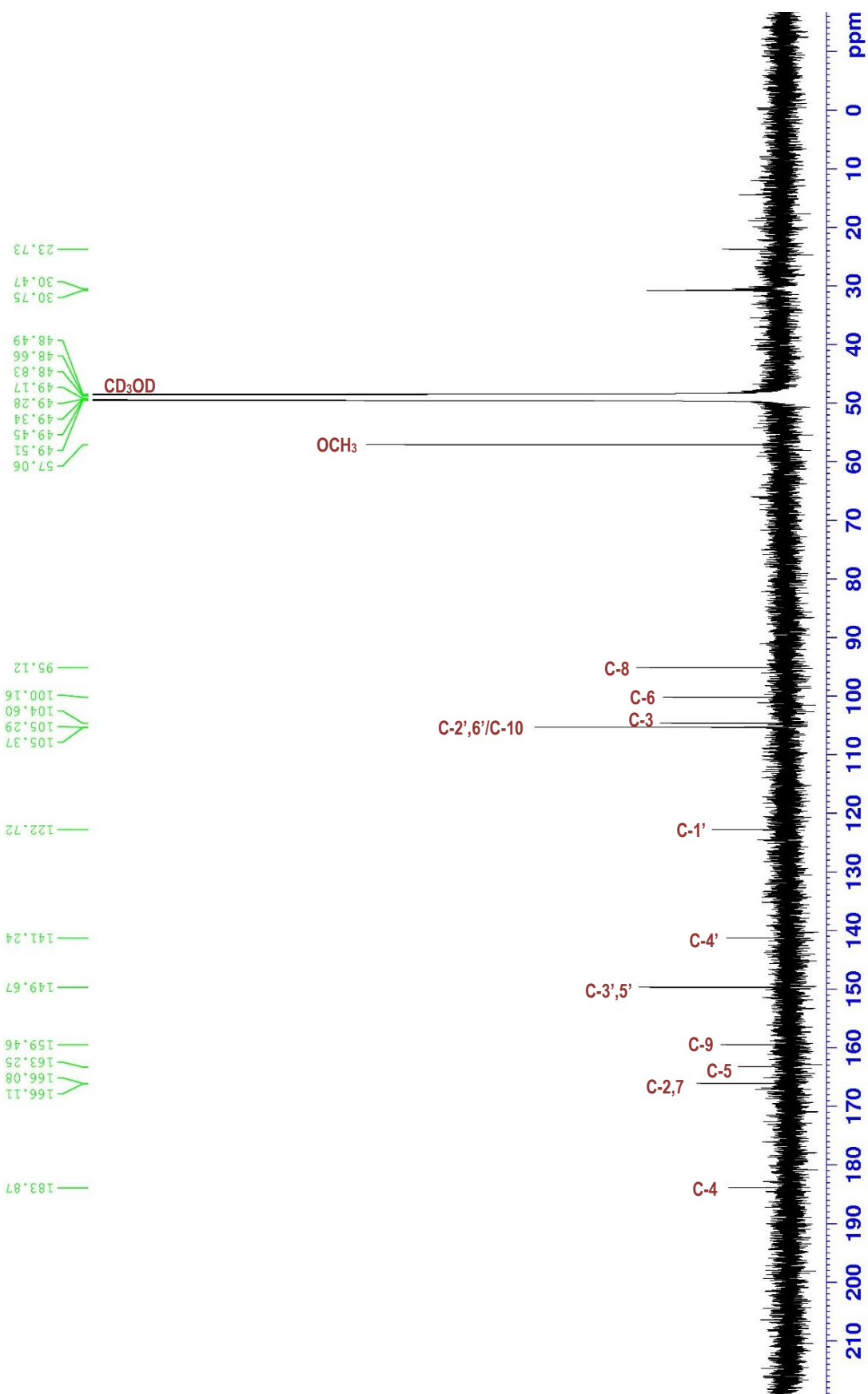
Rycina 27. Widmo ^1H NMR związku 1 (b) (CD_3OD).



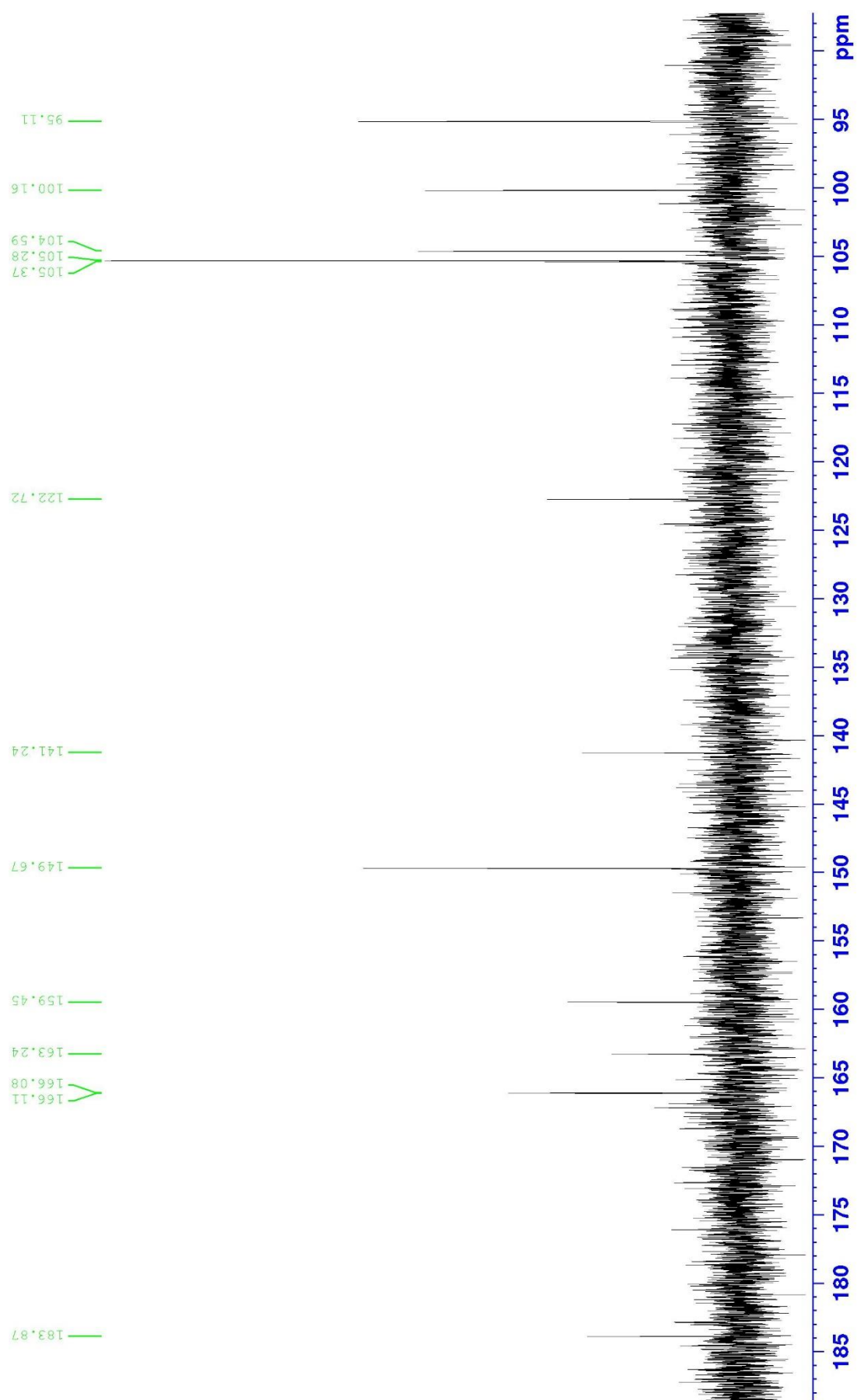
Rycina 28. Widmo ^1H NMR związku 1 (c) (CD_3OD).



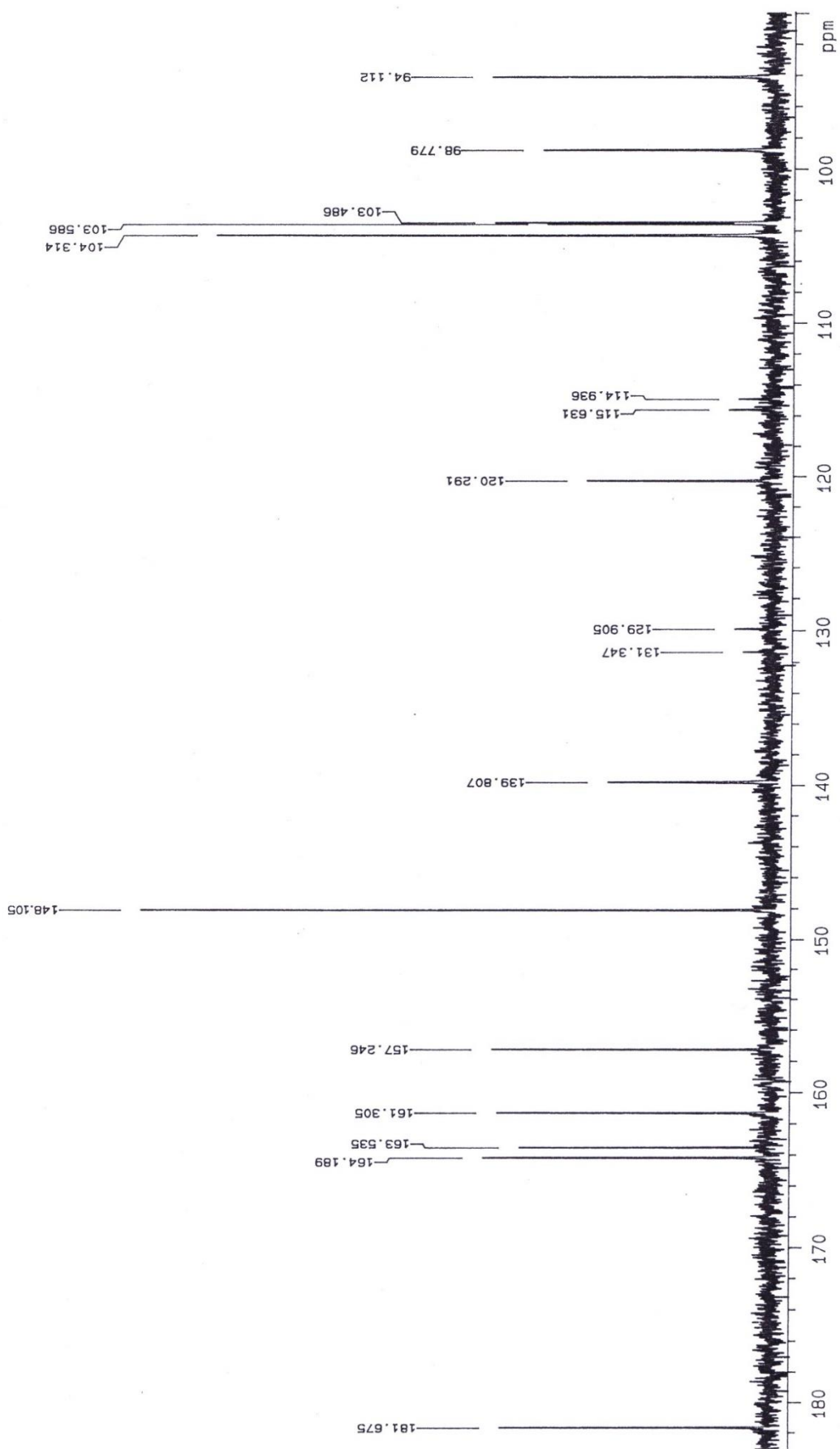
Rycina 29. Widmo ^1H NMR związku 1 ($\text{DMSO-}d_6$).



Rycina 30. Widmo ^{13}C NMR związku 1 (a) (CD_3OD).



Rycina 31. Widmo ^{13}C NMR związku 1(b) (CD_3OD).

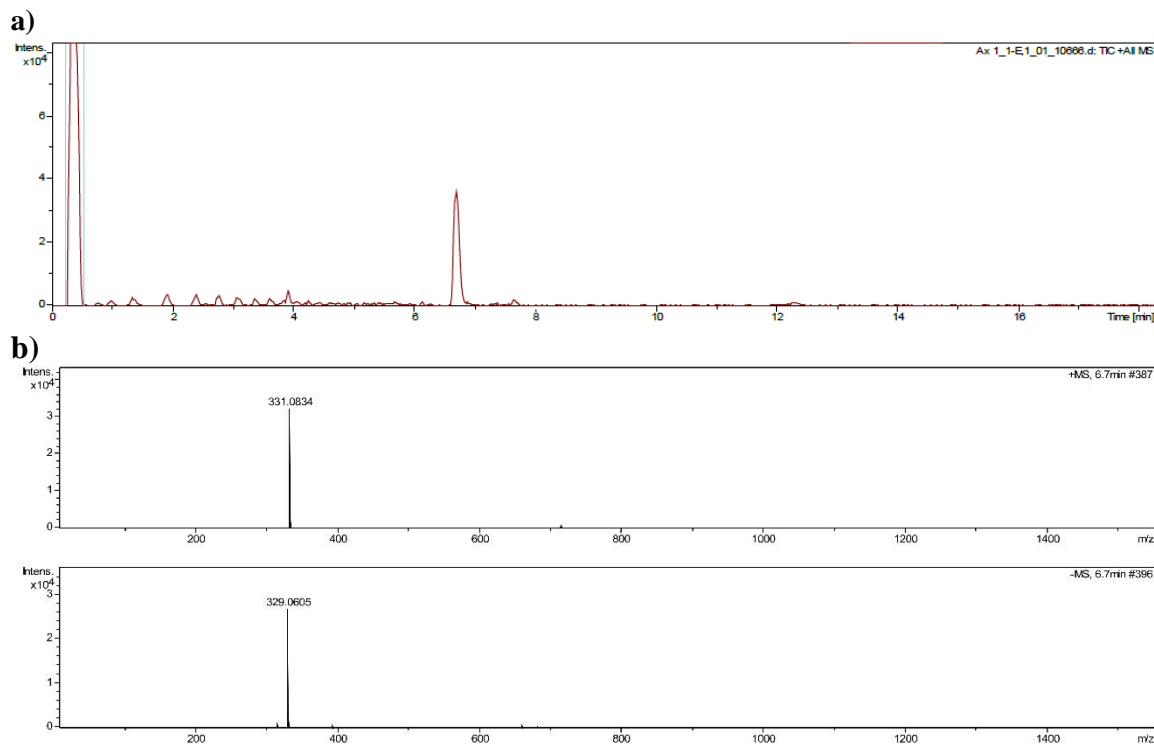


Rycina 32. Widmo ^{13}C NMR związku 1 ($\text{DMSO-}d_6$).

Analiza UPLC-MS

Tabela 9. Analiza LC-MS związku 1.

Tryb jonizacji	Fragmentacja	m/z	Wzór sumaryczny	Masa cząsteczkowa	
				wyznaczona	molekularna
dodatni	$[M+H]^+$	331,0834	$C_{17}H_{14}O_7$	330	330,28886
ujemny	$[M-H]^-$	329,0605			

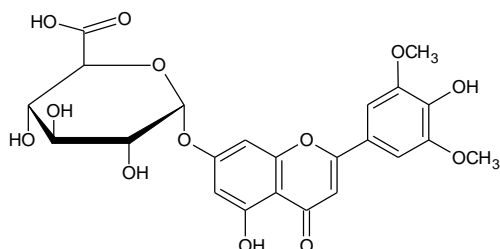


Rycina 33. Chromatogram TIC (a) dla badanej próbki związku 1 i widma MS (b) związku 1 w trybie jonów dodatnich i trybie jonów ujemnych.

9.1.2.1.2. Związek 2

7-O- β -D-glukuronopiranozyd trycyny

Wzór:



Analiza chromatograficzna

Tabela 10. Analiza chromatograficzna związku 2.

Wartość współczynnika R _f				Fluorescencja			
S ₁	S ₃	S ₄	S ₅	UV 366 nm	UV/KOH	UV/AlCl ₃	UV/NA
0,2	0,45	0,25	0,48	brunatna	intensywnie jasnożółta	ciemnożółta	pomarańczowo- różowa

Analiza spektralna UV

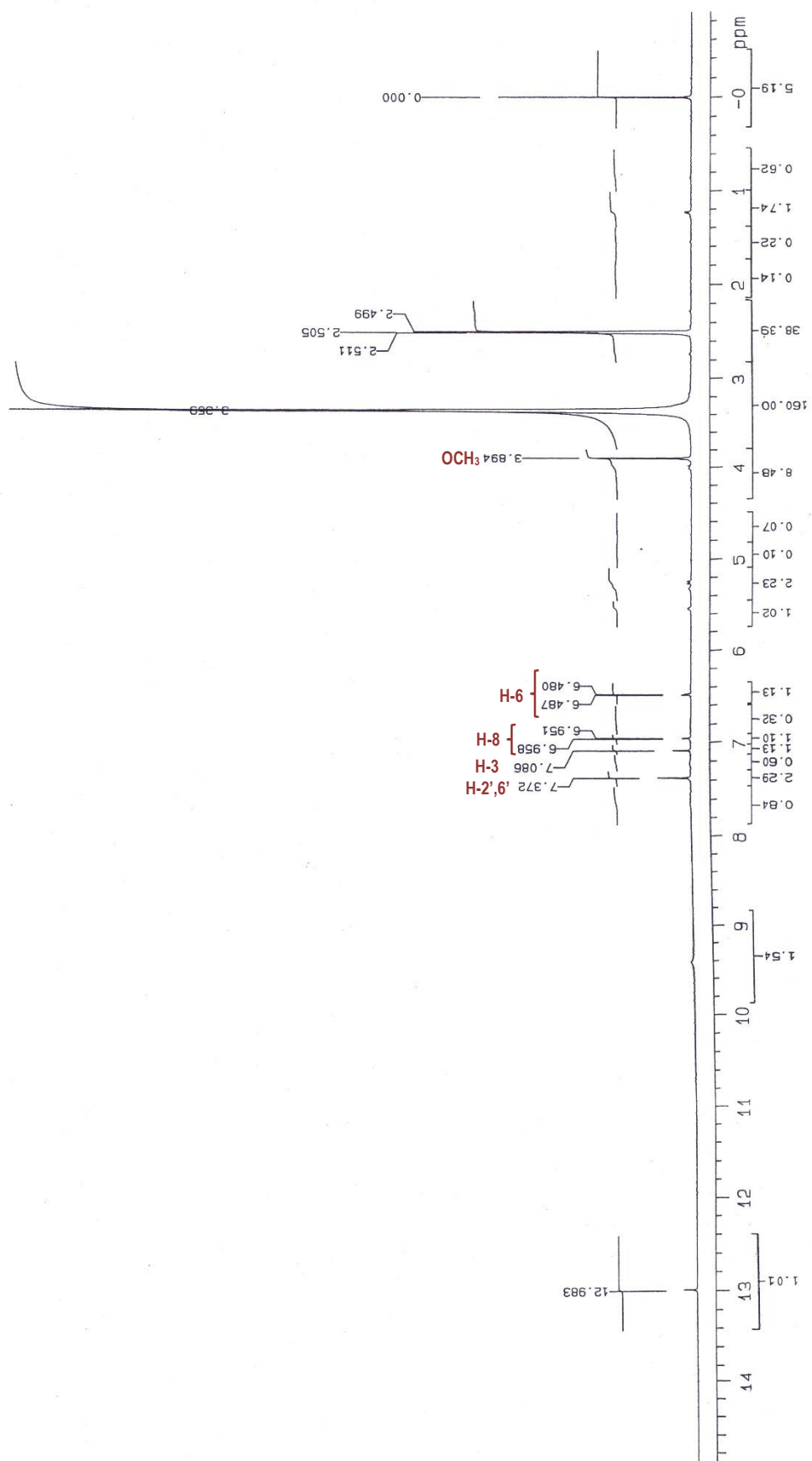
Tabela 11. Analiza spektralna UV związku 2.

	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)
MeOH	249, 270	350
+NaOMe	263, 278sh	322sh, 421
+NaOAc	263	320sh, 422
+NaOAc/H ₃ BO ₃	271	356
+AlCl ₃	258sh, 278	305sh, 363sh, 400
+AlCl ₃ /HCl	250sh, 271	301sh, 360

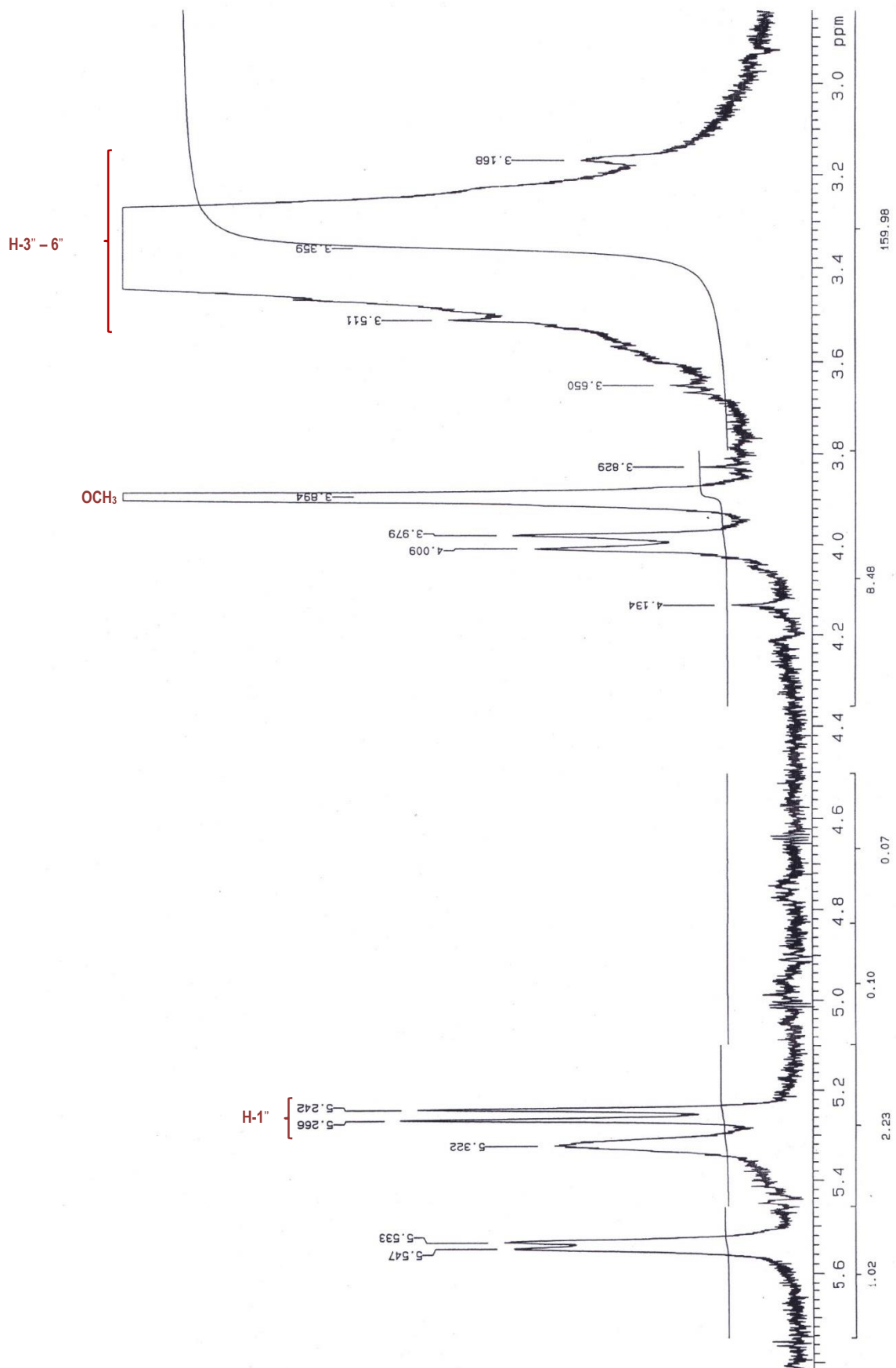
Analiza spektralna ^1H i ^{13}C NMR (DMSO- d_6)Tabela 12. ^1H i ^{13}C NMR związku 2 (DMSO- d_6).

Pozycja	δ H ppm 300 MHz (DMSO- d_6)	δ C ppm 75 MHz (DMSO- d_6)	Dane literaturowe	
			δ H ppm* (DMSO- d_6)	δ C ppm* (DMSO- d_6)
2		164,09		164,2
3	7,08 (s)	103,76	7,06 (s)	103,9
4		181,96		182,1
5		161,05		161,2
6	6,48 (d, $J=1,98$)	99,27	6,47 (d, $J=2,0$)	99,3
7		162,52		162,6
8	6,95 (d, $J=2,31$)	95,00	6,91 (d, $J=2,0$)	95,1
9		156,83		156,9
10		104,90		105,5
1'		120,11		120,2
2'	7,37 (s)	104,54	7,35 (s)	104,6
3'		148,15		148,2
4'		140,03		140,1
		148,15		148,2
6'	7,37 (s)	104,54	7,35 (s)	104,6
3',5'-OCH ₃	3,89 (s)	2 x 56,32	3,88 (s)	2 x 56,4
kw. glukuronowy				
1''	5,26 (d, $J=7,40$)	99,27	5,24 (d, $J=7,0$)	99,3
2''	4,0	72,75	3,28	72,8
3''	} 3,51-3,16 (m)	75,74	3,33 (dd)	75,7
4''		71,20	3,38 (dd)	71,3
5''		75,02	3,98 (dd)	75,2
6''		170,05		170,3

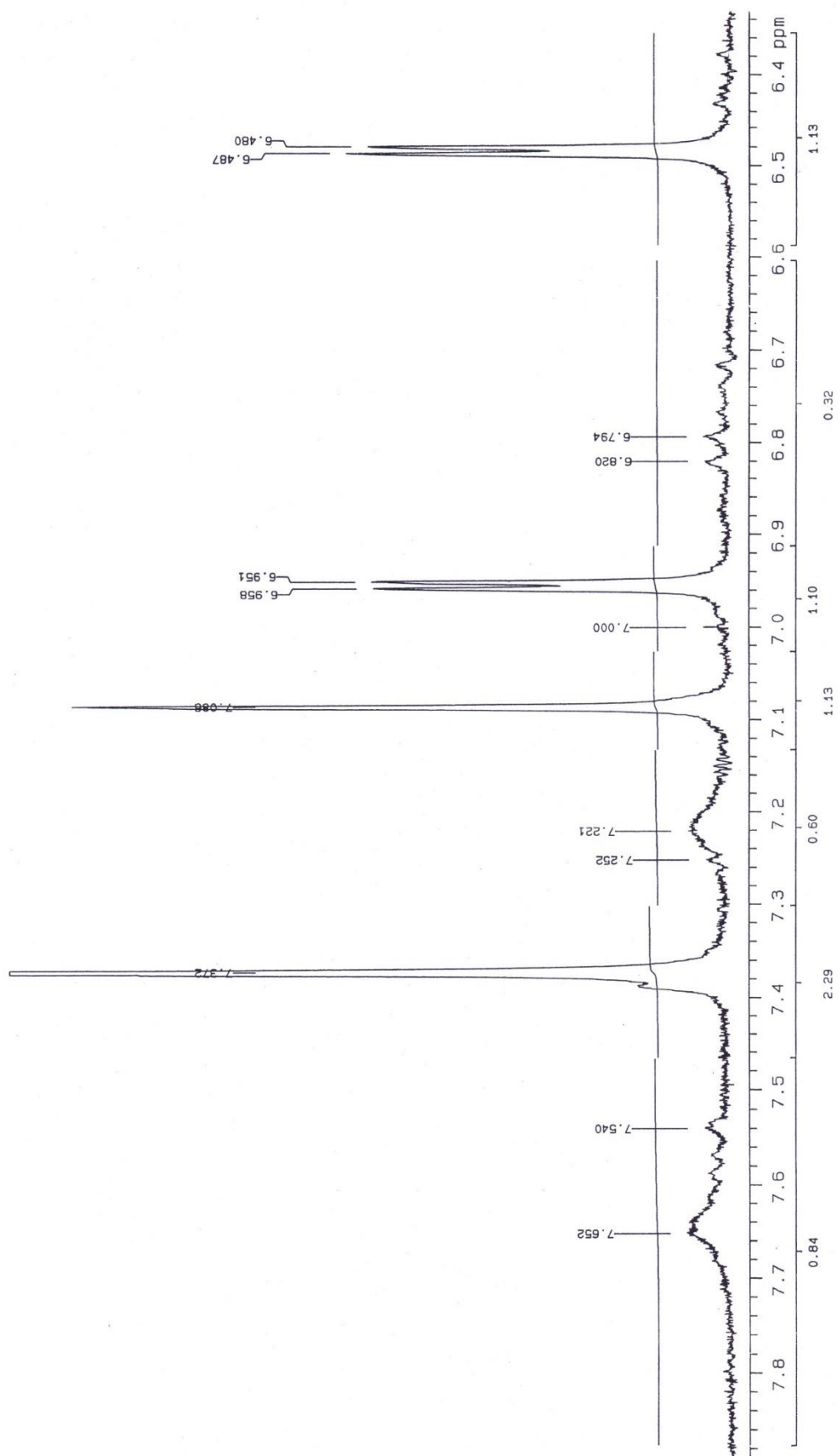
* Stochmal,2001b



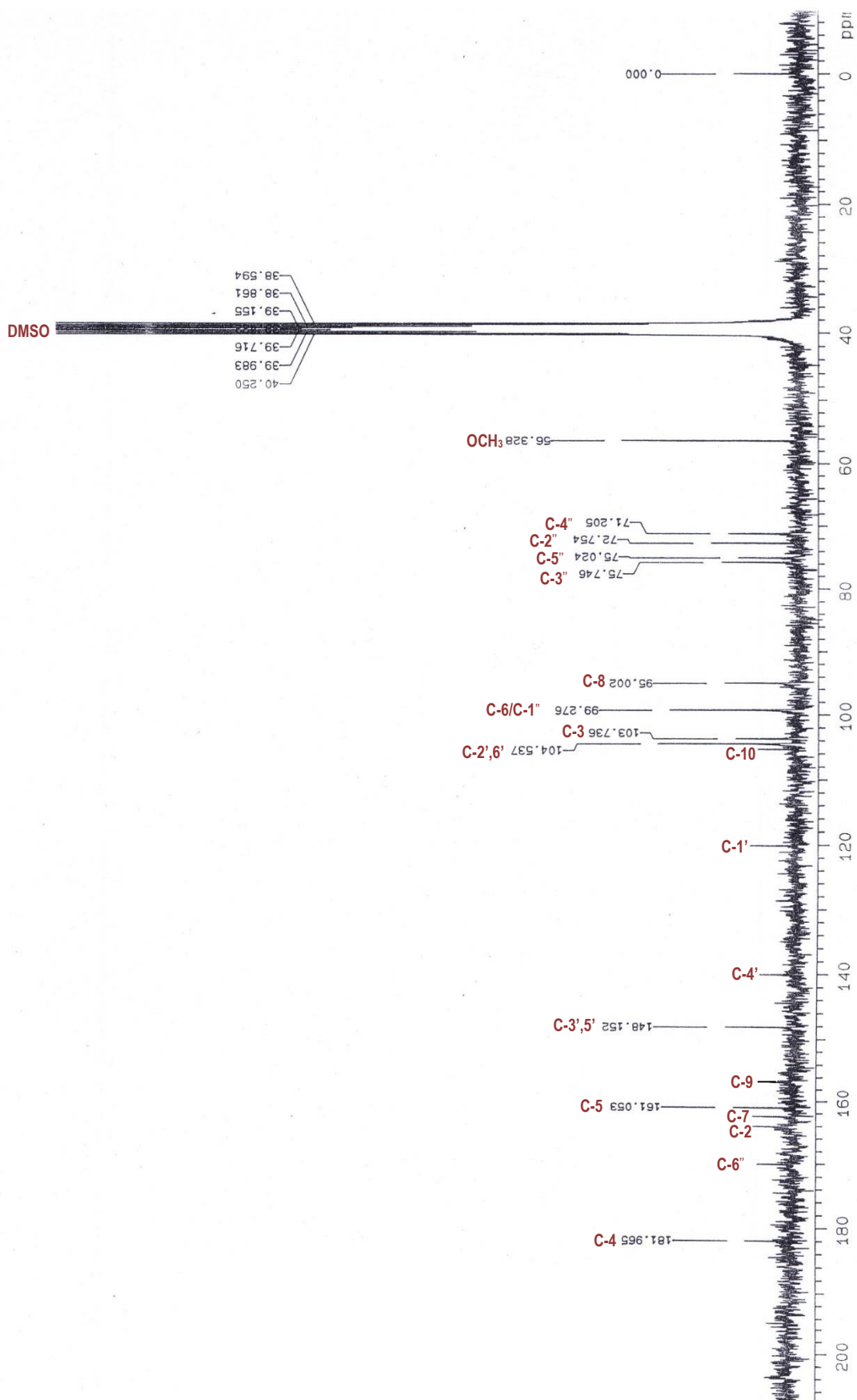
Rycina 34. Widmo ¹H NMR związku 2 (a) (DMSO-d₆).



Rycina 35. Widmo ^1H NMR związku 2 (b) ($\text{DMSO-}d_6$).

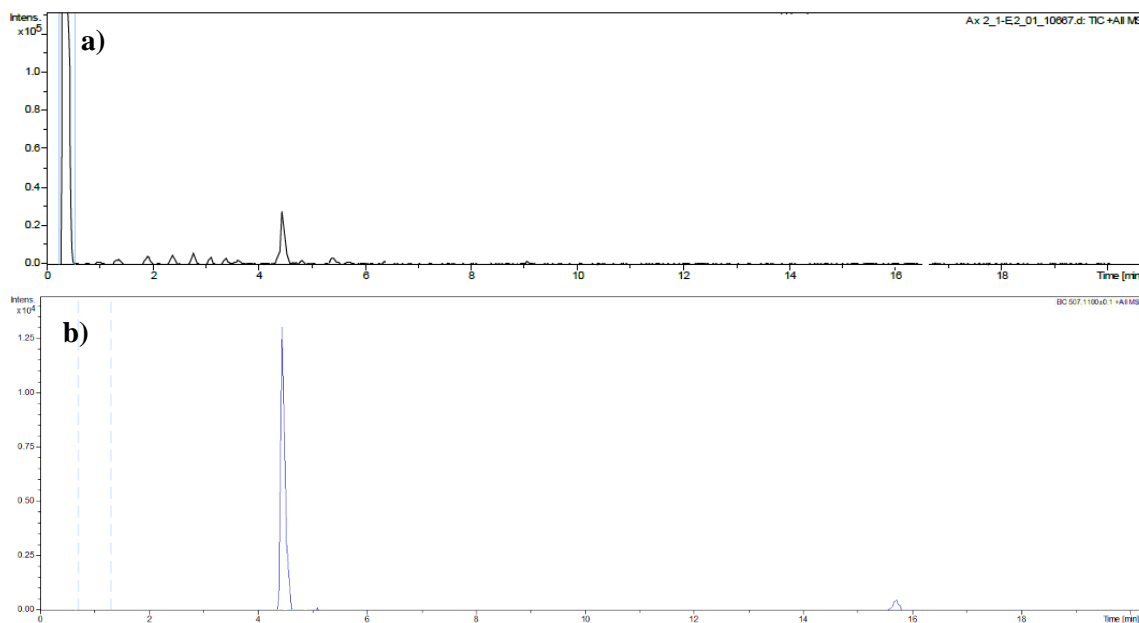


Rycina 36. Widmo ^1H NMR związku 2 (c) ($\text{DMSO-}d_6$).



Rycina 37. Widmo ¹³C NMR związku 2 (DMSO-d₆).

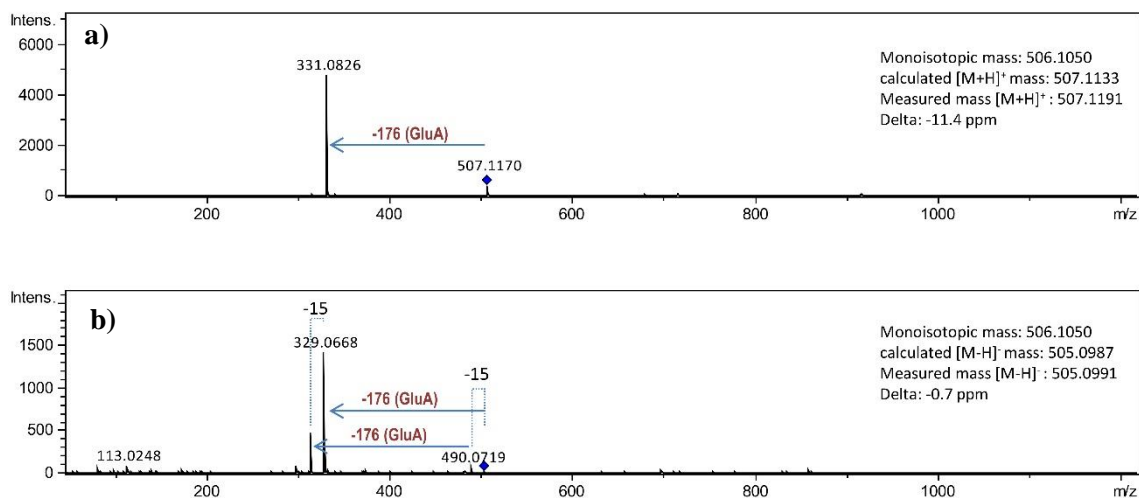
Analiza UPLC-MS/MS



Rycina 38. Chromatogramy TIC (a) i EIC (b) analizowanej próbki związku 2.

Tabela 13. Ścieżki fragmentacyjne związku 2 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	507,1191	[M-H] ⁻	505,0991
Jon fragmentacyjny	Y ₀ ⁺	331,826	Y ₀ ⁻	329,0668
			[M-H] ⁻ -CH ₃	490,0719
			Y ₀ ^{-*}	314,0412
Wzór sumaryczny: C₂₃H₂₂O₁₃			Masa monoizotopowa	
			506,1050	



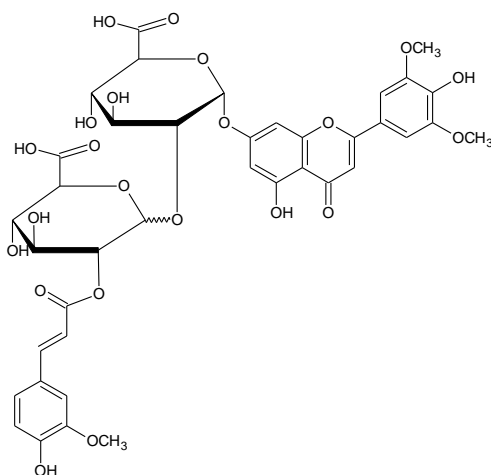
GluA – kwas glukuronowy

Rycina 39. Widma CID MS/MS związku 2 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.1.3. Związek 3

7-O-[2'''-O-feruilo-β-glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-O-β-glukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:



Analiza chromatograficzna

Tabela 14. Analiza chromatograficzna związku 3.

Wartość współczynnika Rf				Fluorescencja			
S ₁	S ₃	S ₄	S ₅	UV _{366 nm}	UV/KOH	UV/AlCl ₃	UV/NA
0,55	0,52	0,57	0,91	brunatna	intensywnie jasnożółta	ciemnożółta	pomarańczowo-różowa

Analiza spektralna UV

Tabela 15. Analiza spektralna związku 3.

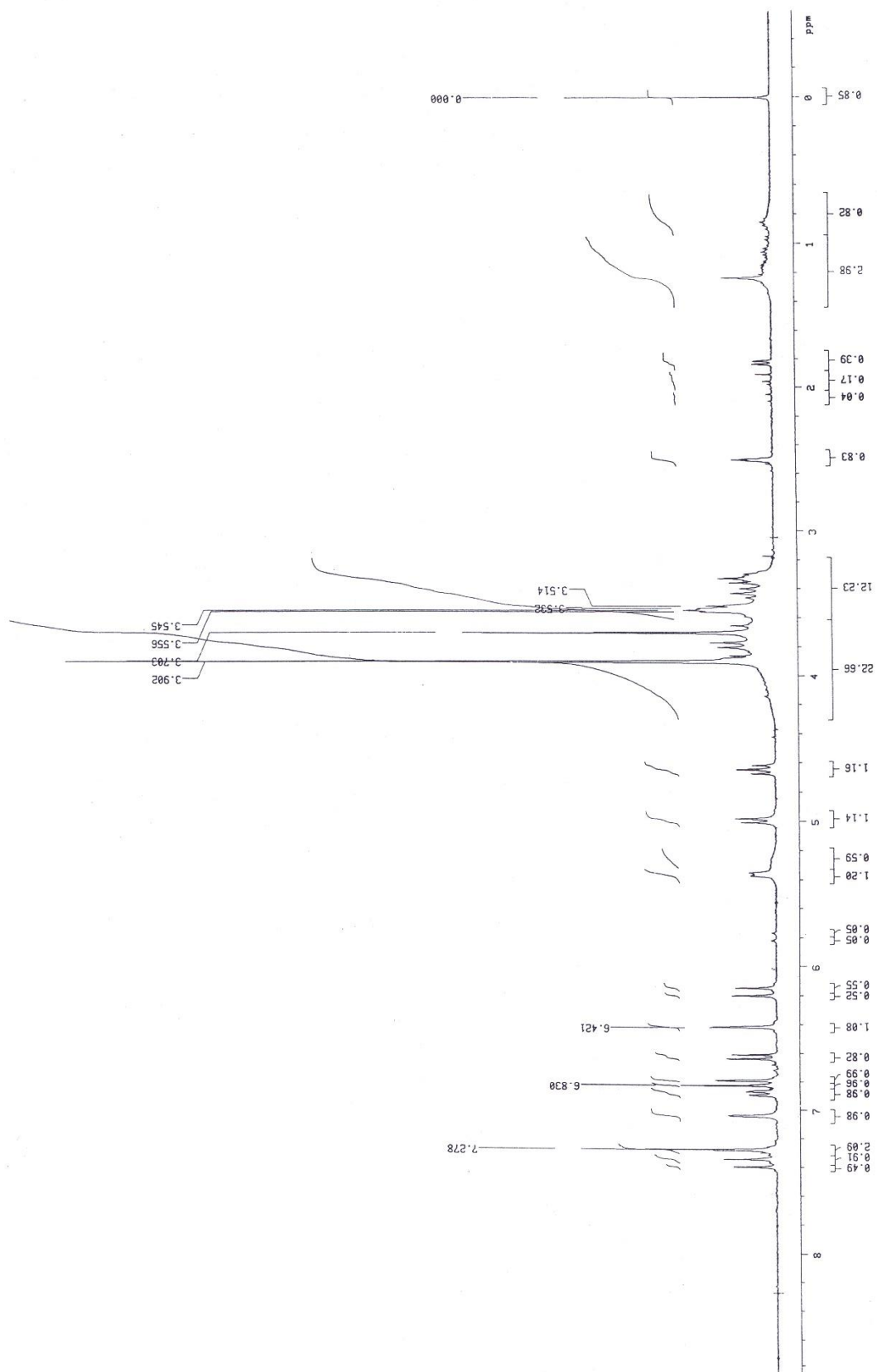
	λ _{max II} (nm)	λ _{max I} (nm)
MeOH	251, 272	335
+NaOMe	258	315sh, 400
+NaOAc	263	336, 425
+NaOAc/H ₃ BO ₃	271	336
+AlCl ₃	278	311sh, 336, 400
+AlCl ₃ /HCl	273	338, 400

Analiza spektralna ^1H i ^{13}C NMR związku 3 (DMSO- d_6)Tabela 16. ^1H i ^{13}C NMR związku 3 (DMSO- d_6).

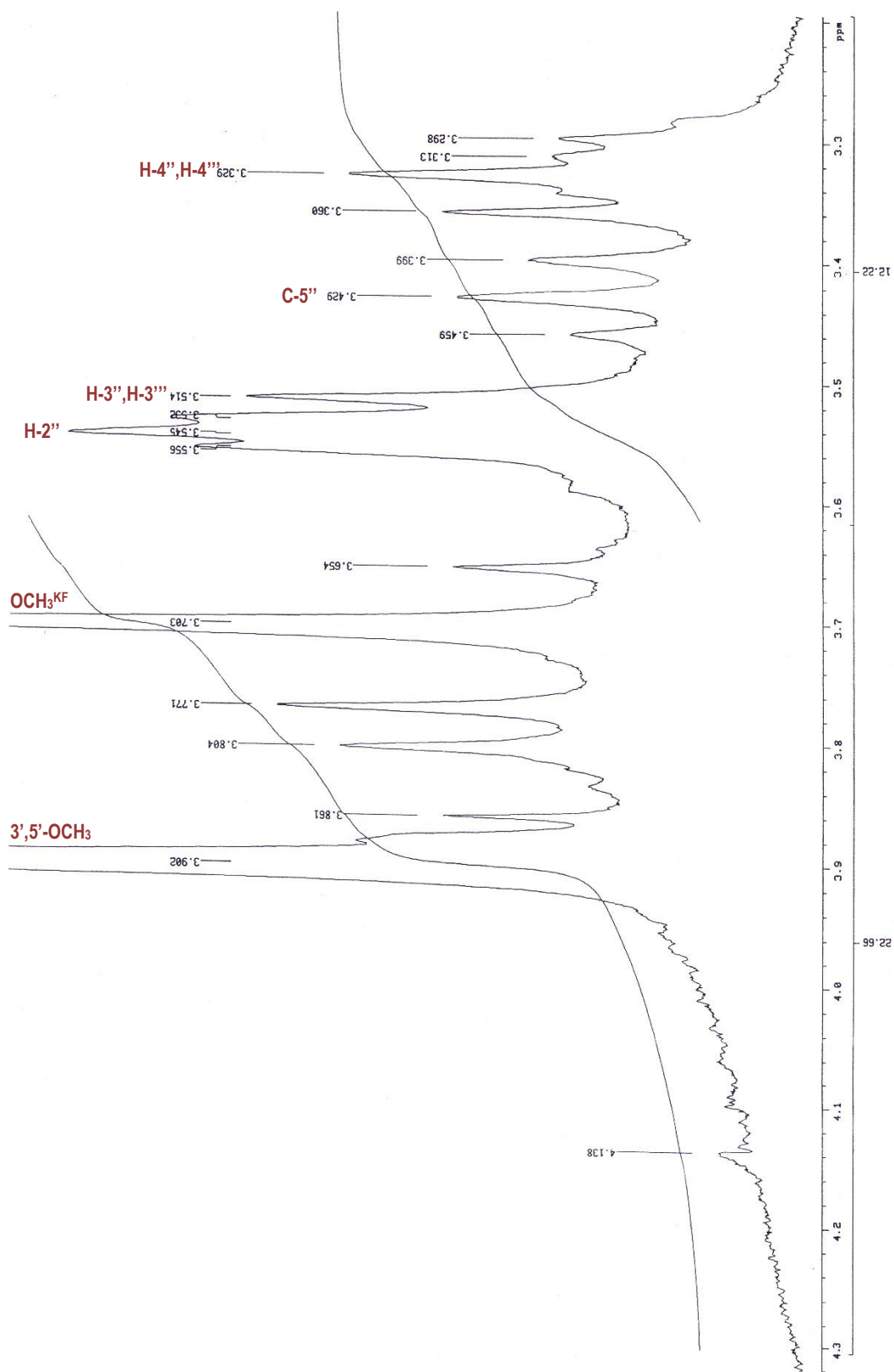
Pozycja	δ H ppm 400 MHz (DMSO- d_6)	δ C ppm 125 MHz (DMSO- d_6)	Dane literaturowe
			δ H ppm* (DMSO- d_6)
2		163,83	
3	6,83 (s)	103,54	6,96 (s)
4		181,75	
5		160,94	
6	6,42 (d, $J=2,10$)	99,06	6,40 (d, $J=2,0$)
7		162,24	
8	6,79 (d, $J=2,07$)	95,24	6,80 (d, $J=2,0$)
9		156,62	
10		105,26	
1'		120,24	
2'	7,27 (s)	104,39	7,32 (s)
3'		148,03	
4'		139,83	
5'		148,03	
6'	7,27 (s)	104,39	7,32 (s)
3',5'-OCH ₃	3,89 (s)	2x56,29	3,87 (s)
kw. glukuronowe			
1''	5,36 (d, $J=6,75$)	96,39	5,35 (s)
2''	3,54	79,44	3,53
3''	3,51	73,93	3,42
4''	3,32	71,43	3,42
5''	3,43	74,35	3,92
6''		170,60	
1'''	4,99 (d, $J=8,14$)	98,36	4,93 (s)
2'''	4,64 (dd, $J=9,10; 8,41$)	73,29	4,63 (s)
3'''	3,51	73,93	3,42 (s)
4'''	3,32	72,04	3,42 (s)
5'''	3,34	74,29	3,57 (s)
6'''		171,02	
kw. ferulowy			

1^{KF}		125,38	
2^{KF}	7,03 (d, $J=1,60$)	110,52	7,17 (s)
3^{KF}		147,64	
4^{KF}		148,94	
5^{KF}	6,62 (d, $J=8,14$)	115,34	6,7 (d)
6^{KF}	6,88 (dd, $J=8,30; 1,28$)	122,33	7,0 (dd)
7^{KF}	7,37 (d, $J=15,76$)	144,23	7,44 (s)
8^{KF}	6,17 (d, $J=15,94$)	114,36	6,32 (s)
COOH		165,45	
OCH₃	3,70 (s)	55,28	3,76 (s)

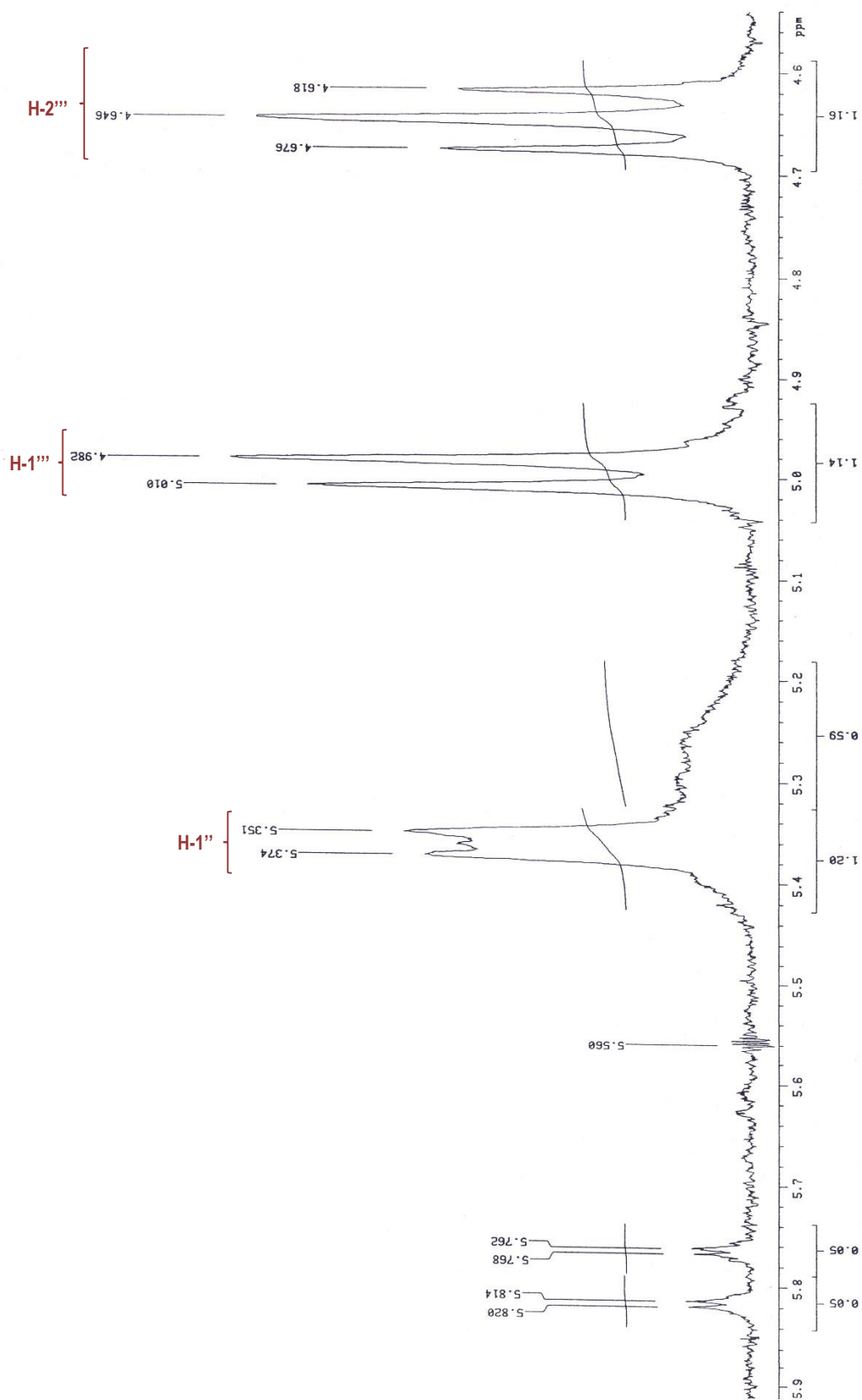
*Stochmal A, 2001b



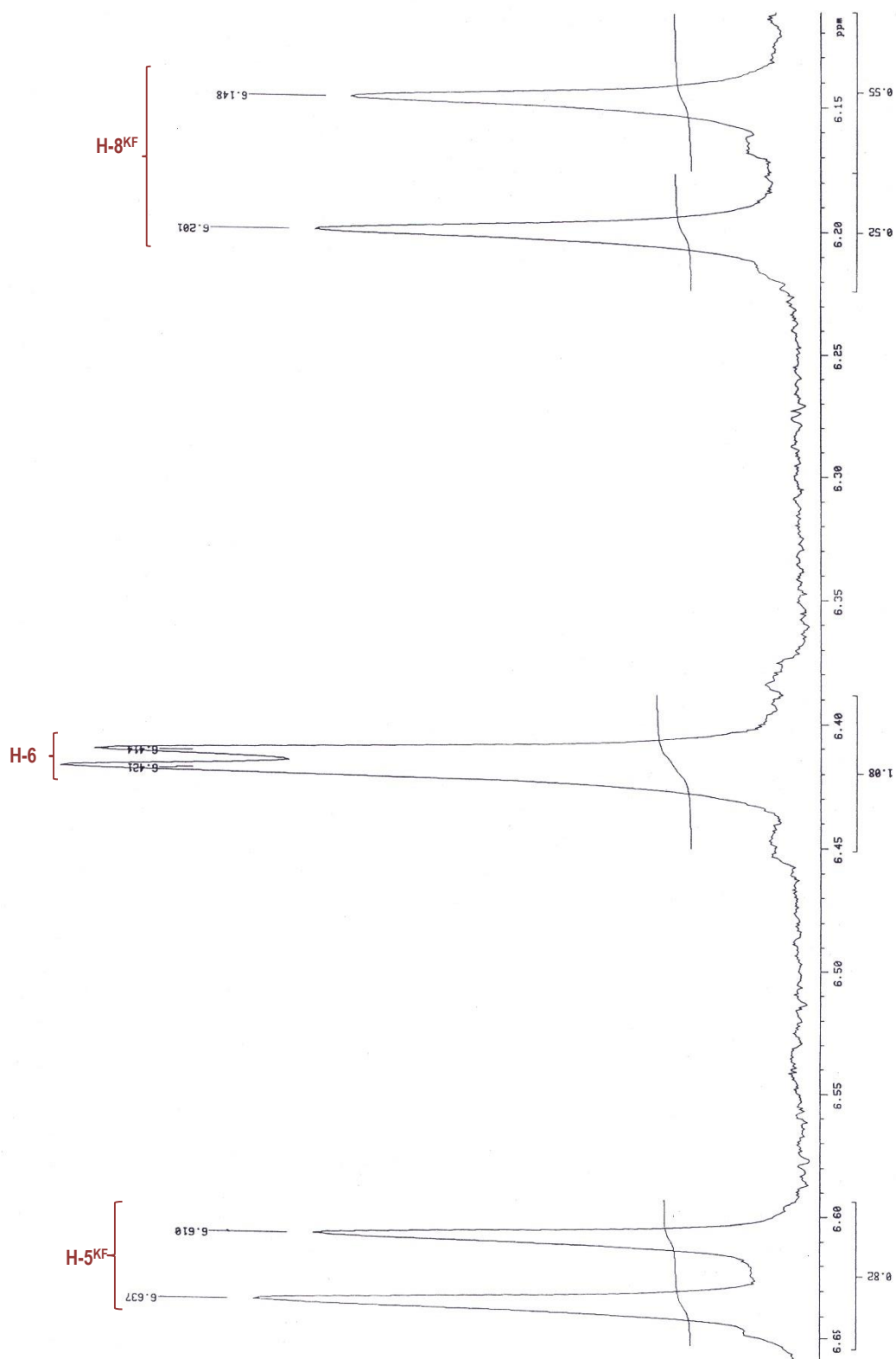
Rycina 40. Widmo ^1H NMR związku 3 (a) ($\text{DMSO-}d_6$).



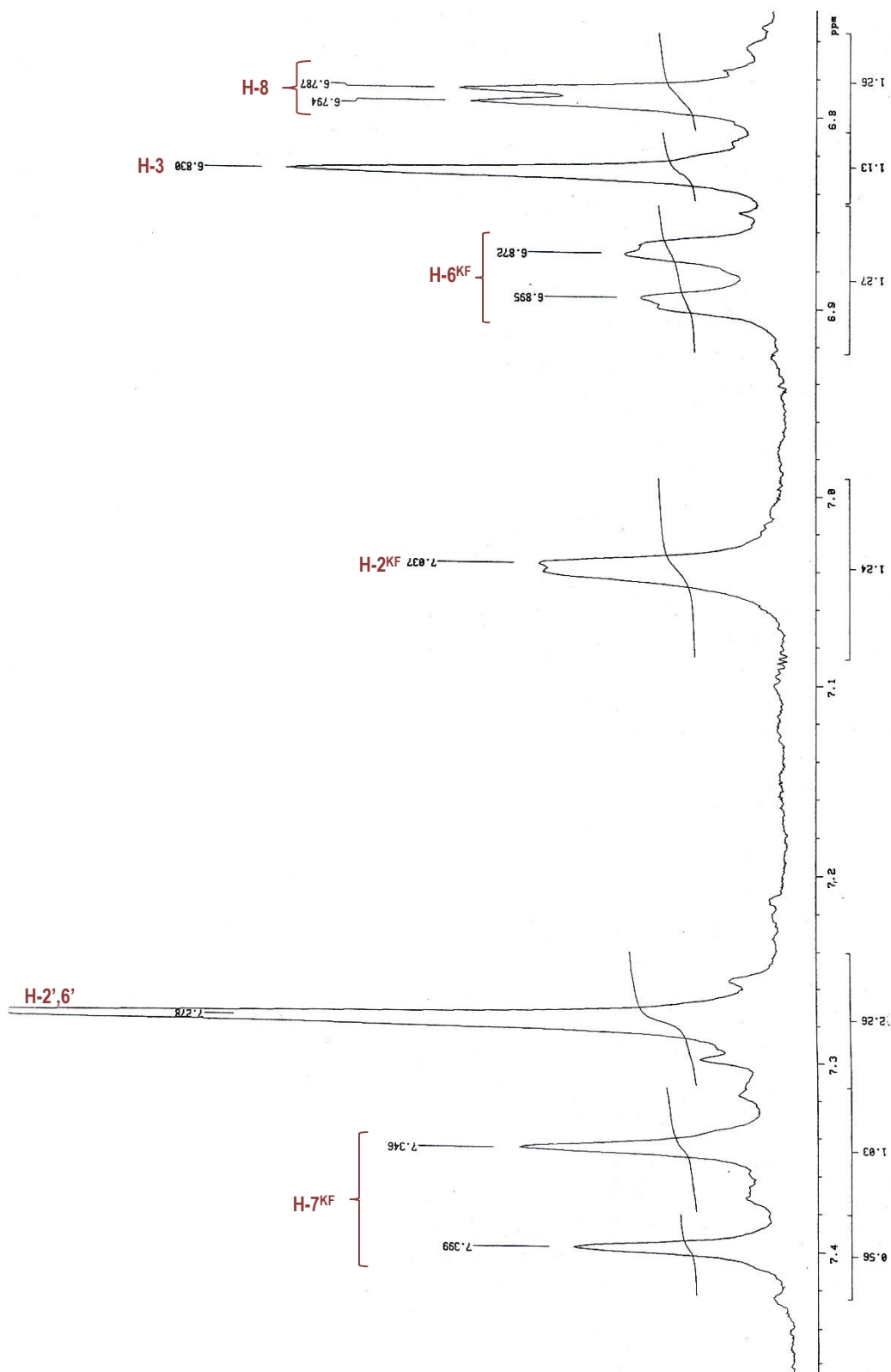
Rycina 41. Widmo ^1H NMR związku 3 (b) ($\text{DMSO-}d_6$).



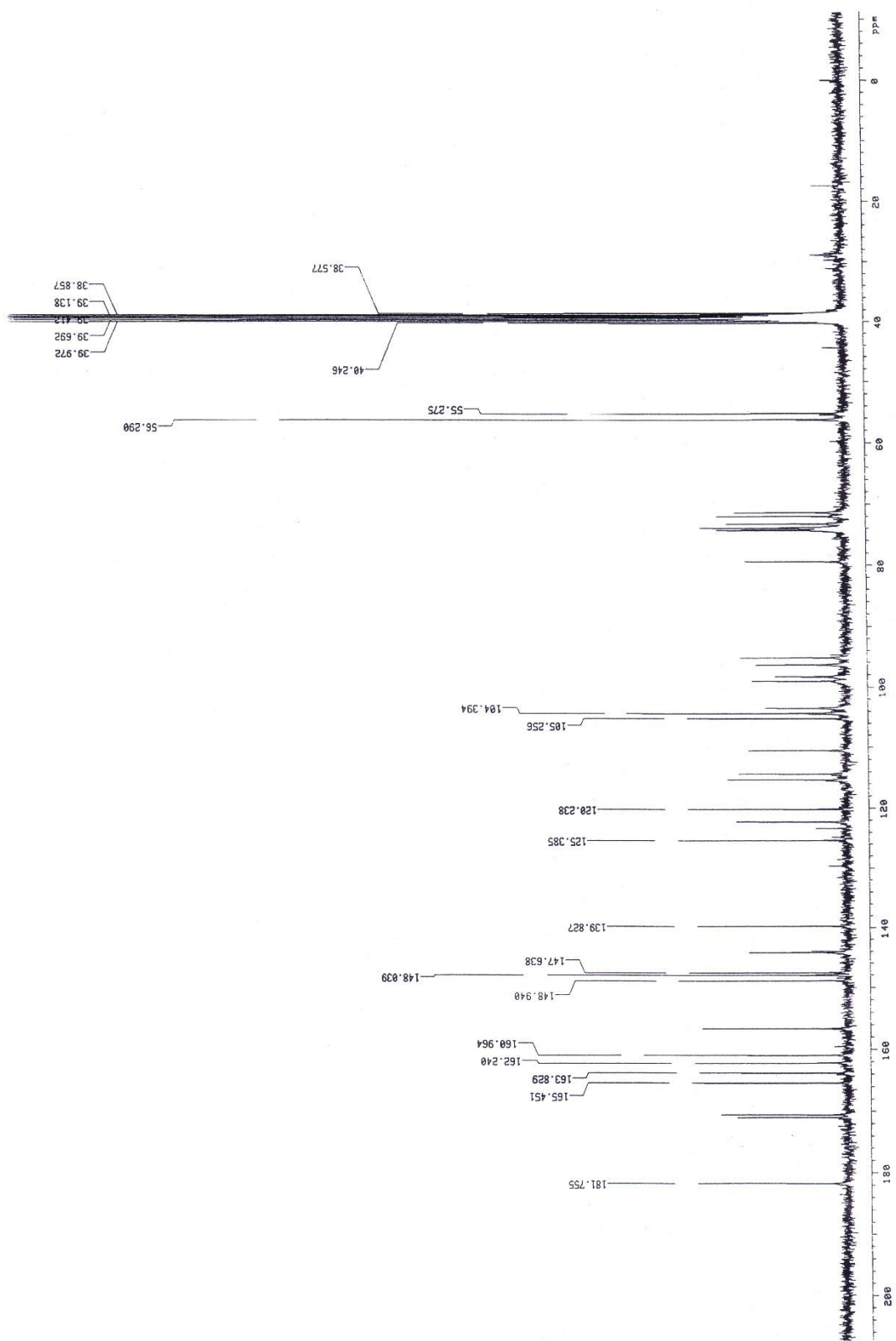
Rycina 42. Widmo ^1H NMR związku 3 (c) (DMSO).



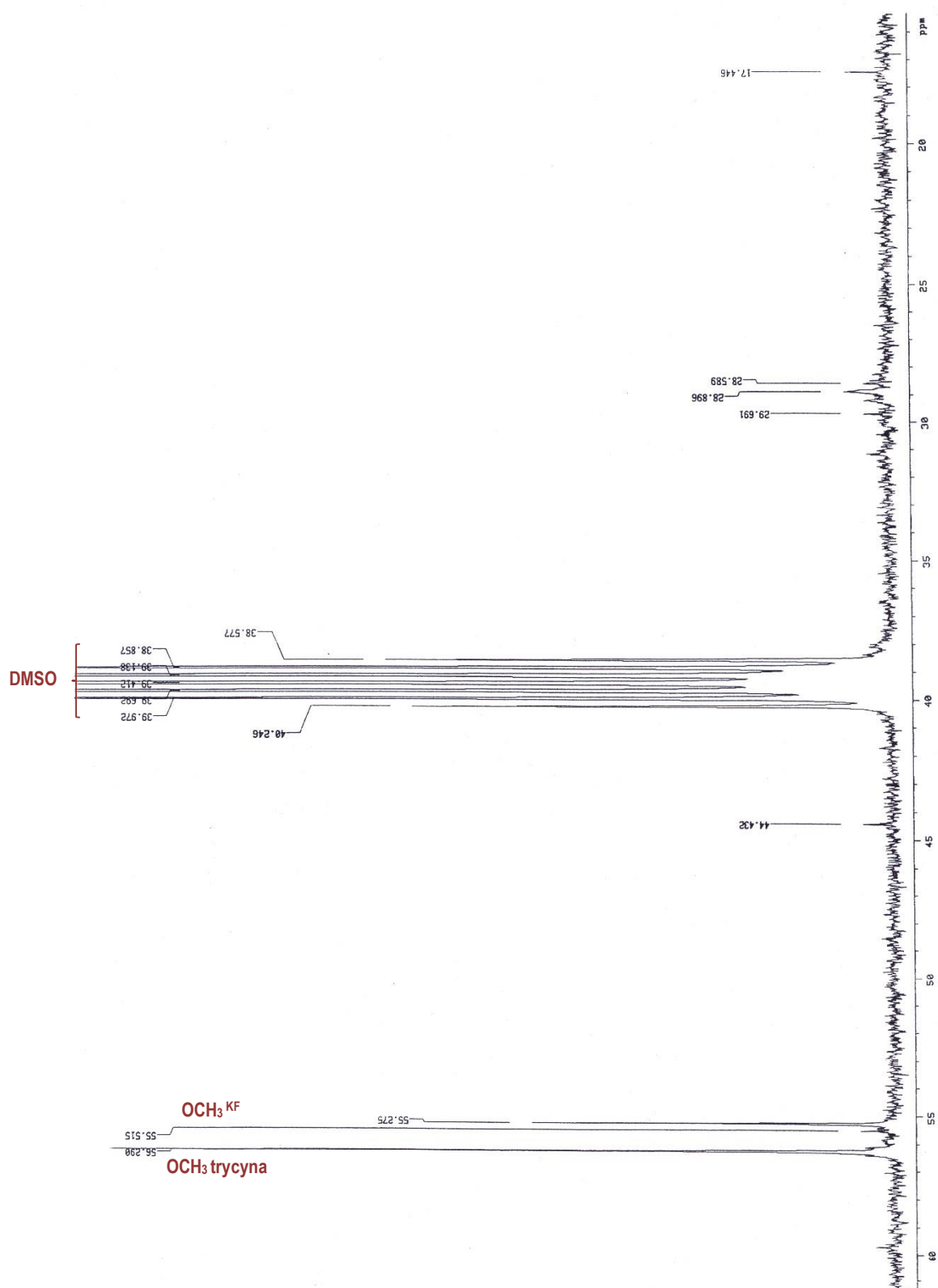
Rycina 43. Widmo ^1H NMR związku 3 (d) ($\text{DMSO-}d_6$).



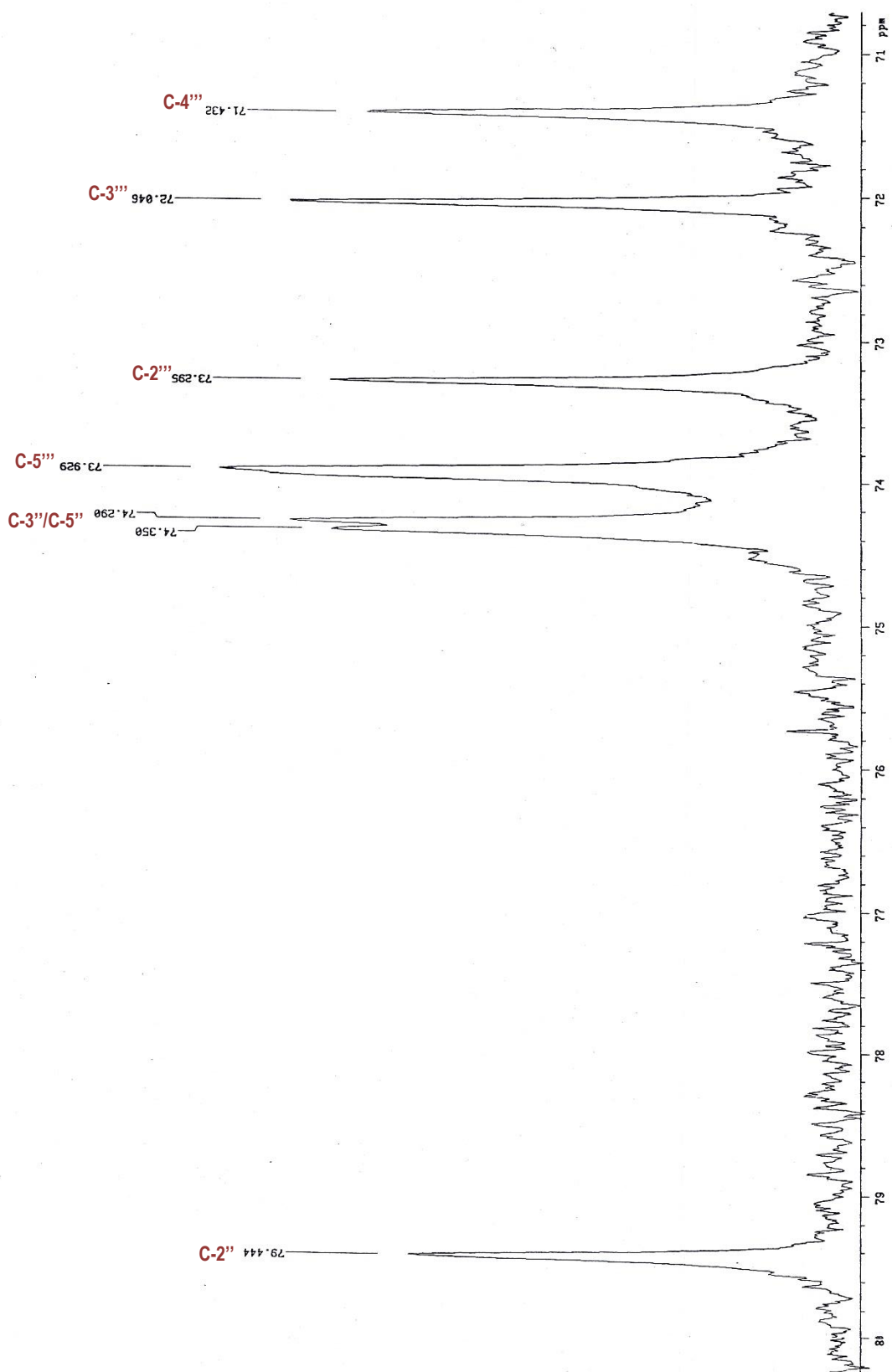
Rycina 44. Widmo ^1H NMR związku 3 (e) ($\text{DMSO-}d_6$).



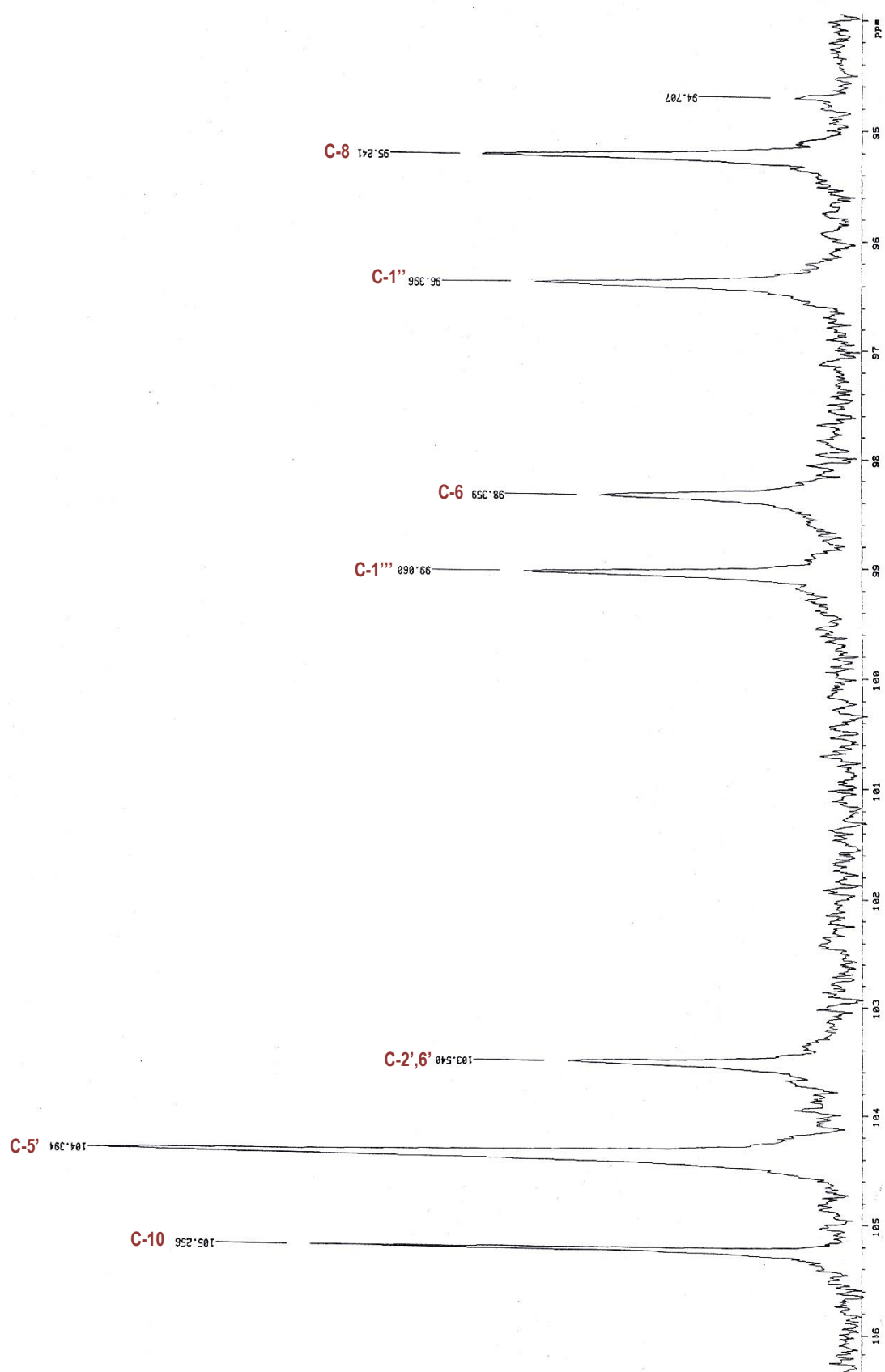
Rycina 45. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (a) ($\text{DMSO-}d_6$).



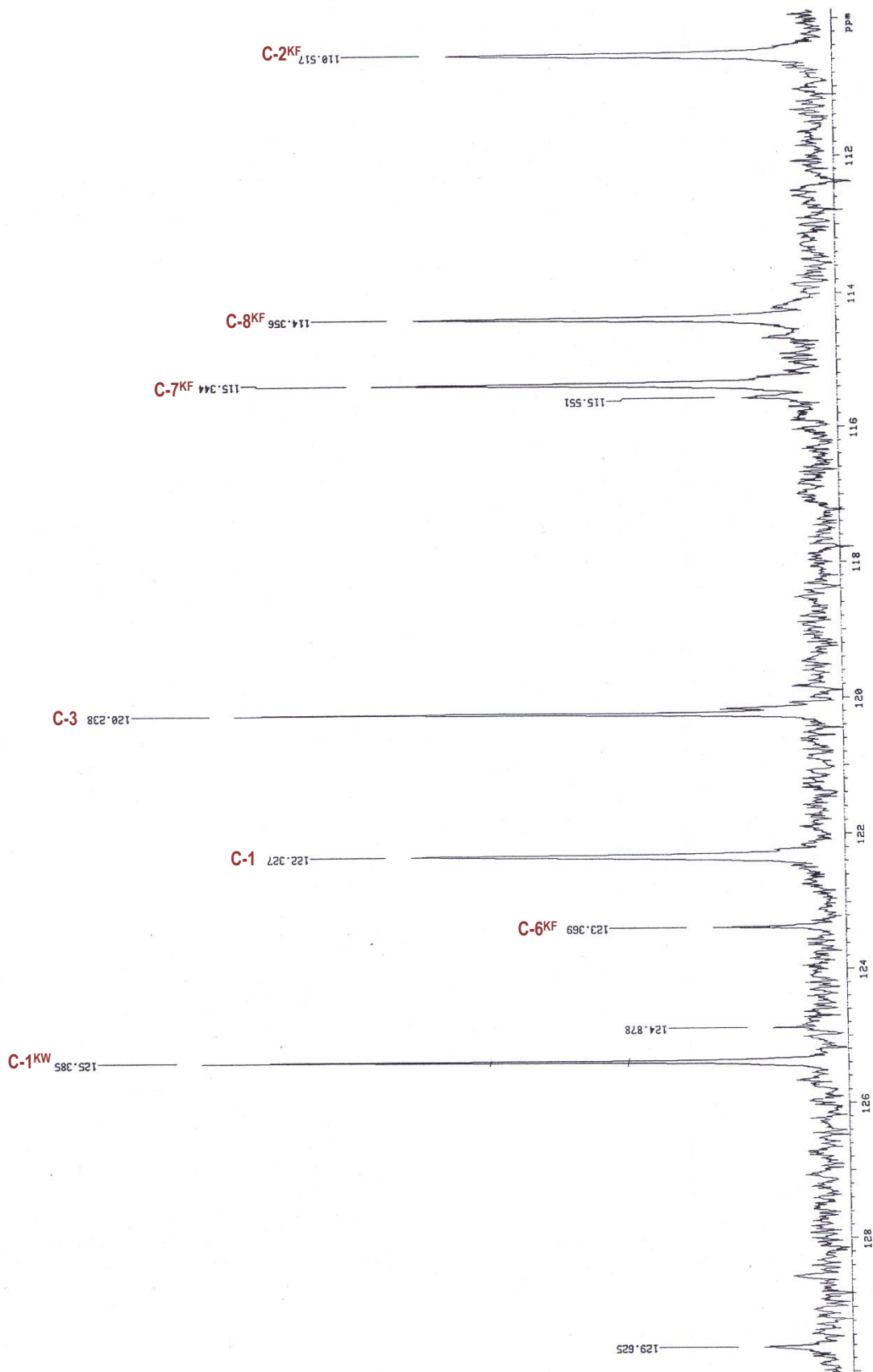
Rycina 46. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (b) ($\text{DMSO-}d_6$).



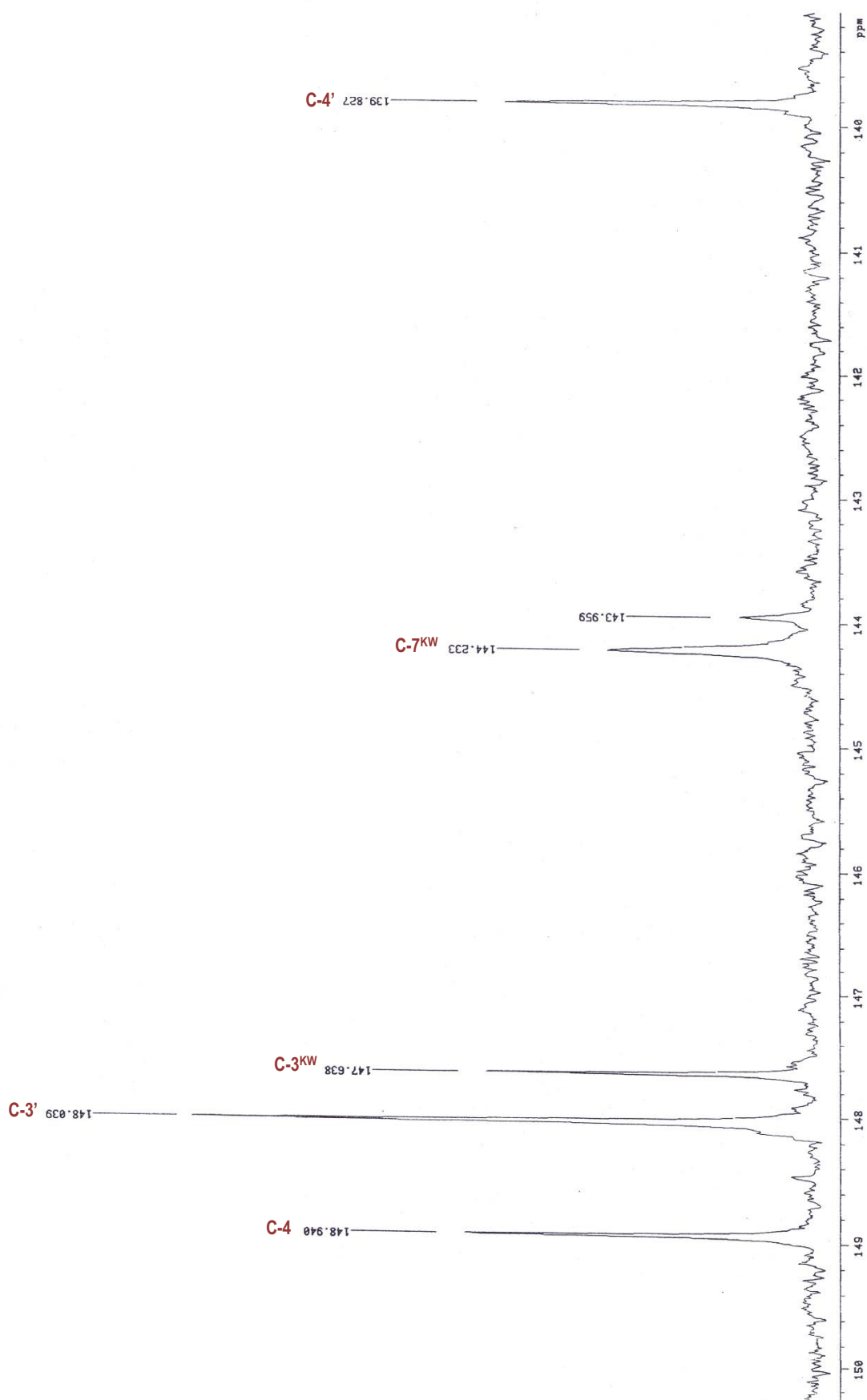
Rycina 47. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (c) ($\text{DMSO-}d_6$).



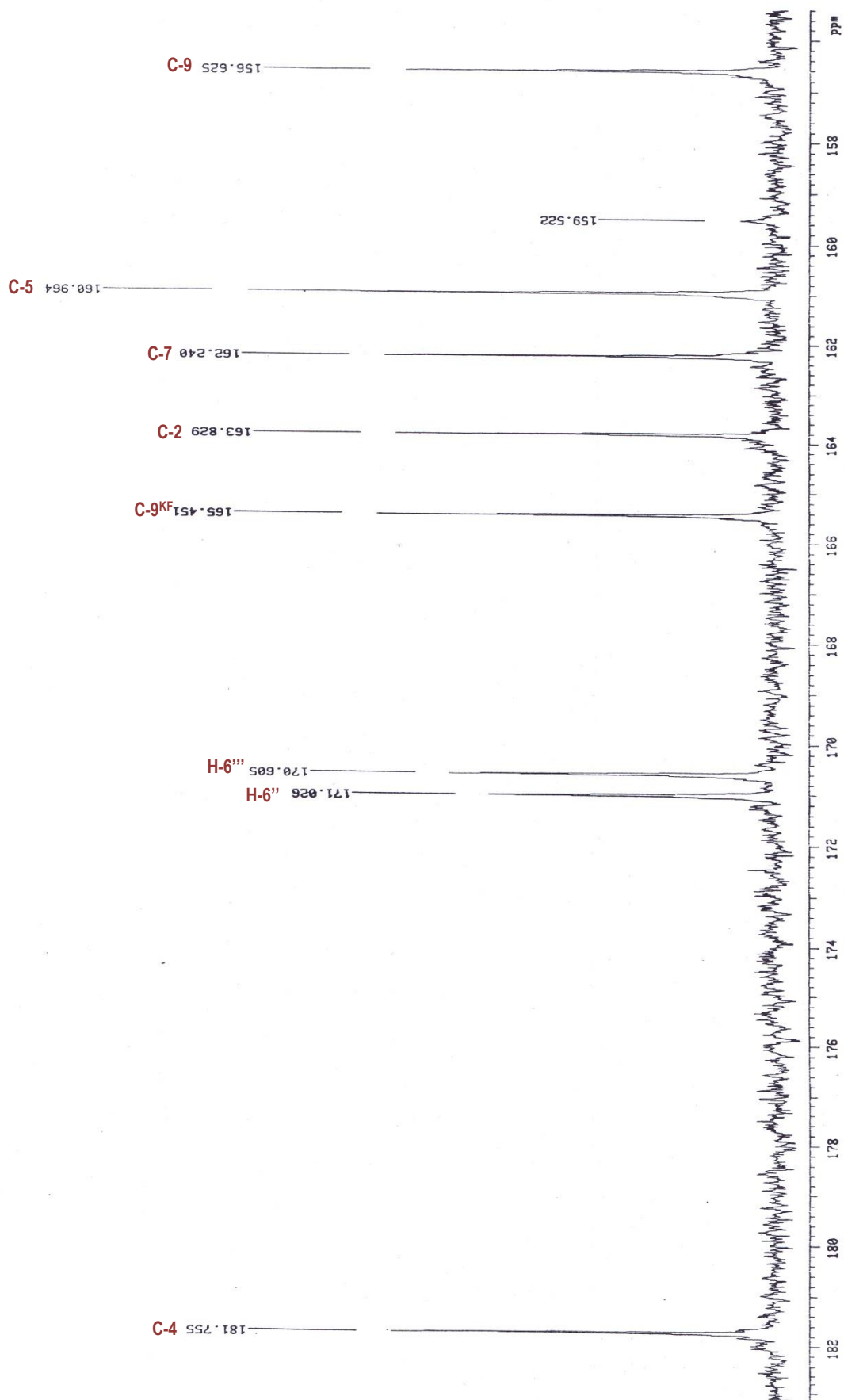
Rycina 48. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (d) (DMSO-d_6).



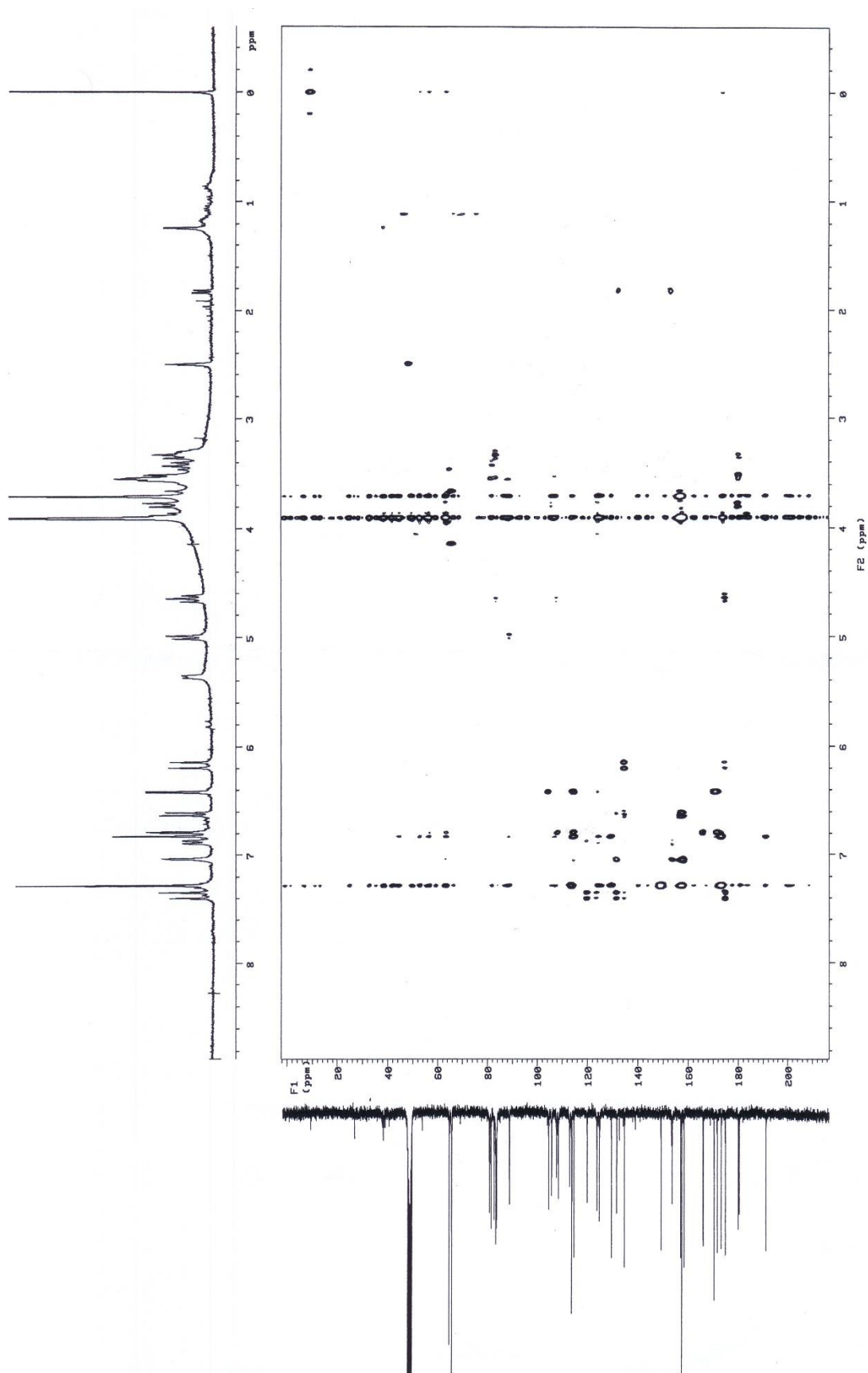
Rycina 49. Widmo ¹³C NMR związku 3 (e) (DMSO-d₆).



Rycina 50. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (f) ($\text{DMSO-}d_6$).

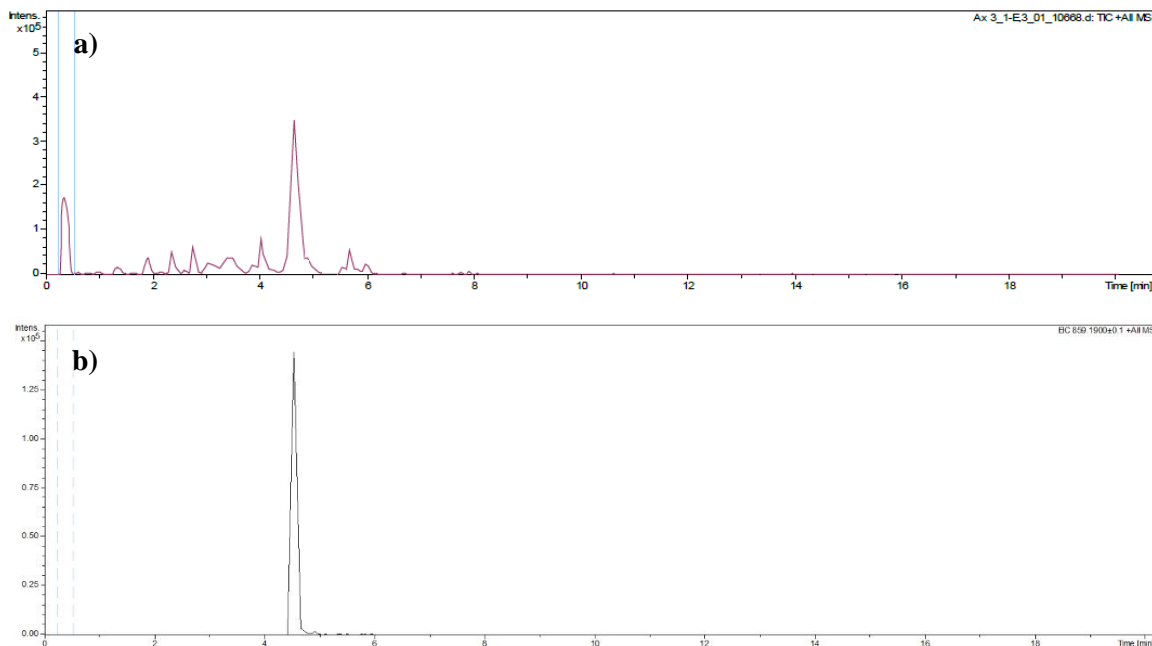


Rycina 51. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (g) ($\text{DMSO-}d_6$).



Rycina 52. Widmo HMBC związku 3.

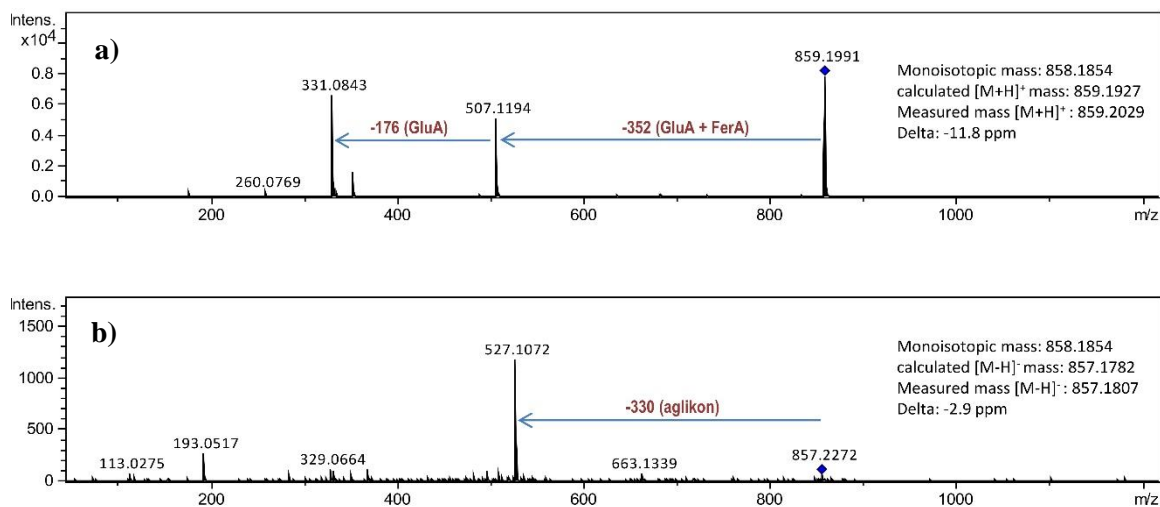
Analiza UPLC-MS/MS



Rycina 53. Chromatogramy TIC (a), EIC (b) analizowanej próbki związku 3.

Tabela 17. Ścieżki fragmentacyjne związku 3 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	<i>m/z</i>	tryb ujemny	<i>m/z</i>
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	859,1991	[M-H] ⁻	857,2272
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	507,1194	B ₂ ⁻	527,1072
	Y ₀ ⁺	331,0843		
Wzór sumaryczny: C₃₉H₃₈O₂₂			Masa monoizotopowa	
			858,1854	



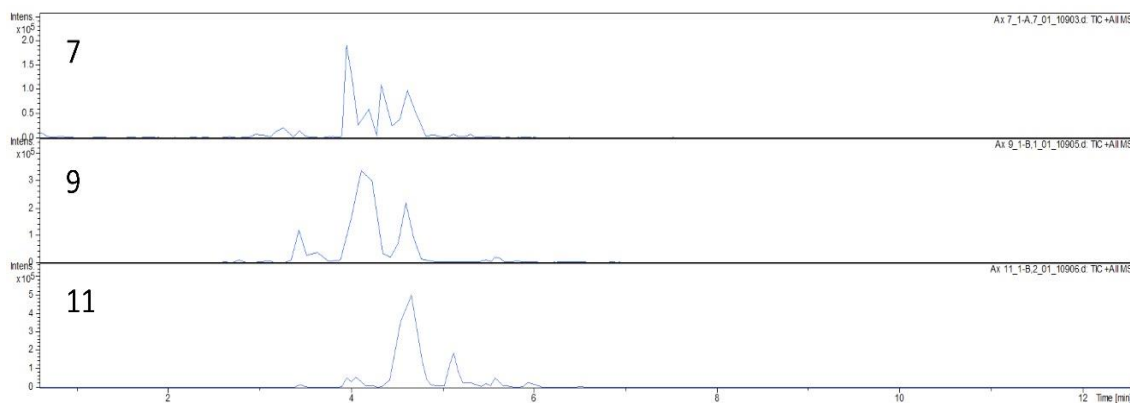
GluA – kwas glukuronowy, **FerA** – kwas ferulowy

Rycina 54. Widma CID MS/MS związku 3 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2. Identyfikacja związków flawonoidowych obecnych we frakcjach

Związki flawonoidowe, których nie udało się wyizolować w postaci jednorodnej identyfikowano w mieszaninie metodą UPLC-MS/MS. Analizie poddano trzy frakcje:

- **frakcja 7**-połączone frakcje 39-68 z **kolumny 2** (OE)
- **frakcja 9**-połączone frakcje 90-120 z **kolumny 3** (W)
- **frakcja 11**-połączone frakcje 121-128 z **kolumny 3** (W)



Rycina 55. Chromatogramy TIC frakcji 7, 9 i 11.

9.1.2.2.1. Analiza UPLC- MS/MS frakcji 7

9.1.2.2.1.1. Związek 4

5-O-glukuronopiranozylo-7-O-glukopiranozyd trycyny

Wzór:

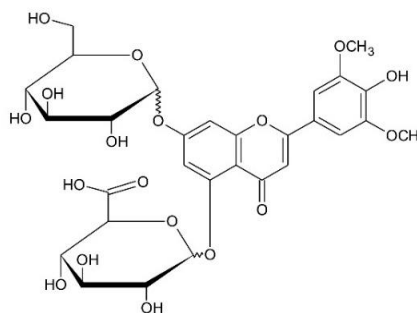
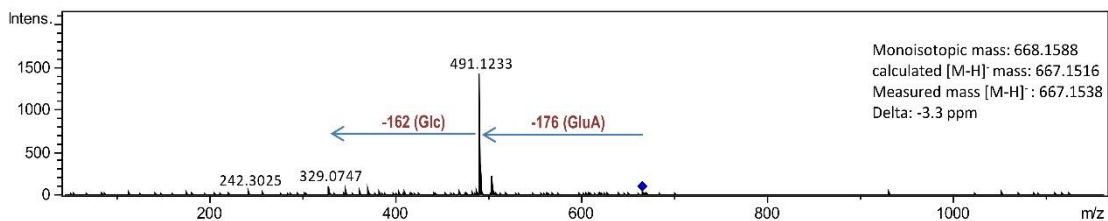
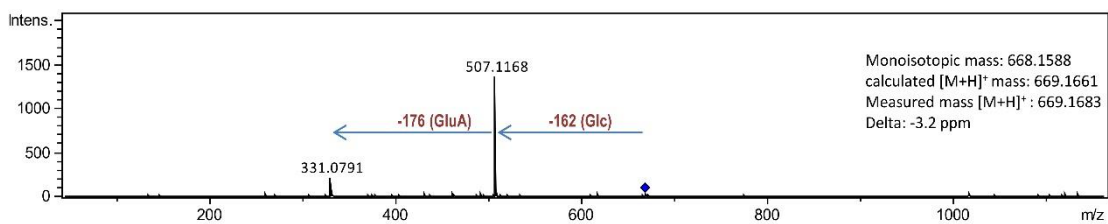


Tabela 18. Ścieżki fragmentacyjne związku 4 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	669,1683	[M-H] ⁻	667,1538
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	507,1168	Y ₁ ⁻	491,1233
	Y ₀ ⁺	331,0791	Y ₀ ⁻	329,0747
Wzór sumaryczny: C ₂₉ H ₃₂ O ₁₈			Masa monoizotopowa	
			668,1588	



GluA – kwas glukuronowy, Glc - glukoza

Rycina 56. Widma CID MS/MS związku 4 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.1.2. Związek 5

7-O-[2'''-O-5-hydroksyferuilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2''')-O-glukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:

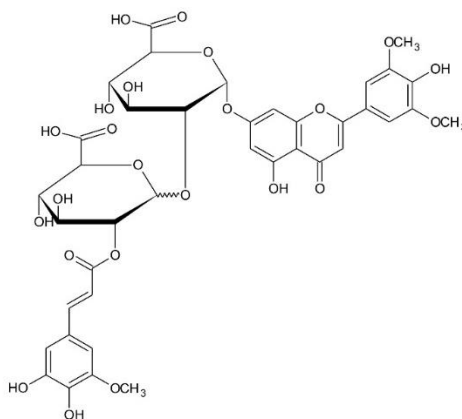
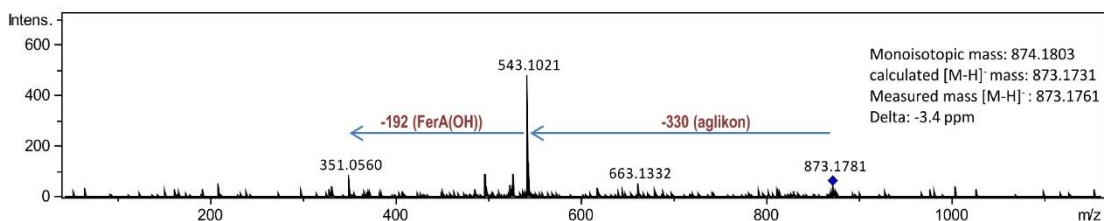
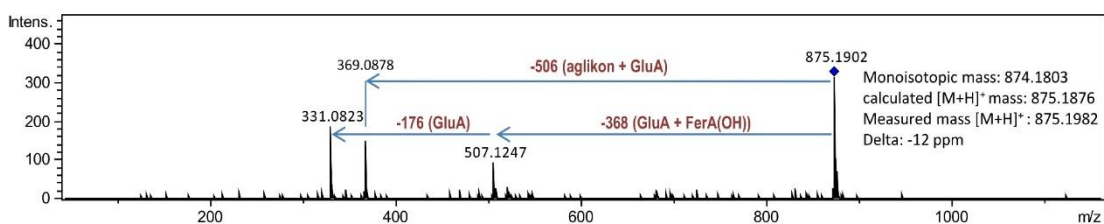


Tabela 19. Ścieżki fragmentacyjne związku 5 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	875,1982	[M-H] ⁻	873,1761
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	507,1247	B ₂ ⁻	543,1021
	Y ₀ ⁺	331,0823	[M-H] ⁻ -aglikon-FerAOH	351,0560
	B ₁ ⁺	369,0878		
Wzór sumaryczny: C₃₉H₃₈O₂₃	Masa monoizotopowa			
	874,1803			



GluA – kwas glukuronowy, (FerA(OH)) – kwas 5-hydroksyferulowy

Rycina 57. Widma CID MS/MS związku 5 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.1.3. Związek 6

4'-O-ksylopiranozylo-7-O-[2'''-O-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2''')-O-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu

Wzór:

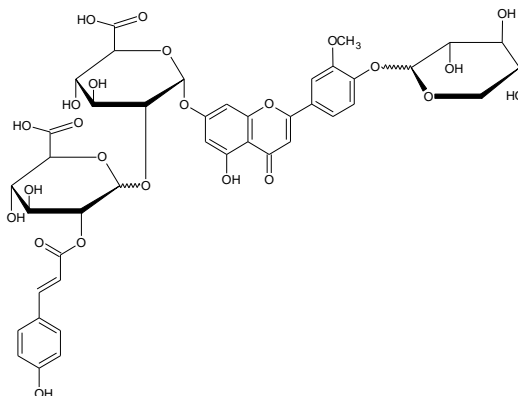
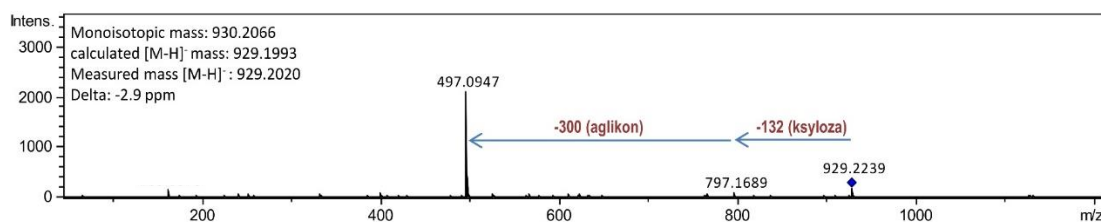
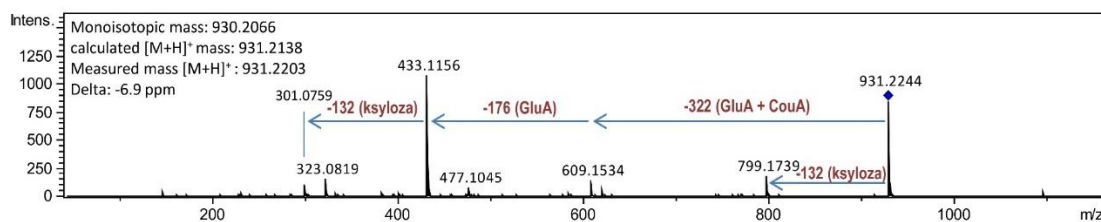


Tabela 20. Ścieżki fragmentacyjne związku 6 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	931,2203	[M-H] ⁻	929,2020
Jon fragmentacyjny	Y ₀ ^{*+}	799,1739	Y ₀ ^{*-}	797,1689
	Y ₂ ⁺	609,1534	B ₂ ⁻	497,0947
	Y ₁ ⁺	433,1156		
	Y ₀ ⁺	301,0759		
Wzór sumaryczny: C₄₂H₄₂O₂₄			Masa monoizotopowa	
			930,2066	



GluA – kwas glukuronowy, Glc – glukoza, Xyl – ksyloza, CouA – kwas kumarowy

Rycina 58. Widma CID MS/MS związku 6 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.1.4. Związek 7

4'-*O*-ksylopiranozylo-7-*O*-[2'''-*O*-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2''')-*O*-glukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:

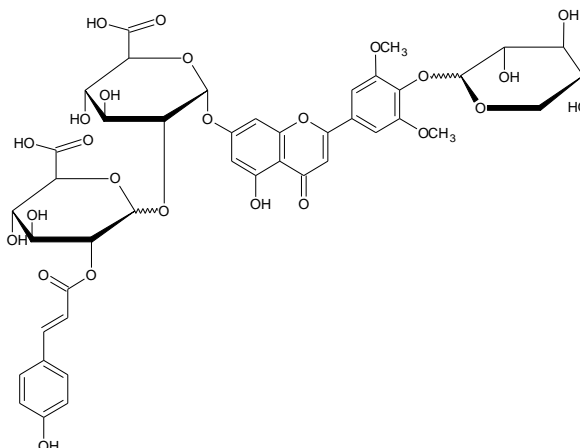
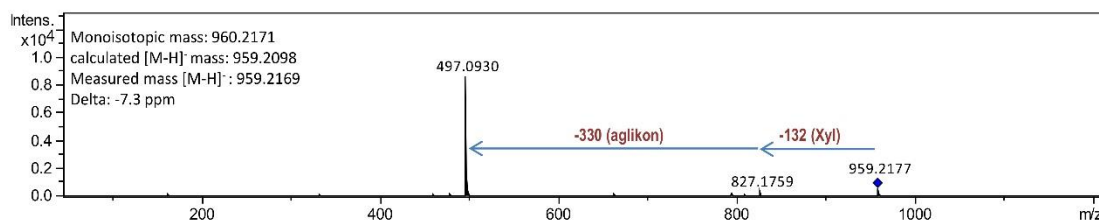
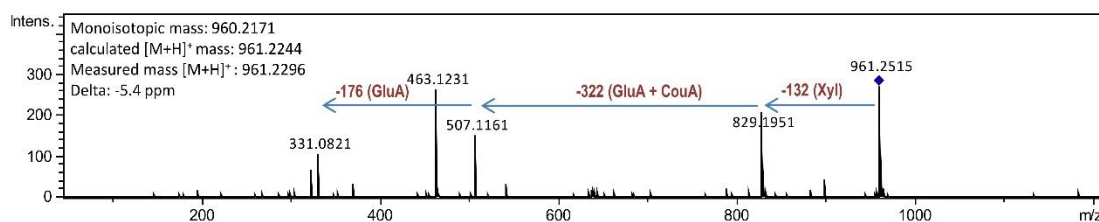


Tabela 21. Ścieżki fragmentacyjne związku 7 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	961,2296	[M-H] ⁻	959,2169
Jon fragmentacyjny	Y ₀ ^{*+}	829,1951	Y ₀ ^{*-}	827,1759
	Y ₁ ⁺	507,1161	B ₂ ⁻	497,0930
	Y ₀ ^{#+}	463,1231		
	Y ₀ ⁺	331,0821		
Wzór sumaryczny: C₄₃H₄₄O₂₅			Masa monoizotopowa	
			960,2171	



GluA – kwas glukuronowy, Glc – glukoza, Xyl – ksyloza, CouA – kwas kumarowy

Rycina 59. Widma CID MS/MS związku 7 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.1.5. Związek 8

7-O-[glukuronopiranozylo-(1''-2'')-O-metyloglukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:

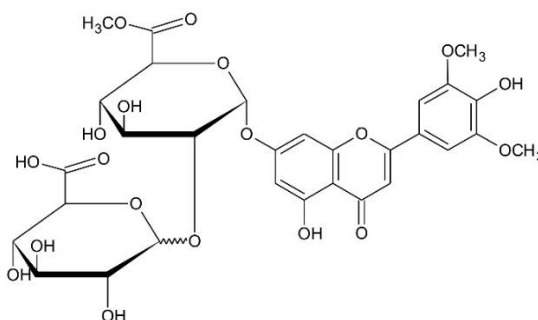
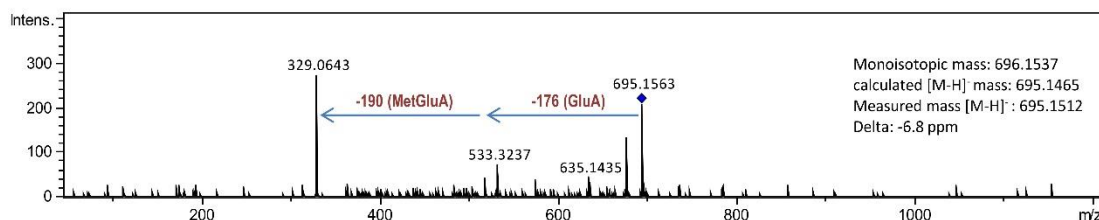
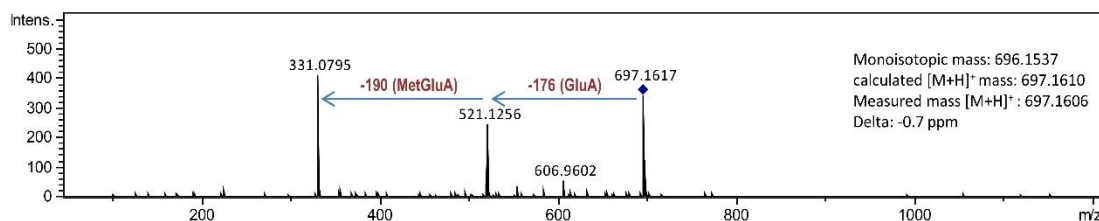


Tabela 22. Ścieżki fragmentacyjne związku 8 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	697,1606	[M-H] ⁻	695,1512
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	521,1256	Y ₁ ⁻	533,3237
	Y ₀ ⁺	331,0795	Y ₀ ⁻	329,0643
Wzór sumaryczny: C ₃₀ H ₃₂ O ₁₉			Masa monoizotopowa	
			696,1537	



GluA – kwas glukuronowy, MetGluA – ester metylowy kwasu glukuronowego

Rycina 60. Widma CID MS/MS związku 8 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2. Analiza UPLC- MS/MS frakcji 9

9.1.2.2.1. Związek 9

3-O-[glukuronopiranozylo-(1''-2'')-glukuronopiranozyd] izoramnetyny

Wzór:

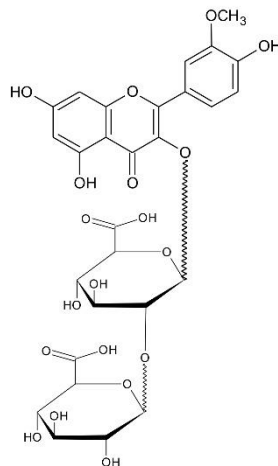
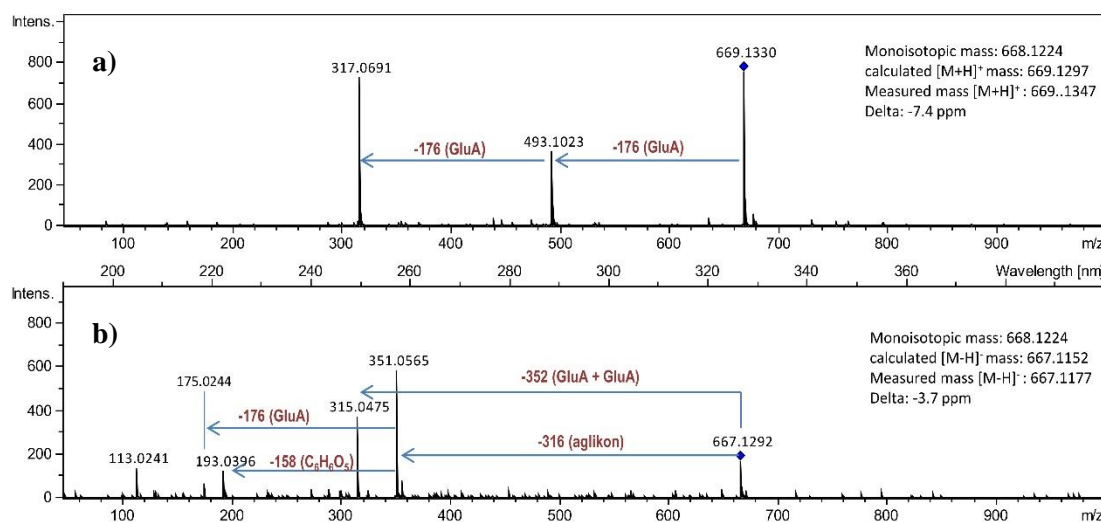


Tabela 23. Ścieżki fragmentacyjne związku 9 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	<i>m/z</i>	tryb ujemny	<i>m/z</i>
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	669,1347	[M-H] ⁻	667,1177
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	493,1023	B ₂ ⁻	351,0565
	Y ₀ ⁺	317,0691	C ₁ ⁻	315,0475
			B ₁ ⁻	193,0396
Wzór sumaryczny: C₂₈H₂₈O₁₉			Masa monoizotopowa	
			668,1224	



GluA – kwas glukuronowy, **CouA** – kwas kumarowy

Rycina 61. Widma CID MS/MS związku 9 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.2. Związek 10

7-O-[glukuronopiranozylo-(1''-2'')-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu

Wzór:

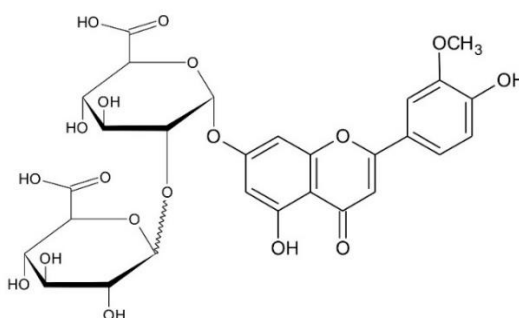
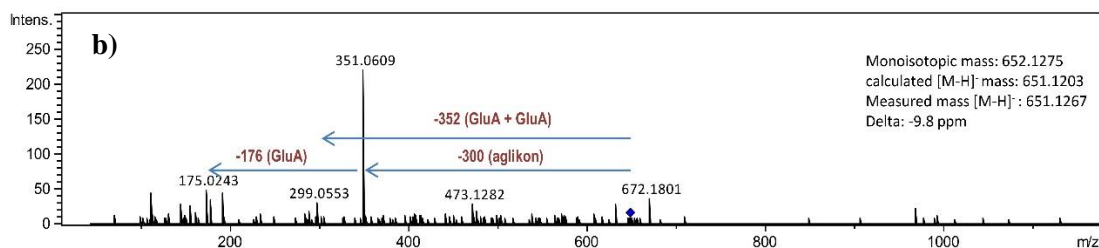
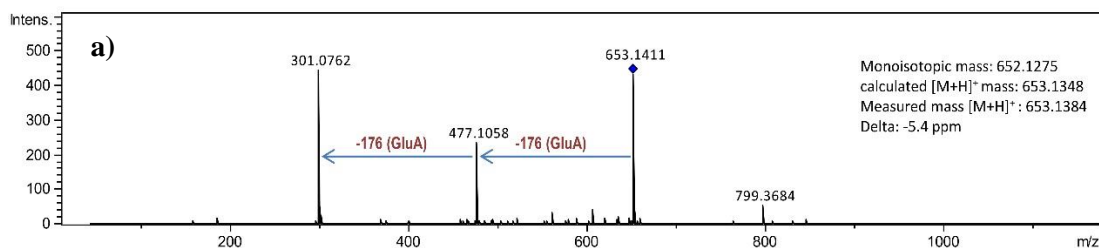


Tabela 24. Ścieżki fragmentacyjne związku 10 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	<i>m/z</i>	tryb ujemny	<i>m/z</i>
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	653,1411	[M-H] ⁻	651,1267
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	477,1058	B ₂ ⁻	351,0609
	Y ₀ ⁺	301,0762	B ₁ ⁻	175,0243
Wzór sumaryczny: C ₂₈ H ₂₈ O ₁₈			Masa monoizotopowa	
			652,1275	



GluA – kwas glukuronowy

Rycina 62. Widma CID MS/MS związku 10 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.3. Związek 11

7-O-[2''-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1'''-3''')-O-glukopiranozyd] chrysoeriolu

Wzór:

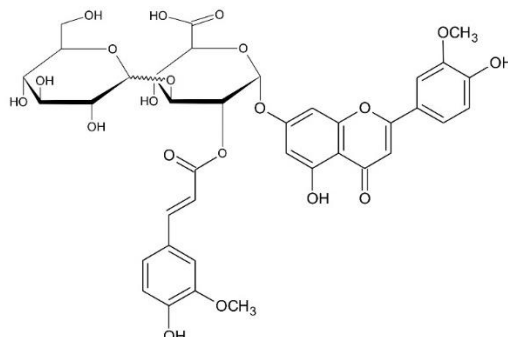
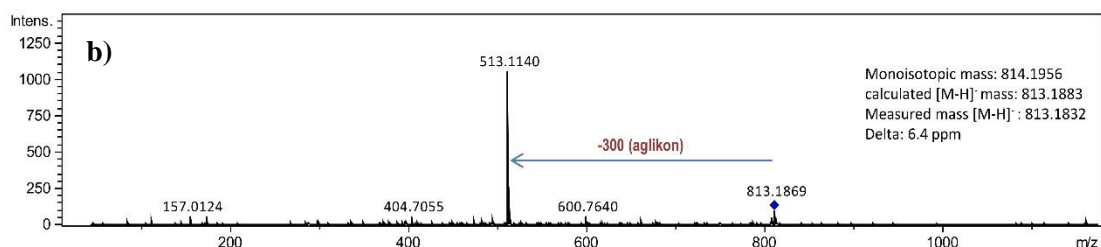
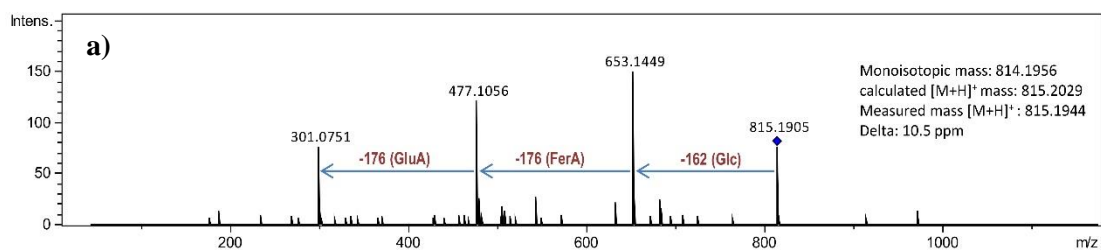


Tabela 25. Ścieżki fragmentacyjne związku 11 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	815,1944	[M-H] ⁻	813,1832
Jon fragmentacyjny	Y ₂ ⁺	653,1449	B ₂ ⁻	513,1140
	Y ₁ ⁺	477,1056		
	Y ₀ ⁺	301,0751		
Wzór sumaryczny: C ₃₈ H ₃₈ O ₂₀			Masa monoizotopowa	
			814,1956	



GluA – kwas glukuronowy, Glc – glukoza, FerA – kwas ferulowy

Rycina 63. Widma CID MS/MS związku 11 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.4. Związek 12

7-O-[2'''-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2''')-O-glukuronopiranozyd] luteoliny

Wzór:

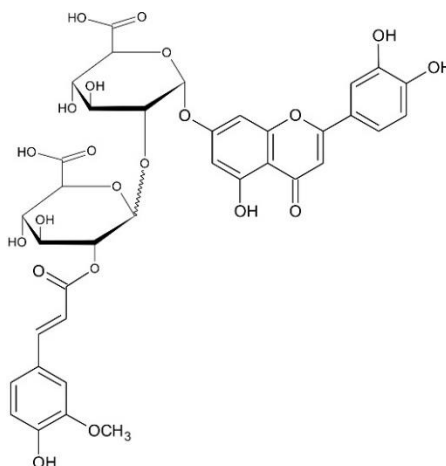
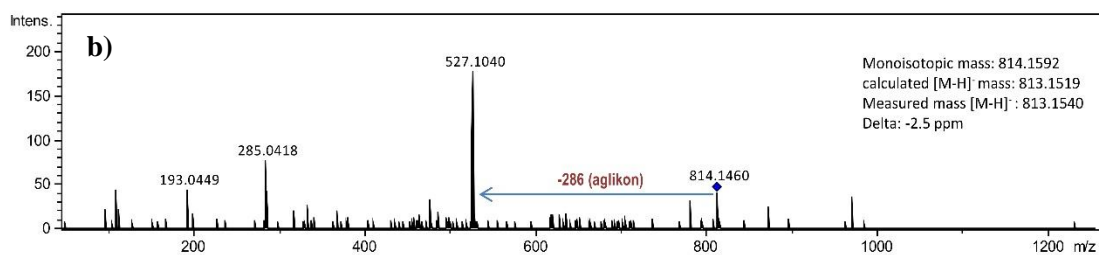
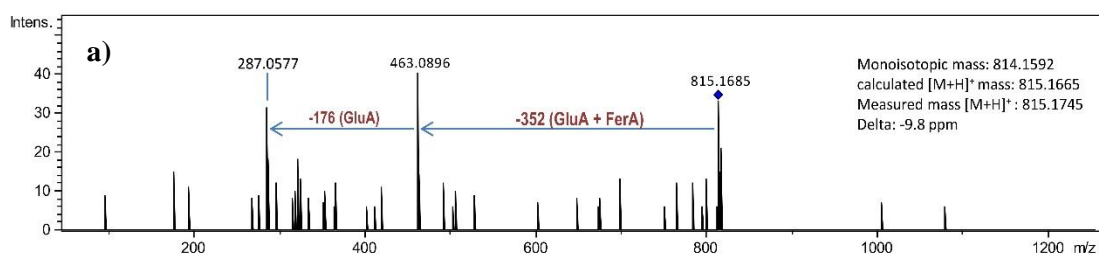


Tabela 26. Ścieżki fragmentacyjne związku 12 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	815,1745	[M-H] ⁻	813,1540
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺ Y ₀ ⁺	463,0896 287,0577	B ₂ ⁻ Y ₀ ⁻	527,1040 285,0418
Wzór sumaryczny: C ₃₇ H ₃₄ O ₂₁			Masa monoizotopowa	
			814,1592	



GluA – kwas glukuronowy, FerA – kwas ferulowy

Rycina 64. Widma CID MS/MS związku 12 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.5. Związek 13

7-O-[glukuronopiranozylo-(1''-2'')-glukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:

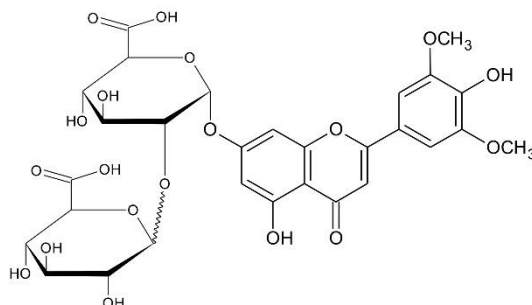
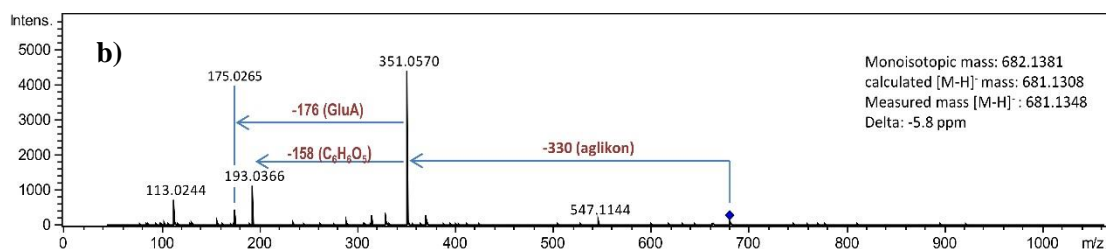
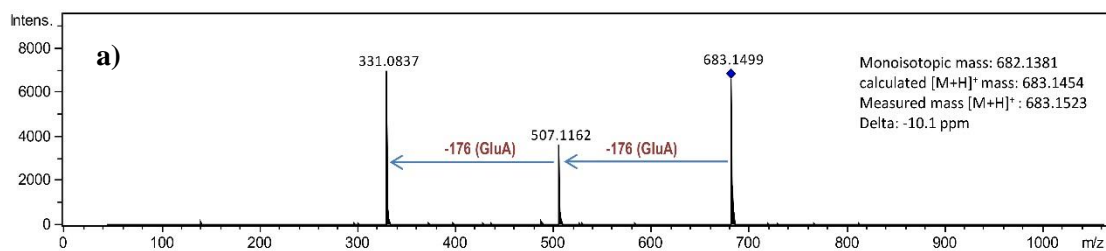


Tabela 27. Ścieżki fragmentacyjne związku 13 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	683,1523	[M-H] ⁻	681,1348
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺ Y ₀ ⁺	507,1162 331,0837	B ₂ ⁻ B ₁ ⁻ C ₁ ⁻	351,0570 175,0265 193,0366
Wzór sumaryczny: C ₂₉ H ₃₀ O ₁₉			Masa monoizotopowa	
			682,1381	



GluA – kwas glukuronowy

Rycina 65. Widma CID MS/MS związku 13 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.6. Związek 14

7-O-[2''-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1'''-3''')-O-glukopiranozyd] trycyny

Wzór:

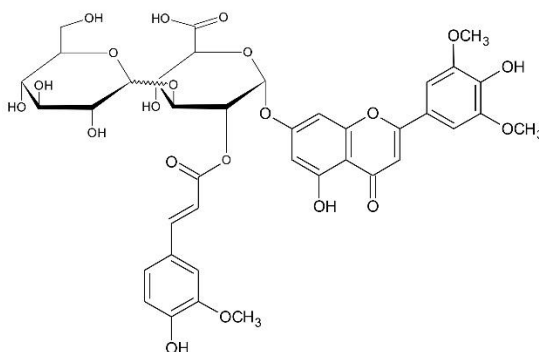
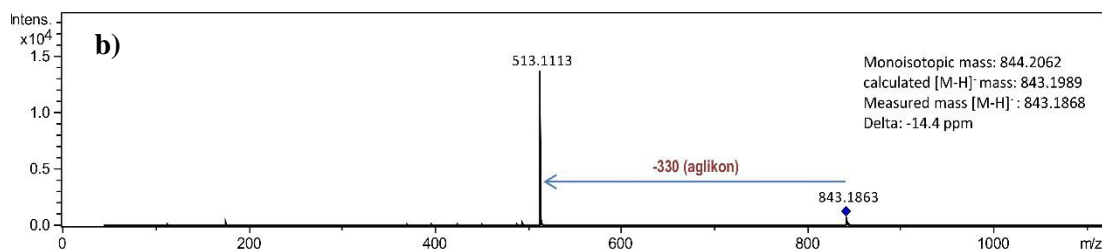
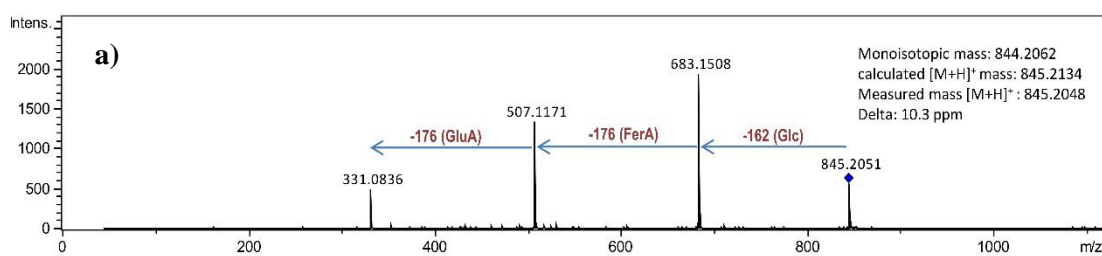


Tabela 28. Ścieżki fragmentacyjne związku 14 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon molekularny	[M+H] ⁺	845,2048	[M-H] ⁻	843,1868
Jon fragmentacyjny	Y ₂ ⁺	683,1508	B ₂ ⁻	513,1113
	Y ₁ ⁺	507,1171		
	Y ₀ ⁺	331,0836		
Wzór sumaryczny: C ₃₉ H ₄₀ O ₂₁			Masa monoizotopowa	
			844,2062	



GluA – kwas glukuronowy, Glc – glukoza, FerA – kwas ferulowy

Rycina 66. Widma CID MS/MS związku 14 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.7. Związek 15

7-O-{2'''-O-feruilo-[glukopiranozylo-(1'''-3''') -O-glukopiranozylo]-(1'''-2''') -O-glukuronopiranozyd} trycyny

Wzór:

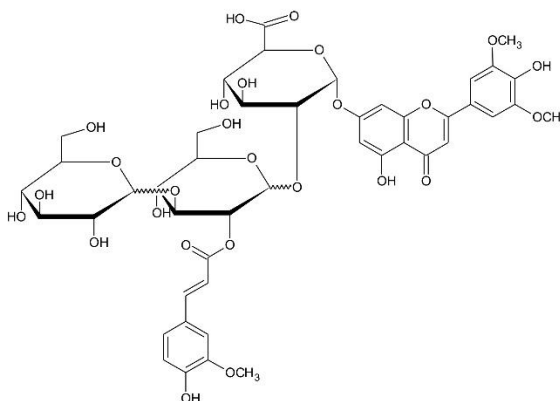
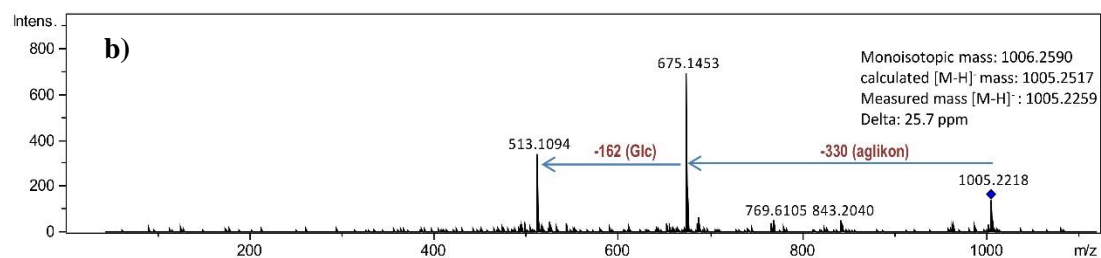
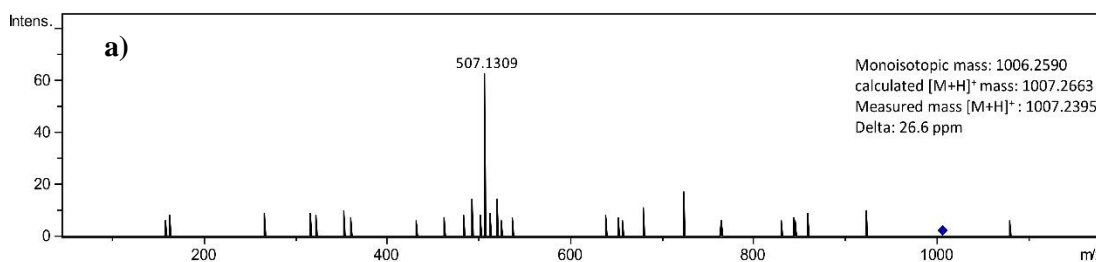


Tabela 29. Ścieżki fragmentacyjne związku 15 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	1007,2395	[M-H] ⁻	1005,2218
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	507,1309	B ₂ ⁻ [M-H] ⁻ -aglikon-Glc	675,1453 513,1094
Wzór sumaryczny: C ₄₅ H ₅₀ O ₂₆			Masa monizotopowa	
			1006,2590	



Glc - glukoza

Rycina 67. Widma CID MS/MS związku 15 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.8. Związek 16

3-O-glukuronopiranozyd izoramnetyny

Wzór:

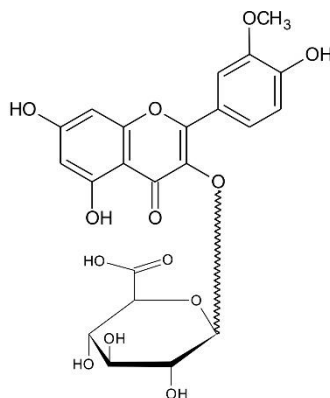
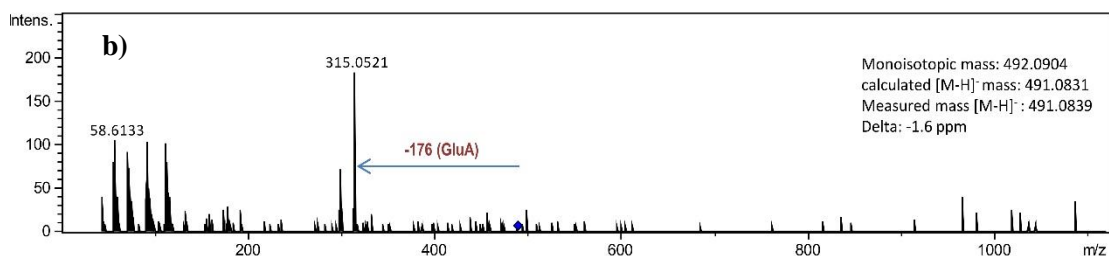
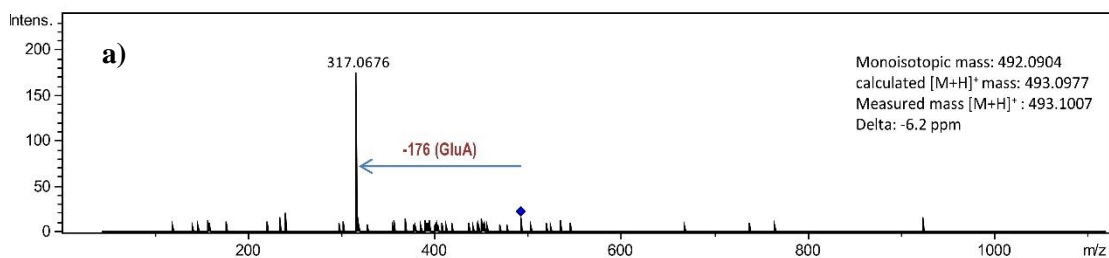


Tabela 30. Ścieżki fragmentacyjne związku 16 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	<i>m/z</i>	tryb ujemny	<i>m/z</i>
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	493,1007	[M-H] ⁻	491,0839
Jon fragmentacyjny	Y ₀ ⁺	317,0676	Y ₀ ⁻	315,0521
Wzór sumaryczny: C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃			Masa monoizotopowa	
			492,0904	



GluA – kwas glukuronowy

Rycina 68. Widma CID MS/MS związku 16 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.9. Związek 17

3-O-{3'''-O-kumaroilo-[glukopiranozylo-(1''''-2''')-O-glukuronopiranozylo]-
(1''''-2''')-O-glukuronopiranozyd} izoramnetyny

Wzór:

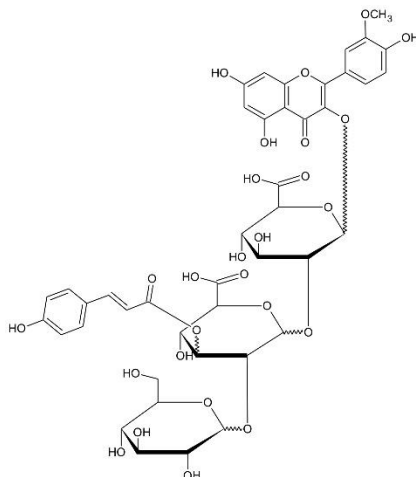
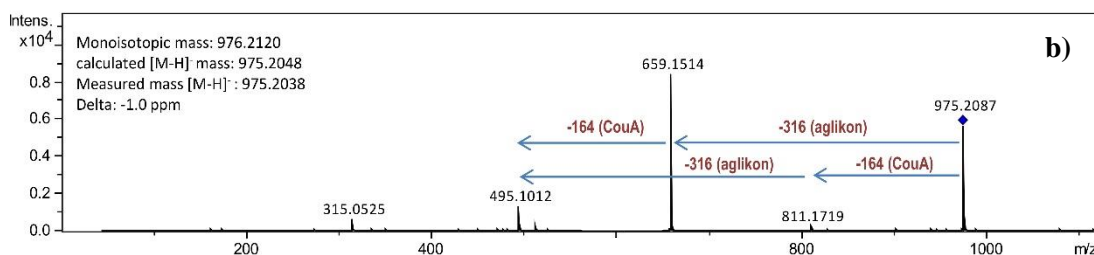
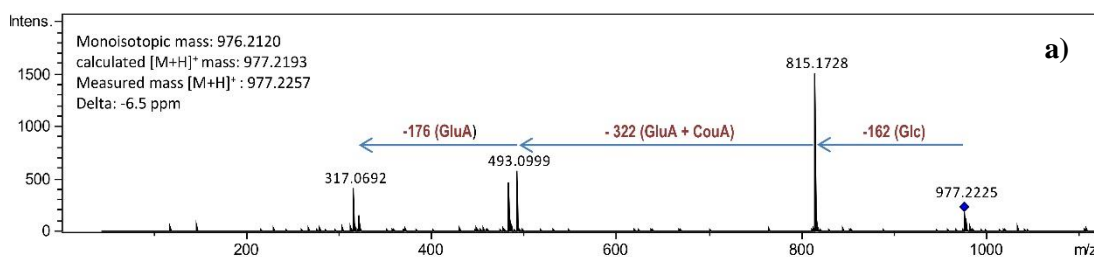


Tabela 31. Ścieżki fragmentacyjne związku 17 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	977,2257	[M-H] ⁻	975,2038
Jon fragmentacyjny	Y ₂ ⁺	815,1728	B ₂ ⁻	659,1514
	Y ₁ ⁺	493,0999	Z ₂ ⁻	811,1719
	Y ₀ ⁺	317,0692	[M-H] ⁻ -aglikon-CouA	495,1012
			Y ₀ ⁻	315,052
Wzór sumaryczny: C₄₃H₄₄O₂₆			Masa monoizotopowa	
			976,2120	



GluA – kwas glukuronowy, **Glc** – glukoza, **CouA** – kwas kumarowy

Rycina 69. Widma CID MS/MS związku 17 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.10. Związek 18

3-O-[2'''-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2''')-O-glukuronopiranozyd] syryngetyny

Wzór:

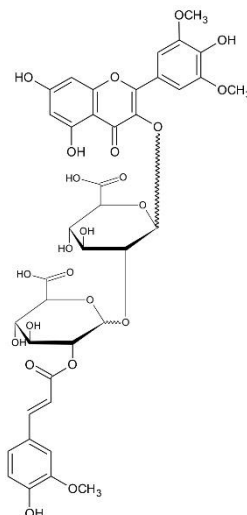
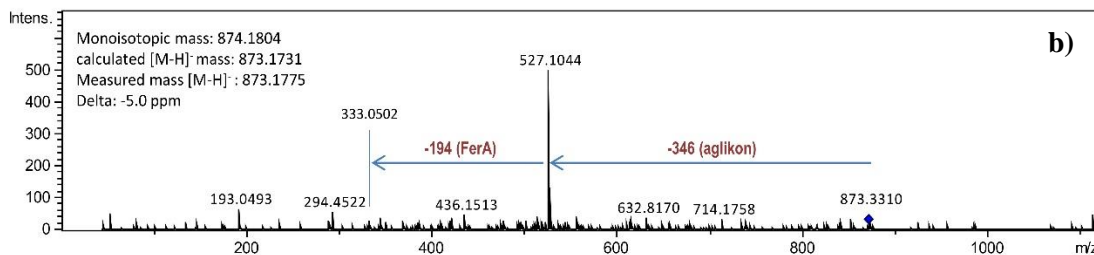
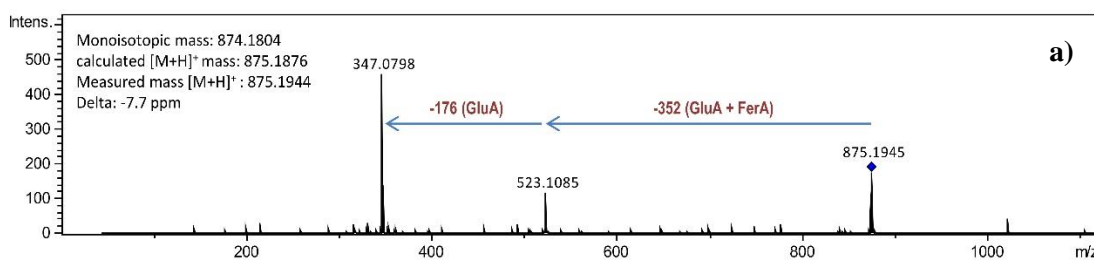


Tabela 32. Ścieżki fragmentacyjne związku 18 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	875,1944	[M-H] ⁻	873,1775
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	523,1085	B ₂ ⁻	527,1044
	Y ₀ ⁺	347,0798	[M-H] ⁻ -aglikon-FerA	333,0502
Wzór sumaryczny: C ₃₉ H ₃₈ O ₂₃			Masa monoizotopowa	
			874,1804	



GluA - kwas glukuronowy, FerA – kwas ferulowy

Rycina 70. Widma CID MS/MS związku 18 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.11. Związek 19

7-O-{2'''-O-feruilo-[glukopiranozylo-(1'''-3''')-O-glukuronopiranozylo]-(1'''-2''')-O-glukuronopiranozyd} apigeniny

Wzór:

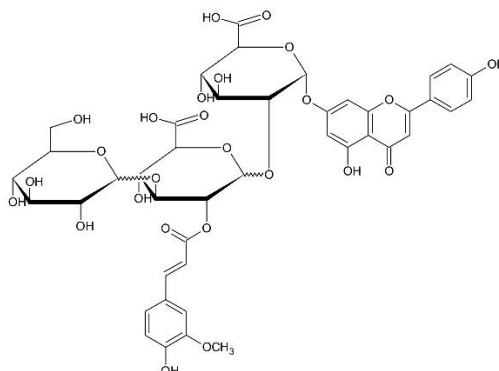
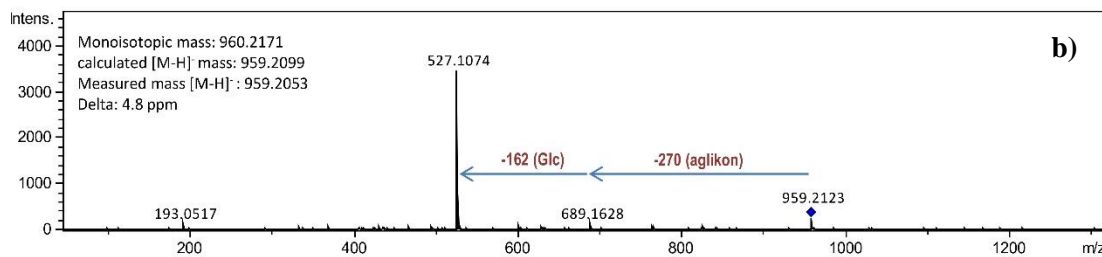
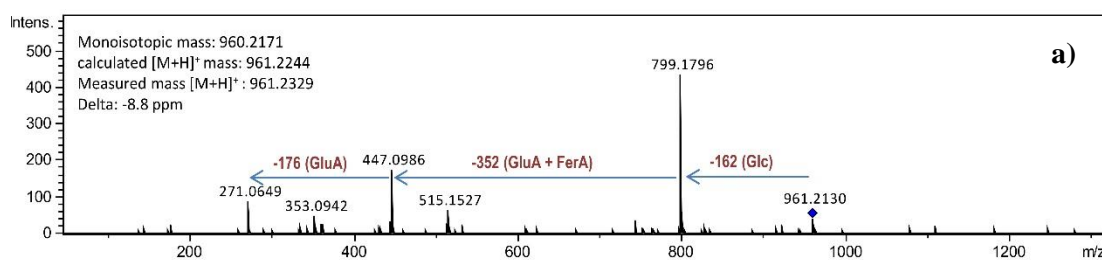


Tabela 33. Ścieżki fragmentacyjne związku 19 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	961,2130	[M-H] ⁻	959,2053
Jon fragmentacyjny	Y ₂ ⁺	799,1796	B ₂ ⁻	689,1628
	Y ₁ ⁺	447,0986	[M-H] ⁻ -aglikon-Glc	527,1074
	Y ₀ ⁺	271,0649		
Wzór sumaryczny: C ₄₃ H ₄₄ O ₂₅	Masa monoizotopowa			
	960,2171			



GluA – kwas glukuronowy, Glc – glukoza, FerA – kwas ferulowy

Rycina 71. Widma CID MS/MS związku 19 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.12. Związek 20

3-O-[2'''-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-glukuronopiranozyd] izoramnetyny

Wzór:

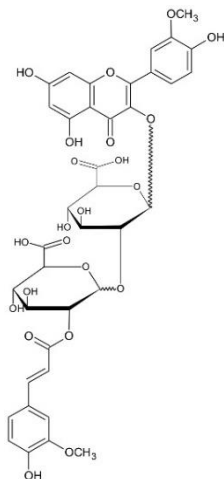
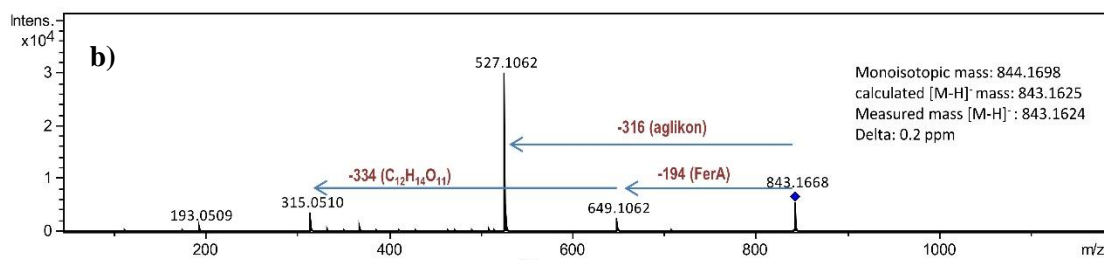
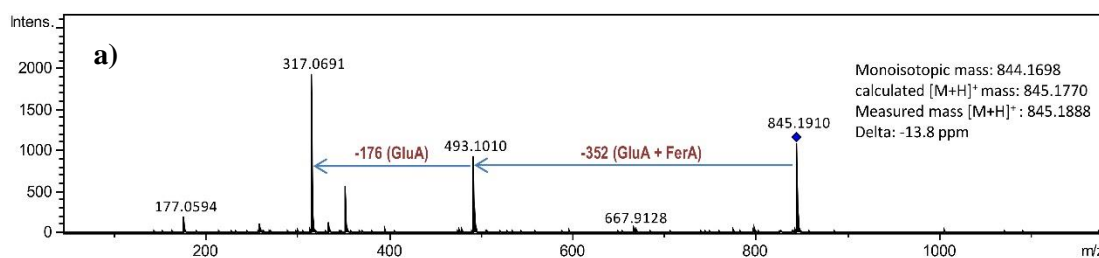


Tabela 34. Ścieżki fragmentacyjne związku 20 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	845,1888	[M-H] ⁻	843,1624
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺ Y ₀ ⁺	493,1010 317,0691	B ₂ ⁻ Z ₂ ⁻ Y ₀ ⁻	527,1062 649,1062 315,0510
Wzór sumaryczny: C ₃₈ H ₃₆ O ₂₂	Masa monoizotopowa			
	844,1698			



GluA – kwas glukuronowy, FerA– kwas ferulowy

Rycina 72. Widma CID MS/MS związku 20 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.13. Związek 21

7-*O*-{3'''-*O*-feruilo-[glukopiranozylo-(1''''-2''')]-*O*-glukuronopiranozylo]-(1''''-2''')-*O*-glukuronopiranozyd} chrysoeriolu

Wzór:

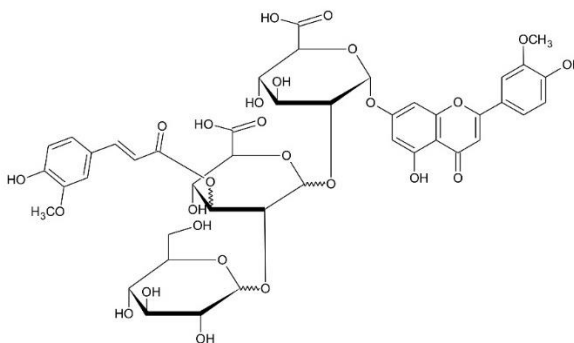
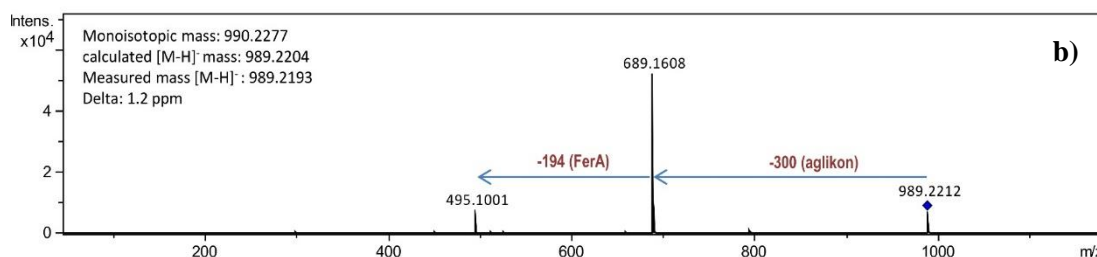
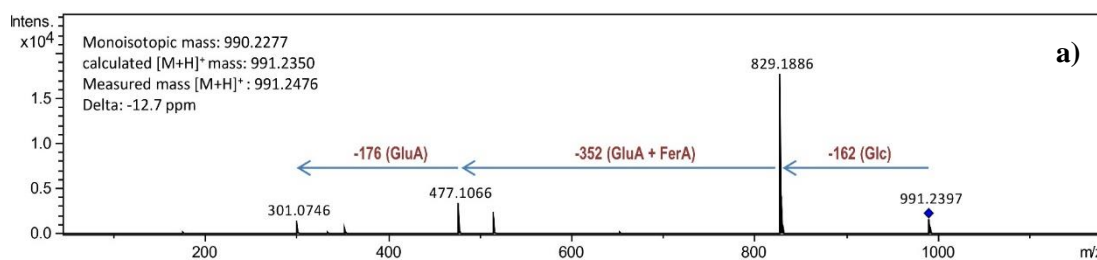


Tabela 35. Ścieżki fragmentacyjne związku 21 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	<i>m/z</i>	tryb ujemny	<i>m/z</i>
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	991,2476	[M-H] ⁻	989,2193
Jon fragmentacyjny	Y ₂ ⁺	829,1886	B ₂ ⁻	689,1608
	Y ₁ ⁺	477,1066	[M-H] ⁻ -aglikon-FerA	495,1013
	Y ₀ ⁺	301,0746		
Wzór sumaryczny: C ₄₄ H ₄₆ O ₂₆				Masa monoizotopowa
				990,2277



GluA – kwas glukuronowy, Glc – glukoza, FerA – kwas ferulowy

Rycina 73. Widma CID MS/MS związku 21 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.14. Związek 22

7-O-{3'''-O-feruilo-[glukopiranozylo-(1''''-2''')-O-glukuronopiranozylo]-(1''''-2''')-O-glukuronopiranozyd} trycyny

Wzór:

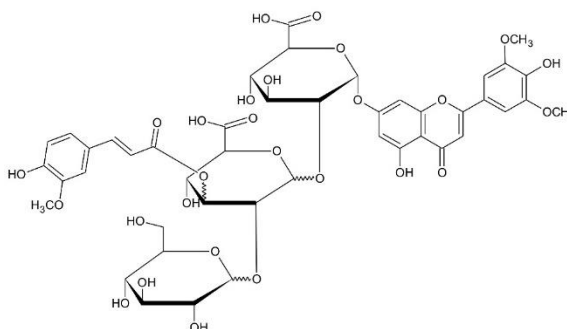
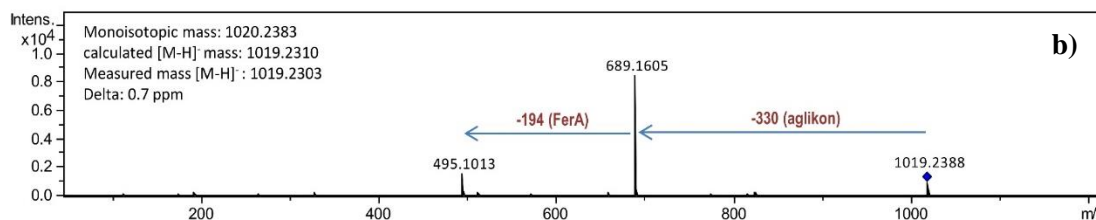
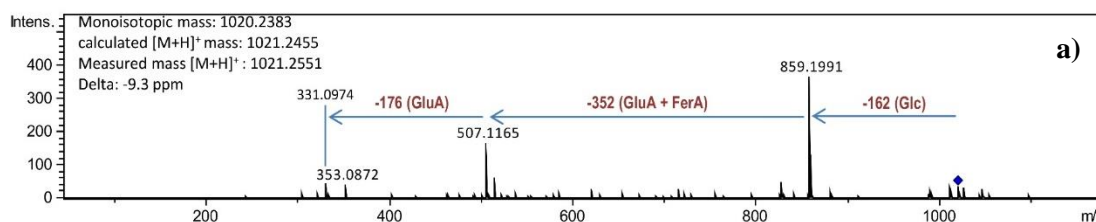


Tabela 36. Ścieżki fragmentacyjne związku 22 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	1021,2551	[M-H] ⁻	1019,2303
Jon fragmentacyjny	Y ₂ ⁺	859,1991	B ₂ ⁻	689,1605
	Y ₁ ⁺	507,1165	[M-H] ⁻ -aglikon-FerA	495,1013
	Y ₀ ⁺⁺	331,0974		
Wzór sumaryczny: C₄₅H₄₈O₂₇	Masa cząsteczkowa			
	1020,2383			



GluA – kwas glukuronowy, Glc – glukoza, FerA – kwas ferulowy

Rycina 74. Widma CID MS/MS związku 22 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.15. Związek 23

7-O-{3'''-O-kumaroilo-[glukopiranozylo-(1''''-2''')-O-glukuronopiranozylo]-(1''''-2''')-O-glukuronopiranozyd} trycyny

Wzór:

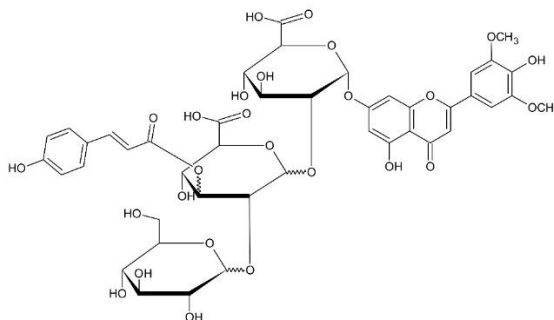
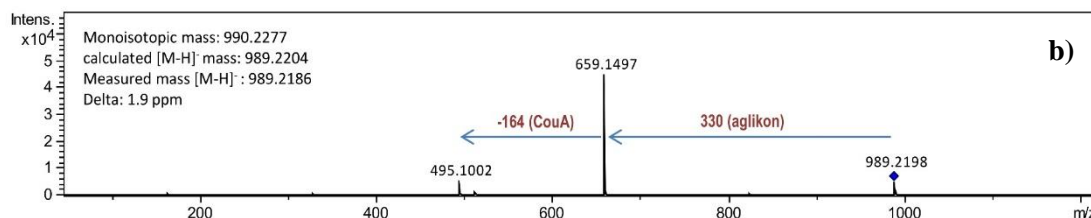
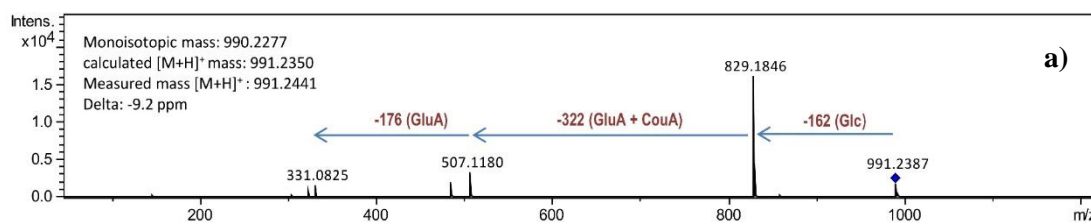


Tabela 37. Ścieżki fragmentacyjne związku 23 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	991,2441	[M-H] ⁻	989,2186
Jon fragmentacyjny	Y ₂ ⁺	829,1846	B ₂ ⁻	659,1497
	Y ₁ ⁺	507,1180	[M-H] ⁻ -aglikon-CouA	495,1013
	Y ₀ ⁺	331,0825		
Wzór sumaryczny: C₄₄H₄₆O₂₆			Masa monoizotopowa	
			990,2277	



GluA – kwas glukuronowy, Glc – glukoza, CouA – kwas kumarowy

Rycina 75. Widma CID MS/MS związku 23 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.16. Związek 24

7-O-[2'''-O-sinapilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2''')-O-glukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:

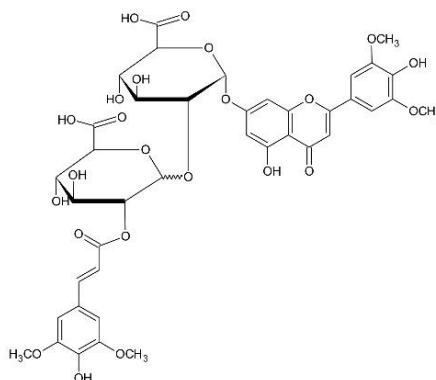
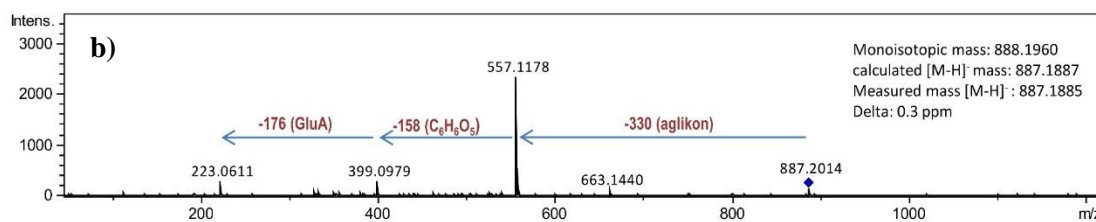
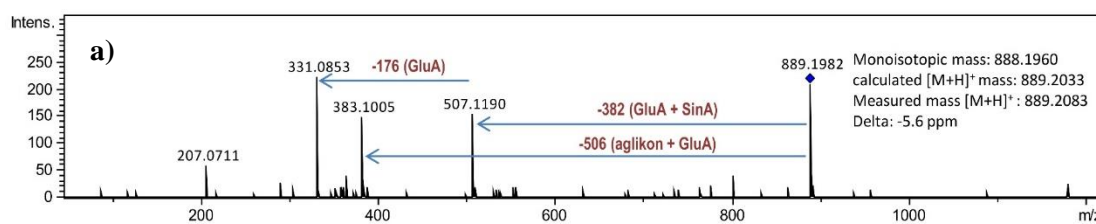


Tabela 38. Ścieżki fragmentacyjne związku 24 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	<i>m/z</i>	tryb ujemny	<i>m/z</i>
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	889,2083	[M-H] ⁻	887,1885
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	507,1190	B ₂ ⁻	557,1178
	Y ₀ ⁺	331,0853	C ₁ ⁻	399,0979
	B ₁ ⁺	383,1005	[SinA-H] ⁻	223,0611
Wzór sumaryczny: C₄₀H₄₀O₂₃			Masa monoizotopowa	
			888,1960	



GluA – kwas glukuronowy, SinA – kwas synapinowy

Rycina 76. Widma CID MS/MS związku 24 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.17. Związek 25

7-O-[2'''-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2''')-O-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu

Wzór:

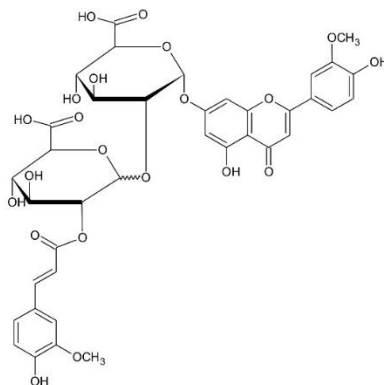
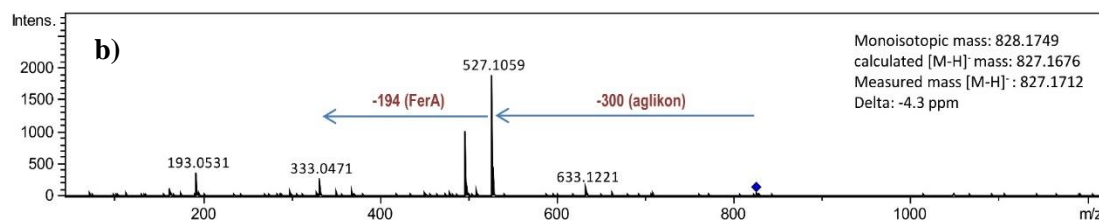
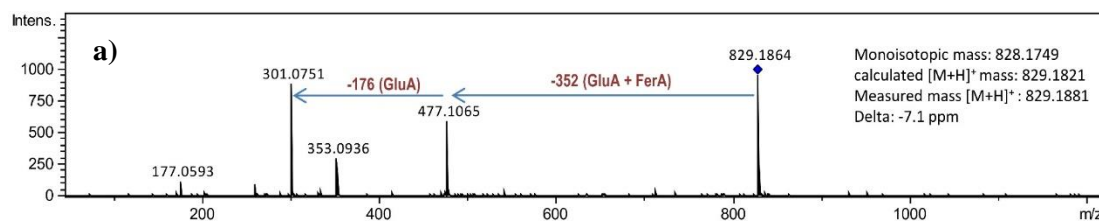


Tabela 39. Ścieżki fragmentacyjne związku 25 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	829,1881	[M-H] ⁻	827,1712
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	477,1065	B ₂ ⁻	527,1059
	Y ₀ ⁺	301,0751	[M-H] ⁻ -aglikon-FerA	333,0471
	B ₁ ⁺	353,0936		
Wzór sumaryczny: C ₃₈ H ₃₆ O ₂₁				Masa monoizotopowa
				828,1749



GluA – kwas glukuronowy, FerA – kwas ferulowy

Rycina 77. Widma CID MS/MS związku 25 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.18. Związek 26

7-O-[2'''-O-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-O-glukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:

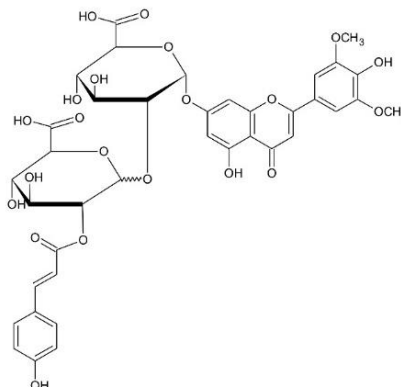
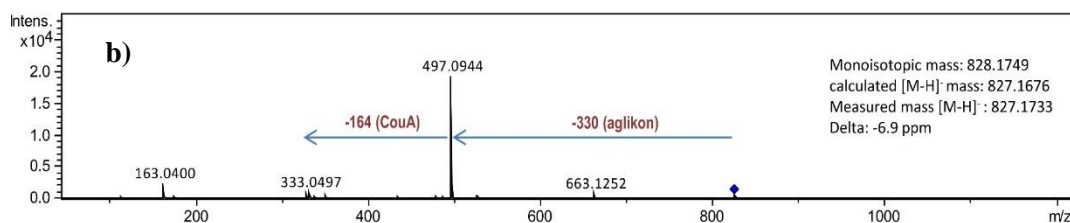
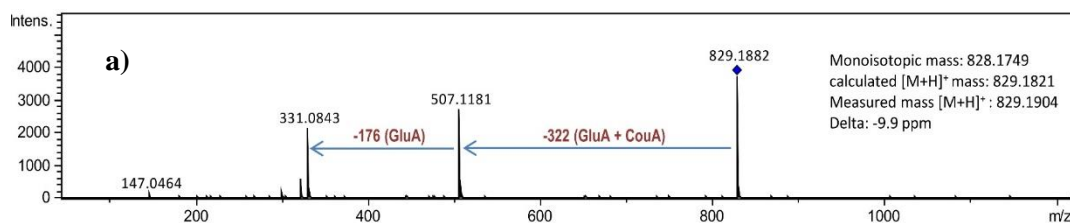


Tabela 40. Ścieżki fragmentacyjne związku 26 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	829,1864	[M-H] ⁻	827,1733
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	507,1181	B ₂ ⁻	497,0944
	Y ₀ ⁺	331,0743	[M-H] ⁻ -aglikon-CouA	333,0497
Wzór sumaryczny: C ₃₈ H ₃₆ O ₂₁			Masa monoizotopowa	
			828,1749	



GluA – kwas glukuronowy, CouA – kwas kumarowy

Rycina 78. Widma CID MS/MS związku 26 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.19. Związek 27

7-O-{3''-O-feruilo-[glukopiranozylo-(1''''-2''')-O-glukuronopiranozylo]-(1''''-2''')-O-glukuronopiranozyd} trycyny

Wzór:

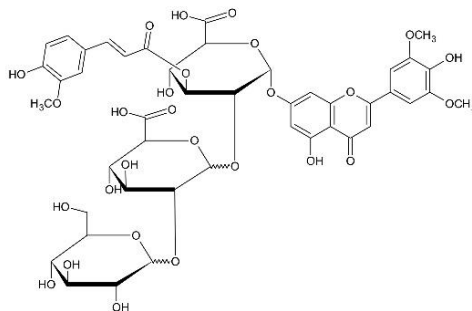
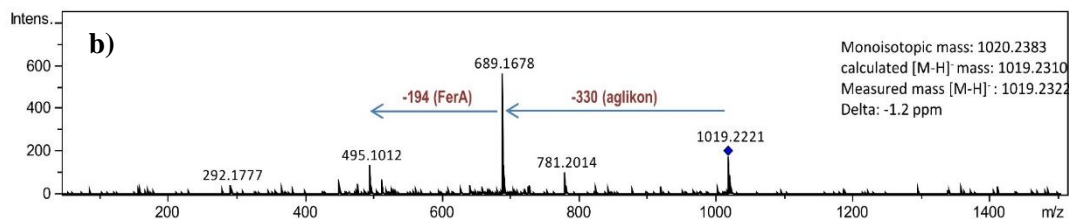
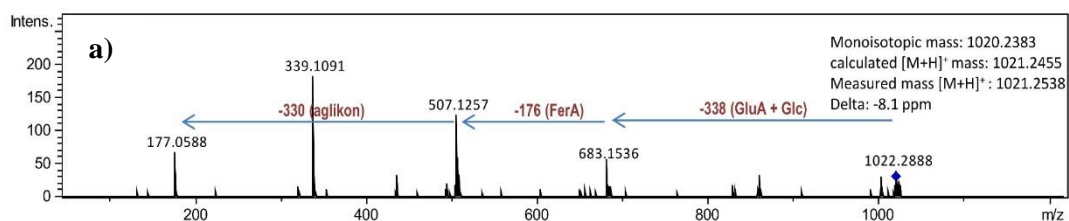


Tabela 41. Ścieżki fragmentacyjne związku 27 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	1021,2538	[M-H] ⁻	1019,2322
Jon fragmentacyjny	Y ₂ ⁺	683,1536	B ₂ ⁻	689,1678
	Y ₁ ⁺	507,1257	[M-H] ⁻ -aglikon-FerA	495,1012
	[FerA-OH+H] ⁺	177,0588		
Wzór sumaryczny: C ₄₅ H ₄₈ O ₂₇			Masa monoizotopowa	
			1020,2383	



GluA – kwas glukuronowy, Glc-glukoza, FerA – kwas ferulowy

Rycina 79. Widma CID MS/MS związku 27 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.3. Analiza UPLC-MS/MS frakcji 11

9.1.2.2.3.1. Związek 28

3-O-[2'''-O-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-O-glukuronopiranozyd] izoramnetyny

Wzór:

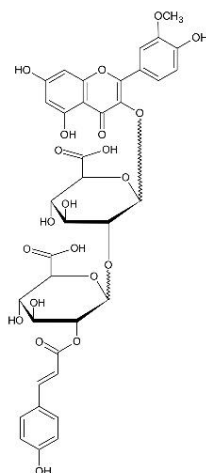
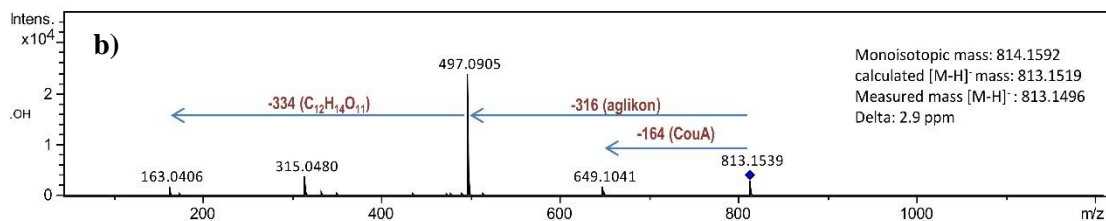
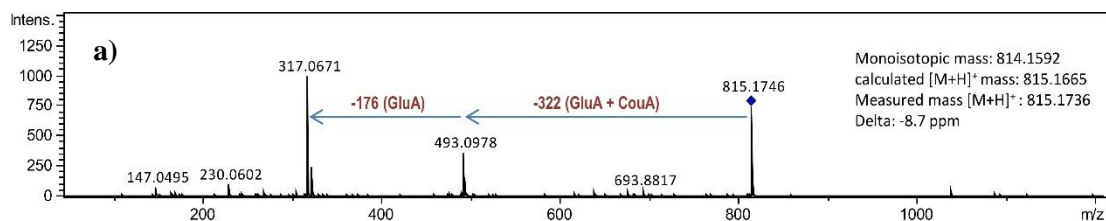


Tabela 42. Ścieżki fragmentacyjne związku 28 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	815,1736	[M-H] ⁻	813,1496
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	493,0978	Z ₂ ⁻	649,1041
	Y ₀ ⁺	317,0671	B ₂ ⁻	497,0905
			[CouA-H] ⁻	163,0406
Wzór sumaryczny: C₃₇H₃₄O₂₁			Masa monoizotopowa	
			814,1592	



GluA – kwas glukuronowy, **CouA** – kwas kumarowy

Rycina 80. Widma CID MS/MS związku 28 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.3.2. Związek 29

7-O-glukuronopiranozyd chrysoeriolu

Wzór:

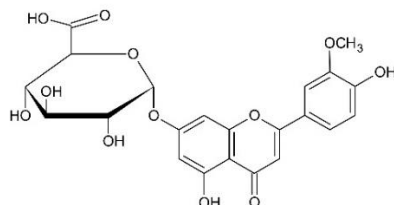
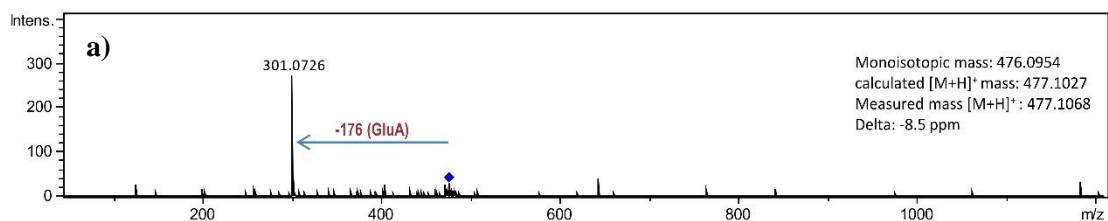


Tabela 43. Ścieżki fragmentacyjne związku 29 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	477,1068	---
Jon fragmentacyjny	Y ₀ ⁺	301,0726	---
Wzór sumaryczny: C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂			Masa monoizotopowa
			476,0954



GluA – kwas glukuronowy

Rycina 81. Widma CID MS/MS związku 29 w trybie jonów dodatnich (a).

9.1.2.2.3.3. Związek 30

7-O-[2'''-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-O-glukuronopiranozyd] apigeniny

Wzór:

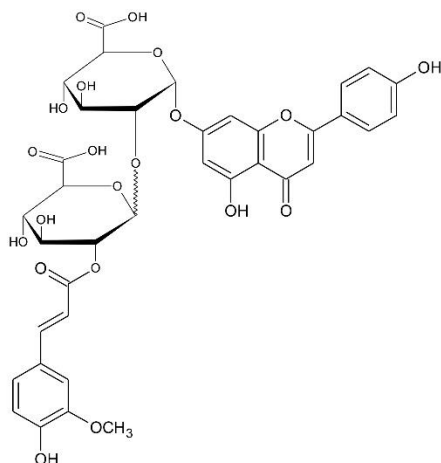
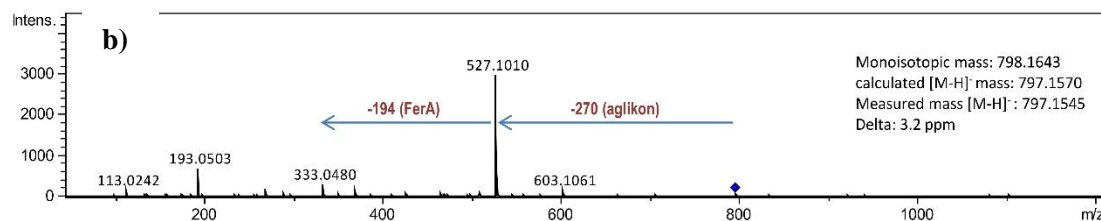
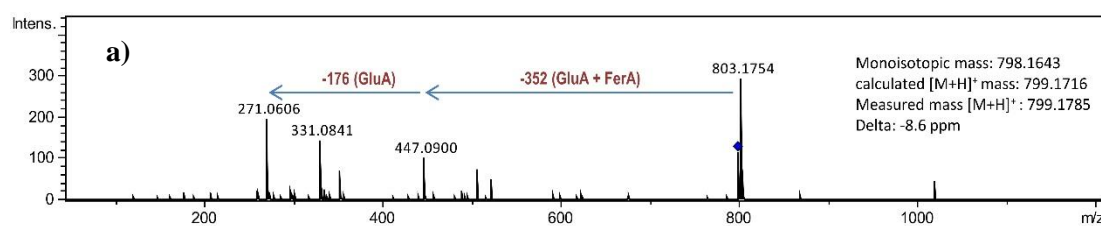


Tabela 44. Ścieżki fragmentacyjne związku 30 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	799,1785	[M-H] ⁻	797,1545
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	447,0900	B ₂ ⁻	527,1010
	Y ₀ ⁺	271,0606	[M-H] ⁻ -aglikon-FerA	333,0480
Wzór sumaryczny: C ₃₇ H ₃₄ O ₂₀			Masa monoizotopowa	
			798,1643	



GluA – kwas glukuronowy, FerA – kwas ferulowy

Rycina 82. Widma CID MS/MS związku 30 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.3.4. Związek 31

7-O-[2'''-O-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-O-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu

Wzór:

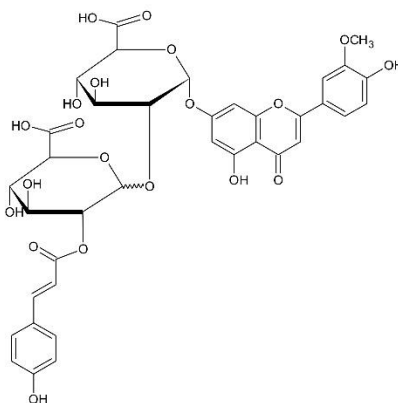
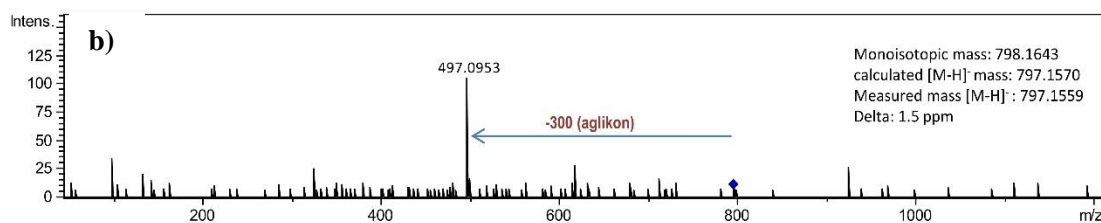
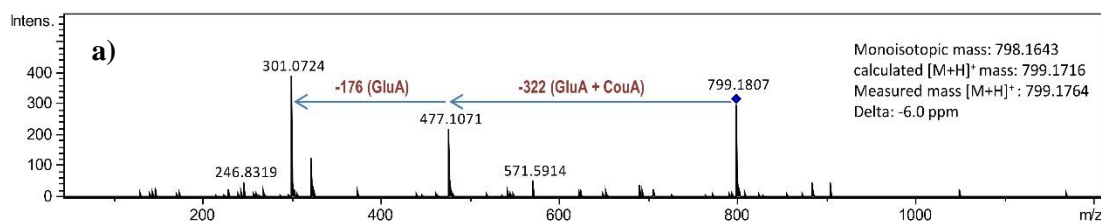


Tabela 45. Ścieżki fragmentacyjne związku 31 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	799,1764	[M-H] ⁻	797,1559
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺ Y ₀ ⁺	477,1071 301,0724	B ₂ ⁻	497,0953
Wzór sumaryczny: C ₃₇ H ₃₄ O ₂₀			Masa monoizotopowa	
			798,1643	



GluA – kwas glukuronowy, CouA – kwas kumarowy

Rycina 83. Widma CID MS/MS związku 31 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.3.5. Związek 32

7-O-[2'''-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2''')-O-metyloglukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:

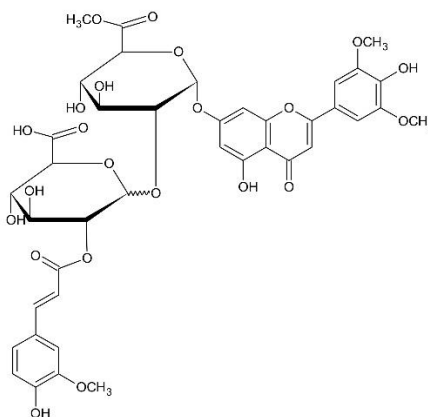
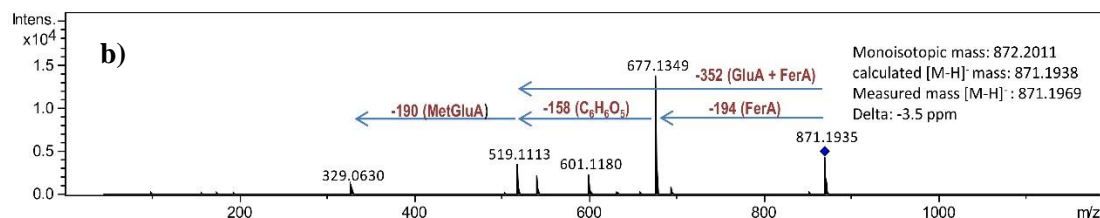
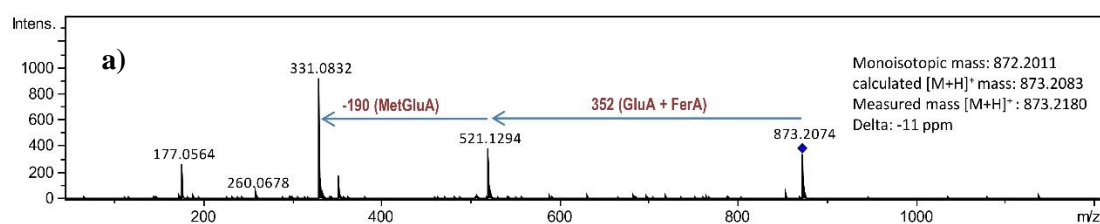


Tabela 46. Ścieżki fragmentacyjne związku 32 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	873,2180	[M-H] ⁻	871,1969
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	521,1294	Y ₁ ⁻	519,1113
	Y ₀ ⁺	331,0832	Z ₂ ⁻	677,1349
			Y ₀ ⁻	329,0630
Wzór sumaryczny: C ₄₀ H ₄₀ O ₂₂			Masa monoizotopowa	
			872,2011	



GluA – kwas glukuronowy, MetGluA – ester metylowy kwasu glukuronowego, FerA – kwas ferulowy

Rycina 84. Widma CID MS/MS związku 32 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.3.6. Związek 33

7-O-[2'''-benzoilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-O-glukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:

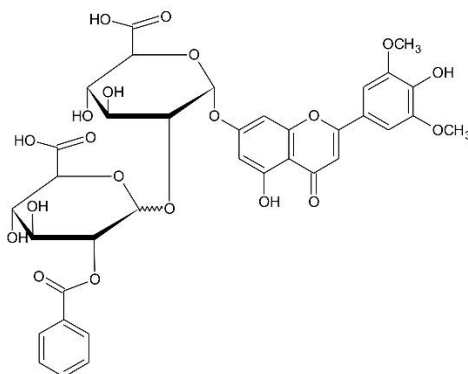
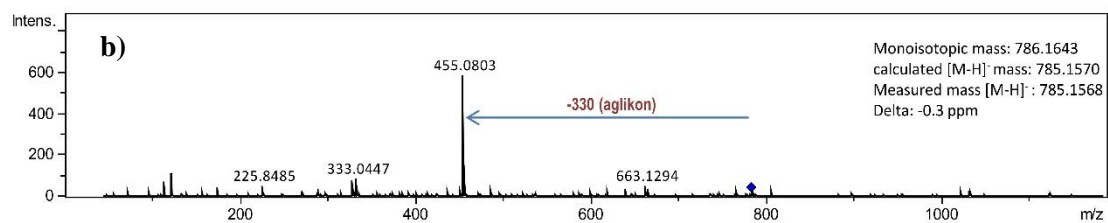
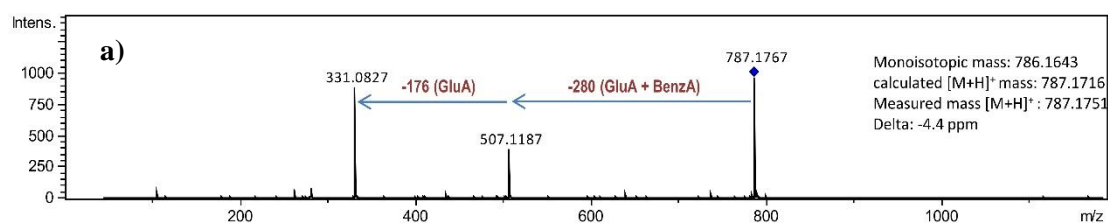


Tabela 47. Ścieżki fragmentacyjne związku 33 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	787,1751	[M-H] ⁻	785,1568
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺ Y ₀ ⁺	507,1187 331,0827	B ₂ ⁻	455,0803
Wzór sumaryczny: C ₃₆ H ₃₄ O ₂₀	Masa cząsteczkowa			
	786,1643			



GluA – kwas glukuronowy, BenzA – kwas benzoesowy

Rycina 85. Widma CID MS/MS związku 33 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.3.7. Związek 34

7-O-[2'''-O-kumaroilo-metyloglukuronopiranozylo-(1'''-2'')-O-glukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:

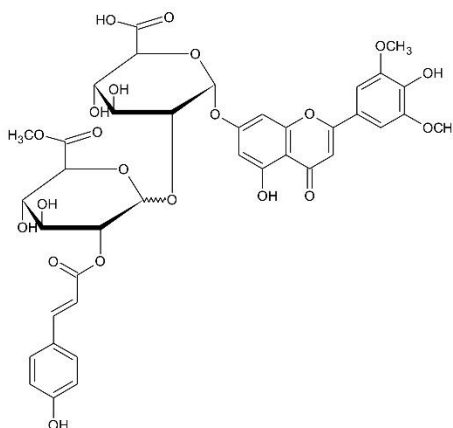
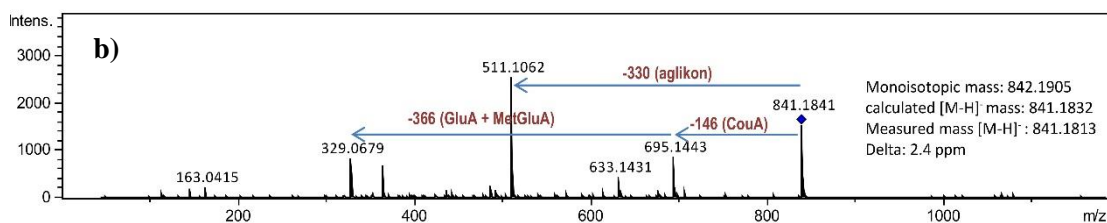
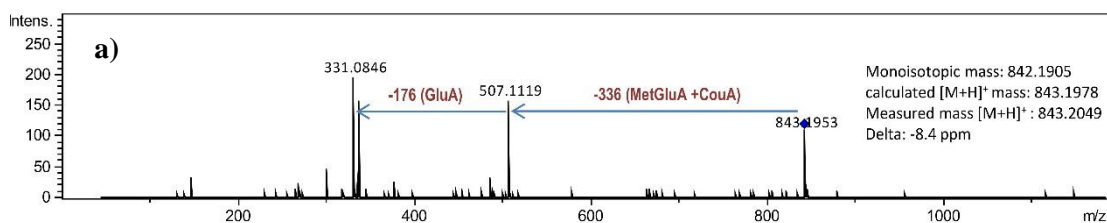


Tabela 48. Ścieżki fragmentacyjne związku 34 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	843,2049	[M-H] ⁻	841,1813
Jon fragmentacyjny	Y ₁ ⁺	507,1119	B ₂ ⁻	511,1062
	Y ₀ ⁺	331,0846	Z ₂ ⁻	695,1443
			Y ₀ ⁻	329,0679
Wzór sumaryczny: C ₃₉ H ₃₈ O ₂₁			Masa monoizotopowa	
			842,1905	



GluA – kwas glukuronowy, MetGluA – ester metylowy kwasu glukuronowego, CouA – kwas kumarowy

Rycina 86. Widma CID MS/MS związku 34 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.3.8. Związek 35

7-*O*-[2'''-*O*-dehidrodiferuilo-glukopiranozylo-(1'''-2''')-*O*-glukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:

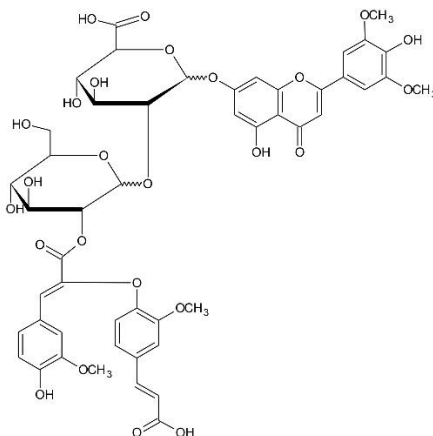
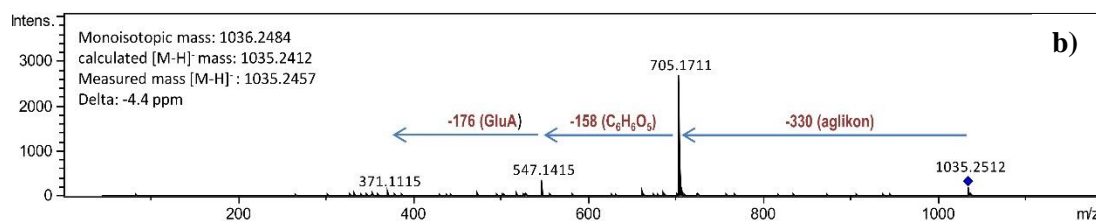
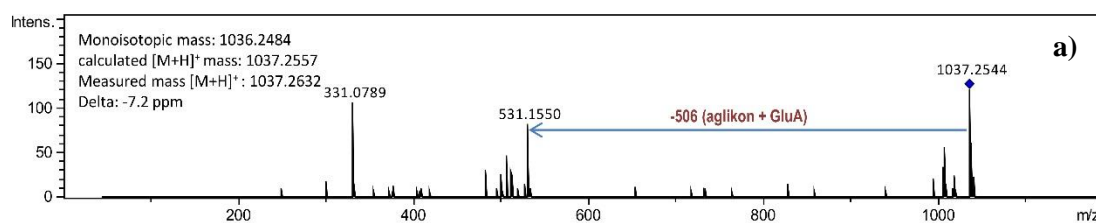


Tabela 49. Ścieżki fragmentacyjne związku 35 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	<i>m/z</i>	tryb ujemny	<i>m/z</i>
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	1037,2632	[M-H] ⁻	1035,2457
Jon fragmentacyjny	B ₁ ⁺	531,1550	B ₂ ⁻	705,1711
	Y ₀ ⁺	331,0789	C ₁ ⁻	547,1415 371,1115
Wzór sumaryczny: C₄₉H₄₈O₂₅			Masa monoizotopowa	
			1036,2484	



GluA – kwas glukuronowy

Rycina 87. Widma CID MS/MS związku 35 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.1.2.2.3.9. Związek 36

7-O-[2'''-O-dehydrodiferuilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2''')-O-glukuronopiranozyd] trycyny

Wzór:

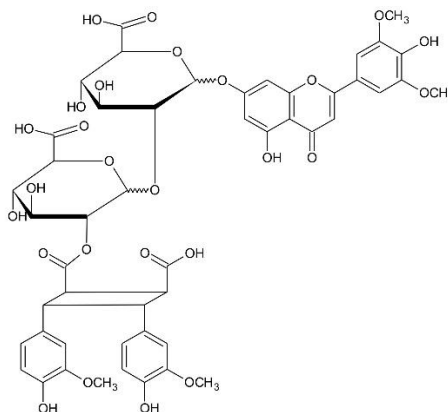
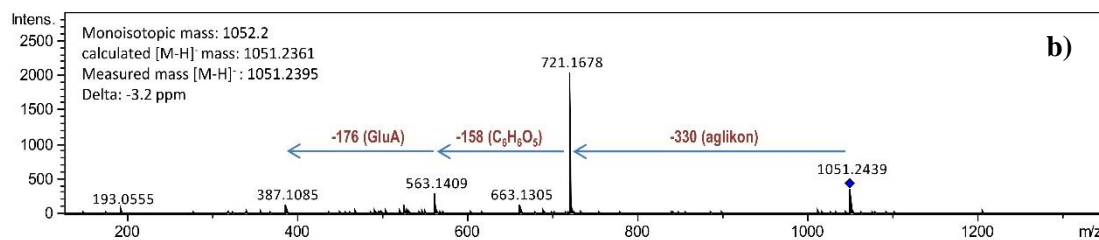
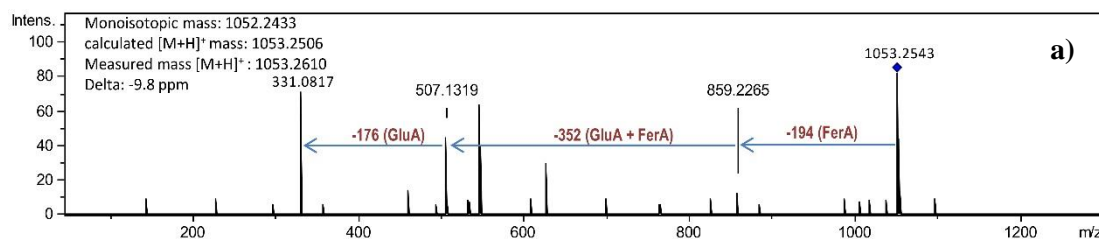


Tabela 50. Ścieżki fragmentacyjne związku 36 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.

	tryb dodatni	m/z	tryb ujemny	m/z
Jon pseudomolekularny	[M+H] ⁺	1053,2543	[M-H] ⁻	1051,2439
Jon fragmentacyjny	Y ₂ ⁺	859,2265	B ₂ ⁻	721,1678
	Y ₁ ⁺	507,1319	C ₁ ⁻	563,1409
	Y ₀ ⁺	331,0817		387,1085
Wzór sumaryczny: C ₄₉ H ₄₈ O ₂₆	Masa monoizotopowa			
	1052,2433			



GluA – kwa glukuronowy, FerA – kwas ferulowy

Rycina 88. Widma CID MS/MS związku 36 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).

9.2. Badania ilościowe

9.2.1. Oznaczanie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem *Folin-Ciocalteu*

9.2.1.1. Krzywa kalibracyjna dla kwasu galusowego

Na podstawie wyników absorbancji, mierzonej dla próbek o określonym stężeniu kwasu galusowego, wykreślono krzywą wzorcową, prezentującą zależność absorbancji od stężenia kwasu galusowego. Uzyskane wyniki oraz obliczenia parametrów statystycznych zostały przedstawione w tabelach 51-52.

Tabela 51. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego.

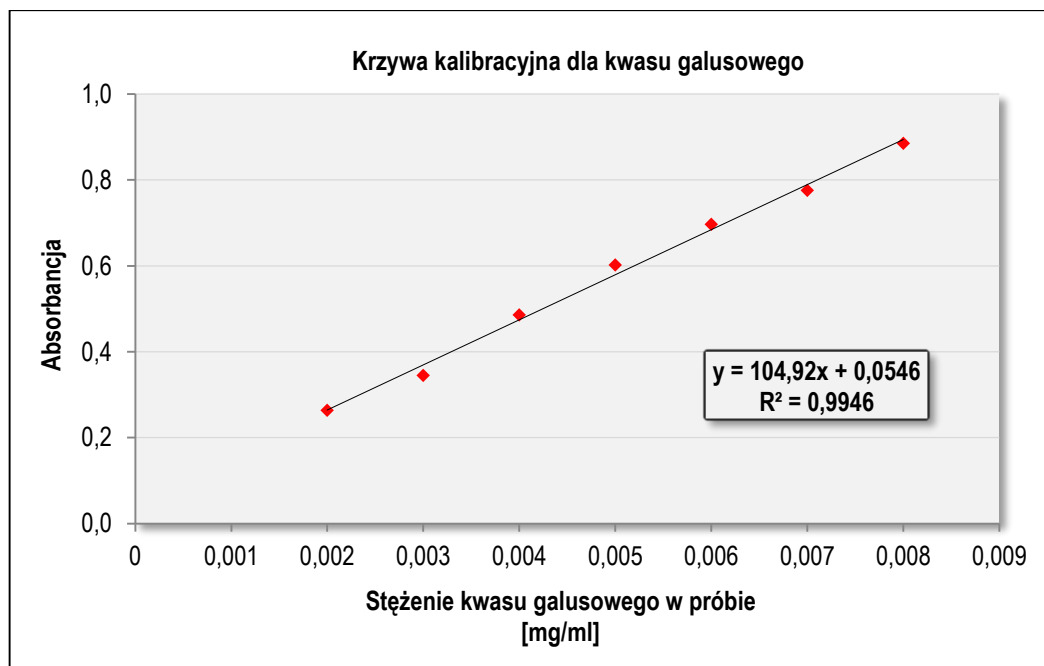
x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{śr}
0,002	0,2636	0,2636	0,2656	0,2611	0,2643	0,2658	0,2640
0,003	0,3487	0,3427	0,3459	0,3481	0,3418	0,3415	0,3448
0,004	0,4878	0,4877	0,4901	0,4860	0,4815	0,4802	0,4856
0,005	0,6025	0,6021	0,6002	0,6026	0,6049	0,6012	0,6023
0,006	0,6926	0,6995	0,6989	0,6958	0,6991	0,6931	0,6965
0,007	0,7791	0,7708	0,7775	0,7758	0,7785	0,7734	0,7759
0,008	0,8885	0,8825	0,8835	0,8863	0,8869	0,8856	0,8856

x-stężenie kwasu galusowego w próbce [mg/ml]; A₁-A₆-wartości absorbancji badanych próbek; A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji

Tabela 52. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych próbek.

x	A _{śr}	S	S _{śr}	W _z	μ	A _{śr} ±2S
0,002	0,2640	0,0017	0,0008	0,6477	0,2640±0,0018	0,2640±0,0034
0,003	0,3448	0,0032	0,3593	0,3781	0,3448±0,0034	0,3448±0,0064
0,004	0,4856	0,0039	0,5132	0,4949	0,4856±0,0041	0,4856±0,0078
0,005	0,6023	0,0016	0,6002	0,6026	0,6023±0,0017	0,6023±0,0032
0,006	0,6965	0,0031	0,6989	0,9658	0,6965±0,0033	0,6965±0,0062
0,007	0,7759	0,0032	0,7875	0,7758	0,7759±0,0034	0,7759±0,0064
0,008	0,8856	0,0022	0,8735	0,8963	0,8856±0,0023	0,8856±0,0044

x-stężenie kwasu galusowego w próbce [mg/ml]; A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; S-odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; S_{śr}- odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, W_z-współczynnik zmienności (%), μ-przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności α=0,05 przy n=6, f=n-1 wartość współczynnika t-Studenta t_{α,f}=2,571), A_{śr}±2S-przedział, w którym powinien się znaleźć wynik pojedynczego oznaczenia dla (α=0,05).



Rycina 89. Krzywa kalibracyjna dla roztworu wzorcowego kwasu galusowego.

9.2.1.2. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w badanych wyciągach w przeliczeniu na kwas galusowy

Zawartość sumy polifenoli w wyciągu metanolowym i odwarze obliczono na podstawie krzywej wzorcowej i przedstawiono w przeliczeniu na kwas galusowy. Otrzymane dla poszczególnych wyciągów wyniki oraz ocena parametrów statystycznych zostały przedstawione w tabelach 53-54.

Zawartość sumy polifenoli w wyciągu metanolowym

Tabela 53. Zawartość sumy polifenoli w metanolowym wyciągu z zieleń *A. amaranthoides*.

Wyciąg metanolowy (stężenie wyciągu w próbce 0,2 mg/ml)					
n	Absorbancja	Zawartość polifenoli w próbce [$\mu\text{g/ml}$]	Zawartość polifenoli w próbce [mg/ml]	Zawartość sumy polifenoli [mg GAE/g wyciągu]	Parametry oceny statystycznej
1	0,5285	4,517	0,0045	22,58	n= 12 f=n-1= 11 (2,201) S=0,5214 S_{sr}=0,2332 W_z=2,2976 μ= 22,69\pm0,3313 A_{sr}\pm2S= 22,69\pm1,0428
2	0,5331	4,561	0,0046	22,80	
3	0,5327	4,557	0,0046	22,78	
4	0,5324	4,554	0,0046	22,77	
5	0,5522	4,743	0,0047	23,71	
6	0,5259	4,492	0,0045	22,46	
7	0,5168	4,405	0,0440	22,03	
8	0,5355	4,583	0,0046	22,92	
9	0,5279	4,511	0,0045	22,56	
10	0,5204	4,440	0,0044	22,20	
11	0,5165	4,402	0,0044	22,01	
12	0,5475	4,698	0,0047	23,49	
średnia	0,5308	4,539	0,0045	22,69	
zawartość polifenoli w % w przeliczeniu na surowiec				0,39%	

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ przy $n=12$, $f=n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f}=2,201$.

Zawartość sumy polifenoli w odwarze

Tabela 54. Zawartość sumy polifenoli w odwarze z ziela *A. amaranthoides*.

Odwar (stężenie wyciągu w próbce 0,15 mg/ml)					
n	Absorbancja	Zawartość polifenoli w próbce [$\mu\text{g/ml}$]	Zawartość polifenoli w próbce [mg/ml]	Zawartość sumy polifenoli [mg GAE/g wyciągu]	Parametry oceny statystycznej
1	0,5588	4,806	0,0048	32,04	n= 12 f=n-1= 11 (2,201) S=0,3614 S _{sr} =0,1616 W _z =1,1593 μ = 31,17±0,2296 A _{sr} ±2S= 31,17±0,7227
2	0,5382	4,609	0,0046	30,73	
3	0,5424	4,649	0,0046	31,00	
4	0,5441	4,665	0,0047	31,10	
5	0,5475	4,698	0,0047	31,32	
6	0,5456	4,680	0,0047	31,20	
7	0,5436	4,661	0,0047	31,07	
8	0,5368	4,596	0,0046	30,64	
9	0,5435	4,660	0,0047	31,06	
10	0,5493	4,715	0,0047	31,43	
11	0,5437	4,662	0,0047	31,08	
12	0,5487	4,709	0,0047	31,40	
średnia	0,5452	4,676	0,0047	31,17	
zawartość polifenoli w % w przeliczeniu na surowiec				0,77%	

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ przy $n=12$, $f=n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f}=2,201$.

9.2.2. Oznaczanie zawartości flawonoidów

9.2.2.1. Krzywa kalibracyjna dla 7-glukozydu apigeniny

Na podstawie wyników absorbancji mierzonej dla próbek o określonym stężeniu 7-glukozydu apigeniny wykreślono krzywą wzorcową, prezentującą zależność absorbancji od stężenia 7-glukozydu apigeniny. Uzyskane wyniki wraz z oceną parametrów statystycznych zostały przedstawione w tabelach 55-56.

Tabela 55. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów 7-glukozydu apigeniny.

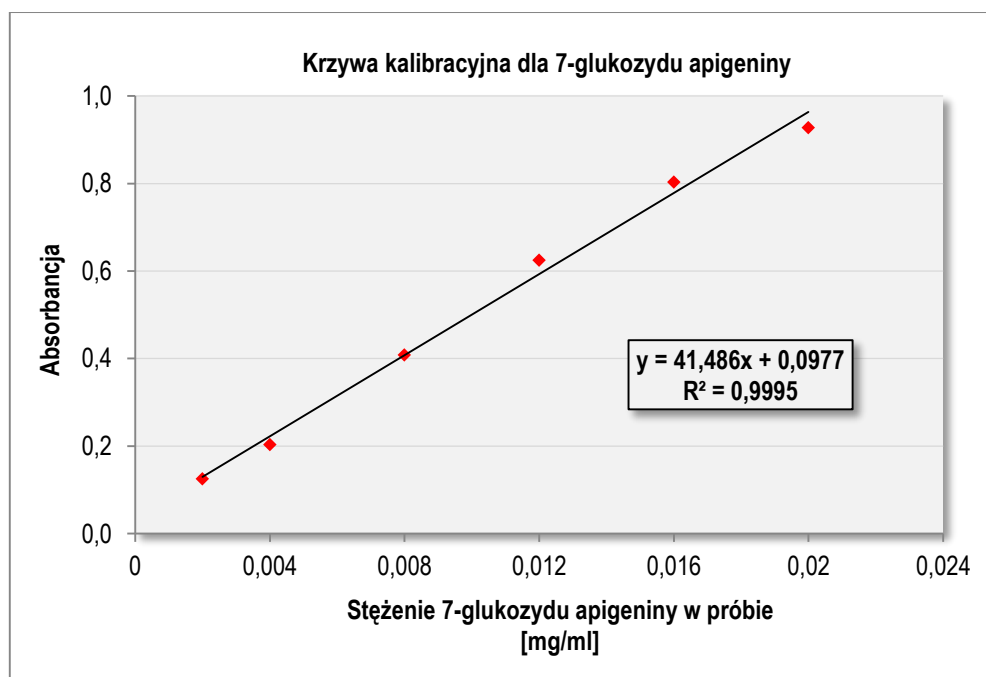
x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{śr}
0,002	0,1852	0,1850	0,1856	0,1849	0,1842	0,1848	0,1850
0,004	0,2567	0,2559	0,2563	0,2566	0,2570	0,2561	0,2564
0,008	0,4285	0,4281	0,4288	0,4290	0,4277	0,4285	0,4284
0,012	0,5998	0,6066	0,6073	0,6078	0,6051	0,6023	0,6048
0,016	0,7561	0,7552	0,7558	0,7589	0,75441	0,7551	0,7559
0,02	0,9286	0,9284	0,9291	0,9281	0,9290	0,9233	0,9278

x- stężenie 7-glukozydu apigeniny w próbce [mg/ml]; A₁-A₆-wartości absorbancji badanych prób; A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 56. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.

x	A _{śr}	S	S _{śr}	W _z	μ	A _{śr} ±2S
0,002	0,1850	0,0005	0,0002	0,2507	0,1850±0,0005	0,2640±0,0009
0,004	0,2564	0,0004	0,0002	0,1592	0,2564±0,0004	0,3448±0,0008
0,008	0,4284	0,0005	0,0002	0,1101	0,4284±0,0005	0,4856±0,0009
0,012	0,6048	0,0032	0,0014	0,5220	0,6048±0,0033	0,6023±0,0063
0,016	0,7559	0,0016	0,0007	0,2086	0,7559±0,0017	0,6965±0,0032
0,02	0,9278	0,0022	0,0010	0,2384	0,9278±0,0023	0,7759±0,0044

x- stężenie 7-glukozydu apigeniny w próbce [mg/ml]; A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; S-odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; S_{śr}- odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, W_z-współczynnik zmienności (%), μ-przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności α=0,05 przy n=6, f=n-1 wartość współczynnika t-Studenta t_{α,f}=2,571), A_{śr}±2S-przedział, w którym powinien się znaleźć wynik pojedynczego oznaczenia dla (α=0,05).



Rycina 90. Krzywa kalibracyjna dla roztworu wzorcowego 7-glukozydu apigeniny.

9.2.2.2. Oznaczenie zawartości flawonoidów w badanym surowcu

Zawartość flawonoidów w ziele *A.amaranthoides* obliczono z krzywej kalibracyjnej otrzymanej dla 7-glukozydu apigeniny. Otrzymane dla poszczególnych wyciągów wyniki oraz ocena parametrów statystycznych zostały przedstawione w tabeli 57.

Tabela 57. Zawartość flawonoidów w ziele *A. amaranthoides*.

Badany wyciąg (ilość surowca w próbie 0,6 mg)					
n	Absorbancja	Zawartość flawonoidów w próbie [$\mu\text{g/ml}$]	Zawartość flawonoidów w próbie [mg/ml]	Zawartość flawonoidów w surowcu [mg AG/g]	Parametry oceny statystycznej
1	0,5222	10,23	0,0102	17,05	n= 12 f=n-1= 11 (2,201) S=0,4932 S _{sr} =0,2206 W _z =2,7768 μ = 17,76 \pm 0,3133 A _{sr} \pm 2S= 17,76 \pm 0,9863
2	0,5394	10,65	0,0106	17,74	
3	0,5350	10,54	0,0105	17,57	
4	0,5368	10,58	0,0106	17,64	
5	0,5238	10,27	0,0103	17,12	
6	0,5308	10,44	0,0104	17,40	
7	0,5453	10,79	0,0108	17,98	
8	0,5649	11,26	0,0113	18,77	
9	0,5400	10,66	0,0107	17,77	
10	0,5421	10,71	0,0107	17,85	
11	0,5392	10,64	0,0106	17,74	
12	0,5574	11,08	0,0111	18,47	
średnia	0,5397	10,66	0,0107	17,76	
Zawartość flawonoidów w %				1,78%	

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ przy $n=12$, $f=n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha, f}=2,201$.

9.3. Badania aktywności biologicznej

9.3.1. Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej metodą z odczynnikiem DPPH

Działanie antyoksydacyjne testowanych wyciągów badano wykorzystując roztwór wolnego rodnika DPPH[•]. Za substancje wzorcowe posłużyły w doświadczeniu BHA (Tabela 58-60, Rycina 91) oraz witamina C (Tabela 61-63, Rycina 92). Dla badanych prób oszacowano parametr IC₅₀, a ponadto aktywność antyoksydacyjna została wyrażona jako równoważnik witaminy C (VCE) w µg/ml, co przedstawiono w tabelach 64-69 i na rycinach 93-94.

9.3.1.1. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej BHA

Tabela 58. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów BHA.

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{śr}
0,78	0,8742	0,8722	0,8795	0,8712	0,8796	0,8779	0,8758
1,56	0,7575	0,7500	0,7544	0,7543	0,7511	0,7577	0,7542
3,125	0,5348	0,5393	0,5396	0,5425	0,5367	0,5327	0,5376
6,25	0,3061	0,3054	0,3023	0,3037	0,3032	0,3046	0,3042
12,5	0,1814	0,1856	0,1823	0,1863	0,1846	0,1802	0,1834
25	0,1095	0,1034	0,1052	0,1081	0,1006	0,1026	0,1049

x-stężenie BHA próbie [µg/ml]; A₁-A₆-wartości absorbancji badanych prób; A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 59. Zdolność zmiatania rodnika DPPH[•] [%].

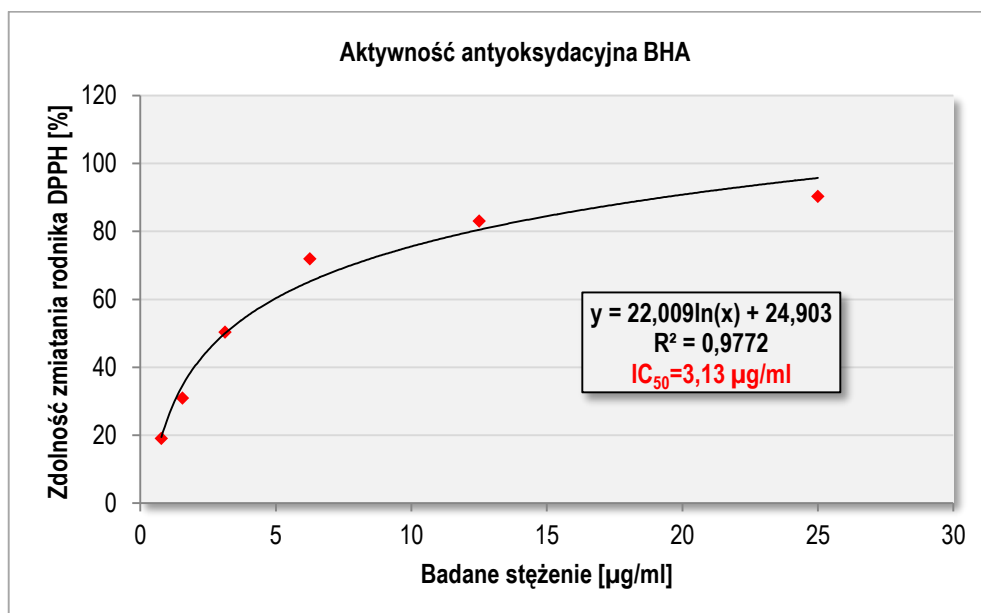
x	1	2	3	4	5	6	średnia
0,78	19,2395	19,4243	18,7499	19,5167	18,7406	18,8977	19,0948
1,56	30,0205	30,7134	30,3069	30,3161	30,6118	30,0020	30,3284
3,125	50,5940	50,1783	50,1506	49,8827	50,4185	50,7880	50,3353
6,25	72,7218	71,7865	72,0729	71,9435	71,9897	71,8604	71,8958
12,5	83,2419	82,8539	83,1587	82,7892	82,9463	83,3527	83,0571
25	89,8842	90,4477	90,2814	90,0135	90,7064	90,5216	90,3091
IC ₅₀	3,13 µg/ml						

x-stężenie BHA w próbie [µg/ml]

Tabela 60. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.

x	Z _{DPPH} %	S	S _{śr}	W _z	μ	A _{śr} ±2S
0,78	19,0948	0,3437	0,1537	1,8000	19,0948±0,3607	19,0948±0,6874
1,56	30,3284	0,2934	0,1312	0,9674	30,3284±0,0870	30,3284±0,5868
3,125	50,3353	0,3294	0,1473	0,6544	50,3353±0,3457	50,3353±0,6588
6,25	71,8958	0,1311	0,0586	0,1823	71,8958±0,1376	71,8958±0,2622
12,5	83,0571	0,2268	0,1014	0,2731	83,0571±0,2380	83,0571±0,4536
25	90,3091	0,3133	0,1401	0,3470	90,3091±0,3288	90,3091±0,6874

x-stężenie BHA w próbce [μg/ml]; Z_{DPPH}%-średnia zdolność zmiatania rodnika DPPH; S-odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; S_{śr}- odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; W_z-współczynnik zmienności (%), μ-przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności α=0,05 przy n=6, f=n-1 wartość współczynnika t-Studenta t_{α,f}=2,571), A_{śr}±2S-przedział, w którym powinien się znaleźć wynik pojedynczego oznaczenia dla (α=0,05).



Rycina 91. Aktywność antyoksydacyjna BHA.

9.3.1.2. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej witaminy C

Tabela 61. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów witaminy C.

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{śr}
1,25	0,8535	0,8594	0,8564	0,8520	0,8516	0,8506	0,8540
2,5	0,7281	0,7271	0,7389	0,7233	0,7340	0,7334	0,7308
3,75	0,6104	0,6194	0,6180	0,6120	0,6152	0,6148	0,6150
5,0	0,4604	0,4697	0,4655	0,4647	0,4624	0,4656	0,4647
6,25	0,3242	0,3236	0,3237	0,3263	0,3275	0,3244	0,3250
7,5	0,2091	0,2081	0,2055	0,2097	0,2094	0,2032	0,2075

x-stężenie witaminy C w próbce [$\mu\text{g/ml}$]; A₁-A₆-wartości absorbancji badanych próbek; A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji

Tabela 62. Zdolność zmiatania rodnika DPPH* [%].

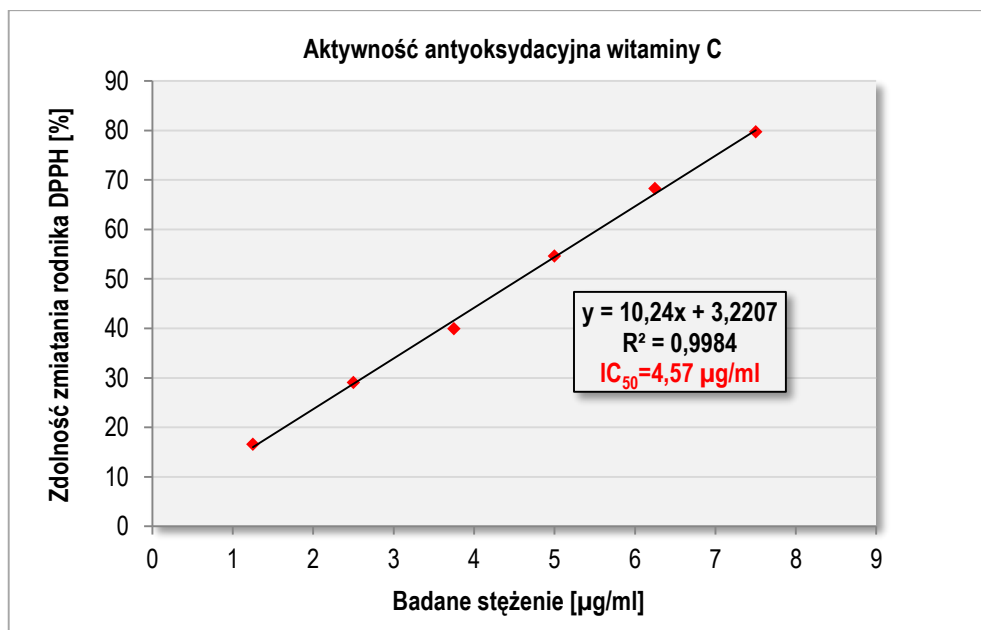
x	1	2	3	4	5	6	średnia
1,25	16,6083	16,0319	16,3250	16,7549	16,7940	16,8721	16,5643
2,5	28,8606	28,9583	27,8054	29,3296	28,2841	28,3428	28,5968
3,75	40,3605	39,4812	39,6180	40,2042	39,8915	39,9306	39,9143
5,0	55,0164	54,1077	54,5181	54,5962	54,8210	54,5083	54,5946
6,25	68,6239	68,3825	68,3727	68,1187	68,0014	68,3043	68,2506
7,5	79,5698	79,6675	79,9215	79,5111	79,5405	80,1462	79,7261
IC ₅₀	4,57 $\mu\text{g/ml}$						

x-stężenie witaminy C w próbce [$\mu\text{g/ml}$]

Tabela 63. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych próbek.

x	Z _{DPPH} %	S	S _{śr}	W _z	μ	A _{śr} ±2S
1,25	16,5643	0,3245	0,1451	1,9591	16,5643±0,3406	16,5643±0,6490
2,5	28,5968	0,5524	0,2471	1,9318	28,5968±0,5797	28,5968±1,1049
3,75	39,9143	0,3345	0,1496	0,8380	39,9143±0,3510	39,9143±0,6689
5,0	54,5946	0,3097	0,1385	0,5672	54,5946±0,3250	54,5943±0,6194
6,25	68,2506	0,1549	0,0693	0,2270	68,2506±0,1626	68,2506±0,3099
7,5	79,7261	0,2543	0,1137	0,3189	79,7261±0,2668	79,7261±0,5085

x-stężenie witaminy C w próbce [$\mu\text{g/ml}$]; Z_{DPPH}%-średnia zdolność zmiatania rodnika DPPH; S-odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; S_{śr}- odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; W_z-współczynnik zmienności (%), μ -przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ przy $n=6$, $f=n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f}=2,571$), A_{śr}±2S-przedział, w którym powinien się znaleźć wynik pojedynczego oznaczenia dla ($\alpha=0,05$).



Rycina 92. Aktywność antyoksydacyjna witaminy C.

9.3.1.3. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej w badanych wyciągach

Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej wyciągu metanolowego

Tabela 64. Wartości pomiarów absorbancji wyciągu metanolowego.

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{śr}
1875	0,4628	0,4624	0,4663	0,4641	0,4603	0,4640	0,4633
1500	0,4836	0,4890	0,4852	0,4886	0,4893	0,4894	0,4875
1125	0,5091	0,5081	0,5000	0,5098	0,5084	0,5033	0,5065
750	0,5758	0,5733	0,5733	0,5736	0,5708	0,5700	0,5728
375	0,6489	0,6499	0,6477	0,6411	0,6455	0,6438	0,6452
187,5	0,7966	0,7997	0,7998	0,7902	0,7919	0,7959	0,7957
93,75	0,8954	0,8996	0,8987	0,8998	0,8976	0,8997	0,8985
46,875	0,9509	0,9503	0,9510	0,9508	0,9512	0,9502	0,9507
23,4375	0,9861	0,9836	0,9841	0,9845	0,9878	0,9842	0,9851

x-stężenie wyciągu w próbce [µg/ml]; A₁-A₆-wartości absorbancji badanych prób;
A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji

Tabela 65. Zdolność zmiatania rodnika DPPH* [%].

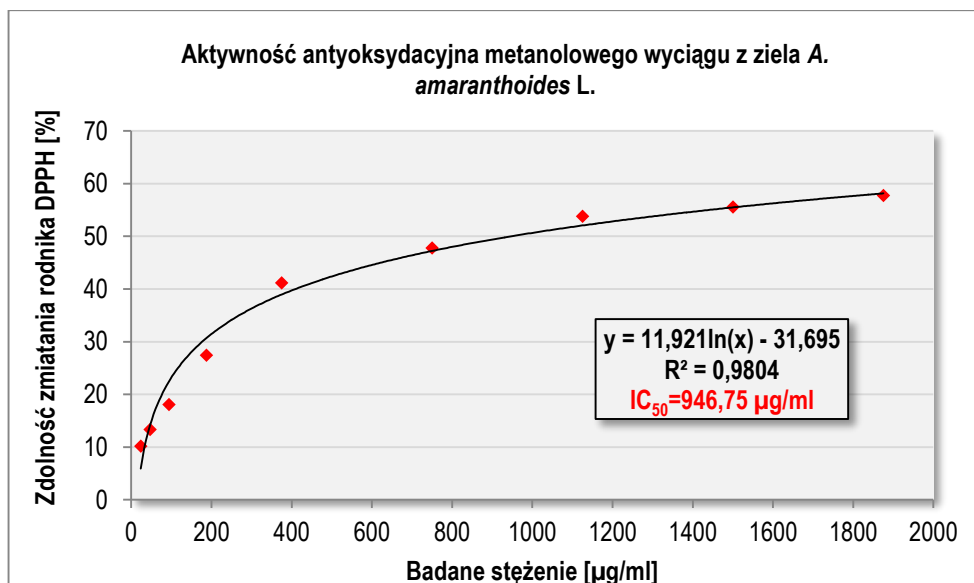
x	1	2	3	4	5	6	średnia	VCE µg/ml
1875	57,8020	57,8384	57,4828	57,6834	58,0299	57,6925	57,7548	5,33
1500	55,9054	55,4130	55,7595	55,4495	55,3857	55,3766	55,5483	5,11
1125	53,5803	53,6715	54,4101	53,5165	53,6442	54,1092	53,8220	4,94
750	47,4986	47,7226	47,7226	47,6992	47,9545	48,0275	47,7722	4,35
375	40,8316	40,7404	41,4881	41,5428	41,1416	41,2966	41,1735	3,71
187,5	27,3639	27,0812	27,0721	27,9475	27,7925	27,4277	27,4475	2,37
93,75	18,3551	17,9721	17,9539	18,0542	18,1545	17,9630	18,0754	1,45
46,875	13,2944	13,3491	13,2853	13,3035	13,2671	13,3583	13,3096	0,99
23,4375	10,0848	10,3128	10,2672	10,2307	9,9298	10,2580	10,1805	0,68
IC₅₀	946,75 µg/ml							

x-stężenie wyciągu w próbce [µg/ml]

Tabela 66. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.

x	Z _{DPPH%}	S	S _{sr}	W _z	µ	A _{sr} ±2S
1875	57,7548	0,1832	0,0819	0,3172	57,7548±0,1923	57,7548±0,3664
1500	55,5483	0,2263	0,1012	0,4075	55,5483±0,2375	55,5483±0,4527
1125	53,8220	0,3562	0,1593	0,6618	53,8220±0,3738	53,8220±0,7123
750	47,7722	0,1912	0,0855	0,4002	47,7722±0,2006	47,7722±0,3823
375	41,1735	0,3335	0,1491	0,8099	41,1735±0,3500	41,1735±0,6669
187,5	27,4475	0,3609	0,1614	1,3150	27,4475±0,3788	27,4475±0,7219
93,75	18,0754	0,1568	0,0701	0,8677	18,0754±0,1646	18,0754±0,3137
46,875	13,3096	0,0363	0,0162	0,2729	13,3096±0,0381	13,3096±0,0726
23,4375	10,1805	0,1453	0,0650	1,4272	10,1805±0,1525	10,1805±0,2906

x-stężenie wyciągu w próbce [µg/ml]; Z_{DPPH%}-średnia zdolność zmiatania rodnika DPPH, S-odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; S_{sr}- odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; W_z-współczynnik zmienności (%), µ-przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności α=0,05 przy n=6, f=n-1 wartość współczynnika t-Studenta t_{α,f}=2,571), A_{sr}±2S-przedział, w którym powinien się znaleźć wynik pojedynczego oznaczenia dla (α=0,05).



Rycina 93. Aktywność antyoksydacyjna metanolowego wyciągu z ziela *A. amaranthoides* L.

Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej odwaru

Tabela 67. Wartości pomiarów absorbancji wyciągu metanolowego.

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{śr}
1875	0,3297	0,3282	0,3213	0,3214	0,3215	0,3229	0,3242
1500	0,3391	0,3314	0,3304	0,3338	0,3351	0,3350	0,3341
1125	0,3635	0,3658	0,3642	0,3697	0,3689	0,3698	0,3670
750	0,4668	0,4703	0,4692	0,4604	0,4668	0,4695	0,4672
375	0,5878	0,5862	0,5890	0,5839	0,5897	0,5812	0,5863
187,5	0,7534	0,7579	0,7558	0,7524	0,7588	0,7552	0,7556
93,75	0,8116	0,8161	0,8180	0,8160	0,8102	0,8193	0,8152
46,875	0,8933	0,8933	0,8925	0,8943	0,8960	0,8977	0,8945
23,4375	0,9310	0,9342	0,9366	0,9332	0,9381	0,9352	0,9347

x-stężenie odwaru w próbce [µg/ml]; A₁-A₆-wartości absorbancji badanych prób; A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji

Tabela 68. Zdolność zmiatania rodnika DPPH* [%].

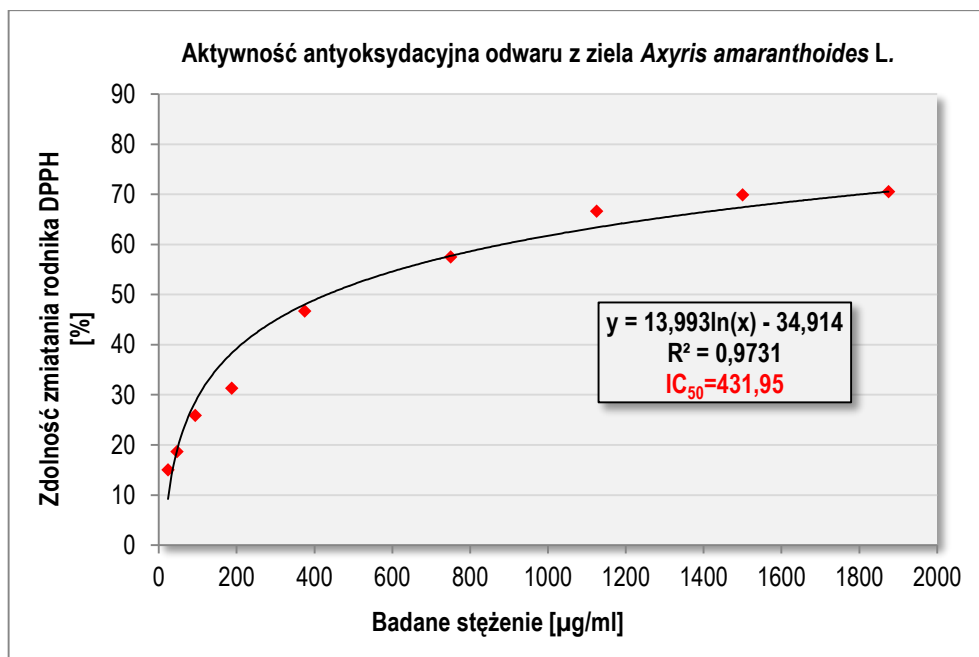
x	1	2	3	4	5	6	średnia	VCE µg/ml	
1875	70,0245	70,1609	70,7883	70,7792	70,7701	70,6428	70,5276	6,57	
1500	69,1699	69,8700	69,9609	69,6518	69,5336	69,5427	69,6212	6,51	
1125	66,9515	66,7424	66,8879	66,3879	66,4606	66,3788	66,6348	6,19	
750	57,5598	57,2416	57,3416	58,1416	57,5598	57,3143	57,5264	5,30	
375	46,5588	46,7042	46,4497	46,9134	46,3860	47,1588	46,6952	4,25	
187,5	31,5029	31,0937	31,2847	31,5938	31,0119	31,3382	31,3044	2,74	
93,75	26,2155	25,8023	25,6296	25,8814	26,3388	25,5114	25,8842	2,21	
46,875	18,7835	18,7902	18,8629	18,6926	18,5380	18,3835	18,6751	1,51	
23,4375	15,3559	15,0720	14,8538	15,1559	14,7104	14,9741	15,0204	1,15	
IC ₅₀	431,95 µg/ml								

x-stężenie wyciągu w próbce [µg/ml]

Tabela 69. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.

x	Z _{DPPH%}	S	S _{sr}	W _z	µ	A _{sr±2S}
1875	70,5276	0,3437	0,1537	0,4874	70,5276±0,3607	70,5276±0,6875
1500	69,6212	0,2813	0,1258	0,4041	69,6212±0,2952	69,6212±0,5627
1125	66,6348	0,2580	0,1154	0,3872	66,6348±0,2708	66,6348±0,5160
750	57,5264	0,3289	0,1471	0,5718	57,5264±0,3452	57,5264±0,6579
375	46,6952	0,2957	0,1322	0,6332	46,6952±0,3103	46,6952±0,5913
187,5	31,3044	0,2257	0,1009	0,7209	31,3044±0,2368	31,3044±0,4514
93,75	25,8842	0,3254	0,1455	1,2572	25,8842±0,3415	25,8842±0,6509
46,875	18,6751	0,1813	0,0811	0,9709	18,6751±0,1903	18,6751±0,3626
23,4375	15,0204	0,2279	0,1019	1,5170	15,0204±0,2391	15,0204±0,4557

x-stężenie wyciągu w próbce[µg/ml]; Z_{DPPH%}-średnia zdolność zmiatania rodnika DPPH, S-odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; S_{sr}- odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, W_z-współczynnik zmienności (%), µ-przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności α=0,05 przy n=6, f=n-1 wartość współczynnika t-Studenta t_{α,f}=2,571), A_{sr±2S}-przedział, w którym powinien się znaleźć wynik pojedynczego oznaczenia dla (α=0,05).



Rycina 94. Aktywność antyoksydacyjna odwaru z ziela *A. amaranthoides* L.

9.3.2. Oznaczanie całkowitej zdolności redukowania jonów żelaza (III) metodą FRAP

Właściwości redukujące badanych wyciągów testowano za pomocą metody FRAP. Wyniki wyrażono jako równoważnik witaminy C (VCE) w µg/ml.

9.3.2.1. Oznaczenie zdolności redukowania jonów Fe³⁺ przez witaminę C

Na podstawie wyników pomiaru absorbancji otrzymanych dla próbek zawierających określone stężenie witaminy C wykreślono krzywą kalibracyjną. Wyniki wraz z oceną parametrów statystycznych zostały przedstawione w tabelach 70 i 71.

Tabela 70. Wartości pomiarów absorbancji witaminy C.

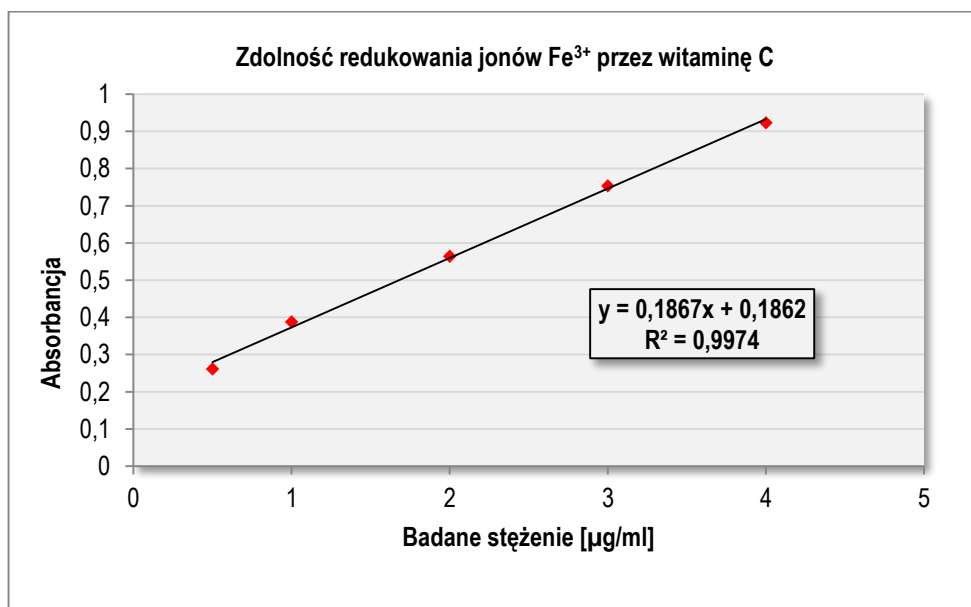
x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{sr}
0,5	0,2617	0,2618	0,2622	0,2611	0,2600	0,2620	0,2615
1,0	0,3921	0,3847	0,3929	0,3830	0,3880	0,3895	0,3884
2,0	0,5613	0,5670	0,5636	0,5658	0,5641	0,5649	0,5645
3,0	0,7508	0,7599	0,7539	0,7561	0,7508	0,7514	0,7538
4,0	0,9225	0,9208	0,9261	0,9250	0,9217	0,9254	0,9236

x-stężenie witaminy C w próbce [µg/ml]; A₁-A₆-wartości absorbancji badanych próbek; A_{sr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji

Tabela 71. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.

x	A _{śr}	S	S _{śr}	W _z	μ	A _{śr} ±2S
0,5	0,2615	0,0008	0,0004	0,3095	0,2615±0,0002	0,2615±0,0016
1,0	0,3884	0,0040	0,0018	1,0180	0,3884±0,0012	0,3884±0,0079
2,0	0,5645	0,0020	0,0009	0,3480	0,5645±0,0006	0,5645±0,0039
3,0	0,7538	0,0036	0,0016	0,4830	0,7538±0,0011	0,7538±0,0073
4,0	0,9236	0,0022	0,0010	0,2378	0,9236±0,0007	0,9236±0,0044

x-stężenie witaminy C w próbce [μg/ml]; A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; S-odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; S_{śr}- odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; W_z-współczynnik zmienności (%), μ-przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności α=0,05 przy n=6, f=n-1 wartość współczynnika t-Studenta t_{α,f}=2,571), A_{śr}±2S-przedział, w którym powinien się znaleźć wynik pojedynczego oznaczenia dla (α=0,05).



Rycina 95. Właściwości redukujące witaminy C.

9.3.2.2. Oznaczenie zdolności redukowania jonów Fe³⁺ przez badane wyciągi

Oznaczenie zdolności redukowania jonów Fe³⁺ przez wyciąg metanolowy

Tabela 72. Wartości pomiarów absorbancji wyciągu.

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{śr}
250	0,2024	0,1998	0,2009	0,1994	0,1994	0,2003	0,2004
500	0,2991	0,2954	0,2932	0,2936	0,2960	0,2942	0,2953
750	0,4496	0,4450	0,4482	0,4587	0,4417	0,4452	0,4480
1000	0,5800	0,5794	0,5765	0,5712	0,5791	0,5801	0,5777
1250	0,7170	0,7130	0,7160	0,7099	0,7180	0,7142	0,7147

x-stężenie wyciągu w próbce [μg/ml]; A₁-A₆-wartości absorbancji badanych prób; A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji

Tabela 73. Zdolność redukowania jonów Fe³⁺ jako równoważnik witaminy C [μg/ml].

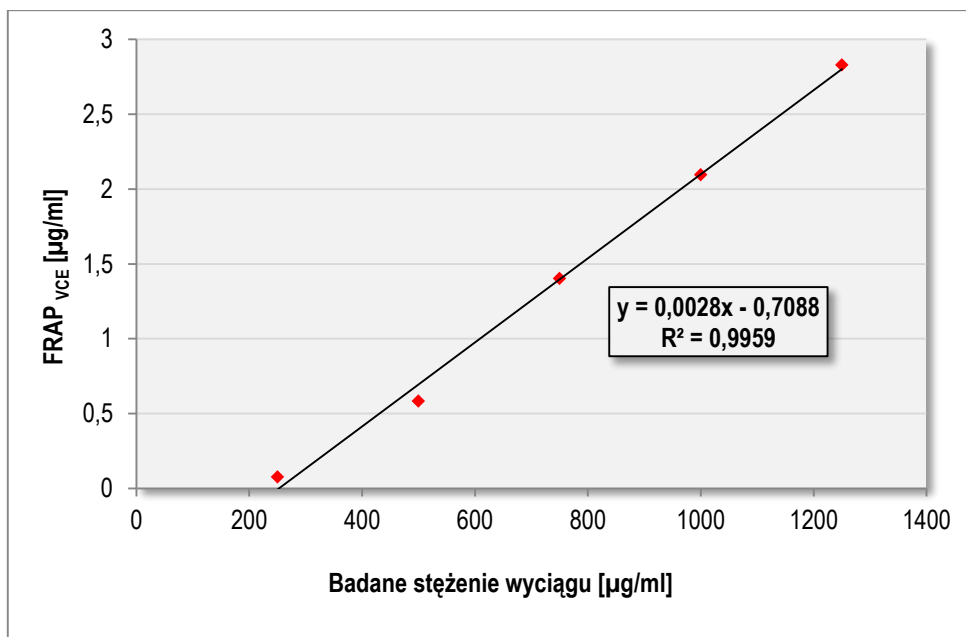
x	1	2	3	4	5	6	średnia
250	0,0868	0,0728	0,0787	0,0707	0,0707	0,0755	0,0759
500	0,6047	0,5849	0,5731	0,5753	0,5881	0,5785	0,5841
750	1,4108	1,3859	1,4031	1,4596	1,3682	1,3873	1,4025
1000	2,1093	2,1061	2,0905	2,0621	2,1044	2,1098	2,0970
1250	2,8428	2,8227	2,8377	2,8050	2,8484	2,8281	2,8308

x-stężenie wyciągu w próbce [μg/ml]

Tabela 74. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.

	A _{śr}	S	S _{śr}	W _z	μ	A _{śr} ±2S
250	0,0759	0,0062	0,0028	8,1182	0,0759±0,0065	0,0759±0,0123
500	0,4770	0,0116	0,0052	1,9853	0,3884±0,0122	0,3884±0,0232
750	1,4025	0,0316	0,0142	2,2564	1,4025±0,0332	1,4025±0,0633
1000	2,0970	0,0185	0,0083	0,8817	2,0970±0,0194	2,0970±0,0370
1250	2,8308	0,0157	0,0070	0,5561	2,8308±0,0165	2,8308±0,0315

x-stężenie wyciągu w próbce [μg/ml]; A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; S-odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; S_{śr}- odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; W_z-współczynnik zmienności (%), μ-przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności α=0,05 przy n=6, f=n-1 wartość współczynnika t-Studenta t_{α,f}=2,571), A_{śr}±2S-przedział, w którym powinien się znaleźć wynik pojedynczego oznaczenia dla (α=0,05).



Rycina 96. Właściwości redukujące metanolowego wyciągu z ziela *A. amaranthoides*.

9.3.2.3. Oznaczenie zdolności redukowania jonów Fe^{3+} przez odwar

Tabela 75. Wartości pomiarów absorbancji odwaru.

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{śr}
250	0,2513	0,2598	0,2574	0,2508	0,2550	0,2539	0,2547
500	0,3548	0,3488	0,3452	0,3485	0,3428	0,3497	0,3483
750	0,5091	0,5169	0,5185	0,5150	0,5033	0,5118	0,5124
1000	0,6400	0,6399	0,6409	0,6420	0,6410	0,6402	0,6407
1250	0,8045	0,8188	0,8011	0,7987	0,7978	0,8046	0,8043

Tabela 76. Zdolność redukowania jonów Fe^{3+} jako równoważnik witaminy C [µg/ml].

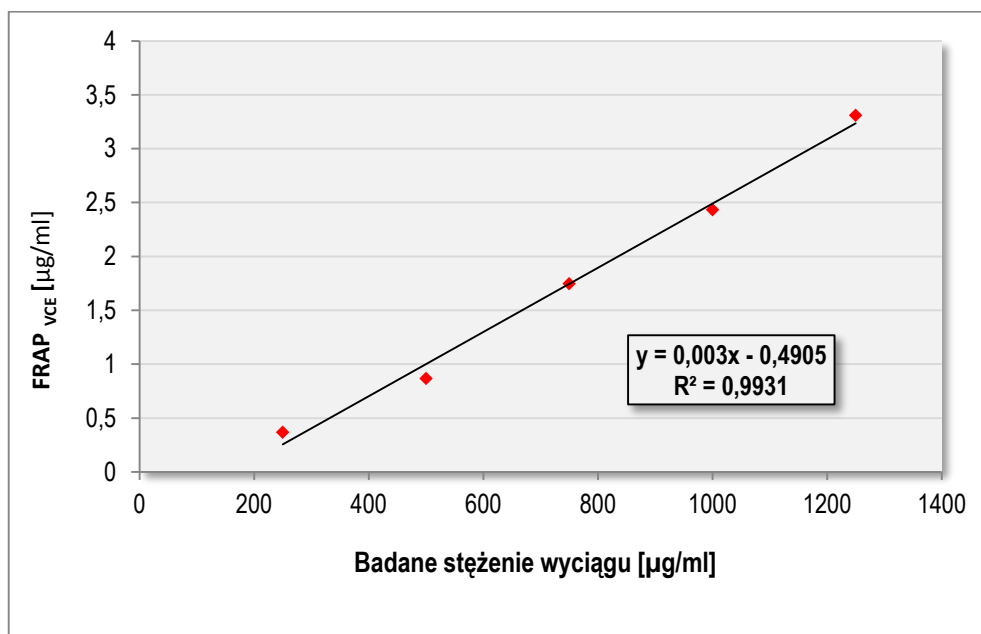
x	1	2	3	4	5	6	średnia
250	0,3487	0,3942	0,3814	0,3460	0,3685	0,3626	0,3669
500	0,9031	0,8709	0,8516	0,8693	0,8388	0,8757	0,8682
750	1,7295	1,7713	1,7799	1,7611	1,6984	1,7440	1,7474
1000	2,4306	2,4301	2,4355	2,4413	2,4360	2,4317	2,4342
1250	3,3117	3,3883	3,2935	3,2807	3,2758	3,3123	3,3104

x-stężenie odwaru w próbce [µg/ml]

Tabela 77. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.

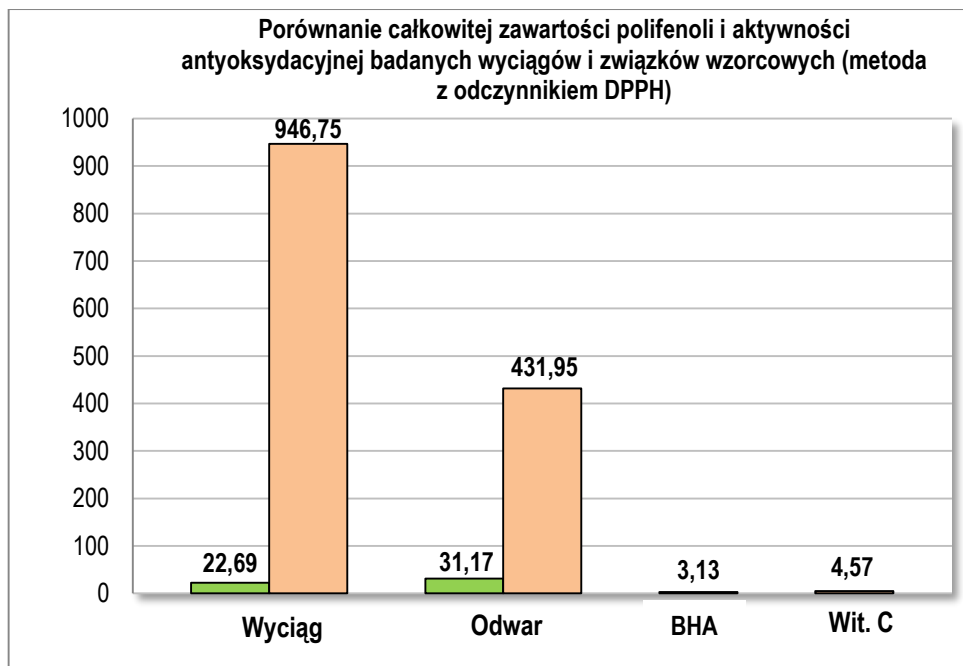
x	A _{śr}	S	S _{śr}	W _z	μ	A _{śr} ±2S
250	0,3669	0,0035	0,0016	0,9504	0,3669±0,0037	0,3669±0,0070
500	0,8682	0,0220	0,0098	2,5340	0,8682±0,0231	0,8682±0,0440
750	1,7474	0,0301	0,0135	1,7246	1,7474±0,0316	1,7474±0,0603
1000	2,4342	0,0043	0,0019	0,1758	2,4342±0,0045	2,4342±0,0086
1250	3,3104	0,0411	0,0184	1,2411	3,3104±0,0431	3,3104±0,0822

x-stężenie odwaru w próbce [μg/ml]; A_{śr}-średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; S-odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; S_{śr}- odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; W_z-współczynnik zmienności (%), μ-przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności α=0,05 przy n=6, f=n-1 wartość współczynnika t-Studenta t_{α,f}=2,571), A_{śr}±2S-przedział, w którym powinien się znaleźć wynik pojedynczego oznaczenia dla (α=0,05).

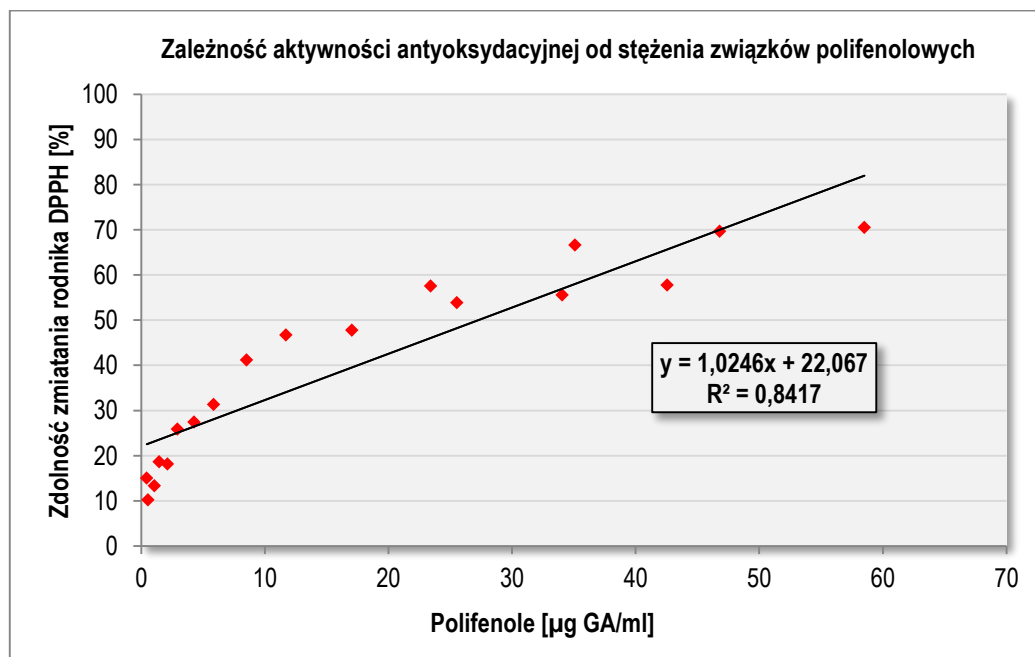


Rycina 97. Właściwości redukujące metanolowego odwaru z ziela *A. amaranthoides*.

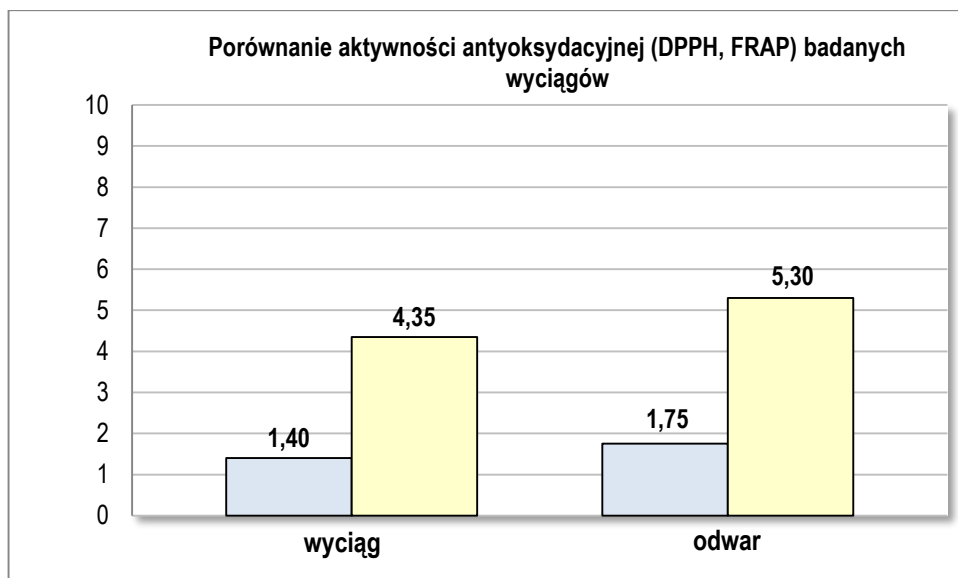
9.3.3. Zależność zawartości całkowitej sumy polifenoli i aktywności antyoksydacyjnej badanych wyciągów



Rycina 98. Zawartość całkowitej sumy polifenoli (mg GAE/g wyciągu) w wyciągu metanolowym i odwarze z ziela *A. amaranthoides* L. oraz aktywność antyoksydacyjna (IC_{50}) wyciągu, odwaru i substancji wzorcowych (DPPH).



Rycina 99. Zależność liniowa aktywności antyoksydacyjnej (DPPH) wyciągu metanolowego i odwaru z ziela *A. amaranthoides* od stężenia związków polifenolowych w badanych próbach.



Rycina 100. Porównanie aktywności antyoksydacyjnej badanych wyciągów z ziela *A. amaranthoides* L. (750 µg/ml) zmierzonej metodą FRAP i DPPH, wyrażonej jako równoważnik witaminy C (VCE) w µg/ml.

9.3.4. Badanie aktywności przeciwzapalnej

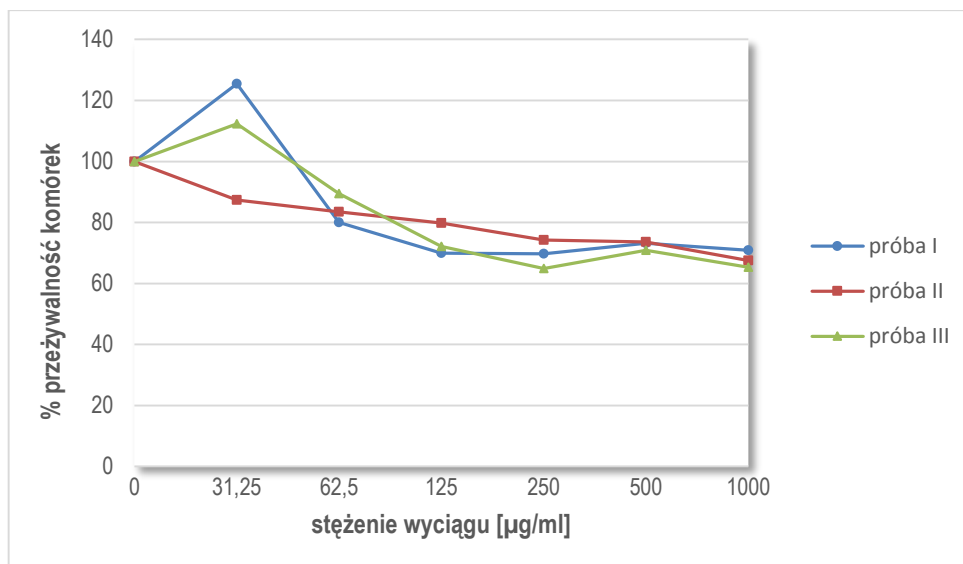
9.3.4.1. Badanie cytotoksyczności wyciągów metodą MTT

Wpływ badanych wyciągów na żywotność linii komórek HaCaT oceniono za pomocą testu MTT. Otrzymane wyniki przedstawiono jako procent grupy kontrolnej w tabeli 78 oraz na rycinach 101-102.

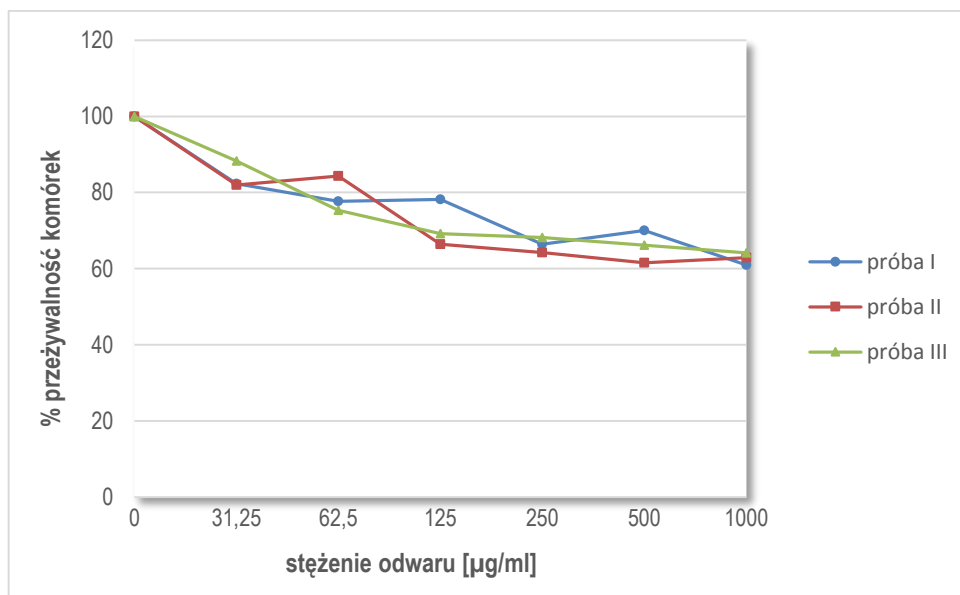
Tabela 78. Przeżywalność komórek HaCaT w zależności od stężenia wyciągów z ziela *A. amaranthoides*.

x	przeżywalność komórek HaCaT					
	wyciąg metanolowy			odwar		
	próba I	próba II	próba III	próba I	próba II	próba III
0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
31,25	125,44	87,34	112,35	82,28	82,01	88,29
62,50	80,05	83,49	89,46	77,71	84,34	75,32
125,00	69,98	79,84	72,12	78,17	66,43	69,22
250,00	69,70	74,23	64,90	66,41	64,23	68,20
500,00	73,17	73,61	70,86	70,01	61,56	66,13
1000,00	70,91	67,55	65,30	60,97	62,88	64,19

x - stężenie wyciągu [µg/ml]; stężenie 0 - próba kontrolna



Rycina 101. Wpływ wyciągu metanolowego z ziela *A. amaranthoides* na przeżywalność komórek HaCaT.



Rycina 102. Wpływ odwaru z ziela *A. amaranthoides* na przeżywalność komórek HaCaT.

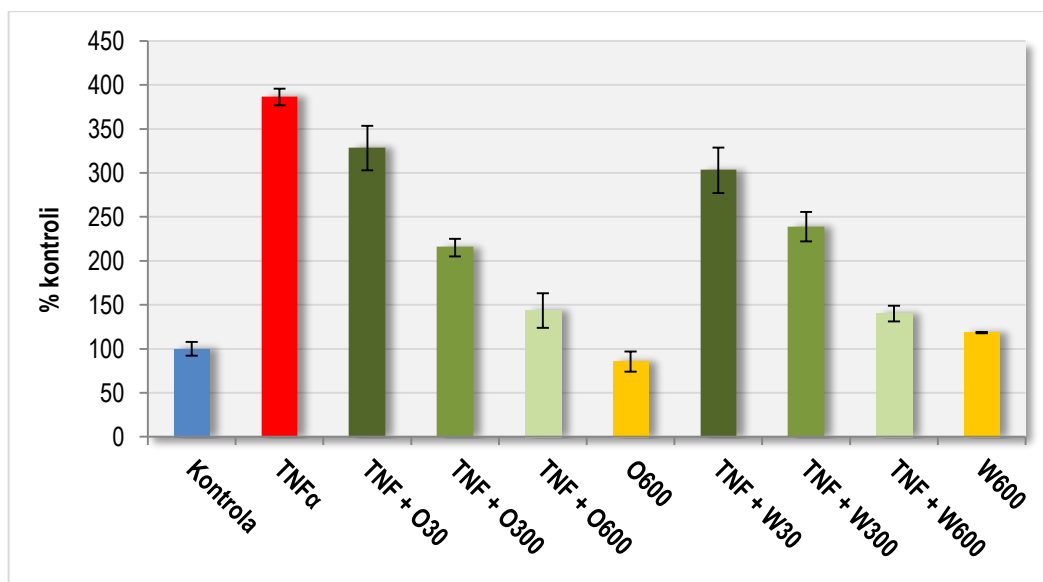
9.3.4.2. Oznaczanie poziomu białka COX-2

Wyniki badania wpływu wyciągu metanolowego i odwaru z ziela *A. amaranthoides* na poziom białka COX-2 przedstawiono w tabeli 79 i na rycinie 103. W badaniu przeprowadzono równoległą próbę dla białka konstytutywnego – β -aktyny, aby kontrolować naniesienie jednakowej ilości białka na poszczególne ścieżki żelu (*loading control*) (Rycina 104). Ocena parametrów statystycznych uzyskanych wyników przeprowadzono w oparciu o test t-Studenta.

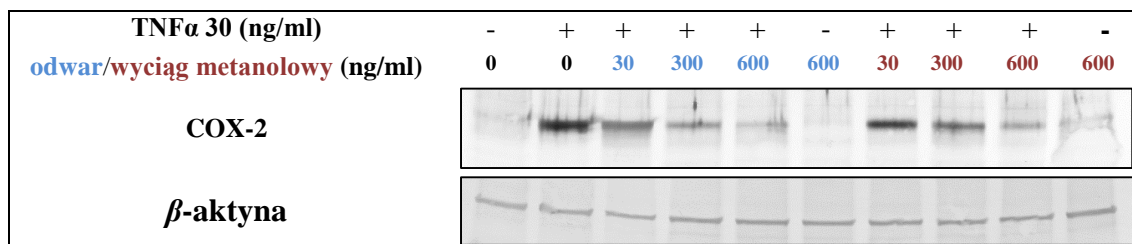
Tabela 79. Wpływ badanych prób (odwar-O, wyciąg metanolowy-W) na poziom białka COX-2 w przeliczeniu na % próby kontrolnej.

Próba	COX-2	
	% kontroli	% $S_{\bar{x}}$
Kontrola	100	7,7347
TNF α	386,29	9,4776
TNF α +O30	328,25	25,3310
TNF α +O300	215,10	10,0150
TNF α +O600	143,68	19,6176
O600	85,63	11,4722
TNF α +W30	302,94	25,6953
TNF α +W300	238,87	16,8232
TNF α +W600	140,18	8,8446
W600	118,50	0,7819

% $S_{\bar{x}}$ - % odchylenia standardowego średniej arytmetycznej



Rycina 103. Wpływ odwaru (O) i wyciągu metanolowego (W) na poziom białek COX-2 w komórkach HaCaT (wynik = % próby kontrolnej \pm SD).



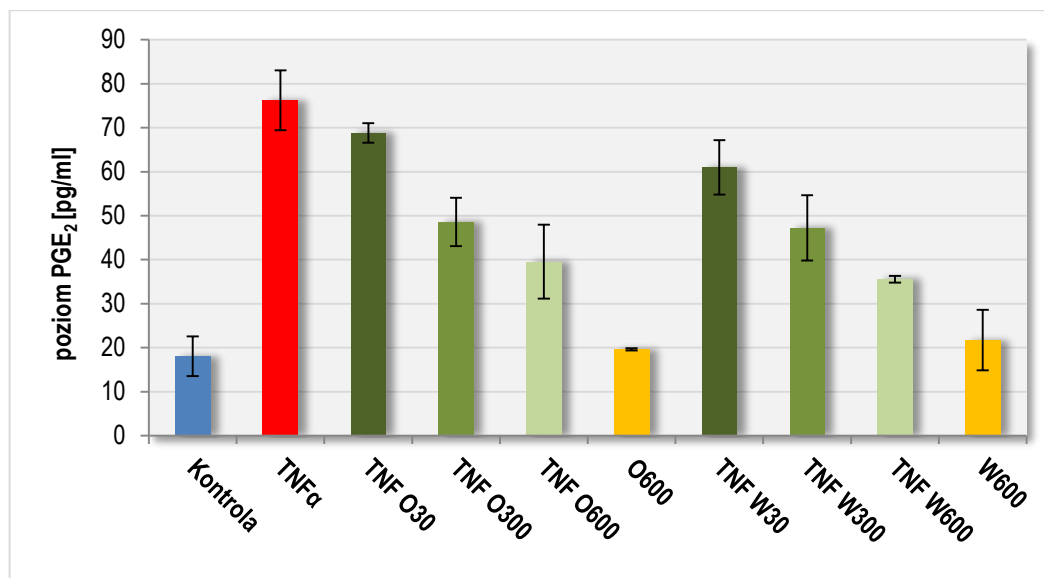
Rycina 104. Wpływ odwaru i nalewki z ziela *A. amaranthoides* na poziom białka COX-2 w komórkach HaCaT oznaczony metodą Western Blot.

9.3.4.3. Oznaczanie poziomu białka PGE₂

Wyniki badania wpływu wyciągu metanolowego i odwaru z ziela *A. amaranthoides* na poziom PGE₂ przedstawiono w tabeli 80 i na rycinie 105. Ocena parametrów statystycznych uzyskanych wyników przeprowadzono w oparciu o test t-Studenta.

Tabela 80. Średnie wartości absorbancji otrzymane w wyniku oznaczania wpływu badanych prób (odwar-O, wyciąg metanolowy-W) na poziom PGE₂.

Próba	PGE ₂	
	\bar{x}	$S_{\bar{x}}$
Kontrola	18,0634	4,5037
TNF α	76,2336	6,7711
TNF α +O30	68,7940	2,2028
TNF α +O300	48,5584	5,5012
TNF α +O600	39,5447	8,3986
O600	19,6240	0,2628
TNF α +W30	60,9877	6,2099
TNF α +W300	47,2330	7,4370
TNF α +W600	35,5622	0,7422
W600	21,7096	6,8798



Rycina 105. Wpływ odwaru (O) i wyciągu metanolowego (W) na poziom PGE₂ w komórkach HaCaT.

9.3.5. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej prowadzono na wybranych szczepach drobnoustrojów, metodą mikrorozcieńczeń. Jako substancje referencyjne zastosowano nystatynę i amikacynę. W doświadczeniu wyznaczono wartości MIC i MBC. Wyniki badania przedstawiono w tabeli 81.

Tabela 81. Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze/grzybobójcze (MBC/MFC) badanych wyciągów i substancji wzorcowych na wybrane szczepy drobnoustrojów.

Mikroorganizmy	Odwar		Wyciąg metanolowy		Nystatyna		Amikacyna		Kontrola [DMSO + podłoże]
	MIC mg/ml	MBC /MFC mg/ml	MIC mg/ml	MBC/ MFC mg/ml	MIC μ g/ml	MFC μ g/ml	MIC μ g/ml	MBC μ g/ml	MIC// MBC/MFC
<i>S. aureus</i> ATCC 4163	200	> 200	37,5	37,5	-	-	2	2	+//+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 6749	> 200	> 200	37,5	37,5	-	-	2	2	+//+
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	> 200	> 200	75	>75	8	16	-	-	+//+
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533	100	200	9,375	37,5	8	64	-	-	+//+
<i>T. rubrum</i> ATCC 28188	50	200	9,375	18,75	8	32	-	-	+//+

OMÓWIENIE I DYSKUSJA

Celem prowadzonych badań była izolacja oraz identyfikacja jednorodnych związków flawonoidowych obecnych w wysuszonym ziele *A. amaranthoides* L. jak i ich identyfikacja w mieszaninie. Ponadto dla wybranych wyciągów przeprowadzono badania ilościowe obejmujące oznaczanie całkowitej sumy polifenoli oraz zawartości flawonoidów, a także ocenę aktywności biologicznej: antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej i przeciwdrobnoustrojowej.

Izolacja i identyfikacja flawonoidów

Izolację związków flawonoidowych prowadzono z wyciągu otrzymanego z wysuszonego ziele *A. amaranthoides* L. Surowiec poddano 24-godzinnej maceracji metanolem, a następnie kolejno trzykrotnej ekstrakcji metanolem oraz trzykrotnej ekstrakcji mieszaniną metanol-woda (1:1) na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną, każdorazowo w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika w czasie 1 godziny. Dla każdego z otrzymanych wyciągów przeprowadzono kontrolę chromatograficzną, na podstawie której stwierdzono podobny obraz dla wszystkich ekstraktów. Ekstrakty połączono i zagęszczono w wyparce próżniowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Zagęszczony wyciąg pozbawiono substancji balastowych poprzez strącenie ich gorącą wodą. Po 24 godzinach całość przecedzono, a przesącz wytrząsano kolejno rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności: chloroformem, eterem dietylowym i octanem etylu. Do dalszych prac izolacyjnych przeznaczono frakcję chloroformową, octanu etylu oraz frakcję wodną. Frakcji eterowej nie wykorzystano do dalszych badań, z uwagi na małą ilość flawonoidów, a także podobny skład do frakcji octanu etylu.

Na podstawie kontroli chromatograficznej stwierdzono obecność jednego związku flawonoidowego we frakcji chloroformowej, natomiast w przypadku frakcji octanowej jak i wodnej, co najmniej kilkunastu flawonoidów. Izolacja jednorodnych związków okazała się trudna, ze względu na podobne właściwości (zbliżone wartości współczynników R_f , wysoka polarność i dobra rozpuszczalność w wodzie). Prace izolacyjne dla pojedynczych struktur powiodły się w przypadku trzech związków, natomiast inne flawonoidy zidentyfikowano w mieszaninach za pomocą metody LC-MS/MS, gdyż nie udało się ich rozdzielić, ze względu na podobne struktury.

Izolację flawonoidów z frakcji chloroformowej (**C**), octanu etylu (**OE**) i wodnej (**W**) prowadzono metodą chromatografii kolumnowej, na szklanych kolumnach wypełnionych celulozą, wymywanych za pomocą wybranych faz rozwijających, często stosowanych w analityce flawonoidów. W wyniku rodziału na kolumnach do kolejnych prac przeznaczono z frakcji chloroformowej podfrakcję 35-37 zawierającą **związek 1**, z frakcji octanu etylu podfrakcję 22-35 zawierającą **związek 2** oraz z frakcji wodnej podfrakcję 73-89 zawierającą **związek 3**. Otrzymane podfrakcje zawierały w przeważającej ilości izolowane struktury, ale i związki fluoryzujące na niebiesko w UV 366 nm, dlatego konieczne było dalsze, kilkukrotne oczyszczanie, które prowadzono na szklanych kolumnach wypełnionych podłożem Sephadex LH-20, wykorzystując układy wymywające o różnej polarności. Końcowe oczyszczanie jednorodnych związków **1**, **2** i **3** prowadzono wykorzystując metodę ekstrakcji do fazy stałej na kolumnkach SPE wypełnionych określonym adsorbentem (Bond Elut C18, Agilent). Podjęto także próby wyodrębniania związków za pomocą preparatywnej chromatografii bibułowej oraz preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej z wieloskładnikowych podfrakcji OE 39-49, W 90-97 i W 101-120, jednak nie przyniosły one oczekiwanych efektów, a poszczególnych związków nie udało się rozdzielić. Wyodrębnione związki **1**, **2** i **3** identyfikowano wybranymi metodami spektralnymi: UV ^1H i ^{13}C NMR oraz (LC-MS i LC-MS/MS).

Spektroskopia UV polega na analizie absorpcji promieniowania ultrafioletowego w zakresie 200-400 nm przez cząsteczki (Kocjan i wsp., 2000). Technika ta jest jedną z najstarszych stosowanych w analizie związków flawonoidowych. Obecnie coraz częściej zastępuje się ją innymi metodami spektralnymi.

Spektroskopia NMR to technika badawcza szeroko wykorzystywana w chemii, biologii, fizyce oraz medycynie. Opiera się ona na zjawisku pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego o określonej częstotliwości przez jądra atomowe, posiadające momenty magnetyczne. Metoda NMR, w oparciu o widma rezonansowe jąder atomów ^1H i ^{13}C , dostarcza jednoznacznych informacji związanych ze strukturą analizowanych związków (Muth i Kachlicki, 2009).

Spektrometria mas z kolei daje możliwość określenia masy cząsteczkowej oraz elementarnego składu cząsteczki na podstawie pomiarów stosunku masy do ładunku: m/z zjonizowanych cząsteczek. Analizy tą metodą charakteryzują się dużą dokładnością, a dodatkowo na podstawie widm masowych jonów fragmentacyjnych powstających na skutek rozpadu, np. protonowanych lub deprotonowanych cząsteczek $[\text{M}-\text{H}]^+$ oraz $[\text{M}-$

HJ⁻ dostarczają informacji na temat budowy chemicznej badanych struktur (Muth i Kachlicki, 2009).

Wyniki analizy UV, NMR i LC-MS oraz LC-MS/MS dla wyizolowanych z ziela *A. amaranthoides* związków flawonoidowych interpretowano w oparciu o dostępne dane literaturowe (Mabry i wsp., 1970; Markham i Ternai, 1976; Markham i wsp., 1978; Agrawal i Rastogi, 1981; Harborne i Mabry, 1982; Dey i Harborne, 1989; Agrawal, 1989; Agrawal, 1992; Harborne, 1994; Marczak i wsp., 2010; Stochmal i wsp., 2001a,b; Kowalska i wsp., 2007; Chao-Lin, 2010; Rivera, 2013).

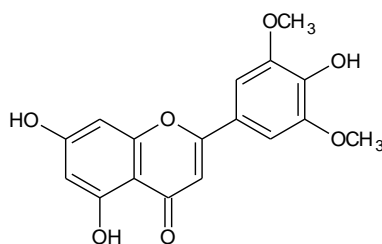
Widma UV większości związków flawonoidowych prezentują dwa charakterystyczne pasma absorpcji występujące w zakresie 240-285 nm (pasmo II) oraz 300-400 nm (pasmo I). Na podstawie położenia I i II maksimum oraz ich przesunięć względem widma w metanolu po dodaniu odczynników jonizujących i kompleksotwórczych, uzyskać można informacje dotyczące budowy związku (Harborne i wsp., 1975). Maksimum I roztworu metanolowego **związku 1, 2 i 3** występowało w zakresie charakterystycznym dla flawonów (335-350 nm) (Tabele 7, 11, 15). Brak przesunięcia II maksimum po dodaniu octanu sodu w stosunku do widma **związku 2 i 3** w metanolu świadczyło o zablokowanej grupie OH w C-7. **Związek 1** z kolei posiadał wolną grupę hydroksylową w C-7, co stwierdzono na podstawie batochromowego przesunięcia II maksimum o $\Delta\lambda=17$ nm (związki z wolną grupą hydroksylową w C-7 dają batochromowe przesunięcie w granicach 5-20 nm). Badane związki nie posiadały ugrupowania ortodihydroksylowego w C-3',4' w pierścieniu B, na co wskazywał brak przesunięcia I maksimum w zakresie ok. $\Delta\lambda=12-36$ nm po dodaniu do metanolowego roztworu związków octanu sodu i kwasu borowego. Ponadto w przypadku wszystkich związków kompleks z chlorkiem glinu był stabilny wobec HCl, a przesunięcie batochromowe I pasma z AlCl_3/HCl w granicach $\Delta\lambda=35-65$ nm w stosunku do MeOH wskazywało na obecność grupy OH w pozycji C-5. Batochromowe przesunięcie maksimum I **związku 3** o $\Delta\lambda=65$ nm, a związków 1 i 2 powyżej 70 nm po dodaniu metylanu sodu do metanolowego roztworu wskazywało na obecność wolnej grupy OH w C-4'.

Widmo ^1H NMR (CD_3OD) **związku 1** (Tabela 8, Ryciny 26-29) w rejonie pola sygnałów pierścienia A prezentowało dwa dublety: przy δ 6,21 ppm ($J=2,03$ Hz; *meta*) i δ 6,48 ppm ($J=2,11$ Hz; *meta*), które zostały przypisane odpowiednio protonom H-6 i H-8 oraz singlet przy δ 6,66 ppm odpowiadający protonowi H-3. W zakresie sygnałów pierścienia B zarejestrowano sygnał w postaci singletu przy δ 7,24 ppm reprezentujący

dwa równoważne protony H-2' i H-6'. Dodatkowo obecny był sygnał w formie singletu przy δ 3,94 ppm odpowiadający dwóm równoważnym grupom metoksyłowym przyłączonym do pierścienia B w pozycjach C-3' i C-5'.

W widmie ^{13}C NMR (**Tabela 8, Rycina 30-32**) zarejestrowano sygnały pochodzące od 14 cząsteczek węgla. Obserwowane sygnały odpowiadały przesunięciom chemicznym mieszczącym się w zakresie wartości charakterystycznych dla grupy flawonów. Sygnały dla węgla C-2 i C-3 zarejestrowano odpowiednio przy wartościach δ 166,11 ppm, 104,60 ppm. Dla węgla C-4 natomiast sygnał pojawił się przy wartości δ 183,87 ppm (przesunięcie sygnału w dół pola o ok. +7,0 ppm w porównaniu z podstawową strukturą flawonu), co świadczy o podstawieniu 5-OH cząsteczki. Zmianę położenia sygnału w porównaniu z podstawową strukturą flawonu zaobserwowano także w przypadku pozycji C-7: δ 166,08 ppm (przesunięcie w dół pola o ok. +33 ppm) i C-5: δ 163,25 ppm (przesunięcie w dół pola o ok. +38 ppm), co wynika z podstawienia pozycji C-7 i C-5 grupami hydroksylowymi. O podstawieniu pozycji 4' pierścienia B grupą hydroksylową świadczy zwykle zmiana położenia sygnału węgla C-4' podstawowej struktury (flawonu) z wartości ok. δ 131 ppm na δ 161 ppm, czyli przesunięcie w dół pola o ok. +30 ppm. W przypadku analizowanego związku jednak sygnał odpowiadający węglowi C-4' zarejestrowano przy δ 141,24 ze względu na obecność grup metoksyłowych w pozycjach C-3' i C-5'. Ponadto o obecności dodatkowych grup w pierścieniu B świadczyła zmiana przesunięcia chemicznego sygnałów C-3' i C-5' w dół pola o ok. +33 ppm z wartości ok. δ 116 ppm (charakterystycznej dla związków podstawionych grupą hydroksylową w pozycji 4') na δ 149,67 ppm. Sygnał odpowiadający dwóm grupom metoksyłowym obecny był przy δ 57,06 ppm. W widmie NMR związku 1 (inna partia osadu) wykonanym w DMSO- d_6 obserwowano podobne sygnały odpowiednich protonów i węgla jak w widmie wykreślonym w CD₃OD (Harborne, 1994; Chao-Lin, 2010).

W przypadku analizy LC-MS w widmie masowym związku 1 zarejestrowany w trybie jonów dodatnich sygnał protonowanej cząsteczki $[\text{M}+\text{H}]^+$ występował przy m/z 331,0834, natomiast w trybie jonów ujemnych sygnał dla deprotonowanej cząsteczki $[\text{M}-\text{H}]^-$ obserwowano przy wartości m/z 329,0605. W wyniku analizy widm MS wyznaczono masę związku na 330, co odpowiadało molekularnej masie trycyny (330,28886) (**Tabela 9, Rycina 33**). Na podstawie przeprowadzonych analiz związek 1 zidentyfikowano jako trycynę czyli 5,7,4'-trihydroksy-3',5'-dimetoksyflawon (**Rycina 106**).



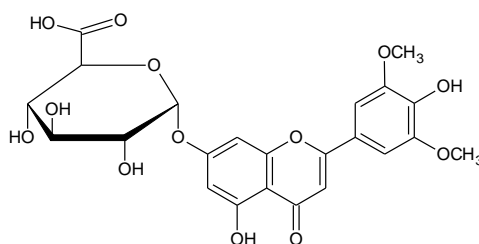
Rycina 106. Wzór strukturalny 5,7,4'-trihydroksy-3',5'-dimetoksyflawonu (trycyny).

W widmie ^1H NMR związku **2** ($\text{DMSO-}d_6$) (Tabela 12, Rycina 34-36) w zakresie sygnałów cząsteczki aglikonu obecne były sygnały czterech protonów: dublet przy δ 6,48 ppm ($J=1,98$ Hz, *meta*) odpowiadający protonowi H-6, dublet przy δ 6,95 ppm ($J=2,31$ Hz, *meta*) pochodzący od protonu H-8 oraz dwa singlety: pierwszy przy δ 7,08 ppm przypisany protonowi H-3 i drugi przy δ 7,37 ppm odpowiadający dwóm równoważnym protonom H-2' i H-6'. Dodatkowo zarejestrowano sygnał w formie singletu przy wartości δ 3,89 ppm, odpowiadający dwóm równoważnym grupom metoksyłowym przyłączonym w pozycjach C-3' i C-5' pierścienia B. Sygnał anomerycznego protonu kwasu uronowego zarejestrowano przy wartości δ 5,26 ppm w postaci dubletu o stałej sprzężenia $J=7,40$ Hz, co sugerowało występowanie jego cząsteczki w formie β -glukuronopiranozydu. Na przyłączenie cząsteczki cukru w pozycji C-7 wskazywało przesunięcie sygnałów protonów H-6 i H-8 w dół pola odpowiednio o około +0,25 ppm i +0,3 ppm w stosunku do wartości odpowiadających trycynie ($\text{DMSO-}d_6$).

Widmo ^{13}C NMR (Tabela 12, Rycina 37) zawierało 19 sygnałów pochodzących od cząsteczek węgla, których wartości przesunięć były zgodne z opisanymi dla trycyny, z przyłączonym w pozycji C-7 kwasem glukuronowym. Diagnostyczny sygnał dla węgla grupy karboksylowej C-6'' kwasu glukuronowego obecny był przy wartości δ 170,05 ppm. Sygnał węgla anomerycznego cząsteczki kwasu uronowego zarejestrowano przy wartości δ 99,7 ppm czyli w zakresie typowym dla *O*-glikozydów. Obecność cząsteczki kwasu uronowego w pozycji C-7 potwierdzała zmiana wartości przesunięcia chemicznego dla węgla C-7 w stosunku do analogicznego sygnału trycyny ($\text{DMSO-}d_6$), w górę pola o -1,12 ppm, natomiast sygnałów w pozycji *orto* C-6 i *orto* C-8 w dół pola o odpowiednio +0,4 ppm i +0,8 ppm, podobnie jak sygnału *para* C-10 o około +1,3 ppm.

Wyniki analizy LC-MS/MS (Tabela 13, Ryciny 38-39) związku z trybie jonów dodatnich prezentowały typowy przebieg fragmentacji dla glikozydów flawonoidowych. Wartość m/z zarejestrowana dla jonu pseudomolekularnego $[\text{M}+\text{H}]^+$ wynosiła 507,1197.

Na skutek rozerwania wiązania *O*-glikozydowego dochodziło do oderwania fragmentu o masie 176 Da, co odpowiadało utracie kwasu glukuronowego. Jednocześnie w widmie obserwowano jon Y_0^+ zarejestrowany przy wartości m/z 331,826 i odpowiadający protonowanej cząsteczce aglikonu – trycyny. Podobny przebieg fragmentacji obserwowano w trybie jonów ujemnych, gdzie na skutek oderwania od jonu pseudomolekularnego (m/z 505) obojętnego fragmentu o masie 176 Da (kwas glukuronowy) obserwowano jon Y_0^- o wartości m/z 329, co odpowiadało deprotonowanej trycynie. Dodatkowo w przypadku związku 2 obserwowano drugą ścieżkę fragmentacyjną, gdzie dochodziło do oderwania grupy metylowej (-15 Da) i pojawienia się w widmie jonu $[M-H]-CH_3$ o m/z 490,0719, od którego w następnej kolejności odszczepiał się kwas glukuronowy i co skutkowało obecnością w widmie dodatkowego jonu oznaczonego jako Y_0^{*-} (m/z 314,0412). Wyznaczona doświadczalnie masa monoizotopowa związku 2 wynosiła 506,1050. Na podstawie przeprowadzonych analiz związek 2 zidentyfikowano jako **7-*O*-glukuronopiranozyd trycyny (Rycina 107)**.



Rycina 107. Wzór strukturalny 7-*O*-glukuronopiranozydu trycyny.

Na podstawie przesunięć chemicznych zarejestrowanych w widmie 1H NMR **związku 3 (Tabela 16, Ryciny 40-44)** poza sygnałami odpowiadającymi trycynie stwierdzono obecność sygnałów odpowiadających dwóm cząsteczkom kwasu glukuronowego i jednej cząsteczce kwasu ferulowego. Sygnały anomerycznych protonów dwóch kwasów uronowych w postaci dwóch dubletów obecnych dla H-1'' przy δ 5,36 ppm i H-1''' przy δ 4,99 ppm prezentowały duże stałe sprzężenia, odpowiednio $J=6,75$ Hz i $J=8,14$ Hz. Potwierdzało to obecność kwasów glukuronowych w formie β -glukuronopiranozydów. Obecność kwasu ferulowego stwierdzono na podstawie dwóch dubletów zarejestrowanych przy δ 7,03 ppm ($J=1,60$ Hz) dla protonu H-2^{FA} i przy δ 6,62 ($J=8,14$ Hz) dla protonu H-5^{FA} oraz podwójnego dubletu obecnego przy δ 6,88 ($J=8,30$; 1,28 Hz) dla protonu H-6^{FA}. Obserwowano także sygnał odpowiadający H-2''' kwasu

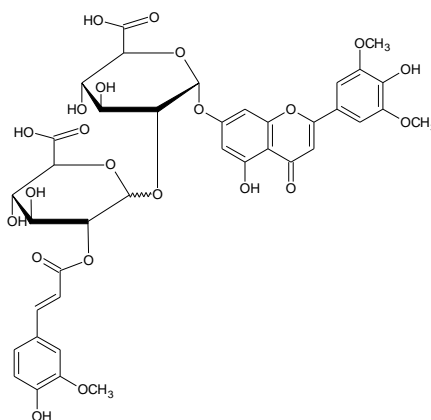
glukuronowego przy δ 4,64 (dd, $J=9,10$; 8,41 Hz) charakterystyczny dla podstawionej cząsteczki kwasu glukuronowego przy węglu C-2. Sygnał przy δ 3,70 ppm w formie singletu, przypisano grupie metoksylovej, a sygnały w formie dubletów o dużych stałych sprzężenia, charakterystycznych dla podwójnego wiązania *trans* w cząsteczce kwasu ferulowego notowano przy δ 7,37 ($J=15,76$ Hz) i δ 6,17 ($J=15,94$ Hz), odpowiednio dla protonów H-7^{FA} i H-8^{FA}.

W widmie ¹³C NMR (**Tabela 16, Ryciny 45-51**) w zakresie charakterystycznym dla anomerycznych węgli cząsteczek cukrowych zarejestrowano dwa sygnały. Pierwszy obecny przy wartości δ 96,39 ppm odpowiadał węglowi C-1'', drugi zarejestrowany przy wartości δ 98,36 ppm przypisano węglowi C-1'''. W widmie ¹³C NMR zaobserwowano zmianę przesunięcia chemicznego sygnału węgla C-2'' w dół pola o ok. +7,0 ppm (δ 79,44 ppm) w stosunku do sygnału węgla C-2 w niepodstawionej cząsteczce kwasu glukuronowego. Na tej podstawie ustalono, że druga cząsteczka kwasu glukuronowego w związku 3 przyłączona była do pierwszej w pozycji C-2''.

W widmie ¹H-¹³C typu HMBC (**Rycina 52**) wykazano korelację pomiędzy protonem H-1'' kwasu glukuronowego (δ 5.36) i węglem C-7 aglikonu (δ 162.24), pomiędzy protonem H-1''' (δ 4.99) kwasu glukuronowego i węglem C-2'' (δ 79.44) drugiego kwasu glukuronowego oraz pomiędzy protonem H-2''' kwasu glukuronowego (δ 4.64) i węglem grupy karboksylowej -COOH kwasu ferulowego (δ 165,45). Na podstawie widma HMBC potwierdzono glikozylację aglikonu w pozycji C-7, połączenie 1→2 pomiędzy cząsteczkami kwasów glukuronowych oraz przyłączenie cząsteczki kwasu ferulowego do kwasu glukuronowego w pozycji C-2'''.

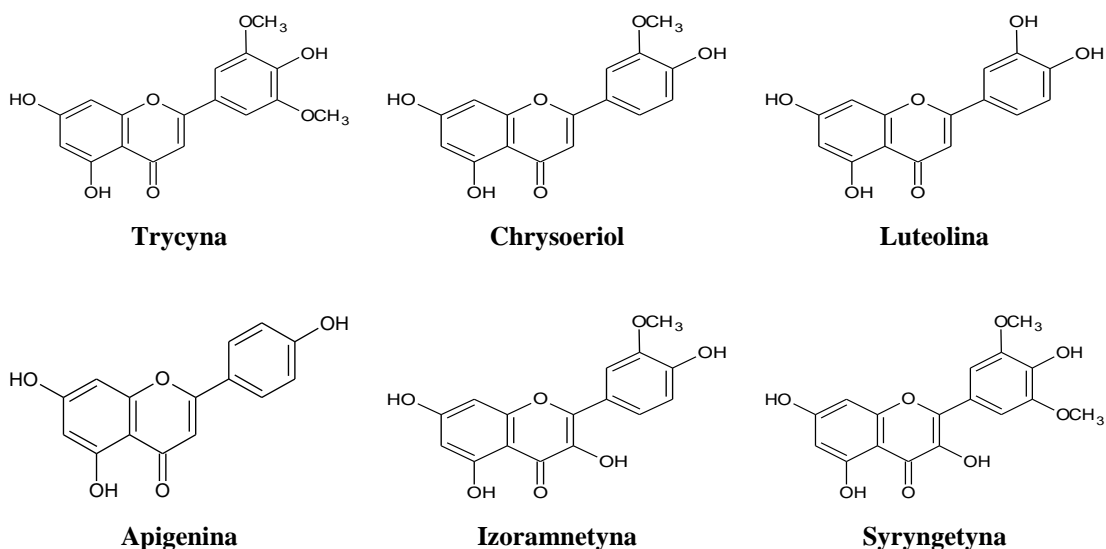
Analiza LC-MS/MS (**Tabela 17, Rycina 53-54**) pozwoliła zaobserwować w trybie pozytywnym obecność trzech jonów zarejestrowanych przy wartościach m/z : 859,1991; 507,1194 i 331,0843. Pierwszy z nich odpowiadał protonowanej cząsteczce związku 3, natomiast dwa kolejne powstawały na skutek oderwania odpowiednio cząsteczki kwasu ferulowego w połączeniu z jedną cząsteczką kwasu glukuronowego: - 352 Da (Y_1^+) oraz na skutek rozerwania wiązania *O*-glikozydowego pomiędzy kwasem glukuronowym a aglikonem -176 Da (Y_0^+). W trybie jonów ujemnych zarejestrowano pik jonu pseudomolekularnego $[M-H]^-$ o wartości m/z 857,2272 oraz pik jonu B_2^- m/z 527,1072, powstałemu na skutek utraty masy odpowiadającej aglikonowi (-330 Da) oraz stabilizacji ujemnego ładunku na strukturze dwóch, połączonych kwasów glukuronowych acylowanych kwasem ferulowym. Masa monoizotopowa związku 3 wynosiła 858,1854. Na podstawie przeprowadzonych analiz związek 3 zidentyfikowano

jako: **7-*O*-[2'''-*O*-feruilo- β -glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-*O*- β -glukuronopiranozyd] trycyny (Rycina 108).**



Rycina 108. Wzór strukturalny 7-*O*-[2'''-*O*-feruilo- β -glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-*O*- β -glukuronopiranozyd] trycyny.

Mimo prowadzonych prac izolacyjnych nie udało się wyodrębnić pozostałych związków flawonoidowych dostępnymi metodami. Z uwagi na ich dużą liczbę, zbliżone struktury, a także wysoką polarność, były one identyfikowane w mieszaninach (frakcjach) za pomocą ultrasprawniej chromatografii cieczowej (UPLC) połączonej z wysokorozdzielczą (kwadrapol-czas przelotu, QToF) spektrometrią mas. Szczegółowe analizy widm MS i MS² umożliwiły identyfikację 33 różnych koniugatów flawonoidowych (poza związkami wyizolowanymi) wśród których 11 związków poznanych było już wcześniej, natomiast 22 zidentyfikowano po raz pierwszy w świecie roślinnym. Stanowiły one pochodne **flawonów: trycyny** (17 związków), **chrysoeriolu** (7 związków), **apigeniny** (2 związki) i **luteoliny** (1 związek) oraz **flawonoli: izoramnetyny** (5 związków) i **syryngetyny** (1 związek) (**Rycina 109**).



Rycina 109. Aglikony związków flawonoidowych zidentyfikowanych w ziele *A. amaranthoides* L.

Wszystkie zidentyfikowane struktury zawierały w części cukrowej jedną do trzech cząsteczek kwasu glukuronowego lub metyloglukuronowego, niekiedy podstawionego cząsteczką kwasu fenolowego, a w niektórych związkach dodatkowo obecna była glukoza i/lub ksyloza.

Należy zaznaczyć, że zastosowanie technik MS może okazać się niewystarczające do określenia pełnej struktury związku chemicznego. Nie pozwala m.in. na jednoznaczne wyznaczenie pozycji podstawienia aglikonu cząsteczką cukru i umożliwia jedynie różnicowanie na pentozę bądź heksozę, bez szczegółowego określenia cukru. Mimo to, na podstawie literatury dotyczącej szeroko prowadzonych badań związanych ze strukturą flawonoidów, możliwe jest ustalenie najbardziej prawdopodobnej budowy badanych związków, które przedstawiono w pracy. W dostępnym piśmiennictwie istnieje wiele badań (głównie analizy metodą NMR) potwierdzających jednoznacznie, typowe dla flawonów i flawonoli, miejsca podstawienia aglikonu cząsteczką cukru, formę cząsteczki cukrowej, rodzaj połączeń międzycukrowych, miejsce występowania połączeń estrowych, a także sposób acylowania cząsteczki pochodnymi kwasu cynamonowego (kwasem *p*-kumarowym, ferulowym, synapinowym) (Kowalska i wsp., 2007). Ponadto, obecność opisywanych w pracy koniugatów flawonów i flawonoli stwierdzono w przypadku różnych innych gatunków roślin (Stochmal i wsp., 2001a,b). Można zatem przyjąć, że układy enzymatyczne odpowiedzialne za glikozydację jak i acylowanie flawonoidów, mają podobną lub taką samą specyfikę działania pomiędzy odrębnymi gatunkami. W związku z powyższym, a także na podstawie analiz NMR

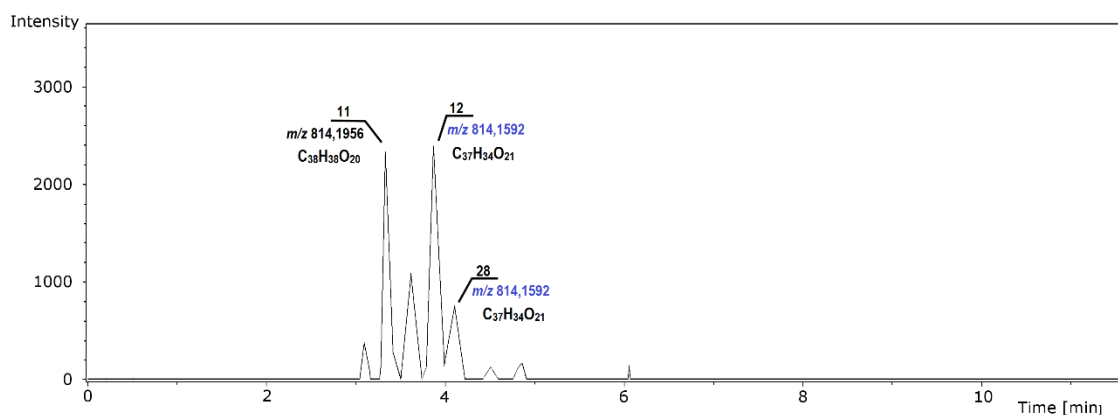
przeprowadzonych w toku niniejszych badań dla wyizolowanych z *A. amaranthoides* flawonoidów, w przypadku pozostałych związków flawonoidowych obecnych w roślinie, przyjęto określone struktury chemiczne, uznając, że są one najbardziej prawdopodobne.

Analizę LC-MS dla wszystkich badanych próbek przeprowadzono zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych (**Tabele 18-50, Rycina 55-88**). Widma uzyskiwano za pomocą wysokorozdzielczego spektrometru mas (Q-ToF), pozwalającego na precyzyjne określenie wartości m/z wszystkich jonów $[M+H]^+$ i $[M-H]^-$ w trybie MS i MS². W przypadku analizowanych związków zastosowanie wysokorozdzielczych technik było konieczne z kilku względów. Głównym problemem pojawiającym się podczas interpretacji widm glikozydów flawonoidowych, dodatkowo acylowanych pochodnymi kwasu cytrynowego, jest obserwacja utraty obojętnych fragmentów (*neutral loss*) grup acylowych o nominalnej masie, odpowiadającej utracie obojętnych fragmentów poszczególnych cukrów (kwas p-kumarowy i ramnoza: -146 Da, kwas kawowy i glukoza lub galaktoza -162 Da, kwas ferulowy i kwas glukuronowy -176 Da). Ponadto występowanie związków o charakterze izobarów, jak to miało miejsce w przypadku analizowanych struktur, nie może być w pełni określone z zastosowaniem niskorozdzielczych analizatorów MS, jak np. pułapka jonowa czy analizator typu kwadrupol. Zastosowanie analizatora ToF w systemie LC-MS/MS dawało rozdzielczość wyższą niż 10000 FWHM. Dzięki temu możliwe było ustalenie dokładnej wartości m/z cząsteczek $[M-H]^+/[M-H]^-$ oraz jonów fragmentacyjnych, z dokładnością większą niż 5 ppm, co w połączeniu z precyzyjnym systemem kalibracji poprzedzającym analizę, umożliwiało dokładniejsze określenie struktury badanych związków. Duży wpływ na uzyskane wyniki miało także zastosowanie systemu UPLC, bowiem z uwagi na bliskie podobieństwa strukturalne niektórych glukuronidów, wysoka rozdzielczość chromatograficzna stanowiła ważny czynnik analizy. Na uwagę zasługuje fakt, że układ UPLC umożliwił rozdział badanych związków w ciągu 8 z 12 minut trwania analizy chromatograficznej. Połączenie tego systemu z szybkim, wysokorozdzielczym spektrometrem mas pozwoliło na rejestrację widm MS² poszczególnych związków. Rycina 110 przedstawia przykład chromatogramu EIC (ang. *extracted ion chromatogram*) dla wartości m/z 815. Na chromatogramie zarejestrowano 7 pików, z czego 3 zostały zidentyfikowane na podstawie dokładnych mas oraz widm fragmentacyjnych. Każdy z rozpoznanych związków posiadał inny aglikon:

- **związek 11 – chrysoeriol:** Chrys-7-*O*-[GluA-(3''-1''')-*O*-Glc-2''-*O*-FerA],

- **związek 12** – luteolinę: Lut-7-*O*-[GluA-(2''-1''')-*O*-GluA-2''''-*O*-FerA],
- **związek 28** – izoramnetynę: Irha-3-*O*-[GluA-(2''-1''')-*O*-GluA-2''''-*O*-CouA].

Ponadto związki **12** i **28** stanowiły izomery, ponieważ charakteryzowały się takim samym składem elementarnym.



Rycina 110. Przykładowy chromatogram EIC zarejestrowany dla wartości m/z 815.

Poza różnymi aglikonami oba izomeryczne koniugaty były acylowane innymi kwasami: **związek 12** kwasem ferulowym, a **związek 28** kwasem *p*-kumarowym, stąd ten sam skład cząsteczkowy. Rozróżnienie wszystkich trzech struktur było możliwe dzięki przeprowadzeniu analizy widm CID w trybie jonów dodatnich i ujemnych (**Ryciny 63, 64 i 80**). Masa **związku 11** różniła się o ok. 40 mDa w stosunku do pozostałych dwóch związków. Różnica taka była zbyt duża aby wynikać np. z nieprawidłowej kalibracji. Stwierdzono zatem, że związek ten stanowi cząsteczkę izobaryczną w stosunku do dwóch pozostałych, co oznacza, że mimo tej samej masy cząsteczkowej charakteryzuje się innym składem elementarnym.

Wśród pozostałych rozpoznanych struktur zidentyfikowano sześć innych par izomerów związków:

- **5**: Tric-7-*O*-[GluA-(2''-1''')-*O*-GluA-2''''-*O*-5 OH FerA] i **18**: Syr-3-*O*-[GluA-(2''-1''')-*O*-GluA-2''''-*O*-FerA],
- **7**: Tric-4'-*O*-Xyl-7-*O*-[GluA-(2''-1''')-*O*-GluA-*O*-2''''-*O*-CouA] i **19**: Apg-7-*O*-{GluA-(2''-1''')-*O*-[GluA-(3''''-1''''')-*O*-Glc-2''''-*O*-FerA]},
- **21**: Chrys-7-*O*-{GluA-(2''-1''')-*O*-[GluA-(2''''-1''''')-*O*-Glc-3''''-*O*-FerA]} i **23**: Tric-7-*O*-{GluA-(2''-1''')-*O*-[GluA-(2''''-1''''')-*O*-Glc-3''''-*O*-CouA]}

- **22:** $\text{Tric-7-O-}\{\text{GluA-(2''-1''')-O-}[\text{GluA-(2'''-1''''')-O-Glc-3'''-O-FerA}]\}$ i **27:** $\text{Tric-7-O-}\{\text{GluA-(2''-1''')-O-}[\text{GluA-(2'''-1''''')-O-Glc-3'''-O-FerA}]\}$
- **25:** $\text{Chrys-7-O-}[\text{GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-FerA}]$ i **26:** $\text{Tric-7-O-}[\text{GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-CouA}]$,
- **30:** $\text{Apg-7-O-}[\text{GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-FerA}]$ i **31:** $\text{Chrys-7-O-}[\text{GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-CouA}]$,

a także dwie pary związków o charakterze izobarów:

- **2:** Tric-7-O-GluA i **9:** $\text{Irha-3-O-}[\text{GluA-(2''-1''')-O-GluA}]$,
- **14:** $\text{Tric-7-O-}[\text{GluA-(3''-1''')-O-Glc-2''-O-FerA}]$ i **20:** $\text{Irha-3-O-}[\text{GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-FerA}]$ (**Tabela 82**).

Tabela 82. Glikozydy flawonoidowe zidentyfikowane w ziele *A. amaranthoides* L – analiza MS².

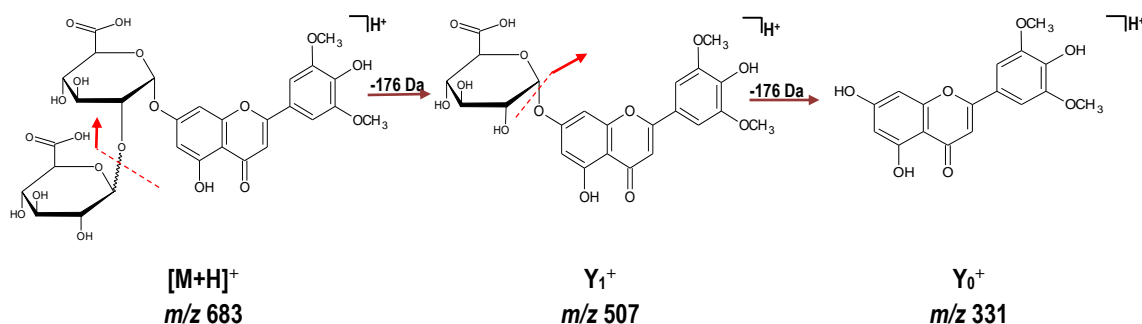
Zw.	Nazwa związku	Skład elementarny	Dokładna masa monoizotopowa [Da]	Jony fragmentacyjne w trybie jonów dodatnich [m/z]	Jony fragmentacyjne w trybie jonów ujemnych [m/z]
2	7-O-β-glukuronopiranozyd trycyny	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₂	506.1050	507, 331	505, 329, 490, 314
3	7-O-[2 ^m -O-feruilo-β-glukuronopiranozylo-(1 ^m -2 ⁿ)-O-β-glukuronopiranozyd] trycyny	C ₃₉ H ₃₈ O ₂₂	858.1854	859, 507, 331	857, 527
4	5-O-glukuronopiranozylo-7-O-glukopiranozyd trycyny	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₈	668.1588	669, 507, 331	667, 491, 329
5	7-O-[2 ^m -O-5-hydroksyferuilo-glukuronopiranozylo-(1 ^m -2 ⁿ)-O-glukuronopiranozyd] trycyny	C ₃₉ H ₃₈ O ₂₃	874.1803	875, 507, 369, 331	873, 543, 351
6	4'-O-ksylopiranozylo-7-O-[2 ^m -O-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1 ^m -2 ⁿ)-O-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu	C ₄₂ H ₄₂ O ₂₄	930.2066	931, 799, 609, 433, 301	929, 797, 497
7	4'-O-ksylopiranozylo-7-O-[2 ^m -O-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1 ^m -2 ⁿ)-O-glukuronopiranozyd] trycyny	C ₄₃ H ₄₄ O ₂₅	960.2171	961, 829, 507, 463, 331	959, 827, 497
8	7-O-[glukuronopiranozylo-(1 ^m -2 ⁿ)-O-metyloglukuronopiranozyd] trycyny	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₉	696.1537	697, 521, 331	695, 533, 329
9	3-O-[glukuronopiranozylo-(1 ^m -2 ⁿ)-glukuronopiranozyd] izoramnetyny	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₉	668.1224	669, 493, 317	667, 351, 315, 193, 175
10	7-O-[glukuronopiranozylo-(1 ^m -2 ⁿ)-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₈	652.1275	653, 477, 317	651, 351, 299, 175

11	7-O-[2"-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1"-3")-O-glukopiranozyd] chrysoeriolu	C ₃₈ H ₃₈ O ₂₀	814.1956	815, 653, 477, 301	813, 513
12	7-O-[2"-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1"-2")-O-glukuronopiranozyd] luteoliny	C ₃₇ H ₃₄ O ₂₁	814.1592	815, 463, 287	813, 527, 285, 193
13	7-O-[glukuronopiranozylo-(1"-2")-glukuronopiranozyd] trycyny	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₉	682.1381	683, 507, 331	681, 351, 193, 175
14	7-O-[2"-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1"-3")-O-glukopiranozyd] trycyny	C ₃₉ H ₄₀ O ₂₁	844.2062	845, 683, 507, 331	843, 513
15	7-O-{2"-O-feruilo-[glukopiranozylo-(1"-3")-O-glukopiranozylo]-(1"-2")-O-glukuronopiranozyd} trycyny	C ₄₅ H ₅₀ O ₂₆	1006.2590	1007, 507	1005, 675, 513
16	3-O-glukuronopiranozyd izoramnetyny	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	492.0904	493, 317	491, 315
17	3-O-{3"-O-kumaroilo-[glukopiranozylo-(1"-2")]-O-glukuronopiranozylo}-(1"-2")-O-glukuronopiranozyd} izoramnetyny	C ₄₃ H ₄₄ O ₂₆	976.2120	977, 815, 493, 317	975, 811, 659, 495, 315
18	3-O-[2"-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1"-2")-O-glukuronopiranozyd] syryngetyny	C ₃₉ H ₃₈ O ₂₃	874.1804	875, 523, 347	873, 527, 333, 193
19	7-O-{2"-O-feruilo-[glukopiranozylo-(1"-3")-O-glukuronopiranozylo]-(1"-2")-O-glukuronopiranozyd} apigeniny	C ₄₃ H ₄₄ O ₂₅	960.2171	961, 799, 447, 271	959, 689, 527, 193

20	3-O-[2 ^{'''} -O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})-glukuronopiranozyd] izoramnetyny	C ₃₈ H ₃₆ O ₂₂	844.1698	845, 493, 317, 177	843, 649, 527, 315, 193
21	7-O-{3 ^{'''} -O-feruilo-[glukopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})]-O-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})-O-glukuronopiranozyd} chrysoeriolu	C ₄₄ H ₄₆ O ₂₆	990.2277	991, 829, 477, 301	989, 689, 495
22	7-O-{3 ^{'''} -O-feruilo-[glukopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})-O-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})-O-glukuronopiranozyd} trycyny	C ₄₅ H ₄₈ O ₂₇	1020.2383	1021, 859, 507, 331	1019, 689, 495
23	7-O-{3 ^{'''} -O-kumaroilo-[glukopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})-O-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})-O-glukuronopiranozyd} trycyny	C ₄₄ H ₄₆ O ₂₆	990.2277	991, 829, 507, 331	989, 659, 495
24	7-O-[2 ^{'''} -O-sinapoilo-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})-O-glukuronopiranozyd] trycyny	C ₄₀ H ₄₀ O ₂₃	888.1960	889, 507, 383, 331, 207	887, 557, 399, 223
25	7-O-[2 ^{'''} -O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})-O-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu	C ₃₈ H ₃₆ O ₂₁	828.1749	829, 477, 353, 301, 177	827, 527, 333, 193
26	7-O-[2 ^{'''} -O-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})-O-glukuronopiranozyd] trycyny	C ₃₈ H ₃₆ O ₂₁	828.1749	829, 507, 331, 147	827, 497, 333, 163
27	7-O-{3 ^{'''} -O-feruilo-[glukopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})-O-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{''})-O-glukuronopiranozyd} trycyny	C ₄₅ H ₄₈ O ₂₇	1020.2383	1021, 683, 507, 177	1019, 689, 495

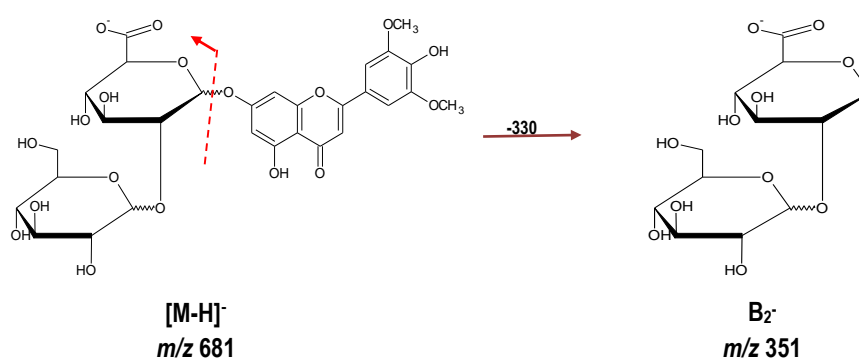
28	3-O-[2 ^{'''} -O-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{'''})-O-glukuronopiranozyd] izoramnetyny	C ₃₇ H ₃₄ O ₂₁	814.1592	815, 493, 317	813, 649, 497, 315, 163
29	7-O-glukuronopiranozyd chrysoeriolu	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	476.0954	477, 301	-
30	7-O-[2 ^{'''} -O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{'''})-O-glukuronopiranozyd] apigeniny	C ₃₇ H ₃₄ O ₂₀	798.1643	799, 447, 331, 271	797, 603, 527, 333, 193
31	7-O-[2 ^{'''} -O-kumaroilo-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{'''})-O-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu	C ₃₇ H ₃₄ O ₂₀	798.1643	799, 477, 301	797, 497
32	7-O-[2 ^{'''} -O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{'''})-O-metyloglukuronopiranozyd] trycyny	C ₄₀ H ₄₀ O ₂₂	872.2011	873, 521, 331, 177	871, 677, 519, 329
33	7-O-[2 ^{'''} -benzoilo-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{'''})-O-glukuronopiranozyd] trycyny	C ₃₆ H ₃₄ O ₂₀	786.1643	787, 507, 331	785, 455, 333,
34	7-O-[2 ^{'''} -O-kumaroilo-metyloglukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{'''})-O-glukuronopiranozyd] trycyny	C ₃₉ H ₃₈ O ₂₁	842.1905	843, 507, 331	841, 695, 633, 511, 329, 163
35	7-O-[2 ^{'''} -O-dehydrodiferuilo-glukopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{'''})-O-glukuronopiranozyd] trycyny	C ₄₉ H ₄₈ O ₂₅	1036.2484	1037, 531, 331	1035, 705, 547, 371
36	7-O-[2 ^{'''} -O-dehydrodiferuilo-glukuronopiranozylo-(1 ^{'''} -2 ^{'''})-O-glukuronopiranozyd] trycyny	C ₄₉ H ₄₈ O ₂₆	1052.2433	1053, 859, 507, 331	1051, 721, 563, 387

Siedem spośród 33 związków zidentyfikowanych metodą spektrometrii mas w ziele *A. amaranthoides* było mono- lub diglikozydami flawonów lub flawonoli. W przypadku pochodnych chrysoeriolu i trycyny (**związki 4, 8, 10, 13, 29**) zawierały one cząsteczki cukrów przyłączone liniowo w pozycji C-7, natomiast dla pochodnych izoramnetyny (**związki 9 i 16**), w oparciu o dostępną literaturę, za najbardziej prawdopodobne miejsce przyłączenia cukrów przyjęto pozycję C-3 (**Antunes-Ricardo i wsp., 2014; Sikorska i Matławska, 2001**). **Związek 16: Irha-3-O-Glu** i **29: Chrys-7-O-GluA** stanowiły monoglukuronidy, **związek 9: Irha-3-O-[GluA-(2''-1''')-O-GluA]**, **10: Chrys-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-GluA]** i **13: Tric-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-GluA]** były diglukuronidami, natomiast **związek 4: Tric-5-O-GluA-7-O-Glc** posiadał przyłączoną jedną cząsteczkę kwasu glukuronowego i glukozy, ale w dwóch różnych pozycjach aglikonu. Dodatkowo **związek 8: Tric-7-O-[MetGluA-(2''-1''')-O-GluA]** był diglukuronidem, z czego jedna z cząsteczek kwasu glukuronowego zawierała ugrupowanie estrowe (ester metylowy). Widma masowe CID wszystkich powyższych związków otrzymane w trybie jonów dodatnich, prezentowały wyłącznie jony fragmentacyjne odpowiadające sukcesywnemu rozpadaniu się kolejnych wiązań glikozydowych pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami cukrów, a także pomiędzy cukrem i aglikonem. Dodatni ładunek stabilizowany był na aglikonie, natomiast w widmie obserwowano szereg jonów Y_n^+ . Taki rodzaj fragmentacji został zaobserwowany już wcześniej (**Marczak i wsp., 2010**) i odpowiada ogólnemu schematowi fragmentowania glikozydów flawonoidowych (**Rycina 111**) (**Domon i Costello, 1988; Claeys i wsp., 1996; Vukics i Guttman, 2010**).



Rycina 111. Schemat ścieżki fragmentacyjnej w trybie jonów dodatnich dla diglukuronidów flawonoidowych wyizolowanych z ziele *A. amaranthoides* na przykładzie 7-O-[glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-glukuronopiranozydu] trycyny (związek 13).

Ścieżka fragmentacyjna obserwowana dla tych samych związków w trybie jonów ujemnych była znacząco różna od uzyskanej dla jonów dodatnich. W tym przypadku na skutek fragmentacji, dla diglikozydów obserwowano przede wszystkim utratę aglikonu oraz stabilizację ujemnego ładunku na połączonych cząsteczkach cukrów. Pik o dużej intensywności obecny przy wartości m/z 351, był typowy dla diglukuronidów, co opisano już wcześniej (**Rycina 112**) (Marczak i wsp., 2010). Interesujący jest fakt, że w przypadku monoglukuronidów (**związek 16: Irha-3-O-Glu** i **29: Chrys-7-O-GluA**) schemat fragmentacji w trybie jonów ujemnych jest taki sam jak w trybie jonów dodatnich. Obserwuje się tutaj utratę cząsteczki cukru i stabilizację ujemnego ładunku na aglikonie, co może sugerować, że tylko ugrupowania o strukturze di- lub triglukuronidów mogą skutecznie stabilizować ładunek ujemny na reszcie cukrowej. Obserwacje te są zgodne z innymi doniesieniami (Kachlicki i wsp., 2007).



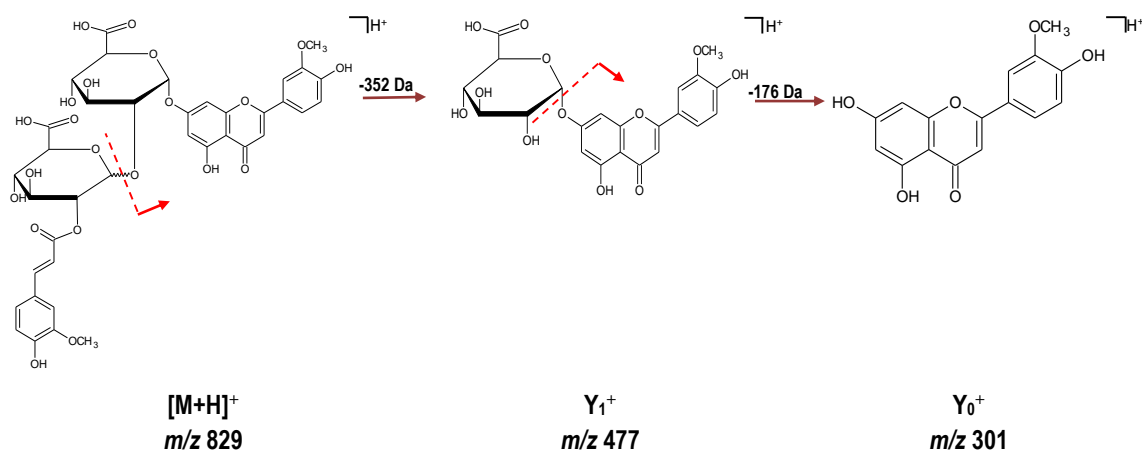
Rycina 112. Główna ścieżka fragmentacyjna w trybie jonów ujemnych diglukuronidów flawonoidowych wyizolowanych z ziela *A. amaranthoides* na przykładzie 7-*O*-[glukuronopiranozylo-(1''-2'')-glukuronopiranozydu] trycyny (**związek 13**).

W przypadku **związku 4: Tric-5-*O*-GluA-7-*O*-Glc**, w trybie dodatnim zaobserwowano w pierwszej kolejności utratę heksozy, a następnie kwasu glukuronowego, natomiast w trybie ujemnym sytuacja była odwrotna – ugrupowaniem, które jako pierwsze odszczepiało się od cząsteczki był kwas glukuronowy. Różnice te jednoznacznie potwierdzały, że zarówno heksoza jak i kwas glukuronowy są bezpośrednio przyłączone do cząsteczki aglikonu w dwóch różnych pozycjach, których na podstawie analizy MS nie można jednoznacznie wskazać. Kolejny ciekawy przypadek stanowił **związek 8: Tric-7-*O*-[MetGluA-(2''-1'')-*O*-GluA]**, który w porównaniu ze **związkiem 13: Tric-7-*O*-[GluA-(2''-1'')-*O*-GluA]** prezentował taką samą ścieżkę fragmentacyjną w trybie dodatnim, podczas gdy w trybie ujemnym schemat fragmentacji był zupełnie inny.

W przypadku metylowanego diglukuronidu ładunek ujemny stabilizowany był na aglikonie. Okazuje się, że podczas gdy dwie grupy karboksylowe połączonych liniowo cząsteczek kwasu glukuronowego silnie stabilizują ładunek (Marczak i wsp., 2010), blokada jednego z ugrupowań karboksylowych powoduje przemieszczenie się ładunku na aglikon. Istnieje tylko kilka doniesień na temat metylowanych diglukuronidów flawonoidowych, dotyczących flawonoli – kwercetyny i metylokwercectyny, wyizolowanych z tkanek zwierzęcych lub płynów ustrojowych (Lee i wsp., 2012; Mullen i wsp., 2003; Duenas i wsp., 2008). W doniesieniach tych nie odnotowano obecności jonu fragmentacyjnego przy wartości m/z 351, co sugeruje, że albo glukuronidy kwercetyny prezentowały inną ścieżkę fragmentacyjną, albo zarówno kwas glukuronowy jak i ester metylowy kwasu glukuronowego, podstawiły dwie różne grupy hydroksylowe aglikonu, do czego jednak autorzy się nie odnieśli.

Spośród 32 zidentyfikowanych w toku badań związków aż 25 z nich było acylowanych różnymi kwasami fenolowymi: kwasem ferulowym (13 związków), kwasem *p*-kumarowym (9 związków), kwasem synapinowym (1 związek), kwasem benzoesowym (1 związek), a także kwasem hydroksyferulowym (1 związek). Ponadto rozpoznano dwa koniugaty trycyny, dla których zaproponowano acylację kwasami dehydrodiferulowymi (**związek 35**: *Tric-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-Glc-2'''-O-DehydrodiFerA]* i **36**: *Tric-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-DehydrodiFerA]*).

Żadne spośród acylowanych związków nie były monoglikozydami, natomiast posiadały przyłączone co najmniej dwie lub trzy cząsteczki cukrowe. Podobną zależność obserwowano wcześniej w przypadku gatunków *Medicago* (Marczak i wsp., 2010; Stochmal i wsp., 2001a,b; Kowalska i wsp., 2007). Analiza ścieżek fragmentacyjnych acylowanych flawonów i flawonoli obecnych w *A. amaranthoides* wykazała podobieństwa w stosunku do szlaków fragmentacyjnych związków pozbawionych ugrupowań acylowych. Było to zauważalne zwłaszcza w trybie jonów dodatnich, gdzie w obu przypadkach obserwowano sekwencyjną utratę ugrupowań przyłączonych do aglikonu i rejestrację szeregu jonów Y_n^+ . Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że regułą jest odszczepianie się od jonu pseudomolekularnego terminalnej cząsteczki kwasu fenolowego w połączeniu z cząsteczką kwasu glukuronowego (**Rycina 113**).



Rycina 113. Schemat ścieżki fragmentacyjnej w trybie jonów dodatnich dla acylowanych diglukuronidów flawonoidowych wyizolowanych z ziela *A. amaranthoides* na przykładzie 7-*O*-[2''-*O*-feruilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2''')-*O*-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu (związek 25).

W przypadku związków podstawionych kwasem ferulowym charakterystyczna była więc utrata fragmentu o masie 352 Da, a kwasem *p*-kumarowym fragmentu 322 Da. Taką samą sytuację obserwowano dla związków podstawionych kwasem hydroksyferulowym (368 Da), benzoesowym (280 Da) i synapinowym (382 Da), jednak z uwagi, że było to tylko kilka przykładów, nie można z całą pewnością stwierdzić, że także w przypadku tych struktur ten rodzaj fragmentacji stanowi regułę.

Odmienne przebieg fragmentacji miał miejsce w przypadku związków posiadających trzy, liniowo połączone cukry, a kwas fenolowy przyłączony był w pozycji innej niż terminalna cząsteczka cukru:

- **15:** Tric-7-*O*-{GluA-(2''-1''')-*O*-[Glc-(3'''-1''')-*O*-Glc- 2'''-*O*-FerA]},
- **17:** Irha-3-*O*-{GluA-(2''-1''')-*O*-[GluA-(2'''-1''')-*O*-Glc- 3'''-*O*-CouA]},
- **19:** Apg-7-*O*-{GluA-(2''-1''')-*O*-[GluA-(3'''-1''')-*O*-Glc- 2'''-*O*-FerA]},
- **21:** Chrys-7-*O*-{GluA-(2''-1''')-*O*-[GluA-(2'''-1''')-*O*-Glc-3'''-*O*-FerA]},
- **22:** Tric-7-*O*-{GluA-(2''-1''')-*O*-[GluA-(2'''-1''')-*O*-Glc-3'''-*O*-FerA]},
- **23:** Tric-7-*O*-{GluA-(2''-1''')-*O*-[GluA-(2'''-1''')-*O*-Glc-3'''-*O*-CouA]}.

W tych przypadkach obserwowano acylację środkowej cząsteczki kwasu glukuronowego, a fragmentem, który jako pierwszy odszczepiał się od poszczególnych jonów pseudomolekularnych, był pojedynczy cukier-heksoza, najprawdopodobniej glukoza (162 Da). Następnie z pozostałego protonowanego fragmentu odszczepiał się kwas glukuronowy z przyłączoną cząsteczką kwasu fenolowego, a w ostatnim etapie dochodziło do rozerwania wiązania *O*-glikozydowego pomiędzy kolejną cząsteczką kwasu glukuronowego i aglikonu. Szczególny przypadek stanowił **związek 27:**

$\text{Tric-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-[GluA-(2'''-1''''')-O-Glc]-3'''-O-FerA]}$, gdzie kwas ferulowy podstawił cząsteczkę kwasu glukuronowego przyłączonego bezpośrednio do aglikonu. W pierwszym etapie fragmentacji następowało odszczepienie połączonych cząsteczek kwasu glukuronowego i glukozy (352 Da), a następnie kwasu ferulowego i ostatecznie rozerwanie wiązania *O*-glikozydowego pomiędzy kwasem glukuronowym i aglikonem. Interesujący jest fakt, że dodatni ładunek ostatecznie stabilizowany był na cząsteczce kwasu glukuronowego, co nie jest typowe dla fragmentacji w trybie jonów dodatnich.

Analiza widm fragmentacyjnych uzyskanych dla acylowanych glikozydów flawonoidowych w trybie jonów ujemnych pozwoliła zaobserwować kilka ciekawych zależności. Fragmentacja jonu pseudomolekularnego $[\text{M-H}]^-$ skutkowałą początkową eliminacją aglikonu i pojawieniem się w widmie jonów fragmentacyjnych (B_2^-) o dużej intensywności, rejestrowanych przy wartościach m/z : 497, 527, 513. Odpowiadały one cząsteczkom cukrów, tworzonym przez dwa kwasy glukuronowe lub kwas glukuronowy i glukozę, a dodatkowo były acylowane kwasem kumarowym (m/z 497) lub ferulowym (m/z 527 i 513). Do odszczepiania się fragmentu acylowego dochodziło w kolejnym etapie fragmentacji. W przypadku niektórych związków zarejestrowano ponadto obecność jonów Y_0^- o znacznie mniejszej intensywności pojawiających się na skutek oderwania się od jonu $[\text{M-H}]^-$ cząsteczki kwasu *p*-kumarowego lub ferulowego:

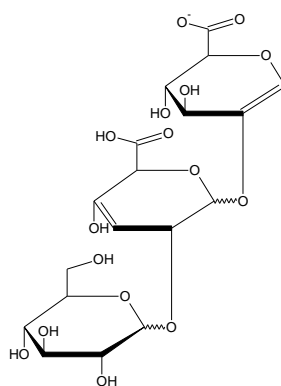
- **4:** $\text{Tric-5-O-GluA-7-O-Glc}$,
- **10:** $\text{Chrys-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-GluA]}$,
- **12:** $\text{Lut-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-FerA]}$,
- **17:** $\text{Irha-3-O-[GluA-(2''-1''')-O-[GluA-(2'''-1''''')-O-Glc-3'''-O-CouA}]}$,
- **20:** $\text{Irha-3-O-[GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-FerA]}$,
- **32:** $\text{Tric-7-O-[MetGluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-FerA]}$,
- **34:** $\text{Tric-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-MetGluA-2'''-O-CouA]}$,
- **17:** $\text{Irha-3-O-[GluA-(2''-1''')-O-[GluA-(2'''-1''''')-O-Glc-3'''-O-CouA}]}$,
- **20:** $\text{Irha-3-O-[GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-FerA]}$,
- **28:** $\text{Irha-3-O-[GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-CouA]}$,
- **32:** $\text{Tric-7-O-[MetGluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-FerA]}$,
- **34:** $\text{Tric-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-MetGluA-2'''-O-CouA]}$.

Ponadto w widmach CID niektórych spośród analizowanych struktur:

- **17:** $\text{Irha-3-O-[GluA-(2''-1''')-O-[GluA-(2'''-1''''')-O-Glc-3'''-O-CouA}]}$,
- **21:** $\text{Chrys-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-[GluA-(2'''-1''''')-O-Glc-3'''-O-FerA}]}$,

- **22:** *Tric-7-O-{GluA-(2''-1''')-O-[GluA-(2'''-1'''')-O-Glc-3'''-O-FerA]}*,
- **23:** *Tric-7-O-{GluA-(2''-1''')-O-[GluA-(2'''-1'''')-O-Glc-3'''-O-CouA]}*,
- **27:** *Tric-7-O-{GluA-(2''-1''')-O-[GluA-(2'''-1'''')-O-Glc]-3''-O-FerA}*,

pojawił się jon fragmentacyjny zarejestrowany przy wartości m/z 495, który odpowiadał fragmentowi stanowiącemu liniowe połączenie dwóch cząsteczek kwasu glukuronowego i jednej glukozy (**Rycina 114**).



m/z 495, $C_{18}H_{23}O_{16}$

Rycina 114. Jon fragmentacyjny rejestrowany dla związków 17, 21, 22, 23 i 27 w trybie jonów ujemnych.

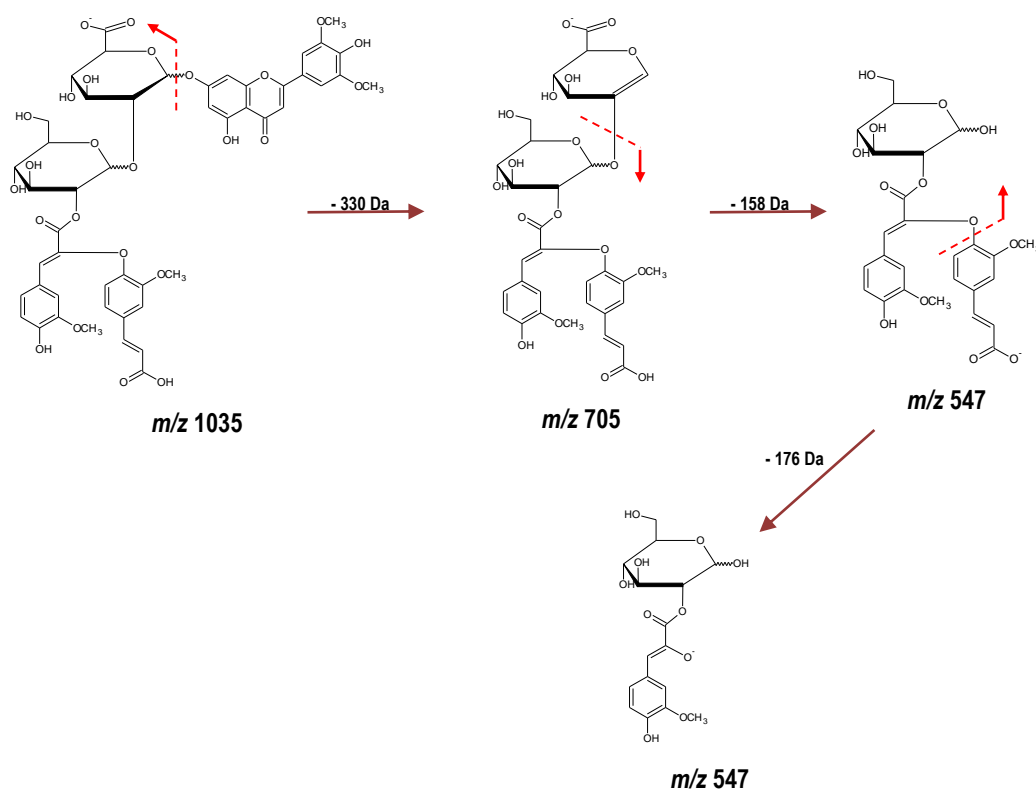
Wydaje się, że fragment ten obserwowany jest wyłącznie w przypadku występowania wiązań glikozydowych 1-2. Obecności jonu przy m/z 495 nie zarejestrowano bowiem w przypadku **związków 15:** *Tric-7-O-{GluA-(2''-1''')-O-[Glc-(3'''-1'''')-O-Glc-2'''-O-FerA]}* i **19:** *Apg-7-O-{GluA-(2''-1''')-O-[GluA-(3'''-1'''')-O-Glc-2'''-O-FerA]}*, które również zawierały trzy liniowo połączone cukry, dla których jednak stwierdzono występowanie jednego wiązania międzycukrowego typu 1-3. Odosobniony przypadek stanowił także **związek 34:** *Tric-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-MetGluA-2'''-O-CouA]*, dla którego w trybie jonów ujemnych obserwowano jon fragmentacyjny o wartości m/z 511, przypisany fragmentowi składającemu się z dwóch cząsteczek kwasu glukuronowego i jednej cząsteczki kwasu kumarowego, z czego dodatkowo jeden kwas glukuronowy zawierał ugrupowanie estrowe (ester metylowy).

Jak wykazano wyżej dla **związku 4** (*Tric-5-O-GluA-7-O-Glc*) analiza widm zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych umożliwiła identyfikację związków posiadających cząsteczki cukrowe przyłączone w dwóch różnych pozycjach. Podobna sytuacja była również obserwowana dla acylowanych **związków 6** (*Chrys-4'-O-Xyl-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-CouA]*) i **7** (*Tric-4'-O-Xyl-7-O-[GluA-(2''-1''')-O-GluA-2'''-O-CouA]*). W trybie pozytywnym obserwowano dwie możliwe ścieżki fragmentacyjne dla jonu pseudomolekularnego. Pierwsza z nich dotyczyła odszczepienia

fragmentu o masie 132 Da odpowiadający cząsteczce pentozy (przypuszczalnie ksylozy). Druga możliwa droga fragmentacji przebiegała poprzez odszczepienie cząsteczki kwasu glukuronowego z przyłączonym kwasem *p*-kumarowym (322 Da). Dalszy rozpad prowadził do otrzymania deprotonowanych cząsteczek aglikonów. W trybie negatywnym z kolei obserwowano utratę obojętnego fragmentu odpowiadającego pentozie, a następnie odszczepienie cząsteczki aglikonu, co skutkowało pojawieniem się jonu fragmentacyjnego przy *m/z* 497 odpowiadającego deprotonowanemu diglukuronidowi acylovanemu kwasem *p*-kumarowym (Marczak i wsp., 2010). Należy jednak zauważyć, że nie jest możliwe określenie pozycji przyłączenia ksylozy wyłącznie na podstawie widm masowych. Można jednak założyć, że, z uwagi na zawadę przestrzenną, najbardziej prawdopodobnym miejscem podstawienia cząsteczką ksylozy jest pozycja C-4'.

W toku badań zarejestrowano ponadto widma fragmentacyjne jonów prekursorowych o relatywnie wysokich masach molekularnych, przekraczających 1000 Da, np. **związek 35**: Tric-7-*O*-[GluA-(2''-1''')-*O*-Glc-2''''-*O*-DehydrodiFerA] (1036 Da) i **36**: Tric-7-*O*-[GluA-(2''-1''')-*O*-GluA-2''''-*O*-DehydrodiFerA] (1052 Da). Analiza ścieżek fragmentacyjnych pozwoliła wysnuć wnioski, że są to diglukuronidy trycyny acylowane kwasami dehydrodiferulowymi. W **związku 36**: występował jako podstawnik cyklobutan kwasu diferulowego (Dobberstein i Bunzel, 2010; Renger i Steinhart, 2000). Tego typu dimer kwasu ferulowego powstaje na skutek cyklodimeryzacji zachodzącej w roślinie pod wpływem promieniowania UV (Ford i Hartley, 1989), stąd nie można jednoznacznie stwierdzić czy związek ten występował pierwotnie w ziele *A. amaranthoides*, czy też powstał w toku przygotowywania próbek do analizy i ich ekspozycji na światło. W trybie jonów dodatnich związek ten prezentował typową ścieżkę fragmentacyjną. W początkowym etapie dochodziło do uwolnienia z dimeru jednej z cząsteczek kwasu ferulowego, a zarejestrowany przy wartości *m/z* 859 jon fragmentacyjny odpowiadał ferulowanemu diglukuronidowi trycyny. Dalsze etapy fragmentacji przebiegały identycznie jak w przypadku związku 3. Dla trybu jonów ujemnych zaobserwowano klasyczne odszczepienie aglikonu, a następnie utratę dwóch kwasów glukuronowych i obecność jonu przy *m/z* 371, przypisanego deprotonowanej cząsteczce dimeru kwasu ferulowego. W widmie zarejestrowano także jon fragmentacyjny przy wartości *m/z* 193 odpowiadający jednej deprotonowanej cząsteczce kwasu ferulowego. **Związek 35** z kolei zawierał w swojej strukturze niecykliczny kwas dehydrodiferulowy, który często bywa obecny w ścianach komórkowych roślin, szczególnie wśród traw, gdzie stanowi

połączenie chemiczne pomiędzy łańcuchami arabinoksylianów (Garcia-Conesa i wsp., 1997; Micard i wsp., 1997). Tego typu dimery produkowane są na skutek reakcji enzymatycznych zachodzących z udziałem peroksydaz, w związku z tym jest bardzo prawdopodobne, że związek ten występuje pierwotnie w roślinie. Kwasy dehydrodiferulowe występują naturalnie w postaci różnych form izomerycznych (Stobiecki i wsp., 2002), w związku z tym nie można jednoznacznie ustalić która z form obecna jest w zidentyfikowanym związku. Przebieg fragmentacji związku 35 różni się od związku 36. W trybie jonów dodatnich obserwowano tutaj bowiem utratę fragmentu o masie 506 Da odpowiadającego odszczepieniu aglikonu połączonego z kwasem glukuronowym (330 Da trycyna, 176 Da kwas glukuronowy). Ładunek dodatni stabilizowany był na glukoze z przyłączonym dimerem kwasu dehydrodiferulowego (m/z 531). Mimo to jony fragmentacyjne odpowiadające deprotonowanemu aglikonowi również były obecne w widmie. Fragmentacja w trybie jonów ujemnych dostarczyła dodatkowych informacji związanych ze strukturą związku 35. W pierwszej kolejności miało miejsce typowe odszczepienie aglikonu z jonu pseudomolekularnego $[M-H]^-$. Następnie dochodziło do oderwania cząsteczki kwasu glukuronowego, a w kolejnym etapie do rozerwania dimeru kwasu ferulowego, co skutkowało obserwacją w widmie jonu przy wartości m/z 371, odpowiadającego glukoze połączonej z kwasem α -hydroksyferulowym. Schemat ścieżki fragmentacyjnej związku 35 w trybie jonów ujemnych przedstawiono na rycinie 115.



Rycina 115. Schemat ścieżki fragmentacyjnej dla 7-*O*-[2^{'''}]-*O*-dehydrodiferuilo-glukopiranozylo-(1^{'''}-2^{'''})-*O*-glukuroopiranozyd] trycyny (związek 35) w trybie jonów ujemnych.

Badania ilościowe

W kolejnym etapie badań dokonywano analizy ilościowej obejmującej określenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach metanolowym i wodnym (odwar) oraz zawartości flawonoidów w surowcu. Obie analizy przeprowadzono z wykorzystaniem odpowiednich metod spektrofotometrycznych. Do chwili obecnej nie podjęto tego rodzaju badań dla *A. amaranthoides*.

Całkowitą zawartość polifenoli oznaczano dla wyciągu metanolowego i wodnego z zastosowaniem metody z odczynnikiem *Folin-Ciocalteu*, a wyniki wyrażono w przeliczeniu na kwas galusowy. Na podstawie analizy stwierdzono, że wyższą zawartością związków polifenolowych charakteryzował się odwar: 31,17±0,7227 mg/GAE g wyciągu (0,77 % w przeliczeniu na surowiec) (**Tabela 54**) natomiast wyciąg metanolowy zawierał ich o ok. 1,5 razy mniej: 22,69±1,0428 mg/GAE g wyciągu (0,31 % w przeliczeniu na surowiec) (**Tabela 53**).

Oznaczanie zawartości flawonoidów przeprowadzono metodą farmakopealną opisaną dla *Violae herba cum flore* (*Ph. Eur. VII, 2010*) zmodyfikowaną przez [Siatka i Kašparová \(2010\)](#). Polega ona na tworzeniu z kwasem borowym i w obecności kwasu

szczawowego chelatów wykazujących zielonożółtą fluorescencję. Reakcja ta jest typowa dla flawonów i flawonoli zawierających ugrupowanie OH w pozycji C-5 aglikonu (Klimek i wsp., 2011). Ponadto dobór tej metody wynikał m.in. z braku konieczności przeprowadzania reakcji hydrolizy wymaganej w najczęściej stosowanej metodzie wg *Christa- Müllera* (FP X, 2014), która oparta jest na tworzeniu barwnych kompleksów z $AlCl_3$ aglikonów powstałych w wyniku hydrolizy wyciągu. Większość flawonoidów obecnych w badanych wyciągach to związki z przyłączonym wiązaniem *O*-glikozydowym kwasem glukuronowym w pozycji C-7 aglikonu. Choć zwykle hydroliza wiązań *O*-glikozydowych przebiega sprawnie, umiejscowienie cząsteczki cukru z pozycji C-7 przeważnie wiąże się z koniecznością dłuższej reakcji. Dodatkowo podstawienie aglikonu w pozycji C-7 kwasem glukuronowym, przez niektórych autorów uważane jest za najbardziej odporne i wymagające najdłuższego czasu przeprowadzania reakcji hydrolizy, nawet do kilku czy kilkunastu godzin (Bohm, 1999). Ponadto flawonoidy obecne w *A. amaranthoides* stosunkowo słabo reagowały z chlorkiem glinu. Mogło to m.in. wynikać z występowania ugrupowania metoksyowego w pozycji C-3' (chrysoeriol, izoramnetyna) lub w pozycji C-3' i C-5' (trycyna, syryngetyna) pierścienia B, a co za tym idzie, mimo obecności ugrupowania hydroksyloвого w pozycji C-4', niezdolności to tworzenia kompleksów z chlorkiem glinu. W związku z tym najczęściej wykorzystywaną w oznaczaniu flawonoidów metodę *Christa-Müllera* uznano za nieodpowiednią w przypadku wyciągów otrzymanych z ziela *A. amaranthoides*. Zastosowana zmodyfikowana wg Siatka i Kašparová (2010) metoda farmakopealna wykazała, że średnia zawartości flawonoidów w surowcu wynosi w przeliczeniu na 7-glukozyd apigeniny 17,76 mg AG/g (1,78 %) (Tabela 57).

Badania aktywności biologicznej

Podjęte badania aktywności biologicznej obejmowały określenie działania antyoksydacyjnego, przeciwzapalnego oraz przeciwdrobnoustrojowego dla wyciągu metanolowego i wodnego.

Działanie przeciwutleniające wyciągów roślinnych może wynikać z obecności w ich składzie związków o charakterze polifenoli, w tym flawonoidów. Liczne prace dowiodły istnienie zależności pomiędzy zawartością tych związków a ich aktywnością antyoksydacyjną (Alonso i wsp., 2002; Gregoris i Stevanato, 2010; Anesini i wsp., 2008).

Potencjał antyoksydacyjny wyznaczano z zastosowaniem dwóch metod. Pierwsza z nich polegała na oznaczeniu działania przeciwutleniającego z zastosowaniem odczynnika DPPH. Jest to metoda powszechnie stosowana w pomiarach aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów roślinnych. Jako substancje referencyjne wykorzystano w badaniu dwa znane antyoksydanty: BHA oraz witaminę C. Otrzymane dla wyciągu metanolowego oraz odwaru wyniki przedstawiono jako równoważnik witaminy C czyli stężenie witaminy C wywierające takie samo działanie antyoksydacyjne, co badany antyoksydant (wyciąg), a także wykorzystując parametr IC_{50} , określający stężenie antyoksydantu (wyciągu) przy, którym dochodziło do spadku początkowego stężenia rodnika ($DPPH^{\bullet}$) o 50 % (**Tabela 65 i 68, Rycina 93-94**). Oba z badanych ekstraktów charakteryzowały się bardzo niską aktywnością antyoksydacyjną. W przypadku wyciągu metanolowego wartość IC_{50} wynosiła 946,75 $\mu\text{g/ml}$, a dla odwaru wartość ta była ponad 2 razy niższa i wynosiła odpowiednio 431,95 $\mu\text{g/ml}$, co odpowiadało większej aktywności wyciągu wodnego. Dla porównania wartość parametru IC_{50} w przypadku zastosowanych w badaniu substancji referencyjnych, BHA i witaminy C, wynosiła odpowiednio 3,13 $\mu\text{g/ml}$ i 4,57 $\mu\text{g/ml}$. Otrzymane wyniki oznaczania aktywności antyoksydacyjnej dobrze korelują z zawartością sumy polifenoli w wyciągach (**Rycina 99**). Druga zastosowana metoda opierała się na reakcji z odczynnikiem FRAP. Jej wykorzystanie umożliwia bezpośrednie oznaczenie zdolności redukujących substancji lub wyciągów. Wyniki doświadczenia zostały przedstawione jako równoważnik witaminy C, która posłużyła w badaniu za związek wzorcowy, co jednocześnie umożliwiło porównanie potencjału antyoksydacyjnego zbadanego dwoma odrębnymi metodami (DPPH, FRAP) (**Rycina 100**). Należy zauważyć, że wyniki pomiaru aktywności antyoksydacyjnej metodą FRAP były bardziej porównywalne dla obu wyciągów niż w przypadku metody z odczynnikiem DPPH. Badanie potwierdziło nieco silniejsze działanie dla odwaru ($FRAP_{VCE}$ dla stężenia 750 $\mu\text{g/ml}$ wyciągu metanolowego i odwaru wynosiło odpowiednio 1,4 i 1,75). Zastanawiający jest fakt, że mimo obecności stosunkowo dużej zawartości flawonoidów w surowcu (17,76 mg AG/g) oba otrzymane z niego wyciągi prezentowały słabą aktywność antyoksydacyjną. Może być to związane ze strukturą związków flawonoidowych. Istnieją doniesienia, w których stwierdza się ścisłą zależność aktywności antyoksydacyjnej flawonoidów od ich budowy (**Arora i wsp., 1999; Cao i wsp., 1997**). Według niektórych badań największy potencjał przeciwutleniający wykazują aglikony (**Hopia i Heinonen, 1999**). Wśród elementów budowy mających wpływ na dużą aktywność antyoksydacyjną wymienia się

występowanie grup hydroksylowych w pozycjach C-3 i C-5 lub C-5 i C-7 (np. kemferol, apigenina). Ponadto znaczenie ma także obecność grup hydroksylowych w pierścieniu B, szczególnie ugrupowań orto-3',4'-dihydroksylowych (np. kwercetyna i luteolina). Glikozylacja, metylacja lub zmiana położenia tych ugrupowań skutkują obniżeniem poziomu aktywności antyoksydacyjnej (Małolepsza i Urbanek, 2000). Z drugiej jednak strony badania dowodzą, że glikozydy flawonoidowe mogą wywierać silne działanie przeciwutleniające. W badaniach aktywności antyoksydacyjnej wykonanych metodą ABTS i EPR wykazano aktywność 7-O-[2''-O-feruiloglukuronopiranozylo-O-glukuronopiranozydu] trycyny, wyodrębnionej z ziela *A. amaranthoides* (Pawlak i wsp., 2010). Inne doświadczenia przeprowadzono m.in. dla di- i tri- glukuronidów flawonów (trycyny, chrysoeriolu, apigeniny) wyizolowanych z *Medicago sativa* i *M. truncatula* z zastosowaniem metody TLC-DPPH. Związki te, podobnie jak w przypadku zidentyfikowanych w wyciągach z ziela *A. amaranthoides*, były acylowane m.in. kwasem ferulowym. Badanie dotyczyło jednak pojedynczych, wyizolowanych związków, natomiast w niniejszej pracy badano aktywność antyoksydacyjną dla wyciągów, w których były obecne flawonoidy. Może to sugerować, że działanie przeciwutleniające związków flawonoidowych znoszone było przez inne występujące w wyciągach grupy związków lub, że nie wszystkie z obecnych w *A. amaranthoides* glukuronidów charakteryzuje wysoka aktywność antyoksydacyjna. Zidentyfikowane struktury w większości zawierały metylowane grupy hydroksylowe w pierścieniu B (trycyna, chrysoeriol, syryngetyna, izoramnetyna) i były podstawione cząsteczkami cukrów w pozycjach C-7, C-3, C-5 czy C-4'. Modyfikacje te mogą wpływać na obniżenie aktywności antyoksydacyjnej, co wymagałoby jednak potwierdzenia poprzez zbadanie działania przeciwutleniającego poszczególnych flawonoidów obecnych w wyciągach.

W związku z istniejącymi w dostępnej literaturze doniesieniami dotyczącymi przeciwzapalnego działania glukuronidów (Hiermann i wsp., 1991), podjęto także badania aktywności przeciwzapalnej.

Udowodniono wielokrotnie, że mechanizm działania przeciwzapalnego flawonoidów może być bardzo zróżnicowany. Przede wszystkim związki te posiadają zdolność inhibicji szeregu enzymów. Do najczęściej wymienianych należą cyklooksygenazy, głównie COX-2, lipooksygenazy, a także fosfolipaza A₂. W rezultacie ich blokowania dochodzi do hamowania kaskady przemian kwasu arachidonowego, a co za tym idzie zmniejszenia syntezy prozapalnych czynników, takich jak np. prostaglandyny czy leukotrieny stanowiące mediatory procesów zapalnych (Matławska, 2008).

Podjęte badania obejmowały ocenę wpływu wyciągu metanolowego i odwaru z ziela *A. amaranthoides* na poziom białka COX-2, a także na poziom PGE₂. W pierwszym etapie doświadczenia przeprowadzono test w kierunku cytotoksycznego działania badanych wyciągów z zastosowaniem testu MTT. Obecnie jest on jednym z najczęściej stosowanych testów określających działanie cytotoksyczne (Anuszevska, 2010), jednak istnieją doniesienia, że w przypadku związków flawonoidowych mogą występować pewne ograniczenia. Udowodniono bowiem, że niektóre aglikony, jak np. kemferol, kwercetyna czy luteolina działają redukująco na MTT, przez co może dochodzić do błędów w odpowiedniej interpretacji uzyskanych wyników (Peng i wsp. 2005). Na podstawie otrzymanych rezultatów stwierdzono, że zarówno wyciąg metanolowy jak i odwar nie działają cytotoksycznie na komórki HaCaT w przyjętym zakresie stężeń. Wartość IC₅₀ względem próby kontrolnej nie została osiągnięta czyli proliferacja komórek nie uległa zmniejszeniu o 50 % (Tabela 78, Rycina 101 i 102).

Kolejnym etapem badania aktywności przeciwzapalnej było określenie wpływu wyciągów na poziom białka COX-2 za pomocą metody Western Blot z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał. Zastosowane w badaniu komórki HaCaT aktywowane były prozapalną cytokiną TNF α . Po przeprowadzeniu inkubacji komórek z badanymi wyciągami, poddawano je działaniu buforu RIPA, którego zadaniem była liza błon komórkowych, a ponadto rozpuszczenie białek oraz inaktywacja odpowiednich enzymów (kinazy, proteazy, fosfatazy). Białka po denaturacji poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu, a następnie dokonywano ich „transferu mokrego” z żelu na membranę PVDF. Wykrywanie białek przeprowadzano za pomocą specyficznych przeciwciał, a ich poziom określano dokonując densytometrycznych pomiarów intensywności prążków otrzymanych na blocie.

Poziom PGE₂ oznaczono z wykorzystaniem zestawu Prostaglandin E₂ Express EIA Kit (Cayman Chemical), postępując zgodnie z instrukcją produktu. Do oznaczenia wykorzystano supernatant z hodowli komórek HaCaT, a polegało ono na konkurencyjnym wiązaniu do przeciwciał poliklonalnych pomiędzy PGE₂ obecną w supernatancie a PGE₂ dodaną do każdej próby skoniugowaną z acetylocholinesterazą. Przeciwciała immobilizowano na płycie wielodołkowej. Następnie przeprowadzano inkubację, po czym wyplukiwano odczynniki, które nie uległy wiązaniu. Ostatnim etapem była reakcja z odczynnikiem zawierającym substrat dla acetylocholinesterazy (odczynnik Ellmana), której produkt silnie absorbuje promieniowanie UV przy długości fali 410 nm, a absorbancja jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości PGE₂ w badanych próbach.

Zarówno wyciąg metanolowy jak i odwar obniżały poziom białka COX-2 względem próby kontrolnej stymulowanej TNF α , odpowiednio o 245 i 242 %, w przypadku najwyższych badanych stężeń - 600 μ g/ml. Jednocześnie dla tego samego stężenia obserwowano obniżenie poziomu PGE₂ o ok. 53 % w przypadku odwaru i o 50 % w przypadku wyciągu metanolowego. Wyniki dla obu badanych wyciągów były zatem porównywalne. Wraz ze wzrostem badanych stężeń zastosowanych w doświadczeniu obserwowano silniejsze oddziaływanie na poziom białkowy COX-2, co jednocześnie korelowało ze wzrostem hamowania poziomu PGE₂. Zależność taka może oznaczać, że badane wyciągi regulują pośrednio aktywność COX-2 poprzez wpływ na poziom enzymu, raczej nie wpływając bezpośrednio na jego aktywność. Niewątpliwie jednak potrzebna jest większa ilość szczegółowych badań, które umożliwiłyby dokładniejsze poznanie mechanizmów przeciwwzapalnego działania ekstraktów z ziela *A. amaranthoides*.

Wiele ekstraktów roślinnych bogatych w związki o charakterze polifenoli, w tym flawonoidy, posiada udowodnione działanie przeciwdrobnoustrojowe. Siła działania, a także jego mechanizm są w głównej mierze uzależnione od struktury poszczególnych związków (Bylka, 2004; Cowan, 1999). Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągu metanolowego i odwaru z ziela *A. amaranthoides* obejmowały ich wpływ na wybrane szczepy bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*), Gram-ujemnych (*Pseudomonas aeruginosa*) i grzybów (*Candida albicans*), w tym dermatofitów (*Trichophyton mentagrophytes* i *T. rubrum*). W doświadczeniu wyznaczano najmniejsze stężenie hamujące rozwój drobnoustrojów (MIC), a także najmniejsze stężenia bakterio- lub grzybobójcze (MBC/MFC). Jako substancje odniesienia wykorzystano nystatynę oraz amikacynę (Tabela 81). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że odwar charakteryzuje się bardzo słabym działaniem przeciwdrobnoustrojowym zarówno w stosunku do bakterii jak i grzybów (*S. aureus*: MIC = 200 mg/ml, MBC > 200 mg/ml; *P. aeruginosa*: MIC i MBC > 200 mg/ml; *C. albicans*: MIC i MFC > 200 mg/ml; *T. mentagrophytes*: MIC = 100 mg/ml, MFC = 200 mg/ml; *T. rubrum*: MIC = 50; MFC = 200 mg/ml). W porównaniu z odwarem aktywność wyciągu metanolowego była wyższa dla szczepów bakterii i grzybów (*S. aureus*: MIC i MBC = 37,5 mg/ml; *P. aeruginosa*: MIC i MBC = 37,5 mg/ml; *C. albicans*: MIC = 75 mg/ml, MFC > 75 mg/ml). Silniejsze działanie cechowało wyciąg metanolowy, zwłaszcza w przypadku dermatofitów: *T. mentagrophytes* i *T. rubrum*, gdzie uzyskane wartości MIC i MFC wynosiły odpowiednio: 9,375 i 37,5 mg/ml oraz 9,375 i 18,75 mg/ml. Z uwagi na fakt, że całkowita

zawartość polifenoli oznaczonych dla obu wyciągów była większa w przypadku odwaru, wysnuto wniosek, że silniejsze przeciwdrobnoustrojowe działanie wyciągu metanolowego może wynikać z występowania w jego składzie związków innych niż te o charakterze polifenoli.

WNIOSKI

1. Ziele *Axyris amaranthoides* L. jest bogatym źródłem wielu glukuronidów flawonoidowych, a zidentyfikowane w badanym surowcu związki są unikalne w świecie roślinnym.
2. Flawonoidy obecne są w surowcu w dużej liczbie (wykryto 36) i wykazują podobne właściwości (wysoka polarność, dobra rozpuszczalność w wodzie, zbliżone wartości współczynnika Rf) oraz mają zbliżone struktury.
3. Wyodrębnienie w postaci jednorodnej, zwykle stosowaną metodą chromatografii kolumnowej, okazało się możliwe w przypadku trzech związków flawonoidowych. Ich budowę chemiczną ustalono na podstawie wyników analiz spektralnych: UV, ^1H i ^{13}C NMR oraz LC-MS i LC-MS/MS.
4. Ustalenie struktury kolejnych trzydziestu trzech związków okazało się możliwe wyłącznie metodą ultrasprawną chromatografię cieczową (UPLC) połączonej z wysokorozdzielczą (kwadrupol-czas przelotu, QToF) spektrometrią mas.
5. Udowodniono, że w identyfikacji wieloskładnikowej mieszaniny glukuronidów o zbliżonych właściwościach, użyteczna jest analiza widm MS^2 po rozdzieleniu związków metodą UPLC.
6. Ustalono, że badany gatunek syntetyzuje glukuronidy flawonoidowe, podstawione 1-3 cząsteczkami kwasu glukuronowego, niekiedy acylowanego pochodnymi kwasu cynamonowego (kwas ferulowy, kumarowy, synapinowy, benzoesowy, dehydrodiferulowy) lub/oraz zestryfikowanej cząsteczką glukozy lub ksylozy.
7. W surowcu dominują związki o strukturze flawonu, spośród których szesnaście to pochodne trycyny, siedem chrysoeriolu, dwa apigeniny i jeden luteoliny. Z grupy flawonoli wykryto pięć pochodnych izoramnetyny i jedną syryngetyny.
8. Czternaście zidentyfikowanych flawonoidów znanych było wcześniej w świecie roślinnym.
9. Określono strukturę 22 glukuronidów flawonoidowych, dotąd nie opisanych w świecie roślinnym.

10. W dostępnej literaturze mało jest danych dotyczących identyfikacji tak dużej liczby glukuronidów flawonoidowych w jednym surowcu roślinnym. Wcześniejsze badania związków o podobnych strukturach zakończyły się identyfikacją (również z zastosowaniem spektrometrii mas) 21 w *Medicago sativa* i 32 glukuronidów flawonoidowych w *M. truncatula*.
11. Porównano całkowitą sumę polifenoli w wyciągu metanolowym i wodnym (odwar) otrzymanych w wysuszonego ziela *A. amaranthoides*. Wyższą zawartością tych związków, w przeliczeniu na kwas galusowy, charakteryzował się odwar.
12. Wykazano, że zawartość flawonoidów w surowcu wynosi 1,77 % w przeliczeniu na 7-glukozyd apigeniny, co pozwala zaliczyć ziele *A. amaranthoides* do surowców flawonoidowych.
13. Dla wyciągów metanolowego i wodnego (odwar) przeprowadzono po raz pierwszy badania aktywności biologicznej, obejmujące działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe.
14. Zarówno wyciąg wodny jak i odwar wykazywały słabą aktywność antyoksydacyjną oraz zdolność redukcji jonów Fe^{3+} . Silniejszym działaniem cechował się odwar. Otrzymane wyniki korelują z całkowitą zawartością polifenoli w obu wyciągach.
15. Oba badane wyciągi wpływały na poziom COX-2 i PGE₂, szczególnie silnie w stężeniu 600 µg/ml. Aktywność hamująca wyciągu metanolowego i odwaru była porównywalna.
16. Wyciągi wykazywały słabe działanie wobec badanych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, natomiast wyciąg metanolowy działał stosunkowo silnie na szczepy dermatofitów.
17. Wyniki przeprowadzonych badań dostarczają nowych informacji na temat składu chemicznego oraz aktywności biologicznej ziela *Axyris amaranthoides*.

STRESZCZENIE

Celem pracy były badania fitochemiczne ziela *Axyris amaranthoides* L. obejmujące analizę składu chemicznego surowca w zakresie związków flawonoidowych jak i ocena wybranych kierunków aktywności biologicznej. Do chwili obecnej surowiec ten nie był poddawany tego typu badaniom.

Teoretyczna część pracy przedstawia informacje na temat rośliny, które obejmują charakterystykę botaniczną rodzaju i gatunku, a także dotychczasowy stan badań. Dodatkowo w części tej zaprezentowano ogólne informacje na temat związków flawonoidowych, ze szczególnym uwzględnieniem glukuronidów flawonoidowych – ich występowania oraz aktywności biologicznej. Kolejnym elementem omówionym w części teoretycznej jest wykorzystanie spektrometrii mas w analizie związków flawonoidowych.

W części doświadczalnej, przy wykorzystaniu techniki chromatografii kolumnowej, wyizolowano trzy związki flawonoidowe: trycynę, 7-*O*-glukuronopiranozyd trycyny, a także 7-*O*-[2'''-*O*-feruilo- β -glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-*O*- β -glukuronopiranozyd] trycyny. Ich strukturę określono metodami spektralnymi: UV, ^1H i ^{13}C NMR, LC-MS/MS. Pozostałych flawonoidów obecnych w surowcu, mimo podjętych prób izolacji (chromatografia kolumnowa, preparatywna chromatografia bibułowa i cienkowarstwowa), nie udało się wyodrębnić. Z powodu podobieństw budowy chemicznej i z uwagi na fakt, że wśród badanych związków występowały liczne izomery oraz izobary konieczne było zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). W wyniku prowadzonych analiz wyznaczono dokładną masę monoizotopową oraz przebieg fragmentacji poszczególnych flawonoidów, co umożliwiło ich identyfikację i rozróżnienie. W efekcie, metodą LC-MS/MS, zidentyfikowano dodatkowo 33 związki flawonoidowe o charakterze glukuronidów, które stanowiły pochodne flawonów (trycyna, chrysoeriol, apigenina, luteolina) oraz flawonoli (izoramnetyna, syryngetyna). Większość z nich to struktury po raz pierwszy zidentyfikowane w świecie roślinnym.

W kolejnym etapie podjęto badania ilościowe dla wyciągu metanolowego oraz wodnego (odwar) otrzymanych z wysuszonego surowca, w których za pomocą metody z odczynnikiem *Folin-Ciocalteu* oznaczono całkowitą zawartość polifenoli

w przeliczeniu na kwas galusowy. Wyższą zawartością związków polifenolowych charakteryzował się odwar – 31,17 mg GAE/g wyciągu, natomiast wyciąg metanolowy zawierał ich około 1,5 razy mniej – 22,69 mg/GAE g wyciągu. Ponadto, wykorzystując zmodyfikowaną metodę farmakopealną (Ph. Eur. VII, *Violae herba cum flore*), oznaczono zawartość flawonoidów w surowcu, która w przeliczeniu na 7-glukozyd apigeniny wynosiła 17,76 mg AG/g surowca.

Zbadano ponadto aktywność przeciwdrobnoustrojową względem wybranych szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*) i Gram-ujemnych (*Pseudomonas aeruginosa*) oraz grzybów (*Candida albicans*), w tym dermatofitów (*Trichophyton mentagrophytes* i *T. rubrum*), wyznaczając parametry MIC i MBC/MFC. Jedynie wyciąg metanolowy wykazywał stosunkowo silne działanie na szczepy dermatofitów (*T. mentagrophytes*: MIC = 9,375; MFC = 37,5 mg/ml) i *T. rubrum*: MIC = 9,375, MFC = 18,75 mg/ml), natomiast słabe było działanie obu ekstraktów wobec pozostałych szczepów badanych drobnoustrojów.

Aktywność antyoksydacyjną wyciągu metanolowego i wodnego badano dwoma metodami spektrofotometrycznymi. W pierwszej z nich oceniano zdolność zmiatania reaktywnego rodnika DPPH^{*}, w drugiej natomiast zdolność redukcji jonów Fe³⁺ do jonów Fe²⁺. Uzyskane wyniki porównywano z działaniem antyoksydacyjnym wybranych substancji referencyjnych: BHA i witaminą C. Choć oba badane wyciągi prezentowały stosunkowo słaby potencjał przeciwutleniający, silniejszą aktywnością antyoksydacyjną wykazywał odwar, dla którego wartość IC₅₀ w pierwszej zastosowanej metodzie wyniosła 431,95 µg/ml. Wartość IC₅₀ osiągnięta dla wyciągu metanolowego wynosiła 946,75 µg/ml. Podobnie, w przypadku metody drugiej, silniejszą zdolnością redukcji jonów Fe³⁺ charakteryzował się odwar. Otrzymane wyniki korelowały z zawartością związków polifenolowych w poszczególnych wyciągach.

W celu oceny działania przeciwzapalnego określono wpływ obu wyciągów na poziom białka COX-2 metodą Western Blot oraz prostaglandyny PGE₂ metodą ELISA w komórkach HaCaT, które aktywowano prozapalną cytokiną TNFα. Zarówno wyciąg metanolowy jak i odwar obniżały poziom białka COX-2 względem próby kontrolnej stymulowanej TNFα, odpowiednio o 245 i 242 %, w przypadku najwyższych badanych stężeń – 600 µg/ml. Jednocześnie dla tych samych stężeń obserwowano obniżenie poziomu PGE₂ o ok. 53 % w przypadku odwaru i o 50 % w przypadku wyciągu metanolowego.

SUMMARY

The aim of dissertation was phytochemical investigation of *Axyris amaranthoides* L. herb, especially including flavonoid compounds, as well as evaluation of some of its biological activities. Until now the plant has not been evaluated in such studies.

The theoretical part of work presents an overview of the plant including botanical characteristic of the whole genus, as well as the current state of research. In addition, this section provides general information on the flavonoid compounds and more detailed information on flavonoid glucuronides – their occurrence and biological activity. Another element discussed in the theoretical part is the use of mass spectrometry in the analysis of flavonoid compounds.

In the experimental part three flavonoid compounds were isolated from the crude extract of the *Axyris amaranthoides* L. herb, using column chromatography technique: tricetin, tricetin 7-*O*-glucuronopyranoside and tricetin 7-*O*-[2''-*O*-feruloyl- β -glucuronopyranosyl-(1''-2'')-*O*- β -glucuronopyranoside]. Their structures were established by spectral methods such as UV, ^1H i ^{13}C NMR, LC-MS/MS. Isolation of other flavonoids present in the extract failed (column chromatography, preparative thin-layer chromatography and preparative paper chromatography). Because of the similarities in chemical structures and due to the fact that many of the identified compounds were isomers or isobars, it was necessary to use high resolution techniques like LC-MS/MS. The exact monoisotopic masses and fragmentation pathways for each compound were determined, which enabled me to distinguish and identify them. As a result in the course of the carried out researches 33 more flavonoid compounds were identified. All of them turned to be glucuronides, flavones (tricetin, chrysoeriol, apigenin, luteolin) and flavonols (isorhamnetin, syringetin) derivatives. Most of them have been detected for the first time.

Further work focused on quantitative analysis of methanolic extract and decoction. The total polyphenolic content was determined by the *Folin-Ciocalteu* method. It was found that higher content of the polyphenols characterized the decoction (31,17 mg GAE/g of extract) and was about 1,5 time less in case of methanolic extract (22,69 mg/g GAE of extract). In addition, the content of total flavonoids in the plant was determined according to the European Pharmacopoeia VII (*Violae herba cum flore*) modified method (17,76 mg AG/g).

The antioxidant activity of the *A. amaranthoides* herb was measured using different tests. In the DPPH test the ability to reduce the DPPH[•] radical by the methanolic extract or decoction was assayed, while in the second one the ability to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺ was defined. The obtained results were compared with the activity of some well-known antioxidants such as BHA or vitamin C. Although both tested extracts presented relatively weak antioxidant potency, decoction turned to be a stronger antioxidant, for which the IC₅₀ value in the first used method was 431,95 µg / ml, while the IC₅₀ value achieved for methanol extract was 946,75 µg/ml. Similarly, in the second method, the stronger ability to reduce Fe³⁺ ions characterized decoction. The observed antioxidant activity correlated with the content of polyphenolic compounds.

Antimicrobial activity was conducted against selected strains of Gram-positive (*Staphylococcus aureus*), gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*) and fungi (*Candida albicans*), including dermatophytes (*Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes*) by determination of the MIC and MBC/MFC. Only methanol extract showed a relatively strong activity against dermatophytes (*T. mentagrophytes*: 9,375 = MIC; MFC = 37,5 mg/ml and *T. rubrum*: 9,375 = MIC; MFC = 18,75 mg/ml). The activity against other microorganism was weak for both extracts.

Anti-inflammatory activity of the *A. amaranthoides* was evaluated by a Western blot method as well as ELISA assay by which the influence of the methanolic extract and decoction on the level of COX-2 protein or PGE₂ in the HaCaT cells activated by proinflammatory cytokine TNF were determined. Both extracts, in the concentration of 600 µg/ml, decreased protein COX-2 level (by 245 % for methanol extract and by 242 % for the decoction). Moreover, the extracts in the same concentration also inhibited synthesis of PGE₂ (by 53 % for decoction and by 50 % for methanol extract).

SPIS TABEL I RYCIN

Tabela 1. Glukuronidy flawonoidowe w świecie roślinnym.....	29
Tabela 2. Stężenia badanych wyciągów wykorzystane w badaniach aktywności antyoksydacyjnej.....	68
Tabela 3. Stężenia wzorców wykorzystanych w zastosowanych metodach badania aktywności antyoksydacyjnej	69
Tabela 4. Stężenia wyciągów wykorzystane w badaniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej.....	77
Tabela 5. Układy wykorzystane do oczyszczania poszczególnych związków na kolumnach wypełnionych podłożem Sephadex LH-20.....	82
Tabela 6. Analiza chromatograficzna związku 1.....	84
Tabela 7. Analiza spektralna UV związku 1.....	84
Tabela 8. ^1H i ^{13}C NMR związku 1 (CD_3OD i $\text{DMSO}-d_6$).....	85
Tabela 9. Analiza LC-MS związku 1.....	93
Tabela 10. Analiza chromatograficzna związku 2.....	94
Tabela 11. Analiza spektralna UV związku 2.....	94
Tabela 12. ^1H i ^{13}C NMR związku 2 ($\text{DMSO}-d_6$).....	95
Tabela 13. Ścieżki fragmentacyjne związku 2 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	100
Tabela 14. Analiza chromatograficzna związku 3.....	101
Tabela 15. Analiza spektralna związku 3.....	101
Tabela 16. ^1H i ^{13}C NMR związku 3 ($\text{DMSO}-d_6$).....	102
Tabela 17. Ścieżki fragmentacyjne związku 3 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	117
Tabela 18. Ścieżki fragmentacyjne związku 4 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	119
Tabela 19. Ścieżki fragmentacyjne związku 5 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	120
Tabela 20. Ścieżki fragmentacyjne związku 6 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	121
Tabela 21. Ścieżki fragmentacyjne związku 7 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	122
Tabela 22. Ścieżki fragmentacyjne związku 8 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	123
Tabela 23. Ścieżki fragmentacyjne związku 9 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	124
Tabela 24. Ścieżki fragmentacyjne związku 10 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	125
Tabela 25. Ścieżki fragmentacyjne związku 11 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	126
Tabela 26. Ścieżki fragmentacyjne związku 12 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	127
Tabela 27. Ścieżki fragmentacyjne związku 13 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	128
Tabela 28. Ścieżki fragmentacyjne związku 14 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	129
Tabela 29. Ścieżki fragmentacyjne związku 15 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	130
Tabela 30. Ścieżki fragmentacyjne związku 16 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	131
Tabela 31. Ścieżki fragmentacyjne związku 17 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	132
Tabela 32. Ścieżki fragmentacyjne związku 18 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	133
Tabela 33. Ścieżki fragmentacyjne związku 19 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	134
Tabela 34. Ścieżki fragmentacyjne związku 20 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	135
Tabela 35. Ścieżki fragmentacyjne związku 21 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	136
Tabela 36. Ścieżki fragmentacyjne związku 22 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	137
Tabela 37. Ścieżki fragmentacyjne związku 23 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	138
Tabela 38. Ścieżki fragmentacyjne związku 24 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	139
Tabela 39. Ścieżki fragmentacyjne związku 25 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	140
Tabela 40. Ścieżki fragmentacyjne związku 26 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	141
Tabela 41. Ścieżki fragmentacyjne związku 27 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	142
Tabela 42. Ścieżki fragmentacyjne związku 28 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	143
Tabela 43. Ścieżki fragmentacyjne związku 29 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	144
Tabela 44. Ścieżki fragmentacyjne związku 30 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	145
Tabela 45. Ścieżki fragmentacyjne związku 31 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	146
Tabela 46. Ścieżki fragmentacyjne związku 32 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	147

Tabela 47. Ścieżki fragmentacyjne związku 33 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	148
Tabela 48. Ścieżki fragmentacyjne związku 34w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	149
Tabela 49. Ścieżki fragmentacyjne związku 35 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	150
Tabela 50. Ścieżki fragmentacyjne związku 36 w trybie jonów dodatnich i ujemnych.....	151
Tabela 51. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego.....	152
Tabela 52. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.....	152
Tabela 53. Zawartość sumy polifenoli w metanolowym wyciągu z ziela <i>A. amaranthoides</i>	154
Tabela 54. Zawartość sumy polifenoli w odwarze z ziela <i>A. amaranthoides</i>	155
Tabela 55. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów 7-glukozydu apigeniny.....	156
Tabela 56. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.....	156
Tabela 57. Zawartość flawonoidów w ziele <i>A. amaranthoides</i>	157
Tabela 58. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów BHA.....	158
Tabela 59. Zdolność zmiatania rodnika DPPH* [%].....	158
Tabela 60. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.....	159
Tabela 61. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów witaminy C.....	160
Tabela 62. Zdolność zmiatania rodnika DPPH* [%].....	160
Tabela 63. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.....	160
Tabela 64. Wartości pomiarów absorbancji wyciągu metanolowego.....	161
Tabela 65. Zdolność zmiatania rodnika DPPH* [%].....	162
Tabela 66. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.....	162
Tabela 67. Wartości pomiarów absorbancji wyciągu metanolowego.....	163
Tabela 68. Zdolność zmiatania rodnika DPPH* [%].....	164
Tabela 69. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.....	164
Tabela 70. Wartości pomiarów absorbancji witaminy C.....	165
Tabela 71. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.....	166
Tabela 72. Wartości pomiarów absorbancji wyciągu.....	167
Tabela 73. Zdolność redukowania jonów Fe ³⁺ jako równoważnik witaminy C [µg/ml].....	167
Tabela 74. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.....	167
Tabela 75. Wartości pomiarów absorbancji odwaru.....	168
Tabela 76. Zdolność redukowania jonów Fe ³⁺ jako równoważnik witaminy C [µg/ml].....	168
Tabela 77. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.....	169
Tabela 78. Przeżywalność komórek HaCaT w zależności od stężenia wyciągów z ziela <i>A. amaranthoides</i>	171
Tabela 79. Wpływ badanych prób (odwar-O, wyciąg metanolowy-W) na poziom białka COX-2 w przeliczeniu na % próby kontrolnej.....	173
Tabela 80. Średnie wartości absorbancji otrzymane w wyniku oznaczania wpływu badanych prób (odwar-O, wyciąg metanolowy-W) na poziom PGE ₂	174
Tabela 81. Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze/grzybobójcze (MBC/MFC) badanych wyciągów i substancji wzorcowych na wybrane szczepy drobnoustrojów.....	175
Tabela 82. Glikozydy flawonoidowe zidentyfikowane w ziele <i>A. amaranthoides</i> L – analiza MS ²	188
Rycina 1. Fragment blaszki liściowej <i>A. prostrata</i> -włoski gwiazdziste.....	15
Rycina 2. Różnice morfologiczne pomiędzy wybranymi gatunkami rodzaju <i>Axyris</i> L.....	16
Rycina 3. Różnice w budowie owoców czarnych (A) i brązowych (B) poszczególnych gatunków z rodzaju <i>Axyris</i>	17
Rycina 4. <i>Axyris amaranthoides</i> L.....	19
Rycina 5. Związki zidentyfikowane w nasionach <i>A. amaranthoides</i> L.....	20
Rycina 6. Ogólny schemat biosyntezy flawonoidów.....	22
Rycina 7. Podstawowa struktura flawonoidowa i schemat numeracji.....	23
Rycina 8. Trzy główne klasy flawonoidów wg IUPAC.....	23

Rycina 9. Podklasy flawonoidów pochodnych 2-fenylobenzopironu i 2-fenylobenzopiranu.	25
Rycina 10. Podklasy flawonoidów pochodnych 3-fenylobenzopiranu.	26
Rycina 11. Podklasy flawonoidów pochodnych 4-fenylobenzopiranu.	26
Rycina 12. Pozostałe klasy flawonoidów.	27
Rycina 13. Nomenklatura oraz główne produkty fragmentacji protonowanych (a) flawonów i (b) flawonoli (fragmentacja metodą CID)	43
Rycina 14. Schemat reakcji tworzenia jonów $^{1,3}A^+$ i $^{1,3}B^+$ wg mechanizmu retro Dielsa-Aldera dla apigeniny (R=H) i luteoliny (R=OH).	43
Rycina 15. Możliwe ścieżki fragmentacyjne flawonoidów związane z rozerwaniem wiązań C-C pierścienia C w dodatnim (PI) i ujemnym (NI) trybie jonizacji; (A) PI i NI: (A1) 1 i 3, (A2) 0 i 4, (B) PI: (B1) 0 i 2, (B2) 1 i 4, (C) NI: (C1) 0 i 3, (C2) 1 i 2, (C3) 1 i 4, (C4) 2 i 4.	44
Rycina 16. Widma CID jonów $[M + H]^+$ (a) luteoliny i (b) kemferolu.	44
Rycina 17. Nomenklatura i możliwe produkty fragmentacji deprotonowanych aglikonów flawonoidowych na przykładzie apigeniny.	45
Rycina 18. Nomenklatura jonów fragmentacyjnych (a) <i>O</i> -glikozydów flawonoidowych oraz (b) <i>C</i> , <i>O</i> - i <i>C</i> -glikozydów flawonoidowych.	47
Rycina 19. Widmo masowe w trybie jonów ujemnych dla (a) 3- <i>O</i> -soforozydu kemferolu i (b) 3,7- <i>O</i> -diglukozydu kemferolu, prezentujące diagnostyczne różnice związane z intensywnością fragmentów Y_0^- i Y_1^-	48
Rycina 20. Grupy acylowe najczęściej podstawiające cukrowe cząsteczki flawonoidów oraz ich charakterystyczne jony fragmentacyjne obserwowane w widmach CID.	50
Rycina 21. Tworzenie kompleksu w wyniku reakcji flawonoidu z kwasem borowym i szczawiovym. ...	62
Rycina 22. Redukcja rodnika DPPH \cdot pod wpływem związku o charakterze utleniacza.	69
Rycina 23. Schemat przebiegu redukcji jonów Fe^{3+} w metodzie FRAP.	71
Rycina 24. Przekształcenie MTT do formazanu.	74
Rycina 25. Ogólny schemat izolacji i identyfikacji związków flawonoidowych w ziele <i>A. amaranthoides</i>	80
Rycina 26. Widmo 1H NMR związku 1 (a) (CD_3OD).	86
Rycina 27. Widmo 1H NMR związku 1 (b) (CD_3OD).	87
Rycina 28. Widmo 1H NMR związku 1 (c) (CD_3OD).	88
Rycina 29. Widmo 1H NMR związku 1 ($DMSO-d_6$).	89
Rycina 30. Widmo ^{13}C NMR związku 1 (a) (CD_3OD).	90
Rycina 31. Widmo ^{13}C NMR związku 1 (b) (CD_3OD).	91
Rycina 32. Widmo ^{13}C NMR związku 1 ($DMSO-d_6$).	92
Rycina 33. Chromatogram TIC (a) dla badanej próbki związku 1 i widma MS (b) związku 1 w trybie jonów dodatnich i trybie jonów ujemnych.	93
Rycina 34. Widmo 1H NMR związku 2 (a) ($DMSO-d_6$).	96
Rycina 35. Widmo 1H NMR związku 2 (b) ($DMSO-d_6$).	97
Rycina 36. Widmo 1H NMR związku 2 (c) ($DMSO-d_6$).	98
Rycina 37. Widmo ^{13}C NMR związku 2 ($DMSO-d_6$).	99
Rycina 38. Chromatogramy TIC (a) i EIC (b) analizowanej próbki związku 2.	100
Rycina 39. Widma CID MS/MS związku 2 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	100
Rycina 40. Widmo 1H NMR związku 3 (a) ($DMSO-d_6$).	104
Rycina 41. Widmo 1H NMR związku 3 (b) ($DMSO-d_6$).	105
Rycina 42. Widmo 1H NMR związku 3 (c) ($DMSO$).	106
Rycina 43. Widmo 1H NMR związku 3 (d) ($DMSO-d_6$).	107
Rycina 44. Widmo 1H NMR związku 3 (e) ($DMSO-d_6$).	108
Rycina 45. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (a) ($DMSO-d_6$).	109
Rycina 46. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (b) ($DMSO-d_6$).	110
Rycina 47. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (c) ($DMSO-d_6$).	111
Rycina 48. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (d) ($DMSO-d_6$).	112
Rycina 49. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (e) ($DMSO-d_6$).	113
Rycina 50. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (f) ($DMSO-d_6$).	114

Rycina 51. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (g) (DMSO- d_6).....	115
Rycina 52. Widmo HMBC związku 3.....	116
Rycina 53. Chromatogramy TIC (a), EIC (b) analizowanej próbki związku 3.....	117
Rycina 54. Widma CID MS/MS związku 3 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).117	
Rycina 55. Chromatogramy TIC frakcji 7, 9 i 11.....	118
Rycina 56. Widma CID MS/MS związku 4 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).119	
Rycina 57. Widma CID MS/MS związku 5 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).120	
Rycina 58. Widma CID MS/MS związku 6 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).121	
Rycina 59. Widma CID MS/MS związku 7 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).122	
Rycina 60. Widma CID MS/MS związku 8 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).123	
Rycina 61. Widma CID MS/MS związku 9 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).124	
Rycina 62. Widma CID MS/MS związku 10 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	125
Rycina 63. Widma CID MS/MS związku 11 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	126
Rycina 64. Widma CID MS/MS związku 12 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	127
Rycina 65. Widma CID MS/MS związku 13 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	128
Rycina 66. Widma CID MS/MS związku 14 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	129
Rycina 67. Widma CID MS/MS związku 15 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	130
Rycina 68. Widma CID MS/MS związku 16 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	131
Rycina 69. Widma CID MS/MS związku 17 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	132
Rycina 70. Widma CID MS/MS związku 18 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	133
Rycina 71. Widma CID MS/MS związku 19 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	134
Rycina 72. Widma CID MS/MS związku 20 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	135
Rycina 73. Widma CID MS/MS związku 21 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	136
Rycina 74. Widma CID MS/MS związku 22 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	137
Rycina 75. Widma CID MS/MS związku 23 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	138
Rycina 76. Widma CID MS/MS związku 24 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	139
Rycina 77. Widma CID MS/MS związku 25 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	140
Rycina 78. Widma CID MS/MS związku 26 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	141
Rycina 79. Widma CID MS/MS związku 27 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	142
Rycina 80. Widma CID MS/MS związku 28 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	143
Rycina 81. Widma CID MS/MS związku 29 w trybie jonów dodatnich (a).	144
Rycina 82. Widma CID MS/MS związku 30 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	145

Rycina 83. Widma CID MS/MS związku 31 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	146
Rycina 84. Widma CID MS/MS związku 32 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	147
Rycina 85. Widma CID MS/MS związku 33 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	148
Rycina 86. Widma CID MS/MS związku 34 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	149
Rycina 87. Widma CID MS/MS związku 35 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	150
Rycina 88. Widma CID MS/MS związku 36 w trybie jonów dodatnich (a) i trybie jonów ujemnych (b).	151
Rycina 89. Krzywa kalibracyjna dla roztworu wzorcowego kwasu galusowego.	153
Rycina 90. Krzywa kalibracyjna dla roztworu wzorcowego 7-glukozydu apigeniny.	156
Rycina 91. Aktywność antyoksydacyjna BHA.	159
Rycina 92. Aktywność antyoksydacyjna witaminy C.	161
Rycina 93. Aktywność antyoksydacyjna metanolowego wyciągu z ziela <i>A. amaranthoides</i> L.	163
Rycina 94. Aktywność antyoksydacyjna odwaru z ziela <i>A. amaranthoides</i> L.	165
Rycina 95. Właściwości redukujące witaminy C.	166
Rycina 96. Właściwości redukujące metanolowego wyciągu z ziela <i>A. amaranthoides</i>	168
Rycina 97. Właściwości redukujące metanolowego odwaru z ziela <i>A. amaranthoides</i>	169
Rycina 98. Zawartość całkowitej sumy polifenoli (mg GAE/g wyciągu) w wyciągu metanolowym i odwarze z ziela <i>A. amaranthoides</i> L. oraz aktywność antyoksydacyjna (IC ₅₀) wyciągu, odwaru i substancji wzorcowych (DPPH).	170
Rycina 99. Zależność aktywności antyoksydacyjnej (DPPH) wyciągu metanolowego i odwaru z ziela <i>A. amaranthoides</i> od stężenia związków polifenolowych w badanych próbach.	170
Rycina 100. Porównanie aktywności antyoksydacyjnej badanych wyciągów z ziela <i>A. amaranthoides</i> L. (750 µg/ml) zmierzonej metodą FRAP i DPPH, wyrażonej jako równoważnik witaminy C (VCE) w µg/ml.	171
Rycina 101. Wpływ wyciągu metanolowego z ziela <i>A. amaranthoides</i> na przeżywalność komórek HaCaT.	172
Rycina 102. Wpływ odwaru z ziela <i>A. amaranthoides</i> na przeżywalność komórek HaCaT.	172
Rycina 103. Wpływ odwaru (O) i wyciągu metanolowego (W) na poziom białek COX-2 w komórkach HaCaT (wynik = % próby kontrolnej ±SD).	173
Rycina 104. Wpływ odwaru i nalewki z ziela <i>A. amaranthoides</i> na poziom białka COX-2 w komórkach HaCaT oznaczony metodą Western Blot.	174
Rycina 105. Wpływ odwaru (O) i wyciągu metanolowego (W) na poziom PGE ₂ w komórkach HaCaT.	175
Rycina 106. Wzór strukturalny 5,7,4'-trihydroksy-3',5'-dimetoksyflawonu (trycyny).	180
Rycina 107. Wzór strukturalny 7-O-glukuronopiranozydu trycyny.	181
Rycina 108. Wzór strukturalny 7-O-[2'''-O-feruilo-β-glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-O-β-glukuronopiranozyd] trycyny.	183
Rycina 109. Aglikony związków flawonoidowych zidentyfikowanych w ziele <i>A. amaranthoides</i> L. ...	184
Rycina 110. Przykładowy chromatogram EIC zarejestrowany dla wartości <i>m/z</i> 815.	186
Rycina 111. Schemat ścieżki fragmentacyjnej w trybie jonów dodatnich dla diglukuronidów flawonoidowych wyizolowanych z ziela <i>A. amaranthoides</i> na przykładzie 7-O-[glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-glukuronopiranozydu] trycyny (związek 13).	192
Rycina 112. Główna ścieżka fragmentacyjna w trybie jonów ujemnych diglukuronidów flawonoidowych wyizolowanych z ziela <i>A. amaranthoides</i> na przykładzie 7-O-[glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-glukuronopiranozydu] trycyny (związek 13).	193
Rycina 113. Schemat ścieżki fragmentacyjnej w trybie jonów dodatnich dla acylowanych diglukuronidów flawonoidowych wyizolowanych z ziela <i>A. amaranthoides</i> na przykładzie 7-O-[2'''-O-feruilo-glukuronopiranozylo-(1'''-2'')-O-glukuronopiranozyd] chrysoeriolu (związek 25).	195

Rycina 114. Jon fragmentacyjny rejestrowany dla związków 17, 21, 22, 23 i 27 w trybie jonów ujemnych.....	197
Rycina 115. Schemat ścieżki fragmentacyjnej dla 7- <i>O</i> -[2'''- <i>O</i> -dehydrodiferuilo-glukopiranozylo-(1'''-2'')- <i>O</i> -glukuronoopiranozyd] trycyny (związek 35) w trybie jonów ujemnych.....	200

BIBLIOGRAFIA

1. Ablajan K, Abliz Z, Shang XY, He JM, Zhang RP, Shi JG. Structural characterization of flavonol 3,7-di-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2006;41:352-360.
2. Adinarayana D, Gunasekar D, Seligmann O, Wagner H. Flavone *O*-and *C*-glycosides of *Rhynchosia beddomei*. *Phytochemistry* 1980;19:480-481.
3. Agrawal PK, Rastogi RP. ¹³C NMR spectroscopy of flavonoids. *Heterocycles* 1981; 16(12):2181-2235.
4. Agrawal PK. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 1989.
5. Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 1992;31(10):3307-3330.
6. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 2002;18(1):75-81.
7. Al-Qudah MA, Al-Jaber HI, Abu Zarga MH, Abu Orabi ST. Flavonoid and phenolic compounds from *Salvia palaestina* L. growing wild in Jordan and their antiozydant activities *Phytochemistry* 2014;99:115-120.
8. Alonso AM, Guillen DA, Barroso CG, Puertas B, Garcia A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(21):5835-5836.
9. Andersen ØM, Markham KR. Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press – Taylor and Francis Group, USA, 2006.
10. Anesini C. Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camelia sinensis*) in Argentina. *J Agric Food Chem.* 2008;56:9225-9229.
11. Anuszevska EL. Badanie aktywności cytotoksycznej produktów leczniczych i wyrobów medycznych. *Gazeta Farmaceutyczna* 2010;5:36-38.
12. Antunes-Ricardo M, Gutierrez-Uribe JA, Martinez-Vitela C, Serna-Saldivar SO. Topical anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica*. *BioMed Research International* 2015, 847320.
13. Aritomi M, Kawasaki T. Three highly oxygenated flavone glucuronides in leaves of *Spinacia oleracea*. *Phytochemistry* 1984;23:2043-2047.
14. Aritomi M, Kawasaki T. Flavonol glycosides in leaves of *Spinacia oleracea*. *Phytochemistry* 1986;25:231-234.
15. Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Rad Biol Med.* 1998;24:1355-1363

16. Asen S, Horowitz RM. Apigenin 4'-*O*- β -D-glucoside 7-*O*- β -D-glucuronide: the copigment in the blue pigment of *Centaurea cyanus*. *Phytochemistry* 1974;13:1219-1223.
17. Becchi M, Fraisse D. Fast Atom Bombardment and Fast Atom Bombardment Collision Activated Dissociation/Mass-Analyzed Ion Kinetic Energy Analysis of C-Glycosidic Flavonoids. *Biomed Environ Mass.* 1989;18:122–130.
18. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake; Proceeding of the third international scientific symposium on tea and human health: role of flavonoids in diet. 2003, 3248S.
19. Beninger CW, Hall C. Allelopathic activity of luteolin 7-*O*- β -D-glucuronide isolated from *Chrysanthemum morifolium* L. *Biochem Syst Ecol.* 2005;33:103-111.
20. Billeter M, Meier B, Sticher O. 8-Hydroxyflavonoid glucuronides from *Malva sylvestris*. *Phytochemistry* 1991;30 (3):987-990.
21. Blackwell H. The history of Russian Pigweed, *Axyris amaranthoides* (*Chenopodiaceae*, *Atriplicaceae*) in North America. *Weed Sci.* 1978;26(1):82-83.
22. Boss PK, Davies C, Robinson SP Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes, *Plant Mol Biol.* 1996;32:565-569.
23. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance; *Nutr Rev.*1998;56(11):317-33.
24. Bohm BA, Collins FW. Flavonoids of *Philydrum lanuginosum*. *Phytochemistry* 1975;14:315-316.
25. Bohm BA. Introduction to flavonoids. Harwood Academi Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1998.
26. Bucar F, Karting T. Flavone glucuronides of *Lycopus virginicus*. *Planta Med.* 1996;61:378-380.
27. Budzianowski J. Six flavonol glucuronides from *Tulipa gesneriana*. *Phytochemistry* 1991;30:1679-1682.
28. Budzianowski J, Korzeniowska K, Chmara E, Mrozkiewicz A. Microvascular protective activity of flavonoid glucuronides fraction from *Tulipa gesneriana*. *Phytother Res.* 1999;13:166-168.
29. Bylka W, Frański R, Stobiecki M. Differentiation between isomeric acacetin-6-*C*-(6''-*O*-malonyl)-glucoside and acacetin-6-*C*-(6''-*O*-malonyl) by using low-energy CID mass spectra. *J Mass Spectrom.* 2002;37:648-650.
30. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad Biol Med.* 1997;22:749-760.
31. Chao-Lin C. Cardiovascular protective flavonolignans and flavonoids from *Calamus quiquisetinerviis*. *Phytochemistry* 2010;71:271-279.
32. Chanaj-Kaczmarek J. Badania fitochemiczne związków polifenolowych w ziele żółtlicy drobnokwiatowej (*Galinsoga parviflora* Cav., *Asteraceae*). Poznań, 2013.

33. Cieśla Ł, Kowalska I, Oleszek W, Stochmal A. Free radical scavenging activities of polyphenolic compounds isolated from *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* assessed by means of thin-layer chromatography DPPH rapid test. *Phytochem Analysis* 2012;24:47-52.
34. Conrad J, Förster-Fromme B, Constantin MA, Ondrus V, Mika S, Mert-Balci F, Klaiber I, Pfannstiel J, Möller W, Rösner H, Förster-Fromme K, Beifus U. Flavonoid glucuronides and chromone from the aquatic macrophyte *Stratiotes aloides*. *J Nat Prod.* 2009;72:835-840.
35. Cuyckens F, Ma YL, Pocsfalvi G, Claeys M. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. *Analysis* 2000;28(10):888-895.
36. Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom.* 2004;39:1-15.
37. Daovy PA, Simon A, Bennini B, Chulia A, Kaouadji M, Christiane D. Flavone and flavonol glycosides from *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry* 1991;30:3099-3101.
38. Detsi A, Majdalani M, Kontogiorgis CA, Hadjipavlou-Litina D, Kefalas P. Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization, and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorgan Medl Chem.* 2009;17:8073-8085.
39. Dey PM, Harborne JB. *Methods in plant biochemistry.* Academic Press, London, San Diego, New York, Berkeley, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 1989.
40. Dinan L. Distribution and levels of phytoecysteroids within individual plants of species of the *Chenopodiaceae*. *Eur J Entomol.* 1995;92:295-300.
41. Dobberstein D, Bunzel M.. Identification of ferulate oligomers from corn stover. *J Sci Food Agric.* 2010;90:1802-1810.
42. Domon B, Costello CE. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.* 1988;5:397.
43. Du Q, Xu Y, Li L, Zhao Y, Jerz G, Winterhalter P. Antioxidant constituents in the fruits of *Luffa cylindrica* (L.) Roem. *J Agric Food Chem.* 2006;54(12):4186-4190.
44. Du Q, Cui H. A new flavone glycoside from the fruits of *Luffa cylindrica*. *Fitoterapia* 2007;78(7-8):609-610.
45. El-Ansari MA, Newwar MAM, El Dein A, El Sherbeiny A, El Sissi HI. A sulphated kaempferol 7,4'-dimethyl ether and a quercetin isoferulylglucuronide from the flowers of *Tamarix aphylla*. *Phytochemistry* 1976;15:231-232.
46. European Pharmacopoeia 7th Edition, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Strasbourg 2010.
47. Fabre N, Rustan I, Hoffmann E, Quetin-Leclerq J. Determination of flavone, flavonol and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2001;12:707-715.
48. Farmakopea Polska X, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2014.

49. Ferreres F, Llorach L, Gil-Izquierdo A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2004;39:312-321.
50. Ferreres F, Gil-Izquierdo A, Andrade PB, Valentao P, Tomas-Barberan FA. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007;1161:214-223.
51. Ford CW, Hartley RD. GC/MS characterization of cyclodimers from *p*-coumaric and ferulic acid by photodimerization. A possible factor influencing cell wall biodegradability. *J Sci Food Agric.* 1989;46:301-310.
52. Fuentes-Bazan S, Uotila P, Borsch T. A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium* sensu lato, and a tribal rearrangement of *Chenopodioideae* (*Chenopodiaceae*). *Wildenowia* 2012;42:5-24.
53. Garazd MM, Garazd YL, Khilya VP. Neoflavones 1. Natural distribution and spectral and biological properties. *Chem Nat Compd.* 2003;39(1):54-121.
54. Garcia-Conesa MT, Plumb GW, Waldron KW, Ralph J, Williamson G, 1997. Ferulic acid dehydrodimers from wheat bran: isolation, purification and antioxidant properties of 8-*O*-4-diferulic acid. *Redox Rep.* 1997;3:319-23.
55. Główniak K, Widelski J. Nowe kierunki fitoterapii. *Panacea.* 2007;4(21):14-15.
56. Gong X, Zhou X, Zhao C, Chen H, Zhao Y. Anti-inflammatory properties of quercetin-3-*O*- β -D-glucuronide-methyl ester from *Polygonum perfoliatum* in mice. *Int J Pharmacol.* 2013; 9(8):533-537.
57. Granica S, Piwowarski JP, Popławska M, Jakubowska M, Borzym J, Kiss AK. Novel insight into qualitative standardization of *Polygoni avicularis herba* (Ph. Eur.). *J Pharmaceut Biomed.* 2013;72:216-222.
58. Granica S, Czerwińska ME, Żyżyńska-Granica B, Kiss AK. Antioxidant and anti-inflammatory flavonol glucuronides from *Polygonum aviculare* L. *Fitoterapia.* 2013; 91:180-188.
59. Gregoris E, Stevanato R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(1):76-82.
60. Grotewold E. *The Science of Flavonoids.* Springer Science & Business Media Inc., USA, 2006.
61. Gudej J, Nazaruk J. Apigenin glicosidoesters from flowers of *Bellis perennis* L. V Konferencja Naukowa n.t. Zastosowanie metod chromatograficznych w badaniach fitochemicznych i biomedycznych. Lublin, 1996.
62. Gunasegaran R, Ubeda A, Alcaraz MJ, Jayaprakasam R, Nair AGR. Acylated flavonol glucosides and other phenolics of *Helichrysum bracteatum*. *Pharmazie* 1993;48:230-231.
63. Guozhu L, Rajesh N, Wang X, Zhang M, Wu Q, Li S, Chen B, Yao S. Identification of flavonoids in the stems and leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *J Chromatogr B.* 2011;879:1023-1028.

64. Hadaś E, Derda M. Rośliny lecznicze w chorobach wywołanych przez pasożytnicze pierwotniaki. *Hegeia Public Health*. 2014;49(3):442-448.
65. Harborne JB, Mabry TJ. *The flavonoids: Advances in research*. Chapman and Hall. London, New York. 1982.
66. Harborne, J. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986* :441-497. Chapman & Hall, 1994.
67. Hase T, Ohtani H, Kasai R, Yamasaki K, Picheansoonthon C. Revised structure for hortensin, a flavonoid from *Millingtonia hortensis*. *Phytochemistry* 1995;40:287-290.
68. Hiermann A. Neue flavonglykoside in den Blättern von *Digitalis lanata*. *Planta Med*. 1982;44:59-60.
69. Hiermann A, Reidlinger M, Juan H, Samez W. Isolierung des antiphlogistischen Wirkprinzips von *Epilobium angustifolium*. *Planta Med*. 1991;57:357-360.
70. Hopia A, Heinonen M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *J Am Oil Chem Soc*. 1999;76(1):139-144.
71. Huang Y, De Bruyne T, Apers S, Ma Y, Claeys M, Pieters L, Vlietinck A. Flavonoid glucuronides from *Picria fel-terrae*. *Phytochemistry* 1999;52:1701-1703.
72. Hughes RJ, Croley TR, Metcalfe CD, March RE. A Tandem Mass Spectrometric Study of Selected Characteristic Flavonoids. *Int J Mass Spectrom*. 2001;210/211:371-385.
73. Hurst WJ. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*, second edition 2008 (Taylor and Francis).
74. Hvattum E, Ekeberg D. Study of the Collision-Induced Radical Cleavage of Flavonoid Glycosides Using Negative Electrospray Ionization Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2003;38:43-49.
75. Iwashina T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J Plant Res*. 2000;113:287-299.
76. Iwashina T, Kokubugata G. Flavonoids in the leaves and flowers of *Myoporum bontioides* native to northernmost region in the *Myoporaceae*. *Bull Natl Mus Nat Sci., Ser. B*. 2010;36(3):117-125.
77. Iwashina T, Setoguchi H, Kitajima J. Flavonoids from the leaves of *Vitex rotundifolia* (*Verbenaceae*), and their qualitative and quantitative comparison between coastal and inland populations. *Bull Natl Mus Nat Sci., Ser. B*. 2011;37(2):87-94.
78. Jasiński M, Mazurkiewicz E, Rodziewicz P, Figlerowicz M. Flawonoidy-budowa, właściwości i funkcja ze szczególnym uwzględnieniem roślin motylkowatych. *Biotechnologia* 2009;2(85):81-89.
79. Justesen U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2001;36:169.
80. Kachlicki P, Einhorn J, Muth D, Kerhoas L, Stobiecki M. Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC/MS/MS metabolite profiling. *J. Mass Spectrom*. 2008;43:572-586.

81. Kadereit G, Zacharias E, Mavrodiev E, Sukhorukov AP. Molecular phylogeny of *Atripliceae* (*Chenopodioideae*, *Chenopodiaceae*): implications for systematics, biogeography, flower and fruit evolution, and the origin of C4 photosynthesis. *Amer J Bot*. 2010;97:1664-1687.
82. Kawasaki M, Hayashi T, Arisawa M, Morita N, Berganza LH. 8-hydroxytricetin 7-glucuronide, a β -glucuronidase inhibitor from *Scoparia dulcis*. *Phytochemistry* 1988;27:3709-3711.
83. Klimek B. Flavonoid glucuronidase from *Verbascum lychnitis* L. and *V. nigrum* L. *Acta Pol Pharm*. 1995;52:53-56.
84. Kocjan R. *Chemia analityczna, podręcznik dla studentów. Tom II. Analiza Instrumentalna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2000.
85. Kowalska I, Stochmal A, Kapusta I, Janda B, Pizza C, Piacente S, Oleszek W. Flavonoids from Barrel Medic (*Medicago truncatula*) aerial parts. *J Agric Food Chem*. 2007;55:2645-2652.
86. Krzysztoń-Russjan J, Książek I, Anuszewska E. Porównanie użyteczności testów MTT i EZ4U stosowanych do oceny cytotoksyczności ksenobiotyków. *Farmacja Polska* 2009;65(6):395-402.
87. Kumar S, Pandey AK 2013 Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview, *The Scientific World Journal* (ID 162750, 16 stron) <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>.
88. Lai X-Y, Zhao Y-Y, Liang H. A flavonoid glucuronide from *Abelmoschus manihot* (L.) Medik. *Biochem Syst Ecol*. 2007;35:891-893.
89. Lee JS, Kim HJ, Lee YS. A new anti-HIV glucuronide from *Chrysanthemum morifolium*. *Planta Med*. 2003;69(9):859-861.
90. Lee WJ, Choi SW, Quantitative Changes of Polyphenolic Compounds in Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves in Relation to Varieties, Harvest Period, and Heat Processing. *Prev Nutr Food Sci*. 2012;17,280-285.
91. Li QM, Claeys M. Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast bombardment and tandem mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom*. 1994;23:403-416.
92. Lu Y, Foo LY. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 2000;55:263-267.
93. Ma YL, Li QM, Van den Heuvel H, Claeys M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1997;11:1357-1364.
94. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag, New-York, 1970:62-68.
95. Majewska M, Czeczot H 2009 Flawonoidy w profilaktyce i terapii, *Terapia i leki*, 65(5):369-377.
96. Małolepsza U, Urbanek H. Flawonoidy roślinne jako związki biochemicznie czynne. *Wiadomości Botaniczne* 2000;44(3/4):27-37.

97. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:727-747.
98. Marczak Ł, Stobiecki M, Jasiński M, Oleszek W, Kachlicki P. Fragmentation pathways of acylated flavonoid diglucuronides from leaves of *Medicago truncatula*. *Phytochem Analysis* 2010;21:224-233.
99. Markham KR, Porter LJ. Flavonoids of the liverwort *Marchantia foliacea*. *Phytochemistry* 1973;12:2007-2010.
100. Markham KR, Porter LJ. Luteolin 3',4'-di-O-β-D-glucuronide and luteolin 3'-O-β-D-glucuronide from *Lunularia cruciata*. *Phytochemistry* 1974a;13:1553-1555.
101. Markham KR, Porter LJ. Flavonoids of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry* 1974b;13:1937-1942.
102. Markham KR, Porter LJ. Isoscutellarein and hypolaetin 8-glucuronides from the liverwort *Marchantia berteroana*. *Phytochemistry* 1975;14:1093-1097.
103. Markham KR, Porter LJ, Mues R, Dietmar Zinsmeister H, Brehm BG. Flavonoid variation in the liverwort *Conocephalum conicum*: evidence for geographic races. *Phytochemistry* 1976;15:147-150.
104. Markham KR, Dietmar Zinsmeister H, Mues R. Luteolin 7-glucuronide-3'-mono(trans)ferulyglucoside and other unusual flavonoids in the aquatic liverwort complex, *Riccia fluitans*. *Phytochemistry* 1978;17:1601-1604.
105. Matławska I. Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, 2008.
106. Merfort I, Wendisch D. Flavonoglukuronide aus den Blüten von *Arnica montana*. *Planta Med.* 1998;54:247-250.
107. Micard V, Grabber JH, Ralph J, Renard CMGC, Thibault JF. Dehydrodiferulic acids from sugar-beet pulp. *Phytochemistry* 1997;44:1365-1368.
108. Miyaichi Y, Imoto Y, Tomimori T, Lin C-C. Studies on the constituents of *Scutellaria* species. IX. On the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria indica*. *Chem Pharm Bull.* 1987;35(9):3720-3725.
109. Molyneux Ph, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2004; 26(2):211-219.
110. Moss GP, Smith PA, Tavernier D Glossary of names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Redommendations 1995) *Pure Appl Chem.* 1995, 67:1307-1375.
111. Moszczyński P, Pyć R. *Biochemia witamin*, PWN, Warszawa, 1999.
112. Mues R. Species specific flavone glucuronides in *Elodea species*. *Biochem Syst Ecol.* 1983; 11:261-265.
113. Mullen W, Hartley RC, Crozier A,. Detection and identification of ¹⁴C-labelled flavonol metabolites by high-performance liquid chromatography-radiocounting and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2003;1007:21-29.

114. Muth D, Kachlicki P. Metody analizy flawonoidów w materiale roślinnym, *Biotechnologia* 2009;2(85):65-80.
115. Nawwar MAM, Buddrus J. A gossypetin glucuronide sulphate from the leaves of *Malva sylvestris*. *Phytochemistry* 1981;20:2446-2448.
116. Nawwar MAM, Souleman AMA, Buddrus J, Linscheid M. Flavonoids of the flowers of *Tamarix nilotica*. *Phytochemistry* 1984;23:2347-2349.
117. Nazaruk J, Gudej J. Flavonoid compounds from the flowers of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. *Acta Pol Pharm– Drug Research* 2003;60(1):87-89.
118. Niessen WMA. *Liquid chromatography – mass spectrometry*, third edition 2006 (Taylor and Francis).
119. Okigawa M, Hatanaka H, Kawano N, Matsunaga I, Tamura Z. Studies on the components of *Clerodendron trochotomum* Thunb. A new glycoside acacetin-7-glucurono-(1-2)-glucuronide from the leaves. *Chem Pharm Bull.* 1971;19:148-152.
120. Patora J, Klimek B. Flavonoids from Lemon balm (*Melissa officinalis* L., *Lamiaceae*). *Acta Pol Pharm– Drug Research* 2002;59(2):139-143.
121. Pawlak K, Bylka W, Jazurek B, Matławska I, Sikorska M, Manikowski H, Białek-Bylka G. Antioxidant activity of flavonoids of different polarity, assayed by modified ABTS cation radical decolorization and EPR technique. *Acta Biol Cracov Bot.* 2010;52(1):97-104.
122. Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloid Surface B.* 2005;45:108-111.
123. Petrusa E, Braidot E, Zancani M, Peresson C, Bertolini A, Patui S, Vianello A. Plant flavonoids- biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *Int J Mol Sci.* 2013;14:14950-14973.
124. Piskunov VP. K woprosu o heterokarpii u aksirisa stschirizewidnogo [Heterocarpy in the Russian pigweed]. *Utschenyje sapiski Uljaniwskiego Pedagog.* 1968;23(3):188-192.
125. Poe ML, Bates A, Onyilagha J. Distribution of leaf flavonoid aglycones and glucuronides in the genus *Phaseolus* and related genera. *Int J Biol.* 2013;5(4):36-43.
126. Popova TP, Pakaln DA. The flavonoids of *Scutellaria galericulata*. *Chem Nat Compd.* 1975;11(1):106-107.
127. Recio MC, Terencio MC, Arenas JA, Giner R, Sanz MJ, Manez S, Rios Canavate JL. Luteolin-7-galactosylglucuronide, a new flavonoid from *Andryala ragusina*. *Pharmazie* 1993;48:228-229.
128. Renger A, Steinhart H. Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre. *Eur Food Res Technol.* 2000;211,422-428.
129. Reveal JL, Chase MW. APG III: Bibliographical information and synonymy of *Magnollidae*. *Phytotaxa* 2011;19:17-134.
130. Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UA. Analytical separation and detection methods of flavonoids. *J Chromathogr A.* 2006;1112:31-63.

131. Rivera YAR. Isolation, structural elucidation and cytotoxic activity of triclin, a natural occurring flavone from Cauca's Valley Sugarcane (Bachelor Thesis). Icesi University, Faculty of Natural Sciences. Santiago de Cali. 2013.
132. Rozario MJ, Merina AJ. The flavonoid quercetin-3-*O*-glucuronide from *Nelumbo nucifera*. *Ind J Appl Res*. 2012;2(1):6-7.
133. Ruzsnyak S, Szent-Györgyi A. Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature* 1936;138:27.
134. Saleh NAM. Flavonol glycosides of *Euphorbia retusa* and *E. sanctae-catharinae*. *Phytochemistry* 1991;30:3099-3101.
135. Sarker SD, Sik V, Rees HH, Dinan L. 1 alpha,20R-dihydroxyecdysone from *Axyris amaranthoides*. *Phytochemistry* 1998;49(8):2305-2010.
136. Sharma V, Ramawat KG. Isoflavonoids, *Handbook of Natural Products, Phytochemistry, Botany, Metabolism Vol. 2*. 2013:1849-1865.
137. Shelyuto VL, Glyzin VI, Bubon NT. Flavonoid glucuronides from *Cirsium aarvense*. *Chem Nat Compd*. 1972;8 (2):236-237.
138. Schulz M, Strack D, Weissenböck G, Markham KR, Dellamonica G, Chopin J. Two luteolin *O*-glucuronides from primary leaves of *Secale cereale*. *Phytochemistry* 1985;24:343-345.
139. Sikorska M, Matławska I. Kaempferol, isorhamnetin and their glycosides in the flowers of *Asclepias syriaca* L. *Acta Pol Pharm*. 2001;58, 269-272.
140. Sikorska M, Matławska I, Frański R. 8-hydroxyflavonoid glucuronides of *Malope trifida*. *Acta Physiol Plant*. 2004;26(3):291-297.
141. Tomimori T, Jin H, Miyaichi Y, Toyofuku S, Namba T. Studies on the constituents of *Scutellaria* species. VI. On the flavonoid constituents of the root *Scutellaria vivularis*. *Chem Pharm Bull*. 1990;38:3488-3490.
142. Smolarz HD, Budzianowski J, Bogucka-Kocka A, Kocki J, Mendyk E. Flavonoid glucuronides with anti-leukemic activity from *Polygonum amphibium* L. *Phytochem Analysis* 2008;19:506-513.
143. Stobiecki M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 2000;54:237-256.
144. Stobiecki M. Applications of separation techniques hyphenated to mass spectrometer for metabolic profiling. *Curr Opin Chem*. 2001;5:89-111.
145. Stobiecki M, Busko M, Marczak L, Bednarek P, Piślewska M, Wojtaszek P. The complexity of oxidative cross-linking of phenylpropanoids - Evidence from an in vitro model system. *Funct Plant Biol*. 2002;29,853-864.
146. Stochmal A, Piacente S, Pizza C, De Ricardis F, Leitz R, Oleszek W.. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *J Agric Food Chem*. 2001a; 49,753-758.
147. Stochmal A, Simonet AM, Macias FA, Oleszek W. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids. 2. Tricin and chrysoeriol glycosides from aerial parts. *J Agric Food Chem*. 2001b;49,5310-5314.

148. Stolarzewicz IA, Ciekot J, Fabiszewska AU, Białecka-Florjańczyk E. Roślinne i mikrobiologiczne źródła przeciwutleniaczy, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2013;67:1359-1373.
149. Strzelecka H, Kamińska J, Kowalski J, Walewska E. Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych, PZWL, Warszawa, 1982.
150. Sukhorukov AP. *Axyris* (*Chenopodiaceae* s.str. or *Amaranthaceae* s.l.) in the Himalayas and Tibet. *Willdenowia* 2011;41:75-82.
151. Sukhorukov AP, Zhang M. Fruit and seed anatomy of *Chenopodium* and related genera (*Chenopodioideae*, *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*): implications for evolution and plant taxonomy. *PLoSone* 2013;8 (4):e61906 (data wejścia: 20.10.2014 r.)
152. Sukhorukov AP. Karpologische untersuchung der *Axyris*-arten (*Chenopodiaceae*) im zusammenhang mit ihrer diagnostic und taxonomie. *Feddes Repertorium* 2005;116(3-4):168-176.
153. Svedström U, Vuorela H, Kostianen R, Laakso I, Hiltunen, R. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenol acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr A*. 2006;1112,103-111.
154. Syam S, Abdelwahab SI, Al-Mamary MA, Mohan S. Synthesis of chalcones with anticancer activities. *Molecules* 2012;17:6179-6195.
155. Tiveron AP, Melo PS, Bergamaschi KB, Vieira TMFS, Regitano-d'Arce M.A.B., Alencar SV. Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. *Int J Mol Sci*. 2012;13(7):8943-8957.
156. Tomas F, Ferreres F, Barberan FAT. Flavonoid diglycosides from *Myoporum tenuifolium*. *J Nat Prod*. 1985;48:506-507.
157. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols, *Nutrients* 2010,2:1231-1246.
158. Valls J; Millán S; Martí MP; Borràs E, Arola L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *J Chromatogr A*. 2009;1216(43):7143-7172.
159. Vukics V, Guttman A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2010;29:1-16.
160. Wilczyńska A. Metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej miodów pszczelich. *Bromat Chem Toksykol*. 2009;3:870-874.
161. Williams CA, Harborne JB, Geiger H, Hoult JR. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry* 1999;52:1181-1182.
162. Winkel-Shirley B Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology; *Plant Physiology* 2001;126:485-493.
163. Wolfender JL, Maillard M, Marston A, Hostettmann K. Mass spectrometry of underivatized naturally occurring glycosides. *Phytochem Analysis* 1992;3:193.
164. Wu ZY, Raven PH, Hong DY. *Flora of China*. Vol. 5 (*Ulmaceae through Basellaceae*). Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 2003.

-
165. Xizhi F, Suixu X, Mei D. Two novel flavonoids from *Ixeris sonchifolia*. J Chinese Pharm Sci. 2000;9(3):134-136.
166. Yamazaki K, Iwashina T, Kitajima J, Gamou Y, Yoshida A, Tannowa T. External and internal flavonoids from Madagascarian *Uncarina* species (*Pedaliaceae*). Biochem Syst Ecol. 2007;35:743-749.
167. Yoshida K, Kameda K, Kondo T. Diglucuronoflavones from purple leaves of *Perilla ocimoides*. Phytochemistry 1995;28:267-270.
168. Yoshizumi M, Tsuchija K, Suzaki Y, Kirima K, Kyaw M, Mon J-H, Terrao M, Tamaki T. Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. J Biophys Res Commun. 2002;293:1458-1465.
169. Zhang Z, Liu Y, Luo P, Zhang H. Separation and purification of two flavone glucuronides from *Erigeron multiradiatus* (Lindl.) Benth with macroporous resins. J Biomed Biotechnol. 2009; ID 875629, 8 pages.
170. Zhang LJ, Yeh SF, Yu YT, Kuo LMY, Kuo YH. Antioxidative flavonol glucuronides and - Anti-HBsAg flavonol from *Rotala rotundifolia*. J Trad Compl Med. 2011;1(1):57-63.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem **pracy doktorskiej pt.**

„Badania fitochemiczne ziela *Axyris amaranthoides* L.”

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia **naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**, a złożona przeze mnie płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej, a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko:

Paulina Znajdek-Awizeń

Data:

Podpis:

Poznań, dnia 24.03.2016 r.