

UNIwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Farmakognozji

Justyna Chanaj-Kaczmarek

**BADANIA FITOCHEMICZNE
ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH W ZIELU
ŻÓŁTLICY DROBNOKWIATOWEJ
(*GALINSOGA PARVIFLORA* CAV., ASTERACEAE)**

ROZPRAWA DOKTORSKA

zrealizowana w ramach grantu promotorskiego nr N N405 305136

finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki

PROMOTOR

prof. dr hab. n. farm. Irena Matławska

Poznań, 2013

POZNAN UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES
CHAIR AND DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY

JUSTYNA CHANAJ-KACZMAREK

**PHYTOCHEMICAL ANALYSIS
OF THE POLYPHENOLIC COMPOUNDS
FROM THE HERB OF GALLANT SOLDIER
(*GALINSOGA PARVIFLORA* CAV., ASTERACEAE)**

PHD THESIS

has been realized as a part of research project
supported by the National Science Centre (No. N N405 305136)

SUPERVISOR

Professor Irena Matławska

Poznań, 2013

Promotorowi mojej pracy

Pani prof. dr hab. n. farm. Irenie Matławskiej

składam serdecznie podziękowania za nieocenioną pomoc

i opiekę w realizacji projektu

Spis treści

Wstęp	11
Cel pracy	13
Część teoretyczna	14
1. Klasyfikacja taksonomiczna gatunku <i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	14
2. Charakterystyka botaniczna rodzaju <i>Galinsoga</i> Ruiz&Pav.	16
3. Charakterystyka botaniczna <i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	17
4. Związki chemiczne w rodzaju <i>Galinsoga</i> Ruiz&Pav.	18
5. Działanie <i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	22
6. Zastosowanie gatunków z rodzaju <i>Galinsoga</i> Ruiz&Pav.	23
Część doświadczalna	26
7. Metodyka badań	26
7.1. Izolacja i identyfikacja flawonoidów	26
7.1.1. Odczynniki i substancje wzorcowe	26
7.1.2. Aparatura	28
7.1.3. Metody chromatograficzne.....	28
7.1.3.1. Chromatografia planarna.....	29
7.1.3.1.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)	29
7.1.3.1.2. Chromatografia bibułowa (PC)	30
7.1.3.1.3. Preparatywna chromatografia bibułowa (PPC).....	30
7.1.3.2. Chromatografia kolumnowa	31
7.1.3.2.1. Chromatografia kolumnowa klasyczna (CC)	31
7.1.4. Analiza spektralna	32
7.1.4.1. Analiza w nadfiolecie (UV).....	32
7.1.4.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem mas (HPLC/UHPLC-DAD-ESI-MS)	32
7.1.4.3. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	33

7.1.5. Hydroliza kwasowa	34
7.1.6. Materiał do badań	34
7.2. Analiza kwasów fenolowych	35
7.2.1. Odczynniki i substancje wzorcowe	35
7.2.2. Aparatura i oprogramowanie	36
7.2.3. Metody chromatograficzne	36
7.2.3.1. Chromatografia cienkowarstwowa (2D-TLC)	36
7.2.3.2. Ultrasprawa chromatografia cieczowa (UPLC-PDA)	37
7.2.4. Przygotowanie wyciągów	38
7.2.4.1. Oznaczenie straty masy po suszeniu	38
7.2.4.2. Frakcja eteru dietylowego do analizy jakościowej (2D-TLC) ...	38
7.2.4.3. Wyciąg do określenia profilu kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA	38
7.3. Badania ilościowe	39
7.3.1. Odczynniki i substancje wzorcowe	39
7.3.2. Aparatura	40
7.3.3. Przygotowanie wyciągów	40
7.3.3.1. Wyciągi podstawowe	40
7.3.3.2. Wyciągi do oznaczeń ilościowych	41
7.4. Badania aktywności biologicznej	43
7.4.1. Odczynniki, bufor, pożywki, substancje i szczepy wzorcowe	43
7.4.2. Podłoża, żele	49
7.4.3. Aparatura i oprogramowanie	50
7.4.4. Przygotowanie wyciągów	50
7.5. Analiza statystyczna	52
8. Wyniki	55
8.1. Izolacja i identyfikacja flawonoidów	55
8.1.1. Izolacja związków flawonoidowych	55
8.1.1.1. Rozdział frakcji octanu etylu (OE) i frakcji wodnej (W)	56
8.1.1.1.1. Rozdział frakcji 52-75, 78-97, 102-172, 182-209	56
8.1.1.1.2. Rozdział frakcji 52-102	57
8.1.1.2. Oczyszczanie frakcji związków flawonoidowych	57
8.1.2. Identyfikacja związków flawonoidowych	59
8.1.2.1. Związek 1	59

8.1.2.2. Związek 2	62
8.1.2.3. Związek 3	67
8.1.2.4. Związek 4	72
8.1.2.5. Związek 5	77
8.1.2.6. Związek 6	83
8.1.2.7. Związek 7	89
8.1.2.8. Hydroliza kwasowa związków 2, 4, 6, 7	95
8.2. Analiza kwasów fenolowych	96
8.2.1. Analiza jakościowa (2D-TLC)	96
8.2.2. Określenie profilu kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA	96
8.2.2.1. Wykreślenie krzywych kalibracyjnych dla wzorcowych kwasów fenolowych	96
8.2.2.1.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych	96
8.2.2.1.2. Obliczenia parametrów krzywych kalibracyjnych	97
8.2.2.2. Walidacja metody	120
8.2.2.3. Określenie profilu kwasów fenolowych w wyciągu	122
8.2.2.3.1. Procedury SPE do oczyszczania wyciągu	122
8.2.2.3.2. Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych w wyciągu	125
8.3. Badania ilościowe	129
8.3.1. Oznaczanie zawartości sumy flawonoidów w przeliczeniu na kwercetynę	129
8.3.1.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowej kwercetyny	129
8.3.1.1.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych	129
8.3.1.1.2. Wykonanie oznaczenia	129
8.3.1.1.3. Obliczenie parametrów krzywej kalibracyjnej	130
8.3.1.2. Oznaczenie zawartości flawonoidów w wyciągach	132
8.3.2. Oznaczanie zawartości kwasów fenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy	134
8.3.2.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu kawowego	134
8.3.2.1.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych	134
8.3.2.1.2. Wykonanie oznaczenia	134

8.3.2.1.3.	Obliczenie parametrów krzywej kalibracyjnej	135
8.3.1.2.	Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych w wyciągach	136
8.3.3.	Oznaczanie sumy polifenoli z odczynnikiem <i>Folin-Ciocalteu</i> w przeliczeniu na kwas galusowy	138
8.3.3.1.	Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu galusowego	138
8.3.3.1.1.	Przygotowanie roztworów wzorcowych	138
8.3.3.1.2.	Wykonanie oznaczenia	139
8.3.3.1.3.	Obliczenie parametrów krzywej kalibracyjnej	139
8.3.3.2.	Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach	141
8.3.4.	Oznaczenie zawartości kwasu L(+)-askorbinowego	143
8.3.4.1.	Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu L(+)-askorbinowego	143
8.3.4.1.1.	Przygotowanie roztworów wzorcowych	143
8.3.4.1.2.	Wykonanie oznaczenia	143
8.3.4.1.3.	Obliczenie parametrów krzywej kalibracyjnej	144
8.3.4.2.	Oznaczenie zawartości kwasu L(+)-askorbinowego w wyciągu	145
8.3.5.	Oznaczenie zawartości pierwiastków za pomocą emisyjnej spektrometrii atomowej (ICP-OES)	146
8.4.	Badania aktywności biologicznej	147
8.4.1.	Aktywność antyoksydacyjna	147
8.4.1.1.	Badanie aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS	147
8.4.1.1.1.	Przygotowanie roztworu kationorodników ABTS ^{•+} ..	147
8.4.1.1.2.	Badanie aktywności antyoksydacyjnej substancji referencyjnych	147
8.4.1.1.2.1.	Przygotowanie roztworów wzorcowych	147
8.4.1.1.2.2.	Wykonanie oznaczenia	149
8.4.1.1.2.3.	Wyznaczanie wartości IC ₅₀	151
8.4.1.1.3.	Badanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów	160
8.4.1.2.	Badanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II)	163
8.4.1.2.1.	Badanie aktywności chelatującej substancji referencyjnych	163

8.4.1.2.1.1.	Przygotowanie roztworów wzorcowych ..	163
8.4.1.2.1.2.	Wykonanie oznaczenia	164
8.4.1.2.1.3.	Wyznaczanie wartości IC ₂₀ lub IC ₅₀	165
8.4.1.2.2.	Badanie aktywności chelatującej wyciągów	173
8.4.1.3.	Badanie aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pozbawionych genu <i>sod1</i> ..	176
8.4.1.3.1.	Materiał do badań	176
8.4.1.3.2.	Hodowla drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	176
8.4.1.3.3.	Testy przeżywalności	177
8.4.1.3.4.	Oznaczanie poziomu karbonylacji białek	180
8.4.1.3.4.1.	Uzyskanie ekstraktów komórkowych	180
8.4.1.3.4.2.	Pomiar stężenia białka metodą Bradford ...	180
8.4.1.3.4.3.	Przygotowanie ekstraktów komórkowych do elektroforezy	181
8.4.1.3.4.4.	Oznaczanie poziomu białek metodą Western blot	181
8.4.1.3.5.	Oznaczanie pomiaru zużycia tlenu przez komórki drożdży	182
8.4.2.	Aktywność przeciwzapalna	183
8.4.2.1.	Hodowla komórek HaCaT	183
8.4.2.2.	Badanie cytotoksyczności wyciągów metodą MTT	184
8.4.2.3.	Oznaczanie poziomu białek COX-2 i iNOS	185
8.4.2.4.	Oznaczanie poziomu PGE ₂	187
8.4.3.	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa i antymutagenna	189
8.4.3.1.	Wykonanie badania	189
8.4.3.2.	Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej i antymutagennej wyciągów	190
Dyskusja		192
Wnioski		229
Streszczenie		231
Summary		234
Spis tabel i rycin		237
Piśmiennictwo		251

Objaśnienia skrótów stosowanych w pracy

- ABTS-(NH₄)₂** - sól diamoniowa kwasu 2,2'-azyno-bis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego)
- OH** - rodnik hydroksylowy
- APS** - nadsiarczan amonu
- BHA** - butylohydroksyanizol
- BSA** - albumina surowicy wołu
- DMEM** - pożywka Dulbecco zmodyfikowana przez Eagle'a (ang. *Dulbecco's modified Eagle medium*)
- DMSO** - dimetylosulfotlenek
- DNPH** - 2,4-dinitrofenylohydrazyna
- ECL** - wzmacniona chemiluminescencja
- EDTA** - kwas wersenowy (kwas etylenodinitrylotetraoctowy)
- EGTA** - kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'-tetraoctowy
- FBS** - płodowa surowica bydlęca
- FCCP** - fenylohydrazon trójfluorometoksykarbonylo-cyjanku
- GHP** - membrana z hydrofilowego polipropylenu
- HaCaT** - immortalizowane prawidłowe ludzkie keratynocyty
- HLB** - równowaga hydrofilowo-lipofilowa
- IL-1** - interleukina 1
- IL-6** - interleukina 6
- MAX** - złożone o mieszanym działaniu wymiennicza anionowego i hydrofobowym
- MTT** - bromek (3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenyltetrazolu)
- Na₂EDTA·2H₂O** - wersenian disodowy dwuwodny
- Na₂S₂O₄** - podsiarczyn sodu
- O₂^{·-}** - anionorodnik ponadtlenkowy

- PBS** - zbuforowany fizjologiczny roztwór soli o pH 6,9
- PMSF** - fluorek fenylometylosulfonylu
- SDS** - dodecylosiarczan sodu
- sod1* - gen Cu/Zn zależnej nadtlenkowej dysmutazy SOD1
- TBT** - tributyllocyna
- TCA** - kwas trójchlorooctowy
- TEMED** - N,N,N',N' tetrametylenodiamina
- TNF α** - czynnik martwicy nowotworu
- TRIS** - tris(hydroksymetylo)-aminometan

Wstęp

Rośliny są niezwykle ważne w życiu człowieka. Wykorzystywane są nie tylko jako pożywienie, dostarczające składników odżywczych i witamin, ale także w lecznictwie. Zakres stosowania roślin w leczeniu różnych dolegliwości, potwierdzony jest wieloletnim doświadczeniem i tradycją przekazywaną z pokolenia na pokolenie. Narastające problemy z nadużywaniem oraz skutkami ubocznymi leków syntetycznych przyczyniły się do tego, iż pierwsza dekada XXI wieku stała się okresem powrotu do intensywnych badań nad zastosowaniem związków pochodzenia roślinnego lub ich wyciągów w profilaktyce i terapii wielu chorób. Ostatnio zwraca się szczególnie uwagę na związki polifenolowe, o silnych właściwościach antyoksydacyjnych, zmiatających wolne rodniki, które mogą być przyczyną zmian degeneracyjnych w organizmie człowieka.

Przykładami związków czynnych, wyizolowanych z roślin, mogą być kwas askorbinowy, kwas salicylowy lub alkaloid diterpenowy paklitaksel, wykorzystywany obecnie w leczeniu nowotworów. Związki naturalne są także często modelowymi strukturami do produkcji syntetycznych, jak i półsyntetycznych pochodnych, które charakteryzują się większą skutecznością i lepszym wchłanianiem np. trokserutyna, pochodna naturalnej rutyny, oraz słabszymi efektami ubocznymi, np. etopozyd, półsyntetyczna pochodna podofilotoksyny. Zaletą leku opartego o wyciągi z surowców roślinnych są występujące w nich substancje czynne, które znajdują się w biologicznej równowadze, a ich wzajemne oddziaływanie zwiększa wchłanianie, biodostępność, a tym samym lepszą aktywność biologiczną. Działanie lecznicze surowców roślinnych jest łagodne i w dawkach zalecanych nie wywołuje najczęściej działań niepożądanych.

Aktualnie coraz większą uwagę zwraca się na standaryzację surowców roślinnych i wyciągów z nich otrzymanych. Odpowiednia zawartość związków czynnych decyduje o skuteczności danego surowca i powtarzalnej aktywności otrzymanego na jego bazie leku. W latach 70-tych dokonano przeglądu najczęściej wykorzystywanych surowców w lecznictwie, a wynikiem działania Komisji E, było opracowanie monografii surowców

(pozytywnych, zerowych i negatywnych), opisujące ich działanie, zastosowanie oraz dawkowanie. Obecnie rozpoczęte prace kontynuuje EMEA, a zespoły naukowe w różnych krajach przygotowują monografie surowców, klasyfikując je do tradycyjnych lub dobrze udokumentowanych, dla których są dostępne badania naukowe, dotyczące zarówno składu jak i aktywności biologicznej.

Istnieje również konieczność opracowywania nowych monografii, aktualnie zapomnianych gatunków lub stosowanych jedynie w medycynie ludowej. Przykładem takiej rośliny może być żótlca drobnokwiatowa (*Galinsoga parviflora* Cav.), która stosowana była leczniczo zarówno zewnątrznie, jak i wewnątrznie, a także w celach spożywczych, co świadczy o braku jej toksyczności. Na podstawie analizy dostępnego piśmiennictwa stwierdzono, że skład chemiczny tego gatunku nie jest dostatecznie poznany, a dane literaturowe dotyczące obecności flawonoidów są niejednoznaczne. Przykładem może być 7-O- β -D-glukopiranozyd apigeniny, który w latach 70-tych został wyodrębniony z rośliny, natomiast jego obecności w wyciągu nie potwierdzono 40 lat później metodą HPLC.

Cel pracy

Celem pracy była analiza składu chemicznego ziela żółtlicy drobnokwiatowej, jak również badania aktywności biologicznej wyciągów z surowca.

Cel pracy realizowano przez wykonanie następujących badań szczegółowych:

- izolację związków flawonoidowych z wykorzystaniem metod chromatograficznych
- określenie struktury wyodrębnionych flawonoidów metodami chemicznymi (hydroliza kwasowa, analiza produktów hydrolizy) oraz spektralnymi (UV, HPLC/UHPLC-DAD-ESI-MS, ^1H i ^{13}C NMR)
- określenie profilu kwasów fenolowych metodą chromatograficzną (2D-TLC) oraz UPLC-PDA
- oznaczenie zawartości związków fenolowych (flawonoidów, kwasów fenolowych, sumy polifenoli) oraz kwasu L(+)-askorbinowego metodami kolorymetrycznymi w różnych wyciągach z surowca
- oznaczenie zawartości pierwiastków techniką ICP-OES w wysuszonym ziele żółtlicy drobnokwiatowej
- badanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów z surowca metodami chemicznymi (metoda ABTS, oznaczanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II)) oraz z wykorzystaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, pozbawionych genu *sod1*
- badanie aktywności przeciwzapalnej ziela żółtlicy drobnokwiatowej poprzez ocenę wpływu nalewki na poziom białek COX-2 i iNOS oraz poziom PGE₂
- badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągów z surowca z użyciem szczepów wzorcowych bakterii i grzybów chorobotwórczych.
- badanie aktywności antymutagennej nalewki z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (test Ames'a).

Część teoretyczna

1. KLASYFIKACJA TAKSONOMICZNA GATUNKU *GALINSOGA PARVIFLORA* CAV.

Królestwo: *Eucaryota* - Jądrowe

Podkrólestwo: *Phytobionta = Plantae* - Rośliny

Gromada: *Spermatophyta* - Rośliny nasienne

Podgromada: *Angiospermae (Magnoliophytina)* - Okrytonasienne (Okrytozalążkowe)

Klasa: *Dicotyledoneae (Dicotyledones)* - Dwuliścienne

Podklasa: *Asteridae (Sympetale, Tetracyclidae)* - Astrowcowe

Nadrząd: *Asteranae* - Astrowe

Rząd: *Asterales (Compositae)* - Astrowce

Rodzina: *Asteraceae (Compositae p.p)* - Astrowate (Złożone)

Podrodzina: *Tubiflorae* - Rurkowe

p.p - *pro parte* - po części

(Pałczyński i wsp., 1994).

Królestwo: *Eucaryota* - Jądrowe
Podkrólestwo: *Phytobionta* - Rośliny
Gromada: *Telomophyta (Embryophyta)* - Rośliny telomowe (osiowe)
Podgromada: *Magnoliophytina (Angiospermae)* - Okrytonasienne
Klasa: *Magnoliopsida (Dicotyledones)* - Dwuliścienne
Podklasa: *Asteridae* - Astrowcowe
Nadrząd: *Asteranae* - Astrowe
Rząd: *Asterales (Compositae)* - Astrowce
Rodzina: *Asteraceae (Compositae)* - Astrowate (Złożone)
(Szweykowski 1995).

Królestwo: *Plantae* - Rośliny
Podkrólestwo: *Tracheobionta* - Rośliny naczyniowe
Gromada: *Spermatophyta* - Rośliny nasienne
Podgromada: *Magnoliophyta* - Rośliny okrytonasienne
Klasa: *Magnoliopsida* - Dwuliścienne
Podklasa: *Asteridae*
Rząd: *Asterales*
Rodzina: *Asteraceae* - Astrowate
Rodzaj: *Galinsoga* Ruiz & Pav. - Żółtlica
Gatunek: *Galinsoga parviflora* Cav. - Żółtlica drobnokwiatowa
(www.plants.usda.gov).

2. CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA RODZAJU *GALINSOGA* RUIZ & PAV.

Synonimy łacińskie: *Wiborgia* Roth., *Adventina* Raf. (Sell i Murrell 2006)

Nazwa *Galinsoga* pochodzi od nazwiska hiszpańskiego botanika i lekarza z XVIII wieku Don Mariano Martinez de Galinsoga (Gledhill 2008).

Według dostępnej literatury rodzaj *Galinsoga* Ruiz & Pav. liczy od 3 do 13 gatunków, pochodzących z Centralnej i Południowej Ameryki (Abrams i Ferris, 1960; Tzvelev, 2002; Bohm i Stuessy, 2001; Ferheen i wsp., 2009). Dwa z nich, *Galinsoga parviflora* Cav. (żółtlica drobnokwiatowa) oraz *Galinsoga quadriradiata* Ruiz et Pav. (*Galinsoga ciliata* (Raf.) Blake, żółtlica owłosiona), rozprzestrzeniły się dzięki działalności człowieka na całym świecie, stając się uciążliwymi chwastami. Gatunki te różnią się stopniem owłosienia oraz wielkością brzeźnych kwiatów w koszyczkach (Mowszowicz, 1977; Peterson, 1977).



Rycina 1. Różnice morfologiczne między żółtlicą drobnokwiatową (A) i żółtlicą owłosioną (B).

Gatunki z rodzaju *Galinsoga* Ruiz & Pav. są roślinami zielnymi, rozgałęzionymi i ulistnionymi naprzeciwległe (Pawłowski i Jasiewicz, 1971; Sell i Murrell, 2006). **Liście** mają wiotkie, kształtu jajowatego lub lancetowatego, na brzegach ząbkowane lub całobrzegie, z nerwicą u nasady trójdzielną, przeważnie ogonkowe (Peterson, 1977; Sell i Murrell, 2006). **Kwiaty** małe, zebrane w wierzchotkowate kwiatostany (Tutin, 1976). Dno koszyczka stożkowate (Tutin, 1976; Pawłowski i Jasiewicz, 1971). Zewnętrzne kwiaty jęczyczkowate nieliczne (najczęściej jest ich od 4-5), słupkowe, o koronie zakończonej 3 szerokimi ząbkami, barwy białej, rzadziej czerwone lub purpurowe (Gleason, 1952; Peterson, 1977; Sell i Murrell, 2006). Wewnętrzne kwiaty rurkowate o koronie 5-cio ząbkowanej, liczniejsze od jęczyczkowatych, barwy żółtej (Sell i Murrell, 2006). **Owocem** jest jednostronnie spłaszczona niełupka, opatrzona na szczycie wieńcem włosków (Gleason, 1952; Tutin, 1976; Sell i Murrell, 2006).

3. CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA *GALINSOGA PARVIFLORA* CAV.

Synonimy łacinskie: *Adventina parviflora* Raf., *Galinsoga hirsuta* Baker, *Galinsoga quiqueradiata* Ruiz & Pav., *Galinsoga semicalva* (Gray) St. John & White, *Stemmatella sodiroi* Hieron, *Wiborgia acmella* Roth., *Wiborgia parviflora* (Cav.) Kunth (DiTomaso i Healy, 2007; Sell i Murrell, 2006)

Nazwy angielskie: smallflower galinsoga, gallant soldier, quickweed (DiTomaso i Healy, 2007)

Nazwy polskie: żółtlca drobnokwiatowa, chwastnica żółta (Senderski, 2009)

Galinsoga parviflora Cav. pochodzi z rejonów Andów, głównie z Peru, skąd w 1794 roku kilka egzemplarzy zostało przywiezionych do ogrodów botanicznych Madrytu i Paryża (Podbielkowski, 1995; Szweykowski, 1993; Castri i wsp., 1990). Z czasem pojawiła się jako roślina zdicząła na innych siedliskach. W Polsce zaobserwowano ją po raz pierwszy w 1807 roku na północy kraju, a w 1859 roku w Krakowie (Podbielkowski, 1995). Obecnie jest rośliną występującą kosmopolitycznie. Jej siedliska to przydroża, nieużytki, ogrody i pola uprawne (Strzelecka i Kowalski, 2000; Thomas i Dykeman, 1990).

Według klasyfikacji historyczno-geograficznej żółtlca drobnokwiatowa zaliczana jest do kenofitów, czyli gatunków zadomowionych po 1500 roku oraz epekofitów, czyli roślin występujących na siedliskach ruderalnych i segetalnych (Kuszevska, 2007).



Jest to roślina jednoroczna, dorastająca do 70 cm wysokości (Strzelecka i Kowalski, 2000; Senderski, 2009; Thomas i Dykeman, 1990). **Łodyga** jest wzniesiona, rozgałęziona, naga lub słabo owłosiona (Krzyściak-Kosińska i Kosiński, 2007; Sell i Murrell, 2006). **Liście** naprzeciwległe, 2,5-8 cm długie, 1,2-4 cm szerokie, dolne są ogonkowe, jajowate, o szczycie zaokrąglonym i brzegu ząbkowanym, spodem na nerwach z rzadka owłosione (Mowszowicz, 1977; Krzyściak-Kosińska i Kosiński, 2007; Senderski, 2009; Thomas i Dykeman, 1990; Broda i Mowszowicz, 2000),

Rycina 2. *Galinsoga parviflora* Cav.

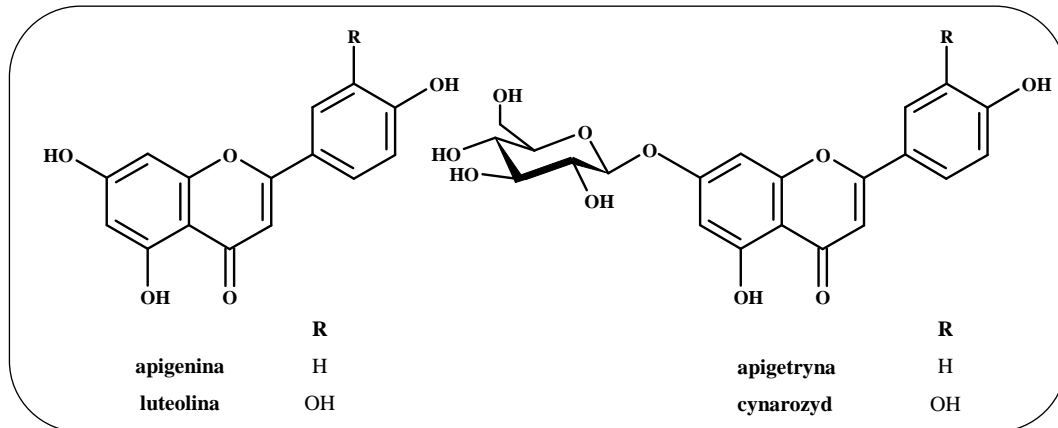
górne podłużnie lancetowate, zazwyczaj bezogonkowe (Strzelecka i Kowalski, 2000; Mowszowicz, 1977). Z kątów liści wyrastają liczne, drobne, długoszypułkowe koszyczki, zebrane w trójdzielne baldachogrona. Plewinki na dnie koszyczka na szczycie 3-dzielne (Broda i Mowszowicz, 2000). **Kwiaty** zewnętrzne języczkowate, białe, rzadziej fioletowe lub fioletowo-czerwone, krótkie, zwykle jest ich 5; kwiaty wewnętrzne rurkowate, żółte (Strzelecka i Kowalski, 2000; DiTomaso i Healy, 2007; Szweykowski, 1993). Kwiaty po przekwitnięciu wiążą się w **owoce** typu niełupki, 1-1,5 mm długie, 4-kanciaste, drobno owłosione, opatrzone włoskami puchu kielichowego (DiTomaso i Healy, 2007).

Żółtlica drobnokwiatowa kwitnie od maja do października. Dojrzałe nasiona pojawiają się w około 14-go dnia po zakwitnięciu rośliny. Jedna roślina może wyprodukować do 7500 nasion rocznie (DiTomaso i Healy, 2007).

4. ZWIĄZKI CHEMICZNE W RODZAJU *GALINSOGA* RUIZ & PAV.

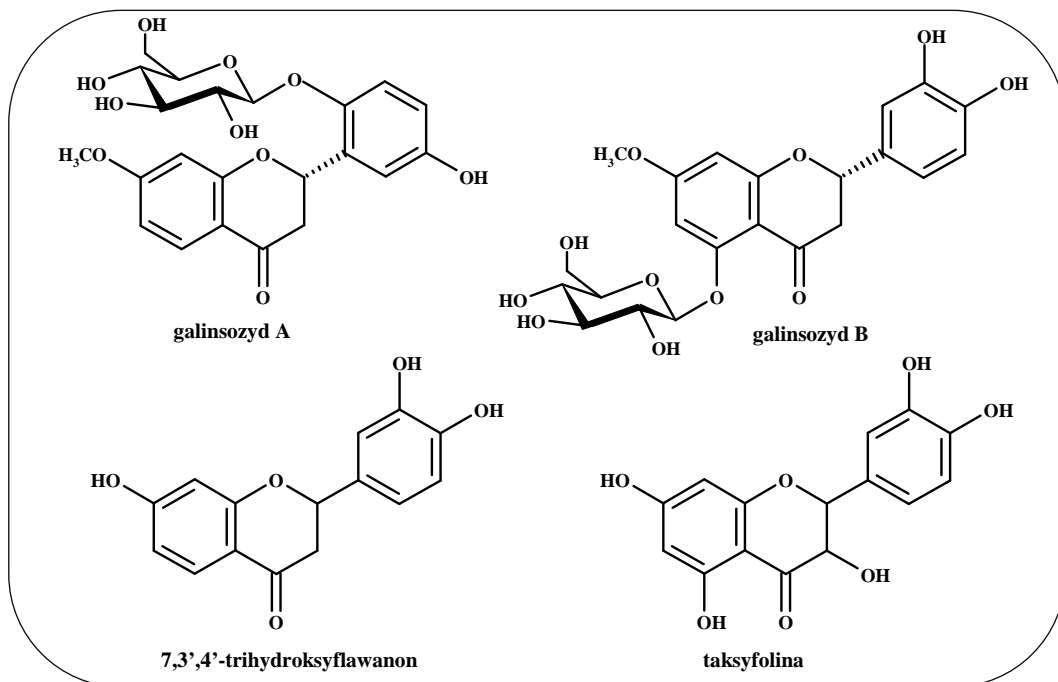
Dotychczasowe badania fitochemiczne dotyczą tylko dwóch gatunków z rodzaju *Galinsoga* Ruiz & Pav.: *Galinsoga parviflora* Cav. oraz *Galinsoga quadriradiata* Ruiz et Pav.

Skład ziela żółtlicy drobnokwiatowej (*Galinsogae herba*) jest słabo poznany. Na podstawie dostępnej literatury wiadomo, iż surowiec zawiera bliżej niezbadane związki saponinowe i śluzowe (Mowszowicz i Broda 1996; Strzelecka i Kowalski 2000; Kosiński, 2008; Senderski, 2009). Niektórzy autorzy donoszą również o obecności w ziele żółtlicy drobnokwiatowej tanin (Ramesar i wsp., 2008) oraz około 16% protein (Sarwa, 2001; Bańkowski i Kuźniewski, 1980). W drugiej połowie lat 70-tych z ziela żółtlicy drobnokwiatowej wyizolowano i zidentyfikowano (UV, analiza produktów hydrolizy) dwa aglikony flawonowe: apigeninę i luteolinę oraz ich glukozydy: 7-*O*- β -D-glukopiranyd apigeniny (apigetryna) oraz 7-*O*- β -D-glukopiranozyd luteoliny (cynarozyd) (Plekhanova i wsp., 1977).



Rycina 3. Struktura chemiczna flawonów wyizolowanych ziela żółtlicy drobnokwiatowej.

W 2009 roku wyizolowano i zidentyfikowano na podstawie wyników analiz spektralnych (MS, ^1H i ^{13}C NMR) cztery związki flawonoidowe (flawanony): 2'-*O*- β -D-glukopiranozyd (2*S*)-5'-hydroksy-7-metoksyflawanon (galinsozyd A), 5'-*O*- β -D-glukopiranozyd (2*S*)-3',4'-dihydroksy-7-metoksyflawanon (galinsozyd B), 7,3',4'-trihydroksyflawanon i 3,5,7,3',4'-pentahydroksyflawanon (taksyfolina) (Ferheen i wsp., 2009).

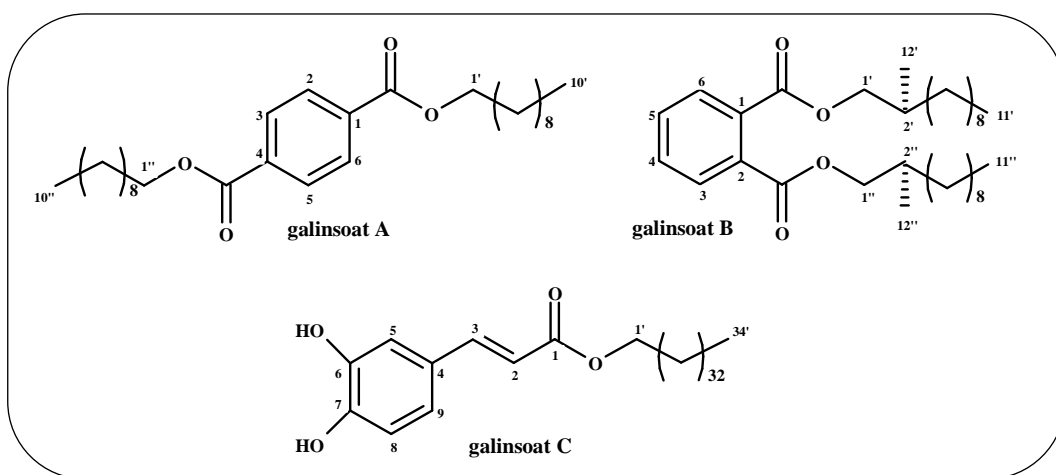


Rycina 4. Struktura chemiczna flawanonów wyizolowanych z ziela żółtlicy drobnokwiatowej.

Metodą HPLC w wyciągach metanolowo-wodnych z ziela żółtlicy drobnokwiatowej stwierdzono obecność trzech flawonoli: 7-*O*- β -glukopiranozydu kwercetyny (kwercymetryna), 3-*O*- β -glukopiranozydu kwercetyny (izokwercytryna), 7-*O*- β -glukopiranozydu 6-hydroksykwercetyny (kwercetagetryna) oraz pochodnych kwasu

kawowego. Nie potwierdzono natomiast obecności apigetryny i 7-*O*- β -glukopiranozydu 6-metoksykwercetyny (patulitryna) (Bazyłko i wsp., 2012).

Ponadto w ziele *Galinsoga parviflora* Cav. stwierdzono występowanie estrów aromatycznych: tereftalanu didecyłu (galinsoat A), ftalanu bis(2',2''-metylundecylu) (galinsoat B) i 6,7-dihydroksycynamonianu tetratriakontanyłu (galinsoat C) (Afza i wsp., 2012); kwasów fenolowych: galusowego, *p*-hydroksybenzoesowego, protokatechowego (Tariq i wsp., 2008), chlorogenowego (Ranilla i wsp., 2010), kawowego (Plekhanova i wsp., 1977), jak również kwasu ursolowego, β -sitosterolu i jego 3-*O*- β -D-glukopiranozydu (Tariq i wsp., 2008).



Rycina 5. Struktura chemiczna estrów aromatycznych obecnych w ziele żółtlicy drobnokwiatowej.

W olejku eterycznym z liści żółtlicy drobnokwiatowej stwierdzono obecność 88 związków, przy czym dominowały: (*Z*)-3-heksen-1-ol (21,7%), β -kariofilen (12,4) i 6-demetoksy-ageratochromen (14,0%), tlenek kariofilenu i α -kadinol (po 3,1%), (*E*)-falkarinol (2,9%), (*E*)-2-heksenal (2,7%), β -bisabolen (2,5%), fitol i skwalen (po 2,4%), α -humulen (1,8%) oraz (*E*)- β -farnezen (1,6%) (Pino i wsp., 2010).

W ziele żółtlicy drobnokwiatowej stwierdzono także obecność związków mineralnych (mg/100 g wysuszonego surowca): wapnia (162 mg), fosforu (38 mg), sodu (36 mg), manganu (44 mg), miedzi (3 mg), cynku (14 mg), magnezu (681 mg), żelaza (27 mg) (Odhav i wsp., 2007) oraz witamin: tiaminy, ryboflawiny, niacyny, kwasu askorbinowego i karotenu (Grubben i Denton, 2004).

Tylko trzy prace naukowe dotyczą badań fitochemicznych drugiego gatunku z rodzaju *Galinsoga* Ruiz & Pav. - żółtlicy owłosionej. W liściach i kwitnących szczytach pędów tego gatunku, stwierdzono dostępnymi wówczas metodami (UV, ¹H NMR) obecność związków flawonoidowych: 7-*O*-β-glukopiranozydu centaureidyny (centaureina), izokwercytryny, patulitryny, kwercymetryny oraz kwercetagetryny (Szepczyńska i Wolbiś, 1984). Występowanie tych flawonoidów w wyciągu metanolowo-wodnym z ziela żółtlicy owłosionej, z wyjątkiem niebadanej centareuiny, oraz obecność apigetryny zostało potwierdzone metodą HPLC (Bazyłko i wsp., 2012). Analizy na obecność kwasów fenolowych i kumaryn ograniczone są do badań chromatograficznych (TLC) i reakcji barwnych z odpowiednimi odczynnikami, w wyniku których stwierdzono obecność dwóch aglikonów kumaryn: skopoletyny, eskuletyny oraz jedenastu kwasów fenolowych, z których 8 zidentyfikowano jako: kwas ferulowy, wanilinowy, izowanilinowy, syringowy, *p*-hydroksybenzoesowy, *p*-kumarowy, protokatechowy i kawowy (Szepczyńska i Wolbiś, 1984). Ponadto oznaczono zawartość retinolu (1,51 mg), kwasu askorbinowego (13,88 mg) i żelaza (5,72 mg) w 100 g świeżego ziela (Bautista-Cruz i wsp., 2011).

Tabela 1. Porównanie obecności flawonów i flawonoli w gatunkach z rodzaju *Galinsoga* Ruiz & Pav. (dane literaturowe)

Flawonoid	Żółtlica drobnokwiatowa	Żółtlica owłosiona
apigenina	+	bd
apigetryna	+ / - *	+
luteolina	+	bd
cynarozyd	+	bd
centaureina	bd	+
izokwercytryna	+	+
kwercymetryna	+	+
kwercetagetryna	+	+
patulitryna	-	+

bd - brak danych, * + Plekhanova i wsp. (1977), - Bazyłko i wsp. (2012).

5. DZIAŁANIE *GALINSOGA PARVIFLORA* CAV.

Wyciągi heksanowe i metanolowe z ziela żółtlicy drobnokwiatowej działają przeciwzapalnie i przyspieszają gojenie się ran. Udowodniono ich wpływ na inicjowanie fazy ziarninowania, poprzez wzrost migracji i proliferacji fibroblastów w miejscu zranienia. Etap ten odgrywa kluczową rolę w procesie gojenia rany, ponieważ fibroblasty odpowiedzialne są za produkcję włókien kolagenowych, fibronektyny, kwasu hialuronowego oraz obkurczanie i zbliżanie się brzegów rany do siebie (Schmidt i wsp., 2009). Wyciąg metanolowy hamuje również aktywność cyklooksygenazy (COX-1) (Matu i van Staden, 2003) i lipooksygenazy (5-LOX) (Akula i Odhav, 2008), hamując kaskadę przemian kwasu arachidonowego oraz wykazuje słabą zdolność zmniejszania aktywacji jądrowego czynnika transkrypcji (NF-κB), odpowiedzialnego za transkrypcję genów dla mediatorów stanu zapalnego (Schmidt i wsp., 2009). Ponadto zapaleniu zazwyczaj towarzyszy zwiększone wydzielanie wolnych rodników, które wpływają na utrzymanie się i rozwój stanu zapalnego. W badaniach nad aktywnością wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej udowodniono ich działanie antyoksydacyjne. Wykazano, że hamują utlenianie kwasu linolowego oraz zmiatają rodnik nadtlenowy i syntetyczny rodnik DPPH[•] (Akula i Odhav, 2008; Ranilla i wsp., 2010; Bazyłko i wsp., 2012).

Ziele żółtlicy drobnokwiatowej działa przeciwbakteryjnie, co może mieć istotny wpływ na szybkość gojenia się ran. Wstępne badanie aktywności przeciwbakteryjnej świeżego soku z ziela żółtlicy drobnokwiatowej przeprowadzono we współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Uzyskane wyniki wskazują, iż działa on zarówno bakteriostatycznie (MIC=0,03 mg/ml), jak i bakteriobójczo (MBC=0,06 mg/ml) w stosunku do dwóch badanych szczepów: *Micrococcus luteus* oraz *Bacillus subtilis* (Matławska i wsp., 2004). Podobne badania zostały przeprowadzone w 2005 roku w Afryce Południowej, w których potwierdzone zostało działanie przeciwbakteryjne wyciągu heksanowego w stosunku do *M. luteus* i *B. subtilis* oraz wykazano aktywność wobec niezbadanego przez nas *Staphylococcus aureus* (Matu i van-Staden, 2003). Ponadto frakcja olejku eterycznego działała na *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* (Pino i wsp., 2010). Wykazano także działanie przeciwwirusowe wyciągu metanolowego wobec wirusa opryszczki typu 1 i 2 (IC₅₀ HSV-1=400 μg/ml, IC₅₀ HSV-2=500 μg/ml) (Simões i wsp., 1999).

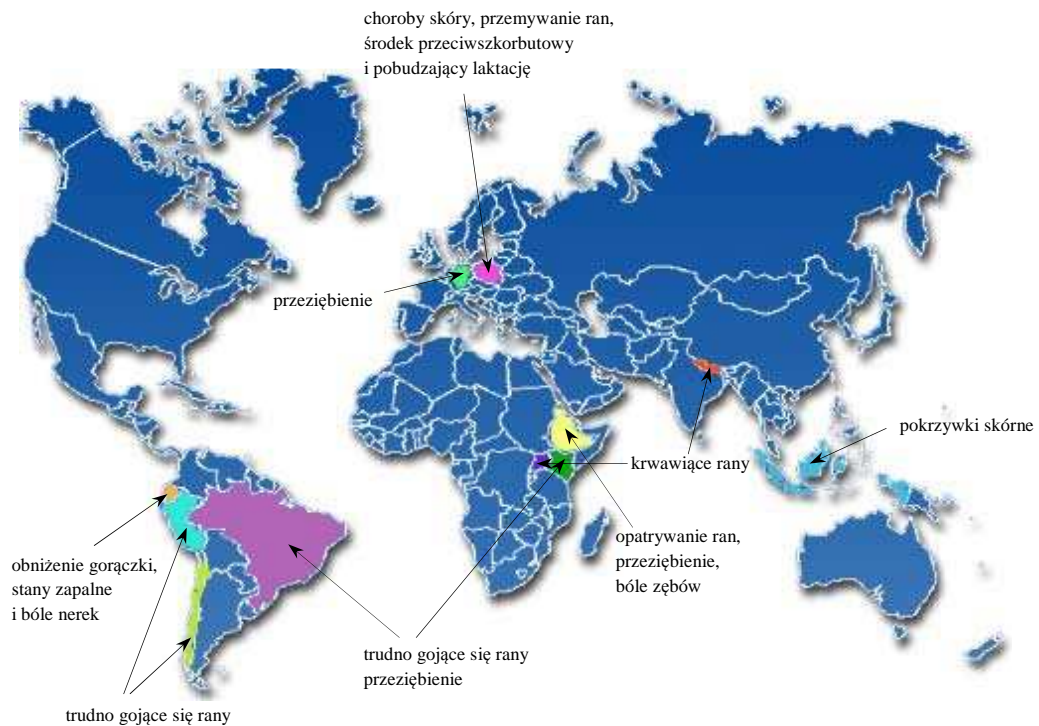
W badaniach nad aktywnością związków wyodrębnionych z ziela żótlicy drobnokwiatowej, udowodniono zdolność do hamowania α -glukozydazy przez galinsoat B oraz ureazy przez galinsoat A (Ferheen i wsp., 2009). W wyniku hamowania działania α -glukozydazy zablockowane jest trawienia cukrów złożonych do prostych, w następstwie czego zmniejsza się przyrost poposiłkowej glikemii. Jest to szczególnie istotne dla osób chorych na cukrzycę typu 2, ponieważ naturalne inhibitory w diecie mogą być skuteczną terapią zarządzania poposiłkową hiperglikemią przy braku skutków ubocznych, w przeciwieństwie do leków syntetycznych.

Dyskusyjne jest hamowanie enzymu konwertazy angiotensyny (ACE) przez wyciągi z ziela żótlicy drobnokwiatowej. ACE jest enzymem katalizującym przemianę angiotensyny I do aktywnej angiotensyny II, odpowiedzialnej za wzrost ciśnienia krwi. Badania Ramesar i wsp. (2008) wykazały, że wyciąg metanolowy z surowca hamował ACE, co nie zostało potwierdzone w badaniach przeprowadzonych przez Ranilla i wsp. (2010).

6. ZASTOSOWANIE GATUNKÓW Z RODZAJU *GALINSOGA* RUIZ & PAV.

Żótlica drobnokwiatowa wykorzystywana jest w medycynie ludowej. W Chile i Peru wyciągi z ziela wykorzystywano do leczenia trudno gojących się ran, w Indonezji w pokrzywkach skórnych, a we wschodniej Afryce w przeziębieniach (Hoppe, 1987). W latach siedemdziesiątych na terenie Niemiec dr M. Stübler stosował z powodzeniem nalewkę z ziela żótlicy drobnokwiatowej przy grypowych infekcjach u dzieci (Wolter, 1983). Także do dnia dzisiejszego w Kenii i Brazylii stosowana jest w trudno gojących się ranach oraz przeziębieniach (Matu i van-Staden, 2003; Fenner i wsp., 2006; Agra i wsp., 2007; de Albuquerque i wsp., 2007, Agra i wsp., 2008), natomiast na obszarze Ekwadoru w celu obniżenia gorączki, stanach zapalnych i bólach nerek (Tene i wsp., 2007). W Etiopii ekstrakt ze świeżego ziela stosowany jest do opatrywania ran, odwar ze zmiażdżonych owoców w przeziębieniu, a roztarte nasiona zmieszane z wodą w bólach zębów (Getahun, 1976; Yineger i wsp., 2008). W Ugandzie i Nepalu świeże, zmiażdżone liście i sok wykorzystywane są na krwawiące rany (Hamill i wsp., 2000; Manandhar i Manandhar, 2002).

W Polsce w lecznictwie ludowym żótlca drobnokwiatowa zewnętrznie stosowana jest w postaci okładów ze świeżego, zmiażdżonego ziela w chorobach skóry (wyprysk, liszaj, egzema) oraz w postaci naparu do przemywania ran (Bańkowski i Serwatka, 1977; Bańkowski i Kuźniewski, 1980; Broda i Mowszowicz, 2000; Strzelecka i Kowalski, 2000; Senderski, 2009; Kosińscy, 2008). Istnieją przypadki wyleczenia przewlekłych egzem trwających nawet kilkanaście lat, a wyleczenie w przeważającej liczbie przypadków uzyskiwano w ciągu 10-12 dni (Wierzbicki, 1993). Napar z wysuszonego ziela stosowany wewnętrznie stanowi środek przeciwszkorbutowy i pobudzający laktację (Bańkowski i Serwatka, 1977; Bańkowski i Kuźniewski, 1980; Sarwa, 2001).



Rycina 6. Zastosowanie żótlcy drobnokwiatowej na świecie.

W homeopatii stosowana jest nalewka pierwotna z ziela żótlcy drobnokwiatowej, o potencji homeopatycznej D1 (1:10), w bólach głowy, stawów, w duszności oraz jako środek przeciwgorączkowy i przeciwszkorbutowy (Varma i Vaid, 2002; Julian, 2003).

Żółtlica drobnokwiatowa jest rośliną jadalną, dodawaną czasami do zup i sałatek (Bańkowski i Serwatka, 1977). W Kolumbii wysuszone liście są ważną przyprawą zupy ziemniaczanej „*ajiacó*” (Pino i wsp., 2010), a w Azji Południowo-Zachodniej spożywane są jako warzywo. Wartość kaloryczna 100 g świeżych liści wynosi 41 kcal i zawiera 4 g białek, 0,5 g tłuszczu, 1,24 g błonnika oraz 5,29 g węglowodanów (Odhav i wsp., 2007).

W Etiopii świeże liście żółtlicy owłosionej są stosowane w postaci okładów w ukąszeniach przez węże (Giday i wsp., 2009).

Część doświadczalna

7. METODYKA BADAŃ

7.1. Izolacja i identyfikacja flawonoidów

7.1.1. Odczynniki i substancje wzorcowe

Do badań izolacyjnych i identyfikacyjnych stosowano odczynniki czyste (cz.), czyste do analizy (cz.d.a.) i o czystości gradientowej:

– aceton cz.d.a. (Me ₂ CO)	POCH ¹
– chlorek glinu (AlCl ₃)	Sigma-Aldrich ²
– chloroform cz.d.a. (CHCl ₃)	POCH
– dichlorometan cz. (CH ₂ Cl ₂)	POCH
– eter dietylowy cz.d.a. (Et ₂ O)	POCH
– kwas borowy (H ₃ BO ₃)	POCH
– kwas mrówkowy 85% cz. (HCO ₂ H)	POCH
– kwas octowy lodowaty 99,5% cz.d.a. (HOAc)	POCH
– kwas solny 36% cz.d.a. (HCl)	POCH
– metaliczny sód (Na)	POCH
– metanol cz.d.a. (MeOH)	POCH
– Naturstoffreagenz A (NA)	Roth ³
– n-butanol cz.d.a. (<i>n</i> -BuOH)	POCH
– n-heksan cz.d.a.	Merck ⁴
– n-propanol cz.d.a. (<i>n</i> -PrOH)	POCH

¹ POCH - Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice, Polska

² Sigma - Aldrich - St. Louis, Stany Zjednoczone

³ Roth - Carl Roth GmbH + Co. KG - Karlsruhe, Niemcy

⁴ Merck - Darmstadt, Niemcy

- 2-propanol cz.d.a. (*izo*-PrOH) POCH
- octan etylu cz.d.a. (EtOAc) POCH
- octan sodu (NaOAc) Sigma-Aldrich
- toluen cz.d.a. POCH
- woda dejonizowana (H₂O) Poznańskie Zakłady
Zielarskie Herbapol⁵
- woda do HPLC Baker⁶
- acetonitryl do HPLC (ACN) Merck
- kwas mrówkowy 99+% POCH.

Substancje wzorcowe:

- aglikony flawonoidowe:
 - kemferol⁷
 - kwercetyna dwuwodna (nr serii 288213490) Fluka²
 - apigenina⁷
 - luteolina⁷
- glikozydy flawonoidowe:
 - 7-*O*- β -glukozyd kwercetyny⁷
 - 3-*O*- β -glukozyd kwercetyny⁷
 - 3-*O*- β -rutynozyd kwercetyny (rutyna, nr serii 20829) Riedel-de Haën⁸
 - 3-*O*- β -glukozyd kemferolu⁷
 - 3-*O*- β -rutynozyd kemferolu⁷
 - 7-*O*- β -glukozyd kwercetagetyny⁹
- cukry:
 - arabinoza Merck
 - galaktoza Merck
 - glukoza Merck
 - ksyloza Merck
 - ramnoza Merck.

⁵ Poznańskie Zakłady Zielarskie Herbapol - Poznań, Polska

⁶ JT Baker Chemical Company - New Jersey, Stany Zjednoczone

⁷ z kolekcji Katedry i Zakładu Farmakognozji UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

⁸ Riedel-de Haën - Seelze, Niemcy

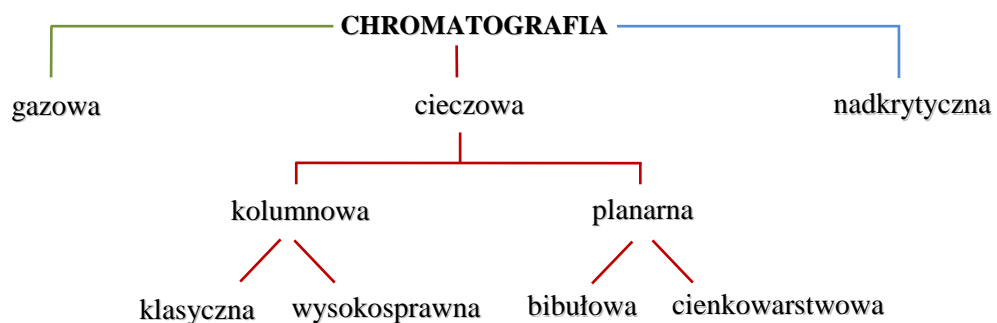
⁹ z kolekcji Katedry Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii UM w Warszawie

7.1.2. Aparatura

- spektrofotometr UV/VIS Lambda 35, Perkin - Elmer (rozdz. 7.1.4.1.)
- chromatograf cieczowy HPLC typ 2690 sprzężony z detektorem UV typ 996 i detektorem masowym z jonizacją elektrosprej ZQ Micromass, Waters (rozdz. 7.1.4.2.)
- chromatograf cieczowy UHPLC model UltiMate 3000 sprzężony z detektorem UV, Dionex i detektorem masowym z jonizacją elektrosprej Amazon SL, Bruker Daltonics (rozdz. 7.1.4.2.)
- spektrometr magnetycznego rezonansu jądrowego: Varian 300 MHz, Bruker Avance II 400 MHz i Bruker Avance III 500 MHz (rozdz. 7.1.4.3.)
- lampa UV 366, Uvitec
- liofilizator Heto PowerDry PL 3000, Thermo Scientific
- łaźnia ultradźwiękowa Elma S 180H, Elmasonic
- waga analityczna LE225D-0CE, Sartorius
- waga apteczna PS 2100/C/2, Radwag
- wirówka laboratoryjna NF 800, Nüve
- wyparka próżniowa Rotavapor R-210, Büchi
- wytrząsarka type 358S, Elpan.

7.1.3. Metody chromatograficzne

Metody chromatograficzne można podzielić ze względu na stan skupienia fazy ruchomej (gazowa, cieczowa i nadkrytyczna) oraz mechanizm rozdzielania (adsorpcyjna, jonowymienna, podziałowa, wykluczania oraz powinowactwa). Chromatografię cieczową, ze względu na technikę procesu chromatografowania, dzielimy na kolumnową i planarną.



Rycina 7. Uproszczony schemat chromatografii cieczowej wykorzystywanej w izolacji związków flawonoidowych.

7.1.3.1. Chromatografia planarna

7.1.3.1.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

W chromatografii cienkowarstwowej fazę stacjonarną stanowiły cienkie warstwy nośnika osadzone na płytkach aluminiowych. W badaniach stosowano płytki (firmy Merck) pokryte:

- celulozą 25 DC-Alufolien Cellulose (grubość warstwy 0,1 mm)
- żelem krzemionkowym 25 DC-Alufolien Kieselgel 60 (grubość warstwy 0,1 mm).

Płytki chromatograficzne rozwijano w temperaturze pokojowej, w komorach pionowych, techniką wstępującą jednokierunkową (1D-TLC).

Chromatografię TLC stosowano w celu porównania frakcji uzyskanych w wyniku rozdziału kolumnowego wyciągów podstawowych oraz otrzymanych związków z substancjami wzorcowymi, jak również do kontroli jednorodności wyodrębnionych związków i przebiegu hydrolizy oraz badania produktów hydrolizy.

Płytki aluminiowe pokryte celulożą rozwijano przy użyciu faz ruchomych:

- S₁ HOAc - H₂O (15:85)
S₂ HOAc - H₂O (30:70)
S₃ *izo*-PrOH - HCO₂H - H₂O (2:5:5)
S₄ *n*-BuOH - HOAc - H₂O (4:1:5) (faza organiczna, BAW)
S₅ *n*-BuOH - HOAc - H₂O (6:1:2) (faza organiczna, BAW)
S₆ EtOAc - HCO₂H - H₂O (10:2:3) (faza organiczna).

Płytki aluminiowe pokryte żelem krzemionkowym rozwijano przy użyciu faz ruchomych:

- S₇ CHCl₃ - HOAc - MeOH - H₂O (60:32:12:8)
S₈ EtOAc - HOAc - HCO₂H - H₂O (100:11:11:26)
S₉ *n*-PrOH - EtOAc - H₂O (7:2:1).

Rozwinięte chromatogramy suszono w warunkach naturalnych i oglądano w świetle lampy UV_{366nm} lub VIS, przed i po spryskaniu odczynnikami wywołującymi:

- W₁ 0,1% metanолоwy roztwór kompleksu kwasu difenyloborowego i etanoloaminy (Naturstoffreagenz A=NA) (flawonoidy)
W₂ 1 % metanолоwy roztwór AlCl₃ (flawonoidy)

W₃ 1% butanolowy roztwór ftalanu aniliny (0,93 g aniliny i 1,66 g kwasu ftalowego w 100 ml n-butanolu nasyconego wodą)/105°C (cukry proste).

7.1.3.1.2. Chromatografia bibułowa (PC)

Przy pomocy techniki PC prowadzono analizę chromatograficzną wyciągów podstawowych, kontrolę frakcji uzyskanych w wyniku rozdzielania mieszanin związków w kolumnach szklanych oraz produktów hydrolizy w układach S₁, S₂, S₃, S₅ oraz

S₁₀ toluen - HOAc - H₂O (125:72:3)

S₁₁ H₂O.

Chromatogramy rozwijano jednokierunkową techniką wstępującą, w temperaturze pokojowej, w wysyconych kamerach szklanych. Chromatogramy po rozwinięciu i wysuszeniu w warunkach naturalnych analizowano jak w przypadku TLC.

7.1.3.1.3. Preparatywna chromatografia bibułowa (PPC)

PPC wykorzystano do dalszego rozdzielania kilkuplamowych frakcji, uzyskanych po rozdzielaniu w kolumnach szklanych wyciągów podstawowych, zawierających mieszaniny związków flawonoidowych.

Na bibułę chromatograficzną nanoszono pasmowo rozdzielane frakcje, a następnie rozwijano jednokierunkową techniką wstępującą w układach rozpuszczalników S₁, S₂ i S₅. Fluoryzujące na żółto lub brązowo w świetle lampy UV_{366nm} pasma flawonoidów wycinano, a następnie wmywano trzykrotnie metanolem i dwukrotnie mieszaniną metanol-woda (1:1), na wrzącej łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika lub na wytrząsarce, w temperaturze pokojowej. Otrzymane eluaty sączono przez sączek karbowany i zagęszczano na wyparce próżniowej w temperaturze poniżej 40° C. Jednorodność uzyskanych związków badano za pomocą TLC w układach S₂, S₄, S₇, S₈ oraz PC w układzie S₁₁.

7.1.3.2. Chromatografia kolumnowa

7.1.3.2.1. Chromatografia kolumnowa klasyczna (CC)

Klasyczną chromatografię kolumnową przeprowadzano w kolumnach szklanych, wypełnionymi adsorbentami:

- celulozą CF-11 (Whatman)
- żelem dekstranowym sefadeks LH-20 (średnica ziaren 20-100 μm) (Sigma-Aldrich).

Kolumny wypełnione celulożą wykorzystano do rozdzielania wyciągów podstawowych, a wypełnione sefadeksem do oczyszczania wyodrębnionych związków flawonoidowych. Do elucji zastosowano fazy ruchome:

A. kolumny wypełnione celulożą:

S₁₁ H₂O

S₁₂ EtOAc - MeOH - H₂O (100:6:20) (faza organiczna)

B. kolumny wypełnione sefadeksem LH-20:

S₁₃ mieszanina CHCl₃ i MeOH (zawierające od 0 do 20 % MeOH)

S₁₄ mieszanina n-heksanu i MeOH (zawierające od 0 do 10 % MeOH)

S₁₅ mieszanina H₂O i MeOH (zawierające od 0 do 20 % MeOH)

S₁₆ MeOH.

Adsorbenty wprowadzano do kolumny w postaci zawiesiny w fazie ruchomej, używanej do elucji. Przepływ fazy ruchomej był grawitacyjny. Wyciągi oraz wyizolowane związki flawonoidowe adsorbowano na niewielkiej ilości adsorbentu i po odparowaniu rozpuszczalnika umieszczano w kolumnie. Rozdział związków w kolumnach kontrolowano w świetle lampy UV_{366nm} oraz chromatograficznie metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC, S₇, S₈, W₁) oraz chromatografii bibułowej (PC, S₂, S₃, S₅, S₁₁, W₁). Na podstawie kontroli chromatograficznej łączono frakcje o podobnym składzie.

7.1.4. Analiza spektralna

7.1.4.1. Analiza w nadfiolecie (UV)

Widma wyodrębnionych związków flawonoidowych wykreślano w aparacie UV/VIS Perkin Elmer Lambda 35 w 0,5 cm kuwetach kwarcowych przed i po dodaniu odczynników kompleksotwórczych (NaOAc/H₃BO₃, AlCl₃, AlCl₃/HCl) i jonizujących (NaOMe, NaOAc). Do obróbki widm wykorzystano oprogramowanie UV WinLab 2.80. Dla każdego związku wykreślono po sześć widm w zakresie 500-220 nm:

1. metanolowego roztworu badanego związku (MeOH)

oraz z dodatkiem:

2. 3 kropli 2,5% metanolowego roztworu metylanu sodu (NaOMe)
3. nadmiaru bezwodnego octanu sodu (w substancji) (NaOAc)
4. nadmiaru bezwodnego octanu sodu i 5 kropli nasyconego, metanolowego roztworu kwasu borowego (NaOAc/H₃BO₃)
5. 5 kropli 5% metanolowego roztworu chlorku glinu (AlCl₃)
6. 5 kropli 5% metanolowego roztworu chlorku glinu i 5 kropli 20% wodnego roztworu HCl (AlCl₃/HCl) (Mabry i wsp. 1970; Dey i Harborne, 1989; Rice-Evans i Packer, 1998).

7.1.4.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem mas UHPLC-DAD-ESI-MS¹⁰ i HPLC-DAD-ESI-MS¹¹

Warunki analizy UHPLC-DAD-ESI-MS (Granica i wsp., 2013)

- kolumna: Zorbax SB-C₁₈ (150 mm×2,1 mm, 1,9 μm), Agilent Technologies
- faza ruchoma: faza **A** - H₂O-ACN-HCO₂H (95:5:0,1), faza **B** - ACN-HCO₂H (100:0,1)
- układ gradientowy: 0-60 min. 1-26% B, 60-90 min. 26-50% B
- przepływ: 0,2 ml/min.
- temperatura kolumny: 25° C
- detekcja DAD: 200-450 nm

¹⁰ analizę wykonała dr hab. n. farm. Anna Kiss w Katedrze Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii UM w Warszawie

¹¹ analizę wykonał dr Tomasz Kozik w Środowiskowym Laboratorium Unikatowej Aparatury Chemicznej (ŚLAUCh) Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

- napięcie kapilary: 4500 V
- temperatura gazu rozpylającego: 300° C
- przepływ gazu: 9 l/min.

Warunki analizy HPLC-DAD-ESI-MS

- kolumna Symmetry (4,6x150 mm, 5 µm)
- faza ruchoma: faza **A** - MeOH, faza **B** - ACN, faza **C** - H₂O, faza **D** - 10% HCO₂H
- układ gradientowy: tabela 2
- detekcja DAD: 220-500 nm
- napięcie kapilary: 3000 V
- temperatura gazu rozpylającego 300C
- czynnik rozpylający: azot (N₂).

Tabela 2. Gradient fazy ruchomej zastosowanej w analizie HPLC-DAD-ESI-MS

Czas (min)	% fazy A	% fazy B	% fazy C	% fazy D	Przepływ (ml/min)
0	0	0	95	5	0,5
30	95	0	0	5	0,5
31	0	0	95	5	0,5
40	0	5	95	0	0,5

7.1.4.3. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)¹²

Widma jednowymiarowe ¹H i ¹³C NMR wyodrębnionych związków flawonoidowych wykonano w spektrometrach magnetycznego rezonansu jądrowego: Varian 300 MHz (związek 2, 3, 4), Bruker Avance II 400 MHz (związek 3, 5) i Bruker Avance III 500 MHz (związek 6, 7), stosując jako rozpuszczalnik dimetylosulfotlenek (DMSO-d₆) lub metanol (CD₃-OD). Przesunięcia chemiczne wyrażano w skali delta (δ), w jednostkach ppm, w odniesieniu do tetrametylosilanu (Si(CH₃)₄, TMS), jako wzorca wewnętrznego. Uzyskane widma analizowano przy użyciu oprogramowania TopSpin 3.1.

¹² analizy NMR wykonały mgr Elżbieta Pasternak i dr Anna Teubert w Laboratorium NMR Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

7.1.5. Hydroliza kwasowa

Do około 1 mg związku flawonoidowego (zw. 2, 4, 6, 7) dodawano 1 ml metanolu i 2 ml 2% kwasu solnego. Następnie ogrzewano na łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną. Przebieg hydrolizy kontrolowano chromatograficznie (TLC, S₁, W₁). W tym celu analizowany związek nakładano na płytkę celulozową bezpośrednio po dodaniu kwasu, a następnie po 5, 15, 30, 45 i 60 minutach, celem uchwycenia momentu powstawania produktów wtórnych. Po zakończeniu hydrolizy mieszaninę poreakcyjną pozostawiono do całkowitego odparowania rozpuszczalnika i kwasu solnego. Do pozostałości dodano wodę, a następnie wytrząsano trzykrotnie z octanem etylu. Warstwę octanu etylu, po zagęszczeniu, kontrolowano na obecność aglikonów wobec wzorców (PC, S₃, S₁₀, W₁) oraz glikozydów wtórnych wobec wzorcowych glikozydów (TLC, S₁, S₆, S₈, W₁). Frakcję wodną po zagęszczeniu analizowano na obecność cukrów prostych (TLC, S₉, W₃).

7.1.6. Materiał do badań

Badano wysuszone w warunkach naturalnych ziele żótlicy drobnokwiatowej (*Galinsoga parviflora* Cav., Asteraceae), zebrane w okresie kwitnienia rośliny. Surowiec zbierano w latach 2005-2010 w ogrodzie Katedry i Zakładu Surowców Leczniczych i Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Przygotowanie i frakcjonowanie wyciągu podstawowego

1 kg wysuszonego ziele żótlicy drobnokwiatowej poddano trzykrotnie jednodniowej maceracji metanolem w temperaturze pokojowej, a następnie trzykrotnej ekstrakcji metanolem i trzykrotnej mieszaniną metanol-woda (1:1), każdorazowo przez 1 godzinę, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalników. Ze względu na podobny obraz chromatograficzny (PC, S₂, S₃, S₅, S₁₁, W₁) uzyskanych maceratów i wyciągów połączono je, zagęszczono na wyparce próżniowej w temperaturze poniżej 45° C, a następnie zalano niewielką ilością gorącej wody. Po ostudzeniu przecedzono, oddzielając substancje balastowe, a uzyskany ekstrakt wytrząsano kolejno z chloroformem, eterem dietylowym oraz z octanem etylu. Otrzymane frakcje (chloroformowa, eteru dietylowego, octanu etylu), łącznie z pozostałością po wytrząsaniu (frakcja wodna), kontrolowano chromatograficznie (PC, S₂, S₃, S₅, W₁).

Ze względu na śladowe ilości związków flawonoidowych we frakcji chloroformowej i eteru dietylowego nie prowadzono dalszych badań tych frakcji. Frakcję octanu etylu i wodną poddano rozdziałowi z wykorzystaniem klasycznej chromatografii kolumnowej (rozdz. 8.1.1.1.).

7.2. Analiza kwasów fenolowych

7.2.1. Odczynniki i substancje wzorcowe

Do analizy kwasów fenolowych stosowano odczynniki czyste (cz.), czyste do analizy (cz.d.a.) i o czystości gradientowej:

– amoniak 25% cz.d.a. (NH ₃)	POCH
– anilina cz.d.a.	POCH
– azotyn sodu (NaNO ₂)	POCH
– dichlorometan cz.	POCH
– eter dietylowy cz.d.a.	POCH
– metanol cz.d.a.	POCH
– kwas octowy lodowaty 99,5 % cz.d.a.	POCH
– kwas <i>o</i> -ftalowy	POCH
– kwas sulfanilowy cz.	POCH
– toluen cz.d.a.	POCH
– węglan sodu (Na ₂ CO ₃)	POCH
– woda dejonizowana	Poznańskie Zakłady Zielarskie Herbapol
– woda do HPLC	Baker
– acetonitryl do HPLC (ACN)	Merck
– metanol do HPLC	Baker
– kwas mrówkowy 99+ %	POCH.

Wzorcowe kwasy fenolowe:

– chlorogenowy (nr serii 2147470)	Roth
– dihydrokawowy (nr serii 75H2511)	Sigma
– <i>trans</i> -ferulowy (nr serii 21120-060)	Sigma-Aldrich
– galusowy (nr serii 71181-079)	Sigma-Aldrich
– izowanilinowy (nr serii 95H0090)	Sigma-Aldrich

– kawowy (nr serii 24050-030)	Sigma-Aldrich
– <i>m</i> -kumarowy (nr serii 68H3416)	Sigma-Aldrich
– <i>p</i> -kumarowy (nr serii 18630)	Fluka
– <i>p</i> -hydroksybenzoesowy (nr serii 28066-020)	Sigma-Aldrich
– <i>p</i> -hydroksyfenylooctowy (nr serii S04869-326)	Sigma-Aldrich
– protokatechowy (nr serii 107H0699)	Sigma-Aldrich
– rozmarynowy (nr serii 27045592)	Roth
– salicylowy (nr serii 247588)	Sigma-Aldrich
– syringowy (nr serii 34136-040)	Sigma-Aldrich
– wanilinowy (nr serii 26222-129)	Sigma-Aldrich.

7.2.2. Aparatura i oprogramowanie

- aparat do ultrasprawnej chromatografii cieczowej UPLC (model Acquity firmy Waters) wyposażony w detektor fotodiodowy (PDA) (rozdz. 7.2.3.2.)
- oprogramowanie Empower 2 Software Build 2154
- lampa UV 366, Uvitec
- waga analityczna LE225D-0CE, Sartorius
- waga apteczna PS 2100/C/2, Radwag
- wyparka próżniowa Rotavapor R-210, Büchi
- wagosuszarka WPE 30 S, Radwag.

7.2.3. Metody chromatograficzne

7.2.3.1. Chromatografia cienkowarstwowa (2D-TLC)

W chromatografii cienkowarstwowej fazę stacjonarną stanowiły cienkie warstwy nośnika osadzone na płytkach aluminiowych pokrytych celulozą 25 DC-Alufolien Cellulose (Merck). Płytki chromatograficzne rozwijano w temperaturze pokojowej, w komorach pionowych, techniką wstępującą dwukierunkową (2D-TLC) w układach:

S₁₇ toluen - HOAc - H₂O (6:7:3) - I kierunek

S₁ HOAc - H₂O (15:85) - II kierunek.

Chromatografię TLC stosowano w celu porównania kwasów obecnych w wyciągu z wzorcowymi kwasami fenolowymi. Rozwinięte chromatogramy suszono w warunkach

naturalnych i oglądano w świetle lampy UV_{366nm} lub VIS, przed i po spryskaniu odczynnikiem wywołującym:

W₄ zdwuazowany kwas sulfanilowy przygotowany *ex tempore* i 20% roztwór węgla sodu (1:1).

7.2.3.2. Ultrasprawa chromatografia cieczowa (UPLC-PDA)

UPLC-PDA wykorzystano do jakościowej i ilościowej analizy mieszaniny 15 kwasów fenolowych.

Warunki analizy chromatograficznej

- kolumna: Waters Acquity UPLC HSS T3 (2,1x150 mm, 1,8 μm) z pre-kolumną BEH C₁₈ (2,1x5 mm, 1,7 μm)
- faza ruchoma: faza **A** - zakwaszona woda, faza **B** - zakwaszony acetonitryl (50 μl stężonego kwasu mrówkowego na 1 litr rozpuszczalnika)
- układ gradientowy: tabela 3
- przepływ: 0,275 ml/min.
- temperatura kolumny i próbek: 24° C
- detekcja PDA: 190-800 nm
- analiza widm: 234,0 - 330,0 nm
- objętość nastrzyku: 2 μl.

Tabela 3 . Gradient fazy ruchomej wykorzystany w analizie kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA

Czas (min)	% fazy A	% fazy B
0,00	97,0	3,0
4,00	87,0	13,0
5,00	82,5	17,5
9,00	82,5	17,5
12,50	75,5	24,5
15,00	97,0	3,0
17,00	97,0	3,0

7.2.4. Przygotowanie wyciągów

7.2.4.1. Oznaczenie straty masy po suszeniu

Wilgotność ziela żółtlicy drobnokwiatowej oznaczono metodą suszarkowo-wagową wg FP VI. Suszenie surowca (1,0 g) prowadzono w temperaturze 130° C. Oznaczenie wykonano w 3 powtórzeniach, a wilgotność surowca obliczono ze wzoru:

$$\text{strata masy po suszeniu (\%)} = 100 - \frac{\text{odczytana masa próbki}}{\text{masa początkowa próbki}} * 100$$

Średnia strata masy po suszeniu wyniosła 8,73 %. Wilgotność surowca została uwzględniona przy naważkach ziela żółtlicy drobnokwiatowej w badaniach zawartości związków czynnych.

7.2.4.2. Frakcja eteru dietylowego do analizy jakościowej (2D-TLC)

10 ml wyciągu o stężeniu 2g/ml (rozd. 7.2.4.3.) poddano wyczerpującej ekstrakcji eterem dietylowym. Otrzymane frakcje eteru dietylowego połączono, zagęszczono do sucha, a uzyskaną pozostałość rozpuszczono w 5 ml metanolu. Frakcję eteru dietylowego poddano dwukierunkowej analizie chromatograficznej na płytkach celulozowych (rozd. 7.2.3.1.) w porównaniu z wzorcowymi kwasami fenolowymi. Chromatogramy oglądano w świetle lampy UV_{366nm}, a po wywołaniu zdwuazowanym kwasem sulfanilowym z 20% węglanem sodu (1:1) w świetle dziennym. Metanolowe roztwory wzorcowych kwasów fenolowych przygotowano w stężeniu 0,1 mg/ml.

7.2.4.3. Wyciąg do określenia profilu kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA

200,00 g wysuszonego ziela żółtlicy drobnokwiatowej poddano dwukrotnie 7-dniowej maceracji mieszaniną metanol-dichlorometan (1:1) w temperaturze pokojowej, a następnie dwukrotnie 3-dniowej maceracji mieszaniną metanol-woda dejonizowana (1:1). Uzyskane wyciągi połączono, przecedzono i zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze nie przekraczającej 45° C, do objętości około 70 ml. Zagęszczony wyciąg przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 100 ml i uzupełniono wodą dejonizowaną, uzyskując stężenie 2,0 g/ml. Wyciąg wykonano w 3 powtórzeniach.

7.3. Badania ilościowe

7.3.1. Odczynniki i substancje wzorcowe

Do oznaczania zawartości flawonoidów

- | | |
|---|-----------------------|
| – kwercetyna dwuwodna (nr serii 288213490) | Fluka |
| – kwas solny cz.d.a. (roztwór wodny, 250g/l) | POCH |
| – chlorek glinu (20g/l) rozpuszczony w mieszaninie
HOAc - MeOH (1:19) (nr serii BCBD3987V) | Sigma-Aldrich |
| – heksametylenotetramina cz.d.a. (0,5% wodny roztwór) | Chempur ¹³ |
| – mieszanina: HOAc (1,02 kg/l) - MeOH (1:19) | |
| – aceton cz.d.a. | POCH |
| – octan etylu cz.d.a. | POCH |
| – metanol cz.d.a. | POCH |
| – siarczan sodu bezwodny cz.d.a. | POCH |
| – woda dejonizowana. | |

Do oznaczania zawartości kwasów fenolowych

- | | |
|--|---------------|
| – kwas kawowy (nr serii 24050-030) | Sigma-Aldrich |
| – 0,5 N (18g/l) roztwór kwasu solnego | POCH |
| – 1 N (40g/l) roztwór wodorotlenku sodu | POCH |
| – azotyn sodu cz.d.a. (nr serii 0314/05/03) | POCH |
| – molibdenian sodu cz.d.a. (nr serii 0235/11/98) | POCH |
| – metanol cz.d.a. | POCH |
| – woda dejonizowana. | |

odczynnik Arnov'a: rozpuszczono 10,0 g molibdenianu sodu i 10,0 g azotynu sodu w kolbie miarowej o pojemności 100 ml i uzupełniono wodą dejonizowaną.

Do oznaczania zawartości sumy polifenoli

- | | |
|---|---------------|
| – kwas galusowy (nr serii 71181-079) | Sigma-Aldrich |
| – odczynnik <i>Folin-Ciocalteu</i> (FC) (nr serii HC807325) | Merck |
| – węglan sodu (7% wodny roztwór) (nr serii 0101/09/08) | POCH |
| – metanol cz.d.a. | POCH |
| – woda dejonizowana. | |

¹³ Chempur - Piekary Śląskie, Polska

Do oznaczania zawartości kwasu L(+)-askorbinowego

- kwas L(+)-askorbinowy cz.d.a. (nr serii 529150113) POCH
- 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) (0,1% acetonowy roztwór) przygotowany *ex tempore* (nr serii BCBB2081) Fluka
- wodorotlenek sodu (0,2 M) POCH
- kwas cytrynowy jednowodny cz.d.a. (0,5% wodny roztwór) (nr serii 1172/02/10) POCH
- aceton cz.d.a. (50% wodny roztwór) POCH
- woda dejonizowana.

Do oznaczania zawartości pierwiastków

- kwas azotowy 65 % Ultranal POCH
- woda dejonizowana.

7.3.2. Aparatura

- mineralizator mikrofalowy CEM Corporation USA Mars 5 (rozdz. 8.3.5.)
- spektrofotometr UV/VIS Lambda 35, Perkin-Elmer
- waga analityczna LE225D-0CE, Sartorius
- waga apteczna PS 2100/C/2, Radwag
- wyparka próżniowa Rotavapor R-210, firmy Büchi
- wytrząsarka type 358S, Elpan.

7.3.3. Przygotowanie wyciągów**7.3.3.1. Wyciągi podstawowe****Podstawowy wyciąg metanolo-wodny (MWP)**

1,0 g wysuszonego ziela żółtlicy drobnokwiatowej poddano wyczerpującej ekstrakcji trzykrotnie 200 ml metanolu i czterokrotnie 150 ml mieszaniny metanol-woda dejonizowana (1:1) na wrzącej łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, każdorazowo przez 1 godzinę. Otrzymane wyciągi połączono, przecedzono przez watę i zagęszczono do objętości około 20 ml na wyparce próżniowej w temperaturze poniżej 45° C. Zagęszczony wyciąg przeniesiono do kolbki miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniono wodą dejonizowaną. Otrzymano podstawowy wyciąg

metanolowo-wodny o stężeniu 20 mg/ml. Wyciąg przygotowano w 3 powtórzeniach (naważki surowca: $m_1=1,01$ g; $m_2=1,02$ g; $m_3=1,02$ g).

Nalewka podstawowa (NP)

5,0 g wysuszonego ziela żółtlicy drobnokwiatowej zalano w kolbie stożkowej 300 ml 70% etanolu. Następnie wytrząsano na wytrząsarce przez 1 godzinę i pozostawiono w ciemnym miejscu na okres 2 dni. Wytrawianie powtórzono jeszcze raz. Uzyskane nalewki połączone, przecedzono przez watę i zagęszczono na wyparce próżniowej, do objętości około 30 ml, a następnie przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniono wodą dejonizowaną. Uzyskano nalewkę podstawową o stężeniu 100 mg/ml. Nalewkę podstawową przygotowano w 3 powtórzeniach (naważki surowca: $m_1=5,00$ g; $m_2=5,03$ g; $m_3=5,02$ g).

Odwar podstawowy (OP)

5,0 g wysuszonego ziela żółtlicy drobnokwiatowej zalano w kolbie stożkowej 300 ml wody dejonizowanej o temperaturze pokojowej, a następnie gotowano przez 20 minut w łaźni wodnej w temperaturze 95° C. Wytrawianie powtórzono jeszcze raz, a uzyskane odwary połączone, przecedzono przez watę i zagęszczono do objętości około 30 ml. Zagęszczony odwar przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniono wodą dejonizowaną. Uzyskano odwar podstawowy o stężeniu 100 mg/ml. Odwar podstawowy przygotowano w 3 powtórzeniach (naważki surowca: $m_1=5,01$ g; $m_2=5,03$ g; $m_3=5,00$ g).

7.3.3.2. Wyciągi do oznaczeń ilościowych

Do oznaczania zawartości flawonoidów

Wyciąg z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (wg FP IX)

Do kolby okrągłodennej o pojemności 50 ml odważono 0,6 g wysuszonego, sproszkowanego ziela żółtlicy drobnokwiatowej, dodano 20 ml acetonu, 2 ml kwasu solnego i 1 ml roztworu wodnego heksametylenotetraminy (metenaminy). Mieszaninę ogrzewano na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 30 minut od chwili zawrzenia. Otrzymany hydrolizat przecedzono przez watę do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Surowiec wraz z watą umieszczono ponownie w kolbie okrągłodennej, dodano 20 ml acetonu i ponownie utrzymywano w stanie wrzenia przez 10 minut. Otrzymany wyciąg przecedzono przez watę do kolby miarowej. Wytrawianie powtórzono jeszcze raz, a uzyskany wyciąg przesączono do kolby miarowej i uzupełniono acetonem do 100 ml.

20 ml zhydrolizowanego wyciągu przeniesiono do rozdzielacza, dodano 20 ml wody dejonizowanej i wytrząsano z 15 ml octanu etylu, a następnie trzema porcjami octanu etylu po 10 ml. Połączone wyciągi octanu etylu w rozdzielaczu przemyto 2 razy po 50 ml wody dejonizowanej, a następnie przesączono przez 10 g bezwodnego siarczanu sodu do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniono octanem etylu, uzyskując stężenie 2,4 mg surowca w 1 ml wyciągu. Wyciąg z ziela żółtlicy drobnokwiatowej przygotowano w 3 powtórzeniach (naważki surowca: $m_1=600,00$ mg; $m_2=600,01$ mg; $m_3=600,02$ mg).

Nalewka i odwar

12,5 ml nalewki podstawowej (**NP**) oraz 10 ml odwaru podstawowego (**OP**) (rozd. 7.3.3.1.) zagęszczono oddzielnie do sucha w kolbach okrągłodennych o pojemności 50 ml. Następnie postępowano jak w przypadku ziela żółtlicy drobnokwiatowej. Z nalewki podstawowej uzyskano wyciąg o stężeniu 5 mg/ml, a z odwaru podstawowego 4 mg/ml.

Do oznaczania zawartości kwasów fenolowych

Wyciągi do badań otrzymano w wyniku rozcieńczenia wyciągów podstawowych (rozd. 7.3.3.1.).

Do kolb miarowych o pojemności 25 ml pobrano:

- 0,8 ml podstawowego wyciągu **metanolowo-wodnego** (MWP), uzyskując rozcieńczenie o stężeniu 0,64 mg surowca w 1 ml wyciągu,
- 0,2 ml **nalewki** podstawowej (NP), uzyskując rozcieńczenie o stężeniu 0,8 mg surowca w 1 ml nalewki,
- 0,15 ml **odwaru** podstawowego (OP), uzyskując rozcieńczenie o stężeniu 0,6 mg surowca w 1 ml odwaru

i uzupełniono wodą dejonizowaną.

Do oznaczania zawartości sumy polifenoli

Wyciągi do badań otrzymano w wyniku rozcieńczenia wyciągów podstawowych (rozd. 7.3.3.1.).

Do kolb miarowych o pojemności 100 ml pobrano:

- 5 ml podstawowego wyciągu **metanolowo-wodnego** (MWP), uzyskując rozcieńczenie o stężeniu 1 mg surowca w 1 ml wyciągu,
- 1,4 ml **nalewki** podstawowej (NP), uzyskując rozcieńczenie o stężeniu 1,4 mg surowca w 1 ml nalewki,

- 1,1 ml **odwaru** podstawowego (OP), uzyskując rozcieńczenie o stężeniu 1,1 mg surowca w 1 ml odwaru

i uzupełniono wodą dejonizowaną.

Do oznaczania zawartości kwasu L(+)-askorbinowego

50,0 g świeżego, rozdrobnionego ziela żółtlicy drobnokwiatowej umieszczono w kolbie płaskodennej o pojemności 100 ml i ekstrahowano 50 ml wodnego roztworu 0,5% kwasu cytrynowego w temperaturze pokojowej na wytrząsarce przez 30 min. Otrzymany wyciąg przesączono przez sączek bibułowy do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Wytrawianie powtórzono jeszcze dwukrotnie, a uzyskane wyciągi przesączono do kolby miarowej i uzupełniono roztworem 0,5% kwasu cytrynowego do 100 ml, uzyskując stężenie 500 mg/ml. Wyciąg przygotowano w 3 powtórzeniach (naważki surowca: $m_1=50,02$ g; $m_2=50,01$ g; $m_3=50,03$ g).

Do oznaczania zawartości pierwiastków metodą ICP-OES

Dwie naważki ($m_1=0,3120$ g i $m_2=0,2856$ g) wysuszonego ziela żółtlicy drobnokwiatowej mineralizowano w 10 ml kwasu azotowego Ultranal i uzupełniono wodą dejonizowaną do objętości 15 ml.

7.4. Badania aktywności biologicznej

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

Do badania aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS

- | | |
|---|----------------|
| – kwercetyna dwuwodna (nr serii 288213490) | Fluka |
| – rutyna (nr serii 20829) | Riedel-de Haën |
| – kwas galusowy (nr serii 71181-079) | Sigma-Aldrich |
| – kwas kawowy (nr serii 24050-030) | Sigma-Aldrich |
| – BHA (nr serii 115K0028) | Sigma-Aldrich |
| – troloks (nr serii S27444-255) | Sigma-Aldrich |
| – nadsiarczan potasu ($K_2S_2O_8$) (nr serii BCBD7429V) | Fluka |
| – ABTS-(NH_4) ₂ (nr serii 061M5308V) | Sigma-Aldrich |
| – metanol cz.d.a. | POCH |
| – woda dejonizowana. | |

Do badania zdolności chelatowania jonów żelaza (II)

- kwercetyna dwuwodna (nr serii 288213490) Fluka
- kwas galusowy (nr serii 71181-079) Sigma-Aldrich
- kwas chlorogenowy (nr serii 2147470) Roth
- Na₂EDTA·2H₂O (nr serii 0349/07/06) POCH
- chlorek żelaza (II) czterowodny (1 mM wodny roztwór)
(nr serii BCBF5170V) Sigma-Aldrich
- ferrozyna (2,5 mM wodny roztwór) (nr serii MKBD9675V) Sigma-Aldrich
- metanol cz.d.a. POCH
- woda dejonizowana.

Do badania aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionych genu *sod1***Do hodowli drożdży *Saccharomyces cerevisiae***

Odczynniki:

- firmy Difco: agar, baktopenon, ekstrakt drożdżowy
- firmy Sigma: glicerol.

Pożywki do hodowli drożdżowej:

- YPG, pH 5,5
 - baktopenon - 2% (w/o)
 - ekstrakt drożdżowy - 1% (w/o)
 - glicerol - 3% (w/w)
- YPD, pH 5,5
 - baktopenon - 2% (w/o)
 - ekstrakt drożdżowy - 1% (w/o)
 - glukoza - 2% (w/o).

W przypadku pożywek stałych dodawano 2% agar. Pożywki sterylizowano przez 20 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery.

Do oznaczania poziomu karbonylacji białek

Odczynniki:

- firmy Serva: PMSF, Ponceau S, SDS, TRIS
- firmy Sigma: akrylamid, APS, bisakrylamid, BSA, dezoksychołan sodu, glicyna, TEMED, TMPD, Tween 20, odczynnik Bradford

- firmy POCH: MeOH, NaCl, Na₃PO₄, NaH₂PO₄, NaH₂PO₄, TCA
- firmy Pharmacia Biotech: odczynnik ECL - Amersham
- firmy Bio-Rad¹⁴: odczynnik Bradford
- zestaw odczynników: OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit, zestaw do wyznaczania poziomu karbonylacji białek (Milipore, nr kat. S7150).

Bufory:

- bufor SDS-PAGE, pH 8,3
 - glicyna - 0,19 M
 - TRIS-HCl - 25 mM
 - SDS - 0,1 % (w/o)
- bufor do elektrotransferu, pH 8,8
 - TRIS-HCl - 20 mM
 - glicyna - 0,15 M
 - SDS - 0,02% (w/o)
 - MeOH - 20% (w/w)
- bufor RIPA, pH 7,0
 - NaCl - 0,22 M
 - Na₃PO₄ - 12,5 mM
 - Nonidet P-40 - 1,25% (w/w)
 - SDS - 0,125% (w/o)
 - dezoksycholan sodu - 30 mM
- bufor PBS-T, pH 7,3
 - NaCl - 145 mM
 - NaH₂PO₄·H₂O (138 g/mol) - 18,84 mM
 - NaH₂PO₄ (142 g/mol) - 810 mM
 - tween 20 - 0,05% (w/w)
- bufor blokujący
 - BSA - 1% (w/o)
 - bufor PBS-T.

¹⁴ Bio-Rad Laboratoies Inc.- Kalifornia, Stany Zjednoczone

Do oznaczania poziomu zużycia tlenu przez komórki drożdży

Odczynniki:

- firmy Sigma: cytrynian sodu, FCCP, TBT, podsiarczyn sodu
- firmy POCH: kwas cytrynowy, etanol.

Bufory:

- bufor cytrynianowy (30 mM), pH 4,5
kwas cytrynowy (3,13 g/l)
cytrynian sodu (4,43 g/l).

Do badania aktywności przeciwzapalnej**Do hodowli komórek HaCaT**

Odczynniki:

- roztwór 0,25% trypsyny, do odklejania komórek
- PBS
- pożywka DMEM z dodatkiem 5% FBS i antybiotyków
- PBS z dodatkiem 0,1% EDTA
- antybiotyki (amfoterycyna B, penicylina, streptomycyna)
- MTT
- *izo*-PrOH zakwaszony stężonym HCl
- DMSO.

Do oznaczania poziomu białek COX-2 i iNOS

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 µl
 - 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

Do oznaczania poziomu PGE₂

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

Do badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej i antymutagennej

- chloramfenikol Merck
- amfoterycyna B Serva¹⁵
- azydek sodu Serva
- DMSO Serva
- szczepy wzorcowe:

Staphylococcus aureus ATCC 6538 P

Escherichia coli PZH O26B6

Candida albicans PCM 1409 PZH

Microsporium gypseum K1

Salmonella typhimurium ATCC TA 1535.

¹⁵ SERVA Electrophoresis GmbH - Heidelberg, Niemcy

7.4.2. Podłoża, żele

Do badania aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionych genu *sod1*

- żel akrylamidowy do elektroforezy białek (SDS-PAGE)

żel rozdzielający (14%)

akrylamid/bisakrylamid - 30% / 0,8% (w/o)

Tris/HCl pH 8,8 - 0,25 M

SDS - 0,1% (w/w)

APS - 0,05%

TEMED - 0,05%

żel zagęszczający (5%)

akrylamid/bisakrylamid - 30% / 0,8% (w/o)

Tris/HCl, pH 6,8 - 0,06 M

SDS - 0,1% (w/w)

APS - 0,05%

TEMED - 0,05%.

Do badania aktywności przeciwzapalnej

- płytki Prostaglandin E₂ Express EIA Kit Cayman¹⁶
- żel poliakryloamidowy 10% Tris Ready Gel Bio-Rad
- żel poliakryloamidowy 7,5% Tris Ready Gel Bio-Rad.

Do badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej i antymutagennej

- aktywność przeciwbakteryjna: Antibiotic Broth i Sabouraud Broth Merck
- aktywność antymutagenna:
 - top agar complex (podłoże B)
 - minimal glucose agar medium (podłoże A, zawierające sole mineralne i 40% glukozę).

¹⁶ Cayman Chemical Company - Michigan, Stany Zjednoczone

7.4.3. Aparatura i oprogramowanie

- spektrofotometr Tecan Infinite M200 (rozdz. 8.4.2.)
- spektrofotometr Shimadzu UVPC-1602C (rozdz. 8.4.1.3.)
- spektrofotometr UV/VIS Lambda 35, Perkin-Elmer (rozdz. 8.4.1.1., 8.4.1.2.)
- aparat G-Box z programem do densytometrycznego pomiaru prążków GeneSnap, Syngene (rozdz. 8.4.2.)
- program Scan Pack 3.0, Biometra (rozdz. 8.4.1.3.)
- wirówka Thermo IEC CL31R (rozdz. 8.4.2.)
- wirówka Hettich Universal 320R (rozdz. 8.4.1.3.)
- wytrząsarka: Finepcr TW3T (rozdz. 8.4.2.)
- wytrząsarka Certomat R (rozdz. 8.4.1.3.)
- wytrząsarka IKA vortex 3 (rozdz. 8.4.1.3.)
- mikroskop: Nikon Eclipse TS100 (rozdz. 8.4.2.)
- aparat do elektrotransferu półsuchego, Kucharczyk (rozdz. 8.4.1.3.)
- elektroda tlenowa Clark, Hansatech (rozdz. 8.4.1.3.)
- waga analityczna LE225D-0CE, Sartorius
- waga apteczna PS 2100/C/2, Radwag
- wyparka próżniowa Rotavapor R-210, Büchi
- wytrząsarka type 358S, Elpan.

7.4.4. Przygotowanie wyciągów

Do badania aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS

Wyciągi do badań otrzymano w wyniku rozcieńczenia wyciągów podstawowych (rozdz. 7.3.3.1.).

Nalewka

Do kolb miarowych o pojemności 10 ml pobrano 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 ml nalewki podstawowej (NP) i uzupełniono wodą dejonizowaną. Uzyskano rozcieńczenia nalewki o stężeniach 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg surowca w 1 ml nalewki. Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 9 prób.

Odwar

Do kolb miarowych o pojemności 10 ml pobrano 0,0125; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,175 ml odwaru podstawowego (OP) i uzupełniono wodą dejonizowaną.

Uzyskano rozcieńczenia odwaru o stężeniach 0,125; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 i 1,75 mg surowca w 1 ml odwaru. Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 9 prób.

Do badania zdolności chelatowania jonów żelaza (II)

Wyciągi do badań otrzymano w wyniku rozcieńczenia wyciągów podstawowych (rozd. 7.3.3.1.).

Nalewka

Do kolby miarowej o pojemności 25 ml pobrano 0,875 ml nalewki podstawowej (NP). Uzyskano nalewkę o stężeniu 3,5 mg/ml, z której pobrano 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ml do kolb miarowych o pojemności 5 ml i uzupełniono wodą dejonizowaną. W ten sposób uzyskano rozcieńczenia nalewki o stężeniach 0,07; 0,35; 0,70; 1,40; 2,10; 2,80 mg surowca w 1 ml nalewki. Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 9 prób.

Odwar

Do kolby miarowej o pojemności 100 ml pobrano 0,4 ml odwaru podstawowego (OP), uzyskując odwar o stężeniu 0,4 mg/ml. Następnie do kolb miarowych o pojemności 5 ml pobrano 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ml odwaru (0,4 mg/ml) i uzupełniono wodą dejonizowaną. Uzyskano rozcieńczenia odwaru o stężeniach 0,008; 0,04; 0,08; 0,16; 0,24 i 0,32 mg surowca w 1 ml odwaru. Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 9 prób.

Do badania aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionych genu *sod1*

Nalewka i odwar

Nalewkę i odwar przygotowano z 10 g wysuszonego ziela żółtlicy drobnokwiatowej w sposób identyczny jak przygotowano nalewkę podstawową i odwar podstawowy (rozd. 7.3.3.1.). Uzyskane wyciągi zagęszczono na wyparce próżniowej do około 10 ml, przeniesiono do kolb miarowych o pojemności 25 ml i uzupełniono wodą dejonizowaną. Uzyskano w ten sposób wyciągi o stężeniu 400 mg/ml.

Do badania aktywności przeciwzapalnej

Nalewka i odwar

Nalewkę i odwar przygotowano z 2 g wysuszonego ziela żółtlicy drobnokwiatowej analogicznie jak przygotowano nalewkę podstawową i odwar podstawowy (rozd. 7.3.3.1.).

Zagęszczoną nalewkę i odwar do objętości około 50 ml przeniesiono do kolb miarowych o pojemności 100 ml i uzupełniono wodą dejonizowaną. Uzyskano wyciągi o stężeniu 20 mg surowca w 1 ml nalewki lub odwaru.

Do badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej i antymutagennej

Nalewka i odwar

Nalewkę i odwar przygotowano z 10 g wysuszonego ziela żółtlicy drobnokwiatowej w sposób identyczny jak przygotowano nalewkę podstawową i odwar podstawowy (rozd. 7.3.3.1.). Uzyskane wyciągi zagęszczono na wyparce próżniowej, uzyskując 1,3522 g suchej masy nalewki i 3,6959 g suchej masy odwaru.

Wyciąg heksanowy

50 g wysuszonego ziela żółtlicy drobnokwiatowej zalano w kolbie stożkowej 1500 ml heksanu i wytrząsano przez 2 godziny na wytrząsarce. Wytrawianie powtórzono jeszcze dwukrotnie, a uzyskane wyciągi połączono, przecedzono przez watę i zagęszczono do sucha, uzyskując 0,5989 g suchej masy.

Sok

Sok otrzymano metodą bezpośredniego wyciskania świeżego ziela żółtlicy drobnokwiatowej za pomocą sokowirówki. Uzyskano 18,0971 g soku z 92,44 g świeżego ziela. Sok następnie zagęszczono na wyparce próżniowej, uzyskując 1,1913 g suchej masy.

7.5. Analiza statystyczna

współczynnik kierunkowy prostej

$$a = \frac{n \sum(xy) - \sum x \cdot \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

wyraz wolny

$$b = \frac{\sum y - a \sum x}{n}$$

współczynnik korelacji prostoliniowej r

$$r = \frac{n \sum(xy) - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2] \cdot [n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

odchylenie standardowe od prostej

$$S_a = \sqrt{\frac{(1-r^2) \cdot \sum y^2}{n-1}} \quad n \text{ -liczba prób}$$

średnia arytmetyczna

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad n \text{ -liczba wyników}$$

odchylenie standardowe pojedynczego wyniku

$$S = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n-1}} \quad n \text{ -liczba wyników, } f=n-1 \text{ (liczba stopni swobody)}$$

odchylenie standardowe średniej arytmetycznej

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

współczynnik zmienności

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

przedział ufności:

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

Dla przyjętego poziomu istotności $\alpha=0,05$ (**P=95%**) i liczby stopni swobody **f=n-1**, wartość współczynnika t-Studenta, w zależności od ilości prób wykonanych dla jednego stężenia wynosi (Pawlaczyk i Zajac, 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	$t_{\alpha, f}=2,262$

Ocena statystyczna i walidacja analizy kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA**błąd względny**

$$BW = \frac{|x_{wz} - x_{obl}|}{x_{wz}} * 100\%$$

gdzie: x_{wz} - stężenie kwasu fenolowego w roztworze wzorcowym

x_{obl} - stężenie kwasu fenolowego obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej

granica wykrywalności

$$LOD_b = \frac{3,3 \cdot S_b}{a} \quad \text{gdzie} \quad S_b = S_{xy} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}}$$

$$LOD_{xy} = \frac{3,3 \cdot S_{xy}}{a} \quad \text{gdzie} \quad S_{xy} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{n-2}}$$

$$LOD_{\bar{sr}} = \frac{LOD_b + LOD_{xy}}{2}$$

gdzie: n - ilość niezależnych oznaczeń dla roztworów wzorcowych, na podstawie których wyznaczono krzywą kalibracyjną

S_b - odchylenie standardowe wyrazu wolnego uzyskanej krzywej kalibracyjnej

S_{xy} - szcążkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej

y_i - wartość pola powierzchni kwasu fenolowego wyznaczona doświadczalnie

Y_i - wartość pola powierzchni kwasu fenolowego obliczona na podstawie znalezionej równania regresji

granica oznaczalności

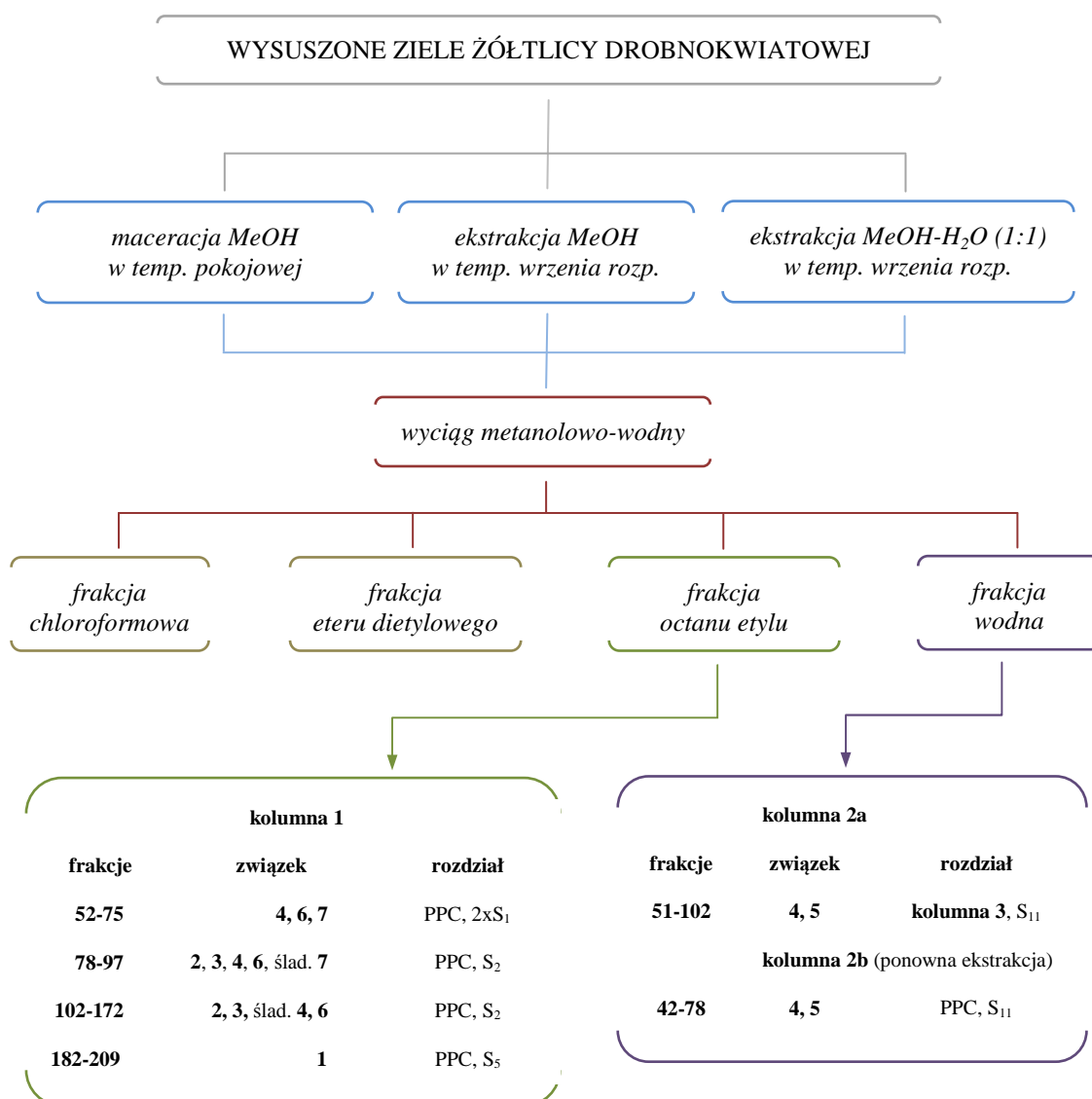
$$LOQ = 3 * LOD$$

8. WYNIKI

8.1. Izolacja i identyfikacja flawonoidów

8.1.1. Izolacja związków flawonoidowych

W frakcji octanu etylu (**OE**) i frakcji wodnej (**W**) (rozdz. 7.1.6.) stwierdzono obecność kilku związków flawonoidowych. Obydwie frakcje poddano rozdzielni chromatograficznemu w kolumnach szklanych. Schemat przeprowadzonego rozdzielu przedstawiono na rycinie 8.



Rycina 8. Schemat izolacji związków flawonoidowych z ziela żółtlicy drobnokwiatowej.

8.1.1.1. Rozdział frakcji octanu etylu (OE) i frakcji wodnej (W)

Rozdział frakcji OE i W przeprowadzono w kolumnach szklanych wypełnionych celulozą Whatman CF-11 w układzie S_{12} (rozd. 7.1.3.2.1.). Z kolumny, w której rozdzielano frakcję octanu etylu (**kolumna 1**), zebrano 235 frakcji o objętości po około 300 ml każda. Natomiast z kolumny z naniesioną frakcją wodną (**kolumna 2a**), zebrano 186 frakcji o objętości po około 200 ml każda. Zbierane frakcje z poszczególnych kolumn zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze poniżej 40° C. Uzyskane frakcje z tej samej kolumny, o podobnym obrazie chromatograficznym, łączono na podstawie wyników kontroli chromatograficznej, prowadzonej za pomocą TLC w układach S_7 , S_8 (rozd. 7.1.3.1.1.) oraz PC w układach S_1 , S_2 , S_3 , S_5 , S_{11} (rozd. 7.1.3.1.2.).

Z kolumny 1 (OE) do izolacji flawonoidów wykorzystano frakcje:

- 52-75 - zawierające mieszaninę związków **4, 6 i 7**
- 78-97 - zawierające mieszaninę związków **2, 3, 4, 6** oraz śladowe ilości związku **7**
- 102-172 - zawierające mieszaninę związków **2, 3** oraz śladowe ilości związków **4 i 6**
- 182-209 - zawierające związek **1**.

Z kolumny 2a (W) do izolacji flawonoidów wykorzystano frakcje:

- 51-102 – zawierające mieszaninę związków **4 i 5**.

Na chromatogramach we wszystkich frakcjach, poza plamami fluoryzującymi na żółto lub brunatno w świetle lampy UV_{366nm} , obecne były dodatkowo liczne związki, fluoryzujące na niebiesko przed wywołaniem oraz na jasnoniebiesko lub seledynowo po wywołaniu odczynnikiem NA.

8.1.1.1.1. Rozdział frakcji 52-75, 78-97, 102-172, 182-209

Rozdział frakcji 52-75, 78-97, 102-172, 182-209 prowadzono z wykorzystaniem planarnej chromatografii preparatywnej (PPC). Metanolowe roztwory poszczególnych frakcji nanoszono pasmowo na arkusze bibuły chromatograficznej Whatman nr 3, a następnie rozwijano jednokierunkową techniką wstępującą w układach rozpuszczalników:

- S_1 (dwukrotnie) - frakcje 52-75
- S_2 - frakcje 78-97 i 102-172
- S_5 - frakcje 182-209.

Chromatogramy po wysuszeniu w warunkach naturalnych oglądano w świetle lampy UV_{366nm}, zaznaczano żółte (zw. 1, 2, 3) i brunatne (zw. 4, 6, 7) pasma związków, które następnie wycinano i wmywano trzykrotnie metanolem i dwukrotnie mieszaniną metanol-woda (1:1) na wrzącej łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną. Uzyskane frakcje związków **1, 2, 3, 4, 6, 7** kontrolowano chromatograficznie (PC, S₂, S₅; TLC, S₈, W₁).

8.1.1.1.2. Rozdział frakcji 52-102

Frakcje 51-102 zebrane z kolumny 2a zawierały mieszaninę związków flawonoidowych **4 i 5**. W wyniku rozdziału chromatograficznego mieszaniny tych związków, za pomocą kolumny wypełnionej celulozą i eluowanej wodą (**kolumna 3**), zebrano 115 frakcji po 100 ml każda, które następnie zagęszczono w temperaturze 50° C do objętości około 10 ml. Kontrola chromatograficzna frakcji (PC, S₁₁, W₁) wykazała obecność związku 4.

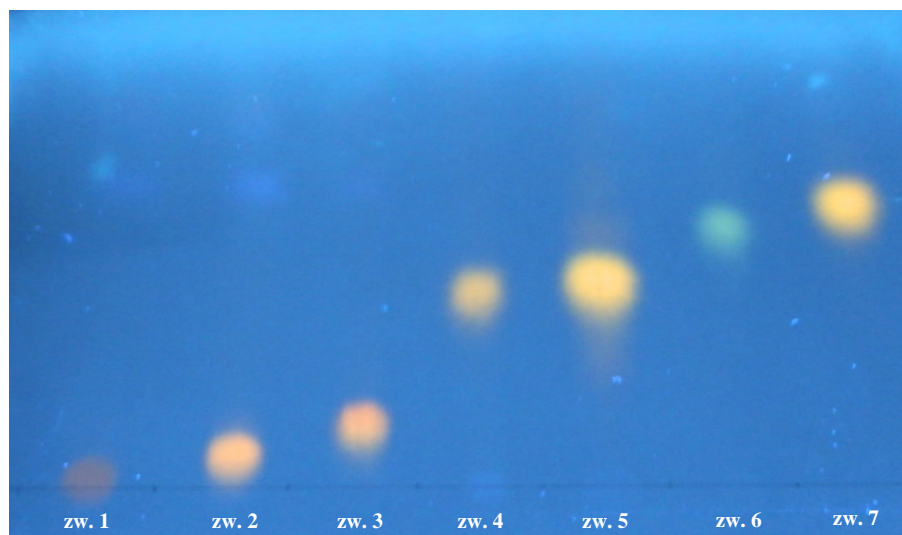
Powtórzenie procedur ekstrakcyjnych i chromatograficznych (**kolumna 2b**) doprowadziły do uzyskania 132 frakcji o objętości 300 ml każda. Frakcje 42-78 rozdzielano za pomocą preparatywnej chromatografii bibułowej w układzie S₁₁. Następnie chromatogramy po wysuszeniu w warunkach naturalnych oglądano w świetle lampy UV_{366nm}, zaznaczano brunatne pasma związków flawonoidowych 4 i 5, które następnie wycinano i eluowano trzykrotnie metanolem i dwukrotnie mieszaniną metanol-woda (1:1) na wytrząsarce, w temperaturze pokojowej. Uzyskano frakcje związków **4 i 5** (PC, S₁₁, W₁).

8.1.1.2. Oczyszczanie frakcji związków flawonoidowych

Przeprowadzone kontrole chromatograficzne frakcji związków wykazały, iż frakcje te zawierały oprócz odpowiednich flawonoidów, także inne związki, wykazujące niebieską fluorescencję w świetle lampy UV_{366nm}. Uzyskane związki flawonoidowe oczyszczano kilkakrotnie od związków fluoryzujących na niebiesko w kolejnych kolumnach szklanych wypełnionych żelom dekstranowym sefadeks LH-20 stosując jako fazy ruchome:

- **związek 1** - dwukrotnie przy pomocy S₁₅, a następnie S₁₆. Uzyskano 2,5 mg związku w postaci bezpostaciowej.
- **związek 2** - dwukrotnie przy pomocy S₁₃, a następnie S₁₆. Uzyskano 8 mg związku w postaci żółtych kryształków.

- **związek 3** - S₁₄, dwukrotnie przy pomocy S₁₅, a następnie S₁₆. Uzyskano 5 mg związku w postaci bezpostaciowej.
- **związek 4** - S₁₃, dwukrotnie przy pomocy S₁₅, a następnie S₁₆. Uzyskano 8 mg związku w postaci żółtych igieł .
- **związek 5** - dwukrotnie przy pomocy S₁₅, a następnie S₁₆. Uzyskano 7 mg związku w postaci żółtych kryształków.
- **związek 6** - S₁₅, S₁₃, a następnie S₁₆. Uzyskano 13 mg związku w postaci żółtych igieł.
- **związek 7** - dwukrotnie przy pomocy S₁₄ i S₁₅, a następnie S₁₆. Uzyskano 9 mg związku w postaci żółtych igieł.



Rycina 9. Chromatogram TLC (S₂, W₁) wyizolowanych związków flawonoidowych.

8.1.2. Identyfikacja związków flawonoidowych

8.1.2.1. Związek 1

7-O- β -glukopiranozyd kwercetagetyny

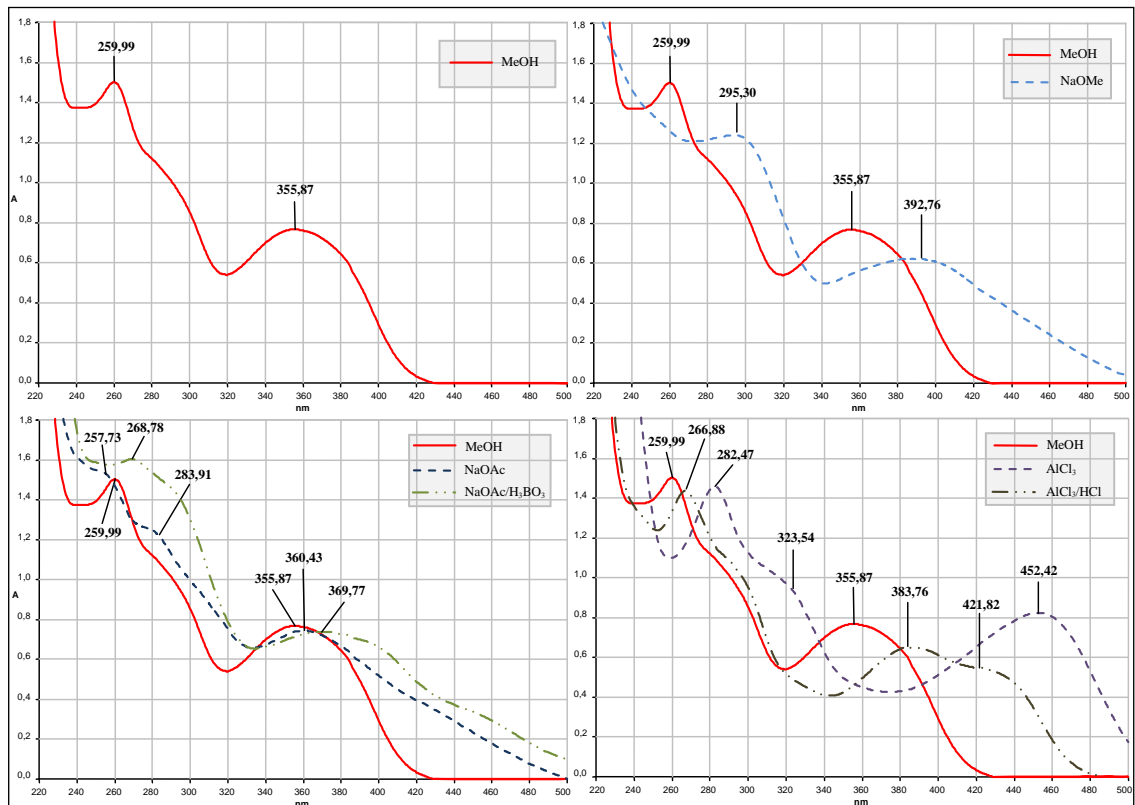
synonimy: 7-O- β -glukopiranozyd 6-hydroksykwercetyny, kwercetagetyna

Analiza chromatograficzna (TLC)

Tabela 4. Analiza chromatograficzna związku 1

Wartość współczynnika R_f			Fluorescencja/zabarwienie			
S_1	S_6	S_9	UV _{366nm}	NA/UV _{366nm}	NA/VIS	$AlCl_3$ /UV _{366nm}
0,02	0,07	0,41	żółta	pomarańczowa	różowożółte	żółta

Analiza widm w nadfiolecie (UV)



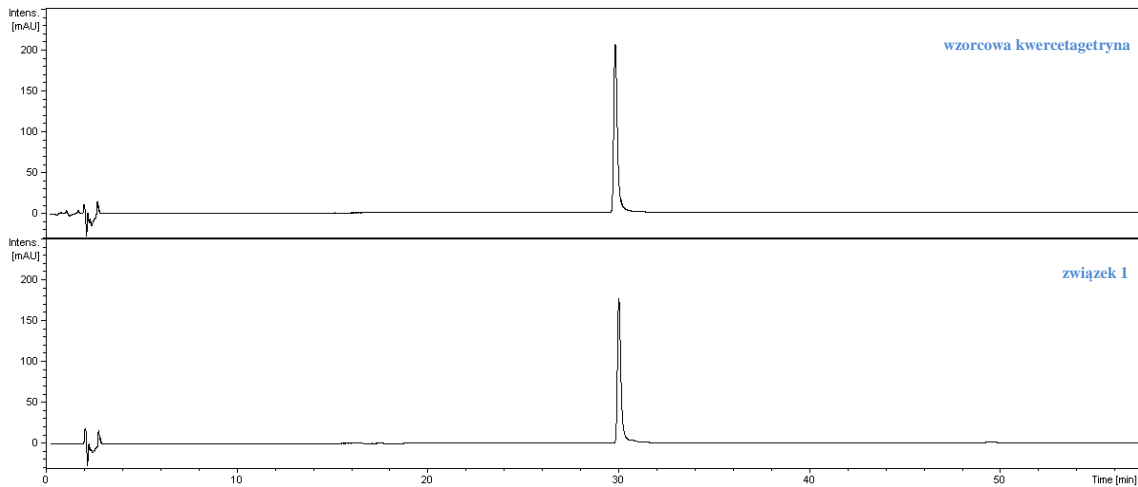
Rycina 10. Widma w nadfiolecie związku 1.

Tabela 5. Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 1

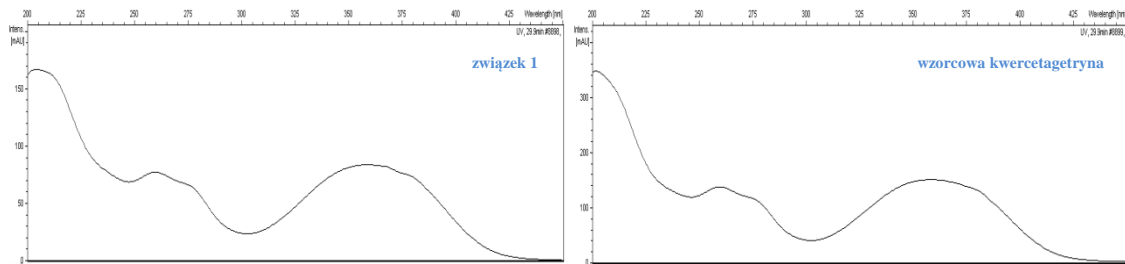
Odczynnik	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{\max I}$ (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	260	-	356	-
+ NaOMe	295		393(dec)	37
+ NaOAc	258, 284	2	360	
+ NaOAc/H ₃ BO ₃	269		370	14
+ AlCl ₃	282		324, 452	30*
+ AlCl ₃ /HCl	267		384, 422	66

* wobec widma z AlCl₃/HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.

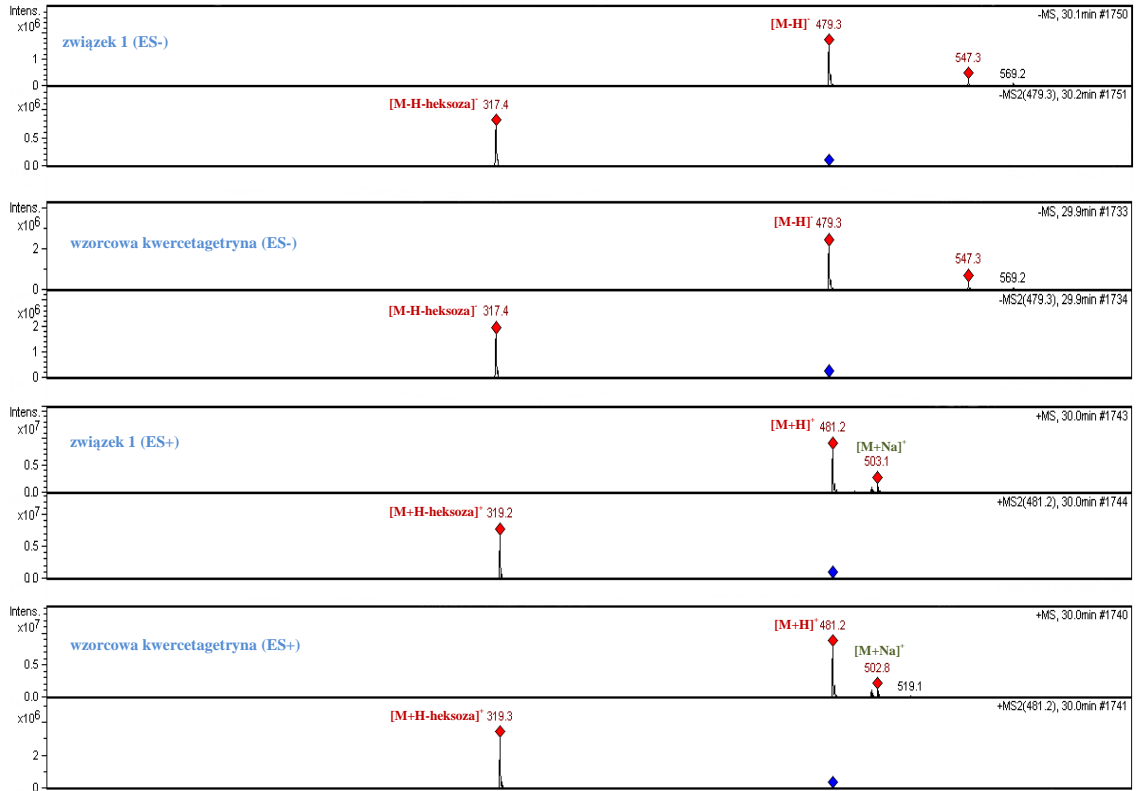
Analiza UHPLC-DAD-ESI-MS



Rycina 11. Chromatogram UHPLC-DAD związku 1 i wzorcowej kwercetagetryny.



Rycina 12. Widma UV-DAD związku 1 i wzorcowej kwercetagetryny.



Rycina 13. Widma ESI-MS związku 1 i wzorcowej kwercetagetryny w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+).

Tabela 6. Wyniki analizy ESI-MS związku 1

	ES -	(m/z)	ES +	(m/z)
jon molekularny	[M-H] ⁻	479	[M+H] ⁺	481
jon fragmentacyjny:				
deprotonowana/protonowana kwercetagetryna	[M-H-heksoza] ⁻	317	[M+H-heksoza] ⁺	319
addukty:				
			[M+Na] ⁺	503
masa związku:	480		wzór sumaryczny związku:	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃

8.1.2.2. Związek 2

7-O- β -glukopiranozyd kwercetyny

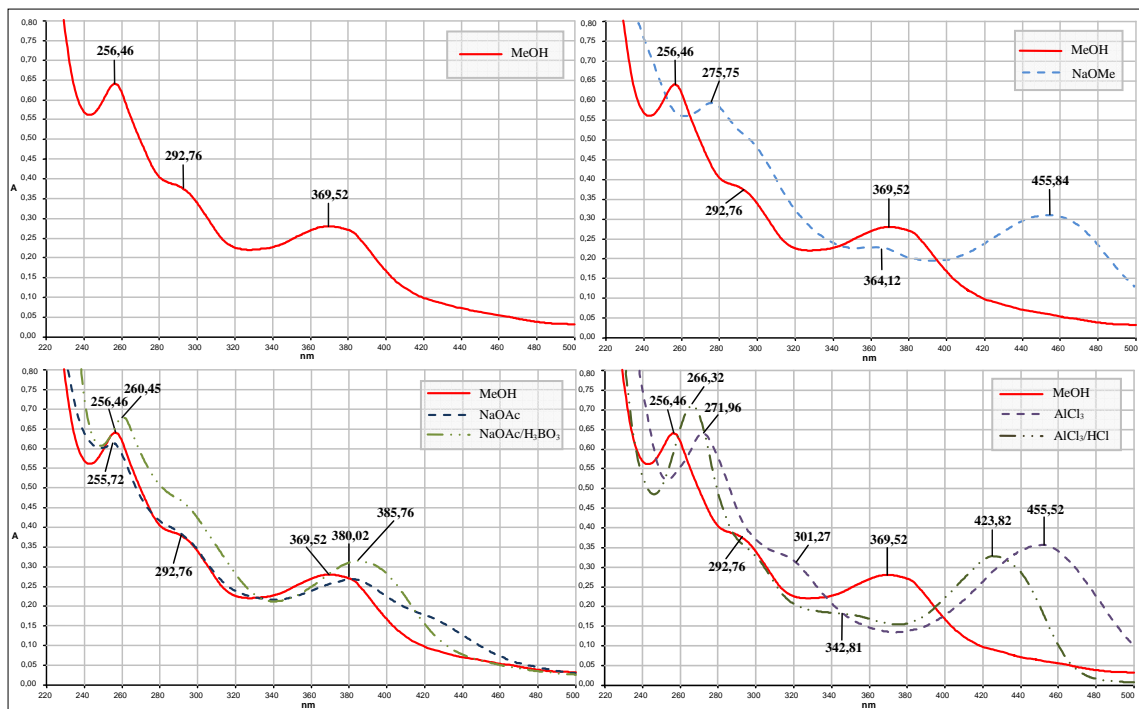
synonim: kwercymetryna

Analiza chromatograficzna (TLC)

Tabela 7. Analiza chromatograficzna związku 2

Wartość współczynnika R_f			Fluorescencja/zabarwienie			
S_1	S_6	S_9	UV _{366nm}	NA/UV _{366nm}	NA/VIS	AlCl ₃ /UV _{366nm}
0,04	0,26	0,62	żółta	pomarańczowa	pomarańczowe	żółta

Analiza spektralna w nadfiolecie (UV)



Rycina 14. Widma w nadfiolecie związku 2.

Tabela 8. Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 2

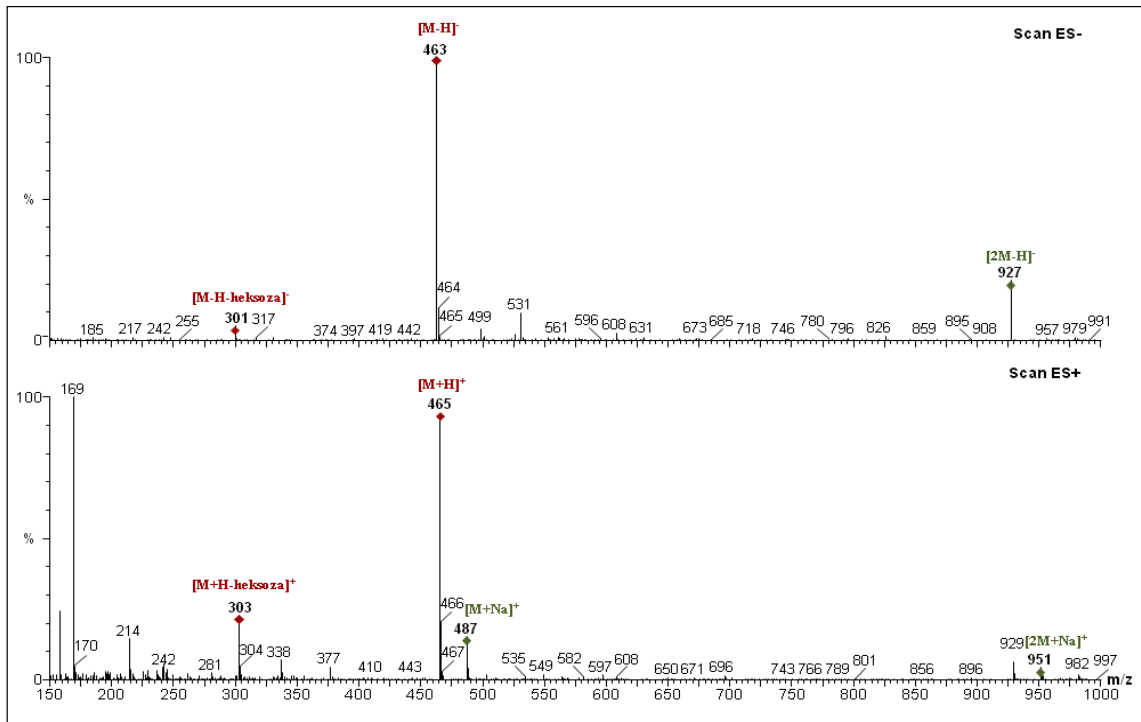
Odczynnik	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{\max I}$ (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	256, 293	-	370	-
+ NaOMe	276		364, 456(dec)	86
+ NaOAc	256	0	380, 423sh	
+ NaOAc/H ₃ BO ₃	260		386	16
+ AlCl ₃	272		301, 456	32*
+ AlCl ₃ /HCl	266		343, 424	54

* wobec widma z AlCl₃/HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.

Analiza HPLC-DAD-ESI-MS

Tabela 9. Analiza HPLC-DAD związku 2

Widmo UV-DAD		Czas retencji (min)
$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)	
256	368	18,47



Rycina 15. Widmo ESI-MS związku 2 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+).

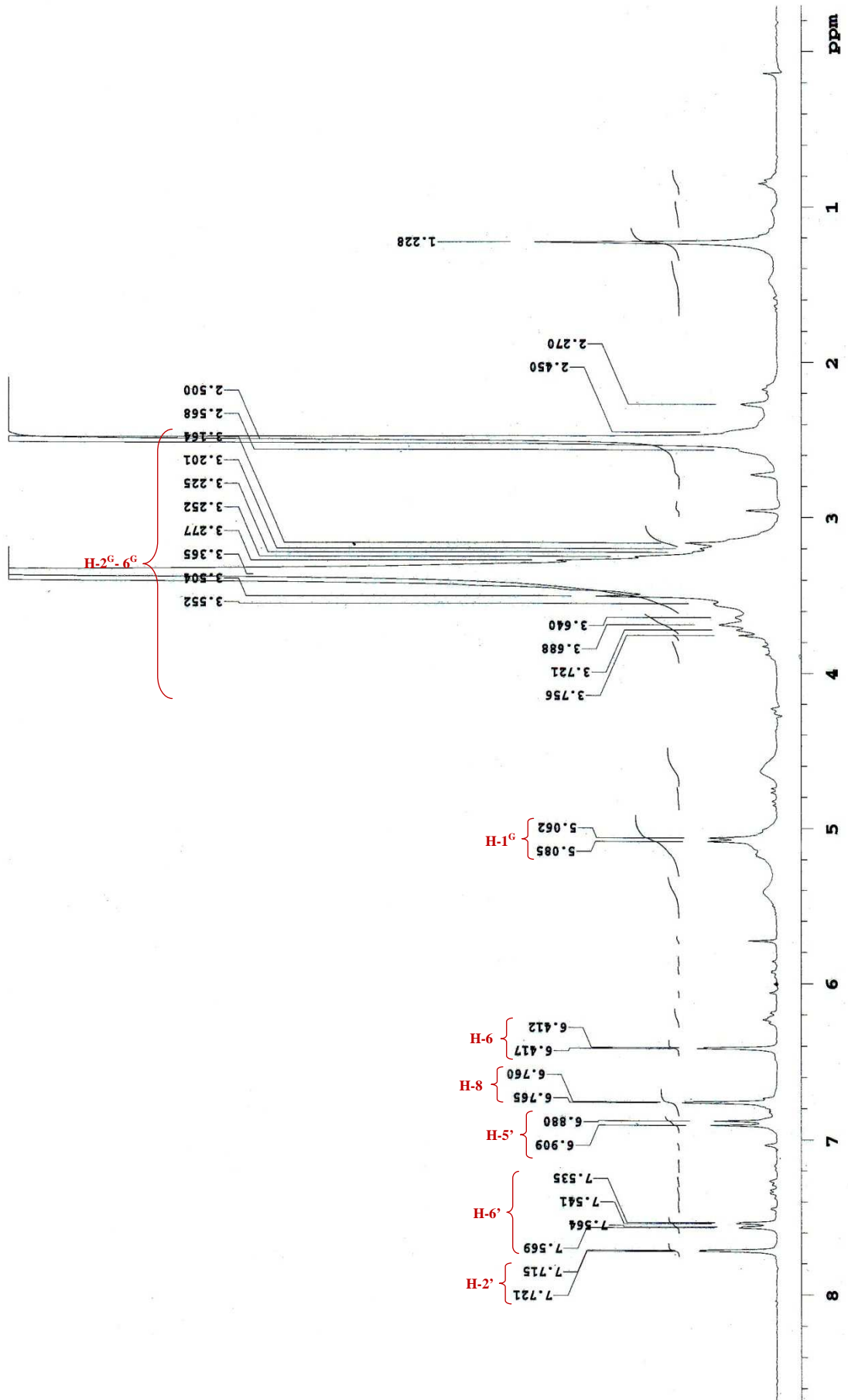
Tabela 10. Wyniki analizy ESI-MS związku 2

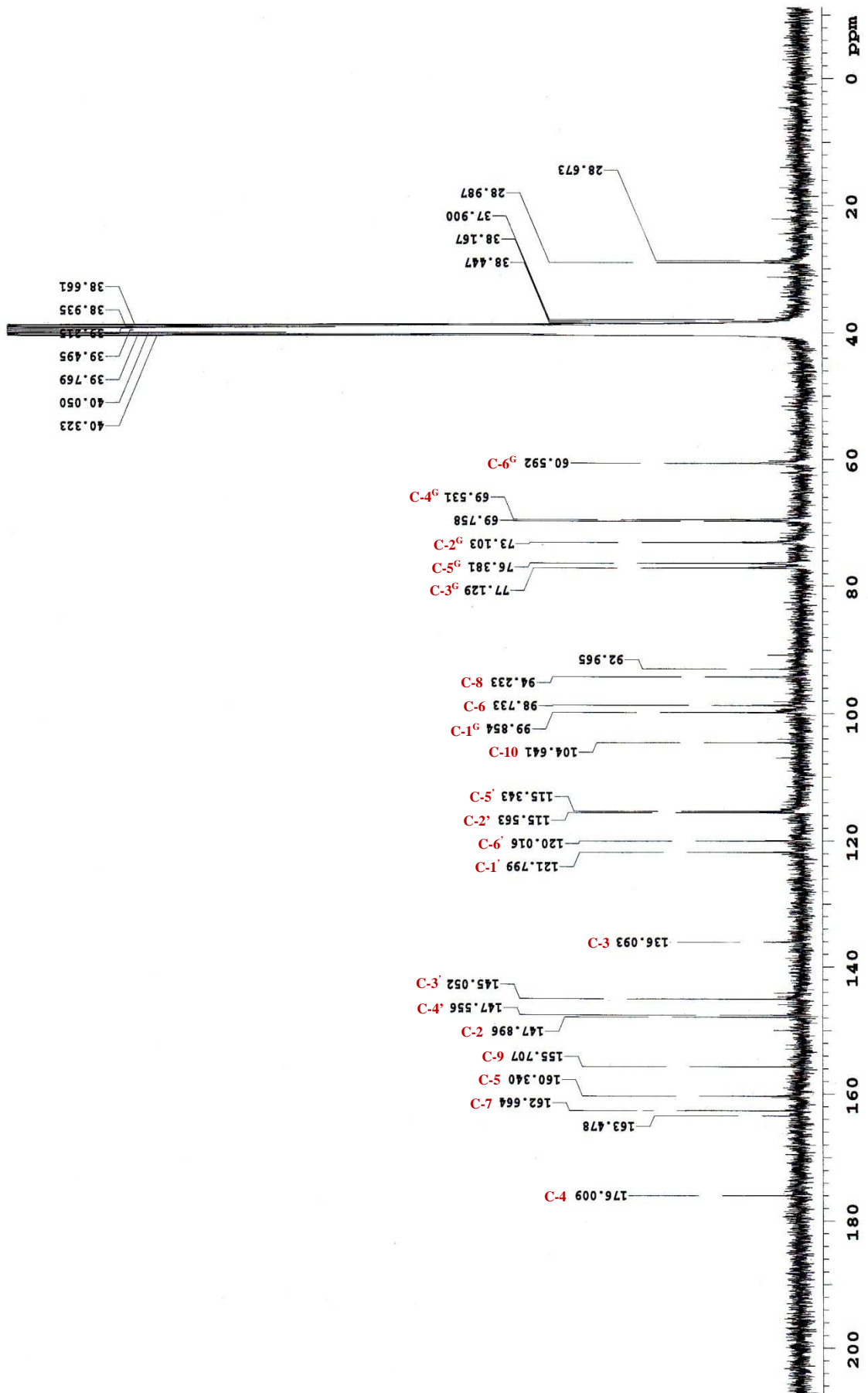
	ES -	(m/z)	ES +	(m/z)
jon molekularny	[M-H] ⁻	463	[M+H] ⁺	465
jon fragmentacyjny:				
deprotonowana/protonowana kwercetyna	[M-H-heksoza] ⁻	301	[M+H-heksoza] ⁺	303
addukty:				
			[M+Na] ⁺	487
			[2M+Na] ⁺	951
	[2M-H] ⁻	927		
masa związku:	464		wzór sumaryczny związku:	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂

Analiza ^1H i ^{13}C NMRTabela 11. ^1H i ^{13}C NMR związku 2 (DMSO- d_6)

Pozycja	Związek 2		Dane literaturowe*	
	$\delta_{\text{C ppm}}$ 75 MHz	$\delta_{\text{H ppm}}$ 300 MHz	$\delta_{\text{C ppm}}$ 100 MHz	$\delta_{\text{H ppm}}$ 400 MHz
2	147,90		147,9 /147,6	
3	136,09		136,0	
4	176,01		176,0	
5	160,34		160,4	12,52 (s, 5-OH)
6	98,73	6,41 (d, $J=2,0$ Hz)	98,7	6,42 (d, $J=1,6$ Hz)
7	162,66		162,7	
8	94,23	6,76 (d, $J=2,0$ Hz)	94,2	6,76 (d, $J=1,6$ Hz)
9	155,71		155,7	
10	104,64		104,6	
1'	121,80		121,8	
2'	115,56	7,72 (d, $J=2,0$ Hz)	115,6 /115,2	7,72 (d, $J=1,7$ Hz)
3'	145,05		145,0	
4'	147,56		147,9/147,6	
5'	115,34	6,89 (d, $J=8,5$ Hz)	115,6/115,2	6,89 (d, $J=6,6$ Hz)
6'	120,02	7,55 (dd, $J=2,0/8,6$ Hz)	120,0	7,55 (dd, $J=1,7/6,6$ Hz)
glukoza				
1 ^G	99,85	5,07 (d, $J=7,2$ Hz)	99,8	5,04 (d, $J=7,4$ Hz)
2 ^G	73,10		73,1	
3 ^G	77,13		77,1	
4 ^G	69,53	3,17-3,76 (m)	69,5	
5 ^G	76,38		76,4	
6 ^G	60,59		60,6	

* Chae i wsp. (2002).

Rycina 16. Widmo ¹H NMR związku 2 (DMSO-d₆).

Rycina 17. Widmo ¹³C NMR związku 2 (DMSO-d₆).

8.1.2.3. Związek 3

7-O- β -glukopiranozyd patuletyny

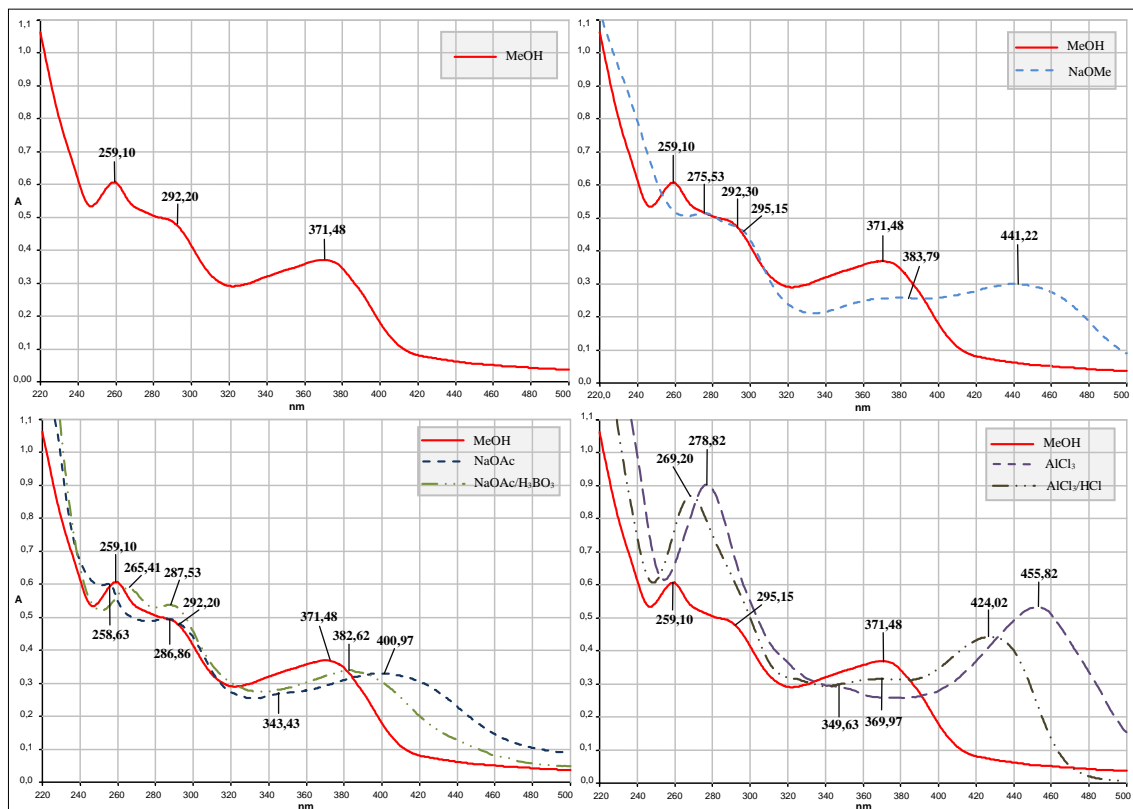
synonimy: 7-O- β -glukopiranozyd 6-metoksykwercetyny, patulitryna

Analiza chromatograficzna (TLC)

Tabela 12. Analiza chromatograficzna związku 3

Wartość współczynnika R _f			Fluorescencja/zabarwienie			
S ₁	S ₆	S ₉	UV _{366nm}	NA/UV _{366nm}	NA/VIS	AlCl ₃ /UV _{366nm}
0,07	0,30	0,60	żółtopomarańczowa	pomarańczowa	pomarańczowe	żółta

Analiza spektralna w nadfiolecie (UV)



Rycina 18. Widma w nadfiolecie związku 3.

Tabela 13. Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 3

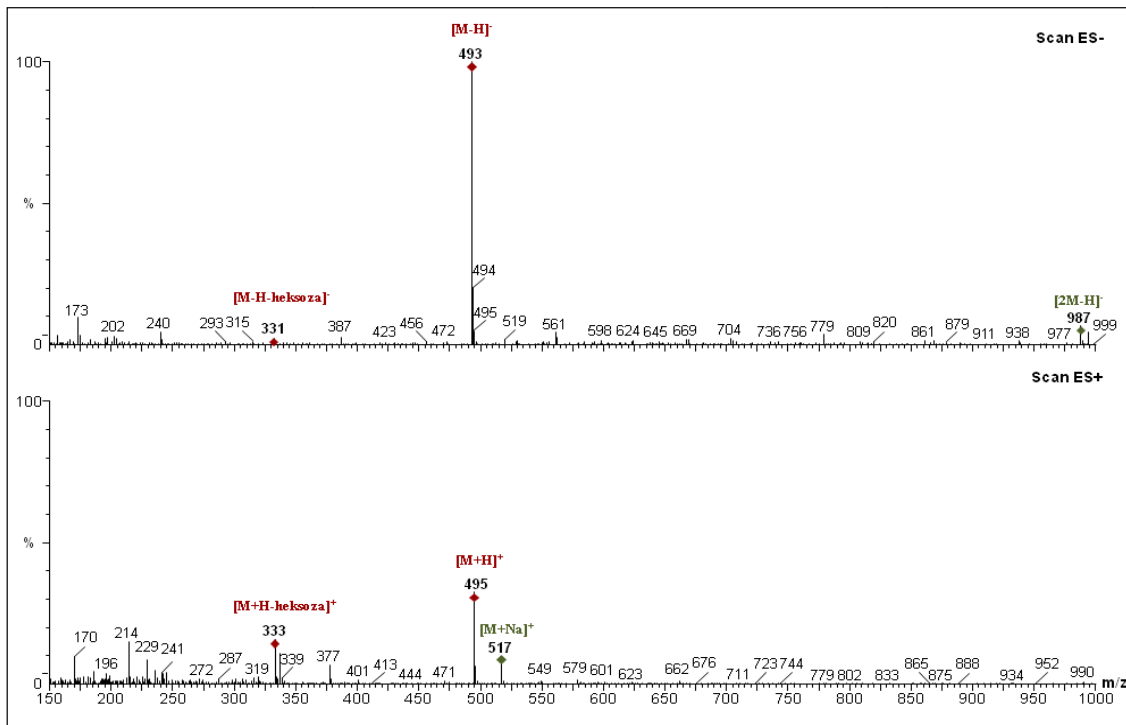
Odczynnik	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{\max I}$ (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	259, 292	-	371	-
+ NaOMe	276, 295sh		384, 441(dec)	70
+ NaOAc	259, 287	0	343sh, 401	
+ NaOAc/H ₃ BO ₃	265, 288		383	12
+ AlCl ₃	279		350sh, 456	32*
+ AlCl ₃ /HCl	269		370, 424	53

* wobec widma z AlCl₃/HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.

Analiza HPLC-DAD-ESI-MS

Tabela 14. Analiza HPLC-DAD związku 3

Widmo UV-DAD		Czas retencji (min)
$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)	
259	370	19,06



Rycina 19. Widmo ESI-MS związku 3 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+).

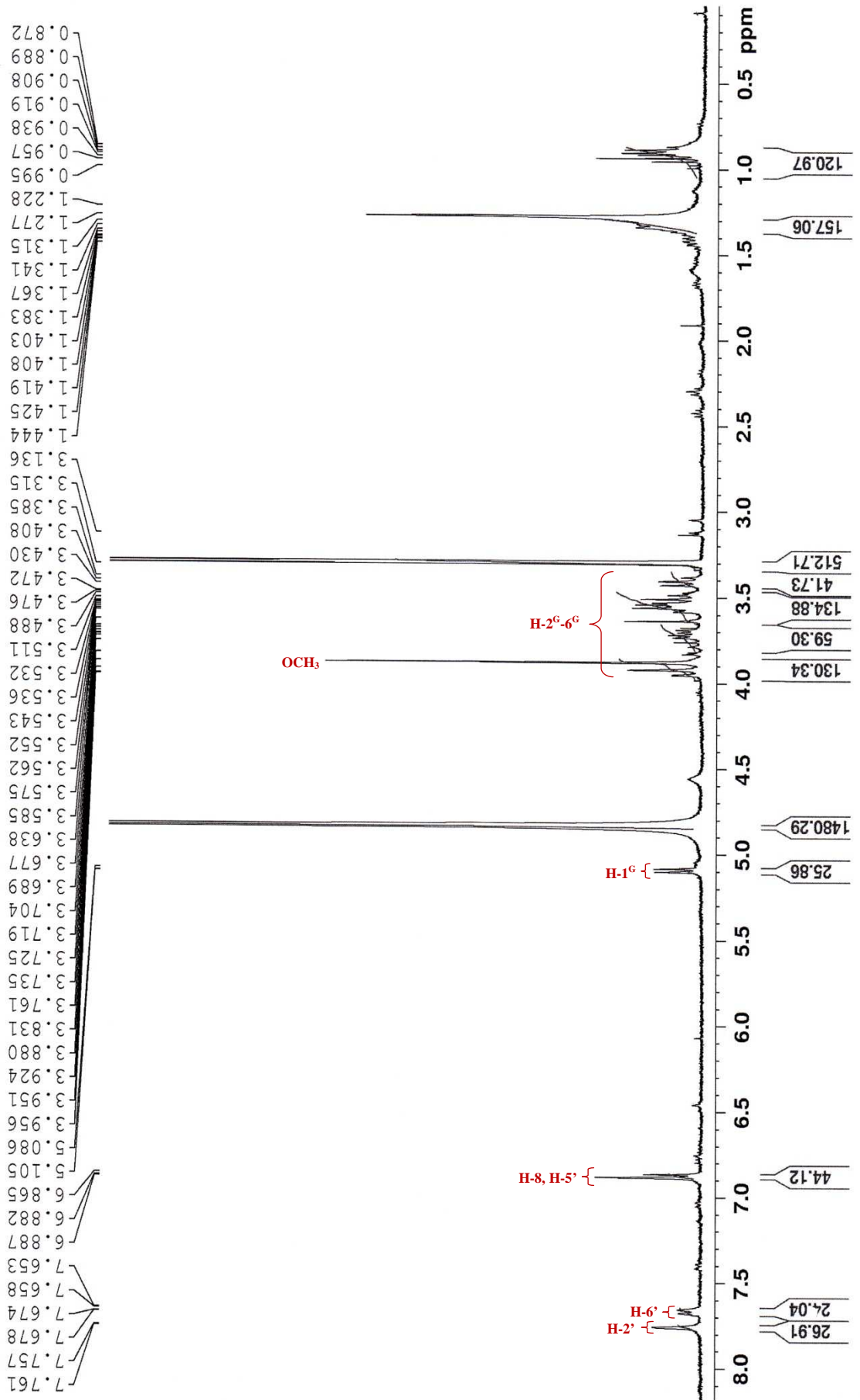
Tabela 15. Wyniki analizy ESI-MS związku 3

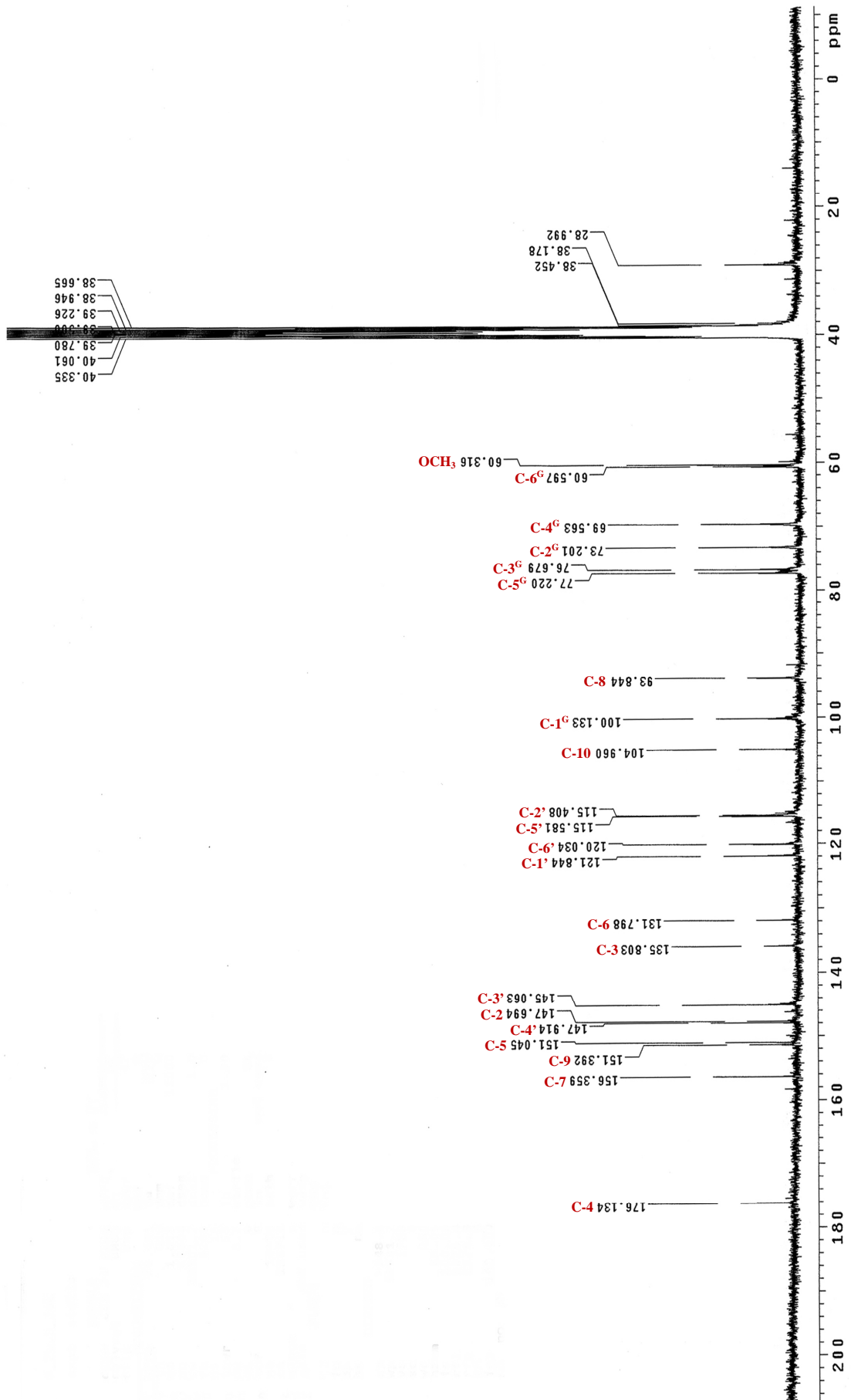
	ES -	(m/z)	ES +	(m/z)
jon molekularny	[M-H] ⁻	493	[M+H] ⁺	495
jon fragmentacyjny:				
deprotonowana/protonowana patuletyna	[M-H-heksoza] ⁻	331	[M+H-heksoza] ⁺	333
addukty:			[M+Na] ⁺	517
	[2M-H] ⁻	987		
masa związku:	494		wzór sumaryczny związku:	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₃

Analiza ^1H i ^{13}C NMRTabela 16. ^1H ($\text{CD}_3\text{-OD}$) i ^{13}C NMR (DMSO-d_6) związku 3

Pozycja	Związek 3		Dane literaturowe*		
	$\delta_{\text{C ppm}}$ 75 MHz	$\delta_{\text{H ppm}}$ 400 MHz	$\delta_{\text{C ppm}}$ 100 MHz	$\delta_{\text{H ppm}}$ 500 MHz	
2	147,69		148,61		
3	135,80		136,62		
4	176,13		176,97		
5	151,04		151,91		
6	131,80		132,65		
7	156,36		157,18		
8	93,84	6,88 (s)	94,75	6,88 (s)	
9	151,39		152,23		
10	104,96		105,83		
1'	121,84		122,67		
2'	115,41	7,76 (d, $J=1,6$ Hz)	116,27	7,77 (d, $J=1,7$ Hz)	
3'	145,06		145,95		
4'	147,91		148,83		
5'	115,58	6,88 (d, $J=8,7$ Hz)	116,51	6,89 (d, $J=8,5$ Hz)	
6'	120,03	7,67 (dd, $J=1,8/8,2$ Hz)	120,99	7,67 (dd, $J=1,8/8,4$ Hz)	
OCH₃	60,32	3,92 (s)	61,23	3,91 (s)	
glukoza					
1 ^G	100,13	5,10 (d, $J=7,3$ Hz)	101,00	5,13 (d, $J=7,2$ Hz)	
2 ^G	73,20	}	74,06		
3 ^G	76,68		77,49		
4 ^G	69,56		3,38-3,96 (m)	70,44	
5 ^G	77,22		78,04		
6 ^G	60,60		61,46		

* ^1H NMR: Schmeda-Hirschmann i wsp. (2004), ^{13}C NMR: Valant-Vetschera i wsp. (2003).

Rycina 20. Widmo ^1H NMR związku 3 ($\text{CD}_3\text{-OD}$).

Rycina 21. Widmo ^{13}C NMR związku 3 (DMSO- d_6).

8.1.2.4. Związek 4

3-O- β -glukopiranozyd kwercetyny

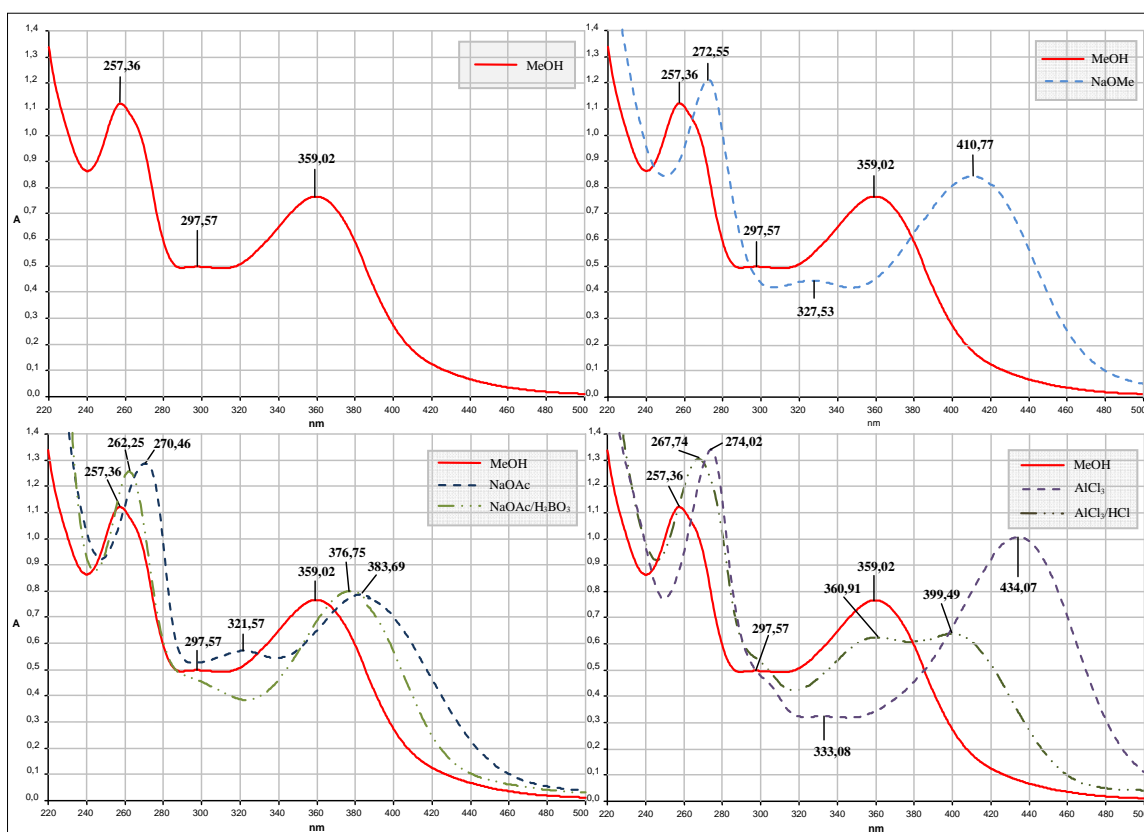
synonim: izokwercytryna

Analiza chromatograficzna (TLC)

Tabela 17. Analiza chromatograficzna związku 4

Wartość współczynnika R_f			Fluorescencja/zabarwienie			
S_1	S_6	S_9	UV _{366nm}	NA/UV _{366nm}	NA/VIS	AlCl ₃ /UV _{366nm}
0,29	0,62	0,62	brunatna	pomarańczowa	żółtopomarańczowe	żółta

Analiza widm w nadfiolecie (UV)



Rycina 22. Widma w nadfiolecie związku 4.

Tabela 18. Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 4

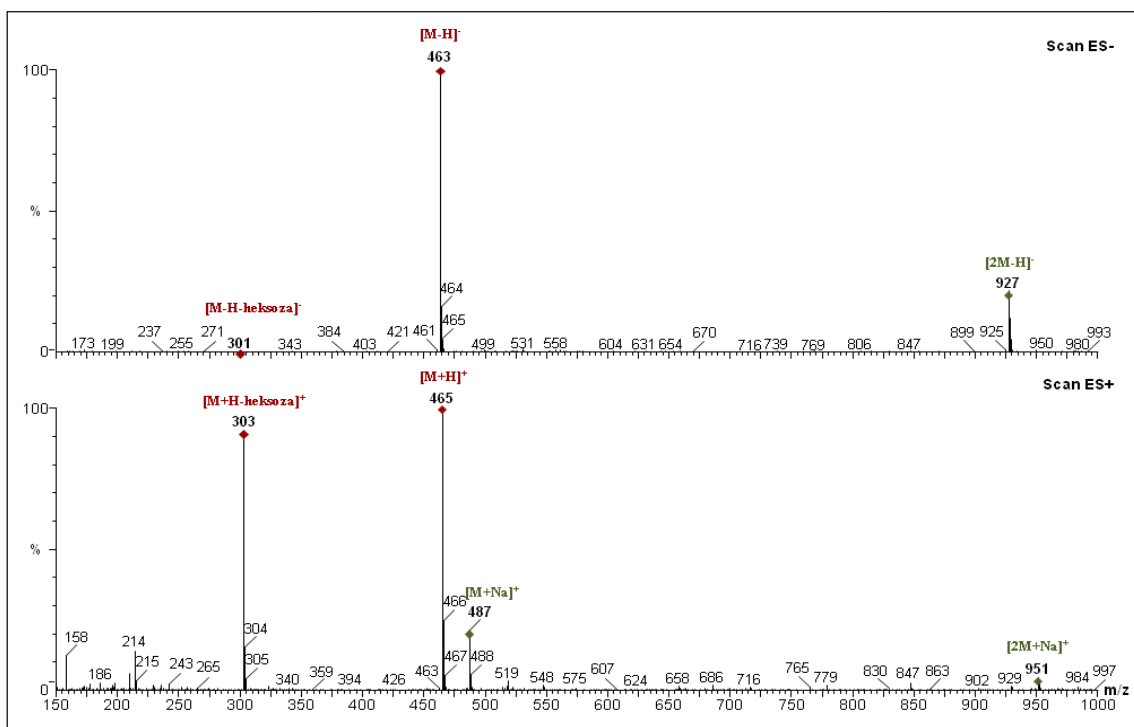
Odczynnik	λ _{max II} (nm)	Δλ	λ _{max I} (nm)	Δλ
MeOH	257	-	298sh, 359	-
+ NaOMe	273		328, 411	52
+ NaOAc	270	13	322, 384	
+ NaOAc/H ₃ BO ₃	262		377	18
+ AlCl ₃	274		333sh, 434	35*
+ AlCl ₃ /HCl	268		361, 399	40

* wobec widma z AlCl₃/HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.

Analiza HPLC-DAD-ESI-MS

Tabela 19. Analiza HPLC-DAD związku 4

Widmo UV-DAD		Czas retencji (min)
$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)	
255	359	15,90



Rycina 23. Analiza ESI-MS związku 4 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+).

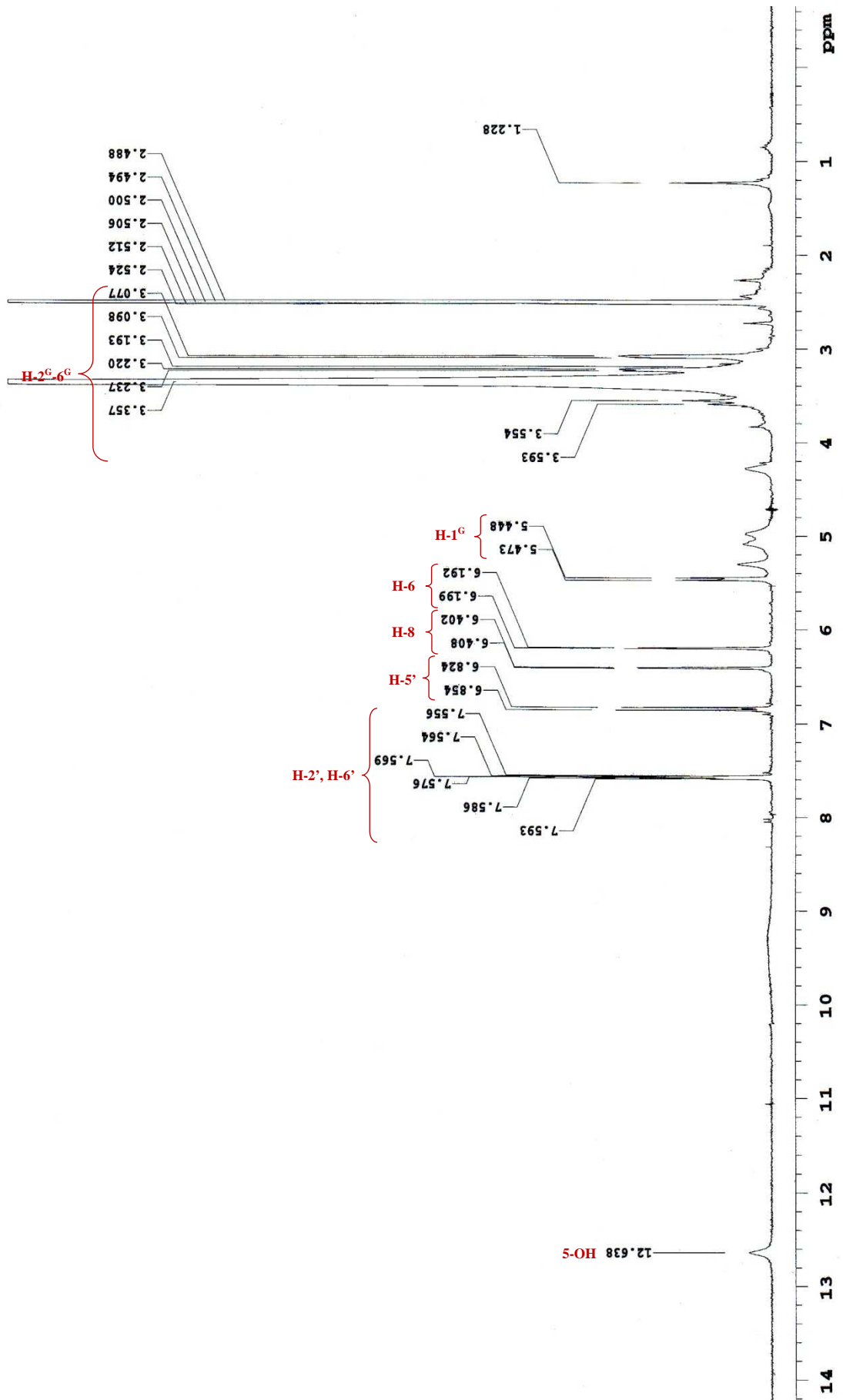
Tabela 20. Wyniki analizy ESI-MS związku 4

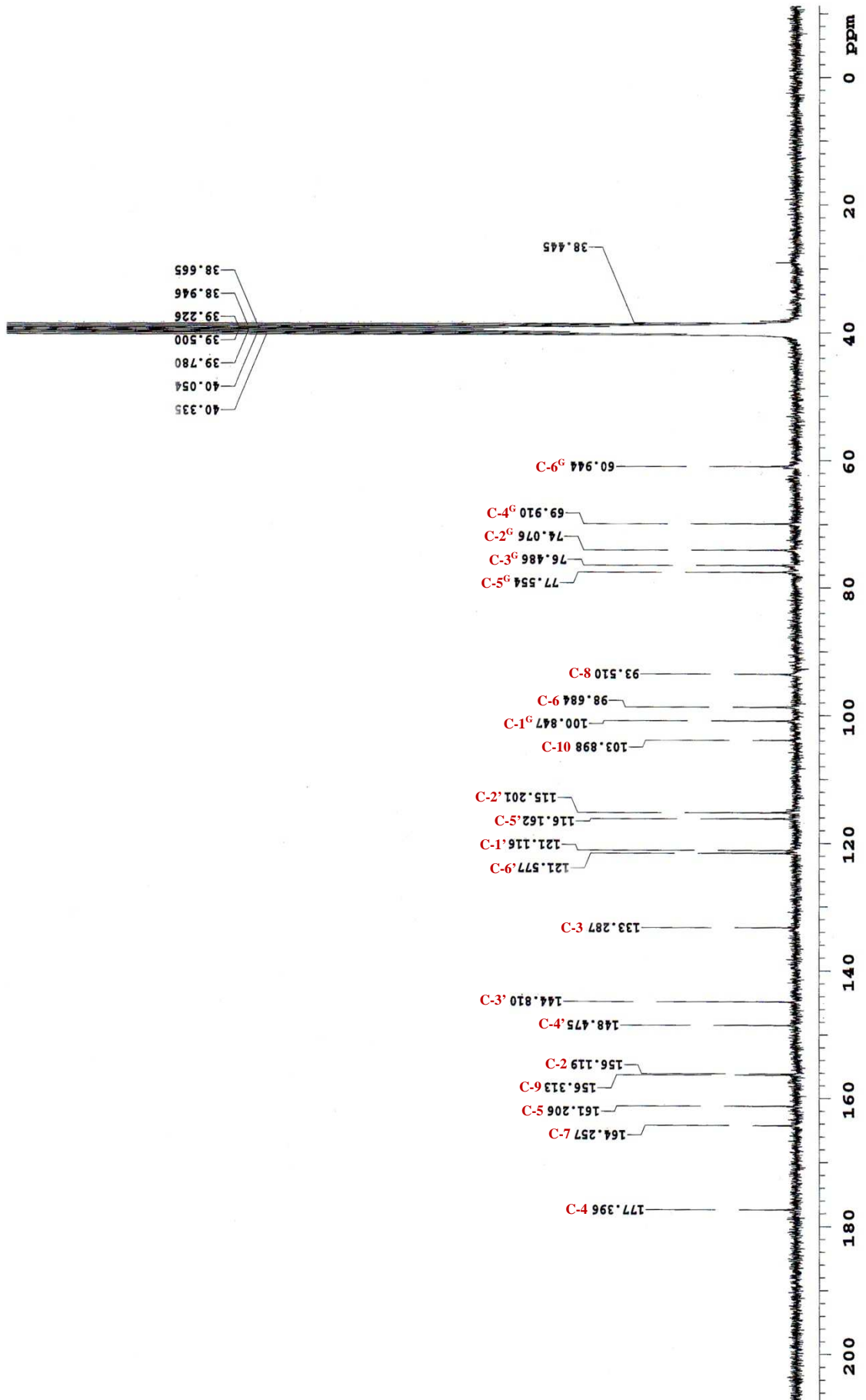
	ES -	(m/z)	ES +	(m/z)
jon molekularny	[M-H] ⁻	463	[M+H] ⁺	465
jon fragmentacyjny:				
deprotonowana/protonowana kwercetyna	[M-H-heksoza] ⁻	301	[M+H-heksoza] ⁺	303
addukty:				
			[M+Na] ⁺	487
			[2M+Na] ⁺	951
	[2M-H] ⁻	927		
masa związku:	464		wzór sumaryczny związku:	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂

Analiza ^1H i ^{13}C NMRTabela 21. ^1H i ^{13}C NMR związku 4 w DMSO- d_6

Pozycja	Związek 4		Dane literaturowe*	
	$\delta_{\text{C}}_{\text{ppm}}$ 75 MHz	$\delta_{\text{H}}_{\text{ppm}}$ 300 MHz	$\delta_{\text{C}}_{\text{ppm}}$ 75 MHz	$\delta_{\text{H}}_{\text{ppm}}$ 300 MHz
2	156,12		156,16	
3	133,29		133,34	
4	177,40		177,78	
5	161,21	12,64 (s, 5-OH)	161,24	
6	98,68	6,19 (d, $J=1,9$ Hz)	98,93	6,20 (d, $J=2,0$ Hz)
7	164,26		164,61	
8	93,51	6,40 (d, $J=1,9$ Hz)	93,63	6,41 (d, $J=2,0$ Hz)
9	156,31		156,40	
10	103,90		103,79	
1'	121,12		121,11	
2'	115,20	7,57 (d, $J=2,0$ Hz)	115,25	7,76 (d, $J=2,5$ Hz)
3'	144,81		144,86	
4'	148,47		148,55	
5'	116,16	6,84 (d, $J=9,0$ Hz)	116,21	6,82 (d, $J=8,5$ Hz)
6'	121,58	7,57 (dd, $J=2,2/8,9$ Hz)	121,62	7,54 (dd, $J=2,5/8,5$ Hz)
glukoza				
1 ^G	100,85	5,46 (d, $J=7,5$ Hz)	100,99	5,34 (d, $J=7,5$ Hz)
2 ^G	74,08		74,16	
3 ^G	76,49		76,56	
4 ^G	69,91	3,08-3,59 (m)	69,99	3,08-3,88 (m)
5 ^G	77,55		77,56	
6 ^G	60,94		61,03	

* Eldahshan (2011).

Rycina 24. Widmo ^1H NMR związku 4 (DMSO- d_6).

Rycina 25. Widmo ^{13}C NMR związku 4 (DMSO- d_6).

8.1.2.5. Związek 5

3-O- β -glukuronid kwercetyny

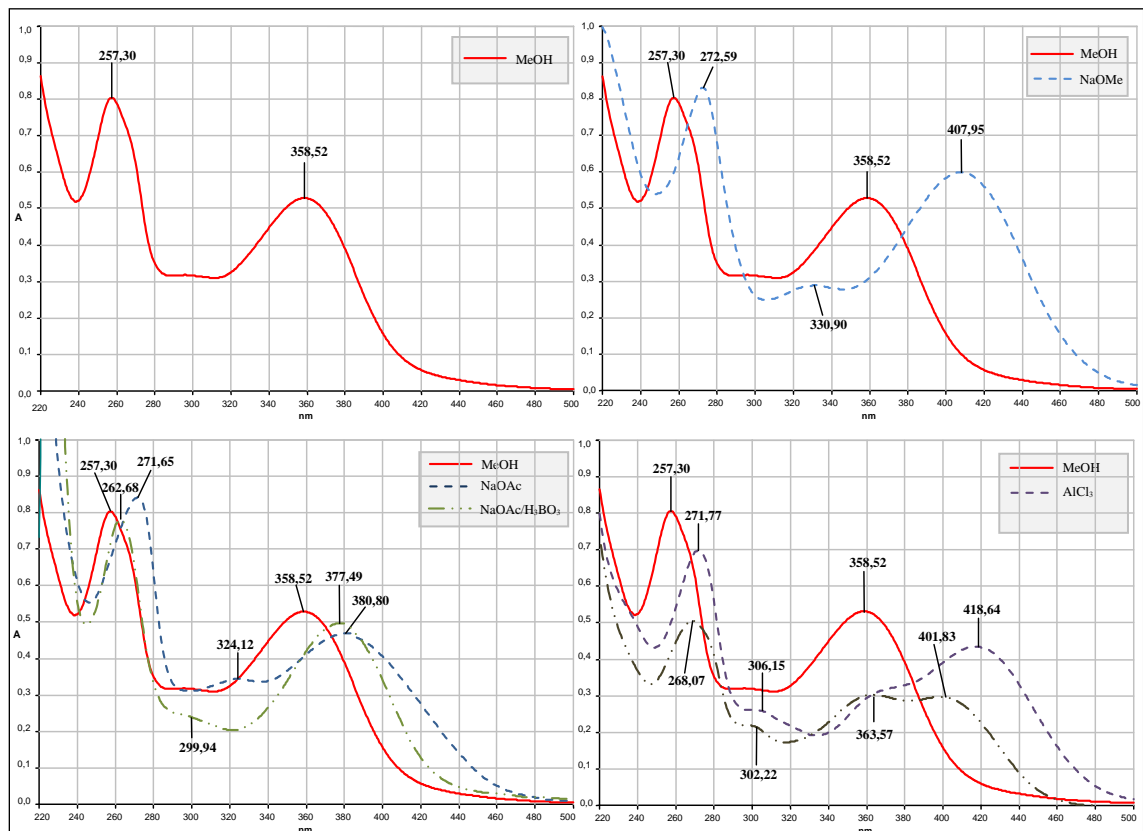
synonim: mikwelianin

Analiza chromatograficzna (TLC)

Tabela 22. Analiza chromatograficzna związku 5

Wartość współczynnika R_f			Fluorescencja/zabarwienie			
S_1	S_6	S_9	UV _{366nm}	NA/UV _{366nm}	NA/VIS	AlCl ₃ /UV _{366nm}
0,29	0,60	0,51	brunatna	żółtopomarańczowa	żółtopomarańczowe	żółta

Analiza spektralna w nadfiolecie (UV)



Rycina 26. Widma w nadfiolecie związku 5.

Tabela 23. Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 5

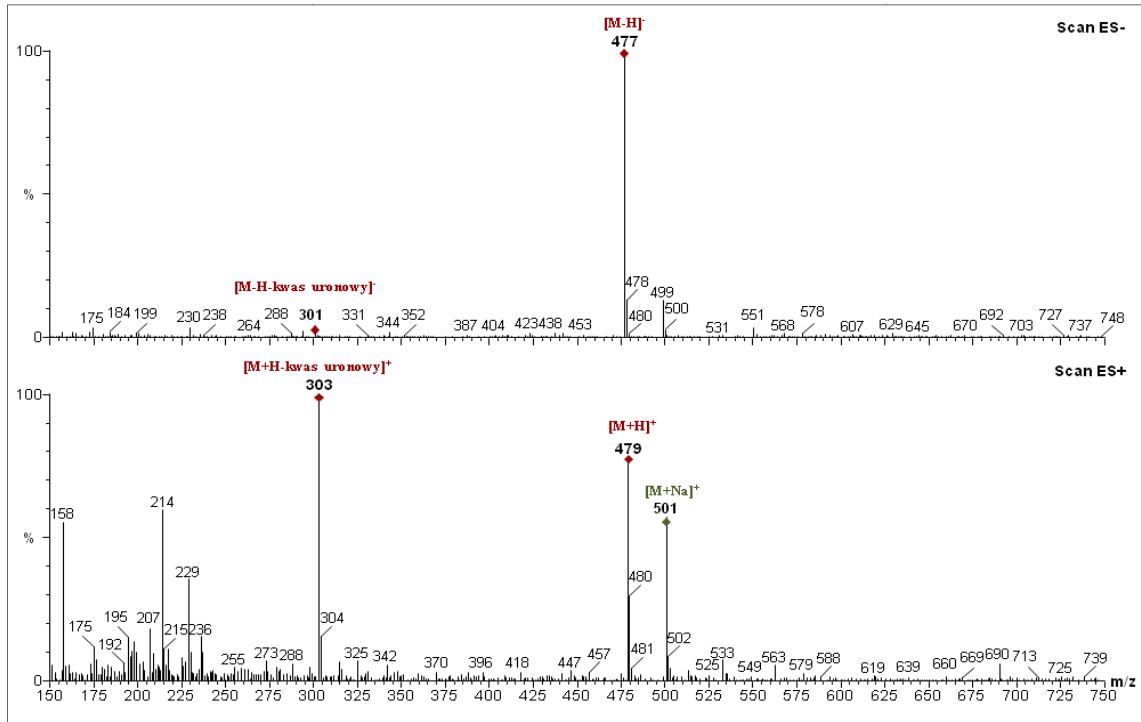
Odczynnik	$\lambda_{max II}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{max I}$ (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	257	-	359	-
+ NaOMe	273		331, 408	49
+ NaOAc	272	15	324, 381	
+ NaOAc/H ₃ BO ₃	263		300sh, 377	18
+ AlCl ₃	272		306sh, 419	17*
+ AlCl ₃ /HCl	268		302sh, 364, 402	43

* wobec widma z AlCl₃/HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.

Analiza HPLC-DAD-ESI-MS

Tabela 24. Analiza HPLC-DAD związku 5

Widmo UV-DAD		Czas retencji (min)
$\lambda_{\text{max II}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max I}}$ (nm)	
255	358	16,25



Rycina 27. Widmo ESI-MS związku 5 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+).

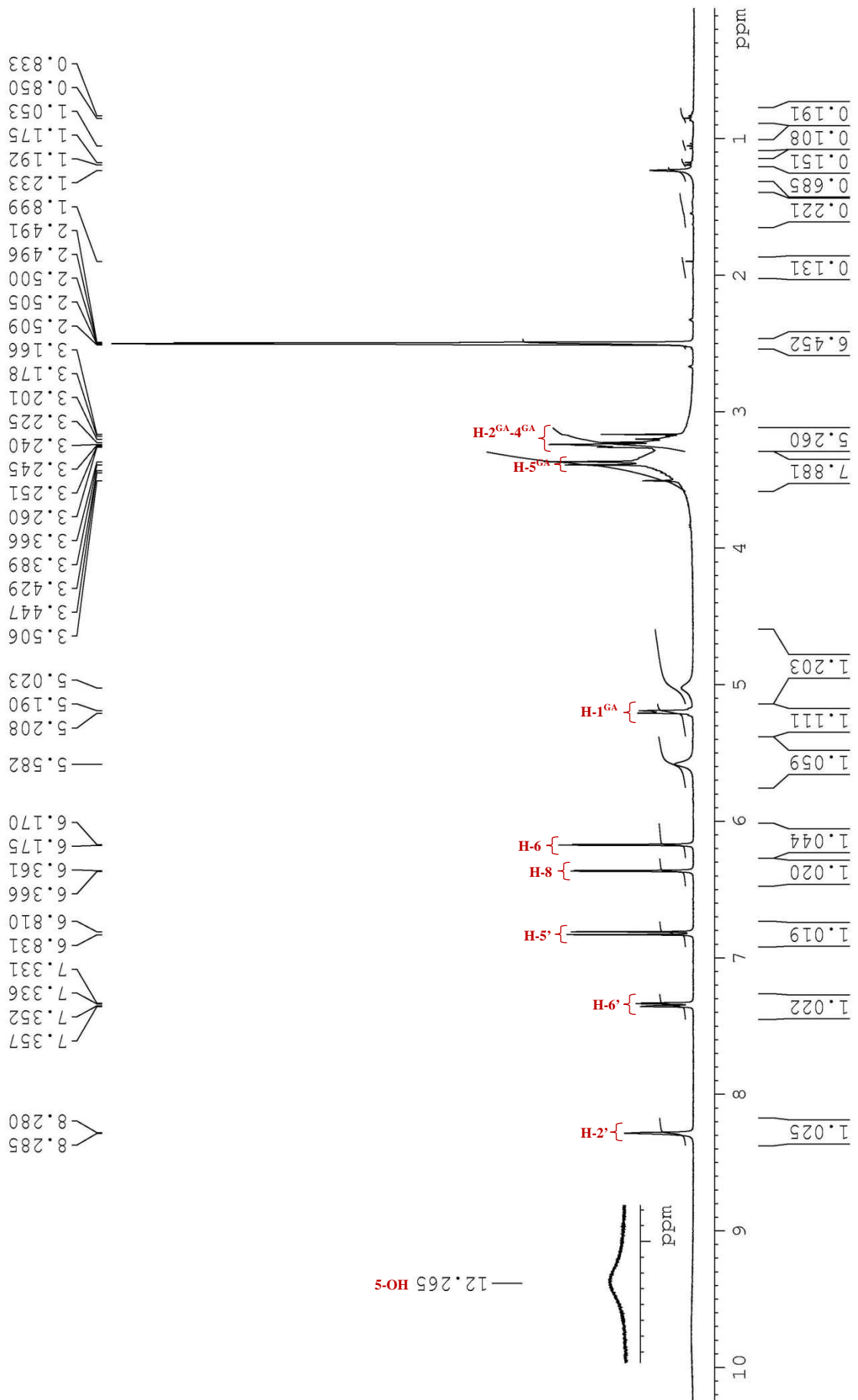
Tabela 25. Wyniki analizy ESI-MS związku 5

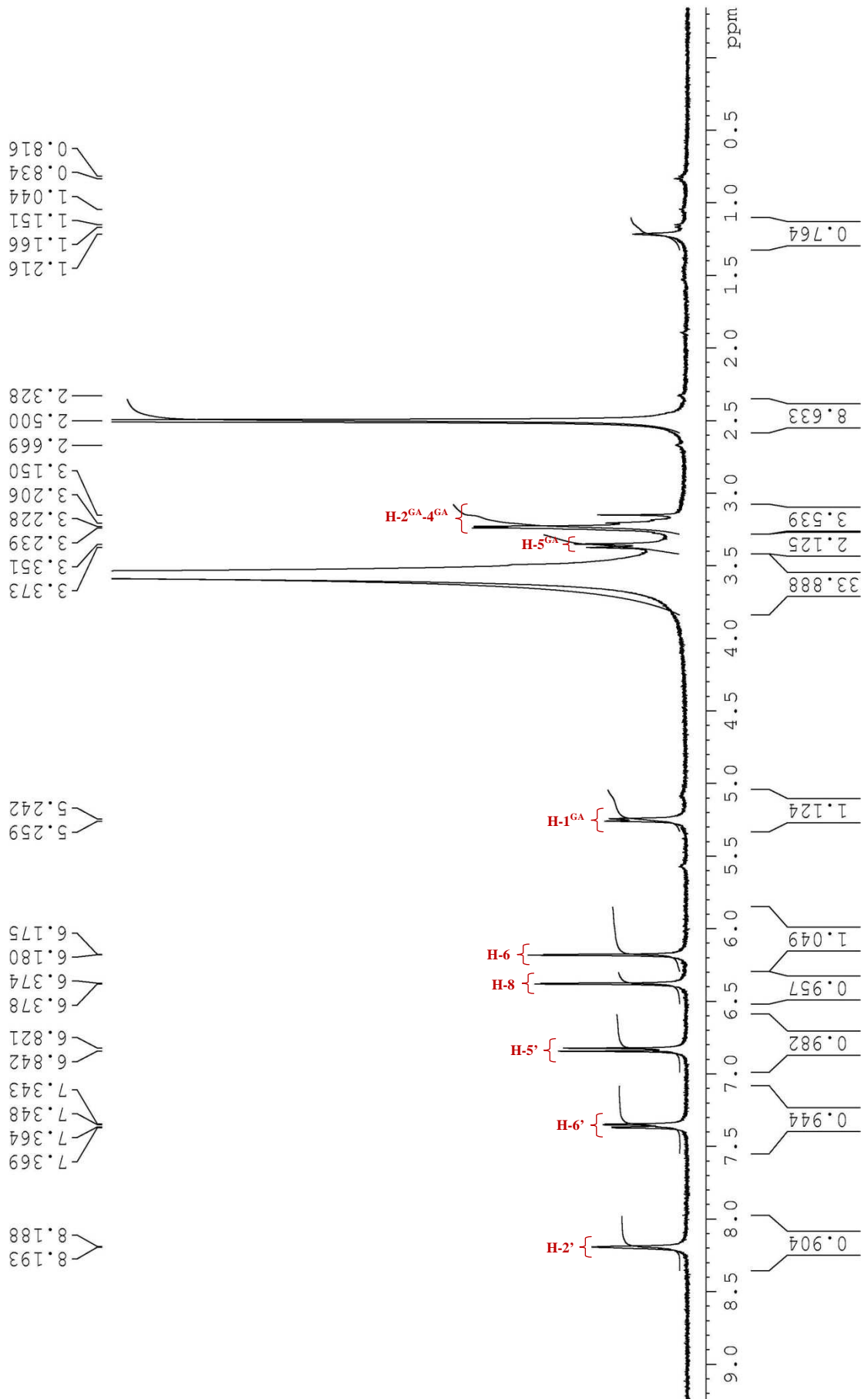
	ES -	(m/z)	ES +	(m/z)
jon molekularny	[M-H] ⁻	477	[M+H] ⁺	479
jon fragmentacyjny:				
deprotonowana/protonowana kwercetyna	[M-H-kwas uronowy] ⁻	301	[M+H-kwas uronowy] ⁺	303
addukty:			[M+Na] ⁺	501
masa związku:	478		wzór sumaryczny związku:	C₂₁H₁₈O₁₃

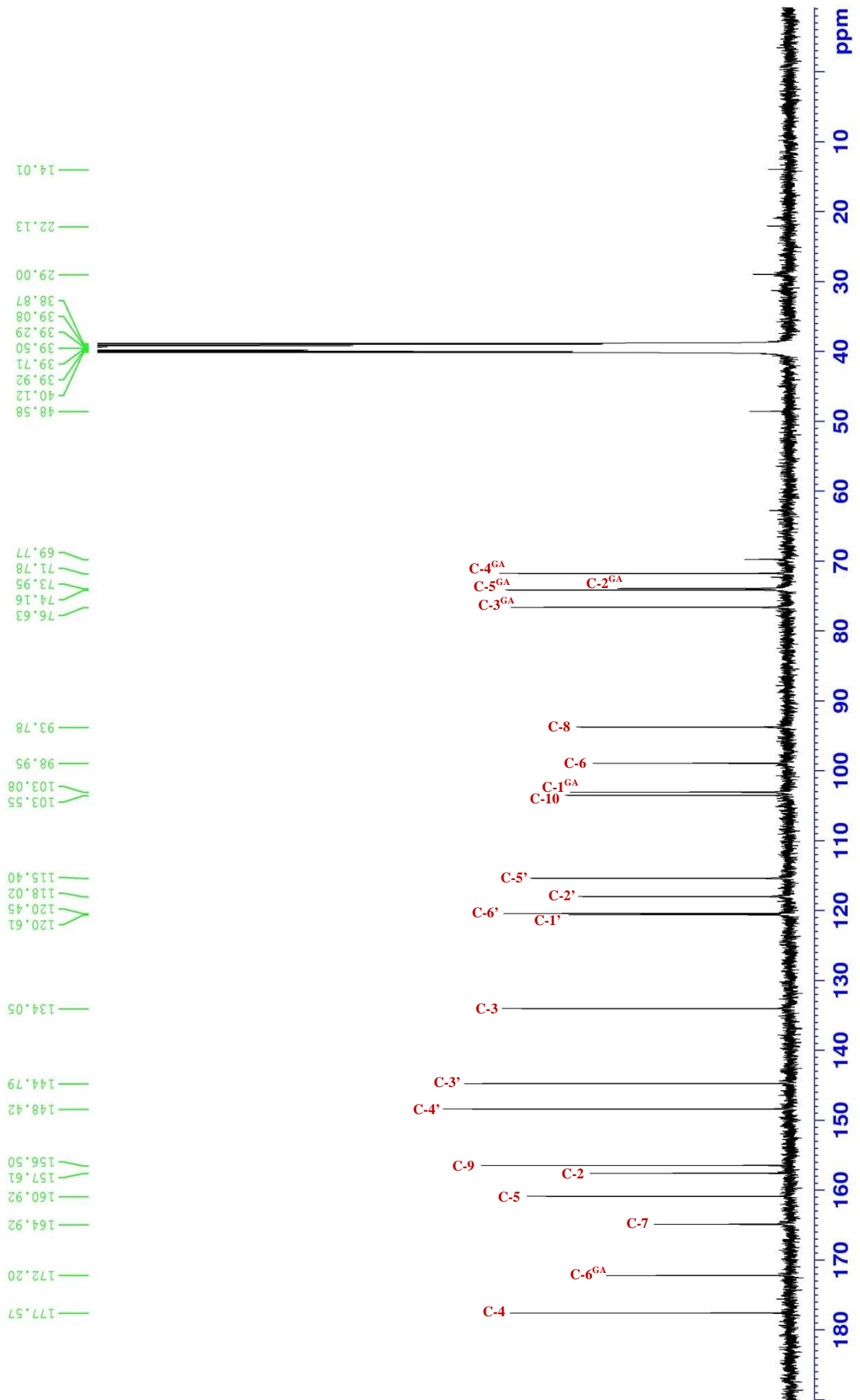
Analiza ^1H i ^{13}C NMRTabela 26. ^1H i ^{13}C NMR związku 5 w DMSO- d_6

Pozycja	Związek 5			Dane literaturowe*	
	$\delta_{\text{C}}_{\text{ppm}}$	$\delta_{\text{H}}_{\text{ppm}}$		$\delta_{\text{C}}_{\text{ppm}}$	$\delta_{\text{H}}_{\text{ppm}}$
	100 MHz	400 MHz (DMSO- d_6)	400 MHz (DMSO- d_6 + D $_2$ O)	75 MHz	300 MHz
2	157,61			157,5	
3	134,05			134,0	
4	177,57			177,6	
5	160,92	12,26		161,0	
6	98,95	6,17 (d, $J=1,9$)	6,18 (d, $J=1,8$)	99,0	6,19 (d, $J=2,0$)
7	164,92			164,9	
8	93,78	6,36 (d, $J=1,9$)	6,38 (d, $J=1,8$)	93,8	6,39 (d, $J=2,0$)
9	156,50			156,5	
10	103,55			103,6	
1'	120,61			120,8	
2'	118,02	8,28 (d, $J=2,2$)	8,18 (d, $J=1,8$)	117,9	8,24 (d, $J=2,1$)
3'	144,79			144,8	
4'	148,42			148,4	
5'	115,40	6,82 (d, $J=8,4$)	6,83 (d, $J=8,4$)	115,4	6,82 d ($J=8,4$)
6'	120,45	7,34 (dd, $J=2,0/8,4$)	7,36 (dd, $J=2,1/8,4$)	120,6	7,30 (dd, $J=2,1/8,4$)
kwasy					
glukuronowy					
1^{GA}	103,08	5,20 (d, $J=7,4$)	5,25 (d, $J=7,1$)	102,9	5,19 (d, $J=7,1$)
2^{GA}	73,95	3,17-3,26 (m)	3,15-3,24 (m)	74,1	3,25 m ^c
3^{GA}	76,63			76,6	3,20 m ^c
4^{GA}	71,78			71,8	3,21 m ^c
5^{GA}	74,16	3,38 (d, $J=9,2$)	3,36 (d, $J=9,1$)	74,2	3,39 d ($J=9,0$)
6^{GA}	172,20			172,3	

* Smolarz i wsp. (2008).

Rycina 28. Widmo ^1H NMR związku 5 (DMSO-d_6).

Rycina 29. Widmo ^1H NMR związku 5 (DMSO- d_6 + D_2O).

Rycina 30. Widmo ^{13}C NMR związku 5 (DMSO-d_6).

8.1.2.6. Związek 6

3-O- β -glukopiranozyd kemferolu

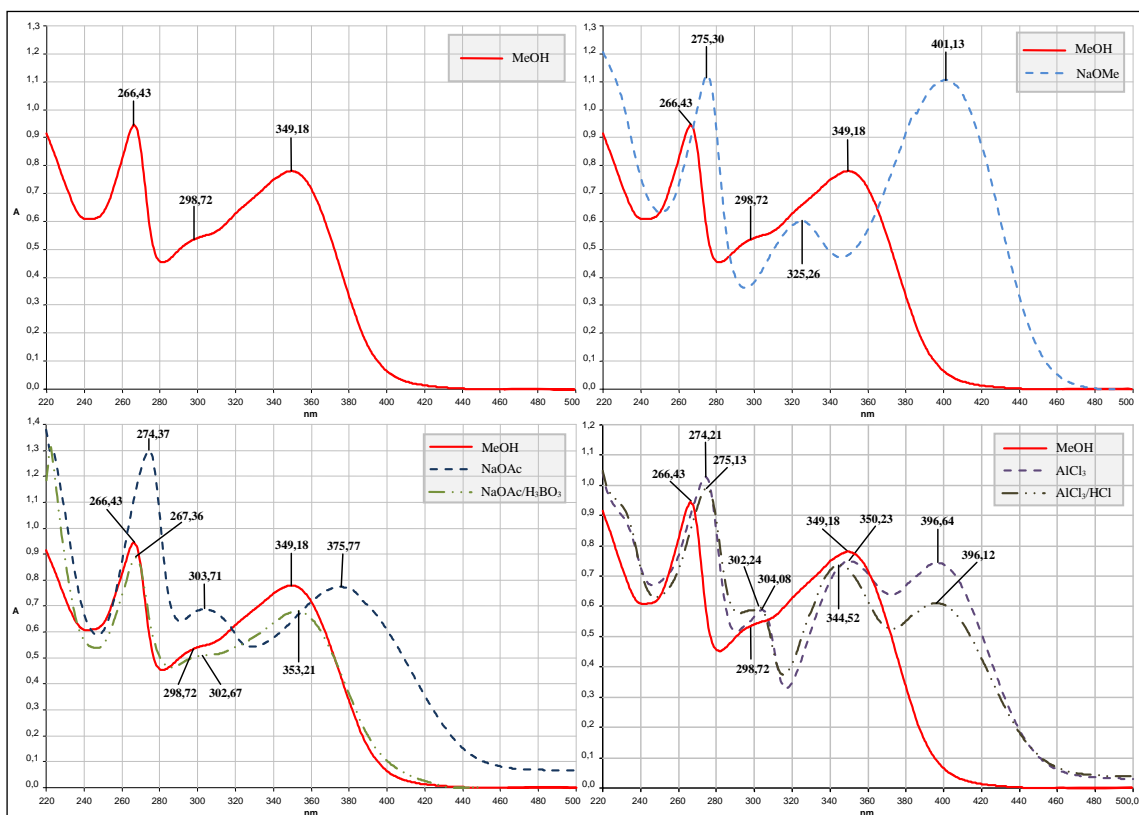
synonim: astragalina

Analiza chromatograficzna (TLC)

Tabela 27. Analiza chromatograficzna związku 6

Wartość współczynnika R _f			Fluorescencja/zabarwienie			
S ₁	S ₆	S ₉	UV _{366nm}	NA/UV _{366nm}	NA/VIS	AlCl ₃ /UV _{366nm}
0,39	0,82	0,70	brunatna	żółta	żółte	jasnożółta

Analiza spektralna w nadfiolecie (UV)



Rycina 31. Widma w nadfiolecie związku 6.

Tabela 28. Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 6

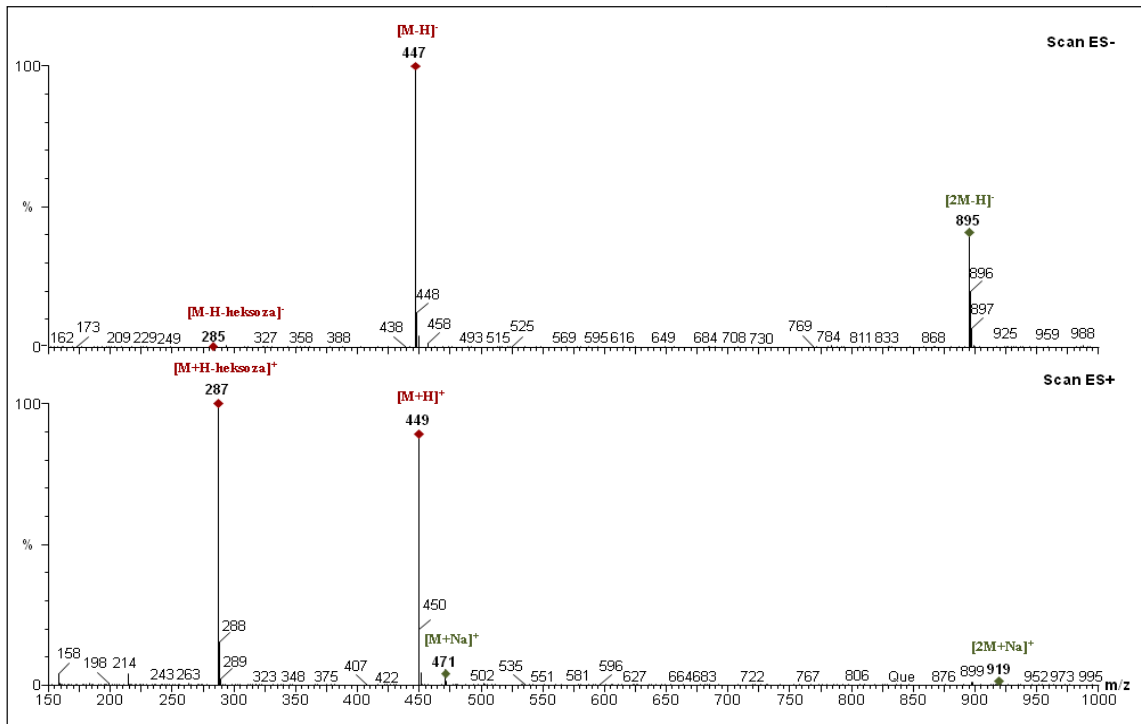
Odczynnik	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{\max I}$ (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	266	-	299sh, 349	-
+ NaOMe	275		325, 401	52
+ NaOAc	274	8	304, 376	
+ NaOAc/H ₃ BO ₃	267		303sh, 353	4
+ AlCl ₃	274		304, 350, 397	1*
+ AlCl ₃ /HCl	275		302, 345, 396	47

* wobec widma z AlCl₃/HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.

Analiza HPLC-DAD-ESI-MS

Tabela 29. Analiza HPLC-DAD związku 6

Widmo UV-DAD		Czas retencji (min)
$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)	
268	352	16,97



Rycina 32. Analiza ESI-MS związku 6 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+).

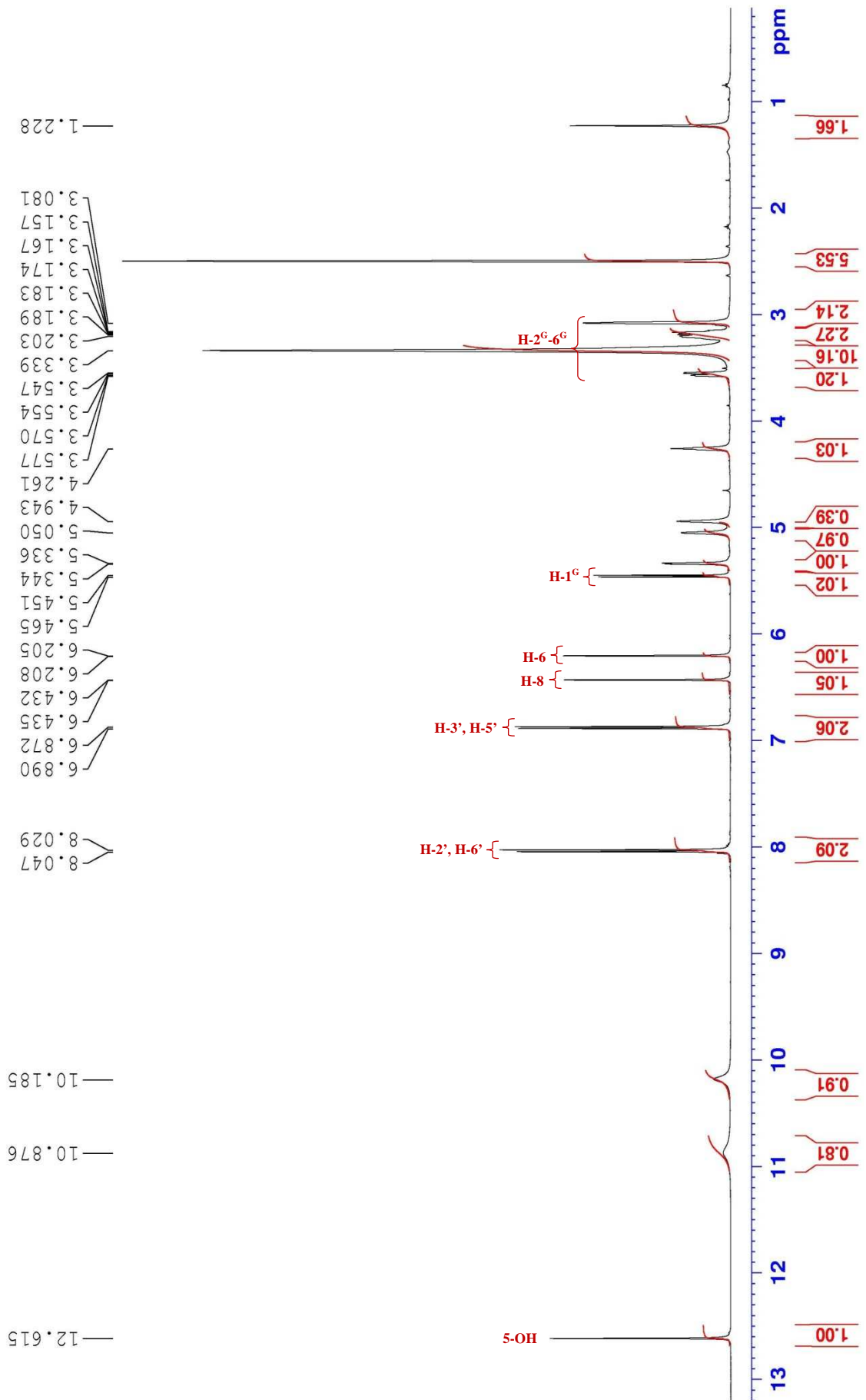
Tabela 30. Wyniki analizy ESI-MS związku 6

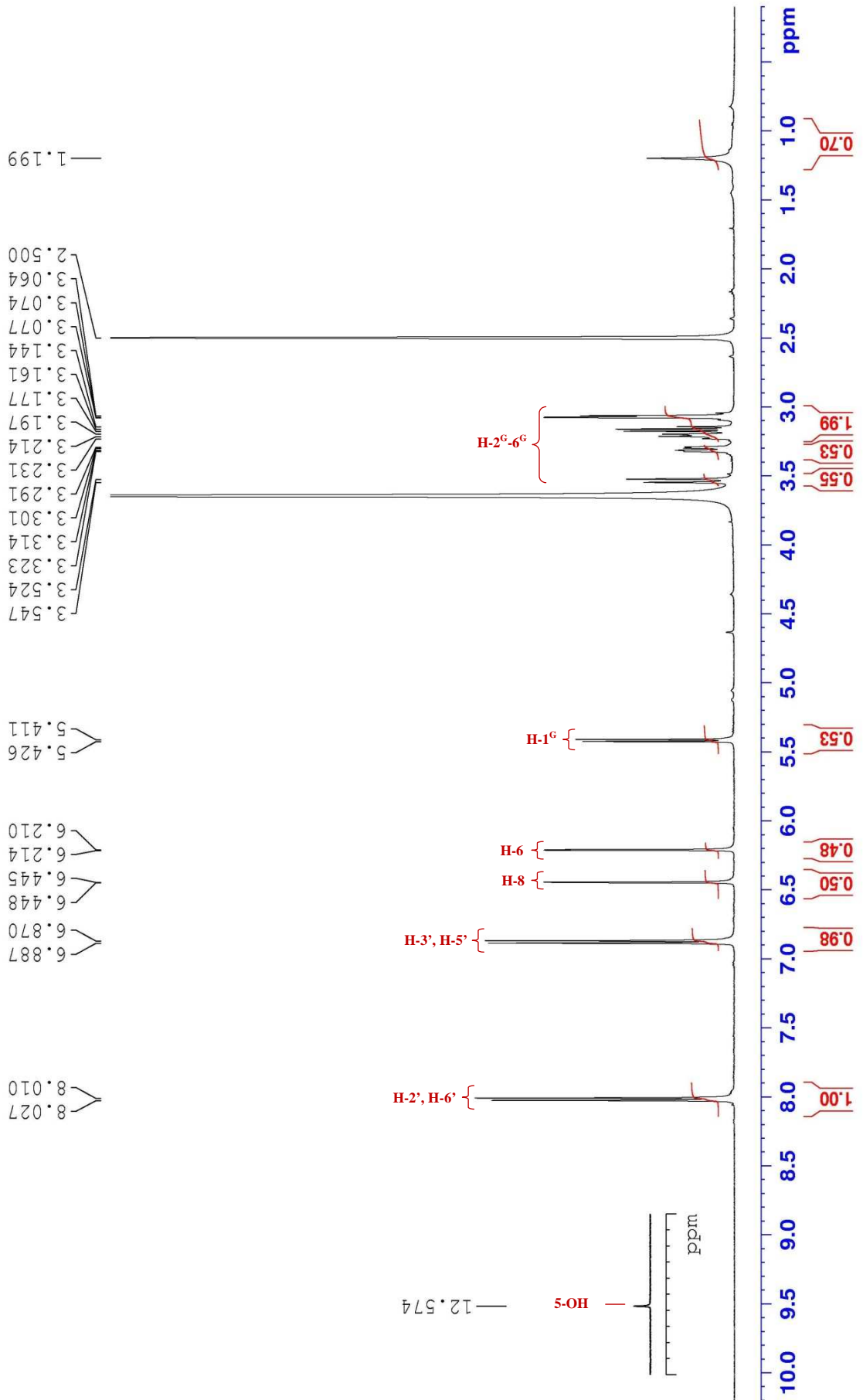
	ES -	(m/z)	ES +	(m/z)
jon molekularny	[M-H] ⁻	447	[M+H] ⁺	449
jon fragmentacyjny:				
deprotonowany/protonowany kemferol	[M-H-heksoza] ⁻	285	[M+H-heksoza] ⁺	287
addukty:				
			[M+Na] ⁺	471
			[2M+Na] ⁺	919
	[2M-H] ⁻	895		
masa związku:	448		wzór sumaryczny związku:	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁

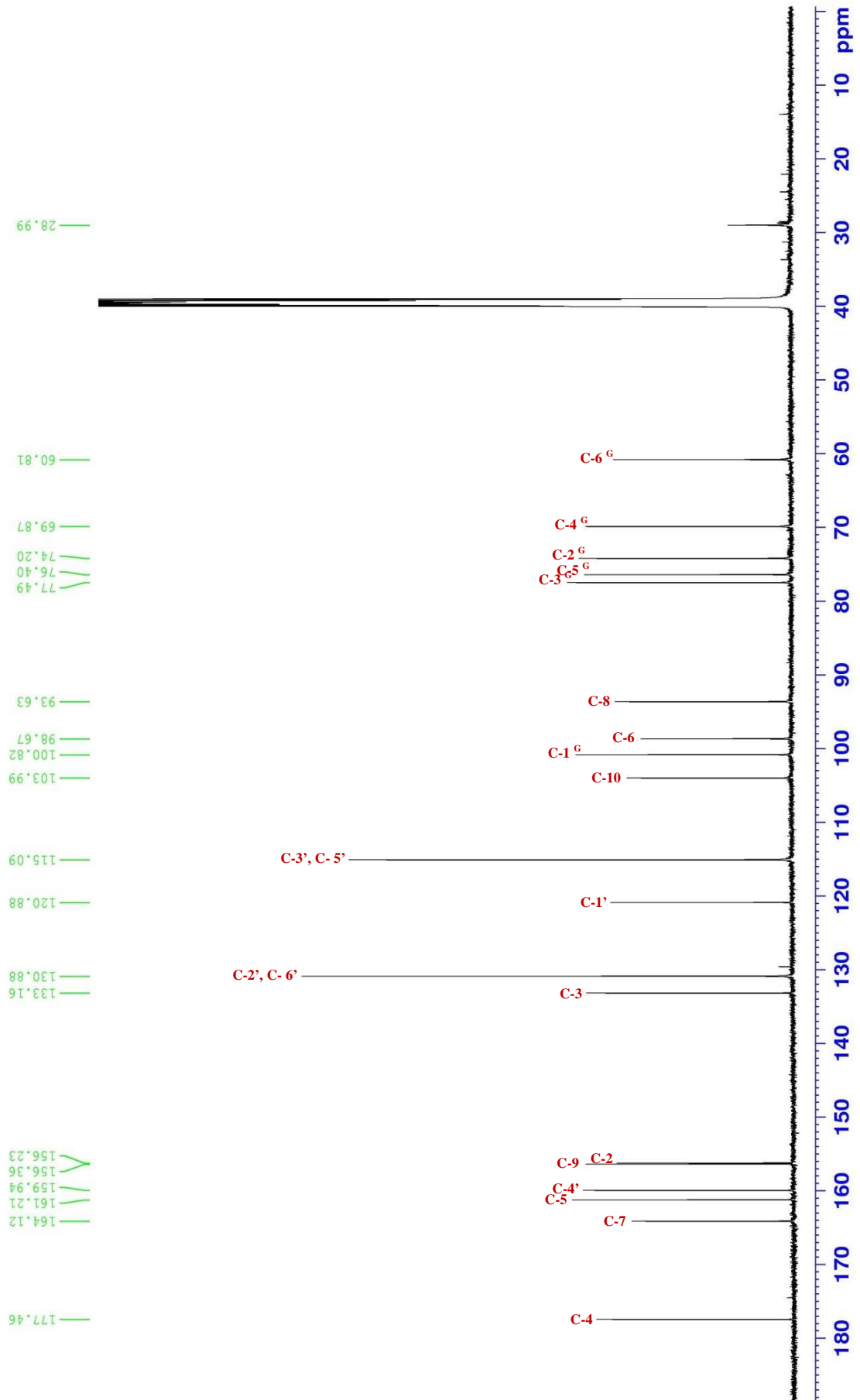
Analiza ^1H i ^{13}C NMRTabela 31. ^1H i ^{13}C NMR związku 6 w DMSO- d_6

Pozycja	Związek 6			Dane literaturowe*	
	$\delta_{\text{C ppm}}$ 125 MHz	$\delta_{\text{H ppm}}$		$\delta_{\text{C ppm}}$ 75 MHz	$\delta_{\text{H ppm}}$ 300 MHz
		500 MHz, DMSO- d_6	500 MHz, DMSO- d_6 +D $_2$ O		
2	156,23			156,3	
3	133,16			133,0	
4	177,46			177,8	
5	161,21	12,61 (s, 5-OH)	12,57 (s, 5-OH)	160,9	
6	98,67	6,21 (d, $J=1,6$ Hz)	6,21 (d, $J=1,8$ Hz)	98,8	6,21 (d, $J=2,0$ Hz)
7	164,12			163,5	
8	93,63	6,43 (d, $J=1,6$ Hz)	6,45 (d, $J=1,8$ Hz)	94,6	6,40 (d, $J=2,0$ Hz)
9	156,36			156,3	
10	103,99			104,4	
1'	120,88			121,9	
2'	130,88	8,04 (d, $J=8,7$ Hz)	8,02 (d, $J=8,8$ Hz)	130,7	8,04 (d, $J=8,8$ Hz)
3'	115,09	6,88 (d, $J=8,7$ Hz)	6,88 (d, $J=8,8$ Hz)	115,0	6,86 (d, $J=8,8$ Hz)
4'	159,94			159,0	
5'	115,09	6,88 (d, $J=8,7$ Hz)	6,88 (d, $J=8,8$ Hz)	115,0	6,86 (d, $J=8,8$ Hz)
6'	130,88	8,04 (d, $J=8,7$ Hz)	8,02 (d, $J=8,8$ Hz)	130,7	8,04 (d, $J=8,8$ Hz)
glukoza					
1 ^G	100,82	5,46 (d, $J=7,4$ Hz)	5,42 (d, $J=7,5$ Hz)	101,0	5,44 (d, $J=7,5$ Hz)
2 ^G	74,20	3,08-3,58 (m)	3,06-3,55 (m)	74,0	3,10-3,75 (m)
3 ^G	77,49			77,5	
4 ^G	69,87			70,5	
5 ^G	76,40			76,3	
6 ^G	60,81			61,0	

* Bylka i Matławska (2001).

Rycina 33. Widmo ^1H NMR związku 6 (DMSO- d_6).

Rycina 34. Widmo ^1H NMR związku 6 ($\text{DMSO-d}_6+\text{D}_2\text{O}$).

Rycina 35. Widmo ^{13}C NMR związku 6 (DMSO-d_6).

8.1.2.7. Związek 7

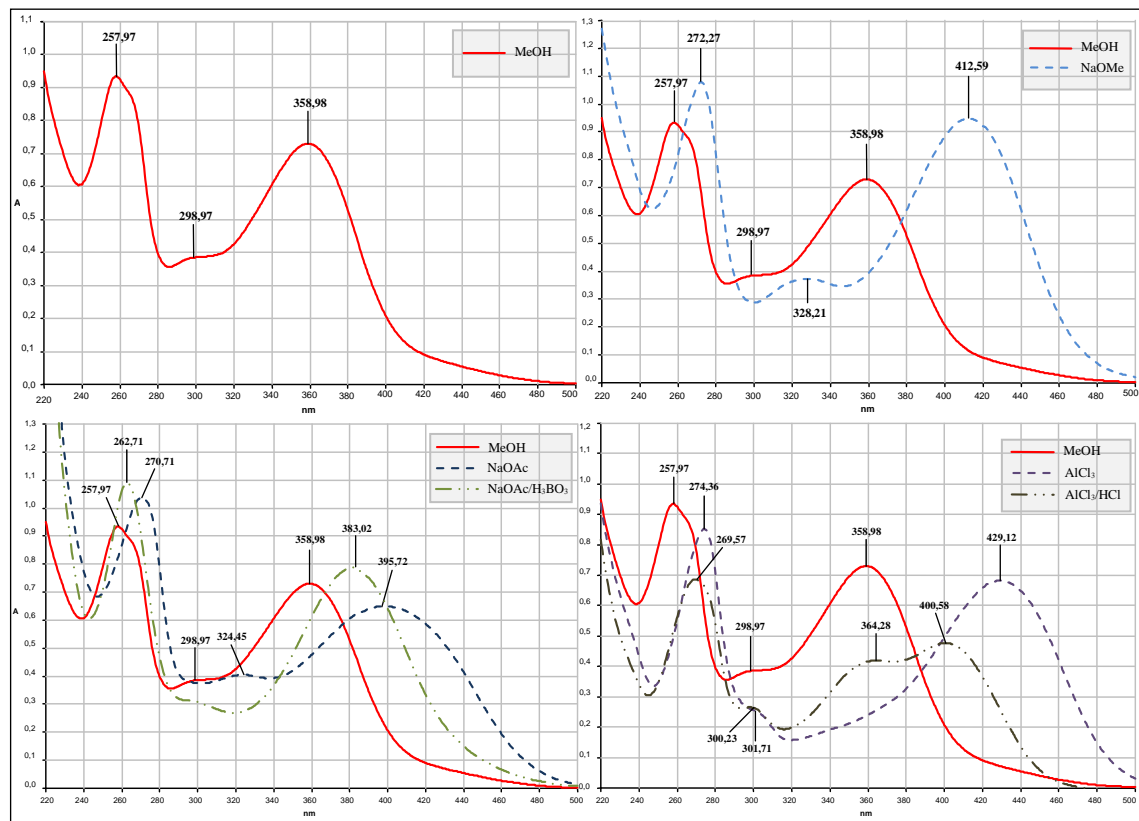
3-O- α -ramnopyranozylo (1 \rightarrow 6)- β -glukopiranozyd kwercetynysynonimy: 3-O- β -rutynozyd kwercetyny, rutyna

Analiza chromatograficzna (TLC)

Tabela 32. Analiza chromatograficzna związku 7

Wartość współczynnika R_f			Fluorescencja/zabarwienie			
S_1	S_6	S_9	UV _{366nm}	NA/UV _{366nm}	NA/VIS	AlCl ₃ /UV _{366nm}
0,47	0,43	0,40	brunatna	pomarańczowa	żółtopomarańczowe	żółta

Analiza spektralna w nadfiolecie (UV)



Rycina 36. Widma w nadfiolecie związku 7.

Tabela 33. Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 7

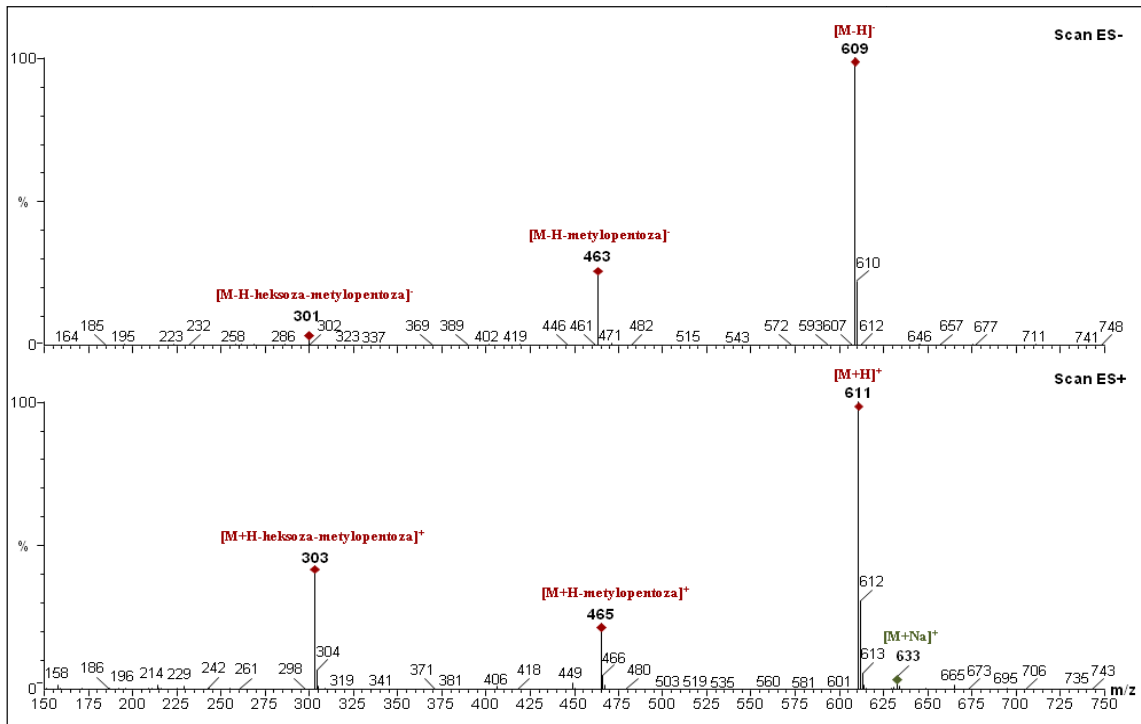
Odczynnik	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{\max I}$ (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	258	-	299sh, 359	-
+ NaOMe	272		328, 413	54
+ NaOAc	271	12	324, 396	
+ NaOAc/H ₃ BO ₃	263		383	24
+ AlCl ₃	274		302sh, 429	28*
+ AlCl ₃ /HCl	270		300sh, 364, 401	42

* wobec widma z AlCl₃/HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.

Analiza HPLC-DAD-ESI-MS

Tabela 34. Analiza HPLC-DAD związku 7

Widmo UV-DAD		Czas retencji (min)
$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)	
255	358	15,96



Rycina 37. Widmo ESI-MS związku 7 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+).

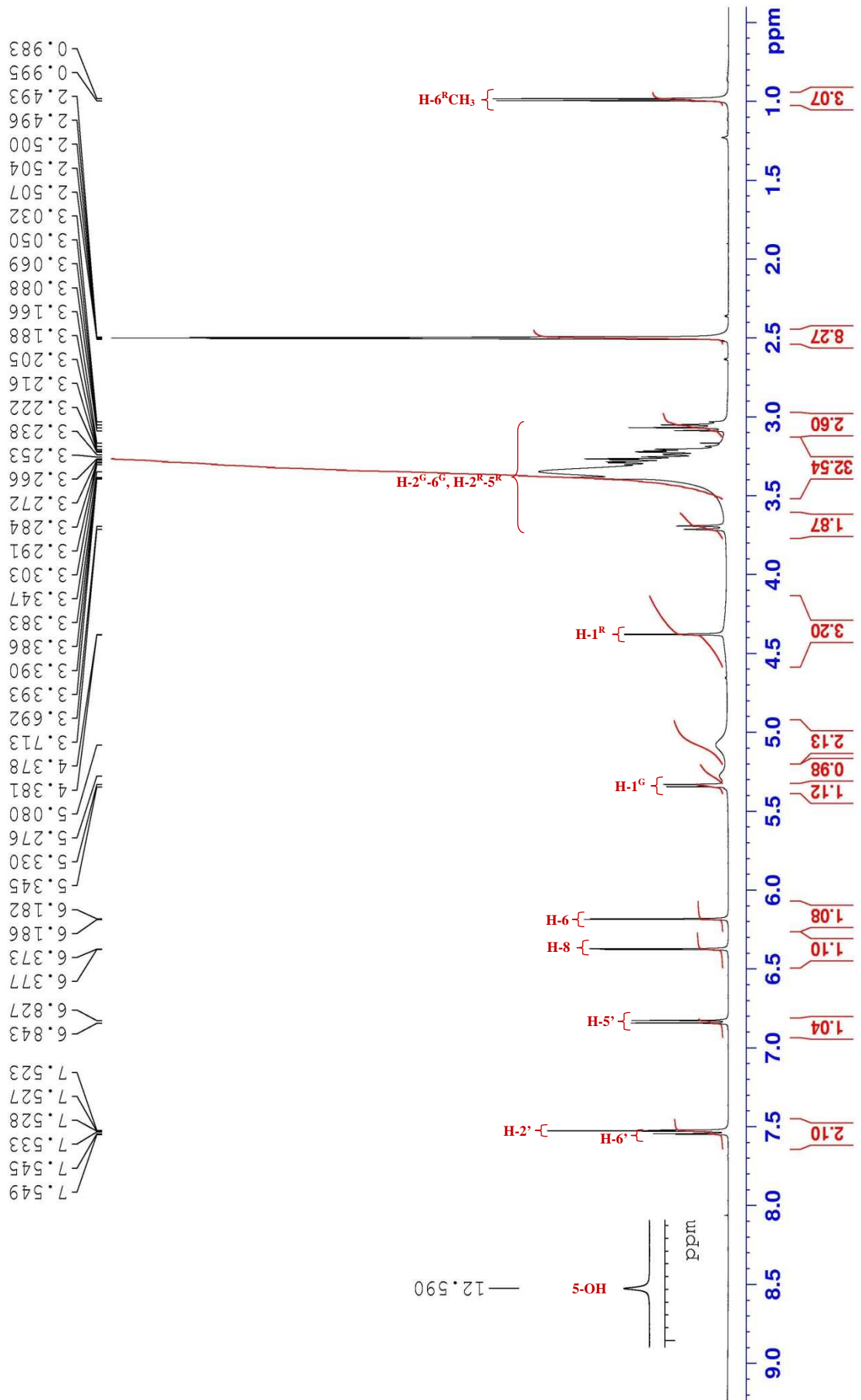
Tabela 35. Wyniki analizy ESI-MS związku 7

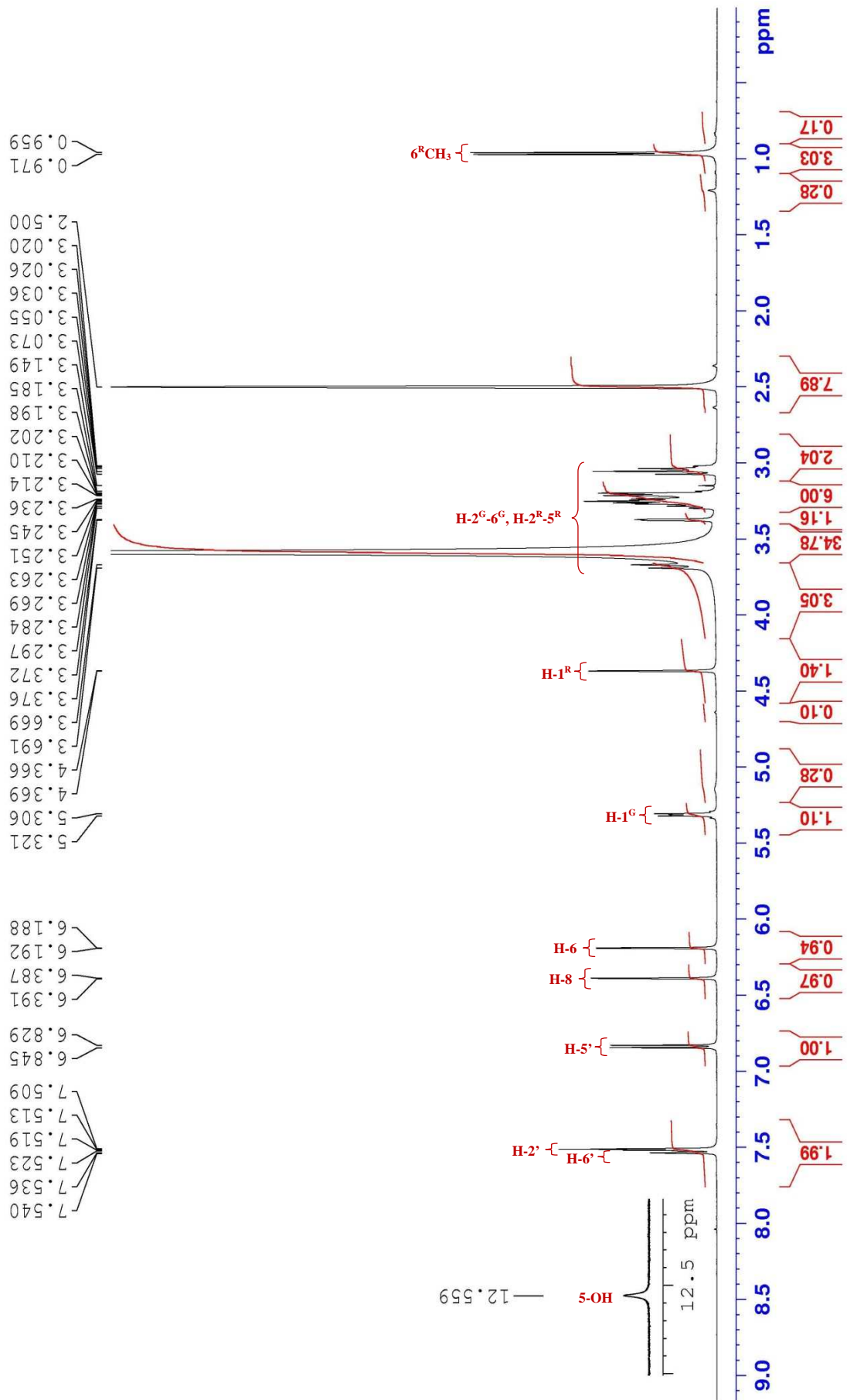
	ES -	(m/z)	ES +	(m/z)
jon molekularny	[M-H] ⁻	609	[M+H] ⁺	611
jony fragmentacyjne:				
deprotonowana/protonowana kwercetyna + heksoza	[M-H-metylopentoza] ⁻	463	[M+H-metylopentoza] ⁺	465
deprotonowana/protonowana kwercetyna	[M-H-heksoza-metylopentoza] ⁻	301	[M+H-heksoza-metylopentoza] ⁺	303
addukty:				
			[M+Na] ⁺	633
masa związku:	610		wzór sumaryczny związku: C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	

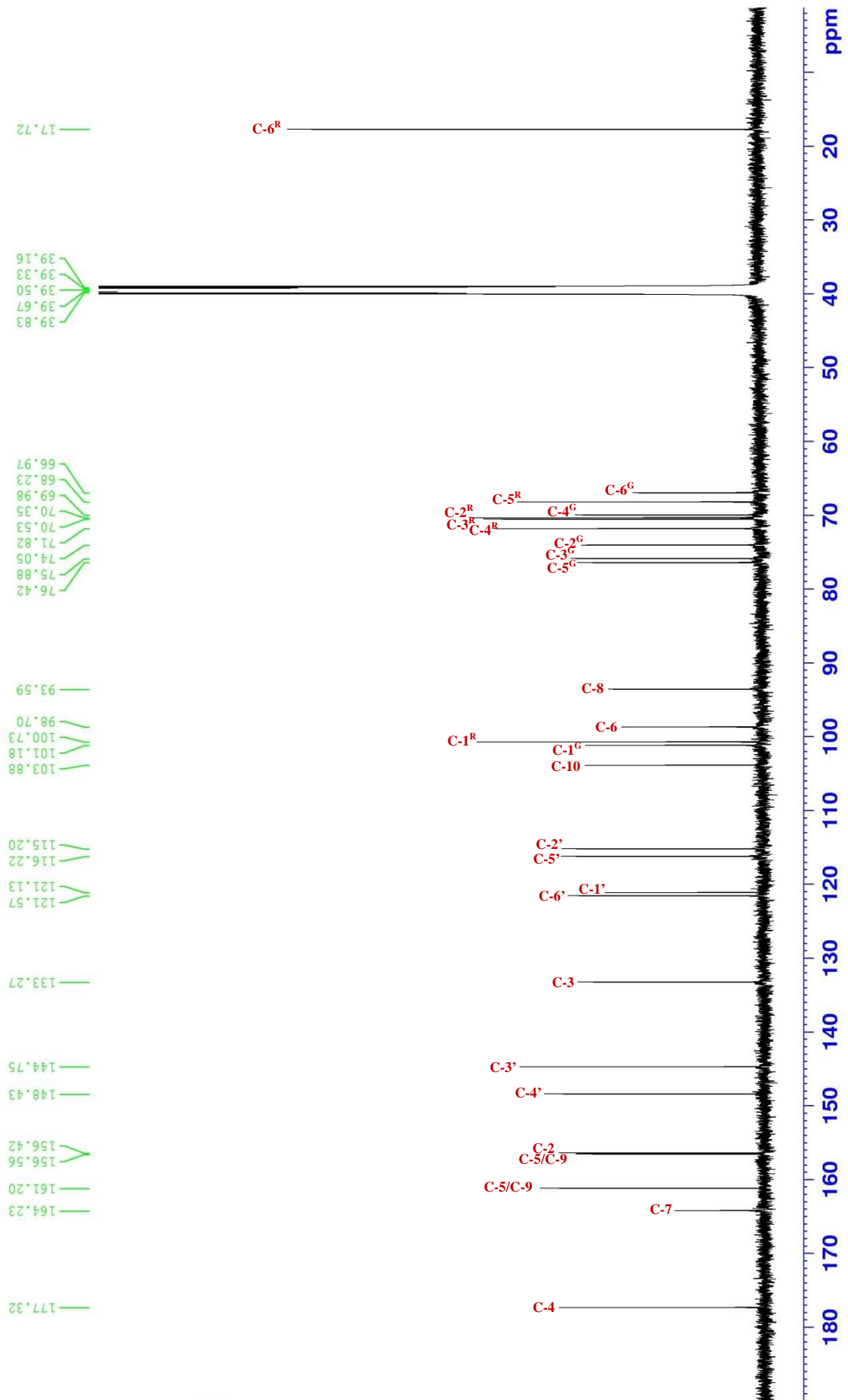
Analiza ^1H i ^{13}C NMRTabela 36. ^1H i ^{13}C NMR związku 7 w DMSO- d_6

Pozycja	Związek 7			Dane literaturowe*	
	$\delta_{\text{C}_{\text{ppm}}}$	$\delta_{\text{H}_{\text{ppm}}}$		$\delta_{\text{C}_{\text{ppm}}}$	$\delta_{\text{H}_{\text{ppm}}}$
	125 MHz	125 MHz (DMSO- d_6)	500 MHz (DMSO- $d_6 + \text{D}_2\text{O}$)	100 MHz	400 MHz
2	156,42			156,4	
3	133,27			133,2	
4	177,32			177,3	
5	156,56**	12,59 s (s, 5-OH)	12,56 (s, 5-OH Hz)	156,6	12,62 s (5-OH)
6	98,70	6,18 (d, $J=2,1$ Hz)	6,19 (d, $J=1,9$ Hz)	98,6	6,19 d ($J=1,88$ Hz)
7	164,23			164,0	
8	93,59	6,37 (d, $J=2,1$ Hz)	6,39 (d, $J=1,9$ Hz)	93,6	6,41 d ($J=1,80$ Hz)
9	161,20**			161,1	
10	103,88			103,9	
1'	121,13			121,1	
2'	115,20	7,52 (d, $J=2,1$ Hz)	7,51 (d, $J=1,9$ Hz)	115,2	7,53 d ($J=8,08$ Hz)
3'	144,75			144,6	
4'	148,43			148,3	
5'	116,22	6,83 (d, $J=8,2$ Hz)	6,84 (d, $J=8,3$ Hz)	116,2	6,85 d ($J=7,84$ Hz)
6'	121,57	7,54 (dd, $J=2,2/8,3$ Hz)	7,53 (dd, $J=2,2/8,4$ Hz)	121,6	7,55 d ($J=7,56$ Hz)
glukoza					
1 ^G	101,18	5,34 (d, $J=7,5$ Hz)	5,31 (d, $J=7,5$ Hz)	101,1	5,32 d ($J=7,44$ Hz)
2 ^G	74,05	3,03-3,71 (m)	3,02-3,69 (m)	73,9	3,08 d ($J=9,28$ Hz)
3 ^G	75,88			75,8	3,23 d ($J=6,0$ Hz)
4 ^G	69,98			69,9	3,26-3,36
5 ^G	76,42			76,3	3,21 d ($J=5,52$ Hz)
6 ^G	66,97			66,9	3,26-3,36
ramnoza					
1 ^R	100,73	4,38 (d, $J=1,2$ Hz)	4,37 (d, $J=1,2$ Hz)	100,7	4,37 d ($J=7,6$ Hz)
2 ^R	70,35	3,03-3,39 (m)	3,02-3,38 (m)	70,3	3,04 d ($J=2,68$ Hz)
3 ^R	70,53			70,5	3,69 d ($J=10,4$ Hz)
4 ^R	71,82			71,8	3,26-3,36
5 ^R	68,23			68,2	3,39 d ($J=1,76$ Hz)
6 ^R -CH ₃	17,72	0,99 (d, $J=6,2$ Hz)	0,96 (d, $J=6,2$ Hz)	17,6	0,97 d ($J=6,12$ Hz)

* Bello i wsp. (2011), ** wg Agrawal (1989): δ_{C_5} - 161,20 ppm, δ_{C_9} - 156,56 ppm.

Rycina 38. Widmo ¹H NMR związku 7 (DMSO-d₆).

Rycina 39. Widmo ¹H NMR związku 7 (DMSO-d₆+ D₂O).

Rycina 40. Widmo ¹³C NMR związku 7 (DMSO-d₆).

8.1.2.8. Hydroliza kwasowa związków 2, 4, 6 i 7

Tabela 37. Wyniki analizy hydrolizy kwasowej związków 2, 4, 6 i 7

Związek/ wzorzec	TLC				PC		Fluorescencja/zabarwienie		
	S ₁	S ₆	S ₈	S ₉	S ₃	S ₁₀	UV ₃₆₆	W ₁ /UV ₃₆₆	W ₃ /VIS
2	0,04	0,26	0,62	-	-	-	ż	p	-
aglikon	-	-	-	-	0,32	0,23	ż	p	-
cukier	-	-	-	0,42	-	-	-	-	br
4	0,29	0,61	0,62	-	-	-	br	p	-
aglikon	-	-	-	-	0,32	0,23	ż	p	-
cukier	-	-	-	0,42	-	-	-	-	br
6	0,39	0,82	0,70	-	-	-	br	ż	-
aglikon	-	-	-	-	0,51	0,72	ż	ż	-
cukier	-	-	-	0,42	-	-	-	-	br
7	0,47	0,43	0,40	-	-	-	br	p	-
7 ₂	0,28	0,62	0,62	-	-	-	br	p	-
aglikon	-	-	-	-	0,32	0,22	ż	p	-
cukier	-	-	-	0,41	-	-	-	-	br
	-	-	-	0,69	-	-	-	-	ż-br
aglikony									
kwercetyna	-	-	-	-	0,32	0,23	ż	p	-
kemferol	-	-	-	-	0,51	0,72	ż	ż	-
apigenina	-	-	-	-	0,61	0,68	br	ż	-
luteolina	-	-	-	-	0,38	0,30	br	p	-
cukry									
arabinoza	-	-	-	0,48	-	-	-	-	cz
ksyloza	-	-	-	0,59	-	-	-	-	cz
ramnoza	-	-	-	0,70	-	-	-	-	ż-br
glukoza	-	-	-	0,42	-	-	-	-	br
galaktoza	-	-	-	0,38	-	-	-	-	br
pochodne kwercetyny									
7-glukozyd	0,04	0,26	0,62	-	-	-	ż	p	-
3-glukozyd	0,29	0,62	0,62	-	-	-	br	p	-
3-rutynozyd	0,47	0,43	0,40	-	-	-	br	p	-
pochodne kemferolu									
3-glukozyd	0,39	0,82	0,70	-	-	-	br	ż	-
3-rutynozyd	0,56	0,49	0,43	-	-	-	br	ż	-

cz-czerwony, br-brunatny, p-pomarańczowy, ż-żółty, ż-br-żółtobrazowy.

8.2. Analiza kwasów fenolowych

8.2.1. Analiza jakościowa (2D-TLC)

Tabela 38. Wyniki analizy chromatograficznej (2D-TLC) wzorcowych kwasów fenolowych i frakcji eteru dietylowego (rozdz. 7.2.4.2.)

	Plama związku/ kwas fenolowe	TLC celuloza		Fluorescencja/zabarwienie	
		S ₁₇	S ₁	UV _{366nm}	W ₄ /VIS
analizowane plamy	plama 1	0,03	0,66	ciemnoniebieska	ciemnopomarańczowe
	plama 2	0,04	0,40; 0,67*	jasnoniebieska	szarobrunatne
	plama 3	0,03	0,82	niebieska	jasnobrunatne
	plama 4	0,50	0,68	jasnośliwkowa	pomarańczowe
wzorcowe kwasy fenolowe	chlorogenowy	0,03	0,83	niebieska	jasnobrunatne
	ferulowy	0,75	0,40; 0,68*	niebieska	fioletowe
	galusowy	0,32	0,71	ciemnoniebieska	jasnopomarańczowe
	izowanilinowy	0,51	0,68	jasnośliwkowa	pomarańczowe
	kawowy	0,04	0,40; 0,67*	jasnoniebieska	szarobrunatne
	<i>p</i> -hydroksybenzoesowy	0,35	0,75	fioletowa	żółte
	<i>p</i> -hydroksyfenylooctowy	0,35	0,89	niebieska	jasnoczerwone
	<i>p</i> -kumarowy	0,38	0,58; 0,79*	fioletowa	czerwone
	protokatechowy	0,03	0,66	ciemnoniebieska	ciemnopomarańczowe
wanilinowy	0,69	0,72	ciemnoniebieska	pomarańczowe	

S₁₇ - toluen-HOAc-H₂O (6:7:3), S₁ - HOAc-H₂O (15:85), W₄ - zdwuazowany kwas sulfanilowy i 20% roztwór węglańu sodu (1:1), * wartości dla konfiguracji *cis* i *trans*.

8.2.2. Określenie profilu kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA

8.2.2.1. Wykreślenie krzywych kalibracyjnych dla wzorcowych kwasów fenolowych

8.2.2.1.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Roztwór podstawowy (1000 µg/ml)

Odważono dokładnie po 0,10000 g wzorcowych kwasów fenolowych do kolb miarowych o pojemności 100 ml i uzupełniono metanolem do współmierności. Uzyskano stężenie roztworów podstawowych 1000 µg/ml.

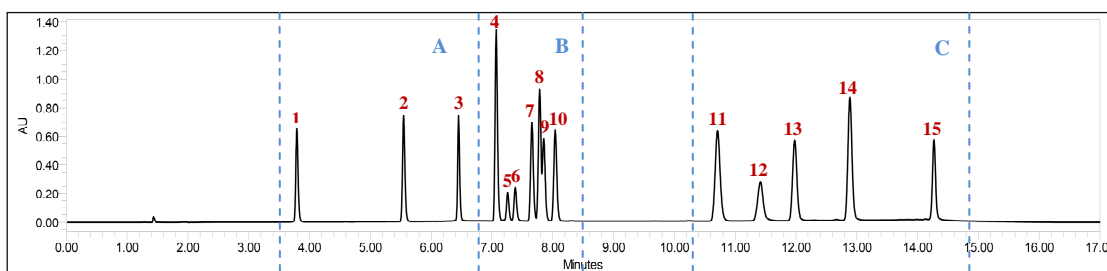
Rozcieńczenia roztworu podstawowego (roztwór B)

Do kolbki miarowej o pojemności 25 ml odmierzano kolejno po 1,25 ml roztworów podstawowych kwasów fenolowych i uzupełniono fazą A (rozdz. 7.2.3.2.), uzyskując roztwór o stężeniu 50 µg/ml (roztwór B). Do probówek typu Eppendorf

odmierzano kolejno 1,0; 0,75; 0,5; 0,25; 0,1 ml roztworu B, a następnie dodawano odpowiednio 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 0,9 ml fazy B, otrzymując następujące stężenia kwasów fenolowych: 40, 30, 20, 10 i 5 $\mu\text{g/ml}$. Stężenie 2 $\mu\text{g/ml}$ uzyskano odmierając 0,2 ml roztworu B i uzupełniając fazą A kolbę miarową o pojemności 5 ml.

Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 8 prób.

8.2.2.1.2. Obliczenia parametrów krzywych kalibracyjnych

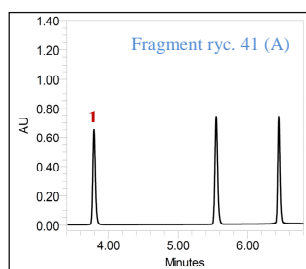


Rycina 41. Chromatogram UPLC wzorcowych kwasów fenolowych w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$: galusowy (1), protokatechowy (2), chlorogenowy (3), *p*-hydroksybenzoesowy (4), dihydrokawowy (5), *p*-hydroksyfenylooctowy (6), wanilinowy (7), kawowy (8), syringowy (9), izowanilinowy (10), *p*-kumarowy (10), salicylowy (12), ferulowy (13), *m*-kumarowy (14), rozmarynowy (15).

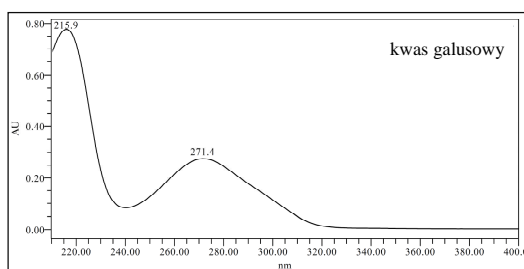
Dla każdego wzorcowego kwasu fenolowego wykreślono krzywą kalibracyjną w zakresie stężeń 2-40 $\mu\text{g/ml}$, z wyjątkiem kwasu rozmarynowego, dla którego zakres ten wynosił 5-50 $\mu\text{g/ml}$.

Parametry oceny statystycznej oraz równania prostych zostały obliczone za pomocą programu Empower 2 Software Build 2154.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu galusowego



Rycina 42. Chromatogram UPLC kwasu galusowego (1); $t_{\text{sr}} = 3,81$ (min).



Rycina 43. Widmo w nadfiolecie kwasu galusowego.

Tabela 39. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu galusowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	141377	142440	142506	142659	143532	143606	143697	145415	143154
5,0	388269	372891	372896	377013	377068	377492	388704	388859	380399
10,0	798760	798786	798943	798983	798731	817197	817346	817935	805835
20,0	1715418	1716172	1716293	1717014	1727624	1734898	1744661	1715060	1723393
30,0	2585288	2586150	2590184	2594106	2594364	2597275	2597779	2667854	2601625
40,0	3469577	3471534	3472896	3472961	3478586	3489321	3492509	3497474	3480607

x - stężenie kwasu galusowego w próbce (µg/ml), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu galusowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 40. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S \bar{A}	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	143154	1200	424	0,84	143154±1004	143154±2401
5,0	380399	7032	2486	1,85	380399±5879	380399±14064
10,0	805835	9656	3414	1,20	805835±8073	805835±19312
20,0	1723393	11205	3962	0,65	1723393±9368	1723393±22410
30,0	2601625	27168	9605	1,04	2601625±22713	2601625±54335
40,0	3480607	10876	3845	0,31	3480607±9093	3480607±21753

x - stężenie kwasu galusowego w próbce (µg/ml), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, S \bar{A} - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy n = 8, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu galusowego:

$$y = 88398x - 53935$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu galusowego (µg/ml).

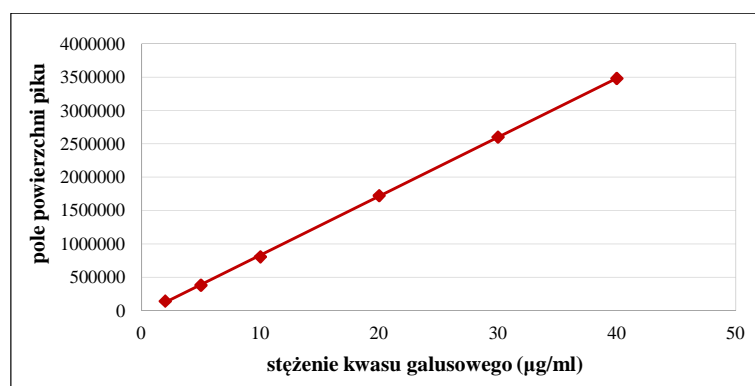
Tabela 41. Parametry równania prostej $y = 88398x - 53935$

a	b	S _a	S _b	S _{xy}	r	r ²
88398	- 53935	204	4582	19312	0,9999	0,9999

a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szcztkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r² - współczynnik determinacji.

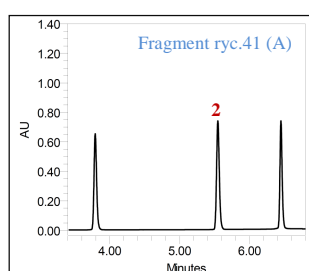
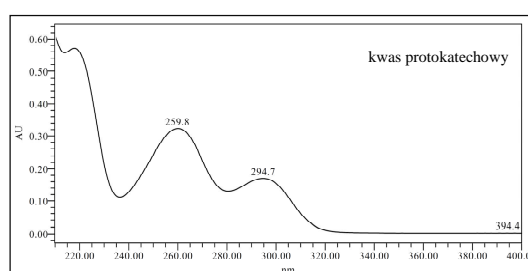
Tabela 42. Pola powierzchni pików roztworów kwasu galusowego obliczone z równania prostej $y = 88398x - 53935$

x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	122861	388055	830045	1714025	2598005	3481985



Rycina 44. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu galusowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu protokatechowego

Rycina 45. Chromatogram UPLC kwasu protokatechowego (2); $t_{sr} = 5,57$ (min).

Rycina 46. Widmo w nadfiolecie kwasu protokatechowego.

Tabela 43. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu protokatechowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	176554	176618	176683	176871	176926	176989	177018	177023	176835
5,0	479938	464920	464962	465101	470565	470609	470843	479693	470829
10,0	976688	977224	977364	977396	977836	997755	998002	998073	985042
20,0	2050554	2051566	2052459	2053854	2060028	2068004	2069490	2069932	2059486
30,0	3087681	3090126	3102130	3102179	3106824	3109086	3109765	3111854	3102456
40,0	4131255	4133129	4138899	4139523	4141982	4144664	4145366	4146579	4140175

x - stężenie kwasu protokatechowego w próbce (µg/ml), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu protokatechowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 44. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	176835	89	67	0,11	176835±158	176835±379
5,0	470829	6139	2170	1,30	470829±5132	470829±12278
10,0	985042	10688	3779	1,08	985042±8935	985042±21376
20,0	2059486	8499	3005	0,41	2059486±7105	2059486±16998
30,0	3102456	9065	3205	0,29	3102456±7579	3102456±18131
40,0	4140175	5640	1994	0,14	4140175±4715	4140175±11279

x - stężenie kwasu protokatechowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu protokatechowego:

$$y = 104765x - 45841$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu protokatechowego ($\mu\text{g/ml}$).

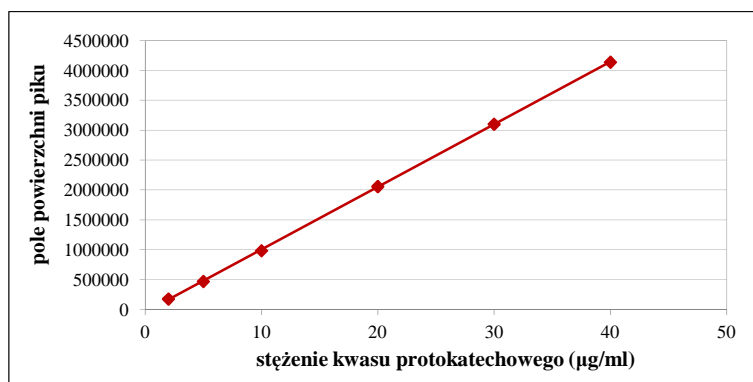
Tabela 45. Parametry równania prostej $y = 104765x - 45841$

a	b	S_a	S_b	S_{xy}	r	r^2
104765	- 45841	136	3051	12862	1,0000	0,9999

a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szacunkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r^2 - współczynnik determinacji.

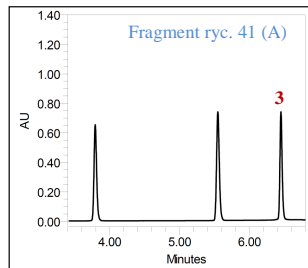
Tabela 46. Pola powierzchni pików roztworów kwasu protokatechowego obliczone z równania prostej $y = 104765x - 45841$

x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	163689	477984	1001809	2049459	3097109	4144759

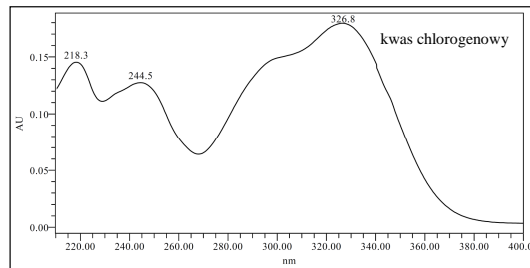


Rycina 47. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu protokatechowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu chlorogenowego



Rycina 48. Chromatogram UPLC kwasu chlorogenowego (3); $t_{sr} = 6,46$ (min).



Rycina 49. Widmo w nadfiolecie kwasu chlorogenowego.

Tabela 47. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu chlorogenowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	120246	120352	120432	120433	120608	120640	120847	120853	120551
5,0	328652	328689	328803	331267	331399	331528	331601	331732	330459
10,0	715791	716153	716458	716651	716682	717309	718971	719638	717207
20,0	1524703	1545205	1527684	1533401	1534219	1537310	1541814	1542049	1535798
30,0	2312973	2264428	2332908	2336994	2373451	2375106	2385839	2387020	2346090
40,0	3084004	3088886	3090149	3191388	3100552	3104964	3178508	3188542	3128374

x - stężenie kwasu chlorogenowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu chlorogenowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 48. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	120551	224	79	0,19	120551 \pm 187	120551 \pm 448
5,0	330459	1451	513	0,44	330459 \pm 1213	330459 \pm 2903
10,0	717207	1378	487	0,19	717207 \pm 1152	717207 \pm 2756
20,0	1535798	7203	2547	0,47	1535798 \pm 6022	1535798 \pm 14407
30,0	2346090	42875	15159	1,83	2346090 \pm 35844	2346090 \pm 85750
40,0	3128374	48426	17121	1,55	3128374 \pm 40485	3128374 \pm 96852

x - stężenie kwasu chlorogenowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy n = 8, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha, f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu chlorogenowego:

$$y = 79806x - 60132$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu chlorogenowego ($\mu\text{g/ml}$).

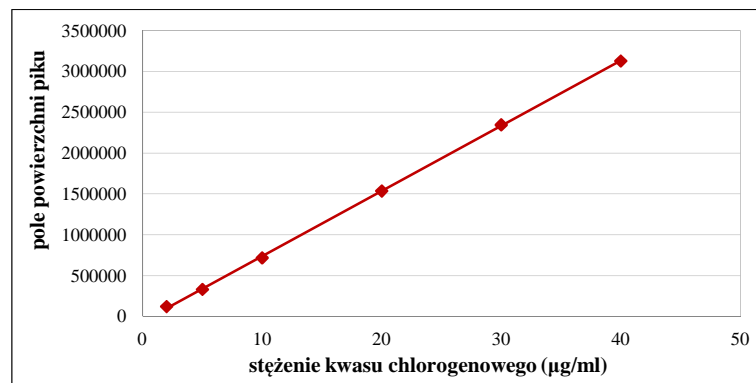
Tabela 49. Parametry równania prostej $y = 79806x - 60132$

a	b	S _a	S _b	S _{xy}	r	r ²
79806	- 60132	306	6865	28932	0,9999	0,9998

a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szacunkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r² - współczynnik determinacji.

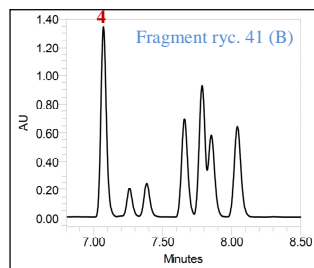
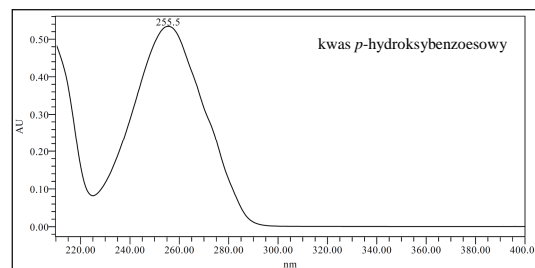
Tabela 50. Pola powierzchni pików roztworów kwasu chlorogenowego obliczone z równania prostej $y = 79806x - 60132$

x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	99480	338898	737928	1535988	2334048	3132108



Rycina 50. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu chlorogenowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu *p*-hydroksybenzoesowego

Rycina 51. Chromatogram UPLC kwasu *p*-hydroksybenzoesowego (4); $t_{sr} = 7,09$ (min).Rycina 52. Widmo w nadfiolecie kwasu *p*-hydroksybenzoesowego.Tabela 51. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu *p*-hydroksybenzoesowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	331764	331373	331521	331739	331825	332040	332479	332578	331915
5,0	889645	864197	865891	874151	874176	874936	890006	890160	877895
10,0	1817503	1818555	1818715	1819449	1821797	1856046	1859283	1859662	1833876
20,0	3773476	3775819	3776912	3777456	3795290	3799274	3800097	3809585	3788489
30,0	5549580	5516043	5593321	5595034	5601375	5603237	5609495	5616648	5585592
40,0	7266368	7271786	7279330	7281390	7289922	7293401	7293497	7318126	7286728

x - stężenie kwasu *p*-hydroksybenzoesowego w próbce (µg/ml), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu *p*-hydroksybenzoesowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 52. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	331915	428	151	0,13	331915±358	331915±857
5,0	877895	10714	3788	1,22	877895±8957	877895±21428
10,0	1833876	20314	7182	1,11	1833876±16983	1833876±40628
20,0	3788489	14061	4971	0,37	3788489±11755	3788489±28122
30,0	5585592	34598	12232	0,62	5585592±28924	5585592±69196
40,0	7286728	16069	5681	0,22	7286728±13434	7286728±32137

x - stężenie kwasu *p*-hydroksybenzoesowego w próbce (μg/ml), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha, f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu *p*-hydroksybenzoesowego:

$$y = 184507x - 6297$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu *p*-hydroksybenzoesowego (μg/ml).

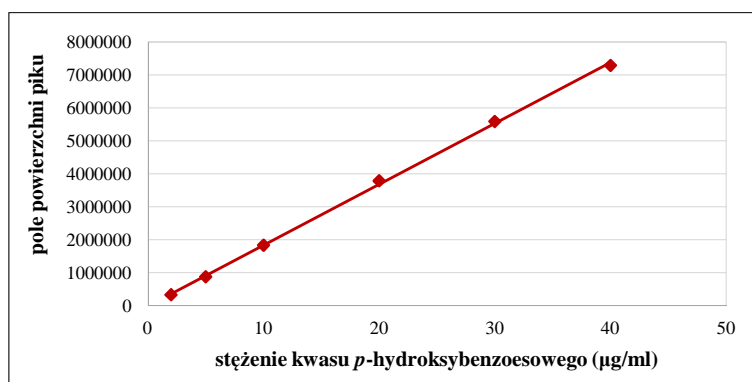
Tabela 53. Parametry równania prostej $y = 184507x - 6297$

a	b	S_a	S_b	S_{xy}	r	r^2
184507	- 6297	712	15995	67409	0,9997	0,9994

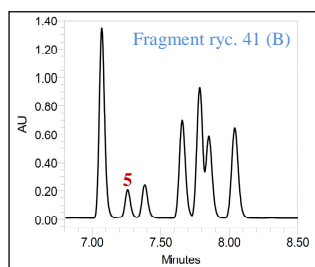
a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szcztkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r^2 - współczynnik determinacji.

Tabela 54. Pola powierzchni pików roztworów kwasu *p*-hydroksybenzoesowego obliczone z równania prostej $y = 184507x - 6297$

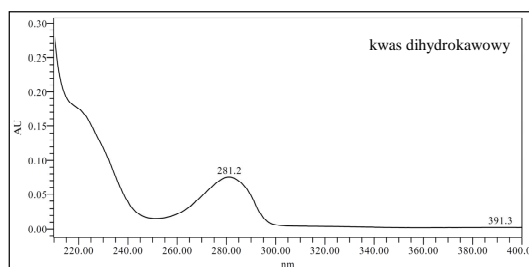
x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	362717	916238	1838773	3683843	5528913	7373983

Rycina 53. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu *p*-hydroksybenzoesowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu dihydrokawowego



Rycina 54. Chromatogram UPLC kwasu dihydrokawowego (5);
 $t_{sr} = 7,28$ (min).



Rycina 55. Widmo w nadfiolecie kwasu dihydrokawowego.

Tabela 55. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu dihydrokawowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	38609	38747	40027	40139	40210	40627	40705	40801	39983
5,0	104452	104472	104496	104572	104642	107087	107161	107370	105532
10,0	240012	249418	249537	242924	242987	247689	248065	250678	246414
20,0	540408	540540	541949	543364	544576	546579	546757	546994	543896
30,0	814065	813325	813573	821640	825929	826934	832122	832199	822473
40,0	1089136	1091955	1093778	1102057	1103585	1104478	1104577	1104630	1099275

x - stężenie kwasu dihydrokawowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$); A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu dihydrokawowego w badanych próbach; \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 56. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S \bar{A}	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	39983	853	302	2,13	39983 \pm 713	39983 \pm 1707
5,0	105532	1390	491	1,32	105532 \pm 1162	105532 \pm 2780
10,0	246414	3895	1377	1,58	246414 \pm 3257	246414 \pm 7791
20,0	543896	2750	972	0,51	543896 \pm 2299	543896 \pm 5500
30,0	822473	8052	2847	0,98	822473 \pm 6732	822473 \pm 16104
40,0	1099275	6511	2302	0,59	1099275 \pm 5444	1099275 \pm 13022

x - stężenie kwasu dihydrokawowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, S \bar{A} - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy n = 8, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu dihydrokawowego:

$$y = 28224x - 27073$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu dihydrokawowego ($\mu\text{g/ml}$).

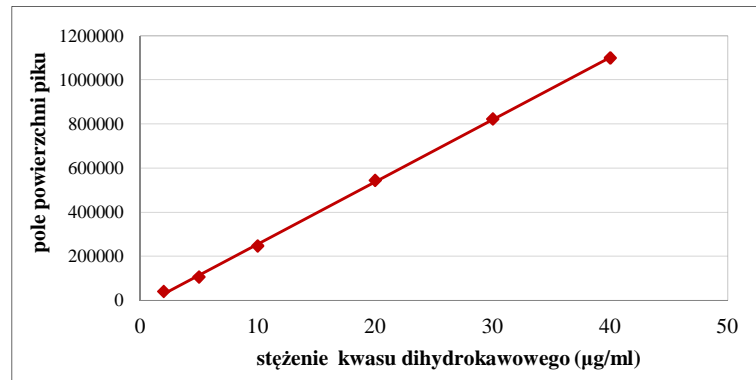
Tabela 57. Parametry równania prostej $y = 28224x - 27073$

a	b	S _a	S _b	S _{xy}	r	r ²
28224	- 27073	92	2063	8694	0,9998	0,9996

a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szczytkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r² - współczynnik determinacji.

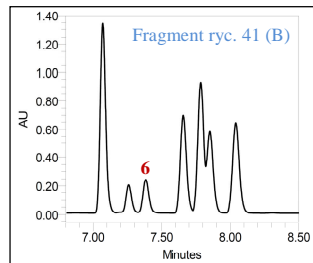
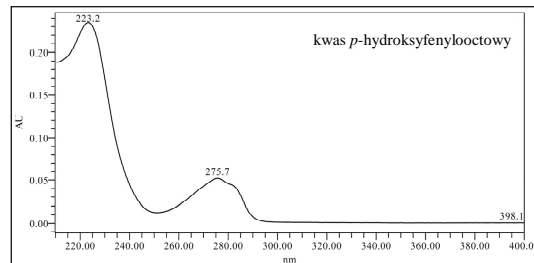
Tabela 58. Pola powierzchni pików roztworów kwasu dihydrokawowego obliczone z równania prostej $y = 28224x - 27073$

x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	29375	114047	255167	537407	819647	1101887



Rycina 56. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu dihydrokawowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego

Rycina 57. Chromatogram UPLC kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego (6); $t_{sr} = 7,41$ (min).Rycina 58. Widmo w nadfiolecie kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego.Tabela 59. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	66165	66318	66325	66366	66392	66395	66428	66436	66353
5,0	167481	162940	164475	164618	164835	164857	167635	167659	165563
10,0	327030	329345	330092	330200	330487	332583	335526	336254	331440
20,0	678668	688939	696043	697257	697639	698309	699441	700212	694564
30,0	1032211	1035170	1040009	1040956	1041941	1043879	1044241	1077260	1044458
40,0	1393865	1394105	1394899	1395626	1396127	1396201	1396758	1398085	1395708

x - stężenie kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego w próbce (µg/ml), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 60. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	66353	87	31	0,13	66353±73	66353±175
5,0	165563	1787	632	1,08	165563±1494	165563±3574
10,0	331440	3146	1112	0,95	331440±2630	331440±6292
20,0	694564	7299	2581	1,05	694564±6102	694564±14598
30,0	1044458	13892	4912	1,33	1044458±11614	1044458±27785
40,0	1395708	1404	496	0,10	1395708±1174	1395708±2808

x - stężenie kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego:

$$y = 35134x - 10204$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego ($\mu\text{g/ml}$).

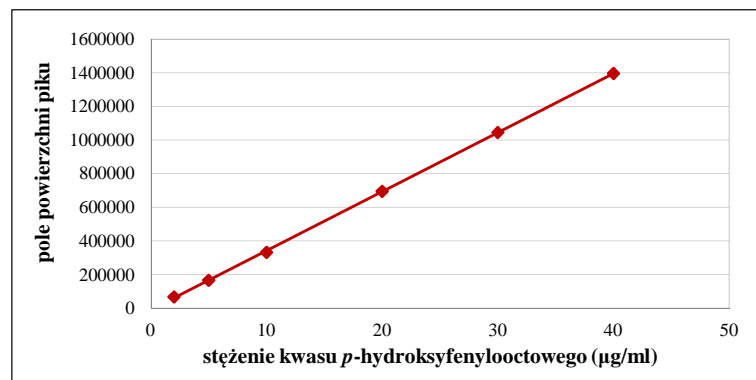
Tabela 61. Parametry równania prostej $y = 35134x - 10204$

a	b	S_a	S_b	S_{xy}	r	r^2
35134	- 10204	84	1897	7993	0,9999	0,9997

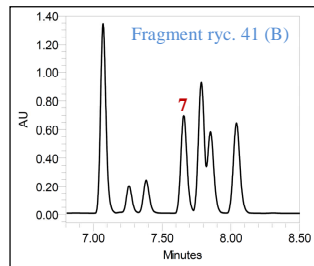
a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szcztakowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r^2 - współczynnik determinacji.

Tabela 62. Pola powierzchni pików roztworów kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego obliczone z równania prostej $y = 35134x - 10204$

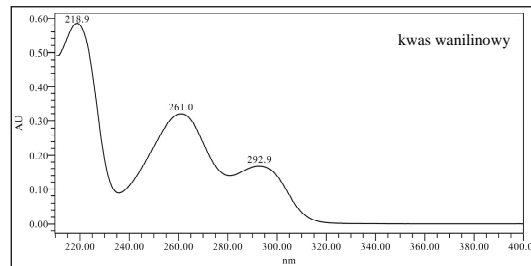
x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	60064	165466	341136	692476	1043816	1395156

Rycina 59. Krzywa kalibracyjna dla kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu wanilinowego



Rycina 60. Chromatogram UPLC kwasu wanilinowego (7); $t_{sr} = 7,68$ (min).



Rycina 61. Widmo w nadfiolecie kwasu wanilinowego.

Tabela 63. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu wanilinowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	180673	180466	180492	180612	180625	180650	181013	181073	180701
5,0	493428	493441	493544	498966	499298	499654	507644	508116	499261
10,0	1040254	1046989	1047507	1047696	1048096	1048174	1069250	1069692	1052207
20,0	2200826	2201593	2202404	2203433	2210786	2217510	2218122	2218513	2209148
30,0	3298164	3313042	3313051	3329123	3329973	3335673	3336009	3336600	3323954
40,0	4427248	4427804	4432050	4433209	4433757	4434234	4437201	4439666	4433146

x - stężenie kwasu wanilinowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu wanilinowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 64. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	180701	224	79	0,12	180701±187	180701±448
5,0	499261	5970	2111	1,20	499261±4991	499261±11941
10,0	1052207	10967	3877	1,04	1052207±9168	1052207±21934
20,0	2209148	7976	2820	0,36	2209148±6668	2209148±15952
30,0	3323954	14185	5015	0,43	3323954±11859	3323954±28371
40,0	4433146	4226	1494	0,10	4433146±3533	4433146±8453

x - stężenie kwasu wanilinowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu wanilinowego:

$$y = 112403x - 54790$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu wanilinowego ($\mu\text{g/ml}$).

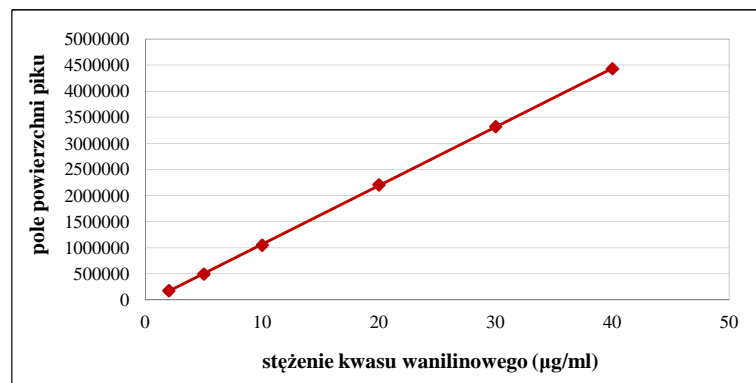
Tabela 65. Parametry równania prostej $y = 112403x - 54790$

a	b	S _a	S _b	S _{xy}	r	r ²
112403	- 54790	154	3449	14536	1,0000	0,9999

a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szacunkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r² - współczynnik determinacji.

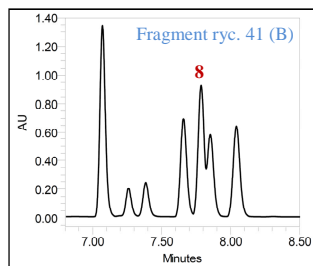
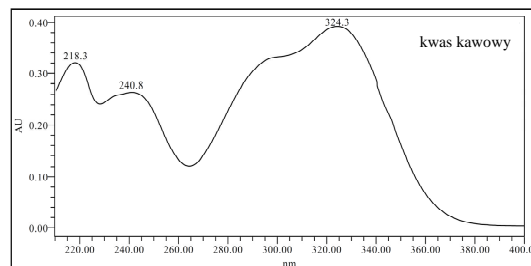
Tabela 66. Pola powierzchni pików roztworów kwasu wanilinowego obliczone z równania prostej $y = 112403x - 54790$

x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	170016	507225	1069240	2193270	3317300	4441330



Rycina 62. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu wanilinowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu kawowego

Rycina 63. Chromatogram UPLC kwasu kawowego (8); $t_{sr} = 7,81$ (min).

Rycina 64. Widmo w nadfiolecie kwasu kawowego.

Tabela 67. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu kawowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	224034	224733	224766	224816	225823	226120	226136	226292	225340
5,0	629625	609373	610931	615710	616765	617344	628311	628797	619607
10,0	1306367	1313537	1314550	1317645	1317976	1320182	1335130	1335722	1320139
20,0	2770813	2772622	2776412	2803593	2817906	2822225	2868710	2882359	2814330
30,0	4193320	4194736	4204100	4208627	4209985	4214104	4214938	4403630	4230430
40,0	5738762	5746874	5747373	5748462	5750113	5752901	5786106	5798103	5758587

x - stężenie kwasu kawowego w próbce (µg/ml), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu kawowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 68. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	225340	850	301	0,38	225340±711	225340±1700
5,0	619607	8185	2894	1,32	619607±6843	619607±16370
10,0	1320139	10302	3642	0,78	1320139±8613	1320139±20604
20,0	2814330	42840	15146	1,52	2814330±35815	2814330±85679
30,0	4230430	70450	24908	1,66	4230430±58898	4230430±140900
40,0	5758587	21319	7537	0,37	5758587±17823	5758587±42638

x - stężenie kwasu kawowego w próbie ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha, f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu kawowego:

$$y = 145745x - 104383$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu kawowego ($\mu\text{g/ml}$).

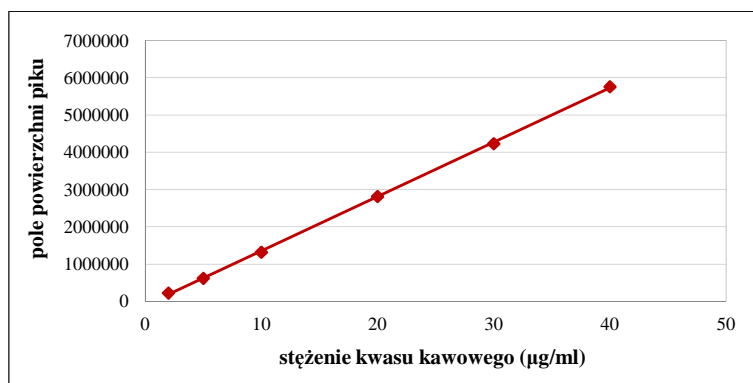
Tabela 69. Parametry równania prostej $y = 145745x - 104383$

a	b	S_a	S_b	S_{xy}	r	r^2
145745	- 104383	474	10653	44897	0,9998	0,9995

a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szaczkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r^2 - współczynnik determinacji.

Tabela 70. Pola powierzchni pików roztworów kwasu kawowego obliczone z równania prostej $y = 145745x - 104383$

x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	187107	624342	1353067	2810517	4267967	5725417



Rycina 65. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu kawowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu syringowego

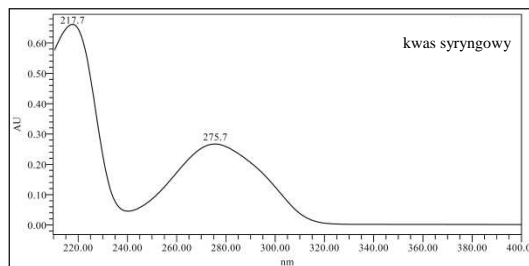
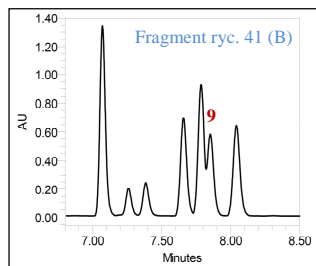


Tabela 71. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu syringowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	147881	147261	147696	147740	148045	148154	148412	148630	147977
5,0	417666	406548	406615	408104	410971	411354	413649	419472	411797
10,0	864551	864715	865350	869238	870077	879529	884276	888666	873300
20,0	1852014	1804264	1808475	1823875	1826376	1827736	1858692	1860864	1832787
30,0	2702800	2746340	2747067	2760917	2766274	2767754	2774011	2737574	2750342
40,0	3718397	3723283	3723770	3726248	3729962	3729974	3735948	3738387	3728246

x - stężenie kwasu syringowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu syringowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 72. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	147977	432	153	0,29	147977 \pm 361	147977 \pm 865
5,0	411797	4865	1720	1,18	411797 \pm 4068	411797 \pm 9731
10,0	873300	9530	3369	1,09	873300 \pm 7967	873300 \pm 19060
20,0	1832787	21973	7769	1,20	1832787 \pm 18370	1832787 \pm 43946
30,0	2750342	22926	8105	0,83	2750342 \pm 19166	2750342 \pm 45851
40,0	3728246	6695	2367	0,18	3728246 \pm 5597	3728246 \pm 13390

x - stężenie kwasu syringowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu syringowego:

$$y = 94223x - 56227$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu syringowego ($\mu\text{g/ml}$).

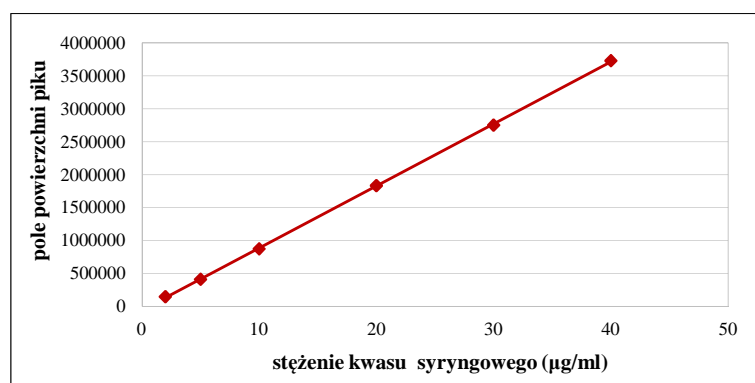
Tabela 73. Parametry równania prostej $y = 94223x - 56227$

a	b	S _a	S _b	S _{xy}	r	r ²
94223	- 56227	202	4544	19150	0,9999	0,9998

a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szacunkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r² - współczynnik determinacji.

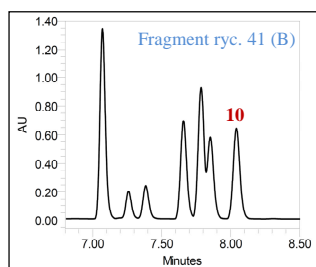
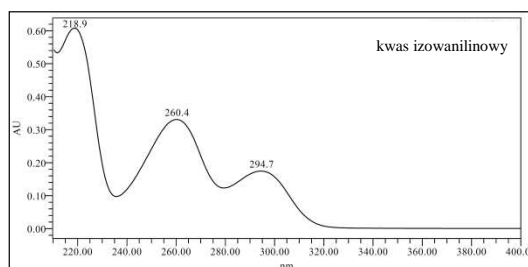
Tabela 74. Pola powierzchni pików roztworów kwasu syringowego obliczone z równania prostej $y = 94223x - 56227$

x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	132219	414888	886003	1828233	2770463	3712693



Rycina 68. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu syringowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu izowanilinowego

Rycina 69. Chromatogram UPLC kwasu izowanilinowego (10); $t_{sr} = 8,06$ (min).

Rycina 70. Widmo w nadfiolecie kwasu izowanilinowego.

Tabela 75. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu izowanilinowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	175682	175461	175643	175750	175857	175892	175971	176019	175784
5,0	499495	484634	484925	484994	490447	490450	490962	499386	490662
10,0	1033774	1034151	1034387	1034447	1034850	1055830	1055922	1056194	1042444
20,0	2186645	2187488	2188586	2189771	2197250	2205479	2205710	2206060	2195874
30,0	3290607	3307589	3309612	3323509	3324050	3328652	3331103	3332367	3318436
40,0	4441683	4445466	4447097	4448302	4449015	4449254	4451394	4452450	4448083

x - stężenie kwasu izowanilinowego w próbce (µg/ml), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu izowanilinowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 76. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	175784	186	64	0,11	175784±156	175784±373
5,0	490662	6044	2137	1,23	490662±5053	490662±12087
10,0	1042444	11215	3965	1,08	1042444±9376	1042444±22429
20,0	2195874	8787	3107	0,40	2195874±7346	2195874±17575
30,0	3318436	14571	5151	0,44	3318436±12181	3318436±29141
40,0	4448083	3404	1203	0,08	4448083±2846	4448083±6808

x - stężenie kwasu izowanilinowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu izowanilinowego:

$$y = 112849x - 67266$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu izowanilinowego ($\mu\text{g/ml}$).

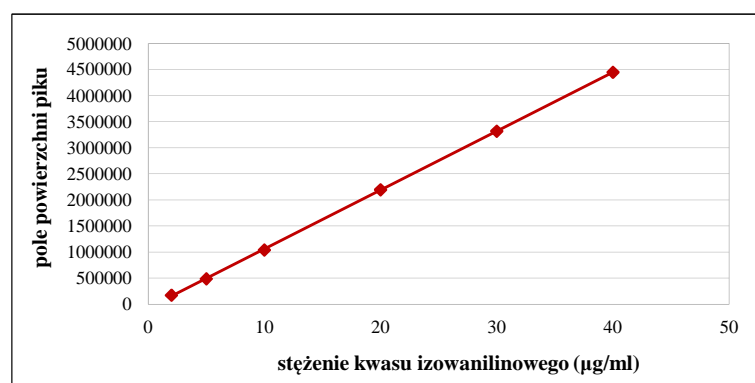
Tabela 77. Parametry równania prostej $y = 112849x - 67266$

a	b	S_a	S_b	S_{xy}	r	r^2
112849	- 67266	149	3340	14075	1,0000	0,9999

a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szcztkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r^2 - współczynnik determinacji.

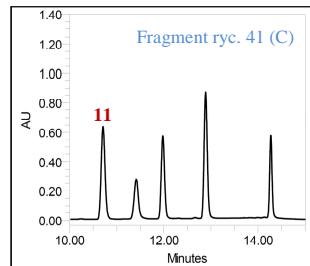
Tabela 78. Pola powierzchni pików roztworów kwasu izowanilinowego obliczone z równania prostej $y = 112849x - 67266$

x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	158432	496979	1061224	2189714	3318204	4446694

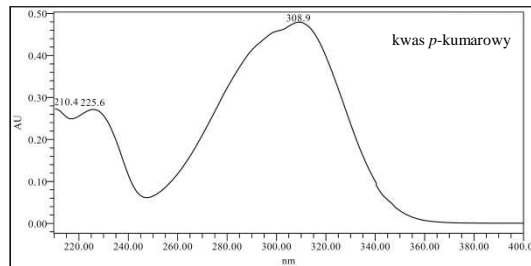


Rycina 71. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu izowanilinowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu *p*-kumarowego



Rycina 72. Chromatogram UPLC kwasu *p*-kumarowego (**11**); $t_{sr} = 10,77$ (min).



Rycina 73. Widmo w nadfiolecie kwasu *p*-kumarowego.

Tabela 79. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu *p*-kumarowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	261651	262066	262190	262294	262359	262448	262617	262649	262284
5,0	753052	753366	753399	753981	754436	763769	763778	764026	757476
10,0	1653372	1655478	1656863	1657107	1657385	1690694	1691184	1691578	1669208
20,0	3640460	3612637	3627381	3629477	3630289	3638066	3662374	3664864	3638194
30,0	5530998	5532768	5551246	5556916	5562700	5563331	5567225	5570310	5554437
40,0	7491539	7501010	7506092	7507301	7508095	7510261	7513943	7520616	7507357

x - stężenie kwasu *p*-kumarowego w próbce (μg/ml), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu *p*-kumarowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 80. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S \bar{A}	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2s$
2,0	262284	324	114	0,12	262284±271	262284±647
5,0	757476	5302	1874	0,70	757476±4432	757476±10604
10,0	1669208	18217	6441	1,09	1669208±15229	1669208±36433
20,0	3638194	17767	6282	0,49	3638194±14854	3638194±35534
30,0	5554437	15110	5342	0,27	5554437±12632	5554437±30219
40,0	7507357	8621	3048	0,11	7507357±7207	7507357±17242

x - stężenie kwasu *p*-kumarowego w próbce (μg/ml), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, S \bar{A} - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy n = 8, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu *p*-kumarowego:

$$y = 191755x - 188141$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu *p*-kumarowego (μg/ml).

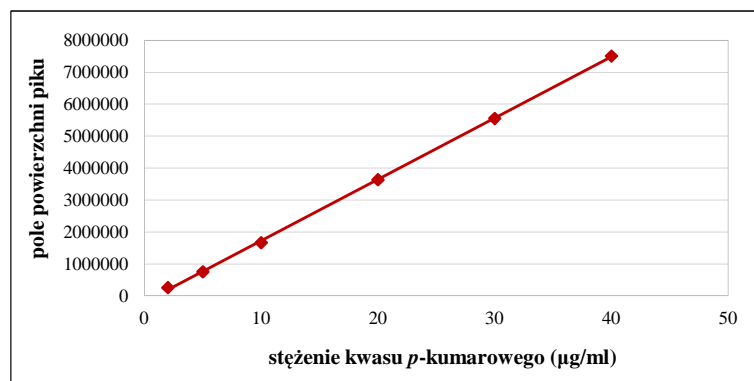
Tabela 81. Parametry równania prostej $y = 191755x - 188141$

a	b	S _a	S _b	S _{xy}	r	r ²
191755	- 188141	439	9870	41597	0,9999	0,9998

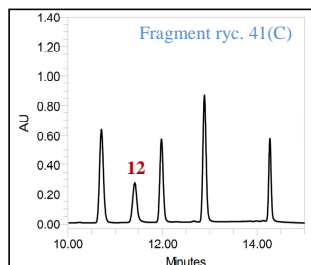
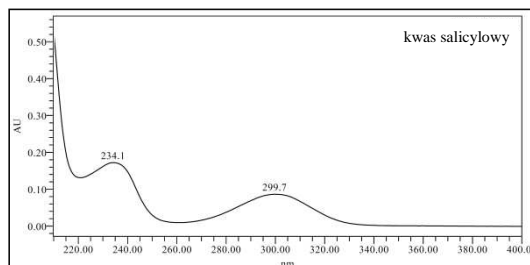
a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szacunkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r² - współczynnik determinacji.

Tabela 82. Pola powierzchni pików roztworów kwasu *p*-kumarowego obliczone z równania prostej $y = 191755x - 188141$

x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	195369	770634	1729409	3646959	5564509	7482059

Rycina 74. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu *p*-kumarowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu salicylowego

Rycina 75. Chromatogram UPLC kwasu salicylowego (**12**); $t_{sr} = 11,47$ (min).

Rycina 76. Widmo w nadfiolecie kwasu salicylowego.

Tabela 83. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu salicylowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	141788	144595	144753	144760	145366	146058	147083	148962	145421
5,0	357357	357907	358867	359392	362454	363705	364165	373873	362215
10,0	780120	774954	776313	781198	782591	786268	786531	787072	781881
20,0	1720784	1716088	1724239	1725287	1726279	1729473	1731728	1732879	1725845
30,0	2630358	2631891	2640657	2646630	2647862	2656395	2656451	2658060	2646038
40,0	3578214	3514935	3525168	3525562	3532845	3537262	3539194	3541986	3536896

x - stężenie kwasu salicylowego w próbce (µg/ml), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu salicylowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 84. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	145421	2086	738	1,43	145421±1744	145421±4173
5,0	362215	5389	1905	1,49	362215±4506	362215±10779
10,0	781881	4643	1641	0,59	781881±3881	781881±9285
20,0	1725845	5621	1987	0,33	1725845±4699	1725845±11241
30,0	2646038	10947	3870	0,41	2646038±9152	2646038±21894
40,0	3536896	18910	6686	0,53	3536896±15809	3536896±37821

x - stężenie kwasu salicylowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha, f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu salicylowego:

$$y = 90342x - 78050$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu salicylowego ($\mu\text{g/ml}$).

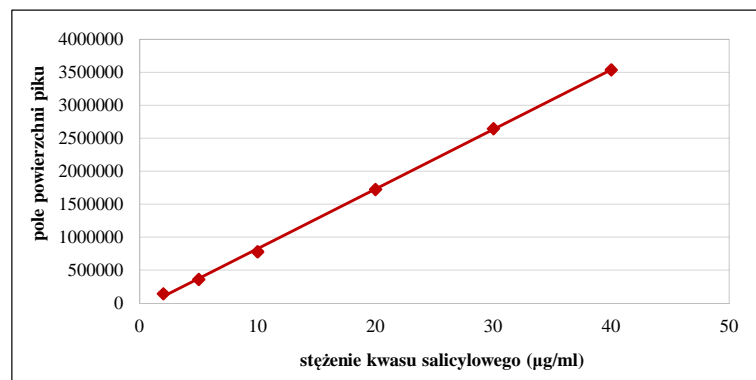
Tabela 85. Parametry równania prostej $y = 90342x - 78050$

a	b	S_a	S_b	S_{xy}	r	r^2
90342	- 78050	297	6673	28124	0,9998	0,9995

a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szcztakowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r^2 - współczynnik determinacji.

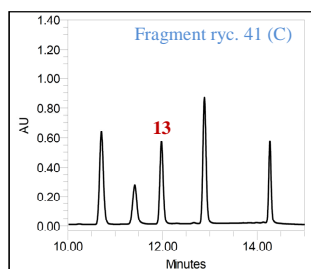
Tabela 86. Pola powierzchni pików roztworów kwasu salicylowego obliczone z równania prostej $y = 90342x - 78050$

x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	102634	373660	825370	1728790	2632210	3535630

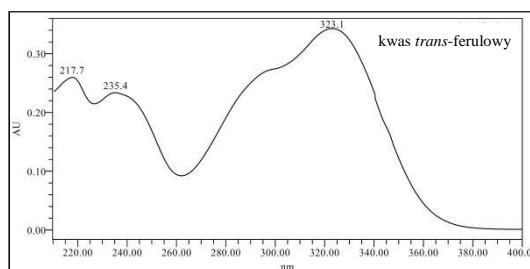


Rycina 77. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu salicylowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu *trans*-ferulowego



Rycina 78. Chromatogram UPLC kwasu *trans*-ferulowego (**13**); $t_{sr} = 12,02$ (min).



Rycina 79. Widmo w nadfiolecie kwasu *trans*-ferulowego.

Tabela 87. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu *trans*-ferulowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	176633	176881	177005	177228	177332	177352	177405	177465	177163
5,0	542794	526758	527085	533892	533941	534121	542778	543363	535592
10,0	1193389	1193419	1194658	1195414	1195653	1218970	1219265	1219829	1203825
20,0	2629101	2621241	2622685	2628303	2643322	2644148	2656257	2672457	2639689
30,0	4024328	4025066	4027292	4027956	4035024	4139184	4141830	4148459	4071142
40,0	5410884	5415565	5418035	5418193	5425472	5425714	5429019	5431492	5421797

x - stężenie kwasu *trans*-ferulowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu *trans*-ferulowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 88. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S _{\bar{A}}	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	177163	294	104	0,17	177163 \pm 245	177163 \pm 587
5,0	535592	6783	2398	1,27	535592 \pm 5671	535592 \pm 13566
10,0	1203825	12888	4556	1,07	1203825 \pm 10774	1203825 \pm 25775
20,0	2639689	17938	6342	0,68	2639689 \pm 14997	2639689 \pm 35877
30,0	4071142	59775	21134	1,47	4071142 \pm 49973	4071142 \pm 119550
40,0	5421797	7172	2536	0,13	5421797 \pm 5996	5421797 \pm 14344

x - stężenie kwasu *trans*-ferulowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, S _{\bar{A}} - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy n = 8, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu *trans*-ferulowego:

$$y = 139473x - 145738$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu *trans*-ferulowego ($\mu\text{g/ml}$).

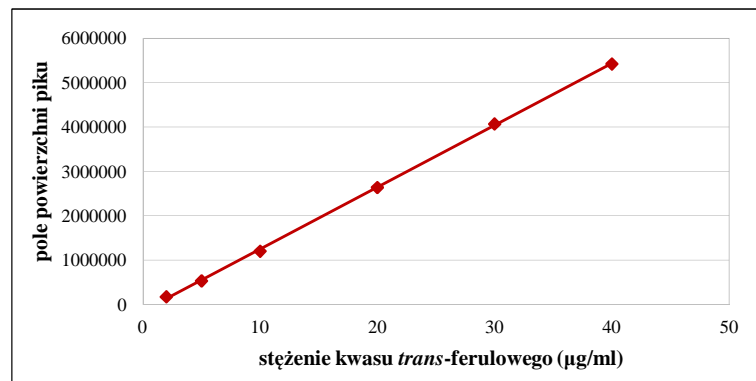
Tabela 89. Parametry równania prostej $y = 139473x - 145738$

a	b	S _a	S _b	S _{xy}	r	r ²
139473	- 145738	420	9430	39744	0,9998	0,9996

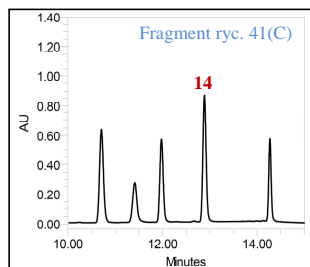
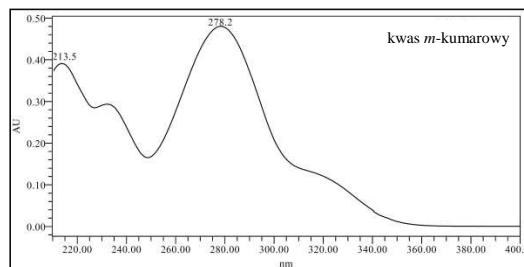
a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szacunkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r² - współczynnik determinacji.

Tabela 90. Pola powierzchni pików roztworów kwasu *trans*-ferulowego obliczone z równania prostej $y = 139473x - 145738$

x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	133208	551627	1248992	2643722	4038452	5433182

Rycina 80. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu *trans*-ferulowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu *m*-kumarowego

Rycina 81. Chromatogram UPLC kwasu *m*-kumarowego (14); $t_{sr} = 12,93$ (min).Rycina 82. Widmo w nadfiolecie kwasu *m*-kumarowego.Tabela 91. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu *m*-kumarowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
2,0	282320	282487	282690	282751	282935	283073	283262	283270	282849
5,0	828705	805499	805890	814447	815793	816327	828636	829708	818126
10,0	1747966	1748230	1748241	1749853	1749935	1783375	1783797	1784403	1761975
20,0	3796587	3770185	3783265	3784403	3785444	3795588	3819350	3819353	3794272
30,0	5713295	5733745	5736984	5740991	5746606	5747337	5751285	5752601	5740356
40,0	7667341	7667619	7668698	7668857	7669690	7671993	7673090	7680901	7671024

x - stężenie kwasu *m*-kumarowego w próbce (µg/ml), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu *m*-kumarowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 92. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
2,0	282849	349	123	0,12	282849±291	282849±697
5,0	818126	9913	3505	1,21	818126±8288	818126±19826
10,0	1761975	18138	6413	1,03	1761975±15164	1761975±36276
20,0	3794272	17492	6184	0,46	3794272±14623	3794272±34983
30,0	5740356	12789	4522	0,22	5740356±10692	5740356±25578
40,0	7671024	4469	1580	0,06	7671024±3736	7671024±8938

x - stężenie kwasu *m*-kumarowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Równanie prostej dla kwasu *m*-kumarowego:

$$y = 195679x - 144835$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu *m*-kumarowego ($\mu\text{g/ml}$).

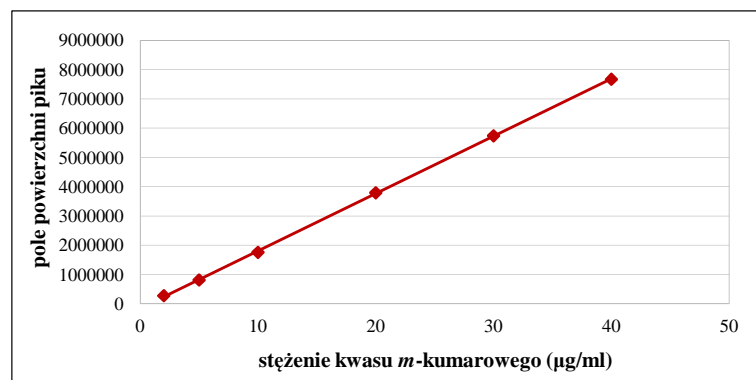
Tabela 93. Parametry równania prostej $y = 195679x - 144835$

a	b	S_a	S_b	S_{xy}	r	r^2
195679	- 144835	337	7573	31916	0,9999	0,9999

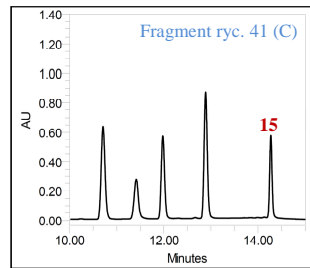
a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szczytkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r^2 - współczynnik determinacji.

Tabela 94. Pola powierzchni pików roztworów kwasu *m*-kumarowego obliczone z równania prostej $y = 195679x - 144835$

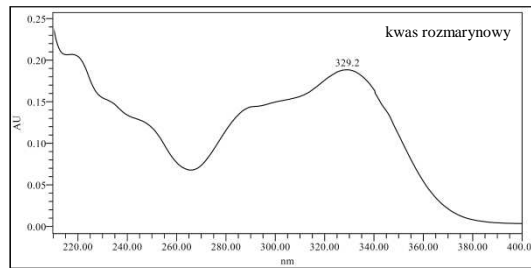
x	2,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
y	246523	833560	1811955	3768745	5725535	7682325

Rycina 83. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu *m*-kumarowego.

Krzywa kalibracyjna dla kwasu rozmarynowego



Rycina 84. Chromatogram UPLC kwasu rozmarynowego (**15**); $t_{sr} = 14,29$ (min).



Rycina 85. Widmo w nadfiolecie kwasu rozmarynowego.

Tabela 95. Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu rozmarynowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
5,0	208538	212065	214624	215690	215871	216074	220772	223736	215921
10,0	665367	665770	665965	671403	671654	673727	667572	676106	669696
20,0	1425692	1442397	1448334	1453257	1453258	1459797	1463563	1463824	1451265
30,0	2194262	2194829	2200946	2228118	2228441	2240789	2249324	2278986	2226962
40,0	2973742	2988084	3006531	3046043	3078950	3105472	3112609	3120846	3054035
50,0	3738992	3783046	3801417	3812239	3812424	3838686	3842345	3862948	3811512

x - stężenie kwasu rozmarynowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), A₁-A₈ - wartości pól powierzchni pików kwasu rozmarynowego w badanych próbach, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików.

Tabela 96. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S \bar{A}	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
5,0	215921	4717	1668	2,18	215921 \pm 3943	215921 \pm 9434
10,0	669696	4083	1443	0,61	669696 \pm 3413	669696 \pm 8165
20,0	1451265	12711	4494	0,88	1451265 \pm 10626	1451265 \pm 25421
30,0	2226962	29713	10505	1,33	2226962 \pm 24840	2226962 \pm 59425
40,0	3054035	58892	20822	1,93	305403 \pm 49235	3054035 \pm 117785
50,0	3811512	38744	13698	1,02	3811512 \pm 32390	3811512 \pm 77487

x - stężenie kwasu rozmarynowego w próbce ($\mu\text{g/ml}$), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości pól powierzchni pików, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, S \bar{A} - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy n = 8, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$)

Równanie prostej dla kwasu rozmarynowego:

$$y = 79620x - 151947$$

gdzie:

y - pole powierzchni pików

x - stężenie kwasu rozmarynowego ($\mu\text{g/ml}$).

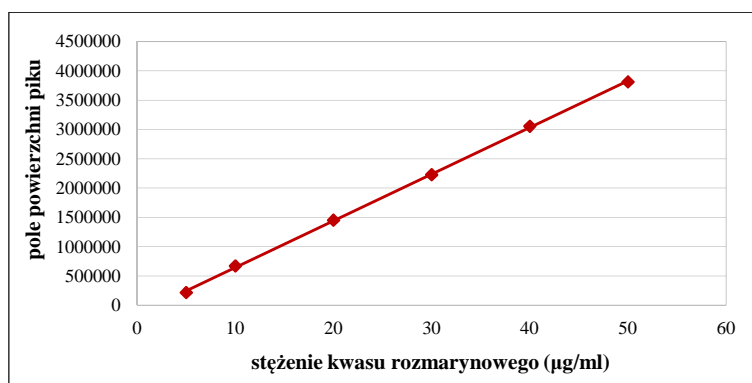
Tabela 97. Parametry równania prostej $y = 79620x - 151947$

a	b	S _a	S _b	S _{xy}	r	r ²
79620	- 151947	265	7392	36889	0,9996	0,9992

a - współczynnik kierunkowy prostej, b - wyraz wolny, S_a - błąd standardowy współczynnika a, S_b - błąd standardowy wyrazu wolnego, S_{xy} - szacunkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracyjnej, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r² - współczynnik determinacji.

Tabela 98. Pola powierzchni pików roztworów kwasu rozmarynowego obliczone z równania prostej $y = 79620x - 151947$

x	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0
y	246153	644253	1440453	2236653	3032853	3829053



Rycina 86. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu rozmarynowego.

8.2.2.2. Walidacja metody

Wyznaczanie liniowości

Dla każdej otrzymanej wartości pola powierzchni wyznaczono w oparciu o krzywe kalibracyjne wartość stężenia, którą następnie porównano z wartością stężenia roztworów kwasów fenolowych wykorzystanych do sporządzenia krzywych wzorcowych. Za kryterium akceptacji przyjęto wartość błędu względnego (BW) < 5% (Konieczka i wsp., 2004). Obliczone wartości przedstawiono w tabeli 99.

Tabela 99. Wartości stężeń kwasów fenolowych obliczone na podstawie krzywych kalibracyjnych i wartości błędów względnych.

Kwasy fenolowe	Średnie stężenie kwasu fenolowego obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej ($\mu\text{g/ml}$) i wartość błędu względnego (BW %)*						Zakres liniowości ($\mu\text{g/ml}$)
	2,23 (11,48%)	4,91 (1,73%)	9,73 (2,74%)	20,11 (0,53%)	30,04 (0,52%)	39,98 (0,27%)	
galusowy	2,23 (11,48%)	4,91 (1,73%)	9,73 (2,74%)	20,11 (0,53%)	30,04 (0,52%)	39,98 (0,27%)	5-40
protokatechowy	2,13 (6,27%)	4,93 (1,37%)	9,84 (1,60%)	20,10 (0,48%)	30,05 (0,30%)	39,96 (0,12%)	5-40
chlorogenowy	2,26 (13,20%)	4,89 (2,12%)	9,74 (2,60%)	20,00 (0,36%)	30,15 (1,46%)	39,95 (1,39%)	5-40
dihydrokawowy	2,38 (18,79%)	4,70 (6,04%)	9,69 (3,10%)	20,23 (1,15%)	30,10 (0,86%)	39,91 (0,45%)	10-40
<i>p</i> -hydroksybenzoesowy	1,83 (8,35%)	4,79 (4,16%)	9,97 (1,06%)	20,57 (2,84%)	30,31 (1,08%)	39,53 (1,18%)	5-40
<i>p</i> -hydroksyfenylooctowy	2,18 (8,95%)	5,00 (0,06%)	9,72 (2,76%)	20,06 (0,91%)	30,02 (0,74%)	40,02 (0,09%)	5-40
wanilinowy	2,10 (4,75%)	4,93 (1,42%)	9,85 (1,53%)	20,14 (0,71%)	30,06 (0,40%)	39,93 (0,18%)	2-40
kawowy	2,26 (13,12%)	4,97 (0,65%)	9,77 (2,26%)	20,03 (1,15%)	29,74 (1,63%)	40,23 (0,57%)	5-40
syryngowy	2,17 (8,36%)	4,97 (0,66%)	9,87 (1,42%)	20,05 (0,91%)	29,79 (0,74%)	40,17 (0,41%)	5-40
izowanilinowy	2,15 (7,69%)	4,94 (1,12%)	9,83 (1,66%)	20,05 (0,34%)	30,00 (0,35%)	40,01 (0,07%)	5-40
<i>p</i> -kumarowy	2,35 (17,45%)	4,93 (1,37%)	9,69 (3,14%)	19,95 (0,45%)	29,95 (0,21%)	40,13 (0,33%)	5-40
salicylowy	2,47 (23,68%)	4,87 (2,53%)	9,52 (4,81%)	19,97 (0,27%)	30,15 (0,53%)	40,01 (0,34%)	5-40
<i>trans</i> -ferulowy	2,32 (15,76%)	4,89 (2,30%)	9,68 (3,24%)	19,97 (0,52%)	30,23 (1,10%)	39,92 (0,20%)	5-40
<i>m</i> -kumarowy	2,19 (9,28%)	4,92 (1,58%)	9,74 (2,55%)	20,13 (0,65%)	30,08 (0,30%)	39,94 (0,14%)	5-40
rozmarynowy	4,62 (7,59%)	10,32 (3,20%)	20,14 (0,68%)	29,88 (1,02%)	40,27 (1,69%)	49,78 (0,80%)	10-50

* wartość BW (%) obliczono ze wzoru (rozd. 7.5.), gdzie stężenie kwasu fenolowego (\bar{x}_{wz}) w stosowanych roztworach wzorcowych ($\mu\text{g/ml}$) wynosiło odpowiednio: 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 i 40,0 dla wszystkich kwasów fenolowych, z wyjątkiem kwasu rozmarynowego, którego stężenia wynosiły: 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 $\mu\text{g/ml}$. Wartości BW podano w nawiasach.

Wyznaczanie granicy wykrywalności i granicy oznaczalności

Granice wykrywalności (LOD, *limit of detection*) obliczono na podstawie średniej wartości odchylenia standardowego zbioru sygnałów i kąta nachylenia krzywej kalibracyjnej (rozd. 7.5.). Za granicę oznaczalności (LOQ, *limit of quantification*) przyjęto trzykrotną wartość LOD (rozd. 7.5.) odpowiednio dla każdego kwasu fenolowego (Konieczka i wsp., 2004).

Powtarzalność

Powtarzalność określono wyznaczając współczynnik zmienności (Wz %) z 14 niezależnych pomiarów w próbkach wzorcowych, wykonanych w ciągu jednego dnia (Konieczka i wsp., 2004). Metodę uważa się za powtarzalną, gdy współczynnik zmienności $Wz \leq 5\%$.

Obliczone wartości parametrów walidacyjnych (powtarzalność, granica wykrywalności i oznaczalności) dla każdego kwasu fenolowego przedstawiono w tabeli 100.

Tabela 100. Równania krzywych kalibracyjnych kwasów fenolowych i wartości parametrów procesu walidacji metody UPLC-PDA

Kwasy fenolowe	Równanie krzywej kalibracyjnej	Powtarzalność (Wz %)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
galusowy	$y = 88398x - 53935$	0,87	0,4460	1,3380
protokatechowy	$y = 104765x - 45841$	0,93	0,2506	0,7519
chlorogenowy	$y = 79806x - 60132$	1,51	0,7401	2,2203
dihydrokawowy	$y = 28224x - 27073$	1,81	0,6289	1,8866
<i>p</i> -hydroksybenzoesowy	$y = 184507x - 6297$	0,81	0,7459	2,2376
<i>p</i> -hydroksyfenylooctowy	$y = 35134x - 10204$	1,48	0,4644	1,3933
wanilinowy	$y = 112403x - 54790$	0,79	0,2640	0,7920
kawowy	$y = 145745x - 104383$	1,52	0,6289	1,8867
syryngowy	$y = 94223x - 56227$	1,72	0,4149	1,2448
izowanilinowy	$y = 112849x - 67266$	0,90	0,2546	0,7639
<i>p</i> -kumarowy	$y = 191755x - 188141$	0,91	0,4429	1,3286
salicylowy	$y = 90342x - 78050$	0,97	0,6355	1,9066
<i>trans</i> -ferulowy	$y = 139473x - 145738$	0,89	0,5817	1,7452
<i>m</i> -kumarowy	$y = 195679x - 144835$	0,91	0,3330	0,9989
rozmarynowy	$y = 79620x - 151947$	1,15	0,9748	2,9243

8.2.2.3. Określenie profilu kwasów fenolowych w wyciągu

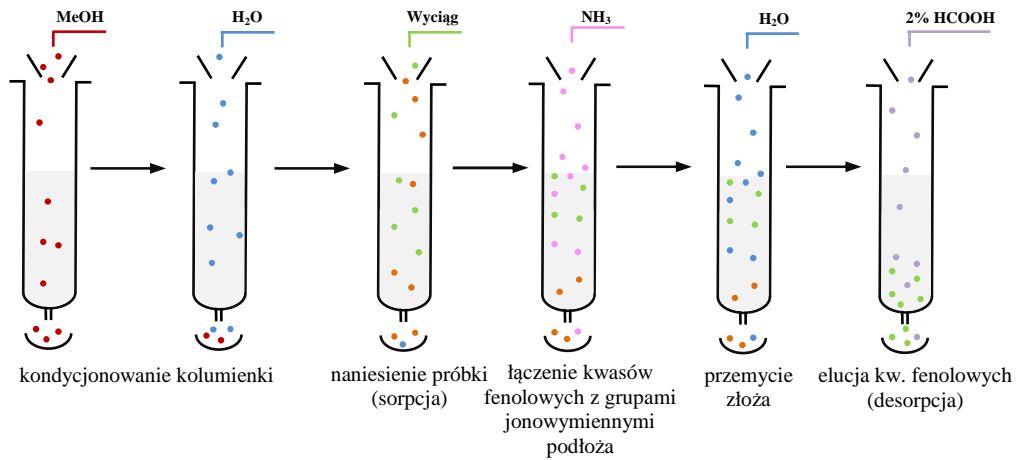
8.2.2.3.1. Procedury SPE do oczyszczania wyciągu

W celu oczyszczenia wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (rozd. 7.2.4.3.) zastosowano ekstrakcję do fazy stałej (SPE) przy użyciu kolumniek ekstrakcyjnych firmy Waters:

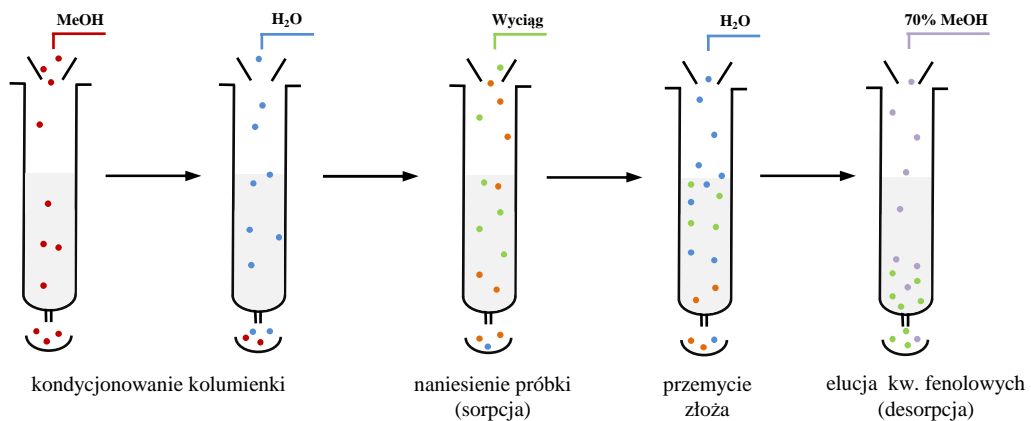
- Oasis MAX 6 cc Vac Cartridge (500 mg podłoża, wielkość ziaren 60 μm)
- Oasis HLB Plus Short Cartridge (225 mg podłoża, wielkość ziaren 60 μm).

Procedury mycia kwasów fenolowych z kolumniek:

Oasis MAX



Oasis HLB



Odzyski kwasów fenolowych obliczono w oparciu o różnicę wartości pól powierzchni pików dla poszczególnych kwasów fenolowych przed oraz po oczyszczeniu mieszaniny wzorcowych kwasów fenolowych o stężeniu 20 µg/ml w kolumnkach wg wzoru:

$$\text{odzysk (\%)} = \frac{A_P}{A_0} \cdot 100$$

gdzie:

A_P - pola powierzchni pików kwasów fenolowych oczyszczonych na kolumnkach Oasis

A_0 - pola powierzchni pików kwasów fenolowych bez oczyszczania

Odzyski kwasów fenolowych obecnych w wyciągach z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (2 g/ml i 1 g/ml) sprawdzono w analogiczny sposób jak dla wzorcowych kwasów fenolowych. Odzyski dla kwasów fenolowych obecnych

w wyciągu były identyczne z odzyskami uzyskanymi dla wzorcowych kwasów fenolowych.

Wartości odzysków dla poszczególnych kwasów fenolowych przy zastosowaniu obydwu kolumniek ekstrakcyjnych przedstawiono w tabeli 101.

Tabela 101. Obliczone wartości odzysków kwasów fenolowych

Kwas fenolowy	Średni odzysk (%)					
	Oasis MAX	S	W _z	Oasis HLB	S	W _z
galusowy	0	0,00	0,00	71,74±0,02	0,02	0,54
protokatechowy	91,19±0,19	0,18	1,02	90,03±0,05	0,05	1,04
chlorogenowy	81,73±0,13	0,12	0,76	83,63±0,01	0,01	0,37
dihydrokawowy	23,50±0,16	0,15	2,75	74,31±0,02	0,02	0,34
<i>p</i> -hydroksybenzoesowy	96,01±0,36	0,34	1,67	90,61±0,07	0,07	1,42
<i>p</i> -hydroksyfenylooctowy	92,30±0,13	0,13	0,67	91,91±0,07	0,07	1,38
wanilinowy	95,76±0,41	0,39	1,91	90,60±0,08	0,08	1,51
kawowy	73,81±0,39	0,38	2,50	84,42±0,05	0,05	1,11
syryngowy	93,59±0,20	0,19	0,97	90,71±0,06	0,05	1,06
izowanilinowy	94,71±0,16	0,15	0,75	90,39±0,06	0,06	1,23
<i>p</i> -kumarowy	92,11±0,14	0,14	0,67	78,12±0,02	0,02	0,39
salicylowy	56,68±0,68	0,65	8,07	66,91±0,03	0,03	1,14
<i>trans</i> -ferulowy	90,02±0,34	0,32	1,67	83,39±0,08	0,08	1,78
<i>m</i> -kumarowy	94,74±0,11	0,10	0,50	89,13±0,05	0,05	1,01
rozmarynowy	58,34±0,40	0,39	3,85	100,77±0,04	0,04	1,13

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 6$, $f = n-1$ wartość współczynnika *t*-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,571$), *S* - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, *W_z* - współczynnik zmienności (%). Na kolor niebieski zaznaczono wyższe wartości odzysków.

Przygotowanie prób do badań

1,0 ml wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej naniesiono na kolumniekę ekstrakcyjną Oasis MAX, przemywano roztworem amoniaku i wodą, a następnie eluowano z niej kwasy fenolowe 25 ml 2% kwasu mrówkowego w metanolu. Uzyskany roztwór zagęszczono do sucha na wyparce próżniowej, rozpuszczono w 2 ml mieszaniny metanol-woda (1:1), a następnie oczyszczono przez filtr strzykawkowy firmy Waters (GHP; 25 mm; 0,2 μ m). W wyciągu z surowca, oczyszczonym na kolumniekach Oasis MAX, oznaczono kwas protokatechowy, *p*-hydroksybenzoesowy i izowanilinowy.

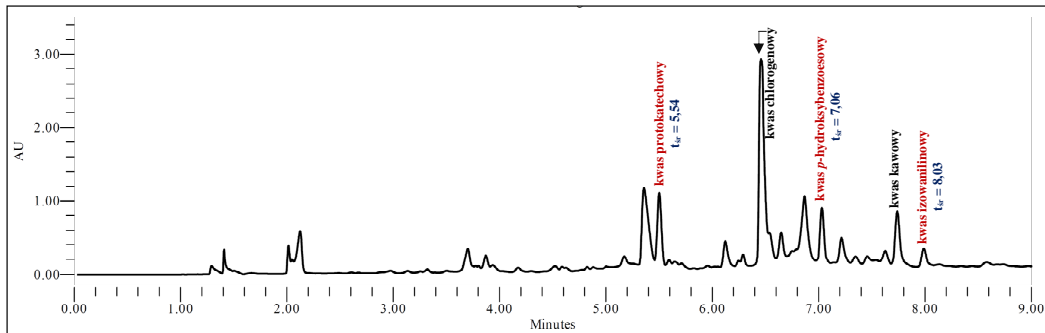
Na kolumniekach ekstrakcyjnych Oasis HLB oczyszczono 0,5 ml i 0,1 ml wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej. Kwasy fenolowe wymywano z kolumnienki 50 ml 70% metanolu. Uzyskany roztwór zagęszczono do sucha na wyparce próżniowej, rozpuszczono w 2 ml mieszaniny metanol-woda (1:1), a następnie oczyszczono przez filtr strzykawkowy (GHP; 25mm; 0,2 μ m). W wyciągu z surowca, oczyszczonym na

kolumnkach Oasis HLB, oznaczono kwas kawowy (próbę 0,5 ml) i kwas chlorogenowy (próbę 0,1 ml).

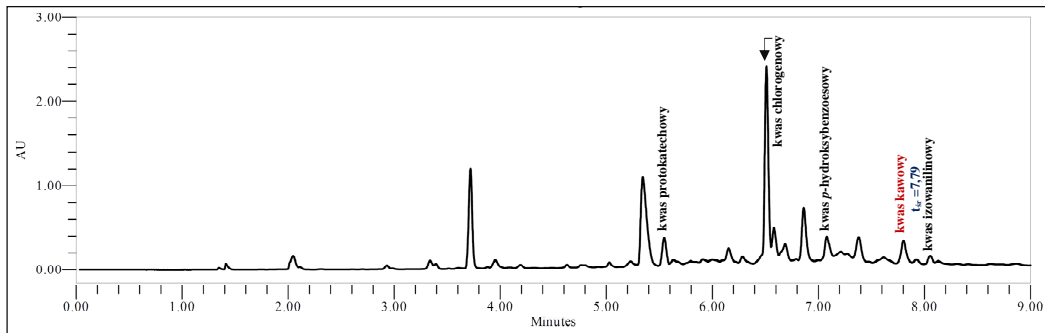
8.2.2.3.2. Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych w wyciągu

Zawartość kwasów fenolowych w ziele żótlicy drobnokwiatowej ($\mu\text{g/g}$ surowca) obliczono na podstawie równania prostych dla poszczególnych kwasów fenolowych.

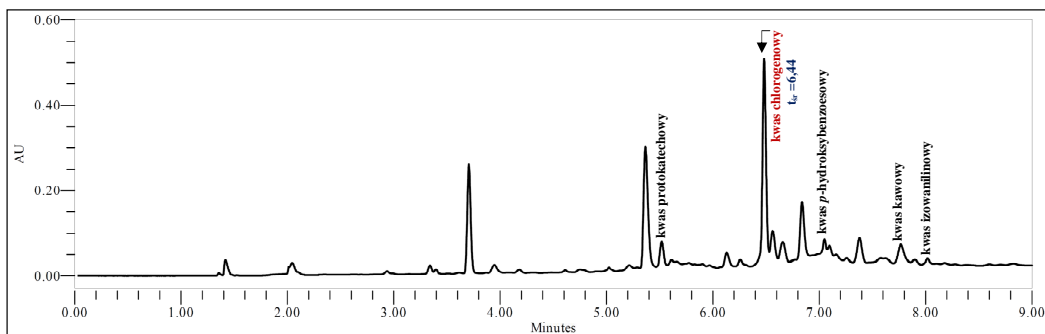
Wyniki analizy oraz ich ocenę statystyczną przedstawiono w tabelach 102 - 111 i na rycinach 87-90.



Rycina 87. Chromatogram UPLC wyciągu z ziela żótlicy drobnokwiatowej (1,0 ml) oczyszczonego przy użyciu kolumnki Oasis MAX.*



Rycina 88. Chromatogram UPLC wyciągu z ziela żótlicy drobnokwiatowej (0,5 ml) oczyszczonego przy użyciu kolumnki Oasis HLB.*



Rycina 89. Chromatogram UPLC wyciągu z ziela żótlicy drobnokwiatowej (0,1 ml) oczyszczonego przy użyciu kolumnki Oasis HLB.*

* kolorem czerwonym zaznaczono kwasy analizowane ilościowo.

Zawartość kwasu protokatechowego

Tabela 102. Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu protokatechowego w surowcu

Stężenie surowca w próbce (g/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	Stężenie kwasu protokatechowego w próbce (µg/ml)	Zawartość kwasu protokatechowego w surowcu (µg/g)
1,00	2082099	2093242	2117244	20,46	20,46±0,44
1,00	2091800	2092957	2096709	20,42	20,42±0,06
1,00	2023823	2061355	2088733	20,08	20,08±0,79
					20,32±0,43

Tabela 103. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	S $_{\bar{x}}$	Wz	μ	A±2S
20,46	0,17	0,13	0,84	20,46±0,44	20,46±0,34
20,42	0,02	0,02	0,12	20,42±0,06	20,42±0,05
20,08	0,31	0,22	1,55	20,08±0,79	20,08±0,62

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ (wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$).

Zawartość kwasu chlorogenowego

Tabela 104. Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu chlorogenowego w surowcu

Stężenie surowca w próbce (g/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	Stężenie kwasu chlorogenowego w próbce (µg/ml)	Zawartość kwasu chlorogenowego w surowcu (µg/g)
0,10	1129286	1129676	1133288	14,92	149,22±0,70
0,10	1124827	1127304	1132927	14,89	148,92±1,32
0,10	1128863	1130151	1132287	14,92	149,18±0,55
					149,11±0,86

Tabela 105. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	S $_{\bar{x}}$	Wz	μ	A±2S
149,22	0,28	0,21	0,19	149,22±0,70	149,22±0,55
148,92	0,52	0,38	0,35	148,92±1,32	148,92±1,04
149,18	0,22	0,15	0,15	149,18±0,55	149,18±0,43

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ (wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$).

Zawartość kwasu *p*-hydroksybenzoesowego

Tabela 106. Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu *p*-hydroksybenzoesowego w surowcu

Stężenie surowca w próbce (g/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	Stężenie kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego w próbce (µg/ml)	Zawartość kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego w surowcu (µg/g)
1,00	1918503	1921526	1921455	10,44	10,44±0,02
1,00	1911682	1913069	1913998	10,40	10,40±0,02
1,00	1919545	1920498	1921720	10,44	10,44±0,02
					10,43±0,02

Tabela 107. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	μ	A \pm 2S
10,44	0,01	0,01	0,09	10,44 \pm 0,02	10,44 \pm 0,02
10,40	0,01	0,00	0,06	10,40 \pm 0,02	10,40 \pm 0,01
10,44	0,01	0,00	0,06	10,44 \pm 0,02	10,44 \pm 0,01

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ (wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$).

Zawartość kwasu kawowego

Tabela 108. Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu kawowego w surowcu

Stężenie surowca w próbce (g/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	Stężenie kwasu kawowego w próbce (μ g/ml)	Zawartość kwasu kawowego w surowcu (μ g/g)
0,50	784075	806171	820658	6,23	12,51\pm0,46
0,50	812685	816246	816437	6,31	12,62\pm0,07
0,50	800459	803595	816695	6,25	12,51\pm0,30
					12,54\pm0,28

Tabela 109. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	μ	A \pm 2S
12,51	0,18	0,13	1,46	12,51 \pm 0,46	12,51 \pm 0,37
12,62	0,03	0,02	0,23	12,62 \pm 0,07	12,62 \pm 0,06
12,51	0,12	0,09	0,95	12,51 \pm 0,30	12,51 \pm 0,24

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ (wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$).

Zawartość kwasu izowanilinowego

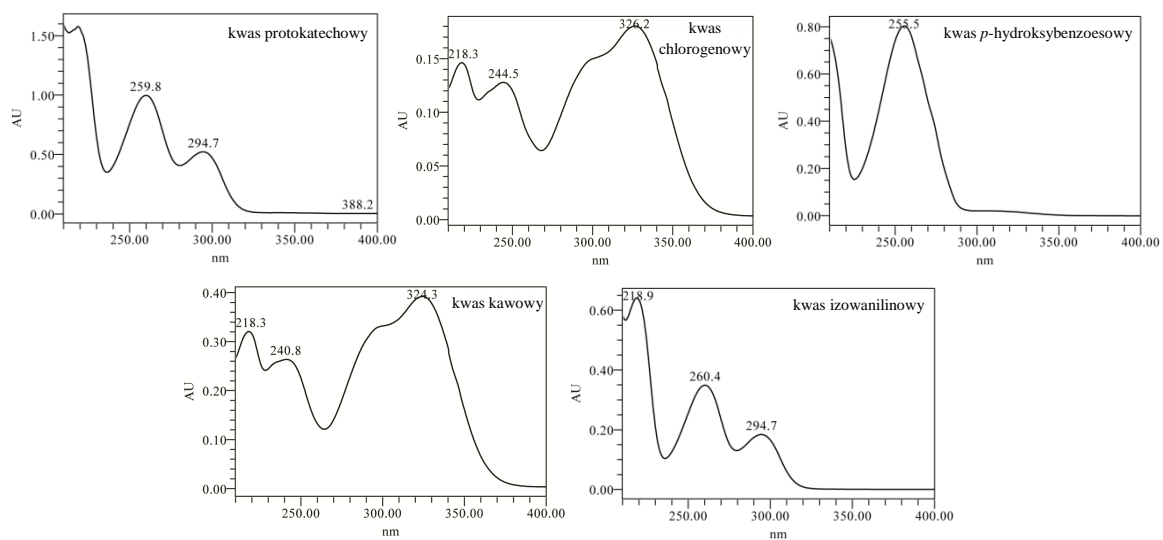
Tabela 110. Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu izowanilinowego w surowcu

Stężenie surowca w próbce (g/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	Stężenie kwasu izowanilinowego w próbce (μ g/ml)	Zawartość kwasu izowanilinowego w surowcu (μ g/g)
1,00	673278	675748	667701	6,55	6,55\pm0,09
1,00	641214	658978	660732	6,39	6,39\pm0,24
1,00	624611	634364	637126	6,20	6,20\pm0,15
					6,38\pm0,16

Tabela 111. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	μ	A \pm 2S
6,55	0,04	0,03	0,56	6,55 \pm 0,09	6,55 \pm 0,07
6,39	0,10	0,07	1,50	6,39 \pm 0,24	6,39 \pm 0,19
6,20	0,06	0,04	0,94	6,20 \pm 0,15	6,20 \pm 0,12

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ (wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$).



Rycina 90. Widma w nadfiolecie kwasów fenolowych obecnych w ziele żółticy drobnokwiatowej.

8.3. Badania ilościowe

8.3.1. Oznaczanie zawartości sumy flawonoidów w przeliczeniu na kwercetynę

Oznaczenie wykonano farmakopealną (FP IX, monografia *Betulae folium*) metodą kolorymetryczną. Metoda ta oparta jest na hydrolizie glikozydów flawonolowych do aglikonów, tworzących barwne kompleksy z chlorkiem glinu. Powstałe kompleksy wykazują maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=425$ nm.

8.3.1.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowej kwercetyny

8.3.1.1.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Roztwór podstawowy (0,2 mg/ml)

Odważono dokładnie 0,01119 g kwercetyny dwuwodnej (co odpowiada 0,01000 g bezwodnej kwercetyny) do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniono metanolem. Uzyskano roztwór podstawowy kwercetyny o stężeniu 0,20 mg/ml.

Rozcieńczenia roztworu podstawowego (0,004 - 0,022 mg/ml)

Do kolbek miarowych o pojemności 5 ml dodawano kolejno:

- podstawowy roztwór kwercetyny w ilościach: 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50; 0,55 ml, co odpowiadało 0,004; 0,006; 0,008; 0,010; 0,012; 0,014; 0,016; 0,018; 0,020 i 0,022 mg kwercetyny w 1ml roztworu,
- metanol do objętości 5 ml.

Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 8 prób.

8.3.1.1.2. Wykonanie oznaczenia

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 5 ml dodawano kolejno:

- 1,0 ml rozcieńczeń podstawowego roztworu kwercetyny, co odpowiadało 0,004 - 0,022 mg kwercetyny w próbie,
- 0,1 ml 5% roztworu $AlCl_3$,
- 1,4 ml mieszaniny kwasu octowego i metanolu (1:19).

W identyczny sposób przygotowano próbę odniesienia, zastępując roztwór chlorku glinu mieszaniną kwasu octowego z metanolem.

Po 30 minutach od momentu dodania odczynnika kompleksotwórczego (AlCl_3), zmierzono absorbancję roztworów przy długości fali $\lambda=425$ nm, wobec próby odniesienia, w kuwetach kwarcowych o grubości 1 cm. Otrzymane wyniki i charakterystykę krzywej kalibracyjnej zamieszczono poniżej (tabele 112 - 116, rycina 91).

8.3.1.1.3. Obliczenie parametrów krzywej kalibracyjnej

Tabela 112. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwercetyny

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
0,004	0,1160	0,1163	0,1164	0,1166	0,1187	0,1191	0,1195	0,1197	0,1178
0,006	0,1823	0,1825	0,1851	0,1853	0,1863	0,1906	0,1908	0,1909	0,1867
0,008	0,2531	0,2531	0,2565	0,2570	0,2579	0,2587	0,2596	0,2604	0,2570
0,010	0,3261	0,3263	0,3263	0,3268	0,3276	0,3280	0,3284	0,3286	0,3273
0,012	0,3940	0,3956	0,3957	0,3983	0,3984	0,4008	0,4008	0,4048	0,3986
0,014	0,4676	0,4683	0,4691	0,4695	0,4702	0,4702	0,4703	0,4704	0,4695
0,016	0,5312	0,5355	0,5365	0,5372	0,5400	0,5409	0,5416	0,5419	0,5381
0,018	0,5933	0,5947	0,5954	0,6149	0,6158	0,6169	0,6187	0,6218	0,6089
0,020	0,6681	0,6712	0,6738	0,6778	0,6839	0,6848	0,6849	0,6849	0,6787
0,022	0,7412	0,7443	0,7462	0,7478	0,7491	0,7492	0,7505	0,7515	0,7475

x - ilość kwercetyny w próbce (mg), A₁-A₈ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 113. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S \bar{A}	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
0,004	0,1178	0,0016	0,0006	1,3572	0,1178±0,0013	0,1178±0,0032
0,006	0,1867	0,0036	0,0013	1,9345	0,1867±0,0030	0,1867±0,0072
0,008	0,2570	0,0027	0,0010	1,0673	0,2570±0,0023	0,2570±0,0055
0,010	0,3273	0,0010	0,0004	0,3090	0,3273±0,0008	0,3273±0,0020
0,012	0,3986	0,0035	0,0012	0,8835	0,3986±0,0029	0,3986±0,0070
0,014	0,4695	0,0010	0,0004	0,2222	0,4695±0,0009	0,4695±0,0021
0,016	0,5381	0,0037	0,0013	0,6878	0,5381±0,0031	0,5381±0,0074
0,018	0,6089	0,0122	0,0043	1,9991	0,6089±0,0102	0,6089±0,0243
0,020	0,6787	0,0069	0,0024	1,0186	0,6787±0,0058	0,6787±0,0138
0,022	0,7475	0,0034	0,0012	0,4583	0,7475±0,0029	0,7475±0,0069

x - ilość kwercetyny w próbce (mg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, S \bar{A} - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy n = 8, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 114. Wartości parametrów krzywej kalibracyjnej dla kwercetyny, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y \bar{A}	xy	x ²	y ²
0,004	0,1178	0,0005	0,00002	0,0139
0,006	0,1867	0,0011	0,00004	0,0349
0,008	0,2570	0,0021	0,00006	0,0661
0,010	0,3273	0,0033	0,00010	0,1071
0,012	0,3986	0,0048	0,00014	0,1588
0,014	0,4695	0,0066	0,00020	0,2204
0,016	0,5381	0,0086	0,00026	0,2896
0,018	0,6089	0,0110	0,00032	0,3708
0,020	0,6787	0,0136	0,00040	0,4606
0,022	0,7475	0,0164	0,00048	0,5587
Σ				
0,1300	4,3300	0,0679	0,00202	2,2808

Współczynniki a i b równania korelacyjnego $y = ax + b$ obliczono metodą najmniejszych kwadratów:

$$y = 35,072x - 0,0229$$

gdzie:

a - współczynnik kierunkowy prostej

y - absorbancja próby

x - ilość kwercetyny w próbce (mg).

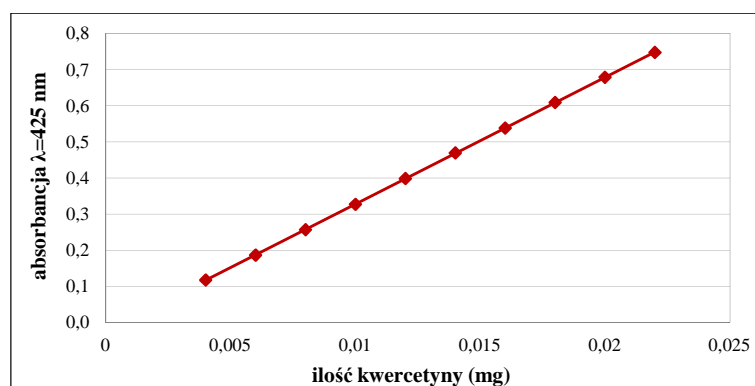
Tabela 115. Parametry równania prostej $y = 35,072x - 0,0229$

a	S _a	b	r	r ²
35,072	0,0098	- 0,0229	0,9998	0,9996

a - współczynnik kierunkowy prostej, S_a - błąd standardowy współczynnika a, b - wyraz wolny, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r² - współczynnik determinacji.

Tabela 116. Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwercetyny wyliczone z równania prostej $y = 35,072x - 0,0229$

x (mg)	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,014	0,016	0,018	0,02	0,022
y \bar{A}	0,1174	0,1875	0,2576	0,3278	0,3979	0,4681	0,5382	0,6084	0,6785	0,7486



Rycina 91. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowej kwercetyny.

8.3.1.2. Oznaczenie zawartości flawonoidów w wyciągach

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 5 ml odmierzano kolejno po 1,0 ml wyciągów do badań (rozdz. 7.3.3.2.), a następnie dodawano odczynniki w kolejności jak w przypadku wykreślenia krzywej kalibracyjnej dla kwercetyny. Dla każdego wyciągu przygotowano po 3 próby.

Przygotowanie próby odniesienia

Do 1,0 ml wyciągów do badań dodano 1,5 ml mieszaniny kwasu octowego z metanolem. Po 30 minutach zmierzono absorbancję roztworów z chlorkiem glinu wobec próby odniesienia, w kuwetach kwarcowych, przy długości fali $\lambda=425$ nm.

Zawartość flawonoidów w wyciągach z ziela żótlicy drobnokwiatowej wyrażono w mg/g surowca w przeliczeniu na kwercetynę, dla której sporządzono krzywą wzorcową.

Wyniki analizy oraz ich ocenę statystyczną przedstawiono w tabelach 117 - 122.

Zawartość flawonoidów w wyciągu z ziela żótlicy drobnokwiatowej (wg FP IX)

Tabela 117. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość flawonoidów w surowcu

Ilość surowca w próbce (mg)	A ₁	A ₂	A ₃	Zawartość flawonoidów w próbce (mg)	Zawartość flawonoidów w surowcu (mg QE/g)
2,4000	0,5143	0,5159	0,5162	0,0154	6,40±0,03
2,4000	0,5156	0,5176	0,5177	0,0154	6,41±0,04
2,4001	0,5182	0,5218	0,5201	0,0155	6,45±0,05
					6,42±0,04

Tabela 118. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	μ	A \pm 2S
6,40	0,01	0,01	0,19	6,40 \pm 0,03	6,40 \pm 0,02
6,41	0,01	0,01	0,22	6,41 \pm 0,04	6,41 \pm 0,03
6,45	0,02	0,01	0,34	6,45 \pm 0,05	6,45 \pm 0,04

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ (wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$).

Zawartość flawonoidów w nalewce

Tabela 119. Wartości pomiarów absorpcji i zawartość flawonoidów w nalewce

Ilość surowca w próbce (mg)	A ₁	A ₂	A ₃	Zawartość flawonoidów w próbce (mg)	Zawartość flawonoidów w nalewce (mg QE/g)
5,000	0,4114	0,4132	0,4138	0,0124	2,48\pm0,02
5,003	0,4118	0,4121	0,4135	0,0124	2,48\pm0,01
5,002	0,4116	0,4129	0,4139	0,0124	2,48\pm0,02
					2,48\pm0,02

Tabela 120. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	μ	A \pm 2S
2,48	0,01	0,01	0,29	2,48 \pm 0,02	2,48 \pm 0,01
2,48	0,01	0,01	0,21	2,48 \pm 0,01	2,48 \pm 0,01
2,48	0,01	0,01	0,26	2,48 \pm 0,02	2,48 \pm 0,01

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ (wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$).

Zawartość flawonoidów w odwarze

Tabela 121. Wartości pomiarów absorpcji i zawartość flawonoidów w odwarze

Ilość surowca w próbce (mg)	A ₁	A ₂	A ₃	Zawartość flawonoidów w próbce (mg)	Zawartość flawonoidów w odwarze (mg QE/g)
4,0008	0,3778	0,3794	0,3802	0,0115	2,86\pm0,02
4,0024	0,3762	0,3796	0,3807	0,0115	2,86\pm0,04
4,0000	0,3777	0,3789	0,3802	0,0115	2,86\pm0,03
					2,86\pm0,02

Tabela 122. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	μ	A \pm 2S
2,86	0,01	0,01	0,30	2,86 \pm 0,02	2,86 \pm 0,02
2,86	0,02	0,01	0,58	2,86 \pm 0,04	2,86 \pm 0,03
2,86	0,01	0,01	0,31	2,86 \pm 0,03	2,86 \pm 0,02

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ (wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$).

8.3.2. Oznaczanie zawartości kwasów fenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy

Oznaczenie zawartości sumy fenolokwasów wykonano zmodyfikowaną metodą kolorymetryczną, z użyciem odczynnika Arnov'a, opisaną w FP VI.

8.3.2.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu kawowego

8.3.2.1.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Roztwór podstawowy (0,2 mg/ml)

Odważono dokładnie 0,01002 g kwasu kawowego do kolby miarowej o pojemności 50 ml, następnie rozpuszczono w 10 ml metanolu i uzupełniono wodą dejonizowaną. Uzyskano roztwór podstawowy kwasu kawowego o stężeniu 0,2 mg/ml.

Rozcieńczenia roztworu podstawowego (4,8 - 33,6 µg/ml)

Do kolbek miarowych o pojemności 5 ml dodawano kolejno:

- podstawowy roztwór kwasu kawowego w ilościach: 0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,60; 0,72; 0,84 ml, co odpowiadało 4,8; 9,6; 14,4; 19,2; 24,0; 28,8 i 33,6 µg kwasu kawowego w 1 ml roztworu,
- wodę dejonizowaną do objętości 5 ml.

Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 8 prób.

8.3.2.1.2. Wykonanie oznaczenia

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodawano kolejno:

- 0,7 ml rozcieńczeń podstawowego roztworu kwasu kawowego, co odpowiadało 3,36 - 23,52 µg wzorca w próbie,
- 0,1 ml roztworu kwasu solnego,
- 0,1 ml odczynnika Arnov'a,
- 0,1 ml roztworu wodorotlenku sodu.

W identyczny sposób przygotowano próbę odniesienia, zastępując roztwór kwasu kawowego wodą dejonizowaną.

Pomiar absorbancji przeprowadzono natychmiast po dodaniu roztworu wodorotlenku sodu wobec próby odniesienia, w kuwetach kwarcowych o grubości 1 cm. Otrzymane wartości absorbancji przy długości fali $\lambda=490$ nm posłużyły do wykreślenia krzywej kalibracyjnej (tabele 123 - 127, rycina 92).

8.3.2.1.3. Obliczenie parametrów krzywej kalibracyjnej

Tabela 123. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu kawowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
3,36	0,1177	0,1178	0,1179	0,1179	0,1184	0,1188	0,1191	0,1192	0,1184
6,72	0,2238	0,2240	0,2243	0,2246	0,2261	0,2265	0,2268	0,2280	0,2255
10,08	0,3300	0,3307	0,3315	0,3330	0,3338	0,3340	0,3342	0,3347	0,3327
13,44	0,4337	0,4350	0,4359	0,4365	0,4371	0,4384	0,4397	0,4425	0,4374
16,80	0,5415	0,5436	0,5458	0,5464	0,5476	0,5486	0,5490	0,5515	0,5468
20,16	0,6407	0,6505	0,6506	0,6512	0,6539	0,6546	0,6555	0,6574	0,6518
23,52	0,7442	0,7482	0,7497	0,7500	0,7610	0,7621	0,7673	0,7755	0,7573

x - ilość kwasu kawowego w próbce (μg), A₁-A₁₀ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 124. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
3,36	0,1184	0,0006	0,0002	0,5169	0,1184 \pm 0,0005	0,1184 \pm 0,0012
6,72	0,2255	0,0015	0,0005	0,6847	0,2255 \pm 0,0013	0,2255 \pm 0,0031
10,08	0,3327	0,0018	0,0006	0,5323	0,3327 \pm 0,0015	0,3327 \pm 0,0035
13,44	0,4374	0,0028	0,0010	0,6402	0,4374 \pm 0,0023	0,4374 \pm 0,0056
16,80	0,5468	0,0032	0,0011	0,5795	0,5468 \pm 0,0026	0,5468 \pm 0,0063
20,16	0,6518	0,0051	0,0018	0,7866	0,6518 \pm 0,0043	0,6518 \pm 0,0103
23,52	0,7573	0,0109	0,0039	1,4409	0,7573 \pm 0,0091	0,7573 \pm 0,0218

x - ilość kwasu kawowego w próbce (μg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 125. Wartości parametrów krzywej kalibracyjnej dla kwasu kawowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y \bar{A}	xy	x ²	y ²
3,36	0,1184	0,3977	11,29	0,0140
6,72	0,2255	1,5154	45,16	0,0509
10,08	0,3327	3,3540	101,61	0,1107
13,44	0,4374	5,8780	180,63	0,1913
16,80	0,5468	9,1854	282,24	0,2989
20,16	0,6518	13,1403	406,43	0,4248
23,52	0,7573	17,8105	553,19	0,5734
Σ				
94,08	3,0699	51,2813	1580,55	1,6640

Współczynniki a i b równania korelacyjnego $y = ax + b$ obliczono metodą najmniejszych kwadratów:

$$y = 0,0317x + 0,0124$$

gdzie:

a - współczynnik kierunkowy prostej

y - absorbancja próby

x - ilość kwasu kawowego w próbce (μg).

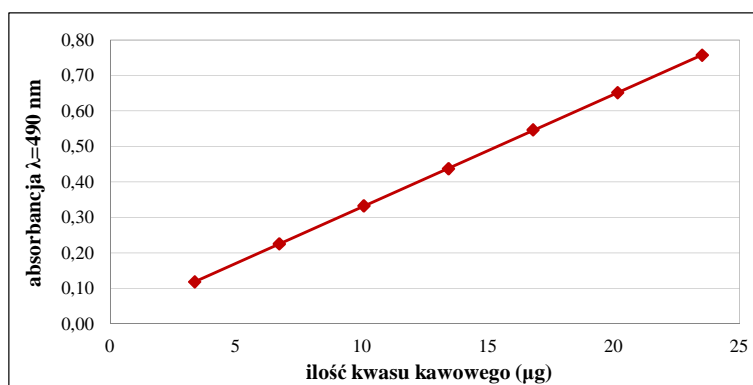
Tabela 126. Parametry równania prostej $y = 0,0317x + 0,0124$

a	S_a	b	r	r^2
0,0317	0,060	0,0124	0,9999	0,9999

a - współczynnik kierunkowy prostej, S_a - błąd standardowy współczynnika a , b - wyraz wolny, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r^2 - współczynnik determinacji.

Tabela 127. Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwasu kawowego wyliczone z równania prostej $y = 0,0317x + 0,0124$

x (μg)	3,36	6,72	10,08	13,44	16,80	20,16	23,52
y \bar{A}	0,1189	0,2254	0,3319	0,4384	0,5450	0,6515	0,7580



Rycina 92. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu kawowego.

8.3.2.2. Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych w wyciągach

Do probówek typu Eppendorf dodawano po 0,7 ml wyciągów (rozdz. 7.3.3.2.), a następnie kolejno odczynniki jak w przypadku wykreślenia krzywej kalibracyjnej dla kwasu kawowego. Dla każdego wyciągu przygotowano po 3 próby.

Zawartość kwasów fenolowych w wyciągach z ziela żółtlicy drobnokwiatowej wyrażano w mg/g surowca, w przeliczeniu na kwas kawowy.

Wyniki analiz i ich oceny statystyczne przedstawiono w tabelach 128 - 133.

Zawartość kwasów fenolowych w wyciągu metanolowo-wodnym

Tabela 128. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w wyciągu metanolowo-wodnym

Ilość surowca w próbce (mg)	A ₁	A ₂	A ₃	Zawartość kwasów fenolowych w próbce (mg)	Zawartość kwasów fenolowych w wyciągu metanolowo-wodnym (mg CAE/g)
0,4484	0,4455	0,4472	0,4474	0,0137	30,55±0,19
0,4489	0,4444	0,4456	0,4534	0,0137	30,60±0,87
0,4489	0,4484	0,4494	0,4499	0,0138	30,70±0,14
					30,62±0,40

Tabela 129. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	S \bar{x}	Wz	μ	A±2S
30,55	0,07	0,06	0,24	30,55±0,19	30,55±0,15
30,60	0,34	0,26	1,12	30,60±0,87	30,60±0,69
30,70	0,05	0,04	0,17	30,70±0,14	30,70±0,11

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$.

Zawartość kwasów fenolowych w nalewce

Tabela 130. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w nalewce

Ilość surowca w próbce (mg)	A ₁	A ₂	A ₃	Zawartość kwasów fenolowych w próbce (mg)	Zawartość kwasów fenolowych w nalewce (mg CAE/g)
0,5603	0,4009	0,4009	0,4013	0,0123	21,88±0,03
0,5600	0,3964	0,3996	0,4098	0,0123	21,94±1,00
0,5602	0,4000	0,4010	0,4034	0,0123	21,91±0,25
					21,91±0,43

Tabela 131. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	S \bar{x}	Wz	μ	A±2S
21,88	0,01	0,01	0,06	21,88±0,03	21,88±0,03
21,94	0,39	0,30	1,80	21,94±1,00	21,94±0,79
21,91	0,10	0,07	0,45	21,91±0,25	21,91±0,20

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$.

Zawartość kwasów fenolowych w odwarze

Tabela 132. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w odwarze

Ilość surowca w próbce (mg)	A ₁	A ₂	A ₃	Zawartość kwasów fenolowych w próbce (mg)	Zawartość kwasów fenolowych w odwarze (mg CAE/g)
0,4201	0,3957	0,3981	0,4006	0,0122	28,97±0,47
0,4202	0,3983	0,4033	0,4077	0,0123	29,33±0,90
0,4200	0,3904	0,3979	0,4048	0,0122	28,94±1,38
					29,08±0,91

Tabela 133. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	S \bar{x}	Wz	μ	A±2S
28,97	0,18	0,12	0,64	28,97±0,47	28,97±0,37
29,33	0,35	0,24	1,20	29,33±0,90	29,33±0,71
28,94	0,54	0,37	1,87	28,94±1,38	28,94±1,08

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$.

8.3.3. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem *Folin-Ciocalteu* w przeliczeniu na kwas galusowy

Zawartość sumy polifenoli oznaczono wg zmodyfikowanej metody Meng i wsp. (2009).

8.3.3.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu galusowego

8.3.3.1.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Roztwór podstawowy (1,0 mg/ml)

Odważono dokładnie 0,10000 g kwasu galusowego do kolby miarowej o pojemności 100 ml, następnie rozpuszczono w 10 ml metanolu i uzupełniono do współmierności wodą dejonizowaną. Uzyskano roztwór podstawowy o stężeniu 1,0 mg/ml.

Rozcieńczenia roztworu podstawowego (0,02 - 0,08 mg/ml)

Do kolbek miarowych o pojemności 5 ml dodawano kolejno:

- podstawowy roztwór kwasu galusowego w ilościach: 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40 ml, co odpowiadało 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07 i 0,08 mg kwasu galusowego w 1 ml roztworu,
- wodę dejonizowaną do objętości 5 ml.

Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 10 prób.

8.3.3.1.2. Wykonanie oznaczenia

Do próbek typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodawano kolejno:

- 0,1 ml rozcieńczeń podstawowego roztworu kwasu galusowego, co odpowiadało 0,002 - 0,008 mg wzorca w próbie,
- 0,1 ml odczynnika *Folin-Ciocalteu* (FC),
- po upływie 3 minut od chwili dodania odczynnika FC dodano 1,0 ml 7% wodnego roztworu węgla sodu.

W identyczny sposób przygotowano próbę odniesienia, zastępując roztwór kwasu galusowego wodą dejonizowaną.

Po upływie 60 minut od momentu dodania węgla sodu mierzono absorbancję otrzymanych roztworów wobec próby odniesienia, w jednorazowych kuwetach plastikowych o grubości 1 cm. Otrzymane wartości absorbancji przy długości fali $\lambda=760$ nm posłużyły do wykreślenia krzywej kalibracyjnej (tabele 134 - 138, rycina 93).

8.3.3.1.3. Obliczenie parametrów krzywej kalibracyjnej

Tabela 134. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	A ₁₀	\bar{A}
0,002	0,2227	0,2228	0,2251	0,2270	0,2271	0,2272	0,2275	0,2286	0,2293	0,2304	0,2268
0,003	0,3323	0,3326	0,3336	0,3340	0,3341	0,3343	0,3365	0,3367	0,3390	0,3401	0,3353
0,004	0,4370	0,4395	0,4410	0,4416	0,4420	0,4423	0,4442	0,4453	0,4465	0,4491	0,4429
0,005	0,5411	0,5418	0,5421	0,5464	0,5474	0,5512	0,5515	0,5526	0,5526	0,5529	0,5480
0,006	0,6494	0,6511	0,6512	0,6513	0,6517	0,6532	0,6545	0,6572	0,6580	0,6617	0,6540
0,007	0,7533	0,7544	0,7561	0,7574	0,7577	0,7592	0,7600	0,7605	0,7627	0,7628	0,7584
0,008	0,8572	0,8607	0,8620	0,8622	0,8629	0,8650	0,8652	0,8653	0,8709	0,8717	0,8643

x - ilość kwasu galusowego w próbie (mg), A₁ - A₁₀ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 135. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
0,002	0,2268	0,0026	1,1283	0,2268 \pm 0,0018	0,2268 \pm 0,0052
0,003	0,3353	0,0027	0,7917	0,3353 \pm 0,0019	0,3353 \pm 0,0054
0,004	0,4429	0,0035	0,7954	0,4429 \pm 0,0025	0,4429 \pm 0,0070
0,005	0,5480	0,0049	0,8869	0,5480 \pm 0,0035	0,5480 \pm 0,0098
0,006	0,6540	0,0039	0,5952	0,6540 \pm 0,0028	0,6540 \pm 0,0078
0,007	0,7584	0,0032	0,4267	0,7584 \pm 0,0023	0,7584 \pm 0,0066
0,008	0,8643	0,0044	0,5111	0,8643 \pm 0,0032	0,8643 \pm 0,0088

x - ilość kwasu galusowego w próbce (mg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 10$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha, f} = 2,262$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 136. Wartości parametrów krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y [\bar{A}]	xy	x^2	y^2
0,002	0,2268	0,0005	0,000004	0,0514
0,003	0,3353	0,0010	0,000009	0,1124
0,004	0,4429	0,0018	0,000016	0,1961
0,005	0,5480	0,0027	0,000025	0,3003
0,006	0,6540	0,0039	0,000036	0,4276
0,007	0,7584	0,0053	0,000049	0,5752
0,008	0,8643	0,0069	0,000064	0,7470
Σ				
0,035	3,8296	0,0221	0,0002	2,4101

Współczynniki a i b równania korelacyjnego $y = ax + b$ obliczono metodą najmniejszych kwadratów:

$$y = 106,07x + 0,0167$$

gdzie:

a - współczynnik kierunkowy prostej

y - absorbancja próby

x - ilość kwasu galusowego w próbce (mg).

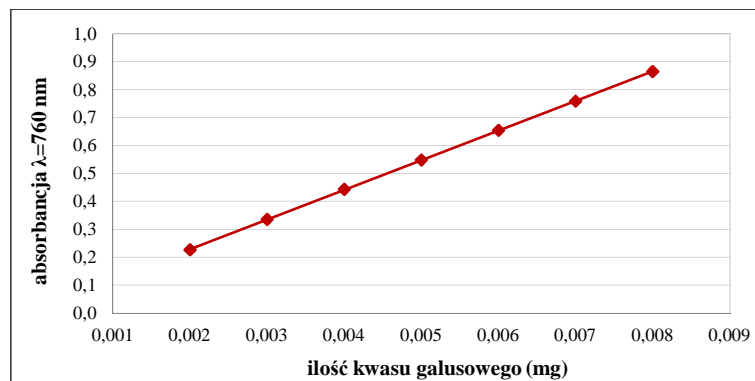
Tabela 137. Parametry równania prostej $y = 106,07 + 0,0167$

a	S_a	b	r	r^2
106,07	0,0069	0,0167	0,9999	0,9999

a - współczynnik kierunkowy prostej, S_a - błąd standardowy współczynnika a, b - wyraz wolny, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r^2 - współczynnik determinacji.

Tabela 138. Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego wyliczone z równania prostej $y = 106,07 + 0,0167x$

x (mg)	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008
y \bar{A}	0,2288	0,3349	0,4410	0,5470	0,6531	0,7591	0,8652



Rycina 93. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu galusowego.

8.3.3.2. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodawano po 0,1 ml badanych wyciągów (rozdz. 7.3.3.2.), a następnie kolejno odczynniki jak w przypadku krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego. Z każdego wyciągu przygotowano po 3 próby.

Wyniki oznaczeń ilościowych badanych wyciągów podano w mg/g surowca, przeliczeniu na kwas galusowy.

Wyniki analizy oraz ich ocenę statystyczną przedstawiono w tabelach 139 -144.

Zawartość sumy polifenoli w wyciągu metanolowo-wodnym

Tabela 139. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość sumy polifenoli w wyciągu metanolowo-wodnym

Ilość surowca w próbce (mg)	A ₁	A ₂	A ₃	Zawartość sumy polifenoli w próbce (mg)	Zawartość sumy polifenoli w wyciągu metanolowo-wodnym (mg GAE/g)
0,1001	0,4461	0,4467	0,4477	0,0041	40,51±0,19
0,1002	0,4478	0,4481	0,4481	0,0041	40,58±0,04
0,1002	0,4461	0,4468	0,4487	0,0041	40,51±0,32
					40,53±0,19

Tabela 140. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	S \bar{x}	Wz	μ	A±2S
40,51	0,08	0,05	0,19	40,51±0,19	40,51±0,15
40,58	0,02	0,01	0,04	40,58±0,04	40,58±0,03
40,51	0,13	0,09	0,31	40,51±0,32	40,51±0,25

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$.

Zawartość sumy polifenoli w nalewce

Tabela 141. Wartości pomiarów absorbancji i zawartości sumy polifenoli w nalewce

Ilość surowca w próbce (mg)	A ₁	A ₂	A ₃	Zawartość sumy polifenoli w próbce (mg)	Zawartość sumy polifenoli w nalewce (mg GAE/g)
0,1400	0,4514	0,4593	0,4472	0,0041	29,36±1,05
0,1401	0,4555	0,4581	0,4559	0,0041	29,60±0,24
0,1400	0,4591	0,4548	0,4588	0,0042	29,69±0,41
					29,55±0,57

Tabela 142. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	S \bar{x}	Wz	μ	A±2S
29,36	0,41	0,30	1,41	29,36±1,05	29,36±0,83
29,60	0,09	0,07	0,32	29,60±0,24	29,60±0,19
29,69	0,16	0,12	0,54	29,69±0,41	29,69±0,32

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$.

Zawartość sumy polifenoli w odwarze

Tabela 143. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość sumy polifenoli w odwarze

Ilość surowca w próbce (mg)	A ₁	A ₂	A ₃	Zawartość sumy polifenoli w próbce (mg)	Zawartość sumy polifenoli w odwarze (mg GAE/g)
0,1100	0,4699	0,4632	0,4621	0,0042	38,43±0,92
0,1101	0,4647	0,4627	0,4598	0,0042	38,16±0,54
0,1100	0,4681	0,4587	0,4589	0,0042	38,16±1,17
					38,25±0,88

Tabela 144. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

\bar{x}	S	S \bar{x}	Wz	μ	A±2S
38,43	0,36	0,28	0,94	38,43±0,92	38,43±0,72
38,16	0,21	0,15	0,55	38,16±0,54	38,16±0,42
38,16	0,46	0,35	1,21	38,16±1,17	38,16±0,92

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$.

8.3.4. Oznaczenie zawartości kwasu L(+)-askorbinowego

Oznaczenie zawartości kwasu L(+)-askorbinowego w ziele żótlicy drobnokwiatowej wykonano wg Abdelmageed i wsp. (1995).

8.3.4.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu L(+)-askorbinowego

8.3.4.1.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Roztwór podstawowy (2,5 mg/ml)

Odważono dokładnie 0,12500 g kwasu L(+)-askorbinowego do kolbki miarowej z oranżowego szkła o pojemności 50 ml i uzupełniono roztworem wodnym 0,5% kwasu cytrynowego, uzyskując roztwór podstawowy o stężeniu 2,5 mg/ml.

Rozcieńczenia roztworu podstawowego (0,085 - 0,165 mg/ml)

Do kolbek miarowych z oranżowego szkła o pojemności 5 ml dodawano kolejno:

- podstawowy roztwór kwasu L(+)-askorbinowego w ilościach: 0,17; 0,20; 0,23; 0,25; 0,27; 0,30; 0,33 ml, co odpowiadało 0,085; 0,100; 0,115; 0,125; 0,135, 0,150 i 0,165 mg kwasu L(+)-askorbinowego w 1 ml roztworu,
- wodny roztwór 0,5% kwasu cytrynowego do 5 ml.

8.3.4.1.2. Wykonanie oznaczenia

Do próbek typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodawano kolejno:

- 0,1 ml rozcieńczeń podstawowego roztworu kwasu L(+)-askorbinowego, co odpowiadało 0,0085 - 0,0165 mg wzorca w próbie,
- 0,1 ml wodorotlenku sodu,
- 0,1 ml odczynnika NBD-Cl,
- 0,7 ml 50% wodnego roztworu acetonu.

Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 5 prób.

Pomiar absorbancji roztworów wykonano po upływie 30 minut od momentu dodania 50% wodnego roztworu acetonu, w kuwetach kwarcowych, przy długości fali $\lambda=582$ nm. Próbkę odniesienia stanowił 50% wodny roztwór acetonu. Otrzymane wartości absorbancji posłużyły do wykreślenia krzywej kalibracyjnej (tabele 145 - 149, rycina 94).

8.3.4.1.3. Obliczenie parametrów krzywej kalibracyjnej

Tabela 145. Wartość pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu L(+)-askorbinowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	\bar{A}
0,0085	0,1335	0,1336	0,1346	0,1367	0,1378	0,1352
0,0100	0,1695	0,1706	0,1709	0,1712	0,1720	0,1708
0,0115	0,2052	0,2055	0,2077	0,2092	0,2105	0,2076
0,0125	0,2280	0,2293	0,2296	0,2360	0,2363	0,2318
0,0135	0,2498	0,2525	0,2533	0,2601	0,2609	0,2553
0,0150	0,2904	0,2908	0,2915	0,2942	0,2946	0,2923
0,0165	0,3243	0,3263	0,3297	0,3304	0,3305	0,3282

x - ilość kwasu L(+)-askorbinowego w próbce (mg), A₁-A₅ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 146. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S \bar{A}	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
0,0085	0,1352	0,0019	0,0009	1,4229	0,1352±0,0024	0,1352±0,0038
0,0100	0,1708	0,0009	0,0004	0,5342	0,1708±0,0011	0,1708±0,0018
0,0115	0,2076	0,0023	0,0010	1,1075	0,2076±0,0029	0,2076±0,0046
0,0125	0,2318	0,0040	0,0018	1,7174	0,2318±0,0049	0,2318±0,0080
0,0135	0,2553	0,0049	0,0022	1,9236	0,2553±0,0061	0,2553±0,0098
0,0150	0,2923	0,0020	0,0009	0,6713	0,2923±0,0024	0,2923±0,0039
0,0165	0,3282	0,0028	0,0012	0,8507	0,3282±0,0035	0,3282±0,0056

x - ilość kwasu L(+)-askorbinowego w próbce (mg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, S \bar{A} - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy n = 5, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,776$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 147. Wartości parametrów krzywej kalibracyjnej dla kwasu L(+)-askorbinowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y [\bar{A}]	xy	x ²	y ²
0,0085	0,1352	0,0011	0,0001	0,0183
0,0100	0,1708	0,0017	0,0001	0,0292
0,0115	0,2076	0,0024	0,0001	0,0431
0,0125	0,2318	0,0029	0,0002	0,0537
0,0135	0,2553	0,0034	0,0002	0,0652
0,0150	0,2923	0,0044	0,0002	0,0854
0,0165	0,3282	0,0054	0,0003	0,1077
Σ				
0,0875	1,6214	0,0214	0,0011	0,4027

Współczynniki a i b równania korelacyjnego $y = ax + b$ obliczono metodą najmniejszych kwadratów:

$$y = 24,158x - 0,0703$$

gdzie:

a - współczynnik kierunkowy prostej

y - absorbancja próby

x - ilość kwasu L(+)-askorbinowego w próbce (mg).

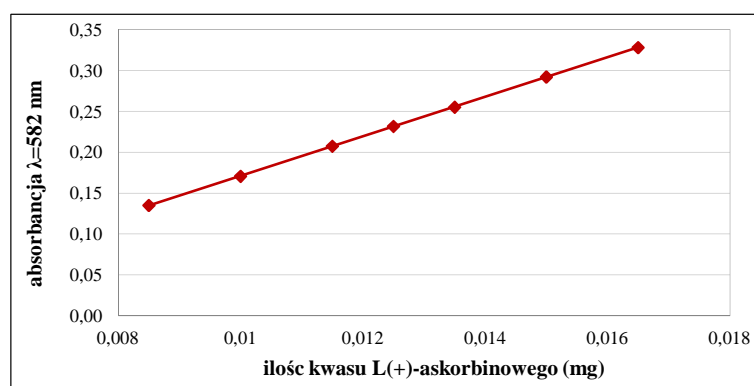
Tabela 148. Parametry równania prostej $y = 24,158x - 0,0703$

a	S_a	b	r	r²
24,158	0,0153	- 0,0703	1,0000	1,0000

a - współczynnik kierunkowy prostej, S_a - błąd standardowy współczynnika a , b - wyraz wolny, r - współczynnik korelacji liniowej Pearsona, r^2 - współczynnik determinacji.

Tabela 149. Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla roztworów kwasu L(+)-askorbinowego wyliczone z równania prostej $y = 24,158x - 0,0703$

x (mg)	0,0085	0,0100	0,0115	0,0125	0,0135	0,0150	0,0165
y \bar{A} 	0,1350	0,1712	0,2075	0,2316	0,2558	0,2920	0,3283



Ryc 94. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu L(+)-askorbinowego.

8.3.4.2. Oznaczenie zawartości kwasu L(+)-askorbinowego w wyciągu

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodawano po 0,1 ml wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (rozd. 7.3.3.2.), a następnie kolejno odczynniki jak w przypadku krzywej kalibracyjnej dla kwasu L(+)-askorbinowego. Dla każdego wyciągu przygotowano po 3 próby.

Obliczeń zawartości dokonano na podstawie równania prostej roztworów wzorcowego kwasu L(+)-askorbinowego $y = 24,158x - 0,0703$.

Zawartość kwasu L(+)-askorbinowego w ziele żółtlicy drobnokwiatowej podano w mg/100 g świeżego surowca.

Tabela 150. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasu L(+)-askorbinowego w surowcu

Ilość surowca w próbce (mg)	A ₁	A ₂	A ₃	Zawartość kwasu askorbinowego w próbce (mg)	Zawartość kwasu askorbinowego w mg/100 g świeżego surowca
50,002	0,2318	0,2334	0,2345	0,0126	25,13±0,29
50,001	0,2464	0,2376	0,2440	0,0130	25,91±0,96
50,003	0,2382	0,2449	0,2474	0,0130	25,98±1,00
					25,67±0,75

Tabela 151. Obliczenia parametrów statystycznych uzyskanych wyników

\bar{x}	S	S _{\bar{x}}	Wz	μ	A±2S
25,13	0,11	0,08	0,45	25,13±0,29	25,13±0,22
25,91	0,38	0,28	1,45	25,91±0,96	25,91±0,75
25,98	0,39	0,29	1,52	25,98±1,00	25,98±0,79

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 3$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 4,403$.

8.3.5. Oznaczanie zawartości pierwiastków za pomocą emisyjnej spektrometrii atomowej (ICP-OES)¹⁷

Parametry mineralizacji wysuszonego zieleń żółticy drobnokwiatowej (rozdz. 7.3.3.2.) przedstawiono w tabeli 152.

Tabela 152. Parametry mineralizacji próbki z zieleń żółticy drobnokwiatowej

Moc maksymalna (W)	Moc (%)	Czas wzrostu (min)	Regulacja ciśnienia (PSI)	Temperatura maksymalna (°C)	Czas podtrzymywania (min)
1200	50	20	195	210	10

Zawartość pierwiastków w wysuszonym zieleń żółticy drobnokwiatowej

Tabela 153. Zawartość pierwiastków w wysuszonym zieleń żółticy drobnokwiatowej

Pierwiastek	Naważka 1 (m=0,3120 g)		Naważka 2 (m=0,2856 g)		Zawartość w surowcu (mg/100 g)
	mg/15ml*	µg/g*	mg/15ml*	µg/g*	
bar (Ba)	0,00467	14,97	0,00384	13,45	1,42±0,20
bor (B)	0,01394	44,68	0,01359	47,58	4,61±0,37
cynk (Zn)	0,01347	3,17	0,01163	4,07	4,20±0,31
kadm (Cd)	0,00011	0,35	0,00008	0,28	0,03±0,01
magnez (Mg)	1,20450	3860,58	1,11300	3897,06	387,88±4,69
mangan (Mn)	0,00941	30,16	0,00792	27,73	2,90±0,31
miedź (Cu)	0,00279	8,94	0,00242	8,47	0,87±0,06
molibden (Mo)	0,00123	3,94	0,00107	3,75	0,38±0,02
wapń (Ca)	12,4500	39903,8	11,4285	40015,8	3995,98±14,40

*n=3; przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 6$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,571$.

¹⁷ analizę wykonano w Pracowni Analizy Pierwiastków na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu

8.4. Badania aktywności biologicznej

8.4.1. Aktywność antyoksydacyjna

8.4.1.1. Badanie aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS

Do oznaczania zdolności zmiatania wolnych rodników wykorzystano reakcję badanych prób z kationorodnikami ABTS^{•+}. Oznaczenie wykonano wg zmodyfikowanej metody Re i wsp. (1999).

8.4.1.1.1. Przygotowanie roztworu kationorodników ABTS^{•+}

Do kolbki miarowej o pojemności 50 ml odważono 0,19204 g ABTS i rozpuszczono w 2,45 mM roztworze nadsiarczanu potasu (0,33116 g K₂S₂O₈ rozpuszczono w wodzie dejonizowanej w kolbie miarowej o pojemności 500 ml). Uzyskano 7,0 mM roztwór podstawowy kationorodników ABTS^{•+}. Roztwór ten inkubowano przez 24 godziny, w ciemnym miejscu, w temperaturze pokojowej. Następnie rozcieńczano go wodą dejonizowaną tak, aby osiągnąć absorbancję ~ 0,77, mierzoną przy długości fali $\lambda=734$ nm.

8.4.1.1.2. Badanie aktywności antyoksydacyjnej substancji referencyjnych

8.4.1.1.2.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Przygotowanie roztworów podstawowych

A. kwercetyny, rutyny, kwasu galusowego, kwasu kawowego (0,5 mg/ml)

Odważono dokładnie 0,01252 g kwercetyny, 0,01250 g rutyny, 0,01253 g kwasu galusowego i 0,01251 g kwasu kawowego do kolb miarowych o pojemności 25 ml. Substancje referencyjne rozpuszczono w 15 ml metanolu, a następnie uzupełniono do współmierności metanolem (kwercetyna i rutyna) lub wodą dejonizowaną (kwas galusowy i kwas kawowy). Uzyskano roztwory podstawowe o stężeniu 0,50 mg/ml.

B. BHA (5,0 mg/ml)

Odważono dokładnie 0,25001 g BHA do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniono do współmierności metanolem. Uzyskano roztwór podstawowy o stężeniu 5,0 mg/ml.

C. troloksu (4,0 mg/ml)

Odważono dokładnie 0,04001 g troloksu do kolby miarowej o pojemności 10 ml i uzupełniono do współmierności metanolem. Uzyskano roztwór podstawowy troloksu o stężeniu 4,0 mg/ml.

Przygotowanie rozcieńczeń roztworów podstawowych**A. kwercetyny (0,01 - 0,05 mg/ml), rutyny (0,05 - 0,25 mg/ml), kwasu galusowego (0,005 - 0,025 mg/ml), kwasu kawowego (0,01 - 0,08 mg/ml)**

Do kolbek miarowych o pojemności 5 ml dodawano kolejno:

- podstawowy roztwór:
 - kwercetyny w ilościach: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ml, co odpowiadało 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 i 0,05 mg/ml kwercetyny,
 - rutyny w ilościach: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 ml, co odpowiadało 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 i 0,25 mg/ml rutyny,
 - kwasu galusowego w ilościach: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 ml, co odpowiadało 0,005; 0,010; 0,015; 0,020 i 0,025 mg/ml kwasu galusowego,
 - kwasu kawowego w ilościach: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 ml, co odpowiadało 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07 i 0,08 mg/ml kwasu kawowego,
- metanol (kwercetyna, rutyna) lub woda dejonizowana (kwas galusowy, kwas kawowy) do objętości 5 ml.

Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 8 prób.

B. BHA (0,025 - 0,25 mg/ml)

Do kolbek miarowych o pojemności 5 ml dodawano kolejno:

- podstawowy roztwór BHA w ilościach: 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 ml, co odpowiadało 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 i 0,25 mg BHA w 1 ml roztworu,
- metanol do objętości 5 ml.

Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 8 prób.

C. troloksu (0,01-0,1 mg/ml)

Do kolbek miarowych o pojemności 10 ml dodawano kolejno:

- podstawowy roztwór wzorcowego troloksu w ilościach: 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 ml, co odpowiadało 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 i 0,1 mg/ml wzorcowego troloksu,
- metanol do objętości 10 ml.

Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 8 prób.

8.4.1.1.2.2. Wykonanie oznaczenia

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodawano kolejno:

- 50 µl rozcieńczeń podstawowych roztworów kwercetyny (0,5 - 2,5 µg), rutyny (2,5 - 12,5 µg), kwasu galusowego (0,25 - 1,25 µg), kwasu kawowego (0,5 - 4,0 µg), BHA (1,25 - 12,5 µg) i troloksu (0,5 - 5,0 µg),
- 1,0 ml roztworu kationorodników ABTS^{•+}.

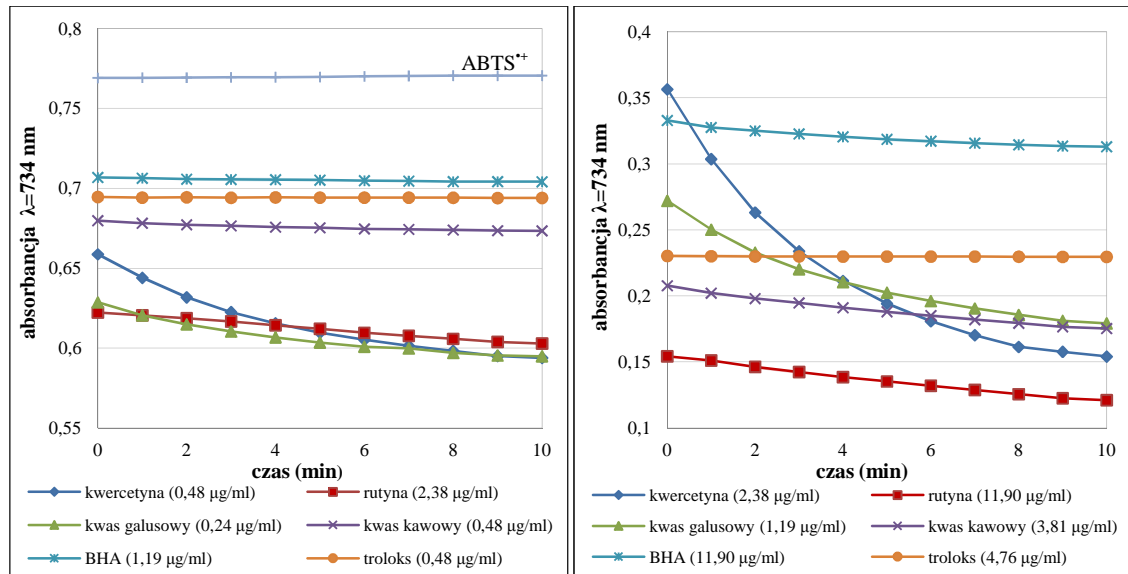
Po 10 minutach zmierzono absorbancję przy długości fali $\lambda=734$ nm, wobec próby odniesienia (woda), w jednorazowych kuwetach plastikowych o grubości 1 cm.

Czas inkubacji wyznaczono doświadczalnie, mierząc zmiany wartości absorbancji wzorców w czasie 10 minut. Pomiar absorbancji wykonano dla najmniejszego i największego stężenia dla danej substancji referencyjnej i wyciągu (tabele 154, 155, ryciny 95, 96).

Tabela 154. Pomiar zmiany wartości absorbancji substancji referencyjnych w czasie

Wzorzec	C	Czas (min)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
kwercetyna	0,48	0,6587	0,6440	0,6318	0,6225	0,6155	0,6097	0,6052	0,6015	0,5983	0,5950	0,5939
	2,38	0,3564	0,3036	0,2631	0,2338	0,2114	0,1942	0,1808	0,1702	0,1614	0,1577	0,1541
rutyna	2,38	0,6223	0,6205	0,6187	0,6167	0,6143	0,6121	0,6096	0,6077	0,6058	0,6039	0,6029
	11,90	0,1543	0,1511	0,1463	0,1424	0,1385	0,1352	0,1320	0,1288	0,1256	0,1225	0,1210
kwas galusowy	0,24	0,6286	0,6205	0,6149	0,6104	0,6067	0,6035	0,6009	0,5998	0,5970	0,5954	0,5949
	1,19	0,2720	0,2502	0,2328	0,2202	0,2104	0,2025	0,1961	0,1905	0,1856	0,1812	0,1792
kwas kawowy	0,48	0,6798	0,6782	0,6772	0,6765	0,6757	0,6753	0,6746	0,6743	0,6739	0,6735	0,6734
	3,81	0,2077	0,2021	0,1980	0,1947	0,1911	0,1880	0,1851	0,1820	0,1793	0,1766	0,1753
BHA	1,19	0,7068	0,7063	0,7057	0,7055	0,7054	0,7051	0,7048	0,7045	0,7042	0,7042	0,7041
	11,90	0,3329	0,3276	0,325	0,3227	0,3205	0,3186	0,3172	0,3157	0,3145	0,3135	0,3130
troloks	0,48	0,6946	0,6942	0,6944	0,6941	0,6943	0,6942	0,6942	0,6942	0,6941	0,6939	0,6940
	4,76	0,2303	0,2301	0,2299	0,2299	0,2298	0,2298	0,2298	0,2298	0,2297	0,2296	0,2296
ABTS ^{•+}	-	0,7691	0,7692	0,7693	0,7695	0,7696	0,7697	0,7701	0,7704	0,7706	0,7705	0,7706

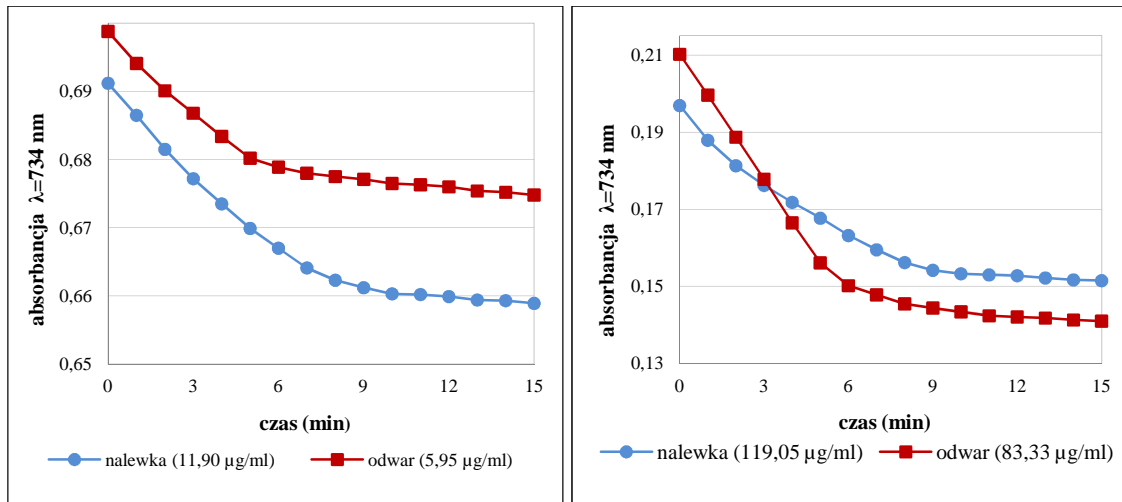
C - stężenie (µg/ml).



Rycina 95. Zmiana absorbancji roztworów substancji referencyjnych w czasie.

Tabela 155. Pomiar zmiany wartości absorbancji nalewki i odwaru w czasie

Czas (min)	Nalewka		Odwar		ABTS ⁺⁺
	11,90 (µg/ml)	119,05 (µg/ml)	5,95 (µg/ml)	83,33 (µg/ml)	
0	0,6912	0,1969	0,6988	0,2102	0,7712
1	0,6865	0,1879	0,6941	0,1996	0,7710
2	0,6815	0,1813	0,6901	0,1887	0,7708
3	0,6772	0,1762	0,6868	0,1778	0,7708
4	0,6735	0,1718	0,6834	0,1665	0,7707
5	0,6699	0,1677	0,6802	0,1561	0,7706
6	0,6670	0,1632	0,6789	0,1502	0,7705
7	0,6641	0,1595	0,6780	0,1478	0,7705
8	0,6623	0,1562	0,6775	0,1455	0,7703
9	0,6612	0,1542	0,6771	0,1444	0,7703
10	0,6603	0,1533	0,6765	0,1434	0,7699
11	0,6602	0,1530	0,6763	0,1424	0,7695
12	0,6599	0,1528	0,6760	0,1421	0,7693
13	0,6594	0,1522	0,6754	0,1418	0,7688
14	0,6593	0,1517	0,6752	0,1413	0,7682
15	0,6587	0,1515	0,6748	0,1410	0,7679



Rycina 96. Zmiana absorbancji nalewki i odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej w czasie.

Zdolność do eliminacji wolnych rodników (%) przez substancje referencyjne oraz badane wyciągi obliczano z równania:

$$\text{stopień zmiatania rodnika (\%)} = \frac{A_{ABTS^{*+}} - A_P}{A_{ABTS^{*+}}} * 100$$

gdzie:

$A_{ABTS^{*+}}$ - średnia absorbancja roztworu kationorodników $ABTS^{*+}$

A_P - średnia absorbancja próbki, odczytana po 10 min. inkubacji.

Wartości IC_{50} (ilość antyoksydantu potrzebna do zmiatania 50 % rodnika) były obliczane metodą interpolacji liniowej pomiędzy wartościami powyżej i poniżej 50% aktywności.

8.4.1.1.2.3. Wyznaczenie wartości IC_{50}

IC_{50} kwercetyny

Tabela 156. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwercetyny

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
ABTS ^{*+}	0,7587	0,7591	0,7594	0,7595	0,7595	0,7597	0,7600	0,7603	0,7595
0,5	0,5605	0,5611	0,5618	0,5624	0,5643	0,5660	0,5661	0,5671	0,5637
1,0	0,4141	0,4177	0,4179	0,4193	0,4196	0,4201	0,4214	0,4228	0,4191
1,5	0,2810	0,2830	0,2846	0,2851	0,2857	0,2870	0,2873	0,2896	0,2854
2,0	0,1999	0,2011	0,2019	0,2035	0,2036	0,2042	0,2055	0,2070	0,2033
2,5	0,1573	0,1591	0,1593	0,1603	0,1606	0,1609	0,1616	0,1619	0,1601

x - ilość kwercetyny w próbce (µg), A₁-A₈ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 157. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
ABTS ⁺⁺	0,7595	0,0005	0,0002	0,0655	0,7595±0,0004	0,7595±0,0010
0,5	0,5637	0,0025	0,0009	0,4511	0,5637±0,0021	0,5637±0,0050
1,0	0,4191	0,0026	0,0009	0,6291	0,4191±0,0022	0,4191±0,0052
1,5	0,2854	0,0027	0,0009	0,9340	0,2854±0,0022	0,2854±0,0054
2,0	0,2033	0,0023	0,0008	1,1431	0,2033±0,0019	0,2033±0,0046
2,5	0,1601	0,0015	0,0005	0,9411	0,1601±0,0013	0,1601±0,0030

x - ilość kwercetyny w próbce (μg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 158. Wartości parametrów krzywej kwercetyny, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y [\bar{A}]	xy	x^2	y^2
ABTS ⁺⁺	0,7595	0,0000	0,0000	0,5768
0,5	0,5637	0,2818	0,2500	0,3177
1,0	0,4191	0,4191	1,0000	0,1757
1,5	0,2854	0,4281	2,2500	0,0815
2,0	0,2033	0,4067	4,0000	0,0413
2,5	0,1601	0,4003	6,2500	0,0256
Σ				
7,50	2,3911	1,9360	13,7500	1,2186

Tabela 159. Stopień zmiatania kationorodników ABTS⁺⁺ i wartość IC₅₀ kwercetyny

x	y [\bar{A}]	Stopień zmiatania rodników ABTS ⁺⁺ (%)	Stężenie kwercetyny ($\mu\text{g/ml}$)
ABTS ⁺⁺	0,7595	00,00	0,00
0,5	0,5637	25,78	0,48
1,0	0,4191	44,82	0,95
1,5	0,2854	62,42	1,43
2,0	0,2033	73,23	1,90
2,5	0,1601	78,92	2,38
równanie prostej: $y = 36,688x + 9,9669$		IC₅₀	1,09

IC₅₀ rutyny

Tabela 160. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów rutyny

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
ABTS⁺⁺	0,7652	0,7659	0,7667	0,7673	0,7676	0,7684	0,7688	0,7699	0,7675
2,5	0,5969	0,5976	0,5983	0,5986	0,5990	0,5990	0,6012	0,6015	0,5990
5,0	0,4321	0,4333	0,4393	0,4406	0,4414	0,4416	0,4430	0,4479	0,4399
7,5	0,3038	0,3073	0,3084	0,3100	0,3100	0,3109	0,3117	0,3163	0,3098
10,0	0,2149	0,2205	0,2211	0,2214	0,2217	0,2220	0,2221	0,2228	0,2208
12,5	0,1273	0,1282	0,1287	0,1294	0,1298	0,1321	0,1336	0,1340	0,1304

x - ilość rutyny w próbce (μg), A₁-A₈ - wartości absorbancji badanych prób; \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 161. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S \bar{A}	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
ABTS⁺⁺	0,7675	0,0015	0,0005	0,2018	0,7675±0,0013	0,7675±0,0030
2,5	0,5990	0,0016	0,0006	0,2685	0,5990±0,0013	0,5990±0,0032
5,0	0,4399	0,0051	0,0018	1,1655	0,4399±0,0043	0,4399±0,0103
7,5	0,3098	0,0036	0,0013	1,1661	0,3098±0,0030	0,3098±0,0072
10,0	0,2208	0,0025	0,0009	1,1262	0,2208±0,0021	0,2208±0,0050
12,5	0,1304	0,0025	0,0009	1,9400	0,1304±0,0021	0,1304±0,0050

x - ilość rutyny w próbce (μg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, S \bar{A} - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności α = 0,05 przy n = 8, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta t_{α,f} = 2,365), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla α = 0,05).

Tabela 162. Wartości parametrów krzywej dla rutyny, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y \bar{A}	xy	x ²	y ²
ABTS⁺⁺	0,7675	0,000	0,00	0,5891
2,5	0,5990	1,4975	6,25	0,3588
5,0	0,4399	2,1995	25,00	0,1935
7,5	0,3098	2,3235	56,25	0,0960
10,0	0,2208	2,2081	100,00	0,0488
12,5	0,1304	1,6298	156,25	0,0170
Σ				
37,50	2,4674	9,8584	343,75	1,3032

Tabela 163. Stopień zmiatania kationorodników ABTS⁺⁺ i wartość IC₅₀ rutyny

x	y \bar{A}	Stopień zmiatania rodników ABTS ⁺⁺ (%)	Stężenie rutyny ($\mu\text{g/ml}$)
ABTS ⁺⁺	0,7675	0,00	0,00
2,5	0,5990	21,95	2,38
5,0	0,4399	42,68	4,76
7,5	0,3098	59,64	7,14
10,0	0,2208	71,23	9,52
12,5	0,1304	83,01	11,90
równanie prostej: $y = 7,1261x + 8,76$		IC₅₀	5,79

IC₅₀ kwasu galusowego

Tabela 164. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
ABTS ⁺⁺	0,7901	0,7903	0,7903	0,7907	0,7907	0,7909	0,7909	0,7910	0,7906
0,25	0,6225	0,6227	0,6233	0,6235	0,6240	0,6245	0,6253	0,6258	0,6240
0,50	0,4984	0,4990	0,4991	0,4998	0,5008	0,5009	0,5017	0,5057	0,5007
0,75	0,3760	0,3763	0,3781	0,3798	0,3799	0,3832	0,3845	0,3847	0,3803
1,00	0,2603	0,2624	0,2629	0,2661	0,2665	0,2665	0,2671	0,2676	0,2649
1,25	0,1769	0,1770	0,1774	0,1796	0,1805	0,1808	0,1808	0,1824	0,1794

x - ilość kwasu galusowego w próbce (μg), A₁-A₈ - wartości absorbancji badanych próbek, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 165. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych próbek

x	\bar{A}	S	S \bar{A}	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
ABTS ⁺⁺	0,7906	0,0003	0,0001	0,0425	0,7906 \pm 0,0003	0,7906 \pm 0,0006
0,25	0,6240	0,0012	0,0004	0,1900	0,6240 \pm 0,0010	0,6240 \pm 0,0024
0,50	0,5007	0,0023	0,0008	0,4629	0,5007 \pm 0,0019	0,5007 \pm 0,0046
0,75	0,3803	0,0035	0,0012	0,9171	0,3803 \pm 0,0029	0,3803 \pm 0,0070
1,00	0,2649	0,0027	0,0009	1,0098	0,2649 \pm 0,0022	0,2649 \pm 0,0054
1,25	0,1794	0,0021	0,0007	1,1572	0,1794 \pm 0,0017	0,1794 \pm 0,0042

x - ilość kwasu galusowego w próbce (μg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, S \bar{A} - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy n = 8, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 166. Wartości parametrów krzywej dla kwasu galusowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y \bar{A}	xy	x ²	y ²
ABTS ⁺⁺	0,7906	0,0000	0,0000	0,6250
0,25	0,6240	0,1560	0,0625	0,3893
0,50	0,5007	0,2503	0,2500	0,2507
0,75	0,3803	0,2852	0,5625	0,1446
1,00	0,2649	0,2649	1,0000	0,0702
1,25	0,1794	0,2243	1,5625	0,0322
Σ				
3,75	2,7399	1,1807	3,4375	1,5120

Tabela 167. Stopień zmiatania kationorodników ABTS⁺⁺ i wartość IC₅₀ kwasu galusowego

x	y \bar{A}	Stopień zmiatania rodników ABTS ⁺⁺ (%)	Stężenie kwasu galusowego (μg/ml)
ABTS ⁺⁺	0,7906	0,00	0,00
0,25	0,6240	21,07	0,24
0,50	0,5007	36,67	0,48
0,75	0,3803	51,90	0,71
1,00	0,2649	66,49	0,95
1,25	0,1794	77,31	1,19
równanie prostej: $y = 66,217x + 4,8857$		IC₅₀	0,68

IC₅₀ kwasu kawowego

Tabela 168. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu kawowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
ABTS ⁺⁺	0,7870	0,7872	0,7872	0,7874	0,7878	0,7881	0,7881	0,7883	0,7876
0,5	0,6658	0,6661	0,6666	0,6675	0,6685	0,6695	0,6726	0,6767	0,6692
1,0	0,5796	0,5806	0,5807	0,5835	0,5850	0,5851	0,5861	0,5864	0,5834
1,5	0,5081	0,5081	0,5089	0,5090	0,5106	0,5106	0,5110	0,5119	0,5098
2,0	0,4315	0,4316	0,4320	0,4333	0,4343	0,4355	0,4365	0,4372	0,4340
2,5	0,3576	0,3600	0,3606	0,3619	0,3624	0,3626	0,3628	0,3648	0,3616
3,0	0,2804	0,2809	0,2820	0,2829	0,2841	0,2842	0,2854	0,2855	0,2832
3,5	0,2122	0,2144	0,2145	0,2152	0,2157	0,2165	0,2177	0,2179	0,2155
4,0	0,1824	0,1826	0,1832	0,1863	0,1880	0,1885	0,1888	0,1848	0,1856

x - ilość kwasu kawowego w próbce (μg), A₁-A₈ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 169. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
ABTS ⁺⁺	0,7876	0,0005	0,0002	0,0633	0,7876±0,0004	0,7876±0,0010
0,5	0,6692	0,0038	0,0013	0,5626	0,6692±0,0031	0,6692±0,0076
1,0	0,5834	0,0027	0,0010	0,4641	0,5834±0,0023	0,5834±0,0054
1,5	0,5098	0,0014	0,0005	0,2809	0,5098±0,0012	0,5098±0,0028
2,0	0,4340	0,0022	0,0008	0,5177	0,4340±0,0019	0,4340±0,0044
2,5	0,3616	0,0022	0,0008	0,6002	0,3616±0,0018	0,3616±0,0044
3,0	0,2832	0,0019	0,0007	0,6883	0,2832±0,0016	0,2832±0,0039
3,5	0,2155	0,0019	0,0007	0,8739	0,2155±0,0016	0,2155±0,0038
4,0	0,1856	0,0027	0,0009	1,4479	0,1856±0,0022	0,1856±0,0054

x - ilość kwasu kawowego w próbce (μg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha, f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 170. Wartości parametrów krzywej dla kwasu kawowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y \bar{A}	xy	x^2	y^2
ABTS ⁺⁺	0,7876	0,0000	0,0000	0,6203
0,5	0,6692	0,3346	0,2500	0,4478
1,0	0,5834	0,5834	1,0000	0,3403
1,5	0,5098	0,7647	2,2500	0,2599
2,0	0,4340	0,8680	4,0000	0,1883
2,5	0,3616	0,9040	6,2500	0,1307
3,0	0,2832	0,8495	9,0000	0,0802
3,5	0,2155	0,7543	12,2500	0,0464
4,0	0,1856	0,7423	16,0000	0,0344
Σ				
18,00	4,0299	5,8008	51,0000	2,1483

Tabela 171. Stopień zmiatania kationorodników ABTS⁺⁺ i wartość IC₅₀ kwasu kawowego

x	y \bar{A}	Stopień zmiatania rodników ABTS ⁺⁺ (%)	Stężenie kwasu kawowego ($\mu\text{g/ml}$)
ABTS ⁺⁺	0,7876	0,00	0,00
0,5	0,6692	15,03	0,48
1,0	0,5834	25,93	0,95
1,5	0,5098	35,27	1,43
2,0	0,4340	44,90	1,90
2,5	0,3616	54,09	2,38
3,0	0,2832	64,04	2,86
3,5	0,2155	72,64	3,33
4,0	0,1856	76,43	3,81
równanie prostej: $y = 19,146x + 8,5229$		IC₅₀	2,17

IC₅₀ BHA

Tabela 172. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów BHA

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
ABTS⁺⁺	0,7790	0,7804	0,7805	0,7806	0,7809	0,7809	0,7810	0,7810	0,7805
1,25	0,7075	0,7079	0,7083	0,7093	0,7097	0,7100	0,7104	0,7152	0,7098
2,50	0,6630	0,6641	0,6643	0,6643	0,6651	0,6652	0,6659	0,6675	0,6649
5,00	0,5735	0,5741	0,5750	0,5752	0,5762	0,5775	0,5788	0,5799	0,5763
7,50	0,4814	0,4849	0,4854	0,4873	0,4878	0,4884	0,4915	0,4946	0,4877
10,00	0,3896	0,3910	0,3913	0,3923	0,3929	0,3959	0,4001	0,4006	0,3942
12,50	0,3038	0,3053	0,3056	0,3059	0,3099	0,3125	0,3144	0,3160	0,3092

x - ilość BHA w próbce (μg), A₁-A₈ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 173. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S \bar{A}	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
ABTS⁺⁺	0,7805	0,0007	0,0002	0,0850	0,7805±0,0006	0,7805±0,0014
1,25	0,7098	0,0024	0,0009	0,3408	0,7098±0,0020	0,7098±0,0048
2,50	0,6649	0,0014	0,0005	0,2038	0,6649±0,0011	0,6649±0,0028
5,00	0,5763	0,0023	0,0008	0,3948	0,5763±0,0019	0,5763±0,0046
7,50	0,4877	0,0041	0,0014	0,8330	0,4877±0,0034	0,4877±0,0082
10,00	0,3942	0,0042	0,0015	1,0667	0,3942±0,0035	0,3942±0,0084
12,50	0,3092	0,0047	0,0017	1,5115	0,3092±0,0039	0,3092±0,0094

x - ilość BHA w próbce (μg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, S \bar{A} - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy n = 8, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,365$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 174. Wartości parametrów krzywej dla BHA, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y [\bar{A}]	xy	x ²	y ²
ABTS⁺⁺	0,7805	0,0000	0,0000	0,6092
1,25	0,7098	0,8872	1,5625	0,5038
2,50	0,6649	1,6623	6,2500	0,4421
5,00	0,5763	2,8814	25,0000	0,3321
7,50	0,4877	3,6575	56,2500	0,2378
10,00	0,3942	3,9421	100,0000	0,1554
12,50	0,3092	3,8647	156,2500	0,0956
Σ				
38,75	3,9226	16,8952	345,3125	2,3760

Tabela 175. Stopień zmiatania kationorodników ABTS⁺⁺ i wartość IC₅₀ BHA

x	y \bar{A}	Stopień zmiatania rodników ABTS ⁺⁺ (%)	Stężenie BHA (μg/ml)
ABTS ⁺⁺	0,7805	0,00	0,00
1,25	0,7098	9,06	1,19
2,50	0,6649	14,81	2,38
5,00	0,5763	26,16	4,76
7,50	0,4877	37,51	7,14
10,0	0,3942	49,49	9,52
12,5	0,3092	60,38	11,90
równanie prostej: $y = 4,5756x + 5,93$		IC ₅₀	9,63

IC₅₀ troloksu

Tabela 176. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów troloksu

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	\bar{A}
ABTS ⁺⁺	0,7773	0,7775	0,7775	0,7776	0,7776	0,7776	0,7777	0,7777	0,7776
0,5	0,6846	0,6857	0,6860	0,6866	0,6867	0,6872	0,6881	0,6889	0,6867
1,0	0,6332	0,6343	0,6352	0,6354	0,6355	0,6360	0,6360	0,6366	0,6366
2,0	0,5245	0,5246	0,5248	0,5259	0,5261	0,5268	0,5285	0,5293	0,5263
3,0	0,4185	0,4192	0,4207	0,4229	0,4231	0,4234	0,4234	0,4239	0,4219
4,0	0,3070	0,3074	0,3078	0,3079	0,3083	0,3108	0,3116	0,3124	0,3092
5,0	0,1872	0,1887	0,1897	0,1902	0,1910	0,1911	0,1912	0,1919	0,1901

x - ilość troloksu w próbce (μg), A₁-A₈ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 177. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S \bar{A}	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
ABTS ⁺⁺	0,7776	0,0001	0,00005	0,0168	0,7776±0,0001	0,7776±0,0002
0,5	0,6867	0,0014	0,0005	0,1981	0,6867±0,0011	0,6867±0,0028
1,0	0,6366	0,0011	0,0004	0,1697	0,6366±0,0009	0,6366±0,0022
2,0	0,5263	0,0018	0,0006	0,3419	0,5263±0,0015	0,5263±0,0036
3,0	0,4219	0,0021	0,0007	0,5006	0,4219±0,0018	0,4219±0,0042
4,0	0,3092	0,0021	0,0007	0,6816	0,3092±0,0018	0,3092±0,0042
5,0	0,1901	0,0015	0,0005	0,8147	0,1901±0,0013	0,1901±0,0030

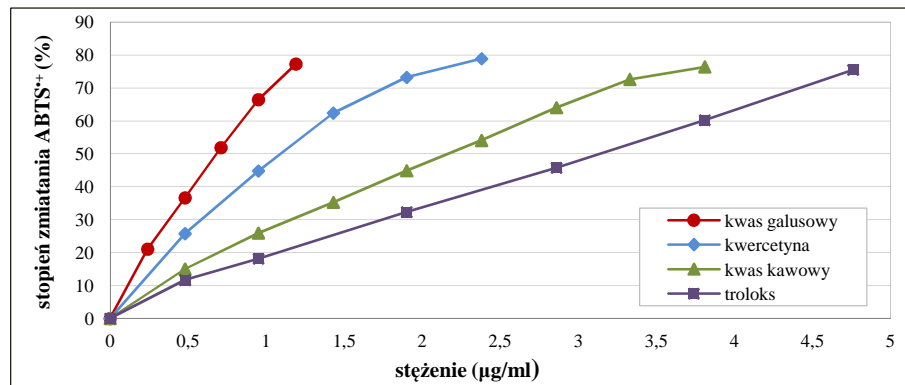
x - ilość troloksu w próbce (μg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, S \bar{A} - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - współczynnik zmienności (%), μ - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności α = 0,05 przy n = 8, f = n-1 wartość współczynnika t-Studenta t_{α,f} = 2,365), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla α = 0,05).

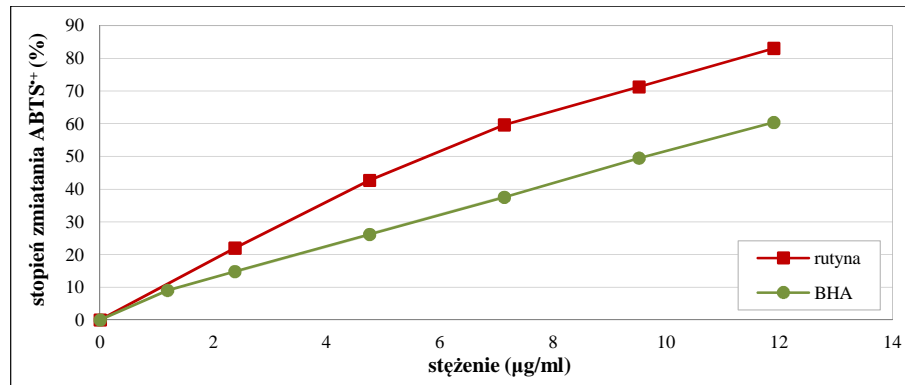
Tabela 178. Wartości parametrów krzywej troloksu, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y \bar{A}	xy	x ²	y ²
ABTS ⁺⁺	0,7776	0,0000	0,0000	0,6046
0,5	0,6867	0,3434	0,2500	0,4716
1,0	0,6366	0,6353	1,0000	0,4036
2,0	0,5263	1,0526	4,0000	0,2770
3,0	0,4219	1,2657	9,0000	0,1780
4,0	0,3092	1,2366	16,0000	0,0956
5,0	0,1901	0,9506	25,0000	0,0361
Σ				
15,50	3,5484	5,4842	55,2500	2,0665

Tabela 179. Stopień zmiatania kationorodników ABTS⁺⁺ i wartość IC₅₀ troloksu

x	y \bar{A}	Stopień zmiatania rodników ABTS ⁺⁺ (%)	Stężenie troloksu (μg/ml)
ABTS ⁺⁺	0,7776	0,00	0,00
0,5	0,6867	11,69	0,48
1,0	0,6366	18,13	0,95
2,0	0,5263	32,32	1,90
3,0	0,4219	45,74	2,86
4,0	0,3092	60,24	3,81
5,0	0,1901	75,55	4,76
równanie prostej: $y = 15,263x + 2,0874$		IC₅₀	3,14

Rycina 97. Stopień zmiatania rodników ABTS⁺⁺ (%) przez kwercetynę, troloks, kwas galusowy i kawowy.

Rycina 98. Stopień zmiatania rodniaków ABTS^{•+} (%) przez rutynę i BHA.

8.4.1.1.3. Badanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów

Do probówek typu Eppendorf dodawano kolejno po 50 µl kolejnych rozcieńczeń nalewki i odwaru (rozdz. 7.7.4.), a następnie po 1,0 ml roztworu rodniaków ABTS^{•+}.

Dla badanych wyciągów z ziela żóltlicy drobnokwiatowej wyznaczono wartości IC₅₀, analogicznie jak w przypadku substancji referencyjnych.

IC₅₀ nalewki

Tabela 180. Wartości pomiarów absorbancji dla nalewki

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	\bar{A}
ABTS ^{•+}	0,7638	0,7653	0,7656	0,7658	0,7660	0,7671	0,7672	0,7671	0,7671	0,7661
12,5	0,6532	0,6542	0,6546	0,6547	0,6553	0,6563	0,6565	0,6571	0,6577	0,6555
25,0	0,5921	0,5940	0,5950	0,5965	0,5968	0,5978	0,5986	0,5987	0,5995	0,5966
50,0	0,4747	0,4750	0,4775	0,4777	0,4780	0,4781	0,4786	0,4787	0,4799	0,4776
75,0	0,3545	0,3567	0,3570	0,3578	0,3579	0,3580	0,3589	0,3590	0,3594	0,3577
100,0	0,2382	0,2405	0,2420	0,2430	0,2433	0,2437	0,2446	0,2450	0,2484	0,2432
125,0	0,1391	0,1397	0,1405	0,1425	0,1429	0,1433	0,1434	0,1443	0,1457	0,1424

x - ilość nalewki w próbce (µg), A₁-A₈ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 181. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S _A	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
ABTS ^{•+}	0,7661	0,0011	0,0009	0,1409	0,7661±0,0008	0,7661±0,0022
12,5	0,6555	0,0014	0,0012	0,2128	0,6555±0,0011	0,6555±0,0028
25,0	0,5966	0,0023	0,0019	0,3866	0,5966±0,0018	0,5966±0,0046
50,0	0,4776	0,0016	0,0012	0,3354	0,4776±0,0012	0,4776±0,0032
75,0	0,3577	0,0014	0,0011	0,3942	0,3577±0,0011	0,3577±0,0028
100,0	0,2432	0,0027	0,0020	1,1158	0,2432±0,0021	0,2432±0,0054
125,0	0,1424	0,0021	0,0017	1,4499	0,1424±0,0016	0,1424±0,0041

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 9$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha, f} = 2,306$.

Tabela 182. Stopień zmiatania kationorodników ABTS^{•+} i wartość IC₅₀ nalewki z ziela żóttlicy drobnokwiatowej

x	y \bar{A}	Stopień zmiatania rodników ABTS ^{•+} (%)	Stężenie nalewki ($\mu\text{g/ml}$)	Stężenie polifenoli ($\mu\text{g GAE/ml}$)
ABTS ^{•+}	0,7776	0,00	0,00	0,00
12,5	0,6867	14,43	11,90	0,35
25,0	0,6366	22,13	23,81	0,70
50,0	0,5263	37,67	47,62	1,40
75,0	0,4219	53,32	71,43	2,11
100,0	0,3092	68,26	95,24	2,81
125,0	0,1901	81,42	119,05	3,52
równanie prostej: $y = 0,6573x + 6,37$		IC₅₀	66,38	1,96

IC₅₀ odwaru

Tabela 183. Wartości pomiarów absorbancji dla odwaru

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	\bar{A}
ABTS ^{•+}	0,7734	0,7733	0,7734	0,7737	0,7738	0,7734	0,7736	0,7732	0,7733	0,7735
6,25	0,6779	0,6792	0,6798	0,6799	0,6800	0,6801	0,6803	0,6806	0,6815	0,6799
12,5	0,6312	0,6315	0,6320	0,6322	0,6328	0,6335	0,6340	0,6360	0,6365	0,6333
25,0	0,5539	0,5542	0,5564	0,5569	0,5588	0,5623	0,5624	0,5631	0,5638	0,5591
37,5	0,4716	0,4741	0,4747	0,4751	0,4762	0,4766	0,4768	0,4793	0,4841	0,4765
50,0	0,3795	0,3796	0,3800	0,3825	0,3833	0,3846	0,3857	0,3872	0,3896	0,3836
62,5	0,3037	0,304	0,3047	0,3050	0,3060	0,3061	0,3066	0,3068	0,3075	0,3056
75,0	0,2183	0,2193	0,2200	0,2205	0,2207	0,2218	0,2218	0,2226	0,2232	0,2209
87,5	0,1449	0,1458	0,1466	0,1469	0,1474	0,1483	0,1489	0,1489	0,1504	0,1476

x - ilość odwaru w próbce (μg), A₁-A₈ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

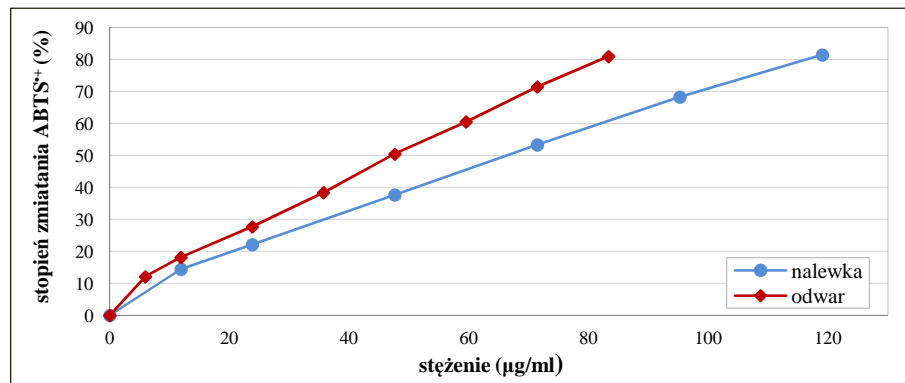
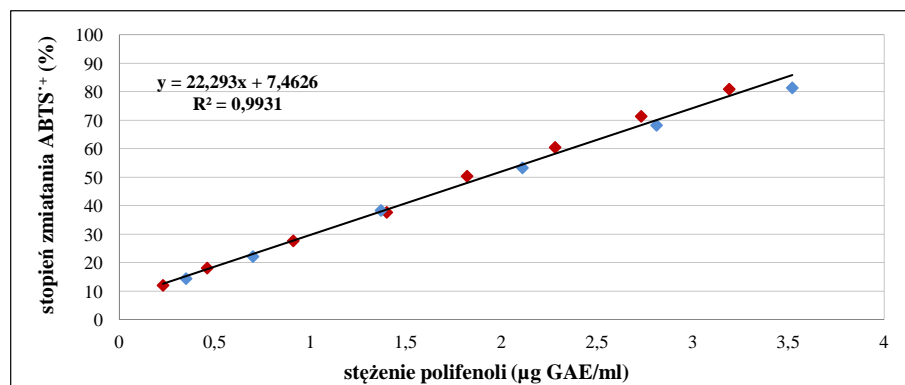
Tabela 184. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	S _A	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
ABTS ^{•+}	0,7735	0,0002	0,0002	0,0245	0,7735 \pm 0,0001	0,7735 \pm 0,0004
6,25	0,6799	0,0009	0,0006	0,1365	0,6799 \pm 0,0007	0,6799 \pm 0,0019
12,5	0,6333	0,0018	0,0015	0,2828	0,6333 \pm 0,0014	0,6333 \pm 0,0036
25,0	0,5591	0,0037	0,0034	0,6599	0,5591 \pm 0,0028	0,5591 \pm 0,0074
37,5	0,4765	0,0033	0,0024	0,7022	0,4765 \pm 0,0026	0,4765 \pm 0,0067
50,0	0,3836	0,0034	0,0029	0,8752	0,3836 \pm 0,0026	0,3836 \pm 0,0067
62,5	0,3056	0,0012	0,0011	0,4052	0,3056 \pm 0,0010	0,3056 \pm 0,0025
75,0	0,2209	0,0015	0,0013	0,6770	0,2209 \pm 0,0011	0,2209 \pm 0,0030
87,5	0,1476	0,0016	0,0014	1,1011	0,1476 \pm 0,0012	0,1476 \pm 0,0032

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 9$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha, f} = 2,306$.

Tabela 185. Stopień zmiatania kationorodników ABTS^{•+} i wartość IC₅₀ odwaru z ziela żótlicy drobnokwiatowej

x	y \bar{A}	Stopień zmiatania rodników ABTS ^{•+} (%)	Stężenie odwaru ($\mu\text{g/ml}$)	Stężenie polifenoli ($\mu\text{g GAE/ml}$)
ABTS ^{•+}	0,7735	0,00	0,00	0,00
6,25	0,6799	12,10	5,95	0,23
12,5	0,6333	18,13	11,90	0,46
25,0	0,5591	27,71	23,81	0,91
37,5	0,4765	38,39	35,71	1,37
50,0	0,3836	50,41	47,62	1,82
62,5	0,3056	60,50	59,52	2,28
75,0	0,2209	71,44	71,43	2,73
87,5	0,1476	80,92	83,33	3,19
równanie prostej: $y = 0,9924x + 3,1498$		IC₅₀	47,21	1,80

Rycina 99. Stopień zmiatania rodników ABTS^{•+} (%) przez nalewkę i odwar z ziela żótlicy drobnokwiatowej.Rycina 100. Zależność liniowa pomiędzy stopniem zmiatania rodników ABTS^{•+} (%) a stężeniem polifenoli w nalewce i odwarze.

8.4.1.2. Badanie zdolności chelatowania jonów żelaza (II)

Badanie zdolności chelatowania jonów żelaza wykonano wg zmodyfikowanej metody Dinis i wsp. (1999).

8.4.1.2.1. Badanie aktywności chelatującej substancji referencyjnych

8.4.1.2.1.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Przygotowanie podstawowych roztworów

A. kwasu galusowego, kwasu chlorogenowego, kwercetyny (1,0 mg/ml i 5,0 mg/ml)

Do kolb miarowych o pojemności 100 ml odważono dokładnie 0,10000 g i 0,50002 g kwasu galusowego, 0,10003 g i 0,50003 g kwasu chlorogenowego oraz 0,11193 g i 0,55960 g kwercetyny. Substancje referencyjne rozpuszczono w 10 ml metanolu, a następnie uzupełniono do współmierności metanolem (kwercetyna) lub wodą dejonizowaną (kwas galusowy i kwas chlorogenowy). Uzyskano roztwory podstawowe o stężeniu 1,0 mg/ml i 5,0 mg/ml.

B. Na₂EDTA·2H₂O (50 mM; 0,0186 mg/ml)

Do kolby miarowej odważono dokładnie 0,00186 g Na₂EDTA·2H₂O i uzupełniono wodą dejonizowaną do 100 ml. Uzyskano roztwór Na₂EDTA·2H₂O 50 mM o stężeniu 0,0186 mg/ml.

Przygotowanie rozcieńczeń roztworów podstawowych

A. kwercetyny, kwasu galusowego, kwasu chlorogenowego (0,02 - 5,0 mg/ml)

Do kolbek miarowych o pojemności 5 ml dodawano kolejno:

- podstawowe roztwory o stężeniu 1,0 mg/ml w ilościach: 0,10; 0,2; 0,4; 0,8; 1,4; 1,8; 2,2; 2,6; 3,2; 3,6; 5,0 ml, co odpowiadało 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,28; 0,36; 0,44; 0,52; 0,64; 0,72 i 1,0 mg/ml kwasu galusowego, kwasu chlorogenowego i kwercetyny oraz podstawowe roztwory o stężeniu 5,0 mg/ml w ilościach: 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 ml co odpowiadało 2,0; 3,0; 4,0 i 5,0 mg kwasu galusowego, kwasu chlorogenowego i kwercetyny w 1 ml roztworu,
- wodę destylowaną (kwas chlorogenowy i galusowy) lub metanol (kwercetyna) do objętości 5 ml.

Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 6 prób.

B. Na₂EDTA·2H₂O (0,37 - 13,39 µg/ml)

Do kolbek miarowych o pojemności 5 ml dodawano kolejno:

- podstawowy roztwór Na₂EDTA·2H₂O w ilościach: 0,1; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,4; 2,8; 3,2; 3,6, co odpowiadało 0,37; 1,49; 2,98; 4,46; 5,95; 7,44; 8,93; 10,42; 11,90; 13,39 µg/ml 50 mM Na₂EDTA·2H₂O,
- wodę destylowaną do objętości 5 ml.

Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 6 prób.

8.4.1.2.1.2. Wykonanie oznaczenia

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodawano kolejno:

- 1,0 ml rozcieńczeń podstawowych roztworów kwasu galusowego, kwasu chlorogenowego, kwercetyny i Na₂EDTA lub wody dejonizowanej (próba kontrolna),
- 50 µl wodnego roztworu chlorku żelaza (II),
- po upływie 10 minut od chwili dodania wodnego roztworu chlorku żelaza (II) dodano 50 µl wodnego roztworu ferrozyny.

Pomiaru absorbancji otrzymanych roztworów dokonano po upływie 10 minut (kwas galusowy, kwas chlorogenowy, wersenian disodowy) lub 30 minut (kwercetyna), od momentu dodania wodnego roztworu ferrozyny, przy długości fali $\lambda=562$ nm, w jednorazowych kuwetach plastikowych o grubości 1 cm. Próbę odniesienia stanowiła woda dejonizowana (kwas galusowy, kwas chlorogenowy, wersenian disodowy) lub metanol (kwercetyna).

Aktywność chelatującą substancji referencyjnych i wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej obliczono wg równania:

$$\text{aktywność chelatująca (\%)} = \frac{A_0 - A_P}{A_0} * 100$$

A_0 - średnia absorbancja próby kontrolnej

A_P - średnia absorbancja prób badanych

Wartości IC₂₀ i IC₅₀ obliczane były metodą interpolacji liniowej pomiędzy wartościami odpowiednio powyżej i poniżej 20% lub 50% aktywności substancji referencyjnej.

8.4.1.2.1.3. Wyznaczenie wartości IC₂₀ lub IC₅₀

IC₅₀ kwercetyny

Tabela 186. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwercetyny

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	\bar{A}
0,00	0,9702	0,9711	0,9714	0,9716	0,9741	0,9796	0,9730
0,02	0,9535	0,9566	0,9582	0,9582	0,9635	0,9637	0,9590
0,04	0,9487	0,9506	0,9548	0,9596	0,9624	0,9638	0,9567
0,08	0,9149	0,9333	0,9382	0,9467	0,9530	0,9258	0,9353
0,16	0,8639	0,8681	0,8705	0,8808	0,8828	0,8877	0,8756
0,28	0,7958	0,8013	0,8021	0,8026	0,8061	0,8127	0,8034
0,36	0,7611	0,7664	0,7674	0,7681	0,7693	0,7710	0,7672
0,44	0,7431	0,7453	0,7460	0,7463	0,7472	0,7478	0,7460
0,52	0,7080	0,7145	0,7175	0,7204	0,7300	0,7376	0,7213
0,64	0,6829	0,6875	0,6892	0,6920	0,6928	0,6969	0,6902
0,72	0,6653	0,6671	0,6744	0,6758	0,6783	0,6954	0,6761
1,00	0,6105	0,6128	0,6204	0,6243	0,6260	0,6270	0,6202
2,00	0,4471	0,4513	0,4531	0,4562	0,4592	0,4599	0,4545
3,00	0,3701	0,3710	0,3724	0,3733	0,3765	0,3769	0,3734
4,00	0,3454	0,3460	0,3468	0,3482	0,3502	0,3550	0,3486
5,00	0,3344	0,3360	0,3366	0,3386	0,3396	0,3400	0,3375

x - ilość kwercetyny w próbie (mg), A₁-A₅ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji

Tabela 187. Wartości parametrów krzywej dla kwercetyny, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y [\bar{A}]	xy	x ²	y ²
0,00	0,9467	0,0000	0,0000	0,9467
0,02	0,9590	0,0192	0,0004	0,9196
0,04	0,9567	0,0383	0,0016	0,9152
0,08	0,9353	0,0748	0,0064	0,8748
0,16	0,8756	0,1401	0,0256	0,7667
0,28	0,8034	0,2250	0,0784	0,6455
0,36	0,7672	0,2762	0,1296	0,5886
0,44	0,7460	0,3282	0,1936	0,5564
0,52	0,7213	0,3751	0,2704	0,5203
0,64	0,6902	0,4417	0,4096	0,4764
0,72	0,6761	0,4868	0,5184	0,4570
1,00	0,6202	0,6202	1,0000	0,3846
2,00	0,4545	0,9089	4,0000	0,2065
3,00	0,3734	1,1201	9,0000	0,1394
4,00	0,3486	1,3944	16,0000	0,1215
5,00	0,3375	1,6877	25,0000	0,1139
		Σ		
18,26	11,2117	8,1367	56,6340	8,6331

Tabela 188. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
0,00	0,9730	0,0035	0,0012	0,3582	0,9730±0,0032	0,9730±0,0070
0,02	0,9590	0,0035	0,0016	0,3582	0,9590±0,0042	0,9590±0,0070
0,04	0,9567	0,0040	0,0026	0,4161	0,9567±0,0066	0,9567±0,0080
0,08	0,9353	0,0063	0,0057	0,6547	0,9353±0,0146	0,9353±0,0125
0,16	0,8756	0,0139	0,0038	1,4831	0,8756±0,0099	0,8756±0,0277
0,28	0,8034	0,0094	0,0023	1,0767	0,8034±0,0059	0,8034±0,0189
0,36	0,7672	0,0034	0,0014	0,4422	0,7653±0,0036	0,7653±0,0068
0,44	0,7460	0,0041	0,0007	0,5327	0,7460±0,0017	0,7460±0,0082
0,52	0,7213	0,0017	0,0044	0,2215	0,7213±0,0113	0,7213±0,0033
0,64	0,6902	0,0108	0,0020	1,4928	0,6902±0,0051	0,6902±0,0215
0,72	0,6761	0,0048	0,0044	0,6993	0,6761±0,0113	0,6761±0,0097
1,00	0,6202	0,0108	0,0029	1,5903	0,6202±0,0074	0,6202±0,0215
2,00	0,4545	0,0070	0,0020	1,1300	0,4545±0,0052	0,4545±0,0140
3,00	0,3734	0,0049	0,0011	1,0829	0,3734±0,0030	0,3734±0,0098
4,00	0,3486	0,0028	0,0015	0,7529	0,3486±0,0038	0,3486±0,0056
5,00	0,3375	0,0036	0,0009	1,0257	0,3375±0,0023	0,3375±0,0072

x - ilość kwercetyny w próbce (mg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - 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 $t_{\alpha,f} = 2,571$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 189. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{50} kwercetyny

x	y [\bar{A}]	Aktywność chelatująca (%)	Stężenie kwercetyny (mg/ml)
0,00	0,9730	0,00	0,00
0,02	0,9590	1,44	0,02
0,04	0,9567	1,68	0,04
0,08	0,9353	3,87	0,07
0,16	0,8756	10,01	0,15
0,28	0,8034	17,43	0,25
0,36	0,7672	21,15	0,33
0,44	0,7460	23,33	0,40
0,52	0,7213	25,87	0,47
0,64	0,6902	29,06	0,58
0,72	0,6761	30,51	0,65
1,00	0,6202	36,26	0,91
2,00	0,4545	53,29	1,82
3,00	0,3734	61,62	2,73
4,00	0,3486	64,17	3,64
5,00	0,3375	65,31	4,55
równanie prostej: $y = 18,714x + 19,23$		IC_{50}	1,64

IC₂₀ kwasu galusowego

Tabela 190. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	\bar{A}
0,00	0,9239	0,9243	0,9251	0,9252	0,9267	0,9293	0,9258
0,02	0,9174	0,9178	0,9215	0,9230	0,9237	0,9243	0,9213
0,04	0,9102	0,9107	0,9142	0,9185	0,9198	0,9211	0,9158
0,08	0,9052	0,9053	0,9097	0,9097	0,9110	0,9130	0,9090
0,16	0,8906	0,8944	0,8947	0,8971	0,9029	0,9054	0,8975
0,28	0,8778	0,8832	0,8854	0,8861	0,8893	0,8921	0,8857
0,36	0,8682	0,8695	0,8698	0,8804	0,8822	0,8842	0,8757
0,44	0,8627	0,8648	0,8665	0,8703	0,8728	0,8805	0,8696
0,52	0,8448	0,8462	0,8662	0,8678	0,8689	0,8728	0,8611
0,64	0,8476	0,8514	0,8544	0,8549	0,8582	0,8582	0,8541
0,72	0,8446	0,8457	0,8464	0,8475	0,8498	0,8559	0,8483
1,00	0,8233	0,8272	0,8285	0,8349	0,8357	0,8429	0,8321
2,00	0,7806	0,7816	0,7825	0,7826	0,7925	0,7977	0,7863
3,00	0,7357	0,7376	0,7384	0,7391	0,7398	0,7474	0,7397
4,00	0,6910	0,6932	0,6979	0,7026	0,7039	0,7040	0,6988
5,00	0,6507	0,6526	0,6591	0,6593	0,6615	0,6661	0,6582

x - ilość kwasu galusowego w próbce (mg), A₁-A₅ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 191. Wartości parametrów krzywej kwasu galusowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y \bar{A}	xy	x ²	y ²
0,00	0,9258	0,0000	0,0000	0,8571
0,02	0,9213	0,0184	0,0004	0,8488
0,04	0,9158	0,0366	0,0016	0,8386
0,08	0,9090	0,0727	0,0064	0,8263
0,16	0,8975	0,1436	0,0256	0,8055
0,28	0,8857	0,2480	0,0784	0,7844
0,36	0,8757	0,3153	0,1296	0,7669
0,44	0,8696	0,3826	0,1936	0,7562
0,52	0,8611	0,4478	0,2704	0,7415
0,64	0,8541	0,5466	0,4096	0,7295
0,72	0,8483	0,6108	0,5184	0,7196
1,00	0,8321	0,8321	1,0000	0,6924
2,00	0,7863	1,5725	4,0000	0,6182
3,00	0,7397	2,2190	9,0000	0,5471
4,00	0,6988	2,7951	16,0000	0,4883
5,00	0,6582	3,2911	25,0000	0,4332
Σ				
18,26	13,4790	13,5322	56,6340	11,4536

Tabela 192. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
0,00	0,9258	0,0020	0,0008	0,2147	0,9258±0,0021	0,9258±0,0040
0,02	0,9213	0,0030	0,0012	0,3262	0,9213±0,0032	0,9213±0,0060
0,04	0,9158	0,0047	0,0019	0,5152	0,9158±0,0050	0,9158±0,0094
0,08	0,9090	0,0031	0,0013	0,3448	0,9090±0,0033	0,9090±0,0063
0,16	0,8975	0,0056	0,0023	0,6239	0,8975±0,0059	0,8975±0,0112
0,28	0,8857	0,0050	0,0020	0,5596	0,8857±0,0052	0,8857±0,0099
0,36	0,8757	0,0073	0,0030	0,8330	0,8757±0,0077	0,8757±0,0146
0,44	0,8696	0,0065	0,0026	0,7449	0,8696±0,0068	0,8696±0,0130
0,52	0,8611	0,0123	0,0050	1,4283	0,8611±0,0129	0,8611±0,0246
0,64	0,8541	0,0041	0,0017	0,4796	0,8541±0,0043	0,8541±0,0082
0,72	0,8483	0,0041	0,0017	0,4852	0,8483±0,0043	0,8483±0,0082
1,00	0,8321	0,0071	0,0029	0,8529	0,8321±0,0074	0,8321±0,0142
2,00	0,7863	0,0071	0,0029	0,9013	0,7863±0,0074	0,7863±0,0142
3,00	0,7397	0,0040	0,0017	0,5467	0,7397±0,0042	0,7397±0,0081
4,00	0,6988	0,0057	0,0023	0,8108	0,6988±0,0059	0,6988±0,0113
5,00	0,6582	0,0057	0,0023	0,8673	0,6582±0,0060	0,6582±0,0114

x - ilość kwasu galusowego w próbce (mg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - 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 $t_{\alpha, f} = 2,571$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 193. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{20} kwasu galusowego

x	y [\bar{A}]	Aktywność chelatująca (%)	Stężenie kwasu galusowego (mg/ml)
0,00	0,9258	0,00	0,00
0,02	0,9213	0,49	0,02
0,04	0,9158	1,08	0,04
0,08	0,9090	1,81	0,07
0,16	0,8975	3,06	0,15
0,28	0,8857	4,33	0,25
0,36	0,8757	5,41	0,33
0,44	0,8696	6,07	0,40
0,52	0,8611	6,99	0,47
0,64	0,8541	7,74	0,58
0,72	0,8483	8,37	0,65
1,00	0,8321	10,12	0,91
2,00	0,7863	15,07	1,82
3,00	0,7397	20,10	2,73
4,00	0,6988	24,52	3,64
5,00	0,6582	28,90	4,55
równanie prostej: $y = 5,5275x + 5,01$		IC_{20}	2,71

IC₂₀ kwasu chlorogenowego

Tabela 194. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu chlorogenowego

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	\bar{A}
0,00	0,9239	0,9243	0,9251	0,9252	0,9267	0,9293	0,9258
0,02	0,9199	0,9211	0,9222	0,9241	0,9264	0,9265	0,9234
0,04	0,9072	0,9094	0,9127	0,9131	0,9173	0,9174	0,9129
0,08	0,9016	0,9038	0,9065	0,9073	0,9099	0,9113	0,9067
0,16	0,8899	0,8901	0,8924	0,8927	0,8970	0,8992	0,8936
0,28	0,8661	0,8743	0,8801	0,8806	0,8807	0,8895	0,8786
0,36	0,8612	0,8635	0,8667	0,8706	0,8796	0,8828	0,8707
0,44	0,8590	0,8594	0,8609	0,8647	0,8659	0,8720	0,8637
0,52	0,8490	0,8560	0,8564	0,8581	0,8616	0,8628	0,8573
0,64	0,8397	0,8410	0,8432	0,8474	0,8509	0,8523	0,8458
0,72	0,8293	0,8320	0,8353	0,8385	0,8427	0,8488	0,8378
1,00	0,8057	0,8067	0,8089	0,8112	0,8136	0,8184	0,8108
2,00	0,7223	0,7231	0,7266	0,7268	0,7274	0,7278	0,7257
3,00	0,6766	0,6783	0,6816	0,6842	0,6852	0,6889	0,6825
4,00	0,6418	0,6433	0,6456	0,6501	0,6514	0,6595	0,6486
5,00	0,6186	0,6242	0,6265	0,6294	0,6334	0,6410	0,6289

x - ilość kwasu chlorogenowego w próbce (mg), A₁ - A₅ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 195. Wartości parametrów krzywej dla kwasu chlorogenowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y \bar{A}	xy	x ²	y ²
0,00	0,9258	0,0000	0,0000	0,8571
0,02	0,9234	0,0185	0,0004	0,8526
0,04	0,9129	0,0365	0,0016	0,8333
0,08	0,9067	0,0725	0,0064	0,8222
0,16	0,8936	0,1430	0,0256	0,7984
0,28	0,8786	0,2460	0,0784	0,7719
0,36	0,8707	0,3135	0,1296	0,7582
0,44	0,8637	0,3800	0,1936	0,7459
0,52	0,8573	0,4458	0,2704	0,7350
0,64	0,8458	0,5413	0,4096	0,7153
0,72	0,8378	0,6032	0,5184	0,7019
1,00	0,8108	0,8108	1,0000	0,6573
2,00	0,7257	1,4513	4,0000	0,5266
3,00	0,6825	2,0474	9,0000	0,4658
4,00	0,6486	2,5945	16,0000	0,4207
5,00	0,6289	3,1443	25,0000	0,3955
Σ				
18,26	13,2128	12,8486	56,6340	11,0577

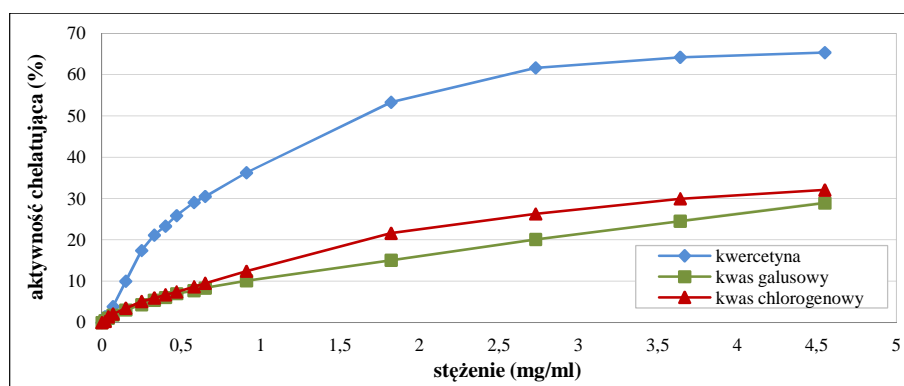
Tabela 196. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
0,00	0,9258	0,0020	0,0008	0,2147	0,9258±0,0021	0,9258±0,0040
0,02	0,9234	0,0028	0,0011	0,2988	0,9234±0,0029	0,9234±0,0055
0,04	0,9129	0,0041	0,0017	0,4501	0,9129±0,0043	0,9129±0,0082
0,08	0,9067	0,0036	0,0015	0,4013	0,9067±0,0038	0,9067±0,0073
0,16	0,8936	0,0038	0,0015	0,4220	0,8936±0,0040	0,8936±0,0075
0,28	0,8786	0,0078	0,0032	0,8878	0,8786±0,0082	0,8786±0,0156
0,36	0,8707	0,0088	0,0036	1,0061	0,8707±0,0092	0,8707±0,0175
0,44	0,8637	0,0050	0,0020	0,5746	0,8637±0,0052	0,8637±0,0099
0,52	0,8573	0,0049	0,0020	0,5733	0,8573±0,0052	0,8573±0,0098
0,64	0,8458	0,0053	0,0021	0,6208	0,8458±0,0055	0,8458±0,0105
0,72	0,8378	0,0072	0,0029	0,8568	0,8378±0,0075	0,8378±0,0144
1,00	0,8108	0,0047	0,0019	0,5842	0,8108±0,0050	0,8108±0,0095
2,00	0,7257	0,0024	0,0010	0,3240	0,7257±0,0025	0,7257±0,0047
3,00	0,6825	0,0046	0,0019	0,6695	0,6825±0,0048	0,6825±0,0091
4,00	0,6486	0,0065	0,0027	1,0045	0,6486±0,0068	0,6486±0,0130
5,00	0,6289	0,0078	0,0032	1,2335	0,6289±0,0081	0,6289±0,0155

x - ilość kwasu chlorogenowego w próbie (mg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - 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 $t_{\alpha,f} = 2,571$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 197. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{20} kwasu chlorogenowego

x	y [\bar{A}]	Aktywność chelatująca (%)	Stężenie kwasu chlorogenowego (mg/ml)
0,00	0,9258	0,00	
0,02	0,9234	0,26	0,02
0,04	0,9129	1,39	0,04
0,08	0,9067	2,06	0,07
0,16	0,8936	3,48	0,15
0,28	0,8786	5,10	0,25
0,36	0,8707	5,95	0,33
0,44	0,8637	6,71	0,40
0,52	0,8573	7,40	0,47
0,64	0,8458	8,64	0,58
0,72	0,8378	9,51	0,65
1,00	0,8108	12,42	0,91
2,00	0,7257	21,61	1,82
3,00	0,6825	26,28	2,73
4,00	0,6486	29,94	3,64
5,00	0,6289	32,07	4,55
równanie prostej: $y = 10,099x + 3,23$		IC_{20}	1,66



Rycina 101. Aktywność chelatująca (%) kwercetyny, kwasu galusowego i kwasu chlorogenowego.

IC₅₀ Na₂EDTA·2H₂O

Tabela 198. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów Na₂EDTA·2H₂O

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	\bar{A}
0,00	0,9239	0,9243	0,9251	0,9252	0,9267	0,9293	0,9258
0,37	0,9029	0,9049	0,9058	0,9080	0,9102	0,9187	0,9084
1,49	0,8685	0,8729	0,8946	0,8946	0,8975	0,8984	0,8878
2,98	0,8584	0,8592	0,8651	0,8655	0,8665	0,8670	0,8636
4,46	0,8207	0,8257	0,8326	0,8327	0,8336	0,8345	0,8300
5,95	0,7592	0,7641	0,7651	0,7610	0,7786	0,7730	0,7668
7,44	0,6652	0,6727	0,6751	0,6799	0,6816	0,6839	0,6864
8,93	0,5614	0,5677	0,5730	0,5758	0,5785	0,5828	0,5932
10,42	0,4717	0,4718	0,4775	0,4806	0,4809	0,483	0,4776
11,90	0,3752	0,3754	0,3758	0,3769	0,3786	0,3802	0,3770
13,39	0,2336	0,2398	0,2413	0,2423	0,2443	0,2446	0,2410

x - ilość Na₂EDTA·2H₂O w próbce (μg), A₁-A₅ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 199. Wartości parametrów krzywej dla kwercetyny, obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y \bar{A}	xy	x ²	y ²
0,00	0,9258	0,0000	0,0000	0,8571
0,37	0,9084	0,3361	0,1369	0,8252
1,49	0,8878	1,3228	2,2201	0,7882
2,98	0,8636	2,5735	8,8804	0,7458
4,46	0,8300	3,7018	19,8916	0,6889
5,95	0,7668	4,5625	35,4025	0,5880
7,44	0,6864	5,1068	55,3536	0,4711
8,93	0,5932	5,2973	79,7449	0,3519
10,42	0,4776	4,9766	108,5764	0,2281
11,90	0,3770	4,4863	141,6100	0,1421
13,39	0,2410	3,2270	179,2921	0,0581
Σ				
67,33	7,5576	35,5907	631,1085	5,7445

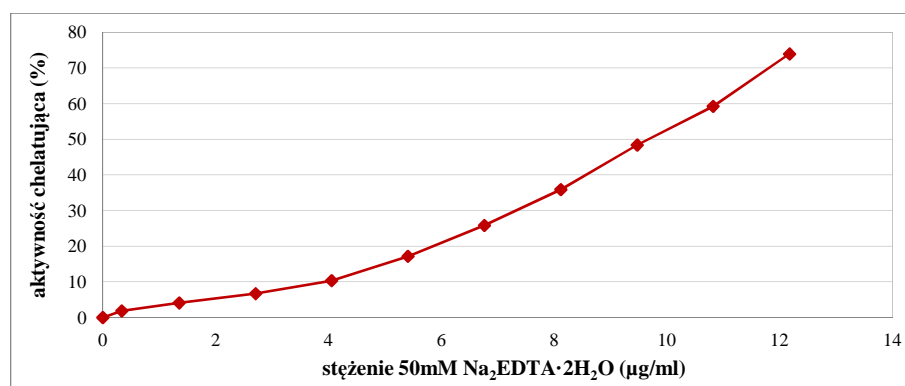
Tabela 200. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
0,00	0,9258	0,0020	0,0008	0,2147	0,9258±0,0021	0,9258±0,0040
0,37	0,9084	0,0056	0,0023	0,6203	0,9084±0,0059	0,9084±0,0113
1,49	0,8878	0,0134	0,0055	1,5057	0,8878±0,0140	0,8878±0,0267
2,98	0,8636	0,0038	0,0016	0,4401	0,8636±0,0040	0,8636±0,0076
4,46	0,8300	0,0055	0,0023	0,6648	0,8300±0,0058	0,8300±0,0110
5,95	0,7668	0,0075	0,0031	0,9746	0,7668±0,0078	0,7668±0,0149
7,44	0,6864	0,0069	0,0028	1,0165	0,6764±0,0072	0,6764±0,0138
8,93	0,5932	0,0077	0,0031	1,3435	0,5732±0,0081	0,5732±0,0154
10,42	0,4776	0,0044	0,0017	0,9266	0,4990±0,0043	0,4990±0,0088
11,90	0,3770	0,0018	0,0007	0,4849	0,3820±0,0018	0,3820±0,0036
13,39	0,2410	0,0040	0,0017	1,6787	0,2410±0,0042	0,2410±0,0081

x - ilość $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ w próbce (μg), \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji, S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku, $S_{\bar{A}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, Wz - 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 $t_{\alpha, f} = 2,571$), $\bar{A} \pm 2S$ - przedział, w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla $\alpha = 0,05$).

Tabela 201. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{50} $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

x	y \bar{A}	Aktywność chelatująca (%)	Stężenie $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{g/ml}$)
0,00	0,9258	0,00	0,00
0,37	0,9084	1,88	0,34
1,49	0,8878	4,10	1,35
2,98	0,8636	6,72	2,71
4,46	0,8300	10,35	4,05
5,95	0,7668	17,17	5,41
7,44	0,6864	25,86	6,76
8,93	0,5932	35,93	8,12
10,42	0,4776	48,41	9,47
11,90	0,3770	59,28	10,82
13,39	0,2410	73,97	12,17
równanie prostej: $y = 8,0519x - 27,841$		IC_{50}	9,67

Rycina 102. Aktywność chelatująca Na₂EDTA·2H₂O (%).

8.4.1.2.2. Badanie aktywności chelatującej wyciągów

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodawano przygotowane rozcieńczenia nalewki i odwaru z zieleń żóltlicy drobnokwiatowej (rozd. 7.4.4.), a następnie odczynniki w kolejności jak w przypadku oznaczania zdolności chelatowania jonów żelaza (II) substancji referencyjnych. Czas inkubacji próby z wodnym roztworem ferrozyny wynosił 30 min.

Dla badanych wyciągów wyznaczono wartości IC₂₀ i IC₅₀, analogicznie jak w przypadku substancji referencyjnych.

Uzyskane wyniki oraz ich ocenę statystyczną przedstawiono w tabelach 202 - 207 i na rycinach 103 - 104.

IC₂₀ i IC₅₀ nalewki

Tabela 202. Wartości pomiarów absorbancji dla nalewki

x	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	\bar{A}
0,00	0,9085	0,9127	0,9155	0,9164	0,9166	0,9170	0,9174	0,9193	0,9202	0,9160
0,07	0,8293	0,8309	0,8343	0,8387	0,8390	0,8392	0,8405	0,8503	0,8540	0,8396
0,35	0,7053	0,7060	0,7060	0,7071	0,7075	0,7076	0,7076	0,7081	0,7099	0,7072
0,70	0,6033	0,6050	0,6064	0,6066	0,6069	0,6070	0,6093	0,6095	0,6122	0,6074
1,40	0,4834	0,4824	0,4917	0,4920	0,4938	0,4968	0,4990	0,5009	0,5024	0,4936
2,10	0,4078	0,4092	0,4094	0,4095	0,4113	0,4120	0,4125	0,4134	0,4184	0,4115
2,80	0,3394	0,3403	0,3442	0,3454	0,3457	0,3471	0,3475	0,3483	0,3489	0,3452
3,50	0,3255	0,3268	0,3276	0,3277	0,3282	0,3283	0,3291	0,3293	0,3309	0,3282

x - ilość nalewki w próbie (mg), A₁-A₈ - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 203. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
0,00	0,9160	0,0033	0,0025	0,3628	0,9160±0,0026	0,9160±0,0066
0,07	0,8396	0,0077	0,0058	0,9173	0,8396±0,0059	0,8396±0,0154
0,35	0,7072	0,0013	0,0010	0,1825	0,7072±0,0010	0,7072±0,0026
0,70	0,6074	0,0025	0,0020	0,4095	0,6074±0,0019	0,6074±0,0050
1,40	0,4936	0,0067	0,0055	1,3604	0,4936±0,0052	0,4936±0,0134
2,10	0,4115	0,0030	0,0023	0,7241	0,4115±0,0023	0,4115±0,0060
2,80	0,3452	0,0032	0,0026	0,9219	0,3452±0,0024	0,3452±0,0064
3,50	0,3282	0,0015	0,0011	0,4447	0,3282±0,0011	0,3282±0,0029

przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 8$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha, f} = 2,306$.

Tabela 204. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{20} i IC_{50} nalewki z ziela żóltlicy drobnokwiatowej

x	y [\bar{A}]	Aktywność chelatująca (%)	Stężenie nalewki (mg/ml)	Stężenie polifenoli ($\mu\text{g GAE/ml}$)
0,00	0,9160	0,00	0,00	0,00
0,07	0,8396	8,34	0,06	1,77
0,35	0,7072	22,80	0,32	9,45
0,70	0,6074	33,69	0,64	18,89
1,40	0,4936	46,12	1,27	37,49
2,10	0,4115	55,08	1,91	56,38
2,80	0,3452	62,32	2,55	75,27
3,50	0,3282	64,17	3,18	93,87
równanie prostej: $y = 55,69x + 4,98$		IC_{20}	0,27	7,95
równanie prostej: $y = 14x + 28,34$		IC_{50}	1,55	45,63

IC_{20} i IC_{50} odwaru

Tabela 205. Wartości pomiarów absorbancji dla odwaru

x	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	A_8	A_9	\bar{A}
0,000	0,8918	0,8971	0,8973	0,8991	0,8995	0,9000	0,9013	0,9021	0,9076	0,8995
0,008	0,8599	0,8601	0,8610	0,8611	0,8620	0,8625	0,8626	0,8637	0,8653	0,8620
0,040	0,7388	0,7389	0,7389	0,7397	0,7406	0,7428	0,7456	0,7473	0,7492	0,7424
0,080	0,5842	0,5850	0,5854	0,5860	0,5868	0,5883	0,5926	0,5937	0,5962	0,5887
0,160	0,2941	0,2943	0,2944	0,2965	0,2966	0,2969	0,2983	0,2990	0,3028	0,2970
0,240	0,1502	0,1504	0,1526	0,1532	0,1534	0,1539	0,1564	0,1568	0,1569	0,1538
0,320	0,1198	0,1201	0,1202	0,1209	0,1210	0,1212	0,1213	0,1213	0,1215	0,1208

x - ilość odwaru w próbie (mg), A_1 - A_8 - wartości absorbancji badanych prób, \bar{A} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

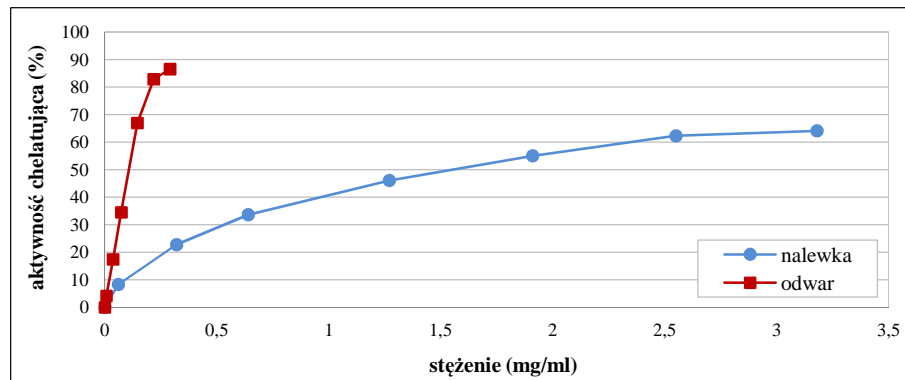
Tabela 206. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób

x	\bar{A}	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	μ	$\bar{A} \pm 2S$
0,000	0,8995	0,0040	0,0029	0,4476	0,8995±0,0031	0,8995±0,0081
0,008	0,8620	0,0016	0,0013	0,1903	0,8620±0,0013	0,8620±0,0033
0,040	0,7424	0,0038	0,0034	0,5092	0,7424±0,0029	0,7424±0,0076
0,080	0,5887	0,0041	0,0037	0,6989	0,5887±0,0032	0,5887±0,0082
0,160	0,2970	0,0026	0,0020	0,8852	0,2970±0,0020	0,2970±0,0053
0,240	0,1538	0,0024	0,0020	1,5610	0,1538±0,0018	0,1538±0,0048
0,320	0,1208	0,0006	0,0005	0,4818	0,1208±0,0004	0,1208±0,0012

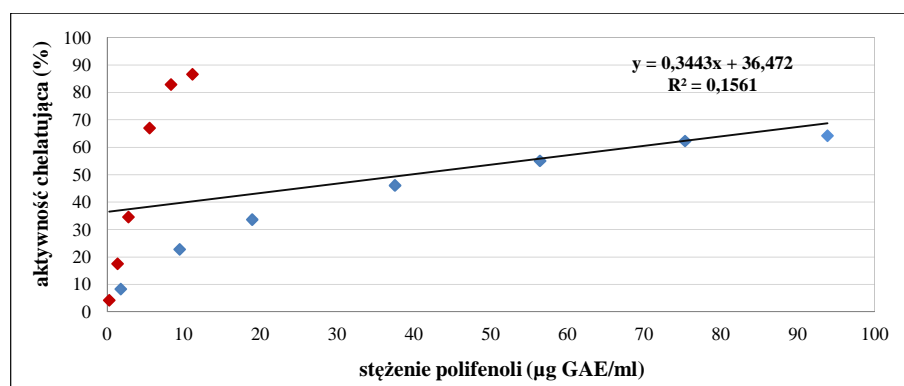
przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95 %, dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ przy $n = 9$, $f = n-1$ wartość współczynnika t-Studenta $t_{\alpha,f} = 2,306$.

Tabela 207. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{20} i IC_{50} odwaru z ziela żółticy drobnokwiatowej

x	y [\bar{A}]	Aktywność chelatująca (%)	Stężenie odwaru (mg/ml)	Stężenie polifenoli ($\mu\text{g GAE/ml}$)
0,000	0,8995	0,00	0,000	0,00
0,008	0,8620	4,18	0,007	0,27
0,040	0,7424	17,47	0,036	1,38
0,080	0,5887	34,55	0,073	2,79
0,160	0,2970	66,98	0,145	5,54
0,240	0,1538	82,90	0,218	8,33
0,320	0,1208	86,58	0,291	11,12
równanie prostej: $y = 461,62x + 0,8516$		IC_{20}	0,040	1,59
równanie prostej: $y = 450,42x + 1,6696$		IC_{50}	0,107	4,10



Rycina 103. Aktywność chelatująca (%) nalewki i odwaru z ziela żółticy drobnokwiatowej.



Rycina 104. Zależność liniowa pomiędzy zdolnością chelatowania jonów żelaza (II) a stężeniem polifenoli w nalewce i odwarze.

8.4.1.3. Badanie aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionych genu *sod1*¹⁸

8.4.1.3.1. Materiał do badań

W badaniach wykorzystano szczep dziki SP-4 (MAT α *leu1 arg4*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz izogenicznego mutantu delecyjnego DSCD1-1C (MAT α *leu1 arg4 sod1:natMX*) zawierającego kasetę natMX w obrębie genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową, zawierającą jony miedzi i cynku (SOD1).

Roztwory substancji referencyjnych (rutyny, kwasu galusowego, troloksu) przygotowano w stężeniu 2 mg/ml. Wykorzystano je do badania przeżywalności komórek drożdży.

8.4.1.3.2. Hodowla drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Pożywki YPD zawierające 2% glukozę stosowano w celu uzyskania odpowiedniego inokulum. Drożdże przeszczepiano z inokulum na pożywki zawierające 3% glicerol (niefermentujące źródło węgla), tak aby początkowe OD₅₄₆/ml wynosiło 0,03. Hodowlę drożdży prowadzono przez 10 godzin w temperaturze 28° C w ciemności, przy ciągłym wytrząsaniu w kolbach Erlenmayera (100 ml), zawierających 25 ml pożywki YPG.

¹⁸ badania wykonał mgr Andonis Karachitos w Zakładzie Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Modyfikacja hodowli

Do uzyskanej hodowli dodawano określoną objętość wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (rozd. 7.4.4.) lub roztworów substancji referencyjnych oraz sterylnej wody bidestylowanej, a następnie prowadzono wzrost hodowli do osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu. Wzrost hodowli kontrolowano, mierząc spektrofotometrycznie gęstość optyczną (OD_{546}/ml). Do hodowli szczepu dzikiego i izogenicznego mutantu *Saccharomyces cerevisiae* (kontrola) dodano po 1,0 ml sterylnej wody bidestylowanej. Modyfikację hodowli mutantu przez substancje referencyjne i wyciągi z ziela żółtlicy drobnokwiatowej przedstawiono w tabeli 208.

Tabela 208. Sposób modyfikacji hodowli drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

mutant <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
	objętość roztworu substancji badanej (ml)	objętość wody bidestylowanej (ml)	stężenie surowca/substancji referencyjnej (mg/ml)
subst. referencyjne			
rutyna	1,0	-	2,0
kwas galusowy	1,0	-	2,0
troloks	1,0	-	2,0
nalewka			
A	0,2	0,8	80,0
B	0,5	0,5	200,0
C	0,8	0,2	320,0
D	1,0	-	400,0
odwar			
A	0,2	0,8	80,0
B	0,5	0,5	200,0
C	0,8	0,2	320,0
D	1,0	-	400,0

8.4.1.3.3. Testy przeżywalności

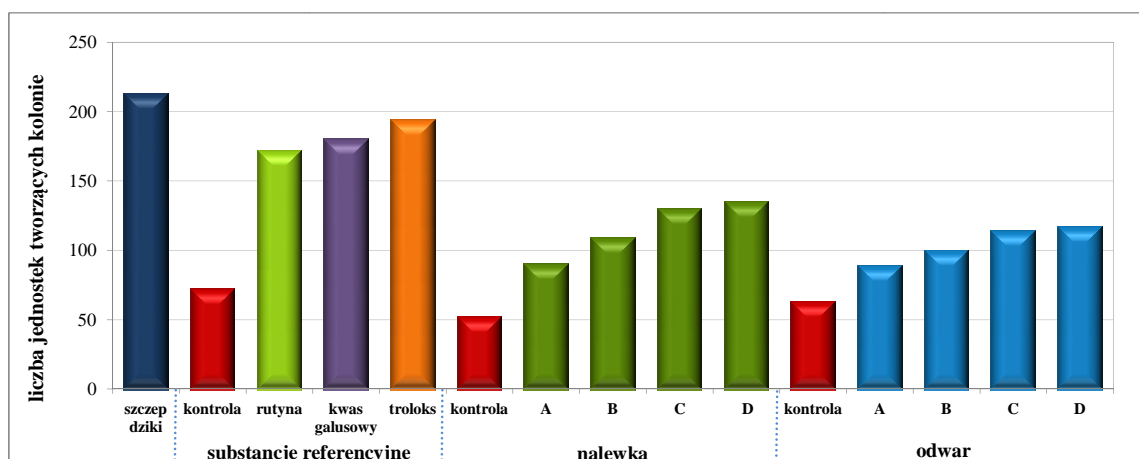
Przygotowano serię 10-krotnych rozcieńczeń hodowli drożdży mutantu delecyjnego drożdży zmodyfikowanych za pomocą substancji referencyjnych, nalewki i odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej, a następnie naniesiono (po 20 μ l) na płytki agarowe YPG i inkubowano 4 dni w temperaturze 28° C. Jako kontrole posłużyły hodowle niezmodyfikowane. Wydajność tworzenia kolonii określana była metodą densytometryczną z wykorzystaniem programu Scan Pack 3.0. Liczono również liczbę jednostek tworzących kolonie (CFU).

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabeli 209 i na rycinach 105 - 109.

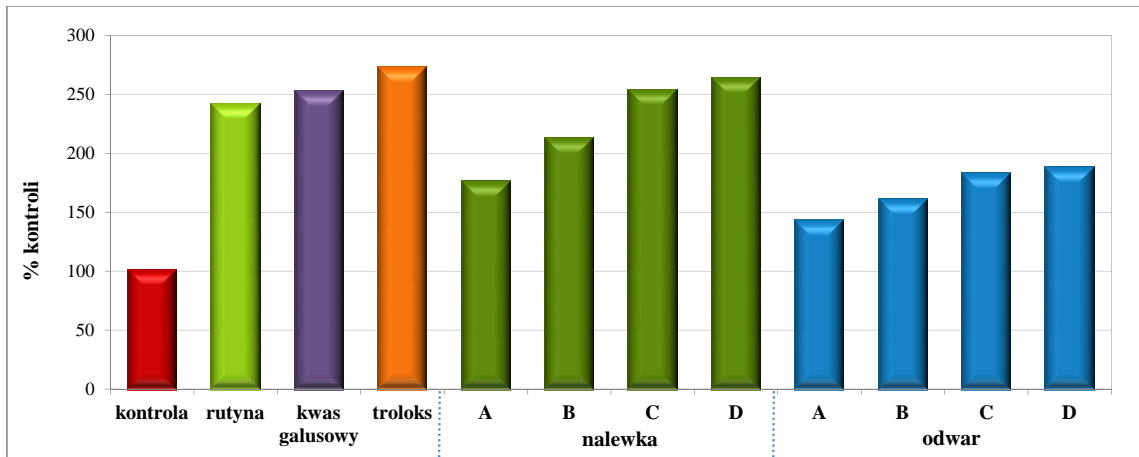
Tabela 209. Wyniki pomiarów densytometrem oraz liczba jednostek tworzących kolonie dla 1000-krotnego rozcieńczenia hodowli: szczepu dzikiego, mutanta oraz hodowli modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych.

	Liczba jednostek tworzących kolonie		Wyniki pomiaru densytometrem	Wydajność tworzenia kolonii* (%)
	wyniki pomiaru	% kontroli		
subst. referencyjne				
kontrola	71	100	1775	100
rutyna	171	241	3183	179
kwas galusowy	179	252	3309	186
troloks	193	272	4373	246
nalewka				
kontrola	51	100	2378	100
A	89	175	2524	106
B	108	212	2853	120
C	129	253	3813	160
D	134	263	5012	211
odwar				
kontrola	62	100	5342	100
A	88	142	4815	90
B	99	160	5102	96
C	113	182	5674	106
D	116	187	6968	130
szczep dziki	212	-	5824	328

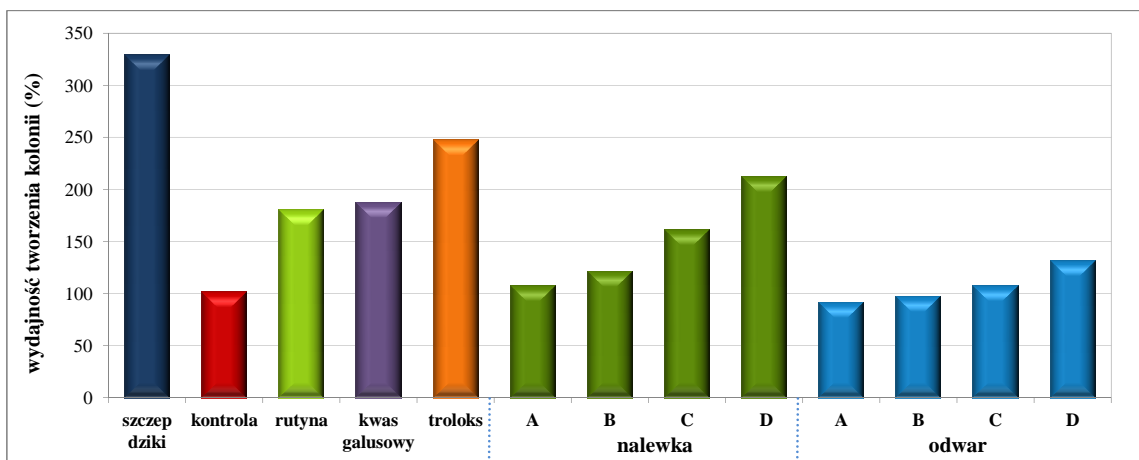
* iloraz pomiaru próby badanej i pomiaru kontroli.



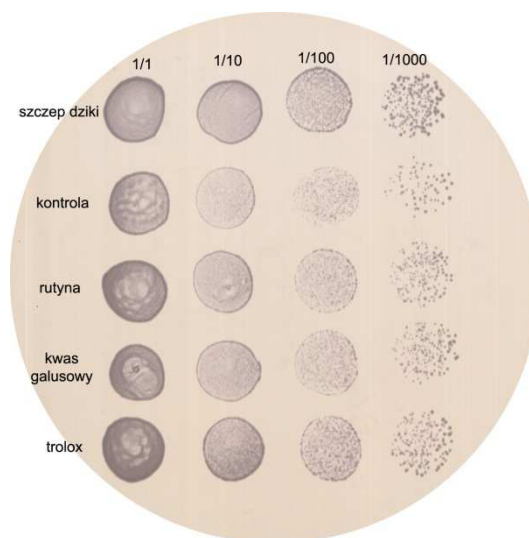
Rycina 105. Liczba jednostek tworzących kolonie dla hodowli modyfikowanych substancjami referencyjnymi i wyciągami z ziela żółtlicy drobnokwiatowej.



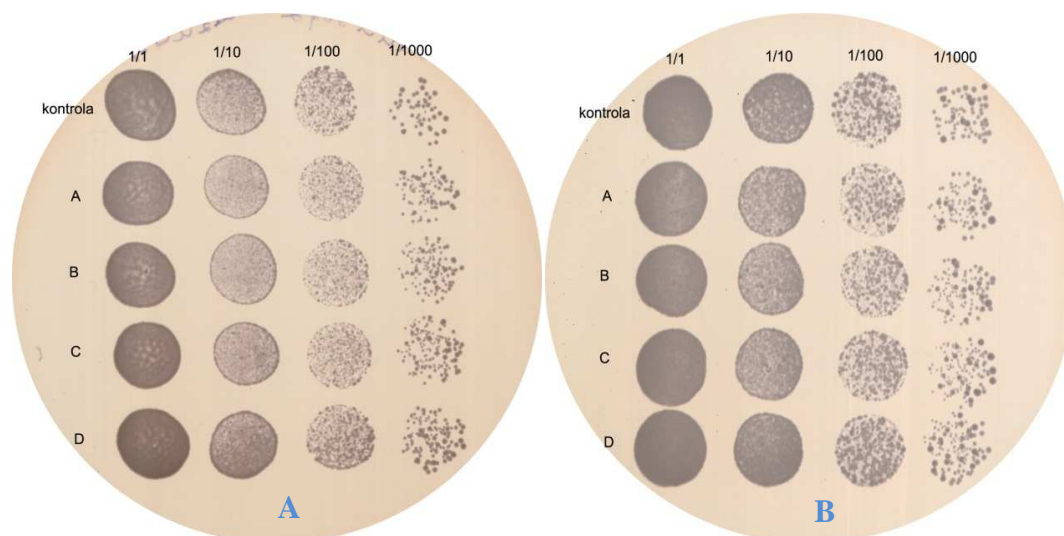
Rycina 106. Liczba jednostek tworzących kolonie wyrażona jako % kontroli dla hodowli modyfikowanych substancjami referencyjnymi i wyciągami z ziela żółticy drobnokwiatowej.



Rycina 107. Wydajność tworzenia kolonii (%) dla hodowli modyfikowanych substancjami referencyjnymi i wyciągami z ziela żółticy drobnokwiatowej.



Rycina 108. Płytki agarowej serii 10-krotnych rozcieńczeń hodowli szczepu dzikiego, mutantu (kontrola) oraz hodowli modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych.



Rycina 109. Płytki agarowe serii 10-krotnych rozcieńczeń hodowli modyfikowanych za pomocą nalewki (A) i odwaru (B) z ziela żóltlicy drobnokwiatowej.

8.4.1.3.4. Oznaczenie poziomu karbonylacji białek

Oznaczenie wykonano zgodnie z protokołem OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (www.millipore.com). Jako kontrola posłużyły hodowle niemodyfikowane.

8.4.1.3.4.1. Uzyskanie ekstraktów komórkowych

W celu uzyskania ekstraktów komórkowych wirowano 25 ml hodowli drożdży przy 3000xg 10 min. w temperaturze 4° C. Osad przemywano dwukrotnie lodowatą wodą bidestylowaną. Jeden gram osadu resuspendowano w 1 ml buforze RIPA. Do przygotowanego preparatu dodano szklane kuleczki (średnica 0,25mm - 0,5mm), w stosunku 1g kulek:1g osadu, a następnie worteksowano dwukrotnie w czasie 1 min., schładzając każdorazowo preparat w czasie 1 min. w lodzie. Uzyskany supernatant przenoszono do nowych probówek i wirowano przy 14000xg przez 5min., w temperaturze 4° C. Osad odrzucano, natomiast supernatant mrożono w -20° C lub od razu wykorzystano do badań.

8.4.1.3.4.2. Pomiar stężenia białka metodą Bradford

Stężenie białka zawartego w ekstraktach komórkowych oznaczano metodą Bradforda. W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej rozcieńczano odtłuszczoną BSA, by uzyskać roztwory o objętości 50 µl, zawierające od 1,25, do 20 µg białka. Następnie do każdej z badanych prób oraz do standardu BSA dodawano 2,5 ml pięciokrotnie rozcieńzonego odczynnika Bradford. Całość inkubowano przez 15 minut i dokonywano

pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda=595$ nm. Na krzywą wzorcową nanoszono odczyty OD badanych prób.

8.4.1.3.4.3. Przygotowanie ekstraktów komórkowych do elektroforezy

Z każdej próby ekstraktów komórkowych pobrano po 15 μg białka i uzupełniano do objętości 5 μl buforem RIPA. Następnie podano 5 μl 12% SDS i 10 μl roztworu DNPH (numer 90448 z zestawu OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit). Całość inkubowano 15 minut, a następnie neutralizowano, dodając 7,5 μl buforu neutralizującego (numer 90449 z zestawu OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit). Próby nakładano na żel SDS-PAGE.

8.4.1.3.4.4. Oznaczenie poziomu białek metodą Western blot

Elektrotransfer półsuchy

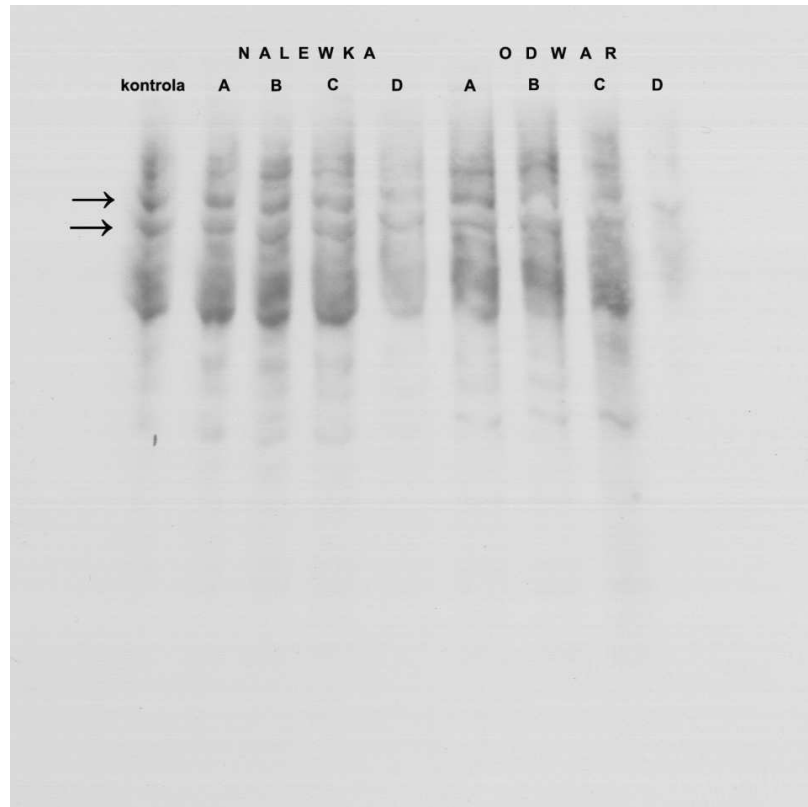
Rozdzielone elektroforetycznie białka przenoszono na nitrocelulozę metodą elektrotransferu półsuchego. W aparacie do elektrotransferu układano kolejno: 3 warstwy bibuły (Whatman), membranę nitrocelulozową (Whatman), żel i ponownie 3 warstwy bibuły. Bibułę i nitrocelulozę nasączano buforem do elektrotransferu. Elektrotransfer prowadzono przy natężeniu 250 mA przez 75 min., przy maksymalnym napięciu 20 V. Po zakończeniu elektrotransferu uzyskany blot barwiono w 0,2% roztworze Ponceau w 3% TCA przez 2 minuty, po czym płukano wodą bidestylowaną.

Immunodetekcja białek

W celu zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciał na uzyskanym blocie, arkusz nitrocelulozy inkubowano z lekkim wytrząsaniem, przez godzinę w 1% roztworze odtłuszczonej BSA w buforze PBS-T (bufor blokujący). Następnie blot inkubowano godzinę z przeciwciałem I-rzędowym (nr 90451 z zestawu OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit w stosunku 1:150) i przemywano: jeden raz 15 minut, a następnie dwa razy po 5 minut w buforze PBS-T. Blot inkubowano w roztworze przeciwciała II-rzędowego, sprzężonego z peroksydazą (nr 90452 z zestawu OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit). Przeciwciała II-rzędowe rozcieńczano w stosunku 1:300 w 1% roztworze odtłuszczonej BSA w buforze PBS-T. Nitrocelulozę ponownie przepłukiwano (jak powyżej).

Peroksydaza sprzężona z przeciwciałem II-rzędowym umożliwia emisję światła, dzięki utlenianiu luminolu. Reakcja ta ulega wzmocnieniu w obecności wzmacniaczy

typu fenoli. Luminol i wzmacniacze są składnikami tzw. odczynników ECL. Nitrocelulozę inkubowano przez 2 minuty w mieszaninie (1:1) odczynników ECL, umieszczano w folii i przenoszono do kasety, po czym nakładano kliszę rentgenowską (Fuji Medical RX). Po 5 minutowej ekspozycji kliszę wywoływano (rycina 110).



Rycina 110. Klisza rentgenowska z uwidocznionymi pasmami białek. Strzałki wskazują przykładowe obszary o obniżonym stopniu karbonylacji białek w porównaniu do kontroli.

8.4.1.3.5. Oznaczenie pomiaru zużycia tlenu przez komórki drożdży

Pomiary zużycia tlenu prowadzono w temperaturze 28° C, przy użyciu elektrody tlenowej, w 1 ml buforu cytrynianowego o pH 4,5. Elektrode tlenową kalibrowano za pomocą silnego reduktora $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Zapis szybkości zużycia tlenu (nmol/min) rejestrowano przy użyciu oprogramowania „oxygen32”. Do naczynia pomiarowego podawano komórki drożdży z hodowli modyfikowanej i niemodyfikowanej w ilości 3 OD_{546} /ml. Jako próba odniesienia posłużyły hodowle niemodyfikowane mutanta i szczepu dzikiego. Wyniki pomiaru procesu oddychania wewnątrzkomórkowego drożdży przedstawiono w tabeli 210.

Tabela 210. Pomiary zużycia tlenu przez komórki drożdży mierzone za pomocą oksygrafu

	Stan 4 (nmol O ₂ /min)	Stan U (nmol O ₂ /min)	U/4
Szczep dziki	12,77	65,69	5,14
Mutant	16,42	58,39	3,56
Nalewka			
A	15,19	53,14	3,50
B	15,21	58,83	3,87
C	15,18	83,50	5,50
D	14,23	87,30	6,13
Odwar			
A	15,20	52,19	3,43
B	14,23	59,78	4,20
C	16,13	89,19	5,53
D	14,23	96,79	6,80

8.4.2. Aktywność przeciwzapalna¹⁹

8.4.2.1. Hodowla komórek HaCaT

Komórki HaCaT hodowano w pożywce płynnej na bazie DMEM, z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej oraz antybiotyków. Hodowlę prowadzono w inkubatorze, w warunkach standardowych (37° C, 5% CO₂), wymieniając medium co 2-3 dni i inkubując komórki przez 10 minut w PBS z dodatkiem 0,1% EDTA. Wszystkie zabiegi na komórkach wykonywano w łoży z nawiewem laminarnym, z zachowaniem atmosfery sterylnej. Po uzyskaniu ciągłej, pojedynczej warstwy komórek, medium usunięto, a następnie komórki przemyto dwukrotnie PBS, w celu wypłukania pożywki i usunięcia martwych komórek. Zawiesinę komórek HaCaT otrzymano w wyniku nadtrawiania ich w inkubatorze przez 5 minut roztworem trypsyny, inaktywowanym przez dodatek medium. Zawiesinę wirowano w próbówce typu Falcon, w temperaturze pokojowej, przy 500xg w czasie 10 minut. Komórki zostały zliczone przy użyciu komory Bürkera pod odwróconym mikroskopem. Supernatant usuwano, a zawiesinę komórek uzupełniano medium do otrzymania pożądanej CFU w 1 ml, po

¹⁹ badania wykonano z udziałem dr n. farm. Michała Cichockiego w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

czym przenoszono do butelek hodowlanych, na szalki lub płytki określoną objętość uzyskanej zawiesiny.

8.4.2.2. Badanie cytotoksyczności wyciągów metodą MTT

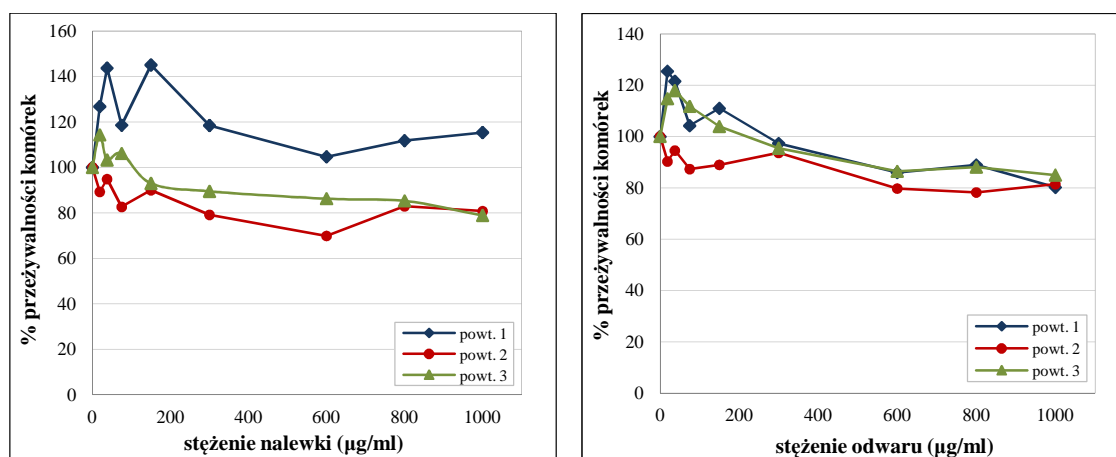
Komórki HaCaT wysiewano na 96-studzienkowe płytki w liczbie 10 000 CFU na każdą studzienkę i inkubowano 24 - godziny. Następnie zmieniano pożywkę (200 μ l) oraz dodawano nalewkę i odwar z ziela żóltlicy drobnokwiatowej (rozdz. 7.4.4.) w stężeniach 18,75; 37,50; 75,0; 150,0; 300,0; 600,0; 800,0 i 1000,0 μ g/ml. Po 72 - godzinnej inkubacji, studzienki przemywano dwukrotnie buforem PBS w ilości 200 μ l, a następnie dodawano roztwór MTT (0,5 mg/ml). Próby poddawano kolejnej, 4 - godzinnej inkubacji, po czym usuwano pożywkę i dodawano po 200 μ l izopropanolu zakwaszonego HCl, w celu rozpuszczenia powstałych kryształków formazanu. Następnie płytki wytrząsano przez 20 minut. Pomiar absorbancji wykonano przy użyciu spektrofotometru (długość fali $\lambda=570$ nm, długość fali odniesienia $\lambda=690$ nm). Wyniki podano jako procent grupy kontrolnej (komórki inkubowane w obecności DMSO). Dla każdego stężenia przeprowadzono 3 niezależne powtórzenia badania.

Wyniki uzyskanych badań przedstawiono w tabeli 211 i na rycinie 111.

Tabela 211. Zależność przeżywalności komórek HaCaT od stężenia wyciągów z ziela żóltlicy drobnokwiatowej

x	przeżywalność komórek HaCaT (%)					
	nalewka			odwar		
	powtórzenie 1	powtórzenie 2	powtórzenie 3	powtórzenie 1	powtórzenie 2	powtórzenie 3
0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
18,75	126,78	89,25	114,30	125,44	90,27	114,76
37,50	143,70	94,82	103,28	121,52	94,53	117,92
75,00	118,55	82,61	106,11	104,24	87,31	111,74
150,0	145,05	89,97	93,00	110,98	88,98	103,90
300,0	118,45	79,13	89,46	97,29	93,63	95,43
600,0	104,66	69,86	86,25	85,96	79,74	86,44
800,0	111,76	82,89	85,28	88,96	78,22	88,06
1000,0	115,34	80,74	78,90	80,18	81,43	84,94

x - stężenie wyciągu (μ g/ml), stężenie 0 - próba kontrolna.



Rycina 111. Wpływ wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej na przeżywalności komórek HaCaT.

8.4.2.3. Oznaczanie poziomu białek COX-2 i iNOS

Pierwszy etap badań polegał na inkubacji komórek HaCaT z nalewką z ziela żółtlicy drobnokwiatowej, a następnie uzyskaniu lizatów białkowych. W tym celu komórki posiewano na szalki Petriego w liczbie 0,5 mln CFU na każdą szalkę. Po 24h wymieniano pożywkę na nową, z dodatkiem 0,5% FBS. Po 24h inkubacji dodawano nalewkę z ziela żółtlicy drobnokwiatowej w stężeniach 30, 300 i 1000 µg/ml (G30, G300 i G1000). W próbie kontrolnej zamiast wyciągów dodawano wodę. Po 30 minutowej inkubacji komórek z nalewką dodawano TNF α w stężeniu 20 ng/ml do medium hodowlanego, a po kolejnych 4h usuwano medium i przepłukiwano szalki dwukrotnie PBS. Następnie komórki poddawano trypsynizacji, a uzyskaną zawiesinę komórek odwirowano przy prędkości 500xg i usuwano supernatant. Osad komórek przepłukano PBS i ponownie odwirowano (500xg). Osad komórek zawieszono w buforze RIPA (300 µl), po czym przez godzinę przeprowadzano lizę, utrzymując próbówki na lodzie i wytrząsając co 15 minut. Gotowe lizaty wirowano przez 30 minut przy 12000xg w temperaturze 5° C. Supernatanty przenoszono do osobnych próbek typu Eppendorf, natomiast osad, zawierający struktury niebiałkowe, odrzucano. Gotowe lizaty przechowywano w temperaturze -75° C. W celu oznaczenia całkowitej zawartości białka we frakcjach zastosowano kolorymetryczną metodę Lowry'ego.

W drugim etapie badań nakładano na żel poliakryloamidowy 10% Tris Ready Gel (COX-2) lub 7,5% Tris Ready Gel (iNOS) uzyskane lizaty komórkowe, w objętości zawierającej po 60 µg białka na jedną kieszonkę. Lizaty komórkowe przed nałożeniem gotowano buforze Loading buffer 1:5 we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Następnie przeprowadzono elektroforetyczny rozdział białka przy napięciu 200 V

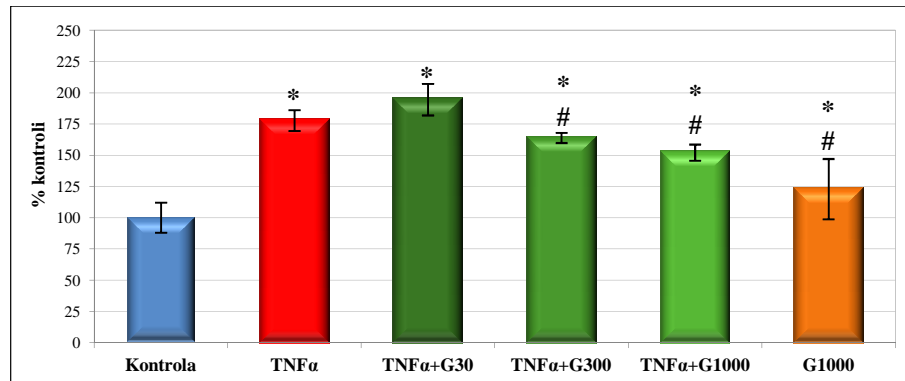
w czasie 37 minut. Po elektroforezie przystąpiono do transferowania białek żelu na błonę PVDF w czasie 90 minut i przy natężeniu prądu 0,15A (transfer mokry). Po dokonaniu transferu błony umieszczano w 10% roztworze odtłuszczonego mleka w DPBS-T. Błony przepłukiwano trzykrotnie buforem DPBS-T i inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (1:1000 w DPBS-T) przez 120 minut. Po kolejnym trzykrotnym przepłukaniu błon DPBS-T nastąpiła inkubacja z przeciwciałami drugorzędowymi (1:2000 w DPBS-T) przez 60 minut. Po raz kolejny trzykrotnie przepłukano błony za pomocą DPBS-T, następnie dwukrotnie roztworem TBS, po czym przeniesiono błony do buforu TRIS o pH 9,5. Do wizualizacji związanych z błoną białek użyto roztworu wywołującego AP-Conjugate-Substrate Kit. Ocena densytometryczna blotów została wykonana przy pomocy aparatu G-Box i programu do densytometrycznego pomiaru prążków GeneSnap. Zastosowano równoległą próbę z detekcją białka konstytutywnego, β -aktyny, w celu kontroli nałożenia jednakowej ilości białka na poszczególne ścieżki żelu (loading control).

Wyniki badań wpływu nalewki z ziela żółtlicy drobnokwiatowej na poziom białek COX-2 i iNOS przedstawiono w tabeli 212 i na rycinach 112-114. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta.

Tabela 212. Wartości pomiarów intensywności prążka badanych prób i ich wpływ na poziom białek COX-2 i iNOS w przeliczeniu na % próby kontrolnej

Próba	COX-2				iNOS			
	\bar{x}	$S_{\bar{x}}$	% kontroli	% $S_{\bar{x}}$	\bar{x}	$S_{\bar{x}}$	% kontroli	% $S_{\bar{x}}$
kontrola	5,708	0,685	100,00	12,00	12,874	0,255	100,00	1,98
TNFα	10,151	0,850	177,85	8,37	13,667	1,495	106,16	10,94
TNFα+G30	11,106	1,405	194,57	12,65	14,617	1,890	113,54	12,93
TNFα+G300	9,351	0,374	163,84	4,00	13,950	2,691	108,36	19,29
TNFα+G1000	8,683	0,560	152,13	6,45	12,292	1,223	95,48	9,95
G1000	7,017	1,690	122,93	24,09	10,243	2,532	79,57	24,72

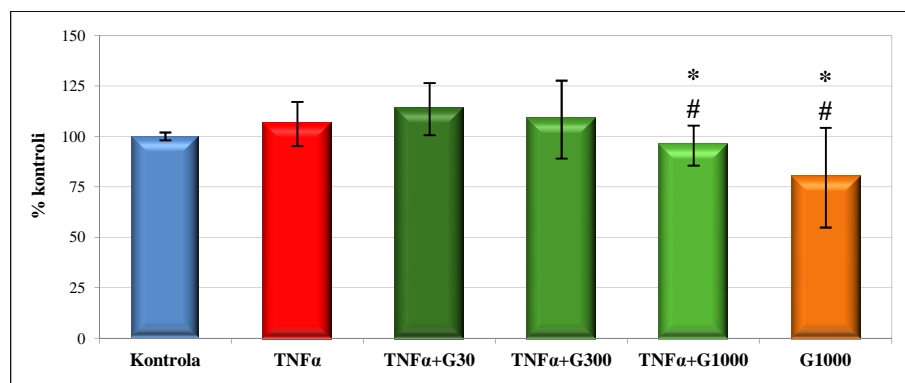
\bar{x} - średnia arytmetyczna z wartości intensywności prążka badanych prób (n=3), $S_{\bar{x}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej, % $S_{\bar{x}}$ - procent odchylenia standardowego średniej arytmetycznej.



* - różnica statystycznie znamiennej wobec grupy kontrolnej, $p \geq 0,05$, $n=3$

- różnica statystycznie znamiennej wobec grupy TNF α , $p \geq 0,05$, $n=3$

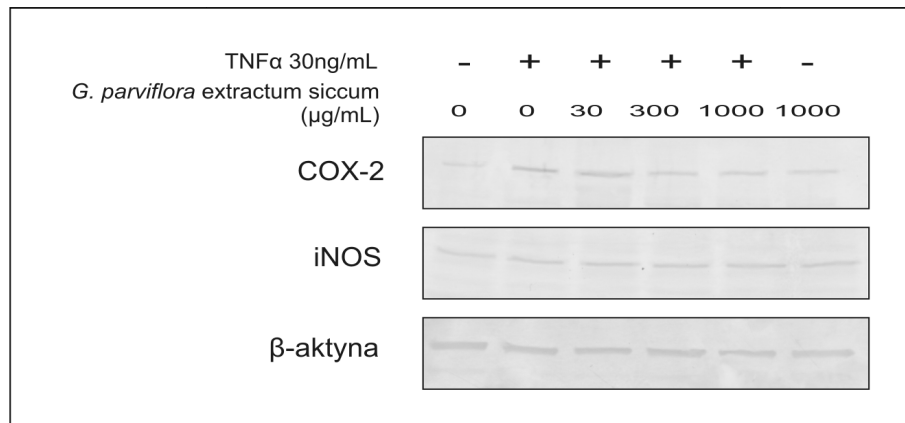
Rycina 112. Wpływ nalewki na poziom białek COX-2 w komórkach HaCaT (wynik wyrażony jako % próby kontrolnej $\pm S_{\bar{x}}$).



* - różnica statystycznie znamiennej wobec grupy kontrolnej, $p \geq 0,05$, $n=3$

- różnica statystycznie znamiennej wobec grupy TNF α , $p \geq 0,05$, $n=3$

Rycina 113. Wpływ nalewki na poziom białek iNOS w komórkach HaCaT (wynik wyrażony jako % próby kontrolnej $\pm S_{\bar{x}}$).



Rycina 114. Wpływ nalewki na poziom białek COX-2 i iNOS w komórkach HaCaT oznaczanych metodą Western blot.

8.4.2.4. Oznaczenie poziomu PGE₂

Komórki HaCaT posiewano na płytki wielodołkowe w liczbie 200 000 cfu/dołek. Po 24h wymieniano medium hodowlane na DMEM z dodatkiem 0,5% FBS. Po kolejnych 24h inkubacji komórek dodawano nalewkę z ziela żółtlicy drobnokwiatowej w stężeniu 30, 300 i 1000 μ g/ml, a następnie po 30 minutach TNF α w stężeniu 20 ng/ml

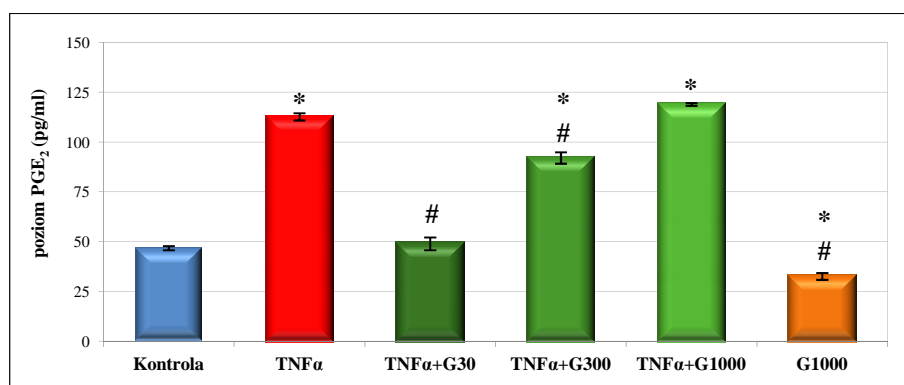
i inkubowano przez dalsze 4h. Próbę kontrolną stanowiło medium hodowlane (kontrola), medium hodowlane z dodatkiem TNF α (TNF α) oraz medium hodowlane z dodatkiem nalewki w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ (G1000). Po 4-godzinnej inkubacji pobierano 0,5 ml medium, które rozcieńczano buforem EIA w stosunku 1:1, a następnie dodawano do płytki wielodołkowej zestawu Prostaglandin E₂ Express EIA Kit w objętości 100 μl . Koniugat PGE₂ z AChE dodawano w objętości 50 μl . Płytki inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej, przy wytrząsaniu. Zawartość mikrostudzienek usuwano, przepłukując je trzykrotnie buforem płuczającym. W celu wywołania reakcji barwnej dodano do pytki 200 μl odczynnika Ellmana i pozostawiono w ciemnym miejscu na 60 minut. Odczytu absorbancji dokonano spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=410$ nm. Obliczenie zawartości PGE₂ w badanych próbach dokonano na podstawie krzywej wzorcowej.

Wyniki badania wpływu nalewki na poziom PGE₂ przedstawiono w tabeli 213 i na rycinie 115. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta.

Tabela 213. Średnie wartości absorbancji prób uzyskanych w badaniu wpływu nalewki z ziela żółticy drobnokwiatowej na poziom PGE₂

Próba	\bar{x}	$S_{\bar{x}}$
kontrola	46,78	1,03
TNFα	112,73	1,79
TNFα+G30	48,97	3,20
TNFα+G300	92,08	2,84
TNFα+G1000	118,94	0,66
G1000	32,63	1,71

\bar{x} - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji badanych prób (n=3), $S_{\bar{x}}$ - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej



* - różnica statystycznie znamiennej wobec grupy kontrolnej, $p \geq 0,05$, n=3

- różnica statystycznie znamiennej wobec grupy TNF α , $p \geq 0,05$, n=3

Rycina 115. Wpływ nalewki na poziom PGE₂ w komórkach HaCaT.

8.4.3. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa i antymutagenna

8.4.3.1. Wykonanie badania

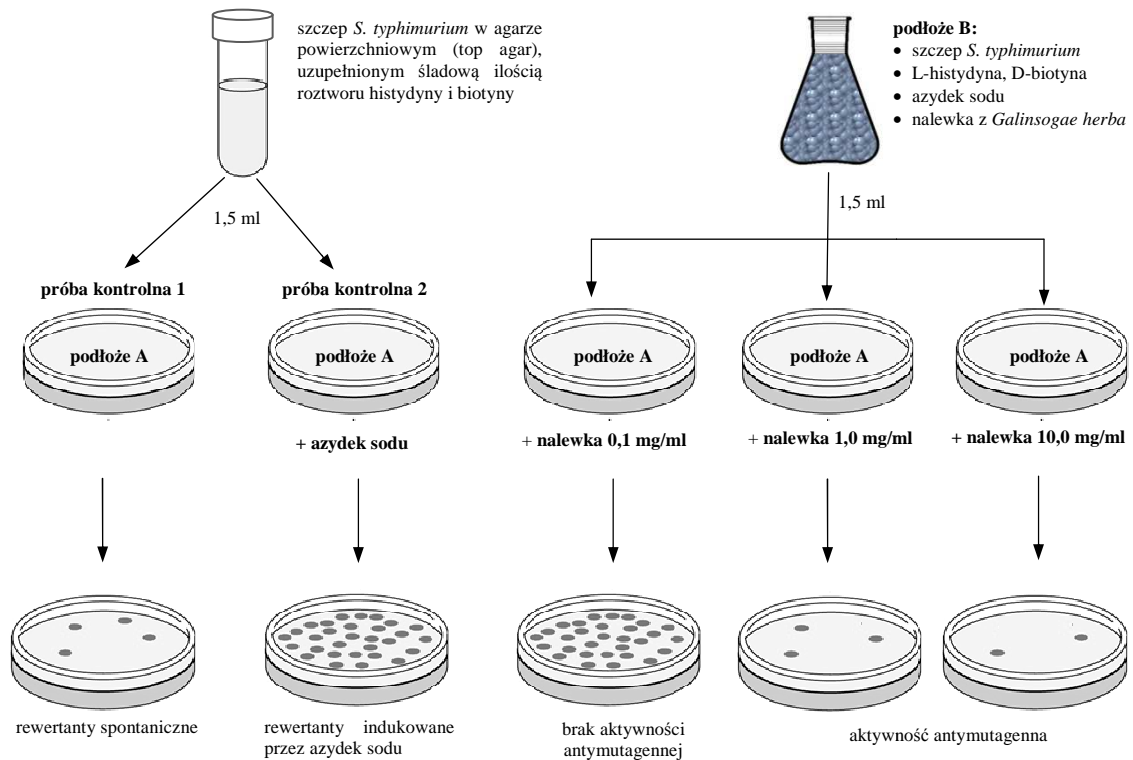
Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Przygotowane wyciągi (heksanowy, nalewka i odwar) oraz sok z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (rozdz. 7.4.4.) rozpuszczono w DMSO w stężeniu 100 mg/ml i przygotowano z nich rozcieńczenia w podłożach płynnych: Antibiotic Broth w przypadku bakterii oraz Sabouraud Broth w przypadku grzybów w stężeniach od 0,1 do 10,0 mg/ml. Do przygotowanych rozcieńczeń próbek o objętości 1 ml dodawano po 0,1 ml 24-godzinnej hodowli badanych szczepów *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans* zawierających 10^5 komórek w 1 ml oraz po 0,1 ml 7-dniowej hodowli *M. gypseum* zawierającej 10^2 komórek, w odpowiednich podłożach. Najmniejsze stężenie hamujące (MIC - *Minimal Inhibitory Concentration*) badanych próbek odczytywano po 24 godzinnej inkubacji w temperaturze 37° C, a aktywność wobec dermatofitów oceniano po inkubacji próbek przez 7 dni w temperaturze 37° C. Jako substancji referencyjnych użyto chloramfenikol (bakterie) oraz amfoterycynę B (grzyby drożdżoidalne). Następnie określono najmniejsze stężenie bakteriobójcze (MBC - *Minimal Bactericidal Concentration*), wykonując posiewy z podłoży płynnych na podłoża stałe i określając wzrost badanych drobnoustrojów.

Aktywność antymutagenna

Działanie antymutagenne nalewki z ziela żółtlicy drobnokwiatowej określano przy użyciu mikrobiologicznego testu Ames'a (Maron i Ames, 1983). Jako substancji mutagennej użyto azydek sodu, a substancją o potencjalnym działaniu antymutagennym była nalewka rozpuszczona w DMSO w stężeniach 10,0 1,0 i 0,1 mg/ml. Do kolbki zawierającej 10 ml upłynnionego i ochłodzonego do temperatury 50° C podłoża warstwy górnej dodawano 0,1 ml mieszaniny L-histydyny i D-biotyny; 0,1 ml azydku sodu oraz 1 ml rozcieńczonej 1:10 hodowli *S.typhimurium* i 1 ml odpowiedniego stężenia badanego wyciągu (podłoże B). Tak przygotowane podłoże warstwy górnej wylewano w ilości 1,5 ml na podłoże warstwy dolnej (podłoże A), znajdujące się w ilości 10 ml w płytce Petriego o średnicy 10 cm (rycina 116). Płytki inkubowano w 37° C. Po upływie 72 godzin liczone kolonie bakteryjne wyrosłe na powierzchni agaru i porównywano do prób kontrolnych. Pierwszą próbę kontrolną stanowiła płytka ze szczepem *Salmonella typhimurium*, gdzie mutacje powstawały w sposób spontaniczny.

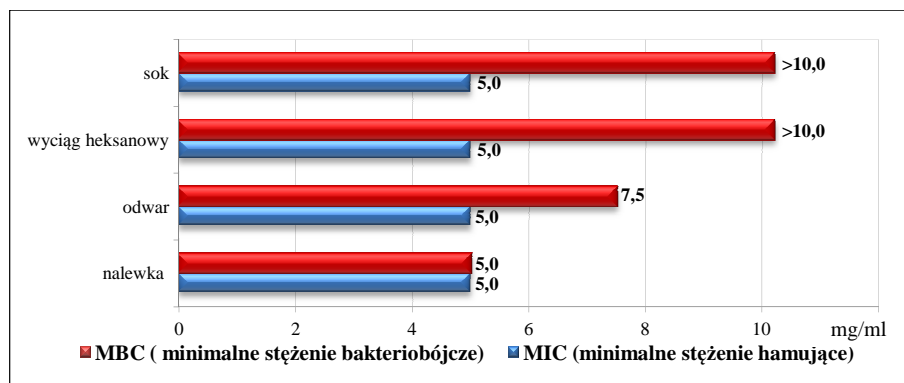
Drugą próbą kontrolną była płytka z dodatkiem szczepu *Salmonella typhimurium* i związku mutagennego. Gdy na płytkach z dodatkiem 10, 1, lub 0,1 mg/ml nalewki z ziela żółtlicy drobnokwiatowej liczba kolonii była mniejsza od 100 (mutacje spontaniczne) przyjmowano, że nalewka wykazuje aktywność antymutagenną. Gdy liczba kolonii przekraczała 1000, przyjmowano, że nalewka nie posiada właściwości antymutagennych.



Rycina 116. Sposób przeprowadzenia testu Ames'a.

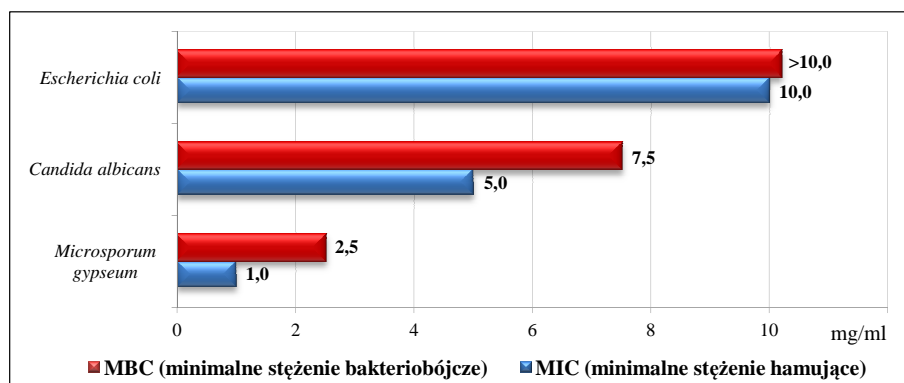
8.4.3.2. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej i antymutagennej wyciągów

Do porównania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągów (wyciąg heksanowy, nalewka, odwar) i soku z ziela żółtlicy drobnokwiatowej użyto szczepu standardowego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P. Wyniki przedstawiono na rycinie 117.



Rycina 117. Działanie przeciwbakteryjne wyciągu heksanowego, nalewki, odwaru i soku z ziela żótlicy drobnokwiatowej.

Nalewkę, jako najbardziej aktywny wyciąg, poddano dalszym badaniom z użyciem szczepów wzorcowych bakterii i grzybów chorobotwórczych: *E. coli* PZH O26B6, *C. albicans* PCM 1409 PZH i *M. gypseum* K1 (rycina 118).



Rycina 118. Działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze nalewki z surowca.

Działanie antybiotyków referencyjnych: chloramfenikolu na *S. aureus* i amfoterycyny B na *C. albicans* przedstawiono w tabeli 214.

Tabela 214. Działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze antybiotyków referencyjnych

Badany drobnoustrój	Aktywność antybiotyczna (mg/ml)			
	chloramfenikol		amfoterycyna B	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	0,005	0,01	-	-
<i>Candida albicans</i> PCM 1409 PZH	-	-	1,0	2,5

Nalewka z ziela żótlicy drobnokwiatowej wykazała aktywność antymutageną w stężeniu 1,0 i 10,0 mg/ml.

Dyskusja

Celem pracy była izolacja i identyfikacja związków flawonoidowych obecnych w ziele żółtlicy drobnokwiatowej, jak również oznaczenie zawartości związków fenolowych (flawonoidów, kwasów fenolowych, sumy polifenoli) i witaminy C metodami kolorymetrycznymi, pierwiastków techniką emisyjnej spektrometrii atomowej (ICP-OES) oraz kwasów fenolowych metodą ultrasprawną chromatografią cieczową (UPLC-PDA) oraz badania aktywności antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej, przeciwdrobnoustrojowej i antymutagennej różnych wyciągów.

Izolacja i identyfikacja flawonoidów

Do izolacji związków flawonoidowych posłużył wyciąg z wysuszonego ziele żółtlicy drobnokwiatowej. Surowiec poddano trzykrotnej jednodniowej maceracji metanolem w temperaturze pokojowej, a następnie trzykrotnej ekstrakcji metanolem i trzykrotnej mieszaniną metanol-woda (1:1), każdorazowo przez 1 godzinę, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalników. Ze względu na podobny obraz chromatograficzny uzyskanych ekstraktów połączono je, zagęszczono do sucha, a następnie zalano wrzącą wodą i odstawiono na 24 godziny. Wytrącone substancje balastowe odcedzono, a przesącz wodny poddano wytrząsaniu z chloroformem, eterem dietylowym i octanem etylu. Uzyskane frakcje, łącznie z pozostałością po wytrząsaniu (frakcja wodna), kontrolowano chromatograficznie. Ze względu na śladowe ilości związków flawonoidowych we frakcji chloroformowej i eteru dietylowego nie prowadzono dalszych badań tych frakcji (rozd. 7.1.6., rycina 8).

Izolację flawonoidów przeprowadzono według metodyki przyjętej dla tej grupy związków (Mabry i wsp., 1970; Strzelecka i wsp., 1987; Dey i Harborne, 1989; Rice-Evans i Packer, 1998; Andersen i Markham, 2006) (rozd. 7.1.3). Rozdział związków flawonoidowych z frakcji octanu etylu i wodnej przeprowadzono metodą chromatografii kolumnowej, stosując jako adsorbent celulozę (rozd. 8.1.1.1.).

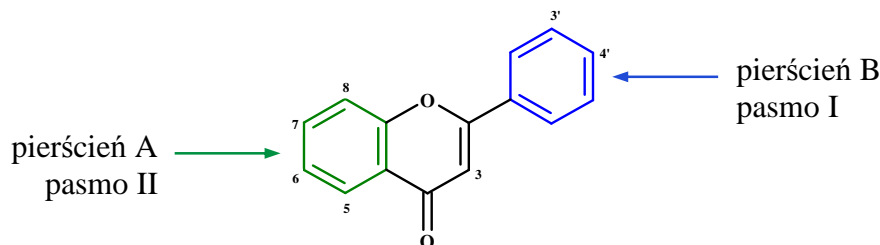
Dalszy rozdział mieszanin związków flawonoidowych, uzyskanych w wyniku rozdziału kolumnowego frakcji octanu etylu, prowadzono metodą preparatywnej chromatografii bibułowej (PPC), doprowadzając do wyizolowania frakcji sześciu związków flawonoidowych (zw. 1, zw. 2, zw. 3, zw. 4, zw. 6, zw. 7). Frakcje uzyskane w wyniku rozdziału kolumnowego frakcji wodnej, zawierały dwa związki flawonoidowe (zw. 4 i zw. 5), które znacznie różniły się wartościami współczynnika R_f w wodzie, wynoszącymi odpowiednio 0,15 i 0,71. Stąd też podjęto decyzję o chromatograficznym rozdziale tych związków z wykorzystaniem klasycznej chromatografii kolumnowej. Kolumnę szklaną, wypełnioną celulozą, eluowano wodą. Zebrane frakcje zagęszczono w temperaturze 50° C do objętości około 10 ml każda. W trakcie kontroli chromatograficznej okazało się, że w uzyskanych frakcjach znajduje się jedynie związek 4, brak było natomiast związku 5. W celu wyodrębnienia związku 5 konieczne było powtórzenie procedur ekstrakcyjnych i chromatograficznych (rozdzielanie kolumnowe). Izolację związków 4 i 5 z frakcji uzyskanych metodą chromatografii kolumnowej prowadzono metodą planarnej chromatografii preparatywnej na bibule chromatograficznej (bibuła Whatman nr 3), stosując jako fazę rozwijającą wodę.

Ze względu na obecność we wszystkich frakcjach flawonoidowych licznych związków o niebieskiej fluorescencji w UV_{366nm} , konieczne było kilkukrotne ich oczyszczanie w kolumnach wypełnionych sefademem, eluowanych naprzemiennie układami o różnej polarności (rozd. 8.1.1.2.).

W wyniku prowadzonych prac izolacyjnych wyodrębniono siedem jednorodnych chromatograficznie związków flawonoidowych, których identyfikację przeprowadzono metodami chemicznymi (badanie produktów hydrolizy kwasowej) oraz spektralnymi (UV, HPLC/UHPLC-DAD-ESI-MS, 1H NMR, ^{13}C NMR).

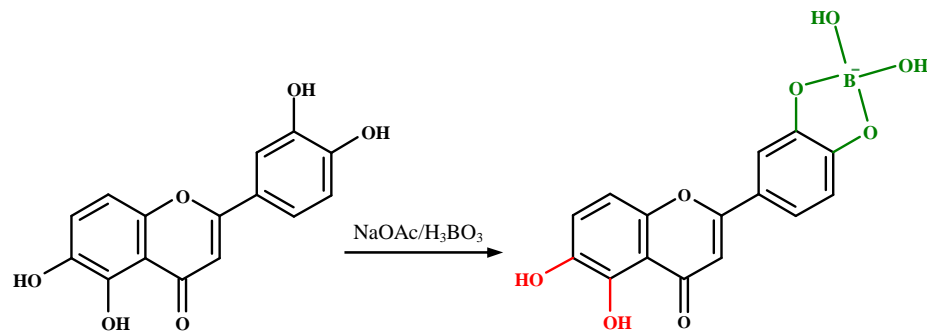
Metoda spektrometrii absorpcyjnej w nadfiolecie (rozd. 7.1.4.1.) jest obecnie wypierana bardziej nowoczesnymi analizami spektralnymi, jest jednak bardzo przydatna we wstępnej identyfikacji związków flawonoidowych. Spektroskopia absorpcyjna stosowana jest w analizie związków posiadających chromofory, czyli ugrupowania atomów połączonych między sobą wielokrotnymi wiązaniami, zawierającymi ruchliwe elektrony (Szczepaniak, 2002). Widmo flawonoidów w metanolu wykazuje dwa pasma absorpcji w zakresie 240-400 nm: pasmo II w zakresie 240-280 nm oraz pasmo I w zakresie 300-380 nm (Mabry i wsp., 1970). Położenie I pasma absorpcji dostarcza informacji o typie flawonoidów, w zakresie

320-355 nm jest charakterystyczne dla flawonów, podczas gdy dla flawonoli zakres ten wynosi 340-385 nm (Rice-Evans i Packer, 1998). Po dodaniu do metanolowego roztworu związku odczynników jonizujących (metylan sodu, octan sodu) oraz kompleksotwórczych (octan sodu z kwasem borowym, chlorek glinu, chlorek glinu z kwasem solnym) następują przesunięcia batochromowe lub hypsochromowe pasm absorpcji, umożliwiające określenie położenia wolnych bądź podstawionych grup hydroksylowych w cząsteczce. Przesunięcie I pasma dostarcza informacji o strukturze pierścienia B, podczas gdy przesunięcie pasma II związane jest z budową pierścienia A (rycina 119). Ponadto przeięcie pasma II widma metanolowego związku od strony fal dłuższych jest charakterystyczne dla związków posiadających ugrupowanie *orto*-dihydroksylowe w pierścieniu B (Mabry i wsp., 1970).



Rycina 119. Wpływ struktury związków flawonoidowych na przesunięcia pasm absorpcji w widmie UV.

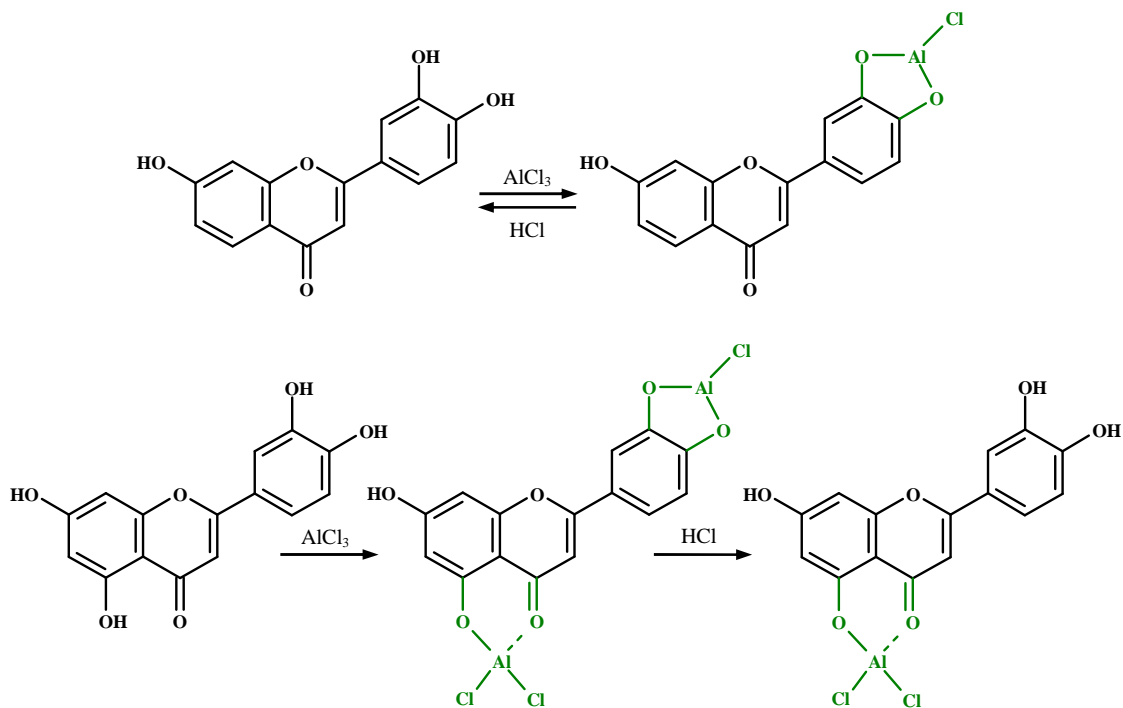
Metylan sodu (NaOMe), jako silna zasada, jonizuje wszystkie wolne grupy hydroksylowe w cząsteczce związku. Przesunięcie batochromowe pasma I w widmie badanego związku o $\Delta\lambda=40-65$ nm, bez zmniejszenia intensywności tego pasma, świadczy o wolnej grupie hydroksylowej w pozycji C-4'. Flawonoidy z trzema wolnymi grupami hydroksylowymi, w tym przy C-3 i C-4', również dają przesunięcie maksimum I w kierunku fal dłuższych, jednak jego intensywność zmniejsza się w czasie. Pojawienie się dodatkowego pasma o niskiej intensywności, w stosunku do widma metanolowego, w zakresie 320-335 nm świadczy o obecności wolnej grupy hydroksylowej przy C-7 w pierścieniu A (Mabry i wsp., 1970; Dey i Harborne, 1989). O wolnej grupie hydroksylowej w pozycji C-7 świadczy także przesunięcie batochromowe pasma II pod wpływem octanu sodu (NaOAc) o $\Delta\lambda=5-20$ nm. Na podstawie wartości przesunięcia pasma I w widmie związku po dodaniu octanu sodu i kwasu borowego (NaOAc/H₃BO₃) można wnioskować o występowaniu ugrupowania katecholowego w cząsteczce aglikonu. Kwas borowy, w obecności octanu sodu, tworzy połączenia chelatowe z grupami *orto*-dihydroksylowymi, położonymi we wszystkich miejscach aglikonu, z wyjątkiem pozycji C-5 i C-6 w pierścieniu A (rycina 120).



Rycina 120. Mechanizm tworzenia połączeń chelatowych H_3BO_3 w obecności NaOAc z grupami *ortho*-dihydroksylowymi flawonoidów (Mabry i wsp., 1970).

Przesunięcie batochromowe pasma I w kierunku fal dłuższych o $\Delta\lambda=12-30$ nm jest diagnostyczne dla flawonoidów, posiadających ugrupowanie katecholowe przy C-3' i C-4' w pierścieniu B. Przesunięcie tego pasma o $\Delta\lambda=5-10$ nm może wskazywać na obecność ugrupowania *ortho*-dihydroksylowego przy C-6 i C-7 lub C-7 i C-8 w pierścieniu A. Obecność wolnego ugrupowania *ortho*-dihydroksylowego w pierścieniu B potwierdza także przesunięcie hypsochromowe pasma I o $\Delta\lambda=30-40$ nm (lub 1a jeśli pasmo I występuje w formie dwóch pików) widma z chlorkiem glinu i kwasem solnym ($AlCl_3/HCl$), w stosunku do pasma I w widmie z chlorkiem glinu ($AlCl_3$), spowodowane rozkładem barwnego kompleksu utworzonego z $AlCl_3$ pod wpływem kwasu solnego (rycina 121). Obecność ugrupowania pirogallolowego w pierścieniu B powoduje hypsochromowe przesunięcie pasma I o $\Delta\lambda=20$ nm po dodaniu kwasu solnego do kompleksu związku z chlorkiem glinu. Natomiast związki flawonoidowe mające wolne grupy hydroksylowe przy C-3 lub C-5 tworzą stabilne w środowisku kwaśnym kompleksy z chlorkiem glinu (Mabry i wsp., 1970). Przesunięcie batochromowe pasma I o $\Delta\lambda=35-55$ nm widma chlorku glinu z kwasem solnym, w stosunku do widma w metanolu, świadczy o wolnej grupie hydroksylowej przy C-5 i podstawionej grupie hydroksylowej w pozycji C-3, natomiast o $\Delta\lambda=50-60$ nm o obecności wolnej grupy hydroksylowej przy C-3 (Dey i Harborne, 1989, Mabry i wsp., 1970).

W widmie w nadfiolecie metanolowego roztworu **związku 1** (tabela 5, rycina 10) obserwowano dwa pasma absorpcji: maksimum I przy $\lambda=356$ nm i maksimum II przy $\lambda=256$ nm. Widmo metanolowego roztworu **związku 2** (tabela 8, rycina 14) charakteryzowało się występowaniem maksimum absorpcji przy $\lambda=370$ nm i $\lambda=256$ nm, natomiast **związku 3** (tabela 13, rycina 18) przy $\lambda=371$ nm i $\lambda=259$ nm. Batochromowe przesunięcie maksimum I, ze spadkiem jego intensywności, o $\Delta\lambda=37$ nm (zw. 1),



Rycina 121. Mechanizm tworzenia połączeń chelatowych AlCl₃ z flawonoidami przed i po dodaniu HCl (Mabry i wsp., 1970).

$\Delta\lambda=86$ nm (zw. 2) i $\Delta\lambda=70$ nm (zw. 3) po dodaniu NaOMe i brak diagnostycznego przesunięcia maksimum II po dodaniu NaOAc, wskazywał na występowanie wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-4' i C-3 oraz podstawionej grupy hydroksylowej w pozycji C-7. Brak dodatkowego pasma o niskiej intensywności w zakresie 320-335 nm w widmach badanych związków z NaOMe potwierdzał brak wolnej grupy hydroksylowej przy C-7 w pierścieniu A. Przesunięcie batochromowe po dodaniu H₃BO₃ do roztworów związków z NaOAc o $\Delta\lambda=14$ nm (zw. 1), $\Delta\lambda=16$ nm (zw. 2) i o $\Delta\lambda=12$ nm (zw. 3) świadczył o występowaniu ugrupowania *ortho*-dihydroksylowego przy C-3' i C-4'. Wartość przesunięcia hypsochromowego maksimum I po dodaniu HCl do roztworów związków z AlCl₃ wynosiła $\Delta\lambda=30$ nm dla związku 1 i $\Delta\lambda=32$ nm dla związków 2 i 3, potwierdzając obecność ugrupowania katecholowego w pierścieniu B. Charakterystyczne przeięcie pasma II widm w metanolu badanych związków potwierdza obecność ugrupowania *ortho*-dihydroksylowego w pierścieniu B aglikonu. Wielkość przesunięcia maksimum I w widmach z AlCl₃/HCl w stosunku do widma w MeOH wynosiła $\Delta\lambda=66$ nm (zw. 1), $\Delta\lambda=54$ nm (zw. 2) i $\Delta\lambda=53$ nm (zw. 3), co wskazywało na wolne grupy hydroksylowe w pozycjach C-3 i C-5.

W widmach w nadfiolecie metanolowych roztworów **związku 4** (tabela 18, rycina 22), **5** (tabela 23, rycina 26) i **7** (tabela 33, rycina 36) obserwowano pasma absorpcji maksimum I przy $\lambda=359$ nm oraz maksimum II przy $\lambda=257$ nm (zw. 4 i 5) i $\lambda=258$ nm (zw. 7).

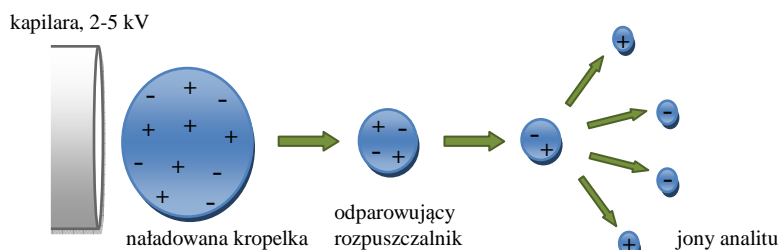
W widmach wykreślonych po reakcji związków z NaOMe obserwowano przesunięcie batochromowe maksimum I o $\Delta\lambda=52$ nm (zw. 4), $\Delta\lambda=49$ nm (zw. 5) i $\Delta\lambda=54$ nm (zw. 7), bez spadku jego intensywności, co wskazywało na obecność wolnej grupy hydroksylowej przy C-4' w pierścieniu B. Przesunięcie batochromowe maksimum II o $\Delta\lambda=13$ nm (zw. 4), $\Delta\lambda=15$ nm (zw. 5) i $\Delta\lambda=12$ nm (zw. 7) po dodaniu NaOAc, świadczyło o występowaniu wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-7 analizowanych związków. Dodatkowe maksimum w widmie z NaOMe przy $\lambda=328$ nm (zw. 4), $\lambda=331$ nm (zw. 5) i $\lambda=328$ nm (zw. 7) potwierdzają obecność wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-7. Wartość batochromowego przesunięcia maksimum I po dodaniu H_3BO_3 w obecności NaOAc o $\Delta\lambda=18$ nm (zw. 4 i 5) i $\Delta\lambda=24$ nm (zw. 7) wskazywała na obecność ugrupowania *ortho*-dihydroksylowego. Widma związków z $AlCl_3$ okazały się niestabilne w środowisku kwasu solnego, w stosunku do widm z $AlCl_3/HCl$, a wartości przesunięć hypsochromowych maksimum I związków 4, 5 i 7 wynosiły odpowiednio $\Delta\lambda=35$ nm, $\Delta\lambda=17$ nm i $\Delta\lambda=28$ nm. Obecność ugrupowania katecholowego przy C-3' i C-4' w pierścienia B potwierdza również kształt pasm II widm metanolowych analizowanych związków. Wartości przesunięć batochromowych o $\Delta\lambda=40$ nm (zw. 4), $\Delta\lambda=43$ nm (zw. 5) i $\Delta\lambda=42$ nm (zw. 7) po dodaniu $AlCl_3/HCl$, w stosunku do widm w metanolu, świadczyły o wolnej grupie hydroksylowej w pozycji C-5 i podstawionej grupie hydroksylowej przy C-3.

Widmo w nadfiolecie metanolowego roztworu **związku 6** (tabela 28, rycina 31) charakteryzowało się występowaniem maksimum I przy $\lambda=349$ nm i maksimum II przy $\lambda=266$ nm. Analiza widma związku po dodaniu odczynników jonizujących wskazywała na obecność wolnej grupy hydroksylowej przy C-4' (batochromowe przesunięcie maksimum I o $\Delta\lambda=52$ nm) i wolnej grupy hydroksylowej przy C-7 (batochromowe przesunięcie maksimum II o $\Delta\lambda=8$ nm oraz dodatkowe maksimum przy $\lambda=325$ nm w widmie z NaOMe). Brak ugrupowania *ortho*-dihydroksylowego w C-3' i C-4' stwierdzono, analizując widmo związku po reakcji z $AlCl_3$, w stosunku do widma z $AlCl_3/HCl$, które okazało się stabilne po dodaniu kwasu solnego, jak również brakiem diagnostycznego przesunięcia po dodaniu NaOAc i H_3BO_3 (batochromowe przesunięcie I maksimum o $\Delta\lambda=4$ nm) oraz brakiem przegięcia maksimum II w kierunku fal dłuższych widma metanolowego związku 6. W widmie z $AlCl_3/HCl$ obserwowano maksimum I przesunięte batochromowo o $\Delta\lambda=47$ nm w stosunku do widma metanolowego, co wskazywało na wolną grupę hydroksylową przy C-5 i zablokowaną przy C-3.

Z analizy widm w UV wyodrębnionych związków flawonoidowych wynika, że są one flawonolami z wolnymi grupami hydroksylowymi w pozycjach C-5 i C-4' oraz posiadającymi, z wyjątkiem związku 6, ugrupowanie *orto*-dihydroksylowe w pierścieniu B. Ponadto związki 1, 2, 3 mają wolną grupę hydroksylową przy C-3 i zablokowaną grupę hydroksylową w pozycji C-7, podczas gdy związki 4, 5, 6, 7 posiadają wolną grupę hydroksylową przy C-7 i zablokowaną grupę hydroksylową w pozycji C-3.

Hydroлизę kwasową częściową i całkowitą, w celu określenia aglikonu oraz rodzaju i liczby cukrów w cząsteczce, przeprowadzono dla związków flawonoidowych wyizolowanych w największych ilościach (zw. **2**, **4**, **6** i **7**). Uzyskane aglikony, cukry oraz glikozydy wtórne porównywano chromatograficznie metodą chromatografii bibułowej (PC) i cienkowarstwowej (TLC) w różnych układach rozwijających ze związkami wzorcowymi (tabela 37). Wyniki badań produktów hydrolizy wskazywały, że związki 2, 4 i 6 są monozydami, gdyż w wyniku hydrolizy kwasowej częściowej nie powstały glikozydy wtórne, a jedynie aglikony: kwercetyna, po hydrolizie związków 2 i 4 oraz kemferol, po hydrolizie związku 6. W hydrolizatach analizowanych związków (2, 4, 6) obecna była glukoza. Wyniki analizy chromatograficznej związku 7 wskazywały, że jest on pochodną kwercetyny, z glukozą i ramnozą w części cukrowej. Związek wtórny, powstały w wyniku hydrolizy kwasowej częściowej, odpowiadał wzorcowemu 3-*O*- β -glukopiranozydowi kwercetyny (tabela 37).

W celu ustalenia struktury flawonoidów wykorzystano także spektrometrię mas (ESI-MS) połączoną z wysokosprawną chromatografią cieczową (rozdz. 7.1.4.2.). Podstawą ESI-MS jest pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego danego jonu. Pierwszy etap analizy polega na wytworzeniu jonów analizowanych związków przez rozpylanie cieczy, zawierającej badaną substancję w polu elektrycznym, przy użyciu napięcia rzędu 2000-5000 V (rycina 122) (Prasain i wsp., 2004).



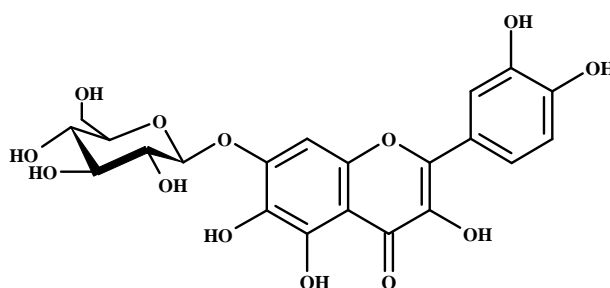
Rycina 122. Uproszczony schemat źródła jonów typu ESI.

Utworzone jony molekularne ulegają fragmentacji i są rozdzielane w zależności od ich masy, a następnie detekcji, proporcjonalnie do ich liczby (de Hoffmann, 1998).

Dla wyizolowanych związków flawonoidowych przeprowadzono badanie techniką HPLC/UHPLC-DAD-ESI-MS, rejestrowaną w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+). Na podstawie wykreślonych widm ESI-MS badanych związków określono masę cząsteczkową badanego związku, masę aglikonu, jak również liczbę, rodzaj i typ wiązania cząsteczek cukru (Stobiecki, 2000; Kazuno i wsp., 2005).

W widmie ESI-MS **związku 1** (tabela 6, rycina 13) rejestrowanym w trybie jonów ujemnych, obserwowano sygnały odpowiadające deprotonowanej cząsteczce związku $[M-H]^-$ przy m/z 479 oraz deprotonowanemu aglikonowi $[M-H\text{-heksoza}]^-$ przy m/z 317. W trybie jonów dodatnich zarejestrowano sygnały, pochodzące od protonowanej cząsteczki związku $[M+H]^+$ przy m/z 481, protonowanego aglikonu $[M+H\text{-heksoza}]^+$, a także od adduktu związku 1 z sodem $[M+Na]^+$ przy m/z 503. Wyniki analizy wskazują, że masa związku 1 wynosi 480, co odpowiada masie kwercetyny z dodatkową grupą hydroksylową, z jedną cząsteczką heksozy (wzór sumaryczny związku: $C_{22}H_{23}O_{14}$). Analiza UHPLC-DAD związku 1 wykazała identyczny czas retencji i wartości maksimum absorpcji w widmie DAD jak wzorcowy 7-*O*- β -glukopiranozyd kwercetagetyny (ryciny 11, 12). Ze względu na zbyt małą ilość wyizolowanego związku 1 (2,5 mg) nie przeprowadzono dla niego dalszych analiz identyfikacyjnych (1H i ^{13}C NMR).

Na podstawie wyników UV, UHPLC-DAD-ESI-MS związek 1 zidentyfikowano jako 7-*O*- β -glukopiranozyd kwercetagetyny.



Rycina 123. Wzór strukturalny 7-*O*- β -glukopiranozydu kwercetagetyny (związek 1).

W widmie ESI-MS związków **2**, **4**, **5** i **7** zarejestrowano sygnały, odpowiadające jonom aglikonu, w trybie jonów ujemnych przy m/z 301 oraz w trybie jonów dodatnich przy m/z 303, co odpowiada masie kwercetyny. Dodatkowo dla każdego związku zarejestrowano sygnały odpowiednich jonów molekularnych oraz sygnały jonów, pochodzących od adduktów cząsteczek związków.

W widmach ESI-MS związku **2** (tabela 10, rycina 15) i **4** (tabela 20, rycina 23) w trybie jonów ujemnych zarejestrowano sygnały, odpowiadające deprotonowanej cząsteczce związku $[M-H]^-$ przy m/z 463 oraz sygnały pochodzące od deprotonowanego adduktu dwóch cząsteczek związku $[2M-H]^-$ przy m/z 927. W trybie jonów dodatnich zarejestrowano sygnały, odpowiadające protonowanej cząsteczce związku $[M+H]^+$ przy m/z 465 oraz adduktom związków 2 i 4 z sodem $[M+Na]^+$ przy m/z 487 i $[2M+Na]^+$ przy m/z 951. Wyniki analizy wskazują, że masa cząsteczkowa związków 2 i 4 wynosi 464, co odpowiada masie kwercetyny, podstawionej cząsteczką heksozy (wzór sumaryczny związku $C_{21}H_{20}O_{12}$).

W widmie ESI-MS związku **5** (tabela 25, rycina 27) zaobserwowano w trybie jonów ujemnych sygnał deprotonowanej cząsteczki związku $[M-H]^-$ przy m/z 477, a w trybie jonów dodatnich sygnały przy m/z 479 i m/z 501, odpowiadające protonowanej cząsteczce związku $[M+H]^+$ i adduktowi związku 5 z sodem $[M+Na]^+$. Wyniki analizy wskazują, że masa związku 5 wynosi 478, co odpowiada masie kwercetyny, podstawionej kwasem uronowym (wzór sumaryczny związku $C_{21}H_{18}O_{13}$).

W widmie ESI-MS związku **7** (tabela 35, rycina 37) w trybie jonów ujemnych zarejestrowano sygnały, pochodzące od deprotonowanej cząsteczki związku $[M-H]^-$ przy m/z 609 i deprotonowanego jonu fragmentacyjnego $[M-H\text{-metylopentoza}]^-$, powstałego w wyniku odszczepienia się cząsteczki metylopentozy, przy m/z 463. W trybie jonów dodatnich obserwowano sygnały protonowanego jonu molekularnego $[M+H]^+$ przy m/z 611 oraz adduktu związku 7 z sodem $[M+Na]^+$ przy m/z 633, a także sygnał protonowanego jonu fragmentacyjnego $[M+H\text{-metylopentoza}]^+$ przy m/z 465. Wyniki analizy wskazują, że masa związku 7 wynosi 610, co odpowiada masie kwercetyny, jednej cząsteczce heksozy i jednej cząsteczce metylopentozy (wzór sumaryczny związku: $C_{27}H_{30}O_{16}$).

W widmie ESI-MS związku **3** (tabela 15, rycina 19) w trybie jonów ujemnych zaobserwowano sygnały przy m/z 493 i m/z 331, odpowiadające deprotonowanej cząsteczce związku $[M-H]^-$ i deprotonowanemu aglikonowi $[M-H\text{-heksoza}]^-$, a także przy m/z 987, odpowiadające deprotonowanemu adduktowi dwóch cząsteczek związku $[2M-H]^-$. W trybie jonów dodatnich zarejestrowano sygnały, pochodzące od protonowanej cząsteczki związku $[M+H]^+$ przy m/z 495 i adduktu związku 3 z sodem $[M+Na]^+$ przy m/z 517, a także od protonowanego aglikonu $[M+H\text{-heksoza}]^+$ przy m/z 333. Masa związku 3 wynosi 494, co odpowiada masie kwercetyny z dodatkową grupą metoksyłową, z jedną cząsteczką heksozy (wzór sumaryczny $C_{22}H_{23}O_{13}$).

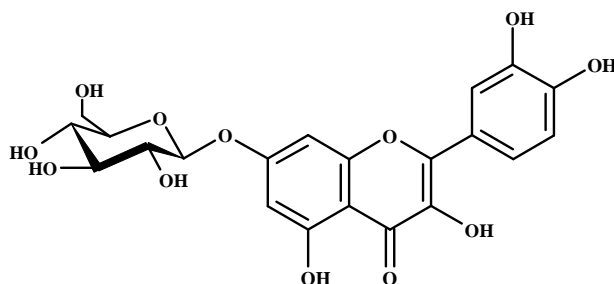
W widmie ESI-MS **związku 6** (tabela 30, rycina 32) w trybie jonów ujemnych zarejestrowano sygnał, odpowiadający deprotonowanej cząsteczce związku $[M-H]^-$ przy m/z 447 oraz sygnał, pochodzący od deprotonowanego adduktu dwóch cząsteczek związku $[2M-H]^-$ przy m/z 895. W trybie jonów dodatnich zarejestrowano sygnały, odpowiadające protonowanej cząsteczce związku $[M+H]^+$ przy m/z 449 oraz adduktom związku 6 z sodem $[M+Na]^+$ przy m/z 471 i $[2M+Na]^+$ przy m/z 919. Sygnał jonu fragmentacyjnego, pochodzący od jonu aglikonu, występował przy m/z 285 i m/z 287, odpowiednio w trybie jonów ujemnych $[M-H\text{-hekszoza}]^-$ i dodatnich $[M+H\text{-hekszoza}]^+$. Wyniki analizy wskazują, że masa cząsteczkowa związku 6 wynosi 448, co odpowiada masie kemferolu i jednej cząsteczce heksozy (wzór sumaryczny związku: $C_{21}H_{20}O_{11}$).

W celu określenia struktury flawonoidów stosowano także metodę spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego 1H NMR i ^{13}C NMR (rozdz. 7.1.4.3.). Zjawisko jądrowego rezonansu magnetycznego oparte jest na oddziaływaniu pomiędzy dipolem magnetycznym jądra a zewnętrznym polem magnetycznym (Szczepaniak, 2002). Sygnały rezonansowe w widmie 1H NMR pojawiają się w zakresie 0-13 ppm, a z wartości ich przesunięć można wnioskować o liczbie protonów występujących w cząsteczce związku. Położenie protonu anomerycznego cukru dostarcza informacji na temat rodzaju i pozycji podstawników cukrowych, jak również sposobu ich przyłączenia do aglikonu (wiązanie *O*- lub *C*-glikozydowe). Sygnały rezonansowe w widmie ^{13}C NMR pojawiają się w zakresie 0-200 ppm. Na podstawie widma ^{13}C NMR można określić liczbę atomów węgla w cząsteczce, gdyż każdy węgiel w związku jest reprezentowany przez jeden sygnał rezonansowy, a także typ wiązania (*O*- lub *C*-glikozydowe) oraz rodzaj i pozycję podstawników.

Analizę widm 1H i ^{13}C NMR wyodrębnionych związków flawonoidowych przeprowadzono w oparciu o dane literaturowe: 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), Park i wsp. (2008). Widma 1H i ^{13}C NMR analizowanych związków flawonoidowych wykreślono w DMSO- d_6 , za wyjątkiem widma 1H NMR związku 3, gdzie jako rozpuszczalnik zastosowano $CD_3\text{-OD}$. Dla związków 5, 6, 7 wykreślono dodatkowo widma 1H NMR po dodaniu D_2O do DMSO- d_6 . W widmach 1H i ^{13}C NMR sygnały związków 2 i 3 występowały w zakresie pola charakterystycznego dla 7-*O*-podstawionych flawonoli, podczas gdy dla związków 4, 5, 6 i 7 w obszarze typowym dla 3-*O*-podstawionych flawonoli.

W widmie ^1H NMR **związku 2** (tabela 11, rycina 16) w rejonie sygnałów pierścienia A obserwowano dwa dublety przy δ 6,41 ppm i δ 6,76 ppm o stałych sprzężenia $J=2,0$ Hz, które przypisano odpowiednio protonom H-6 i H-8. Ponadto zarejestrowano 3 sygnały, pochodzące od protonów pierścienia B. Sygnał protonu H-6' pojawił się przy δ 7,55 ppm jako dublet dubletów o stałej sprzężenia *meta* $J=2,0$ Hz i *orto* $J=8,6$ Hz. Sygnały protonów H-2' i H-5' uwidaczniały się w postaci dubletów odpowiednio przy δ 7,72 ppm ($J=2,0$ Hz) i δ 6,89 ppm ($J=8,5$ Hz). Sygnał protonu anomerycznego cukru w formie dubletu zarejestrowano przy δ 5,07 ppm. Jego położenie oraz wartość stałej sprzężenia $J=7,2$ Hz są charakterystyczne dla β -glukopiranozydów, przyłączonych wiązaniem *O*-glikozydowym w pozycji C-7 pierścienia A. O obecności cząsteczki cukru w tej pozycji świadczy także przesunięcie sygnałów H-6 i H-8 w dół pola, w stosunku do analogicznych sygnałów kwercetyny, odpowiednio o około +0,2 ppm i +0,3 ppm. W widmie ^{13}C NMR związku 2 (tabela 11, rycina 17) obserwowano 21 sygnałów węgla. Wartości przesunięć chemicznych odpowiadały kwercetynie, z przyłączoną cząsteczką cukru (heksozą) w pozycji C-7. O obecności podstawnika w pozycji C-7, świadczyło przesunięcie sygnału C-7 (δ 162,66 ppm) w górę pola o około -1,2 ppm, a sygnałów w pozycji *orto* C-6 i C-8 i w pozycji *para* C-10 w dół pola, odpowiednio o +0,5 ppm, +0,9 ppm i +1,6 ppm. Sygnał anomerycznego węgla cukru przy δ 100,13 ppm wskazywał na połączenie *O*-glikozydowe z aglikonem.

Na podstawie przeprowadzonych badań (hydroliza kwasowa, UV, HPLC-DAD-ESI-MS, ^1H i ^{13}C NMR) związek 2 zidentyfikowano jako 7-*O*- β -glukopiranozyd kwercetyny.

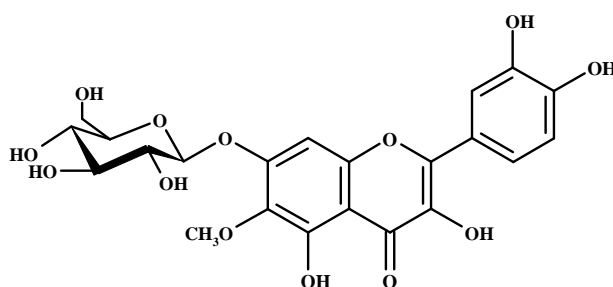


Rycina 124. Wzór strukturalny 7-*O*- β -glukopiranozydu kwercetyny (związek 2).

W widmie ^1H NMR **związku 3** (tabela 16, rycina 20) w rejonie sygnałów cząsteczki aglikonu pojawiły się cztery sygnały protonów: singlet przy δ 6,88 ppm, pochodzący od protonu H-8, dwa dublety przy δ 7,76 ppm ($J=1,6$ Hz) i przy δ 6,88 ppm ($J=8,7$ Hz), odpowiadające protonom H-2' i H-5' oraz dublet dubletów przy δ 7,67 ppm ($J=1,8$ Hz i 8,2 Hz), przypisany protonowi H-6'. Dodatkowo obserwowano sygnał w postaci

singletu przy δ 3,92 ppm, charakterystyczny dla grupy metoksylowej. Sygnał protonu anomerycznego cukru obserwowano przy δ 5,10 ppm, jako dublet o stałej sprzężenia $J=7,3$ Hz, co wskazuje na występowanie cząsteczki cukru w formie β -glukopiranozydu, przyłączonej do aglikonu wiązaniem *O*-glikozydowym w pozycji C-7. W widmie ^{13}C NMR (tabela 16, rycina 21) zarejestrowano 22 sygnały, przypisane 16 węglom aglikonu i 6 węglom reszty cukrowej. Sygnał przy δ 60,32 ppm odpowiadał grupie metoksylowej, przyłączonej do aglikonu flawonoidu w pozycji C-6 (przesunięcie sygnału z δ 98,2 ppm do δ 131,8 ppm w porównaniu z kwercetyną). O obecności cząsteczki cukru w pozycji C-7, wskazuje zmiana przesunięcia chemicznego węgla C-7 z δ 157,4 ppm do δ 156,36 ppm (w stosunku do aglikonu), natomiast o wiązaniu *O*-glikozydowym przesunięcie chemiczne C-1 glukozy z δ 96,8 ppm do δ 100,13 ppm.

Analiza przeprowadzonych badań (UV, HPLC-DAD-ESI-MS, ^1H i ^{13}C NMR) wskazuje, że związek 3 jest 7-*O*- β -glukopiranozydem patuletyny.

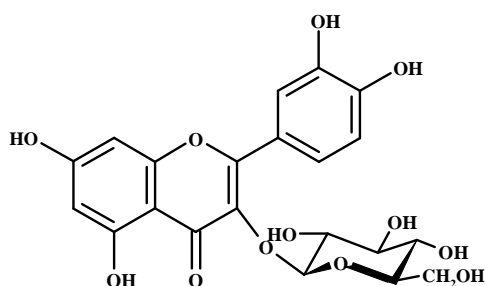


Rycina 125. Wzór strukturalny 7-*O*- β -glukopiranozydu patuletyny (związek 3).

W widmie ^1H NMR **związku 4** (tabela 21, rycina 24) w zakresie pola sygnałów pierścienia A zarejestrowano sygnały protonów H-6 przy δ 6,19 ppm oraz H-8 przy δ 6,40 ppm, oba w formie dubletu o stałej sprzężenia $J=1,9$ Hz oraz sygnał w postaci singletu przy δ 12,64 ppm, pochodzący od protonu grupy hydroksylowej w pozycji C-5. Ponadto obserwowano trzy sygnały protonów pierścienia B. Sygnał protonu H-6' uwidocznił się przy δ 7,57 ppm, jako dublet dubletów o stałej sprzężenia *meta* $J=2,2$ Hz i *orto* $J=8,9$ Hz. *Meta* sprzężony sygnał H-2' zarejestrowano przy δ 7,57 ppm ($J=2,0$ Hz), natomiast *orto* sprzężony sygnał H-5' przy δ 6,84 ppm ($J=9,0$ Hz), oba miały charakter dubletów. Sygnał pochodzący od protonu anomerycznego cukru w formie dubletu, obserwowano przy δ 5,46 ppm ($J=7,5$ Hz). Jego położenie i wartość stałej sprzężenia są charakterystyczne dla β -glukopiranozydów, przyłączonych w pozycji C-3 wiązaniem *O*-glikozydowym. W widmie ^{13}C NMR (tabela 21, rycina 25) zarejestrowano 21 sygnałów, odpowiadających wartościami przesunięć chemicznych kwercetynie,

z zablokowaną grupą hydroksylową w pozycji C-3. Na obecność reszty cukrowej przy C-3 wskazuje przesunięcie sygnału tego węgla w górę pola o -2,2 ppm, w stosunku do analogicznego sygnału niepodstawionego aglikonu, a także przesunięcie w dół pola sygnałów sąsiednich węgli w pozycji *orto* C-2 (+9,2 ppm), C-4 (+1,6 ppm) oraz *para* C-10 (+0,8 ppm). Sygnał węgla anomerycznego cukru obserwowano przy δ 100,85 ppm, czyli w zakresie typowym dla *O*-glikozydów.

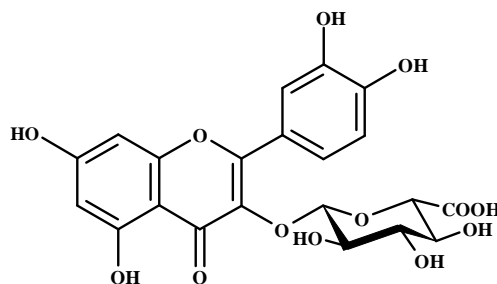
Na podstawie przeprowadzonych badań (hydroliza kwasowa, UV, HPLC-DAD-ESI-MS, ^1H i ^{13}C NMR) związek 4 zidentyfikowano jako 3-*O*- β -glukopiranozyd kwercetyny.



Rycina 126. Wzór strukturalny 3-*O*- β -glukopiranozydu kwercetyny (związek 4).

W widmie ^1H NMR **związku 5** (tabela 26, ryciny 28, 29) w rejonie sygnałów pierścienia A zarejestrowano dwa sygnały protonów w formie dubletów, przy δ 6,17 ppm i δ 6,36 ppm o takiej samej stałej wartości sprzężenia $J=1,9$ Hz, które przypisano odpowiednio protonom H-6 i H-8 oraz sygnał w formie singletu przy δ 12,26 ppm, pochodzący od protonu grupy hydroksylowej w pozycji C-5. Trzy sygnały protonów obserwowanych przy δ 8,28 ppm (dublet, $J=2,2$ Hz), δ 6,82 ppm (dublet, $J=8,4$ Hz) i δ 7,34 ppm (dublet dubletów, $J=2,0$ Hz i 8,4 Hz), odpowiadały protonom H-2', H-5' i H-6' w pierścieniu B. Sygnał protonu anomerycznego kwasu uronowego w postaci dubletu przy δ 5,20 ppm o stałej sprzężenia $J=7,1$ Hz wskazuje na jego przyłączenie do aglikonu wiązaniem *O*-glikozydowym. W widmie ^{13}C NMR (tabela 26, rycina 30) zarejestrowano 21 sygnałów, odpowiadających wartościami przesunięć kwercetynie, z zablokowaną grupą hydroksylową w pozycji C-3 kwasem uronowym (sygnał przy δ 172,20 ppm przypisano grupie karboksylowej). O podstawieniu węgla C-3 świadczą przesunięcia chemiczne w górę pola sygnału C-3 o około -1,5 ppm oraz sygnałów w dół pola C-2 (+10,7 ppm), C-4 (+1,8 ppm) i C-10 (+0,5 ppm). Sygnał węgla anomerycznego cząsteczki kwasu uronowego zarejestrowano przy δ 103,08 ppm, czyli w zakresie pola typowym dla *O*-glikozydów.

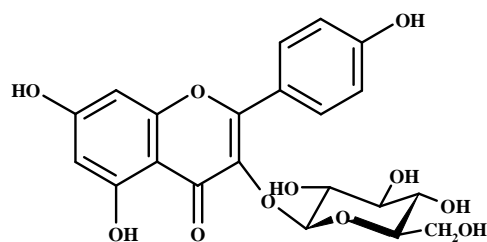
Z uzyskanych wyników badań (UV, HPLC-DAD-ESI-MS, ^1H i ^{13}C NMR) wynika, że związek 5 jest 3-*O*- β -glukuronidem kwercetyny.



Rycina 127. Wzór strukturalny 3-*O*- β -glukuronidu kwercetyny (związek 5).

W widmie ^1H NMR **związku 6** (tabela 31, ryciny 33, 34) w zakresie sygnałów pierścienia A obserwowano dwa sygnały w formie dubletów przy δ 6,21 ppm (H-6) i δ 6,43 ppm, (H-8) o stałych sprzężenia $J=1,8$ Hz oraz jeden sygnał w formie singletu przy δ 12,61 ppm (5-OH). Dwa sygnały o charakterze dubletów, zarejestrowane w zakresie sygnałów pierścienia B, o stałych sprzężenia *orto* $J=8,7$ Hz pojawiły się przy δ 8,04 ppm oraz przy δ 6,88 ppm i zostały przypisane odpowiednio protonom H-2', 6' i H-3', 5'. Sygnał anomerycznego protonu cukru obserwowano przy δ 5,46 ($J=7,4$ Hz), co wskazuje na wiązanie *O*-glikozydowe pomiędzy aglikonem i β -glukopiranozą. W widmie ^{13}C NMR (tabela 31, rycina 35) zarejestrowano 21 sygnałów, 15 sygnałów pochodziło od węgli aglikonu, a 6 sygnałów należało do węgli reszty cukrowej. Wartości przesunięć chemicznych węgli aglikonu były zgodne z danymi literaturowymi dla pochodnych kemferolu, z przyłączoną cząsteczką glukozy w pozycji C-3. W porównaniu z widmem kemferolu, sygnał C-3 przesunięty był w górę pola o około -2,4 ppm, natomiast sygnały sąsiednich węgli w pozycji *orto* (C-2, C-4) oraz w pozycji *para* (C-10) przesunięte były w dół pola, odpowiednio o około +9,4 ppm, +1,6 ppm, +0,9 ppm, co wskazuje na obecność podstawnika w pozycji C-3. Potwierdzeniem występowania wiązania *O*-glikozydowego pomiędzy aglikonem i cząsteczką glukozy był przesunięty w dół pola sygnał C-1 glukozy (δ 100,82 ppm), w porównaniu z sygnałem samego cukru.

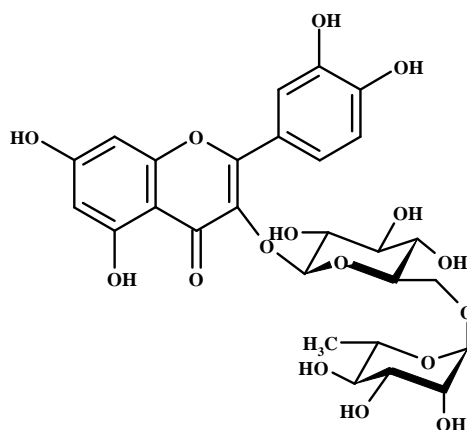
Na podstawie przeprowadzonych badań (hydroliza kwasowa, UV, HPLC-DAD-ESI-MS, ^1H i ^{13}C NMR) związek 6 zidentyfikowano jako 3-*O*- β -glukopiranozyd kemferolu.

Rycina 128. Wzór strukturalny 3-*O*- β -glukopiranozydu kemferolu.

W widmie ^1H NMR **związku 7** (tabela 36, ryciny 38, 39) w obszarze sygnałów pierścienia A zarejestrowano dwa sygnały w formie dubletów, przy δ 6,18 ppm i δ 6,37 ppm, o stałych sprzężenia $J=2,1$ Hz, pochodzące odpowiednio od protonów H-6 i H-8 oraz sygnał w postaci singletu przy δ 12,59, przypisany 5-OH. W zakresie pola sygnałów pierścienia B odnotowano obecność trzech sygnałów. Dwa z nich uwidoczniły się w formie dubletów przy δ 7,52 ppm ($J=2,1$ Hz), odpowiadający H-2' i przy δ 6,83 ppm ($J=8,2$ Hz), przypisany H-5'. Sygnał rezonansowy przy δ 7,54 ppm, w postaci dubletu dubletów o stałej sprzężenia *meta* $J=2,2$ Hz i *orto* $J=8,3$ Hz, pochodził od protonu H-6'. W rejonie sygnałów anomerycznych protonów cukrów obserwowano dwa sygnały, co wskazuje na obecność dwóch cząsteczek cukru w związku 7. W *O*-glikozydach sygnał anomerycznego protonu cukru, przyłączonego bezpośrednio do aglikonu, występuje bliżej sygnałów rezonansowych, pochodzących od protonów aglikonu, dlatego dublet przy δ 5,34 ppm ($J=7,5$ Hz) przypisano protonowi β -glukopiranozy, przyłączonej bezpośrednio do pierścienia, a dublet przy δ 4,38 ppm ($J=1,2$ Hz) odpowiadał protonowi α -ramnopiranozy. Dodatkowo przy δ 0,99 ppm zarejestrowano sygnał, w postaci dubletu o stałej sprzężenia $J=6,2$ Hz, odpowiadający grupie metylowej ramnozy. W widmie ^{13}C NMR (tabela 36, rycina 40) zarejestrowane przesunięcia chemiczne aglikonu odpowiadały kwercetynie, z zablokowaną grupą hydroksylową w pozycji C-3. O miejscu przyłączenia reszty cukrowej świadczyły przesunięcia chemiczne sygnału C-3 w górę pola o -2,2 ppm oraz w dół pola sygnałów C-2 (+9,5 ppm), C-4 (+1,5 ppm) i C-10 (+0,8 ppm). O występowaniu dwóch cząsteczek cukrów świadczyła obecność dwóch sygnałów węgli anomerycznych przy δ 101,18 ppm i δ 100,73 ppm oraz liczba sygnałów zarejestrowanych w zakresie pola δ 65-77 ppm. Dodatkowo obserwowano sygnał grupy metylowej, charakterystyczny dla ramnozy, przy δ 17,72 ppm. Przesunięcie sygnału C-6 glukozy z δ 61,8 ppm do δ 66,97 ppm (przesunięcie w dół pola o +5,2 ppm) w porównaniu z niepodstawioną β -glukopiranozą oraz C-1 ramnozy z δ 94,8 ppm do δ 100,73 ppm (przesunięcie w dół pola o +5,9 ppm) w porównaniu z niepodstawioną

α -ramnopiranozą, wskazuje na obecność wiązania 1→6 pomiędzy cząsteczkami cukrów. Położenie sygnału anomerycznego węgla glukozy przy δ 101,18 ppm wskazuje na obecność wiązania *O*-glikozydowego pomiędzy heksozą a aglikonem.

Na podstawie przeprowadzonych badań (hydroliza kwasowa, UV, HPLC-DAD-ESI-MS, ^1H i ^{13}C NMR) związek 7 zidentyfikowano jako 3-*O*- α -ramnopiranozylo (1→6)- β -glukopiranozyd kwercetyny (rutyna).



Rycina 129. Wzór strukturalny 3-*O*- α -ramnopiranozylo (1→6)- β -glukopiranozydu kwercetyny (związek 7).

Określenie profilu kwasów fenolowych

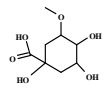
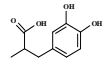
Wstępna analiza frakcji eteru dietylowego wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej wykazała obecność w nim czterech kwasów fenolowych (tabela 38): protokatechowego, chlorogenowego, kawowego i izowanilinowego.

Do oznaczenia jakościowego i ilościowego kwasów fenolowych wykorzystano ultrasprawną chromatografię cieczową (UPLC-PDA). UPLC, w odróżnieniu od HPLC (wysokosprawną chromatografię cieczową), umożliwia lepszą rozdzielczość pików składników mieszanin, znaczne skrócenie czasu trwania analizy chromatograficznej oraz niższe zużycie odczynników, potrzebnych do jej przeprowadzenia (Spáčil i wsp., 2008). Uzyskano to w wyniku wykorzystania w UPLC krótszych i węższych kolumn, wypełnionych podłożem o cząstkach wielkości poniżej 2 μm oraz możliwością zastosowania wyższych ciśnień podczas trwania analizy (Stepnowski i wsp., 2010; Witkiewicz, 2005). Z przeglądu piśmiennictwa wynika, iż w ostatnich latach opracowywano nowe metody rozdzielania fenolokwasów techniką ultrasprawnej chromatografii cieczowej (Klejduś i wsp., 2008; Nováková i wsp., 2010; Vichapong i wsp., 2010; Hung i wsp., 2011; De Paepe i wsp., 2013; Gonçalves i wsp., 2013). Jednak żadna z dostępnych publikacji nie podejmowała próby rozdzielania mieszaniny 15

kwasów fenolowych, najczęściej spotykanych w świecie roślinnym: chlorogenowego, dihydrokawowego, ferulowego, galusowego, izowanilinowego, kawowego, *m*-kumarowego, *p*-kumarowego, *p*-hydroksybenzoesowego, *p*-hydroksyfenylooctowego, protokatechowego, syringowego, salicylowego, wanilinowego i rozmarynowego. Strukturę chemiczną poszczególnych kwasów przedstawiono w tabeli 215.

Tabela 215. Struktura chemiczna kwasów fenolowych rozdzielanych metodą UPLC-PDA

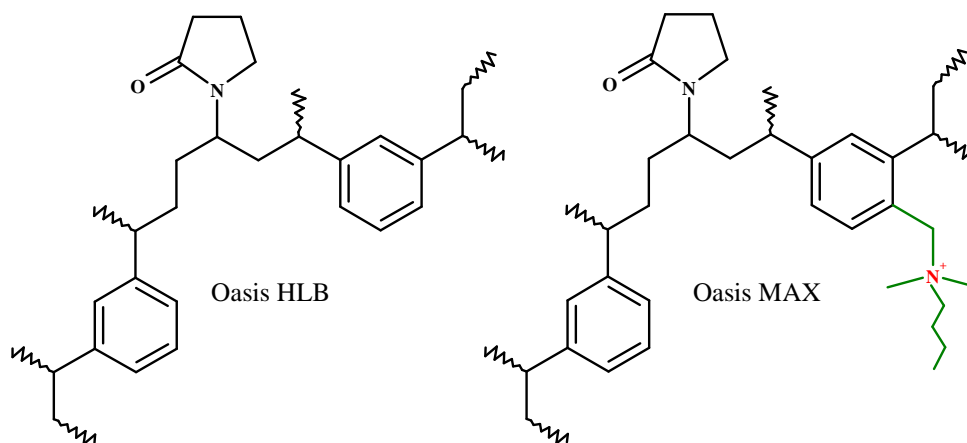
pochodne kwasu benzoesowego	R₁	R₂	R₃	R₄
kw. galusowy	OH	OH	OH	H
kw. izowanilinowy	H	OCH ₃	OH	H
<i>p</i> -hydroksybenzoesowy	H	OH	H	H
kw. protokatechowy	H	OH	OH	H
kw. salicylowy	H	H	H	OH
kw. syringowy	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
kw. wanilinowy	H	OH	OCH ₃	H

pochodne kwasu cynamonowego	R₁	R₂	R₃	R₄
kw. chlorogenowy	H	OH	OH	
kw. ferulowy	H	OH	OCH ₃	H
kw. kawowy	H	OH	OH	H
kw. <i>m</i> -kumarowy	OH	H	H	H
kw. <i>p</i> -kumarowy	H	OH	H	H
kw. rozmarynowy	H	OH	OH	

pochodna kwasu fenylooctowego	R₁	R₂	R₃
<i>p</i> -hydroksyfenylooctowy	H	OH	H

pochodna kwasu fenylpropanowego	R₁	R₂	R₃
kw. dihydrokawowy	H	OH	OH

Do rozdziału mieszaniny w/w kwasów fenolowych techniką UPLC-PDA opracowano nową, gradientową metodę z wykorzystaniem dwuskładnikowej fazy ruchomej (tabela 3). Obok dobrej rozdzielczości pików analizowanych kwasów, uzyskano także zadowalający czas rozdziału (15 min). Opracowana metoda została poddana walidacji, poprzez wyznaczenie parametrów kalibracji, limitów detekcji i oznaczalności oraz precyzji i dokładności. Testy walidacyjne wykazały, że metoda jest dokładna, precyzyjna, charakteryzuje się liniowością w szerokim zakresie stężeń, wysoką powtarzalnością i niską wartością granicy wykrywalności i oznaczalności (tabele 99, 100). Badaniom na zawartość kwasów fenolowych poddano wyciąg z wysuszonego ziela żółtlicy drobnokwiatowej (rozdz. 7.2.4.3.). W celu oczyszczenia wyciągu zastosowano ekstrakcję do fazy stałej (SPE), przy użyciu dwóch rodzajów kolumniek ekstrakcyjnych firmy Waters: Oasis MAX oraz Oasis HLB (rozdz. 8.2.2.3.1.) (Blahová i Brandšteterová, 2004; Dvořáková i wsp., 2007). Kolumniki te różnią się strukturą chemiczną matrycy. W kolumnikach Oasis HLB złoże występuje w postaci kopolimeru diwinylobenzenu i winylopirolidonu, które jest dodatkowo zmodyfikowane grupami jonowymiennymi (czwartorzędowe grupy aminowe) w kolumnikach Oasis MAX (rycina 130).



Rycina 130. Struktura kolumniek Oasis HLB i Oasis MAX (www.waters.com).

Badano również różne mieszaniny rozpuszczalników w celu uzyskania jak najwyższych wartości odzysków dla oznaczanych kwasów fenolowych. Najlepszym rozpuszczalnikiem do wymycia kwasów fenolowych z kolumniki Oasis MAX okazał się 2% kwas mrówkowy w metanolu, a wartości odzysków powyżej 90% uzyskano dla 9 kwasów fenolowych: protakatechowego, *p*-hydroksybenzoesowego, *p*-hydroksyfenylooctowego, wanilinowego, syringowego, izowanilinowego, *p*-kumarowego, ferulowego i *m*-kumarowego. Podobne wartości odzysków dla pozostałych 6 kwasów fenolowych

(galusowego, chlorogenowego, dihydrokawowego, kawowego, salicylowego i rozmarynowego) uzyskano przy użyciu kolumnienki Oasis HLB, wymywanej 70% metanolem. Wartości odzysków dla poszczególnych kwasów fenolowych przedstawiono w tabeli 101. Identyfikację kwasów fenolowych prowadzono porównując czasy retencji i widma w nadfiolecie pików związków obecnych na chromatogramach z czasami retencji i widmami w nadfiolecie pików substancji wzorcowych (tabela 216) oraz metodą dodatku wzorca do badanej próbki. W wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej stwierdzono obecność 5 kwasów fenolowych ($\mu\text{g/g}$ suchego surowca): chlorogenowego ($149,11 \pm 0,86$), kawowego ($12,54 \pm 0,28$), protokatechowego ($20,32 \pm 0,43$), izowanilinowego ($6,38 \pm 0,16$) oraz *p*-hydroksybenzoesowego ($10,43 \pm 0,02$) (tabele 102-111, ryciny 87-90), którego obecności nie stwierdzono metodą chromatograficzną (2D-TLC). Oznaczona zawartość kwasu chlorogenowego była niższa w porównaniu z danymi literaturowymi ($6,1 \pm 0,2$ mg/g) (Ranilla i wsp., 2010). Z uwagi na występujące różnice w odzyskach poszczególnych kwasów fenolowych, przy zastosowaniu opisanych powyżej procedur ekstrakcyjnych, wyciąg z ziela żółtlicy drobnokwiatowej ekstrahowano do fazy stałej z użyciem obydwu typów kolumnienek. Kwas protokatechowy, *p*-hydroksybenzoesowy i izowanilinowy oznaczono w wyciągu oczyszczonym za pomocą kolumnienki Oasis MAX, natomiast do analizy kwasu chlorogenowego i kawowego użyto kolumnienki Oasis HLB. Konieczność przygotowania dwóch prób z różnej ilości wyciągu w przypadku kolumnienki Oasis HLB, spowodowana była wysoką zawartością kwasu chlorogenowego w wyciągu, której wartość w próbce przygotowanej z 0,5 ml wyciągu nie mieściła się w granicach stężeń krzywej kalibracyjnej dla tego kwasu.

Tabela 216. Wartości parametrów wykorzystanych do identyfikacji kwasów fenolowych obecnych w surowcu

Kwas fenolowy	Wzorcowe kwasy fenolowe			Kwasy fenolowe oznaczone w surowcu		
	t_{sr}	$\lambda_{max II}$ (nm)	$\lambda_{max I}$ (nm)	t_{sr}	$\lambda_{max II}$ (nm)	$\lambda_{max I}$ (nm)
protokatechowy	5,57	259,8	294,7	5,54	259,8	294,7
chlorogenowy	6,46	244,5	326,8	6,44	244,5	326,2
<i>p</i> -hydroksybenzoesowy	7,09	255,5	-	7,06	255,5	-
kawowy	7,81	240,8	324,3	7,79	240,8	324,3
izowanilinowy	8,06	260,4	294,7	8,03	260,4	294,7

Badania ilościowe

Kolejnym etapem badań była analiza ilościowa wybranych grup związków z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych (flawonoidy, kwasy fenolowe, suma polifenoli, kwas L(+)-askorbinowy) oraz emisyjnej spektrometrii atomowej (pierwiastki).

Oznaczenie zawartości flawonoidów (FP IX) i kwasów fenolowych (FP VI) wykonano metodami farmakopealnymi, a zawartość sumy polifenoli przeprowadzono wg zmodyfikowanej metody Meng i wsp. (2009), z wykorzystaniem odczynnika *Folin-Ciocalteu* (FC). Odczynnik ten stanowi mieszanina kwasu fosforowolframowego ($H_3PW_{12}O_{40}$) i kwasu fosfomolibdenowego ($H_3PMo_{12}O_{40}$), które po utlenieniu polifenoli w środowisku alkalicznym (Na_2CO_3), ulegają redukcji do tlenków wolframu i molibdenu (Georgé i wsp., 2005). Mechanizm reakcji opiera się na przenoszeniu elektronu wg reakcji $Mo(VI) (\text{żółty}) + e^- \rightarrow Mo(V) (\text{niebieski})$, a tworzenie niebieskiego produktu w reakcji związków fenolowych z odczynnikiem FC jest niezależne od struktury fenoli (Grajek, 2007). Stężenia związków fenolowych w badanych próbach było proporcjonalne do intensywności absorpcji, mierzonej przy długości fali $\lambda=760$ nm.

Badaniami na zawartość wybranych grup związków objęto surowiec, wyciąg metanolowo-wodny, nalewkę i odwar z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (rozd. 7.3.3.2.). Zawartość podawano w mg/g suchego surowca, w przeliczeniu na:

- kwercetynę w analizie zawartości flawonoidów (mg QE/g)
- kwas kawowy w analizie zawartości kwasów fenolowych (mg CAE/g)
- kwas galusowy w analizie zawartości sumy polifenoli (mg GAE/g).

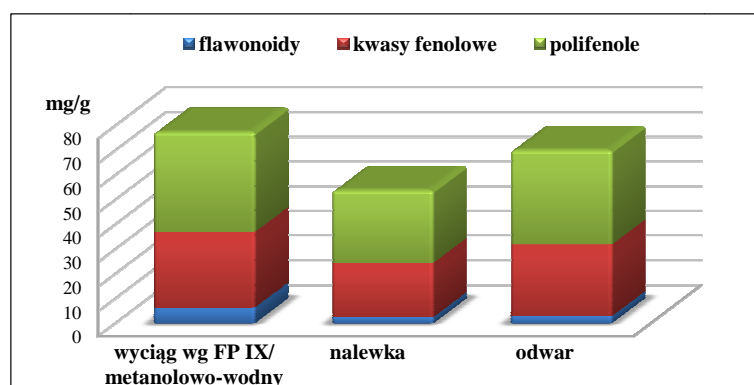
Spektrofotometrycznie oznaczoną zawartość flawonoidów (rozd. 8.3.1.), kwasów fenolowych (8.3.2.) i sumy polifenoli (8.3.3.) w badanych wyciągach przedstawiono w tabeli 217 i na rycinie 131.

Tabela 217. Zawartość związków polifenolowych w wyciągach z ziela żółtlicy drobnokwiatowej

Wyciąg	Zawartość		
	flawonoidy (mg QE/g)	kwasy fenolowe (mg CAE/g)	polifenole (mg GAE/g)
wg FP IX/metanolowo-wodny	6,42±0,04	30,62±0,40	40,53±0,19
nalewka	2,48±0,02	21,91±0,43	29,55±0,57
odwar	2,86±0,02	29,08±0,91	38,25±0,88

Największą zawartość flawonoidów oznaczono w wyciągu z surowca (wg FP IX) (6,42±0,04 mg QE/g surowca). W nalewce i odwarze zawartość flawonoidów była

ponad dwukrotnie niższa niż w wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej i wynosiła $2,48 \pm 0,02$ mg QE/g surowca w nalewce i $2,86 \pm 0,02$ mg QE/g surowca w odwarze. Zawartość kwasów fenolowych i sumy polifenoli w wyciągu metanolowo-wodnym i odwarze była porównywalna i wynosiła odpowiednio $30,62 \pm 0,40$ i $29,08 \pm 0,91$ mg CAE/g surowca oraz $40,53 \pm 0,19$ i $38,25 \pm 0,88$ mg GAE/g surowca, podczas gdy w nalewce ich zawartość była prawie 1,5 razy niższa i wynosiła $21,91 \pm 0,43$ mg CAE/g surowca oraz $29,55 \pm 0,57$ mg GAE/g surowca.



Rycina 131. Zawartość flawonoidów, kwasów fenolowych i polifenoli w wyciągach z ziela żółtlicy drobnokwiatowej.

W wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej oznaczono także zawartość kwasu L(+)-askorbinowego (rozdz. 8.3.4.). Badania w tym kierunku podjęto ze względu na doniesienia podręcznikowe o zastosowaniu naparu z surowca jako środka przeciwszkorbutowego. Witamina C, tj. kwas L(+)-askorbinowy i jego forma utleniona kwas L-dehydroaskorbinowy, należy do rozpuszczalnych w wodzie witamin. Zaliczana jest do naturalnych przeciwutleniaczy środowiska wodnego organizmu (Halliwell, 1999). Witamina C uczestniczy w syntezie kolagenu, karnityny, katecholamin oraz metabolizmie tyrozyny i cholesterolu (Padayatty i wsp., 2003). Obniża ciśnienie krwi, ułatwia przyswajanie niehemowego żelaza z pokarmu, hamuje peroksydację lipidów błon komórkowych i lipoprotein osocza, głównie lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) (Padayatty i wsp., 2003), a także zapewnia prawidłową strukturę śródbłonna naczyń krwionośnych i łagodzi ich stan zapalny (Aguirre i May, 2008; Farbstein i wsp., 2010). Zmniejsza powstawanie nowotworów, zwłaszcza raka żołądka, hamując przekształcanie azotanów w rakotwórcze N-nitrozoaminy (Padayatty i wsp., 2003). Zapotrzebowanie dobowe na witaminę C u dorosłego człowieka wynosi 60-75 mg, u dzieci 45-50 mg, a u niemowląt 25-40 mg (Podlewski i Chwalibogowska-Podlewska, 2010). Źródłem witaminy C dla człowieka są produkty roślinne, głównie owoce i warzywa (tabela 218) lub preparaty z jej syntetyczną postacią. Pomiędzy naturalną a syntetyczną witaminą C

nie ma różnic w strukturze chemicznej, jednak badania wykazały, że kwas askorbinowy pochodzący z naturalnych produktów, lepiej się wchłania i dłużej utrzymuje terapeutyczne stężenie w organizmie. Spowodowane jest to obecnością innych związków w roślinie, np. flawonoidów, które zwiększają przyswajanie naturalnej witaminy C w błonie śluzowej żołądka i jelita cienkiego, jak również zmniejszają jej przekształcanie się w kwas dehydroaskorbinowy, ze względu na ich właściwości antyoksydacyjne (Vinson i Bose, 1983; Vinson i Bose, 1988). Długotrwały niedobór tej witaminy w organizmie człowieka wywołuje chorobę zwaną skorbutem, który objawia się obrzękami i krwawieniami z dziąseł, wolniejszym gojeniem się ran, kruchością naczyń włosowatych, zwiększoną łamliwością kości, bólami mięśni i stawów, zmęczeniem (Podlewski i Chwalibogowska-Podlewska, 2010).

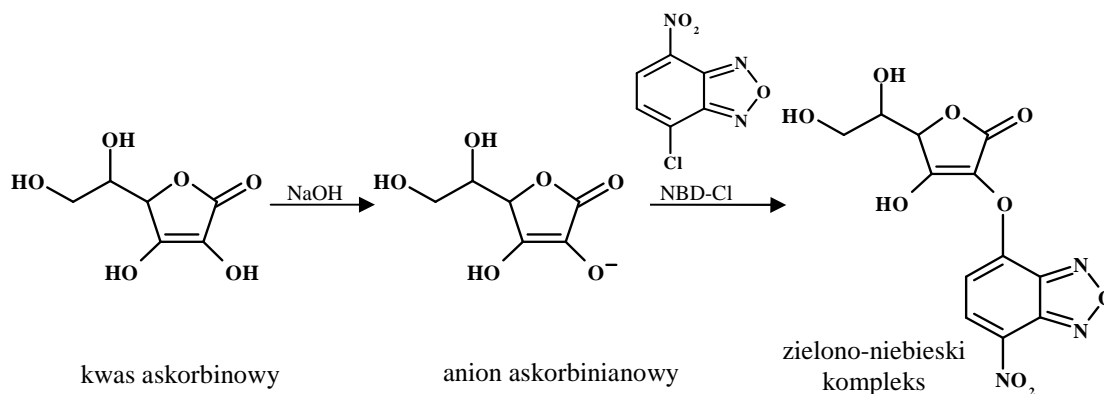
Tabela 218. Zawartość witaminy C w warzywach i owocach

Produkt	Zawartość (mg/100 g)	Piśmiennictwo
owoc róży	615-943	Ercisli ,2007; Rosu i wsp., 2011
porzeczki czarne	182	Maćkowiak i Torliński, 2007
papryka	139	Maćkowiak i Torliński, 2007
owoc bzu czarnego	117	Jabłońska-Ryś i wsp., 2009
poziomka	81	Jabłońska-Ryś i wsp., 2009
owoc jarzębiny	68	Jabłońska-Ryś i wsp., 2009
pomarańcze	52-78	Vanderslice i Higgs, 1991
kapusta czerwona	54	Maćkowiak i Torliński, 2007
kiwi	47	Esch i wsp., 2010
porzeczki czerwone	46	Maćkowiak i Torliński, 2007
grejfruty	40	Maćkowiak i Torliński, 2007
cytryna	26	Esch i wsp., 2010
szpinak	25-70	Vanderslice i Higgs, 1991
pomidory	23	Maćkowiak i Torliński, 2007
banany	12-19	Vanderslice i Higgs 1991

Wyciągi do badań przygotowano ze świeżego ziela żółtlicy drobnokwiatowej (rozd. 7.3.3.2.), ponieważ w czasie suszenia i przechowywania surowca, mogą występować duże straty witaminy C, spowodowane jej wrażliwością na działanie światła, tlenu, wysokiej temperatury i jonów metali przejściowych (głównie żelaza i miedzi) (Wilson i wsp., 1995). Oznaczenie zawartości kwasu L(+)-askorbinowego wykonano przy użyciu metody kolorymetrycznej wg Abdelmageed i wsp. (1995). Mechanizm reakcji polega na przeprowadzeniu kwasu askorbinowego w anion askorbinianowy za pomocą

silnej zasady, a następnie utworzeniu barwnego (zielono-niebieskiego) kompleksu anionu z 4-chloro-7-nitrobenzofurazanem (rycina 132).

Zawartość kwasu L(+)-askorbinowego w 100 g świeżego ziela żółtlicy drobnokwiatowej wynosi $25,67 \pm 0,75$ mg (tabele 150, 151) i jest dwukrotnie wyższa od zawartości witaminy C w ziele żółtlicy owłosionej (Bautista-Cruz i wsp., 2011).



Rycina 132. Sugerowany mechanizm reakcji kwasu askorbinowego z NBD-Cl (Abdelmageed i wsp., 1995).

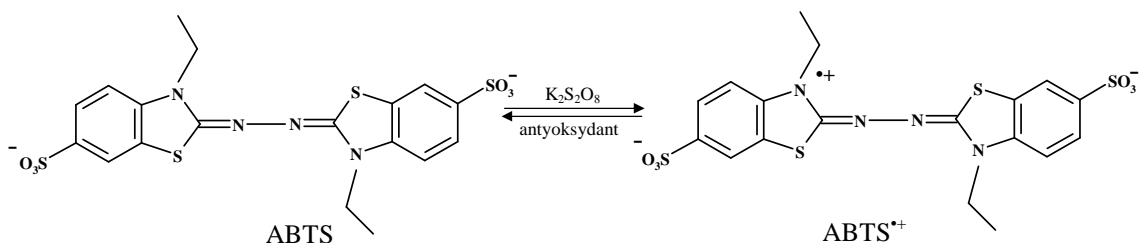
W ziele żółtlicy drobnokwiatowej oznaczono ponadto zawartość pierwiastków za pomocą emisyjnej spektrometrii atomowej (ICP-OES) (rozdz. 8.3.5.). Technika ICP-OES wykorzystuje zjawisko emisji promieniowania elektromagnetycznego o ściśle określonych dla danego pierwiastka długościach fal, zachodzącego pod wpływem wzbudzenia w plazmie wytworzonej w gazowym argonie. Metoda polega na odparowaniu rozpuszczalnika w plazmie wysokotemperaturowej i wydzieleniu w wyniku tego procesu cząstek soli, które ostatecznie są rozkładane na atomy (Szczepaniak, 2002). W ziele żółtlicy drobnokwiatowej stwierdzono obecność pierwiastków (mg/100 g suchego surowca): wapnia ($3995,98 \pm 14,40$), magnezu ($387,88 \pm 4,69$), boru ($4,61 \pm 0,37$), cynku ($4,20 \pm 0,31$), manganu ($2,90 \pm 0,31$), baru ($1,42 \pm 0,20$), miedzi ($0,87 \pm 0,06$), molibdenu ($0,38 \pm 0,02$), kadmu ($0,03 \pm 0,01$), natomiast nie stwierdzono występowania antymonu, arsenu, berylu, kobaltu, niklu, selenu, talu i wanadu. Zawartość oznaczonych metali ciężkich (głównie cynku, kadmu, miedzi) w surowcu może także wynikać z ich obecności w wysokich stężeniach w glebie i akumulacji przez roślinę. Można stwierdzić, że zawartość miedzi, manganu, cynku i magnezu była znacznie niższa w badanym surowcu, w porównaniu z danymi literaturowymi (Odhav i wsp., 2007), wyższa natomiast była zawartość wapnia.

Aktywność biologiczna

Badania aktywności biologicznej przeprowadzono z wykorzystaniem nalewki i odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (rozdz. 7.4.4.). Wyciąg metanolowo-wodny, ze względu na porównywalną zawartość badanych związków do odwaru, został wykluczony z dalszych badań. Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej przeprowadzono, wykorzystując także wyciąg heksanowy i sok z surowca (rozdz. 7.4.4.), gdyż w literaturze są badania przeprowadzane na takich wyciągach (Matu i van-Staden, 2003; Matławska i wsp., 2004).

Właściwości przeciwutleniające wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej badano 3 metodami. Dwie z nich, metoda ABTS oraz oznaczenie zdolności chelatowania jonów żelaza (II), polegały na reakcjach wyciągów z surowca z odczynnikami chemicznymi. Trzecia metoda polegała na ocenie wpływu nalewki i odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej na żywotność i funkcje biologiczne komórek drożdży, pozbawionych genu *sod1*.

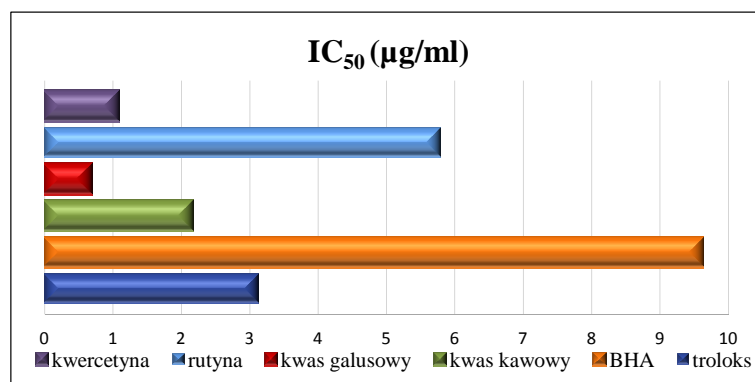
Do oznaczania zdolności zmiatania wolnych rodników, wykorzystano reakcję badanych prób z kationorodnikami $ABTS^{\bullet+}$, wytworzonymi z soli amonowej kwasu 2,2'-azino-bis(3-etylobenzo-tiazolino-6-sulfonowego) przez utlenienie nadsiarczanem potasu (rozdz. 8.4.1.1.). Utlenienie związku ABTS następowało natychmiast, natomiast rodniki $ABTS^{\bullet+}$ maksymalną wartość absorbancji i pełną stabilność uzyskiwały po upływie 6-48 godzin, stąd roztwór kationorodników wykorzystywany do oznaczeń sporządzano z 24-godzinnym wyprzedzeniem (Siddhuraju i Becker, 2007). Badanie aktywności przeciwutleniającej wykonano wg zmodyfikowanej metody Re i wsp. (1999). Jest to metoda kolorymetryczna, polegająca na redukcji kationorodników $ABTS^{\bullet+}$ do ABTS po dodaniu przeciwutleniacza (rycina 133).



Rycina 133. Zasada metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS.

Spadek intensywności zabarwienia roztworu kationorodników z niebiesko-zielonej na jasnozielony jest proporcjonalny do stężenia antyoksydantu i jego aktywności. Wykazano, że podczas reakcji $ABTS^{\bullet+}$ z flawonoidami powstają produkty o silniejszych

właściwościach antyoksydacyjnych i szybciej reagujące z rodnikiem niż związki macierzyste. Aktywność antyoksydacyjna jest w tej sytuacji sumą aktywności substancji badanej i produktów jej reakcji z rodnikiem (Arts i wsp., 2004). Stopień redukcji rodników $ABTS^{*+}$ mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=734$ nm. W dostępnej literaturze zalecane są różne czasy inkubacji próby z roztworem kationorodników $ABTS^{*+}$ (Miliauskas i wsp., 2004; Razali i wsp., 2008; Joseph i wsp., 2011). Pomiar zmiany absorbancji badanych prób w czasie (tabele 154, 155, ryciny 95, 96) wykazał, iż czas potrzebny do osiągnięcia stałej wartości antyoksydacyjnej badanych wyciągów i substancji referencyjnych wynosił 10 min. W oznaczeniu zdolności zmiatania kationorodników jako substancji referencyjnych użyto związki o udowodnionej aktywności antyoksydacyjnej (Nenadis i wsp., 2007; Seddik i wsp., 2010); flawonoidy: kwercetynę (w stężeniu 0,48-2,38 $\mu\text{g/ml}$) i rutynę (w stężeniu 2,38-11,90 $\mu\text{g/ml}$), kwasy fenolowe: galusowy (w stężeniu 0,24-1,19 $\mu\text{g/ml}$) i kawowy (w stężeniu 0,48-3,81 $\mu\text{g/ml}$), BHA (w stężeniu 1,19-11,90 $\mu\text{g/ml}$) oraz troloks (w stężeniu 0,48-4,76 $\mu\text{g/ml}$). Na podstawie uzyskanych wartości absorbancji wykreślono krzywe aktywności antyoksydacyjnej substancji referencyjnych (ryciny 97, 98) i badanych wyciągów (rycina 99), wyrażone jako zdolność do dezaktywacji kationorodników $ABTS^{*+}$ w zależności od stężenia. Krzywe te pozwoliły na wyznaczenie współczynnika IC_{50} , określającego stężenie antyoksydantu, jakie powoduje dezaktywację 50% kationorodników $ABTS^{*+}$, użytych w warunkach doświadczenia. Wartości IC_{50} były obliczane metodą interpolacji liniowej, pomiędzy wartościami powyżej i poniżej 50% aktywności. Im wartość IC_{50} dla danego związku jest niższa, tym jego aktywność antyoksydacyjna jest wyższa. Wartości IC_{50} wskazują na zróżnicowaną aktywność antyoksydacyjną badanych wyciągów i substancji referencyjnych (rycina 134).



Rycina 134. Wartości IC_{50} substancji referencyjnych.

Najsilniejszymi antyoksydantami okazały się kwas galusowy ($IC_{50}=0,68 \mu\text{g/ml}$) i kwercetyna ($IC_{50}=1,09 \mu\text{g/ml}$), a najslabszymi rutyna ($IC_{50}=5,79 \mu\text{g/ml}$) i BHA ($IC_{50}=9,63 \mu\text{g/ml}$). Aktywność antyoksydacyjna kwasu kawowego ($IC_{50}=2,17 \mu\text{g/ml}$) była dwukrotnie niższa niż dla kwercetyny, a troloksu ($IC_{50}=3,14 \mu\text{g/ml}$) trzykrotnie wyższa od aktywności BHA. Odwar ($IC_{50}=47,21 \mu\text{g/ml}$) posiadał silniejsze właściwości antyoksydacyjne niż nalewka z ziela żółtlicy drobnokwiatowej ($IC_{50}=66,38 \mu\text{g/ml}$), jednak słabsze od użytych w badaniu substancji referencyjnych (tabela 219).

Tabela 219. Porównanie aktywności antyoksydacyjnej nalewki i odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej z aktywnością użytych w badaniu substancji referencyjnych

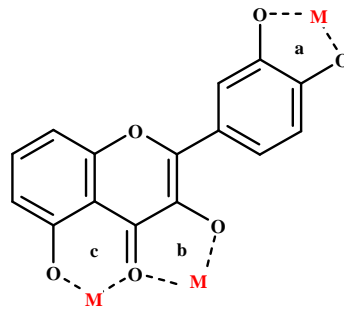
Substancja referencyjna	Aktywność antyoksydacyjna (ABTS)	
	nalewka	odwar
kwercetyna	61 razy słabsza	43 razy słabsza
rutyna	11 razy słabsza	8 razy słabsza
kwas galusowy	98 razy słabsza	70 razy słabsza
kwas kawowy	31 razy słabsza	22 razy słabsza
BHA	7 razy słabsza	5 razy słabsza
troloks	21 razy słabsza	15 razy słabsza

Wykreślono również liniowe zależności pomiędzy stopniem zmiatania rodnika $ABTS^{\bullet+}$ (%) a zawartością polifenoli w badanych wyciągach (rycina 100). Wysoki współczynnik determinacji ($r^2=0,9931$) wskazuje, iż właściwości antyoksydacyjne ziela żółtlicy drobnokwiatowej są silnie skorelowane z obecnością związków polifenolowych. Słabsza aktywność nalewki może wynikać z mniejszej zawartości związków polifenolowych w porównaniu z odwarem.

Antyoksydacyjne właściwości związków polifenolowych mogą również wynikać z ich zdolności do chelatowania jonów metali. Wykazano, że flawonoidy oprócz hamowania powstawania reaktywnych form tlenu, mogą również tworzyć trwałe kompleksy z metalami przejściowymi (głównie żelaza i miedzi), zapobiegając tym samym powstawaniu wolnych rodników w reakcji Fentona i Habera-Weissa, mogących wpływać destrukcyjnie na wiele struktur m.in. białka, lipidy i kwasy nukleinowe. Szczególnie niebezpieczny jest rodnik hydroksylowy ($\bullet\text{OH}$), który reagując z lipidami, powoduje ich peroksydację.

Zdolność chelatowania jonów metali przez związki flawonoidowe zależy od ich struktury chemicznej. Miejscami wiązania metali do cząsteczek flawonoidów są *orto*-dihydroksylowe grupy w pozycji C-3' i C-4' w pierścieniu B (a) oraz grupa 4-keto

i 3-hydroksy w pierścieniu C (b) lub 4-keto i 5-hydroksy w pierścieniu C i A (c) (rycina 135). Podwójne wiązanie pomiędzy C-2 a C-3 zwiększa zdolność do chelatowania jonów Fe^{2+} (van Acker i wsp., 1998; Leopoldini i wsp., 2006; Mladenka i wsp., 2010).



Rycina 135. Miejsca wiązania jonów metali do cząsteczek flawonoidów.

Zdolność do chelatowania jonów metali przez kwasy fenolowe uzależniona jest od liczby grup hydroksylowych. Kwasy fenolowe posiadające ugrupowanie pirogallolowe (trihydroksylowe) są silniejszymi chelatorami niż kwasy fenolowe z ugrupowaniem katecholowym (dihydroksylowym). Dodatkowo pochodne kwasu cynamonowego (kwas chlorogenowy, kawowy) posiadają większą zdolność chelatowania jonów metali niż pochodne kwasu hydroksybenzoesowego (kwas galusowy, protokatechowy) (Moran i wsp., 1997; Andjelković i wsp., 2006). Aktywność chelatująca badanych kwasów fenolowych przedstawia się następująco: kwas chlorogenowy > kawowy > galusowy > protokatechowy (Andjelković i wsp., 2006).

Zdolność chelatowania jonów żelaza (II) przez badane wyciągi oznaczono spektrofotometrycznie wg zmodyfikowanej metody Dinis i wsp. (1994) (rozdz. 8.4.1.2.). Jest to metoda kolorymetryczna, polegająca na pomiarze ilości jonów Fe^{2+} niezwiązanych przez wyciągi, a wychwytywane przez związek, posiadający silne właściwości wiązania jonów Fe^{2+} - ferrozynę. Wartości absorbancji barwnego kompleksu Fe^{2+} -ferrozyna, mierzone przy długości fali $\lambda = 562$ nm, odzwierciedlały zdolność chelatowania jonów Fe^{2+} przez badane wyciągi. Im mniejsza absorbancja kompleksu, tym większa zdolność chelatowania jonów Fe^{2+} , a tym samym większe właściwości antyoksydacyjne wyciągów. Jako substancji referencyjnych użyto związki o udowodnionych aktywnościach chelatujących: kwercetynę, kwas galusowy i kwas chlorogenowy (w stężeniach 0,02-4,55 mg/ml) oraz wersenian disodowy (w stężeniach 0,338-13,636 $\mu\text{g/ml}$). Kwercetyna, kwas galusowy i chlorogenowy należą do związków fenolowych, obecnych w roślinach, natomiast wersenian disodowy jest syntetycznym lekiem, stosowanym dożylnie w leczeniu hiperkalcemii oraz w zaburzeniach rytmu

serca, spowodowanych glikozydami naparstnicy (Podlewski i Chwalibogowska-Podlewska 2010). Czas inkubacji prób (nalewka, odwar, substancje referencyjne) z roztworem wodnym ferrozyny wyznaczono doświadczalnie, mierząc zmiany absorbancji w czasie. Okazało się, iż czas potrzebny do osiągnięcia stałej wartości absorbancji dla kwasu galusowego, kwasu chlorogenowego i wersenianu disodowego wynosił 10 min, podczas gdy dla kwercetyny, nalewki i odwaru był trzykrotnie dłuższy i wynosił 30 min. Z uzyskanych wartości pomiarów absorbancji wykreślono krzywe zależności aktywności chelatującej wyciągów (rycina 103) i substancji referencyjnych (ryciny 101, 102) w zależności od ich stężenia. Na podstawie uzyskanych krzywych wyznaczono wartości IC_{20} lub IC_{50} , analogicznie jak w przypadku oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS. Konieczność wyznaczenia wartości IC_{20} była spowodowana tym, że użyte kwasy fenolowe (kwas galusowy i chlorogenowy) jako substancje referencyjne nie osiągnęły wartości 50% aktywności w zakresie badanych stężeń. Wyniki wskazują, iż najsilniejszym związkiem chelatującym był wersenian disodowy, którego wartość IC_{50} wynosiła 9,67 $\mu\text{g/ml}$. Najłabsze właściwości kompleksowania jonów żelaza miał kwas galusowy ($IC_{20}=2,71$ mg/ml) i kwas chlorogenowy ($IC_{20}=1,66$ mg/ml). Siła chelatowania nalewki ($IC_{50}=1,55$ mg/ml) była porównywalna z aktywnością kwercetyny ($IC_{50}=1,64$ mg/ml). Odwar działał 15 razy silniej niż nalewka ($IC_{50}=0,11$ mg/ml). Porównanie aktywności chelatującej wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej z aktywnością referencyjnych związków polifenolowych przedstawiono w tabeli 220.

Tabela 220. Porównanie aktywności chelatującej nalewki i odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej z aktywnością referencyjnych związków polifenolowych

Substancja referencyjna	Zdolność chelatowania jonów żelaza (II)	
	nalewka	odwar
kwercetyna	porównywalna	15 razy silniejsza
kwas galusowy	10 razy silniejsza	68 razy silniejsza
kwas chlorogenowy	6 razy silniejsza	41 razy silniejsza

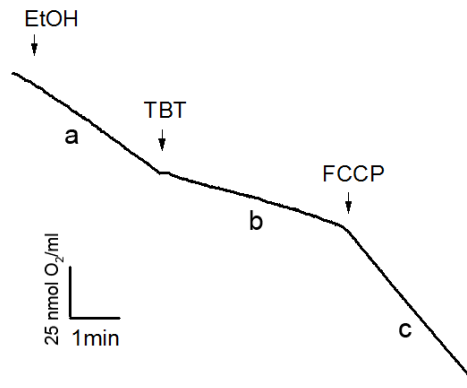
Określono również stopień korelacji zdolności chelatowania jonów Fe^{2+} przez badane wyciągi w zależności od zawartości w nich związków polifenolowych (rycina 104). Niska wartość współczynnika determinacji ($r^2=0,1561$) świadczy, że aktywność chelatująca wyciągów jest zależna nie tylko od obecności w nich związków polifenolowych, ale także od innych, łatwo ekstrahowalnych wodą w wysokiej temperaturze związków.

Badania aktywności antyoksydacyjnej wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej przeprowadzono także z wykorzystaniem drożdży, pozbawionych genu *sod1* (mutant delecyjny *Saccharomyces cerevisiae* szczep DSCD1-1C (MAT α *leu1 arg4 sod1:natMX*) (rozdz. 8.4.1.3.). Gen *sod1* zawiera sekwencję dla dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1), głównego cytoplazmatycznego białka, katalizującego reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i tlenu zgodnie z równaniem (Liochev i Fridovich, 2007): $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Badania wpływu związków na żywotność drożdży, pozbawionych genu *sod1*, dotyczyły jedynie syntetycznych substancji, o udowodnionej aktywności antyoksydacyjnej (Żyracka i wsp., 2005). Przeprowadzone oznaczenia, z wykorzystaniem wyciągu roślinnego, będącego źródłem naturalnych antyoksydantów, wykonano po raz pierwszy (równolegle przeprowadzono badania dla wyciągu z ziela dymnicy). W badaniach oceniano wpływ nalewki i odwaru z surowca na żywotność komórek drożdży, ochronę przed uszkodzeniami białek, jak również badano proces oddychania wewnątrzkomórkowego mutantu *S. cerevisiae*.

Testy przeżywalności polegały na ocenie wpływu substancji referencyjnych (rutyna, kwas galusowy, troloks) i badanych wyciągów na żywotność drożdży, pozbawionych genu *sod1*. Wartość uzyskanego efektu cytoprotekcyjnego określano na podstawie wydajności tworzenia kolonii (stosunek pomiaru densytometrycznego próby modyfikowanej wobec kontroli - niemodyfikowanej hodowli mutantu) oraz liczby jednostek tworzących kolonie (CFU), dla 1000-krotnych rozcieńczeń hodowli. W badaniu obliczono również przeżywalność komórek szczepu dzikiego wobec mutantu (tabela 209, ryciny 105-109). Wyniki badań wskazują, że wyciągi z ziela żółtlicy drobnokwiatowej nie wykazują efektu cytotoksycznego na hodowle drożdży w pełnym zakresie badanych stężeń, a wręcz przeciwnie, liczba i wydajność tworzonych kolonii była wprost proporcjonalna do ich stężenia. Substancje referencyjne i nalewka w stężeniach 320 mg/ml i 400 mg/ml najsilniej zwiększały liczbę kolonii mutantu (wzrost około 2,5-krotny w stosunku do próby kontrolnej). Nieco mniejszą przeżywalność komórek drożdży obserwowano w przypadku hodowli modyfikowanej za pomocą odwaru, który w analogicznych stężeniach jak nalewka zwiększał liczbę kolonii około 2-krotnie. Natomiast wydajność tworzenia kolonii przez mutantu była najsilniejsza w obecności nalewki w stężeniu 400 mg/ml i była nieznacznie słabsza od aktywności wzorcowego troloksu. Odwar charakteryzował się słabszym wpływem na wydajność tworzenia kolonii.

Oznaczono także wpływ wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej na poziom karbonylacji białek. Powstające RFT rozpadają się lub wchodzą w reakcje ze składnikami komórek, uszkadzając kwasy nukleinowe, białka oraz lipidy, wpływając negatywnie na funkcje życiowe komórki (Bartosz, 2009). Białka są jednym z głównych celów szkodliwego działania wolnych rodników, takich jak $O_2^{\cdot-}$ i $\cdot OH$, które rozrywają wiązania dwusiarczkowe, powodując denaturację niektórych białek. RFT mogą także specyficznie modyfikować reszty aminokwasowe, a spośród wszystkich aminokwasów najbardziej podatnymi na utlenianie są cysteina, metionina, histydyna, tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina (Lushchak, 2006). Utlenianie białek powoduje przyłączenie grup karbonylowych do niektórych reszt aminokwasowych, do których należą lizyna, arginina, prolina i treonina (Levine, 1983; Climent i wsp., 1989; Farber i Levine, 1986; Stadtman, 1993). Uszkodzenia oksydacyjne białek mogą w konsekwencji prowadzić do zmian w ich funkcjonowaniu, np. zmieniając aktywność enzymatyczną lub prowadzić do ich degradacji. U mutantów pozbawionych SOD1 *S. cerevisiae*, znajdujących się zarówno w logarytmicznej fazie wzrostu, jak też w fazie stacjonarnej stwierdzono podwyższony stopień utlenienia kilkunastu białek, w tym bardzo wysoki stopień utlenienia enolazy, enzymu biorącego udział w szlaku glikolitycznym (O'Brien i wsp., 2004). Oznacza to, że metabolizm energetyczny tych mutantów może być zakłócony, co prowadzić może do obserwowanych zmian fenotypu. Uzyskane wyniki wskazują, że wraz ze wzrostem stężenia badanych wyciągów, zmniejszeniu ulegał stopień karbonylacji białek (rycina 110). Zredukowanie ilości uszkodzonych białek ma istotny wpływ na poprawę funkcji biologicznych komórki, co daje potwierdzenie w testach przeżywalności. Korzystny efekt najprawdopodobniej związany jest z zawartością polifenoli, o działaniu antyoksydacyjnym (Balasundram i wsp. 2006).

Pomiar zużycia tlenu przez komórki drożdży umożliwia badanie procesu oddychania wewnątrzkomórkowego drożdży z hodowli niemodyfikowanej i modyfikowanej, poddanej działaniu wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej. Wykorzystanie inhibitora syntazy ATP (tributylocyna) oraz protonoforu FCCP, pozwalało na szerszą ocenę funkcji mitochondriów. Oprócz pomiaru endogennego (fizjologicznego) stanu oddechowego, mierzono tempo oddychania niezwiązanego z fosforylacją oksydacyjną, indukowanego tributyllocyną (4. stan oddechowy), wynikającego z przecieku protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Natomiast po podaniu rozpręgacza FCCP, zwiększającego przewodnictwo protonów, wyznaczano maksymalne tempo oddychania (oddechowy stan U) (rycina 136).



Rycina 136. Przykładowy pomiar oksygraficzny, gdzie a – tempo oddychania endogennego wspartego etanolem (EtOH), będącego źródłem substratu oddechowego dla mitochondrialnego łańcucha oddechowego; b – stan 4 indukowany tributyllocyną (TBT); c – stan U indukowany FCCP (rycina zaproponowana przez mgr Andonisa Karachitos).

Wyznaczenie tych parametrów umożliwia ocenę sprzężenia energetycznego komórek drożdży, wyrażonego stosunkiem stanu U do stanu 4. W mitochondriach reaktywne formy tlenu są produkowane głównie przez kompleks I, a także kompleks III łańcucha oddechowego (Lambert i Brand, 2009; Murphy, 2009). Produkcja wolnych rodników jest wprost proporcjonalna do wartości siły protonomotorycznej (Korshunov i wsp., 1997). Z drugiej strony, siła protonomotoryczna napędza syntezę ATP w mitochondriach, niezbędną do życia komórki. W związku z tym wartość siły protonomotorycznej jest ściśle związana ze statusem energetycznym komórki. Produkcja wolnych rodników nie jest liniową funkcją szybkości oddychania, a częściowe rozpraszenie siły protonomotorycznej (np. z użyciem rozprzegaczy), powoduje duży spadek produkcji RFT (Miwa i Brand, 2003).

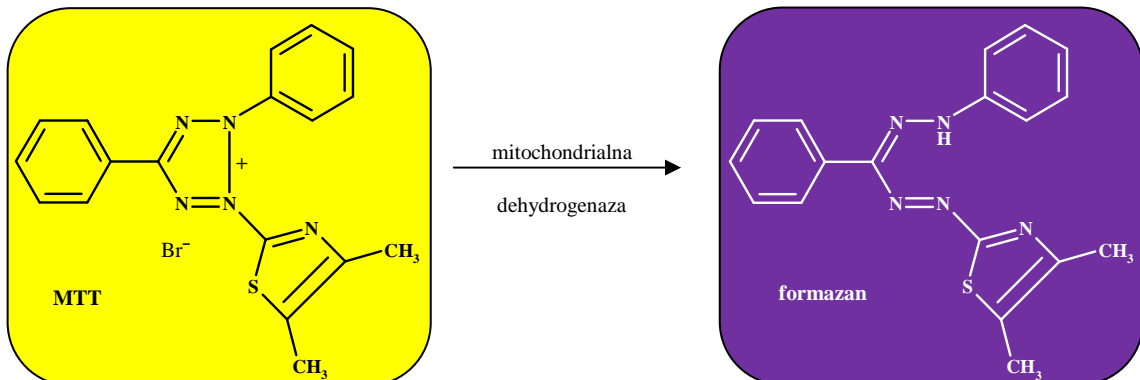
Otrzymane wyniki wykazały, że sprzężenie energetyczne komórek z hodowli modyfikowanej mutanta Δ SOD1 (pozbawionego SOD1) drożdży poddanych działaniu wyciągów uległo znacznemu wzrostowi w porównaniu do hodowli niemodyfikowanej, jak również w porównaniu do szczepu dzikiego (tabela 210). Wzrost sprzężenia energetycznego jest zależny od wzrostu siły protonomotorycznej, a co za tym idzie, związany z poprawą statusu energetycznego komórek. Hipotetyczny wzrost produkcji RFT w zaistniałym przypadku nie wykazał negatywnego wpływu na funkcje biologiczne komórki, czego potwierdzeniem są przeprowadzone testy przeżywalności.

Wyniki badań hodowli drożdży modyfikowanych wyciągami z ziela żóltlicy drobnokwiatowej potwierdzają jej właściwości antyoksydacyjne, oznaczone wcześniej metodami chemicznymi.

Podjęcie badań aktywności przeciwzapalnej nalewki z ziela żółtlicy drobnokwiatowej wynikało z doniesień literaturowych o działaniu przeciwzapalnym wyciągów metanолоwych z surowca, w których udowodniono ich wpływ na COX-1 i 5-LOX (Matu i van Staden, 2003; Akula i Odhav, 2008). Hamowanie aktywności tych enzymów może być związane z obecnością flawonoidów w surowcu. Mechanizm działania przeciwzapalnego flawonoidów jest złożony i zależy od struktury chemicznej związków. Flawonoidy wykazują zdolność hamowania fosfolipazy A₂, biorącej udział w uwalnianiu kwasu arachidonowego (AA) z fosfolipidów błon komórkowych, jak również enzymów, odpowiedzialnych za jego przemiany: lipooksygenazy (LOX) oraz cyklooksygenazy (COX) (Odontuya i wsp., 2005; García-Lafuente i wsp., 2009). Cyklooksygenaza występuje w postaci trzech izoenzymów: konstytutywnej (COX-1), indukowanej (COX-2) oraz zlokalizowanej w ośrodkowym układzie nerwowym COX-3. Obecnie uważa się, że COX-3 jest odmienną formą COX-1, hamowaną min. przez paracetamol (Chandrasekharan i wsp., 2002). Efektem blokowania enzymów (głównie 5-LOX i COX-2) jest zmniejszenie syntezy eikozanoidów (leukotrienów, tromboksanów oraz prostaglandyn), zaliczanych do mediatorów zapalenia. W wyniku tego następuje zahamowanie migracji leukocytów, regulacja napięcia ścian naczyń włosowatych i zmniejszenie stanu zapalnego. Badania wykazały, że flawonoidy mają także zdolność blokowania produkcji tlenu azotu (NO) i ekspresji indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) (González-Gallego i wsp., 2007; Hämäläinen i wsp., 2007; García-Lafuente i wsp., 2009). Enzym ten może być wytwarzany niemal w każdej komórce po pobudzeniu jej odpowiednim bodźcem, np. składnikiem ściany komórkowej bakterii lub cytokinami. Efekt przeciwzapalny obserwowany jest również na skutek hamowania przez flawonoidy aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB i indukcji cytokin prozapalnych, głównie TNFα, IL-1 i IL-6 (González-Gallego i wsp., 2007; Hämäläinen i wsp., 2007; García-Lafuente i wsp., 2009; Tuñón i wsp., 2009; Serafini i wsp., 2010).

Celem badań była ocena wpływu nalewki na poziom białek COX-2 i iNOS oraz poziom PGE₂ (rozdz. 8.4.2.). W pierwszym etapie badań określano cytotoksyczność nalewki i odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej wobec komórek HaCaT przy użyciu metody kolorymetrycznej MTT. Metoda MTT oparta jest na założeniu, że do przeprowadzenia obserwowanej w niej reakcji, zdolne są tylko żywe komórki. W wyniku działania obecnej w komórkach mitochondrialnej dehydrogenazy, żółta, rozpuszczalna w wodzie

sól błękitu tetrazolowego (MTT) przekształcana jest do purpurowych, nierozpuszczalnych w wodzie kryształów formazanu (rycina 137).



Rycina 137. Konwersja soli błękitu tetrazolowego (MTT) do formazanu.

Po zmianie środowiska i rozpuszczeniu kryształów w izopropanolu, powstaje barwny roztwór. Mierzona spektrofotometrycznie intensywność zabarwienia roztworu jest wprost proporcjonalna do ilości powstałego produktu. Z pomiarów absorbancji obliczono procent przeżywalności komórek w obecności wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej w stosunku do komórek kontrolnych. Test MTT ma jednak pewne ograniczenia w przypadku badania wyciągów roślinnych. Badania dowiodły, że aglikony flawonoidowe (kwercetyna, kemferol, luteolina) posiadają silne właściwości redukujące MTT, co może być przyczyną błędnej interpretacji wyników (Peng i wsp., 2005). Uzyskane wyniki testu MTT wskazują, że nalewka i odwar w badanym zakresie stężeń nie działa cytotoksycznie na komórki HaCaT, gdyż nie została osiągnięta wartość IC_{50} (stężenie zmniejszające przeżycie komórek o 50%) w stosunku do próby kontrolnej (tabela 211, rycina 111).

W drugim etapie oceniano wpływ nalewki (odwaru nie badano) z ziela żółtlicy drobnokwiatowej na poziom białek COX-2, iNOS metodą Western blot, z zastosowaniem specyficznych przeciwciał oraz poziom PGE_2 metodą ELISA. Badania wykonano z użyciem komórek HaCaT, aktywowanych prozapalną cytokiną TNF α . W celu przeprowadzenia badań komórki HaCaT inkubowano z nalewką, a następnie poddano je lizie przy zastosowaniu buforu RIPA, który zawiera dodatek detergentów oraz inhibitorów proteaz, a także soli sodowej EDTA i ortowanadynianu (V) sodu. Działanie buforu sprowadza się do lizy błon komórkowych, rozpuszczenia białek oraz inaktywacji proteaz, kinaz i fosfataz. Uzyskane lizaty białkowe poddano analizie z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, skierowanych przeciwko ludzkiemu białku COX-2 oraz iNOS. Zdenaturowane białka rozdzielano elektroforetycznie na

podstawie ich mas cząsteczkowych za pomocą żelu poliakryloamidowego (SDS-PAGE), a następnie dokonano elektrotransferu białek z żelu na membranę PVDF. Obecność oznaczanych białek wykrywano przy użyciu specyficznych wobec nich przeciwciał. Miejsca, które nie związały białek na błonie przed dodaniem przeciwciał, zostały zablokowane za pomocą roztworu mleka odtłuszczonego. Związane białka z przeciwciałami pierwszorzędowymi wykrywano za pomocą przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z fosfatazą zasadową, która umożliwia barwną detekcję białek. Ocena poziomu białek dokonano na podstawie pomiarów densytometrycznych prążków uzyskanych na błonie.

Oznaczenie poziomu PGE₂ wykonano w supernatancie z hodowli komórek HaCaT, za pomocą zestawu Prostaglandin E₂ Express EIA Kit firmy Cayman Chemical, zgodnie z zaleceniami producenta (www.caymanchem.com). Oznaczenie polegało na konkurencyjnym wiązaniu zawartej w supernatancie PGE₂ oraz dodanej do każdej próby PGE₂ skoniugowanej z acetylocholinoesterazą (AChE) do poliklonalnych przeciwciał immobilizowanych na płytce wielodołkowej. Po odpowiednim czasie inkubacji odpłukiwano niezwiązane odczynniki oraz przeprowadzano reakcję z tzw. odczynnikiem Ellmana, zawierającym substrat dla AChE. Produkt reakcji enzymatycznej AChE wykazuje silną absorbancję przy 410 nm, która jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości PGE₂ w badanych próbach.

Nalewka z ziela żóttlicy drobnokwiatowej w zakresie badanych stężeń wykazała silną zdolność hamowania poziomu białkowego COX-2 i iNOS (tabela 212, ryciny 112-114), co wynika z zaobserwowanego obniżenia poziomu białka o odpowiednio 50 i 25% w stosunku do grupy kontrolnej, stymulowanej TNF α , przy najwyższym z zastosowanych stężeń nalewki (1000 μ g/ml). Wynik ten może sugerować oddziaływanie związków czynnych, obecnych w wyciągu na badane białka na poziomie transkrypcyjnym. Działanie takie zostało potwierdzone w innych badaniach, wskazujących na oddziaływanie flawonoidów na czynnik transkrypcyjny NF- κ B, odpowiedzialny za kontrolę transkrypcyjną genów COX-2 i iNOS (García-Lafuente i wsp., 2009). Jednocześnie zaobserwowano zmniejszenie poziomu produkcji czynnika prozapalnego, prostaglandyny E₂ (PGE₂) o około 60% w porównaniu z komórkami stymulowanymi TNF α , już w przypadku najniższego z zastosowanych stężeń, 30 μ g/ml (tabela 213, rycina 115). Podwyższenie stężenia wyciągu zwiększało efekt oddziaływania na poziom białkowy COX-2, jednak nie korelowało z silniejszym hamowaniem poziomu PGE₂. Brak takiej korelacji może wynikać z ograniczeń

zastosowanego modelu badań, ponieważ synteza PGE₂ wymaga dłuższego czasu niż oddziaływanie na poziom białka enzymatycznego cyklooksigenazy. Wykazano np. że w wyniku stymulacji nefrocytów estrami forbolu, zwiększony poziom PGE₂ zaobserwowano znacznie później, niż zwiększenie syntezy mRNA cyklooksigenazy i podwyższenie uwalniania arachidonianu, który jest substratem dla COX-2 (Yokota, 1991). Wobec tego wydaje się konieczne przeprowadzenie dłuższych inkubacji z badanymi wyciągami oraz TNF α , aby dokonać oceny wpływu nalewki na poziom PGE₂, i co za tym idzie na aktywność COX. Z drugiej strony zaobserwowany efekt zmniejszania poziomu PGE₂ przez nalewkę z ziela z żółtlicy drobnokwiatowej tylko w niskich stężeniach może być związany z możliwym działaniem pro-oksydacyjnym obecnych w wyciągu związków flawonoidowych w wyższych stężeniach. Cotelle (2001) wskazuje na możliwość zachodzenia w komórkach w obecności metali przejściowych procesów autooksydacyjnych flawonoidów, co prowadzi do produkcji związków o charakterze reaktywnych form tlenu i działaniu pro-oksydacyjnym. Efektowi pro-oksydacyjnemu sprzyja zwiększona liczba grup hydroksylowych w cząsteczce flawonoidów, ale jest on także uzależniony od użytego stężenia związku, i tak związki o charakterze antyoksydantów w wyższych dawkach mogą mieć działanie pro-oksydacyjne (Halliwell, 2008; Procházková i wsp., 2011). Z kolei podwyższony poziom związków o charakterze reaktywnych form tlenu sprzyja stymulacji procesów zapalnych (Azad i wsp., 2008).

Reasumując, dla zrozumienia pełnego mechanizmu działania przeciwzapalnego ziela żółtlicy drobnokwiatowej wydaje się konieczne przeprowadzenie dodatkowych badań, które mogłyby obejmować m.in. oddziaływanie na aktywność wyizolowanej cyklooksigenazy COX-1 i COX-2 *in vitro* oraz działanie na poziom PGE₂ przy zastosowaniu różnych stężeń surowca i czasów ekspozycji.

Ze względu na zastosowanie w medycynie ludowej odwarów z ziela z żółtlicy drobnokwiatowej do przemywania ran oraz w chorobach skóry (liszaj, egzema), jak również publikacje, prezentujące wyniki badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej surowca wobec trzech szczepów bakterii: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* i *Bacillus subtilis*, kontynuowano badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej, z wykorzystaniem szczepów drobnoustrojów dotąd niebadanych (rozdz. 8.4.3.2.). Aktywność przeciwdrobnoustrojową wyciągów (heksanowy, nalewka, odwar) i soku z *Galinsogae herba* badano wobec wzorcowego szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC

6538 P, natomiast przy użyciu wzorcowych szczepów bakterii *Escherichia coli* PZH O26B6 i grzybów chorobotwórczych (*Candida albicans* PCM 1409 PZH, *Microsporium gypseum* K1), określono aktywność nalewki.

S. aureus (gronkowiec złocisty) jest gram-dodatnią bakterią, występującą na skórze oraz w jamie nosowo-gardłowej. Większość zakażeń wywołanych przez *S. aureus* to ropne infekcje skórne (czyraki, ropnie, liszajec), zapalenie złuszczone skóry (SSS-*scale skin syndrome*) oraz zatrucia pokarmowe, związane z produkcją toksyn. *E. coli* (pałeczka okrężnicy) jest gram-ujemną symbiotyczną bakterią, obecną w jelicie grubym. W określonych warunkach wykazuje cechy chorobotwórcze i może powodować m.in. zakażenia układu moczowego i pokarmowego. *C. albicans* należy do drożdżaków. Wywołuje zakażenia oportunistyczne (kandydozy, drożdżyce), które najczęściej dotyczą skóry, błon śluzowych lub paznokci, w rzadkich przypadkach jest to infekcja ogólnoustrojowa. *M. gypseum* należy do dermatofitów, posiadających zdolność do degradacji keratyny, dzięki czemu mogą kolonizować skórę, włosy, czy paznokcie (Zaremba i Borowski, 1997).

Aktywność wyciągów z ziela żóltlicy drobnokwiatowej określano wyznaczając najmniejsze stężenie bakteriobójcze (MBC) oraz najmniejsze stężenie hamujące rozwój (MIC) bakterii i grzybów użytych w badaniu. Wyniki podawano w mg/ml w przeliczeniu na surowiec. Jako antybiotyk referencyjny zastosowano chloramfenikol oraz amfoterycynę B (tabela 214). Sok i wyciąg heksanowy działały najslabiej (MBC>10 mg/ml, MIC=5,0 mg/ml) wobec *S. aureus*, natomiast nalewka wykazywała najsilniejszy efekt bakteriostatyczny i bakteriobójczy (MBC=MIC=5,0 mg/ml) wobec użytego w badaniu szczepu bakterii. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że nalewka działała przeciwdrobnoustrojowo w granicach stężeń od 1,0 do >10,0 mg/ml, wobec szczepów wzorcowych bakterii i grzybów chorobotwórczych: *E. coli*, *C. albicans* i *M. gypseum*. Najsilniejszą aktywność wykazywała wobec *M. gypseum* (MBC=2,5 mg/ml, MIC=1,0 mg/ml), średnią wobec *C. albicans* (MBC=7,5 mg/ml, MIC=5,0 mg/ml), a najslabszą wobec *E. coli* (MBC>10 mg/ml, MIC=10 mg/ml). Wyniki badań mikrobiologicznych przedstawiono na rycinach 117 i 118.

Za działanie przeciwdrobnoustrojowe mogą być odpowiedzialne związki polifenolowe obecne w surowcu. Na podstawie dostępnych prac naukowych wiadomo, iż związki flawonoidowe wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową, a mechanizm ich działania jest wielokierunkowy. Może on wynikać z hamowania syntezy kwasów nukleinowych, w wyniku blokowania bakteryjnej gyrazy DNA i/lub topoizomerazy IV

(Bernard i wsp., 1997; Plaper i wsp., 2003; Hossion i wsp., 2011) lub z hamowania metabolizmu komórki drobnoustroju, poprzez wpływ na syntezę ATP (Haraguchi i wsp., 1998; Chinnam i wsp., 2010). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa flawonoidów związana jest również z możliwością blokowania syntezy ściany komórkowej (Wu i wsp., 2008) lub błony komórkowej bakterii (Jeong i wsp., 2009), a także z zaburzeniem funkcji błony cytoplazmatycznej (Cushnie i Lamb, 2005). Działanie przeciwbakteryjne kwasów fenolowych jest słabo poznane. Podobnie jak flawonoidy mogą hamować gyrazę DNA bakterii, prowadząc do zablokowania replikacji DNA (Weinder-Wells i wsp., 1998) lub uszkadzać błonę cytoplazmatyczną i zwiększać utratę potasu z komórek (Lou i wsp., 2011). Dla zidentyfikowanych przez mnie związków polifenolowych, za wyjątkiem 3-*O*- β -glukuronidu kwercetyny (Panizzi i wsp. 2002), udowodniono działanie przeciwdrobnoustrojowe (tabela 221).

Tabela 221. Aktywność przeciwbakteryjna flawonoidów i kwasów fenolowych obecnych w ziele żóltlicy drobnokwiatowej

Związek	Nazwa drobnoustroju	Piśmiennictwo
kwercetagetryna	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Mezache i wsp., 2009
patulitryna	<i>A. faecalis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>C. coli</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. mutans</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. vulgaris</i>	Rhama i Madhavan, 2011
izokwercytryna astragalina	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Akroum i wsp., 2009
rutyna	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Shigella spp</i>	Salawu i wsp., 2011 Bello i wsp., 2011
kwas kawowy	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Shigella spp</i>	Salawu i wsp., 2011
kwas protokatechowy	<i>A. baumannii</i> , <i>B. cereus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i>	Pretto i wsp., 2004; Liu i wsp., 2005, Chao i Yin, 2009
kwas chlorogenowy	<i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>M. furfur</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>T. beigeli</i>	Sung i Lee 2010; Lou i wsp., 2011

Działanie antymutagenne nalewki z surowca określano przy użyciu mikrobiologicznego testu Ames'a, opartego na wykrywaniu mutacji powrotnych u bakterii *Salmonella typhimurium* (Maron i Ames, 1983). W badaniach wykorzystano histydyno-zależny szczep *S. typhimurium* ATCC TA 1535, u którego rewersja, prowadząca do powstania szczepu niezależnego od obecności histydyny, zachodzi pod wpływem substancji mutagennej. Azydek sodu użyto jako substancji mutagennej, a substancją o potencjalnym działaniu przeciwmutagennym była nalewka, rozpuszczona w DMSO w stężeniach 0,1; 1,0 i 10,0 mg/ml (rycina 116). Nalewka z ziele żóltlicy drobnokwiatowej wykazywała działanie antymutagenne w stężeniu 1,0 i 10,0 mg/ml.

Wnioski

1. Z wysuszonego zieleń *Galinsoga parviflora* Cav. wyizolowano metodą chromatografii kolumnowej i preparatywnej 7 związków flawonoidowych.
2. Strukturę związków flawonoidowych określono przy użyciu metod chemicznych (hydroliza kwasowa, analiza produktów hydrolizy) i spektralnych (UV, HPLC/UHPLC-DAD-ESI-MS, ^1H i ^{13}C NMR).
3. Obecność 3-*O*- β -glukuronidu kwercetyny, 3-*O*- β -glukopiranozydu kemferolu i 3-*O*- α -ramnopiranozylo (1 \rightarrow 6)- β -glukopiranozydu kwercetyny stwierdzono po raz pierwszy w rodzaju *Galinsoga* Ruiz & Pav., a w zieleń żółtlicy drobnokwiatowej dodatkowo obecność 7-*O*- β -glukopiranozydu patuletyny.
4. W wyciągu z zieleń żółtlicy drobnokwiatowej, za pomocą opracowanej i zwalidowanej przez mnie metody rozdziału mieszaniny 15 kwasów fenolowych UPLC-PDA, stwierdzono obecność i oznaczono zawartość 5 kwasów fenolowych. Po raz pierwszy stwierdzono obecność kwasu izowanilinowego w zieleń żółtlicy drobnokwiatowej, jak również oznaczono ilościowo kwas protokatechowy, *p*-hydroksybenzoesowy, kawowy i izowanilinowy.
5. Porównano zawartości flawonoidów, kwasów fenolowych i sumy polifenoli w różnych wyciągach z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych. Największą zawartość flawonoidów oznaczono w wyciągu z surowca (wg FP IX), podczas gdy wyciąg metanolowo-wodny i odwar charakteryzowały się wysoką zawartością kwasów fenolowych i sumy polifenoli.
6. Wyciąg z zieleń żółtlicy drobnokwiatowej posłużył do oznaczenia zawartości kwasu L-(+)-askorbinowego, który wynosił $25,67 \pm 0,75$ mg/100 g świeżego surowca. Dotychczas tylko wymieniano, że witamina C jest obecna w surowcu.
7. W wysuszonym zieleń żółtlicy drobnokwiatowej techniką ICP-OES oznaczono zawartość 9 pierwiastków, w tym 5 po raz pierwszy (Ba, B, Cd, Mn, Mo).

8. Przeprowadzono badania aktywności antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej, przeciwdrobnoustrojowej i antymutagennej różnych wyciągów.
9. Nalewka i odwar wykazywały działanie antyoksydacyjne. Odwar silniej chelatował jony żelaza (II) oraz zmiatał kationorodniki ABTS^{•+} niż nalewka. Wyniki badań aktywności antyoksydacyjnej skonfrontowano z wynikami oznaczeń zawartości polifenoli metodą FC, co pozwoliło wykazać silną korelację pomiędzy zdolnością zmiatania kationorodników ABTS^{•+} przez badane wyciągi, a zawartością w nich związków polifenolowych. Za aktywność chelatującą wyciągów odpowiedzialne są głównie inne związki, łatwo ekstrahowalne wodą. Nalewka silniej zwiększała liczbę i wydajność tworzenia kolonii przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, pozbawione genu *sod1*, niż odwar, podczas gdy wpływ obydwu wyciągów na stopień uszkodzenia białek i na zużycie tlenu przez komórki drożdży był podobny. Badania aktywności antyoksydacyjnej wyciągu roślinnego na komórkach drożdży, pozbawionych genu *sod1*, przeprowadzono po raz pierwszy (równolegle przeprowadzono analogiczne badania dla wyciągów z ziela dymnicy lekarskiej).
10. Nalewka z ziela żótlicy drobnokwiatowej wywierała wpływ na ekspresję białek COX-2 i iNOS oraz poziom PGE₂ w komórkach HaCaT aktywowanych TNF α , silnie zmniejszała poziom białkowego COX-2 i iNOS w stężeniu 1000 μ g/ml oraz poziom prozapalnej prostaglandyny PGE₂ w stężeniu 30 μ g/ml. Badania w tym kierunku podjęto po raz pierwszy.
11. Wyciągi z ziela żótlicy drobnokwiatowej wykazują średnią aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec użytych w badaniach wzorcowych szczepów bakterii i grzybów (*E. coli* PZH O26B6, *C. albicans* PCM 1409 PZH, *M. gypseum* K1). Najsilniej działała nalewka, dla której udowodniono także działanie antymutagenne (test Ames'a).
12. Wyniki badań poszerzają wiedzę na temat składu chemicznego (głównie związków flawonoidowych i kwasów fenolowych), jak również aktywności biologicznej ziela żótlicy drobnokwiatowej. Wykazana aktywność może tłumaczyć wykorzystanie ziela *Galinsoga parviflora* Cav. w medycynie ludowej w chorobach skóry.

Streszczenie

Celem pracy była analiza fitochemiczna związków polifenolowych: flawonoidów i kwasów fenolowych obecnych w ziele żóltlicy drobnokwiatowej (*Galinsogae herba*), jak również analiza ilościowa wybranych grup związków i ocena aktywności surowca, w aspekcie próby wyjaśnienia zastosowania surowca w medycynie ludowej w chorobach skóry.

W części teoretycznej przedstawiono klasyfikację taksonomiczną żóltlicy drobnokwiatowej, charakterystykę botaniczną rodzaju i gatunku *Galinsoga parviflora* Cav., a także dotychczasowy stan wiedzy, dotyczący składu chemicznego, działania i zastosowania roślin należących do rodzaju *Galinsoga* Ruiz&Pav.

W części doświadczalnej z wyciągu podstawowego z ziela żóltlicy drobnokwiatowej metodą chromatografii kolumnowej (CC) i bibułowej (PPC) przy użyciu rozpuszczalników o różnej polarności wyizolowano 7 związków flawonoidowych. Trzy z nich są 7-*O*-glukozydami flawonoli: **7-*O*- β -glukopiranozyd kwercetagetyny**, **7-*O*- β -glukopiranozyd kwercetyny** i **7-*O*- β -glukopiranozyd palutetyny**, a cztery związki okazały się 3-*O*-glikozydami: kwercetyny (**3-*O*- β -glukopiranozyd kwercetyny**, **3-*O*- β -glukuronid kwercetyny**, **3-*O*- α -ramnopiranozylo(1 \rightarrow 6)- β -glukopiranozyd kwercetyny**) i kemferolu (**3-*O*- β -glukopiranozyd kemferolu**). W badanym gatunku stwierdzono po raz pierwszy obecność 7-*O*- β -glukopiranozydu patuletyny, 3-*O*- β -glukuronidu kwercetyny, 3-*O*- β -glukopiranozydu kemferolu i 3-*O*- α -ramnopiranozylo (1 \rightarrow 6)- β -glukopiranozydu kwercetyny. Ich strukturę ustalono przy użyciu metod chemicznych (hydroliza kwasowa, analiza produktów hydrolizy) i spektralnych (UV, HPLC/UHPLC-DAD-ESI-MS, ^1H i ^{13}C NMR).

W ziele żóltlicy drobnokwiatowej metodą chromatografii cienkowarstwowej (2D-TLC) stwierdzono obecność kwasów fenolowych. Opracowano nową, gradientową metodę UPLC-PDA rozdziału mieszaniny 15 wzorcowych kwasów fenolowych, najczęściej spotykanych w świecie roślinnym, a testy walidacyjne wskazują, że jest dokładna, precyzyjna i powtarzalna. Metodę wykorzystano do oznaczania zawartości

kwasów fenolowych w wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej, który uprzednio poddano oczyszczaniu wykorzystując ekstrakcję do fazy stałej (SPE). Wyciąg z surowca zawierał 5 kwasów fenolowych ($\mu\text{g/g}$ surowca): **protokatechowy** ($20,32\pm 0,43$), **chlorogenowy** ($149,11\pm 0,86$), **p-hydroksybenzoesowy** ($10,44\pm 0,02$), **kawowy** ($12,54\pm 0,28$) i **izowanilinowy** ($6,38\pm 0,16$).

W ziele żółtlicy drobnokwiatowej oznaczono po raz pierwszy **zawartość wybranych grup związków** (flawonoidy, kwasy fenolowe, suma polifenoli, kwas L(+)-askorbinowy) z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych. Zawartość związków polifenolowych porównano w różnych wyciągach. Największą zawartość flawonoidów oznaczono w wyciągu z surowca wg FP IX ($6,42\pm 0,04$ mg QE/g surowca), natomiast kwasów fenolowych i sumy polifenoli w wyciągu metanolowo-wodnym ($30,62\pm 0,40$ mg CAE/g i $40,53\pm 0,19$ mg GAE/g surowca) i odwarze ($29,08\pm 0,91$ mg CAE/g i $38,25\pm 0,88$ mg GAE/g surowca). Zawartość kwasu L(+)-askorbinowego w 100 g świeżego ziela wynosiła $25,67\pm 0,75$ mg. Oznaczono ponadto zawartość pierwiastków (mg/100 g suchego surowca) techniką emisyjnej spektrometrii atomowej (ICP-OES): wapnia ($3995,98\pm 14,40$), magnezu ($387,88\pm 4,69$), boru ($4,61\pm 0,37$), cynku ($4,20\pm 0,31$), manganu ($2,90\pm 0,31$), baru ($1,42\pm 0,20$), miedzi ($0,87\pm 0,06$), molibdenu ($0,38\pm 0,02$), kadmu ($0,03\pm 0,01$).

Aktywność antyoksydacyjną ziela żółtlicy drobnokwiatowej badano metodami kolorymetrycznymi oraz z użyciem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, pozbawionych genu *sod1*. Metoda ABTS polegała na oznaczeniu zdolności zmiatania kationorodników ABTS^{•+} przez nalewkę i odwar. Wyniki porównano z aktywnością substancji referencyjnych o udowodnionym działaniu antyoksydacyjnym: kwasem galusowym i kawowym, kwercetyną, rutyną, trolokssem oraz z BHA. Odwar wykazywał silniejsze właściwości antyoksydacyjne niż nalewka, jednak słabsze od substancji referencyjnych użytych w badaniu. Oznaczono także zdolność chelatowania jonów żelaza (II) przez wyciągi i substancje referencyjne: Na₂EDTA, kwercetynę oraz kwas galusowy i kwas chlorogenowy. Aktywność chelatująca nalewki była porównywalna z aktywnością kwercetyny, natomiast odwar działał 15 razy silniej niż nalewka. Zdolność chelatowania jonów żelaza (II) wyciągów nie jest silnie skorelowana z zawartością polifenoli, o czym świadczy niska wartość współczynnika determinacji ($r^2=0,1561$)
Badanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej, przeprowadzone z wykorzystaniem drożdży, pozbawionych genu *sod1*, potwierdzają

właściwości przeciwutleniające surowca oznaczone metodami chemicznymi. Badania polegały na ocenie wpływu nalewki i odwaru z surowca na liczbę i wydajność tworzenia kolonii (test przeżywalności), jak również oznaczeniu poziomu karbonylacji białek i pomiaru zużycia tlenu przez komórki drożdży. Jako substancji referencyjnych użyto troloks, kwas galusowy i rutynę. Nalewka i odwar w badanym zakresie stężeń, zwiększały zarówno liczbę, jak i wydajność tworzenia kolonii, a najsilniejsze działanie wykazywała nalewka w stężeniu 400 mg/ml. Zmniejszały one także ilość uszkodzonych białek oraz zwiększały proces oddychania wewnątrzkomórkowego drożdży.

Badanie **aktywności przeciwzapalnej** polegało na ocenie wpływu nalewki z surowca na poziom białek COX-2 i iNOS (metoda Western blot) oraz poziomu prostaglandyny PGE₂ (metoda ELISA) w komórkach HaCaT, aktywowanych prozapalną cytokiną TNF α . Nalewka w stężeniu 1000 μ g/ml posiadała silną zdolność hamowania poziomu białkowego COX-2 i iNOS (odpowiednio 50 i 25%), jak również zmniejszała syntezę prozapalnej prostaglandyny PGE₂ (o około 60%) w stężeniu 30 μ g/ml.

Badano także **aktywność przeciwdrobnoustrojową** wyciągu heksanowego, nalewki, odwaru i soku z ziela żółtlicy drobnokwiatowej wobec wzorcowej bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P. Najsilniejszy efekt bakteriostatyczny wykazywała nalewka (MBC=MIC=5,0 mg/ml), którą następnie badano z użyciem szczepów wzorcowych bakterii (*Escherichia coli* PZH O26B6) i grzybów chorobotwórczych (*Candida albicans* PCM 1409 PZH i *Microsporium gypseum* K1). Najsilniejszą aktywność wykazywała wobec *M. gypseum* (MBC=2,5; MIC=1,0 mg/ml), średnią wobec *C. albicans* (MBC=7,5; MIC=5,0 mg/ml), a najsłabszą wobec *E. coli* (MBC>10, MIC=10 mg/ml). Przy użyciu mikrobiologicznego testu Ames'a, opartego na wykrywaniu mutacji powrotnych u bakterii *Salmonella typhimurium* ATCC TA 1535, wykazano **aktywność antymutageną** nalewki w stężeniu 1,0 i 10,0 mg/ml.

Summary

The primary objective of the conducted studies was phytochemical analysis of polyphenolics, mainly flavonoids and phenolic acids, present in the herb of gallant soldier (*Galinsoga parviflora* Cav.). The second goal were quantification of the selected groups of phenolic compounds, as well as evaluation of some of their biological activities in order to support application of the studied plant in folk medicine, in skin diseases in particular.

The theoretical part of the thesis provides an updated overview of both *Galinsoga parviflora* Cav. as well as the whole genus, including their taxonomic classification, botanical characteristic, chemistry and ethnobotany.

The experimental section includes the phytochemical and biological chapters. In the course of the carried out researches seven flavonoids were isolated from the crude extract of the *Galinsoga parviflora* Cav. herb, using a combination of different chromatographic techniques (i.e. either multiple LC or PPC, with solvents of various polarities). The structures of those compounds were established by chemical (partial and total acid hydrolysis) and spectral methods (UV, HPLC/UHPLC-DAD-ESI-MS, ^1H NMR and ^{13}C NMR). Three of them turned to be flavonol 7-*O*-glucosides: quercetagenin 7-*O*- β -glucopyranoside, quercetin 7-*O*- β -glucopyranoside and patuletin 7-*O*- β -glucopyranoside. The other flavonoids were quercetin glycosides (quercetin 3-*O*- β -glucopyranoside, quercetin 3-*O*- β -glucuronide, quercetin 3-*O*- α -rhamnopyranosylo (1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside) and one kaempferol derivative (kaempferol 3-*O*- β -glucopyranoside). The patuletin 7-*O*- β -glucopyranoside, quercetin 3-*O*- β -glucuronide, quercetin 3-*O*- α -rhamnopyranosylo (1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside and kaempferol 3-*O*- β -glucopyranoside have been detected in gallant soldier for the first time.

Further work focused on phenolic acids. At the beginning, in the studied extract four popular compounds were detected by means of a classical thin layer chromatography (2D-TLC). Then, the presence of them was confirmed by means

a newly established UPLC-PDA method, which allows to quantify simultaneously fifteen most common phenolic acids. The validation tests indicated, that the created method was precise, repeatable and accurate. The preliminary purified (SPE) gallant soldier herb extract was found to contain the following acids ($\mu\text{g/g}$ dry weight): protocatechuic ($20,32\pm 0,43$), chlorogenic ($149,11\pm 0,86$), *p*-hydroxybenzoic ($10,44\pm 0,02$), caffeic ($12,54\pm 0,28$) and isovanillic ($6,38\pm 0,16$).

Moreover, various spectrophotometric methods were applied to determine the content of the selected groups of compounds (i.e. total flavonoids, total phenolic acids, total polyphenols and ascorbic acid) in different gallant soldier extracts. The extract prepared according to the Polish Pharmacopoeia IX was found to contain the highest amount of flavonoids ($6,42\pm 0,04$ mg QE/g dry weight), while decoction and the methanolic-water extract were the richest in both phenolic acids and total polyphenolics ($29,08\pm 0,91$ mg CAE/g or $38,25\pm 0,88$ mg GAE/g dry weight and $30,62\pm 0,40$ mg CAE/g or $40,53\pm 0,19$ mg GAE/g dry weight, respectively). The content of ascorbic acid in the fresh gallant soldier herb was $25,67\pm 0,75$ mg%.

On the other hand, an ICP-OES method was used to calculate the amount (mg/g dry weight) of calcium ($3995,98\pm 14,40$), magnesium ($387,88\pm 4,69$), boron ($4,61\pm 0,37$), zinc ($4,20\pm 0,31$), manganese ($2,90\pm 0,31$), barium ($1,42\pm 0,20$), cooper ($0,87\pm 0,06$), molybdenum ($0,38\pm 0,02$), cadmium ($0,03\pm 0,01$) in the studied plant .

The antioxidant potency of the *Galinsoga parviflora* Cav. herb was measured by different tests – i.e. the colorimetric methods and also using a *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain without gene *sod1*. In the ABTS test the ability to reduce the $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radical by the gallant soldier tincture or decoction were assayed. The obtained results were compared with the activity of well-known antioxidants, as gallic and caffeic acids, quercetin, rutin, trolox and BHA. Decoction showed stronger free radical-scavenging activity than the tincture, but weaker than the reference substances. Iron chelating activity by the extracts and reference substances: Na_2EDTA , quercetin, gallic and chlorogenic acids was assayed. Chelating activity of tincture was comparable with quercetin activity; however, decoction was 15 times more active than tincture. The observed antioxidant activity was not strongly correlated with the content of total polyphenolics ($r^2=0,1561$).

The antioxidant activity of the *Galinsoga parviflora* Cav. extracts was later confirmed in the tests with *S. cerevisiae* yeast strain without gene *sod1*. That studies aimed at determination of replicative life span, analysis and quantification of protein carbonylation, and measurements of respiration rates by *S. cerevisiae*. Trolox, rutin and gallic acid were used as reference substances. Both the number and efficiency of buds formed by each cell were increased by either the gallant soldier tincture or decoction, but the highest activity was recorded for the tincture in the concentration of 400 mg/ml. What is more, the number of protein oxidations was decreased, and respiratory process in the mitochondria was increased by those extracts.

Anti-inflammatory activity of the *Galinsoga parviflora* Cav. tincture was tested by a Western blot method and ELISA assay, which let assess the influence of the tincture on the level of proteins COX-2 and iNOS (Western blot method) or PGE₂ (ELISA assay) in the HaCaT cells activated by proinflammatory cytokine TNF α . The tincture, in the concentration of 1000 μ g/ml, strongly inhibited the level of proteins COX-2 and iNOS (by 50% and 25 %, respectively), while in the concentration of 30 μ g/ml it also decreased synthesis of proinflammatory prostaglandin PGE₂ (approximately by 60 %).

First, the antibacterial activity of the n-hexane extract, tincture, decoction and juice of the *Galinsoga parviflora* Cav. herb was tested against the *Staphylococcus aureus* standard strain (ATCC 6538 P). Since the tincture showed a strong effect (MBC=MIC =5,0 mg/ml), thus it was later tested against the *Escherichia coli* standard strain (PZH O26B6) and the pathogenic fungi (*Candida albicans* PCM 1409 PZH and *Microsporium gypseum* K1). The studied tincture was the most potent against *M. gypseum* (MBC=2,5; MIC=1,0 mg/ml), showed a medium activity against *C. albicans* (MBC=7,5; MIC=5,0 mg/ml) and the weakest against *E. coli* (MBC>10, MIC=10 mg/ml). Additionally, in the Ames test, based on detection of the reverse mutation in *Salmonella typhimurum* ATCC TA 1535, it turned to be non mutagenic in concentration between 1,0 and 10,0 mg/ml.

Spis tabel i rycin

Tabela 1.	Porównanie obecności flawonów i flawonoli w gatunkach z rodzaju <i>Galinsoga</i> Ruiz & Pav.	21
Tabela 2.	Gradient fazy ruchomej zastosowanej w analizie HPLC-DAD-ESI-MS	33
Tabela 3.	Gradient fazy ruchomej wykorzystany w analizie kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA	37
Tabela 4.	Analiza chromatograficzna związku 1	59
Tabela 5.	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 1	60
Tabela 6.	Wyniki analizy ESI-MS związku 1	61
Tabela 7.	Analiza chromatograficzna związku 2	62
Tabela 8.	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 2	62
Tabela 9.	Analiza HPLC-DAD związku 2	63
Tabela 10.	Wyniki analizy ESI-MS związku 2	63
Tabela 11.	^1H i ^{13}C NMR związku 2 (DMSO- d_6)	64
Tabela 12.	Analiza chromatograficzna związku 3	67
Tabela 13.	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 3	67
Tabela 14.	Analiza HPLC-DAD związku 3	68
Tabela 15.	Wyniki analizy ESI-MS związku 3	68
Tabela 16.	^1H ($\text{CD}_3\text{-OD}$) i ^{13}C NMR (DMSO- d_6) związku 3	69
Tabela 17.	Analiza chromatograficzna związku 4	72
Tabela 18.	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 4	72
Tabela 19.	Analiza HPLC-DAD związku 4	73
Tabela 20.	Wyniki analizy ESI-MS związku 4	73
Tabela 21.	^1H i ^{13}C NMR związku 4 w DMSO- d_6	74
Tabela 22.	Analiza chromatograficzna związku 5	77
Tabela 23.	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 5	77
Tabela 24.	Analiza HPLC-DAD związku 5	78

Tabela 25.	Wyniki analizy ESI-MS związku 5	78
Tabela 26.	^1H i ^{13}C NMR związku 5 w DMSO- d_6	79
Tabela 27.	Analiza chromatograficzna związku 6	83
Tabela 28.	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 6	83
Tabela 29.	Analiza HPLC-DAD związku 6	84
Tabela 30.	Wyniki analizy ESI-MS związku 6	84
Tabela 31.	^1H i ^{13}C NMR związku 6 w DMSO- d_6	85
Tabela 32.	Analiza chromatograficzna związku 7	89
Tabela 33.	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 7	89
Tabela 34.	Analiza HPLC-DAD związku 7	90
Tabela 35.	Wyniki analizy ESI-MS związku 7	90
Tabela 36.	^1H i ^{13}C NMR związku 7 w DMSO- d_6	91
Tabela 37.	Wyniki analizy hydrolizy kwasowej związków 2, 4, 6 i 7	95
Tabela 38.	Wyniki analizy chromatograficznej (2D-TLC) wzorcowych kwasów fenolowych i frakcji eteru dietylowego	96
Tabela 39.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu galusowego	98
Tabela 40.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	98
Tabela 41.	Parametry równania prostej $y = 88398x - 53935$	98
Tabela 42.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu galusowego obliczone z równania prostej $y = 88398x - 53935$	98
Tabela 43.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu protokatechowego ...	99
Tabela 44.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	100
Tabela 45.	Parametry równania prostej $y = 104765x - 45841$	100
Tabela 46.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu protokatechowego obliczone z równania prostej $y = 104765x - 45841$	100
Tabela 47.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu chlorogenowego ...	101
Tabela 48.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	101
Tabela 49.	Parametry równania prostej $y = 79806x - 60132$	102
Tabela 50.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu chlorogenowego obliczone z równania prostej $y = 79806x - 60132$	102
Tabela 51.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego	102
Tabela 52.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	103
Tabela 53.	Parametry równania prostej $y = 184507x - 6297$	103
Tabela 54.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego obliczone z równania prostej $y = 184507x - 6297$	103

Tabela 55.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu dihydrokawowego	104
Tabela 56.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	104
Tabela 57.	Parametry równania prostej $y = 28224x - 27073$	105
Tabela 58.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu dihydrokawowego	105
	obliczone z równania prostej $y = 28224x - 27073$	105
Tabela 59.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu <i>p</i> -hydroksyfenylooctowego	105
Tabela 60.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.....	106
Tabela 61.	Parametry równania prostej $y = 35134x - 10204$	106
Tabela 62.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu <i>p</i> -hydroksyfenylooctowego obliczone z równania prostej $y = 35134x - 10204$	106
Tabela 63.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu wanilinowego	107
Tabela 64.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	107
Tabela 65.	Parametry równania prostej $y = 112403x - 54790$	108
Tabela 66.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu wanilinowego obliczone z równania prostej $y = 112403x - 54790$	108
Tabela 67.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu kawowego	108
Tabela 68.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	109
Tabela 69.	Parametry równania prostej $y = 145745x - 104383$	109
Tabela 70.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu kawowego obliczone z równania prostej $y = 145745x - 104383$	109
Tabela 71.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu syringowego	110
Tabela 72.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	110
Tabela 73.	Parametry równania prostej $y = 94223x - 56227$	111
Tabela 74.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu syringowego obliczone z równania prostej $y = 94223x - 56227$	111
Tabela 75.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu izowanilinowego	111
Tabela 76.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	112
Tabela 77.	Parametry równania prostej $y = 112849x - 67226$	112
Tabela 78.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu izowanilinowego obliczone z równania prostej $y = 112849x - 67226$	112
Tabela 79.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu <i>p</i> -kumarowego	113
Tabela 80.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	113
Tabela 81.	Parametry równania prostej $y = 191755x - 188141$	114
Tabela 82.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu <i>p</i> -kumarowego obliczone z równania prostej $y = 191755x - 188141$	114
Tabela 83.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu salicylowego	114

Tabela 84.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób.....	115
Tabela 85.	Parametry równania prostej $y = 90342x - 78050$	115
Tabela 86.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu salicylowego obliczone z równania prostej $y = 90342x - 78050$	115
Tabela 87.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu <i>trans</i> -ferulowego ..	116
Tabela 88.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	116
Tabela 89.	Parametry równania prostej $y = 139473x - 145738$	117
Tabela 90.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu <i>trans</i> -ferulowego obliczone z równania prostej $y = 139473x - 145738$	117
Tabela 91.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu <i>m</i> -kumarowego	117
Tabela 92.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	118
Tabela 93.	Parametry równania prostej $y = 195679x - 144835$	118
Tabela 94.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu <i>m</i> -kumarowego obliczone z równania prostej $y = 195679x - 144835$	118
Tabela 95.	Wartości pól powierzchni pików roztworów kwasu rozmarynowego	119
Tabela 96.	Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	119
Tabela 97.	Parametry równania prostej $y = 79620x - 151947$	120
Tabela 98.	Pola powierzchni pików roztworów kwasu rozmarynowego obliczone z równania prostej $y = 79620x - 151947$	120
Tabela 99.	Wartości stężeń kwasów fenolowych obliczone na podstawie krzywych kalibracyjnych i wartości błędów względnych	121
Tabela 100.	Równania krzywych kalibracyjnych kwasów fenolowych i wartości parametrów procesu walidacji metody UPLC-PDA	122
Tabela 101.	Obliczone wartości odzysków kwasów fenolowych	124
Tabela 102.	Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu protokatechowego w surowcu	126
Tabela 103.	Ocena statystyczna uzyskanych wyników	126
Tabela 104.	Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu chlorogenowego w surowcu	126
Tabela 105.	Ocena statystyczna uzyskanych wyników	126
Tabela 106.	Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego w surowcu	126
Tabela 107.	Ocena statystyczna uzyskanych wyników	127
Tabela 108.	Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu kawowego w surowcu	127
Tabela 109.	Ocena statystyczna uzyskanych wyników	127

Tabela 110. Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu izowanilinowego w surowcu	127
Tabela 111. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	127
Tabela 112. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwercetyny	130
Tabela 113. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	130
Tabela 114. Wartości parametrów krzywej kalibracyjnej dla kwercetyny, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	131
Tabela 115. Parametry równania prostej $y = 35,072x - 0,0229$	131
Tabela 116. Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwercetyny wyliczone z równania prostej $y = 35,072x - 0,0229$	131
Tabela 117. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość flawonoidów w surowcu ..	132
Tabela 118. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	133
Tabela 119. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość flawonoidów w nalewce ..	133
Tabela 120. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	133
Tabela 121. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość flawonoidów w odwarze ..	133
Tabela 122. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	133
Tabela 123. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu kawowego	135
Tabela 124. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	135
Tabela 125. Wartości parametrów krzywej kalibracyjnej dla kwasu kawowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	135
Tabela 126. Parametry równania prostej $y = 0,0317x + 0,0124$	136
Tabela 127. Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwasu kawowego wyliczone z równania prostej $y = 0,0317x + 0,0124$	136
Tabela 128. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w wyciągu metanolowo-wodnym	137
Tabela 129. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	137
Tabela 130. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w nalewce	137
Tabela 131. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	137
Tabela 132. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w odwarze	138
Tabela 133. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	138
Tabela 134. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego	139
Tabela 135. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	140
Tabela 136. Wartości parametrów krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	140
Tabela 137. Parametry równania prostej $y = 106,07x + 0,0167$	140

Tabela 138. Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego wyliczone z równania prostej $y = 106,07x + 0,0167$	141
Tabela 139. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość sumy polifenoli w surowcu	141
Tabela 140. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	141
Tabela 141. Wartości pomiarów absorbancji i zawartości sumy polifenoli w nalewce	142
Tabela 142. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	142
Tabela 143. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość sumy polifenoli w odwarze	142
Tabela 144. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	142
Tabela 145. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu L(+)-askorbinowego	144
Tabela 146. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	144
Tabela 147. Wartości parametrów krzywej kalibracyjnej dla kwasu L(+)-askorbinowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	144
Tabela 148. Parametry równania prostej $y = 24,158x - 0,0703$	145
Tabela 149. Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla roztworów kwasu L(+)-askorbinowego wyliczone z równania prostej $y = 24,158x - 0,0703$	145
Tabela 150. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasu L(+)-askorbinowego w surowcu	146
Tabela 151. Obliczenia parametrów statystycznych uzyskanych wyników	146
Tabela 152. Parametry mineralizacji próbki z zieleń żółticy drobnokwiatowej	146
Tabela 153. Zawartość pierwiastków w wysuszonym zieleń żółticy drobnokwiatowej	146
Tabela 154. Pomiar zmiany wartości absorbancji substancji referencyjnych w czasie	149
Tabela 155. Pomiar zmiany wartości absorbancji nalewki i odwaru w czasie	150
Tabela 156. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwercetyny	151
Tabela 157. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	152
Tabela 158. Wartości parametrów krzywej kwercetyny, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	152
Tabela 159. Stopień zmiatania kationorodników ABTS ⁺ i wartość IC ₅₀ kwercetyny	152
Tabela 160. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów rutyny	153
Tabela 161. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	153

Tabela 162. Wartości parametrów krzywej dla rutyny, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	153
Tabela 163. Stopień zmiatania kationorodników ABTS ⁺ i wartość IC ₅₀ rutyny	154
Tabela 164. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego	154
Tabela 165. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	154
Tabela 166. Wartości parametrów krzywej dla kwasu galusowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	155
Tabela 167. Stopień zmiatania kationorodników ABTS ⁺ i wartość IC ₅₀ kwasu galusowego	155
Tabela 168. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu kawowego	155
Tabela 169. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	156
Tabela 170. Wartości parametrów krzywej dla kwasu kawowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	156
Tabela 171. Stopień zmiatania kationorodników ABTS ⁺ i wartość IC ₅₀ kwasu kawowego	156
Tabela 172. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów BHA	157
Tabela 173. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	157
Tabela 174. Wartości parametrów krzywej dla BHA, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	157
Tabela 175. Stopień zmiatania kationorodników ABTS ⁺ i wartość IC ₅₀ BHA	158
Tabela 176. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów troloksu	158
Tabela 177. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	158
Tabela 178. Wartości parametrów krzywej troloksu, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	159
Tabela 179. Stopień zmiatania kationorodników ABTS ⁺ i wartość IC ₅₀ troloksu	159
Tabela 180. Wartości pomiarów absorbancji dla nalewki	160
Tabela 181. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	160
Tabela 182. Stopień zmiatania kationorodników ABTS ⁺ i wartość IC ₅₀ nalewki z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	161
Tabela 183. Wartości pomiarów absorbancji dla odwaru	161
Tabela 184. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	161
Tabela 185. Stopień zmiatania kationorodników ABTS ⁺ i wartość IC ₅₀ odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	162
Tabela 186. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwercetyny	165
Tabela 187. Wartości parametrów krzywej dla kwercetyny, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	165
Tabela 188. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	166

Tabela 189. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{50} kwercetyny	166
Tabela 190. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego	167
Tabela 191. Wartości parametrów krzywej kwasu galusowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	167
Tabela 192. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	168
Tabela 193. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{20} kwasu galusowego	168
Tabela 194. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu chlorogenowego	169
Tabela 195. Wartości parametrów krzywej dla kwasu chlorogenowego, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	169
Tabela 196. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	170
Tabela 197. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{20} kwasu chlorogenowego	170
Tabela 198. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	171
Tabela 199. Wartości parametrów krzywej dla kwercetyny, obliczone metodą najmniejszych kwadratów	171
Tabela 200. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	172
Tabela 201. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{50} $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	172
Tabela 202. Wartości pomiarów absorbancji dla nalewki	173
Tabela 203. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	174
Tabela 204. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{20} i IC_{50} nalewki z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	174
Tabela 205. Wartości pomiarów absorbancji dla odwaru	174
Tabela 206. Obliczenia parametrów statystycznych dla badanych prób	175
Tabela 207. Aktywność chelatująca oraz wartość IC_{20} i IC_{50} odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	175
Tabela 208. Sposób modyfikacji hodowli drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	177
Tabela 209. Wyniki pomiarów densytometrem oraz liczba jednostek tworzących kolonie dla 1000-krotnego rozcieńczenia hodowli: szczepu dzikiego, mutantu oraz hodowli modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych	178
Tabela 210. Pomiar zużycia tlenu przez komórki drożdży mierzone za pomocą oksygrafu	183
Tabela 211. Zależność przeżywalności komórek HaCaT od stężenia wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	184
Tabela 212. Wartości pomiarów intensywności prążka badanych prób i ich wpływ na poziom białek COX-2 i iNOS w przeliczeniu na % próby kontrolnej	186

Tabela 213. Średnie wartości absorbancji prób uzyskanych w badaniu wpływu nalewki z zieleń żółtlicy drobnokwiatowej na poziom PGE ₂	188
Tabela 214. Działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze antybiotyków referencyjnych	191
Tabela 215. Struktura chemiczna kwasów fenolowych rozdzielanych metodą UPLC-PDA	208
Tabela 216. Wartości parametrów wykorzystanych do identyfikacji kwasów fenolowych obecnych w surowcu	210
Tabela 217. Zawartość związków polifenolowych w wyciągach z zieleń żółtlicy drobnokwiatowej	211
Tabela 218. Zawartość witaminy C w warzywach i owocach	213
Tabela 219. Porównanie aktywności antyoksydacyjnej nalewki i odwaru z zieleń żółtlicy drobnokwiatowej z aktywnością użytych w badaniu substancji referencyjnych	217
Tabela 220. Porównanie aktywności chelatującej nalewki i odwaru z zieleń żółtlicy drobnokwiatowej z aktywnością referencyjnych związków polifenolowych	219
Tabela 221. Aktywność przeciwbakteryjna flawonoidów i kwasów fenolowych obecnych w zieleń żółtlicy drobnokwiatowej	228
Rycina 1. Różnice morfologiczne między żółtlicą drobnokwiatową i żółtlicą owłosioną (dane literaturowe)	16
Rycina 2. <i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	18
Rycina 3. Struktura chemiczna flawonów wyizolowanych z zieleń żółtlicy drobnokwiatowej	19
Rycina 4. Struktura chemiczna flawanonów wyizolowanych z zieleń żółtlicy drobnokwiatowej	19
Rycina 5. Struktura chemiczna estrów aromatycznych występujących w zieleń żółtlicy drobnokwiatowej	20
Rycina 6. Zastosowanie żółtlicy drobnokwiatowej na świecie	24
Rycina 7. Uproszczony schemat chromatografii cieczowej wykorzystywanej w izolacji związków flawonoidowych	28
Rycina 8. Schemat izolacji związków flawonoidowych z zieleń żółtlicy drobnokwiatowej	55
Rycina 9. Chromatogram TLC (S ₂ , W ₁) wyizolowanych związków flawonoidowych	58
Rycina 10. Widma w nadfiolecie związku 1	59
Rycina 11. Chromatogram UHPLC-DAD związku 1 i wzorcowej kwercetagetryny	60

Rycina 12.	Widma UV-DAD związku 1 i wzorcowej kwercetagestryny	60
Rycina 13.	Widma ESI-MS związku 1 i wzorcowej kwercetagestryny w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+)	61
Rycina 14.	Widma w nadfiolecie związku 2	62
Rycina 15.	Widmo ESI-MS związku 2 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+)	63
Rycina 16.	Widmo ^1H NMR związku 2 (DMSO- d_6)	65
Rycina 17.	Widmo ^{13}C NMR związku 2 (DMSO- d_6)	66
Rycina 18.	Widma w nadfiolecie związku 3	67
Rycina 19.	Widmo ESI-MS związku 3 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+)	68
Rycina 20.	Widmo ^1H NMR związku 3 ($\text{CD}_3\text{-OD}$)	70
Rycina 21.	Widmo ^{13}C NMR związku 3 (DMSO- d_6)	71
Rycina 22.	Widma w nadfiolecie związku 4	72
Rycina 23.	Analiza ESI-MS związku 4 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+)	73
Rycina 24.	Widmo ^1H NMR związku 4 (DMSO- d_6)	75
Rycina 25.	Widmo ^{13}C NMR związku 4 (DMSO- d_6)	76
Rycina 26.	Widma w nadfiolecie związku 5	77
Rycina 27.	Widmo ESI-MS związku 5 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+)	78
Rycina 28.	Widmo ^1H NMR związku 5 (DMSO- d_6)	80
Rycina 29.	Widmo ^1H NMR związku 5 (DMSO- $\text{d}_6\text{+D}_2\text{O}$)	81
Rycina 30.	Widmo ^{13}C NMR związku 5 (DMSO- d_6)	82
Rycina 31.	Widma w nadfiolecie związku 6	83
Rycina 32.	Analiza ESI-MS związku 6 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+)	84
Rycina 33.	Widmo ^1H NMR związku 6 (DMSO- d_6)	86
Rycina 34.	Widmo ^1H NMR związku 6 (DMSO- $\text{d}_6\text{+D}_2\text{O}$)	87
Rycina 35.	Widmo ^{13}C NMR związku 6 (DMSO- d_6)	88
Rycina 36.	Widma w nadfiolecie związku 7	89
Rycina 37.	Widmo ESI-MS związku 7 w trybie jonów ujemnych (ES-) i dodatnich (ES+)	90
Rycina 38.	Widmo ^1H NMR związku 7 (DMSO- d_6)	92
Rycina 39.	Widmo ^1H NMR związku 7 (DMSO- $\text{d}_6\text{+D}_2\text{O}$)	93

Rycina 40.	Widmo ^{13}C NMR związku 7 (DMSO- d_6)	94
Rycina 41.	Chromatogram UPLC wzorcowych kwasów fenolowych w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$	97
Rycina 42.	Chromatogram UPLC kwasu galusowego	97
Rycina 43.	Widmo w nadfiolecie kwasu galusowego	97
Rycina 44.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu galusowego	99
Rycina 45.	Chromatogram UPLC kwasu protokatechowego	99
Rycina 46.	Widmo w nadfiolecie kwasu protokatechowego	99
Rycina 47.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu protokatechowego	100
Rycina 48.	Chromatogram UPLC kwasu chlorogenowego	101
Rycina 49.	Widmo w nadfiolecie kwasu chlorogenowego	101
Rycina 50.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu chlorogenowego	102
Rycina 51.	Chromatogram UPLC kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego	102
Rycina 52.	Widmo w nadfiolecie kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego	102
Rycina 53.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego	103
Rycina 54.	Chromatogram UPLC kwasu dihydrokawowego	104
Rycina 55.	Widmo w nadfiolecie kwasu dihydrokawowego	104
Rycina 56.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu dihydrokawowego	105
Rycina 57.	Chromatogram UPLC kwasu <i>p</i> -hydroksyfenylooctowego	105
Rycina 58.	Widmo w nadfiolecie kwasu <i>p</i> -hydroksyfenylooctowego	105
Rycina 59.	Krzywa kalibracyjna dla kwasu <i>p</i> -hydroksyfenylooctowego	106
Rycina 60.	Chromatogram UPLC kwasu wanilinowego	107
Rycina 61.	Widmo w nadfiolecie kwasu wanilinowego	107
Rycina 62.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu wanilinowego	108
Rycina 63.	Chromatogram UPLC kwasu kawowego	108
Rycina 64.	Widmo w nadfiolecie kwasu kawowego	108
Rycina 65.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu kawowego.....	109
Rycina 66.	Chromatogram UPLC kwasu syringowego	110
Rycina 67.	Widmo w nadfiolecie kwasu syringowego	110
Rycina 68.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu syringowego	111
Rycina 69.	Chromatogram UPLC kwasu izowanilinowego	111
Rycina 70.	Widmo w nadfiolecie kwasu izowanilinowego	111
Rycina 71.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu izowanilinowego	112

Rycina 72.	Chromatogram UPLC kwasu <i>p</i> -kumarowego	113
Rycina 73.	Widmo w nadfiolecie kwasu <i>p</i> -kumarowego	113
Rycina 74.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu <i>p</i> -kumarowego	114
Rycina 75.	Chromatogram UPLC kwasu salicylowego	114
Rycina 76.	Widmo w nadfiolecie kwasu salicylowego	114
Rycina 77.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu salicylowego	115
Rycina 78.	Chromatogram UPLC kwasu <i>trans</i> -ferulowego	116
Rycina 79.	Widmo w nadfiolecie kwasu <i>trans</i> -ferulowego	116
Rycina 80.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu <i>trans</i> -ferulowego	117
Rycina 81.	Chromatogram UPLC kwasu <i>m</i> -kumarowego	117
Rycina 82.	Widmo w nadfiolecie kwasu <i>m</i> -kumarowego	117
Rycina 83.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu <i>m</i> -kumarowego	118
Rycina 84.	Chromatogram UPLC kwasu rozmarynowego	119
Rycina 85.	Widmo w nadfiolecie kwasu rozmarynowego	119
Rycina 86.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu rozmarynowego	120
Rycina 87.	Chromatogram UPLC wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (1,0 ml) oczyszczonego przy użyciu kolumny Oasis MAX.	125
Rycina 88.	Chromatogram UPLC wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (0,5 ml) oczyszczonego przy użyciu kolumny Oasis HLB	125
Rycina 89.	Chromatogram UPLC wyciągu z ziela żółtlicy drobnokwiatowej (0,1 ml) oczyszczonego przy użyciu kolumny Oasis HLB	125
Rycina 90.	Widma w nadfiolecie kwasów fenolowych obecnych w ziele żółtlicy drobnokwiatowej	128
Rycina 91.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowej kwercetyny	132
Rycina 92.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu kawowego	136
Rycina 93.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu galusowego	141
Rycina 94.	Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu L(+)-askorbinowego	145
Rycina 95.	Zmiana absorbancji roztworów substancji referencyjnych w czasie	150
Rycina 96.	Zmiana absorbancji nalewki i odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej w czasie	151
Rycina 97.	Stopień zmiatania rodników ABTS ^{•+} (%) przez kwercetynę, troloks, kwas galusowy i kawowy	159
Rycina 98.	Stopień zmiatania rodników ABTS ^{•+} (%) przez rutynę i BHA	160
Rycina 99.	Stopień zmiatania rodników ABTS ^{•+} (%) przez nalewkę i odwar z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	162

Rycina 100. Zależność liniowa pomiędzy stopniem zmiatania rodników ABTS ^{•+} (%) a stężeniem polifenoli w nalewce i odwarze	162
Rycina 101. Aktywność chelatująca (%) kwercetyny, kwasu galusowego i kwasu chlorogenowego	171
Rycina 102. Aktywność chelatująca (%) Na ₂ EDTA·2H ₂ O	173
Rycina 103. Aktywność chelatująca (%) nalewki i odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	175
Rycina 104. Zależność liniowa pomiędzy zdolnością chelatowania jonów żelaza a stężeniem polifenoli w nalewce i odwarze	176
Rycina 105. Liczba jednostek tworzących kolonie dla hodowli modyfikowanych substancjami referencyjnymi i wyciągami z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	178
Rycina 106. Liczba jednostek tworzących kolonie wyrażona jako % kontroli dla hodowli modyfikowanych substancjami referencyjnymi i wyciągami z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	179
Rycina 107. Wydajność tworzenia kolonii (%) dla hodowli modyfikowanych substancjami referencyjnymi i wyciągami z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	179
Rycina 108. Płytkę agarową serii 10-krotnych rozcieńczeń hodowli szczepu dzikiego, mutantą (kontrola) oraz hodowli modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych	179
Rycina 109. Płytki agarowe serii 10-krotnych rozcieńczeń hodowli modyfikowanych za pomocą nalewki i odwaru z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	180
Rycina 110. Klisza rentgenowska z uwidocznionymi pasmami białek. Strzałki wskazują przykładowe obszary o obniżonym stopniu karbonylacji białek w porównaniu do kontroli	182
Rycina 111. Wpływ wyciągów z ziela żółtlicy drobnokwiatowej na przeżywalności komórek HaCaT	185
Rycina 112. Wpływ nalewki na poziom białek COX-2 w komórkach HaCaT (wynik wyrażony jako % próby kontrolnej $\pm S_{\bar{x}}$)	187
Rycina 113. Wpływ nalewki na poziom białek iNOS w komórkach HaCaT (wynik wyrażony jako % próby kontrolnej $\pm S_{\bar{x}}$)	187
Rycina 114. Wpływ nalewki na poziom białek COX-2 i iNOS w komórkach HaCaT oznaczanych metodą Western blot	187
Rycina 115. Wpływ nalewki na poziom PGE ₂ w komórkach HaCaT	188
Rycina 116. Sposób przeprowadzenia testu Ames'a	190

Rycina 117. Działanie przeciwbakteryjne wyciągu heksanowego, nalewki, odwaru i soku z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	191
Rycina 118. Działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze nalewki z surowca	191
Rycina 119. Wpływ struktury związków flawonoidowych na przesunięcia pasm absorpcji w widmie UV	194
Rycina 120. Mechanizm tworzenia połączeń chelatowych H_3BO_3 w obecności NaOAc z grupami <i>orto</i> -dihydroksylowymi flawonoidów	195
Rycina 121. Mechanizm tworzenia połączeń chelatowych $AlCl_3$ z flawonoidami przed i po dodaniu HCl	196
Rycina 122. Uproszczony schemat źródła jonów typu ESI	198
Rycina 123. Wzór strukturalny 7- <i>O</i> - β -glukopiranozydu kwercetagetyny (związek 1)	199
Rycina 124. Wzór strukturalny 7- <i>O</i> - β -glukopiranozydu kwercetyny (związek 2)	202
Rycina 125. Wzór strukturalny 7- <i>O</i> - β -glukopiranozydu patuletyny (związek 3)	203
Rycina 126. Wzór strukturalny 3- <i>O</i> - β -glukopiranozydu kwercetyny (związek 4)	204
Rycina 127. Wzór strukturalny 3- <i>O</i> - β -glukuronid kwercetyny (związek 5)	205
Rycina 128. Wzór strukturalny 3- <i>O</i> - β -glukopiranozydu kemferolu (związek 6)	206
Rycina 129. Wzór strukturalny 3- <i>O</i> - α -ramnopiranozylo(1 \rightarrow 6)- β -glukopiranozyd kwercetyny (związek 7)	207
Rycina 130. Struktura kolumnienek Oasis HLB i Oasis MAX	209
Rycina 131. Zawartość flawonoidów, kwasów fenolowych i polifenoli w wyciągach z ziela żółtlicy drobnokwiatowej	212
Rycina 132. Sugerowany mechanizm reakcji kwasu askorbinowego z NBD-Cl	214
Rycina 133. Zasada metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS	215
Rycina 134. Wartości IC_{50} substancji referencyjnych	216
Rycina 135. Miejsca wiązania jonów metali do cząsteczek flawonoidów	218
Rycina 136. Przykładowy pomiar oksygraficzny	222
Rycina 137. Konwersja soli błękitu tetrazolowego (MTT) do formazanu	224

Piśmiennictwo

1. Abdelmageed OH, Khashaba PY, Askal HF, Saleh GA, Refaat IH. Selective spectrophotometric determination of ascorbic acid in drugs and foods. *Talanta* 1995; 42(4): 573-9.
2. Abrams L, Ferris RS. Illustrated flora of the Pacific States. Washington, Oregon, and California, Vol. IV: Bignoniaceae to Compositae. Stanford University Press, Stanford, California 1960.
3. Afza N, Yasmeen S, Ferheen S, Malik A, Ali MI, Kalhoro MA, Ifzal R. New aromatic esters from *Galinsoga parviflora*. *J Asian Nat Prod Res* 2012; 14(5): 424-8.
4. Agra MF, Baracho GS, Nurit K, Basílio IJLD, Coelho VPM. Medicinal and poisonous diversity of the flora of „Cariri Paraibano”, Brazil. *J Ethnopharmacol* 2007; 111(2): 383-95.
5. Agra MF, Silva KN, Lima Diniz Basílio IJ, França de Freitas P, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 2008; 18(3): 472-508.
6. Agrawal PK, Rastogi RP. ¹³C NMR spectroscopy of flavonoids. *Heterocycles* 1981; 16(12): 2181-2235.
7. Agrawal PK. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo 1989.
8. Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 1992; 31(10): 3307-30.
9. Aguirre R, May JM. Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. *Pharmacol Ther* 2008; 119(1): 96-103.
10. Akroum S, Bendjeddou D, Satta D, Lalaoui K. Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *Am-Euras J Sci Res* 2009; 4(2): 93-6.
11. Akula US, Odhav B. *In vitro* 5-lipoxygenase inhibition of polyphenolic antioxidants from undomesticated plants of South Africa. *J Med Plant Res* 2008; 2(9): 207-12.
12. Andersen ØM, Markham KR. Flavonoids. Chemistry, biochemistry and application. Taylor&Francis Group, Boca Raton, London, New York 2006.

13. Andjelković M, Van Camp J, De Meulenaer B, Depaemelaere G, Socaciu C, Verloo M, Verhe R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem* 2006; 98(1): 23-31.
14. Arts MJ, Haenen GR, Voss HP, Bast A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food Chem Toxicol* 2004; 42(1): 45-9.
15. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008; 11(1): 1-15.
16. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 2006; 99(1): 191-203.
17. Bańkowski C, Kuźniewski E. Ziołolecznictwo ludowe. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1980.
18. Bańkowski C, Serwatka J. Pożyteczne chwasty. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1977.
19. Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wyd. 2. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 2009.
20. Bautista-Cruz A, Arnaud-Viñas MR, Martínez-Gutiérrez GA, Sánchez-Medina PS, Pérez Pacheco R. The traditional medicinal and food uses of four plants in Oaxaca, Mexico. *J Med Plant Res* 2011; 5(15): 3404-11.
21. Bazyłko A, Stolarczyk M, Derwińska M, Kiss AK. Determination of antioxidant activity of extracts and fractions obtained from *Galinsoga parviflora* and *Galinsoga quadriradiata*, and a qualitative study of the most active fractions using TLC and HPLC methods. *Nat Prod Res* 2012; 26(17): 1584-93.
22. Bello IA, Ndukwe GI, Audu OT, Habila JD. A bioactive flavonoid from *Pavetta crassipes* K. Schum. *Org Med Chem Lett* 2011; 1(1): 14.
23. Bernard FX, Sablé S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Crouzet J, Blanche F. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(5): 992-8.
24. Blahová E, Brandšteterová E. Approaches in sample handling before HPLC analysis of complex matrices. *Chem Pap* 2004; 58(5): 362-73.
25. Bohm BA, Stuessy TF: Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae). Springer-Verlag, Wien 2001.
26. Broda B, Mowszowicz J. Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych trujących i użytkowych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2000.
27. Byłka W, Matławska I. Flavonoids and free phenolic acids from *Phytolacca americana* L. leaves. *Acta Pol Pharm* 2001; 58(1): 69-72.

28. Castri FDi, Debussche M, Hansen AJ. Biological invasions in Europe and the Mediterranean Basin. Kluwer Academic Publisher, Netherlands 1990.
29. Chae S, Lee S, Kang SS and Lee HJ. Flavone glucosides from the leaves of *Helianthus tuberosus*. *Nat Prod Sci* 2002; 8(4): 141-3.
30. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(21): 13926-31.
31. Chao C-Y, Yin M-C. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathog Dis* 2009; 6(2): 201-6.
32. Chinnam N, Dadi PK, Sabri SA, Ahmad M, Kabir MA, Ahmad Z. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. *Int J Biol Macromol* 2010; 46(5): 478-86.
33. Climent I, Tsai L, Levine RL. Derivatization of gamma-glutamyl semialdehyde residues in oxidized proteins by fluoresceinamine. *Anal Biochem* 1989; 182(2): 226-32.
34. Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001; 1(6): 569-90.
35. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26(5):343-56. Errata: *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27(2): 181.
36. de Albuquerque UP, Muniz de Medeiros P, de Almeida ALS, Monteiro JM, Machado de Freitas Lins Neto E, Gomes de Melo J, dos Santos JP. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 2007; 114(3): 325-54.
37. de Hoffmann E, Charette J, Stroobant V. Spektrometria mas. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1998.
38. De Paepe D, Servaes K, Noten B, Diels L, De Loose M, Van Droogenbroeck B, Voorspoels S. An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits. *Food Chem* 2013; 136(2): 368-75.
39. Dey PM, Harborne JB. Methods in Plant Biochemistry. Academic Press, London, San Diego, New York, Berkeley, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto 1989.
40. Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 1994; 315: 161-9.
41. DiTomaso JM, Healy EA. Weeds of California and Other Western States. Regents of the University of California Department of Agriculture and Natural Resources 2007.

42. Dvořáková M, Hulín P, Karabín M, Dostálek P Determination of polyphenols in beer by an effective method based on solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Czech J Food Sci* 2007; 25(4): 182-8.
43. Eldahshan OA. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds of carob leaves grown in Egypt. *Curr Res J Biol Sci* 2011; 3(1): 52-5.
44. Ercisli S. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chem* 2007; 104: 1379-84.
45. Esch JR, Friend JR, Kariuki JK. Determination of the vitamin C content of conventionally and organically grown fruits by cyclic voltammetry. *Int J Electrochem Sci* 2010; 5: 1464-74.
46. Farber JM, Levine RL. Sequence of a peptide susceptible to mixed function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. *J Biol Chem* 1986; 261(10): 4574-8.
47. Farbstein D, Kozak-Blickstein A, Levy AP. Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. *Molecules* 2010; 15(11): 8098-110.
48. Farmakopea Polska IX. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2011.
49. Farmakopea Polska VI. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2005.
50. Fenner R, Betti AH, Mentz LA, Rates SMK: Plants utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Braz J Pharm Sci* 2006; 42(3): 369-94.
51. Ferheen S, Afza N, Malik A, Iqbal L, Azam Rasool M, Irfan Ali M, Bakhsh Tareen R. Galinsosides A and B, bioactive flavanone glucosides from *Galinsoga parviflora*. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2009; 24(5): 1128-32.
52. García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno MA, Martínez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res* 2009; 58(9): 537-52.
53. Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem* 2005; 53(5): 1370-3.
54. Getahun A. Some common medicinal and poisonous plants used in Ethiopian folk medicine. Registered in the data bank prelude, ref:VG 07; Amare Getahun, 1976.
55. Giday M, Asfaw Z, Woldu Z. Medicinal plants of the Meinit ethnic group of Ethiopia: an ethnobotanical study. *J Ethnopharmacol* 2009; 124(3): 513-21.
56. Gleason HA: Illustrated flora of the northeastern United States and adjacent Canada 1952.
57. Gledhill D. The names of plants. Cambridge University Press, New York 2008.

58. Gonçalves J, Silva CL, Castilho PC, Câmara JS. An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. *Microchem J* 2013; 106: 129-38.
59. González-Gallego J, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp* 2007; 22(3): 287-93.
60. Grajek W. Przeciwtleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007.
61. Granica S, Piwowarski JP, Popławska M, Jakubowska M, Borzym J, Kiss AK. Novel insight into qualitative standardization of *Polygoni avicularis herba* (Ph. Eur.). *J Pharm Biomed Anal* 2013; 72: 216-22.
62. Grubben GJH, Denton OA. Plant Resources of Tropical Africa 2. Vegetables. PROTA Foundation/Backhuys Publishers, Wageningen, Netherlands 2004.
63. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch Biochem Biophys* 2008; 476(2): 107-12.
64. Halliwell B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends Biochem Sci* 1999; 24(7): 255-9.
65. Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm* 2007; Article ID 45673.
66. Hamill FA, Apio S, Mubiru NK, Mosango M, Bukenya-Ziraba R, Maganyi OW, Soejarto DD. Traditional herbal drugs of southern Uganda, I. *J Ethnopharmacol* 2000; 70(3): 281-300.
67. Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshita T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry* 1998; 48(1): 125-9.
68. Harborne JB, Mabry TJ: The flavonoids: Advances in Research. Chapman and Hall, London, New York 1982.
69. Harborne JB. Flavonoids Advances in Research since 1986. Chapman & Hall, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras 1994.
70. Hoppe HA. Drogen Kunde Walter de Gruyter, Berlin, New York 1987.
71. Hossion AM, Zamami Y, Kandahary RK, Tsuchiya T, Ogawa W, Iwado A, Sasaki K. Quercetin diacylglycoside analogues showing dual inhibition of DNA gyrase and topoisomerase IV as novel antibacterial agents. *J Med Chem* 2011; 54(11): 3686-703.

72. Hung PV, Hatcher DW, Barker W. Phenolic acid composition of sprouted wheats by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and their antioxidant activities. *Food Chem* 2011; 126(4): 1896-1901
73. Jabłońska-Ryś E, Zalewska-Korona M, Kalbarczyk J. Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *J Fruit Ornament Plant Res* 2009; 17(2): 115-20.
74. Jeong KW, Lee JY, Kang DI, Lee JU, Shin SY, Kim Y. Screening of flavonoids as candidate antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *J Nat Prod* 2009; 72(4): 719-24.
75. Joseph JM, Sowndhararajan K, Rajendrakumaran D, Manian S. *In vitro* antioxidant potential of different parts of *Solanum surattense* Burm. f. *Food Sci Biotechnol* 2011; 20(2): 477-83.
76. Julian OA. Dictionary of Homoeopathic Materia Medica. B. Jain Publishers (P) Ltd., New Delhi 2003.
77. Kazuno S, Yanagida M, Shindo N, Murayama K. Mass spectrometric identification and quantification of glycosyl flavonoids, including dihydrochalcones with neutral loss scan mode. *Anal Biochem* 2005; 347(2): 182-92.
78. Klejdus B, Vacek J, Lojková L, Benesová L, Kubán V. Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases. *J Chromatogr A* 2008; 1195(1-2): 52-9
79. Konieczka P (red.). Ocena i kontrola jakości wyników analitycznych. Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiska, Gdańsk 2004.
80. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 416(1): 15-8.
81. Kosińscy R i M: Atlas ziół. Wydawnictwo Pascal, Bielsko-Biała 2008.
82. Krzyściak-Kosińska R, Kosiński M. Atlas roślin. Wydawnictwo Pascal, Bielsko-Biała 2007.
83. Kuszewska K: Żółtlica-skąd przybyła i dokąd wędruje. *Natura. Przyroda Warmii i Mazur* 2007; 3(7): 9-10.
84. Lambert AJ, Brand MD. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol Biol* 2009; 554: 165-81.
85. Leopoldini M, Russo N, Chiodo S, Toscano M. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J Agric Food Chem* 2006; 54(17): 6343-51.
86. Levine RL. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem* 1983; 258(19): 11823-7.
87. Liochev SI, Fridovich I. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic Biol Med* 2007; 42(10): 1465-9.

88. Liu K, Tsao S, Yin M. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytother Res* 2005; 19(11): 942-5.
89. Lou Z, Wang H, Zhu S, Ma C, Wang Z. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *J Food Sci* 2011; 76(6): M398-403.
90. Lushchak VI. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta Biochim Pol* 2006; 53(4): 679-84.
91. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1970.
92. Maćkowiak K, Torliński L. Współczesne poglądy na rolę witaminy C w fizjologii i patologii człowieka. *Nowiny Lekarskie* 2007; 76(4): 349-56.
93. Manandhar NP, Manandhar S. Plants and people of Nepal. Timber Press, Inc. Portland, Oregon 2002.
94. Markham KR, Ternai B, Stanley R, Geiger H, Mabry TJ. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 1978; 34: 1389-97.
95. Markham KR, Ternai B. ¹³C NMR of flavonoids – II. Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron* 1976; 32: 2607-12.
96. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113(3-4): 173-215.
97. Matławska I, Sikorska M, Szauffer-Hajdrych M, Bylka W, Goślińska O. Plant extracts as antimicrobial agents. *Pol J Pharmacol* 2004; 56, suppl.: 159.
98. Matu EN, van Staden J. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *J Ethnopharmacol* 2003; 87(1): 35-41.
99. Meng CC, Jalil AMM, Ismail A. Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk and white chocolates on the Malaysian market. *Molecules* 2009; 14(1): 200-9.
100. Mezache N, Akkal S, Laouar H, Seguin E. Flavonoids from *Chrysanthemum myconis* and their antibacterial activity. *Chem Nat Comp* 2009; 45(5): 715-6.
101. Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 2004; 85: 231-7.
102. Miwa S, Brand MD. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(Pt 6): 1300-1.
103. Mladenka P, Zatloukalová L, Filipický T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2010; 49(6): 963-75.

104. Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(5): 861-70.
105. Mowszowicz J: Pospolite rośliny naczyniowe Polski. Państwowe Wydawnictwo Naukowe; Warszawa 1977.
106. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417(1): 1-13.
107. Nenadis N, Lazaridou O, Tsimidou MZ. Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. *J Agric Food Chem* 2007; 55(14): 5452-60.
108. Nováková L, Spáčil Z, Seifrtová M, Opletal L, Solich P. Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures. *Talanta* 2010; 80(5): 1970-9.
109. O'Brien KM, Dirmeier R, Engle M, Poyton RO. Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem* 2004; 279(50): 51817-27.
110. Odhav B, Beekrum S, Akula U, Baijnath H. Preliminary assessment of nutritional value of traditional leafy vegetables in KwaZulu-Natal, South Africa. *J Food Compost Anal* 2007; 20(5): 430-5.
111. Odontuya G, Hoult JR, Houghton PJ. Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytother Res* 2005; 19(9): 782-6.
112. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J-H, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(1): 18-35.
113. Pałczyński A, Podbielkowski Z, Polakowski B. Botanika. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1994.
114. Panizzi L, Caponi C, Catalano S, Cioni PL, Morelli I. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *J Ethnopharmacol* 2002; 79(2): 165-8.
115. Park Y, Moon BH, Lee E, Hong S, Lee S, Lim Y. The ¹H and ¹³C NMR data of 19 methoxyflavonol derivatives. *Bull Korean Chem Soc* 2008; 29(1): 81-4
116. Pawlaczyk J, Zając M. Walidacja metod analizy chemicznej. Wydanie 3. Wydawnictwo naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2005.

117. Pawłowski B, Jasiewicz A. Flora Polska. Rośliny Naczyniowe Polski i Ziemi Ościennych. Tom XII. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa-Kraków 1971.
118. Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005; 45: 108-11.
119. Peterson RT. A Field Guide to Edible Wild Plants: Eastern and Central North America. Houghton Mifflin Harcourt, New York 1977.
120. Pino JA, Gaviria M, Quevedo-Vega J, García-Lesmes L, Quijano-Celis CE, Essential oil of *Galinsoga parviflora* leaves from Colombia, *Nat Prod Commun* 2010; 5(11): 1831-2.
121. Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, Jerala R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306(2): 530-6.
122. Plekhanova TI, Bandyukova VA, Mikhailova GA. Flavonoids of *Galinsoga parviflora*. *Khim Prirod Soedinenii* 1977; 6: 862.
123. Podbielkowski Z. Wędrówki roślin. Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne, Warszawa 1995.
124. Podlewski J, Chwalibogowska-Podlewska A. Leki współczesnej terapii. Wydanie XX. Medical Tribune, Warszawa 2010.
125. Prasain JK, Wang CC, Barnes S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(9): 1324-50.
126. Pretto JB, Cechinel-Filho V, Noldin VF, Sartori MRK, Isaias DEB, Cruz AB. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). *Z Naturforsch C* 2004; 59(9-10): 657-62.
127. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011; 82(4): 513-23;
128. Ramesar S, Baijnath H, Govender T, Mackraj I. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity of nutritive plants in KwaZulu-Natal. *J Med Food* 2008; 11(2): 331-6.
129. Ranilla LG, Kwon Y-I, Apostolidis E, Shetty K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresour Technol* 2010; 101(12): 4676-89.
130. Razali N, Razab R, Junit SM, Aziz AA. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chem* 2008; 111: 38-44

131. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(9-10): 1231-7.
132. Rhama S, Madhavan S. Antibacterial activity of the flavonoid, patulitrin isolated from the flowers of *Tagetes erecta* L. *Int J PharmTech Res* 2011; 3(3): 1407-9.
133. Rice-Evans CA, Packer L. Flavonoids in Health and Disease. Marcel Dekker, Inc. New York 1998.
134. Rosu CM, Manzu C, Olteanu Z, Oprica L, Oprea A, Ciornea E, Zamfirache MM. Several fruit characteristics of *Rosa* sp. genotypes from the northeastern region of Romania. *Not Bot Horti Agrobi* 2011; 39(2): 203-8
135. Salawu SO, Ogundare AO, Ola-Salawu BB, Akindahunsi AA. Antimicrobial activities of phenolic containing extracts of some tropical vegetables. *Afr J Pharm Pharmacol* 2011; 5(4): 486-92.
136. Sarwa A. Wielki leksykon roślin leczniczych. Wydawnictwo „Książka i Wiedza”, Warszawa 2001.
137. Schmeda-Hirschmann G, Tapia A, Theoduloz C, Rodríguez J, López S, Feresin GE. Free radical scavengers and antioxidants from *Tagetes mendocina*. *Z Naturforsch C* 2004; 59(5-6): 345-53.
138. Schmidt C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luik S, Flores EMM, Bittencourt CF, Zanetti GD, Heinzmann BM, Laufer S, Merfort I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J Ethnopharmacol* 2009; 122(3): 523-32.
139. Seddik K, Nadjat I, Abderrahmane B, Daoud H, Lekhmici A. Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* Asso. leaves and some phenolic compounds. *J Med Plant Res* 2010; 4(13): 1273-280.
140. Sell P, Murrell G. Flora of Great Britain and Ireland, Vol. 4, Campanulaceae-Asteraceae. Cambridge University Press, New York 2006.
141. Senderski ME. Zioła. Praktyczny poradnik o ziołach i ziołolecznictwie. Wydawnictwo K.E. Liber; Warszawa 2009.
142. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc* 2010; 69(3): 273-8.
143. Siddhuraju P, Becker K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chem* 2007; 101: 10-19.
144. Simões CM, Falkenberg M, Mentz LA, Schenkel EP, Amoros M, Girre L. Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine* 1999; 6(3): 205-14.

145. Smolarz HD, Budzianowski J, Bogucka-Kocka A, Kocki J, Mendyk E. Flavonoid glucuronides with anti-leukaemic activity from *Polygonum amphibium* L. *Phytochem Anal* 2008; 19: 506-13.
146. Spácil Z, Nováková L, Solich P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta* 2008; 76(1): 189-99.
147. Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 797-821.
148. Stepnowski P, Synak E, Szafranek B, Kaczyński Z. Techniki separacyjne. Uniwersytet Gdański, Gdańsk 2010.
149. Stobiecki M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 2000; 54(3): 237-56.
150. Strzelecka H, Kamińska J, Kowalski J, Malinowski j, walewska E. Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych. PZWŁ, Warszawa 1987.
151. Strzelecka H, Kowalski J. Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000.
152. Sung WS, Lee DG. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure Appl Chem* 2010; 82(1): 219-26.
153. Szczepaniak W. Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, wyd. 4, Warszawa 2002.
154. Szepczyńska K, Wolbiś M. Związki polifenolowe *Galinsoga ciliata* (RAF.) BLAKE (Compositae). *Acta Pol Pharm* 1984; 41(1): 117-21.
155. Szweykowski J i A. Botanika. Systematyka. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995.
156. Szweykowski J i A. Słownik Botaniczny. Wydawnictwo „Wiedza Powszechna”, Warszawa. 743; 1993.
157. Tariq S, Ferheen S, Moazzam M, Jabbar A, Riaz N, Saleem M, Afza N, Malik A, Tareen RB. Phytochemical studies on *Galinsoga parviflora*. *J Chem Soc Pak* 2008; 30: 762-5.
158. Tene V, Malagón O, Finzi PV, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. *J Ethnopharmacol* 2007; 111(1): 63-81.
159. Thomas E, Dykeman P. Edible Wild Plants: A North American Field Guide. Sterling Publishing Co., Inc. New York 1990.
160. Tuñón MJ, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, González-Gallego J. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Curr Drug Metab* 2009; 10(3): 256-71.

161. Tutin T. Flora Europaea. Vol. 4. eds Tutin T, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. Cambridge Univ. Press, Cambridge 1976.
162. Tzvelev NN. Flora of Russia (vol. 7): The European Part and Bordering Regions. CRC Press, A.A. Balkema-Rotterdam-Brookfield 2002.
163. Valant-Vetschera KM, Wollenweber E, Faure R, Gaydou E. New exudate flavonoids of species from the *Chrysanthemum complex* (Asteraceae-Anthemideae). *Biochem Syst Ecol* 2003; 31(5): 545-8.
164. van Acker SA, van Balen GP, van den Berg DJ, Bast A, van der Vijgh WJ. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1998; 56(8): 935-43.
165. Vanderslice JT, Higgs DJ. Vitamin C content of foods: sample variability. *Am J Clin Nutr* 1991; 54(6 Suppl): 1323S-7S.
166. Varma PN, Vaid I. Encyclopaedia of Homoeopathic Pharmacopoeia, vol. II: Eberthinum - Ozonum. B. Jain Publishers (P) Ltd., New Delhi 2002.
167. Vichapong J, Sookserm M, Srijesdaruk V, Swatsitang P, Srijaranai S. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *Food Sci Technol* 2010; 43(9): 1325-30.
168. Vinson JA, Bose P. Comparative bioavailability of synthetic and natural vitamin C in guinea pigs. *Nutr Rep Int* 1983; 27(4).
169. Vinson JA, Bose P. Comparative bioavailability to humans of ascorbic acid alone or in a citrus extract. *Am J Clin Nutr* 1988; 48(3): 601-4.
170. Weinder-Wells MA, Altom J, Fernandez J, Fraga-Spano SA, Hilliard J, Ohemeng K, Barrett JF. DNA gyrase inhibitory activity of ellagic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8(1): 97-100.
171. Wierzbicki A. Żółtlica skuteczna w egzemie. *Wiadomości Zielarskie* 1993; 3: 19.
172. Wilson RJ, Beezer AE, Mitchell JC. A kinetic study of the oxidation of L-ascorbic acid (vitamin-C) in solution using an isothermal microcalorimeter. *Thermochim Acta* 1995; 264: 27-40.
173. Witkiewicz Z. Podstawy chromatografii. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne. Warszawa 2005.
174. Wolter H. Therapeutic experiments with new herbal derivatives in homeopathy, *Allgemeine-Homoeopathische-Zeitung* 1983; 228(1): 17-22.
175. Wu D, Kong Y, Han C, Chen J, Hu L, Jiang H, Shen X. D-Alanine:D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(5): 421-6.
176. www.caymanchem.com
177. www.millipore.com

178. www.plants.usda.gov
179. www.waters.com
180. Yineger H, Kelbessa E, Bekele T, Lulekal E. Plants used in traditional management of human ailments at Bale Mountains National Park, Southeastern Ethiopia. *J Med Plant Res* 2008; 2: 132-53.
181. Yokota K. Cellular mechanism of synergistic stimulation of PGE₂ production by phorbol diester and Ca²⁺ ionophore A23187 in cultured Madin-Darby canine kidney cells. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288(1): 192-201.
182. Zaremba ML, Borowski J. *Mikrobiologia lekarska*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1997.
183. Żyracka E, Zadrag R, Koziol S, Krzepińko A, Bartosz G, Biliński T. Yeast as a biosensor for antioxidants: simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. *Acta Biochim Pol* 2005; 52(3): 679-84.

Oświadczenia

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem **pracy doktorskiej** p.t.:

**„Badania fitochemiczne związków polifenolowych w ziele żółtlicy drobnokwiatowej
(*Galinsoga parviflora* Cav. Asteraceae).”**

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 dyskietka/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.

Justyna Chanaj-Kaczmarek

Poznań, 12-02-2013

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia 12-02-2013

Justyna Chanaj-Kaczmarek