

**UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**



Izabella Łajs

**Fitochemiczne badania porównawcze wyciągów ze świeżych i
wysuszonych surowców roślinnych**

**Phytochemical Comparative Studies of Extracts from Fresh
and Dried Plant Materials**

Rozprawa doktorska

Poznań 2013

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

Promotor: **prof. dr hab. Irena Matławska**

***Pani prof. dr hab. Irenie Matławskiej** pragnę serdecznie
podziękować za ogromną pomoc, szereg cennych wskazówek, serdeczność,
życzliwość, wyrozumiałość, trud i poświęcenie związane
z powstaniem niniejszej pracy
~serdecznie dziękuję~*

*Pracownikom Katedry i Zakładu Farmakognozji, szczególnie
Pani dr Mirosławie Szauffer-Hajdrych, Panu mgr inż. Jackowi Borys
za czas który poświęcili, pomoc oraz wielką
cierpliwość i wyrozumiałość*

*Pracę tą dedykuję moim **rodzicom, mężowi i córce**, dzięki którym
mogłam uzyskać wykształcenie i którzy zawsze we mnie
wierzyli i wspierali
~serdecznie dziękuję~*

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI

I.	WSTĘP I CEL PRACY	1
II.	CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	2
1.	Sposoby otrzymywania przemysłowego wyciągów roślinnych	2
1.1.	Rodzaje wyciągów ze względu na stan zagęszczenia.....	2
1.1.1.	Metody otrzymywania wyciągów	3
1.1.2.	Urządzenia do ekstrakcji surowców roślinnych wykorzystywane w produkcji	6
1.1.3.	Solubilizatory stosowane jako substancje pomocnicze w technologii ekstrakcyjnej	7
1.2.	Wyciągi i ich wytwarzanie wg Farmakopei Polskiej wydanie IX.....	7
2.	Skład, działanie, zastosowanie wybranych surowców roślinnych	10
2.1.	Owies zwyczajny (<i>Avena sativa</i> L.)	11
2.1.1.	Charakterystyka botaniczna, występowanie	12
2.1.2.	Wymagania klimatyczne i glebowe	14
2.1.3.	Skład chemiczny	15
2.1.4.	Działanie i zastosowanie.....	17
2.2.	Podbiał pospolity (<i>Tussilago farfara</i> L.)	20
2.2.1.	Charakterystyka botaniczna, występowanie	21
2.2.2.	Wymagania klimatyczne i glebowe	22
2.2.3.	Skład chemiczny	22
2.2.4.	Działanie i zastosowanie.....	22
2.3.	Miłorząb japoński (dwuklapowy) (<i>Ginkgo biloba</i> L.).....	26
2.3.1.	Charakterystyka botaniczna, występowanie	27
2.3.2.	Wymagania klimatyczne i glebowe	29
2.3.3.	Skład chemiczny	30
2.3.4.	Działanie i zastosowanie.....	31
2.4.	Oczar wirginijski (<i>Hamamelis virginiana</i> L.)	36
2.4.1.	Charakterystyka botaniczna, występowanie	37
2.4.2.	Wymagania klimatyczne i glebowe	38
2.4.3.	Skład chemiczny	39

2.4.4. Działanie i zastosowanie.....	40
2.5. Melisa lekarska (<i>Melissa officinalis</i> L.).....	45
2.5.1. Charakterystyka botaniczna, występowanie	46
2.5.2. Wymagania klimatyczne i glebowe	46
2.5.3. Skład chemiczny	47
2.5.4. Działanie i zastosowanie.....	49
3. Polifenole jako naturalne antyoksydanty	51
3.1. Wybrane grupy polifenoli.....	51
3.2. Działanie polifenoli	55
4. Znaczenie antyoksydantów w produktach spożywczych, lekach i kosmetykach.....	56
III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	59
1. Materiał do badań.....	59
1.1. Przygotowanie wyciągów	59
1.1.1. Otrzymywanie soku (<i>succus</i>) ze świeżych surowców roślinnych	59
1.1.2. Otrzymywanie nalewki (<i>tinctura</i>) z wysuszonych surowców roślinnych ...	60
2. Oznaczenia ilościowe wybranych grup związków w sokach i nalewkach	61
2.1. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem Folin - Ciocalteu.....	61
2.1.1. Odczynniki i aparatura.....	61
2.1.2. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla roztworu wzorcowego kwasu chlorogenowego.....	61
2.1.2.1. Analiza statystyczna.....	63
2.1.3. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w badanych próbach	65
2.2. Oznaczenie zawartości flawonoidów metodą wg Christa - Müllera	70
2.2.1. Odczynniki i aparatura.....	70
2.2.2. Oznaczenie zawartości flawonoidów w badanych próbach.....	71
3. Badania biologiczne	75
3.1. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej badanych wyciągów za pomocą analizy z rodnikiem DPPH	75
3.1.1. Odczynniki i aparatura.....	75
3.1.2. Przygotowanie prób do oznaczeń	76
3.1.3. Zawartość surowca [mg] w objętości pobieranych soków/nalewek [ml] do analizy z rodnikiem DPPH.....	93
4. Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych wyciągów	105

4.1.	Materiał do badań	105
4.2.	Przeprowadzenie badań mikrobiologicznych.....	106
5.	Oznaczanie ilościowe wybranych grup związków w badanych surowcach roślinnych świeżych i wysuszonych	107
5.1.	Przygotowanie wyciągów ze świeżych i wysuszonych surowców roślinnych	107
5.1.1.	Otrzymywanie wyciągów metanolowych (M).....	107
5.1.2.	Otrzymywanie wyciągów metanolowo-wodnych (MW).....	108
5.2.	Oznaczenie straty masy po suszeniu	109
5.2.1.	Aparatura.....	109
5.2.2.	Wykonanie oznaczenia	109
5.2.3.	Strata masy po suszeniu	109
5.3.	Oznaczenie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem Folin - Ciocalteu...	111
5.3.1.	Odczynniki i aparatura.....	111
5.3.2.	Krzywa kalibracyjna dla roztworu kwasu chlorogenowego	111
5.3.3.	Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w badanych próbach	111
5.4.	Oznaczenie zawartości flawonoidów metodą wg Christa - Müllera	122
5.4.1.	Odczynniki i aparatura.....	122
5.4.2.	Oznaczenie zawartości flawonoidów.....	122
IV.	DYSKUSJA	126
V.	WNIOSKI	139
VI.	STRESZCZENIE	141
VII.	SUMMARY	143
VIII.	SPIS TABEL I RYCIN	145
IX.	PIŚMIENNICTWO	153
X.	DOKUMENTACJA	162

I. WSTĘP I CEL PRACY

W dobie ogromnego postępu technologicznego i istnienia syntetycznych preparatów leczniczych i pielęgnacyjnych, specyfiki zawierające w swym składzie substancje roślinne cieszą się niesłabnącą popularnością. Niewyczerpanym źródłem różnorodnych składników naturalnych jest świat roślinny.

Skład chemiczny roślin jest złożony i obejmuje zarówno związki proste, jak i połączenia bardziej skomplikowane, z których wiele ma silne działanie biologiczne. W związku z tym jako składniki preparatów roślinnych, wykorzystywanych zarówno w celach leczniczych i kosmetycznych stosuje się wyizolowane poszczególne związki, uznane za substancje aktywne lub też całe zespoły związków obecnych w roślinie, podawane w postaci odpowiedniego przetworu, najczęściej wyciągu. Stosowanie wyciągu powoduje najczęściej lepszy efekt terapeutyczny niż pojedynczy związek ze względu na współdziałanie synergistyczne wszystkich składników chemicznych wyciągu.

Preparaty zawierające związki naturalne lub wyciągi roślinne są często lepiej akceptowane przez konsumentów i uważane za bardziej bezpieczne. Udowodniono, że zmniejszają one ryzyko wystąpienia wielu chorób, zaliczanych do cywilizacyjnych lub łagodzą ich powikłania i spowalniają procesy prowadzące do przedwczesnego starzenia się organizmu.

Na skład roślin wpływają różne czynniki, wynikające ze zmienności genetycznej, środowiskowej i rozwojowej, ale także istotne są warunki zbioru, przechowywania i otrzymywania wyciągów roślinnych. W dalszym ciągu ograniczone są dane na temat różnic w składzie wyciągów przygotowywanych ze świeżych surowców roślinnych i surowców, poddanych uprzednio procesowi suszenia. Różnice w składzie mogą rzutować na skuteczność bądź osłabienie lub brak skuteczności preparatów otrzymanych na bazie wyciągów roślinnych.

Celem pracy były badania porównawcze przemysłowo otrzymanych (Zakłady Zielarskie Phytopharm Kłęka S.A) wyciągów z wysuszonych surowców w formie nalewek (*tinctura*) i świeżych surowców w formie soków (*succus*). Do przygotowania wyciągów wytypowano: liść podbiału - *Farfarae folium*, ziele melisy - *Melissae herba*, ziele owsa - *Avenae herba*, liść miłorzębu japońskiego - *Ginkgo bilobae folium* oraz korę oczaru wirginijskiego - *Hamamelidis cortex*. Badania porównawcze obejmowały: oznaczenie zawartości związków polifenolowych i flawonoidowych oraz aktywności antyoksydacyjnej i przeciwdrobnoustrojowej w sokach i nalewkach. Dodatkowo przeprowadzono też oznaczenie zawartości związków polifenolowych i flawonoidowych bezpośrednio w surowcach świeżych i wysuszonych.

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Sposoby otrzymywania przemysłowego wyciągów roślinnych

Wyciągi roślinne otrzymywane są poprzez wytrawienie materiału roślinnego rozpuszczalnikiem, najczęściej wodą lub etanolem i ich mieszaninami, a następnie odpowiednio zagęszczane. Zawierają one mieszaninę wielu składników, chociaż na ich skład ma wpływ: rodzaj i stopień rozdrobnienia, metody ekstrakcji i suszenia surowca, a z kolei na skład surowców roślinnych mają wpływ m. in.: warunki uprawy (miejsce, nawożenie) i warunki zbioru.

1.1. Rodzaje wyciągów ze względu na stan zagęszczenia

Ze względu na stan zagęszczenia, wyróżnia się następujące rodzaje wyciągów:

- wyciągi suche (*Extracta sicca*) o konsystencji sypkiego proszku i zawartości wody nie więcej niż 5% powstałe po całkowitym odparowaniu rozpuszczalnika. Dla wyciągów tych określa się tożsamość, oznacza się: zawartość substancji czynnych, stratę masy po suszeniu, popiół, zanieczyszczenia mikrobiologiczne oraz metale ciężkie. Wyciągi suche stosuje się w technologii aptecznej do przygotowania proszków lub otrzymywania mniej stężonych przetworów z surowców zielarskich, np. syropów, nalewek, wyciągów płynnych, a także składnikami granulatów, tabletek, kapsułek, czopków. Stanowią trwałą postać leku pod warunkiem prawidłowego ich przechowywania. Ze względu na higroskopijność, należy przechowywać w szczelnie zamkniętych naczyniach, niekiedy nad środkami osuszającymi, np. żelem krzemionkowym lub w opakowaniach, zawierających w nakrętce wkładkę z substancją osuszającą [Janicki i inni 2006].

- wyciągi gęste (*Extracta spissa*) to gęste, plastyczne lub półplastyczne masy o zawartości wody do 30%, są ciemne, maziste, lepkie, nietrwałe, podatne na rozwój mikroflory, jak i zmiany charakteru składników czynnych, co spowodowane jest działalnością enzymów. W zakładach przetwórstwa zielarskiego jest półproduktem do szybkiego dalszego przerobu przy otrzymywaniu granulatów, tabletek, a także jako dobra substancja wiążąca [Janicki i inni 2006].

- wyciągi płynne (*Extracta fluida*) są przezroczyste, barwne o zapachu i smaku właściwym dla wytrawionego surowca. Dla wyciągów tych określa się tożsamość, oznacza się: zawartość substancji czynnych lub suchą pozostałość. Określa się też zawartość alkoholu etylowego,

gęstość, zanieczyszczenia metalami ciężkimi i mikrobiologiczne. Trwałość wyciągów płynnych zbliżona jest do trwałości nalewek, a stężenie substancji czynnych jest takie same, jak w surowcu (1: 1) [Janicki i inni 2006].

- wyciągi olejowe (*Extracta olea*), stanowią formę wyciągów płynnych, ponieważ do wytrawiania suchego surowca roślinnego używany jest olej roślinny jako rozpuszczalnik, a wytrawieniu ulegają substancje o charakterze lipofilowym [Janicki i inni 2006].

- wyciągi rzadkie (*Extracta tenua sive mollia*) przygotowane *ex tempore*. W wyciągach tych zawartość wody wynosi od 50% - 60%. W warunkach przemysłowych wyciągi te stosuje się do sporządzania granulatu lub tabletek [Janicki i inni 2006].

1.1.1. Metody otrzymywania wyciągów

Podstawowym procesem technologicznym otrzymywania wyciągów z surowców naturalnych jest ekstrakcja, polegająca na wytrawianiu (oparte o zjawisko dyfuzji) za pomocą rozpuszczalników. Od sposobu podawania rozpuszczalnika rozróżnia się: periodyczne metody ekstrakcji, w których rozpuszczalnik podawany jest jednorazowo lub w częściach oraz ciągle metody ekstrakcji, w których surowiec styka się stale ze świeżym rozpuszczalnikiem [Brud i Glinka 2001].

Periodyczne metody ekstrakcji mogą być jednostopniowe i wielostopniowe. W metodach jednostopniowych na początku procesu podaje się całą ilość rozpuszczalnika. W momencie wyrównania stężeń między zawartością komórki, a rozpuszczalnikiem, proces kończy się automatycznie [Brud i Glinka 2001].

Maceracja to najprostszy sposób ekstrakcji; rozdrobniony surowiec zalewa się rozpuszczalnikiem ekstrahującym, a następnie po kilku dniach zlewa się macerat z nadwyekstrahowanego materiału. Dwa równoległe procesy zachodzą w przypadku rozdrobnionego wysuszonego surowca: rozpuszczalnik wnika do uszkodzonych komórek powierzchniowych, powodując rozpuszczanie zawartości komórki i przenika do wnętrza nieuszkodzonej komórki, przez ścianę komórkową, zbudowaną z celulozy, posiadającą właściwości pęcznienia i przepuszczania roztworów molekularnych.

Zanim rozpuszczalnik wniknie do komórki, musi spowodować jej spęcznienie. Zgrupowane blisko siebie cząsteczki celulozy, przyciągają z dużą siłą cząsteczki wody lub innego rozpuszczalnika, który dostaje się do wnętrza komórek i powoduje spęcznienie zaszuszonej

plazmy oraz rozpuszczenie zawartych w nich związków. W związku z tym we wnętrzu komórki powstaje stężony roztwór, w stosunku do rozpuszczalnika, znajdującego się poza komórką, wytwarza się duża różnica stężeń. Poprzez błonę komórkową dyfundują rozpuszczone cząsteczki związków niskomolekularnych, natomiast zatrzymane zostają wysokomolekularne, np. koloidy. Dyfuzja trwa do zrównoważenia się stężenia roztworu wewnątrz komórki ze stężeniem zewnętrznym. Ekstrakcja kończy się po ustaleniu się równowagi. Całkowita ekstrakcja surowca podczas tego procesu jest nieosiągalna [Brud i Glinka 2001].

Modyfikacja maceracji:

- maceracja z mieszaniem - surowiec miesza się w maceratorze obrotowym,
- maceracja ultradźwiękami - w krótkim czasie łatwiej uzyskać całkowite wytrawienie surowca,
- maceracja w podwyższonej temperaturze od 30° – 50° C (dygestia),
- maceracja w podwyższonej temperaturze i ciśnieniu,
- maceracja wielokrotna,
- turbo ekstrakcja - ekstrakcja wirowa [Janicki i inni 2006, Muller i Hildebrand 1998].

Ciągłe metody ekstrakcji - świeży rozpuszczalnik dopływa bez przerwy do surowca i wypiera stopniowo mniej lub bardziej nasycony roztwór. Przez cały czas ekstrakcji utrzymuje się maksymalna różnica stężeń, pomiędzy roztworem znajdującym się w komórce, a płynem po jej zewnętrznej stronie. Metoda ta gwarantuje w pierwszych frakcjach wyciągu dobrą wydajność całkowitą i wysokie stężenie początkowe związków czynnych.

Metody ekstrakcji ciągłej to:

- perkolacja - ciągła ekstrakcja, w której z surowca roślinnego wmywane są związki chemiczne ciągłym lub periodycznie zmiennym strumieniem rozpuszczalnika. Metoda ta stosowana jest w farmacji do otrzymywania wyciągów roślinnych i nalewek. W procesie tym następuje całkowite wytrawienie surowca, wytwarzanie preparatów zagęszczonych jak również zmniejszenie ilości używanego rozpuszczalnika [Brud i Glinka 2001, Muller i Hildebrand 1998].
- diakolacja - Została wprowadzona przez Breddina, jest to metoda perkolacji ciśnieniowej, prowadzona w stosunkowo wąskich rurach. Szybkość wkrapiania jest bardzo mała, dzięki temu można ekstrahować ilością rozpuszczalnika, równą ilości surowca. W ten sposób otrzymuje się wyciągi płynne w stosunku 1:1.
- ewakolacja - metoda została opracowana przez Kesslera i polega na wykorzystaniu różnicy ciśnień. Rury o średnicy 17 mm i długości 800 mm napełnia się surowcem, przez który

przepuszcza się rozpuszczalnik, stosując podciśnienie. Do regulowania szybkości przepływu wykorzystana została różnica między ciśnieniem wewnątrz aparatu, a ciśnieniem zewnętrznym [Brud i Glinka 2001, Muller i Hildebrand 1998].

- wytrawienie za pomocą aparatu soxhleta - kroplami z chłodnicy spływa rozpuszczalnik na surowiec wytrawiając go, następnie poprzez urządzenie syfonujące przelewa się do kolby, ogrzewając do wrzenia, a pary kondensują na chłodnicy. Obieg rozpuszczalnika powtarza się, nielotna część wyciągu pozostaje w kolbie [Brud i Glinka 2001].

Poza w/w metodami ekstrakcji ciągłej stosuje się:

- wytrawienie za pomocą baterii perkolatorów,
- wytrawienie ciągle przeciwprądowe,
- wytrawienie gazami, najczęściej CO₂ [Muller i Hildebrand 1998].

Wyciągi płynne (*Extracta fluida*) sporządza się przez wytrawianie surowca roślinnego mieszaniną alkoholu etylowego z wodą [1g wyciągu zawiera ciała czynne z 1g surowca (1:1)]. Metodą dwustopniowej perkolacji dokonuje się wytrawienie surowca; w pierwszym etapie zbiera się płyn wyciągowy w ilości 85% masy wytrawionego surowca i odstawia się, a w drugim etapie prowadzi się perkolację do zupełnego wyczerpania surowca. Otrzymany w drugim etapie perkolacji płyn wyciągowy, zagęszcza się do objętości 15 cz. i miesza się z pierwszą częścią perkolatu tak, aby została zachowana proporcja 1:1. Obniżone ciśnienie i temperatura procesu nie przekraczająca 50°C są czynnikami warunkującymi stabilność substancji czynnych podczas zagęszczania. Proces zagęszczania przeprowadza się w odpowiednich wyparkach. Mieszaninę obu płynów wyciągowych pozostawia się na 3 doby w temperaturze 15°C i sączy. Proces otrzymywania wyciągów płynnych, przeprowadza się w warunkach przemysłowych w baterii ekstraktorów z mieszadłem lub perkolatorów [Janicki i inni 2006].

Wyciągi suche (*Extracta sicca*) sporządza się z płynu wyciągowego przez oddestylowanie rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem, do określonej suchej pozostałości. W warunkach laboratoryjnych, wytrawienie surowca przeprowadza się metodą perkolacji dwustopniowej, stosując jako rozpuszczalnik alkohol etylowy o różnym stężeniu. W skali przemysłowej proces ten przeprowadza się w bateriach ekstrakcyjnych, wykorzystując metody dynamiczne. Zastosowanie mają też dodatkowe operacje technologiczne, nie normowane wymaganiami farmakopealnymi. Są nimi najczęściej: wstępne odbalastowanie surowców rozpuszczalnikami niepolarnymi, przeprowadzenie zespołu czynnego do fazy polarnej i reekstrakcja w fazie ciecz - ciecz, rozpuszczalnikami wybiórczymi, często przy zróżnicowanej kwasowości tych procesów.

Proces zagęszczania w warunkach laboratoryjnych przeprowadza się w wyparkach, a płyn wyciągowy zagęszcza się do masy o konsystencji syropu, zawierającej 60 - 85% suchej masy. W suszarkach próżniowych przeprowadza się całkowite odparowanie rozpuszczalnika. W celu szybkiego zagęszczenia płynu wyciągowego w stosunkowo niskiej temperaturze, stosuje się wyparki obiegowo lub cienkowarstwowe (suszenie ochronne) [Janicki i inni 2006].

Wyciągi gęste (*Extracta spissa*) otrzymuje się na ogół metodą ekstrakcji bateryjnej, z zastosowaniem zróżnicowanych technik. Jako rozpuszczalnik może być zastosowany etanol w mieszaninie z wodą lub woda. Do uzyskania masy gęstej i lepkiej, o konsystencji mazistej, zawierającej około 70% suchej masy, przeprowadza się zagęszczenie.

Wyciągi olejowe (*Extracta olea*) otrzymuje się w wyniku maceracji dynamicznej. W warunkach przemysłowych stosowane są maceratory z mieszadłem z możliwością prowadzenia procesu ekstrakcji w podwyższonej temperaturze. Zbiera się płyn wyciągowy przez odciekanie, a surowiec poddaje prasowaniu, najczęściej w prasie ślimakowej. Połączone płyny wyciągowe sączy się [Janicki i inni 2006].

1.1.2. Urządzenia do ekstrakcji surowców roślinnych wykorzystywane w produkcji

Urządzenia do ekstrakcji surowców roślinnych można podzielić na:

- wielkoprzemysłowe - stosuje się w zakładach o ograniczonym asortymencie produkcji, zajmujących się izolacją czystych związków, np. alkaloidów maku.

W produkcji przemysłowej stosowane są wyparki cienkowarstwowe próżniowe. Różnorodność konstrukcji tych urządzeń jest duża, zależy od wielu czynników (m.in. od lepkości zagęszczanych cieczy). Do oddestylowania cieczy o małej lepkości stosuje się wyparki Expanding - Flow, natomiast dla cieczy o dużej lepkości wyparki systemu Liprotherm. Często używane są wyparki cylindryczne kilkumetrowej wysokości, ogrzewane płaszczowo.

- laboratoryjno - apteczne - stosuje się klasyczne perkolatory, ekstraktory kołowe, wyparki obiegowo, rotacyjne (Rotavapor). W produkcji laboratoryjnej przeprowadza się ekstrakcję wirową przy pomocy szybko obrotowych mieszadeł, które obracają się wewnątrz nieruchomego statora. Naczynie ekstrakcyjne otoczone jest spiralą chłodzącą, znajdującą się w naczyniu z wodą. Płyn w naczyniu ekstrakcyjnym musi być utrzymywany w stałej temperaturze. W przypadku wzrostu temperatury (powyżej temperatura wrzenia) może dojść do degradacji związków czynnych zawartych w płynie.

Podczas zagęszczania wyciągów z surowców roślinnych pojawia się piana. Na skutek dużej szybkości cyrkulacji, w wyparkach obiegowych rozbicie piany zachodzi prawie automatycznie. Urządzenie do rozbijania piany składa się ze stożkowatych talerzy osadzonych na wydrążonej wewnątrz osi. Na wewnętrznej stronie talerzy znajdują się radialnie ustawione blaszki. Urządzenie to posiada własny napęd i dzięki uszczelkom może być zamontowane do urządzeń pracujących pod zwiększonym lub zmniejszonym ciśnieniem [Janicki i inni 2006, Muller i Hildebrand 1998].

1.1.3. Solubilizatory stosowane jako substancje pomocnicze w technologii ekstrakcyjnej

W technologii ekstrakcyjnej, w celu poprawienia rozpuszczalności w wodzie substancji trudno w niej rozpuszczalnych, bez spowodowania zmian chemicznych, stosuje się solubilizatory objętne. Najczęściej stosuje się solubilizatory niejonogenne, takie jak:

- Tween 20 - monolaurynian polioksyetylenosorbitanu,
- Tween 40 - monopalmitynian polioksyetylenosorbitanu,
- Tween 60 - monostearynian polioksyetylenosorbitanu,
- Tween 80 - monooleinian polioksyetylenosorbitanu

Przyspieszają one też resorpcję wielu związków [Brod i Glinka 2001].

Do zlikwidowania piany w wyciągach używa się środków przeciw pienieniu, takich jak: olejów roślinnych (sojowego, lnianego), smalcu, pochodnych kwasów tłuszczowych, alkoholu oktylowego, cetylowego, poliglikole i silikony. Substancje te powinny:

- usuwać elastyczność powierzchni piany,
- posiadać niskie napięcie powierzchniowe,
- łatwo rozprzestrzeniać się po powierzchni piany,
- posiadać małą rozpuszczalność [Janicki i inni 2006, Muller i Hildebrand 1998].

Substancje pomocnicze: syrop skrobiowy, maltodekstryna, glukoza, skrobia, mannitol, koloidalna krzemionka, celuloza i jej pochodne, stosowane jako dodatek podczas suszenia rozpyłowego, w celu otrzymania produktu o ograniczonej higroskopijności oraz o określonej zawartości substancji czynnych [Janicki i inni 2006].

1.2. Wyciągi i ich wytwarzanie wg Farmakopei Polskiej wydanie IX

Wg FP IX wyciągi (extracta) określone są jako przetwory o konsystencji: płynnej, do których zalicza się wyciągi i nalewki, półstałej to wyciągi gęste i oleozywice oraz stałej

stanowiące wyciągi suche. Wyciągi te otrzymywane są z substancji roślinnej lub substancji pochodzenia zwierzęcego, które w większości są w postaci wysuszonej. Ze względu na zastosowanie i sposób wytwarzania można wyróżnić kilka rodzajów wyciągów, np.:

- wyciągi standaryzowane - doprowadzone są do wymaganej zawartości składników o znanej aktywności terapeutycznej, z uwzględnieniem przyjętej tolerancji. Standaryzację uzyskuje się przez dodanie do wyciągu substancji obojętnej lub przez zmieszanie partii wyciągów,
- wyciągi kwantyfikowane (oznaczone ilościowo) - doprowadzone są do określonej zawartości składników. Dostosowanie uzyskuje się przez zmieszanie partii wyciągów,
- inne wyciągi określane są przez proces ich produkcji (postać substancji roślinnej lub zwierzęcej użytej do wytrawiania, warunki ekstrakcji, rozpuszczalnik) oraz ich specyfikacje.

Wytwarzanie wyciągów związane jest z zastosowaniem odpowiednich metod przy użyciu etanolu lub innych rozpuszczalników. Przed wtrawianiem różne serie substancji pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego mogą być zmieszane. Wytrawiana substancja roślinna lub zwierzęca poddana może być wstępnemu procesowi, np.: inaktywacji enzymów, rozdrabnianiu lub odtłuszczaniu. Natomiast niepożądane składniki mogą być usuwane po wytrawieniu [[Farmakopea Polska IX 2011](#)].

Użyte do przygotowania wyciągów substancje roślinne lub pochodzenia zwierzęcego muszą być zgodne ze stosowaną monografią farmakopealną.

Ze względu na konsystencje wyróżnia się:

- wyciągi płynne (*Extracta fluida*) - są przetworami o konsystencji płynnej, w których pierwsza część ich masy lub objętości odpowiada pierwszej części wysuszonej substancji roślinnej lub pochodzenia zwierzęcego. Wyciągi tego rodzaju są przygotowywane z użyciem etanolu o określonym stężeniu lub wody do wytrawiania substancji roślinnej lub pochodzenia zwierzęcego albo też przez rozpuszczenie w etanolu bądź w wodzie wyciągu gęstego lub suchego.
- nalewki (*Tincturae*) - są płynnymi przetworami otrzymanymi przez wytrawianie jednej części substancji roślinnej lub pochodzenia zwierzęcego i pięciu części rozpuszczalnika. Nalewki są przygotowywane przez macerację lub perkolację, używając tylko etanolu o odpowiednim stężeniu do wytrawiania substancji roślinnej lub pochodzenia zwierzęcego względnie przez rozpuszczenie w etanolu wyciągu gęstego lub suchego. Nalewki są przezroczystymi przetworami. Niewielki osad powstały w wyniku przechowywania nalewki jest akceptowany, dopóki skład przetworu nie zmieni się znacząco.
- wyciągi gęste (*Extracta spissa*) - są przetworami półstałymi otrzymanymi przez odparowanie lub częściowe odparowanie rozpuszczalnika użytego do wytrawiania.

- oleożywice (*Oleoresina*) - półstałe roztwory żywicy w olejku eterycznym lub w oleju tłustym. Otrzymywane są przez odparowanie rozpuszczalnika bądź rozpuszczalników użytych do ich wytwarzania.
- wyciągi suche (*Extracta sicca*) - przetwory o stałej konsystencji, otrzymywane przez odparowanie rozpuszczalnika użytego do ich wytwarzania. Strata masy po suszeniu w wyciągach suchych nie powinna być większa niż 5% (m/m) [[Farmakopea Polska IX 2011](#)].

2. Skład, działanie, zastosowanie wybranych surowców roślinnych

Rośliny są bogatym źródłem substancji biologicznie aktywnych, które oddziałują na organizm człowieka, zapobiegają chorobom, mają właściwości lecznicze, ale też mogą być źródłem groźnych trucizn. Działanie farmakologiczne zależy od chemicznej budowy danej substancji, dawki oraz sposobu podania. W kosmetyce powszechnie stosuje się wyciągi z surowców pochodzenia roślinnego, pozyskiwane z owoców, kwiatów, liści, kłaczy, korzeni oraz kory. Mają one często charakter metabolitów wtórnych. Najczęściej pozyskuje się je z tych organów, w których nagromadzona jest ich największa ilość.

W niniejszym rozdziale przedstawię skład i działanie pięciu wybranych roślin, z których w lecznictwie wykorzystywane są surowce: *Avenae herba*, *Farfarae folium*, *Ginkgo bilobae folium*, *Hamamelidis cortex*, *Melissae herba*, z których wyciągi są wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym.

2.1. Owies zwyczajny (*Avena sativa* L.)



Rycina 1. *Avena sativa* L. [<http://pl.wikipedia.org/wiki/Owies>]

2.1.1. Charakterystyka botaniczna, występowanie

Nazwa owies notowana jest w polszczyźnie od XIV wieku, jednak pochodzenie tego słowa sięga zamierzchłej przeszłości. Proslowiańska nazwa owies jest starą nazwą zboża, pochodzącą od słowa *anig* - z języka indoeuropejskiego lub wywodzi się z języka greckiego - *aigilops* [Mitrofanov 1968]. *Avasám* i *avasa* to pokrewne słowa, które były używane przez etymologów od 1500 r. p.n.e. w języku staroindyjskim. Owies głuchy (*Avena fatua*), jako chwast pszenicy płaskurki (*Triticum dicoccum*) pojawił się na terenach Europy w epoce starszego brązu, w drugim tysiącleciu. Na obszarach Danii, Szwecji, Finlandii oraz Wyspach Brytyjskich, owies wyparł wymagającą pszenicę. Ziarna owsa głuchego znaleziono też w wykopaliskach biskupińskich (z ok. 700 r. p.n.e.). Jako chwast leczniczy owies stosowano w starożytnej Grecji. Owies nagi (*Avena nuda*) uprawiano w Chinach od VII wieku n.e. Po raz pierwszy do Ameryki sprowadzono to zboże w 1602 roku, a do Australii w XVIII wieku. Na ziemiach polskich traktowano początkowo owies jako chwast, natomiast uprawa związana jest z pobytem Celtów na polskich obszarach. Odciski ziarniaków owsa znaleziono między innymi na stanowiskach archeologicznych w Mogile (Kraków - Nowa Huta) oraz w Nowej Cerekwi (Opolskie) [Gąsiorowski i Cierniewska 1995].

Pod względem systematycznym owies (*Avena*) należy do rodziny traw (*Gramineae*), podrodziny wiechlinowate (*Baeoideae*), plemienia owsowatych (*Aveneae*). *Euavena* - owsy, to zboże jednoroczne, dzikie gatunki i chwasty, natomiast *Avenastrum*, to wieloletnie trawy łąkowe i pastwiskowe. Owies jary i ozimy, to formy związane z okresem wegetacji zboża. W Polsce uprawiany jest owies jary, w Wielkiej Brytanii, Francji, Belgii na ziarno wysiewa się owies ozimy, a w Ameryce, Australii i Nowej Zelandii na kiszonkę i siano [Gąsiorowski i Cierniewska 1995].

Systematyka botaniczna rodzaju *Avena* jest skomplikowana i w trakcie opracowywania. Opierając się na poliploidalności dzieli się go na trzy grupy: diploidalna ($2n = 14$), tetraploidalna ($2n = 28$) i heksaploidalna ($2n = 42$). Gatunki różnią się: liczbą i morfologią chromosomów, kształtem wiechy, pokrojem rośliny, charakterystyką plew i plewek oraz w przypadku gatunków dzikich, sposobem rozsiewania się (osypywania). Większość z gatunków rodzaju *Avena* stanowią rośliny dziko rosnące i chwasty. Do roślin uprawnych należy przede wszystkim owies siewny *Avena sativa* (ok. 90% upraw na świecie), rzadziej uprawia się pozostałe gatunki: *Avena strigosa*, *Avena abyssinica*, *Avena byzantina* i *Avena fatua* [Leggett 1992].

Korzeń (*radix*) - system korzeniowy wiązkowy. W początkowej fazie kiełkowania ziarna, wykształcają się korzenie zarodkowe, następnie powstaje system korzeniowy, tworzący się z korzeni pozarodkowych, które wyrastają z węzłów łodygowych. System korzeniowy stanowi rozgałęzioną masę nitkowatą, rozchodzącą się w różnych kierunkach, w promieniu 20 cm na głębokości 80 cm. W przesuszonych warstwach gleby pojedyncze korzenie, mogą dochodzić do głębokości 2 m [Gąsiorowski i Cierniewska 1995].

Łodyga (*culmus*) - nazywana źdźbłem lub potocznie słomą. Wyróżnia się dwa rodzaje pędów: pęd główny, powstający ze stożka wzrostu i pędy boczne, które uformowały się w węzłach krzewienia. Zwykle wytwarza pięć źdźbeł, mających długość od 40 do 120 cm. Źdźbła główne i boczne są wyprostowane o kształcie cylindrycznym, wewnątrz puste, dojrzałe ma sześć do siedmiu pełnych węzłów. Łodyga owsa wraz z osadzonymi na niej liśćmi, spełnia rolę organu asymilującego oraz magazynującego składniki pokarmowe i produkty asymilacji.

Liść (*folium*) - w początkowej fazie rozwoju młode liście owsa skrócone są w lewo. Pochwa liściowa, otaczająca międzywęzła jest otwarta, natomiast brzegi jej zachodzą na siebie. Języczek (*ligula*), to cienka błonka poprzeczna między pochwą liściową, a blaszką liściową. Jest ona długa, zakończona stożkowato o brzegach ząbkowanych.

Wiecha (*panicula*) - jest kwiatostanem owsa. Osadka, złożona z węzłów i międzywęzli stanowi główną oś kwiatostanu, posiada ona boczne rozgałęzienia, na których osadzone są kłoski. Dla danej odmiany owsa, kształt wiechy jest zróżnicowany na dwa podstawowe typy:

- chorągiewkowata - ma odgałęzienia boczne, zwrócone w jedną stronę i ustawione w stosunku do osi kwiatostanu pod kątem 10 - 25°,
- rozpięchła - ma odgałęzienia boczne, które zwrócone są w różne strony w stosunku do osi głównej. W obrębie wiechy rozpięchłej wyróżnia się cztery podgrupy w zależności od ustawienia gałązek bocznych: zwisłą, krzaczastą, sztywną (wzniesioną) i rozstrzeloną [Herse 1979].

Na końcach rozgałęzień wiechy, mieszczą się kłoski, otoczone dwiema plewami, okrywającymi kwiatki (1-3, najczęściej są dwa) umieszczone na krótkiej osi. Kwiat owsa składa się z plewek: dolnej (zewewnętrznej) i górnej (wewnętrznej), słupka i trzech pręcików. Kwiatki są obupłciowe, a słupek jednozalążkowy, pierzasty. Kłoski dwu- lub trzykwiatkowe. Kształtem przypominają łódeczkę o regularnej powierzchni. Kwiatki są płodne, ziarniak dolny silnie rozwinięty, szczelnie zamknięty przez zewnętrzną plewkę kwiatową (*palea*) o siedmiu żyłkach, otaczającą ziarniak w 75%. Ziarniak górny znajduje się powyżej ziarniaka dolnego i osadzony jest na krótkim trzoneczku. Jest szczelnie zamknięty przez własne plewki kwiatowe [Gąsiorowski i Cierniewska 1995, Dubas i Gładysiak 1994].

Owoc (*fructus*) - suchy niepękający, jednonasienny ziarniak. Ziarniak owsa oplewionego zamknięty jest w łusce. Ziarniak owsa nagiego nie ma plewek. Grubość plewki kwiatowej waha się od 140 do 169 μm i stanowi średnio 25 - 30% masy ziarniaka. Powierzchnia ziarna owsa pokryta jest włoskami, które w zależności od położenia mają różne rozmiary. Włoski znajdujące się w bródce osiągają długość od 800 - 1200 μm , a grubość ich u podstawy wynosi 18 - 20 μm , włoski rozmieszczone w środkowej części ziarniaka mają długość 200 - 300 μm , a grubość 4 - 8 μm [Aufhammer i Fischbeck 1973].

2.1.2. Wymagania klimatyczne i glebowe

Łagodny klimat sprzyja uprawie owsa. Ziarna zaczynają kiełkować w temperaturze 2 - 3⁰C, a w okresie krzewienia temperatura powinna mieścić się od 13 do 18⁰C.

Podczas krzewienia i formowania ziarna, wysoka temperatura ma wpływ na nieprawidłową wielkość plonu [Gąsiorowski i Cierniewska 1995]. Owies posiada małe wymagania cieplne, dlatego zboże to odporne na ostry klimat, znajduje lepsze warunki uprawy w Polsce na północy, w rejonach podgórskich i górach na wysokości 700 m n.p.m. Obfite opady sprzyjają, a nadmiar wody, susze majowe oraz czerwcowe, osłabiają wzrost rośliny. Ilość wody potrzebna owsu do otrzymania 1 kg suchej masy to około 500 litrów, natomiast pszenica jara i jęczmień zużywają 350 - 400 litrów. Słoneczny i suchy okres od kwitnienia do zawiązywania się ziarniaków, sprzyja dobremu ich wypełnianiu oraz równomiernemu dojrzewaniu [Gąsiorowski i Cierniewska 1995].

Okres wegetacji owsa skraca się i wydłuża, zależnie od długości dnia, tzn. im dłuższy dzień tym krótszy okres rozwoju wegetatywnego. Wzrost rośliny, odbywający się przy dobrym oświetleniu, wzmacnia jej odporność na wyleganie i choroby, a proces fotosyntezy jest wyższy niż przy niedoborze światła [Gąsiorowski i Cierniewska 1995].

Wymagania glebowe owsa w przeciwieństwie do pszenicy i jęczmienia nie są zbyt duże. Najodpowiedniejszymi glebami, spełniającymi warunki są: wilgotne mady nadrzeczne, gliniaste szczyrki, nie przesuszone torfowiska, może być też uprawiany na ciężkich glebach gliniastych. Znosi gleby kwaśne i podmokłe, nie wymaga ich wapnowania. Położone wysoko na terenach górskich gleby orne, zaliczane są ze względu na warunki klimatyczne, do tzw. kompleksu owsiano - ziemniaczanego (na wysokości 500 - 700 m n.p.m.) [Gąsiorowski i Cierniewska 1995, Dobrzański i Zawadzki 1999].

Ze względów klimatycznych w różnych rejonach kraju za optymalny okres wysiewu owsa, uważa się termin od 15 do 25 marca, najpóźniej do 10 kwietnia [Gąsiorowski i Cierniewska 1995].

2.1.3. Skład chemiczny

Owies posiada różnorodne związki chemiczne w różnych częściach rośliny. Duże ilości węglowodanów występują w słomie, ziarniakach i korzeniach, natomiast dobrze przyswajalne białko w ilości 7 - 23 % zawiera ziele i ziarno. W ziarnach wykryto związki sterolowe, a przede wszystkim β -sitosterol, δ -awenasterol oraz stigmasterol. W słomie owsianej, ziele i ziarniakach, znaleziono saponiny steroidowe (avenakozyd A i avenakozyd B) [European Medicines Agency 2008]. Obecność saponin tri terpenowych, wykryto w korzeniach owsa, a związki flawonoidowe w ziele owsianym i słomie, natomiast w ziarnie znaleziono również alkaloidy: delkozynę, delsominę i likoktoninę, a także witaminę C, tłuszcz i melatoninę. Plewka i ziarno owsa jest bogate w składniki mineralne i witaminy oraz znaczne ilości krzemu w formie rozpuszczalnej [European Medicines Agency 2008, Glinka R. i Glinka M. 2008].

BIAŁKA - owies zawiera znaczną ilość globulin, stanowiących około 50 - 80% masy wszystkich białek [Bartnikowska i inni 2000] oraz niską zawartością prolamin i gluteliny 20 - 25%. Aminokwasowy skład obłuszczonego ziarniaka owsa jest bardziej korzystny pod względem żywieniowym, niż w przypadku innych zbóż, głównie ze względu na większą zawartość ważniejszych aminokwasów egzogennych (lizyna, treonina, metionina). W owsie występuje średnio wyższa niż w innych zbożach, zawartość lizyny (4,2%), treoniny (3,3%) oraz fenyloalaniny i tyrozyny (w sumie ponad 8,8%). Wyższa jest zawartość tryptofanu - 1,3%, a także metioniny - ponad 3% w wybranych odmianach [Gąsiorowski i Cierniewska 1995]. Obserwowano też wysoką zawartość aminokwasów o łańcuchach rozgałęzionych (leucyna + izoleucyna - 16,6 %). Podobnie do innych zbóż, prolamin zawierają około 43% sumy gluteliny (gliadyna + prolamina) oraz niższą od pozostałych frakcji, zawartość głównych aminokwasów egzogennych, ale poziom lizyny jest w niej niższy niż u prolaminy innych zbóż. Poziom aminokwasów o łańcuchach rozgałęzionych jest w prolamie owsa wysoki (18%), aminokwasów aromatycznych nie odbiega od poziomu w całym ziarnie, a zawartość metioniny - ponad 3% jest w tej frakcji najwyższa. Korzystnym składnikiem aminokwasowym z żywieniowego punktu widzenia są albuminy i globuliny, które stanowią

wspólnie około 70% białka ogółem, to właśnie ich poziom wpływa na wartość żywieniową owsa i produktów jego przerobu [Gąsiorowski 2003].

WĘGLOWODANY - 1% całkowitej ilości mono- i oligosacharydów, stanowi sacharoza (640 mg/100g), fruktoza (91mg/100g), rafinoza (190mg/100g) i glukoza (52mg/100g), zawartość polisacharydów w owsie jest niska, dominuje tu skrobia, około 55%, a więc około 10% mniej w porównaniu do innych zbóż, zmagazynowana w bielmie. [Bartnikowska i inni 2000]. Oprócz skrobi na uwagę zasługują: hemiceluloza i celuloza, tworzące strukturę ścian komórkowych, składowe błonnika pokarmowego.

TŁUSZCZE - pod względem zawartości tłuszczu (4 - 10%) owies zdecydowanie przewyższa inne zboża uprawiane w Polsce. Lipidy zawarte w ziarniakach owsa, występują w postaci polarnego tłuszczu złożonego (fosfolipidy i glikolipidy) oraz niepolarnego tłuszczu prostego (triacyloglicerole, monoacylglicerole, wolne kwasy tłuszczowe), ponadto towarzyszą im sterole i estry kwasów tłuszczowych. Nienasycone kwasy tłuszczowe, stanowią około 80% wszystkich kwasów. Są to głównie kwasy: oleinowy (29 - 53%), linolowy (24 - 48%), α - linolenowy (1-5%), a także kwasy o dłuższych łańcuchach: arachidonowy, eikozapentaenowy, dokozaheksaenowy [Gąsiorowski i Cierniewska 1995]. Spożycie 100g płatków owsianych, pozwala na pokrycie około 30% dziennego zapotrzebowania człowieka na kwas linolowy [Gąsiorowski 2003]. NNKT spełniają ważną rolę w przemianach biochemicznych organizmu oraz w regulacji czynności fizjologicznych (np. poprzez syntezę prostaglandyn) [Gąsiorowski 2003]. Kwasy te hamują również proces agregacji płytek krwi, zapobiegając w ten sposób powstawaniu zakrzepów. Zdolność obniżania cholesterolu, poprzez zastosowanie diety owsianej, jest spowodowana obecnością: błonnika pokarmowego, kwasu linolowego, polifenoli oraz fitosteroli.

PRZECIWIUTLENIACZE - należą do nich związki polifenolowe: kwasy hydroksybenzoesowe - pochodne kwasu protokatechowego, hydroksycynamonowe- *p*-kumarowy, ferulowy i kawowy, Ponadto w ziarnie owsa do związków wykazujących właściwości przeciwutleniające, zalicza się: amidy, alkilofenole, flawonoidy i awentramidyny [Peterson 2001, Gąsiorowski i Cierniewska 1995]. Przeciwutleniające działanie polifenoli, polega na ich zdolności do łączenia się z metalami - Fe i Cu, uniemożliwiając ich udział w procesach enzymatycznych utleniania. Mogą też oddawać elektron wolnym rodnikom, co je unieczynnia [Hanczakowski 2002]. Aktywność przeciwutleniająca kwasów fenolowych zależy od ich budowy chemicznej, a dokładniej od grup metyloksylowych czy hydroksyloowych w cząsteczkach kwasów. Awentramidyny są termo stabilne, stąd ich zdolności przeciwutleniające nie obniżają się, mimo przeprowadzanych zabiegów

technologicznych [Dimberg i inni 1993]. Aktywność związków jest zbliżona do syntetycznych przeciwutleniaczy, takich jak: butylohydroksytoluen (BHT) i galusan propylu [Rosicka - Kaczmarek 2004]. Odnaczają się również działaniem bakteriostatycznym, poprawiają pracę serca i wywierają pozytywny wpływ na krążenie oraz zapobiegają chronicznym zapaleniom [Finley 2004], nawet chorobom nowotworowym. Negatywną stroną obecności awentramidyn jest obniżenie przyswajalności białek [Rosicka - Kaczmarek 2004].

FITYNIANY - ziarno owsa zawiera 0,76 - 1,1% kwasu fitynowego, co w porównaniu z ziarnami innych zbóż, jest średnią wartością [Gąsiorowski i Cierniewska 1995]. Kwas fitynowy i jego pochodne ze względu na trwałe wiązanie P, Ca, Fe, Mg, Mn, Zn i Cu z przewodu pokarmowego, uważano jedynie za czynniki antyodżywcze. Z powodu wiązania jonów metali przejściowych (Fe, Cu), kwas fitynowy można uważać za związek, który wykazuje działanie przeciwutleniające, które chroni komórki błony śluzowej jelita. Jako źródło mezoinozytolu, należącego do grupy witamin o nieznannej bliżej funkcji koenzymatycznej, posiada właściwości czynnika wzrostowego, przeciwmiażdżycowego, przeciwcukrzycowego i przeciwrakowego [Gąsiorowski i Cierniewska 1995, Bartnikowska 1997].

WITAMINY - zawiera witaminy z grupy B (B₁, B₂, B₆), kwas pantotenowy, witaminę E i K. [Gąsiorowski 1994].

SOLE MINERALNE - produkty zbożowe są źródłem soli mineralnych. Najwięcej ich jest w zarodku i warstwie peryferyjnej ziarna. Substancje mineralne, zawarte w ziarnie owsa są dodatnio skorelowane z zawartością składników włókna pokarmowego. Na uwagę zasługują związki Ca, Mg, P, Fe oraz duże ilości rozpuszczalnej w wodzie krzemionki (91,7 - 2,8%), również cenny dla zdrowia Zn, m.in. w płatkach owsianych, młodym owsie, a w szczególności w plewach i otrębach. Na uwagę zasługuje również bardzo niska zawartość Na, co powinno być cenną informacją dla osób z niewydolnością układu krążenia [Gąsiorowski 1994, Makowska 2002].

2.1.4. Działanie i zastosowanie

Wyciągom z ziela owsa przypisuje się działanie wykrztuśne, przeciwbólowe, moczopędne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwzapalne, przeciwdepresyjne, uspakajające, nasenne, poprawiające metabolizm. Obniżają też poziom kwasu moczowego we krwi, wzmacniają układ nerwowy, dostarczają makro- i mikroelementów, chronią komórki wątroby przed uszkodzeniem, zapobiegają powstawaniu kamieni moczowych.

Płatki owsiane i ziarniaki działają powlekająco, dostarczają witamin, obniżają poziom cholesterolu i kwasu moczowego we krwi, działają oczyszczająco na jelita [Kozłowski i inni 2008]. Mąka i płatki owsiane mają działanie zmiękczające, z których wodne zawiesiny, wykorzystywane są do okładów na ropnie i czyraki. Po dodaniu ich do środków kosmetycznych, usuwają martwy naskórek, brud i osad z różnych powierzchni ciała. Mąka tworzy ochronny film na skórze, włosach oraz paznokciach [Jędrzejko i inni 2007].

Zastosowanie owsa w celach leczniczych:

- ekstrakt alkoholowy ze świeżej, całej rośliny, podawano grupie ochotników dla ułatwienia zaprzestania palenia papierosów, co znacznie zmniejszyło głód nikotynowy, dzięki temu ułatwiło rzucenie nałogowego palenia [Anand 1971]. Ekstrakt z zielonych części rośliny, zawiera w swoim składzie substancje o właściwościach antagonistycznych w stosunku do morfiny [Connor i inni 1975]. Ekstrakt z liści owsa wpływa na wydzielanie hormonu folikulotropowego (FSH) - hormonu płciowego z kory mózgowej, podwzgórza i przysadki [Sugawara i Webster 1986].

Wyciągi z ziela owsa wykorzystuje się w celach leczniczych:

- ✓ wewnątrznie: w chorobach nerek i pęcherza moczowego, kamicy moczowej, schorzeniach układu sercowo-naczyniowego i dróg oddechowych, nadczynności tarczycy, pomocniczo w padaczce i zaburzeniach przemiany materii; napary z ziarna podaje się w dnacie moczanowej, chorobach reumatycznych, wyczerpaniu nerwowym, osłabieniu, cukrzycy, nikotynizmie, przy zbyt wysokim poziomie cholesterolu we krwi; W leczeniu dietetycznym jako potrawę lekko strawną oraz jako środek powlekający w stanach zapalnych, podrażnieniach błony śluzowej jamy ustnej, gardła i przełyku, stosuje się płatki owsiane; W zaparciach, spowodowanych niewłaściwym odżywianiem oraz przy podwyższonym poziomie cholesterolu we krwi, zaleca się otręby owsiane.
- ✓ zewnątrznie: kąpiele z dodatkiem naparów z ziela i słomy okazują się pomocne w schorzeniach reumatycznych, stanach zapalnych skóry, trądziku, nadmiernej potliwości stóp, kamicy moczowej i chorobach nerek, polecane są dla osób wyczerpanych nerwowo, a także osłabionych [Kozłowski i inni 2008, Makowska 2002].
- w kosmetyce - produkty uzyskane z owsa, wywierają korzystny wpływ na skórę i nadają się do pielęgnacji cery tłustej i trądzikowej. Posiadają one właściwości

przeciwzapalne, łagodzą podrażnienia oraz skutecznie wzmacniają barierę naskórkową i działają antyoksydacyjnie, np. Golden Age 60⁺ Cream (AA Prestige), zawierający ekstrakt z ziarniaków owsa zwyczajnego. W preparatach znajdujemy także mąkę owsianą, która jest środkiem absorpcyjnym (pochlaniającym), umożliwiającym „wprowadzenie” do kosmetyków substancji, rozpuszczalnych w wodzie lub olejach, zmniejsza lub podwyższa lepkość kosmetyków, jest substancją natłuszczającą oraz wygładzającą (działa przeciwzmarszczkowo i opóźnia efekty starzenia skóry) [Jędrzejko i inni 2007]. Wyciąg z ziela owsa dodaje się do mydeł, balsamów, kremów i płynów do pielęgnacji ciała. W kosmetyce wykorzystuje się „Mleczko owsiane”, które jest wyciągiem z ziarniaków owsa, zawierającym hydrofilowe i lipidowe substancje aktywne, a właściwościami mleczka pielęgnacyjnego są: nawilżenie, odżywienie, dzięki obecności węglowodanów; regeneracja i natłuszczenie, dzięki obecności lipidów; łagodzenie i wzmacnianie systemu odpornościowego skóry, wynikające z działania beta-sitosterolu. Szampon na bazie mleczka z owsa jest bogaty w polisacharydy, działa łagodząco i ochronnie na łodygę włosa, jak i skórę głowy. Nadaje włosom miękkość i lekkość, a także ułatwia rozczesywanie włosów i zapobiega ich elektryzowaniu się, np. Szampon na bazie mleczka z owsa (Klorane) oraz maseczka odżywczo-odbudowująca, zawierająca mleczko z owsa (Yves Rocher) [Brud i Glinka 2001].

- w przemyśle spożywczym - biorąc po uwagę wartość odżywczą, trwałość, brak zdolności do wywoływania alergii, ziarniaki z owsa i produkty na bazie owsa, służą do przyrządzania najrozmaitszych potraw, dań śniadaniowych i obiadowych (płatki, pęczak, mąka, otręby, kasze i mieszanki owocowo - zbożowe typu müsli). Produkty owsiane służą jako zagęstniki do zup, sosów, odżywek oraz wypełniacze do pasztetów. Mąka owsiana jest składnikiem wielu odżywek dziecięcych [Fast i Caldwell 1990]. Produkty owsiane utrzymują długo świeżość, są stosowane w piekarnictwie i wypiekach domowych - chleb, bułeczki, ciasteczka i placki owsiane [Gąsiorowski 1994, Jędrzejko i inni 2007].

2.2. Podbiał pospolity (*Tussilago farfara* L.)



Rycina 2. *Tussilago farfara* L. [<http://www.miniaturkabeztajemnic.com/listaz.html>]

2.2.1. Charakterystyka botaniczna, występowanie

Podbiał pospolity (*Tussilago farfara* L.) należy do rodziny astrowatych (*Asteraceae*). Końskie kopyto, boże liczko, ośła stopa, białodrzew to nazwy regionalne podbiału [Dorda 2006, Glinka R. i Glinka M. 2008]. Jest wieloletnią rośliną niezwykle rozpowszechnioną w regionie holarktycznym, występuje w Europie, zachodniej i północnej Azji, północnej Afryce, w północnej Ameryce oraz na terenie Australii. W Polsce jest popularnym chwastem rosnącym w zaroślach, na brzegach rzek i stawów, rowach przydrożnych i grobli. Wyrasta również na zboczach i osuwiskach skalnych, pogorzeliiskach oraz nieużytkach (stare cegielnie, hałdy kopalniane, nieeksploatowane torowiska kolejowe). Spotyka się w zwartych łąkach, czasami razem z lepiężnikiem różowym (*Petasites officinalis* L.) lub innymi gatunkami lepiężników, których liście mogą stanowić zanieczyszczenia liści podbiału [Szweykowska i Szweykowski 2003]. Podbiał jest byliną, dochodzącą do 25cm wysokości. Łodyga kwiatowa (*stipula*) - nierozgałęzia się, jest bladożółta lub bladozielona, z czerwonymi łuskami oraz jedwabistymi włoskami na powierzchni. Najpierw powstają pędy kwiatostanowe na których szczytach wyrastają pojedynczo koszyczki o średnicy 2 - 3 cm, ze złocistożółtymi kwiatami języczkowymi, ułożonymi w kilku rzędach na obrzeżu i kwiaty rurkowate w środku koszyczka. Kwiaty języczkowe są kwiatami żeńskimi ze słupkiem, a kwiaty rurkowate są obupłciowe, słupek jest płodny, środek koszyczka wypełniają kwiaty męskie. Koszyczki podbiałów zamykają się przy braku słońca. Liście podbiału rozwijają się po przekwitnięciu koszyczków.

Liść (*folium*) - w zarysie jest okrągławy, posiada wycięcie u nasady, stąd wygląd jest nieco sercowaty, do 30 cm szerokości z czerniawymi „ząbkami” na ich brzegach; liście odziomkowe wyrastają z podziemnego kłącza. Najbardziej charakterystyczny dla liści podbiału jest białawy „kutner” (włoski biczowate 3 - 5 komórkowe), pokrywający ich spodnią stronę, stąd polska nazwa rodzajowa „podbiał”, młode liście są owłosione również na górnej stronie blaszki, owłosienie to szybko jednak zanika. Liście są bez zapachu i mają gorzki smak. Liść ma budowę bifacjalną: miękisz palisadowy 3 - warstwowy, miękisz gąbczasty z dużymi przestworami międzykomórkowymi (wiązki przewodzące otoczone włóknami). Na obu skórkach aparaty szparkowe z 4 - 9 komórkami przyszparkowymi [Kohlmünzer 2003].

Owoc (*fructus*) - razem z rozwojem liści już w kwietniu dojrzewają owoce, drobne niełupki z puchem kielichowym z pojedynczych włosków, nieco przypominające „dmuchawce”.

2.2.2. Wymagania klimatyczne i glebowe

Podbiał posiada niewielkie wymagania glebowe, lubi gleby podmokłe, gliniaste z dużą zawartością wapnia. W uprawach rolnych podbiał stanowi chwast i jest trudny do wytopienia, gdyż rozmnaża się przez podział pędów podziemnych - rozłogów. Porą zbioru jest wiosna, wcześniej niż liście, zbierane są koszyczki kwiatowe [Krześniak 1986].

2.2.3. Skład chemiczny

W celach leczniczych stosuje się liście (*Farfarae folium*) i koszyczki kwiatowe (*Farfarae flos*), zaliczane do surowców śluzowych. Polisacharydy śluzowe (7 - 8 %) hydroлизują do D(+) - galaktozy, L(+) - arabinozy, L(+) - ksylozy i kwasu D - galakturonowego. Dalszymi składnikami są garbniki (do 17%) oraz kwas galusowy, a także śladowe ilości olejku eterycznego, związki o gorzkim smaku, fitosterole (m.in. beta - sitosterol, stigmasterol), saponiny triterpenowe typu ursanu (alfa – amyryny) – m.in. pochodne faradiolu i arnidiolu, flawonoidy pochodne kemferolu i kwercetyny (m.in. hiperozyd, izokwercytryna, rutyna), cholina, inulina, kwasy organiczne (winowy, jabłkowy), kwas krzemowy, śladowe ilości substancji żywicznych oraz sole mineralne (17 - 20%), w tym zanieczyszczenia, gromadzące się w kutnerze spodniej strony liści - (m.in. Ca, Mg, Fe, Al., Zn, Mn). Alkaloidy pirolizydynowe stanowią około 0,000045%. Należą do nich tussilagina, izotussilagina, neotussilagina - estry necyny o charakterze nasyconym, które nie wykazują działania toksycznego; senecjonina i senkirkina, estry necyny posiadające wiązanie 1,2 - nienasycone i ich N - tlenki, działające hepatotoksycznie i karcynogennie [Matławska 2008]. W liściach roślin, pochodzących z Australii i Norwegii, znaleziono alkaloid pirolizydynowy senkirkinę, pochodzących ze środkowej i zachodniej Europy-tussilaginę [Kohlmünzer 2003, Yaoitay i inni 2001]. W lecznictwie stosuje się liście i kwiaty, otrzymywane z roślin o niskiej zawartości alkaloidów pirolizydynowych.

2.2.4. Działanie i zastosowanie

Lecznicze właściwości podbiału nawiązują do łacińskiej nazwy rodzajowej *Tussilago*, pochodzącej od łacińskiego *tussis*, *tussio* - kaszel i *agare* - odeprzeć; natomiast grecka nazwa podbiału *bechion*, utworzona została od słowa *bex*, czyli kaszel [Dorda 2006]. Hipokrates, Galen i Pliniusz stosowali podbiał w chorobach układu oddechowego, natomiast

błogosławiona Hildegarda zalecała zażywanie podbiału w chorobach „klatki piersiowej” i jako środek wykrztuśny. W zapaleniu oskrzeli, astmie i kaszlu, wdychano przez rurkę dym z palonych na węglu z drzew cytrusowych korzeni tej rośliny [Kruszewski 2001].

Surowiec stosuje się jako lek śluzowy (*mucilaginosum*), powlekający i ochronny (*protectivum*) i przyspieszający gojenie (*advulnantes*), wykrztuśny i odlegmający (*expectorans*), rozkurczowy (*spasmolyticum*) i goryczowy (*amarum*). Aktywności te wynikają z synergistycznego działania śluzu, garbników, flawonoidów, związków krzemu i triterpenów wraz z solami mineralnymi, kwasami organicznymi i śladami olejku eterycznego. Jest to surowiec pneumotropowy, wywiera wpływ na układ oddechowy, a w szczególności:

- działa rozkurczowo (flawonoidy, olejek eteryczny) - przy kaszlu (poprzez osłabienie odruchu wykrztuśnego), duszności oraz bólach w klatce piersiowej.

Wskazania: w leczeniu, profilaktyce chorób układu oddechowego, jak: lekkie stany zapalne górnych dróg oddechowych, ostre i przewlekłe zapalenie oskrzeli (*bronchitis chronica*) oraz w zapaleniu gardła i migdałków [Makowska i Alkiewicz 2000].

- działa wykrztuśnie (śluz, triterpeny, kwasy organiczne) - poprzez zmniejszenie lepkości zalegającego śluzu i umożliwienie komórkom urzęsionym, przesunięcia zalegającej wydzieliny w kierunku krtani, wywołuje odruch wykrztuśny, który jest utrudniony z powodu zmniejszonych odruchów kaszlowych.

Wskazania: krztusiec, przewlekły nieżyt dróg oddechowych z towarzyszącym kaszlem, gorączką, poceniem nocnym, zalegającym płynem surowiczo - śluzowym w oskrzelach, zapaleniem i gruźlicą płuc oraz innymi chorobami zakaźnymi [Makowska i Alkiewicz 2000].

- redukuje przekrwienie i obrzęki błon śluzowych (garbniki, kwas galusowy, flawonoidy) oraz nadmierne wydzielanie śluzu oskrzelowego, utrudniającego oddychanie i ułatwiającego rozwój bakterii

- działa odkażająco, łagodząc bóle gardła (garbniki, olejek eteryczny).

Wskazania: stany zapalne górnych dróg oddechowych, oskrzeli i płuc.

- pobudza regenerację tkanek, przyspiesza proces ziarninowania (gojenia) i zablizniania ran, posiada właściwości przeciwzapalne i ściągające (śluz, garbniki, sole mineralne, krzemionka, fitosterole).

- wewnątrznie - uszkodzenia śródmiąższowej tkanki płucnej w przebiegu przebytych chorób: przewlekła niewydolność krążenia, gruźlica płuc, grzybica płuc (*pneumomycosis*), narażenie na szkodliwe gazy i pyły, sarkoidoza.

- zewnątrznie - stany zapalne jamy ustnej, dziąseł i języka, utrudnione gojenie się ran, skórne zmiany ropiejące i wrzodziejące np. czyrak pojedynczy (*furunculus*), oparzenia (*combustionis*) i odmrożenia (*congelationis*) [Kozłowski i inni 2008].

- działa osłaniająco - stosowany w leczeniu nadreaktywności oskrzeli, napadowego skurczu dróg oddechowych, duszności (astma oskrzelowa); liść ma właściwości neuroprotektoryjne, antyoksydacyjne i przeciwzapalne, a mechanizm tego działania jest związany z hamującym wpływem na przemianę kwasu arachidonowego i produkcję tlenku azotu (NO) w makrofagach [Cho i inni 2005, Szumny i inni 2007].

Kwiat podbiału zaliczany jest przez Tradycyjną Medycynę Chińską (TMC) do środków leczących objawowo poprzez zmniejszanie odruchów kaszlu i usprawnianie przepływu powietrza co łagodzi duszności. Ze względu na swoje działanie, łączony jest z ziołami, działającymi przyczynowo, likwidującymi źródło dolegliwości. W zależności od czynników wywołujących schorzenie, kwiat podbiału połączono z następującymi ziołami:

- przy kaszlu spowodowanym przez przyczyny zewnętrzne:

- ziele przęśli (*Herba Ephedrae = ma huang*), ziele kopytnika z korzeniami (*Asari herba cum radicibus = xi xin*),
- owoc łopianu większego (*Arcti lappae fructus = niu bang zi*), korzeń przewiercienia chińskiego (*Bupleuri radix = chai hu*).

- przy kaszlu z przyczyn wewnętrznych, z ziołami wzmacniającymi:

- korzeń szałwii (*Salviae miltiorrhizae radix = dan shen*),
- kwiat krokosza barwierskiego (*Carthami tinctorii flos = hong hua*).

- przy kaszlu z gorąca, z ziołami oczyszczającymi:

- korzeń remanii kleistej (*Rehmaniae glutinosae radix = sheng di huang*),

- przy kaszlu z zimna, z ziołami ogrzewającymi wewnątrz:

- kora cynamonowca chińskiego (*Cinnamomi cassiae cortex = gui zi*) [Cho i inni 2005, Szumny i inni 2007].

Przeciwwskazania i ostrzeżenia:

Liście podbiału służą do przyrządzania wyciągów o działaniu powlekającym błony śluzowe. Z liści podbiału przygotowuje się głównie napary (*infusa*) i nalewki (*tincturae*), ze świeżego surowca: syropy (*sirupi*), soki (*succi*) i rzadko dziś spotykane powidełka (*electuaria*) [Janicki i inni 2006]. Liście stosowane są zewnątrznie w postaci okładów w chorobowych zmianach skórnych, np. wrzodach; a wewnątrznie w dychawicy oskrzelowej dawniej polecano palenie suszonych liści (np. w fajce) *per se* lub z innymi ziołami (np. liść tymianku - *Thymi folium*, kwiat lawendy - *Lavandulae flos*, a w bardzo ciężkich stanach nawet liść bielunia - *Stramonii*

folium). Wyciąg z surowca wchodzi w skład płynów: Farfplant, Mel Farfarae, Succus Farfarae, syropu Farfaron, pastylek do ssania „Tymianek i Podbiał”, Gardlox, mieszanek ziołowych: Neopektosan, Pektosan, syropów Pyrosal i Termasil (*antipyretica*), żelu do jamy ustnej Mucosit (*antiphlogisticum*).

Podbiał pospolity ze względu na swoje właściwości znalazł zastosowanie w preparatach kosmetycznych. Produkty te przyspieszają gojenie ran, działają przeciwzapalnie, kojąco przez co łagodzą podrażnienia skóry wrażliwej, naczynkowej, nadaje miękkość i regeneruje skórę np. Herbal cosmetics (Pierwoje Reshenie) zawierający wyciąg z liści podbiału; działają ochronnie na skórę np. Skin 79 The Oriental Gold BB Cream SPF 25, zawierający ekstrakt z kwiatów podbiału, a także posiadają właściwości ściągające i napinające skórę np. Herba Botanic-balsam modelujący (Biogened Polska), zawierający w składzie wyciąg z liści podbiału. Wykorzystywany w preparatach do pielęgnacji włosów, w połączeniu ze skrzypem wzmacnia i wygładza strukturę włosa oraz działa leczniczo na skórę głowy.

Wyciąg z liści podbiału ma zastosowanie w produkcji olejów do kąpieli, maseczek kosmetycznych, kremów i lotionów dla wrażliwej cery, jak również w preparatach do głębokiego oczyszczenia cery z zanieczyszczonymi porami oraz przeciw łupieżowi. W celu uzyskania maseczki dla przetłuszczającej się cery, wykorzystuje się tłuczone świeże liście podbiału. Ta sama maseczka ma doskonały wpływ również na zdrową cerę, nadając jej jędrny i świeży wygląd [Glinka i Glinka 2008, Jędrzejko i inni 2007]. W celu likwidacji plam wątrobowych na skórze, skutecznie pomaga systematyczne przemywanie twarzy odwarem z liści podbiału [Kozłowski i inni 2008].

Inne zastosowanie podbiału:

- w kuchni: z młodych liści podbiału przyrządza się sałatki, dodaje się do zup [Kozłowski i inni 2008],

- suszone liście dodaje się do tytoniu [Kruszewski 2001].

2.3. Miłorząd japoński (dwuklapowy) (*Ginkgo biloba* L.)



Rycina 3. *Ginkgo biloba* L. w stanie naturalnym

[<http://e-centrumogrodnicze.pl/produkt/rośliny---drzewa-i-krzewy/sadzonki-z-odkrytym-systemem-korzeniowym/iglaste/miłorzęb-japoński-998.html>]

2.3.1. Charakterystyka botaniczna, występowanie

Miłorząb japoński (dwuklapowy) (*Ginkgo biloba* L.) - należy do rodziny miłorzębowatych (*Ginkgoaceae*). Jest jedynym żyjącym liściastym drzewem nagozalążkowym. Jest gatunkiem długowiecznym, może dożywać nawet 2000 lat. Podobny jest do kopalnego gatunku *Ginkgo adiantoides*. Około trzydziestu milionów lat temu na kuli ziemskiej było rozpowszechnionych 17 gatunków miłorzębu [Heer 1974]. Gatunek endemiczny i reliktowy, występuje w regionach południowo - wschodnich Chin. Obszar 1018 ha zajmują stanowiska naturalne, zawierające 167 drzew w wieku powyżej 1000 lat, pierściny powyżej 123 cm oraz wysokości dwudziestu metrów, znajduje się też kilka drzew w wieku do 3400 lat i wysokości 40 m. Od XI wieku został rozpowszechniony przez buddyjskich mnichów na terenie całych Chin, a także Japonii, początkowo jako drzewo owocowe (jadalny zarodek - „pestka”), a później jako drzewo ozdobne w różnych rejonach świata [Kalisz i inni 2006].

Miłorząb został introdukowany z Japonii do Europy i Stanów Zjednoczonych w XVIII wieku, stąd nazywany jest często japońskim [Kobendza 1957/58]. Za najstarszy okaz w Europie, uważane jest drzewo w ogrodzie botanicznym w Utrechcie [Duiven 1970]. Przez 30 lat drzewo to było uprawiane w szklarni, później posadzono je do gruntu. Na większą skalę miłorzęby zaczęto sadzić od 1754 r. Okres sprowadzenia miłorzębu do Polski nie jest znany. Najstarsze rosnące drzewo w Polsce znajduje się w Łańcucie i zostało posadzone przez księżną Lubomirską na przełomie lat 1770/1780, a następnie w 1808 r. - w Ogrodzie Botanicznym w Krakowie, 1824 r. - w Ogrodzie Botanicznym w Warszawie, w parku w Puławach miłorząb posadzono między 1784 a 1820 r., 1827 r. - w arboretum w Kórniku, a także w Ogrodzie Dendrologicznym w Przelewicach oraz Witaszycach [Szymanowski 1996, Kalisz i inni 2006].

Na całym świecie występuje ok. 200 odmian, m.in.:

- „Bolesław Chrobry ” - blaszki pogrubione, postrzępione i pofryzowane, odmiana polska;
- „Stefan Batory” - wyhodowany na AR w Poznaniu;
- „Władysław Łokietek ” - bardzo drobne liście, bardzo wolno rośnie (10 lat osiąga 60 - 70 cm, a 20 lat - 1,7 m);
- „Mieszko I ” - pokrój stożkowy, średni wzrost, odmiana polska;
- „Przemysław II ” - wąski pokrój, odmiana polska;
- „Kazimierz Wielki ” - przewieszające pędy, korona kopulasta, pędy grube i długie, blaszki liściowe do 20cm, intensywnie i szybko rosnące, odmiana polska;

„Fastigiata” - wąska, kolumnowa, klon męski;

„Mariken” - holenderska, do małych ogrodów, szczepiona powstała z „czarciej miotły”, ciemniejsze liście, kuliste, niektóre liście zrosnięte po 2, klon męski;

„Pragense” - w Pradze w latach 60 - tych, początkowo pędy wzniesione do góry, po kilku latach pędy opadają, krótkie przyrosty 20 - 30 cm, klon męski;

„Saratoga” - amerykańska odmiana - z lat 80 - tych, inny kształt blaszki liściowej, podstawa zawsze klinowata, kopulasta korona, często krzewiasta, klon męski;

„Variegata” - powstała w Chinach w 1856 r., w 1995 trafiła do Polski, rośnie wolno, z białymi paskami lub plamami na liściach, bardzo duża zmienność liści, im więcej słońca tym bardziej pstra, korona szeroko kopulasta, klon żeński [cyt. wg Johnson i More 2009].

Miłorząb japoński jest drzewem dwupiennym rozdzielнопłciowym i wiatroplnym, mającym rozgałęziony system korzeniowy palowy i głęboki.

Pokrój - korona regularna, w młodości lekko stożkowata, gałęzie odrastają prostopadle do pnia lub kierują się ukośnie, niezbyt sztywne, lekko zwisające na końcach ku dołowi, z wiekiem korona staje się coraz bardziej rozłożysta, wierzchołek zaokrągla się i staje się cylindryczna. Drzewa żeńskie - mają pokrój zbliżony do okrytozalążkowych, a drzewa męskie - pokrój strzelisty.

Pień (*trunk*) - osiąga 4,5 metra średnicy w pierśnicy, prosty „strzałowaty”. Kora bruzdowana, u starszych drzew jest głęboko spękana. Gałęzie są prostopadle osadzone do pnia. Pędy zróżnicowane są na żółtawopopielate długopędy i znacznej długości krótkopędy o charakterystycznych wałeczkach, z wieloma śladami po opadłych liściach i łuskach. Długopędy roczne często są grubsze na końcach niż u nasady; żeńskie pędy mają pąki małe zaostrome, a męskie duże i zaokrąglone.

Liść (*folium*) - liście ułożone są skrętolegle na długopędach, na krótkopędach gęsto skupione po 3 - 5. Blaszka liściowa wachlarzowata, często z wcięciem, dzielącym liść na dwie klapy. Blaszka jest skórzasta, twarda, zielona, aparaty szparkowe jak u okrytozalążkowych, na spodniej stronie liście o unerwieniu widlastym, rozgałęziającym się dychotomicznie. Liście jesienią przed opadnięciem, przebarwiają się na intensywnie żółty kolor, utrzymują się na drzewie aż do ujemnych temperatur, a potem bardzo długo utrzymuje się żółta barwa leżących liści na powierzchni gleby.

Kwiat (*flos*) - wyrasta z kątów łusek lub liści pędów i jest mało widoczny. Kwiaty męskie tzw. kotkowe, osadzone są na krótkopędach; pręciki liczne ze zwisającymi i podłużnie pękającymi pylnikami, mocno pylą, a pyłek może być przenoszony nawet na odległość 1,5 km.

Kwiaty żeńskie (owocolistki) to dwa nagie zalążki, umieszczone na długich szypułkach, osadzonych na krótkopędzie. Przeważnie pojawia się parzysta liczba kwiatów (niepozorne kwiaty męskie i żeńskie pojawiają się w tym samym czasie, co liście) [Korszun 1995].

Owoc (*fructus*) - przypominający żółtą śliwkę na długiej szypule, otoczone mięsistą osnówką wokół pestki o średnicy około 2,5 cm do 3 cm, owoce z drzew opadają później niż liście (listopad), a rozkładająca się osnówka wydziela cuchnący zapach.

Drewno (*ksylem*) - przypomina wyglądem drewno drzew iglastych, wykorzystywane w rzeźbiarstwie, odporne na gnicie i ogień, posiada w swoim wyglądzie jedwabisty połysk i zwartą strukturę z dobrze widocznymi rocznymi słojami [Korszun 1995].

2.3.2. Wymagania klimatyczne i glebowe

Miłorząb jest gatunkiem wymagającym stanowiska słonecznego i dobrze rośnie w klimacie nadmorskim [Kobendza 1957/58]. Jest drzewem wiatroodpornym, wrażliwym na niskie temperatury, zwłaszcza jego siewki i młode okazy (6 - 10 letnie). Miłorząb rośnie wolno, a po 3 latach uprawy osiąga wysokość około 1m. Miłorząb można rozmnażać generatywnie (z nasion) i wegetatywnie (przez zdrewniałe sadzonki). Zdolność kiełkowania nasion w Polsce jest niska (20 do 30 %) z powodu niedojrzałości zarodków [Korszun 1995], natomiast sprowadzone z Korei, Chin i Japonii kiełkują w ok. 45%. Dojrzałe nasiona wykazują zdolność kiełkowania przez cały rok [Korszun 1993, Korszun 1995]. Nasiona przygotowuje się do siewu jesienią lub wiosną po uprzedniej stratyfikacji w temperaturze + 2⁰C przez okres od 30 - 60 dni [Kobendza 1957/58, Korszun 1995]. Rozmnażanie miłorzębu następuje poprzez ukorzenie zielonych sadzonek, pobranych z 1 - rocznych pędów, pół zdrewniałych i zdrewniałych, które ukorzeniają się w 40 - 70%, w zależności do zastosowanej substancji wzrostowej [Kalisz i inni 2006].

Zainteresowanie przemysłu farmaceutycznego uprawą miłorzębu wzrasta, ze względu na wykorzystywanie liści do produkcji leków.

Od 4 roku uprawy, corocznie zbiera się liście z roślin o wysokości około 60 cm [Balz 1991]. Największa plantacja miłorzębu o powierzchni 400 ha ma około 10 mln drzew i znajduje się w Południowej Karolinie (USA). Z 1 ha otrzymuje się 3 - 4 ton suszonych liści. W Polsce doświadczalna plantacja miłorzębu jest prowadzona od 1993r. w Akademii Rolniczej w Poznaniu oraz na plantacji Zakładów Zielarskich Phytopharm Klęka S.A.

Na uwagę zasługuje przystosowanie się miłorzębu do warunków miejskich (zanieczyszczenia powietrza, niska wilgotność), w których inne rośliny nie potrafiłyby już egzystować. Drzewo

to choruje rzadko i jest odporne na zanieczyszczenia środowiska. O wytrzymałości tych drzew świadczy fakt, że w 1923 r. w Tokio wiele starszych okazów przetrwało pożar po trzęsieniu Ziemi. Pomimo częściowo zwęglonych i opalonych konarów, wiosną wyrosły nowe pędy; miłorząb jest też wytrzymały na promieniowanie, przeżyło drzewo rosnące w epicentrum wybuchu jądrowego w Hiroszynie w 1945 r. [Kalisz i inni 2006].

2.3.3. Skład chemiczny

Badania fitochemiczne liści miłorzębu doprowadziły do wykrycia nowych i ciekawych struktur związków chemicznych. Zawartość składników czynnych roślin leczniczych zależy od warunków klimatycznych i gleby. Liście miłorzębu są zbierane tylko ze specjalnie prowadzonych plantacji i w określonym okresie wegetacji. W składzie chemicznym surowca wyodrębniono różne aktywne składniki, wśród których najważniejszymi są flawonoidy i terpenoidy [Glinka R. i Glinka M. 2008].

POLIFENOLE - flawony, flawonole, flawanonole, wg FP IX nie mniej niż 0,5% flawonoidów w przeliczeniu na glikozydy flawonowe, występują w postaci wolnej, jak również mono-, di- i triglikozydów oraz glikozydoestrów. Frakcja ta zawiera także biflawony, jako pochodne amentoflawonu oraz katechiny i oligomeryczne proantocyjanidyny. Flawonoidy, które występują w *Ginkgo biloba extract* (EGb) neutralizują wolne rodniki reaktywnych atomów pierwiastków lub grupy atomów, które mogą uszkodzić strukturalne elementy komórkowe. W standaryzowanych ekstraktach występują proantocyjanidyny i skondensowane garbniki (polimery o masie cząsteczkowej od 800 - 6000) w ilości około 7% [Weinges i inni 1968, Kalisz i inni 2006, Farmakopea Polska IX 2011].

TERPENOIDY - w ilości około 6% obecne są w surowcu, jest to druga grupa związków aktywnie czynnych. W grupie tej wyodrębniono laktony diterpenowe (ginkgolidy) oraz seskwiterpen trilaktonowy tzw. bilobalid. Ginkgolidy A, B, C, I, M to diterpeny o jednakowym szkielecie, różnią się podstawnikami. Podstawowy układ tych związków stanowi sześć pięciocłonowych pierścieni (3 pierścienie butanolidowo-laktonowe, dwa cyklopentanowe, jeden tetrahydrofuranowy). Produktem oksydatywnej degradacji biologicznej ginkgolidów jest bilobalid, w którym wyróżnia się 4 pierścienie - trzy butanolidowe i jeden cyklopentanowy z grupą t-butyłową [Kalisz i inni 2006, Farmakopea Polska IX 2011].

STEROLE - W liściu miłorzębu wyodrębniono sterole: β - sitosterol i jego glukozyd, kampesterol i 22 - dihydrobrassicasterol [Kalisz i inni 2006].

KWASY ORGANICZNE - nadają wyciągowi charakter kwaśny, poprawiają rozpuszczalność związków czynnych w wodzie. Standardowy wyciąg z *Ginkgo biloba* w swoim składzie zawiera np.: kwas 6 - hydroksykynurenowy, ferulowy, chlorogenowy, kawowy, waniliowy i *p* - kumarowy [Quaranta i inni 2003].

KWASY GINKGOLOWE – wykazują właściwości alergogenne, mogą również wykazywać działanie neurotoksyczne. Handlowe preparaty z *Ginkgo biloba* zawierają ograniczoną zawartość kwasów ginkgolowych i składników balastowych [Kalisz i inni 2006, Farmakopea Polska IX 2011].

2.3.4. Działanie i zastosowanie

Wyciągi z liści miłorzębu mają szerokie działanie farmakologiczne, a obserwacje kliniczne, potwierdziły skuteczność leczniczą. Wywierają one wpływ na mikrokążenie i krążenie obwodowe oraz parametry reologiczne. Skutecznie wpływają na naczynia krwionośne (tętnicze i żyłne), regulując cały układ naczyniowy poprzez:

- wpływ na układ adrenergiczny,
- wzmacnianie ścian naczyń krwionośnych przez co zapobiega i hamuje ich przepuszczalność,
- zwiększenie szybkości przepływu krwi w naczyniach, a zmniejszenie jej lepkości,
- oddziaływanie na żyły częściowo zależne od układu adrenergicznego
- zapobieganie niedokrwieniu tkanki mózgowej (ischemii).

Standaryzowane ekstrakty z liści miłorzębu, wykazują właściwości ochronne na naczynia krwionośne. Wpływ wyciągu *Ginkgo biloba* na OUN (ośrodkowy układ nerwowy) prowadzi do pobudzenia krążenia przez co poprawia ukrwienie, zwiększa ilość substancji metabolicznych oraz tlenu, które docierają do tkanek, powodując rozszerzenie tętniczek oraz zwiększa wykorzystanie przez komórki glukozy i tlenu, przywracając w ten sposób prawidłowy metabolizm w mitochondriach, glikolizę tlenową i syntezę ATP, stabilizuje błony lizosomalne, hamuje aktywność proteaz, reguluje prawidłowe napięcie naczyń.

Wyciąg z *Ginkgo biloba* działa antyoksydacyjnie, hamując powstawanie wolnych rodników nadtlenkowych, przeciwdziałając oznakom starzenia się, hamuje agregację płytek krwi, poprawia ukrwienie ślimaka w uchu wewnętrznym [Molski 2005].

Wykazując szerokie spektrum działania, wyciąg z liści *Ginkgo biloba* wykorzystuje się w:

➤ medycynie

Neurologia i psychiatria - wykazuje pozytywny wpływ w leczeniu demencji, chorobie Alzheimera, w psychozach różnego pochodzenia i zaburzeniach zachowania u ludzi starszych, a także w uszkodzeniach tkanki mózgowej na tle zmian naczyniowych (hipoksja, ischemia). Wcześniejsze badania u chorych i zdrowych, potwierdziły, że podawanie preparatu EGb761 zwiększa i usprawnia przepływ krwi przez mózg. Zaobserwowano zwiększone zużycie tlenu, a także glukozy w obrębie tkanki mózgowej [Drieu 1988]. Neurologicznie chorym z objawami niedokrwienia mózgu, podano preparat w dawce 160mg/dobę. Po dwóch miesiącach terapii przepływ krwi przez tkankę mózgową zwiększył się, uzyskując prawidłowe wartości fizjologiczne [Tea i inni 1979]. Stosowanie wyciągu *Ginkgo biloba* zmniejsza niewydolność mózgu, np. szumów usznych, zawrotów głowy, zaburzenia widzenia i równowagi, a także zmniejsza upośledzenie pamięci krótkotrwałej [Brage 1986]. Na uwagę zasługuje fakt, korzystnego działania terapeutycznego, wyciągu z *Ginkgo biloba*, u pacjentów z jaskrą [Quaranta i inni 2003]. Zmniejszał on także uszkodzenia reperfuzyjne po okresie niedokrwienia w siatkówce i zatrzymywał przedsiatkówkową proliferację w eksperymentalnym odwarstwieniu siatkówki [Baudouin i inni 1994, Kim i inni 1998]. U osób w wieku podeszłym po podaniu preparatu z liści miłorzębu, obserwowano poprawę pola widzenia [Raabe i inni 1991].

Prospektywne, otwarte, wieloośrodkowe kontrolowane badanie kliniczne z udziałem 156 chorych z łagodnym i umiarkowanym otępieniem, u których zastosowano EGb761 (240 mg/dobę) wykazało skuteczne działanie w 24 - tygodniowej terapii, natomiast stosując dawkę 120 mg/dobę przez 52 tygodnie u 202 chorych z wieloogniskowym otępieniem w kontrolowanym badaniu klinicznym z podwójnie ślełą próbą, uzyskano znaczną poprawę [Kanowski i inni 1996]. W porównaniu z grupą placebo, wykazano znamienne statystycznie usprawnienie procesów poznawczych u chorych, otrzymujących EGb761 w testach: ADAS - Cog i GERRI [Le Bars i inni 1997].

Badania kliniczne z zastosowaniem preparatów z liści miłorzębu w chorobie Alzheimera, wykazały następujące korzyści:

- polepszenie myślenia i poprawę pamięci,
- stabilizację aktywności dnia codziennego,
- poprawę w zachowaniach społecznych,

- zmniejszenie stanów depresyjnych [Itil i Mortorano 1995].

Na korzystny wpływ terapii EGb761 mogły mieć wpływ właściwości antyoksydacyjne preparatu, stabilizacja błon komórkowych, regulacja metabolizmu, zachodzącego w komórkach. W układzie cholinergicznym OUN (ośrodkowego układu nerwowego) wyciąg EGb761 poprawia syntezę i uwalnianie acetylocholino, oraz wzrost liczby receptorów cholinergicznym [Blecharz-Klin i inni 2003].

Standaryzowane ekstrakty *Ginkgo biloba* od lat są wykorzystywane w celu poprawy pamięci, uczenia i kojarzenia oraz koncentracji. W wielu przeprowadzonych badaniach stwierdzono u osób w średnim wieku (50 - 59 lat) polepszenie pamięci po podaniu EGb761 w dawce 120 mg/dobę. Stosując długotrwale ekstrakt z liści miłorzębu przez okres aż 52 tygodni w dawce 120 mg/dobę u osób w wieku 18 - 41 lat i osób starszych 45 - 90 lat z otępieniem, zauważono skuteczną poprawę funkcji neurologicznych [Moulton i inni 2001, Salomon i inni 2002].

W badaniach klinicznych długotrwale podawanie EGb761 przez okres 6 - 12 miesięcy powodowało dużą poprawę u chorych z zaburzeniami krążenia obwodowego. Wyciąg z miłorzębu japońskiego użyto do analizy czasowo - dystansowego chodu, która wykazała wydłużenie dystansu chodzenia bez dolegliwości bólowych o około 50 %.

Przeprowadzono kontrolowane badanie, wykorzystując wyciąg z liści miłorzębu EGb 761 w dawce 160mg/dobę u alpinistów, które wykazało łagodzenie objawów choroby wysokościowej i zmniejszenie zaburzeń krążenia obwodowego [Ernst 1996].

- Toksyczność i działania niepożądane - preparaty zawierające w składzie wyciąg z liści *Ginkgo biloba* są bezpieczne i dobrze tolerowane przez organizm człowieka pod warunkiem prawidłowego dawkowania leku. Przeprowadzone badania wykazały niską toksyczność wyciągu po podaniu myszom ($LD_{50} = 7725$ mg/kg) [Blumenthal i inni 1998].

Działania niepożądane jakie zaobserwowano u ponad sto tysięcy chorych, otrzymujących wyciąg z liści *Ginkgo biloba* miały na ogół przebieg łagodny, m.in.: kołatanie serca, bóle głowy, objawy ze strony przewodu pokarmowego i skórne reakcje alergiczne, odnotowano pojedyncze przypadki krwotoków podpajęczynówkowych i krwiaków podoponowych [Schneider i inni 2002].

Przeciwwskazaniem do stosowania standaryzowanego ekstraktu z liści *Ginkgo biloba* jest nietolerancja lub nadwrażliwość na składniki, wchodzące w skład preparatu oraz podawanie go kobietom w ciąży, w okresie karmienia piersią, dzieciom i 36 godzin

przed planowanym zabiegiem chirurgicznym. Wystąpienie interakcji jest możliwe podczas łączenia preparatów *Ginkgo biloba* z lekami:

- przeciwzkrzepowymi i przeciwagregacyjnymi np. warfaryną, heparyną, aspiryną (może powodować wylewy wewnątrzczaszkowe);
- moczopędnymi z grupy tiazydów;
- łączenie z tricyklicznymi antydepresantami może obniżyć próg napadu padaczkowego;
- przeciwdepresyjnymi, hamującymi wychwyt zwrotny serotoniny [Blecharz-Klin i inni 2003].

W Polsce dostępne są liczne preparaty, zawierające wyciągi z liści miłorzębu japońskiego np.: Bilobil, Ginkofar, Memoplant, Ginkoprim, Tanakan, Cardiobonisol, Tebokan, Tebonin i Rokan [Kalisz i inni 2006].

- w kosmetyce - wyciąg z liści miłorzębu wzbudził zainteresowanie w laboratoriach kosmetycznych. Po udowodnieniu korzystnych właściwości, został wykorzystany w preparatach kosmetycznych ze względu na działanie pojednające, zwalczające cellulit, uelastyczniające naczynka włosowate, zmniejszające lepkość krwi, neutralizujące wolne rodniki, hamujące procesy starzenia, jako środek przeciwzapalny i przeciwalergiczny, kojący dla skóry i skóry głowy. W kosmetologii ekstrakty z liści miłorzębu polecane są do pielęgnacji skóry suchej (wykazują działanie nawilżające) i cery z rozszerzonymi naczynkami (zapobiegają pojawianiu się pajączków). Używane są w kremach, tonikach, hydrożelach, szamponach i odżywkach do włosów (w połączeniu z dymnicą pospolitą, zwiększa cyrkulację krwi oraz zdolność do wchłonięcia przez włosy składników odżywczych). Na rynku polskim pojawiło się wiele kosmetyków, zawierających ekstrakt z liści miłorzębu m.in.
- Krem modelujący owal twarzy na dzień i noc do skóry suchej (Eucerin),
 - Krem z miłorzębem japońskim i prowitaminą B₅, półtłusty (Mincer AA),
 - Anti - Couperose krem na naczynka (Bielenda),
 - Dermacos, seria do cery nadwrażliwej, skłonnej do zaczerwienień i pękających naczynek (Farmona),
 - Perfect Beauty - koncentrat obkurczający oraz krem do cery naczyniowej na dzień i noc (Farmona),
 - Uelastyczniający krem, poprawiający gęstość skóry na noc do cery naczynkowej (Dr Irena Eris),
 - Liftingujące płatki pod oczy (Bielenda),

- Herbal Care - szampon z miłorzębem japońskim (Farmona, Logona),
 - Maska anatomiczna, hydrożelowa - Exclusive Line perłowa i diamentowa maska do twarzy (Bielenda),
 - Maska anatomiczna, hydrożelowa - liftingująca (Bielenda),
 - Beauty formulas - maseczka kolagenowa na twarz (Beauty Formu),
 - Lipocell Bloker - oliwka do masażu (Ziaja) [[Glinka R. i Glinka M. 2008, Jędrzejko i inni 2007](#)].
- W celach spożywczych - w Japonii nasiona (zwane ginnam) są powszechnie konsumowane (po uprażeniu), są składnikiem również popularnej potrawy chawan mushi.

2.4. Oczar wirginijski (*Hamamelis virginiana* L.)



Rycina 4. *Hamamelis virginiana* L [http://pl.wikipedia.org/wiki/Oczar]

Kwiat (*flos*) - małe, nitkowate złoto - żółte, występują w pachwinach liści, zebrane po dwie lub trzy w główki o silnym zapachu; są obupłciowe, składają się z tasiemkowych płatków, prostych lub skręconych, główki osadzone są na krótkich łodygach, które widać przed wypuszczeniem lub po opadnięciu liści. Każdy kwiat połączony jest z szerokim, łuskowatym liściem kryjącym i dwoma podobnymi przedliściami [Kozłowski i inni 2008, Glinka R. i Glinka M. 2008].

Owoc (*fructus*) - owoce to dwuklapowe, dwukomorowe zdrewniałe torebki, pękające wzdłuż od wierzchołka. Każda komora zawiera czarne, błyszczące nasienie, w środku białe i oleiste. Owoce są jadalne, mają smak orzeszków pistacjowych [Kozłowski i inni 2008].

Kora (*cortex*) - jest bezwonna, smak jej jest ściągająco gorzki, żółtkowana do 3 cm szerokości i 2 mm grubości. Powierzchnia zewnętrzna jest jasno żółtawo-brązowa lub czerwono-brązowa, powierzchnia wewnętrzna jest bladoczerwono żółtawa, słabo prążkowana [Bisset i Wichtl 2004]. Korę pierwotną od kory wtórnej oddziela jasnożółty pierścień mechaniczny sklereid o różnych kształtach, okrągłe do owalnego lub zbliżone kształtem do prostokąta; mocno zgrubiałe, zwykle występują w grupach złożonych (2, 3 komórki); ściany posiadają liczne, rozgałęzione prążki i kanały.

Kryształki szczawianu wapnia w formie jedyńców, w komórkach otaczających pęki grubościennych włókien, występujących w korze wtórnej [Farmakopea Polska IX 2011].

2.4.2. Wymagania klimatyczne i glebowe

Oczar wirginijski jest rośliną nie wymagającą, a jego uprawa jest bezproblemowa, stanowiskiem są obszary słoneczne do lekko zacienionych, nie za sucha, dość wilgotna i żyzna gleba, lekko kwaśna. Rozmnaża się latem przez sadzonki, nasiona (wymagany jest proces stratyfikacji), odkłady.

Przy pielęgnacji krzewu nie wykonuje się zabiegu cięcia, z wyjątkiem usunięcia chorych i uszkodzonych pędów. Całkowitą mrozoodporność roślina uzyskuje wraz z wiekiem. W ogrodzie roślina wygląda efektownie jesienią, gdy pojawiają się kwiaty, a liście przebarwiają się na kolor intensywnie żółty [Kozłowski i inni 2008].

2.4.3. Skład chemiczny

Surowiec zielarski stanowią liście oczaru wirginijskiego (*Hamamelidis folium*) oraz kora (*Hamamelidis cortex*), zawierające garbniki w ilości ok. 1 % [Farmakopea Polska IX 2011].

GARBNIKI - są mieszaniną, składającą się z 0,7 - 1,5% hydrolizujących galoilotanoidów m.in. hamamelitaniny (=2,5-di-*O*-galoilo-D-hamameloza) i z 80 - 88,5% oligomerycznych proantocyjanidyn (oligomery procyjanidyny i prodelfinidyny z katechinową i galoilokatechinową cząsteczką). Obecne są także: (+) - katechina, (+) - galoilokatechina, (-) - galusan epigalokatechiny, a także około 10% kwasu galusowego [ESCOP Monographs 2003, Vennat i inni 1992, Wichtl 2004].

FLAWONOIDY – w liściu oczaru obecne są flawonole: kemferol, kwercetyna oraz ich glikozydy: 3-*O*-glukozyd kemferolu (astragalina), 3-*O*-glukozyd kwercetyny (izokwercytryna), 3-*O*-ramnozyd kwercetyny oraz mirycetyna (= 5 - hydroksykwercetyna) [ESCOP Monographs 2003, Wichtl 2004].

INNE ZWIĄZKI - liście oczaru wirginijskiego zawierają kwasy organiczne, takie jak: kawowy, chinowy, galusowy [ESCOP Monographs 2003, Wichtl 2004].

Olejek eteryczny (0,01 - 0,5%) obecny w liściach zawiera 40% alifatycznych alkoholi, 15% estrów, 25% związków karbonylowych (9,7 % *n*-heksan-2-alu; 3,2% aldehydu octowego; 3,5% α - jononu; 1% β - jononu) [Wichtl 2004].

Związki czynne *Hamamelidis cortex*:

Kora zawiera do 10% garbników. Najbardziej charakterystycznym związkiem jest hamamelitanina, występująca w postaci mieszaniny form furanozowych i piranozowych (2,5-di-*O*-galoilohamamelozy i 1-*O*-(4-hydroksybenzoilo) - 2,3,5-tri-*O*-galoilohama-melofuranozy) [Hartish i Kołodziej 1996]. Obecne są także proantocyjanidyny: dimery procyjanidyn, takie jak: katechino - (4 α →8) - katechina, 3-*O*-galoiloepikatechino - (4 - β →8) -katechina, 3-*O*-galoiloepigallokatechino - (4 - β →8) - galoilokatechina, oligomeryczne proantocyjanidyny, zawierające 4 - 9 cząsteczek katechiny/galoilokatechiny (niektóre z nich są 3-*O*-galoilowane) [ESCOP Monographs 2003]; flawon-3-ole takie jak: (+) - katechina, (+) - galoilokatechina, 3-*O*-galusan(-) - epikatechiny oraz 3-*O*-galusan(-) -epigalokatechiny. Występują także di- i tri-*O*-galoilohamamelozy, ich pochodne: 4-hydroksybenzoesy; a także pentagaloiloglukoza, kwas galusowy oraz 0,1% olejku eterycznego [ESCOP Monographs 2003] i małe ilości flawonoidów [Wichtl 2004].

2.4.4. Działanie i zastosowanie

Już setki lat temu Indianie Północnoamerykańscy doceniali właściwości lecznicze oczaru wirginijskiego (*Hamamelis virginiana*), nazwając go „Świątą rośliną Indian”. Liście i korę stosowano wtedy jako środek przeciwbiegunkowy w czerwonce i biegunkach innego pochodzenia, jako lek przeciwkrwotoczny, przyspieszający gojenie się ran oraz stłuczeń i zadrapań. Obok wcześniejszych doniesień, wskazujących na działanie ściągające, przeciwkrwotoczne, przeciwzapalne i przyspieszające ziarnowanie, spotyka się nowe informacje o jego działaniu usuwającym rodniki nadtlenu azotu, ochronnym przeciw promieniowaniu UV, czy też jego skuteczności przy zapobieganiu atrofii dróg moczowo-płciowych w okresie menopauzy [Glinka R. i Glinka M. 2008].

Liście oczaru stosowane są wewnętrznie w postaci naparów lub płynnych wyciągów (1:1, 45% etanol); zewnętrznie stosowane są półpłynne lub płynne preparaty, (5 - 10% odwary z liści), a także czopki, zawierające 200 mg suchego ekstraktu oraz maści, zawierające 10% płynnego wyciągu [ESCOP Monographs 2003] w dolegliwościach przewodu pokarmowego z niewielkimi krwawieniami, osłabieniu ścianek naczyń krwionośnych, żylakach (ból i ciężkość nóg) oraz hemoroidach. Kora oczaru jest stosowana wewnętrznie w postaci odwarów, naparów i nalewek, natomiast zewnętrznie w postaci odwarów (5 - 10g kory na 250 ml wody), ekstraktów w półpłynnych lub płynnych preparatach, odpowiadających 20 - 30% kory [ESCOP Monographs 2003].

Zewnętrznie stosuje się odwary z liści, rzadziej z kory w stłuczeniach, obrzękach, świądzie skóry, lekkich oparzeniach, wynaczynieniach, egzemach, żylakach nóg i odbytu, krwawieniu z nosa, ponadto do pędzlowania dziąseł, do płukania ust, przemywania oczu w zapaleniu spojówek, jako środek kosmetyczny i higieniczny.

Wyciągi ze świeżych gałązek stosuje się w homeopatii w analogicznych schorzeniach jak w allopatii, a ponadto w krwawieniach macicznych i przedłużonym miesiączkowaniu [Wichtl 2004, Kozłowski i inni 2008].

Liście i kora oczaru wykazują działanie:

Ściągające - dzięki obecności związków polifenolowych, szczególnie tanin (np. hamamelitaniny), aldehydów oraz oligomerycznych proantocyjanidyn [Hänsel 1991, Laux i Oschmann 1993, Steinegger i Hansel 1992]. Zastosowanie niskich stężeń wyciągów z liści oczaru na błony śluzowe i skórę, doprowadziło do uszczelniania błon komórkowych i zmniejszonej przepuszczalności naczyń włosowatych. Wyższe stężenia wywoływały wytrącenie białek, pogrubienie warstwy koloidalnej oraz powstanie cienkiej błony w miejscu

zranienia i lekkie uciśnięcie, znajdujących się poniżej tkanek skóry [Laux i Oschmann 1993]. Silne działanie ściągające wykazują alkoholowe wyciągi, wyciąg z kory oczaru działa trochę silniej niż z liści [Balansard 1970].

Przeciwzapalne - wyciągi z kory i liści oczaru działały przeciwzapalnie *in vitro* i *in vivo*. Dootrzewnowe podanie 70% wyciągu etanolowego z liści, zahamowało fazę obrzęku poduszeczek łap szczura [Duwiejua i inni 1994]. Hamamelitanina i proantocyjanidyny, wyizolowane z oczaru, są silnymi inhibitorami 5-lipoksygenazy. Zastosowanie miejscowe wodno - alkoholowego wyciągu z kory (250 µg/ml) zahamowało obrzęk ucha myszy, wywołany olejem krotonowym. Przeprowadzone badanie wykazały działanie przeciwbakteryjne oraz zwalczające wirusa opryszczki pospolitej typu 1 (ED₅₀ 11 µg/ml), przez frakcje proantocyjanidyn z wyciągu wodno- alkoholowego, która także hamowała α-glukozydazę (ED₅₀ 0,35 µg/ml) i elastazę leukocytów ludzkich (ED₅₀ 1,4 µg/ml).

W badaniach klinicznych udowodniono skuteczność przeciwzapalną liści i kory oczaru w leczeniu rumienia skórno, wywołanego promieniowaniem UVB. W próbie rumieniowej dokonano porównania skuteczności przeciwzapalnej mlecza do opalania, zawierającego 10% wodny wyciąg z liści oczaru z dwoma innymi produktami (mleczkami) nie zawierającymi oczaru. Spośród grupy 30 zdrowych ochotników, każdy otrzymał cztery dawki promieniowania UVB. Nasilenie rumienia oceniono wzrokowo i za pomocą kolorymetru (urządzenia do pomiaru rumienia skóry) po 7, 24, 48 godzinach od napromieniowania. Mleczko, zawierające wyciąg z oczaru, spowodowało po 7 godzinach zmniejszenie rumienia po 48 godzinach o 20% i o 27%, natomiast mleczko zwykłe o 11% i 15% [Hughes-Formella i inni 1998].

Oceniono działanie przeciwzapalne w randomizowanym, podwójnie ślepych badaniu na grupie 48 pacjentów, po zastosowaniu destylatu z kory oczaru w fosfolipidowym nośniku, a także hydrokortyzonu, wyciągu z rumianku i czterech preparatów, opartych na nośnikach nie zawierających żadnych leków. Preparat z oczaru i krem z hydrokortyzonem (1%), spowodował ustępowanie rumienia, wywołanego światłem ultrafioletowym, poprzez drażnienie skóry taśmą samoprzylepną. Najlepsze efekty uzyskano po zastosowaniu kremu z hydrokortyzonem [Korting i inni 1993].

Antyoksydacyjne - przeprowadzone badania wykazały hamowanie przez hamamelitaniny produkcji anionorodników ponadtlenowych (IC₅₀ /1,38 µmol/l) oraz rodników hydroksyloowych (IC₅₀ 5,46 µmol/l) [Masaki i inni 1992, Masaki i inni 1993]; wyciągi z liści hamowały depolimeryzację kwasu hialuronowego oraz ochraniały ludzkie fibroblasty skóry przed uszkodzeniem, wskutek aktywności anionorodników ponadtlenkowych. Kwas

galusowy i hamamelitaniny chroniły fibroblasty skóry myszy przed uszkodzeniem przez anionorodniki ponadtlenkowe (IC₅₀ odpowiednio 1,01 μmol/l i 1,31 μmol/ml) [Masaki i inni 1992, Masaki i inni 1993]. Obydwa polifenole posiadają właściwości wychwytywania wolnych rodników: anionorodnika ponadtlenkowego, (IC₅₀ 1,31 μmol/ml dla hamamelitaniny i 1,01 μmol/ml dla kwasu galusowego, w porównaniu z kwasem askorbinowym, u którego wynosi ono 23,31 μmol/ml); rodnika hydroksylowego (IC₅₀ 5,46 μmol/ml dla hamamelitaniny i 78,04 μmol/ml dla kwasu galusowego). Skuteczność wychwytywania tlenu singletowego kształtowała się na poziomie IC₅₀ 45,51 μmol/ml dla hamamelitaniny i 69,81 μmol/ml dla kwasu galusowego [Masaki 1995].

Przeciwwirusowe - w ramach randomizowanego badania, podwójnie ślepego, kontrolowanego placebo, zastosowano maść z wyciągiem z kory oczaru, w celu sprawdzenia jej skuteczności i bezpieczeństwa w leczeniu zakażeń opryszczką wargową. W ciągu 48 godzin od nawrotu objawów opryszczki, podawano preparat 34 pacjentom i kontynuowano leczenie przez 8 dni. U pacjentów leczonych maścią, zawierającą wyciąg z kory oczaru, uległa znacznemu zmniejszeniu po zakończeniu terapii, wielkość zakażonego obszaru opryszczką, w porównaniu z pacjentami otrzymującymi placebo (P = 0,022) [Baumgärtner 1998].

Przeciwbólowe - randomizowanym badaniem klinicznym objęto 266 pacjentek, poddanych epizjotomii (nacięciu krocza), sprawdzając skuteczność trzech środków przeciwbólowych w zmniejszaniu bólu, siniaków i obrzęków. Miejscowo zastosowano: krem zawierający wodny wyciąg z oczaru, krem referencyjny, zawierający 1% hydrokortyzonu wraz ze środkiem miejscowo znieczulającym oraz okład z lodu. Stwierdzono taką samą skuteczność wybranych trzech środków przeciwbólowych [Moore i James 1989].

Antybakteryjne - wodny wyciąg z liści oczaru hamuje *in vitro* wzrost *Escherichia coli* (MIC = 0,4 mg/ml), *Staphylococcus aureus* (MIC = 0,4 mg/ml), *Bacillus subtilis* (MIC = 1,1 mg/ml), oraz *Enterococcus faecalis* (MIC = 3,0 mg/ml), natomiast wodny wyciąg z kory hamował *in vitro* wzrost *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Enterococcus faecalis* (MIC dla wszystkich 10,0 mg/ml) [Brantner i Grein 1994].

Wpływ na zwężenie żył, naczyń- badano wpływ preparatów z liści (destylatu uzyskanego przy użyciu pary wodnej, nalewki i wyciągu alkoholowego) na zwężenie żył, poprzez pomiar dopływu krwi do tylnej łapy królika. Obserwowano zmniejszony dopływ krwi po podaniu dotętnicznym destylatu. Jednoczesne podanie leków adrenergicznych, adrenolitycznych i miotonicznych nie miało wpływu na ten efekt [Bernard inni 1972, Balansard i inni 1972].

W randomizowanym, kontrolowanym przy pomocy placebo eksperymencie, oceniono wpływ wodnego wyciągu z oczaru w glikolu propylenowym, na zwężenie naczyń u 30 zdrowych ochotników. W efekcie obserwowano obniżenie temperatury skóry przez wyciąg z powodu zwężenia naczyń [Diemunsch i Mathis 1987, Laux i Oschmann 1993]. Analizowano działanie przeciwzapalne maści, zawierającej 25 g wodnego destylatu z oczaru/100g produktu na grupie 5 pacjentów z chorobami skóry i 22 zdrowych ochotnikach. W obu grupach wykazano umiarkowane działanie przeciwzapalne, poprzez obniżenie przewodnictwa cieplnego skóry z powodu zwężenia naczyń [Sorkin 1980].

Wyciąg z kory wchodzi w skład żelu Oczar - Zdrowe nogi (Septyk), stosowanej w przypadku zmęczonych i ciężkich nóg, maści Proktosanol (Pompa) w leczeniu wewnętrznym guzków krwawniczych odbytu i leczeniu świądu sromu, a także żelu Trioxil (Naturallabs), zalecanego jako środek do usuwania trądziku [Glinka i Glinka 2008].

Zastosowanie w kosmetologii:

Wyciąg z liści i kory oczaru, posiada szeroki zakres działania i wykorzystywany jest w różnych preparatach leczniczych i kosmetycznych. Jest stosowany jako składnik chusteczek do oczyszczania oraz jako środek łagodzący podrażnienia. W trakcie przeprowadzonych badań ustalono, że oczar wirginijski nie wykazuje działania toksycznego ani mutagennego oraz rakotwórczego, może więc on być długotrwale stosowany.

W kosmetologii stosowane są głównie wyciągi z liści i pędów oczaru, które zapewniają działanie ściągające oraz wzmacniające naczynia krwionośne i poprawiające ukrwienie; znacznie ograniczają wydzielanie łoju, dzięki czemu oczyszczają cerę o zatkanych porach. Wyciąg z liści znalazł zastosowanie jako składnik kremów dziennych i na noc, pudrów do twarzy, kosmetyków przeciwpotowych, dodatków do kąpieli i maseczek kosmetycznych [Glinka i Glinka 2008].

Firma Idena proponuje suchy ekstrakt z oczaru, zawierający nie mniej niż 14% garbników, przeliczonych na hamamelitaninę oraz nie mniej niż 1,5% flawonoidów w przeliczeniu na rutynę; ekstrakt wodno - alkoholowy z młodych kwitnących gałązek oraz wodę oczarową o przyjemnym zapachu, otrzymaną przez destylację z parą wodną świeżych, młodych gałązek i listków oczaru. Woda oczarowa polecana jest szczególnie do przemywania cery tłustej z siatką rozszerzonych żyłek.

Wyciągi z liści i gałązek oczaru bywają dodatkiem do mydeł, przeznaczonych do pielęgnacji cery nadmiernie zaczerwienionej i alergicznej, kremów o działaniu przeciwzapalnym, przeznaczonych do pielęgnacji cery wrażliwej na wilgoć, zimno, wiatr i łatwo czerwieniejącej (oczar zmniejsza kruchość kapilar, reguluje krążenie skórne). Wyciągi z oczaru stosuje się do

wyrobu balsamów i kremów, przeznaczonych do masażu pojedynających oraz do preparatów odżywczych wraz z olejem rycynowym, używanym do pielęgnacji włosów suchych, z niewystarczającą wydzieliną łojową. Do wód po goleniu oraz lotionów i toników zostały wykorzystane właściwości ściągające ekstraktu z oczaru [Glinka R. i Glinka M. 2008, Lamer-Zarawska i Noculak-Palczewska 1994].

Przykłady kosmetyków, w skład których wchodzi wyciąg oczarowy:

- Anti - Couperose krem na naczynka (Bielenda),
- Fitoregulator z wyciągiem z oczaru wirginijskiego - krem do twarzy i ciała z tendencją do rozszerzonych naczyń (A.T.W.),
- Serum normalizująco-balansujące (Farmona),
- AA Face - seria kosmetyków do cery z rozszerzonymi naczynkami (Oceanic), (wyciąg z liści i kory oczaru wirginijskiego jest składnikiem Ennacomples[®]),
- Dermacos - seria do cery nadwrażliwej, skłonnej do zaczerwienień i pękających naczynek (Farmona)
- Botanic Man - seria kosmetyków: serum normalizujące tonik łagodzący, krem nawilżający - pielęgnacyjny (Farmona),
- AA Men - linia pielęgnacyjna dla mężczyzn (Oceanic),
- Kojący żel myjący. Pharmaceris N (Dr Irena Eris),
- Woda hamamelisowa z liści i gałązek oczaru wirginijskiego, (Herba Studio),
- Lipocils, odżywka do rzęs (Talika)
- Emulsja po goleniu dla panów, Lepo (Pedrini Cosmetici) [Glinka R. i Glinka M. 2008].

2.5. Melisa lekarska (*Melissa officinalis* L.)



Rycina 5. *Melissa officinalis* L. [http://pl.wikipedia.org/wiki/Melisa_lekarska]

2.5.1. Charakterystyka botaniczna, występowanie

Melisa lekarska (*Melissa officinalis* L.) z rodziny jasnowatych (*Lamiaceae*). Osiąga wysokość 30 - 100 cm, ma wzniesioną, czterokątną, mocno rozgałęzioną, drewniejącą u nasady łodygę, narządy podziemne to kłącza. Jasnozielone liście o owalnym i sercowatym kształcie, ostrych końcach i ząbkowanych brzegach są ogonkowe, ułożone naprzemianległe. Szczyty liści są tępe (2 - 9 x 1,5 - 7cm). Z pachwin liści wyrastają po 3 - 10 kwiatów, koloru białego lub białoróżowego. Owocem jest brunatna gładka rozłupka, rozpadająca się na 4 części. Surowiec ten posiada cytrynowy zapach i gorzkawo - korzenny smak, kwitnie od czerwca do sierpnia [Agata i inni 1993, Soulimani i inni 1991].

Wyróżnia się trzy podgatunki melisy: subsp. *officinalis*, subsp. *altissima*, subsp. *indora* [Bailey 1958, Tagashira i Ohtake 1998, Szafer i inni 1976].

2.5.2. Wymagania klimatyczne i glebowe

Melisa lekarska jest rośliną wieloletnią i może osiągnąć wiek 25 - 30 lat, natomiast w uprawie wykorzystuje się populację przez 3 - 5 lat. Roślina wymaga stanowiska słonecznego, ciepłego, osłoniętego od wiatrów, żyznej, lekkiej i wilgotnej gleby o dużej zawartości wapnia. Nasiona wysiewane jesienią, w rzędy co 40 cm, bezpośrednio do gruntu, wschodzą w kwietniu. Na rozsadnik wysiewane w kwietniu, w rzędy co 5 - 6 cm, o głębokości 0,5 cm, wschodzą po 14 - 24 dniach. Rozsadę z dwiema parami liści właściwych, pikuje się do większych pojemników. Po 15 maja, rozsadę o wysokości 5 - 8 cm, wysadza się do gruntu w rozstawie 40 x 30 cm [Kohlmünzer 2003].

Zbiór główny liści odbywa się pod koniec czerwca lub na początku lipca, a w ciągu okresu wegetacji 2 - 3 - krotnie. Liście szybko brunatnieją, dlatego suszy się je natychmiast w temperaturze nie przekraczającej 35°C. Surowiec wysuszony przechowuje się w szczelnym opakowaniu, w pomieszczeniu suchym chłodnym i ciemnym [Kohlmünzer 2003].

Melisa lekarska uprawiana jest w całej Europie (Francji, Anglii, Niemczech), Afryce Północnej, Ameryce, na północy Europy np. w Skandynawii jest uprawiana jako roślina jednoroczna [Czygan i inni 1997, Hänsel i inni 2007].

2.5.3. Skład chemiczny

OLEJEK ETERYCZNY - w zależności od pochodzenia surowca, zawartość olejku oznaczona metodą destylacji z parą wodną, może mieścić się w zakresie: 0,05 - 0,20% - Niemcy [Koch-Heitzmann i Schultze 1984]; 0,016 - 0,246% - tereny byłej Jugosławii [Lamaison i inni 1991], 0,09 - 0,23% - Słowacja [Thieme i Kitze 1973]; 0,01% - Indie [Lamaison i inni 1991], natomiast surowiec pochodzący z Polski zawierał od 0,073 - 0,29 ml/100g olejku [Bieskorn i inni 1952]. Surowiec uprawiany w klimacie cieplejszym wykazuje wyższą zawartość olejku np. w Hiszpanii w delcie rzeki Ebro (0,28 - 0,58%) [Adzet i inni 1992], a w klimacie południowo-europejskim (Hiszpania) poprzez klonowanie roślin, uzyskano populację, która zawierała 0,8% olejku [Adzet i inni 1992].

Na początku ubiegłego stulecia przeprowadzono badania, w wyniku których zidentyfikowano składniki, nadające olejкови cytrynowy zapach są to: cytral (geranial - cytral a, neral - cytral b) i cytronelal [Zänglein i inni 1995, Ożarowski 1982].

Grupę seskwiterpenów reprezentuje głównie β -kariofilen (1 do 12%), następnie germakren D (5 - 15%) i kariofilenoepoksyd (0,5 - 9%), α - kopaen, α - kubeben, humulina, d - kadninen [Tittel i inni 1982].

W niższych stężeniach lub w ilościach śladowych występuje kolejnych 60 składników. Zmienne zawartości aldehydów i innych związków były podstawą do przeprowadzenia dodatkowych badań, które potwierdziły, że zawartość cytralu w stosunku do cytronelalu w górnych częściach rośliny jest zdecydowanie wyższy, natomiast w niższych częściach dominuje cytronelal [Tittel i inni 1982].

Różne pochodzenie, klimat, czas zbioru i wiek rośliny mają wpływ na ilościowy skład olejku eterycznego [Litvinenko i inni 1975, Sarer i Kökdil 1991].

FLAWONOIDY- związki flawonoidowe: 7-*O*-glukozyd luteoliny oraz ramnazynę (3,5,4-trihydroksy-7,3'- dimetoksyflawon) wyodrębnili niemieccy autorzy w roku 1973 [Steinegger i Hansel 1992].

W innych badaniach, wyodrębniono jako główny składnik melisy lekarskiej, nieznaną glikozyd luteoliny o wartości czasu retencji innym niż 7-*O*-glukozyd luteoliny. Zawartość tego związku oznaczona metodą HPLC wyniosła 0,5%. Ogólna zawartość flawonoidów oznaczona metodą spektrofotometryczną (przy użyciu kwasu bornego i szczawiowego) wyniosła 0,51% [Borkowski i Styrylska 1954]; Badacze rumuńscy i węgierscy, uzyskali podobny wynik (0,22 - 0,66% wg badań rumuńskich) [Hohmann i inni 1999] i (0,23% wg badań węgierskich) [Heeger 1956].

GARBNIKI I FENOLOKWASY - pierwsze doniesienie o obecności garbników w liściach melisy, na podstawie reakcji barwnych i osadowych, pochodzą z 1903 roku [cyt. wg Hose i inni 1997]. Zawartość garbników w liściach melisy, oznaczanych metodą z proszkiem skórzanym wynosi 3 - 5%; a głównym składnikiem może być kwas rozmarynowy, który jest estrem kwasu kawowego i α - hydroksydihydrokawowego, a także kwas chlorogenowy [Hose i inni 1997].

W liściach melisy stwierdzono obecność fenolokwasów: kwas *p*-kumarowy, kwas ferulowy oraz izomery kwasu chlorogenowego (kwasy krypto- i neochlorogenowy) [Lawrence 1989], kwas protokatechowy (3,4-dihydroksybenzoesowy) oraz estry metylowe kwasu kawowego i rozmarynowego [Sarer i Kökdil 1991]; wg FP IX nie mniej niż 4% sumy pochodnych hydroksycynamonowych w przeliczeniu na kwas rozmarynowy. W 1993 roku z liści roślin uprawianych w Japonii, wyodrębniono kwas melitrykowy, który okazał się trimerem, kwasu kawowego [Adzet i inni 1992].

Zawartość glikozydowych lub estrowych połączeń fenolokwasów oznaczona metodą GC, po ich hydrolizie i przeprowadzeniu wolnych fenolokwasów w trimetylosililowe pochodne [Tutin i inni 1973], wyniosła: 21000 mg/kg kwasu kawowego, 830 mg/kg kwasu *p*-kumarowego, 120 mg/kg kwasu ferulowego, po 100 mg/kg kwasu *p*-hydroksybenzoesowego, protokatechowego, gentyzynowego, ponadto śladowe ilości kwasu syringowego, waniliowego i salicylowego [Tutin i inni 1973].

TRITERPENY - badania wykazały, że frakcje triterpenowe w ziele melisy zawierają kwasy: ursolowy i oleanolowy w stosunku 4:1, a 3,5% tej frakcji stanowił kwas 19 α -hydroksyursolowy oraz kwasy 2 α -hydroksyoleanolowy i 2 α -hydroksyursolowy w stosunku 2:3 oraz śladowe ilości kwasu 2 β -hydroksyoleanolowego i 29-hydroksyoleanolowego. W korzeniach melisy lekarskiej triterpeny reprezentuje kwas betulinowy (około 1%), alkohol betulinowy, betulina, kwas 2 α -hydroksyursolowy (około 3,5%), 2 β -hydroksyoleanolowy (około 2,5%) [Broda 2002, Bierskorn i Krause 1974].

INNE SKŁADNIKI- autorzy japońscy wyodrębnili z liści 2 - (3',4'-dihydroksyfenilo) - 1,3-benzodiokso-5-aldehyd o właściwościach antyoksydacyjnych [Sarer i Kökdil 1991]. Nerol, geraniol oraz alkohol benzyloowy i fenyloetyloowy to glikozydowe połączenia alkoholi monoterpenowych [Litvinenko i inni 1975]. Wykazano również obecność kwasu bursztynowego i melisowego oraz krystaliczną substancję gorzką o nieznannej strukturze. W owocach melisy stwierdzono 12%-ową zawartość śluzu hydrolizującego do glukozy, ksylozy, ramnozy, kwasu *D*-galakturonowego oraz witaminy C, B₁, B₂ [Hose i inni 1997].

Owoce melisy lekarskiej zawierają olej, w skład którego wchodzi kwas α -linolenowy (50%) i linolowy (30%) [Koch-Heitzmann i Schultze 1984].

2.5.4. Działanie i zastosowanie

Jako zioło miododajne, melisa lekarska znana była już w starożytności. Stosowano nacieranie ścian nowych uli, świeżym zielem melisy w celu zwabienia pszczoł, dlatego często nazywano ją: miodownikiem, pszczelnikiem, rojownikiem. Podobnie wykorzystywali tę roślinę Słowianie, używając nazwy surowca - rojnik. Melisa została przywieziona przez Arabów do Hiszpanii, skąd za pośrednictwem zakonników, rozpowszechniła się na całą Europę [Kohlmünzer 2003]. Dioskorydes nazywał ją *melissophyllon* (od mellita - pszczoła), Rzymianie - *apiastron* (od apis - pszczoła) [Berg i inni 1997, Mulkens i Kapetanidis 1988].

Wyciągi z liści melisy działają rozkurczowo, uspokajająco, przeciwwirusowo, przeciwzapalnie, żółciopędnie, przeciwbakteryjnie, pobudzają wydzielanie soków trawiennych, zatrzymują namnażanie komórek nowotworowych, regulują wydzielanie łju, działają odświeżająco i łagodząco [Kohlmünzer 2003].

Zastosowanie melisy lekarskiej:

- w medycynie - od ponad 2000 lat znane były właściwości lecznicze melisy. Paracelsus (1493-1541) określa melisę jako „najlepsze ziele dla serca, spośród wszystkich innych”. W Niemczech melisę rozślawił m.in. preparat *Melissengeist*, od 1611 roku wytwarzany przez Zakon Karmelitów Bosych jako cudowny środek na „wszelkie rodzaje cierpień” [Hose i inni 1997].

Zawarte w surowce składniki olejku eterycznego, poprzez obniżenie progu wrażliwości ośrodkowego układu nerwowego (OUN), wykazują działanie uspokajające [Schenk i Brieskorn 1994]. Związki polifenolowe m. in.: kwas kawowy i niezidentyfikowany glikozyd kwasu kawowego, zawarte w wodnym wyciągu z melisy, zatrzymują podział komórek nowotworowych [Czikow i Łaptiew 1983, Chlabicz i inni 1984].

Liście melisy stanowią składnik preparatów złożonych, ułatwiających zasypianie oraz spokojny sen [Veverkova i inni 1995, Kozłowski i inni 2008]. Przeprowadzono badanie z zastosowaniem preparatu złożonego, w skład którego wchodził korzeń waleriany, szyszka chmielu, liść melisy i ziele serdecznika. W badaniu brało udział 50 mężczyzn, uzależnionych od alkoholu z bezsennością i z zespołem abstynencji. Stwierdzono statystyczną poprawę jakości snu w porównaniu z grupą placebo, jednak

zaobserwowano większą senność po porannym przebudzeniu. Zazywanie tego preparatu ziołowego, zmniejszyło częstość przebudzeń nocnych i występowanie koszmarów sennych [Widy-Tyszkiewicz i Schminda 1997].

Liście stosuje się również w stanach pobudzenia nerwowego oraz zaburzeniach rytmu serca i czynnościach przewodu pokarmowego. Podawanie ekstraktu z liści melisy przez około 16 tygodni u pacjentów z łagodną chorobą Alzheimera, spowalniało objawy otępienia oraz polepszały aktywność [Gunther 1952].

Liście lub ziele melisy, a także wyciągi, wchodzi w skład wielu preparatów takich jak: Intractum Melissae, Melisa fix (herbatka ekspresowa), Amarosol (płyn), Melisa (tabletki ziołowe), Cratinex (krople), Melis - Tonic (płyn), Melisana Klosterfrau (płyn), Nervomix (kapsułki), Nervogran (granulki), Amol (płyn), Veliran (krople).

- w kosmetyce - ekstrakt z melisy, stosowany jest w różnych formach kosmetycznych, przeznaczonych do pielęgnacji przetłuszczającej się cery i włosów, tonizujących kąpiele (kremy, maseczki, olejki), past do zębów m.in.:
 - Nivelazione - seria kosmetyków do pielęgnacji stóp, w skład którego wchodzi: mineralna sól, krem, peeling oraz zmiękczająca maseczka do stóp (Farmona),
 - Melisa - mleczko kosmetyczne do demakijażu łagodząco-nawilżające (Uroda),
 - Melisa - pomadka do ust pielęgnacyjno-ochronna (Uroda),
 - Melisa - krem łagodny, nawilżający (Uroda),
 - Melisa - tonik do twarzy, łagodny nawilżający (Uroda),
 - Olejek kąpielowy z melisą, bazylią i trawą cytrynową (Farmona).
- w przemyśle spożywczym - suche wyciągi stosowane są w przyprawach smakowych oraz aromatyzowania octu, herbaty, win i likierów.

3. Polifenole jako naturalne antyoksydanty

Polifenole są wtórnymi metabolitami roślinnymi o zróżnicowanej budowie, masie cząsteczkowej oraz właściwościach fizycznych, chemicznych i biologicznych. Występują w różnych częściach roślin, odgrywając istotną rolę w okresie wzrostu i reprodukcji rośliny. Klasa polifenoli stanowi układy zawierające dwie, trzy i więcej grup hydroksylowych - OH, przyłączonych do pierścienia aromatycznego. W zależności od liczby pierścieni aromatycznych w budowie, polifenole dzieli się na proste - jeden pierścień aromatyczny (rezorcyna, hydrochinon, pirokatechina) oraz złożone - zawierają kilka pierścieni aromatycznych sprzężonych (np. hiperycyna). Do klasy polifenoli zaliczane są także: antocyjany, różne typy flawonoidów, katechiny, lignany, kumaryny, stilbeny. Jest to więc bardzo zróżnicowana pod względem chemicznym grupa składników, której skład zależy od gatunku rośliny, odmiany, warunków klimatycznych oraz uprawy. Związki polifenolowe występują też w produktach spożywczych, w roślinach strączkowych, orzechach, nasionach, owocach, zbożach, warzywach, grzybach, herbacie, kakao [Alasalvar i inni 2001, Molski 2005].

3.1. Wybrane grupy polifenoli

Polifenole pochodzenia naturalnego stanowią bardzo liczną grupę, obejmującą około osiem tysięcy związków. Ze względu na strukturę podstawowego szkieletu węglowego wśród związków polifenolowych można wyróżnić między innymi: flawonoidy, kwasy fenolowe, lignany i stilbeny [Pietta 2000].

Flawonoidy stanowią największą i najbardziej zróżnicowaną grupę związków. Występują nie tylko jako aglikony, ale również w formie związanej z cukrami, jako glikozydy. Związki te pełnią wiele ważnych funkcji w roślinie: np. biorą udział w morfogenezie, fotosyntezie, determinacji płci, oddychaniu, regulacji hormonów wzrostu, jak również w kształtowaniu smaku i barwy owoców, warzyw, produktów spożywczych, otrzymywanych w wyniku ich przetwarzania (wina, herbaty, czekolady) [Czeczot 2000, Wilska-Jeszka 2007]. Różnorodność i aktywność flawonoidów ściśle związana jest z działaniem antyoksydacyjnym. W zależności od stopnia utlenienia heterocyklicznego pierścienia oraz położenia pierścienia fenolowego dokonano podziału flawonoidów na klasy, do których zalicza się np: flawony, flawanony, flawonole, izoflawony oraz chalkony z otwartym pierścieniem heterocyklicznym. Spokrewnione z flawonoidami są antocyjany, czerwone, fioletowe barwniki części roślin.

Najczęściej występują jako acetylowane pochodne cyjanidyny w czerwonej kapuście, czerwonej cebuli, rzodkiewce, jak również w owocach jagodowych (skórce i miąższu), czerwonych winogronach [Wilksa-Jeszka 2007].

Chalkony - np.: ksantohumol (w szyszkach chmiel), izosalipurpol i jego glikozyd-izosalipurozyd, występujące w kwiatostanach kocanek [Matławska 2008].

Flawony - głównie występują jako glikozydy luteoliny i apigeniny. Barwią na żółto części roślin (*flavus* - żółty). Występują w kwiatach, zbożach, warzywach, ziołach, przyprawach.

Flawonole - najbardziej rozpowszechnionym flawonolem jest kwercetyna. Postać krystaliczna kwercytyny, jest praktycznie nierozpuszczalna w wodzie, natomiast bardzo dobrze rozpuszcza się w alkaliach i pirydynie. Posiada charakter lipofilny oraz dobrą wchłanianiałość z przewodu pokarmowego. W czerwonym winie, zielonej herbacie, sokach, otrzymywanych z różnych produktów, występuje w postaci rozpuszczonej [Yao i inni 2004]; pochodne kwercetyny głównie rutyna 3-*O*-ramnoglukozyd kwercetyny, występuje w różnych gatunkach roślin, np. ziele fiołka trójbarwnego (*Violae tricoloris herba*), ziele dziurawca zwyczajnego (*Hypericae herba*), kwiat bzu czarnego (*Sambuci flos*). Synteza flawonoli zachodzi w obecności światła, dlatego też gromadzone są one w zewnętrznych częściach tkanek liści i skórce owoców. Rośliny bogate we flawonole to: owoce jagodowe, skórka jabłek, owoce żurawiny, papryka, cebula, herbata, włoska kapusta, jarmuż [Aherne i O'Brien 2002, Jeszka i Flaczyk 2008].

Flawanony - największe ilości występują w owocach cytrusowych, warzywach; np. pomidorach, ziołach - mięta. Przedstawicielem tej klasy jest naryngina, neohesperozyd naryngeniny, występujący w grejpfrutach, narirutyna - rutynozyd naryngeniny, znajduje się w cytrynach. W pomarańczach obecna jest hesperydyna (7-*O*-rutynozyd hesperetyny), która izolowana jest z materiału roślinnego w postaci jasnożółtych kryształów. Całe owoce cytrusowe są kilkakrotnie bogatsze w te związki, aniżeli soki otrzymywane z miąższu [Wilksa-Jeszka 2007].

Izoflawony - zwane fitoestrogenami. Bogate w β -D-glikozydowe formy izoflawonów, są rośliny strączkowe, np: nasiona grochu, bób, soji, a także ryż, chmiel, otręby, pszenica i jej kielki, żyto. Związki słabo rozpuszczają się w wodzie, natomiast dobrze w alkoholu (genistyna daidzyna). W przewodzie pokarmowym ulegają hydrolizie do wolnych aglikonów, wchłonięte ulegają dalszym przekształceniom w wątrobie do aktywnych biologicznie związków (ekwol) [Wilksa-Jeszka 2007; Janeczko 2004].

Flawanole - aglikony występujące w formach monomerycznej i spolimeryzowanej. Flawanole w formie monomerycznej to katechiny, których najwięcej znajduje się w liściach herbaty (60 - 80% sumy polifenoli). W liściach zielonej herbaty występują D + L - katechina (0,4%), L -

epikatechina (1,3%), D + L - galokatechina (2,0%), L - epigalo - katechina (12%), L - galusan epikatechiny (18,1%), L - galusan epigalokatechiny (58,1%). Katechiny, które występują w herbacie oraz polifenole z kory sosny łącznie z resweratrolem (pochodna stilbenu) w czerwonym winie są nie tylko antyoksydantami ale i wazodilatorami. Ich obecność w diecie wywiera właściwości cytoprotekcyjne, chroni komórki przed uszkodzeniami, wywołanymi przez wolne rodniki, jak również zmniejsza ryzyko chorób serca. Katechiny występują w różnych odmianach jabłek, morelach (epikatechina), w pigwowcu (epikatechina), winogronach, orzechach, kakao [Gramza i Korczak 2005, Wilska-Jeszka 2007, Janeczko 2004].

Do polifenoli zaliczane są taniny, które dzieli się na: taniny hydrolizujące, estry kwasu galusowego lub elagowego z glukozą względnie niearomatycznymi poliolami. Tego typu taniny występują w zdrewniałych częściach roślin, np. kora dębu; taniny niehydrolizujące, to proantocyjanidyny, które zbudowane są z jednostek epikatechiny lub katechiny. Występują najczęściej w niedojrzałych owocach, pestkach winogron, nasionach roślin oleistych, warzywach strączkowych, ziarnach zbóż [King i Young 1999, Wilska-Jeszka 2007].

Kwasy fenolowe - są hydroksylowymi pochodnymi kwasu benzoowego ($C_6 - C_1$) lub cynamonowego ($C_6 - C_3$), występują w roślinach jako wolne oraz w formie związanej, jako składowe garbników hydrolizujących, w postaci estrów oraz glikozydów.

Kwasy cynamonowe różnią się miejscem podstawienia grup hydroksylowych i metoksylowych w szkielecie podstawowym. Zwykle występują w połączeniach z innymi związkami, po podgrzaniu w środowisku kwaśnym, zachodzi hydroliza wiązań estrowych i glikozydowych, powodując wzrost ilości wolnych fenolokwasów. Grupy karboksylowe mają zdolność do obierania elektronu, co ujemnie wpływa na właściwości donorowe hydroksybenzoenu, dlatego też pochodne kwasu cynamonowego są bardziej efektywnymi przeciwutleniaczami niż pochodne kwasu benzoowego [Mitek i Gasik 2007]. Przedstawicielami kwasów hydroksycynamonowych są:

- kwas kawowy (3,4-dihydroksycynamonowy), cechują go właściwości bakteriobójcze, przeciwzapalne, immunotropowe. Z kwasem chinowym tworzy depsyd - kwas chlorogenowy, stanowiący składnik zielonych nasion kawy, wykazujący aktywność przeciwrodnikową, immunostymulującą, przeciwlipidową. Kwas ten występuje w roślinach kwiatowych, w formie wolnej i związanej np. z flawonoidami [Wilska-Jeszka 2007].

- kwas ferulowy (4-hydroksy-5-metoksy-cynamonowy) jest przeciwutleniaczem, dezaktywuje wolne rodniki, m.in. reaktywne formy tlenu, redukując stres oksydacyjny oraz tworzenie dimerów tymidynowych. Wykazuje działanie żółciopędne i lipotropowe. Bardzo dobrze

rozpuszcza się w wodzie i etanolu. Naturalnie występuje w wielu roślinach, głównie w liściach, nasionach i korzeniach drzew iglastych, w ziarnach pszenicy, żytach, kukurydzy, ryżu.

- kwas *p* - kumarowy ($C_9H_8O_3$) izomer ten jest najbardziej rozpowszechniony w przyrodzie. Wykazuje silne właściwości przeciwutleniające. Zmniejsza ryzyko wystąpienia raka żołądka poprzez ograniczenie powstawania nitrozamin. Kwas ten znajduje się w wielu gatunkach roślin m.in. w orzeszkach ziemnych, marchwi, pomidorach, czosnku [Mitek i Gasik 2007, King i Young 1999].

Do kwasów hydroksybenzoesowych, charakteryzujących się właściwościami przeciwutleniającymi należą:

- kwas protokatechowy ($C_7H_6O_4$) stanowi bardzo częsty składnik diety człowieka. Występuje w owocach: śliwki, agrest, winogrona, orzechy; w produktach pochodzenia roślinnego; np. oliwie z oliwek, białym winie; w roślinach przyprawowych; np. anyżu gwiaździstym, melisie lekarskiej, cynamonowcu, rozmarynie lekarskim, jak również w ziarnach i siewkach pszenicy, otrębach i ziarnach brązowego ryżu. W medycynie naturalnej stosowane są rośliny lecznicze, w których kwas ten stanowi główny biologiczny składnik czynny, np. kwiat hibiskusa [Wilska-Jeszka 2007].

- kwas *p* - hydroksybenzoesowy ($C_7H_6O_2$) w stanie naturalnym występuje w korze strączyńca, czereśni, malinach i anyżu, a także w żurawinie, cynamonie, grzybach, a nawet w niektórych produktach mlecznych [Wilska-Jeszka 2007].

- kwas galusowy (3,4,5-trihydroksybenzoesowy) jest silnym przeciwutleniaczem. Tworzy depsydy - połączenia estrowe dwóch lub więcej fenolokwasów: np. kwas-4-digalusowy, jest składnikiem garbników. Jest inhibitorem degradacji insuliny, działa przeciwzapalnie, przeciwwirusowo i przeciwbakteryjnie. Występuje w herbacie, cebuli, owocach jagodowych: czarnej porzeczce, malinach, jarzynach [Molski 2005; Wilska - Jeszka 2007].

Inne związki fenolowe:

- Stilbeny - grupa polifenoli, syntetyzowana z pochodnych kwasu cynamonowego. W roślinach wyższych występuje w formie wolnej, np. trans - resweratrol, oksyresweratrol oraz jako dimery, polimery i glikozydy. Stilbeny występują w korzeniach i drewnie roślin, natomiast duże ilości spotkać można w owocach czerwonych winogron, owocach morwy, czerwonej porzeczce oraz w orzeszkach ziemnych [Fremont 2000, Sroka i inni 2005].

- Lignany - grupa polifenoli, występują głównie w formie aglikonów, rzadziej glikozydów. Sekoizolaricirezolinol i matairezolinol występują w nasionach słonecznika i lnu, organizmach zwierzęcych, natomiast w organizmach ludzkich, związki te metabolizują do podobnych

związków o charakterze estrogenów, takich jak: enterolakton i enterodiol [Ososki i Kennelly 2003]. Lignany w dużej ilości występują w ziarnie sezamowym, są to: sezamina, episezamina, sezaminol, sezamolina. W mniejszych ilościach występują w pełnoziarnistych produktach zbożowych (żyto), owoce (wiśnie, gruszki, jabłka, śliwki), warzywa (cebula, koper włoski, szparagi, marchew, czosnek), nasiona słonecznika, soczewicy [Ide i inni 2003].

3.2. Działanie polifenoli

Polifenole wykazują wielostronną aktywność biologiczną, uważane są też za jedne z najlepszych substancji o właściwościach antyoksydacyjnych, które wynikają z bezpośredniej reakcji z wolnymi rodnikami, zmiatania wolnych rodników oraz związania się z jonami metali, które wpływają na powstawanie wolnych rodników.

Do najważniejszych kierunków działań polifenoli, zalicza się:

- działanie przeciwnowotworowe - związki fenolowe zmniejszają i hamują powstawanie szkodliwych wolnych rodników; kwercetyna hamuje podział komórek rakowych i wpływa na ich apoptozę,
- działanie przeciwmiażdżycowe - hyperozyd obniża ciśnienie krwi; katechiny obniżają stężenie całkowitego cholesterolu we krwi i frakcji „złego” cholesterolu LDL, antocyjany podwyższają frakcje „dobrego” cholesterolu HDL; polifenole zapobiegają tworzeniu się blaszek miażdżycowych [Janeczko 2004],
- działanie przeciwcukrzycowe - wpływają na tworzenie się insuliny i przekształcenie proinsuliny w insulinę; hamują wytwarzanie glukozy w wątrobie, obniżają stężenie cukru we krwi [Czeczot 2000],
- działanie przeciwdrobnoustrojowe - kwercetyna działa przeciwwirusowo na wirusa opryszczki wargowej i narządów płciowych, katechiny ochraniają komórki wątroby podczas wirusowego zapalenia wątroby typu A i B [Bylka i inni 2004],
- działanie przeciwalergiczne - kwercetyna zmniejszając produkcję histaminy, działa antyalergicznie,
- inne działanie - polifenole zapobiegają demencji starczej, chorobie Alzheimera, Parkinsona, zaćmie, uszczelniają naczynia krwionośne i stabilizują witaminę C, stanowią naturalny filtr wobec promieni UVA, uszkadzających skórę właściwą [Czeczot 2000].

4. Znaczenie antyoksydantów w produktach spożywczych, lekach i kosmetykach

Zdrowy, odpowiednio odżywiony i sprawny fizycznie organizm, zwalcza skutecznie działanie wolnych rodników za pomocą związków endogennych o działaniu antyoksydacyjnym. Wytwarzanie antyoksydantów zależy od genetycznych uwarunkowań organizmu, wieku i rodzaju diety. Starszy, nieprawidłowo odżywiony i osłabiony chorobami organizm, słabiej broni się przed wolnymi rodnikami, ponieważ wytwarza mniej antyoksydantów. Produkcji wolnych rodników sprzyjają: stresujący tryb życia, zanieczyszczenie środowiska, promieniowanie radioaktywne, urządzenia elektroniczne, chemiczne konserwanty żywności. Organizm należy wspomagać, dostarczając w pożywieniu odpowiednią dawkę antyoksydantów, niezbędnych do zwalczania wolnych rodników. W dzisiejszych czasach konsumenci coraz bardziej zwracają uwagę na produkty spożywcze, zawierające antyoksydanty. Dietetycy i lekarze zalecają dietę obfitującą w warzywa i owoce, dlatego że zawierają one w dużych ilościach związki chemiczne, zdolne do zwalczania wolnych rodników, zmniejszają ryzyko zachorowań na choroby układu sercowo - naczyniowego i nowotwory, jak również opóźniają procesy starzenia fizycznego i intelektualnego.

Naturalne antyoksydanty cieszą się dużym zainteresowaniem, ponieważ główną wadą syntetycznych antyoksydantów, stosownych jako konserwanty żywności, są efekty uboczne, ujawniające się *in vivo* (kumulują się w organizmie, uszkadzając wątrobę). Przyjmowane z pożywieniem antyoksydanty, pomagają chronić organizm przed stresem oksydacyjnym. Dodatkowo pełnią funkcję regulatorową dla enzymów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych oraz są czynnikami sygnałowymi i wpływającymi na ekspresję genów. Większe ilości antyoksydantów mają te gatunki warzyw i owoców z których część spożywana ma dużą zawartość suchej masy: np. orzechy (laskowe, włoskie), migdały, fasola w porównaniu do gatunków, które są silnie „nawodnione”: np. kiwi, ananas, arbuz, ogórek. Wysoką wartość potencjału antyoksydacyjnego wykazują stosowane przyprawy bez względu na to czy są świeże, suche lub zmielone.

Dietetycy zalecają spożywanie surowych warzyw i owoców. Gotowanie warzyw w wodzie znacznie zmniejsza wartości przeciwutleniające (do 30% w stosunku do wartości posiadanych w stanie surowym), natomiast podczas gotowania na parze około 20% przeciwutleniaczy ulega zniszczeniu [Hunter i Fletcher 2002].

Uzupełnieniem diety mogą być suplementy wytworzone z owoców, warzyw, ziół i zbóż, stanowiące koncentraty naturalnych antyoksydantów, a także żywność funkcjonalna, która

oprócz wartości odżywczych ma wywierać korzystny wpływ na jedną lub więcej funkcji organizmu. Efektem może być poprawa stanu zdrowia, samopoczucia, czy zmniejszenie ryzyka chorób [Wawer i inni. 2012].

Wśród konsumentów coraz większym zainteresowaniem cieszą się kosmetyki naturalne, zawierające ekstrakty roślinne, bogate w związki polifenolowe. Łączą one działanie przeciwrodnikowe ze stymulacją odnowy tkankowej, zdolnością do łagodzenia podrażnień, jak również usprawnieniem mikrokrążenia [Potargowicz i Szerszenowicz 2006].

Poza działaniem przeciwutleniającym wykazują właściwości przeciwzapalne, przeciwalergiczne, uszczelniające naczynia włosowate, promieniochronne. W związku z aktywnością ekstraktów roślinnych, bogatych w polifenole, producenci kosmetyków wykorzystują je w preparatach rozjaśniających skórę, dla cery wrażliwej i naczynkowej, przeciwmarszczkowych, z trądzikiem różowatym, regulujących czynności gruczołów łojowych dla cery tłustej i trądzikowej [Brand - Garnys i inni 2001, Schmid i inni 2003]. Przeciwutleniacze, pochodzące z naturalnych źródeł, w produktach kosmetycznych mogą zastępować syntetyczne antyoksydanty (BHA - butylohydroksyanizol, BHT - butylohydroksytoluen), które powodują wystąpienie swędzącej wysypki, rumienia oraz alergicznego kontaktowego zapalenia skóry. W preparatach kosmetycznych wykorzystano szeroką gamę ekstraktów roślinnych o dużej zawartości polifenoli i aktywności przeciwutleniającej. Jako składniki kosmetyków o najwyższej aktywności przeciwutleniającej uważa się ekstrakty roślinne: owoców aceroli (*Malpighia glabra extract*), kory wierzby białej (*Salix alba bark extract*), kwiatu arniki górskiej (*Arnica montana extract*), liści i kory brzozy (*Betula alba extract*), kwiatu róży (*Rosa flos*), które są źródłem antyoksydantów w produktach przeciwmarszczkowych i przeciwstarzeniowych. W kosmetykach ściągających, odświeżających, wygładzających, zamykających pory, likwidujących cellulitis jako składniki preparatów wykorzystane zostały ekstrakty z: owoców brzoskwini pospolitej (*Prunus persica extract*) [Wawer 2001], winnorośli właściwej (*Vitis vinifera extract*), awokado (*Persea gratissima extract*). Preparaty kosmetyczne, zawierające naturalne źródło polifenoli, chronią skórę przed czynnikami zewnętrznymi, zwalniają proces starzenia się skóry, zapobiegają nowotworom skóry oraz poprawiają regenerację tkanek uszkodzonych przez nadmierne działanie promieni UV [Glinka i inni 2002]. Środki naturalne, którymi pielęgnowana i chroniona jest skóra, wnikają w nią głęboko, zachowując jej naturalne piękno [Jędrzejko i inni 2007].

Wiek XX był wiekiem antybiotyków, które zwalczały wiele groźnych dla życia chorób zakaźnych. Wiek XXI określa się jako wiek antyoksydantów - przeciwutleniaczy,

które skutecznie likwidują nadmiar wolnych rodników. Im mniej szkodliwych cząsteczek, tym mniejsze ryzyko uszkodzenia komórek oraz materiału genetycznego. Antyoksydanty dostarczone w odpowiednich dawkach zmniejszają ryzyko rozwoju nowotworów, wspomagają układ odpornościowy, ochraniają tkankę nerwową oraz łagodzą skutki stresu. Wielokierunkowe działanie antyoksydantów stwarza szeroką perspektywę w poszukiwaniu nowych rozwiązań w terapii lekowej, nie tylko o charakterze uzupełniającym, ale też mogących mieć istotne znaczenie kliniczne. Coraz większym zainteresowaniem świata medycznego cieszą się roślinne antyoksydanty, których źródłem są owoce, warzywa, nasiona, a także używki - herbata, wino. Przeciwwutleniające flawonoidy, występujące w kwiatach głogu, liściach herbaty, miłorzębu, owocach pomarańczy, łagodzą proces zapalny, pomagają zwalczać infekcje wirusowe, jak również alergię [Gruszka 2011, Frohne 2006]. Czerwone wino, zawierające resweratrol, pomaga zwalczać wysoki poziom cholesterolu, zapobiega rozwojowi zmian nowotworowych. Owoce żurawiny, bogate w aktywne biologicznie przeciwutleniacze - proantocyjanidyny, są głównym składnikiem, odpowiedzialnym za hamowanie wzrostu bakterii i rozwoju infekcji układu moczowego [Wawer i inni 2012, Frohne 2006].

Czosnek pospolity (*Allium sativum*) zawiera antyoksydanty, wspomagające układ krążenia i oddychania. Luteina - popularny karotenoid, bierze udział w ochronie siatkówki przed szkodliwym działaniem wolnych rodników [Wawer i inni 2012, Frohne 2006]. Badania populacyjne wykazały, że w krajach o wysokim spożyciu związków polifenolowych, zachorowalność na choroby układu krążenia jest znacznie mniejsza, np. w Japonii źródłem polifenoli jest przede wszystkim zielona herbata, w Holandii - cebula i jabłka, we Francji - czerwone wino.

Stosowanie suplementów diety, bogatych w antyoksydanty, należy ograniczyć maksymalnie do trzech miesięcy, ponieważ dostarczenie zbyt wysokich dawek, może wywołać zachwianie równowagi organizmu.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły świeże i wysuszone w temperaturze pokojowej, wybrane surowce roślinne (p. pkt. II. 2.): liść podbiału - *Farfarae folium*, ziele melisy - *Melissae herba*, ziele owsa - *Avenae herba*, liść miłorzębu - *Ginkgo bilobae folium* oraz kora oczaru - *Hamamelidis cortex*, pochodzące z plantacji Zakładów Zielarskich Phytopharm Klęka SA.

Wyciągi do badań:

- wyciągi z surowców roślinnych, świeżych: soki (S) i z wysuszonych: nalewki (T), zostały przygotowane w Zakładach Zielarskich Phytopharm Klęka SA.
- wyciągi metanolowe (M) oraz metanolowo - wodne (MW) ze świeżych i wysuszonych surowców roślinnych, zostały przygotowane w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

1.1. Przygotowanie wyciągów

1.1.1. Otrzymywanie soku (*succus*) ze świeżych surowców roślinnych

Liście podbiału, liście miłorzębu, korę oczaru, ziele melisy i ziele owsa (wilgotność około 80%), (p. pkt. III.1.) zalano 96% etanolem w stosunku 1:1[g/g] i poddano dwukrotnej ekstrakcji. W pierwszym etapie ekstrahowano surowce w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 10 minut, a następnie świeżą partią rozpuszczalnika, macerowano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Surowce roślinne przecedzono, a otrzymane wyciągi odpowiednio połączono.

W celu oddzielenia substancji balastowych, otrzymane surowe wyciągi przez dwa tygodnie pozostawiono w suchym, chłodnym i zaciemnionym miejscu. Po tym okresie dokonano oddzielenia wydzielonego osadu (substancje balastowe) metodą filtracji przez podwójną bibułę, otrzymując klarowne wyciągi (soki - S).

Tabela 1. Materiał do badań oraz skróty użyte w pracy (soki - S)

Nazwa produktu *	Skrót
<i>Farfarae succus</i> *	FS
<i>Melissae succus</i> *	MS
<i>Avenae succus</i> *	AS
<i>Ginkgo bilobae succus</i> *	GS
<i>Hamamelidis succus</i> *	HS

*wg Raportu Produkcji – Phytopharm- p. pkt. 7.

1.1.2. Otrzymywanie nalewki (*tinctura*) z wysuszonych surowców roślinnych

Świeże surowce roślinne (p. pkt. III.1.) suszono w temperaturze pokojowej, w suchym i zaciemnionym miejscu. Czas suszenia surowców wynosił:

- liść podbiału - 6 dni
- ziele melisy - 3 dni
- ziele owsa - 4 dni
- liść miłorzębu - 10 dni
- kora oczaru - 10 dni

Wysuszone i rozdrobnione surowce zalano rozpuszczalnikiem ekstrahującym - etanolem 65 - 67% w stosunku 1:10 [g/g]. Proces maceracji przeprowadzano w maceratorze przez 6 dni w temperaturze pokojowej.

Po zakończonej ekstrakcji surowce roślinne oddzielono, a otrzymane surowe wyciągi przez dwa tygodnie pozostawiono w suchym i zaciemnionym miejscu. Po tym okresie oddzielono wydzielony osad (substancje balastowe); a następnie w wyniku filtracji przez podwójną bibułę otrzymano klarowne wyciągi (nalewki - T).

Tabela 2. Materiał do badań oraz skróty użyte w pracy (nalewki - T)

Nazwa produktu *	Skrót
<i>Farfarae tinctura</i> *	FT
<i>Melissae tinctura</i> *	MT
<i>Avenae tinctura</i> *	AT
<i>Ginkgo bilobae tinctura</i> *	GT
<i>Hamamelidis tinctura</i> *	HT

*wg Raportu Produkcji - Phytopharm- p. pkt. 7.

2. Oznaczenia ilościowe wybranych grup związków w sokach i nalewkach

2.1. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem Folin - Ciocalteu

2.1.1. Odczynniki i aparatura

Odczynniki

- kwas chlorogenowy	LOBA-CHEMIE, Wien-Fischamed	$C_{16}H_{18}O_9$
- odczynnik Folin - Ciocalteu 2N	SIGMA ALDRICH	FC
- sodu węglan cz.d.a.	POCH Gliwice	Na_2CO_3
- woda destylowana (= woda)		

- **roztwór kwasu chlorogenowego:** odważono dokładnie 0,02 g kwasu chlorogenowego do kolby miarowej pojemności 100 ml i uzupełniono wodą. Uzyskano w ten sposób roztwór o stężeniu 0,2 mg/ml.

- **20% wodny roztwór węglanu sodu:** do kolby miarowej o pojemności 50 ml, przeniesiono dokładnie odważone 10,0 g węglanu sodu, następnie rozpuszczono w 40 ml wody i uzupełniono wodą do kreski.

Aparatura

- Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin - Elmer,
kuwety szklane, grubość warstwy 0,5 cm
- waga analityczna Sartorius LE225D - OCE

2.1.2. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla roztworu wzorcowego kwasu chlorogenowego

Przygotowano 6 kolb miarowych pojemności 10 ml, owiniętych folią aluminiową (odczynnik Folin - Ciocalteu jest wrażliwy na światło) do których dodano 4 ml wody, a następnie roztwór wzorcowy kwasu chlorogenowego dokładnie w ilościach: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 ml, co odpowiadało 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12 mg wzorca. W kolejnym etapie do kolb dodawano po 0,5 ml odczynnika Folin - Ciocalteu (p. pkt. 2.1.1.), a dokładnie po 1 minucie dodano po 2,0 ml 20% roztworu węglanu sodu (p. pkt. 2.1.1.), zachowując odstęp czasowy 2 minuty między próbami. Następnie kolbki uzupełniono wodą i dokładnie wymieszano. Po upływie 30 minut od dodania roztworu węglanu sodu, mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda_{max} = 760$ nm, wobec próby odniesienia, którą stanowiła mieszanina

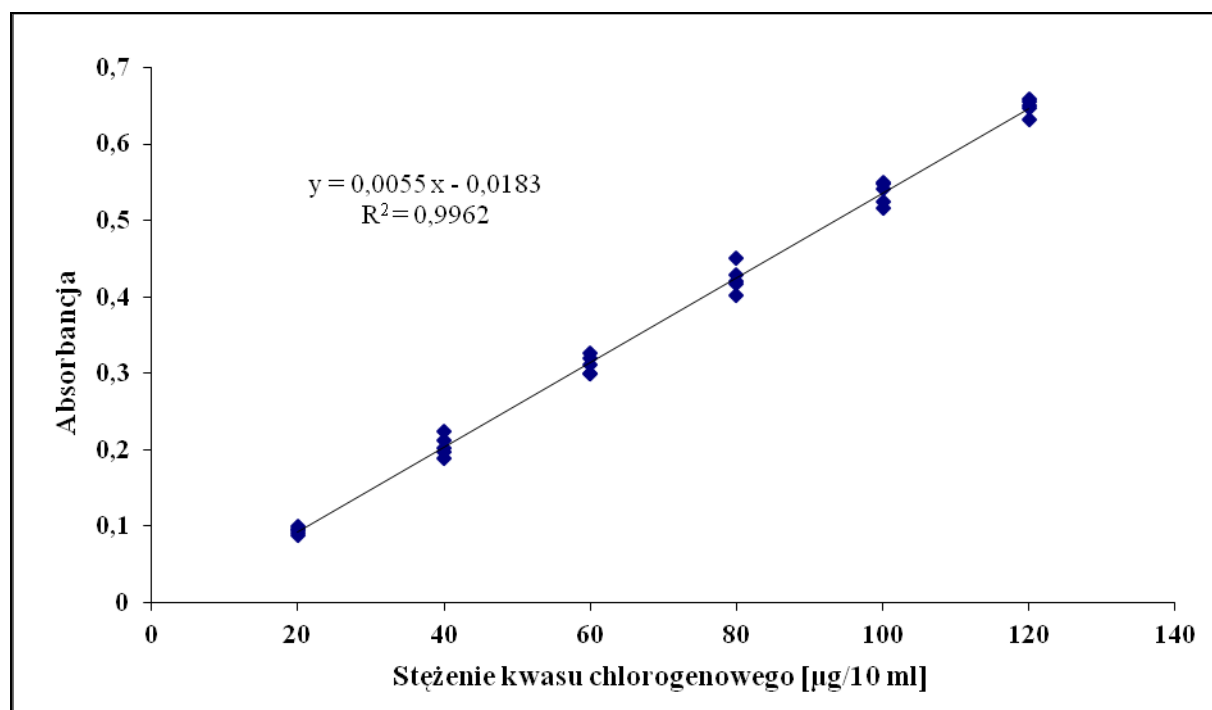
roztworu węgłanu sodu, odczynnika FC w wyżej podanych ilościach, bez wzorcowego kwasu chlorogenowego, uzupełniono wodą w kolbce o pojemności 10 ml [Dóka i Bicanic 2002].

Dla każdego stężenia wzorca dokonano po pięć pomiarów absorbancji (Tabela 3).

Tabela 3. Wartości absorbancji dla poszczególnych roztworów wzorcowych

Lp.	x [µg/10ml]	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	\bar{A}
1.	20	0,0918	0,0882	0,0958	0,0947	0,0997	\bar{A}_1
2.	40	0,1966	0,2235	0,2118	0,2025	0,1881	\bar{A}_2
3.	60	0,2995	0,2996	0,3263	0,3188	0,3116	\bar{A}_3
4.	80	0,4013	0,4200	0,4279	0,4165	0,4506	\bar{A}_4
5.	100	0,5157	0,5246	0,5492	0,5479	0,5413	\bar{A}_5
6.	120	0,6473	0,6507	0,6553	0,6589	0,6313	\bar{A}_6

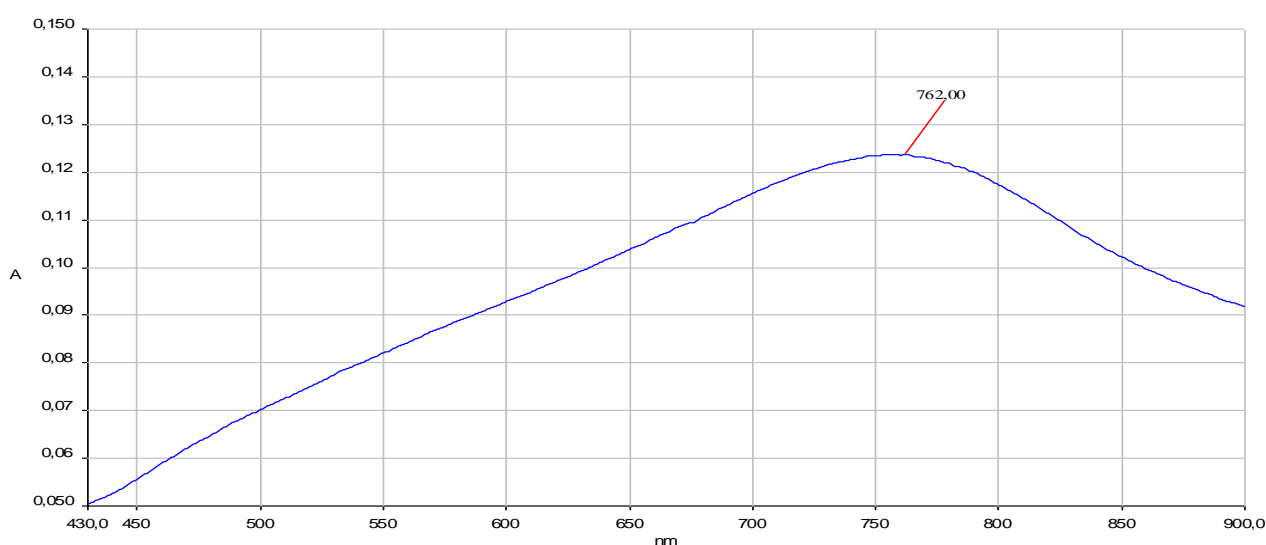
x - zawartość kwasu chlorogenowego (µg/10ml)
A - absorbancja (760 nm)



Rycina 6. Wykres krzywej kalibracyjnej dla kwasu chlorogenowego.

Tabela 4. Analiza statystyczna krzywej kalibracyjnej

\bar{A}	SD	SD _{sr}	±2SD	\bar{A}		
				±2SD	±μ (dla α=0,05, n=4, t=2,776)	
\bar{A}_1	0,0940	0,0043	0,00193	0,0086	0,0940±0,0086	0,0940±0,0054
\bar{A}_2	0,2045	0,0137	0,00612	0,0274	0,2045±0,0274	0,2045±0,0170
\bar{A}_3	0,3112	0,0118	0,00528	0,0236	0,3112±0,0236	0,3112±0,0147
\bar{A}_4	0,4233	0,0181	0,00809	0,0362	0,4233±0,0362	0,4233±0,0224
\bar{A}_5	0,5357	0,0149	0,00665	0,0298	0,5357±0,0298	0,5357±0,0185
\bar{A}_6	0,6487	0,0107	0,00478	0,0214	0,6487±0,0214	0,6487±0,0133



Rycina 7. Widmo UV kwasu chlorogenowego z odczynnikiem Folin - Ciocalteu.

2.1.2.1. Analiza statystyczna

Tabela 5. Zestawienie parametrów regresji liniowej

a	0,00554	Sa	0,00006
b	-0,01835	Sb	0,00506
R	0,9981		
R²	0,9962		
S	0,0049		
\bar{y}	0,3696		
Wz	1,3135		

Wzory użyte do obliczenia parametrów regresji [Pawlaczyk i Zajac 2005]:

$$a = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{1}{n} (\sum y_i - a \sum x_i)$$

gdzie:

a, b - parametry krzywej wzorcowej $y = ax + b$

x_i, y_i - wartości doświadczane

n - liczba wykonanych pomiarów

- Obliczenia współczynnika korelacji prostoliniowej R:

$$R = \frac{\sum x \cdot y}{\sqrt{\sum x^2 \cdot \sum y^2}}$$

- Obliczenie błędów parametrów a i b

$$S_a = \sqrt{\frac{n[\sum y_i^2 - a \sum x_i y_i - b \sum y_i]}{(n-2)[n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2]}}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{1}{n} S_a^2 \cdot \sum x_i^2}$$

- Obliczenia odchylenia standardowego od prostej S:

$$S = \frac{\sqrt{(1-r^2) \cdot \sum y^2}}{n-1}$$

- Obliczenia współczynnika zmienności W_z :

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

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

- Obliczenia odchylenia standardowego średniej arytmetycznej SD_{sr} :

$$SD_{\text{sr}} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

- Obliczenia przedziału ufności μ dla $\alpha = 0,05$, $f = n-1 = 4$:

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

gdzie:

$t_{\alpha, f}$ - wartość parametru rozkładu Studenta

f - liczba stopni swobody

2.1.3. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w badanych próbach

a) Przygotowanie prób do oznaczeń

Z każdego wyciągu w postaci soku (p.pkt. 1.1.1.) i nalewki (p. pkt. 1.1.2.) pobierano odpowiednie objętości (p. Tabela 6) i przenoszono do kolb miarowych o pojemności 25 ml, a następnie uzupełniono wodą do kreski.

Otrzymano roztwory podstawowe do oznaczeń odpowiednio: FSP, ASP, MSP, GSP, HSP i FTP, ATP, MTP, GTP, HTP.

b) Wykonanie oznaczenia

Do 5 kolbek miarowych o pojemności 10 ml, owiniętych folią aluminiową (odczynnik Folin-Ciocalteu jest wrażliwy na światło), zawierających 4 ml wody, dodano po 0,2 ml roztworu podstawowego (p. pkt. 2.1.3. a) w postaci soku/nalewki, a następnie 0,50 ml odczynnika FC. Dokładnie po 1 minucie dodano po 2,0 ml 20% roztworu węgla sodu (p. pkt. 2.1.1.) zachowując odstęp czasowy 2 minuty między próbami. Następnie kolbki uzupełniono do kreski wodą i dokładnie wymieszano. Po upływie 30 minut od dodania roztworu węgla sodu mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 760 \text{ nm}$, wobec próby odniesienia, którą stanowiła mieszanina roztworu węgla sodu, odczynnika FC w wyżej podanych ilościach, bez wyciągu, uzupełniona do kreski wodą w kolbce o pojemności 10 ml [Dóka i Bicanic 2002].

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach (Tabela 6-9, Rycina 8).

c) Obliczenie zawartości sumy polifenoli w badanych próbach

- Zawartość sumy polifenoli [%] w badanych próbach w przeliczeniu na surowiec obliczono wg wzoru:

$$C = \frac{A}{a \cdot x} \cdot z$$

gdzie:

C - zawartość polifenoli w badanej próbce w przeliczeniu na surowiec [%]

A - absorbancja próbki badanego wyciągu

a - współczynnik kierunkowy prostej $a = 0,0055$ w przeliczeniu na kwas chlorogenowy

x - zawartość wyciągu [ml] przeliczona na surowiec [mg] (Tabela 6)

z - współczynnik obliczeniowy 0,1 (100 %/1000)

- Obliczenia standardowego odchylenia pojedynczego wyniku (SD) i współczynnika zmienności (W_z)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

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

gdzie:

n - 1 - liczba stopnia swobody

\bar{x} - średnia z wyników pomiaru

x_i - pojedynczy wynik

Tabela 6. Zawartość surowca [mg] w objętości soku/nalewki prób pobranych do analizy

1	2	3	4	5	6
Próba	Objętość soku/nalewki [ml]	Gęstość wyciągu [g/ml]	Stosunek surowca do soku/nalewki [g/g]	Zawartość surowca w podanej objętości soku/nalewki ^{ΔΔ} [mg]	Roztwory podstawowe [25 ml]
FS	0,91	0,9285	1: 0,91	7,4	FSP
MS	0,82	0,9200	1: 0,82	7,4	MSP
AS	6,00	0,9210	1: 0,81	54,6	ASP
GS	0,68	0,9270	1: 0,68	7,5	GSP
HS	0,69	0,8750	1: 0,69	7,0	HSP
FT	0,46	0,9137	1: 4,66	7,3*	FTP
MT	0,74	0,9030	1: 7,46	7,2*	MTP
AT	10,0	0,8990	1: 7,11	101,2*	ATP
GT	0,71	0,9120	1: 7,18	7,3*	GTP
HT	6,00	0,8430	1: 9,10	44,5*	HTP

* Pobrano po 100,0 ml odpowiedniej nalewki, odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w odpowiednim rozpuszczalniku i przeniesiono do kolbki miarowej o pojemności 10 ml oraz uzupełniono do kreski, dalej postępowano jak w przypadku soku p.pkt. 2.1.3.b

d) Obliczenie zawartości surowca w objętości soku/nalewki^{ΔΔ} użytej do analizy

- Przykład obliczenia zawartości surowca w podanej objętości soku

(Tabela 6, próba FS):

0,9285 g – 1 ml Jeżeli 1 ml soku/nalewki waży 0,9285 g/ml (kolumna 3),
 x – 0,91 ml to 0,91 ml soku/nalewki (kolumna 2) waży 0,844935 g.
 x = 0,844935 g

1 g – 0,91 g Jeżeli z 1 g surowca uzyskano 0,91 g soku/nalewki
 x – 0,844935 g (kolumna 4) to 0,844935 g soku/nalewki otrzymano z x g
 x = 0,9285 g surowca.

0,9285 g – 25 ml Jeżeli 0,9285 g surowca znajduje się w 25 ml
 x – 0,2ml (p.pkt. 2.1.3.a - b) to 0,2 ml pobranego do analizy
 x = 0,0074 g = 7,4 mg znajduje się 0,0074 g = 7,4 mg.

- Przykład obliczenia zawartości surowca w objętości nalewki (Tabela 6, próba FT):

0,9137 g – 1 ml Jeżeli 1 ml soku/nalewki waży 0,9137 g/ml (kolumna3),
 x – 0,46 ml to 0,46 ml soku/nalewki (kolumna 2) waży 0,4203 g.
 x = 0,4203 g

1 g – 4,66 g Jeżeli z 1 g surowca uzyskano 4,66 g soku/nalewki
 x – 0,0902 g · 10 (kolumna 4) to 0,0902 g soku/nalewki z uwzględnieniem
 x = 0,9020 g zagęszczenia* (p. Tabela 6), otrzymano z x g surowca.

0,9020 g – 25 ml Jeżeli 0,9020 g surowca znajduje się w 25 ml
 x – 0,2 ml (p.pkt. 2.1.3.a - b) to 0,2 ml pobranego do analizy
 x = 0,0073 g = 7,3 mg znajduje się 0,0073 g = 7,3 mg.

Tabela 7. Absorbancja badanych wyciągów (p. pkt. 1.1.1.) ze świeżych surowców roślinnych (*succus*)

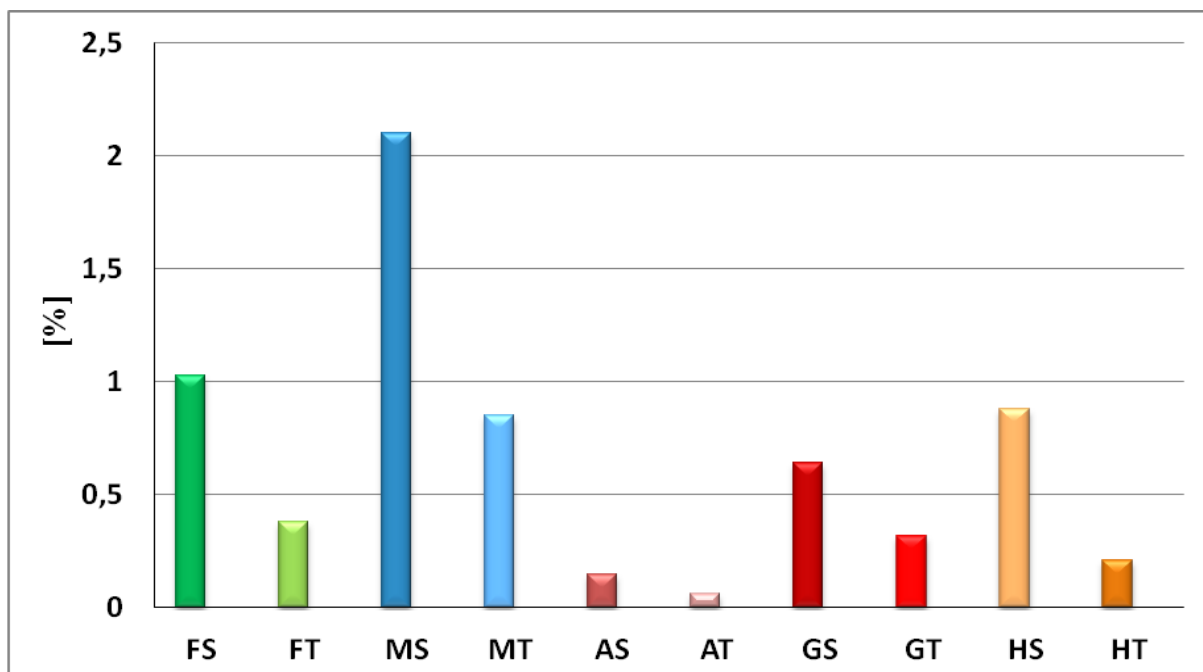
Wyciąg (sok)	Analizowana próba [25 ml]	Absorbancja [A]				
		1	2	3	4	5
FS	FSP	0,4482	0,4189	0,4215	0,4262	0,4070
MS	MSP	0,8148	0,8592	0,8921	0,9050	0,8351
AS	ASP	0,4664	0,4665	0,4710	0,4473	0,4705
GS	GSP	0,2854	0,2628	0,2755	0,2374	0,2704
HS	HSP	0,3394	0,3356	0,3456	0,3454	0,3383

Tabela 8. Absorbancja badanych wyciągów (p. pkt. 1.1.2.) z wysuszonych surowców roślinnych (*tinctura*)

Wyciąg (nalewka)	Analizowana próba [25 ml]	Absorbancja [A]				
		1	2	3	4	5
FT	FTP	0,1665	0,1535	0,1429	0,1550	0,1597
MT	MTP	0,3279	0,3563	0,3492	0,3231	0,3454
AT	ATP	0,3563	0,3611	0,3691	0,3455	0,3569
GT	GTP	0,1231	0,1250	0,1395	0,1442	0,1226
HT	HTP	0,4659	0,5159	0,5191	0,5415	0,5483

Tabela 9. Oznaczenia zawartości sumy polifenoli w badanych wyciągach (*succus/tinctura*) w przeliczeniu na kwas chlorogenowy i analiza statystyczna uzyskanych wyników

Sok/Nalewka	$\bar{\Sigma}$ polifenoli [%]	Analiza statystyczna				
		SD	W _z [%]	SD _{sr}	$\bar{\Sigma}$ polifenoli	
					$\pm 2SD$	$\pm \mu$ (dla $\alpha=0,05, f=4, t=2,776$)
FS	1,03	0,04	3,56	0,02	1,03 \pm 0,07	1,03 \pm 0,05
MS	2,10	0,09	4,39	0,04	2,10 \pm 0,18	2,10 \pm 0,11
AS	0,15	0,00	2,10	0,00	0,15 \pm 0,01	0,15 \pm 0,00
GS	0,64	0,04	6,81	0,02	0,64 \pm 0,09	0,64 \pm 0,05
HS	0,88	0,01	1,31	0,01	0,88 \pm 0,02	0,88 \pm 0,01
FT	0,38	0,02	5,58	0,01	0,38 \pm 0,04	0,38 \pm 0,03
MT	0,85	0,04	4,18	0,02	0,85 \pm 0,07	0,85 \pm 0,04
AT	0,06	0,00	2,39	0,00	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00
GT	0,32	0,03	7,79	0,01	0,32 \pm 0,05	0,32 \pm 0,03
HT	0,21	0,01	6,25	0,01	0,21 \pm 0,03	0,21 \pm 0,02



Rycina 8. Zawartość sumy polifenoli w przeliczeniu na kwas chlorogenowy (w %) w badanych sokach i nalewkach: *Farfarae succus* (FS), *Farfarae tinctura* (FT), *Melissae succus* (MS), *Melissae tinctura* (MT), *Avenae succus* (AS), *Avenae tinctura* (AT), *Ginkgo bilobae succus* (GS), *Ginkgo bilobae tinctura* (GT), *Hamamelidis succus* (HS), *Hamamelidis tinctura* (HT).

2.2. Oznaczenie zawartości flawonoidów metodą wg Christa-Müllera [Farmakopea VI 2002]

2.2.1. Odczynniki i aparatura

Odczynniki i ich roztwory

- aceton cz.d.a.	POCH Gliwice	C_3H_6O
- kwas octowy (1,02 kg/l) cz.d.a.	Merck Niemcy	$C_2H_4O_2$
- kwas solny (425 g/l) cz.d.a.	POCH Gliwice	HCl
- metanol cz.d.a.	POCH Gliwice	MeOH
- octan etylu cz.d.a.	POCH Gliwice	$C_4H_8O_2$
- metenamina cz.d.a.	POCH Gliwice	$C_6H_{12}N_4$
- chlorek glinu cz.d.a.	Merck Niemcy	$AlCl_3$
- mieszanina (1:19) kwasu octowego (1,02 kg/l) z metanolem		
- woda destylowana (= woda)		

- **kwas solny (281 g/l) OD:** 66,1 ml kwasu solnego (425 g/l = 36%) zmieszano z 20 ml wody i uzupełniono wodą w kolbie miarowej pojemności 100 ml.
- **roztwór chlorku glinu (20 g/l) OD:** 2,0 g chlorku glinu rozpuszczono w 100 ml mieszaniny (1:19) kwasu octowego (1,02 kg/l) z metanolem.
- **roztwór metenaminy 0,5% (urotropina):** 0,05 g metenaminy rozpuszczono w 10,0 ml wody.

Aparatura

- Spektrofotometr SPEKOL 11 (Carl Zeiss, Jena, Germany),
kuwety szklane, grubość warstwy 1 cm
- waga analityczna Sartorius LE225D - OCE
- wyparka próżniowa BUCHI Rotavapor R - 210

2.2.2. Oznaczenie zawartości flawonoidów w badanych próbach

a) Materiał do badań

Do badań wykorzystano wyciągi ze świeżych (FS, MS, AS, GS, HS) i wysuszonych (FT, MT, AT, GT, HT) surowców, otrzymane w pkt. 1.1.1. i 1.1.2.

b) Przygotowanie roztworu podstawowego

Do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml, odważono każdorazowo odpowiednie ilości soku/nalewki (p. Tabela 10), odparowano do sucha i dodano 20 ml acetonu, 2,0 ml kwasu solnego (281 g/l) oraz 1,0 ml roztworu wodnego metenaminy. Mieszaninę utrzymywano 30 minut we wrzeniu na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Otrzymany hydrolyzát przesączono przez watę do kolby miarowej o pojemności 100 ml, po czym osad wraz z watą umieszczono w tej samej kolbie okrągłodennej, dodano 20 ml acetonu i ponownie utrzymywano 10 minut we wrzeniu. Otrzymany hydrolyzát przesączono przez watę do tej samej kolby miarowej. Wytrawianie powtórzono jeszcze raz, a uzyskany wyciąg przesączono również do tej samej kolby miarowej i uzupełniono acetonem do 100 ml.

Odmierzono 20,0 ml zhydrolyzowanego wyciągu do rozdzielacza, dodano 20 ml wody i wytrząsano octanem etylu: 1 raz 15 ml i 3 razy po 10 ml. Połączone fazy organiczne przemyto 2 x 40 ml wody (warstwę wodną odrzucono), a następnie przesączono przez watę do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniono octanem etylu do kreski.

W ten sam sposób otrzymano roztwory podstawowe dla każdego z analizowanych soków/nalewek. Z poszczególnych soków/nalewek przygotowano po trzy oddzielne roztwory podstawowe.

c) Przygotowanie roztworów do badań

Równolegle oznaczono po trzy próby z każdego roztworu podstawowego. Do każdej z 3 kolb miarowych o pojemności 25 ml, dodano po 10,0 ml roztworu podstawowego; 2,0 ml roztworu chlorku glinu i uzupełniono mieszaniną (1:19) kwasu octowego z metanolem do 25 ml.

d) Przygotowanie roztworu porównawczego

Odmierzono 10,0 ml odpowiedniego roztworu podstawowego do kolbki miarowej o pojemności 25 ml i uzupełniono mieszaniną (1:19) kwasu octowego z metanolem do kreski.

Po 45 minutach zmierzono absorbancję roztworów badanych z chlorkiem glinu (p. pkt. 2.2.2.c) wobec odpowiedniej dla nich (p. pkt. 2.2.2.d) próby porównawczej w kuwetach szklanych 1 cm, przy długości fali $\lambda = 425$ nm. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach (Tabela 10-13, Rycina 9). Przedstawiona absorbancja (Tabela 11-12) jest średnią z dwóch pomiarów.

e) Obliczenie zawartości flawonoidów

Zawartość flawonoidów [%] w przeliczeniu na kwercetynę, obliczono w badanych próbach wg wzoru, uwzględniając absorbowalność kwercetyny $\alpha_{1cm}^{1\%} = 714$ [Farmakopea VI 2002]

$$X = \frac{A \cdot k}{m}$$

gdzie:

X - zawartość sumy flawonoidów w przeliczeniu na surowiec [%]

A - absorbancja roztworu badanego

m - masa wyciągu [g] przeliczona na określoną masę surowca [g]

k - przelicznik dla kwercetyny, $k = 0,875$

Tabela 10. Zawartość surowca [g] w objętości soku/nalewki [g] w próbach pobranych do analizy

Próba (sok/nalewka)	Objętość soku/nalewki [ml]	Zawartość surowca w objętości soku/nalewki [g]	Stosunek surowca do soku/nalewki [g/g]
	w próbach pobranych do analizy		
FS	0,91	1,00	1: 0,91
FT	5,03	1,08	1: 4,66
MS	0,82	1,00	1: 0,82
MT	7,46	1,00	1: 7,46
AS	40,10	44,55	1: 0,81
AT	230,0	32,35	1: 7,11
GS	0,68	1,00	1: 0,68
GT	10,03	1,40	1: 7,18
HS	6,92	10,03	1: 0,69
HT	60,00	6,60	1: 9,10

Tabela 11. Absorbancja badanych wyciągów ze świeżych surowców roślinnych (*succus*)

Wyciąg: sok	Ilość soku pobierana do analizy [g]	Absorbancja średnia [\bar{A}]		
		\bar{A}_1	\bar{A}_2	\bar{A}_3
FS	0,91	0,695	0,695	0,692
MS	0,82	0,246	0,245	0,245
AS	40,10	0,414	0,423	0,409
GS	0,68	0,559	0,552	0,552
HS	6,92	0,467	0,451	0,431

$\bar{A}_1, \bar{A}_2, \bar{A}_3$ – absorbancje średnie z dwóch pomiarów dla poszczególnych soków/nalewek

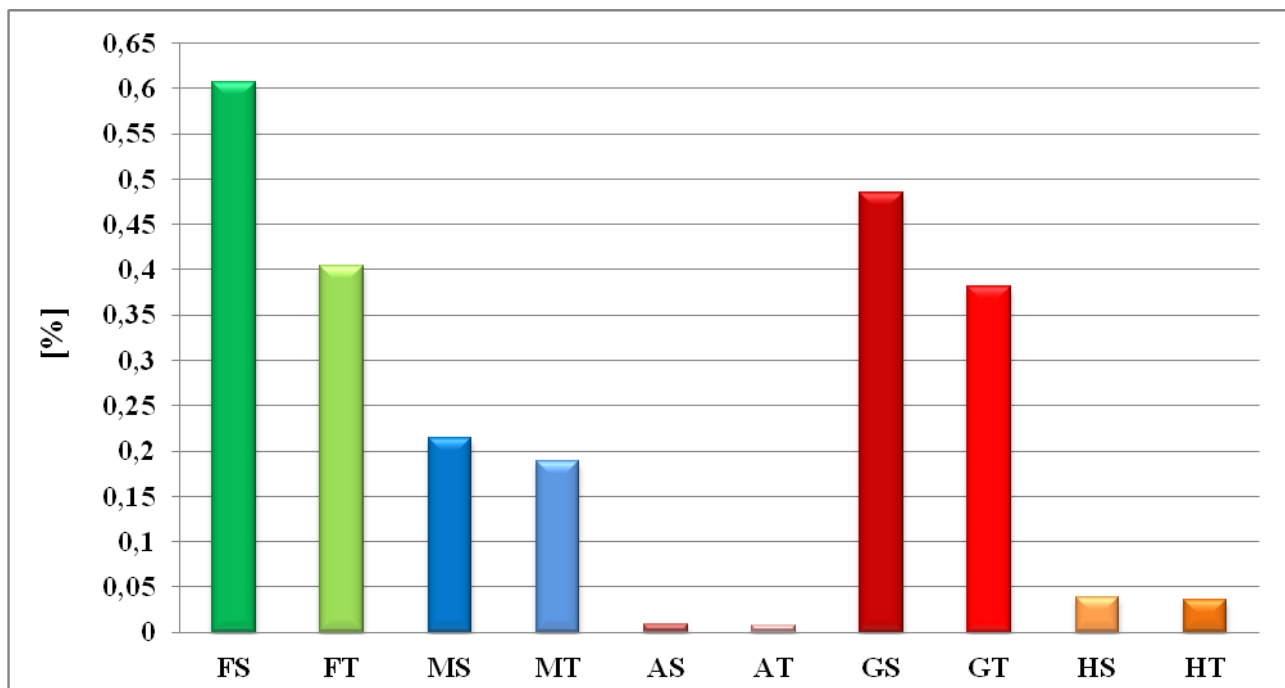
Tabela 12. Absorbancja badanych wyciągów z wysuszonych surowców roślinnych (*tinctura*)

Wyciąg: nalewka	Ilość nalewki pobierana do analizy [g]	Absorbancja średnia [\bar{A}]		
		\bar{A}_1	\bar{A}_2	\bar{A}_3
FT	5,03	0,496	0,501	0,501
MT	7,46	0,216	0,218	0,216
AT	230,0	0,284	0,268	0,297
GT	10,03	0,613	0,605	0,611
HT	60,0	0,266	0,278	0,272

$\bar{A}_1, \bar{A}_2, \bar{A}_3$ – absorbancje średnie z dwóch pomiarów dla poszczególnych soków/nalewek

Tabela 13. Oznaczenie zawartości flawonoidów w badanych wyciągach (*succus/tinctura*) w przeliczeniu na kwercetynę i analiza statystyczna uzyskanych wyników

Sok/Nalewka	$\bar{\Sigma}$ flawonoidów [%]	Analiza statystyczna				
		SD	W_z [%]	SD _{sr}	$\bar{\Sigma}$ flawonoidów	
					$\pm 2SD$	$\pm \mu$ (dla $\alpha=0,05, f=5, t=2,571$)
FS	0,61	0,00	0,25	0,00	0,61 \pm 0,00	0,61 \pm 0,00
MS	0,22	0,00	0,24	0,00	0,22 \pm 0,00	0,22 \pm 0,00
AS	0,01	0,00	1,71	0,00	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
GS	0,49	0,00	0,73	0,00	0,49 \pm 0,01	0,49 \pm 0,00
HS	0,04	0,00	4,01	0,00	0,04 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00
FT	0,41	0,00	0,58	0,00	0,41 \pm 0,00	0,41 \pm 0,00
MT	0,19	0,00	0,53	0,00	0,19 \pm 0,00	0,19 \pm 0,00
AT	0,01	0,00	5,13	0,00	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
GT	0,38	0,00	0,68	0,00	0,38 \pm 0,01	0,38 \pm 0,00
HT	0,04	0,00	2,21	0,00	0,04 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00



Rycina 9. Zawartość flawonoidów w przeliczeniu na kwercetynę (w %) w badanych sokach i nalewkach: *Farfarae succus* (FS), *Farfarae tinctura* (FT), *Melissae succus* (MS), *Melissae tinctura* (MT), *Avenae succus* (AS), *Avenae tinctura* (AT), *Ginkgo bilobae succus* (GS), *Ginkgo bilobae tinctura* (GT), *Hamamelidis succus* (HS), *Hamamelidis tinctura* (HT).

3. Badania biologiczne

3.1. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej badanych wyciągów za pomocą analizy z rodnikiem DPPH

3.1.1. Odczynniki i aparatura

Odczynniki i ich roztwory

- metanol cz.d.a. POCH Gliwice MeOH
- woda destylowana (= woda)
- rodnik 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyny ALDRICH nr kat.D9132 DPPH
- roztwór metanolowy rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyny (DPPH) [[Drużyńska, Klepacka 2005](#)]

Do kolby miarowej pojemności 100 ml, odważono na wadze analitycznej 0,0062 g rodnika DPPH, rozpuszczono bardzo dokładnie w metanolu i uzupełniono rozpuszczalnikiem do kreski. Rodnik DPPH jest wrażliwy na światło, dlatego dla zabezpieczenia wszystkim analizom takich samych warunków, przygotowywano odczynnik w kolbkach owiniętych w folię aluminiową na ok. 1 godzinę przed każdą z analiz i przechowywano w lodówce, a

następnie wyjęto odczynnik na 10 minut przed użyciem do analizy w celu doprowadzenia do temperatury pokojowej.

Aparatura

- Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer, kuwety szklane, grubość warstw 0,5 cm

3.1.2. Przygotowanie prób do oznaczeń

a) Materiał do badań

Do badań wykorzystano wyciągi ze świeżych (soki - **FS, MS, AS, GS, HS**) i wysuszonych (nalewki - **FT, MT, AT, GT, HT**) surowców otrzymane w pkt. 1.1.1. i 1.1.2.

b) Przygotowanie rozcieńczeń podstawowych z wyciągów

- Z wyciągów badanych **FS, FT, HS, HT, GS, GT i AS** (p. pkt. 1.1.1. i 1.1.2.) pobrano każdorazowo po: 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 25 ml, a następnie uzupełniono wodą do kreski i mieszano. Z tak otrzymanych roztworów podstawowych:

- **FSP-5, -10, -15, -20; i FTP-5, -10, -15, -20;**

- **HSP-5, -10, -15, -20; i HTP-5, -10, -15, -20;**

- **GSP-5, -10, -15, -20; i GTP-5, -10, -15, -20;**

- **ASP-5, -10, -15, -20;**

wykonano następujące rozcieńczenia:

➤ Z roztworów: **FSP-5*, FTP-5, HSP-5, HTP-5, GSP-5, GTP-5 i ASP-5** pobierano kolejno 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 8,0; 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, przykładowo uzyskano następujące roztwory: ***FSP-5/0,1; FSP-5/0,5; FSP-5/1,0 ; FSP-5/3,0 ; FSP-5/8,0; FSP-5/10,0**

➤ Z roztworów: **FSP-10*, FTP-10, HSP-10, HTP-10, GSP-10, GTP-10 i ASP-10** pobierano po 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, uzyskując przykładowo następujący roztwór: **FSP-10/10,0***

➤ Z roztworów: **FSP-15*, FTP-15, HSP-15, HTP-15, GSP-15, GTP-15 i ASP-15** pobierano po 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, uzyskując przykładowo następujący roztwór: **FSP-15/10,0***

- Z roztworów: **FSP-20***, **FTP-20**, **HSP-20**, **HTP-20**, **GSP-20**, **GTP-20** i **ASP-20** pobierano po 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, uzyskując przykładowo następujący roztwór: **FSP-20/10,0***

- Z wyciągów badanych **MS** i **MT** (p. pkt. 1.1.1. i 1.1.2.) pobrano kolejno: 5,0 ml (**MS**, **MT**) i 10,0 ml (**MS**, **MT**) i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 25 ml, a następnie uzupełniono wodą do kreski i mieszano, uzyskując roztwory podstawowe:

- **MSP-5, -10;**

- **MTP-5, -10;**

Z tak otrzymanych roztworów podstawowych wykonano następujące rozcieńczenia:

- Z roztworów: **MSP-5***; **MTP-5** pobierano kolejno 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 8,0; 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, przykładowo uzyskano następujące roztwory: ***MSP-5/0,1; MSP-5/0,5; MSP-5/1,0; MSP-5/3,0; MSP-5/8,0; MSP-5/10,0**

- Z roztworów: **MSP-10***; **MTP-10** pobierano kolejno 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 8,0; 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, przykładowo uzyskano następujące roztwory: ***MSP-10/0,1; MSP-10/0,5; MSP-10/1,0; MSP-10/3,0; MSP-10/8,0; MSP-10/10,0**

- Z wyciągu badanego **AT** (p. pkt. 1.1.2.) pobrano kolejno: 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 25 ml.

Pobrano również 30,0 ml wyciągu **AT** i zagęszczono na wyparce próżniowej do około 20 ml, a następnie przeniesiono ilościowo również do kolbki miarowej pojemności 25 ml. Otrzymane rozcieńczenia uzupełniono wodą do kreski i mieszano, uzyskując roztwory podstawowe:

- **ATP-5,-10,-15,-20,-25,-30;**

Z wyżej wymienionych roztworów przygotowano następujące rozcieńczenia:

- Z roztworu: **ATP-5** pobierano kolejno 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 8,0; 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, uzyskano następujące roztwory: **ATP-5/0,1; ATP-5/0,5; ATP-5/1,0; ATP-5/3,0; ATP-5/8,0; ATP-5/10,0**

- Z roztworu: **ATP-10** pobrano 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, uzyskując następujący roztwór: **ATP-10/10,0**
- Z roztworu: **ATP-15** pobrano 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, uzyskując następujący roztwór: **ATP-15/10,0**
- Z roztworu: **ATP-20** pobrano 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej o pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, uzyskując następujący roztwór: **ATP-20/10,0**
- Z roztworu: **ATP-25** pobrano 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej o pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, uzyskując następujący roztwór: **ATP-25/10,0**
- Z roztworu: **ATP-30** pobrano 10,0 ml i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej pojemności 10 ml i uzupełniono wodą do kreski, uzyskując następujący roztwór: **ATP-30/10,0**

c) Przygotowanie próby porównawczej

Do szklanych fiolek, owiniętych w folię aluminiową, przenoszono kolejno po 0,2 ml wody i 1,4 ml metanolowego roztworu DPPH (p. pkt.3.1.1.), zamykano i mieszano.

d) Przygotowanie próby ślepej

Do szklanych fiolek przenoszono po 0,2 ml wody i 1,4 ml metanolu, zamykano i mieszano.

e) Wykonanie oznaczenia

Do owiniętych w folię aluminiową szklanych fiolek przenoszono 0,2 ml wszystkich rozcieńczeń, przygotowanych na bazie rozcieńczeń podstawowych (p. pkt. 3.1.2.b) badanych wyciągów (**FSP, FTP, MSP, MTP, ASP, ATP, HSP, HTP, GSP, GTP**), a następnie dodawano po 1,4 ml metanolowego roztworu DPPH, zachowując odstęp czasowy 2 minuty między próbami, mieszano i zamykano.

Przykładowo z *Farfarae folium* badano:

- **FSP-5/0,1; FSP-5/0,5; FSP-5/1,0; FSP-5/3,0; FSP-5/8,0; FSP-5/10,0**
- **FSP-10/10,0**
- **FSP-15/10,0**
- **FSP-20/10,0**

Każdorazowo, równocześnie przygotowano 3 próby roztworu DPPH (próba porównawcza).

Z każdego badanego rozcieńczenia wykonywano po trzy oznaczenia, podając w tabeli wynik średni. Identycznie postępowano w przypadku próby porównawczej DPPH.

Po 30 minutach mierzono absorbancję przy siedmiu długościach fali $\lambda = 515, 517, 520, 533, 536, 537$ i 540 nm, wobec próby ślepej (p. pkt. 3.1.2.d).

Ilość każdego z przygotowanych rozcieńczeń pobrana do analizy jest zróżnicowana, w celu uzyskania maksymalnej aktywności [%] zmiatania wolnych rodników (Tabela 14-33).

Wykreślano widma absorbancji badanych roztworów w zakresie $500 - 600$ nm (Rycina 28-37). Ustalono, że ww. roztwory wykazywały $\lambda = 540$ nm i tą długość fali zastosowano w dalszych oznaczeniach. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach (Tabela 14-33; Rycina 10-27).

f) Obliczenie ilości wyciągu obecnego w analizowanych próbach^{ΔΔ}

Przykład obliczenia dla wartości podanej w tabeli 14. rozcieńczenie FS9:

20,0 ml wyciągu FS - 25,0 ml roztworu podstawowego FSP20

x - 10,0 ml FSP20

x = 8,00 ml FSP20/10,0

g) Obliczenie zdolności redukowania rodnika DPPH

Aktywność redukowania rodnika DPPH [A_k] przez badane próby obliczono przy użyciu wzoru:

$$A_k = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \cdot 100 \%$$

gdzie: A_k - aktywność przeciwutleniająca badanego roztworu

A_i - średnia absorbancja roztworu badanego (z trzech oznaczeń)

A_0 - średnia absorbancja roztworu rodnika DPPH (z trzech oznaczeń)

Tabela 14. Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez *Farfarae succus*

<i>Farfarae succus</i>						
Próba		Ilość wyciągu badanego ^{ΔΔ} [ml]	Absorbancja A_i	Aktywność A_k [%]	Ilość pozostałego DPPH [%]	Σ polifenoli w próbie [%]
DPPH		0,00	0,8726 [A_0]	0,00	100,0	0,00
FSP-5/0,1	FS1*	0,02	0,6814	21,91	78,09	0,02
FSP-5/0,5	FS2*	0,10	0,1455	83,32	16,68	0,09
FSP-5/1,0	FS3*	0,20	0,1032	88,17	11,83	0,19
FSP-5/3,0	FS4*	0,60	0,0733	91,60	8,40	0,56
FSP-5/8,0	FS5*	1,60	0,0680	92,21	7,79	1,49
FSP-5/10,0	FS6*	2,00	0,0701	91,97	8,03	1,86
FSP-10/10,0	FS7*	4,00	0,1030	88,20	11,80	3,72
FSP-15/10,0	FS8*	6,00	0,1472	83,13	16,87	5,58
FSP-20/10,0	FS9*	8,00	0,2026	76,78	23,22	7,44

^{ΔΔ} p. pkt 3.1.2.f
 * Oznaczenia wykorzystane na rycinach 20-27: Porównanie aktywności przeciwutleniającej
 Długość fali analitycznej $\lambda = 540$ nm

Tabela 15. Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez *Farfarae tinctura*

<i>Farfarae tinctura</i>						
Próba		Ilość wyciągu badanego ^{ΔΔ} [ml]	Absorbancja A_i	Aktywność A_k [%]	Ilość pozostałego DPPH [%]	Σ polifenoli w próbie [%]
DPPH		0,00	0,9136 [A_0]	0,00	100,0	0,00
FTP-5/0,1	FT1*	0,02	0,7348	19,57	80,43	0,00
FTP-5/0,5	FT2*	0,1	0,2078	77,25	22,75	0,02
FTP-5/1,0	FT3*	0,2	0,1287	85,91	14,09	0,03
FTP-5/3,0	FT4*	0,6	0,0892	90,24	9,76	0,10
FTP-5/8,0	FT5*	1,6	0,0930	89,82	10,18	0,27
FTP-5/10,0	FT6*	2,0	0,0985	89,21	10,79	0,34
FTP-10/10,0	FT7*	4,0	0,1452	84,11	15,89	0,68
FTP-15/10,0	FT8*	6,0	0,2029	77,79	22,21	1,02
FTP-20/10,0	FT9*	8,0	0,2786	69,50	30,50	1,36

^{ΔΔ} p. pkt 3.1.2.f
 * Oznaczenia wykorzystane na rycinach 20-27: Porównanie aktywności przeciwutleniającej
 Długość fali analitycznej $\lambda = 540$ nm

Tabela 16. Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez *Melissae succus*

<i>Melissae succus</i>						
Próba		Ilość wyciągu badanego ^{△△} [ml]	Absorbancja A_i	Aktywność A_k [%]	Ilość pozostałego DPPH [%]	Σ polifenoli w próbie [%]
DPPH		0,00	0,9674 [A_0]	0,00	100,0	0,00
MSP-5/0,1	MS1*	0,02	0,5815	39,89	60,11	0,03
MSP-5/0,5	MS2*	0,1	0,074	92,35	7,65	0,17
MSP-5/1,0	MS3*	0,2	0,0667	93,11	6,89	0,35
MSP-5/3,0	MS4*	0,6	0,0664	93,14	6,86	1,04
MSP-5/8,0	MS5*	1,6	0,0806	91,67	8,33	2,77
MSP-5/10,0	MS6*	2,0	0,0906	90,63	9,37	3,46
MSP-10/10,0	MS7*	4,0	0,1732	82,10	17,90	6,92

^{△△} p. pkt 3.1.2.f
 * Oznaczenia wykorzystane na rycinach 20-27: Porównanie aktywności przeciwutleniającej
 Długość fali analitycznej $\lambda = 540$ nm

Tabela 17. Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez *Melissae tinctura*

<i>Melissae tinctura</i>						
Próba		Ilość wyciągu badanego ^{△△} [ml]	Absorbancja A_i	Aktywność A_k [%]	Ilość pozostałego DPPH [%]	Σ polifenoli w próbie [%]
DPPH		0,00	0,8504 [A_0]	0,00	100,0	0,00
MTP-5/0,1	MT1*	0,02	0,7010	17,57	82,43	0,01
MTP-5/0,5	MT2*	0,1	0,1278	84,97	15,03	0,06
MTP-5/1,0	MT3*	0,2	0,0638	92,50	7,50	0,13
MTP-5/3,0	MT4*	0,6	0,058	93,18	6,82	0,38
MTP-5/8,0	MT5*	1,6	0,0634	92,54	7,46	1,02
MTP-5/10,0	MT6*	2,0	0,0662	92,21	7,79	1,28
MTP-10/10,0	MT7*	4,0	0,0852	89,98	10,02	2,56

^{△△} p. pkt 3.1.2.f
 * Oznaczenia wykorzystane na rycinach 20-27: Porównanie aktywności przeciwutleniającej
 Długość fali analitycznej $\lambda = 540$ nm

Tabela 18. Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez *Avenae succus*

<i>Avenae succus</i>						
Próba		Ilość wyciągu badanego ^{ΔΔ} [ml]	Absorbancja A_i	Aktywność A_k [%]	Ilość pozostałego DPPH [%]	Σ polifenoli w próbie [%]
DPPH⁰⁰⁰		0,00	0,8836 [A_0]	0,00	100,0	0,00
ASP-5/0,1	AS1*	0,02	0,8705	1,48	98,52	0,02
ASP-5/0,5	AS2*	0,1	0,8316	5,88	94,12	0,09
ASP-5/1,0	AS3*	0,2	0,7771	12,05	87,95	0,18
ASP-5/3,0	AS4*	0,6	0,5971	32,42	67,58	0,55
ASP-5/8,0	AS5*	1,6	0,2443	72,35	27,65	1,47
ASP-5/10,0	AS6*	2,0	0,1831	79,28	20,72	1,84
DPPH⁰⁰⁰		0,00	0,9732 [A_0]	0,00	100,0	0,00
ASP-10/10,0	AS7*	4,0	0,1237	87,29	12,71	3,68
DPPH⁰⁰⁰		0,00	0,9251 [A_0]	0,00	100,0	0,00
ASP-15/10,0	AS8*	6,0	0,1957	78,84	21,16	5,52
ASP-20/10,0	AS9*	8,0	0,2258	75,59	24,41	7,36
^{ΔΔ} p. pkt 3.1.2.f						
* Oznaczenia wykorzystane na rycinach 20-27: Porównanie aktywności przeciwutleniającej						
⁰⁰⁰ Analizę wykonywano w trzech etapach						
Długość fali analitycznej $\lambda = 540$ nm						

Tabela 19. Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez *Avenae tinctura*

<i>Avenae tinctura</i>						
Próba		Ilość wyciągu badanego ^{ΔΔ} [ml]	Absorbancja A _i	Aktywność A _k [%]	Ilość pozostałego DPPH [%]	$\bar{\Sigma}$ polifenoli w próbie [%]
DPPH⁰⁰⁰		0,00	0,9732 [A ₀]	0,00	100,0	0,00
ATP-5/0,1	AT1*	0,02	0,9331	4,12	95,88	0,01
ATP-5/0,5	AT2*	0,1	0,9292	4,52	95,48	0,06
ATP-5/1,0	AT3*	0,2	0,9074	6,76	93,24	0,13
ATP-5/3,0	AT4*	0,6	0,8434	13,34	86,66	0,38
ATP-5/8,0	AT5*	1,6	0,7116	26,88	73,12	1,02
ATP-5/10,0	AT6*	2,0	0,6659	31,58	68,42	1,28
ATP-10/10,0	AT7*	4,0	0,4440	54,38	45,62	2,56
DPPH⁰⁰⁰		0,00	0,9251 [A ₀]	0,00	100,0	0,00
ATP-15/10,0	AT8*	6,0	0,3242	64,95	35,10	3,84
ATP-20/10,0	AT9*	8,0	0,2221	75,99	24,01	5,12
DPPH⁰⁰⁰		0,00	0,8861 [A ₀]	0,00	100,0	0,00
ATP-25/10,0	AT10*	10,0	0,2006	77,36	22,64	6,40
ATP-30/10,0	AT11*	12,0	0,2090	76,41	23,59	7,68
^{ΔΔ} p. pkt 3.1.2.f * Oznaczenia wykorzystane na rycinach 20-27: Porównanie aktywności przeciwutleniającej ⁰⁰⁰ Analizę wykonywano w trzech etapach Długość fali analitycznej $\lambda = 540$ nm						

Tabela 20. Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez *Ginkgo bilobae succus*

<i>Ginkgo bilobae succus</i>						
Próba		Ilość wyciągu badanego ^{ΔΔ} [ml]	Absorbancja A _i	Aktywność A _k [%]	Ilość pozostałego DPPH [%]	Σ polifenoli w próbce [%]
DPPH		0,00	0,9251 [A ₀]	0,00	100,0	0,00
GSP-5/0,1	GS1*	0,02	0,8685	6,12	93,88	0,01
GSP-5/0,5	GS2*	0,1	0,6316	31,73	68,27	0,04
GSP-5/1,0	GS3*	0,2	0,4389	52,56	47,44	0,09
GSP-5/3,0	GS4*	0,6	0,0988	89,32	10,68	0,26
GSP-5/8,0	GS5*	1,6	0,0719	92,23	7,77	0,70
GSP-5/10,0	GS6*	2,0	0,0834	90,98	9,02	0,88
GSP-10/10,0	GS7*	4,0	0,2120	77,08	22,92	1,76
GSP-15/10,0	GS8*	6,0	0,3131	66,15	33,85	2,64
GSP-20/10,0	GS9*	8,0	0,3687	60,14	39,86	3,52

^{ΔΔ} p. pkt 3.1.2.f
* Oznaczenia wykorzystane na rycinach 20-27: Porównanie aktywności przeciwutleniającej
Długość fali analitycznej λ = 540 nm

Tabela 21. Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez *Ginkgo bilobae tinctura*

<i>Ginkgo bilobae tinctura</i>						
Próba		Ilość wyciągu badanego ^{ΔΔ} [ml]	Absorbancja A _i	Aktywność A _k [%]	Ilość pozostałego DPPH [%]	Σ polifenoli w próbce [%]
DPPH		0,00	0,8861 [A ₀]	0,00	100,0	0,00
GTP-5/0,1	GT1*	0,02	0,8726	1,52	98,48	0,00
GTP-5/0,5	GT2*	0,1	0,7593	14,31	85,69	0,02
GTP-5/1,0	GT3*	0,2	0,6488	26,78	73,22	0,05
GTP-5/3,0	GT4*	0,6	0,3449	61,08	38,92	0,14
GTP-5/8,0	GT5*	1,6	0,0927	89,54	10,46	0,37
GTP-5/10,0	GT6*	2,0	0,0742	91,63	8,37	0,46
GTP-10/10,0	GT7*	4,0	0,0777	91,23	8,77	0,92
GTP-15/10,0	GT8*	6,0	0,1101	87,57	12,43	1,38
GTP-20/10,0	GT9*	8,0	0,1466	83,45	16,55	1,84

^{ΔΔ} p. pkt 3.1.2.f
* Oznaczenia wykorzystane na rycinach 20-27: Porównanie aktywności przeciwutleniającej
Długość fali analitycznej λ = 540 nm

Tabela 22. Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez *Hamamelidis succus*

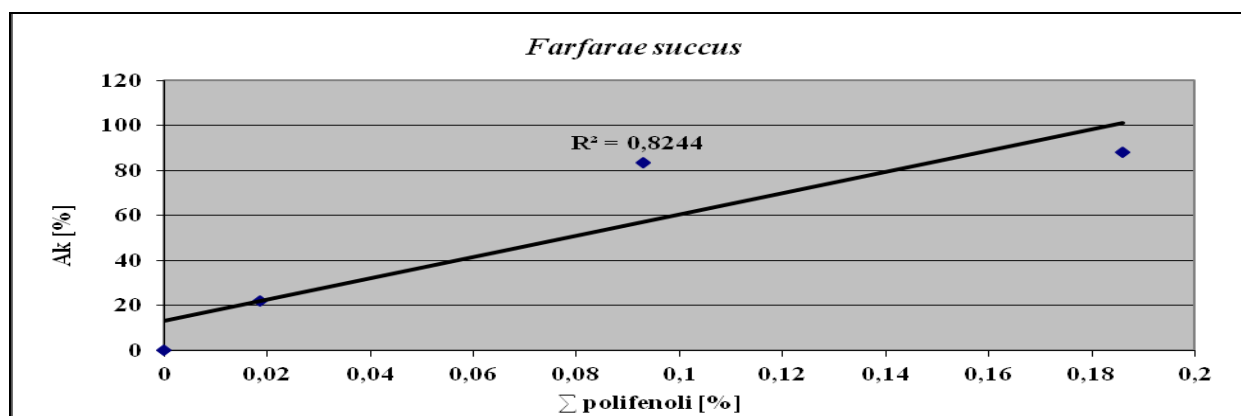
<i>Hamamelidis succus</i>						
Próba		Ilość wyciągu badanego ^{ΔΔ} [ml]	Absorbancja A_i	Aktywność A_k [%]	Ilość pozostałego DPPH [%]	Σ polifenoli w próbie [%]
DPPH		0,00	0,7609 [A_0]	0,00	100,0	0,00
HSP-5/0,1	HS1*	0,02	0,5779	24,05	75,95	0,01
HSP-5/0,5	HS2*	0,1	0,0552	92,74	7,26	0,06
HSP-5/1,0	HS3*	0,2	0,0418	94,51	5,49	0,12
HSP-5/3,0	HS4*	0,6	0,0449	94,09	5,91	0,37
HSP-5/8,0	HS5*	1,6	0,0514	93,24	6,76	0,98
HSP-5/10,0	HS6*	2,0	0,0553	92,73	7,27	1,22
HSP-10/10,0	HS7*	4,0	0,0749	90,16	9,84	2,44
HSP-15/10,0	HS8*	6,0	0,0948	87,54	12,46	3,66
HSP-20/10,0	HS9*	8,0	0,1109	85,42	14,58	4,88

^{ΔΔ} p. pkt 3.1.2.f
 * Oznaczenia wykorzystane na rycinach 20-27: Porównanie aktywności przeciwutleniającej
 Długość fali analitycznej $\lambda = 540$ nm

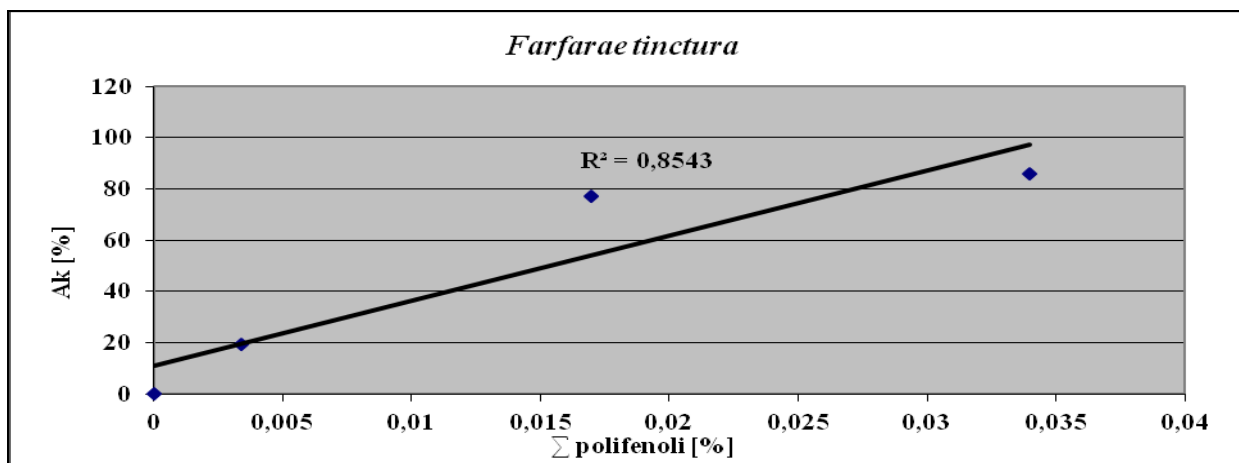
Tabela 23. Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez *Hamamelidis tinctura*

<i>Hamamelidis tinctura</i>						
Próba		Ilość wyciągu badanego ^{ΔΔ} [ml]	Absorbancja A _i	Aktywność A _k [%]	Ilość pozostałego DPPH [%]	Σ polifenoli w próbie [%]
DPPH ⁰⁰⁰		0,00	0,7773 [A ₀]	0,00	100,0	0,00
HTP-5/0,1	HT1*	0,02	0,7614	2,04	97,96	0,03
HTP-5/0,5	HT2*	0,1	0,5249	32,47	67,53	0,13
HTP-5/1,0	HT3*	0,2	0,2651	65,89	34,11	0,25
DPPH ⁰⁰⁰		0,0	0,7968 [A ₀]	0,00	100,0	0,00
HTP-5/3,0	HT4*	0,6	0,0481	93,96	6,04	0,76
HTP-5/8,0	HT5*	1,6	0,0448	94,38	5,62	2,03
HTP-5/10,0	HT6*	2,0	0,0462	94,20	5,80	2,54
HTP-10/10,0	HT7*	4,0	0,0473	94,06	5,94	5,08
HTP-15/10,0	HT8*	6,0	0,0519	93,49	6,51	7,62
HTP-20/10,0	HT9*	8,0	0,0567	92,88	7,12	10,16

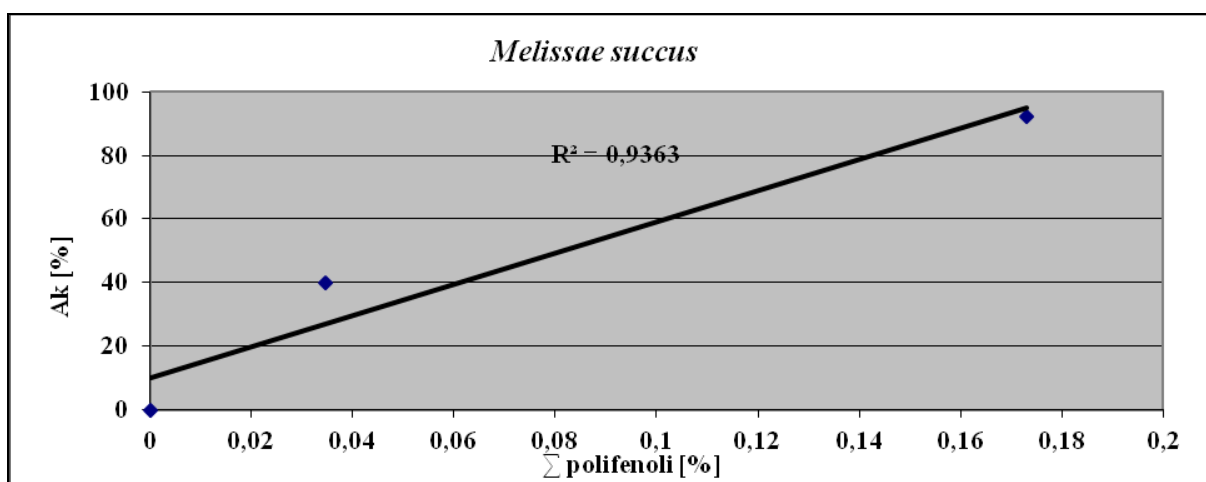
^{ΔΔ} p. pkt 3.1.2.f
 * Oznaczenia wykorzystane na rycinach 20-27: Porównanie aktywności przeciwutleniającej
⁰⁰⁰Analizę wykonywano w trzech etapach
 Długość fali analitycznej λ = 540 nm



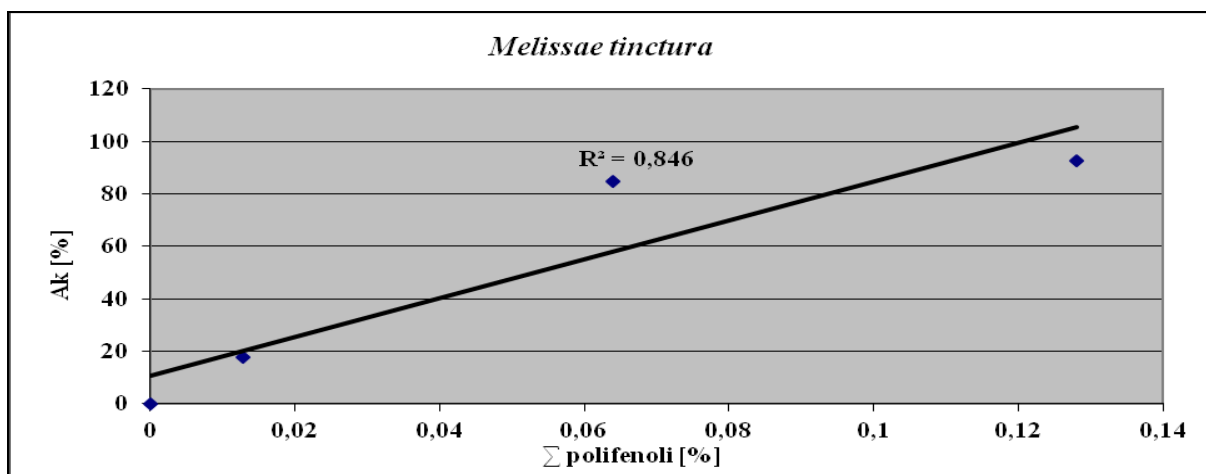
Rycina 10. Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbce *Farfarae succus*.



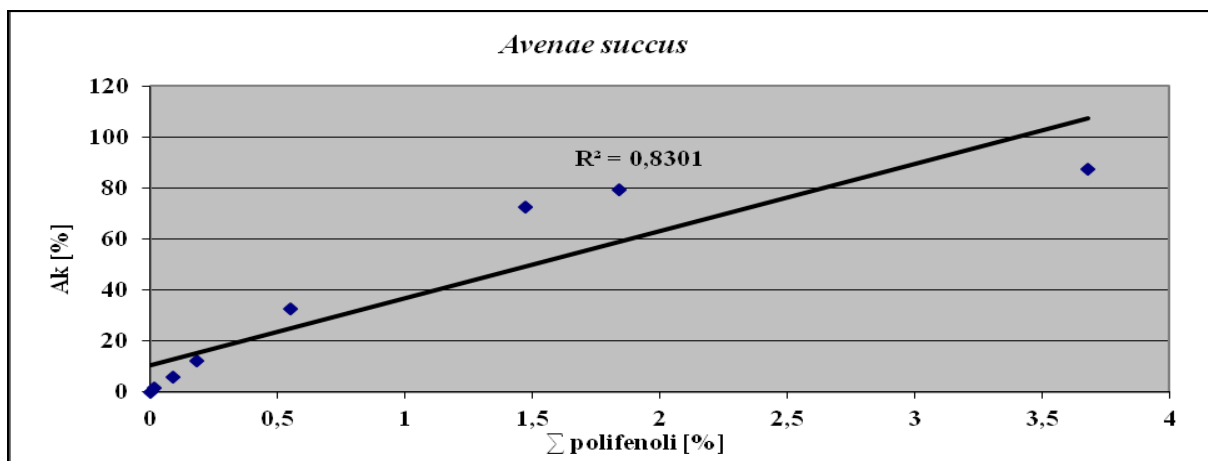
Rycina 11. Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbce *Farfarae tinctura*.



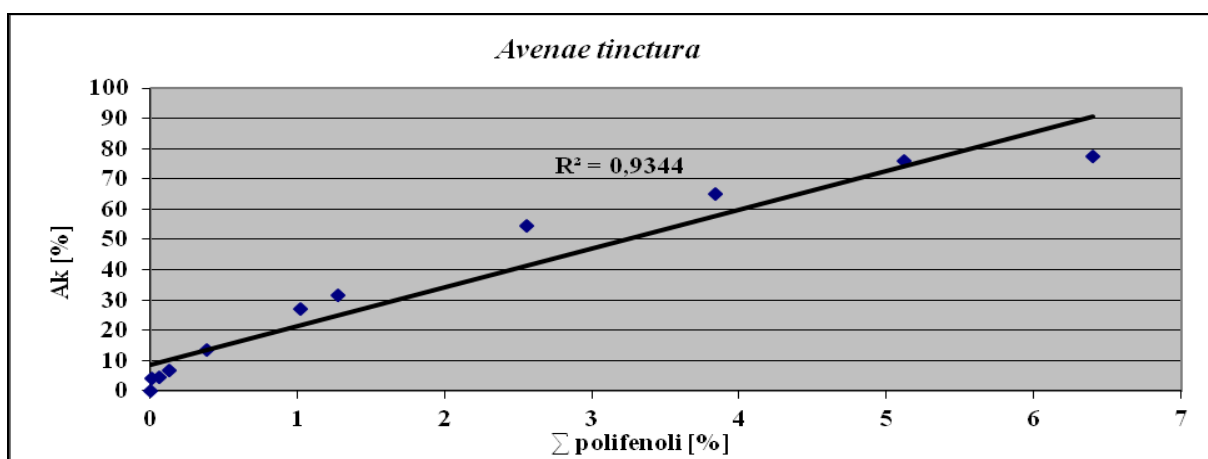
Rycina 12. Liniowa zależność aktywności od zawartości polifenoli w próbce *Melissae succus*.



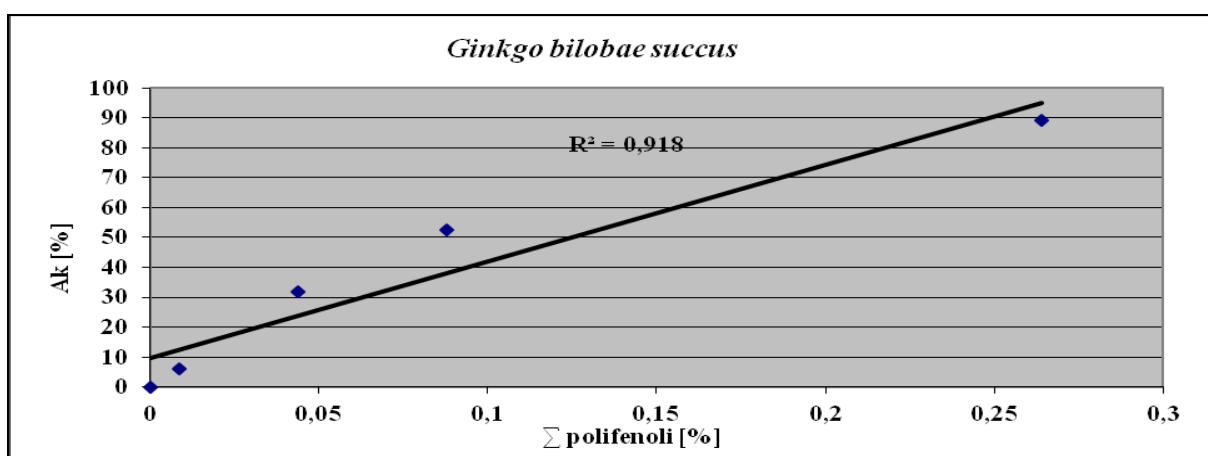
Rycina 13. Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbce *Melissae tinctura*.



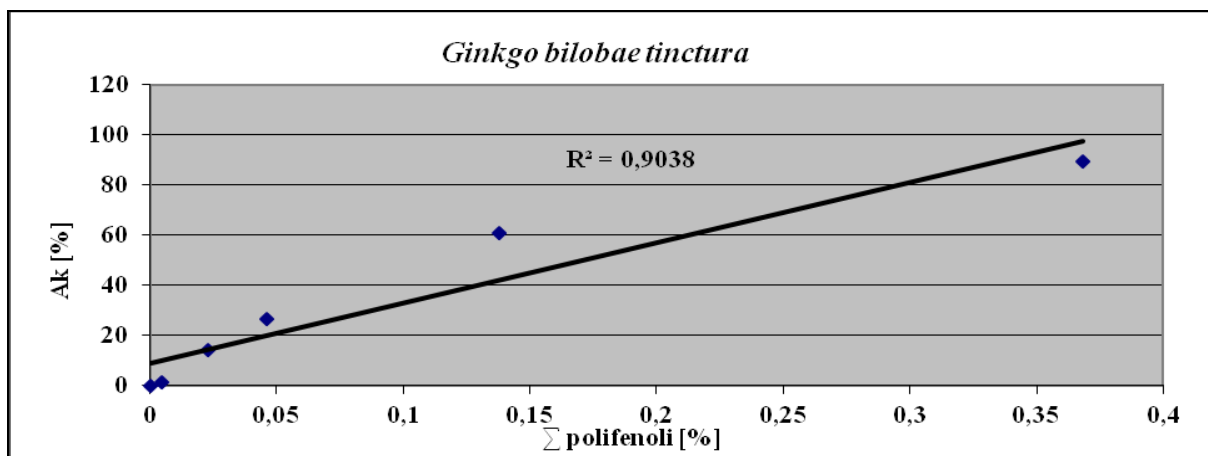
Rycina 14. Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbce *Avenae succus*.



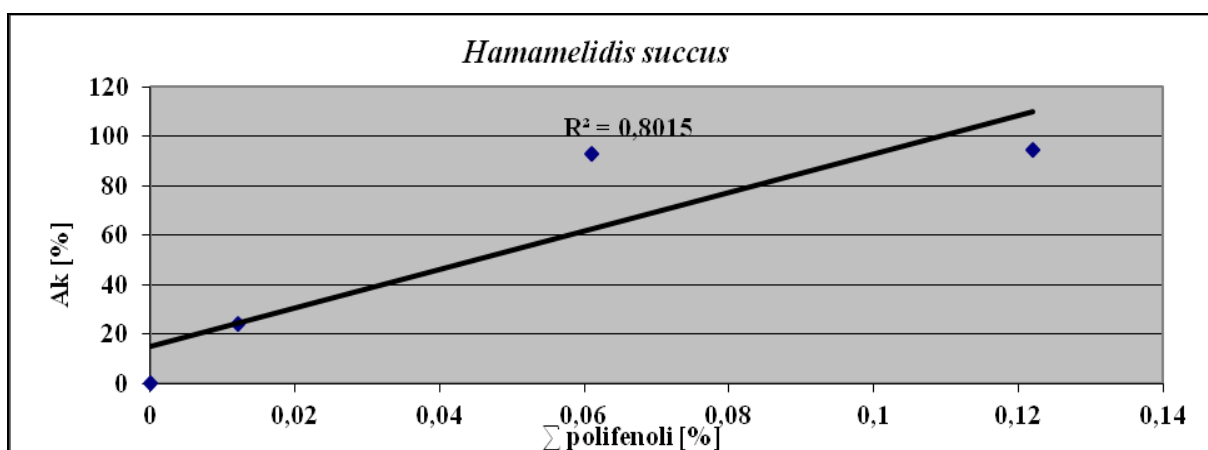
Rycina 15. Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbce *Avenae tinctura*.



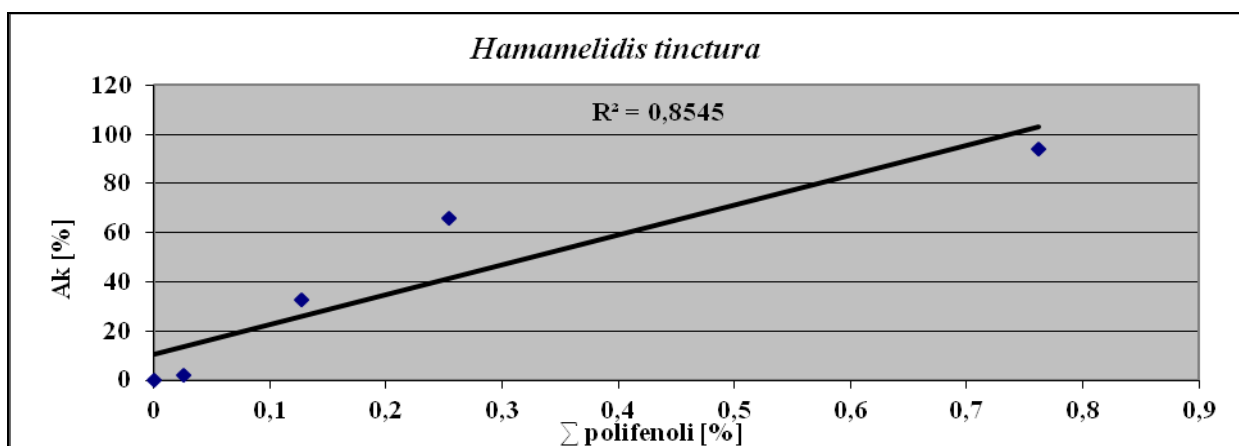
Rycina 16. Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbce *Ginkgo bilobae succus*.



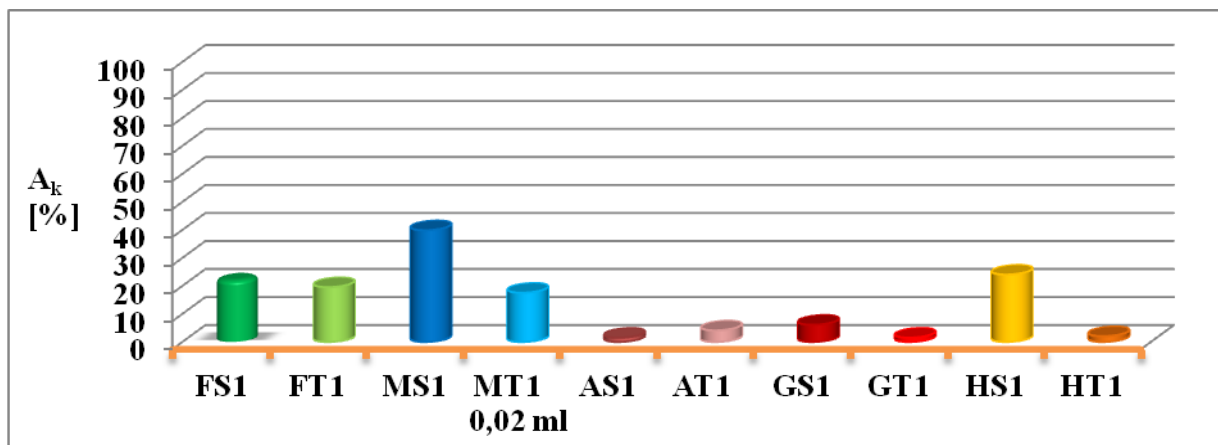
Rycina 17. Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbce *Ginkgo bilobae tinctura*.



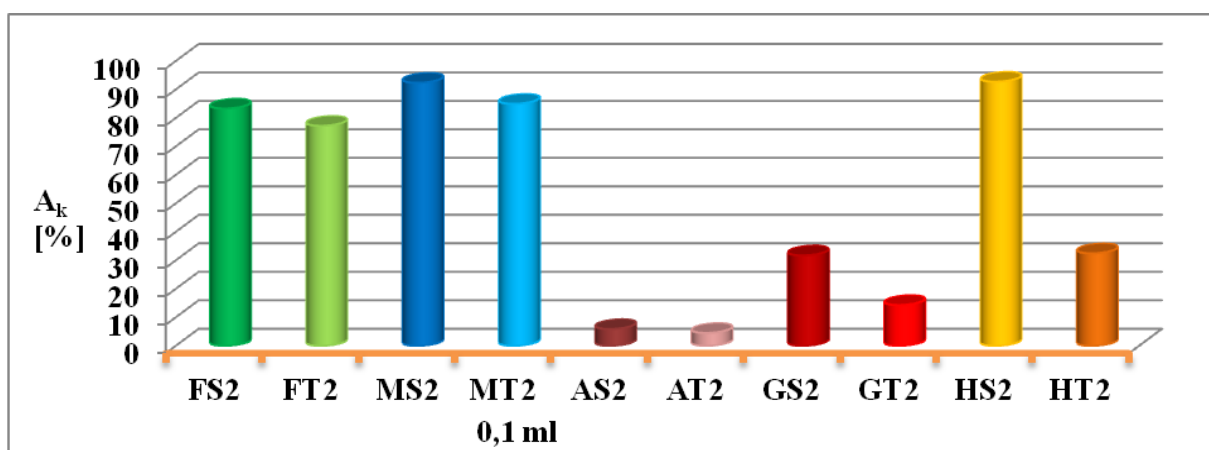
Rycina 18. Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbce *Hamamelis succus*.



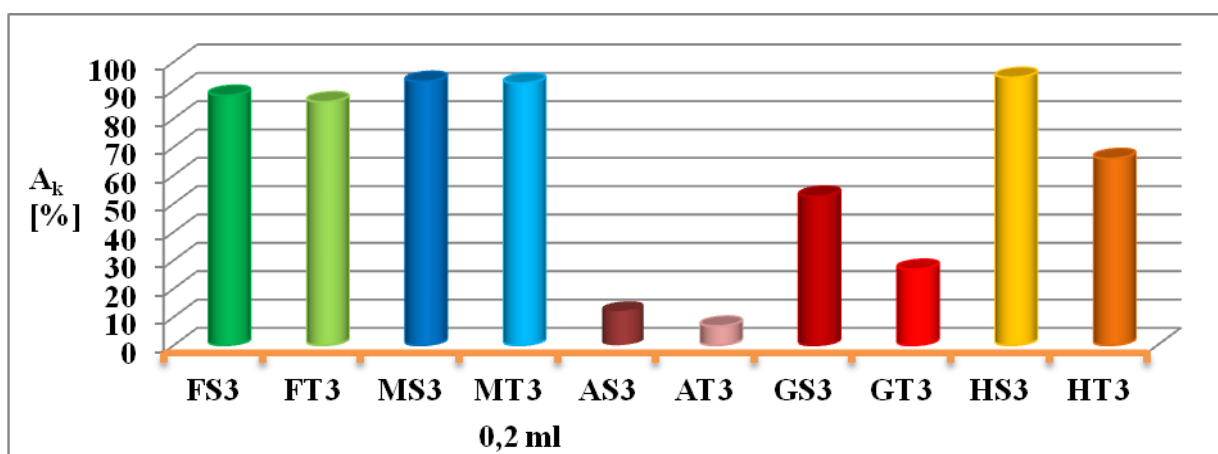
Rycina 19. Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbce *Hamamelis tinctura*.



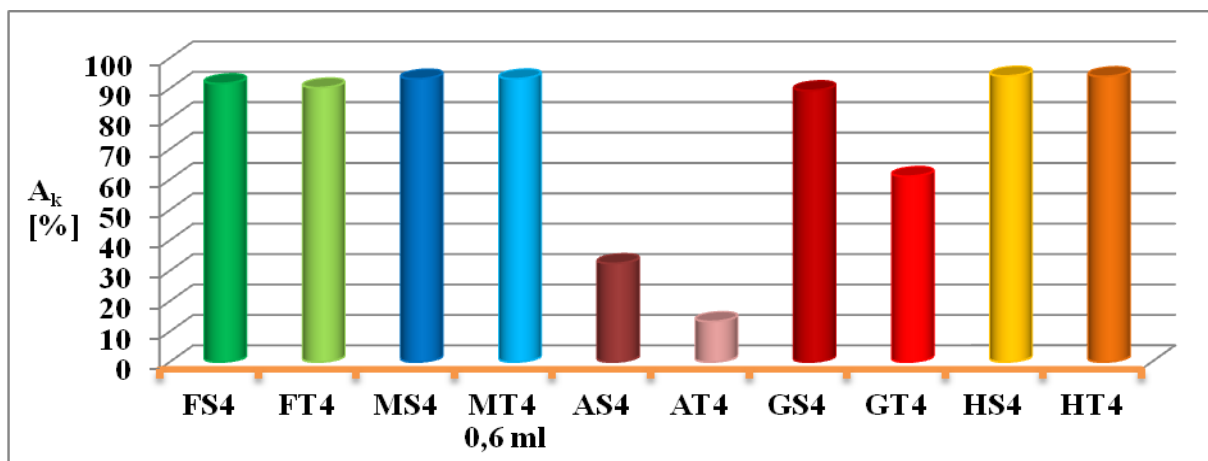
Rycina 20. Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 0,02 ml badanych soków i nalewek: FS1, FT1, MS1, MT1, AS1, AT1, GS1, GT1, HS1, HT1(p. Tabela 14-33).



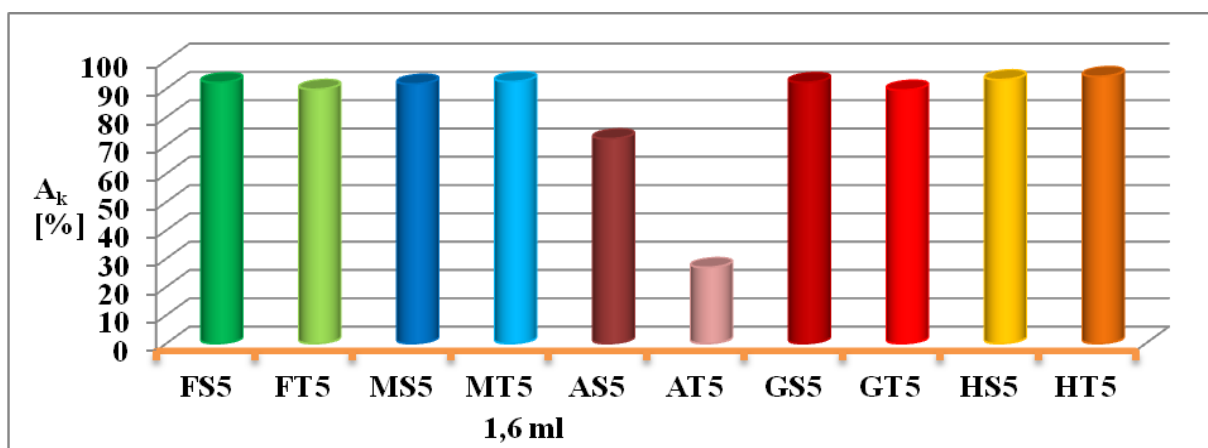
Rycina 21. Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 0,1 ml badanych soków i nalewek: FS2, FT2, MS2, MT2, AS2, AT2, GS2, GT2, HS2, HT2 (p. Tabela 14-33).



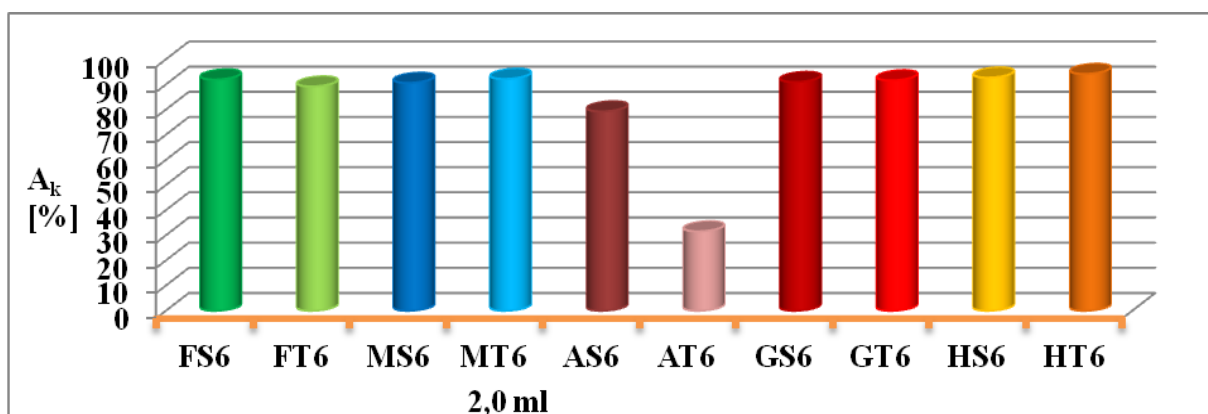
Rycina 22. Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 0,2 ml badanych soków i nalewek: FS3, FT3, MS3, MT3, AS3, AT3, GS3, GT3, HS3, HT3 (p. Tabela 14-33).



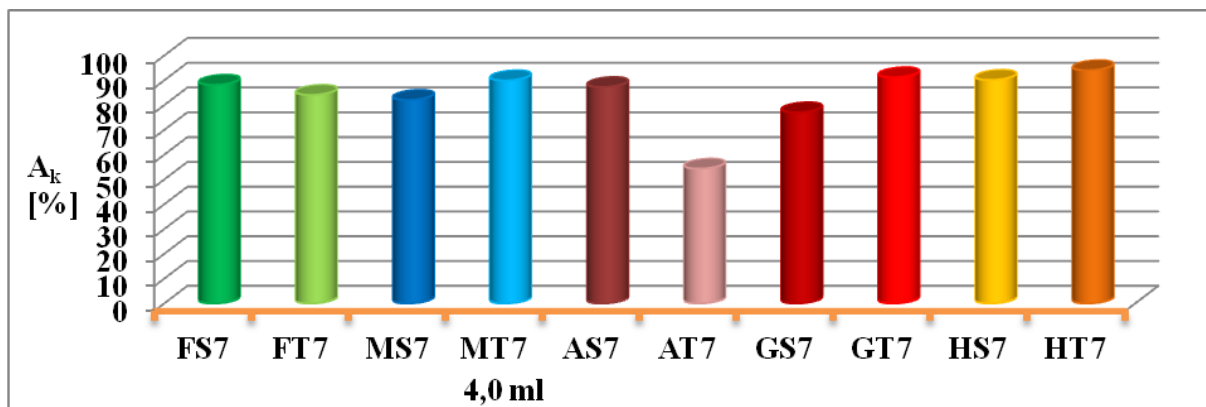
Rycina 23. Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 0,6 ml badanych soków i nalewek: FS4, FT4, MS4, MT4, AS4, AT4, GS4, GT4, HS4, HT4 (p. Tabela 14-33).



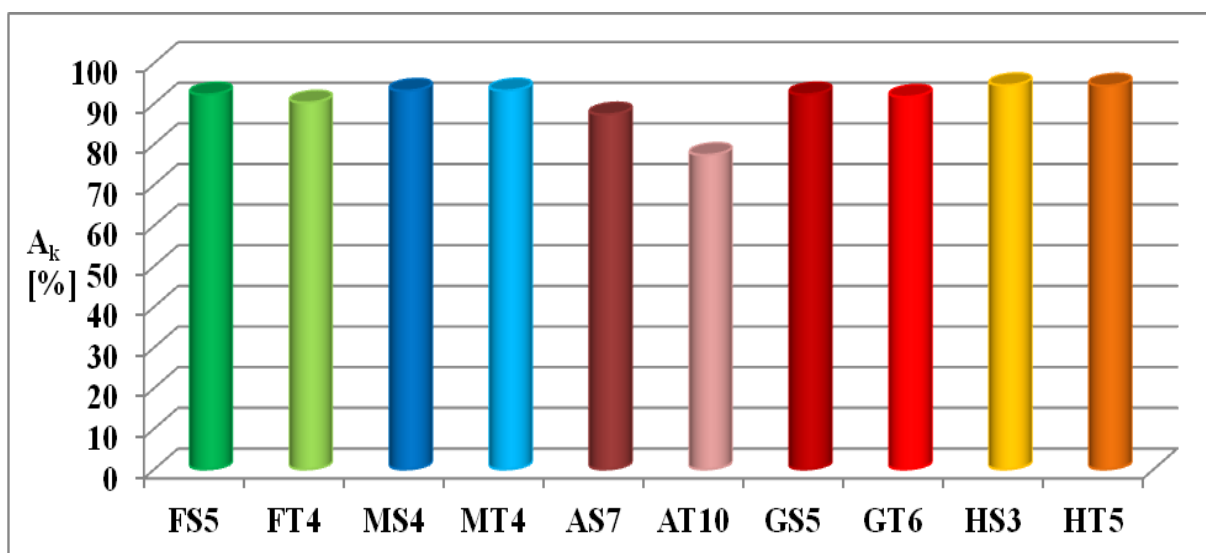
Rycina 24. Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 1,6 ml badanych soków i nalewek: FS5, FT5, MS5, MT5, AS5, AT5, GS5, GT5, HS5, HT5 (p. Tabela 14-33).



Rycina 25. Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 2,0 ml badanych soków i nalewek: FS6, FT6, MS6, MT6, AS6, AT6, GS6, GT6, HS6, HT6 (p. Tabela 14-33).



Rycina 26. Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 4,0 ml badanych soków i nalewek: FS7, FT7, MS7, MT7, AS7, AT7, GS7, GT7, HS7, HT7 (p. Tabela 14-33).



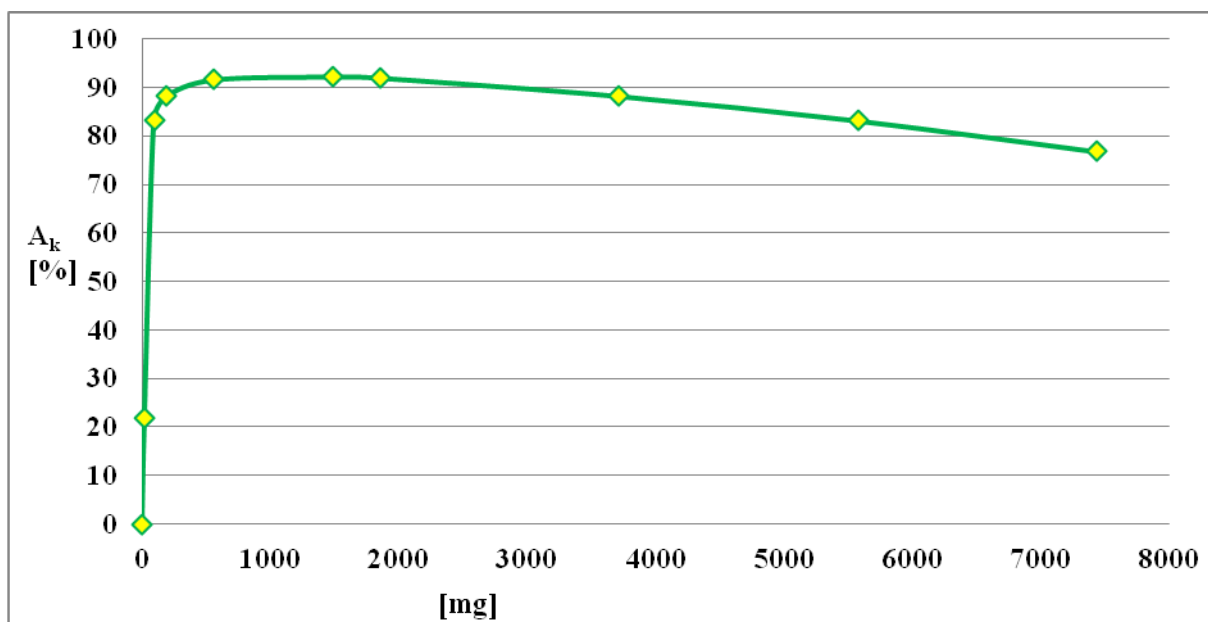
Rycina 27. Maksymalna aktywność A_k [%] zmiatania wolnych rodników dla badanych soków i nalewek (p. Tabela 14-33).

3.1.3. Zawartość surowca [mg] w objętości pobieranych soków/nalewek [ml] do analizy z rodnikiem DPPH

Tabela 24. Zawartość surowca [mg] w objętościach *Farfarae succus* [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 14)

<i>Farfarae succus</i>				
Próba		Zawartość surowca (w objętości soku) [mg]	Pobierana objętość soku [ml]	Gęstość soku [g/ml]
FSP-5/0,1	FS1*	18,57	0,02	0,9285
FSP-5/0,5	FS2*	92,85	0,10	
FSP-5/1,0	FS3*	185,70	0,20	
FSP-5/3,0	FS4*	557,10	0,60	
FSP-5/8,0	FS5*	1485,60	1,60	
FSP-5/10,0	FS6*	1857,00	2,00	
FSP-10/10,0	FS7*	3714,00	4,00	
FSP-15/10,0	FS8*	5571,00	6,00	
FSP-20/10,0	FS9*	7428,00	8,00	

*Symbole stosowane w trakcie analizy na aparacie Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer

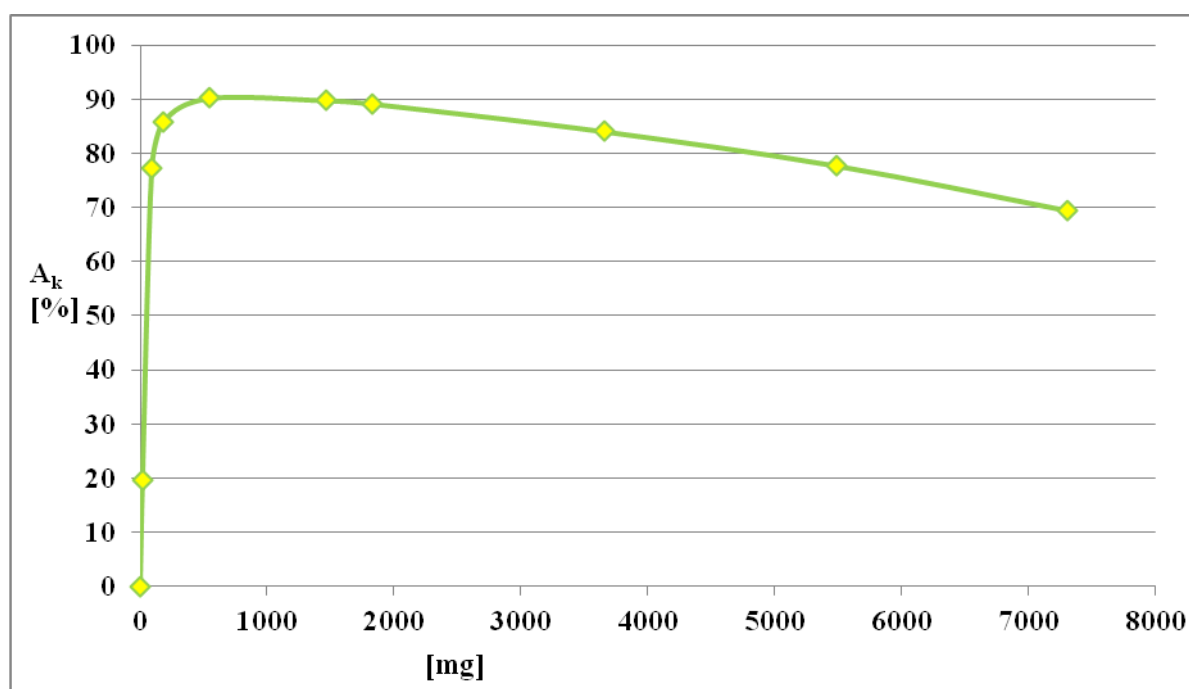


Rycina 28. Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] *Farfarae succus* od zawartości surowca [mg].

Tabela 25. Zawartość surowca [mg] w objętościach *Farfarae tinctura* [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 15)

<i>Farfarae tinctura</i>				
Próba		Zawartość surowca (w objętości nalewki) [mg]	Pobierana objętość nalewki [ml]	Gęstość nalewki [g/ml]
FTP-5/0,1	FT1*	18,3	0,02	0,9137
FTP-5/0,5	FT2*	91,4	0,10	
FTP-5/1,0	FT3*	182,7	0,20	
FTP-5/3,0	FT4*	548,2	0,60	
FTP-5/8,0	FT5*	1461,9	1,60	
FTP-5/10,0	FT6*	1827,4	2,00	
FTP-10/10,0	FT7*	3654,8	4,00	
FTP-15/10,0	FT8*	5482,2	6,00	
FTP-20/10,0	FT9*	7309,6	8,00	

*Symbole stosowane w trakcie analizy na aparacie Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer

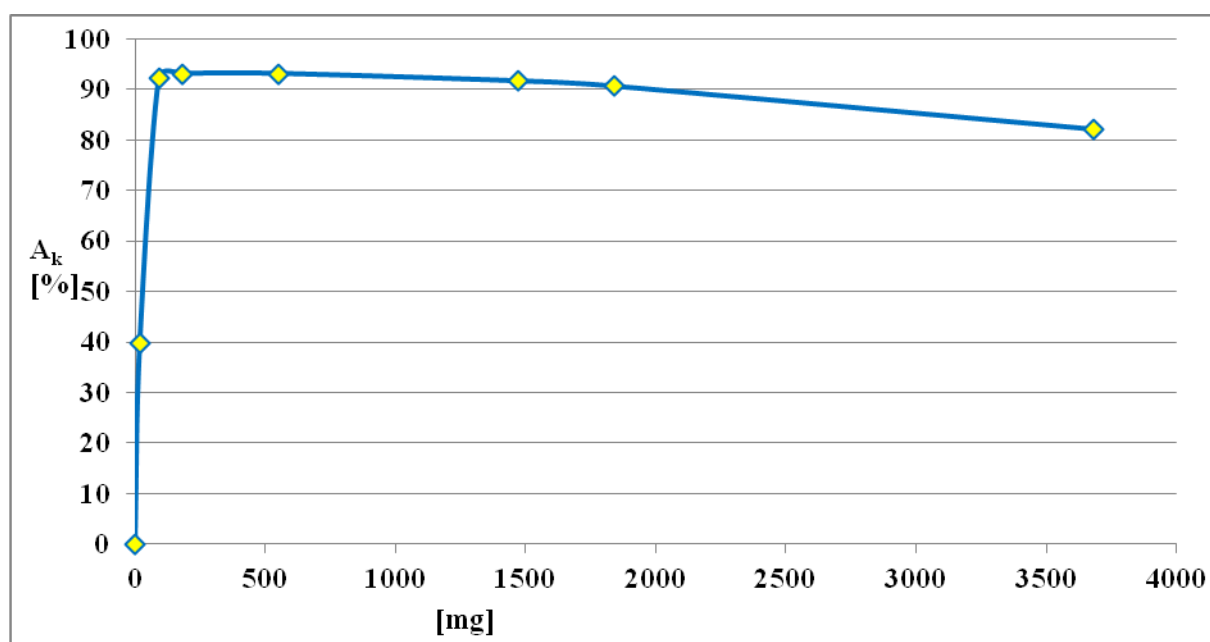


Rycina 29. Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] *Farfarae tinctura* od zawartości surowca [mg].

Tabela 26. Zawartość surowca [mg] w objętościach *Melissae succus* [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 16)

<i>Melissae succus</i>				
Próba		Zawartość surowca (w objętości soku) [mg]	Pobierana objętość soku [ml]	Gęstość soku [g/ml]
MSP-5/0,1	MS1*	18,4	0,02	0,920
MSP-5/0,5	MS2*	92,0	0,10	
MSP-5/1,0	MS3*	184,0	0,20	
MSP-5/3,0	MS4*	552,0	0,60	
MSP-5/8,0	MS5*	1472,0	1,60	
MSP-5/10,0	MS6*	1840,0	2,00	
MSP-10/10,0	MS7*	3680,0	4,00	

*Symbole stosowane w trakcie analizy na aparacie Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer

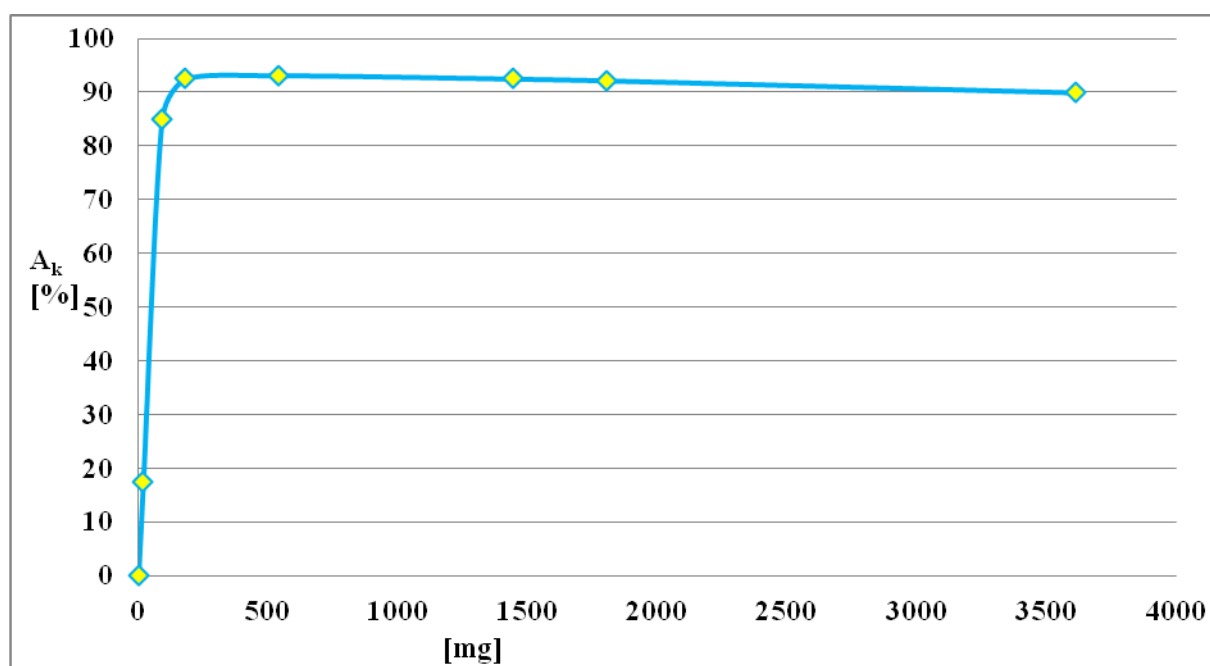


Rycina 30. Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] *Melissae succus* od zawartości surowca [mg].

Tabela 27. Zawartość surowca [mg] w objętościach *Melissae tictura* [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 17)

<i>Melissae tinctura</i>				
Próba		Zawartość surowca (w objętości nalewki) [mg]	Pobierana objętość nalewki [ml]	Gęstość nalewki [g/ml]
MTP-5/0,1	MT1*	18,1	0,02	0,903
MTP-5/0,5	MT2*	90,3	0,10	
MTP-5/1,0	MT3*	180,6	0,20	
MTP-5/3,0	MT4*	541,8	0,60	
MTP-5/8,0	MT5*	1444,8	1,60	
MTP-5/10,0	MT6*	1806,0	2,00	
MTP-10/10,0	MT7*	3612,0	4,00	

*Symbole stosowane w trakcie analizy na aparacie Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer

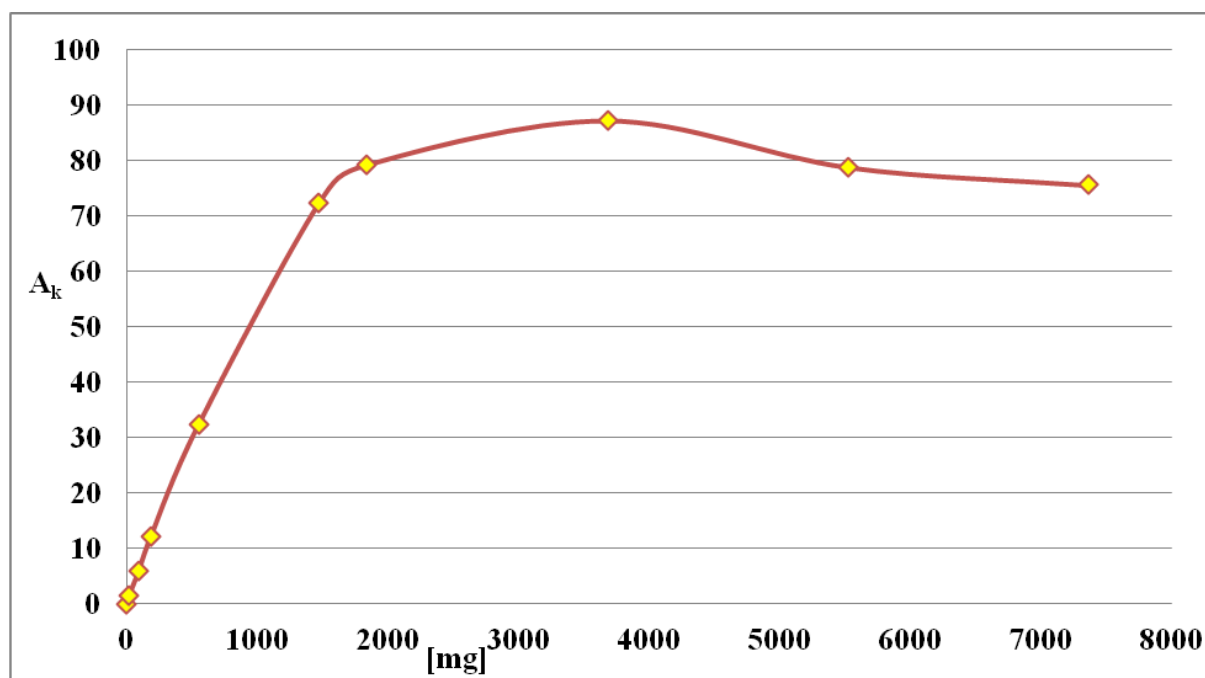


Rycina 31. Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] *Melissae tinctura* od zawartości surowca [mg].

Tabela 28. Zawartość surowca [mg] w objętościach *Avenae succus* [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 18)

<i>Avenae succus</i>				
Próba		Zawartość surowca (w objętości soku) [mg]	Pobierana objętość soku [ml]	Gęstość soku [g/ml]
ASP-5/0,1	AS1*	18,4	0,02	0,921
ASP-5/0,5	AS2*	92,1	0,10	
ASP-5/1,0	AS3*	184,2	0,20	
ASP-5/3,0	AS4*	552,6	0,60	
ASP-5/8,0	AS5*	1473,6	1,60	
ASP-5/10,0	AS6*	1842,0	2,00	
ASP-10/10,0	AS7*	3684,0	4,00	
ASP-15/10,0	AS8*	5526,0	6,00	
ASP-20/10,0	AS9*	7368,0	8,00	

*Symbole stosowane w trakcie analizy na aparacie Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer

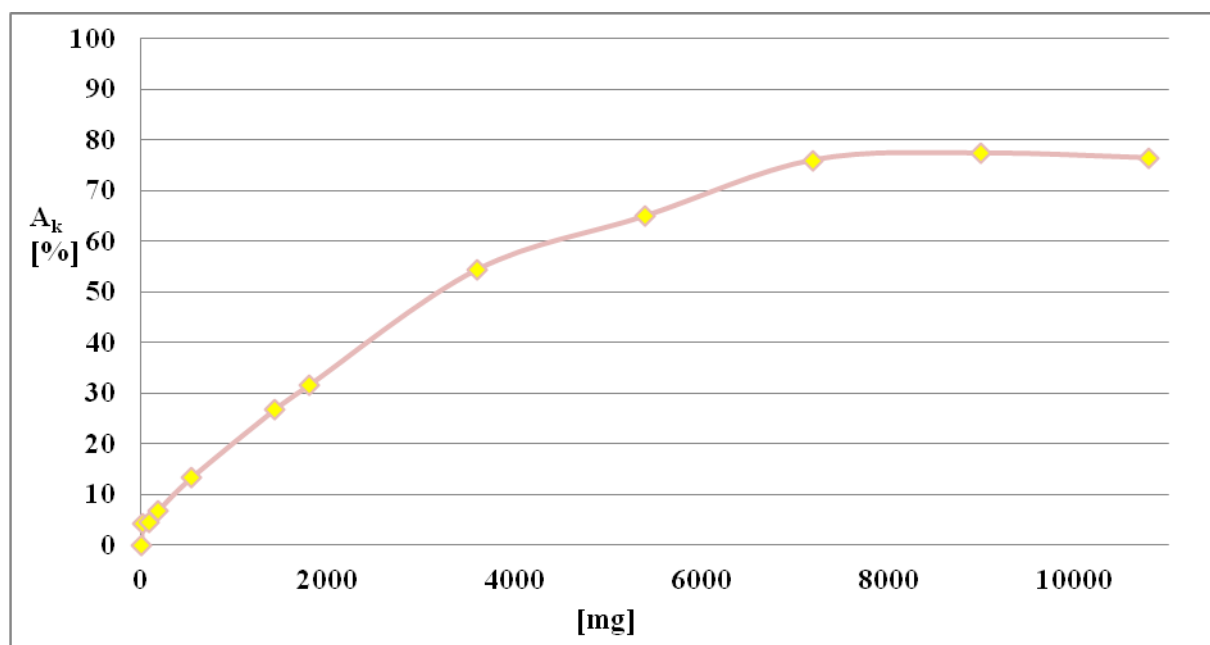


Rycina 32. Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] *Avenae succus* od zawartości surowca [mg].

Tabela 29. Zawartość surowca [mg] w objętościach *Avenae tinctura* [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 19)

<i>Avenae tinctura</i>				
Próba		Zawartość surowca (w objętości nalewki) [mg]	Pobierana objętość nalewki [ml]	Gęstość nalewki [g/ml]
ATP-5/0,1	AT1*	18,0	0,02	0,899
ATP-5/0,5	AT2*	89,9	0,10	
ATP-5/1,0	AT3*	179,8	0,20	
ATP-5/3,0	AT4*	539,4	0,60	
ATP-5/8,0	AT5*	1438,4	1,60	
ATP-5/10,0	AT6*	1798,0	2,00	
ATP-10/10,0	AT7*	3596,0	4,00	
ATP-15/10,0	AT8*	5394,0	6,00	
ATP-20/10,0	AT9*	7192,0	8,00	
ATP-25/10,0	AT10*	8990,0	10,00	
ATP-30/10,0	AT11*	10788,0	12,00	

*Symbole stosowane w trakcie analizy na aparacie Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer

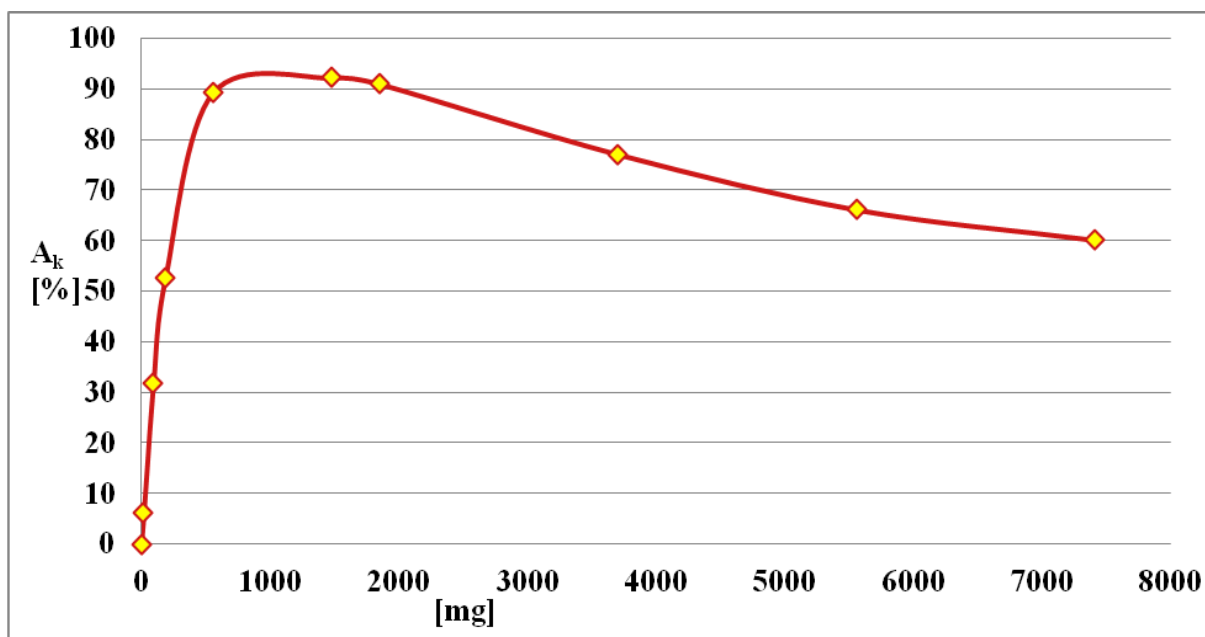


Rycina 33. Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] *Avenae tinctura* od zawartości surowca [mg].

Tabela 30. Zawartość surowca [mg] w objętościach *Ginkgo bilobae succus* [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 20)

<i>Ginkgo bilobae succus</i>				
Próba		Zawartość surowca w soku [mg]	Pobierana objętość soku [ml]	Gęstość soku [g/ml]
GSP-5/0,1	GS1*	18,5	0,02	0,927
GSP-5/0,5	GS2*	92,7	0,10	
GSP-5/1,0	GS3*	185,4	0,20	
GSP-5/3,0	GS4*	556,2	0,60	
GSP-5/8,0	GS5*	1483,2	1,60	
GSP-5/10,0	GS6*	1854,0	2,00	
GSP-10/10,0	GS7*	3708,0	4,00	
GSP-15/10,0	GS8*	5562,0	6,00	
GSP-20/10,0	GS9*	7416,0	8,00	

*Symbole stosowane w trakcie analizy na aparacie Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer

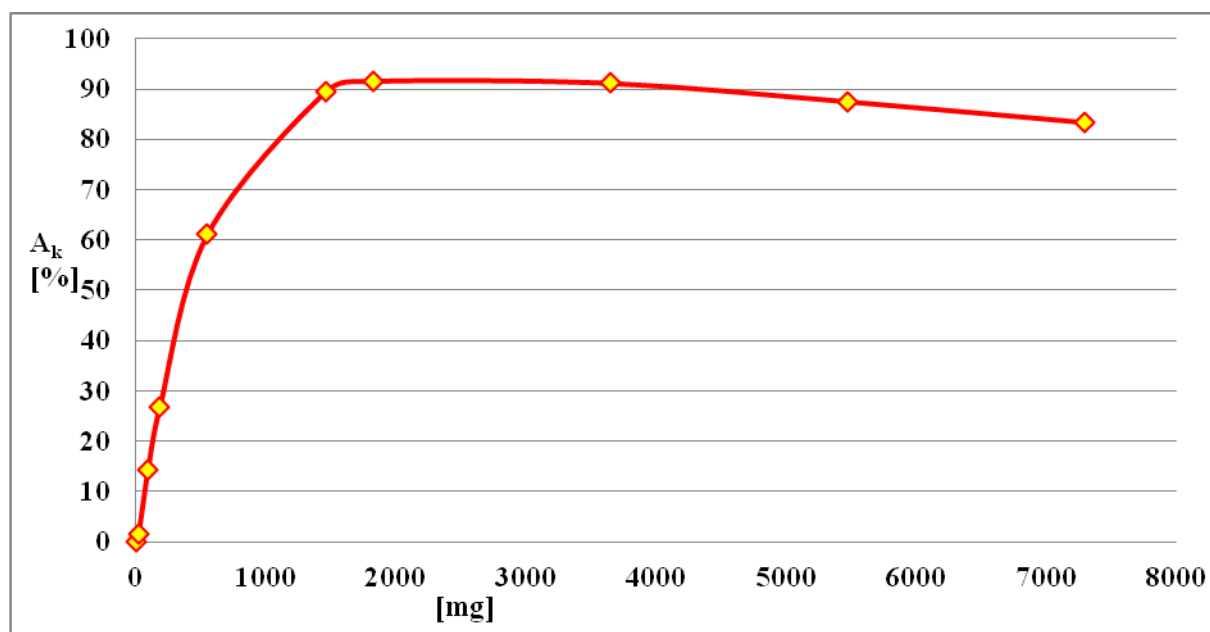


Rycina 34. Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] *Ginkgo bilobae succus* od zawartości surowca [mg].

Tabela 31. Zawartość surowca [mg] w objętościach *Ginkgo bilobae tinctura* [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 21)

<i>Ginkgo bilobae tinctura</i>				
Próba		Zawartość surowca w nalewce [mg]	Pobierana objętość nalewki [ml]	Gęstość nalewki [g/ml]
GTP-5/0,1	GT1*	18,2	0,02	0,912
GTP-5/0,5	GT2*	91,2	0,10	
GTP-5/1,0	GT3*	182,4	0,20	
GTP-5/3,0	GT4*	547,2	0,60	
GTP-5/8,0	GT5*	1459,2	1,60	
GTP-5/10,0	GT6*	1824,0	2,00	
GTP-10/10,0	GT7*	3648,0	4,00	
GTP-15/10,0	GT8*	5472,0	6,00	
GTP-20/10,0	GT9*	7296,0	8,00	

*Symbole stosowane w trakcie analizy na aparacie Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer

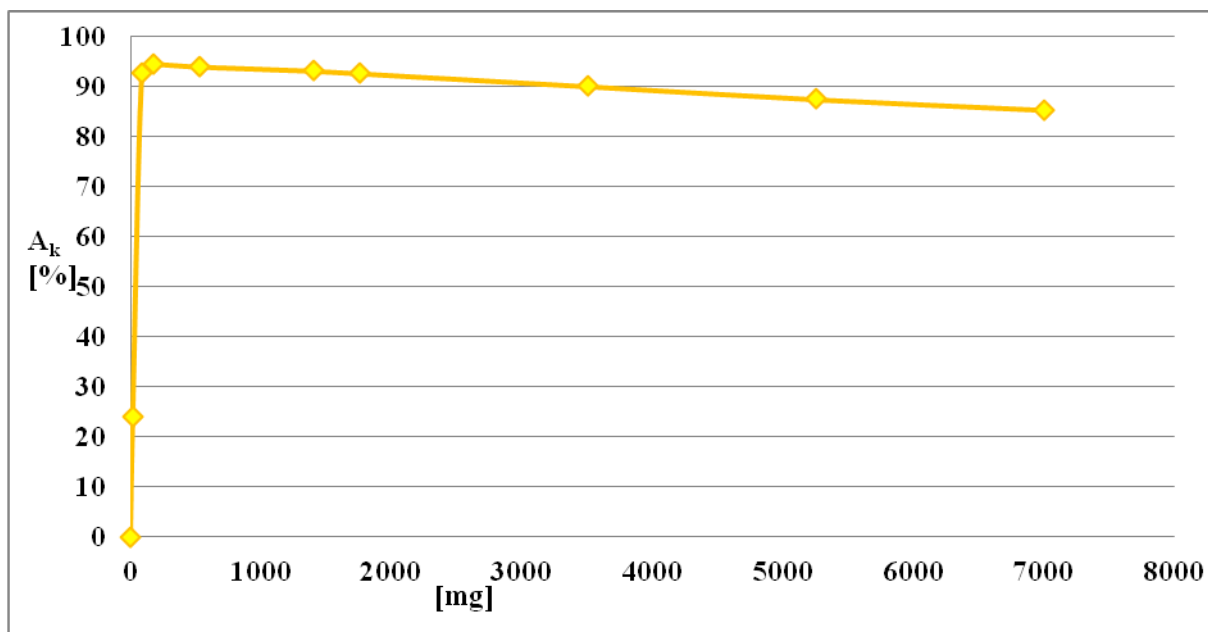


Rycina 35. Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] *Ginkgo bilobae tinctura* od zawartości surowca [mg].

Tabela 32. Zawartość surowca [mg] w objętościach *Hamamelidis succus* [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 22)

<i>Hamamelidis succus</i>				
Próba		Zawartość surowca w soku [mg]	Pobierana objętość soku [ml]	Gęstość soku [g/ml]
HSP-5/0,1	HS1*	17,5	0,02	0,875
HSP-5/0,5	HS2*	87,5	0,10	
HSP-5/1,0	HS3*	175,0	0,20	
HSP-5/3,0	HS4*	525,0	0,60	
HSP-5/8,0	HS5*	1400,0	1,60	
HSP-5/10,0	HS6*	1750,0	2,00	
HSP-10/10,0	HS7*	3500,0	4,00	
HSP-15/10,0	HS8*	5250,0	6,00	
HSP-20/10,0	HS9*	7000,0	8,00	

*Symbole stosowane w trakcie analizy na aparacie Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer

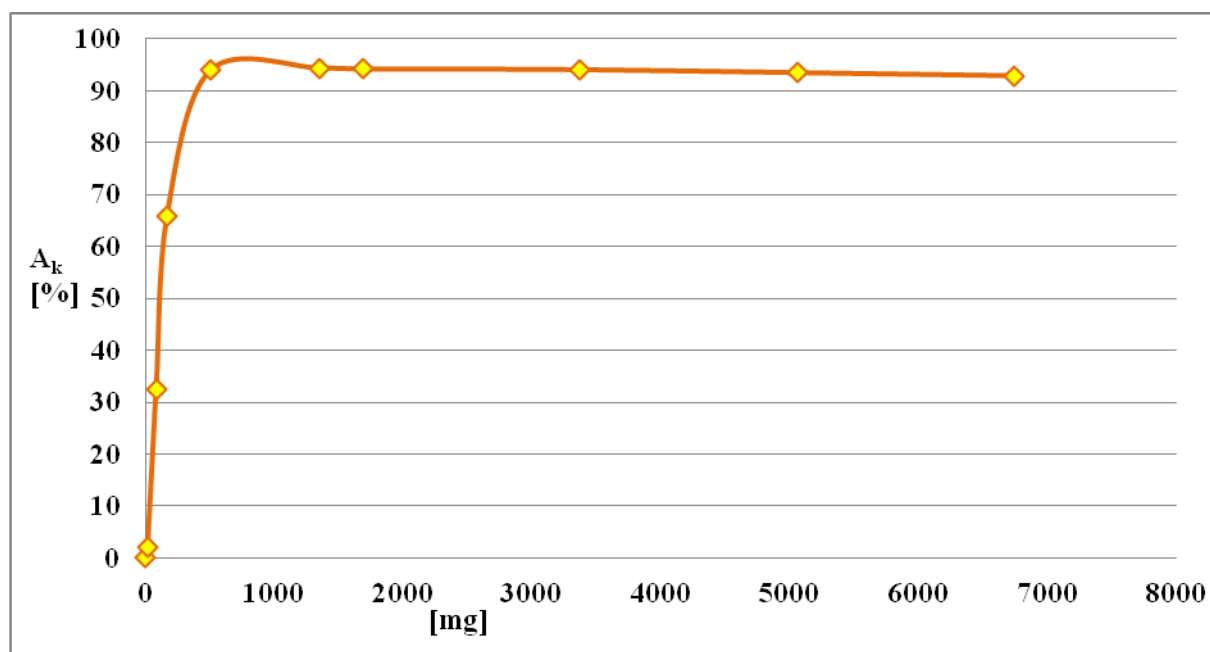


Rycina 36. Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] *Hamamelidis succus* od zawartości surowca [mg].

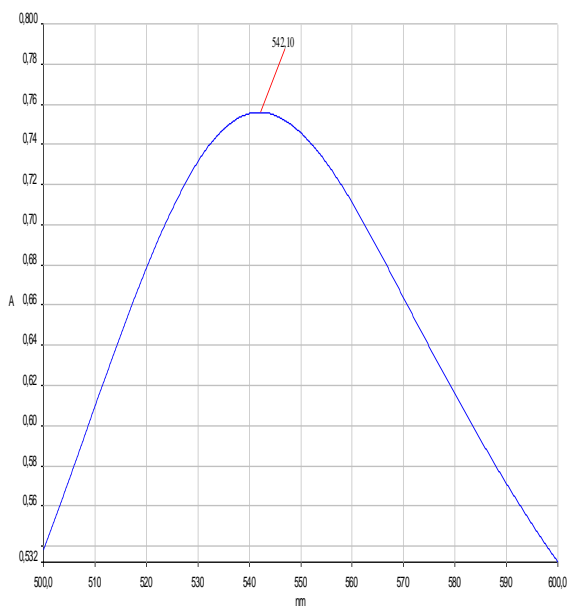
Tabela 33. Zawartość surowca [mg] w objętościach *Hamamelidis tinctura* [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 23)

<i>Hamamelidis tinctura</i>				
Próba		Zawartość surowca w nalewce [mg]	Pobierana objętość nalewki [ml]	Gęstość nalewki [g/ml]
HTP-5/0,1	HT1*	16,9	0,02	0,843
HTP-5/0,5	HT2*	84,3	0,10	
HTP-5/1,0	HT3*	168,6	0,20	
HTP-5/3,0	HT4*	505,8	0,60	
HTP-5/8,0	HT5*	1348,8	1,60	
HTP-5/10,0	HT6*	1686,0	2,00	
HTP-10/10,0	HT7*	3372,0	4,00	
HTP-15/10,0	HT8*	5058,0	6,00	
HTP-20/10,0	HT9*	6744,0	8,00	

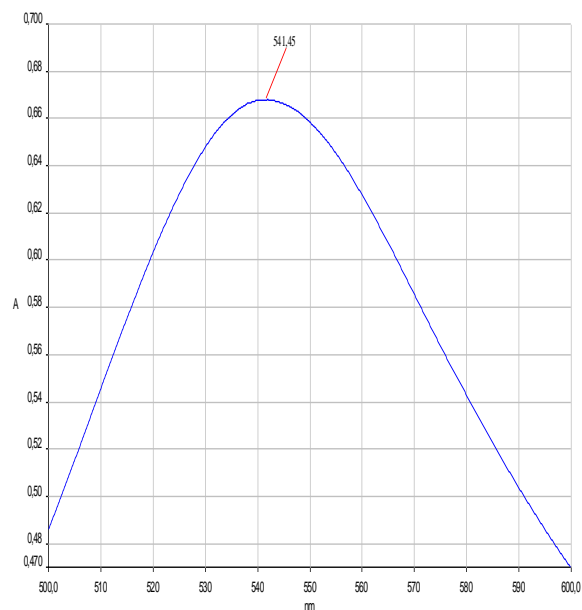
*Symbole stosowane w trakcie analizy na aparacie Spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer



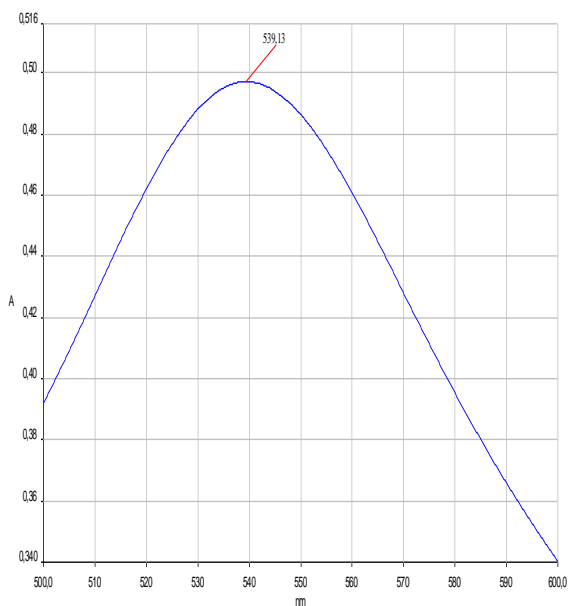
Rycina 37. Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] *Hamamelidis tinctura* od zawartości surowca [mg].



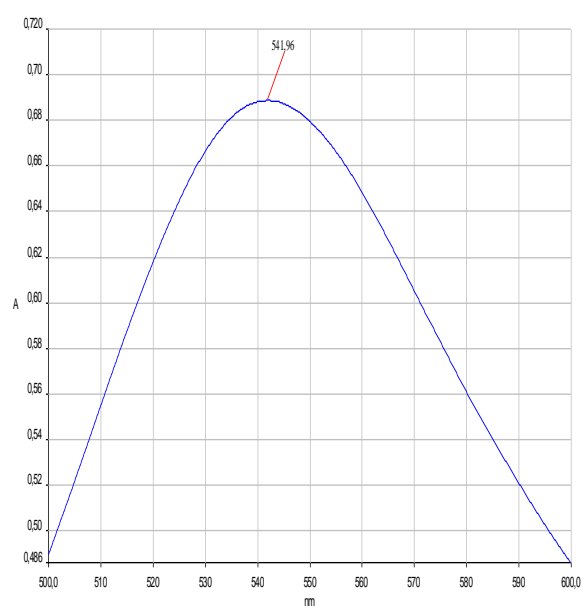
Rycina 38. Widmo wyciągu *Farfarae succus* z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 – 600 nm ($\lambda_{\max}=542,10$).



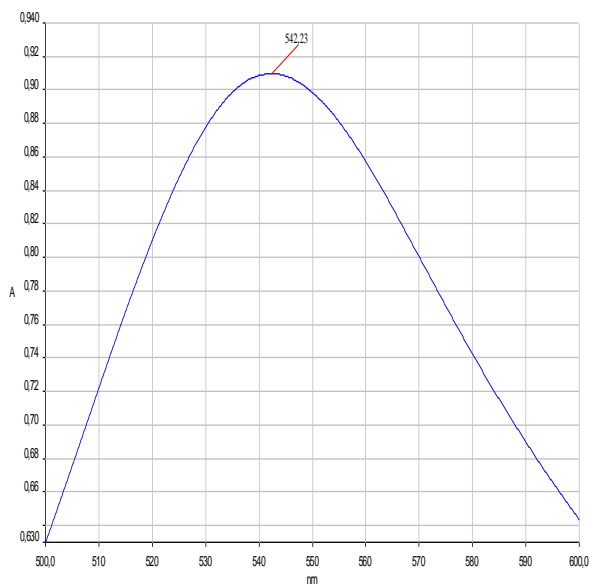
Rycina 39. Widmo wyciągu *Farfarae tinctura* z odczynnikiem DPPH w zakresie 500–600 nm ($\lambda_{\max}=541,45$).



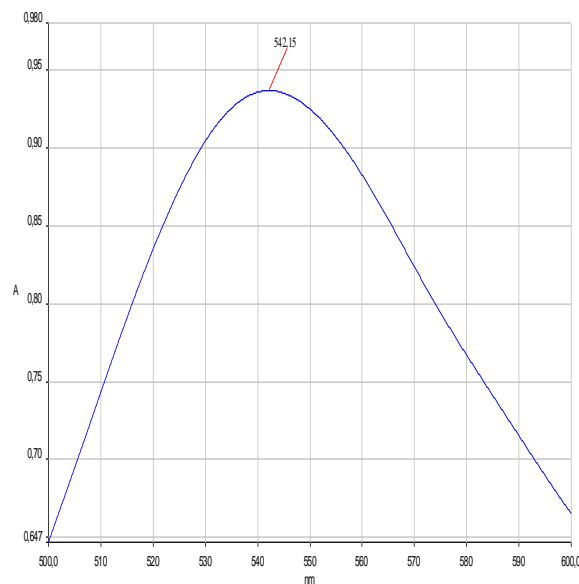
Rycina 40. Widmo wyciągu *Melissae succus* z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 – 600 nm ($\lambda_{\max}=539,13$).



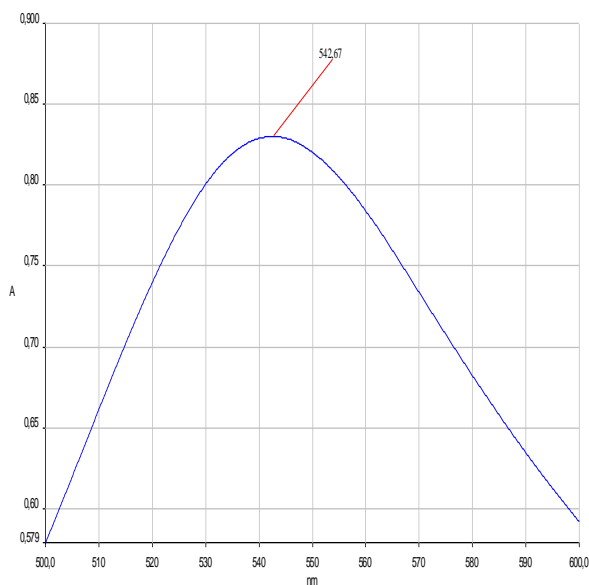
Rycina 41. Widmo wyciągu *Melissae tinctura* z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 – 600 nm ($\lambda_{\max}=541,96$).



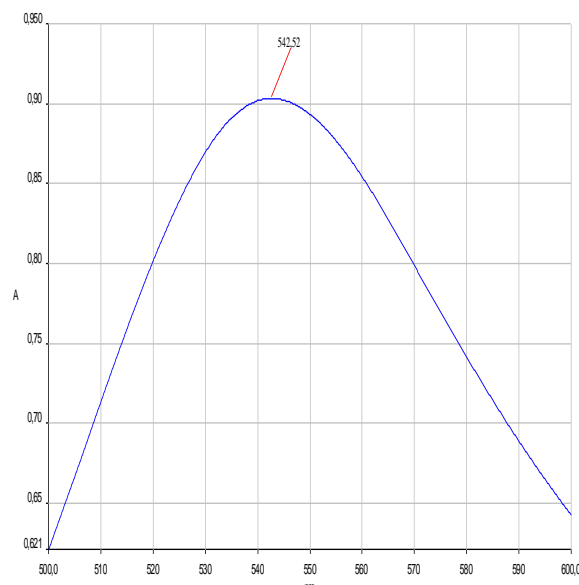
Rycina 42. Widmo wyciągu *Avenae succus* z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 – 600 nm ($\lambda_{\max}=542,23$).



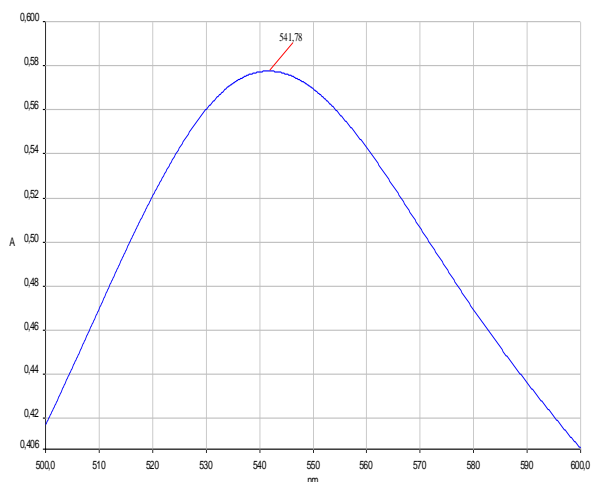
Rycina 43. Widmo wyciągu *Avenae tinctura* z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 – 600 nm ($\lambda_{\max}=542,15$).



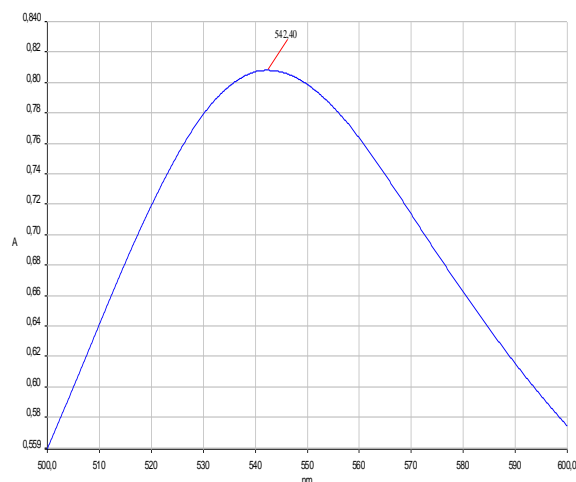
Rycina 44. Widmo wyciągu *Ginkgo bilobae succus* z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 – 600 nm ($\lambda_{\max}=542,67$).



Rycina 45. Widmo wyciągu *Ginkgo bilobae tinctura* z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 – 600 nm ($\lambda_{\max}=542,52$).



Rycina 46. Widmo wyciągu *Hamamelidis succus* z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 – 600 nm ($\lambda_{\max}=541,78$).



Rycina 47. Widmo wyciągu *Hamamelidis tinctura* z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 – 600 nm ($\lambda_{\max}=542,40$).

4. Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych wyciągów

4.1. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły wyciągi ze świeżych i wysuszonych, wybranych surowców roślinnych (p. pkt. 1.1.1., 1.1.2.)

Wszystkie analizowane wyciągi w dobranej ilości odparowano do sucha na wyparce próżniowej (Tabela 34).

Tabela 34. Objętości wyciągów roślinnych (soki/nalewki) i ich suche pozostałości użyte do badań mikrobiologicznych

Próba	Objętość wyciągu [ml]	Sucha pozostałość* [g]
FS	20,0	0,8591
FT	30,0	1,1052
MS	25,0	0,8884
MT	50,0	0,9400
AS	25,0	0,7405
AT	75,0	0,9632
GS	19,0	1,6447
GT	15,0	0,7123
HS	50,0	0,8687
HT	130,0	0,7025

*sucha pozostałość po odparowaniu podanej objętości wyciągu

4.2. Przeprowadzenie badań mikrobiologicznych

Badania przeprowadzono z użyciem wrażliwego na antybiotyki międzynarodowego szczepu standardowego *Staphylococcus aureus*. Wyciągi rozpuszczono w sulfotlenku dwumetylu (DMSO) w stężeniu 100 mg/ml i przygotowywano z nich rozcieńczenia w płynnym podłożu Antibiotic Broth w stężeniach od 0,1 do 10,0 mg/ml.

Do przygotowanych rozcieńczeń wyciągów o objętości 1 ml dodawano po 0,1 ml 18-godzinnej hodowli szczepu standardowego, zawierającej 10^5 komórek w 1 ml. Następnie po 18 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C, określano najmniejsze stężenie hamujące (MIC- *Minimal Inhibitory Concentration*) badanych wyciągów i najmniejsze stężenie bakteriobójcze (MBC- *Minimal Bactericidal Concentration*) wobec badanego szczepu standardowego. W celu porównawczym użyto antybiotyków referencyjnych – tetracykliny i chloramfenikolu (firmy Merck). Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione w tabeli (Tabela 35).

Badania przeprowadzono w Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu.

Tabela 35. Działanie przeciwbakteryjne (MIC, MBC) badanych wyciągów (soki/nalewki)

Wyciąg	MIC [mg/ml]	MBC [mg/ml]
FS	5,0	7,5
FT	5,0	10,0
MS	2,5	2,5
MT	2,5	2,5
AS	7,5	10,0
AT	7,5	7,5
GS	2,5	5,0
GT	0,25	0,25
HS	1,0	2,5
HT	1,0	2,5
Antybiotyk	MIC [mg/ml]	MBC [mg/ml]
Tetracyklina	0,0001	0,0001
Chloramfenikol	0,005	0,005

5. Oznaczanie ilościowe wybranych grup związków w badanych surowcach roślinnych świeżych i wysuszonych

5.1. Przygotowanie wyciągów ze świeżych i wysuszonych surowców roślinnych

Wyciągi metanolowe (M) i metanolowo - wodne (MW) z liścia podbiału - *Farfarae folium*, ziela melisy - *Melissae herba*, ziela owsa - *Avenae herba*, liścia miłorzębu - *Ginkgo bilobae folium* i kory oczaru - *Hamamelidis cortex*, przygotowano w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (pkt. 5.1.1.) z materiału roślinnego, pochodzącego z plantacji Zakładu Zielarskiego Phytopharm Klęka SA (p. pkt. 1.).

5.1.1. Otrzymywanie wyciągów metanolowych (M)

Po 30,0 g każdego z surowców roślinnych, świeżych i wysuszonych (p. pkt. 5.1.) zalano oddzielnie 400 ml metanolu, następnie ekstrahowano dwukrotnie tą samą ilością rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej na łaźni ultradźwiękowej przez 1 godzinę. Uzyskane odpowiednie metanolowe wyciągi połączono i zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze nie przekraczającej 60°C. Suche pozostałości po zagęszczeniu, rozpuszczano w wodzie na łaźni ultradźwiękowej w temperaturze 60°C przez około 30 minut, następnie przesączono przez bibułę do kolbek miarowych i uzupełniono wodą do objętości 50 ml. Otrzymano klarowne roztwory, które oznaczono odpowiednio - Mś i Mw (p. Tabela 36), a następnie przechowywano w lodówce.

Tabela 36. Wyciągi metanolowe ze świeżych i z wysuszonych surowców roślinnych (p. pkt. 5.1.1.) oraz skróty użyte w pracy

Nazwa surowca	Wyciągi metanolowe z surowców	
	świeżych	wysuszonych
<i>Farfarae folium</i>	FMś	FMw
<i>Melissae herba</i>	MMś	MMw
<i>Avenae herba</i>	AMś	AMw
<i>Ginkgo bilobae folium</i>	GMś	GMw
<i>Hamamelidis cortex</i>	HMś	HMw

Objaśnienie : Mś - wyciąg metanolowy ze świeżego surowca
Mw - wyciąg metanolowy z wysuszonego surowca

5.1.2. Otrzymywanie wyciągów metanolowo - wodnych (MW)

Surowce świeże i wysuszone (p. pkt. 5.1.1.) wykorzystane do otrzymania wyciągów metanolowych (Mś i Mw) ekstrahowano jeszcze dwukrotnie 200 ml mieszaniną metanol - woda (1:1) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na łaźni ultradźwiękowej. Uzyskane odpowiednie wyciągi połączono i zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem w 60°C. Suche pozostałości po zagęszczeniu, rozpuszczano w wodzie na łaźni ultradźwiękowej w 60°C przez około 30 minut, następnie przesączono przez bibułę do kolbek miarowych o poj. 50 ml i uzupełniono mieszaniną metanol - woda (1:1). Otrzymano klarowne wyciągi, które oznaczono odpowiednio: metanolowo - wodne - MWś i MWw (p. Tabela 37), a następnie przechowywano w lodówce.

Tabela 37. Wyciągi metanolowo - wodne ze świeżych i z wysuszonych surowców roślinnych (p. pkt. 5.1.2.) oraz skróty użyte w pracy

Nazwa surowca	Wyciągi metanolowo-wodne z surowców	
	świeżych	wysuszonych
<i>Farfarae folium</i>	FMWś	FMWw
<i>Melissae herba</i>	MMWś	MMWw
<i>Avenae herba</i>	AMWś	AMWw
<i>Ginkgo bilobae folium</i>	GMWś	GMWw
<i>Hamamelidis cortex</i>	HMWś	HMWw

Objaśnienie: MWś - wyciąg metanolowo-wodny z surowca świeżego
MWw - wyciąg metanolowo-wodny z surowca wysuszonego

5.2. Oznaczenie straty masy po suszeniu

5.2.1. Aparatura

- wagosuszarka RADWAG WPE 30S

5.2.2. Wykonanie oznaczenia

Podczas oznaczenia straty masy po suszeniu określono masę próbki przed analizą oraz po jej zakończeniu. W tym celu odważono dokładnie około 1 g rozdrobnionego surowca roślinnego (świeżego i wysuszonego) i umieszczono równomierną warstwę na całej powierzchni szalki aluminiowej w komorze wagowej. Średni czas suszenia w temperaturze 105⁰C wynosił około 30 minut (do uzyskania stałej masy).

Uzyskane wyniki znajdują się w tabelach (Tabela 38-39, Rycina 48-49).

5.2.3. Straty masy po suszeniu

Stratę masy w badanych próbkach obliczono wg wzoru:

$$\frac{X_2}{X_1} \cdot 100 \% = A\%$$

$$100 \% - A \% = B \%$$

gdzie:

X₁ - masa próbki przed wysuszeniem [g]

X₂ - masa próbki po wysuszeniu [g]

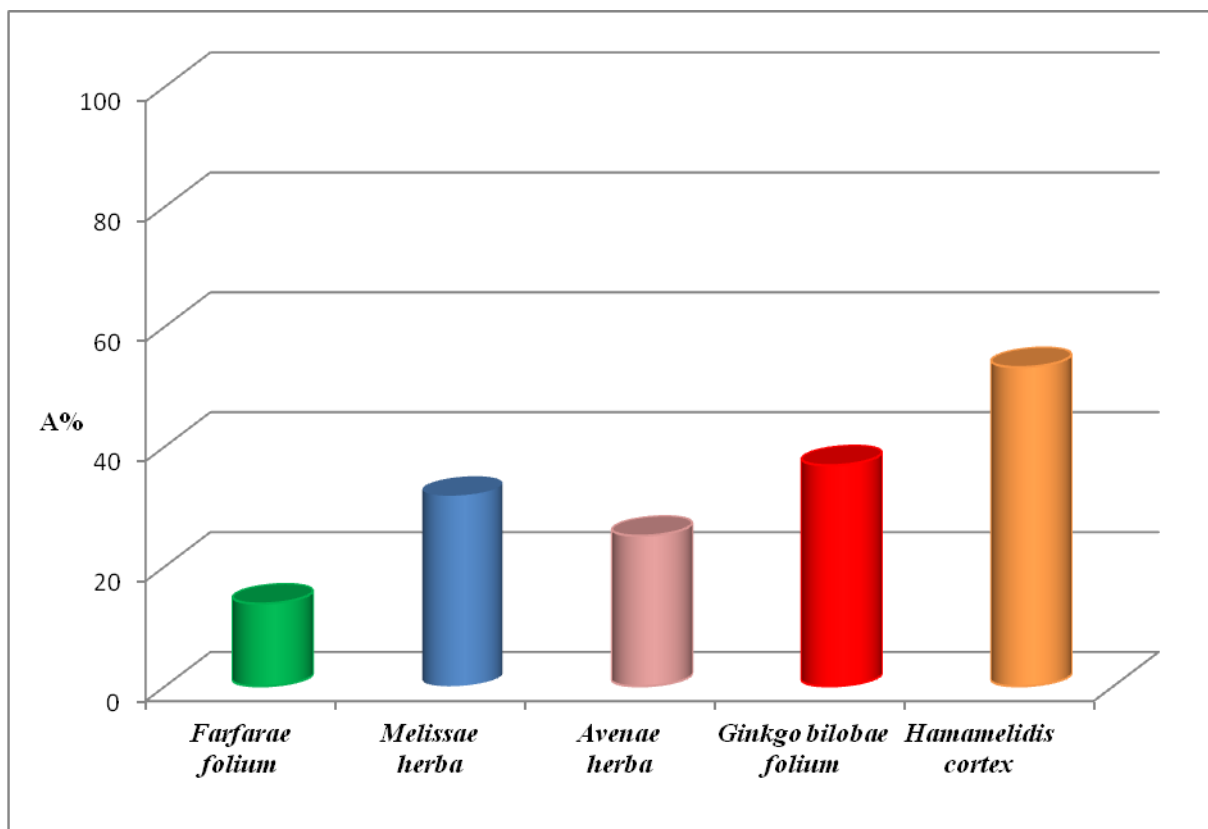
A% - zawartość suchej masy [%]

B% - strata masy po suszeniu [%]

Tabela 38. Oznaczenie straty masy po suszeniu w świeżych surowcach roślinnych

Surowce	X ₁ [g]	X ₂ [g]	A%	B%
<i>Farfarae folium</i>	0,972	0,134	13,79	86,21
<i>Melissae herba</i>	1,010	0,321	31,78	68,22
<i>Avenae herba</i>	0,980	0,246	25,10	74,90
<i>Ginkgo bilobae folium</i>	0,974	0,359	36,86	63,14
<i>Hamamelidis cortex</i>	0,977	0,520	53,22	46,78

Objaśnienie
X₁ - masa badanej próbki przed suszeniem
X₂ - masa próbki po wysuszeniu
A% - zawartość suchej masy[%]
B% - strata masy po suszeniu [%]

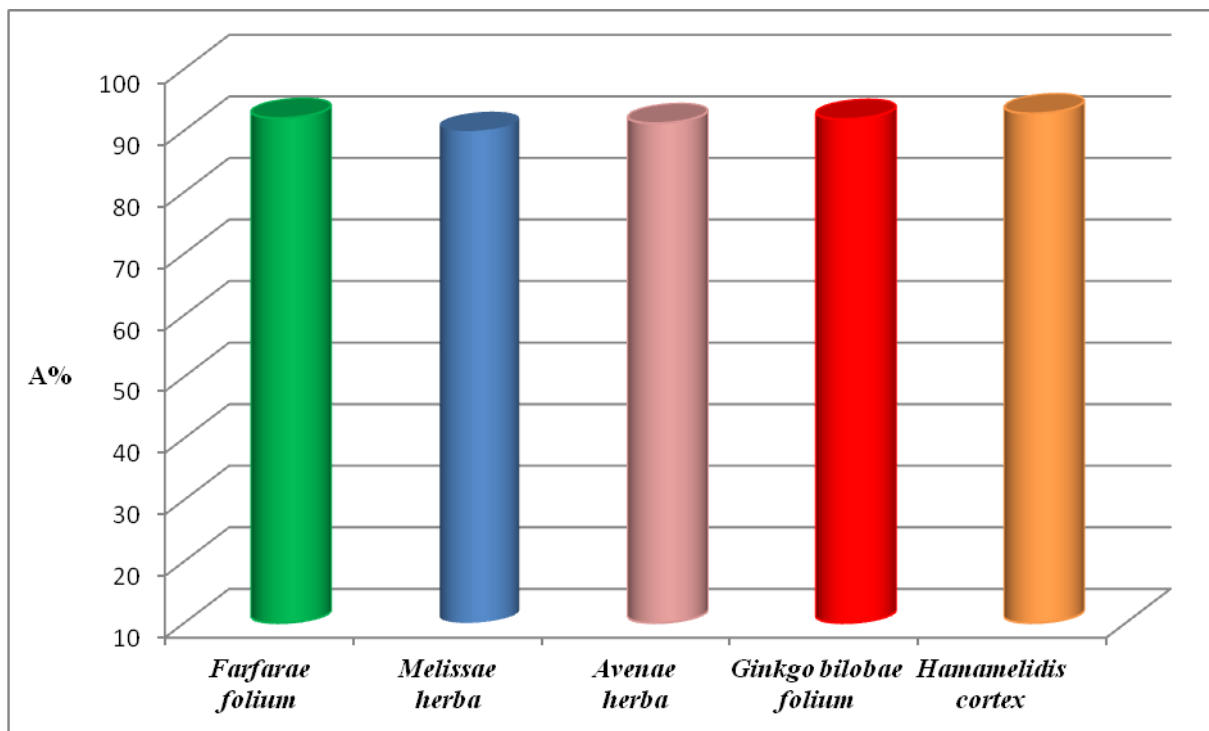


Rycina 48. Zawartość suchej masy w świeżych surowcach roślinnych [A%].

Tabela 39. Oznaczenie straty masy po suszeniu w wysuszonych surowcach roślinnych

Surowce	X ₁ [g]	X ₂ [g]	A%	B%
<i>Farfarae folium</i>	0,965	0,888	92,02	7,98
<i>Melissae herba</i>	0,961	0,864	89,91	10,09
<i>Avenae herba</i>	0,953	0,869	91,18	8,82
<i>Ginkgo bilobae folium</i>	0,957	0,879	91,85	8,15
<i>Hamamelidis cortex</i>	0,954	0,885	92,77	7,23

Objaśnienie
X₁ - masa badanej próbki przed suszeniem
X₂ - masa próbki po wysuszeniu
A% - zawartość suchej masy [%]
B% - strata masy po suszeniu [%]



Rycina 49. Zawartość suchej masy w wysuszonych surowcach roślinnych [A%].

5.3. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem Folin-Ciocalteu

5.3.1. Odczynniki i aparatura

p. pkt. 2.1.1.

5.3.2. Krzywa kalibracyjna dla roztworu kwasu chlorogenowego

p. pkt. 2.1.2.

5.3.3. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w badanych próbach

a) Przygotowanie prób do oznaczeń

Z wyciągów metanolowych Mś i Mw (p. Tabela 36) oraz metanolowo-wodnych MWś i MWw (p. Tabela 37) pobierano odpowiednie objętości roztworów i przenoszono do kolb miarowych o pojemności 25ml, a następnie uzupełniono wodą do kreski.

Otrzymano roztwory podstawowe odpowiednio:

- FMś/wP, MMś/wP, AMś/wP, GMś/wP, HMś/wP;
- FMWś/wP, MMWś/wP, AMWś/wP, GMWś/wP, HMWś/wP.

b) Wykonanie oznaczenia

Każdorazowo do 5 kolbek miarowych, pojemności 10 ml, owiniętych folią aluminiową (odczynnik Folin-Ciocalteu jest wrażliwy na światło) zawierających 4 ml wody dodano po 0,2 ml roztworu podstawowego np. FMŚP (p. pkt. 5.3.2.a) dodano 0,50 ml odczynnika FC (p. pkt. 5.3.1.). Dokładnie po 1 minucie dodano po 2,0 ml 20% roztworu węglanu sodu (p. pkt. 5.3.1.), zachowując odstęp czasowy 2 minuty między próbami. Następnie kolbki uzupełniono do kreski wodą i dokładnie wymieszano. Po upływie 30 minut od dodania roztworu węglanu sodu, mierzono absorbancję w zakresie długości fali $\lambda_{\max} = 720-765$ nm, wobec próby odniesienia, którą stanowiła mieszanina roztworu węglanu sodu, odczynnika FC w wyżej podanych ilościach, bez wyciągu, uzupełniona do kreski wodą w kolbce o pojemności 10 ml [Dóka i Bicanic 2002].

Na podstawie wykreślonego widma wybrano długość fali przy której próby badanych roztworów wykazywały maksimum absorpcji (Rycina 51-70). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach (Tabela 40-47, Rycina 50).

c) Obliczenie zawartości sumy polifenoli w badanych próbach

- Zawartość sumy polifenoli [%] w badanych próbach w przeliczeniu na surowiec obliczono wg wzoru:

$$C = \frac{A}{a \cdot x} \cdot z$$

gdzie:

C - zawartość sumy polifenoli w badanej próbce w przeliczeniu na surowiec [%]

A - absorbancja próbki badanego wyciągu M i MW (wartość średnia \bar{A})

a - współczynnik kierunkowy prostej $a = 0,0055$ w przeliczeniu na kwas chlorogenowy

x - zawartość wyciągu przeliczona na surowiec [mg] (Tabela 40-41)

z – współczynnik obliczeniowy 0,1 (100 %/1000)

- Obliczenia standardowe odchylenia pojedynczego wyniku (SD) i współczynnika zmienności (W_z)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

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

gdzie:

$n - 1$ - liczba stopnia swobody

\bar{x} - średnia z wyników pomiaru

x_i - pojedynczy wynik

Tabela 40. Zawartość surowca [mg] w objętości wyciągów Mś i MWś z uwzględnieniem straty masy po suszeniu (Tabela 38)

Wyciąg z surowca		Objętość wyciągu [ml]		Zawartość surowca w podanej objętości wyciągu [mg]		Roztwory podstawowe [25 ml]
		Mś	MWś	Mś	MWś	
<i>Farfarae folium</i>	F	1,0	8,0	0,6	5,3	FMś/MWśP
<i>Melissae herba</i>	M	1,0	2,0	1,6	3,1	MMś/MWśP
<i>Avenae herba</i>	A	4,0	30,0	4,9	36,1	AMś/MWśP
<i>Ginkgo bilobae folium</i>	G	1,0	2,0	1,8	3,6	GMś/MWśP
<i>Hamamelidis cortex</i>	H	0,5	3,0	1,3	7,7	HMś/MWśP

Tabela 41. Zawartość surowca [mg] w objętości wyciągów Mw i MWw z uwzględnieniem straty masy po suszeniu (Tabela 39)

Wyciąg z surowca		Objętość wyciągu [ml]		Zawartość surowca w wyciągu [mg]		Roztwory podstawowe [25 ml]
		Mw	MWw	Mw	MWw	
<i>Farfarae folium</i>	F	0,5	0,4	2,2	1,8	FMw/MWwP
<i>Melissae herba</i>	M	0,5	0,2	2,1	0,9	MMw/MWwP
<i>Avenae herba</i>	A	3,0	4,0	13,1	17,5	AMw/MWwP
<i>Ginkgo bilobae folium</i>	G	2,0	1,0	8,8	4,4	GMw/MWwP
<i>Hamamelidis cortex</i>	H	0,7	0,9	3,4	4,0	HMw/MWwP

Tabela 42. Absorbancja badanych wyciągów z surowców świeżych Mś i MWś

Wyciąg	Absorbancja				
	[A]				
	1	2	3	4	5
FMś	0,2286	0,2319	0,2374	0,2279	0,2373
FMWś	0,3422	0,3360	0,3348	0,3418	0,3267
MMś	0,8191	0,8236	0,8155	0,7961	0,8095
MMWś	0,6570	0,6788	0,6716	0,6742	0,6940
AMś	0,2009	0,1960	0,1985	0,1977	0,1867
AMWś	0,1914	0,1912	0,1916	0,1898	0,1938
GMś	0,2602	0,2652	0,2628	0,2628	0,2474
GMWś	0,2590	0,2474	0,2488	0,2514	0,2638
HMś	0,3092	0,3148	0,3341	0,3460	0,3364
HMWś	0,5630	0,5647	0,5652	0,5660	0,5603

Tabela 43. Absorbancja badanych wyciągów z surowców wysuszonych Mw i MWw

Wyciąg	Absorbancja				
	[A]				
	1	2	3	4	5
FMw	0,3389	0,3548	0,3449	0,3361	0,3327
FMWw	0,4253	0,4488	0,4345	0,4509	0,4485
MMw	0,2110	0,2183	0,2030	0,2107	0,2061
MMWw	0,5048	0,4928	0,4946	0,5037	0,4932
AMw	0,1849	0,1692	0,1828	0,1745	0,1950
AMWw	0,3696	0,3659	0,3673	0,3921	0,3922
GMw	0,6177	0,6301	0,6480	0,6494	0,6375
GMWw	0,6014	0,6087	0,6248	0,6123	0,6430
HMw	0,6179	0,6247	0,6261	0,6203	0,6180
HMWw	0,4534	0,4670	0,4608	0,4616	0,4621

Tabela 44. Oznaczenie zawartości polifenoli w wyciągach z surowców świeżych Mś i MWś i analiza statystyczna uzyskanych wyników

Wyciąg	Pobrana objętość wyciągu [ml]*	$\bar{\Sigma}$ polifenoli [%]	Analiza statystyczna				
			SD	W _z [%]	SD _{śr}	$\bar{\Sigma}$ polifenoli	
						± 2SD	± μ (dla α=0,05, f=4, t=2,776)
FMś	1,0	7,00	0,14	1,97	0,06	7,00 ± 0,28	7,00 ± 0,17
FMWś	8,0	1,15	0,02	1,88	0,01	1,15 ± 0,04	1,15 ± 0,03
MMś	1,0	9,18	0,12	1,31	0,05	9,18 ± 0,24	9,18 ± 0,15
MMWś	2,0	3,93	0,08	1,98	0,03	3,93 ± 0,16	3,93 ± 0,10
AMś	4,0	0,72	0,02	2,79	0,01	0,72 ± 0,04	0,72 ± 0,03
AMWś	30,0	0,10	0,00	0,75	0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
GMś	1,0	2,60	0,07	2,73	0,03	2,60 ± 0,14	2,60 ± 0,09
GMWś	2,0	1,27	0,04	2,77	0,02	1,27 ± 0,07	1,27 ± 0,04
HMś	0,5	4,55	0,21	4,72	0,10	4,55 ± 0,43	4,55 ± 0,27
HMWś	3,0	1,32	0,01	0,40	0,00	1,32 ± 0,01	1,32 ± 0,01

*do uzyskania roztworów podstawowych [25 ml]

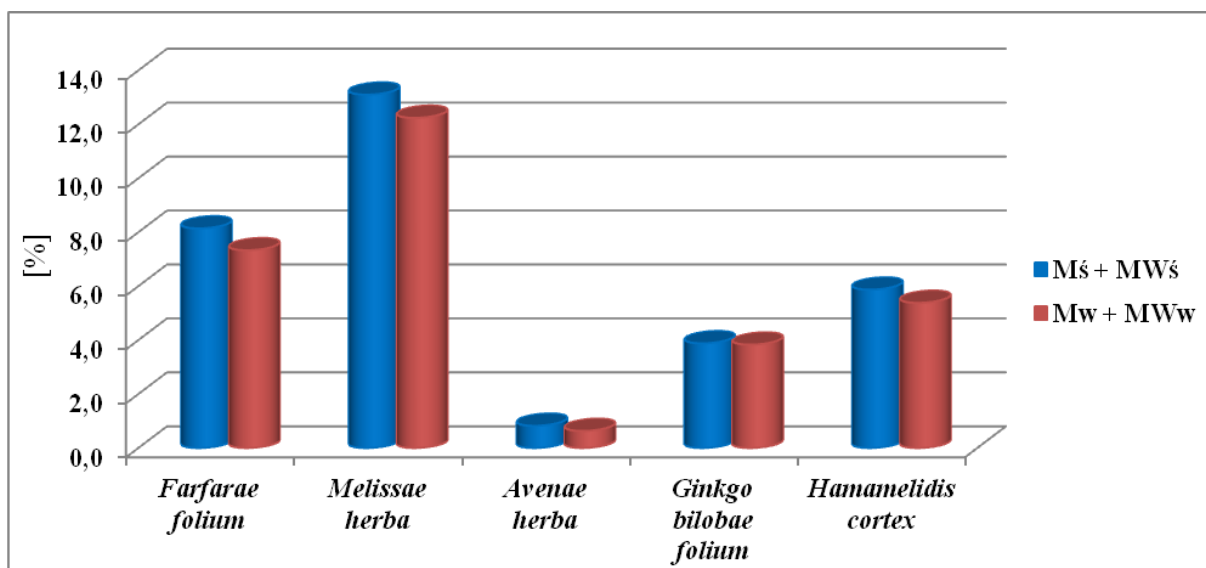
Tabela 45. Oznaczenie zawartości polifenoli w wyciągach z surowców wysuszonych Mw i MWw i analiza statystyczna uzyskanych wyników

Wyciąg	Pobrana objętość wyciągu [ml]*	$\bar{\Sigma}$ polifenoli [%]	Analiza statystyczna				
			SD	W _z [%]	SD _{śr}	$\bar{\Sigma}$ polifenoli	
						± 2SD	± μ (dla α=0,05, f=4, t=2,776)
FMw	0,5	2,80	0,07	2,54	0,03	2,80 ± 0,14	2,80 ± 0,09
FMWw	0,4	4,53	0,11	2,54	0,05	4,53 ± 0,23	4,53 ± 0,14
MMw	0,5	1,80	0,05	2,76	0,02	1,80 ± 0,10	1,80 ± 0,06
MMWw	0,2	10,45	0,12	1,19	0,06	10,45 ± 0,25	10,45 ± 0,15
AMw	3,0	0,25	0,01	5,49	0,01	0,25 ± 0,03	0,25 ± 0,02
AMWw	4,0	0,39	0,01	3,58	0,01	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,02
GMw	2,0	1,30	0,03	2,07	0,01	1,30 ± 0,05	1,30 ± 0,03
GMWw	1,0	2,53	0,07	2,64	0,03	2,53 ± 0,13	2,53 ± 0,08
HMw	0,7	3,30	0,02	0,61	0,01	3,30 ± 0,04	3,30 ± 0,03
HMWw	0,9	2,08	0,02	1,06	0,01	2,08 ± 0,04	2,08 ± 0,03

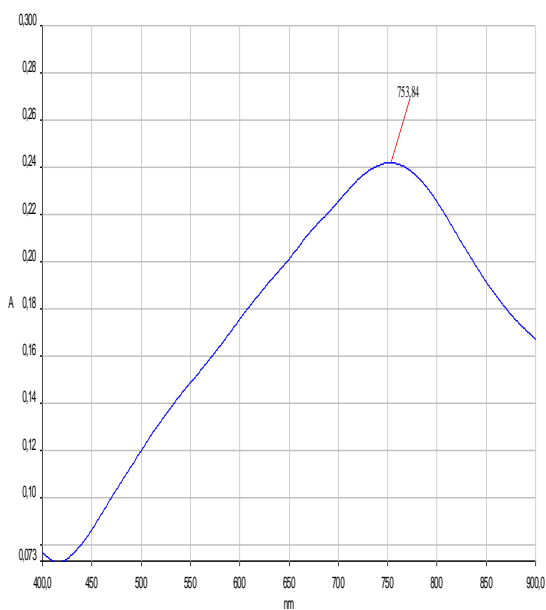
* do uzyskania roztworów podstawowych [25 ml]

Tabela 46. Zawartość sumy polifenoli w wyciągach metanolowych (Mś, Mw) i metanolowo-wodnych (MWś, MWw) otrzymanych ze świeżych (ś) i wysuszonych (w) surowców roślinnych w przeliczeniu na kwas chlorogenowy

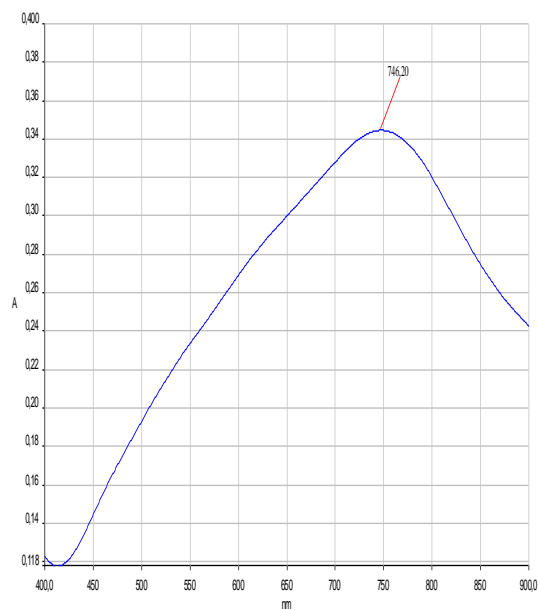
Surowce z których otrzymano wyciągi metanolowe Mś, Mw i metanolowo-wodne MWś, MWw		Σ polifenoli [%]	
		Mś + MWś	Mw + MWw
<i>Farfarae folium</i>	F	8,15	7,33
<i>Melissae herba</i>	M	13,11	12,25
<i>Avenae herba</i>	A	0,82	0,64
<i>Ginkgo bilobae folium</i>	G	3,87	3,83
<i>Hamamelidis cortex</i>	H	5,87	5,38



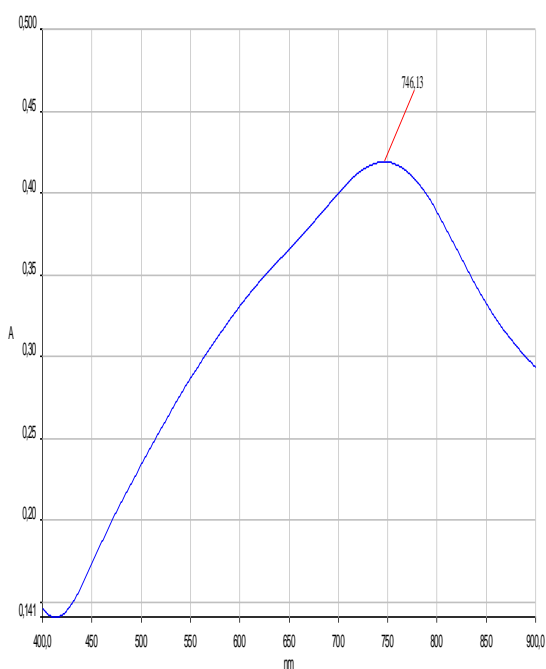
Rycina 50. Zawartość sumy polifenoli w przeliczeniu na kwas chlorogenowy w wyciągach metanolowych (Mś) i metanolowo-wodnych (MWś) ze świeżych surowców roślinnych oraz metanolowych (Mw) i metanolowo-wodnych (MWw) z wysuszonych surowców roślinnych



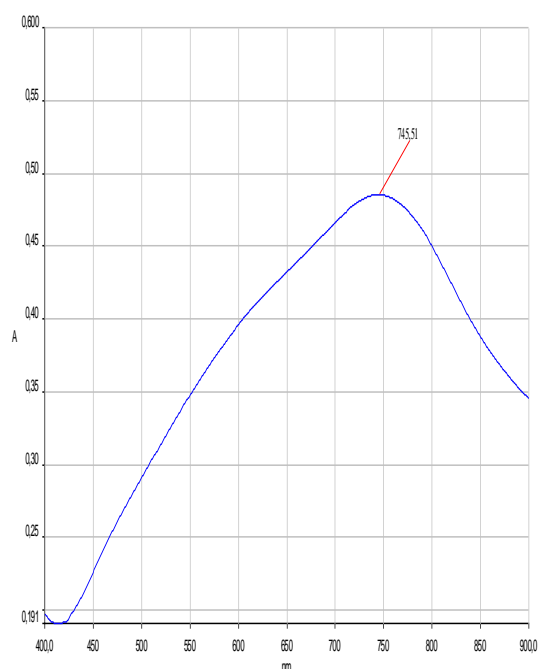
Rycina 51. Widmo wyciągu **FMś** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 753,84$).



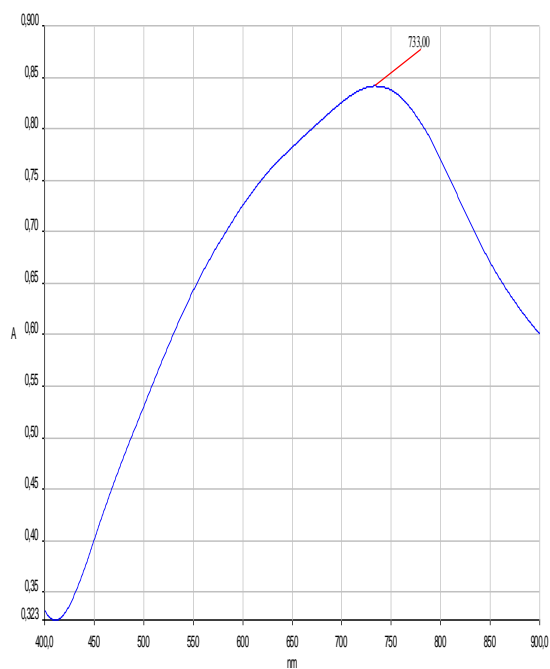
Rycina 53. Widmo wyciągu **FMWś** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 746,20$).



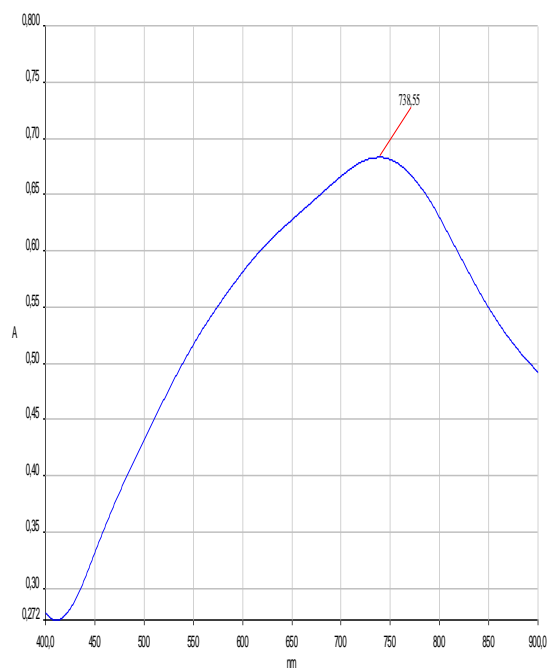
Rycina 52. Widmo wyciągu **FMw** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 746,13$).



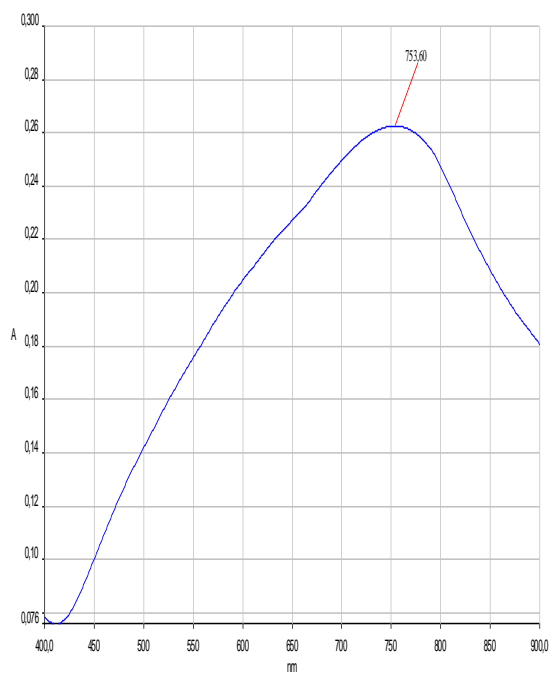
Rycina 54. Widmo wyciągu **FMWw** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 745,51$).



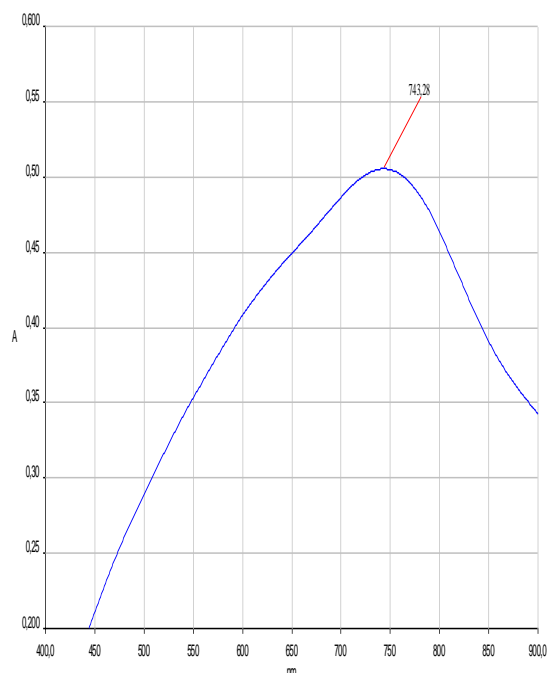
Rycina 55. Widmo wyciągu **MMŚ** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=733,00$).



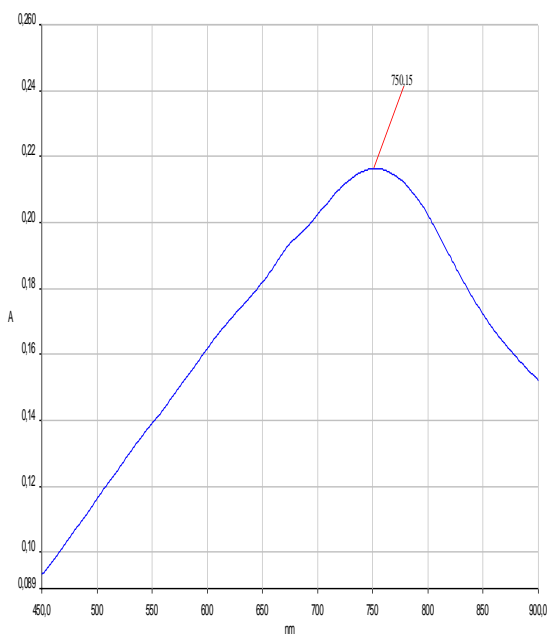
Rycina 57. Widmo wyciągu **MMWŚ** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=738,55$).



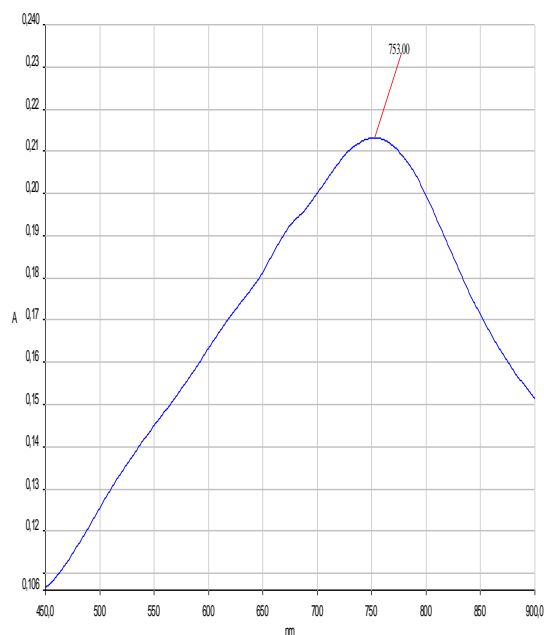
Rycina 56. Widmo wyciągu **MMw** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=753,60$).



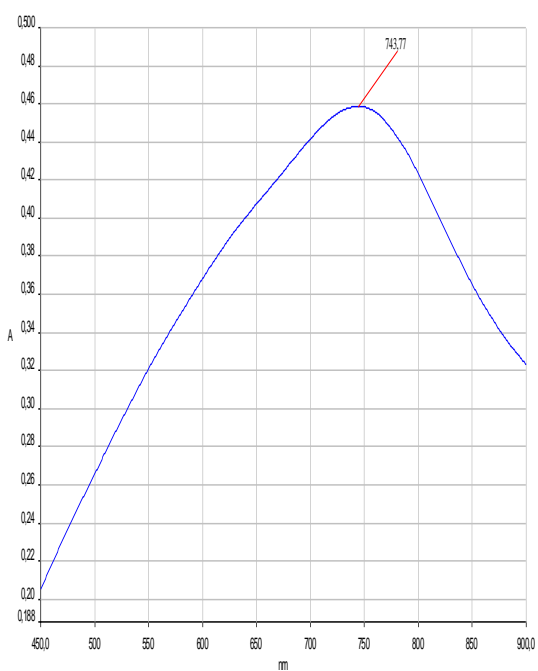
Rycina 58. Widmo wyciągu **MMWw** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=743,28$).



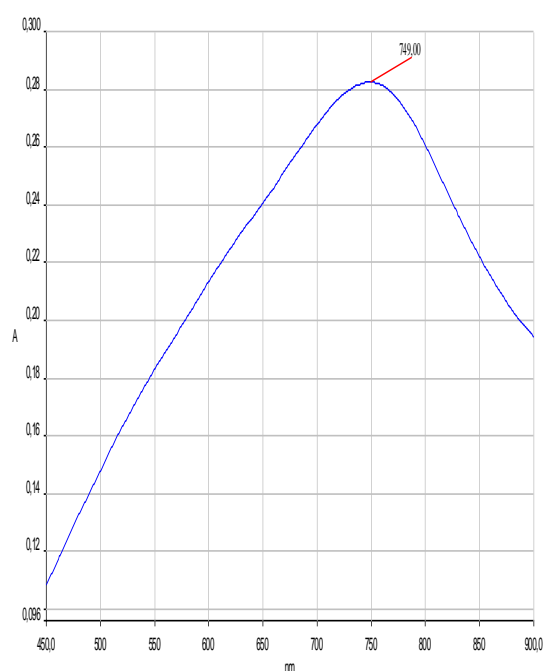
Rycina 59. Widmo wyciągu **AMWś** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=750,15$).



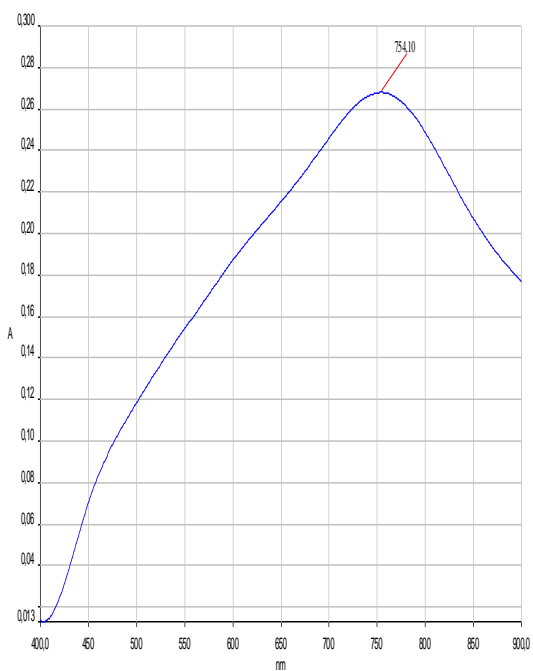
Rycina 61. Widmo wyciągu **AMś** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=753,00$).



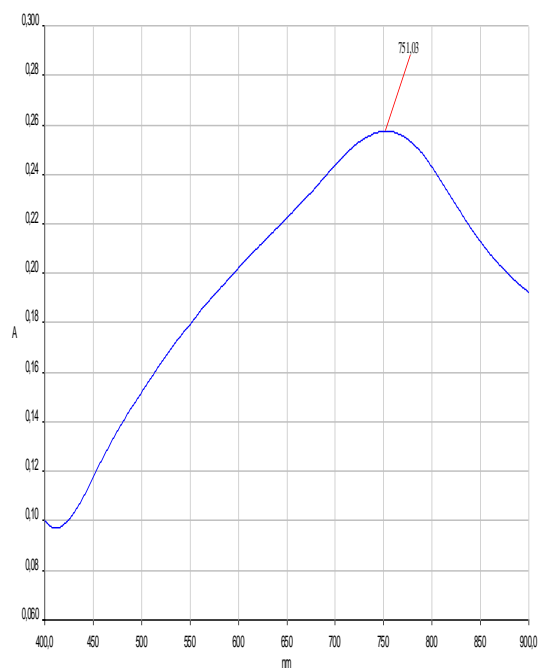
Rycina 60. Widmo wyciągu **AMWw** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=743,77$).



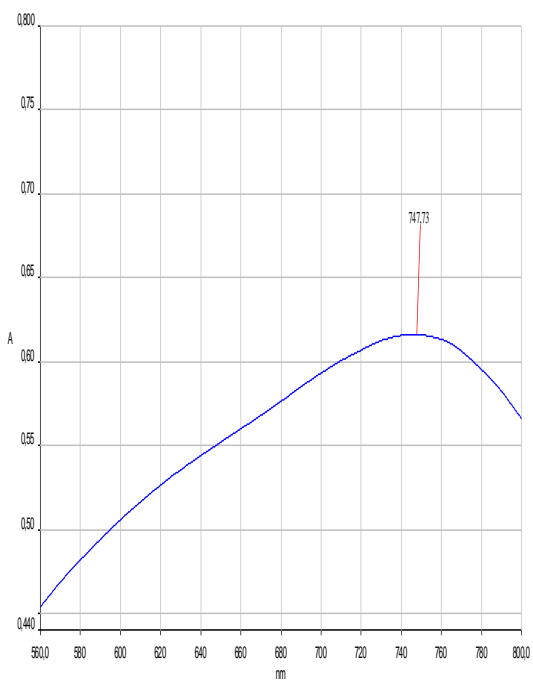
Rycina 62. Widmo wyciągu **AMw** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=749,00$).



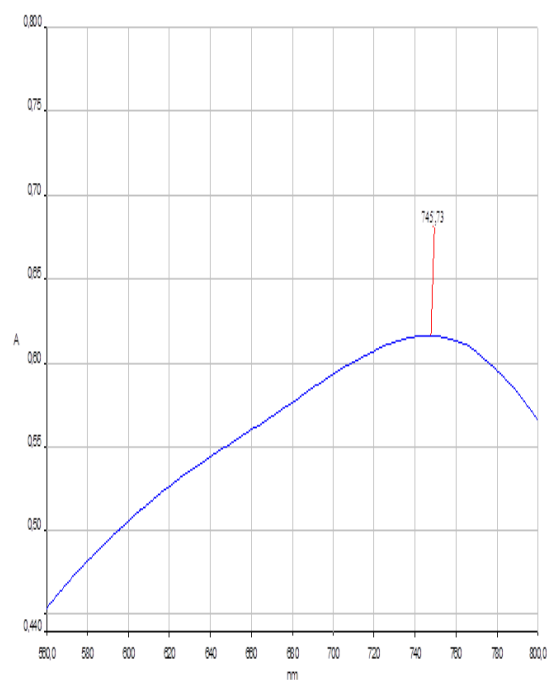
Rycina 63. Widmo wyciągu **GMs** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}= 754,10$).



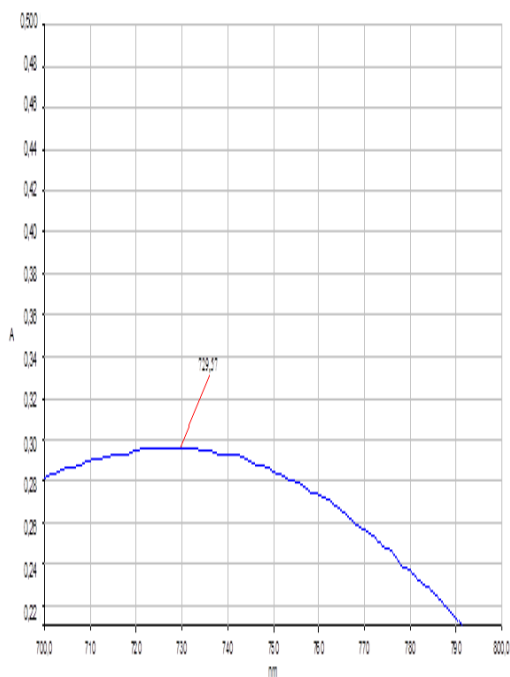
Rycina 65. Widmo wyciągu **GMW** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}= 751,03$).



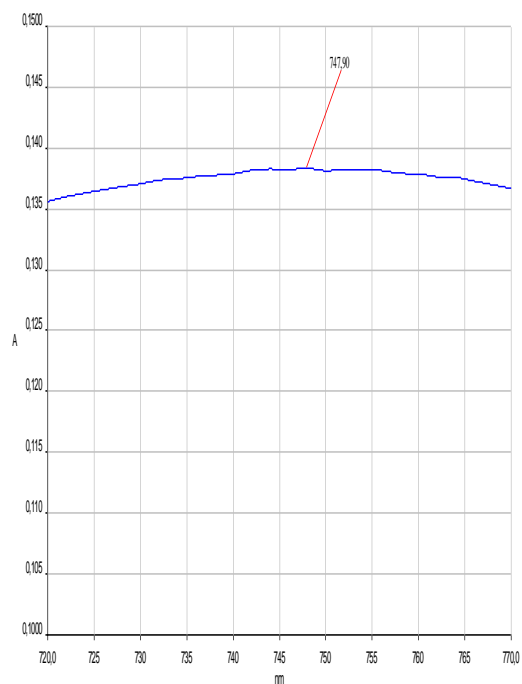
Rycina 64. Widmo wyciągu **GMw** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}= 747,73$).



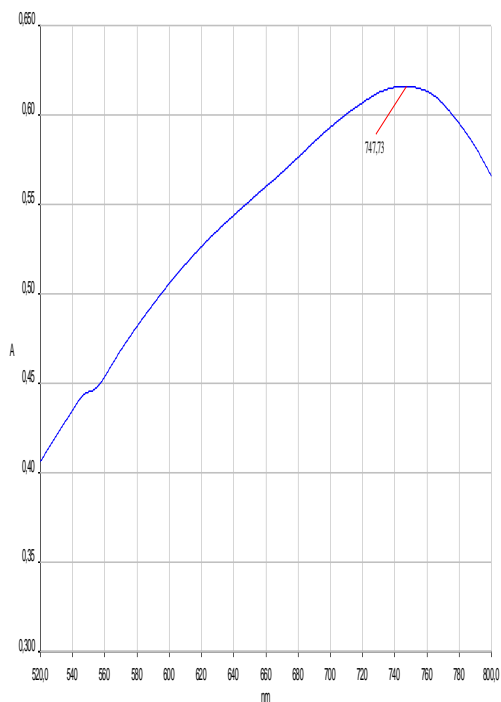
Rycina 66. Widmo wyciągu **GMWw** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}= 745,73$).



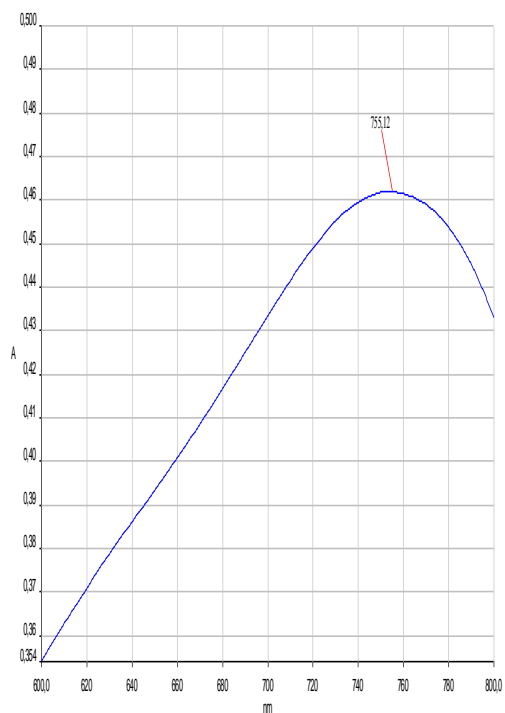
Rycina 67. Widmo wyciągu **HMś** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=729,57$).



Rycina 69. Widmo wyciągu **HMWś** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=747,90$).



Rycina 68. Widmo wyciągu **HMw** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=747,73$)



Rycina 70. Widmo wyciągu **HMWw** z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max}=755,12$)

5.4. Oznaczenie zawartości flawonoidów metodą wg Christa-Müllera

5.4.1. Odczynniki i aparatura

p. pkt. 2.2.1.

5.4.2. Oznaczenie zawartości flawonoidów

a) Materiał do badań

Wyciągi metanolowe i metanolowo - wodne ze świeżych i wysuszonych surowców roślinnych otrzymane w pkt. 5.1.1. i 5.1.2.

b) Przygotowanie roztworu podstawowego

Do kolb okrągłodennych pojemności 250 ml, odważono odpowiednie ilości rozdrobnionych świeżych i wysuszonych surowców i dodano po 20 ml acetonu, 2,0 ml kwasu solnego (281 g/l) oraz 1,0 ml roztworu wodnego metenaminy. Mieszaninę utrzymywano 30 minut we wrzeniu na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Otrzymany hydrolyzaty przesączono przez watę do kolb miarowych o pojemności 100 ml, po czym osad wraz z watą umieszczono w tej samej kolbie okrągłodennej, dodano 20 ml acetonu i ponownie utrzymywano 10 minut w temperaturze wrzenia. Otrzymany hydrolyzaty przesączono przez watę do tej samej kolby miarowej. Wytrawianie powtórzono jeszcze raz, a uzyskany zhydrolyzowany wyciąg przesączono również do tej samej kolby miarowej i uzupełniono acetonem do 100 ml.

Odmierzono 20,0 ml zhydrolyzowanego wyciągu do rozdzielacza, dodano 20 ml wody i wytrząsano octanem etylu, porcjami 1 raz po 15 ml i 3 razy po 10 ml. Połączone fazy organiczne przemyto 2 x 40 ml wody (warstwę wodną odrzucono), a następnie przesączono przez watę do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniono octanem etylu.

W ten sam sposób otrzymano roztwory podstawowe dla każdego z surowców świeżych i wysuszonych poddanych analizie. Z poszczególnych surowców przygotowano po trzy oddzielne wyciągi.

c) Przygotowanie roztworów do badań

Równolegle oznaczono po trzy próby z każdego roztworu podstawowego (p. pkt. 5.4.2.b). Do każdej z 3 kolb miarowych pojemności 25 ml, dodano po 10,0 ml roztworu podstawowego, 2,0 ml roztworu chlorku glinowego i uzupełniono mieszaniną (1:19) kwasu octowego z metanolem do 25,0 ml.

d) Przygotowanie roztworu porównawczego

Dla każdej próby badanej przygotowano odpowiedni roztwór porównawczy. Odmierzono 10,0 ml odpowiedniego roztworu podstawowego (p. pkt. 5.4.2.b) do kolbki miarowej pojemności 25 ml i uzupełniono mieszaniną (1:19) kwasu octowego z metanolem.

Po 45 minutach zmierzono absorbancję roztworów z chlorkiem glinu wobec odpowiedniej próby porównawczej w kuwetach szklanych 1 cm, przy długości fali $\lambda = 425$ nm. Uzyskane wyniki znajdują się w tabelach (Tabela 48-51, Rycina 71). Przedstawiona absorbancja (Tabela 48-49) jest średnią z dwóch pomiarów.

e) Obliczenie zawartości flawonoidów

Zawartość flawonoidów [%] w przeliczeniu na kwercetynę, obliczono w badanych próbach wg wzoru, uwzględniając absorbowalność kwercetyny $\alpha_{1cm}^{1\%} = 714$ [Farmakopea VI 2002].

$$X = \frac{A \cdot k}{m}$$

gdzie:

X - zawartość sumy flawonoidów w przeliczeniu na surowiec [%]

A - absorbancja roztworu badanego

m - odważka surowca świeżego/wysuszonego [g]

k - przelicznik dla kwercetyny, $k = 0,875$

Tabela 47. Absorbancja wyciągów ze **świeżych surowców** roślinnych

Surowiec świeży	Odważka surowca [g]	Strata masy po suszeniu [%]	Ilość surowca w przeliczeniu na suchą masę [g]	Absorbancja [Å]		
				\bar{A}_1	\bar{A}_2	\bar{A}_3
<i>Farfarae folium</i>	1,0008	86,21	0,1380	0,180	0,175	0,176
<i>Melissae herba</i>	2,0001	68,22	0,6356	0,384	0,380	0,387
<i>Avenae herba</i>	4,0074	74,90	1,0058	0,554	0,550	0,554
<i>Ginkgo bilobae folium</i>	1,0801	63,14	0,3981	0,260	0,258	0,261
<i>Hamamelidis cortex</i>	6,0014	46,78	3,1939	0,202	0,199	0,199

$\bar{A}_1, \bar{A}_2, \bar{A}_3$ – absorbancje średnie z dwóch pomiarów dla poszczególnych soków/nalewek

Tabela 48. Absorbancja wyciągów z **wysuszonych surowców** roślinnych

Surowiec wysuszony	Odważka surowca [g]	Strata masy po suszeniu [%]	Ilość surowca w przeliczeniu na suchą masę [g]	Absorbancja [Å]		
				\bar{A}_1	\bar{A}_2	\bar{A}_3
<i>Farfarae folium</i>	0,3048	7,98	0,2805	0,272	0,273	0,274
<i>Melissae herba</i>	1,0054	10,09	0,9040	0,314	0,314	0,313
<i>Avenae herba</i>	5,0016	8,82	4,5608	0,635	0,628	0,623
<i>Ginkgo bilobae folium</i>	0,4008	8,15	0,3682	0,248	0,251	0,246
<i>Hamamelidis cortex</i>	4,0077	7,23	5,2949	0,311	0,313	0,312

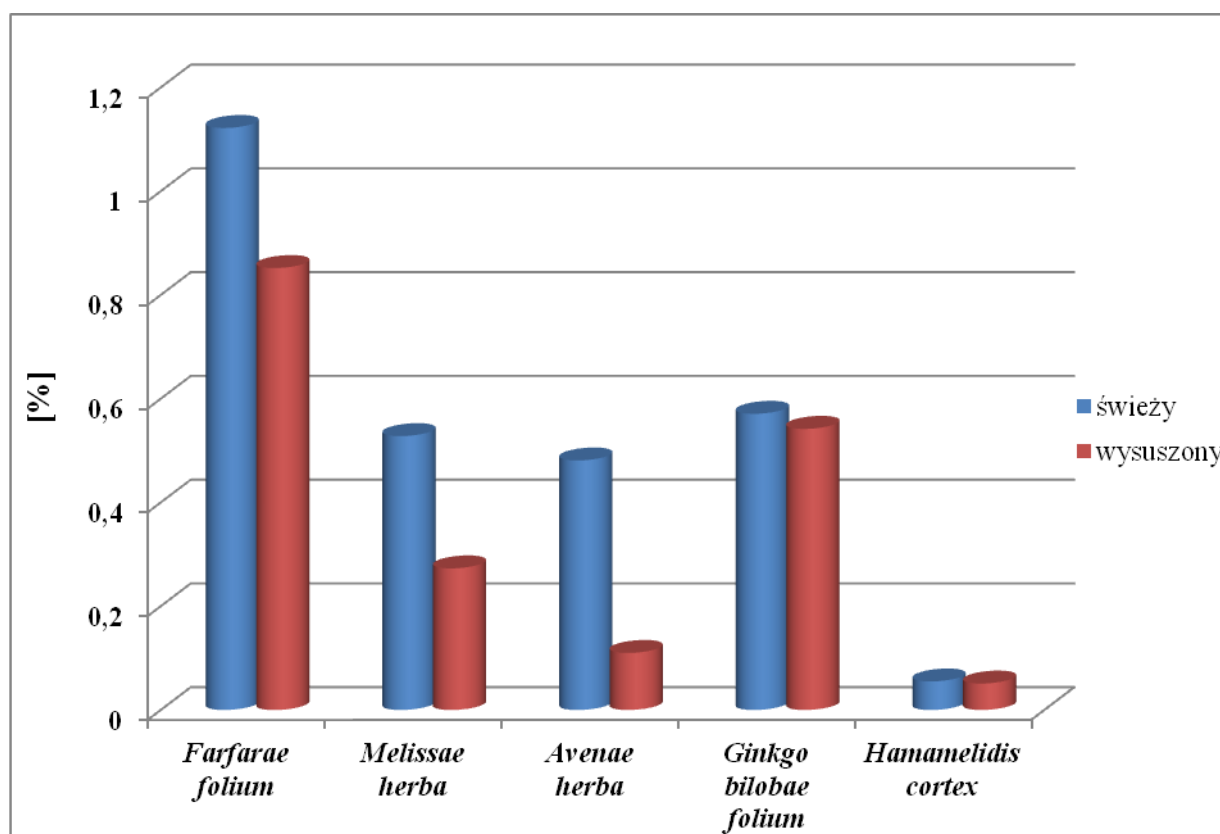
$\bar{A}_1, \bar{A}_2, \bar{A}_3$ – absorbancje średnie z dwóch pomiarów dla poszczególnych soków/nalewek

Tabela 49. Oznaczenie zawartości flawonoidów w **świeżych surowcach** w przeliczeniu na kwercetynę i analiza statystyczna uzyskanych wyników

Surowiec świeży	$\bar{\Sigma}$ flawonoidów [%]	Analiza statystyczna				
		SD	W_z [%]	SD _{sr}	Σ flawonoidów	
					$\pm 2SD$	$\pm \mu$ (dla $\alpha=0,05, f=5, t=2,571$)
<i>Farfarae folium</i>	1,12	0,02	1,49	0,01	1,12 \pm 0,03	1,12 \pm 0,02
<i>Melissae herba</i>	0,53	0,00	0,92	0,00	0,53 \pm 0,01	0,53 \pm 0,01
<i>Avenae herba</i>	0,48	0,00	0,42	0,00	0,48 \pm 0,00	0,48 \pm 0,00
<i>Ginkgo bilobae folium</i>	0,57	0,00	0,59	0,00	0,57 \pm 0,01	0,57 \pm 0,00
<i>Hamamelidis cortex</i>	0,05	0,00	0,87	0,00	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00

Tabela 50. Oznaczenie zawartości flawonoidów w wysuszonych surowcach w przeliczeniu na kwercetynę i analiza statystyczna uzyskanych wyników

Surowiec wysuszony	$\bar{\Sigma}$ flawonoidów [%]	Analiza statystyczna				
		SD	W_z [%]	SD_{sr}	Σ flawonoidów	
					$\pm 2SD$	$\pm \mu$ (dla $\alpha=0,05, f=5, t=2,571$)
<i>Farfarae folium</i>	0,85	0,00	0,37	0,00	$0,85 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,00$
<i>Melissae herba</i>	0,27	0,00	0,18	0,00	$0,27 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,00$
<i>Avenae herba</i>	0,11	0,00	0,96	0,00	$0,11 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$
<i>Ginkgo bilobae folium</i>	0,54	0,01	1,01	0,00	$0,54 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,01$
<i>Hamamelidis cortex</i>	0,05	0,00	0,32	0,00	$0,05 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$



Rycina 71. Zawartość flawonoidów w surowcach **świeżych i wysuszonych** w przeliczeniu na kwercetynę (w %).

IV. DYSKUSJA

Dane epidemiologiczne wskazują, iż 60% ludności na całym świecie stosuje leki i preparaty roślinne, w krajach rozwijających się nawet 80% i więcej, ich zaletą jest to, że są one tanie oraz dobrze tolerowane przez pacjentów, mogą być stosowane przez dłuższy czas ze względu na brak, przy stosowaniu w zalecanych dawkach, działań niepożądanych [Babusevram i inni 2012].

Oprócz preparatów zawierających tkanki roślinne wykorzystywane są też przetwory, będące najczęściej wyciągami ze świeżych, bądź wysuszonych surowców roślinnych.

Wyciągi ze świeżych surowców roślinnych były przygotowywane od najdawniejszych czasów, w starożytności stosowali je Hipokrates oraz Galen; twórca homeopatii, Samuel Hahnemann, określał wyciągi ze świeżych ziół jako esencje; wykorzystują je również fitoterapeuci w różnych krajach całego świata.

Wyciągi ze świeżych surowców roślinnych stają się w ostatnich latach przedmiotem szczególnego zainteresowania rynku farmaceutycznego. Przygotowuje się je z surowców, stabilizowanych parami etanolu w celu unieczynnienia enzymów, mogących spowodować rozkład związków, obecnych w roślinie, stąd skład takich wyciągów jest najbardziej zbliżony do składu świeżej rośliny.

Skład nalewek i wyciągów płynnych, wytwarzanych z roślin wysuszonych, często odbiega od składu żywej rośliny. Podczas suszenia i przechowywania, związki obecne w surowcu roślinnym w tym związki czynne, odpowiedzialne za aktywność biologiczną, ulegają jakościowym i ilościowym przemianom chemicznym, głównie wskutek działania enzymów.

Wprawdzie suszenie świeżych surowców roślinnych jest również formą stabilizacji, lecz nie chroni w pełni pierwotnego składu związków czynnych, gdyż całkowite unieczynnienie enzymów, następuje dopiero, gdy zawartość wody w surowcu jest niższa niż 5%.

Na rynku w Polsce dostępne są nalewki proste z kwiatów arniki, nagietka, liści szalwii, miłorzębu, korzeni pięciornika i kozłka.

Trwałość wyciągów ze świeżych stabilizowanych surowców roślinnych poprzez działanie najczęściej na świeży surowiec, przegrzany parami etanolu, jest też większa niż odpowiednich nalewek lub płynnych wyciągów, otrzymywanych z wysuszonych surowców, gdyż nie zachodzą w nich już żadne zmiany, spowodowane działaniem enzymów z wyjątkiem wytrącania się wielocząstkowych substancji balastowych, podczas dłuższego przechowywania w niestałych warunkach. W Polsce na rynku etanolowo-wodne wyciągi ze świeżych surowców są w postaci soków i inkraktów (stabilizowana alkoholatura) [Jambor i Czosnowska 2002].

Intrakty otrzymywane są metodą opracowaną we Francji przez Perota i Gorisa w pierwszej połowie XX wieku, a nazwa pochodzi od łacińskiego czasownika *intraho*, co w języku polskim oznacza wyciągać i została zaproponowana przez Boulanger - Daussego. Soki są w zasadzie wyciągami ze świeżych roślin, które utrwalone zostały etanolem.

Na rynku polskim wykorzystuje się w leczeniu kilka intraktów: intrakt z kwiatostanu głogu, z ziela jemioly, z nasion kasztanowca, z korzeni kozłka i liści melisy, z ziela dziurawca i z ziela przymiotna kanadyjskiego.

W grupie stabilizowanych soków największe znaczenie w nowoczesnej fitoterapii mają: sok z jeżówki purpurowej, z babki lancetowatej, z liści podbiału, z ziela krwawnika, z korzeni mniszka, z korzeni łopianu, z ziela dziurawca, z liści brzozy, z ziela pokrzywy, ze złocienia maruny. Przetwory ze świeżych roślin mogą być wykorzystywane jako substancje aktywne leków złożonych: np. Bioaron C, zawiera jako substancje aktywne wyciąg ze świeżych liści aloesu oraz sok ze świeżych owoców aronii czarnoowocowej [Jambor i Czosnowska 2002].

Biorąc pod uwagę fakt, że wyciągi ze stabilizowanych, świeżych roślin zawierają składniki chemiczne podobne do występujących w żywej roślinie, można uznać je za potencjalnie pierwszoplanową grupę wyciągów farmaceutycznych i kosmetycznych. Brak jednak wszechstronnych badań fitochemicznych, farmakologicznych i klinicznych, dla jednoznacznego określenia metod standaryzacji oraz zakresu i sposobu ich stosowania.

Prace porównujące nie tylko skład świeżych i wysuszonych surowców, ale też wpływ na organizm, który czasem może być zróżnicowany w zależności od surowca użytego do ekstrakcji, jak też rozpuszczalnika, są nieliczne i pojawiają się dopiero od niedawna w piśmiennictwie, najczęściej dotyczą one roślin egzotycznych, stosowanych w medycynie ludowej różnych krajów.

Przeprowadzono badanie porównujące skład, wpływ na parametry krwi i osocza, a także bezpieczeństwo stosowania ekstraktu ze świeżych i suszonych liści *Rhizophora mucronata*, wykorzystywanych w medycynie ludowej na południowym wybrzeżu Indii w leczeniu dusznicy bolesnej, cukrzycy, biegunek, krwimoczu i w krwotokach. Stwierdzono w wyciągach ze świeżych liści, wyższą niż w wyciągach z suszonych liści, zawartość kwasów organicznych, flawonoidów, garbników, steroidów, białek i aminokwasów. W eksperymentach przeprowadzonych na szczurach, którym podawano przez 1 tydzień wyciągi w dawce 500 mg/kg⁻¹ stwierdzono, że wyciąg ze świeżych liści nie zmieniał w znaczący sposób badanych parametrów we krwi i w osoczu, podczas, gdy podawanie wyciągów z suszonych liści zwiększało poziom glukozy (trzykrotnie), cholesterolu, aminotransferazy alaninowej, bilirubiny, natomiast obniżało poziom hemoglobiny, czerwonych i białych

krwinek oraz liczby płytek krwi. Autorzy artykułu podkreślają, że długotrwałe stosowanie wyciągów ze świeżych liści jest bezpieczne w odróżnieniu od wyciągów z wysuszonych liści [Babusevnam i inni 2012].

W medycynie ludowej w leczeniu cukrzycy stosuje się wodno-alkoholowe ekstrakty roślinne, między innymi w Indiach wykorzystuje się w tym celu liście guajawy (*Psidium guajawa*). Wyciągi wodno - alkoholowe uzyskane ze świeżych i suszonych liści, w dawce 500 mg/kg, podawano przez 30 dni szczurom, u których cukrzycę wywołało alloxanem i w obydwu przypadkach obserwowano znaczące obniżenie poziomu glukozy. Wyciąg ze świeżych liści obniżał poziom glukozy w stopniu porównywalnym z wynikami grupy szczurów, którym podawano lek przeciwcukrzycowy - glibenklamid (10 mg/kg) [Rapaka i Vannam 2012].

Badano wpływ różnych warunków suszenia na zawartość całkowitą fenoli (z odczynnikiem Folin - Ciocalteu) i aktywność antyoksydacyjną (z DPPH, metoda FRAP) w porównaniu z wyciągiem uzyskanym ze świeżej rośliny *Cardiospermum halicacabum*, wykorzystywanej w ludowej medycynie Indii w reumatyzmie, lumbago i w gorączce. Badania farmakologiczne potwierdziły przeciwzapalną aktywność wyciągów. Wyciągi ze świeżego surowca wykazywały wyższą aktywność antyoksydacyjną niż wyciągi z surowca poddanego procesowi suszenia. Najwięcej związków fenolowych oznaczono w wyciągu ze świeżego surowca, ekstrahowanego wrzącą wodą, nieco mniej związków fenolowych było w wyciągu alkoholowym, największe straty związków fenolowych powodowało suszenie w mikrofalówce, co pociągało za sobą spadek aktywności antyoksydacyjnej. Dane literaturowe wskazują, że proces suszenia w różnym stopniu może wpływać na zawartość związków fenolowych, w ziele lebidki i liściach mięty, suszonych na słońcu, zwiększała się zawartość fenoli, podczas, gdy w liściach melisy nie obserwowano różnic pomiędzy suszeniem na słońcu i w cieniu. Kolejnym elementem wpływającym na ilość związków fenolowych w wyciągu jest rodzaj rozpuszczalnika [Annamalai i inni 2011].

Wyniki uzyskane przez badaczy dziewięciu gatunków tajskich roślin z których przygotowano ekstrakty przy użyciu czterech różnych rozpuszczalników: woda, 80% etanol, octan etylu i heksan, potwierdziły również niższą zawartość fenoli i słabsze działanie antyoksydacyjne wyciągów z wysuszonych surowców w porównaniu do wyciągów przygotowanych ze świeżych roślin. Wśród badanych ekstraktów najwyższą zawartość polifenoli i najsilniejsze działanie antyoksydacyjne, posiadały wyciągi alkoholowe ze świeżych roślin. 80% etanol był najskuteczniejszym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji związków polifenolowych i przeciwutleniających, następnym rozpuszczalnikiem była woda, potem octan etylu i heksan.

Zawartość polifenoli w wyciągach ze świeżych i wysuszonych roślin była skorelowana z aktywnością przeciwutleniającą [Areekul i Phomkaivon 2011].

Niekiedy suszenie wpływa na wyższą zawartość związków czynnych, przykładem może być ziele melisy. Badanie wykazało, iż w przemysłowo otrzymanych nalewkach z wysuszonego ziela znajduje się wyższa zawartość kwasu rozmarynowego (2,96 - 22,18 mg/ml) niż w wyciągach ze świeżego surowca (około 0,92mg/ml). Nalewki i alkoholowo-wodne wyciągi z ziela melisy są stosowane miejscowo (1% nalewki w kremie) w infekcjach wirusem opryszczki, a także doustnie jako środek wiatropędny i uspokajający. Ponieważ za aktywność przeciwwirusową odpowiada kwas rozmarynowy, stąd nalewki z wysuszonego ziela melisy będą skuteczniejsze jako środek antywirusowy [Sanchez - Medina i inni 2007]. Monografia ziela melisy [Farmakopea IX 2011] dotyczy wysuszonego surowca, w którym powinno być nie mniej niż 1% kwasu rozmarynowego, podczas, gdy w ekstrakcie z powyższego surowca (przy pomocy wodno-alkoholowego rozpuszczalnika, zawierającego nie mniej niż 70% etanolu) nie mniej niż 2% kwasu rozmarynowego. Innym przykładem iż w wysuszonym surowcu jest więcej związków czynnych jest ziele glistnika, pomimo tego wyciągi przygotowuje się ze świeżego ziela o niższej zawartości alkaloidów, nie biorąc pod uwagę danych naukowych [Kopytko i inni 2005].

Wyciągi z surowców roślinnych są popularną formą wykorzystywaną jako składniki preparatów, łatwych do przechowywania i dozowania. Istnieje jednak potrzeba podjęcia szerokich badań fitochemicznych i farmakologicznych dla jednoznacznego określenia i porównania różnic w składzie wybranych związków czynnych, pomiędzy wyciągami z surowców świeżych i wysuszonych, a także różnic w ich aktywności.

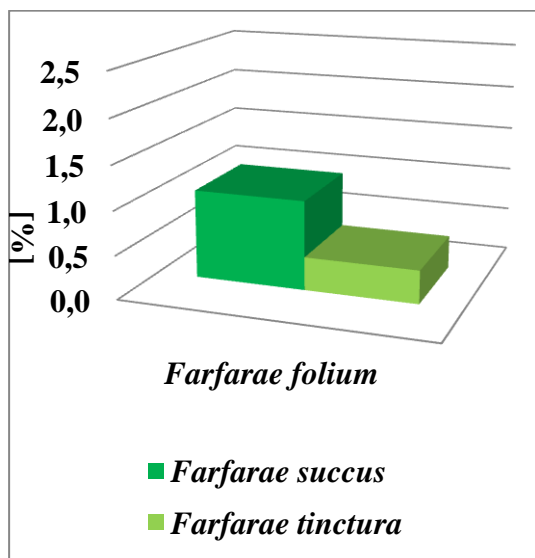
Celem niniejszej pracy było porównanie zawartości wybranych grup związków i aktywności, przemysłowo otrzymanych wyciągów z wysuszonych surowców w formie nalewek (*tinctura*) i świeżych surowców w formie soków (*succus*). Badania porównawcze nalewek i soków obejmowały: oznaczenie zawartości sumy polifenoli i flawonoidów, a także aktywności biologicznej: antyoksydacyjnej i przeciwdrobnoustrojowej. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli i flawonoidów przeprowadzono też bezpośrednio w surowcach świeżych i wysuszonych z których przygotowano odpowiednie wyciągi.

Zawartość sumy polifenoli w sokach (ze świeżego) i nalewkach (z wysuszonego surowca) oznaczono metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem odczynnika Folin-Ciocalteu, a sumę polifenoli przeliczano na kwas chlorogenowy.

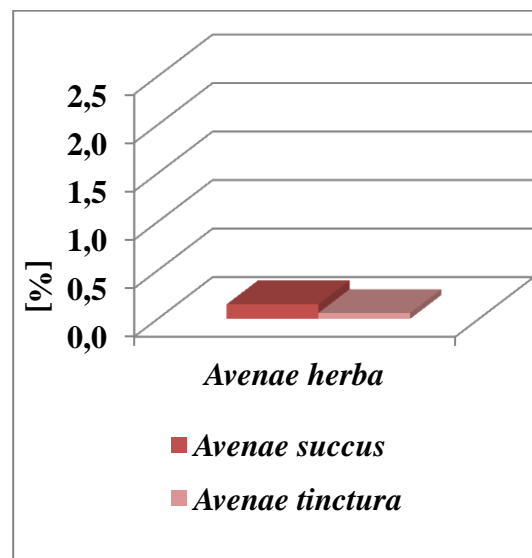
Najbogatsze w związki polifenolowe okazały się soki (Rycina 72 - 76), charakteryzujące się różną zawartością, mieszczącą się w zakresie od 0,15% do 2,10%. Najwyższą zawartość

sumy polifenoli spośród badanych wyciągów stwierdzono w soku z ziela melisy 2,10 % (Rycina 73), natomiast najniższą zawartość polifenoli oznaczono w soku z ziela owsa 0,15% (Rycina 74).

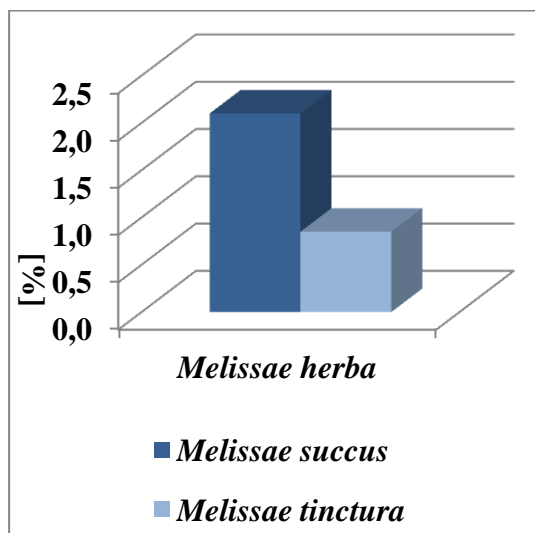
Niższą około dwukrotnie w stosunku do zawartości w sokach, zawartość związków polifenolowych obserwowano w nalewkach, przy czym najwyższą oznaczono w nalewce z ziela melisy 0,85% (Rycina 73), a najniższą w nalewce z ziela owsa 0,06 % (Rycina 74).



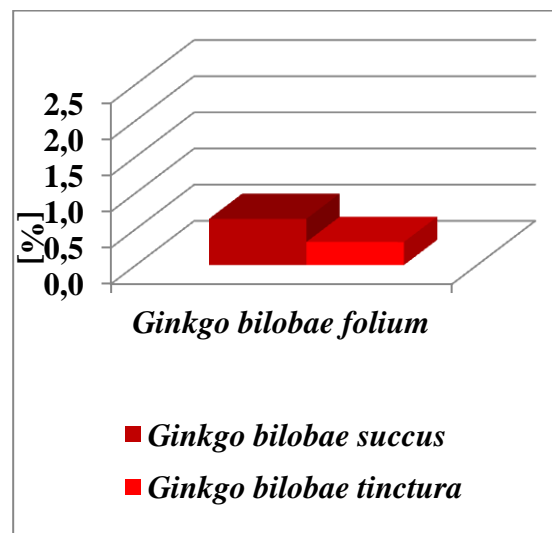
Rycina 72. Zawartość sumy polifenoli w soku i nalewce z *Farfarae folium*.



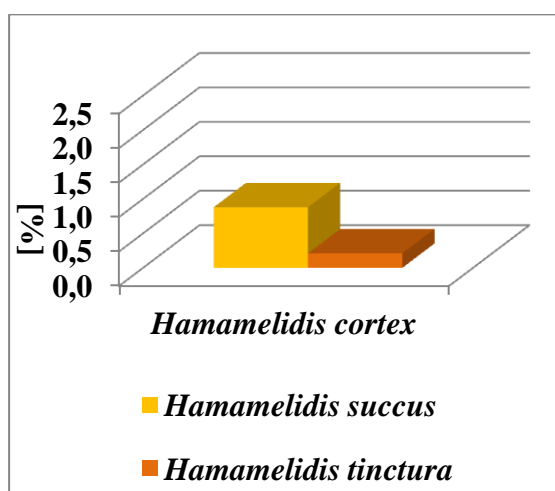
Rycina 74. Zawartość sumy polifenoli w soku i nalewce z *Avenae herba*.



Rycina 73. Zawartość sumy polifenoli w soku i nalewce z *Melissae herba*.



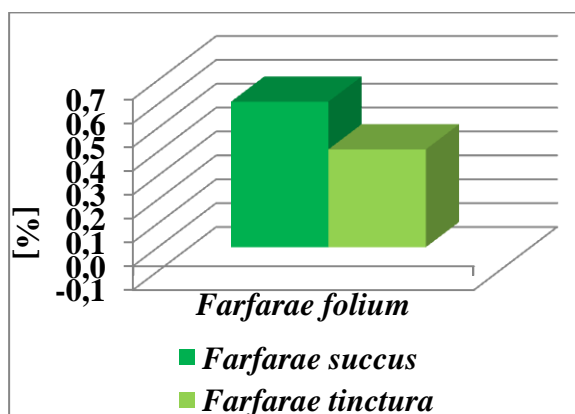
Rycina 75. Zawartość sumy polifenoli w soku i nalewce z *Ginkgo bilobae folium*.



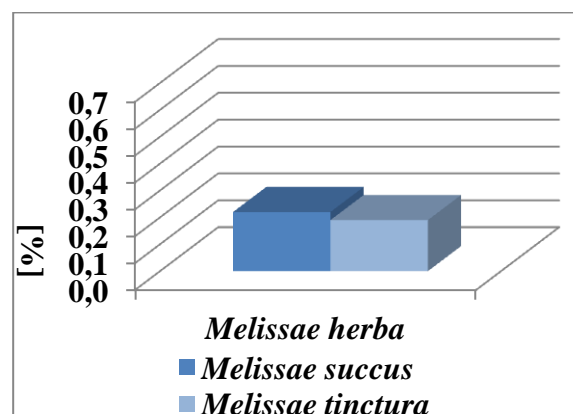
Rycina 76. Zawartość sumy polifenoli w soku i nalewce z *Hamamelidis cortex*.

W analizowanych wyciągach: sokach i nalewkach, oznaczono zawartość flawonoidów metodą kolorymetryczną wg Christa-Müllera, a sumę flawonoidów przeliczono na kwercetynę. W badaniu tym wykazano również wyższą zawartość flawonoidów w sokach, otrzymywanych ze świeżych surowców roślinnych, mieszczącą się w zakresie od 0,01 do 0,61% (Rycina 77-81), natomiast wyciągi w formie nalewek, zawierały od 0,01 do 0,41% flawonoidów (Rycina 77-81).

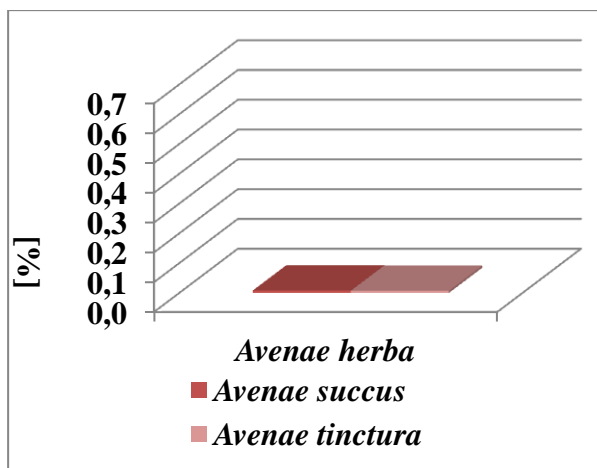
Najwyższą zawartość flawonoidów spośród soków i nalewek oznaczono w wyciągach z liści podbiału: 0,61% w soku i 0,41% w nalewce (Rycina 77). Bogatym w związki flawonoidowe okazał się również sok z liści miłorzębu japońskiego (0,49%) (Rycina 80), ziela melisy (0,22%) (Rycina 78), a także nalewka z liścia miłorzębu japońskiego (0,38%) (Rycina 80) i z ziela melisy (0,19%) (Rycina 78).



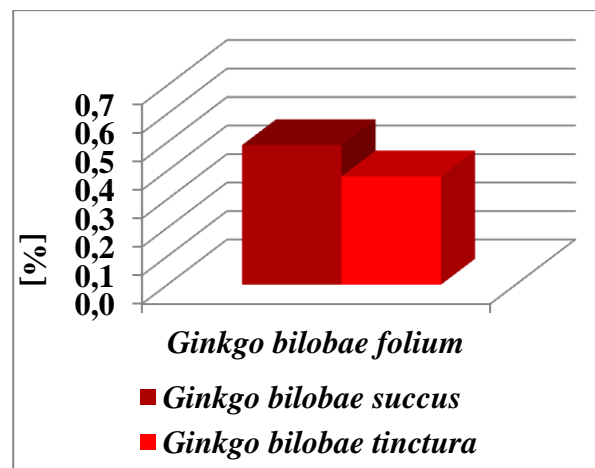
Rycina 77. Zawartość flawonoidów w soku i nalewce z *Farfarae folium*.



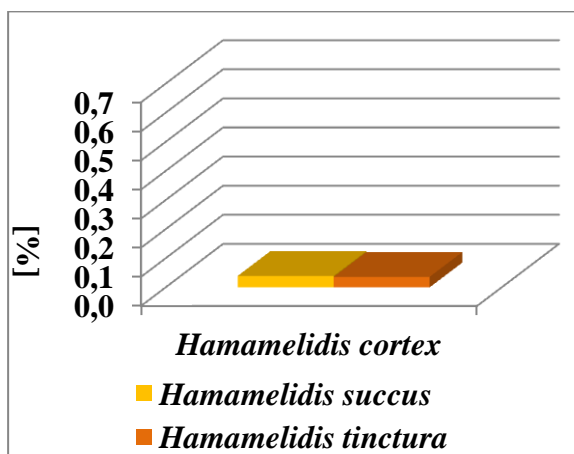
Rycina 78. Zawartość flawonoidów w soku i nalewce z *Melissae herba*.



Rycina 79. Zawartość flawonoidów w soku i nalewce z *Avenae herba*.



Rycina 80. Zawartość flawonoidów w soku i nalewce z *Ginkgo bilobae folium*.



Rycina 81. Zawartość flawonoidów w soku i nalewce z *Hamamelidis cortex*.

Antyoksydanty pochodzenia roślinnego, szczególnie związki o charakterze fenoli, odgrywają ważną rolę w życiu człowieka. Badania epidemiologiczne potwierdzają, że konsumpcja żywności roślinnej, bogatej w antyoksydanty jest korzystna dla zdrowia i może zmniejszać ryzyko chorób cywilizacyjnych: serca i układu krążenia, chorób nowotworowych czy cukrzycy oraz przeciwdziałać oznakom przedwczesnego starzenia się skóry co ma znaczenie w kosmetologii. Zawartość związków naturalnych o właściwościach antyoksydacyjnych, zależy niewątpliwie od użytego rozpuszczalnika do ekstrakcji, ale także może mieć na to wpływ, czy zastosowaliśmy świeży surowiec, bezpośrednio po zbiorze, czy poddany wysuszeniu i przechowywaniu do momentu ekstrakcji.

Dane literaturowe mówią o przeprowadzeniu próby porównania aktywności antyoksydacyjnej wyciągów ze świeżego i wysuszonego materiału roślinnego, pochodzącego

z dwóch roślin, rosnących w Malezji *Paederia foetida* i *Syzygium aqueum* przy zastosowaniu układu β -karoten/kwas linolowy i metody ABTS. Uzyskane wyniki wykazały, że wyciągi ze świeżych roślin działały silniej antyoksydacyjnie w porównaniu do wyciągów z wysuszonych roślin, a wyniki korelowały z zawartością polifenoli [Hasnah i inni 2009]. Badano też wpływ czterech różnych systemów rozpuszczalników na wydajność ekstrakcji, zawartość związków fenolowych i aktywność antyoksydacyjną różnych części siedmiu wybranych do badań roślin. Stwierdzono, że najwięcej związków fenolowych i najsilniejszą aktywnością antyoksydacyjną charakteryzowały się wyciągi wodno-alkoholowe [Sultana i inni 2009].

Badanie, obejmujące ocenę aktywności antyoksydacyjnej wyciągów, które przeprowadzono metodą spektrofotometryczną ze stabilnym rodnikiem DPPH było kolejnym etapem mojej pracy. Analizując aktywność przeciwutleniającą wszystkich wyciągów zauważono, że ze wzrostem ilości surowca w wyciągu rośnie jego aktywność antyoksydacyjna. Aktywność ta dla soku z kory oczaru rosła w zależności od zawartości wyciągu (od 0,02 do 8,00 ml) i wynosiła maksymalnie 94,51% (Tabela 22, Rycina 36). Sok z kory oczaru okazał się najsilniejszym przeciwutleniającym wyciągiem, a jednocześnie bogatym w związki polifenolowe (0,88%) (Rycina 76). Wyciągami o stosunkowo wysokiej zawartości polifenoli i dużej aktywności przeciwutleniającej okazały się nalewki z ziela melisy 93,18% (Tabela 17), sok z ziela melisy 93,14% (Tabela 16), sok z kory oczaru 94,51% (Tabela 22), sok z liści miłorzębu 92,23% (Tabela 20), sok z liścia podbiału 92,21% (Tabela 14) oraz nalewka z liścia podbiału 90,24% (Tabela 15). Słabszą aktywnością cechował się sok z ziela owsa 87,29% (Tabela 18) oraz nalewka z ziela owsa 77,36% (Tabela 19).

Oznaczono zależność aktywności przeciwutleniającej badanych wyciągów (p. pkt. III.1.) od ilości pobranego wyciągu do analizy. Ilość przy której wykazano maksymalną aktywność zmiatania wolnych rodników przez badane wyciągi była zróżnicowana (Tabela 14-23, Rycina 27).

Częstym badaniem *in vitro* różnych wyciągów roślinnych są badania aktywności przeciwbakteryjnej. Najczęściej wyciągi roślinne wykazują słabe działanie przeciwdrobnoustrojowe w porównaniu do antybiotyków, wyjątkiem są związki fenolowe obecne w olejkach eterycznych (tymol, eugenol), które mogą być skuteczne w walce z bakteriami antybiotykoopornymi. Chociaż w dostępnym piśmiennictwie prace dotyczące działania przeciwdrobnoustrojowego wyciągów roślinnych są bardzo często publikowane, to tylko w nielicznych pracach porównywana jest aktywność przeciwdrobnoustrojowa wyciągów ze świeżych i wysuszonych surowców roślinnych.

W jednej z takich prac dokonano oceny działania przeciwbakteryjnego wyciągów alkoholowych i wodnych ze świeżego i suszonego materiału *Commelina benghalensis*. Roślina ta jest wykorzystywana w medycynie ludowej Ugandy jako środek w leczeniu ran, oparzeń, stanów zapalnych uszu i spojówek, przeciwzapalny, a nawet aborcyjny. W ogólnym ujęciu wyniki testów przeciwbakteryjnych wskazują, że ekstrakty etanolowe z suszonych surowców były bardziej aktywne niż wyciągi wodne oraz zawierały więcej grup związków, uznawanych za związki czynne, ze względu na ich lepszą ekstrakcję alkoholem. Wyciągi alkoholowe ze świeżego surowca były jednak bardziej aktywne przeciwko *Candida albicans*, ze względu na obecność w nich kumaryny o działaniu przeciwwgrzybiczym i słabiej aktywne wobec *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Tak więc, wyciąg etanolowy powinien być wykorzystywany w celu uzyskania działania przeciwdrobnoustrojowego [Cuèllar Cuèllar, Okori 2010].

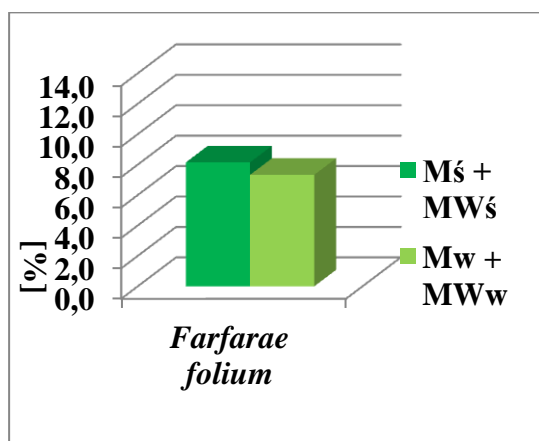
W badaniach własnych, badanie aktywności przeciwbakteryjnej wybranych wyciągów roślinnych (Tabela 34), przeprowadzono z użyciem wrażliwego na antybiotyki międzynarodowego szczepu standardowego *Staphylococcus aureus*. Oznaczono wartości najmniejszego stężenia hamującego (MIC - *Minimal Inhibitory Concentration*) badanych wyciągów oraz najmniejsze stężenie bakteriobójcze (MBC - *Minimal Bactericidal Concentration*) wobec badanego szczepu standardowego. W celu porównawczym użyto antybiotyków referencyjnych- tetracykliny i chloramfenikolu.

Badane wyciągi roślinne w formie nalewek i soków odznaczały się średnią aktywnością przeciwbakteryjną (MIC i MBC w granicach 0,25-10,0 mg/ml), w porównaniu do substancji referencyjnych- tetracykliny (MIC = 0,0001 mg/ml) oraz chloramfenikolu (MIC = 0,005 mg/ml). Spośród badanych wyciągów nalewka z liści miłorzębu charakteryzowała się najsilniejszą aktywnością przeciwbakteryjną (MIC i MBC = 0,25 mg/ml), co wskazuje na udział nie tylko związków polifenolowych w tej aktywności, nieco mniejszą aktywnością odznaczały się sok i nalewka z kory oczaru i ziela melisy (Tabela 35).

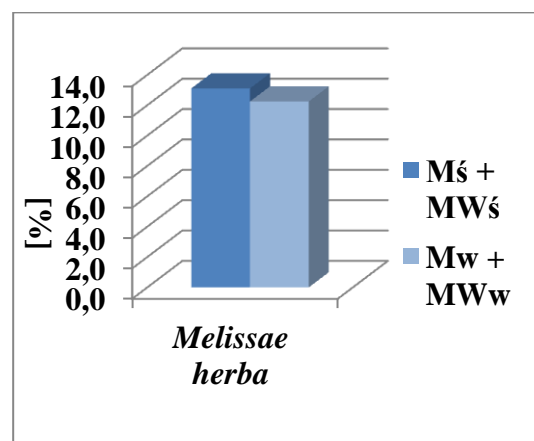
W kolejnym etapie pracy analizowano zawartość związków polifenolowych i flawonoidowych w surowcach świeżych i wysuszonych, uwzględniając stratę masy po suszeniu: w liściach podbiału - *Farfarae folium*, ziele owsa - *Avenae herba*, ziele melisy - *Melissae herba*, liściach miłorzębu japońskiego - *Ginkgo bilobae folium* oraz korze oczaru wirginijskiego - *Hamamelidis cortex*, które posłużyły potem do przygotowania nalewek i soków w Zakładach Zielarskich Phytopharm Kłęka S.A. (III.5.1.1. i III. 5.1.2.). W tym celu oznaczono stratę masy po suszeniu surowców świeżych i wysuszonych (p. pkt. 5.2.). Średni czas suszenia wynosił około 30 minut, w temperaturze 105⁰C. Największą stratę masy po

suszeniu spośród świeżych surowców roślinnych, stwierdzono w liściu podbiału (86,21%) (Tabela 38), natomiast w wysuszonych surowcach w ziele melisy (10,09%) (Tabela 39).

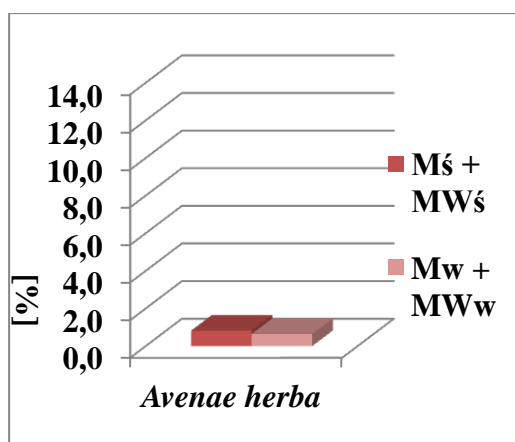
Ogólną zawartość polifenoli oznaczano metodą z odczynnikiem Folin - Ciocalteu w przeliczeniu na kwas chlorogenowy. Najwyższą ilość związków polifenolowych oznaczono w świeżych surowcach roślinnych, mieściła się ona w zakresie od 0,82% do 13,11% (Rycina 82-86), natomiast wysuszone surowce roślinne zawierały od 0,64% do 12,25% związków polifenolowych (Rycina 82-86). Spośród wyciągów ze świeżych i wysuszonych surowców roślinnych, najwięcej związków polifenolowych zawierał wyciąg z ziela melisy: 13,11% ze świeżego i 12,25% z wysuszonego surowca (Rycina 83), a najmniej wyciąg z ziela owsa: 0,82% ze świeżego i 0,64% z wysuszonego surowca (Rycina 84). Pozostałe wyciągi zawierały następujące ilości związków polifenolowych: wyciąg z liścia podbiału 8,15% ze świeżego i 7,33% z wysuszonego surowca (Rycina 82), wyciąg z kory oczaru: 5,87% ze świeżego i 5,38% z wysuszonego surowca (Rycina 86), a wyciąg z liści miłorzębu: 3,87% ze świeżego i 3,83% z wysuszonego surowca (Rycina 85).



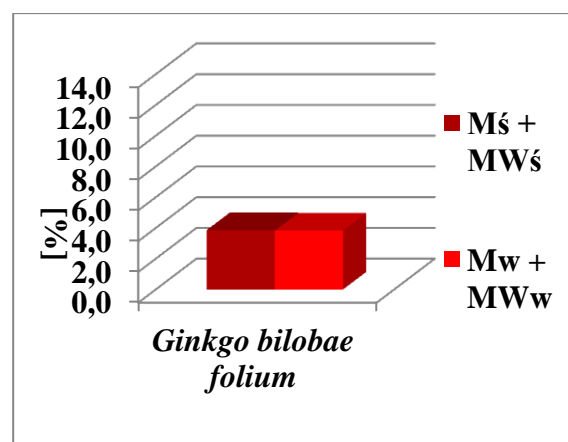
Rycina 82. Zawartość sumy polifenoli w badanych wyciągach z *Farfarae folium* (Mś + MWś, Mw + MWw).



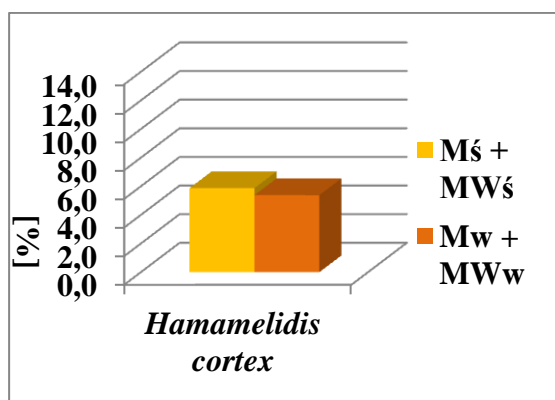
Rycina 83. Zawartość sumy polifenoli w badanych wyciągach z *Melissae herba* (Mś + MWś, Mw + MWw).



Rycina 84. Zawartość sumy polifenoli w badanych wyciągach z *Avenae herba* (Mś + MWś, Mw + MWw).



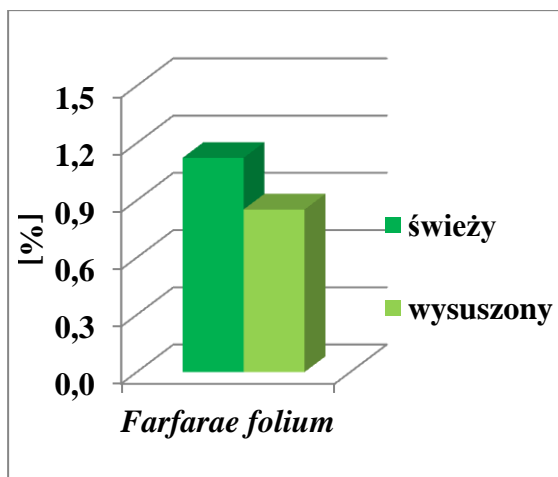
Rycina 85. Zawartość sumy polifenoli w badanych wyciągach z *Ginkgo bilobae folium* (Mś + MWś, Mw + MWw).



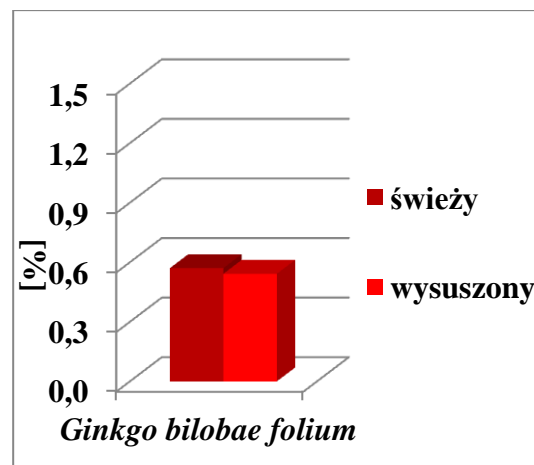
Rycina 86. Zawartość sumy polifenoli w badanych wyciągach z *Hamamelidis cortex* (Mś + MWś, Mw + MWw).

Najwięcej polifenoli z pośród badanych surowców oznaczono w świeżym ziele melisy (*Melissae herba* Mś + MWś).

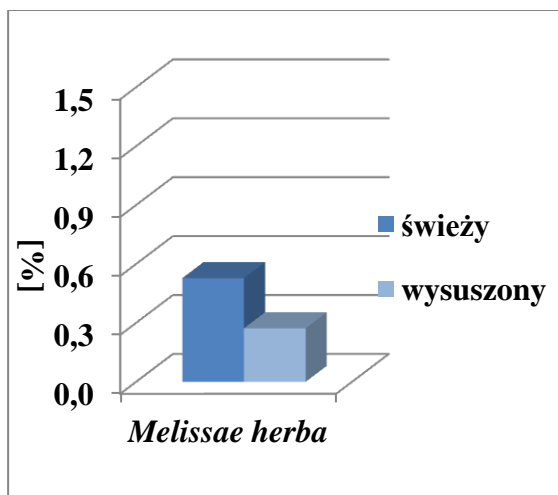
Zawartość flawonoidów w przeliczeniu na kwercetynę oznaczona w badanych surowcach świeżych i wysuszonych metodą kolorymetryczną wg Christa-Müllera, była najwyższa w świeżych surowcach (Rycina 87 - 91) i wynosiła od 0,05% w korze oczaru (Rycina 91) do 1,12% w liściach podbiału (Rycina 87).



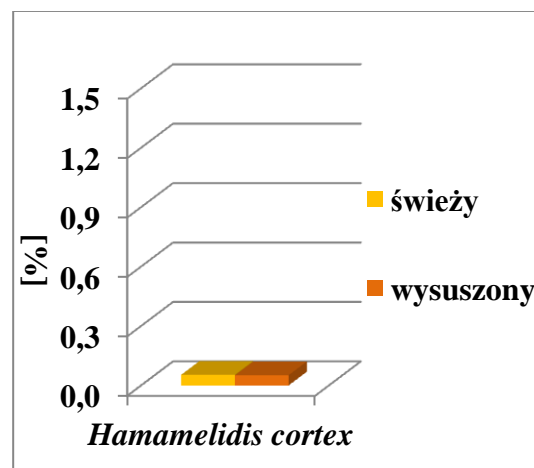
Rycina 87. Zawartość flawonoidów w świeżym i wysuszonym *Farfarae folium*.



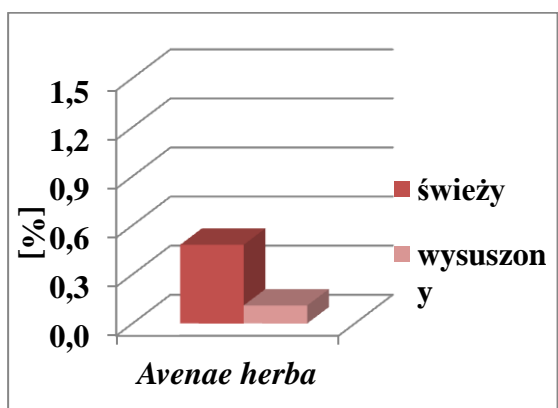
Rycina 90. Zawartość flawonoidów w świeżym i wysuszonym *Ginkgo bilobae folium*.



Rycina 88. Zawartość flawonoidów w świeżym i wysuszonym *Melissae herba*.



Rycina 91. Zawartość flawonoidów w świeżym i wysuszonym *Hamamelidis cortex*.



Rycina 89. Zawartość flawonoidów w świeżym i wysuszonym *Avenae herba*.

Wartość surowca, wykorzystywanego w celach leczniczych musi być jak najwyższa ze względu na cel, jakiemu służy. Zależy ona przede wszystkim od zawartości substancji czynnych, uwarunkowanej właściwie przeprowadzonym zbiorem i suszeniem. Skład chemiczny roślin nie jest stały. Każda grupa związków ma inną dynamikę tworzenia się i gromadzenia w różnych fazach wegetacji roślin, a poziom ich wzrasta lub maleje. A zatem okres i pora zbioru ma duże znaczenie dla wartości surowca, a ilość substancji czynnych zmienia się w zależności od wielu warunków: uprawy, warunków atmosferycznych, pielęgnacji, czasu zbioru, suszenia [Jadczak i Grzeszczuk 2006].

Rośliny uprawiane dzięki lepszym warunkom glebowym, zabiegom pielęgnacyjnym zawierają zwykle więcej i w większych stężeniach substancje lecznicze niż rośliny dziko rosnące z tzw. zbioru naturalnego [Sławiński i inni 2008].

Różnice w składzie przetworów, uzyskanych z surowców roślinnych mogą też wynikać ze sposobu ekstrakcji (maceracja czy perkolacja), stosunku surowca do rozpuszczalnika, stężenia alkoholu. Skład przetworów może z kolei rzutować na skuteczność terapii, a brak pozytywnego efektu może wynikać z niewłaściwych procedur technologicznych.

Ostatnio zwraca się coraz więcej uwagi na konieczność określania profilu metabolomicznego uzyskanych wyciągów z materiału roślinnego. Użycie spektrometrii NMR, bądź metod chromatograficznych w metabolomice zaleca EMEA. Brak jednak wystarczających danych, umożliwiających interpretację uzyskanych widm np. NMR, a byłoby to szybkim narzędziem do identyfikacji związków czynnych, których wysoka zawartość gwarantowałaby skuteczność leczniczą.

V. WNIOSKI

1. Materiał do badań stanowiły nalewki i soki otrzymane w Zakładach Zielarskich Phytopharm Klęka S.A. z pięciu wybranych surowców roślinnych: liść podbiału - *Farfarae folium*, ziele owsa - *Avenae herba*, ziele melisy – *Melissae herba*, liść miłorzębu japońskiego – *Ginkgo bilobae folium* oraz kora oczaru wirginijskiego – *Hamamelidis cortex*.
2. Badania porównawcze zawartości związków polifenolowych i flawonoidów obecnych w nalewkach (z wysuszonych surowców) i sokach (ze świeżych surowców) z pięciu wybranych surowców roślinnych przeprowadzono po raz pierwszy.
3. Badania porównawcze aktywności antyoksydacyjnej i przeciwdrobnoustrojowej w nalewkach (z wysuszonych surowców) i sokach (ze świeżych surowców) z pięciu wybranych surowców roślinnych przeprowadzono również po raz pierwszy.
4. Oznaczenie związków polifenolowych przeprowadzono z odczynnikiem Folin-Ciocalteu: więcej związków polifenolowych jest obecnych w sokach (od 0,15% do 2,10%), najwięcej w soku z ziela melisy (2,10%), w nalewkach zawartość związków fenolowych była dwukrotnie niższa. Najwięcej związków polifenolowych, spośród badanych nalewek było w nalewce z ziela melisy (0,85%).
5. W analizowanych wyciągach: soki i nalewki, oznaczono zawartość flawonoidów metodą kolorymetryczną wg Christa-Müllera. Wykazano również wyższą zawartość flawonoidów w sokach (od 0,01 do 0,61%). Najwyższą ilość flawonoidów zawierał sok i nalewka z liści podbiału (0,61% w soku, 0,41% w nalewce).
6. W badaniu aktywności antyoksydacyjnej wyciągów, które przeprowadzono metodą spektrofotometryczną ze stabilnym rodnikiem DPPH zaobserwowano, że ze wzrostem ilości surowca w wyciągu rośnie jego aktywność antyoksydacyjna. Aktywność ta w soku z kory oczaru rosła w zależności od zawartości wyciągu (od 0,02 do 8,00 ml) i wynosiła maksymalnie 94,51%. Sok z kory oczaru okazał się najaktywniejszym antyoksydacyjnie wyciągiem. Wyciągami o stosunkowo wysokiej zawartości polifenoli i dużej aktywności przeciwutleniającej okazały się nalewka z ziela melisy (93,18%), sok z ziela melisy (93,14%), sok z kory oczaru (94,51%), sok z liści miłorzębu (92,23%), sok z liścia podbiału (92,21%) oraz nalewka z liścia podbiału (90,24%). Słabszą aktywnością cechował się sok z ziela owsa (87,29 %) oraz nalewka z ziela owsa (77,36%).

7. Przeprowadzono badanie aktywności przeciwbakteryjnej wyciągów roślinnych z użyciem wrażliwego na antybiotyki międzynarodowego szczepu standardowego *Staphylococcus aureus* wobec antybiotyków referencyjnych (tetracyklina i chloramfenikol). Badane wyciągi roślinne odznaczały się średnią aktywnością przeciwbakteryjną (MIC i MBC w granicach 0,25-10,0 mg/ml), w porównaniu do substancji referencyjnej- tetracykliny (MIC = 0,0001 mg/ml) i chloramfenikolu (MIC = 0,005 mg/ml), najsilniejszą aktywnością odznaczył się wyciąg etanolowy z nalewki liścia miłorzębu (MIC i MBC = 0,25 mg/ml), co wskazuje na udział nie tylko związków polifenolowych w tej aktywności.
8. Analizowano zawartość związków polifenolowych i flawonoidowych w wyciągach przygotowanych bezpośrednio z surowców świeżych i wysuszonych uwzględniając stratę masy po suszeniu.
9. Spośród badanych surowców, najwięcej związków polifenolowych zawierało ziele melisy 13,11 % (ze świeżego surowca) i 12,25 % (z wysuszonego surowca).
10. Zawartość flawonoidów oznaczona w wyciągach, przygotowanych bezpośrednio z surowców świeżych i wysuszonych była wyższa w świeżych surowcach roślinnych i wynosiła od 0,05% w korze oczaru do 1,12% w liściach podbiału.
11. Słuszne jest, aby wymagania standaryzacyjne, dotyczące zawartości związków fenolowych i flawonoidów w surowcach i w przetworach były zróżnicowane, gdyż przetwory zawierają mniejsze ilości tych związków w porównaniu z surowcami.
12. Z powodu zróżnicowanej zawartości związków polifenolowych w przetworach ze świeżych i wysuszonych surowców roślinnych, mogą one wykazywać zróżnicowaną aktywność, co w przeprowadzonych badaniach wykazano dla działania antyoksydacyjnego i przeciwbakteryjnego.
13. Badania porównawcze wyciągów ze świeżych i wysuszonych surowców roślinnych, powinny być kontynuowane.

VI. STRESZCZENIE

W części teoretycznej pracy przedstawiono charakterystykę botaniczną, oraz dane dotyczące występowania, wymagań klimatycznych i glebowych, skład chemiczny, działanie i zastosowanie w lecznictwie i kosmetologii, a także działania uboczne pięciu wybranych surowców roślinnych: liści podbiału - *Farfarae folium*, ziela melisy - *Melissae herba*, ziela owsa - *Avenae herba*, liści miłorzębu japońskiego - *Ginkgo bilobae folium* oraz kory oczaru - *Hamamelidis cortex*. Opisano także metody przemysłowe otrzymywania wyciągów roślinnych. Scharakteryzowano związki polifenolowe, występowanie oraz wpływ na organizm ludzki, znaczenie ich obecności jako antyoksydantów w produktach spożywczych, lekach i kosmetykach.

Celem pracy doświadczalnej były badania porównawcze nalewek (*tinctura*) z suchych surowców i soków (*succus*) ze świeżych surowców, przygotowanych w Zakładach Zielarskich Phytopharm Klęka S.A, które obejmowały: oznaczenie zawartości polifenoli i flawonoidów, a także aktywności przeciwutleniającej (z udziałem rodnika DPPH) i przeciwdrobnoustrojowej (z użyciem szczepu *Staphylococcus aureus* wobec antybiotyków: tetracykliny i chloramfenikolu), jak również porównanie zawartości polifenoli i flawonoidów, oznaczanych bezpośrednio w świeżych i wysuszonych surowcach.

Wyniki badań wskazują, że najbogatsze w związki polifenolowe jak i flawonoidy okazały się soki; niższą około dwukrotnie zawartość związków polifenolowych oznaczono w nalewkach. Najwyższą ilość sumy flawonoidów (metoda kolorymetryczna wg Christa-Müllera) w przeliczeniu na kwercetynę zawierał sok (0,61%) z liści podbiału i sok z liści miłorzębu japońskiego (0,49%).

Najwyższą zdolność do zmiatania rodnika DPPH wykazywał sok z kory oczaru (94,51%), nalewka i sok z ziela melisy (93,18% i 93,14%), sok z liści miłorzębu (92,23%) oraz sok i nalewka z liści podbiału (92,21% i 90,24%); słabszą aktywnością cechował się sok oraz nalewka z ziela owsa (87,29 % i 77,36%). Korelację między zawartością polifenoli i flawonoidów, zaobserwowano w sokach z kory oczaru, ziela melisy, liści miłorzębu oraz liści podbiału.

W badaniu aktywności przeciwbakteryjnej badanych nalewek i soków oznaczono wartości MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) oraz MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) wobec szczepu *Staphylococcus aureus* w porównaniu z antybiotykami referencyjnymi (tetracyklina i chloramfenikol). Najsilniejszą aktywnością przeciwbakteryjną (MIC i MBC = 0,25 mg/ml) charakteryzowała się nalewka z liści miłorzębu, nieco mniejszą aktywność wykazywały sok i nalewka z kory oczaru i ziela melisy.

Oznaczono też zawartość związków polifenolowych i flawonoidowych bezpośrednio w surowcach świeżych i wysuszonych, uwzględniając stratę masy po suszeniu. Najwyższą ilość związków polifenolowych i flawonoidowych oznaczono w świeżych surowcach roślinnych, najwięcej związków polifenolowych zawierało ziele melisy (13,11%), a najwięcej flawonoidów świeże liście podbiału (1,12%).

Badania nad wyciągami uzyskanymi ze świeżych i wysuszonych surowców roślinnych powinny być kontynuowane, gdyż różnice w zawartości grup związków mogą modyfikować aktywność biologiczną preparatów na ich bazie.

VII.SUMMARY

The theoretical part of this Ph. D. thesis presents the botanical characteristics, data concerning the occurrence, climatic and soil requirements, chemical composition, activity and application in medicine and cosmetology, as well as the side effects of the following plant materials: coltsfoot leaf - *Farfarae folium*, Melissa leaf – *Melissae herba*, oats (green tops) - *Avenae herba*, Ginkgo leaf – *Ginkgo bilobae folium* and Hamamelis bark (witch hazel) – *Hamamelidis cortex*. The industrial methods of making the plant extracts were also described. The polyphenol-based compounds, occurrence and effect on the human organism, as well as the significance of their presence as antioxidants in food, medicines and cosmetics were characterised.

The purpose of the experiments was to conduct comparative tests of tinctures (*tinctura*) made from the dried plant materials and juices (*succus*) from the fresh plant material, prepared in Zakłady Zielarskie Phytopharm Klęka S.A., which covered determining the content of polyphenols and flavonoids, the antioxidative activity (using the DPPH radical) and antimicrobial activity (with the use of the *Staphylococcus aureus* strain, in comparison to the antibiotics: tetracycline and chloramphenicol), as well as a comparison of the content of polyphenols and flavonoids determined directly in the fresh and dried materials.

The results of the tests indicated that the juices contained the highest content of both polyphenols and flavonoids; approximately half the content of the polyphenol compounds was determined in the tinctures. The greatest quantity of flavonoids (according to Christ-Müller's colorimetric method) calculated as quercetin was contained in the juice made from coltsfoot leaves (0.61%) and the juice made from Ginkgo leaf (0.49%).

The greatest DPPH radical scavenging capacity was observed for the juice made from Hamamelis bark (94.51%), the tincture and juice made from Melissa leaf (93.18% and 93.14%), the juice made from Ginkgo leaf (92.23%), as well as the juice and tincture made from coltsfoot leaf (92.21% and 90.24%); the juice and tincture made from oats were characterised by weaker activity (87.29 % and 77.36%). Correlation between the content of polyphenols and that of flavonoids was observed in the juices made from Hamamelis bark, Melissa leaf, Ginkgo leaf and coltsfoot leaves.

In the study of the antimicrobial activity of the tinctures and juices, the MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) and MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) values against the *Staphylococcus aureus* strain were determined and compared with the reference antibiotics (tetracycline and chloramphenicol). The tincture made from Ginkgo leaf showed the strongest antimicrobial activity (MIC and MBC = 0.25 mg/ml), while the juice and tincture made from Hamamelis bark and Melissa leaf demonstrated slightly weaker activity of this kind.

The content of polyphenol and flavonoid compounds was also directly determined in the fresh and dried plant materials, taking the mass loss after drying into consideration. The largest amount of polyphenol and flavonoid compounds was determined in the fresh plant materials; Melissa leaf contained the greatest quantity of polyphenol compounds (13.11%), while the fresh coltsfoot leaves contained the greatest quantity of flavonoid compounds (1.12%).

The studies into the extracts obtained from the fresh and dried plant materials should be continued as the differences in the content of the compound groups can modify the biological activity of the preparations based on them.

VIII. SPIS TABEL I RYCIN

TABELE

Tabela 1.	Materiał do badań oraz skróty użyte w pracy (soki - S)	59
Tabela 2.	Materiał do badań oraz skróty użyte w pracy (nalewki - T).....	60
Tabela 3.	Wartości absorbancji dla poszczególnych roztworów wzorcowych	62
Tabela 4.	Analiza statystyczna krzywej kalibracyjnej	63
Tabela 5.	Zestawienie parametrów regresji liniowej	63
Tabela 6.	Zawartość surowca [mg] w objętości soku/nalewki prób pobranych do analizy	67
Tabela 7.	Absorbancja badanych wyciągów (p. pkt. 1.1.1.) ze świeżych surowców roślinnych (<i>succus</i>)	68
Tabela 8.	Absorbancja badanych wyciągów (p. pkt. 1.1.2.) z wysuszonych surowców roślinnych (<i>tinctura</i>)	69
Tabela 9.	Oznaczenia zawartości sumy polifenoli w badanych wyciągach (<i>succus/tinctura</i>) w przeliczeniu na kwas chlorogenowy i analiza statystyczna uzyskanych wyników	69
Tabela 10.	Zawartość surowca [g] w objętości soku/nalewki [g] w próbach pobranych do analizy	73
Tabela 11.	Absorbancja badanych wyciągów ze świeżych surowców roślinnych (<i>succus</i>).....	73
Tabela 12.	Absorbancja badanych wyciągów z wysuszonych surowców roślinnych (<i>tinctura</i>).....	74
Tabela 13.	Oznaczenie zawartości flawonoidów w badanych wyciągach (<i>succus/tinctura</i>) w przeliczeniu na kwercetynę i analiza statystyczna uzyskanych wyników	74
Tabela 14.	Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez <i>Farfarae succus</i>	80
Tabela 15.	Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez <i>Farfarae tinctura</i>	80
Tabela 16.	Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez <i>Melissae succus</i>	81
Tabela 17.	Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez <i>Melissae tinctura</i> ..	81
Tabela 18.	Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez <i>Avenae succus</i>	82
Tabela 19.	Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez <i>Avenae tinctura</i>	83
Tabela 20.	Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez <i>Ginkgo bilobae succus</i>	84

Tabela 21.	Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez <i>Ginkgo bilobae tinctura</i>	84
Tabela 22.	Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez <i>Hamamelidis succus</i>	85
Tabela 23.	Oznaczenie zdolności redukowania rodnika DPPH przez <i>Hamamelidis tinctura</i>	86
Tabela 24.	Zawartość surowca [mg] w objętościach <i>Farfarae succus</i> [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 14).....	93
Tabela 25.	Zawartość surowca [mg] w objętościach <i>Farfarae tinctura</i> [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 15).....	94
Tabela 26.	Zawartość surowca [mg] w objętościach <i>Melissae succus</i> [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 16)	95
Tabela 27.	Zawartość surowca [mg] w objętościach <i>Melissae tictura</i> [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 17).....	96
Tabela 28.	Zawartość surowca [mg] w objętościach <i>Avenae succus</i> [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 18).....	97
Tabela 29.	Zawartość surowca [mg] w objętościach <i>Avenae tinctura</i> [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 19).....	98
Tabela 30.	Zawartość surowca [mg] w objętościach <i>Ginkgo bilobae succus</i> [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 20).....	99
Tabela 31.	Zawartość surowca [mg] w objętościach <i>Ginkgo bilobae tinctura</i> [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 21).....	100
Tabela 32.	Zawartość surowca [mg] w objętościach <i>Hamamelidis succus</i> [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 22).....	101
Tabela 33.	Zawartość surowca [mg] w objętościach <i>Hamamelidis tinctura</i> [ml] pobranych do analizy z rodnikiem DPPH (p. Tabela 23).....	102
Tabela 34.	Objętości wyciągów roślinnych (soki/nalewki) i ich suche pozostałości użyte do badań mikrobiologicznych	105
Tabela 35.	Działanie przeciwbakteryjne (MIC, MBC) badanych wyciągów (soki/nalewki)	106
Tabela 36.	Wyciągi metanolowe ze świeżych i z wysuszonych surowców roślinnych (p. pkt. 5.1.1.) oraz skróty użyte w pracy	107
Tabela 37.	Wyciągi metanolowo-wodne ze świeżych i z wysuszonych surowców roślinnych (p. pkt. 5.1.2.) oraz skróty użyte w pracy	108

Tabela 38.	Oznaczenie straty masy po suszeniu w świeżych surowcach roślinnych	109
Tabela 39.	Oznaczenie straty masy po suszeniu w wysuszonych surowcach roślinnych	110
Tabela 40.	Zawartość surowca [mg] w objętości wyciągów Mś i MWś z uwzględnieniem straty masy po suszeniu (Tabela 38).....	113
Tabela 41.	Zawartość surowca [mg] w objętości wyciągów Mw i MWw z uwzględnieniem straty masy po suszeniu (Tabela 39).....	113
Tabela 42.	Absorbancja badanych wyciągów z surowców świeżych Mś i MWś	114
Tabela 43.	Absorbancja badanych wyciągów z surowców wysuszonych Mw i MWw ...	114
Tabela 44.	Oznaczenie zawartości polifenoli w wyciągach z surowców świeżych Mś i MWś i analiza statystyczna uzyskanych wyników	115
Tabela 45.	Oznaczenie zawartości polifenoli w wyciągach z surowców wysuszonych Mw i MWw i analiza statystyczna uzyskanych wyników	115
Tabela 46.	Zawartość sumy polifenoli w wyciągach metanolowych (Mś, Mw) i metanolowo-wodnych (MWś, MWw) otrzymanych ze świeżych (ś) i wysuszonych (w) surowców roślinnych w przeliczeniu na kwas chlorogenowy	116
Tabela 47.	Absorbancja wyciągów ze świeżych surowców roślinnych	124
Tabela 48.	Absorbancja wyciągów z wysuszonych surowców roślinnych	124
Tabela 49.	Oznaczenie zawartości flawonoidów w świeżych surowcach w przeliczeniu na kwercetynę i analiza statystyczna uzyskanych wyników	124
Tabela 50.	Oznaczenie zawartości flawonoidów w wysuszonych surowcach w przeliczeniu na kwercetynę i analiza statystyczna uzyskanych wyników	125

RYCINY

Rycina 1.	<i>Avena sativa</i> L. [http://pl.wikipedia.org/wiki/Owies]	11
Rycina 2.	<i>Tussilago farfara</i> L. [http://www.miniaturkabeztajemnic.com/listaz.html]	20
Rycina 3.	<i>Ginkgo biloba</i> L. w stanie naturalnym [http://e-centrumogrodnicze.pl/produkt/rosliny---drzewa-i-krzewy/sadzonki-z-odkrytym-systemem-korzeniowym/iglaste/milorzab-japonski-998.html]	26
Rycina 4.	<i>Hamamelis virginiana</i> L. [http://pl.wikipedia.org/wiki/Oczar]	36
Rycina 5.	<i>Melissa officinalis</i> L. [http://pl.wikipedia.org/wiki/Melisa_lekarska]	45
Rycina 6.	Wykres krzywej kalibracyjnej dla kwasu chlorogenowego	62
Rycina 7.	Widmo UV kwasu chlorogenowego z odczynnikiem Folin - Ciocalteu	63

Rycina 8.	Zawartość sumy polifenoli w przeliczeniu na kwas chlorogenowy (w %) w badanych sokach i nalewkach: <i>Farfarae succus</i> (FS), <i>Farfarae tinctura</i> (FT), <i>Melissae succus</i> (MS), <i>Melissae tinctura</i> (MT), <i>Avenae succus</i> (AS), <i>Avenae tinctura</i> (AT), <i>Ginkgo bilobae succus</i> (GS), <i>Ginkgo bilobae tinctura</i> (GT), <i>Hamamelidis succus</i> (HS), <i>Hamamelidis tinctura</i> (HT).....	70
Rycina 9.	Zawartość flawonoidów w przeliczeniu na kwercetynę (w %) w badanych sokach i nalewkach: <i>Farfarae succus</i> (FS), <i>Farfarae tinctura</i> (FT), <i>Melissae succus</i> (MS), <i>Melissae tinctura</i> (MT), <i>Avenae succus</i> (AS), <i>Avenae tinctura</i> (AT), <i>Ginkgo bilobae succus</i> (GS), <i>Ginkgo bilobae tinctura</i> (GT), <i>Hamamelidis succus</i> (HS), <i>Hamamelidis tinctura</i> (HT).....	75
Rycina 10.	Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbie <i>Farfarae succus</i>	86
Rycina 11.	Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbie <i>Farfarae tinctura</i>	87
Rycina 12.	Liniowa zależność aktywności od zawartości polifenoli w próbie <i>Melissae succus</i>	87
Rycina 13.	Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbie <i>Melissae tinctura</i>	87
Rycina 14.	Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbie <i>Avenae succus</i>	88
Rycina 15.	Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbie <i>Avenae tinctura</i>	88
Rycina 16.	Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbie <i>Ginkgo bilobae succus</i>	88
Rycina 17.	Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbie <i>Ginkgo bilobae tinctura</i>	89
Rycina 18.	Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbie <i>Hamamelis succus</i>	89
Rycina 19.	Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbie <i>Hamamelis tinctura</i>	89
Rycina 20.	Liniowa zależność aktywności antyoksydacyjnej od zawartości polifenoli w próbie <i>Hamamelis tinctura</i>	90

Rycina 21.	Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 0,1 ml badanych soków i nalewek: FS2, FT2, MS2, MT2, AS2, AT2, GS2, GT2, HS2, HT2 (p. Tabela 14-33).....	90
Rycina 22.	Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 0,2 ml badanych soków i nalewek: FS3, FT3, MS3, MT3, AS3, AT3, GS3, GT3, HS3, HT3 (p. Tabela 14-33).....	90
Rycina 23.	Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 0,6 ml badanych soków i nalewek: FS4, FT4, MS4, MT4, AS4, AT4, GS4, GT4, HS4, HT4 (p. Tabela 14-33).....	91
Rycina 24.	Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 1,6 ml badanych soków i nalewek: FS5, FT5, MS5, MT5, AS5, AT5, GS5, GT5, HS5, HT5 (p. Tabela 14-33).....	91
Rycina 25.	Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 2,0 ml badanych soków i nalewek: FS6, FT6, MS6, MT6, AS6, AT6, GS6, GT6, HS6, HT6 (p. Tabela 14-33).....	91
Rycina 26.	Porównanie aktywności przeciwutleniającej A_k [%] w 4,0 ml badanych soków i nalewek: FS7, FT7, MS7, MT7, AS7, AT7, GS7, GT7, HS7, HT7 (p. Tabela 14-33).....	92
Rycina 27.	Maksymalna aktywność A_k [%] zmiatania wolnych rodników dla badanych soków i nalewek	92
Rycina 28.	Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] <i>Farfarae succus</i> od zawartości surowca [mg].....	93
Rycina 29.	Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] <i>Farfarae tinctura</i> od zawartości surowca [mg].....	94
Rycina 30.	Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] <i>Melissae succus</i> od zawartości surowca [mg].....	95
Rycina 31.	Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] <i>Melissae tinctura</i> od zawartości surowca [mg].....	96
Rycina 32.	Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] <i>Avenae succus</i> od zawartości surowca [mg].....	97
Rycina 33.	Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] <i>Avenae tinctura</i> od zawartości surowca [mg].....	98
Rycina 34.	Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] <i>Ginkgo bilobae succus</i> od zawartości surowca [mg]	99

Rycina 35.	Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] <i>Ginkgo bilobae tinctura</i> od zawartości surowca [mg]	100
Rycina 36.	Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] <i>Hamamelidis succus</i> od zawartości surowca [mg]	101
Rycina 37.	Zależność aktywności przeciwutleniającej A_k [%] <i>Hamamelidis tinctura</i> od zawartości surowca [mg]	102
Rycina 38.	Widmo wyciągu <i>Farfarae succus</i> z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 - 600 nm ($\lambda_{max} = 542,10$).....	103
Rycina 39.	Widmo wyciągu <i>Farfarae tinctura</i> z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 - 600 nm ($\lambda_{max} = 541,45$).....	103
Rycina 40.	Widmo wyciągu <i>Melissae succus</i> z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 - 600 nm ($\lambda_{max} = 539,13$).....	103
Rycina 41.	Widmo wyciągu <i>Melissae tinctura</i> z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 - 600 nm ($\lambda_{max} = 541,96$).....	103
Rycina 42.	Widmo wyciągu <i>Avenae succus</i> z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 - 600 nm ($\lambda_{max} = 542,23$).....	104
Rycina 43.	Widmo wyciągu <i>Avenae tinctura</i> z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 - 600 nm ($\lambda_{max} = 542,15$).....	104
Rycina 44.	Widmo wyciągu <i>Ginkgo bilobae succus</i> z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 - 600 nm ($\lambda_{max} = 542,67$)	104
Rycina 45.	Widmo wyciągu <i>Ginkgo bilobae tinctura</i> z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 - 600 nm ($\lambda_{max} = 542,52$)	104
Rycina 46.	Widmo wyciągu <i>Hamamelidis succus</i> z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 - 600 nm ($\lambda_{max} = 541,78$).....	105
Rycina 47.	Widmo wyciągu <i>Hamamelidis tinctura</i> z odczynnikiem DPPH w zakresie 500 - 600 nm ($\lambda_{max} = 542,40$).....	105
Rycina 48.	Zawartość suchej masy w świeżych surowcach roślinnych [A%]	110
Rycina 49.	Zawartość suchej masy w wysuszonych surowcach roślinnych [A%]	111
Rycina 50.	Zawartość sumy polifenoli w przeliczeniu na kwas chlorogenowy w wyciągach metanolowych (Mś) i metanolowo-wodnych (MWś) ze świeżych surowców roślinnych oraz metanolowych (Mw) i metanolowo-wodnych (MWw) z wysuszonych surowców roślinnych	116
Rycina 51.	Widmo wyciągu FMś z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{max} = 753,84$).....	117

Rycina 52.	Widmo wyciągu FMWś z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 746,20$).....	117
Rycina 53.	Widmo wyciągu FMw z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 746,13$).....	117
Rycina 54.	Widmo wyciągu FMWw z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 745,51$).....	117
Rycina 55.	Widmo wyciągu MMś z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 733,00$).....	118
Rycina 56.	Widmo wyciągu MMWś z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 738,55$).....	118
Rycina 57.	Widmo wyciągu MMw z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 753,60$).....	118
Rycina 58.	Widmo wyciągu MMWw z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 743,28$).....	118
Rycina 59.	Widmo wyciągu AMś z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 753,00$).....	119
Rycina 60.	Widmo wyciągu AMWś z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 750,15$).....	119
Rycina 61.	Widmo wyciągu AMw z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 749,00$)	119
Rycina 62.	Widmo wyciągu AMWw z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 743,77$).....	119
Rycina 63.	Widmo wyciągu GMś z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 754,10$)	120
Rycina 64.	Widmo wyciągu GMWś z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 751,03$).....	120
Rycina 65.	Widmo wyciągu GMw z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 747,73$).....	120
Rycina 66.	Widmo wyciągu GMWw z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 745,73$).....	120
Rycina 67.	Widmo wyciągu HMś z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 729,57$).....	121
Rycina 68.	Widmo wyciągu HMWś z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 747,90$).....	121

Rycina 69.	Widmo wyciągu HMw z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 747,73$).....	121
Rycina 70.	Widmo wyciągu HMWw z odczynnikiem Folin-Ciocalteu w zakresie 400 - 900 nm ($\lambda_{\max} = 755,12$).....	121
Rycina 71.	Zawartość flawonoidów w surowcach świeżych i wysuszonych w przeliczeniu na kwercetynę (%).....	125
Rycina 72.	Zawartość sumy polifenoli w soku i nalewce z <i>Farfarae folium</i>	130
Rycina 73.	Zawartość sumy polifenoli w soku i nalewce z <i>Melissae herba</i>	130
Rycina 74.	Zawartość sumy polifenoli w soku i nalewce z <i>Avenae herba</i>	130
Rycina 75.	Zawartość sumy polifenoli w soku i nalewce z <i>Ginkgo bilobae folium</i>	130
Rycina 76.	Zawartość sumy polifenoli w soku i nalewce z <i>Hamamelidis cortex</i>	131
Rycina 77.	Zawartość flawonoidów w soku i nalewce z <i>Farfarae folium</i>	131
Rycina 78.	Zawartość flawonoidów w soku i nalewce z <i>Melissae herba</i>	131
Rycina 79.	Zawartość flawonoidów w soku i nalewce z <i>Avenae herba</i>	132
Rycina 80.	Zawartość flawonoidów w soku i nalewce z <i>Ginkgo bilobae folium</i>	132
Rycina 81.	Zawartość flawonoidów w soku i nalewce z <i>Hamamelidis cortex</i>	132
Rycina 82.	Zawartość sumy polifenoli w badanych wyciągach z <i>Farfarae folium</i> (Mś + MWś, Mw + MWw).....	135
Rycina 83.	Zawartość sumy polifenoli w badanych wyciągach z <i>Melissae herba</i> (Mś + MWś, Mw + MWw).....	135
Rycina 84.	Zawartość sumy polifenoli w badanych wyciągach z <i>Avenae herba</i> (Mś + MWś, Mw + MWw).....	136
Rycina 85.	Zawartość sumy polifenoli w badanych wyciągach z <i>Ginkgo bilobae folium</i> (Mś + MWś, Mw + MWw).....	136
Rycina 86.	Zawartość sumy polifenoli w badanych wyciągach z <i>Hamamelidis cortex</i> (Mś + MWś, Mw + MWw).....	136
Rycina 87.	Zawartość flawonoidów w świeżym i wysuszonym <i>Farfarae folium</i>	137
Rycina 88.	Zawartość flawonoidów w świeżym i wysuszonym <i>Melissae herba</i>	137
Rycina 89.	Zawartość flawonoidów w świeżym i wysuszonym <i>Avenae herba</i>	137
Rycina 90.	Zawartość flawonoidów w świeżym i wysuszonym <i>Ginkgo bilobae folium</i>	137
Rycina 91.	Zawartość flawonoidów w świeżym i wysuszonym <i>Hamamelidis cortex</i>	137

IX. PIŚMIENICTWO

1. Adzet T., Ponz R., Wolf E., Schulte E. Genetic Variability of the Essential Oil Content of *Melissa officinalis*. *Planta Medica*, 1992, 58 (6): 558-561.
2. Adzet T., Ponz R., Wolf E., Schulte E. Content and Composition of *M. officinalis* Oil in Relation to Leaf Position and Harvest Time. *Planta Medica*, 1992, 58 (6): 562-564.
3. Agata I., Kusakabe H., Hatano T., Nishibe S., Okuda T. Melitric acids A and B, new Trimeric Caffeic Acid Derivatives from *Melissa officinalis*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 1993, 41(9): 1608-1611.
4. Aherne S.A., O'Brien NM. Dietary Flavonols: Chemistry, Food content, and Metabolism. *Nutrition*, 2002, 18: 75-81.
5. Alasalvar C., Grigor J. M., Zhang D., Quantick P.C., Shahidi F. Comparison of Volatiles, Phenolics, Sugars, Antioxidants Vitamins, and Sensory Quality of Different Carrot Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 1410-1416.
6. Anand CL. Effect of *Avena sativa* on Cigarette Smoking. *Nature*, 1971, 233: 496.
7. Annamalai A., Ponmari G., Sathishkumar R., Lakshmi PTV. Effect of drying treatment on the contents of antioxidants in *Cardiospermum halicacabum* Linn. 2011, B – 313.
8. Areekul V., Phomkaivon N. Comparison on the Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Various Solvent Extracts of Fresh and Dried Thai Indigenous Plants. The 12thASEAN Food Conference, BITEC Bangna, Bangkok, Thailand, 2011, 297-301.
9. Aufhammer G., Fischbeck G. Getreide. Produktionstechnik und Verwertung. DLG- Verlag. Frankfurt, 1973, 80-88.
10. Babuselvam M., Kathiresan K., Ravikumar S., Uthiraselvam M., Rajabudeen E. Scientific Evaluation of Aqueous Extracts of Fresh and Dried Leaves from *Rhizophora mucronata lamk* (Rhizophoraceae) in Rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, 6 (11): 814-817.
11. Bailey LH. Manual of Cultivated Plants. The Macmillan Company, New York, 1958, 733-739.
12. Balansard P., Dalaage M., Faure F., Bouyard P. Méthode d'étude quantitative de l'action veinotrope. *Thérapie*, 1970, 25: 675- 682.
13. Balansard P., Faure F., Balansard G., Delaage M., Roussey A., Bouyard P. Tonivenous Effect of a Purified Extract from *Hamamelis virginiana*. *Thérapie* 1972, 27 (5): 793- 799.
14. Balz JP. *Ginkgo biloba*. Production Agronomique d'un Principe Actif pour Personnes Agees. 3rd International Conference on Medicinal and Aromatic Plants; 1991.
15. Bartnikowska E., Lange E., Rakowska M. Ziarno Owsa Niedocenione Źródło Składników Odżywczych i Biologicznie Czynnych. Cz. I. Ogólna Charakterystyka Owsa. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 2000, 215, 209-221, 223-237.
16. Bartnikowska E. Włókno Pokarmowe w Żywieniu Człowieka. Cz. I Przemysł Spożywczy, 1997, 5: 43-44, 48.
17. Baudouin C., Ettaiche M., Imbert F., Droy-Lefaix MT., Gastaud P., Lapalus P. Inhibition of Preferation by Free Radical Scavengers in an Experimental Model of Tractional Retinal Detachment. *Experimental Eye Research*, 1994, 59(6): 697-706.

18. Baumgärtner M., Köhler S., Moll I. *Hamamelis*- Spezialextrakt zur lokalen Behandlung des *Herpes labialis*, eine Plazebokontrollierte Doppelblindstudie. Zeitschrift für Allgemeine Medizin, 1998, 74 (3): 158-161.
19. Bernard P., Balansard P., Balansard G., Bovis A. Valeur Pharmacodynamique Toniveineuse des Préparations Galéniques á Base de Feuilles d'*Hamamelis*. Journal de Pharmacie de Belgique, 1972, 27 (4): 505- 512.
20. Berg T., Freundl E., Czygan FC. *Melissa officinalis* subsp. *altissima*: Characteristics of a Possible Adulteration of Lemon balm. Pharmazie, 1997, 52: 802-808.
21. Bisset NG., Wichtl M. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart 2004.
22. Blecharz- Klin K., Piechal A., Widy – Tyszkiewicz E. Milorzáb japoński we Współczesnej Terapii. Przewodnik lekarza, 2003, 5: 42-47.
23. Blumenthal M., Busse W.R., Galdberg A., Gruenwald J., Hall T., Riggins W., Risters R.S. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. American Botanical Council Austin, Texas, 1998, 82-83.
24. Borkowski B., Styrylska D. Zawartość Olejku w Liściach melisy w Okresie Rocznej Wegetacji. Acta Poloniae Pharmaceutica, 1954, 11(2): 153-158.
25. Brage D. Chronic Cerebral Insufficiency: A Controlled Double-blind Study between *Ginkgo biloba* Extract and Dihydroergotoxine in Patients with Cerebral Insufficiency; La Semana Médica, 1986; 169: 381-389.
26. Brand-Garnys EE., Van Dansik P., Brand HM. Looking in the Face of Cosmeceuticals. Journal of the Polish Society of Cosmetic Chemists, 2001, 127 (1/2): 8-13.
27. Brantner A., Grein E. Antibacterial Activity of Plant Extracts Used Externally in Traditional Medicine. Journal of Ethnopharmacology, 1994, 44: 35-40.
28. Bieskorn CH., Briner H., Schlumprecht L., Eberhardt KH. Vergleichende quantitative Bestimmungen der Ursolsäure und des ätherischen Öls in pharmazeutisch- und lebensmittelchemisch-wichtigen Labiaten. Archiv der Pharmazie, Bericht der Deutschen Pharmakognosie Gesellschaft, 1952, 285: 290-296.
29. Brieskorn CH., Krause W. Weitere Triterpene aus *Melissa officinalis* L. Archiv der Pharmazie, 1974, 307: 603-610.
30. Broda B. Zarys botaniki farmaceutycznej, PZWL, W-wa, 2002.
31. Brud W., Glinka R. Technologia Kosmetyków. Oficyna Wydawnicza Łódź, 2001, 29-53.
32. Bylka W., Matławska I., Pilewski NA. Natural flavonoids as antimicrobial agents. Journal of the American Nutraceutical Association, 2004, 7 (2): 9 -16.
33. Chlabicz J., Róžański A., Gałasiński W. The Influence of Water Extracts from *Melissa officinalis* on the Protein Biosynthesis *in vitro*. Pharmazie, 1984, 39: 770.
34. Cho J., Kim HM., Yeo SJ., Zhang J., Kangs JS., Ryu JH., Jeong YS., Lee YS., Jin C., Kim JM., Myung CS. Neuroprotective and Antioxidant Effects of the Ethyl Acetate Fraction Prepared from *Tussilago farfara* L. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2005, 28: 455- 460.

35. Connor J., Connor T., Marshall PB., Reid A., Turnbull MJ. The pharmacology of *Avena sativa*. *Pharmacy and Pharmacology*, 1975, 27 (2): 92-98.
36. Cuèllar Cuèllar A., Okori D. Preliminary Phytochemical and Antimicrobial Evaluation of the Fresh and Dried Whole Plant Extracts from *Commelina benghalensis*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 2010, 2:104-116.
37. Czeczot H. Flawonoidy- naturalne antyoksydanty w naszej diecie. *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*, 2000, 4: 372-382.
38. Czиков P., Łaptiew J. Rośliny lecznicze i bogate w witaminy. PWRiL, W-wa 1983.
39. Czygan FC., Hose S., Zanglein A., Van den Berg T., Schultze W., Kubeczka KH. Ontogenetic Variation of the Essential Leaf Oil of *Melissa officinalis* L. *Pharmazie*, 1997, 52: 247-253.
40. Diemunsch AM., Mathis C. Circular Self-Test Path (CSTP). Effet vasoconstricteur de l'hamame'lis en application externe. *Pharmaceutical*, 1987, 3: 111-114.
41. Dimberg L., Theander O., Lingnert H. Awenanthramides- a Group of Phenolic Antioxidants in Oats. *Cereal Chemistry*, 1993, 70: 337-341.
42. Dobrzański B., Zawadzki S. *Gleboznawstwo PWRiL; Wyd. IV, W-wa, 1999.*
43. Dorda A. Bliżej natury-podbiał. *Gazeta Ustrońska*, 2006, 17.
44. Drieu K. Preparation and Definition of *Ginkgo biloba* Extract. *Rokan Ginkgo biloba: Recent Results in Pharmacology and Clinic: Springer- Verlag, Berlin, 1988, 32-36.*
45. Drużyńska B., Klepacka M. Charakterystyka preparatów polifenoli otrzymanych z okrywy nasiennej fasoli czerwonej, brązowej i białej i ich właściwości przeciwutleniające. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2005, 4 (2): 119-128.
46. Dubas A., Gładysiak S. *Szczegółowa uprawa roślin rolniczych, Akademia Rolnicza, Poznań, 1994.*
47. Duiven JM. *Ginkgo. Natura. Amsterdam, 1970, 67, 144.*
48. Duwiejua M., Zetlin IJ., Wateman PG., Gray AI. Anti- inflammatory Activity of *Polygonum bistorta*, *Guaiacum officinale* and *Hamamelis virginiana* in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1994, 46 (4): 286-290.
49. Ernst. E. *Ginkgo biloba extract in Peripheral Arterial Diseases: a Systematic Research Based on Controlled Studies in the Literature. Fortschritte der Medizin*, 1996; 114: 85-87.
50. ESCOP Monographs. Second edition. The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, *Melissae folium*, 2003, 223-230.
51. European Medicines Agency. Assessment Report on *Avena sativa* L. herba and *Avena sativa* L. fructus. London, 2008, 8.
52. *Farmakopea Polska. Wydanie VI, IX, Tom I, W-wa, 2002, 150, 2011, 1291-1292.*
53. Fast RB., Caldwell EF. *Breakfast Cereals and how they Grade. American Association of Cereal chemists (AACC), Saint Paul, Minnesota, 1990.*
54. Finley JW. Phenolic Antioxidants and Prevention of Chronic Inflammation. *Food Technology*, 2004, 58(11): 42-46.
55. Fremont L. Mini review: Biological Effects of Resveratrol. *Life Sciences*, 2000, 66: 663-673.
56. Frohne D. *Leksykon roślin leczniczych. Wydawnictwo EBER, 2006 ,157- 159, 179- 182, 254- 260, 525.*

57. Gąsiorowski H., Cierniewska A. Owies- chemia i technologia. PWRiL, Poznań, 1995, 20-22, 25-28, 40-42, 88-89, 90-95, 96-99, 159-165.
58. Gąsiorowski H. Technologia produkcji chleba żytniego. PWRiL, Poznań, 1994, 223-235.
59. Gąsiorowski H. Wartość fizjologiczno-żywnościowa owsa. Przegląd Zbożowo Młynarski, 2003, 47 (3): 26-28.
60. Glinka R., Glinka M. Receptura kosmetyczna z elementami kosmologii. tom I, UM w Łodzi, 2008, 93-94, 112-113, 159-162, 173, 236-237.
61. Glinka R., Rokicki P., Cieśliński M., Klimczok A. Selected Fruit Extracts in New Cosmetic Forms with Antioxidative Function. Polish Journal of Cosmetology, 2002, 1: 36-42, 4: 269-277.
62. Gramza A., Koreczak J. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as Antioxidants in Lipid Systems. Trends in Food Science and Technology, 2005, 16 (8): 351-358.
63. Gruszka D. Antyoksydanty i ich rola w zachowaniu młodości i zdrowia. Zdrowie i Uroda, 2011, 1, 5-7.
64. Gunther E. The essential oils. D. van Nostrand Company Inc. Toronto, vol 5, New York, London, 1952.
65. Hanczakowski P. Fenole- substancje antyodżywcze czy prozdrowotne?, Biuletyn Informacyjny Instytut Zootechniki, 2002, 4: 33-39.
66. Hänsel R., Sticher O., Steinegger E. Pharmakognosie – Phytopharmazie. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2007.
67. Hartish C., Kołodziej M. Galloylhamameloses and Proanthocyanidins from *Hamamelis Virginiana*. Phytochemistry, 1996, 42 (1):191-198.
68. Hasnah O., Afidah AR., Norhafizah MI., Nornaemah MB. Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Paederia foetida* and *Syzygium aqueum*. Molecules 2009, 14, 970-978.
69. Heer O. Veber *Ginkgo* Thunbrg, Gartenflora; 1974, 23, 260.
70. Herse J. Szczegółowa uprawa roślin. PWN, W-wa, 1979.
71. Heeger E. F. Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenbaus. Deutscher Bauernverlag Berlin, 1956, 792.
72. Hohmann J., Zupko I., Redei D., Csanyi M., Falkay G., Mathe I., Janicsak G. Protective Effects of the Aerial Parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their Constituents against Enzyme- dependent and Enzyme- independent Lipid Peroxidation. Planta Medica, 1999, 65 (6): 576-578.
73. Hose S., Zanglein A., Van der Berg T., Schultze W., Kubeczka KH., Czygan FC. Ontogenetic Variation of the Essential Leaf Oil of *Melissa officinalis* L. Die Pharmazie, 1997, 52 (3): 247-253.
74. Hughes- Formella BJ., Bohnsack K., Rippke F., Benner G., Rudolph M., Tausch I., Gassmueller J. Anti-inflammatory Effect of *Hamamelis* Lotion in a UVB Erythema Test. Dermatology, Basel, Switzerland, 1998, 196: 316-322.
75. Hunter KJ., Fletcher JM. The antioxidant activity and composition of fresh, frozen jarred and canned vegetables. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2002, 3: 399-406.
76. Ide T., Kushi M., Takahashi Y., Shinohara K., Fukuda N., Sirato-Yasumoto S. Sesamin, a sesame lignan, as a potent serum lipid-lowering food component. Japan. Agricultural Research Quarterly, 2003, 37 (3): 151-158.

77. Itil T., Mortorano D. Natural substances in psychiatry (*Ginkgo biloba* in dementia). *Psychopharmacol Bulletin*, New York University Medical Center, 1995; 31(1): 147-158.
78. Jadczyk D., Grzeczuk M. Zbiór i konserwacja ziół. *Panacea*, 2006, 4 (17): 28-31.
79. Jambor J., Czosnowska E. Preparaty ze świeżych roślin. *Postępy Fitoterapii*, 2002, 1/2: 2-5.
80. Janeczko Z. Polifenole roślinne w terapii schorzeń układu krążenia. *Panacea*, 2004, 3 (8): 22-26.
81. Janicki S., Fiebig A., Sznitowska M., Achmatowicz T. Farmacja stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2006, 375-386.
82. Jeszka M., Flaczyk E. HPLC analysis- determination of flavonols in *Morus alba* leaves, W: International Scientific Conference of PhD Students. Faculty of Biotechnology and Food Sciences and Faculty of Agrobiolgy and Food Resources at Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2008, 118- 120.
83. Jędrzejko K., Kowalczyk B., Bacler B. Rośliny kosmetyczne. Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, 2007, 8-12, 59- 120, 82-83, 126-128.
84. Johnson O., More D. Drzewa. Multico, Warszawa, 2009, 20.
85. Kalisz O., Wolski T., Gerkowicz M. Miłorząb japoński (*Ginkgo biloba*) i jego preparaty w terapii zaburzeń krążenia mózgowego i obwodowego. Uniwersytet im. Marii Curie- Skłodowskiej- Lublin, 2006, 61: 11-17.
86. Kanowski S., Hermann WM., Stephan K., Wierich W., Hörr R. Proof Of Efficacy of the *Ginkgo biloba* special extract EGb 761 in outpatient suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi- infarct dementia. *Pharmacopsychiatry*, 1996, 29: 47-56.
87. Kim SY., Kwak JS., Shin JP., Lee SH. The protection of the retina from the ischemic injury by the free radical scavenger EGb 761 and zinc the cat retina. *Ophthalmologica*, 1998, 212, 268.
88. King A., Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 1999, 99(2): 213-218.
89. Kobendza R. Miłorząb dwuklapowy (*Ginkgo biloba* L.). *Roczniki Sekcji Dendrologicznej Polskiego Towarzystwa Botanicznego*, 1957/58, 12, 39.
90. Kohlmünzer S. Farmakognozja. PZWL, W-wa, 2003, 62-63, 128-135.
91. Kopytko YF., Dargaeva TD., Sokolskaya TA., Grodnitskaya EI., Kopnin AA. New methods for the quality control of a homeopathic matrix tincture of greater celandine. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2005, 39, 11: 603-609.
92. Korszun S. Uprawa miłorzębu dwuklapowego i jego odmiany stożkowatej w pojemnikach. *Rocznik Akademii Rolniczej. Rozprawy naukowe*, Poznań, 1995, 262.
93. Korszun S. Rozmnażanie miłorzębu dwuklapowego. cz. I *Wiadomości Zielarskie*, 1993, 10, 13.
94. Korting HC., Schäfer-Korting M., Hart H., Laux P., Schmid M. Anti-inflammatory activity of *Hamamelis* distillate applied topically to the skin. Influence of vehicle and dose. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1993, 44 (4): 315-318.
95. Kozłowski J.A., Wielgosz T, Cis J. Ziola z apteki natury. Wydawnictwo Publicat, Poznań, 2008, 105-108, 121, 126-128, 136-137.
96. Kruszewski J. Alergia a używki: herbata, zioła. cz. III, *Klinika Chorób Infekcyjnych i Alergologii Instytutu Medycyny Wewnętrznej, Alergia i Ty*, Warszawa, 2001.

97. Krześniak M.L. Apteczka ziołowa. Wydawnictwo Sport i Turystyka, Warszawa, 1986, 76-78.
98. Koch-Heitzmann I., Schultze W. *Melissa officinalis* L. Eine alte Arzneipflanzen mit neuen therapeutischen Wirkung. Deutsche Apotheker Zeitung, 1984, 124 (43): 2137-2145.
99. Lamaison I. L., Petitjean-Freytet C., Carnat A. Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 1991, 66 (7): 185-188.
100. Lawrence B. M. Progress in Essential Oils. Performance Flavor, 1989, 14: 75-76; 1996, 21: 59-60.
101. Lamer- Zarawska E., Noculak- Palczewska A. Kosmetyki naturalne. ASTRUM, Wrocław, 1994, 121-123.
102. Laux P., Oschmann R. Die Zaubernul- *Hamamelis virginiana* L. Zeitschrift für Phytotherapie, 1993, 14(3): 155-166.
103. Le Bars Pl., Katz MM., Barman N., Itil TM., Freedman AM., Schatzberg AF. A placebo- controlled, double- blind, randomized trial of an extract of *Ginkgo biloba* for dementia. North American EGB Study Group, JAMA, 1997; 278 (16): 1327- 1332.
104. Leggett J.M. Classification and speciation in *Avena*. Oat science and technology. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, 1992.
105. Litvinenko VI., Popowa TP., Simonjan AV., ZOZ IG., Sokolov VS. Gerbstoffe und Oxyzimtsäure- abkommlinge in Labiaten. Planta Medica, 1975, 27: 372-380.
106. Makowska A., Zbożowe produkty śniadaniowe, Przegląd Zbożowo Młynarski, 2002, 9: 23-25.
107. Makowska M., Alkiewicz J. Leki roślinne w leczeniu wybranych schorzeń dróg oddechowych. Klinika Pneumonologii i Alergologii Dziecięcej Instytutu Pediatrii AM w Poznaniu, Postępy Fitoterapii, 2000, 3: 38-41.
108. Matławska I. (pod redakcją) Farmakognozja. AM Poznań, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, 2008: 102-104.
109. Matławska I. Herbaty, herbatki, ziółka. Panacea 4, 2008, 13: 20-22.
110. Masaki H., Atsumi T., Sakurai H. Evaluation of superoxide scavenging activities of *Hamamelis extract* and hamamelitannin. Free Radical Research Communications, 1993, 19: 333-340.
111. Masaki H., Sekihara K., Sakak S., Fujii M., Atumi T., Suzuki K. Development of anti-aging component as a cosmetic ingredient. Effect of hamamelitannin as the active oxygen scavenger. IFSCC International Congress Yokohama, 1992, 2: 437-439.
112. Masaki H. Protective activity of hamamelitannin on cell damage induced by superoxide anion radicals in murine dermal fibroblasts. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 1995, 18 (1): 59-63.
113. Mitek M., Gasik A. Polifenole w żywności. Właściwości przeciwutleniające. Przemysł Spożywczy, 2007, 9: 36-39.
114. Mitrofanov A.S., Mitrofanova K.S., Oves, Kolos, Moskva, 1968.
115. Molski M. Chemia piękna. WSZPZiU, Poznań, 2005, 273-274.
116. Moore W., James DK. A random trial of three topical analgesic agents in the treatment of episiotomy pain following instrumental vaginal delivery. Journal of Obstetrics and Gynaecology, 1989, 10: 35-39.
117. Moulton Pl., Boyko LN., Fitzpatrick JI., Petros TV. The effect *Ginkgo biloba* on memory in healthy male volunteers. Physiology and Behavior, 2001, 73(4): 659-665.

118. Mulkens A., Kapetanidis J. Flavonoides des feuilles de *Melissa officinalis* L. Lamiaceae. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 1987, 62: 19-22, 1988; 63: 266-270.
119. Muller RH., Hildebrand GE. *Technologia nowoczesnych postaci leków*. Wydawnictwo Lekarskie, 1998, 128-220.
120. Ososki AL., Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy Research*, 2003, 17: 845- 869.
121. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods. Departament Rolnictwa USA, 2007-2011.
122. Ożarowski A. *Ziołolecznictwo. Poradnik dla lekarzy*, Wyd. III, PZWL, W-wa, 1982, 185.
123. Pawlaczyk J., Zając M. Walidacja metod analizy chemicznej. Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej, Poznań, 2005, 23-36.
124. Peterson D.M. Oast antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 2001, 33(2): 115-129.
125. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products –Lloydia*, 2000, 63: 1035-1042.
126. Potargiewicz E., Szerszenowicz E. Vegetal polyphenols in cosmetics. *Polish Journal of Cosmetology*, 2006, 9 (2): 70- 76.
127. Raabe A., Raabe M., Ihm P. Therapeutic follow- up using automatic perimetry in chronic cerebroretinal ischemia in elderly patients. Prospective double-blind study with graduated dose *Ginkgo biloba* treatment. *Klinische Monatsblätter Augenheilkunde*, 1991, 199, 432.
128. Rapaka D., Vennam S. Evaluation and comparison of anti-diabetic activity of hydroalcoholic extracts of fresh and dry leaves of *Psidium guajava* in type-II *diabetes mellitus*. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 2012, 2 (4): 62-65.
129. Rosicka-Kaczmarek J. Polifenole jako naturalne antyoksydanty w żywności. *Przegląd Piekarsko Cukierniczy*, 2004, 6: 12-16.
130. Salomon PR, Adams F., Silver A, Zimmer J., Deveaux R. *Ginkgo* for memory enhancement: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2002, 288 (7): 835- 840.
131. Sanchez-Medina A., Etheridge ChJ., Hawkes GE., Hylands PJ., Pendry BA., Hughes MJ., Corcoran O. Comparison of rosmarinic acid content in commercial tinctures produced from fresh and dried lemon balm (*Melissa officinalis*). *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2007, 10 (4): 455-463.
132. Sarer E., Kökdil G. Constituents of the Essential Oil from *Melissa officinalis*. *Planta Medica*, 1991, 57: 89-90.
133. Schenck G., Brieskorn CH. Untersuchungen fiber die Inhaltstoffe der Melisse. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, 1994, 282.
134. Schmid D., Zulli F., Missen HP, Prieur H. Penetration and metabolism of isoflavones in human skin. *Cosmetics and Toiletries Magazine*, 2003, 118(9): 71- 76.
135. Schneider C., Board C., Misse P., Arnaud B., Schmitt-Bernard CF. Spontaneous Hyphema Caused by *Ginkgo biloba* extract. *Journal of Ophtalmology*, 2002; 25 (7): 731- 732.
136. Sławiński C., Witkowska-Walczak B., Zamorski K., Baranowski P., Mazurek W. Wpływ uprawy na hydrofizyczne właściwości gleb. II Sympozjum Naukowe, Jakość Środowiska Surowców i Żywności, 2008, Poznań, 370-372.

137. Sorkin B. Hametum Salbe, eine Kortikoidfreie antiinflammatorische Salbe. *Physikalische Medizin und Rehabilitation, Zeitschrift für praxisnahe Medizin*, 1980, 21: 53-57.
138. Soulimani R., Younas C., Fleurentin J., Mortier F., Misslin R., Derrieux G. Neurotropic action of the hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* in the mouse. *Planta Medica*, 1991, 57 (2): 105-109.
139. Sroka Z., Gamian A., Cisowski W. Niskocząsteczkowe związki przeciwutleniające pochodzenia naturalnego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2005, 59: 34-41.
140. Steinegger E, O. Sticher, Hänsel R. *Pharmakognosie- Phytopharmazie*. Springer Verlag, Berlin, 1999.
141. Sugawara K., Webster FH. Oat utilization: past, present and future. Oast, Chemistry and Technology American Association of Cereal Chemists (AACC), Saint Paul, 1986, 413-430.
142. Sultana B., Anwar F., Ashraf M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant. Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules* 2009, 14: 2167-2180.
143. Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules* 2009, 14: 2167-2180.
144. Szafer W., Kulczyński S., Pawłowski B. *Rośliny polskie*. PWN, W-wa, 1976.
145. Szumny D., Szypuła E., Szydłowski M. Leki roślinne stosowane w chorobach układu oddechowego. *Dental and Medical Problems*, 2007, 44 (4): 507-510.
146. Szweykowska A., Szweykowski J. *Słownik botaniczny*. Wydanie II, Warszawa, 2003, 766-767.
147. Szymanowski T. Kiedy wprowadzone zostały obce gatunki drzew do uprawy w Polsce. *Roczniki Sekcji Dendrologicznej Polskiego Towarzystwa Botanicznego*, 1996, 14, 81.
148. Tagashira M., Ohtake Y. A new antioxidative 1, 3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. *Planta Medica*, 1998, 64: 555-558.
149. Tea S., Celsis P., Clanet M., Marc-Vergnes JP. Effets clinique hemodynamique et metaboliques de l' extrait de *Ginkgo biloba* en pathologie vasculaire cerebrale. *Gazette Medicale de France*, 1979; 86: 4149-4152.
150. Thieme H., Kitz C. Uber das Vorkommen von Flavonoiden in *Melissa officinalis*. *Pharmazie*, 1973, 28: 69-70.
151. Tittel G., Wagner H., Bos R., Chemical composition of the essential oil from *Melissa*. *Planta Medica*, 1982, 46: 91-98.
152. Tutin TG., Heywood VH., Burges NA., Moore DM., Valentine DH. *Flora Europaea*, 1973.
153. Quaranta L., Bettelli S., Uva MG., Semeraro F., Turano R., Gandolfo E. Effect of *Ginkgo biloba* extract on preexisting visual field damage i normal tension glaucoma. *Ophthalmology*, 2003, 110 (2): 359-362.
154. Vennat B., Gross D., Pourrat A., Pourrat H. *Hamamelis virginiana*: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 1992, 67(1): 11-14.
155. Vaverkova S., Tekel J., Holla M. The effect of herbicides on the qualitative properties of *medicinal plants*. Part 3: Content and composition of the essential oil from *Melissa officinalis* L. after application of basagran. *Pharmazie*, 1995, 50: 835-836.
156. Wawer J. Antocyjanidyny, struktura i działanie antyoksydacyjne. *Farmacja Polska*, 2001, 57(15): 728-731.
157. Wawer J., Ambroziak S., Klekot K., Tendaj R., Żyrkowska M. Owoce jagodowe kopalnią antyoksydantów i źródłem zdrowia. *Zdrowie i uroda*, 2012, 4/1: 4-7, 12- 16, 52- 61.

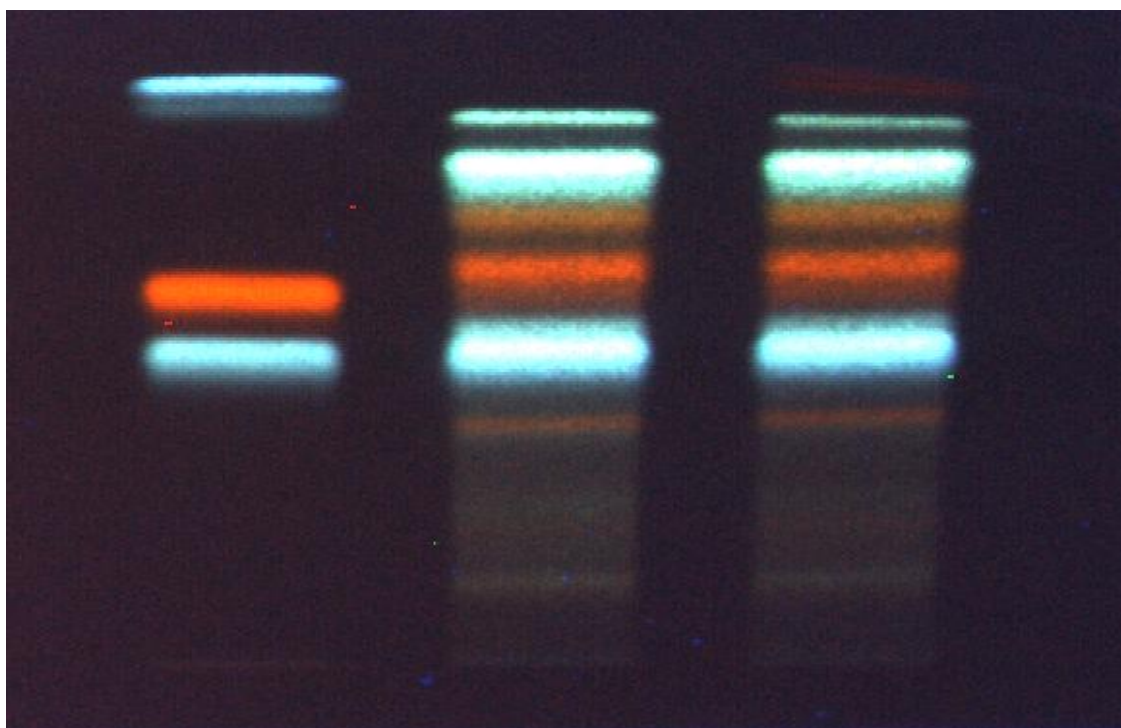
158. Weinges K., Bähr W., Kloss P. Übersicht über die Inhaltsstoffe aus den Blättern des Ginkgo- Baumes (*Ginkgo biloba L.*). *Arzneimittel- Forschung*, 1968, 18: 537-539.
159. Wichtl M. *Herbal drugs and pharmaceuticals*. Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, 2004.
160. Widy-Tyszkiewicz E., Schminda R. A randomized double blind study of sedative effects of phytotherapeutic containing valerian, hops, balm and motherwort versus placebo. *Herba Polonica*, 1997; 43(2): 154-159.
161. Wilska-Jeszka J. Polifenole, glukozytolany i inne związki prozdrowotne i antyżywnościowe. *Chemia żywności. Tom I. Składniki żywności*. WNT, Warszawa, 2007, 206-226.
162. Yao LH., Jiang YM., Shi J., Tomas-Barberan FA., Datta N., Singanusong R., Chen SS. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Human Nutrition*, 2004, 59: 113-122.
163. Yaoitay Y., Suzuki N., Kikuchi M. Structures of new Sesquiterpenoids from *Farfarae flos*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 49(5): 645-648.
164. Zänglein A., Schultze W., Wolf E. Melissenblätter. Ein Beitrag zur neuen Monographie im Europäischen Arzneibuch. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 1995, 17-35.
165. <http://e-centrumogrodnicze.pl/produkt/rosliny---drzewa-i-krzewy/sadzonki-z-okrytym-systemem-korzeniowym/iglaste/milorzab-japonski-998.html>
166. http://pl.wikipedia.org/wiki/Melisa_lekarska
167. <http://pl.wikipedia.org/wiki/Oczar>
168. <http://pl.wikipedia.org/wiki/Owies>

X. DOKUMENTACJA

Zawarta poniżej dokumentacja została wykonana w Laboratorium Zakładów Zielarskich Phytopharm Klęka S.A.

Tinctura Farfarae^Δ, *Succus Farfarae*^Δ

Chromatogram potwierdzający obecność flawonoidów w preparatach



1

2

3

Lp	Próbka
1	Substancje wzorcowe wg wzrastającego Rf.: kwas chlorogenowy, hyperozyd, kwas kawowy
2	<i>Succus Farfarae</i> s.090591
3	<i>Tinctura Farfarae</i> s.090591

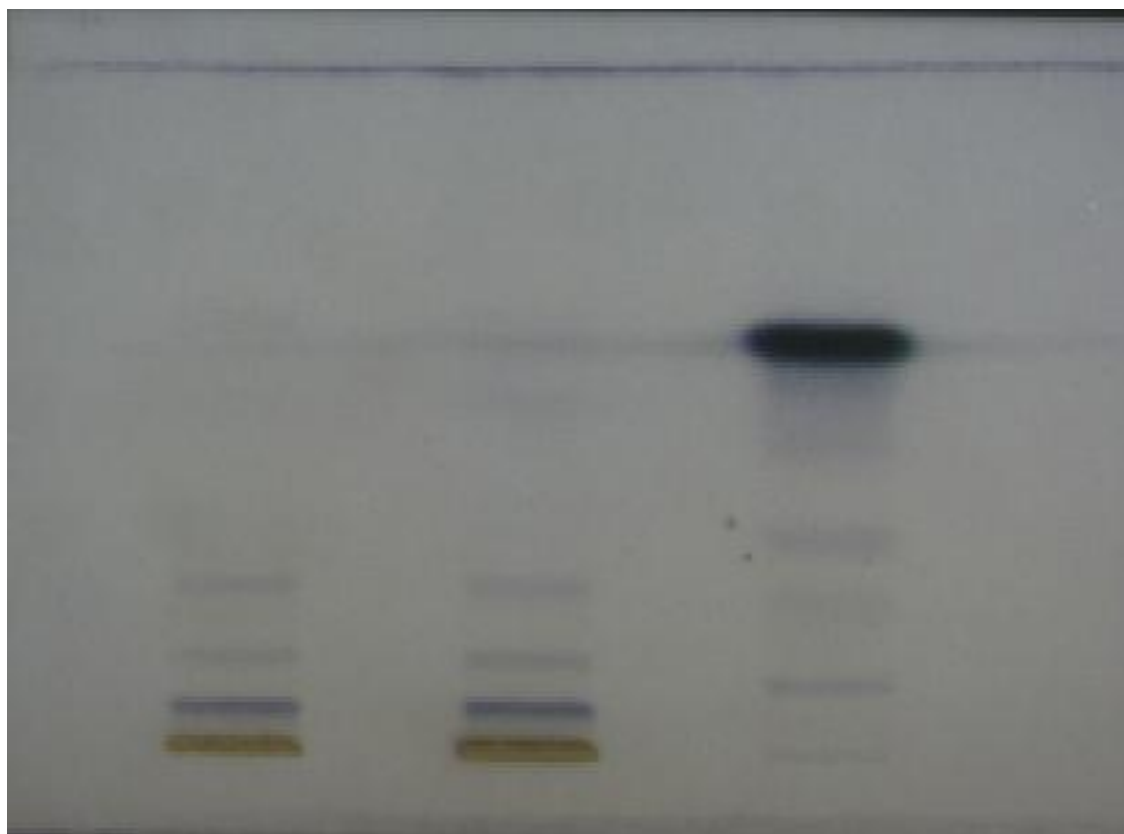
Warunki chromatograficzne

Faza stacjonarna	Szklana, plastikowa z żelem krzemionkowym 60 F ₂₅₄ , firmy Merck
Faza rozwijająca	Octan etylu - kwas mrówkowy - kwas octowy - woda [100:11:11:27]
Szerokość traku	20 mm
Droga rozwijania	ok.9 cm
Objętość próbek	próby: 20 µl, wzorzec: 10 µl
Wzorzec	rutozyd c= 0,1% (m/v) w metanolu kwas kawowy c= 0,1% (m/v) w metanolu
Odczynnik wywołujący	- NP (Natural produkt reagent A, boran 2-aminoetylowo-difenyłowy), roztwór o c=1% (m/v) w metanolu, - PEG (glikol polietylenowy 4000) roztwór o c= 5% (m/v) w etanolu
Derywatyżacja	Po wysuszeniu na powietrzu płytkę ogrzewano przez ok. 5 - 10 min w suszarce w temp. 105°C . Jeszcze ciepłą płytkę spryskano odczynnikami NP i PEG.
Detekcja	UV 366nm

Przygotowanie próby: 1 ml badanego preparatu zmieszać z 5 ml metanolu i przesączyć przez filtr membranowy.

Tinctura Melissa•, *Succus Melissa*•

Chromatogram potwierdzający obecność terpenów w preparatach



1

2

3

Lp	Próbka
1	<i>Tinctura Melissa</i> s.090691
2	<i>Succus Melissa</i> s.090691
3	Substancja wzorcowa cytronellal

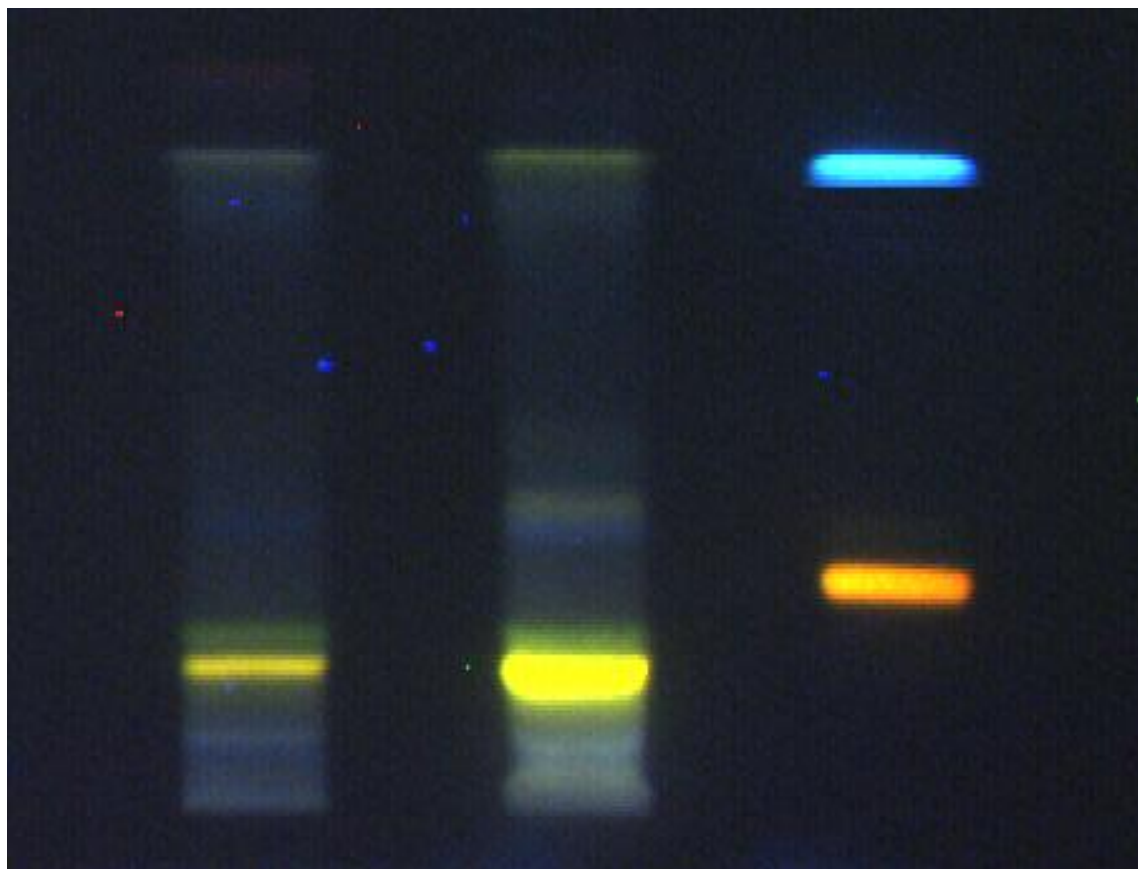
Warunki chromatograficzne

Faza stacjonarna	Szklana, plastikowa z żelem krzemionkowym 60 F ₂₅₄ , firmy Merck
Faza rozwijająca	Toluen -octan etylu [93:7]
Szerokość traku	10 mm
Droga rozwijania	ok.9 cm
Objętość próbek	próby: 20 µl, wzorzec: 5 µl
Wzorzec	cytronellal c= 6,5mg/ml (m/v) w toluenie
Odczynnik wywołujący	- kwas siarkowy stężony roztwór o c=5% (m/v) w etanolu, - wanilina roztwór o c=1% (m/v) w etanolu,
Derywatywacja	Po wysuszeniu na powietrzu płytkę spryskać roztworem kwasu siarkowego a następnie roztworem waniliny i ogrzewać przez ok. 5 - 10 min w suszarce w temp. 105°C .
Detekcja	Vis

Przygotowanie próby: Nałożenie bezpośrednie.

Tinctura Avenae[■], *Succus Avenae*[■]

Chromatogram potwierdzający obecność flawonoidów w preparatach



1

2

3

Lp	Próbka
1	<i>Tinctura Avenae</i> s.090791
2	<i>Succus Avenae</i> s.090791
3	Substancje wzorcowe wg wzrastającego Rf.: rutozyd, kwas kawowy

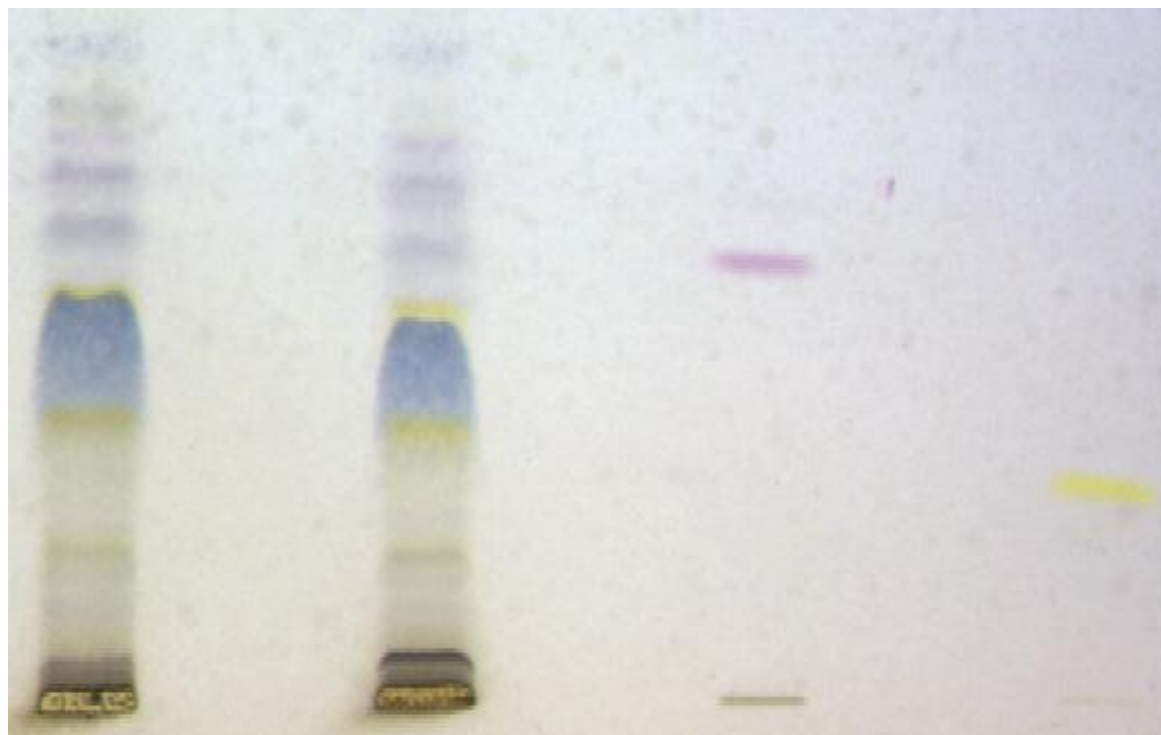
Warunki chromatograficzne

Faza stacjonarna	Szklana, plastikowa z żelem krzemionkowym 60 F ₂₅₄ , firmy Merck
Faza rozwijająca	Octan etylu - kwas mrówkowy - kwas octowy - woda [100:11:11:27]
Szerokość traku	15 mm
Droga rozwijania	ok.9 cm
Objętość próbek	próby: 20 µl, wzorzec: 10 µl
Wzorzec	rutozyd c= 0,1% (m/v) w metanolu kwas kawowy c= 0,1% (m/v) w metanolu
Odczynnik wywołujący	- NP (Natural produkt reagent A, boran 2-aminoetylowo-difenyłowy), roztwór o c=1% (m/v) w metanolu, - PEG (glikol polietylenowy 4000) roztwór o c= 5% (m/v) w etanolu
Derywatyzacja	Po wysuszeniu na powietrzu płytkę ogrzać przez ok. 5 - 10 min w suszarce w temp. 105°C . Jeszcze ciepłą płytkę spryskać odczynnikami NP i PEG.
Detekcja	UV 366nm

Przygotowanie próby: Nałożenie bezpośrednie.

Tinctura Ginkgo**, *Succus Ginkgo*

Chromatogram potwierdzający obecność bilobalidów w preparatach



1

2

3

4

Lp	Próbka
1	<i>Tinctura Ginkgo</i> s.090991
2	<i>Succus Ginkgo</i> s.090991
3	Substancja wzorcowa: tymoloftaleina
4	Substancja wzorcowa: fluoresceina

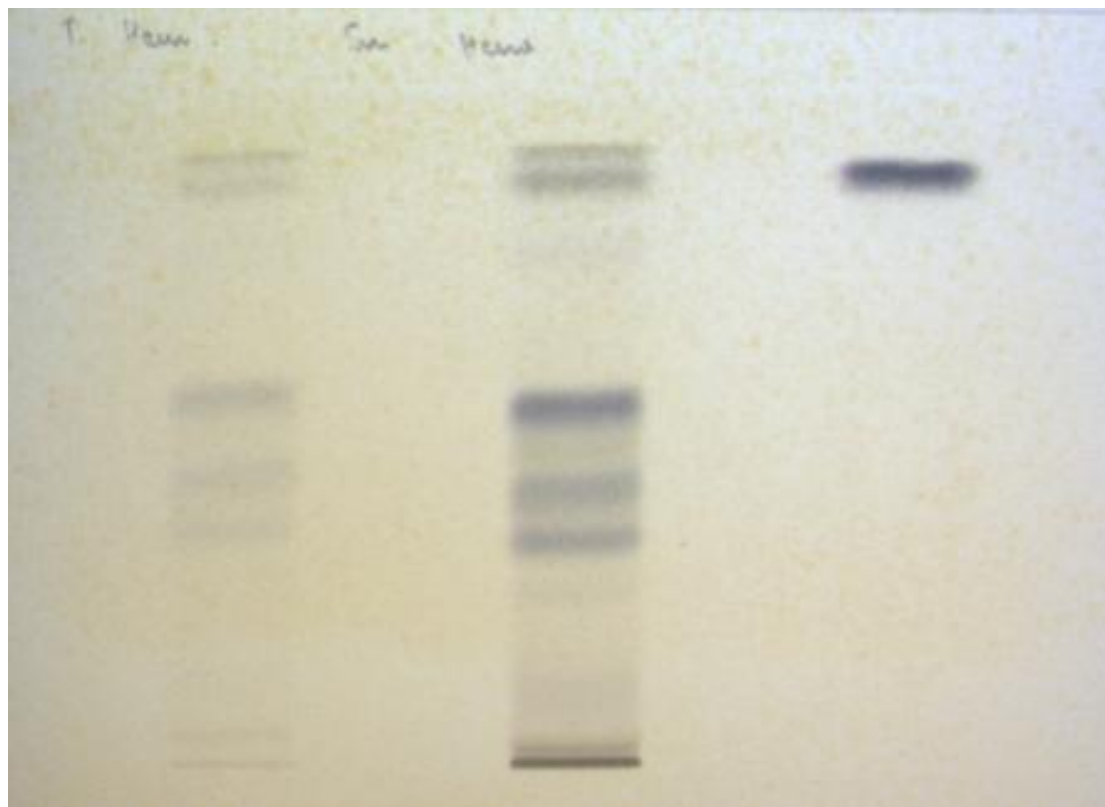
Warunki chromatograficzne

Faza stacjonarna	Szklana, plastikowa z żelem krzemionkowym 60 F ₂₅₄ , firmy Merck
Faza rozwijająca	Toluen - aceton [7:3]
Szerokość traku	10 mm
Droga rozwijania	ok.9 cm
Objętość próbek	próby: 40 µl, wzorzec: 10 µl
Wzorzec	tymoloftaleina c= 0,05% (m/v) w metanolu fluoresceina c= 0,05% (m/v) w metanolu
Odczynnik wywołujący	do 0,5 ml aldehydu anyżowego dodać w następującej kolejności: 10,0 ml kwasu octowego lodowatego, 85,0 ml metanolu i 5,0 ml kwasu siarkowego stężonego
Derywatywacja	Chromatogram wysuszyć na powietrzu, spryskać odczynnikiem wywołującym a następnie ogrzewać 5-10 minut w temp. 100-105°C.
Detekcja	światło widzialne (VIS)

Przygotowanie próby: Nałożenie bezpośrednie.

Tinctura Hamamelidis^o, *Succus Hamamelidis*^o

Chromatogram potwierdzający obecność garbników w preparatach



1

2

3

Lp	Próbka
1	<i>Tinctura Hamamelidis</i> s.091091
2	<i>Succus Hamamelidis</i> s.091091
3	Substancja wzorcowa kwas galusowy

Warunki chromatograficzne

Faza stacjonarna	Płytką z żelem krzemionkowym 60
Faza rozwijająca	Kwas mrówkowy- stężony –woda- mrówczan etylu [10:10:80]
Szerokość traku	15 mm
Droga rozwijania	ok.8 cm
Objętość próbek	próby: 10 µl, wzorzec: 10 µl
Wzorzec	Kwas galusowy c= 0,1% (m/v) w metanol
Odczynnik wywołujący	chlerek żelaza (III) sześciowodny o c=13g/l (m/v)
Derywatyżacja	Po wysuszeniu na powietrzu płytkę ogrzewać przez 10 min w suszarce w temp. 100-105°C a następnie po ochłodzeniu spryskać odczynnikiem wywołującym.
Detekcja	Vis

Przygotowanie próby: Nałożenie bezpośrednie.

Analizy wykonane w Laboratorium Zakładów Zielarskich Phytopharm Kłęka S.A. przez dr Aldonę Krawczyk