

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

**KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOGNOZJI**

**MICHAŁ WYSOCKI**

**ZWIĄZKI POLIFENOLOWE W ZIELU  
DYMNICY LEKARSKIEJ  
(*FUMARIA OFFICINALIS*)**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**PROMOTOR**

**Prof. dr hab. n. farm. Irena Matławska**

**Poznań, 2014**

**POZNAN UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES**  
**CHAIR AND DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY**

**MICHAŁ WYSOCKI**

**POLYPHENOLIC COMPOUNDS FROM  
THE HERB OF EARTH SMOKE  
(*FUMARIA OFFICINALIS*)**

**PHD THESIS**

**SUPERVISOR**

**Professor Irena Matławska**

**Poznań, 2014**

*Promotorowi mojej pracy*  
***Pani prof. dr hab. n. farm. Irenie Matławskiej***  
*składam serdeczne podziękowania za nieocenioną pomoc*  
*i opiekę podczas realizacji niniejszej pracy*

*Wszystkim, którzy nigdy we mnie nie zawąpili  
z całego serca dziękuję*

**SPIS TREŚCI**



---

---

<b>Wstęp</b> .....	13
<b>Część teoretyczna</b> .....	16
1. Klasyfikacja taksonomiczna <i>Fumaria officinalis</i> L. ....	17
2. Charakterystyka botaniczna rodziny <i>Fumariaceae</i> .....	19
3. Charakterystyka botaniczna <i>Fumaria officinalis</i> L. ....	21
4. Związki chemiczne w <i>Fumaria officinalis</i> L. ....	26
5. Działanie farmakologiczne <i>Fumaria officinalis</i> L. ....	33
6. Zastosowanie <i>Fumaria officinalis</i> L. ....	39
7. Przeciwwskazania, działania niepożądane, interakcje oraz toksyczność .....	42
<b>Cel pracy</b> .....	44
<b>Część doświadczalna</b> .....	46
8. Metodyka badań .....	47
8.1. Materiał do badań .....	47
8.1.1. Oznaczenie straty masy po suszeniu .....	47
8.2. Izolacja i identyfikacja flawonoidów .....	47
8.2.1. Odczynniki i substancje wzorcowe .....	47
8.2.2. Aparatura .....	49
8.2.3. Przygotowanie i frakcjonowanie wyciągu podstawowego .....	49
8.2.4. Metody chromatograficzne .....	50
8.2.4.1. Chromatografia planarna.....	50
8.2.4.1.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) .....	50
8.2.4.1.2. Chromatografia bibułowa (PC) .....	51
8.2.4.1.3. Preparatywna chromatografia bibułowa (PPC) .....	51
8.2.4.2. Chromatografia kolumnowa klasyczna (CC) .....	52
8.2.5. Analiza spektralna .....	53
8.2.5.1. Analiza w nadfiolecie (UV).....	53
8.2.5.2. Wysokosprawną chromatografią cieczą sprężoną z detektorem mas HPLC-DAD-ESI-MS .....	53
8.2.5.3. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) .....	54
8.2.6. Hydroliza kwasowa .....	54
8.3. Analiza kwasów fenolowych .....	55
8.3.1. Odczynniki i substancje wzorcowe .....	55
8.3.2. Aparatura i oprogramowanie .....	56

---

---

8.3.3. Przygotowanie wyciągów .....	56
8.3.3.1. Frakcja eteru etylowego do analizy jakościowej (2D-TLC) .....	56
8.3.3.2. Wyciąg do określenia profilu kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA .....	56
8.3.4. Metody chromatograficzne .....	57
8.3.4.1. Chromatografia cienkowarstwowa dwukierunkowa (2D-TLC) .....	57
8.3.4.2. Ultrasprawa chromatografia cieczowa (UPLC-PDA) .....	57
8.4. Badania ilościowe .....	58
8.4.1. Odczynniki i substancje wzorcowe .....	58
8.4.1.1. Do oznaczania zawartości sumy polifenoli .....	58
8.4.1.2. Do oznaczania zawartości flawonoidów .....	58
8.4.1.3. Do oznaczania zawartości kwasów fenolowych .....	59
8.4.2. Aparatura .....	59
8.4.3. Przygotowanie wyciągów .....	60
8.4.3.1. Wyciągi podstawowe .....	60
8.4.3.1.1. Wyciąg metanolowo-wodny podstawowy (MWP) .....	60
8.4.3.1.2. Nalewka podstawowa (NP) .....	60
8.4.3.1.3. Odwar podstawowy (OP) .....	60
8.4.3.2. Wyciągi do oznaczeń ilościowych .....	61
8.4.3.2.1. Do oznaczania zawartości sumy polifenoli .....	61
8.4.3.2.1.1. Wyciąg metanolowo-wodny .....	61
8.4.3.2.1.2. Nalewka .....	61
8.4.3.2.1.3. Odwar .....	61
8.4.3.2.2. Do oznaczania zawartości flawonoidów .....	61
8.4.3.2.2.1. Wyciąg z ziela dymnicy (wg FP IX) .....	61
8.4.3.2.2.2. Nalewka .....	62
8.4.3.2.2.3. Odwar .....	62
8.4.3.2.3. Do oznaczania zawartości kwasów fenolowych .....	62
8.4.3.2.3.1. Wyciąg metanolowo-wodny .....	63
8.4.3.2.3.2. Nalewka .....	63
8.4.3.2.3.3. Odwar .....	63
8.5. Badania aktywności biologicznej .....	63
8.5.1. Odczynniki, bufony, pożywki, podłoża, żele i szczepy wzorcowe .....	63
8.5.1.1. Do badania aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS .....	63

---

---

8.5.1.2. Do badania aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem komórek drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pozbawionych genu <i>sod1</i> .....	64
8.5.1.2.1. Do hodowli drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	64
8.5.1.2.2. Do oznaczania poziomu karbonylacji białek .....	64
8.5.1.2.3. Do oznaczania poziomu zużycia tlenu przez komórki drożdży ..	66
8.5.1.3. Do badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej .....	67
8.5.2. Aparatura i oprogramowanie .....	67
8.5.3. Przygotowanie wyciągów .....	68
8.5.3.1. Do badania aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS .....	68
8.5.3.1.1. Nalewka .....	68
8.5.3.1.2. Odwar .....	68
8.5.3.2. Do badania aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem komórek drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pozbawionych genu <i>sod1</i> .....	68
8.5.3.2.1. Nalewka i odwar .....	68
8.5.3.3. Do badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej .....	69
8.5.3.3.1. Nalewka i odwar .....	69
8.6. Analiza statystyczna .....	69
9. Wyniki .....	71
9.1. Izolacja i identyfikacja flawonoidów .....	71
9.1.1. Izolacja związków flawonoidowych .....	71
9.1.1.1. Rozdział frakcji octanu etylu i frakcji wodnej .....	72
9.1.1.1.1. Rozdział frakcji 39-54, 56-87, 92-140, 142-169 .....	72
9.1.1.1.2. Rozdział frakcji 42-64, 68-107 .....	73
9.1.1.2. Oczyszczanie frakcji związków flawonoidowych .....	73
9.1.2. Identyfikacja związków flawonoidowych .....	75
9.1.2.1. Związek 1 .....	75
9.1.2.2. Związek 2 .....	82
9.1.2.3. Związek 3 .....	88
9.1.2.4. Związek 4 .....	95
9.1.2.5. Związek 5 .....	102
9.1.2.6. Hydroliza kwasowa wyizolowanych związków flawonoidowych ...	109
9.2. Analiza kwasów fenolowych .....	110



---

---

9.2.1. Analiza jakościowa (2D-TLC) .....	110
9.2.2. Określenie profilu kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA .....	111
9.2.2.1. Przygotowanie prób do badań .....	115
9.2.2.2. Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych w wyciągu .....	117
9.3. Badania ilościowe .....	123
9.3.1. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli z odczynnikiem <i>Folin-Ciocalteu</i> w przeliczeniu na kwas galusowy .....	123
9.3.1.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu galusowego .....	123
9.3.1.1.1. Przygotowanie roztworu podstawowego kwasu galusowego (1,0 mg/mL) .....	123
9.3.1.1.2. Przygotowanie rozcieńczeń roztworu podstawowego (0,02 – 0,08 mg/mL) .....	123
9.3.1.1.3. Wykonanie oznaczenia .....	123
9.3.1.2. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach .....	126
9.3.1.2.1. Zawartość sumy polifenoli w nalewce .....	126
9.3.1.2.2. Zawartość sumy polifenoli w odwarze .....	127
9.3.1.2.3. Zawartość sumy polifenoli w wyciągu metanolowo-wodnym ...	128
9.3.2. Oznaczenie zawartości sumy flawonoidów w przeliczeniu na kwercetynę .....	129
9.3.2.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowej kwercetyny .....	129
9.3.2.1.1. Przygotowanie roztworu podstawowego kwercetyny (0,2 mg/mL) .....	129
9.3.2.1.2. Przygotowanie rozcieńczeń roztworu podstawowego (4,0 – 22,0 µg/mL) .....	130
9.3.2.1.3. Wykonanie oznaczenia .....	130
9.3.2.2. Oznaczenie zawartości flawonoidów w wyciągach .....	133
9.3.2.2.1. Zawartość flawonoidów w nalewce .....	134
9.3.2.2.2. Zawartość flawonoidów w odwarze .....	135
9.3.2.2.3. Zawartość flawonoidów w wyciągu z ziela dymnicy (wg FP IX) .....	136
9.3.3. Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy .....	137

---

---

9.3.3.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu kawowego .....	137
9.3.3.1.1. Przygotowanie roztworu podstawowego kwasu kawowego (0,2 mg/mL) .....	137
9.3.3.1.2. Przygotowanie rozcieńczeń roztworu podstawowego (4,8 – 33,6 µg/mL) .....	137
9.3.3.1.3. Wykonanie oznaczenia .....	137
9.3.3.2. Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych w wyciągach .....	140
9.3.3.2.1. Zawartość kwasów fenolowych w nalewce .....	140
9.3.3.2.2. Zawartość kwasów fenolowych w odwarze .....	141
9.3.3.2.3. Zawartość kwasów fenolowych w wyciągu metanolowo-wodnym .....	142
9.4. Badania aktywności biologicznej .....	144
9.4.1. Aktywność antyoksydacyjna .....	144
9.4.1.1. Badanie aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS .....	144
9.4.1.1.1. Przygotowanie roztworu kationorodników ABTS <sup>•+</sup> .....	144
9.4.1.1.2. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej substancji referencyjnych .....	144
9.4.1.1.2.1. Przygotowanie roztworów podstawowych .....	144
9.4.1.1.2.2. Przygotowanie rozcieńczeń roztworów podstawowych .....	145
9.4.1.1.2.3. Wykonanie oznaczenia .....	145
9.4.1.1.2.4. Wyznaczenie IC <sub>50</sub> .....	146
9.4.1.1.3. Badanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów .....	152
9.4.1.2. Badanie aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem komórek drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pozbawionych genu <i>sod1</i> .....	156
9.4.1.2.1. Materiał do badań .....	156
9.4.1.2.2. Hodowla drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	157
9.4.1.2.3. Modyfikacje hodowli drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	157
9.4.1.2.4. Testy przeżywalności .....	158
9.4.1.2.5. Wyznaczenie poziomu karbonylacji białek .....	162
9.4.1.2.5.1. Preparacja ekstraktów komórkowych .....	162
9.4.1.2.5.2. Pomiar stężenia białka metodą Bradford .....	163
9.4.1.2.5.3. Przygotowanie ekstraktów komórkowych do elektroforezy .....	163

9.4.1.2.5.4. Western blot .....	163
9.4.1.2.6. Oznaczanie pomiaru zużycia tlenu przez komórki drożdży .....	165
9.4.2. Aktywność przeciwbakteryjna .....	165
9.4.2.1. Wykonanie badania .....	165
9.4.2.2. Wyniki .....	166
<b>Omówienie wyników i dyskusja .....</b>	<b>167</b>
<b>Wnioski .....</b>	<b>193</b>
<b>Streszczenie .....</b>	<b>196</b>
<b>Summary .....</b>	<b>199</b>
<b>Spis tabel .....</b>	<b>202</b>
<b>Spis rycin .....</b>	<b>207</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>213</b>

## OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

<b>ABTS-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	- sól diamoniowa kwasu 2,2'-azyno-bis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego)
<b>APS</b>	- nadsiarczan amonu
<b>BSA</b>	- albumina surowicy wołu
<b>DMSO</b>	- dimetylosulfotlenek
<b>DNP</b>	- 2,4-dinitrofenylohydrazyna
<b>ECL</b>	- wzmocniona chemiluminescencja
<b>FCCP</b>	- 4-(trifluorometoksy)fenylohydrazon cyjanku karbonylu
<b>GHP</b>	- membrana z hydrofilowego polipropylenu
<b>HLB</b>	- równowaga hydrofilowo-lipofilowa
<b>MAX</b>	- złożę o mieszanym działaniu wymiennicza anionowego i hydrofobowym
<b>·OH</b>	- rodnik hydroksylowy
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	- anionrodnik ponadtlenkowy
<b>PBS</b>	- zbuforowany fizjologiczny roztwór soli o pH=6,9
<b>PMSF</b>	- fluorek fenylometylosulfonylu
<b>RFT</b>	- reaktywne formy tlenu
<b>SDS</b>	- dodecylosiarczan sodu
<b>sod1</b>	- gen Cu/Zn zależnej nadtlenkowej dysmutazy SOD1
<b>TBT</b>	- tributyllocyna
<b>TCA</b>	- kwas trójchlorooctowy
<b>TEMED</b>	- N,N,N',N'-tetrametylenodiamina
<b>TMPD</b>	- N,N,N',N'-tetrametylo- <i>p</i> -fenylenodiamina
<b>TRIS</b>	- tris(hydroksymetylo)aminometan

**WSTEP**



*„Co wiemy, to tylko kropelka.  
Czego nie wiemy, to cały ocean.”*  
**Isaac Newton (1643-1727)**

Historia farmacji i medycyny liczy niemal tyle samo lat, co historia cywilizacji. Wiemy dziś na pewno, że zawód lekarza znany już był w starożytnej Mezopotamii, a egipscy kapłani dysponowali długą listą leków oraz środków leczniczych, pochodzenia naturalnego. Przez setki lat ludzie szukali najlepszych i najefektywniejszych leków i terapii, mających uczynić życie człowieka wolnym od chorób i bólu. Intensywny rozwój techniki, wdrażanie nowych technologii, a także innowacyjnych metod produkcji w XX i XXI wieku zdecydowanie ułatwiło przeprowadzanie syntez chemicznych i prowadzenie badań nad substancjami chemicznymi, ich właściwościami oraz mechanizmami działania. Leki syntetyczne, ratujące życie w ostrych stanach, stosowane w chorobach przewlekłych, przez długi okres czasu i w dużych dawkach, mogą być przyczyną licznych działań ubocznych.

W ostatnich latach coraz więcej zwolenników zyskuje moda na zdrowy tryb życia, rozumiany jako powrót do surowców naturalnych, jak najmniej przetworzonych. Niewątpliwie tempo życia w XXI wieku, stale towarzyszący nam stres wraz z coraz powszechniejszą świadomością, dotyczącą ujemnych skutków stosowania substancji chemicznych, chociażby takich jak konserwanty, sztuczne barwniki, aromaty, a także leki, skutkuje społecznym lękiem przed „chemią”. Zatem coraz uważniej czytamy etykiety na opakowaniach, coraz częściej sięgamy po produkty naturalne w przeświadczeniu, że są one najlepszymi, a zarazem najbezpieczniejszymi dla naszego organizmu.

Wielokrotnie w swojej praktyce zawodowej, spotykałem się z pacjentami, poszukującymi leków pochodzenia roślinnego jako alternatywy dla leku syntetycznego. Należy pamiętać że wiele związków roślinnych, zaliczanych jest do substancji silnie i bardzo silnie działających. Stosowanie ziół bez należytej świadomości może powodować więc poważne skutki uboczne i działania niepożądane, włącznie z zagrożeniem życia.

Odpowiedzią rynku farmaceutycznego na zapotrzebowanie społeczeństwa oraz aktualne trendy było pojawienie się na aptecznych półkach ogromnych ilości suplementów diety, w skład których wchodzi substancje naturalne, bądź wyciągi

roślinne. Wprowadzenie do obrotu takich preparatów jest stosunkowo łatwe, a ich skład nie podlega praktycznie żadnej kontroli ze strony jednostek nadzorczych. Producenci suplementów sięgają często po surowce roślinne, które nie posiadają standaryzacji i nie spełniają kryteriów bezpieczeństwa. Nie tylko jakość, ale nawet dobór składników niektórych roślinnych suplementów diety można określić jako kontrowersyjny.

W zaistniałej sytuacji niezwykle istotne wydaje się podjęcie ze wzmoczoną intensywnością badań nad lekiem roślinnym. Ważne są tutaj nie tylko poszukiwania nowych roślin o potencjalnym działaniu leczniczym, ale także analiza znanych już surowców roślinnych, stosowanych od lat w medycynie ludowej. Często potwierdzenie występowania w powszechnie znanej roślinie, nowej grupy związków, wiąże się z przypisaniem jej nowych wskazań leczniczych, bądź zwróceniem uwagi na jej potencjalne działania niepożądane z przeciwwskazaniami do stosowania. Gruntowne badania mogłyby stać się również przesłanką do zmian przepisów prawa w zakresie wprowadzania do obrotu preparatów leczniczych, zawierających w składzie surowce roślinne.

Właściwości lecznicze dymnicy lekarskiej znane były od wieków, co skutkowało stosowaniem jej w medycynie ludowej. Jednak dopiero na przełomie XX i XXI wieku zostały z ziela wyodrębnione i zidentyfikowane liczne alkaloidy. Ostatnie lata przyniosły natomiast zainteresowanie badaczy, innymi grupami związków ziela dymnicy lekarskiej. Niezależnie od podjętych w 2010 roku przeze mnie badań nad związkami polifenolowymi, ziele dymnicy wzbudziło też zainteresowanie badaczy w innych ośrodkach.

Badania *Fumaria officinalis* L., powinny być kontynuowane, szczególnie w kierunku dotąd mało poznanej aktywności farmakologicznej, tym bardziej, że na rynku farmaceutycznym dostępne jest zarówno ziele dymnicy - *Fumariae herba* jak i preparaty zawierające wyciągi z ziela.

**CZĘŚĆ  
TEORETYCZNA**





**1. KLASYFIKACJA TAKSONOMICZNA *FUMARIA OFFICINALIS* L.**

<b>Królestwo:</b>	<i>Eucaryota</i> – Jądrowe
<b>Podkrólestwo:</b>	<i>Phytobionta (Plantae)</i> – Rośliny
<b>Gromada:</b>	<i>Spermatophyta</i> – Rośliny nasienne
<b>Podgromada:</b>	<i>Angiospermae (Magnoliophytina)</i> – Okrytonasienne (Okrytozalążkowe)
<b>Klasa:</b>	<i>Dicotyledoneae</i> – Dwuliścienne
<b>Podklasa:</b>	<i>Magnoliidae (Polycarpicae)</i> – Magnoliowcowe
<b>Rząd:</b>	<i>Papaverales</i> – Makowce
<b>Rodzina:</b>	<i>Fumariaceae</i> – Dymnicowate
<b>Gatunek:</b>	<i>Fumaria officinalis</i> L. – Dymnica pospolita

(Pałczyński i Podbielkowski 1994)

<b>Królestwo:</b>	<i>Plantae</i> - Rośliny
<b>Podkrólestwo:</b>	<i>Tracheobionta</i> – Rośliny naczyniowe
<b>Gromada:</b>	<i>Spermatophyta</i> – Rośliny nasienne
<b>Podgromada:</b>	<i>Magnoliophyta</i> – Rośliny okrytonasienne
<b>Klasa:</b>	<i>Magnoliopsida</i> - Dwuliścienne
<b>Podklasa:</b>	<i>Magnoliidae</i> - Magnoliowe
<b>Rząd:</b>	<i>Papaverales</i> - Makowce
<b>Rodzina:</b>	<i>Fumariaceae</i> - Dymnicowate
<b>Rodzaj:</b>	<i>Fumaria</i> L. - Dymnica
<b>Gatunek:</b>	<i>Fumaria officinalis</i> L. – Dymnica pospolita

([www.plants.usda.gov](http://www.plants.usda.gov))

<b>Królestwo:</b>	<i>Eukaryota</i> - Jądrowe
<b>Podkrólestwo:</b>	<i>Phytobionta</i> – Rośliny
<b>Gromada:</b>	<i>Telomophyta (Embryophyta)</i> – Rośliny telomowe (Rośliny osiowe)
<b>Podgromada:</b>	Magnoliophytina ( <i>Angiospermae</i> ) – Okrytozalążkowe
<b>Klasa:</b>	<i>Magnoliopsida (Dicotyledones)</i> - Dwuliścienne
<b>Podklasa:</b>	<i>Ranunculiiidae</i> - Jaskrowe
<b>Rząd:</b>	<i>Papaverales</i> - Makowce
<b>Rodzina:</b>	<i>Fumariaceae</i> - Dymnicowate
<b>Gatunek:</b>	<i>Fumaria officinalis</i> L. – Dymnica pospolita

(Szweykowska i Szweykowski 1999)

## 2. CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA RODZINY *FUMARIACEAE*

Rodzina *Fumariaceae* składa się z 17 rodzajów, obejmujących ok. 530 gatunków roślin (Kubitzki i wsp. 1993). We florze polskiej występują rośliny należące do 2 rodzajów: *Corydalis* DC. (kokorycz) i *Fumaria* L. (dymnica) (Drobnik 2007; Szweykowska i Szweykowski 1993).

Rodzaj *Corydalis* DC. obejmuje głównie byliny, rosnące w lasach liściastych, które kwitną wczesną wiosną, jeszcze przed rozwinięciem się liści na drzewach (Szweykowska i Szweykowski 1993).

Rodzaj *Fumaria* L. liczy ok. 55 gatunków roślin rocznych, przeważnie pnących lub płożących (Bown 1999), z czego we florze Polski występuje tylko 8 z nich: *Fumaria capreolata* L. – dymnica wielkokwiatowa, *Fumaria densiflora* DC. – dymnica gęstokwiatowa, *Fumaria muralis* Sond. ex W.D.J. Koch – dymnica murowa, *Fumaria officinalis* L. – dymnica pospolita, *Fumaria parviflora* Lam. – dymnica wąskolistna, *Fumaria rostellata* Knaf – dymnica szerokodziałkowa, *Fumaria schleicheri* Soy.-Will. – dymnica różowa oraz *Fumaria vaillantii* Loisel. – dymnica drobnokwiatowa (Mirek i wsp. 2002).

Niektórzy autorzy do rodziny *Fumariaceae* zaliczają również gatunki należące do rodzaju *Dicentra* Borkh. ex Bernh. (serduszka), a sadzone w Polsce praktycznie wyłącznie w ogrodach (Rutkowski 1998).

Rośliny należące do rodziny *Fumariaceae* występują głównie na półkuli północnej na obszarach o klimacie umiarkowanym. Wiele gatunków uprawianych jest także w ogrodach ze względu na walory dekoracyjne (Szweykowska i Szweykowski 1993).



Rycina 1. Przedstawiciele rodzaju *Fumaria* L., *Corydalis* DC. oraz *Dicentra* Borkh. ex Bernh.

Gatunki z rodziny *Fumariaceae* nie posiadają soku mlecznego, w przeciwieństwie do gatunków z rodziny *Papaveraceae*, należącej również do rzędu *Papaverales*. Ich liście są często silnie podzielone (Szweykowska i Szweykowski 1993). Najbardziej charakterystyczną cechą tych roślin są grzbieciste kwiaty (rzadziej dwuboczne) o dwóch opadających działkach kielicha i czterech płatkach korony, z których jeden lub dwa wykształcają wyrostek o kształcie tępej ostrogi (Pałczyński i wsp. 1994; Szweykowska i Szweykowski 1993). Sześć pręcików zrosniętych jest ze sobą po trzy, tworząc dwa pęki (Rutkowski 1998; Szweykowska i Szweykowski 1993). Słupek jeden, górny, zbudowany jest z dwóch owocolistków. Owoc natomiast stanowi torebka lub rzadziej drobna niełupka (Szweykowska i Szweykowski 1993).

### 3. CHARAKTERYSTYKA BOTANICZNA *FUMARIA OFFICINALIS* L.

**Synonimy łacińskie:** *Fumaria media* Lois., *Fumaria sturmii* Op. (Nowiński 1983)

**Synonimy polskie:** dymnica pospolita, dymnica lekarska, dymówka, rutka polna, ptasia ruta, kokorycz lekarska, kokorycz lekarski (Kuźniewski i Augustyn-Puziewicz 1984)

**Synonimy angielskie:** common fumitory (Lewkowicz-Mosiej 2010), earth smoke, hedge fumitory, beggary, fumus, vapor, wax dolls (LaGow 2004)

**Synonimy francuskie:** fumeterre officinale (Lewkowicz-Mosiej 2010), herbe á la veuve, fiel de terre, herbe á la jaunisse (Goetz i wsp. 2009)

**Synonimy niemieckie:** echter Erdrauch, gewöhnlicher Erdrauch, gebräuchlicher Erdrauch (Goetz i wsp. 2009)

**Synonimy włoskie:** *Fumaria comune*, feccia, fumosterno (Goetz i wsp. 2009), cresta di gallo (van Wyk i Wink 2008)

**Synonimy hiszpańskie:** *Fumária oficial*, sangre de Cristo, fumdeterra, palomilla (Goetz i wsp. 2009)

Nazwa *fumaria* pochodzi od łacińskiego słowa „fumus” oznaczającego dym (Bown 1999). Pliniusz Stary określenie „fumus” stosował jako nazwę pewnej rośliny, której gryzący sok wyciska łzy z oczu, tak samo jak dym. Obecnie, uważa się że opis ten dotyczył dymnicy lekarskiej (Rejewski 1996).

Dymnica lekarska jest gatunkiem rodzimym prawdopodobnie dla obszaru śródziemnomorskiego (Jasiewicz 1985). Obecnie w stanie dzikim rośnie niemal w całej Europie i Azji, na wyspach Kanaryjskich, Maderze oraz w północnej Afryce (Lewkowicz-Mosiej 2012). Zasięg jej występowania obejmuje Europę bez Arktyki, cały rejon śródziemnomorski po Etiopię, dalej Syberię Zachodnią po rzekę Ob. Gatunek ten został również zawleczony do Ameryki Północnej (Bühning 2010; Nowiński 1983; Ożarowski i wsp. 1990).

W Polsce dymnica lekarska występuje jako chwast pól, ogrodów, ugorów i odłogów (Kuźniewski i Augustyn-Puziewicz 1984). Pospolita jest na całym niżu oraz niższych położeniach górskich (Broda i Mowszowicz 1996). Rozluźnienie stanowisk

daje się zauważyć na przedpolu Karpat i w Karpatach (Jasiewicz 1985; Szafer 1927). Dymnica lekarska preferuje gleby mineralno-próchnicze o obojętnym odczynie pH. Najczęściej rośnie na stanowiskach o umiarkowanym lub pełnym dostępie światła (Zarzycki i wsp. 2002).



Rycina 2. *Fumaria officinalis* L. – stan naturalny.

Dymnica lekarska jest wspinającą się rośliną roczną o barwie niebieskawo zielonej, posiadającą specyficzny zapach dymu (Anioł-Kwiatkowska i wsp. 1993; van Wyk i Wink 2008). Łodyga dymnicy lekarskiej jest wzniesiona lub dźwigająca się, gałęzista, bogato ulistniona. W miejscach zacienionych często pnąca się przy pomocy ogonków liściowych. Osiąga niekiedy wysokość do 50 cm (Jasiewicz 1985; Szafer 1927; Szafer i wsp. 1976).



Rycina 3. *Fumaria officinalis* L. – kwitnąca łodyga.

Liście są szarozielone, podwójnie pierzastodzielne, o odcinkach pierzasto- lub dłoniastodzielnych. Łatki liściowe zwykle równowąskolancetowate lub podługowate, czasem na szczycie łopatkowato rozszerzone (Broda i Mowszowicz 1996; Evans 2009; Kuźniewski i Augustyn-Puziewicz 1984; Mowszowicz 1980; Szafer i wsp. 1976). Liście dymnicy lekarskiej są bardzo zmiennej wielkości, łatki liściowe osiągają najczęściej 2 – 3 mm szerokości (Jasiewicz 1985).



Rycina 4. *Fumaria officinalis* L. – liście.

Kwiaty są drobne, różnej długości, grzbieciste, zebrane w zwarte groniaste kwiatostany (Kuźniewski i Augustyn-Puziewicz 1984; Mowszowicz 1980; Ożarowski i wsp. 1990). Korona jest purpuroworóżowa, rzadziej bladioróżowa, na szczycie ciemnopurpurowa. Górny płatek jest szeroki, wyraźnie bocznie spłaszczony, na grzbiecie posiada wyraźną zieloną linię. Szczyt górnego płatka mocno łopatkowato rozszerzony, tępo zakończony lub zastrzony. Górny płatek jest bardzo szeroko oskrzydłony, skrzydełka odgięte ku górze, zazwyczaj przewyższają grzbiet. Dolny płatek jest wąski, na szczycie łopatkowato rozszerzony, czasem lekko oskrzydłony. Ostroga jest wydłużona, zagięta ku dołowi lub prosta (Jasiewicz 1985). Działki kielicha są zawsze węższe niż korona, jajowate, jajowato-lancetowate, podługowate lub lekko tarczowate, z wyraźnym nerwem środkowym. Brzegi działek kielicha są nieregularnie ząbkowane, a przy podstawie często nacinane (Broda i Mowszowicz 1996; Jasiewicz 1985).



Rycina 5. *Fumaria officinalis* L. – kwiaty.

Owoce jest tępa na szczycie, spłaszczona, kulistawa niełupka o pomarszczonej powierzchni (Broda i Mowszowicz 1996; Evans 2009).





Rycina 6. *Fumaria officinalis* L. – owoce na łodydze.



Rycina 7. *Fumaria officinalis* L. – owoce.

Okres kwitnienia dymnicy lekarskiej przypada na miesiące od maja do września (Broda i Mowszowicz 1996; Ożarowski i wsp. 1990).

#### 4. ZWIĄZKI CHEMICZNE W *FUMARIA OFFICINALIS* L.

Publikacje naukowe odnoszące się do składu chemicznego ziela dymnicy, dotyczą głównie alkaloidów, występujących w tym surowcu. Skład alkaloidów dymnicy lekarskiej był przedmiotem badań naukowych już w 1938 roku. Chemik niemieckiego pochodzenia, Richard Helmuth Manske wyizolował oraz zidentyfikował wtedy kilka alkaloidów izochinolinowych (MacLean 1969).

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy w ziele dymnicy występują dwie grupy związków alkaloidowych (Matławska 2008). Są to alkaloidy izochinolinowe typu protopiny, protoberberyny, spirobenzyloizochinoliny, ftalidoizochinoliny, narceiny, benzofenantrydyny, aporfiny, oraz alkaloidy pochodne indenobenzazepiny. Szczegółowe dane dotyczące zidentyfikowanych w surowcu związków alkaloidowych zebrano w Tabeli 1.

Tabela 1. Alkaloidy występujące w ziele dymnicy

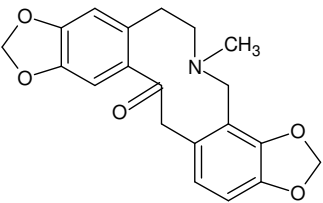
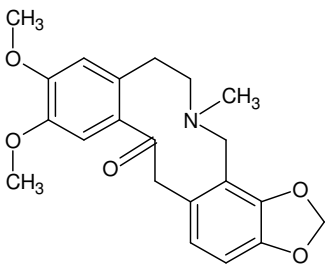
Typ / nazwa	Wzór chemiczny	Piśmiennictwo
<b>ALKALOIDY IZOCHINOLINOWE</b>		
typ protopiny	protopina (fumaryna) 	Bradley 1992; Bruneton 1999; Czapska 1988; Golkiewicz i Wawrzynowicz 1970; MacLean i wsp. 1969; Newall i wsp. 1996; Petruczynik 2011; Seger i wsp. 2004; Soušek i wsp. 1999; Sturm i wsp. 2005; Suau i wsp. 2002; Wawrzynowicz i wsp. 1968
	kryptopina (kryptokawina) 	Bradley 1992; Czapska 1988; Golkiewicz i Wawrzynowicz 1970; MacLean i wsp. 1969; Newall i wsp. 1996; Seger i wsp. 2004; Soušek i wsp. 1999; Sturm i wsp. 2005; Suau i wsp. 2002; Wawrzynowicz i wsp. 1968

Tabela 1. Alkaloidy występujące w ziele dymnicy cd.

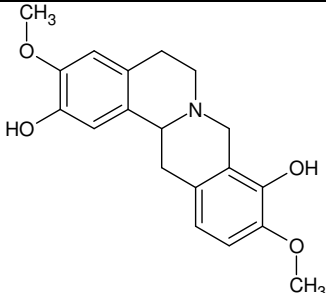
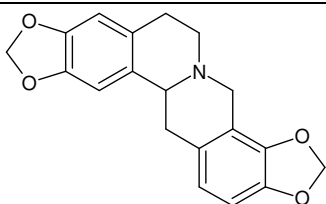
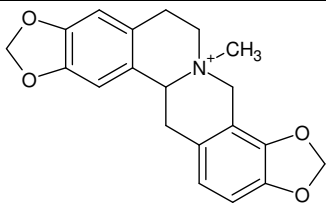
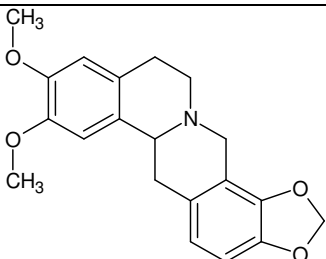
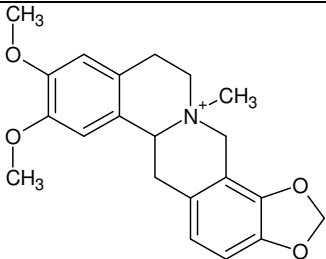
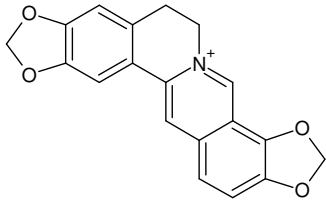
typ protoberberyny	aurotensyna (skouleryna)		Bradley 1992; Czapska 1988; Golkiewicz i Wawrzynowicz 1970; MacLean i wsp. 1969; Newall i wsp. 1996; Wawrzynowicz i wsp. 1968
	stylopina		Bradley 1992; Czapska 1988; Golkiewicz i Wawrzynowicz 1970; MacLean i wsp. 1969; Newall i wsp. 1996; Soušek i wsp. 1999; Wawrzynowicz i wsp. 1968
	N-metylostylopina		Soušek i wsp. 1999
	synaktyna		Bradley 1992; Czapska 1988; Golkiewicz i Wawrzynowicz 1970; MacLean i wsp. 1969; Newall i wsp. 1996; Seger i wsp. 2004; Soušek i wsp. 1999; Sturm i wsp. 2005; Suau i wsp. 2002; Wawrzynowicz i wsp. 1968
	N-metylosynaktyna		Bradley 1992; Newall i wsp. 1996
	koptyzyna		Soušek i wsp. 1999; Wawrzynowicz i wsp. 1968

Tabela 1. Alkaloidy występujące w ziele dymnicy cd.

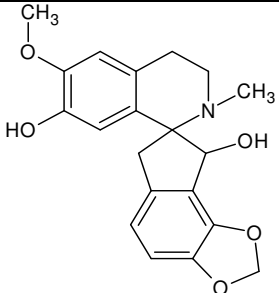
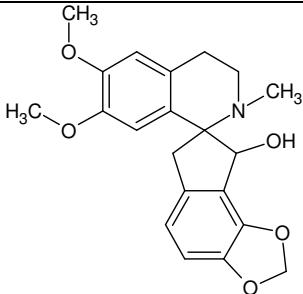
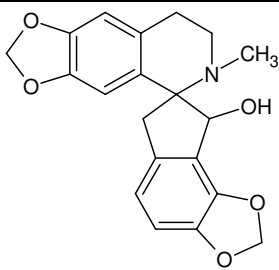
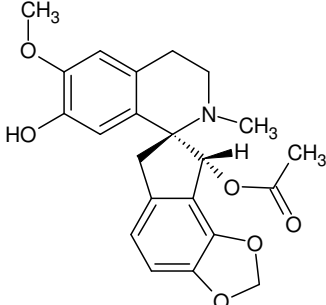
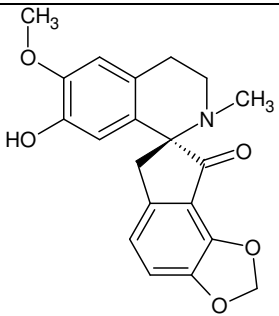
typ spirobenzylizochinoliny	fumarytyna		Bradley 1992; MacLean i wsp. 1969; Newall i wsp. 1996; Soušek i wsp. 1999; Suau i wsp. 2002
	fumarycyna		Bradley 1992; Bruneton 1999; MacLean i wsp. 1968; MacLean i wsp. 1969; Newall i wsp. 1996; Soušek i wsp. 1999
	fumarylina		Bradley 1992; Bruneton 1999; MacLean i wsp. 1968; MacLean i wsp. 1969; Newall i wsp. 1996; Soušek i wsp. 1999; Suau i wsp. 2002
	(-)-fumarofycyna		Seger i wsp. 2004; Soušek i wsp. 1999; Sturm i wsp. 2005; Suau i wsp. 2002
	(+)-parfumina		Seger i wsp. 2004; Soušek i wsp. 1999; Sturm i wsp. 2005; Suau i wsp. 2002

Tabela 1. Alkaloidy występujące w ziele dymnicy cd.

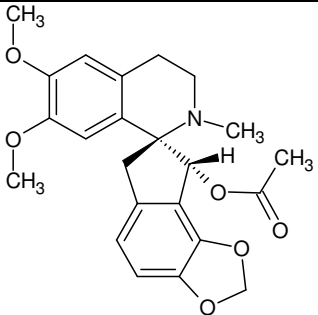
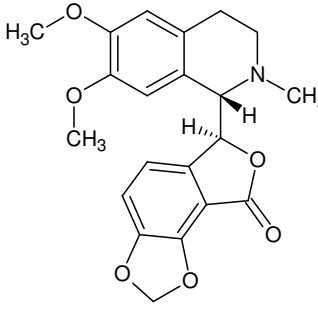
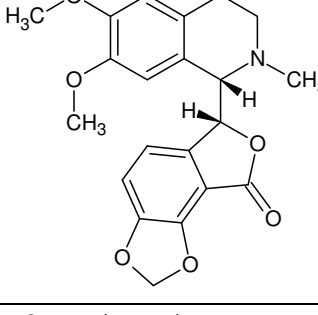
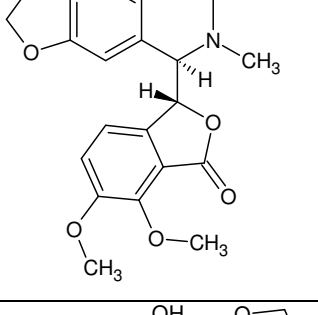
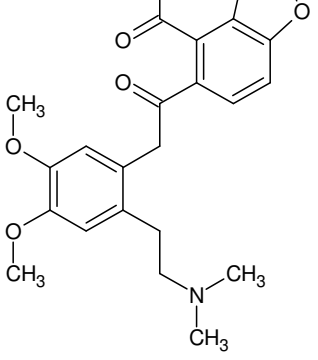
	(-)-O-metylofumarofycyna		Seger i wsp. 2004; Soušek i wsp. 1999; Sturm i wsp. 2005
typ ftalidoizochinoliny	(+)-adlumina		Seger i wsp. 2004; Sturm i wsp. 2005; Suau i wsp. 2002;
	(+)-korlumina		Seger i wsp. 2004; Sturm i wsp. 2005
	(-)- $\alpha$ -hydrastyna		Seger i wsp. 2004; Sturm i wsp. 2005
typ narceiny	adlumiceina		Soušek i wsp. 1999

Tabela 1. Alkaloidy występujące w ziele dymnicy cd.

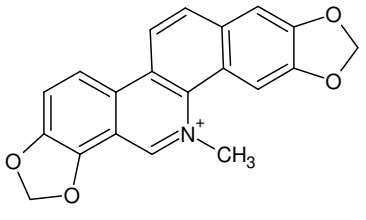
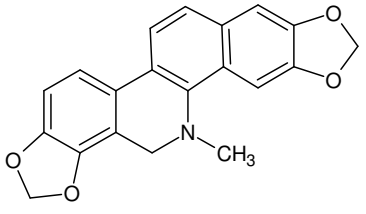
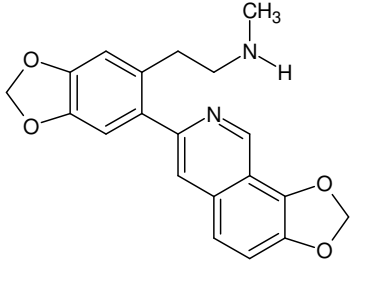
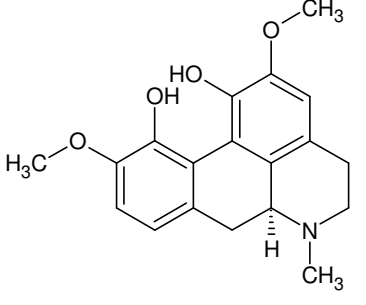
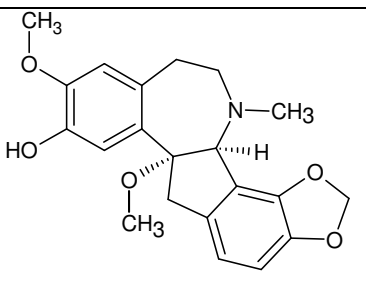
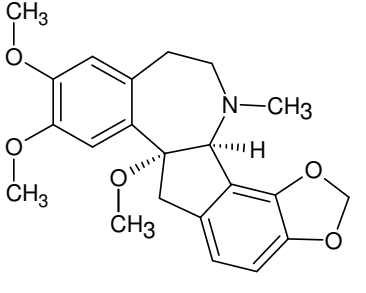
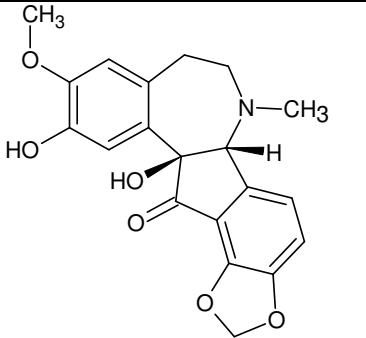
typ benzofenantrydyny	sangwinaryna		Newall i wsp. 1996; Petruczynek 2011; Wawrzynowicz i wsp. 1968
	dihydrosangwinaryna		Suau i wsp. 2002
	korydamina		Seger i wsp. 2004; Sturm i wsp. 2005
typ aporfiny	korytuberyna		Soušek i wsp. 1999
<b>ALKALOIDY POCHODNE INDENOBENZAZEPINY</b>			
	fumarytrydyna		Bradley 1992; Newall i wsp. 1996
	fumarytryna		Bradley 1992; Bruneton 1999; Newall i wsp. 1996;

Tabela 1. Alkaloidy występujące w ziele dymnicy cd.

fumarofina		Bruneton 1999
------------	------------------------------------------------------------------------------------	---------------

Farmakopea Polska IX w monografii *Fumariae herba* ziele dymnicy podaje, iż substancję roślinną stanowią całe lub połamane, wysuszone nadziemne części *Fumaria officinalis* L., zebrane w pełni kwitnienia. Ziele dymnicy powinno zawierać nie mniej niż 0,40% sumy alkaloidów w przeliczeniu na protopinę (Farmakopea Polska IX). Według danych literaturowych zawartość ta najczęściej waha się w granicach 0,5–1,0% (Wagner i Bladt 1996).

Naukowcy opracowali liczne sposoby rozdziału zespołu alkaloidów ziele dymnicy. Metody te, to m.in. chromatografia preparatywna na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym (Jóźwiak i Waksmundzka-Hajnos 2007), chromatografia planarna z wykorzystaniem bibuły chromatograficznej (Wawrzynowicz i wsp. 1968), rozdział przeciwwądowy w aparacie Craiga (Wawrzynowicz i Waksmundzki 1968) oraz chromatografia kolumnowa (Golkiewicz i Wawrzynowicz 1970).

Dominującym w ziele dymnicy alkaloidem jest protopina (Bradley 1992). Jej ogólna zawartość wynosi 0,08-0,40% (Czapska 1988; Wichtl 2004). W związku z wysoką zawartością protopiny w ziele dymnicy (Wynne i wsp. 2004) prowadzone były intensywne badania nad efektywnymi metodami jej izolacji oraz optymalizacją tego procesu (Rakotondramasy-Rabesiaka i wsp. 2007; Rakotondramasy-Rabesiaka i wsp. 2008; Rakotondramasy-Rabesiaka i wsp. 2009). Opracowano również metody oznaczania protopiny w ziele dymnicy. Przykładem może tu być metoda chromatograficzno-spektrofotometryczna (Czapska 1988), czy też połączenie chromatografii cienkowarstwowej z densytometrią (Vrancheva i wsp. 2012).

W ziele dymnicy stwierdzono również obecność związków polifenolowych. Przeprowadzone analizy ilościowe z wykorzystaniem odczynnika Folin-Ciocalteu wykazały, że zawartość sumy polifenoli w ziele dymnicy w przeliczeniu na kwas

galusowy wynosi od 10,50 mg GAE/g do 30,30 mg GAE/g (w zależności od cytowanej publikacji) (Ivanov i wsp. 2014; Sengul i wsp. 2009).

Na początku lat 70-tych, francuscy badacze wyizolowali z ziela dymnicy oraz zidentyfikowali za pomocą chromatografii bibułowej, analizy produktów hydrolizy i analizy spektralnej w nadfiolecie, pięć związków flawonoidowych: 3-glukozyd kwercetyny, 3,7-diglukozyd kwercetyny, 3-arabinoglukozyd kwercetyny, rutynę wraz ze śladowymi ilościami 3-arabinozydu kemferolu (Torck i wsp. 1971). Kolejną próbę izolacji oraz identyfikacji związków flawonoidowych w surowcu podjęto w 1989 roku w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W badaniach uwzględniono tylko frakcję octanu etylu, oraz wstępnie analizowano frakcję butanolową. Wyniki uzyskane za pomocą analizy chromatograficznej (cienkowarstwowej i bibułowej), spektralnej w nadfiolecie oraz hydrolizy wskazywały na obecność pochodnych kwercetyny i kemferolu. (Ellnain-Wojtaszek i wsp. 1989). Po zakończeniu badań, przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, w 2014 ukazały się dwie publikacje, których autorzy za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej potwierdzili obecność 3,7-di-*O*-glukozydu kwercetyny, 3-*O*-arabinoglukozydu kwercetyny, 3-*O*-glukozydu kwercetyny oraz rutyny w wyciągu z ziela dymnicy. Stwierdzili oni także obecność mirycetyny, kemferolu, kwercetyny, hiperozydu oraz apigeniny (Ivanov i wsp. 2014; Karioti i wsp. 2014).

W ziele dymnicy wykazano również obecność wolnych kwasów fenolowych, takich jak: kwas p-kumarowy, kwas synapinowy (Ivanov i wsp. 2014), kwas ferulowy (Ivanov i wsp. 2014; Soušek i wsp. 1999), kwas protokatechowy (Soušek i wsp. 1999), kwas kawowy (Bradley 1992; Newall i wsp. 1996; Soušek i wsp. 1999), kwas chlorogenowy (Bradley 1992; Newall i wsp. 1996), a także występowanie połączeń estrowych, pochodnych kwasu hydroksycynamonowego z kwasem jabłkowym (Frohne 2010; Wichtl 2004).

W ziele dymnicy występują ponadto śluzy, żywice (Jurkowska 2005; Newall i wsp. 1996; Wawrzyniak 1992), związki goryczowe (Jurkowska 2005; Newall i wsp. 1996), garbniki, sole mineralne (Jurkowska 2005; Wawrzyniak 1992), witamina C (Jurkowska 2005), a także organiczne kwasy alifatyczne takie jak: kwas fumarowy (Bradley i wsp. 1992; Jurkowska 2005; Newall i wsp. 1996; Soušek i wsp. 1999; Wawrzyniak 1992) i kwas jabłkowy (Soušek i wsp. 1999).



## 5. DZIAŁANIE FARMAKOLOGICZNE *FUMARIA OFFICIANLIS* L.

### DZIAŁANIE SPAZMOLITYCZNE

Działanie rozkurczowe dymnicy lekarskiej na mięśnie gładkie oraz zwieracze przewodu pokarmowego wykazano w badaniach na zwierzętach. Eksperyment ten polegał na pomiarze szybkości tranzytu pokarmowego u świń, którym podawano wyciąg z ziela dymnicy oraz porównaniu uzyskanych wyników z grupą kontrolną (Borgida 1973). Podręczniki z zakresu ziołolecznictwa informują, że ziele dymnicy przywraca prawidłową perystaltykę jelit, odpowiednie rozmieszczenie treści pokarmowej i regularne wypróżnienia (Ożarowski 1980; Ożarowski i Jaroniewski 1987; Ożarowski i wsp. 1978). Wskazują również na efekt spazmolityczny w obrębie dróg żółciowych i moczowych, a także naczyń krwionośnych (Frohne 2010; Ożarowski 1980; Ożarowski i Jaroniewski 1987; Ożarowski i wsp. 1978).

### DZIAŁANIE AMFOCHOLERETYCZNE

Aktywność amfocholeretyczna ziela dymnicy została wykazana u szczurów laboratoryjnych już w 1966 roku (Boucard i Laubenheimer 1966). Preparaty z ziela dymnicy zwiększają wytwarzanie żółci, stosownie do potrzeb organizmu lub hamują produkcję żółci w przypadku jej nadmiaru. Nie wywierają wpływu natomiast w momencie prawidłowego wydzielania żółci. Wykazano ponadto, że dymnica lekarska posiada właściwości choleścystokinetyczne (pobudzające opróżnianie pęcherzyka żółciowego), gdyż poprzez rozkurczający wpływ na zwieracz Oddiego, ułatwia przepływ żółci do dwunastnicy (Bradley 1992; Nowak 2012; Ożarowski 1980; Ożarowski i Jaroniewski 1987; Ożarowski i wsp. 1978).

Przeprowadzono badania kliniczne w których wzięli udział pacjenci z różnymi zaburzeniami wydzielania żółci, będącymi następstwem usunięcia pęcherzyka żółciowego, dyskinezy dróg żółciowych lub zapalenia pęcherzyka żółciowego i dróg żółciowych, leczeni wcześniej nieefektywnie przez okres dwóch lat. Wykazano, że ekstrakt z ziela dymnicy przyjmowany w dawkach 6 x 250 mg i 4 x 250 mg po dwóch tygodniach stosowania, znacznie zmniejszał objawy takie jak bóle brzucha w prawej górnej części, bóle poposiłkowe, wzdęcia, nudności, wymioty, trudności ze snem i bóle głowy. Efekt ten zaobserwowano u 71% badanych. Efektywność działania wodnego, suchego ekstraktu z ziela dymnicy w dawce 750 – 1500 mg na dobę, podawanego przez

okres 1 – 3 miesięcy wyniosła średnio 78,5%. Najwyższą skuteczność (100%) zanotowano u osób z kamicą żółciową, natomiast najniższą (66%) u pacjentów z żółtaczką, będącą następstwem wirusowego zapalenia wątroby (Nowak 2012).

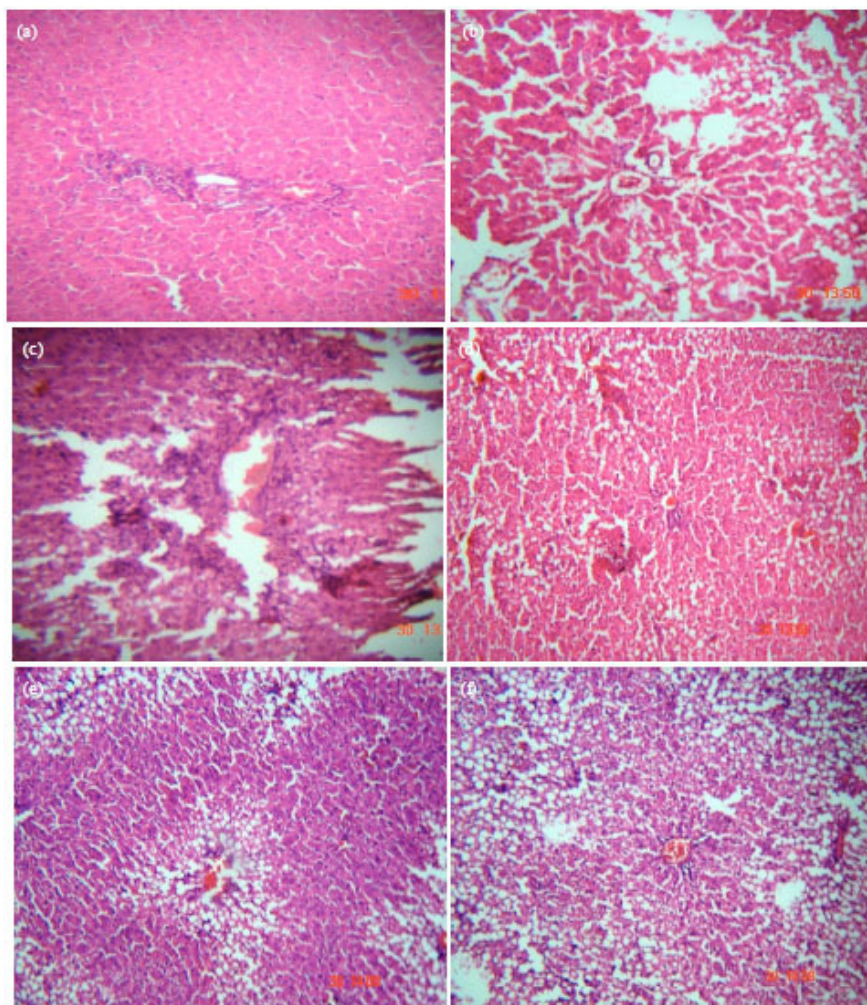
#### DZIAŁANIE HEPATOPROTEKCYJNE

W celu spowodowania uszkodzenia wątroby, podawano szczurom podskórnie 0,8 mL/kg masy ciała 30% roztworu czterochlorku węgla (CCl<sub>4</sub>) w parafinie. Grupom badanym aplikowano dodatkowo doustnie etanolowy wyciąg z ziela dymnicy w ilości od 100 do 500 mg/kg masy ciała. W przypadku kontroli negatywnej podawano 0,9% roztwór chlorku sodu (NaCl), natomiast jako substancję standardową, zastosowano sylimarynę w ilości 100 mg/kg masy ciała.

W celu wykazania działania hepatoprotekcyjnego, wykonano analizę poziomu markerów biochemicznych krwi takich jak: aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginianowa, fosfataza alkaliczna, bilirubina, cholesterol oraz triglicerydy. Uzyskane wartości powyższych parametrów jednoznacznie wskazywały na zależny od dawki efekt hepatoprotekcyjny etanolowego wyciągu z ziela dymnicy. Wyniki uzyskane w grupie szczurów, którym podawano 500 mg/kg masy ciała wyciągu z ziela dymnicy były porównywalne do tych w grupie otrzymującej sylimarynę.

Wykonano również pomiar dziennego wydalania z moczem kwasu askorbinowego u badanych szczurów. Zmiany w ilości wydalanego kwasu askorbinowego z moczem, odzwierciedlają zmiany jego poziomu w wątrobie, gdzie wytwarzany jest jako metabolit glukozy i galaktozy w szlaku kwasu glukuronowego. Z tego powodu parametr ten może być stosowany jako wskaźnik stopnia hepatotoksyczności, wywołanej czterochlorkiem węgla. U szczurów, którym podano wyciągi z ziela dymnicy lub sylimarynę, poziom kwasu askorbinowego w wydalonym moczu zbliżony był do wartości fizjologicznych.

Szczury biorące udział w badaniu poddano również resekcji wątroby, a uzyskany materiał biologiczny, analizowano histopatologicznie (Rycina 8) (Sharma i wsp. 2012).



Rycina 8. Obraz mikroskopowy wątroby szczurów; **(a)** – kontrola negatywna (1 mL/kg masy ciała 0,9% NaCl p.o.); **(b)** – kontrola pozytywna (0,8 mL/kg masy ciała 30% roztworu CCl<sub>4</sub> s.c.); **(c)** – 0,8 mL/kg masy ciała 30% roztworu CCl<sub>4</sub> s.c. + 100 mg/kg masy ciała wyciągu z ziela dymnicy p.o.; **(d)** – 0,8 mL/kg masy ciała 30% roztworu CCl<sub>4</sub> s.c. + 200 mg/kg masy ciała wyciągu z ziela dymnicy p.o.; **(e)** – 0,8 mL/kg masy ciała 30% roztworu CCl<sub>4</sub> s.c. + 500 mg/kg masy ciała wyciągu z ziela dymnicy p.o.; **(f)** - 0,8 mL/kg masy ciała 30% roztworu CCl<sub>4</sub> s.c. + 100 mg/kg masy ciała sylimaryny p.o. (Sharma i wsp. 2012).

#### WPLYW NA PROFIL HEMATOLOGICZNY

Wpływ wodno-alkoholowego wyciągu z ziela dymnicy na profil hematologiczny analizowano na królikach nowozelandzkich. Zwierzęta podzielono na trzy grupy. Dwie grupy otrzymywały doustnie wyciąg z ziela dymnicy, odpowiednio 200 mg/kg masy ciała oraz 400 mg/kg masy ciała. Trzecią grupę stanowiła kontrola. Uzyskane wyniki badań próbek krwi pobranej z komory serca wskazywały na zmniejszenie wartości

parametrów takich jak: wskaźnik hematokrytowy, poziom hemoglobiny, średnia objętość krwinki czerwonej, poziom erytrocytów, całkowity poziom leukocytów oraz poziom neutrofilii u królików, którym podawano wyciąg z ziela dymnicy. Poziom obserwowanej redukcji aktywności hematologicznej był niezależny od wielkości podawanych dawek wyciągu. Stwierdzono również, że wyciąg z ziela dymnicy powoduje wzrost liczby limfocytów, eozynofili oraz monocytów w krwi badanych zwierząt (Khoshvaghti i wsp. 2013).

#### DZIAŁANIE PRZECIWARYTMICZNE

W badaniu aktywności przeciwartrytmicznej wykorzystano zespół alkaloidów dymnicy lekarskiej, nazwany przez naukowców TAFOL (total alkaloids of *Fumaria officinalis* L.), który uzyskano oczyszczając przy pomocy żywicy jonowymiennej, zakwaszony kwasem siarkowym, wodny wyciąg z dymnicy lekarskiej. Aktywność przeciwartrytmiczną badano na białych myszach oraz królikach.

W celu uzyskania arytmii u myszy, zastosowano dożylnie podanie chlorku wapnia. TAFOL podany dożylnie w dawce 5 mg/kg masy ciała, zwiększał przeżywalność myszy o 50% w porównaniu do kontroli, jak również wydłużał ponad 2,5-krotnie czas od momentu indukcji arytmii do śmierci zwierzęcia. Jako substancje referencyjne wykorzystano w badaniu chinidynę oraz etmozynę. Etmozyna w dawce 3 mg/kg masy ciała, zapobiegała śmierci 40% myszy. Chinidyna natomiast w zakresie 1-15 mg/kg masy ciała nie wykazywała działania protekcyjnego, wydłużała wyłącznie czas do wystąpienia zgonu. Wykonano również pomiary w przypadku zastosowania u myszy czystej protopiny oraz kryptopiny. Tylko kryptopina w dawce 10 mg/kg masy ciała, zwiększała przeżywalność u myszy o 15,5% (Gorbunov i wsp. 1977).

W eksperymencie na królikach, arytmie indukowano za pomocą podawanej dożylnie adrenaliny. TAFOL w dawce 0,5 mg/kg masy ciała, przeciwdziałał rozwojowi arytmii u 50% zwierząt, natomiast zwiększenie dawki do 1 mg/kg masy ciała, hamowało arytmie już u 90% królików. Protopina w dawce 0,5 mg/kg masy ciała nie wywierała żadnego efektu, natomiast dawka 1 mg/kg masy ciała przeciwdziałała arytmii u 40% zwierząt. Kryptopina podana w analogicznych dawkach nie wykazywała efektu przeciwartrytmicznego. W eksperymencie na królikach, wykorzystano również substancje referencyjne: chinidynę oraz etmozynę. Chinidyna podana w dawce 5 mg/kg masy ciała, zapobiegała zaburzeniom pracy serca u 66,6% zwierząt. Etmozyna

natomiast efekt przeciwartymiczny wykazywała w dawce 0,3 mg/kg masy ciała u 20% królików oraz w dawce 0,6 mg/kg masy ciała u 50% królików (Gorbunov i wsp. 1977).

#### DZIAŁANIE PRZECIWNOWOTWOROWE

Naukowcy z Uniwersytetu Abant Izzet Baysal w Turcji przeprowadzili badania przesiewowe 16 gatunków roślin w kierunku ich działania przeciwnowotworowego. W eksperymencie wykorzystano m.in. wodny, etanolowy oraz metanolowy wyciąg z ziela dymnicy. W badaniach zastosowano zmodyfikowaną metodę z użyciem krążków ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) oraz szczepu bakterii *Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 23341). Najwyższą aktywność przeciwnowotworową spośród analizowanych ekstraktów z ziela dymnicy, wykazał wyciąg wodny. Stopień zahamowania nowotworu był taki sam jak w przypadku zastosowanej kontroli pozytywnej w postaci kamptotecyny i wyniósł 100%. Wyciąg etanolowy oraz metanolowy, wykazywały aktywność hamującą odpowiednio na poziomie 65% i 73% (Karakas i wsp. 2012).

#### DZIAŁANIE ANTYOKSYDACYJNE

Analizowano aktywność przeciwutleniającą wyciągu z ziela dymnicy, uzyskanego przez ekstrakcję surowca 70% etanolem w temperaturze 70°C. W badaniu wykorzystano metodę z użyciem odczynnika DPPH oraz ABTS, jak również analizę FRAP i CUPRAC. Jako substancje referencyjne o udowodnionej aktywności antyoksydacyjnej, zastosowano: kwercetynę, rutynę, kwas ferulowy, kwas synapinowy oraz kwas p-kumarowy. Wyniki otrzymane we wszystkich czterech analizach jednoznacznie wskazywały, że etanolowo-wodny wyciąg z ziela dymnicy posiada silne właściwości antyoksydacyjne (Ivanov i wsp. 2014).

Przeprowadzono również badania metanolowego wyciągu z nadziemnych części dymnicy lekarskiej, uzyskanego poprzez ekstrakcję surowca w aparacie Soxleta. W analizie wykorzystano odczynnik  $\beta$ -karoten - kwas linolowy. Aktywność antyoksydacyjną wyciągu metanolowego, określano poprzez pomiar stopnia zahamowania tworzenia się lotnych związków organicznych i wodoronadtlenków sprzężonych dienów, powstających podczas utleniania kwasu linolowego. Ekstrakt z ziela dymnicy wykazywał aktywność hamującą na poziomie 78,93%. Uzyskany

wynik zestawiono z substancjami referencyjnymi: BHA (200 mg/L) – 93,21% oraz BHT (200 mg/L) – 90,71% (Sengul i wsp. 2009).

Pozytywne wyniki uzyskano również w badaniach *in vivo* właściwości przeciwutleniających etanolowego maceratu z liści dymnicy lekarskiej. W celu wywołania immunotoksyczności oraz stresu oksydacyjnego, aplikowano szczurom 20% etanol. Następnie podawano doustnie wyciąg z liści dymnicy lekarskiej lub mieszaninę witamin C i E w dawce 100 mg/kg masy ciała. Wykonując pomiary parametrów takich jak fagocytoza, całkowity poziom leukocytów, stopień peroksydacji lipidów, ilość zredukowanego glutationu, odpowiedź humoralna i komórkowa, aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, wykazano że, wyciąg z liści dymnicy lekarskiej zapobiegał negatywnym zmianom wywoływanym przez etanol, porównywalnie do mieszaniny witamin C i E, posiadających udokumentowaną aktywność antyoksydacyjną (Wasu i Muley 2009).

#### DZIAŁANIE PRZECIWDROBNOUSTROJOWE

W dostępnej literaturze naukowej odnaleźć można liczne wyniki badań wskazujące na aktywność przeciwdrobnoustrojową wyciągów z ziela dymnicy. Wykazano działanie przeciwbakteryjne wyciągu etanolowego w kierunku: *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* (Shah i wsp. 2012), *Serratia marcescens* oraz *Salmonella typhimurium* (Karakas i wsp. 2012). Wyciąg heksanowy posiadał aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do *Staphylococcus epidermidis* i *Escherichia coli* (Shah i wsp. 2012). Wyciąg metanolowy wykazywał aktywność w stosunku do *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* (Sengul i wsp. 2009), wyciąg wodny natomiast w stosunku do *Salmonella typhimurium* (Karakas i wsp. 2012). Najszersze spektrum działania przeciwbakteryjnego zanotowano dla wyciągu uzyskanego przez ekstrakcję ziela dymnicy za pomocą mieszaniny etanol – woda (80:20). Szczepy wrażliwe na działanie tego wyciągu to: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis* i *Micrococcus luteus* (Dulger i Gomuz 2004).

Badania wykazały również aktywność przeciwgrzybiczą wyciągu etanolowego (*Trichoderma*, *Alternaria solani*, *Aspergillus niger*), metanolowego (*Saccharomyces boulardi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cladosporium herbarum*, *Paecilomyces variotii*) (Sengul i wsp 2009), heksanowego (*Alternaria solani*, *Aspergillus niger*) (Shah i wsp. 2012), wodnego (*Cladosporium herbarum*) (Sengul i wsp. 2009) oraz etanolowo-wodnego (*Candida albicans*, *Kluyveromyces fragilis*, *Rhodotorula rubra*) (Dulger i Gomuz 2004).

#### DZIAŁANIE PRZYWROBÓJCZE

Prowadzono również badania nad działaniem przywrobójczym wyciągu metanolowego z ziela dymnicy. Uzyskane wyniki wykazały brak aktywności wobec *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni* oraz *Echinostoma caproni* (Ferreira 2011).

### **6. ZASTOSOWANIE *FUMARIA OFFICIANLIS* L.**

Pierwsze wzmianki na temat dymnicy lekarskiej pojawiły się już w starożytnej Grecji i Rzymie (Strzelecka i Kowalski 2000). Chociaż greccy lekarze niewiele wiedzieli o dymnicy lekarskiej, to Arabowie cenili ją jako środek na „oczyszczanie krwi”. Do Europy wiedza ta dotarła poprzez szkołę medyków w Salerno. Ziele dymnicy bardzo często pojawia się już w średniowiecznych zielnikach (Mayer i wsp. 2004).

W dostępnej literaturze najobszerniej opisane jest zastosowanie dymnicy lekarskiej w leczeniu chorób dróg żółciowych. Preparaty z ziela dymnicy wykazują działanie rozkurczowe na górne odcinki układu pokarmowego, stąd też stosowane są w zaparciach oraz spastycznych bólach przewodów żółciowych (Borkowski i wsp. 1994; Bruneton 1999; Wichtl 2004).

Podstawowymi wskazaniami do włączenia do prowadzonego leczenia, podawania wewnętrznego dymnicy lekarskiej są niedobory żółci, spowodowane niewydolnością wątroby, kolka żółciowa, jak również zespół objawów po chirurgicznym usunięciu kamieni żółciowych. Ponadto wyciągi z ziela dymnicy stosowane są w terapii ukierunkowanej na zwalczanie problemów, wynikających z nadmiernego wydzielania żółci, w zespole spastyczno-nadciśnieniowym z zastojami żółci i bólem oraz w dyskinezie, wywołanej skurczem zwieracza bańki wątrobowo-

trzustkowej, a także w objawach towarzyszących tym schorzeniom (Ożarowski 1980). W przypadku chorób wątroby i dróg żółciowych, podczas których występuje upośledzenie wytwarzania żółci oraz jej przepływu, najczęściej stosuje się odwar z ziela dymnicy (Ożarowski i wsp. 1978). Zalecana długość terapii oscyluje w przedziale 10 – 15 dni, w czasie których należy od dwóch do czterech razy dziennie przyjmować doustnie 1 – 3 łyżek odwaru, przygotowanego z ½ łyżki ziela dymnicy, zalanego 250 mL letniej wody i gotowanego przez 3 minuty (Ożarowski i Jaroniewski 1987).

Prowadzone były badania nad możliwością zastosowania ziela dymnicy w terapii syndromu jelita drażliwego, jednak uzyskane wyniki były porównywalne z placebo (Brinkhaus i wsp 2005).

Podając wyciągi z ziela dymnicy jako uzupełnienie terapii alkaloidami sporyszu (ergotamina, dihydroergotamina), można uzyskać dobre wyniki w leczeniu migreny, indukowanej przez dyskinezę żółciową, kamice żółciową i niewydolność wątroby, jak również w terapii typowej migreny (Ożarowski 1980; Ożarowski i wsp. 1978).

Ponadto dymnica lekarska, podawana wewnętrznie, wykorzystywana jest jako środek przeczyszczający. Podanie doustne stosuje się także w celu zwiększenia diurezy, (Skidmore-Roth 2001; Wichtl 2004), jak i obniżenia ciśnienia krwi (Sturm i wsp. 2006). U osób wyczerpanych fizycznie i rekonwalescentów po ciężkich chorobach zakaźnych, ziele dymnicy podawane wewnętrznie, stosowane jest jako środek wzmacniający (Sarwa 2001). Znane jest również wewnętrzne zastosowanie dymnicy lekarskiej w leczeniu w chorób reumatycznych (Sturm i wsp. 2006), nerwic wegetatywnych oraz nadkwasoty (Sarwa 2001).

Z kolei stosowane zewnętrznie wyciągi z ziela dymnicy, wykorzystywane są w leczeniu wykwitów skórnych (Ebadi 2002), egzemy (Ebadi 2002; Skidmore-Roth 2001), łuszczycy oraz świerzbu (Skidmore-Roth 2001). Dymnica lekarska w postaci lotionu do przemywania oczu, stosowana jest w zapaleniu spojówek (Ebadi 2002), natomiast w postaci okładów i przymoczek na ropiejące zranienia (Sarwa 2001).

W leczeniu egzemy oraz dermatoz, wykorzystuje się łączne podanie doustne oraz stosowanie zewnętrzne wyciągów z ziela dymnicy (Erdoğan 2002).

Zewnętrzne zastosowanie dymnicy lekarskiej w zakresie leczenia chorób skóry, może być związane z obecnością w roślinie kwasu fumarowego. Obecnie kwas fumarowy, otrzymywany jest syntetycznie i wchodzi w skład m.in. preparatów, łagodzących objawy łuszczycy (Wichtl 2004).



O cennych właściwościach leczniczych dymnicy lekarskiej świadczą jej różnorodne zastosowania w medycynie ludowej wielu państw. W Turcji dymnicę lekarską stosuje się jako środek przeczyszczający oraz moczopędny (Dulger i Gomuz 2004). W Pakistanie jest środkiem przeciwgorączkowym (Shah i wsp. 2012). W centralnej części Włoch stosuje się całą roślinę w postaci naparu lub odwaru w leczeniu chorób reumatycznych, stanów zapalnych stawów, miażdżycy tętnic oraz jako środek do oczyszczania krwi (Hänsel i wsp. 1993). We Włoszech oraz Tunezji dymnicę lekarską, wykorzystuje się jako środek do leczenia obrzęków (Leporatti i Ghedira 2009). W Bułgarii pozbawiony alkaloidów wyciąg, stosuje się w leczeniu nadciśnienia tętniczego. Na Wyspach Kanaryjskich dymnica lekarska znalazła zastosowanie jako środek hipoglikemiczny. W Hiszpanii natomiast, nadziemne części rośliny wykorzystuje się w infekcjach, różnorodnych dolegliwościach skurczowych, a także jako środek o działaniu wzmacniającym (Hänsel i wsp. 1993).

Dymnica lekarska znalazła również zastosowanie w homeopatii. Podstawowym założeniem homeopatycznej metody leczenia jest posługiwanie się środkami wywołującymi objawy podobne do objawów choroby, którą należy wyleczyć (Boulet 2009). Opracowano w związku z tym zespół objawów chorobowych, który stanowi przesłankę włączenia do terapii preparatów homeopatycznych zawierających dymnicę lekarską. Symptomy te to objawy psychiczne, takie jak: splątanie, poważne problemy z koncentracją, poczucie braku jasności umysłu, przygnębienie, zmienność nastrojów, stany lękowe, intensywne marzenia senne, zmęczenie oraz znużenie, nasilające się o godzinie 16.00, a także ucisk w gardle, ostre bóle i skurcze w okolicach brzusznych, wzdęcia, biegunka, luźne stolce oraz wykwyty skórne (Riley 2012).

Najbardziej rozpowszechnionym na polskim rynku aptecznym lekiem złożonym zawierającym w składzie dymnicę lekarską są tabletki Boldovera® produkowane przez firmę Aflofarm, mające status leku. Zawierają one oprócz 10 mg *Fumariae extractum siccum*, 15 mg *Aloe extractum siccum* oraz 1 mg *Boldinum* (alkaloid izochinolinowy pozyskiwany z *Peumus boldus* Mol.). Wskazaniami do stosowania preparatu Boldovera® są zaburzenia trawienia, spowodowane zaburzeniami wydzielania żółci (wzdęcia, uczucie pełności, odbijanie), lekkie skurczowe dolegliwości żółdkowo-jelitowe oraz łagodne zaparcia, związane np. ze zmianą diety lub miejsca pobytu (ulotka dla pacjenta – Boldovera® tabletki). Dopuszczenie do obrotu w Polsce posiada także zioło pojedyncze – *Fumariae herba*, które może służyć do przygotowywania kąpieli relaksacyjno-odprężających ([www.flos.pl](http://www.flos.pl)). W Polsce zarejestrowane są również

preparaty homeopatyczne Lymphomyosot® firmy Heel w postaci tabletek podjęzykowych i kropli doustnych, zawierające w składzie dymnicę lekarską. Tabletki podjęzykowe Lymphomyosot® zawierają 15 mg *Fumaria officinalis* D4 w jednej tabletkie, krople natomiast 5g *Fumaria officinalis* D4 w 100g kropli (ulotka dla pacjenta – Lymphomyosot® Hell tabletki; ulotka dla pacjenta – Lymphomyosot® Heel krople doustne).

## 7. PRZECIWWSKAZANIA, DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE, INTERAKCJE ORAZ TOKSYCZNOŚĆ

Przeciwwskazaniem do stosowania preparatów, zawierających ziele dymnicy jest niedrożność dróg żółciowych (Nowak 2012). Ziela dymnicy nie należy również stosować u osób z podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym oraz u chorujących na epilepsję (Skidmore-Roth 2001). Wpływ preparatów, zawierających dymnicę lekarską na płód nie został dostatecznie zbadany, stąd też nie zaleca się ich stosowania u kobiet w okresie ciąży i laktacji (Bradley 1992; Skidmore-Roth 2001). Ziela dymnicy nie należy podawać również dzieciom (Skidmore-Roth 2001). Wodno-alkoholowy wyciąg z ziela dymnicy wykazywał redukcję aktywności hematologicznej w badaniach na królikach, dlatego też należy zachować ostrożność w przypadku osób z anemią lub chorobami immunologicznymi (Khoshvaghti i wsp. 2013).

Terapia z wykorzystaniem dymnicy lekarskiej, obciążona jest ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych ze strony:

- układu sercowo-naczyniowego (obniżenie ciśnienia krwi),
- centralnego układu nerwowego (ryzyko wystąpienia ataku padaczkowego w przypadku stosowania wysokich dawek),
- narządu wzroku (wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego),
- układu pokarmowego (wymioty, nudności, brak łaknienia) (Skidmore-Roth 2001).

Długotrwałe stosowanie dymnicy lekarskiej może doprowadzić do wystąpienia objawów jaskry (Ożarowski i Jaroniewski 1987). Przedawkowanie surowca może powodować zwiększoną senność (Erdoğrul 2002). Ze względu na ryzyko porażenia mięśni gładkich oraz niekorzystny wpływ na pracę serca, w przypadku stosowania

większych dawek wyciągów z ziela dymnicy, zalecana jest konsultacja lekarska (Macků i Krejča 1989).

Preparaty zawierające dymnicę lekarską mogą wchodzić w interakcje z lekami przeciwartmicznymi,  $\beta$ -adrenolitycznymi oraz glikozydami nasercowymi, zwiększając siłę ich działania (Skidmore-Roth 2001). Badania nad wpływem alkaloidów pochodzenia roślinnego na ludzkie enzymy metabolizujące leki wskazują, że alkaloidy izochinolinowe, występujące w dymnicy lekarskiej, wchodzą w interakcje z enzymami z rodziny cytochromu P450. Wykazano m.in., że alkaloidy te są silnymi inhibitorami CYP2D6 oraz CYP3A4, które pełnią istotną rolę w metabolizmie ksenobiotyków. Przykładowo CYP3A4 bierze udział w metabolizmie około 50 % leków, posiadających zastosowanie kliniczne (Salminen i wsp. 2011; Vrba i wsp. 2011). W związku z tym istotne jest, aby przed włączeniem do terapii ziela dymnicy, dokładnie przeanalizować szlaki metaboliczne pozostałych leków, przyjmowanych przez chorego. Możliwe jest również przeprowadzenie monitorowania stężenia leków we krwi i odpowiednia korekta ich dawek.

Toksyczność etanolowego wyciągu z ziela dymnicy badano, podając dootrzewnowo myszom albinosom, wzrastające jego dawki (od 5mg/kg masy ciała do 2000 mg/kg masy ciała). Myszy obserwowano pod kątem znacznych zmian zachowania lub wystąpienia zgonu. Jedynie dawka 2000 mg/kg masy ciała, wywołała objawy toksyczne (Sharma i wsp. 2012). Toksyczność dymnicy lekarskiej analizowano również z wykorzystaniem słonowodnych skorupiaków *Artemia salina* (brine shrimp lethality bioassay). Ziele dymnicy ekstrahowano *n*-heksanem, octanem etylu, etanolem, metanolem oraz wodą, uzyskując w ten sposób odpowiednie wyciągi do badań. Wyniki eksperymentu wykazały, że tylko wyciąg *n*-heksanowy posiadał niewielką aktywność cytotoksyczną w stosunku do *Artemia salina* ( $LC_{50} = 901,24 \mu\text{g/mL}$ ) (Erdoğan 2009).

**CEL PRACY**



## CEL PRACY

Celem pracy była analiza związków polifenolowych występujących w ziele dymnicy oraz badania aktywności biologicznej wyciągów z surowca.

Cel pracy realizowano przez wykonanie następujących badań szczegółowych:

- izolację związków flawonoidowych z wykorzystaniem metod chromatograficznych
- określenie struktury chemicznej wyizolowanych flawonoidów metodami chemicznymi (hydroliza kwasowa, analiza produktów hydrolizy) oraz spektralnymi (UV, HPLC-DAD-ESI-MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR)
- określenie profilu kwasów fenolowych metodą chromatograficzną (2D-TLC) oraz UPLC-PDA
- oznaczenie zawartości związków fenolowych (sumy polifenoli, flawonoidów, kwasów fenolowych) metodami kolorymetrycznymi w różnych wyciągach z ziela dymnicy
- badanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów z ziela dymnicy metodą chemiczną (metoda ABTS) oraz biologiczną z wykorzystaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, pozbawionych genu *sod1*
- badanie aktywności przeciwbakteryjnej wyciągów z ziela dymnicy z użyciem wzorcowego szczepu *Staphylococcus aureus*

**CZEŚĆ  
DOŚWIADCZALNA**



## 8. METODYKA BADAŃ

### 8.1. Materiał do badań

W badaniach wykorzystano produkt handlowy: ziele dymnicy – *Fumariae herba* (*Fumaria officinalis* L., Fumariaceae) produkcji: Zakład Konfekcjonawania Ziół FLOS oznaczony serią 1079.

#### 8.1.1. Oznaczenie straty masy po suszeniu

Wilgotność ziela dymnicy lekarskiej oznaczono metodą suszarkowo-wagową wg FP VI. Suszenie surowca (1,0 g) przeprowadzono na wagosuszarce WPE 30 S firmy Radwag w temperaturze 130° C. Oznaczenie wykonano trzykrotnie, obliczając wilgotność surowca ze wzoru:

$$\text{strata masy po suszeniu (\%)} = 100 - \frac{\text{masa próbki po suszeniu}}{\text{masa pierwotna próbki}} \cdot 100$$

Średnia strata masy po suszeniu wyniosła  $8,24 \pm 0,09\%$ .

### 8.2. Izolacja i identyfikacja flawonoidów

#### 8.2.1. Odczynniki i substancje wzorcowe

##### Odczynniki

- |                                                 |               |
|-------------------------------------------------|---------------|
| ○ aceton cz.d.a. (Me <sub>2</sub> CO)           | POCH          |
| ○ anilina cz.d.a                                | POCH          |
| ○ chlorek glinu (AlCl <sub>3</sub> )            | Sigma-Aldrich |
| ○ chloroform cz.d.a. (CHCl <sub>3</sub> )       | POCH          |
| ○ eter dietylowy cz.d.a (Et <sub>2</sub> O)     | POCH          |
| ○ kwas borowy (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) | POCH          |
| ○ kwas mrówkowy 85% cz. (HCO <sub>2</sub> H)    | POCH          |
| ○ kwas octowy lodowaty 99,5% cz.d.a. (HOAc)     | POCH          |
| ○ kwas <i>o</i> -ftalowy                        | POCH          |

- kwas solny 36% cz.d.a. (HCl) POCH
- metaliczny sól (Na) POCH
- Naturstoffreagenz A (NA) Roth
- *n*-butanol cz.d.a. (*n*-BuOH) POCH
- *n*-propanol cz.d.a. (*n*-PrOH) POCH
- 2-propanol cz.d.a. (*izo*-PrOH) POCH
- octan etylu cz.d.a. (EtOAc) POCH
- octan sodu (NaOAc) Sigma-Aldrich
- toluen cz.d.a. POCH
- woda destylowana

### Substancje wzorcowe

- glikozydy flawonoidowe
  - 3-*O*-β-glukozyd kwercetyny<sup>1</sup>
  - 3-*O*-β-rutynozyd kwercetyny (rutyna)  
(seria 20829) Riedel-de Haën
  - 3-*O*-α-arabinozylo(1→6)-β-glukozyd  
kwercetyny<sup>1</sup>
  - 3-*O*-β-glukozyd kemferolu<sup>1</sup>
  - 3-*O*-β-rutynozyd kemferolu<sup>1</sup>
- aglikony flawonoidowe
  - kwercetyna dwuwodna (seria 288213490) Fluka
  - kemferol<sup>1</sup>
  - apigenina<sup>1</sup>
  - luteolina<sup>1</sup>
- cukry
  - arabinoza Merck
  - glukoza Merck
  - galaktoza Merck
  - ksyloza Merck
  - ramnoza Merck

<sup>1</sup> substancje wzorcowe z kolekcji Katedry i Zakładu Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



### 8.2.2. Aparatura

- spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer
- chromatograf cieczowy HPLC typ 2690 sprzężony z detektorem UV typ 996 i detektorem masowym z jonizacją elektrosprej ZQ Micromass Waters
- spektrofotometr magnetycznego rezonansu jądrowego Avance II 400 MHz Bruker
- spektrofotometr magnetycznego rezonansu jądrowego Avance III 500 MHz Bruker
- lampa UV 366 nm Uvitec
- łaźnia ultradźwiękowa Elma S 180H Elmasonic
- wytrząsarka 358S Elpan
- wyparka próżniowa Rotavapor R-210 Büchi
- waga apteczna PS 2100/C/2 Radwag
- waga analityczna LE225D-0CE Sartorius

### 8.2.3. Przygotowanie i frakcjonowanie wyciągu podstawowego

800 g wysuszonego ziela dymnicy lekarskiej (surowiec handlowy) poddano trzykrotnie jednodniowej maceracji w temperaturze pokojowej, a następnie trzykrotnej ekstrakcji metanolem i trzykrotnej mieszaniną metanol – woda (1:1), każdorazowo przez 1 godzinę, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalników. Uzyskane maceraty i wyciągi poddano kontroli chromatograficznej (PC, S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, W<sub>1</sub>). Ze względu na podobny obraz chromatograficzny połączono je, zagęszczono na wyparce próżniowej w temperaturze poniżej 45°C, a następnie zalano niewielką ilością gorącej wody. Po ostudzeniu precedzono, oddzielając substancje balastowe.

Uzyskany wyciąg wytrząsano kolejno z chloroformem, eterem dietylowym oraz octanem etylu. Otrzymane frakcje (chloroformowa, eteru dietylowego, octanu etylu oraz wodna) poddano kontroli chromatograficznej (PC, S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, W<sub>1</sub>).

Frakcję octanu etylu oraz frakcję wodną przeznaczono do izolacji związków flawonoidowych. Ze względu na śladowe ilości związków flawonoidowych we frakcji chloroformowej oraz eteru dietylowego nie prowadzono dalszych badań tych frakcji.

## 8.2.4. Metody chromatograficzne

W analizie związków flawonoidowych wykorzystano chromatografię planarną (cienkowarstwową i bibułową) oraz klasyczną chromatografię kolumnową.

### 8.2.4.1. Chromatografia planarna

#### 8.2.4.1.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

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

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

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

Płytki pokryte celulozą rozwijano przy użyciu faz ruchowych:

- **S<sub>1</sub>** HOAc – H<sub>2</sub>O (15:85)
- **S<sub>2</sub>** *izo*-PrOH – HCO<sub>2</sub>H – H<sub>2</sub>O (2:5:5)
- **S<sub>3</sub>** *n*-BuOH – HOAc – H<sub>2</sub>O (6:1:2)
- **S<sub>4</sub>** EtOAc – HCO<sub>2</sub>H – H<sub>2</sub>O (10:2:3)

Płytki pokryte żelem krzemionkowym rozwijano przy użyciu faz ruchomych:

- **S<sub>5</sub>** EtOAc – HOAc – HCO<sub>2</sub>H – H<sub>2</sub>O (100:11:11:26)
- **S<sub>6</sub>** *n*-PrOH – EtOAc – H<sub>2</sub>O (7:2:1)

Chromatogramy po rozwinięciu suszono w warunkach naturalnych, a następnie analizowano w świetle lampy UV<sub>366 nm</sub> przed oraz po spryskaniu odczynnikami wywołującymi:

- **W<sub>1</sub>** 0,1% metanolowy roztwór kompleksu kwasu difenyloborowego i etanoloaminy (Naturstoffreagenz A = NA) (flawonoidy)
- **W<sub>2</sub>** 1% metanolowy roztwór AlCl<sub>3</sub> (flawonoidy)

- **W<sub>3</sub>** 1% butanolowy roztwór ftalanu aniliny (0,93 g aniliny i 1,66 g kwasu ftalowego w 100 mL *n*-butanolu nasyconego wodą) / 105°C (cukry proste)

Chromatografię cienkowarstwową wykorzystano w celu analizy frakcji uzyskanych w wyniku rozdzielania kolumnowego wyciągów podstawowych, kontroli jednorodności wyizolowanych związków, porównania uzyskanych związków z wzorcami, jak również w celu monitorowania przebiegu hydrolizy i badania produktów hydrolizy.

#### **8.2.4.1.2. Chromatografia bibułowa (PC)**

Przy pomocy chromatografii bibułowej analizowano wyciągi podstawowe, kontrolowano frakcje uzyskane w wyniku rozdzielania mieszanin związków w kolumnach szklanych, a także badano produkty hydrolizy wyizolowanych związków.

Chromatogramy rozwijano techniką jednokierunkową wstępującą w wysyconych kamerach szklanych, w temperaturze pokojowej. Fazę ruchomą stanowiły układy S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> oraz

- **S<sub>7</sub>** toluen – HOAc – H<sub>2</sub>O (125:72:3)

#### **8.2.4.1.3. Chromatografia bibułowa preparatywna (PPC)**

Bibułową chromatografię preparatywną wykorzystano do rozdzielania niejednorodnych frakcji uzyskanych po rozdzielaniu w kolumnach szklanych wyciągów podstawowych.

Rozdzielane frakcje nanoszono pasmowo na bibułę chromatograficzną, a następnie rozwijano techniką jednokierunkową wstępującą, stosując jako fazę ruchomą układy S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>. Po rozwinięciu chromatogramów, fluoryzujące na żółto lub brunatno w świetle lampy UV<sub>366 nm</sub> pasma flawonoidów wycinano, a następnie wmywano trzykrotnie metanolem i dwukrotnie mieszaniną metanol-woda (1:1), na łąźni wodnej w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, pod chłodnicą zwrotną. Otrzymane eluaty przesączono przez sączek karbowany i zagęszczono na wyparce

próżniowej w temperaturze poniżej 40°C. Jednorodność uzyskanych związków badano za pomocą TLC w układach S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub>.

#### 8.2.4.2. Chromatografia kolumnowa klasyczna (CC)

Klasyczną chromatografię kolumnową przeprowadzono w kolumnach szklanych wypełnionych adsorbentami

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

Kolumny wypełnione celulożą wykorzystano w celu rozdzielenia wyciągów podstawowych, natomiast wypełnione sefadeksem posłużyły do oczyszczania wyizolowanych związków flawonoidowych.

W kolumnach wypełnionych celulożą do elucji zastosowano fazy ruchome:

- S<sub>8</sub> H<sub>2</sub>O
- S<sub>9</sub> EtOAc – MeOH – H<sub>2</sub>O (100:6:20) (faza organiczna)

W kolumnach wypełnionych sefadeksem LH-20 do elucji zastosowano fazy ruchome:

- S<sub>10</sub> mieszanina CHCl<sub>3</sub> i MeOH (zawierająca od 0 do 20% MeOH)
- S<sub>11</sub> mieszanina H<sub>2</sub>O i MeOH (zawierająca od 0 do 20% H<sub>2</sub>O)
- S<sub>12</sub> MeOH

Do kolumn adsorbenty wprowadzane były w postaci zawiesiny w fazie ruchomej używanej później do elucji. Przepływ fazy ruchomej był grawitacyjny. Poszczególne wyciągi lub frakcje wyodrębnionych związków flawonoidowych adsorbowano na niewielkiej ilości adsorbentu, a następnie po odparowaniu rozpuszczalnika umieszczano w kolumnie. Kontrolę rozdzielenia związków w kolumnach prowadzono w świetle lampy UV<sub>366 nm</sub>, a także za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC, S<sub>5</sub>, W<sub>1</sub>) oraz bibułowej (PC, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, W<sub>1</sub>).

## 8.2.5. Analiza spektralna

### 8.2.5.1. Analiza w nadfiolecie (UV)

Widma wyizolowanych związków flawonoidowych wykreślano przy użyciu aparatu UV/VIS Lambda 35 firmy Perkin Elmer w 0,5 cm kuwetach kwarcowych przed oraz po dodaniu odczynników jonizujących i kompleksotwórczych (NaOMe, NaOAc, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>/HCl). Obróbkę graficzną widm wykonano za pomocą oprogramowania UV WinLab 2.80. Dla każdego z wyodrębnionych związków wykreślono po sześć widm w zakresie 220 - 500 nm:

- o metanolowego roztworu analizowanego związku (MeOH)

oraz metanolowego roztworu badanego związku z dodatkiem:

- o 3 kropli 2,5% metanolowego roztworu metylanu sodu (NaOMe)
- o nadmiaru bezwodnego octanu sodu (NaOAc)
- o nadmiaru bezwodnego octanu sodu i 5 kropli nasyconego, metanolowego roztworu kwasu borowego (NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)
- o 5 kropli 5% metanolowego roztworu chlorku glinu (AlCl<sub>3</sub>)
- o 5 kropli 5% metanolowego roztworu chlorku glinu i 5 kropli 20% wodnego roztworu HCl (AlCl<sub>3</sub>/HCl) (Dey i Harborne 1989; Mabry i wsp 1970)

### 8.2.5.2. Wysokosprawną chromatografią cieczową sprzężoną z detektorem mas HPLC-DAD-ESI-MS<sup>2</sup>

- o warunki analizy
  - kolumna: Symmetry (4,6 x 150 mm, 5 μm)
  - faza ruchoma: A – MeOH, B – ACN, C – H<sub>2</sub>O, D – 10% HCO<sub>2</sub>H
  - układ gradientowy: Tabela 2
  - przepływ: 0,5 mL/min
  - detekcja DAD: 220 – 500 nm
  - napięcie kapilary: 3000 V
  - czynnik rozpylający: azot (N<sub>2</sub>)
  - temperatura gazu rozpylającego: 300° C

<sup>2</sup> Analizy wykonano w Środowiskowym Laboratorium Unikatowej Aparatury Chemicznej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

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

Czas (min)	% fazy A	% fazy B	% fazy C	% fazy D
0	0	0	95	5
20	95	0	0	5
21	0	0	95	5
30	0	5	95	0

### 8.2.5.3. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)<sup>3</sup>

Widma <sup>1</sup>H oraz <sup>13</sup>C NMR uzyskanych związków flawonoidowych wykonane zostały w spektrometrach magnetycznego rezonansu jądrowego: Bruker Avance II 400 MHz (związek 2, 3, 5) oraz Bruker Avance III 500 MHz (związek 1, 4). Jako rozpuszczalnik zastosowano dimetylosulfotlenek (DMSO-d<sub>6</sub>). Uzyskane widma analizowano za pomocą oprogramowania komputerowego TopSpin 3.1.

### 8.2.6. Hydroliza kwasowa

Do około 1 mg związku flawonoidowego dodawano 1 mL metanolu oraz 2 mL 2% kwasu solnego. Uzyskaną mieszaninę ogrzewano na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Proces hydrolizy kontrolowano chromatograficznie (TLC, S<sub>1</sub>, W<sub>1</sub>). W tym celu na płytkę aluminiową pokrytą celulozą nakładano roztwór analizowanego związku bezpośrednio po dodaniu kwasu solnego, a następnie po upływie 5, 15, 30, 45 i 60 minut, aby uchwycić moment powstawania produktów wtórnych.

Po zakończeniu hydrolizy mieszaninę poreakcyjną pozostawiono do całkowitego odparowania rozpuszczalnika oraz kwasu solnego. Suchą pozostałość rozpuszczono w wodzie, a następnie wytrząsano trzykrotnie małymi porcjami octanu etylu. Otrzymane warstwy octanu etylu połączono i zagęszczono, po czym poddano kontroli chromatograficznej na obecność aglikonów (PC, S<sub>2</sub>, S<sub>7</sub>, W<sub>1</sub>) oraz glikozydów wtórnych (TLC, S<sub>1</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub>, W<sub>1</sub>) wobec wzorców. Połączone frakcje wodne po zagęszczeniu analizowano na obecność cukrów prostych (TLC, S<sub>6</sub>, W<sub>3</sub>).

<sup>3</sup> Analizy wykonano w Laboratorium NMR Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

### 8.3. Analiza kwasów fenolowych

#### 8.3.1. Odczynniki i substancje wzorcowe

○ amoniak 25% cz.d.a.	POCH
○ azotyn sodu (NaNO <sub>2</sub> )	POCH
○ dichlorometan cz.	POCH
○ eter dietylowy cz.d.a.	POCH
○ metanol cz.d.a.	POCH
○ kwas octowy lodowaty 99,5% cz.d.a.	POCH
○ kwas sulfanilowy cz.	POCH
○ toluen cz.d.a.	POCH
○ węglan sodu (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	POCH
○ woda destylowana	
○ woda do HPLC	Baker
○ acetonitryl do HPLC (ACN)	Merck
○ metanol do HPLC	Baker
○ kwas mrówkowy 99+%	POCH
○ wzorcowe kwasy fenolowe:	
➤ chlorogenowy (seria 2147470)	Roth
➤ <i>trans</i> -ferulowy (seria 21120-060)	Sigma-Aldrich
➤ galusowy (seria 71181-079)	Sigma-Aldrich
➤ izowanilinowy (seria 95H0090)	Sigma-Aldrich
➤ kawowy (seria 24050-030)	Sigma-Aldrich
➤ <i>p</i> -hydroksybenzoesowy (seria 28066-020)	Sigma-Aldrich
➤ <i>p</i> -hydroksyfenylooctowy (seria S04869-326)	Sigma-Aldrich
➤ <i>p</i> -kumarowy (seria 18630)	Fluka
➤ protokatechowy (seria 107H0699)	Sigma-Aldrich
➤ syryngowy (seria 34136-040)	Sigma-Aldrich
➤ wanilinowy (seria 26222-129)	Sigma-Aldrich

### 8.3.2. Aparatura i oprogramowanie

- aparat do ultrasprawnej chromatografii cieczowej (model Acquity) wyposażony w detektor fotodiodowy (PDA) Waters
- oprogramowanie Empower 2 Software Buid 2154
- waga analityczna LE225D-0CE Sartorius
- waga apteczna PS 2100/C/2 Radwag
- lampa UV 366 nm Uvitec
- wyparka próżniowa Rotavapor R-210 Büchi

### 8.3.3. Przygotowanie wyciągów

#### 8.3.3.1. Frakcja eteru etylowego do analizy jakościowej (2D-TLC)

10 mL wyciągu o stężeniu 2 g/mL (rozd.6.3.3.2.) poddano wyczerpującej ekstrakcji eterem dietylowym. Uzyskane frakcje eteru dietylowego połączono, a następnie zagęszczono do sucha. Otrzymaną pozostałość rozpuszczono w 5 mL metanolu. Przygotowaną w ten sposób frakcję poddano dwukierunkowej analizie chromatograficznej na płytkach pokrytych celulozą (2D-TLC). Równolegle analogicznie wykonano chromatogram dla wzorcowych kwasów fenolowych. Metanolowe roztwory wzorcowych kwasów fenolowych przygotowano w stężeniu 0,1 mg/mL.

#### 8.3.3.2. Wyciąg do określenia profilu kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA

200,0 g ziela dymnicy lekarskiej poddano dwukrotnie 7-dniowej maceracji mieszaniną metanol-dichlorometan (1:1), a następnie 3-dniowej maceracji mieszaniną metanol-woda destylowana (1:1). Otrzymane wyciągi połączono, przecedzono i zagęszczono w wyparce próżniowej (w temperaturze nie przekraczającej 45°C) do objętości około 80 mL. Zagęszczony wyciąg przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 100 mL i uzupełniono wodą destylowaną, uzyskując stężenie 2,0 g ziela w 1 mL. Wyciąg wykonano w 3 powtórzeniach.



### 8.3.4. Metody chromatograficzne

#### 8.3.4.1. Chromatografia cienkowarstwowa dwukierunkowa (2D-TLC)

W chromatografii cienkowarstwowej wykorzystano gotowe płytki aluminiowe pokryte celulozą DC-Alufolien Cellulose firmy Merck. Płytki chromatograficzne rozwijano techniką wstępującą dwukierunkową (2D-TLC) w temperaturze pokojowej, w pionowych komorach, w układach:

- **S<sub>13</sub>** toluen – HOAc – H<sub>2</sub>O (6:7:3) – **I kierunek**
- **S<sub>1</sub>** HOAc – H<sub>2</sub>O (15:85) – **II kierunek**

Rozwinięte i wysuszone w warunkach naturalnych chromatogramy oglądano w świetle lampy UV <sub>366 nm</sub> oraz w świetle widzialnym, przed i po spryskaniu płytek odczynnikiem wywołującym:

- **W<sub>4</sub>** zdwuazowany kwas sulfanilowy przygotowany *ex tempore* i 20% roztwór węgla sodu (1:1)

Chromatografię TLC wykonano w celu wykazania obecności kwasów fenolowych w ziele dymnicy.

#### 8.3.4.2. Ultrasprawa chromatografia cieczowa (UPLC-PDA)

Ultrasprawną chromatografię cieczową wykorzystano do analizy jakościowej i ilościowej kwasów fenolowych występujących w wyciągu.

- warunki analizy
  - kolumna: Waters Acquity UPLC HSS T3 (2,1x150 mm, 1,8 μm) z pre-kolumną BEH C<sub>18</sub> (2,1x5 mm, 1,7 μm)
  - faza ruchoma: A – zakwaszona woda, B – zakwaszony acetonitryl (50 μL stężonego kwasu mrówkowego na 1 litr rozpuszczalnika)
  - układ gradientowy: Tabela 3
  - przepływ: 0,275 mL/min

- temperatura kolumny i próbek: 24°C
- detekcja PDA: 190 – 800 nm
- analiza widm: 234 – 330 nm
- objętość nastrzyku: 2 µL

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

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

## 8.4. Badania ilościowe

### 8.4.1. Odczynniki i substancje wzorcowe

#### 8.4.1.1. Do oznaczania zawartości sumy polifenoli

- kwas galusowy (seria 71181-079) Sigma-Aldrich
- odczynnik *Folin-Ciocalteu* (FC) (seria HC807325) Merck
- węgiel sodu (7% roztwór wodny) (seria 0101/09/08) POCH
- metanol cz.d.a. POCH
- woda destylowana

#### 8.4.1.2. Do oznaczania zawartości flawonoidów

- kwercetyna dwuwodna (seria 288213490) Fluka
- kwas solny cz.d.a. (roztwór wodny, 250 g/L) POCH
- chlorek glinu (seria BCBD3987V) rozpuszczony w mieszaninie HOAc – MeOH (1:19) (20 g/L) Sigma-Aldrich

- heksametylenotetramina cz.d.a. (0,5% roztwór wodny) Chempur
- mieszanina HOAc (1,02 kg/L) – MeOH (1:19)
- aceton cz.d.a. POCH
- octan etylu cz.d.a. POCH
- metanol cz.d.a. POCH
- bezwodny siarczan sodu cz.d.a. POCH
- woda destylowana

#### 8.4.1.3. Do oznaczania zawartości kwasów fenolowych

- kwas kawowy (seria 24050-030) Sigma-Aldrich
- 0,5 N roztwór kwasu solnego (18 g/L) POCH
- 1 N roztwór wodorotlenku sodu (40 g/L) POCH
- azotyn sodu cz.d.a. (seria 0314/05/03) POCH
- molibdenian sodu cz.d.a. (seria 0235/11/98) POCH
- metanol cz.d.a. POCH
- woda destylowana
- odczynnik Arnov'a: 10,0 g molibdenianu sodu i 10,0 g azotynu sodu rozpuszczono w kolbie miarowej o pojemności 100 mL, a następnie uzupełniono wodą destylowaną do współmierności

#### 8.4.2. Aparatura

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

### **8.4.3. Przygotowanie wyciągów**

#### **8.4.3.1. Wyciągi podstawowe**

##### **8.4.3.1.1. Wyciąg metanolowo-wodny podstawowy (MWP)**

1,0 g wysuszonego ziela dymnicy lekarskiej poddano wyczerpującej ekstrakcji trzykrotnie 250 mL metanolu oraz czterokrotnie 200 mL mieszaniny metanol-woda destylowana (1:1). Ekstrakcję każdorazowo prowadzono przez 1 godzinę na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Uzyskane wyciągi połączono, przecedzono przez watę i zagęszczono na wyparce próżniowej do objętości około 25 mL, po czym przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 50 mL i uzupełniono wodą destylowaną. W ten sposób uzyskano wyciąg podstawowy metanolowo-wodny o stężeniu 20 mg/mL. Wyciąg przygotowano w 3 powtórzeniach.

##### **8.4.3.1.2. Nalewka podstawowa (NP)**

5,0 g wysuszonego ziela dymnicy lekarskiej zalano w kolbie stożkowej 300 mL 70% etanolu, a następnie wytrząsano na wytrząsarce przez 1 godzinę. Kolbę odstawiono w ciemne miejsce na okres 2 dni. Wytrawianie przeprowadzono w powyższy sposób dwukrotnie. Uzyskane nalewki połączono, przecedzono przez watę i zagęszczono na wyparce próżniowej do objętości około 25 mL, po czym przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 50 mL i uzupełniono wodą destylowaną. W ten sposób uzyskano nalewkę podstawową o stężeniu 100 mg/mL. Nalewkę podstawową przygotowano w 3 powtórzeniach.

##### **8.4.3.1.3. Odwar podstawowy (OP)**

5,0 g wysuszonego ziela dymnicy lekarskiej zalano w kolbie stożkowej 300 mL wody destylowanej o temperaturze pokojowej, a następnie ogrzewano przez 20 minut w łaźni wodnej o temperaturze 95°C. Wytrawianie przeprowadzono w powyższy sposób dwukrotnie. Uzyskane odwary połączono, przecedzono przez watę i zagęszczono na wyparce próżniowej do objętości około 25 mL, po czym przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 50 mL i uzupełniono wodą destylowaną. W ten sposób

uzyskano odwar podstawowy o stężeniu 100 mg/mL. Odwar podstawowy przygotowano w 3 powtórzeniach.

#### **8.4.3.2. Wyciągi do oznaczeń ilościowych**

##### **8.4.3.2.1. Do oznaczania zawartości sumy polifenoli**

Wyciągi do badań uzyskano poprzez rozcieńczenie wyciągów podstawowych.

###### **8.4.3.2.1.1. Wyciąg metanolowo-wodny**

Do kolby miarowej o pojemności 10 mL pobrano 1,4 mL podstawowego wyciągu metanolowo-wodnego (MWP), a następnie uzupełniono wodą destylowaną, uzyskując stężenie 2,8 mg/mL.

###### **8.4.3.2.1.2. Nalewka**

Do kolby miarowej o pojemności 100 mL pobrano 4 mL nalewki podstawowej (NP), a następnie uzupełniono wodą destylowaną, uzyskując stężenie 4 mg/mL.

###### **8.4.3.2.1.3. Odwar**

Do kolby miarowej o pojemności 100 mL pobrano 3 mL odwaru podstawowego (OP), a następnie uzupełniono wodą destylowaną, uzyskując stężenie 3 mg/mL.

##### **8.4.3.2.2. Do oznaczania zawartości flawonoidów**

###### **8.4.3.2.2.1. Wyciąg z ziela dymnicy (wg FP IX)**

Do kolby okrągłodennej o pojemności 50 mL odważono 0,6 g wysuszonego, sproszkowanego ziela dymnicy lekarskiej. Dodano następnie 20 mL acetonu, 2 mL kwasu solnego i 1 mL wodnego roztworu heksametylenotetraminy (metenaminy). Uzyskaną mieszaninę ogrzewano na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 30

minut od chwili zawrzenia, a następnie przecedzono przez zwitek waty do kolby miarowej o pojemności 100 mL. Surowiec wraz z watą umieszczono ponownie w kolbie okrągłodennej, dodano 20 mL acetonu i utrzymywano w stanie wrzenia przez 10 minut. Uzyskany wyciąg przecedzono przez watę do kolby miarowej. Ekstrakcję powtórzono jeszcze raz, a uzyskany ostatecznie wyciąg przesączono do kolby miarowej przez sączek bibułowy i uzupełniono acetonem do 100 mL. 20 mL tego roztworu przeniesiono do rozdzielacza, dodano 20 mL wody destylowanej i wytrząsano z 15 mL octanu etylu. Następnie wytrząsanie powtórzono jeszcze trzema porcjami octanu etylu po 10 mL każda. Połączone wyciągi octanu etylu przemyto w rozdzielaczu dwiema porcjami wody destylowanej po 50 mL, a następnie przesączono przez 10 g bezwodnego siarczanu sodu do kolby miarowej o pojemności 50 mL i uzupełniono octanem etylu do współmierności. Uzyskano stężenie 2,4 mg ziela w 1 mL wyciągu. Wyciąg z ziela dymnicy przygotowano w powyższy sposób w 3 powtórzeniach.

#### **8.4.3.2.2.2.Nalewka**

Do kolby miarowej o pojemności 50 mL pobrano 16,5 mL nalewki podstawowej (NP) i zagęszczono do sucha. Następnie postępowano jak w przypadku wyciągu z ziela dymnicy wg FP IX. Uzyskano w ten sposób stężenie 6,6 mg ziela w 1 mL wyciągu.

#### **8.4.3.2.2.3.Odwar**

Do kolby miarowej o pojemności 50 mL pobrano 25,0 mL odwaru podstawowego (OP) i zagęszczono do sucha. Następnie postępowano jak w przypadku wyciągu z ziela dymnicy (wg FP IX). Uzyskano w ten sposób stężenie 10,0 mg ziela w 1 mL wyciągu.

#### **8.4.3.2.3. Do oznaczania zawartości kwasów fenolowych**

Wyciągi do badań uzyskano poprzez rozcieńczenie wyciągów podstawowych.

#### **8.4.3.2.3.1. Wyciąg metanolowo-wodny**

Do kolby miarowej o pojemności 25 mL pobrano 2,75 mL podstawowego wyciągu metanolowo-wodnego (MWP), a następnie uzupełniono wodą destylowaną, uzyskując stężenie 2,2 mg/mL.

#### **8.4.3.2.3.2. Nalewka**

Do kolby miarowej o pojemności 25 mL pobrano 0,9 mL nalewki podstawowej (NP), a następnie uzupełniono wodą destylowaną, uzyskując stężenie 3,6 mg/mL.

#### **8.4.3.2.3.3. Odwar**

Do kolby miarowej o pojemności 25 mL pobrano 0,6 mL odwaru podstawowego (OP), a następnie uzupełniono wodą destylowaną, uzyskując stężenie 2,4 mg/mL.

### **8.5. Badania aktywności biologicznej**

#### **8.5.1. Odczynniki, bufony, pożywki, podłoża, żele i szczepy wzorcowe**

##### **8.5.1.1. Do badania aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS**

- |                                                          |                |
|----------------------------------------------------------|----------------|
| ○ rutyna (seria 20829)                                   | Riedel-de Haën |
| ○ kwas galusowy (seria 71181-079)                        | Sigma-Aldrich  |
| ○ troloks (seria S27444-255)                             | Sigma-Aldrich  |
| ○ nadsiarczan potasu (seria BCBD7429V)                   | Fluka          |
| ○ ABTS-(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (seria 061M5308V) | Sigma-Aldrich  |
| ○ metanol cz.d.a.                                        | POCH           |
| ○ woda destylowana                                       |                |

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

#### 8.5.1.2.1. Do hodowli drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

##### Szczepy

- szczep dziki SP-4 (MAT $\alpha$  *leu1 arg4*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
- izogeniczny mutant delecyjny DSCD1-1C (MAT $\alpha$  *leu1 arg4 sod1:natMX*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

##### Odczynniki

- agar, baktopenon, ekstrakt drożdżowy Difco
- glicerol, glukoza Sigma-Aldrich

##### Pożywki

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

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

#### 8.5.1.2.2. Do oznaczania poziomu karbonylacji białek

##### Szczepy

- szczep dziki SP-4 (MAT $\alpha$  *leu1 arg4*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
- izogeniczny mutant delecyjny DSCD1-1C (MAT $\alpha$  *leu1 arg4 sod1:natMX*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae*



## Odczynniki

- PMSF, Ponceau S, SDS, TRIS Serva
- akrylamid, APS, bisakrylamid, BSA, dezoksyholan sodu, glicyna, TEMED, TMPD, Tween 20, Nonidet P-40 Sigma-Aldrich
- MeOH, NaCl, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, TCA POCH
- odczynnik ECL Amersham  
Pharmacia Biotech
- odczynnik Bradford Bio-Rad
- zestaw odczynników: OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit

## Bufory

- bufor SDS-PAGE (pH 8,3)
  - glicyna – 0,19 M
  - TRIS-HCl – 25 mM
  - SDS – 0,1 % (w/o)
- bufor do elektrotransferu (pH 8,8)
  - TRIS-HCl – 20 mM
  - glicyna – 0,15 M
  - SDS – 0,02% (w/o)
  - MeOH – 20% (w/w)
- bufor RIPA (pH 7,0)
  - NaCl – 0,22 M
  - Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – 12,5 mM
  - Nonidet P-40 – 1,25% (w/w)
  - SDS – 0,125% (w/o)
  - dezoksyholan sodu – 30 mM
- bufor PBS-T (pH 7,3)
  - NaCl – 145 mM
  - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (138 g/mol) – 18,84 mM
  - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (142 g/mol) – 810 Mm
  - Tween 20 – 0,05% (w/w)

- bufor blokujący
  - BSA – 1% (w/o)
  - bufor PBS-T

### **Żele**

- żel akrylamidowy do elektroforezy białek (SDS-PAGE)
  - żel rozdzielający (14%)
    - akrylamid/bisakrylamid – 30% / 0,8% (w/o)
    - TRIS-HCl pH 8,8 – 0,25 M
    - SDS – 0,1% (w/w)
    - APS – 0,05%
    - TEMED – 0,05%
  - żel zagęszczający (5%)
    - akrylamid/bisakrylamid – 30% / 0,8% (w/o)
    - TRIS-HCl pH 6,8 – 0,06 M
    - SDS – 0,1% (w/w)
    - APS – 0,05%
    - TEMED – 0,05%

#### **8.5.1.2.3. Do oznaczania poziomu zużycia tlenu przez komórki drożdży**

##### **Szczepy**

- szczep dziki SP-4 (MAT $\alpha$  *leu1 arg4*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
- izogeniczny mutant delecyjny DSCD1-1C (MAT $\alpha$  *leu1 arg4 sod1:natMX*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

##### **Odczynniki**

- cytrynian sodu, FCCP, TBT, podsiarczyn sodu                      Sigma-Aldrich
- kwas cytrynowy, etanol                                                      POCH

**Bufory**

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

**8.5.1.3. Do badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej****Szczepy**

- wrażliwy na antybiotyki międzynarodowy szczep standardowy  
*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P

**Odczynniki**

- DMSO Sigma-Aldrich
- chloramfenikol Merck

**Podłoża**

- podłoże płynne Antibiotic Broth Merck
- podłoże agarowe Antibiotic Agar Merck

**8.5.2. Aparatura i oprogramowanie**

- spektrofotometr UVPC-1602C Shimadzu
- spektrofotometr UV/VIS Lambda 35 Perkin-Elmer
- wirówka Universal 320R Hettich
- wytrząsarka Certomat R Sartorius
- wytrząsarka Vortex 3 IKA
- aparat do elektrotransferu półsuchego Kucharczyk
- elektroda tlenowa Clark Hansatech
- wyparka próżniowa Rotavapor R-210 Büchi
- wytrząsarka 358S Elpan
- waga apteczna PS 2100/C/2 Radwag
- waga analityczna LE225D-0CE Sartorius
- program Scan Pack 3.0 Biometra

### **8.5.3. Przygotowanie wyciągów**

#### **8.5.3.1. Do badania aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS**

Wyciągi do badań uzyskano poprzez odpowiednie rozcieńczenie wyciągów podstawowych.

##### **8.5.3.1.1. Nalewka**

Do 6 kolb miarowych o pojemności 10 mL pobrano kolejno 0,05; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 oraz 0,75 mL nalewki podstawowej (NP) i uzupełniono wodą destylowaną. Uzyskano w ten sposób rozcieńczenia nalewki o następujących stężeniach: 0,5; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 mg ziela w 1 mL nalewki. Dla każdego z rozcieńczeń przygotowano po 9 prób.

##### **8.5.3.1.2. Odwar**

Do 5 kolb miarowych o pojemności 10 mL pobrano kolejno 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 oraz 0,5 mL odwaru podstawowego (OP) i uzupełniono wodą destylowaną. Uzyskano w ten sposób rozcieńczenia odwaru o następujących stężeniach: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg ziela w 1 mL odwaru. Dla każdego z rozcieńczeń przygotowano po 9 prób.

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

##### **8.5.3.2.1. Nalewka i odwar**

Nalewkę i odwar z ziela dymnicy przygotowano z 10 g surowca w sposób identyczny jak nalewkę podstawową i odwar podstawowy. Uzyskane wyciągi zagęszczono na wyparce próżniowej do objętości około 10 mL, a następnie przeniesiono do kolb miarowych o pojemności 25 mL i uzupełniono wodą destylowaną do współmierności. Uzyskano w ten sposób wyciągi o stężeniu 400 mg/mL.

### 8.5.3.3. Do badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej

#### 8.5.3.3.1. Nalewka i odwar

Nalewkę i odwar z ziela dymnicy lekarskiej przygotowano z 10 g surowca w sposób identyczny jak nalewkę podstawową i odwar podstawowy. Uzyskane wyciągi zagęszczono na wyparce próżniowej uzyskując 3,0631 g suchej masy nalewki oraz 3,6358 g suchej masy odwaru.

## 8.6. Analiza statystyczna

### Współczynnik kierunkowy prostej

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

### Wyraz wolny

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

### Współczynnik korelacji liniowej r

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

### Średnia arytmetyczna

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

### Odchylenie standardowe pojedynczego wyniku

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

**Odchylenie standardowe średniej arytmetycznej**

$$S_x = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad n - \text{liczba wyników}$$

**Współczynnik zmienności**

$$W_z = \frac{S}{x} \times 100\%$$

**Przedział ufności**

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

Dla przyjętego poziomu istotności  $\alpha=0,05$  ( $P=95\%$ ) i liczby stopni swobody  $f=n-1$ , wartość współczynnika t-Studenta wynosi (Pawlaczyk i Zajac 2005):

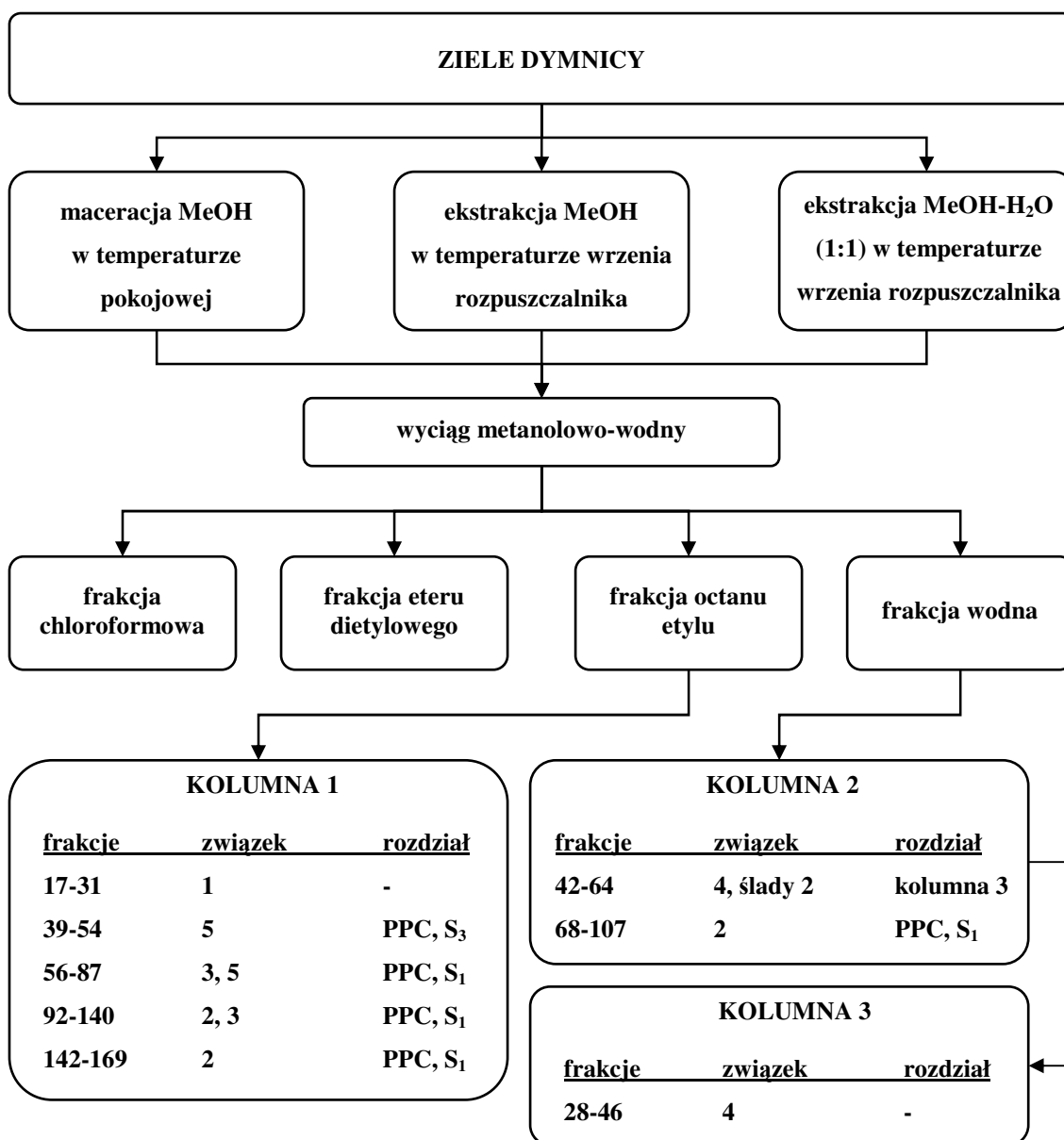
n=3	f=2	$t_{\alpha, f}=4,403$
n=8	f=7	$t_{\alpha, f}=2,365$
n=9	f=8	$t_{\alpha, f}=2,306$
n=10	f=9	$t_{\alpha, f}=2,262$

## 9. WYNIKI

### 9.1. Izolacja i identyfikacja flawonoidów

#### 9.1.1. Izolacja związków flawonoidowych

Obecność związków flawonoidowych stwierdzono w frakcji octanu etylu oraz w frakcji wodnej. Obydwie frakcje poddano rozdzielaniu za pomocą klasycznej chromatografii kolumnowej. Schemat przeprowadzonego rozdzielania przedstawiono na Rycinie 9.



Rycina 9. Schemat izolacji związków flawonoidowych z zieleń dymnicy.

### 9.1.1.1. Rozdział frakcji octanu etylu i frakcji wodnej

Rozdział frakcji octanu etylu i frakcji wodnej przeprowadzono w kolumnach szklanych wypełnionych celulozą Whatman CF-11 w układzie S<sub>9</sub>. Z kolumny 1 (rozdzielanie frakcji octanu etylu) zebrano 192 frakcje o objętości po około 250 mL każda. Z kolumny 2 (rozdzielanie frakcji wodnej) zebrano natomiast 152 frakcje o objętości po około 200 mL każda. Zebrane z poszczególnych kolumn frakcje zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze poniżej 40°C. Na podstawie kontroli chromatograficznej, prowadzonej za pomocą TLC w układach S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> oraz PC w układach S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, łączono frakcje z tej samej kolumny o podobnym obrazie chromatograficznym.

Z **kolumny 1** (frakcja octanu etylu) do izolacji flawonoidów wykorzystano frakcje:

- 17-31 – zawierające związek **1**
- 39-54 – zawierające związek **5**
- 56-87 – zawierające mieszaninę związków **3 i 5**
- 92-140 – zawierające mieszaninę związków **2 i 3**
- 142-169 – zawierające związek **2**

Z **kolumny 2** (frakcja wodna) do izolacji związków flawonoidowych wykorzystano frakcje:

- 42-64 – zawierające związek **4** oraz śladową ilość związku **2**
- 68-107 – zawierające związek **2**

We wszystkich frakcjach, poza plamami fluoryzującymi na żółto i brunatno w świetle lampy UV<sub>366 nm</sub>, na chromatogramach widoczne były dodatkowo liczne związki fluoryzujące na niebiesko przed wywołaniem, oraz na jasnoniebiesko lub seledynowo po wywołaniu odczynnikiem NA.

#### 9.1.1.1.1. Rozdział frakcji 39-54, 56-87, 92-140, 142-169

Rozdział frakcji 39-54, 56-87, 92-140, 142-169 prowadzono z wykorzystaniem bibułowej chromatografii preparatywnej (PPC). Roztwory metanolowe poszczególnych frakcji nanoszono pasmowo na arkusze bibuły chromatograficznej Whatman nr 3.



Chromatogramy rozwijano techniką jednokierunkową wstępującą, stosując jako fazę ruchomą układy rozpuszczalników:

- S<sub>1</sub> – frakcje 56-87, 92-140, 142-169
- S<sub>3</sub> – frakcja 39-54

Rozwinięte chromatogramy suszono w warunkach naturalnych, a następnie oglądano w świetle lampy UV<sub>366 nm</sub>. Pasma związków fluoryzujących na żółto (związek 1) oraz brunatno (związki 2, 3, 5) wycinano, a następnie wymywano trzykrotnie metanolem i dwukrotnie mieszaniną metanol-woda (1:1) na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Uzyskane frakcje **związków 1, 2, 3, 5** poddano kontroli chromatograficznej TLC (S<sub>5</sub>, W<sub>1</sub>) oraz PC (S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, W<sub>1</sub>).

#### 9.1.1.1.2. Rozdział frakcji 42-64, 68-107

Frakcje 42-64 zebrane z kolumny 2 zawierały związek 4 oraz śladowe ilości związku 2. Rozdział tych frakcji przeprowadzono na pomocą kolumny wypełnionej celulozą stosując do elucji układ S<sub>8</sub> (**kolumna 3**). Zebrano 80 frakcji, po około 150 mL każda, które następnie zagęszczono w temperaturze 50°C pod zmniejszonym ciśnieniem. Kontrola chromatograficzna (PC, S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, W<sub>1</sub>) wykazała obecność **związku 4** w frakcjach 28-46. Z frakcji ze śladowymi ilościami związku 2 nie podjęto prób odzysku tego związku.

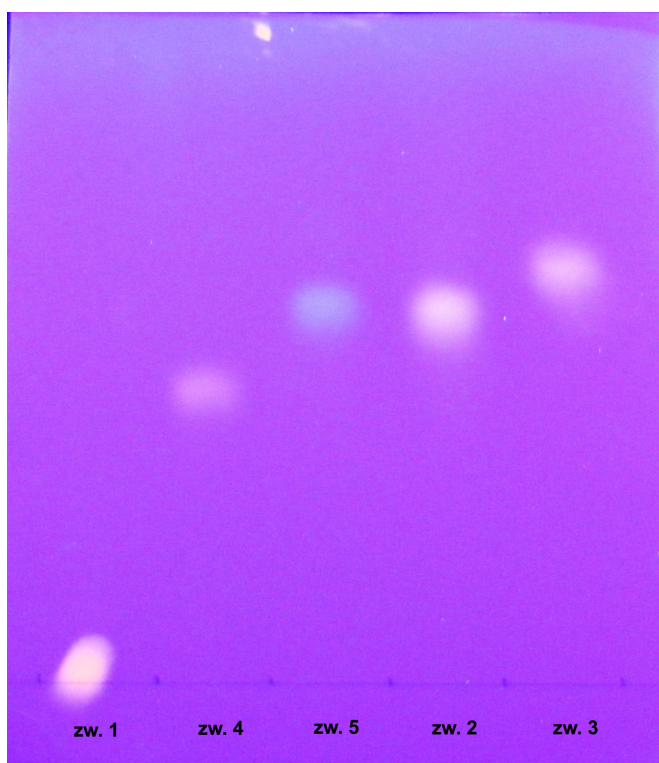
Frakcje 68-107 poddano rozdziałowi za pomocą bibułowej chromatografii preparatywnej w układzie S<sub>1</sub>. Rozwinięte chromatogramy oglądano w świetle lampy UV<sub>366 nm</sub>, zaznaczano brunatne pasma związku 2, a następnie je wycinano i eluowano trzykrotnie metanolem i dwukrotnie mieszaniną metanol-woda (1:1) na łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Uzyskaną w ten sposób frakcję **związku 2** kontrolowano chromatograficznie TLC (S<sub>5</sub>, W<sub>1</sub>) oraz PC (S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, W<sub>1</sub>).

#### 9.1.1.2. Oczyszczanie frakcji związków flawonoidowych

Przeprowadzone kontrole chromatograficzne frakcji związków wykazały, że zawierają one oprócz odpowiednich flawonoidów, także zanieczyszczenia innymi związkami wykazującymi niebieską fluorescencję w świetle lampy UV<sub>366 nm</sub>. W celu

uzyskania jednorodnych chromatograficznie frakcji związków odpowiednich do dalszych analiz identyfikacyjnych przeprowadzono kilkakrotne oczyszczanie za pomocą klasycznej chromatografii kolumnowej. Zastosowano kolumny szklane wypełnione żelom dekstranowym sefadeks LH-20, natomiast jako fazę ruchomą układy rozpuszczalników:

- **związek 1** – dwukrotnie  $S_{10}$ , a następnie  $S_{12}$ ; uzyskano 13 mg związku w postaci żółtych igieł
- **związek 2** – dwukrotnie  $S_{10}$ , dwukrotnie  $S_{11}$ , a następnie  $S_{12}$ ; uzyskano 10 mg związku w postaci żółtych igieł
- **związek 3** – dwukrotnie  $S_{10}$ , dwukrotnie  $S_{11}$ , a następnie  $S_{12}$ ; uzyskano 11 mg związku w postaci żółtych igieł
- **związek 4** –  $S_{10}$ , dwukrotnie  $S_{11}$ , a następnie  $S_{12}$ ; uzyskano 9 mg związku w postaci żółtych igieł
- **związek 5** – dwukrotnie  $S_{11}$ , a następnie  $S_{12}$ ; uzyskano 14 mg związku w postaci żółtych igieł



Rycina 10. Chromatogram TLC ( $S_1$ ,  $W_1$ ) wyizolowanych związków flawonoidowych.

## 9.1.2. Identyfikacja związków flawonoidowych

### 9.1.2.1. Związek 1

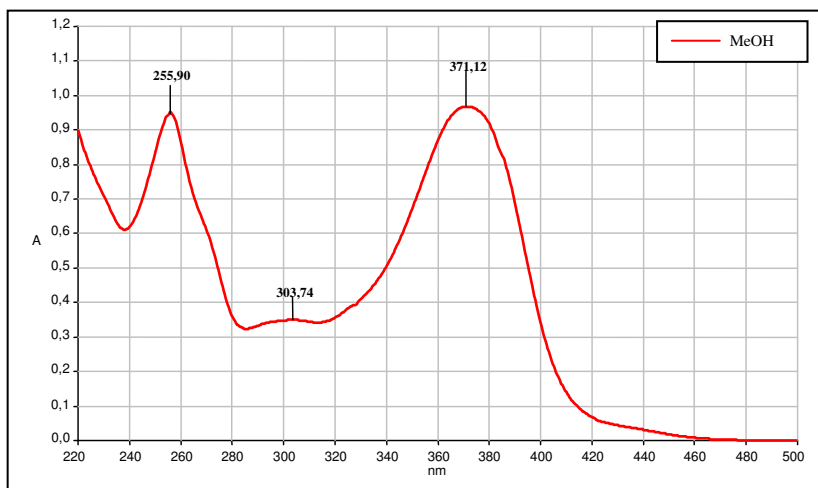
#### Kwercetyna

#### Analiza chromatograficzna (TLC)

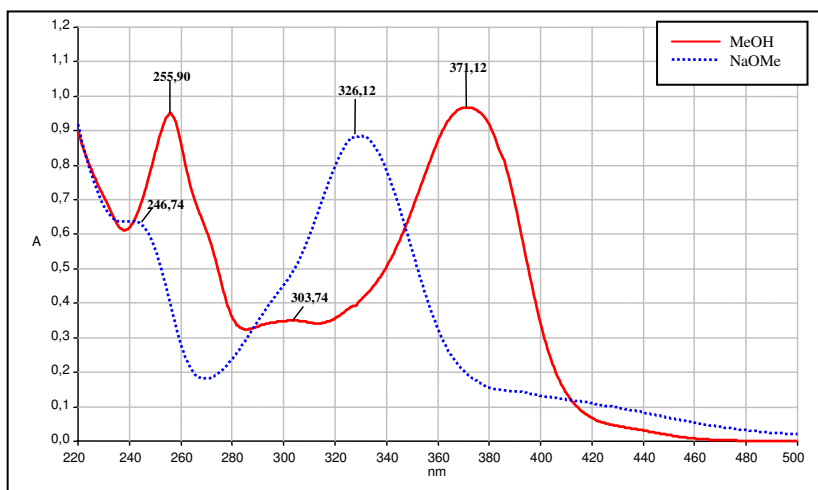
Tabela 4. Analiza chromatograficzna związku 1

Wartość współczynnika $R_f$			Fluorescencja / zabarwienie			
$S_1$	$S_4$	$S_5$	UV <sub>366 nm</sub>	NA/UV <sub>366 nm</sub>	NA/VIS	AlCl <sub>3</sub> /UV <sub>366 nm</sub>
0,02	0,82	0,94	żółta	pomarańczowa	pomarańczowe	żółta

#### Analiza spektralna w nadfiolecie (UV)



Rycina 11. Widmo w nadfiolecie związku 1 (MeOH).



Rycina 12. Widma w nadfiolecie związku 1 (MeOH, NaOMe).

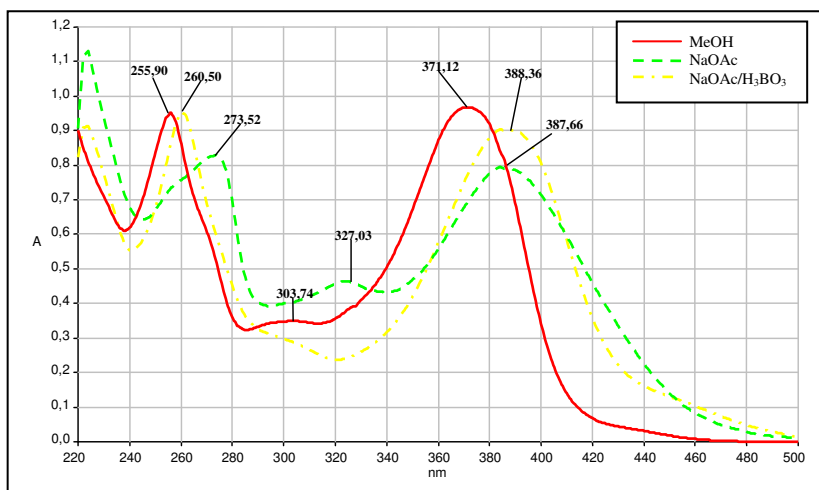
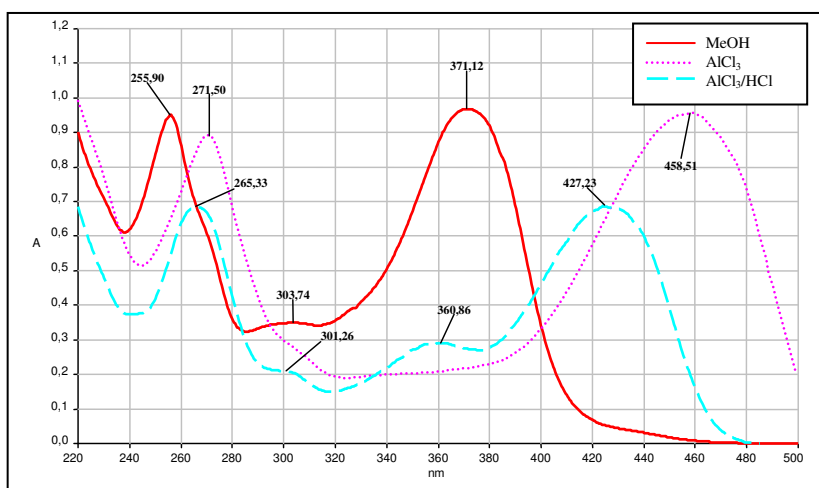
Rycina 13. Widma w nadfiolecie związku 1 (MeOH, NaOAc, NaOAc / H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).Rycina 14. Widma w nadfiolecie związku 1 (MeOH, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> / HCl).

Tabela 5. Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 1

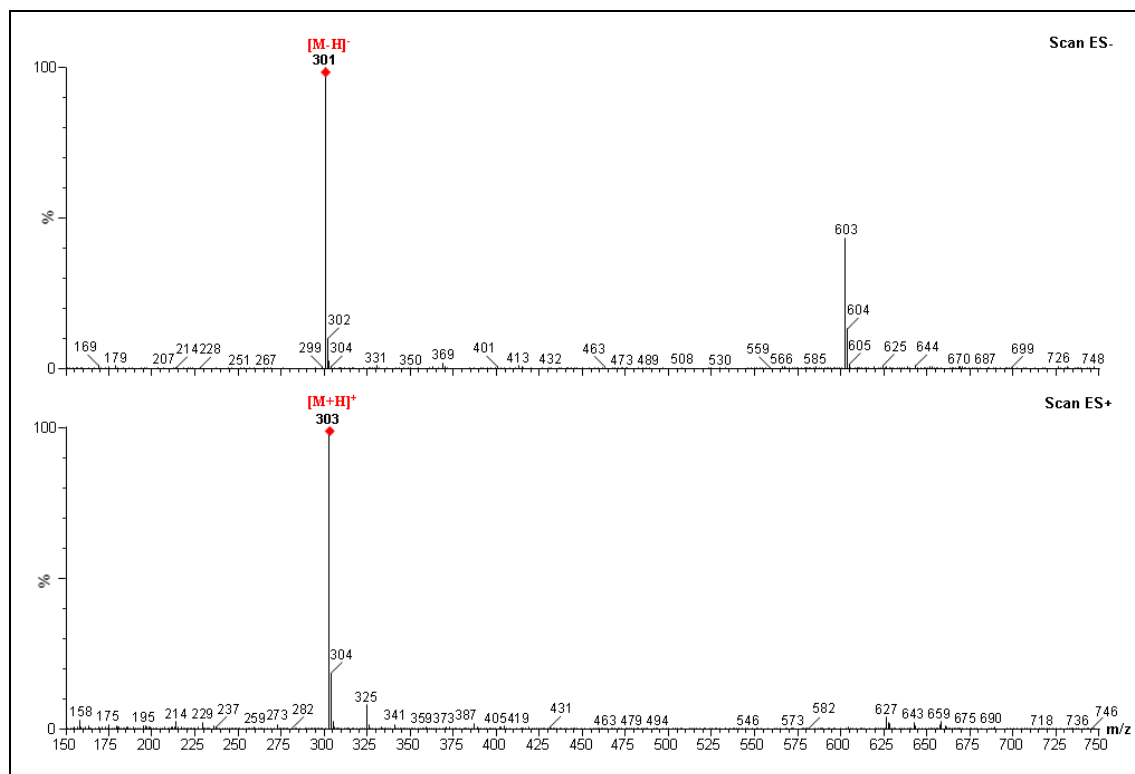
Odczynnik	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{\max I}$ (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	256	-	304; 371	-
+NaOMe	247		326	45,00
+NaOAc	274	18	327; 388	
+NaOAc / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	261		388	17
+AlCl <sub>3</sub>	272		458	31*
+AlCl <sub>3</sub> / HCl	265		301; 427	56

\*wobec widma z AlCl<sub>3</sub> / HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.

## Analiza HPLC-DAD-ESI-MS

Tabela 6. Analiza HPLC-DAD związku 1

Czas retencji (min)	Widmo UV-DAD	
	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)
18,95	254	368



Rycina 15. Widmo ESI-MS związku 1 w trybie jonów ujemnych (ES-) oraz jonów dodatnich (ES+).

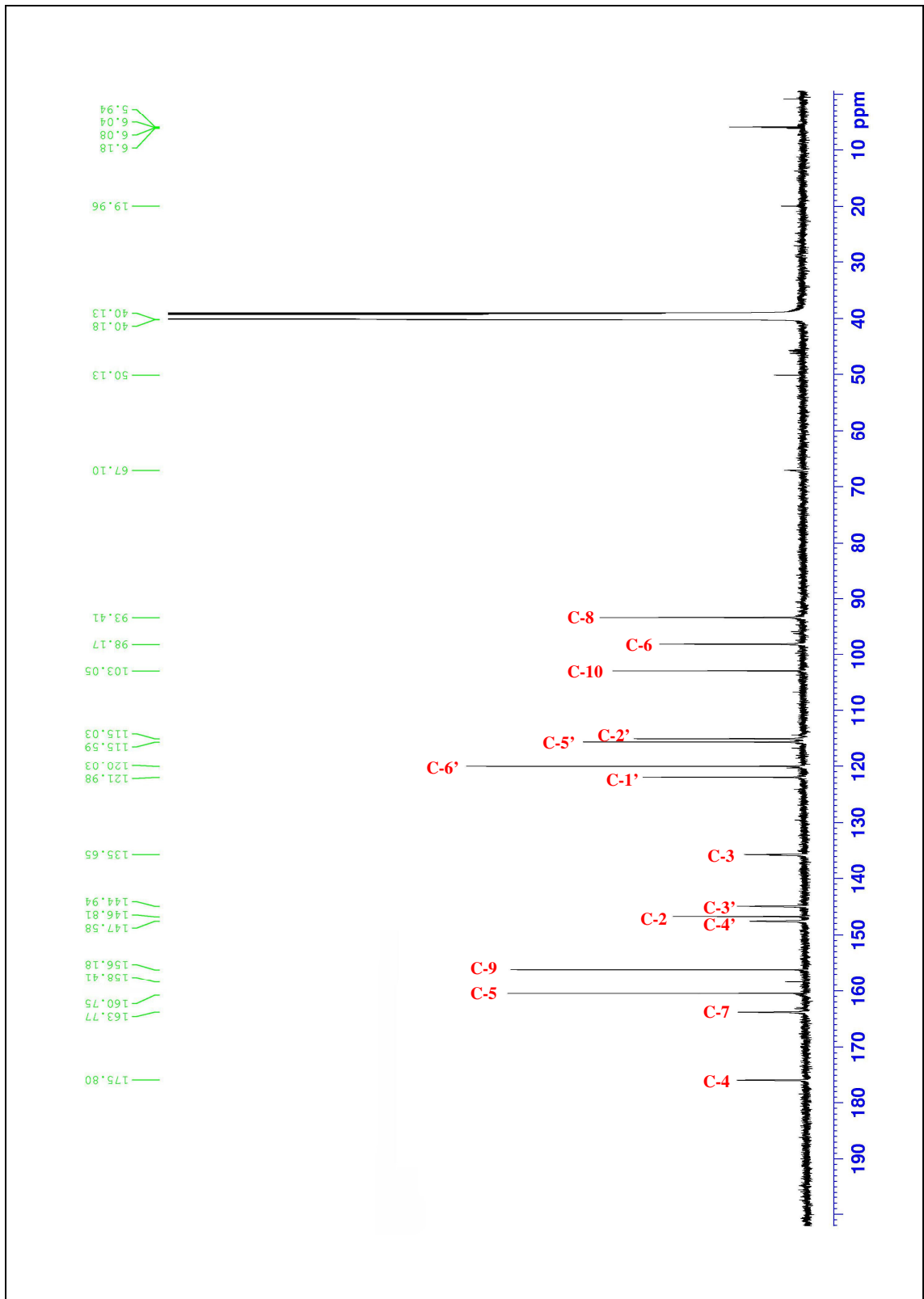
Tabela 7. Wyniki analizy ESI-MS związku 1

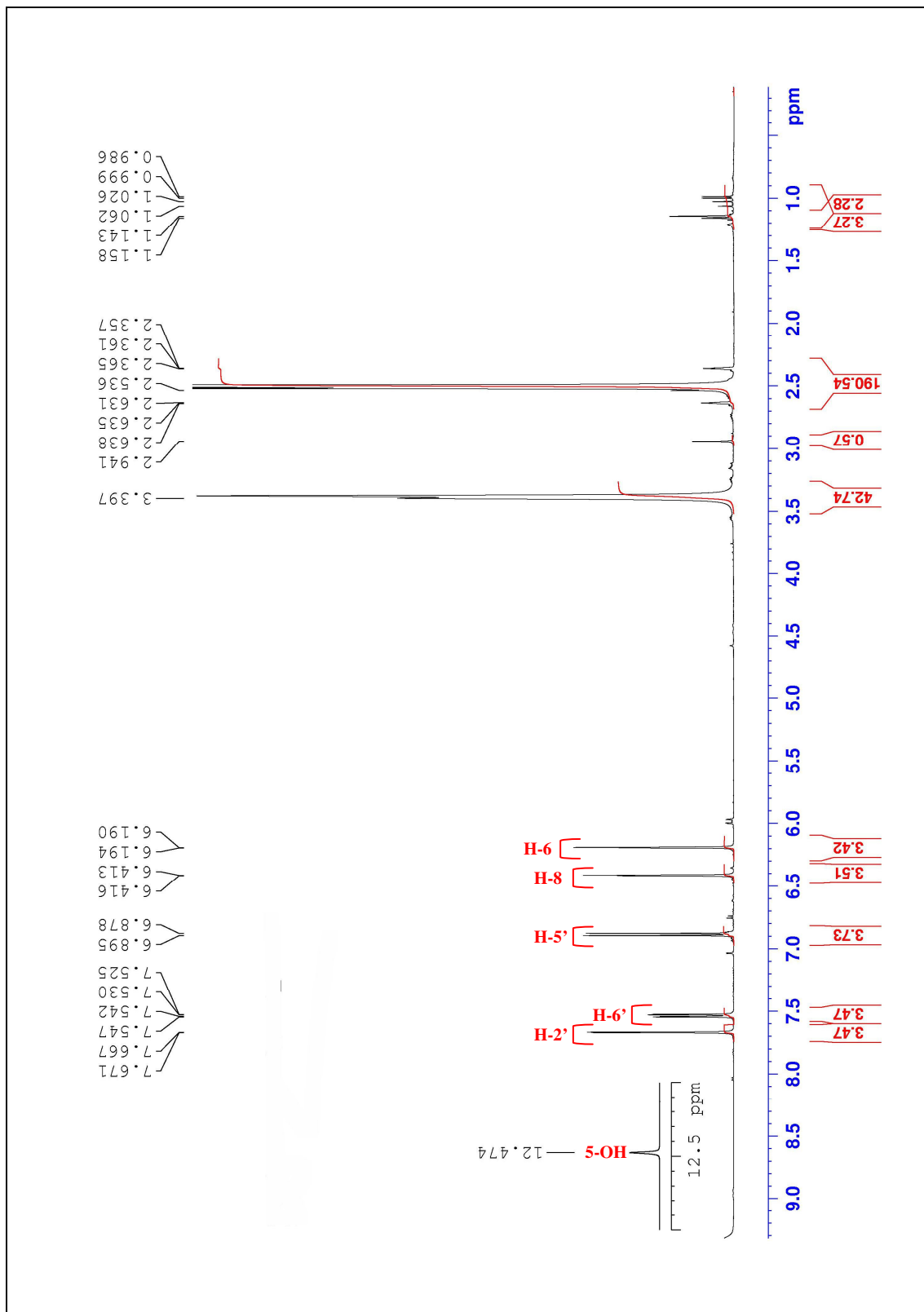
	ES-	<i>m/z</i>	ES+	<i>m/z</i>
jon molekularny	[M-H] <sup>-</sup>	301	[M+H] <sup>+</sup>	303
masa związku: 302		wzór sumaryczny związku: C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>		

Analiza  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMRTabela 8.  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR związku 1 w DMSO- $d_6$ 

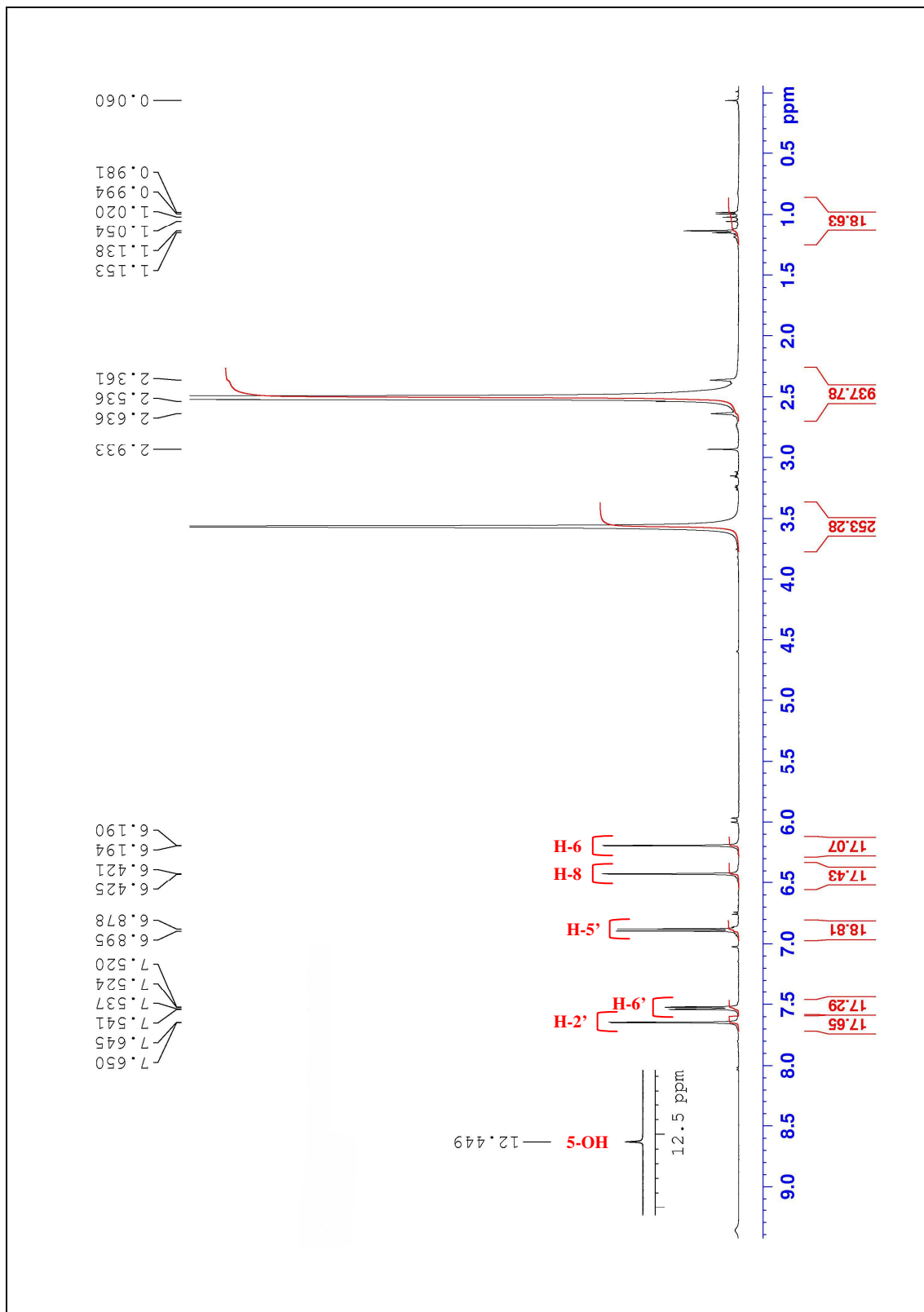
Związek 1				
Pozycja	$\delta\text{C}_{\text{ppm}}$ 125 MHz	$\delta\text{H}_{\text{ppm}}$		
		500 MHz, DMSO- $d_6$	500 MHz, DMSO- $d_6$ +D $_2$ O	
aglikon	2	146,81		
	3	135,65		
	4	175,80		
	5	160,75	12,47 (s, 5-OH)	12,45 (s, 5-OH)
	6	98,71	6,19 (d, $J=1,9$ Hz)	6,19 (d, $J=2,0$ Hz)
	7	163,77		
	8	93,41	6,41 (d, $J=1,8$ Hz)	6,42 (d, $J=2,0$ Hz)
	9	156,18		
	10	103,05		
	1'	121,98		
	2'	115,03	7,64 (d, $J=2,1$ Hz)	7,65 (d, $J=2,2$ Hz)
	3'	144,94		
	4'	147,58		
	5'	115,59	6,89 (d, $J=8,5$ Hz)	6,89 (d, $J=8,5$ Hz)
6'	120,03	7,54 (dd, $J=2,2/8,5$ Hz)	7,53 (dd, $J=2,2/8,5$ Hz)	

Widma  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR **związku 1** są zgodne z danymi literaturowymi dla **kwercetyny** (Agrawal i Rastogi 1981; Agrawal 1989; Dey i Harborne 1989; Harborne i Mabry 1982; Harborne 1994; Mabry i wsp. 1970; Markham i wsp. 1978).

Rycina 16. Widmo <sup>13</sup>C NMR związku 1 (DMSO-d<sub>6</sub>).

Rycina 17. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku 1 ( $\text{DMSO-d}_6$ ).



Rycina 18. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku 1 ( $\text{DMSO-d}_6+\text{D}_2\text{O}$ ).

### 9.1.2.2. Związek 2

#### 3-O- $\alpha$ -arabinopiranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny

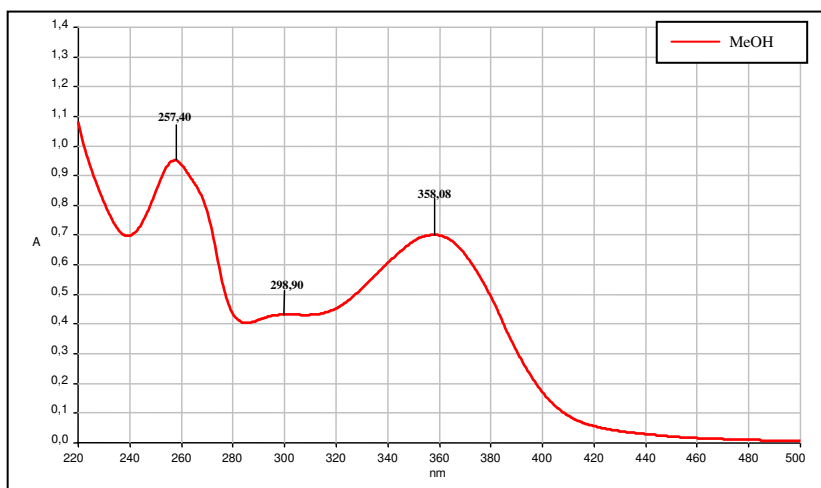
synonim: peltatozyd

#### Analiza chromatograficzna (TLC)

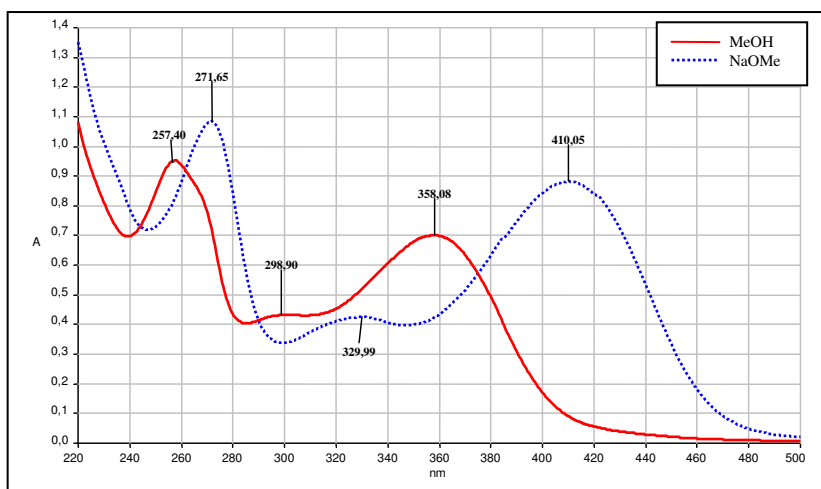
Tabela 9. Analiza chromatograficzna związku 2

Wartość współczynnika R <sub>f</sub>			Fluorescencja / zabarwienie			
S <sub>1</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	UV <sub>366 nm</sub>	NA/UV <sub>366 nm</sub>	NA/VIS	AlCl <sub>3</sub> /UV <sub>366 nm</sub>
0,42	0,23	0,30	brunatna	pomarańczowa	żółtopomarańczowe	żółta

#### Analiza spektralna w nadfiolecie (UV)



Rycina 19. Widmo w nadfiolecie związku 2 (MeOH).



Rycina 20. Widma w nadfiolecie związku 2 (MeOH, NaOMe).

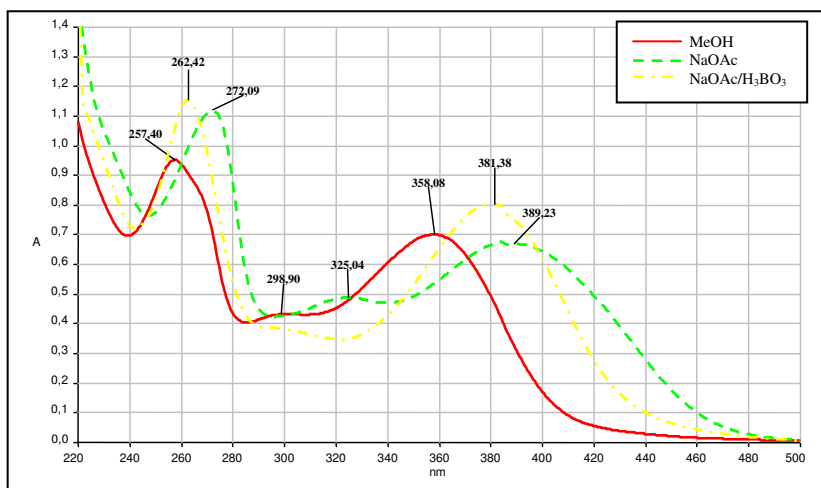
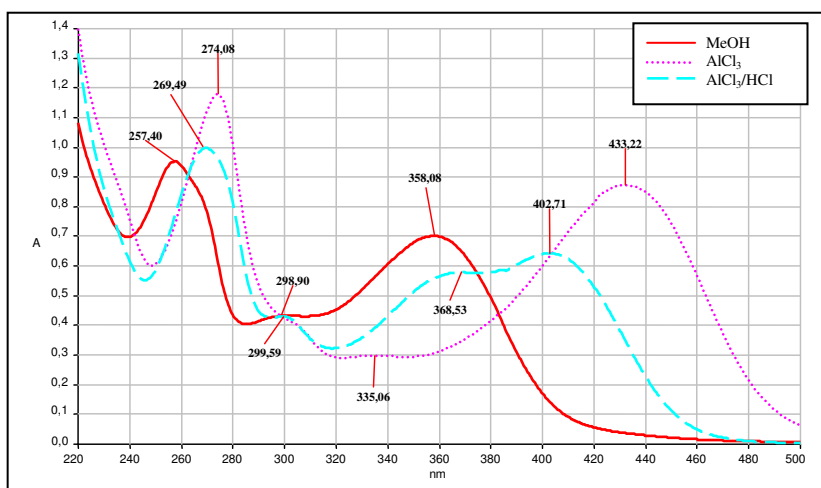
Rycina 21. Widma w nadfiolecie związku 2 (MeOH, NaOAc, NaOAc / H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).Rycina 22. Widma w nadfiolecie związku 2 (MeOH, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> / HCl).

Tabela 10. Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 2

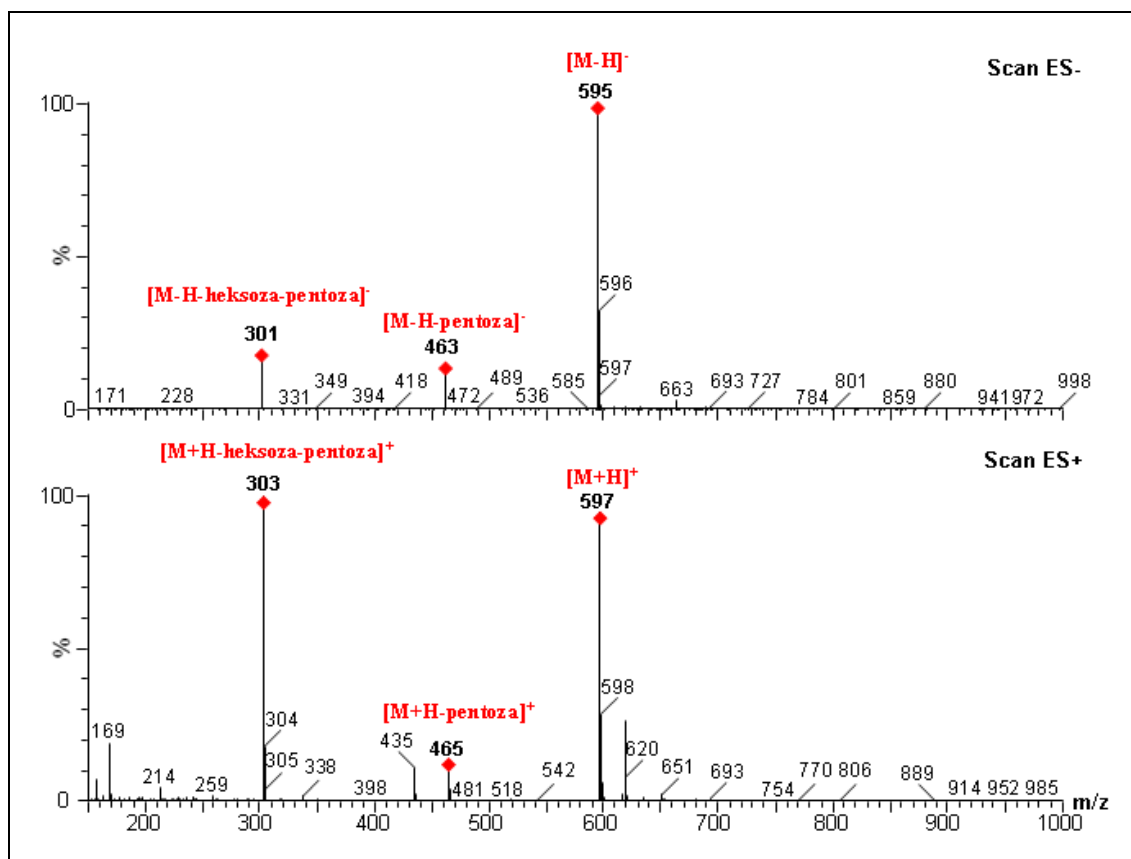
Odczynnik	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{\max I}$ (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	257	-	299; 358	-
+NaOMe	272		330; 410	52
+NaOAc	272	15	325; 389	
+NaOAc / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	262		381	23
+AlCl <sub>3</sub>	274		335; 433	30*
+AlCl <sub>3</sub> / HCl	269		300; 369; 403	45

\*wobec widma z AlCl<sub>3</sub> / HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.

## Analiza HPLC-DAD-ESI-MS

Tabela 11. Analiza HPLC-DAD związku 2

Czas retencji (min)	Widmo UV-DAD	
	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)
18,78	354	259



Rycina 23. Widmo ESI-MS związku 2 w trybie jonów ujemnych (ES-) oraz jonów dodatnich (ES+).

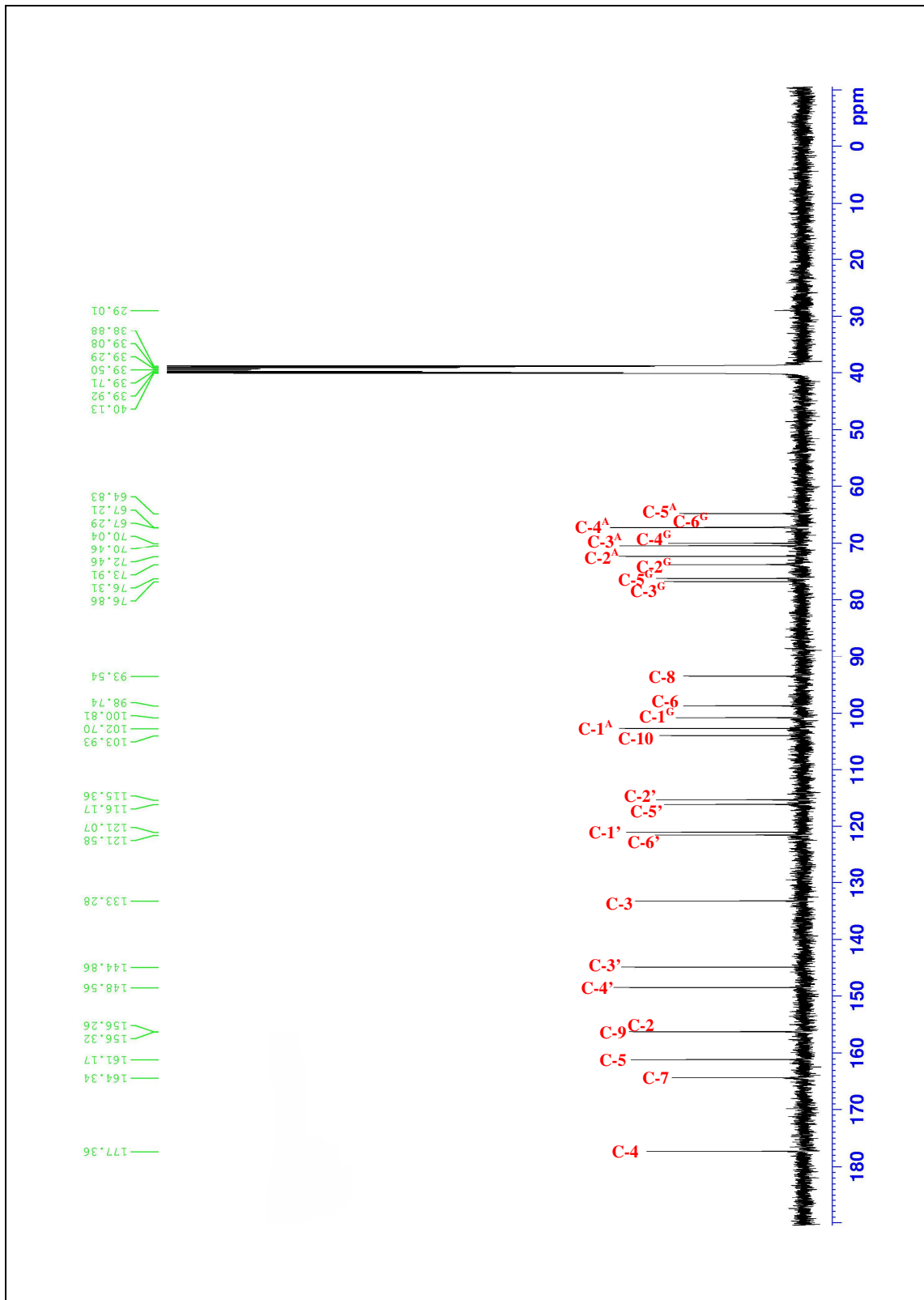
Tabela 12. Wyniki analizy ESI-MS związku 2

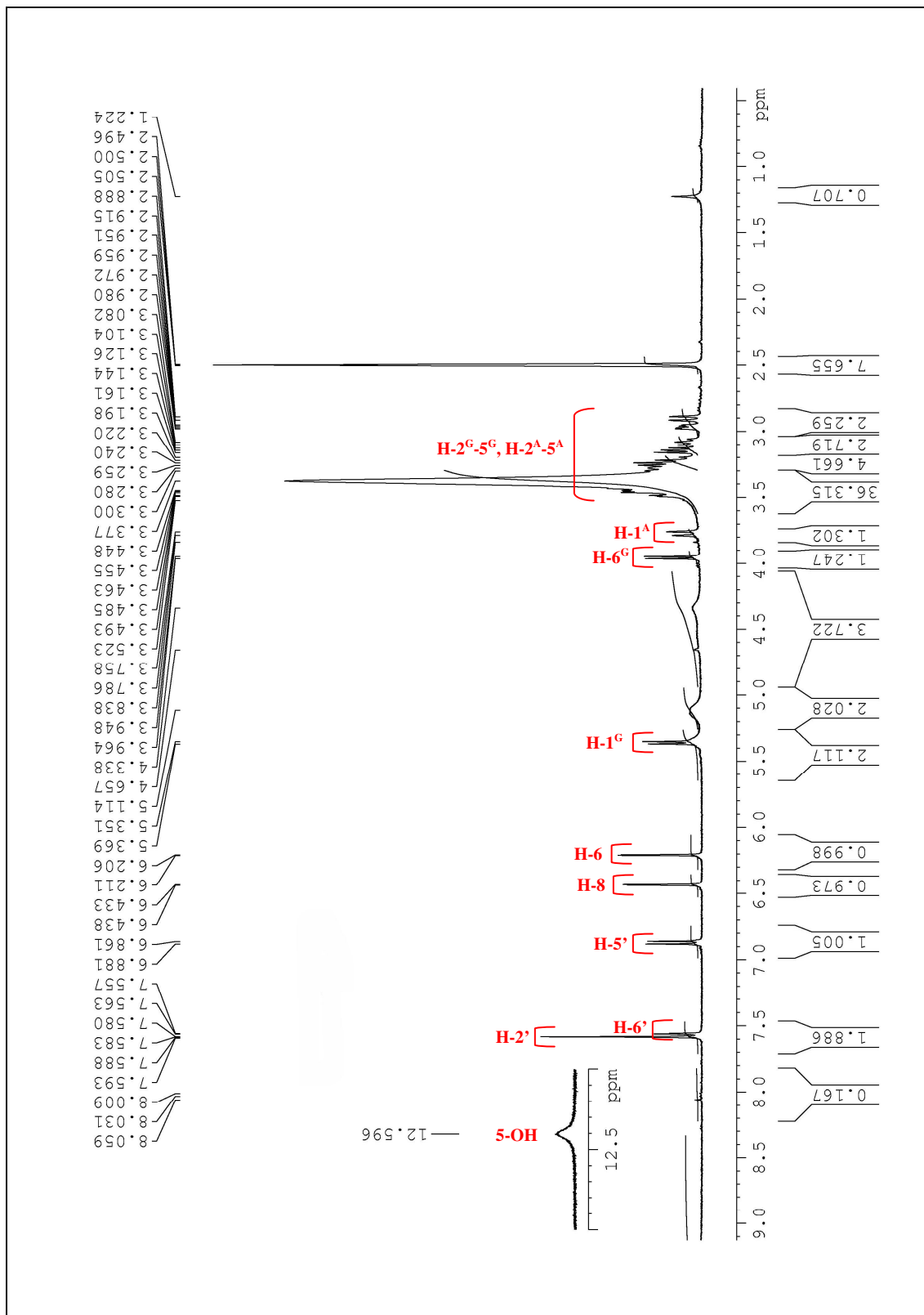
	ES-	<i>m/z</i>	ES+	<i>m/z</i>
jon molekularny	[M-H] <sup>-</sup>	595	[M+H] <sup>+</sup>	597
iony fragmentacyjne:				
deprotonowana / protonowana kwercetyna + heksoza	[M-H-pentoz a] <sup>-</sup>	463	[M+H-pentoz a] <sup>+</sup>	465
deprotonowana / protonowana kwercetyna	[M-H-heksoza- pentoz a] <sup>-</sup>	301	[M+H-heksoza- pentoz a] <sup>+</sup>	303
<b>masa związku: 596</b>	<b>wzór sumaryczny związku: C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>16</sub></b>			

Analiza  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMRTabela 13.  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR związku 2 w DMSO- $d_6$ 

Związek 2			
Pozycja	$\delta\text{C}_{\text{ppm}}$	$\delta\text{H}_{\text{ppm}}$	
		100 MHz	400 MHz, DMSO- $d_6$
aglikon	2	156,26	
	3	133,28	
	4	177,36	
	5	161,17	12,60 (s, 5-OH)
	6	98,74	6,21 (d, $J=1,9$ Hz)
	7	164,34	
	8	93,54	6,40 (d, $J=1,9$ Hz)
	9	156,32	
	10	103,93	
	1'	121,07	
	2'	115,36	7,59 (d, $J=2,0$ Hz)
	3'	144,86	
	4'	148,56	
	5'	116,17	6,87 (d, $J=8,1$ Hz)
6'	121,58	7,57 (dd, $J=1,8/8,6$ Hz)	
glukoza	1 <sup>G</sup>	100,81	5,36 (d, $J=7,2$ Hz)
	2 <sup>G</sup>	73,91	2,89 – 3,52 (m)
	3 <sup>G</sup>	76,86	
	4 <sup>G</sup>	70,04	
	5 <sup>G</sup>	76,31	
	6 <sup>G</sup>	67,21	3,77 (d, $J=11,0$ Hz)
arabinoza	1 <sup>A</sup>	102,70	3,96 (d, $J=6,7$ Hz)
	2 <sup>A</sup>	72,46	
	3 <sup>A</sup>	70,46	
	4 <sup>A</sup>	67,29	
	5 <sup>A</sup>	64,83	

Widma  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR związku 2 są zgodne z danymi literaturowymi dla **3-O- $\alpha$ -arabinopiranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozydu kwercetyny** (Agrawal i Rastogi 1981; Agrawal 1989; Agrawal 1992; Clematis i wsp. 2011; Dey i Harborne 1989; Harborne i Mabry 1982; Harborne 1994; Mabry i wsp. 1970; Markham i Ternai 1976; Markham i wsp. 1978; Teng i wsp. 2002).

Rycina 24. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku 2 ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

Rycina 25. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku 2 ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

### 9.1.2.3. Związek 3

#### 3-O- $\alpha$ -ramnopiranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny

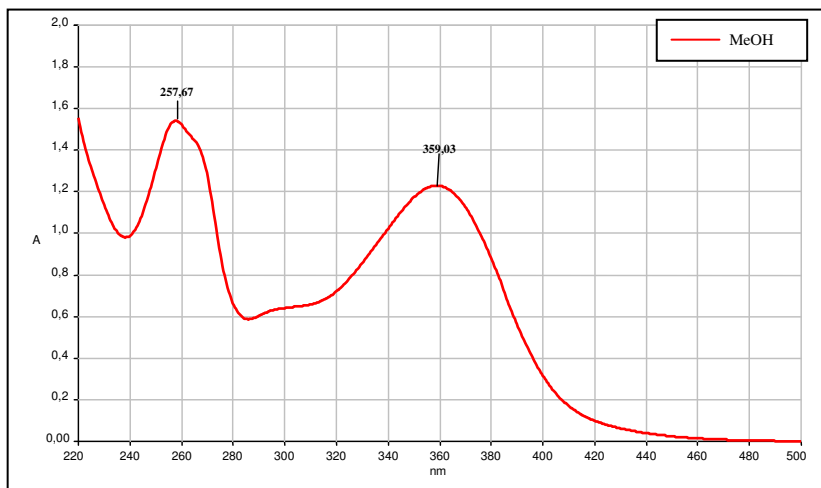
synonimy: 3-O- $\beta$ -rutynozyd kwercetyny, rutyna

#### Analiza chromatograficzna (TLC)

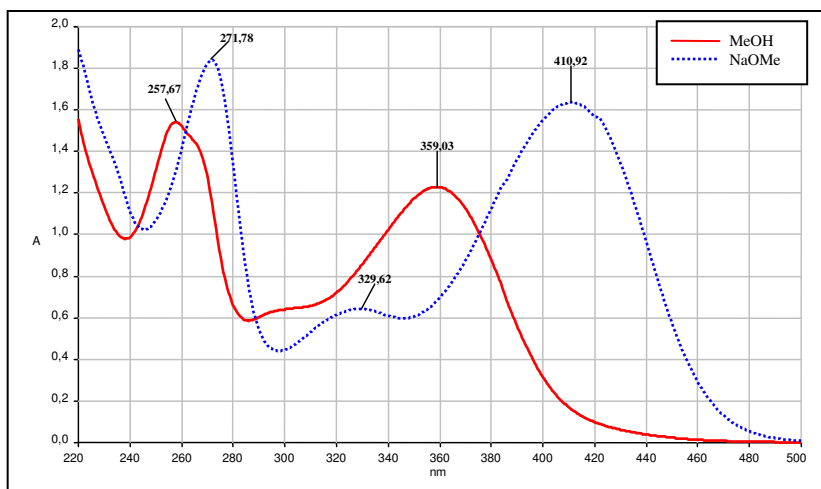
Tabela 14. Analiza chromatograficzna związku 3

Wartość współczynnika R <sub>f</sub>			Fluorescencja / zabarwienie			
S <sub>1</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	UV <sub>366 nm</sub>	NA/UV <sub>366 nm</sub>	NA/VIS	AlCl <sub>3</sub> /UV <sub>366 nm</sub>
0,47	0,43	0,40	brunatna	pomarańczowa	żółtopomarańczowe	żółta

#### Analiza spektralna w nadfiolecie (UV)



Rycina 26. Widmo w nadfiolecie związku 3 (MeOH).



Rycina 27. Widma w nadfiolecie związku 3 (MeOH, NaOMe).



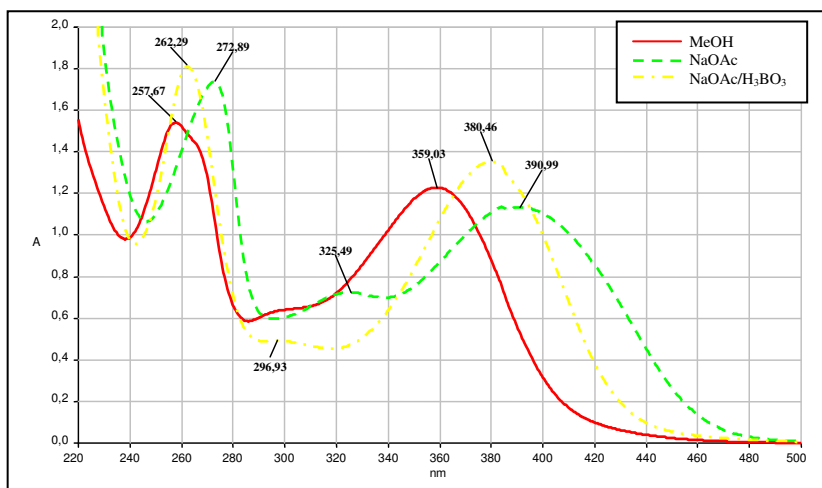
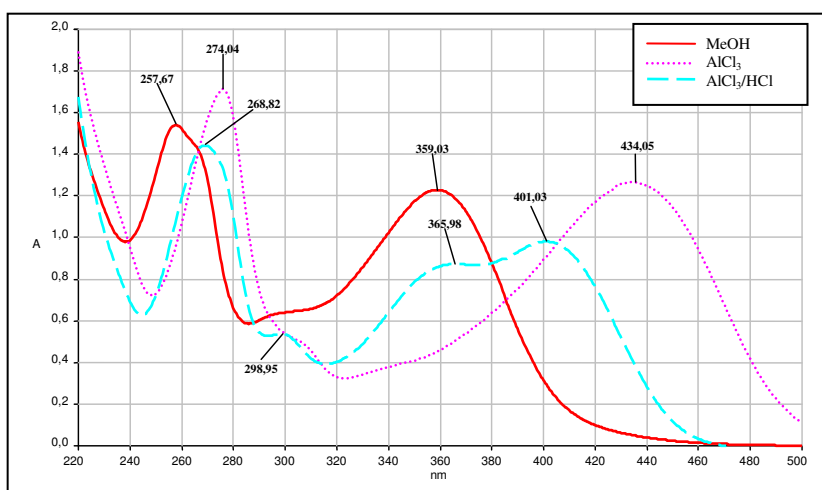
Rycina 28. Widma w nadfioletcie związku 3 (MeOH, NaOAc, NaOAc / H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).Rycina 29. Widma w nadfioletcie związku 3 (MeOH, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> / HCl).

Tabela 15. Charakterystyka spektralna widm w nadfioletcie związku 3

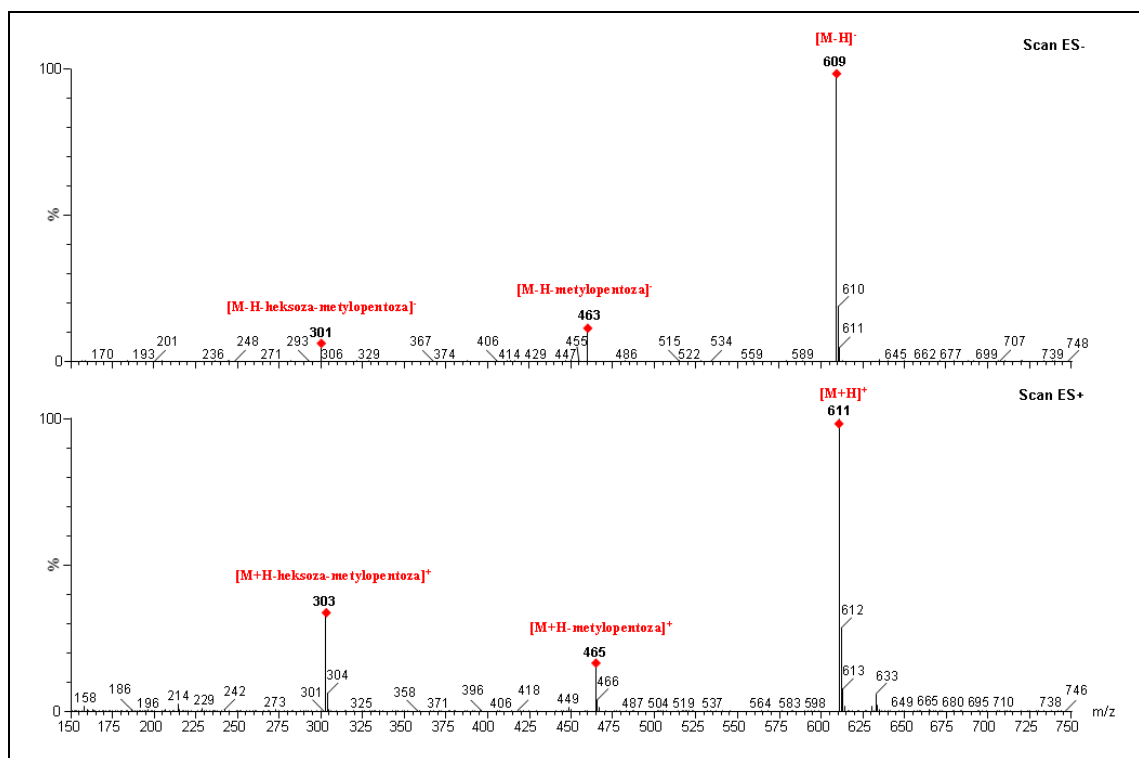
Odczynnik	λ <sub>max II</sub> (nm)	Δλ	λ <sub>max I</sub> (nm)	Δλ
<b>MeOH</b>	258	-	359	-
<b>+NaOMe</b>	272		330; 411	52
<b>+NaOAc</b>	273	15	325; 391	
<b>+NaOAc / H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	262		297; 380	21
<b>+AlCl<sub>3</sub></b>	274		434	33*
<b>+AlCl<sub>3</sub> / HCl</b>	269		299; 366; 401	42

\*wobec widma z AlCl<sub>3</sub> / HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.

### Analiza HPLC-DAD-ESI-MS

Tabela 16. Analiza HPLC-DAD związku 3

Czas retencji (min)	Widmo UV-DAD	
	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)
16,00	354	255



Rycina 30. Widmo ESI-MS związku 3 w trybie jonów ujemnych (ES-) oraz jonów dodatnich (ES+).

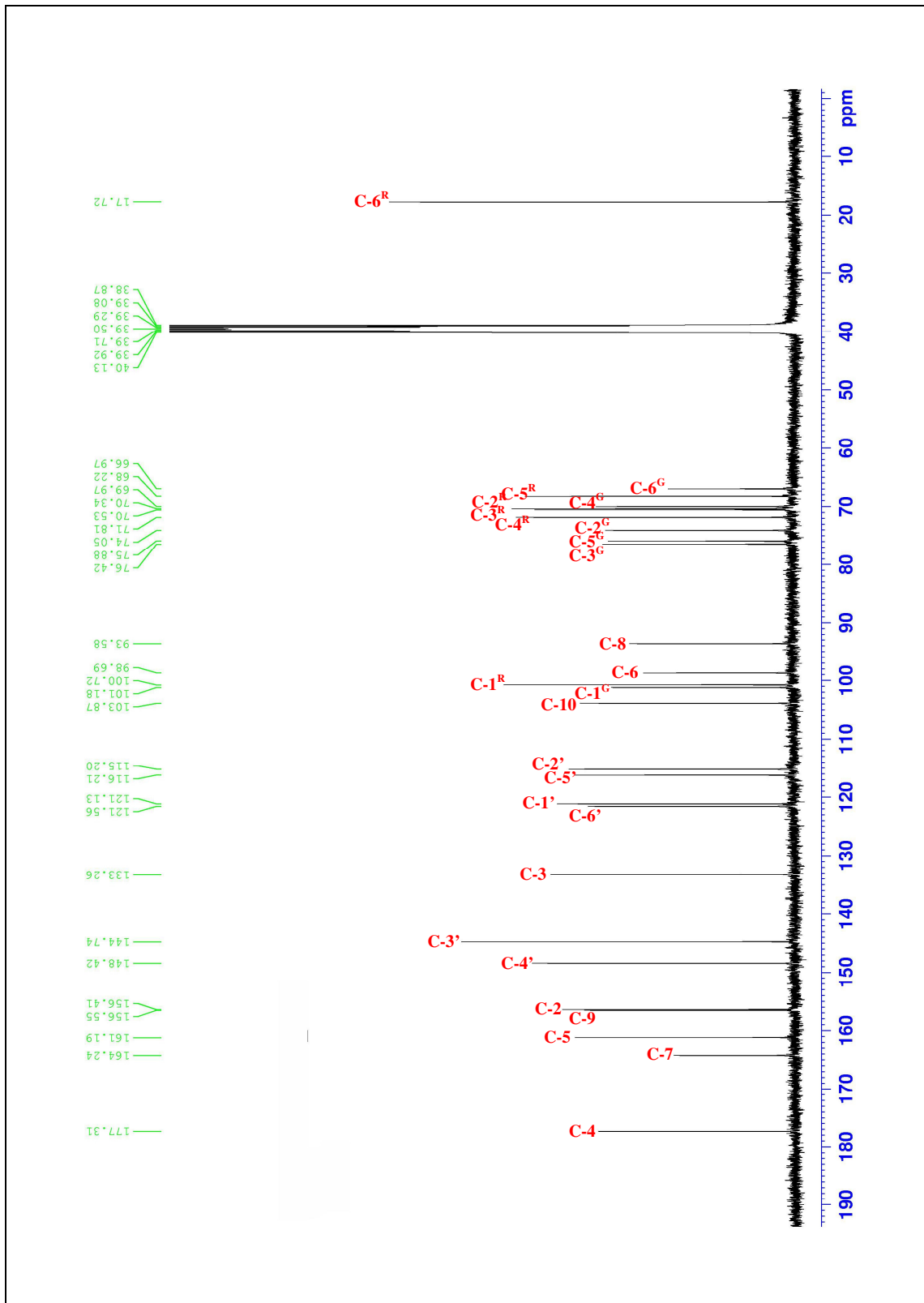
Tabela 17. Wyniki analizy ESI-MS związku 3

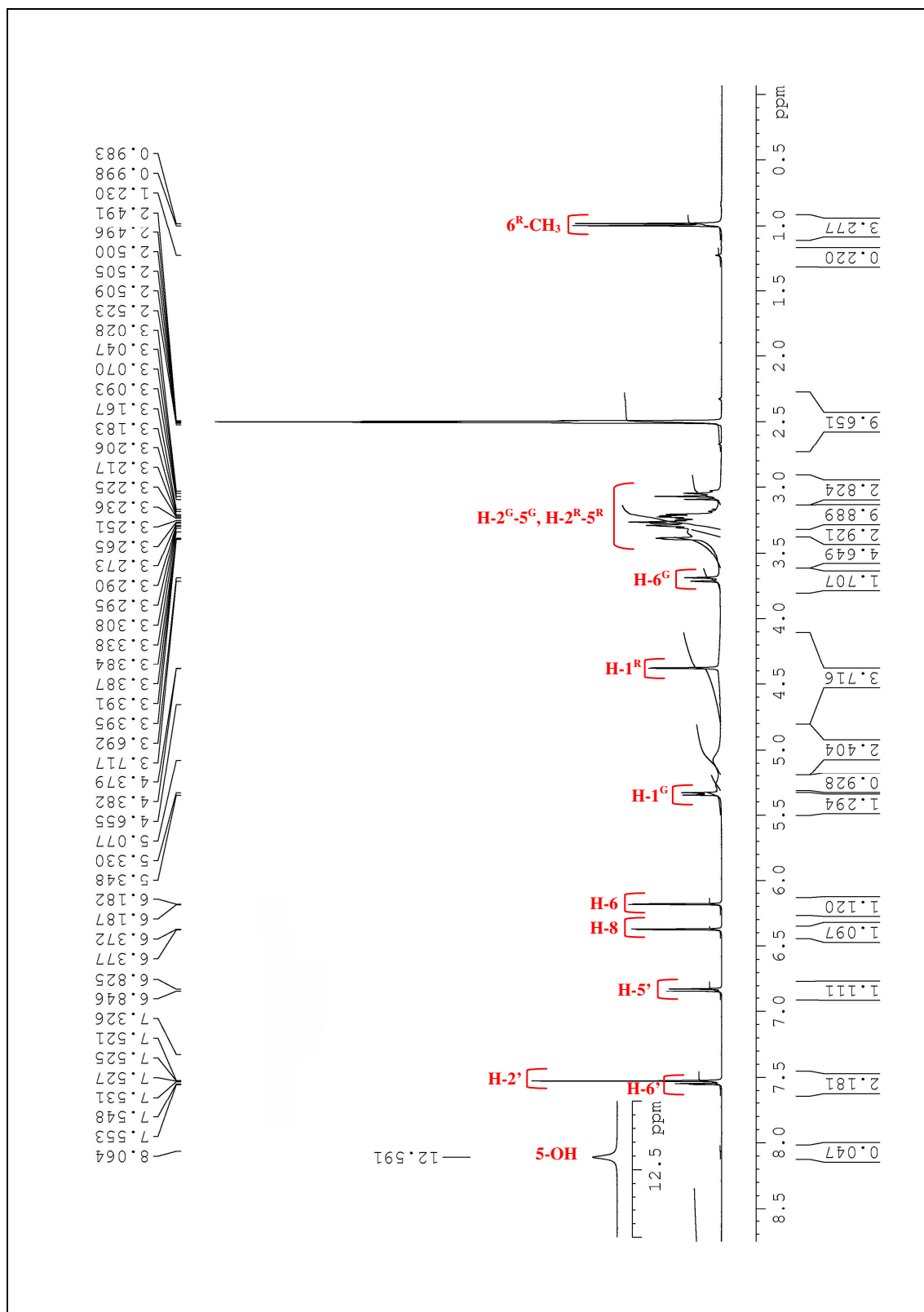
	ES-	<i>m/z</i>	ES+	<i>m/z</i>
<b>jon molekularny</b>	[M-H] <sup>-</sup>	609	[M+H] <sup>+</sup>	611
<b>jony fragmentacyjne:</b>				
deprotonowana / protonowana kwercetyna + heksoza	[M-H-metylopentoza] <sup>-</sup>	463	[M+H-metylopentoza] <sup>+</sup>	465
deprotonowana / protonowana kwercetyna	[M-H-heksoza- metylopentoza] <sup>-</sup>	301	[M+H-heksoza- metylopentoza] <sup>+</sup>	303
<b>masa związku: 610</b>		<b>wzór sumaryczny związku: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub></b>		

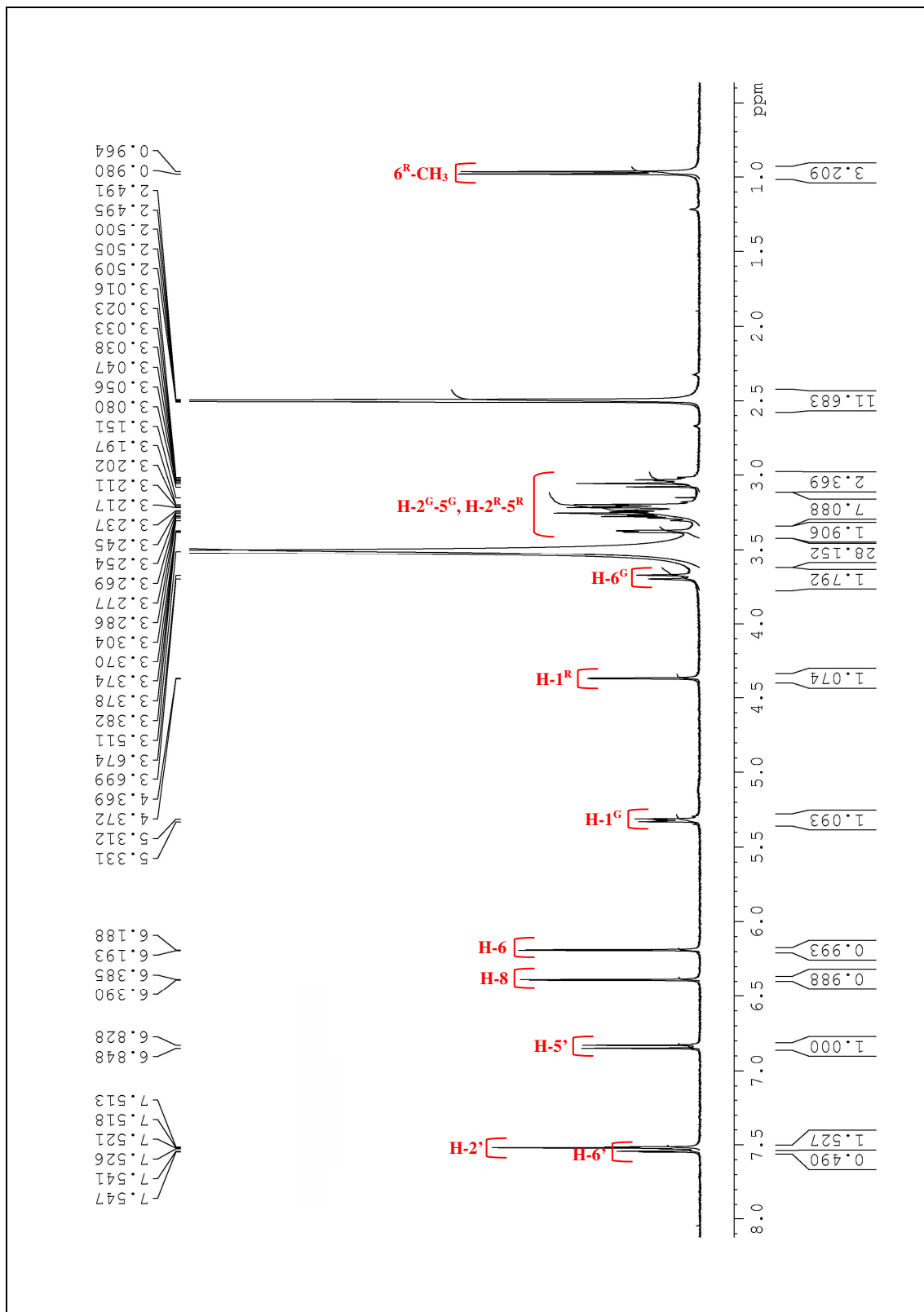
Analiza  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMRTabela 18.  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR związku 3 w DMSO- $d_6$ 

Związek 3				
Pozycja	$\delta\text{C}_{\text{ppm}}$ 100 MHz	$\delta\text{H}_{\text{ppm}}$		
		400 MHz, DMSO- $d_6$	400 MHz, DMSO- $d_6$ +D $_2$ O	
aglikon	2	156,41		
	3	133,26		
	4	177,31		
	5	161,19	12,59 (s, 5-OH)	
	6	98,69	6,18 (d, $J=2,0$ Hz)	6,19 (d, $J=2,1$ Hz)
	7	164,24		
	8	93,58	6,37 (d, $J=2,0$ Hz)	6,39 (d, $J=2,0$ Hz)
	9	156,55		
	10	103,87		
	1'	121,13		
	2'	115,20	7,53 (d, $J=1,5$ Hz)	7,52 (d, $J=2,0$ Hz)
	3'	144,74		
	4'	148,42		
	5'	116,21	6,84 (d, $J=8,3$ Hz)	6,84 (d, $J=8,3$ Hz)
6'	121,56	7,55 (dd, $J=2,0/8,6$ Hz)	7,53 (dd, $J=2,3/8,2$ Hz)	
glukoza	1 <sup>G</sup>	101,18	5,34 (d, $J=7,4$ Hz)	5,32 (d, $J=7,6$ Hz)
	2 <sup>G</sup>	74,05	3,03 – 3,40 (m)	3,02 – 3,38 (m)
	3 <sup>G</sup>	76,42		
	4 <sup>G</sup>	69,97		
	5 <sup>G</sup>	75,88		
	6 <sup>G</sup>	66,97	3,70 (d, $J=10,2$ Hz)	3,69 (d, $J=10,1$ )
ramnoza	1 <sup>R</sup>	100,72	4,38 (d, $J=1,1$ Hz)	4,37 (d, $J=1,3$ )
	2 <sup>R</sup>	70,34	3,03 – 3,40 (m)	3,02 – 3,38 (m)
	3 <sup>R</sup>	70,53		
	4 <sup>R</sup>	71,81		
	5 <sup>R</sup>	68,22		
	6 <sup>R</sup> - CH <sub>3</sub>	17,72	0,99 (d, $J=6,2$ Hz)	0,97 (d, $J=6,2$ Hz)

Widma  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR związku 3 są zgodne z danymi literaturowymi dla **3-O- $\alpha$ -ramnopiranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozydu kwercetyny** (Agrawal i Rastogi 1981; Agrawal 1989; Agrawal 1992; Dey i Harborne 1989; Harborne i Mabry 1982; Harborne 1994; Mabry i wsp. 1970; Markham i Ternai 1976; Markham i wsp. 1978).

Rycina 31. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku 3 ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

Rycina 32. Widmo <sup>1</sup>H NMR związku 3 (DMSO-d<sub>6</sub>).

Rycina 33. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku 3 ( $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$ ).

### 9.1.2.4. Związek 4

#### 3-O- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny

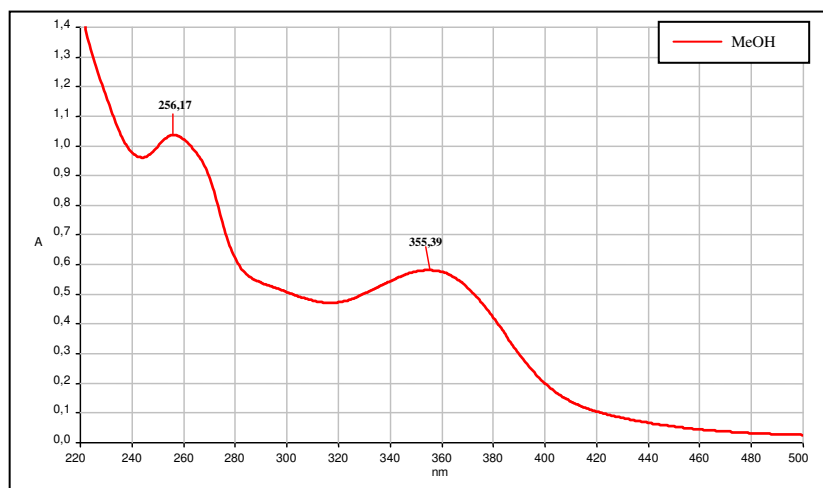
synonim: izokwercytryna

### Analiza chromatograficzna (TLC)

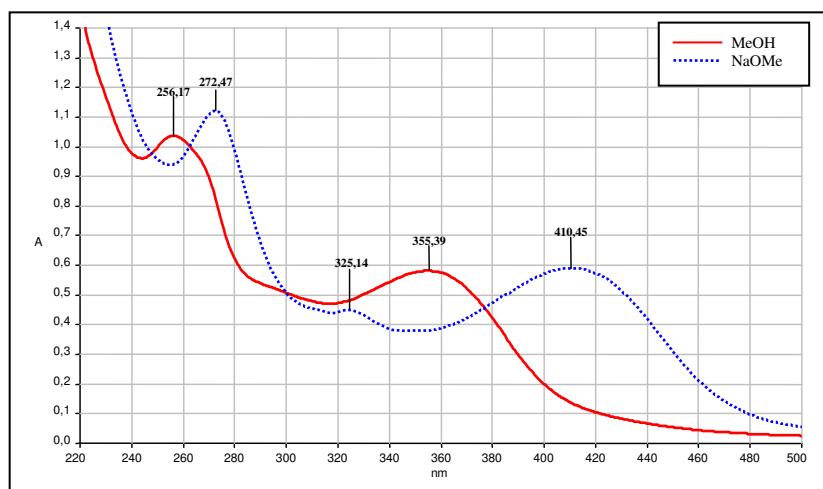
Tabela 19. Analiza chromatograficzna związku 4

Wartość współczynnika $R_f$			Fluorescencja / zabarwienie			
$S_1$	$S_4$	$S_5$	UV <sub>366 nm</sub>	NA/UV <sub>366 nm</sub>	NA/VIS	AlCl <sub>3</sub> /UV <sub>366 nm</sub>
0,28	0,62	0,61	brunatna	pomarańczowa	żółtopomarańczowe	żółta

### Analiza spektralna w nadfiolecie (UV)



Rycina 34. Widmo w nadfiolecie związku 4 (MeOH).



Rycina 35. Widma w nadfiolecie związku 4 (MeOH, NaOMe).

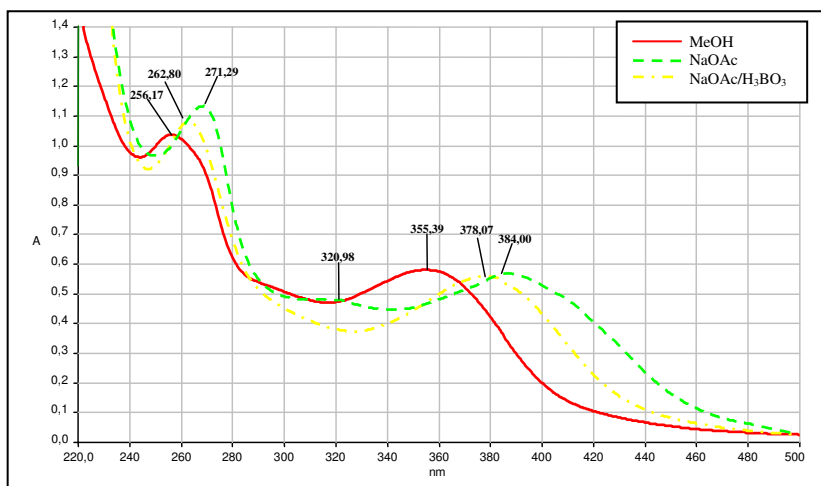
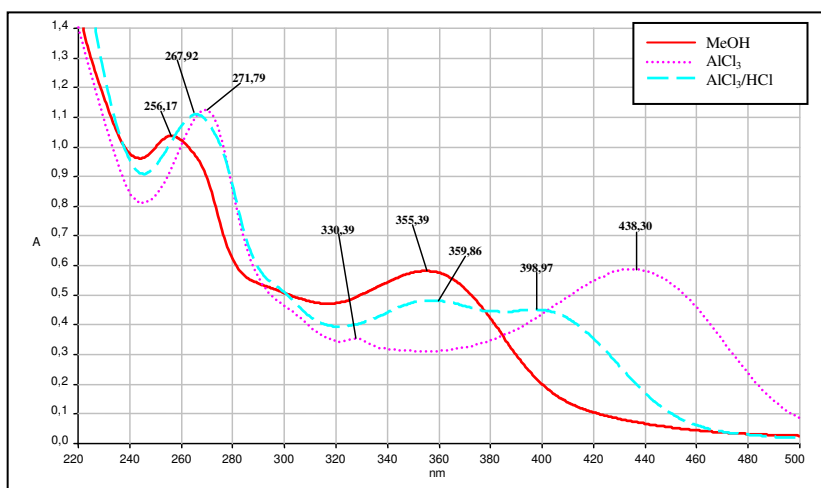
Rycina 36. Widma w nadfioletu związku 4 (MeOH, NaOAc, NaOAc / H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).Rycina 37. Widma w nadfioletu związku 4 (MeOH, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> / HCl).

Tabela 20. Charakterystyka spektralna widm w nadfioletu związku 4

Odczynnik	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{\max I}$ (nm)	$\Delta\lambda$
MeOH	256	-	355	-
+NaOMe	272		325; 410	55
+NaOAc	271	15	321; 384	
+NaOAc / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	263		378	23
+AlCl <sub>3</sub>	272		330; 438	39*
+AlCl <sub>3</sub> / HCl	268		360; 399	44

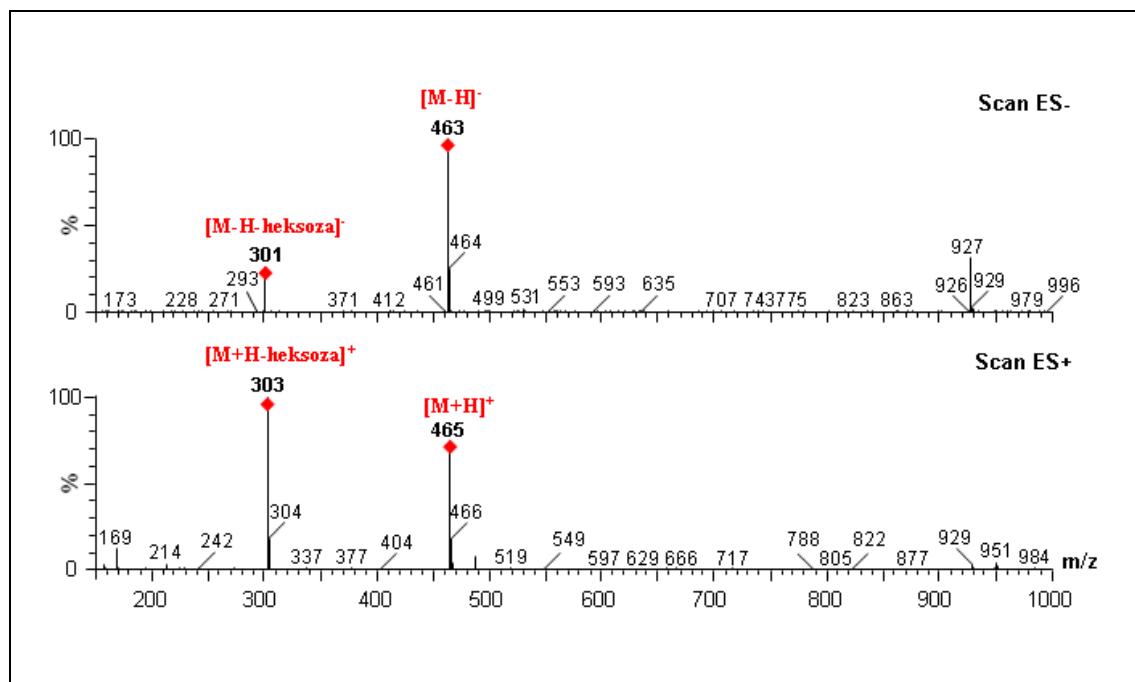
\*wobec widma z AlCl<sub>3</sub> / HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.



### Analiza HPLC-DAD-ESI-MS

Tabela 21. Analiza HPLC-DAD związku 4

Czas retencji (min)	Widmo UV-DAD	
	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)
19,93	355	252



Rycina 38. Widmo ESI-MS związku 4 w trybie jonów ujemnych (ES-) oraz jonów dodatnich (ES+).

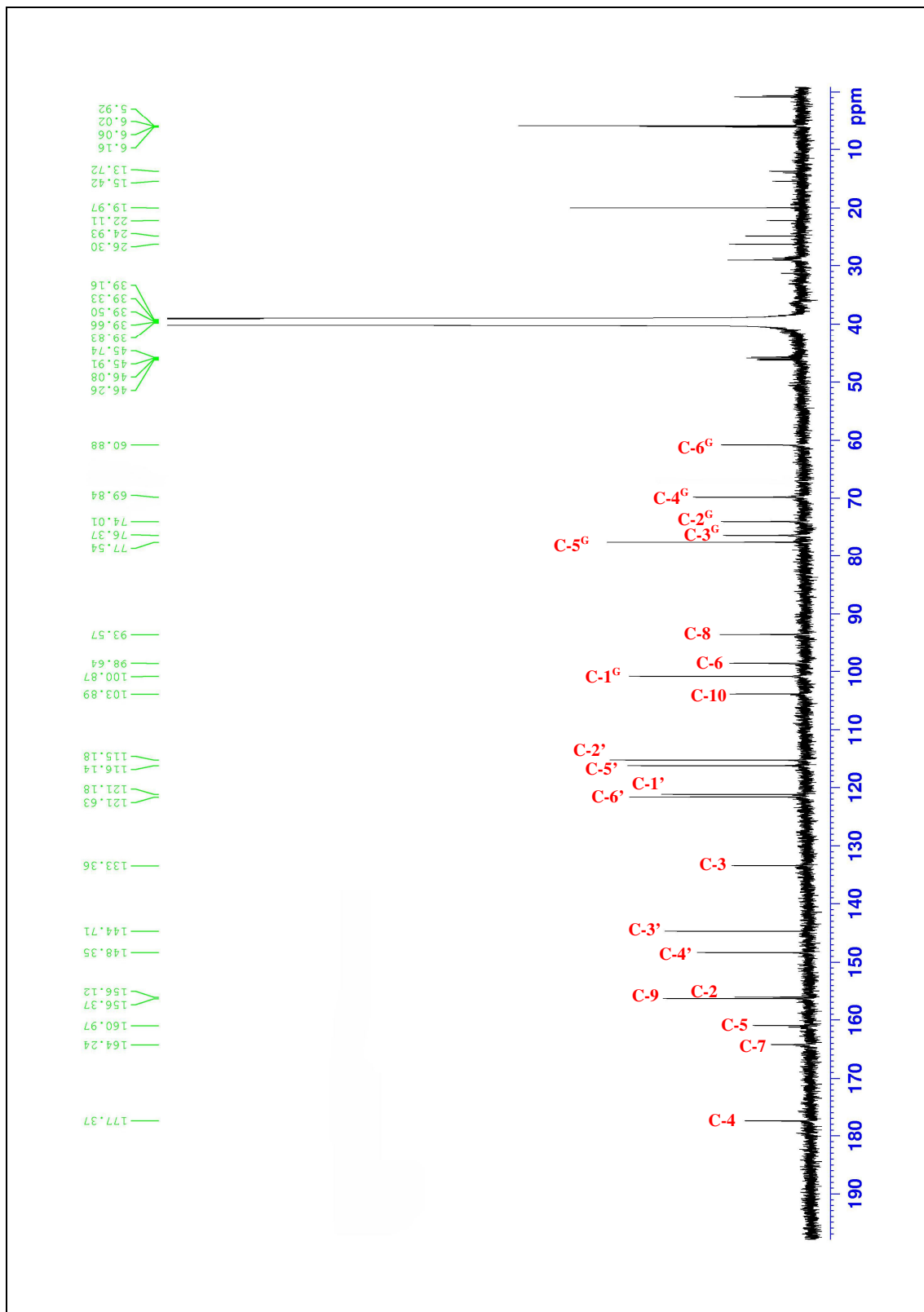
Tabela 22. Wyniki analizy ESI-MS związku 4

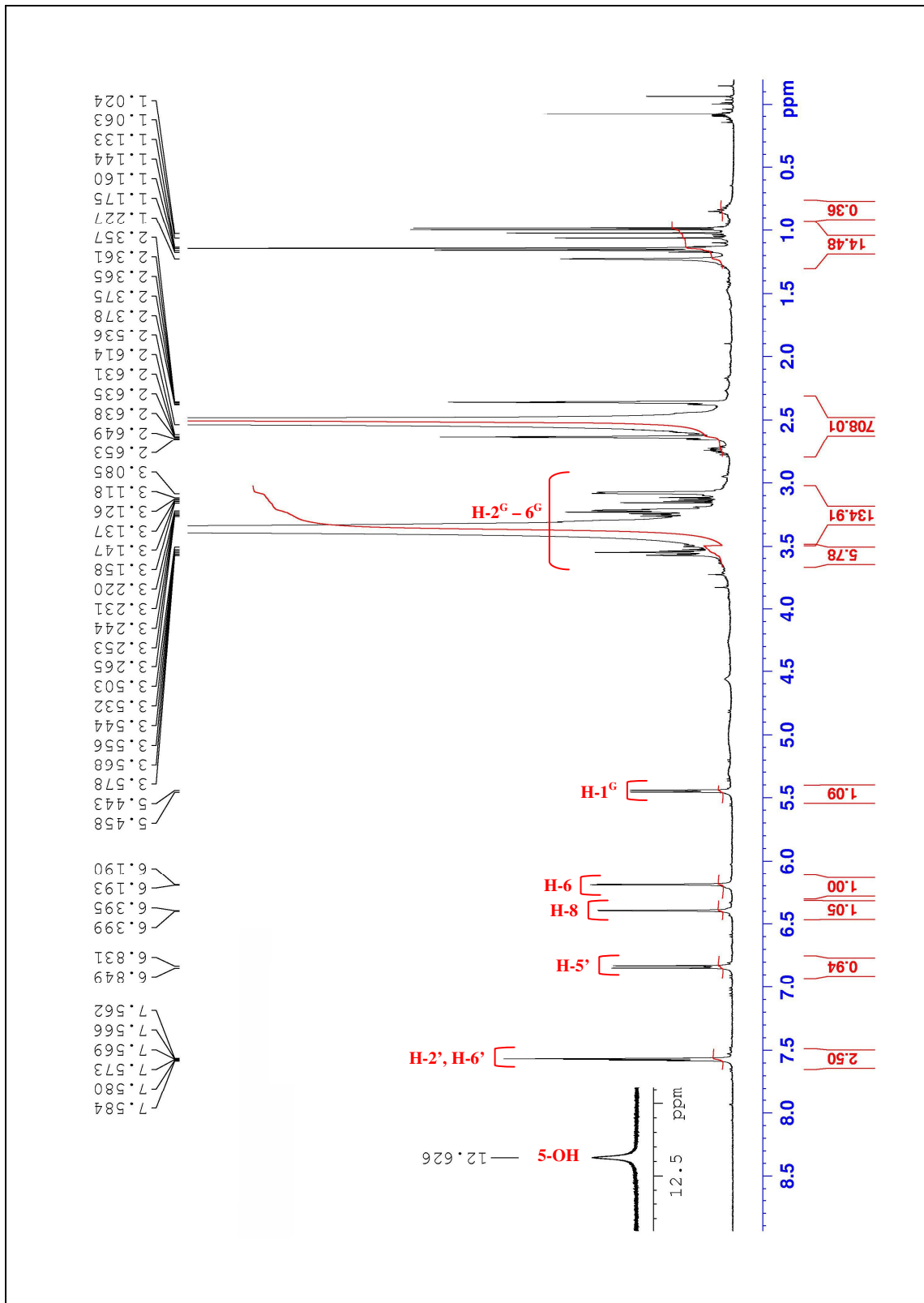
	ES-	<i>m/z</i>	ES+	<i>m/z</i>
jon molekularny	[M-H] <sup>-</sup>	463	[M+H] <sup>+</sup>	465
jon fragmentacyjny:				
deprotonowana / protonowana kwercetyna	[M-H-heksoza] <sup>-</sup>	301	[M+H-heksoza] <sup>+</sup>	303
masa związku: 464		wzór sumaryczny związku: C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>		

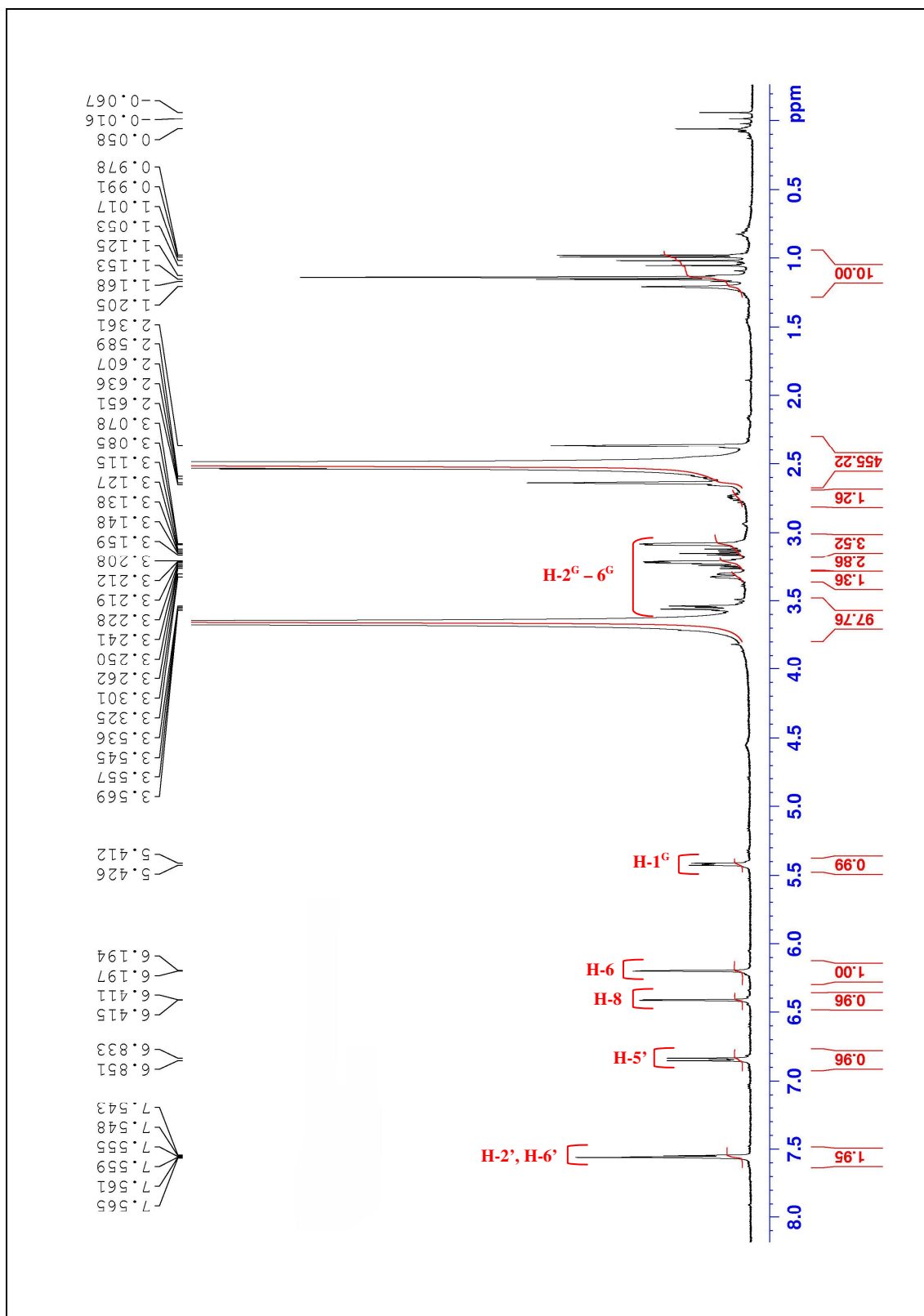
Analiza  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMRTabela 23.  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR związku 4 w DMSO- $d_6$ 

Związek 4				
Pozycja	$\delta\text{C}_{\text{ppm}}$	$\delta\text{H}_{\text{ppm}}$		
		125 MHz	500 MHz, DMSO- $d_6$	500 MHz, DMSO- $d_6$ +D $_2$ O
aglikon	2	156,12		
	3	133,36		
	4	177,37		
	5	160,97	12,63 (s, 5-OH)	
	6	98,64	6,19 (d, $J=1,9$ Hz)	6,20 (d, $J=1,9$ Hz)
	7	164,24		
	8	93,57	6,40 (d $J=1,9$ Hz)	6,41 (d, $J=2,0$ Hz)
	9	156,37		
	10	103,89		
	1'	121,18		
	2'	115,18	7,57 (d, $J=2,1$ Hz)	7,56 (d, $J=2,1$ Hz)
	3'	144,71		
	4'	148,35		
	5'	116,14	6,84 (d, $J=9,0$ Hz)	6,84 (d, $J=9,0$ Hz)
6'	121,63	7,57 (dd, $J=2,3/9,0$ Hz)	7,55 (dd, $J=2,1/8,6$ Hz)	
glukoza	1 <sup>G</sup>	100,87	5,45 (d, $J=7,5$ Hz)	5,42 (d, $J=7,3$ Hz)
	2 <sup>G</sup>	74,01	3,09 – 3,58 (m)	3,08 – 3,59 (m)
	3 <sup>G</sup>	76,37		
	4 <sup>G</sup>	69,84		
	5 <sup>G</sup>	77,54		
	6 <sup>G</sup>	60,88		

Widma  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR **związku 4** są zgodne z danymi literaturowymi dla **3-O- $\beta$ -glukopiranozydu kwercetyny** (Agrawal i Rastogi 1981; Agrawal 1989; Agrawal 1992; Dey i Harborne 1989; Harborne i Mabry 1982; Harborne 1994; Mabry i wsp. 1970; Markham i Ternai 1976; Markham i wsp. 1978).

Rycina 39. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku 4 ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

Rycina 40. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku 4 ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

Rycina 41. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku 4 ( $\text{DMSO-d}_6+\text{D}_2\text{O}$ ).

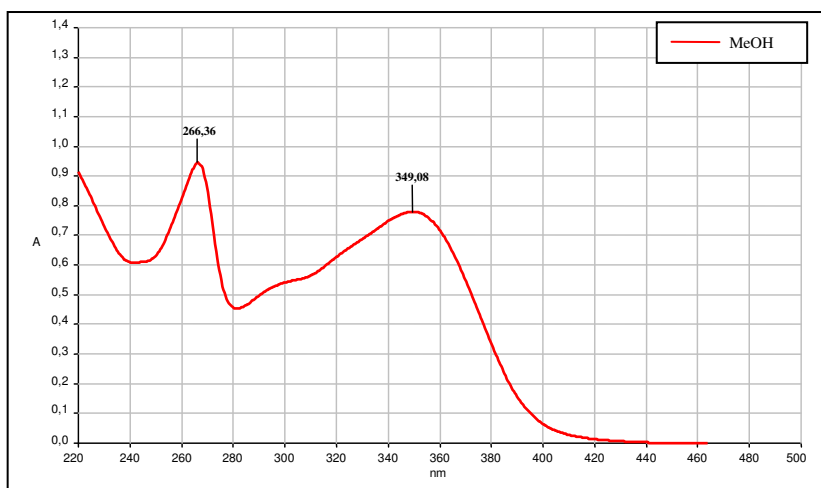
**9.1.2.5. Związek 5****3-O- $\beta$ -glukopiranozyd kemferolu**

synonim: astragalina

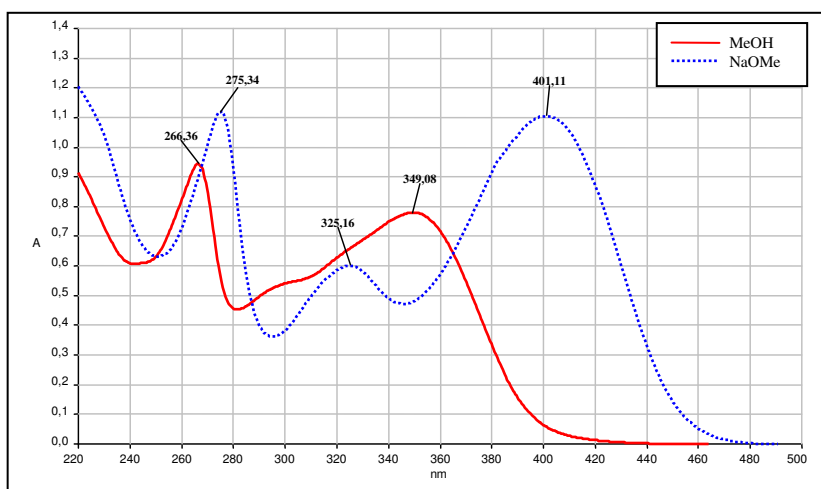
**Analiza chromatograficzna (TLC)**

Tabela 24. Analiza chromatograficzna związku 5

Wartość współczynnika $R_f$			Fluorescencja / zabarwienie			
$S_1$	$S_4$	$S_5$	UV <sub>366 nm</sub>	NA/UV <sub>366 nm</sub>	NA/VIS	AlCl <sub>3</sub> /UV <sub>366 nm</sub>
0,39	0,81	0,70	brunatna	żółta	żółte	jasnożółta

**Analiza spektralna w nadfiolecie (UV)**

Rycina 42. Widmo w nadfiolecie związku 5 (MeOH).



Rycina 43. Widma w nadfiolecie związku 5 (MeOH, NaOMe).

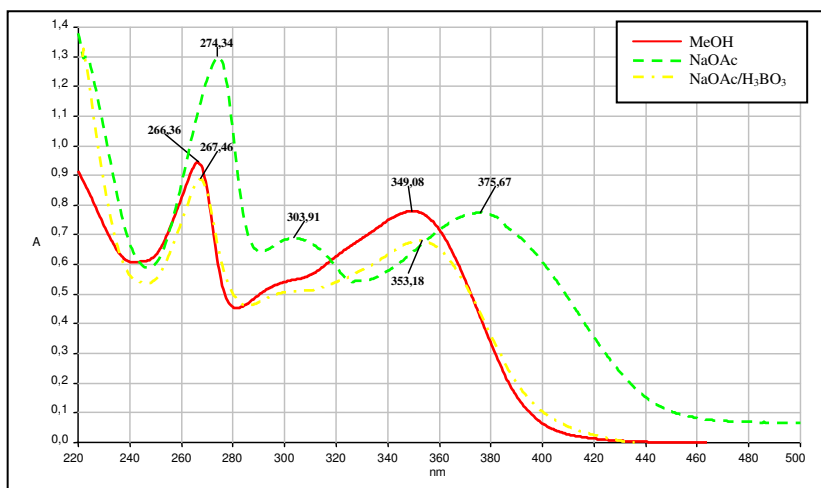
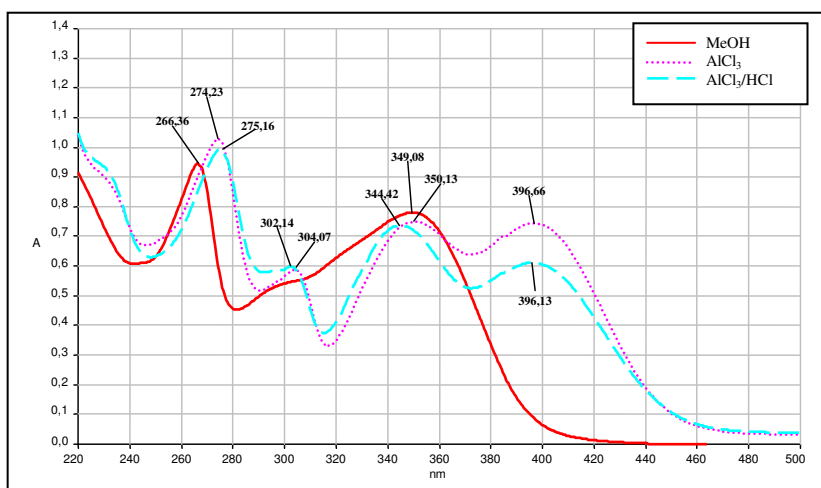
Rycina 44. Widma w nadfiolecie związku 5 (MeOH, NaOAc, NaOAc / H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).Rycina 45. Widma w nadfiolecie związku 5 (MeOH, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> / HCl).

Tabela 25. Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 5

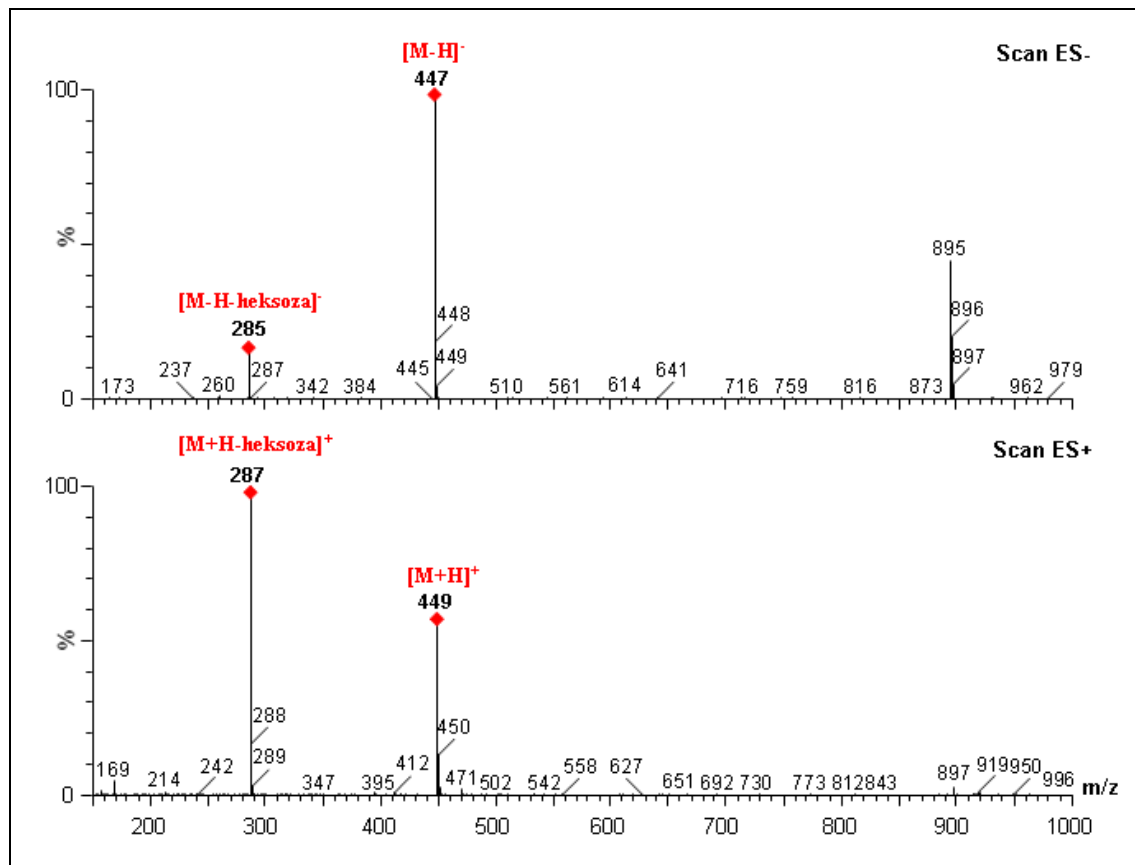
Odczynnik	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{\max I}$ (nm)	$\Delta\lambda$
<b>MeOH</b>	266	-	349	-
<b>+NaOMe</b>	275		325; 401	52
<b>+NaOAc</b>	274	8	304; 376	
<b>+NaOAc / H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	267		353	4
<b>+AlCl<sub>3</sub></b>	274		304; 350; 397	1*
<b>+AlCl<sub>3</sub> / HCl</b>	275		302; 344; 396	47

\*wobec widma z AlCl<sub>3</sub> / HCl. Pozostałe widma analizowano w stosunku do widma w MeOH.

### Analiza HPLC-DAD-ESI-MS

Tabela 26. Analiza HPLC-DAD związku 5

Czas retencji (min)	Widmo UV-DAD	
	$\lambda_{\max II}$ (nm)	$\lambda_{\max I}$ (nm)
21,45	349	265



Rycina 46. Widmo ESI-MS związku 5 w trybie jonów ujemnych (ES-) oraz jonów dodatnich (ES+).

Tabela 27. Wyniki analizy ESI-MS związku 5

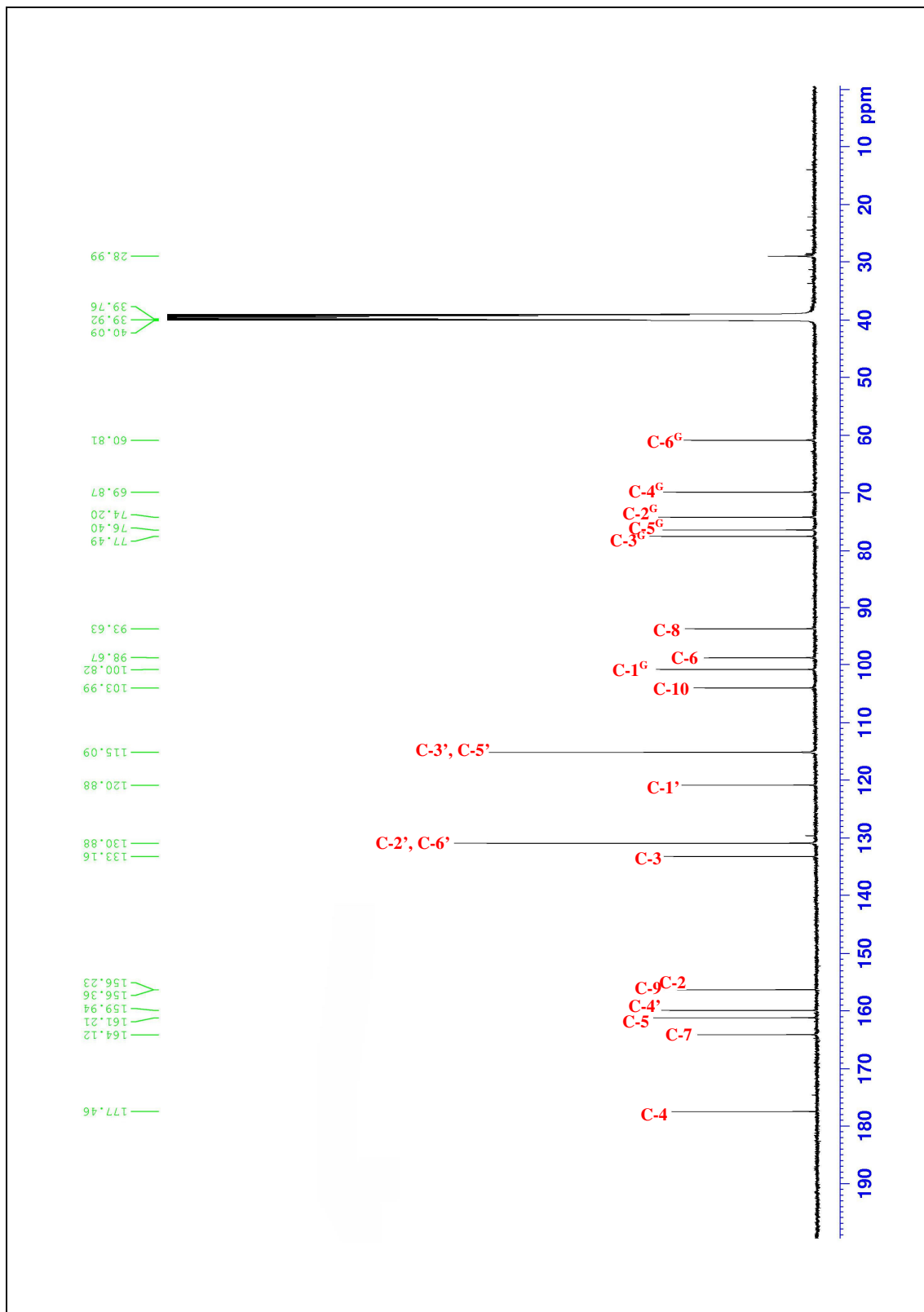
	ES-	<i>m/z</i>	ES+	<i>m/z</i>
jon molekularny	[M-H] <sup>-</sup>	447	[M+H] <sup>+</sup>	449
jon fragmentacyjny:				
deprotonowany / protonowany kemferol	[M-H-heksoza] <sup>-</sup>	285	[M+H-heksoza] <sup>+</sup>	287
masa związku: 448		wzór sumaryczny związku: C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>		

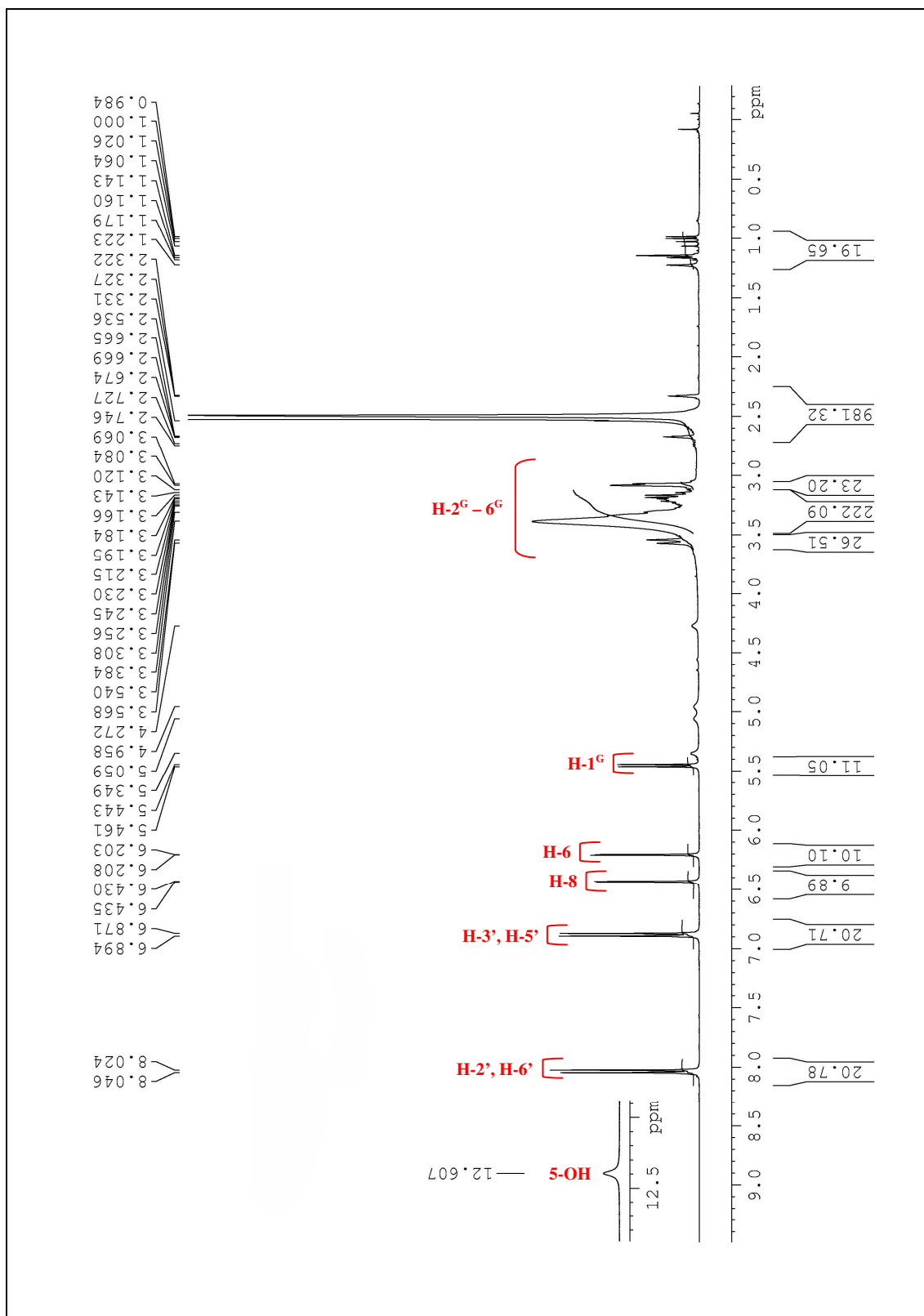


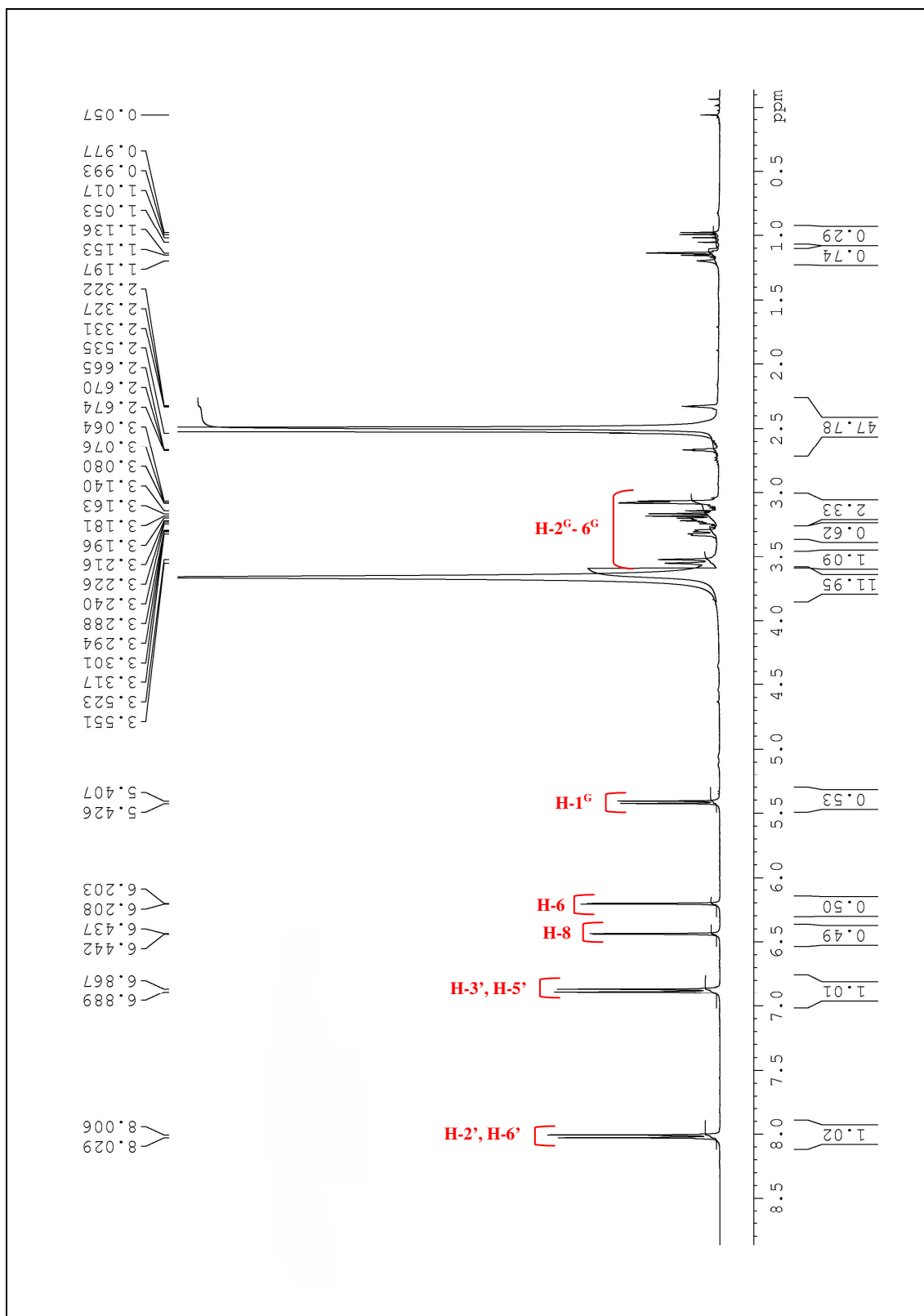
Analiza  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMRTabela 28.  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR związku 5 w DMSO- $d_6$ 

Związek 5				
Pozycja	$\delta\text{C}_{\text{ppm}}$ 100 MHz	$\delta\text{H}_{\text{ppm}}$		
		400 MHz, DMSO- $d_6$	400 MHz, DMSO- $d_6$ +D $_2$ O	
aglikon	2	156,23		
	3	133,16		
	4	177,46		
	5	161,21	12,61 (s, 5-OH)	
	6	98,67	6,21 (d, $J=2,0$ Hz)	6,21 (d, $J=2,0$ Hz)
	7	164,12		
	8	93,63	6,43 (d, $J=2,0$ Hz)	6,44 (d, $J=2,1$ Hz)
	9	156,36		
	10	103,99		
	1'	120,88		
	2'	130,88	8,04 (d, $J=8,9$ Hz)	8,02 (d, $J=8,9$ Hz)
	3'	115,09	6,89 (d, $J=8,9$ Hz)	6,88 (d, $J=8,9$ Hz)
	4'	159,94		
	5'	115,09	6,89 (d, $J=8,9$ Hz)	6,88 (d, $J=8,9$ Hz)
6'	130,88	8,04 (d, $J=8,9$ Hz)	8,02 (d, $J=8,9$ Hz)	
glukoza	1 <sup>G</sup>	100,82	5,45 (d, $J=7,4$ Hz)	5,42 (d, $J=7,5$ Hz)
	2 <sup>G</sup>	74,20	3,07 – 3,57 (m)	3,06 – 3,55 (m)
	3 <sup>G</sup>	77,49		
	4 <sup>G</sup>	69,87		
	5 <sup>G</sup>	76,40		
	6 <sup>G</sup>	60,81		

Widma  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR **związku 5** są zgodne z danymi literaturowymi dla **3-O- $\beta$ -glukopiranozydu kemferolu** (Agrawal i Rastogi 1981; Agrawal 1989; Agrawal 1992; Dey i Harborne 1989; Harborne i Mabry 1982; Harborne 1994; Mabry i wsp. 1970; Markham i Ternai 1976; Markham i wsp. 1978).

Rycina 47. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku 5 ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

Rycina 48. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku 5 ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

Rycina 49. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku 5 (DMSO- $d_6$ + $\text{D}_2\text{O}$ ).

### 9.1.2.6. Hydroliza kwasowa wyizolowanych związków flawonoidowych

Tabela 29. Wyniki analizy hydrolizy kwasowej wyizolowanych związków flawonoidowych

Związek / wzorzec		TLC				PC		Fluorescencja / zabarwienie			
		S <sub>1</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>7</sub>	UV <sub>366</sub>	UV <sub>366</sub> /W <sub>1</sub>	VIS/W <sub>3</sub>	
Analizowane związki	związek 1	0,02	0,82	0,94	-	0,32	0,23	ż	p	-	
	związek 2	0,42	0,23	0,30	-	-	-	br	p	-	
	związek 2*	0,29	0,61	0,62	-	-	-	br	p	-	
	aglikon	-	-	-	-	0,32	0,22	ż	p	-	
	cukier	-	-	-	0,42	-	-	-	-	br	
	cukier	-	-	-	0,48	-	-	-	-	cz	
	związek 3	0,47	0,43	0,40	-	-	-	br	p	-	
	związek 3*	0,29	0,62	0,62	-	-	-	br	p	-	
	aglikon	-	-	-	-	0,32	0,23	ż	p	-	
	cukier	-	-	-	0,41	-	-	-	-	br	
	cukier	-	-	-	0,70	-	-	-	-	ż-br	
	związek 4	0,28	0,62	0,61	-	-	-	br	p	-	
	aglikon	-	-	-	-	0,32	0,23	ż	p	-	
	cukier	-	-	-	0,42	-	-	-	-	br	
	związek 5	0,39	0,81	0,70	-	-	-	br	ż	-	
	aglikon	-	-	-	-	0,51	0,71	ż	ż	-	
cukier	-	-	-	0,41	-	-	-	-	br		
Wzorcowe flawonoidy i cukry	<b>aglikony</b>										
	kwercetyna	-	-	-	-	0,32	0,23	ż	p	-	
	kemferol	-	-	-	-	0,51	0,72	ż	ż	-	
	apigenina	-	-	-	-	0,61	0,68	br	ż	-	
	luteolina	-	-	-	-	0,38	0,30	br	p	-	
	<b>cukry</b>										
	arabinoza	-	-	-	0,48	-	-	-	-	cz	
	ksyloza	-	-	-	0,59	-	-	-	-	cz	
	ramnoza	-	-	-	0,70	-	-	-	-	ż-br	
	glukoza	-	-	-	0,42	-	-	-	-	br	
	galaktoza	-	-	-	0,38	-	-	-	-	br	
	<b>pochodne kwercetyny</b>										
	3-O-β-glukozyd	0,29	0,62	0,62	-	-	-	br	p	-	
	3-O-β-rutynozyd	0,47	0,43	0,40	-	-	-	br	p	-	
	3-O-α-arabinozylo (1→6)-β-glukozyd	0,42	0,23	0,31	-	-	-	br	p	-	
	<b>pochodne kemferolu</b>										
3-O-β-glukozyd	0,39	0,82	0,70	-	-	-	br	ż	-		
3-O-β-rutynozyd	0,56	0,49	0,43	-	-	-	br	ż	-		

\* - produkt wtórny hydrolizy kwasowej; oznaczenia fluorescencji / zabarwienia: br – brunatny, cz – czerwony, p – pomarańczowy, ż – żółty, ż-br – żółtobrazowy.

## 9.2. Analiza kwasów fenolowych

### 9.2.1. Analiza jakościowa (2D-TLC)

Tabela 30. Wyniki analizy chromatograficznej (2D-TLC) wzorcowych kwasów fenolowych i frakcji eteru dietylowego

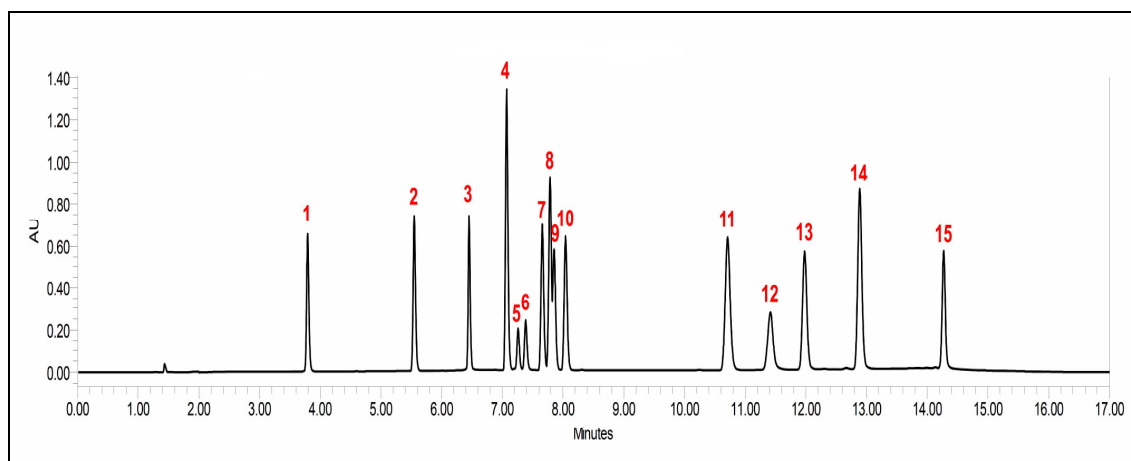
Wzorcowy kwas fenolowy / plama związku		Wartość współczynnika R <sub>f</sub>		Fluorescencja UV <sub>366 nm</sub>	Zabarwienie W <sub>4</sub> /VIS
		S <sub>13</sub>	S <sub>1</sub>		
Wzorcowe kwasy fenolowe	chlorogenowy	0,03	0,84	niebieska	jasnobrunatne
	<i>trans</i> -ferulowy	0,75	0,41	niebieska	fioletowe
	galusowy	0,33	0,71	ciemnoniebieska	jasnopomarańczowe
	izowanilinowy	0,51	0,68	jasnośliwkowa	pomarańczowe
	kawowy	0,04	0,41/0,67*	jasnoniebieska	szarobrunatne
	<i>p</i> -hydroksybenzoesowy	0,36	0,77	fioletowa	żółte
	<i>p</i> -hydroksyfenylooctowy	0,35	0,88	niebieska	jasnoczerwone
	<i>p</i> -kumarowy	0,38	0,57/0,78*	fioletowa	czerwone
	protokatechowy	0,03	0,65	ciemnoniebieska	ciemnopomarańczowe
	syryngowy	0,73	0,72	fioletowa	różowe
	wanilinowy	0,69	0,73	ciemnoniebieska	pomarańczowe
Plamy związków	plama 1	0,03	0,65	ciemnoniebieska	ciemnopomarańczowe
	plama 2	0,38	0,57/0,78*	fioletowa	czerwone
	plama 3	0,75	0,41	niebieska	fioletowe
	plama 4	0,04	0,41/0,67*	jasnoniebieska	szarobrunatne

\* - wartości dla konfiguracji *cis*; S<sub>13</sub> - toluen-HOAc-H<sub>2</sub>O (6:7:3); S<sub>1</sub> - HOAc-H<sub>2</sub>O (15:85); W<sub>4</sub> - zdwuazowany kwas sulfanilowy przygotowany *ex tempore* i 20% roztwór węgla sodu (1:1).

### 9.2.2. Określenie profilu kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA

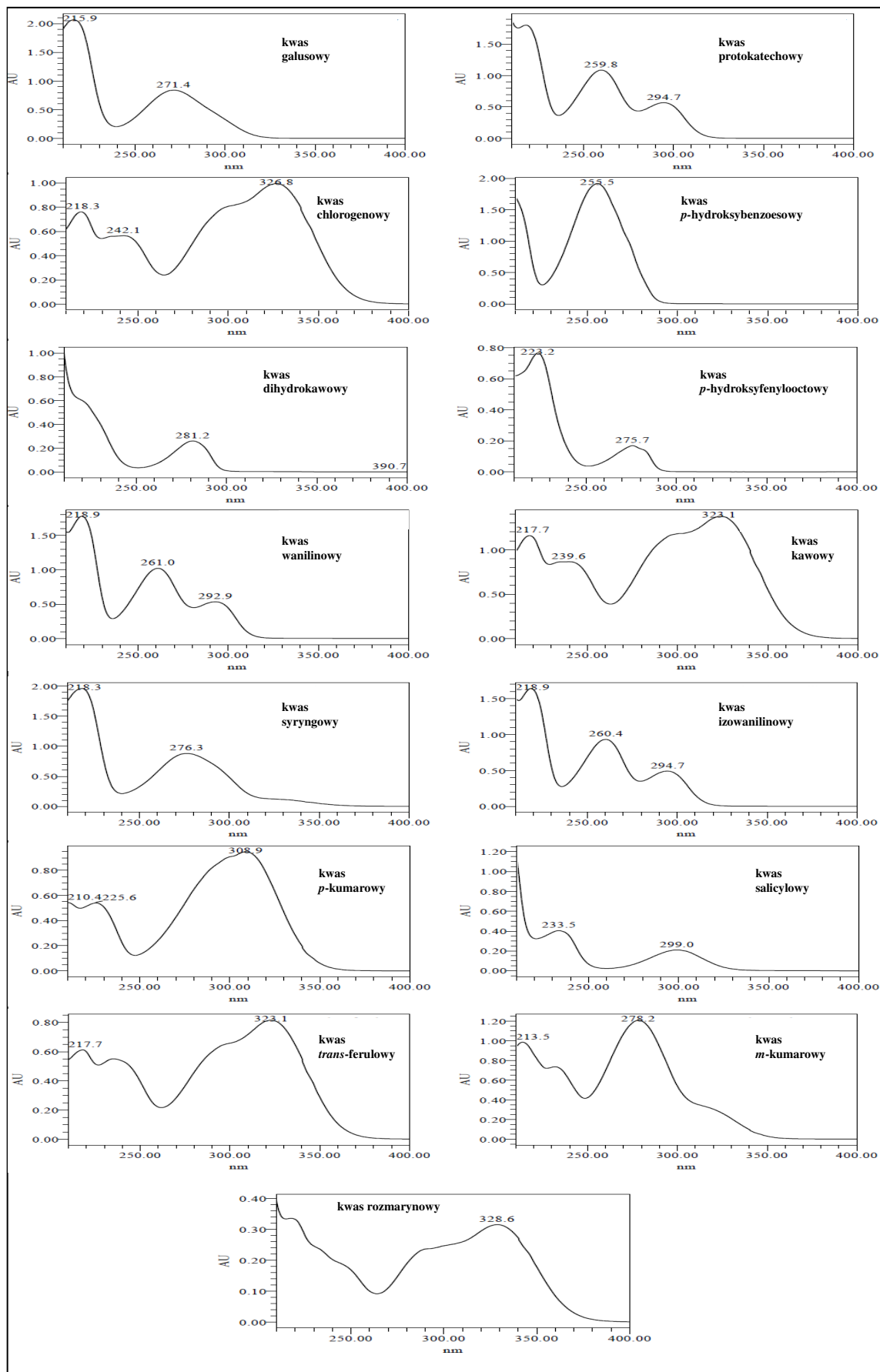
Analizę wykonano zgodnie z metodyką opracowaną w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu<sup>4</sup>.

Opracowana metoda umożliwia rozdział mieszaniny 15 najczęściej spotykanych w świecie roślinnym kwasów fenolowych (chlorogenowego, dihydrokawowego, ferulowego, galusowego, izowanilinowego, kawowego, *m*-kumarowego, *p*-kumarowego, *p*-hydroksybenzoesowego, *p*-hydroksyfenylooctowego, protokatechowego, syringowego, salicylowego, wanilinowego, rozmarynowego) za pomocą ultrasprawnej chromatografii cieczowej (Rycina 50).



Rycina 50. Chromatogram UPLC wzorcowych kwasów fenolowych w stężeniu 20 µg/mL: galusowy (1), protokatechowy (2), chlorogenowy (3), *p*-hydroksybenzoesowy (4), dihydrokawowy (5), *p*-hydroksyfenylooctowy (6), wanilinowy (7), kawowy (8), syringowy (9), izowanilinowy (10), *p*-kumarowy (11), salicylowy (12), *trans*-ferulowy (13), *m*-kumarowy (14), rozmarynowy (15).

<sup>4</sup> Metodykę opracowały dr Małgorzata Wojcińska oraz dr Justyna Chanaj-Kaczmarek



Rycina 51. Widma w nadfiolecie wzorcowych kwasów fenolowych.



Dla każdego wzorcowego kwasu fenolowego wykreślono krzywą kalibracyjną w zakresie stężeń 2 – 40 µg/mL, z wyjątkiem kwasu rozmarynowego, dla którego zakres ten wynosił 5 – 50 µg/mL (Tabele 31 - 32).

Tabela 31. Wartości czasów retencji oraz równania krzywych kalibracyjnych kwasów fenolowych (Chanaj-Kaczmarek 2013)

Kwas fenolowy	t (min)	Równanie krzywej kalibracyjnej	r
galusowy	3,81	$y = 88398x - 53935$	0,9999
protokatechowy	5,57	$y = 104765x - 45841$	1,0000
chlorogenowy	6,46	$y = 79806x - 60132$	0,9999
dihydrokawowy	7,09	$y = 28224x - 27073$	0,9997
<i>p</i> -hydroksybenzoesowy	7,28	$y = 184507x - 6297$	0,9998
<i>p</i> -hydroksyfenylooctowy	7,41	$y = 35134x - 10204$	0,9999
wanilinowy	7,68	$y = 112403x - 54790$	1,0000
kawowy	7,81	$y = 145745x - 104383$	0,9998
syryngowy	7,87	$y = 94223x - 56227$	0,9999
izowanilinowy	8,06	$y = 112849x - 67266$	1,0000
<i>p</i> -kumarowy	10,77	$y = 191755x - 188141$	0,9999
salicylowy	11,47	$y = 90342x - 78050$	0,9998
<i>trans</i> -ferulowy	12,02	$y = 139473x - 145738$	0,9998
<i>m</i> -kumarowy	12,93	$y = 195679x - 144835$	0,9999
rozmarynowy	14,29	$y = 79620x - 151947$	0,9996

t – średni czas retencji (n=8); r – współczynnik korelacji liniowej Pearsona; x – stężenie kwasu fenolowego; y – pole powierzchni piku.

Tabela 32. Wartości parametrów procesu walidacji metody UPLC-PDA (Chanaj-Kaczmarek 2013)

Kwas fenolowy	Powtarzalność (Wz %)	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Zakres liniowości ( $\mu\text{g/mL}$ )
galusowy	0,87	0,4460	1,3380	5-40
protokatechowy	0,93	0,2506	0,7519	5-40
chlorogenowy	1,51	0,7401	2,2203	5-40
dihydrokawowy	1,81	0,6289	1,8866	10-40
<i>p</i> -hydroksybenzoesowy	0,81	0,7459	2,2376	5-40
<i>p</i> -hydroksyfenylooctowy	1,48	0,4644	1,3933	5-40
wanilinowy	0,79	0,2640	0,7920	2-40
kawowy	1,52	0,6289	1,8867	5-40
syryngowy	1,72	0,4149	1,2448	5-40
izowanilinowy	0,90	0,2546	0,7639	5-40
<i>p</i> -kumarowy	0,91	0,4429	1,3286	5-40
salicylowy	0,97	0,6355	1,9066	5-40
<i>trans</i> -ferulowy	0,89	0,5817	1,7452	5-40
<i>m</i> -kumarowy	0,91	0,3330	0,9989	5-40
rozmarynowy	1,15	0,9748	2,9243	10-50

LOD (limit of detection) – granica wykrywalności; LOQ (limit of quantification) – granica oznaczalności.

W celu oczyszczenia wyciągu roślinnego metodyka zakłada wykonanie ekstrakcji do fazy stałej (SPE) za pomocą kolumniek ekstrakcyjnych firmy Waters (Oasis MAX oraz Oasis HLB).

Odzyski kwasów fenolowych obliczono w oparciu o różnicę pól powierzchni pików poszczególnych kwasów fenolowych przed oraz po oczyszczeniu mieszaniny wzorcowych kwasów fenolowych o stężeniu 20  $\mu\text{g/mL}$  w kolumnkach ekstrakcyjnych (Tabela 33).

Tabela 33. Wartości odzysków poszczególnych kwasów fenolowych (Chanaj-Kaczmarek 2013)

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

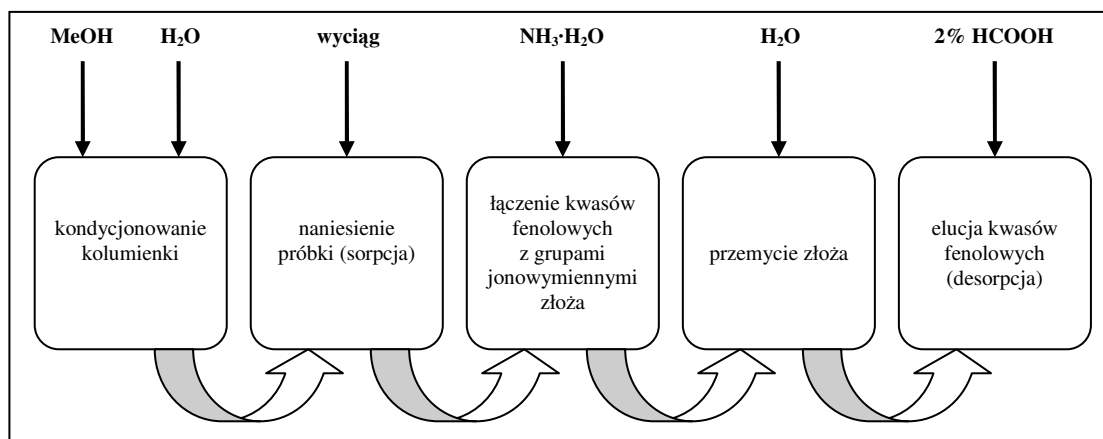
S – odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; Wz – współczynnik zmienności (%). Kolorem niebieskim oznaczono najwyższe średnie wartości odzysków dla poszczególnych kwasów fenolowych.

### 9.2.2.1. Przygotowanie prób do badań

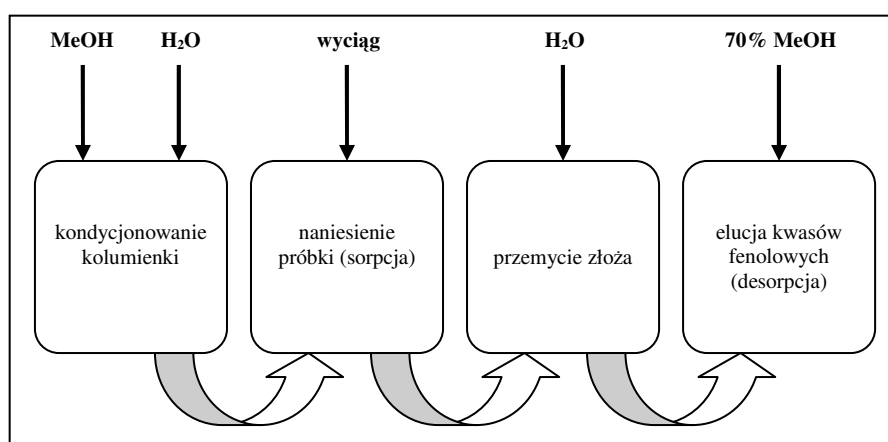
W celu oczyszczenia wyciągu z ziela dymnicy lekarskiej zastosowano ekstrakcję do fazy stałej (SPE) używając kolumniek ekstrakcyjnych firmy Waters:

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

Procedurę wymywania kwasów fenolowych z kolumniek przedstawiono na Rycinach 52 - 53.



Rycina 52. Schemat wymywania kwasów fenolowych z kolumny Oasis MAX.



Rycina 53. Schemat wymywania kwasów fenolowych z kolumny Oasis HLB.

Na kolumnkę ekstrakcyjną Oasis MAX naniesiono 0,5 mL wyciągu z ziela dymnicy lekarskiej (rozd. 8.3.3.2.). Następnie kolumnkę przemywano roztworem amoniaku oraz wodą destylowaną. Kwasy fenolowe eluowano z niej za pomocą 25 mL 2% kwasu mrówkowego w metanolu. Uzyskany roztwór zagęszczono do sucha na wyparce próżniowej, rozpuszczono w 2 mL mieszaniny metanol – woda (1:1), a następnie oczyszczono przez filtr strzykawkowy (GHP, 25 mm, 0,2 μm, Waters). Ze względu na wyższe wartości odzysków (Tabela 33), w wyciągu z ziela dymnicy oczyszczonym na kolumnkach Oasis MAX oznaczono kwas protokatechowy, *p*-kumarowy oraz *trans*-ferulowy.

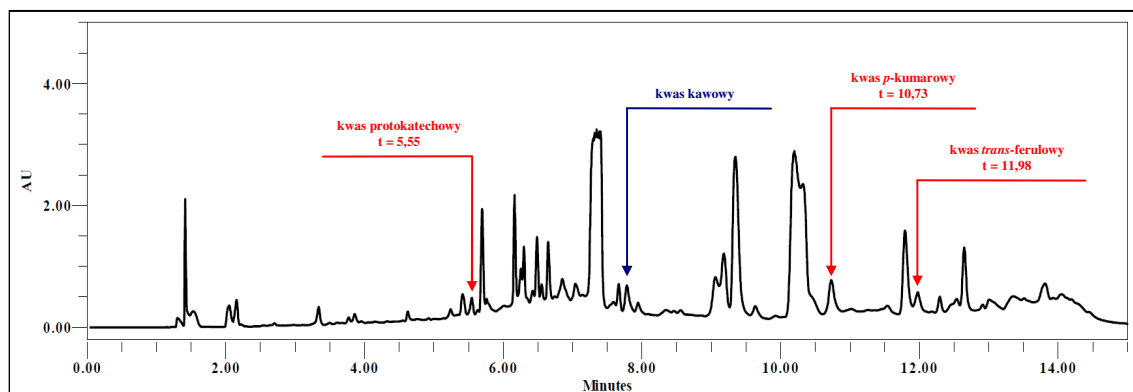
Na kolumnkę ekstrakcyjną Oasis HLB naniesiono 0,35 mL wyciągu z ziela dymnicy lekarskiej (rozd. 8.3.3.2.). Kolumnkę przemywano wodą destylowaną. Kwasy fenolowe eluowano natomiast 50 mL 70% metanolu. Otrzymany roztwór zagęszczono do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszczono w 2 mL mieszaniny

metanol – woda (1:1) i oczyszczono przez filtr strzykawkowy (GHP, 25 mm, 0,2  $\mu$ m, Waters). W oczyszczonym na kolumnkach Oasis HLB wyciągu z ziela dymnicy oznaczono kwas kawowy.

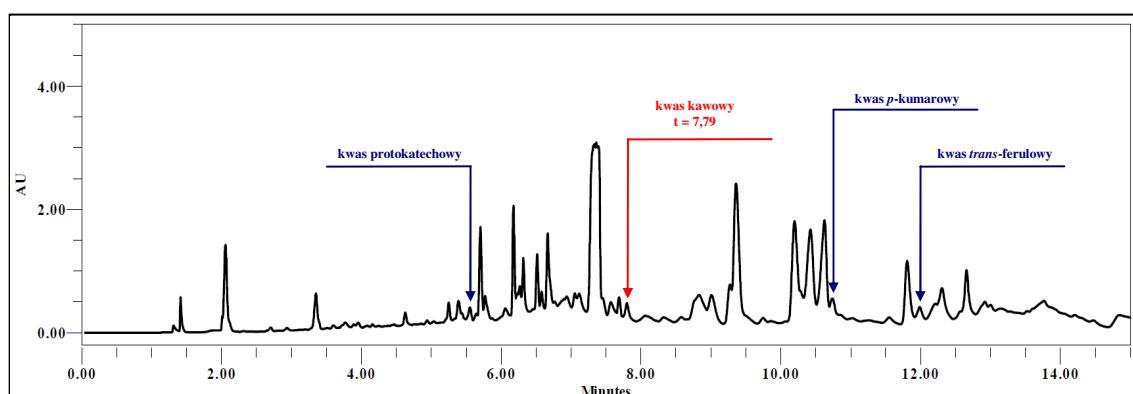
### 9.2.2.2. Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych w wyciągu

Zawartość kwasów fenolowych w ziele dymnicy lekarskiej ( $\mu$ g/g ziela) obliczono na podstawie równań prostych wyznaczonych dla poszczególnych wzorcowych kwasów fenolowych.

Wyniki analizy oraz ich parametry statystyczne przedstawiono w Tabelach 34 – 41 i na Rycinach 54 – 55.



Rycina 54. Chromatogram UPLC wyciągu z ziela dymnicy (0,5 mL) oczyszczonego przy użyciu kolumnki Oasis MAX (kolorem czerwonym zaznaczono kwasy fenolowe analizowane ilościowo).



Rycina 55. Chromatogram UPLC wyciągu z ziela dymnicy (0,35 mL) oczyszczonego przy użyciu kolumnki Oasis HLB (kolorem czerwonym zaznaczono kwasy fenolowe analizowane ilościowo).

## Zawartość kwasu protokatechowego w ziele dymnicy

Tabela 34. Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu protokatechowego w ziele dymnicy

	Ilość ziela w próbie (g/mL)	A	Zawartość kwasu protokatechowego	
			w próbie (µg/mL)	w ziele dymnicy (µg/g)
I	0,50	877502	8,81	17,63
		860238	8,65	17,30
		860072	8,65	17,29
II	0,50	880533	8,84	17,68
		891459	8,95	17,89
		896598	9,00	17,99
III	0,50	909303	9,12	18,23
		888650	8,92	17,84
		902384	9,05	18,10

A – pole powierzchni pików.

Tabela 35. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
I	17,41	0,19	0,11	1,10	17,41±0,49	17,41±0,38
II	17,86	0,16	0,09	0,88	17,86±0,40	17,86±0,31
III	18,06	0,20	0,12	1,11	18,06±0,51	18,06±0,40
					<b>17,77±0,46</b>	

$\bar{x}$  - średnia zawartość kwasu protokatechowego w ziele w danym powtórzeniu; S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha, f}=4,403$ );  $\bar{A} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

### Zawartość kwasu *p*-kumarowego w ziele dymnicy

Tabela 36. Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu *p*-kumarowego w ziele dymnicy

	Ilość ziela w próbie (g/mL)	A	Zawartość kwasu <i>p</i> -kumarowego	
			w próbie (µg/mL)	w ziele dymnicy (µg/g)
I	0,50	5036145	27,24	54,49
		5030586	27,22	54,43
		5110755	27,63	55,27
II	0,50	5097667	27,57	55,13
		5112277	27,64	55,28
		5195744	28,08	56,15
III	0,50	5075779	27,45	54,90
		5152402	27,85	55,70
		5033798	27,23	54,46

A – pole powierzchni pików.

Tabela 37. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
I	54,73	0,47	0,27	0,85	54,73±1,19	54,73±0,93
II	55,52	0,55	0,32	0,99	55,52±1,40	55,52±1,10
III	55,02	0,63	0,36	1,14	55,02±1,59	55,02±1,25
					<b>55,09±1,39</b>	

$\bar{x}$  - średnia zawartość kwasu *p*-kumarowego w ziele w danym powtórzeniu; S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha, f}=4,403$ );  $\bar{A} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

**Zawartość kwasu *trans*-ferulowego w ziele dymnicy**Tabela 38. Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu *trans*-ferulowego w ziele dymnicy

	Ilość ziela w próbce (g/mL)	A	Zawartość kwasu <i>trans</i> -ferulowego	
			w próbce (µg/mL)	w ziele dymnicy (µg/g)
<b>I</b>	0,50	2570763	19,48	38,95
		2556866	19,38	38,75
		2523964	19,14	38,28
<b>II</b>	0,50	2553016	19,35	38,70
		2538209	19,24	38,49
		2576403	19,52	39,03
<b>III</b>	0,50	2551294	19,34	38,67
		2510389	19,04	38,09
		2535940	19,23	38,45

A – pole powierzchni pików.

Tabela 39. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
<b>I</b>	38,66	0,34	0,20	0,8	38,66±0,88	38,66±0,69
<b>II</b>	38,74	0,28	0,16	0,71	38,74±0,70	38,74±0,55
<b>III</b>	38,41	0,30	0,17	0,77	38,41±0,75	38,41±0,59

**38,60±0,78**

$\bar{x}$  - średnia zawartość kwasu *trans*-ferulowego w ziele w danym powtórzeniu; S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha, f}=4,403$ );  $\bar{x} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).



## Zawartość kwasu kawowego w ziele dymnicy

Tabela 40. Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu kawowego w ziele dymnicy

	Ilość ziela w próbce (g/mL)	A	Zawartość kwasu kawowego	
			w próbce (µg/mL)	w ziele dymnicy (µg/g)
<b>I</b>	0,35	1168826	8,74	24,96
		1155486	8,64	24,70
		1172563	8,76	25,03
<b>II</b>	0,35	1161775	8,69	24,82
		1165659	8,71	24,90
		1150478	8,61	24,60
<b>III</b>	0,35	1165621	8,71	24,90
		1152083	8,62	24,63
		1163080	8,70	24,85

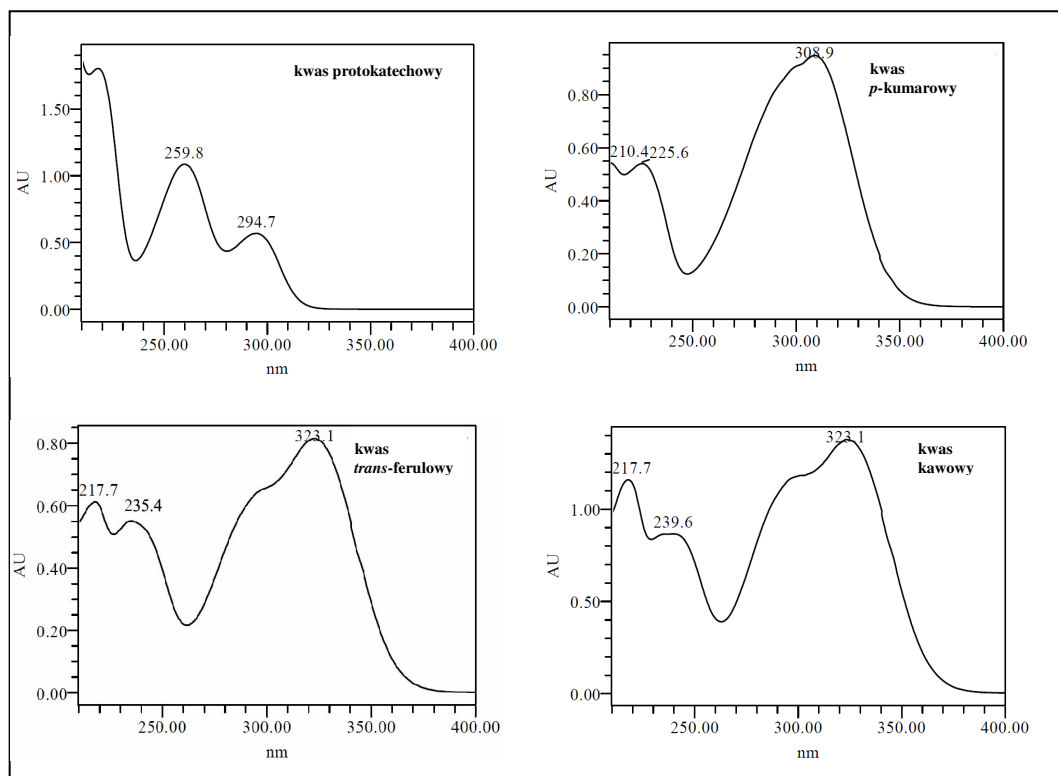
A – pole powierzchni pików.

Tabela 41. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
<b>I</b>	24,90	0,18	0,10	0,71	24,90±0,45	24,90±0,35
<b>II</b>	24,77	0,15	0,09	0,62	24,77±0,39	24,77±0,31
<b>III</b>	24,79	0,14	0,08	0,57	24,79±0,36	24,79±0,28

**24,82±0,40**

$\bar{x}$  - średnia zawartość kwasu kawowego w ziele w danym powtórzeniu; S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha, f}=4,403$ );  $\bar{x} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).



Rycina 56. Widma w nadfioletcie kwasów fenolowych występujących w ziele dymnicy.

### **9.3. Badania ilościowe**

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

Oznaczenie wykonano za pomocą zmodyfikowanej metody [Meng i wsp. \(2009\)](#).

##### **9.3.1.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu galusowego**

###### **9.3.1.1.1. Przygotowanie roztworu podstawowego kwasu galusowego (1,0 mg/mL)**

Do kolby miarowej o pojemności 100 ml odważono dokładnie 0,10000 g kwasu galusowego. Rozpuszczono go w 10 mL metanolu, a następnie uzupełniono do współmierności wodą destylowaną. Uzyskano w ten sposób roztwór podstawowy o stężeniu 1,0 mg/mL.

###### **9.3.1.1.2. Przygotowanie rozcieńczeń roztworu podstawowego (0,02 – 0,08 mg/mL)**

Do kolb miarowych o pojemności 5 mL dodawano roztwór podstawowy kwasu galusowego w ilościach: 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40 mL, a następnie uzupełniono wodą destylowaną do współmierności. Uzyskano roztwory o stężeniach 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07 oraz 0,08 mg/mL. Dla każdego z rozcieńczeń przygotowano po 10 prób.

###### **9.3.1.1.3. Wykonanie oznaczenia**

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 mL dodawano kolejno:

- 0,1 mL poszczególnych rozcieńczeń podstawowego roztworu kwasu galusowego
- 0,1 mL odczynnika *Folin-Ciocalteu* (FC)
- 1,0 mL 7% wodnego roztworu węgla sodu (po upływie 3 minut od momentu dodania odczynnika FC)

Próbę odniesienia przygotowano w analogiczny sposób, zastępując roztwór kwasu galusowego wodą destylowaną.

Po 60 minutach inkubacji liczonych od chwili dodania roztworu węglanu sodu mierzono absorbancję uzyskanych roztworów wobec próby odniesienia przy długości fali  $\lambda=760$  nm, w jednorazowych kuwetach plastikowych o grubości 1 cm. Otrzymane wyniki posłużyły do wykreślenia krzywej kalibracyjnej.

Tabela 42. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego

x	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>9</sub>	A <sub>10</sub>	$\bar{A}$
<b>0,002</b>	0,2227	0,2228	0,2251	0,2270	0,2271	0,2272	0,2275	0,2286	0,2293	0,2304	0,2268
<b>0,003</b>	0,3323	0,3326	0,3340	0,3336	0,3341	0,3367	0,3365	0,3343	0,3390	0,3401	0,3353
<b>0,004</b>	0,4370	0,4410	0,4395	0,4423	0,4416	0,4420	0,4442	0,4465	0,4453	0,4491	0,4429
<b>0,005</b>	0,5418	0,5411	0,5421	0,5512	0,5474	0,5515	0,5464	0,5529	0,5526	0,5526	0,5480
<b>0,006</b>	0,6617	0,6572	0,6545	0,6532	0,6580	0,6494	0,6511	0,6513	0,6512	0,6517	0,6539
<b>0,007</b>	0,7533	0,7544	0,7574	0,7561	0,7577	0,7600	0,7592	0,7627	0,7605	0,7628	0,7584
<b>0,008</b>	0,8572	0,8620	0,8607	0,8629	0,8622	0,8653	0,8650	0,8652	0,8717	0,8709	0,8643

x – ilość kwasu galusowego w badanej próbce (mg); A<sub>1</sub> – A<sub>10</sub> – wartość absorbancji badanych próbek;  $\bar{A}$  – średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 43. Parametry statystyczne obliczone dla badanych próbek

x	$\bar{A}$	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	$\mu$	$\bar{A} \pm 2S$
<b>0,002</b>	0,2268	0,0026	0,0008	1,1283	0,2268±0,0018	0,2268±0,0051
<b>0,003</b>	0,3353	0,0027	0,0008	0,7917	0,3353±0,0019	0,3353±0,0053
<b>0,004</b>	0,4429	0,0035	0,0011	0,7954	0,4429±0,0025	0,4429±0,0070
<b>0,005</b>	0,5480	0,0049	0,0015	0,8869	0,5480±0,0035	0,5480±0,0097
<b>0,006</b>	0,6539	0,0039	0,0012	0,5952	0,6539±0,0028	0,6539±0,0078
<b>0,007</b>	0,7584	0,0032	0,0010	0,4267	0,7584±0,0023	0,7584±0,0065
<b>0,008</b>	0,8643	0,0044	0,0014	0,5111	0,8643±0,0032	0,8643±0,0088

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

Tabela 44. Parametry krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y ( $\bar{A}$ )	x*y	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>
0,002	0,2268	0,000454	0,000004	0,051425
0,003	0,3353	0,001006	0,000009	0,112440
0,004	0,4429	0,001771	0,000016	0,196116
0,005	0,5480	0,002740	0,000025	0,300260
0,006	0,6539	0,003924	0,000036	0,427624
0,007	0,7584	0,005309	0,000049	0,575186
0,008	0,8643	0,006914	0,000064	0,747032
$\Sigma$				
0,035	3,8296	0,022118	0,000203	2,410082

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

$$y = 106,0671x + 0,0167$$

gdzie:

x – ilość kwasu galusowego w próbie (mg)

y – absorbancja próby

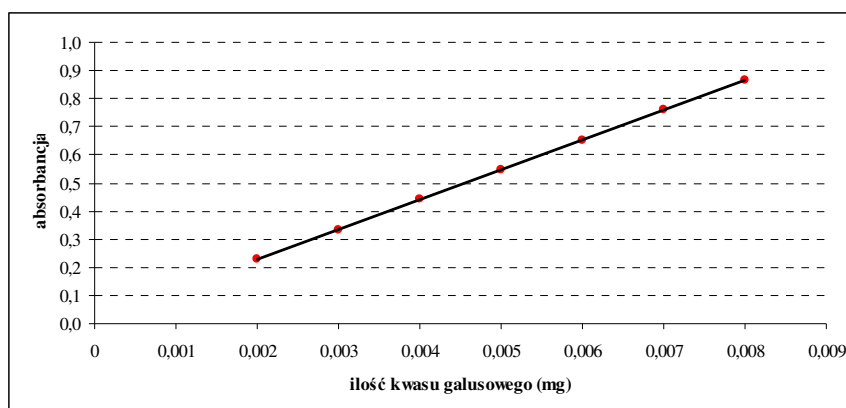
Tabela 45. Parametry równania prostej  $y = 106,0671x + 0,0167$ 

a	b	r	r <sup>2</sup>
106,0671	0,0167	0,9999	0,9999

a – współczynnik kierunkowy prostej; b – wyraz wolny; r – współczynnik korelacji liniowej Pearsona; r<sup>2</sup> – współczynnik determinacji

Tabela 46. Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego obliczone z równania prostej  $y = 106,0671x + 0,0167$ 

x (mg)	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008
y ( $\bar{A}$ )	0,2289	0,3349	0,4410	0,5471	0,6531	0,7592	0,8653



Rycina 57. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu galusowego.

### 9.3.1.2. Oznaczenie zawartości sumy polifenoli w wyciągach

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 mL dodawano po 0,1 mL badanych wyciągów (rozdz. 8.4.3.2.1.), a następnie odczynniki analogicznie jak w przypadku krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego. Z każdego powtórzenia poszczególnych wyciągów przygotowano po 3 próby. Wyniki oznaczeń podano w przeliczeniu na kwas galusowy w mg/g ziela dymnicy (mg GAE/g).

#### 9.3.1.2.1. Zawartość sumy polifenoli w nalewce

Tabela 47. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość sumy polifenoli w nalewce

	Ilość ziela w próbce (mg)	A	Zawartość sumy polifenoli	
			w próbce (mg)	w nalewce (mg GAE/g)
<b>I</b>	0,40	0,4507	0,0041	10,23
		0,4491	0,0041	10,19
		0,4485	0,0041	10,18
<b>II</b>	0,40	0,4525	0,0041	10,27
		0,4479	0,0041	10,16
		0,4553	0,0041	10,34
<b>III</b>	0,40	0,4472	0,0041	10,15
		0,4483	0,0041	10,17
		0,4511	0,0041	10,24

I, II, III – przygotowane powtórzenia nalewki; A – wartości absorbancji badanych prób.

Tabela 48. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
<b>I</b>	10,20	0,03	0,02	0,26	10,20±0,07	10,20±0,05
<b>II</b>	10,26	0,09	0,05	0,86	10,26±0,22	10,26±0,18
<b>III</b>	10,19	0,05	0,03	0,47	10,19±0,12	10,19±0,09
					<b>10,21±0,14</b>	

$\bar{x}$  - średnia zawartość sumy polifenoli w nalewce w danym powtórzeniu (mg GAE/g); S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha,f}=4,403$ );  $\bar{x} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Średnia zawartość sumy polifenoli w przygotowanej nalewce wynosi **10,21 mg w 1 g ziela dymnicy** w przeliczeniu na kwas galusowy.

### 9.3.1.2.2. Zawartość sumy polifenoli w odwarze

Tabela 49. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość sumy polifenoli w odwarze

	Ilość ziela w próbie (mg)	A	Zawartość sumy polifenoli	
			w próbie (mg)	w odwarze (mg GAE/g)
<b>I</b>	0,30	0,4485	0,0041	13,57
		0,4545	0,0041	13,76
		0,4518	0,0041	13,67
<b>II</b>	0,30	0,4524	0,0041	13,69
		0,4545	0,0041	13,76
		0,4530	0,0041	13,71
<b>III</b>	0,30	0,4465	0,0041	13,51
		0,4529	0,0041	13,71
		0,4488	0,0041	13,58

I, II, III – przygotowane powtórzenia odwaru; A – wartości absorbancji badanych prób.

Tabela 50. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
<b>I</b>	13,67	0,09	0,05	0,69	13,67±0,24	13,67±0,19
<b>II</b>	13,72	0,03	0,02	0,25	13,72±0,09	13,72±0,07
<b>III</b>	13,60	0,10	0,06	0,75	13,60±0,26	13,60±0,20
					<b>13,66±0,20</b>	

$\bar{x}$  - średnia zawartość sumy polifenoli w odwarze w danym powtórzeniu (mg GAE/g); S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha,f}=4,403$ );  $\bar{x} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Średnia zawartość sumy polifenoli w przygotowanym odwarze wynosi **13,66 mg w 1 g ziela dymnicy** w przeliczeniu na kwas galusowy.

### 9.3.1.2.3. Zawartość sumy polifenoli w wyciągu metanolowo-wodnym

Tabela 51. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość sumy polifenoli w wyciągu metanolowo-wodnym

	Ilość ziela w próbce (mg)	A	Zawartość sumy polifenoli	
			w próbce (mg)	w wyciągu metanolowo-wodnym (mg GAE/g)
<b>I</b>	0,28	0,4442	0,0040	14,39
		0,4442	0,0040	14,39
		0,4453	0,0040	14,43
<b>II</b>	0,28	0,4476	0,0041	14,51
		0,4437	0,0040	14,38
		0,4425	0,0040	14,34
<b>III</b>	0,28	0,4440	0,0040	14,39
		0,4491	0,0041	14,56
		0,4476	0,0041	14,51

I, II, III – przygotowane powtórzenia wyciągu metanolowo-wodnego; A – wartości absorbancji badanych próbek.



Tabela 52. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
I	14,41	0,02	0,01	0,15	14,41±0,05	14,41±0,04
II	14,41	0,09	0,05	0,62	14,41±0,23	14,41±0,18
III	14,49	0,09	0,05	0,61	14,49±0,22	14,49±0,18
					<b>14,43±0,17</b>	

$\bar{x}$  - średnia zawartość sumy polifenoli w wyciągu metanolowo-wodnym w danym powtórzeniu (mg GAE/g); S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha,f}=4,403$ );  $\bar{x} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Średnia zawartość sumy polifenoli w wyciągu metanolowo-wodnym wynosi **14,43 mg w 1 g ziela dymnicy** w przeliczeniu na kwas galusowy.

### 9.3.2. Oznaczenie zawartości sumy flawonoidów w przeliczeniu na kwercetynę

Oznaczenie wykonano kolorymetryczną metodą farmakopealną (FP IX, monografia *Betulae folium*).

#### 9.3.2.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowej kwercetyny

##### 9.3.2.1.1. Przygotowanie roztworu podstawowego kwercetyny (0,2 mg/mL)

Do kolby miarowej o pojemności 50 mL odważono dokładnie 0,01119 g kwercetyny dwuwodnej (co odpowiadało 0,01000 g kwercetyny bezwodnej), a następnie uzupełniono do współmierności metanolem. Uzyskano w ten sposób roztwór podstawowy o stężeniu 0,2 mg/mL.

### 9.3.2.1.2. Przygotowanie rozcieńczeń roztworu podstawowego (4,0 – 22,0 µg/mL)

Do kolb miarowych o pojemności 5 mL dodawano roztwór podstawowy kwercetyny w ilościach: 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50; 0,55 mL, a następnie uzupełniono metanolem do współmierności. Uzyskano roztwory o stężeniach 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0 oraz 22,0 µg/mL. Dla każdego z rozcieńczeń przygotowano po 8 prób.

### 9.3.2.1.3. Wykonanie oznaczenia

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 5 mL dodawano kolejno:

- 1,0 mL poszczególnych rozcieńczeń podstawowego roztworu kwercetyny (co odpowiadało 4,0 – 22,0 µg kwercetyny)
- 0,1 mL 5% roztworu  $\text{AlCl}_3$
- 1,4 mL mieszaniny kwasu octowego i metanolu (1:19)

Próbę odniesienia przygotowano w analogiczny sposób, zastępując roztwór chlorku glinu mieszaniną kwasu octowego z metanolem.

Absorbancję uzyskanych roztworów mierzono po upływie 30 minut od momentu dodania odczynnika kompleksotwórczego ( $\text{AlCl}_3$ ), w kuwetach kwarcowych o grubości 1 cm, wobec próby odniesienia, przy długości fali  $\lambda=425$  nm. Otrzymane wyniki posłużyły do wykreślenia krzywej kalibracyjnej.

Tabela 53. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwercetyny

x	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	$\bar{A}$
4,0	0,1165	0,1175	0,1164	0,1187	0,1166	0,1191	0,1189	0,1173	0,1176
6,0	0,1906	0,1863	0,1851	0,1853	0,1888	0,1908	0,1865	0,1901	0,1879
8,0	0,2531	0,2565	0,2531	0,2570	0,2596	0,2579	0,2587	0,2590	0,2569
10,0	0,3284	0,3259	0,3263	0,3263	0,3278	0,3286	0,3261	0,3276	0,3271
12,0	0,4008	0,3944	0,3956	0,3957	0,3984	0,4008	0,3983	0,4048	0,3986
14,0	0,4704	0,4702	0,4703	0,4702	0,4691	0,4683	0,4676	0,4695	0,4695
16,0	0,5312	0,5365	0,5355	0,5372	0,5414	0,5419	0,5409	0,5405	0,5381
18,0	0,5966	0,5988	0,5954	0,6133	0,6169	0,6158	0,6149	0,6161	0,6085
20,0	0,6712	0,6778	0,6738	0,6839	0,6849	0,6848	0,6849	0,6721	0,6792
22,0	0,7443	0,7515	0,7412	0,7462	0,7492	0,7491	0,7505	0,7515	0,7479

x – ilość kwercetyny w badanej próbce (µg); A<sub>1</sub> – A<sub>10</sub> – wartość absorbancji badanych prób;  $\bar{A}$  – średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 54. Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób

x	$\bar{A}$	S	S <sub><math>\bar{A}</math></sub>	Wz	µ	$\bar{A} \pm 2S$
4,0	0,1176	0,0011	0,0004	0,9584	0,1176±0,0009	0,1176±0,0023
6,0	0,1879	0,0024	0,0008	1,2792	0,1879±0,0020	0,1879±0,0048
8,0	0,2569	0,0025	0,0009	0,9869	0,2569±0,0021	0,2569±0,0051
10,0	0,3271	0,0011	0,0004	0,3348	0,3271±0,0009	0,3271±0,0022
12,0	0,3986	0,0034	0,0012	0,8654	0,3986±0,0029	0,3986±0,0069
14,0	0,4695	0,0010	0,0004	0,2222	0,4695±0,0009	0,4695±0,0021
16,0	0,5381	0,0037	0,0013	0,6905	0,5381±0,0031	0,5381±0,0074
18,0	0,6085	0,0097	0,0034	1,5872	0,6085±0,0081	0,6085±0,0193
20,0	0,6792	0,0061	0,0022	0,9041	0,6792±0,0051	0,6792±0,0123
22,0	0,7479	0,0037	0,0013	0,4965	0,7479±0,0031	0,7479±0,0074

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

Tabela 55. Parametry krzywej kalibracyjnej dla kwercetyny obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y ( $\bar{A}$ )	x*y	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>
4,0	0,1176	0,470500	16,0	0,013836
6,0	0,1879	1,127625	36,0	0,035321
8,0	0,2569	2,054900	64,0	0,065978
10,0	0,3271	3,271250	100,0	0,107011
12,0	0,3986	4,783200	144,0	0,158882
14,0	0,4695	6,572300	196,0	0,220383
16,0	0,5381	8,610200	256,0	0,289592
18,0	0,6085	10,952550	324,0	0,370242
20,0	0,6792	13,583500	400,0	0,461279
22,0	0,7479	16,454625	484,0	0,559411
$\Sigma$				
70,0	2,2957	26,889975	812,0	0,891002

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

$$y = 0,0336x - 0,0056$$

gdzie:

x – ilość kwercetyny w próbie ( $\mu\text{g}$ )

y – absorbancja próby

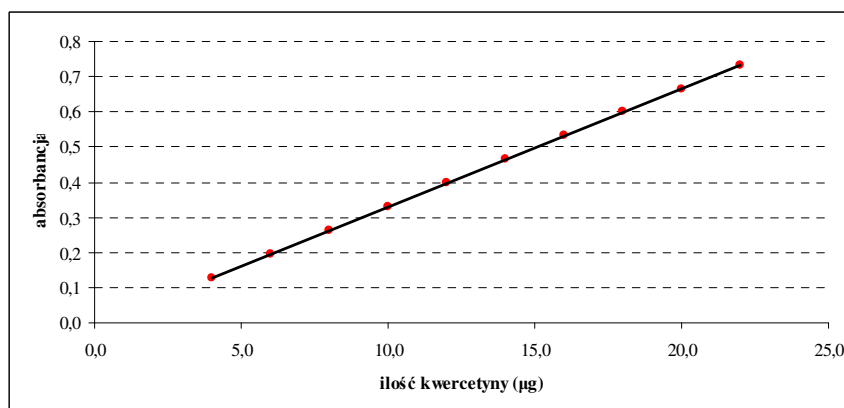
Tabela 56. Parametry równania prostej  $y = 0,0336x - 0,0056$ 

a	b	r	r <sup>2</sup>
0,0336	-0,0056	0,9997	0,9994

a – współczynnik kierunkowy prostej; b – wyraz wolny; r – współczynnik korelacji liniowej Pearsona; r<sup>2</sup> – współczynnik determinacji

Tabela 57. Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwercetyny obliczone z równania prostej  $y = 0,0336x - 0,0056$

<b>x (μg)</b>	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0	16,0	18,0	20,0	22,0
<b>y (Å)</b>	0,1288	0,1960	0,2632	0,3304	0,3976	0,4648	0,5320	0,5992	0,6664	0,7336



Rycina 58. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowej kwercetyny.

### 9.3.2.2. Oznaczenie zawartości flawonoidów w wyciągach

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 5 mL dodawano po 1,0 mL badanych wyciągów (rozdz. 8.4.3.2.2.), a następnie odczynniki analogicznie jak w przypadku wykreślenia krzywej kalibracyjnej dla kwercetyny. Z każdego powtórzenia poszczególnych wyciągów przygotowano po 3 próby. Wyniki oznaczeń podano w przeliczeniu na kwercetynę w mg/g ziela dymnicy (mg QE/g).

### 9.3.2.2.1. Zawartość flawonoidów w nalewce

Tabela 58. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość flawonoidów w nalewce

	Ilość ziela w próbie (mg)	A	Zawartość flawonoidów	
			w próbie (mg)	w nalewce (mg QE/g)
I	6,6	0,4570	0,0138	2,09
		0,4553	0,0137	2,08
		0,4571	0,0138	2,09
II	6,6	0,4553	0,0137	2,08
		0,4557	0,0137	2,08
		0,4582	0,0138	2,09
III	6,6	0,4569	0,0138	2,09
		0,4577	0,0138	2,09
		0,4582	0,0138	2,09

I, II, III – przygotowane powtórzenia nalewki; A – wartości absorbancji badanych prób

Tabela 59. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
I	2,08	0,00	0,00	0,22	2,08±0,01	2,08±0,01
II	2,08	0,01	0,00	0,34	2,08±0,02	2,08±0,01
III	2,09	0,00	0,00	0,14	2,09±0,01	2,09±0,01
					<b>2,09±0,01</b>	

$\bar{x}$  - średnia zawartość flawonoidów w nalewce w danym powtórzeniu (mg QE/g); S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha, f}=4,403$ );  $\bar{x} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Średnia zawartość flawonoidów w przygotowanej nalewce wynosi **2,09 mg w 1 g ziela dymnicy** w przeliczeniu na kwercetynę.

### 9.3.2.2.2. Zawartość flawonoidów w odwarze

Tabela 60. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość flawonoidów w odwarze

	Ilość ziela w próbie (mg)	A	Zawartość flawonoidów	
			w próbie (mg)	w odwarze (mg QE/g)
<b>I</b>	10,00	0,5354	0,0161	1,61
		0,5321	0,0160	1,60
		0,5335	0,0160	1,60
<b>II</b>	10,00	0,5337	0,0161	1,61
		0,5358	0,0161	1,61
		0,5336	0,0160	1,60
<b>III</b>	10,00	0,5365	0,0161	1,61
		0,5352	0,0161	1,61
		0,5344	0,0161	1,61

I, II, III – przygotowane powtórzenia odwaru; A – wartości absorbancji badanych prób.

Tabela 61. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
<b>I</b>	1,61	0,00	0,00	0,31	1,61±0,01	1,61±0,01
<b>II</b>	1,61	0,00	0,00	0,23	1,61±0,01	1,61±0,01
<b>III</b>	1,61	0,00	0,00	0,20	1,61±0,01	1,61±0,01
					<b>1,61±0,01</b>	

$\bar{x}$  - średnia zawartość flawonoidów w odwarze w danym powtórzeniu (mg QE/g); S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha, f}=4,403$ );  $\bar{x} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Średnia zawartość flawonoidów w przygotowanym odwarze wynosi **1,61 mg w 1 g ziela dymnicy** w przeliczeniu na kwercetynę.

### 9.3.2.2.3. Zawartość flawonoidów w wyciągu z ziela dymnicy (wg FP IX)

Tabela 62. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość flawonoidów w wyciągu z ziela dymnicy wg FP IX

	Ilość ziela w próbie (mg)	A	Zawartość flawonoidów	
			w próbie (mg)	w wyciągu (mg QE/g)
<b>I</b>	2,40	0,4942	0,0149	6,20
		0,4945	0,0149	6,20
		0,4937	0,0149	6,19
<b>II</b>	2,40	0,4943	0,0149	6,20
		0,4938	0,0149	6,19
		0,4934	0,0149	6,19
<b>III</b>	2,40	0,4951	0,0149	6,21
		0,4933	0,0148	6,19
		0,4941	0,0149	6,20

I, II, III – przygotowane powtórzenia wyciągu; A – wartości absorbancji badanych prób.

Tabela 63. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
<b>I</b>	6,20	0,01	0,00	0,08	6,20±0,01	6,20±0,01
<b>II</b>	6,19	0,01	0,00	0,09	6,19±0,01	6,19±0,01
<b>III</b>	6,20	0,01	0,01	0,18	6,10±0,03	6,20±0,02
					<b>6,20±0,02</b>	

$\bar{x}$  - średnia zawartość flawonoidów w wyciągu w danym powtórzeniu wyciągu (mg QE/g); S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha, f}=4,403$ );  $\bar{x} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Średnia zawartość flawonoidów w wyciągu z ziela dymnicy wg FP IX wynosi **6,20 mg w 1 g ziela dymnicy** w przeliczeniu na kwercetynę.



### **9.3.3. Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy**

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

#### **9.3.3.1. Wykreślenie krzywej kalibracyjnej dla wzorcowego kwasu kawowego**

##### **9.3.3.1.1. Przygotowanie roztworu podstawowego kwasu kawowego (0,2 mg/mL)**

Do kolby miarowej o pojemności 50 mL odważono dokładnie 0,01000 g kwasu kawowego. Rozpuszczono go w 10 mL metanolu, a następnie uzupełniono do współmierności wodą destylowaną. Uzyskano w ten sposób roztwór podstawowy o stężeniu 0,2 mg/mL.

##### **9.3.3.1.2. Przygotowanie rozcieńczeń roztworu podstawowego (4,8 – 33,6 µg/mL)**

Do kolb miarowych o pojemności 5 mL dodawano roztwór podstawowy kwasu kawowego w ilościach: 0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,60; 0,72; 0,84 mL, a następnie uzupełniono wodą destylowaną do współmierności. Uzyskano roztwory o stężeniach 4,8; 9,6; 14,4; 19,2; 24,0; 28,8 oraz 33,6 µg/mL. Dla każdego z rozcieńczeń przygotowano po 10 prób.

##### **9.3.3.1.3. Wykonanie oznaczenia**

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 mL dodawano kolejno:

- 0,7 mL poszczególnych rozcieńczeń podstawowego roztworu kwasu kawowego (co odpowiadało 3,36 – 23,52 µg kwasu kawowego)
- 0,1 mL roztworu kwasu solnego
- 0,1 mL odczynnika Arnov'a
- 0,1 mL roztworu wodorotlenku sodu

Próbę odniesienia przygotowano w analogiczny sposób, zastępując roztwór kwasu kawowego wodą destylowaną.

Absorbancję uzyskanych roztworów mierzono natychmiast po dodaniu roztworu wodorotlenku sodu, w kuwetach kwarcowych o grubości 1 cm, wobec próby odniesienia, przy długości fali  $\lambda=490$  nm. Otrzymane wyniki posłużyły do wykreślenia krzywej kalibracyjnej.

Tabela 64. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu kawowego

x	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>9</sub>	A <sub>10</sub>	$\bar{A}$
<b>3,36</b>	0,1191	0,1179	0,1188	0,1178	0,1192	0,1184	0,1177	0,1177	0,1179	0,1172	0,1182
<b>6,72</b>	0,2243	0,2246	0,2261	0,2237	0,2240	0,2268	0,2238	0,2265	0,2280	0,2281	0,2256
<b>10,08</b>	0,3387	0,3347	0,3340	0,3330	0,3342	0,3371	0,3385	0,3363	0,3338	0,3315	0,3352
<b>13,44</b>	0,4350	0,4336	0,4337	0,4359	0,4324	0,4397	0,4371	0,4318	0,4365	0,4384	0,4354
<b>16,80</b>	0,5490	0,5543	0,5486	0,5531	0,5566	0,5458	0,5550	0,5476	0,5515	0,5464	0,5508
<b>20,16</b>	0,6635	0,6539	0,6512	0,6506	0,6555	0,6653	0,6505	0,6546	0,6574	0,6662	0,6569
<b>23,52</b>	0,7500	0,7412	0,7482	0,7442	0,7385	0,7330	0,7353	0,7384	0,7497	0,7415	0,7420

x – ilość kwasu kawowego w badanej próbce ( $\mu\text{g}$ ); A<sub>1</sub> – A<sub>10</sub> – wartość absorbancji badanych próbek;  $\bar{A}$  – średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 65. Parametry statystyczne obliczone dla badanych próbek

x	$\bar{A}$	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	$\mu$	$\bar{A} \pm 2S$
<b>3,36</b>	0,1182	0,0007	0,0002	0,5670	0,1182 $\pm$ 0,0005	0,1182 $\pm$ 0,0013
<b>6,72</b>	0,2256	0,0017	0,0005	0,7622	0,2256 $\pm$ 0,0012	0,2256 $\pm$ 0,0034
<b>10,08</b>	0,3352	0,0024	0,0008	0,7112	0,3352 $\pm$ 0,0017	0,3352 $\pm$ 0,0048
<b>13,44</b>	0,4354	0,0026	0,0008	0,5934	0,4354 $\pm$ 0,0018	0,4354 $\pm$ 0,0052
<b>16,80</b>	0,5508	0,0038	0,0012	0,6953	0,5508 $\pm$ 0,0027	0,5508 $\pm$ 0,0077
<b>20,16</b>	0,6569	0,0061	0,0019	0,9222	0,6569 $\pm$ 0,0043	0,6569 $\pm$ 0,0121
<b>23,52</b>	0,7420	0,0059	0,0019	0,8018	0,7420 $\pm$ 0,0043	0,7420 $\pm$ 0,0119

x - zawartość kwasu kawowego w badanej próbce ( $\mu\text{g}$ );  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{A}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz – współczynnik zmienności (%);  $\mu$  – przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=10$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha,f}=2,262$ );  $\bar{A} \pm 2S$  – przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Tabela 66. Parametry krzywej kalibracyjnej dla kwasu kawowego obliczone metodą najmniejszych kwadratów

x	y ( $\bar{A}$ )	x*y	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>
3,36	0,1182	0,397051	11,289600	0,013964
6,72	0,2256	1,515965	45,158400	0,050891
10,08	0,3352	3,378614	101,606400	0,112346
13,44	0,4354	5,851910	180,633600	0,189582
16,80	0,5508	9,253272	282,240000	0,303370
20,16	0,6569	13,242499	406,425600	0,431478
23,52	0,7420	17,451840	553,190400	0,550564
$\Sigma$				
94,08	3,0640	51,091152	1580,544000	1,652194

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

$$y = 0,0314x + 0,0163$$

gdzie:

x – ilość kwasu kawowego w próbce ( $\mu\text{g}$ )

y – absorbancja próby

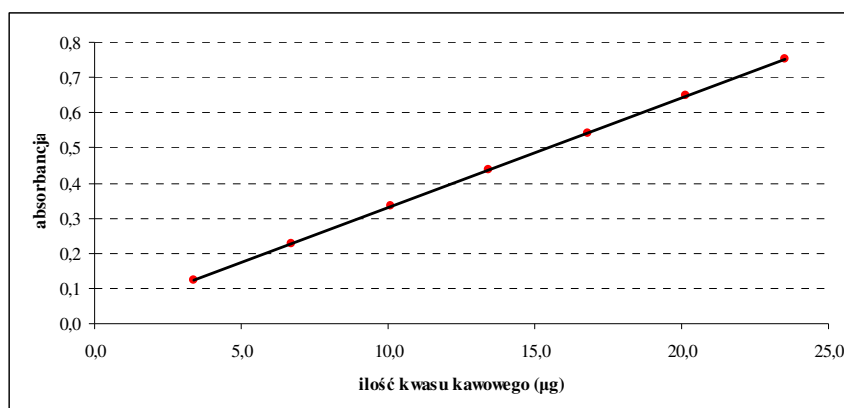
Tabela 67. Parametry równania prostej  $y = 0,0314x + 0,0163$ 

a	b	r	r <sup>2</sup>
0,0314	0,0163	0,9998	0,9996

a – współczynnik kierunkowy prostej; b – wyraz wolny; r – współczynnik korelacji liniowej Pearsona; r<sup>2</sup> – współczynnik determinacji

Tabela 68. Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwasu kawowego obliczone z równania prostej  $y = 0,0314x + 0,0163$ 

x ( $\mu\text{g}$ )	3,36	6,72	10,08	13,44	16,8	20,16	23,52
y ( $\bar{A}$ )	0,1217	0,2270	0,3324	0,4377	0,5431	0,6484	0,7538



Rycina 59. Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu kawowego.

### 9.3.3.2. Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych w wyciągach

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 mL dodawano po 0,7 mL badanych wyciągów (rozd. 8.4.3.2.3.), a następnie odczynniki analogicznie jak w przypadku wykreślenia krzywej kalibracyjnej dla kwasu kawowego. Z każdego powtórzenia poszczególnych wyciągów przygotowano po 3 próby. Wyniki oznaczeń podano w przeliczeniu na kwas kawowy w mg/g ziela dymnicy (mg CAE/g).

#### 9.3.3.2.1. Zawartość kwasów fenolowych w nalewce

Tabela 69. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w nalewce

	Ilość ziela w próbce (mg)	A	Zawartość kwasów fenolowych	
			w próbce (mg)	w nalewce (mg CAE/g)
<b>I</b>	2,52	0,4068	0,0124	4,94
		0,4131	0,0126	5,01
		0,4075	0,0125	4,94
<b>II</b>	2,52	0,4033	0,0123	4,89
		0,4043	0,0124	4,90
		0,4076	0,0125	4,95
<b>III</b>	2,52	0,4065	0,0124	4,93
		0,4041	0,0124	4,90
		0,4098	0,0125	4,97

I, II, III – przygotowane powtórzenia nalewki; A – wartości absorbancji badanych prób.

Tabela 70. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
I	4,96	0,04	0,03	0,88	4,96±0,11	4,96±0,09
II	4,91	0,03	0,02	0,58	4,91±0,07	4,91±0,06
III	4,94	0,04	0,02	0,73	4,94±0,09	4,94±0,07
					<b>4,94±0,09</b>	

$\bar{x}$  - średnia zawartość kwasów fenolowych w nalewce w danym powtórzeniu (mg CAE/g); S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha, f}=4,403$ );  $\bar{x} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Średnia zawartość kwasów fenolowych w przygotowanej nalewce wynosi **4,94 mg w 1 g ziela dymnicy** w przeliczeniu na kwas kawowy.

### 9.3.3.2.2. Zawartość kwasów fenolowych w odwarze

Tabela 71. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w odwarze

	Ilość ziela w próbie (mg)	A	Zawartość kwasów fenolowych	
			w próbie (mg)	w odwarze (mg CAE/g)
I	1,68	0,4009	0,0122	7,29
		0,3938	0,0120	7,16
		0,3993	0,0122	7,26
II	1,68	0,3993	0,0122	7,26
		0,3962	0,0121	7,20
		0,4000	0,0122	7,27
III	1,68	0,3992	0,0122	7,26
		0,3938	0,0120	7,16
		0,3982	0,0122	7,24

I, II, III – przygotowane powtórzenia odwaru; A – wartości absorbancji badanych prób.

Tabela 72. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
I	7,23	0,07	0,04	0,98	7,24±0,18	7,24±0,14
II	7,25	0,04	0,02	0,53	7,25±0,10	7,25±0,08
III	7,22	0,05	0,03	0,75	7,22±0,14	7,22±0,11
					<b>7,23±0,14</b>	

$\bar{x}$  - średnia zawartość kwasów fenolowych w odwarze w danym powtórzeniu (mg CAE/g); S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha, f}=4,403$ );  $\bar{x} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Średnia zawartość kwasów fenolowych w przygotowanym odwarze wynosi **7,23 mg w 1 g ziela dymnicy** w przeliczeniu na kwas kawowy.

### 9.3.3.2.3. Zawartość kwasów fenolowych w wyciągu metanolowo-wodnym

Tabela 73. Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w wyciągu metanolowo-wodnym

	Ilość ziela w próbce (mg)	A	Zawartość kwasów fenolowych	
			w próbce (mg)	w wyciągu metanolowo-wodnym (mg CAE/g)
I	1,54	0,4092	0,0125	8,13
		0,4132	0,0126	8,21
		0,4071	0,0124	8,08
II	1,54	0,4072	0,0124	8,08
		0,4099	0,0125	8,14
		0,413	0,0126	8,20
III	1,54	0,4099	0,0125	8,14
		0,412	0,0126	8,18
		0,4101	0,0125	8,14

I, II, III – przygotowane powtórzenia wyciągu metanolowo-wodnego; A – wartości absorbancji badanych prób.

Tabela 74. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	Wz	$\mu$	$\bar{x} \pm 2S$
<b>I</b>	8,14	0,06	0,04	0,79	8,14±0,16	8,14±0,13
<b>II</b>	8,14	0,06	0,03	0,74	8,14±0,15	8,14±0,12
<b>III</b>	8,16	0,02	0,01	0,29	8,16±0,06	8,16±0,05
					<b>8,15±0,13</b>	

$\bar{x}$  - średnia zawartość kwasów fenolowych w wyciągu metanolowo-wodnym w danym powtórzeniu (mg CAE/g); S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{x}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=3$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha,f}=4,403$ );  $\bar{x} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Średnia zawartość kwasów fenolowych w wyciągu metanolowo-wodnym wynosi **8,15 mg w 1 g ziela dymnicy** w przeliczeniu na kwas kawowy.

## **9.4. Badania aktywności biologicznej**

### **9.4.1. Aktywność antyoksydacyjna**

#### **9.4.1.1. Badanie aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS**

Oznaczenie wykonano wg zmodyfikowanej metody Re i wsp. (2009). Do oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej wykorzystano reakcję redukcji kationorodników ABTS<sup>•+</sup> przez badaną nalewkę i odwar.

##### **9.4.1.1.1. Przygotowanie roztworu kationorodników ABTS<sup>•+</sup>**

Do kolby miarowej o pojemności 50 mL odważono dokładnie 0,19204 g ABTS i rozpuszczono go w 2,45 mM roztworze nadsiarczanu potasu. Roztwór K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> uzyskano przez rozpuszczenie 0,33116 g substancji w wodzie destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 500 mL. Otrzymany 7,0 mM roztwór podstawowy kationorodników ABTS<sup>•+</sup> inkubowano przez 12 godzin w temperaturze pokojowej, w ciemnym miejscu. Po tym czasie rozcieńczono go wodą destylowaną, tak aby przy długości fali  $\lambda=734$  nm wykazywał absorbancję ~0,77.

##### **9.4.1.1.2. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej substancji referencyjnych**

###### **9.4.1.1.2.1. Przygotowanie roztworów podstawowych**

###### **A. rutyny**

Odważono 0,01250 g wzorcowej rutyny do kolby miarowej o pojemności 25 mL i uzupełniono metanolem, uzyskując roztwór o stężeniu 0,50 mg/mL.

###### **B. kwasu galusowego**

Odważono 0,01251 g wzorcowego kwasu galusowego do kolby miarowej o pojemności 25 mL, rozpuszczono go w 20 mL metanolu i uzupełniono wodą destylowaną. Uzyskano w ten sposób roztwór o stężeniu 0,50 mg/mL.



### **C. troloksu**

Odważono 0,02002 g wzorcowego troloksu do kolby miarowej o pojemności 5 mL i uzupełniono metanolem, uzyskując roztwór o stężeniu 4,00 mg/mL.

#### **9.4.1.1.2.2. Przygotowanie rozcieńczeń roztworów podstawowych**

##### **A. rutyny (0,05 – 0,25 mg/mL)**

Do kolb miarowych o pojemności 5 mL dodano podstawowy roztwór rutyny w ilości: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mL, a następnie uzupełniono metanolem. Uzyskano roztwory o stężeniach: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 oraz 0,25 mg/mL. Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 8 prób.

##### **B. kwasu galusowego (0,005 – 0,025 mg/mL)**

Do kolb miarowych o pojemności 5 mL dodano podstawowy roztwór kwasu galusowego w ilości: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 mL, a następnie uzupełniono wodą destylowaną. Uzyskano roztwory o stężeniach: 0,005; 0,010; 0,015; 0,020 i 0,025 mg/mL. Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 8 prób.

##### **C. troloksu (0,01 – 0,10 mg/mL)**

Do kolb miarowych o pojemności 10 mL dodano podstawowy roztwór troloksu w ilości: 0,025; 0,050; 0,100; 0,150; 0,200; 0,250 mL, a następnie uzupełniono metanolem. Uzyskano roztwory o stężeniach: 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 i 0,10 mg/mL. Dla każdego rozcieńczenia przygotowano po 8 prób.

#### **9.4.1.1.2.3. Wykonanie oznaczenia**

Do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 mL dodawano kolejno:

- 50  $\mu$ L rozcieńczeń podstawowych roztworów substancji referencyjnych: rutyny (2,5 – 12,5  $\mu$ g), kwasu galusowego (0,25 – 1,25  $\mu$ g) i troloksu (0,5 – 5,0  $\mu$ g)
- 1,0 mL roztworu kationorodników ABTS<sup>•+</sup>

Pomiar absorbancji prób wykonano po 10 minutach inkubacji (czas wyznaczony doświadczalnie). Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda=734$  nm, wobec próby odniesienia (woda), w jednorazowych plastikowych kuwetach o grubości 1 cm.

Zdolność do neutralizacji wolnych rodników (%) obliczono na podstawie poniższego równania:

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

gdzie:

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

$A_p$  - średnia absorbancja próbki, odczytana po 10 minutach inkubacji

Wartości  $IC_{50}$  (stężenie antyoksydantu niezbędne do eliminacji 50% wolnych rodników) obliczono metodą interpolacji liniowej między wartościami poniżej i powyżej 50% aktywności antyoksydacyjnej.

#### 9.4.1.1.2.4. Wyznaczenie $IC_{50}$

##### $IC_{50}$ dla rutyny

Tabela 75. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów rutyny

x	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	$\bar{A}$
0,00	0,7658	0,7659	0,7667	0,7673	0,7684	0,7688	0,7676	0,7691	0,7675
2,50	0,5976	0,5969	0,5986	0,5990	0,5983	0,5990	0,6011	0,6010	0,5989
5,00	0,4393	0,4406	0,4418	0,4414	0,4434	0,4438	0,4402	0,4385	0,4411
7,50	0,3073	0,31	0,3109	0,3084	0,3117	0,31	0,3143	0,3111	0,3105
10,00	0,2166	0,2205	0,2214	0,2217	0,2228	0,2211	0,222	0,2199	0,2208
12,50	0,1285	0,1287	0,1298	0,1319	0,1294	0,131	0,1312	0,1301	0,1301

x - zawartość rutyny w badanej próbce ( $\mu\text{g}$ ); A<sub>1</sub>-A<sub>8</sub> - wartości absorbancji badanych prób;  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 76. Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób

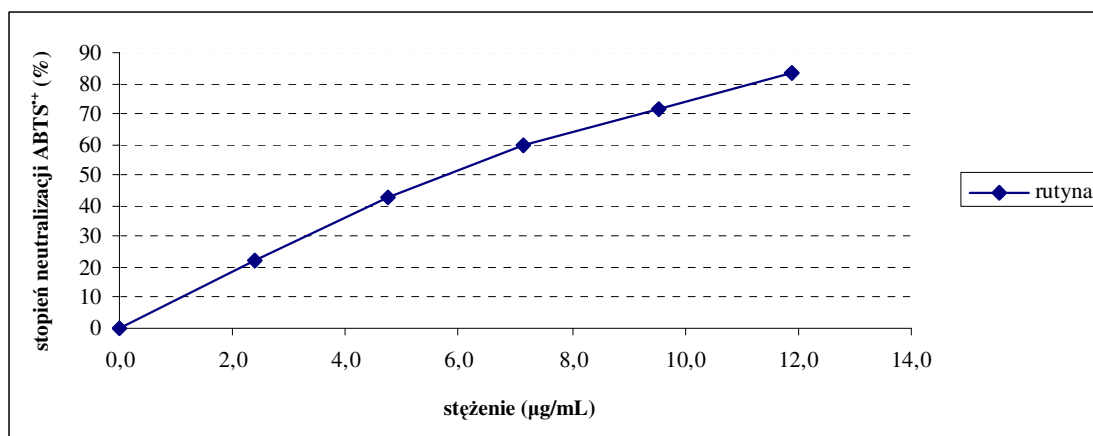
x	$\bar{A}$	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	$\mu$	$\bar{A} \pm 2S$
<b>0,00</b>	0,7675	0,0013	0,0004	0,1647	0,7675±0,0011	0,7675±0,0025
<b>2,50</b>	0,5989	0,0015	0,0005	0,2476	0,5989±0,0012	0,5989±0,0030
<b>5,00</b>	0,4411	0,0019	0,0007	0,4216	0,4411±0,0016	0,4411±0,0037
<b>7,50</b>	0,3105	0,0021	0,0008	0,6837	0,3105±0,0018	0,3105±0,0042
<b>10,00</b>	0,2208	0,0019	0,0007	0,8599	0,2208±0,0016	0,2208±0,0038
<b>12,50</b>	0,1301	0,0012	0,0004	0,9350	0,1301±0,0010	0,1301±0,0024

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

Tabela 77. Stopień neutralizacji kationorodników ABTS<sup>++</sup> przez rutynę

x	Stężenie rutyny w próbce ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{A}$	Stopień neutralizacji rodników ABTS <sup>++</sup> (%)
<b>0,00</b>	0,00	0,7675	0
<b>2,50</b>	2,38	0,5989	21,96
<b>5,00</b>	4,76	0,4411	42,52
<b>7,50</b>	7,14	0,3105	59,55
<b>10,00</b>	9,52	0,2208	71,24
<b>12,50</b>	11,90	0,1301	83,05

x - zawartość rutyny w badanej próbce ( $\mu\text{g}$ );  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; objętość badanych prób  $V=1,05$  mL.



Rycina 60. Stopień neutralizacji kationorodników ABTS<sup>+</sup> przez rutynę.

Z równania prostej przechodzącej przez punkty o współrzędnych (4,76; 42,52) oraz (7,14; 59,55):

$$y = 7,1555x + 8,4600$$

obliczono wartość **IC<sub>50</sub> dla rutyny**, która wynosiła **5,81 µg/mL**.

### IC<sub>50</sub> dla kwasu galusowego

Tabela 78. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego

x	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	$\bar{A}$
<b>0,00</b>	0,7765	0,7765	0,777	0,7765	0,7766	0,7765	0,7766	0,7764	0,7766
<b>0,25</b>	0,6023	0,6016	0,5987	0,6019	0,5996	0,6006	0,5994	0,6018	0,6007
<b>0,50</b>	0,4864	0,4878	0,4875	0,4919	0,4870	0,4899	0,4909	0,4876	0,4886
<b>0,75</b>	0,3866	0,3868	0,3867	0,3858	0,3850	0,3889	0,3866	0,3861	0,3866
<b>1,00</b>	0,2925	0,2947	0,2919	0,2902	0,2918	0,2910	0,2908	0,2904	0,2917
<b>1,25</b>	0,1962	0,1961	0,1969	0,1953	0,1963	0,1957	0,1955	0,1951	0,1959

x - zawartość kwasu galusowego w badanej próbce (µg); A<sub>1</sub>-A<sub>8</sub> - wartości absorbancji badanych prób;  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 79. Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób

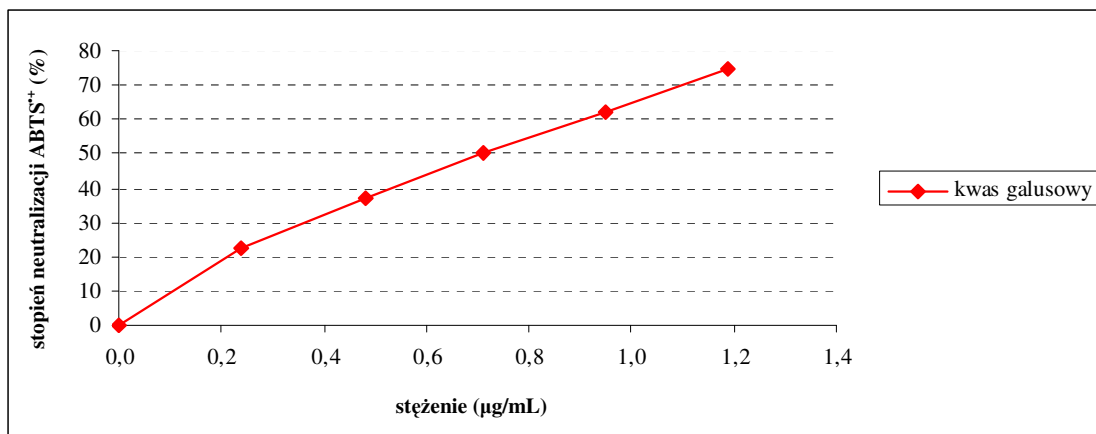
x	$\bar{A}$	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	$\mu$	$\bar{A} \pm 2S$
<b>0,00</b>	0,7766	0,0002	0,0001	0,0236	0,7766±0,0002	0,7766±0,0004
<b>0,25</b>	0,6007	0,0014	0,0005	0,2261	0,6007±0,0011	0,6007±0,0027
<b>0,50</b>	0,4886	0,0020	0,0007	0,4102	0,4886±0,0017	0,4886±0,0040
<b>0,75</b>	0,3866	0,0011	0,0004	0,2897	0,3866±0,0009	0,3866±0,0022
<b>1,00</b>	0,2917	0,0015	0,0005	0,5005	0,2917±0,0012	0,2917±0,0029
<b>1,25</b>	0,1959	0,0006	0,0002	0,3044	0,1959±0,0005	0,1959±0,0012

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

Tabela 80. Stopień neutralizacji kationorodników ABTS<sup>++</sup> przez kwas galusowy

x	Stężenie kwasu galusowego w próbce ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{A}$	Stopień neutralizacji rodników ABTS <sup>++</sup> (%)
<b>0,00</b>	0,00	0,7766	0
<b>0,25</b>	0,24	0,6007	22,64
<b>0,50</b>	0,48	0,4886	37,08
<b>0,75</b>	0,71	0,3866	50,22
<b>1,00</b>	0,95	0,2917	62,44
<b>1,25</b>	1,19	0,1959	74,78

x - zawartość kwasu galusowego w badanej próbce ( $\mu\text{g}$ );  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; objętość badanych prób  $V=1,05$  mL.



Rycina 61. Stopień neutralizacji kationorodników ABTS<sup>+</sup> przez kwas galusowy.

Z równania prostej przechodzącej przez punkty o współrzędnych (0,48; 37,08) oraz (0,71; 50,22):

$$y = 57,1304x + 9,6574$$

obliczono wartość **IC<sub>50</sub> dla kwasu galusowego**, która wynosiła **0,71 µg/mL**.

### IC<sub>50</sub> dla troloksu

Tabela 81. Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów troloksu

x	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	$\bar{A}$
<b>0,00</b>	0,7711	0,7707	0,7709	0,7707	0,7709	0,7709	0,7711	0,7710	0,7709
<b>0,50</b>	0,6852	0,6847	0,6870	0,6857	0,6854	0,6877	0,6857	0,6858	0,6859
<b>1,00</b>	0,6269	0,6223	0,6265	0,6256	0,6252	0,6240	0,6265	0,6256	0,6253
<b>2,00</b>	0,5080	0,5079	0,5082	0,5087	0,5075	0,5091	0,5106	0,5110	0,5089
<b>3,00</b>	0,4109	0,4103	0,4102	0,4107	0,4105	0,4111	0,4111	0,4128	0,4110
<b>4,00</b>	0,2851	0,2832	0,2848	0,2833	0,2834	0,2833	0,2872	0,2868	0,2846
<b>5,00</b>	0,1507	0,1504	0,1504	0,1503	0,1504	0,1523	0,1522	0,1520	0,1511

x - zawartość troloksu w badanej próbie (µg); A<sub>1</sub>-A<sub>8</sub> - wartości absorbancji badanych prób;  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 82. Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób

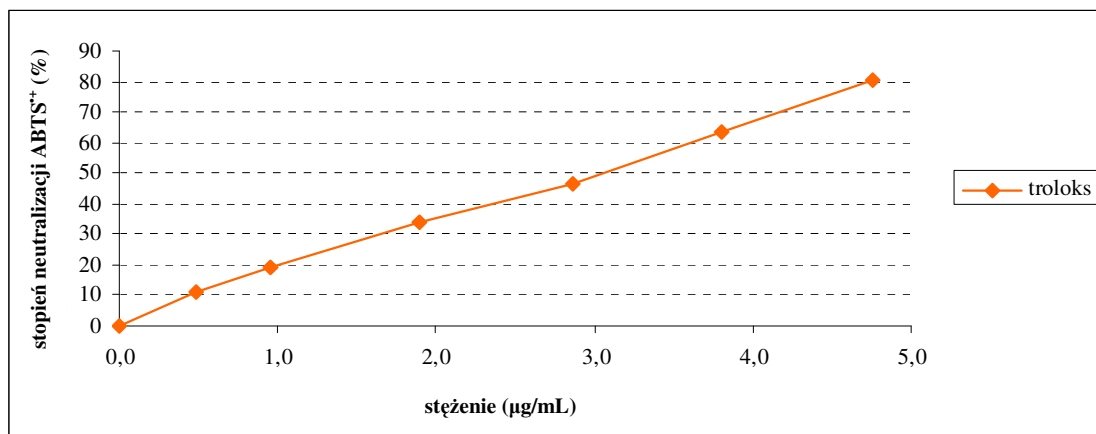
x	$\bar{A}$	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	$\mu$	$\bar{A} \pm 2S$
<b>0,00</b>	0,7709	0,0002	0,0001	0,0201	0,7709±0,0001	0,7709±0,0003
<b>0,50</b>	0,6859	0,0010	0,0003	0,1428	0,6859±0,0008	0,6859±0,0020
<b>1,00</b>	0,6253	0,0015	0,0005	0,2441	0,6253±0,0013	0,6253±0,0031
<b>2,00</b>	0,5089	0,0013	0,0005	0,2534	0,5089±0,0011	0,5089±0,0026
<b>3,00</b>	0,4110	0,0008	0,0003	0,1998	0,4110±0,0007	0,4110±0,0016
<b>4,00</b>	0,2846	0,0016	0,0006	0,5736	0,2846±0,0014	0,2846±0,0033
<b>5,00</b>	0,1511	0,0009	0,0003	0,5988	0,1511±0,0008	0,1511±0,0018

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

Tabela 83. Stopień neutralizacji kationorodników ABTS<sup>++</sup> przez troloks

x	Stężenie troloksu w próbce ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{A}$	Stopień neutralizacji rodników ABTS <sup>++</sup> (%)
<b>0,00</b>	0,00	0,7709	0,00
<b>0,50</b>	0,48	0,6859	11,03
<b>1,00</b>	0,95	0,6253	18,89
<b>2,00</b>	1,90	0,5089	33,99
<b>3,00</b>	2,86	0,4110	46,69
<b>4,00</b>	3,81	0,2846	63,08
<b>5,00</b>	4,76	0,1511	80,40

x - zawartość troloksu w badanej próbce ( $\mu\text{g}$ );  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; objętość badanych prób  $V=1,05$  mL.



Rycina 62. Stopień neutralizacji kationorodników ABTS<sup>•+</sup> przez troloks.

Z równania prostej przechodzącej przez punkty o współrzędnych (2,86; 46,69) oraz (3,81; 63,08):

$$y = 17,2526x + 2,6525$$

obliczono wartość **IC<sub>50</sub> dla troloksu**, która wynosiła **3,05 µg/mL**.

#### 9.4.1.1.3 Badanie aktywności antyoksydacyjnej wyciągów

Do probówek typu Eppendorf dodawano kolejno po 50 µL kolejnych rozcieńczeń nalewki i odwaru (rozd. 8.4.3.1), a następnie po 1,0 mL roztworu kationorodników ABTS<sup>•+</sup>.

Dla badanych wyciągów z ziela dymnicy lekarskiej wyznaczono wartości IC<sub>50</sub> analogicznie jak w przypadku substancji referencyjnych.



**IC<sub>50</sub> dla nalewki**

Tabela 84. Wartości pomiarów absorbancji dla nalewki

x	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>9</sub>	$\bar{A}$
<b>0,00</b>	0,7763	0,7759	0,7758	0,7758	0,7759	0,7759	0,7759	0,7758	0,7760	0,7759
<b>25,00</b>	0,7035	0,7043	0,7030	0,7039	0,7034	0,7034	0,7025	0,7021	0,7023	0,7032
<b>75,00</b>	0,6388	0,6386	0,6371	0,6369	0,6376	0,6376	0,6383	0,6372	0,6374	0,6377
<b>150,00</b>	0,5564	0,5577	0,5570	0,5575	0,5561	0,5568	0,5579	0,5563	0,5565	0,5569
<b>225,00</b>	0,4830	0,4845	0,4840	0,4837	0,4837	0,4829	0,4852	0,4838	0,4842	0,4839
<b>300,00</b>	0,4154	0,4168	0,4163	0,4155	0,4181	0,4172	0,4164	0,4150	0,4156	0,4163
<b>375,00</b>	0,3458	0,3469	0,3460	0,3452	0,3487	0,3476	0,3472	0,3457	0,3465	0,3466

x - zawartość ziela w badanej próbce (μg); A<sub>1</sub>-A<sub>9</sub> - wartości absorbancji badanych próbek;  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 85. Parametry statystyczne obliczone dla badanych próbek

x	$\bar{A}$	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	$\mu$	$\bar{A} \pm 2S$
<b>0,00</b>	0,7759	0,0002	0,0001	0,0201	0,7759±0,0001	0,7759±0,0003
<b>25,00</b>	0,7032	0,0007	0,0002	0,1055	0,7032±0,0006	0,7032±0,0015
<b>75,00</b>	0,6377	0,0007	0,0002	0,1072	0,6377±0,0005	0,6377±0,0014
<b>150,00</b>	0,5569	0,0007	0,0002	0,1176	0,5569±0,0005	0,5569±0,0013
<b>225,00</b>	0,4839	0,0007	0,0002	0,1470	0,4839±0,0005	0,4839±0,0014
<b>300,00</b>	0,4163	0,0010	0,0003	0,2391	0,4163±0,0008	0,4163±0,0020
<b>375,00</b>	0,3466	0,0011	0,0004	0,3166	0,3466±0,0008	0,3466±0,0022

x - zawartość ziela w badanej próbce (μg);  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{A}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy n=9, f=n-1 wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha, f}=2,306$ );  $\bar{A} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Tabela 86. Stopień neutralizacji kationorodników ABTS<sup>++</sup> przez nalewkę z ziela dymnicy

x	Stężenie nalewki w próbce (µg/mL)	Stężenie polifenoli w próbce (µg GAE/mL)	$\bar{A}$	Stopień neutralizacji rodników ABTS <sup>++</sup> (%)
0,00	0,00	0,00	0,7759	0,00
25,00	23,81	0,24	0,7032	9,38
75,00	71,43	0,73	0,6377	17,81
150,00	142,86	1,46	0,5569	28,23
225,00	214,29	2,19	0,4839	37,64
300,00	285,71	2,92	0,4163	46,35
375,00	357,14	3,65	0,3466	55,33

x - zawartość ziela w badanej próbce (µg);  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; objętość badanych prób V=1,05 mL.

Z równania prostej przechodzącej przez punkty o współrzędnych (285,71; 46,35) oraz (357,14; 55,33):

$$y = 0,1257x + 10,4313$$

obliczono wartość **IC<sub>50</sub> dla nalewki**, która wynosiła **314,79 µg/mL**.

### IC<sub>50</sub> dla odwaru

Tabela 87. Wartości pomiarów absorbancji dla odwaru

x	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>9</sub>	$\bar{A}$
0,00	0,7734	0,7735	0,7737	0,7732	0,7732	0,7731	0,7735	0,7735	0,7737	0,7734
50,00	0,6213	0,6184	0,6181	0,6199	0,6184	0,6180	0,6177	0,6173	0,6169	0,6184
100,00	0,5187	0,5137	0,5188	0,5185	0,5166	0,5158	0,5151	0,5142	0,5131	0,5161
150,00	0,4180	0,4172	0,4145	0,4157	0,4152	0,4144	0,4122	0,4132	0,4187	0,4155
200,00	0,3392	0,3354	0,3333	0,3374	0,3361	0,3349	0,3333	0,3310	0,3362	0,3352
250,00	0,2560	0,2562	0,2555	0,2543	0,2533	0,2521	0,2559	0,2547	0,2533	0,2546

x - zawartość ziela w badanej próbce (µg); A<sub>1</sub>-A<sub>9</sub> - wartości absorbancji badanych prób;  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji.

Tabela 88. Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób

x	$\bar{A}$	S	$S_{\bar{A}}$	Wz	$\mu$	$\bar{A} \pm 2S$
<b>0,00</b>	0,7734	0,0002	0,0001	0,0280	0,7734±0,0002	0,7734±0,0004
<b>50,00</b>	0,6184	0,0014	0,0005	0,2202	0,6184±0,0010	0,6184±0,0027
<b>100,00</b>	0,5161	0,0022	0,0007	0,4306	0,5161±0,0017	0,5161±0,0044
<b>150,00</b>	0,4155	0,0022	0,0007	0,5238	0,4155±0,0017	0,4155±0,0044
<b>200,00</b>	0,3352	0,0024	0,0008	0,7280	0,3352±0,0019	0,3352±0,0049
<b>250,00</b>	0,2546	0,0014	0,0005	0,5683	0,2546±0,0011	0,2546±0,0029

x - zawartość ziela w badanej próbce ( $\mu\text{g}$ );  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;  $S_{\bar{A}}$  - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; Wz - współczynnik zmienności (%);  $\mu$  - przedział ufności (przyjmując poziom prawdopodobieństwa 95%, dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  przy  $n=9$ ,  $f=n-1$  wartość współczynnika rozkładu t-Studenta  $t_{\alpha, f}=2,306$ );  $\bar{A} \pm 2S$  - przedział w którym powinien znaleźć się wynik pojedynczego oznaczenia (dla  $\alpha = 0,05$ ).

Tabela 89. Stopień neutralizacji kationorodników ABTS<sup>++</sup> przez odwar z ziela dymnicy

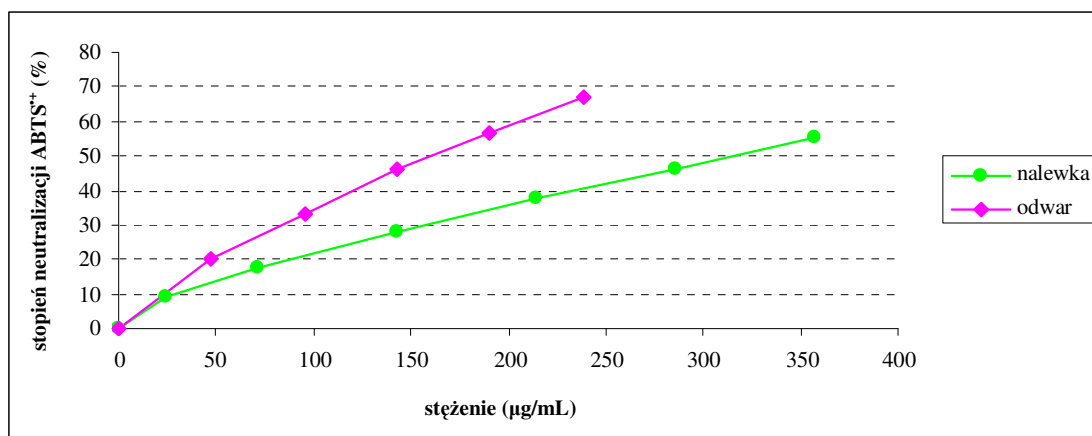
x	Stężenie odwaru w próbce ( $\mu\text{g/mL}$ )	Stężenie polifenoli w próbce ( $\mu\text{g GAE/mL}$ )	$\bar{A}$	Stopień neutralizacji rodników ABTS <sup>++</sup> (%)
<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,7734	0,00
<b>50,00</b>	47,62	0,65	0,6184	20,04
<b>100,00</b>	95,24	1,30	0,5161	33,28
<b>150,00</b>	142,86	1,95	0,4155	46,28
<b>200,00</b>	190,48	2,60	0,3352	56,66
<b>250,00</b>	238,10	3,25	0,2546	67,08

x - zawartość ziela w badanej próbce ( $\mu\text{g}$ );  $\bar{A}$  - średnia arytmetyczna z wartości absorbancji; objętość badanych prób  $V=1,05$  mL.

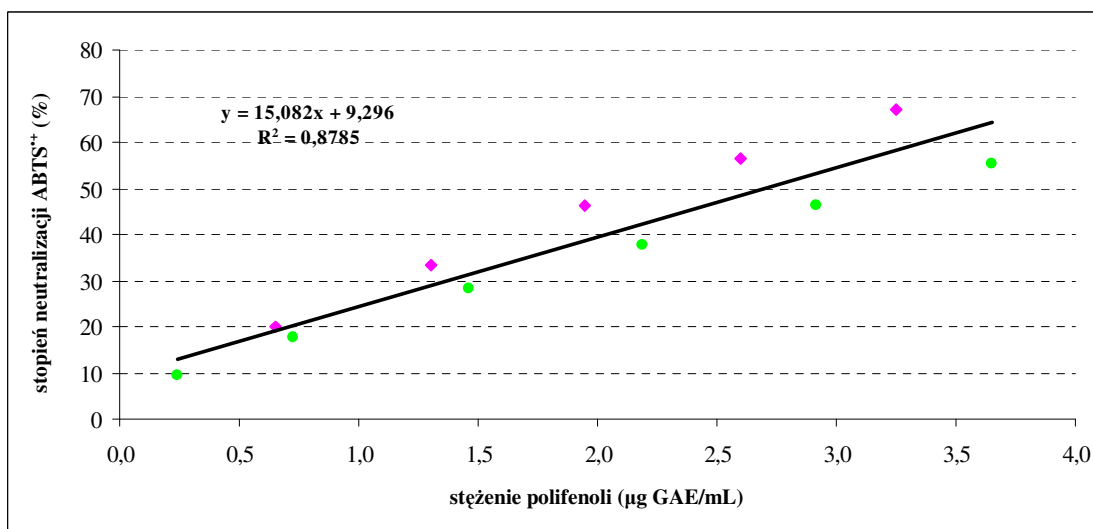
Z równania prostej przechodzącej przez punkty o współrzędnych (142,86; 46,28) oraz (190,48; 56,66):

$$y = 0,2180x + 15,1400$$

obliczono wartość **IC<sub>50</sub> dla odwaru**, która wynosiła **159,91  $\mu\text{g/mL}$** .



Rycina 63. Stopień neutralizacji kationorodników ABTS<sup>+</sup> (%) przez nalewkę i odwar z ziela dymnicy.



Rycina 64. Zależność liniowa pomiędzy stopniem neutralizacji kationorodników ABTS<sup>+</sup> (%), a stężeniem polifenoli w nalewce i odwarze z ziela dymnicy.

#### 9.4.1.2. Badanie aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionych genu *sod1*<sup>5</sup>

##### 9.4.1.2.1. Materiał do badań

W badaniach wykorzystano zarówno szczep dziki SP-4 (MAT $\alpha$  *leu1 arg4*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, jak i izogenicznego mutantu delecyjnego DSCD1-

<sup>5</sup> Badania wykonał dr Andonis Karachitos w Zakładzie Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

1C (MAT $\alpha$  *leu1 arg4 sod1:natMX*) zawierającego kasetę natMX w obrębie genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową zawierającą jony miedzi i cynku (SOD1).

Materiałem roślinnym była nalewka i odwar z ziela dymnicy lekarskiej o stężeniu 400 mg ziela w 1 mL (rozdz. 8.5.3.2.1.). Roztwory substancji referencyjnych (rutyny, kwasu galusowego, troloksu) przygotowano w stężeniu 2 mg/mL.

#### **9.4.1.2.2. Hodowla drożdży *Saccharomyces cerevisiae***

Pożywki YPD zawierające 2% glukozę stosowano w celu uzyskania odpowiedniego inokulum. Drożdże przeszczepiano z inokulum na pożywki zawierające 3% glicerol (niefermentujące źródło węgla), tak aby początkowe OD<sub>546</sub>/mL wynosiło 0,03. Hodowlę drożdży prowadzono w ciemności przez 10 godzin, w temperaturze 28°C, przy ciągłym wytrząsaniu w kolbach Erlenmayera o pojemności 100 mL, zawierających 25 mL pożywki YPG.

#### **9.4.1.2.3. Modyfikacje hodowli drożdży *Saccharomyces cerevisiae***

Do hodowli dodawano określoną objętość nalewki/odwaru z ziela dymnicy lekarskiej lub roztworu substancji referencyjnej oraz sterylnej wody bidestylowanej, a następnie prowadzono wzrost hodowli do osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu. Wzrost hodowli kontrolowano spektrofotometrycznie, mierząc gęstość optyczną (OD/mL) przy długości fali  $\lambda=546$  nm. Do hodowli szczepu dzikiego dodawano 1,0 mL sterylnej wody bidestylowanej. Sposób modyfikacji hodowli izogenicznego mutantu delecyjnego przez substancje referencyjne i wyciągi z ziela dymnicy lekarskiej przedstawiono w Tabeli 90.

Tabela 90. Sposób modyfikacji hodowli izogenicznego mutantu delecyjnego DSCD1-1C (*MAT $\alpha$  leu1 arg4 sod1:natMX*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

		Objętość roztworu substancji badanej lub wyciągu [mL]	Objętość wody bidestylowanej [mL]	Zawartość ziela dymnicy/substancji referencyjnej [mg]
<b>kontrola</b>		-	1,0	-
<b>substancje referencyjne</b>	rutyna	1,0	-	2,0
	kwask galusowy	1,0	-	2,0
	troloks	1,0	-	2,0
<b>nalewka</b>	A	0,2	0,8	80,0
	B	0,5	0,5	200,0
	C	0,8	0,2	320,0
	D	1,0	-	400,0
<b>odwar</b>	A	0,2	0,8	80,0
	B	0,5	0,5	200,0
	C	0,8	0,2	320,0
	D	1,0	-	400,0

#### 9.4.1.2.4. Testy przeżywalności

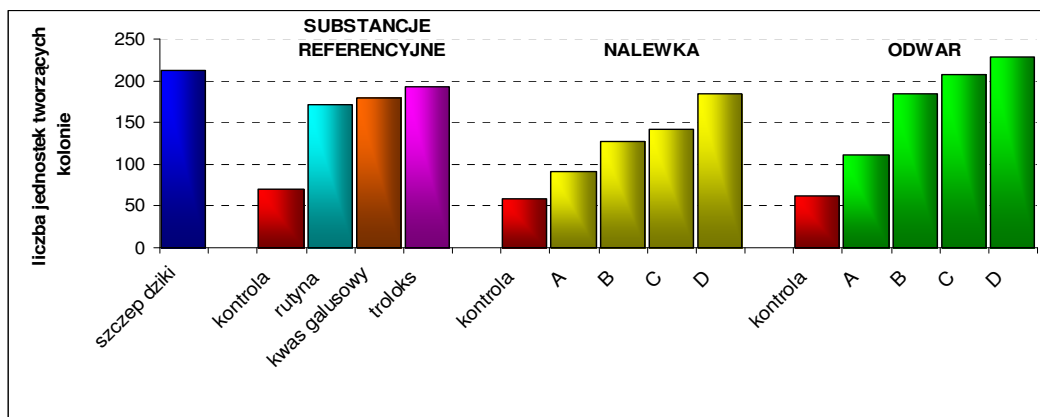
Przygotowano serię 10-krotnych rozcieńczeń hodowli mutantu delecyjnego modyfikowanych za pomocą substancji referencyjnych, nalewki oraz odwaru z ziela dymnicy lekarskiej. Poszczególne rozcieńczenia naniesiono następnie (po 20  $\mu$ l) na płytki agarowe YPG i inkubowano 4 dni w temperaturze 28°C. Jako kontrole posłużyły hodowle niezmodyfikowane. Wydajność tworzenia kolonii określana była metodą densytometryczną z wykorzystaniem programu Scan Pack 3.0. Zliczano również liczbę jednostek tworzących kolonie (CFU). Wyniki zestawiono także z hodowlą szczepu dzikiego.

Wyniki uzyskane w przeprowadzonych badaniach przedstawiono w Tabeli 91 oraz na Rycinach 65 – 70.

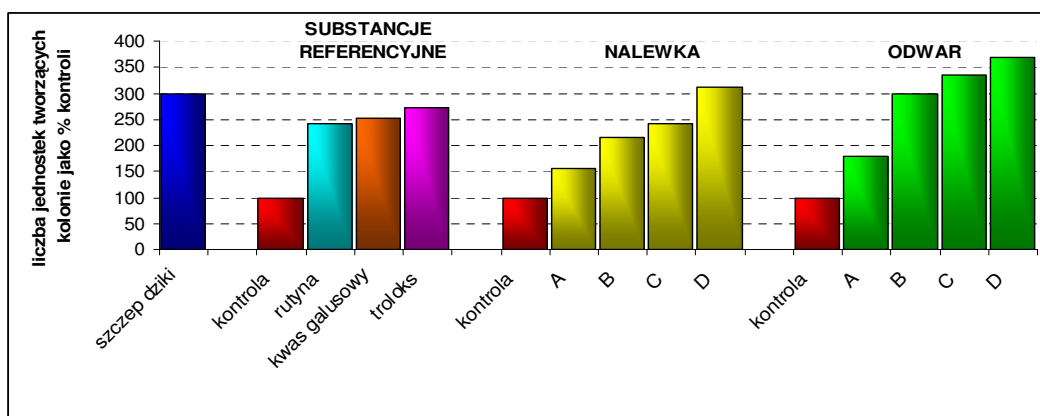
Tabela 91. Liczba jednostek tworzących kolonie oraz wyniki pomiarów densytometrem dla 1000-krotnego rozcieńczenia hodowli: szczepu dzikiego, mutantu (kontrola) oraz modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych lub odpowiednią ilością nalewki/odwaru z ziela dymnicy

		Liczba jednostek tworzących kolonie		Wydajność tworzenia kolonii	
		Wynik pomiaru	% kontroli	Wynik pomiaru densytometrem	% kontroli*
<b>szczep dziki</b>		212	299	5824	328
<b>substancje referencyjne</b>	kontrola	71	100	1775	100
	rutyna	171	241	3183	179
	kwas galusowy	179	252	3309	186
	troloks	193	272	4373	246
<b>nalewka</b>	kontrola	59	100	2973	100
	A	92	156	2921	98
	B	127	215	3443	116
	C	142	241	3716	125
	D	184	312	5944	200
<b>odwar</b>	kontrola	62	100	2931	100
	A	111	179	3674	125
	B	185	298	4497	153
	C	208	335	4964	169
	D	229	369	6296	215

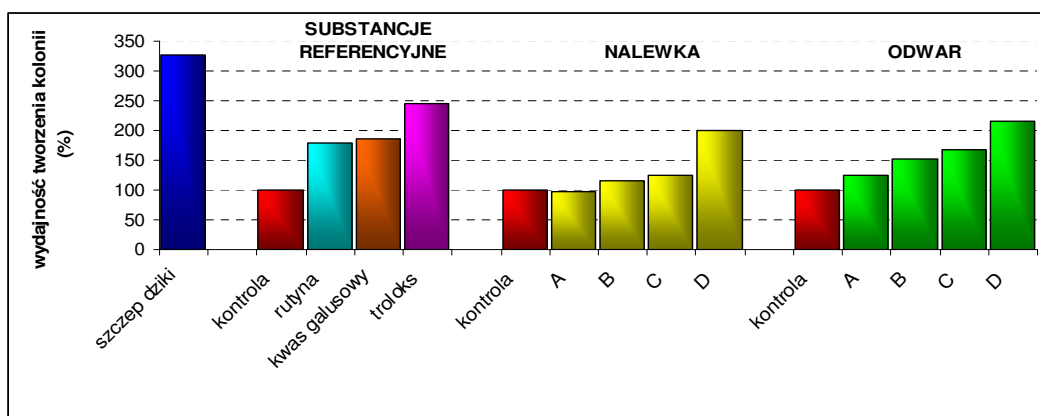
\* iloraz pomiaru próby badanej i pomiaru kontroli wyrażony w %.



Rycina 65. Liczba jednostek tworzących kolonie dla hodowli: szczepu dzikiego, mutantu (kontrola) oraz modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych lub odpowiednią ilością nalewki/odwaru z ziela dymnicy.

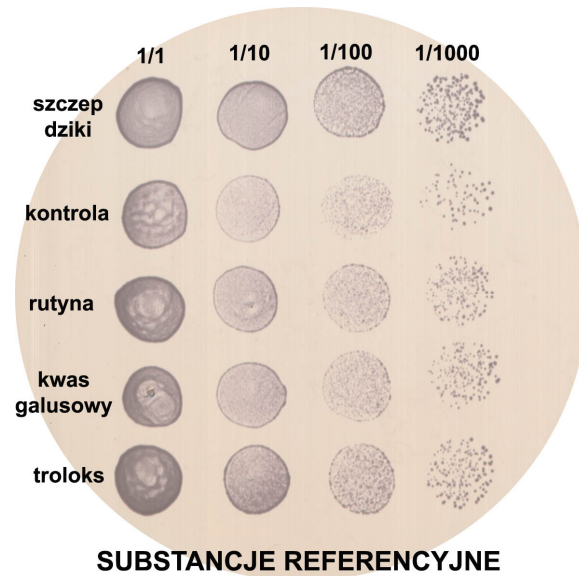


Rycina 66. Liczba jednostek tworzących kolonie wyrażona jako % kontroli dla hodowli: szczepu dzikiego, mutantu (kontrola) oraz modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych lub odpowiednią ilością nalewki/odwaru z ziela dymnicy.

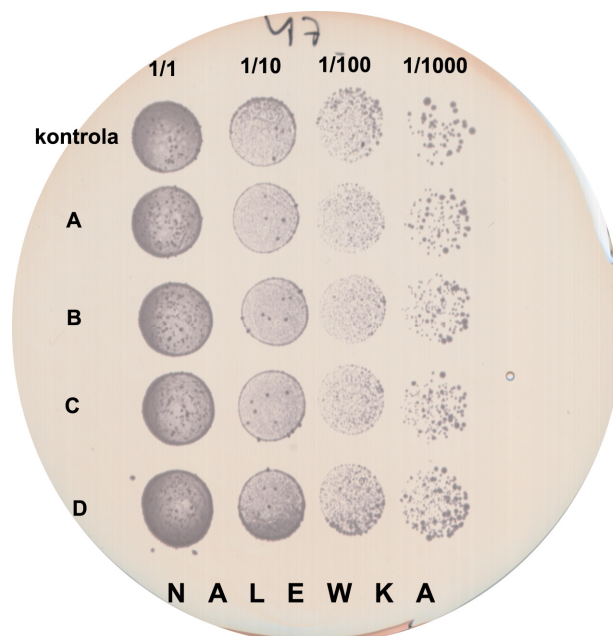


Rycina 67. Wydajność tworzenia kolonii dla hodowli: szczepu dzikiego, mutantu (kontrola) oraz modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych lub odpowiednią ilością nalewki/odwaru z ziela dymnicy.

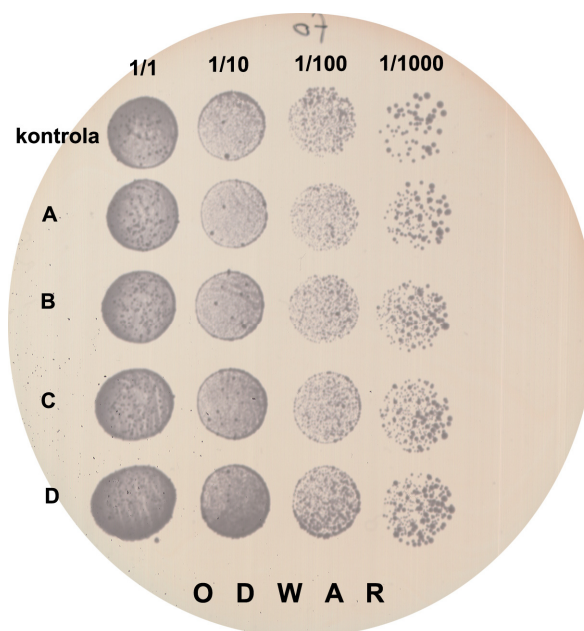




Rycina 68. Płytki agarowa przedstawiająca serie 10-krotnych rozcieńczeń hodowli: szczepu dzikiego, mutantu (kontrola) oraz modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych.



Rycina 69. Płytki agarowa przedstawiająca serie 10-krotnych rozcieńczeń hodowli: szczepu dzikiego, mutantu (kontrola) oraz modyfikowanych wzrastającą ilością nalewki z ziela dymnicy.



Rycina 70. Płytki agarowa przedstawiająca serie 10-krotnych rozcieńczeń hodowli: szczepu dzikiego, mutanta (kontrola) oraz modyfikowanych wzrastającą ilością odwaru z ziela dymnicy.

#### 9.4.1.2.5. Wyznaczenie poziomu karbonylacji białek

Badanie wykonano zgodnie z metodyką protokołu OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit. Jako kontrola w oznaczeniu posłużyły hodowle niemodyfikowane.

##### 9.4.1.2.5.1. Preparacja ekstraktów komórkowych

W celu uzyskania ekstraktów komórkowych wirowano 25 mL hodowli drożdży przy 3000xg przez 10 minut w temperaturze 4°C. Osad przemywano dwukrotnie lodowatą wodą bidestylowaną. Jeden gram osadu resuspendowano w 1 mL buforu RIPA. Do przygotowanego preparatu dodano szklane kuleczki (średnica 0,25 - 0,5mm) w stosunku 1 g kulek na 1 g osadu, a następnie worteksowano dwukrotnie w czasie 1 minuty, schładzając każdorazowo preparat w czasie 1 minuty w lodzie. Uzyskany supernatant przenoszono do nowych probówek i wirowano przy 14000xg przez 5 minut w temperaturze 4°C. Osad odrzucano, natomiast supernatant mrożono w -20°C lub od razu wykorzystywano do badań.

#### **9.4.1.2.5.2. Pomiar stężenia białka metodą Bradford**

Stężenie białka zawartego w ekstraktach komórkowych oznaczano metodą Bradford. W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej rozcieńczano odtłuszczone BSA, by uzyskać roztwory o objętości 50  $\mu\text{L}$ , zawierające od 1,25 do 20  $\mu\text{g}$  białka. Następnie do każdej z badanych prób oraz do standardu BSA dodawano 2,5 mL pięciokrotnie rozcieńczonego odczynnika Bradford. Całość inkubowano przez 15 minut i dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali  $\lambda=595$  nm. Na krzywą wzorcową nanoszono odczyty gęstości optycznej (OD) badanych prób.

#### **9.4.1.2.5.3. Przygotowanie ekstraktów komórkowych do elektroforezy**

Z każdej próby ekstraktów komórkowych pobrano po 15  $\mu\text{g}$  białka i uzupełniano do objętości 5  $\mu\text{L}$  buforem RIPA. Następnie dodano 5  $\mu\text{L}$  12% SDS, po czym podano 10  $\mu\text{L}$  roztworu DNPH (2,4-dinitrofenylohydrazyna; numer 90448 z zestawu OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit). Całość inkubowano 15 minut, a następnie neutralizowano podając 7,5  $\mu\text{L}$  buforu neutralizującego (numer 90449 z zestawu OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit). Próby nakładano na żel SDS-PAGE.

#### **9.4.1.2.5.4. Western blot**

##### **Elektrotransfer półsuchy**

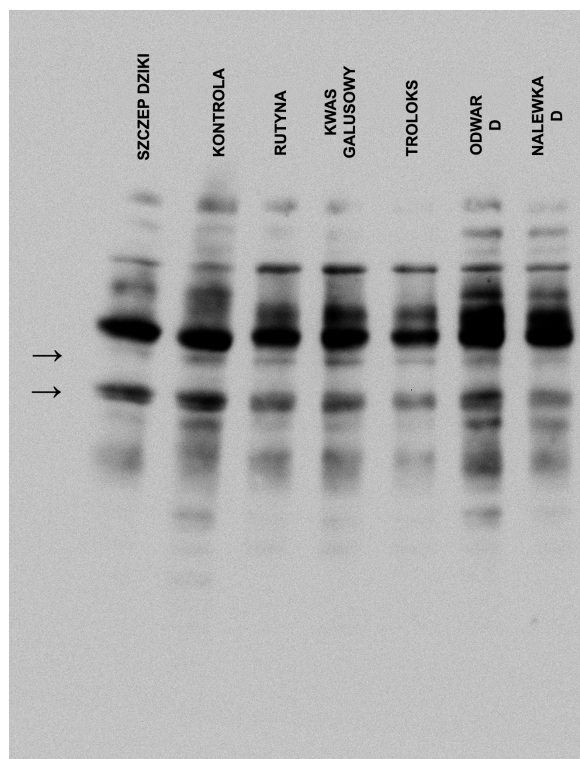
Rozdzielone elektroforetycznie białka przenoszono na nitrocelulozę metodą elektrotransferu półsuchego (w aparacie firmy Kucharczyk). W aparacie do elektrotransferu układano kolejno: 3 warstwy bibuły (Whatman), membranę nitrocelulozową (Whatman), żel i ponownie 3 warstwy bibuły. Bibułę i nitrocelulozę nasączano buforem do elektrotransferu. Elektrotransfer prowadzono przy natężeniu 250 mA przez 75 min., przy maksymalnym napięciu 20 V. Po zakończeniu elektrotransferu uzyskany blot barwiono w 0,2% roztworze Ponceau w 3% TCA przez 2 minuty, po czym płukano wodą bidestylowaną.

##### **Immunodetekcja białek**

W celu zablokowania niespecyficznego miejsca wiązania przeciwciał na

uzyskanym blocie, arkusz nitrocelulozy inkubowano z lekkim wytrząsaniem przez 1 godzinę w 1% roztworze odtłuszczonej BSA w buforze PBS-T (bufor blokujący). Blot inkubowano następnie przez 1 godzinę z przeciwciałem I-rzędowym (numer 90451 z zestawu OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit w stosunku 1:150) i przemywano jeden raz przez 15 minut, a następnie dwa razy po 5 minut w buforze PBS-T. Kolejnym etapem było inkubowanie w roztworze przeciwciała II-rzędowego, sprzężonego z peroksydazą (numer 90452 z zestawu OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit). Przeciwciała II-rzędowe rozcieńczano w stosunku 1:300 w 1% roztworze odtłuszczonej BSA w buforze PBS-T (bufor blokujący). Nitrocelulozę ponownie przepłukiwano (jak powyżej).

Peroksydaza sprzężona z przeciwciałem II-rzędowym umożliwia emisję światła, dzięki utlenianiu luminolu. Reakcja ta ulega wzmocnieniu w obecności wzmacniaczy typu fenoli. Luminol i wzmacniacze są składnikami tzw. odczynników ECL. Nitrocelulozę inkubowano przez 2 minuty w mieszaninie (1:1) odczynników ECL, umieszczano w folii i przenoszono do kasety, po czym nakładano kliszę rentgenowską (Fuji Medical RX). Po 5 minutowej ekspozycji kliszę wywoływano.



Rycina 71. Klisza rentgenowska z uwidocznionymi pasmami białek. Strzałki wskazują przykładowe obszary o obniżonym poziomie karbonylacji białek w porównaniu do kontroli.

#### 9.4.1.2.6. Oznaczenie pomiaru zużycia tlenu przez komórki drożdży

Pomiary zużycia tlenu prowadzono w temperaturze 28°C, przy użyciu elektrody tlenowej Clark w 1 mL buforu cytrynianowego o pH 4,5. Elektrode tlenową kalibrowano za pomocą silnego reduktora Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Zapis szybkości zużycia tlenu (nmol/min) rejestrowano przy użyciu oprogramowania „oxyg32”. Do naczynia pomiarowego podawano komórki drożdży z hodowli modyfikowanej i niemodyfikowanej w ilości 3 OD<sub>546</sub>/mL. Próbkę odniesienia stanowiły hodowle niemodyfikowane mutanta, jak i szczepu dzikiego.

Tabela 92. Pomiary zużycia tlenu przez komórki drożdży wykonane przy użyciu elektrody tlenowej

	<b>Stan 4</b> (nmol O <sub>2</sub> /min)	<b>Stan U</b> (nmol O <sub>2</sub> /min)	<b>U/4</b>
<b>szczep dziki</b>	10,95	41,6	3,80
<b>mutant (kontrola)</b>	20,80	48,17	2,31
<b>rutyna</b>	16,42	56,93	3,47
<b>kwask galusowy</b>	15,33	54,74	3,57
<b>troloks</b>	14,23	48,17	3,38
<b>nalewka D</b>	15,33	52,55	3,43
<b>odwar D</b>	14,23	41,60	2,92

### 9.4.2. Aktywność przeciwbakteryjna<sup>6</sup>

#### 9.4.2.1. Wykonanie badania

Badania przeprowadzono wykorzystując wrażliwy na antybiotyki międzynarodowy szczep standardowy *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P. Zagęszczone do suchej masy wyciągi z ziela dymnicy (rozdz. 8.5.3.3.) rozpuszczano w DMSO w stężeniu 100 mg/mL i przygotowywano z nich rozcieńczenia w płynnym podłożu Antibiotic Broth (firmy Merck) w stężeniach od 0,1 mg/mL do 10 mg/mL.

<sup>6</sup> Badania wykonano w Zakładzie Farmakologii i Biologii Doświadczalnej, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu.

Do przygotowanych rozcieńczeń wyciągów o objętości 1 mL dodawano po 0,1 mL 18-godzinnej hodowli szczepu standardowego o gęstości  $10^5$  komórek w 1 mL. Następnie po 18 godzinach inkubacji w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  określano najmniejsze stężenie hamujące (*MIC – Minimal Inhibitory Concentration*) badanych wyciągów. Ponadto określano najmniejsze stężenia bakteriobójcze (*MBC – Minimal Bactericide Concentration*) wobec badanego szczepu standardowego, przez posiew ze wszystkich rozcieńczeń próbki w podłożu płynnym na podłożu agarowe Antibiotic Agar (firmy Merck). W celu porównawczym użyto również antybiotyku referencyjnego – chloramfenikolu.

#### 9.4.2.2. Wyniki

Uzyskane wartości MIC oraz MBC dla nalewki i odwaru z ziela dymnicy lekarskiej oraz dla chloramfenikolu zestawiono w Tabeli 93.

Tabela 93. Wartości *MIC* oraz *MBC* uzyskane podczas badania aktywności przeciwbakteryjnej

	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<b>nalewka</b>	7,5	10,0
<b>odwar</b>	10,0	>10,0
<b>chloramfenikol</b>	0,005	0,005

**OMÓWIENIE  
WYNIKÓW  
I DYSKUSJA**



Celem pracy była izolacja i identyfikacja związków flawonoidowych występujących w ziele dymnicy, jak również ilościowe oznaczenie związków fenolowych (sumy polifenoli, flawonoidów i kwasów fenolowych) metodami kolorymetrycznymi, kwasów fenolowych metodą ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC-PDA) oraz badania aktywności przeciwutleniającej i przeciwdrobnoustrojowej wyciągów z ziela dymnicy.

### **Izolacja i identyfikacja flawonoidów**

Do izolacji związków flawonoidowych wykorzystano wyciąg z ziela dymnicy. Przeprowadzono trzykrotnie jednodniową macerację metanolem w temperaturze pokojowej. Następnie wykonano trzykrotnie ekstrakcję metanolem oraz trzykrotnie ekstrakcję mieszaniną metanol-woda (1:1), każdorazowo przez 1 godzinę, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalników. Uzyskane wyciągi poddano kontroli chromatograficznej. Ze względu na podobny obraz chromatograficzny połączono je, zagęszczono na wyparce próżniowej, a następnie zalano gorącą wodą i odstawiono na 24 godziny. Wytrącone substancje balastowe odcedzono, a uzyskany przesącz wytrząsano z chloroformem, eterem dietylowym oraz octanem etylu. Uzyskane frakcje (chloroformową, eteru dietylowego, octanu etylu oraz wodną) kontrolowano chromatograficznie. Ze względu na śladowe ilości związków flawonoidowych we frakcji chloroformowej oraz eteru dietylowego nie prowadzono dalszych badań tych frakcji (rozdz. 8.2.3., Rycina 9).

Izolację flawonoidów przeprowadzono według metodyki przyjętej dla tej grupy związków (Andersen i Markham 2006; Dey i Harborne 1989; Harborne 1998; Mabry i wsp. 1970) (rozdz. 8.2.4.). Rozdział związków flawonoidowych z frakcji octanu etylu oraz z frakcji wodnej przeprowadzono za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując celulozę jako fazę stacjonarną (rozdz. 9.1.1.1.). Z frakcji octanu etylu uzyskano w ten sposób **związek 1**. Dalszy rozdział mieszanin lub zanieczyszczonych związków flawonoidowych otrzymanych w wyniku rozdziału kolumnowego frakcji octanu etylu prowadzono metodą bibułowej chromatografii preparatywnej (PPC), doprowadzając do uzyskania trzech flawonoidów (**związek 2**, **związek 3**, **związek 5**). We frakcjach uzyskanych po rozdziale kolumnowym frakcji wodnej występowały dwa związki flawonoidowe. Połączone frakcje 68-107 poddano rozdziałowi bibułą

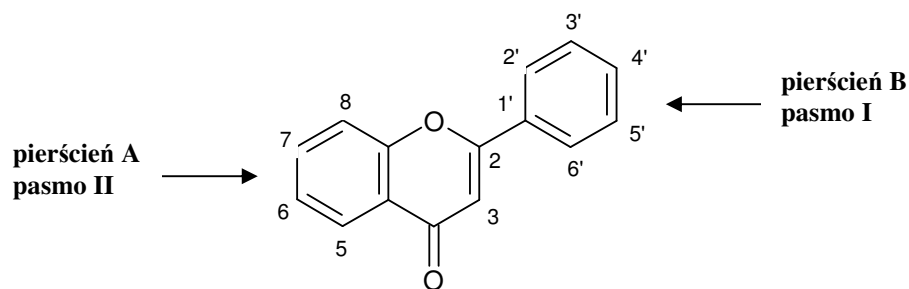


chromatografią preparatywną otrzymując ostatecznie **związek 2** (uzyskany wcześniej z frakcji octanu etylu). W celu wyodrębnienia ostatniego flawonoidu (**związek 4**) mieszaninę frakcji 42-64 poddano rozdzielaniu kolumnowemu, wykorzystując jako adsorbent celulozę oraz wodę jako fazę ruchomą. W połączonych frakcjach 42-64 występowały również śladowe ilości związku 2, jednak ze względu na znikomą zawartość nie podjęto prób odzysku tego związku z tych frakcji.

Ostatnim etapem izolacji flawonoidów było kilkukrotne ich oczyszczanie w kolumnach wypełnionych sefademem, eluowanych naprzemiennie układami o różnej polarności, ponieważ we wszystkich frakcjach związków flawonoidowych obecne były liczne związki o niebieskiej fluorescencji w UV<sub>366 nm</sub> (rozdz. 9.1.1.2.).

W wyniku przeprowadzonych zabiegów izolacyjnych wyodrębniono pięć jednorodnych chromatograficznie różnych związków flawonoidowych, których identyfikację przeprowadzono metodami chemicznymi (hydroliza kwasowa częściowa i całkowita) oraz spektralnymi (UV, HPLC-DAD-ESI-MS, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR).

Badanie struktury związków metodą spektrometrii absorpcyjnej w nadfiolecie jest aktualnie wypierane przez bardziej nowoczesne analizy spektralne, jednak ciągle jest ono bardzo przydatne we wstępnej identyfikacji związków flawonoidowych. Spektroskopię absorpcyjną wykorzystuje się w analizie związków posiadających tzw. chromofory. Są to ugrupowania zawierające wiązania wielokrotne w obrębie których zachodzą przejścia elektronowe odpowiadające za pasmo widmowe (Szczepaniak 2002). Metanolowe widmo flawonoidów wykazuje dwa główne pasma absorpcji w zakresie 240 – 400 nm. Pasma I występuje najczęściej w zakresie 300 – 380 nm, natomiast pasmo II w zakresie 240-280 nm. Położenie pasma I dostarcza informacji o typie flawonoidów. Zakres 304 – 350 nm jest charakterystyczny dla flawonów, a 328 – 385 nm dla flawonoli. Dodanie do metanolowego roztworu związku odczynników jonizujących lub kompleksotwórczych, takich jak metylan sodu (NaOMe), octan sodu (NaOAc), octan sodu z kwasem borowym (NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), chlorek glinu (AlCl<sub>3</sub>), czy też chlorek glinu z kwasem solnym (AlCl<sub>3</sub>/HCl) prowadzi do występowania w widmie przesunięć batmochromowych lub hypsochromowych pasm absorpcji, na podstawie których możliwe jest określenie położenia wolnych bądź podstawionych grup hydroksylowych w cząsteczce. Przesunięcie pasma I dostarcza informacji o strukturze pierścienia B, natomiast przesunięcie pasma II związane jest z budową pierścienia A (Rycina 72) (Mabry i wsp. 1970).



Rycina 72. Związek między strukturą związków flawonoidowych, a przesunięciami pasm absorpcji w widmie UV.

Widmo w nadfiolecie metanolowego roztworu **związku 1** charakteryzowało się występowaniem maksimum I przy  $\lambda=371$  nm i maksimum II przy  $\lambda=256$  nm (Rycina 11, Tabela 5). Wartość przesunięcia maksimum I o  $\Delta\lambda=45$  nm po dodaniu NaOMe (Rycina 12, Tabela 5) wskazywała na obecność wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-4' w pierścieniu B. Przesunięcie batmochromowe maksimum II w widmie związku z NaOAc o  $\Delta\lambda=18$  nm (Rycina 13, Tabela 5) świadczyło o występowaniu wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-7. Na występowanie ugrupowania *orto*-dihydroksylowego w pozycji C-3' i C-4' wskazywało przesunięcie batmochromowe maksimum I po dodaniu  $H_3BO_3$  do roztworu związku z NaOAc o  $\Delta\lambda=17$  nm (Rycina 13, Tabela 5), jak również hypsochromowe przesunięcie maksimum I po dodaniu HCl do roztworu związku z  $AlCl_3$  o  $\Delta\lambda=31$  nm wobec widma z  $AlCl_3$  (Rycina 14, Tabela 5). Wartość przesunięcia batmochromowego maksimum I o  $\Delta\lambda=56$  nm po dodaniu  $AlCl_3/HCl$  w stosunku do widma w metanolu świadczyła o wolnej grupie hydroksylowej w pozycji C-5 oraz C-3 (Rycina 14, Tabela 5).

W widmie w nadfiolecie metanolowego roztworu **związku 2** obserwowano maksimum I przy  $\lambda=358$  nm oraz maksimum II przy  $\lambda=257$  nm (Rycina 19, Tabela 10). Batmochromowe przesunięcie maksimum I o  $\Delta\lambda=52$  nm w widmie z dodatkiem NaOMe (Rycina 20, Tabela 10) wskazywało na wolną grupę hydroksylową w pozycji C-4'. Wartość przesunięcia batmochromowego  $\Delta\lambda=15$  maksimum II w widmie związku z NaOAc (Rycina 21, Tabela 10) świadczyła o obecności wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-7. Batmochromowe przesunięcie maksimum I o  $\Delta\lambda=23$  nm w widmie z NaOAc oraz  $H_3BO_3$  w stosunku do widma metanolowego roztworu związku (Rycina 21, Tabela 10), a także hypsochromowe przesunięcie maksimum I o  $\Delta\lambda=30$  nm w widmie z  $AlCl_3$  oraz HCl w stosunku do widma z dodatkiem  $AlCl_3$  (Rycina 22, Tabela 10), wskazywało natomiast na występowanie ugrupowania *orto*-

dihydroksylowego w pozycji C-3' i C-4'. O obecności podstawionej grupy hydroksylowej w pozycji C-3 oraz wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-5 wnioskować można było na podstawie batmochromowego przesunięcia maksimum I w widmie z  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  o  $\Delta\lambda=45$  nm (Rycina 22, Tabela 10).

Widmo w nadfiolecie metanolowego roztworu **związku 3** charakteryzowało się występowaniem maksimum I przy  $\lambda=359$  nm oraz maksimum II przy  $\lambda=258$  nm (Rycina 26, Tabela 15). Batmochromowe przesunięcie maksimum I po dodaniu NaOMe o  $\Delta\lambda=52$  nm (Rycina 27, Tabela 15) wskazywało na obecność wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-4' pierścienia B. Na występowanie wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-7 pierścienia A wskazywało natomiast batmochromowe przesunięcie maksimum II o  $\Delta\lambda=15$  nm w widmie z NaOAc (Rycina 28, Tabela 15). O obecności w badanym związku ugrupowania *orto*-dihydroksylowego w pozycji C-3' i C-4' świadczyło batmochromowe przesunięcie maksimum I o  $\Delta\lambda=21$  nm w widmie z dodatkiem NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Rycina 28, Tabela 15), jak również hypsochromowe przesunięcie maksimum I o  $\Delta\lambda=33$  nm w widmie z  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  w stosunku do widma z  $\text{AlCl}_3$  (Rycina 29, Tabela 15). Na występowanie wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-5 oraz podstawionej grupy hydroksylowej w pozycji C-3 wskazywała wartość batmochromowego przesunięcia maksimum I  $\Delta\lambda=42$  nm w widmie z  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  względem widma metanolowego (Rycina 29, Tabela 15).

Widmo w nadfiolecie metanolowego roztworu **związku 4** charakteryzowało się występowaniem maksimum I przy  $\lambda=355$  nm oraz maksimum II przy  $\lambda=256$  nm (Rycina 34, Tabela 20). Pojawienie się batmochromowego przesunięcia maksimum I  $\Delta\lambda=55$  nm w widmie po dodaniu NaOMe (Rycina 35, Tabela 20) świadczyło o wolnej grupie hydroksylowej w pozycji C-4' w pierścieniu B. Na występowanie wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-7 pierścienia A wskazywało batmochromowe przesunięcie maksimum II  $\Delta\lambda=15$  nm w widmie z dodatkiem NaOAc (Rycina 36, Tabela 20). Obecność ugrupowania *orto*-dihydroksylowego w analizowanym związku potwierdzało batmochromowe przesunięcie maksimum I  $\Delta\lambda=23$  nm w widmie z NaOAc oraz  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Rycina 36, Tabela 20), a także hypsochromowe przesunięcie maksimum I  $\Delta\lambda=39$  nm w widmie z  $\text{AlCl}_3$  oraz HCl względem widma z dodanym  $\text{AlCl}_3$  (Rycina 37, Tabela 20). Wartość batmochromowego przesunięcia maksimum I  $\Delta\lambda=44$  nm obserwowanego w widmie z  $\text{AlCl}_3$  i HCl (Rycina 37, Tabela 20) świadczyła o występowaniu wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-5 oraz podstawionej grupy hydroksylowej w pozycji C-3 w analizowanym związku.

W widmie w nadfiolecie metanolowego roztworu **związku 5** obserwowano maksimum I przy  $\lambda=349$  nm oraz maksimum II przy  $\lambda=266$  nm (Rycina 42, Tabela 25). Przesunięcie batmochromowe maksimum I  $\Delta\lambda=52$  nm w widmie z NaOMe (Rycina 43, Tabela 25) wskazywało na występowanie wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-4'. O obecności wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-7 świadczyło batmochromowe przesunięcie maksimum II  $\Delta\lambda=8$  nm w widmie z dodatkiem NaOAc (Rycina 44, Tabela 25). Brak ugrupowania *orto*-dihydroksylowego w pozycji C-3' i C-4' stwierdzono analizując widmo po dodaniu NaOAc i H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> względem widma metanolowego (przesunięcie maksimum I  $\Delta\lambda=4$  nm) (Rycina 44, Tabela 25) oraz widmo z dodatkiem AlCl<sub>3</sub> i HCl względem widma z AlCl<sub>3</sub> (przesunięcie maksimum I  $\Delta\lambda=1$  nm) (Rycina 45, Tabela 25). Obecność wolnej grupy hydroksylowej w pozycji C-5 oraz podstawionej grupy hydroksylowej w pozycji C-3 potwierdzało batmochromowe przesunięcie maksimum I  $\Delta\lambda=47$  nm w widmie z AlCl<sub>3</sub>/HCl (Rycina 45, Tabela 25).

Podsumowując dane analizy spektralnej w nadfiolecie można stwierdzić, że wszystkie wyizolowane flawonoidy są flawonolami z wolnymi grupami hydroksylowymi w pozycjach C-5, C-7 oraz C-4'. Związki 1, 2, 3, 4 posiadają ugrupowanie *orto*-dihydroksylowe w pozycji C-3' i C-4'. W związkach 2, 3, 4, 5 występuje podstawiona grupa hydroksylowa w pozycji C-3, natomiast w związku 1 grupa ta jest wolna.

Dla wszystkich wyizolowanych związków flawonoidowych przeprowadzono hydrolizę kwasową częściową i całkowitą w celu określenia typu aglikonu oraz rodzaju i liczby cukrów w cząsteczce związku. Uzyskane aglikony, cukry oraz glikozydy wtórne porównywano ze związkami wzorcowymi metodą chromatografii bibułowej (PC) oraz cienkowarstwowej (TLC) stosując różne układy rozwijające (Tabela 29).

Wyniki badań wykazały że związek 1 jest aglikonem (kwercetyna). Związki 4 i 5 są natomiast monozydami, gdyż w wyniku hydrolizy kwasowej częściowej tych związków nie powstawały glikozydy wtórne, a jedynie aglikony: kwercetyna w przypadku związku 4 oraz kemferol w przypadku związku 5. W hydrolizatach związków 4 i 5 obecna była glukoza. Analiza chromatograficzna związku 2 wskazywała, że jest on pochodną kwercetyny z glukozą i arabinozą w części cukrowej. Analiza chromatograficzna związku 3 wskazywała natomiast, że jest on również pochodną kwercetyny, lecz w części cukrowej znajduje się glukoza oraz ramnoza. Związek

wtórny, który powstał w wyniku hydrolizy kwasowej częściowej związków 2 i 3 odpowiadał wzorcowemu 3-*O*- $\beta$ -glukopiranozydowi kwercetyny.

W kolejnym etapie ustalania struktury wyizolowanych flawonoidów wykorzystano spektrometrię mas (ESI-MS) połączoną z wysokosprawną chromatografią cieczową (rozd. 8.2.5.2.).

Spektrometria mas jest techniką analityczną zaliczaną do metod spektroskopowych, której podstawą jest pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego danego jonu. W ESI-MS ciecz zawierająca substancję badaną rozpylana jest pod ciśnieniem atmosferycznym z cienkiej kapilary tworząc na jej wyjściu naładowane małe krople. Pole elektryczne o wysokim potencjale (rzędu 1000 – 5000 V) wytwarza się między wylotem kapilary, a przeciwelektrodą umieszczoną w niewielkiej odległości od kapilary. Między układem elektrod następuje odparowywanie rozpuszczalnika i tworzenie jonów w fazie gazowej, które dalej trafiają do analizatora i detektora (Prasain i wsp. 2004; Szczepaniak 2002).

Dla wyizolowanych flawonoidów przeprowadzono badanie techniką HPLC-DAD-ESI-MS, rejestrowaną w trybie jonów ujemnych (ES-) oraz dodatnich (ES+). Na podstawie uzyskanych widm analizowanych związków flawonoidowych określono masę cząsteczkową związku, masę aglikonu oraz liczbę, rodzaj i typ wiązania cząsteczek cukru (Kazuno i wsp. 2005; Santos-Buelga i Williamson 2003; Stobiecki 2000).

W widmie ESI-MS **związku 1** (Rycina 15, Tabela 7) zarejestrowanym w trybie jonów ujemnych obserwowano sygnał odpowiadający deprotonowanej cząsteczce związku  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  301. W trybie jonów dodatnich natomiast zarejestrowano sygnał pochodzący od protonowanej cząsteczki związku  $[M+H]^+$  przy  $m/z$  303. Wyniki analizy wskazują, że masa cząsteczkowa związku 1 wynosi 302, co odpowiada masie kwercetyny (wzór sumaryczny związku:  $C_{15}H_{10}O_7$ ).

W widmie ESI-MS **związku 2** (Rycina 23, Tabela 12) w trybie jonów ujemnych zaobserwowano sygnały pochodzące od deprotonowanej cząsteczki związku  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  595, deprotonowanego jonu fragmentacyjnego  $[M-H-pentoza]^-$ , powstałego w wyniku odszczepienia się cząsteczki pentozy, przy  $m/z$  463 oraz deprotonowanego jonu aglikonu  $[M-H-heksoza-pentoza]^-$  przy  $m/z$  301. W trybie jonów dodatnich zarejestrowano natomiast sygnały pochodzące od protonowanej cząsteczki związku  $[M+H]^+$  przy  $m/z$  597, protonowanego jonu fragmentacyjnego  $[M+H-pentoza]^+$  przy  $m/z$

465 oraz protonowanego jonu aglikonu  $[M+H\text{-heksoza-pentoza}]^+$  przy  $m/z$  303. Wyniki analizy wskazują, że masa cząsteczkowa związku 2 wynosi 596, co odpowiada masie kwercetyny z jedną cząsteczką heksozy oraz jedną cząsteczką pentozy (wzór sumaryczny związku:  $C_{26}H_{28}O_{16}$ ).

W widmie ESI-MS **związku 3** (Rycina 30, Tabela 17) w trybie jonów ujemnych zarejestrowano sygnały odpowiadające deprotonowanej cząsteczce związku  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  609 oraz deprotonowanemu jonowi fragmentacyjnemu  $[M-H\text{-metylopentoza}]^-$ , który powstał poprzez odszczepienie się cząsteczki metylopentozy, przy  $m/z$  463. Zaobserwowano również sygnał pochodzący od deprotonowanego jonu aglikonu  $[M-H\text{-heksoza-metylopentoza}]^-$  przy  $m/z$  301. W trybie jonów dodatnich zarejestrowano sygnały pochodzące od protonowanej cząsteczki związku  $[M+H]^+$  przy  $m/z$  611, protonowanego jonu fragmentacyjnego  $[M+H\text{-metylopentoza}]^+$  przy  $m/z$  465 oraz protonowanego jonu aglikonu  $[M+H\text{-heksoza-metylopentoza}]^+$  przy  $m/z$  303. Wyniki analizy wskazują, że masa cząsteczkowa związku 3 wynosi 610, co odpowiada masie kwercetyny z jedną cząsteczką heksozy oraz jedną cząsteczką metylopentozy (wzór sumaryczny związku:  $C_{27}H_{30}O_{16}$ ).

W widmie ESI-MS **związku 4** (Rycina 38, Tabela 22) w trybie jonów ujemnych zaobserwowano sygnały pochodzące od deprotonowanej cząsteczki związku  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  463 oraz deprotonowanego jonu fragmentacyjnego  $[M-H\text{-heksoza}]^-$  przy  $m/z$  301. W trybie jonów dodatnich natomiast zarejestrowano sygnały pochodzące od protonowanego jonu molekularnego  $[M+H]^+$  przy  $m/z$  465 oraz protonowanego jonu aglikonu  $[M+H\text{-heksoza}]^+$  przy  $m/z$  303. Wyniki analizy wskazują, że masa cząsteczkowa związku 4 wynosi 464, co odpowiada masie kwercetyny z jedną cząsteczką heksozy (wzór sumaryczny związku:  $C_{21}H_{20}O_{12}$ ).

W widmie ESI-MS **związku 5** (Rycina 46, Tabela 27) w trybie jonów ujemnych zarejestrowano sygnał odpowiadający deprotonowanej cząsteczce związku  $[M-H]^-$  przy  $m/z$  447 oraz sygnał deprotonowanego jonu fragmentacyjnego pochodzący od aglikonu  $[M-H\text{-heksoza}]^-$  przy  $m/z$  285. W trybie jonów dodatnich stwierdzono obecność sygnału protonowanej cząsteczki związku  $[M+H]^+$  przy  $m/z$  449 oraz protonowanego jonu fragmentacyjnego  $[M+H\text{-heksoza}]^+$  przy  $m/z$  287. Wyniki analizy wskazują, że masa cząsteczkowa związku 5 wynosi 448, co odpowiada masie kemferolu z jedną cząsteczką heksozy (wzór sumaryczny związku:  $C_{21}H_{20}O_{11}$ ).

Celem określenia struktury wyizolowanych flawonoidów wykorzystano również metodę spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR.

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego jest jedną z metod cząsteczkowej spektroskopii absorbcyjnej. Jądrowy rezonans magnetyczny opiera się na zjawisku absorpcji promieniowania elektromagnetycznego o częstotliwości radiowej przez jądra atomowe niektórych izotopów umieszczonych w jednorodnym polu magnetycznym (Szczepaniak 2002).

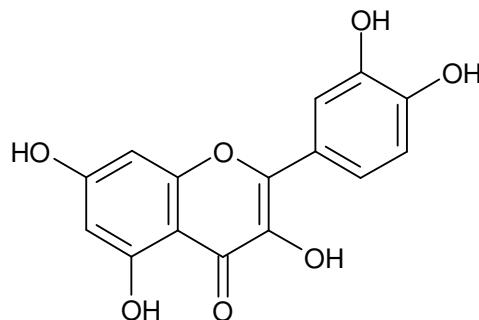
W widmie  $^1\text{H}$  NMR sygnały rezonansowe pojawiają się w zakresie 0 – 13 ppm. Na podstawie wartości ich przesunięć chemicznych można wnioskować o liczbie protonów w analizowanym związku. Istotnych informacji na temat budowy cząsteczki dostarcza położenie anomerycznego protonu cukru (rodzaj i pozycja podstawników cukrowych, sposób ich przyłączenia do aglikonu). W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR sygnały rezonansowe pojawiają się natomiast w zakresie 0 – 200 ppm. Analizując widmo  $^{13}\text{C}$  NMR można określić liczbę atomów węgla w cząsteczce, jak i typ wiązania (*O*- lub *C*-glikozydowe) oraz rodzaj i pozycję podstawników.

Analizę widm  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR wyizolowanych związków flawonoidowych przeprowadzono w oparciu o dane literaturowe: Agrawal i Rastogi (1981), Agrawal (1989), Agrawal (1992), Clematis i wsp. (2011), Dey i Harborne (1989), Harborne i Mabry (1982), Harborne (1994), Mabry i wsp. (1970), Markham i Ternai (1976), Markham i wsp. (1978), Teng i wsp. (2002). Widma  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR wszystkich analizowanych związków wykreślono w DMSO- $d_6$ . Dla związków 1, 3, 4, 5 wykreślono dodatkowo widma  $^1\text{H}$  NMR po dodaniu  $\text{D}_2\text{O}$  do DMSO- $d_6$ . W widmach  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR sygnały związków 2, 3, 4 i 5 występowały w zakresie pola charakterystycznym dla 3-*O*-podstawionych flawonoli, natomiast sygnały związku 1 w obszarze typowym dla aglikonów.

W widmie  $^1\text{H}$  NMR **związku 1** (Tabela 8, Ryciny 17 i 18) w zakresie sygnałów pierścienia A zaobserwowano trzy sygnały protonów: H-6 w formie dubletu przy  $\delta$  6,19 ppm o stałej sprzężenia  $J=1,9$  Hz, H-8 w formie dubletu przy  $\delta$  6,41 ppm o stałej sprzężenia  $J=1,8$  Hz oraz sygnał w postaci singletu przy  $\delta$  12,47 ppm pochodzący od protonu grupy hydroksylowej w pozycji C-5. Dodatkowo zarejestrowano trzy sygnały protonów pierścienia B. Sygnał protonu H-6' występował jako dublet dubletów przy  $\delta$  7,54 ppm o stałej sprzężenia *meta*  $J=2,2$  Hz i *orto*  $J=8,5$  Hz. Sygnały protonów H-2' przy  $\delta$  7,64 ppm oraz H-5' przy  $\delta$  6,89 ppm miały charakter dubletów o stałych sprzężenia odpowiednio  $J=2,1$  Hz oraz  $J=8,5$  Hz. W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR związku 1

(Tabela 8, Rycina 16) zarejestrowano 15 sygnałów węgla. Ich ilość i rozmieszczenie były analogiczne z danymi literaturowymi dla niepodstawionej kwercetyny.

Na podstawie przeprowadzonych badań (hydroliza kwasowa, UV, HPLC-DAD-ESI-MS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR) **związek 1** zidentyfikowano jako kwercetynę.



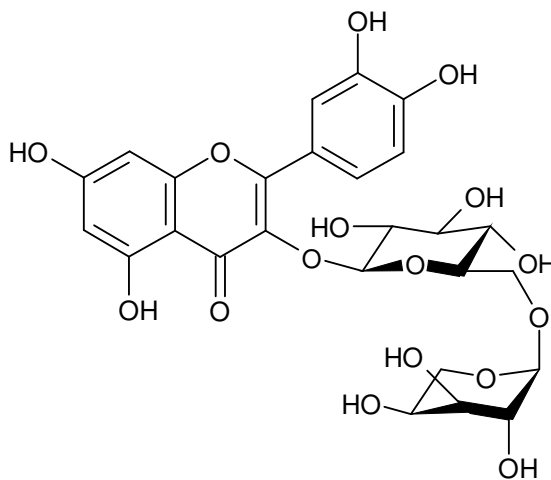
Rycina 73. Wzór strukturalny kwercetyny (związek 1).

W widmie  $^1\text{H}$  NMR **związku 2** (Tabela 13, Rycina 25) w zakresie sygnałów pierścienia A zarejestrowano sygnały protonów: H-6 w formie dubletu przy  $\delta$  6,40 ppm ( $J=1,9$  Hz), H-8 w formie dubletu przy  $\delta$  6,40 ppm ( $J=1,9$  Hz) oraz sygnał protonu pochodzącego z grupy hydroksylowej w pozycji C-5 w postaci singletu przy  $\delta$  12,60 ppm. W obszarze pola sygnałów pierścienia B uwidoczniły się 3 sygnały. Dwa z nich w postaci dubletów przy  $\delta$  7,59 pp ( $J=2,0$  Hz) oraz przy  $\delta$  6,87 ppm ( $J=8,1$  Hz) przypisano odpowiednio protonom H-2' i H-5'. Trzeci sygnał przyporządkowany protonowi H-6' występował przy  $\delta$  7,57 ppm w postaci dubletu dubletów o stałej sprzężenia *meta*  $J=1,8$  Hz oraz *orto*  $J=7,2$  Hz. W zakresie sygnałów anomerycznych protonów cukrów zarejestrowano dwa sygnały, co wskazywało na obecność dwóch cząsteczek cukru w związku 2. W *O*-glikozydach sygnał anomerycznego protonu cukru, który przyłączony jest bezpośrednio do aglikonu występuje bliżej sygnałów rezonansowych pochodzących od protonów aglikonu. W związku z tym sygnał w formie dubletu przy  $\delta$  5,36 ppm o stałej sprzężenia  $J=7,2$  Hz przypisano protonowi H-1  $\beta$ -glukopiranozy przyłączonej bezpośrednio do pierścienia, natomiast dublet przy  $\delta$  3,96 ppm o stałej sprzężenia  $J=6,7$  Hz protonowi H-1  $\alpha$ -arabinopiranozy. Dodatkowo w widmie związku 2 obserwowano dublet przy  $\delta$  3,77 ppm ( $J=11,0$  Hz), który przypisano protonowi H-6 glukozy. W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR związku 2 (Tabela 13, Rycina 24) zarejestrowano 26 sygnałów. Obserwowane przesunięcia chemiczne aglikonu wskazywały na kwercetynę z zablokowaną grupą hydroksylową w pozycji C-3. O miejscu przyłączenia reszty cukrowej w aglikonie świadczyły przesunięcia sygnału



C-3 w górę pola (-2,4 ppm) oraz sygnałów C-2 (+9,5 ppm), C-4 (+1,6 ppm) i C-9 (+0,2 ppm) w dół pola. Na występowanie dwóch cząsteczek cukrów w analizowanym związku wskazywała obecność dwóch sygnałów anomerycznych atomów węgla przy  $\delta$  100,81 ppm i  $\delta$  102,70 ppm, jak również liczba sygnałów zarejestrowanych w zakresie  $\delta$  64 – 77 ppm. Przesunięcie sygnału C-6 glukozy z  $\delta$  61,50 ppm do  $\delta$  67,21 ppm (w dół pola o +5,7 ppm) w porównaniu do niepodstawionej  $\beta$ -glukopiranozy oraz sygnału C-1 arabinozy z  $\delta$  97,80 ppm do  $\delta$  102,70 ppm (w dół pola o +4,9 ppm) w porównaniu do niepodstawionej  $\alpha$ -arabinopiranozy wskazuje na obecność wiązania 1 $\rightarrow$ 6 między cząsteczkami cukrów. Sygnał anomerycznego atomu węgla glukozy przy  $\delta$  100,81 ppm potwierdza także obecność wiązania *O*-glikozydowego między heksozą a aglikonem.

Na podstawie przeprowadzonych badań (hydroliza kwasowa, UV, HPLC-DAD-ESI-MS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR) **związek 2** zidentyfikowano jako 3-*O*- $\alpha$ -arabinopiranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny.

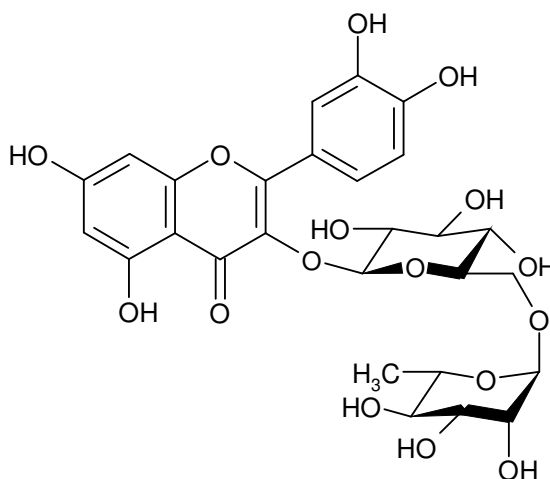


Rycina 74. Wzór strukturalny 3-*O*- $\alpha$ -arabinopiranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozydu kwercetyny (związek 2).

W widmie  $^1\text{H}$  NMR **związku 3** (Tabela 18, Ryciny 32, 33) w obszarze sygnałów pierścienia A zaobserwowano dwa sygnały w postaci dubletów przy  $\delta$  6,18 ppm oraz  $\delta$  6,37 ppm o stałych sprzężenia  $J=2,0$  Hz pochodzące odpowiednio od protonów H-6 i H-8. Dodatkowo zarejestrowano sygnał w postaci singletu przy  $\delta$  12,59, który pochodził od protonu grupy hydroksylowej w pozycji C-5. W zakresie pola sygnałów pierścienia B uwidoczniły się trzy sygnały. Dwa z nich w postaci dubletów przy  $\delta$  7,53 ppm ( $J=1,5$  Hz) odpowiadający H-2' oraz przy  $\delta$  6,84 ( $J=8,3$  Hz) odpowiadający H-5'.

Trzeci sygnał przypisany protonowi H-6' występował w formie dubletu dubletów przy  $\delta$  7,55 ppm o stałej sprzężenia *meta*  $J=2,0$  Hz i *orto*  $J=8,6$  Hz. W obszarze sygnałów anomerycznych protonów cukrów zarejestrowano dwa sygnały, co wskazuje na obecność dwóch cząsteczek cukru w związku 3. W *O*-glikozydach sygnał anomerycznego protonu cukru, który przyłączony jest bezpośrednio do aglikonu występuje bliżej sygnałów rezonansowych pochodzących od protonów aglikonu. Dlatego też sygnał w formie dubletu przy  $\delta$  5,34 ppm ( $J=7,5$  Hz) przypisano protonowi H-1  $\beta$ -glukopiranozy przyłączonej bezpośrednio do pierścienia, natomiast dublet przy  $\delta$  4,38 ppm ( $J=1,1$  Hz) protonowi H-1  $\alpha$ -ramnopiranozy. Dodatkowo w widmie  $^1\text{H}$  NMR związku 3 zarejestrowano sygnał przy  $\delta$  0,99 ppm w postaci dubletu o stałej sprzężenia  $J=6,2$  Hz odpowiadający grupie metylowej ramnozy oraz dublet przy  $\delta$  3,70 ppm o stałej sprzężenia  $J=10,2$  Hz przypisany protonowi H-6 glukozy. W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR związku 3 (Tabela 18, Rycina 31) obserwowano 27 sygnałów. Zarejestrowane przesunięcia chemiczne aglikonu odpowiadały kwercetynie z zablokowaną grupą hydroksylową w pozycji C-3. Na miejsce przyłączenia reszty cukrowej wskazywało przesunięcie chemiczne sygnału C-3 w górę pola o -2,4 ppm oraz przesunięcia sygnałów C-2 (+9,6 ppm), C-4 (+1,5 ppm) i C-9 (+0,4 ppm) w dół pola. O występowaniu dwóch cząsteczek cukrów w związku 3 świadczyła obecność dwóch sygnałów anomerycznych atomów węgla przy  $\delta$  101,18 ppm i  $\delta$  100,72 ppm, a także liczba sygnałów w zarejestrowanych w zakresie  $\delta$  66 – 77 ppm. W widmie obserwowano także charakterystyczny dla ramnozy sygnał grupy metylowej przy  $\delta$  17,72 ppm. Przesunięcie sygnału C-6 glukozy z  $\delta$  61,50 ppm do  $\delta$  66,97 ppm (w dół pola o +5,5 ppm) w porównaniu z niepodstawioną  $\beta$ -glukopiranozą oraz sygnału C-1 ramnozy z  $\delta$  95,00 ppm do  $\delta$  100,72 ppm (w dół pola o +5,7 ppm) w porównaniu z niepodstawioną  $\alpha$ -ramnopiranozą wskazuje na występowanie wiązania 1 $\rightarrow$ 6 między cząsteczkami cukrów. Sygnał anomerycznego węgla glukozy przy  $\delta$  101,18 ppm potwierdza obecność wiązania *O*-glikozydowego między heksozą a aglikonem.

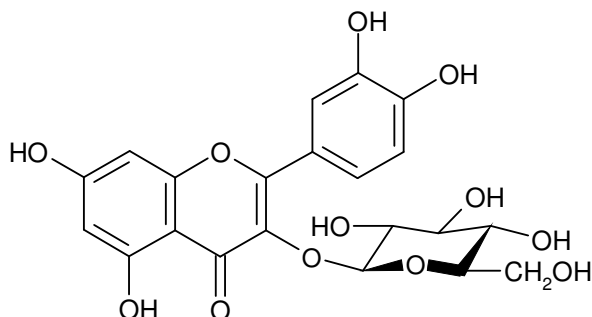
Na podstawie przeprowadzonych badań (hydroliza kwasowa, UV, HPLC-DAD-ESI-MS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR) **związek 3** zidentyfikowano jako 3-*O*- $\alpha$ -ramnopiranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny (rutyna).



Rycina 75. Wzór strukturalny 3-*O*- $\alpha$ -ramnopyranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozydu kwercetyny (związek 3).

W widmie  $^1\text{H}$  NMR **związku 4** (Tabela 23, Ryciny 40, 41) w rejonie sygnałów pierścienia A zarejestrowano trzy sygnały: dwa sygnały w postaci dubletów przy  $\delta$  6,19 ppm i  $\delta$  6,40 ppm o takiej samej wartości stałej sprzężenia  $J=1,9$  Hz, które przypisano odpowiednio protonom H-6 i H-8 oraz jeden sygnał protonu grupy hydroksylowej w pozycji C-5 w formie singletu przy  $\delta$  12,63 ppm. Dodatkowo obserwowano trzy sygnały protonów pierścienia B. Sygnał protonu H-2' zarejestrowano przy  $\delta$  7,57 ppm jako dublet o stałej sprzężenia  $J=2,1$  Hz. Sygnał protonu H-5' występował przy  $\delta$  6,84 ppm w postaci dubletu o stałej sprzężenia  $J=9,0$  Hz. Dublet dubletów przy  $\delta$  7,57 o stałych sprzężenia *meta*  $J=2,3$  Hz i *orto*  $J=9,0$  Hz przypisano natomiast sygnałowi protonu H-6'. Sygnał pochodzący od anomerycznego protonu cukru obserwowano w formie dubletu przy  $\delta$  5,45 ppm o stałej sprzężenia  $J=7,5$  Hz. Położenie tego sygnału oraz wartość stałej sprzężenia są charakterystyczne dla  $\beta$ -glukopiranozydów przyłączonych wiązaniem *O*-glikozydowym w pozycji C-3 aglikonu. W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR związku 4 (Tabela 23, Rycina 39) zarejestrowano 21 sygnałów. Wartości przesunięć chemicznych odpowiadały kwercetynie z przyłączoną cząsteczką glukozy w pozycji C-3. Na obecność reszty cukrowej przy węglu C-3 aglikonu wskazuje przesunięcie sygnału tego węgla w górę pola o -2,3 ppm w stosunku do analogicznego sygnału niepodstawionego aglikonu, jak również przesunięcie w dół pola sąsiednich węgli w pozycji *orto* C-2 (+9,3 ppm) i C-4 (+1,6 ppm) oraz *para* C-9 (+0,8 ppm). Potwierdzeniem występowania wiązania *O*-glikozydowego pomiędzy aglikonem i cząsteczką cukru był przesunięty w dół pola sygnał C-1 glukozy ( $\delta$  100,87 ppm) w porównaniu z sygnałem samego cukru.

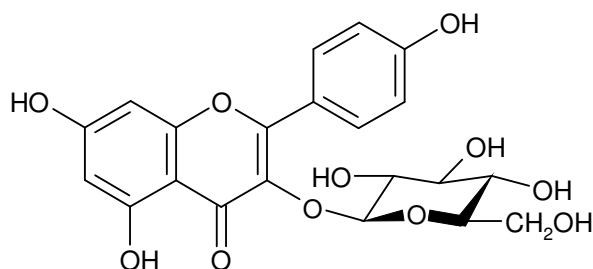
Na podstawie przeprowadzonych badań (hydroliza kwasowa, UV, HPLC-DAD-ESI-MS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR) **związek 4** zidentyfikowano jako 3-*O*- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny.



Rycina 76. Wzór strukturalny 3-*O*- $\beta$ -glukopiranozydu kwercetyny (związek 4).

W widmie  $^1\text{H}$  NMR **związku 5** (Tabela 28, Ryciny 47, 48) w zakresie pola sygnałów pierścienia A obserwowano dwa sygnały w formie dubletów przy  $\delta$  6,21 ppm ( $J=2,0$  Hz) i przy  $\delta$  6,43 ppm ( $J=2,0$  Hz), które przypisano odpowiednio protonom H-6 i H-8, oraz jeden sygnał w postaci singletu przy  $\delta$  12,61 ppm (sygnał protonu grupy hydroksylowej w pozycji C-5). Dwa sygnały w formie dubletów, które zarejestrowano w rejonie sygnałów pierścienia B, o stałych sprzężenia *ortho*  $J=8,9$  Hz przy  $\delta$  6,89 ppm oraz  $\delta$  8,04 ppm przypisano odpowiednio protonom H-3', H-5' oraz H-2', H-6'. Sygnał anomerycznego protonu cukru zarejestrowano w postaci dubletu przy  $\delta$  5,45 o stałej sprzężenia  $J=7,4$  Hz, co wskazuje na wiązanie *O*-glikozydowe między aglikonem oraz cząsteczką  $\beta$ -glukopiranozy. W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR związku 5 (Tabela 28, Rycina 47) obserwowano 21 sygnałów, z czego 15 sygnałów przypisano poszczególnym węglom aglikonu, natomiast pozostałe 6 sygnałów węglom reszty cukrowej. Wartości przesunięć chemicznych były zgodne z danymi literaturowymi dla kemferolu z przyłączoną cząsteczką glukozy w pozycji C-3. Na występowanie reszty cukrowej w pozycji C-3 aglikonu wskazywało przesunięcie sygnału C-3 w górę pola o około -2,4 ppm oraz sąsiednich węgli w pozycji *ortho* (C-2, C-4) i w pozycji *para* (C-9) w dół pola odpowiednio o około +9,4 ppm, +1,6 ppm, +0,2 ppm. Sygnał anomerycznego atomu węgla cząsteczki cukru obserwowano przy  $\delta$  100,82 ppm, czyli w zakresie typowym dla *O*-glikozydów.

Na podstawie przeprowadzonych badań (hydroliza kwasowa, UV, HPLC-DAD-ESI-MS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR) **związek 5** zidentyfikowano jako 3-*O*- $\beta$ -glukopiranozyd kemferolu.



Rycina 77. Wzór strukturalny 3-*O*- $\beta$ -glukopiranozydu kemferolu (związek 5).

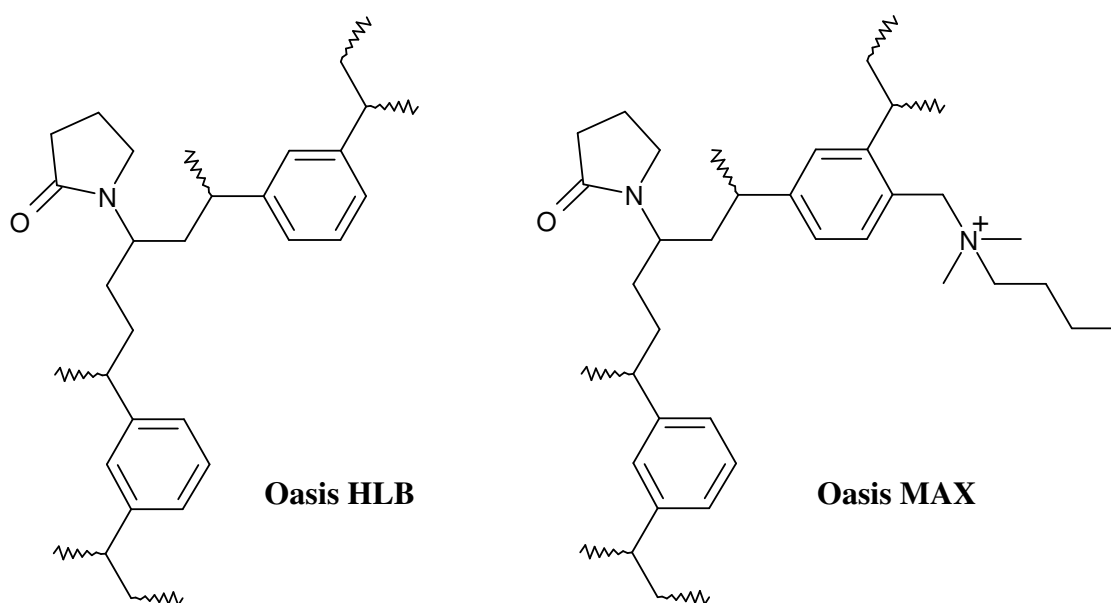
Występowanie związków 1, 2, 3, 4 stwierdzone zostało w ziele dymnicy, również przez innych autorów (Ivanov i wsp. 2014; Karioti i wsp. 2014; Torck i wsp. 1971). Po raz pierwszy z ziela dymnicy wyizolowano i zidentyfikowano 3-*O*- $\beta$ -glukopiranozyd kemferolu.

### Określenie profilu kwasów fenolowych.

Wstępna jakościowa analiza chromatograficzna 2D-TLC frakcji eteru dietylowego wyciągu z ziela dymnicy (rozdz. 8.3.3.1.) wykazała obecność czterech kwasów fenolowych (Tabela 30): *trans*-ferulowego, kawowego, *p*-kumarowego i protokatechowego.

Celem identyfikacji i oznaczenia ilościowego kwasów fenolowych w ziele dymnicy zastosowano ultrasprawną chromatografię cieczową (UPLC-PDA). Analizę przeprowadzono zgodnie z metodyką opracowaną w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu przez dr Małgorzatę Wojcińską oraz dr Justynę Chanaj-Kaczmarek. Metoda ta umożliwia z wykorzystaniem techniki UPLC-PDA rozdział mieszaniny 15 najczęściej spotykanych w świecie roślinnym kwasów fenolowych: chlorogenowego, dihydrokawowego, ferulowego, galusowego, izowanilinowego, kawowego, *m*-kumarowego, *p*-kumarowego, *p*-hydroksybenzoesowego, *p*-hydroksyfenylooctowego, protokatechowego, syryngowego, salicylowego, wanilinowego i rozmarynowego. Przeprowadzone testy walidacyjne wykazały, że metoda ta jest dokładna, precyzyjna, charakteryzuje się liniowością w szerokim zakresie stężeń, wysoką powtarzalnością oraz niską wartością granicy oznaczalności (Chanaj-Kaczmarek 2013).

Badaniom na zawartość kwasów fenolowych poddano wyciąg z wysuszonego ziela dymnicy (rozdz. 8.3.3.2.). W celu oczyszczenia wyciągu wykorzystano ekstrakcję do fazy stałej (SPE), stosując dwa rodzaje kolumniek ekstrakcyjnych firmy Waters (Oasis MAX oraz Oasis HLB), które różnią się strukturą chemiczną matrycy (Blahová i Brandšteterová 2004; Dvořáková i wsp. 2007). W kolumniekach Oasis HLB złoże występuje w postaci kopolimeru diwinylobenzenu i winylopirolidonu, natomiast w kolumniekach Oasis MAX jest ono dodatkowo zmodyfikowane czwartorzędowymi grupami aminowymi (grupy jonowymienne) (Rycina 78).



Rycina 78. Struktura chemiczna matrycy kolumniek Oasis HLB i Oasis MAX ([www.waters.com](http://www.waters.com)).

Kwasy fenolowe z kolumnieki Oasis HLB eluowano mieszaniną metanol-woda (70:30), natomiast z kolumnieki Oasis MAX 2% roztworem kwasu mrówkowego w metanolu.

Identyfikację kwasów fenolowych prowadzono porównując czasy retencji i widma w nadfiolecie pików związków obecnych na chromatogramach z czasami retencji i widmami w nadfiolecie substancji wzorcowych (Ryciny 50-51, Tabela 31), a także metodą dodatku wzorca do badanej próby. Zawartość kwasów fenolowych obecnych w próbach obliczono wykorzystując pola powierzchni pików oraz równania krzywych kalibracyjnych wyznaczonych dla substancji wzorcowych.

W wyciągu z ziela dymnicy stwierdzono obecność oraz oznaczono zawartość (wynik podano w  $\mu\text{g}$  kwasu fenolowego / g ziela) czterech kwasów fenolowych: kwasu protokatechowego ( $17,77 \pm 0,46 \mu\text{g/g}$ ), kwasu *p*-kumarowego ( $55,09 \pm 1,39 \mu\text{g/g}$ ), kwasu *trans*-ferulowego ( $38,60 \pm 0,78 \mu\text{g/g}$ ) oraz kwasu kawowego ( $24,82 \pm 0,40 \mu\text{g/g}$ ) (Ryciny 54-56, Tabele 34-41). Ze względu na różnice występujące w odzyskach poszczególnych kwasów fenolowych przy zastosowaniu procedury ekstrakcji do fazy stałej (Tabela 33), kwas protokatechowy, kwas *p*-kumarowy i kwas *trans*-ferulowy oznaczono w wyciągu oczyszczonym za pomocą kolumnienki Oasis HLB, natomiast kwas kawowy oznaczono w wyciągu oczyszczonym za pomocą kolumnienki Oasis MAX.

Tabela 94. Wartości parametrów wykorzystanych do identyfikacji kwasów fenolowych obecnych w ziele dymnicy

Kwasy fenolowe	Wzorcowe			Oznaczone w ziele dymnicy		
	t (min)	$\lambda_{\text{max II}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max I}}$ (nm)	t (min)	$\lambda_{\text{max II}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max I}}$ (nm)
protokatechowy	5,57	259,8	294,7	5,55	259,8	294,7
<i>p</i> -kumarowy	10,77	225,6	308,9	10,73	225,6	308,9
<i>trans</i> -ferulowy	12,02	235,4	323,1	11,98	235,4	323,1
kawowy	7,81	239,6	323,1	7,79	239,6	323,1

Obecność w ziele dymnicy wyżej wymienionych kwasów fenolowych stwierdzają również inni autorzy (Ivanov i wsp. 2014; Soušek i wsp. 1999). W niniejszej pracy nie potwierdzono w ziele dymnicy, stwierdzanych przez innych autorów kwasu synapinowego (Ivanov i wsp. 2014) oraz chlorogenowego (Bradley 1992; Newall i wsp. 1996).

### Badania ilościowe

Przeprowadzono oznaczenie ilościowe sumy polifenoli, flawonoidów oraz kwasów fenolowych w ziele dymnicy z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych.

Oznaczenie zawartości sumy polifenoli przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Meng i wsp (2009). Metoda ta zakłada wykorzystanie

odczynnika *Folin-Ciocalteu* (FC). Odczynnik ten jest mieszaniną kwasu fosforowolframowego ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) i kwasu fosfomolibdenowego ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), które w środowisku alkalicznym ( $Na_2CO_3$ ), podczas utleniania fenoli, ulegają redukcji do niebieskich tlenków wolframu i molibdenu. Intensywność niebieskiego zabarwienia koreluje z zawartością związków fenolowych (Azlim Almey i wsp. 2010; Georgé i wsp. 2005; Maurya i Singh 2010). Stężenia związków fenolowych w badanych próbach były proporcjonalne do intensywności absorpcji mierzonej spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda=760$  nm.

Zawartość flawonoidów badano kolorymetryczną metodą farmakopealną (FP IX 2011) zamieszczoną w monografii *Betulae folium*. W analizie wykorzystano odczynnik kompleksotwórczy w postaci chlorku glinu. Absorbancję prób mierzono przy długości fali  $\lambda=425$  nm.

Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych wykonano metodą kolorymetryczną z użyciem odczynnika Arnov'a (wodny roztwór molibdenianu sodu i azotynu sodu), opisaną w Farmakopei Polskiej VI (2002). Absorbancję analizowanych prób mierzono przy długości fali  $\lambda=490$  nm.

Badaniami na zawartość sumy polifenoli, flawonoidów i kwasów fenolowych objęto wyciąg wg FP IX, wyciąg metanolowo-wodny, nalewkę oraz odwar z ziela dymnicy (rozdz. 8.4.3.2.). Zawartość poszczególnych grup związków podawano w przeliczeniu na:

- kwas galusowy w analizie zawartości sumy polifenoli (mg GAE/g ziela dymnicy)
- kwercetynę w analizie zawartości flawonoidów (mg QE/g ziela dymnicy)
- kwas kawowy w analizie zawartości kwasów fenolowych (mg CAE/g ziela dymnicy)

Oznaczoną spektrofotometrycznie zawartość sumy polifenoli (rozdz. 9.3.1.), flawonoidów (rozdz. 9.3.2.) oraz kwasów fenolowych (rozdz. 9.3.3.) przedstawiono w Tabeli 95.



Tabela 95. Zawartość sumy polifenoli, flawonoidów i kwasów fenolowych w ziele dymnicy

Wyciąg	Zawartość		
	polifenole (mg GAE/g)	flawonoidy (mg QE/g)	kwasy fenolowe (mg CAE/g)
wg FP IX/metanolowo-wodny	14,43±0,17	6,20±0,02	8,15±0,13
nalewka	10,21±0,14	2,09±0,01	4,94±0,09
odwar	13,66±0,20	1,61±0,01	7,23±0,14

Zawartość polifenoli oznaczona w wyciągu metanolowo-wodnym i odwarze była porównywalna i wynosiła odpowiednio 14,43±0,17 mg GAE/g ziela i 13,66±0,20 mg GAE/g ziela. Nalewka natomiast charakteryzowała się niższą o około 30% zawartością sumy polifenoli (10,21±0,14 mg GAE/g ziela). Największą zawartość flawonoidów oznaczono w wyciągu z ziela dymnicy wg FP IX (6,20±0,02 mg QE/g ziela). W nalewce i odwarze zawartość flawonoidów była natomiast około 3-krotnie niższa i wynosiła 2,09±0,01 mg QE/g ziela w nalewce oraz 1,61±0,01 mg QE/g ziela w odwarze. Zawartość kwasów fenolowych była zbliżona w wyciągu metanolowo-wodnym (8,15±0,13 mg CAE/g ziela) i odwarze (7,23±0,14 mg CAE/g ziela). Wartość uzyskana dla nalewki była około 1,5-krotnie niższa i wynosiła 4,94±0,09 mg CAE/g ziela.

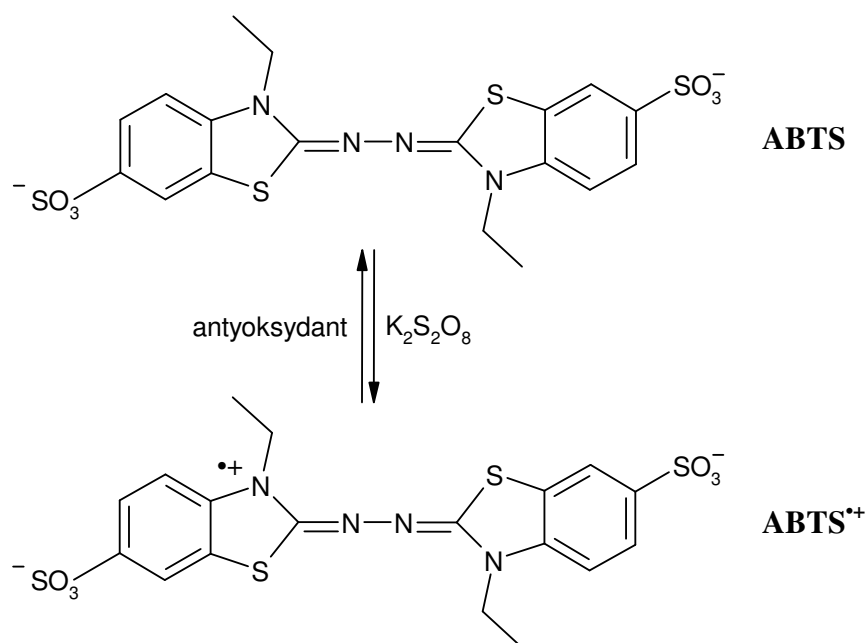
### Aktywność biologiczna

Do badania aktywności biologicznej wykorzystano nalewkę oraz odwar z ziela dymnicy (rozdz. 8.5.3.).

Właściwości antyoksydacyjne wyciągów z ziela dymnicy badano dwiema metodami. Metoda z użyciem ABTS polegała na reakcji analizowanych wyciągów z odczynnikami chemicznymi. Druga metoda natomiast miała na celu ocenę wpływu nalewki i odwaru z ziela dymnicy na przeżywalność oraz funkcje biologiczne komórek zmutowanych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, pozbawionych genu *sod1*.

W pierwszym etapie badań właściwości antyoksydacyjnych wykorzystano reakcję badanych prób z kationorodnikami ABTS<sup>•+</sup>, które wytworzono z soli amonowej kwasu 2,2'-azino-bis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) poprzez utlenienie

nadsiarczanem potasu (rozdz. 9.4.1.1.). Roztwór kationorodników, który wykorzystywano do oznaczeń sporządzono z 24-godzinnym wyprzedzeniem, gdyż mimo że utlenienie ABTS następowało natychmiast, to rodniki  $ABTS^{\bullet+}$  pełną stabilność i maksymalną wartość absorbancji uzyskiwały po upływie 6-48 godzin (Siddhuraju i Becker 2007). Badanie aktywności przeciwutleniającej wykonano wg zmodyfikowanej metody Re i wsp. (1999). Jest to metoda kolorymetryczna, która polega na redukcji kationorodników  $ABTS^{\bullet+}$  (barwa niebiesko-zielona) do ABTS (barwa jasnozielona) po dodaniu przeciwutleniacza (Rycina 79). Spadek intensywności zabarwienia roztworu kationorodników  $ABTS^{\bullet+}$  jest proporcjonalny do stężenia antyoksydantu i jego aktywności.



Rycina 79. Reakcja utleniania ABTS do  $ABTS^{\bullet+}$  oraz redukcji  $ABTS^{\bullet+}$  do ABTS.

Stopień redukcji rodników  $ABTS^{\bullet+}$  w badanych próbach mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda=734$  nm. Pomiar absorbancji prób wykonywano po 10 minutach inkubacji z roztworem kationorodników  $ABTS^{\bullet+}$  (czas wyznaczony doświadczalnie), gdyż po tym czasie zarówno analizowane wyciągi jak i substancje referencyjne osiągały stałą wartość antyoksydacyjną. W oznaczeniu jako substancje referencyjne wykorzystano związki o udowodnionej aktywności antyoksydacyjnej (Nenadis i wsp. 2007; Seddik i wsp. 2010): rutyne (w stężeniu 2,38 –

11,90  $\mu\text{g/mL}$ ), kwas galusowy (w stężeniu 0,24 – 1,19  $\mu\text{g/mL}$ ) oraz troloks (w stężeniu 0,48 – 4,76  $\mu\text{g/mL}$ ). Uzyskane wartości absorbancji posłużyły do wykreślenia krzywych aktywności antyoksydacyjnej substancji referencyjnych (Ryciny 60-62) oraz badanych wyciągów (Rycina 63), wyrażonych jako zdolność do dezaktywacji kationorodników  $\text{ABTS}^{*+}$  w zależności od stężenia. Na podstawie wykreślonych krzywych wyznaczono wartości współczynnika  $\text{IC}_{50}$ , który określa stężenie antyoksydantu prowadzące do dezaktywacji 50% kationorodników  $\text{ABTS}^{*+}$ . Współczynniki  $\text{IC}_{50}$  obliczono metodą interpolacji liniowej, między wartościami poniżej oraz powyżej 50% aktywności. Związek posiada tym większą aktywność przeciwutleniającą im jego wartość  $\text{IC}_{50}$  jest niższa.

Najsilniejszym antyoksydantem spośród analizowanych związków referencyjnych okazał się kwas galusowy, naj słabszym natomiast rutyna. Odwar z ziela dymnicy charakteryzował się słabszymi właściwościami przeciwutleniającymi w porównaniu z nalewką (Tabela 96). Zarówno odwar jak i nalewka posiadały słabsze właściwości przeciwutleniające, niż wykorzystane substancje referencyjne.

Tabela 96. Wartości  $\text{IC}_{50}$  substancji referencyjnych i wyciągów z ziela dymnicy

Badana substancja referencyjna / wyciąg	Wartość $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
rutyna	5,81
kwas galusowy	0,71
troloks	3,05
nalewka	314,79
odwar	159,91

Wykreślona została również liniowa zależność między stopniem neutralizacji kationorodnika  $\text{ABTS}^{*+}$  (%), a stężeniem polifenoli w badanych wyciągach. Uzyskana wysoka wartość współczynnika determinacji ( $r^2=0,8785$ ) wskazuje, że właściwości antyoksydacyjne ziela dymnicy są w dużym stopniu skorelowane z obecnością związków polifenolowych. Zgodnie z interpretacją podaną w literaturze wynik ten sugeruje, że około 88% aktywności przeciwutleniającej surowca wynika z obecności związków polifenolowych (Javanmardi i wsp. 2003).

Analizę aktywności przeciwutleniającej wyciągów z ziela dymnicy przeprowadzono również z wykorzystaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Drożdże *S. cerevisiae* są powszechnie stosowane jako model w badaniach różnych aspektów funkcjonowania komórek eukariotycznych, w tym również w wyjaśnianiu mechanizmów patogenezы ludzkich chorób, jak i działania leków (Barrientos 2003; Karachitos i wsp. 2013). W komórkach *S. cerevisiae* istnieją dwa podstawowe mechanizmy syntezy ATP (glikoliza i fosforylacja oksydacyjna). W związku z tym, nawet poważne upośledzenie funkcji łańcucha oddechowego i/lub syntazy ATP nie prowadzi do skutku letalnego (w przeciwieństwie do niektórych komórek ssaków), o ile zapewnione zostaną właściwe warunki wzrostu. Do innych właściwości, dzięki którym *S. cerevisiae* stanowią niezwykle przydatny model w badaniach ludzkich chorób zalicza się: podatność na eksperymentalne manipulacje (w tym genetyczne), szybką reprodukcję oraz możliwość uzyskania znacznej masy materiału do badań, w postaci komórek, mitochondriów czy też izolowanych białek. Co więcej, ewolucyjna bliskość linii rozwojowych zwierząt i grzybów, znajduje swój wyraz w obecności homologów genów i białek u drożdży *S. cerevisiae* i człowieka, w tym również SOD1 (Barrientos 2003; Bastow i wsp. 2011).

Gen *sod1* zawiera sekwencję dla dysmutazy ponadtlenkowej SOD1 (dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca miedź i cynk). CuZnSOD zlokalizowana jest przede wszystkim w cytozolu, ale może występować również w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Enzym ten uczestniczy w dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego powstającego w różnych miejscach komórki, w tym podczas transportu elektronów przez mitochondrialny łańcuch oddechowy, skąd anionorodnik ponadtlenkowy może być uwalniany do przestrzeni międzybłonowej bądź dalej do cytozolu. Jest to zatem istotny enzym antyoksydacyjny, a jednym ze skutków jego działania jest ochrona białek przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (O'Brien i wsp. 2004).

W badaniach oceniających działanie antyoksydacyjne związków, niezwykle przydatne są drożdże *Saccharomyces cerevisiae* pozbawione CuZnSOD, ponieważ w przeciwieństwie do mutantów pozbawionych innych enzymów antyoksydacyjnych, np. katalazy, wykazują różnice w fenotypie w porównaniu ze szczepem dzikim (Dani i wsp. 2008; Żyracka i wsp. 2005). Mutanty *S. cerevisiae* pozbawione SOD1 są bardziej wrażliwe na obecność utleniaczy, a tym samym są bardziej podatne na pojawienie się stresu oksydacyjnego. Mają również skróconą długość życia w porównaniu ze szczepem dzikim, która może być wydłużona w obecności egzogennych

antyoksydantów, takich jak askorbinian, cysteina, N-acetylocysteina oraz glutation (Żyracka i wsp. 2005).

W badaniach wykorzystano zarówno szczep dziki SP-4 (MAT $\alpha$  *leu1 arg4*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, jak i izogenicznego mutantu delecyjnego DSCD1-1C (MAT $\alpha$  *leu1 arg4 sod1:natMX*) zawierającego kasetę natMX w obrębie genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową zawierającą jony miedzi i cynku (SOD1). Badano wpływ nalewki i odwaru z ziela dymnicy na żywotność komórek drożdży, ochronę białek przed uszkodzeniami oksydacyjnymi oraz na proces oddychania wewnątrzkomórkowego mutantu *S. cerevisiae* (równolegle przeprowadzono analizy wyciągów z ziela żótlicy drobnokwiatowej). Badania wyciągów roślinnych z wykorzystaniem mutantu *Saccharomyces cerevisiae*, pozbawionego naturalnych mechanizmów obronnych przed działalnością wolnych rodników, wykonano po raz pierwszy. W przeprowadzonych wcześniej badaniach wyciągów roślinnych wykorzystywano drożdże, u których stres oksydacyjny indukowano, dodając do hodowli oksydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Ravipati i wsp. 2012).

Testy przeżywalności komórek drożdży umożliwiły zbadanie wpływu odwaru, nalewki oraz substancji referencyjnych (rutyna, kwas galusowy, troloks) na żywotność komórek drożdży pozbawionych genu *sod1*. Wielkość uzyskanego efektu cytoprotekcyjnego w zwiększaniu przeżywalności komórek drożdży określono na podstawie wydajności tworzenia kolonii (stosunek pomiaru densytometrycznego próby modyfikowanej wobec kontroli – niemodyfikowanej hodowli mutantu) oraz obliczenia liczby jednostek tworzących kolonie (CFU) dla 1000-krotnych rozcieńczeń hodowli. W badaniu zestawiono również ze sobą przeżywalność komórek szczepu dzikiego wobec mutantu (Tabela 91, Ryciny 65 – 70).

Uzyskane wyniki wskazują, że w pełnym zakresie zastosowanych stężeń, wyciągi nie wykazują efektu cytotoksycznego na hodowle drożdży, a wręcz przeciwnie, zarówno liczba jednostek tworzących kolonie jak i wydajność tworzenia kolonii były proporcjonalne do stężenia odwaru i nalewki. Liczbę kolonii mutantu najsilniej zwiększał odwar dodany do hodowli w stężeniu odpowiadającym 400 mg ziela dymnicy (400 mg w 26 ml płynnej pożywki YPG). Liczba jednostek tworzących kolonie była w tym przypadku ponad 3,5-krotnie wyższa w porównaniu do próby kontrolnej. Nieco niższe wartości uzyskano dla hodowli modyfikowanych nalewką z ziela dymnicy, gdyż przy analogicznym stężeniu wzrost zwiększył się około 3-krotnie. Liczbę kolonii, która przekroczyła wartość uzyskaną dla szczepu dzikiego osiągnięto dla hodowli

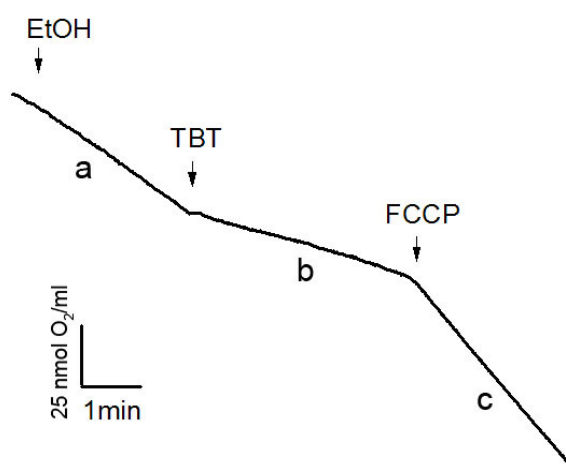
modyfikowanych nalewką o stężeniu odpowiadającym 400 mg ziela dymnicy (400 mg w 26 ml pożywki płynnej YPG) oraz odwarem o stężeniu odpowiadającym 320 mg i 400 mg ziela dymnicy (odpowiednio 320 mg w 26 ml płynnej pożywki YPG oraz 400 mg w 26 ml płynnej pożywki YPG). Spośród substancji referencyjnych (rutyna, kwas galusowy, troloks) najwyższą aktywność w zwiększaniu liczby kolonii wykazał troloks dodany do hodowli w ilości 2 mg. Wydajność tworzenia kolonii mutantu była najsilniejsza w obecności najwyższych badanych stężeń zarówno nalewki jak i odwaru (wzrost około 2-krotny w porównaniu do kontroli), a uzyskane wartości były nieco niższe od tych w przypadku hodowli modyfikowanej 2 mg troloksu.

W przeprowadzonych badaniach z wykorzystaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oznaczono również wpływ wyciągów z ziela dymnicy na poziom karbonylacji białek.

Powstające RFT rozpadają się lub wchodzi w reakcje ze składnikami komórek uszkadzając kwasy nukleinowe, białka oraz lipidy wpływając negatywnie na funkcje życiowe komórki (Bartosz 2009). Białka są jednym z głównych celów szkodliwego działania wolnych rodników, takich jak  $O_2^{\cdot-}$  i  $\cdot OH$ , które rozrywają wiązania dwusiarczkowe, powodując denaturację niektórych białek. RFT mogą także specyficznie modyfikować reszty aminokwasowe, a spośród wszystkich aminokwasów najbardziej podatnymi na utlenianie są cysteina, metionina, histydyna, tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina (Lushchak 2006). Utlenianie białek powoduje przyłączenie grup karbonylowych do niektórych reszt aminokwasowych, do których należą lizyna, arginina, prolina i treonina (Climent i wsp. 1989; Farber i Levine 1986; Levine 1983; Stadtman 1993). Uszkodzenia oksydacyjne białek mogą w konsekwencji prowadzić do zmian w ich funkcjonowaniu, np. zmieniając aktywność enzymatyczną lub prowadzić do ich degradacji. U mutantów *S. cerevisiae* pozbawionych SOD1, znajdujących się zarówno w logarytmicznej fazie wzrostu, jak też w fazie stacjonarnej stwierdzono podwyższony stopień utlenienia kilkunastu białek, w tym bardzo wysoki stopień utlenienia enolazy – enzymu biorącego udział w szlaku glikolitycznym (O'Brien i wsp. 2004). Ponadto, udowodniono, że u mutantów pozbawionych SOD1 dochodzi do zmiany aktywności kanału VDAC, który odpowiedzialny jest między innymi za transport metabolitów między mitochondriami i cytozolem (Karachitos i wsp. 2009). Oznacza to, że metabolizm energetyczny tych mutantów może być zakłócony, co prowadzić może natomiast do obserwowanych zmian fenotypu.

W przeprowadzonym eksperymencie zaobserwowano, że modyfikacja hodowli mutantu *S. cerevisiae* za pomocą referencyjnych antyoksydantów (rutyna, kwas galusowy, troloks), jak również odwaru oraz nalewki z ziela dymnicy prowadziła do zmniejszenia stopnia karbonylacji niektórych białek (Rycina 71). Niewątpliwie zredukowanie ilości uszkodzonych białek mają istotny wpływ na poprawę funkcji biologicznych komórki, co daje potwierdzenie w testach przeżywalności. Uzyskany korzystny efekt najprawdopodobniej związany jest z obecnością polifenoli wykazujących działanie przeciwutleniające.

Pomiar zużycia tlenu przez komórki drożdży umożliwia badanie procesu oddychania wewnątrzkomórkowego drożdży z hodowli niemodyfikowanej i modyfikowanej, poddanej działaniu wyciągów z ziela dymnicy oraz referencyjnych antyoksydantów (rutyna, kwas galusowy, troloks). Wykorzystanie inhibitora syntazy ATP (tributylocyna) oraz protonoforu FCCP pozwala na szerszą ocenę funkcji mitochondriów. Oprócz pomiaru endogenego (fizjologicznego) stanu oddechowego, mierzono tempo oddychania niezwiązanego z fosforylacją oksydacyjną, indukowanego tributylocyną (4. stan oddechowy), wynikającego z przecieku protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Natomiast po podaniu rozpręgacza FCCP, zwiększającego przewodnictwo protonów, wyznaczano maksymalne tempo oddychania (oddechowy stan U) (Rycina 80). Wyznaczenie tych parametrów umożliwia ocenę sprzężenia energetycznego komórek drożdży wyrażonego stosunkiem stanu U do stanu 4.



Rycina 80. Przykładowy pomiar oksygraficzny, gdzie a – tempo oddychania endogenne wsparte etanolem (EtOH), będącego źródłem substratu oddechowego dla mitochondrialnego łańcucha oddechowego; b – stan 4 indukowany tributylocyną (TBT); c – stan U indukowany FCCP (rycina zaproponowana przez dr Andonisa Karachitos).

W mitochondriach reaktywne formy tlenu są produkowane głównie przez kompleks I jak również kompleks III łańcucha oddechowego (Lambert i Brand 2009; Murphy 2009). Produkcja wolnych rodników jest zależna od wysokiej wartości siły protonomotorycznej (Korshunov i wsp. 1997). Z drugiej strony, siła protonomotoryczna napędza syntezę ATP w mitochondriach. W związku z tym wartość siły protonomotorycznej jest ściśle związana ze statusem energetycznym komórki. Produkcja wolnych rodników nie jest liniową funkcją szybkości oddychania, a częściowe rozpraszenie siły protonomotorycznej (np. z użyciem rozpręgaczy), powoduje duży spadek produkcji RFT (Miwa i Brand 2003).

Otrzymane wyniki wykazały, że sprzężenie energetyczne komórek z hodowli modyfikowanej mutantu  $\Delta$ SOD1 (pozbawionego SOD1) drożdży poddanych działaniu wyciągów z ziela dymnicy, jak i substancji referencyjnych uległo wzrostowi w porównaniu do hodowli niemodyfikowanej (Tabela 92). Wzrost sprzężenia energetycznego jest zależny od wzrostu siły protonomotorycznej, a co za tym idzie, związany z poprawą statusu energetycznego komórek. Hipotetyczny wzrost produkcji RFT w zaistniałym przypadku nie wykazał negatywnego wpływu na funkcje biologiczne komórki, czego potwierdzeniem są przeprowadzone testy przeżywalności.

Uzyskane wyniki badań hodowli drożdży *Saccharomyces cerevisiae* modyfikowanych wyciągami z ziela dymnicy potwierdzają jej właściwości antyoksydacyjne, oznaczone wcześniej metodą chemiczną.

Ostatnim etapem prac badawczych była analiza aktywności przeciwbakteryjnej nalewki i odwaru z ziela dymnicy. Badanie przeprowadzono wykorzystując wrażliwy na antybiotyki międzynarodowy szczep standardowy *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P. Aktywność wyciągów z ziela dymnicy określano wyznaczając najmniejsze stężenie bakteriobójcze (MBC) oraz najmniejsze stężenie hamujące rozwój bakterii (MIC). Jako antybiotyk referencyjny zastosowano chloramfenikol. Wyniki badań wskazują, że zarówno nalewka, jak i odwar z ziela dymnicy wykazują słabe działanie antybiotyczne w porównaniu do chloramfenikolu. Nalewka odznaczała się nieco silniejszym działaniem (MIC = 7,5 mg suchej masy / mL, MBC = 10,0 mg suchej masy / mL) w porównaniu z odwarem (MIC = 10 mg suchej masy / mL, MBC > 10,0 mg suchej masy na mL) wobec szczepu standardowego *Staphylococcus aureus*.



**WNIOSKI**



## WNIOSKI

1. Z wysuszonego zieleń dymnicy wyizolowano metodami chromatograficznymi pięć związków flawonoidowych. Strukturę wyizolowanych związków po raz pierwszy określono przy użyciu metod spektralnych: HPLC-DAD-ESI-MS oraz  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, jako: kwercetynę i jej pochodne: 3-*O*- $\alpha$ -arabinopiranozylo (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny, 3-*O*- $\alpha$ -ramnopiranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny, 3-*O*- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny oraz 3-*O*- $\beta$ -glukopiranozyd kemferolu. Dotychczas identyfikacja wyizolowanych flawonoidów oparta była jedynie na podstawie analizy produktów hydrolizy kwasowej oraz analizie w nadfiolecie, stąd nie udawadniano rodzaju wiązań międzycukrowych.
2. Obecność 3-*O*- $\beta$ -glukopiranozyd kemferolu stwierdzono w zieleń dymnicy po raz pierwszy.
3. Po raz pierwszy w zieleń dymnicy, za pomocą ultrasprawniej chromatografii cieczowej (UPLC) oznaczono zawartość kwasów fenolowych: protokatechowego, *p*-kumarowego, *trans*-ferulowego i kawowego. Nie potwierdzono natomiast, wcześniej opisywanych w zieleń dymnicy kwasu synapinowego i chlorogenowego.
4. Z porównania zawartości flawonoidów, kwasów fenolowych i sumy polifenoli w różnych wyciągach z zieleń dymnicy, oznaczonych metodami spektrofotometrycznymi wynika, że największą zawartością flawonoidów charakteryzował się wyciąg z dymnicy lekarskiej, przygotowany wg FP IX, natomiast w wyciągu metanolowo-wodnym i odwarze oznaczono najwyższe zawartości kwasów fenolowych i sumy polifenoli.
5. Po raz pierwszy badano działanie antyoksydacyjne form farmaceutycznych: nalewki i odwaru z zieleń dymnicy. Odwar prawie dwukrotnie silniej neutralizował kationorodniki ABTS $^{*\cdot+}$  niż nalewka. Wykazano również silną korelację ( $r^2=0,8785$ ), pomiędzy zdolnością neutralizacji ABTS $^{*\cdot+}$  przez badane wyciągi, a zawartością w nich związków polifenolowych. Zarówno odwar i nalewka z zieleń dymnicy wykazywały słabsze właściwości przeciwutleniające niż substancje referencyjne (rutyna, kwas galusowy, troloks).

6. Aktywność antyoksydacyjną odwaru i nalewki z ziela dymnicy po raz pierwszy potwierdzono, wykorzystując izogenicznego mutantu delecyjnego DSCD1-1C (MAT $\alpha$  *leu1 arg4 sod1:natMX*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, zawierającego kasetę natMX w obrębie genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową, zawierającą jony miedzi i cynku (SOD1). Nalewka i odwar z ziela dymnicy zwiększały liczbę jednostek tworzących kolonie oraz wydajność tworzenia kolonii drożdży, jak również zmniejszały poziom karbonylacji białek i zwiększały sprzężenie energetyczne komórek mutantu *Saccharomyces cerevisiae*. Podobny model analizy zastosowano dotychczas dla kilku związków roślinnych. W przeprowadzonych wcześniej badaniach wyciągów roślinnych, wykorzystywano tylko drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, u których stres oksydacyjny indukowano przy pomocy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
7. Nalewka i odwar z ziela dymnicy, w porównaniu do chloramfenikolu, wykazywały raczej słabe działanie antybiotyczne wobec szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P. Nalewka odznaczała się nieco silniejszym działaniem (MIC = 7,5 mg suchej masy / mL, MBC = 10,0 mg suchej masy / mL) w porównaniu z odwarem (MIC = 10 mg suchej masy / mL, MBC > 10,0 mg suchej masy na mL).

# **STRESZCZENIE**



Głównym celem przeprowadzonych badań była analiza fitochemiczna związków polifenolowych: flawonoidów i kwasów fenolowych, obecnych w ziele dymnicy (*Fumariae herba*), jak również oznaczenie ilościowe: sumy polifenoli, flawonoidów i kwasów fenolowych w ekstraktach z ziele dymnicy jak również ocena aktywności biologicznej (antyoksydacyjnej, przeciwbakteryjnej) badanych wyciągów.

W części teoretycznej przedstawiono wiadomości dotyczące dymnicy lekarskiej, charakterystykę botaniczną rodziny *Fumariaceae* i gatunku *Fumaria officinalis* L., a także aktualny stan wiedzy o składzie chemicznym, działaniu, zastosowaniu, przeciwwskazaniach, działaniach niepożądanych, interakcjach i toksyczności ziele dymnicy (*Fumariae herba*).

W części doświadczalnej z wyciągu z ziele dymnicy, metodą chromatografii kolumnowej (CC) oraz bibułowej (PPC), przy użyciu rozpuszczalników o różnej polarności, wyizolowano pięć związków flawonoidowych. Strukturę wyodrębnionych związków ustalono przy użyciu metod chemicznych (hydroliza kwasowa, analiza produktów hydrolizy) oraz spektralnych (UV, HPLC-DAD-ESI-MS,  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR). W efekcie zidentyfikowano **kwercetynę**, **3-O- $\alpha$ -arabinopiranozylo (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny**, **3-O- $\alpha$ -ramnopiranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny**, **3-O- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny** i **3-O- $\beta$ -glukopiranozyd kemferolu**.

Obecność kwasów fenolowych w ziele dymnicy, potwierdzono metodą dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (2D-TLC) oraz SPE-UPLC-PDA.

W różnych wyciągach z ziele dymnicy oznaczono metodami spektrofotometrycznymi (kolorymetrycznie lub SPE-UPLC-PDA) zawartość sumy polifenoli, flawonoidów i kwasów fenolowych.

Największą zawartość sumy polifenoli i kwasów fenolowych, wykazano w wyciągu metanolowo-wodnym ( $8,15 \pm 0,13$  mg CAE/g i  $14,43 \pm 0,17$  mg GAE/g surowca) i odwarze ( $7,23 \pm 0,13$  mg CAE/g i  $13,66 \pm 0,20$  mg GAE/g surowca). Zawartość flawonoidów była największa w wyciągu przygotowanym wg FP IX ( $6,20 \pm 0,02$  mg QE/g ziele). Zawartość kwasów fenolowych w ziele dymnicy ( $\mu\text{g/g}$  ziele) wynosiła: **protokatechowego** -  $17,77 \pm 0,46$ , **p-kumarowego** -  $55,09 \pm 1,39$ , **trans-ferulowego**  $38,60 \pm 0,78$  oraz **kawowego** -  $24,82 \pm 0,40$ .

Aktywność antyoksydacyjną ziela dymnicy analizowano wykorzystując metodę kolorymetryczną (ABTS) oraz z użyciem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, pozbawionych genu *sod1*. W metodzie ABTS odwar z ziela dymnicy charakteryzował się słabszą zdolnością redukcji rodnika ABTS<sup>•+</sup> w porównaniu z nalewką. Zarówno odwar i nalewka z ziela dymnicy wykazywały słabsze właściwości przeciwutleniające niż substancje referencyjne (rutyna, kwas galusowy, troloks).

Aktywność antyoksydacyjną wyciągów z ziela dymnicy potwierdzono również w badaniach z wykorzystaniem mutanta drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionego genu *sod1*. Analiza polegała na ocenie wpływu nalewki i odwaru z surowca na liczbę i wydajność tworzenia kolonii (testy przeżywalności), oznaczeniu poziomu karbonylacji białek, jak również pomiarze zużycia tlenu przez komórki drożdży. Zarówno nalewka, jak i odwar, w badanym zakresie stężeń, zwiększały liczbę i wydajność tworzenia kolonii mutanta drożdży, zmniejszały ilość uszkodzonych białek oraz powodowały wzrost sprzężenia energetycznego komórek. Ponownie rutyna, kwas galusowy i troloks, stanowiły substancje referencyjne.

Nalewka i odwar z ziela dymnicy, w porównaniu do chloramfenikolu, wykazywały raczej słabe działanie antybiotyczne wobec szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P. Nalewka odznaczała się nieco silniejszym działaniem (MIC = 7,5 mg suchej masy / mL, MBC = 10,0 mg suchej masy / mL) w porównaniu z odwarem (MIC = 10 mg suchej masy / mL, MBC > 10,0 mg suchej masy na mL).

## **SUMMARY**



The main purpose of the concluded studies was phytochemical analysis of polyphenolics: flavonoids and phenolic acids present in the herb of fumitory (*Fumaria officinalis*) as well as quantitative determination of the total polyphenols, flavonoids and phenolic acids in the herb of fumitory extracts, followed by the evaluation of their biological (antioxidant and antimicrobial) activities.

The theoretical part of the thesis provides an overview of fumitory, the botanical characteristics of the family *Fumariaceae* and *Fumaria officinalis* L. as well as present state of the knowledge respecting for chemical composition, application, contraindications, side effects, interactions and toxicity of fumitory.

In the experimental section five flavonoids were isolated from the *Fumaria officinalis* L. extract by both column chromatography (CC) and paper chromatography (PPC) methods with solvents with of various polarities. The structure of each isolated compound was elucidated by either chemical (such as acid hydrolysis and the analysis of the hydrolysis products) and spectral methods (UV, HPLC-DAD-ESI-MS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR). As a result **quercetin, quercetin 3-O- $\alpha$ -arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucopyranoside, quercetin 3-O- $\alpha$ -rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucopyranoside, quercetin 3-O- $\beta$ -glucopyranoside and kaempferol 3-O- $\beta$ -glucopyranoside** were identified.

The presence of phenolic acids in the fumitory herb was proven by the two-dimensional thin layer chromatography (2D-TLC) and the SPE-UPLC-PDA methods.

The contents of total phenolics, flavonoids and phenolic acids were determined in the various fumitory extracts by means of spectrophotometric (colorimetric or SPE-UPLC-PDA) methods.

The highest content of phenolic acids and total polyphenols was detected in the methanol-water extract (8,15 $\pm$ 0,13 mg CAE/g and 14,43 $\pm$ 0,17 mg GAE/g herb) and in the decoction (7,23 $\pm$ 0,13 mg CAE/g and 13,66 $\pm$ 0,20 mg GAE/g herb). The total of flavonoids was the highest in the extract which was prepared according to Polish Pharmacopoeia IX (6,20 $\pm$ 0,02 mg QE/g herb). The content of individual phenolic acids in the fumitory herb ( $\mu\text{g/g}$  herb) was as follows: 17,77  $\pm$ 0,46 of protocatechuic, 55,09 $\pm$ 1,39 of *p*-coumaric, 38,60 $\pm$ 0,78 of *trans*-ferulic and 24,82 $\pm$ 0,40 of caffeic acid.

The antioxidant activity of fumitory herb was evaluated by an *in vitro* ABTS colorimetric assay as well as using a *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain devoid of *sod1* gene. In the ABTS test the fumitory decoction characterized by weaker ability to reduce the ABTS $^{*\cdot}$  radical compared to the tincture. Both decoction and tincture had



weaker antioxidant properties than the reference substances (rutin, gallic acid, and trolox).

The antioxidant activity of the fumitory extracts was further confirmed using a method with the mutant of *Saccharomyces cerevisiae* yeast lack of *sod1* gene. The analysis consisted of the evaluation of tincture's and decoction's influence on the quantity and yield of yeast colonies formation (survival tests) as well as of determining the level of protein carbonylation and measuring the oxygen consumption by the yeast. Both the extract and the tincture, in the applied range of concentration, were increasing the quantity and yield of yeast mutant colonies formation, reducing the number of damaged proteins and causing an increase of energy coupling in the cells. Again, rutin, gallic acid, and trolox were used as the positive reference substances.

Both, the fumitory decoction and tincture, in comparison to chloramphenicol, showed rather weak antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P strain. The potential of the tincture was a little bit stronger (MIC = 7,5 mg of dry weight/mL, MBC = 10,0 mg of dry weight/mL), than that of the decoction (MIC = 10 mg of dry weight/mL, MBC > 10,0 mg of dry weight/mL).

**SPIS TABEL**



<b>Tabela 1.</b>	Alkaloidy występujące w ziele dymnicy .....	26
<b>Tabela 2.</b>	Gradient fazy ruchomej zastosowanej w analizie HPLC-DAD-ESI-MS .....	54
<b>Tabela 3.</b>	Gradient fazy ruchomej zastosowanej w analizie kwasów fenolowych metodą UPLC-PDA .....	58
<b>Tabela 4.</b>	Analiza chromatograficzna związku 1 .....	75
<b>Tabela 5.</b>	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 1 .....	76
<b>Tabela 6.</b>	Analiza HPLC-DAD związku 1 .....	77
<b>Tabela 7.</b>	Wyniki analizy ESI-MS związku 1.....	77
<b>Tabela 8.</b>	$^{13}\text{C}$ i $^1\text{H}$ NMR związku 1 w DMSO- $d_6$ .....	78
<b>Tabela 9.</b>	Analiza chromatograficzna związku 2 .....	82
<b>Tabela 10.</b>	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 2 .....	83
<b>Tabela 11.</b>	Analiza HPLC-DAD związku 2 .....	84
<b>Tabela 12.</b>	Wyniki analizy ESI-MS związku 2 .....	84
<b>Tabela 13.</b>	$^{13}\text{C}$ i $^1\text{H}$ NMR związku 2 w DMSO- $d_6$ .....	85
<b>Tabela 14.</b>	Analiza chromatograficzna związku 3 .....	88
<b>Tabela 15.</b>	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 3 .....	89
<b>Tabela 16.</b>	Analiza HPLC-DAD związku 3 .....	90
<b>Tabela 17.</b>	Wyniki analizy ESI-MS związku 3 .....	90
<b>Tabela 18.</b>	$^{13}\text{C}$ i $^1\text{H}$ NMR związku 3 w DMSO- $d_6$ .....	91
<b>Tabela 19.</b>	Analiza chromatograficzna związku 4 .....	95
<b>Tabela 20.</b>	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 4 .....	96
<b>Tabela 21.</b>	Analiza HPLC-DAD związku 4 .....	97
<b>Tabela 22.</b>	Wyniki analizy ESI-MS związku 4 .....	97
<b>Tabela 23.</b>	$^{13}\text{C}$ i $^1\text{H}$ NMR związku 4 w DMSO- $d_6$ .....	98
<b>Tabela 24.</b>	Analiza chromatograficzna związku 5 .....	102
<b>Tabela 25.</b>	Charakterystyka spektralna widm w nadfiolecie związku 5 .....	103
<b>Tabela 26.</b>	Analiza HPLC-DAD związku 5 .....	104
<b>Tabela 27.</b>	Wyniki analizy ESI-MS związku 5 .....	104
<b>Tabela 28.</b>	$^{13}\text{C}$ i $^1\text{H}$ NMR związku 5 w DMSO- $d_6$ .....	105
<b>Tabela 29.</b>	Wyniki analizy hydrolizy kwasowej wyizolowanych związków flawonoidowych .....	109
<b>Tabela 30.</b>	Wyniki analizy chromatograficznej (2D-TLC) wzorcowych kwasów fenolowych i frakcji eteru dietylowego .....	110

<b>Tabela 31.</b>	Wartości czasów retencji oraz równania krzywych kalibracyjnych kwasów fenolowych (Chanaj-Kaczmarek 2013) .....	113
<b>Tabela 32.</b>	Wartości parametrów procesu walidacji metody UPLC-PDA (Chanaj-Kaczmarek 2013) .....	114
<b>Tabela 33.</b>	Wartości odzysków poszczególnych kwasów fenolowych (Chanaj-Kaczmarek 2013) .....	115
<b>Tabela 34.</b>	Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu protokatechowego w ziele dymnicy .....	118
<b>Tabela 35.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	118
<b>Tabela 36.</b>	Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu <i>p</i> -kumarowego w ziele dymnicy .....	119
<b>Tabela 37.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	119
<b>Tabela 38.</b>	Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu <i>trans</i> -ferulowego w ziele dymnicy .....	120
<b>Tabela 39.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	120
<b>Tabela 40.</b>	Wartości pól powierzchni pików i zawartość kwasu kawowego w ziele dymnicy .....	121
<b>Tabela 41.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	121
<b>Tabela 42.</b>	Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego .....	124
<b>Tabela 43.</b>	Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób .....	124
<b>Tabela 44.</b>	Parametry krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego obliczone metodą najmniejszych kwadratów .....	125
<b>Tabela 45.</b>	Parametry równania prostej $y = 106,0671x + 0,0167$ .....	125
<b>Tabela 46.</b>	Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwasu galusowego obliczone z równania prostej $y = 106,0671x + 0,0167$ .....	125
<b>Tabela 47.</b>	Wartości pomiarów absorbancji i zawartość sumy polifenoli w nalewce .....	126
<b>Tabela 48.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	127
<b>Tabela 49.</b>	Wartości pomiarów absorbancji i zawartość sumy polifenoli w odwarze .....	127
<b>Tabela 50.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	128
<b>Tabela 51.</b>	Wartości pomiarów absorbancji i zawartość sumy polifenoli w wyciągu metanolowo-wodnym .....	128
<b>Tabela 52.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	129

<b>Tabela 53.</b>	Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwercetyny .....	131
<b>Tabela 54.</b>	Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób .....	131
<b>Tabela 55.</b>	Parametry krzywej kalibracyjnej dla kwercetyny obliczone metodą najmniejszych kwadratów .....	132
<b>Tabela 56.</b>	Parametry równania prostej $y = 0,0336x - 0,0056$ .....	132
<b>Tabela 57.</b>	Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwercetyny obliczone z równania prostej $y = 0,0336x - 0,0056$ .....	133
<b>Tabela 58.</b>	Wartości pomiarów absorbancji i zawartość flawonoidów w nalewce .....	134
<b>Tabela 59.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	134
<b>Tabela 60.</b>	Wartości pomiarów absorbancji i zawartość flawonoidów w odwarze .....	135
<b>Tabela 61.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	135
<b>Tabela 62.</b>	Wartości pomiarów absorbancji i zawartość flawonoidów w wyciągu z ziela dymnicy wg FP IX .....	136
<b>Tabela 63.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	136
<b>Tabela 64.</b>	Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu kawowego .....	138
<b>Tabela 65.</b>	Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób .....	138
<b>Tabela 66.</b>	Parametry krzywej kalibracyjnej dla kwasu kawowego obliczone metodą najmniejszych kwadratów .....	139
<b>Tabela 67.</b>	Parametry równania prostej $y = 0,0314x + 0,0163$ .....	139
<b>Tabela 68.</b>	Punkty teoretyczne krzywej kalibracyjnej dla kwasu kawowego obliczone z równania prostej $y = 0,0314x + 0,0163$ .....	139
<b>Tabela 69.</b>	Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w nalewce .....	140
<b>Tabela 70.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	141
<b>Tabela 71.</b>	Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w odwarze .....	141
<b>Tabela 72.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	142
<b>Tabela 73.</b>	Wartości pomiarów absorbancji i zawartość kwasów fenolowych w wyciągu metanolowo-wodnym .....	142
<b>Tabela 74.</b>	Ocena statystyczna uzyskanych wyników .....	143
<b>Tabela 75.</b>	Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów rutyny .....	146
<b>Tabela 76.</b>	Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób .....	147

<b>Tabela 77.</b>	Stopień neutralizacji kationorodników ABTS <sup>•+</sup> przez rutynę .....	147
<b>Tabela 78.</b>	Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów kwasu galusowego .....	148
<b>Tabela 79.</b>	Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób .....	149
<b>Tabela 80.</b>	Stopień neutralizacji kationorodników ABTS <sup>•+</sup> przez kwas galusowy ..	149
<b>Tabela 81.</b>	Wartości pomiarów absorbancji dla roztworów troloksu .....	150
<b>Tabela 82.</b>	Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób .....	151
<b>Tabela 83.</b>	Stopień neutralizacji kationorodników ABTS <sup>•+</sup> przez troloks .....	151
<b>Tabela 84.</b>	Wartości pomiarów absorbancji dla nalewki .....	153
<b>Tabela 85.</b>	Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób .....	153
<b>Tabela 86.</b>	Stopień neutralizacji kationorodników ABTS <sup>•+</sup> przez nalewkę z ziela dymnicy .....	154
<b>Tabela 87.</b>	Wartości pomiarów absorbancji dla odwaru .....	154
<b>Tabela 88.</b>	Parametry statystyczne obliczone dla badanych prób .....	155
<b>Tabela 89.</b>	Stopień neutralizacji kationorodników ABTS <sup>•+</sup> przez odwar z ziela dymnicy .....	155
<b>Tabela 90.</b>	Sposób modyfikacji hodowli izogenicznego mutantu delecyjnego DSCD1-1C (MAT $\alpha$ <i>leu1 arg4 sod1::natMX</i> ) drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	158
<b>Tabela 91.</b>	Liczba jednostek tworzących kolonie oraz wyniki pomiarów densytometrem dla 1000-krotnego rozcieńczenia hodowli: szczepu dzikiego, mutantu (kontrola) oraz modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych lub odpowiednią ilością nalewki/odwaru z ziela dymnicy .....	159
<b>Tabela 92.</b>	Pomiary zużycia tlenu przez komórki drożdży wykonane przy użyciu elektrody tlenowej .....	165
<b>Tabela 93.</b>	Wartości <i>MIC</i> oraz <i>MBC</i> uzyskane podczas badania aktywności przeciwbakteryjnej .....	166
<b>Tabela 94.</b>	Wartości parametrów wykorzystanych do identyfikacji kwasów fenolowych obecnych w ziele dymnicy .....	183
<b>Tabela 95.</b>	Zawartość sumy polifenoli, flawonoidów i kwasów fenolowych w ziele dymnicy .....	185
<b>Tabela 96.</b>	Wartości IC <sub>50</sub> substancji referencyjnych i wyciągów z ziela dymnicy .....	187

**SPIS RYCIN**



<b>Rycina 1.</b>	Przedstawiciele rodzaju <i>Fumaria</i> L., <i>Corydalis</i> DC. oraz <i>Dicentra</i> Borkh. ex Bernh. ....	20
<b>Rycina 2.</b>	<i>Fumaria officinalis</i> L. – stan naturalny .....	22
<b>Rycina 3.</b>	<i>Fumaria officinalis</i> L. – kwitnąca łodyga .....	23
<b>Rycina 4.</b>	<i>Fumaria officinalis</i> L. – liście .....	23
<b>Rycina 5.</b>	<i>Fumaria officinalis</i> L. – kwiaty .....	24
<b>Rycina 6.</b>	<i>Fumaria officinalis</i> L. – owoce na łodydze .....	25
<b>Rycina 7.</b>	<i>Fumaria officinalis</i> L. – owoce .....	25
<b>Rycina 8.</b>	Obraz mikroskopowy wątroby szczurów; <b>(a)</b> – kontrola negatywna (1 mL/kg masy ciała 0,9% NaCl p.o.); <b>(b)</b> – kontrola pozytywna (0,8 mL/kg masy ciała 30% roztworu CCl <sub>4</sub> s.c.); <b>(c)</b> – 0,8 mL/kg masy ciała 30% roztworu CCl <sub>4</sub> s.c. + 100 mg/kg masy ciała wyciągu z ziela dymnicy p.o.; <b>(d)</b> – 0,8 mL/kg masy ciała 30% roztworu CCl <sub>4</sub> s.c. + 200 mg/kg masy ciała wyciągu z ziela dymnicy p.o.; <b>(e)</b> – 0,8 mL/kg masy ciała 30% roztworu CCl <sub>4</sub> s.c. + 500 mg/kg masy ciała wyciągu z ziela dymnicy p.o.; <b>(f)</b> - 0,8 mL/kg masy ciała 30% roztworu CCl <sub>4</sub> s.c. + 100 mg/kg masy ciała sylimaryny p.o. (Sharma i wsp. 2012) .....	35
<b>Rycina 9.</b>	Schemat izolacji związków flawonoidowych z ziela dymnicy .....	71
<b>Rycina 10.</b>	Chromatogram TLC (S <sub>1</sub> , W <sub>1</sub> ) wyizolowanych związków flawonoidowych .....	74
<b>Rycina 11.</b>	Widmo w nadfiolecie związku 1 (MeOH) .....	75
<b>Rycina 12.</b>	Widma w nadfiolecie związku 1 (MeOH, NaOMe) .....	75
<b>Rycina 13.</b>	Widma w nadfiolecie związku 1 (MeOH, NaOAc, NaOAc / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) ...	76
<b>Rycina 14.</b>	Widma w nadfiolecie związku 1 (MeOH, AlCl <sub>3</sub> , AlCl <sub>3</sub> / HCl) .....	76
<b>Rycina 15.</b>	Widmo ESI-MS związku 1 w trybie jonów ujemnych (ES-) oraz jonów dodatnich (ES+) .....	77
<b>Rycina 16.</b>	Widmo <sup>13</sup> C NMR związku 1 (DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	79
<b>Rycina 17.</b>	Widmo <sup>1</sup> H NMR związku 1 (DMSO-d <sub>6</sub> ) .....	80
<b>Rycina 18.</b>	Widmo <sup>1</sup> H NMR związku 1 (DMSO-d <sub>6</sub> +D <sub>2</sub> O) .....	81
<b>Rycina 19.</b>	Widmo w nadfiolecie związku 2 (MeOH) .....	82
<b>Rycina 20.</b>	Widma w nadfiolecie związku 2 (MeOH, NaOMe) .....	82
<b>Rycina 21.</b>	Widma w nadfiolecie związku 2 (MeOH, NaOAc, NaOAc / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) ...	83
<b>Rycina 22.</b>	Widma w nadfiolecie związku 2 (MeOH, AlCl <sub>3</sub> , AlCl <sub>3</sub> / HCl) .....	83



<b>Rycina 23.</b> Widmo ESI-MS związku 2 w trybie jonów ujemnych (ES-) oraz jonów dodatnich (ES+). .....	84
<b>Rycina 24.</b> Widmo $^{13}\text{C}$ NMR związku 2 (DMSO- $d_6$ ) .....	86
<b>Rycina 25.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku 2 (DMSO- $d_6$ ) .....	87
<b>Rycina 26.</b> Widmo w nadfiolecie związku 3 (MeOH) .....	88
<b>Rycina 27.</b> Widma w nadfiolecie związku 3 (MeOH, NaOMe) .....	88
<b>Rycina 28.</b> Widma w nadfiolecie związku 3 (MeOH, NaOAc, NaOAc / $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) ...	89
<b>Rycina 29.</b> Widma w nadfiolecie związku 3 (MeOH, $\text{AlCl}_3$ , $\text{AlCl}_3$ / HCl) .....	89
<b>Rycina 30.</b> Widmo ESI-MS związku 3 w trybie jonów ujemnych (ES-) oraz jonów dodatnich (ES+) .....	90
<b>Rycina 31.</b> Widmo $^{13}\text{C}$ NMR związku 3 (DMSO- $d_6$ ) .....	92
<b>Rycina 32.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku 3 (DMSO- $d_6$ ) .....	93
<b>Rycina 33.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku 3 (DMSO- $d_6$ + $\text{D}_2\text{O}$ ) .....	94
<b>Rycina 34.</b> Widmo w nadfiolecie związku 4 (MeOH) .....	95
<b>Rycina 35.</b> Widma w nadfiolecie związku 4 (MeOH, NaOMe) .....	95
<b>Rycina 36.</b> Widma w nadfiolecie związku 4 (MeOH, NaOAc, NaOAc / $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) ...	96
<b>Rycina 37.</b> Widma w nadfiolecie związku 4 (MeOH, $\text{AlCl}_3$ , $\text{AlCl}_3$ / HCl) .....	96
<b>Rycina 38.</b> Widmo ESI-MS związku 4 w trybie jonów ujemnych (ES-) oraz jonów dodatnich (ES+) .....	97
<b>Rycina 39.</b> Widmo $^{13}\text{C}$ NMR związku 4 (DMSO- $d_6$ ) .....	99
<b>Rycina 40.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku 4 (DMSO- $d_6$ ) .....	100
<b>Rycina 41.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku 4 (DMSO- $d_6$ + $\text{D}_2\text{O}$ ) .....	101
<b>Rycina 42.</b> Widmo w nadfiolecie związku 5 (MeOH) .....	102
<b>Rycina 43.</b> Widma w nadfiolecie związku 5 (MeOH, NaOMe) .....	102
<b>Rycina 44.</b> Widma w nadfiolecie związku 5 (MeOH, NaOAc, NaOAc / $\text{H}_3\text{BO}_3$ )....	103
<b>Rycina 45.</b> Widma w nadfiolecie związku 5 (MeOH, $\text{AlCl}_3$ , $\text{AlCl}_3$ / HCl) .....	103
<b>Rycina 46.</b> Widmo ESI-MS związku 5 w trybie jonów ujemnych (ES-) oraz jonów dodatnich (ES+) .....	104
<b>Rycina 47.</b> Widmo $^{13}\text{C}$ NMR związku 5 (DMSO- $d_6$ ) .....	106
<b>Rycina 48.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku 5 (DMSO- $d_6$ ) .....	107
<b>Rycina 49.</b> Widmo $^1\text{H}$ NMR związku 5 (DMSO- $d_6$ + $\text{D}_2\text{O}$ ) .....	108

<b>Rycina 50.</b> Chromatogram UPLC wzorcowych kwasów fenolowych w stężeniu 20 µg/mL: galusowy (1), protokatechowy (2), chlorogenowy (3), <i>p</i> -hydroksybenzoesowy (4), dihydrokawowy (5), <i>p</i> -hydroksyfenylooctowy (6), wanilinowy (7), kawowy (8), syringowy (9), izowanilinowy (10), <i>p</i> -kumarowy (11), salicylowy (12), <i>trans</i> -ferulowy (13), <i>m</i> -kumarowy (14), rozmarynowy (15) .....	111
<b>Rycina 51.</b> Widma w nadfiolecie wzorcowych kwasów fenolowych .....	112
<b>Rycina 52.</b> Schemat wymywania kwasów fenolowych z kolumny Oasis MAX .....	116
<b>Rycina 53.</b> Schemat wymywania kwasów fenolowych z kolumny Oasis HLB .....	116
<b>Rycina 54.</b> Chromatogram UPLC wyciągu z ziela dymnicy (0,5 mL) oczyszczonego przy użyciu kolumny Oasis MAX (kolorem czerwonym zaznaczono kwasy fenolowe analizowane ilościowo) .....	117
<b>Rycina 55.</b> Chromatogram UPLC wyciągu z ziela dymnicy (0,35 mL) oczyszczonego przy użyciu kolumny Oasis HLB (kolorem czerwonym zaznaczono kwasy fenolowe analizowane ilościowo) .....	117
<b>Rycina 56.</b> Widma w nadfiolecie kwasów fenolowych występujących w ziele dymnicy .....	122
<b>Rycina 57.</b> Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu galusowego .....	126
<b>Rycina 58.</b> Krzywa kalibracyjna dla wzorcowej kwercetyny .....	133
<b>Rycina 59.</b> Krzywa kalibracyjna dla wzorcowego kwasu kawowego .....	140
<b>Rycina 60.</b> Stopień neutralizacji kationorodników ABTS <sup>•+</sup> przez rutynę .....	148
<b>Rycina 61.</b> Stopień neutralizacji kationorodników ABTS <sup>•+</sup> przez kwas galusowy ..	150
<b>Rycina 62.</b> Stopień neutralizacji kationorodników ABTS <sup>•+</sup> przez troloks .....	152
<b>Rycina 63.</b> Stopień neutralizacji kationorodników ABTS <sup>•+</sup> (%) przez nalewkę i odwar z ziela dymnicy .....	156
<b>Rycina 64.</b> Zależność liniowa pomiędzy stopniem neutralizacji kationorodników ABTS <sup>•+</sup> (%) a stężeniem polifenoli w nalewce i odwarze z ziela dymnicy .....	156

<b>Rycina 65.</b> Liczba jednostek tworzących kolonie dla hodowli: szczepu dzikiego, mutanta (kontrola) oraz modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych lub odpowiednią ilością nalewki/odwaru z ziela dymnicy .....	160
<b>Rycina 66.</b> Liczba jednostek tworzących kolonie wyrażona jako % kontroli dla hodowli: szczepu dzikiego, mutanta (kontrola) oraz modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych lub odpowiednią ilością nalewki/odwaru z ziela dymnicy.....	160
<b>Rycina 67.</b> Wydajność tworzenia kolonii dla hodowli: szczepu dzikiego, mutanta (kontrola) oraz modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych lub odpowiednią ilością nalewki/odwaru z ziela dymnicy .....	160
<b>Rycina 68.</b> Płytką agarową przedstawiającą serie 10-krotnych rozcieńczeń hodowli: szczepu dzikiego, mutanta (kontrola) oraz modyfikowanych roztworami substancji referencyjnych .....	161
<b>Rycina 69.</b> Płytką agarową przedstawiającą serie 10-krotnych rozcieńczeń hodowli: szczepu dzikiego, mutanta (kontrola) oraz modyfikowanych wzrastającą ilością nalewki z ziela dymnicy .....	161
<b>Rycina 70.</b> Płytką agarową przedstawiającą serie 10-krotnych rozcieńczeń hodowli: szczepu dzikiego, mutanta (kontrola) oraz modyfikowanych wzrastającą ilością odwaru z ziela dymnicy .....	162
<b>Rycina 71.</b> Klisza rentgenowska z uwidocznionymi pasmami białek. Strzałki wskazują przykładowe obszary o obniżonym poziomie karbonylacji białek w porównaniu do kontroli .....	164
<b>Rycina 72.</b> Związek między strukturą związków flawonoidowych, a przesunięciami pasm absorpcji w widmie UV .....	170
<b>Rycina 73.</b> Wzór strukturalny kwercetyny (związek 1) .....	176
<b>Rycina 74.</b> Wzór strukturalny 3- <i>O</i> - $\alpha$ -arabinopiranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozydu kwercetyny (związek 2) .....	177
<b>Rycina 75.</b> Wzór strukturalny 3- <i>O</i> - $\alpha$ -ramnopiranozylo(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukopiranozydu kwercetyny (związek 3) .....	179
<b>Rycina 76.</b> Wzór strukturalny 3- <i>O</i> - $\beta$ -glukopiranozydu kwercetyny (związek 4) .....	180
<b>Rycina 77.</b> Wzór strukturalny 3- <i>O</i> - $\beta$ -glukopiranozydu kemferolu (związek 5) .....	181
<b>Rycina 78.</b> Struktura chemiczna matrycy kolumnienek Oasis HLB i Oasis MAX ....	182

<b>Rycina 79.</b> Reakcja utleniania ABTS do ABTS <sup>•+</sup> oraz redukcji ABTS <sup>•+</sup> do ABTS .....	186
<b>Rycina 80.</b> Przykładowy pomiar oksygraficzny, gdzie a – tempo oddychania endogenego wspartego etanolem (EtOH), będącego źródłem substratu oddechowego dla mitochondrialnego łańcucha oddechowego; b – stan 4 indukowany tributyllocyną (TBT); c – stan U indukowany FCCP (rycina zaproponowana przez dr Andonisa Karachitos) .....	191

## **BIBLIOGRAFIA**



1. Agrawal PK, Rastogi RP.  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of flavonoids. *Heterocycles* 1981; 16(12): 2181-2235.
2. Agrawal PK. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo 1989.
3. Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 1992; 31(10): 3307-30.
4. Andersen ØM, Markham KR. Flavonoids. Chemistry, biochemistry and application. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York 2006.
5. Anioł-Kwiatkowska J, Kwiatkowski S, Berdowski W. Rośliny lecznicze. Atlas. Wydawnictwo Arkady, Warszawa 1993.
6. Azlim Almey AA, Ahmed Jalal Khan C, Syed Zahir I, Mustapha Suleiman K, Aisyah MR, Kamarul Rahim K. Total phenolic content and primary antioxidant activity of methanolic and ethanolic extracts of aromatic plants' leaves. *Int Food Res J* 2010; 17(4): 1077–84.
7. Barrientos A. Yeast models of human mitochondrial diseases. *IUBMB Life* 2003; 55: 83-95.
8. Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wyd. 2. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 2009.
9. Bastow EL, Gourlay CW, Tuite MF. Using yeast models to probe the molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Soc Trans* 2011; 39(5): 1482-7.
10. Blahová E, Brandšteterová E. Approaches in sample handling before HPLC analysis of complex matrices. *Chem Pap* 2004; 58(5): 362-73.
11. Borgida L-P. Transit alimentaire chez le porc en croissance effet d'un extrait de fumeterre et de la métapimazine. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 1973; 13(4): 724–7.

12. Borkowski B, Lutomski J, Skrzydlewska E, Zygmunt B. Rośliny lecznicze w fitoterapii. Kompendium roślin leczniczych uszeregowanych według zakresów stosowania na podstawie monografii opracowanych przez Komisję E Federalnego Urzędu Zdrowia RFN. Instytut Roślin i Przetworów Zielarskich, Poznań 1994.
13. Boucard M, Laubenheimer B. Action du nébulisat de fumeterre sur le débit biliaire du rat. *Therapie* 1966; 21: 903-11.
14. Boulet J. Homeopatia. Fakty i mity. Axel Springer Polska Sp. z o.o., Warszawa 2009.
15. Bown D. Wielka encyklopedia ziół. Muza SA, Warszawa 1999.
16. Bradley PR. British herbal compendium. Volume 1. A handbook of scientific information on widely used plant drugs. Companion to Volume 1 of the British Herbal Pharmacopoeia. British Herbal Medicine Association, Bournemouth 1992.
17. Brinkhaus B, Hentschel C, Von Keudell C, Schindler G, Lindner M, Stützer H, Kohlen R, Willich SN, Lehmacher W, Hahn EG. Herbal medicine with curcuma and fumitory in the treatment of irritable bowel syndrome: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40(8): 936–43.
18. Broda B, Mowszowicz J. Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych. Wydanie V. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996.
19. Bruneton J. Pharmacognosy. Phytochemistry. Medicinal Plants. Second Edition. Lavoisier Publishing, Paris 1999.
20. Bühring U. Wszystko o ziołach. Świat Książki. Warszawa 2010.
21. Chanaj-Kaczmarek J. Badania fitochemiczne związków polifenolowych w ziele żóltlicy drobnokwiatowej (*Galinsoga parviflora* Cav., Asteraceae). Rozprawa doktorska. Poznań 2013.
22. Clematis F, Tedeschini J, Dolci M, Lanzotti V, Cangelosi B, Fascella S, Curir P. Phenol composition and susceptibility to *Fusarium oxysporum dianthi* in carnation. *Journal of Life Sciences* 2011; 5: 921-25.

23. Climent I, Tsai L, Levine RL. Derivatization of gamma-glutamyl semialdehyde residues in oxidized proteins by fluoresceinamine. *Anal Biochem* 1989; 182(2): 226-32.
24. Czapska A. Chromatograficzno-spektrofotometryczna metoda oznaczania protopiny w *Herba Fumariae*. *Herba Pol* 1988; 34(3): 143-9.
25. Dani C, Bonatto D, Salvador M, Pereira MD, Henriques JAP, Eleutherio E. Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 4268-72.
26. Dey PM, Harborne JB. *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, London, San Diego, New York, Berkeley, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto 1989.
27. Drobnik J. *Zielnik i zielnikoznawstwo*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
28. Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial Activity of Certain Plants used in Turkish Traditional Medicine. *Asian J Plant Sci* 2004; 3(1): 104-7.
29. Dvořáková M, Hulín P, Karabín M, Dostálek P. Determination of polyphenols in beer by an effective method based on solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Czech J Food Sci* 2007; 25(4): 182-8.
30. Ebadi M. *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*. CRC Press, Boca Raton 2002.
31. Ellnain-Wojtaszek M, Drost-Karbowska K, Konieczna A, Kowalewski Z. Związki flawonoidowe w ziele dymnicy pospolitej – *Fumaria officinalis* L. (*Papaveraceae*). *Pamiętnik Farmaceutyczny* 1989; 170(1): 25-34.
32. Erdoğan TF. Brine shrimp lethality Bioassa of *Fumaria densiflora* DC. and *Fumaria officinalis* L. extracts. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 2009; 28(2): 125-32.
33. Erdoğrul ÖT. Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Used in Folk Medicine. *Pharmaceut biol* 2002; 40(4): 269-73.



34. Evans WC. Trease and Evans Pharmacognosy. Sixteenth edition. Saunders Elsevier, Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto 2009.
35. Farber JM, Levine RL. Sequence of a peptide susceptible to mixed function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. *J Biol Chem* 1986; 261(10): 4574-8.
36. Farmakopea Polska IX. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2011.
37. Farmakopea Polska VI. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2002.
38. Ferreira JFS, Peaden P, Keiser J. In vitro trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*: trematocidal plant alcoholic extracts. *Parasitol Res* 2011; 109(6): 1585–92.
39. Frohne D. Leksykon roślin leczniczych. Przewodnik naukowy. MedPharm Polska, Wrocław 2010.
40. Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem* 2005; 53(5): 1370-3.
41. Goetz P, Ghedira K, Jeune RL. *Fumaria officinalis* L. (*Fumariaceae*). *Phytothérapie* 2009; 7(4): 221–5.
42. Golkiewicz W, Wawrzynowicz T. Adsorption chromatography of alkaloids of *Fumaria officinalis*. *Chromatographia* 1970; 3(8): 356–8.
43. Gorbunov NP, Molokhova LG, Sukhanov AA. Preparation and the arrhythmic activity of the total alkaloids of *Fumaria officinalis* L. *Pharm Chem J* 1977; 11(5): 640–2.
44. Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Drogen E-O. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1993.
45. Harborne JB, Mabry TJ: The flavonoids: Advances in Research. Chapman and Hall, London, New York 1982.

46. Harborne JB. *Flavonoids Advances in Research since 1986*. Chapman & Hall, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras 1994.
47. Harborne JB. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. Third edition. Chapman & Hall, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras 1998.
48. Ivanov IG, Vrancheva RZ, Marchev AS, Petkova NT, Aneva IY, Denev PP, Georgiev VG, Pavlov AI. Antioxidant activities and phenolic compounds in Bulgarian *Fumaria* species. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2014; 3(2): 296-306.
49. Jasiewicz A. *Flora Polska. Rośliny naczyniowe. Dwuliścienne wolnopłatkowe – dwuokwiatowe. Tom IV. Część I. Wydanie II. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, Kraków 1985.*
50. Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco JM. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chem* 2003; 83: 547-550.
51. Józwiak GW, Waksmundzka-Hajnos M. Preparative-layer chromatography of an extract of alkaloids from *Fumaria officinalis*. *Acta Chromatogr* 2007; 18: 207-18.
52. Jurkowska S. *Tezaurus: substancje czynne pochodzenia roślinnego wykorzystywane w kosmetykach. Wydanie II. Ośrodek Informatyczno-Badawczy „Ekoprzem”, Dąbrowa Górnicza 2005.*
53. Karachitos A, Galganska H, Wojtkowska M, Budzinska M, Stobienia O, Bartosz G, Kmita H. Cu,Zn-superoxide dismutase is necessary for proper function of VDAC in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEBS Lett* 2009; 583(2): 449-55.
54. Karachitos A, García del Pozo JS, de Groot PWJ, Kmita H, Jordán J. Minocycline mediated mitochondrial cytoprotection: premises for therapy of cerebrovascular and neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets* 2013; 14(1): 47-55.
55. Karakaş FP, Yildirim A, Türker A. Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turk J Biol* 2012; 36(6): 641-52.

56. Karioti A, Giocaliere E, Guccione C, Pieraccini G, Gallo E, Vannacci A, Bilia AR. Combined HPLC-DAD-MS, HPLC-MS<sup>n</sup> and NMR spectroscopy for quality control of plant extracts: The case of a commercial blend sold as dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 88:7–15.
57. Kazuno S, Yanagida M, Shindo N, Murayama K. Mass spectrometric identification and quantification of glycosyl flavonoids, including dihydrochalcones with neutral loss scan mode. *Anal Biochem* 2005; 347(2): 182-92.
58. Khoshvaghti A, Derakhshanian S, Zamanzadeh A, Sarvestani AA. The effects of *Fumaria officinalis* hydroalcoholic extracts on haematological profile of New Zealand rabbits. *Comp Clin Pathol* 2013; 1–5. DOI: 10.1007/s00580-013-1705-9.
59. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 416(1): 15-8.
60. Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V. The Families and Genera of Vascular Plants. II. Flowering Plants – Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1993.
61. Kuźniewski E, Augustyn-Puziewicz J. Przewodnik ziołolecznictwa ludowego. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, Wrocław 1984.
62. LaGow B. PDR for Herbal Medicines. Third edition. Thomson PDR, Montvale 2004.
63. Lambert AJ, Brand MD. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol Biol* 2009; 554: 165-81.
64. Leporatti ML, Ghedira K. Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *J Ethnobiol Ethnomed* 2009; 5(1):31.
65. Levine RL. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem* 1983; 258(19): 11823-7.

66. Lewkowicz-Mosiej T. Rośliny Lecznicze. Leksykon. Świat Książki. Warszawa 2012.
67. Lushchak VI. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta Biochim Pol* 2006; 53(4): 679-84.
68. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1970.
69. Macků J, Krejča J. Atlas roślin leczniczych. Zakład Narodowy imienia Ossolińskich – Wydawnictwo, Wrocław 1989.
70. MacLean DB, Bell RA, Saunders JK, Chen C-Y, Manske RHF. Structures of three minor alkaloids of *Fumaria officinalis* L. *Can J Chem* 1969; 47(19): 3593–9.
71. Markham KR, Ternai B, Stanley R, Geiger H, Mabry TJ. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 1978; 34: 1389-97.
72. Markham KR, Ternai B. <sup>13</sup>C NMR of flavonoids – II. Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron* 1976; 32: 2607-12.
73. Matławska I. Farmakognozja. Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2008.
74. Maurya S, Singh D. Quantitative analysis of total phenolic content in *Adhatoda vasica* Nees extracts. *Int J PharmTech Res* 2010; 2(4): 2403-6.
75. Mayer JG, Uehleke B, Saum K. Zioła ojców benedyktynów. Mieszanki i leczenie. Świat Książki, Warszawa 2004.
76. Meng CC, Jalil AMM, Ismail A. Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk and white chocolates on the Malaysian market. *Molecules* 2009; 14(1): 200-9.

77. Mirek Z, Piękoś-Mirkowa H, Zając A, Zając M. Różnorodność biologiczna Polski. Vol. 1. Krytyczna lista roślin naczyniowych Polski. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Lubicz 2002.
78. Miwa S, Brand MD. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(Pt 6): 1300-1.
79. Mowszowicz J. Pospolite Rośliny Naczyniowe Polski. Wydanie V. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1980.
80. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417(1): 1-13.
81. Nenadis N, Lazaridou O, Tsimidou MZ. Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. *J Agric Food Chem* 2007; 55(14): 5452-60.
82. Newall CA, Anderson LA, Phillipsom JD. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. The Pharmaceutical Press, London 1996.
83. Nowak G. Leki pochodzenia naturalnego. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2012.
84. Nowiński M. Dzieje upraw i roślin leczniczych. Wydanie II. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1983.
85. O'Brien KM, Dirmeier R, Engle M, Poyton RO. Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem* 2004; 279(50): 51817-27.
86. Ożarowski A, Jaroniewski W. Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, Warszawa 1987.
87. Ożarowski A, Łańcucki J, Gąsiorowska K. Leki roślinne – informator. Zjednoczenie Przemysłu Zielarskiego Herbapol, Warszawa 1978.

88. Ożarowski A, Rumińska A, Suchorska K, Węglarz Z. Leksykon roślin leczniczych. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1990.
89. Ożarowski A. Ziołolecznictwo. Poradnik dla lekarzy. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1980.
90. Pałczyński A, Podbielkowski Z, Polakowski B. Botanika. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1994.
91. Pawlaczyk J, Zając M. Walidacja metod analizy chemicznej. Wydanie 3. Wydawnictwo naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2005.
92. Petruczyński A. Effect of chromatographic conditions on the separation and system efficiency for HPLC of selected alkaloids on different stationary phases. *J AOAC Int* 2011; 94(1): 77–89.
93. Prasain JK, Wang CC, Barnes S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(9): 1324-50.
94. Rakotondramasy-Rabesiaka L, Havet J-L, Porte C, Fauduet H. Solid–liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L. - Analysis determination, kinetic reaction and model building. *Separ Purif Tech* 2007; 54(2): 253–61.
95. Rakotondramasy-Rabesiaka L, Havet J-L, Porte C, Fauduet H. Solid–liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L. - Kinetic modelling of influential parameters. *Ind Crop Prod* 2009; 29(2–3): 516–23.
96. Rakotondramasy-Rabesiaka L, Havet J-L, Porte C, Fauduet H. Solid–liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L.—Experimental study and process optimization. *Separ Purif Tech* 2008; 59(3): 253–61.
97. Ravipati AS, Zhang L, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, Bartlett J, Smith PT, Shanmugam K, Münch G, Wu MJ, Satyanarayanan M, Vysetti B. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12: 173.

98. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(9-10): 1231-7.
99. Rejewski M. Pochodzenie łacińskich nazw roślin polskich. Przewodnik botaniczny. Wydanie I. Wydawnictwo Książka i Wiedza, Warszawa 1996.
100. Riley DS. *Materia medica of new and old homeopathic medicines*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2012.
101. Rutkowski L. Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
102. Salminen KA, Meyer A, Jerabkova L, Korhonen LE, Rahnasto M, Juvonen RO, Imming P, Raunio H. Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomedicine* 2011; 18(6): 533–8.
103. Santos-Buelga C, Williamson G. *Methods in polyphenol analysis*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2003.
104. Sarwa A. *Wielki leksykon roślin leczniczych*. Książka i Wiedza, Warszawa 2001.
105. Saunders JK, Bell RA, Chen C-Y, MacLean DB, Manske RHF. The structures of three alkaloids from *Fumaria officinalis* L. *Can J Chem* 1968; 46(17): 2873–5.
106. Seddik K, Nadjat I, Abderrahmane B, Daoud H, Lekhmici A. Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* Asso. leaves and some phenolic compounds. *J Med Plant Res* 2010; 4(13): 1273-280.
107. Seger C, Sturm S, Strasser E-M, Ellmerer E, Stuppner H. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signal assignment of benzyloisoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. (*Papaveraceae*). *Magn Reson Chem* 2004; 42(10): 882–6.
108. Sengul M, Yildiz H, Gungor N, Cetin B, Eser Z, Ercisli S. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22(1): 102–6.

109. Shah Z, Ilyas M, Khan M, Ahmad A, Khan M, Khan N. Antimicrobial activities of selected medicinal plants collected from Northern districts of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *J Pharm Res* 2012; 5(3): 1729-33.
110. Sharma UR, Prakash T, Surendra V, Karki R, Rama Rao N, Goli D. Hepatoprotective activity of *Fumaria officinalis* against CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. *Pharmacologia* 2012; 3(1): 9–14.
111. Siddhuraju P, Becker K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chem* 2007; 101: 10-19.
112. Skidmore-Roth L. Mosby's Handbook of Herbs and Natural Supplements. Mosby, St. Louis 2001.
113. Soušek J, Guédon D, Adam T, Bochořáková H, Táborská E, Válka I, Šimánek V. Alkaloids and organic acids content of eight *Fumaria* species. *Phytochem Anal* 1999; 10(1): 6–11.
114. Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 797-821.
115. Stobiecki M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 2000; 54(3): 237-56.
116. Strzelecka H, Kowalski J. Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000.
117. Sturm S, Strasser E-M, Stuppner H. Quantification of *Fumaria officinalis* isoquinoline alkaloids by nonaqueous capillary electrophoresis-electrospray ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006; 1112(1-2): 331–8.
118. Suau R, Cabezudo B, Rico R, Nájera F, López-Romero JM. Direct determination of alkaloid contents in *Fumaria* species by GC-MS. *Phytochem Anal* 2002; 13(6): 363–7.



119. Szafer W, Kulczyński S, Pawłowski B. Rośliny polskie. Opisy i klucze do oznaczania wszystkich gatunków roślin naczyniowych rosnących w Polsce bądź dziko, bądź też zdiczałych lub częściej hodowanych z 500 rysunkami. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1976.
120. Szafer W. Flora Polska. Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych. Tom III. Dwuliścienne wolnopłatkowe: dwuokwiatowe. Nakładem Polskiej Akademii Umiejętności, Kraków 1927.
121. Szczepaniak W. Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo naukowe PWN, wydanie 4 poprawione i rozszerzone, Warszawa 2002.
122. Szweykowska A, Szweykowski J. Botanika. Tom II – Systematyka. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.
123. Szweykowska A, Szweykowski J. Słownik botaniczny. Wydawnictwo Wiedza Powszechna, Warszawa 1993.
124. Teng R, Xie H, Li ZH, Liu X, Wang D, Yang C. Two new acylated flavonoid glycosides from *Morina nepalensis* var. *alba* Hand.-Mazz. *Magn Reson Chem* 2002; 40: 415-20.
125. Torck M, Pinkas M, Bézanger-Beauquesne L. Les hétérosides flavoniques de la Fumeterre *Fumaria officinalis* L. Fumariacées. *Ann Pharm Fr* 1971; 29(12): 591-596.
126. Ulotka dla pacjenta. Boldovera - tabletki. Data opracowania ulotki: 25.04.2013.
127. Ulotka dla pacjenta. Lymphomyosot Heel - krople doustne, roztwór. Data zatwierdzenia tekstu ulotki: lipiec 2011.
128. Ulotka dla pacjenta. Lymphomyosot Heel - tabletki. Data zatwierdzenia tekstu ulotki: lipiec 2011.
129. Van Wyk B-E, Wink M. Rośliny lecznicze świata. Ilustrowany przewodnik. MedPharm Polska, Wrocław 2008.

130. Vrancheva R, Ivanov I, Marchev A, Pavlov A. Qualitative and quantitative determination of protopine in *Fumaria spp.* by TLC-densitometry method. *J BioSci Biotech* 2012; 1(3): 255-9.
131. Vrba J, Vrublova E, Modriansky M, Ulrichova J. Protopine and allocryptopine increase mRNA levels of cytochromes P450 1A in human hepatocytes and HepG2 cells independently of AhR. *Toxicol Lett* 2011; 203(2): 135-41.
132. Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Second Edition. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg 1996.
133. Wasu SJ, Muley BP. Antioxidant activity of *Fumaria officinalis* Linn. and its study on ethanol induced – immunosuppression. *Research J Pharm and Tech* 2009; 2(2): 405-8.
134. Wawrzyniak E. Leczenie ziołami. Kompendium fitoterapii. Przedsiębiorstwo Poligraficzno Wydawnicze „Contrast” Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, Warszawa 1992.
135. Wawrzynowicz T, Waksmundzki A, Soczewiński E. Partition chromatography and countercurrent distribution of alkaloids of *Fumaria officinalis*. I. Chromatographic separation of ternary bases. *Chromatographia* 1968; 1(7-8): 327–31.
136. Wawrzynowicz T, Waksmundzki A. Partition chromatography and countercurrent distribution of alkaloids of *Fumaria officinalis*. II. Separation of ternary bases by countercurrent distribution. *Chromatographia* 1968; 1(9-10): 378–81.
137. Wichtl M. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. A Handbook for Practice on a Scientific Basis. Third Edition. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart 2004.
138. [www.flos.pl](http://www.flos.pl) (data wejścia 17.09.2014)
139. [www.plants.usda.gov](http://www.plants.usda.gov) (data wejścia 11.06.2014)
140. [www.waters.com](http://www.waters.com) (data wejścia 06.08.2014)

141. Wynne PM, Vine JH, Amiet RG. Protopine alkaloids in horse urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 811(1): 85–91.
142. Zarzycki K, Trzcńska-Tacik H, Różański W, Szeląg Z, Wołek J, Korzeniak U. Różnorodność biologiczna Polski. Vol. 2. Ekologiczne liczby wskaźnikowe roślin naczyniowych Polski. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Lubicz 2002.
143. Żyracka E, Zadrag R, Kozioł S, Krzepiło A, Bartosz G, Biliński T. Yeast as a biosensor for antioxidants: simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. *Acta Biochim Pol* 2005; 52(3): 679-84.

## OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem **pracy doktorskiej** p.t.:

**„Związki polifenolowe w ziele dymnicy lekarskiej (*Fumaria officinalis*)”**

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

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

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

Michał Wysocki

Poznań, 23.09.2014

## **OŚWIADCZENIE**

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej ([www.wbc.poznan.pl](http://www.wbc.poznan.pl)).

Michał Wysocki

Poznań, 23.09.2014