

# Zastosowanie metod chromatograficznych i spektroskopowych w analizie fitochemicznej wybranych surowców roślinnych (cz. II)

Mirosława Krauze-Baranowska<sup>1</sup>, Irena Malinowska<sup>2\*</sup>

**Część pierwsza artykułu, która ukazała się w numerze 6/2010 LAB, zawierała następujące rozdziały:**

- Wstęp
- Analiza ekstraktów roślinnych przy pomocy metod chromatograficznych i spektroskopowych
- Przedmiot badań
- Przygotowanie próbki do analizy
- Izolacja i identyfikacja związków czynnych z materiału roślinnego
- Izolacja i identyfikacja nieznanego związku z ekstraktu z kory wierzby, przy wykorzystaniu metody TLC

## Jakościowa i ilościowa analiza związków aktywnych farmakologicznie przy pomocy metod chromatograficznych

Separacja związków występujących w wyciągach roślinnych metodami chromatografii cieczowej służy nie tylko kontroli procesu izolacji (kontrola frakcji z kolumn preparatywnych), samej izolacji oraz badaniom identyfikacyjnym z zastosowaniem metod chemicznych (hydroliza, otrzymywanie pochodnych). Kolejnym ważnym zastosowaniem są badania jakościowe i ilościowe związków

czynnych obecnych w ekstraktach roślinnych, prowadzone najczęściej wobec wzorców, których obecność w badanym materiale roślinnym opisuje literatura [1, 2, 26], i skład chemiczny badanego surowca roślinnego jest w dużym stopniu rozpoznany. Badania takie mają służyć określeniu tożsamości surowca (analiza metodą „fingerprint”), kontroli jakości surowca roślinnego, są przydatne również w analizach chemotaksonomicznych. Celem analityka jest zatem opracowanie odpowiednich procedur chromatograficz-

nych, co następuje w procesie optymalizacji warunków metody.

## Wykorzystanie chromatografii cieczowej do określania składu chemicznego ekstraktów roślinnych

Chromatografia cieczowa jest najczęściej wykorzystywaną techniką chromatograficzną do rozpoznania chemicznego składu ekstraktów otrzymanych z surowców roślinnych. Rozdzielenie chromatograficzne oraz oznaczenie jakościowe i ilościowe poszczególnych związków można prowadzić przy pomocy dwóch podstawowych technik chromatografii cieczowej – wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz chromatografii planarnej (TLC, HPTLC). Techniki te w wielu przypadkach można stosować zamiennie w zależności od stopnia złożoności rozwiązywanego problemu analitycznego wynikającego z charakteru chemicznego matrycy roślinnej.

## Wykorzystanie analitycznej TLC/HPTLC do analiz fitochemicznych

Techniki TLC i HPTLC w porównaniu do HPLC są mniej czułe,

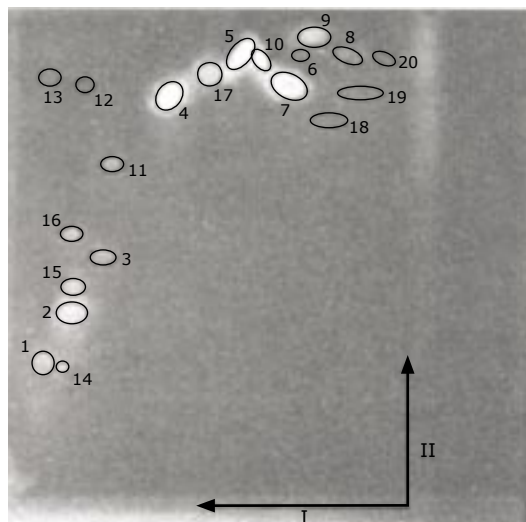
jednakże posiadają szereg zalet, które przesądzają o szerokim zastosowaniu chromatografii planarnej w fitochemii, a są to:

- prostota aparatury,
  - równoległe rozwijanie kilku a nawet kilkunastu próbek jednocześnie,
  - możliwość sprzężenia z innymi technikami (detektor DAD, MS),
  - różnorodne metody detekcji badanych związków na płytach chromatograficznych,
  - brak wpływu składu fazy ruchomej na detekcję badanych substancji,
  - stosowanie wielokrotnego i wielokierunkowego rozwijania płytki chromatograficznej, zmiany składu fazy ruchomej (elucja gradientowa o wzrastającej mocy elucyjnej) w jednym akcie chromatograficznym [2],
  - zastosowanie warstw różnych adsorbentów na płycie chromatograficznej (gradient złoża) [8].
- W badaniach chromatograficznych złożonych mieszanin związków, jakimi są ekstrakty roślinne, czy pojedynczych substancji czynnych, jednym z pierwszych kryteriów identyfikacyjnych jest badanie re-

tencji oznaczanych substancji w stosunku do wzorca. Jednak w tak skomplikowanych mieszaninach jakimi są wyciągi roślinne, parametry retencji substancji mogą być jednym, ale nie jedynym kryterium identyfikacji związku. Przyjmuje się, że mamy do czynienia z taką samą substancją jak wzorzec, jeśli wartości retencji (w przypadku TLC – współczynnik opóźnienia  $R_f$ ) są takie same w trzech układach chromatograficznych o różnych fazach stacjonarnych i ruchomych. W przypadku nowych związków, muszą być one rozdzielone od pozostałych, aby mogły w konsekwencji procedury izolacyjnej, zostać strukturalnie określone.

Ze względu na złożony skład ekstraktu metanolowego z liści daglezi zielonej, nie udało się rozdzielić metodą HPTLC wszystkich związków stosując nawet wielostopniowe rozwijanie gradientowe [8, 27] (rys. 8). Wielokrotne rozwijanie płytki (na krótszym czy coraz dłuższym dystansie z użyciem tej samej fazy ruchomej czy o większej /lub mniejszej mocy elucyjnej) jest szczególnie użyteczną metodą przy analizach wieloskładnikowych mieszanin jakimi są ekstrakty roślinne.

Niewątpliwą zaletą TLC jest możliwość nie tylko wielokrotnego rozwijania płytki w jednym kierunku (1D), ale i wielokrotnego rozwijania w dwóch kierunkach (2D-TLC) [2]. Stosując chromatografię dwukierunkową, z użyciem dwóch różnych faz ruchomych, można na otrzymanych chromatogramach TLC obserwować różnice zarówno w



Rys. 9. 2D TLC chromatogram ekstraktu metanolowego z *Pseudotsuga menziesii*: 1 – hyperozyd, 2 – astragalina, 3 – (E)-tilirozyd, 4 – (E)-dtilirozyd, 5 – daglejozyd I, 6 – daglejozyd II, 7 – daglejozyd III, 8 – daglejozyd IV, 9, 10 – nieznane flawonoidy, 11 – kwercetyna, 12 – kemferol, 13 – izoramnetyna, 14-20 – nieznane flawonoidy. Płytki szklane Multi KSC5, fazy ruchome: kierunek 1 – żel krzemionkowy chloroform-propanol-2-woda 30:30:10:5 v/v/v/v, kierunek II, Faza RP-18, metanol-woda-kwas mrówkowy 70:30:6 v/v/v [3]

składzie jakościowym jak i ilościowym badanych ekstraktów.

W przypadku ekstraktów z liści daglezi zielonej dodatkowo zastosowano w jednej płaszczyźnie płytki dwa adsorbenty, co umożliwiło rozdzielanie metoda 2D TLC składników ekstraktu – aglikonów, estrów i glikozydów flawonolowych w systemie ortogonalnym NP (warstwa żelu krzemionkowego – wąskie pasmo) – RP (faza związana C-18, pozostała część płaszczyzny) (rys. 9).

Stosując dwukierunkową chromatografię cienkowarstwową można osiągnąć rozdzielanie większej liczby związków, a więc w takim przypadku, nie jest konieczne oczyszczanie lub frakcjonowanie surowego ekstraktu.

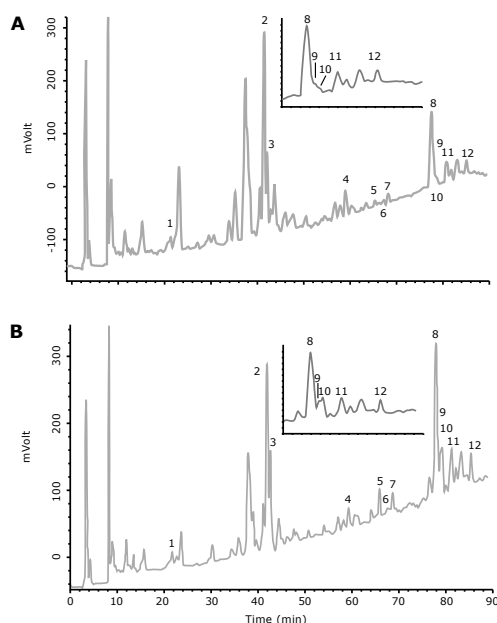
Najlepsze rozdzielanie badanych związków osiągnięto stosując wysokosprawną gradientową chromatografię kolumnową (HPLC) z użyciem elucji gradientowej (rys. 10).

Jak widać z zamieszczonych chromatogramów HPLC, badany materiał roślinny, jakimi są 2 odmiany daglezi zielonej, różni się zarówno składem jakościowym jak i ilościowym.

Opracowane warunki rozdzielania metodą RP-HPLC, mają duże znaczenie praktyczne, ponieważ mogą służyć do badań zmian zawartości interesujących nas związków w materiale roślinnym w zależności od cyklu wegetacyjnego oraz badań wpływu warunków przechowywania ekstraktów roślinnych na trwałość poszczególnych związków (rys. 11 a,b). Dotyczy to szczególnie daglejozydu I, który częściowo, w trakcie przechowywania może powstawać jako produkt dimeryzacji daglejozydu III.

### Wykorzystanie wysokociśnieniowej chromatografii planarnej (OPLC) do ilościowego oznaczenia salicyny w ekstraktach z kory wierzby

Technika TLC pozwala na szybkie, skryningowe określenie jakości materiału roślinnego. Z jej użyciem można wobec substancji wzorcowych



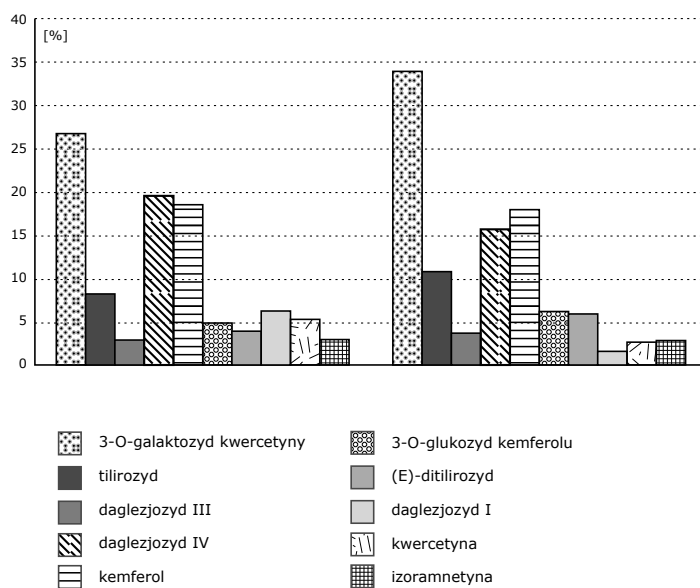
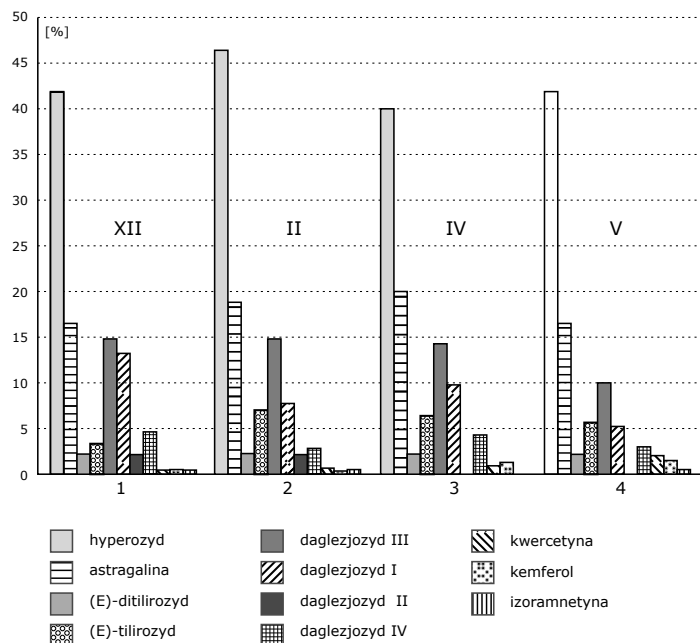
Rys. 10. Chromatogramy HPLC wyciągów metanolowych z *Pseudotsuga menziesii* var. *cesia* (A) i *Pseudotsuga menziesii* var. *Glauca* (B).

1 – kwas chlorogenowy, 2 – 3-O-galaktozyd kwercetyny, 3 – 3-glukozyd kemferolu, 4 – E-tilirozyd, 5 – kwercetyna, 6 – izoramnetyna, 7 – kemferol, 8 – E-dtilirozyd, 9 – daglejozyd I, 10 – daglejozyd III, 11 – daglejozyd II, 12 – daglejozyd IV.

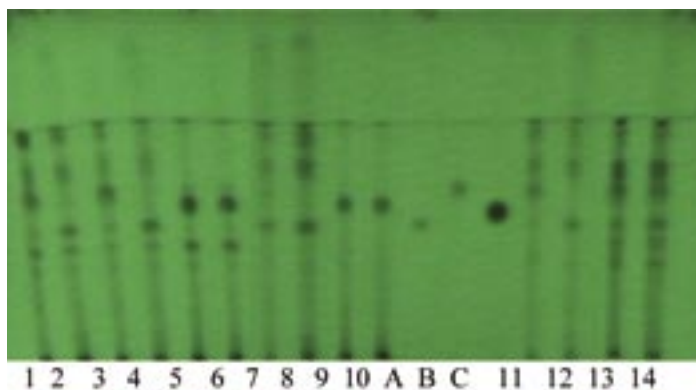
Kolumna Spherisorb ODS II, elucja gradientowa: od 5% do 100 % tetrahydrofuranu w mieszaninie z wodą z dodatkiem kwasu fosforowego, tG 86 min

potwierdzić obecność związku oraz określić jego ilość. W tym celu są optymalizowane warunki analizy w zakresie składu fazy ruchomej, zastosowanego adsorbentu oraz metody deprzywatykacji. Kora wierzby jest wykorzystywana

głównie jako źródło salicyny ( $\beta$ -D-glukozydu alkoholu salicylowego), substancji mającej działanie przeciwgorączkowe oraz przeciwzapalne. Dlatego obecność związku oraz jego zawartość decydują o przydatności materiału roślinnego



Rys. 11. Zmiany zawartości flawonoidów (% zawartości w zespole) w igłach daglezi zielonej  
 A. w miesiącach od grudnia do maja (miesiące XII, , II, III, IV, V)  
 B. przechowywanej 1 – bez dostępu światła, 2 – z dostępem światła dziennego



Rys. 12. Obraz płytki chromatograficznej (TLC) ekstraktu z kory wierzby; (od lewej) wybrane ekstrakty (po jednej plamce). Wzorce: A – salicyna, B – helicyna, C – L-piceina

go do produkcji leków roślinnych. Metodą TLC można ocenić jakość otrzymanej do badań kory wierzby w zakresie występowania salicyny (rys. 12, 12 A) natomiast nie można oznaczyć ilościowo tego związku, ze względu na niewystarczające rozdzielanie od innego prostego fenolu, obecnego w ekstrakcie, mianowicie L-piceiny.

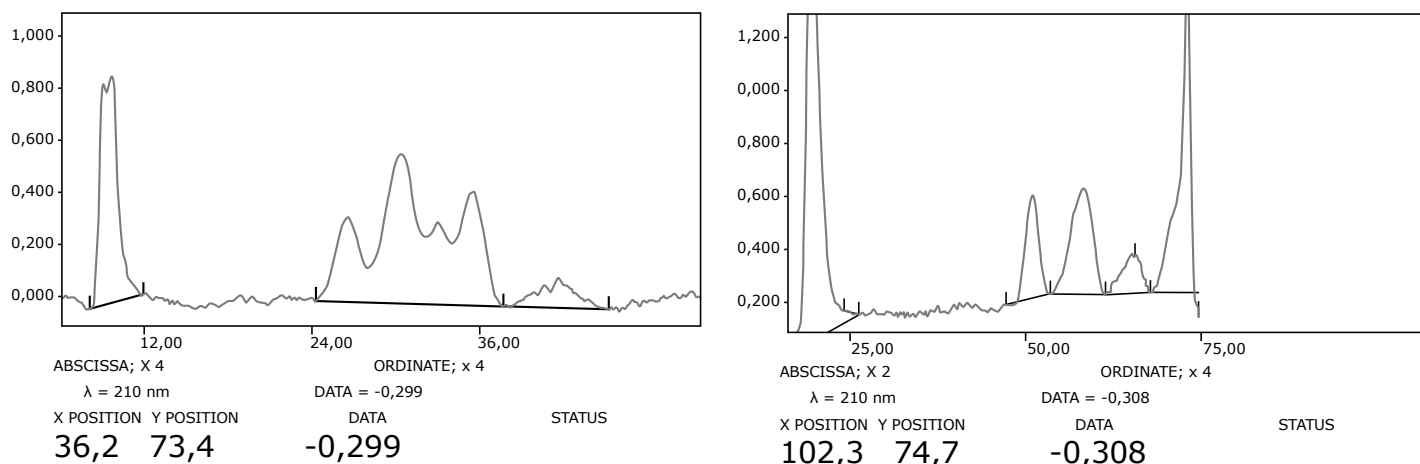
Na otrzymanych densytogramach ekstraktów piki tych substancji mogą mniej lub bardziej rozdzielone, w zależności od ich ilości w surowcu, co powoduje błędne oznaczenia ilościowe (rys. 13 A). Jeżeli jednak zastąpimy klasyczną TLC chromatografią z wymuszonym przepływem OPLC można obydwie związki oznaczyć w sposób ilościowy (rys. 13 B).

Oznaczenia ilościowe salicyny w korze wierzby, przeprowadzone na podstawie densytogramów TLC, wyznaczają jej zawartość na poziomie  $0,678 \pm 0,05$  (mg/mL ekstraktu), co stanowi 7,4% błędu, i mniej dokładne niż te wykonane techniką OPLC -  $0,408 \pm 0,016$  (mg/mL ekstraktu), co stanowi 4% oznaczanej wartości.

**Analiza jakościowa ilościowa ekstraktów roślinnych z użyciem HPLC**

O właściwościach leczniczych ekstraktów z kory wierzby decyduje nie tylko obecność i ilość salicyny, ale również obecność innych pochodnych alkoholu salicylowego. Z chemotaksonomicznego punktu widzenia jest to charakterystyczna grupa związków dla rodzaju Salix [13,15,16,32]. Najczęściej w korze wierzby występuje salicyna oraz jej estry: salikortyna, fragilina, tremulacyna.

Obecność glikozydów fenolowych w badanych ekstraktach metanolowych prowadzono wobec następujących wzorców – salicyny (1) salikortyny (2), 2'-acetylosalikortyny (3), piceiny (4), helicyny (5), salidrozydu (6) triandryny (7) populiny (8) i tremulacyny (9), wykorzystując układy chromatograficzne opisane w literaturze [13,33,34]. Najkorzystniejsze rozdzielanie mieszaniny analizowanych związków metodą TLC na żelu krzemionkowym uzyskano w fazie ruchomej octan etylu/meta-nol/woda. Po wybarwieniu plamek substancji odczyn-



Rys. 13. A. Densytogram obrazujący rozdział ekstraktu z kory wierzby metodą TLC

B. Densytogram obrazujący rozdział ekstraktu z kory wierzby techniką OPLC

1 – salicyna, 2 – L-piceina, 3 – helicyna, szybkość przepływu – 120  $\mu\text{l}/\text{min}$ , objętość raptownie wpływająca na płytke – 300  $\mu\text{l}$ , objętość użyta do rozwinięcia płytki – 2000  $\mu\text{l}$ , ciśnienie – 50 bar. Faza ruchoma – octan etylu, metanol, woda (77:13:10). Faza stacjonarna – SiO<sub>2</sub>F254S, kondycjonowane 20 minut: 1 – salicyna, 2 – helicyna, 3 – L-piceina

nikiem tymolowym (roztwór tymolu w mieszaninie – kwas siarkowy/etanol), otrzymano trwale barwne plamki o zabarwieniu od różowego do ciemnofioletowego. Na podstawie ich wartości  $R_f$  można było stwierdzić, które z wzorcowych substancji występują w analizowanym materiale roślinnym (rys. 14). Taka analiza miała charakter wyłącznie skryningowy.

W ilościowych badaniach salicyny i innych pochodnych prostych fenoli wykorzystuje się często wysokosprawną chromatografię cieczą w układzie faz odwróconych [35-37]. Podjęto próbę analizy związków salicylowych techniką NP-HPLC, otrzymując bardzo szerokie podstawy pików badanych związków, stąd do dalszych badań wykorzystano technikę RP-HPLC. Badania prowadzono w następującym układzie: faza stacjonarna – RP-18, faza ruchoma – acetonitryl/woda/kwas octowy (7+93+0,1 v/v/v) uzyskując zadowalające rozdzielanie 5

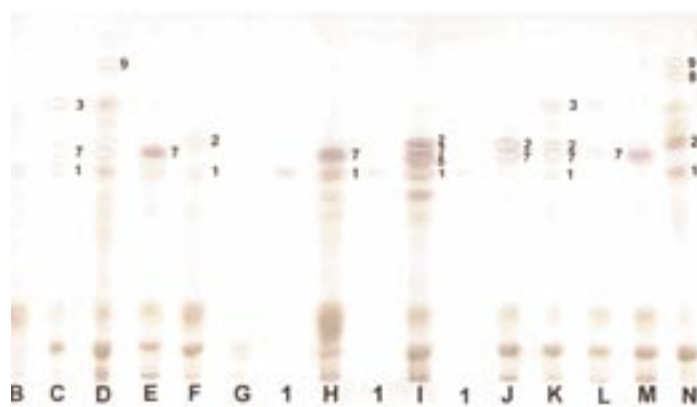
związków: salicyny, piceiny, salidrozydu, populiny i tremulacyny.

Ze względu na to, że związki salicylowe słabo absorbują promieniowanie z zakresu UV, do badań użyto detektora światła rozproszonego (ELSD Evaporative Light Scattering Detector). Zasada jego działania polega na rozpraszaniu przez cząstki analitu światła emitowanego przez laser [38]. Eluat wychodzący z kolumny chromatograficznej ulega rozpyleniu w strumieniu tlenu węgla a następnie jest odparowany w nebulizatorze. Na cząstkach tak powstałego aerozolu emitowane z lasera promieniowanie ulega rozpraszaniu. Natężenie rozproszonego promieniowania jest przetwarzane w odpowiedni sposób oraz rejestrowane w postaci chromatogramu [39-42]. Intensywność promieniowania rozproszonego zależy, oprócz ilości cząstek rozpraszających również od wielkości cząsteczki substancji (a nie od jej budowy che-

micznej). Z tego też powodu detektor ELSD jest uważany za detektor uniwersalny, praktycznie umożliwia on wykrywanie wszystkich stosunkowo nietlotnych substancji [41, 43]. Obecnie detektor ELSD stanowi alternatywę do detektora UV-VIS przy wykrywaniu substancji nie posiadających w swojej cząsteczce grup chromoforowych [32]. W ostatnich latach popularne staje się stosowanie równoległe detekcji ELSD wraz z detekcją

UV-VIS. Pozwala to na uzyskanie lepszych informacji na temat składu badanej próbki. Na rys. 15 przedstawiono chromatogram HPLC mieszaniny wzorcowych glikozydów fenolowych.

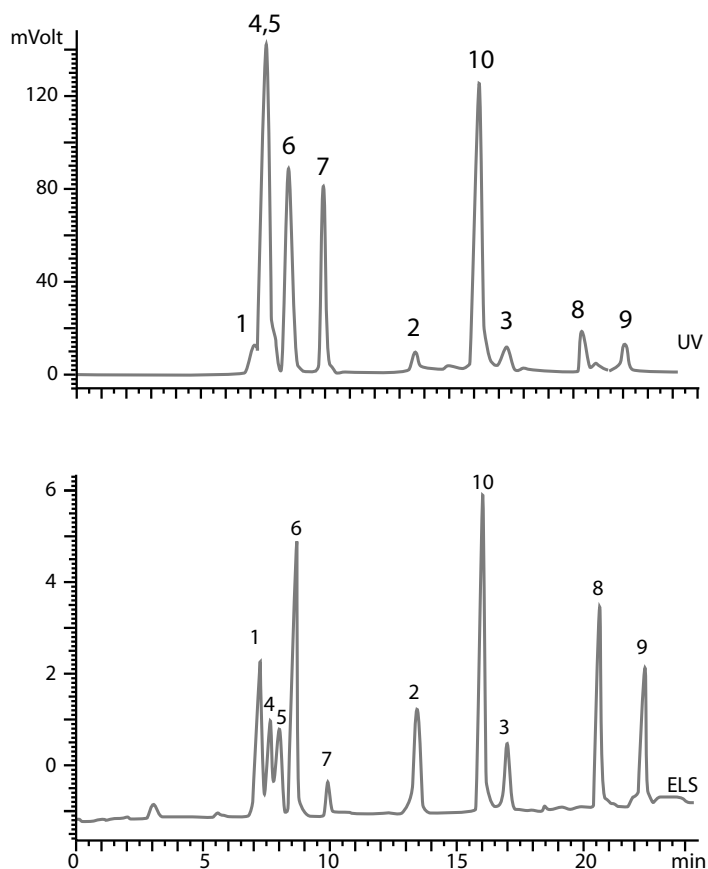
Na chromatogramie HPLC-UV nie są od siebie oddzielone piki związków 1,4,5 oraz 8 i 9. Sygnały pochodzące od związków 3, 7, 8 i 9 są bardzo słabe, co świadczy o niskim progu detekcji tej metody. Stosując detektor ELS można otrzy-



Rys. 14. Chromatogram TLC salicyny (1) i ekstraktów metanolowych z kory wybranych wierzb.

Salicyna (1), salikortyna (2), 2'-acetylosalikortyna (3), piceina (4), helicyna (5), salidrozyd (6), triandryna (7), populina (8), tremulacyna (9)



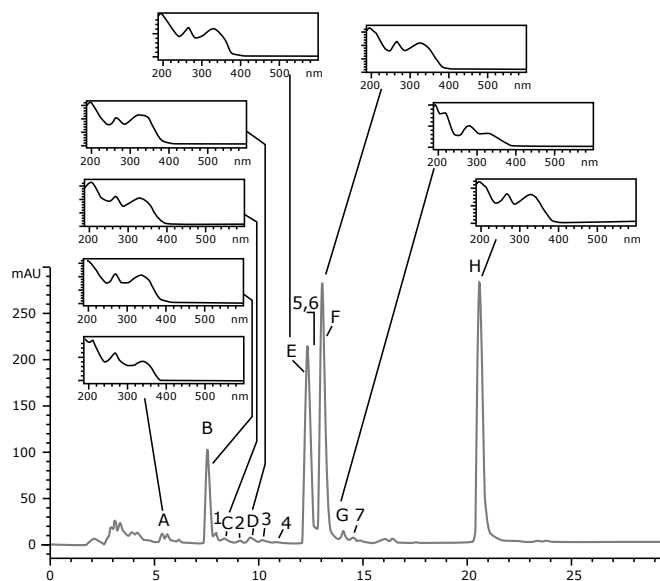


Rys. 15. Chromatogramy HPLC-UV i HPLC-ELS mieszanki glikozydów fenolowych  
 1 – salicyna, 2 – salikortyna, 3 – 2'-acetylosalikortyna, 4 – salidrozyd, 5 – piceina, 6 – helicyna, 7 – triandryna, 8 – populina, 9 – tremulacyna, 10 – 7-O-glikozyd naryngeny. Kolumna Chromolith Performance Si połączona z kolumną Chromolith Performance RP18e (100 mmx 4,6 mm), elucja gradientowa (A – acetonitryl, B – woda/TFA (99,95/005 v/v) od 3 do 48% A w A+B. (tG = 27 min), t = 30oC, v = 1mL/min, detekcja UV przy λ = 268 nm, detekcja ELS: układ off mode temperatura fazy ruchomej w kapilarze – DDT 113,2oC, prędkość przepływu gazu – NFG + 3,2 l/min, poziom 1

mać obserwować rozdzielanie pików substancji 1,4 i 5 oraz znaczne wzmocnienie sygnałów pochodzących od substancji 3, 8 i 9. Jakkolwiek intensywność pików substancji 2 jest niższa. Zastosowane w badaniach dwa sposoby detekcji uzupełniają się i przy jednoczesnym ich użyciu można otrzymać więcej wiarygodnych informacji o ilościowym i jakościowym składzie badanych mieszanin.

**Sprzężenie HPLC/MS/UV**

Sprzężenie chromatografu cieczowego z dwoma detektorami – UV oraz masowym pozwala na częściową identyfikację nieznanymi związków obecnych w ekstraktach, czy też frakcjach ekstraktów roślinnych. Z drugiej strony stanowi wiarygodne narzędzie do chromatograficznej identyfikacji znanych związków występujących w badanym surowcu, czy też zidentyfiko-



Rys. 16. Chromatogram HPLC/UV (λ = 330 nm) ekstraktu chloroformowego z liści Ginkgo Biloba z widmami UV biflawonów: A – amentoflawon, B – bilobetyna, C – 5'-metoksybilobetyna, D – 7-O-metyloamentoflawon, E – izoginkgetyna, F – ginkgetyna, G – 2.4-dihydroksygingketyna, H – sciadopityzyna, 1-7 niezidentyfikowane biflawonoidy

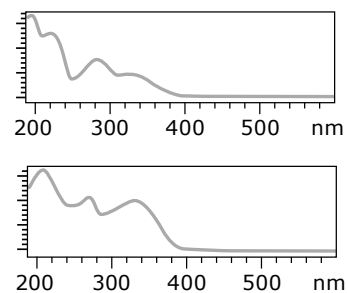
wanych w innym materiale roślinnym poprzez wykorzystanie baz danych. Identyfikację związku przeprowadza się na podstawie następujących parametrów:

- czasu retencji,
- wartości m/z jonu molekularnego,
- widma UV.

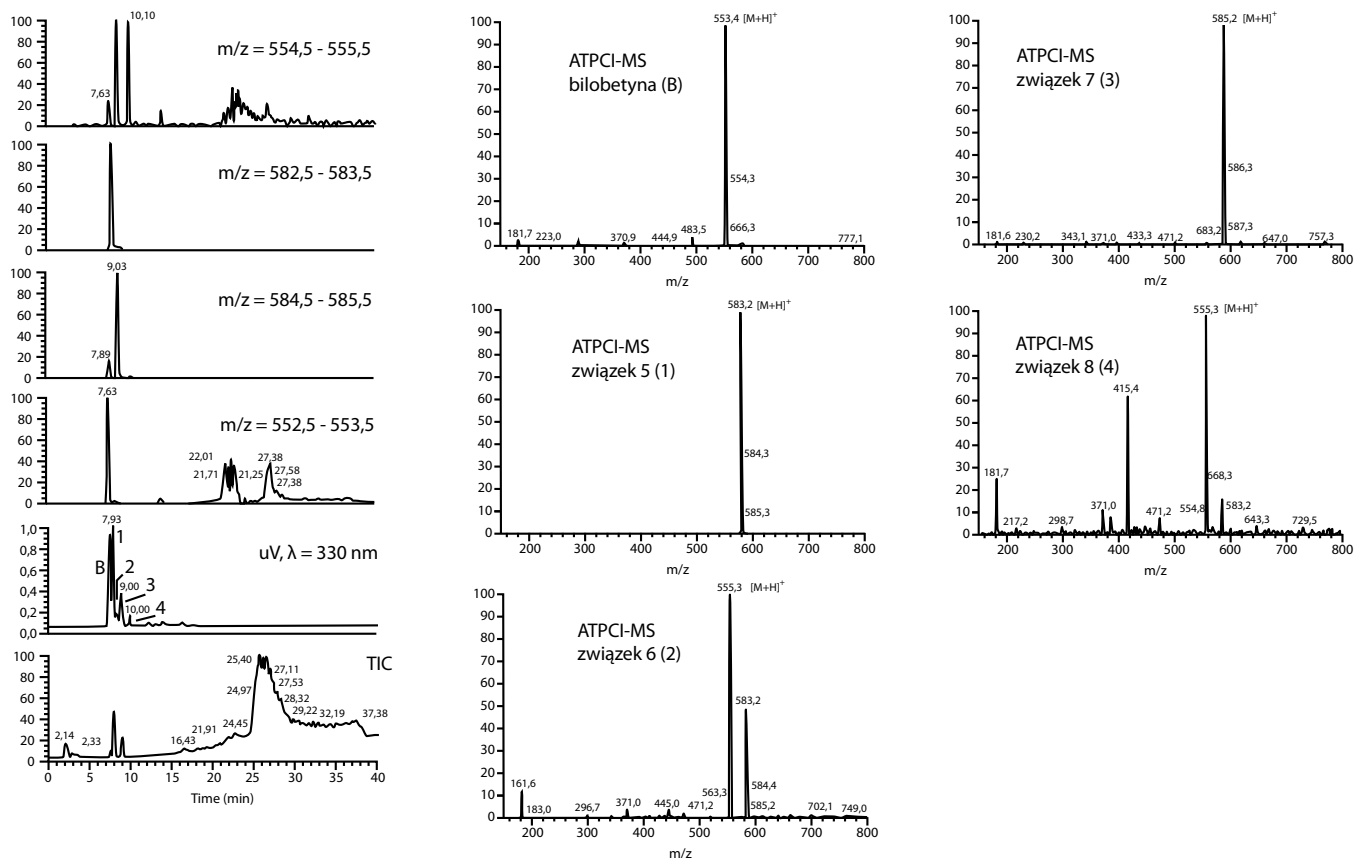
Metodę HPLC-MS-UV zastosowano przy identyfikacji nieznanymi substancji w ekstrakcie biflawonoidów z *Ginkgo biloba* (*Gingkoaceae*) - miłorzęb japoński. Na otrzymanym chromatogramie ekstraktu chloroformowego obserwowano obecność pików związków, których nie można było jednoznacznie sklasyfikować w oparciu o posiadane wzorce (związki 1-7 (rys. 16)). W takim przypadku otrzymane widma UV oraz MS dostarczają dodatkowych danych o charakterze związku.

Związek oznaczony na chromatogramie HPLC jako 1 wykazuje czas retencji w zastosowanym układzie chromatograficznym (7,91), zbliżony do czasu retencji 5'-metoksybilobetyny (7,93) i posiada identyczną masę cząsteczkową (583,2 Da). Jednak widma UV obydwu związków różnią się od siebie położeniem dwóch maksimum pasm absorpcji (rys. 17).

Widmo UV związku 1 wykazuje maksimum absorpcji I pasmo λ<sub>max</sub> 336, 340 nm i II



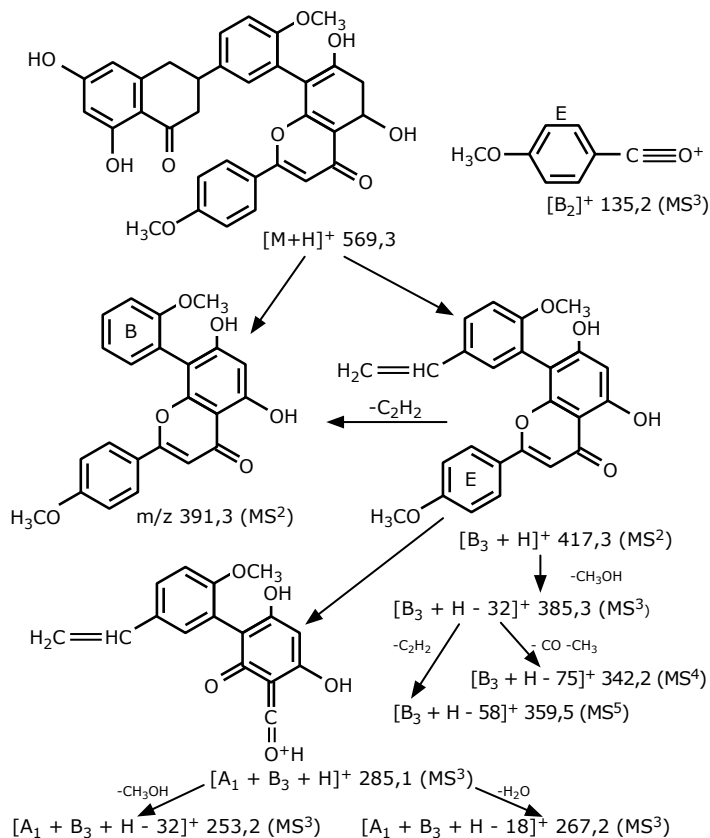
Rys.17. Widmo UV związku 1 (A) oraz 5'-metoksybilobetyny (B)



Rys. 18. Rozdzielenie HPLC/UV/ATPCI-MS biflawonoidów z *Ginkgo biloba* (frakcja IV) [3]

pasmo  $\lambda_{\max}$  269, 281 nm podczas gdy widmo 5' – metoksybilobetyny wykazuje maksimum absorpcji I pasmo  $\lambda_{\max}$  326 nm i II pasmo  $\lambda_{\max}$  270 nm. Obecność w paśmie II flawonów i flawonoli dwóch wierzchołków, lub jednego z przegięciem wskazuje na obecność w bocznym fenylu ugrupowania orto-dihydroksylowego lub obecność dodatkowej, obok hydroksylowej grupy metoksylowej [44]. Obydwa związki wykazują podobne wartości  $R_F$  na poliamidzie (odpowiednio 0.41 i 0.39). Powyższe dane sugerują, że związek 1 może różnić się od 5' – metoksybilobetyny położeniem grupy metoksylowej i hydroksylowej w bocznych podstawnikach fenylowych. Na otrzymanym chromatografie HPLC rys. 16 nie wszystkie

związki występujące w ekstrakcie udało się rozdzielić w sposób zadowalający. Dlatego do badań metodą HPLC/UV/MS przeznaczono 4 frakcje otrzymane w wyniku chromatografii wyciągu chloroformowego na grawitacyjnej kolumnie preparatywnej wypełnionej poliamidem, które częściowo oczyszczano metodą preparatywnej TLC. Zawierały one obok znanych biflawonów nieznanne związki flawonoidowe. Otrzymane frakcje analizowano metodą LC-MS/MS z pułapką jonową stosując jako metodę jonizacji jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization). Na podstawie otrzymanych widm APCI badanych biflawonoidów (rys. 18) wartości mas pozornych jonów

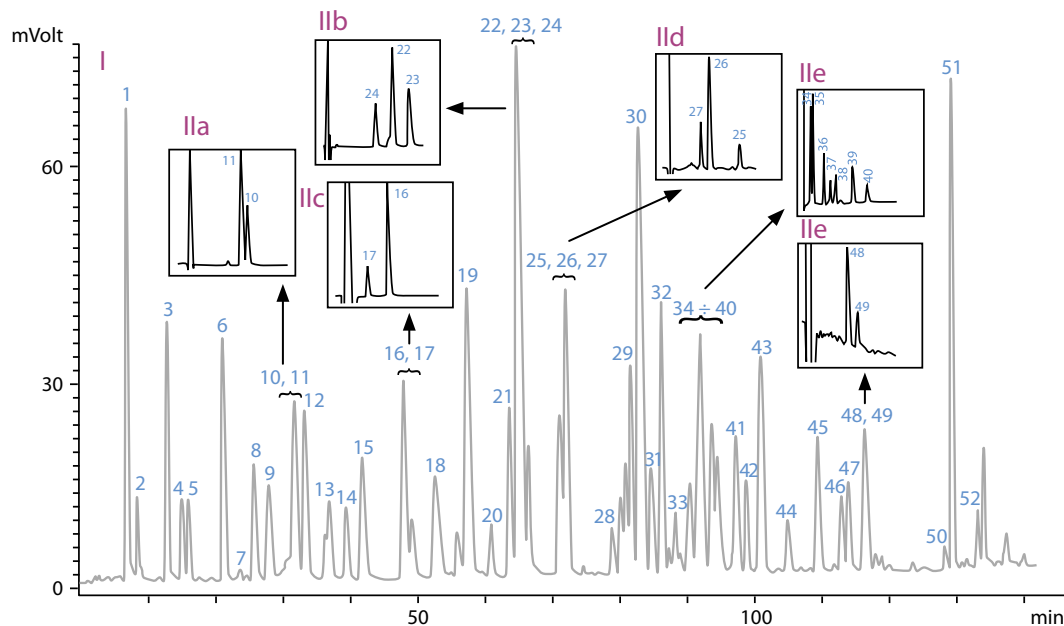


Rys. 19. Przepuszczalne struktury jonów fragmentacyjnych w widmach APCI-MS/MS 2,3-dihydrozinkgetiny z *Ginkgo biloba* [3].

molekularnych wskazywały, że nieznanne połączenia należą do pochodnych biapigeniny, (m.c.z. 538 Da) oraz różnią się pomiędzy sobą ilością grup metoksyowych (związki 2,4 – 1 OCH<sub>3</sub>, związki 1,3,6,7 – 2 OCH<sub>3</sub>, związek 5 – 4OCH<sub>3</sub>). Na podstawie danych otrzymanych metodą tandemowej spektrometrii masowej z pułapką jonową, i porównaniu z danymi literaturowymi [26, 45] określono przypuszczalne ścieżki fragmentacji w warunkach jonizacji ATCPI biflawonów występujących w liściach *Ginkgo biloba* (rys. 19).

**Dwuwymiarowa chromatografia cieczowa**

W ostatnich latach coraz większą popularność w badaniach chromatograficznych ekstraktów roślinnych zdobywa technika dwuwymiarowej chromatografii cieczowej – 2D LC. Charakteryzuje się ona prowadzeniem w tym samym czasie rozdzielń chromatograficznych na dwóch kolumnach, najczęściej w systemie ortogonalnym, co w rezultacie daje wzrost wartości P (pojemności względem pików). Jest realizowana z wykorzystaniem dwóch technik: „heart cutting” [46] i „comprehensive” (LCxLC) [47]. W pierwszej z nich jedynie wybrane, nierozdzielone na pierwszej kolumnie związki są rozdzielane na kolumnie drugiej. Natomiast w drugiej technice wszystkie obecne w matrycy roślinnej związki podlegają rozdzielaniu na obydwu kolumnach. Technikę „heart cutting” wykorzystano do rozdzielania składników ekstraktów z kory wierzby, które stanowiły związki salicy-



Rys. 20. Chromatogram 2D-HPLC mieszaniny substancji wzorcowych: 1 – kwas galusowy, 2 – kwas homogentyzynowy, 3 – kwas prokatechowy, 4 – salicyna, 5 – kwas a rezorcyłowy, 6 – kwas p-hydroksybenzoesowy, 7 – kwas gentyzynowy, 8 – kwas dihydrokawowy, 9 – kwas m-hydroksybenzoesowy, 10 – kwas 2.3 dihydroksybenzoesowy, 11 – kwas β rezorcyłowy, 12 – kwas wanilinowy, 13 – kwas homowanilinowy, 14 – katechina, 15 – kwas kawowy, 16 – kwas syringowy, 17 – kwas chlorogenowy, 18 – kwas salicyłowy, 19 – kwas p-kumarowy, 20 – epikatechina, 21 – kwas weratrowy, 22 – kwas m-kumarowy, 23 – kwas 2.4-dimetoksybenzoesowy, 25 – kwas felurowy, 26 – kwas o-kumarowy, 27 – kwas izoferulowy, 28 – 5-O-glukozyd naryngeniny, 29 – 7-O-glukozyd naryngeniny, 30 – kwas cynamonowy, 31 – kwas 3.4-dimetoksykynamonowy, 32 – naryngina, 33 – 7-O-glukozyd luteoliny, 34 – rutyna, 35 – 3-O-glukozyd kwercetyny, 36 – 7-O-glukozyd apigeniny, 37 – mirycetyna, 38 – kwas rozmarynowy, 39 – izosalipurpozyd, 40 – kwas 4-metoksykynamonowy, 41 – 3-O-glukozyd kemferolu, 42 – 3-O-glukozyd izoramnetyny, 43 – naryngina, 44 – kwercetyna, 45 – luteolina, 46 – 7-O-ramnozyd kemferolu, 47 – kemferol, 48 – apigenina, 49 – izoramnetyna, 50 – 6''-p-kumaroilosalipurpozyd, 51 – kupresuflawon, 52 – amantoflawon.

I wymiar – kolumna Supelcosil LC-18 (150 mm x 3 mm, 3 μm), elucja gradientowa: A-metanol, B-woda/kwas ortofosforowy 99,9/0,1 v/v od 3% do 70% A w A+B (TR – 150 min), v = 0,4 ml/min, detekcja UV, λ = 280 nm, II wymiar kolumna Chromaolith Performance RP-18e (100mmx4,6mm) elucja izokratyczna, faza ruchoma acetonitryl/woda (v/v) IIa 5/95, IIb

lowe, flawonoidowe (pochodne chalconów, flawanonów), kwasów fenolowych oraz katechin (rys. 20).

**Podsumowanie**

Rozwój technik chromatograficznych i metod spektroskopowych spowodował intensywny rozwój badań nad lekiem pochodzenia roślinnego. Rozpoznanie składu chemicznego surowców i ekstraktów roślinnych dostarczyło

naukowych podstaw do wyjaśnienia charakteru i specyfiki leku roślinnego. Surowce i ekstrakty roślinne zawierają wieloskładnikowe mieszaniny o złożonym składzie chemicznym, dlatego też ich analiza chociaż skomplikowana i o dużym stopniu trudności jest konieczna z wielu powodów, a mianowicie:

- jedynie 5%-15% roślin spośród 250 000 gatunków jest rozpoznanych w zakresie

związków czynnych farmakologicznie,

- 45% ludności świata wykorzystuje do celów leczniczych surowce roślinne.

W wyniku badań fitochemicznych odkryto nie tylko wiele nowych cennych leczniczo gatunków roślin, ale również wiele związków wyizolowanych z roślin znalazło szerokie zastosowanie w medycynie. Badania fitochemiczne, obok badań farmakologicznych i kli-





- cebo-controlled Double Blind Clinical Trial *Phyther. Res.* 15 (2001) 344-350
18. Chrubasik S, m Eisemberg E., Balan E., Weinberger T., Luzziati R.,
19. Schmid B., Kötter I., Heide L., Pharmacokinetics of Salicin after Oral Administration of a standardised Willow Bark Extract *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 57 (2001) 387-391.
20. European Farmakopoea, Concil of Europe, Strasbourg, 2004
21. Farmakopea Polska, PTFarm, Warszawa 2002
22. Chrubasik S., Efecy of Willow Barck Extract and therapeutic Activity, *Clin., Pharmacol. Therap.*, 74 (2003) 95
23. Chrubasik S., Eisenberg E., Balan E., Weinberger T., Luzziati R., Conradt Ch., Willow Bark Extract, a Useful Alternative for the Tratment of Osteoarthritis: Comment on the Editorial by Marcus and Suarez-Almazor *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 278-280
24. Pobłocka-Olech L., Zastosowanie metod chromatograficznych w badaniach składu chemicznego kory niektórych gatunków i klonów wierzby, Gdańsk 2003
25. Krauze-Baranowska M., Pobłocka L. Metody ekstrakcji stosowane w przygotowaniu próbek do analizy fitochemicznej. *Farm. Pol.* (2002) 58, 411-21.
26. Markham K.R., Techniques of flavonoids identyfication, (1982) Academic Press, London, str 36-49, 72-93
27. Matysik G., Problemy optymalizacji chromatografii ciekłokwarstwowej, Lublin, 1997, str. 88-114
28. <http://encyclopedia.thefreedictionary.com/Pyrocatechin?p>
29. Anderson M.A., Hellman B.E., Different Roles of Fpg and Endo III of catechol - ilnduced DNA Damage in Extendent – term Cultureson Human Lymphocytes and L5178Y Mouse Lymphoma *Cels Toxicol. Vitro* 19 (2005) 779-86
30. 205 Schwiegert N., Zehnder A.J., Eggen R.I., Chemical Properties of Catechols and Their Molecular Modes of Toxic Action in Cells from Microorganism to Mammals, *Environmental Microbiol.*, 3 (2001) 89-92
31. Pobłocka-Olech L., Krauze-Baranowska M., Głód D., Kawiak A., Łojkowska E. Chromatographic analysis of simple phenols in some species from the genus *Salix*. *Phytochem. Anal.* 2010, 21, 463-469.
32. Meier B., Shao Y., Julkunen-Tiito R., Bettschart A., Sticher O. A Cematotoxicomic Survey of Phenolic Compounds in Swiss Willow Species. *Planta Med.* 58 (1992) 698
33. Hrynkiewicz-Sudnik J., Sękowski B., Wilczkiewicz M., Rozmnażanie drzew i krzewów liściastych, PWN, Warszawa (1990)
34. Poukens-Enwart P., Tits M., Angenot L. Densitometric Determination of Salicin in Willow Stem Bark, *J. Planar Chromatogr.*, 6 (1993) 434-437
35. Julkunen-Tiitto R., Gebhardt H., Further Studies on Drying Willow (*Salix*) Twigs: the Effect of Low Drying Temperature on Labile Phenolics, *Planta Med.* 58 (1992) 385-6
36. Julkunen-Tiitto R., Meier B., Variation on Growth and Secondary Phenolics Among Field-Cultivated Clones of *Salix myrsinifolia*. *PlantaMed.* 58 (1992) 77-80
37. Kammerer B., Kahlich R., Biegert C., Gleiter C.H., Heide L., HPLC-MS/MS Analysis of Willow Bark Extracts Contained in Pharmaceutical Preparations *Phytochem. Anal.* 16(2005) 470-8
38. Stołyhwo A., Colin H., Giochon G. Use of Light Scattering as a Detector Principle in Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, (1983) 1-18
39. <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.pdf> - Bioanalytical Method Validation, 2001
40. Z. Witkiewicz, podstawy Chromatografii, WNT, Warszawa, 2005
41. Young C.S. The HPLC Analysis of Salicin Containing White Willow Barck Extract Using Evaporative Light-Scattering Detection, LC/GC – the Application Notebook, February 2004, 47
42. Young C.S., Dolan J.W. Success wiyh Evaporative Light-Scattering Detection, LC/GC (2003) 132-7
43. Svedström U., Vuorela H., Kostiainen R., Huovinen K., Laakso I., Hiltunen R., High – performance Liquid Chromatographic Determination of Oligomeric Procyanidins from Dimers Up to the Hexamer in Hawthorn, *J. Chromatogr. A*, 968, (2002) 53-60
44. 22 Markham K.R., Techniques of flavonoids identification, str 36-39, 72-93, Academic Press, London, 1982.
45. Hoffman E., Harette J., Strobant V., Spektrometria mas, WNT, Warszawa, 1998
46. Souza L.M., Cipriani T.R., Sant'Ana C., Iacomini M., Corin P., Sasaki G. Heart-cutting two-dimensional (size exclusionreversed phase) liquid chromatography –mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *J. Chromatogr. A*. 2009, 1216, 99-95.
47. Cesla P., Hajek T., Jandera P. Optimization of two –dimensional gradient liquid chromatography separations. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 3443-3457

\*<sup>1</sup>Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Katedra i Zakład Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego; <sup>2</sup>Wydział Chemii, Katedra Chemii Fizycznej, Zakład Chromatografii Planarnej, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie

Temat był zaprezentowany w postaci referatu na Ogólnopolskim sympozjum „Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości” UMCS, Lublin 2010 r.