



Katedra i Zakład Farmakognozji, 90-151 Łódź, ul. Dr J. Muszyńskiego 1, tel. (+48 42) 677 9169,
e-mail: monika.olszewska@umed.lodz.pl, WWW: www.umed.lodz.pl

Załącznik nr 3

do wniosku

o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego
w dziedzinie **nauk farmaceutycznych**

(obszar wiedzy: **farmakognozja**)

dr n. farm. inż. Monika Anna Olszewska

AUTOREFERAT

Łódź 2012

1. IMIĘ I NAZWISKO: Monika Anna Olszewska**2. INFORMACJE O EDUKACJI, POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE**

- **1987-1992** → studia jednolite magisterskie na Wydziale Chemii Spożywczej i Biotechnologii Politechniki Łódzkiej, kierunek: technologia chemiczna, specjalność: technologia aromatów i produktów zapachowych
- **1990-1991** → w ramach ITS (indywidualnego toku studiów) studia uzupełniające na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej w zakresie metod syntezy organicznej oraz metod spektroskopowych identyfikacji związków organicznych
- **20 października 1992, Łódź** → tytuł magistra inżyniera technologii chemicznej uzyskany z wyróżnieniem po przedstawieniu pracy magisterskiej pt. „*Elektrochemiczne metoksyłowanie pochodnych furanu*”, promotor: dr hab. Krzysztof Śmigieński
- **23 listopada 2001, Łódź** → tytuł doktora nauk farmaceutycznych z wyróżnieniem nadany uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi (obecnie Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pt. „*Badania składu chemicznego kwiatów i liści *Prunus spinosa* L. (Rosaceae)*”, promotor: prof. dr hab. n. farm. Maria Wolbiś, recenzenci: prof. dr hab. n. farm. Lucjan Świątek i prof. dr hab. n. farm. Kazimierz Głowniak.

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- **12 listopada 1992 – 30 września 1995** → Zakład Farmakognozji Instytutu Technologii i Chemii Leków Akademii Medycznej w Łodzi (obecnie Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) – pracownik inżyniersko-techniczny
- **1 października 1995 – 30 czerwca 2002** → Zakład Farmakognozji Instytutu Technologii i Chemii Leków Akademii Medycznej w Łodzi (obecnie Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) – pracownik naukowo-dydaktyczny na stanowisku asystenta
- **1 lipca 2002 – do chwili obecnej** → Zakład Farmakognozji Katedry Farmakognozji Akademii Medycznej w Łodzi (od 1 października 2002 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) – pracownik naukowo-dydaktyczny na stanowisku adiunkta

4. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE ZGŁOSZONE DO POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO

(wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.);

Osiągnięcie naukowe przedstawione do oceny w ramach postępowania habilitacyjnego stanowi monotematyczny cykl wymienionych niżej dziesięciu artykułów oryginalnych (**H.1-H.10**), których jestem jedyną lub pierwszą autorką, opublikowanych w latach 2008-2012, o łącznym współczynniku oddziaływania (**IF**, ISI Journal Citation Report) z roku ukazania się publikacji równym **14.675** i wartości punktacji **KBN/MNiSW** wynoszącej **198**. Tematyka cyklu to:

Charakterystyka profili polifenolowych i aktywności antyoksydacyjnej *in vitro* wybranych surowców roślinnych z rodzaju *Sorbus sensu lato*.

- H.1. Olszewska M.** (2008). Separation of quercetin, sexangularetin, kaempferol and isorhamnetin for simultaneous HPLC determination of flavonoid aglycones in inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48 (3), 629–635. IF=2.629, KBN/MNiSW=20 (aktualnie: IF=2.967, KBN/MNiSW=30).

Mój udział procentowy w powstaniu pracy, jako jej jedynej autorki, wynosi 100%.

- H.2. Olszewska M.A., Michel P.** (2009). Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species in relation to their polyphenolic composition. *Natural Product Research*, 23 (16), 1507–1521. IF=0.810, KBN/MNiSW=15 (aktualnie: IF=1.009, KBN=20).

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów, optymalizacji warunków analizy aktywności antyoksydacyjnej, wykonaniu oznaczeń HPLC zawartości flawonoidów i kwasów chlorogenowych, analizie statystycznej i interpretacji wyników, redakcji manuskryptu oraz pełnieniu funkcji autorki korespondującej. Mój udział procentowy w powstaniu pracy szacuję na 75%.

- H.3. Olszewska M.** (2009). Flavonoid profile of *Sorbus intermedia* (Ehrh.) Pers. *Chemistry of Natural Compounds*, 45 (5), 722–724. IF=0.572, KBN/MNiSW=10 (aktualnie IF=1.029, KBN/MNiSW=15).

Mój udział procentowy w powstaniu pracy, jako jej jedynej autorki, wynosi 100%.

- H.4. Olszewska M.A., Nowak S., Michel P., Banaszczyk P., Kicel A.** (2010). Assessment of the content of phenolics and antioxidant action of inflorescences and leaves of selected species from the genus *Sorbus sensu stricto*. *Molecules*, 15, 8769–8783. IF=1.988, KBN/MNiSW=20 (aktualnie: IF=2.385, KBN/MNiSW=25).

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów, optymalizacji warunków analizy aktywności antyoksydacyjnej, opracowaniu i optymalizacji metody HPLC-PDA analizy kwasów chlorogenowych w badanych surowcach, wykonaniu oznaczeń HPLC zawartości flawonoidów i częściowo oznaczeń zawartości kwasów chlorogenowych, analizie statystycznej i interpretacji wyników, redakcji manuskryptu oraz pełnieniu funkcji autorki korespondującej. Mój udział procentowy w powstaniu pracy szacuję na 70%.

- H.5. Olszewska M.A., Roj J.M.** (2011). Phenolic constituents of the inflorescences of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. *Phytochemistry Letters*, 4 (2), 151-157. IF=1.222, KBN/MNiSW=20.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów, optymalizacji procesu izolacji polifenoli z surowca, identyfikacji spektralnej wyodrębnionych związków, interpretacji wyników, redakcji manuskryptu oraz pełnieniu funkcji autorki korespondującej. Mój udział procentowy w powstaniu pracy szacuję na 80%.

- H.6. Olszewska M.A.** (2011). Variation in the phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of *Sorbus aucuparia* leaf extracts during vegetation. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 68 (6), 937–944. Erratum in: *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 69 (1), 167 (2012). IF=0.663, KBN/MNiSW=15.

Mój udział procentowy w powstaniu pracy, jako jej jedynej autorki, wynosi 100%.

- H.7. Olszewska M.A.** (2011). *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of the inflorescences, leaves and fruits of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 68 (6), 945–953. Erratum in: *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 69 (1), 167 (2012). IF=0.663, KBN/ MNiSW=15.

Mój udział procentowy w powstaniu pracy, jako jej jedynej autorki, wynosi 100%.

- H.8. Olszewska M.A., Michel P.** (2012). Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from various leaf extracts of *Sorbus aria* (L.) Crantz. *Natural Product Research*, 26 (3), 243–254. IF=1.009, KBN/MNiSW=20.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów, optymalizacji procesu izolacji polifenoli z surowca, identyfikacji spektralnej wyodrębnionych związków, opracowaniu i optymalizacji metody HPLC-fingerprint analizy polifenoli w badanych ekstraktach, wykonaniu oznaczeń HPLC zawartości polifenoli, analizie statystycznej i interpretacji wyników, redakcji manuskryptu oraz pełnieniu funkcji autora korespondującego. Mój udział procentowy w powstaniu pracy szacuję na 75%.

- H.9. Olszewska M.A., Presler A., Michel P.** (2012). Profiling of phenolic metabolites and antioxidant activity of dry extracts from the selected *Sorbus* species. *Molecules*, 17, 3093–3113. IF=2.385, KBN/MNiSW=25.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów, optymalizacji warunków analizy aktywności antyoksydacyjnej, opracowaniu, optymalizacji i walidacji metody HPLC-PDA-fingerprint analizy polifenoli w badanych ekstraktach, wykonaniu oznaczeń HPLC zawartości polifenoli, analizie statystycznej i interpretacji wyników, redakcji manuskryptu oraz pełnieniu funkcji autora korespondującego. Mój udział procentowy w powstaniu pracy szacuję na 70%.

- H.10. Olszewska M.A.** (2012). New validated high-performance liquid chromatographic method for simultaneous analysis of ten flavonoid aglycones in plant extracts using a C18 fused-core column and acetonitrile-tetrahydrofuran gradient. *Journal of Separation Science*, 35 (17), 2174–2183. IF=2.733, KBN/MNiSW=30.

Mój udział procentowy w powstaniu pracy, jako jej jedyne autora, wynosi 100%.

Prace badawcze, których wynikiem są ww. publikacje, zostały zrealizowane dzięki finansowemu wsparciu MNiSW oraz Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w ramach kierowanych przeze mnie, odpowiednio grantu habilitacyjnego Nr N N405 398037 i grantu własnego Nr 502-13-485. Pozycje **H.2**, **H.4**, **H.5**, **H.8** i **H.9** powstały we współpracy z dr n. farm. inż. Agnieszką Kicel, dr n. farm. Sławomirą Nowak i mgr farm Piotrem Michelem z zespołu macierzystej Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; mgr farm. Anną Presler i mgr farm. Joanną M. Roj, dyplomantkami Katedry; oraz mgr Piotrem Banaszcakiem z Arboretum Leśnego Zakładu Doświadczalnego SGGW w Rogowie. Oświadczenia współautorów, określające ich wkład w przygotowanie odpowiednich prac zostały zamieszczone w **załączniku nr 7**.

Poza publikacjami **H.1–H.10**, wyniki prac badawczych stanowiących podstawę wniosku habilitacyjnego zostały zaprezentowane w formie referatu i komunikatów zjazdowych (**załącznik nr 5**, pozycje **II.K.3**, **III.B.9**, **III.B.11** i **III.B.13**) na krajowych i międzynarodowych konferencjach tematycznych.

OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. CYKLU PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

4.1. WPROWADZENIE –

– FARMAKOGNOSTYCZNE I ANALITYCZNE PRZESŁANKI PROJEKTU HABILITACYJNEGO

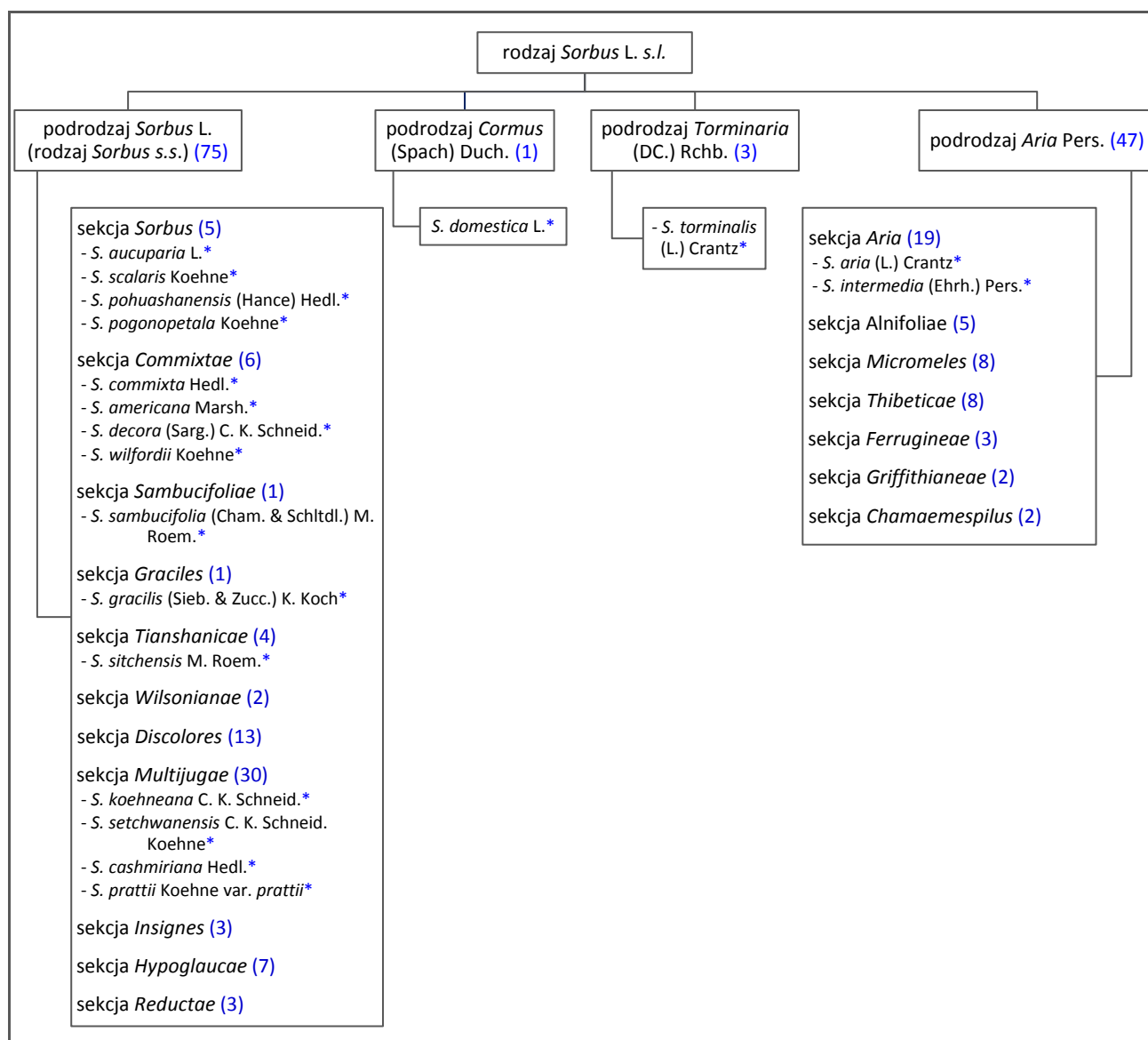
Prowadzone w ostatnich latach badania epidemiologiczne sugerują istnienie ścisłego związku pomiędzy dietą bogatą w substancje pochodzenia roślinnego, przede wszystkim w związki polifenolowe, a obniżonym ryzykiem zapaadalności na tzw. choroby cywilizacyjne, stanowiące jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny, m.in. choroby układu krążenia, choroby neurodegeneracyjne i autoimmunologiczne, nowotwory, otyłość i choroby metaboliczne, a także ze spowolnionym procesem starzenia (Arts i Hollman, 2005; Huxley i Neil, 2003; Hollman i wsp., 2010; Graf i wsp., 2005; Riboli i Norat, 2003; Scalbert i wsp., 2005). Fakt ten doprowadził do stworzenia koncepcji żywności funkcjonalnej i suplementacji diety preparatami roślinnymi, jako elementami terapii wspomagającej lub profilaktyki chorób cywilizacyjnych (Alissa i Ferns, 2012; Cencic i Chingwaru, 2010). Znaczenie polifenoli roślinnych w tym ujęciu wynika z ich wielokierunkowego wpływu na organizm człowieka, w tym na aktywność szeregu układów enzymatycznych i białek funkcjonalnych, sygnalizację komórkową oraz na procesy detoksykacji ksenobiotyków (Middleton

i wsp., 2000). W znacznej części efekty te związane są z regulującym wpływem polifenoli roślinnych na procesy oksydacyjno-redukcyjne zachodzące w żywych komórkach, w tym przede wszystkim na utrzymywanie lub restytucję równowagi redox zaburzonej w wyniku rozwoju tzw. stresu oksydacyjnego (Pandey i Rizvi, 2009). Stres oksydacyjny, objawiający się nadmierną aktywnością i/lub zwiększonym stężeniem reaktywnych form tlenu – RFT (wolnych rodników, nadtlenu wodoru, tlenu singletowego, etc.) w wyniku zachwiania naturalnej równowagi pomiędzy ich wytwarzaniem a neutralizacją przez endogenne systemy antyoksydacyjne, wymieniany jest, jako jeden z głównych czynników patogennych w etiologii większości chorób cywilizacyjnych (Melo i wsp., 2011; Soga i wsp., 2012). W terapii i profilaktyce stresu oksydacyjnego polifenole roślinne pełnią rolę egzogennych antyoksydantów, które dzięki zróżnicowanym mechanizmom redox (bezpośredniej redukcji wolnych rodników – tzw. „zmiataniu”; inhibicji enzymów oksydacyjnych, np. oksydazy ksantynowej, oksydazy NAD(P)H, lipooksygenaz, cyklooksygenaz, etc.; chelatowaniu jonów metali zaangażowanych w aktywację enzymów oksydacyjnych lub propagację wolnorodnikowych reakcji łańcuchowych) mają zdolność efektywnego wspomagania endogennego systemu ochronnego organizmu (Mladěnka i wsp., 2010). Odkrycie zjawiska stresu oksydacyjnego i jego wpływu na zdrowie człowieka wzbudziło znaczne zainteresowanie problematyką antyoksydantów, w tym antyoksydantów egzogennych, ich roli w leczeniu i profilaktyce, możliwej toksyczności, zasad ewentualnej suplementacji, źródeł pozyskiwania, etc. Skalę tego zainteresowania oddaje liczba pozycji literaturowych opublikowanych do roku 2010 – 150 000 pozycji – która to liczba systematycznie wzrasta o około 4 000 rocznie według serwisów Thomson Reuters Web of Knowledge (ISI Web of Knowledge) i US National Library of Medicine (MEDLINE i Pub-Med.). Obok wielu istotnych kierunków badań antyoksydantów pod kątem ich losów w organizmie (wchłaniania, metabolizacji, udziału metabolitów w całkowitej aktywności antyoksydacyjnej *in vivo*), jednym z wiodących kierunków badawczych jest analiza aktywności antyoksydacyjnej *in vitro* roślinnych surowców leczniczych, stosowanych w medycynie tradycyjnej lub oficjalnej, oraz poszukiwanie nowych, wydajnych źródeł naturalnych antyoksydantów, w tym polifenoli, które miałyby szansę znaleźć zastosowanie praktyczne w produkcji preparatów leczniczych, suplementów diety lub kosmetyków o właściwościach przeciwutleniających.

O sukcesie badań skринingowych nakierowanych na wskazanie nowych źródeł naturalnych przeciwutleniaczy decyduje już etap wstępnej selekcji materiału roślinnego, który powinien brać pod uwagę zarówno czynniki ekonomiczne (dostępność materiałowa), chemotaksonomiczne (prawopodobną obecność antyoksydantów, w tym polifenoli), jak i te związane z zastosowaniem odpowiednich surowców jako środków spożywczych (potencjalna nietoksyczność) i/lub leczniczych (wskazówki podłoża antyoksydacyjnej aktywności biologicznej). Opierając się na opisanych niżej przesłankach uwzględniających ww. teoretyczne determinanty, postawiłam tezę o prawdopodobnej znacznej wartości ekstraktów *Sorbus* jako źródeł naturalnych polifenolowych antyoksydantów. Podjęte przeze mnie badania zmierzały do wyselekcjonowania grupy surowców *Sorbus* o najwyższym potencjale w tym zakresie, scharakteryzowania czynników odpowiedzialnych za ich aktywność antyoksydacyjną oraz opracowania procedur standaryzacji wybranych surowców i ekstraktów.

Rodzaj *Sorbus* L. *sensu lato* (s.l.) – jarzab – należy do najliczniejszych i najbardziej zróżnicowanych rodzajów sklasyfikowanych w obrębie rodziny Rosaceae i podrodziny Maloideae. W najszerszym ujęciu, obok około 80-ciu podstawowych gatunków diploidalnych ($2n = 34$), rodzaj *Sorbus* s.l. obejmuje również do 170-ciu mikrogatunków, najczęściej poliploidalnych ($2n = 51$ lub $2n = 68$), taksonów apomiktycznych pochodzenia mieszańcowego (Aldasoro i wsp., 2004; Phipps i wsp., 1990). Według najnowszego piśmiennictwa, w obrębie rodzaju *Sorbus* s.l. wyróżnia się cztery podrodzaje: podrodzaj *Sorbus* L. – rodzaj *Sorbus sensu stricto* (s.s.), grupujący do 100-130 taksonów, w tym *S. aucuparia* L., jako gatunek modelowy; podrodzaj *Cormus* (Spach) Duch., obejmujący jeden gatunek – *S. domestica* L.; podrodzaj *Aria* Pers., grupujący do 100 gatunków, w tym *S. aria* (L.) Crantz, jako gatunek modelowy; oraz podrodzaj *Torminaria* (DC.) Rchb., obejmujący trzy taksony, w tym modelowy gatunek *S. torminalis* (L.) Crantz (Aldasoro i wsp., 2004). W granicach dwóch najliczniejszych podrodzajów wyróżnia się ponadto kolejne podjednostki taksonomiczne – 11 sekcji w przypadku podrodzaju *Sorbus* (McAllister, 2005) i 7 sekcji dla podrodzaju *Aria* (Aldasoro i wsp., 2004) (schemat klasyfikacji rodzaju *Sorbus* s.l. z uwzględnieniem gatunków stanowiących przedmiot projektu habilitacyjnego przedstawia rycina A1). Zasięg naturalnego występowania przedstawicieli rodzaju *Sorbus* s.l. to cała strefa klimatu umiarkowanego półkuli północnej z centrum największego zróżnicowania gatunkowego na terenach Azji środkowo-

wschodniej (około 150-ciu gatunków) i Europy (około 90-ciu gatunków). Na terenie Polski w stanie naturalnym spotykanych jest pięć gatunków *Sorbus*, w tym przede wszystkim występujący na całym obszarze kraju jarzab pospolity (*S. aucuparia*), oraz znacznie rzadziej obserwowane *S. aria* (jarzab mączny), *S. torminalis* (jarzab brekinia), *S. domestica* (jarzab domowy) i *S. chamaemespilus* (jarzab nieszpulkowy) (Seneta i Dolatowski, 2000).



Rycina A1. Taksonomia rodzaju *Sorbus* s.l. z wyszczególnieniem gatunków badanych w ramach projektu habilitacyjnego (*)
[w nawiasach podano liczbę podstawowych (dobrze zdefiniowanych) gatunków wg. McAllister (2005) i Aldasoro i wsp. (2004)].

Przedstawiciele rodzaju *Sorbus* s.l. mają stosunkowo duże znaczenie użytkowe – dostarczają jadalnych owoców i wartościowych surowców zielarskich, a także znajdują szerokie zastosowanie, jako atrakcyjne rośliny ozdobne o małych wymaganiach glebowych i klimatycznych, co decyduje o dużej dostępności materiałowej surowców pozyskiwanych z najpopularniejszych gatunków. Spośród licznych taksonów *Sorbus*, największe znaczenie spożywcze mają owoce gatunku *S. aucuparia* i jego odmian słodkoowocowych (np. *S. aucuparia* var. *edulis* Dieck), gatunków *S. domestica*, *S. torminalis* i *S. latifolia* (Lam.) Pers., a także owoce *S. americana* Marsh., *S. aria*, *S. intermedia* (Ehrh.) Pers., *S. scopulina* Greene i *S. sitchensis* M. Roem (Faciola, 1998). Dojrzałe owoce *Sorbus* mogą być spożywane na surowo lub przetwarzane na wiele sposobów (dżemy, konfitury, wina, likiery, etc.), przetwory wykazują przy tym dużą trwałość z uwagi na zawartość kwasu sorbowego (kwasu 2,4-heksadienowego, E 200), hamującego rozwój grzybów i licznych szczepów bakterii, (Bell i wsp., 1959). Poza aktywnością przeciwdrobnoustrojową (Rauha i wsp., 2000; Watanabe i wsp., 2003), owoce *Sorbus* (*S. aucuparia*, *Sorbi fructus*) wykazują działanie diuretyczne, wspomagające

przemianę materii i hepatoprotekcyjne (Borkowski i wsp. 1994; Ożarowski, 1976; Strzelecka i Kowalski, 2000; Podlewski i Chwalibogowska-Podlowska, 2005), a także hamują aktywność hialuronidazy, zmniejszają przepuszczalność kapilar i mogą być stosowane, jako skuteczne środki wazoprotekcyjne (Golubenko, 1967). Z uwagi na obecność skondensowanych proantocyjanidyn, suszone owoce różnych gatunków *Sorbus* (*S. aucuparia*, *S. domestica*, *S. torminalis*) stanowią łagodnie działające środki ściągające i przeciwbiegunkowe (Strzelecka i Kowalski, 2000; Termentzi i wsp., 2006; Tsitsa-Tzardi i wsp., 1992), natomiast obecność w niedojrzałych i/lub świeżych owocach *Sorbus* znacznych ilości kwasu parasorbowego [(2S)-2-metylo-2,3-dihydropiran-6-onu] warunkuje ich działanie przeczyszczające (Strzelecka i Kowalski, 2000; Podlewski i Chwalibogowska-Podlowska, 2005).

Poza owocami, w lecznictwie tradycyjnym zastosowanie znajdują także kwiaty (kwiatostany), liście oraz kora przedstawicieli rodzaju *Sorbus* s.l. W Polsce największe znaczenie mają kwiaty *S. aucuparia* (*Sorbi flos*) stosowane, jako środki diuretyczne, przeciwzapalne i słabo przeczyszczające (Ożarowski, 1976). Liście i kora wielu gatunków *Sorbus*, m.in. *S. aucuparia*, *S. domestica*, *S. torminalis* i *S. americana*, wykazują przede wszystkim działanie ściągające, przeciwbiegunkowe i przeciwzapalne, choć dostępne są również dane dokumentujące stosowanie tych surowców, jako środków spazmolitycznych, diuretycznych i antydiabetycznych (Kültür, 2007; McCune i Johns, 2002). Duże znaczenie w lecznictwie krajów azjatyckich ma kora *S. commixta* Hedl., tradycyjnie wykorzystywana, jako lek spazmolityczny, przeciwzapalny, przeciwastmatyczny, kardio- i hepatoprotekcyjny oraz regulujący przemianę materii i metabolizm lipidów, które to zastosowania znalazły potwierdzenie w badaniach farmakologicznych (Kang i wsp., 2005 i 2007; Sohn i wsp., 2005a,b; Yin i wsp., 2005; Yu i wsp., 2009 i 2011). Oprócz wpływu na gospodarkę lipidową, surowce z rodzaju *Sorbus* s.l. [kora i owoce *S. decora* (Sarg.) C.K. Schneid., *S. aucuparia*, *S. commixta* i *S. domestica*] wykazują także istotny wpływ na procesy trawienia, wchłaniania i metabolizm węglowodanów, co skutkuje możliwością efektywnego zastosowania tych surowców w terapii cukrzycy, szczególnie cukrzycy typu II i schorzeń cukrzyco-zależnych, w tym retinopatii cukrzycowej, nadciśnienia i otyłości (Grussu i wsp., 2011; Guerrero-Analco i wsp., 2010; Kültür, 2007; Lee i wsp., 2012; Termentzi i wsp. 2008b; Vianna i wsp. 2011). W lecznictwie tradycyjnym, wyciągi z liści *S. aucuparia*, owoców *S. sambucifolia* Roem. i kory *S. commixta* były zalecane również w terapii niektórych rodzajów nowotworów, głównie nowotworów gruczołu krokowego i jelita grubego, a aktywność przeciwnowotworowa tychże wyciągów została częściowo potwierdzona w testach *in vitro* indukcji apoptozy i aktywności antyproliferacyjnej w stosunku do licznych linii komórek nowotworowych, w tym ludzkich komórek raka jelita grubego HT-29 i białaczki limfoblastycznej HL-60 (Goun i wsp., 2002; Yoshizawa i wsp., 2000a,b).

Częściowa zbieżność kierunków tradycyjnego stosowania z chorobami o podłożu oksydacyjnym, a także wzmianki o obecności polifenoli w surowcach z rodzaju *Sorbus* s.l., w sposób naturalny zainspirowały badania aktywności antyoksydacyjnej i zawartości związków polifenolowych w tych surowcach, w tym również badania stanowiące przedmiot mojego projektu habilitacyjnego. Do chwili opublikowania wyników moich prac, stosunkowo najlepiej udokumentowana była aktywność owoców *Sorbus*, w tym przede wszystkim owoców *S. aucuparia*, jej odmian słodkoowocowych i mieszańców hodowlanych (Ganhão i wsp., 2010; Hukkanen i wsp., 2006; Kähkönen i wsp., 1999 i 2001; Korotkova i wsp., 2003; Kylli i wsp., 2010; Wojdyło i Oszmiański, 2009) oraz owoców *S. domestica* (Egea i wsp., 2010; Ölschlager i wsp., 2004; Termentzi i wsp., 2006). Poza owocami, analizie aktywności przeciwutleniającej poddano również korę *S. americana* i *S. commixta* (Acuña i wsp., 2002; Bae i wsp., 2007; Lee i wsp., 2006; McCune i Johns, 2002). W testach inhibicji autooksydacji linoleinianu metylu wykazano m.in., że aktywność antyoksydacyjna *in vitro* ekstraktów z owoców *S. aucuparia*, wyrażona w procentach inhibicji (88-98%), jest porównywalna lub nawet wyższa niż aktywność wielu cenionych owoców, znanych jako silne przeciwutleniacze, m.in. owoców aronii (*Aronia mitschurinii*, 93-94%), żurawiny (*Vaccinium oxycoccus*, 87-96%), borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*, 62-92%), borówki brusznicy (*V. vitis idaea*, 91-96%), czarnej porzeczki (*Ribes nigrum*, 13-83%) czy dzikiej róży (35%) (Kähkönen i wsp., 1999 i 2001). Wojdyło i Oszmiański (2009) zaobserwowali, że sok z owoców *S. aucuparia* wykazuje również silną aktywność przeciwwolnorodnikową w stosunku do kationorodnika ABTS^{•+} [TEAC (EC₅₀) = 6.4 mmol Troloxu[®]/100 ml soku] i aktywność redukującą jony Fe³⁺ (FRAP = 2.1 mmol Troloxu[®]/100 ml), oraz że aktywność ta jest wyższa niż odpowiednia aktywność soków z owoców pigwowca (*Chaenomeles japonica*, TEAC = 4.9 mmol Troloxu[®]/100 ml, FRAP = 1.1 mmol Troloxu[®]/100 ml), głogu (*Crataegus laevigata*, TEAC = 4.2 mmol Troloxu[®]/100 ml, FRAP = 1.3

mmol Troloxu[®]/100 ml) i rokitnika (*Hippophaë rhamnoides*, TEAC = 1.8 mmol Troloxu[®]/100 ml, FRAP = 0.7 mmol Troloxu[®]/100 ml). Podobnie Termentzi i wsp. (2006) udokumentowali, że aktywność przeciwrodnikowa najaktywniejszych frakcji ekstraktu metanolowego z owoców *S. domestica* w stosunku do rodnika DPPH (EC_{50} = 0.34-0.59 g frakcji *n*-butanolu/g DPPH) i rodnika wodoronadtlenkowego $HOO^{\bullet}$ (metoda chemiluminescencyjna, CL IC_{50} = 0.79-1.26 μ g frakcji dichlorometanu, eteru dietylowego lub octanu etylu/ml) jest porównywalna z aktywnością Troloxu[®] (DPPH EC_{50} = 0.18 g/g DPPH; CL IC_{50} = 2.50 μ g/ml), syntetycznego analogu witaminy E. Z kolei McCune i Johns (2002) wykazali, że suchy ekstrakt metanolowy z kory *S. americana* należy do najsilniejszych antyoksydantów wśród surowców roślinnych stosowanych w leczeniu tradycyjnym Ameryki Północnej. Aktywność przeciwrodnikowa ekstraktu z kory *S. americana* w stosunku do rodnika DPPH (EC_{50} = 15.8 μ g ekstraktu/ml), anionrodnika ponadtlenkowego $O_2^{\bullet-}$ (18.4% inhibicji) i rodników nadtlenkowych $ROO^{\bullet}$ generowanych przez AAPH (16.7% inhibicji) okazała się być porównywalna z aktywnością ekstraktu czarnej herbaty i wyższa od aktywności większości testowanych ekstraktów, w tym m.in. ekstraktu z kory *Prunus serotina*, liści *Juniperus virginiana*, korzeni *Solidago canadensis*, czy korzeni *Taraxacum officinale*. Warto zwrócić uwagę na stosunek zdolności do zmiatania rodnika DPPH ekstraktu z kory *S. americana* a ekstraktu z korzeni *Acorus calamus* (EC_{50} = 75.7 μ g ekstraktu/ml). Ten ostatni ekstrakt został poddany analizie także przez Acuña i wsp. (2002) i w teście DPPH wykazał on aktywność (EC_{50} = 46.7 μ g ekstraktu/ml) znacząco wyższą niż ekstrakt z owoców *S. americana* (EC_{50} = 114.0 μ g ekstraktu/ml). Porównanie wyników otrzymanych przez obydwie ww. zespoły badawcze prowadzi do wniosku, że aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z kory *S. americana* jest około 12-razy wyższa niż aktywność ekstraktów z owoców tego gatunku, co pozwala przypuszczać, że najaktywniejszych antyoksydacyjnie surowców *Sorbus* należy poszukiwać wśród innych niż owoce materiałów roślinnych. Podobnie wysoką aktywnością przeciwutleniającą co ekstrakt z kory *S. americana* odznacza się ekstrakt z kory *S. commixta* – Bae i wsp. (2007) udokumentowali, że aktywność ekstraktu z tego surowca w teście DPPH (EC_{50} = 15.2-18.2 μ g /ml) nie jest różna od aktywności BHA (butylohydroksyanizolu, E320, EC_{50} = 14.4 μ g/ml), zaś aktywność przeciwrodnikowa w stosunku do anionrodnika ponadtlenkowego $O_2^{\bullet-}$ (IC_{50} = 13.6-14.8 μ g/ml) jest znacząco wyższa niż obserwowana dla BHA (IC_{50} = 32.4 μ g /ml). Udowodniono ponadto, że ekstrakt z kory *S. commixta*, zarówno surowy ekstrakt etanolowy, jak i hydrolizat enzymatyczny otrzymany przy udziale glikozydaz, efektywnie zmniejszają stężenie reaktywnych form tlenu generowanych pod wpływem naświetlania ludzkich fibroblastów promieniowaniem UVB, ograniczają fototoksyczne uszkodzenia komórek skóry i zwiększają ich przeżywalność o około 40% w stosunku do próby kontrolnej (Bae i wsp., 2007). Z kolei Lee i wsp. (2006), w badaniach *in vivo*, zaobserwowali wyraźny efekt hepatoprotekcyjny ekstraktu metanolowego z kory *S. commixta* oraz jego frakcji octanu etylu, wynikający z inhibicji peroksydacji lipidów w hepatocytach szczurów poddanych działaniu etanolu.

Wyżej opisane dane doświadczalne, choć bardzo obiecujące, nie są niestety wystarczające do pełnego scharakteryzowania wartości ekstraktów *Sorbus*, jako naturalnych antyoksydantów, głównie z powodu niewielkiej puli surowców poddanych badaniom oraz generalnego braku w większości z dotychczas opublikowanych prac (Ganhão i wsp., 2010; Hukkanen i wsp., 2006; Kähkönen i wsp., 1999 i 2001; Korotkova i wsp., 2003; Kylli i wsp., 2010; Ölschläger i wsp., 2004) porównania aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów *Sorbus* z aktywnością wzorcowych przeciwutleniaczy, zarówno naturalnych, np. kwercetyny, katechiny, kwasu kawowego, czy kwasu askorbinowego jak i syntetycznych antyoksydantów stosowanych w przemyśle, np. BHA, BHT (butylohydroksytoluenu; 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu, E321) lub TBHQ (*tert*-butylohydrochinonu, E319), co stanowi jeden z warunków koniecznych prawidłowej oceny wartości surowca roślinnego, jako źródła naturalnych antyoksydantów z perspektywą potencjalnego zastosowania przemysłowego. W związku z tym, porównawcza analiza aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów *Sorbus* i znanych antyoksydantów wzorcowych stała się jednym z podstawowych moich celów badawczych w przedłożonym do oceny projekcie habilitacyjnym.

Aktywność antyoksydacyjna surowców roślinnych jest najczęściej determinowana przez obecność związków polifenolowych (Balasundram i wsp., 2006; Prakash i Kumar, 2011; Soobrattee i wsp., 2008). Wartość surowca roślinnego, jako źródła naturalnych antyoksydantów o potencjalnym znaczeniu przemysłowym, zależy od kilku podstawowych czynników, m.in. od dostępności surowca (zakresu naturalnego występowania, ewentualnej łatwości uprawy),

poziomu aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów, zawartości związków polifenolowych (antyoksydantów) w surowcu i ekstraktach oraz możliwej do uzyskania wydajności ekstrakcji. Ostatnie dwa czynniki mają przede wszystkim duże znaczenie ekonomiczne i mogą ostatecznie przesądzać o szansach surowca roślinnego na wprowadzenie do produkcji preparatów przeciwtleniających. Według danych literaturowych, średnio jedynie do 15% surowców roślinnych poddawanych badaniom przesiewowym wykazuje zawartość polifenoli wyższą niż 5% masy surowca wysuszonego (s.m.) w przeliczeniu na kwas galusowy (GAE), a tylko 5-8% surowców zawartość wyższą niż 10% GAE oraz odpowiadającą tym wartościom odpowiednio wysoką aktywność antyoksydacyjną (Borneo i wsp., 2009; Cai i wsp., 2004; Kähkönen i wsp., 1999; Liu i wsp., 2008; Surveswaran i wsp., 2007; Tawaha i wsp., 2007) i może być tym samym uważane za wydajne źródła tych związków. Niewielka ilość znanych surowców roślinnych, obiektywnie bogatych w naturalne polifenolowe antyoksydanty, decyduje o potrzebie podjęcia dalszych badań w celu poszerzenia tej listy. Dla potrzeb prezentowanego projektu habilitacyjnego, zawartość polifenoli w masie surowca wysuszonego nie mniejszą niż 10% GAE przyjąłam za warunek progowy uznania surowca za wartościowe źródło naturalnych antyoksydantów (polifenoli). Jak wynika z dotychczasowych badań, zawartość polifenoli w owocach *Sorbus* kształtuje się w granicach 0.14-1.01% GAE w świeżej masie (Ganhão et al., 2010; Hukkanen i wsp., 2006) i 1.87-2.09% GAE w surowcu wysuszonym (Kähkönen i wsp., 1999 i 2001), a zatem nie spełnia tego warunku. Stosunkowo niska zawartość polifenoli jest charakterystyczna dla większości owoców stanowiących element diety człowieka i nawet dla najbogatszych w związki polifenolowe owocach aronii (*Aronia melanocarpa*, 4.0-4.2% s.m.), bazyńny czarnej (*Empetrum nigrum*, 5.1-5.2% s.m.) i borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*, 3.0-3.8% s.m.) nie przekracza 6% GAE w surowcu wysuszonym (Kähkönen i wsp., 1999 i 2001). W przypadku roślin drzewiastych, znacznie wyższej zawartości polifenoli, a tym samym wyższej aktywności antyoksydacyjnej, należy spodziewać się w innych organach, np. kwiatach (kwiatostanach), liściach lub korze (Kähkönen i wsp., 1999). Uwzględniając powyższe, w ramach projektu habilitacyjnego badaniom przesiewowym aktywności antyoksydacyjnej i zawartości polifenoli postanowiłam poddać kwiatostany i/lub liście wybranych 18-stu gatunków z rodzaju *Sorbus* s.l. (rycina A1), w tym wszystkich gatunków wymienianych w literaturze, jako gatunki lecznicze, stosowane w tradycyjnym lub oficjalnym leczeniu.

W badaniach aktywności przeciwtleniającej substancji roślinnych, jako miarę zawartości polifenoli przyjmuje się zwykle wynik analizy prowadzonej spektrofotometryczną metodą Folina-Ciocalteu (FC) (Folin i Ciocalteu, 1927; Singleton i Rossi, 1965). Reakcja FC jest reakcją redox, a zatem wielkość sygnału pomiarowego zależy od wartości potencjału redox analitów, z czego wynika niebezpieczeństwo uzyskiwania z jednej strony zawyżonych wyników zawartości polifenoli w przypadku próbek zawierających niepolifenolowe składniki redukujące, jak np. cukry, aminy aromatyczne, aminokwasy, kwas askorbinowy, etc., a z drugiej strony niebezpieczeństwo niedoszacowania zawartości polifenoli o słabych właściwościach redukujących, np. flawonoidów o zablokowanych grupach hydroksylowych (Prior i wsp., 2005). Stąd też właściwa charakterystyka frakcji polifenolowych surowców roślinnych o właściwościach antyoksydacyjnych powinna obejmować nie tylko oznaczenia całkowitej zawartości tych związków w materiale roślinnym metodą FC, lecz także jakościową i ilościową analizę profili związków polifenolowych, w tym izolację i/lub ustalenie struktury poszczególnych analitów wraz z analizą ich aktywności przeciwtleniającej i określeniem wpływu na całkowitą aktywność surowca. W przypadku surowców z rodzaju *Sorbus* s.l. tak kompleksowe badania zostały jak dotąd przeprowadzone jedynie dla owoców *S. aucuparia* (Hukkanen i wsp., 2006), a częściowo także dla owoców *S. domestica* (Termentzi i wsp., 2006, 2008a i 2009) oraz kory *S. commixta* (Na i wsp., 2002). Szczególnie zwraca uwagę fakt występowania ograniczonej ilości danych na temat składu chemicznego surowców z rodzaju *Sorbus* s.l., pomimo dość szerokiego ich wykorzystywania do celów spożywczych i leczniczych. Spośród licznych gatunków *Sorbus*, jedynie sześć zostało do dnia dzisiejszego poddanych dokładniejszym badaniom składu polifenoli, tzn. badaniom izolacyjnym z określeniem struktury metodami spektralnymi lub badaniom chromatograficznym z wykorzystaniem sprzężonych technik wysokiej rozdzielczości, jak np. HPLC-PDA lub HPLC-MSⁿ. Dostępne dane dotyczą m.in. owoców i kwiatostanów *S. aucuparia* (Gil-Izquierdo i Mellenthin, 2001; Häkkinen i Auriola, 1998; Hukkanen i wsp., 2006; Jerzmanowska i Kamecki, 1973; Youssef, 1998), owoców i kory *S. commixta* (Bhat i wsp., 2009; Bylka i wsp., 1977; Na i wsp., 2002), owoców *S. domestica* (Termentzi i wsp., 2008a i 2009), liści *S. aucuparia* f. *pendula* (Pavlii i Makarova, 1967), liści *S. torminalis* (Tsitsa-Tzardi i wsp., 1992), a także kwiatostanów i liści *S. quercifolia* (*S. hybrida*) (Pavlii i Makarova, 1971). Poszerzenie stanu wiedzy na temat fitochemii polifenoli rodzaju *Sorbus* s.l., stanowiące jeden z

głównych celów mojego projektu habilitacyjnego, jest zatem istotne nie tylko dla pełnej charakterystyki surowców *Sorbus*, jako źródeł naturalnych przeciwutleniaczy, ale stanowić może także punkt wyjścia dla przeprowadzenia analizy chemotaksonomicznej tego trudnego do klasyfikacji botanicznej rodzaju.

Newralgicznym elementem analiz surowca roślinnego jest dobór odpowiednich metod badawczych mających na celu jakościową i/lub ilościową ocenę jego składu chemicznego i aktywności. Specyficzna trudność badań fitochemicznych wynika ze złożoności i niepowtarzalności (oryginalności) składu chemicznego ekstraktów roślinnych pochodzących z różnych taksonów lub organów roślinnych. Stwarza to konieczność, co najmniej adaptacji znanych metod analitycznych do nowych surowców roślinnych z uwzględnieniem np. optymalnych metod ekstrakcji lub czasu inkubacji, a nierzadko wymaga opracowania całkowicie nowych procedur analitycznych. W przypadku surowców *Sorbus*, do momentu publikacji badań stanowiących przedmiot przedłożonego do oceny projektu habilitacyjnego, dostępnych było wprawdzie kilka metod (HPLC) prezentujących analizę polifenoli w owocach, w tym m.in. również w owocach *Sorbus* (Gil-Izquierdo i Mellenthin, 2001; Kähkönen i wsp., 2001; Häkkinen i Auriola, 1998; Häkkinen i wsp., 1999a,b; Hukkanen i wsp., 2006; Mattila i wsp., 2006; Määtä-Riihinen i wsp., 2004; Termentzi i wsp. 2008a; Wojdyło i Oszmiański, 2009), jednak tylko trzy z ww. metod (Häkkinen i wsp., 1999a,b; Mattila i wsp., 2006) zostały poddane testom walidacyjnym, w tym jedynie Häkkinen i wsp. (1999a) walidację prowadzili w oparciu o ekstrakty *Sorbus*, osiągając niestety niesatysfakcjonujące wyniki (odzysk analityków na poziomie 63%). Większość z opisanych metod to procedury HPLC-PDA fingerprint o wyjątkowo wysokich całkowitych czasach elucji (50-95 min) (Gil-Izquierdo i Mellenthin, 2001; Kähkönen i wsp., 2001; Hukkanen i wsp., 2006; Mattila i wsp., 2006; Termentzi i wsp. 2008a) lub niskiej rozdzielczości (Häkkinen i Auriola, 1998; Määtä-Riihinen i wsp., 2004). Po uwzględnieniu faktu, że w kwiatostanach i liściach *Sorbus* można spodziewać się większego zróżnicowania związków polifenolowych niż obserwowane w owocach, opracowanie i walidacja nowych metod HPLC o wysokiej rozdzielczości, mających służyć analizie jakościowej i ilościowej profili polifenolowych surowców z rodzaju *Sorbus s.l.*, stało się kolejnym z priorytetów przedłożonego do oceny projektu habilitacyjnego.

4.2. CEL NAUKOWY PROJEKTU HABILITACYJNEGO

Celem przedłożonej rozprawy habilitacyjnej była ocena wartości surowców roślinnych pozyskiwanych z rodzaju *Sorbus s.l.*, w tym przede wszystkim nie badanych wcześniej kwiatostanów i liści wybranych gatunków *Sorbus*, jako źródeł naturalnych polifenolowych antyoksydantów. Podstawowe wątki badawcze realizowane w ramach projektu to:

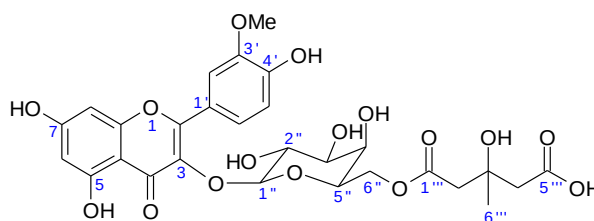
- izolacja, badania strukturalne i analiza aktywności antyoksydacyjnej *in vitro* głównych składników polifenolowych modelowych gatunków *Sorbus*, w tym *S. aucuparia* L., *S. aria* (L.) Crantz, *S. intermedia* (Ehrh.) Pers. i *S. torminalis* (L.) Crantz;
- badania przesiewowe aktywności antyoksydacyjnej i zawartości polifenoli w kwiatostanach, liściach i/lub owocach 18-stu gatunków *Sorbus* ze wskazaniem najaktywniejszych i najbogatszych w polifenole surowców;
- charakterystyka aktywności antyoksydacyjnej suchych ekstraktów z najaktywniejszych surowców *Sorbus* w relacji do zawartości polifenoli i z uwzględnieniem porównawczych analiz aktywności wzorcowych antyoksydantów polifenolowych;
- opracowanie, optymalizacja i walidacja metod analitycznych stosowanych w badaniach aktywności antyoksydacyjnej i zawartości polifenoli.

4.3. OSIĄGNIĘTE WYNIKI I ZNACZENIE PRACY

4.3.1. Izolacja i badania strukturalne składników polifenolowych surowców z rodzaju *Sorbus* s.l.

Badaniom izolacyjnym poddałam wyciągi metanolowo-wodne (70%, v/v) z surowców wybranych na podstawie znaczących różnic w obserwowanym profilu chromatograficznym (HPLC), tzn. kwiatostanów *S. aucuparia*, *S. torminalis* i *S. intermedia*, oraz liści *S. aria*. Izolację prowadziłam metodami grawitacyjnej chromatografii kolumnowej z wykorzystaniem szeregu adsorbentów i złoż o charakterze sit molekularnych (poliamid SC6, celuloza, sefadex LH-20). Wyodrębniane frakcje były kontrolowane pod względem aktywności antyoksydacyjnej w stosunku do rodnika DPPH. Identyfikacji strukturalnej wyizolowanych związków dokonałam w oparciu o analizę widm spektralnych (UV, FAB/LSI/ HR MS, ^1H i ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY, HMBC, HMQC, TOCSY) oraz produktów hydrolizy kwasowej i alkalicznej (analiza jakościowa aglikonów i składników cukrowych, w tym analiza konfiguracji absolutnej cukrów).

W wyniku przeprowadzonych prac, z badanych surowców roślinnych wyodrębniłam i zidentyfikowałam **42** związki polifenolowe reprezentujące **20** różnych struktur z grup kwasów fenolowych (pochodnych kwasu kawowego), flawonów i flawonoli, w tym **28** związków wyodrębniłam po raz pierwszy z badanych gatunków, zaś **10** związków wyizolowałam po raz pierwszy z rodzaju *Sorbus* s.l. (Tabela A1). Szczególną wartość naukową stanowi izolacja z kwiatostanów *S. torminalis* **torminalozydu** (rycina A2) – nowego związku naturalnego, **3-O-[6''-O-(3'''-hydroksy-3'''-metyloglutaroiło)]- β -D-galaktopiranozydu izoramnetyny**, flawonoidu acylowanego rzadko spotykaną w przyrodzie pochodną kwasu glutarowego:



Rycina A2. Torminalozyd – 3-O-[6''-O-(3'''-hydroksy-3'''-metyloglutaroiło)]- β -D-galaktopiranozyd izoramnetyny
– nowy związek naturalny wyizolowany z kwiatostanów *S. torminalis*.

Uwzględniając wydajność izolacyjną poszczególnych związków oraz wyniki testu DPPH przeprowadzonego metodą TLC wg. Parejo i wsp. (2004) ustaliłam, że głównymi antyoksydantami surowców stanowiących materiał izolacyjny są glikozydy kwercetyny, w tym przede wszystkim dominująca izokwercetryna (3-O- β -D-glukopiranozyd kwercetyny) oraz w dalszej kolejności hiperozyd (3-O- β -D-galaktopiranozyd kwercetyny), awikularyna (3-O- α -L-arabinofuranozyd kwercetyny), rutyna, 3-O- β -soforozyd kwercetyny i 3-O- β -D-glukopiranozydo-7-O- α -L-ramnopiranozyd kwercetyny, a także izomeryczne kwasy monokawoilochinowe, w tym głównie kwas chlorogenowy (5-O-kawoilochinowy). Związki te zostały w dalszej części pracy poddane szczegółowym badaniom aktywności antyoksydacyjnej *in vitro* z wykorzystaniem modeli chemicznych (patrz publikacje H.3, H.7, H.8 i H.9).

Dane dotyczące izolacji i identyfikacji strukturalnej polifenoli *Sorbus* zostały opublikowane (publikacje H.1, H.3, H.5, H.8) oraz zaprezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych (patrz załącznik nr 5, pozycje III.B.9, III.B.11 i III.B.13).

4.3.2. Opracowanie, optymalizacja i walidacja stosowanych metod analitycznych

4.3.2.1. Optymalizacja procedur testowych do badań aktywności antyoksydacyjnej

Jednym z podstawowych problemów w badaniach aktywności antyoksydacyjnej surowców roślinnych jest brak ustalonych kryteriów standaryzujących stosowane testy analityczne oraz powstające z tego powodu trudności w bezpośrednim porównaniu wyników uzyskiwanych przez różne laboratoria (Prior i wsp., 2005). Wyniki najpopularniejszych chemicznych, bezkomórkowych testów aktywności przeciwrodnikowej, w tym testów DPPH i ABTS (TEAC), przedstawiane zwykle, jako procentowy spadek początkowego stężenia rodnika lub odpowiadający tej wartości spadek

absorbancji roztworu testowego, zależne są tym samym od przyjętych warunków początkowych reakcji, w tym początkowych stężeń reagentów oraz czasu inkubacji próbki. W przypadku testu TEAC III (ABTS/K₂S₂O₈) warunki analizy opracowane przez Re i wsp. (1999) i powszechnie akceptowane jako procedura standardowa, wymagają zastosowania kalibrowanego roztworu kationorodnika ABTS^{•+} o absorbancji początkowej 0.700 ± 0.020 AU ($\lambda = 734$ nm), wyrażenia wyników w postaci parametru EC₅₀ (efektywnego stężenia analitu pozwalającego na obniżenie początkowej absorbancji roztworu reakcyjnego o 50%, IC₅₀) oraz w formie równoważników Troloxu[®]. Jedyne różnice w procedurach TEAC III stosowanych przez różne laboratoria wynikają z różnych czasów inkubacji (4–20 min) (Re i wsp., 1999; Stratil i wsp., 2006). W przypadku testu DPPH stosowane procedury analityczne różnią się drastycznie, zarówno w kwestii początkowego stężenia rodnika (19.5 μ M – 84.2 mM), czasu inkubacji (5–120 min), jak i sposobu wyrażania wyników (procent zmiatania, EC₅₀/IC₅₀) (Burda i Oleszek, 2001; Stratil i wsp., 2006; Surveswaran i wsp., 2007), co znacznie utrudnia lub wręcz uniemożliwia porównanie danych otrzymanych przez różne zespoły badawcze. Szczególnie problematyczne wydaje się stosowanie ultrakrótkich czasów inkubacji (5–10 min), co może powodować znaczne niedoszacowanie aktywności analitów, których szybkość reakcji z DPPH jest niska (Molyneux, 2004).

Tabela A1. Związki polifenolowe wyodrębnione z surowców *Sorbus s.l.* w ramach projektu habilitacyjnego.

Lp.	Związek ^a	<i>S. aucuparia</i> (kwiatostany) ^b	<i>S. intermedia</i> (kwiatostany) ^b	<i>S. torminalis</i> (kwiatostany) ^b	<i>S. aria</i> (liście) ^b
1.	kwercetyna	•	▲		
2.	seksangularetyna	•	▲		
3.	3-O- β -D-glukopiranozyd kwercetyny (izokwercytryna)	•	•	▲	▲
4.	3-O- β -D-galaktopiranozyd kwercetyny (hiperozyd)	▲	▲	▲	▲
5.	3-O- α -L-arabinofuranozyd kwercetyny (awikularyna)		▲		
6.	3-O- β -D-glukopiranozyd izoramnetyny		▲	▲	▲
7.	3-O- β -D-galaktopiranozyd izoramnetyny			▲	
8.	3-O-[6"-O-(3'''-hydroksy-3'''-metyloglutarolo)]- β -D-galaktopiranozyd izoramnetyny (tormalnozyd)			▲	
9.	3-O- β -D-glukopiranozyd seksangularetyny (sorbarozyd)	•	▲	▲	
10.	3-O- β -D-glukopiranozyd limocytryny			▲	
11.	7-O- β -D-glukopiranozyd chryzoeriolu			▲	
12.	3-O- β -D-glukopiranozyd kemferolu (astragalina)		•		▲
13.	3-O- β -D-glukopiranozyd-7-O- α -L-ramnopiranozyd kwercetyny				▲
14.	3-O- β -D-glukopiranozyd-7-O- α -L-ramnopiranozyd kemferolu				▲
15.	3-O-(6"-O- α -L-ramnopiranozyd)- β -D-glukopiranozyd kwercetyny (rutyna)	•	•		▲
16.	3-O-(2"-O- β -D-glukopiranozyd)- β -D-glukopiranozyd kwercetyny (3-O- β -soforozyd kwercetyny)	•	•		
17.	3-O-(2"-O- β -D-glukopiranozyd)- β -D-glukopiranozyd kemferolu (3-O- β -soforozyd kemferolu)	▲			
18.	kwas chlorogenowy (5-O-kawoilochinowy)	•	▲	▲	▲
19.	kwas neochlorogenowy (3-O-kawoilochinowy)	•		▲	▲
20.	kwas kryptochlorogenowy (4-O-kawoilochinowy)	•			
Publikacja źródłowa		H.1^c	H.3	H.5	H.8

^a Związki 4-8 i 10-14 (oznaczone na niebiesko) zostały wyizolowane z rodzaju *Sorbus s.l.* po raz pierwszy, w tym związek 8 został wyodrębniony i opisany, jako nowy związek naturalny. ^b Znaczniki (•,▲) symbolizują fakt wyizolowania danego związku z odpowiedniego surowca, w tym związki oznaczone (▲) zostały wyodrębnione z danego gatunku po raz pierwszy. ^c Z powodu istnienia wcześniejszych prac z tego zakresu (Jerzmanowska i Kamecki, 1973), izolacja polifenoli z kwiatostanów *S. aucuparia* została zaprezentowana wyłącznie w formie komunikatów zjazdowych (załącznik nr 5, pozycje III.B.9 i III.B.11), za wyjątkiem seksangularetyny (2), której izolację i dane spektralne przedstawiono w publikacji H.1.

Uwzględniając powyższe, w ramach prezentowanej rozprawy przeprowadziłam analizy kinetyki reakcji wyciągów *Sorbus* (dla *S. aucuparia*, jako gatunku modelowego) oraz szeregu wzorcowych polifenoli (kwercetyny, hiperozydu, rutyny, kwasu chlorogenowego i Troloxu[®]) z rodnikiem DPPH, kationorodnikiem ABTS^{•+} oraz odczynnikiem FRAP ustalając czasy inkubacji konieczne do osiągnięcia stanu równowagi termodynamicznej poszczególnych reakcji (patrz publikacja H.2). Początkowe stężenia rodników zostały przyjęte wg. Re i wsp. (1999), jako odpowiadające absorbancji 0.700 ± 0.030 AU, zarówno w teście TEAC III ($\lambda = 734$ nm), jak i w teście DPPH ($\lambda = 517$ nm). Wyniki zostały zaprezentowane w postaci parametrów EC₅₀ (IC₅₀) w jednostkach stężenia (μ g/ml) oraz w równoważnikach Troloxu[®], co umożliwiło dokonanie porównania otrzymanych danych z dużą częścią danych literaturowych. Z uwagi na fakt, że nawet niewielkie różnice w początkowej absorbancji roztworów rodników (mieszczące się w kalibracyjnym zakresie

± 0.030 AU) mogą w sposób istotny wpływać na wartości EC_{50} wyznaczane dla analitów o podobnej aktywności antyoksydacyjnej (co zostało zaobserwowane np. dla suchych ekstraktów z niektórych surowców *Sorbus*), zaproponowałam w tym przypadku dodatkowe przeliczenie pierwotnych wartości EC_{50} na wartości znormalizowane (odpowiadające absorbancji 0.700 AU), korzystając z faktu stałości współczynników stechiometrycznych reakcji, a tym samym proporcjonalności początkowej absorbancji (stężeń) roztworów rodników oraz wartości EC_{50} . Zastosowana metoda normalizacji wyników testów DPPH i TEAC III została zaprezentowana w **publikacji H.9**.

4.3.2.2. Optymalizacja i walidacja metod HPLC-UV i HPLC-PDA analizy polifenoli *Sorbus*

Specyfika badań surowców roślinnych wynika m.in. z faktu oryginalności składu chemicznego różnych gatunków i organów roślinnych, stąd też warunkiem koniecznym dokładnych i precyzyjnych analiz produktów roślinnych jest właściwa adaptacja stosowanych metod analitycznych do charakteru badanego materiału. Realizacja założeń prezentowanego projektu habilitacyjnego wymagała opracowania i optymalizacji niezależnych procedur analiz HPLC umożliwiających pełną charakterystykę polifenolowych analitów *Sorbus*, w tym oznaczenie całkowitej zawartości głównych grup związków (flawonoidów i izomerów kwasu chlorogenowego) oraz analizę fingerprint profili jakościowych i ilościowych badanych surowców.

4.3.2.2.1. Metoda HPLC-UV oznaczania całkowitej zawartości flawonoidów – procedura podstawowa

Analiza zawartości aglikonów flawonoidowych w zhydrolizowanych wyciągach roślinnych po rozdziale HPLC jest szybką i dokładną metodą oznaczania całkowitej zawartości flawonoidów w badanym materiale (Merken i Beecher, 2000). Pomimo ograniczenia liczby analitów poprzez hydrolizę, efektywny rozdział złożonych mieszanin aglikonów flawonoidowych na najczęściej stosowanych kolumnach typu C18 stanowi znaczny problem analityczny, szczególnie w przypadku występowania obok siebie aglikonów o podobnej charakterystyce podstawienia pierścieni A/B układu flawonu grupami hydroksylowymi, która to charakterystyka w dużym stopniu determinuje ich retencję w układzie faz odwróconych (Repollés i wsp., 2006; Wang i Huang, 2004). Z taką sytuacją mamy do czynienia w przypadku surowców z rodzaju *Sorbus s.l.*, szczególnie kwiatostanów gatunków reprezentujących podrodzaje *Sorbus* i *Aria*, w których, jak wykazały wyniki prac izolacyjnych prowadzonych w ramach przedłożonego projektu (patrz p. 4.3.1), występują pochodne czterech podstawowych aglikonów flawonoidowych, w tym kwercetyny (QU) oraz trzech dalszych aglikonów o identycznej charakterystyce hydroksylacji pierścieni A/B, tj. kemferolu (KA), izoramnetyny (IS) i seksangularetny (SX, 8-metoksykemferolu), generujących pary krytyczne dla rozdziału RP-HPLC. Z uwagi na fakt, że SX jest stosunkowo rzadko spotykana w przyrodzie, w literaturze opisano jak dotąd jedynie kilka metod HPLC pozwalających na jej oznaczenie w mieszaninie innych aglikonów (Ferrerres i wsp., 1991; Martos i wsp., 1997; Soler i wsp., 1995), metody te nie gwarantowały jednak uzyskania dobrej rozdzielczości pików ($R_s > 1.50$) w rozsądnym czasie analizy ($t < 30$ min). Z tego względu, w ramach prezentowanej rozprawy podjęłam się opracowania nowej, efektywnej metody RP-HPLC-UV rozdziału i oznaczania ilościowego ww. czterech aglikonów flawonoidowych. Optymalizacji poddałam skład fazy ruchomej, w tym zawartość modyfikatora organicznego, rodzaj stosowanego kwasu, sposób ekstrakcji i przygotowania próbek, a także wielkość stosowanych kolumn C18. Najlepsze wyniki uzyskałam przy zastosowaniu kolumny o długości 250 mm (Lichrosphere 100; 5 μ m, 4.6 mm i.d.; Merck), dwuskładnikowego eluentu (metanol-0.5% kwas ortofosforowy) w układzie elucji gradientowej i przepływu 1.0 ml/min (25°C). Zoptymalizowana metoda, umożliwiająca całkowity rozdział par krytycznych SX/KA i KA/IS ($R_s \geq 2.00$) w krótkim czasie ($t < 20$ min), została poddana pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi ICH (2005) poprzez wyznaczenie parametrów kalibracji, limitów detekcji i oznaczalności, stabilności analitów oraz precyzji i dokładności. Testy walidacyjne wykazały, że metoda jest precyzyjna, dokładna, wysoce czuła i umożliwia detekcję oraz oznaczenie zawartości analitów przy niskich stężeniach granicznych. Uzyskanie efektywnego rozdziału SX i pozostałych trzech popularnych aglikonów umożliwia zastosowanie opracowanej metody nie tylko, jako procedury standaryzacji surowców z rodzaju *Sorbus*, ale także innych surowców roślinnych o podobnym profilu aglikonów flawonoidowych. Optymalizacji i walidacji opracowanej metody oraz jej możliwym zastosowaniom praktycznym została poświęcona **publikacja H.1**.

4.3.2.2.2. Metoda HPLC-UV oznaczania całkowitej zawartości flawonoidów – procedura uniwersalna

Wyniki prac izolacyjnych prowadzonych w ramach niniejszego projektu dla *S. torminalis* oraz wcześniejsze doniesienia literaturowe dotyczące *S. torminalis*, *S. domestica* i *S. commixta* (Bylka i wsp., 1977; Termentzi i wsp., 2008a; Tsitsa-Tzardi i wsp., 1992) wskazywały na możliwość występowania w surowcach pozyskiwanych z tych gatunków co najmniej 9-10-ciu aglikonów flawonoidowych, w tym najpopularniejszych w przyrodzie: kwercetyny (QU), kemferolu (KA), izoramnetyny (IS), mirycetyny (MY) apigeniny (AP) i luteoliny (LU), oraz ich metoksyłowych pochodnych: chryzoeriolu (CH), seksangularetyny (SX), limocytryny (LM) i akacetyny (AC). Należy podkreślić, że mimo licznych opublikowanych prac z zakresu analizy HPLC aglikonów flawonoidowych (Crozier i wsp., 1997; Haghi i Hatami, 2010; Hasler i wsp., 1990; Justensen i wsp., 1998; Mattilla i wsp., 2000; Merken i Beecher, 2000; Repollés i wsp., 2006; Wang i Huang, 2004; Zhao i wsp., 2008), w tym również pracy stanowiącej część prezentowanej rozprawy (H.1), jak dotąd nie była znana metoda pozwalająca na jednoczesny rozdział (przynajmniej do linii podstawowej) dwóch najważniejszych par krytycznych, tj. par QU/LU oraz grupy AP/KA/IS. Z uwagi na identyczną charakterystykę hydroksylacji pierścieni A/B, dodatkowy problem stanowi obecność pozostałych wymienionych flawonoidów metoksyłowanych, która powoduje powiększenie grupy krytycznej AP/KA/IS o trzy kolejne związki, tj. SX, CH i LM. W związku z tym, w ramach prezentowanego projektu badawczego podjęłam się opracowania nowej metody HPLC pozwalającej na efektywny rozdział ww. złożonej mieszaniny analitów, co wymagało przeprowadzenia pogłębionej optymalizacji procedury chromatograficznej ukierunkowanej na jednoczesne zwiększenie selektywności fazy ruchomej i sprawności kolumny chromatograficznej w stosunku do dotychczas stosowanych i opisywanych w literaturze.

Optymalizacji poddałam skład fazy ruchomej, w tym zawartość modyfikatorów organicznych, pH, rodzaj stosowanego kwasu, sposób przygotowania i oczyszczania próbek, a także rodzaj wypełnienia i wielkość stosowanych kolumn chromatograficznych. Testom zostały poddane kolumny RP-18 o wypełnieniu całkowicie porowatym (średnica ziaren 3-5 μm), typu fused-core (ziarno powierzchniowo porowate o średnicy 2.7 μm), a także kolumny wypełnione modyfikowaną krzemionką typu RP-Amide i RP-Phenyl. Najlepsze wyniki zostały uzyskane przy zastosowaniu kolumny RP-18 typu fused-core (Ascentis Express C18, 2.7 μm , 150 $\times$ 4.6 mm i.d., Supelco), trójskładnikowego eluentu (acetonitryl-tetrahydrofuran-0.5% kwas ortofosforowy, pH=2.0) w układzie elucji gradientowej i dla przepływu fazy ruchomej 1 ml/min (30°C). Zoptymalizowana metoda umożliwia jednoczesną analizę 10-ciu aglikonów flawonoidowych (QU, LU, AP, KA, IS, CH, SX, LM, AC i MY) z bardzo wysoką rozdzielczością ($R_s > 2.30$) i w czasie ≈ 30 min (łącznie z czasem przemywania i równoważenia kolumny). Opracowany profil gradientu okazał się być uniwersalny i umożliwiający analizę analitów również na tradycyjnych kolumnach o wypełnieniu całkowicie porowatym i średnicach ziaren 3-5 μm (testowane kolumny: Ascentis C18, 3 μm , 150 $\times$ 4.6 mm i.d., Ascentis C18, 5 μm , 250 $\times$ 4.6 mm i.d., Supelco), który to typ kolumn jest najczęściej stosowany w analizie i standaryzacji surowców oraz leków roślinnych. W tym przypadku jednak uzyskane rozdzielczości były nieco niższe (min. $R_s = 1.8-2.0$) a czasy analizy dłuższe (45-55 min). Należy podkreślić, że nawet uwzględniając zastosowanie mniej sprawnych kolumn, opracowana przeze mnie metoda gwarantuje uzyskanie najwyższej rozdzielczości z dotychczas opublikowanych w literaturze i może być tym samym stosowana nie tylko do oznaczeń ilościowych, lecz także do badań chemotaksonomicznych składu aglikonów flawonoidowych w różnych surowcach roślinnych, w których to badaniach wysoka rozdzielczość pików jest warunkiem koniecznym poprawnej identyfikacji poszczególnych analitów, szczególnie w przypadku stosowania detekcji UV-Vis i detektora PDA. Ponadto, dzięki zastosowaniu kolumny typu fused-core, uzyskana wysoka rozdzielczość nie była okupiona znacznym wzrostem ciśnienia wstecznego, co jest zwykle obserwowane dla kolumn całkowicie porowatych o średnicach ziaren $< 3 \mu\text{m}$. Analizy były prowadzone przy ciśnieniach wstecznych w zakresie 4100-4300 psi, co umożliwia zastosowanie opracowanej metody również na tradycyjnych aparatach HPLC o limicie ciśnieniowym 6000 psi, w tym praktycznym limicie dla pracy ciągłej 4500 psi.

Przydatność zoptymalizowanej metody do analizy surowców roślinnych została sprawdzona na przykładzie popularnych surowców leczniczych o złożonym składzie aglikonów, tj. liści *Ginkgo biloba* i *Betula pendula*, a także szeregu surowców z rodzaju *Sorbus s.l.*, w tym kwiatostanów *S. torminalis*. Odpowiednie testy wykazały, że opracowana metoda jest uniwersalna i wysoce selektywna, zarówno w stosunku do analizowanych aglikonów, jak i w stosunku do pozos-

tałych pików matrycy roślinnych, co może umożliwić równoczesne oznaczenie innych polifenoli obecnych w zhydrolizowanych ekstraktach, jak np. kwasów fenolowych czy C-glikozydów flawonoidowych.

Opracowana metoda została poddana pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi ICH (2005) poprzez wyznaczenie parametrów kalibracji, limitów detekcji i oznaczalności, stabilności analitów oraz precyzji i dokładności. Testy walidacyjne wykazały, że metoda jest precyzyjna, dokładna, wysoce czuła i umożliwia detekcję oraz oznaczenie zawartości analitów przy granicznych stężeniach znacznie niższych niż dotąd publikowane w literaturze dla detekcji UV.

Tym samym należy uznać, że zaproponowana przeze mnie metoda stanowi istotny postęp w dziedzinie analizy HPLC aglikonów flawonoidowych, a jej opracowanie jest jednym z największych osiągnięć przedłożonej rozprawy habilitacyjnej. Analizowane aglikony są składnikami wielu surowców roślinnych posiadających monografie w europejskiej i polskiej farmakopei, a standaryzacja większości z nich opiera się w dalszym ciągu na czaso- i pracochłonnej metodzie analizy kolorymetrycznej. Pełna walidacja opracowanej nowej metody HPLC umożliwia jej zastosowanie, jako uniwersalnej, dokładnej i czułej metody standaryzacji surowców flawonoidowych stosowanych w lecznictwie. Optymalizacji i walidacji opracowanej metody oraz jej możliwym zastosowaniom praktycznym została poświęcona **publikacja H.10** oraz referat wygłoszony na konferencji tematycznej (**załącznik nr 5**, pozycja **II.K.3**).

4.3.2.2.3. Analiza HPLC izomerów kwasu chlorogenowego

Dla ustalenia wpływu polifenoli na aktywność antyoksydacyjną surowców z rodzaju *Sorbus s.l.* konieczna była konfrontacja wyników przesiewowych testów aktywności z całkowitą zawartością tych związków w materiale roślinnym, w tym przede wszystkim z zawartością proantocyjanidyn, flawonoidów i izomerów kwasu chlorogenowego, które to grupy polifenoli stanowią dominujące składniki chemiczne badanych surowców, jak ustalono na podstawie wyników prac izolacyjnych (patrz p. 4.3.1) i dostępnych danych literaturowych. Oznaczenia całkowitej zawartości proantocyjanidyn przeprowadzono spektrofotometryczną metodą **Portera i wsp. (1986)**, zaś całkowitą zawartość flawonoidów oznaczono wyżej opisaną podstawową metodą HPLC opracowaną w ramach prezentowanego projektu. Z uwagi na fakt, że znane spektrofotometryczne metody oznaczania kwasów fenolowych, w tym najpopularniejsza metoda Arnova, dają wyniki zwykle znacznie zawyżone w stosunku do rzeczywistej zawartości tych związków w próbkach, niezbędnym było opracowanie szybkiej i dokładnej metody HPLC, umożliwiającej wybiórcze oznaczenie izomerów kwasu chlorogenowego w badanym materiale. Opracowana przeze mnie metoda umożliwia szybki (22 min, łącznie z czasem przemycania i równoważenia kolumny) rozdział na klasycznej kolumnie RP-18 [Lichrosphere 100 (5 µm, 250 × 4.6 mm i.d., Merck)] dominujących pochodnych kwasu chlorogenowego (izomerycznych kwasów monokawoilochinowych) oraz ich niezależne oznaczenie w ekstraktach i surowcach z rodzaju *Sorbus s.l.* Stosunkowo krótki czas rozdziału analitów uzyskałam poprzez zastosowanie kombinacji podwyższonej temperatury kolumny (40°C), zwiększonej prędkości przepływu fazy ruchomej (1.2 ml/min) oraz przyspieszonej elucji innych składników wyciągów oznaczającej rezygnację z całkowitego rozdziału składników matrycy eluujących po pikach kwasów chlorogenowych, np. flawonoidów.

Kwas chlorogenowy i jego pochodne mają udokumentowaną, szeroką aktywność biologiczną, w tym aktywność antyoksydacyjną, stanowiąc składniki warunkujące działanie biologiczne wielu surowców leczniczych (**Clifford, 1999**). Z uwagi na prostotę i krótki czas analizy, opracowana metoda stanowi zatem dobrą alternatywę dla opisanych w literaturze, czasochłonnych (45-60 min) analiz typu fingerprint oraz metod spektrofotometrycznych i może być wykorzystywana do analiz surowców bogatych w ww. kwasy. Wykorzystanie opracowanej metody do oznaczania zawartości izomerów kwasu chlorogenowego w surowcach z rodzaju *Sorbus* zostało przedstawione w **publikacji H.4**.

4.3.2.2.4. Analiza HPLC-PDA-fingerprint polifenoli w surowcach i ekstraktach *Sorbus*

Wstępne testy optymalizacyjne dla metody fingerprint oznaczania polifenoli w rodzaju *Sorbus s.l.* przeprowadziłam z wykorzystaniem kolumny Lichrosphere 100 (5 µm, 250 × 4.6 mm i.d., Merck), opracowując wyjściowy profil elucji gradientowej w układzie acetonitryl-0.5% kwas ortofosforowy (pH=2.0), przy przepływie 0.9 ml/min (25°C) i w czasie 50 min. Opracowana metoda wyjściowa została wykorzystana do oznaczenia zawartości 9-ciu polifenolowych metabolitów wtórnych w suchych ekstraktach z liści *S. aria* (patrz **publikacja H.8**).

Z uwagi na stosunkowo długi czas rozdziału i rozdzielczość oszacowaną, jako niewystarczającą dla celów analizy polifenoli w innych surowcach *Sorbus*, metoda wyjściowa wymagała dalszej optymalizacji. W tym celu przeprowadziłam testy sześciu kolumn chromatograficznych typu RP-18 o różnej rozdzielczości i selektywności, w tym tradycyjnych kolumn całkowicie porowatych o wypełnieniach 3-5- μm i długości 150-250 mm oraz nowoczesnych kolumn typu fused-core (ziarno 2.7- μm) i długości 75-150 mm. Najlepszy rozdzielczości polifenolowych składników ekstraktów *Sorbus* został uzyskany, podobnie jak w przypadku analizy aglikonów flawonoidowych, z zastosowaniem kolumny typu fused-core. Jednak z uwagi na zróżnicowane właściwości chromatograficzne badanych związków, uzyskanie wysokiej rozdzielczości pików było możliwe przy zastosowaniu krótszej kolumny (Ascentis Express C18, 2.7 μm , 75 $\times$ 4.6 mm i.d., Supelco) i większego przepływu fazy ruchomej (1.4 ml/min, 30°C), co spowodowało znacznie skrócenie czasu analizy (25 min, łącznie z czasem przemywania i równoważenia kolumny). Taki czas analizy należy do najkrótszych z opisywanych w literaturze dla złożonych mieszanin polifenoli o podobnym składzie jakościowym, analizowanych z użyciem tradycyjnych aparatów HPLC [najczęściej spotykane czasy analizy wahają się w granicach 45-60 min (Harnly i wsp., 2007; Merken i Beecher, 2000)].

Opracowana przeze mnie metoda HPLC-fingerprint umożliwia rozdzielanie około 100 różnych polifenoli z grup kwasów fenolowych pochodnych kwasu *p*-hydroksybenzoesowego, protokatechowego, *p*-kumarowego, kawowego (w tym kwasów kawoilochinowych), glikozydów flawonoidowych pochodnych flawonoli, flawonów i pochodnych flawanu, a także aglikonów flawonoidowych. Tak duża selektywność metody wynika z jednej strony z wysokiej sprawności zastosowanej kolumny chromatograficznej, przekładającej się na wysoką rozdzielczość, zaś z drugiej strony z możliwości wybiórczej analizy poszczególnych grup analitów przy różnych długościach fali detekcji (detekcja PDA). Metoda została poddana pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi ICH (2005) poprzez wyznaczenie parametrów kalibracji dla 11 wzorców zewnętrznych, limitów detekcji i oznaczalności, stabilności analitów oraz precyzji i dokładności. Zoptymalizowana i zwalidowana metoda została wykorzystana do analizy jakościowej i ilościowej polifenoli w ekstraktach *Sorbus* (patrz **publikacja H.9**). Z uwagi na wysoką selektywność metoda może być rekomendowana, jako efektywne i szybkie narzędzie do analizy związków polifenolowych w wielu surowcach roślinnych, szczególnie reprezentujących rodzinę Rosaceae, gdyż większość ze zidentyfikowanych analitów, w tym wszystkie substancje wzorcowe, stanowi często spotykane składniki tego rodzaju surowców.

4.3.3. Wstępne analizy aktywności antyoksydacyjnej surowców z rodzaju *Sorbus* s.l. w relacji do zawartości polifenoli – testy surowców modelowych

W celu wstępnego oszacowania zróżnicowania poziomów aktywności antyoksydacyjnej i zawartości polifenoli w surowcach z rodzaju *Sorbus* s.l., badaniom poddano kwiatostany, liście i owoce trzech gatunków modelowych dla poszczególnych podrodzajów, tj. *S. aucuparia*, *S. aria* i *S. torminalis* oraz gatunku hybrydowego – *S. intermedia*, będącego mieszańcem trzech wymienionych gatunków modelowych, klasyfikowanym w obrębie podrodzaju *Aria*. Uwzględniając fakt, że sposób prowadzenia ekstrakcji oraz rodzaj stosowanego rozpuszczalnika mogą w sposób znaczący wpływać na stopień ekstrakcji analitów i w konsekwencji na aktywność uzyskiwanych ekstraktów, w pierwszym etapie prac dokonano optymalizacji procesu ekstrakcji antyoksydantów z surowców *Sorbus*. Testy wydajności ekstrakcji prowadzono dla kwiatostanów, liści i owoców *S. aucuparia*, przyjmując wyniki analizy spektrofotometrycznej ekstraktów metodą Folina-Ciocalteu (Folin i Ciocalteu, 1927; Singleton i Rossi, 1965), jako estymatory całkowitej zawartości polifenoli i jednocześnie, jako wskaźniki ich aktywności redox, z uwagi na fakt, że mechanizm reakcji FC jest uważany za identyczny z występującym w licznych testach aktywności antyoksydacyjnej (Huang i wsp., 2005; Prior i wsp., 2005). Spośród testowanych metod ekstrakcji (24-godzinna maceracja w temperaturze pokojowej lub w temperaturze 40°C, ekstrakcja na gorąco, ekstrakcja ultradźwiękowa) i rozpuszczalników, najefektywniejszą procedurą ekstrakcji, zapewniającą maksymalizację odzysku polifenolowych antyoksydantów, okazała się klasyczna metoda ekstrakcji na gorąco (30 min) w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika – mieszaniny metanol(etanol)-woda (70:30, v/v). Zoptymalizowaną procedurę ekstrakcji zastosowano następnie we wszystkich kolejnych etapach badań.

Aktywność antyoksydacyjną surowców pozyskanych z *S. aucuparia*, *S. aria* i *S. intermedia* badałam trzema metodami *in vitro* o dominującym mechanizmie typu SET (single electron transfer), tj. metodami DPPH, TEAC III i FRAP

(patrz **publikacja H.2**), zaś aktywność surowców pozyskanych z *S. torminalis* i *S. aucuparia* analizowałam za pomocą ww. testów DPPH i TEAC III, oraz dodatkowo metodą o komplementarnym mechanizmie typu HAT (hydrogen atom transfer), tj. metodą inhibicji oksydacji kwasu linolenowego (patrz **publikacja H.7**), co pozwoliło na przeanalizowanie szerokiego spektrum aktywności badanych ekstraktów. Ten etap pracy był również poświęcony optymalizacji procedur testowych do warunków analizy ekstraktów *Sorbus* (patrz p. 4.3.2.1). Wybór chemicznych, bezkomórkowych modeli testowych stosowanych w ww. wstępnych, a także w późniejszych przesiewowych badaniach aktywności przeciwtłuszczowej *Sorbus* był podyktowany koniecznością przeprowadzenia analiz licznych próbek surowców (40 próbek w powtórzeniach) w krótkim czasie, umożliwiającym zapewnienie stałych warunków analizy.

Wyniki testów aktywności antyoksydacyjnej skonfrontowano z wynikami oznaczeń zawartości polifenoli, tj. całkowitą zawartością polifenoli oznaczoną metodą FC i wyrażoną w równoważnikach kwasu galusowego (GAE), oraz całkowitą zawartością polifenoli obliczoną, jako sumą zawartości proantocyjanidyn, flawonoidów i dominujących izomerów kwasu chlorogenowego, oznaczonych niezależnie metodą [Portera i wsp. \(1986\)](#), oraz metodami HPLC opracowanymi w ramach projektu habilitacyjnego (patrz p. 4.3.2.2.1 i 4.3.2.2.3). Poziomy zawartości polifenoli wyznaczone metodą FC i jako suma trzech grup związków dominujących były zbieżne oraz silnie, liniowo skorelowane ($r = 0.9840$, $p < 0.01$), co pozwoliło wykazać, że wyniki analizy FC stanowią bardzo dobry i dokładny estymator rzeczywistej zawartości związków polifenolowych w surowcach *Sorbus*. Zawartość ta wahała się w granicach 2.14–11.83% GAE w masie surowca wysuszonego, w zależności od rodzaju surowca: najwyższe wartości obserwowano dla kwiatostanów (5.75–11.83% GAE), nieco niższe dla liści (4.28–9.09% GAE), zaś najniższe dla owoców badanych gatunków (2.14–2.98% GAE). Założenie o zawartości polifenoli przekraczającej 10% GAE spełniały zatem tylko kwiatostany *S. aucuparia*, lecz liście tego gatunku oraz kwiatostany i liście hybrydowego *S. intermedia* wykazywały zawartości bliskie tej wartości, co prowadziło do wniosku, że najwydajniejszych źródeł polifenoli w obrębie rodzaju *Sorbus* s.l. należy poszukiwać wśród kwiatostanów i liści gatunków pokrewnych *S. aucuparia*, tj. reprezentujących podrodzaj *Sorbus* (rodzaj *Sorbus* s.s.).

Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała także istnienie statystycznie istotnych korelacji pomiędzy estymatorami aktywności antyoksydacyjnej oraz wynikami całkowitej zawartości polifenoli ($R^2 = 0.8097$ – 0.9810 , $p < 0.05$), a także zawartością poszczególnych grup polifenoli *Sorbus*, tj. proantocyjanidyn, flawonoidów i izomerów kwasu chlorogenowego ($R^2 = 0.7516$ – 0.9355 , $p < 0.05$), co potwierdziło dominujący wpływ polifenoli na aktywność antyoksydacyjną badanych surowców. Wyraźna korelacja pomiędzy wynikami oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej uzyskanymi metodami o komplementarnych mechanizmach SET i HAT ($r = 0.9799$ – 0.9831 , $p < 0.05$) świadczyła z kolei o potencjalnie uniwersalnym charakterze ekstraktów *Sorbus*, jako naturalnych antyoksydantów. Przeliczenie wyników oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej *S. aucuparia* z uwzględnieniem oznaczonej dla odpowiednich surowców zawartości polifenoli pozwoliło na przybliżone oszacowanie aktywności frakcji polifenoli, która to aktywność (EC_{50}/IC_{50} , $\mu\text{g/ml}$) w przypadku kwiatostanów i liści tego gatunku była porównywalna lub wyższa niż aktywność wzorcowych polifenoli, w tym kwercetyny, BHA, BHT, TBHQ i Troloxu[®]. Fakt ten stanowił impuls do pogłębionych badań aktywności surowców i suchych ekstraktów z surowców reprezentujących rodzaj *Sorbus* s.s.

4.3.4. Przesiewowe badania aktywności antyoksydacyjnej i zawartości polifenoli w kwiatostanach i liściach wybranych gatunków z rodzaju *Sorbus* s.s.

Dla kwiatostanów i liści 15-stu gatunków z rodzaju *Sorbus* s.s. wykonano serię analiz podstawowego profilu polifenolowego, tj. analizy całkowitej zawartości proantocyjanidyn, flawonoidów i głównych pochodnych kawoilochinowych (kwasów chlorogenowego i neochlorogenowego). Suma tak oznaczonych polifenoli wykazała bardzo dobrą zgodność i korelację ($r = 0.8551$, $p < 0.001$) z całkowitą zawartością polifenoli oznaczoną metodą FC. Wyniki oznaczeń zawartości polifenoli i aktywności antyoksydacyjnej, oznaczonej komplementarnymi metodami DPPH i inhibicji oksydacji kwasu linolenowego, poddano analizie skupień, która pozwoliła na wytypowanie grupy dziesięciu najaktywniejszych i najbogatszych w polifenole surowców tworzących wspólny klaster statystyczny (CL1), tj. kwiatostanów *S. aucuparia*, *S. commixta*, *S. decora*, *S. koehneana*, *S. gracilis*, *S. pohuashanensis* i *S. sitchensis* oraz liści *S. wilfordii*, *S. gracilis* i *S. pogonopetala*. Całkowita zawartość polifenoli w surowcach z tej grupy wynosiła 9.29–12.31% GAE masy surowca

wysuszonego ($10.90 \pm 0.91\%$ GAE), co lokowało je wśród najbogatszych w polifenole, znanych surowców roślinnych (Borneo i wsp., 2009; Cai i wsp., 2004; Liu i wsp., 2008; Surveswaran i wsp., 2007) i świadczyło o ich znacznej wartości, jako źródeł naturalnych antyoksydantów. Tezę tę wzmacniała obserwacja silnej korelacji liniowej pomiędzy wynikami aktywności oznaczonymi metodami o różnym mechanizmie reakcji ($r = -0.8089$, $p < 0.001$), dowodząca faktu, że badane surowce są antyoksydantami uniwersalnymi, aktywnymi w obydwu typach reakcji, SET i HAT. Omówione badania i wypływające z nich wnioski przedstawiono w **publikacji H.4**.

4.3.5. Analiza profili polifenolowych i aktywności antyoksydacyjnej suchych ekstraktów z kwiatostanów i liści gatunków *Sorbus* s.s. w relacji do aktywności substancji wzorcowych

Kierując się dostępnością odpowiednich surowców na terenie Polski, dokonałam wyboru ośmiu surowców spośród dziewięciu tworzących klastę CL1, z których zoptymalizowaną uprzednio metodą ekstrakcji (patrz p. 4.3.3), z wykorzystaniem optymalnego ekstraktanta (70% uwodniony metanol) zostały przygotowane odpowiednie ekstrakty alkoholowo-wodne, rozfrakcjonowane dalej poprzez ekstrakcję chloroformem, eterem dietylowym, octanem etylu i *n*-butanolem, a następnie wysuszone i/lub poddane liofilizacji. Otrzymane suche ekstrakty (frakcje polifenolowe) poddano analizie aktywności antyoksydacyjnej trzema metodami typu SET (DPPH, TEAC III, FRAP) i komplementarną metodą typu HAT (metodą inhibicji oksydacji kwasu linolenowego), oraz badaniom profilu polifenolowego. Wyniki badań aktywności, oznaczeń całkowitej zawartości polifenoli metodą FC, całkowitej zawartości proantocyjanidyn metodą Portera i wsp. (1986) oraz wyniki oznaczeń zawartości indywidualnych metabolitów fenolowych metodą HPLC fingerprint (patrz p. 4.3.2.2.4) poddano analizie statystycznej (ANOVA, analiza regresji i korelacji liniowej, w tym analiza korelacji cząstkowych), która wykazała, że za aktywność antyoksydacyjną typu SET ekstraktów *Sorbus* odpowiadają głównie proantocyjanidyny, flawonoidy i pochodne kwasu kawowego, w tym izomery kwasu chlorogenowego, a najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne i najwyższą zawartość polifenoli prezentują frakcje octanu etylu i *n*-butanolu. Silne powiązanie aktywności antyoksydacyjnej typu SET ekstraktów suchych z rodzajem rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji zostało wyjaśnione podobnym ilościowym i jakościowym profilem chemicznym ekstraktów i frakcji tego samego rozpuszczalnika. Aktywność antyoksydacyjna typu HAT ekstraktów *Sorbus* okazała się być z kolei zależna w głównej mierze od gatunku i rodzaju wyjściowego surowca, a najwyższy potencjał antyoksydacyjny zaobserwowano dla ekstraktów z liści *S. wilfordii*, w tym szczególnie dla ekstraktu metanolowo-wodnego oraz jego frakcji *n*-butanolu i pozostałości wodnej. Aktywność przeciwwolnorodnikowa (DPPH, TEAC III), zdolność redukująca (FRAP) oraz zdolność hamowania oksydacji kwasu linolenowego najaktywniejszych z suchych ekstraktów *Sorbus* okazała się być porównywalna lub wyższa ($p < 0.05$) od aktywności wzorcowych antyoksydantów syntetycznych (Trolox®, BHA, BHT, TBHQ) i niektórych antyoksydantów naturalnych (rutyna, kwas chlorogenowy). Wyższą aktywność antyoksydacyjną (wyrażoną w jednostkach masy) zaobserwowano dla małocząsteczkowych polifenoli, tj. kwercetyny, katechiny, kwasu kawowego i kwasu galusowego, co związane było częściowo z niższą masą molową tych związków w porównaniu do polifenoli *Sorbus*, wśród których, jak wspomniano wyżej, przeważają proantocyjanidyny, glikozydy flawonoidowe i kwasy kawoilochinowe o wyższym ciężarze cząsteczkowym. Należy jednak podkreślić, że w przypadku substancji wzorcowych korelacja ($R^2 = 0.4451\text{--}0.6806$, $p < 0.05$) pomiędzy parametrami aktywności antyoksydacyjnej (wartościami EC_{50}/IC_{50} , FRAP) wyznaczonymi różnymi metodami (np. DPPH/TEAC III, DPPH/FRAP, etc.), jest stosunkowo słaba, co wskazuje na istotne różnice w reaktywności wzorców w różnych typach reakcji redox. Z kolei dla ekstraktów *Sorbus* analogiczna korelacja parametrów aktywności była wyraźnie silniejsza ($R^2 = 0.8216\text{--}0.9289$, $p < 0.01$), co świadczy o bardziej zrównoważonym i tym samym uniwersalnym charakterze reaktywności tych ekstraktów w różnych typach reakcji redox, wynikającym prawdopodobnie z synergicznego wpływu składników o różnej budowie chemicznej i reaktywności na sumaryczną całkowitą aktywność ekstraktów.

Wyniki analiz HPLC-PDA-fingerprint potwierdziły fakt, że polifenole stanowią główne składniki badanych suchych ekstraktów. Najwyższą zawartość polifenoli obliczoną, jako suma wszystkich pików, zaobserwowano dla frakcji octanu etylu (15.3–46.0% s.m.) i *n*-butanolu (11.8–29.6% s.m.). Biorąc pod uwagę wydajność ekstrakcji uzyskaną dla poszczególnych rozpuszczalników, zastosowanie *n*-butanolu (wydajność 5–8% w stosunku do masy surowca wysuszonego) wydaje się być optymalnym sposobem koncentracji polifenoli surowców z rodzaju *Sorbus* s.s. Niektóre z ekstraktów

okazały się być szczególnie bogate w określone związki polifenolowe, np. ekstrakt *n*-butanolu z kwiatostanów *S. commixta* w kwas chlorogenowy (19.5% s.m.), ekstrakt octanu etylu z kwiatostanów *S. aucuparia* w izokwercytrynę (16.5% s.m.) i hiperozyd (9% s.m.), ekstrakt octanu etylu z kwiatostanów *S. decora* w hiperozyd (10.7% s.m.), zaś ekstrakt *n*-butanolu z liści *S. wilfordii* w 3-soforozyd kwercetyny (13.4% s.m.). Wymienione związki wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, w tym aktywność antyoksydacyjną (Chawla i wsp., 2005; Li i wsp., 2011; Piao i wsp., 2008; Sato i wsp., 2011; Silva i wsp., 2009; Yokoshira i wsp., 2008) i zostały dopuszczone do użytku jako dodatki do żywności, nutraceutyków oraz kosmetyków (izokwercytryna) w wielu krajach świata. Jednak pomimo szerokiego występowania w świecie roślinnym, znanych jest jedynie niewiele wydajnych źródeł naturalnych tych związków, co wskazuje na możliwość praktycznego wykorzystania ekstraktów *Sorbus* w celu ich izolacji. Omówione badania i wypływające z nich wnioski przedstawiono w **publikacji H.9**.

4.3.6. Optymalizacja terminu zbioru liści gatunków reprezentujących podrodzaj *Sorbus* s.s.

W trakcie badań surowców z podrodzaju *Sorbus* s.s. wykazałam, że liście niektórych gatunków należą do grupy surowców o najwyższej aktywności antyoksydacyjnej i zawartości polifenoli (patrz p. 4.3.4). Z uwagi na fakt, że zbiór liści jest potencjalnie możliwy podczas całego cyklu wegetacyjnego, postanowiłam dokonać optymalizacji terminu zbioru tego rodzaju surowców. Badania przeprowadziłam dla liści *S. aucuparia* zebranych w roku 2009 w trakcie pełnego cyklu wegetacyjnego (zbiór od maja do października w odstępach miesięcznych). Dla próbek liści oznaczyłam aktywność antyoksydacyjną dwiema metodami o komplementarnych mechanizmach reakcji, tj. metodą inhibicji oksydacji kwasu linolenowego (typ HAT) oraz metodą DPPH (typ SET), a także całkowitą zawartość polifenoli oraz profil głównych metabolitów wtórnych (całkowitą zawartość flawonoidów, kwasów chlorogenowych i proantocyjanidyn). Analiza statystyczna wyników wykazała, że optymalnym okresem zbioru liści, z punktu widzenia maksymalizacji aktywności i zawartości polifenoli, jest okres trzech miesięcy letnich, od czerwca do sierpnia. Zaobserwowane różnice aktywności i zawartości polifenoli w liściach *Sorbus* w trakcie całego okresu wegetacji były stosunkowo niewielkie, poza wczesną wiosną, kiedy wymienione parametry były zdecydowanie niższe niż obserwowane w miesiącach późniejszych. Tym samym udokumentowałam, że liście gatunków *Sorbus* stanowią dobrą alternatywę dla wykazujących wyższą aktywność antyoksydacyjną kwiatostanów z uwagi na większą dostępność surowca i wynikający stąd mniejszy ewentualny koszt produkcji ekstraktów w przypadku praktycznego zastosowania ww. surowców, jako źródeł naturalnych antyoksydantów. Omówione badania i wypływające z nich wnioski przedstawiłam w **publikacji H.6**.

3.4. PODSUMOWANIE OSIĄGNIĘĆ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ WNIOSKU HABILITACYJNEGO

Przedstawiony cykl publikacji **H.1–H.10** stanowi nowe, kompleksowe opracowanie fitochemiczno-analityczne wybranej grupy **34** surowców roślinnych pozyskanych z rodzaju *Sorbus* s.l. w aspekcie zawartości związków polifenolowych oraz aktywności antyoksydacyjnej *in vitro*. Najważniejsze osiągnięcia poznawcze ww. cyklu wymieniono poniżej.

- Wyselekcjonowanie grupy ośmiu surowców z rodzaju *Sorbus* s.l. (kwiatostanów i/lub liści gatunków z rodzaju *Sorbus* s.s.) o dużej dostępności na terenie Polski, wysokiej całkowitej zawartości polifenoli ($10.9 \pm 0.9\%$ GAE s.m.) oraz wysokiej wydajności produkcji zasobnych w polifenole ekstraktów ($29.5 \pm 2.4\%$ s.m. dla 70% ekstraktów metanolowo-wodnych). Zawartość związków polifenolowych w badanych surowcach została zweryfikowana w drodze kompleksowych analiz profili jakościowych i ilościowych prowadzonych metodami spektrofotometrycznymi, HPLC-UV i HPLC-PDA. Silna i statystycznie istotna korelacja pomiędzy parametrami aktywności antyoksydacyjnej *in vitro* a zawartością polifenoli pozwala myśleć o praktycznym zastosowaniu tych surowców jako wydajnych i ekonomicznie opłacalnych źródeł naturalnych polifenolowych antyoksydantów;
- Udokumentowanie silnej aktywności antyoksydacyjnej suchych ekstraktów z surowców z rodzaju *Sorbus* s.s. poprzez bezpośrednie porównanie ich potencjału przeciwutleniającego z aktywnością szeregu wzorcowych antyoksydantów stosowanych w przemyśle. Jak wykazano, suche ekstrakty metanolowo-wodne otrzymane z ww. ośmiu surowców, a szczególnie ich frakcje octanu etylu i *n*-butanolu, wykazują aktywność antyoksydacyjną *in vitro*

porównywalną lub wyższą od aktywności szeregu wzorcowych antyoksydantów syntetycznych (Trolox[®], BHA, BHT, TBHQ) i naturalnych (rutyna, kwas chlorogenowy), przy jednocześniej wyższej niż obserwowana dla substancji wzorcowych korelacji pomiędzy parametrami aktywności antyoksydacyjnej wyznaczonymi różnymi metodami, co może świadczyć o zrównoważonym i uniwersalnym charakterze reaktywności ekstraktów *Sorbus*, oraz wskazuje na ich duży potencjał jako naturalnych przeciwutleniaczy z perspektywą praktycznego zastosowania.

- Potwierdzenie za pomocą metod statystycznych, że za aktywność antyoksydacyjną ekstraktów *Sorbus*, szczególnie aktywność typu SET, odpowiadają analizowane związki polifenolowe, w tym przede wszystkim proantocyjanidyny, kwasy kawoilochinowe oraz flawonoidy.
- Izolacja z modelowych surowców *Sorbus* szeregu znanych, wzorcowych antyoksydantów, w tym kwercetyny, izo-kwercytryny, rutyny i kwasu chlorogenowego z wydajnością potwierdzającą ww. wnioski statystyczne.
- Izolacja z surowców *Sorbus* licznych rzadkich w przyrodzie flawonoidów, w tym 3-O- β -D-glukopiranozydów seksangularetryny, limocytryny i chryzoeriolu, oraz nowego związku naturalnego – torminalozydu – 3-O-[6"-O-(3'''-hydroksy-3'''-metyloglutaroiło)]- β -D-galaktopiranozydu izoramnetyny. Spośród wyizolowanych związków polifenolowych, dwadzieścia osiem zostało wyodrębnionych po raz pierwszy z badanych gatunków, zaś dziesięć po raz pierwszy z rodzaju *Sorbus s.l.*
- Przeprowadzenie po raz pierwszy badań fitochemicznych wszystkich analizowanych surowców za wyjątkiem owoców i kwiatostanów *S. aucuparia*.
- Opracowanie, optymalizacja i walidacja szeregu nowych metod HPLC-PDA jakościowej i ilościowej analizy polifenoli, w tym szczególnie uniwersalnej i selektywnej metody analizy zawartości dziesięciu aglikonów flawonoidowych w hydrolizatach roślinnych z użyciem kolumny typu fused-core oraz gradientu acetonitrylu i tetrahydrofuranu, która może być polecana, jako szybka, dokładna i czuła metoda standaryzacji surowców flawonoidowych stosowanych w lecznictwie. Warta polecenia jest także metoda HPLC-PDA-fingerprint szybkiej analizy profili polifenolowych surowych ekstraktów *Sorbus*, która z uwagi na uzyskaną dużą rozdzielczość pików może stanowić wygodne narzędzie do przeprowadzenia analiz chemotaksonomicznych rodzaju *Sorbus s.l.*, a także analiz innych surowców z rodziny Rosaceae o podobnym składzie jakościowym.

Reasumując, w toku przeprowadzonych badań potwierdzono tezę projektu habilitacyjnego o znacznej wartości surowców i ekstraktów *Sorbus*, jako źródeł naturalnych przeciwutleniaczy, szczególnie produktów pozyskiwanych z innych niż owoce materiałów roślinnych (kwiatostanów i liści). Otrzymane pozytywne wyniki wskazują na konieczność przeprowadzenia dalszych rozszerzonych badań aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów *Sorbus*, w tym przede wszystkim badań *in vitro* aktywności typu HAT w układach biologicznych oraz badań *in vivo*, a także analiz toksykologicznych i sensorycznych, które otwierałyby drogę do praktycznego zastosowania ekstraktów *Sorbus* w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym, etc. Obok analizy chemotaksonomicznej rodzaju *Sorbus s.l.*, wszystkie wymienione wyżej kierunki badawcze pozostają wśród moich planów naukowych na najbliższą przyszłość.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Poza pracami stanowiącymi podstawę wniosku habilitacyjnego (**H.1–H.10**), mój dorobek naukowy obejmuje **34** pozycje, w tym **15** oryginalnych artykułów pełnotekstowych (*załącznik nr 5*, pozycje **II.A.1–II.A.6**, **II.D.1–II.D.9**) prezentujących wyniki prac eksperymentalnych, **2** artykuły przeglądowe (*załącznik nr 5*, pozycje **II.D.10** i **II.D.11**) oraz **17** komunikatów i referatów zjazdowych zaprezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach tematycznych (*załącznik nr 5*, pozycje **II.K.1–II.K.3**, **III.B.1–III.B.14**).

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (**IF**, ISI Journal Citation Report) wszystkich prac oryginalnych (z roku opublikowania) wynosi **21.880** (w tym **7.205** dla artykułów spoza cyklu habilitacyjnego), zaś wartość punktacji **KBN/MNiSW** wynosi **340** (**142** dla artykułów spoza cyklu habilitacyjnego). Aktualny współczynnik **IF (2011)** prac oryginalnych jest równy **29.230** (**13.163** dla artykułów spoza cyklu habilitacyjnego), aktualna punktacja **KBN/MNiSW** wynosi **464** (**249** dla artykułów spoza cyklu habilitacyjnego). Poza pracami **H.1–H.10**, po uzyskaniu stopnia doktora opublikowałam łącznie **22** pozycje, w tym **10** publikacji oryginalnych (*załącznik nr 5*, pozycje **II.A.1–II.A.6**, **II.D.6–II.D.9**), **2** artykuły przeglądowe (*załącznik nr 5*, pozycje **II.D.10** i **II.D.11**) oraz **10** komunikatów i referatów zjazdowych (*załącznik nr 5*, pozycje **II.K.1–II.K.3**, **III.B.8–III.B.14**). Całkowita **liczba cytowań** prac oryginalnych według bazy **Scopus** wynosi **103** (**64** wg. Web of Science), zaś **index Hirscha** jest równy **6** (**5** wg. WoS).

5.1. Tematyka badawcza i główne wątki działalności naukowej

Podjęmowana przeze mnie tematyka badawcza i główne zainteresowania naukowe oscylują wokół aspektów strukturalnych, analitycznych i aktywności antyoksydacyjnej składników polifenolowych i triterpenoidowych roślinnych surowców leczniczych. Pogłębione badania fitochemiczne materiału roślinnego w kierunku identyfikacji strukturalnej ich składników chemicznych, ze szczególnym uwzględnieniem związków determinujących aktywność biologiczną, oraz opracowania dokładnych, precyzyjnych i specyficznych metod standaryzacji preparatów leczniczych w odniesieniu do odpowiednich markerów analitycznych, mają kluczowe znaczenie dla weryfikacji wartości terapeutycznej surowców stosowanych w medycynie tradycyjnej, przywrócenia dla lecznictwa surowców mniej popularnych lub zapomnianych, oraz wskazania nowych źródeł dla leku naturalnego, w tym wydajnych źródeł znanych związków o udokumentowanej aktywności farmakologicznej, a także nowych związków naturalnych. W połączeniu z badaniami farmakologicznymi *in vitro* i *in vivo* izolowanych związków i wyciągów roślinnych, badania fitochemiczne umożliwiają wprowadzenie do lecznictwa nowoczesnego, racjonalnego leku roślinnego.

Kierując się powyższymi przesłankami, dokonałam wyboru grupy surowców roślinnych stosowanych w większości w lecznictwie tradycyjnym, o fragmentarycznie rozpoznanym składzie chemicznym i nieopracowanej lub wymagającej usprawnienia metodyce standaryzacji, które stały się przedmiotem kilku projektów badawczych (*załącznik 5I*), w tym tematu doktorskiego, realizowanych przeze mnie, indywidualnie lub we współpracy naukowej, w latach 1995-2012 i obejmujących niżej wymienione główne wątki badawcze.

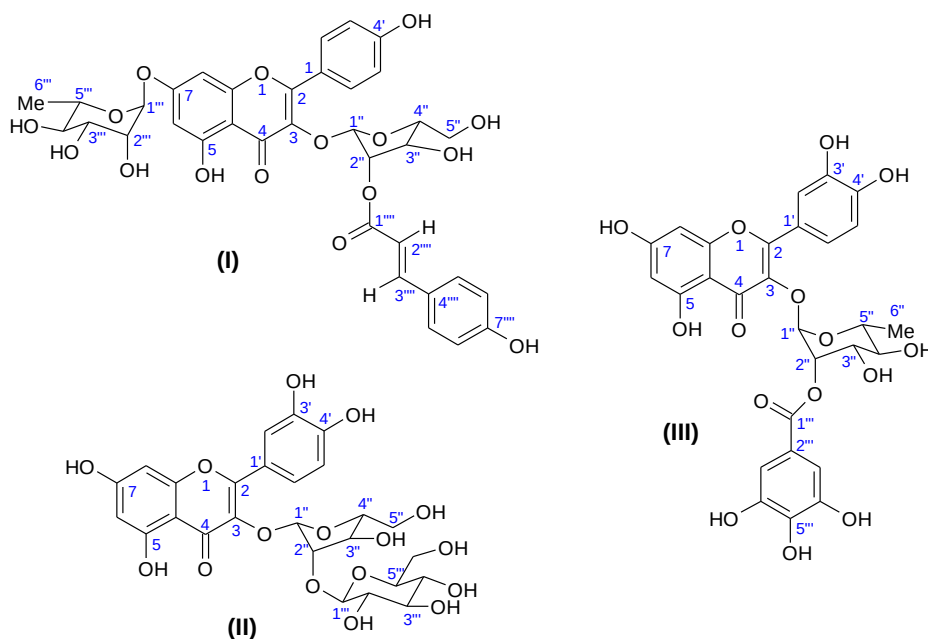
- Izolacja i określenie struktury składników biologicznie czynnych wybranych surowców roślinnych stosowanych w medycynie tradycyjnej, w tym ziela *Sedum aizoon* L. (*Crassulaceae*), kwiatów i liści *Prunus spinosa* L. (*Rosaceae*), kwiatostanów i liści *Prunus padus* L. (*Rosaceae*) oraz kwiatostanów i liści *Prunus serotina* Ehrh. (*Rosaceae*).
- Opracowanie, optymalizacja i walidacja metod HPLC jakościowej i/lub ilościowej analizy głównych składników czynnych, w tym związków flawonoidowych, fenolokwasów, steroli i kwasów triterpenowych w ww. surowcach oraz ziele *Chrysosplenium alternifolium* L. (*Saxifragaceae*).
- Opracowanie, optymalizacja i walidacja metod HPLC jakościowej i/lub ilościowej analizy głównych składników czynnych o charakterze polifenoli (flawonoidów i fenylopropanoidów) w farmakopealnych surowcach roślinnych, w tym kwiatach *Verbascum phlomoides* L. i *Verbascum densiflorum* Bertol. (*Scrophulariaceae*), oraz szeregu surowców flawonoidowych, m.in. liściach *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgoaceae*), ziele *Hypericum perforatum* L. (*Hypericaceae*) i kwiatach *Sambucus nigra* L. (*Caprifoliaceae*);

- Analiza aktywności antyoksydacyjnej głównych składników polifenolowych i wyciągów z kwiatostanów i liści *Prunus padus* i *Prunus serotina*, kwiatów *Prunus spinosa* oraz liści *Gaultheria procumbens* L. (Ericaceae).

5.2. Osiągnięte wyniki i znaczenie badań

5.2.1. Izolacja i badania strukturalne składników czynnych

W wyniku przeprowadzonych prac izolacyjnych, z badanych surowców roślinnych wyodrębniłam i zidentyfikowałam (m.in. w oparciu o analizę widm spektralnych, w tym widm UV, IR, FAB/LSI/HR MS, ^1H i ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY, HMBC, HMQC, i TOCSY) 57 związków reprezentujących 44 różne struktury chemiczne z grup kwasów fenolowych, flawonoidów, steroli i triterpenów, w tym 32 związki wyodrębniłam po raz pierwszy z odpowiednich gatunków (Tabela A2). Szczególną wartość naukową stanowi izolacja trzech nowych związków naturalnych (rycina A3): 3-O-(2''-galoilo)- α -L-ramnopiranozydu kwercetyny z ziela *Sedum aizoon*, oraz 3-O-(2''-E-p-kumaroilo)- α -L-arabinofuranozydo-7-O- α -L-ramnopiranozydu kemferolu i 3-O-(2''-O- β -D-glukopiranozylo)- α -L-arabinofuranozydu kwercetyny z liści *Prunus spinosa*. Wart podkreślenia jest także fakt izolacji szeregu rzadkich w przyrodzie związków flawonoidowych, w tym trzech związków wyodrębnionych po raz drugi ze źródeł naturalnych: 3-O-(2''-E-p-kumaroilo)- α -L-arabinofuranozydu kemferolu z liści *Prunus spinosa* (wyzolowanego wcześniej z igliwia *Picea koraiensis*; Ivanova i wsp., 1978), 3-O- α -arabinofuranozydu izoramnetyny z liści *Prunus serotina* (wyzolowanego wcześniej z *Taxodium distichum*; Geiger i De Groot-Pfleiderer, 1979) oraz 3-O-(2''-O- β -ksylopiranozylo)- β -galaktopiranozydu izoramnetyny z liści *Prunus padus* (wyzolowanego wcześniej z kwiatów *Asclepias syriaca*; Sikorska i Matławska, 2001). W przypadku dwóch ostatnich z wymienionych związków, a także 3-O- β -ksylopiranozydu izoramnetyny wyodrębnionego z liści *Prunus serotina*, po raz pierwszy podałam dane spektralne uzyskane w drodze eksperymentów NMR. Z kolei w przypadku 3-O-(2''-O- β -ksylopiranozylo)- β -glukopiranozydu i 3-O-(2''-O- β -ksylopiranozylo)- β -galaktopiranozydu kwercetyny, diglikozydów flawonoidowych wyizolowanych z liści *Prunus padus*, oraz kwasu korosolowego (2 α -hydroksyursolowego) z liści *Prunus serotina*, w drodze eksperymentów 1D i 2D NMR dokonałam rewizji struktury w stosunku do proponowanych uprzednio dla odpowiednich związków występujących w badanych surowcach (Biessels i wsp., 1974; Ostrowska i Kowalewski, 1971).



Rycina A3. Nowe związki naturalne wyizolowane z badanych surowców: (I), 3-O-(2''-E-p-kumaroilo)- α -L-arabinofuranozydo-7-O- α -L-ramnopiranozyd kemferolu, wyodrębniony z liści *Prunus spinosa*; (II), 3-O-(2''-O- β -D-glukopiranozylo)- α -L-arabinofuranozyd kwercetyny, z liści *Prunus spinosa*; (III), 3-O-(2''-galoilo)- α -L-ramnopiranozyd kwercetyny, z ziela *Sedum aizoon*.

Tabela A2. Wyniki prac izolacyjnych – związki wyodrębnione z badanych surowców roślinnych.

Lp.	Związek ^a	<i>Sedum aizoon</i> (ziele) ^b	<i>Prunus spinosa</i> (kwiaty) ^b	<i>Prunus spinosa</i> (liście) ^b	<i>Prunus serotina</i> (liście) ^b	<i>Prunus padus</i> (liście) ^b
1.	kwas galusowy	•				
2.	galusan metylu	▲				
3.	kwas chlorogenowy (5- <i>O</i> -kawoilochinowy)					▲
4.	kwercetyna	•	•	•		
5.	kemferol		•	•		
6.	mirycetyna	•				
7.	3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozyd mirycetyny (mirycetryna)	•				
8.	3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozyd kwercetyny (kwercetryna)	▲	•			
9.	3- <i>O</i> -(2"-galoilo)- α -L-ramnopiranozyd kwercetyny	▲				
10.	3- <i>O</i> - β -D-glukopiranozyd kwercetyny (izokwercetryna)		▲			
11.	3- <i>O</i> - β -D-galaktopiranozyd kwercetyny (hiperozyd)				▲	•
12.	3- <i>O</i> - α -L-arabinofuranozyd kwercetyny (awikularyna)		•	•	▲	
13.	3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranozyd kwercetyny (gwajaweryna)		▲			
14.	3- <i>O</i> - β -D-ksylopiranozyd kwercetyny (rejnutryna)		•		▲	
15.	3- <i>O</i> -(4"- <i>O</i> - β -D-glukopiranozylo)- α -L-ramnopiranozyd kwercetyny (multinozyd A)		▲			
16.	3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> - β -D-glukopiranozylo)- α -L-arabinofuranozyd kwercetyny			▲		
17.	3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozylo)- β -D-glukopiranozyd kwercetyny (rutyna)				▲	
18.	3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozylo)- β -D-glukopiranozyd kwercetyny (3- <i>O</i> - β -neohesperidozyd kwercetyny)				▲	
19.	3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozylo)- β -D-galaktopiranozyd kwercetyny				▲	
20.	3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> - β -ksylopiranozylo)- β -glukopiranozyd kwercetyny					▲
21.	3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> - β -ksylopiranozylo)- β -galaktopiranozyd kwercetyny					▲
22.	3- <i>O</i> - α -L-arabinofuranozyd kemferolu (juglanina)		•	•		
23.	3- <i>O</i> -(2"- <i>E</i> - <i>p</i> -kumaroilo)- α -L-arabinofuranozyd kemferolu		▲			
24.	3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozyd kemferolu (afzelina)		•			
25.	7- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozyd kemferolu		•	•		
26.	3- <i>O</i> - β -D-ksylopiranozyd kemferolu		▲			
27.	3- <i>O</i> - β -D-glukopiranozyd kemferolu (astragalina)					•
28.	3,7-di- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozyd kemferolu		•	•		
29.	3- <i>O</i> - α -L-arabinofuranozydo-7- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozyd kemferolu			•		
30.	3- <i>O</i> -(2"- <i>E</i> - <i>p</i> -kumaroilo)- α -L-arabinofuranozydo-7- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozyd kemferolu			▲		
31.	3- <i>O</i> -(4"- <i>O</i> - β -D-glukopiranozylo)- α -L-ramnopiranozyd kemferolu (multifloryna B)		▲			
32.	3- <i>O</i> - α -arabinofuranozyd izoramnetyny				▲	
33.	3- <i>O</i> - β -ksylopiranozyd izoramnetyny				▲	
34.	3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> - α -L-ramnopiranozylo)- β -D-glukopiranozyd izoramnetyny (narcyzyna)				▲	
35.	3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> - β -ksylopiranozylo)- β -galaktopiranozyd izoramnetyny					▲
36.	α -amyryna		▲			
37.	β -amyryna		▲			
38.	β -sitosterol		•			
39.	stigmasterol		▲			
40.	γ -sitosterol		▲			
41.	3- <i>O</i> - β -D-glukopiranozyd β -sitosterolu		▲			
42.	kwas ursolowy		▲		•	
43.	kwas oleanolowy		▲		•	
44.	kwas korosolowy (kwas 2 α -hydroksyursolowy)				▲	
Publikacje źródłowe^c		II.D.1	II.D.4– II.D.6	II.A.1	II.D.8, II.D.9	II.A.6

^a Związki **9**, **16** i **30** (oznaczone na niebiesko) zostały wyizolowane i opisane, jako nowe związki naturalne, zaś związki **23**, **32** i **35** (oznaczone na zielono) zostały wyodrębnione po raz drugi ze źródeł naturalnych. ^b Znaczniki (•,▲) symbolizują fakt wyizolowania danego związku z odpowiedniego surowca, w tym związki oznaczone (▲) zostały wyodrębnione z danego gatunku po raz pierwszy. ^c Numeracja wg. załącznika nr 5.

Dane dotyczące izolacji i identyfikacji strukturalnej składników chemicznych ww. surowców roślinnych zostały opublikowane (załącznik nr 5, pozycje II.D.1, II.D.4–II.D.6, II.D.8, II.D.9, II.A.1 i II.A.6) oraz zaprezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach tematycznych (załącznik nr 5, pozycje II.K.1, III.B.1–III.B.4, III.B.6–III.B.8 i III.B.10). Publikacje II.D.4–II.D.6 i II.A.1, stanowiące efekt realizacji projektu doktorskiego, a także pozycja II.D.1, powstały we współpracy naukowej z prof. Marią Wolbiś, Kierownikiem macierzystej Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, promotorem mojej pracy doktorskiej.

5.2.2. Standaryzacja roślinnych surowców leczniczych - opracowanie i walidacja metod analitycznych, analiza jakościowa i ilościowa

5.2.2.1. Analiza jakościowa HPLC-UV fenolokwasów i flawonoidów w surowcach z rodzaju *Prunus*

Do celów identyfikacji składników występujących w badanych surowcach w ilościach uniemożliwiających ich efektywną izolację i określenie struktury metodami spektroskopowymi, opracowałam niezależne metody HPLC-UV pozwalające na identyfikację fenolokwasów w kwiatach i liściach *Prunus spinosa* (patrz **załącznik nr 5, publikacja II.D.2**) oraz identyfikację monoglikozydów flawonoidowych w liściach *Prunus serotina* (patrz **załącznik nr 5, artykuł II.D.9**).

Pierwsza z ww. metod stanowiła adaptację procedury opracowanej przez Dzido i Smolarz (1994), której optymalizacja do warunków analizy *P. spinosa* pozwoliła na uzyskanie efektywnego rozdziału składników matrycy roślinnej oraz identyfikację 11 analitów fenolokwasowych, w tym kwasów: galusowego, protokatechowego, *p*-hydroksybenzoesowego, chlorogenowego, wanilinowego, *cis*- i *trans*-kawowego, *cis*- i *trans*-*p*-kumarowego, oraz *cis*- i *trans*-ferulowego, których obecność w badanym gatunku stwierdziłam po raz pierwszy (z wyjątkiem kwasu chlorogenowego). Dzięki zastosowaniu krótkiej kolumny chromatograficznej o dużej sprawności (Hypersil ODS, 5 µm, 125 × 4.0 mm, Hewlett-Packard), trójskładnikowego eluentu (acetonitryl-tetrahydrofuran-0.5% kwas ortofosforowy) w układzie elucji gradientowej oraz przepływu fazy ruchomej 1 ml/min (25°C), obok dobrej rozdzielczości pików analitów uzyskałam także zadowalający czas rozdziału (20 min, łącznie z czasem przemywania i równoważenia kolumny; patrz **publikacja II.D.2**). Praca ta, stanowiąca część mojej pracy doktorskiej, powstała we współpracy z prof. Marią Wolbiś, jako jej promotorem. Poza źródłową pozycją **II.D.2**, wyniki ww. badań zostały zaprezentowane również na międzynarodowej konferencji tematycznej (**załącznik nr 5, pozycja III.B.5**).

Kolejną z metod jakościowej analizy HPLC-UV opracowałam w celu identyfikacji pięciu monoglikozydów flawonolowych występujących w kwiatostanach i liściach *P. serotina* obok pięciu wyizolowanych wcześniej związków dominujących (patrz **publikacja II.D.8** i Tabela A2). Skrajnie niska zawartość przedmiotowych analitów w surowcu pozwalała na obserwację ich obecności jedynie we frakcjach otrzymanych w wyniku preparatywnych rozdzielów chromatograficznych ekstraktów surowych, co zapewniło jednocześnie separację heksozydów flawonolowych od ich pentozydowych i metylopentozydowych odpowiedników. Z uwagi na stosunkowo niewielką różnicę w polarności i wielkości cząsteczek w obrębie grup heksozydów i pentozydów flawonolowych, ich jednoczesny rozdziel wymaga zwykle zastosowania stosunkowo niskich stężeń początkowych modyfikatorów organicznych i łagodnego profilu gradientu przy wydłużonym całkowitym czasie elucji (> 50 min), szczególnie w przypadku występowania w analizowanych frakcjach najtrudniejszej do separacji pary krytycznej złożonej z izokwercytryny i hiperozydu (3-*O*-β-D-glukopiranozydu i 3-*O*-β-D-galaktopiranozydu kwercetyny) (Vvedenskaya i wsp., 2004). Z tego względu, dla celów analizy rozfrakcjonowanych ekstraktów *P. serotina* zdecydowałam się opracować dwie niezależne procedury HPLC, pozwalające na rozdziel odpowiednich frakcji heksozydów i pentozydów flawonolowych, co znacznie skróciło całkowity czas analizy badanych frakcji. Pierwsza z ww. procedur (kolumna Hypersil ODS, 5 µm, 125 × 4.0 mm, Hewlett-Packard; elucja gradientowa; eluent: metanol-0.5% kwas ortofosforowy; czas analizy: 26.5 min, łącznie z czasem przemywania i równoważenia kolumny) umożliwiła efektywny rozdziel ośmiu monozydów flawonolowych, w tym siedmiu pentozydów, przy jednoczesnej koelucji pary krytycznej izokwercytryna/hiperozyd i została wykorzystana do analizy jakościowej frakcji pentozydów *P. serotina*. Druga procedura (kolumna j.w.; elucja gradientowa; eluent: acetonitryl-0.5% kwas ortofosforowy; czas analizy: 25.5 min, łącznie z czasem przemywania i równoważenia kolumny) umożliwiła efektywny rozdziel frakcji heksozydów flawonolowych, w tym pary krytycznej izokwercytryna/hiperozyd. Efektem przeprowadzonych badań była identyfikacja w ekstraktach *P. serotina* pięciu monozydów flawonolowych, w tym astragaliny (3-*O*-β-D-glukopiranozydu kemferolu), gwajaweryny (3-*O*-α-L-arabinopiranozydu kwercetyny), izokwercytryny, juglaniny (3-*O*-α-L-arabinofuranozydu kemferolu) i 3-*O*-β-D-ksylopiranozydu kemferolu, co stanowiło pierwsze doniesienie o ich występowaniu w badanym gatunku (patrz **publikacja II.D.9**).

5.2.2.2. Analiza jakościowa i ilościowa GC-MS steroli i triterpenów w kwiatach i liściach *P. spinosa*

W trakcie realizacji projektu doktorskiego uczestniczyłam także w badaniach GC-MS wolnych triterpenoidów *P. spinosa*. Dwie niezależne procedury GC-MS jakościowej i ilościowej analizy triterpenoidów w materiale roślinnym opracowano we współpracy z mgr inż. Krystyną Majdą z Instytutu Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej, oraz z dr Wiktorem J. Wesółowskim z Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi. Opracowane metody zostały wykorzystane, odpowiednio, do jakościowej identyfikacji składników frakcji wolnych steroli i alkoholi triterpenowych, a także do jakościowej i ilościowej analizy β -sitosterolu, kwasu ursolowego i kwasu oleanolowego w kwiatach i liściach *P. spinosa* (patrz **załącznik nr 5, publikacja II.D.5**). Wymienione analizy triterpenoidów przeprowadzono po raz pierwszy dla surowców pozyskanych z badanego gatunku. Źródłowa pozycja (**II.D.5**), prezentująca wyniki stanowiące część mojej pracy doktorskiej, powstała we współpracy z prof. Marią Wolbiś, jako jej promotorem. Wyniki te zostały również zaprezentowane na krajowej konferencji tematycznej (**załącznik nr 5, pozycja III.B.6**).

5.2.2.3. Analiza ilościowa HPLC-UV wolnych kwasów triterpenowych w materiale roślinnym

Wolne kwasy triterpenowe, w tym najpopularniejsze w świecie roślinnym kwasy ursolowy (UA) i oleanolowy (OA), a także ich hydroksylowe pochodne, jak kwas 2α -hydroksyursolowy (kwas korosolowy, CA) wykazują wyraźną aktywność farmakologiczną (potwierdzoną w testach *in vitro* i *in vivo*), stanowiąc składniki biologicznie czynne licznych surowców leczniczych. Najpopularniejszą metodą analizy tych związków pozostaje metoda GC-MSD, która jednak wymaga derywatyzacji nielotnych analitów triterpenoidowych, co wydłuża czas analiz i zwiększa ich koszt oraz niebezpieczeństwo niedokładności. Piśmiennictwo dla metod HPLC analizy wolnych kwasów triterpenowych jest stosunkowo wąskie, z większością prac dotyczących izomerycznych kwasów UA i OA, oraz z nielicznymi pracami uwzględniającymi ich pochodne hydroksylowe ([Chen i wsp., 2003](#); [Claude i wsp., 2004](#)), a także brakiem systemowych badań wpływu zmiennych parametrów układu chromatograficznego (rodzaju kolumny, rodzaju i stężenia modyfikatora organicznego w eluencie, pH, temperatury, etc.) na jakość rozdzielania (parametry retencji i rozdzielczość par krytycznych). Doceniając znaczenie wolnych kwasów triterpenowych dla aktywności surowców leczniczych, podjęłam się opracowania i optymalizacji metody RP-HPLC-UV analizy izomerycznych kwasów UA i OA oraz pochodnego kwasu CA w materiale roślinnym z wykorzystaniem kwiatostanów, liści i owoców *P. serotina*, jako materiałów testowych. Optymalizacji poddałam rodzaj stosowanej kolumny RP-18, rodzaj i stężenie modyfikatora organicznego w eluencie, stężenie kwasu ortofosforowego w eluencie, prędkość przepływu fazy ruchomej, długość fali detekcji, a także parametry procedury ekstrakcji. Zoptymalizowana przeze mnie metoda (kolumna Nucleodur-Gravity C18, 5 μ m, 250 $\times$ 4.6 mm, Macherey-Nagel; elucja izokratyczna; eluent: metanol-1.0% kwas ortofosforowy, 90:10 (v/v); przepływ fazy ruchomej 0.6 ml/min; 25°C) umożliwia rozdział ww. trzech analitów oraz pików matryc roślinnych w czasie 30 min z dobrą rozdzielczością pary krytycznej UA/OA ($R_s > 1.40$). Opracowana metoda została poddana pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi [ICH \(2005\)](#) i zastosowana do przeprowadzenia systematycznych analiz zawartości wolnych kwasów triterpenowych w surowcach pozyskanych z *P. serotina* w różnych okresach wegetacji. Wyniki tych analiz wykazały, że liście badanego gatunku stanowią bogate źródło kwasów triterpenowych, w tym przede wszystkim kwasu UA (0.67–1.14% s.m.), a w mniejszym stopniu również kwasu CA (0.16–0.18% s.m. w liściach zebranych późną jesienią). Z uwagi na liczne doniesienia literaturowe dotyczące znacznej aktywności antydiabetycznej CA ([Miura i wsp., 2006](#); [Stohs i wsp., 2012](#); [Yamada i wsp., 2008](#)), a także stosunkowo prostą izolację tego związku z materiału roślinnego, fakt ten może stanowić podstawę praktycznego zastosowania liści *P. serotina*, jako wydajnego źródła CA. Optymalizacji i walidacji ww. metody oraz jej możliwym zastosowaniom praktycznym poświęciłam **publikację II.A.3 (załącznik 5)**.

5.2.2.4. Analiza ilościowa HPLC-UV aglikonów flawonoidowych w hydrolizatach roślinnych

Z uwagi na fakt powszechnego występowania związków flawonoidowych w roślinnych surowcach leczniczych, w tym we wszystkich surowcach stanowiących przedmiot moich zainteresowań naukowych, opracowanie dokładnych, niepracochłonnych i szybkich metod analizy ilościowej tych związków stało się jednym z priorytetowych wątków badawczych realizowanych przeze mnie projektów. Szczególny nacisk położyłam na optymalizację metod analizy

HPLC-UV aglikonów flawonoidowych w hydrolizatach roślinnych, w tym na optymalizację rozdziału trzech najpopularniejszych w przyrodzie aglikonów, tj. kwercetyny (QU), kemferolu (KA) i izoramnetyny (IS) na kolumnach RP-18. Stosując różne stężenia modyfikatora organicznego (metanolu) w eluencie oraz różną intensywność elucji gradientowej, opracowałam cztery niezależne procedury RP-HPLC, które umożliwiają efektywny rozdział analitów ($R_s > 1.5$) i pików testowanych matryc roślinnych na wybranej kolumnie (Hypersil ODS, 5 μm , 125 $\times$ 4.0 mm, HP) oraz dokonanie analizy jakościowej i ilościowej hydrolizatów w krótkim czasie (5.5–15.5 min, łącznie z czasem przemywania i równoważenia kolumny), zależnym od składu analizowanego hydrolizatu. Najkrótszy czas rozdziału (5.5 min) został uzyskany dla hydrolizatów zawierających jedynie dwa z ww. aglikonów, tj. QU i KA, a zoptymalizowana metoda HPLC, opracowana we współpracy z prof. Edwardem Baldem i dr Rafałem Głowackim z Katedry Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, została poddana walidacji i wykorzystana do oznaczania całkowitej zawartości flawonoidów w kwiatach i liściach *P. spinosa* (patrz **załącznik nr 5, publikacja II.D.3**). Pozycja ta, prezentująca wyniki stanowiące część mojej pracy doktorskiej, powstała również we współpracy z prof. Marią Wolbiś, jako jej promotorem.

Trzy kolejne warianty metody, umożliwiające rozdział wszystkich ww. aglikonów flawonoidowych (QU, KA i IS) w czasie 7.0, 11.0 i 15.5 min (łącznie z czasem przemywania i równoważenia kolumny), zostały opracowane z myślą o analizie surowców roślinnych różniących się stopniem złożoności matrycy hydrolizatów, w tym najpopularniejszych farmakopealnych surowców flawonoidowych, takich jak *Ginkgo folium*, *Hyperici herba*, *Calendulae flos*, *Sambuci flos*, *Solidaginis virgaureae herba* i *Tiliae flos*, a także kwiatostanów i liści *P. serotina*. We wszystkich przypadkach efektywny rozdział analitów i pików matryc został osiągnięty przy zastosowaniu znacznie łagodniejszych warunków elucji (prędkości przepływu eluentu w granicach 1.2–1.6 ml/min, ciśnienia wsteczne < 320 bar) niż przyjęte przez Haslera i wsp. (1990) w metodzie referencyjnej, dla której uzyskanie wysokiej rozdzielczości pary krytycznej KA/IS (1.98) i stosunkowo krótkiego czasu rozdziału (12 min, bez czasu przemywania i równoważenia kolumny) zostało okupione wysokim ciśnieniem wstecznym (> 400 bar przy przepływie eluentu 2 ml/min), utrudniającym stosowanie metody referencyjnej do rutynowych analiz i standaryzacji surowców roślinnych. Tym samym, opracowane przeze mnie ww. nowe warianty metody mogą być polecane, jako szybkie procedury standaryzacyjne surowców flawonoidowych o odpowiednim składzie aglikonów, stosowalne również na tradycyjnych aparatach HPLC o limicie ciśnieniowym 400 bar (≈ 6000 psi). Wybrane warianty metody zostały poddane pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi ICH (2005) poprzez wyznaczenie parametrów kalibracji, limitów detekcji i oznaczalności, oraz precyzji i dokładności. Jedna z opracowanych metod została wykorzystana do wykonania systemowych analiz zawartości związków flawonoidowych w kwiatostanach i liściach *P. serotina* w zależności od etapu wegetacji. Optymalizacji i walidacji trzech wyżej opisanych wariantów metody RP-HPLC analizy aglikonów flawonoidowych w hydrolizatach roślinnych oraz ich możliwym zastosowaniom praktycznym została poświęcona **publikacja II.A.2 (załącznik nr 5)**, a także komunikat zaprezentowany na krajowej konferencji tematycznej (**załącznik nr 5, pozycja III.B.12**).

5.2.2.4. Analizy HPLC-UV i HPLC-PDA fingerprint profili polifenolowych w materiale roślinnym

Chromatograficzne analizy typu fingerprint stanowią wydajne narzędzie jakościowej i ilościowej charakterystyki profili związków biologicznie czynnych roślinnych surowców leczniczych, przydatne zarówno w rutynowej standaryzacji produktów roślinnych, jak i w badaniach ich tożsamości, stabilności, zmienności sezonowej, a także w badaniach chemotaksonomicznych. Z uwagi na ogromną różnorodność strukturalną wtórnych metabolitów roślinnych, analityczne metody profilujące muszą być zwykle opracowywane niezależnie dla odpowiednich gatunków/surowców/preparatów roślinnych z uwzględnieniem ich indywidualnej charakterystyki chemicznej. W związku z tym, w ramach czterech różnych projektów badawczych uczestniczyłam w opracowaniu i walidacji niżej opisanych czterech niezależnych procedur HPLC-fingerprint analizy polifenoli w surowcach roślinnych pozyskiwanych z *P. serotina*, *P. padus*, *Verbascum densiflorum* i *V. phlomidoides*, oraz *Chrysosplenium alternifolium*.

- **Analiza HPLC-UV polifenoli w kwiatostanach i liściach *P. serotina*** – optymalizacji poddałam procedurę ekstrakcji polifenoli z materiału roślinnego oraz procedurę separacji analitów polifenolowych na kolumnie RP-18. Zoptymalizowana metoda rozdziału została poddana pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi ICH (2005) dla potrzeb analizy ilościowej siedmiu dominujących składników badanych ekstraktów, w tym kwasu chlorogenowego, rutyny,

hiperozydu, rejnutyryny, gwajaweryny, awikularyny i juglaniny, a następnie wykorzystana do badań zmienności profilu polifenolowego kwiatostanów i liści *P. serotina* w zależności od etapu wegetacji. Wynikom ww. testów została poświęcona **publikacja II.A.2 (załącznik nr 5)**, a także dwa komunikaty zaprezentowane na krajowych konferencjach tematycznych (**załącznik nr 5**, pozycje **III.B.10** i **III.B.12**).

- **Analiza HPLC-UV polifenoli w kwiatostanach i liściach *P. padus*** – analogiczne do wyżej opisanych testy optymalizacyjne przeprowadziłam dla surowców pozyskiwanych z *P. padus*. Zoptymalizowana metoda rozdzielcza została poddana pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi ICH (2005) dla potrzeb analizy ilościowej sześciu dominujących składników badanych ekstraktów, w tym kwasu chlorogenowego, mieszaniny 3-O-(2''-O- β -ksylopiranozylo)- β -glukopiranozydu i 3-O-(2''-O- β -ksylopiranozylo)- β -galaktopiranozydu kwercetyny, hiperozydu i astragaliny, a następnie wykorzystana do badań zmienności profilu polifenolowego kwiatostanów i liści *P. padus* w zależności od etapu wegetacji. Wynikom ww. testów została poświęcona **publikacja II.A.6 (załącznik nr 5)**.
- **Analiza HPLC-UV polifenoli w kwiatach *V. densiflorum* i *V. phlomoides*** – w związku z faktem, że fenylopropanoidy i związki flawonoidowe wymieniane są w piśmiennictwie, jako determinanty aktywności przeciwzapalnej, przeciwdrobnoustrojowej i diuretycznej farmakopealnego surowca *Verbasci flos* (Turker i Gurel, 2005), a jednocześnie w obliczu braku danych dotyczących ich zawartości w surowcu oraz znanych metod analitycznych służących standaryzacji preparatów dziewanny na zawartość polifenoli, we współpracy z prof. Barbarą Klimek i dr Magdaleną Tokar z macierzystego zespołu Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi podjęłam się opracowania i walidacji odpowiedniej metody HPLC-UV. W toku prac badawczych, optymalizacji poddano proces ekstrakcji polifenoli z surowca (ze szczególnym uwzględnieniem trudno rozpuszczalnej diosminy) oraz procedurę rozdzielczą składników badanych ekstraktów na kolumnie RP-18. Zoptymalizowana procedura pozwala na efektywny ($R_s > 1.50$) rozdział większości z dziesięciu analitów z grup fenylopropanoidów i flawonoidów, a także pików matrycy roślinnej za wyjątkiem pików pary krytycznej diosminy i 7-O- β -rutynozydu tamaryksetyny ($R_s = 0.75$). Opracowaną metodę poddano pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi ICH (2005) dla potrzeb analizy dziesięciu dominujących składników badanych ekstraktów, w tym forsytazydu B, werbaskozydu, 7-O- β -D-glukopiranozydów kwercetyny, luteoliny, apigeniny i tamaryksetyny, oraz diosminy i 7-O- β -rutynozydu tamaryksetyny, a następnie wykorzystano do badań jakościowego i ilościowego profilu polifenoli w farmakopealnym surowcu *Verbasci flos* pozyskanym z dwóch podstawowych gatunków dziewanny. Wykazano, że profile polifenolowe *V. densiflorum* i *V. phlomoides* różnią się istotnie, co umożliwia praktyczne zastosowanie opracowanej metody, jako procedury standaryzacji zawartości polifenoli w *Verbasci flos*, a także identyfikację gatunkową odpowiedniego materiału roślinnego. Optymalizacji i walidacji wyżej opisanej metody oraz jej możliwym zastosowaniom praktycznym została poświęcona **publikacja II.A.5 (załącznik nr 5)**.
- **Analiza HPLC-PDA flawonoidów w ziele *Chrysosplenium alternifolium*** – we współpracy naukowej z prof. Janem Gudejem z macierzystej Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi podjęłam się opracowania metody HPLC-PDA analizy lipofilowych, polimetoksyloowanych flawonoidów, stanowiących składniki biologicznie czynne ziele *C. alternifolium*, cenionego surowca tradycyjnej medycyny orientalnej o nieopracowanej wcześniej metodyce standaryzacji. Optymalizacji poddałam proces ekstrakcji oraz procedurę rozdzielczą badanych ekstraktów roślinnych. Rozdziały prowadziłam na krótkiej kolumnie typu RP-18 (Hypersil ODS, 5 μ m, 125 $\times$ 4.0 mm, HP), co umożliwiło uzyskanie wysokiej rozdzielczości pików analitów i matrycy roślinnej ($R_s > 2.0$) w stosunkowo krótkim czasie (20 min, łącznie z czasem przemywania i równoważenia kolumny). Zoptymalizowana przeze mnie metoda została poddana pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi ICH (2005) dla potrzeb analizy czterech dominujących składników flawonoidowych badanych ekstraktów, w tym izomerycznych chryzosplenozydów i chryzosplenoli B i D, a następnie wykorzystana do badań jakościowego i ilościowego profilu flawonoidów w próbkach surowca różnego pochodzenia. Optymalizacji i walidacji wyżej opisanej metody oraz jej możliwym zastosowaniom praktycznym została poświęcona **publikacja II.A.4 (załącznik nr 5)**. Wyniki pracy zostały ponadto zaprezentowane w formie referatu na krajowej konferencji tematycznej (**załącznik nr 5**, pozycja **II.K.2**).

5.2.3. Badania aktywności antyoksydacyjnej surowców roślinnych

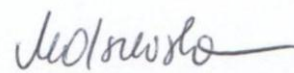
Większość z badanych przeze mnie surowców roślinnych należy uznać za zasobne w polifenole, w tym szczególnie pochodne zawierające w strukturze ugrupowania orto-dihydroksyfenylowe, jak pochodne kwercetyny, katechiny i kwasu kawowego, związki o dobrze udokumentowanej w piśmiennictwie aktywności antyoksydacyjnej. Fakt ten stanowił przesłankę dla podjętych przeze mnie we współpracy z mgr Piotrem Michelem z macierzystej Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz liczną grupą dyplomantek Katedry badań *in vitro* aktywności antyoksydacyjnej najbardziej obiecujących z ww. surowców, w tym surowców pozyskiwanych z rodzaju *Prunus* (*P. padus*, *P. spinosa* i *P. serotina*) oraz z gatunku *Gaultheria procumbens*. Badania były prowadzone metodami o różnym mechanizmie reakcji redoks, tj. metodą DPPH, FRAP oraz metodą inhibicji oksydacji kwasu linolenowego w stosunku do licznych wzorców naturalnych i syntetycznych antyoksydantów polifenolowych, w tym także związków wyodrębnionych z badanych surowców. Wyniki testów aktywności poddano konfrontacji z wynikami oznaczeń zawartości polifenoli, w tym wynikami otrzymanymi metodą FC oraz wyrażonymi, jako suma głównych grup metabolitów wtórnych (proantocyjanidyn i indywidualnych metabolitów analizowanych metodami HPLC-fingerprint). Do chwili obecnej opublikowane zostały wyniki prac dotyczących surowców pozyskiwanych z gatunku *P. padus* (patrz **załącznik nr 5, publikacja II.A.6**), natomiast dane dotyczące aktywności antyoksydacyjnej surowców pozyskiwanych z gatunku *G. procumbens* zostały zaprezentowane na międzynarodowej konferencji tematycznej (**załącznik nr 5, pozycja III.B.14**).

5.3. Współpraca naukowa

Podczas realizacji projektów badawczych współpracowałam z zespołami Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Katedry Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, Instytutu Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej, Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi, Ogrodu Botanicznego w Łodzi oraz Arboretum Leśnego Zakładu Doświadczalnego SGGW w Rogowie.

5.4. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze i inne

Opis pozostałych moich osiągnięć naukowo-badawczych, takich jak uzyskane nagrody naukowe, udział i kierownictwo grantów i projektów badawczych wraz z pełną listą publikacji oryginalnych, przeglądowych i wystąpień konferencyjnych, a także dodatkowe informacje dotyczące mojej aktywności i osiągnięć dydaktycznych zostały przedstawione w **załączniku nr 5**.



dr n. farm inż. Monika A. Olszewska

6. PIŚMIENNICTWO

- Acuña U.M., Atha D.E., Ma J., Nee M.H., Kennelly E.J. (2002). Antioxidant capacities of ten edible North American plants. *Phytotherapy Research*, 16, 63–65.
- Aldasoro J.J., Aedo C., Garmendia F.M., de la Hoz F.P., Navarro C. (2004). Revision of *Sorbus* Subgenera *Aria* and *Torminaria* (Rosaceae-Maloideae). *Systematic Botany Monographs*, 69, 189–212.
- Alissa E.M., Ferns G.A. (2012). Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. *Journal of Nutrition and Metabolism* (in press). doi:10.1155/2012/569486.
- Arts I.C.W., Hollman P.C.H. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 317–25.
- Bae J-T., Sim G-S., Kim J-H., Pyo H-B., Yun J-W., Lee B-C. (2007). Antioxidative activity of the hydrolytic enzyme treated *Sorbus commixta* Hedl. and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 in UV irradiated human dermal fibroblasts. *Archives of Pharmacal Research*, 30, 1116–23.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Bell T.A., Etschells J.L., Borg A.F. (1959). Influence of sorbic acid on the growth of certain species of bacteria, yeast, and filamentous fungi. *Journal of Bacteriology*, 77, 573–580.
- Bhat L.R., Bae M.S., Kim. B.M., Oh G-S., Chai K.Y. (2009). A chalcone glycoside from the fruits of *Sorbus commixta* Hedl. *Molecules*, 14, 5323–5327.
- Biessels H.W.A., van der Kerk-van Hoof A.C., Kettenes-van den Bosch J.J., Salemnik C.A. (1974). Triterpenes of *Prunus serotina* and *P. lusitana*. *Phytochemistry*, 13, 203–207.
- Borkowski B. (red), Lutomski J., Skrzydlewska E., Zygmunt B. (1994). Rośliny lecznicze w fitoterapii. Poznań: IRIpZ.
- Borneo R., Leon A.E., Aguirre A., Ribotta P., Canterro J.J. (2009). Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their *in vitro* testing in a model food system. *Food Chemistry*, 112, 664–670.
- Burda B., Oleszek W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774–2779.
- Bylka W., Kowalewski Z., Oleksiak K. (1977). Związki flawonoidowe w owocach *Sorbus commixta* Hedl. *Herba Polonica*, 23, 105–109.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 2157–2184.
- Cencic A., Chingwaru W. (2010). The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients*, 2, 611–625.
- Chawla R., Arora R., Sagar R.K., Singh S., Puri S.C., Kumar R., Singh S., Sharma A.K., Prasada J., Khan H.A., Sharma R.K., Dhar K.L., Spitteller M., Qazi G.N. (2005). 3-O-β-D-Galactopyranoside of quercetin as an active principle from high altitude *Podophyllum hexandrum* and evaluation of its radioprotective properties. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60, 728–738.
- Chen J.H., Xia Z.H., Tan R.X. (2003). High-performance liquid chromatographic analysis of bioactive triterpenes in *Perilla frutescens*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32, 1175–1179.
- Claude B., Morin P., Lafosse M., Andre P. (2004). Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized β- and γ-cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1049, 37–42.
- Clifford M.N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 362–372.
- Crozier A., Jensen E., Lean M. E. J., McDonald M.S. (1997). *Journal of Chromatography A*, 761, 315–321.
- Dzido T.H., Smolarz H.D. Preliminary computer simulation for fine tuning of the high-performance liquid chromatography of some phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 679, 59–66.
- Egea I., Sánchez-Bel P., Romojaro F., Pretel M.T. (2010). Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 121–129.
- Facciola S. (1998). *Cornucopia II: A source book of edible plants* (p. 211). Vista, CA: Kampong Publications.
- Ferreres F., Tomás-Barberán F.A., Gil M.I., Tomás-Lorente F. (1991). An HPLC technique for flavonoid analysis in honey, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56, 49–56.
- Folin O., Ciocalteu V. (1927). On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 2, 627–650.
- Ganhão R., Estevez M., Kylli P., Heinonen M., Morcuende D. (2010). Characterization of selected wild Mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8854–8861.
- Geiger H., De Groot-Pfleiderer W. (1979). Die flavon- und flavonolglycoside von *Taxodium distichum*. *Phytochemistry*, 18, 1709–1710.
- Gil-Izquierdo A., Mellenthin A. (2001). Identification and quantitation of flavonols in rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.) juice. *European Food Research and Technology*, 213, 12–17.
- Golubenko V.G. (1967). Resistance of blood capillaries in patients with myocardial infraction and angina pectoris and the influence exercised by anti-coagulants and a preparations made of *S. aucuparia* – “vitamin CP”. *Sovetskaya Medicina*, 30, 98–101.
- Goun E.A., Petrichenko V.M., Solodnikov S.U., Suhinina T.V., Kline M.A., Cunningham G., Nguyen C., Miles H. (2002). Anticancer and anti-thrombin activity of Russian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 337–342.
- Graf B.A., Milbury P.E., Blumberg J.B. (2005). Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food*, 8, 281–90.
- Grussu D., Stewart D., McDougall G.J. (2011). Berry polyphenols inhibit α-amylase *in vitro*: identifying active components in rowanberry and raspberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2324–2331.
- Guerrero-Analco J.A., Martineau L., Saleem A., Madiraju P., Muhammad A., Durst T., Haddad P., Arnason J.T. (2010). Bioassay-guided isolation of the antidiabetic principle from *Sorbus decora* (Rosaceae) used traditionally by the Eeyou Istchee Cree First Nations. *Journal of Natural Products*,

73, 1519–1523.

- Haghi G., Hatami A. (2010). Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in plant materials by a newly developed isocratic high-performance liquid chromatography approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10812–10816.
- Harnly J.M., Bhagwat S., Lin L.-Z. (2007). Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 47–61.
- Hasler A., Sticher O., Meier B. (1990). High-performance liquid chromatographic determination of five widespread flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography*, 508, 236–240.
- Häkkinen S., Auriola S. (1998). High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultra-violet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries. *Journal of Chromatography A*, 829, 91–100.
- Häkkinen S., Heinonen M., Kärenlampi S., Mykkänen H., Ruuskanen J., Törrönen R. (1999b). Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, 32, 345–353.
- Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkänen H.M., Törrönen A.R. (1999a). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2274–2279.
- Hollman P.C., Geelen A., Kromhout D. (2010). Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women. *Journal of Nutrition*, 140, 600–604.
- Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant activity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.
- Hukkanen A.T., Pölönen S.S., Kärenlampi S.O., Kokko H.I. (2006). Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 112–119.
- Huxley R.R., Neil H.A. (2003). The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 904–908.
- ICH (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. International Conference on Harmonisation, Q2(R1). <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM073384.pdf>.
- Ivanova S.Z., Zapesochaya G.G., Medvedeva S.A., Tyukavkina N.A. (1978). An O-acylated flavonol glycoside from the needles of *Picea koraïensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 14, 162–165.
- Jerzmanowska Z., Kamecki J. (1973). Phytochemical analysis of inflorescence of mountain ash (rowan tree) – *Sorbus aucuparia* L. Part II. *Roczniki Chemii*, 47, 1629–1638.
- Justesen U., Knuthsen P., Leth T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799, 101–110.
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Heinonen M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076–4082.
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.-P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954–3962.
- Kang D.G., Lee J.K., Choi D.H., Sohn E.J., Moon M.K., Lee H.S. (2005). Vascular relaxation by the methanol extract of *Sorbus cortex* via NO-cGMP pathway. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28, 860–864.
- Kang D.G., Sohn E.J., Lee A.S., Kim J.S., Lee D.H., Lee H.S. (2007). Methanol extract of *Sorbus commixta* cortex prevents vascular inflammation in rats with a high fructose-induced metabolic syndrome. *American Journal of Chinese Medicine*, 35, 265–277.
- Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Avramchik O.A. (2003). Investigation of antioxidant and catalytic properties of some active substances by voltammetry. *Annals of Bioanalytical Chemistry*, 375, 465–468.
- Kültür S. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 341–364.
- Kylli P., Nohynek L., Puupponen-Pimiä R., Westerlund-Wikström B., McDougall G., Stewart D., Heinonen M. (2010). Rowanberry phenolics: compositional analysis and bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11985–11992.
- Lee S.-O., Lee H.W., Lee I.-S., Im H.G. (2006). The pharmacological potential of *Sorbus commixta* cortex on blood alcohol concentration and hepatic lipid peroxidation in acute alcohol-treated rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58, 685–693.
- Lee Y.M., Kim Y.S., Lee Y., Kim J., Sun H., Kim J.H., Kim J.S. (2012). Inhibitory activities of pancreatic lipase and phosphodiesterase from Korean medicinal plant extracts. *Phytotherapy Research*, 26, 778–782.
- Li R., Yuan C., Dong C., Shuang S., Choi M.M. (2011). *In vivo* antioxidative effect of isoquercitrin on cadmium-induced oxidative damage to mouse liver and kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 383, 437–45.
- Liu H., Qiu N., Ding H., Yao R. (2008). Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medicinal and food uses. *Food Research International*, 41, 363–370.
- Martos I., Cossentini M., Ferreres F., Tomás-Barberán F.A. (1997). Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 2824–2829.
- Mattila P., Astola J., Kumpulainen J. (2000). Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5834–5841.
- Mattila P., Hellström J., Törrönen R. (2006). Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7193–7199.
- Määttä-Riihinen K.R., Kamal-Eldin A., Mattila P.H., Gonzalez-Paramas A.M., Törrönen A.R. (2004). Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4477–4486.
- McAllister H. (2005). *The Genus Sorbus: Mountain Ash and Other Rowans*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- McCune L.M., Johns T. (2002). Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 197–205.
- Melo A., Monteiro L., Lima R.M., Oliveira D.M., Cerqueira M.D., El-Bachá R.S. (2011). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms

- and therapeutic perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, ID: 467180, 14 pages.
- Merken H.M., Beecher G.R. (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A*, 897, 177–184.
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673–751.
- Miura T., Ueda N., Yamada K., Fukushima M., Ishida T., Kaneko T., Matsuyama F., Seino Y. (2006). Antidiabetic effects of corosolic acid in KK-Ay diabetic mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29, 585–587.
- Mladěnká P., Zatloukalová L., Filipický T., Hrdina R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 963–975.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211–219.
- Na M.K., An R.B., Lee S.M., Min B.S., Kim Y.H., Bae K.H., & Kang S.S. (2002). Antioxidant compounds from the stem bark of *Sorbus commixta*. *Natural Product Sciences*, 8, 26–29.
- Nürnberg H. (1964a). Zur Verbreitung der Flavonole in den Blättern und Früchten der Gattung *Sorbus*. *Flora*, 155, 598–602.
- Nürnberg H. (1964b). Flavonol glycosides of the leaves of *Sorbus aucuparia edulis*. *Pharmazie*, 19, 476–480.
- Ostrowska B., Kowalewski Z. (1971). Flavonoid glycosides from the blossoms of *Padus avium*. *Planta Medica*, 20, 263–271.
- Ożarowski A. (red) (1976). *Ziołolecznictwo, poradnik dla lekarzy*. Warszawa: PZWL.
- Ölschläger C., Milde J., Schempp H., Treuter D. (2004). Polyphenols and antioxidant capacity of *Sorbus domestica* L. fruits. *Journal of Applied Botany*, 78, 112–116.
- Pandey K.B., Rizvi S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 270–278.
- Parejo I., Caprai E., Bastida J., Viladomat F., Jauregui O., Codina C. (2004). Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 175–184.
- Pavlii O.J., Makarova G.V. (1967). Flavonols from the foliage of *Sorbus pendula*. *Khimiya Prirodnich Soedinenii*, 3, 281.
- Pavlii O.J., Makarova G.V. (1971). Polyphenols from *Sorbus quercifolia*. *Khimiya Prirodnich Soedinenii*, 6, 761–762.
- Phipps J.B., Robertson K.R., Smith P.G., Rohrer J.R. (1990). A checklist of the subfamily Maloideae (Rosaceae). *Canadian Journal of Botany*, 68, 2209–2269.
- Piao M.J., Kang K.A., Zhang R., Ko D.O., Wang Z.H., You H.J., Kim H.S., Kim J.S., Kang S.S., Hyun J.W. (2008). Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780, 1448–1457.
- Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlowska A. (2005). *Leki współczesnej terapii*. Warszawa: Split Trading.
- Porter L.J., Hrstich L.N., Chana B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223–230.
- Prakash D., Kumar N. (2011). Cost Effective Natural Antioxidants (pp. 163–188). In: Watson R.R., Gerald J.K., & Preedy V.R. (eds.). *Nutrients, Dietary Supplements, and Nutraceuticals: Cost Analysis Versus Clinical Benefits (Nutrition and Health)*. New York/Dortrecht/Heidelberg/London: Humana Press (Springer).
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
- Rauha J.P., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorela P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 3–12.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.
- Repollés C., Herrero-Martinez J.M., Rafols C. (2006). Analysis of prominent flavonoid aglycones by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*, 1131, 51–57.
- Riboli E., Norat T. (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 559S–569S.
- Robertson K.R., Phipps J.B., Rohrer J.R., Smith P.G. (1991). A synopsis of genera in Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany*, 16, 376–394.
- Sato Y., Itagaki S., Kurokawa T., Ogura J., Kobayashi M., Hirano T., Sugawara M., Iseki K. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmacology*, 403, 136–138.
- Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215S–217S.
- Seneta W., Dolatowski J. (2000). *Dendrologia* (pp. 249–258). Warszawa: PWN.
- Silva C.G., Raulino R.J., Cerqueira D.M., Mannarino S.C., Pereira M.D., Panek A.D., Silva J.F., Menezes F.S., Eleutherio E.C. (2009). *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and *Hyptis fasciculata*. *Phytomedicine*, 16, 761–767.
- Sikorska M., Matlawska I. (2001). Kaempferol, isorhamnetin and their glycosides in the flowers of *Asclepias syriaca* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 58, 269–272.
- Singleton V. L., Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Soga M., Matsuzawa A., Ichijo H. (2012). Oxidative stress-induced diseases via the ASK1 signaling pathway. *International Journal of Cell Biology*, 2012, ID: 439587, 5 pages.
- Sohn E.J., Kang D.G., Choi D.H., Lee A.S., Mun Y.J., Woo W.H., Kim J.S., Lee H.S. (2005a). Effect of methanol extract of *Sorbus* cortex in a rat model of L-NAME-induced atherosclerosis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1239–1243.

- Sohn E.J., Kang D.G., Mun Y.J., Woo W.H., Lee H.S. (2005b). Anti-atherogenic effects of the methanol extract of *Sorbus cortex* in atherogenic-diet rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1444–1449.
- Soler C., Gil MI, Garcia-Viguera C., Tomas-Barberan F.A. (1995). Flavonoids patterns of French honeys with different floral origin. *Apidologie*, 26, 53–60.
- Soobrattee M.A., Bahorun T., Neergheen V.S., Googoolye K., Aruoma O.I. (2008). Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculiaceae families of Mauritian endemic plants. *Toxicology in Vitro*, 22, 45–56.
- Stohs S.J., Miller H., Kaats G.R. (2012). A review of the efficacy and safety of banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) and corosolic acid. *Phytotherapy Research*, 26, 317–324.
- Stratil P., Klejdus B., Kuban V (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 607–616.
- Strzelecka H., Kowalski J. (2000). *Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa* (p. 202). Warszawa: PWN.
- Surveswaran S., Cai Y., Corke H., Sun M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102, 938–953.
- Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elimat T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104, 1372–1378.
- Termentzi A., Alexiou P., Demopoulos V.J., Kokkalou E. (2008b). The aldose reductase inhibitory capacity of *Sorbus domestica* fruit extracts depends on their phenolic content and may be useful for the control of diabetic complications. *Pharmazie*, 63, 693–696.
- Termentzi A., Kefalas P., Kokkalou E. (2006). Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruit at different maturity stages. *Food Chemistry*, 98 (4), 599–608.
- Termentzi A., Kefalas P., Kokkalou E. (2008a). LC–DAD–MS(ESI+) analysis of the phenolic content of *Sorbus domestica* fruits in relation to their maturity stage. *Food Chemistry*, 106 (3), 1234–1245.
- Termentzi A., Zervou M., Kokkalou E. (2009). Isolation and structure elucidation of novel phenolic constituents from *Sorbus domestica* fruits. *Food Chemistry*, 116, 371–381.
- Tsitsa-Tzardi E., Philianos S. (1992). Constituents of *Sorbus torminalis* leaves. *Fitoterapia*, 63, 189–190.
- Turker A.U., Gurel E. (2005). Common mullein (*Verbascum thapsus* L.): recent advances in research. *Phytotherapy Research*, 19, 733–739.
- Vianna R., Brault A., Martineau L.C., Couture R., Arnason J.T., Haddad P.S. (2011). *In vivo* anti-diabetic activity of the ethanolic crude extract of *Sorbus decora* C.K.Schneid. (Rosaceae): a medicinal plant used by Canadian James Bay Cree Nations to treat symptoms related to diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, ID: 237941, 7 pages.
- Vvedenskaya I.O., Rosen R.T., Guido J.E., Russell D.J., Mills K.A., Vorsa N. (2004). Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 188–195.
- Wang S.P., Huang K.J. (2004). Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1032, 273–279.
- Watanabe N., Utamura H., Abe M. (2003). Chemical characteristic of rowan fruit observed from ability both reduction and antibacteria. *Mizu Shari Gijutsu*, 44, 227–230.
- Wojdyło A., Oszmiański J. (2009). Bioactive compounds of selected fruit juices. *Natural Product Communications*, 4, 671–676.
- Yamada K., Hosokawa M., Fujimoto S., Fujiwara H., Fujita Y., Harada N., Yamada C., Fukushima M., Ueda N., Kaneko T., Matsuyama F., Yamada Y., Seino Y., Inagaki N. (2008). Effect of corosolic acid on gluconeogenesis in rat liver. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 80, 48–55.
- Yin M.H., Kang D.G., Choi D.H., Kwon T.O., & Lee H.S. (2005). Screening of vasorelaxant activity of some medicinal plants used in Oriental medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 113–117.
- Yokohira M., Yamakawa K., Saoo K., Matsuda Y., Hosokawa K., Hashimoto N., Kuno T., Imaida K. (2008). Antioxidant effects of flavonoids used as food additives (purple corn color, enzymatically modified isoquercitrin, and isoquercitrin) on liver carcinogenesis in a rat medium-term bioassay. *Journal of Food Science*, 73, C561–C568.
- Yoshizawa Y., Kawaii S., Urashima M., Fukase T., Sato T., Murofushi N., Nishimura H. (2000a). Differentiation-inducing effects of small fruit juices on HL-60 leukemic cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3177–3182.
- Yoshizawa Y., Kawaii S., Urashima M., Fukase T., Sato T., Tanaka R., Murofushi N., Nishimura H. (2000b). Antiproliferative effects of small fruit juices on several cancer cell lines. *Anticancer Research*, 20, 4285–4289.
- Youssef S.A. (1998). Triterpenoids and flavonoid glycoside from fruits of *Sorbus aucuparia* (DC) cultivated in Egypt. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, 20, 63–65.
- Yu T., Lee Y.J., Cho J.Y. (2009). Inhibitory effect of *Sorbus commixta* extract on lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory events in macrophages. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 600–607.
- Yu T., Lee Y.J., Jang H.J., Kim A.R., Hong S., Kim T.W., Kim M.Y., Lee J., Lee Y.G., Cho J.Y. (2011). Anti-inflammatory activity of *Sorbus commixta* water extract and its molecular inhibitory mechanism. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 493–500.
- Zhao L., Ge J., Qiao C., Zhang H., Jiang S. (2008). Separation and quantification of flavonoid compounds in *Rhododendron anthopogonoides* Maxim by high-performance liquid chromatography. *Acta Chromatographica*, 20, 135–146.

