

STRESZCZENIE

Celem pracy była analiza fitochemiczna i farmakologiczna surowców roślinnych pochodzących z szeregu odmian *Rubus idaeus* (malina właściwa), *Rubus occidentalis* (malina zachodnia) i *Lonicera caerulea* var. *edulis* (wiciokrzew siny) hodowanych w Polsce.

Surowcami włączonymi w badania były owoce 11 odmian uprawowych *R. idaeus* ('Benefis', 'Beskid', 'Glen Ample', 'Heritage', 'Laszka', 'Pokusa', 'Polana', 'Polesie', 'Polka', 'Poranna Rosa', 'Willamette'), owoce 1 odmiany uprawowej *R. occidentalis* ('Litacz'), pędy 2 odmian *R. idaeus* ('Glen Ample', 'Willamette') oraz pędy 2 odmian *R. occidentalis* ('Bristol', 'Litacz') pozyskane z egzemplarzy kolekcji Sadowniczego Zakładu Doświadczalnego Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Brzeznej (Brzezna, Polska). Dodatkowo dokonano zbioru pędów *R. idaeus* ze stanu dzikiego, z trzech stanowisk Trójmiejskiego Parku Krajobrazowego. Owoce i kwiaty 3 krajowych odmian uprawowych *L. caerulea* var. *edulis* ('Brazowa', 'Wojtek', 'Zielona') pozyskano ze Szkołki Borówki Wysokiej i Jagody Kamczackiej 'Jagódka' (Lębork, Polska).

W analizie fitochemicznej użyto technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), włączając w to jedno- (1D LC) i dwuwymiarową chromatografię (2D LC), do rozdzielania szeregu metabolitów wtórnych w owocach i pędach malin, oraz owocach i kwiatach wiciokrzewu. Użycie nowych rozwiązań separacyjnych w zakresie opracowanych systemów 2D LC, umożliwiających efektywne rozdzielenie różnych grup metabolitów wtórnych było celem cząstkowym przeprowadzanych badań.

Analiza aktywności biologicznej obejmowała analizę aktywności przeciwbakteryjnej bogatych w elagotaniny ekstraktów z owoców i pędów malin, poprzez ocenę ich oddziaływania z antybiotykami wobec wybranych szczepów bakteryjnych oraz analizę aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksycznej urolityn – produktów metabolizmu elagotanin i kwasu elagowego. Owoce i kwiaty *L. caerulea* var. *edulis* oceniano w zakresie ich działania przeciwdrobnoustrojowego (owoce i kwiaty) antyoksydacyjnego i przeciwzapalnego (owoce).

Przedstawiona dysertacja składa się z czterech części: teoretycznej, doświadczalnej, omówienia wyników badań własnych oraz wyników i wniosków. W części teoretycznej przedstawiono charakterystykę botaniczną, oraz dotychczasowy stan wiedzy na temat składu chemicznego i aktywności biologicznej badanych surowców oraz wybranych produktów ich metabolizmu (urolityn), jak również przegląd technik 2D LC używanych w analizie wybranych grup metabolitów wtórnych obecnych w badanych surowcach. W drugiej części przedstawiono metodologię przeprowadzonych badań doświadczalnych, natomiast części trzecia i czwarta koncentrują się na opisie i omówieniu uzyskanych wyników i wyciągniętych w nich wniosków.

Przeprowadzono analizę fitochemiczną związków fenolowych należących do elagotanin, flawonoli i flawan-3-oli i kwasów fenolowych w owocach odmian krajowych *R. idaeus* i *R. occidentalis* metodą HPLC-DAD ESI-MS stosując kolumnę Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3µm) i elucję gradientową obejmującą wzrost stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, v/v/v) w 0.1% wodnym roztworze TFA od 12 do 100%. Elagotaniny i ich pochodne identyfikowano w ekstraktach etanolowo-wodnych, natomiast identyfikację flawonoli, flawan-3-oli oraz kwasów fenolowych przeprowadzono we frakcjach octanu etylu ekstraktów metanolowych.

W ekstraktach etanolowo-wodnych owoców wszystkich odmian potwierdzono obecność elagotanin: sangwiny H-6, lambertianiny C, oraz w mniejszych ilościach izomeru sangwiny H-6, dwóch izomerów sangwiny H-10, sangwiny H-2 oraz kwasu elagowego. Owoce badanych odmian odznaczały się pewnym zróżnicowaniem składu chemicznego w zakresie profili zawartości elagotanin, głównie sangwiny H-6, jej izomeru oraz lambertianiny C. Dodatkowo sangwinę H-2 oznaczono po raz pierwszy jako składnik owoców maliny właściwej i maliny zachodniej.

Oprócz związków należących do elagotanin, we frakcjach octanu etylu, w oparciu o związki wzorcowe zidentyfikowano kwas galusowy, protokatechowy, kawowy, izokwercetynę, hiperozyd, rutynę, tilirozyd, 3-O-glukuronid kwercetyny, 3-O-glukuronid kemferolu, kemferol katechinę, epikatechinę, epigalokatechinę, procyanidynę B₁ oraz B₂. Na podstawie widm ESI-MS otrzymanych techniką SIM zidentyfikowano dodatkowo galoilo-bis-HHDP-glukozę, trzy pentozydy i acetylopentozydy kwasu elagowego oraz nieznanne pochodne katechiny i procyanidyny. Owoce badanych odmian charakteryzowały bardzo niskie stężenia w/w związków oraz niewielkie zróżnicowanie w zakresie ich kompozycji pomiędzy badanymi odmianami. W związku z tym sformułowano wniosek, że powyższe związki nie mają wpływu na różnice w aktywności biologicznej owoców malin obserwowane we wcześniejszych badaniach [19].

W ekstraktach z owoców *R. occidentalis* po raz pierwszy oznaczono: lambertianinę C, izomer sangwiny H-6, izomery sangwiny H-10, sangwinę H-2, pentozydy i acetylopentozydy kwasu elagowego, kwas protokatechowy, epikatechinę, epigalokatechinę, procyanidynę B₁ i B₂, izokwercetynę, 3-O-glukuronid kwercetyny, 3-O-glukuronid kemferolu oraz kemferol.

Kontynuowano badania fitochemiczne pędów *R. idaeus* opracowując system 2D LC do separacji ich zespołu metabolitów wtórnych.

Do identyfikacji metabolitów wtórnych w pędach *R. idaeus* 'Willamette' zmodyfikowano wcześniej opracowany system 'comprehensive' LC x LC, w zakresie zastosowanej kolumny w 2D – Chromolith Performance (100 x 4.6 mm, 2 µm), która była 4-rzy dłuższa od poprzedniej,

oraz zwiększając prędkość przepływu z 1.5 do 6 ml/min [19]. Na otrzymanym chromatogramie LC x LC zidentyfikowano sangwinę H-6, kwasy galusowy, protokatechowy, kawowy oraz elagowy, katechinę, epikatechinę, procyanidynę B₂, hiperozyd, izokwercetynę, 3-O-glukuronid kwercetyny oraz 3-O-galaktozyd kemferolu – natomiast nie odnotowano sygnałów związków odpowiadającym innym elagotaninom zidentyfikowanym w ramach jednowymiarowej analizy HPLC-DAD ESI-MS: izomerom sangwiny H-10, lambertianinie C, izomerowi sangwiny H-6 i sangwinie H-2.

Do badań włączono pędy odmiany o wyższej zawartości elagotanin ('Glen Ample'), modyfikując system 2D LC w zakresie rodzajów kolumn oraz programów elucji gradientowej. W badaniach wstępnych użyto kolumn wykonanych w technologii 'core-shell' typu Kinetex o różnych mechanizmach retencji: C-18, PFP oraz HILIC, oraz dwóch programów elucji gradientowej: jeden obejmujący wzrastające stężenie mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 v/v/v), od 10 do 100%, w 0.1% wodnym roztworze TFA, natomiast drugi wrastające stężenie mieszaniny ACN:MeOH:H₂O:TFA (5:80:15:0.1 v/v/v/v), od 10 do 60%, w 0.1% wodnym roztworze TFA. W badaniach identyfikacyjnych użyto detektora UV, oraz MS z jonizacją ESI i APCI, które są komplementarnymi względem siebie metodami jonizacji. Obniżenie temperatury kolumny z T – 32 °C do T – 20 °C pozwoliło na efektywniejsze rozdzielanie i ograniczenie efektu rozmycia pasma (ang. *band broadening*).

Rozdzielone związki z wartościami t_r poniżej 30 min w większości rozpoznano jako elagotaniny, kwasy fenolowe oraz flawan-3-ole, natomiast związki o wartości t_r powyżej 30 min w przeważającej większości stanowiły flawonole oraz pochodne kwasu elagowego. W zależności od zastosowanej kolumny oraz fazy ruchomej, obserwowano koelucję niektórych związków o niższych intensywnościach pików, z pikami o wyższej intensywności i nie mogły być zarejestrowane przy długości fali λ – 280 nm.

Kolumny Kinetex C-18 i Kinetex PFP zapewniały najlepszą rozdzielczość przy czym w porównaniu do Kinetex C-18, Kinetex PFP była bardziej efektywna, rozdzielając pentozydy i acetylpentozydy kwasu elagowego, podczas gdy jedynym związkiem oddzielnym lepiej na kolumnie Kinetex C-18 był izomer sangwiny H-6. Z zastosowaniem fazy ruchomej zawierającej ACN:MeOH:H₂O:TFA (5:80:15:0.1 v/v/v/v) rozdzielono epigalokatechinę oraz trzy związki zidentyfikowane jako galoilo-HHDP-glukoza, natomiast sangwina H-2 i metylopentozyd kwasu elagowego były rozdzielane tylko w fazie ruchomej zawierającej ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 v/v/v/v).

Separacja na kolumnach Kinetex C-18 i PFP pozwoliła na rozdzielanie i wykrycie szeregu związków dotychczas niezidentyfikowanych w pędach *R. idaeus*, takich jak pochodne kwasu elagowego czy epigalokatechina, jednak nie osiągnięto satysfakcjonującego rozdzielania kwasu

elagowego, hiperozydu, izokwercetyny, 3-O-glukuronidu kwercetyny oraz acetylopentozydów kwasu elagowego.

W procedurze rozdzielania 'on-line' 2D LC wybrano kolumnę Luna C-18 (150 x 1 mm, 3 μm) ($T - 34^{\circ}\text{C}$) do rozdzielń w ^1D , oraz Kinetex PFP (100 x 4.6 mm, 2.6 μm) ($T - 20^{\circ}\text{C}$) w ^2D . Do rozdzielń zastosowano fazę ruchomą będącą mieszaniną ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 $v/v/v$) w 0.1 % wodnym roztworze TFA tworząc program dwa programy elucji gradientowej, obejmujące wzrastające stężenie ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 $v/v/v$), w 0.1 % wodnym roztworze TFA, od 10 do 100 % w przypadku programu w ^1D , oraz od 10 do 49 % w programie w ^2D . Na kolumnie ^1D składniki próbki wstępnie rozdzielono w warunkach elucji gradientowej na frakcje o różnej polarności, które następnie wprowadzano na kolumnę ^2D , w czasie modulacji wynoszącym 8 minut. Użyto detektora UV oraz MS z jonizacją ESI, APCI oraz DUIS-MS, w trybie jonów ujemnych. Identyfikację związków przeprowadzono na podstawie porównania widm UV oraz MS ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi. Opracowane warunki separacji uznano za optymalne biorąc pod uwagę parametry techniczne systemu HPLC, typy zastosowanych kolumn oraz specyfikę badanej matrycy roślinnej w zakresie kompozycji związków czynnych.

Wyciągi z pędów *R. idaeus* odmiany 'Glen Ample' poddano analizie z użyciem opracowanego systemu 'on-line' 2D LC dzieląc ponad 40 związków w postaci pojedynczych pików, spośród których zidentyfikowano: sangwinę H-6 oraz jej izomer, 4 izomery sangwiny H-10, sangwinę H-2 i jej izomer, szereg izomerów galoilo-HHDP-glukozy oraz galoilo-bis-HHDP-glukozy, pochodne kwasu elagowego w postaci pentozydu, metylopentozydów oraz acetylopentozydów, kwasy galusowy, protokatechowy i kawowy, katechinę, epikatechinę, epigalokatechinę, procyjanidyny B₁ i B₂, hiperozyd, izokwercetynę oraz 3-O-glukuronid kwercetyny.

Elagotaniny identyfikowano głównie w oparciu o widma ESI-MS, ponieważ jony o masie powyżej 1000 Da nie były rejestrowane w przypadku jonizacji APCI. Dla większości elagotanin i pochodnych kwasu elagowego obserwowano jon odpowiadający kwasowi elagowemu, obecny tylko w widmach APCI, przy m/z 301 $[\text{M-H}]^-$. Podobnie w widmach APCI glikozydów flawonoidowych obserwowano obecność jonów fragmentacyjnych odpowiadających aglikonom flawonoidowym.

System 'on-line' 2D LC zapewnił 100% wzrost rozdzielczości względem rozdzielń jednowymiarowych i pozwolił na rozdzielenie szeregu związków nie rozpoznawanych wcześniej jako składniki pędów *R. idaeus*, włączając w to sangwinę H-2 i jej izomer, izomer sangwiny H-6, trzy izomery galoilo-HHDP-glukozy, dwa izomery galoilo-bis-HHDP-glukozy oraz jeden pentozyd, dwa metylopentozydy oraz dwa acetylopentozydy kwasu elagowego.

Uwzględniając fakt że skład chemiczny pędów *R. occidentalis* nie jest znany, do badań fitochemicznych przeznaczono pędy 2 odmian uprawowych *R. occidentalis* ('Bristol' i 'Litacz'), porównując ich profile z profilami pędów gatunku *R. idaeus* (odmiany 'Glen Ample') oraz gatunku pokrewnego *Rubus fruticosus* (pozyskanych ze stanu naturalnego). Metanolowe ekstrakty z pędów poddano separacji na kolumnie Kinetex PFP, z użyciem programu elucji gradientowej obejmującego wzrastające stężenie mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*), od 10% do 40%, w 0.1% wodnym roztworze TFA. Identyfikacji związków dokonano w oparciu o porównanie widm UV oraz ESI-MS ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi.

W pędach dwóch badanych odmian *R. occidentalis* wykryto: kwasy galusowy, protokatechowy, kawowy i elagowy, pentozyd i dwa acetylpentozydy kwasu elagowego, trzy izomery sangwiny H-10, katechinę, epikatechinę, procyjanidynę B₂, izokwercetynę oraz 3-O-glukuronid kwercetyny, pochodną katechiny/procyjanidynę oraz dwa flawonoidy o nieznannej strukturze.

Profil chromatograficzny pędów obydwu badanych odmian *R. occidentalis* był odmienny od profili pędów maliny właściwej i jeżyny, oraz znacznie uboższy (21 związków fenolowych, na tle 31 związków zidentyfikowanych w pędach *R. idaeus* 'Glen Ample' i 28 związków w pędach *R. fruticosus*) we wszystkie związki fenolowe obecne w badanych gatunkach, z wyjątkiem kwasu elagowego. W pędach *R. occidentalis* nie wykryto również najbardziej charakterystycznej elagotaniiny dla rodzaju *Rubus*: sangwiny H-6.

Chemotaksonomiczne porównanie profili pędów *R. occidentalis* z pędami *R. idaeus* i *R. fruticosus*, wskazują na dalsze pokrewieństwo *R. occidentalis* i *R. idaeus* pomimo przynależności do tego samego podrodzaju (*Idaeobatus*).

Uwzględniając tradycyjne zastosowanie zbieranych zimą pędów maliny właściwej jako surowca przeciwprzeziębieniowego, oceniono profile metabolitów wtórnych w cyklu wegetacyjnym pędów maliny właściwej zebranych z trzech naturalnych stanowisk Trójmiejskiego Parku Krajobrazowego. Metanolowe ekstrakty z pędów poddano separacji na kolumnie Kinetex PFP, z użyciem programu elucji gradientowej obejmującego wzrastające stężenie mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1 *v/v/v*), od 10% do 40%, w 0.1% wodnym roztworze TFA. Identyfikacji związków dokonano w oparciu o porównanie widm UV oraz ESI-MS ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi.

Profile pędów maliny właściwej zebranych z trzech stanowisk naturalnych były zbliżone do pędów *R. idaeus* odmian uprawowych, z kwasem elagowym oraz sangwiną H-6 jako związkami dominującymi w zespole.

Najwyższe stężenia dla badanych fenoli obserwowano w okresie wiosennym, jesienią odnotowując ich wyraźny spadek, który utrzymywał się w pędach zimowych. Na podstawie otrzymanych wyników wysunięto wniosek że zbiór pędów *R. idaeus* do celów leczniczych powinien mieć miejsce na wiosnę ze względu na najwyższe w tym okresie stężenia aktywnych biologicznych metabolitów wtórnych.

Oceniono skład chemiczny owoców trzech krajowych odmian uprawowych *L. caerulea* var. *edulis* ('Brazowa', 'Wojtek', 'Zielona') w zakresie metabolitów wtórnych należących do związków polifenolowych, prostych fenoli oraz irydoidów. W analizie zastosowano kolumnę Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3µm) i elucję gradientową obejmującą wzrost stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, v/v/v) w 0.1% wodnym roztworze TFA od 12 do 100%. Identyfikacji związków dokonano w oparciu o porównanie widm UV oraz ESI-MS ze związkami wzorcowymi oraz danymi literaturowymi.

Badane odmiany charakteryzowały się zbliżonym profilem chromatograficznym w zakresie związków fenolowych, z 3-O-glukozydem cyjanidyny jako dominującym związkiem, wraz z towarzyszącymi mu 3,5-O-diglukozydem cyjanidyny, 3-O-rutynozydem cyjanidyny, 3-O-glukozydem pelargonidyny, 3-O-glukozydem peonidyny, 3,5-O-diglukozydem peonidyny, hiperozydem, rutyną, izokwercetyną, procyjanidyną B₂, katechiną, epikatechiną oraz kwasami chlorogenowym, neochlorogenowym i 3,5-O-dikawoilochinowym. Chociaż większość związków była wcześniej identyfikowana jako składniki owoców *L. caerulea*, to procyjanidyna B₂ została zidentyfikowana po raz pierwszy.

W oparciu o widma UV, we wszystkich badanych odmianach zidentyfikowano 6 związków o maksimach absorpcji charakterystycznych dla związków irydoidowych (λ_{\max} 234-238 nm). W ich identyfikacji porównano efektywność dwóch typów jonizacji: ESI i APCI, w dodatnim oraz ujemnym trybie jonów. W przypadku jonizacji ujemnej, zarówno w widmach ESI jak i APCI, obserwowano wysoką intensywność jonów stanowiących addukty z TFA ([M-H+TFA]⁻), przy bardzo niskiej intensywności sygnałów jonów pseudomolekularnych, natomiast w trybie jonów dodatnich, w większości identyfikowanych związków, sygnały jonów pseudomolekularnych charakteryzowały się wysoką intensywnością, i towarzyszył im szereg innych jonów odpowiadających adduktom [M+NH₄]⁺, [M+Na]⁺ czy [M+K]⁺ oraz jon powstający po odszczepieniu cząsteczki wody ([M+H-H₂O]⁺).

W oparciu o związki wzorcowe, trzy spośród sześciu rozdzielonych irydoidów rozpoznano jako kwas loganowy, swerozyd i loganinę. Na podstawie widm UV, MS i porównania z danymi literaturowymi pozostałe związki wstępnie zidentyfikowano jako 7-O-pentozyd kwasu loganowego, 7-O-pentozyd kwasu 7-epi-loganowego oraz 7-O-pentozyd loganiny. Analiza

ilościowa ujawniła że owoce badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis* zawierają irydoidy w zbliżonym zakresie stężeń, spośród których dominującym związkiem w badanych odmianach jest kwas loganowy. Są to pierwsze doniesienia na temat kompozycji związków irydoidowych w owocach *L. caerulea* var. *edulis*.

Oceniono skład chemiczny kwiatów trzech krajowych odmian uprawowych *L. caerulea* var. *edulis* ('Brazowa', 'Wojtek', 'Zielona') w zakresie metabolitów wtórnych należących do flawonoidów, fenolokwasów, irydoidów oraz saponin. Kwiaty gatunku *L. caerulea* nie były wcześniej badane w zakresie składu chemicznego.

Do oznaczeń ilościowych i jakościowych zespołów metabolitów wtórnych z grup flawonoidów, irydoidów oraz fenolokwasów, w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis* opracowano system 'on-line' i 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC. Identyfikacji dokonano w oparciu o związki wzorcowe lub w oparciu o widma UV oraz ESI-MS otrzymane w trybie zbierania pełnych widm (¹D) oraz techniką SIM (²D), porównując je z danymi literaturowymi.

W warunkach 1D LC otrzymano dobre rozdzielanie 26 związków z czego 9 należało do kwasów fenolowych, 2 do irydoidów, oraz 15 do flawonoidów. Dla związków które nie rozdzieliły się w 1D LC, eluujących w zakresach wartości t_R 12-13 min (FR.1), 15-16 min (FR.2), 17.5-18.5 min (FR.3), 24.5-25.5 min (FR.4), oraz 27-28 min (FR.5), opracowano system 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC – składający się z kolumny Discovery HS C-18 w ¹D (150 x 2.1 mm, 3 μ m) oraz kolumny Kinetex F5 (50 x 4.6 mm, 2.6 μ m) w ²D. Wszystkie opracowane programy elucji obejmowały wzrost stężenia mieszaniny ACN:H₂O:TFA (50:50:0.1, *v/v/v*) w 0.1% wodnym roztworze TFA od 12 do 100%, przy czym w ¹D zastosowano gradient liniowy, natomiast w ²D programy elucji łączące w poszczególnych etapach elucję izokratyczną i gradient liniowy. Przy użyciu 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC rozdzielono dodatkowo 21 związków z czego 6 należało do kwasów fenolowych, 8 do irydoidów, oraz 7 do flawonoidów.

System 'on-line' 'heart-cutting' 2D LC umożliwił efektywne rozdzielanie związków czynnych kwiatów odmiany 'Wojtek', natomiast w odniesieniu do odmian 'Brazowa' i 'Zielona' separacja składników FR.A i FR.B eluujących z ¹D w czasach t_R 18.5-19 min i t_R 19.1-19.7 min nie była możliwa. Związki z FR.A i FR. B odmian 'Brazowa' oraz 'Wojtek' rozdzielono w systemie 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC. Frakcje zebrano ręcznie z kolumny ¹D, w 3 powtórzeniach oraz rozdzielono na kolumnie Kinetex PFP (100 x 4.6 mm, 2.6 μ m) stosując program używany w rozdzielaniu ¹D, co pozwoliło na identyfikację dwóch dodatkowych związków irydoidowych.

Przy użyciu 'on-line' i 'off-line' 'heart-cutting' 2D LC ustalono, że kwiaty 3 odmian krajowych *L. caerulea* są źródłem 51 związków należących do flawonoidów, kwasów fenolowych i irydoidów.

W materiale roślinnym 22 związki rozpoznano jako flawonoidy, spośród których większość stanowiły pochodne luteoliny i kwercetyny. Wobec związków wzorcowych zidentyfikowano 9 flawonoidów: rutynę, 7-O-rutynozyd luteoliny, izokwercetynę, 7-O-glukozyd luteoliny, 3-O-rutynozyd kemferolu, kwercytrynę, ochnaflawon, kupressuflawon oraz amentoflawon. Spośród pozostałych 14 związków uznanych za flawonoidy, w oparciu o otrzymane widma UV oraz MS, 9 z nich wstępnie zidentyfikowano bazując na danych literaturowych jako: dwa ramnozylo-heksozydy luteoliny, heksozyd kwercetyny, ramnozylo-heksozyd apigeniny, diheksozyd luteoliny, 7-O-neohesperozyd chryzoeriolu, pentozylo-heksozyd kwercetyny pentozylo-heksozyd luteoliny oraz ramnozylo-heksozyd izoramnetyny. Obserwowano różnice w stężeniach niektórych flawonoidów pomiędzy badanymi odmianami, niemniej jednak dominującymi flawonoidami w kwiatach wszystkich trzech badanych odmian była rutyna, wraz z obecnymi w znacznych ilościach kupressuflawonem, amentoflawonem oraz pentozylo-heksozydem kwercetyny. Flawonoidy stanowiły dominującą grupę związków spośród wszystkich badanych grup metabolitów wtórnych w kwiatach *L. caerulea* var. *edulis*, zarówno pod względem liczby zidentyfikowanych związków, jak i wartości stężeń, co wyróżnia kwiaty gatunku *L. caerulea* var. *edulis* na tle innych gatunków z rodzaju *Lonicera*.

W kwiatach badanych odmian 15 związków rozpoznano jako fenolokwasy. Dwa związki: kwas kawowy i chlorogenowy, zidentyfikowano w oparciu o porównanie z wzorcami, natomiast identyfikacja kolejnych 12 fenolokwasów: neochlorogenowego, 3 kwasów kawoilochinowych, 4,5-di-O-kawoilochinowego, 3,5-di-O-kawoilochinowego, 3,4-di-O-kawoilochinowego, p-kumaroilochinowego, feruilochinowego, feruilokawoilochinowego oraz glukozydu kwasu p-kumaroilochinowego i heksozydu kwasu kawowego była oparta na porównaniu wartości t_R , widm UV oraz MS z danymi literaturowymi. Odnotowano zbliżone poziomy stężenie fenolokwasów w kwiatach wszystkich 3 badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*. Kwasy chlorogenowy i 3,5-di-O-kawoilochinowy dominowały z zespołu, wraz z kwasem neochlorogenowym i 3,4-di-O-kawoilochinowym obecnymi w wyższych stężeniach, co jest zgodne z wynikami dotyczącymi kwiatów innych gatunków z rodzaju *Lonicera*.

W materiale roślinnym 14 związków zidentyfikowano jako irydoidy. Kwas loganowy, loganinę i swerozyd zidentyfikowano w oparciu o porównanie ze związkami wzorcowymi, natomiast kolejne 10, w tym: dwa izomery kwasu sekologanowego, kwas 8-epi-loganowy, sekologanozyd, 7-O-arabinozyd demetylosekologanolu, epi-wogelozyd, sekoksyloganina,

serynosekologanina, treoninosekologanina oraz 7-ester butylowy sekoksyloganiny zidentyfikowano w oparciu o porównanie wartości t_R , widm UV oraz MS z danymi literaturowymi. Kwas 8-epi-loganowy, sekoksyloganinę i serynosekologaninę zidentyfikowano jedynie w odmianach 'Brazowa' i 'Zielona' natomiast jeden z izomerów kwasu sekologanowego oznaczono tylko w odmianie 'Wojtek'. Kwas loganowy był dominującym irydoidem w odmianie 'Wojtek', oraz występował również w znacznych stężeniach w pozostałych dwóch odmianach, jednak towarzyszyło mu równie wysokie stężenie niezidentyfikowanego związku irydoidowego, oraz, w przypadku odmiany 'Brazowa', znaczne stężenie loganiny. Dane literaturowe wskazują na swerozyd i loganinę jako dominujące irydoidy w kwiatach rodzaju *Lonicera*, co jest częściowo zgodne z wynikami otrzymanymi dla kwiatów odmiany 'Brazowa'.

Odmiana 'Wojtek' wyróżniała się najwyższym stężeniem związków z grupy flawonoidów i kwasów fenolowych podczas gdy najwyższe poziomy irydoidów występowały w odmianach 'Wojtek' i 'Brazowa'.

Do rozdzielenia i identyfikacji saponin w kwiatach 3 badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*, użyto kolumnę Discovery HS C-18 (150 x 2.1 mm, 3 μ m) wraz z programem elucji gradientowej obejmującym wzrost stężenia mieszaniny ACN:MeOH:HCOOH (80:20:0.05, *v/v/v*) w 0.1% wodnym roztworze HCOOH od 10 do 65%. Do identyfikacji związków zastosowano detektory ELSD i ESI-MS. Z użyciem detektora ELSD nie odnotowano obecności saponin w kwiatach wszystkich 3 odmian wiciokrzewów, natomiast w widmie ESI-MS, w trybie jonów ujemnych wykryto obecność jonu stanowiącego addukt z kwasem mrówkowym ([M-H+HCOOH]), odpowiadającego masie cząsteczkowej saponiny: estrowi 28-O- β -glukopiranozylo(6 \rightarrow 1)-O- β -glukopiranozylo-hederageniny, identyfikowanej w kwiatach rodzaju *Lonicera*. Na tej podstawie stwierdzono że kwiaty wszystkich 3 badanych odmian krajowych są źródłem saponiny: estru 28-O- β -glukopiranozylo(6 \rightarrow 1)-O- β -glukopiranozylo-hederageniny, która jest obecna w śladowych ilościach [262]. W dotychczasowych pracach saponiny identyfikowano w niewielkich ilościach w kwiatach rodzaju *Lonicera*, co jest zgodne w wynikami obecnej analizy, jakkolwiek ich zespół był jakościowo bogatszy [262, 267, 272].

Uwzględniając dane literaturowe o synergizmie niektórych ekstraktów roślinnych, lub wyizolowanych z nich związków z antybiotykami [291, 294, 295, 299-306], oceniono interakcje badanych ekstraktów z owoców *R. idaeus* ('Poranna Rosa', 'Laszka'), owoców *R. occidentalis* ('Litacz') oraz pędów *R. idaeus* ('Willamette') z 36 różnymi antybiotykami wobec 4 szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) i 4 szczepów bakterii Gram-ujemnych (*Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*) charakteryzujących się największą

wrażliwością na badane ekstrakty [19, 28]. Dodatkowo badania prowadzono również wobec 2 szczepów antybiotykoopornych *S. aureus* MRSA (12677 i 13318) oraz *Escherichia coli* ESBL (12186 i 12293), które zbadano na tle ich szczepów wzorcowych.

W badaniach interakcji ekstraktów z owoców i pędów malin z antybiotykami, obserwowane zjawiska synergizmu, antagonizmu lub addycji były zależne od rodzaju zastosowanego ekstraktu, antybiotyku oraz szczepu bakteryjnego.

W przypadku bakterii Gram-dodatnich, obserwowano że ekstrakty z owoców i pędów działają synergistycznie z teracyklinami wobec *C. diphtheriae* i *N. meningitidis*, natomiast antagonistycznie z aminoglikozydami i fluorochinolonami wobec *S. aureus* i *S. epidermidis*. Bakterią wobec której obserwowano największą liczbę synergizmów synergizmów była *C. diphtheriae*.

W przypadku bakterii Gram-ujemnych dominującym typem interakcji ekstrakt-antybiotyk we wszystkich badanych szczepach był efekt addycji. Jednakże podobnie jak w przypadku bakterii Gram-dodatnich obserwowano znaczną liczbę synergizmów badanych ekstraktów z tetracykliną wobec *H. pylori* i *N. meningitidis*.

Dla badanych szczepów *S. aureus* MRSA oraz *E. coli* ESBL obserwowano działanie antagonistyczne prawie wszystkich badanych ekstraktów z gentamycyną, oraz wszystkich badanych szczepów z cyprofloksacyną wobec szczepów *E. coli* ESBL. W pojedynczych przypadkach odnotowano synergizm antybiotyków (klindamycyna, ampicylina, penicylina) z ekstraktem z pędów *R. idaeus* 'Willamette' który niwelował antybiotykooporność szczepów *S. aureus* MRSA 12677 i 13318.

Zarówno wobec szczepu wzorcowego jak i szczepów antybiotykoopornych ESBL 12293 i ESBL 12186 bakterii *E. coli* zauważono działanie antagonistyczne prawie wszystkich badanych ekstraktów z gentamycyną, cyprofloksacyną oraz kotrimoksazolem.

Wyniki badań aktywności przeciwbakteryjnej związków pochodzenia roślinnego stanowią ważny obszar poszukiwań nowych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, jakkolwiek należy podkreślić że badania synergizmu antybiotyków z ekstraktami pochodzenia roślinnego mogą prowadzić do opracowania nowych metod leczenia i mogą okazać się skutecznym narzędziem w walce z wieloopornością bakterii na antybiotyki [289]. Dlatego więcej badań powinno być ukierunkowanych na analizę interakcji roślinnych metabolitów wtórnych z antybiotykami, z uwzględnieniem ich molekularnego mechanizmu [289, 294].

Ponieważ elagotaniny stanowią główną grupę metabolitów wtórnych w surowcach malin, oraz stwierdzono że ich metabolity – urolityny – są aktywne biologicznie [87, 107, 109-143], postanowiono ocenić ich aktywność przeciwdrobnoustrojową i cytotoksyczną.

Badania aktywności przeciwbakteryjnej urolityn A-C oraz metylourolityn A-B prowadzono wobec 10 szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) oraz Gram-ujemnych (*Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*). Działanie hamujące wzrost obserwowano dla 3 spośród 5 badanych urolityn obserwowano tylko wobec pojedynczych bakterii.

Działanie hamujące wzrost w stężeniu 1 mg/ml odnotowano wobec *C. diphtheriae* w przypadku urolityn A, C i metylourolityny B, wobec *S. epidermidis* w przypadku urolityny A, oraz wobec *K. pneumoniae* w przypadku urolityny C. Najsilniejszym działaniem charakteryzowała się urolityna C, której wartości MIC wobec bakterii *S. aureus* i *S. epidermidis* wynosiły 0.25 mg/ml i 0.06 mg/ml, odpowiednio. Aktywność przeciwbakteryjna urolityn była o wiele słabsza niż sangwiny H-6 i kwasu elagowego.

Oceny aktywności przeciwnowotworowej urolityn A-C dokonano przy pomocy testu oceny cytotoksyczności MTT wobec 4 linii komórkowych ludzkiego raka piersi: MCF-7, T47D, BT474 i MDA-MB-468, wyznaczając wartości IC_{50} . Ponadto porównano aktywność wolnego kwasu elagowego, elagotany sangwiny H-6 (stanowiącą formę glikozydowo związanego kwasu elagowego), oraz ekstraktu z pędów *R. idaeus* 'Willamette', stanowiącego bogate źródło kwasu elagowego i sangwiny H-6. Dla niektórych związków gdzie eksperymentalnie nie osiągnięto stężenia odpowiadającego IC_{50} , określono wartości predykcyjne.

Nie stwierdzono aktywności cytotoksycznej ekstraktu z pędów maliny natomiast aktywność cytotoksyczna kwasu elagowego i sangwiny H-6 wobec poszczególnych linii była na zbliżonym poziomie i przyjmowała wartości IC_{50} 57-85 $\mu\text{g/ml}$ dla sangwiny H-6 oraz 54-80 $\mu\text{g/ml}$ dla kwasu elagowego. Linią najbardziej wrażliwą na działanie obydwu związków była linia MDA-MB-468, a następnie, w kolejności, linie T47D, MCF-7 oraz BT474.

Wartości IC_{50} oznaczone dla urolityny A wobec linii MCF-7 oraz BT474 były na zbliżonym poziomie i wynosiły 22-25 $\mu\text{g/ml}$. Natomiast wobec pozostałych dwóch linii (T47D i MDA-MB-468), aktywność cytotoksyczna urolityny A była ponad 2-razy silniejsza (IC_{50} 9-10 $\mu\text{g/ml}$). Dla urolityny C wartości IC_{50} wobec linii T47D oraz MDA-MB-468 wynosiły odpowiednio 15 i 17 $\mu\text{g/ml}$.

W porównaniu do sangwiny H-6 i kwasu elagowego, urolityny A i C charakteryzowały się od 2 do 8-razy silniejszą aktywnością cytotoksyczną, przy czym linie T47D oraz MDA-MB-468 charakteryzowały się większą wrażliwością na działanie cytotoksyczne urolityn.

Aby porównać aktywność przeciwbakteryjną owoców i kwiatów *L. caerulea* var. *edulis* do aktywności poprzednio badanych owoców malin [19], wyznaczono wartości MIC i MBC

badanych ekstraktów wobec 15 szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* grupy A, B i G, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) i Gram-ujemnych (*Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*).

Ekstrakt z owoców hamował wzrost 4 bakterii z wartościami MIC od 1 do 32 mg/ml, oraz wykazywał aktywność bakteriobójczą wobec 11 bakterii, z wartościami MBC od 8 do 64 mg/ml. Bakteriami najbardziej wrażliwymi na bakteriobójcze działanie ekstraktu były *Corynebacterium diphtheriae*, *Moraxella catarrhalis* i *Neisseria meningitidis*. W porównaniu do wcześniejszych danych [19], aktywność przeciwbakteryjna ekstraktu z owoców wiciokrzewu była podobna bądź na niższym poziomie niż oznaczana dla ekstraktów z owoców *R. idaeus* i *R. occidentalis*. Natomiast ekstrakt z kwiatów nie wykazywał działania bakteriobójczego i hamował wzrost tylko 9 bakterii. W większości przypadków ekstrakt z kwiatów działał słabiej niż ekstrakt z owoców, za wyjątkiem bakterii *C. diphtheriae*, *Streptococcus* grupy A oraz *S. epidermidis* wobec których wartości MIC przyjmowały wartość od 2 do 4 mg/ml.

W poprzednich badaniach ustalono że aktywność antyoksydacyjna i przeciwzapalna ekstraktów z owoców *R. idaeus* i *R. occidentalis* jest skorelowana z zawartością pochodnych cyjanidyny [19]. Ponieważ owoce *L. caerulea* var. *edulis* rozpoznano jako bogate źródło antocyjanów, w tym pochodnych cyjanidyny, dokonano oceny ich aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej.

Aby ocenić aktywność antyoksydacyjną ekstraktu z owoców *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek', użyto dwóch testów oceniających zdolność zmiatania wolnych rodników (test DPPH) oraz potencjał redukcyjny (test fosforomolibdenowy). W teście DPPH wartość EC₅₀ ekstraktu z owoców wiciokrzewu wynosiła 109.5 µg/ml, natomiast potencjał redukcyjny w teście fosforomolibdenowym wynosił 87.2 mg/g AAE (ekwiwalent 0.49 µmoli kwasu askorbinowego). W porównaniu do danych literaturowych, owoce wiciokrzewu siniego charakteryzują się średnią aktywnością antyoksydacyjną oraz słabym potencjałem redukcyjnym.

Aktywność przeciwzapalną ekstraktu z owoców *L. caerulea* var. *edulis* 'Wojtek' oznaczano dla 3 dawek (50, 500 oraz 1000 mg/kg m.c.), w warunkach in vivo, modelu indukowanego karageniną obrzęku łapy szczura, w odniesieniu do indometacyny. Ze wszystkich badanych dawek statystycznie istotne zahamowanie obrzęku obserwowano jedynie dla dawki 500 mg/kg m.c., które było ok. 2-razy słabsze od działania indometacyny w pierwszych 2 godzinach eksperymentu, natomiast od 3 do 5 godziny ich efekt przeciwzapalny był porównywalny i utrzymywał się na tym samym poziomie.

Aktywność antyoksydacyjna i przeciwzapalna ekstraktu z owoców *L. caerulea* var. *edulis* była niewiele słabsza niż ekstraktu z owoców *R. occidentalis* (który zidentyfikowano jako najbardziej efektywny ekstrakt z owoców malin w poprzednich badaniach) oraz prawdopodobnie jest skorelowana z zawartością antocyjanów.

Otrzymane wyniki uzupełniają wiedzę o składzie chemicznym i właściwościach farmakologicznych owoców i pędów maliny *R. idaeus* i *R. occidentalis* oraz owoców i kwiatów *L. caerulea*.

System 2D LC użyty w analizie składu chemicznego pędów malin może być przydatny w badaniach polifenoli w innych surowcach z rodzaju *Rubus*. Podobnie, opracowany do analizy fitochemicznej kwiatów system 2D LC może być użyteczny w badaniach składu chemicznego innych gatunków z rodzaju *Lonicera*.