

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

**WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**



## **Katarzyna Kimel**

---

**Badania estrów kwasu kawowego w niektórych gatunkach z rodzaju  
*Symphytum* i *Arnica* z oceną *in vitro* aktywności przeciwzapalnej  
oraz dostępności farmaceutycznej**

**PRACA DOKTORSKA**

---

PROMOTOR:

**Prof. dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska**

PROMOTOR POMOCNICZY:

**prof. dr hab. n. farm. Małgorzata Sznitowska**

**KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOGNOZJI**

**GDAŃSK 2023**

## ***Podziękowania***

**Profesor Mirosławie Krauze-Baranowskiej** za wskazanie tematu badań, liczne cenne wskazówki oraz wsparcie merytoryczne w realizacji pracy doktorskiej

**Pracownikom Katedry Farmakognozji oraz Ogrodu Roślin Leczniczych** za efektywną współpracę w prowadzonych badaniach oraz budowanie koleżeńskiej atmosfery

**Rodzinie i Bliskim** za pomoc w dążeniu do wyznaczonego celu

**Praca obejmuje wyniki dotychczas nieopublikowane oraz zwarte w następujących publikacjach:**

**Prace eksperymentalne:**

- **K. Kimel**, S. Godlewska, M. Krauze-Baranowska, L. Pobłocka-Olech (2019) HPLC-DAD-ESI/MS Analysis of Arnica TM Constituents. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 7 (6): 1015-1027, DOI: 10.32383/appdr/112187
- **K. Kimel**, M. Zienkiewicz, B. Sparzak-Stefanowska, M. Krauze-Baranowska (2020) TLC-Densitometric Analysis of Allanoin in *Symphytum officinale* L. Roots. *Acta Pharmaceutica*, 70: 101-110, DOI: 10.2478/acph-2020-0014
- **K. Kimel**, S. Godlewska, M. Krauze-Baranowska, L. Pobłocka-Olech (2020) HPLC-DAD-ESI/MS Comparison of the Chemical Composition of Flowers from two Arnica Species Grown in Poland. *Herba Polonica*, 77 (2): 1-10, DOI: 10.2478/hepo-2020-0008
- **K. Kimel**, S. Godlewska, M. Gleńsk, K. Gobis, J. Ośko, M. Grembecka, M. Krauze-Baranowska (2023) HPLC-MS/MS Evaluation of Pyrrolizidine Alkaloids Profile in Relation to Safety of Comfrey Roots and Leaves from Polish Sources. *Molecules* 2023, 28(16), 6171, DOI: 10.3390/molecules28166171

**Prace przeglądowe:**

- **K. Kimel**, M. Krauze-Baranowska (2021) Skuteczność i bezpieczeństwo stosowania korzenia *Symphytum officinale* L. – przegląd danych literaturowych. *Postępy Fitoterapii*, 22 (1): 23-31, DOI: 0.25121/PF.2021.22.1.23
- M. Krauze-Baranowska, **K. Kimel** (2022) Arnika górská i jej znaczenie lecznicze w świetle badań naukowych. *Farmacja Polska*, 78 (9): 491-502, DOI: 10.32383/farmpol/156952

**Praca została zrealizowana przy wsparciu projektu:** "Interdyscyplinarny program studiów doktoranckich jako narzędzie kształcenia kadr dla nauki i gospodarki w obszarze profilaktyki i terapii chorób cywilizacyjnych" PO WER.03.02.00-IP.08.00-DOK/16. Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

**Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na następujących konferencjach krajowych i międzynarodowych:**

**Wystąpienia ustne:**

- XXV Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego; 07-08.12.2018, Gdańsk – **K. Kimel**, M. Zienkiewicz, B. Sparak-Stefanowska, M. Krauze-Baranowska: *Zastosowanie TLC w analizie alantoiny w Symphytum officinale L.*
- Trends in Natural Product Research – PSE Young Scientists' Meeting; 19-22.06.2019, Budapeszt (Węgry) – **K. Kimel**, L. Pobłocka-Olech, S. Godlewska, M. Krauze-Baranowska: *Comparative phytochemical analysis of active compounds from Symphytum officinale roots and leaves*
- Bonifraterska Konferencja Ziołolecznictwa 2019: Fitoterapia. Tradycja. Współczesność. Perspektywy rozwoju; 29.11.2019, Warszawa – **K. Kimel**, S. Godlewska, M. Krauze-Baranowska: *Analiza porównawcza składu chemicznego nalewki (Arnica TM) i kwiatów z dwóch gatunków arniki*
- Trends in Natural Product Research – PSE Young Scientists' Meeting; 23-26.05.2022, Kolymbari, Kreta (Grecja) – **K. Kimel**, L. Pobłocka-Olech, S. Godlewska, M. Gorzkiewicz, M. Gleńsk, B. Klajnert-Maculewicz, M. Krauze-Baranowska: *In vitro analysis of antioxidant and anti-inflammatory activity of comfrey root and leaf extracts with evaluation of their chemical composition*

**Sesje plakatowe:**

- 64th International Pharmaceutical Students' Federation World Congress; 30.07-08.08.2018, Mendoza (Argentyna) – **K. Kimel**, S. Godlewska, M. Zienkiewicz, B. Sparak-Stefanowska, M. Krauze-Baranowska: *Phytochemical analysis of comfrey (Symphytum officinale L.) root and leaf*
- 65th International Pharmaceutical Students' Federation World Congress; 30.07-8.08.2019, Kigali (Rwanda) – **K. Kimel**, S. Godlewska, M. Krauze-Baranowska: *HPLC-DAD-ESI/MS comparison of the chemical composition of Arnica TM and two Arnica species flowers (Nagroda za II miejsce)*
- 13th World Congress on Polyphenols Applications: Malta Polyphenols 2019; 30.09-1.10.2019, Valetta (Malta) – **K. Kimel**, S. Godlewska, M. Krauze-Baranowska: *HPLC-DAD-ESI/MS comparison of the chemical composition of Arnica TM and two Arnica species flowers*
- XXV Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego; 28-29.01.2021, Gdańsk – **K. Kimel**, S. Godlewska, L. Pobłocka-Olech, M. Krauze-Baranowska: *Badania fitochemiczne z oceną aktywności przeciwzapalnej in vitro liści i korzenia żywokostu lekarskiego*
- 17th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology; 18-20.05.2022, Gandawa (Belgia) – **K. Kimel**, S. Godlewska, M. Gleńsk, M. Krauze-Baranowska: *HPLC-MS/MS analysis of pyrrolizidine alkaloids in comfrey*
- 16th World Congress on Polyphenols Applications: Malta Polyphenols 2023; 28-29.09.2023, Corinthia Palace (Malta) – **K. Kimel**, M. Krauze-Baranowska, S. Godlewska, J. Oško, M. Grembecka: *Comparative analysis of comfrey roots and leaves in terms of their polyphenols composition and antioxidant activity*

**Wykaz skrótów zastosowanych w pracy:**

1D TLC – *one direction thin-layer chromatography*, jednokierunkowa chromatografia cienkowarstwowa

2D TLC – *two direction thin-layer chromatography*, dwukierunkowa chromatografia cienkowarstwowa

4C-DHPL 3H – 3-hydroksylaza 4-kumarylo-3',4'-dihydroksyfenylomleczanu

4C-pHPL 3H, 4C-pHPL 3'-H – 3-/3'-hydroksylaza 4-kumarylo-4'-hydroksyfenylomleczanu

4C-S/Q 3H – 3-hydroksylaza 4-kumaryloszikimianu/chinianu

4CL – CoA-ligaza kwasu 4-kumarowego

5-LOX – 5-lipooksygenaza

ABTS – sól diamonowa kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego)

ACh – *Arnica chamissonis*, arnika łąkowa

ACN – acetonitryl

ADAMTS – *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*; dezintegryna A i metaloproteinaza z motywami trombospondyny

ADC – *automatic development chamber*, automatyczna komora do rozwijania

AM – *Arnica montana*, arnika góraska

AP1 – *activator protein 1*; białko aktywacyjne 1

C4H – 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego

CA – *caffeic acid*, kwas kawowy

Caf-pHPL 3'H – 3'-hydroksylaza kawoilo-4'-hydroksyfenylomleczanu

CE – *collision energy*, energia kolizji

CGA – *chlorogenic acid*, kwas chlorogenowy

CoA – koenzym A

COX-1 – cyklooksyzgenaza-1

COX-2 – cyklooksyzgenaza-2

CTGF – czynnik wzrostu tkanki łącznej

CQA – *caffeoylquinic acid*, kwasy kawoilochinowy

CV – współczynnik zmienności

DAD – *diode array detector*, detector z matrycą diodową

diCQA – *dicaaffeoylquinic acid*, kwas dikawoilochinowy

DPP-4 – dipeptydylopeptydaza-4

DPPH – rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*, kwas wersenowy

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*, test immunoenzymosorpcyjny

EMA – *European Medicines Agency*, Europejska Agencja Leków

EP – *European Pharmacopoeia*, Farmakopea Europejska

ERK – *extracellular signal-regulated kinases*, kinazy regulowane sygnałem pozakomórkowym

ESI – *electrospray ionization*, jonizacja poprzez elektrorozpraszanie

EtOAc – octan etylu

EtOH – etanol

FA – *formic acid*, kwas mrówkowy

FA – *factor analysis*, analiza czynnikowa

FDA – *Food and Drug Administration*, Agencja Żywności i Leków

FP – Farmakopea Polska

FRAP – *ferric reducing antioxidant power*, zdolność redukcji jonów żelaza

GC – *gas chromatography*, chromatografia gazowa

GSIS – *glucose-stimulated insulin secretion*, sekrecja insuliny stymulowana glukozą

HCS/QT – hydroksycynamonylo-CoA : szikimo-/chino- hydroksycynamonylotransferaza

HepG2 – ludzkie linie komórkowe raka wątroby

Hex – heksan

HCV – *hepatitis C virus*; wirusowe zapalenie wątroby typu C

HFMD – *hand, foot and mouth disease*; choroba dłoni, stóp i jamy ustnej

HIV – *human immunodeficiency virus*; ludzki wirus niedoboru odporności

HMBC – *heteronuclear multiple bond coherence*, heterojądrowa korelacja dalekiego zasięgu

HPCE – *high performance capilar electrophoresis*, wysokosprawna elektroforeza kapilarna

HPLC – *high performance liquid chromatography*, wysokosprawna chromatografia cieczowa

HPPD – dioksygenaza hydroksyfenylopirogonianu

HPPR – reduktaza hydroksyfenylopirogonianu

HPTLC – *high performance thin-layer chromatography*, wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa

HSC – komórki gwiazdziste wątroby

HSQC – *heteronuclear single quantum correlation*, heterojądrowa korelacja z detekcją przejść kwantowych

KSCN – tiocyjanian potasu

IBA1 – specyficzne białko aktywacji makrogleju

IC<sub>50</sub> – *half maximal inhibitory concentration*; połowa maksymalnego stężenia hamującego

ICH – *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

IFN-γ – interferon γ

IL – interleukina

iNOS – indukowalna syntaza tlenu azotu

JAK – *Janus kinases*, kinazy janusowe

LLE – *liquid-liquid extraction*, ekstrakcja ciecz-ciecz

LOD – *limit of detection*, granica wykrywalności

LOQ – *limit of quantification*, granica oznaczalności

LPS – lipopolisacharyd

LTA<sub>4</sub> – leukotrien A<sub>4</sub>

LTC<sub>4</sub> – leukotrien C<sub>4</sub>

MAPK – *mitogen-activated protein kinase*, kinazy aktywowane mitogenami

m.c. – masa ciała

MCP3 – *monocyte chemotactic protein 3*, chemotaktyczne białka monocytów 3

MGD – *multiple gradient development*

MeOH – metanol

MMP – *matrix metalloproteinase*, metaloproteinazy macierzy

monoCQA – *monocaffeoylquinic acid*, kwas monokawoilochinowy

MRM – *multiple-reaction monitoring*, monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji

mRNA – *messenger RNA*; matrycowe RNA

MS – *mass spectrometry*, spektroskopia mas

NBT – *nitro blue tetrazolium chloride*, błękit nitrotetrazoliowy

NF<sub>κ</sub>B – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

NMR – *nuclear magnetic resonance*, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

NO – tlenek azotu



NOESY – *nuclear overhauser effect spectroscopy*, spektroskopia jądrowa wykorzystująca efekt Overhausera

NOS – syntaza tlenku azotu

NPR – *natural product reagent*, 1% metanolowy roztwór estru 2-aminoetylowego kwasu difenyloborowego

Oct-1 – *octamer-1 transcription factor*; czynnik transkrypcyjny oktamer-1

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

P-IRS-2 – substrat-2 receptora insulinowego

PA – *pyrrolizidine alkaloid*, alkaloidy pirolizydynowe

PAL – amoniakoliza fenyloalaniny

PARP – *poly(ADP-ribose) polymerase*, polimeraza poli(ADP-ryboza)

PDX-1 – czynnik promotora insuliny 1

PG - prostaglandyna

PEG – glikol polietylenowy

PG – prostaglandyna

PIK-3 – *phosphoinositide 3-kinase*, 3-kinaza fosfatydyloinozytolu

RA – kwas rozmarynowy

RAS – syntaza kwasu rozmarynowego

R<sub>f</sub> – *retardation factor*, współczynnik opóźnienia

ROESY – *rotation frame nuclear overhauser effect spectroscopy*, spektroskopia wykorzystująca efekt Overhausera w rotującym układzie współrzędnych

ROS – *reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu

RP – *reverse phase*, układ faz odwróconych

RSD – względne odchylenie standardowe

s.m. – sucha masa

SA – kwas salwianolowy

SIM – *selected ion monitoring*

Sp1 – *specificity protein 1*; białko specyficzności 1

SPE – *solid-phase extraction*, ekstrakcja do fazy stałej

STAT – *signal transducer and activator of transcription 3*, przekaźnik sygnałów i aktywator transkrypcji

STL – *sesquiterpene lactones*, laktony seskwiterpenowe

*t*-BOOH – *tert-butyl hydroperoxide*, wodoronadtlenek tert-butyłu

TAT – aminotransferaza tyrozyny

TBP – *TATA-binding protein*; białko wiążące TATA

tetraCQA – *tetracaffeoylquinic acid*, kwas tetrakawoilochinowy

$t_G$  – *gradient time*; czas gradientu

TGF- $\beta$ 1 – transformujący czynnik wzrostu  $\beta$ 1

TIC – *total ion chromatogram*

$T_R$  – *retention time*; czas retencji

triCQA – *tricafeoylquinic acid*; kwas trikawoilochinowy

TLC – *thin-layer chromatography*; chromatografia cienkowarstwowa

TM – *tinctura materna*; nalewka macierzysta

TNF $\alpha$  – *tumor necrosis factor*; czynnik martwicy nowotworów

TPTZ – 2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyna

Troloks – kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksylowy

UE – Unia Europejska

UV – promieniowanie ultrafioletowe

Vis – światło widzialne

XO – *xanthine oxidase*, oksydaza ksantynowa

## Spis treści

<b>CEL PRACY .....</b>	<b>22</b>
<b>I CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....</b>	<b>25</b>
<b>1. Żywokost lekarski (<i>Symphytum officinale</i> L.).....</b>	<b>25</b>
1.1. Stanowisko systematyczne .....	25
1.2. Występowanie .....	25
1.3. Charakterystyka botaniczna.....	25
1.4. Historia zastosowań leczniczych .....	27
1.5. Obowiązujące ograniczenia na tle doniesień o toksyczności korzenia żywokostu	27
1.1. Skład chemiczny korzeni i liści żywokostu .....	31
1.1.1. <i>Alantoina</i> .....	31
1.1.2. <i>Śluz</i> .....	31
1.1.3. <i>Kwasy fenolowe</i> .....	32
1.1.4. <i>Alkaloidy pirolizydynowe</i> .....	33
1.1.5. <i>Flawonoidy i inne związki</i> .....	34
1.1. Aktywność farmakologiczna surowców roślinnych otrzymywanych z <i>Symphytum officinale</i> i innych gatunków z rodzaju <i>Symphytum</i> .....	34
1.1.1. <i>Działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne</i> .....	34
1.1.2. <i>Działanie wspomagające gojenie ran</i> .....	35
1.1.3. <i>Inne kierunki działania</i> .....	36
1.2. Badania kliniczne.....	36
<b>2. Arnika górską (<i>Arnica montana</i> L.) i arnika łąkowa (<i>Arnica chamissonis</i> L.).....</b>	<b>39</b>
2.1. Stanowisko systematyczne .....	39
2.2. Występowanie .....	39
2.3. Charakterystyka botaniczna.....	40
2.4. Historia zastosowań leczniczych .....	41

2.5.	Surowce farmaceutyczne pozyskiwane z arniki.....	42
2.6.	Produkty lecznicze roślinne zawierające przetwory z arniki górskiej.....	43
1.1.	Skład chemiczny .....	45
1.1.1.	<i>Laktony seskwiterpenowe</i> .....	47
1.1.2.	<i>Flawonoidy</i> .....	48
1.1.3.	<i>Kwasy fenolowe</i> .....	48
1.1.4.	<i>Olejek eteryczny</i> .....	48
1.1.5.	<i>Inne związki</i> .....	48
1.2.	Działanie lecznicze .....	49
2.6.1.	<i>Działanie przeciwzapalne i przeciwobrzękowe</i> .....	49
2.6.2.	<i>Działanie wzmacniające naczynia krwionośne</i> .....	50
2.6.3.	<i>Działanie antyoksydacyjne</i> .....	50
2.6.4.	Działanie przeciwreumatyczne .....	51
2.6.5.	Działanie przeciwbólowe .....	51
2.6.6.	<i>Działanie przeciwdrobnoustrojowe</i> .....	52
2.6.7.	<i>Inne kierunki działania</i> .....	52
2.7.	Mechanizm działania – biochemiczny i molekularny. ....	53
<b>3.</b>	<b>Estry pochodne kwasu kawowego</b> .....	<b>57</b>
3.1.	Biosynteza .....	57
3.2.	Estry kwasu kawowego z kwasem 3,4-dihydrofenylomlekowym (kawoilotaniny).....	59
3.2.1.	<i>Budowa chemiczna</i> .....	59
3.2.2.	<i>Występowanie</i> .....	59
3.2.3.	<i>Aktywność biologiczna i mechanizm działania</i> .....	60
3.3.	Estry kwasu kawowego z kwasem chinowym – kwasy kawoilochinowe .....	62
3.3.1.	<i>Budowa chemiczna</i> .....	62
3.3.2.	<i>Występowanie</i> .....	64

3.3.3. Aktywność biologiczna i mechanizm działania .....	65
<b>II CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA .....</b>	<b>72</b>
<b>1. Badania fitochemiczne .....</b>	<b>72</b>
<b>1. Rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne .....</b>	<b>72</b>
1.1. Odczynniki chemiczne .....	72
1.2. Substancje wzorcowe .....	72
<b>2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny.....</b>	<b>73</b>
2.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) .....	73
2.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) .....	73
2.2.1. System HPLC-UV/Vis Prominence (Shimadzu, Kioto, Japonia) .....	73
2.2.2. System HPLC-DAD-ESI/MS Prominence (Shimadzu, Kioto, Japonia) .....	73
2.2.3. System HPLC-MS/MS Prominence (Shimadzu, Kioto, Japonia).....	74
2.3. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) .....	74
2.4. Inne .....	74
<b>3. Analiza chromatograficzna .....</b>	<b>75</b>
3.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) .....	75
3.1.1. Płytki chromatograficzne do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) .....	75
3.1.2. Fazy ruchome.....	75
3.1.3. Rozdzielenia w automatycznej komorze chromatograficznej ADC2.....	77
3.1.4. Odczynniki wywołujące: .....	77
3.1.5. Derywatyżacja w automatycznym aparacie do derywatyżacji CAMAG Derivatizer .....	77
3.1.6. Analiza densytometryczna .....	78
3.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) .....	78
3.2.1. Kolumny chromatograficzne .....	78
3.2.2. Elucja.....	78

<b>4. Materiał roślinny .....</b>	<b>80</b>
4.1. Korzenie żywokostu lekarskiego ( <i>Symphyti radix</i> ) .....	80
4.2. Liście żywokostu lekarskiego ( <i>Symphyti folium</i> ) .....	80
4.3. Kwiaty arniki górskiej i łąkowej ( <i>Arnicae flos</i> ) .....	81
4.4. Nalewki macierzyste z arniki ( <i>Arnica TM</i> ) .....	82
<b>5. Ekstrakcja materiału roślinnego .....</b>	<b>82</b>
5.1. Korzeń żywokostu lekarskiego ( <i>Symphyti radix</i> ) .....	82
5.2. Liść żywokostu lekarskiego ( <i>Symphyti folium</i> ) .....	83
5.3. Kwiaty arniki górskiej i łąkowej ( <i>Arnicae flos</i> ) .....	84
5.4. Nalewki macierzyste z arniki ( <i>Arnica TM</i> ) .....	84
<b>6. Analiza chromatograficzna związków biologicznie czynnych – korzeń i liść żywokostu lekarskiego.....</b>	<b>84</b>
6.1. Analiza chromatograficzna alantoiny (50).....	84
6.1.1. Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego metodą TLC ....	84
6.1.2. Analiza jakościowa i ilościowa metodą densytometrii-TLC .....	85
6.1.3. Walidacja metody TLC .....	86
6.2. Analiza chromatograficzna polifenoli (kwasy fenolowe, flawonoidy).....	87
6.2.1. Analiza jakościowa metodami jedno- i dwukierunkowej TLC (1D TLC, 2D TLC)	87
6.2.2. Analiza jakościowa metodą HPLC .....	87
6.2.3. Izolacja i identyfikacja estru kwasu kawowego z korzenia żywokostu lekarskiego.....	88
6.2.4. Analiza ilościowa metodą HPLC.....	89
6.3. Analiza chromatograficzna alkaloidów pirolizydynowych metodą HPLC-DAD-MS/MS.....	90
6.3.1. Warunki rozdzielania chromatograficznego .....	90
6.3.2. Analiza jakościowa .....	90

6.3.3.	Analiza ilościowa i pół-ilościowa.....	91
6.3.4.	Walidacja metody .....	91
<b>7.</b>	<b>Analiza chromatograficzna związków biologicznie czynnych – kwiatostany i nalewki z arniki .....</b>	<b>92</b>
7.1.	Analiza chromatograficzna prostych fenoli i polifenoli .....	92
7.1.1.	Analiza jakościowa metodą 2D TLC.....	92
7.1.2.	Analiza jakościowa i ilościowa metodą HPLC (99, 110) .....	92
7.2.	Analiza chromatograficzna laktonów seskwiterpenowych .....	93
7.2.1.	Analiza jakościowa metodą 1D TLC.....	93
7.2.2.	Analiza 2D TLC.....	93
7.2.3.	Analiza jakościowa i ilościowa metodą HPLC (99, 110) .....	93
7.2.4.	Oczyszczanie ekstraktu z wykorzystaniem automatycznej ekstrakcji do fazy stałej (SPE) .....	94
<b>2.</b>	<b>Badania aktywności biologicznej.....</b>	<b>96</b>
<b>8.</b>	<b>Rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne .....</b>	<b>96</b>
8.1.	Odczynniki chemiczne i substancje wzorcowe.....	96
<b>9.</b>	<b>Aparatura i sprzęt laboratoryjny.....</b>	<b>96</b>
<b>10.</b>	<b>Badania aktywności przeciwutleniającej .....</b>	<b>97</b>
10.1.	Oznaczenia aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem technik spektroskopii UV-Vis.....	97
10.1.1.	Przygotowanie próbek do analizy .....	97
10.1.2.	Test z zastosowaniem stabilnego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH•) .....	97
10.1.3.	Oznaczanie zdolności redukcji jonów żelaza (III) – test FRAP .....	98
10.1.4.	Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej z zastosowaniem soli diamoniowej 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu) – ABTS.....	98



10.2. Oznaczenia aktywności wymiatającej wolne rodniki i zdolności do hamowania oksydazy ksantynowej z wykorzystaniem bioautografii-TLC .....	99
10.2.1. Przygotowanie próbek do analizy .....	99
10.2.2. Test z zastosowaniem rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH•)...	99
10.2.3. Test w układzie ryboflawina-światło-NBT .....	99
10.2.4. Test hamowania oksydazy ksantynowej (XO).....	100
<b>11. Badania aktywności przeciwzapalnej.....</b>	<b>100</b>
11.1. Przygotowanie próbek do analizy .....	100
11.2. Ocena hamowania cyklooksygenazy-1 i -2.....	101
<b>12. Analiza statystyczna .....</b>	<b>101</b>
<b>3. Badania dostępności farmaceutycznej .....</b>	<b>102</b>
<b>13. Rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne .....</b>	<b>102</b>
13.1. Odczynniki chemiczne i substancje wzorcowe.....	102
<b>14. Aparatura i sprzęt laboratoryjny.....</b>	<b>102</b>
<b>15. Ocena dostępności farmaceutycznej .....</b>	<b>102</b>
<b>III BADANIA WŁASNE .....</b>	<b>104</b>
<b>A. Omówienie wyników badań fitochemicznych.....</b>	<b>104</b>
<b>1. Optymalizacja warunków ekstrakcji związków czynnych biologicznie z korzenia i liścia żywokostu.....</b>	<b>105</b>
<b>2. Analiza chromatograficzna TLC z densytometrią oznaczania alantoiny w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego .....</b>	<b>106</b>
2.1. Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego alantoiny z korzeni i liści żywokostu lekarskiego metodą TLC.....	108
2.2. Optymalizacja warunków pomiarów densytometrycznych .....	111
2.3. Walidacja metody .....	113
2.4. Omówienie wyników oznaczeń alantoiny w korzeniach i liściach żywokostu .....	115
2.4.1. Analiza jakościowa .....	115

2.4.2.	Analiza ilościowa .....	115
<b>3.</b>	<b>Analiza chromatograficzna polifenoli w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego ...</b>	<b>117</b>
3.1.	Analiza jakościowa zespołu polifenoli z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego metodami TLC oraz HPLC.....	120
3.1.1.	Analiza jakościowa zespołu polifenoli z korzenia żywokostu lekarskiego metodami TLC.....	120
3.1.2.	Analiza jakościowa zespołu polifenoli z korzenia żywokostu lekarskiego metodami HPLC oraz izolacja i identyfikacja związku 5 .....	122
3.1.3.	Analiza jakościowa zespołu polifenoli z liścia żywokostu lekarskiego metodami TLC	127
3.1.4.	Analiza jakościowa zespołu polifenoli z liścia żywokostu lekarskiego metodami HPLC	132
3.2.	Analiza ilościowa polifenoli z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego metodą HPLC-DAD-UV/Vis.....	134
3.2.1.	Korzenie żywokostu .....	134
3.2.2.	Liście żywokostu.....	136
3.2.3.	Walidacja metody ilościowej.....	138
<b>4.</b>	<b>Analiza chromatograficzna alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego .....</b>	<b>138</b>
4.1.	Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego HPLC-MS/MS.....	140
4.2.	Identyfikacja alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego opracowaną metodą LC-MS/MS.....	142
4.3.	Analiza „pół-ilościowa” alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego opracowaną metodą LC-MS/MS .....	144
4.4.	Analiza ilościowa alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego opracowaną metodą LC-MS/MS .....	147
4.5.	Walidacja metody ilościowej oznaczania zawartości alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego opracowaną metodą LC-MS/MS .....	149

4.6. Analiza czynnikowa dystrybucji alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu.....	150
<b>5. Analiza chromatograficzna związków polifenolowych i prostych fenoli w kwiatach i nalewkach z arniki górskiej i łąkowej .....</b>	<b>152</b>
5.1. Dobór kolumny chromatograficznej.....	153
5.2. Rozpoznanie zespołu prostych fenoli i polifenoli w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS.....	154
5.2.1. Identyfikacja flawonoidów w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS.....	158
5.2.2. Identyfikacja kwasów fenolowych i estrów pochodnych kwasu kawowego w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS .....	160
5.3. Omówienie wyników analizy ilościowej związków biologicznie czynnych w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS .....	161
5.3.1. Omówienie wyników analizy ilościowej flawonoidów w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS.....	163
5.3.2. Omówienie wyników analizy ilościowej kwasów fenolowych w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS .....	163
<b>6. Analiza chromatograficzna laktonów seskwiterpenowych w kwiatach i nalewkach z arniki górskiej i łąkowej.....</b>	<b>166</b>
6.1. Opracowanie warunków rozdzielania chromatograficznego HPLC zespołu laktonów seskwiterpenowych przetworów z arniki.....	167
6.2. Identyfikacja zespołu laktonów seskwiterpenowych pochodnych helenaliny i dihydrohelenaliny w nalewce z całej świeżej rośliny <i>A. montana</i> z użyciem opracowanej metody HPLC-DAD-ESI/MS .....	168
6.3. Porównanie zespołu laktonów seskwiterpenowych w kwiatostanach arniki górskiej i łąkowej oraz nalewkach z świeżej całej rośliny arniki górskiej metodą HPLC-DAD-ESI/MS	170
6.4. Oznaczenie zawartości laktonów seskwiterpenowych w kwiatach i nalewkach z arniki metodą HPLC-DAD-ESI/MS.....	172

6.5.	Porównanie zespołu laktonów seskwiterpenowych w kwiatostanach arniki górskiej i łąkowej oraz nalewkach ze świeżej całej rośliny arniki górskiej metodami TLC .....	173
<b>B.</b>	<b>Omówienie wyników badań aktywności biologicznej .....</b>	<b>177</b>
<b>7.</b>	<b>Omówienie wyników oznaczenia aktywności przeciwutleniającej wyciągów z korzeni i liści żywokostu z wykorzystaniem technik spektroskopii UV-Vis.....</b>	<b>178</b>
7.1.	Analiza statystyczna .....	179
7.1.1.	Korelacje .....	180
7.1.2.	Test Kruskala-Wallisa.....	181
7.1.3.	Test post-hoc Dunna .....	182
7.1.4.	Analiza czynnikowa .....	183
<b>8.</b>	<b>Omówienie wyników oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej składników wyciągów z korzenia i liścia żywokostu z wykorzystaniem bioautografii-TLC</b>	<b>185</b>
8.1.	Bioautografia-1D TLC – test DPPH.....	185
8.2.	Bioautografia-2D TLC – test DPPH.....	186
8.3.	Bioautografia-2D TLC – układ ryboflawina-światło-NBT i test hamowania oksydazy ksantynowej .....	189
<b>9.</b>	<b>Omówienie wyników oznaczenia aktywności przeciwzapalnej wyciągów z korzeni i liści żywokostu jako aktywności hamującej cyklooksygenazę-1 i -2.....</b>	<b>190</b>
9.1.	Oznaczenie aktywności kwasu rozmarynowego .....	190
9.2.	Oznaczenia aktywności wyciągów z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego.....	191
<b>10.</b>	<b>Ocena aktywności biologicznej wyciągów otrzymanych z kwiatów arniki górskiej i arniki łąkowej .....</b>	<b>194</b>
10.1.	Testy spektrofotometryczne – ABTS i FRAP .....	194
10.2.	Bioautografia-TLC – test DPPH .....	194
10.3.	Bioautografia-TLC – układ ryboflawina-światło-NBT i test hamowania oksydazy ksantynowej .....	196

<b>C. Omówienie wyników badań dostępności farmaceutycznej .....</b>	<b>198</b>
<b>11. Omówienie wyników badań dostępności farmaceutycznej estrów pochodnych kwasu kawowego .....</b>	<b>199</b>
<b>12. Omówienie wyników badań dostępności farmaceutycznej helenaliny i alkaloidów pirolizydynowych .....</b>	<b>202</b>
<b>IV WYNIKI I WNIOSKI .....</b>	<b>206</b>
<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>218</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>229</b>
<b>BIBLIOGRAFIA: .....</b>	<b>240</b>
<b>SPIS ILUSTRACJI: .....</b>	<b>261</b>
<b>SPIS TABEL: .....</b>	<b>268</b>

## CEL PRACY

Surowce roślinne otrzymywane z gatunków należących do rodzaju *Arnica* (kwiat arniki<sup>1</sup> - gatunki *Arnica montana* L. i *Arnica chamissonis* Less. oraz nalewki z całej świeżej rośliny *A. montana* L.) i *Symphytum officinale* L. (korzeń i liść żywokostu lekarskiego) są od wieków stosowane w medycynie tradycyjnej. W ciągu ostatnich dekad wycofano się z ich użycia wewnętrznego, ale nadal są szeroko stosowane w aplikacji zewnętrznej m. in. w terapii schorzeń reumatycznych i układu mięśniowo-szkieletowego (1-6). Jak wynika z niektórych badań klinicznych, wykazują skuteczność zbliżoną lub nawet silniejszą w porównaniu do stosowanych w tych samych wskazaniach leków syntetycznych (7, 8).

Głównymi związkami o aktywności biologicznej, decydującej o efektach terapeutycznych, substancji czynnych roślinnych z gatunków z rodzaju *Arnica* i gatunku *S. officinale* są alantoina w żywokoście lekarskim (6, 9) oraz laktony seskwiterpenowe w arnikach (głównie helenalina i jej estry) (2, 10). Surowce pozyskiwane z wymienionych gatunków stanowią również źródło wielu innych grup związków, które mogą odgrywać znaczącą rolę w aktywności leczniczej poprzez synergię działania, skutkującą zwiększeniem potencjału biologicznego oraz decydować o poliwalencji – wielokierunkowości ich efektów terapeutycznych. Ponadto mogą mieć również wpływ na ich biodostępność, na co m.in. wskazują dotychczasowe wyniki badań przenikania przez skórę takich związków jak alantoina czy helenalina (11-13). Znaczenie wielu grup związków chemicznych obecnych w wymienionych powyżej surowcach w ogólnej aktywności zarówno biologicznej jak i terapeutycznej nie jest do końca rozpoznana. Grupę takich związków stanowią estry kwasu kawowego (CAE), które są dzisiaj intensywnie badane w różnych leczniczych surowcach roślinnych, zarówno w aspekcie fitochemicznym jak i farmakologicznym (14-18).

Podejmując się realizacji założonych w planowanej dysertacji celów, uwzględniono fakt, że we wcześniejszych badaniach prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji ujawniono obecność nieznanych związków z grupy pochodnych kwasu kawowego w korzeniu żywokostu lekarskiego (19). W trakcie prowadzenia prac badawczych ukazała się publikacja zespołu *Trifan*

---

<sup>1</sup> Zgodnie z nomenklaturą botaniczną są to kwiatostany – koszyczki kwiatowe, w odniesieniu do surowca farmaceutycznego stosowane jest jednak, mniej precyzyjne, nazewnictwo farmakopealne – kwiat arniki (*Arnicae flos*), który jednocześnie jest definiowany jako „wysuszone całe lub częściowo rozpadnięte koszyczki *Arnica montana* L.” W pracy określenia kwiatostany/koszyczki/kwiaty są stosowane zamiennie.

i wsp. (20), potwierdzająca wyniki uzyskane w niniejszej pracy w toku eksperymentów izolacyjnych i badań strukturalnych estrów kwasu kawowego, z korzenia żywokostu. Uwzględniając doniesienia literaturowe o estrach kwasu kawowego jako składnikach leczniczych surowców roślinnych w kwiatach arniki (21) oraz w korzeniu żywokostu lekarskiego (13), uznano za interesujące przeprowadzenie badań w zakresie ich aktywności biologicznej, obejmującej ocenę działania przeciwutleniającego i przeciwzapalnego. Oprócz objętych monografiami EMA korzenia żywokostu (22) i kwiatu arniki górskiej (*Arnica montana* L.) (23), do badań włączono również, stosowane tradycyjnie w tym samym zakresie, ale charakteryzujące się słabo rozpoznany składem chemicznym, liście żywokostu lekarskiego oraz kwiaty arniki łąkowej (*A. chamissonis* Less.), i nalewkę homeopatyczną ze świeżej całej rośliny arniki górskiej (*Arnica* TM, różne pochodzenie).

Podstawowy cel pracy stanowiło rozpoznanie zespołów estrów pochodnych kwasu kawowego w substancjach roślinnych czynnych pozyskiwanych z gatunków *Arnica montana* L., *A. chamissonis* Less. i *Symphytum officinale* L. oraz ocena ich dostępności farmaceutycznej z określeniem udziału w aktywności antyoksydacyjnej jako części aktywności przeciwzapalnej na tle innych obecnych w nich metabolitów wtórnych.

Realizacja celu podstawowego obejmowała następujące cele cząstkowe:

- Opracowanie metod analizy jakościowej i ilościowej zespołów estrów pochodnych kwasu kawowego oraz innych związków o charakterze polifenoli (kwasy fenolowe, flawonoidy) z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w sprzężeniu z detektorem z matrycą diodową (DAD) i spektrometrem mas (MS) oraz technik jedno- i dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (1D i 2D TLC)
- Identyfikację nowych związków z grupy estrów pochodnych kwasu kawowego stanowiących składniki wyciągów z badanych surowców roślinnych metodami HPLC-DAD-MS oraz opracowanie metody ich izolacji z korzenia żywokostu z wykorzystaniem automatycznej ekstrakcji do fazy stałej (SPE)
- Opracowanie metody analizy innych metabolitów wtórnych odgrywających rolę w aktywności biologicznej badanych surowców:
  - Opracowanie metody TLC w sprzężeniu z densytometrią analizy jakościowej i ilościowej alantoiny w wyciągach metanolowych z żywokostu lekarskiego

- Opracowanie metody HPLC-MS/MS analizy jakościowej i ilościowej oraz rozpoznanie składu zespołu alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu
- Opracowanie metod HPLC-DAD-ESI/MS i TLC analizy laktonów seskwiterpenowych obecnych w wyciągach z kwiatów arniki górskiej i łąkowej, w tym rozpoznanie zespołu laktonów seskwiterpenowych obecnych w nalewce ze świeżej całej rośliny arniki górskiej
- Ocenę aktywności przeciwutleniającej i częściowo przeciwzapalnej surowych wyciągów oraz pojedynczych związków czynnych z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego oraz kwiatów arniki górskiej i łąkowej
- Ocenę dostępności farmaceutycznej estrów pochodnych kwasu kawowego, obok helenaliny i alkaloidów pirolizydynowych, jako składników wyciągów z badanych surowców oraz pojedynczych związków czynnych

Opracowane metody chromatograficzne wykorzystano do analizy porównawczej, w zakresie składu chemicznego korzeni i liści żywokostu lekarskiego oraz kwiatów arniki górskiej i łąkowej pozyskanych z krajowych ogrodów botanicznych, sklepów zielarskich i stanowisk naturalnych oraz producentów nalewki TM z arniki górskiej oraz aktywności biologicznej.



## I CZĘŚĆ TEORETYCZNA

## I CZĘŚĆ TEORETYCZNA

### 1. Żywokost lekarski (*Symphytum officinale* L.)<sup>2</sup>

#### 1.1. Stanowisko systematyczne

**Królestwo:** *Archaeplastida* – Rośliny

**Gromada:** *Spermatophyta* – Nasienne

**Podgromada:** *Angiospermae (Magnoliophytina)* – Okrytonasienne

**Klasa:** *Dicotyledonopsida (Dicotyledones, Magnoliatae)* – Dwuliścienne

**Rząd:** *Boraginales* – Ogórecznikowate

**Rodzina:** *Boraginaceae* – Szorstkolistne

**Rodzaj:** *Symphytum* L. – Żywokost

**Gatunek:** *Symphytum officinale* L. – Żywokost lekarski

#### 1.2. Występowanie

Żywokost lekarski (*Symphytum officinale* L.) jest rośliną wieloletnią, pochodzącą z Europy i Azji Mniejszej oraz Środkowej, a obecnie zawleczoną również do Ameryki Północnej, stanowiąc w Kanadzie i Alasce, gatunek inwazyjny. W Polsce jest pospolitym gatunkiem.

Preferuje siedliska podmokłe, dobrze rośnie na glebach torfowych i wilgotnych. Zasiedla podmokłe łąki i lasy, obrzeża stawów, jezior oraz wolno płynących rzek (22, 24, 25).

#### 1.3. Charakterystyka botaniczna

Łodyga żywokostu lekarskiego jest kanciasta i pusta w środku, pokryta szorstkimi włoskami. Osiąga wysokość od 30 do 120 cm, w górnej części rozgałęziając się.

---

<sup>2</sup> Niektóre fragmenty rozdziału pochodzą z pracy przeglądowej: K. Kimel, M. Krauze-Baranowska (2021) Skuteczność i bezpieczeństwo stosowania korzenia *Symphytum officinale* L. – przegląd danych literaturowych. *Postępy Fitoterapii*, 22 (1): 23-31, DOI: 0.25121/PF.2021.22.1.23

Ulistnienie skrętoległe, liście osiągające długość do 25 cm, szorstko owłosione o podługowato-lancetowatym kształcie, całobrzegie. Dolne z oskrzydłym ogonkiem, zaś górne siedzące i węższe, mniejsze oraz bardziej zastrzone.



Ryc. 1: Żywokost lekarski (*Symphytum officinale* L.)

Okres kwitnienia od maja do czerwca/lipca. Kwiaty 5-krotne, rurkowato-dzwoneczkowate o zrośniętym kielichu, osiągające do 1-2 cm długości. Wyrastają z górnych kątów liści na krótkich, czerwonych szypułkach, zebrane w zwisające kwiatostany typu sierpika. Najczęściej kwiaty są koloru purpurowo-fioletowego, rzadziej różowego, białego lub kremowego

Korzeń pojedynczy, wrzecionowaty, podłużnie głęboko bruzdowany, silnie rozgałęziony od nasady, osiągający długość do 30 cm. Powierzchnia zewnętrzna jest ciemnobrunatna, niemal czarna. W przekroju poprzecznym korzeń jest znacznie jaśniejszy, prawie kremowy (Ryc. 1).

Surowiec farmaceutyczny stanowią korzenie żywokostu, zbierane jesienią lub wczesną wiosną. Rzadziej, głównie w medycynie ludowej, wykorzystywane są także wysuszone liście żywokostu, zazwyczaj zbierane w porze kwitnienia (22, 24-28).

#### 1.4. Historia zastosowań leczniczych

Żywokost lekarski (*Symphytum officinale* L.) jest rośliną leczniczą wykorzystywaną w medycynie tradycyjnej od tysięcy lat. Dioskurides już około 60 r. n.e. stosował wyciąg z rozdrobnionego korzenia żywokostu na „przepukliny i krwioplucie” oraz zewnętrznie „na rany i stany zapalne”. Do XVII wieku wskazania do stosowania korzenia znacznie rozszerzono, uznając go skutecznym *panaceum* w schorzeniach układu oddechowego, układu pokarmowego oraz złamaniach kości, stłuczeniach, nadmiernych krwawieniach menstruacyjnych, zakrzepach i hemoroidach (29). Zakres stosowania wewnętrznego korzenia żywokostu do końca XX wieku obejmował nieżyt żołądka i jelit, chorobę wrzodową żołądka i dwunastnicy, uszkodzenia błony śluzowej układu pokarmowego oraz stany zapalne zlokalizowane w obrębie górnych i dolnych dróg oddechowych, w tym choroby płuc (30).

Frost i wsp. (3) donoszą, że liście i korzenie żywokostu, zarówno wysuszone jak i świeże, są nadal stosowane przez 75% brytyjskich zielarzy w dolegliwościach bólowych i stanach zapalnych zlokalizowanych w układzie kostno-mięśniowym, w tym będących wynikiem urazów – tj. złamaniach i pęknięciach kości, stłuczeniach objawiających się zasinieniem i obrzękiem oraz stanach pooperacyjnych.

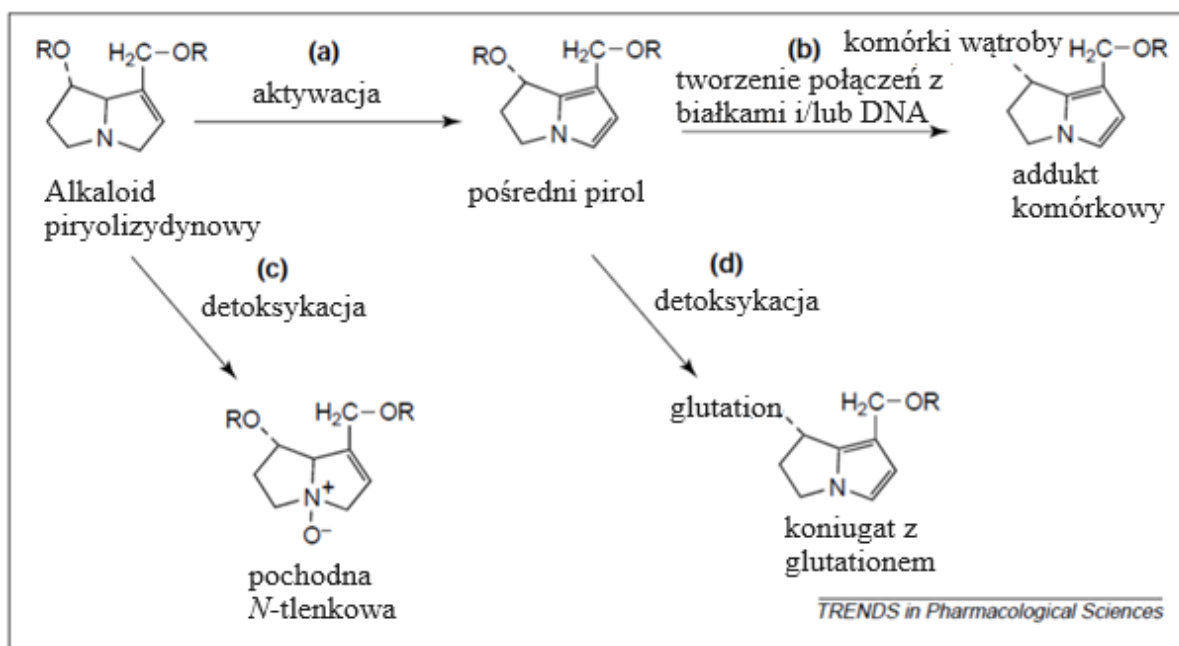
#### 1.5. Obowiązujące ograniczenia na tle doniesień o toksyczności korzenia żywokostu

W 2001 roku amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA), opierając się na doniesieniach o hepatotoksyczności alkaloidów pirolizydynowych o szkielecie 1,2-nienasyconej necyny, nakazała wycofanie z rynku produktów zawierających korzeń żywokostu (31). Obecnie, Europejska Agencja Leków (EMA) w raporcie z 2015 r. dopuszcza na rynek europejski produkty z wyciągami z korzenia żywokostu jedynie do stosowania zewnętrznego, na nieuszkodzoną skórę. Jednocześnie uznaje za bezpieczną dzienną dawkę alkaloidów pirolizydynowych 0,007 µg/kg, z zastrzeżeniem odnośnie okresu przyjmowania surowca do 10 dni w krótkotrwałych terapiach (22). Jest to znacząca zmiana w porównaniu do stanowiska z 2012 r., w którym EMA ograniczała stosowanie surowca do 4-6 tygodni w roku. W niektórych krajach takich jak

Niemcy, Austria czy Węgry zarejestrowane są produkty lecznicze z korzeniem żywokostu, których wymienione limity czasu stosowania nie dotyczą. Jest to wynikiem obniżonej i kontrolowanej, w wyciągach z korzenia żywokostu, zawartości alkaloidów pirolizydynowych, a nawet niekiedy całkowicie ich pozbawionych w rezultacie zastosowania zmodyfikowanego procesu technologicznego ich wytwarzania. Jakkolwiek, w niektórych doniesieniach informowano o spadku aktywności przeciwzapalnej ekstraktów z surowca jako wyniku stosowania, w procesie produkcyjnym, wymienników kationowych, eliminujących alkaloidy pirolizydynowe (32).

W Polsce dostępne są jedynie produkty z przetworami z korzenia żywokostu o statusie produktów kosmetycznych. Jednocześnie, sklepy zielarskie oferują wysuszone korzenie i liście żywokostu oraz oleje żywokostowe, o niekontrolowanej zawartości alkaloidów pirolizydynowych, które w zależności od potrzeb i wiedzy (lub braku wiedzy) konsumenta mogą być wykorzystane zarówno zewnętrznie jak i wewnętrznie (liście i korzenie). Liść żywokostu lekarskiego nie posiadając monografii EMA, w świetle obowiązujących na terenie UE regulacji, nie powinien być uwzględniany jako substancja roślinna czynna. Jednak na rynkach niektórych krajów europejskich dostępna jest maść Traumaplant® zawierająca 10% soku pozbawionego obecności alkaloidów pirolizydynowych ze świeżych części nadziemnych innego gatunku żywokostu, mianowicie żywokostu rosyjskiego - *Symphytum x uplandicum*.

Podstawowym ograniczeniem leczniczego stosowania korzenia żywokostu jest hepatotoksyczność alkaloidów pirolizydynowych (PA) o szkielecie 1,2-nienasyconej necyny. Związki te są metabolizowane przez cytochrom P450 do *N*-tlenków lub dehydroretronecyny, silnie toksycznego metabolitu pirolowego o właściwościach alkilujących, prowadzących do uszkodzeń śródbłonna naczyń krwionośnych wątroby i innych narządów. W przebiegu ostrej lub przewlekłej toksyczności możliwe jest dalsze enzymatyczne przekształcanie *N*-tlenków alkaloidów do wysoko reaktywnych elektrofilowych związków wykazujących zdolność do akumulacji w organizmie i wiążących się ze strukturami komórkowymi (33, 34) (Ryc. 2).



Ryc. 2: Aktywacja i detoksykacja alkaloidów pirolizydynowych: (a) aktywacja poprzez dehydrogenację do pośredniego pirolu, który następnie (b) reaguje z białkiem lub DNA tworząc komórkowy addukt. Detoksykacja w wyniku (c) *N*-oksydacji alkaloidu pirolizydynowego lub (d) koniugacji pirolu z glutationem. Schemat wg Rode i wsp. (34)

Szereg wyników badań potwierdza hepatotoksyczność, genotoksyczność i mutagenność alkaloidów pirolizydynowych (33, 35). W modelach zwierzęcych obserwowano stymulację powstawania zmian nowotworowych w wielu narządach, głównie wątrobie, płucach, nerkach, pęcherzu moczowym oraz na skórze (35, 36), brak jednak jednoznacznych dowodów na indukcję procesów nowotworzenia i powstawania guzów u ludzi jako rezultatu stosowania wyciągów roślinnych zawierających alkaloidy pirolizydynowe.

Problemem w badaniach toksyczności alkaloidów pirolizydynowych jest duża zmienność międzygatunkowa procesów metabolizmu i wrażliwość osobnicza na alkaloidy pirolizydynowe. Wśród zastosowanych modeli zwierzęcych dominują wrażliwe na alkaloidy pirolizydynowe, myszy, szczury (36, 37) oraz kurczaki (38). Inne gatunki zwierząt laboratoryjnych takie jak świnki morskie, króliki, chomiki wykazują wysoką odporność na działanie tych związków (39). Dopiero ostatnie lata przyniosły doniesienia o toksyczności intermedyny, likopsaminy i ich *N*-tlenków w badaniach na ludzkich liniach komórkowych wątroby (40, 41).

Odnotowane wcześniej przypadki zatruc u ludzi były spowodowane doustnym przyjmowaniem produktów ziołowych zawierających alkaloidy pirolizydynowe i skutkowały konsekwencjami zdrowotnymi takimi jak, marskość wątroby w przebiegu ostrych zatruc oraz choroba zarostowa

żył wątrobowych, przy długotrwałym kontakcie (42-46). Należy podkreślić, że ujawnione klinicznie przypadki zatruc nie zawsze wskazywały na żywokost lekarski (*Symphytum officinale*) jako czynnik etiologiczny. Ze względu na duże podobieństwo morfologiczne korzenie bardziej toksycznych gatunków takich jak żywokost rosyjski (*Symphytum x uplandicum*), czy żywokost szorstki (*Symphytum asperum*) były błędnie identyfikowane jako *Symphytum officinale* (34). Ponadto w niektórych preparatach, oprócz deklarowanego w składzie żywokostu lekarskiego, były obecne jako zanieczyszczenia inne surowce zawierające alkaloidy pirolizydynowe (46). Ważnym podkreślenia jest fakt, wykazania wielokrotnie niższej zawartości alkaloidów pirolizydynowych w liściach żywokostu rosyjskiego w porównaniu do korzeni. W publikacji opisującej przypadek zatrucia kapsułkami żywokostowo-pepsynowymi *Ridker* i wsp. (42) podkreślają brak możliwości jednoznacznej identyfikacji gatunku i jego odmiany. Podobnie, w cytowanej w kontekście toksyczności żywokostu lekarskiego pracy *Zuckerman* i wsp. (44), opisywano zatrucie nieokreślonym „tradycyjnym lekiem ziołowym” z rozpoznaniem jako składnika *Senecio latifolius* z rodziny *Compositae*, charakteryzującym się znacząco wyższą zawartością alkaloidów pirolizydynowych w porównaniu do żywokostu.

W świetle powyższych doniesień, zgodnie z zaleceniami EMA, należy zachować szczególną ostrożność i świadomość ryzyka związanego ze stosowaniem wewnętrznym korzenia żywokostu. Dotychczas brak jest danych o toksyczności alkaloidów pirolizydynowych przy podaniu na skórę wyciągu z korzenia żywokostu.

W badaniach na szczurach wskazano na bezpieczeństwo stosowania wyciągów z żywokostu w preparatach dermatologicznych, uzyskując przy aplikacji na skórę 20-50-krotnie niższe stężenia alkaloidów pirolizydynowych i ich *N*-tlenków w moczu, w porównaniu do podania *per os*. Jakkolwiek potwierdza to fakt przenikania alkaloidów przez skórę, to jednak należy podkreślić, że obserwowana zawartość związków w moczu wyniosła jedynie 0,1-0,4% zastosowanej dawki (47). Podobne wyniki uzyskano w przeprowadzonych przez *Jedlinski* i wsp. (48) badaniach oceny przenikania likopsaminy przez błony syntetyczne (0,1-0,72% po 72h) i ludzki naskórek (0,04-0,22%). Wskazują one jednoznacznie, że wymagane przez EMA (22) limity są praktycznie niemożliwe do przekroczenia przy stosowaniu zewnętrznym surowca.

W dyskusji o toksyczności żywokostu lekarskiego pomija się często potencjalnie korzystny, synergistyczny wpływ pozostałych związków obecnych w surowcu. Większość badań była prowadzona na wyizolowanych alkaloidach (38, 47, 48), a nie wyciągach roślinnych je

zawierających. Doniesienia o właściwościach hepatoprotekcyjnych, obecnego w liściu i korzeniu żywokostu w stosunkowo wysokich stężeniach, kwasu rozmarynowego (49), sugerują potrzebę badania surowych wyciągów pod kątem potencjalnych efektów niwelowania toksyczności alkaloidów przez ten związek.

### 1.1. Skład chemiczny korzeni i liści żywokostu

Surowce otrzymywane z *Symphytum officinale* charakteryzują się zróżnicowanym składem chemicznym, który pomimo długiego okresu ich stosowania w lecznictwie, wciąż pozostaje w pełni nierozpoznany.

#### 1.1.1. Alantoina

Związkiem wyróżniającym żywokost na tle innych gatunków roślin jest alantoina – pochodna mocznika. Jej zawartość w korzeniu wynosi od 0,6 do 2,55% (22, 50) a niekiedy osiąga nawet 4,7% (24). Brak jest jednoznacznych danych o zawartości alantoiny w liściach. *Foster* i wsp. (51) podają, że wynosi ona 0,3%, a *Sousa* i wsp. (52) i *Teixeira* i wsp. (53) wskazują na wielokrotnie niższą zawartość alantoiny w liściach w porównaniu do korzeni (1 mg/g i 7-25,5 mg/g oraz 2,6-7,8 mg/g i 13,2-17,7 mg/g, odpowiednio w liściu i korzeniu). Rozbieżności te mogą wynikać z różnic w porze zbioru surowca. W badaniach akumulacji alantoiny w różnych częściach rośliny, zawartość w młodych liściach, zebranych w okresie letnim, była wielokrotnie wyższa (około 130 mg/g), w porównaniu do korzeni (około 7 mg/g) (54).

#### 1.1.2. Śluz

Korzeń żywokostu zaliczany jest do surowców śluzowych (około 29% zawartości), stanowiąc mieszaninę polisacharydów zbudowanych z fragmentów kwasu galakturonowego, glukozy, galaktozy i arabinozy, o zawartości kwasów uronowych na poziomie 9,36%. W badaniach spektrofotometrycznych *in vitro* potwierdzono aktywność przeciwutleniającą obecnych w korzeniu żywokostu polisacharydów (6, 55, 56).

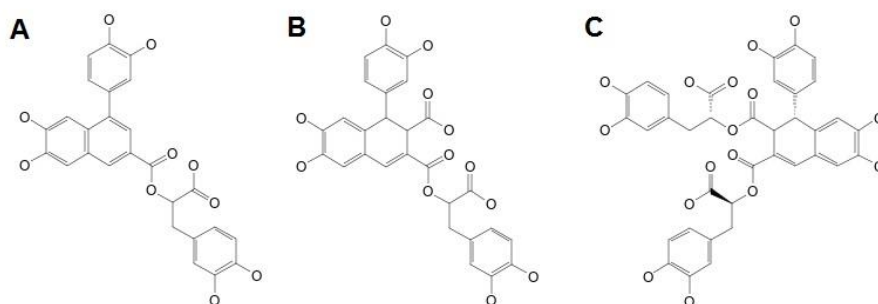
Właściwości przeciwzapalne posiada zidentyfikowany w korzeniu żywokostu przez *Hiermann* i wsp. (57) glikopeptyd o masie cząsteczkowej około 9000 Da. Jest on zbudowany z 16 aminokwasów (w tym 8 egzogennych, mianowicie: treoniny, waliny, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny, lizyny, histydy, argininy) oraz fragmentów fruktozy, glukozy, galaktozy i arabinozy obecnych w stosunku ilościowym 2:2:1:1.

### 1.1.3. Kwasy fenolowe

Związkiem dominującym w zespole kwasów fenolowych korzenia żywokostu jest opisany przez *Grabias* i wsp. (58) kwas rozmarynowy, którego zawartość w wyciągach wodnych z surowca wynosiła 0,85-1,27 mg/g (59, 60) do 1,94 mg/g w wyciągu wodno-etanolowym (61, 62). Ponadto, w zespole fenolokwasów *Sowa* i wsp.(61) w wyciągu wodno-etanolowym z korzenia żywokostu stwierdzili obecność kwasu kawowego (0,00187 mg/g), p-hydroksybenzoesowego (0,00723 mg/g), chlorogenowego (0,0008 mg/g) i p-kumarowego (0,00062 mg/g), natomiast *Tahirovic* i wsp. (59) w wyciągu wodnym takich kwasów jak: chlorogenowy (1,27 mg/g), galusowy (0,05 mg/g) i kawowy (0,15 mg/g). Ponadto *Savić* i wsp. (60) w wyciągu wodnym z korzenia żywokostu wskazują na obecność kwasu elagowego i kwasu 5-O-feruloilochinowego. Jednak oznaczone przez autorów pracy, zaskakująco wysokie zawartości kwasów fenolowych w tym surowcu (w tym 7,4% kwasu elagowego i 12,8% kwasu rozmarynowego przeliczeniu na wyciąg suchy) oraz użyta metoda ekstrakcji, (aparatus Soxhleeta, ekstrahent – woda) budzą wątpliwości oraz wydają się mało wiarygodne.

W ostatnich latach kontynuowano badania nad kwasami fenolowymi metodą HPLC-DAD-QTOF-MS/MS, wskazując na obecność w wyciągu wodno-etanolowym z korzenia żywokostu szeregu estrowych pochodnych kwasu kawowego, mianowicie izomerów kwasów salwianolowych/izosalwianolowych A, B i C, stanowiących trimery i tetramery kwasu kawowego (13, 63). W wyniku przeprowadzonej przez *Trifan* i wsp. (64) izolacji z surowca powyższych związków, skorygowano ich struktury w oparciu otrzymane widma MS i NMR, ostatecznie zaliczając je do lignanów pochodnych kwasu kawowego, mianowicie: rabdozyny (0,14-0,89 mg/g) tetrameru kwasu kawowego - oraz dwóch trimerów kwasu kawowego - globoidnanu A (0,27-1,93 mg/g) i B (0,13-0,99 mg/g) (62, 64) (Ryc. 3). W zespole związków lignanowych żywokostu wymieniane są również dwa inne lignany, mianowicie komfreina A i ternifoliuzlignan D (65). W wyciągu metanolowym z liści wykazano wysoką zawartość kwasu galusowego (6,93 mg /g suchego wyciągu) (66), podczas gdy w wyciągu wodnym obecne były w wyższych stężeniach niż w korzeniu - kwas kawowy (0,29 mg/g), rozmarynowy (1,15 mg/g) i galusowy 0,20 mg/g (59).





Ryc. 3: Wzory strukturalne nowych związków z grupy lignanów pochodnych kwasu kawowego, zidentyfikowanych w korzeniu żywokostu. A – globoidnan A, B – globoidnan B, C - rabdozyna.

#### 1.1.4. Alkaloidy pirolizydynowe

Zespół związków alkaloidowych w korzeniu i liściu żywokostu, stanowią alkaloidy pirolizydynowe, których toksyczność warunkowana jest obecnością nienasyconego wiązania pomiędzy węglami C-1 i C-2 w pierścieniu necyny oraz charakterem estrowym łańcucha bocznego (35). Badania przeprowadzone metodą LC-HRMS/MS wyciągu wodno-etanolowego z korzenia żywokostu, wykazały obecność 20 alkaloidów pirolizydynowych i ich pochodnych, tj.: intermedyny, likopsaminy, 7-acetylo pochodnych intermedyny i likopsaminy oraz ich *N*-tlenków, *N*-tlenków echimidyny, symfytyny, symladyny, 3'-acetylo- symfytyny i symladyny, 7-saracynylo-9-trachelantylotretronecyny, 7-saracynylo-9-wiridiflorylloretronecyny oraz wolnych form: symfytyny, symladyny, dihydrointermedyny/dihydrolikopsaminy i ich stereoisomerów. Spośród 16 badanych korzeni żywokostu, pochodzących z europejskich aptek, w ośmiu dominowały *N*-tlenki acetylointermedyny i acetylolikopsaminy (0,967-2,673 mg/g), a w siedmiu *N*-tlenek likopsaminy (0,528-1,873 mg/g). Alkaloidy – intermedyna, likopsamina oraz acetylointermedyna i acetylolikopsamina – charakteryzujące się silniejszym efektem hepatotoksycznym, we wszystkich analizowanych surowcach były obecne w wielokrotnie niższych stężeniach (0,003-0,151 mg/g) (62). Publikacje z ostatnich lat nie potwierdzają występowania, wcześniej wykrytych lazjokarpiny, mioskopiny, symwirydyny oraz echimidyny (22, 33, 35), która ze względu na bardzo podobne widmo masowe może być *N*-tlenkiem symwirydyny (67). Liście żywokostu zawierają znacznie mniejsze ilości alkaloidów pirolizydynowych (wg EMA w korzeniu 1380-8320 µg/g do 15-55 µg/g w liściach) (22, 68), i mogłyby stanowić w praktyce klinicznej bardziej bezpieczny roślinny surowiec leczniczy.

#### 1.1.5. Flawonoidy i inne związki

W korzeniu żywokostu pochodzenia rumuńskiego, Paun i wsp. (69), ujawnili metodą HPLC-UV/Vis obecność w niskich stężeniach flawonoidów: rutyny (7,85 mg/kg), luteoliny (1,11 mg/kg), kwercetyny (1,50 mg/kg), kemferolu (1,49 mg/kg) i apigeniny. W zespołach flawonoidów obecnych w wyciągach alkoholowych (metanolowy, etanolowy) z liści żywokostu dotychczas stwierdzono obecność heksozydu, acetyloheksozydu i ramnozydo-heksozydu kwercetyny oraz ramnozydo-heksozydu kemferolu (64). Niewiele jest jednak badań dotyczących składu chemicznego liści (59, 68, 70).

Ponadto, w korzeniu żywokostu wykazano obecność saponin triterpenowych – leonozydu A, B, D, kaulozydu (71) oraz symfytoksyny A (65), tanin katechinowych (około 2,4%), aminokwasów, witamin (24), związków mineralnych - wapnia (0,052 mg/l), magnezu (0,054 mg/l), cynku (0,079 mg/l) oraz toksycznego niklu (0,050 mg/l) i ołowiu (0,354 mg/l) a także bogatego zespołu ponad 30 kwasów tłuszczowych – głównie kwasów dekanowych (63, 64).

W nasionach wykazano obecność alantoiny i flawonoidów (16,60 µg/g nasion i 28,1 µg/g nasion, odpowiednio) (72) oraz frakcji lipofilowej (57,6%), z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, w tym kwasem γ-linolenowym (16%) (73).

#### 1.1. Aktywność farmakologiczna surowców roślinnych otrzymywanych z *Symphytum officinale* i innych gatunków z rodzaju *Symphytum*

Spośród wymienionych powyżej związków czynnych, udział w efektach leczniczych korzenia żywokostu przypisuje się przede wszystkim alantoinie, kwasowi rozmarynowemu, glikopeptydowi, śluzom i związkom garbnikowym. Badania nad działaniem leczniczym żywokostu lekarskiego są intensywnie rozwijane w ostatnich latach, wykazano m. in. aktywność przeciwzapalną, antynocycyptywną i przeciwutleniającą wyciągów alkoholowych z korzenia.

##### 1.1.1. Działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne

W licznych modelach doświadczalnych wykazano, że kwas rozmarynowy i jego pochodne wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, od działania przeciwutleniającego poprzez przeciwzapalne do przeciwwirusowego i przeciwbakteryjnego oraz przeciwnowotworowego (18). W mechanizmie działania przeciwzapalnego jest wymieniane

zmianie i blokowanie wytwarzania wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (ROS) oraz hamowanie syntezy prostaglandyn i innych prozapalnych białek (m.in. PGE<sub>2</sub>, IL-6, IL-4, IL-1β, IFN-γ, COX-2, NO). Kwas rozmarynowy wykazuje ponadto ochronny wpływ na skórę obniżając produkcję i wydzielanie IL-6 oraz reaktywnych form tlenu (ROS), zapobiegając uszkadzającemu keratynocyty działaniu promieniowania UVB (17, 18). Działanie przeciwzapalne, związane z inhibicją uwalniania IL-1β i przeciwutleniające (testy DPPH, FRAP), na poziomie nieco niższym niż kwasu rozmarynowego, wykazano dla oligomerów kwasu kawowego – rabdozyny i globoidnanów A i B (20).

W badaniach *in vivo* prowadzonych na myszach i szczurach stwierdzono, że siła działania przeciwzapalnego wyciągu z korzenia żywokostu podawanego *per os* w modelu indukowania karageniną obrzęku łąpy jest statystycznie znacząca w porównaniu do placebo i zależna od dawki. W pierwszej fazie formowania obrzęku aktywność przeciwzapalna przewyższała działanie diklofenaku (8).

Innym związkiem o aktywności przeciwzapalnej jest obecny w korzeniu żywokostu glikopeptyd, który hamuje uwalnianie prostaglandyn, przede wszystkim PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, metabolitów lipooksygenazy (12-HETE) i kwasu arachidonowego poprzez selektywne obniżanie ekspresji fosfolipazy A<sub>2</sub> (57). Z kolei obecne w surowcu śluzu tworzą warstwę ochronną na skórze oraz błonach śluzowych, zapewniając ochronę przed czynnikami zewnętrznymi, natomiast garbniki katechinowe działają ściągająco, przeciwzapalnie oraz hamują mikrokrwawienia.

### 1.1.2. Działanie wspomagające gojenie ran

Podstawowym związkiem łączonym z wykazywanym, przez wyciągi z korzenia żywokostu, działaniem wspomagającym gojenie ran jest alantoina, która stymuluje regenerację tkanek, wzrost komórek nabłonka i powstawanie ziarniny. Jednocześnie działa keratolitycznie, przeciwzapalnie i nawilżająco, przyspieszając usuwanie martwej tkanki, co skutkuje łagodzeniem bólu. Pomimo szerokiego zastosowania w kosmetyce i farmacji, mechanizm działania leczniczego tego związku wciąż jednak nie jest znany. W badaniach prowadzonych na zwierzętach wykazano, że w grupie leczonej preparatem zawierającym alantoinę redukcja liczby komórek zapalnych, jak i stymulacja odkładania kolagenu zachodziły szybciej, w porównaniu do placebo, a proces gojenia ran prowadził do formowania bardziej zorganizowanej tkanki, o strukturze zbliżonej do zdrowej skóry. Ograniczanie stanu zapalnego

przez alantoinę zachodzi prawdopodobnie poprzez hamowanie chemotaksji komórek prozapalnych w obrębie rany i zapobieganie uwalnianiu oraz zmiatanie wolnych rodników i reaktywnych form tlenu odpowiedzialnych za stres oksydacyjny i uszkodzenia tkanek. Dowiedziono, że alantoina przyspiesza gojenie ran poprzez stymulację proliferacji fibroblastów, tworzenia ziarniny, a także syntezy i reabsorpcji kolagenu (9, 74). Stwierdzono, że stosowanie preparatów zawierających jedynie alantoinę jest mniej efektywne w porównaniu do stosowania wyciągu z korzenia żywokostu lekarskiego (75), co świadczy o znaczącej roli pozostałych składników ekstraktu i efektach synergistycznych.

Sowa i wsp. (61) wykazali w modelu *in vitro* wpływ stymulujący na proliferację fibroblastów ludzkiej skóry (HSF) wyciągu wodno-etanolowego z korzenia żywokostu, wiążąc go z właściwościami przeciwutleniającymi i zdolnością redukcji wolnych rodników. Aktywację, na zbliżonym poziomie, proliferacji komórek mysich fibroblastów skóry 3T3 odnotowano dla wyciągów wodnego i etanolowego z liści żywokostu, jakkolwiek silniejszą aktywność przeciwutleniającą ujawnił wyciąg etanolowy o wyższej zawartości związków fenolowych [31, 55].

### 1.1.3. Inne kierunki działania

Badania aktywności biologicznej dziko rosnących roślin z Półwyspu Bałkańskiego, wskazują na hamowanie aktywności enzymatycznej wyciągu etanolowego z liści żywokostu, w tym inhibicję  $\alpha$ -amylazy (1,86 mmol ACAE/g) i  $\alpha$ -glukozydazy (11,47 mmol ACAE/g), kilkakrotnie silniejszą od wyciągu z kwiatu bzu czarnego (*Sambuci flos*). Aktywność obydwu enzymów jest związana z rozwojem cukrzycy i syndromu metabolicznego. Jednocześnie wykazano cytotoksyczność wyciągu wobec linii komórek nowotworowych Hep2c (nowotworu szyjki macicy) i RD (mięśaka prążkowanokomórkowego), odpowiednio w stężeniach 27,43 i 11,56  $\mu$ g/ml, potwierdzając jego potencjalne działanie przeciwnowotworowe (76).

## 1.2. Badania kliniczne

Skuteczność preparatów z wyciągami z różnych gatunków żywokostów oceniono w licznych badaniach klinicznych produktów zawierających ekstrakty z części podziemnych (korzenie) żywokostu lekarskiego oraz z części nadziemnych (liście, ziele) żywokostu lekarskiego i żywokostu rosyjskiego (*Symphytum x uplandicum*). Sformułowane pytania kliniczne dotyczyły

m. in. skuteczności w schorzeniach układu mięśniowo-szkieletowego - bólach mięśni, urazach stawów m.in. stawu skokowego, osteoartrozie kolana, ostrych dolegliwościach bólowych pleców, łokciu tenisisty, zapaleniu ścięgien kończyn górnych oraz stymulacji procesu gojenia ran, uszkodzeń naskórka – otarciach, owrzodzeniach żyłakowych nóg i rumieniu spowodowanym promieniowaniem UV, zarówno u dorosłych, jak i u dzieci. W przeprowadzonych badaniach pacjenci nie zgłaszali działań niepożądanych, a nieliczne obserwowane obejmowały m. in. skórne zmiany o podłożu alergicznym (3, 4, 24, 77). Jako leków/terapii referencyjnych użyto leków syntetycznych o zbliżonych wskazaniach stosowania do ocenianego zakresu skuteczności, takich jak diklofenak (8), antybiotyki (78) i indometacyna w podaniu na skórę w postaci żelu lub maści, kortykosterydy w iniekcjach domięśniowych oraz krioterapia (77).

W większości badań klinicznych prowadzonych w odniesieniu do związków/terapii referencyjnych, wykazano porównywalną lub wyższą skuteczność preparatów zawierających wyciągi z żywokostu lekarskiego. Jednak należy podkreślić fakt, że większość badanych produktów charakteryzowała się obniżoną zawartością alkaloidów pirolizydynowych, uzyskaną w wyniku zastosowania zmodyfikowanego procesu produkcyjnego. Natomiast w badanych wyciągach nie określono zawartości związków biologicznie czynnych odpowiedzialnych za efekty lecznicze. Badania obejmowały komercyjnie dostępne produkty z żywokostem i w większości były finansowane przez ich producentów, co mogło wskazywać na wysokie ryzyko stronniczości. Frost i wsp. (77) w krytycznym przeglądzie 26 badań klinicznych oceniających skuteczność i bezpieczeństwo stosowania korzenia żywokostu, oszacowali dla większości z nich ryzyko stronniczości jako wysokie, z niskim jedynie w przypadku dwóch badań.

Pierwszym z nich było randomizowane (n-120), wieloośrodkowe badanie kliniczne z podwójnie ślepią próbą wobec placebo, skuteczności leczenia ostrego bólu pleców z użyciem maści zawierającej 35% wyciągu z korzenia żywokostu lekarskiego *S. officinale* (1:2 etanol 60% (v/v)) w miejscowej aplikacji na skórę trzy razy dziennie w ilości 4 g każdorazowo. Zmiany nasilenia bólu w aktywnym standaryzowanym ruchu i spoczynku (*active standardised movement*) oceniano w skali wzrokowo-analogowej (VAS) podczas czterech wizyt pacjentów grupy badanej w odniesieniu do grupy kontrolnej, w przeciągu 5 dni. Wykazano znaczącą skuteczność maści żywokostowej w oparciu o obserwowany spadek natężenia bólu w aktywnym ruchu średnio o 95,2% (vs placebo 37,8%), oraz w spoczynku o 97,4% (vs placebo 39,6%) (79).

W drugim randomizowanym badaniu klinicznym z podwójnie ślełą próbą w grupie dzieci w wieku 3-12 lat (n=108) stosowanie kremu zawierającego 10% wyciągu ze świeżych części nadziemnych żywokostu rosyjskiego (*Symphytum x uplandicum*) skracało proces gojenia średnio o 4,1 dnia w porównaniu do preparatu o niższej zawartości wyciągu (1%). Wykazano statystycznie istotną różnicę w szybkości gojenia rany. Nie odnotowano żadnych działań niepożądanych, w tym reakcji alergicznych i podrażnień (80).

Badaniami klinicznymi objęto m.in. roślinne produkty lecznicze, dostępne na europejskich rynkach m.in. niemieckim, mianowicie Kytta-salbe® i Kytta-balsam® – zawierające 35% wyciągu z korzenia żywokostu lekarskiego oraz Traumaplant® o zawartości 10% wyciągu z części nadziemnych żywokostu rosyjskiego. Są one klasyfikowane w grupie produktów roślinnych o tradycyjnym zastosowaniu. EMA nie wydała zgody na zmianę kategorii produktów tzn. na produkty o ugruntowanym zastosowaniu w oparciu o przedstawione wyniki badań klinicznych, stwierdzając, że brak standaryzacji i określenia zawartości związków czynnych biologicznie decydujących o działaniu przeciwzapalnym i w konsekwencji przeciwbólowym, nie gwarantuje ich powtarzalnej skuteczności terapeutycznej. Podsumowując, EMA uznaje stosowanie produktów leczniczych z korzenia żywokostu lekarskiego w leczeniu objawowym urazów i stłuczeń, natomiast nie przyznaje im statusu produktów o ugruntowanym zastosowaniu w leczeniu reumatycznego zapalenia stawów, bólu mięśni i stawów, kontuzji sportowych.

## 2. Arnika górską (*Arnica montana* L.) i Arnika łąkowa (*Arnica chamissonis* L.)<sup>3</sup>

### 2.1. Stanowisko systematyczne

**Królestwo:** *Archaeplastida* – Rośliny

**Gromada:** *Spermatophyta* – Nasienne

**Podgromada:** *Angiospermae (Magnoliophytina)* – Okrytonasienne

**Klasa:** *Dicotyledonopsida (Dicotyledones, Magnoliatae)* – Dwuliścienne

**Rząd:** *Asterales* – Astrowce

**Rodzina:** *Asteraceae* – Astrowate

**Rodzaj:** *Arnica* L. – Arnika

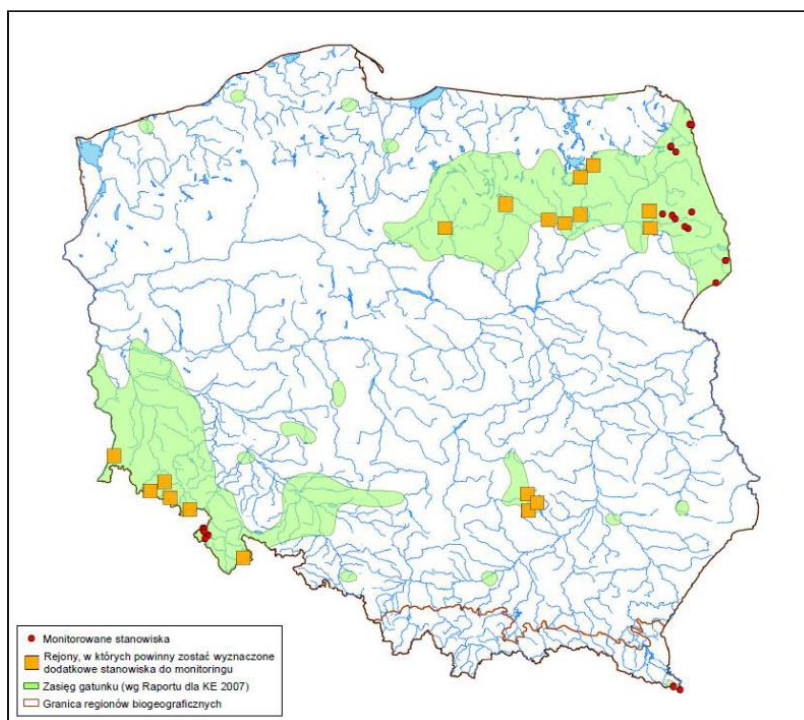
**Gatunek:** *Arnica montana* L. – Arnika górską / *Arnica chamissonis* Less. – Arnika łąkowa

### 2.2. Występowanie

Arnika górską (*Arnica montana* L.), nazywana kupalnikiem, jest gatunkiem natywnym dla Europy, występującym na górskich i podgórskich (500-2500 m n.p.m.) obszarach większości kontynentu, z wyjątkiem wysp brytyjskich i półwyspu bałkańskiego. W wielu krajach, w tym w Polsce, jest gatunkiem zagrożonym wyginięciem. Na terenie Polski obecna przede wszystkim w Sudetach i na Pojezierzu Mazurskim. Rzadziej obserwowana, w rozproszonych stanowiskach, na Dolnym Śląsku, Wyżynie Małopolskiej, w Górach Świętokrzyskich i Bieszczadach Zachodnich (2, 81-83) (Ryc. 4).

---

<sup>3</sup> Niektóre fragmenty rozdziału pochodzą z pracy przeglądowej: M. Krauze-Baranowska, K. Kimel (2022) Arnika górską i jej znaczenie lecznicze w świetle badań naukowych. *Farmacja Polska*, 78 (9): 491-502, DOI: 10.32383/farmpol/156952



Ryc. 4: Rozmieszczenie stanowisk monitoringu gatunku (*A. montana*) na tle jego zasięgu geograficznego; dane na rok 2012 (84)

W przeciwieństwie do arniki górskiej, arnika łąkowa (*Arnica chamissonis* Less.) jest gatunkiem pochodzącym z Ameryki Północnej – naturalnie występuje we wschodniej części Stanów Zjednoczonych oraz Kanadzie – naturalizowanym w niektórych częściach Europy. Rośnie, w porównaniu do arniki górskiej, na niższych wysokościach, preferując podmokłe łąki (85).

### 2.3. Charakterystyka botaniczna

Cechą charakterystyczną arniki górskiej są duże żółte koszyczki kwiatowe o średnicy sięgającej nawet ponad 80 mm. Na obwodzie koszyczka znajduje się 14-20 kwiatów języczkowatych o długości 20-30 mm, a w jego wnętrzu promieniście ułożone są liczne, znacznie krótsze (6-8 mm) kwiaty rurkowate. Obydwa typy kwiatów są otoczone obfitym, szarym puchem kielichowym. Kwiatostany, średnio od 1 do 7, wyrastają na szczycie prostej, zielonej i gruczołowato owłosionej łodygi, dorastającej do 20-60 cm wysokości.

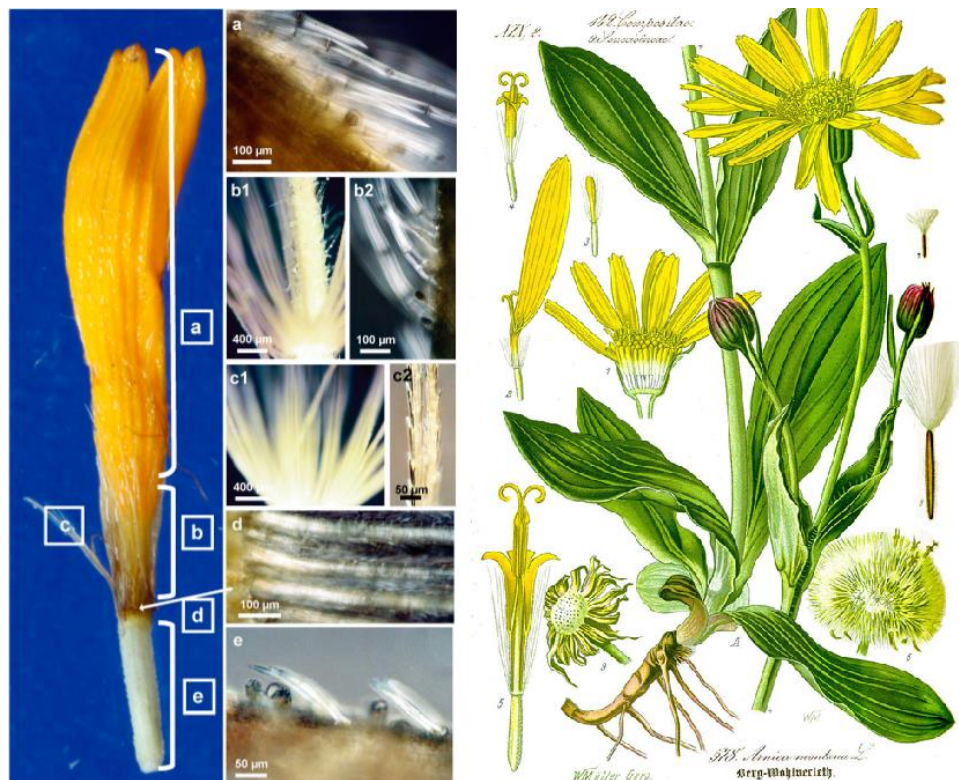
Arnika wykształca rozetę liści odziomkowych o wydłużonym odwrotnie-jajowatym kształcie, a także mniejsze, wyrastające naprzeciwlegle parami na pojedynczym pędzie, jajowato-lancetowate liście łodygowe.



Owoc stanowi niełupka o długości 4-5 mm, na szczycie pokryta żółtawymi włoskami puchu kielichowego (Ryc. 5).

Arnika łąkowa, w przeciwieństwie do arniki górskiej charakteryzuje się około 2-krotnie mniejszą średnicą kwiatostanów (20-40 mm), ale wykształca ich więcej.

Surowiec farmaceutyczny stanowi wysuszony koszyczek arniki, zbierany w okresie kwitnienia. W homeopatii wykorzystywana jest nalewka macierzysta sporządzana z całej świeżej rośliny oraz jej odpowiednie rozcieńczenia (2, 27, 85, 86).



Ryc. 5: Zdjęcie mikroskopowe pojedynczego kwiatu arniki górskiej (*Arnica montana* L.) (87) oraz cała roślina.

#### 2.4. Historia zastosowań leczniczych

Kwiaty arniki mają sięgającą tysiąclecia tradycję stosowania w leczeniu, w szczególności jako surowca o działaniu przeciwzapalnym (88-91). Jednak rośliny tej nie znali starożytni prekursorzy fitoterapii, mianowicie Hipokrates czy Dioskurides (89, 91). Pierwsze informacje o wykorzystaniu arniki w leczeniu przypuszczalnie pochodzą z XII w. Prawdopodobnie to właśnie arnikę mogła opisywać św. Hildegarda z Bingen w dziele *Physica*, pisząc: „kiedy między skórą a ciałem człeka wystąpią plamy i pęcherze, trzeba natenczas zagotowawszy w wodzie, ziele na rany ciepłe przykładać, a ów uleczon będzie”. Nie jest jednak jednoznaczne, czy opis

ten dotyczy arniki, gdyż autorka nie wymienia nazwy rośliny wprost, a używa nazwy „Wuntwurz” – ziele na rany. Wymieniane przez nią zastosowania: „zranienia zewnętrzne, wrzody, plamy i bąble pod skórą” pokrywają się jednak z tymi przypisywanymi wówczas arnicy (89). Potwierdzone jest stosowanie arniki górskiej w medycynie ludowej co najmniej od XVI w., i była ona zalecana w „krwotokach, urazach tępych” i „zapalnych zmianach skórnych” (89, 91). Wymieniane wskazania są między innymi prezentowane w Zielniku Adama Lonitzera: „U Sasów używa go [tego ziele] gmin, gdy kto spadnie z wysoka albo inaczej przy pracy rany się nabawi” (89).

Oficjalnie do lecznictwa arnika została wprowadzona dopiero w XVIII w. Cenił ją między innymi niemiecki poeta Johann Wolfgang von Goethe, leczony wyciągiem z arniki u kresu życia w celu złagodzenia objawów zapalenia płuc (91). W tym czasie tradycyjne wskazania do jej stosowania obejmowały zarówno aplikację wewnętrzną, głównie w leczeniu gorączki, chorób płuc i układu sercowo-naczyniowego (m.in. tzw. „serce starcze”, zaburzenia krążenia), jak i zewnętrzną, w obrzękach i podskórnych wylewach spowodowanych urazami o różnym charakterze m. in. wskutek uderzenia, skręcenia, zwknięcia stawu itd. Popularność surowca doprowadziła na przestrzeni lat do wytrzebienia zasobów naturalnych i przyczyniła się do obecnego statusu arniki górskiej jako rośliny narażonej na wyginięcie.

Obecnie wiele tradycyjnych, wcześniejszych wskazań do stosowania arniki górskiej pozostało w użyciu alopaticznym. Produkty lecznicze zawierające wyciągi z arniki są zalecane jedynie zewnętrznie w obrzękach, stanach zapalnych skóry, czyrączności, zapaleniu żył, schorzeniach reumatycznych, tępych urazach będących wynikiem stłuczeń, zwknięć, złamań, a także jako przyspieszające wchłanianie podskórnych wylewów, wybroczyn, obrzęków pourazowych i po ukąszeniach owadów (92-95). Nalewka lub wyciąg płynny z arniki, w bardzo dużych rozcieńczeniach, są stosowane wewnętrznie jedynie w homeopatii (95). Jednocześnie wyciągi z arniki należą do szeroko stosowanych składników pochodzenia roślinnego w różnego rodzaju produktach kosmetycznych (96).

## 2.5. Surowce farmaceutyczne pozyskiwane z arniki

Zgodnie z wytycznymi monografii EMA (23) i Farmakopei Europejskiej (97) surowiec farmaceutyczny stanowią wysuszone koszyczki arniki górskiej (*Arnicae flos*), o zawartości laktonów seskwiterpenowych nie mniejszej niż 0,4% w przeliczeniu na tyglinian

dihydrohelenaliny. Podobnie kwiat arniki definiuje obowiązująca Farmakopea Polska XII (98). W Farmakopei Francuskiej można natomiast znaleźć dodatkową monografię „*Arnica montana ad praeparationes homoeopathicas*” opisującą jako surowiec leczniczy roślinny całą, świeżą roślinę – arnikę górską w okresie jej kwitnienia.

Arnika górską stanowi gatunek narażony na wyginięcie, wpisany na Czerwoną Listę Roślin i Grzybów (81). Dopuszczalne może być w przyszłości, zastąpienie jej arniką łąkową (*A. chamissonis*) (85, 99-101). Starsze wydania Farmakopei Polskiej (do V wydania), w monografii *Arnicae flos* wskazywały na wysuszone koszyczki z obydwu gatunków arniki jako surowca leczniczego roślinnego i był on wówczas standaryzowany nie na zawartość laktonów seskwiterpenowych, a flawonoidów, których zawartość miała się mieścić w zakresie 0,4-0,6% (28, 102). Z kolei niemiecka Komisja E dopuszcza do stosowania kwiatostany obydwu gatunków arnik, zarówno wysuszone, jak i świeże (101).

Niektórzy autorzy wskazują na duże zróżnicowanie profilu chemicznego kwiatu/koszyczka arniki w zależności od miejsca zbioru. Badania obejmujące kwiatostany arniki górskiej pozyskiwane ze stanowisk naturalnych w Hiszpanii i Rumunii wskazują na najwyższą zawartość helenaliny i innych laktonów seskwiterpenowych oraz kwasów fenolowych w surowcach rosnących w najwyższych partiach gór (1330-1460 m n.p.m. w Hiszpanii, 1000-1700 m n.p.m. w Rumunii) (103, 104). Z wyników badań arnik pochodzących z północnych Włoch wynika jednak, że odnotowana wcześniej korelacja może nie być stała – najwyższe stężenia związków fenolowych i laktonów seskwiterpenowych odnotowano na średnich wysokościach (1608-1817 m n.p.m), podczas gdy na wyższych były one niższe (83).

## 2.6. Produkty lecznicze roślinne zawierające przetwory z arniki górskiej

Obecnie, zastosowanie w lecznictwie produktów z arniką jest oparte na wieloletniej tradycji użycia kwiatów arniki i są one rejestrowane jako tradycyjne roślinne produkty lecznicze. Według monografii EMA (23), przetworami z kwiatów arniki dopuszczonymi do stosowania są nalewki (tinctura) otrzymane przez ekstrakcję surowca mieszaninami wody i etanolu:

- 70% etanolem (v/v) w stosunku DER 1:10,
- 60% etanolem (v/v) w stosunku DER 1:5,

- wyciągi płynne ze świeżych kwiatów z użyciem jako rozpuszczalnika 50% etanolu (*m/m*) w stosunku DER 1:20.

Produkty zawierające przetwory z arniki różnią się ich zawartością. Najczęściej są to maści/kremy/żele o zawartości nalewki 10-25% lub wyciągu olejowego 15%, oraz preparaty płynne stosowane w postaci okładów/płukanek – w tym celu zaleca się użycie wyciągu płynnego (50% etanolu) z surowca lub rozcieńczenie nalewki wodą w stosunkach 1:3 i 1:10 [16,7,14,30-32]. Rekomendowane dawkowanie to aplikacja maści/żelu/kreму 2-3 razy dziennie, a wyciągu płynnego 2-4 razy dziennie na zmienioną chorobowo, ale bez uszkodzeń, skórę (23).

Według zaleceń EMA, stosowanie produktów zawierających przetwory z arniki powinno być ograniczone do 10 dni, i jeśli objawy nie ustępują, skonsultowane z lekarzem. Nie jest wskazane stosowanie preparatów z arniki u dzieci poniżej 12 roku życia oraz w okresie ciąży i laktacji (23, 105). Wybrani autorzy zalecają zachowanie większej ostrożności – *Gehrmann* i wsp. (106), sugerują konsultację stosowania wyciągów z arniki przy ostrych dolegliwościach utrzymujących się powyżej 7 dni lub cyklicznie stałych, z kolei *Brinkmann* i wsp. (107) zalecają ograniczenie stosowania nierozcieńczonej nalewki jedynie do pędzlowania małych powierzchni ciała. W piśmiennictwie naukowym można znaleźć także informacje o stosowaniu arniki jako esencji – pranalewki o stężeniu 60% *Arnica montana ex planta tota* (całej rośliny) – aplikowanej w formie okładów na nieuszkodzoną skórę po rozcieńczeniu: 1 łyżka pranalewki w ¼ l wody (107).

Zgodnie z wytycznymi EMA, tradycyjne wskazania do przyjmowania arniki wewnętrznie w chorobach sercowo-naczyniowych są aktualnie wykluczone, a produkty lecznicze zawierające ten surowiec mogą być stosowane jedynie zewnętrznie, na skórę (23). Wyjątek stanowi Australia, w której dopuszcza się podanie doustne wyciągu z arniki, a rekomendowana dawka dzienna stanowi w tym przypadku ekwiwalent 1 mg wysuszonej substancji roślinnej (105). W pozostałych krajach, stosowanie wewnętrznie nalewki z arniki jest dozwolone w homeopatii ale tylko jej odpowiednich rozcieńczeń (potencji) (95).

## 1.1. Skład chemiczny

Stosowane w fitoterapii koszyczki arniki górskiej zawierają wieloskładnikową mieszaninę co najmniej kilku grup związków chemicznych aktywnych biologicznie (Tabela 1). Do najważniejszych grup metabolitów wtórnych decydujących o właściwościach leczniczych arniki górskiej należą charakterystyczne dla rodziny *Asteraceae* laktony seskwiterpenowe pochodne helenaliny, a także związki fenolowe – przede wszystkim flawonoidy oraz, jak wynika z ostatnich doniesień naukowych kwasy fenolowe – pochodne kwasu kawowego (23, 88, 93, 99, 108).

Tabela 1: Najważniejsze związki biologicznie czynne zidentyfikowane w kwiatach arniki górskiej (86, 88, 92, 96, 99, 100, 108-111)

Grupa związków / Nazwa związku:	
<b>Helenalina</b>	
<b>11<math>\alpha</math>13<math>\beta</math>-dihydrohelenalina</b>	
<b>Estry pochodne helenaliny i 11<math>\alpha</math>13<math>\beta</math>-dihydrohelenaliny</b>	6- <i>O</i> -(2-metylomaślan) helenaliny
	6- <i>O</i> -izomaślan dihydrohelenaliny
	6- <i>O</i> -izomaślan helenaliny
	6- <i>O</i> -izomaślan dihydrohelenaliny
	6- <i>O</i> -metakrylan helenaliny
	6- <i>O</i> -octan helenaliny
	6- <i>O</i> -octan dihydrohelenaliny
	6- <i>O</i> -tyglinian helenaliny
	6- <i>O</i> -tyglinian dihydrohelenaliny
	6-izobutyrylotetrahydrohelenalina
	2 $\beta$ -etoksy-6- <i>O</i> -izobutyrylo-1,2,3-dihydrohelenalina
	<b>Glikozydy flawonoidowe:</b>
3- <i>O</i> -glukuronid kemferolu	
3- <i>O</i> -acetyloglukozyd kemferolu	
3- <i>O</i> -glukozyd kwercetyny	
3- <i>O</i> -glukuronid kwercetyny	
3- <i>O</i> -glukozyd patuletyny	

	3-O-glukuronid patuletyny
	7-O-glukozyd eupafoliny
	7-O-glukuronid eupafoliny
	3-O-glukozyd luteoliny
<b>Aglukony flawonoidowe</b>	Apigenina
	Kemferol
	6-metoksykemferol
	Betuletyna
	Hispidulina
	Jaceozydyna
	Pektolinarygenina
<b>Kwasy fenolowe:</b>	
<b>Kwasy dikawoilochinowe:</b>	Kwas 1,5-dikawoilochinowy
	Kwas 4,5-dikawoilochinowy
	Kwas 3,4-dikawoilochinowy
	Kwas 1-metoksy-szczawianoilo[oksanolo]-3,5-dikawoilochinowy
	Kwas chlorogenowy
Kwas kawowy	
Kwas galusowy	
Kwas p-kumarowy	
Kwas p-hydroksy-benzoowy	
Kwas gentyzynowy	
Kwas ferulowy	
Kwas wanilinowy	
<b>Olejek eteryczny:</b>	
Kumen	
Tuj-2,4-dien	
Nonanal	
Dekanal	
E-kariofilen	

Eugenol
Tymol i jego estry
<b>Inne związki:</b>
Poliacetyleny
Karotenoidy
Kumaryny
Fitosterole
Związki gorzkie
Triterpeny pochodne $\alpha$ -amaryny
Żywice
Alkaloidy pirolizydynowe

### 1.1.1. Laktony seskwiterpenowe

Grupą metabolitów wtórnych odgrywających kluczową rolę w aktywności terapeutycznej arniki są laktony seskwiterpenowe, występujące w stężeniach zbliżonych do flawonoidów (0,2-0,8% lub 0,3%-1%) (23). Kwiat arniki (*Arnicae flos*) jako surowiec farmakopealny powinien zawierać nie mniej niż 0,4% laktonów seskwiterpenowych wyrażonych jako tyglinian dihydrohelenaliny, natomiast nalewka z arniki (*Arnicae tinctura*) nie mniej niż 0,04% (23).

W surowcu dominują związki typu pseudogwajanu: helenalina i 11 $\alpha$ ,13-dihydrohelenalina oraz ich estry z kwasem octowym, izomasłowym, 2-metylomasłowym, tyglinowym i metakrylowym (88, 92, 109, 110). Ponadto, w roślinie stwierdzono obecność 2 $\beta$ -etoksy-6-*O*-izobutyrylo-1,2,3-dihydrohelenaliny, 6-*O*-izobutyrylotetrahydrohelenaliny (111), a z wyciągu alkoholowego ze świeżych kwiatów wyizolowano także 3 nowe 1,5-trans-gwajanolidy m. in. 11 $\alpha$ ,13-dihydro-2-*O*-tyloiloflorylenalinę i jej 2-*O*-izowalerylową pochodną (111).

W kwiatach arniki łąkowej dodatkowo obecne są chamissonolidy (2,3-dihydro-2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ -dihydroksypochodne helenaliny i 11 $\alpha$ 13 $\beta$ -dihydrohelenaliny; w tym 4-*O*-acetylo-6-dezoksychamissonolid) oraz arnifoliny (2,3-dihydro-2 $\alpha$ -hydroksypochodne helenaliny) a także arnikolid G (112-114). Ponadto kwiaty *A. chamissonis* charakteryzuje obecność ksantalonginy i dihydroksantalonginy, laktonów obecnych również w koszyczkach gatunków *A. gracilis* oraz *A. latifolia* (115).

### 1.1.2. Flawonoidy

Zespół flawonoidów obecnych w koszyczku arniki obejmuje flawonole i flawony w formie połączeń glikozydowych. Należą do nich zarówno 3-O-glikozydy jak i 3-O-glukuronidy kwercetyny i kemferolu (zawartość 0,4-0,6%), oraz 7-O-glikozydy flawonowe, m.in. pochodne luteoliny, apigeniny (92, 108, 110). W zespole zidentyfikowanych w roślinie flawonoidów wymienia się także: betuletol, 6-metoksykemferol, hispidulinę, jaceozydynę, pektolinaryngeninę, glikozydy patuletyny i eupafoliny (96, 99).

### 1.1.3. Kwasy fenolowe

W surowcu obecne są następujące kwasy fenolowe, m.in. kwas galusowy, kawowy, p-hydroksybenzoesowy, p-kumarowy, gentyzynowy, ferulowy, wanilinowy (96, 99, 108). W kwiatostanach arniki stwierdzono występowanie w wysokich stężeniach estrów kwasu kawowego z kwasem chinowym – w tym dominujących w zespole izomerów kwasu mono- i di-kawoilochinowego: kwasu chlorogenowego, kwasów 1,5- i 3,5-dikawoilochinowych, kwasu 1-metoksy-szczawianoilo[oksanoilo]-3,5-dikawoilochinowego (99).

### 1.1.4. Olejek eteryczny

Koszyczki arniki stanowią źródło olejku eterycznego, charakteryzującego się półstałą konsystencją, jako rezultatu obecności kwasów tłuszczowych, m.in. kwasu palmitynowego, mirystynowego i linolenowego oraz n-alkanów C14-C30 (86, 96). Skład olejku eterycznego różni się w zależności od warunków geograficznych i środowiskowych. W olejkach eterycznych otrzymywanych z arnik pochodzących ze stanowisk europejskich dominują związki seskwiterpenowe, monotereny i pochodne fenolu (86). W olejku eterycznym z koszyczków arniki górskiej w najwyższych stężeniach występują: kumen, tuj-2,4-dien, nonanal, dekanal, E-kariofilen, eugenol oraz tymol i jego estry (metylowy, dimetylowy ester z kwasem izomasłowym) (86, 96, 100).

### 1.1.5. Inne związki

Do innych grup związków biologicznie czynnych wykrytych w koszyczku arniki należą między innymi: poliacetyleny, karotenoidy ( $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, kryptoksantyna, luteina), pochodne kumaryny (umbeliferon, skopoletyna), fitosterole (arnisteryna), związki gorzkie (arnicyna), irydoidy (loliolid), związki triterpenowe pochodne  $\alpha$ -amyryny (arnidiol, faradiol), żywice oraz alkaloidy pirolizydynowe (tussilagina, izotussilagina) (88, 92, 96).



## 1.2. Działanie lecznicze

W fitoterapii preparaty z arniki są wskazane do stosowania w obrzękach pourazowych, wybroczynach krwawych, będących wynikiem stłuczeń, zwichnięć i złamań, w zapaleniu żył powierzchniowych, stanach zapalnych jamy ustnej i dziąseł, schorzeniach skórnych takich jak czyrączność, stany zapalne po ukąszeniu owadów (93, 107, 108, 116, 117). Ponadto znajdują zastosowanie w łagodzeniu bólów mięśniowych i reumatycznych (93, 107), a jak wskazują najnowsze badania także w leczeniu leiszmaniozy skórnej (118). Stosowanie wyciągów z arniki miejscowo zewnętrznie w owrzodzeniach żyłakowych podudzi, zapaleniu żył, oparzeniach I i II stopnia (116, 119) jest problematyczne, chociaż podejrzewa się, że mogą poprawiać ukrwienie i przyspieszać ziarninowanie (119). Doustne stosowanie arniki jest jednak w fitoterapii przeciwwskazane – uważa się, że dotychczasowe badania dotyczące ryzyka związanego z przyjmowaniem surowca wewnątrznie nie dostarczają dostatecznych dowodów, aby potwierdzić jego bezpieczeństwo (23, 96, 111, 116). Stosowane wewnątrznie wyciągi z arniki stymulują wzrost czynności wydzielniczej przewodu pokarmowego i działają spazmolitycznie. W podaniu *per os* wskazuje się jednak na możliwe działanie drażniące błony śluzowe, objawiające się bólem w obrębie żołądka, biegunkami i wymiotami (96, 106, 111), co według niektórych źródeł jest związane z obecnością helenaliny. Związek ten wykazuje również działanie hipotensyjne, zwalniające akcję serca i ma silne właściwości alergizujące (96, 111).

Zbliżone do tych fitoterapeutycznych, są wskazania do stosowania zarówno zewnętrznego, jak i wewnętrznego preparatów homeopatycznych zawierających wyciąg ze świeżej całej rośliny *A. montana*. Obejmują one: urazy o charakterze miejscowym, ogólnym będące wynikiem stłuczeń, zwichnięć, złamań, leczenie przed- i po-operacyjne, krwawienia skąpe lub średnio obfite, zmęczenie mięśniowe jako konsekwencja wysiłku fizycznego, zmiany w obrębie naczyń włosowatych, kruchość naczyń, bolesne żyłaki kończyn dolnych (2, 110).

### 2.6.1. Działanie przeciwzapalne i przeciwobrzękowe

Aktywność przeciwzapalna wyciągów z arniki jest łączona głównie z obecnością laktonów seskwiterpenowych. Związki te poprzez unieczynnienie syntetazy prostaglandynowej hamują syntezę prostaglandyn i powodują obniżenie parametrów biochemicznych towarzyszących procesom zapalnym (94, 120-123). Najbardziej aktywnym związkiem o działaniu przeciwzapalnym jest helenalina (23, 94). W doświadczalnym modelu ostrego zapalenia, siła

jej działania była porównywalna z indometacyną (2,5 mg/kg m.c. helenaliny vs. 10 mg/kg m.c. indometacyny), natomiast w modelu przewlekłego stanu zapalnego silniejsza od indometacyny nawet o 25% (120).

Działanie przeciwobrzękowe helenaliny potwierdzają badania *in vivo* na modelach zwierzęcych. Helenalina hamowała indukowany karageniną obrzęk łapy szczura. Jednocześnie dawka 2,5 mg/kg m.c. podana dootrzewnowo szczurom opóźniła wystąpienie objawów zapalnych o 30-180 min. Z kolei 20 mg/kg m.c. helenaliny podanej dootrzewnowo myszom hamowało w 93% odczuwanie bólu indukowanego kwasem octowym (120, 123).

### 2.6.2. Działanie wzmacniające naczynia krwionośne

Dzięki zdolności przenikania do głębszych warstw skóry oraz do naczyń krwionośnych, związki chemiczne arniki wzmacniają ściany naczyń włosowatych, a w przypadku uszkodzeń (np. w następstwie kontuzji, urazu) zapobiegają przenikaniu osocza przez łożysko żyłne i zmniejszają występujący obrzęk oraz ograniczają jego bolesność. Ponadto, stymulują wchłanianie płynu wysiękowego m.in. poprzez regulację ciśnienia na zewnątrz i wewnątrz drobnych naczyń podskórnych (94, 95, 108), a także, przeciwdziałając agregacji płytek krwi, zapobiegają powstawaniu zakrzepów żylnych (94, 111). Pozytywne efekty obserwowano w badaniach klinicznych skuteczności terapii niewydolności żyłnej z wykorzystaniem żelu z arniki (zawartość przetworu z arniki 20% oraz 25%) (2), oraz ograniczaniu poporodowej utraty krwi u kobiet z użyciem preparatów homeopatycznych zawierających obok wyciągu z arniki, wyciąg ze stokrotki (Arnica C6 i Bellis perennis C6 oraz Arnica C30 i Bellis perennis C30) (2, 124).

W modelach zwierzęcych obserwowano korzystny wpływ helenaliny na układ sercowo-naczyniowy w małych dawkach ( $10^{-5}$ - $10^{-3}$  mola), mianowicie działanie inotropowe dodatnie a w wyższych stężeniach – inotropowe ujemne prowadzące do bloku skurczów mięśnia sercowego. Ponadto wykazano, że helenalina stymuluje ośrodek oddechowy, poprawia krążenie obwodowe i mózgowie oraz przepływ krwi w naczyniach wieńcowych, a także działa przeciwzapalnie i przeciwobrzękowo w obrębie żył obwodowych i naczyń mózgowych (94-96, 111).

### 2.6.3. Działanie antyoksydacyjne

O działaniu antyoksydacyjnym kwiatostanów arniki decyduje przede wszystkim obecność w surowcu flawonoidów i kwasów fenolowych. Badania *in vitro* z użyciem testów DPPH i ABTS

(aktywność „zmiatająca” wolne rodniki) oraz FRAP (hamowanie reakcji wolnorodnikowych) wskazują na wysoki potencjał antyoksydacyjny wyciągu z kwiatów arniki górskiej (2, 125). Ponadto, wyciąg etanolowy z arniki, w stopniu zależnym od zawartości w nim flawonoidów i kwasów fenolowych, chronił mysie fibroblasty przed szkodliwym działaniem stresu oksydacyjnego (109). Działanie przeciwutleniające, ograniczające produkcję i neutralizujące wolne rodniki, poprzez ochronę komórek przed działaniem stresu oksydacyjnego, pośredniczy w aktywności przeciwzapalnej surowca (126).

#### 2.6.4. Działanie przeciwreumatyczne

Aktywność przeciwreumatyczną żelu zawierającego 20% wyciągu z kwiatów arniki potwierdzono w badaniach klinicznych. Wyniki badania przeprowadzonego na 174 pacjentach z chorobą zwyrodnieniową stawów rąk wskazują, że aplikacja żelu z ekstraktem z arniki przynosi korzyści zbliżone do stosowania ibuprofenu przy podobnej liczbie działań niepożądanych (2, 127). Pozytywne wyniki odnotowano w badaniu randomizowanym, podwójnie zaślepionym, w którym żel z arniką (50%) ujawnił podobną siłę działania do żelu z ibuprofenem (5%) w leczeniu osteoartrozy palców (2).

Statystycznie znaczący spadek bólu, sztywności i ograniczenia funkcji stawu kolanowego stwierdzono w 6-tygodniowych badaniach otwartych, wieloośrodkowych, oceniających skuteczność terapii żelem zawierającym 50 g nalewki z arniki (rano i wieczorem 3 tygodnie) – 75% pacjentów potwierdziło, że chętnie użyje preparatu ponownie (2, 128).

#### 2.6.5. Działanie przeciwbólowe

W badaniach, na myszach i szczurach, żelu zawierającego wyciąg z arniki (stosowany pojedynczo lub w połączeniu z wyciągiem z ziela dziurawca) obserwowano oprócz działania przeciwzapalnego, również efekty przeciwbólowe. Działanie uśmierzające ból odnotowano w badaniach klinicznych z wykorzystaniem preparatów homeopatycznych w leczeniu neuralgicznego bólu zęba (*Arnica 7C* i *Hypericum 15C*), bólu mięśni pleców (*Arnica planta tota* Rh D3), jak i w pooperacyjnej terapii zespołu cieśni nadgarstka (maść zawierająca 5% nalewki *Arnica TM*) (2).

#### 2.6.6. Działanie przeciwdrobnoustrojowe

Badania *in vitro* ujawniają działanie przeciwdrobnoustrojowe przetworów z arniki górskiej. Octan helenaliny i 11 $\alpha$ ,13-helenaliny wykazują działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze (96). Badania nad aktywnością przeciwwirusową laktonów seskwiterpenowych wskazują na aktywność przeciwwirusową helenaliny wobec wirusowego zapalenia wątroby typu C (HCV). Związek charakteryzował się najwyższą efektywnością spośród 10 badanych laktonów seskwiterpenowych (EC<sub>50</sub> 1,25  $\mu$ M) (129).

Badania z ostatnich lat nalewki z arniki i występujących w niej laktonów seskwiterpenowych w leczeniu leishmaniozy skórnej u chomików, wskazują również na działanie przeciwpierwotniakowe (118). Przeprowadzone badania *in vitro* i w modelu zwierzęcym potwierdziły skuteczność nalewki z arniki oraz frakcji laktonów seskwiterpenowych przeciwko odpowiedzialnym za leishmaniozę skórną gatunkom: *Leishmania tropica* oraz *L. braziliensis*. Jednocześnie, terapia z wykorzystaniem wyciągów z arniki skracala czas gojenia towarzyszących leishmaniozie skórnej, ran i owrzodzeń (118).

Związki chemiczne zawarte w ekstrakcie dobrze wchłaniają się przez naskórek. Badania przenikania przez skórę zespołu laktonów seskwiterpenowych obecnych w nalewce z arniki (Arnikatinktur Hetterich; Teofarma, Włochy) wykazały, że w ciągu 4h w płynie akceptorowym są wykrywane ich niskie stężenia, zaś po 48 h większość jest absorbowana i przechodzi do skóry na poziomie 97,6, 97,8 i 99,3%, odpowiednio, wiążąc się nieodwracalnie z białkami i wykazując korzystny efekt w leczeniu schorzeń skórnych, takich jak leishmanioza. Odnotowano, że przenikanie laktonów jako składników wyciągu z arniki jest wyższe w porównaniu do aplikowanych jako pojedynczych związków – inne składniki ekstraktu mogą więc działać jak promotory wchłaniania laktonów seskwiterpenowych (118).

#### 2.6.7. Inne kierunki działania

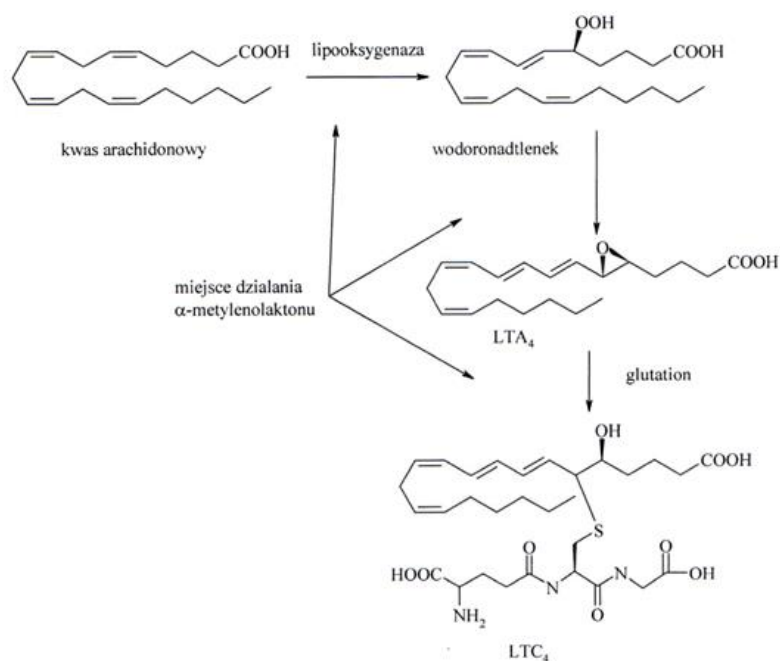
Badania *in vitro* wskazują na aktywność immunomodulującą frakcji polisacharydowej z kwiatostanu arniki górskiej – obserwowano właściwości immunostymulujące związane z nasileniem fagocytozy przez granulocyty oraz aktywacją makrofagów. Ponadto, w modelu zwierzęcym, wyizolowane z wyciągu z arniki górskiej laktony seskwiterpenowe po podaniu dożylnym ujawniły działanie uterotoniczne oraz poprawiające funkcje oddechowe (zwiększenie częstotliwości i objętości oddechu, odpowiednio o 35 i 45%) (2). Wstępne badania

*in vitro* wskazują na możliwą aktywność przeciwnowotworową helenaliny, związaną m.in. ze zdolnością do hamowania NF- $\kappa$ B i indukcji apoptozy (129).

## 2.7. Mechanizm działania – biochemiczny i molekularny.

W pracy porównującej aktywność przeciwzapalną niektórych surowców roślinnych, wyciąg z *A. montana* należał do grupy najsilniej hamujących COX-2 i TNF- $\alpha$  oraz produkcję NO w mysich makrofagach stymulowanych LPS (130).

Działanie przeciwzapalne arniki jest wynikiem przede wszystkim obecności laktonów seskwiterpenowych – helenaliny i jej pochodnych. Badania zależności aktywność-struktura szeregu laktonów seskwiterpenowych wskazują, na podstawową rolę w aktywności przeciwzapalnej struktur nienasyconych, takich jak ugrupowanie  $\alpha$ -metyleno- $\gamma$ -laktonowe i/lub niepodstawione reszty  $\alpha,\beta$ -cyklopentenowe (helenalina posiada oba ugrupowania w cząsteczce) (Ryc. 4) (120-122, 131).



Ryc. 6: Mechanizm biochemiczny działania przeciwzapalnego  $\alpha$ -metylenolaktonów (120, 121, 132).

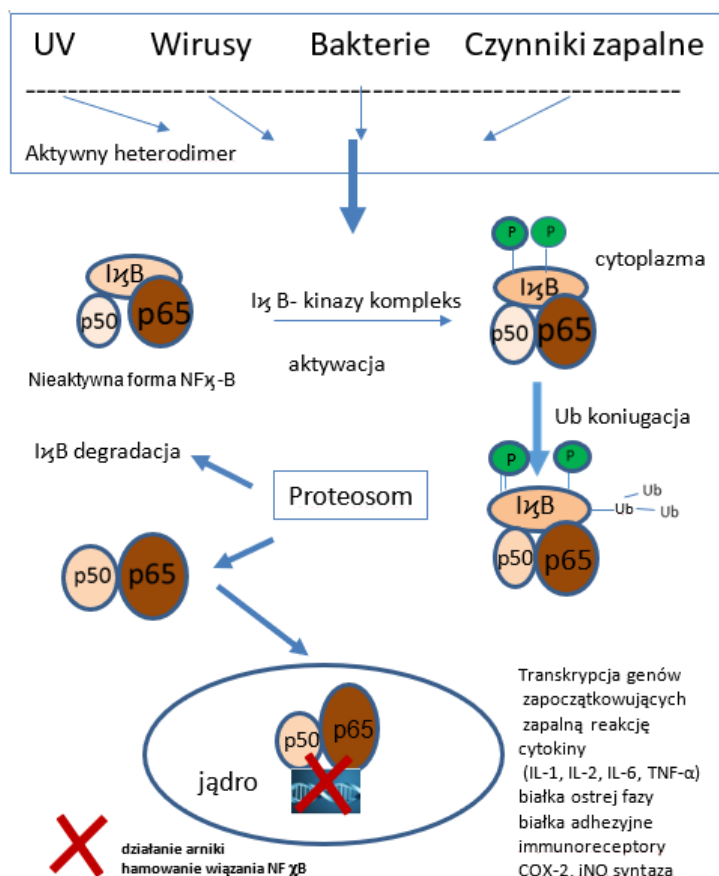
Rolę ugrupowania  $\alpha$ -metylenowego w efekcie przeciwzapalnym potwierdzono w badaniach porównujących aktywność helenaliny i octanu jej zredukowanej pochodnej – 11 $\alpha$ ,13-dihydrohelenaliny. Znaczącą inhibicję syntazy  $LTC_4$  obserwowano tylko dla pierwszego związku z dwóch wymienionych (131, 132). Ocena hamowania syntezy leukotrienu  $LTC_4$  w ludzkich

płytkach krwi wykazała, że po 5 min preinkubacji wartość  $IC_{50}$  dla helenaliny wynosiła 100  $\mu M$ , a dla octanu 11 $\alpha$ ,13-dihydrohelenaliny 275  $\mu M$ , natomiast po 60 min w przypadku helenaliny została obniżona do 12  $\mu M$ . Aktywność była zależna nie tylko od czasu inkubacji, ale i użytego stężenia związku (132). Ponadto, badania przeprowadzone z wykorzystaniem ludzkich granulocytów wykazały, że helenalina hamuje zarówno syntezę LTC<sub>4</sub>, jak i 5-LOX ( $IC_{50}$  9  $\mu M$  po 60 min. preinkubacji), nie wpływając przy tym na hydrolazę LTA<sub>4</sub> (132).

Badania w modelu *in vitro* wykazały, że helenalina i jej pochodne ograniczają oksydacyjną fosforylację w neutrofilach, stabilizują membrany lizosomów i hamują aktywność enzymów lizosomalnych, biorących udział w procesach zapalnych. Silniejszym działaniem cechuje się helenalina, która w stężeniu  $5 \times 10^{-5}$  hamowała chemotaktyczną migrację ludzkich neutrofilii wielojądrzastych o 100%, w porównaniu do 20% dla 2,3-dihydrohelenaliny (121).

Jednocześnie, obecne w wyciągu flawonoidy, na poziomie biochemicznym, wykazują zdolność do hamowania aktywności enzymów i prozapalnych mediatorów takich jak COX, 5-LOX, hialuronidaza i elastaza (105, 115).

Molekularny mechanizm działania przeciwzapalnego wyciągu z arniki wynika z obecności różnych grup substancji biologicznie czynnych i obejmuje, przede wszystkim hamowanie aktywacji NF- $\kappa$ B, NF-AT, które stymulują transkrypcję genów prozapalnych białek – cytokin IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , białek ostrej fazy, COX, iNOs (88, 115, 117, 119, 123). Badania aktywności przeciwzapalnej 12 gatunków z rodzaju *Arnica* wykazały pomiędzy poszczególnymi gatunkami znaczące, zależne od zawartości helenalolidów, różnice w hamowaniu niektórych cytokin prozapalnych, czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B oraz uwalnianiu elastazy z ludzkich neutrofilii. Najwyższą aktywnością charakteryzował się wyciąg z *A. montana*, zawierający najwyższe stężenia tych związków (115). Znaczenie helenaliny w molekularnym mechanizmie działania przeciwzapalnego arniki ujawniły badania, w których wykazano, że w stosunku do czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B selektywnie alkiluje ona podjednostkę p65, powodując jego unieczynnienie (Ryc. 5) (117, 123).



Ryc. 7: Molekularny mechanizm aktywności przeciwzapalnej helenaliny (123).

W grupie aktywnych biologicznie laktonów seskwiterpenowych obecnych w wyciągu z arniki, obok helenaliny i 11 $\alpha$ ,13-dihydrohelenaliny wymienia się również ich estrowe pochodne. Badania wykazują jednak, że to helenalina jest odpowiedzialna za najsilniejszy efekt przeciwzapalny, silniejszy od 11 $\alpha$ ,13-dihydrohelenaliny, co wynika z różnic strukturalnych i konformacyjnych obydwu związków (10, 132).

Czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B występuje w cytoplazmie niestymulowanych komórek w formie nieaktywnej a następnie jest aktywowany pod wpływem fosforylacji i degradacji jego hamującej jednostki I $\kappa$ B. Helenalina hamuje jego aktywację w odpowiedzi na 4 różne czynniki obecne w limfocytach T i B oraz komórkach śródbłonna i ogranicza I $\kappa$ B-regulowaną ekspresję genów. Proces ten jest selektywny i nie dotyczy innych czynników transkrypcyjnych, takich jak Oct-1, TBP, Sp1 i STAT 5. Działanie hamujące helenaliny nie jest wynikiem bezpośredniej modyfikacji aktywnego heterodimeru NF- $\kappa$ B, a raczej jest modyfikacją kompleksu NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B i w konsekwencji prowadzi do zablokowania uwalniania I $\kappa$ B (117, 123). Mechanizm przeciwzapalnego działania laktonów seskwiterpenowych jest więc odmienny od

niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), kwasu acetylosalicylowego i indometacyny (123).

Wyciąg z arniki, w sposób zależny od dawki i w niskim zakresie stężeń, obniża poziomy mRNA metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, głównie MMP1 i MMP13, w wołowych i ludzkich chondrocytach stawów. Wskazuje to na możliwość zastosowania arniki w leczeniu chorób reumatoidalnych. Działanie to jest przypuszczalnie związane z hamowaniem czynników transkrypcyjnych AP-1 i NF- $\kappa$ B wiążących DNA. Metaloproteiny należą do enzymów proteolitycznych (endopeptydaz) uczestniczących w fizjologicznych i patologicznych procesach przebudowy i degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Badana aktywność była silniejsza dla wyciągu z arniki niż dla izolowanych laktonów seskwiterpenowych. Potwierdza to udział w aktywności przeciwzapalnej i przeciwreumatycznej także innych grup związków biologicznie czynnych obecnych w ekstrakcie (116).



### 3. Estry pochodne kwasu kawowego

Kwasy fenolowe od dekady są przedmiotem badań fitochemicznych, farmakologicznych wskazujących na ich zróżnicowane właściwości biologiczne, w szczególności działanie przeciwzapalne i przeciwutleniające. W rezultacie surowce je zawierające są wykorzystywane w fitoterapii (np. liść karczocha) lub jako pojedyncze związki są one składnikami produktów kosmetycznych, w terapiach *anti-aging* (15, 133, 134).

Szczególą grupą kwasów fenolowych są szeroko rozpowszechnione w świecie roślin pochodne kwasu kawowego, występujące zarówno w postaci glikozydów, jak i estrów, spośród których wyróżnia się estry kwasu kawowego z kwasem 3,4-dihydrofenylomlekowym (tzw. kawoilotaniny) oraz estry kwasu kawowego z kwasem chinowym (kwasy mono-, di-, trikawoilochinowe), obecne między innymi w korzeniu żywokostu lekarskiego i kwiatostanach arniki, odpowiednio (5, 82, 135).

#### 3.1. Biosynteza

Biosynteza kawoilotanin i kwasów kawoilochinowych rozpoczyna się od dwóch aminokwasów aromatycznych – L-feniloalaniny i L-tyrozyny, które niezależnie od siebie są przekształcane do pośrednich prekursorów. Feniloalanina poprzez szlak fenylopropanoidowy – w reakcjach enzymatycznych z udziałem amoniakolizazy feniloalaniny (PAL), 4-hydroksylazy kwasu cynamonowego (C4G) i CoA-ligazy kwasu 4-kumarowego jest przekształcana do 4-kumarylo-CoA; natomiast tyrozyna przez aminotransferazę tyrozyny i następnie reduktazę hydroksyfenylopirogonianu (HPPR) do kwasu hydroksyfenylomlekowego (134, 136).

W procesie biosyntezy kawoilotanin, obydwa prekursory ulegają estryfikacji katalizowanej przez „syntazę kwasu rozmarynowego” (RAS; 4-kumarylo-CoA : 4-kumarylotransferaza kwasu 3'-hydroksyfenylomlekowego : 4-kumarylotransferaza kwasu 4'-hydroksyfenylomlekowego) w wyniku której powstaje ester kwasu 4-kumarylo-4'-hydroksyfenylomlekowego (4C-pHPL). W końcowym etapie powstawania kwasu rozmarynowego, grupy 3- i 3'-hydroksylowe są wprowadzane za pośrednictwem reakcji monooksygenazy zależnych od cytochromu P450. (136).

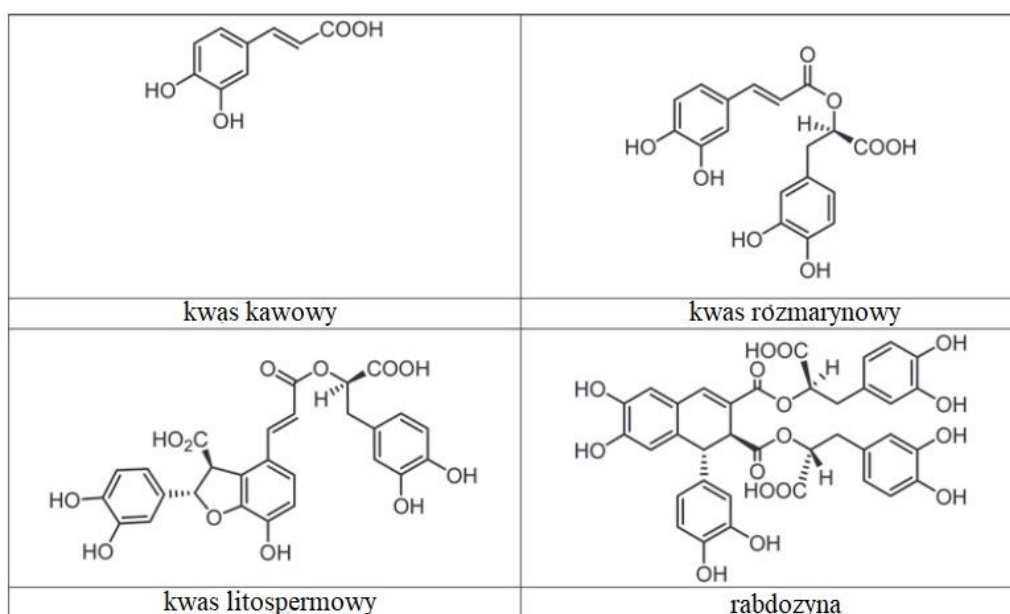


kawoilochinowego pełniące rolę zarówno donora, jak i akceptora acylu. Pozostałe izomery mogą powstawać w wyniku spontanicznej migracji grupy acylowej w wakuolach (Ryc. 8) (134).

### 3.2. Estry kwasu kawowego z kwasem 3,4-dihydrofenylomlekowym (kawoilotaniny)

#### 3.2.1. Budowa chemiczna

Do grupy kawoilotanin zaliczane są związki stanowiące pochodne kwasu kawowego będące jego estrami z kwasem 3,4-dihydrofenylomlekowym. Najważniejszym przedstawicielem tej grupy jest kwas rozmarynowy. Związki o bardziej skomplikowanych strukturach, takie jak kwasy litospermowe, rabdozyna (Ryc. 9), niekiedy bywają klasyfikowane jako „oligomery kwasu kawowego” (trimery, tetramery, pentamery). Jakkolwiek uwzględniając obecność w strukturze jednostki kwasu 3,4-dihydrofenylomlekowego nie jest to w pełni poprawna terminologia, bywa jednak stosowana w celu odróżnienia poszczególnych grup związków (18).



Ryc. 9: Struktury chemiczne przykładowych estrów kwasu kawowego z kwasem 3,4-dihydrofenylomlekowym (18)

#### 3.2.2. Występowanie

Najważniejszym przedstawicielem estrów pochodnych kwasu kawowego zaliczanych do grupy kawoilotanin jest kwas rozmarynowy. Związek ten zidentyfikowano w licznych gatunkach należących do rodziny Boraginaceae oraz Lamiaceae (podrodzina Nepetoideae), między innymi w roślinach leczniczych takich jak: *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Mentha x piperita*, *Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis*, *Symphytum officinale* (14, 18). Kwas rozmarynowy został

również rozpoznany jako składnik pojedynczych przedstawicieli innych rodzin, m.in. Chroranthaceae (*Sarcandra glabra*, *Chloranthus officinalis*), Marantaceae (*Thalia geniculata*), Malvaceae (*Helicteres jamaicensis*), Apiaceae (*Centella asiatica*, *Sanicula europaea*, *Eryngium alpinum*, *Foeniculum vulgare*) (136).

Spośród innych estrów kwasu kawowego zaliczanych do jego oligomerów należy wymienić między innymi związki takie jak:

- Rabdozyna (po raz pierwszy izolowana z *Rabdosia japonica*, obecna także w *Macrotomia euchroma*, *Symphytum officinale*) (18, 62)
- Kwas litospermowy B/kwas salwianolowy B (po raz pierwszy izolowany z *Lithospermum erythrorhizon*)
- Kwasy junanowe A, B, C, D, E, F, G i H (izolowane z *Salvia yunnanensis*, obecna także w *Pulmonaria officinalis*) (18, 137)
- Kwasy salwianolowe A, C, D, F i G (izolowane z *Salvia miltiorrhiza*) (138)
- Globoidnan A (izolowany po raz pierwszy z *Eucalyptus globoidea*) (139).

### 3.2.3. Aktywność biologiczna i mechanizm działania

Ze względu na obecność licznych grup hydroksylowych (-OH), pochodne kwasu kawowego zaliczane do grupy kawoilotanin są związkami o silnych właściwościach antyoksydacyjnych. Dodatkowo odnotowano także inne, częściowo łączone z aktywnością przeciwutleniającą, kierunki działania – m.in. aktywność przeciwzapalną, neuroprotekcijną, hepatoprotekcijną, przeciwdrobnoustrojową, przeciwalergiczną (14, 17, 18, 49)

#### 3.2.3.1. Działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne

Aktywność przeciwutleniająca kwasu rozmarynowego jest wiązana przede wszystkim z jego działaniem przeciwrodnikowym i zdolnością do stabilizacji błon komórkowych, poprzez ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym. Doniesienia literaturowe wskazują, że związek ten wzmacnia oksydacyjną stabilizację liposomów, znacząco obniża produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), wymiata wolne rodniki oraz ogranicza uwalnianie IL-6, chroniąc ludzkie keratynocyty przed działaniem promieniowania UVB (17, 18). Silne właściwości antyoksydacyjne wykazują także pochodne kwasu rozmarynowego, np. obecne w korzeniu żywokostu lekarskiego: rabdozyna oraz globoidnan A i B. Badania z wykorzystaniem testów DPPH i ABTS (wymiatanie wolnych rodników) związków obecnych w wyciągu z korzenia

*Symphytum officinale* wskazały na spadek aktywności przeciwwolnorodnikowej w kolejności: rabdozyna > globoidnan B > globoidnan A > kwas rozmarynowy. Spośród wymienionych związków, kwas rozmarynowy charakteryzował się jednak najsilniejszą aktywnością hamującą uwalnianie IL-1 $\beta$  w neutrofilach stymulowanych LPS (20).

W badaniach na linii komórkowej RAW 264.7 kwas rozmarynowy obecny w ekstrakcie z *Prunella vulgaris* ujawnił zdolność do hamowania indukowanej LPS produkcji PGE<sub>2</sub> i NO oraz stymulowanej LPS aktywacji cyklooksygenazy-2 (COX-2) (17). Zbliżony mechanizm działania obserwowano w badaniach *in vivo* w modelu zapalenia jelit indukowanego solą sodową dekstranu siarczanu. Efekty łagodzące stan zapalny powiązano z obniżoną produkcją NO, iNOs, mieloperoksydazy i cyklooksygenazy (14). Znaczące działanie przeciwzapalne kwasu rozmarynowego potwierdzono także w modelu indukowanego karageniną obrzęku łąpy szczura oraz u myszy z ostrym uszkodzeniem płuc indukowanym LPS (17).

#### 3.2.3.2. Działanie hepatoprotekcyjne

Badania *in vitro* oraz *in vivo* wykazały zdolność kwasu rozmarynowego do blokowania procesów włóknienia wątroby, co jest przypuszczalnie związane z inhibicją ekspresji TGF- $\beta$ 1 i CTGF, oraz hamowania aktywacji komórek gwiaździstych wątroby (HSC) (49). Doniesienia o hepatoprotekcji kwasu rozmarynowego są szczególnie ważne w kontekście obowiązujących ograniczeń w stosowaniu wyciągów z korzenia żywokostu, związanych z obecnością w surowcu hepatotoksycznych alkaloidów pirolizydynowych.

#### 3.2.3.3. Działanie przeciwdrobnoustrojowe

Działanie przeciwdrobnoustrojowe kwasu rozmarynowego i jego pochodnych obejmuje zarówno aktywność przeciwwirusową, jak i bakteriobójczą. Dwie syntetyczne pochodne – kwas nitrorozmarynowy i 6,6'-dinitrorozmarynowy charakteryzowały się zdolnością do hamowania aktywności integrazy HIV-1 oraz replikacji wirusa w ludzkich limfocytach MT-4. Aktywność hamującą wobec integrazy HIV-1 obserwowano także dla rabdozyny. W innych badaniach obserwowano korzystny wpływ kwasu rozmarynowego u myszy zakażonych wirusem japońskiego zapalenia mózgu – dawka 25 mg/kg m.c. powodowała obniżenie śmiertelności o 20% w porównaniu z grupą kontrolną (17).

Kwas rozmarynowy w stężeniach 0,1-1,3 mg/ml wykazał również działanie bakteriostatyczne i/lub bakteriobójcze wobec ośmiu szczepów bakterii patogennych, mianowicie: *Staphylococcus*

*epidermidis* 5001, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus lugdunensis* T26A3, *Enterococcus faecalis* C159-6, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583, *Corynebacterium* T25-17, *Mycobacterium smegmatis* 5003 oraz *Staphylococcus warneri* T12A12 (17).

#### 3.2.3.4. Inne kierunki działania

Interesującym kierunkiem działania kwasu rozmarynowego jest także obserwowana aktywność neuroprotekcjna i wzmacniająca zdolności poznawcze, która może być rezultatem hamowania oligopeptydazy prolilowej. Badania *in silico* i *in vivo* wskazują również na możliwe działanie lecznicze i profilaktyczne w chorobie Alzheimerera, związane z hamowaniem agregacji  $\beta$ -amyloidu (14, 17, 18).

Kwas rozmarynowy wykazuje również potencjalne działanie przeciwnowotworowe poprzez hamowanie indukowanej przez TNF- $\alpha$  apoptozy, produkcji ROS i aktywacji NF- $\kappa$ B. Mechanizm ten ujawniono w modelu z wykorzystaniem ludzkich linii komórkowych białaczki mieloblastycznej U937 (140). Dodatkowo, Xu i wsp. (141) wykazali, że kwas rozmarynowy ogranicza metastazę komórek nowotworu piersi do kości.

### 3.3. Estry kwasu kawowego z kwasem chinowym – kwasy kawoilochinowe

#### 3.3.1. Budowa chemiczna

Podstawową strukturę chemiczną kwasów kawoilochinowych (diCQA) stanowi kwas chinowy (kwas (1S,3R,4S,5R)-1,3,4,5-tetrahydroksycykloheksanokarboksyłowy) połączony wiązaniem estrowym z jedną (kwasy monokawoilochinowe; monoCQA), dwiema (kwasy dikawoilochinowe; diCQA), trzema (kwasy trikawoilochinowe; triCQA) lub czterema (kwasy tetrakawoilochinowe; tetraCQA) jednostkami kwasu kawowego.

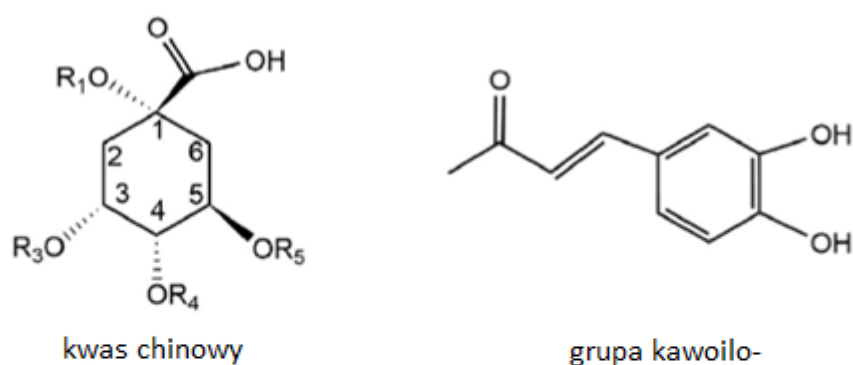
Ze względu na różne miejsce wiązania jednostek kwasu kawowego do struktury kwasu chinowego (różne pozycje węgla – C 1,3,4,5) wyróżnia się:

- cztery kombinacje strukturalne kwasu monokawoilochinowego – kwas 1-kawoilochinowy, kwas 5-kawoilochinowy (kwas chlorogenowy<sup>4</sup>), kwas 3-kawoilochinowy (kwas kryptochlorogenowy) i kwas 4-kawoilochinowy (kwas neochlorogenowy)

---

<sup>4</sup> Zgodnie z obecną nomenklaturą IUPAC; w niektórych publikacjach wciąż opisywany jako kwas 3-kawoilochinowy.

- sześć kombinacji strukturalnych kwasu dikawoilochinowego – kwas 1,3-dikawoilochinowy (1,3-diCQA), kwas 1,4-dikawoilochinowy (1,4-diCQA), kwas 1,5-dikawoilochinowy (1,5-diCQA), kwas 3,4-dikawoilochinowy (3,4-diCQA), kwas 3,5-dikawoilochinowy (3,5-diCQA) oraz kwas 4,5-dikawoilochinowy (4,5-diCQA) (Ryc. 10)
- cztery kombinacje strukturalne kwasu trikawoilochinowego – kwas 1,3,4-trikawoilochinowy, kwas 1,3,5-trikawoilochinowy, kwas 1,4,5-trikawoilochinowy i kwas 3,4,5-trikawoilochinowy
- Jeden kwas tetrakawoilochinowy – kwas 1,3,4,5-tetrakawoilochinowy (134, 142).



Di-CQAs	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
1,3-diCQA	kawoilo-	kawoilo-	H	H
1,4-diCQA	kawoilo-	H	kawoilo-	H
1,5-diCQA	kawoilo-	H	H	kawoilo-
3,4-diCQA	H	kawoilo-	kawoilo-	H
3,5-diCQA	H	kawoilo-	H	kawoilo-
4,5-diCQA	H	H	kawoilo-	kawoilo-

Ryc. 10: Struktury chemiczne kwasów dikawoilochinowych (143)

Kwasy kawoilochinowe mogą tworzyć również połączenia estrowe z innymi kwasami. Przykładowo w kwiatostanach arniki górskiej wykryto obecność kwasów: 1,5-dikawoilo-3-metoksy-szczawianoilo[*oksanoilo*]chinowego, 1,3-dikawoilo-4-metoksy-szczawianoilo[*oksanoilo*]chinowego, 3,5-dikawoilo-4-metoksy-szczawianoilo[*oksanoilo*]chinowego, 1-metoksy-szczawianoilo[*oksanoilo*]-4,5-dikawoilochinowego, 3-kawoilo-4-feruloilo-5-metoksy-szczawianoilo[*oksanoilo*]chinowego, 3-feruloilo-4-metoksy-szczawianoilo[*oksanoilo*]-5-kawoilochinowego, 1,5-dikawoilo-4-fumarylochinowego, 1,5-dikawoilo-3-fumarylochinowego, 3,5-dikawoilo-1,4-dimetoksy-szczawianoilo[*oksanoilo*]chinowego, 1-metoksy-szczawianoilo[*oksanoilo*]-3,4,5-

trikawoilochinowego i 1,3,4-trikawoilo-5-metoksy-szczawianoilo[oksanoilo]chinowego (21). W ziele miodunki plamistej (*Pulmonaria officinalis* L.) obecne są kwasy 2-O-, 3-O- i 4-O-kawoilotreonowe oraz 2-O- i 3-O-kawoiloglicerynowe (137), zaś w korzeniu łopianu większego (*Arctium lappa*) stwierdzono obecność kwasów 4,5-O-dikawoilo-1-O-(5-hydroksypentanoilo)chinowego, 1,5- i 4,5-O-dikawoilo-1-O-(metylohydroksybursztynoilo)chinowego i 5-O-dikawoilo-1-O-(metylo-bursztynoilo)chinowego (144).

### 3.3.2. Występowanie

Kwas chlorogenowy, będący przedstawicielem kwasów monokawoilochinowych (monoCQA), jest jednym z najszerzej dostępnych kwasów fenolowych obecnych w produktach żywnościowych naturalnego pochodzenia, m.in. jako składnik kawy, herbaty, owoców cytrusowych i jagodowych, jak również licznych surowców leczniczych roślinnych z rodzin *Lamiaceae*, *Asteraceae* (15).

Kwasy dikawoilochinowe (diCQA) stanowią grupę fenolokwasów występujących w różnych częściach – zarówno podziemnych (korzenie, kłącza, bulwy, nasiona), jak i nadziemnych (liście, kwiaty, łodygi, owoce) – roślin europejskich oraz egzotycznych (134, 135). Przez wiele lat związki te były badane przeważnie w surowcach stanowiących składniki napojów – ziarnach zielonej kawy, kwiatach chryzantemy (*Chrysanthemum coronatum*), bulwach pochryznu jadalnego (*Dioscorea alata*), herbaty kuding (*Ilex latifolia*), kwiatach wiciokrzewu (*Lonicera japonicae*) i herbatach (133, 135, 145, 146).

Nowsze publikacje wskazują także na obecność poszczególnych kwasów dikawoilochinowych w innych surowcach, m.in.:

- kwas 1,3-diCQA – nasiona i liście *Foeniculum vulgare*, części nadziemne *Onopordum illyricum*, *Galium verum*, *Cinnamomum aromaticum*, nasiona *Vernonia anthelmintical*,
- kwas 1,4-diCQA – części nadziemne *Artemisia sacrorum*, *Ligusticum chuanxiong*, *Gastrodia elata*,
- kwas 1,5-diCQA – liście *Stevia rebaudiana*, *Espletia barclayana*, korzenie i bulwy *Melanoselinum decipiens*, *Monizia edulis*, *Helianthus tuberosus*, kwiaty *Carthamus spp.*



- Kwas 3,4-diCQA – części nadziemne *Achrocline satureioides*, *Anthemis tinctoria*, korzenie i kłącza *Valeriana jatamansi*, kwiaty *Helichrysum arenarium*, korzenie *Angelicae pubescentis*
- Kwas 3,5-diCQA – owoce *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinum uliginosum*, olej *Olea europaea*, części nadziemne *Saxifraga umbellulata*, *Achrocline satureioides*, *Anthemis tinctoria*
- Kwas 4,5-diCQA - owoce *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinum uliginosum*, części nadziemne *Achrocline satureioides*, *Anthemis tinctoria* (142)

Obecność kwasów dikawoilochinowych (1,5-diCQA, 3,5-diCQA i 4,5-diCQA) jako związków dominujących w grupie fenolokwasów obserwowano także w kwiatach arniki górskiej (*Arnica montana* L.) i łąkowej (*Arnica chamissonis* Less.). Spośród kwasów kawoilochinowych w wymienionych surowcach obecne są m.in. kwas chlorogenowy, kwas 1,4,5,-trikawoilochinowy (związek po raz pierwszy wykryty w kwiatostanie arniki górskiej), 1-metoksy-szczawianoilo[oksanoilo]-3,5-dikawoilochinowy, kwas feruloilokawoilochinowy (99, 108, 110, 142, 147).

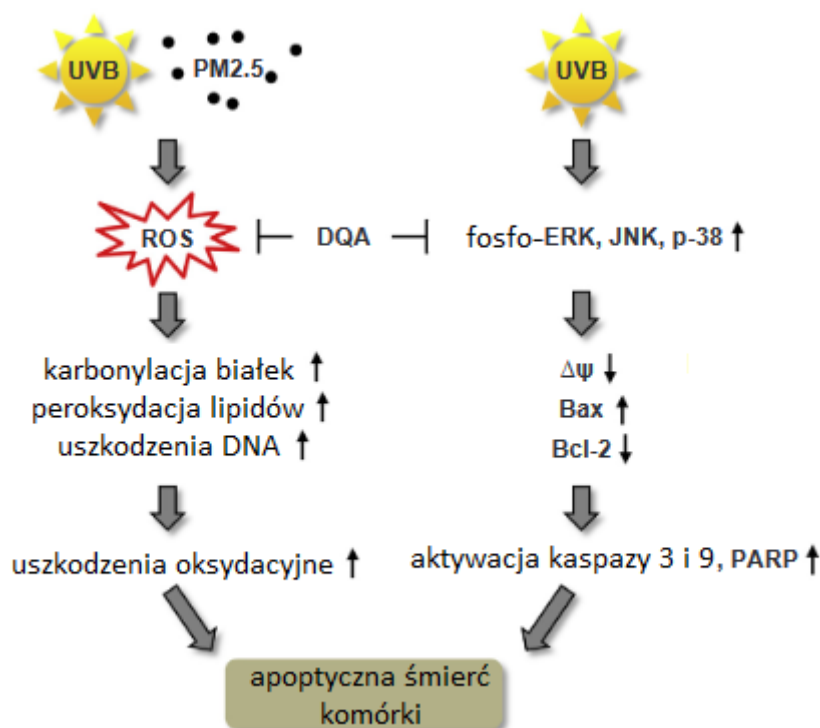
### 3.3.3. Aktywność biologiczna i mechanizm działania

Kwasy kawoilochinowe, w szczególności kwas chlorogenowy, był przedmiotem wielu badań, które ujawniły jego wielokierunkowe działanie biologiczne. Liczne doniesienia literaturowe wymieniają również dla innych przedstawicieli tej grupy aktywność przeciwutleniającą, przeciwzapalną, przeciwbakteryjną, przeciwnowotworową, przeciwwirusową, neuroprotekcijną, a badania przedkliniczne sugerują także potencjalne działanie łagodzące objawy choroby Alzheimera czy przeciwdziałające rozwojowi takich chorób cywilizacyjnych, jak cukrzyca i nadciśnienie (15, 133-135, 146). Podobne kierunki aktywności farmakologicznej są także opisywane dla wybranych diCQA, jednakże wiedza na ich temat wciąż pozostaje niepełna a znaczna część badań nad ich mechanizmami działania pochodzi z ostatnich 5 lat.

#### 3.3.3.1. Działanie przeciwutleniające

Kwasy dikawoilochinowe, podobnie jak inne związki bogate w wolne grupy hydroksylowe będące donorami atomów wodoru, charakteryzują się silną aktywnością przeciwutleniającą. Po oddaniu wodoru w celu redukcji wolnego rodnika fenolokwasy są utleniane do odpowiedniego rodnika fenoksyłowego, które ulegają szybkiej stabilizacji rezonansowej, przeciwdziałając wystąpieniu efektu prooksydacyjnego (133, 134, 146). Dla wybranych

kwasów dikawoilochinowych (3,4-diCQA, 3,5-diCQA i 3,5-diCQA) aktywność antyoksydacyjna, obejmująca wymiatanie/hamowanie produkcji wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (ROS), hamowanie reakcji oksydacji i przeciwdziałanie efektom stresu oksydacyjnego (Ryc. 11), została potwierdzona w badaniach *in vitro* – chemicznych oraz na liniach komórkowych (133, 134, 146, 148, 149).

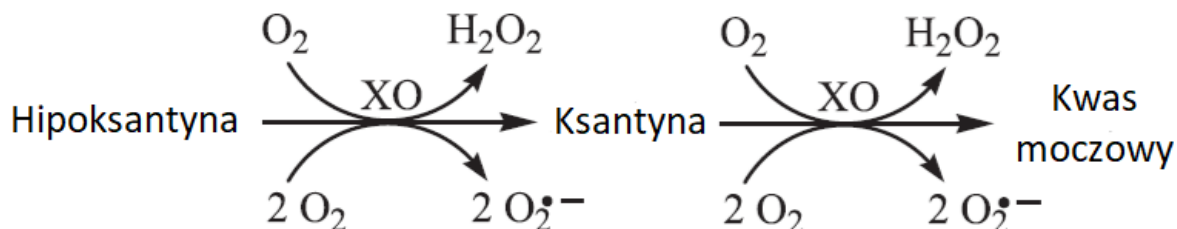


Ryc. 11: Schemat obrazujący ochronne działanie kwasu 3,4-dikawoilochinowego przed apoptozą komórek pod wpływem negatywnego działania promieniowania UVB i pyłów zawieszonych o średnicy  $<2,5 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2,5}$ ) wg. Hyun et al. (149). ERK – kinaza regulowana sygnałem pozakomórkowym; PARP – polimeraza poli(ADP-ryboza)

Dotychczasowe badania wykazały, że kwasy 3,4-, 3,5- i 4,5-dikawoilochinowe chronią przed uszkodzeniami chromosomów plazmidów DNA indukowanymi działaniem  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a 3,5-diCQA wykazuje działanie ochronne przed indukowaną *t*-BOOH produkcją ROS w komórkach HepG2 (ludzka linia komórkowa raka wątroby) (133) i apoptozą H9C2 (linia komórkowa kardiomiocytów) (150).

3,4-, 3,5- i 4,5-diCQA charakteryzują się także silną aktywnością redukującą i przeciwrodnikową, przewyższającą kwasy monokawoilochinowe 3-, 4-, 5-CQA. Wyznaczone wartości  $\text{EC}_{50}$  (połowa maksymalnego stężenia skutecznego) dla rodnika DPPH wyniosły 7,5-9,5  $\mu\text{g/ml}$  dla diCQA i 13,2-13,8  $\mu\text{g/ml}$  dla mono-CQA, a dla rodnika ABTS kolejno 67,3-77,6

$\mu\text{g/ml}$  i  $87,5\text{-}91,5 \mu\text{g/ml}$ . Najsilniejszą aktywnością charakteryzował się kwas 4,5-dikawoilochinowy. Podobną zależność zaobserwowano także w teście FRAP oceniającym zdolności redukcyjne analizowanych związków (151).



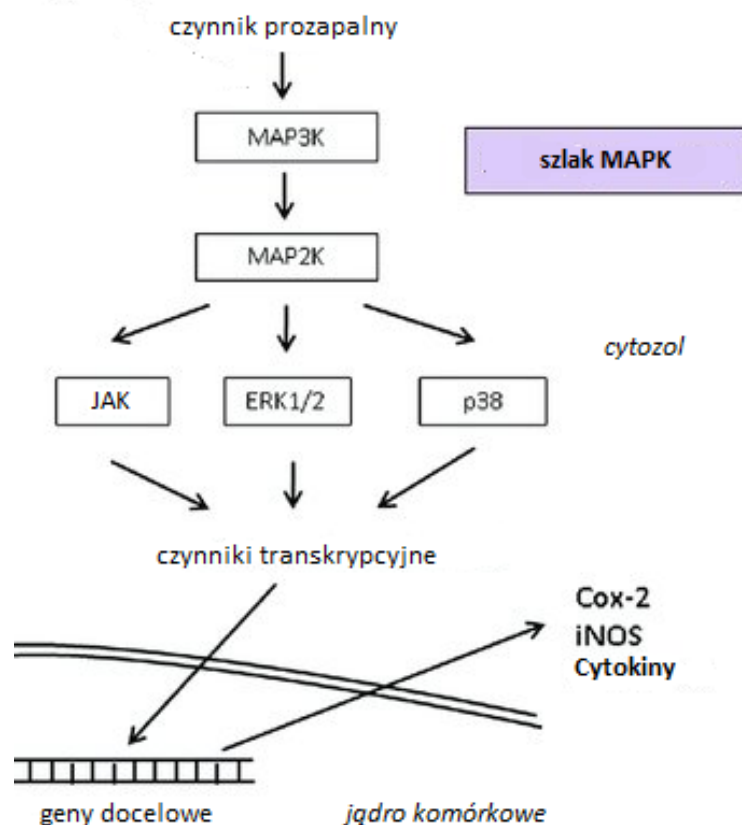
Ryc. 12: Oksydacja hipoksantyny i ksantyny do kwasu moczowego katalizowana przez oksydazę ksantynową (152)

Kwasy dikawoilochinowe ujawniły również zdolność hamowania oksydazy ksantynowej (XO) – enzymu odgrywającego istotną rolę w metabolizmie kwasów nukleinowych *in vivo* oraz procesach hydroksylacji ksantyny i hipoksantyny do kwasu moczowego. Przemianom tym towarzyszy znaczący wzrost produkcji ROS (Ryc. 12), a oprócz znaczenia w stresie oksydacyjnym XO odgrywa także rolę w rozwoju chorób związanych z hiperurykemią (kamica nerkowa, dna moczana) (143, 152, 153). W dotychczasowych badaniach odnotowano zależność pomiędzy aktywnością hamującą XO, a położeniem podstawników w izomerach kwasu dikawoilochinowego, kształtującą się w kolejności: 1,4-diCQA > 3,4-diCQA > 1,3-diCQA > 4,5-diCQA > 3,5-diCQA, jednak słabszą od allopurynolu (143, 154).

### 3.3.3.2. Działanie przeciwzapalne

Działanie przeciwutleniające pośrednio poprzez hamowanie stresu oksydacyjnego i związanej z nim produkcji cytokin prozapalnych, włącza się w działanie przeciwzapalne substancji biologicznie czynnych (155). W przypadku kwasów dikawoilochinowych nie jest to jednak jedyny mechanizm aktywności przeciwzapalnej.

Badania przeprowadzone z użyciem kwasu 4,5-dikawoilochinowego na liniach komórkowych RAW264.7 wykazały zdolność 4,5-diCQA do hamowania indukowanej lipopolisacharydem ekspresji NO i NOs,  $\text{PGE}_2$ , COX-2, TNF- $\alpha$  oraz interleukin (IL-1 $\beta$  i IL-6). Autorzy badania wiążą to działanie z hamowaniem translokacji jądrowej TNF- $\alpha$  i fosforylacji kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK) (Ryc. 13). Dodatkowe badania *in vivo*, w modelu indukowanego karageniną obrzęku łapy szczura, potwierdziły aktywność przeciwzapalną 4,5-diCQA związaną z hamowaniem COX-2, NOs i TNF- $\alpha$  w sposób zależny od dawki (156).



Ryc. 13: Rola szlaku MAPK w reakcjach zapalnych (155)

Podobne wyniki uzyskano w badaniach nad kwasem 3,5-dikawoilochinowym prowadzonych na liniach komórkowych mikrogleju BV2 i w modelu indukowanego CFA (adiuwant Freund'a) obrzęku łapy myszy. Podobnie jak w przypadku 4,5-diCQA, mechanizm aktywności przeciwzapalnej związany był z hamowaniem ekspresji COX-2, NOS oraz dodatkowo MCP3 i IBA1. Molekularny mechanizm tej aktywności jest prawdopodobnie związany z hamowaniem autofagii za pośrednictwem ścieżki przekazywania JAK-STAT3 oraz ekspresji MCP3 (157).

Ocena aktywności hamującej 4,5-diCQA i mieszaniny 3,4-diCQA i 3,5-diCQA wobec PGE<sub>2</sub>, COX-2 i NOS przeprowadzona na linii komórkowej ludzkich makrofagów RAW 264.7 wykazała silniejsze działanie kwasów 3,4-diCQA i 3,5-diCQA (IC<sub>50</sub> kolejno: 86,5 μM, 80 μM i 145,5 μM) niż kwasu 4,5-dikawoilochinowego (IC<sub>50</sub>: 102,5 μM, 155,2 μM i 150 μM). Analizowane związki oddziaływały silniej na szlak PGE<sub>2</sub>/COX-2 niż NO/NOS (158).

### 3.3.3.3. Działanie przeciwreumatyczne

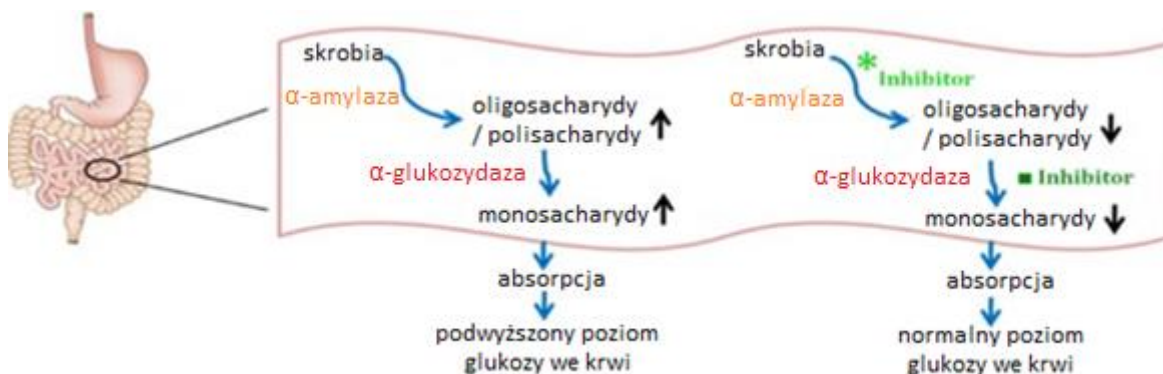
Ze względu na działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne, kwasy dikawoilochinowe i bogate w nie surowce roślinne mogą stanowić potencjalny lek w chorobach reumatycznych,

objawiających się stanami zapalnymi stawów. W rozdziale 3.3.3.2 opisano aktywność hamującą oksydazę ksantynową kwasów 1,4-diCQA, 3,4-diCQA, 1,3-diCQA, 4,5-diCQA i 3,5-diCQA, co może decydować o ich zastosowaniu w leczeniu i spowalnianiu rozwoju dny moczanowej – zapalenia stawów spowodowanego odkładaniem się kwasu moczowego w stawach, ścięgnach i sąsiadujących tkankach (143, 154).

Kwas 4,5-dikawoilochinowy był także badany pod kątem działania ochronnego na chondrocyty w chorobie zwyrodnieniowej stawów na liniach komórkowych (szczurze chondrocyty) i *in vivo* w modelu zwierzęcym (szczury). Potwierdzono, że 4,5-diCQA w sposób zależny od dawki hamuje indukowaną działaniem IL-1 $\beta$  ekspresję PGE<sub>2</sub>, TNF $\alpha$ , NOS, COX-2 i cytokin prozapalnych w chondrocytach. Działanie to było związane przede wszystkim z hamowaniem transkrypcji NF $\kappa$ B regulującego transkrypcję metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) -1, -3 i -13 oraz ADAMTS-4 – enzymów odpowiedzialnych za degradację proteoglikanów tkanki chrząstki (159).

#### 3.3.3.4. Działanie przeciwcukrzycowe

W świetle wyników niektórych badań, kwasy dikawoilochinowe mogą w przyszłości być potencjalnymi kandydatami na leki stosowanymi w leczeniu i profilaktyce cukrzycy. Aktywność przeciwcukrzycowa pięciu kwasów dikawoilochinowych (1,5-diCQA, 1,4-diCQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA i 4,5-diCQA) była oceniana na szczurzych komórkach  $\beta$ -trzustkowych (INS-1). Badania te potwierdziły zdolność wyżej wymienionych związków w stężeniach 12,5-100  $\mu$ M do hamowania aktywności  $\alpha$ -glukozydazy, w kolejności: 1,4-diCQA > 1,5-diCQA > 3,4-diCQA > 4,5-diCQA > 3,5-diCQA, spośród których pierwszy charakteryzował się siłą działania wyższą niż, stosowana jako związek porównawczy, akarboza (IC<sub>50</sub> 51.75  $\pm$  0.32  $\mu$ M vs. 60.91  $\pm$  3.85  $\mu$ M). W tym samym modelu oceniono wpływ diCQAs na sekrecję insuliny stymulowaną glukozą (GSIS), wykazując, że w nietoksycznych dla komórek stężeniach (2,5-10  $\mu$ M) pobudzają ją w sposób zależny od dawki, w kolejności: 4,5-diCQA > 3,4-diCQA > 1,4-diCQA > 3,5-diCQA > 1,5-diCQA. Jakkolwiek siła działania 4,5-diCQA była niższa niż związku porównawczego – gliklazydu, to powodował on niemal 5-krotne zwiększenie GSIS w porównaniu do próby kontrolnej. Potencjalny mechanizm działania przeciwcukrzycowego jest wynikiem wzrostu ekspresji białek ERK, P-IRS-2, Akt, PIK-3 i PDX-1 (160).



Ryc. 14: Rola  $\alpha$ -amylazy i  $\alpha$ -glukozydazy w trawieniu i metabolizmie skrobi (161)

W innym badaniu *in vitro* potwierdzono możliwą rolę kwasów dikawoilochinowych (3,5-diCQA i 4,5-diCQA) w aktywności przeciwcukrzycowej liścia bylicy rocznej (*Artemisia annua*). Zarówno polarna frakcja bogata w diCQAs, jak i pojedyncze związki, wykazywały zdolność do hamowania aktywności  $\alpha$ -amylazy,  $\alpha$ -glukozydazy (Ryc. 14), dipeptydylopeptydazy-4 (DPP-4) i reduktazy aldozy. Inhibitory DPP-4 stanowią nową klasę, wykorzystywanych w terapii cukrzycy typu 2, leków hipoglikemizujących hamujących rozkład inkretyn, które są odpowiedzialne za stymulację sekrecji insuliny i hamowanie uwalniania glukagonu (162).

#### 1.1.1.1. Inne kierunki aktywności farmakologicznej

Pojedyncze publikacje naukowe wskazują na liczne inne kierunki aktywności farmakologicznej kwasów dikawoilochinowych, m.in. działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwdepresyjne i przeciwnowotworowe.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa diCQAs jest skierowana zarówno przeciwko wirusom, jak i grzybom. Potwierdzono zdolność kwasów 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA i 1,5-diCQA do selektywnego hamowania integrazy HIV-1 w warunkach *in vitro* w limfocytach MT-2 (163) oraz 3,4-diCQA do blokowania przyłączenia się enterowirusa EV-A17 (odpowiedzialnego za HFMD obejmującą m. in. wysypkę na powierzchni skóry dłoni, stóp oraz nabłonka jamy ustnej u dzieci a także niekiedy przypadki paraliżu polio-podobnego) do komórek gospodarza, poprzez zakłócanie przyłączania się EV-A17 do receptora siarczanu heparanu (164). 3,5-diCQA wykazuje z kolei działanie grzybobójcze poprzez rozpraszanie biofilmu *Aspergillus fumigatus* w wyniku obniżenia hydrofobowości powierzchni komórkowej i hamowanie ekspresji genów hydrofobin. Dodatek tego związku do biofilmu był także efektywny w obniżaniu adaptacyjnej oporności *A. fumigatus* przeciwko lekom przeciwgrzybicznym, wzmacniając działanie amfoterycyny B i worykonazolu (165).

Kwasy 1,3-diCQA, 3,4-diCQA i 3,5-diCQA z *Arctium lappa* – surowca wykorzystywanego w chińskiej medycynie tradycyjnej – w badaniach *in vivo* prowadzonych w modelu zwierzęcym [myszy po owariektomii (166) i myszy z depresją indukowaną kortyzolem (167)] wykazały potencjalną aktywność przeciwdepresyjną. Kwas 1,3-dikawoilochinowy poprzez pobudzenie neuronalnej NOS znosił zachowania depresyjne spowodowane niedoborem estrogenów u myszy po owariektomii, dzięki czemu może stanowić potencjalny lek łagodzący negatywne objawy związane z menopauzą (166). Z kolei kwasy 3,4-diCQA i 3,5-diCQA poprzez hamowanie aktywności monoaminooksydazy-A i -B w astrocytach i neuronach ograniczały produkcję ROS u myszy z depresją indukowaną kortyzolem. W konsekwencji wykazywały działanie neuroprotektcyjne, chroniąc neurony przed negatywnym działaniem stresu oksydacyjnego, oraz łagodziły zachowania depresyjne, w tym problemy z pamięcią (167).

Badania na ludzkich liniach komórkowych raka okrężnicy (CRL-2557 i HT-29) wskazały, że bogata w 3,4-diCQA i 3,5-diCQA frakcja yerba mate (*Ilex paraguariensis*) wykazuje zdolność do hamowania proliferacji i promocji apoptozy komórek nowotworowych w stężeniach niewykazujących efektów cytotoksycznych na liniach kontrolnych (CCD-33co). Frakcja kwasów dikawoilochinowych pobudzała apoptozę komórek CRL-2557 i HT-29 za pośrednictwem aktywacji kaskady kaspazy-3 i -8 (158). Również w przypadku 1,3-diCQA i 1,5-diCQA stwierdzono potencjalne właściwości przeciwnowotworowe, w badaniach na liniach komórkowych nowotworów piersi (MCF-7, MDA-MB-231, i MCF-10A). Obydwa kwasy istotnie hamowały proliferację i migrację komórek MCF-7 i MDA-MB-231 w sposób zależny od dawki w stężeniach 24-96  $\mu$ M, najprawdopodobniej poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> oraz pobudzenie apoptozy za pośrednictwem szlaków JAK/PIK3/Akt i MAPK/ERK (168). W badaniach na nienowotworowych liniach komórkowych kwasy dikawoilochinowe nie wykazywały efektów cytotoksycznych (168), dlatego mogą one być w przyszłości potencjalnymi kandydatami na leki przeciwnowotworowe.

## II CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 1. Badania fitochemiczne

#### 1. Rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne

##### 1.1. Odczynniki chemiczne

Octan etylu, eter diizopropylowy, butanol, kwas octowy, kwas siarkowy 98% (POCH, Gliwice, Polska), keton metyloetylowy (ChemLab, ZedelGem, Belgia), aceton, heksan, kwas mrówkowy cz.d.a. i LC-MS LichroPur 97,5–98,5%, kwas solny 37% cz.d.a. (Merck, Dramstadt, Niemcy), etanol 95% (Polmos, Wrocław, Polska), acetonitryl Lichrosolv®, metanol Lichrosolv®, chloroform (Merck, Darmstadt, Germany), chlorek glinu, *p*-dimetyloaminobenzaldehyd, natural product reagent A (diphenylboric acid  $\beta$ -aminoethyl ester), glikol polietylenowy 400 (PEG 400) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), wanilina (Loba Feinchemie, Fischamend, Austria), woda demineralizowana otrzymana z użyciem systemu Millipore (Molsheim, France).

##### 1.2. Substancje wzorcowe

Apigenina, kemferolu, kwercetyna, izokwercetyna, hiperozyd, kwas chlorogenowy, kwas kawowy, kwas ferulowy (Fluka, St. Gallen, Szwajcaria), 7-O-glukozyd luteoliny, 7-O-glukozyd apigeniny, luteolina, astragalina, galangina, genkwanina, izoramnetyna, 3-O-glukuronid kwercetyny, 3-O-glukuronid kemferolu (Extrasynthèse, Lyon, Francja), hispidulina pectolaryngenina (PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Niemcy), naryngenina, kwas izochlorogenowy, kwas *p*-kumarowy (Koch-Light, Colnbrook, Wielka Brytania), chryzyna, cynaryna, kwas wanilinowy, kwas 1,5-dikawoilochinowy, kwas 3,4-dikawoilochinowy, kwas 3,5-dikawoilochinowy, kwas 4,5-dikawoilochinowy, helenalina, kwas rozmarynowy, kwas kawowy, 3-O-(6''-O-malonylo)-glukozyd kwercetyny, alantoina, kwas litospermowy, kwas salwianolowy A, B, C i D (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy), likopsamina, intermedyna, *N*-tlenek intermedyny (Planta Analytica LLC, New Milford, USA), globoidnan A z przeprowadzonej według opisanej w niniejszej dysertacji izolacji z korzenia żywokostu.



## 2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

### 2.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

- **Komory chromatograficzne:**
  - **Komora pionowa** o wymiarach 10 x 11 x 6 cm
  - **Automatyczna komora chromatograficzna ADC2** (*Automatic Development Chamber 2*) (Camag, Muttenz, Szwajcaria)
- **Aplikator półautomatyczny AS30** (Desaga, Numbrecht, Niemcy)
- **Przyrząd do cięcia płytek chromatograficznych** (Desaga, Numbrecht, Niemcy)
- **Kabina do spryskiwania chromatogramów TLC** (Camag, Muttenz, Szwajcaria)
- **Automatyczna komora do derywatywacji** (*Camag Derivatizer*) (Camag, Muttenz, Szwajcaria)
- **Komora wizualizacyjna z lampą UV** (254 nm/366 nm) (Camag, Muttenz, Szwajcaria) z oprogramowaniem **WinCats**
- **Densytmierz CD60** (Desaga, Numbrecht, Niemcy) z oprogramowaniem **ProQuant**

### 2.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Badania z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) prowadzono z użyciem trzech systemów chromatograficznych. Uzyskane wyniki analizowano wykorzystując oprogramowanie LabSolution (system II i III) i LC solution (system I).

#### 2.2.1. System HPLC-UV/Vis Prominence (Shimadzu, Kioto, Japonia)

- Degazer DGU-20A<sub>5</sub>
- Termostat CTO-10AS<sub>VP</sub>
- Autosampler SIL-20AC<sub>XR</sub>
- Pompa LC-20AD z zaworem 4-rokanałowym
- Detektor UV-Vis SPD-M20A
- Kontroler CBM-20A

#### 2.2.2. System HPLC-DAD-ESI/MS Prominence (Shimadzu, Kioto, Japonia)

- Degazer DGU-20A<sub>5</sub>
- Termostat CTO-20AC

- Autosampler SIL-20ACXR
  - Dwie pompy LC-20AC
  - Detektor DAD SPD-M20A
  - Kontroler CBM-20A
  - Spektrometr mas LCMS-2020 (*Liquid Chromatography Mass Spectrometer*) z jonizacją ESI (*Electrospray Ionization*)
  - Wytwornica azotu (*Nitrogen generator*) (Peak Scientific, Wielka Brytania)
- 2.2.3. System HPLC-MS/MS Prominence (Shimadzu, Kioto, Japonia)

- Degazer DGU-20A<sub>5</sub>
- Termostat CTO-20AC
- Autosampler SIL-20ACXR
- Dwie pompy LC-20AC
- Kontroler CBM-20A
- Zawór FCV-20AH<sub>2</sub>
- Wytwornica azotu PEAK Scientific Genius XE35 230
- Spektrometr mas LCM-8040 z potrójnym kwadrupolem i jonizacją ESI

### 2.3. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Ekstrakcję do fazy stałej prowadzono z użyciem automatycznego systemu SmartPrep Extractor II (Horizon Technology, Salem, USA) na kolumnkach SPE Discovery DSC-18 (1 g, 6 ml; Supelco, Bellefonte, USA).

### 2.4. Inne

- **Mikrostrzykawki o pojemnościach:** 10 µl, 50 µl (Hamilton, Reno, USA)
- **Wyparka próżniowa** (Unipan, Warszawa Polska)
- **Automatyczna wyparka obrotowa** Rotavapor R-300 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Szwajcaria)
- **Łaźnie wodne:** SWL (Bytom, Polska), Unipan typ 365P (Warszawa, Polska)
- **Płuczka ultradźwiękowa** (Bandelin, Niemcy)
- **Wirówka** (MPW Med. Instruments, Polska)

- **Miniwytrząsarka MS2** (IKA, Wilmington, USA)
- **Płyta grzewcza Thermoplate S** (Desaga, Numbrecht, Niemcy)
- **Liofilizator Steris Lyovac GT2 SRK** (Systemtechnik GmbH, Niemcy)
- **Waga laboratoryjna Sartorius Quintix 125D**; dokładność pomiaru 0,01 mg (Sartorius, Gottingen, Niemcy)
- **System oczyszczania wody Direct-Q 3 UV** (Merck Millipore, Burlington, USA)
- **Sączki membranowe** o średnicy porów 0,45  $\mu\text{m}$  i 0,22  $\mu\text{m}$  (Supelco, Bellefonte, USA)

### 3. Analiza chromatograficzna

#### 3.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

##### 3.1.1. Płytki chromatograficzne do chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Stosowano szklane i aluminiowe płytki chromatograficzne o wymiarach 20 x 20 cm, przycinane do odpowiednich wymiarów i pokryte następującymi adsorbentami:

#### A. Płytki szklane:

- Żel krzemionkowy – TLC SilicaGel 60 (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Żel krzemionkowy – TLC SilicaGel 60<sub>F254</sub> (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Żel krzemionkowy – HPTLC SilicaGel 60 (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Żel krzemionkowy – HPTLC SilicaGel 60<sub>F254</sub> (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi – HPTLC SilicaGel 60 RP-18W<sub>F254S</sub> (Merck, Darmstadt, Niemcy)

#### B. Płytki aluminiowe:

- Żel krzemionkowy – TLC SilicaGel 60 (Merck, Darmstadt, Niemcy)

##### 3.1.2. Fazy ruchome

#### A. Analiza alantoiny:

- F1: keton metyletylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (43 : 2 : 1 : 4, v/v/v/v)
- F2: metanol – kwas mrówkowy – woda (70 : 6 : 30 v/v/v)
- F3: butanol – 50% metanol (3 : 1 v/v)
- F4: butanol – 50% metanol (2 : 1 v/v)
- F5: butanol – 50% metanol + kwas mrówkowy (2 : 1 + 0,3 v/v + ml)

- F6: butanol – 50% metanol + kwas mrówkowy (2 : 1 + 0,2 v/v + ml)
- F7: butanol – 50% metanol + kwas mrówkowy (2 : 1 + 0,16 v/v + ml)

**B. Analiza prostych fenoli i polifenoli:**

- F1: eter diizopropylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (50 : 30 : 10 : 10, v/v/v/v)
- F2: chloroform – metanol – kwas mrówkowy – woda (70 : 30 : 2 : 2, v/v/v/v)
- F3: keton metyloetylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (40 : 20 : 1 : 6 v/v/v/v)
- F4: keton metyloetylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (50 : 30 : 10 : 10, v/v/v/v)
- F5: keton metyloetylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (30 : 50 : 10 : 10, v/v/v/v)
- F6: keton metyloetylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (35 : 50 : 10 : 5, v/v/v/v)

**C. Analiza laktonów seskwiterpenowych:**

- F1: heksan – octan etylu (95 : 5, v/v)
- F2: heksan – octan etylu (9 : 1, v/v)
- F3: heksan – octan etylu (1 : 2, v/v)
- F4: heksan – octan etylu (1 : 1, v/v)
- F5: heksan – octan etylu (3 : 2, v/v)
- F6: heksan – octan etylu (8 : 2, v/v)
- F7: heksan – octan etylu (8,5 : 1,5, v/v)
- F8: heksan – octan etylu – kwas mrówkowy (9 : 1 : 0,2, v/v/v)
- F9: heksan – octan etylu – kwas mrówkowy (8 : 2 : 0,2, v/v/v)
- F10: chloroform – aceton (4 : 1, v/v)
- F11: chloroform – aceton (8 : 1, v/v)
- F12: chloroform – aceton (4 : 3, v/v)
- F13: chloroform – aceton (10 : 1, v/v)
- F14: chloroform – aceton (5 : 1, v/v)
- F15: chloroform – aceton (6 : 1, v/v)

### 3.1.3. Rozdzielenia w automatycznej komorze chromatograficznej ADC2

Parametry pracy komory ADC2 (Camag, Muttzen, Szwajcaria) optymalizowano w zależności od analizowanej grupy związków chemicznych w zakresie parametrów takich jak:

- Wilgotność (47%) kontrola z użyciem nasyconego roztworu tiocyjanianu potasu KSCN)
- Czas prekondycjonowania chromatogramu
- Czas nasycania
- Dystans rozwijania
- Czas suszenia chromatogramu

### 3.1.4. Odczynniki wywołujące:

- I. **Odczynnik wywołujący alantoinę (zmodyfikowany odczynnik Ehrlich'a):** *p*-dimetyloaminobenzaldehyd (0,25 g) w mieszaninie 38 ml metanolu i 12 ml stężonego kwasu chlorowodorowego (HCl); 5 min ogrzewania w temperaturze 100°C (50, 98, 169).
- II. **Odczynniki wywołujące związki polifenolowe** (flawonoidy, fenolokwasy):
  - A. 2% metanolowy roztwór chlorku glinu (AlCl<sub>3</sub>) (170)
  - B. NPR (*Natural Product Reagent A*) – 1% metanolowy roztwór estru 2-aminoetylowego kwasu difenyloborowego (169, 170)
  - C. 5% etanolowy roztwór glikolu polietylenowego 400 (PEG 400) (170)
- III. **Odczynnik wywołujący laktony seskwiterpenowe:** odczynnik wanilinowy (0,5 g waniliny w 15,0 ml etanolu z dodatkiem 0,5 ml stężonego kwasu siarkowego (VI) i 3 kropli stężonego kwasu octowego); 10 min ogrzewania w temperaturze 70°C (169, 171).

### 3.1.5. Derywatyżacja w automatycznym aparacie do derywatyżacji CAMAG Derivatizer

Derywatyżację chromatogramów prowadzono w automatycznym aparacie do derywatyżacji CAMAG Derivatizer (Camag, Muttzen, Szwajcaria) przy następujących ustawieniach:

- I. **Odczynnik wywołujący alantoinę** – żółta dysza, poziom 6
- II. **Odczynniki wywołujące związki polifenolowe:**
  - A. Niebieska dysza, poziom 3
  - B. Zielona dysza, poziom 3

C. Niebieska dysza, poziom 4

### III. Odczynnik wywołujący laktony seskwiterpenowe – czerwona dysza, poziom 4

#### 3.1.6. Analiza densytometryczna

Densytogramy otrzymano z użyciem densytometru CD60 (Desaga, Numbrecht, Niemcy). Pomiary przeprowadzono stosując skanowanie liniowe przy parametrach szczeliny 0,4 mm x 4,0 mm i 0,02 x 8,0 mm, w świetle UV przy długości fali w zakresie 190-270 nm (lampa deuterowa).

#### 3.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

##### 3.2.1. Kolumny chromatograficzne

Stosowano kolumny HPLC o różnych wymiarach, wypełnione różnymi adsorbentami:

- Kinetex C-18 (2,6  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 100 mm) (Phenomenex, USA)
- Kinetex C-18 (2,6  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm) (Phenomenex, USA)
- Kinetex PFP (2,6  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 100 mm) (Phenomenex, USA)
- Kinetex F5 (2,6  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 100 mm) (Phenomenex, USA)
- HILIC Luna NH<sub>2</sub> (3  $\mu\text{m}$ , 1 x 150 mm) (Phenomenex, USA)

##### 3.2.2. Elucja

Stosowano fazy ruchome, stanowiące mieszaniny różnych rozpuszczalników organicznych i wody z dodatkiem lub bez kwasów organicznych.

##### 3.2.2.1. Fazy ruchome

- A: woda
- B: acetonitryl
- C: 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (v/v)
- D: 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w mieszaninie woda : acetonitryl (50:50, v/v)
- E: metanol
- F: mieszanina woda : metanol (45:5, v/v)
- G: mieszanina woda : metanol (50:50, v/v)
- H: mieszanina woda : acetonitryl (60:40, v/v)

Fazy ruchome sporządzano z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych o stopniu czystości HPLC-MS oraz wody ultraczystej (Milipor).

### 3.2.2.2. Programy elucji izokratycznej

- **Program I** – 20% B w mieszaninie A + B ( $t_G$  20 min)
- **Program II** – 17% F w mieszaninie E + F ( $t_G$  25 min)
- **Program III** – 100% G ( $t_G$  51 min)
- **Program IV** – 100% H ( $t_G$  115 min)

### 3.2.2.3. Programy elucji gradientowej

- **Program I – mieszanina rozpuszczalników C + D:**  
0 min – 12% D, 10 min – 20% D, 30 min – 43% D, 40-50min – 100% D, 51-60 min – 12% D
- **Program II – mieszanina rozpuszczalników C + D:**  
0 min – 12% D, 10 min – 20% D, 30 min – 43% D, 50-55 min – 100% D, 60-70 min – 12% D
- **Program III – mieszanina rozpuszczalników C + D:**  
0 min – 12% D, 10 min – 20% D, 35 min – 43% D, 60-64 min – 100% D, 66-76 min – 12% D
- **Program IV – mieszanina rozpuszczalników C + D:**  
0-5 min – 8% D, 11-20min – 20% D, 25-30 min – 50% D, 32-34min – 100% D, 35-50min – 8% D
- **Program V – mieszanina rozpuszczalników C + D:**  
0-7 min – 8% D, 11 min – 16% D, 12 min – 18% D, 18 min – 40% D, 30 min – 45% D, 35-40 min – 50% D, 42-44 min – 100% D, 45-60 min – 8% D
- **Program VI – mieszanina rozpuszczalników C + D:**  
0 min – 10% D, 3-6 min – 8% D, 11 min – 10% D, 13-18 min – 18% D, 22-30 min – 27% D, 31-41 min – 33% D, 42 min – 40% D, 43-45 min – 100% D, 60 min – 10% D
- **Program VII – mieszanina rozpuszczalników C + D:**  
0-1,5 min – 10% D, 2-8 min – 8% D, 9-13 min – 10% D, 15 min – 18% D, 23-31 min – 25% D, 33-45 min – 30% D, 46 min – 40% D, 48-50 min – 100% D, 60 min – 10% D
- **Program VIII – mieszanina rozpuszczalników C + D:**  
0-1,5 min – 10% D, 2-3 min – 8% D, 9 min – 9% D, 10-13 min – 10% D, 15 min – 18% D, 23-31 min – 25% D, 33-45 min – 30% D, 46 min – 40% D, 55 min – 70% D, 65-65 min – 100% D, 68-83 min – 10% D

## 4. Materiał roślinny

### 4.1. Korzenie żywokostu lekarskiego (*Symphyti radix*)

Materiał do badań stanowiły wysuszone korzenie żywokostu lekarskiego (*Symphyti radix*) pochodzące od czterech producentów krajowych – firm zielarskich zajmujących się skupem, przetwarzaniem i dystrybucją surowców zbieranych ze stanowisk naturalnych:

- Flos (Fr)
- Dary Natury (DNr)
- Dary Podlasia (DPr)
- EkoHerba (EHr)

oraz z 4 krajowych ogrodów botanicznych:

- Ogród Botaniczny UMCS w Lublinie; zbiór: 23.10.2018 (Lu)
- Miejski Ogród Botaniczny w Zabrze; zbiór: 6.11.2018 (Za)
- Ogród Roślin Leczniczych Uniwersytet Medyczny w Łodzi; zbiór: 23.11.2018 (Łó)
- Ogród Roślin Leczniczych GUMed; zbiór: 19.11.2018 (Gd)

### 4.2. Liście żywokostu lekarskiego (*Symphyti folium*)

Materiał do badań stanowiły wysuszone liście żywokostu lekarskiego (*Symphyti folium*) pochodzące od trzech producentów krajowych – firm zielarskich zajmujących się skupem, przetwarzaniem i dystrybucją surowców zbieranych ze stanowisk naturalnych:

- Dary Podlasia (DPf)
- EkoHerba (EHf)
- Herbisarium (Hf)

oraz zidentyfikowane i zebrane 30.05.2020 r. przez inż. Izabelę Kobierską z Ogrodu Roślin Leczniczych GUMed świeże liście żywokostu ze stanowiska naturalnego (DRf) w Dolinie Radości w Gdańsku (współrzędne: 54°23'37.9"N 18°31'03.0"E) (Ryc. 15).





#### 4.4. Nalewki macierzyste z arniki (*Arnica* TM)

Materiał do badań stanowiły dostępne na rynku europejskim produkty homeopatyczne – nalewki macierzyste (*tinctura materna*, TM) ze świeżej całej rośliny arniki górskiej (*Arnica montana*) pochodzące z dwóch firm:

- *Arnica montana* TM (Boiron, Francja); nr serii: D1040138 (N1) – nalewka przygotowana ze świeżej całej rośliny *A. montana* w proporcjach 1:10 (surowiec roślinny : etanol 96%). Zawartość wody w zebranych materiale roślinnym wynosiła 75,4%.
- *Arnica montana* TM (Helios Homeopathy, Wielka Brytania); nr serii: W528095 (N2) – brak informacji od producenta dotyczących sposobu przygotowania nalewki i ilości użytego surowca<sup>5</sup>.

### 5. Ekstrakcja materiału roślinnego

#### 5.1. Korzeń żywokostu lekarskiego (*Symphyti radix*)

##### **Metoda I:**

Wysuszone korzenie żywokostu lekarskiego sproszkowano. Do przygotowania wyciągu odważano 1 g ujednoliconej próbki surowca, a następnie ekstrahowano przez 15 lub 30 min w temperaturze pokojowej z użyciem płuczki ultradźwiękowej w:

- 10 ml metanolu
- 10 ml etanolu
- 10 ml 50% metanolu
- 10 ml 50% etanolu

Po zakończeniu ekstrakcji wyciągi alkoholowe filtrowano przez sączone bibułowy do kolb miarowych o pojemności 10 ml i uzupełniano odpowiednim rozpuszczalnikiem (A-D). W trakcie prowadzonych analiz, próbki przechowywano w lodówce (temp. 4°C) lub zamrażarce (temp. -20°C).

##### **Metoda II:**

---

<sup>5</sup> Nalewka sporządzana przez producenta na zamówienie, nieopatrzona ulotką informacyjną. Producent nie udzielił odpowiedzi na maila z zapytaniem o dokładny skład i sposób przygotowania preparatu.

Wysuszone korzenie żywokostu lekarskiego sproszkowano i odważano po 1 g ujednoliconej próbki surowca, a następnie ekstrahowano przez 15 min pod chłodnicą zwrotną w:

- A. 25 ml metanolu, temp. 60°C
- B. 25 ml etanolu, temp. 80°C.

Po ekstrakcji wyciągi alkoholowe filtrowano przez sączonek bibułowy do kolb miarowych o pojemności 25 ml i uzupełniano określonym rozpuszczalnikiem (A lub B). W trakcie prowadzonych analiz, próbki przechowywano w lodówce (temp. 4°C) lub zamrażarce (temp. -20°C).

## 5.2. Liść żywokostu lekarskiego (*Symphyti folium*)

Wysuszone liście żywokostu lekarskiego ekstrahowano z wykorzystaniem trzech różnych metod:

### **Metoda I:**

Wysuszone liście żywokostu sproszkowano i ujednoliconą próbkę surowca (5 g) dwukrotnie ekstrahowano w aparacie Soxhleta. Początkowo z użyciem chloroformu w celu oczyszczenia materiału z chlorofilu i lipofilowych związków balastowych (A1), a następnie metanolem (temp. 70°C). Otrzymany wyciąg filtrowano przez sączonek bibułowy i rozcieńczano do objętości 50 ml. W trakcie prowadzonych analiz, próbki przechowywano w lodówce (temp. 4°C) lub zamrażarce (temp. -20°C).

### **Metoda II:**

Oczyszczony chloroformem materiał roślinny (A1; 1 g; DRf) ekstrahowano metanolem (10 ml) na łożni ultradźwiękowej (30 min, temperatura pokojowa) a następnie wirowano 15 min. Odwirowany ekstrakt filtrowano przez sączonek bibułowy do kolby miarowej o pojemności 10 ml i uzupełniano metanolem. Próbkę przechowywano w lodówce (temp. 4°C).

### **Metoda III:**

Rozdrobnione liście żywokostu (20 g; DRf) poddano 48h maceracji z użyciem 600 ml metanolu. Otrzymany macerat odparowano do sucha, rozpuszczono w 25 ml wody i wytrząsano z octanem etylu (3 x 15 ml) [ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE)]. Warstwę organiczną filtrowano przez

sączek bibułowy, odparowano do sucha i rozpuszczono w 10 ml metanolu. Próbkę przechowywano w lodówce (temp. 4°C).

### 5.3. Kwiaty arniki górskiej i łąkowej (*Arnicae flos*)

Wyciągi z kwiatów arniki górskiej i łąkowej przygotowano według metody ekstrakcji opisanej przez *Zheleva-Dimitrova* i wsp. (172). Wsuszone koszycki arniki sproszkowano i do przygotowania wyciągu odważano po 1 g ujednoliconej próbki surowca. Następnie ekstrahowano 80% metanolem (2 x 5 ml) na łaźni ultradźwiękowej (30 min, temperatura pokojowa) i wirowano 15 minut. Odwirowany ekstrakt filtrowano przez sączek bibułowy do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Surowiec ponownie ekstrahowano według tej samej procedury. Połączone wyciągi uzupełniono 80% metanolem do objętości 10 ml. W trakcie prowadzonych analiz, próbki przechowywano w lodówce (temp. 4°C) lub zamrażarce (temp. -20°C).

### 5.4. Nalewki macierzyste z arniki (*Arnica TM*)

Komercyjnie dostępne nalewki macierzyste z arniki (*Arnica TM*) analizowano bezpośrednio lub z próbki nalewki usuwano rozpuszczalnik pod strumieniem azotu (N<sub>2</sub>) a następnie pozostałość rozpuszczono w tej samej objętości metanolu (stosowano 100% lub 80% metanol). Podczas prowadzonych analiz, nalewki oraz przygotowane próbki przechowywano w lodówce (temp. 4°C) lub zamrażarce (temp. -20°C).

## 6. Analiza chromatograficzna związków biologicznie czynnych – korzeń i liść żywokostu lekarskiego

### 6.1. Analiza chromatograficzna alantoiny (50)

#### 6.1.1. Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego metodą TLC

Stosowano dwie metody ekstrakcji wysuszonego korzenia żywokostu lekarskiego, opisane w rozdziale 4.1. Rozdzielenia prowadzono na szklanych płytkach chromatograficznych pokrytych żelam krzemionkowym TLC i HPTLC: SilicaGel 60, SilicaGel 60<sub>F254</sub> oraz modyfikowanym żelam krzemionkowym HPTLC SilicaGel 60 RP-18W F<sub>254S</sub>. Jako fazy ruchome stosowano fazy A/F1-F7 opisane w rozdziale 3.1.2. Do wizualizacji chromatogramów stosowano odczynnik do wywoływania alantoiny (temp. 100°C, 5 min) przygotowany według opisu z punktu 3.1.4.

### 6.1.2. Analiza jakościowa i ilościowa metodą densytometrii-TLC

Analizy metodami chromatografii cienkowarstwowej prowadzono na szklanych płytkach chromatograficznych TLC pokrytych żelem krzemionkowym Si60 (analiza jakościowa) lub Si60<sub>F254</sub> (analiza ilościowa) o wymiarach 20 x 10 cm (Merck, Darmstadt, Niemcy). Wzorzec alantoiny (roztwór metanolowy 1 mg/ml) oraz analizowane etanolowe i metanolowe wyciągi roślinne z korzeni i liści żywokostu, przygotowano zgodnie z opisem w rozdziałach 4.1. (metoda II) i 4.2. (metoda II) i aplikowano na płytki chromatograficzne w objętości 5 µl z wykorzystaniem półautomatycznego aplikatora Desaga AS-30 jako pasma długości 5 mm. Chromatogramy rozwijano z użyciem fazy ruchomej opisanej w rozdziale 3.1.2 (A/F7) w automatycznej komorze chromatograficznej ADC2 na dystansie 75 mm w temperaturze pokojowej. Rozwijanie chromatogramu poprzedzono 15 min okresem ustalania wilgotności (47%, nasycony roztwór KSCN) i 2 min prekondukcjonowania płytki, a otrzymane chromatogramy suszono w ciągu 8 min.

#### 6.1.2.1. Analiza jakościowa

Do celów analizy jakościowej otrzymane chromatogramy wywoływano z użyciem opisanego w rozdziale 3.1.4. odczynnika wywołującego alantoinę (temp. 100°C, 5 min) – związek wywołujący jako pasma/plamy barwy żółtej w świetle widzialnym.

#### 6.1.2.2. Analiza ilościowa

Analizę ilościową prowadzono z użyciem densytometrii na chromatogramach otrzymanych w warunkach opisanych w rozdziale 6.1.2, po optymalizacji przeprowadzonej zgodnie z warunkami opisanymi w rozdziale 3.1.6 – długość fali  $\lambda$ -190 nm, szerokość szczeliny 0,4 x 4,0 mm. Próbkę analizowanych wyciągów roślinnych (5 µl) nakładano na płytkę TLC, każdorazowo obok krzywej wzorcowej przygotowanej poprzez aplikację rozcieńczeń alantoiny w zakresie 210-5000 ng/pasmo (plama) [6 pasm (plam), po 5 µl], bez wcześniejszej derywatywacji chromatogramów.

#### 6.1.2.3. Analiza ilościowa metodą HPLC

Analizę prowadzono z użyciem systemu HPLC opisanego w rozdziale 2.2.2. na kolumnie HILIC Luna NH<sub>2</sub> (150 x 1 mm, 3 µm), temperatura kolumny: 20°C, stosując program elucji izokratycznej I (rozdział 3.2.2.2.) Przepływ fazy ruchomej: 0,1 ml/min, objętość nastrzyku: 1 µl, detekcja w świetle UV:  $\lambda$ -210 nm i  $\lambda$ -190 nm.

### 6.1.3. Walidacja metody TLC

Walidację metody przeprowadzono w oparciu o oznaczenie: specyficzności, liniowości, precyzji instrumentalnej, powtarzalności, precyzji jedno- i międzydniowej, granicy wykrywalności (LOD), granicy oznaczalności (LOQ) (Tabela 5), stabilności (ang. *robustness*) (Tabela 6) i odzysku (Tabela 7).

#### 6.1.3.1. Specyficzność

Specyficzność metody określono poprzez przeprowadzenie dwukierunkowego rozdzielania badanego wyciągu aplikowanego w objętości 5  $\mu$ l na płytkę TLC Si60 w obecności 1  $\mu$ l substancji wzorcowej. Chromatogram rozwijano w obydwu kierunkach w fazie A/F7 (3.1.2). Pasma alantoiny uwidoczniono za pomocą odczynnika do wywoływania alantoiny (temp. 100°C, 5 min) (Tabela 5).

#### 6.1.3.2. Precyzja instrumentalna, jedno- i międzydniowa

Precyzję instrumentalną metody wyznaczono poprzez 7-krotny pomiar powierzchni pola pasma alantoiny aplikowanej w stężeniach 1000 i 4000 ng/plama (5  $\mu$ l), zgodnie z warunkami analizy opisanymi w rozdziale 6.1.2. (Tabela 5).

Powtarzalność jednodniową wyznaczono analizując trzy kolejne rozdzielania trzech pasm (plam) analizowanego wyciągu (5  $\mu$ l) w ciągu jednego dnia (n=9), natomiast powtarzalność międzydniową poprzez analizę trzech rozdzieleń chromatograficznych trzech pasm (plam) analizowanego wyciągu (5  $\mu$ l) uzyskanych w trzech kolejnych dniach (n=9) (Tabela 5).

#### 6.1.3.3. Granica wykrywalności (LOD) i granica oznaczalności (LOQ)

Granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) oznaczono poprzez analizę densytometryczną, zgodnie z opracowanymi warunkami (6.1.2.), wzorca alantoiny aplikowanego w stężeniach 50-5000 ng/plama, stosując jako kryterium stosunek sygnał/szum=3 (LOD) i sygnał/szum=10 (LOQ). W obliczeniach uwzględniono najwyższą powierzchnię piku szumu na densytogramie (Tabela 5).

#### 6.1.3.4. Stabilność metody (*robustness*)

Stabilność metody (*robustness*) wyznaczono w oparciu o wrażliwość współczynnika opóźnienia ( $R_f$ ) na niewielkie modyfikacje w zakresie składu fazy ruchomej oraz dystansu rozwijania chromatogramu (Tabela 6).

#### 6.1.3.5. Odzysk

Dokładność metody określono poprzez badanie odzysku metodą dodatku wzorca. Wzorzec (alantoina) był dodawany do próbek wyciągu na poziomach 25% i 50% oznaczonej zawartości związku w analizowanej próbce roślinnej (Tabela 7).

### 6.2. Analiza chromatograficzna polifenoli (kwasy fenolowe, flawonoidy)

#### 6.2.1. Analiza jakościowa metodami jedno- i dwukierunkowej TLC (1D TLC, 2D TLC)

Rozdzielenia prowadzono na szklanych płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym TLC SilicaGel 60<sub>F254</sub>. Próbki wyciągów aplikowano za pomocą półautomatycznego aplikatora w postaci pasm o długości 8 mm (1D TLC) lub plam (2D TLC), w objętościach od 5 do 25 mL. Chromatogramy rozwijano w automatycznej komorze ADC2 przy następujących ustawieniach:

- Wilgotność 49% (nasycony roztwór KSCN)
- Czas wysycania komory: 10 min
- Czas suszenia: 8 min
- Dystans rozwijania: 85 mm

Jako fazy ruchome stosując opisane w rozdziale 3.1.2.:

- rozdzielania jednokierunkowe (1D TLC) – fazy B/F1-F2
- rozdzielania dwukierunkowe (2D TLC) – pierwszy kierunek: B/F2, drugi kierunek: B/F3-F6

Wizualizację chromatogramów przeprowadzono po derywatywacji z użyciem automatycznej komory do derywatywacji (CAMAG Derivatizer) według ustawień opisanych w rozdziale 3.1.5., z wykorzystaniem odczynników do wywoływania związków fenolowych – 2% chlorku glinu (AlCl<sub>3</sub>), *Natural Product Reagent* (NPR) oraz glikolu polietylenowego 400 (PEG 400) przygotowanych według opisu z rozdziału 3.1.4, detekcja w świetle UV λ-366 nm.

#### 6.2.2. Analiza jakościowa metodą HPLC

Analizę przeprowadzono z użyciem systemu HPLC opisanego w rozdziale 2.2.2. na kolumnach Kinetex C-18, Kinetex F5 i Kinetex PFP (100 x 4,6 mm; 2,6 μm), temperatura: 35°C, stosując



programy elucji gradientowej I-III (rozdział 3.2.2.3) Przepływ fazy ruchomej: 0,8 ml/min, objętość nastrzyku: 1 µl, detekcja w świetle UV: 254 i 280 nm.

Jako metodę zbierania danych chromatograficznych stosowano monitorowanie wybranych jonów SIM (*single ion monitoring*) oraz pełny skan w zakresie  $m/z$  150-1000 w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Parametry pracy detektora masowego: napięcie jonizacji: 4,5 kV (jonizacja dodatnia) lub 3,5 kV (jonizacja ujemna), napięcie detektora: 1,3 kV (+) lub 3,5 kV (-), temperatura DL 250°C, temperatura bloku grzewczego 200°C, przepływ gazu rozpylającego (N<sub>2</sub>) 1,5 l/min, przepływ gazu suszącego (N<sub>2</sub>) 15 ml/min.

### 6.2.3. Izolacja i identyfikacja estru kwasu kawowego z korzenia żywokostu lekarskiego

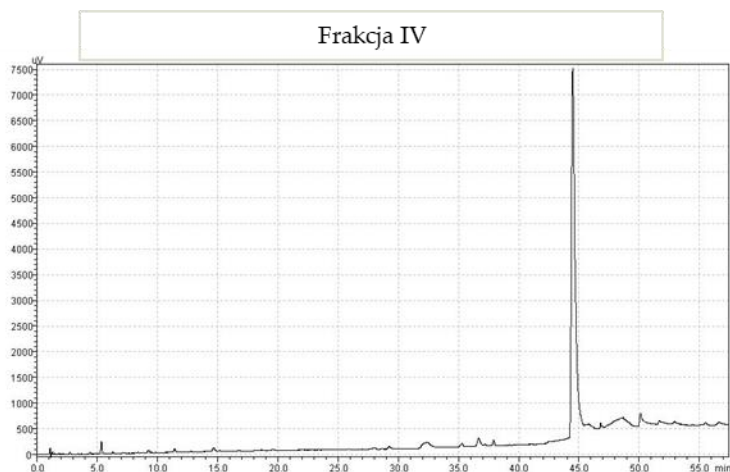
#### 6.2.3.1. Izolacja z wykorzystaniem automatycznej SPE

Do badań przeznaczono metanolowy wyciąg z korzenia żywokostu firmy „Flos” (Fr; 1 g/25 ml), z którego odparowano rozpuszczalnik do objętości 8 ml pod zmniejszonym ciśnieniem. Zagęszczony wyciąg frakcjonowano 6-krotnie z użyciem automatycznego aparatu SmartPrep Extractor II na kolumnach Discovery DSC-18 (1 g, 6 ml) zgodnie z procedurą:

- Czyszczenie przewodów doprowadzających reagenty
- Kondycjonowanie kolumny:
  - 6 ml metanolu
  - 6 ml wody
  - 6 ml 30% metanolu
- Aplikacja 1 ml wyciągu roślinnego (1 ml/min)
- Wymywanie frakcji:
  - I-III – po 2 ml 30% metanolu
  - IV-VI – po 2 ml 50% metanolu
  - VII – 6 ml 100% metanolu
- Czyszczenie przewodów doprowadzających próbki

Skład jakościowy i czystość otrzymanych frakcji kontrolowano metodą HPLC-UV/Vis z użyciem systemu HPLC opisanego w rozdziale 2.2.1. na kolumnie Kinetex F5 (4,6 x 100 mm; 2,6 µm), w warunkach analizy zgodnych z opisanymi w rozdziale 6.2.2. Frakcje IV i V (Ryc. 16), zawierające oczyszczony izolowany związek, z poszczególnych rozdzieleń łączono, odparowywano metanol i następnie liofilizowano. Otrzymany liofilizat przechowywano w temperaturze -20°C.





Ryc. 16: Chromatogram HPLC przykładowej frakcji IV zawierającej oczyszczony globoidnan A

#### 6.2.3.2. Identyfikacja z użyciem magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i spektrometrii mas (HPLC-DAD-ESI/MS)

Strukturę chemiczną wyizolowanego związku potwierdzono w oparciu o widma  $^1\text{H}$  NMR jednowymiarowe i dwuwymiarowe, homokorelacyjne i heterokorelacyjne 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR współpracując z dr. Inż. Pawłem Sowińskim z Międzyuczelnianego Laboratorium NMR (Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej), który ustalił ostateczną strukturę związku oraz poprzez porównanie danych ESI-MS otrzymanych z użyciem systemu HPLC-DAD-ESI/MS (rozdział 2.2.2.) na kolumnie Kinetex F5 (100 x 4,6 mm; 2,6  $\mu\text{m}$ ) w warunkach analizy opisanych w rozdziale 6.2.2. z danymi literaturowymi (56)<sup>6</sup>.

#### 6.2.4. Analiza ilościowa metodą HPLC

Analizę przeprowadzono przy użyciu systemu HPLC opisanego w rozdziale 2.2.2. na kolumnach Kinetex C-18 i Kinetex F5 (100 x 4,6 mm; 2,6 $\mu\text{m}$ ), temperatura: 35°C, stosując program elucji gradientowej II (rozdział 3.2.2.3) Przepływ fazy ruchomej: 0,8 ml/min, objętość nastrzyku: 1  $\mu\text{l}$ , detekcja w świetle UV:  $\lambda$ -254 i  $\lambda$ -280 nm.

Oznaczenia ilościowe prowadzono w odniesieniu do krzywych wzorcowych przygotowanych z użyciem następujących substancji wzorcowych:

- Kwas kawowy (3,125-100  $\mu\text{g/ml}$ )

<sup>6</sup>Początkowe badania nad tożsamością wyizolowanego związku były prowadzone przed ukazaniem się cytowanej publikacji.

- Kwas rozmarynowy (3,125-100 µg/ml)
- 3-*O*-glukozyd kwercetyny (1,56-100 µg/ml)
- 3-*O*-glukozyd kemferolu (1,56-100 µg/ml)
- 3-*O*-galaktozyd kwercetyny (1,56-100 µg/ml)

### 6.3. Analiza chromatograficzna alkaloidów pirolizydynowych metodą HPLC-DAD-MS/MS

Do celów analizy jakościowej i ilościowej alkaloidów pirolizydynowych obecnych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego opracowano metodę, której optymalizację i walidację szczegółowo opisano w publikacji *Molecules* (Kimel et al. 2023) (87).

#### 6.3.1. Warunki rozdzielania chromatograficznego

Analizę jakościową i ilościową przeprowadzono przy użyciu systemu HPLC-MS/MS opisanego w rozdziale 2.2.3 na kolumnie Kinetex C-18 (100 x 2,1 mm; 2,6 µm) wyposażonej w przedkolumnę, w temperaturze: 25°C, stosując program elucji gradientowej VIII (rozdział 3.2.2.3). Przepływ fazy ruchomej: 0,2 ml/min, objętość nastrzyku: 1 µl, detekcja w trybie SIM (*selected ion monitoring*) i MRM (*multiple-reaction monitoring*), tryb jonizacji dodatkowo.

Parametry pracy detektora masowego: napięcie jonizacji: 4,5 kV, napięcie detektora: 1,9 kV, temperatura DL 250°C, temperatura bloku grzewczego 400°C, przepływ gazu kolizyjnego (Ar) 3 l/min, ciśnienie gazu CID 230 kPa, przepływ gazu suszącego (N<sub>2</sub>) 15 ml/min,

#### 6.3.2. Analiza jakościowa

Analizę MS<sup>2</sup> i MS<sup>3</sup> trzech głównych związków (intermedyny, likopsaminy, *N*-tlenku intermedyny) przeprowadzono poprzez porównanie odpowiednich przejść MRM i czasów retencji z użytymi substancjami wzorcowymi. Pozostałe związki (*N*-tlenek likopsaminy, *N*-tlenki dihydrointermedyny i dihydrolikopsaminy, 7-acetylointermedyna, 7-acetylolikopsamina, *N*-tlenek 7-acetylointermedyny, *N*-tlenek 7-acetylolikopsaminy, *N*-tlenek 7-saracynylo-9-tracheanylloretronecyny, *N*-tlenek 7-saracynylo-9-wiridifloryloretronecyny, *N*-tlenek echimidyny, symfytyna, symladyna, *N*-tlenek symfytyny, *N*-tlenek symladyny i *N*-tlenek 3-acetylosymfytyny) zidentyfikowano w oparciu dane chromatograficzne MS<sup>2</sup> i MS<sup>3</sup> opisane w literaturze. Energia kolizji (CE) dla dwóch najbardziej intensywnych przejść była dobierana eksperymentalnie. W tym celu mierzono intensywność piku dla poszczególnych energii kolizji

w zakresie 15-45 eV, w odstępach co 5 eV. Do dalszych badań dla każdego przejścia wykorzystano energię, przy której uzyskano najwyższą intensywność pików.

### *6.3.3. Analiza ilościowa i pół-ilościowa*

Analizę ilościową dla intermedyny, likopsaminy i *N*-tlenku intermedyny przeprowadzono metodą dodatku wzorca techniką MRM w trybie dodatniej jonizacji próbki. Ze względu na brak dostępnego wzorca *N*-tlenku likopsaminy, zawartości tego związku obliczono w oparciu o krzywą wzorcową dla *N*-tlenku intermedyny.

Roztwory substancji wzorcowych przygotowano poprzez rozpuszczenie 1 mg intermedyny, likopsaminy i *N*-tlenku likopsaminy w 1 ml metanolu. Następnie, przygotowano roztwory podstawowe o wybranych stężeniach, stanowiące mieszaniny trzech związków w metanolu w celu wyznaczenia krzywych kalibracyjnych. Krzywe te sporządzono w zakresach: 1-9,25 µg/ml dla intermedyny, 2-20 µg/ml dla likopsaminy i 1-16 µg/ml dla *N*-tlenku intermedyny. Otrzymane roztwory substancji wzorcowych dodawano do odpowiednio rozcieńczonych próbek wyciągów roślinnych. Rozcieńczenie analizowanej próbki (od 0 do 1:30, w zależności od surowca) i zakres krzywej kalibracyjnej były dobierane w oparciu o przewidywaną zawartość oznaczanych związków szacowaną na podstawie pól powierzchni pików techniką MRM.

Analizę pół-ilościową pozostałych alkaloidów pirolizydynowych przeprowadzono w oparciu o porównanie pól powierzchni pików dla pierwszego przejścia MRM ( $MS^2$ ) każdego ze związków w trybie jonizacji dodatniej.

### *6.3.4. Walidacja metody*

Opracowaną metodę HPLC-MS/MS zwalidowano poprzez wyznaczenie parametrów takich jak: zakresy krzywych kalibracyjnych, liniowość, granica wykrywalności (LOD) i granica oznaczalności (LOQ), powtarzalność jednodniowa i międzodniowa, odzysk (na poziomie 50% i 100%), w oparciu o wytyczne International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH).

## 7. Analiza chromatograficzna związków biologicznie czynnych – kwiatostany i nalewki z arniki

### 7.1. Analiza chromatograficzna prostych fenoli i polifenoli

#### 7.1.1. Analiza jakościowa metodą 2D TLC

Rozdzielenia prowadzono na szklanych płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym TLC SilicaGel 60<sub>F254</sub>. Próbki aplikowano za pomocą półautomatycznego aplikatora w formie pasma/plamy o objętości 20 µl. Chromatogramy rozwijano w automatycznej komorze ADC2 przy następujących ustawieniach:

- Wilgotność 49% (nasycony roztwór KSCN)
- Czas wysycania komory: 10 min
- Dystans rozwijania: 85 mm
- Czas suszenia: 8 min

Jako fazy ruchome stosowano opisane w rozdziale 3.1.2. – pierwszy kierunek: B/F2, drugi kierunek: B/F6.

Wizualizację chromatogramów przeprowadzono po derywatywacji z użyciem automatycznej komory do derywatywacji (CAMAG Derivatizer) według ustawień opisanych w rozdziale 3.1.5., z wykorzystaniem odczynników do wywoływania związków fenolowych NPR oraz PEG 400 przygotowanych według opisu z rozdziału 3.1.4, detekcja w świetle UV λ-366 nm.

#### 7.1.2. Analiza jakościowa i ilościowa metodą HPLC (99, 110)

Analizy prowadzono z użyciem systemu HPLC-DAD-ESI/MS opisanego w rozdziale 2.2.2. na kolumnie Kinetex PFP (100 x 4,6 mm; 2,6 µm), temperatura: 20°C, stosując program elucji gradientowej III (rozdział 3.2.2.3.). Przepływ fazy ruchomej: 0,8 ml/min, objętość nastrzyku: 1 µl (analiza jakościowa), 6 µl i 1 µl (analiza ilościowa), detekcja w świetle UV: λ-330 nm.

Jako metodę zbierania danych chromatograficznych stosowano monitorowanie wybranych jonów SIM (*single ion monitoring*) oraz pełny skan w zakresie *m/z* 150-800 w trybie jonów dodatnich. Parametry pracy detektora masowego: napięcie jonizacji: 5,0 kV, napięcie detektora: 1,25 kV, temperatura DL 250°C, temperatura bloku grzewczego 200°C, przepływ gazu rozpylającego (N<sub>2</sub>) 1,5 l/min, przepływ gazu suszącego (N<sub>2</sub>) 15 ml/min.

## 7.2. Analiza chromatograficzna laktonów seskwiterpenowych

### 7.2.1. Analiza jakościowa metodą 1D TLC

Analizę jednokierunkową prowadzono na płytkach szklanych pokrytych żelem krzemionkowym TLC Silica gel 60. Próbkę наносzono w objętości 20  $\mu\text{l}$  za pomocą półautomatycznego aplikatora w postaci pasm o długości 8 mm. Rozdzielenie prowadzono w niekontrolowanych warunkach (brak kontroli temperatury i wilgotności – warunki laboratoryjne) w pionowej komorze analitycznej, jako fazy ruchome stosując mieszaniny heksanu, octanu etylu i kwasu mrówkowego w różnych stosunkach objętościowych. Stosowano technikę MGD (*multiple gradient development*): dwukrotnie rozwijając chromatogram w fazie ruchomej C/F8 na dystansie 8 cm, a następnie jednokrotnie w fazie ruchomej C/F9 na dystansie 5 cm (rozdział 3.1.2).

Chromatogramy wywoływano odczynnikiem wanilinowym opisanym w rozdziale 3.1.4, używając automatycznego aparatu do derywatywacji, a następnie ogrzewano na płycie grzewczej w temperaturze 70°C do uzyskania widocznych barwnych pasm. Detekcję prowadzono w świetle widzialnym bezpośrednio po derywatywacji i po upływie 24 godzin.

### 7.2.2. Analiza 2D TLC

Analizę TLC dwukierunkową prowadzono na płytkach szklanych pokrytych żelem krzemionkowym TLC Silica gel 60, po uprzednim przemyciu chloroformem i aktywacji w temperaturze 100°C (30 min). Próbkę наносzono za pomocą strzykawki szklanej w objętości 50  $\mu\text{l}$  w postaci plamy. Rozdzielenie prowadzono w niekontrolowanych warunkach w pionowej komorze analitycznej rozwijając płytkę na dystansie 8 cm, jako fazy ruchome stosując w pierwszym kierunku fazę C/F5, w drugim kierunku fazę C/F15.

Chromatogramy wywoływano odczynnikiem wanilinowym opisanym w rozdziale 3.1.4, używając automatycznego aparatu do derywatywacji, a następnie ogrzewano na płycie grzewczej w temperaturze 70°C do uzyskania widocznych barwnych plam. Detekcję prowadzono w świetle widzialnym bezpośrednio po derywatywacji i po upływie 24 godzin.

### 7.2.3. Analiza jakościowa i ilościowa metodą HPLC (99, 110)

Do analizy jakościowej i ilościowej laktonów seskwiterpenowych w kwiatostanach i nalewkach z arniki opracowano metodę, której optymalizację i walidację szczegółowo opisano w dwóch

publikacjach: *Acta Poloniae Pharmaceutica* (Kimel et al. 2019) (98) oraz *Herba Polonica* (Kimel et al. 2020) (87).

Jako metodę zbierania danych chromatograficznych stosowano technikę monitorowania wybranych jonów SIM (*single ion monitoring*) oraz pełne skany w zakresie  $m/z$  250-400 w trybie jonów dodatnich. Parametry pracy detektora masowego: napięcie jonizacji: 5,0 kV, napięcie detektora: 1,25 kV, temperatura DL 250°C, temperatura bloku grzewczego 200°C, przepływ gazu rozpylającego (N<sub>2</sub>) 1,5 l/min, przepływ gazu suszącego (N<sub>2</sub>) 15 ml/min

#### ○ **Oznaczanie helenaliny**

Analizy prowadzono z użyciem systemu HPLC-DAD-ESI/MS opisanego w rozdziale 2.2.2. na kolumnie Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm; 2,6 μm), w temperaturze 30°C, stosując program elucji izokratycznej II (rozdział 1.1.5.2.). Przepływ fazy ruchomej: 0,8 ml/min, objętość nastrzyku: 3 μl i 10 μl, detekcja w świetle UV: λ-225 nm.

#### ○ **Oznaczanie estrów helenaliny i dihydrohelenaliny**

Analizy prowadzono z użyciem systemu HPLC-DAD-ESI/MS opisanego w rozdziale 2.2.2 na dwóch szeregowo połączonych kolumnach Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm; 2,6 μm), w temperaturze: 30°C, stosując programy elucji gradientowej IX, X i XI (rozdział 3.2.2.3.). Przepływ fazy ruchomej: 0,8 ml/min, objętość nastrzyku: 6 μl i 10 μl, detekcja w świetle UV: λ-225 nm.

#### *7.2.4. Oczyszczanie ekstraktu z wykorzystaniem automatycznej ekstrakcji do fazy stałej (SPE)*

Warunki rozdzielania frakcji laktonowej i polifenolowej, opracowano w oparciu o badania wyciągu metanolowego z kwiatu arniki górskiej (**AM6**) oraz nalewkę macierzystą ze świeżej całej rośliny arniki górskiej (**N2**). Próbki do badań przygotowano jak podano poniżej:

- AM6 – pod zmniejszonym ciśnieniem usunięto rozpuszczalnik użyty do ekstrakcji (100% metanol) a otrzymaną pozostałość rozpuszczono w wodzie i liofilizowano. Odważono 50 mg otrzymanego liofilizatu i rozpuszczono w 5 ml 100% metanolu.
- N2 – 10 ml nalewki odparowano w strumieniu azotu, a następnie otrzymaną pozostałość rozpuszczono w 10 ml 100% metanolu.

Otrzymane wyciągi filtrowano przez sączi membranowe o średnicy porów 0,22  $\mu\text{m}$  a następnie oczyszczano z użyciem automatycznego systemu SPE SmartPrepExtractor II na kolumnach Discovery DSC-18 (1 g, 6 ml) zgodnie z programem:

- Czyszczenie przewodów doprowadzających rozpuszczalniki
- Kondycjonowanie kolumny:
  - 6 ml metanolu
  - 6 ml wody
  - 6 ml 30% metanolu
- Aplikacja 1 ml wyciągu roślinnego (1 ml/min)
- Wymywanie frakcji według przygotowanych czterech programów (P1-P4):
  - P1 – F1: 6 ml 30% MeOH, F2: 6 ml 60% MeOH, F3: 6 ml MeOH
  - P2 – F1: 6 ml 20% MeOH, F2: 6 ml 60% MeOH, F3: 6 ml MeOH
  - P3 – F1: 6 ml 20% MeOH, F2: 6 ml 50% MeOH, F3: 6 ml 60% MeOH, F4: 6 ml MeOH
  - P4 – F1: 6 ml 20% MeOH, F2: 6 ml 30% MeOH, F3: 6 ml 60% MeOH, F4: 6 ml MeOH
- Czyszczenie przewodów doprowadzających próbkę i rozpuszczalniki

Z otrzymanych frakcji odparowywano metanol pod zmniejszonym ciśnieniem a otrzymaną pozostałość poddawano liofilizacji. Liofilizaty do celów analizy HPLC z użyciem metod opisanych w rozdziale 7.1.2 i 7.2.3 rozpuszczano w 1 ml metanolu. Przechowywano w chłodnym miejscu (lodówka 4 °C).

## 2. Badania aktywności biologicznej

### 8. Rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne

#### 8.1. Odczynniki chemiczne i substancje wzorcowe

Metanol, chloroform, kwas mrówkowy (POCH, Gliwice, Polska), aceton, heksan (Merck, Darmstadt, Niemcy), keton metyloetylowy (99,8% ChemLab, Zedelgem, Belgia), etanol 95% (Polmos, Wrocław, Polska), 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH), błękit nitrotetrazoliowy (NBT), oksydaza ksantynowa (XO), ksantyna, kwas 6-hydrokso-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksylowy (troloks), 2,4,6-tris-(2-pirydylo)-1,3,5-triazyna (TPTZ), sól diamoniowa 2,2'-azobis-3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu (ABTS), kwas rozmarynowy (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy), azotyn sodowy, kwas chlorowodorowy, kwas wersenowy (EDTA), ryboflawina, agar, bufor fosforanowy, bufor octanowy, chlorek żelaza sześciowodny ( $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ), woda demineralizowana otrzymana z użyciem systemu Millipore (Molsheim, Francja).

### 9. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- **Pipety automatyczne, końcówki do pipet**
- **Wirówka** (MPW Med. Instruments, Polska)
- **Miniwytrząsarka MS2** (IKA, Wilmington, USA)
- **Komora zanurzeniowa TLC Chromatogram Immersion Device III** (Camag, Muttenz, Szwajcaria)
- **Spektrofotometr UV-1800** (Shimadzu, Kioto, Japonia)
- **Spektrofotometr do płytek mikrotitracyjnych Epoch** (BioTek Instruments, Highland Park, USA)
- **Łaźnię wodne:** SWL (Bytom, Polska), Unipan typ 365P (Warszawa, Polska)
- **Płyta grzewcza Thermoplate S** (Desega, Numbrecht, Niemcy)
- **Płuczka ultradźwiękowa** (Bandelin, Niemcy)
- **654 pH-meter** (Metrohm, Herisau, Szwajcaria)
- **Kuwety kwarcowe**
- **Płytki petriego**
- Przygotowanie analizowanych próbek i chromatogramów TLC z użyciem aparatury opisanej w rozdziałach 2.1 i 2.4.



## 10. Badania aktywności przeciwutleniającej

### 10.1. Oznaczenia aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem technik spektroskopii UV-Vis

#### 10.1.1. Przygotowanie próbek do analizy

Oznaczenia prowadzono z wykorzystaniem wyciągów roślinnych otrzymanych z badanych surowców zgodnie z procedurami opisanymi w:

- Rozdziale 5.1 – korzeń żywokostu, wyciągi metanolowe (metoda IIA),
- Rozdziale 5.2 – liście żywokostu, ekstrakcja metodą Soxhleta (metoda I)
- Rozdziale 5.3 – kwiaty arniki górskiej i łąkowej.

Rozcieńczonych w zależności od badanego wyciągu z surowca i metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej, mianowicie:

- Korzenie żywokostu – rozcieńczenia 1:10 (DPPH) i 1:20 (FRAP, ABTS)
- Liście żywokostu – rozcieńczenia 1:50 (DPPH, FRAP, ABTS)
- Kwiatostany arniki – rozcieńczenia 1:20 (DPPH) i 1:100 (FRAP, ABTS)

#### 10.1.2. Test z zastosowaniem stabilnego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH•)

Ocenę aktywności przeciwutleniającej przeprowadzono z zastosowaniem 0,04 mM metanolowego roztworu stabilnego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH•) względem krzywej wzorcowej sporządzonej z sześciu rozcieńczeń kwasu 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksyłowego (Troloks) w metanolu o stężeniach: 0,02; 0,04; 0,05; 0,06; 0,08; 0,1 mM.

Przygotowany *ex tempore* metanolowy roztwór DPPH inkubowano przez 60 min w temperaturze 4°C. Następnie przenoszono do kuwet kwarcowych 2,5 ml roztworu DPPH i dodawano 350 µl odpowiedniego analitu (badany wyciąg/rozcieńczenie troloks – krzywa wzorcow/metanol – ślepa próba). Przygotowane roztwory inkubowano 30 min bez dostępu światła, w temperaturze pokojowej a następnie mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda$ -517 nm.

### *10.1.3. Oznaczenie zdolności redukowania jonów żelaza (III) – test FRAP*

Oznaczenie zdolności redukowania jonów żelaza (III) przeprowadzono z użyciem odczynnika FRAP, który stanowi doprowadzoną do temperatury 37°C mieszaninę następujących odczynników w stosunku objętościowym 10:1:1 (v/v/v):

- 300 mM roztwór buforu octanowego o pH 3,6
- 10 mM roztwór 2,4,6-tris-(2-pirydylo)-1,3,5-triazyny (TPTZ) w 40 mM kwasie chlorowodorowym (HCl)
- 20 mM roztwór  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  w wodzie.

Oznaczenia prowadzono wobec krzywej wzorcowej sporządzonej z sześciu rozcieńczeń Troloksu w wodzie w stężeniach: 0,02; 0,03; 0,06; 0,12; 0,36; 0,48 mM.

Odczynnik FRAP ogrzewano na łaźni wodnej do temperatury 37°C. Następnie przenoszono do kuwet kwarcowych 3 ml odczynnika FRAP i dodawano 150  $\mu\text{l}$  odpowiedniego analitu (badany wyciąg/rozcieńczenie troloks – krzywa wzorcowa/woda – ślepa próba). Przygotowane roztwory inkubowano 30 min bez dostępu światła, w temperaturze pokojowej a następnie mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda$ -593 nm.

### *10.1.4. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej z zastosowaniem soli diamoniowej 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu) – ABTS*

W celu przeprowadzenia oznaczenia aktywności przeciwutleniającej wygenerowano kationorodnik ABTS <sup>•+</sup> poprzez 15h inkubację bez dostępu światła, w temperaturze 4°C mieszaniny stanowiącej:

- 2 ml 7 mM roztworu soli diamoniowej 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu) (ABTS)
- 0,35 ml 140 mM nadsiarczynu potasowego

Po inkubacji mieszaninę odczynników rozcieńczono wodą redestylowaną w stosunku 1 : 90 (v/v) przy zachowaniu stałej absorbancji o wartości  $0,7 \pm 0,02$ . Pomiar prowadzono względem krzywej wzorcowej sporządzonej z sześciu rozcieńczeń Troloksu w wodzie w stężeniach: 0,02; 0,03; 0,05; 0,08; 0,1; 0,12 mM.

Do kuwet kwarcowych wprowadzano 2 ml odczynnika ABTS i 200  $\mu$ l odpowiedniego analitu (badany wyciąg/rozcieńczenie troloks – krzywa wzorcowa/woda – ślepa próba), następnie dwukrotnie mierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda$ -734 nm – w 1 i 6 minucie zapoczątkowanej reakcji.

## 10.2. Oznaczenia aktywności wymiatającej wolne rodniki i zdolności do hamowania oksydazy ksantynowej z wykorzystaniem bioautografii-TLC

### 10.2.1. Przygotowanie próbek do analizy

Otrzymane na szklanych (10.2.1) lub aluminiowych płytkach TLC (10.2.3 i 10.2.4) chromatogramy TLC przeznaczone do celów oznaczeń aktywności biologicznej z wykorzystaniem technik bioautografii-TLC przygotowano zgodnie z warunkami analizy chromatograficznej, opisanymi w rozdziałach 6.2.1 i 7.2.1 .

### 10.2.2. Test z zastosowaniem rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH•)

Rozwinięty chromatogram TLC zanurzano z użyciem komory zanurzeniowej 5 sekund w roztworze 0,05% DPPH•, a następnie inkubowano 30 min bez dostępu do światła. Związki wykazujące aktywność wymiatającą wolne rodniki obserwowano w świetle dziennym jako jasnożółte pasma na ciemnofioletowym tle chromatogramu TLC.

### 10.2.3. Test w układzie ryboflawina-światło-NBT

Mieszaninę wywołującą stanowiącą:

- 8,2 ml wody
- 0,5 ml buforu fosforanowego (pH 7,9)
- 3 mg kwasu wersenowy (EDTA)
- 50 mg agaru

Ogrzewano mieszając do temperatury 90°C i uzyskania pełnego rozpuszczenia agaru. Uzyskany roztwór stopniowo chłodzono do temperatury 60-65°C, po czym dodawano do niego przygotowane roztwory błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) (2,2 mg w 1,2 ml wody) oraz ryboflawiny (1,25 mg/ml, 100  $\mu$ l). Otrzymaną mieszaninę, bez dostępu światła, rozprowadzano równomiernie na przygotowanym chromatogramie i pozostawiano bez dostępu światła do zestalenia agarowej warstwy (6 min).

Następnie w celu wizualizacji antyoksydantów, chromatogram poddawano naświetlaniu lampą jarzeniową o mocy 36 W do uzyskania fioletowego wybarwienia powierzchni tła (10-15 min). Związki posiadające właściwości przeciwutleniające obserwowano w świetle dziennym jako jasnożółte pasma na ciemnofioletowym tle chromatogramu TLC.

#### 10.2.4. Test hamowania oksydazy ksantynowej (XO)

Test przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch mieszanin wywołujących:

- Mieszanina wywołująca A – 8,2 ml wody, 0,5 ml buforu fosforanowego (pH 7,9), 3 mg EDTA oraz 50 mg agaru
- Mieszanina wywołująca B – roztwór 45 mg ksantyny w 10 ml 0,5 M roztworu wodorotlenku sodu, rozcieńczony wodą destylowaną do objętości 100 ml a następnie zakwaszony z użyciem 1 M roztworu kwasu solnego do pH 7,5.

Mieszaninę wywołującą A ogrzewano nieprzerwanie mieszając do temperatury 90°C i uzyskania pełnego rozpuszczenia agaru. Otrzymany roztwór stopniowo chłodzono do temperatury 60-65°C i następnie dodawano do niego wcześniej przygotowane roztwory błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) (2,2 mg w 1,2 ml wody) oraz oksydazy ksantyny (5 U, 77,5 µl). Otrzymaną mieszaninę, bez dostępu światła, rozprowadzano równomiernie na rozwiniętym chromatogramie TLC i pozostawiano bez dostępu światła do zestalenia warstwy agarowej (6 min).

Następnie pokryty zestalonym agarem chromatogram TLC umieszczano na szklanej płytce Petriego, zalewano mieszaniną wywołującą B i inkubowano 15 min na płycie termicznej w temperaturze 38°C, bez dostępu światła. Związki hamujące działanie oksydazy ksantyny były widoczne w świetle dziennym jako jasnożółte pasma na ciemnofioletowym tle chromatogramu TLC.

## 11. Badania aktywności przeciwzapalnej

### 11.1. Przygotowanie próbek do analizy

Oznaczenia aktywności kwasu rozmarynowego przeprowadzono z użyciem substancji wzorcowej (Rosmarinic acid ≥98%, from *Rosemarinus officinalis*; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy) rozpuszczonej w metanolu i rozcieńczonej do uzyskania stężeń odpowiednio: 10, 100, 500 µM.

W oznaczeniach aktywności wyciągów metanolowych z korzenia i liścia żywokostu wykorzystano ekstrakty przygotowane według procedur opisanych w:

- rozdziale 5.1 – korzeń żywokostu; metoda IIA,
- rozdziale 5.2 – liście żywokostu; metody I-III

rozcieńczonych w zależności od analizowanego wyciągu odpowiednio:

- Korzenie żywokostu – rozcieńczenia 1:10, 1:20, 1:50
- Liście żywokostu – rozcieńczenia 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200

### 11.2. Ocena hamowania cyklooksygenazy-1 i -2

Ocenę hamowania cyklooksygenazy-1 i -2 (COX-1, COX-2) przeprowadzono z użyciem komercyjnych zestawów COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) według procedur opisanych w dołączonej instrukcji<sup>7</sup> (173).

Pomiar absorbancji próby badanej przeprowadzono po upływie 20 lub 30 min, przy jej wartości dla próby kontrolnej w zakresie 0,3-2,0. Odczyt prowadzono dla długości fali  $\lambda$ -405,  $\lambda$ -410,  $\lambda$ -415 i  $\lambda$ -420 nm.

## 12. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne prowadzono z użyciem programu Statistica 13.3 (TIBCO, Software Inc., Palo Alto, USA). Analizy chemometryczne obejmujące zastosowanie testów takich jak test Kruskala-Wallisa, korelacja rang Spearman, test post-hoc Dunna oraz analizę czynnikową (FA) i analizę skupień (CA) przy użyciu metody Warda z zastosowaniem odległości euklidesowej, przeprowadzono przy współpracy z dr Justyną Ośko i prof. dr hab. Małgorzatą Grembecką z Katedry i Zakładu Bromatologii, GUMed.

---

<sup>7</sup> Dostępna również on-line: <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/560131.pdf> [data dostępu: 10.10.2023]

### 3. Badania dostępności farmaceutycznej

#### 13. Rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne

##### 13.1. Odczynniki chemiczne i substancje wzorcowe

Metanol (POCH, Gliwice, Polska), kwas kawowy, kwas rozmarynowy, kwas chlorogenowy, kwas kawowy, helenalina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy), woda demineralizowana otrzymana z użyciem systemu Millipore (Molsheim, Francja).

#### 14. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- **Aparat do badania dyfuzji H3-02** (PermeGear, Hellertown, USA)
- **Komora dyfuzyjna** szklana horyzontalna typu side-side (PermeGear, Hellertown, USA)
- **Błony półprzepuszczalne:**
  - Błona dializacyjna **Biotech CE Tubing** (SpectraPor Dialysis membrane) – estry celulozy; średnica filtra 10 mm, punkt odcięcia 1000 kDa (Replige, Waltham, USA)
  - Błona do testów dyfuzji przezskórnej **Strat-M** – poliolefiny i polieterosulfon; grubość 300 µm, średnica filtra 25 mm (Millipore, Burlington, USA)
- **Miniwytrząsarka MS2** (IKA, Wilmington, USA)
- **Liofilizator Steris Lyovac GT2 SRK** (Systemtechnik GmbH, Niemcy)

#### 15. Ocena dostępności farmaceutycznej

Ocenę dostępności farmaceutycznej prowadzono w szklanych poziomych komorach dyfuzyjnych typu side-by-side z użyciem błon półprzepuszczalnych imitujących ludzką skórę – błony dializacyjnej wykonanej z estrów celulozy (SpectraPor Dialysis membrane) oraz błony do testów dyfuzji przezskórnej Strat-M wykonanej z poliolefiny i polieterosulfonu. Materiał do badań stanowiły przygotowane w 10% metanolu roztwory wzorcowe kwasu kawowego (25 i 250 µg/ml), kwasu rozmarynowego (1,5 mg/ml i 150 µg/ml), kwasu chlorogenowego (2 mg/ml) i helenaliny (30 µg/ml) oraz liofilizaty wyciągów roślinnych otrzymanych z użyciem metod ekstrakcji opisanych w rozdziale 5.– z korzenia żywokostu **DNr** (10 g surowca/250 ml), liścia żywokostu **Hf** (13 g surowca/130 ml) oraz kwiatostanu arniki górskiej **AM** (10 g/100 ml) o oznaczonej zawartości substancji biologicznie czynnych.

Donor stanowił 1 ml roztworu substancji wzorcowej lub 1 ml rozpuszczonego/zawieszonego w 10% metanolu liofilizatu (10 mg/1 ml) z badanego wyciągu roślinnego. Jako płyn akceptorowy stosowano 5 ml wody oczyszczonej. Eksperyment prowadzono w temperaturze 37°C przez 24h, po upływie tego czasu pobierano całą objętość płynu akceptorowego i liofilizowano a następnie rozpuszczano w 100 µl metanolu do celów analizy ilościowej z użyciem opracowanych metod HPLC.

Badaniu poddano oprócz płynu donorowego i płynu akceptorowego, użyte w eksperymencie błony półprzepuszczalne, celem oceny stopnia potencjalnej absorpcji badanych składników biologicznie czynnych w warstwach skóry. Rozdrobnioną błonę Strat-M poddano 30 min ekstrakcji 30% metanolem na płuczce ultradźwiękowej (temp. pokojowa). Otrzymany roztwór po odparowaniu metanolu poddano liofilizacji a liofilizat do celów analizy ilościowej rozpuszczono w 100 µl metanolu.

### III BADANIA WŁASNE

#### A. Omówienie wyników badań fitochemicznych

Przeprowadzone badania fitochemiczne obejmowały przede wszystkim analizę jakościową i ilościową estrów kwasu kawowego na tle innych grup biologicznie czynnych metabolitów wtórnych, odpowiedzialnych zarówno za aktywność terapeutyczną, jak i potencjalną toksyczność analizowanych surowców roślinnych – korzeni i liści żywokostu lekarskiego (*Symphytum officinale* L.; *radix et folium*), kwiatów arniki górskiej (*Arnica montana* L.; *flos*) i arniki łąkowej (*A. chamissonis* Less.; *flos*) oraz homeopatycznych nalewek macierzystych z całej świeżej rośliny arniki górskiej (*Arnica TM; tinctura materna*). W badaniach uwzględniono surowce roślinne pochodzące zarówno z krajowych ogrodów botanicznych jak i stanowisk naturalnych, oraz surowce dostępne na krajowym rynku zielarskim pochodzące ze źródeł komercyjnych.

Analizowane surowce roślinne należą do fitoterapeutyków dopuszczonych przez EMA do rejestracji w krajach UE jako tradycyjne produkty lecznicze o wieloletniej tradycji stosowania (22, 23) i wykorzystywanych w podobnych zakresach wskazań terapeutycznych (5, 82). Pomimo tego, ich skład chemiczny wciąż nie został w pełni rozpoznany, o czym świadczą opublikowane w ostatnich latach nieliczne doniesienia o identyfikacji nowych związków, mogących mieć istotne znaczenie dla aktywności terapeutycznej korzenia i liści żywokostu oraz kwiatów arniki łąkowej czy nalewek homeopatycznych z całej świeżej rośliny arniki górskiej (5, 62, 82, 110). W celu rozszerzenia wiedzy o składzie chemicznym badanych surowców roślinnych, opracowano metody chromatograficzne umożliwiające analizę jakościową i ilościową metabolitów wtórnych w kwiatach i nalewkach z arniki – z grupy laktonów seskwiterpenowych, fenolokwasów i flawonoidów (99, 110) oraz w korzeniu i liściu żywokostu – alantoiny (50), alkaloidów pirolizydynowych i związków fenolowych (prostych fenoli i polifenoli). Są to grupy związków wymieniane w literaturze jako pełniące podstawową rolę w aktywności terapeutycznej, np. alantoina w żywokoście, laktony seskwiterpenowe w arnicy, obok stanowiących przedmiot dysertacji estrów kwasu kawowego (5, 82). Analizy przeprowadzono z użyciem technik chromatografii cienkwarstwowej (1D TLC, 2D TLC) w połączeniu z densytometrią oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w sprzężeniu ze



spektrometrią mas (DAD-ESI-MS, DAD-MS/MS) oraz detekcją w świetle ultrafioletowym i widzialnym (UV-Vis).

Ponadto, opracowano metodę izolacji oraz ustalono strukturę wykrytego w korzeniu żywokostu lignanu – trimeru kwasu kawowego, początkowo opisywanego w literaturze jako izomer kwasu salwianolowego (13), wykorzystując technikę automatycznej ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Techniki SPE użyto również do opracowania metody frakcjonowania przetworów (wyciąg alkoholowy, nalewka z arniki), w celu wydzielenia zespołów bogatych w związki fenolowe oraz z dominacją laktonów seskwiterpenowych.

## 1. Optymalizacja warunków ekstrakcji związków czynnych biologicznie z korzenia i liścia żywokostu

W początkowym etapie badań optymalizowano warunki ekstrakcji związków czynnych z wysuszonych korzeni i liści żywokostu oraz świeżych liści żywokostu. Zastosowano różne techniki ekstrakcji, używane we wcześniejszych badaniach nad tym gatunkiem, mianowicie: ekstrakcja ciec-ciało stałe pod chłodnicą zwrotną (13) i ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (174) – korzeń żywokostu, ekstrakcja w aparacie Soxhleta (175) oraz ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami i maceracja (59) – liść żywokostu. Spośród rozpuszczalników ekstrakcyjnych stosowano alkohole i ich mieszaniny z wodą: metanol, etanol, 60% etanol i 50% metanol (170).

Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami mieszaniną woda-alkohol korzenia żywokostu skutkowała wyodrębnieniem dużej ilości polisacharydów, co skutkowało wysoką lepkością ekstraktu, stanowiącą problem w analizach chromatograficznych HPLC. Dlatego wybrano jako ekstrahent do badań metanol i/lub etanol.

Optymalizując metodę ekstrakcji związków czynnych z liści żywokostu, charakteryzujących się wysoką zawartością chlorofilu, zdecydowano o wstępnym oczyszczaniu badanego surowca poprzez ekstrakcję chloroformem w aparacie Soxhleta (temperatura 60°C) a następnie ekstrakcję oczyszczonego materiału metanolem.

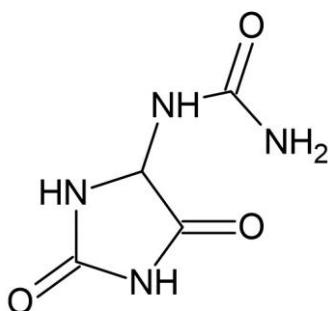
W rezultacie do badań otrzymano wyciągi otrzymane następującymi metodami:

- Korzeń żywokostu:

- Ekstrakcja ciecz-ciało stałe pod chłodnicą zwrotną etanolem i/lub metanolem, do celów analizy jakościowej i ilościowej oraz badań biologicznych
- Liść żywokostu:
  - ekstrakcja w aparacie Soxhleta (w temperaturze wrzenia rozpuszczalników), do celów analizy jakościowej i ilościowej oraz badań biologicznych
  - ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (30 min) lub maceracja (48 h) (w temperaturze pokojowej), do celów analizy jakościowej związków fenolowych

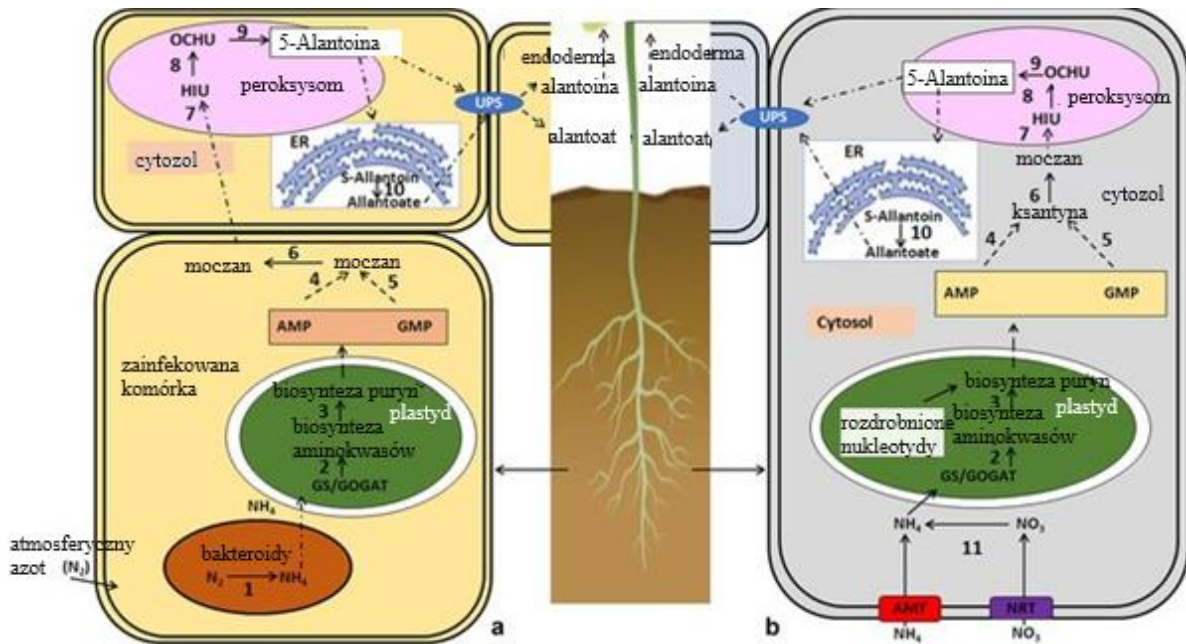
## 2. Analiza chromatograficzna TLC z densytometrią oznaczania alantoiny w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego

Alantoina (5-ureidohydantoina) (Ryc. 17) jest szeroko rozpowszechnioną w królestwie roślin, substancją z grupy ureidów, powstającą z kwasu moczowego jako pośredni produkt metabolizmu puryn (Ryc. 18).



Ryc. 17: Wzór strukturalny alantoiny.

Poza korzeniem żywokostu występuje między innymi w surowcach fitoterapeutycznych takich jak ziele miodunki (176). Alantoina nie jest jedynie związkiem pochodzenia roślinnego, jej obecność stwierdzano w moczu zwierząt (m.in. psów, kotów, królików i małp) oraz w niewielkich stężeniach u ludzi – w kształtującym się łożysku i surowicy kobiet w ciąży (9).



Ryc. 18: Szlaki biosyntezy alantoiny i jej transportu do tkanek roślinnych wg Kaur et al. (176).

W roślinach alantoina pełni ważną rolę w procesach odpowiedzi na abiotyczne czynniki stresowe (176), a jej działanie antyoksydacyjne ma znaczenie w aspektach leczniczych i kosmetycznych. Badania potwierdzają skuteczność alantoiny jako wspomagającej leczenie ran, łagodzącej podrażnienia, wspierającej regenerację naskórka (5, 9, 74). Mechanizm działania alantoiny jest wielokierunkowy, obejmuje między innymi pobudzenie aktywności keratolitycznej, podziałów komórkowych, proliferacji fibroblastów, stymulację nabłonka i usuwania martwej tkanki. Ponadto, alantoina działa przeciwzapalnie, poprzez modulację odpowiedzi zapalnej, najprawdopodobniej związaną z hamowaniem chemotaksji cytokin prozapalnych (74).

W związku z powyższym, alantoina stanowi cenny składnik leków dermatologicznych (t.j. *Contractubex*, *Cepan*, *Alantan Plus*, *Dernilan*, *Mucosit*) oraz licznych produktów o statusie kosmetyków, dermokosmetyków i wyrobów medycznych, niekiedy zawierających również wyciągi roślinne. Jakkolwiek w przeważającej liczbie preparatów z alantoiną jest ona obecna jako pojedynczy składnik, to badania nad mechanizmem działania wyciągu z korzenia żywokostu lekarskiego jednoznacznie wskazują na efekty synergistyczne alantoiny w połączeniu z innymi składnikami ekstraktu roślinnego z tego surowca (75).

Pomimo szerokiego stosowania alantoiny, dotychczas niewiele uwagi poświęcono analizie ilościowej tego związku w ekstraktach roślinnych, charakteryzujących się bogatą kompozycją

metabolitów wtórnych należących do różnych grup chemicznych. Ponadto, dostępne metody bazowały przede wszystkim na oznaczeniach z wykorzystaniem wymagających kosztownej aparatury i odczynników metod HPLC oraz niestandardowych kolumn – w analizie nasion *Zea mays* Econosil C18 o wymiarach 25 x 4,6 mm, 5 µm, w analizie ryżu Wakosil 5NH<sub>2</sub> o wymiarach 250 x 4,6 mm, 5 µm (60, 177-179).

Do celów przeprowadzenia analizy jakościowej i ilościowej alantoiny w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego opracowano szybką i tanią metodę TLC z analizą densytometryczną, której optymalizację i walidację szczegółowo opisano w publikacji, na łamach czasopisma *Acta Pharmaceutica*<sup>8</sup> (Kimel et al. 2020) (50).

### 2.1. Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego alantoiny z korzeni i liści żywokostu lekarskiego metodą TLC

Optymalizację warunków rozdzielania chromatograficznego techniką chromatografii cienkowarstwowej prowadzono w zakresie doboru fazy stacjonarnej w układzie faz normalnych (płytki TLC Si60, TLC Si60<sub>F254</sub>, HPTLC Si60) oraz fazy ruchomej wykorzystując mieszaniny rozpuszczalników opisywane w literaturze: keton metyloetylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (43 : 2 : 1 : 4, v/v/v/v) (180, 181) i butanol – 50% metanol (3 : 1 v/v) i ich modyfikacje oraz rozdzielanie w układzie faz odwróconych na płytkach TLC RP-18 W<sub>254</sub> mieszaniną metanol – kwas mrówkowy – woda (70 : 6 : 30 v/v/v) (182, 183).

Dotychczas opracowane metody analizy ilościowej alantoiny z TLC służyły ocenie zawartości związku w lekach (180) lub płynach biologicznych (181). Układ faz pozwalający na analizę alantoiny w próbkach leków stanowił mieszaninę keton metyloetylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (40 : 2 : 1 : 6 v/v/v/v) (180). Zastosowanie niewielkiej modyfikacji proporcji rozpuszczalników (F2; 43 : 2 : 1 : 4 v/v/v/v) w stanowiącej przedmiot badań matrycy roślinnej, jaką są korzenie i liście żywokostu lekarskiego, pozwoliło na detekcję alantoiny w wyciągu, jednak rozdzielanie nie było wystarczające do przeprowadzenia analizy ilościowej. Ze względu na bardziej złożony skład matrycy, wybarwiającej się pod wpływem zmodyfikowanego

---

<sup>8</sup> Kimel K, Zienkiewicz M, Sparzak-Stefanowska B, Krauze-Baranowska M. TLC-densitometric analysis of allantoin in *Symphytum officinale* L. roots. *Acta pharmaceutica* (Zagreb, Croatia). 2020;70(1): 101-10.

odczynnika Ehrlicha żółte pasmo alantoiny koeluowało z szarawo wybarwiającym się pasmem innego, niezidentyfikowanego związku.

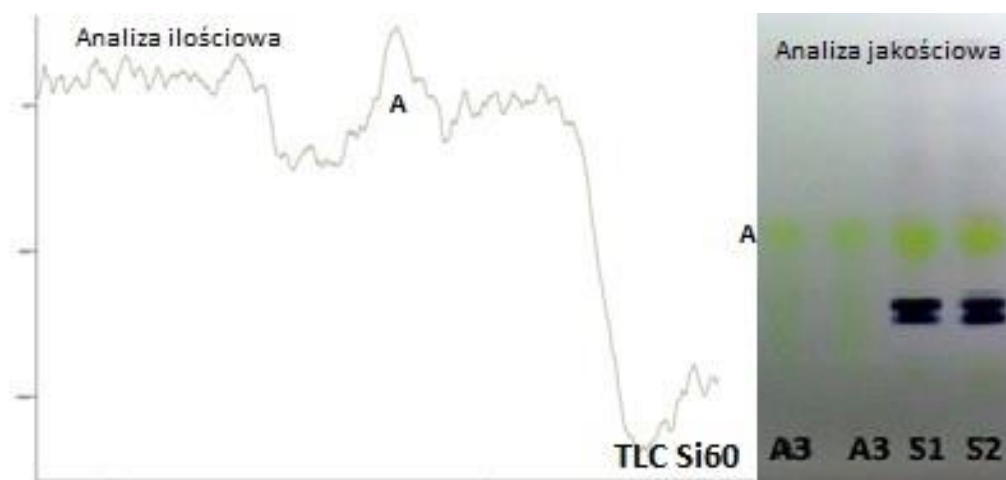
W celu uzyskania pełnej separacji pasma alantoiny od związków balastowych i poprawy jego koncentracji przetestowano szereg modyfikacji opisywanych w literaturze faz ruchomych (180), najlepszy efekt rozdzielania uzyskując w układzie A/F7: butanol – 50% metanol + kwas mrówkowy (40 : 20 + 0,16 v/v + ml) (Tabela 2).

Tabela 2: Optymalizacja warunków rozdzielania alantoiny w korzeniu i liściu żywokostu metodą TLC w zakresie doboru fazy ruchomej z użyciem faz F1-F7.

Nr fazy	Rodzaj fazy ruchomej	Efekt rozdzielania
A/F1	metanol – kwas mrówkowy – woda 70 : 6 : 30 (v/v/v)	Brak rozdzielania; układ faz odwróconych (płytki TLC RP-18 W <sub>254</sub> )
A/F2	keton metyloetylowy – aceton - kwas mrówkowy - woda 43 : 2 : 1 : 4 (v/v/v/v)	Brak rozdzielania, obecność pasma interferującego z pasmem alantoiny
A/F3	butanol - 50% metanol 2 : 1 (v/v),	Dobre rozdzielanie, słaba koncentracja pasma alantoiny
A/F4	butanol – 50% metanol 1 : 1 (v/v)	
A/F5	butanol – 50% metanol + kwas mrówkowy 40 : 20 + 0,3 (v/v + ml)	Dobre rozdzielanie, słaba koncentracja pasma alantoiny
A/F6	butanol – 50% metanol + kwas mrówkowy 40 : 20 + 0,2 (v/v + ml)	Dobre rozdzielanie, słaba koncentracja pasma alantoiny
A/F7	butanol – 50% metanol + kwas mrówkowy 40 : 20 + 0,16 (v/v + ml)	Dobre rozdzielanie, wysoka koncentracja pasma alantoiny

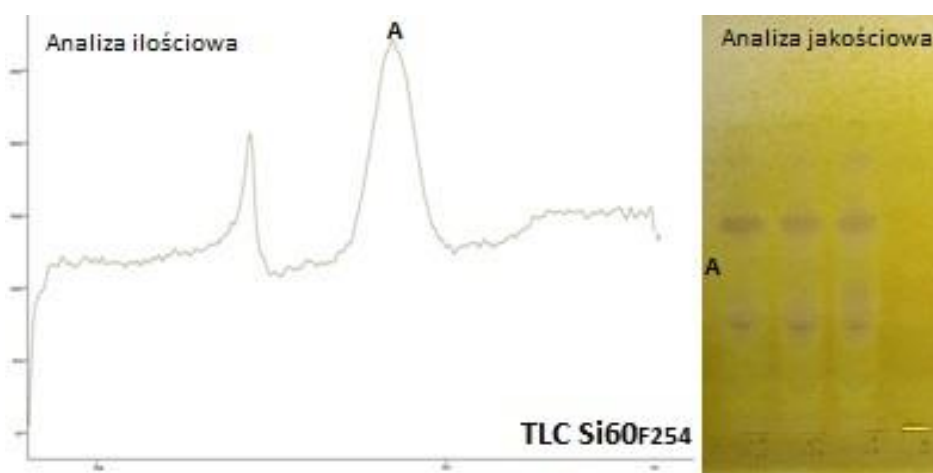
W wyniku optymalizacji fazy stacjonarnej zdecydowano o wykorzystaniu dwóch typów płytek TLC – TLC Si60 do analizy jakościowej oraz TLC Si60<sub>F254</sub> do analizy ilościowej, prowadzonej bez derywatywacji.

W trakcie analiz prowadzonych na płytkach TLC Si60 na otrzymywanych densytogramach obserwowano zaburzenia linii bazowej, „falszującej” prawidłowy odczyt intensywności piku alantoiny (Ryc. 19).



Ryc. 19: Densytogram (bez derywatywacji) oraz chromatogram TLC (po derywatywacji) wyciągu metanolowego z korzenia żywokostu (S1, S2) i alantoiny (A3). Płytki TLC Si60, faza ruchoma: A/F7, detekcja UV  $\lambda$ -190 nm i światło dzienne, A – alantoina.

Zastosowanie jako fazy stacjonarnej płytek TLC Si60<sub>F254</sub>, pozwoliło na poprawę jakości widma UV, jakkolwiek derywatywacja wiązała się z wybarwieniem na żółto adsorbentu, co utrudniało obserwację pasma alantoiny w świetle dziennym (Ryc. 20).



Ryc. 20: Densytogram (bez derywatywacji) oraz chromatogram TLC (po derywatywacji) wyciągu metanolowego z korzenia żywokostu (S1, S2) i alantoiny (A3). Płytki TLC Si60<sub>F254</sub>, faza ruchoma: A/F7, detekcja UV  $\lambda$ -190 nm i światło dzienne, A – alantoina.

Zastosowanie płytek HPTLC Si60 i HPTLC Si60<sub>F254</sub> nie skutkowało poprawą jakości rozdzieleń chromatograficznych i analiz densytometrycznych, w związku z czym zdecydowano o stosowaniu równie efektywnych, lecz tańszych płytek TLC.

Ostatni etap optymalizacji stanowił dobór parametrów rozdzielania z użyciem automatycznej komory chromatograficznej (ADC2), pozwalającej na zachowanie stałych parametrów w

zakresie wilgotności, dystansu rozwijania chromatogramu oraz czasu prekondycjonowania płytki. W wyniku przeprowadzonej optymalizacji (Tabela 3) zdecydowano na prowadzenie rozdzielenia przy zachowaniu wilgotności na poziomie  $49 \pm 1 \%$ , dystansie 75 mm, poprzedzonej 2 minutowym prekondycjonowaniem płytki chromatograficznej.

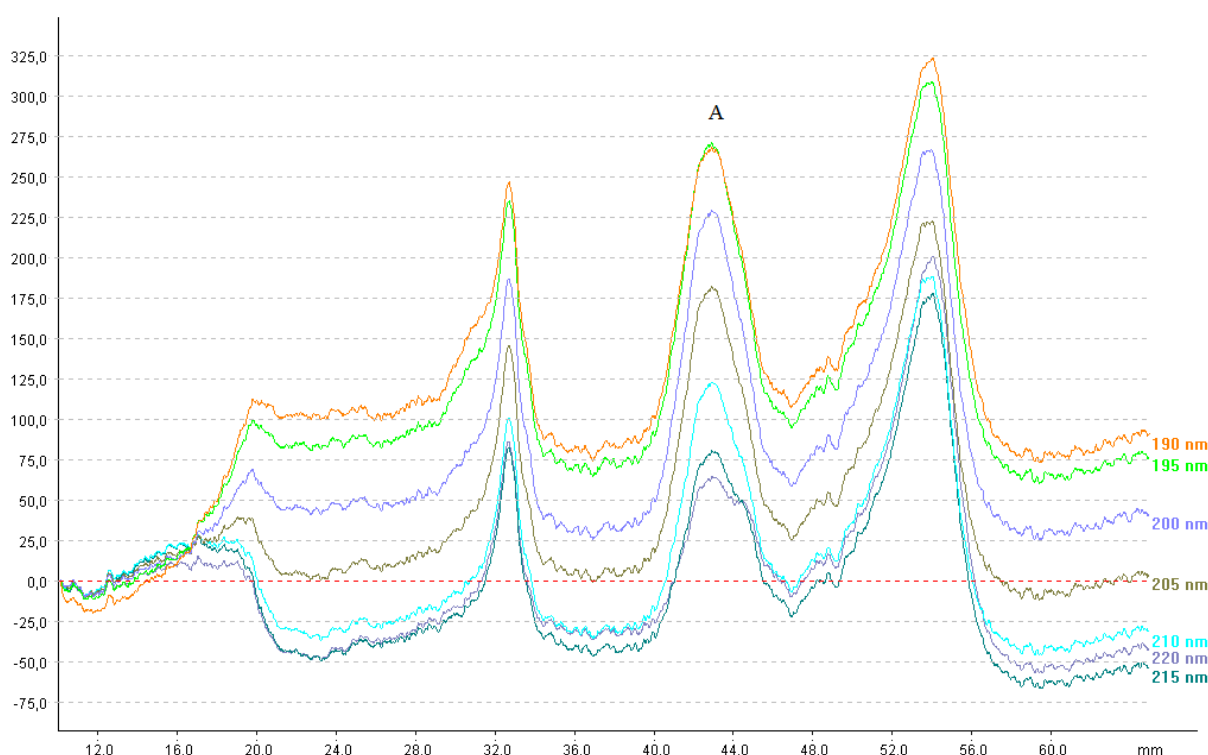
Tabela 3: Optymalizacja warunków rozdzielenia z użyciem automatycznej komory chromatograficznej (ADC2)

	Zmienna	Efekt
<b>Wilgotność</b>	$39 \pm 1\%$ ( $\text{MgCl}_2$ )	Rozmycie pasma alantoiny
	$49 \pm 1\%$ ( $\text{KSCN}$ )	Dobre rozdzielanie
<b>Dystans rozwijania chromatogramu</b>	85 mm	Dobre rozdzielanie
	75 mm	Wyższa koncentracja pasma alantoiny
<b>Prekondycjonowanie</b>	brak	Dobre rozdzielanie
	2 min	Wyższa koncentracja pasma alantoiny

## 2.2. Optymalizacja warunków pomiarów densytometrycznych

Warunki analizy densytometrycznej optymalizowano w zakresie długości fali oraz doboru wymiarów szczeliny przepuszczającej wiązkę światła.

Dotychczas z użyciem densytometrii oznaczano alantoinę w moczu krów mlecznych, po rozdzieleniu składników próbki na płytkach chromatograficznych Silica gel- $\text{NH}_2$ ,  $F_{254\text{nm}}$  przy długości fali  $\lambda$ -254 nm (184). Ze względu na różnicę w typie stosowanych płytek chromatograficznych oraz badanej matrycy, dobrano długość fali pozwalającą na uzyskanie najwyższej intensywności pików alantoiny poprzez przeprowadzenie multiskanu z użyciem lampy deuterowej, w zakresie  $\lambda$ -190-270 nm (zmiana co 10 nm) a następnie  $\lambda$ -190-210 nm (zmiana co 5 nm) (Ryc. 21). Do pomiarów wybrano długość fali  $\lambda$ -190 nm, pozwalającą na uzyskanie pików alantoiny o najwyższej intensywności, wyrażonej jako wartość pola powierzchni.



Ryc. 21: Obserwowane zmiany w intensywności pików alantoiny podczas pomiarów densytometrycznych przy różnych długościach fali (multiskan w zakresie  $\lambda$ -190-210 nm, zmiana co 5 nm), na podstawie wyciągu z korzenia żywokostu (Fr).

Szerokość szczeliny przepuszczającej wiązkę światła w densytmetrze optymalizowano przy długości fali  $\lambda$ -190 nm, stosując dwa ustawienia: 0,02 x 8,0 mm oraz 0,4 x 4,0 mm. Pola powierzchni pików porównywano w oparciu o otrzymane wyniki dla różnych stężeń alantoiny. Zastosowanie większej szczeliny pozwalało na uzyskanie przy pomiarach densytometrycznych znacznie wyższego pola powierzchni pików, w związku z czym zdecydowano na prowadzenie analiz ilościowych przy ustawieniu 0,4 x 4,0 mm (**Błąd! Nieprawidłowy odsyłacz do zakładki: wskazuje na nią samą.**).

Tabela 4: Różnice w polach powierzchni pików alantoiny w zależności od zastosowanych parametrów pomiaru densytometrycznego (wymiar szczeliny), długość fali:  $\lambda$ -190 nm

Stężenie alantoiny (ng/pkt)	Pole powierzchni pików alantoiny przy danych wymiarach szczeliny	
	0,02 x 8,0 mm	0,4 x 4,0 mm
500	135,71	173,13
1000	233,04	283,35
2000	392,07	482,58



3000	543,76	672,96
4000	692,42	839,43
5000	805,65	990,71

### 2.3. Walidacja metody

Oznaczenia ilościowe alantoiny przeprowadzono w oparciu o wykreśloną krzywą regresji dla siedmiu stężeń alantoiny (210-5000 ng/pasmo – punkt; pkt), aplikowanych każdorazowo na płytkę chromatograficzną obok analizowanych ekstraktów roślinnych w formie pasm.

Metodę zwalidowano w zakresie liniowości, specyficzności, granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), precyzji, jedno- i międzydniowej (Tabela 5).

Tabela 5: Parametry walidacyjne metody TLC densytometrycznego oznaczania alantoiny

Parametry walidacyjne	
Krzywa regresji, współczynnik korelacji (n=7, 210-5000 ng/pasmo, n=7)	a = 8,4678 ± 0,4033 b = -404,6982 ± 119,9879 R <sup>2</sup> = 0,9971
Specyficzność (hR <sub>f</sub> = R <sub>f</sub> x 100)	46
Granica wykrywalności (LOD) [ng]	70
Granica oznaczalności (LOQ) [ng]	210
Precyzja instrumentalna (n=7) (CV [%])	2,30 (1000 ng/pasmo) 3,73 (4000 ng/pasmo)
Powtarzalność jednodniowa (CV [%])	7,7 (wyciąg)
Powtarzalność międzydniowa (CV [%])	6,07 (wyciąg)

Ze względu na zmiany właściwości rozdzielczych żelu krzemionkowego związane z warunkami separacji i możliwość wystąpienia drobnych błędów ze strony analityka, przeprowadzono także walidację w zakresie stabilności (*ang. robustness*) opracowanej metody. Uwzględniono wpływ zmian w obrębie proporcji pomiędzy rozpuszczalnikami wchodzącymi w skład fazy ruchomej oraz różnych dystansów rozwijania chromatogramu na wartość współczynnika opóźnienia (R<sub>f</sub>).

Wykazano, że opracowana metoda jest bardzo stabilna przy niewielkich wahaniami składu fazy ruchomej (zmiennosc  $R_f$  alantoiny o 2,2-5,2%), jednocześnie charakteryzując się większą wrażliwością na zmiany dystansu rozwijania chromatogramu (zmiennosc  $R_f$  o 7,2-8,9%) (Tabela 6).

Tabela 6: Parametry walidacyjne w zakresie stabilności metody TLC densytometrycznego oznaczania alantoiny w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego

Modyfikowany parametr	Poziom zmian	Zmiennosc $R_f$ (RSD, %)
Skład fazy ruchomej butanol : 50 % metanol + kwas mrówkowy (v/v + ml)	36 : 24 + 0,16	5,2
	40 : 20 + 0,1	2,2
	40 : 20 + 0,2	2,2
Dystans rozwijania (cm)	6,5	8,9
	8,5	7,2

W celu potwierdzenia dokładności wyników otrzymanych z użyciem opracowanej metody TLC przeprowadzono badanie odzysku na poziomie dodatku wzorca 50% i 25% (Tabela 7). Uzyskane wyniki wskazują na bardzo dobry osiągnięty odzysk metody na poziomie 25% dodatku wzorca i niższy przy dodatku na poziomie 50%. Wskazuje to najwyższą dokładność metody w analizie próbek o niskiej zawartości alantoiny, wraz ze wzrostem stężenia analitu w ekstrakcie, dokładność metody spada.

Tabela 7: Wartości odzysku metody TLC densytometrycznego oznaczania alantoiny

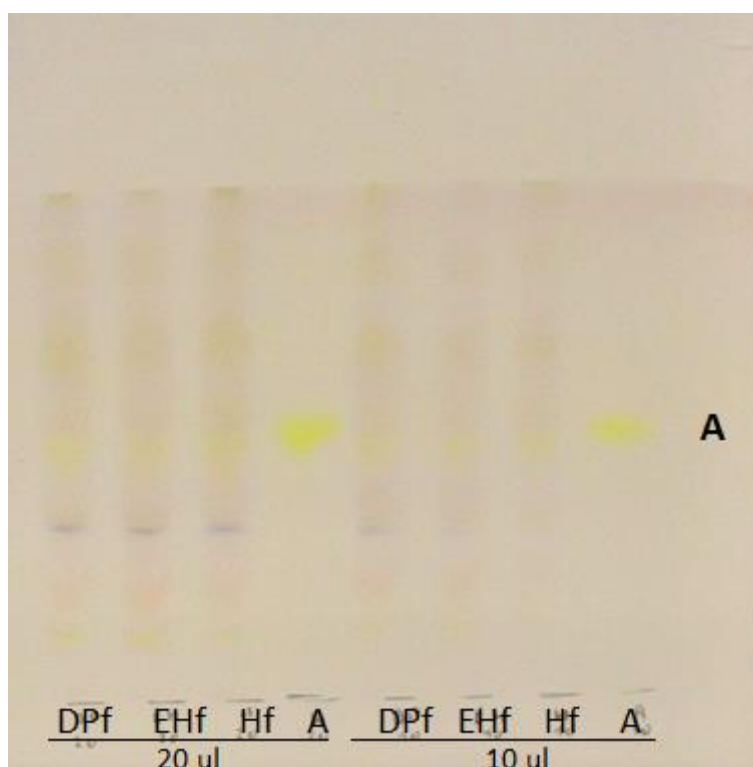
Wyciąg	Zawartość alantoiny w próbce (mg)	Dodatek wzorca (mg)	Odzysk (SD, %)
EtOH (n=6)	8,9	4,4	93,10 ± 1,2
MeOH (n=3)			86,75 ± 4,0
EtOH (n=3)		2,2	104,5 ± 2,3
MeOH (n=3)			100,3 ± 1,4

## 2.4. Omówienie wyników oznaczeń alantoiny w korzeniach i liściach żywokostu

### 2.4.1. Analiza jakościowa

W oparciu o przeprowadzone analizy potwierdzono obecność alantoiny we wszystkich analizowanych wyciągach roślinnych z korzeni i liści żywokostu lekarskiego.

W przypadku wyciągów z liści żywokostu (**DPf**, **EHf** i **Hf**) widoczne we wszystkich próbkach żółte pasmo alantoiny ( $R_f$ -4,6) interferowało z rozmytym na całej długości chromatogramu TLC pasmem innych związków (Ryc. 22). Jakkolwiek uzyskany chromatogram TLC pozwolił na potwierdzenie obecności alantoiny w w analizowanych liściach żywokostu, nie mógł być wykorzystany do celów analizy ilościowej – interferujące związki „zaburzały” linię bazową densytogramu. W celu uniknięcia błędnej interpretacji wyników, obecność alantoiny w liściach żywokostu potwierdzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).



Ryc. 22: Chromatogram TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego (DPf EHf, Hf) oraz alantoiny (A) jako wzorca: płytka TLC Si60, faza ruchoma: A/F7, odczynnik wywołujący: zmodyfikowany odczynnik Ehrlicha, detekcja: światło dzienne; objętość aplikacji - 20 i 10  $\mu$ l/pasmo

### 2.4.2. Analiza ilościowa

Oznaczona zawartość alantoiny w pięciu analizowanych próbkach z korzeni żywokostu (**Fr**, **DPr**, **EHr**, **Łó**; 0,75-2,11%) zawierała się w zakresie normy farmakopealnej (0,7% według FP IV (28))

lub jej granicach (**Za** 0,65%). Spośród pozostałych, w trzech (**DNr, Lu, Gd**; 0,35-0,39% lub <LOQ) była niemal dwukrotnie niższa a w przypadku próbki **Gd** poniżej granicy oznaczalności opracowanej metody (Tabela 8).

Tabela 8: Wyniki oznaczeń ilościowych alantoiny w korzeniach i liściach żywokostu lekarskiego metodą TLC z oznaczeniem densytometrycznym

	Lp.	Surowiec (4.1,4.2)	Zawartość alantoiny [%]
Korzenie	1.	<b>Fr</b>	2,09 ± 0,15
	2.	<b>DNr</b>	0,35 ± 0,17
	3.	<b>DPr</b>	1,66 ± 0,15
	4.	<b>EHR</b>	2,11 ± 0,38
	5.	<b>Lu</b>	0,39 ± 0,17
	6.	<b>Za</b>	0,65 ± 0,10
	7.	<b>łó</b>	0,75 ± 0,23
	8.	<b>Gd</b>	< LOQ
Liście	9.	<b>DPf</b>	< LOQ
	10.	<b>EHf</b>	< LOQ
	11.	<b>Hf</b>	< LOQ

Szczególną uwagę zwraca bardzo niska zawartość alantoiny w surowcach pochodzących z krajowych ogrodów botanicznych (**Lu, Za, łó, Gd**; 0,39-0,75% lub <LOQ), w których była ona oceniana krótko po zbiorze – trudno więc wnioskować o rozkładzie związku w okresie przechowywania.

Próbki pochodzące ze źródeł komercyjnych w większości charakteryzowały się wysoką zawartością alantoiny (**Fr, DPr, EHR**; 1,66-2,11%), odpowiadającej normie farmakopealnej (28) oraz danym literaturowym (0,6-4,7%) (4, 50, 54). Wyjątek stanowi próbka **DNr** (0,35%) – drugi najuboższy w alantoinę materiał spośród wszystkich analizowanych. Odmienne wyniki uzyskano w opublikowanym we wrześniu 2023 roku badaniu zawartości alantoiny w korzeniach żywokostu metodą HPLC-DAD-UV/Vis. Oznaczone stężenia alantoiny w surowcach pochodzących od tych samych producentów wynosiły 2,75% dla korzeni żywokostu od firmy

Flos (**Fr**) oraz 3,1% w surowcu Dary Natury (**DNr**) (185). Rozbieżności te, w przypadku próbki **DNr** niemal 10-krotne, wskazują na możliwą znaczną różnicę w jakości korzeni żywokostu dostępnych na rynku zielarskim.

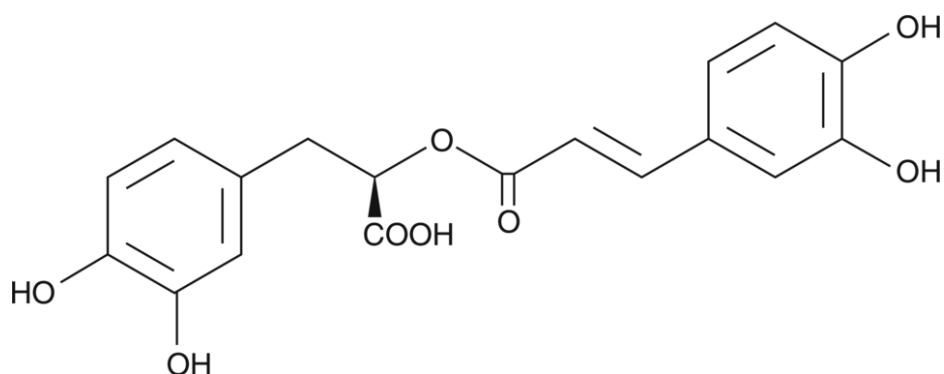
Badania ostatnich lat potwierdzają, że alantoina w królestwie roślin pełni nie tylko rolę przenośnika i źródła azotu, ale także modulatora odporności na czynniki stresowe. Wysoki poziom alantoiny jest obserwowany w roślinach narażonych na stres środowiskowy związany m.in. z obecnością metali ciężkich, wysokim promieniowaniem, suszą, zasoleniem, stresem osmotycznym (176). Niska zawartość alantoiny w surowcach „ogrodowych” może więc wynikać z kontrolowanych warunków uprawy i dbałości o zapewnienie roślinom prawidłowych warunków do wzrostu. Podczas gdy materiał ze źródeł komercyjnych – sklepów zielarskich, zbierany ze stanowisk naturalnych, był narażony na zmienne w większym stopniu na zmienne warunki środowiskowe i stres.

Mniej jednoznaczne są informacje dotyczące średniej zawartości alantoiny w liściach żywokostu. Część źródeł literaturowych wskazuje na znacznie niższą zawartość alantoiny w liściach, niż w korzeniu, kształtującą się na średnim poziomie 0,1-0,8% (51-53). Jednak niektóre badania nad akumulacją tego związku w liściach żywokostu wykazały, znaczne wahania w jego zawartości w zależności od fazy rozwoju wegetacyjnego rośliny – w młodych liściach osiągającą 13% a w czasie kwitnienia obniżającą się do 2% (54). Niski poziom alantoiny w liściach raportowany w niektórych badaniach, sugeruje formułowanie zaleceń co do okresu zbioru surowca – dla liści powinien on mieścić się w fazie wegetacyjnej rośliny (26, 88).

W liściach żywokostu pochodzących ze sklepów zielarskich (**DPf, EHf, Hf**) – w przypadku korzeni charakteryzujących się wyższą zawartością alantoiny niż materiał „ogrodowy” – poziom alantoiny odnotowano poniżej granicy oznaczalności opracowanej metody densytometrii-TLC. Stanowi to potwierdzenie wcześniejszych doniesień o znacznie niższej zawartości alantoiny w zbieranych w okresie kwitnienia liściach żywokostu, w porównaniu do jego korzeni.

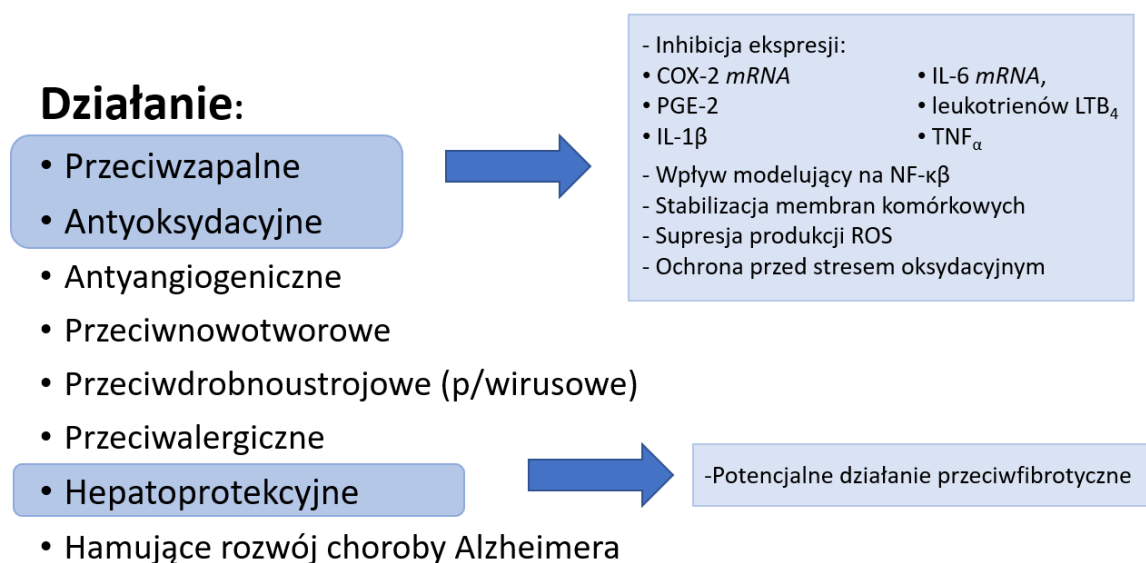
### 3. Analiza chromatograficzna polifenoli w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego

Obok alantoiny, za jedną z najważniejszych substancji biologicznie czynnych w korzeniu i liściach żywokostu uważany jest kwas rozmarynowy – ester kwasu kawowego oraz kwasu 3,4-dihydroksyfenylomlekowego (Ryc. 23).



Ryc. 23: Wzór strukturalny kwasu rozmarynowego.

Podobnie jak wiele innych kwasów fenolowych, zawierających wolne grupy hydroksylowe (-OH), związek ten wykazuje zdolność do wymiatania i hamowania produkcji wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (ROS) poprzez hamowanie syntezy prostaglandyn i innych białek prozapalnych. Dodatkowo wykazano dla kwasu rozmarynowego działanie ochronne na skórę, zapobiegające uszkodzeniom keratynocytów przez promieniowanie UVB (5, 17, 18, 61, 186) (Ryc. 24).



Ryc. 24: Kierunki aktywności biologicznej kwasu rozmarynowego oraz proponowane mechanizmy działania (17, 18, 49)..

W literaturze są dostępne dane o działaniu przeciwfibrotycznym i hepatoprotekcyjnym kwasu rozmarynowego (49), które w kontekście zastosowań leczniczych korzenia i liści żywokostu lekarskiego, mogą mieć znaczenie w ograniczaniu ryzyka występowania działań niepożądanych, związanych z obecnością hepatotoksycznych alkaloidów pirolizydynowych o szkielecie 1,2-nienasyconej necyny (6, 34, 187).

Pomimo wieloletniej tradycji stosowania leczniczego korzenia żywokostu lekarskiego, nie rozwijano badań nad jego składem chemicznym, szczególnie w zakresie związków fenolowych i polifenolowych. Dopiero w ostatnich latach, prowadzone równoległe w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej, badania innej grupy naukowców, dostarczyły nowych danych o nieznanym wcześniej związkach o strukturach trimerów i tetramerów kwasu kawowego (63). Natomiast prowadzone w ramach realizowanej pracy doktorskiej analizy fitochemiczne pozwoliły na rozszerzenie wiedzy i pełniejsze rozpoznanie profilu chemicznego drugiego surowca pozyskiwanego z żywokostu lekarskiego, mianowicie liścia. (59, 70, 72).

Kwasy fenolowe jako estry pochodne kwasu kawowego oraz flawonoidy są grupami związków biologicznie czynnych łączonych z silną aktywnością przeciwutleniającą, którą zawdzięczają przede wszystkim obecności wolnych grup -OH, zdolnych do wymiatania/wychwytywania wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (ROS). W konsekwencji związki fenolowe chronią komórki przed szkodliwym działaniem stresu oksydacyjnego, uczestniczącego w formowaniu stanów zapalnych. Kwasy fenolowe wykazują dodatkowo aktywność przeciwzapalną poprzez modulację ekspresji cytokin prozapalnych, jak i wpływ na niektóre enzymy – m.in. hamowanie cyklooksygenazy-1 i -2 i/lub lipooksygenazy-5 (17, 18, 133, 135, 170, 188, 189). Ich obecność w wyciągach z korzeni i liści żywokostu lekarskiego może więc bezpośrednio przekładać się na aktywność przeciwutleniającą i przeciwzapalną surowca oraz jego potencjalne działanie przeciwreumatyczne, przeciwbólowe i wspomagające gojenie urazów układu mięśniowo-szkieletowego (stłuczenia, skręcenia) (1, 5, 20, 60, 63, 66, 75).

W toku realizowanej dysertacji przeprowadzono badania w zakresie analizy chromatograficznej (TLC i HPLC) polifenoli w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego obejmujące zarówno analizę jakościową wymienionych surowców, ukierunkowaną na rozpoznanie nowych związków, jak i ocenę ich zawartości w wymienionych surowcach pochodzących z różnych źródeł.

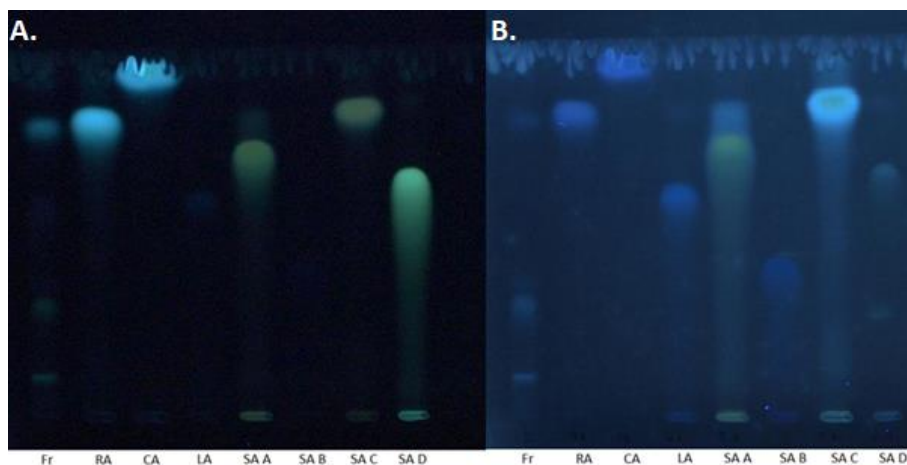
### 3.1. Analiza jakościowa zespołu polifenoli z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego metodami TLC oraz HPLC

#### 3.1.1. Analiza jakościowa zespołu polifenoli z korzenia żywokostu lekarskiego metodami TLC

Punktem wyjścia dla analizy profilu kwasów fenolowych w korzeniu żywokostu lekarskiego były wcześniejsze badania prowadzone w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji GUMed (19) wskazujące na obecność w surowcu nowych związków, poza znanymi i opisanymi wcześniej izomerami kwasów salwianolowych A, B i C oraz kwasu litospermowego (13, 63).

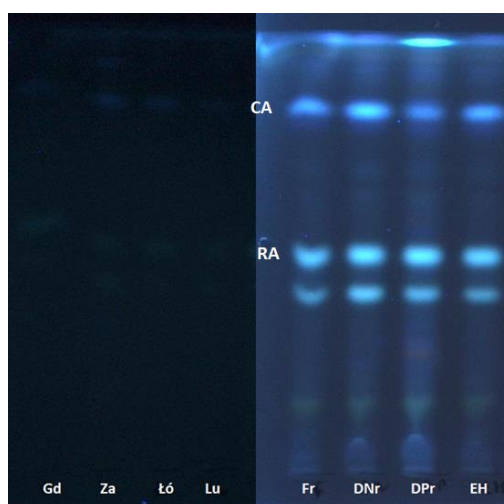
W pierwszym etapie badań porównano skład wyciągu metanolowego z korzenia żywokostu (**Fr**) z odpowiednimi substancjami wzorcowymi z użyciem TLC – rozdzielanie przeprowadzono na płytce szklanej TLC Si60 w opisywanych w literaturze warunkach: faza ruchoma: B/F1: eter diizopropylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (50 : 30 : 10 : 10, v/v/v/v) (169, 190), derywatywacja odczynnikami NPR+PEG z detekcją przy długości fali  $\lambda$ -366 nm. Analiza otrzymanego chromatogramu TLC (Ryc. 25) potwierdziła obecność, wymienianych w literaturze: **kwasu rozmarynowego** (Rf-0,80) i niewielkich ilości **kwasu kawowego** (Rf-0,95) (4, 13, 60, 66). Jednocześnie, wstępnie wykluczono obecność kwasów salwianolowych A (Rf-0,72), B (Rf-0,40), C (Rf-0,86) i D (Rf-0,69). Zastosowana derywatywacja odczynnikami NPR+PEG nie umożliwiła pełnej identyfikacji pasma kwasu litospermowego (słaba fluorescencja w świetle UV). Natomiast zastosowanie jako odczynnika wywołującego 2% roztworu  $AlCl_3$ , pozwoliło obserwować ten związek jako fluoryzujące ciemnoniebiesko pasmo (Rf-0,60), jednak nieobecne w badanym wyciągu roślinnym (Ryc. 25). Wykluczenie obecności kwasu litospermowego miało na celu rozstrzygnięcie wątpliwości, co do jego występowania w korzeniu żywokostu, ze względu na sprzeczne dane literaturowe (13, 22, 24, 63).





Ryc. 25: Chromatogram 1D TLC wyciągu z korzenia (Fr) żywokostu lekarskiego oraz substancji wzorcowych: RA - kwas rozmarynowy, CA - kwas kawowy, LA - kwas litospermowy, SA A-D – kwasy salwianolowe A-D. Płytką: TLC Si60<sub>F254</sub>, Faza ruchoma: B/F1; A – odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja  $\lambda$ -366 nm, B – odczynnik wywołujący: 2% AlCl<sub>3</sub>, detekcja UV;  $\lambda$ -366 nm

Powtórzenie rozdzieleń TLC z zastosowaniem innej literaturowej fazy ruchomej B/F2: chloroform – metanol – kwas mrówkowy – woda (70 : 30 : 2 : 2, v/v/v/v) (169, 170, 190, 191) pozwoliło na znaczne obniżenie wartości Rf **kwasy kawowego** (Rf-0,82) oraz **kwasy rozmarynowego** (Rf-0,50), a także uwidocznienie na chromatogramie obecności dodatkowych związków Ryc. 26).

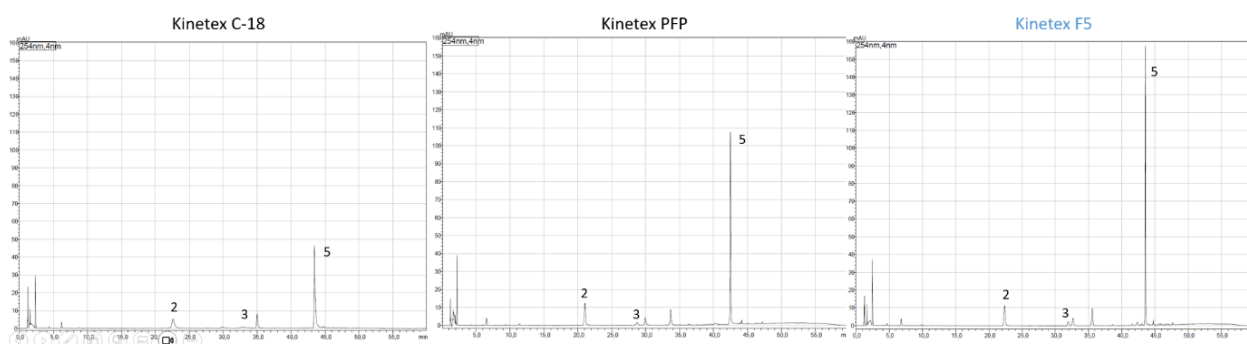


Ryc. 26: Chromatogram 1D TLC wyciągów z korzeni żywokostu lekarskiego (oznaczenia surowców zgodne z danymi podanymi w rozdziale 4.1. Płytką: TLC Si60<sub>F254</sub>, Faza ruchoma: B/F1; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja  $\lambda$ -366 nm. CA – kwas kawowy, RA – kwas rozmarynowy.

### 3.1.2. Analiza jakościowa zespołu polifenoli z korzenia żywokostu lekarskiego metodami HPLC oraz izolacja i identyfikacja związku 5

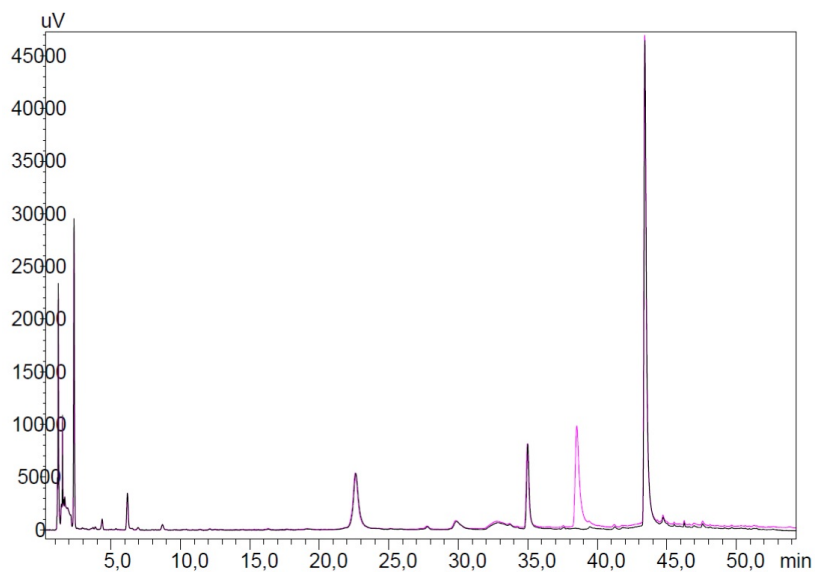
W celu przeprowadzenia identyfikacji związków fenolowych o nieznanym tożsamości zoptymalizowano następnie warunki rozdzielania metodami HPLC. Opracowany program elucji gradientowej stanowi modyfikację elucji wykorzystywanej podczas wcześniejszych badań w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji (**Program I**) (19). Obecny w fazach ruchomych kwas trifluorooctowy zastąpiono kwasem mrówkowym. Ze względu na obserwowane pogorszenie separacji wydłużono także czas wymywania związków mieszaniną rozpuszczalników **C + D** o stężeniu 43% D (**Program II**).

Dodatkowo, w celu poprawy efektywności separacji związków (**2**, **3** i **5**), przeprowadzono optymalizację w zakresie doboru kolumny chromatograficznej. Spośród trzech testowanych kolumn o wymiarach 100 x 4,6 mm; 2,6 µm: Kinetex C-18, Kinetex PFP i Kinetex F5, najlepsze rezultaty uzyskano na kolumnie Kinetex F5 pozwalającej na otrzymanie najwyższej intensywności pików związków **5** oraz separacji dodatkowych związków w zakresie  $t_R$  36-48 min (Ryc. 27).

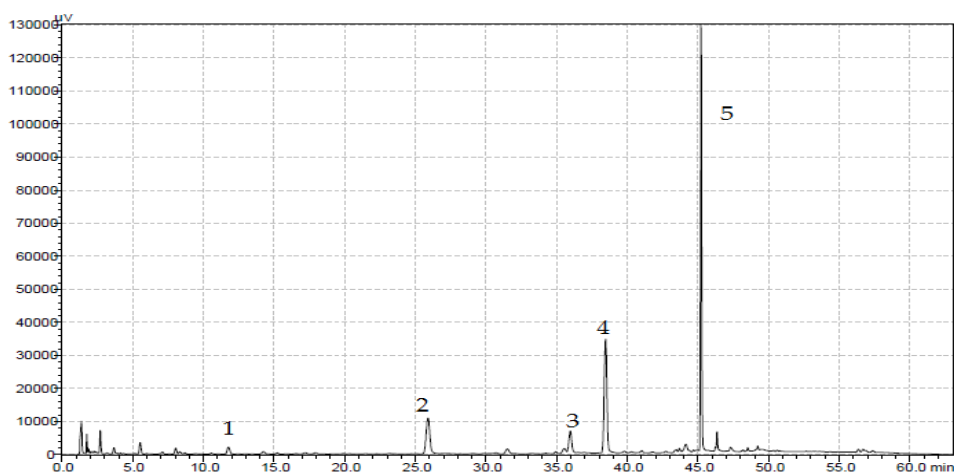


Ryc. 27: Optymalizacja rozdzielania chromatograficznego HPLC związków fenolowych w korzeniu żywokostu w zakresie doboru kolumny chromatograficznej: kolumny Kinetex C-18, Kinetex PFP i Kinetex F5, T kolumny - 35°C, elucja gradientowa: program II, detekcja UV  $\lambda$ -254 nm. 2, 3, 5 – zgodnie z Tabelą 9.

W opracowanych warunkach rozdzielania chromatograficznego HPLC, ostatecznie wykluczono obecność kwasu litospermowego ( $t_R$  - 38,34 min) w analizowanym materiale roślinnym (Ryc. 28) oraz potwierdzono obecność: **kwasu kawowego** (związek **1**;  $t_R$  -11,49) i **kwasu rozmarynowego** (związek **4**;  $t_R$  - 38,34) (Ryc. 29).



Ryc. 28: Chromatogram HPLC wyciągu z korzenia żywokostu (Fr) (linia czarna) oraz wyciągu z korzenia żywokostu (Fr) z dodatkiem wzorca kwasu litospermowego (linia różowa). Kolumna: Kinetex F5 (100 x 4,6 mm), T - 35°C, elucja gradientowa: program II, detekcja UV  $\lambda$ -254 nm



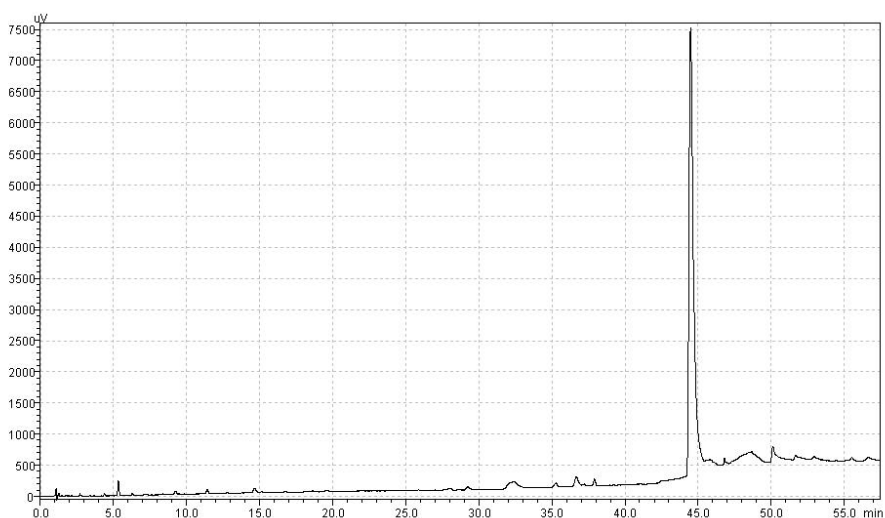
Ryc. 29: Chromatogram HPLC wyciągu z korzenia żywokostu (Fr). Kolumna: Kinetex F5 (100 x 4,6 mm), T - 35°C, elucja gradientowa: program II, detekcja UV  $\lambda$ -254 nm. Numeracja związków zgodnie z *Tabela 9*.

Kierując się wysoką intensywnością piku związku **5**, świadcząca o jego wysokiej zawartości w badanym wyciągu, zdecydowano o podjęciu próby jego izolacji z wyciągu z korzenia żywokostu (**Fr**) z wykorzystaniem zautomatyzowanego systemu do ekstrakcji do fazy stałej (SPE) (Ryc. 30).



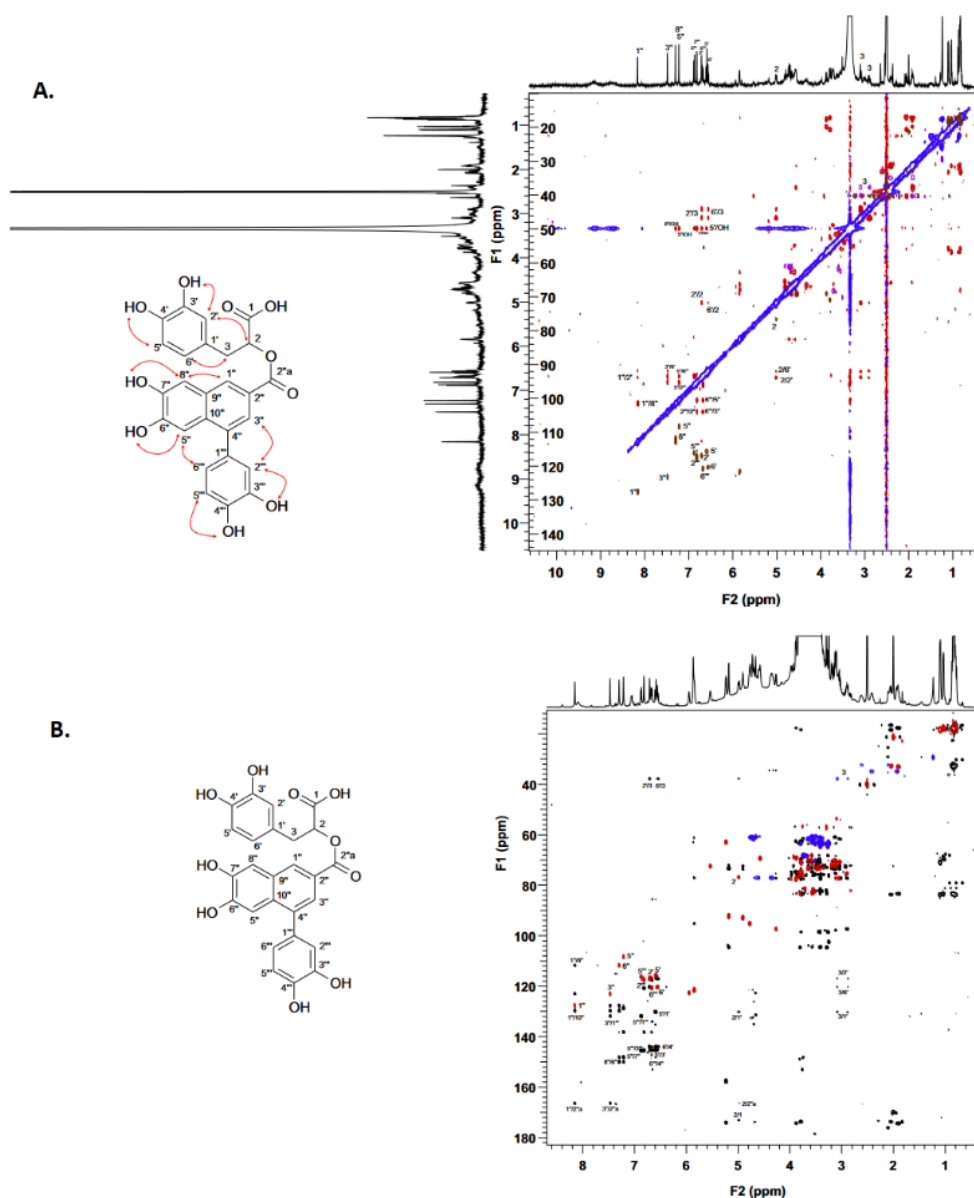
Ryc. 30: Zautomatyzowany system do ekstrakcji do fazy stałej SmartPrepExtractor II.

Uwzględniając czas retencji związku **5** ustalono, że jego wymycie następuje w czasie kiedy gradient elucji mieści się w zakresie 70% fazy D w C, co odpowiada 35% acetonitrylu lub, w oparciu o przeliczenia uwzględniające różnice w sile elucji, 40% metanolu (192). Opracowany program izolacji obejmował wymywanie po 3 frakcje o objętości 2 ml każda z użyciem 30% i 50% metanolu (I-III – 30% metanol; IV-VI – 50% metanol), oraz jednej frakcji (VII) wymywanej 6 ml 100% metanolu. Każda z otrzymanych frakcji była kontrolowana z użyciem opracowanej metody HPLC w celu oceny stopnia oczyszczenia związku oraz powtarzalności procesu separacji na użytych kolumnkach SPE. Frakcje **IV** i **V**, charakteryzujące się najwyższym stopniem oczyszczenia związku **5** ( $t_R$  - 44,49 min) (Ryc. 31) z kolejnych rozdzieleń były następnie łączone, odparowywane i liofilizowane.

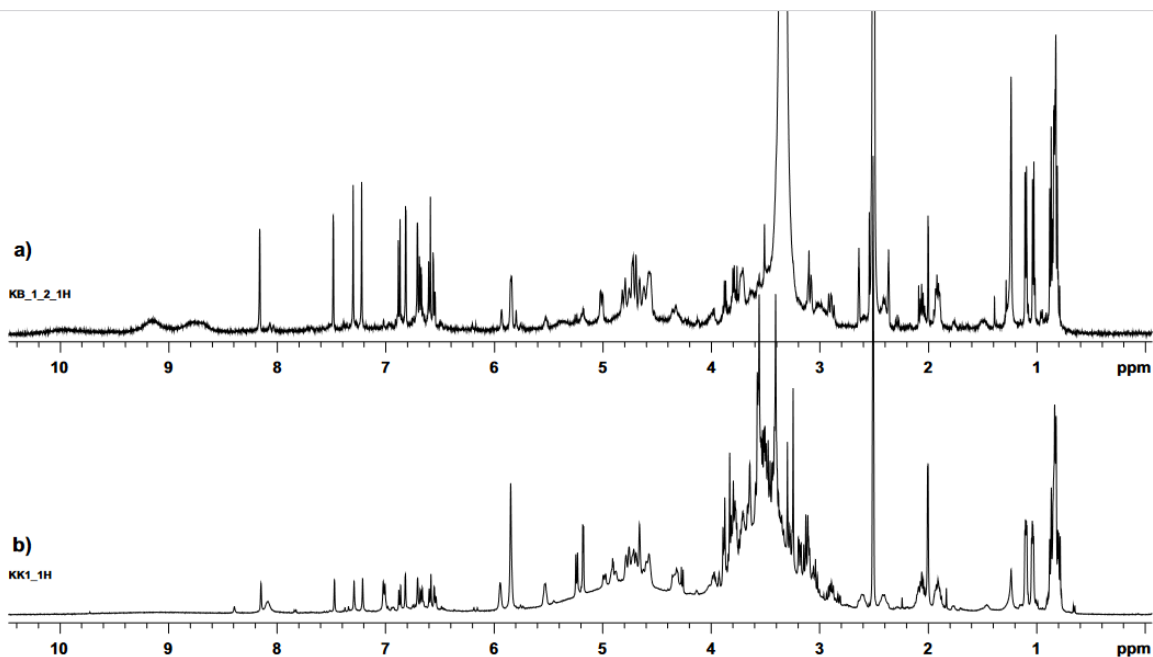


Ryc. 31: Chromatogram HPLC frakcji **IV** zawierającej oczyszczony związek **5** ( $t_R$  - 45 min). Kolumna: Kinetex F5 (100 x 4,6 mm), T-35°C, elucja gradientowa: program II, detekcja UV  $\lambda$ -254 nm

Uzyskany liofilizat wyizolowanego związku **5** przekazano do badań strukturalnych za pomocą magnetycznego rezonansu nuklearnego (NMR) z wykorzystaniem technik homojądrowych COSY i ROESY oraz heterojądrowych HSQC i HMBC uwzględniając oddziaływania hetero- i homokorelacyjne pomiędzy atomami  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  (Ryc. 32, Ryc. 33). Badania zostały przeprowadzone we współpracy z dr Pawłem Sowińskim z Międzyuczelnianego Laboratorium NMR przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, który ostatecznie zinterpretował widma i zaproponował strukturę związku **5** jako globoidnanu A.

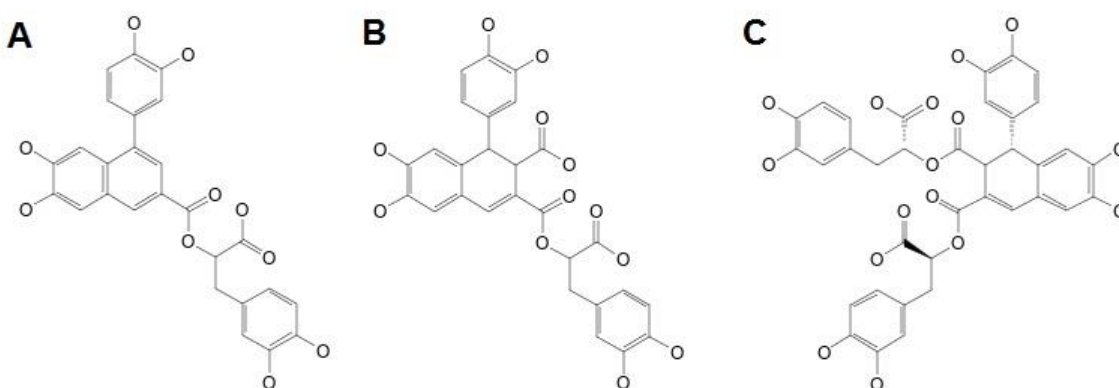


Ryc. 32: Zestawienia widm NMR zarejestrowanych w DMSO- $d_6$  w temperaturze pokojowej. A - widma ROESY (czerwono-niebieskie) i gHSQC (brązowo-fioletowe); czerwonymi strzałkami zaznaczono wybrane efekty NOE. B - widma HSQC (czerwono-niebieskie) i HMBC (czarne).



Ryc. 33: Widma  $^1\text{H}$  NMR izolatów związku 5 (DMSO- $d_6$ , temperatura pokojowa)

Wyniki otrzymanych badań strukturalnych związku **5** potwierdziły opublikowane w podobnym czasie doniesienia (20) o jego identyfikacji jako lignanu trimeru kwasu kawowego – **globoidnanu A**. Opracowana metoda izolacji za pomocą zautomatyzowanego systemu SPE stanowi alternatywę dla opisaną we wspomnianej publikacji metody wykorzystującej chromatografię techniką ciec-z-ciecz (LCC) z zastosowaniem dwufazowego układu rozpuszczalników.



Ryc. 34: Wzory strukturalne lignanów pochodnych kwasu kawowego zidentyfikowanych w korzeniu żywokostu. A – globoidnan A; B – globoidnan B; C – rabdozyna

W oparciu o uzyskane metodą HPLC-DAD-ESI/MS widma UV i ESI-MS związków **2** i **3** (Ryc. 29, Tabela 9) z danymi literaturowym związki te zidentyfikowano kolejno jako trimer kwasu kawowego – **globoidnan B** i tetramer kwasu kawowego – **rabdozynę** (Ryc. 34).

*Tabela 9:* Estrы pochodne kwasu kawowego zidentyfikowane w korzeniu żywokostu lekarskiego metodami HPLC (detektor UV/Vis i MS). \* - tożsamość związków potwierdzona poprzez kochromatografię wyciągu z substancjami wzorcowymi.

L.p.	Nazwa związku	$[M+H]^+/[M+H]^-$ [m/z]	UV $_{\lambda_{max}}$ [nm]
1.	Kwas kawowy*	179 <sup>-</sup>	239, 323
2.	Globoidnan B	539 <sup>+</sup> /537 <sup>-</sup>	220sh, 251, 282, 315sh, 344
3.	Rabdosyna	719 <sup>+</sup> /717 <sup>-</sup>	255sh, 282, 316sh, 344nw
4.	Kwas rozmarynowy*	361 <sup>+</sup> /359 <sup>-</sup>	218, 233sh, 246sh, 289sh, 328
5.	Globoidnan A*	493 <sup>+</sup> , 983 <sup>+</sup> /491 <sup>-</sup>	215, 261, 318

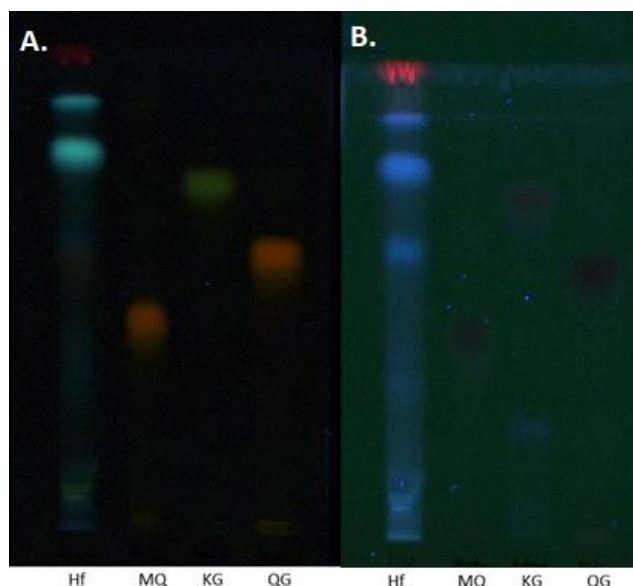
Zgodnie z założoną hipotezą, wszystkie trzy nowo rozpoznane związki (**2**, **3** i **5**) należą do estrów pochodnych kwasu kawowego.

### *3.1.3. Analiza jakościowa zespołu polifenoli z liścia żywokostu lekarskiego metodami TLC*

Opublikowane nieliczne badania fitochemiczne liści żywokostu lekarskiego koncentrują się przede wszystkim na alantoinie i alkaloidach pirolizydynowych. W zespole kwasów fenolowych odnotowano w surowcu obecność kwasu rozmarynowego, kawowego i galusowego (59) a w grupie flawonoidów jedynie acetyloheksozydu kwercetyny i rutyny (64).

Zastosowanie warunków rozdzielania jednokierunkowego (1D TLC) użytych wcześniej w analizie wyciągu z korzenia żywokostu pozwoliło na zidentyfikowanie pasm odpowiadających **kwasowi kawowemu** ( $R_f=0,80$ ) i **rozmarynowemu** ( $R_f=0,95$ ). Znacznie bogatszy skład wyciągu z liścia żywokostu, skutkujący obecnością, na całym dystansie rozwijania chromatogramu rozmytego pasma nie pozwoliło jednak na potwierdzenie/wykluczenie obecności wybranych

glikozydów flawonoidów, występujących w charakteryzującym się zbliżonym składem chemicznym zielu miodunki plamistej (*Pulmonaria officinalis* L., *Boraginaceae*) (137, 193) (Ryc. 35).

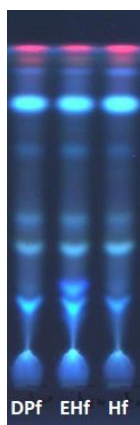


Ryc. 35: Chromatogram 1D TLC wyciągu z liścia żywokostu lekarskiego (Hf) oraz substancji wzorcowych: MQ - 3-O-(6''-malonylo)-glukozyd kwercetyny; KG – 3-O-glukozyd kemferolu, QG – 3-O-glukozyd kwercetyny. Płytką: TLC Si60<sub>F254</sub>, faza ruchoma: B/F1; A – odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV:  $\lambda$ -366 nm, B – odczynnik wywołujący: 2% AlCl<sub>3</sub>, detekcja UV:  $\lambda$ -366 nm.

W celu poprawy separacji związków polifenolowych zoptymalizowano warunki rozdzielania dwukierunkowego (2D TLC) (170), konieczne do przeprowadzenia zaplanowanych w kolejnych etapach badań aktywności biologicznej z wykorzystaniem bioautografii-TLC.

Jako fazę pierwszego kierunku zastosowano mieszaninę B/F2: chloroform – metanol – kwas mrówkowy – woda (70 : 30 : 2 : 2, v/v/v/v), która pozwoliła na obniżenie wartości R<sub>f</sub> i poprawę separacji, fluoryzujących jasnoniebiesko, kwasów fenolowych (Ryc. 36).





Ryc. 36: Chromatogram 1D TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego (DPf, EHf, Hf). Płytką: TLC Si60<sub>F254</sub>, faza ruchoma: B/F2; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV:  $\lambda$ -366 nm.

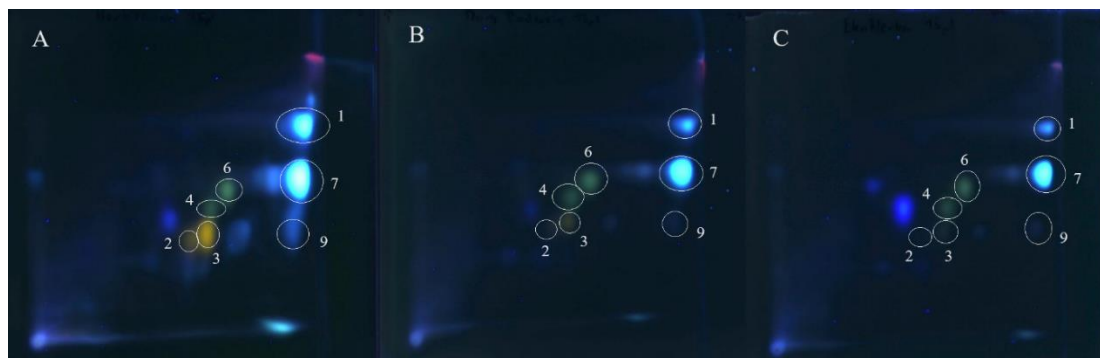
Rozdzielenie w drugim kierunku optymalizowano z użyciem mieszanin keton metyletylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (191) o różnych proporcjach poszczególnych rozpuszczalników (B/F2-F5). Najlepszą separację, pozwalającą na uzyskanie pasm flawonoidów w zakresie  $R_f$  około 0,6-0,75 chromatogramu, uzyskano z użyciem fazy B/F6: keton metyletylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (35 : 50 : 10 : 5, v/v/v/v) (Ryc. 37).



Ryc. 37: Chromatogram 1D TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego (Hf). Płytką: TLC Si60<sub>F254</sub>, faza ruchoma: B/F6; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV:  $\lambda$ -366 nm.

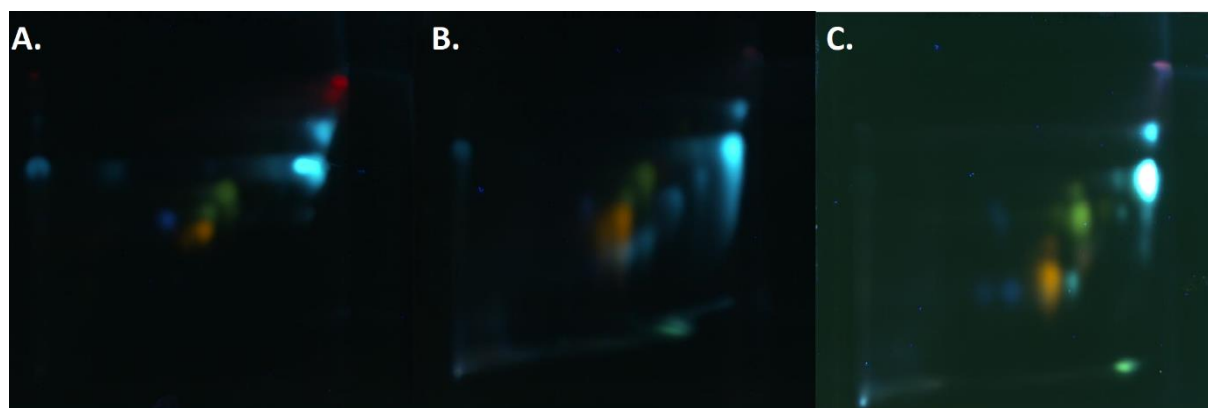
Stosując zoptymalizowane warunki separacji przeprowadzono analizę porównawczą profili chemicznych wyciągów przygotowanych techniką ekstrakcji w aparacie Soxhleta z wszystkich czterech analizowanych liści żywokostów. Ujawniła ona znaczne różnice w intensywności

rozdzielonych pasm, wskazując na potencjalne wahania w zawartości poszczególnych składników surowca (Ryc. 38).



Ryc. 38: Chromatogramy 2D TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego (A – Hf, B – DPf, C – EHf). Płytką: TLC Si60<sub>F254</sub>; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV:  $\lambda$ -366 nm.

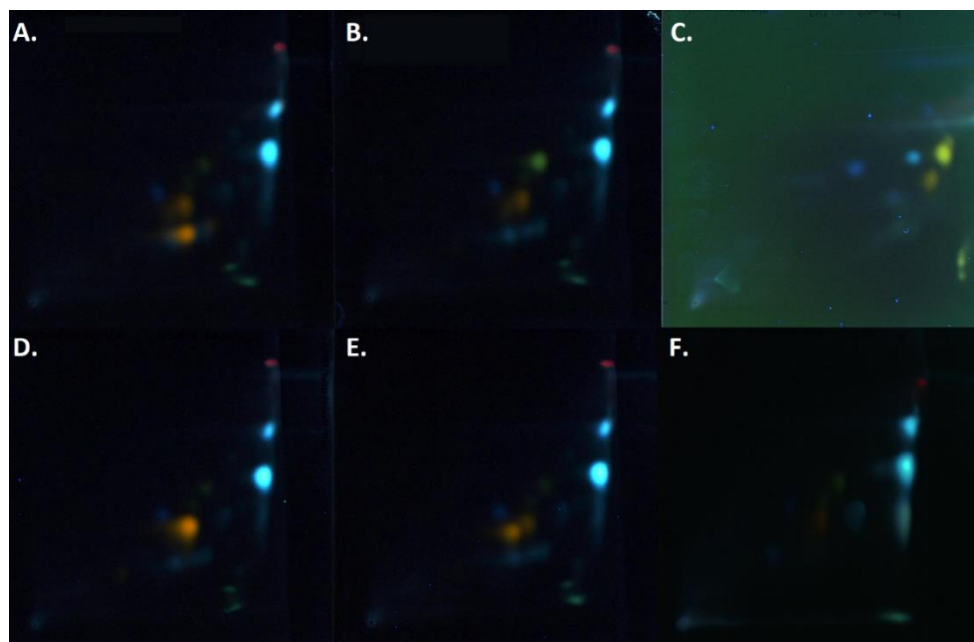
Porównanie zespołów polifenoli w ekstraktach z liści żywokostu otrzymanych w aparacie Soxhleta z dwiema innymi technikami ekstrakcji – maceracją i ekstrakcją wspomaganą ultradźwiękami pozwoliło odnotować różnicę w liczbie glikozydów flawonoidowych [żółtozielono fluoryzujące pasma – pochodne kemferolu, pomarańczowo fluoryzujące – pochodne kwercetyny (170, 190)]. Wyciągi otrzymane w temperaturze pokojowej charakteryzowały się obecnością dwóch dodatkowych związków stanowiących glikozydy kemferolu i kwercetyny (Ryc. 39).



Ryc. 39: Chromatogramy 2D TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego (DRf) otrzymanych różnymi metodami ekstrakcji ( $\lambda$ -366 nm. A – maceracja, B – ekstrakcja w aparacie Soxhleta, C – ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami). Płytką: TLC Si60<sub>F254</sub>; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV:  $\lambda$ -366 nm.

Co potwierdzono ko-chromatografią wyciągu z liścia z żywokostu (**Hf**) z dostępnymi substancjami wzorcowymi: 3-*O*-(6''-malonylo)-glukozydem kwercetyny ( $R_{f1}$ -0,27,  $R_{f2}$ -0,60), 3-*O*-glukozydem kemferolu ( $R_{f1}$ =0,54,  $R_{f2}$ =0,69), 3-*O*-galaktozydem kemferolu ( $R_{f1}$ -0,58 ,  $R_{f2}$ -

0,85), 3-*O*-glukozydem kwercetyny ( $R_{f1}=0,37$ ,  $R_{f2}=0,65$ ), 3-*O*-galaktozydem kwercetyny ( $R_{f1}=0,34$ ,  $R_{f2}=0,58$ ) i wyizolowanym z korzenia żywokostu globoidnanem A ( $R_{f1}=0,43$ ,  $R_{f2}=0,92$ ) (Ryc. 40). 3-*O*-(6''-malonylo)-glukozydy kemferolu i kwercetyny stanowią składniki ziela miodunki plamistej, gatunku pochodzącego z rodziny *Boraginaceae*, charakteryzującego się również obecnością globoidnanu A (137).

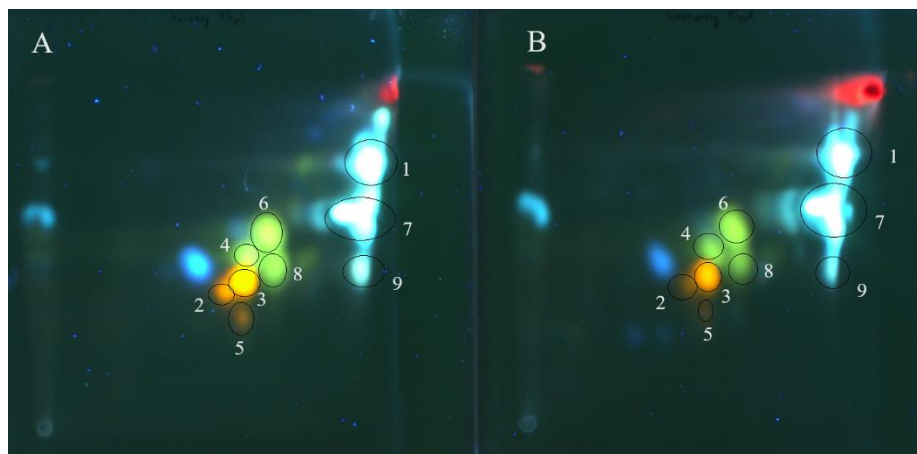


Ryc. 40: Chromatogramy 2D TLC wyciągu z liści żywokostu lekarskiego (Hf; 15  $\mu$ l) z dodatkiem wzorców (2  $\mu$ l) związków fenolowych. Płytki: TLC Si60<sub>F254</sub>; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV:  $\lambda$ -366 nm. A – 3-*O*-(6''-malonylo)glukozyd kwercetyny; B – 3-*O*-glukozyd kemferolu; C – 3-*O*-galaktozyd kemferolu; D – 3-*O*-glukozyd kwercetyny; E – 3-*O*-galaktozyd kwercetyny, F – globoidnan A.

Zgodnie z zaobserwowanymi wcześniej różnicami w profilach chemicznych wyciągów z liści żywokostu otrzymanych różnymi metodami ekstrakcji, 3-*O*-(6''-malonylo)-glukozyd kwercetyny i 3-*O*-(6''-malonylo)-glukozyd kemferolu były nieobecne w wyciągu uzyskanym metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta, co może być spowodowane temperaturą ogrzewania (łaźnia wodna, temp. wrzenia rozpuszczalnika ok. 80°C) otrzymanego w temperaturze pokojowej ekstraktu i rozkładu obydwu związków. Wpływ podwyższonej temperatury na rozkład 3-*O*-(6''-malonylo)-glukozydu kwercetyny i 3-*O*-(6''-malonylo)-glukozydu kemferolu obserwowano w procesie suszenia soku z czarnej porzeczki (*Rubus nigrum* L.) – wyciągi suche otrzymane poprzez suszenie próżniowe w temperaturze 90°C charakteryzowały się niemal 2-krotnie niższą zawartością 3-*O*-(6''-malonylo)glukozydu kwercetyny (24,5-36,7 mg/kg db) niż przy

zastosowaniu temperatury 50°C i 70°C (30,9-64,4 mg/kg db i 31,2-61,7 mg/kg db, kolejno) (194).

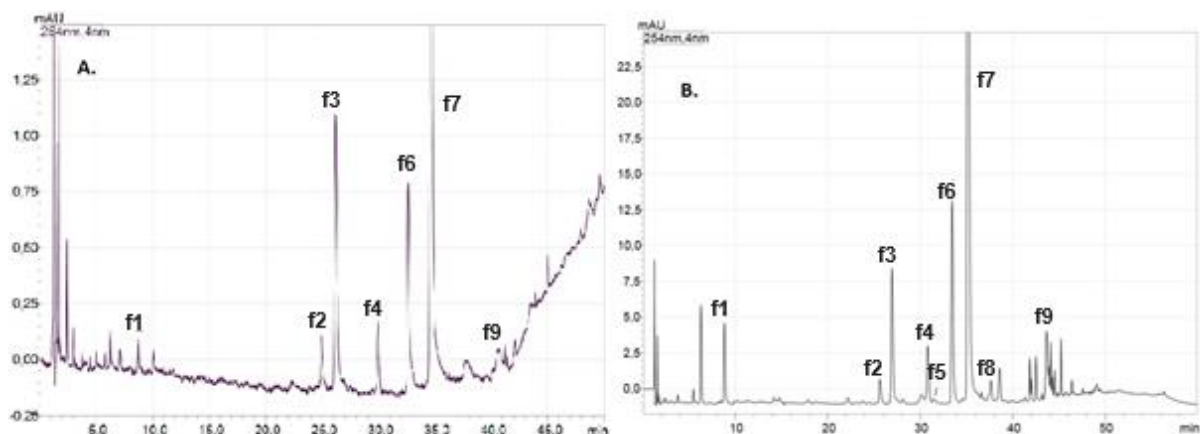
Porównanie metodą 2D TLC profili chemicznych wyciągów metanolowych z wysuszonego (temp. suszenia po zbiorze 35°C) i świeżego liścia żywokostu otrzymanych metodą maceracji, potwierdziło wniosek o negatywnym wpływie warunków ekstrakcji z użyciem aparatu Soxhleta na trwałość estrów malonylowych glikozydów kemferolu i kwercetyny (Ryc. 41).



Ryc. 41: Chromatogramy 2D TLC wyciągów ze świeżych (A) i suszonych (B) liści żywokostu lekarskiego (DRf). Płytki: TLC Si60<sub>F254</sub>; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV:  $\lambda$ -366 nm. Różnice w intensywności plam wynikają z aplikacji różnych stężeń wyciągu. Numeracja związków odpowiada Tabeli 10.

#### 3.1.4. Analiza jakościowa zespołu polifenoli z liścia żywokostu lekarskiego metodami HPLC

Rozdzielenie chromatograficzne HPLC wyciągu metanolowego z liścia żywokostu (DPf) przeprowadzono na kolumnie Kinetex C-18 z użyciem, opisanych wcześniej, warunków opracowanych dla wyciągu z korzenia żywokostu (program elucji gradientowej II, temperatura kolumny: T-35°C, detekcja UV:  $\lambda$ -254 nm). Uzyskane wyniki potwierdziły obecność w badanym wyciągu nieopisanych wcześniej w liściach żywokostu związków z grupy glikozydów flawonoidowych, wstępnie rozpoznanych metodą TLC (Tabela 10). Ponadto, potwierdzono różnice w profilach chemicznych pomiędzy surowcem ekstrahowanym w podwyższonej temperaturze (aparat Soxhleta), a ekstrakcją w temperaturze pokojowej (maceracja) (Ryc. 41).



Ryc. 42: Chromatogram HPLC wyciągów metanolowych z liścia żywokostu (DRf) uzyskanych dwoma metodami (A – ekstrakcja w aparacie Soxhleta, rozcieńczenie 1:1; B – maceracja (48 h), rozcieńczenie 1:10). Kolumna: Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm), T - 35°C, elucja gradientowa: program II, detekcja UV  $\lambda$ -254 nm. Numeracja związków odpowiada *Tabela 10*.

W oparciu o otrzymane dane widm UV i ESI-MS oraz porównanie z wzorcami, zidentyfikowano metodą HPLC-DAD-ESI-MS jako piki **f1** i **f7** odpowiednio kwasy –  **kwas kawowy** i  **kwas rozmarynowy** oraz pik **f9** jako dotychczas wykryty jedynie w częściach podziemnych rośliny **globoidnan A** (*Tabela 10*).

*Tabela 10*: Kwasy fenolowe i flawonoidy zidentyfikowane w liściu żywokostu lekarskiego metoda HPLC-DAD-ESI-MS

L.p.	Nazwa związku	$[M+H]^+ / [M+H]^-$ [m/z]	UV <sub>max</sub> [nm]
f1.	Kwas kawowy**	179 <sup>+</sup>	295sh, 321
f2.*	3-O-galaktozyd kwercetyny**	465 <sup>+</sup> / 463 <sup>-</sup>	254, 266sh, 353
f3.*	3-O-glukozyd kwercetyny**	465 <sup>+</sup> / 463 <sup>-</sup>	256, 266sh, 349
f4.*	3-O-galaktozyd kemferolu	449 <sup>+</sup> / 447 <sup>-</sup>	262, 295sh, 349
f5.*	3-O-(6''-malonylo)glukozyd kwercetyny**	551 <sup>+</sup>	254, 266sh, 348
f6.*	3-O-glukozyd kemferolu**	449 <sup>+</sup> / 447 <sup>-</sup>	263, 296sh, 347
f7.	Kwas rozmarynowy**	361 <sup>+</sup> / 359 <sup>-</sup>	217, 288sh, 328
f8.*	3-O-(6''-malonylo)glukozyd kemferolu	435 <sup>+</sup> / 533 <sup>-</sup>	264, 294sh, 347
f9.*	Globoidnan A**	493 <sup>+</sup> , 983 <sup>+</sup> / 491 <sup>-</sup>	259, 317

Objaśnienia: \* - związki nieopisywane dotąd w surowcu; \*\* - związki, których tożsamość została potwierdzona z użyciem substancji wzorcowych.

W widmach masowych ESI-MS związków **f2** i **f3** obserwowano obecność jonów molekularnych przy  $m/z$  463  $[M+H]^-$  w trybie jonów ujemnych i 465  $[M+H]^+$  w trybie dodatnim wskazujące na

masę cząsteczkową związków wynoszącą 464 Da. Jednocześnie, podobnie jak dla związku **f5**, w którego widmie ESI-MS obecny był jon molekularny przy  $m/z$  551  $[M+H]^+$  co wskazywało na masę cząsteczkową 550 Da – maksima absorpcji widm UV były charakterystyczne dla pochodnych kwercetyny: 254-256, 266sh, 348-349. W oparciu o powyższe dane zidentyfikowano związki **f2**, **f3** i **f5** jako glikozydy kwercetyny. Na podstawie masy cząsteczkowej związku **f5** wyznaczonej przez jon molekularny przy  $m/z$  551  $[M+H]^+$  jako 3-*O*-(6''-malonylo)-glukozyd kwercetyny – estru glikozydu kwercetyny z kwasem malonowym.

W otrzymanych widmach UV związków **f4**, **f6** i **f8** maksima absorpcji I i II były w zakresach charakterystycznych dla pochodnych kemferolu (262-264, 294-296sh, 347-349). Na podstawie obecności w widmach ESI-MS jonów molekularnych przy  $m/z$  447  $[M+H]^-$  w trybie jonów ujemnych i 449  $[M+H]^+$  w trybie jonów dodatnich (związki **f4** i **f6**) oraz przy  $m/z$  533<sup>-</sup> w trybie ujemnym (związek **f8**) wymienione związki zidentyfikowano jako kolejno: 3-*O*-galaktozyd kemferolu, 3-*O*-glukozyd kemferolu i 3-*O*-(6''-malonylo)-glukozyd kemferolu.

### 3.2. Analiza ilościowa polifenoli z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego metodą HPLC-DAD-UV/Vis

#### 3.2.1. Korzenie żywokostu

W oparciu o przeprowadzoną analizę ilościową kwasu kawowego i jego trzech pochodnych – globoidnanów A i B oraz kwasu rozmarynowego, porównano dystrybucję i udział poszczególnych fenolokwasów w dostępnych substancjach roślinnych stanowiących korzenie żywokostu, pochodzące z różnych źródeł (4.1). Otrzymane wyniki wykazały znaczące różnice w zawartościach estrów pochodnych kwasu kawowego w badanych substancjach czynnych roślinnych (Tabela 11).

Tabela 11: Zawartość (mg/g s.m.) kwasu kawowego oraz jego pochodnych (globoidnan B, kwas rozmarynowy, globoidnan A) w badanych korzeniach żywokostu lekarskiego oznaczona z użyciem opracowanej metody HPLC-DAD-UV/Vis.

Korzeń żywokostu/ pochodzenie	Kwas kawowy <sup>1</sup> (mg/g s.m.)	Globoidnan B <sup>2</sup> (mg/g s.m.)	Kwas rozmarynowy <sup>2</sup> (mg/g s.m.)	Globoidnan A <sup>2</sup> (mg/g s.m.)
<b>Fr<sup>a</sup></b>	0,1108 ± 0,0040 <sup>egh</sup>	0,551 ± 0,023 <sup>ceh</sup>	1,180 ± 0,021 <sup>bcefg</sup>	1,084 ± 0,019 <sup>egh</sup>
<b>DNr<sup>b</sup></b>	0,1120 ± 0,0027 <sup>egh</sup>	0,531 ± 0,028 <sup>eh</sup>	1,714 ± 0,062 <sup>acdeh</sup>	0,883 ± 0,029 <sup>eg</sup>

<b>DPr<sup>c</sup></b>	0,1081 ± 0,0067 <sup>gh</sup>	0,371 ± 0,101 <sup>afgh</sup>	0,49 ± 0,14 <sup>abdfg</sup>	0,78 ± 0,32 <sup>eg</sup>
<b>EHR<sup>d</sup></b>	0,1084 ± 0,0067 <sup>gh</sup>	0,478 ± 0,021 <sup>gh</sup>	1,051 ± 0,030 <sup>bcfg</sup>	1,0457 ± 0,0053 <sup>egh</sup>
<b>Lu<sup>e</sup></b>	0,0976 ± 0,0049 <sup>abf</sup>	0,338 ± 0,020 <sup>abfgh</sup>	0,695 ± 0,023 <sup>abfg</sup>	0,2350 ± 0,0061 <sup>abcdf</sup>
<b>Za<sup>f</sup></b>	0,1104 ± 0,0027 <sup>egh</sup>	0,596 ± 0,093 <sup>eh</sup>	1,57 ± 0,33 <sup>acdeh</sup>	0,98 ± 0,24 <sup>eg</sup>
<b>Łó<sup>g</sup></b>	0,0927 ± 0,0014 <sup>abcdf</sup>	0,657 ± 0,017 <sup>cde</sup>	1,800 ± 0,061 <sup>acdeh</sup>	0,199 ± 0,015 <sup>abcdf</sup>
<b>Gd<sup>h</sup></b>	0,0880 ± 0,0015 <sup>abcdf</sup>	0,920 ± 0,093 <sup>abcdefg</sup>	0,852 ± 0,086 <sup>bfg</sup>	0,587 ± 0,066 <sup>ad</sup>

Objaśnienia: <sup>1</sup>W przeliczeniu na kwas kawowy, <sup>2</sup>W przeliczeniu na kwas rozmarynowy; <sup>abcdeh</sup> Statystycznie istotne różnice w zawartości fenolokwasów ( $p < 0,05$ ) pomiędzy analizowanymi korzeniami; różnice są wyrażone tą samą literą (test Tukeya).

Najniższe stężenia odnotowano dla kwasu kawowego (**1**), którego zawartość w korzeniach żywokostu kształtowała się w zakresie 0,088-0,112 mg/g s.m. Obserwowano, że obecność tego związku jest zależna od pochodzenia materiału roślinnego – surowce z ogrodów botanicznych (**Lu**, **Łó**, **Gd**) charakteryzowały się statystycznie istotnie niższą zawartością kwasu kawowego (0,088-0,0976 mg/g s.m.) niż surowce pochodzące z firm zielarskich (**Fr**, **DNr**, **DPr**, **EHR**; 0,1081-0,112 mg/g s.m.). Wyjątek stanowi pochodzący z ogrodu botanicznego korzeń żywokostu **Za** o zawartości kwasu kawowego (0,1104 ± 0,0027 mg/g s.m.) na poziomie surowców dostępnych komercyjnie (**Fr**, **DNr**, **DPr**, **EHR**). Zależność ta nie była obserwowana dla pozostałych związków – estrów pochodnych kwasu kawowego (związki **2**, **3**, **4** i **5**). Odnotowane statystycznie istotne różnice pomiędzy poszczególnymi surowcami występują niezależnie od pochodzenia materiału roślinnego i muszą być związane z innymi czynnikami. *Trifan* i wsp. (195) jako jedną z potencjalnych przyczyn obserwowanych różnic w oznaczonych przez nich zawartościach pochodnych kwasu kawowego w korzeniach żywokostu sugerowali wpływ czasu przechowywania wysuszonych surowców. W opublikowanym badaniu odnotowali spadek stężeń poszczególnych związków pomiędzy 1. a 6. miesiącem po zbiorze – o 30-47% dla kwasu rozmarynowego, 19-60% dla globoidnanu A, 25-50% dla globoidnanu B i 29-63% dla rabdozyny. Wiarygodność sformułowanych przez *Trifan* i wsp. (195) wniosków, podważać może

fakt odnotowania w niektórych z badanych przez nich surowców, w 2. i 3. miesiącu przechowywania, najwyższych stężeń wybranych związków pochodnych kwasu kawowego, (195). Przeprowadzone badania, w ramach niniejszej dysertacji wykluczają wpływu czasu przechowywania na zawartość pochodnych kwasu kawowego, ponieważ badane surowce pochodzące z ogrodów botanicznych były zbierane w zbliżonym okresie (okres jednego miesiąca – 23.10-23.11.2018), będących przedmiotem badań (**Lu**, **Łó**, **Gd** i **Za**).

Otrzymane w toku niniejszej pracy wyniki dla wyciągów metanolowych z korzenia żywokostu (z wyjątkiem surowców **DPr** –  $0,49 \pm 0,14$  mg/g s.m. i **Lu** –  $0,695 \pm 0,023$  mg g/s.m.) w większości mieszczą się w zakresach podawanych w piśmiennictwie - kwas rozmarynowy (**4**) był obecny w wyciągach wodnych z surowca w zakresie 0,85-1,27 mg/g (59, 60) do 1,94 mg/g w wyciągu wodno-etanolowym (61, 62) W dwóch badanych w ramach niniejszej dysertacji korzeniach żywokostu kwas rozmarynowy nie jest związkiem dominującym, występując w stężeniu niższym niż globoidnan A (**DPr**) lub globoidnan B (**Gd**). Wysoki udział globoidnanu A (**5**) w zespole związków fenolowych korzenia żywokostu lekarskiego ujawnili w *Trifan* i wsp. (62), i stanowił on związek dominujący w 6 spośród 16 analizowanych korzeni (wyciągi wodno-alkoholowe). Po raz pierwszy zaobserwowano dominację w zespole związków polifenolowych korzenia żywokostu globoidnanu B (**3**) – surowiec **Gd**.

### 3.2.2. Liście żywokostu

Wszystkie analizowane liście żywokostu charakteryzowały się wyższą zawartością kwasu kawowego (0,139-0,194 mg/g s.m.) i kwasu rozmarynowego (1,911-2,4 mg/g s.m.) (Tabela 12) w porównaniu do badanych korzeni żywokostu (Tabela 11).



Tabela 12: Zawartość fenolokwasów (mg/g s.m.) oraz glikozydów flawonoidowych (µg/g s.m.) w badanych liściach żywokostu lekarskiego oznaczona z użyciem opracowanej metody HPLC-DAD-UV/Vis.

Liść żywokostu / pochodzenie	Kwas kawowy [mg/g s.m.]	Kwas rozmarynowy [mg/g s.m.]	3-O-galaktozyd kwercetyny* [µg/g s.m.]	3-O-glukozyd kwercetyny [µg/g s.m.]	3-O-galaktozyd kemferolu* [µg/g s.m.]	3-O-glukozyd kemferolu [µg/g s.m.]
<b>EH<sup>f</sup></b>	0,1390 ± 0,0077 <sup>c</sup>	1,911 ± 0,027 <sup>c</sup>	85,07 ± 0,75 <sup>bc</sup>	250,6 ± 3,8 <sup>bc</sup>	95,62 ± 2,06 <sup>c</sup>	148,2 ± 3,4 <sup>c</sup>
<b>DP<sup>f</sup></b>	0,127 ± 0,010 <sup>c</sup>	2,05 ± 0,16 <sup>c</sup>	100,6 ± 6,6 <sup>ac</sup>	259,62 ± 0,81 <sup>ac</sup>	110,22 ± 1,59 <sup>c</sup>	167,0 ± 3,4 <sup>c</sup>
<b>H<sup>f</sup></b>	0,194 ± 0,017 <sup>ab</sup>	2,40 ± 0,16 <sup>ab</sup>	235 ± 11 <sup>ab</sup>	959,1 ± 1,5 <sup>bc</sup>	210,1 ± 1,3 <sup>ab</sup>	386 ± 12 <sup>ab</sup>

\*w przeliczeniu na 3-O-galaktozyd kwercetyny; <sup>abc</sup> Statystycznie istotne różnice w zawartości oznaczanych związków (p < 0,05) pomiędzy analizowanymi próbkami; różnice są wyrażone tą samą literą (test Tukeya).

Oznaczono zawartości, ujawnionych po raz pierwszy w liściu żywokostu, glikozydów flawonoidowych – 3-O-glukozydów i galaktozydów kwercetyny i kemferolu, natomiast niemożliwym było oznaczenie zawartości ich estrów malonylowych (zawartość poniżej LOQ). Obserwowano duże zróżnicowanie w zawartościach glikozydów flawonoidowych w liściach żywokostu, podobnie jak dla pochodnych kwasu kawowego w korzeniu żywokostu. Surowiec **H<sup>f</sup>** charakteryzował się ponad 2-krotnie wyższą zawartością 3-O-galaktozydu kwercetyny, 3-O-galaktozydu kemferolu i 3-O-glukozydu kemferolu oraz niemal 4-krotnie wyższym stężeniem 3-O-glukozydu kwercetyny (Tabela 12).

Rozpoznane po raz pierwszy w liściu żywokostu lekarskiego glikozydy flawonoidów, obok pochodnych kwasu kawowego, mogą odgrywać znaczącą rolę w jego aktywności przeciwutleniającej i pośrednio przeciwzapalnej. Charakteryzują się one wielokierunkowym mechanizmem działania antyoksydacyjnego, obejmującym między innymi wymiatanie wolnych rodników i ROS, hamowanie aktywności enzymów uczestniczących w procesach oksydacyjnych (m.in. oksydazy ksantynowej, syntazy tlenu azotu) oraz zdolnością do tworzenia kompleksów z kationami metali (196, 197).

### 3.2.3. Walidacja metody ilościowej

Opracowaną metodę poddano walidacji w zakresie liniowości, granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), precyzji jedno- i międzydniowej, wykazując, że metoda jest powtarzalna, precyzyjna i liniowa oraz charakteryzuje się zadowalającym odzyskiem dla kwasu rozmarynowego na poziomie dodatku wzorca 50% - CV 103,56%, 100% - CV107,25% i 150% - CV 107,82% (Tabela 13).

Tabela 13: Parametry walidacyjne dla oznaczeń zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów metodą HPLC-UV/Vis w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego

Parametr walidacyjny	Kwas kawowy	Kwas rozmarynowy	3-O-glukozyd kwercetyny	3-O-glukozyd kemferolu
Krzywa regresji	$Y = 1641,8x - 12817$	$Y = 3191,4x - 12526$	$Y = 1596x - 1198,1$	$Y = 1524,2x - 61,522$
Współczynnik korelacji	0,9999	0,9999	0,9995	0,9998
LOD [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,122	0,3789	0,700	0,469
LOQ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,366	1,136	2,332	1,5625
Odzysk $\pm$ CV [%]	50%	-	103,56	-
	100%	-	107,25	-
	150%	-	107,82	-
Precyzja [CV%]	Jednodniowa	1,038	1,086	0,686
	Międzydniowa	5,12	6,82	1,030

## 4. Analiza chromatograficzna alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego

Substancje roślinne stanowiące korzeń i liście żywokostu lekarskiego, oprócz substancji czynnych o właściwościach terapeutycznych (alantoiny, kwasów fenolowych, flawonoidów), stanowią źródło związków o potwierdzonej aktywności hepatotoksycznej – alkaloidów pirolizydynowych (PAs; *pyrrolizidine alkaloids*). Zagadnienia związane z regulacjami EMA, uwzględniającymi bezpieczeństwo stosowania korzenia i liści żywokostu zostały szczegółowo omówione w rozdziale 1.5 części teoretycznej.

Pomimo obowiązujących ograniczeń czasowych w stosowaniu korzenia żywokostu, wynikających z obecności alkaloidów pirolizydynowych, dane o profilu jakościowym i ilościowym tej grupy związków w surowcu są wrywkowe. Badania ostatnich lat nie tylko

wykazały błędy w identyfikacji niektórych alkaloidów – wykluczając obecność wymienianych m.in. w raporcie EMA z 2015 roku (22) lazjokarpiny, mioskopiny, symwirydiny oraz echimidyny (62, 67) – ale także dostarczyły nowych informacji o poziomie toksyczności intermedyny, likopsaminy i ich *N*-tlenków, uważanych za związki alkaloidowe dominujące w surowcu. Najnowsze doniesienia o silniejszym działaniu cytotoksycznym i hepatotoksycznym likopsaminy i jej *N*-tlenku, w porównaniu do ich stereoizomerów – intermedyny i jej *N*-tlenku (40, 41) – generują konieczność opracowania bardziej efektywnych systemów chromatograficznej separacji, szczególnie form izomerycznych alkaloidów. W większości prac dotyczących analizy chromatograficznej alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu żywokostu nie uzyskano dotychczas pełnej separacji par stereoizomerów (62, 198), a więc nie określono stosunku ilościowego alkaloidów charakteryzujących się zróżnicowaną hepatotoksycznością.

Obecnie, ze względu na wysoką czułość, selektywność i specyficzność, metodą pierwszego wyboru w analizie alkaloidów pirolizydynowych jest UHPLC lub HPLC w sprzężeniu ze spektrometrią mas (187, 199). W obowiązującym, 11. wydaniu Farmakopei Europejskiej (200) opublikowano monografię opisującą warunki metody LC-MS/MS dla oznaczania Pas, w tym likopsaminy, intermedyny i ich *N*-tlenków oraz *N*-tlenku echimidyny, jako zanieczyszczeń w substancjach czynnych roślinnych. W analizie alkaloidów pirolizydynowych wykorzystywane są również metody chromatografii gazowej (GC), jednak konieczność przeprowadzenia ich derywatywacji, ze względu na niską lotność oraz ryzyko rozkładu termicznego, szczególnie termolabilnych *N*-tlenków, w trakcie procesu chromatograficznego, może powodować, że otrzymane wyniki oznaczeń ilościowych będą obciążone dużym błędem (187).

W toku przeprowadzonych badań opracowano metodę HPLC-MS/MS umożliwiającą uzyskanie efektywnego rozdzielania poszczególnych alkaloidów pirolizydynowych, obecnych w korzeniach i liściach żywokostu lekarskiego, celem ich analizy jakościowej i ilościowej. Opracowaną metodę wykorzystano w analizie porównawczej zespołów alkaloidów pirolizydynowych w korzeniach i liściach żywokostu a wyniki przeprowadzonych analiz posłużyły do rozważenia bezpieczeństwa stosowania tych surowców, z uwzględnieniem również najnowszych danych literaturowych (40, 41).

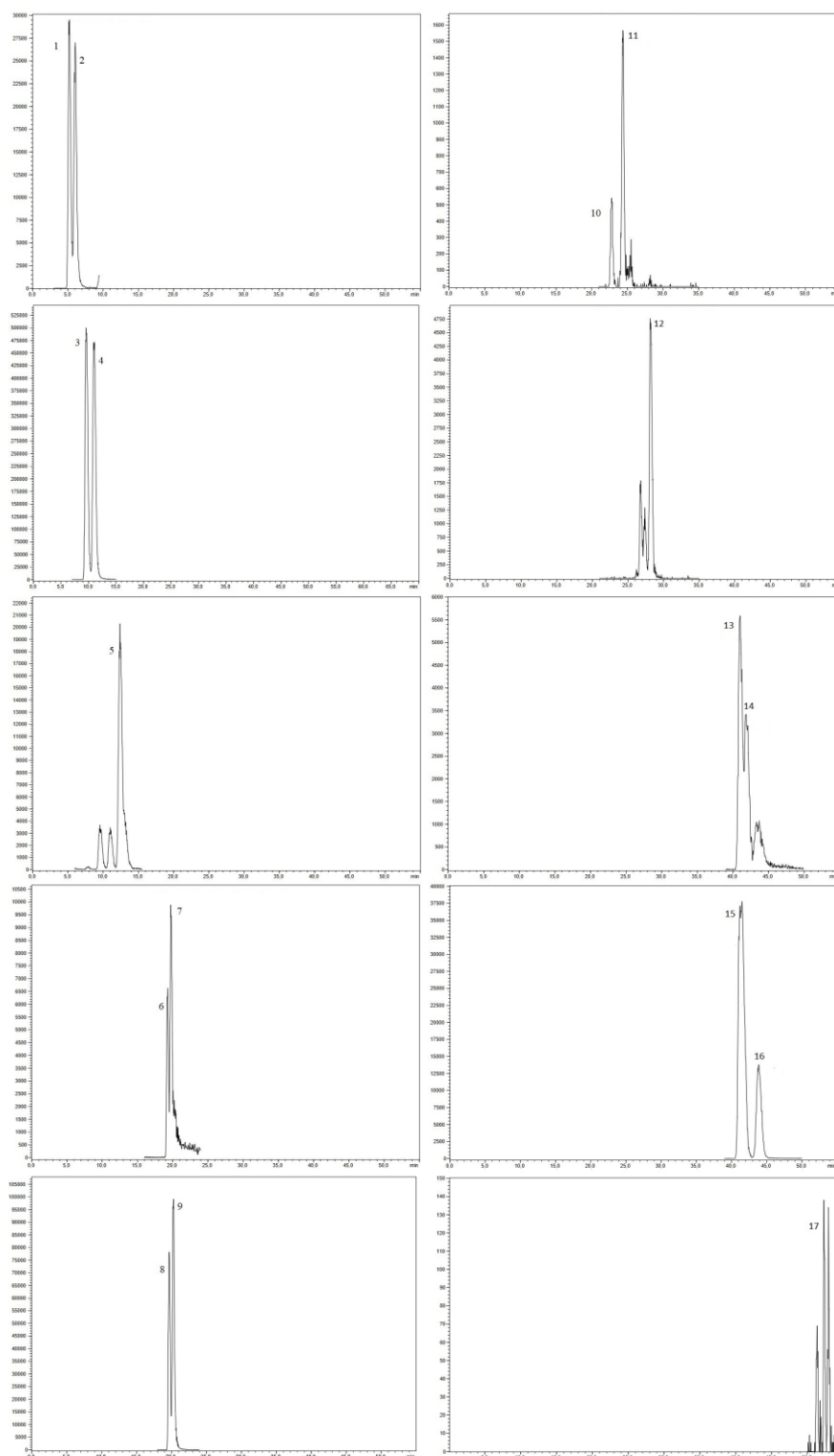
#### 4.1. Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego HPLC-MS/MS

Warunki rozdzielania chromatograficznego alkaloidów pirolizydynowych optymalizowano w odniesieniu do dotychczasowych danych literaturowych (62, 198, 201), dążąc do uzyskania efektywnego rozdzielania poszczególnych par stereoizomerów. Przeprowadzono próby modyfikacji różnych rozwiązań proponowanych w publikacjach naukowych z obszaru analizy HPLC alkaloidów pirolizydynowych (42, 193, 196).

Analizy chromatograficzne alkaloidów pirolizydynowych z użyciem HPLC prowadzone są najczęściej w temperaturze 40°C (13, 67, 202-204). *Altamirano* i wsp. (198) obserwowali znaczący wpływ temperatury na separację niektórych par izomerów alkaloidów pirolizydynowych przy zastosowaniu zmiennego gradientu temperatury (50°C i 15°C). Obniżenie temperatury analizy do 15°C w połowie gradientu elucji pozwoliło im na uzyskanie separacji pików należących do symfytyny, *N*-tlenku symfytyny i ich izomerów. Z kolei w badaniach alkaloidów pirolizydynowych w innych surowcach z rodziny *Boraginaceae* – *S. cordatum* (205) i *Echium vulgare* (201) zastosowano stałą temperaturę 25°C. Uwzględniając te dane przeprowadzono próby separacji alkaloidów pirolizydynowych przy różnych temperaturach kolumny w zakresie 25-40°C. W konsekwencji zdecydowano o obniżeniu temperatury analizy do 25°C, co pozwoliło na uzyskanie efektywnego rozdzielania intermedyny, likopsaminy i ich *N*-tlenków umożliwiającego ich oznaczenie ilościowe.

Po pierwszych nieefektywnych próbach użycia programu elucji gradientowej oraz mieszanin rozpuszczalników opisanych przez *Altamirano* i wsp. (198) modyfikowano warunki separacji stosując jako eluent 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w mieszaninie acetonitryl-woda 50:50 (v/v), zamiast czystego acetonitrylu (198). Opracowano cztery programy elucji gradientowej, które charakteryzowały się również stopniowym wydłużaniem czasu elucji na wybranych etapach gradientu (programy elucji gradientowej V-VIII, 3.2.2.3). Spośród użytych czterech programów elucji gradientowej najbardziej efektywny okazał się program VIII, który umożliwił uzyskanie efektywnego rozdzielania także pochodnych symfytyny i symlandyny (Ryc. 43). W rezultacie w analizie PAs zastosowano kolumnę Kinetex C-18 (2,6 μm, 2,1 x 100 mm) oraz program elucji gradientowej VIII charakteryzujący się elucją w zmiennym gradiencie stężenia fazy D stanowiącej mieszaninę acetonitryl-woda-kwas mrówkowy (50:50:0,1) w 0,1% roztworze kwasu mrówkowego w wodzie według programu: 0-1,5 min – 10% D, 2-3 min – 8%

D, 9 min – 9% D, 10-13 min – 10% D, 15 min – 18% D, 23-31 min – 25% D, 33-45 min – 30% D, 46 min – 40% D, 55 min – 70% D, 65-65 min – 100% D, 68-83 min – 10% D.



Ryc. 43: Chromatogramy TIC (*total ion chromatogram*) uzyskane w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM, *multiple-reaction monitoring*) alkaloidów pirolizydowych obecnych w wyciągu metanolowym z korzenia żywokostu lekarskiego (DPr) rozdzielonych z użyciem opracowanej metody HPLC-MS/MS. Kolumna Kinetex C-18 (100 x 2,1 mm), elucja gradientowa: program VIII. Numeracja pików zgodnie z *Tabela 14*.

#### 4.2. Identyfikacja alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego opracowaną metodą LC-MS/MS

Analizę jakościową alkaloidów pirolizydynowych obecnych w badanych korzeniach i liściach żywokostu prowadzono z użyciem dostępnych substancji wzorcowych (intermedyna, likopsamina, *N*-tlenek intermedyny) oraz opisanych w literaturze charakterystycznych przejść  $MS^2$  i  $MS^3$  dla poszczególnych związków alkaloidowych (13, 62, 206, 207) (Tabela 14).

*Tabela 14:* Dane chromatograficzne (nazwa związku,  $t_R$  [min],  $[M+H]^+$  [ $m/z$ ],  $MS^2$  [ $m/z$ ], energia kolizji CE [eV]) uzyskane dla wykrytych alkaloidów pirolizydynowych obecnych w wyciągach metanolowych z korzeni i liści żywokostu lekarskiego. Identyfikację związków przeprowadzono w oparciu o dane literaturowe (13, 62, 206, 207) oraz dostępne substancje wzorcowe (\*).

L.p.	Nazwa związku	Czas retencji (min)	Jon prekursorowy $[M + H]^+$ ( $m/z$ )	$MS^2$ ( $m/z$ ) (CE [eV])
1	Intermedyna*	5,25	300,1	94.1 (-28), 138.05 (-19), 156.1 (-30)
2	Likopsamina*	6,07	300,1	94.1 (-28), 156.05 (-30), 138.1 (-20)
3	<i>N</i> -tlenek intermedyny*	9,62	316,1	172.05 (-28), 138.05 (-29), 111 (-42)
4	<i>N</i> -tlenek likpsaminy	11,04	316,1	172.05 (-28), 138.05 (-29), 111 (-42)
5	<i>N</i> -tlenek dihydrointermedyny / <i>N</i> -tlenek dihydrolikopsaminy	12,48/13,16	318,2	174.1 (-30), 113.05 (-40), 156.1 (-40)
6	7'-acetylointermedyna	19,28	342,2	120.07 (-25), 180.09 (-15), 198.07 (-30)
7	7'-acetylolikopsamina	19,66	342,2	120.08 (-25), 180.1 (-15), 198.08 (-30)
8	<i>N</i> -tlenek 7'-acetylointermedyny	19,76	358,1	214.01 (-30), 180.09 (-30), 137.08 (-30)
9	<i>N</i> -tlenek 7'-acetylolikopsaminy	20,25	358,1	214.01 (-30), 180.1 (-30), 137.07 (-30)
10	<i>N</i> -tlenek 7'-sarracynylo-9-trachelantylotretronecy ny	22,79	414,2	270.1 (-30), 120.07 (-40), 137.08 (-40)
11	<i>N</i> -tlenek 7'-sarracynylo-9-wiridiflorynolretronecy ny	24,31	414,2	270.1 (-30), 137.08 (-35), 120.08 (-45)
12	<i>N</i> -tlenek echimidyny	26,20/27,27/28,14	414,2	254.1 (-30), 396.07 (-25), 352.1 (-25), 137.08 (-30)
13	Symfityna	40,92	382,2	120.08 (-25), 238.1 (-30), 220.1 (-15), 138.08 (-35)

<b>14</b>	Symlandyna	41,86	382,2	120.07 (-25), 220.1 (-15), 238.1 (-30), 138.08 (-35)
<b>15</b>	<i>N</i> -tlenek symfytyny	41,14	398,2	254.1 (-30), 137.07 (-35), 220.1 (-15)
<b>16</b>	<i>N</i> -tlenek symlandyny	43,83	398,2	254.1 (-30), 137.08 (-35), 220.1 (-15)
<b>17</b>	<i>N</i> -tlenek 3'-acetylosymfytyny i jego izomery	51,28/52,79/ 52,31/52,96	440,2	254.1 (-30), 220.1 (-30), 137.07 (-40), 120.07 (-35)

Intermedyna (**1**) i likopsamina (**2**), które zostały zidentyfikowane poprzez porównanie z substancjami wzorcowymi (kolejność elucji:  $t_{R1} < t_{R2}$ ), charakteryzują się nieznacznymi różnicami w intensywności pików drugiego i trzeciego przejścia w widmach MS, mianowicie dla intermedyny:  $MS^2 300,1 > 138,05 (m/z)$  i  $MS^3 300,1 > 156,1 (m/z)$ ,  $Q(ii)/Q(i)$  0,63, a dla likopsaminy odpowiednio,  $MS^2 300,1 > 156,1 (m/z)$  i  $MS^3 300,1 > 138,05 (m/z)$ ,  $Q(ii)/Q(i)$  0,51 (62, 206). Podobną kolejność elucji obserwowano dla *N*-tlenków intermedyny (**3**) i likopsaminy (**4**) – pik **3** o czasie retencji 9,62 min, odpowiadającym  $t_R$  wzorca, został rozpoznany jako *N*-tlenek intermedyny, a jego izomer o takich samych wartościach przejść w widmach masowych widoczny jako pik **4** o wartości  $t_R$  11,04 min zidentyfikowano jako *N*-tlenek likopsaminy. Kolejność elucji oraz charakterystyka przejść MS odpowiadają wcześniejszym doniesieniom literaturowym, które umożliwiły również przypisanie pików **6**, **7**, **8** i **9** kolejno do 7'-acetylointermedyny, 7'-acetylolikopsaminy oraz ich odpowiednich *N*-tlenków (Tabela 14) (62, 206).

Rozróżnienie pików sarracynylowych pochodnych – *N*-tlenku 7'-sarracynilo-9-trachelantylotretronecyny (**10**) i *N*-tlenku 7'-sarracynilo-9-wiridiflorynolretronecyny (**11**) od *N*-tlenku echimidyny (**12**) przeprowadzono w oparciu o wcześniejsze dane pochodzące z badań nad alkaloidami pirolizydynowymi w korzeniu żywokostu (62) oraz ziołowych herbatach i miódach (202, 207). Na ich podstawie określono charakterystyczne przejścia dla *N*-tlenku echimidyny (**12**) jako:  $414,2 > 254,1 (m/z)$ ,  $414,2 > 396,07 (m/z)$  i  $414,2 > 352,1 (m/z)$ , podczas gdy w przypadku sarracynylowych pochodnych (**10**, **11**) przejściem o największej intensywności było  $414,2 > 270,1 (m/z)$ . Kolejność elucji związków **10** i **11** (kolejno: 22,79 min i 24,31 min) przypisano w oparciu o dane literaturowe (Tabela 14) (62).

Kolejność elucji symfytyny (**13**), symlandyny (**14**), ich *N*-tlenków (**15** i **16**) oraz potencjalnej acetylo-pochodnej symfytyny (**17**) odpowiadała wcześniej obserwowanej dla pochodnych

intermedyny/likopsaminy, mianowicie: forma wolna > *N*-tlenek > acetylowa pochodna, co jest zgodne z wynikami badań surowców z rodzaju *Echium* spp. (201). Różnice pomiędzy otrzymanymi wynikami analiz HPLC-MS/MS a wynikami *Trifan* i wsp. (62), raportującymi symfytynę i symlandynę jako związki o najwyższych czasach retencji, mogą być rezultatem użycia innego typu kolumny HPLC, mianowicie Gemini C-18 została zastąpiona kolumną Kinetex C-18 (100 x 2,1 mm) (42).

Związek **17** został wstępnie zidentyfikowany jako *N*-tlenek 3'-acetylosymfytyny lub jego izomery, jednak niska intensywność pików, spowodowana bardzo niskim stężeniem związku/związków w analizowanym materiale roślinnym, nie pozwoliła na odróżnienie poszczególnych pochodnych – w trybie MRM w czasie retencji  $t_R$  51,28-52,96 min obserwowano 4 piki. Wyjątek stanowił surowiec **DPr**, dla którego obserwowano w tym zakresie  $t_R$  3 piki, i mogą one odpowiadać izomerom, takim jak np. *N*-tlenek 3'-acetylosymlandyny (62).

#### 4.3. Analiza „pół-ilościowa” alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego opracowaną metodą LC-MS/MS

Obecność większości zidentyfikowanych alkaloidów pirolizydynowych potwierdzono we wszystkich analizowanych wyciągach z korzeni i liści żywokostu lekarskiego. Jedyny wyjątek stanowił, obecny w bardzo niskich stężeniach, związek **17** – *N*-tlenek 3'-acetylosymfytyny lub jego izomery, nieobecny w dwóch korzeniach (**Gd**, **Zab**) oraz wszystkich trzech analizowanych liściach (**DPf**, **EHf**, **Hf**) (Tabela 15).

Tabela 15: Dystrybucja alkaloidów pirolizydynowych w korzeniach i liściach żywokostu lekarskiego w oparciu o analizę „pół-ilościową” przeprowadzoną poprzez porównanie pól powierzchni pików pierwszego jonu fragmentacyjnego w trybie MRM.

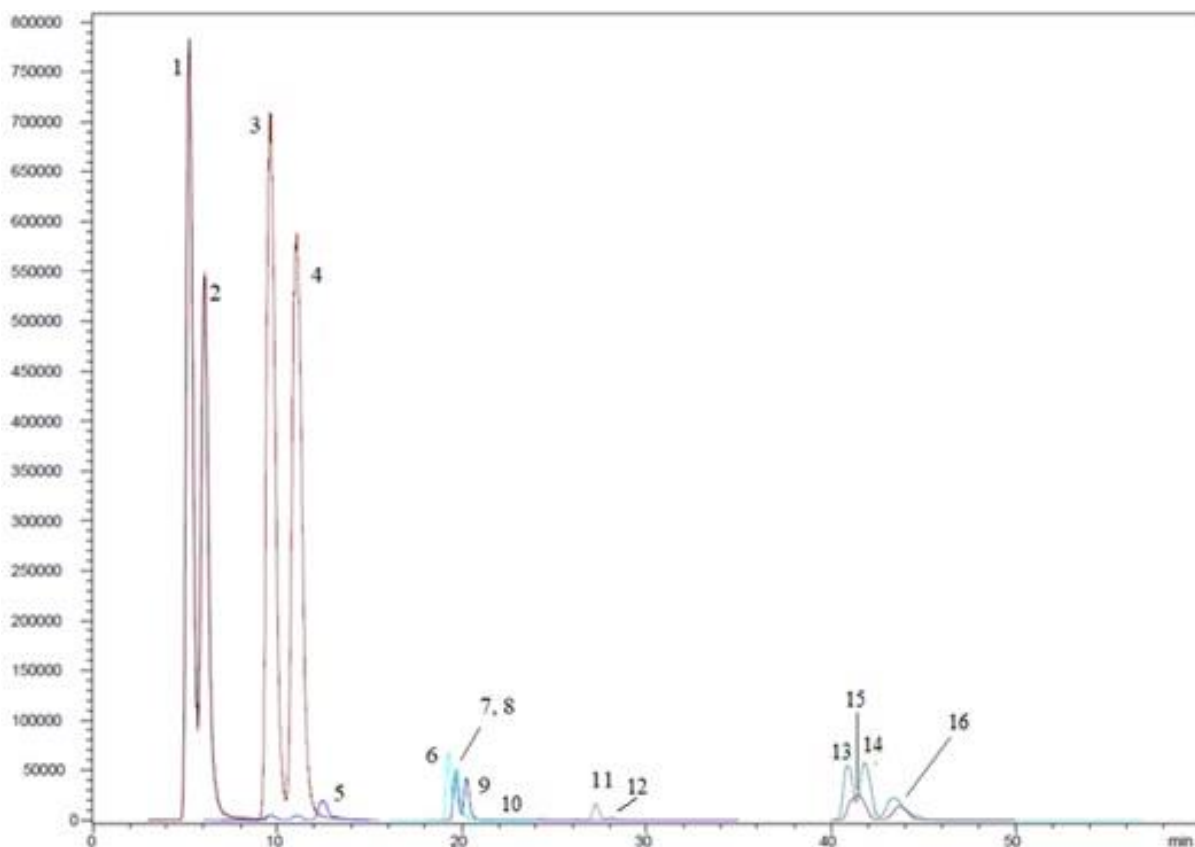
L.p.	Nazwa związku	Korzenie						Liście		
		Zab	Gd	DNr	DPr	EHr	DRr	DPf	EHf	Hf
1	Intermedyna*	+	++	+++	+++	++	++	++++	+++	++
2	Likopsamina*	++	++	+++	+++	+++	++	++++	++++	+++
3	<i>N</i> -tlenek intermedyny*	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++
4	<i>N</i> -tlenek likpsaminy	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
5	<i>N</i> -tlenek dihydrointermedyny / <i>N</i> -tlenek dihydrolikopsaminy	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	7'-acetylointermedyna	+	+	++	++	++	++	+	+	+
7	7'-acetylolikopsamina	++	+	++	++	++	++	+	+	+
8	<i>N</i> -tlenek 7'-acetylointermedyny	++	+++	++	+++	+++	+++	+	+	+



<b>9</b>	<i>N</i> -tlenek 7'-acetylolikopsaminy	+++	+++	++	+++	+++	++++	+	+	+
<b>10</b>	<i>N</i> -tlenek 7'-sarracynylo-9-Trachelantylotretronecyny	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>11</b>	<i>N</i> -tlenek 7'-sarracynylo-9-wiridiflorynolretronecyny	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>12</b>	<i>N</i> -tlenek echimidyny	+	+	+	+	+	+	+	+	++
<b>13</b>	Symfytyna	+	+	++	+	+	+	+	+	+
<b>14</b>	Symlandyna	+	+	++	+	+	+	+	+	+
<b>15</b>	<i>N</i> -tlenek symfytyny	+	+	++	+	+	+	+	+	+
<b>16</b>	<i>N</i> -tlenek symlandyny	+	+	++	+	+	+	+	+	+
<b>17</b>	<i>N</i> -tlenek 3'-acetylosymfytyny i jego izomery	-	-	+	+	+	+	-	-	-

Objaśnienia: ++++ - związek dominujący, +++ - związek główny, ++ - związek poboczny, + - związek śladowy, - - związek nieobecny w surowcu

Analizę „pół-ilościową” alkaloidów pirolizydynowych przeprowadzono poprzez porównanie pól powierzchni pików pierwszego jonu fragmentacyjnego (jon ilościowy, *quantifier ion*) otrzymanych w trybie MRM w jonizacji dodatniej. Przedstawione w Tabeli 15 dane obrazują jedynie udział poszczególnych związków w danym materiale roślinnym, bez porównania zawartości pomiędzy różnymi badanymi substancjami roślinnymi – przykładowy chromatogram charakteryzujący różnice w polach powierzchni pików poszczególnych związków przedstawiono na Ryc. 44. Uzyskane dane pozwalają obserwować znaczące różnice w kompozycji alkaloidów pirolizydynowych w korzeniach i liściach żywokostu pochodzących z różnych źródeł i rosnących w różnych warunkach.



Ryc. 44: Chromatogram głównych pików (tryb MRM) alkaloidów pirolizydynowych obecnych w metanolowym wyciągu z korzenia żywokostu (**DPr**) rozdzielonych z użyciem opracowanej metody HPLC-MS/MS. Kolumna: Kinetex C-18 (100 x 2,1 mm), elucja gradientowa: program: VIII. Numeracja pików zgodnie z *Tabela 14*.

We wszystkich analizowanych korzeniach żywokostu, związkami dominującymi są: *N*-tlenki intermedyny i likopsaminy (**3, 4**), przy wysokim udziale intermedyny (**1**), likopsaminy (**2**) oraz *N*-tlenków ich acetylowych pochodnych (**8, 9**). Większość surowców roślinnych charakteryzuje się podobnym udziałem poszczególnych związków w zespole alkaloidów pirolizydynowych. Wyjątek stanowią surowce **Gd** – o niższym udziale 7'-acetylointermedyny (**6**) i 7'-acetylolikopsaminy (**8**) oraz **DNr** – wykazujący wyższy udział symfityny (**13**), symlandyny (**14**) i ich *N*-tlenków (**15, 16**), stanowiących w pozostałych korzeniach związki śladowe.

Odnosząc się do najnowszych danych dotyczących toksyczności intermedyny, likopsaminy i ich *N*-tlenków (40) warto zauważyć, że w większości analizowanych korzeniach żywokostu, dominowały, uznane za bardziej toksyczne, pochodne likopsaminy.

Liście żywokostu charakteryzowały się wyraźną dominacją w zespole intermedyny (**1**), likopsaminy (**2**) i ich *N*-tlenków (**3, 4**), przy śladowej obecności pozostałych alkaloidów pirolizydynowych. Wyjątek stanowi surowiec **Hf** o nieznacznie wyższym udziale *N*-tlenku echimidyny (**12**).

#### 4.4. Analiza ilościowa alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego opracowaną metodą LC-MS/MS

Celem oceny zawartości głównych – dominujących w badanych surowcach alkaloidów pirolizydynowych, mianowicie: intermedyny, likopsaminy i ich *N*-tlenków, obok analizy „pół-ilościowej”, przeprowadzono metodą HPLC-MS/MS ich analizę ilościową. Otrzymane wyniki przedstawiono jako stężenie związku w wyciągu metanolowym wyrażone w ng/μl – Tabela 16, oraz w przeliczeniu na wysuszony surowiec roślinny (mg/g s.m.) – Tabela 17.

Tabela 16: Zawartość (ng/μl = μg/ml) alkaloidów pirolizydynowych w wyciągach metanolowych z korzeni (Zab, Gd, DNr, DPr, EHr, DRr) i liści żywokostu (DPf, EHf, Hf) lekarskiego oznaczona z wykorzystaniem metody dodatku wzorca w warunkach opracowanej metody HPLC-MS/MS w trybie MRM.

Badany materiał roślinny	Intermedyna [ng/μl]	Likopsamina [ng/μl]	<i>N</i> -tlenek intermedyny [ng/μl]	<i>N</i> -tlenek likopsaminy [ng/μl]
Zab	0,307 ± 0,034	2,24 ± 0,17	5,15 ± 0,30	20,42 ± 1,23
Gd	0,832 ± 0,085	1,54 ± 0,16	8,09 ± 0,59	13,49 ± 0,4
DNr	2,07 ± 0,21	2,51 ± 0,12	62,30 ± 8,76	64,5 ± 2,5
DPr	7,83 ± 0,81	6,95 ± 0,43	8,10 ± 0,81	14,65 ± 0,83
E Hr	5,38 ± 0,52	6,31 ± 0,23	60,85 ± 2,70	58,3 ± 7,9
DRr	1,56 ± 0,18	2,82 ± 0,28	18,80 ± 1,10	33,74 ± 1,36
DPf	1,49 ± 0,16	2,59 ± 0,30	2,63 ± 0,15	4,50 ± 0,066
EHf	3,00 ± 0,10	3,15 ± 0,19	2,63 ± 0,06	2,61 ± 0,11
Hf	2,15 ± 0,19	4,99 ± 0,44	6,22 ± 0,12	10,9 ± 0,360

Tabela 17: Zawartość (mg/g s.m.) alkaloidów pirolizydynowych w analizowanych korzeniach (Zab, Gd, DNr, DPr, EHr, DRr) i liściach żywokostu (DPf, EHf, Hf) żywokostu lekarskiego oznaczona z wykorzystaniem metody dodatku wzorca w warunkach opracowanej metody HPLC-MS/MS w trybie MRM.

.Badany materiał roślinny	Intermedyna [mg/g s.m.]	Likopsamina [mg/g s.m.]	<i>N</i> -tlenek intermedyny [mg/g s.m.]	<i>N</i> -tlenek likopsaminy [mg/g s.m.]	Σ <sub>Pas</sub> *
Zab <sup>a</sup>	0,0077 ± 0,00090 bcdefghi	0,0560 ± 0,0042 bdefgh	0,1287 ± 0,0075 bcdefghi	0,5105 ± 0,0307 bcdefghi	0,70 ± 0,043
Gd <sup>b</sup>	0,0208 ± 0,0021 acdefh	0,0385 ± 0,0040 acdefgi	0,2022 ± 0,0147 bcefgih	0,3372 ± 0,0100 acefghi	0,60 ± 0,31

<b>DNr<sup>c</sup></b>	0,0517 ± 0,0052 abdefghi	0,0627 ± 0,0030 bdefghi	1,5575 ± 0,1150 abdfghi	1,6125 ± 0,0625 abdefghi	3,28 ± 0,19
<b>DPr<sup>d</sup></b>	0,1957 ± 0,0202 abcefgi	0,1737 ± 0,0107 abcefgi	0,2057 ± 0,0147 acefgi	0,3662 ± 0,0207 acefgi	0,94 ± 0,0665
<b>EHR<sup>e</sup></b>	0,1345 ± 0,0130 abcdfghi	0,1577 ± 0,0057 abcdfghi	1,5212 ± 0,0675 abdfghi	1,4575 ± 0,1975 abcdfghi	3,27 ± 0,284
<b>DRr<sup>f</sup></b>	0,0390 ± 0,0045 abcdeghi	0,0705 ± 0,0070 abcdeghi	0,4700 ± 0,0275 abcdeghi	0,8435 ± 0,0340 abcdeghi	1,42 ± 0,073
<b>DPf<sup>g</sup></b>	0,0149 ± 0,0016 acdefh	0,0259 ± 0,003 abcdefi	0,0264 ± 0,0017 abcdef	0,0449 ± 0,0007 abcdef	0,11 ± 0,0070
<b>EHf<sup>h</sup></b>	0,0300 ± 0,0010 abcdefgi	0,0315 ± 0,0019 acdefi	0,0263 ± 0,0006 abcdef	0,0261 ± 0,0011 abcdefi	0,11 ± 0,0046
<b>Hf<sup>i</sup></b>	0,0215 ± 0,0019 acdefh	0,0499 ± 0,0044 bcdefgh	0,0622 ± 0,0012 abcdef	0,1090 ± 0,0036 abcdefh	0,24 ± 0,11

\*Suma oznaczonych alkaloidów pirolizydynowych (średnia ± odchylenie standardowe); <sup>abcdeghi</sup> Statystycznie istotne różnice w zawartości alkaloidów pirolizydynowych ( $p < 0,05$ ) pomiędzy analizowanymi korzeniami i liśćmi żywokotu; różnice wyrażono użyciem tej samej litery (test Tukeya).

W analizowanych korzeniach żywokostu pozyskanych z różnych źródeł (ogrody botaniczne – **Zab**, **Gd**, sklepy zielarskie – **DNr**, **DPr**, **EHR** i stanowisko naturalne – **DRr**) odnotowano znaczące różnice w zawartości alkaloidów pirolizydynowych. Oznaczone zawartości intermedyny (**1**) różniły się nawet 25-krotnie (0,0077 mg/g s.m. w **Zab** vs 0,1957 mg/g s.m. w **DPr**), natomiast w przypadku *N*-tlenku intermedyny (**3**) ponad 10-krotnie (0,1287 mg/g s.m. w **Zab** vs 1,5575 mg/g s.m. w **DNr** vs 1,5212 mg/g s.m. w **EHR**). W większości objętych badaniem surowców obserwowano większy udział likopsaminy (**2**) i jej *N*-tlenku (**4**) w porównaniu do ich mniej toksycznych izomerów – intermedyny (**1**) i *N*-tlenku intermedyny (**3**) (40).

Ponadto, najwyższe spośród analizowanych materiałów roślinnych z żywokostu, zawartości alkaloidów pirolizydynowych odnotowano w korzeniach **DNr** i **EHR** (suma oznaczonych alkaloidów kolejno: 3,28 mg/g s.m. i 3,27 mg/g s.m.) zakupionych w sklepach zielarskich. Oznaczone, w tych surowcach (wyciągi metanolowe), zawartości *N*-tlenku intermedyny (**3**) (62,3 µg/ml dla **DNr** vs 60,85 µg/ml dla **EHR**) oraz *N*-tlenku likopsaminy (**4**) (64,5 µg/ml vs 58,3 µg/ml, kolejno) przekraczają wyznaczone przez Wang i wsp. (40) wartości IC<sub>50</sub> dla ludzkich linii

komórek wątrobowych (hepatocytów) zdrowych (HepD) i nowotworowych (HepG2) – określonych kolejno dla *N*-tlenku intermedyny jako 56,38 i 57,32 µg/ml i 49,11 oraz 46,43 µg/ml dla *N*-tlenku likopsaminy – co może sugerować ich potencjalne działanie hepatotoksyczne. Jednocześnie, zawartości intermedyny (**1**) i likopsaminy (**2**) w surowcu **EHR** (odpowiednio 0,1345 mg/g s.m. i 0,1577 mg/g s.m.) oraz **DPr** (0,1957 mg/g s.m. i 0,1737 mg/g s.m.) są istotnie wyższe niż dotychczas raportowane w literaturze [odpowiednio 0,1 mg/g s.m. i 0,118 mg/g s.m. w publikacji *Trifan* i wsp. (62)]. Wyniki przeprowadzonej przez *Trifan* i wsp. (195) oceny wpływu czasu przechowywania korzenia żywokostu na zawartość poszczególnych substancji biologicznie czynnych, można jednak uznać za mocno zaniżone. Zespół badaczy na przestrzeni krótkiego okresu przechowywania surowca po zbiorze (6 miesięcy) obserwował znaczący spadek zawartości *N*-tlenków intermedyny (o 56%) i likopsaminy (o 93%) do poziomu 0,01-0,23 mg/g s.m. (195). Natomiast przeprowadzone w niniejszej pracy badania korzeni żywokostu pomimo upływu 2-3 lat od zbioru wykazały obecność powyższych alkaloidów w znacznie wyższych stężeniach (Tabela 17). Produkty zielarskie, w formie rozdrobnionych substancji roślinnych są dostępne w sprzedaży odręcznej w sklepach zielarskich i często nieopatrzone informacjami o potencjalnej toksyczności i możliwych skutkach ubocznych niewłaściwego ich użycia.

Przeprowadzona analiza ilościowa potwierdziła, że liście żywokostu charakteryzują się bardziej stabilnym i powtarzalnym profilem alkaloidów pirolizydynowych w porównaniu do jego korzeni. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi (68), oznaczone zawartości alkaloidów pirolizydynowych w liściach były znacząco (nawet 14-krotnie) niższe niż w korzeniach – całkowita zawartość alkaloidów w zakresach 0,11-0,24 mg/g s.m w liściach. i 0,60-3,28 mg/g s.m. w korzeniach.

#### 4.5. Walidacja metody ilościowej oznaczania zawartości alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego opracowaną metodą LC-MS/MS

Opracowaną metodę poddano walidacji w zakresie liniowości, granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), precyzji, jedno- i międzydniowej (Tabela 18), wykazując, że metoda jest powtarzalna, precyzyjna i liniowa oraz charakteryzuje się zadowalającym odzyskiem przy dodatku wzorca na poziomie 50% - CV 105-112%, na poziomie 100% nieco zawyżając otrzymane wyniki - CV 112-117%.

Tabela 18: Parametry walidacyjne dla opracowanej metody HPLC-MSMS analizy ilościowej alkaloidów pirolizydynowych w korzeniach i liściach żywokostu lekarskiego.

Parametr walidacyjny		Intermedyna	Likopsamina	N-tlenek intermedyny	N-tlenek likopsaminy
Współczynnik korelacji	Korzeń	0,9818-0,9923	0,9824-0,9984	0,9973-0,9997	-*
	Liść	0,9810-0,9905	0,9909-0,9944	0,9901-0,9983	-*
LOD [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Korzeń	0,0026-0,0045	0,0028-0,0054	0,0027-0,0048	0,0026-0,0063
	Liść	0,010-0,013	0,0028-0,0048	0,0032-0,0061	0,0026-0,0031
LOQ [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Korzeń	0,0086-0,015	0,0094-0,018	0,0089-0,016	0,0086-0,021
	Liść	0,0030-0,0038	0,0094-0,016	0,0103-0,0204	0,0087-0,010
Odzysk $\pm$ CV [%] <sup>1</sup>	50%	105 $\pm$ 12	111 $\pm$ 3	112 $\pm$ 11	-
	100%	117 $\pm$ 22	112 $\pm$ 8	114 $\pm$ 12	-
Precyzja [CV%] <sup>2</sup>	Jednodniowa	0,63	0,67	0,97	-
	Międzydniowa	1,18	0,98	1,00	-

\*Związek oznaczany w przeliczeniu na krzywą dla N-tlenku intermedyny. <sup>1</sup>Oznaczony dla próbki liścia żywokostu (DPf) (n-2);

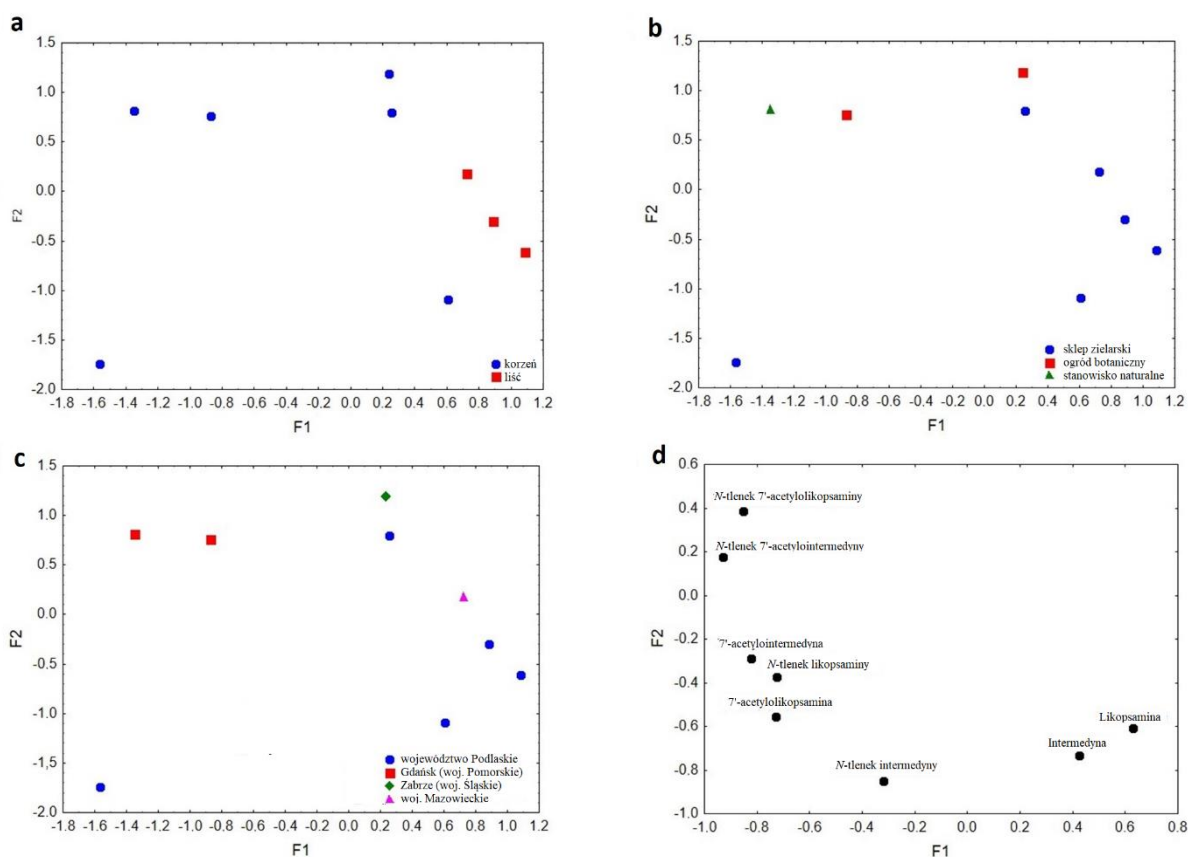
<sup>2</sup>Oznaczona dla próbki liścia żywokostu (DPf) (jednodniowa: n-6, międzydniowa: n-3).

#### 4.6. Analiza czynnikowa dystrybucji alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu

Przeprowadzona analiza czynnikowa (FA, *factor analysis*) obejmowała zarówno wyciągi z liści, oraz korzeni żywokostu a jej wyniki przedstawiono na Ryc. 45. Na jej podstawie czynnik pierwszy (F1) odpowiadał za 49,96% wyjaśnianej wariancji, a czynnik drugi (F2) za 29,21%. Skumulowana wartość własna wyjaśnianej wariancji dla obu czynników wyniosła 79,17%. Uzyskane wartości własne dla F1 i F2 wyniosły odpowiednio 3,99 i 2,34.

Jak przedstawiono na Ryc. 45, próbki żywokostu zróżnicowano w oparciu o trzy kategorie:

- Anatomiczna część rośliny (liść lub korzeń)
- Warunki uprawy (rozdzielenie pomiędzy surowcami uprawianymi w ogrodach botanicznych a zakupionymi ze sklepów zielarskich – zbieranych z warunków naturalnych)
- Geograficzne pochodzenie próbki (różne rejony Polski)



Ryc. 45: Wykres rozrzutu próbek obiektów dla dwóch czynników ze względu na: a) część anatomiczną rośliny; b) warunki uprawy; c) pochodzenie geograficzne żywokostu; d) Wykres rozrzutu ładunków dla alkaloidów pirolizydowych we wszystkich analizowanych próbkach.

Na wykresie Ryc. 45a, próbki żywokostu zostały zróżnicowane ze względu na anatomiczną część rośliny (korzeń-liść). Za różnorodność próbek odpowiadał przede wszystkim czynnik pierwszy (F1), którego wysokie wartości wyraźnie oddzielają próbki liści żywokostu, za których rozróżnienie odpowiedzialna była zawartość likopsaminy i intermedyny. Niskie wartości F1 charakteryzowały z kolei korzenie żywokostu oraz odpowiedzialne za ich oddzielenie pochodne (*N*-tlenki i formy acetylowe) intermedyny i likopsaminy (Ryc. 45d).

Drugi czynnik (F2) odpowiedzialny był za zróżnicowanie próbek ze względu na warunki uprawy (Ryc. 45b). Wysokie wartości F2 charakteryzują próbki pochodzące ze stanowisk słonecznych – uprawiane w ogrodach botanicznych oraz surowiec zebrany ze stanowiska naturalnego, odróżniając je od opisanych niskimi wartościami F2 surowców zakupionych w sklepach zielarskich. Próbki ze stanowisk słonecznych są charakteryzowane przez *N*-tlenek 7'-acetylolikopsaminy i *N*-tlenek 7'-acetylointermedyny (Ryc. 45d), co sugeruje wpływ warunków uprawy (np. nasłonecznienia) na zawartość tych metabolitów wtórnych w surowcu.

Ponadto, otrzymane wyniki analizowano ze względu na pochodzenie geograficzne badanych surowców roślinnych. Jak przedstawiono na (Ryc. 45c), wysokie wartości F1 charakteryzują próbki pochodzące z województw: Podlaskiego, Mazowieckiego i Śląskiego (Zabrze), niskie odpowiadają z kolei surowcom pochodzącym z Gdańska (województwo Pomorskie). Wyraźne oddzielenie surowców z Pomorza od pozostałych sugeruje wysoki wpływ na biosyntezę niektórych metabolitów wtórnych warunków klimatycznych, charakterystycznych dla poszczególnych regionów. Surowce z Gdańska wyróżnia zawartość *N*-tlenku 7'-acetylolikopsaminy, *N*-tlenku 7'-acetylointermedyny i częściowo 7'-acetylointermedyny. Wysokie wartości F1, grupujące badany materiał roślinny z południowej i wschodniej Polski (woj. Podlaskie, Śląskie i Mazowieckie), są charakteryzowane przez zawartość intermedyny, likopsaminy, ich *N*-tlenków oraz 7'-acetylolikopsaminy (Ryc. 45d).

## 5. Analiza chromatograficzna związków polifenolowych i prostych fenoli w kwiatach i nalewkach z arniki górskiej i łąkowej

Kwiat arniki początkowo stosowano w medycynie tradycyjnej wewnątrz i zewnątrz, natomiast obecnie jest stosowany w fitoterapii tylko zewnątrz (2, 23, 82, 90, 105). W dużych rozcieńczeniach, nalewki z całej świeżej rośliny arniki są stosowane zarówno zewnątrz, jak i wewnątrz w homeopatii (2, 82, 128). Działanie lecznicze arniki przypisuje się przede wszystkim obecności laktonów seskwiterpenowych, w szczególności helenalinie (103, 111, 147, 172), jakkolwiek jej skład chemiczny jest złożony i obejmuje flawonoidy oraz kwasy fenolowe (21, 104, 108, 172, 208), w tym liczne pochodne kwasu kawowego należące do grupy kwasów kawoilochinowych (CQA). Brakuje danych dotyczących udziału tych związków w aktywności biologicznej surowca.

Dane literaturowe o składzie chemicznym *Arnica montana* dotyczą głównie wysuszonych kwiatów (103, 104, 125, 147, 172) natomiast nieznana jest kompozycja chemiczna świeżych kwiatów (111) oraz całej świeżej rośliny, stanowiącej materiał wyjściowy do produkcji leków homeopatycznych (*Arnica planta tota*). Zgodnie z Farmakopeą Europejską (200) i monografią HMPC EMA (23) jedynie arnika górska (*Arnica montana* L.) umieszczona na czerwonej liście gatunków chronionych (81) może stanowić źródło surowca roślinnego leczniczego. Natomiast inny, bardziej rozpowszechniony w świecie roślinnym, gatunek z rodzaju *Arnica*, mianowicie arnika łąkowa (*Arnica chamissonis* Less.), jest jedynie wykorzystywany w medycynie tradycyjnej, jakkolwiek uwzględniany był jako surowiec leczniczy w monografii *Arnicae*

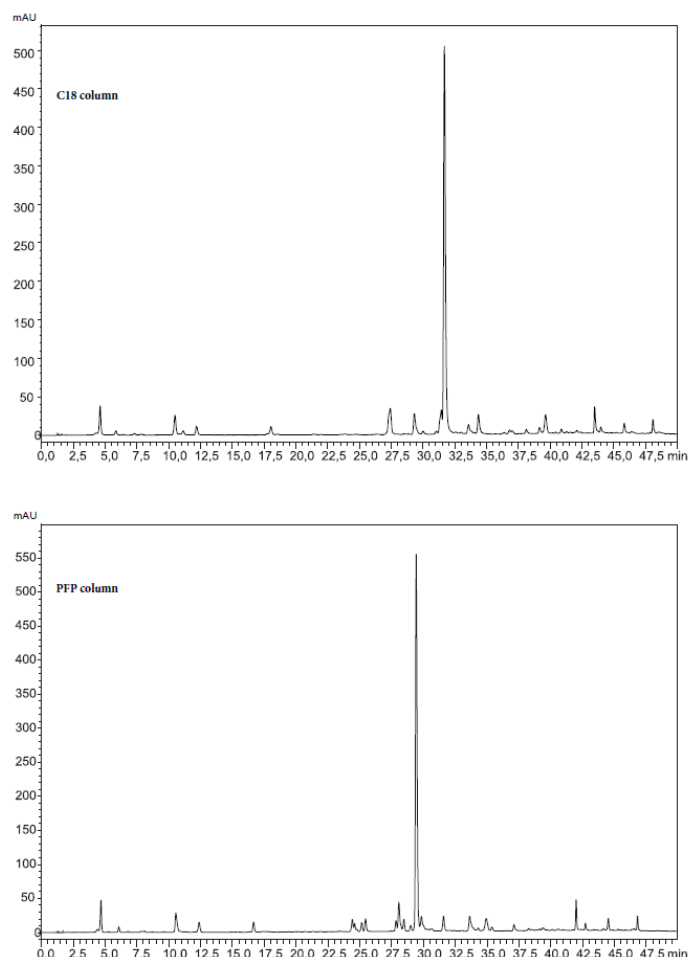


*anthodium* w Farmakopei Polskiej V (102). Skład chemiczny kwiatów *A. chamissonis* nadal pozostaje nie w pełni rozpoznany (85, 100).

Porównano, z użyciem opracowanych metod HPLC-DAD-ESI- MS, profile związków polifenolowych w wyciągach z całej świeżej rośliny *Arnica montana* L. (nalewki macierzyste TM firm Boiron i Helios) z profilami wysuszonych kwiatów *Arnica montana* L. i *Arnica chamissonis* Less. pochodzących ze źródeł komercyjnych i stanowisk naturalnych.

### 5.1. Dobór kolumny chromatograficznej

Optymalizując warunki rozdzielania chromatograficznego analizowano efektywność separacji HPLC z użyciem dwóch typów kolumn chromatograficznych: Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm; 2,6  $\mu\text{m}$ ) oraz Kinetex PFP (100 x 4,6 mm; 2,6  $\mu\text{m}$ ) (Ryc. 46).



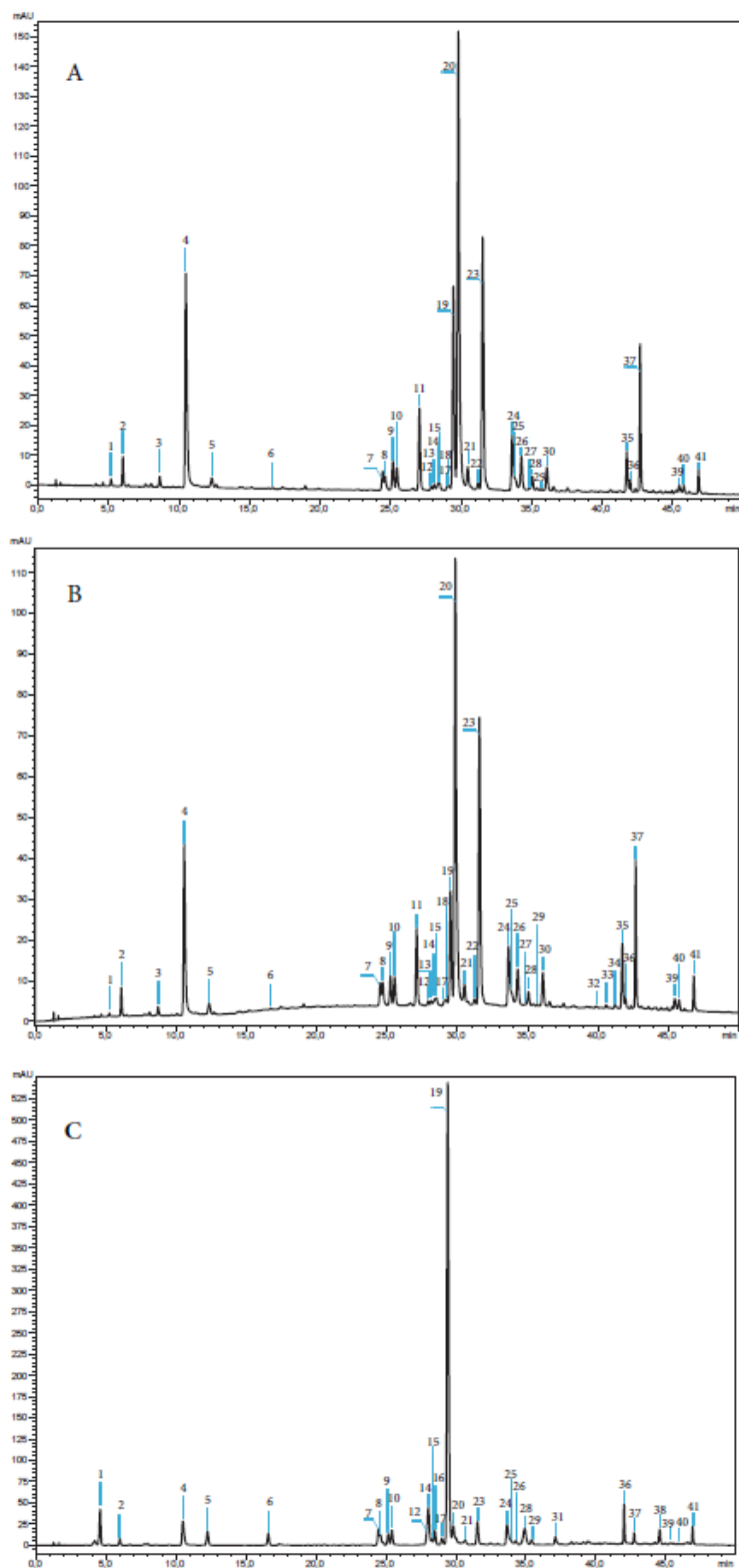
Ryc. 46: Chromatogramy HPLC związków biologicznie czynnych z nalewki Arnica TM (Boiron) otrzymane z użyciem kolumn Kinetex C-18 i Kinetex PFP. Elucja gradientowa: program III, detekcja UV  $\lambda$ -330 nm.

Najlepsze rozdzielanie związków fenolowych z badanych próbek (kwiatów arniki i nalewki ze świeżej całej rośliny) otrzymano na kolumnie typu PFP. Zastosowanie, której pozwoliło na lepsze rozdzielanie związków o wartościach  $t_R$  w zakresie 22,5-37,5 min, w porównaniu z kolumną C-18 (Ryc. 46). Separacja na kolumnie PFP obejmuje pięć różnych mechanizmów interakcji pomiędzy zastosowanym adsorbentem a związkami polarnymi i niepolarnymi, w tym interakcje związane z powstawaniem wiązań wodorowych i oddziaływaniami  $\pi$ - $\pi$  w pierścieniu aromatycznym oraz interakcje, elektrostatyczne, steryczne i hydrofobowe (209).

### 5.2. Rozpoznanie zespołu prostych fenoli i polifenoli w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS

W badanym materiale roślinnym, w oparciu o liczbę rozdzielonych pojedynczych pików, zidentyfikowano 41 związków należących do prostych fenoli i polifenoli (Ryc. 47 i Tabela 19). Analizy przeprowadzono wobec substancji wzorcowych z grupy kwasów fenolowych: pochodnych kwasu benzoowego – kwasu p-hydroksybenzoowego, protokatechowego, galusowego i wanilinowego, pochodnych kwasu cynamonowego – kwasu ferulowego i kawowego oraz kwasów fenolowych o charakterze kwasów kawoilochinowych (estrów kwasu kawowego i chinowego; CQA) – kwasu chlorogenowego (5-O-CQA), cynaryny (1,5-O-CQA), kwasu izochlorogenowego, kwasów 1,5-, 3,4- i 4,5-dikawoilochinowych; oraz związków flawonoidowych: z grupy flawonów – luteoliny, 7-O-glukozyd luteoliny, apigeniny, 7-O-glukozydy apigeniny i z grupy flawonoli – kemferolu, astragaliny (3-O-glukozyd kemferolu), hiperozydu (3-O-galaktozyd kwercetyny), kwercetyny, izokwercetyny (3-O-glukozyd kwercetyny) i izoramnetyny.

W badanym materiale roślinnym potwierdzono obecność pochodnych kwasu cynamonowego: kwasu chlorogenowego (związek **4**), kwasu kawowego (**5**), cynaryny (**6**), pochodnych kwasu benzoowego: kwasu protokatechowego (**2**), z grupy flawonów: 7-O-glukozydu apigeniny (**22**), apigeniny (**39**), flawonoli: izokwercetyny (**9**), 3-O-glukozydu kwercetyny (**16**), kwercetyny (**34**), kemferolu (**40**), luteoliny (**35**), 7-O-glukozydu luteoliny (**11**) (Tabela 19). Wymienione związki wcześniej zidentyfikowano w kwiatach *Arnica montana* i *Arnica chamissonis* (2, 21, 104, 125, 147, 172). Z drugiej strony, w badanym materiale roślinnym nie potwierdzono obecności następujących związków z grupy kwasów fenolowych i pochodnych flawonoli: kwasu galusowego, kwasu ferulowego, kwasu p-hydroksybenzoowego, kwasu p-kumarowego, kwasu wanilinowego, izoramnetyny i hiperozydu (104, 125, 172).



Ryc. 47: Chromatogramy HPLC ekstraktów z kwiatów *Arnica montana* (A) i *Arnica chamissonis* (B) oraz nalewki macierzystej ze świeżej całej rośliny *A. montana* (Arnica TM; Boiron) (C). Kolumna Kinetex PFP (100 x 4,6 mm), elucja gradientowa: program III, detekcja: UV  $\lambda$ -330 nm. Numeracja związków zgodnie z Tabela 19.

Tabela 19: Polifenole i proste fenole zidentyfikowane w kwiatach *A. montana* i *A. chamissonis* oraz nalewce macierzystej ze świeżej całej rośliny *A. montana* (Arnica TM; Boiron) z użyciem opracowanej metody HPLC-DAD-ESI/MS.

L.p.	Nazwa związku	t <sub>R</sub> (min)	UV λ <sub>max</sub> (nm)				ESI-MS (m/z) [M+H] <sup>+</sup> , [Ag+H] <sup>+</sup>	Korelacja z wzorcem
1	Izomer kwasu kawoilochinowego	4,57	234	243sh	296sh	326	355	
2	Kwas protokatechowy	5,97	259	292			155	0,8591
3	Niezidentyfikowany związek	8,71	230	293sh	314			
4	Kwas chlorogenowy	10,46	234	243sh	296sh	324	355	0,943
5	Kwas kawowy	12,23	232	241sh	294sh	322	181	0,9981
6	Cynaryna	16,61	230	243sh	299sh	325	516	0,9813
7	3-O-glukozyd patuletyny	24,51	256	269sh	348		495, 333	
8	3-O-glukuronid patuletyny	24,66	256	267sh	347		509, 333	
9	Izokwercetyna	25,21	255	265sh	310sh	352	465	0,9813
10	3-O-glukuronid kwercetyny	25,49	255	264sh	310sh	353	479	
11	7-O-glukozyd luteoliny	27,10	254	264sh	347		449	0,9787
12	7-O-glukozyd eupafoliny	27,76	269	296sh	330		479, 317	
13	3-O-glukozyd 6-metoksykemferolu	28,10	249sh	270	344		479, 317	
14	Izomer kwasu dikawoilochinowego	28,14	234	246sh	298sh	325	517	
15	7-O-glukuronid eupafoliny	28,35	269	334			493, 317	
16	3-O-glukozyd kemferolu	28,56	264	300sh	340		449	0,9953
17	3-O-glukuronid kemferolu	29,07	260	300sh	347		463	
18	Pochodna kwasu kawowego	29,21	233	240sh	300sh	324		
19	Kwas 1,5-dikawoilochinowy	29,49	234	246sh	296sh	328	517	
20	Kwas 4,5-dikawoilochinowy	29,89	235	246sh	296sh	329	517	
21	Kwas 3,4-dikawoilochinowy	30,74	235	265sh	300sh	352	517	
22	7-O-glukozyd apigeniny	31,23	267	334			433	0,9377
23	Kwas 1-metoksy-szczawianoilo[oksaloi]-3,5-dikawoilochinowy	31,62	235	241sh	298sh	329	603	
24	Izomer kwasu dikawoilochinowego	33,74	235	242sh	297sh	328	517	

<b>25</b>	3- <i>O</i> -glukozyd luteoliny	33,99	267	301sh	331		449, 317	
<b>26</b>	Izomer kwasu dikawoilochinowego	34,37	230	240sh	297sh,	330		
<b>27</b>	Kwas feruloilokawoilochinowy	34,82	235	242sh	300	329	531	
<b>28</b>	3- <i>O</i> -acetyloglukozyd kemferolu	34,98	264	300sh	345		491	
<b>29</b>	Pochodna kwasu kawowego	35,50	232	245sh	300sh	330		
<b>30</b>	Pochodna kwasu kawowego	36,08	232	240sh	300sh	327		
<b>31</b>	Kwas trikawoilochinowy	37,20	233	242sh	300sh	325	679	
<b>32</b>	Patuletyna	40,20	256	271sh	366		333	
<b>33</b>	6-metoksykemferol	40,59	252sh	270	344		317	
<b>34</b>	Kwercetyna	41,21	254	265	310sh	367	303	0,984
<b>35</b>	Luteolina	41,75	253	265sh	298sh	347	287	0,9928
<b>36</b>	Pochodna kwasu kawowego	42,08	232	243sh	300sh	329		
<b>37</b>	Pochodna kwasu kawowego	42,79	233	245sh	300sh	329		
<b>38</b>	6-metoksyapigenina	44,62	272			333	317	
<b>39</b>	Apigenina	45,28	267	304sh	329		271	0,9231
<b>40</b>	Kemferol	45,94	253sh	267sh	299sh	341	287	0,9231
<b>41</b>	Pochodna kwasu kawowego	46,97	235	241sh	307sh	330		

Różnicę w profilach chemicznych badanych przetworów roślinnych stanowiła obecność jedynie w nalewce *Arnica* TM sporządzanej ze świeżej rośliny *Arnica montana* 6-metoksyapigeniny (**38**), kwasu trikawoilochinowego (**31**) i 3-*O*-glukozydu kemferolu (**16**). Są to pierwsze informacje o składzie chemicznym tego produktu, a wymienione związki te nie były obecne w analizowanych surowcach stanowiących wysuszone kwiaty arniki górskiej i łąkowej. Ponadto, po raz pierwszy wykazano obecność 7-*O*-glukozydu eupafoliny (**12**), 3-*O*-acetyloglukozydu kemferolu (**28**) i 3-*O*-glukozydu luteoliny (**25**) w kwiatach *A. montana* (Ryc. 47). Związki **28** i **25** dotychczas wykryto jedynie w kwiatach *A. chamissonis* (210).

Profil chromatograficzny ekstraktów z zakupionych w sklepach zielarskich wysuszonych kwiatów *Arnica montana* (Runo) i *Arnica chamissonis* (Kawon) był praktycznie identyczny, co może także świadczyć o błędnej identyfikacji surowca roślinnego.

### 5.2.1. Identyfikacja flawonoidów w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS

Identyfikację pozostałych związków flawonoidowych przeprowadzono na podstawie porównania danych literaturowych (83, 104, 210, 211) oraz uzyskanych z użyciem detektorów DAD i MS widm UV i wartości  $m/z$  jonów molekularnych  $[M+H]^+$  i fragmentacyjnych  $[Ag+H]^+$ . W badanym materiale roślinnym potwierdzono obecność szeregu flawonów (Tabela 19): 3-*O*-glukozydu 6-metoksykemferolu (**13**) (211), 7-*O*-glukozydu eupafoliny (7-*O*-glukozyd 6-metoksyluteoliny) (**12**) (210) oraz 3-*O*-glukozydu luteoliny (**25**) (210). W grupie flawonoli na podstawie widm UV i wartości  $m/z$  jonów molekularnych zidentyfikowano następujące flawonole: 3-*O*-glukuronid kwercetyny (**10**), 3-*O*-glukuronid kemferolu (**17**) oraz 3-*O*-acetyloglukozyd kemferolu (**28**) (211).

Związki **7** i **8** charakteryzowały się identycznymi widmami UV, co wskazuje na tą samą pozycję glikozydacji w strukturze flawonoidu ( $\lambda_{\max}$  256, 269sh, 347 nm) (182). Podobnie, w widmach ESI-MS obydwie związki wykazywały obecność wspólnego jonu fragmentacyjnego  $[Ag+H]^+$  o wartości  $m/z$  333, odpowiadającego masie cząsteczkowej patuletyny (6-metoksykwercetyny) oraz rozróżniających je jonów molekularnych  $[M+H]^+$  o wartości  $m/z$  495 dla związku **7** i  $m/z$  509 dla związku **8**, pozwalając na ich identyfikację jako glikozydy patuletyny, odpowiednio 3-*O*-glukozyd patuletyny (**7**) i 3-*O*-glukuronid patuletyny (**8**). Obydwie związki wcześniej opisano w gatunkach *A. montana* i *A. chamissonis* przez Merfort i wsp. (211).

Widmo UV związku **10** charakteryzowały maksima absorpcji charakterystyczne dla pochodnych kwercetyny (182), identyczne z widmem związku **9** zidentyfikowanego wobec substancji wzorcowej jako izokwercetyna (3-*O*-glukozyd kwercetyny). W oparciu o obecność jonu molekularnego o wartości  $m/z$  479, związek **10** został rozpoznany jako 3-*O*-glukuronid kwercetyny (182).

Związek **12** wstępnie zidentyfikowano jako 7-*O*-glukozyd eupafoliny (7-*O*-glukozyd 6-metoksyluteoliny) biorąc pod uwagę obecność dwóch maksimów absorpcji w widmie UV: przy 330 nm (I maksimum), 269 nm (II maksimum) z przegięciem przy 296 nm, co jest charakterystyczne dla flawonów z podstawnikiem orto-dihydroksylowym w strukturze bocznego fenylu (182) oraz obecność jonów molekularnych o wartościach  $m/z$  479  $[M+H]^+$  i  $m/z$  317  $[Ag+H]^+$ . Do tej pory w kwiatach *A. chamissonis* wykazano obecność jedynie formy

estrowej 7-*O*-glukozydu eupafoliny, a mianowicie 6''-*O*-(2-metylobutyrylo)-7-*O*-glukozydu eupafoliny (211)

Związki **18** i **28** charakteryzowały się widmami UV podobnymi do 3-*O*-glukozydu kemferolu (**16**). Obecność jonu molekularnego  $[M+H]^+$  o wartości  $m/z$  463 pozwoliła na identyfikację związku **18** jako 3-*O*-glukuronid kemferolu, który wcześniej rozpoznano jako składnik kwiatów *A. montana* i *A. chamissonis* (104, 211). Z kolei w widmie MS związku **28** odnotowano obecność jonu molekularnego  $[M+H]^+$  o wartości  $m/z$  491, wskazującego na podstawnik acetyloheksosowy. Na podstawie powyższych danych, związek **28** rozpoznano jako 3-acetyloglukozyd kemferolu, który wcześniej identyfikowano tylko w kwiatach *A. chamissonis* (211). Podobnie jak w przypadku glukuronidów i glukozydów patuletyny i kwercetyny, wartość  $t_R$  3-*O*-glukuronidu kemferolu ( $t_R$  – 29,07 min) była wyższa w porównaniu do 3-*O*-glukozydu kemferolu ( $t_R$  – 28,56 min) (Tabela 19).

Widmo UV związku **25** wskazuje na brak ugrupowania orto-dihydroksylowego w bocznym fenylu, podczas gdy widmo ESI-MS wykazuje obecność jonu fragmentacyjnego  $[Ag+H]^+$  o wartości  $m/z$  317 i jonu molekularnego  $[M+H]^+$  o wartości  $m/z$  449, charakterystycznych dla pochodnych luteoliny z przyłączoną jednostką cukrową – glukozą w pozycji C-3'-OH. W oparciu o te dane, związek **25** został wstępnie zidentyfikowany jako 3-*O*-glukozyd luteoliny.

Spośród wolnych aglikonów w badanym materiale roślinnym związek **32** został zidentyfikowany jako patuletyna, a związek **33** jako 6-metoksykemferol (Tabela 19). Obecność obydwu związków potwierdzono tylko w kwiatach *Arnica chamissonis*. Z drugiej strony 6-metoksyapigeninę (związek **38**) rozpoznano tylko w nalewce ze świeżej całej rośliny *A. montana* (*Arnica* TM) (Ryc. 47).

Podsumowując przeprowadzone analizy, po raz pierwszy rozpoznano zespół flawonoidów z nalewki z całej świeżej rośliny *A. montana* ujawniając różnice w składzie chemicznym w porównaniu do wysuszonych kwiatów arniki. Nalewka TM wyróżniała się obecnością 6-metoksyapigeniny, przy braku 7-*O*-glukozydu luteoliny, 6-*O*-glukozydu 3-metoksykemferolu, 7-*O*-glukozydu apigeniny i luteoliny obserwowanych w kwiatach arniki górskiej i łąkowej.

Dodatkowo, w wysuszonych kwiatach *A. chamissonis* ujawniono obecność patuletyny, 6-metoksykemferolu i kemferolu, nie występujących w pozostałych badanych przetworach roślinnych. Po raz pierwszy wykazano obecność 3-*O*-acetyloglukozydu i 7-*O*-glukozydu

eupafoliny w przetworach arniki górskiej – związki te dotychczas były opisywane tylko w kwiatach arniki łąkowej (211).

### 5.2.2. Identyfikacja kwasów fenolowych i estrów pochodnych kwasu kawowego w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS

W badanym materiale roślinnym wykazano obecność szeregu związków o widmach UV zbliżonych do kwasu kawowego (232, 241sh, 294sh, 322) (Tabela 19 i Ryc. 47) (21, 208). Były to związki: **1, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 31, 36, 37** i **41**.

Na podstawie wartości  $m/z$  jonu molekularnego 603  $[M+H]^+$ , związek **23** został zidentyfikowany jako kwas 1-metoksy-szczawianoilo[oksaloiło]-3,5-dikawoilochinowy (21, 208). Z kolei związki **19, 20** i **21** charakteryzowane przez obecność jonu molekularnego  $[M+H]^+$  o wartości  $m/z$  517 w oparciu o kolejność elucji i porównanie z substancjami wzorcowymi, zidentyfikowano jako izomery kwasów dikawoilochinowych (diCQA) – 1,5-diCQA (**19**), 4,5-diCQA (**20**), 3,4-diCQA (**21**).

Związek **27**, wykazujący obecność jonu molekularnego  $[M+H]^+$  o wartości  $m/z$  531 w widmie ESI-MS wstępnie oznaczono jako kwas feruloilokawoilochinowy, którego obecność wcześniej opisywano w kwiatach arniki, a związek **31** na podstawie jonu molekularnego o wartości  $m/z$  679  $[M+H]^+$  jako kwas trikawoilochinowy.

Oprócz kwasu chlorogenowego (**4**), wykazano także obecność związku **1** – izomeru kwasu mono-kawoilochinowego, którego jon molekularny  $[M+H]^+$  o wartości  $m/z$  355 odpowiada masie cząsteczkowej kwasu chlorogenowego. Związek ten może być kwasem kryptochlorogenowym (4-*O*-kawoilochinowym) lub neochlorogenowym (3-*O*-kawoilochinowym) (135).

Po raz pierwszy rozpoznano zespół kwasów fenolowych obecnych w nalewce ze świeżej całej rośliny *A. montana* ujawniając obecność kwasu trikawoilochinowego, niewykrytego w kwiatach arniki górskiej i łąkowej. Przeprowadzona analiza HPLC przy użyciu detektorów DAD i ESI-MS nie wykazała obecności niektórych kwasów fenolowych, wcześniej zidentyfikowanych w kwiatach *Arnica montana*, takich jak: kwas trikawoilo-szczawianoilo[oksaloiło]-chinowy, kwas dikawoilo-dimetyloksy-szczawianoilo[oksaloiło]-chinowy, kwas acetylo-feruloilo-metoksy-szczawianoilo[oksaloiło]-chinowy oraz kwas dikawoilo-fumaroilo-chinowy (21, 208)



5.3. Omówienie wyników analizy ilościowej związków biologicznie czynnych w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS

Oznaczoną w badanych surowcach roślinnych zawartość związków z grupy prostych fenoli i polifenoli wyrażono jako mg/100 g s.m. i przedstawiono w Tabeli 20. Masę surowca roślinnego, stanowiącego świeżą całą roślinę *A. montana*, użytego do produkcji nalewki Arnica TM obliczono na podstawie danych przekazanych przez producenta (Boiron, Francja). W Tabeli 20 umieszczono dodatkowo informacje o zawartości poszczególnych związków w przeliczeniu na 100ml nalewki Arnica TM.

Zawartość poszczególnych flawonoli obliczono w oparciu o krzywą wzorcową wyznaczoną z użyciem kwercetyny, flawonów w przeliczeniu na luteolinę, a kwasów kawoilochinowych/fenolowych w przeliczeniu na kwas chlorogenowy (Tabela 20). Całkowita zawartość flawonoli/flawonów/kwasów fenolowych wyrażono jako sumę oznaczonych związków.

Tabela 20: Zawartość polifenoli i prostych fenoli zidentyfikowanych w analizowanym materiale roślinnym – kwiatach *A. montana* i *A. chamissonis* (mg/g s.m.) oraz nalewce macierzystej całej świeżej rośliny *A. montana* N1 (Arnica TM; Boiron) (mg/100g s.m. i mg/100 ml nalewki) oznaczonych opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS.

L.p.	Nazwa związku	<b>A. chamissonis</b>	<b>A. montana</b>	<b>Arnica TM</b>	
		Zawartość [mg/100g s.m.]	Zawartość [mg/100g s.m.]	Zawartość [mg/100g s.m.]	Zawartość [mg/100 mL nalewki]
1	Izomer kwasu kawoilochinowego	1,82 ± 0,33	2,43 ± 0,37	41,5 ± 1,8	4,61 ± 0,20
2	Kwas protokatechowy	26,0 ± 2,1	25,8 ± 3,5	6,04 ± 0,15	0,672 ± 0,017
3	Niezidentyfikowany związek	*	*	-	-
4	Kwas chlorogenowy	<b>328 ± 29</b>	<b>416,1 ± 6,1</b>	41.2 ± 1.1	4,58 ± 0,12
5	Kwas kawowy	14,4 ± 1,0	11,9 ± 2,5	16.68 ± 0.57	1,857 ± 0,064
6	Cynaryna	1,14 ± 0,15	1,82 ± 0,20	12.82 ± 0.39	1,427 ± 0,043
7	3-O-glukozyd patuletyny	14,7 ± 2,8	10,9 ± 1,5	7.33 ± 0.14	0,815 ± 0,015
8	3-O-glukuronid patuletyny	11,9 ± 1,7	10,29 ± 0,66	4.41 ± 0.25	0,491 ± 0,028
9	Izokwercetyna	16,5 ± 2,6	18,74 ± 0,57	5.19 ± 0.11	0,577 ± 0,012
10	3-O-glukuronid kwercetyny	16,8 ± 2,5	15,1 ± 1,6	6.91 ± 0.19	0,769 ± 0,021
11	7-O-glukozyd luteoliny	<b>127 ± 22</b>	<b>140 ± 23</b>	-	-
12	7-O-glukozyd eupafoliny	9,7 ± 1,1	8,6 ± 1,3	14.7 ± 1.7	1,64 ± 0,18
13	3-O-glukozyd 6-metoksykemferolu	3,99 ± 0,45	4,53 ± 0,42	-	-

14	Izomer kwasu dikawoilochinowego	8,2 ± 1,3	4,86 ± 1,5	55,0 ± 2,7	6,12 ± 0,30
15	7-O-glukuronid eupafoliny	18,2 ± 5,5	14,01 ± 0,54	7,76 ± 0,41	0,864 ± 0,046
16	3-O-glukozyd kemferolu	-	-	6,56 ± 0,29	0,730 ± 0,032
17	3-O-glukuronid kemferolu	2,56 ± 0,51	2,77 ± 0,24	7,55 ± 0,13	0,840 ± 0,014
18	Pochodna kwasu kawowego	3,50 ± 0,78	3,27 ± 0,34	-	-
19	Kwas 1,5-dikawoilochinowy	165 ± 23	350 ± 48	<b>450 ± 13</b>	50,1 ± 1,4
20	Kwas 4,5-dikawoilochinowy	<b>624 ± 92</b>	<b>700,8 ± 6,7</b>	31,5 ± 1,1	3,51 ± 0,12
21	Kwas 3,4-dikawoilochinowy	22,1 ± 1,1	26,0 ± 2,3	6,80 ± 0,32	0,757 ± 0,036
22	7-O-glukozyd apigeniny	12,2 ± 1,9	11,8 ± 1,0	-	-
23	Kwas 1-metoksy-szczawianoilo[oksaloi]-3,5-dikawoilochinowy	<b>438 ± 28</b>	<b>425 ± 12</b>	33,7 ± 1,1	3,75 ± 0,13
24	Izomer kwasu dikawoilochinowego	104 ± 34	82,3 ± 9,9	37,1 ± 1,3	4,13 ± 0,15
25	3-O-glukozyd luteoliny	28,3 ± 6,1	17,9 ± 1,4	8,69 ± 0,23	0,968 ± 0,026
26	Izomer kwasu dikawoilochinowego	57 ± 12	48,07 ± 4,14	5,09 ± 0,09	0,567 ± 0,010
27	Kwas feruloilokawoilochinowy	0,59 ± 0,03	1,84 ± 0,14	-	-
28	3-O-acetyloglukozyd kemferolu	9,18 ± 0,38	8,9 ± 1,4	12,00 ± 0,35	1,335 ± 0,039
29	Pochodna kwasu kawowego	2,24 ± 0,37	3,14 ± 0,34	5,35 ± 0,23	0,596 ± 0,026
30	Pochodna kwasu kawowego	54,5 ± 5,5	32,5 ± 1,8	-	-
31	Kwas trikawoilochinowy	-	-	8,65 ± 0,28	0,962 ± 0,031
32	Patuletyna	1,66 ± 0,04	-	-	-
33	6-metoksykemferol	2,84 ± 0,33	-	-	-
34	Kwercetyna	3,94 ± 0,09	-	-	-
35	Luteolina	121,1 ± 8,7	71,7 ± 1,3	-	-
36	Pochodna kwasu kawowego	10,0 ± 1,3	11,8 ± 1,8	36,1 ± 1,7	4,017 ± 0,193
37	Pochodna kwasu kawowego	182 ± 17	179,4 ± 9,1	7,84 ± 0,39	0,872 ± 0,044
38	6-metoksyapigenina	-	-	19,6 ± 1,6	2,178 ± 0,176
39	Apigenina	25,7 ± 4,6	19,05 ± 0,62	2,30 ± 0,15	0,256 ± 0,016
40	Kemferol	7,15 ± 0,34	5,17 ± 0,74	0,55 ± 0,01	0,061 ± 0,001
41	Pochodna kwasu kawowego	*	*	*	*
<b>Całkowita zawartość flawonów</b>		<b>343 ± 52</b>	<b>283 ± 49</b>	<b>53,0 ± 6,7</b>	<b>5,91 ± 0,44</b>
<b>Całkowita zawartość flawonoli</b>		<b>92,2 ± 5,7</b>	<b>76,8 ± 5,4</b>	<b>42,9 ± 3,5</b>	<b>5,62 ± 0,16</b>

<b>Całkowita zawartość kwasów fenolowych</b>	<b>2040 ± 170</b>	<b>2330 ± 200</b>	<b>803 ± 110</b>	<b>88,527 ± 2,88</b>
--	-------------------	-------------------	------------------	----------------------

### 5.3.1. Omówienie wyników analizy ilościowej flawonoidów w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS

Badane kwiaty *A. montana* i *A. chamissonis* charakteryzowały się najwyższą zawartością flawonoidów, w tym prawie 4-krotną przewagą flawonów ( $283 \pm 49$  mg/100 g s.m. w *A. montana* i  $343 \pm 52$  mg/100 g s.m. w *A. chamissonis*) w porównaniu do flawonoli ( $76,8 \pm 5,4$  mg/100 g s.m. i  $92,2 \pm 5,7$  mg/100 g s.m., odpowiednio). Nalewka Arnica TM sporządzona ze świeżej całej rośliny *A. montana* charakteryzowała się 2-krotnie niższą zawartością flawonoli ( $42,9 \pm 3,5$  mg/100 g s.m.) i prawie 6-7-krotnie niższą zawartością flawonów ( $53,0 \pm 6,7$  mg/100 g s.m.) (Tabela 20).

Związki dominujące w obydwu surowcach stanowiły: luteolina (**35**) ( $121,1 \pm 0,087$  mg/100 g s.m. *A. chamissonis* i  $71,7 \pm 1,3$  mg/100 g s.m. *A. montana*), apigenina (**39**) ( $25,7 \pm 4,6$  mg/100 g s.m. *A. chamissonis* i  $19,05 \pm 0,62$  mg/100 g s.m. *A. montana*), 7-O-glukozyd luteoliny (**11**) ( $140 \pm 23$  mg/100 g s.m. *A. chamissonis* i  $127 \pm 22$  mg/100 g s.m. *A. montana*), 3-O-glukozyd luteoliny (**25**) ( $28,3 \pm 6,1$  mg/100 g s.m. *A. chamissonis* i  $17,9 \pm 1,4$  mg/100 g s.m. *A. montana*) oraz 7-O-glukuronid eupafoliny (**15**) ( $18,2 \pm 5,5$  mg/100 g s.m. *A. chamissonis* i  $14,01 \pm 0,54$  mg/100 g s.m. *A. montana*) (Tabela 20).

W odróżnieniu do wyciągów otrzymanych z wysuszonych kwiatów, w zespole flawonoidów obecnych w nalewce sporządzonej ze świeżej całej rośliny arniki górskiej dominowały: 6-metoksyapigenina (**38**) ( $19,6 \pm 1,6$  mg/100 g s.m.), 7-O-glukozyd eupafoliny (**12**) ( $14,7 \pm 1,7$  mg/100 g s.m.) i 3-O-acetyloglukozyd kemferolu (**28**) ( $12,0 \pm 0,35$  mg/100 g s.m.) (Tabela 20).

### 5.3.2. Omówienie wyników analizy ilościowej kwasów fenolowych w przetworach z arniki opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS

W grupie kwasów fenolowych, w analizowanych kwiatach arniki górskiej i łąkowej dominował kwas chlorogenowy (**4**) ( $328 \pm 29$  mg/100 g s.m. *A. chamissonis*,  $416,1 \pm 6,1$  mg/100 g s.m. *A. montana*), kwas 1,5-dikawoilochinowy (**19**) ( $165 \pm 23$  mg/100 g s.m. *A. chamissonis*,  $350 \pm 48$  mg/100 g s.m. *A. montana*), kwas 4,5-dikawoilochinowy (**20**) ( $624 \pm 92$  mg/100 g s.m. *A. chamissonis*,  $700,8 \pm 6,7$  mg/100 g s.m. *A. montana*) i kwas 1-metoksy-

szczawianoilo[oksaloi]o]-3,5-dikawoilochinowy (**23**) ( $438 \pm 28$  mg/100 g s.m. *A. chamissonis*,  $425 \pm 12$  mg/100 g s.m. *A. montana*) (Tabela 20).

W zespole kwasów fenolowych obecnych w nalewce *Arnica* TM ze świeżej całej rośliny *A. montana* dominował kwas 3,4-dikawoilochinowy (**21**) ( $450 \pm 13$  mg/100 g s.m.) – stanowiący ponad połowę zespołu – oraz kwas chlorogenowy (**4**) ( $41,2 \pm 1,1$  mg/100 g s.m.) i izomer kwasu dikawoilochinowego o niezidentyfikowanej strukturze (**14**) ( $55,0 \pm 2,7$  mg/100 g s.m.). Dodatkowo, wykazano obecność czterech pochodnych kwasu kawowego w stężeniach około 30 mg/100 g s.m. (**20, 23, 24, 36**).

W przeliczeniu na suchą masę, surowiec stanowiący źródło nalewki *Arnica* TM (świeża cała roślina *A. montana*) charakteryzuje się najwyższą zawartością kwasu 3,4-dikawoilochinowego (**21**), wyraźnie dominującego w zespole polifenoli i prostych fenoli, podczas gdy w surowcach kwiatowych związkiem dominującym jest kwas 4,5-dikawoilochinowy (**20**) ( $624 \pm 92$  mg/100 g s.m. *A. chamissonis*,  $700,8 \pm 6,7$  mg/100 g s.m. *A. montana*).

Kwiaty *A. montana* wyróżniały się najwyższą całkowitą zawartością kwasów fenolowych ( $2330 \pm 200$  mg/100 g s.m.). Zbliżoną sumę kwasów fenolowych oznaczono w kwiatach *A. chamissonis* ( $2040 \pm 170$  mg/100 g s.m.), podczas gdy w całej roślinie *A. montana* stanowiącej materiał wyjściowy do produkcji nalewki *Arnica* TM była ona niemal 3-krotnie niższa ( $803 \pm 110$  mg/100 g s.m.) (Tabela 20).

Porównanie zawartości dominujących estrów pochodnych kwasu kawowego – kwasu chlorogenowego, kwasów 1,5-diCQA, 4,5-diCQA i 3,4-diCQA oraz kwasu 1-metoksy-szczawianoilo[oksaloi]o]-3,5-dikawoilochinowego w kwiatach arniki górskiej pochodzących ze stanowisk naturalnych i ogrodu botanicznego oraz nalewki z całej świeżej rośliny *A. montana* **N2** produkowanej przez firmę Helios (Wielka Brytania) wykazało istotne statystycznie różnice w profilach ilościowych badanych przetworów (Tabela 21). Jakkolwiek, związek dominujący stanowił kwas 4,5-dikawoilochinowy, zarówno w kwiatach arniki górskiej, jak i nalewce *Arnica* TM firmy Helios (Wielka Brytania). Rozróżniało to brytyjską nalewkę ze świeżej całej rośliny *A. montana* (**N2**) od produktu francuskiej firmy Boiron (**N1**), w której dominuje kwas 1,5-dikawoilochinowy, obecny w ponad 10-krotnie wyższym stężeniu niż 4,5-diCQA. Jednocześnie badane kwiaty arniki górskiej ze stanowisk naturalnych charakteryzowały się dużo niższą zawartością kwasu chlorogenowego (3-4-krotnie) i kwasu 1-metoksy-szczawianoilo[oksaloi]o]-

3,5-dikawoilochinowego (niemal 10-krotnie), przy wyższym udziale kwasu 3,4-dikawoilochinowego (niemal 10-krotnie) (Tabela 20).

Tabela 21: Zawartość dominujących estrów pochodnych kwasu kawowego w kwiatach *A. montana* pochodzących ze stanowisk naturalnych (AM2-AM5) i ogrodów botanicznych (AM1, AM6) i nalewce macierzystej z całej świeżej rośliny *A. montana* (N2; Arnica TM; Helios) (mg/100 ml nalewki) oznaczonych opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS.

L.p.	Nazwa związku	AM1 <sup>a</sup> [mg/100 g s.m.]	AM2 <sup>b</sup> [mg/100 g s.m.]	AM3 <sup>c</sup> [mg/100 g s.m.]	AM4 <sup>d</sup> [mg/100 g s.m.]	AM5 <sup>e</sup> [mg/100 g s.m.]	AM6 <sup>f</sup> [mg/100 g s.m.]	N2 <sup>g</sup> [mg/100 ml nalewki]
4	Kwas chlorogenowy	127,78 ± 0,36	95,5 ± 1,8 <sup>cg</sup>	104,9 ± 3,5 <sup>bg</sup>	154,66 ± 0,77 <sup>f</sup>	72,69 ± 5,66	172 ± 12 <sup>d</sup>	98,2 ± 3,3 <sup>bc</sup>
19	Kwas 1,5- dikawoilochinowy	172,3 ± 1,3 <sup>e</sup>	115,22 ± 0,57 <sup>cdf</sup>	79,9 ± 6,4 <sup>beg</sup>	141,95 ± 0,88 <sup>abf</sup>	78,5 ± 3,1 <sup>cg</sup>	127,7 ± 22,9 <sup>bd</sup>	77,67 ± 0,10 <sup>ce</sup>
20	Kwas 4,5- dikawoilochinowy	773,7 ± 5,4 <sup>df</sup>	454,2 ± 2,4 <sup>ceg</sup>	529 ± 19 <sup>bg</sup>	828,7 ± 1,6 <sup>af</sup>	365,4 ± 9,0 <sup>bg</sup>	858 ± 62 <sup>ad</sup>	452,13 ± 0,18 <sup>bce</sup>
21	Kwas 3,4- dikawoilochinowy	247,41 ± 0,21 <sup>f</sup>	170,2 ± 1,5 <sup>cd</sup>	144,7 ± 2,7 <sup>bde</sup>	138,7 ± 1,8 <sup>bcd</sup>	121,6 ± 5,1 <sup>cd</sup>	229 ± 22 <sup>a</sup>	54,80 ± 0,49
23	Kwas 1-metoksy- szczawianoilo[oksaloi]- 3,5-dikawoilochinowy	64,33 ± 0,54	43,067 ± 0,056 <sup>c</sup>	43,9 ± 3,2 <sup>b</sup>	29,56 ± 0,37 <sup>e</sup>	35,7 ± 2,6 <sup>d</sup>	71,85 ± 0,47	15,08 ± 0,28

<sup>abcdefg</sup> Istotne statystycznie różnice w zawartości dominujących estrów pochodnych kwasu kawowego ( $p < 0,05$ ) pomiędzy badanymi przetworami arniki górskiej; brak różnic wyrażono użyciem tej samej litery (test Tukeya).

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań, po raz pierwszy oznaczono zawartość substancji biologicznie czynnych obecnych w nalewce z całej świeżej rośliny *A. montana* (Arnica TM; Boiron, Francja). Charakteryzowała się ona niższą zawartością związków polifenolowych i prostych fenoli – zarówno z grupy kwasów fenolowych, jak i flawonoidów, w porównaniu do wysuszonych kwiatów arniki. Jakkolwiek, w zespole flawonoidów wyróżniał ją zbliżony stosunek ilościowy flawonów do flawonoli (1:1), w przeciwieństwie do kwiatów arniki górskiej i łąkowej o niemal 4-krotnej przewadze flawonów. Związki dominujące w zespole polifenoli badanych przetworów z arnik stanowiły estry pochodne kwasu kawowego – kwas 4,5-dikawoilochinowy w kwiatach arniki górskiej pochodzących ze źródeł komercyjnych i naturalnych, kwiatach arniki łąkowej ze źródeł komercyjnych i nalewce Arnica TM firmy Helios, natomiast kwas 1,5-dikawoilochinowy w nalewce Arnica TM firmy Boiron.

## 6. Analiza chromatograficzna laktonów seskwiterpenowych w kwiatach i nalewkach z arniki górskiej i łąkowej

Drugą, obok związków polifenolowych, grupę metabolitów wtórnych o kluczowym znaczeniu dla aktywności terapeutycznej przetworów z kwiatostanów arniki (*Arnicae flos*) stanowią laktony seskwiterpenowe, w tym helenalina, dihydrohelenalina i ich estry, którym przypisuje się podstawową rolę w mechanizmie aktywności przeciwzapalnej tych surowców (10, 120, 121, 123, 132). Badania nad mechanizmem aktywności laktonów seskwiterpenowych arniki wykazały, że hamują one syntezę prostaglandyn poprzez inaktywację enzymu syntetazy prostaglandyn i powodują obniżenie parametrów biochemicznych związanych z procesami zapalnymi. Mechanizm działania na poziomie molekularnym helenaliny obejmuje hamowanie aktywacji czynników transkrypcyjnych takich jak NF- $\kappa$ B, NF-AT stymulujących transkrypcję białek prozapalnych m.in. cytokin IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , białka ostrej fazy, COX i iNOS (10, 123, 132). Prowadzone badania nad zespołem laktonów seskwiterpenowych w arnikach górskich wskazują na możliwy związek pomiędzy zawartością tych związków w surowcu, a warunkami wzrostu rośliny. Naukowcy z Hiszpanii oraz Rumunii wykazali pozytywną korelację pomiędzy stężeniem helenaliny i jej pochodnych w kwiatostanach arniki a wysokością n.p.m. stanowiska zbioru, odnotowując najwyższe stężenia w surowcach rosnących na wysokości 1330-1460 m n.p.m. (Hiszpania) i 1000-1700 m n.p.m. (Rumunia) (103, 104). Podobną zależność zaobserwowano w badaniu obejmującym kwiatostany arniki ze stanowisk naturalnych położonych w północnych Włoszech – w analizie obejmującej surowce rosnące w stanowiskach położonych na wysokościach 1227-2060 m n.p.m., najwyższą zawartością helenaliny charakteryzowały się te, rosnące na wysokości 1608-1817 m n.p.m. (83).

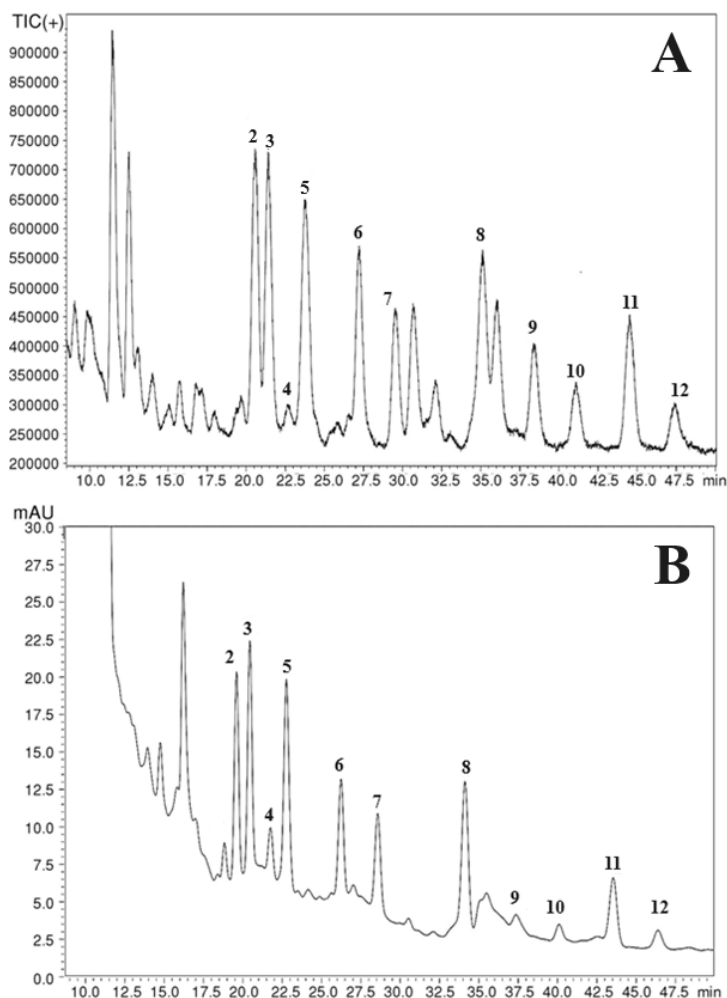
Niewiele jest jednak danych dotyczących różnic w profilu laktonów seskwiterpenowych pomiędzy kwiatostanami arniki górskiej i łąkowej a dostępne informacje pozostają w sprzeczności. Parafiniuk i wsp. wykazali w kwiatostanie arniki łąkowej jedynie obecność helenaliny i tyglinianu helenaliny (87), podczas gdy w innych badaniach – obejmujących surowiec pozyskany z 7 różnych źródeł, w większości próbek odnotowało obecność tyglinianu helenaliny, dimetyloakrylanu dihydrohelenaliny i śladowych ilości dihydrohelenaliny oraz jej angelinianu, przy braku wolnej helenaliny. Dwa spośród siedmiu kwiatostanów arniki łąkowej objętych badaniem charakteryzowały się także obecnością innych pochodnych dihydrohelenaliny - octanu, izomaślanu, 2-metylomaślanu, izowalerianu i tyglinianu (212).

Kolejnym etapem badań było rozpoznanie i porównanie profili laktonów seskwiterpenowych obecnych w kwiatostanach arniki górskiej i łąkowej oraz w nalewkach ze świeżej całej rośliny arniki górskiej (*Arnica TM*, Boiron oraz *Arnica TM*, Helios).

#### 6.1. Opracowanie warunków rozdzielania chromatograficznego HPLC zespołu laktonów seskwiterpenowych przetworów z arniki

Publikacje z ostatnich lat wymieniają liczne ograniczenia i problemy związane z zastosowaniem metody oznaczania laktonów seskwiterpenowych zawartej w monografii farmakopealnej (200) – *Douglas* i wsp. podkreślają konieczność przeprowadzenia wieloetapowego oczyszczania wyciągu (213), *Perry* i wsp. podważają wiarygodność przeliczania zawartości pochodnych estrowych na tyglinian helenaliny w odniesieniu do substancji wzorcowej, jaką jest santonina (103) a *Bergonzi* i wsp. donoszą o niepowodzeniach w odtworzeniu metody farmakopealnej w badaniach przenikania przez skórę ekstraktu z arniki otrzymanego metodą ekstrakcji w stanie nadkrytycznym (214).

W analizie jakościowej i ilościowej zespołu laktonów seskwiterpenowych estrów helenaliny i dihydrohelenaliny w kwiatach arniki opracowano w niniejszej pracy metodę HPLC, umożliwiającą pominięcie skomplikowanego etapu oczyszczania surowego wyciągu z tego surowca. Rozdzielenia chromatograficzne prowadzono na dwóch połączonych szeregowo kolumnach Kinetex C-18 (2,6  $\mu\text{m}$ , 4,60 x 100 mm) stosując elucję izokratyczną III i IV (rozdział 3.2.2.2) oraz detekcję UV  $\lambda$ -225 nm, co umożliwiło uzyskanie efektywnej separacji zespołu 11 laktonów seskwiterpenowych (Ryc. 48).



Ryc. 48: Chromatogram HPLC – TIC+ (*total ion chromatogram*; jonizacja dodatnia) (A) i UV (B) zespołu laktonów seskwiterpenowych obecnych w nalewce ze świeżej całej rośliny arniki górskiej *Arnica* TM (N1) (Boiron, Francja). Dwie szeregowo połączone kolumny Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm), elucja izokratyczna: program III, detekcja ESI-MS i UV  $\lambda$ -225 nm. Numeracja pików odpowiada *Tabela 22*.

## 6.2. Identyfikacja zespołu laktonów seskwiterpenowych pochodnych helenaliny i dihydrohelenaliny w nalewce z całej świeżej rośliny *A. montana* z użyciem opracowanej metody HPLC-DAD-ESI/MS

W oparciu o otrzymane widma UV, widma masowe ESI-MS i dane literaturowe (87, 103, 104, 111-114, 213) zidentyfikowano 10 związków obecnych w nalewce z arniki górskiej (N1) (Ryc. 48 i *Tabela 22*). Związki **6**, **8**, **11** i **12** przypisano do estrów helenaliny, kolejno: izomaślan, tyglinian, 2-metylomaślan i walerian helenaliny a związki **2**, **3**, **7**, **9**, **10** do estrów dihydrohelenaliny, kolejno: metakrylan, acetylodihydrohelenalina, octan, tyglinian, 2-metylomaślan i walerian dihydrohelenaliny wymieniane w piśmiennictwie jako składniki zespołu laktonów seskwiterpenowych obecnych w kwiatostanach *A. montana* (87, 103, 104, 112-114, 213). W pikie **5** o wartości  $t_R$  22,8 min wykazano obecność dwóch związków –



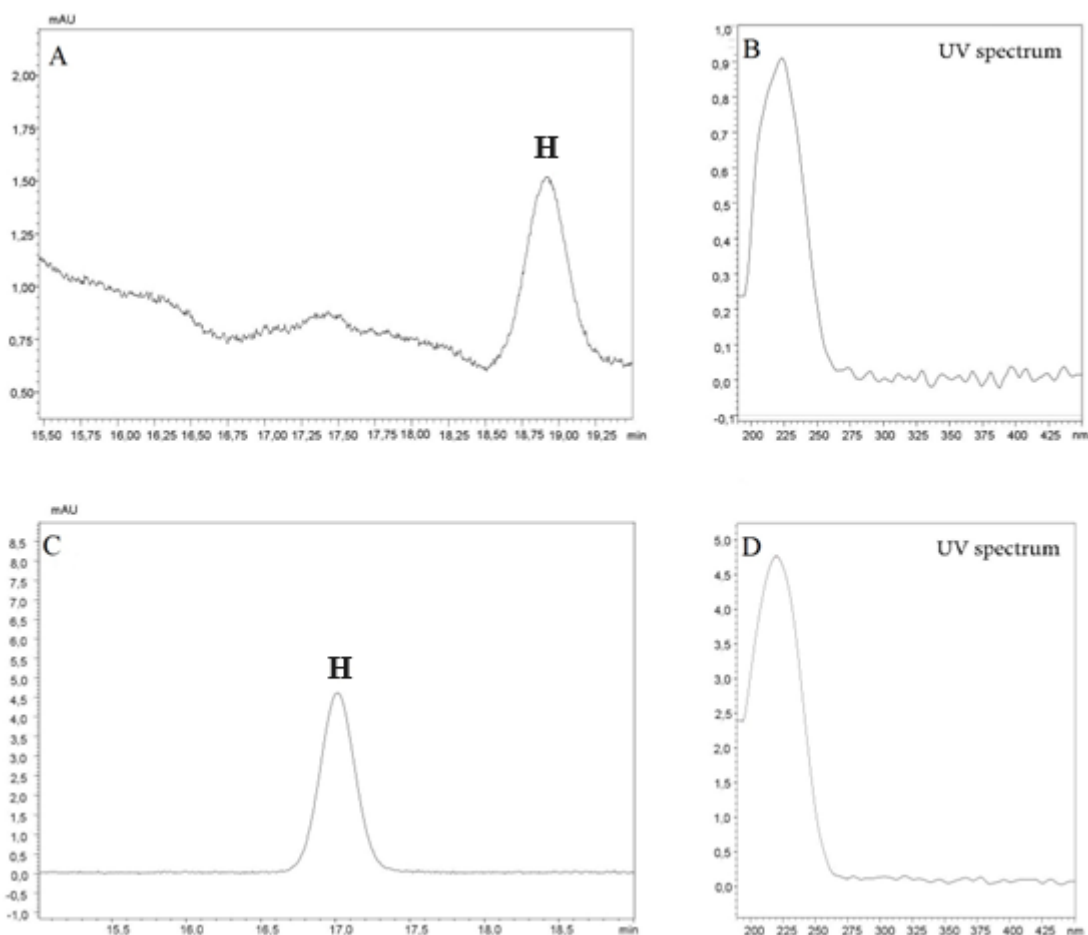
metakrylanu helenaliny i izomaślanu dihydrohelenaliny. Koelucję tych dwóch związków w innych warunkach rozdzielania chromatograficznego HPLC odnotowali *Perry* i wsp. (103)

Tabela 22: Laktony seskwiterpenowe zidentyfikowane w nalewce ze świeżej całej rośliny arniki górskiej *Arnica TM N1* (Boiron, Francja).

L.p.	t <sub>R</sub> (min)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Nazwa związku
H*	18.8	263	Helenalina
2	19.6	333	Metakrylan dihydrohelenaliny
3	20.4	307	Acetylodihydrohelenalina
4	21.8	363	Nieznany lakton
5	22.8	331 / 335	Metakrylan helenaliny / Izomaślan dihydrohelenaliny
6	26.2	333	Izomaślan helenaliny
7	28.6	347	Tyglinian dihydrohelenaliny
8	34.1	345	Tyglinian helenaliny
9	37.4	349	2-metylomaślan dihydrohelenaliny
10	40.1	349	Walerian dihydrohelenaliny
11	43.5	347	2-metylomaślan helenaliny
12	46.4	347	Walerian helenaliny

Objaśnienie: \* - dane chromatograficzne dla rozdzielania według programu elucji izokratycznej IV

Ze względu na niską wartość t<sub>R</sub> helenaliny (**1**) (t<sub>R</sub> - 6,7 min) nie udało się potwierdzić jej obecności w analizowanej próbce z użyciem opracowanych warunków rozdzielania. W tym celu przeprowadzono oznaczenie na pojedynczej kolumnie Kinetex C-18, stosując program elucji zmodyfikowany poprzez obniżenie siły elucji mieszaniny rozpuszczalników – stężenie metanolu w mieszaninie MeOH:H<sub>2</sub>O z 50:50 v/v zwiększono do 45:5 v/v (program elucji izokratycznej **IV**; rozdział 3.2.2.2) – Ryc. 49.



Ryc. 49: Chromatogramy HPLC-DAD-ESI/MS nalewki ze świeżej całej rośliny arniki górskiej *Arnica* TM N1 (Boiron, Francja) (A, B) i wzorcowej helenaliny (C, D). Kolumna Kinetex C-18, elucja izokratyczna: program II, detekcja UV  $\lambda$ -225 nm.

Obecność helenaliny potwierdzono na podstawie otrzymanego jonu molekularnego  $m/z$  263  $[M+H]^+$  oraz poprzez porównanie czasu retencji i widm UV z roztworem substancji wzorcowej (Ryc. 49).

### 6.3. Porównanie zespołu laktonów seskwiterpenowych w kwiatostanach arniki górskiej i łąkowej oraz nalewkach z świeżej całej rośliny arniki górskiej metodą HPLC-DAD-ESI/MS

Analiza chromatograficzna HPLC-DAD-ESI/MS wyciągów metanolowych z kwiatostanów arniki górskiej (**AM**) i łąkowej (**AC**) zakupionych w polskich sklepach zielarskich nie potwierdziła w surowcach obecności pełnego zespołu laktonów seskwiterpenowych. W obydwu analizowanych surowcach wykryto jedynie obecność helenaliny (**H**) oraz acetylodihydrohelenaliny (**3**) (Tabela 23).

Tabela 23: Zespoły laktonów seskwiterpenowych w kwiatach arniki górskiej (**AM**) i łąkowej (**AC**) pochodzących ze źródeł komercyjnych, kwiatach arniki górskiej ze stanowisk naturalnych i ogrodów botanicznych (**AM1-AM6**) oraz nalewkach ze świeżej całej rośliny arniki górskiej (**N1, N2**). Numeracja pików zgodnie z *Tabela 22*; H – helenalina.

Związek	Analizowany surowiec/nalewka									
	AC	AM	AM1	AM2	AM3	AM4	AM5	AM6	N1	N2
<b>H</b>	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
<b>2</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>3</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>4</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>5</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>6</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>7</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>8</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>9</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>10</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>11</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>12</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Objaśnienia: + - związek obecny, +/- - związek obecny w śladowych ilościach, - - nie wykryto.

Przeprowadzona analiza jakościowa HPLC-DAD-ESI/MS potwierdziła obecność pełnego zespołu laktonów seskwiterpenowych estrów helenaliny i dihydrohelenaliny (związki **2-12**) we wszystkich badanych wyciągach metanолоwych z kwiatu arniki górskiej pochodzących ze stanowisk naturalnych i ogrodu botanicznego (**AM1-AM6**) oraz drugiej nalewce z całej świeżej rośliny *A. montana* – *Arnica* TM (Helios, Wielka Brytania) (**N2**), ujawniając istotne różnice w składzie pomiędzy surowcami pozyskanymi ze stanowisk naturalnych i ogrodów botanicznych a surowcami ze źródeł komercyjnych, opisywanych przez producentów jako kwiatostany arniki łąkowej (**AC**) i arniki górskiej (**AM**). Jednocześnie w kwiatach arniki górskiej **AM4** nie potwierdzono obecności helenaliny a w surowcu **AM3** występowała ona jedynie w śladowych ilościach.

Zaobserwowane różnice mogą świadczyć o błędnej identyfikacji surowca **AM**, stanowiącego *de facto* kwiatostan arniki łąkowej, nie górskiej. Zgodnie z wynikami badań obejmujących analizę składu kwiatostanów z 16 rodzajów z gatunku *Arnica*, kwiatostany *A. chamissonis*

charakteryzują się uboższym zespołem laktonów seskwiterpenowych, w zakresie pochodnych helenaliny i dihydrohelenaliny, niż *A. montana* (212).

#### 6.4. Oznaczenie zawartości laktonów seskwiterpenowych w kwiatach i nalewkach z arniki metodą HPLC-DAD-ESI/MS

Opracowane warunki separacji zespołu laktonów seskwiterpenowych metodą HPLC-DAD-ESI/MS zostały zwalidowane (Tabela 24) i wykorzystane do przeprowadzenia oznaczeń ilościowych.

Tabela 24: Parametry walidacyjne dla metody HPLC-DAD-ESI/MS oznaczania helenaliny i laktonów seskwiterpenowych w kwiatostanach arniki.

Związek chemiczny	Zakres krzywej $\mu\text{g/ml}$	Krzywa kalibracyjna	R <sup>2</sup>	LOD [ $\mu\text{g/ml}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Helenalina*	3,125–100	$y = 3256,4 x + 12005$	0,9982	0,638	2,126
Helenalina**	3,125–50	$y = 2614,2x + 341,29$	0,9989	1,267	4,223

\* Metoda HPLC dla oznaczenia całkowitej zawartości laktonów seskwiterpenowych; \*\* Metoda HPLC dla oznaczenia helenaliny

Nalewka *Arnica* TM firmy Boiron (**N1**) charakteryzowała się niższą zawartością wolnej helenaliny ( $0,591 \pm 0,015$  mg/100 g s.m.) niż kwiaty arniki górskiej (**AM**) i łąkowej (**AC**) pochodzące ze źródeł komercyjnych (odpowiednio,  $1,5 \pm 0,4$  mg/100 g s.m. i  $0,764 \pm 0,026$  mg/100 g s.m.). Porównanie widm UV pików helenaliny na chromatogramach HPLC wykazało jednak możliwą obecność zanieczyszczeń w postaci związków koeluujących z helenaliną. Zanieczyszczenie widma UV helenaliny oraz niska intensywność piku uniemożliwiły oznaczenie zawartości helenaliny w kwiatach arniki górskiej ze stanowisk naturalnych i ogrodów botanicznych (**AM1-AM6**) oraz drugiej nalewce – firmy Helios (**N2**) (Tabela 25).

Tabela 25: Zawartość helenaliny i całkowita zawartość laktonów seskwiterpenowych w kwiatach *A. montana* (**AM**) i *A. chamissonis* (**AC**) ze źródeł komercyjnych, kwiatach *A. montana* ze stanowisk naturalnych (**AM1-AM6**) oraz nalewkach ze świeżej całej rośliny *A. montana* (**N1**, Arnica TM; Boiron i **N2**, Arnica TM; Helios, Wielka Brytania) (mg/100g s.m).

Materiał roślinny	Helenalina [mg/100 g s.m.] $\pm$ SD	Całkowita zawartość laktonów seskwiterpenowych [mg/100 g s.m.] $\pm$ SD
-------------------	---	--

<b>AM</b>	1,50 ± 0,40	_*
<b>AC</b>	0,764 ± 0,026	_*
<b>AM1</b>	n.o.	151,52 ± 0,88
<b>AM2</b>	n.o.	96,8 ± 1,9
<b>AM3</b>	n.o.	76,4 ± 3,79
<b>AM4</b>	_*	119,29 ± 0,56
<b>AM5</b>	n.o.	117 ± 11
<b>AM6</b>	n.o.	129 ± 11
<b>N1</b>	0,591 ± 0,015	99,4 ± 3,4
<b>N2</b>	n.o.	n.o.

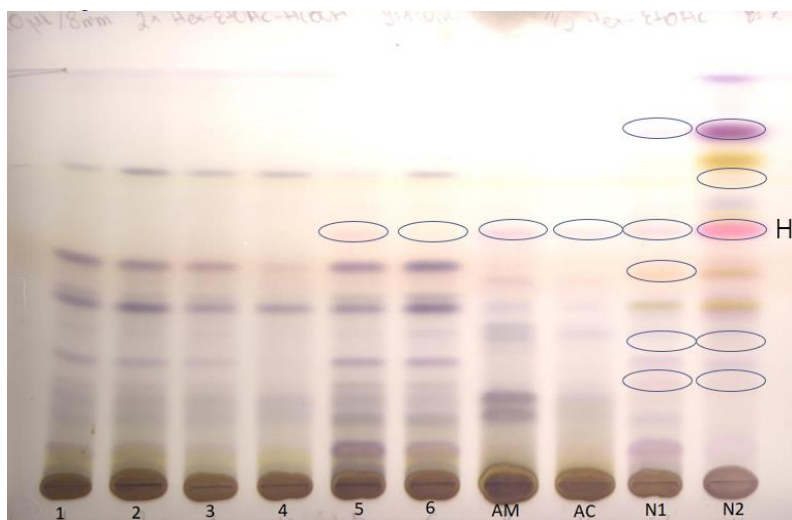
Objaśnienia: \* - związki nieobecne w badanym surowcu, n.o. – nie oznaczono, zawartość części związków z zespołu laktonów seskwiterpenowych poniżej LOQ lub obecność zanieczyszczeń w widmie UV helenaliny.

Kwiaty arniki górskiej pochodzące ze stanowisk naturalnych (**AM2-AM5**) i ogrodów botanicznych (**AM1, AM6**) wykazały duże różnice w całkowitej zawartości laktonów seskwiterpenowych, mieszczące się w zakresie 76,4-151,52 mg/100 g s.m. Cztery spośród nich (**AM1, AM4-AM6**) charakteryzowały się wyższą zawartością laktonów seskwiterpenowych niż nalewka *Arnica* TM firmy Boiron (**N1**). Podczas gdy w nalewce *Arnica* TM firmy Helios (**N2**) część z oznaczanych związków (związki **7-12**) występowała w stężeniach <LOQ.

#### 6.5. Porównanie zespołu laktonów seskwiterpenowych w kwiatostanach arniki górskiej i łąkowej oraz nalewkach ze świeżej całej rośliny arniki górskiej metodami TLC

Różnice w profilach laktonów seskwiterpenowych w badanych materiale roślinnym z arniki wykazano również metodami chromatografii cienkowarstwowej 1D i 2D TLC. Przeprowadzono optymalizację warunków rozdzielania chromatograficznego w zakresie doboru fazy stacjonarnej (płytki HPTLC Si60, TLC Si60 i TLC Si60<sub>F254</sub>) oraz fazy ruchomej (mieszanki heksan-octan etylu w różnych proporcjach, C/F1-F9; rozdział 3.1.2). W ocenie efektywności separacji zespołu laktonów seskwiterpenowych uwzględniono liczbę rozdzielonych pasm/plam, wybarwiających się pod wpływem odczynnika wywołującego i zakres ich wartości R<sub>F</sub>. Najlepsze rozdzielanie otrzymano metodą 1D TLC z zastosowaniem techniki MGD (*multi-gradient development*) obejmującym dwukrotne rozwinięcie chromatogramu TLC na dystansie 8 cm z użyciem fazy ruchomej C/F8 (heksan-octan etylu-kwas mrówkowy 9:1:0,1 v/v/v) a następnie jednokrotne na dystansie 5 cm z użyciem fazy ruchomej C/F9 (heksan-octan etylu 8:2 v/v).

Otrzymane w opracowanych warunkach chromatogramy derywatywowano za pomocą odczynnika wanilinowego w kwasie siarkowym (rozdział 3.1.4), zgodnie z danymi *Picman* i wsp. (171) uwidaczniającego helenalinę w postaci różowo-pomarańczowego pasma. Ponadto obserwowano w badanych wyciągach z kwiatów arniki pasma przybierające barwę od słabo różowej do szaro-fioletowej oraz żółtej (Ryc. 50).

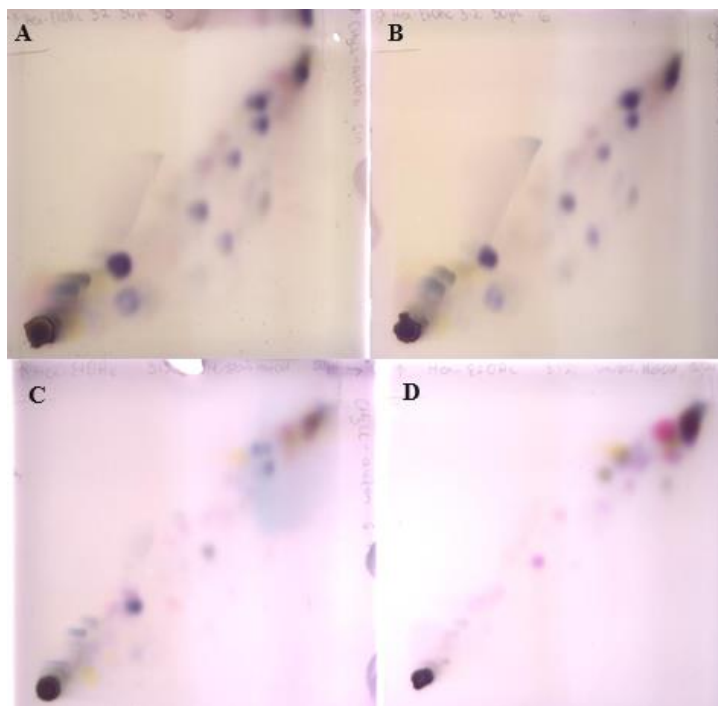


Ryc. 50: Chromatogram 1D TLC zespołu laktonów seskwiterpenowych obecnych w kwiatostanach arniki górskiej pochodzących ze stanowisk naturalnych i ogrodów botanicznych (1-6), kwiatostanów arniki górskiej (AM) i łąkowej (AC) zakupionych w sklepach zielarskich oraz dwóch nalewek ze świeżej całej rośliny arniki górskiej (N1, N2). Faza stacjonarna: TLC Si60, faza ruchoma – układ MGD: 2x C/F8 (9 cm), 1x C/F9 (6 cm), odczynnik wywołujący: odczynnik wanilinowy w kwasie siarkowym, detekcja: światło widzialne, objętość aplikowanej próbki: 20  $\mu$ l.

Uzyskane rozdzielanie (Ryc. 50) potwierdziło duże podobieństwo wyciągów z arniki górskiej **AM1-AM6** i nalewki **N1**, charakteryzujących się zbliżoną liczbą rozdzielonych fioletowo-szarych pasm mogących stanowić estry pochodne helenaliny i dihydrohelenaliny z niewielkimi różnicami w ich intensywności. Spośród wymienionych wyróżniły się surowce **AM5** i **AM6** (wyższa intensywność pasm o  $R_f$  poniżej 0,1) oraz nalewka **N2** charakteryzująca się obecnością intensywnych pasm o  $R_f$  powyżej 0,58, wybarwiających się na niebiesko, żółto i fioletowo. Wyciągi z kwiatów arniki zakupionych w sklepach zielarskich (**AM** i **AC**) charakteryzowały się najuboższym składem jakościowym.

Opracowana metoda 2D TLC umożliwiła uzyskanie efektywniejszego rozdzielania fioletowo-szarych pasm, mogących odpowiadać estrom pochodnym helenaliny i dihydrohelenaliny. Optymalizacja warunków rozdzielania w zakresie faz ruchomych obejmowała porównanie jakości separacji z wykorzystaniem jako fazy pierwszego kierunku faz C/F1-F9 oraz faz C/F10-F15 jako fazy drugiego kierunku. Najlepsze rozdzielanie osiągnięto w układzie – I kierunek faza:

C/F5 – heksan-octan etylu 3:2 (v/v), II kierunek faza: C/F15 – chloroform-aceton 6:1 (v/v) (Ryc. 51).



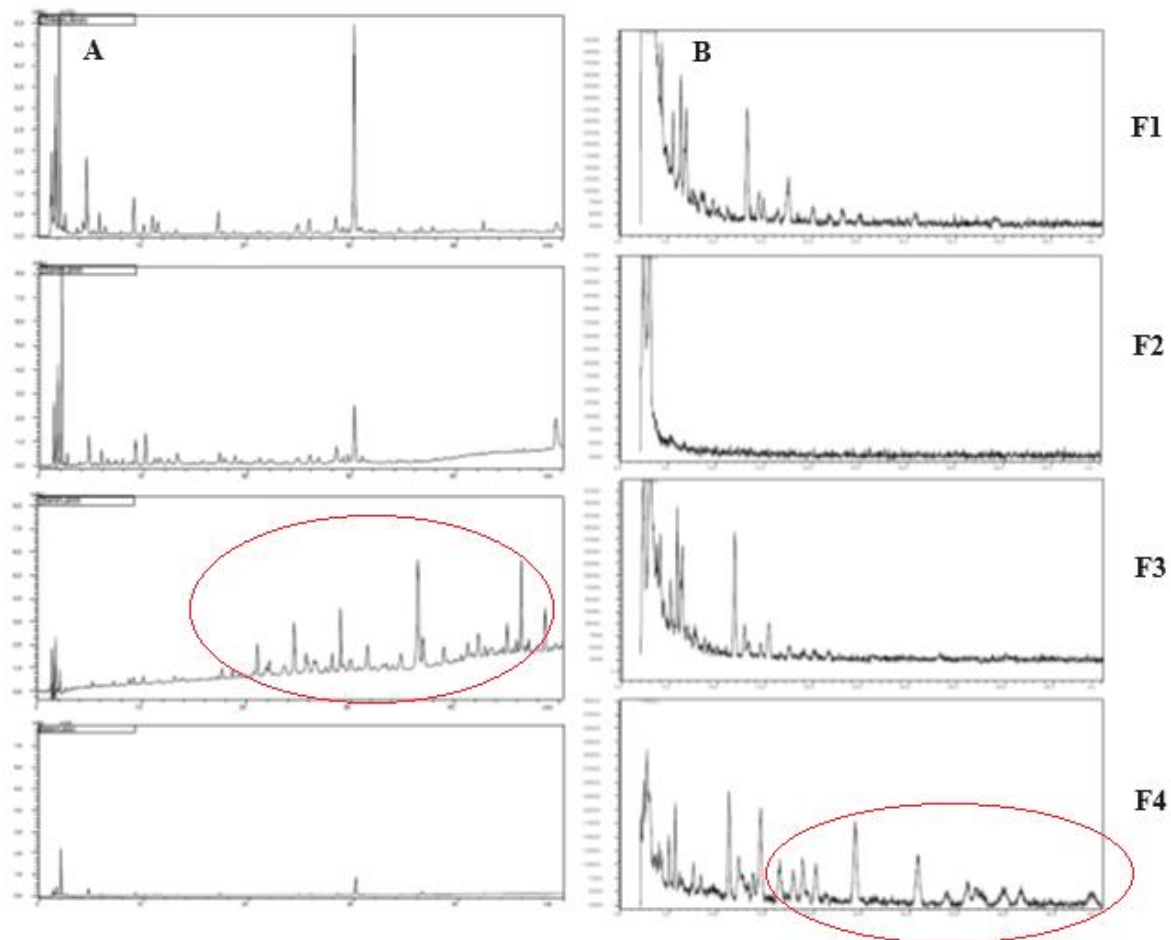
Ryc. 51: Chromatogramy 2D TLC wyciągów metanolowych z arniki górskiej (A - AM5; B - AM6) oraz nalewek świeżej całej rośliny arniki górskiej (C - N1; D - N2). Faza stacjonarna: TLC Si60, fazy ruchome – I faza: C/F5, II faza: C/F15; odczynnik wywołujący: odczynnik wanilinowy w kwasie siarkowym, detekcja: światło dzienne, objętość aplikowanej próbki: 50  $\mu$ l.

Na otrzymanych chromatogramach 2D TLC wyciągów z arniki górskiej **AM5** i **AM6** uzyskano rozdzielanie około 12 fioletowo-szarych pasm (Ryc. 51) przypuszczalnie należących do zespołu estrów helenaliny i dihydrohelenaliny rozpoznanych metodą HPLC-DAD-ESI/MS (Tabela 22). Ze względu na brak dostępnych substancji wzorcowych, nie przeprowadzono pełnej identyfikacji poszczególnych pasm. Opracowany układ chromatograficzny (2D TLC) będzie w przyszłości wykorzystany do dalszych badań laktonów seskwiterpenowych w kwiatach arnik.

#### 6.6. Oczyszczanie ekstraktu z wykorzystaniem automatycznej ekstrakcji do fazy stałej (SPE)

W ramach realizowanych badań opracowana została metoda oczyszczania wyciągów metanolowych z kwiatostanów arniki pozwalająca na wydzielenie frakcji bogatej w laktony seskwiterpenowe obok frakcji polifenolowej metoda SPE, w systemie zautomatyzowanym. Próbkę nalewki z świeżej całej rośliny arniki górskiej **N1** kolejno frakcjonowano stosując 4 programy elucji gradientowej uwzględniające wzrost stężenia metanolu w mieszaninie metanol-woda za pomocą automatycznego zestawu do ekstrakcji do fazy stałej (SmartPrep Extractor, Horizon). Najlepsze wyniki uzyskano stosując program P4 obejmujący rozdzielanie

aplikowanego wyciągu na 4 frakcje, wykorzystując kolejno po 6 ml 20% metanolu (F1), 30% metanolu (F2), 60% metanolu (F3) i 100% metanolu (F4). Analiza uzyskanych frakcji opracowanymi metodami HPLC-DAD-ESI/MS wykazała obecność pełnego zespołu polifenoli we frakcji **F3** oraz pełnego zespołu laktonów seskwiterpenowych we frakcji **F4**, w pełni oczyszczonej od związków fenolowych (Ryc. 52).



Ryc. 52: Chromatogramy HPLC frakcji (F1 – 20% metanol, F2 – 30% metanol, F3 – 60% metanol, F4 – 100% metanol) wydzielonych z nalewki N1 z użyciem opracowanej metody SPE. A – zespół związków polifenolowych (detekcja UV 254 nm; wg metody opisanej w rozdziale 4), B – zespół laktonów seskwiterpenowych (TIC, jonizacja dodatnia; wg metody opisanej w rozdziale 6).

Skuteczność uzyskanej metody została dodatkowo potwierdzona poprzez powtórzenie procedury dla wybranego wyciągu metanolowego z kwiatu arniki górskiej (**AM6**).

Opracowana metoda SPE może stanowić szybszą i tańszą alternatywę dla metody oczyszczania surowego wyciągu z arniki opisanej w monografii farmakopealnej tego surowca (98).



## B. Omówienie wyników badań aktywności biologicznej

Przeprowadzone badania obejmowały ocenę aktywności przeciwutleniającej jako stanowiącej element aktywności przeciwzapalnej, wyciągów roślinnych otrzymanych z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego oraz kwiatów arniki górskiej i łąkowej. Szczególną uwagę poświęcono wyciągom z żywokostu lekarskiego, ze względu na obecność – ujawnionych w ostatnich latach i potwierdzonych w przeprowadzonych badaniach fitochemicznych – nieopisywanych dotąd w surowcu estrów pochodnych kwasu kawowego, o wciąż słabo poznanej aktywności biologicznej, mianowicie rabdozyny, globoidnanu A i globoidnanu B (20, 65).

Ocenę aktywności przeciwutleniającej metanolowych wyciągów roślinnych przeprowadzono z użyciem standardowych testów spektrofotometrycznych – DPPH i ABTS oceniających zdolność do wymiatania wolnych rodników oraz FRAP pozwalający ocenić zdolność analizowanego wyciągu do redukcji jonów żelaza – hamowania reakcji wolnorodnikowych (215, 216). Ponieważ metody te oceniają potencjał całego zespołu związków czynnych zawartych w badanym ekstrakcie roślinnym, dodatkowo charakteryzowano badane matryce roślinne z żywokostu i arnik. Dlatego przeprowadzono także rozpoznanie związków czynnych z użyciem technik bioautografii-TLC. Testy bioautograficzne-TLC stanowią szybką i tanią metodę badania właściwości biologicznych związków chemicznych jako składników ekstraktów roślinnych poprzez ich derywatyzację na chromatogramach TLC – związki przejawiające oznaczaną aktywność ulegają wybarwieniu odznaczając się od pozostałych substancji (217, 218). Do oceny aktywności przeciwutleniającej zastosowano dwa rodzaje testów bioautograficznych pozwalających na ujawnienie związków o właściwościach przeciwrodnikowych – test DPPH do oceny zdolności do wymiatania wolnych rodników i system ryboflawina-światło-NBT (*nitro blue tetrazolium chloride*) oceniający zdolność do hamowania powstawania wolnych rodników – a także enzymatyczny test hamowania oksydazy ksantynowej (XO, *xanthine oxidase*) do oceny aktywności przeciwzapalnej, wyrażonej jako zdolność do hamowania XO, enzymu odpowiedzialnego za metabolizm puryn, którego inhibitory są z powodzeniem stosowane w leczeniu dny moczanowej (152, 217, 218).

Dodatkowo, podjęto próbę oceny aktywności przeciwzapalnej wyciągów z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego z użyciem gotowych zestawów do testów immunoenzymatycznych (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) ukierunkowanych na badanie aktywności hamującej cyklooksygenazę-1 i -2 (COX, *cyclooxygenase-1/-2*) – COX (ovine/human) Inhibitor

Screening Assay Kit (Cayman Chemical, USA). Test ten bezpośrednio mierzy poziom prostaglandyn PGF2 $\alpha$  poprzez redukcję z wykorzystaniem SnCl<sub>2</sub> prostaglandyny PGH<sub>2</sub> wytwarzanej w przebiegu reakcji cyklooksygenazy (219, 220).

## 7. Omówienie wyników oznaczenia aktywności przeciwutleniającej wyciągów z korzeni i liści żywokostu z wykorzystaniem technik spektroskopii UV-Vis

Ocenę aktywności przeciwutleniającej wyciągów metanolowych z korzenia i liścia żywokostu przeprowadzono z wykorzystaniem testów spektrofotometrycznych DPPH i ABTS (wymiatanie wolnych rodników) oraz FRAP (chelatacja jonów żelaza) a wyniki oznaczeń zostały wyrażone jako mmol TE (*trolox equivalent*)/g s.m. (Tabela 26).

Tabela 26: Wyniki oznaczeń aktywności przeciwutleniającej wyciągów z korzeni i liści żywokostu lekarskiego z wykorzystaniem testów spektrofotometrycznych DPPH, FRAP i ABTS.

L.p.	Pochodzenie surowca:	DPPH (mmol TE/g s.m.), n=3	FRAP (mmol TE/g s.m.), n=3	ABTS (mmol TE/g s.m.), n=3
<b>Korzenie żywokostu</b>				
1.	<b>Fr<sup>a</sup></b>	0,178 ± 0,018 <sup>efh</sup>	0,88 ± 0,11 <sup>efijk</sup>	0,302 ± 0,024 <sup>efhijk</sup>
2.	<b>DNr<sup>b</sup></b>	0,207 ± 0,002 <sup>efhj</sup>	1,137 ± 0,027 <sup>cdeijk</sup>	0,386 ± 0,039 <sup>ek</sup>
3.	<b>DPr<sup>c</sup></b>	0,1725 ± 0,0071 <sup>efh</sup>	0,827 ± 0,056 <sup>befijk</sup>	0,29 ± 0,17 <sup>efhijk</sup>
4.	<b>EHR<sup>d</sup></b>	0,1682 ± 0,0046 <sup>efh</sup>	0,843 ± 0,016 <sup>befijk</sup>	0,348 ± 0,014 <sup>efjk</sup>
5.	<b>Lu<sup>e</sup></b>	0,0960 ± 0,0031 <sup>abcdefijk</sup>	0,412 ± 0,0055 <sup>abcdeghijk</sup>	0,1078 ± 0,0029 <sup>abcdefghijk</sup>
6.	<b>Za<sup>f</sup></b>	0,097 ± 0,012 <sup>abcdeijk</sup>	1,26 ± 0,037 <sup>acdeijk</sup>	0,471 ± 0,018 <sup>acdeg</sup>
7.	<b>Łó<sup>g</sup></b>	0,203 ± 0,013 <sup>efhj</sup>	1,018 ± 0,21 <sup>eijk</sup>	0,364 ± 0,083 <sup>efjk</sup>
8.	<b>Gd<sup>h</sup></b>	0,0749 ± 0,0089 <sup>abcdgijk</sup>	1,031 ± 0,054 <sup>eijk</sup>	0,418 ± 0,031 <sup>acek</sup>
<b>Liście żywokostu</b>				
1.	<b>DPF<sup>i</sup></b>	0,171 ± 0,019 <sup>efh</sup>	1,491 ± 0,058 <sup>abcdeghk</sup>	0,427 ± 0,014 <sup>acek</sup>
2.	<b>EHF<sup>j</sup></b>	0,1615 ± 0,0062 <sup>befgh</sup>	1,522 ± 0,069 <sup>abcdeghk</sup>	0,469 ± 0,025 <sup>acdeg</sup>
3.	<b>Hf<sup>k</sup></b>	0,195 ± 0,025 <sup>efh</sup>	1,897 ± 0,082 <sup>abcdeghij</sup>	0,561 ± 0,034 <sup>abcdeghi</sup>

<sup>abcdegh</sup> Statystycznie istotne różnice w sile działania antyoksydacyjnego wyrażonego jako mmol TE/g ( $p < 0,05$ ) pomiędzy analizowanymi próbkami; różnice są wyrażone tą samą literą (test Tukeya).

Wyniki oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej wyciągów metanolowych z korzeni żywokostu lekarskiego, podobnie jak w przypadku omawianych wyników oznaczeń ilościowych pochodnych kwasu kawowego (rozdział 3.2), ujawniły statystycznie istotne różnice pomiędzy analizowanymi wyciągami roślinnymi. Ponadto zaobserwowano związek pomiędzy wynikami pomiarów aktywności antyoksydacyjnej a pochodzeniem materiału roślinnego. Wyciągi

metanolowe z korzeni żywokostu pozyskanych ze sklepów zielarskich (**Fr**, **DNr**, **DPr** i **EHR**) wykazały statystycznie istotne różnice w aktywności w porównaniu do surowców pochodzących z upraw ogrodowych – w szczególności w zakresie zdolności do wymiatania wolnych rodników (testy DPPH i ABTS). Podobną zależność zaobserwowano w przypadku zdolności do redukcji jonów żelaza (test FRAP), z wyjątkiem surowca **DNr** charakteryzującego się znacznie silniejszym efektem hamującym reakcje wolnorodnikowe.

Podobieństwa w sile działania antyoksydacyjnego odnotowano także w grupie wyciągów metanolowych z korzeni żywokostu pochodzących z ogrodów botanicznych (**Za**, **Łó** i **Gd**). Spośród nich, wyciąg z korzenia **Lu** charakteryzował się najłagodniejszym działaniem przeciwutleniającym niż pozostałe surowce objęte badaniem (wyjątek – **Za** w teście DPPH). Warto odnotować, że spośród analizowanych korzeni, charakteryzował się najniższą zawartością globoidnanu B i jedną z najniższych zawartości globoidnanu A i kwasu rozmarynowego.

Objęte badaniem metanolowe wyciągi z liści żywokostu charakteryzowały się 2-4-krotnie wyższą zdolnością do redukcji jonów żelaza, mierzoną testem FRAP, w porównaniu do wyciągów metanolowych z korzeni żywokostu (1,491-1,897 mmol TE/g s.m. vs. 0,412-1,26 mmol TE/g s.m.) wykazując istotne statystycznie różnice pomiędzy większością analizowanych wyciągów z korzenia żywokostu, z wyjątkiem surowców **DPf** i **Za**. Jednocześnie wykazywały zbliżoną aktywność wymiatającą wolne rodniki, mierzoną testami DPPH i ABTS, co wyciągi z części podziemnych żywokostu – w przypadku testu DPPH nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy wynikami dla liści żywokostu a korzeniami otrzymanymi z firm zielarskich (**Fr**, **DNr**, **DPr**, **EHR**), z kolei aktywność antyoksydacyjna mierzona testem ABTS była zbliżona do wyników dla korzeni pochodzącymi z ogrodów botanicznych (**Lu**, **Za**, **Gd**).

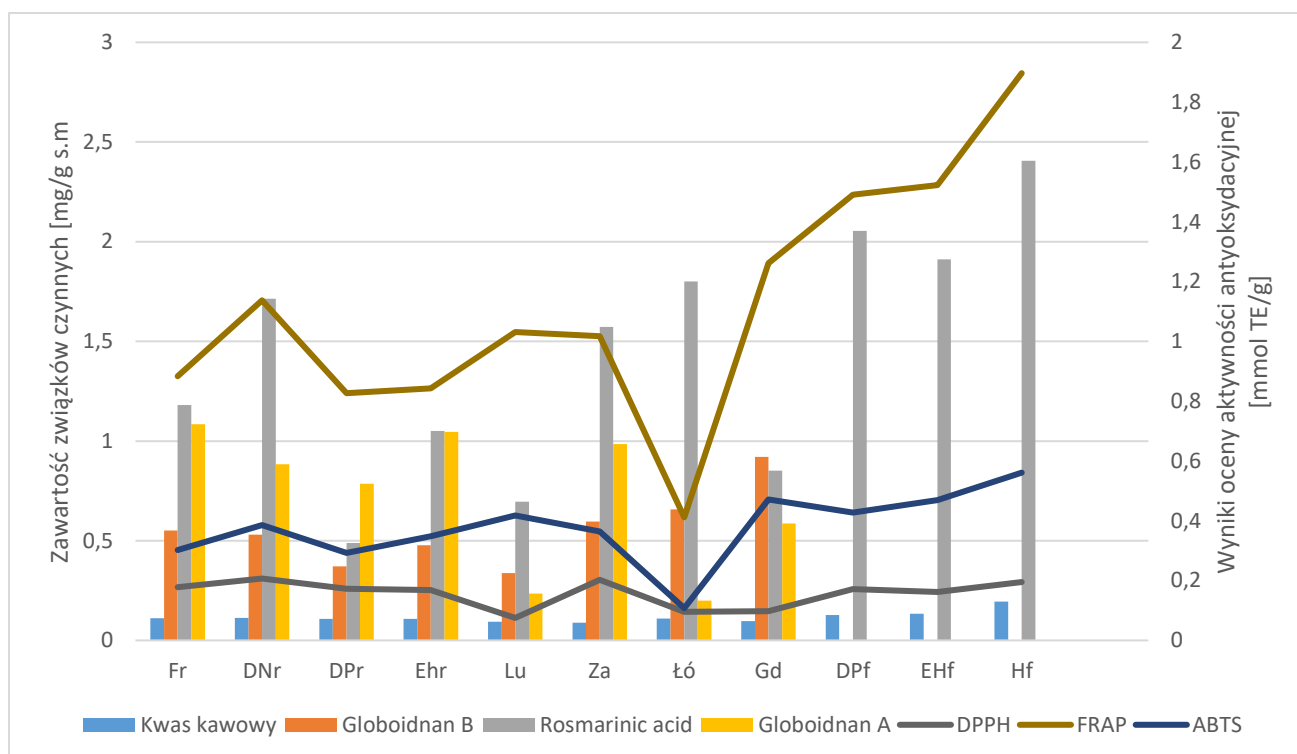
### 7.1. Analiza statystyczna

W celu zbadania różnic występujących pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną wyciągów metanolowych z korzeni i liści żywokostu a pochodzeniem próbek – zarówno anatomicznym (korzeń/liść), jak i związanym ze źródłem surowca (ogród botaniczny/sklep zielarski i pochodzenie geograficzne) zdecydowano o przeprowadzeniu pogłębionej analizy chemometrycznej.

Analizy chemometryczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 13.3. Spośród otrzymanych danych ilościowych wykorzystano w analizie chemometrycznej oznaczone zawartości kwasu kawowego i kwasu rozmarynowego, a także wyniki oznaczeń metodami DPPH, FRAP i ABTS dla liści i korzenia żywokostu. Wyniki dla związków takich jak globoidnan A i B, które są nieobecne w liściach, a oznaczono ich zawartości w korzeniach, zostały dodatkowo uwzględnione w analizie. Dane do analizy chemometrycznej podzielono na dwie główne grupy. Pierwsza grupa składała się z wyników dla korzeni żywokostu, a druga grupa, z wyników dla korzeni i liści. Dane zostały przeanalizowane pod kątem istnienia rozkładu normalnego. W przypadku jego braku zastosowano testy nieparametryczne, takie jak test Kruskala-Wallisa i korelację rang Spearmana. Uzyskana baza danych została wykorzystana do przeprowadzenia analizy czynnikowej (FA) i analizy skupień (CA) przy użyciu metody Warda z zastosowaniem odległości euklidesowej. Próbkę korzeni żywokostu zróżnicowano ze względu na pochodzenie geograficzne i metodę uprawy (producent-ogród). Liście i korzenie, z drugiej strony, zróżnicowano ze względu na część anatomiczną (korzeń-liść), pochodzenie i metodę uprawy biorąc pod uwagę zawartości analizowanych związków

#### *7.1.1. Korelacje*

Test korelacji rang Spearmana przeprowadzono na trzech poziomach istotności:  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ . Najbardziej istotne statystycznie zależności zaobserwowano przy  $p < 0,001$  dla korzeni żywokostu dla następujących par, tj. kwas kawowy-globoidnan A, kwas rozmarynowy-FRAP i ABTS-FRAP. W przypadku wyciągów metanolowych z korzeni i liści żywokostu występowały korelacje ( $p < 0,001$ ) między zawartością kwasu kawowego a kwasu rozmarynowego a także pomiędzy stężeniami tych związków a wynikami testów spektrofotometrycznych w parach: kwas kawowy-FRAP, kwas rozmarynowy-FRAP, kwas rozmarynowy-ABTS.



Ryc. 53: Histogram obrazujący zależności pomiędzy wynikami oceny aktywności antyoksydacyjnej surowców (DPPH, FRAP, ABTS; mmol TE/g) a zawartością pochodnych kwasu kawowego (mg/g s.m.).

Przy poziomie istotności  $p < 0,05$  zaobserwowano istotną statystycznie wysoką korelację pomiędzy zawartością kwasu rozmarynowego a wynikami testów DPPH i FRAP (0,61-0,65,  $p < 0,05$ ) oraz umiarkowaną korelację pomiędzy zawartością kwasu kawowego a wynikami testu DPPH (0,43,  $p < 0,05$ ) i zawartością globoidnanu A a wynikami FRAP i ABTS (0,39-0,41,  $p < 0,05$ ), potwierdzając rolę pochodnych kwasu kawowego w aktywności antyoksydacyjnej surowców otrzymywanych z korzeni i liści żywokostu (Ryc. 53).

### 7.1.2. Test Kruskala-Wallis

Test nieparametryczny Kruskala-Wallis wykazał statystycznie istotne różnice w dwóch grupach analizowanych danych (korzenie i liście) pod względem pochodzenia geograficznego, metody uprawy i zróżnicowania anatomicznej części żywokostu.

Wyniki uzyskane dla grupy korzeni ze względu na pochodzenie geograficzne były następujące: kwas kawowy ( $H=17,520$ ;  $p=0,014$ ), globoidnan B ( $H=20,413$ ;  $p=0,005$ ), kwas rozmarynowy ( $H=21,773$ ;  $p=0,003$ ), globoidnan A ( $H=19,693$ ;  $p=0,006$ ), DPPH ( $H=20,004$ ;  $p=0,006$ ), FRAP ( $H=19,933$ ;  $p=0,006$ ) i ABTS ( $H=19,880$ ;  $p=0,006$ ). Dane dotyczące korzeni sklasyfikowane według metody uprawy (producent-ogród) były następujące: kwas kawowy ( $H=9,363$ ;  $p=0,002$ ), globoidnan B ( $H=3,203$ ;  $p=0,073$ ), kwas rozmarynowy ( $H=0,403$ ;  $p=0,525$ ),

globoidnan A (H=6,453; p=0,011), DPPH (H=5,470; p=0,019), FRAP (H=1,080; p=0,030) i ABTS (H=1,470; p=0,225).

Druga grupa uwzględniała dane dla korzeni i liści, które analizowano pod kątem części anatomicznej rośliny, pochodzenia geograficznego i metody uprawy. Wyniki testu Kruskala-Wallisa dla danych korzeń-liść (część anatomiczna rośliny) były następujące: kwas kawowy (H=19,059; p=0,000), kwas rozmarynowy (H=19,059; p=0,000), DPPH (H=1,105; p=0,293), FRAP (H=19,059; p=0,000) i ABTS (H=11,805; p=0,001). Dla tej samej grupy danych przeprowadzono test z uwzględnieniem innej zmiennej grupującej, tj. pochodzenia geograficznego: kwas kawowy (H=24,383; p=0,002), kwas rozmarynowy (H=16,200; p=0,040), DPPH (H=21,567; p=0,006), FRAP (H=17,330; p=0,027) i ABTS (H=22,652; p=0,004). Ostatnia analiza dotyczyła wpływu metody uprawy (producent-ogród) na dane, a wyniki były następujące: kwas kawowy (H=16,035; p=0,000), kwas rozmarynowy (H=2,590; p=0,108), DPPH (H=5,385; p=0,020), FRAP (H=1,815; p=0,178) i ABTS (H=0,169; p=0,681).

### *7.1.3. Test post-hoc Dunna*

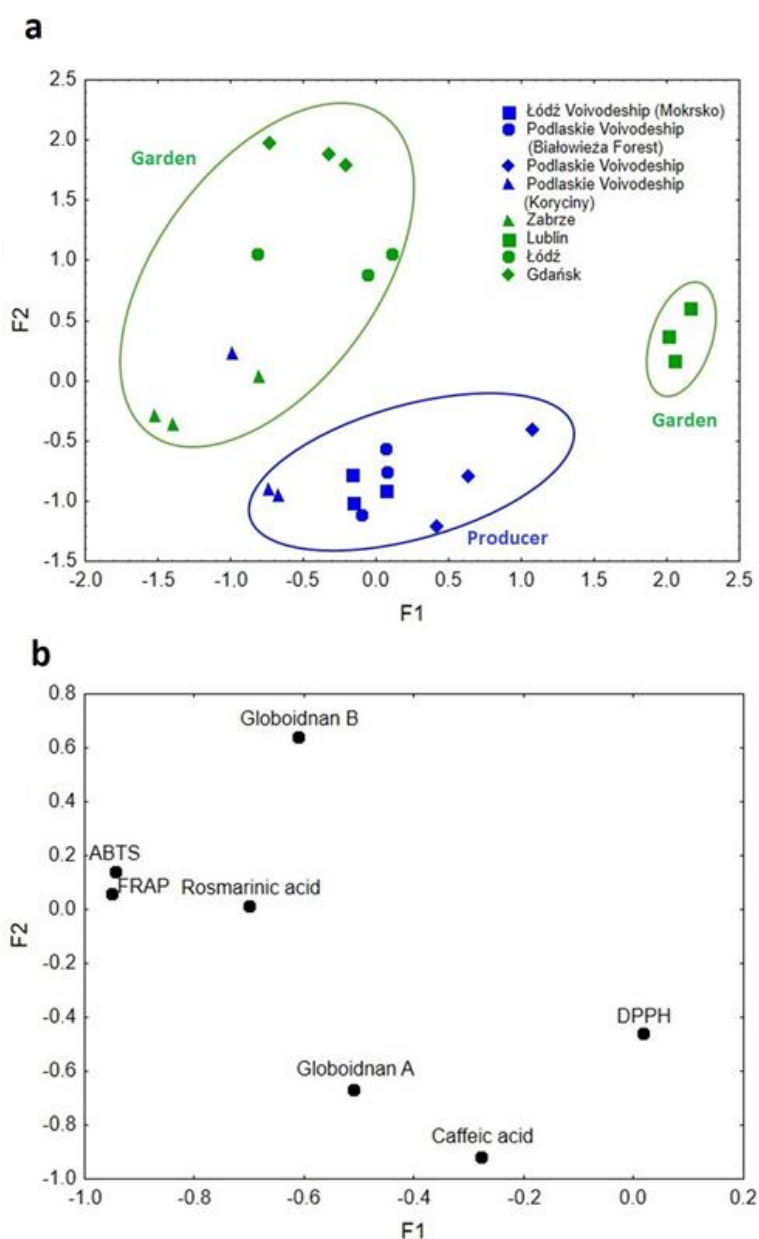
Test Dunna jako test post-hoc został przeprowadzony na trzech poziomach istotności:  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ . Podobnie jak w przypadku testu Kruskala-Wallisa, dane zostały podzielone na dwie grupy: korzenie i korzenie-liście. Zgodnie z tym samym schematem, dane analizowano pod kątem pochodzenia geograficznego, metody uprawy (producent-ogród) i anatomicznej części rośliny (dla grupy korzeń-liść).

W przypadku pierwszego zestawu danych dotyczących korzeni żywokostu, surowce **Za** i **Lu** (DPPH i FRAP) wykazały statystycznie istotne zależności pod kątem pochodzenia geograficznego przy  $p < 0,01$ . Dla danych sklasyfikowanych według metody uprawy, najbardziej istotne zależności ( $p < 0,01$ ) stwierdzono dla kwasu kawowego (producent-ogród).

W drugiej grupie analizowanych danych (korzeń-liść) uzyskano zróżnicowanie między korzeniem a liściem pod względem zawartości kwasu kawowego, kwasu rozmarynowego, oraz wynikami testów antyoksydacyjnych FRAP i ABTS ( $p < 0,001$ ). Jeśli chodzi o zróżnicowanie analizowanych surowców roślinnych w zależności od ich pochodzenia geograficznego, istotne zróżnicowanie uzyskano na poziomie istotności  $p < 0,01$  dla Mazowsza i Lubelszczyzny (FRAP i ABTS). Zastosowany test post-hoc dla metody uprawy (producent-ogród) wykazał istotne różnice ( $p < 0,001$ ) w zawartości kwasu kawowego.

#### 7.1.4. Analiza czynnikowa

Analiza czynnikowa (*factor analysis*, FA) została przeprowadzona dla danych dotyczących korzeni żywokostu, a jej wyniki przedstawiono na Ryc. 54. Na podstawie FA czynnik pierwszy (F1) odpowiadał za 42,80% wyjaśnianej wariancji, a czynnik drugi (F2) za 27,69%. Skumulowana wartość własna wyjaśnianej wariancji dla obu czynników wyniosła 70,49%. Uzyskane wartości własne dla F1 i F2 wyniosły odpowiednio 2,99 i 1,94. Na wykresach Ryc. 54a i b zaobserwowano wyraźne zróżnicowanie surowców otrzymywanych z żywokostu lekarskiego na trzy główne grupy.



Ryc. 54: A) Wykres rozrzutu próbek obiektów dla dwóch czynników ze względu na pochodzenie geograficzne żywokostu i metodę uprawy. B) Wykres rozrzutu ładunków dla elementów we wszystkich analizowanych próbkach.

Pierwszy czynnik (F1) był odpowiedzialny za zróżnicowanie surowców pod względem ich pochodzenia geograficznego. Próbki pochodzące z Lublina (południowo-wschodnia Polska) były wyraźnie oddzielone od pozostałych i opisane wysokimi wartościami F1. Za to rozróżnienie odpowiedzialna była metoda DPPH, która charakteryzuje się większą wrażliwością na związki hydrofobowe (221).

Drugie zgrupowanie opisywały niskie i średnie wartości F1, które odpowiadały korzeniom żywokostu pochodzącym z Zabrza, Łodzi i Gdańska. Ich lokalizacje na mapie Polski układają się w linię, ciągnącą się od północy przez centrum i na południe kraju, czyli głównie jego zachodnią część. Surowce te, scharakteryzowane zostały poprzez zawartość związków takich jak kwas rozmarynowy, globoidnan B oraz wyniki oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej metodami ABTS i FRAP (Ryc. 54b).

Średnie wartości F1 odpowiadały surowcom pochodzącym z województwa podlaskiego, położonego w północno-wschodniej Polsce, charakteryzowanym przez zawartość globoidnanu A i kwasu kawowego. Natomiast drugi czynnik (F2) odpowiadał głównie za podział analizowanych próbek ze względu na sposób/warunki uprawy roślin (producent-ogród). Niskie wartości F2 charakteryzowały korzenie żywokostu pochodzące od producentów, głównie z województwa podlaskiego, które wyróżniały się przede wszystkim zawartością kwasu kawowego i globoidnanu A. Wysokie wartości F2 przypisywano zawartości kwasu rozmarynowego, globoidnanu B oraz wynikom testów antyoksydacyjnych ABTS i FRAP oraz korzeniom żywokostu lekarskiego uprawianym w warunkach ogrodowych. Ze względu na takie zróżnicowanie, prawdopodobny wpływ na zróżnicowanie pod względem zawartości pochodnych kwasu kawowego oraz aktywności antyoksydacyjnej analizowanych wyciągów metanolowych mogą mieć warunki glebowe i klimatyczne, a także czas zbioru rośliny (221).

Przeprowadzona analiza czynnikowa pozwoliła na rozdzielenie analizowanych wyciągów z korzeni żywokostu pod względem pochodzenia geograficznego oraz zastosowanych warunków uprawy (producent-ogród), wpływających na udział poszczególnych przeciwutleniaczy.

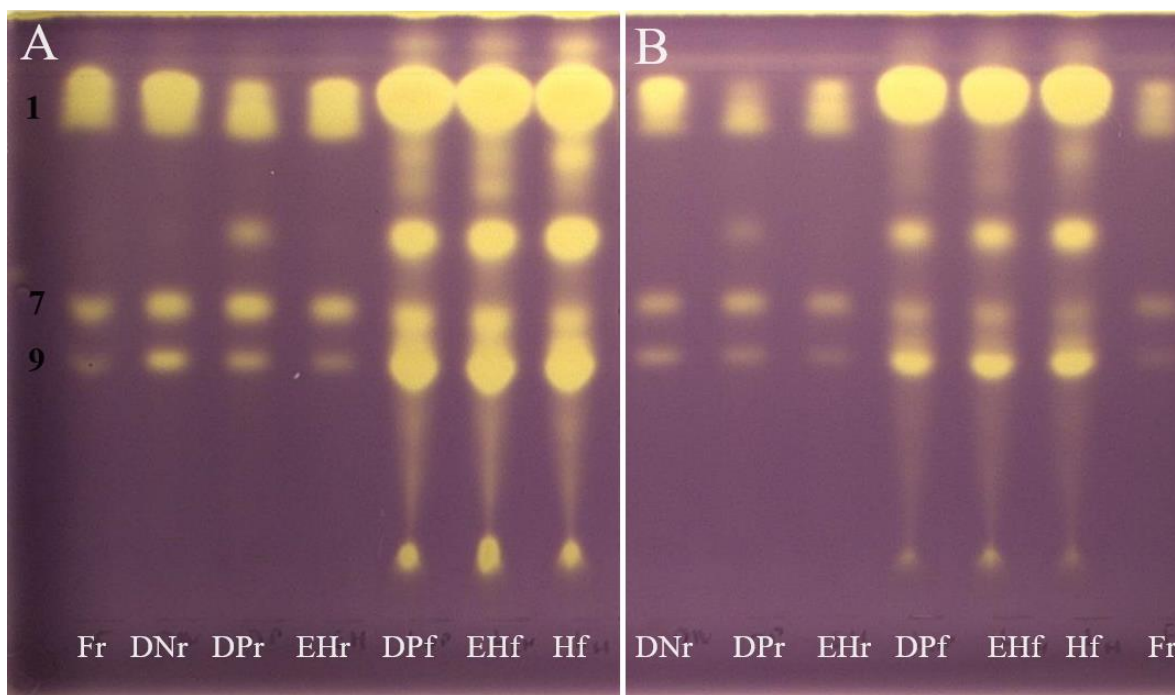


## 8. Omówienie wyników oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej składników wyciągów z korzenia i liścia żywokostu z wykorzystaniem bioautografii-TLC

Oceniając aktywność przeciwutleniającą i przeciwzapalną poszczególnych związków - składników wyciągów z korzeni i liści żywokostu lekarskiego rozdzielonych metodą TLC przeprowadzono badania z wykorzystaniem techniki bioautografii-TLC. Identyfikacja poszczególnych związków została opisana w rozdziale 3.1 a do oceny ich właściwości przeciwutleniających – wyrażonych jako zdolność do wymiatania wolnych rodników oraz przeciwzapalnych – wyrażonych jako zdolność do hamowania aktywności oksydazy ksantynowej (XO), wykorzystano następujące testy bioautografii-TLC – test DPPH, test w układzie ryboflawina-światło-NBT i test hamowania oksydazy ksantynowej. We wszystkich trzech zastosowanych testach związki jako biologicznie czynne, w zakresie badanej aktywności, można obserwować w świetle dziennym jako jasnożółte pasma na tle wybarwionej fioletowo powierzchni chromatogramów TLC.

### 8.1. Bioautografia-1D TLC – test DPPH

Ocenę aktywności wymiatającej wolne rodniki składników wyciągów z korzeni i liści żywokostu lekarskiego rozpoczęto od badania skryningowego wszystkich ekstraktów roślinnych [otrzymane chromatogramy według opracowanej metody 1D TLC opisanej w rozdziale 6.2.1 (Ryc. 55)]. Przeprowadzone oznaczenia pozwoliły na potwierdzenie silnych właściwości antyoksydacyjnych zespołu związków fenolowych obecnych w analizowanych surowcach. W korzeniach żywokostu lekarskiego aktywność wymiatającą wolne rodniki wykazał kwas kawowy (**1**) oraz jego pochodne – kwas rozmarynowy (**7**) i globoidnan A (**9**), podczas gdy w liściach żywokostu odnotowano silniejszą intensywność wybarwienia pasm pod wpływem odczynnika DPPH a także obecność dodatkowych związków o aktywności antyoksydacyjnej, mogących należeć zarówno do grupy kwasów fenolowych, jak i flawonoidów.

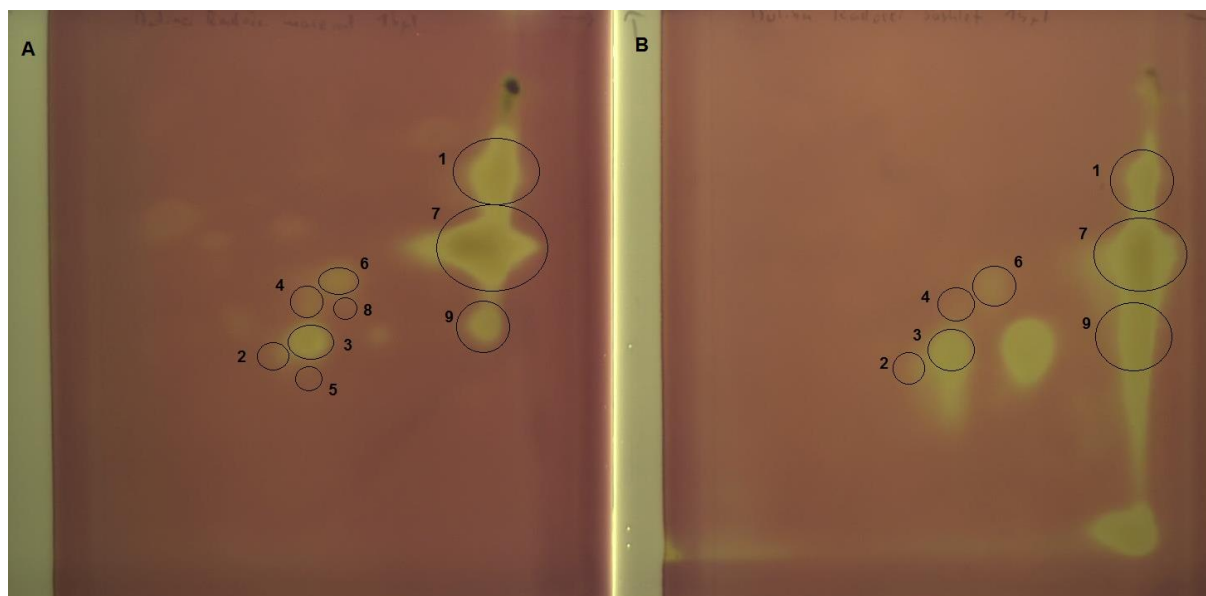


Ryc. 55: Chromatogram 1D TLC wyciągów z korzeni i liści żywokostu lekarskiego (oznaczenia surowców zgodne z danymi podanymi w rozdziale 4.1.). Płytki TLC Si60<sub>F254</sub>, faza ruchoma: B/F2; odczynnik wywołujący: DPPH, detekcja: światło widzialne, objętość aplikowanej próbki: A – 10 µL/pasmo, B - 5 µL/pasmo. 1 – kwas kawowy, 7 – kwas rozmarynowy, 9 – globoidnan A.

Uwzględniając bogatszy skład jakościowy oraz obecność glikozydów flawonoidowych, obok głównych składników korzenia żywokostu - kwasów rozmarynowego, kawowego i globoidnanu A, wyciągi z liścia żywokostu przeznaczono do bardziej szczegółowych badań bioautograficznych z użyciem 2D TLC.

## 8.2. Bioautografia-2D TLC – test DPPH

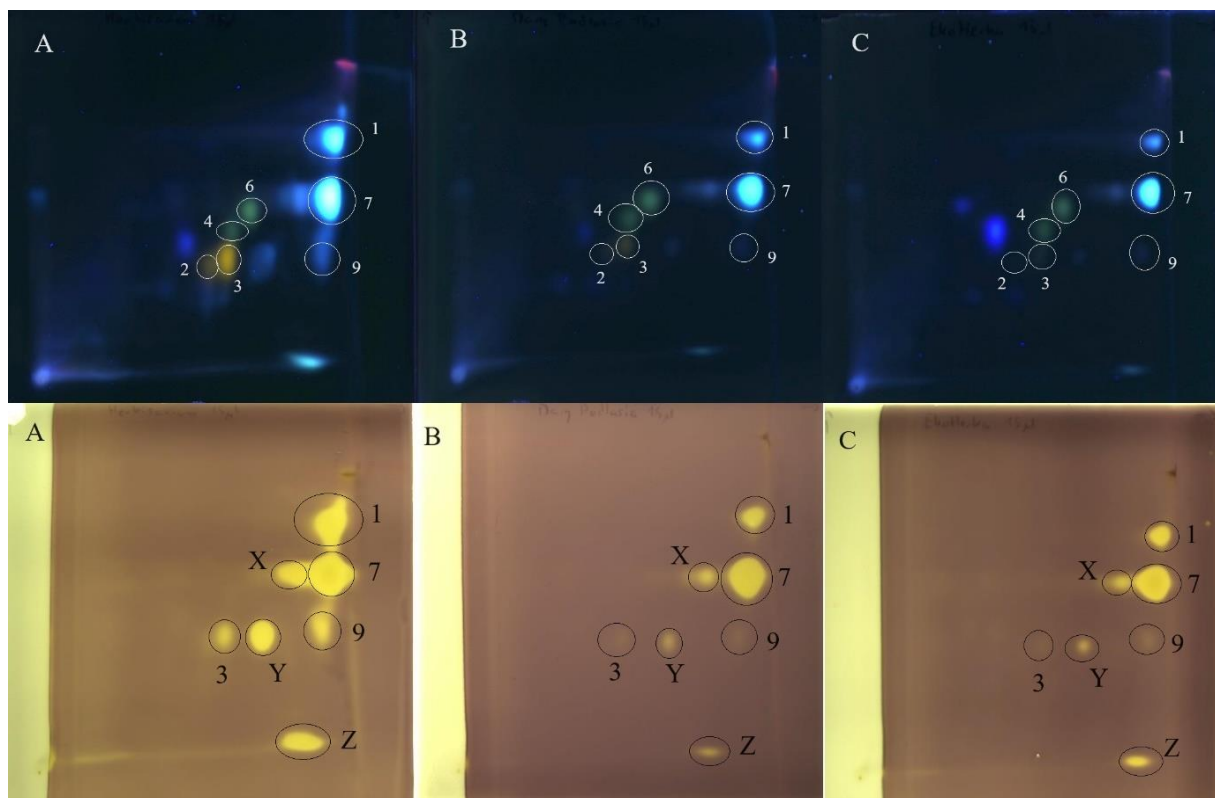
Początkowo porównano aktywność składników wyciągów z liścia żywokostu (**DRf**) otrzymanych dwiema metodami ekstrakcji – maceracją metanolem a następnie ekstrakcją typu ciec-ciecz octanem etylu oraz w wyniku ekstrakcji metanolem w aparacie Soxhleta (Ryc. 56) – jak wykazały opisane w badania jakościowe (rozdział 3.1.3), wyciągi te różnią się pod względem obecności malonyloestrów kwercetyny i kemferolu.



Ryc. 56: Chromatogram 2D TLC wyciągu z liścia żywokostu (**DRf**) sporządzonego metodą: A) maceracji metanolem, B) ekstrakcji metanolem w aparacie Soxhlet. Płytki TLC Si60<sub>F254</sub>; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący: DPPH, detekcja: światło dzienne. Numeracja związków zgodnie z *Tabela 10*.

Test DPPH ujawnił zdolność do wymiatania wolnych rodników wszystkich związków zidentyfikowanych w liściu żywokostu lekarskiego (Ryc. 56). W oparciu o porównanie intensywności wybarwionych pasm jako związki o najsilniejszej aktywności przeciwutleniającej uznano kwas kawowy (**1**) oraz kwas rozmarynowy (**7**), które stanowiły składniki dominujące we wszystkich analizowanych wyciągach z liścia żywokostu (analiza ilościowa metodą HPLC, rozdział 3.2.2). Wysoką intensywnością charakteryzowało się pasmo globoidnanu A (**9**), słabo wybarwiającego się w analizach TLC jakościowych pod wpływem odczynnika derywatyzującego NPR+PEG. Może to świadczyć o jego szczególnie silnej zdolności do wymiatania wolnych rodników, ujawniającej się już przy niskich stężeniach związku jako składnika ekstraktów roślinnych. W przeprowadzonych testach spektrofotometrycznych oceniających właściwości antyoksydacyjne wyciągu z korzeni żywokostu nie zaobserwowano korelacji pomiędzy zawartością globoidnanu A a wynikami testu DPPH, badania bioautograficzne sugerują jednak jego możliwy wysoki udział w aktywności wymiatającej wolne rodniki.

Spośród oznaczonych glikozydów flawonoidów, najwyższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się 3-*O*-glukozydy kwercetyny (**3**) i kemferolu (**6**). Podczas gdy ich 3-*O*-galaktozydy (**2** i **4**, kolejno) oraz, obecne jedynie w wyciągu otrzymanym metodą maceracji, malonyloestry (**5** i **8**) uwidaczniały się jako słabo wybarwione, jasnożółte pasma, co może być rezultatem ich niskich stężeń w badanym ekstrakcie.



Ryc. 57: Chromatogramy 2D TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego zakupionych od krajowych firm zielarskich (A – Hf, B – DPf, C – EHf). Płytki TLC Si60<sub>F254</sub>, 15µL; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący i detekcja: górne płytki – NPR+PEG, UV λ-366 nm dolne płytki – odczynnik DPPH, światło dzienne. Numeracja związków zgodnie z *Tabela 10*.

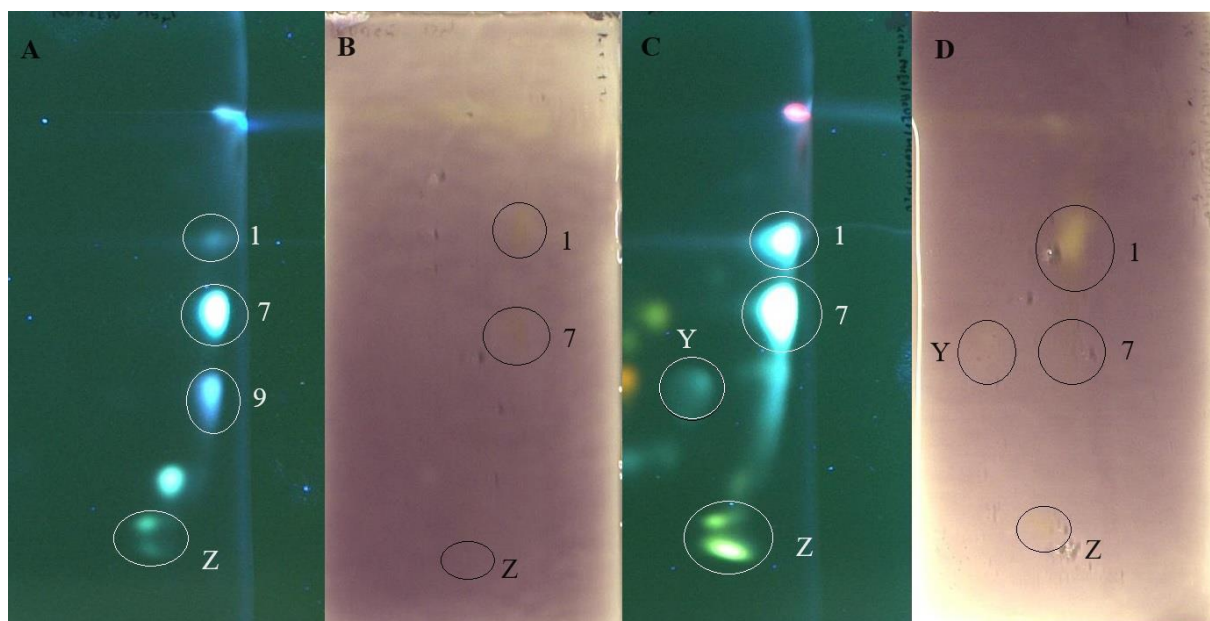
We wszystkich ekstraktach z liści żywokostu zakupionych od krajowych firm zielarskich (Hf, DPf, EHf) (Ryc. 57). najwyższym udziałem w aktywności wymiatającej wolne rodniki charakteryzował się kwas kawowy (**1**) oraz kwas rozmarynowy (**7**), z nieznacznym udziałem globoidnanu A (**9**) oraz 3-O-glukozydu kwercetyny (**3**). Wyciąg z liści żywokostu **Hf** – charakteryzujący się wyższą zawartością poszczególnych związków biologicznie czynnych – wyróżniał się na chromatogramie TLC pod względem intensywności plam rozdzielonych związków (Ryc. 57), co było zgodne z wynikami przeprowadzonych oznaczeń ilościowych (rozdział 3.2.2) oraz oznaczeń aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem testów spektrofotometrycznych (rozdział 7).

Przeprowadzone oznaczenia ujawniły także znaczącą aktywność antyoksydacyjną trzech niezidentyfikowanych związków opisanych jako **X**, **Y** i **Z**, obecnych w wysokich stężeniach przede wszystkim w surowcu **Hf**. Jasno-niebieskawa fluorescencja plam tych związków po derywatywacji odczynnikami NPR+PEG pozwala założyć, że podobnie jak związki **1**, **7** i **9**, należą one do grupy kwasów fenolowych.

### 8.3. Bioautografia-2D TLC – układ ryboflawina-światło-NBT i test hamowania oksydazy ksantynowej

Ze względu na trudności w uzyskaniu jednolitej warstwy żelu agarowego o odpowiedniej grubości na całej płytce TLC o wymiarach 10x10 cm, zdecydowano ograniczyć obszar badany do prawej części chromatogramu (5x10 cm), obejmującej pasma należące do pochodnych kwasu kawowego.

Test bioautograficzny w układzie ryboflawina-światło-NBT przeprowadzony z wykorzystaniem chromatogramów 2D TLC wyciągów z korzenia i liści żywokostu lekarskiego (Ryc. 58) potwierdził właściwości przeciwrodnikowe kwasu kawowego (**związek 1**), kwasu rozmarynowego (**7**) i dwóch przypuszczalnie kwasów fenolowych o nierozpoznanych strukturach - **Y** i **Z**. W przeciwieństwie do testu DPPH, nie uzyskano pozytywnej odpowiedzi dla globoidnanu A (**9**) co może świadczyć o odmiennym mechanizmie działania tego związku. Podczas gdy test DPPH służy ocenie zdolności do wymiatania wolnych rodników, układ ryboflawina-światło-NBT ujawnia zdolność do hamowania ich produkcji (152).

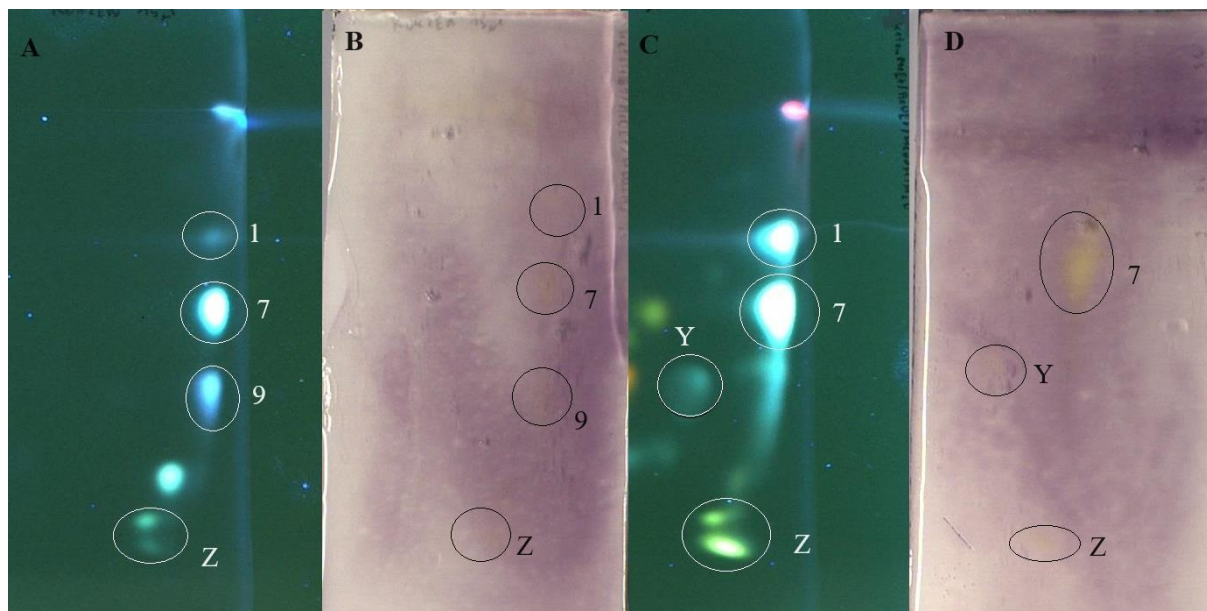


Ryc. 58: Chromatogramy 2D TLC wyciągów z korzenia (A, B) oraz liścia (C, D) żywokostu lekarskiego po derywatywacji odczynnikami NPR+PEG, detekcja UV:  $\lambda$ -366 nm (A i C) i po przeprowadzeniu testu bioautograficznego w układzie ryboflawina-światło-NBT, detekcja: światło dzienne (B i D). Płytki TLC Si60<sub>F254</sub>; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6.

W teście hamowania oksydazy ksantynowej (Ryc. 59) oceniającym możliwą zdolność do inhibicji tego enzymu uzyskano podobne wyniki dla obecnych w wyciągu z korzenia żywokostu: kwasu kawowego (**1**), kwasu rozmarynowego (**7**) i globoidnanu A (**9**), związku **Z**, a w przypadku



wyciągu z liścia żywokostu dodatkowo związków **Y** i **Z**. Żółta fluorescencja pasma globoidnanu A (**9**) w teście hamowania oksydazy ksantynowej, przy braku odpowiedzi w układzie ryboflawina-światło-NBT może świadczyć o aktywności tego związku jako selektywnego „czystego” inhibitora XO (152).



Ryc. 59: Chromatogramy 2D TLC wyciągów z korzenia (A, B) oraz liścia (C, D) żywokostu po derywatywacji odczynnikiem NPR+PEG, detekcja UV:  $\lambda$ -366 nm (A i C) i po przeprowadzeniu testu bioautograficznego w układzie ryboflawina-światło-NBT, detekcja: światło dzienne (B i D). Płytki TLC Si60F<sub>254</sub>; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6.

Uzyskane wyniki potwierdzają działanie wymiatające wolne rodniki związków dominujących w zespole polifenoli w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego a także sugerują ich potencjalne właściwości przeciwzapalne, związane nie tylko z aktywnością przeciwrodnikową, ale także możliwym działaniem hamującym oksydazę ksantynową.

## 9. Omówienie wyników oznaczenia aktywności przeciwzapalnej wyciągów z korzeni i liści żywokostu jako aktywności hamującej cyklooksygenazę-1 i -2

### 9.1. Oznaczenie aktywności kwasu rozmarynowego

Przeprowadzono ocenę aktywności hamującej cyklooksygenazę-1 i -2 dla, obecnego w wysokich stężeniach zarówno w wyciągach z korzeni jak i liści żywokostu lekarskiego, kwasu rozmarynowego jako substancji odniesienia.

Otrzymane wyniki (Tabela 27) pozwoliły potwierdzić działanie przeciwzapalne kwasu rozmarynowego wyrażone jako zdolność do hamowania COX-1 i COX-2 (14, 17, 18). Jednocześnie wyznaczono wartości IC<sub>50</sub> (*half maximal inhibitory concentration*) wynoszące kolejno 300,36 μM dla COX-1 i 1040,52 μM dla COX-2, i wskazały one na silniejszą aktywność hamującą przeciwko COX-1 (Tabela 27).

Tabela 27: Wyniki oznaczeń aktywności hamującej cyklooksyzgenazę-1 i -2 [% inhibicji] przeprowadzonych z COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, USA) dla kwasu rozmarynowego jako substancji odniesienia.

Związki	Stężenie μM	COX-1 [% inhibicji]	COX-2 [% inhibicji]
Kwas rozmarynowy	10	33,86	23,16
	100	42,09	31,77
	500	59,57	36,79
	<b>IC50 [μM]:</b>	<b>300,36</b>	<b>1040,52</b>

## 9.2. Oznaczenia aktywności wyciągów z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego

Zastosowana metoda – zestawy ELISA COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, USA) – dotychczas była z powodzeniem stosowana w oznaczeniach aktywności przeciwzapalnej pojedynczych izolowanych związków (219, 220, 222, 223), w literaturze nie odnotowano jej użycia do analizy w tym zakresie wyciągów roślinnych. Przeprowadzone oznaczenia bardzo skomplikowanych matryc roślinnych o złożonym składzie chemicznym charakteryzowały problemy z otrzymaniem powtarzalnych, a więc również wiarygodnych wyników. Z tego względu badania ograniczono jedynie do wyselekcjonowanych wyciągów z korzenia i liści żywokostu a prezentowane w Tabeli 28 dane obejmują wybrane wyniki.

Do oznaczeń aktywności przeciwzapalnej jako aktywności hamującej cyklooksyzgenazę-1 i -2 przeznaczono wyciągi metanolowe z liści żywokostu lekarskiego (**DRf**) otrzymane trzema różnymi metodami ekstrakcji, mianowicie ekstrakcji w aparacie Soxhleta (**DRf-I**), ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami (**DRf-II**) i maceracji (**DRf-III**) (rozdział 4.2 części eksperymentalnej). Spośród wyciągów metanolowych z korzeni żywokostu do badań wyciągi z dwóch surowców, wyróżniających się na tle innych – **DPr** z dominacją w zespole kwasów

fenolowych, globoidnanu A oraz **DNr** o najwyższej zawartości dominującego kwasu rozmarynowego (Tabela 28).

Obydwa objęte badaniem wyciągi metanolowe z korzenia żywokostu lekarskiego, podobnie jak kwas rozmarynowy, charakteryzowały się wyższą aktywnością hamującą cyklooksygenazę-1 w porównaniu do cyklooksygenazy-2 – dla wyciągu **DPr** w stężeniu 4 mg s.m./ml 65,25% inhibicji COX-1 i 19,63% inhibicji COX-2, dla **DNr** 55,7% inhibicji COX-1 przez ekstrakt o stężeniu 4 mg s.m./1 i 28,86% inhibicji COX-2 w stężeniu 8 mg s.m./ml.

Tabela 28: Wyniki oznaczeń aktywności hamującej cyklooksygenazę-1 i -2 [% inhibicji] przeprowadzonych z użyciem COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, USA) dla wyciągów metanolowych z liści żywokostu otrzymanych trzema różnymi metodami ekstrakcji oraz wyciągów metanolowych z korzeni żywokostu.

Analizowany wyciąg metanolowy		Stężenie [mg s.m./ml]	COX-1 [% inhibicji]	COX-2 [% inhibicji]
Korzenie żywokostu	<b>DPr</b>	4	65,25	19,63
	<b>DNr</b>	4	55,7	-
		8	*	28,86
Liście żywokostu	<b>DRf-I</b>	2	20,79	-
		10	37,16	82,8
	<b>DRf-II</b>	2	-	70,93
		10	33,62	*
	<b>DRf-III</b>	10	22,18	-



		40	*	19,71
--	--	----	---	-------

Objaśnienie: \* wynik wykraczający poza poziom inhibicji substancji odniesienia, - brak otrzymanego wyniku.

Podobną zależność obserwowano dla wyciągu metanolowego z liścia żywokostu sporządzonego metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta (**DRf-I**) – 20,79% inhibicji COX-1 w stężeniu 2 mg s.m./ml i odpowiednio 37,16% i 82,8% inhibicji dla COX-1 i COX-2 w stężeniu 10 mg s.m. ml) – oraz dla wyciągu metanolowego z liści żywokostu otrzymanego metodą maceracji (**DRf-III**), który w stężeniu 10 mg s.m./ml hamował COX-1 na poziomie 22,18% i charakteryzował się najslabszym działaniem przeciwko COX-2 obserwowanym dopiero dla stężenia 40 mg s.m./ml na poziomie 19,71%.

Spośród wszystkich analizowanych wyciągów roślinnych wyróżnił się wyciąg metanolowy z liści żywokostu sporządzony metodą ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami (**DRf-II**), dla którego odnotowano silniejsze działanie hamujące COX-2 (70,93% inhibicji COX-2 w stężeniu 2 mg s.m./ml vs 33,62% inhibicji COX-1 w stężeniu 10 mg s.m./ml). Przeprowadzona analiza jakościowa zespołu polifenoli metodą 2D TLC (opisana w rozdziale 3.1.1) wykazała, że wyróżnia go obecność w najwyższych stężeniach 3-O-(6"-malonylo)-glukozydów kwercetyny i kemferolu (największa intensywność plam), w wyciągach **DRf-I** i **DRf-III** obecnych w śladowych ilościach.

Otrzymane wyniki potwierdzają możliwy mechanizm działania przeciwzapalnego wyciągów z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego, jak i obecnego w nich kwasu rozmarynowego związany ze zdolnością do hamowania aktywności enzymatycznej cyklooksygenazy-1 i -2. Analizowane wyciągi (z wyjątkiem **DRf-II**) charakteryzowały się silniejszym działaniem ukierunkowanym przeciwko COX-1, występującej fizjologicznie w komórkach ludzkiego organizmu i biorącej udział w prawidłowej pracy m.in. układu krwionośnego (agregacja płytek krwi) i pokarmowego (m.in. działanie ochronne na śluzówkę żołądka). Aktywność hamująca ten enzym jest uznawana za główną przyczynę działań niepożądanych związanych ze stosowaniem nieselektywnych leków NLPZ (niesteroidowe leki przeciwzapalne), takich jak powstawanie nadżerek i owrzodzeń w obrębie błony śluzowej przewodu pokarmowego, krwawienia z przewodu pokarmowego oraz uszkodzenie czynności nerek (224, 225).

## 10. Ocena aktywności biologicznej wyciągów otrzymanych z kwiatów arniki górskiej i arniki łąkowej

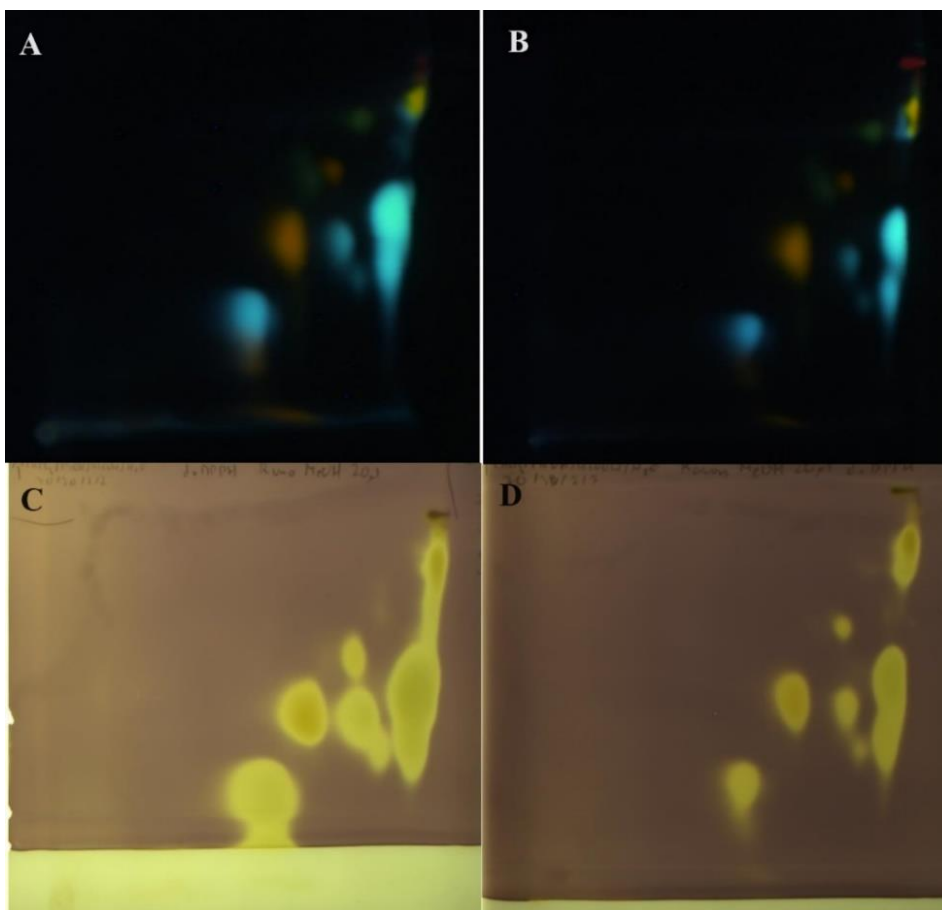
Przeprowadzona analiza jakościowa i ilościowa składu chemicznego kwiatów arniki górskiej i łąkowej ze źródeł komercyjnych (omówiona w rozdziałach 5.2 i 5.3) wykazała wysoki poziom podobieństwa obydwu surowców pod względem profilu związków polifenolowych i prostych fenoli. Surowce te różniły się jednak pod względem składu ilościowego – wyciąg z arniki górskiej charakteryzował się wyższą całkowitą zawartością kwasów fenolowych, w tym dominujących w zespole kwasów dikawoilochinowych (kwas chlorogenowy, kwasy 1,5-diCQA, 4,5-diCQA i kwas 1-metoksyzawianoilo[oksaloiło]-3,5-dikawoilochinowy), z kolei wyciąg z arniki łąkowej cechowała wyższa całkowita zawartość związków flawonoidów (flawonów i flawonoli) (Tabela 20).

### 10.1. Testy spektrofotometryczne – ABTS i FRAP

Wyciągi metanolowe z kwiatów arniki górskiej i arniki łąkowej charakteryzowały się zbliżoną aktywnością zarówno w teście FRAP, oceniającym zdolność do redukcji jonów żelaza (odpowiednio  $0,84 \pm 0,13$  mmol TE/g s.m. i  $0,78 \pm 0,082$  mmol TE/g s.m.), jak i teście ABTS, oceniającym zdolność do wymiatania wolnych rodników (odpowiednio  $1,11 \pm 0,085$  mmol TE/g s.m. i  $1,05 \pm 0,096$  mmol TE/g s.m.).

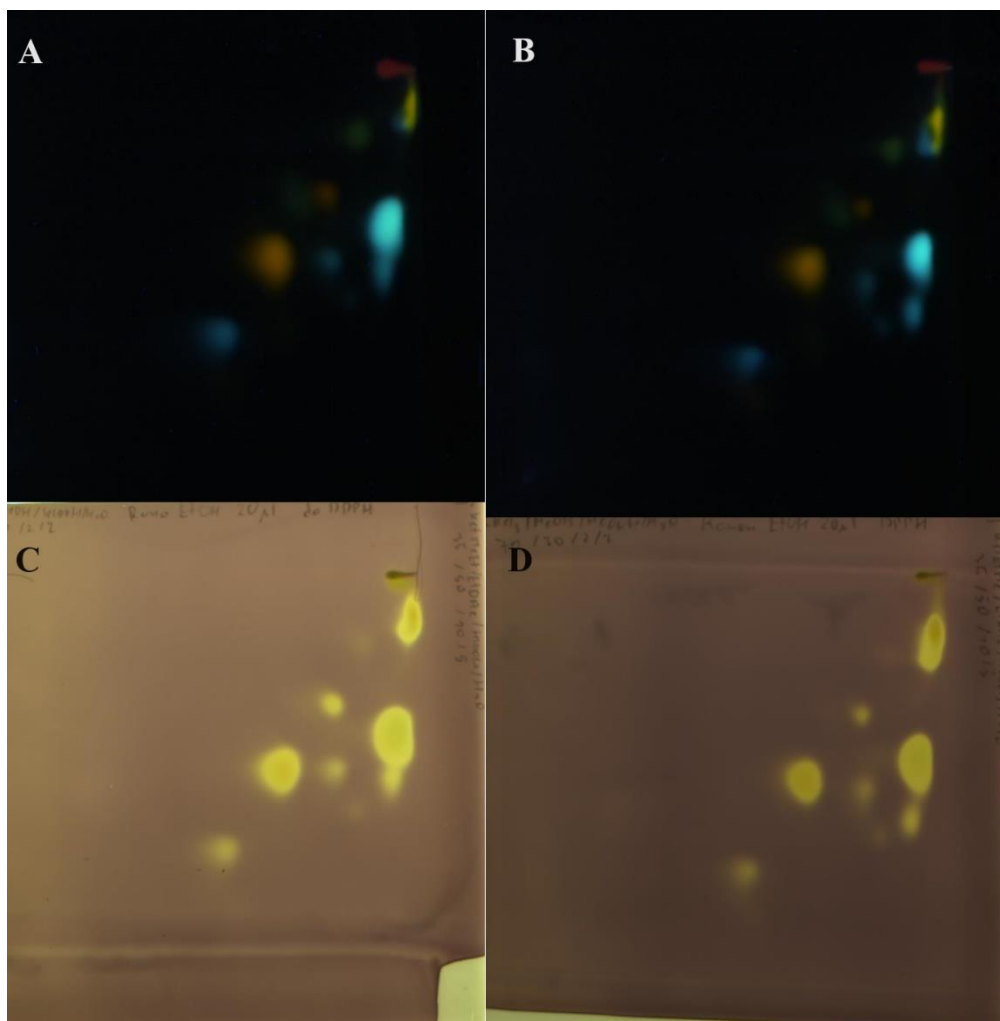
### 10.2. Bioautografia-TLC – test DPPH

Odmienne wyniki uzyskano z użyciem testu DPPH metodą bioautografii-TLC. Analizowane wyciągi metanolowe z kwiatów arniki górskiej i łąkowej różniła intensywność pasm związków fenolowych po derywatywacji odczynnikami NPR+PEG (fluoryzujące pomarańczowo, żółto, żółto-zielono plamy flawonoidów oraz jasnoniebiesko plamy kwasów fenolowych), jak i ich obserwowana odpowiedź w przeprowadzonym teście DPPH (żółte plamy związków o różnej intensywności). Wyniki testu DPPH na chromatogramach TLC sugerują, że wyciąg z kwiatu arniki górskiej wykazuje silniejszą aktywność wymiatającą wolne rodniki, ze względu na być może wyższe zawartości estrów pochodnych kwasu kawowego, w tym o 1/5 wyższą kwasu chlorogenowego i ponad 2-krotnie wyższą kwasu 1,5-diCQA (Ryc. 60).



Ryc. 60: Chromatogramy 2D TLC wyciągów metanolowych z kwiatów arniki górskiej (A, C) i arniki łąkowej (B, D). Objętość aplikowanej próbki: 20  $\mu$ L; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; detekcja: A, B – NPR+PEG, 366 nm C, D – odczynnik DPPH, światło widzialne.

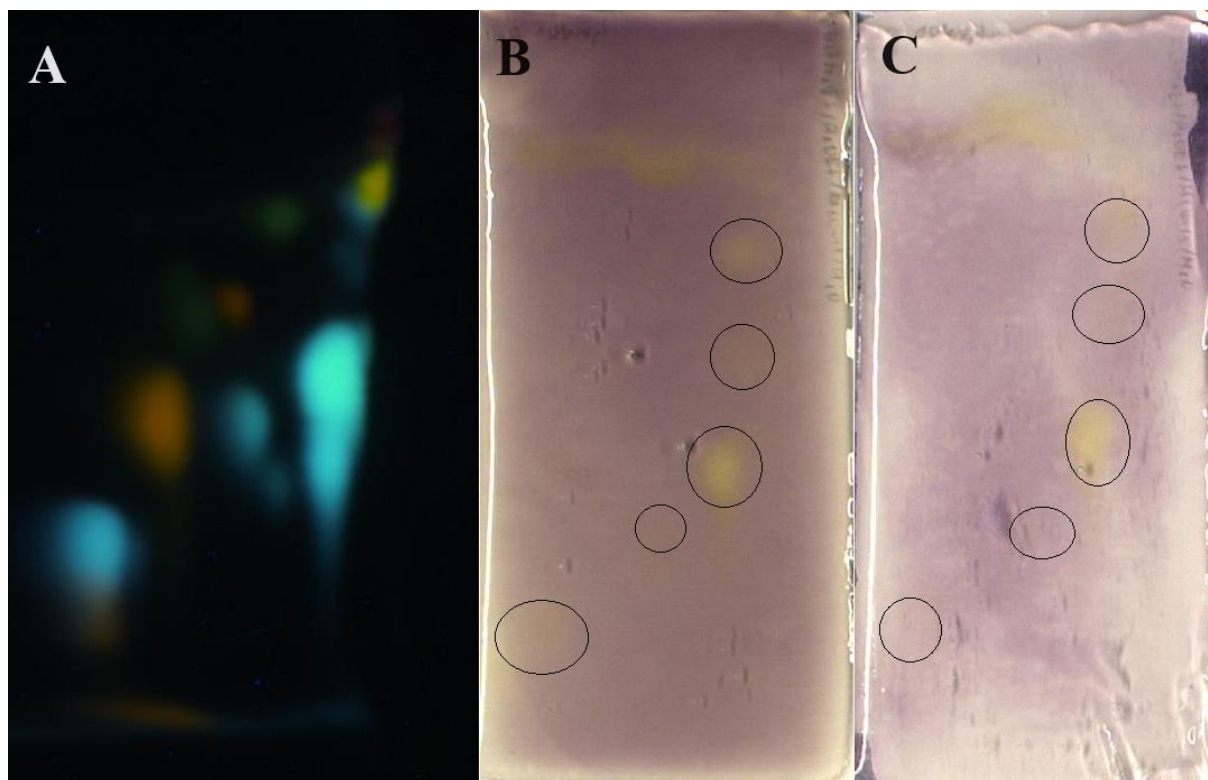
Niezależnie od zaobserwowanych różnic w intensywności poszczególnych pasm, obserwowane na chromatogramie 2D TLC związki fenolowe (NPR+PEG) wykazały zdolność do wymiatania wolnych rodników (żółte pasma w teście DPPH). W przeciwieństwie do wyciągów metanolowych, wyciągi etanolowe z obydwu arnik nie wykazały tak znaczących różnic w odpowiedzi na przeprowadzoną reakcję z użyciem rodnika DPPH (Ryc. 61), co może sugerować, że etanol jest słabszym ekstrahentem związków czynnych z kwiatów arniki. Rozpuszczalnik ten jest podstawowym w otrzymywaniu przetworów z kwiatów arniki stosowanych w fitoterapii.



Ryc. 61: Chromatogramy 2D TLC wyciągów etanolowych z kwiatów arniki górskiej (A, C) i arniki łąkowej (B, D). Objętość aplikowanej próbki: 20  $\mu$ L; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; detekcja: A, B – NPR+PEG, 366 nm C, D – odczynnik DPPH, światło widzialne.

### 10.3. Bioautografia-TLC – układ ryboflawina-światło-NBT i test hamowania oksydazy ksantynowej

Badania aktywności biologicznej z wykorzystaniem układu ryboflawina-światło-NBT oraz testu hamowania oksydazy ksantynowej przeprowadzone dla wyciągu metanolowego z arniki górskiej (Ryc. 62), w przeciwieństwie do testu DPPH, ujawniły działanie przeciwrodnikowe jedynie dla obecnych w ekstrakcie kwasów fenolowych (jasnoniebiesko fluoryzujące pasma po derywatacji odczynnikiem NPR+PEG). Natomiast, nie obserwowano dla większości plam flawonoidów (pomarańczowe i zielone pasma po derywatacji odczynnikiem NPR+PEG) żółtego wybarwienia pod wpływem rodnika DPPH.



Ryc. 62: Chromatogramy 2D TLC wyciągu metanolowego z kwiatu arniki górskiej po derywatywacji odczynnikami NPR+PEG (A) oraz przeprowadzeniu testów bioautograficznych: B – układ ryboflawina-światło-NBT, C – test hamowania oksydazy ksantynowej. Objętość aplikowanej próbki: 20  $\mu$ L; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6.

Uzyskane wyniki wskazują na istotny udział estrów kwasu kawowego w aktywności przeciwutleniającej zespołu polifenoli w kwiatach arniki.

### C. Omówienie wyników badań dostępności farmaceutycznej

Ocenę dostępności farmaceutycznej jako stopnia przenikania przez błony półprzepuszczalne imitujące skórę (SpectraPor i Strat-M), prowadzono w komorach dyfuzyjnych typu side-by-side z wykorzystaniem standaryzowanego materiału roślinnego o znanej zawartości badanych związków biologicznie czynnych. Próbki do badań stanowiły wybrane wyciągi z korzenia (**DNr**) i liści żywokostu (**Hf**), charakteryzujące się najwyższą zawartością kwasów fenolowych (kwas kawowy, rozmarynowy, globoidnan A) oraz wyciągu z kwiatów arniki górskiej (**AM**) o najwyższej zawartości kwasów dikawoilochinowych.

Dotychczasowe wyniki badań dostępności farmaceutycznej kwasów fenolowych wskazują na przenikanie tych związków przez stosowane błony półprzepuszczalne (naturalna celuloza) oraz ludzką skórę *ex vivo* na poziomie <10% (226-230). Wyjątek stanowił kwas rozmarynowy jako składnik wyciągu z liścia melisy, który w modelu z użyciem błony półprzepuszczalnej z naturalnej celulozy w ciągu 6h przenikał do płynu akceptorowego w 40% (maść w/o). Związek ten nie wykazał zdolności do penetracji przez ludzką skórę *ex vivo*, przenikając jedynie do warstw epidermy w zakresie 0,22-1,08% (w zależności od użytego medium) (229). W badaniu dostępności farmaceutycznej prostych kwasów fenolowych jako składników propolisu (kwas kawowy, wanilinowy, kumarowy i ferulowy) przy zastosowaniu błon półprzepuszczalnych z naturalnej celulozy, odnotowano w płynie akceptorowym stężenia badanych związków na poziomie 9-32% (32% dla kwasu wanilinowego z kremu w/o, 9% dla kwasu kawowego z kremu w/o). Z kolei eksperyment z użyciem ludzkiej skóry wykazał jedynie 5% penetracji do epidermy kwasów ferulowego i kumarowego i 4% kwasu kawowego oraz przejście do skóry właściwej odpowiednio 4% i 6% wymienionych obok 8% kwasu wanilinowego (227).

Dane literaturowe o dostępności farmaceutycznej helenaliny z kwiatów arniki oraz alkaloidów pirolizydynowych z żywokostu lekarskiego są ograniczone. Dotychczas badano jedynie przenikanie estrów pochodnych helenaliny i dihydrohelenaliny, bez uwzględnienia ich wolnych form (12, 231, 232) oraz likopsaminy spośród alkaloidów pirolizydynowych żywokostu (48, 233).

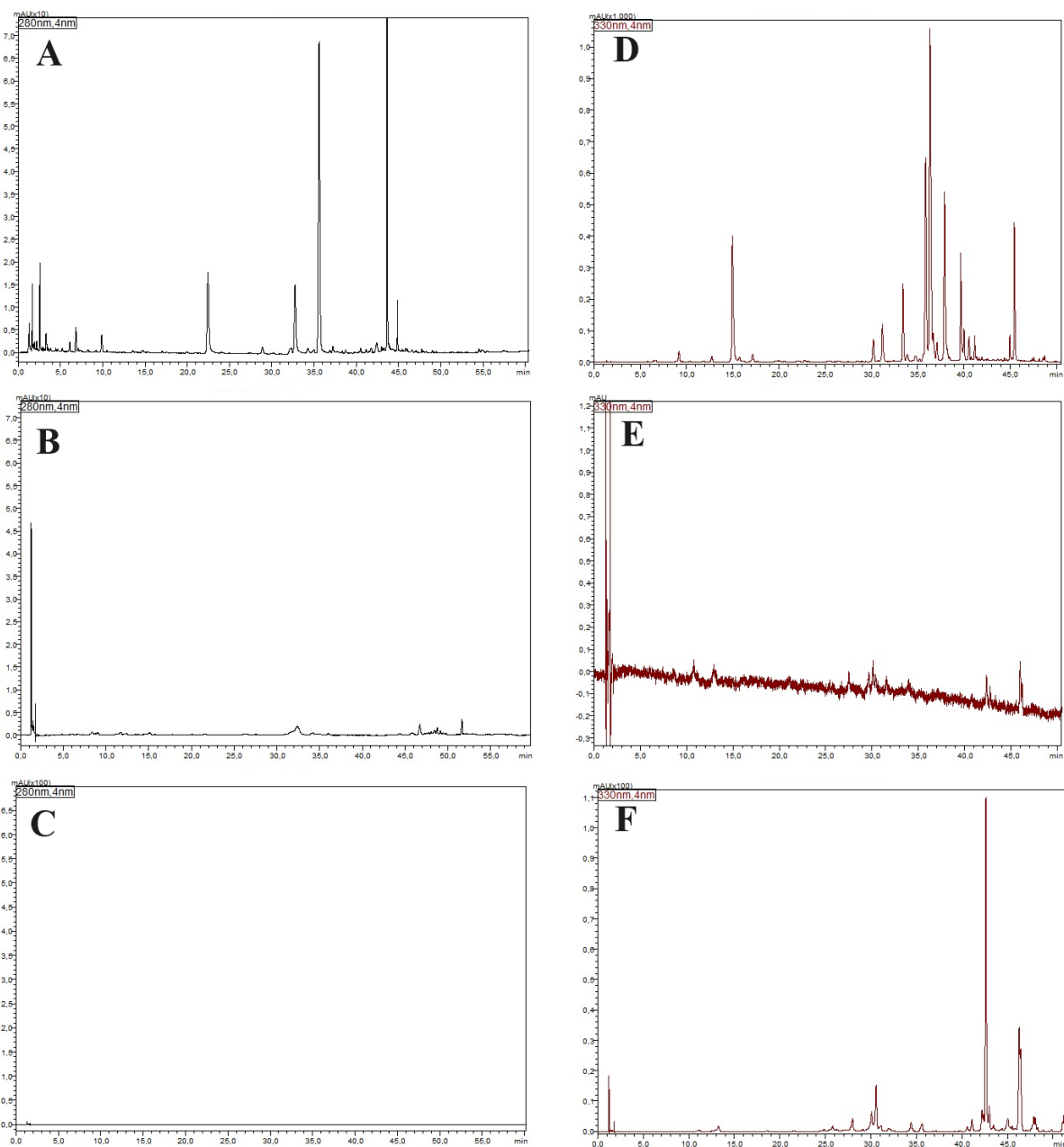
## 11. Omówienie wyników badań dostępności farmaceutycznej estrów pochodnych kwasu kawowego

Badania poziomu dostępności farmaceutycznej estrów pochodnych kwasu kawowego z użyciem błon celulozowych SpectraPor wykazały wysoki stopień przenikania analizowanych związków przez membranę, na poziomie powyżej 72% dla składników wyciągu z korzenia żywokostu (kwas kawowy, kwas rozmarynowy, globoidnan A) oraz powyżej 48% dla składników wyciągu z liścia żywokostu (kwas kawowy, kwas rozmarynowy) (Tabela 29). Odnotowane różnice w stopniu przenikania kwasu kawowego i kwasu rozmarynowego pomiędzy wyciągami z korzenia i liścia żywokostu mogą wiązać się z różnicami w zawartościach tych związków. Wyższy stopień przenikania obserwowano dla wyciągu z korzenia żywokostu, charakteryzującego się dużo niższą zawartością kwasów pochodnych kwasu kawowego.

Tabela 29: Wyniki oceny dostępności farmaceutycznej estrów pochodnych kwasu kawowego obecnych w wyciągach metanolowych z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego przeprowadzonych z użyciem błon celulozowych.

Surowiec roślinny	Nazwa związku	Zawartość w płynie donorowym [µg/ml]	Zawartość w płynie akceptorowym [µg/ml]	Procent przenikania [%]
Korzeń żywokostu	Kwas kawowy	1,61	1,23	76,51
	Kwas rozmarynowy	31,46	25,26	80,28
	Globoidnan A	19,31	13,97	72,34
Liść żywokostu	Kwas kawowy	28,39	13,89	48,92
	Kwas rozmarynowy	168,94	108,94	64,48

Przeprowadzone eksperymenty z użyciem błon półprzepuszczalnych Strat-M, stanowiących model bardziej zbliżony do warunków ludzkiej skóry (234), nie wykazały zdolności wszystkich substancji badanych do penetracji przez zastosowaną membranę, mianowicie pochodnych kwasu kawowego (kwas kawowy, kwas rozmarynowy, globoidnan A) z korzenia i liścia żywokostu oraz z arniki górskiej (kwas chlorogenowy i pozostałe kwasy diCQA) – stężenia wykryte w płynie donorowym mieściły się poniżej granicy oznaczalności (LOQ) (Ryc. 63).



Ryc. 63: Chromatogramy HPLC zespołu estrów pochodnych kwasu kawowego obecnych w przebiegu badania dostępności farmaceutycznej dla wyciągu z korzenia żywokostu (A, B, C) i kwiatu arniki (D, E, F) z użyciem błon półprzepuszczalnych Strata-M. A, D – płyn donorowy, B,E – płyn akceptorowy, C,F – płyn po ekstrakcji błon półprzepuszczalnych.

Badanie ekstraktu otrzymanego przez wytrawianie użytych w eksperymencie błon półprzepuszczalnych sugeruje możliwą absorpcję kwasu kawowego, kwasu rozmarynowego i kwasu chlorogenowego w warstwach skóry (Tabela 30, Ryc. 63).

Tabela 30: Wynik oznaczeń absorpcji estrów pochodnych kwasu kawowego obecnych w wyciągach metanolowych z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego w błonach półprzepuszczalnych Strata-M, po ekstrakcji etanolem (30 min w płucce ultradźwiękowej, temp. pok.).

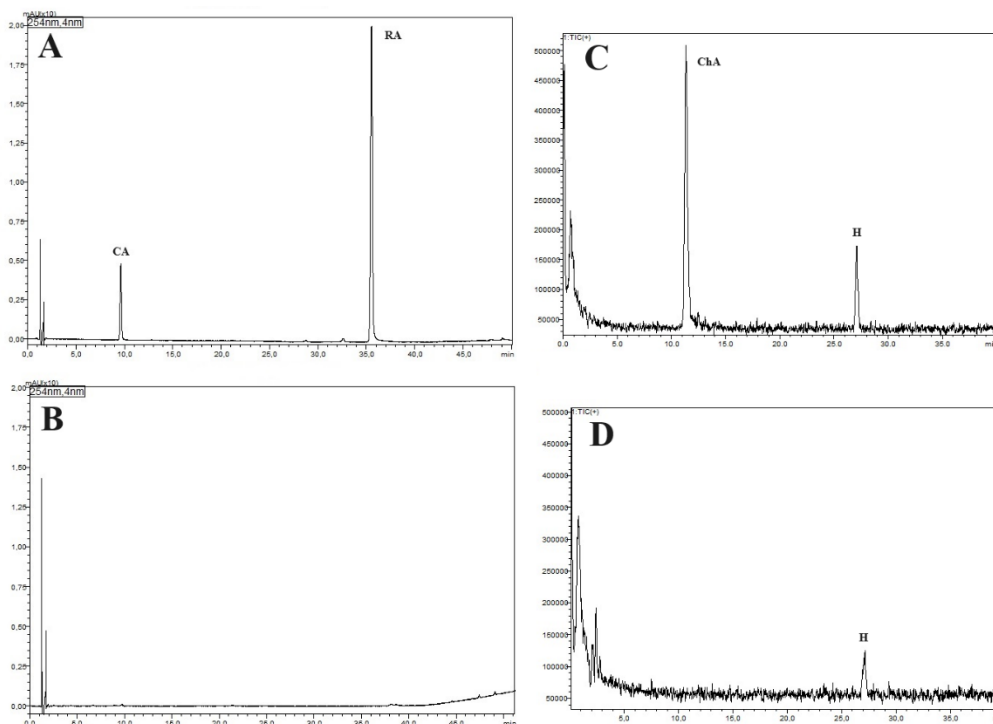
Surowiec roślinny	Nazwa związku	Zawartość w błonie [ $\mu\text{g/ml}$ ]	% absorpcji [%]
Korzeń żywokostu	Kwas kawowy	0,43	54,15



	Kwas rozmarynowy	1,39	4,09
	Globoidnan A	<LOD	-
Liść żywokostu	Kwas kawowy	4,15	8,37
	Kwas rozmarynowy	5,44	1,13
Kwiat arniki	Kwas chlorogenowy	15,94	0,72

Możliwa zdolność absorpcji badanych pochodnych kwasu kawowego w ludzkiej skórze, może przekładać się na ich efekt przeciwdrobnoustrojowy w podaniu miejscowym (60, 235) a w przypadku wyciągu z arniki górskiej, zgodnie z ostatnimi danymi literaturowymi także przeciwpierwotniakowy (118).

Brak zdolności do przenikania przez błony półprzepuszczalne imitujące ludzką skórę badanych związków z grupy pochodnych kwasu kawowego potwierdzono w eksperymencie z wykorzystaniem substancji wzorcowych. Pomimo zastosowania w płynie donorowym zwiększonych stężeń analizowanych pojedynczych związków (kwas rozmarynowy – 150 µg/ml i 1,5 mg/ml, kwas kawowy – 150 µg/ml i 25 µg/ml, kwas chlorogenowy – 1,5 mg/ml), nie stwierdzono ich obecności w płynie akceptorowym (Ryc. 64).



Ryc. 64: Chromatogramy HPLC mieszaniny kwasu rozmarynowego (RA; 1,5 mg/ml) i kwasu kawowego (CA; 250 µg/ml) (A, B) oraz kwasu chlorogenowego (ChA; 1,5 mg/g) i helenaliny (H; 30 µg/ml) (C, D) w przebiegu badania dostępności farmaceutycznej z użyciem błon półprzepuszczalnych Strat-M. A, C – płyn donorowy, B, D – płyn akceptorowy.

Eksperyment przeprowadzony dla wyciągów z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego z użyciem komercyjnych błon Strata-M (polieterosulfon), o strukturze dużo bardziej zbliżonej do ludzkiej skóry (234) wykazał, że wyniki dotychczasowych badań prowadzonych przede wszystkim na błonach celulozowych (227, 229, 230, 236) mogą być obarczone dużym błędem metodologicznym.

## 12. Omówienie wyników badań dostępności farmaceutycznej helenaliny i alkaloidów pirolizydynowych

Druga część badań obejmowała ocenę dostępności farmaceutycznej innych substancji biologicznie czynnych obecnych w analizowanych surowcach roślinnych – helenaliny pełniącej istotną rolę w aktywności terapeutycznej wyciągów z kwiatów arniki oraz alkaloidów pirolizydynowych odpowiedzialnych za możliwe działania niepożądane wyciągów z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego.

Ocena stopnia przenikania przez membranę Strata-M helenaliny, jako składnika wyciągu z kwiatu arniki górskiej, była niemożliwa w związku z bardzo niską zawartością helenaliny w analizowanym wyciągu (15 µg/g s.m.), w konsekwencji jej obecnością ujawnioną w płynie

akceptorowym poniżej LOQ. Helenalina podawana w dwukrotnie zwiększonym stężeniu (30 µg/ml) przenikała do płynu akceptorowego na poziomie 25% (wykryte stężenie w płynie donorowym – 20,24 µg/ml, w płynie akceptorowym – 4,93 µg/ml) (Ryc. 64).

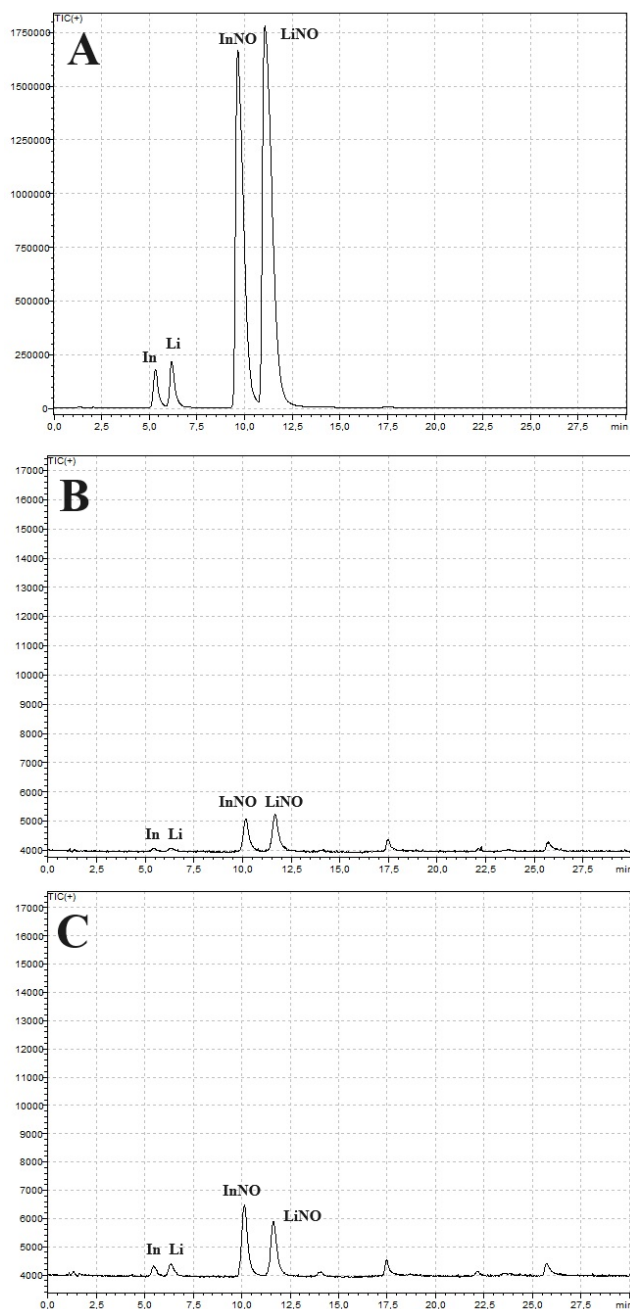
Ocenę dostępności farmaceutycznej alkaloidów pirolizydynowych obecnych w korzeniu i liściu żywokostu prowadzono w modelu z użyciem błon celulozowych oraz z zastosowaniem błon Strat-M. Zastosowanie błon celulozowych, podobnie jak w przypadku oznaczeń dla kwasów fenolowych, wykazało bardzo wysoki poziom przenikania analizowanych związków w zakresie 81-90% (Tabela 31).

Tabela 31: Wynik badań dostępności farmaceutycznej alkaloidów pirolizydynowych obecnych w wyciągach metanolowych z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego przeprowadzonych z użyciem błon celulozowych.

Surowiec roślinny	Nazwa związku	Zawartość w płynie donorowym [µg/ml]	Zawartość w płynie akceptorowym [µg/ml]	Procent przenikania [%]
Korzeń żywokostu	intermedyna	2,244	1,830	81,58
	likopsamina	2,150	1,782	82,87
	N-tlenek intermedyny	17,564	14,694	83,66
	N-tlenek likopsaminy	22,980	18,71	81,40
Liść żywokostu	intermedyna	0,100	0,087	87,51
	likopsamina	0,660	0,598	90,53
	N-tlenek intermedyny	0,1056	0,0919	87,01
	N-tlenek likopsaminy	8,858	7,894	89,12

Badanie z zastosowaniem błon półprzepuszczalnych Strata-M ponownie, w odniesieniu do błon celulozowych, ujawniło niższy stopień przenikania i pozwoliło uzyskać bardziej wiarygodne wyniki w warunkach bardziej zbliżonych do ludzkiej skóry. Odnotowano przenikanie przez błonę N-tlenków intermedyny i likopsaminy na bardzo niskim poziomie 0,04%, podczas gdy zawartość ich wolnych form mieściła się poniżej LOQ (Tabela 32, Ryc. 65).

Dodatkowo, po ekstrakcji użytych w eksperymencie błon, odnotowano w otrzymanym ekstrakcie obecność zarówno wolnych form intermedyny i likopsaminy (absorpcja na poziomie odpowiednio 0,32% i 0,36%), jak i ich N-tlenków (0,11% dla obydwu związków).



Ryc. 65: Chromatogramy HPLC zespołu alkaloidów pirolizydynowych z korzenia żywokostu w przebiegu otrzymane w badaniach dostępności farmaceutycznej z użyciem błon półprzepuszczalnych Strat-M. A– płyn donorowy, B – płyn akceptorowy, C –ekstrakt z błon półprzepuszczalnych. In – intermedyna, Li – likopsamina, InNO – N-tlenek intermedyny, LiNO – N-tlenek likopsaminy.

Tabela 32: Wyniki badań dostępności farmaceutycznej alkaloidów pirolizydynowych z wyciągów metanolowych z korzenia żywokostu lekarskiego przeprowadzonych z użyciem błon półprzepuszczalnych Strata-M.

Nazwa związku	Zawartość w płynie donorowym [µg/ml]	Zawartość w płynie akceptorowym [µg/ml]	Procent przenikania [%]	Zawartość w błonie [µg/ml]	% absorpcji [%]
intermedyna	2,775	<LOQ	-	0,0090	0,32
likopsamina	2,658	<LOQ	-	0,0095	0,36

N-tlenek intermedyny	18,718	0,0071	0,04	0,0201	0,11
N-tlenek likopsaminy	23,844	0,0087	0,04	0,0262	0,11

Otrzymane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia literaturowe o bardzo niskiej dostępności farmaceutycznej likopsaminy w podaniu na skórę, mieszczącej się w zakresie 0,04-0,22% dla ludzkiej skóry ex vivo lub 0,11-0,72% w badaniach z użyciem syntetycznych błon półprzepuszczalnych z regenerowanej celulozy) (48, 233). Dotychczas nie prowadzono badań stopnia przenikania przez skórę N-tlenków likopsaminy i intermedyny, które jednak jak wskazują otrzymane wyniki mogą charakteryzować się większą dostępnością farmaceutyczną w porównaniu do ich wolnych form. Ma to szczególne znaczenie w kontekście najnowszych badań dotyczących toksyczności tych związków (40, 41) oraz wskazujących na zdolność mikrobioty ludzkiej skóry do biotransformacji obecnych w wyciągach z korzenia i liści żywokostu N-tlenków acetylointermedyny/acetylolikopsaminy i N-tlenków symfytyny/symlandyny do N-tlenków intermedyny i likopsaminy i w konsekwencji wzrostu w skórze poziomu tych związków (237).

## IV WYNIKI I WNIOSKI

Badaniami objęto korzenie i liście żywokostu lekarskiego *Symphytum officinale* L. (*Boraginaceae*) pochodzenia krajowego, pozyskane z ogrodów botanicznych, stanowiska naturalnego i od krajowych producentów – firm zielarskich, których skład porównano w zakresie związków polifenolowych, ze szczególnym uwzględnieniem estrów pochodnych kwasu kawowego oraz innych grup substancji biologicznie czynnych – alantoiny współodpowiedzialnej za efekty terapeutyczne i alkaloidów pirolizydynowych odpowiadających za potencjalne efekty hepatotoksyczne. Ponadto przedmiotem badań były kwiaty arniki górskiej *Arnica montana* L. i arniki łąkowej *Arnica chamissonis* Less. pochodzące z krajowych firm zielarskich, kwiaty arniki górskiej pozyskane z chronionych stanowisk naturalnych i ogrodu botanicznego oraz nalewki macierzyste sporządzone ze świeżej całej rośliny arniki górskiej (*Arnica* TM), których skład zanalizowano przede wszystkim w zakresie estrów pochodnych kwasu kawowego, obok innych związków polifenolowych oraz laktonów seskwiterpenowych, decydujących o efektach terapeutycznych tych surowców.

W zakresie badań aktywności biologicznej oceniono *in vitro* działanie przeciwutleniające, jako element działania przeciwzapalnego, wyciągów metanolowych z korzeni i liści żywokostu lekarskiego oraz wyciągów metanolowych i etanolowych z kwiatów arniki górskiej i łąkowej.

Ocena dostępności farmaceutycznej obejmowała badania *in vitro* przenikania przez błony półprzepuszczalne imitujące ludzką skórę, składników wyciągów metanolowych z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego oraz kwiatu arniki górskiej, obok substancji wzorcowych – kwasu rozmarynowego, kwasu kawowego, kwasu chlorogenowego i helenaliny.

W ramach przeprowadzonych badań:

1. Opracowano warunki analizy jakościowej i ilościowej alantoiny w korzeniu żywokostu poddaną walidacji metodą TLC z oznaczeniem densytometrycznym. Stosowano: płytki chromatograficzne TLC Si60, mieszaninę butanol – 50% metanol + kwas mrówkowy (40 : 20 + 0,16 v/v + ml) jako fazę ruchomą oraz odczynnik Ehrlich'a o zmodyfikowanym składzie jako odczynnik wywołujący. Rozdzielenia prowadzono przy kontrolowanej wilgotności (47%) w automatycznej komorze chromatograficznej ADC2.

Wykazano w większości analizowanych korzeni żywokostu (5 spośród 8) (**Fr, DPr, EHR, ŁÓ**; 0,75-2,11%) zawartość alantoiny w zakresie dawnej normy farmakopealnej – FP IV

(>0,7%) lub jej granicach (**Za**; 0,65%) a w pozostałych trzech (**DNr, Lu, Gd**; 0,35-0,39% lub <LOQ) była ona znacząco niższa. Odnotowano w korzeniach pochodzących z ogrodów botanicznych (**Łó, Lu, Za, Gd**) niższą zawartość alantoiny w porównaniu do większości z pozyskanych ze sklepów zielarskich (**Fr, DPr, EHr**).

Opracowano warunki analizy jakościowej i ilościowej zespołu związków fenolowych (kwas fenolowy i flawonoidy) obecnych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego metodą HPLC-DAD-ESI/MS. Rozdzielenia prowadzono na kolumnach Kinetex F5 (100 x 4,6 mm) – korzeń żywokostu oraz Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm) – liść żywokostu, stosując elucję gradientową obejmującą wzrost stężenia mieszaniny acetonitryl-woda-kwas mrówkowy (50:50:0,1 v/v/v) (D) w 0,1% roztworze kwasu mrówkowego według programu III [0 min – 12% D, 10 min – 20% D, 30 min – 43% D, 50-55 min – 100% D, 60-70 min – 12% D].

- a. potwierdzono w korzeniu żywokostu lekarskiego obecność estrów pochodnych kwasu kawowego: globoidnanu A, globoidnanu B i rabdozyny, obok kwasu rozmarynowego i kwasu kawowego.
- b. po raz pierwszy ujawniono w liściu żywokostu lekarskiego obecność szeregu glikozydów flawonoidowych – glukozydów, galaktozydów i malonylo-glukozydów kwercetyny i kemferolu oraz globoidnanu A, kwasu rozmarynowego obok kwasu kawowego, obserwując jednocześnie wpływ temperatury procesu ekstrakcji na obecność estrów malonylowych glikozydów kwercetyny i kemferolu w otrzymanych wyciągach z surowca
- c. oznaczono zawartość związków fenolowych w korzeniach żywokostu lekarskiego pochodzących z krajowych ogrodów botanicznych i firm zielarskich – kwasu kawowego w zakresie 0,089-0,112 mg/g s.m., globoidnanu B w zakresie 0,338-0,92 mg/g s.m., kwasu rozmarynowego w zakresie 0,695-1,8 mg/g s.m. i globoidnanu A w zakresie 0,199-1,084 mg/g s.m, mieszczącym się w zakresie podawanym w literaturze. Po raz pierwszy odnotowano w korzeniu żywokostu dominację w zespole polifenoli globoidnanu B (1 z 8 badanych surowców) oraz potwierdzono wysoki udział globoidnanu A (związek dominujący w 1 z 8 badanych surowców).
- d. oznaczono zawartość związków fenolowych i glikozydów flawonoidowych w liściach żywokostu lekarskiego pochodzących z krajowych ogrodów

botanicznych i firm zielarskich, wykazując obecność kwasu kawowego w zakresie 0,127-0,194 mg/g s.m., kwasu rozmarynowego w zakresie 1,911-2,405 mg/g s.m., 3-*O*-galaktozydu kwercetyny w zakresie 85,07-234,98 µg/g s.m., 3-*O*-glukozydu kwercetyny w zakresie 250,58-959,14 µg/g s.m., 3-*O*-galaktozydu kemferolu w zakresie 95,62-210,09 µg/g s.m. i 3-*O*-glukozydu kemferolu w zakresie 148,24-385,94 µg/g s.m.

- e. odnotowano znaczące różnice w profilach fitochemicznych korzeni żywokostu w zakresie jakościowym jak i ilościowym (estry pochodne kwasu kawowego) w przeciwieństwie do liści żywokostu, wykazujących bardziej stabilną kompozycję związków czynnych, niezależną od pochodzenia surowca.
2. Opracowano warunki analizy jakościowej metodami 1D i 2D TLC zespołu związków fenolowych (kwasy fenolowe i flawonoidy) z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego, stosując płytki chromatograficzne TLC Si60, oraz jako fazy ruchome w rozdzielaniu 1D TLC mieszaninę eter diizopropylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (50 : 30 : 10 : 10, v/v/v/v), natomiast w analizie 2D TLC mieszaninę chloroform – metanol – kwas mrówkowy – woda (70 : 30 : 2 : 2, v/v/v/v) jako fazę I kierunku i keton metyletylowy – aceton – kwas mrówkowy – woda (35 : 50 : 10 : 5, v/v/v/v) jako fazę II kierunku rozwijania.
  3. Metodą SPE w opracowanych warunkach separacji wyodrębniono z korzenia żywokostu i określono strukturę globoidnanu A
  4. Opracowano i zwalidowano warunki analizy jakościowej i ilościowej zespołu alkaloidów pirolizydynowych obecnych w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego metodą HPLC-MS/MS. Rozdzielenia prowadzono na kolumnie Kinetex C-18 (100 x 2,1 mm) w temperaturze 25°C, stosując elucję gradientową obejmującą wzrost stężenia mieszaniny acetonitryl-woda-kwas mrówkowy (50:50:0,1, v/v/v) (D) w 0,1% roztworze kwasu mrówkowego według programu elucji gradientowej VIII [0-1,5 min – 10% D, 2-3 min – 8% D, 9 min – 9% D, 10-13 min – 10% D, 15 min – 18% D, 23-31 min – 25% D, 33-45 min – 30% D, 46 min – 40% D, 55 min – 70% D, 65-65 min – 100% D, 68-83 min – 10% D]
    - a. w warunkach opracowanej metody uzyskano efektywne rozdzielanie zespołu 14 alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu żywokostu: intermedyny, likopsaminy, *N*-tlenku intermedyny, *N*-tlenku likopsaminy, *N*-tlenku



dihydrointermedyny/dihydrolikopsaminy, 7'-acetylointermedyny, 7'-acetylolikopsaminy, N-tlenku 7'-acetylintermedyny, N-tlenku 7'-acetylolikopsaminy, N-tlenku 7'-sarracynylo-9-trachelantylotretronecyny, N-tlenku 7'-sarracynylo-9-wiridiflorynolretronecyny, N-tlenku echimidyny, symfytyny, symlandyny, N-tlenku symfytyny, N-tlenku symlandyny oraz N-tlenku 3'-acetylosymfytyny i jego izomerów. Wyjątek stanowiły dwa korzenie (**Gd, Zab**), w których N-tlenek 3'-acetylosymfytyny i jego izomery nie były obecne.

- b. po raz pierwszy scharakteryzowano zespół alkaloidów pirolizydynowych w liściach żywokostu, który był identyczny w zakresie jakościowym z zespołem alkaloidów pirolizydynowych w korzeniach żywokostu, z wyjątkiem N-tlenku 3'-acetylosymfytyny lub jego izomerów, nieobecnych we wszystkich liściach żywokostu (**DPf, EHf, Hf**).
- c. porównano w oparciu o przeprowadzoną analizę pół-ilościową (porównanie wartości pół powierzchni pików) zespoły alkaloidów pirolizydynowych korzeni i liści żywokostu, wykazując w korzeniu żywokostu dominację N-tlenków intermedyny i likopsaminy, przy wysokim udziale intermedyny, likopsaminy oraz N-tlenków ich acetylowych pochodnych, co było zgodne z danymi literaturowymi, a w liściach po raz pierwszy dominację intermedyny, likopsaminy i ich N-tlenków, przy śladowym udziale pozostałych związków
- d. oznaczono zawartości dominujących alkaloidów pirolizydynowych w zespołach: z korzeni intermedyny – 0,01345-0,1957 mg/g s.m., likopsaminy – 0,0705-0,1737 mg/g s.m., N-tlenek intermedyny – 0,2022-1,5575 mg/g s.m., N-tlenek likopsaminy – 0,3372-1,6125 mg/g s.m. oraz w liściach kolejno: 0,0149-0,3 mg/g s.m., 0,0259-0,499 mg/g s.m., 0,0263-0,0622 mg/g s.m. i 0,0261-0,1090 mg/g s.m.
- e. wykazano istotne statystycznie różnice w zawartościach alkaloidów pirolizydynowych w badanych korzeniach, w przeciwieństwie do liści charakteryzujących się większą stabilnością profilu alkaloidów pirolizydynowych

- f. wykazano, że korzenie żywokostu charakteryzują się znacząco wyższą całkowitą zawartością alkaloidów pirolizydynowych (0,70-3,28 mg/g s.m.), w porównaniu do liści (0,11-0,25 mg/g s.m.), co potwierdzają dane literaturowe.
5. W oparciu o przeprowadzone analizy ilościowe metodą HPLC-MS/MS alkaloidów pirolizydynowych wykazano dla dwóch badanych korzeni żywokostu możliwość przekroczenia wyznaczonych i opisanych w literaturze wartości  $IC_{50}$  alkaloidów pirolizydynowych wobec zdrowych komórek wątroby, co może sugerować ich potencjalne działanie hepatotoksyczne.
6. Analiza chemometryczna wykazała związek pomiędzy rozpoznanym profilem alkaloidów pirolizydynowych (jakościowym i ilościowym) a pochodzeniem anatomicznym (korzeń/liść) i geograficznym (różne miejsca zbioru) surowców otrzymywanych z żywokostu lekarskiego.
7. Opracowano i zwalidowano warunki analizy jakościowej i ilościowej zespołu związków polifenolowych (kwasów fenolowych, flawonoidów) w kwiatach arniki górskiej i łąkowej oraz nalewkach ze świeżej całej rośliny arniki górskiej metodą HPLC-DAD-ESI/MS. Rozdzielenia prowadzono na kolumnie Kinetex PFP (100 x 4,6 mm) stosując elucję gradientową według programu III obejmującą wzrost stężenia mieszaniny acetonitryl-woda-kwas mrówkowy (50:50:0,1, v/v/v) (D) w 0,1% roztworze kwasu mrówkowego według programu III [0 min – 12% D, 10 min – 20% D, 35 min – 43% D, 60-64 min – 100% D, 66-76 min – 12% D].
- a. w opracowanych warunkach uzyskano rozdzielenie 41 związków fenolowych, spośród których w oparciu o otrzymane widma UV, MS i porównanie parametrów chromatograficznych z wzorcami zidentyfikowano 20 związków z grupy kwasów fenolowych i 20 związków z grupy flawonoidów.
- b. po raz pierwszy rozpoznano składniki zespołu związków fenolowych w nalewce ze świeżej całej rośliny arniki górskiej (*Arnica* TM; Boiron, Francja), wykazując różnice w składzie jakościowym w porównaniu do profilu fitochemicznego kwiatów arniki górskiej i łąkowej. W nalewce *Arnica* TM wykazano obecność, niewykrytych w kwiatach *A. montana* i *A. chamissonis*, kwasu trikawoilochinowego oraz 6-metoksyapigeniny, przy braku obecności występujących w obydwu surowcach: 7-*O*-glukozydu luteoliny, 3-*O*-glukozydu 6-metoksykemferolu, 7-*O*-glukozydu apigeniny i dwóch pochodnych kwasu

kawowego o nierozpoznanych strukturach. W Wyciągu metanolowym z kwiatu arniki łąkowej wykazano ponadto obecność patuletyny, 6-metoksykemferolu i kwercetyny, niewykrytych w nalewce oraz kwiatach arniki górskiej.

- c. wykazano dominację w zespole związków fenolowych kwasów dikawoilochinowych, stanowiących estry pochodne kwasu kawowego. Związkami dominującymi w kwiatach arniki górskiej i łąkowej pochodzących ze źródeł komercyjnych były kwas 4,5-dikawoilochinowy (odpowiednio:  $700,8 \pm 6,7$  mg/100 g s.m. i  $624 \pm 92$  mg/100 g s.m.), kwas 1-metoksyzawianooilo[oksalooilo]-3,5-dikawoilochinowy (odpowiednio:  $425 \pm 12$  mg/100 g s.m. i  $438 \pm 28$  mg/100 g s.m.) oraz kwas chlorogenowy (odpowiednio:  $416,1 \pm 6,1$  mg/100 g s.m. i  $328 \pm 29$  mg/100 g s.m.), natomiast w nalewce *Arnica* TM (Boiron, Francja) dominował kwas 1,5-dikawoilochinowy ( $450 \pm 13$  mg/100 g s.m.).
  - d. ujawniono że w kwiatach arniki górskiej pochodzących ze stanowisk naturalnych dominowały: kwas 4,5-dikawoilochinowy ( $365,4-858$  mg/100 g s.m.), kwas 1-metoksyzawianooilo[oksalooilo]-3,5-dikawoilochinowy ( $29,56-71,85$  mg/100 g s.m.), kwas chlorogenowy ( $95,5-172$  mg/100 g s.m.) oraz w nalewce *Arnica* TM firmy Helios (Wielka Brytania) kolejno: kwas 4,5-dikawoilochinowy ( $452,13 \pm 0,18$  mg/100 g s.m.), kwas 1-metoksyzawianooilo[oksalooilo]-3,5-dikawoilochinowy ( $15,08 \pm 0,28$  mg/g s.m.) i kwas chlorogenowy  $98,2 \pm 3,3$  mg/100 g s.m.).
  - e. oznaczona całkowita zawartość w kwiatach arniki górskiej i łąkowej oraz nalewce *Arnica* TM (Boiron) kwasów fenolowych (kolejno:  $2330 \pm 200$  mg/100 g s.m.,  $2040 \pm 170$  mg/100 g s.m. i  $804 \pm 101$  mg/100 g s.m.), flawonów (kolejno:  $283 \pm 49$  mg/100 g s.m.,  $343 \pm 52$  mg/100 g s.m. i  $53,0 \pm 6,7$  mg/100 g s.m.) oraz flawonoli (kolejno:  $76,8 \pm 5,4$  mg/100 g s.m.,  $92,2 \pm 5,7$  mg/100 g s.m. i  $42,9 \pm 3,5$  mg/100 g s.m.), wskazała na ogólnie niższą zawartość substancji biologicznie czynnych w nalewce ze świeżej całej rośliny arniki górskiej, w porównaniu do wysuszonych kwiatów arniki górskiej i łąkowej.
8. Opracowano i zwalidowano warunki analizy jakościowej i ilościowej zespołu laktonów seskwiterpenowych z kwiatu arniki górskiej i łąkowej oraz nalewkach ze świeżej całej rośliny arniki górskiej metodą HPLC-DAD-ESI/MS. Rozdzielenia dla helenaliny

prowadzono na kolumnie Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm) stosując elucję izokratyczną mieszaniną zawierającą w metanolu 17% fazy F: woda-metanol 45:5 (v/v) ( $t_G$  25 min). W analizie estrów helenaliny i dihydrohelenaliny zastosowano po raz pierwszy dwie szeregowo połączone kolumny Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm), co umożliwiło pominięcie etapu oczyszczania wyciągu, oraz użyto elucję izokratyczną z wykorzystaniem mieszaniny woda-metanol 50:50 (v/v) ( $t_G$  51 min).

- a. po raz pierwszy rozpoznano zespół laktonów seskwiterpenowych obecnych w nalewce ze świeżej całej rośliny arniki górskiej (*Arnica* TM; Boiron, Francja), potwierdzając obecność: helenaliny, metakrylanu dihydrohelenaliny, acetylodihydrohelenaliny, metakrylanu helenaliny, izomaślanu helenaliny, izomaślanu dihydrohelenaliny, tyglinianu dihydrohelenaliny, tyglinianu helenaliny, 2-metylomaślanu dihydrohelenaliny, 2-metylomaślanu helenaliny, walerianu dihydrohelenaliny i walerianu helenaliny.
- b. w kwiatach arniki łąkowej i górskiej pochodzących ze źródeł komercyjnych ujawniono jedynie obecność helenaliny i acetylodihydrohelenaliny. Natomiast, badane nalewki homeopatyczne oraz w większości kwiaty arniki górskiej pochodzące ze stanowisk naturalnych charakteryzowały się obecnością wszystkich zidentyfikowanych laktonów seskwiterpenowych, wyjątek stanowił kwiat *A. montana* z Karkonoskiego Parku Narodowego (**AM4**), w którym nie potwierdzono obecności helenaliny.
- c. najwyższą zawartość helenaliny wykazano w kwiatach arniki górskiej i łąkowej zakupionych w sklepach zielarskich (jakkolwiek może to być obarczone błędem ze względu na przypuszczalną obecność ko-eluuujących związków towarzyszących) (odpowiednio:  $1,50 \pm 0,40$  mg/100 g s.m i  $0,764 \pm 0,026$  mg/100 g s.m). Zawartość helenaliny w nalewce *Arnica* TM (Boiron, Francja) ( $0,591 \pm 0,015$  mg/100 g s.m) była prawie 3-krotnie niższa, natomiast suma laktonów seskwiterpenowych w nalewce *Arnica* TM (Boiron, Francja) ( $99,4 \pm 3,4$  mg/100 g s.m) mieściła się w zakresie oznaczonym dla niektórych kwiatów arniki górskiej pochodzących ze stanowisk naturalnych i ogrodów botanicznych (zawartość w zakresie 76,4-151,52 mg/100 g s.m.)
- d. wykazano różnice w składzie ilościowych badanych nalewek homeopatycznych, wyższą zawartością kwasu 4,5-dikawoilochinowego, kwasu 3,4-

dikawoilochinowego i kwasu chlorogenowego charakteryzowała się nalewka Helios, przy wyższej zawartości kwasu 1,5-diCQA, kwasu 1-metoksyszczawianolio[oskaloilo]-3,5-dikawoilochinowego oraz laktonów seskwiterpenowych w nalewce Boiron. W porównaniu do kwiatów arniki górskiej pochodzących ze stanowisk naturalnych, nalewka *Arnica* TM firmy Helios charakteryzowała się 2-5-krotnie niższą zawartością kwasów 3,4-dikawoilochinowego i 1-metoksyszczawianolio[oskaloilo]-3,5-dikawoilochinowego.

9. Opracowano wstępne warunki analizy zespołów laktonów seskwiterpenowych z kwiatów arniki metodami chromatografii cienkowarstwowej, w tym z użyciem techniki MGD obejmującej dwukrotne rozwinięcie chromatogramu TLC użyciem fazy ruchomej C/F8 (heksan-octan etylu-kwas mrówkowy 9:1:0,1 v/v/v) a następnie jednokrotnie z użyciem fazy ruchomej C/F9 (heksan-octan etylu 8:2 v/v) oraz 2D TLC stosując w pierwszym kierunku fazę: C/F5 – heksan-octan etylu 3:2 (v/v), w drugim kierunku fazę: C/F15 – chloroform-aceton 6:1 (v/v). Użyciem odczynnika wanilinowego w kwasie siarkowym potwierdzono obecność helenaliny.

Przeprowadzona analiza porównawcza techniką MGD wskazała na różnice w składach jakościowych i ilościowych (intensywność pasm) badanych nalewek homeopatycznych *Arnica* TM (Boiron/Helios), oraz wykazała podobieństwa między badanymi kwiatami arniki górskiej ze stanowisk naturalnych, a nalewką homeopatyczną *Arnica* TM (Boiron).

10. Opracowano warunki rozdzielania frakcji polifenolowej od frakcji laktonów seskwiterpenowych metodą SPE w systemie automatycznym z użyciem kolumny Discovery-C18 (6ml, 1g) oraz stosując wymywanie mieszaninami metanol-woda o wzrastającym stężeniu metanolu (od 20% do 100%). Skuteczność metody potwierdzono również dla nalewki ze świeżej całej rośliny arniki górskiej. Opracowaną metodę można wykorzystać do oczyszczania i zatężania frakcji laktonów seskwiterpenowych w celu ich dalszej analizy.
11. Oceniono aktywność przeciwutleniającą wyciągów metanolowych z korzenia i liścia żywokostu z wykorzystaniem testów spektrofotometrycznych DPPH i ABTS (zmiatanie wolnych rodników) oraz testu FRAP (hamownie reakcji wolnorodnikowej).

- a. w porównaniu do wyciągów z korzenia żywokostu wykazano 2-4-krotnie wyższą zdolnością do hamowania reakcji wolnorodnikowych wyciągów z liści żywokostu, mierzoną testem FRAP (0,412-1,26 mmol TE/g s.m. vs 1,491-1,897 mmol TE/g s.m.) i niemal 2-krotnie wyższą aktywnością przeciwrodnikową mierzoną testem ABTS (0,292-0,471 mmol TE/g s.m. vs 0,427-0,561 mmol TE/g s.m.) przy zbliżonej aktywności wymiatającej wolne rodniki, mierzonej testem DPPH (0,075-0,207 mmol TE/g s.m. vs 0,1615-0,195 mmol TE/g s.m.).
- b. wykazano istotne statystycznie różnice w aktywności wyciągów z korzeni żywokostu pozyskanych ze sklepów zielarskich oraz pochodzących z upraw ogrodowych – surowce zakupione w sklepach zielarskich charakteryzowały się słabszą zdolnością do wymiatania wolnych rodników (testy DPPH i ABTS). Podobną zależność zaobserwowano w przypadku zdolności do hamowania reakcji wolnorodnikowych (test FRAP), z wyjątkiem surowca **DNr** charakteryzującego się znacznie silniejszym działaniem.
- c. ujawniono istotną statystycznie wysoką korelację pomiędzy zawartością kwasu rozmarynowego a wynikami testów DPPH i FRAP (0,61-0,65,  $p < 0,05$ ) oraz umiarkowaną korelację pomiędzy zawartością kwasu kawowego a wynikami testu DPPH (0,43,  $p < 0,05$ ) i zawartością globoidnanu A a wynikami FRAP i ABTS (0,39-0,41,  $p < 0,05$ ), potwierdzając znaczenie pochodnych kwasu kawowego w aktywności antyoksydacyjnej surowców stanowiących korzenie i liście żywokostu.
- d. wykazano, że kwiaty arniki górskiej i łąkowej pochodzące ze źródeł komercyjnych charakteryzują się zbliżoną siłą działania antyoksydacyjnego w użytych testach spektrofotometrycznych (FRAP:  $0,84 \pm 0,13$  mmol TE/g s.m. dla *A. montana* i  $0,78 \pm 0,082$  mmol TE/g s.m. dla *A. chamissonis*; ABTS:  $1,11 \pm 0,085$  mmol TE/g s.m. i  $1,05 \pm 0,096$  mmol TE/g s.m., odpowiednio). Interesującym jest fakt, że wyciągi z kwiatów arniki górskiej, przypuszczalnie ze względu na wyższą całkowitą zawartość kwasów fenolowych charakteryzują się niemal 2-krotnie silniejszą aktywnością wymiatającą wolne rodniki, mierzoną testem ABTS, w porównaniu wyciągów z korzeni żywokostu.

## 12. Metodami bioautografii-TLC z użyciem rodnika DPPH:

- a. wykazano aktywność przeciwutleniającą (wymiatanie wolnych rodników) oraz zdolność do hamowania aktywności oksydazy ksantynowej dla obecnego w wyciągach z korzenia i liścia żywokostu kwasu kawowego oraz jego pochodnych – kwasu rozmarynowego i globoidnanu A, potwierdzając ich rolę w działaniu antyoksydacyjnym badanych surowców roślinnych. Jednocześnie ujawniono, że globoidnan A może być selektywnym inhibitorem XO.
  - b. odnotowano silniejszą aktywność przeciwutleniającą składników wyciągów metanolowych w porównaniu z wyciągami etanolowymi otrzymanymi z kwiatów arniki. Wyniki testu DPPH na chromatogramach TLC sugerują, że wyciąg z kwiatu arniki górskiej wykazuje silniejszą aktywność wymiatającą wolne rodniki, ze względu na być może wyższe zawartości estrów pochodnych kwasu kawowego, w tym o 1/5 wyższą kwasu chlorogenowego i ponad 2-krotnie wyższą kwasu 1,5-diCQA w porównaniu do wyciągu z arniki łąkowej.
13. W wyniku przeprowadzonej oceny *in vitro* aktywności hamującej COX-1 i COX-2 wyciągów metanolowych z liścia żywokostu otrzymanych trzema różnymi metodami ekstrakcji oraz wyciągów metanolowych z korzenia żywokostu, wykazano że:
- a. wyciągi metanolowe z korzenia i liścia żywokostu charakteryzują się wyższą aktywnością hamującą COX-1 w porównaniu do COX-2. W zależności od użytego stężenia procent inhibicji wynosił dla wyciągów z korzeni 55,7-65,25% inhibicji COX-1 i 19,63%-28,86% inhibicji COX-2.
  - b. otrzymane wyciągi alkoholowe z liści charakteryzował niższy procent hamowania COX-1 (20,79-37,16% inhibicji) w porównaniu do wyciągów z korzeni, natomiast dla wyciągu z liści otrzymanego w aparacie Soxhleta (**DR-I**) obserwowano efekty hamujące przy niższym użytym jego stężeniu w porównaniu do korzeni. Wyjątek stanowił wyciąg otrzymany w wyniku ekstrakcji wspomaganiej ultradźwiękami (**DRf-II**), dla którego odnotowano przewagę działania hamującego COX-2 w porównaniu do COX-1.
14. W przyjętych modelach oceny dostępności farmaceutycznej jako stopnia przenikania przez błony półprzepuszczalne imitujące ludzką skórę odnotowano duże różnice w zależności od typu stosowanej membrany:
- a. wykazano wysoki stopień przenikania kwasu kawowego i jego pochodnych (kwas rozmarynowy, globoidnan A) przez błonę celulozową na poziomie

powyżej 72% jako składników wyciągu z korzenia żywokostu (kwas kawowy, kwas rozmarynowy, globoidnan A) oraz powyżej 48% jako składników wyciągu z liścia żywokostu (kwas kawowy, kwas rozmarynowy).

- b. nie wykazano zdolności do przenikania przez imitującą ludzką skórę membranę Strat-M dla pochodnych kwasu kawowego obecnych w wyciągach metanolowych z korzenia i liścia żywokostu (kwas kawowy, kwas rozmarynowy, globoidnan A) oraz w wyciągu metanolowym z arniki górskiej (kwas chlorogenowy i pozostałe kwasy diCQA), jako składników wyciągu oraz jako pojedynczych związków.
- c. wykazano absorpcję w warstwach imitującej ludzką skórę błony półprzepuszczalnej Strat-M kwasu kawowego (54,15% z korzenia żywokostu, 8,37% z liścia żywokostu), rozmarynowego (4,09% i 1,13%, odpowiednio) i chlorogenowego (0,72% z kwiatu arniki górskiej). Nie wykazano w badanym płynie obecności globoidnanu A.
- d. wykazano zdolność do przenikania przez błonę Strat-M helenaliny na poziomie niemal 25%. Jednocześnie nie wykryto helenaliny w płynie akceptorowym po aplikacji wyciągu z kwiatu arniki górskiej, ze względu na jej niskie stężenia w wyciągu badanym.
- e. wykazano przenikanie przez błonę półprzepuszczalną Strat-M *N*-tlenków intermedyny i likopsaminy na bardzo niskim poziomie 0,04%, podczas gdy zawartość ich wolnych form mieściła się poniżej LOQ. Odnotowano absorpcję w warstwach membrany Strat-M zarówno wolnych form intermedyny i likopsaminy na poziomie odpowiednio 0,32% i 0,36%, jak i ich *N*-tlenków (0,11% dla obydwu związków).

W rezultacie przeprowadzonych badań opracowano szereg metod chromatograficznych z wykorzystaniem technik TLC (1D, 2D TLC, MGD, bioautografia) oraz HPLC (HPLC-DAD-ESI/MS, HPLC-MSMS, HPLC-UV/Vis), które przeznaczono w toku pracy do rozpoznania składu chemicznego badanych surowców, jednocześnie metody te mogą być użyte w analizach innych surowców roślinnych o podobnym profilu chemicznym (np. gatunkach z rodziny *Boraginaceae*, gatunkach z rodzaju *Arnica*). Wyniki badań poszerzyły wiedzę o zespołach związków z grupy



estrów kwasu kawowego w surowcach pochodzących z rodzaju *Arnica* i gatunku *Symphytum officinale*, na tle innych substancji biologicznie czynnych.

Potwierdzono możliwy udział estrów pochodnych kwasu kawowego w aktywności przeciwutleniającej i przeciwzapalnej badanych surowców, nie wykazując jednak ich zdolności do penetracji przez błony półprzepuszczalne imitujące ludzką skórę, co może świadczyć o słabej dostępności farmaceutycznej badanych związków.

Otrzymane wyniki wykazały duże różnice w jakości surowców komercyjnych otrzymywanych z badanych gatunków, co bezpośrednio może przekładać się na ich właściwości terapeutyczne. Odnotowane wysokie stężenia alkaloidów pirolizydynowych w niektórych badanych korzeniach żywokostu mogą stanowić zagrożenie zdrowotne i skłaniają do sformułowania wniosku o konieczności kontroli zawartości alkaloidów pirolizydynowych w surowcach dostępnych na rynku zielarskim.

## STRESZCZENIE

Surowce roślinne otrzymywane z gatunków należących do rodzaju *Arnica* (kwiat arniki - gatunki *Arnica montana* L. i *Arnica chamissonis* Less. oraz nalewki z całej świeżej rośliny *A. montana* L.) i gatunku *Symphytum officinale* L. (korzeń i liść żywokostu lekarskiego) są od wieków stosowane w europejskiej medycynie tradycyjnej. W ciągu ostatnich dekad wycofano się z ich użycia wewnętrznego, ze względu na działania niepożądane wykazywane przy aplikacji *per os* przez obecne w arnicy laktony seskwiterpenowe oraz występujące w żywokoście lekarskim hepatotoksyczne alkaloidy pirolizydynowe o szkielecie 1,2-nienasyconej necyny. Wciąż jednak cieszą się szeroko stosowane w aplikacji zewnętrznej m.in. w leczeniu schorzeń reumatycznych i układu mięśniowo-szkieletowego – dolegliwości bólowych ze strony mięśni i stawów, kontuzji sportowych, urazów takich jak stłuczenia, złamania, skręcenia. Jak wynika z badań klinicznych, w niektórych przypadkach wykazując skuteczność zbliżoną lub nawet silniejszą niż stosowane w tych samych wskazaniach leki syntetyczne.

Na krajowym rynku aptecznym i zielarskim surowce pozyskiwane z arniki i żywokostu stanowią przeważnie składniki produktów kosmetycznych lub (w przypadku arniki) preparatów homeopatycznych, których skład chemiczny nie podlega ścisłej kontroli i standaryzacji. Jedynie kwiat arniki górskiej (*Arnicae flos*; *A. montana* L.) i nalewka z arniki górskiej (*Arnicae tinctura*) posiadają monografie w obowiązującej Farmakopei Polskiej XII, a kwiat arniki górskiej (*Arnicae flos*; *A. montana* L.) i korzeń żywokostu (*Symphyti radix*; *Symphytum officinale* L.) są również objęte monografiami Europejskiej Agencji Leków (EMA). Na rynku zielarskim obecne są również sprzedawane w formie suszonej surowce stanowiące liść żywokostu, kwiat arniki łąkowej (*A. chamissonis* Less.), o słabo poznanym składzie chemicznym.

Głównymi związkami o aktywności biologicznej, decydującej o efektach terapeutycznych, substancji czynnych roślinnych z gatunków z rodzaju *Arnica* i gatunku *S. officinale* są alantoina w żywokoście lekarskim oraz laktony seskwiterpenowe w arnikach (głównie helenalina i jej estry). Surowce pozyskiwane z wymienionych gatunków stanowią również źródło wielu innych grup związków, które mogą odgrywać znaczącą rolę w aktywności leczniczej poprzez synergiczne działania, skutkującą zwiększeniem potencjału biologicznego oraz decydować o poliwalencji – wielokierunkowości ich efektów terapeutycznych. Ponadto mogą mieć również wpływ na ich biodostępność, na co m.in. wskazują dotychczasowe wyniki badań przenikania przez skórę takich związków jak alantoina czy helenalina.

Znaczenie wielu grup związków chemicznych obecnych w wymienionych powyżej surowcach w ogólnej aktywności zarówno biologicznej jak i terapeutycznej nie jest do końca rozpoznana. Grupę takich związków stanowią estry kwasu kawowego (CAE), które są dzisiaj intensywnie badane w różnych leczniczych surowcach roślinnych, zarówno w aspekcie fitochemicznym jak i farmakologicznym. Badania ostatnich lat wykazały obecność nieopisywanych wcześniej w tych surowcach pochodnych kwasu rozmarynowego w korzeniu żywokostu oraz izomerów i pochodnych kwasu dikawoilochinowego w kwiecie arniki górskiej. Są to grupy związków znanych z szerokiego zakresu działania farmakologicznego, obejmującego m.in. aktywność przeciwutleniającą, przeciwzapalną, przeciwdrobnoustrojową, neuroprotekcijną, a ich rola w działaniu leczniczym ekstraktów roślinnych z arniki i żywokostu lekarskiego wciąż nie została w pełni poznana.

W niniejszej rozprawie doktorskiej zaprezentowano wyniki badań nad zespołami estrów pochodnych kwasu kawowego obecnych w surowcach z wybranych gatunków z rodzaju *Arnica* (*Arnica montana* L., *Arnica chamissonis* Less.) i *Symphytum officinale* L., w kontekście ich działania przeciwzapalnego. Ponadto przedstawiono wyniki badań dostępności farmaceutycznej wybranych substancji biologicznie czynnych oraz analizy fitochemicznej innych obecnych w wymienionych surowcach metabolitów wtórnych.

Rozprawa doktorska składa się z trzech głównych części. Część pierwsza obejmuje omówienie aktualnego stanu wiedzy na temat badanych gatunków – arniki górskiej i łąkowej oraz żywokostu lekarskiego – ich historii stosowania, składu chemicznego, aktywności farmakologicznej, obecności na rynku zielarskim/farmaceutycznym oraz stanowiących przedmiot badań estrów pochodnych kwasu kawowego (estrów kwasu kawowego z kwasem 3,4-dihydrofenylomlekowym i estrów kwasu kawowego z kwasem chinowym) w zakresie ich budowy, występowania i aktywności farmakologicznej. W drugiej części przedstawiono metodologię prowadzonych badań. Natomiast w trzecia część dysertacji stanowi omówienie wyników przeprowadzonych badań fitochemicznych, oceny aktywności biologicznej i dostępności farmaceutycznej.

Cel pracy stanowiła analiza jakościowa i ilościowa zespołów estrów pochodnych kwasu kawowego, obok innych metabolitów wtórnych (t.j. alantoiny, alkaloidów pirolizydynowych i laktonów seskwiterpenowych) w surowcach z arniki górskiej i łąkowej oraz żywokostu

lekarskiego wraz z oceną ich aktywności przeciwzapalnej i dostępności farmaceutycznej wybranych substancji biologicznie czynnych.

Do badań przeznaczono:

- Korzenie żywokostu lekarskiego pochodzące od 4 producentów (firmy zielarskie *Flos*, *Dary Natury*, *Dary Podlasia*, *EkoHerba*), 4 ogrodów botanicznych (Ogród Botaniczny UMCS w Lublinie, Miejski Ogród Botaniczny w Zabrze, Ogród Roślin Leczniczych Uniwersytet Medyczny w Łodzi i Ogród Roślin Leczniczych GUMed), 1 stanowiska naturalnego (Dolina Radości, Gdańsk)
- Liście żywokostu pochodzące od 3 producentów (firmy zielarskie *Dary Podlasia*, *EkoHerba*, *Herbisarium*) i z 1 stanowiska naturalnego (Dolina Radości, Gdańsk)
- Kwiaty arniki górskiej pochodzące od 1 producenta (firma zielarska *Runo*), z 4 stanowisk naturalnych (Łaz, Kraków, Pasterka, Karkonoski Park Narodowy) i z 1 ogrodu botanicznego (Ogród Botaniczny UAM w Poznaniu)
- Kwiaty arniki łąkowej pochodzące od 1 producenta (firma zielarska *Kawon*)
- Nalewki macierzyste ze świeżej całej rośliny arniki górskiej *Arnica* TM otrzymane od 2 firm – Boiron (Francja) i Helios (Wielka Brytania).

W rezultacie przeprowadzonej analizy fitochemicznej opracowano i zoptymalizowano szereg metod chromatograficznych do oceny jakościowej i ilościowej zespołów wybranych substancji biologicznie czynnych obecnych w badanych surowcach.

Opracowano i zwalidowano metodę analizy jakościowej i ilościowej alantoiny w wyciągach metanolowych z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego z wykorzystaniem densytometrii w sprzężeniu z chromatografią cienkowarstwową. Separację pasma alantoiny w badanych wyciągach prowadzono na płytkach TLC Si60 (analiza jakościowa) i TLC Si60<sub>F254</sub> (analiza ilościowa) z użyciem mieszaniny butanol:50% metanol:kwas mrówkowy 40:20:0.16 (v/v/v) w warunkach kontrolowanej wilgotności 47% (nasycony roztwór tiocyjanianu potasu). Do celów analizy jakościowej chromatogramy TLC derywatyzowano modyfikowanym odczynnikiem Ehrlicha, podczas gdy analizę ilościową prowadzono densytometrycznie, bez uprzedniej derywatyzacji, przy długości fali  $\lambda$ -190 nm. Otrzymane wyniki wykazały bardzo niską zawartość alantoiny w liściach żywokostu (<LOQ). Korzenie żywokostu pochodzące z firm zielarskich

charakteryzowały się wyższą zawartością alantoiny w porównaniu do surowców pozyskanych z ogrodów botanicznych.

Opracowano metodę HPLC-DAD-ESI/MS analizy ilościowej i jakościowej zespołu polifenoli w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego, optymalizując fazę stacjonarną, fazę ruchomą i profil elucji gradientowej. Najlepsze rozdzielanie uzyskano stosując kolumny Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm) (liść żywokostu) i Kinetex F5 (100 x 4,6 mm) (korzeń żywokostu) w warunkach elucji gradientowej obejmującej wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:FA (50:50:0,1) od 12% do 100% w 0,1% roztworze kwasu mrówkowego (FA) w wodzie ( $t_G$  70 min, profil gradientu liniowo-skokowy). Rozpoznano skład jakościowy estrów pochodnych kwasu kawowego i innych związków polifenolowych w surowcach otrzymywanych z żywokostu lekarskiego, potwierdzając obecność kwasu kawowego, kwasu rozmarynowego, globoidnanu A, globoidnanu B i rabdozyny w korzeniu żywokostu oraz ujawniając obecność globoidnanu A i szeregu glikozydów flawonoidów (glukozydy, galaktozydy i malonylo-glukozydy kwercetyny i kemferolu) w wyciągu z liścia żywokostu. Dodatkowo, opracowano warunki separacji wymienionych związków metodami TLC (1D i 2D TLC). Separację prowadzono stosując płytki TLC Si60 z użyciem mieszaniny eter diizopropylowy–aceton–kwas mrówkowy–woda (50:30:10:10, v/v/v/v). Natomiast chromatogramy 2D TLC rozwijano z użyciem mieszanin: chloroform-metanol-kwas mrówkowy-woda (70:30:2:2, v/v/v/v) (I kierunek) i keton metyletylowy-aceton-kwas mrówkowy-woda (35:50:10:5, v/v/v/v). Otrzymane pasma badanych związków derywatyzowano odczynnikiem NPR+PEG.

W celu identyfikacji strukturalnej globoidnanu A opracowano metodę jego izolacji z wyciągu metanolowego z korzenia żywokostu z użyciem automatycznej ekstrakcji do fazy stałej SPE. Izolację prowadzono poprzez aplikację zatężonego wyciągu na kolumnkę SPE Discovery-C18 (1 g, 6 ml) a następnie frakcjonowanie rosnącymi stężeniami metanolu, stosując kolejno po 2 ml: 30% metanolu (frakcje I-III), po 2 ml 50% metanolu (frakcje IV-VI) i 6 ml 100% metanolu (frakcja VII). Oczyszczony związek otrzymywano we frakcjach IV i V, które następnie łączono i liofilizowano. Strukturę chemiczną globoidnanu A potwierdzono z użyciem metod NMR i HPLC-DAD-MS.

Zoptymalizowane warunki rozdzielania chromatograficznego HPLC wykorzystano do przeprowadzenia analizy ilościowej, obejmującej ocenę zawartości kwasu kawowego, kwasu rozmarynowego, globoidnanu A i globoidnanu B w korzeniach żywokostu oraz kwasu

kawowego, kwasu rozmarynowego, glukozydów i glikozydów kwercetyny i kemferolu w liściu żywokostu. Opracowana metoda została zwalidowana, a otrzymane wyniki ujawniły duże zróżnicowanie w składzie ilościowym substancji roślinnych czynnych z żywokostu lekarskiego w zależności od ich pochodzenia. Wyciągi metanolowe z liścia żywokostu charakteryzowały się wyższą zawartością kwasów fenolowych w porównaniu do korzenia żywokostu, z dominacją w zespole kwasu rozmarynowego. Udział poszczególnych pochodnych kwasu kawowego w badanych wyciągach z korzenia żywokostu był zróżnicowany, w zależności od pochodzenia surowca związki dominujące stanowiły kwas rozmarynowy, globoidnan A lub globoidnan B.

Ostatni etap prac fitochemicznych nad surowcami z żywokostu lekarskiego stanowiło opracowanie metody HPLC-MS/MS analizy jakościowej i ilościowej zespołu alkaloidów pirolizydynowych (PAs) z zastosowaniem techniki MRM w trybie jonizacji dodatniej. Najlepsze rozdzielanie uzyskano stosując kolumnę Kinetex C-18 (100 x 2,1 mm) i prowadząc separację w temperaturze 25°C w warunkach elucji gradientowej obejmującej w 1-9 min spadek stężenia mieszaniny ACN:woda:FA (50:50:0,1) w 0,1% roztworze kwasu mrówkowego (FA) w wodzie od 10% do 0% a następnie jego wzrost do 100% ( $t_G$  83 min, profil gradientu liniowo-skokowy). Opracowana metoda pozwoliła na uzyskanie separacji i identyfikację zespołu 17 alkaloidów pirolizydynowych o szkielecie 1,2-nienasyconej necyny, obejmującego intermedynę, likopsaminę i ich *N*-tlenki, *N*-tlenek dihydrointermedyny/dihydrolikopsaminy, acetylointermedynę, acetylolikopsaminę i ich *N*-tlenki, *N*-tlenek 7'-saracynylo-9-trachelantylotretronecyny, *N*-tlenek 7'-saracynylo-9-wiridifloryloretronecyny, *N*-tlenek echimidyny, symfitynę, symlandynę i ich *N*-tlenki oraz *N*-tlenek 3'-acetylosymfityny i jego izomery. Po raz pierwszy zidentyfikowano profil PAs obecnych w liściu żywokostu potwierdzając obecność pełnego zespołu wyżej wymienionych związków z wyjątkiem *N*-tlenku 3'-acetylosymfityny, obecnego w korzeniu w śladowych ilościach.

Opracowane warunki rozdzielania HPLC-MS/MS wykorzystano do przeprowadzenia analizy pół-ilościowej, która wykazała dominację *N*-tlenków intermedyny i likopsaminy, obok ich wolnych form i *N*-tlenków form acetylowych w zespole PAs korzenia żywokostu oraz *N*-tlenków i wolnych form intermedyny i likopsaminy w liściu żywokostu. Metodą dodatku wzorca z użyciem techniki MRM w trybie jonizacji dodatniej przeprowadzono analizę ilościową HPLC-MS/MS dominujących alkaloidów pirolizydynowych, których zawartości mieściły się w zakresach: intermedyna – 0,0149-0,1957 mg/g s.m., likopsamina – 0,0259-0,1737 mg/g s.m.,

N-tlenek intermedyny – 0,0263-1,5575 mg/g s.m., N-tlenek likopsaminy – 0,261-1,6125 mg/g s.m. wykazując istotne statystycznie różnice pomiędzy analizowanymi surowcami. Suma oznaczonych alkaloidów dla korzeni żywokostu mieściła się w zakresie 0,60-3,28 mg/g s.m. a dla liści na kilkakrotnie niższym poziomie 0,11-0,24 mg/g s.m. Jednocześnie, najwyższe stężenia alkaloidów pirolizydynowych odnotowano w surowcach pochodzących od producentów – krajowych firm zielarskich. W odniesieniu do najnowszych danych literaturowych na temat hepatotoksyczności intermedyny, likopsaminy i ich N-tlenków można wnioskować o potencjalnej toksyczności dwóch surowców charakteryzujących się najwyższą zawartością N-tlenków intermedyny i likopsaminy.

Opracowano i zwalidowano warunki analizy jakościowej i ilościowej zespołu związków polifenolowych (kwasów fenolowych i flawonoidów) obecnych w wyciągach metanolowych z kwiatu arniki górskiej i łąkowej oraz nalewkach z całej świeżej rośliny arniki górskiej metodą HPLC-DAD-ESI/MS. Optymalizację rozdzieleń prowadzono w zakresie doboru fazy stacjonarnej i gradientu elucji. Najlepsze rozdzielenie badanych związków uzyskano na kolumnie Kinetex PFP (100 x 4,6 mm) stosując elucję gradientową obejmującą wzrost stężenia mieszaniny ACN-woda-FA (50:50:0,1) od 12% do 100% w 0,1% roztworze kwasu mrówkowego ( $t_G$  76 min, profil gradientu liniowo-skokowy). Wykryto 41 związków fenolowych (w tym 10 o nie w pełni rozpoznanych strukturach), w tym 20 związków z grupy kwasów fenolowych i 20 z grupy flawonoidów. Przeprowadzona analiza porównawcza wykazała różnice w składzie jakościowym pomiędzy badanymi przetworami z arniki. Nalewka *Arnica* TM wyróżniła się obecnością, niewykrytych w kwiatach *A. montana* i *A. chamissonis* kwasu trikawoilochinowego oraz 6-metoksyapigeniny, przy braku obecności występujących w obydwu surowcach kwiatowych: 7-O-glukozydu luteoliny, 3-O-glukozydu 6-metoksykemferolu, 7-O-glukozydu apigeniny i dwóch pochodnych kwasu kawowego o nierozpoznanych strukturach. Wyciąg metanolowy z kwiatu arniki łąkowej wyróżnił się obecnością patuletyny, 6-metoksykemferolu i kwercetyny, nieobecnych w nalewce oraz kwiatach arniki górskiej.

W następnym kroku przeprowadzono analizę ilościową rozdzielonych związków polifenolowych. Związki dominujące w zespole polifenoli stanowiły estry pochodne kwasu kawowego. W wyciągach metanolowych z kwiatów arniki górskiej i łąkowej kwas 4,5-dikawoilochinowy (odpowiednio:  $700,8 \pm 6,7$  mg/100 g s.m. i  $624 \pm 92$  mg/100 g s.m.), kwas 1-metoksy-szczawianoilo[oksaloi]lo-3,5-dikawoilochinowy (odpowiednio:  $425$  mg  $\pm$  12

mg/100 g s.m. i  $438 \pm 28$  mg/100 g s.m.) oraz kwas chlorogenowy (odpowiednio:  $416,1 \pm 6,1$  mg/100 g s.m. i  $328 \pm 29$  mg/100 g s.m.), natomiast w nalewce *Arnica* TM dominował kwas 1,5-dikawoilochinowy ( $450 \pm 13$  mg/100 g s.m.). Oznaczono całkowitą zawartość obecnych w kwiatach arniki górskiej i łąkowej oraz nalewce *Arnica* TM kwasów fenolowych (kolejno:  $2330 \pm 200$  mg/100 g s.m.,  $2040 \pm 170$  mg/100 g s.m. i  $804 \pm 101$  mg/100 g s.m.), flawonów (kolejno:  $283 \pm 49$  mg/100 g s.m.,  $343 \pm 52$  mg/100 g s.m. i  $53,0 \pm 6,7$  mg/100 g s.m.) oraz flawonoli (kolejno:  $76,8 \pm 5,4$  mg/100 g s.m.,  $92,2 \pm 5,7$  mg/100 g s.m. i  $42,9 \pm 3,5$  mg/100 g s.m.), wykazując niższą zawartość substancji biologicznie czynnych w nalewce świeżej całej rośliny arniki górskiej, w porównaniu do suszonych kwiatów arniki górskiej i łąkowej.

W toku analizy fitochemicznej wyciągów z kwiatu arniki górskiej i łąkowej oraz nalewek *Arnica* TM opracowano i zwalidowano również warunki analizy jakościowej i ilościowej zespołu laktonów seskwiterpenowych metodą HPLC-DAD-ESI/MS. Rozdzielenia dla helenaliny prowadzono na kolumnie Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm) stosując elucję izokratyczną w stężeniu 17% mieszaniny woda-metanol 45:5 (v/v) w metanolu ( $t_R$  25 min). W analizie estrów helenaliny i dihydrohelenaliny zastosowano dwie szeregowo połączone kolumny Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm), pozwalające na pominięcie etapu oczyszczania wyciągu oraz elucję izokratyczną mieszaniną woda-metanol 50:50 (v/v) ( $t_R$  51 min). Stosując opracowane warunki rozdzielania HPLC po raz pierwszy rozpoznano zespół laktonów seskwiterpenowych obecnych w nalewce świeżej całej rośliny arniki górskiej (*Arnica* TM; Boiron, Francja), potwierdzając obecność: helenaliny, metakrylanu dihydrohelenaliny, acetylodihydrohelenaliny, metakrylanu helenaliny, izomaślanu helenaliny, izomaślanu dihydrohelenaliny, tiglinianu dihydrohelenaliny, tiglinianu helenaliny, 2-metylomaślanu dihydrohelenaliny, 2-metylomaślanu helenaliny, walerianu dihydrohelenaliny i walerianu helenaliny. Porównano zespoły laktonów seskwiterpenowych w nalewkach *Arnica* TM od dwóch producentów, kwiatach arniki górskiej i łąkowej zakupionych w sklepach zielarskich i kwiatach arniki górskiej pozyskanych ze stanowisk naturalnych i ogrodu botanicznego. W surowcach zakupionych w sklepach zielarskich w zespole laktonów seskwiterpenowych potwierdzono jedynie obecność helenaliny i acetylodihydrohelenaliny. Obydwie badane nalewki oraz większość kwiatów arniki górskiej pochodzących ze stanowisk naturalnych zawierały pełny zespół zidentyfikowanych laktonów seskwiterpenowych, wyjątek stanowił kwiat *A. montana* z Karkonoskiego Parku Narodowego, w którym nie potwierdzono obecności helenaliny.



Dodatkowo, opracowano warunki separacji związków mogących stanowić laktony seskwiterpenowe estry helenaliny i dihydrohelenaliny metodami 1D TLC w systemie MGD obejmującym dwukrotne rozwinięcie chromatogramu TLC na wysokość 9 cm z użyciem mieszaniny heksan-octan etylu-kwas mrówkowy 9:1:0,1 (v/v/v) a następnie jednokrotnie na wysokość 6cm mieszaniną heksan-octan etylu 8:2 (v/v) oraz 2D TLC w układzie stosując jako fazę pierwszego kierunku mieszaniną heksan-octan etylu 3:2 (v/v) i fazę drugiego kierunku mieszaniną chloroform-aceton 6:1 (v/v). Derywatyzację chromatogramów TLC prowadzono odczynnikiem wanilinowym w kwasie siarkowym, wybarwiający pasmo helenaliny na kolor różowo-pomarańczowy. Przeprowadzona analiza porównawcza wyciągów metanolowych z kwiatów arniki górskiej i łąkowej oraz dwóch nalewek *Arnica* TM wykazała znaczące różnice w ich składach jakościowych i ilościowych (intensywność pasm).

Opracowano metodę automatycznej SPE pozwalającej na oczyszczenie wyciągu metanolowego z arniki poprzez rozdzielanie frakcji polifenolowej (F3) obok frakcji laktonów seskwiterpenowych (F4). Badany wyciąg aplikowano na kolumnkę SPE Discovery-C18 (6 ml, 1 g) i frakcjonowano stosując kolejno po 6 ml 20% metanolu (F1), 30% metanolu (F2), 60% metanolu (F3) i 100% metanolu (F4). Skuteczność metody potwierdzono również dla nalewki ze świeżej całej rośliny arniki górskiej.

Ocenę aktywności przeciwutleniającej jako stanowiącej element aktywności przeciwzapalnej badanych substancji czynnych roślinnych prowadzono z wykorzystaniem testów spektrofotometrycznych DPPH, FRAP i ABTS, bioautografii-TLC (test DPPH, test hamowania oksydazy ksantynowej i układ ryboflawina-światło-NBT) oraz testów ELISA do oznaczeń aktywności hamującej COX-1 i COX-2.

W ocenie aktywności przeciwutleniającej wyciągów metanolowych z korzeni i liści żywokostu lekarskiego z użyciem testów spektrofotometrycznych wykazano istotne statystycznie różnice w aktywności wyciągów z korzeni żywokostu pozyskanych ze sklepów zielarskich oraz pochodzących z upraw ogrodowych – surowce zakupione w sklepach zielarskich charakteryzowały się słabszą zdolnością do wymiatania wolnych rodników (testy DPPH i ABTS). Podobną zależność zaobserwowano w przypadku zdolności do redukcji jonów żelaza (test FRAP), z wyjątkiem jednego surowca, charakteryzującego się znacznie silniejszym działaniem. Jednocześnie wyciągi z liści żywokostu charakteryzowały się, w porównaniu do wyciągów metanolowych z korzeni żywokostu, 2-4-krotnie wyższą zdolnością do redukcji jonów żelaza,

mierzona testem FRAP (1,491-1,897 mmol TE/g s.m. vs 0,412-1,26 mmol TE/g s.m.) i niemal 2-krotnie wyższą aktywnością przeciwrodnikową mierzona testem ABTS (0,427-0,561 mmol TE/g s.m. vs 0,292-0,471 mmol TE/g s.m.), przy zbliżonej aktywności wymiatającej wolne rodniki, mierzonej testami DPPH (0,1615-0,195 mmol TE/g s.m. vs 0,075-0,207 mmol TE/g s.m.).

Analiza statystyczna wykazała wysoką korelację pomiędzy zawartością kwasu rozmarynowego a wynikami testów DPPH i FRAP (0,61-0,65,  $p < 0,05$ ) oraz umiarkowaną korelację pomiędzy zawartością kwasu kawowego a wynikami testu DPPH (0,43,  $p < 0,05$ ) i zawartością globoidnanu A a wynikami FRAP i ABTS (0,39-0,41,  $p < 0,05$ ), potwierdzając rolę pochodnych kwasu kawowego w aktywności antyoksydacyjnej surowców otrzymywanych z korzeni i liści żywokostu. Rolę wymienionych związków w działaniu antyoksydacyjnym badanych surowców potwierdzono z użyciem bioautografii-TLC. Przeprowadzone eksperymenty wykazały aktywność przeciwutleniającą (wymiatanie wolnych rodników) oraz zdolność do hamowania aktywności oksydazy ksantynowej dla obecnego w wyciągach z korzenia i liścia żywokostu kwasu kawowego oraz jego pochodnych – kwasu rozmarynowego i globoidnanu A.

Dla wyciągów metanolowych z liścia żywokostu otrzymanych trzema różnymi metodami ekstrakcji (ekstrakcja w aparacie Soxhleta, maceracja, ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami) oraz dwóch wyciągów metanolowych z korzenia żywokostu przeprowadzono dodatkowo ocenę aktywności hamującej COX-1 i COX-2 z użyciem komercyjnych zestawów ELISA (COX ovine/human Inhibitory Screening Assay Kit; Cayman Chemical). Wykazano, że wyciągi metanolowe z korzenia i liścia żywokostu charakteryzują się wyższą aktywnością hamującą COX-1 w porównaniu do COX-2. W przypadku korzeni żywokostu w stężeniu 4 mg s.m./ml 55-7-65,25% inhibicji COX-1 oraz 19,63% inhibicji w stężeniu 4 mg s.m./ml lub 28,86% inhibicji w stężeniu 8 mg s.m./ml COX-2. W przypadku liści żywokostu dla wyciągu otrzymanego z użyciem aparatu Soxhleta – 20,79% inhibicji COX-1 w stężeniu 2 mg s.m./ml i odpowiednio 37,16% i 82,8% inhibicji dla COX-1 i COX-2 w stężeniu 10 mg s.m. ml, dla maceratu w stężeniu 10 mg s.m./ml 22,18% inhibicji COX-1, w stężeniu 40 mg s.m./ml 19,71% inhibicji COX-2. Wyjątek stanowił wyciąg otrzymany poprzez ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami, dla którego odnotowano przewagę działania hamującego COX-2 (70,93% inhibicji COX-2 w stężeniu 2 mg s.m./ml vs 33,62% inhibicji COX-1 w stężeniu 10 mg s.m./ml).

Badania aktywności przeciwutleniającej przetworów z arniki obejmowały porównanie wyciągów metanolowych z zakupionych w sklepach zielarskich kwiatów arniki górskiej i

łkowej. Ocena aktywności z użyciem testów spektrofotometrycznych wykazała, że obydwie surowce charakteryzują się zbliżoną siłą działania antyoksydacyjnego (FRAP:  $0,84 \pm 0,13$  mmol TE/g s.m. dla *A. montana* i  $0,78 \pm 0,082$  mmol TE/g s.m. dla *A. chamissonis*; ABTS:  $1,11 \pm 0,085$  mmol TE/g s.m. i  $1,05 \pm 0,096$  mmol TE/g s.m., odpowiednio). Zastosowanie testów bioautograficznych w sprzężeniu z TLC również wskazało na bardzo zbliżone profile substancji o aktywności przeciwutleniającej – w obydwu badanych wyciągach działanie wymiatające wolne rodniki w teście DPPH wykazały wszystkie związki polifenolowe rozdzielone na chromatogramie TLC, podczas gdy test hamowania oksydazy ksantynowej potwierdził działanie enzymatyczne jedynie dla zespołu kwasów fenolowych. Porównując aktywność wyciągów alkoholowych otrzymanych z użyciem różnych rozpuszczalników wykazano silniejszą aktywność przeciwutleniającą składników wyciągów metanolowych w porównaniu z wyciągami etanolowymi.

W ostatnim etapie realizowanych badań przeprowadzono ocenę dostępności farmaceutycznej jako stopnia przenikania przez błony półprzepuszczalne imitujące ludzką skórę, dla kwasów fenolowych obecnych w wyciągu z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego oraz wyciągu z arniki górskiej, a także helenaliny i alkaloidów pirolizydynowych.

Wykazano wysoki stopień przenikania kwasu kawowego i jego pochodnych (kwas rozmarynowy, globoidnan A) przez błonę celulozową na poziomie powyżej 72% dla składników wyciągu z korzenia żywokostu (kwas kawowy, kwas rozmarynowy, globoidnan A) oraz powyżej 48% dla składników wyciągu z liścia żywokostu (kwas kawowy, kwas rozmarynowy). Jednocześnie, nie potwierdzono zdolności wymienionych związków oraz kwasów dikawoilochinowych do penetracji przez membranę Strat-M, stanowiącą model lepiej odzwierciedlający warunki dla ludzkiej skóry, jako składników wyciągu oraz jako pojedynczych związków. Ekstrakcja użytych w eksperymencie błon półprzepuszczalnych Start-M wykazała absorpcję ich warstwach kwasu kawowego (54,15% z korzenia żywokostu, 8,37% z liścia żywokostu), rozmarynowego (4,09% i 1,13%, odpowiednio) i chlorogenowego (0,72% z kwiatu arniki górskiej). Nie wykazano obecności globoidnanu A.

Badania dla innych grup metabolitów wtórnych wykazały zdolność do przenikania przez błonę Strat-M roztworu wzorca helenaliny o stężeniu 30  $\mu\text{g/ml}$  na poziomie niemal 25%. Związek nie został wykryty w płynie akceptorowym po aplikacji wyciągu z kwiatu arniki górskiej. Z kolei w zespole alkaloidów pirolizydynowych korzenia i liścia żywokostu lekarskiego wykazano

przenikanie przez błonę półprzepuszczalną Strat-M *N*-tlenków intermedyny i likopsaminy na bardzo niskim poziomie 0,04%, podczas gdy zawartość ich wolnych form mieściła się poniżej LOQ. Odnotowano absorpcję w warstwach membrany Strat-M zarówno wolnych form intermedyny i likopsaminy na poziomie odpowiednio 0,32% i 0,36%, jak i ich *N*-tlenków (0,11% dla obydwu związków).

W rezultacie przeprowadzonych badań opracowano szereg metod chromatograficznych (TLC, HPLC), które posłużyły do rozpoznania składu chemicznego badanych surowców, w tym słabo poznanych liści żywokostu i nalewek z całej świeżej rośliny *A. montana*, w zakresie związków polifenolowych oraz metabolitów wtórnych – alantoiny i alkaloidów pirolizydynowych w żywokostie oraz laktonów seskwiterpenowych w dwóch gatunkach arniki. Opracowane metody mogą być przydatne w dalszych analizach składu chemicznego badanych surowców roślinnych oraz wymienionych grup związków biologicznie czynnych w innych matrycach roślinnych.

Potwierdzono możliwy udział estrów pochodnych kwasu kawowego w aktywności przeciwutleniającej jako stanowiącej element aktywności przeciwzapalnej, badanych surowców, nie wykazując jednak ich zdolności do penetracji przez błony półprzepuszczalne imitujące ludzką skórę, co może świadczyć o słabej dostępności farmaceutycznej badanych związków.

Objęcie badaniami surowców krajowych pozyskanych ze sklepów zielarskich, stanowisk naturalnych i ogrodów botanicznych wykazało liczne, znaczące różnice w ich składzie ilościowym oraz aktywności biologicznej, ze szczególnym uwzględnieniem liści i korzeni żywokostu lekarskiego. Obserwowane różnice w jakości (zawartość związków biologicznie czynnych, aktywność biologiczna) i potencjalnym bezpieczeństwie (zawartość alkaloidów pirolizydynowych) obecnych na rynku zielarskim surowców roślinnych stanowią sygnał do dalszych badań oraz rozważań nad koniecznością objęcia ich dodatkową kontrolą lub standaryzacją.

## SUMMARY

Plant raw materials obtained from species belonging to the genus *Arnica* (arnica flower - species *Arnica montana* L. and *Arnica chamissonis* Less. and tinctures from the whole fresh plant *A. montana* L.) and the species *Symphytum officinale* L. (comfrey root and leaf) are used in European traditional medicine for centuries. In recent decades, their internal use has been withdrawn due to side effects caused by the sesquiterpene lactones present in arnica and hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids with a 1,2-unsaturated necin moiety in comfrey. However, they are still widely used in external applications, including treatment of rheumatic diseases and musculoskeletal system disorders, such as: pain in muscles and joints, sports injuries, bruises, fractures, sprains. According to clinical trials, in some cases they show effectiveness similar or even stronger than synthetic drugs with the same indications.

On the national pharmaceutical and herbal market, herbal substances obtained from arnica and comfrey are usually ingredients of cosmetic products or (in the case of arnica) homeopathic preparations, the chemical composition of which is not subject to strict control and standardization. Only arnica flower (*Arnicae flos*; *A. montana* L.) and arnica tincture (*Arnicae tinctura*) have monographs in the Polish Pharmacopoeia XII, while arnica flower (*Arnicae flos*; *A. montana* L.) and comfrey root (*Symphyti radix*; *Symphytum officinale* L.) are covered by monographs of the European Medicines Agency (EMA). In herbal stores dried raw materials such as comfrey leaves and arnica flowers (*A. chamissonis* Less.) are also sold, however their chemical composition is poorly known.

The main compounds responsible for the biological activity and determining the therapeutic effects of herbal substances from the *Arnica* genus and *S. officinale* species are allantoin in comfrey and sesquiterpene lactones in arnica (mainly helenalin and its esters). However, raw plant materials obtained from the above-mentioned species are also a source of many other groups of biologically active compounds that can play a significant role in therapeutic activity through synergy of action, resulting in an increase in biological potential and determine their polyvalence - multidirectional therapeutic effects. In addition, they may also affect their bioavailability, as it has been shown in recent studies on the skin permeability of compounds such as allantoin or helenalin.

The importance of many groups of chemical compounds, which are present in the above-mentioned plant raw materials, in their biological and therapeutic activity is not fully recognized. A group of such compounds are caffeic acid esters (CAE), which nowadays are intensively studied in various medicinal plant raw materials, both in phytochemical and pharmacological aspects. Last years have revealed the presence of previously undescribed derivatives of rosmarinic acid in comfrey roots and isomers and derivatives of dicaffeoylquinic acid in arnica flowers. These groups of compounds are known for a wide range of pharmacological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and neuroprotective activity, and their role in the therapeutic effects of plant extracts from arnica and comfrey is still not fully understood.

This doctoral dissertation presents the results of research on the esters of caffeic acid derivatives present in herbal substances from selected species of the genus *Arnica* (*Arnica montana* L., *Arnica chamissonis* Less.) and *Symphytum officinale* L., in the context of their anti-inflammatory potential. In addition, the results of research on the pharmaceutical availability of selected biologically active substances and phytochemical analysis of other secondary metabolites present in the mentioned plant raw materials were presented.

The doctoral dissertation consists of three main parts. The first part includes a discussion of the current state of knowledge about the studied species – mountain and meadow arnica, and comfrey - their history of use, chemical composition, pharmacological activity, presence on the herbal/pharmaceutical market, as well as esters of caffeic acid derivatives (esters of caffeic acid with 3,4-dihydrophenyllactic acid and esters of caffeic acid with quinic acid) – their chemical structures, occurrence and pharmacological activity. The second part presents the methodology of the conducted research. The third part of the dissertation discusses the results of phytochemical tests, assessment of biological activity and pharmaceutical availability.

The aim of the study was the qualitative and quantitative analysis of groups of esters of caffeic acid derivatives, along with other secondary metabolites (i.e. allantoin, pyrrolizidine alkaloids and sesquiterpene lactones) in plant raw materials from mountain and meadow arnica and comfrey, along with the assessment of their anti-inflammatory activity and pharmaceutical availability of selected biologically active substances.

The following herbal substances were used for research:

- Comfrey roots from 4 producers (herbal companies Flos, Dary Natury, Dary Podlasia, EkoHerba), 4 botanical gardens (Botanical Garden UMCS in Lublin, Municipal Botanical Garden in Zabrze, Garden of Medicinal Plants Medical University of Lodz and Medicinal Plants Garden of MUG), 1 natural site (Dolina Radości, Gdańsk)
- Comfrey leaves from 3 producers (herbal companies Dary Podlasia, EkoHerba, Herbarium) and from 1 natural site (Dolina Radości, Gdańsk)
- Mountain arnica (*A. montana*) flowers from 1 producer (Runo herbal company), 4 natural sites (Łaz, Kraków, Pasterka, Karkonoski National Park) and 1 botanical garden (Botanical Garden of the Adam Mickiewicz University in Poznań)
- Meadow arnica (*A. chamissonis*) flowers from 1 producer (Kawon herbal company)
- Mother tinctures from fresh whole plant of *A. montana* – Arnica TM obtained from 2 companies - Boiron (France) and Helios (Great Britain).

As a result of the phytochemical analysis, several chromatographic methods were developed and optimized for the qualitative and quantitative assessment of selected biologically active substances present in the tested raw materials.

The HPLC-DAD-ESI/MS method for quantitative and qualitative analysis of the polyphenol compound in the root and leaf of common comfrey has been developed. In the optimization process different columns, mobile phases, and gradient programs were tested. The best separation was achieved on Kinetex C-18 (100 x 4.6 mm) column for the comfrey leaf and Kinetex F5 (100 x 4.6 mm) column for the comfrey root, under the gradient elution comprising the increase in the concentration of the ACN:water:FA (50:50:0.1) mixture from 12% to 100% in 0.1% formic acid (FA) solution in water ( $t_G$  70 minutes, linear-stepwise gradient profile). The qualitative composition of esters of caffeic acid derivatives and other polyphenolic compounds in herbal substances obtained from common comfrey was identified, confirming the presence of caffeic acid, rosmarinic acid, globoidnan A, globoidnan B, and rabsosine in comfrey root, and the presence of globoidnan A and a group of flavonoid glycosides (glucosides, galactosides, and malonyl-glucosides of quercetin and kaempferol) in the comfrey leaf. Additionally, 1D and 2D TLC separation conditions for these compounds were developed. Separation was carried out on TLC plates Si60 with mobile phase consisting of diisopropyl ether-acetone-formic acid-water (50:30:10:10, v/v/v/v) mixture. 2D TLC chromatograms were developed using chloroform-methanol-formic acid- water (70:30:2:2, v/v/v/v) in the first

direction and methyl ethyl ketone-acetone-formic acid- water (35:50:10:5, v/v/v/v) in the second direction. Derivatization of the separated compounds was done with the NPR+PEG reagent and detection under UV  $\lambda$ -366 nm.

To identify the structural composition of globoidnan A, an automated solid-phase extraction (SPE) method for its isolation from a methanolic extract of comfrey root was developed. The isolation was carried out by applying the concentrated extract to a SPE Discovery-C18 column (1 g, 6 ml), followed by fractionation with increasing concentrations of methanol, using 2 ml of 30% methanol (fractions I-III), 2 ml of 50% methanol (fractions IV-VI), and 6 ml of 100% methanol (fraction VII). The purified compound was obtained in fractions IV and V, which were then combined and lyophilized. The chemical structure of globoidnan A was confirmed using NMR and HPLC-DAD-MS methods.

The optimized conditions for HPLC chromatographic separation were used for quantitative analysis – the assessment of the content of caffeic acid, rosmarinic acid, globoidnan A, and globoidnan B in comfrey roots, as well as caffeic acid, rosmarinic acid and flavonoid glycosides (glucosides, and galactosides of quercetin and kaempferol) in comfrey leaves. The developed method was validated and revealed significant variations in the quantitative composition of herbal substances obtained from *S. officinale*, depending on their origin. Methanolic comfrey leaf extracts had higher contents of phenolic acids compared to comfrey roots, with rosmarinic acid as the dominating compound. The contribution of individual derivatives of caffeic acid in the tested root extracts varied, with rosmarinic acid, globoidnan A, or globoidnan B being the dominant compounds, depending on the source of the raw material.

The final stage of phytochemical work on comfrey plant raw materials involved the development of the HPLC-MS/MS method for qualitative and quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids (PAs) using the MRM technique in positive ionization mode. The best separation was achieved on Kinetex C-18 column (100 x 2.1 mm) at a temperature of 25°C under gradient elution conditions, comprising a decrease in the concentration of the ACN:water:FA (50:50:0.1) mixture from 10% to 0% in a 0.1% formic acid (FA) solution in water from 1 to 9 minutes, followed by an increase to 100% ( $t_G$  83 minutes, linear-stepwise gradient profile). The developed method allowed for the separation and identification of a group of 17 pyrrolizidine alkaloids with an 1,2-unsaturated necine moiety, including intermedine, lycopsamine, and their *N*-oxides, dihydrointermedine/dihydrolycopsamine *N*-oxide,



acetylointermediate, acetylycopsamine, and their N-oxides, 7'-senecionyl-9-trachelantylotretronecine N-oxide, 7'-senecionyl-9-viridiflorolretronecine N-oxide, echimidine N-oxide, symphytine, symlandine, and their N-oxides, as well as 3'-acetylsymphytine N-oxide and its isomers. For the first time, the PAs profile of comfrey leaves was identified, confirming the presence of all of the mentioned compounds, with the exception of 3'-acetylsymphytine N-oxide, which was present in the roots in trace amounts.

The developed HPLC-MS/MS separation conditions were used to conduct a semi-quantitative analysis, which demonstrated the dominance of intermediate and lycopsamine N-oxides, along with their free forms and N-oxides of acetylated forms in comfrey roots, and N-oxides and free forms of intermediate and lycopsamine in comfrey leaves. Using the MRM technique in positive ionization mode and the standard addition method, a HPLC-MS/MS quantitative analysis of the dominant pyrrolizidine alkaloids was performed, revealing their contents in the following ranges: intermediate – 0.0149-0.1957 mg/g dry weight, lycopsamine – 0.0259-0.1737 mg/g dry weight, intermediate N-oxide – 0.0263-1.5575 mg/g dry weight, lycopsamine N-oxide – 0.261-1.6125 mg/g dry weight. Statistically significant differences between the analyzed plant raw materials were observed. The total alkaloids content for comfrey roots ranged 0.60-3.28 mg/g dry weight, while for leaves, the levels were significantly lower, ranging 0.11-0.24 mg/g dry weight. Meanwhile, the highest concentrations of pyrrolizidine alkaloids were found in herbal substances from domestic herbal companies. Considering the most recent literature data on the hepatotoxicity of intermediate, lycopsamine, and their N-oxides, there may be a potential toxicity associated with two raw materials characterized by the highest content of intermediate and lycopsamine N-oxides.

The HPLC-DAD-ESI/MS method for qualitative and quantitative analysis of polyphenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) present in methanolic extracts of mountain arnica (*A. montana*) and meadow arnica (*A. chamissonis*) flowers and tinctures from the entire fresh plant of mountain arnica (*Arnica* TM) were developed and validated. In the optimization process different columns and gradient programs were tested. The best was achieved using a Kinetex PFP column (100 x 4.6 mm) with gradient elution, comprising of the increasing concentration of ACN-water-FA (50:50:0.1) mixture from 12% to 100% in a 0.1% formic acid solution ( $t_G$  76 minutes, linear-stepwise gradient profile). A total of 41 phenolic compounds were detected, including 10 with unidentified structures, comprising 20 phenolic acids and 20

flavonoids. Comparative analysis revealed differences in the qualitative composition of arnica products. *Arnica* TM tincture stood out due to the presence of compounds not found in the *A. montana* and *A. chamissonis* flowers, such as tricaffeoylquinic acid and 6-methoxyapigenin, along with the absence of compounds present in both *Arnica flos*, including 7-*O*-glucoside of luteolin, 6-methoxykaempferol 3-*O*-glucoside, apigenin 7-*O*-glucoside, and two caffeic acid derivatives with unrecognized structures. Methanolic extract from *A. chamissonis* flowers was distinctive for the presence of patuletin, 6-methoxykaempferol, and quercetin, which were absent in the tincture and mountain arnica flowers.

In the next step, quantitative analysis of the separated polyphenolic compounds was carried out. The dominant compounds in the polyphenol group were esters of caffeic acid derivatives. In the methanolic extracts of mountain arnica and meadow arnica flowers, the dominating compounds were 4,5-dicaffeoylquinic acid ( $700.8 \pm 6.7$  mg/100 g dry weight and  $624 \pm 92$  mg/100 g dry weight, respectively), 1-methoxyoxalyl-3,5-dicaffeoylquinic acid ( $425 \text{ mg} \pm 12$  mg/100 g dry weight and  $438 \pm 28$  mg/100 g dry weight, respectively), and chlorogenic acid ( $416.1 \pm 6.1$  mg/100 g dry weight and  $328 \pm 29$  mg/100 g dry weight, respectively). In the contrary, the dominant compound in *Arnica* TM tincture was 1,5-dicaffeoylquinic acid ( $450 \pm 13$  mg/100 g dry weight). The total phenolic acids content in *A. montana* flowers, *A. chamissonis* flowers, and *Arnica* TM tincture was determined as  $2330 \pm 200$  mg/100 g dry weight,  $2040 \pm 170$  mg/100 g dry weight, and  $804 \pm 101$  mg/100 g dry weight, respectively. The flavone content was determined as  $283 \pm 49$  mg/100 g dry weight,  $343 \pm 52$  mg/100 g dry weight, and  $53.0 \pm 6.7$  mg/100 g dry weight, respectively, while the flavonol content was measured as  $76.8 \pm 5.4$  mg/100 g dry weight,  $92.2 \pm 5.7$  mg/100 g dry weight, and  $42.9 \pm 3.5$  mg/100 g dry weight, respectively, indicating a lower content of biologically active substances in the *Arnica* TM tincture prepared from the entire fresh plant of *A. montana*, compared to dried *A. montana* and *A. chamissonis* flowers.

The HPLC-DAD-ESI/MS method for qualitative and quantitative analysis of sesquiterpene lactones in mountain arnica and meadow arnica flowers and *Arnica* TM tinctures, was developed and validated. Separation of helenalin was carried out on a Kinetex C-18 column (100 x 4.6 mm) using isocratic elution with a 17% mixture of water-methanol (45:5 v/v) in methanol ( $t_R$  25 minutes), while the analysis of helenalin and dihydrohelenalin esters was conducted on two sequentially connected Kinetex C-18 columns (100 x 4.6 mm), what allowed

the direct analysis of the extract without the need for purification, using an isocratic elution of water-methanol 50:50 (v/v) ( $t_G$  51 minutes). Using the developed HPLC separation conditions, the complete set of identified sesquiterpene lactones was identified for the first time in the *Arnica* TM tincture (Boiron, France), confirming the presence of helenalin, dihydrohelenalin methacrylate, acetyldihydrohelenalin, helenalin methacrylate, dihydrohelenalin methacrylate, dihydrohelenalin tyginate, helenalin tyginate, dihydrohelenalin 2-methylbutyrate, helenalin 2-methylbutyrate, dihydrohelenalin valerate, and helenalin valerate. The sesquiterpene lactone profiles in *Arnica* TM tinctures from two producers, arnica flowers purchased in herbal shops, and arnica flowers obtained from natural sites and botanical gardens, were compared. In herbal substances purchased in herbal shops only the presence of helenalin and acetyldihydrohelenalin was confirmed. Both tested tinctures and most of the mountain arnica flowers from natural sites contained the complete set of identified sesquiterpene lactones, apart from *A. montana* flowers from the Karkonosze National Park, in which the presence of helenalin was not confirmed.

Moreover, TLC methods for sesquiterpene lactones separation were optimized, using 1D TLC in the MGD system, involving a two-step development of the TLC chromatogram with a mixture of hexane-ethyl acetate-formic acid 9:1:0.1 (v/v/v), and then once with hexane-ethyl acetate 8:2 (v/v), and 2D TLC method with the use of hexane-ethyl acetate 3:2 (v/v) in the first direction and chloroform-acetone 6:1 (v/v) as the second direction. The TLC chromatograms were derivatized with a vanillin reagent in sulfuric acid, turning helenalin band into pink-orange color. Comparative analysis of methanol extracts from mountain arnica and meadow arnica flowers, as well as two *Arnica* TM tinctures, showed significant differences in their qualitative and quantitative compositions (band intensities).

The automated Solid-Phase Extraction (SPE) method was developed to purify the methanol extract of arnica by separating the polyphenol fraction (F3) from the sesquiterpene lactone fraction (F4). The analyzed extract was applied to a SPE column (Discovery-C18, 6 ml, 1 g) and fractionated successively using 6 ml of 20% methanol (F1), 30% methanol (F2), 60% methanol (F3), and 100% methanol (F4). The method's efficiency was also confirmed for tinctures made from fresh whole mountain arnica plants.

The assessment of antioxidant activity, as the component of the anti-inflammatory activity of the tested herbal substances, was conducted using spectrophotometric assays: DPPH, FRAP, and ABTS, as well as bioautography-TLC (DPPH assay, xanthine oxidase inhibition test, and riboflavin-light-NBT system), and ELISA tests for the determination of COX-1 and COX-2 inhibitory activities.

The evaluation of the antioxidant activity of methanol extracts from the roots and leaves of common comfrey using spectrophotometric tests, revealed statistically significant differences in the activity of extracts from comfrey roots obtained from herbal stores compared to those cultivated in botanical gardens. The materials purchased from herbal stores exhibited weaker free radical scavenging abilities (DPPH and ABTS tests). A similar trend was observed in the iron ion reduction capacity (FRAP test), apart from one sample, which showed significantly stronger activity. In contrast, extracts from comfrey leaves exhibited 2-4 times higher iron ion reduction capacity compared to comfrey roots, as measured by the FRAP test (1.491-1.897 mmol TE/g s.m. vs. 0.412-1.26 mmol TE/g s.m.), and nearly twice the antioxidant activity as measured by the ABTS test (0.427-0.561 mmol TE/g s.m. vs. 0.292-0.471 mmol TE/g s.m.), with similar free radical scavenging activity measured by the DPPH tests (0.1615-0.195 mmol TE/g s.m. vs. 0.075-0.207 mmol TE/g s.m.).

Statistical analysis revealed a high correlation between the content of rosmarinic acid and the results of the DPPH and FRAP tests (0.61-0.65,  $p < 0.05$ ), moderate correlation between the content of caffeic acid and the results of the DPPH test (0.43,  $p < 0.05$ ) and the content of globoidnan A and the results of FRAP and ABTS tests (0.39-0.41,  $p < 0.05$ ), confirming the role of caffeic acid derivatives in the antioxidant activity of plant raw materials obtained from the comfrey. The role of these compounds in the antioxidant action of the tested herbal substances was also confirmed with bioautography-TLC assays. The experiments revealed antioxidant activity (free radical scavenging) and the ability to inhibit xanthine oxidase activity for caffeic acid and its ester derivatives, such as rosmarinic acid and globoidnan A, present in the extracts from comfrey roots and leaves.

For methanol extracts from comfrey leaves prepared with three different extraction methods (Soxhlet extraction, maceration, ultrasonic-assisted extraction), and two methanol extracts from comfrey roots, additional evaluation of COX-1 and COX-2 inhibitory activity was conducted using commercial ELISA kits (COX ovine/human Inhibitory Screening Assay Kit;

Cayman Chemical). It was shown that methanol extracts from comfrey roots and leaves exhibited higher inhibitory activity against COX-1 compared to COX-2. In the case of comfrey roots, at a concentration of 4 mg s.m./ml, there was 55.7-65.25% COX-1 inhibition, and 19.63% inhibition at a concentration of 4 mg s.m./ml or 28.86% inhibition at a concentration of 8 mg s.m./ml against COX-2. In the case of comfrey leaves, the extract obtained using the Soxhlet apparatus exhibited 20.79% COX-1 inhibition at a concentration of 2 mg s.m./ml and, correspondingly, 37.16% and 82.8% inhibition against COX-1 and COX-2 at a concentration of 10 mg s.m./ml. For the macerate, there was 22.18% COX-1 inhibition at a concentration of 10 mg s.m./ml and 19.71% COX-2 inhibition at a concentration of 40 mg s.m./ml. An exception was the extract obtained through ultrasonic-assisted extraction, which exhibited a stronger inhibitory activity against COX-2 (70.93% COX-2 inhibition at a concentration of 2 mg s.m./ml vs. 33.62% COX-1 inhibition at a concentration of 10 mg s.m./ml).

The assessment of antioxidant activity in arnica products included a comparison of methanol extracts from purchased mountain arnica and meadow arnica flowers. The evaluation using spectrophotometric tests showed that both materials exhibited a similar antioxidant activity (FRAP:  $0.84 \pm 0.13$  mmol TE/g s.m. for *A. montana* and  $0.78 \pm 0.082$  mmol TE/g s.m. for *A. chamissonis*; ABTS:  $1.11 \pm 0.085$  mmol TE/g s.m. and  $1.05 \pm 0.096$  mmol TE/g s.m., respectively). Bioautography-TLC assays indicated that their profiles of compounds showing antioxidant activity were similar in both extracts. In both extracts, all polyphenolic compounds separated on the TLC chromatogram exhibited free radical scavenging activity in the DPPH test, while the xanthine oxidase inhibition test confirmed the enzymatic activity only for the group of phenolic acids. Comparing the antioxidant activity of methanol and ethanol extracts, it was found that the methanol extracts exhibited stronger antioxidant activity.

In the final stage of the conducted research, the pharmaceutical availability, as the degree of penetration through semi-permeable membranes simulating human skin, was assessed for phenolic acids present in the extract from the roots and leaves of common comfrey, as well as for the helenalin and pyrrolizidine alkaloids. High penetration levels were demonstrated for caffeic acid and its derivatives (rosmarinic acid, globoidnan A) through cellulose membrane, exceeding 72% for components in the comfrey root extract (caffeic acid, rosmarinic acid, globoidnan A), and exceeding 48% for components in the comfrey leaf extract (caffeic acid, rosmarinic acid). Simultaneously, the ability of these compounds and dicaffeoylquinic acids to

penetrate through Strat-M membrane, which simulates better the conditions for human skin, was not confirmed, both as components of the extract and as individual compounds. The extraction of the semi-permeable Strat-M membranes used in the experiment revealed the absorption of their layers for caffeic acid (54.15% from comfrey root, 8.37% from comfrey leaf), rosmarinic acid (4.09% and 1.13%, respectively), and chlorogenic acid (0.72% from mountain arnica flower). The presence of globoidnan A in acceptor fluid was not detected.

Research for other groups of secondary metabolites demonstrated the ability to penetrate through the Strat-M membrane for a solution of helenalin standard at a concentration of 30 µg/ml at nearly 25%. The compound was not detected in the acceptor fluid after applying the extract from mountain arnica flower. In contrast, for the pyrrolizidine alkaloids group in the roots and leaves of comfrey, penetration through the semi-permeable Strat-M membrane was demonstrated for *N*-oxides of intermedine and lycopsamine at a very low level of 0.04%, while the content of their free forms was below the LOQ. Absorption was observed in the layers of the Strat-M membrane for both free forms of intermedine and lycopsamine, at levels of 0.32% and 0.36%, as well as for their *N*-oxides (0.11% for both compounds).

As a result of the conducted research, a number of chromatographic methods (TLC, HPLC) were developed to identify the chemical composition of the tested plant raw materials, including the less-known comfrey leaves and tinctures from the whole fresh plant of *A. montana*, in terms of polyphenolic compounds and secondary metabolites, such as allantoin and pyrrolizidine alkaloids in comfrey and sesquiterpene lactones in two species of arnica. The developed methods may be useful for further analysis of the chemical composition of tested plant raw materials and the mentioned groups of biologically active compounds in other plant matrices.

The possible involvement of caffeic acid derivatives in antioxidant activity as part of the anti-inflammatory activity of the tested herbal substances was confirmed, although their ability to penetrate semi-permeable membranes simulating human skin was not demonstrated, which may indicate poor pharmaceutical availability of the tested compounds.

Conducting research on domestic raw materials obtained from herbal stores, natural sites, and botanical gardens revealed significant differences in their quantitative composition and biological activity, with special consideration for the leaves and roots of comfrey. The observed

differences in quality (content of biologically active compounds, biological activity) and potential safety (content of pyrrolizidine alkaloids) of herbal raw materials on the market signal the need for further research and consideration of additional control or standardization.

## BIBLIOGRAFIA:

1. Corciova A, Matei D, Ivanescu B. Medicinal herbs as possible sources of anti-inflammatory products. *Balneo Research Journal*. 2017;8:231-241.
2. Kriplani P, Guarve K, Baghael US. *Arnica montana* L. - a plant of healing: review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017;69:925-945.
3. Frost R, O'Meara S, MacPherson H. The external use of comfrey: A practitioner survey. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 2014;20:347-355.
4. Staiger C. Comfrey root: from tradition to modern clinical trials. *Wiener medizinische Wochenschrift*. 2013; 163:58-64.
5. Kimel K, Krauze-Baranowska M. Skuteczność i bezpieczeństwo stosowania korzenia *Symphytum officinale* L. – przegląd danych literaturowych [The efficacy and safety of *Symphytum officinale* L. root – a review of literature data]. *Postępy Fitoterapii*. 2021;22:23-31.
6. Salehi B, Sharopov F, Tumer TB, Ozleyen A, Rodriguez-Perez C, Ezzat SM, et al. *Symphytum* Species: A Comprehensive Review on Chemical Composition, Food Applications and Phytopharmacology. *Molecules*. 2019;24: 2272.
7. Widrig R, Suter A, Saller R, Melzer J. Choosing between NSAID and arnica for topical treatment of hand osteoarthritis in a randomised, double-blind study. *Rheumatology international*. 2007;27:585-591.
8. Predel HG, Giannetti B, Koll R, Bulitta M, Staiger C. Efficacy of a Comfrey root extract ointment in comparison to a Diclofenac gel in the treatment of ankle distortions: Results of an observer-blind, randomized, multicenter study. *Phytomedicine*. 2005;12:707-714.
9. Shestopalov AV, Shkurat TP, Mikashinovich ZI, Kryzhanovskaya IO, Bogacheva MA, Lomteva SV, et al. Biological functions of allantoin. *Biology Bulletin*. 2006;33:437-440.
10. Drogosz J, Janecka A. Helenalin - A Sesquiterpene Lactone with Multidirectional Activity. *Current Drug Targets*. 2019;20:444-452.
11. Andres R, Brenneisen R, Clerc J. Relating antiphlogistic efficacy of dermatics containing extracts of *Symphytum officinale* to chemical profiles. *Planta Medica* 1989;55:643-644.
12. Wagner S, Suter A, Merfort I. Skin penetration studies of *Arnica* preparations and of their sesquiterpene lactones. *Planta Medica*. 2004;70:897-903.



13. Trifan A, Opitz SE, Josuran R, Grubelnik A, Esslinger N, Peter S, et al. Is comfrey root more than toxic pyrrolizidine alkaloids? Salvianolic acids among antioxidant polyphenols in comfrey (*Symphytum officinale* L.) roots. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;112:178-187.
14. Marchev AS, Vasileva LV, Amirova KM, Savova MS, Koycheva IK, Balcheva-Sivenova ZP, et al. Rosmarinic acid - From bench to valuable applications in food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 2021;117:182-193.
15. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;97:67-74.
16. Neelakandan M, Vasudevan K, Sentharamaikannan K, Manoharan S. Pharmacological effects of chlorogenic acid: an overview. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2017;8:28-32.
17. Kim GD, Park YS, Jin YH, Park CS. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99:2083-2092.
18. Bulgakov VP, Inyushkina YV, Fedoreyev SA. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012;32:203-217.
19. Zienkiewicz M. Analiza chromatograficzna wybranych produktów zielarskich zawierających korzeń żywokostu lekarskiego *Symphytum officinale* L. [praca magisterska]. Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk 2014.
20. Trifan A, Skalicka-Wozniak K, Granica S, Czerwinska ME, Kruk A, Marcourt L, et al. *Symphytum officinale* L.: Liquid-liquid chromatography isolation of caffeic acid oligomers and evaluation of their influence on pro-inflammatory cytokine release in LPS-stimulated neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology*. 2020;262:113169.
21. Jaiswal R, Kuhnert N. Identification and Characterization of Two New Derivatives of Chlorogenic Acids in Arnica (*Arnica montana* L.) Flowers by High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59:4033-4039.
22. EMA. Assessment report on *Symphytum officinale* L., radix. Committee on Herbal Medicine Products (HMPC); 2015. Dostęp on-line: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-symphytum-officinale-l-radix\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-symphytum-officinale-l-radix_en.pdf) (dostęp: 10.10.2023)

23. EMA. Assessment report on *Arnica montana*, flos.: Committee on Herbal Medicine Products (HMPC); 2012. Dostęp on-line: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/draft-assessment-report-arnica-montana-l-flos\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/draft-assessment-report-arnica-montana-l-flos_en.pdf) (dostęp: 10.10.2023)
24. Staiger C. Comfrey: a clinical overview. *Phytotherapy Research*. 2012;26:1441-1448.
25. Broda B. *Zarys botaniki farmaceutycznej*. Warszawa: PZWL; 1998.
26. Bruneton J. *Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants*. 2nd ed. Intercept Ltd, Paryż 1999.
27. Rutkowski L. *Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej*. II ed. PWN, Warszawa; 2016.
28. *Farmakopea Polska IV*. PZWL, Warszawa 1965-1970.
29. Adams M, Berset C, Kessler M, Hamburger M. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders - a survey of European herbals from the 16th and 17th century. *J Ethnopharmacol*. 2009;121:343-259.
30. Ożarowski A. *Ziołolecznictwo. Poradnik dla lekarzy*. II ed. PZWL, Warszawa; 1980.
31. FDA. FDA Advises Dietary Supplement Manufacturers to Remove Comfrey Products From the Market. Office of Nutritional Products, Labeling, and Dietary Supplements; 2001. Dostęp on-line: <https://www.e-lactancia.org/media/papers/Comfrey-FDA2001.pdf> (dostęp: 10.10.2023)
32. Andres R, Bourquin D, Brenneisen R, Clerc J. The antiphlogistic efficacy of dermatics containing pyrrolizidine alkaloid-free extracts of *Symphytum officinale*. *Planta Medica*. 1990;56:664.
33. Stickel F, Seitz HK. The efficacy and safety of comfrey. *Public health nutrition*. 2000;3:501-508.
34. Rode D. Comfrey toxicity revisited. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2002;23:497-499.
35. Mei N, Guo L, Fu PP, Fuscoe JC, Luan Y, Chen T. Metabolism, Genotoxicity, and Carcinogenicity of Comfrey. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*. 2010;13:509-526.
36. Mei N, Guo L, Fu PP, Heflich RH, Chen T. Mutagenicity of comfrey (*Symphytum officinale*) in rat liver. *British Journal of Cancer*. 2005;92:873-875.
37. Tao C, Nan M, P. FP. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Applied Toxicology*. 2010;30:183-196.

38. Brown AW, Stegelmeier BL, Colegate SM, Gardner DR, Panter KE, Knoppel EL, et al. The comparative toxicity of a reduced, crude comfrey (*Symphytum officinale*) alkaloid extract and the pure, comfrey-derived pyrrolizidine alkaloids, lycopsamine and intermedine in chicks (*Gallus gallus domesticus*). *Journal of Applied Toxicology*. 2016;36:716-725.
39. Cheeke PR. Toxicity And Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids. *Journal of Animal Science*. 1988;66:2343-2350.
40. Wang ZQ, Han HL, Wang C, Zheng QQ, Chen HP, Zhang XC, et al. Hepatotoxicity of Pyrrolizidine Alkaloid Compound Intermedine: Comparison with Other Pyrrolizidine Alkaloids and Its Toxicological Mechanism. *Toxins*. 2021;13:849.
41. Wang ZQ, Qiao L, Zheng QQ, Han HL, Li ZG, Zhang XC, et al. Combined Hepatotoxicity and Toxicity Mechanism of Intermedine and Lycopsamine. *Toxins*. 2022;14:633.
42. Ridker PM, Ohkuma S, McDermott WV, Trey C, Huxtable RJ. Hepatic Venocclusive Disease Associated With The Consumption Of Pyrrolizidine-Containing Dietary Supplements. *Gastroenterology*. 1985;88:1050-1054.
43. Ridker P, Mcdermott W. Comfrey herb tea and hepatic veno-occlusive disease. *The Lancet*. 1989;333:657-658.
44. Zuckerman M, Steenkamp V, Stewart MJ. Hepatic veno-occlusive disease as a result of a traditional remedy: confirmation of toxic pyrrolizidine alkaloids as the cause, using an *in vitro* technique. *Journal of Clinical Pathology*. 2002;55:676-679.
45. Weston C, Cooper B, Davies J, Levine D. Veno-occlusive disease of the liver secondary to ingestion of comfrey. *British medical journal (Clinical research ed)*. 1987;295:183.
46. Avila C, Breakspear I, Hawrelak J, Salmond S, Evans S. A systematic review and quality assessment of case reports of adverse events for borage (*Borago officinalis*), coltsfoot (*Tussilago farfara*) and comfrey (*Symphytum officinale*). *Fitoterapia*. 2020;142:104519
47. Brauchli J, Lüthy J, Zweifel U, Schlatter C. Pyrrolizidine alkaloids from *Symphytum officinale* L. and their percutaneous absorption in rats. *Experientia*. 1982;38:1085-1087.
48. Jedlinszki N, Balazs B, Csanyi E, Csupor D. Penetration of lycopsamine from a comfrey ointment through human epidermis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017;83:1-4.
49. Li GS, Jiang WL, Tian JW, Qu GW, Zhu HB, Fu FH. In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. *Phytomedicine*. 2010;17):282-288.

50. Kimel K, Zienkiewicz M, Spzarak-Stefanowska B, Krauze-Baranowska M. TLC-densitometric analysis of allantoin in *Symphytum officinale* L. roots. *Acta pharmaceutica* (Zagreb, Croatia). 2020;70:101-110.
51. Foster S. *Tyler's honest herbal: a sensible guide to the use of herbs and related remedies*: Routledge, Abingdon-on-Thames 2012.
52. de Sousa MP, Matos MEO, de Abreu Matos FJ. *Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras*. Editora UFC, Fortaleza 1991.
53. Teixeira JPF, Duarte F. Avaliação do teor de ureídeos em plantas de confrei. *Bragantia*. 1985;44:487-492.
54. Mazzafera P, Goncalves KV, Shimizu MM. Control of allantoin accumulation in comfrey. *Natural Product Communications*. 2008;3:1411-1422.
55. Duan MY, Shang HM, Chen SL, Li R, Wu HX. Physicochemical properties and activities of comfrey polysaccharides extracted by different techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;115:876-882.
56. Gill S, Krauze M, Janeczko Z. Polisacharydy w *Symphytum officinale* L. *Herba Polonica*. 1988;34:109-114.
57. Hiermann A, Writzel M. Antiphlogistic glycopeptide from the roots of *Symphytum officinale*. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*. 1998;8:154-157.
58. Grabias B, Swiatek L. Phenolic acids in *Symphytum officinale* L. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*. 1998;8:81-84.
59. Tahirovic I, Rimpapa Z, Cavar S, Huseinovic S, Muradic S, Salihovic M, et al. Content of some phenolic acids and rutin in the leaves and roots of *Symphytum officinale* L. *Planta Medica*. 2010;76:1265 (congress abstract).
60. Savic VL, Savic SR, Nikolic VD, Nikolic LB, Najman SJ, Lazarevic JS, et al. The identification and quantification of bioactive compounds from the aqueous extract of comfrey root by UHPLC-DAD-HESI-MS method and its microbial activity. *Hemijska Industrija*. 2015;69:1-8.
61. Sowa I, Paduch R, Strzemeski M, Zielinska S, Rydzik-Strzemska E, Sawicki J, et al. Proliferative and antioxidant activity of *Symphytum officinale* root extract. *Natural Product Research*. 2018;32:605-609.
62. Trifan A, Wolfram E, Esslinger N, Grubelnik A, Skalicka-Wozniak K, Minceva M, et al. Globoidnan A, radosiin and globoidnan B as new phenolic markers in European-sourced comfrey (*Symphytum officinale* L.) root samples. *Phytochemical Analysis*. 2021;32:482-494.

63. Nastic N, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Svarc-Gajic J, Segura-Carretero A. Comparative Assessment of Phytochemical Profiles of Comfrey (*Symphytum officinale* L.) Root Extracts Obtained by Different Extraction Techniques. *Molecules*. 2020;25:837.
64. Trifan A, Zengin G, Sinan KI, Wolfram E, Skalicka-Wozniak K, Luca SV. LC-HRMS/MS phytochemical profiling of *Symphytum officinale* L. and *Anchusa ochroleuca* M. Bieb. (*Boraginaceae*): Unveiling their multi-biological potential via an integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;204:114283.
65. D'Urso G, Masullo M, Seigner J, Holper-Schichl YM, de Martin R, Plaza A, et al. LC-ESI-FT-MS(n) Metabolite Profiling of *Symphytum officinale* L. Roots Leads to Isolation of Comfreyin A, an Unusual Arylnaphthalene Lignan. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21:4671
66. Nossa González DL, Pérez T, Verónica Y, Núñez R, Elías W. Determination of polyphenols and antioxidant activity of polar extracts of comfrey (*Symphytum officinale* L). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2016;21:125-132.
67. Liu F, Wan SY, Jiang ZJ, Li SFY, Ong ES, Osorio JCC. Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta*. 2009;80:916-923.
68. Betz JM, Eppley RM, Taylor WC, Andrezejewski D. Determination Of Pyrrolizidine Alkaloids In Commercial Comfrey Products (*Symphytum* sp). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1994;83:649-653.
69. Paun G, Neagu E, Litescu SC, Rotinberg P, Radu GL. Application of membrane processes for the concentration of *Symphytum officinale* and *Geranium robertianum* extracts to obtain compounds with high anti-oxidative activity. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2012;77:1191-1203.
70. Oberlies NH, Kim NC, Brine DR, Collins BJ, Handy RW, Sparacino CM, et al. Analysis of herbal teas made from the leaves of comfrey (*Symphytum officinale*): reduction of N-oxides results in order of magnitude increases in the measurable concentration of pyrrolizidine alkaloids. *Public Health Nutrition*. 2004;7:919-924.
71. Ahmad VU, Noorwala M, Mohammad FV, Sener B, Gilani AUH, Aftab K. Symphytoxi-A, A Triterpenoid Saponin From The Roots Of *Symphytum officinale*. *Phytochemistry*. 1993;32:1003-1006.

72. Al-Nimer MSM, Wahbee Z. Ultraviolet light assisted extraction of flavonoids and allantoin from aqueous and alcoholic extracts of *Symphytum officinale*. Journal of Intercultural Ethnopharmacology. 2017;6:280-283.
73. Yunusova SG, Lyashenko SS, Fedorov NI, Yunusov MS, Denisenko ON. Lipids and Lipophilic Constituents of Comfrey (*Symphytum Officinale* L.) Seeds. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2017;50:728-731.
74. Araújo LU, Grabe-Guimarães A, Mosqueira VCF, Carneiro CM, Silva-Barcellos NM. Profile of wound healing process induced by allantoin. Acta Cirurgica Brasileira. 2010;25:460-461.
75. Savic VL, Nikolic VD, Arsic IA, Stanojevic LP, Najman SJ, Stojanovic S, et al. Comparative Study of the Biological Activity of Allantoin and Aqueous Extract of the Comfrey Root. Phytotherapy Research. 2015;29:1117-1122.
76. Vujanovic M, Zengin G, Durovic S, Maskovic P, Cvetanovic A, Radojkovic M. Biological activity of extracts of traditional wild medicinal plants from the Balkan Peninsula. South African Journal of Botany. 2019;120:213-218.
77. Frost R, MacPherson H, O'Meara S. A critical scoping review of external uses of comfrey (*Symphytum* spp.). Complementary Therapies in Medicine. 2013;21:724-475.
78. Jankovic A, Paravina M, Spalevic L, Stanojevic M, Nikolic L. Plantoderm's® and Fitoven's® influence on microbiological flora of venous ulcers. Arh Farm (Belgr). 2003;53:455-465.
79. Giannetti BM, Staiger C, Bulitta M, Predel HG. Efficacy and safety of comfrey root extract ointment in the treatment of acute upper or lower back pain: results of a double-blind, randomised, placebo controlled, multicentre trial. British Journal of Sports Medicine. 2010;44:637-641.
80. Barna M, Kucera A, Hladikova M, Kucera M. Randomized double-blind study: Wound-healing effects of a *Symphytum* herb extract cream (*Symphytum × uplandicum* Nyman) in children. Arzneimittelforschung. 2012;62:285-289.
81. Zarzycki K, Szelańg Z. Red list of plants and fungi in Poland. Czerwona lista roślin i grzybów Polski. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN; Kraków 2006.
82. Krauze-Baranowska M, Kimel K. Arnika górská i jej znaczenie lecznicze w świetle badań naukowych. Farm Pol. 2022;78:491-502.

83. Clauser M, Aiello N, Scartezzini F, Innocenti G, Dall'Acqua S. Differences in the Chemical Composition of *Arnica montana* Flowers from Wild Populations of North Italy. *Natural Product Communications*. 2014;9:3-6.
84. GIOŚ. Monitoring gatunków i siedlisk przyrodniczych ze szczególnym uwzględnieniem specjalnych obszarów ochrony siedlisk Natura 2000 - WYNIKI MONITORINGU. Główny Inspektorat Ochrony Środowiska; Warszawa 2012.
85. Sugier D. The flowering pattern of *Arnica montana* L. and *A. chamissonis* Less. under field cultivation conditions with successive flower head collection. *Acta agrobotanica*. 2007;60:133-139.
86. Sugier D, Sugier P, Jakubowicz-Gil J, Winiarczyk K, Kowalski R. Essential Oil from *Arnica Montana* L. Achenes: Chemical Characteristics and Anticancer Activity. *Molecules*. 2019;24:4158.
87. Parafiniuk A, Kromer K, Fleszar MG, Kreitschitz A, Wiśniewski J, Gamian A. Localization of Sesquiterpene Lactones Biosynthesis in Flowers of *Arnica* Taxa. *Molecules*. 2023;28:4379.
88. Heinrich M, Barnes J, Prieto-Garcia J, Gibbons S, Williamson E. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone; Edinburgh 2004.
89. Mayer J, Saum K, Uehleke G. *Zioła ojców benedyktynów. Mieszanki i leczenie*. Świat Książki; Warszawa 2004.
90. Schulz V, Hänsel R, Tyler VE. *Rational Phytotherapy. A Physicians' Guide to Herbal Medicine*. Springer; Berlin 2001.
91. Strzelecka H, Kowalski J. *Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa*. PWN; Warszawa 2000.
92. Bruneton J. *Pharmacognosy*. Lavoisier; Paris 1999.
93. Evans W. *Trease and Evans' Pharmacognosy*. Saunders Ltd; Nottingham 2009.
94. Karłowicz-Bodalska K, Rudkowska E, Han-Marek M. Leki naturalne o działaniu ochraniającym ściany naczyń krwionośnych. *Postępy Fitoterapii*. 2006;7:47-60.
95. Lamer-Zarawska E, Kowal-Gierczak B, Niedworok J. *Fitoterapia i leki roślinne*. PZWL; Warszawa 2007.
96. Leung AY, Foster S. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*. Wiley and Sons; New Jearsy 2003.
97. *European Pharmacopeia*. 10th ed 2019.
98. *Farmakopea Polska XII*. URPL; Warszawa 2019.

99. Kimel K, Krauze-Baranowska M, Godlewska S, Pobłocka-Olech L. HPLC-DAD-ESI/MS comparison of the chemical composition of flowers from two species grown in Poland. *Herba Polonica*. 2020;66:1-10.
100. Kowalski R, Sugier D, Sugier P, Kolodziej B. Evaluation of the chemical composition of essential oils with respect to the maturity of flower heads of *Arnica montana* L. and *Arnica chamissonis* Less. cultivated for industry. *Industrial Crops and Products*. 2015;76:857-865.
101. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines: American Botanical Council; 1999.
102. Farmakopea Polska V. URPL; Warszawa 1990.
103. Perry NB, Burgess EJ, Guitian MAR, Franco RR, Mosquera EL, Smallfield BM, et al. Sesquiterpene Lactones in *Arnica montana*: Helenalin and Dihydrohelenalin Chemotypes in Spain. *Planta Medica*. 2009;75:660-666.
104. Stefanache CP, Bujor OC, Necula R, Grigoras V, Mardari C, Birsan C, et al. Sesquiterpene lactones and phenolic compounds content in *Arnica montana* flowers and leaves samples harvested from wild sites in North-East Romania. *Planta Medica*. 2016;82:S1-S382 (congress abstract).
105. Mills SY, Bone K. The essential guide to herbal safety. Elsevier; Missouri 2005.
106. Gehrmann B, Koch W-G, Tschirch CO, Brinkmann H. Profile działania leków roślinnych. Medpharm; Wrocław 2006.
107. Gehrmann B, Koch W-G, Tschirch CO, Brinkmann H, Wismeyer K. Fitoterapia racjonalne porady i zalecenia. Medpharm; Wrocław 2007.
108. Ganzera M, Egger C, Zidorn C, Stuppner H. Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2008;614:196-200.
109. Craciunescu O, Constantin D, Gaspar A, Toma L, Utoiu E, Moldovan L. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chemistry Central Journal*. 2012;6:97.
110. Kimel K, Godlewska S, Krauze-Baranowska M, Pobłocka-Olech L. HPLC-DAD-ESI/MS Analysis of *Arnica* TM Constituents. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2020;76:1015-1027.
111. Kos O, Lindenmeyer MT, Tubaro A, Sosa S, Merfort I. New sesquiterpene lactones from arnica tincture prepared from fresh flowerheads of *Arnica montana*. *Planta Medica*. 2005;71:1044-1052.



112. Willuhn G, Kresken J. Sesquiterpene Lactones From *Arnica chamissonis*. *Planta Medica*. 1981;47:157-160.
113. Kresken J, Willuhn G. Further Sesquiterpene Lactones From Blossoms Of *Arnica chamissonis*. *Planta Medica*. 1982;45:132.
114. Leven W, Willuhn G. Sesquiterpene Lactones From *Arnica chamissonis* Less. 6. Identification And Quantitative Determination By High-Performance Liquid And Gas Chromatography. *Journal of Chromatography*. 1987;410:329-342.
115. Ekenas C, Zebrowska A, Schuler B, Vrede T, Andreassen K, Backlund A, et al. Screening for Anti-Inflammatory Activity of 12 *Arnica* (*Asteraceae*) Species Assessed by Inhibition of NF-kappa B and Release of Human Neutrophil Elastase. *Planta Medica*. 2008;74:1789-1794.
116. Jager C, Hrenn A, Zwingmann J, Suter A, Merfort I. Phytomedicines Prepared from *Arnica* Flowers Inhibit the Transcription Factors AP-1 and NF-kB and Modulate the Activity of MMP1 and MMP13 in Human and Bovine Chondrocytes. *Planta Medica*. 2009;75:1319-1325.
117. Merfort I. *Arnica montana* anti-inflammatory effect transcription factors NF-kappa B cytokines. *Forschende Komplementarmedizin Und Klassische Naturheilkunde*. 2003;10:45-48.
118. Robledo SM, Murillo J, Arbelaez N, Montoya A, Ospina V, Jurgens FM, et al. Therapeutic Efficacy of *Arnica* in Hamsters with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* and *L. tropica*. *Pharmaceuticals*. 2022;15:776.
119. Klaas CA, Wagner G, Sosa S, Della Loggia R, Bomme U, Pahl HL, et al. Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from *Arnica* flowers. *Planta Medica*. 2002;68:385-391.
120. Hall I, Starnes Jr C, Lee K, Waddell T. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1980;69:537-543.
121. Hall I, Lee K, Starnes C, Sumida Y, Wu R, Waddell T, et al. Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1979;68:537-542.
122. Hall IH, Lee KH, Starnes CO, Egebaly SA, Ibuka T, Wu YS, et al. Antitumor agents XXX: Evaluation of  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone-containing agents for inhibition of tumor growth, respiration, and nucleic acid synthesis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1978;67:1235-1239.

123. Lyss G, Schmidt TJ, Merfort I, Pahl HL. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF-kappa B. *Biological Chemistry*. 1997;378:951-961.
124. Oberbaum M, Galoyan N, Lerner-Geva L, Singer SR, Grisaru S, Shashar D, et al. The effect of the homeopathic remedies *Arnica montana* and *Bellis perennis* on mild postpartum bleeding - A randomized, double-blind, placebo-controlled study - Preliminary results. *Complementary Therapies in Medicine*. 2005;13:87-90.
125. Zheleva-Dimitrova D, Balabanova V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory potential of *Arnica montana* cultivated in Bulgaria. *Turkish Journal of Biology*. 2012;36:732-737.
126. Diaz P, Jeong SC, Lee S, Khoo C, Koyyalamudi SR. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chinese Medicine*. 2012;7:26.
127. Widrig R, Suter A, Saller R, Melzer J. Choosing between NSAID and arnica for topical treatment of hand osteoarthritis in a randomised, double-blind study. *Rheumatology International*. 2007;27:585-591.
128. Leivers K. Unravelling the confusion around arnica's herbal and homoeopathic use. *Pharmaceutical Journal* 2005;275:289-291.
129. Chatuverdi D. Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. *Opportunity, Challenges and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*. Research Signpost; India 2011.
130. Verma N, Tripathi SK, Sahu D, Das HR, Das RH. Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2010;336:127-135.
131. Szumny A. Synteza i właściwości biologiczne  $\alpha$ -metylenolaktonów. Akademia Rolnicza we Wrocławiu; Wrocław 2006 (rozprawa doktorska).
132. Tornhamre S, Schmidt TJ, Nasman-Glaser B, Ericsson I, Lindgren JA. Inhibitory effects of helenalin and related compounds on 5-lipoxygenase and leukotriene C-4 synthase in human blood cells. *Biochemical Pharmacology*. 2001;62:903-911.
133. Liang N, Kitts DD. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients*. 2016;8:16.

134. Magana AA, Kamimura N, Soumyanath A, Stevens JF, Maier CS. Caffeoylquinic acids: chemistry, biosynthesis, occurrence, analytical challenges, and bioactivity. *Plant Journal*. 2021;107:1299-1319.
135. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80:1033-1043.
136. Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hucherig S, et al. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*. 2009;70:1663-1679.
137. Krzyzanowska-Kowalczyk J, Pecio L, Moldoch J, Ludwiczuk A, Kowalczyk M. Novel Phenolic Constituents of *Pulmonaria officinalis* L. LC-MS/MS Comparison of Spring and Autumn Metabolite Profiles. *Molecules*. 2018;23:2277.
138. Jiang RW, Lau KM, Hon PM, Mak TCW, Woo KS, Fung KP. Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Current Medicinal Chemistry*. 2005;12:237-246.
139. Ovenden SPB, Yu J, Wan SS, Sberna G, Tait RM, Rhodes D, et al. Globoidnan A: a lignan from *Eucalyptus globoidea* inhibits HIV integrase. *Phytochemistry*. 2004;65:3255-3259.
140. Moon DO, Kim MO, Lee JD, Choi YH, Kim GY. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF-alpha-induced NF-kappa B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Letters*. 2010;288:183-191.
141. Xu YC, Jiang ZJ, Ji GA, Liu JW. Inhibition of Bone Metastasis from Breast Carcinoma by Rosmarinic Acid. *Planta Medica*. 2010;76:956-962.
142. Liu WW, Li JD, Zhang XM, Zu YX, Yang Y, Liu WJ, et al. Current Advances in Naturally Occurring Caffeoylquinic Acids: Structure, Bioactivity, and Synthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020;68:10489-10516.
143. Cao WW, Fang YJ, Wu T, Liang FQ, Cheng YX, Salah M, et al. Insights from multispectral and molecular docking investigation on the xanthine oxidase inhibition by 1,4-dicaffeoylquinic acid. *Journal of Molecular Structure*. 2020;1219:128475.
144. Jiang XW, Bai JP, Zhang Q, Hu XL, Tian X, Zhu J, et al. Caffeoylquinic acid derivatives from the roots of *Arctium lappa* L. (burdock) and their structure-activity relationships (SARs) of free radical scavenging activities. *Phytochemistry Letters*. 2016;15:159-163.

145. Meinhart AD, Caldeirao L, Damin FM, Teixeira J, Godoy HT. Analysis of chlorogenic acids isomers and caffeic acid in 89 herbal infusions (tea). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018;73:76-82.
146. Tamayose CI, dos Santos EA, Roque N, Costa-Lotufo LV, Ferreira MJP. Caffeoylquinic Acids: Separation Method, Antiradical Properties and Cytotoxicity. *Chemistry & Biodiversity*. 2019;16: e1900093.
147. Spitaler R, Schlorhauser PD, Ellmerer EP, Merfort I, Bortenschlager S, Stuppner H, et al. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. *Phytochemistry*. 2006;67:409-417.
148. Liang NJ, Kitts DD. Amelioration of Oxidative Stress in Caco-2 Cells Treated with Pro-inflammatory Proteins by Chlorogenic Acid Isomers via Activation of the Nrf2-Keap1 -ARE-Signaling Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66:11008-11107.
149. Hyun YJ, Piao MJ, Kang KA, Ryu YS, Zhen AX, Cho SJ, et al. 3,4-Dicaffeoylquinic acid protects human keratinocytes against environmental oxidative damage. *Journal of Functional Foods*. 2019;52:430-441.
150. Bi YM, Wu YT, Chen L, Tan ZB, Fan HJ, Xie LP, et al. 3,5-Dicaffeoylquinic acid protects H9C2 cells against oxidative stress-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Food & Nutrition Research*. 2018;62.
151. Xu JG, Hu QP, Liu Y. Antioxidant and DNA-Protective Activities of Chlorogenic Acid Isomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60:11625-11630.
152. Ramallo IA, Zacchino SA, Furlan RLE. A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochemical Analysis*. 2006;17:15-19.
153. Liu XY, Chen RH, Shang YJ, Jiao BH, Huang CG. Lithospermic acid as a novel xanthine oxidase inhibitor has anti-inflammatory and hypouricemic effects in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2008;176:137-142.
154. Li YZ, Wan Y, Li RY, Xu LJ, Xie MY, Fu GM. Solvent extraction of caffeoylquinic acids from *Artemisia selengensis* Turcz leaves and their in vitro inhibitory activities on xanthine oxidase. *Industrial Crops and Products*. 2018;118:296-301.
155. Wu XL, Schauss AG. Mitigation of Inflammation with Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60:6703-6717.

156. Jang G, Lee S, Hong J, Park B, Kim D, Kim C. Anti-Inflammatory Effect of 4,5-Dicaffeoylquinic Acid on RAW264.7 Cells and a Rat Model of Inflammation. *Nutrients*. 2021;13:3537.
157. Park J, Kim Y, Lee C, Kim YT. 3,5-Dicaffeoylquinic acid attenuates microglial activation-mediated inflammatory pain by enhancing autophagy through the suppression of MCP3/JAK2/STAT3 signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;153: 113549.
158. Puangpraphant S, Berhow MA, Vermillion K, Potts G, de Mejia EG. Dicaffeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF-kappa B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011;55:1509-1522.
159. Jang G, Lee SA, Hong JH, Park BR, Kim D, Kim CS. Chondroprotective Effects of 4,5-Dicaffeoylquinic Acid in Osteoarthritis through NF-kappa B Signaling Inhibition. *Antioxidants*. 2022;11:487.
160. Lee D, Lee H-D, Kwon H, Lee HL, Hwang GS, Choi S, et al. Insulin secretion and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of dicaffeoylquinic acid derivatives. *Applied Biological Chemistry*. 2022;65:1-9.
161. Naveen J, Baskaran V. Antidiabetic plant-derived nutraceuticals: a critical review. *European Journal of Nutrition*. 2018;57:1275-1299.
162. El-Askary H, Salem HH, Motaal AA. Potential Mechanisms Involved in the Protective Effect of Dicaffeoylquinic Acids from *Artemisia annua* L. Leaves against Diabetes and Its Complications. *Molecules*. 2022;27:857.
163. McDougall B, King PJ, Wu BW, Hostomsky Z, Reinecke MG, Robinson WE. Dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42:140-146.
164. Hsieh CF, Chen YL, Lin GH, Chan YF, Hsieh PW, Horng JT. 3,4-Dicaffeoylquinic Acid from the Medicinal Plant *Ilex kaushue* Disrupts the Interaction Between the Five-Fold Axis of Enterovirus A-71 and the Heparan Sulfate Receptor. *Journal of Virology*. 2022;96: e0054221.
165. Luo J, Wang K, Li GS, Lei DQ, Huang YJ, Li WD, et al. 3,5-Dicaffeoylquinic Acid Disperses *Aspergillus Fumigatus* Biofilm and Enhances Fungicidal Efficacy of Voriconazole and Amphotericin B. *Medical Science Monitor*. 2018;24:427-437.

166. Lim DW, Kim M, Yoon M, Lee J, Lee C, Um MY. 1,3-Dicaffeoylquinic Acid as an Active Compound of *Arctium lappa* Root Extract Ameliorates Depressive-Like Behavior by Regulating Hippocampal Nitric Oxide Synthesis in Ovariectomized Mice. *Antioxidants*. 2021;10:1281.
167. Lim DW, Park J, Jung J, Kim SH, Um MY, Yoon M, et al. Dicaffeoylquinic acids alleviate memory loss via reduction of oxidative stress in stress-hormone-induced depressive mice. *Pharmacological Research*. 2020;161: 105252.
168. Zhou YH, Fu X, Guan YQ, Gong MT, He K, Huang B. 1,3-Dicaffeoylquinic acid targeting 14-3-3 tau suppresses human breast cancer cell proliferation and metastasis through IL6/JAK2/PI3K pathway. *Biochemical Pharmacology*. 2020;172: 113752.
169. Kirschner JG. *Thin-Layer Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc.; New York 1990.
170. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T, editors. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Taylor & Francis Group; Boca Raton 2008.
171. Picman AK, Ranieri RL, Towers GHN, Lam J. Visualization Reagents For Sesquiterpene Lactones And Polyacetylenes On Thin-Layer Chromatograms. *Journal of Chromatography*. 1980;189:187-198.
172. Zheleva-Dimitrova DZ, Balabanova V, Gevrenova R, Doichinova I, Vitkova A. Chemometrics-based Approach in Analysis of *Arnicae flos*. *Pharmacognosy Magazine*. 2015;11:S538-S44.
173. COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit Booklet Ann Arbor, USA: Cayman Chemical; [on-line: <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/560131.pdf>] (Dostęp: 10.10.2023).
174. Vladić J, Nastić N, Stanojković T, Žižak Ž, Čakarević J, Popović L, et al. Subcritical water for recovery of polyphenols from comfrey root and biological activities of extracts. *Acta Chimica Slovenica*. 2019;66:473-483.
175. Alkan FU, Anlas C, Ustuner O, Bakirel T, Sari AB. Antioxidant and proliferative effects of aqueous and ethanolic extracts of *Symphytum officinale* on 3T3 Swiss albino mouse fibroblast cell line. *Asian J Plant Sci Res*. 2014;4:62-68.
176. Kaur H, Chowrasia S, Gaur VS, Mondal TK. Allantoin: emerging role in plant abiotic stress tolerance. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2021;39:648-661.
177. Haghi G, Arshi R, Safaei A. Improved high-performance liquid chromatography (HPLC) method for qualitative and quantitative analysis of allantoin in *Zea mays*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56:1205-1209.

178. Maksimovic Z, Malenovic A, Jancic B, Kovacevic N. Quantification of allantoin in various *Zea mays* L. hybrids by RP-HPLC with UV detection. *Pharmazie*. 2004;59:524-527.
179. Han S-J, Ryu S-N. Quantitative analysis of allantoin in various rice varieties. *Korean Journal of Crop Science*. 2007;52:453-457.
180. Sherma J, Cortelyou PS. Determination Of Allantoin In Drug Preparations By Quantitative High-Performance TLC. *Journal of Liquid Chromatography*. 1986;9:3415-321.
181. Abraham J, Simeone FA, Hopkins RW. Sensitive Assay For Allantoin. *Analytical Biochemistry*. 1976;70:377-380.
182. Markham KR. *Techniques of flavonoid identification*: Academic press; London 1982.
183. Barbakadze V, Mulkijanyan K, Gogilashvili L, Amiranashvili L, Merlani M, Novikova Z, et al. Allantoin-and pyrrolizidine alkaloids-free wound healing compositions from *Symphytum asperum*. *Bull Georg Natl Acad Sci*. 2009;3:159-164.
184. Vlassa M, Filip M, Pascalau V, Coman V, Dragomir C. Determination of purine derivatives in bovine urine using rapid chromatographic techniques. *Arch Zootech*. 2009;12:59-70.
185. Hawrylak-Nowak B, Dresler S. Assessment of allantoin concentrations in comfrey root available on the Polish market. *Acta Agrobotanica*. 2023;76:1-4.
186. Vostinaru O, Conea S, Mogosan C, Toma CC, Borza CC, Vlase L. Anti-inflammatory and antinociceptive effect of *Symphytum officinale* root. *Romanian Biotechnological Letters*. 2018;23:14160-14167.
187. Casado N, Morante-Zarcero S, Sierra I. The concerning food safety issue of pyrrolizidine alkaloids: An overview. *Trends in Food Science & Technology*. 2022;120:123-139.
188. Fernandez-Panchon MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008;48(6):649-671.
189. Martins N, Barros L, Ferreira I. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;48:1-12.
190. Waksmundzka-Hajnos M, Hawryl MA, Ciesla L. Analysis of Plant Material. *Instrumental Thin-Layer Chromatography*. 2015:505-553.
191. Poblócka-Olech L, Krauze-Baranowska M. TLC of active compounds from selected *Populus* leaves. 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis; 24-26th September; Gdańsk, Poland 2019. (materiały konferencyjne).

192. Okamura K, Hibi K, Nakamura H. A Calculation Method of Corresponding Mobile Phase Composition for Obtaining the Same Retention with Different Binary Organic/Aqueous Solvent Systems in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Analytical Sciences*. 1990;6:857-861.
193. Dresler S, Szymczak G, Wojcik M. Comparison of some secondary metabolite content in the seventeen species of the *Boraginaceae* family. *Pharmaceutical biology*. 2017;55:691-695.
194. Michalska A, Wojdylo A, Brzezowska J, Majerska J, Ciska E. The Influence of Inulin on the Retention of Polyphenolic Compounds during the Drying of Blackcurrant Juice. *Molecules*. 2019;24:4167.
195. Trifan A, Zengin G, Sinan KI, Esslinger N, Grubelnik A, Wolfram E, et al. Influence of the Post-Harvest Storage Time on the Multi-Biological Potential, Phenolic and Pyrrolizidine Alkaloid Content of Comfrey (*Symphytum officinale* L.) Roots Collected from Different European Regions. *Plants-Basel*. 2021;10:1825.
196. Yang B, Liu HL, Yang JL, Gupta VK, Jiang YM. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends in Food Science & Technology*. 2018;79:116-124.
197. Shen N, Wang TF, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2022;383: 132531.
198. Altamirano JC, Gratz SR, Wolnik KA. Investigation of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in commercial comfrey-containing products and botanical materials by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Aoac International*. 2005;88:406-412.
199. Kopp T, Abdel-Tawab M, Mizaikoff B. Extracting and Analyzing Pyrrolizidine Alkaloids in Medicinal Plants: A Review. *Toxins*. 2020;12:320.
200. European Pharmacopeia. 11th ed 2023.
201. Skoneczny D, Weston PA, Zhu XC, Gurr GM, Callaway RM, Weston LA. Metabolic Profiling of Pyrrolizidine Alkaloids in Foliage of Two *Echium* spp. Invaders in Australia-A Case of Novel Weapons? *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16:26721-26737.
202. Oppermann U, Moreau S, Burkli A. Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Teas and Herbal Teas by LC-MS/MS. Poster presentation at RAFA symposium, 2019. (materiały konferencyjne)



203. Ruzicka J, Berger-Büter K, Esslinger N, Novak J. Assessment of the diversity of comfrey (*Symphytum officinale* L. and *S. × uplandicum* Nyman). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2021;68:2813-2825.
204. Madge I, Gehling M, Schone C, Winterhalter P, These A. Pyrrolizidine alkaloid profiling of four *Boraginaceae* species from Northern Germany and implications for the analytical scope proposed for monitoring of maximum levels. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*. 2020;37:1339-1358.
205. Mroczek T, Ndjoko-Ioset K, Glowniak K, Miekiewicz-Capala A, Hostettmann K. Investigation of *Symphytum cordatum* alkaloids by liquid-liquid partitioning, thin-layer chromatography and liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2006;566:157-166.
206. Wuilloud JCA, Gratz SR, Gamble BM, Wolnik KA. Simultaneous analysis of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and N-oxides in comfrey root by LC-ion trap mass spectrometry. *Analyst*. 2004;129:150-156.
207. Sixto A, Niell S, Heinzen H. Straightforward Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Honey through Simplified Methanol Extraction (QuPPE) and LC-MS/MS Modes. *Acs Omega*. 2019;4:22632-22637.
208. Merfort I. Caffeoylquinic Acids From Flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry*. 1992;31:2111-2113.
209. Kula M, Glod D, Krauze-Baranowska M. Two-dimensional liquid chromatography (LC) of phenolic compounds from the shoots of *Rubus idaeus* 'Glen Ample' cultivar variety. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016;121:99-106.
210. Merfort I, Wendisch D. New Flavonoid Glycosides From *Arnicae Flos* DAB-9. *Planta Medica*. 1992;58:355-357.
211. Merfort I, Wendisch D. Flavonoid Glycosides from *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Planta Medica*. 1987:434-437.
212. Ekenäs C, Rosén J, Wagner S, Merfort I, Backlund A, Andreasen K. Secondary chemistry and ribosomal DNA data congruencies in *Arnica* (*Asteraceae*). *Cladistics*. 2009;25:78-92.
213. Douglas JA, Smallfield BM, Burgess EJ, Perry NB, Anderson RE, Douglas MH, et al. Sesquiterpene Lactones in *Arnica montana*: a rapid analytical method and the effects of flower maturity and simulated mechanical harvesting on quality and yield. *Planta Medica*. 2004;70:166-170.

214. Bergonzi MC, Bilia AR, Casiraghi A, Cilurzo F, Minghetti P, Montanari L, et al. Evaluation of skin permeability of sesquiterpenes of an innovative supercritical carbon dioxide *Arnica* extract by HPLC/DAD/MS. *Pharmazie*. 2005;60:36-38.
215. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006;19:669-675.
216. Huang DJ, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53:1841-1856.
217. Bram S, Wolfram E. Recent Advances in Effect-directed Enzyme Assays based on Thin-layer Chromatography. *Phytochemical Analysis*. 2017;28:74-86.
218. Ciesla LM, Waksmundzka-Hajnos M, Wojtunik KA, Hajnos M. Thin-layer chromatography coupled with biological detection to screen natural mixtures for potential drug leads. *Phytochemistry Letters*. 2015;11:445-454.
219. Fernandes C, Palmeira A, Ramos I, Carneiro C, Afonso C, Tiritan M, et al. Chiral derivatives of xanthenes: Investigation of the effect of enantioselectivity on inhibition of cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) and binding interaction with human serum albumin. *Pharmaceuticals*. 2017;10:50.
220. Gorzkiewicz M, Janaszewska A, Ficker M, Svenningsen SW, Christensen JB, Klajnert-Maculewicz B. Pyrrolidone-modified PAMAM dendrimers enhance anti-inflammatory potential of indomethacin in vitro. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2019;181:959-962.
221. Shekarchi M, Hajimehdipour H, Saeidnia S, Gohari AR, Hamedani MP. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of *Labiatae* family. *Pharmacognosy Magazine*. 2012;8:37-41.
222. Nguyen HT, Vu TY, Chandi V, Polimati H, Tatipamula VB. Dual COX and 5-LOX inhibition by clerodane diterpenes from seeds of *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thwaites. *Scientific Reports*. 2020;10: 15965.
223. Killari KN, Thuan NH, Prasanth D, Panda SP, Pasala PK, Ketha A, et al. Bioassay Guided Isolation of Anti-Inflammatory Compounds from *Bauhinia variegata* L.: A Key Ingredient in Herbo-Mineral Formulation, Gandmala Kandan Ras. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023;85:227-232.
224. Kmieć N, Wełnicka-Jaśkiewicz M, Jassem J. Niesteroidowe leki przeciwzapalne w profilaktyce i leczeniu nowotworów jelita grubego. *Nowotwory J Oncol*. 2014;64:175-179.

225. Cryer B, Dubois A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase - A review. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 1998;56:341-361.
226. Marti-Mestres G, Mestres JP, Bres J, Martin S, Ramos J, Vian L. The "in vitro" percutaneous penetration of three antioxidant compounds. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;331:139-144.
227. Zilius M, Ramanauskien K, Briedis V. Release of Propolis Phenolic Acids from Semisolid Formulations and Their Penetration into the Human Skin In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013:e358717.
228. Yutani R, Kikuchi T, Teraoka R, Kitagawa S. Efficient Delivery and Distribution in Skin of Chlorogenic Acid and Resveratrol Induced by Microemulsion Using Sucrose Laurate. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2014;62:274-280.
229. Stelmakiene A, Ramanauskiene K, Briedis V. Release of rosmarinic acid from semisolid formulations and its penetration through human skin ex vivo. *Acta Pharmaceutica*. 2015;65:199-205.
230. Spagnol CM, Di Filippo LD, Isaac VLB, Correa MA, Salgado HRN. Caffeic Acid in Dermatological Formulations: In Vitro Release Profile and Skin Absorption. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2017;20:675-681.
231. Wagner S, Merfort I. Skin penetration behaviour of sesquiterpene lactones from different Arnica preparations using a validated GC-MSD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;43:32-38.
232. Tekko IA, Bonner MC, Bowen RD, Williams AC. Permeation of bioactive constituents from *Arnica montana* preparations through human skin in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2006;58:1167-1176.
233. Kuchta K, Schmidt M. Safety of medicinal comfrey cream preparations (*Symphytum officinale* s.l.): The pyrrolizidine alkaloid lycopsamine is poorly absorbed through human skin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2020;118: 104784.
234. Uchida T, Kadhum WR, Kanai S, Todo H, Oshizaka T, Sugibayashi K. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M (TM). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;67:113-118.
235. Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Biabiany M, Standaert-Vitse A, Riviere C, et al. Rosmarinic Acid and Its Methyl Ester as Antimicrobial Components of the Hydromethanolic

Extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (*Lamiaceae*). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013:e604536.

236. Saija A, Tomaino A, Trombetta D, De Pasquale A, Uccella N, Barbuzzi T, et al. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. International Journal of Pharmaceutics. 2000;199:39-47.

## SPIS ILUSTRACJI:

Ryc. 1: Żywokost lekarski ( <i>Symphytum officinale</i> L.) .....	26
Ryc. 2: Aktywacja i detoksykacja alkaloidów pirolizydynowych: (a) aktywacja poprzez dehydrogenację do pośredniego pirolu, który następnie (b) reaguje z białkiem lub DNA tworząc komórkowy addukt. Detoksykacja w wyniku (c) <i>N</i> -oksydacji alkaloidu pirolizydynowego lub (d) koniugacji pirolu z glutationem. Schemat wg Rode i wsp. (34) .....	29
Ryc. 3: Wzory strukturalne nowych związków z grupy lignanów pochodnych kwasu kawowego, zidentyfikowanych w korzeniu żywokostu. A – globoidnan A, B – globoidnan B, C - rabdozyna. ....	33
Ryc. 4: Rozmieszczenie stanowisk monitoringu gatunku ( <i>A. montana</i> ) na tle jego zasięgu geograficznego; dane na rok 2012 (84) .....	40
Ryc. 5: Zdjęcie mikroskopowe pojedynczego kwiatu arniki górskiej ( <i>Arnica montana</i> L.) (87) oraz cała roślina .....	41
Ryc. 6: Mechanizm biochemiczny działania przeciwzapalnego $\alpha$ -metylenolaktonów (120, 121, 132).....	53
Ryc. 7: Molekularny mechanizm aktywności przeciwzapalnej helenaliny (123).....	55
Ryc. 8: Proponowane szlaki biosyntezy kwasu rozmarynowego, chlorogenowego i innych produktów szlaku fenylopropanoidowego. PAL – amoniakoliaza fenyloalaniny; C4H – 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego; 4CL – CoA-ligaza kwasu 4-kumarowego; TAT – aminotransferaza tyrozyny; HPPR – reduktaza hydroksyfenylopirogronianu; RAS – syntaza kwasu rozmarynowego; 4C-pHPL 3H, 4C-pHPL 3'-H – 3-/3'-hydroksylaza 4-kumarylo-4'-hydroksyfenylomleczanu; Caf-pHPL 3'H – 3'-hydroksylaza kawoilo-4'-hydroksyfenylomleczanu; 4C-DHPL 3H – 3-hydroksylaza 4-kumarylo-3',4'-dihydroksyfenylomleczanu; HPPD – dioksygenaza hydroksyfenylopirogronianu; HCS/QT – hydroksycynamonylo-CoA : szikimo-/chino- hydroksycynamonylotransferaza; 4C-S/Q 3H – 3-hydroksylaza 4-kumaryloszikimianu/chinianu (136).....	58
Ryc. 9: Struktury chemiczne przykładowych estrów kwasu kawowego z kwasem 3,4-dihydrofenylomlekowym (18) .....	59
Ryc. 10: Struktury chemiczne kwasów dikawoilochinowych (143).....	63
Ryc. 11: Schemat obrazujący ochronne działanie kwasu 3,4-dikawoilochinowego przed apoptozą komórek pod wpływem negatywnego działania promieniowania UVB i pyłów	

zawieszonych o średnicy <2,5 μm (PM <sub>2,5</sub> ) wg. <i>Hyun et al.</i> (149). ERK – kinaza regulowana sygnałem pozakomórkowym; PARP – polimeraza poli(ADP-ryboza).....	66
Ryc. 12: Oksydacja hipoksantyny i ksantyny do kwasu moczowego katalizowana przez oksydazę ksantynową (152).....	67
Ryc. 13: Rola szlaku MAPK w reakcjach zapalnych (155).....	68
Ryc. 14: Rola α-amylazy i α-glukozydazy w trawieniu i metabolizmie skrobi (161) .....	70
Ryc. 15: X - miejsce zbioru liści żywokostu ze stanowiska naturalnego (Dolina Radości, Gdańsk; 54°23'37.9"N 18°31'03.0"E) .....	81
Ryc. 16: Chromatogram HPLC przykładowej frakcji IV zawierającej oczyszczony globoidnan A .....	89
Ryc. 17: Wzór strukturalny alantoiny.....	106
Ryc. 18: Szlaki biosyntezy alantoiny i jej transportu do tkanek roślinnych wg <i>Kaur et al.</i> (176). .....	107
Ryc. 19: Densytogram (bez derywatywacji) oraz chromatogram TLC (po derywatywacji) wyciągu metanolowego z korzenia żywokostu (S1, S2) i alantoiny (A3). Płytki TLC Si60, faza ruchoma: A/F7, detekcja UV λ-190 nm i światło dzienne, A – alantoina. ....	110
Ryc. 20: Densytogram (bez derywatywacji) oraz chromatogram TLC (po derywatywacji) wyciągu metanolowego z korzenia żywokostu (S1, S2) i alantoiny (A3). Płytki TLC Si60 <sub>F254</sub> , faza ruchoma: A/F7, detekcja UV λ-190 nm i światło dzienne, A – alantoina. ....	110
Ryc. 21: Obserwowane zmiany w intensywności piku alantoiny podczas pomiarów densytometrycznych przy różnych długościach fali (multiskan w zakresie λ-190-210 nm, zmiana co 5 nm), na podstawie wyciągu z korzenia żywokostu (Fr).....	112
Ryc. 22: Chromatogram TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego (DPf EHf, Hf) oraz alantoiny (A) jako wzorca: płytka TLC Si60, faza ruchoma: A/F7, odczynnik wywołujący: zmodyfikowany odczynnik Ehrlicha, detekcja: światło dzienne; objętość aplikacji - 20 i 10 μl/pasmo .....	115
Ryc. 23: Wzór strukturalny kwasu rozmarynowego. ....	118
Ryc. 24: Kierunki aktywności biologicznej kwasu rozmarynowego oraz proponowane mechanizmy działania (17, 18, 49).....	118
Ryc. 25: Chromatogram 1D TLC wyciągu z korzenia (Fr) żywokostu lekarskiego oraz substancji wzorcowych: RA - kwas rozmarynowy, CA - kwas kawowy, LA - kwas litospermowy, SA A-D – kwasy salwianolowe A-D. Płytki: TLC Si60 <sub>F254</sub> , Faza ruchoma: B/F1; A – odczynnik wywołujący:	

NPR+PEG, detekcja $\lambda$ -366 nm, B – odczynnik wywołujący: 2% $AlCl_3$ , detekcja UV:, $\lambda$ -366 nm .....	121
Ryc. 26: Chromatogram 1D TLC wyciągów z korzeni żywokostu lekarskiego (oznaczenia surowców zgodne z danymi podanymi w rozdziale 4.1. Płytką: TLC Si60 <sub>F254</sub> , Faza ruchoma: B/F1; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja $\lambda$ -366 nm. CA – kwas kawowy, RA – kwas rozmarynowy. ....	121
Ryc. 27: Optymalizacja rozdzielania chromatograficznego HPLC związków fenolowych w korzeniu żywokostu w zakresie doboru kolumny chromatograficznej: kolumny Kinetex C-18, Kinetex PFP i Kinetex F5, T kolumny - 35°C, elucja gradientowa: program II, detekcja UV $\lambda$ -254 nm. 2, 3, 5 – zgodnie z Tabelą 9.....	122
Ryc. 28: Chromatogram HPLC wyciągu z korzenia żywokostu (Fr) (linia czarna) oraz wyciągu z korzenia żywokostu (Fr) z dodatkiem wzorca kwasu litospermowego (linia różowa). Kolumna: Kinetex F5 (100 x 4,6 mm), T - 35°C, elucja gradientowa: program II, detekcja UV $\lambda$ -254 nm .....	123
Ryc. 29: Chromatogram HPLC wyciągu z korzenia żywokostu (Fr). Kolumna: Kinetex F5 (100 x 4,6 mm), T - 35°C, elucja gradientowa: program II, detekcja UV $\lambda$ -254 nm. Numeracja związków zgodnie z Tabela 9. ....	123
Ryc. 30: Zautomatyzowany system do ekstrakcji do fazy stałej SmartPrepExtractor II.....	124
Ryc. 31: Chromatogram HPLC frakcji <b>IV</b> zawierającej oczyszczony związek <b>5</b> ( $t_R$ - 45 min). Kolumna: Kinetex F5 (100 x 4,6 mm), T-35°C, elucja gradientowa: program II, detekcja UV $\lambda$ -254 nm.....	124
Ryc. 32: Zestawienia widm NMR zarejestrowanych w DMSO-d <sub>6</sub> w temperaturze pokojowej. A - widma ROESY (czerwono-niebieskie) i gHSQC (brązowo-fioletowe); czerwonymi strzałkami zaznaczono wybrane efekty NOE. B - widma HSQC (czerwono-niebieskie) i HMBC (czarne). .....	125
Ryc. 33: Widma <sup>1</sup> H NMR izolatów związku 5 (DMSO-d <sub>6</sub> , temperatura pokojowa).....	126
Ryc. 34: Wzory strukturalne lignanów pochodnych kwasu kawowego zidentyfikowanych w korzeniu żywokostu. A – globoidnan A; B – globoidnan B; C – rabdozyna.....	126
Ryc. 35: Chromatogram 1D TLC wyciągu z liścia żywokostu lekarskiego (Hf) oraz substancji wzorcowych: MQ - 3-O-(6''-malonylo)-glukozyd kwercetyny; KG – 3-O-glukozyd kemferolu, QG – 3-O-glukozyd kwercetyny. Płytką: TLC Si60 <sub>F254</sub> , faza ruchoma: B/F1; A – odczynnik	

wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV: $\lambda$ -366 nm, B – odczynnik wywołujący: 2% $AlCl_3$ , detekcja UV: $\lambda$ -366 nm.....	128
Ryc. 36: Chromatogram 1D TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego (DPf, EHf, Hf). Płytką: TLC Si60 <sub>F254</sub> , faza ruchoma: B/F2; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV: $\lambda$ -366 nm. ....	129
Ryc. 37: Chromatogram 1D TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego (Hf). Płytką: TLC Si60 <sub>F254</sub> , faza ruchoma: B/F6; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV: $\lambda$ -366 nm. ....	129
Ryc. 38: Chromatogramy 2D TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego (A – Hf, B – DPf, C – EHf). Płytką: TLC Si60 <sub>F254</sub> ; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV: $\lambda$ -366 nm. ....	130
Ryc. 39: Chromatogramy 2D TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego (DRf) otrzymanych różnymi metodami ekstrakcji ( $\lambda$ -366 nm. A – maceracja, B – ekstrakcja w aparacie Soxhleta, C – ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami). Płytką: TLC Si60 <sub>F254</sub> ; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV: $\lambda$ -366 nm.....	130
Ryc. 40: Chromatogramy 2D TLC wyciągu z liści żywokostu lekarskiego (Hf; 15 $\mu$ l) z dodatkiem wzorców (2 $\mu$ l) związków fenolowych. Płytką: TLC Si60 <sub>F254</sub> ; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV: $\lambda$ -366 nm. A – 3-O-(6''-malonylo)glukozyd kwercetyny; B – 3-O-glukozyd kemferolu; C – 3-O-galaktozyd kemferolu; D – 3-O-glukozyd kwercetyny; E – 3-O-galaktozyd kwercetyny, F – globoidnan A. ....	131
Ryc. 41: Chromatogramy 2D TLC wyciągów ze świeżych (A) i suszonych (B) liści żywokostu lekarskiego (DRf). Płytką: TLC Si60 <sub>F254</sub> ; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący: NPR+PEG, detekcja UV: $\lambda$ -366 nm. Różnice w intensywności plam wynikają z aplikacji różnych stężeń wyciągu. Numeracja związków odpowiada Tabela 10. ..	132
Ryc. 42: Chromatogram HPLC wyciągów metanolowych z liścia żywokostu (DRf) uzyskanych dwoma metodami (A – ekstrakcja w aparacie Soxhleta, rozcieńczenie 1:1; B – maceracja (48 h), rozcieńczenie 1:10). Kolumna: Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm), T - 35°C, elucja gradientowa: program II, detekcja UV $\lambda$ -254 nm. Numeracja związków odpowiada Tabela 10. ....	133
Ryc. 43: Chromatogramy TIC (total ion chromatogram) uzyskane w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM, multiple-reaction monitoring) alkaloidów pirolizydynowych obecnych w wyciągu metanolowym z korzenia żywokostu lekarskiego (DPr) rozdzielonych z użyciem opracowanej metody HPLC-MS/MS. Kolumna Kinetex C-18 (100 x 2,1 mm), elucja gradientowa: program VIII. Numeracja pików zgodnie z Tabelą 14. ....	141



Ryc. 44: Chromatogram głównych pików (tryb MRM) alkaloidów pirolizydynowych obecnych w metanolowym wyciągu z korzenia żywokostu ( <b>DPr</b> ) rozdzielonych z użyciem opracowanej metody HPLC-MS/MS. Kolumna: Kinetex C-18 (100 x 2,1 mm), elucja gradientowa: program: VIII. Numeracja pików zgodnie z Tabelą 14. ....	146
Ryc. 45: Wykres rozrzutu próbek obiektów dla dwóch czynników ze względu na: a) część anatomiczną rośliny; b) warunki uprawy; c) pochodzenie geograficzne żywokostu; d) Wykres rozrzutu ładunków dla alkaloidów pirolizydynowych we wszystkich analizowanych próbkach. ....	151
Ryc. 46: Chromatogramy HPLC związków biologicznie czynnych z nalewki Arnica TM (Boiron) otrzymane z użyciem kolumn Kinetex C-18 i Kinetex PFP. Elucja gradientowa: program III, detekcja UV $\lambda$ -330 nm. ....	153
Ryc. 47: Chromatogramy HPLC ekstraktów z kwiatów Arnica montana (A) i Arnica chamissonis (B) oraz nalewki macierzystej ze świeżej całej rośliny A. montana (Arnica TM; Boiron) (C). Kolumna Kinetex PFP (100 x 4,6 mm), elucja gradientowa: program III, detekcja: UV $\lambda$ -330 nm. Numeracja związków zgodnie z Tabela 19.....	155
Ryc. 48: Chromatogram HPLC – TIC+ (total ion chromatogram; jonizacja dodatnia) (A) i UV (B) zespołu laktonów seskwiterpenowych obecnych w nalewce ze świeżej całej rośliny arniki górskiej Arnica TM ( <b>N1</b> ) (Boiron, Francja). Dwie szeregowo połączone kolumny Kinetex C-18 (100 x 4,6 mm), elucja izokratyczna: program III, detekcja ESI-MS i UV $\lambda$ -225 nm. Numeracja pików odpowiada Tabela 22.....	168
Ryc. 49: Chromatogramy HPLC-DAD-ESI/MS nalewki ze świeżej całej rośliny arniki górskiej Arnica TM <b>N1</b> (Boiron, Francja) (A, B) i wzorcowej helenaliny (C, D). Kolumna Kinetex C-18, elucja izokratyczna: program II, detekcja UV $\lambda$ -225 nm. ....	170
Ryc. 50: Chromatogram 1D TLC zespołu laktonów seskwiterpenowych obecnych w kwiatostanach arniki górskiej pochodzących ze stanowisk naturalnych i ogrodów botanicznych (1-6), kwiatostanów arniki górskiej (AM) i łąkowej (AC) zakupionych w sklepach zielarskich oraz dwóch nalewek ze świeżej całej rośliny arniki górskiej (N1, N2). Faza stacjonarna: TLC Si60, faza ruchoma – układ MGD: 2x C/F8 (9 cm), 1x C/F9 (6 cm), odczynnik wywołujący: odczynnik wanilinowy w kwasie siarkowym, detekcja: światło widzialne, objętość aplikowanej próbki: 20 $\mu$ l.....	174
Ryc. 51: Chromatogramy 2D TLC wyciągów metanolowych z arniki górskiej (A - AM5; B - AM6) oraz nalewek świeżej całej rośliny arniki górskiej (C - N1; D - N2). Faza stacjonarna: TLC Si60,	

fazy ruchome – I faza: C/F5, II faza: C/F15; odczynnik wywołujący: odczynnik wanilinowy w kwasie siarkowym, detekcja: światło dzienne, objętość aplikowanej próbki: 50 µl. ....	175
Ryc. 52: Chromatogramy HPLC frakcji (F1 – 20% metanol, F2 – 30% metanol, F3 – 60% metanol, F4 – 100% metanol) wydzielonych z nalewki N1 z użyciem opracowanej metody SPE. A – zespół związków polifenolowych (detekcja UV 254 nm; wg metody opisanej w rozdziale 4), B – zespół laktonów seskwiterpenowych (TIC, jonizacja dodatnia; wg metody opisanej w rozdziale 6). ....	176
Ryc. 53: Histogram obrazujący zależności pomiędzy wynikami oceny aktywności antyoksydacyjnej surowców (DPPH, FRAP, ABTS; mmol TE/g) a zawartością pochodnych kwasu kawowego (mg/g s.m.). ....	181
Ryc. 54: A) Wykres rozrzutu próbek obiektów dla dwóch czynników ze względu na pochodzenie geograficzne żywokostu i metodę uprawy. B) Wykres rozrzutu ładunków dla elementów we wszystkich analizowanych próbkach. ....	183
Ryc. 55: Chromatogram 1D TLC wyciągów z korzeni i liści żywokostu lekarskiego (oznaczenia surowców zgodne z danymi podanymi w rozdziale 4.1.). Płytki TLC Si60 <sub>F254</sub> , faza ruchoma: B/F2; odczynnik wywołujący: DPPH, detekcja: światło widzialne, objętość aplikowanej próbki: A – 10 µL/pasmo, B - 5 µL/pasmo. 1 – kwas kawowy, 7 – kwas rozmarynowy, 9 – globoidnan A....	186
Ryc. 56: Chromatogram 2D TLC wyciągu z liścia żywokostu ( <b>DRf</b> ) sporządzonego metodą: A) maceracji metanolem, B) ekstrakcji metanolem w aparacie Soxhlet. Płytki TLC Si60 <sub>F254</sub> ; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący: DPPH, detekcja: światło dzienne. Numeracja związków zgodnie z Tabela 10. ....	187
Ryc. 57: Chromatogramy 2D TLC wyciągów z liści żywokostu lekarskiego zakupionych od krajowych firm zielarskich (A – Hf, B – DPf, C – EHf). Płytki TLC Si60 <sub>F254</sub> , 15µL; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; odczynnik wywołujący i detekcja: górne płytki – NPR+PEG, UV λ-366 nm dolne płytki – odczynnik DPPH, światło dzienne. Numeracja związków zgodnie z Tabela 10. ....	188
Ryc. 58: Chromatogramy 2D TLC wyciągów z korzenia (A, B) oraz liścia (C, D) żywokostu lekarskiego po derywatywacji odczynnikami NPR+PEG, detekcja UV: λ-366 nm (A i C) i po przeprowadzeniu testu bioautograficznego w układzie ryboflawina-światło-NBT, detekcja: światło dzienne (B i D). Płytki TLC Si60 <sub>F254</sub> ; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6. ....	189

Ryc. 59: Chromatogramy 2D TLC wyciągów z korzenia (A, B) oraz liścia (C, D) żywokostu po derywatywacji odczynnikami NPR+PEG, detekcja UV: $\lambda$ -366 nm (A i C) i po przeprowadzeniu testu bioautograficznego w układzie ryboflawina-światło-NBT, detekcja: światło dzienne (B i D). Płytki TLC Si60 <sub>F254</sub> ; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6. ....	190
Ryc. 60: Chromatogramy 2D TLC wyciągów metanolowych z kwiatów arniki górskiej (A, C) i arniki łąkowej (B, D). Objętość aplikowanej próbki: 20 $\mu$ L; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; detekcja: A, B – NPR+PEG, 366 nm C, D – odczynnik DPPH, światło widzialne. ....	195
Ryc. 61: Chromatogramy 2D TLC wyciągów etanolowych z kwiatów arniki górskiej (A, C) i arniki łąkowej (B, D). Objętość aplikowanej próbki: 20 $\mu$ L; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6; detekcja: A, B – NPR+PEG, 366 nm C, D – odczynnik DPPH, światło widzialne. ....	196
Ryc. 62: Chromatogramy 2D TLC wyciągu metanolowego z kwiatu arniki górskiej po derywatywacji odczynnikami NPR+PEG (A) oraz przeprowadzeniu testów bioautograficznych: B – układ ryboflawina-światło-NBT, C – test hamowania oksydazy ksantynowej. Objętość aplikowanej próbki: 20 $\mu$ L; fazy ruchome: I kierunek – B/F2, II kierunek – B/F6. ....	197
Ryc. 63: Chromatogramy HPLC zespołu estrów pochodnych kwasu kawowego obecnych w przebiegu badania dostępności farmaceutycznej dla wyciągu z korzenia żywokostu (A, B, C) i kwiatu arniki (D, E, F) z użyciem błon półprzepuszczalnych Strat-M. A, D – płyn donorowy, B, E – płyn akceptorowy, C, F – płyn po ekstrakcji błon półprzepuszczalnych. ....	200
Ryc. 64: Chromatogramy HPLC mieszaniny kwasu rozmarynowego (RA; 1,5 mg/ml) i kwasu kawowego (CA; 250 $\mu$ g/ml) (A, B) oraz kwasu chlorogenowego (ChA; 1,5 mg/g) i helenaliny (H; 30 $\mu$ g/ml) (C, D) w przebiegu badania dostępności farmaceutycznej z użyciem błon półprzepuszczalnych Strat-M. A, C – płyn donorowy, B, D – płyn akceptorowy. ....	202
Ryc. 65: Chromatogramy HPLC zespołu alkaloidów pirolizydynowych z korzenia żywokostu w przebiegu otrzymane w badaniach dostępności farmaceutycznej z użyciem błon półprzepuszczalnych Strat-M. A – płyn donorowy, B – płyn akceptorowy, C – ekstrakt z błon półprzepuszczalnych. In – intermedyna, Li – likopsamina, InNO – N-tlenek intermedyny, LiNO – N-tlenek likopsaminy. ....	204

## SPIS TABEL:

Tabela 1: Najważniejsze związki biologicznie czynne zidentyfikowane w kwiatach arniki górskiej (86, 88, 92, 96, 99, 100, 108-111) .....	45
Tabela 2: Optymalizacja warunków rozdzielania alantoiny w korzeniu i liściu żywokostu metodą TLC w zakresie doboru fazy ruchomej z użyciem faz F1-F7.....	109
Tabela 3: Optymalizacja warunków rozdzielania z użyciem automatycznej komory chromatograficznej (ADC2) .....	111
Tabela 4: Różnice w polach powierzchni pików alantoiny w zależności od zastosowanych parametrów pomiaru densytometrycznego (wymiary szczeliny), długość fali: $\lambda$ -190 nm.....	112
Tabela 5: Parametry walidacyjne metody TLC densytometrycznego oznaczania alantoiny ..	113
Tabela 6: Parametry walidacyjne w zakresie stabilności metody TLC densytometrycznego oznaczania alantoiny w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego .....	114
Tabela 7: Wartości odzysku metody TLC densytometrycznego oznaczania alantoiny .....	114
Tabela 8: Wyniki oznaczeń ilościowych alantoiny w korzeniach i liściach żywokostu lekarskiego metodą TLC z oznaczeniem densytometrycznym .....	116
Tabela 9: Estry pochodne kwasu kawowego zidentyfikowane w korzeniu żywokostu lekarskiego metodami HPLC (detektor UV/Vis i MS). * - tożsamość związków potwierdzona poprzez kochromatografię wyciągu z substancjami wzorcowymi. ....	127
Tabela 10: Kwasy fenolowe i flawonoidy zidentyfikowane w liściu żywokostu lekarskiego metoda HPLC-DAD-ESI-MS .....	133
Tabela 11: Zawartość (mg/g s.m.) kwasu kawowego oraz jego pochodnych (globoidnan B, kwas rozmarynowy, globoidnan A) w badanych korzeniach żywokostu lekarskiego oznaczona z użyciem opracowanej metody HPLC-DAD-UV/Vis.....	134
Tabela 12: Zawartość fenolokwasów (mg/g s.m.) oraz glikozydów flawonoidowych ( $\mu$ g/g s.m.) w badanych liściach żywokostu lekarskiego oznaczona z użyciem opracowanej metody HPLC-DAD-UV/Vis.....	137
Tabela 13: Parametry walidacyjne dla oznaczeń zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów metodą HPLC-UV/Vis w korzeniu i liściu żywokostu lekarskiego.....	138
Tabela 14: Dane chromatograficzne (nazwa związku, $t_R$ [min], $[M+H]^+$ [m/z], $MS^2$ [m/z], energia kolizji CE [eV]) uzyskane dla wykrytych alkaloidów pirolizydynowych obecnych w wyciągach	

metanolowych z korzeni i liści żywokostu lekarskiego. Identyfikację związków przeprowadzono w oparciu o dane literaturowe (13, 62, 206, 207) oraz dostępne substancje wzorcowe (*). 142	
Tabela 15: Dystrybucja alkaloidów pirolizydynowych w korzeniach i liściach żywokostu lekarskiego w oparciu o analizę „pół-ilościową” przeprowadzoną poprzez porównanie pól powierzchni pików pierwszego jonu fragmentacyjnego w trybie MRM. ....	144
Tabela 16: Zawartość (ng/μl = μg/ml) alkaloidów pirolizydynowych w wyciągach metanolowych z korzeni (Zab, Gd, DNr, DPr, EHr, DRr) i liści żywokostu (DPf, EHf, Hf) lekarskiego oznaczona z wykorzystaniem metody dodatku wzorca w warunkach opracowanej metody HPLC-MS/MS w trybie MRM. ....	147
Tabela 17: Zawartość (mg/g s.m.) alkaloidów pirolizydynowych w analizowanych korzeniach (Zab, Gd, DNr, DPr, EHr, DRr) i liściach żywokostu (DPf, EHf, Hf) żywokostu lekarskiego oznaczona z wykorzystaniem metody dodatku wzorca w warunkach opracowanej metody HPLC-MS/MS w trybie MRM. ....	147
Tabela 18: Parametry walidacyjne dla opracowanej metody HPLC-MSMS analizy ilościowej alkaloidów pirolizydynowych w korzeniach i liściach żywokostu lekarskiego. ....	150
Tabela 19: Polifenole i proste fenole zidentyfikowane w kwiatach <i>A. montana</i> i <i>A. chamissonis</i> oraz nalewce macierzystej ze świeżej całej rośliny <i>A. montana</i> (Arnica TM; Boiron) z użyciem opracowanej metody HPLC-DAD-ESI/MS. ....	156
Tabela 20: Zawartość polifenoli i prostych fenoli zidentyfikowanych w analizowanym materiale roślinnym – kwiatach <i>A. montana</i> i <i>A. chamissonis</i> (mg/g s.m.) oraz nalewce macierzystej całej świeżej rośliny <i>A. montana</i> <b>N1</b> (Arnica TM; Boiron) (mg/100g s.m. i mg/100 ml nalewki) oznaczonych opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS. ....	161
Tabela 21: Zawartość dominujących estrów pochodnych kwasu kawowego w kwiatach <i>A. montana</i> pochodzących ze stanowisk naturalnych ( <b>AM2-AM5</b> ) i ogrodów botanicznych ( <b>AM1, AM6</b> ) i nalewce macierzystej z całej świeżej rośliny <i>A. montana</i> ( <b>N2</b> ; Arnica TM; Helios) (mg/100 ml nalewki) oznaczonych opracowaną metodą HPLC-DAD-ESI/MS. ....	165
Tabela 22: Laktony seskwiterpenowe zidentyfikowane w nalewce ze świeżej całej rośliny arniki górskiej Arnica TM <b>N1</b> (Boiron, Francja). ....	169
Tabela 23: Zespoły laktonów seskwiterpenowych w kwiatach arniki górskiej ( <b>AM</b> ) i łąkowej ( <b>AC</b> ) pochodzących ze źródeł komercyjnych, kwiatach arniki górskiej ze stanowisk naturalnych i ogrodów botanicznych ( <b>AM1-AM6</b> ) oraz nalewkach ze świeżej całej rośliny arniki górskiej ( <b>N1, N2</b> ). Numeracja pików zgodnie z Tabela 22; H – helenalina. ....	171

Tabela 24: Parametry walidacyjne dla metody HPLC-DAD-ESI/MS oznaczania helenaliny i laktonów seskwiterpenowych w kwiatostanach arniki.....	172
Tabela 25: Zawartość helenaliny i całkowita zawartość laktonów seskwiterpenowych w kwiatach <i>A. montana</i> ( <b>AM</b> ) i <i>A. chamissonis</i> ( <b>AC</b> ) ze źródeł komercyjnych, kwiatach <i>A. montana</i> ze stanowisk naturalnych ( <b>AM1-AM6</b> ) oraz nalewkach ze świeżej całej rośliny <i>A. montana</i> ( <b>N1</b> , Arnica TM; Boiron i <b>N2</b> , Arnica TM; Helios, Wielka Brytania) (mg/100g s.m). ....	172
Tabela 26: Wyniki oznaczeń aktywności przeciwutleniającej wyciągów z korzeni i liści żywokostu lekarskiego z wykorzystaniem testów spektrofotometrycznych DPPH, FRAP i ABTS. ....	178
Tabela 27: Wyniki oznaczeń aktywności hamującej cyklooksygenazę-1 i -2 [% inhibicji] przeprowadzonych z COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, USA) dla kwasu rozmarynowego jako substancji odniesienia.....	191
Tabela 28: Wyniki oznaczeń aktywności hamującej cyklooksygenazę-1 i -2 [% inhibicji] przeprowadzonych z użyciem COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical, USA) dla wyciągów metanolowych z liści żywokostu otrzymanych trzema różnymi metodami ekstrakcji oraz wyciągów metanolowych z korzeni żywokostu. ....	192
Tabela 29: Wyniki oceny dostępności farmaceutycznej estrów pochodnych kwasu kawowego obecnych w wyciągach metanolowych z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego przeprowadzonych z użyciem błon celulozowych. ....	199
Tabela 30: Wynik oznaczeń absorpcji estrów pochodnych kwasu kawowego obecnych w wyciągach metanolowych z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego w błonach półprzepuszczalnych Strata-M, po ekstrakcji etanolem (30 min w płuczce ultradźwiękowej, temp. pok.).....	200
Tabela 31: Wynik badań dostępności farmaceutycznej alkaloidów pirolizydynowych obecnych w wyciągach metanolowych z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego przeprowadzonych z użyciem błon celulozowych. ....	203
Tabela 32: Wyniki badań dostępności farmaceutycznej alkaloidów pirolizydynowych z wyciągów metanolowych z korzenia żywokostu lekarskiego przeprowadzonych z użyciem błon półprzepuszczalnych Strata-M.....	204