

## WPROWADZENIE

Liście topoli (*Populi folium*) są jednym z surowców roślinnych wykorzystywanych w fitoterapii chorób reumatycznych, w tym dny moczanowej [1]. Monografia Farmakopei Polskiej (FP) XI określa jako surowiec leczniczy liście topoli czarnej *Populus nigra* o zawartości flawonoidów nie mniejszej niż 0,6% oraz pochodnych salicylowych w stężeniu co najmniej 0,2%. Naturalne zasoby *P. nigra* w Polsce są sukcesywnie ograniczane, a poszukiwanie nowych źródeł surowca, odpowiadającego normom farmakopealnym, staje się koniecznością. W Polsce występuje ponad 30 gatunków i odmian topól, których liście mogą stanowić potencjalne źródło surowca do użytku farmaceutycznego. Skład chemiczny liści większości przedstawicieli rodzaju *Populus* jest słabo rozpoznany, przede wszystkim w zakresie flawonoidów i fenolokwasów oraz ich pochodnych, posiadających właściwości antywołnorodnikowe, decydujące również o efekcie przeciwzapalnym. Obecność różnych grup

związków czynnych w liściach topól decydujących o właściwościach leczniczych powoduje, że stanowią one interesujący obiekt badań. Dotychczasowe dane literaturowe dostarczają niewiele informacji odnośnie mechanizmów aktywności biologicznej liścia topoli, w tym przeciwzapalnej w powiązaniu z jego kompozycją chemiczną. Badania objęły analizę składu chemicznego liści powszechnie występujących gatunków i odmian topól z zastosowaniem metody HPLC-DAD-ESI-MS oraz ocenę ich aktywności przeciwutleniającej i przeciwzapalnej w oparciu o analizę bioautografii TLC oraz testy spektrofotometryczne.

## PIŚMIENNICTWO:

[1] Z. Błach-Olszewska, A. Długosz, B. Kowal-Gierczak, E. Lamer-Zarawska, J. Niedworok: „Fitoterapia i leki roślinne”. Warszawa: PZWL, 2007.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2019/03/X/NZ7/00440 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

## ANALIZA FITOCHEMICZNA

### Materiał roślinny

Liście następujących gatunków topoli: *Populus alba* L., *P. nigra* L. i *P. candidans* Aiton zostały zebrane na terenie Gdańska w czerwcu 2013.

### Przygotowanie wyciągów

Wysuszone i rozdrobnione liście topoli (1 g) ekstrahowano metanolem (3 x 30 ml, 60°C) na łaźni wodnej (45 min). Otrzymane wyciągi łącznie i następnie zagęszczano do objętości 25 ml.

### Warunki analizy HPLC-MS

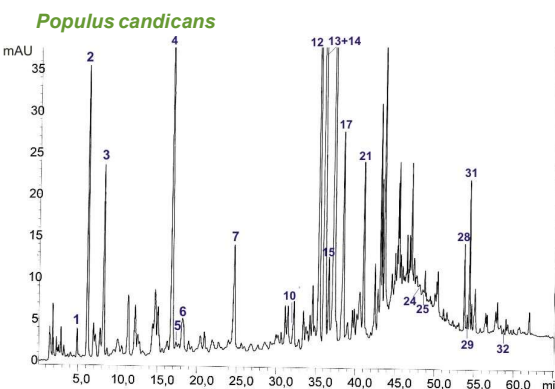
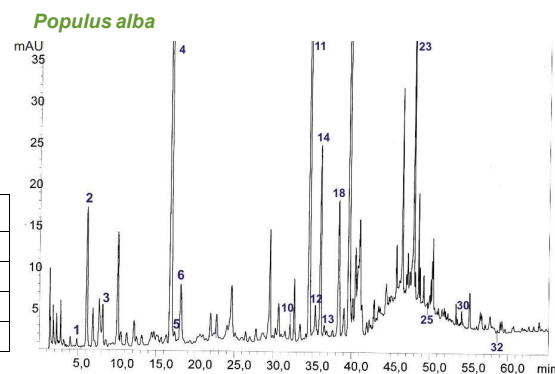
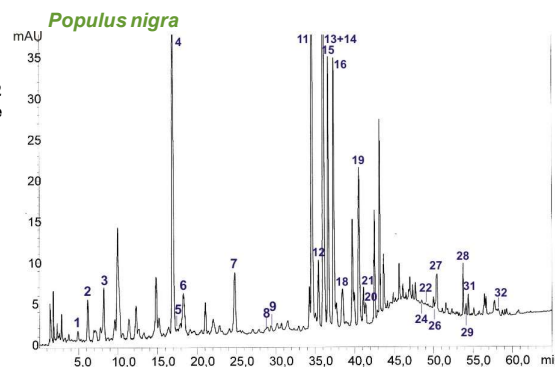
Kolumna Kinetex F5 (100 x 4,6mm, 2,6 um) (Phenomenex, USA), elucja gradientowa: A- woda/kwas mrówkowy (100/0,1, v/v), B- acetonitryl/kwas mrówkowy (100/0,1, v/v): od 3 do 20% B w A+B (tG = 40 min), 20 do 50% B w A+B (tG = 40 do 55 min), 50 do 70% (tG = 55 do 65 min) i 70 do 100% B w A+B (tG = 65 do 69 min), T = 20°C, v = 0,8 ml/min, detekcja UV λ- 254 nm; detekcja ESI-MS metodą SCAN: napięcie interfejsu 3,5 kV, napięcie detektora 4,5 kV, natężenie przepływu gazu suszającego 15l/min, natężenie przepływu gazu nebulizującego 3l/min.

Tab. 1. Aktywność przeciwutleniająca wyciągów z liści topoli w testach spektrofotometrycznych.

Gatunek topoli	Aktywność przeciwutleniająca [mM Trolox/g suchej masy surowca]		
	Test DPPH	Test FRAP	Test ABTS
<i>P. alba</i> (A)	0,4928 ± 0,0264	4,8202 ± 0,1283	1,8135 ± 0,0858
<i>P. candidans</i> (Cd)	0,7841 ± 0,0145	5,1871 ± 0,3216	2,1848 ± 0,2107
<i>P. nigra</i> (N)	0,9142 ± 0,0509	6,3630 ± 0,2185	2,5144 ± 0,0758

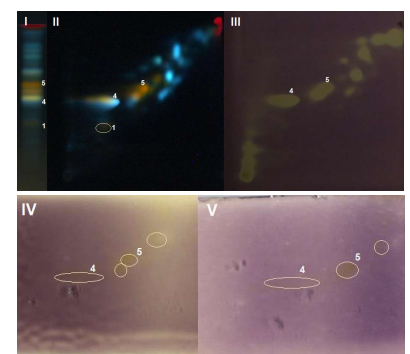
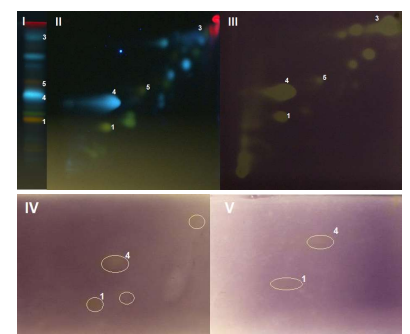
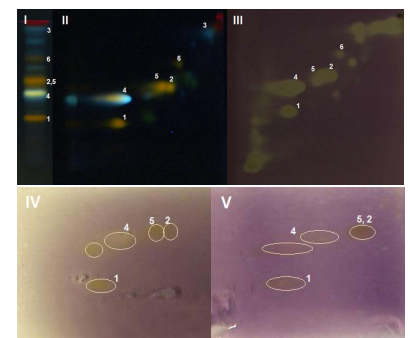
## WNIOSKI

- Opracowano metodę HPLC-ESI-DAD-MS separacji metabolitów wtórnych występujących w liściach topoli. Związki identyfikowano w odniesieniu do 55 substancji wzorcowych z grupy flawonoidów, kwasów fenolowych, flawan-3-oli i pochodnych salicylowych.
- Rozpoznano skład chemiczny liści 3 gatunków topól: czarnej (*P.nigra*), białej (*P.alba*) i włochatej (*P.candidans*).
- W analizie bioautograficznej TLC wyciągów metanolowych z liści topól wykorzystano zoptymalizowane warunki 2D-TLC.
- Wykazano obecność związków posiadających właściwości antyoksydacyjne we wszystkich analizowanych ekstraktach, w testach bioautografii TLC z wykorzystaniem DPPH, ryboflawiny i inhibicji oksydazy ksantyny. Wśród związków aktywnych zidentyfikowano rutynę, izokwercytrynę, cynarozyd i kwas chlorogenowy w ekstrakcie z topoli czarnej, rutynę i kwas chlorogenowy w topoli białej oraz izokwercytrynę i kwas chlorogenowy w topoli włochatej.
- Oceniono potencjał antyoksydacyjny analizowanych liści topoli w testach spektrofotometrycznych FRAP, ABTS i DPPH.



Ryc. 1. Chromatogramy HPLC-MS wyciągów z liści topól:

1- kwas galusowy, 2- salicylna, 3- kwas protokatechowy, 4- kwas chlorogenowy, 5- katechina, 6- kwas kawowy, 7- kwas p-kumarowy, 8- kwas ferulowy, 9- 3,4'-diglukozyd kwercetyny, 10- 3',7'-diglukozyd luteoliny, 11- 3-O-rutynozyd kwercetyny (rutyna), 12- 3-O-galaktozyd kwercetyny (hyperozyd), 13- 3-O-glukozyd kwercetyny (izokwercytryna), 14- 3-O-glukuronid kwercetyny, 15- 7-O-glukozyd luteoliny, 16- 3-O-glukuronid luteoliny, 17- 3-O-arabinozyd kwercetyny (guajaweryna), 18- 3-O-galaktozyd kemferolu, 19- 3-O-ramnozyd kwercetyny (kwercytryna), 20- 3-O-arabinozyd kemferolu, 21- 3-O-glukozyd izorametyny, 22- kwercetyna, 23- tremulacyna, 24- pinobanksyna, 25- naryngenina, 26- apigenina, 27- kemferol, 28- chryzyna, 29- pinocembryna, 30- ester fenylowy kwasu kawowego, 31- galangin, 32- pinostrobin.



Ryc. 2. Rozdzielenia jedno- (1D) i dwukierunkowe (2D) TLC wyciągów metanolowych z liści topól:

Adsorbent: żel krzemionkowy 60 F<sub>254</sub>, fazy ruchome 1D: octan etylu/keton metylo-etylowy/woda/kwas mrówkowy (50:30:10:10, v/v/v/v); 2D: chloroform/metanol/woda/kwas mrówkowy (70:30:2:2, v/v/v/v); komora pionowa wyłożona bibulą (6 cm) i nasycona (7 min). I- i II- NPR/PEG, UV λ-366 nm; III- 0,05% DPPH; IV- test z ryboflawiną; V- test inhibicji oksydazy ksantyny. 1- rutyna, 2- 7-O-glukozyd luteoliny (cynarozyd), 3- kwas kawowy, 4- kwas chlorogenowy, 5- izokwercytryna (3-O-glukozyd kwercetyny), 6- kwercytryna (3-O-ramnozyd kwercetyny).